

DOI:10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2009. 01. 003

半边旗提取物 5F 对非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞生长的抑制作用

刘 义¹,吴科锋¹,李 立¹,George G CHEN²,Michael KY HSIN²,
Malcolm J UNDERWOOD²,梁念慈^{1,3}

Inhibitory Effects of 5F from *Pteris semiinnata* L. on Proliferation of Non-small Cell Lung Cancer NCI-H460 Cells

LIU Yi¹, WU Ke-feng¹, LI Li¹, George G CHEN², Michael KY HSIN², Malcolm J UNDERWOOD², LI-ANG Lian-ci^{1,3}

1. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Nature Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Department of Surgery, The Chinese University of HongKong, Prince of Wales Hospital, Shatin, N. T.; 3. Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical College

Corresponding Authors: LIANG Lian-ci, E-mail: plliu78@sina.com

Abstract: Objective To investigate inhibitory effects of 5F from *Pteris semiinnata* L. on proliferation of Non-small cell lung cancer NCI-H460 cells. **Methods** NCI-H460 cell growth inhibition mediated by 5F was detected by MTT. PI-Hoechst double staining and TUNEL assay were used to observe cell apoptosis. Flow cytometer was used to determine the effect of 5F on the content of DNA in cells. **Results** 5F displayed growth inhibitory activity against NCI-H460 cells with IC_{50} values of 21, 40, 4.52 and 1.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ at the point of 24, 48 and 72 hours. 5F could induce apoptosis. NCI-H460 cells treated by 5F were arrested in G_2/M . **Conclusion** *In vitro* 5F significantly inhibited the proliferation of NCI-H460 cells and the activity might be realized through inducing apoptosis.

Key words: *Pteris semiinnata* L.; 5F; NCI-H460; Proliferation inhibited

摘 要:目的 研究半边旗提取物 5F 对非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞生长的抑制作用。**方法** MTT 法检测 5F 对 NCI-H460 细胞的生长抑制作用;用 PI-Hoechst 荧光双染法和 TUNEL 法检测细胞凋亡;流式细胞仪检测 5F 对 DNA 含量的影响。**结果** 5F 抑制 NCI-H460 细胞的生长,其效果与 5F 的浓度和作用时间相关,24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为:21、40、4.52、1.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$;荧光双染色法显示经 5F 作用后细胞出现变形,染色质浓缩,产生凋亡小体;细胞被阻滞在 G_2/M 期。**结论** 5F 在体外能有效地抑制 NCI-H460 细胞的生长,其作用可能是通过诱导其凋亡产生的。

关键词: 半边旗; 5F; NCI-H460; 生长抑制

中图分类号:R734.2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2009)01-0009-04

0 引言

半边旗(*Pteris semiinnata* L.)是生长在我国南方的传统中草药,民间用其来治疗感染性疾病。从半边旗中分离提取到一些具有生物活性的物质,以 5F 含量最高,其结构为二萜类化合物,见图 1。化学结构

名为 11- α -羟基-15-氧-16-烯-对映贝壳杉烷-19-酸(Ent-11 α -hydroxy-15-oxo-kaur 16-en-19-oic acid)。本课题研究表明 5F 在体外能抑制多种癌细胞的生长并诱导凋亡的发生;能明显减小 K562、S180 等瘤株在小鼠所形成的肿瘤大小,延长小鼠存活时间^[1-3]。

收稿日期:2008-05-17;修回日期:2008-06-13
基金项目:国家自然科学基金资助项目(39870900);粤港合作课题(GHP/022/06)
作者单位:1. 524023 广东湛江,广东医学院广东天然药物研究与开发重点实验室;2. 香港 新界 沙田 韦尔斯亲王医院 香港中文大学外科系;3. 广东医学院生物化学与分子生物学研究所
通信作者:梁念慈, E-mail: plliu78@sina.com
作者简介:刘义(1978-),男,硕士,助理研究员,主要从事抗肿瘤生化药理研究

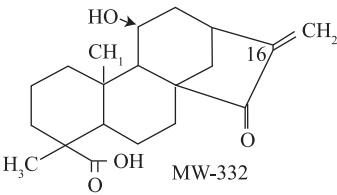


图 1 5F 的化学结构
Fig 1 The structure of compound 5F

肺癌是目前全世界人类最主要的癌症死因之一,其中 75%~80%为非小细胞肺癌(NSNLC),晚期肺癌患者仅有 2%存活率超过 5 年,通常不满 1 年。近年来,对肺癌患者的治疗还是以化疗和放疗为主导,这些治疗药物和措施会给患者带来极大的痛苦,因此,从天然植物中提取具有抑制肺癌细胞生长的高效低毒的化合物已经成为抗肿瘤研究的热点。本研究旨在探讨 5F 对非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞生长的抑制作用及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

从植物半边旗中提取的 5F,纯度为 100%,使用前溶于 DMSO。

MTT、Hoechst33342、PI 为 Sigma 公司产品;超级无支原体新生牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司;RPMI-1640 购自美国 Hyclone 公司;胰酶购自美国 Gibco 公司;细胞凋亡检测试剂盒为武汉博士德生物工程有限公司产品;其余试剂均为国产分析纯。

非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞由本室传代。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

NCI-H460 细胞培养于含 10%小牛血清,100 kU/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 饱和湿度细胞培养箱培养。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测 5F 对 NCI-H460 细胞的生长抑制作用

取对数生长期的 NCI-H460 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化,RPMI-1640 完全培养液调制成 2.0×10^4 /ml 细胞悬液,接种于 96 孔板中,每孔接种 100 μ l(含 2.0×10^3 个细胞)。培养过夜后,吸出培养液,加入新培养液 90 μ l 及不同浓度的 5F 药液 10 μ l,使终浓度分别为 5、10、20、40、80 μ g/ml。同时设置 ADM 阳性对照组,空白对照组加入相同体积的培养液,每一浓度设 8 个平行孔。继续培养 24、48、72 h。每孔加入 MTT(5 g/L)20 μ l,继续培养 4~6 h。每孔加入 DMSO 100 μ l。在微型振荡器上摇匀 15 min,结晶溶解后,立即比色,用 ELX800 型酶标仪在主波长为 570 nm,参比波长为 630 处测量 OD 值,比色以空白孔调零。实验重复 3 次。

抑制率 = (1 - 实验组 8 孔 OD 值平均值/对照组 8 孔 OD 值平均值) $\times$ 100%。

Bliss 方法计算半数抑制浓度 IC₅₀。

1.2.3 荧光显微镜观察细胞形态

取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 2.0×10^5 /ml,加 1ml 到预先放置盖玻片的 6 孔板中,24 h 待细胞爬片后,加入不同浓度的 5F 药液,使其终浓度为 5、10、20 μ g/ml,继续培养 24 h 后,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入 Hoechst33342 37℃染色 15 min, PBS 洗涤 2 次,再加入 PI 染色液于冰上染色 15 min, PBS 洗涤 2 次,于荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 流式细胞仪检测 DNA 含量的变化

参照文献介绍的方法略加改进,1 000 r/min,离心 5min 收集药物处理组和对照组细胞, PBS 洗涤 2 次,体积分数为 70%的乙醇-20℃固定 24 h 以上, PBS 离心洗去乙醇后加 PI 染液(含 50 mg/L PI, 10 mg/L RnaseA, 0.1% TritonX-100, 0.1% 柠檬酸钠和 0.5% NaCl),室温下避光染色 30 min, 400 目筛网过滤,用 EPICSXL 型(美国)流式细胞仪检测 DNA 含量,实验重复 3 次。

1.2.5 细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡

取对数生长期细胞,调整细胞浓度为 2.0×10^5 个/ml,加 1ml 到预先放置盖玻片的 6 孔板中,24 h 待细胞爬片后,加入不同浓度的 5F 药液,使其终浓度为 5、10、20 μ g/ml,继续培养 24 h 后,用 4%多聚甲醛/0.01M PBS 室温下固定 60 min,余下步骤按试剂盒说明书进行操作。

2 结果

2.1 5F 对 NCI-H460 细胞生长的抑制作用

从表 1 和图 2 的结果可以看出,5F 能明显抑制 NCI-H460 细胞的生长,其效果与时间和浓度相关。5、10、20、40、80 μ g/ml 的 5F 在作用细胞 48 h 后效果与阳性对照药 ADM 相近。5F 作用 NCI-H460 细胞 24、48、72 h 的 IC₅₀ 分别为:21.40、4.52、1.02 μ g/ml。

2.2 荧光显微镜观察 5F 对 NCI-H460 细胞的影响

经 PI-Hoechst 双染的 NCI-H460 细胞,对照组细胞核大小较均一,呈圆形或椭圆形,染色质分布均匀,此外光下显蓝色荧光,出现个别坏死细胞,见图 3a。而经 5F 处理 24 h 后的 NCI-H460 细胞细胞形态则出现不同程度皱缩,变形,染色质浓缩,部分细胞核染色体碎裂,并有凋亡小体出现,见图 3b~d。且细胞凋亡形态出现的多少与 5F 的浓度相关。

2.3 流式细胞仪检测细胞 DNA 的变化

5F 作用细胞 24、48 h 后 NCI-H460 细胞的 DNA 含量发生变化。随着 5F 作用终浓度的增加(5~40 μ g/ml), G₀/G₁ 期 DNA 出现含量降低, S 期

表 1 5F 对 NCI-H460 细胞的生长抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 1 Inhibition of NCI-H460 cell proliferation by 5F($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	24 h		48 h		72 h	
	OD570	IR(%)	OD570	IR(%)	OD570	IR(%)
Control	0.283 $\pm$ 0.014	—	0.464 $\pm$ 0.026	—	0.699 $\pm$ 0.033	—
ADM(5 $\mu\text{g/ml}$)	0.175 $\pm$ 0.008 **	38.3	0.107 $\pm$ 0.003 ***	76.9	0.050 $\pm$ 0.001 ***	93.9
5	0.257 $\pm$ 0.007 *	8.9	0.201 $\pm$ 0.015 ***	47.9	0.184 $\pm$ 0.017 ***	73.7
10	0.178 $\pm$ 0.010 **	37.0	0.137 $\pm$ 0.009 ***	70.5	0.083 $\pm$ 0.005 ***	88.2
20	0.144 $\pm$ 0.006 ***	49.1	0.101 $\pm$ 0.006 ***	78.1	0.056 $\pm$ 0.002 ***	92.0
40	0.104 $\pm$ 0.010 ***	63.0	0.067 $\pm$ 0.005 ***	85.4	0.002 $\pm$ 0.001 ***	94.7
80	0.036 $\pm$ 0.001 ***	87.0	0.040 $\pm$ 0.003 ***	91.2	0.025 $\pm$ 0.007 ***	96.5

* : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$; *** : $P < 0.001$

表 2 5F 处理 NCI-H460 细胞不同时相 DNA 含量的影响(%, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab 2 Effect of DNA content of NDI-H460 cells treated by 5F(%, $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	24 h			48 h		
	G ₁ /G ₀	S	G ₂ /M	G ₁ /G ₀	S	G ₂ /M
Control	47.4 $\pm$ 3.3	47.2 $\pm$ 2.6	5.4 $\pm$ 2.1	59.4 $\pm$ 1.2	38.4 $\pm$ 3.3	2.2 $\pm$ 3.1
5	44.4 $\pm$ 4.2	48.9 $\pm$ 1.2	6.7 $\pm$ 5.3	57.8 $\pm$ 4.5	39.8 $\pm$ 5.2	3.2 $\pm$ 2.1
10	43.5 $\pm$ 2.5	48.4 $\pm$ 3.1	8.1 $\pm$ 3.3	54.6 $\pm$ 3.1 *	39.7 $\pm$ 3.2	5.7 $\pm$ 3.3
20	39.4 $\pm$ 3.2 *	49.9 $\pm$ 2.2	10.7 $\pm$ 5.1 *	48.9 $\pm$ 4.2 *	42.8 $\pm$ 6.3 *	9.3 $\pm$ 4.1 *
40	35.2 $\pm$ 5.1 *	51.6 $\pm$ 3.4	13.2 $\pm$ 3.2 *	44.7 $\pm$ 1.5 *	44.7 $\pm$ 2.4 *	12.0 $\pm$ 4.4 *

* : $P < 0.05$

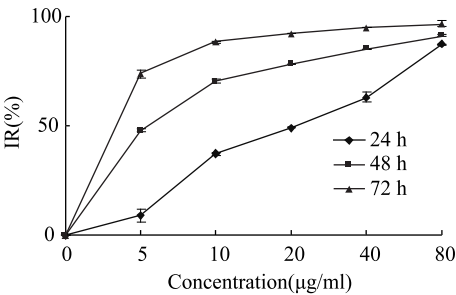


图 2 5F 对 NCI-H460 细胞的生长抑制作用

Fig 2 Inhibition of NCI-H460 cell proliferation by 5F

变化不明显, G₂/M 显著增加。提示 5F 可以将 NCI-H460 细胞阻滞在 G₂/M 期,见表 2。

2.4 TUNEL 法检测 5F 对 NCI-H460 细胞凋亡的影响

TUNEL 法检测显示正常对照细胞不显深棕黄色,而经 5F 处理后的细胞胞核呈深棕黄色,表现为形态皱缩,核固缩,凝集成块,并形成凋亡小体,其凋亡数与 5F 剂量呈正相关,见图 4。

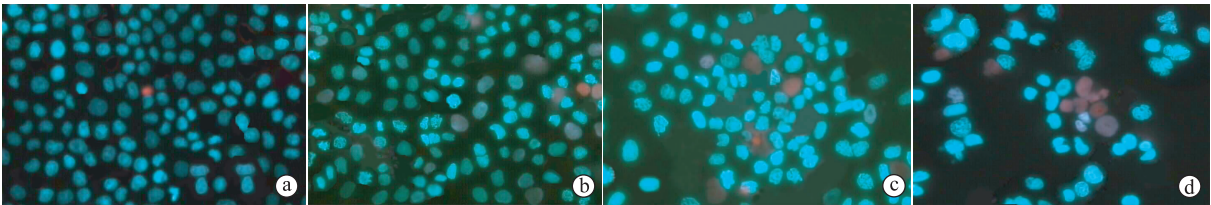
3 讨论

临床上用于治疗肿瘤的热疗、放疗、化疗及生物疗法一直被用于杀死肿瘤细胞,随着肿瘤的治疗正朝着日益完善的综合治疗方向迈进,尤其近十几年迅速发展的生物治疗给人们带来了新的希望,但目

前化学药物治疗在临床上依然起着重要作用。由于化疗药物的毒副作用及易产生耐药性等缺陷,从天然产物中筛选新的高效低毒的抗肿瘤药仍然是当务之急。本课题对半边旗的有效活性成分及提取工艺进行了详细的研究^[4-6],多年的实验证实其二萜类提取物 5F 在体外可致人的多种癌细胞死亡,主要作用机制是诱导肿瘤细胞凋亡并能抑制肿瘤细胞的迁移^[7-9]。

细胞凋亡(Apoptosis)是细胞在其生长、发育过程中发生的一种复杂的生理和病理过程,对机体的正常发育和自身稳定起着极其重要的作用。凋亡细胞的特征是细胞体积缩小,随即与邻近细胞的连接丧失,彼此脱离,失去微绒毛,胞浆浓缩,内质网扩张呈泡状并与细胞膜融合,核染色质浓缩呈块、团,典型的为半月形,凝聚于核膜周边,核仁裂解,进而细胞膜内陷将细胞自行分割为多个具有完整膜性结构,内含各种细胞成分的凋亡小体。不少疾病(包括肿瘤)的发病与凋亡受抑制有关,许多抗癌药物都是通过最终触发肿瘤细胞凋亡通路达到治疗的目的^[6]。大多数抗癌药物都可引起肿瘤细胞的凋亡,诱导细胞凋亡可能是抗癌药物发挥作用的共同通路,所以细胞凋亡成为评估抗癌药物作用能力的一项重要指标。

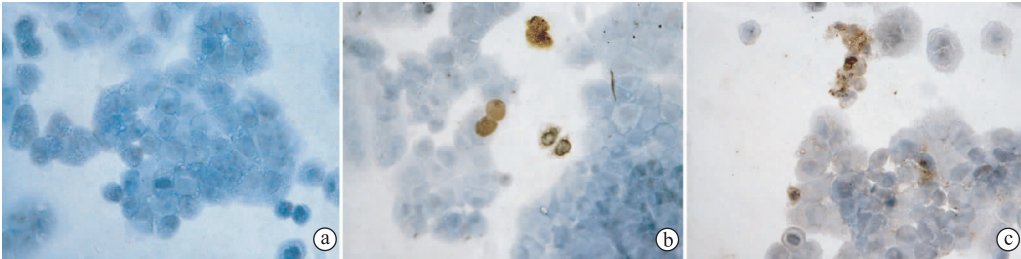
实验结果表明,5F 在体外能显著的抑制 NCI-H460



a: control; b: 5 $\mu\text{g/ml}$ 5F, 24 h, cells stained with Hoechst-PI; c: 10 $\mu\text{g/ml}$ 5F, 24 h, cells stained with Hoechst-PI; d: 20 $\mu\text{g/ml}$ 5F, 24 h, cells stained with Hoechst-PI

图 3 荧光显微镜观察 5F 诱导的 NCI-H460 凋亡细胞形态学变化 ($\times 200$)

Fig 3 Morphological analysis of NCI-H460 apoptotic cells induced by 5F by fluorescence microscopy ($\times 200$)



a: control; b: 10 $\mu\text{g/ml}$ 5F; c: 20 $\mu\text{g/ml}$ 5F

图 4 TUNEL 法检测 5F 诱导的 NCI-H460 细胞凋亡 ($\times 200$)

Fig 4 TUNEL analysis of NCI-H460 cells apoptosis induced by 5F ($\times 400$)

细胞的生长增殖, 24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为: 21. 40、4. 52、1. 02 $\mu\text{g/ml}$, 5F 对其的生长抑制作用呈浓度 - 剂量及时间 - 剂量关系; 荧光双染的结果显示经不同浓度的 5F 处理 24 h 后的 NCI-H460 细胞细胞形态出现不同程度皱缩, 变形, 染色质浓缩, 部分细胞核染色体碎裂, 并伴有凋亡小体出现, 细胞凋亡形态出现的数量与 5F 的作用浓度有关, 这提示 5F 体外对 NCI-H460 的生长抑制作用可能与其诱导凋亡有关; 流式细胞仪检测结果发现细胞被阻滞在 G_2/M 期, 但 5F 终浓度为 40 $\mu\text{g/ml}$ 时, 细胞周期各时相均出现不同程度的改变, 这可能与高浓度 5F 直接杀伤细胞, 表现出细胞毒作用有关; 进一步用 TUNEL 法进行凋亡检测证实了 5F 抑制 NCI-H460 生长的作用是由其诱导凋亡而产生的。提示 5F 具有诱导 NCI-H460 细胞凋亡的能力, 是一种值得深入研究的新型抗肿瘤候选化合物。

参考文献:

[1] 崔燎, 梁念慈, 陈志东, 等. 半边旗体内外抗癌急性毒性研究[J]. 中药材, 1996, 32(1): 29-32.

[2] 张晓, 崔燎, 梁念慈, 等. 半边旗有效成分及抗肿瘤活性研究[J]. 中国药理学杂志, 1997, 32(1): 37-38.

[3] 李金华, 梁念慈, 莫丽儿, 等. 半边旗五种成分体外细胞毒活性比较及构效关系分析[J]. 药学报, 1998, 33(9): 641-644.

[4] 吕应年, 吴科峰, 邓亦峰, 等. 高效液相色谱法测定半边旗中木犀草素的含量[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(1): 102-103.

[5] 典灵辉, 梁念慈. 半边旗药材提取工艺的研究[J]. 中国药业, 2007, 16(9): 24-25.

[6] 龚先玲, 陈志红, 梁念慈. 高效液相色谱法分析测定半边旗中黄酮类化合物[J]. 时珍国医国药, 2007, 18(5): 1028-1029.

[7] 何太平, 覃燕梅, 莫丽儿, 等. 半边旗二萜类化合物 SF 对高转移卵巢癌 HO -8910PM 细胞中癌相关基因表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(1): 117-122.

[8] Liu Z, Ng E K, Liang N C, et al. Cell death induced by Pteris semipinnata L. is associated with p53 and oxidant stress in gastric cancer cells[J]. FEBS Letters, 2005, 579(6): 1477-1487.

[9] Liu ZM, Chen GG, Vlantis AC, et al. Cell death induced by ent-11a-hydroxy-15-oxo-kaur-16-en-19-oic-acid in anaplastic thyroid carcinoma cells is via a mitochondrial-mediated pathway[J]. Apoptosis, 2005, 10(6): 1345-1356.

[10] Waxman DJ, Schwartz PS. Harnessing apoptosis for improved anticancer gene therapy[J]. Cancer Res, 2003, 63(24): 8563-8572.

[编辑: 周永红; 校对: 杨 卉]