

莪术油对肺癌 SPC-A4 细胞株的体外抑制作用

★ 盛辉 (吉林大学第一医院呼吸科 长春 130021)
★ 苑春莉* (吉林大学基础医学院病理生理教研室 长春 130021)
★ 王医术 (吉林大学基础医学院病理生物教研室 长春 130021)

摘要:目的:研究莪术油对体外培养肺癌 SPC-A4 细胞株的直接抑制作用及可能机制。方法:通过液体培养法、克隆形成法、MTT 比色法和³H-TdR 掺入法分别检测给药后肿瘤细胞的增殖情况、克隆形成率、生存率及 DNA 合成抑制率来探讨莪术的抑瘤效应。结果:与莪术油共育 24 小时的细胞伸展不良,胞体回缩,贴附型细胞不贴壁,胞质粗糙,有大量颗粒状物堆积,而且药物浓度越大,形态学改变越明显。给药组肿瘤细胞增殖缓慢甚至停滞,出现细胞脱落、胞浆内颗粒状物堆积等形态学改变,克隆形成数明显少于对照组,cpm 和 A 值明显降低,即³H-TdR 掺入率减少,生存率下降。结论:莪术油对体外培养肺癌细胞具有直接杀伤作用,抑制作用与药物浓度和作用时间相关。

关键词:肺癌;莪术油;SPC-A4 细胞株;克隆形成;DNA 合成

中图分类号:R 965 **文献标识码:**A

莪术为姜科植物蓬莪术、广西莪术或者温郁金的干燥根茎,现代研究表明其有效成分为莪术酮、莪术醇和 β -榄香烯等,具有抗肿瘤、抗菌、抗病毒、抗凝血和抗氧化的效用^[1],已经有莪术油注射液和 β -榄香烯乳应用于临床。莪术油为莪术根茎所含的挥发油,本研究通过观察在不同药物浓度和不同作用时间下莪术油对体外培养肺癌 SPC-A4 细胞株增殖的抑制作用,评估莪术油用于肺癌治疗的可行性。

1 材料与试剂

莪术油注射液购自山东鲁抗辰欣药业有限公司,人肺癌细胞系 SPC-A4 由吉林省肿瘤医院毒理研究室惠赠,为贴附型细胞。噻唑蓝(MTT, Sigma),十二烷基磺酸钠(SDS)和二甲基亚砜(DMSO, 国产分析纯)均购自北京华美生物工程公司。³H-TdR 购自北京原子能研究所,放射强度为 1mCi。RPMI 1640 为 Hyclone 公司生产,新生小牛血清、24 孔板、96 孔板购自长春博特生物制剂公司。全自动酶标读数仪 Bio RAD 550 型。

2 方法

2.1 莪术对肺癌细胞增殖抑制实验 常规培养 SPC-A4 肺癌细胞株,取对数生长期的贴附型肺癌细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化后调成 1×10^4 个/mL 细胞悬液,取 0.2 mL 细胞悬液分别加入含有 0.5、

1.0、2.0 和 40 mg/mL 莪术油注射液、20% 胎牛血清(FCS)及 RPMI-1640 液的 24 孔细胞培养板中,每孔总量为 2 mL,设 3 复孔,并设对照孔。37℃、5%CO₂ 饱和湿度下培养,第 4 天计数克隆数目,以大于或等于 20 个的细胞群为一个克隆。

2.2 动态检测莪术对肿瘤细胞增殖的影响 取 0.2 mL 肺癌细胞悬液加入 96 孔细胞培养板,依次加入 RPMI-1640、10%FCS 及 4 种浓度的莪术油注射液,每种浓度设 8 个复孔,并设对照孔,孵育,分别于给药后第 1~4 天每日分别取 2 孔台盼蓝染色计数。

2.3 莪术对肿瘤细胞 DNA 合成抑制作用 取 0.1 mL 密度为 1×10^4 肺癌细胞悬液,加入 96 孔细胞培养板,依次加入 RPMI-1640、10%FCS 及 3 种浓度的莪术油注射液,每种浓度设 3 个复孔,并设对照孔,孵育 70 小时后,每孔加入 0.4 μ Ci³H-TdR,继续孵育 2 小时,收集细胞于纤维滤膜上,洗涤,晾干。置于含有 3 mL 闪烁液的液闪瓶中,LKB-1211 型液体闪烁计数器记录每分钟脉冲次数(cpm)。按下式计算:

掺入抑制率(%) = (对照组 cpm - 实验组 cpm / 对照组 cpm) $\times$ 100%。

2.4 莪术对肿瘤细胞的杀伤作用 MTT 法(四甲

* 通讯作者

基偶氮唑盐微量酶反应比色法)原理:活细胞线粒体中存在与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)相关的脱氢酶,可以将黄色的四氮唑化合物(MTT)还原为不溶性的蓝紫色的甲瓚,死细胞中此酶消失,MTT 不被还原。用二甲基亚砜(DMSO)溶解甲瓚后,可用酶标仪在 570 nm 波长处检测光密度。

步骤同 2.3,孵育 68 小时后,每孔分别加入 50 μ L 5 mg/mL MTT,继续孵育 4 小时,加入酸化 SDS 100 μ L,孵育过夜(>20 小时),以 SDS 作空白调零,全自动酶标仪 570 nm 处测 OD 值,计算生存率:

生存率(%) = 药物实验组的平均 OD 值/细胞对照组的平均 OD 值 $\times$ 100%。

3 结果

3.1 莪术对肺癌细胞增殖的影响 莪术明显抑制了 SPC-A4 肺癌细胞的克隆形成($P < 0.01$),形成克隆的数目随药物浓度增加而减少,在药物浓度达到 4.0 mg/mL 时无克隆形成。见表 1。

表 1 肺癌细胞克隆形成数目

组别	n	克隆形成数目
对照组	3	89.23 $\pm$ 10.45
药物组 0.5 mg/mL	3	10.67 $\pm$ 2.55
1.0 mg/mL	3	3.33 $\pm$ 1.67
2.0 mg/mL	3	1.33 $\pm$ 0.50
4.0 mg/mL	3	0

注:与对照组比, * $P < 0.01$ 。

3.2 3 种肿瘤细胞的动态生长情况 莪术对肺癌细胞生长具有抑制作用,孵育 6 小时镜下可见给药组细胞增殖缓慢,贴附型细胞伸展不良,胞体回缩,胞质极度粗糙,内有大量颗粒状物堆积,48 小时后大部分细胞脱落死亡,崩溃融解,增殖停滞;而对照组细胞伸展良好,胞质均匀透明,核大、核仁清晰。台盼蓝染色,给药组着色细胞占细胞总数的 20% 以上,而对照组小于 5%。

3.3 莪术对 DNA 合成的抑制作用 实验组 cpm 明显低于对照组($P < 0.01$),与药物浓度呈反比,标志 DNA 合成明显受抑制。见表 2。

表 2 莪术对肺癌细胞的³H-TdR 掺入抑制率的影响

莪术油浓度/mg, mL ⁻¹	0.5	1.0	2.0	4.0
抑制率(%)	47.46	65.98	78.55	95.42

3.4 莪术对肿瘤细胞生存率的影响 OD 值与细胞存活数之间存在线性关系,实验组 OD 值明显低于对照组($P < 0.01$),且随药物浓度的增加而降低。见表 3。

表 3 莪术对肺癌细胞生存率的影响

莪术油浓度/mg, mL ⁻¹	0.5	1.0	2.0	4.0
生存率(%)	61.89	45.67	25.80	10.25

3 讨论

莪术主要产于广西、四川、浙江等地,其性温味辛苦,具有破血行气、消瘀止痛的功效,是临床上常用的活血化瘀药物。现代药理研究认为,莪术的主要活性成分为莪术酮、莪术醇和 β 榄香烯等,抗肿瘤是莪术油最主要的药理作用^[1]。莪术油具有直接细胞毒作用,可以直接抑制或破坏癌细胞;诱导肿瘤细胞凋亡;抑制肿瘤细胞异常增殖;影响癌细胞的核酸代谢;提高机体免疫保护效应;可以影响癌细胞膜电位,进而杀灭癌细胞^[2]。

我们发现莪术对体外培养肺癌细胞具有直接杀伤作用,随着药物浓度的增加杀伤作用增强。与莪术油共育 6 小时镜下可见给药组细胞增殖缓慢,贴附型细胞伸展不良,胞体回缩,胞质极度粗糙,内有大量颗粒状物堆积,48 小时后大部分细胞脱落死亡,崩溃融解,增殖停滞,而且药物浓度越大,形态学改变越明显。大量研究表明只有当细胞代谢不良时方出现细胞轮廓增强、反差增大,在胞质内出现颗粒、空泡及脂滴等,说明莪术油引起了肺癌细胞的代谢紊乱,不能维持细胞生长^[3]。MTT 比色法进一步证实了莪术油干扰细胞代谢,正常活细胞线粒体内的活性脱氢酶可将 MTT 还原为紫色的甲瓚(formazan),且细胞的存活数与其产生的甲瓚的 OD 值之间存在线性关系。给药组肿瘤细胞生长受抑,OD 值明显低于对照组。贴附是贴壁细胞生长增殖的条件之一,通常细胞表面有由细胞分泌的糖蛋白膜,即细胞外衣,它对细胞运动尤其是贴附支持物的生长有重要作用。细胞外衣的性质与细胞物质交换、酸碱失衡及膜电位等有一定的关系^[4]。改变细胞外衣的性质可抑制其贴附,使细胞由支持物上脱落下来。莪术油可能通过干扰细胞代谢、改变细胞外衣的性质抑制肿瘤细胞的增殖。

TdR 是 DNA 合成的必需物质,增殖过程中的细胞可摄取营养液中的 TdR 以合成 DNA,红景天可使 TdR 掺入量明显减少。由此推测抑制 S 期肿瘤细胞 DNA 的合成,抑制细胞增殖,发生凋亡是其抗癌机制之一。

参考文献

- [1]王茂盛. 中药学[M]. 北京:科学技术出版社,2001.263~264
- [2]肖鸣,赵海,晏子友. 中药莪术及其有效成分的药理研究概况[J]. 中西药信息,2004,21(2):29~30
- [3]赵华,骆云鹏. 莪术对子宫内腺癌作用的光镜及超微结构研究[J]. 重庆医科大学学报,2004,29(2):176~180
- [4]郭征,组织培养及分子生物学技术[M]. 北京:北京出版社,1995.