

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.04.010

• 基础研究 •

芝麻素对肺腺癌细胞增殖和凋亡的影响

郑珍玉^{1*}, 车成日¹, 白金权², 林 星¹, 金虎日¹

Effect of Sesamin on Proliferation and Apoptosis of Pulmonary Adenocarcinoma Cell

ZHENG Zhenyu^{1*}, CHE Chengri¹, BAI jinqian², LIN Xing¹, JIN Huri¹

1.Department of Thoracic Surgery, The Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000,China;2. Department of Anorectal Surgical, The Affiliated Hospital of Jilin Medical College(*:Present:Department of Thoracic Surgery &Breast Surgery, Jinlin Oil Field General Hospital,Songyuan 138000,China)

Corresponding Author: CHE Chengri, E-mail:ycrche@ybu.edu.cn



Abstract:Objective To investigate the effect and mechanism of sesamin on antiproliferation and apoptosis induction of human lung adenocarcinoma cell line A-549 *in vitro*, and provide a theory basis for traditional medicine treatment in antineoplastic therapy. **Methods** Human lung adenocarcinoma cell line A549 was cultivated *in vitro*. Then the effect of antiproliferation and cytotoxicity of sesamin on human lung adenocarcinoma cell line A549 was analyzed by MTT; Morphological changes were observed by inverted microscope and HE staining; Flow cytometry was used to investigate the expression of Bcl-2 and Bax; The apoptosis rate was determined by AnnexinV/PI staining; The changes of apoptosis protein kinase such as Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 were detected by immunohistochemistry. **Results** MTT assay showed that sesamin had significant inhibition on the growth of A549 cell line in dose- and time-dependent manner; It was observed by inverted microscope the volume of the cell A549 was decreased and got round, nuclear condensed chromatin, the junction between cell was loosed, adherence ability was decreased. A typical cell morphology changes such as the cytoplasm dehydrated and concentrated was showed by HE staining and enhanced feosin staining; Immunohistochemical assay showed that the expression of Caspase-3, 8, 9 was increased compared with those in control group, it had a significantly difference ($P<0.05$); Flow cytometry showed a cell apoptosis peak after treated by 40 $\mu\text{g/ml}$ sesamin for 48 h, and the number of cell was increased in S phase and decreased in G_0/G_1 phase, and most cell stay in S phase. The expression of Bcl-2 was decreased, while the expression of Bax was increased. **Conclusion** Sesamin can significantly inhibit the growth of A549 cells and the effect is dose-dependent and time-dependent. Sesamin could arrest the A549 cells in the S phase. Sesamin induced apoptosis via two main pathways: the mitochondrial pathway and the death receptor-mediated pathway. Sesamin has a significant effect on anti-tumor. It will be hopefully exploited as a new anti-tumor or tonic.

Key words: Sesamin; Human lung cancer cell line A549; Apoptosis; Proliferation

摘 要:目的 探讨芝麻素对人肺腺癌A549细胞株的抗增殖和诱导凋亡作用及其机制, 为开发抗肿瘤中药提供实验和理论依据。**方法** 应用MTT法检测芝麻素对A549细胞株的抗增殖及细胞毒性作用; 应用倒置显微镜、HE染色法来观察肿瘤细胞的形态学变化; 应用免疫细胞化学技术检测Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9的表达变化; AnnexinV/PI双染色法分析细胞凋亡率及测定细胞Bcl-2及Bax表达水平。**结果** 芝麻素对A549细胞株均有明显抑制作用, 且呈现出浓度和时间依赖性; 倒置显微镜观察发现实验组细胞体积变小变圆, 细胞间连接疏松, 贴壁能力减弱; HE染色结果发现实验组细胞质脱水浓缩, 伊红染色增强等典型的细胞形态学变化, 免疫细胞化学检测发现实验组细胞Caspase-3、Caspase-8和Caspase-9的表达增加与对照组相比较差异有统计学意义($P<0.01$); 流式细胞仪分析结果显示芝麻素40 $\mu\text{g/ml}$ 作用48 h后, 细胞主要阻滞在S期; Bcl-2蛋白的表达降低, Bax蛋白的表达升高。**结论** 芝麻素对人肺腺癌A549细胞株具有抑制增殖作用, 并呈浓度和时间依赖性

佳; 芝麻素诱导凋亡作用机制可能与细胞周期发生S期阻滞有关; 芝麻素由死亡受体通路和线粒体通路共同完成凋亡的启动和执行。

关键词: 芝麻素; 人肺腺癌A549细胞; 细胞凋亡; 增殖

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

收稿日期: 2013-01-22; 修回日期: 2013-06-26
作者单位: 1.133000 吉林延吉, 延边大学附属医院胸外科; 2.吉林医药学院附属医院肛肠科 (*:现单位:138000 吉林松原, 吉林油田总医院胸乳腺外科)
通信作者: 车成日 (1963-), E-mail: ycrche@ybu.edu.cn
作者简介: 郑珍玉 (1985-), 女, 硕士, 医师, 主要从事肺癌的基础及临床研究

0 引言

肺癌是世界上发病率最高的恶性肿瘤之一^[1]，目前位居癌症死因的第一位。迄今为止，除手术外，化疗是最主要的治疗手段之一。木脂素是芝麻中主要活性成分^[2-3]，其中芝麻素占约木脂素一半含量，在体内表现为较强的生物学活性^[4]。本实验主要研究芝麻素的体外抗肺癌及诱导细胞凋亡的作用并揭示其可能的抗肿瘤机制，为芝麻素开发成抗肿瘤辅助用药或抗肿瘤新药提供进一步的实验和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺腺癌A549细胞株（由中国医学科学院购置，由本科室体外传代培养）。肺腺癌A549细胞株培养于含体积分数为10%胎牛血清的DMEM培养液中,置37℃、5%的CO₂培养箱中培养，实验时取对数生长期细胞。

1.2 方法

1.2.1 MTT检测 测定开始实验前24 h进行细胞换液，取对数生长期人肺腺癌A549细胞，消化制备成单细胞悬液，低倍镜下进行细胞计数后，接种于96孔板中，细胞浓度为1×10⁶个/毫升。细胞贴壁后，每孔分别加入药物20 μl，使实验组芝麻素终浓度达10、20、40、60、80 μg/ml，并另设空白组和对照组，分别培养24、48、72 h后，每孔分别加入5 mg/ml的MTT溶液20 μl，37℃孵育4 h后，小心弃上清液，每孔分别加入二甲基亚砷（DMSO）150 μl，轻轻振荡10 min后用酶标仪在492 nm处测定吸光度（A）值。计算细胞生长抑制率及药物抑制率，并利用NDST软件计算半数抑制浓度（IC₅₀）。计算公式：肿瘤细胞增殖抑制率（%）= 1 - [加药孔A值/对照孔A值]×100%。

1.2.2 倒置显微镜观察 取对数生长期人肺癌A549细胞，0.25%胰酶常规消化，吹打均匀，制备成浓度为1×10⁶个/毫升的细胞悬液，接种于75 ml培养瓶中，贴壁生长后加入芝麻素 40 μg/ml，另设对照组，CO₂培养箱培养24、48、72 h后，利用倒置显微镜进行细胞形态学观察，并拍照记录。

1.2.3 HE染色 取对数生长期人肺腺癌A549细胞，制备成浓度为1×10⁶个/毫升细胞悬液，接种于6孔板中，每孔细胞2 ml，设空白对照组（不加药物）、芝麻素40 μg/ml组，细胞贴壁牢固后，分别加入相应药物，在CO₂培养箱培养48 h后，按照常规染色法进行HE染色观察。

1.2.4 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的人肺腺癌A549细胞，用0.25%胰酶消化，吹打均匀，制备成1×10⁶个/毫升细胞悬液,置于100 ml的培养瓶中培养，加入芝麻素40 μg/ml，另设立对照组（不加药物），放入CO₂恒温细胞培养箱，放入CO₂恒温细胞培养箱，继续培养48 h后，收集细胞悬液，按以下步骤进行：冷PBS（pH:7.2~7.4）缓冲液洗涤，1 000 r/min，离心3 min，2次；加入2 ml冷PBS缓冲液，制备成单细胞悬液；加入4 ml预冷的70%乙醇固定，4℃保存过夜；将细胞悬液1 000 r/min,离心5 min，小心弃上清液；冷PBS缓冲液2 ml 洗涤，1 000 r/min，离心5 min，2次；加入RNA酶，37℃水浴30 min；加碘化丙锭(PI)染色液混匀，4℃避光30 min；上机检测，检测凋亡率，查看变异率，分析细胞周期分布等情况。

1.2.5 Annexin V/PI双染色法检测细胞凋亡 取对数生长期的人肺腺癌A549细胞，用0.25%胰酶消化，吹打均匀，制备成1×10⁶个/毫升细胞悬液，置于100 ml的培养瓶中培养，加入芝麻素40 μg/ml，另设立对照组（不加药物），放入CO₂恒温细胞培养箱，继续培养48 h后，收集细胞悬液，按以下步骤进行：将待测细胞的培养液用移液器吸入到15 ml试管中，用冷PBS洗涤两次，PBS洗液亦收集到试管中。加胰酶消化；用收集的弃液和PBS洗涤液终止消化，混匀分别收入到各自的离心管中，300 r/min，离心5 min弃上清液；冷PBS（1~2）ml洗涤2次，300 r/min，离心5 min弃上清液；用冷PBS洗涤各组待检细胞2次，并在1×binding buffer中重悬细胞浓度为1×10⁶个/毫升。吸取100 μl的细胞(1×10⁵)至试管中；加入5 μl的Annexin V试剂（BD）和5 μl的碘化丙锭(PI)（BD）（在室温下进行，上机前添加PI）。轻柔混匀后避光室温下孵育15 min后每管加入400 μl结合缓冲液，立即上流式细胞仪分析，检测细胞凋亡。

1.2.6 流式细胞术检测Bcl-2、Bax凋亡蛋白表达 取对数生长期的人肺腺癌A549细胞，用0.25%胰酶消化，吹打均匀，制备成1×10⁶个/毫升细胞悬液，置于100 ml的培养瓶中培养，加入芝麻素40 μg/ml，另设立对照组（不加药物），放入CO₂恒温细胞培养箱，继续培养48 h后，收集细胞悬液，按以下步骤进行：将待测细胞的培养液用移液器吸入到15 ml试管中，用冷PBS洗涤两次，PBS洗液亦收集到试管中。加胰酶消化；用收集的弃液和PBS洗涤液终止消化，混匀分别收入到各自的离心管中；300 r/min离心5 min弃上清液；冷PBS

(1~2) ml洗涤2次, 300 r/min离心5 min弃上清液; 收集各组待检细胞, 加入冷PBS (1~2) ml, 轻柔混匀; 300 r/min离心5 min, 弃上清液; 加入1 ml 1×的细胞通透液(按说明书细胞通透液1:9稀释)。室温孵育10 min; 500 r/min离心5 min, 倒掉上清液; 加入特异性包内荧光抗体: 对照管加IgG1 FITC(20 ul)或IgG1 PE(20 μl), 检测管加Bcl-2 FITC 20 μl (BD) 或bax PE20 ul (BD), 轻柔震荡; 室温避光孵育30 min; 加入2 ml的PBS缓冲液, 轻柔震荡混匀; 500 r/min离心5 min, 倒掉上清液; 加入0.5 ml PBS, 混悬, 以流式细胞术检测Bcl-2、Bax凋亡蛋白表达。

1.2.7 免疫细胞化学染色 细胞爬片参考体外细胞培养方法中的爬片方法, 实验操作按照SABC试剂盒即Caspase3、8、9试剂盒(武汉博士德)的说明, 参照实验程序, 略加修改。光学显微镜下观察, 并拍照记录。结果判断: 细胞内观察到清晰的棕色颗粒为阳性细胞。Caspase在细胞质中呈现黄色颗粒为阳性表达, 以细胞轻微着色或未着色判定为阴性, 每张爬片在显微镜下用10×40放大倍率观察10个视野, 每个视野中, 分别计算出阳性细胞数和细胞总数, 并计算细胞阳性表达率。细胞阳性表达率(%)=阳性细胞数/细胞总数×100%, 免疫组织化学染色中, 以已知阳性物质的肺癌组织切片为阳性对照, 以PBS缓冲液代替单抗工作液为阴性对照。

1.3 统计学方法

应用SPSS17.0统计软件进行统计学分析, 数据资料以均数±标准差表示, 各组之间均数比较采用*t*检验, 以*P*<0.05为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT检测细胞生长增殖情况

MTT结果显示芝麻素10、20、40、60、80 μg/ml分别对肺癌A549细胞均有抑制作用, 随时间延长而逐渐增强, 组间比较差异有统计学意义(*P*<0.01), 见表1。我们以接近半数抑制浓度(*IC*₅₀)为参考, 观察不同浓度的药物对肺腺癌A549细胞的抑制作用, 48 h结果显示芝麻素40 μg/ml组较对照组, 抑制率明显(*P*<0.01), 最接近*IC*₅₀。

2.2 倒置显微镜观察情况

倒置显微镜见对照组细胞形态为多角形或梭形, 细胞密集, 贴壁牢固, 细胞间距小, 细胞体积大, 细胞膜完整; 胞质丰富且分布均匀, 饱满而

表1 MTT法检测各组药物不同时间段的细胞抑制率
Table1 MTT detected cell growth inhibiting rate of each groups in different time periods

Groups(μg/ml)	24 h(%)	48 h(%)	72 h(%)
Control	4.75±0.30	5.25±3.02	8.81±2.71
10	17.20±0.60 [*]	15.74±7.42 [#]	39.98±8.98 ⁺
20	27.4±10.91 [*]	26.67±5.11 [#]	46.58±8.95 ⁺
40	37.26±9.57 [*]	53.17±7.05 [#]	46.00±9.98 ⁺
60	40.15±9.33 [*]	57.13±4.11 [#]	50.76±9.47 ⁺
80	48.69±4.60 [*]	69.69±7.42 [#]	59.16±11.03 ⁺

Notes: 24 h*:different concentration groups a compared to control group, *P*<0.01; 48 h#:different concentration groups a compared to control group, *P*<0.01; 72 h+:different concentration groups a compared to control group, *P*<0.01

透亮, 可见核分裂相; 芝麻素作用24 h组, 细胞间距变大, 细胞数量较对照组有所减少, 体积略缩小, 胞质凝缩, 折光率增强, 细胞膜完整, 贴壁牢固, 部分癌细胞呈逐渐变圆趋势, 可见部分凋亡细胞; 芝麻素作用48 h组, 细胞数明显减少, 细胞稀疏, 细胞凋亡明显, 细胞间隙变大; 芝麻素作用72 h组, 细胞数量明显减少, 凋亡增多, 细胞数量明显减少, 细胞轮廓增强, 变圆的细胞数量更加增多, 贴壁细胞很少, 视野中细胞凋亡增加。

2.3 HE染色情况

HE染色形态学观察对照组细胞形态呈不规则多角形, 细胞排列致密, 细胞间空隙少, 胞质丰富, 细胞核染色明显, 细胞核中可见多个核仁, 核分裂相多见; 芝麻素作用24 h组细胞形态不规则, 细胞排列较疏松, 视野中可见部分凋亡细胞; 芝麻素作用48 h组肿瘤细胞表现为核浓缩, 胞质浓缩减少, 体积缩小, 呈圆形或不规则形, 核染色质浓缩或染色质块形成, 染色体被染成深蓝色, 视野中可见凋亡细胞; 芝麻素作用72 h组可见细胞排列疏松, 胞质浓缩, 变圆的细胞较对照组更多, 视野中可见较多的凋亡细胞, 见图1。

2.4 流式细胞术检测细胞周期情况

40 μg/ml芝麻素作用于肺腺癌A549细胞48 h后, 与对照组相比, 其细胞分布周期发生了明显变化, 表现在G期细胞明显减少, 多数细胞阻滞在S期, 见表2。由于采用特殊的设门技术, 细胞周期中并没有出现典型的亚二倍体峰, 即凋亡峰。

2.5 Annexin V/PI检测细胞凋亡以及Bcl-2、Bax凋亡蛋白表达情况

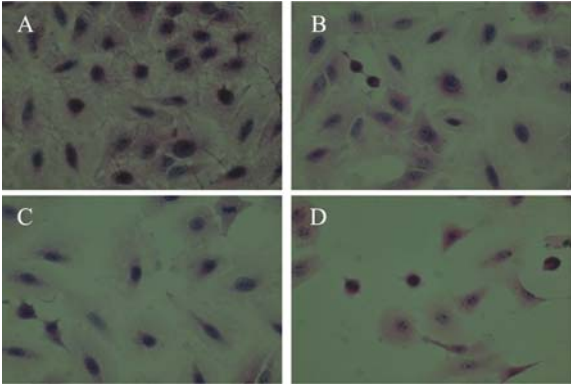
Annexin V/PI检测细胞早期凋亡结果和对照组相比, 芝麻素干预组凋亡明显, 与对照组相比, 有显著差异, 见图2和表3。流式细胞仪检测凋亡蛋白Bcl-2及Bax结果示与对照组相比较, 芝麻素干预后, Bcl-2蛋白的表达降低, 而Bax蛋白的表

表2 各浓度芝麻素作用A549细胞48小时细胞周期、凋亡率及变异系数变化

Table2 The rate of cell cycle and apoptosis and coefficient of variation in human lung adenocarcinoma cell line A-549 of 48h after different concentration sesamin treatment

Groups (μg/ml)	Cell cycle (%)			Apoptosis rate (%)	Different concentration (%)
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M		
Control	81.41±3.32	14.82±3.54	4.74±1.25	5.67±1.53	4.78±1.08
Sesamin	67.38±9.5*	27.86±10.14 [#]	4.98±2.71 ⁺	20.26±4.84 [§]	4.63±0.81

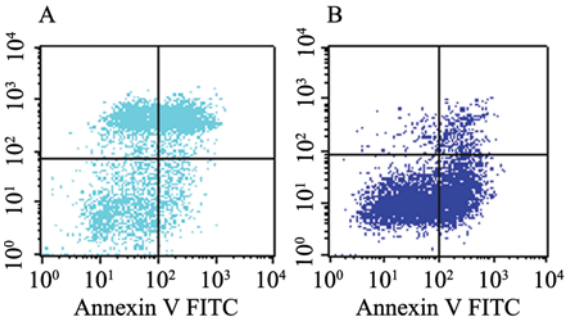
Notes:G0/G1 stage: *:compared to control group, $P<0.01$;S stage: #:compared to control group, $P<0.01$;G₂/M stage: +:compared to control group, $P>0.05$;apoptosis rate:§:compared to control group, $P<0.01$;coefficient of variation were less than 7.0 in all groups, controled in normal variation range, all numbers were a valid date and were acceptable



A:control group;B:24 h after 40 μg/ml sesamin treatment;C:48 h after 40 μg/ml sesamin treatment;D:72 h after 40 μg/ml sesamin treatment

图1 对照组人肺腺癌A549细胞和40 μg/ml芝麻素作用不同时间的细胞形态

Figure1 The cellular morphology of human lung adenocarcinoma cell line A549 and different time after 40 μg/ml sesamin treatment



A: control group; B:experiment group

图2 Annexin V/PI检测细胞凋亡

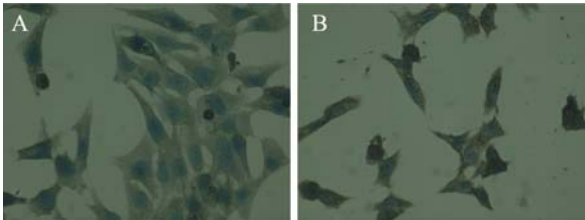
Figure2 Cell apoptosis detected by Annexin V/PI staining

达升高,Bcl-2/Bax比值降低,与对照组相比,差异有统计学意义,见图3、4和表3。

2.6 免疫细胞化学染色情况

经免疫细胞化学染色后,在光学显微镜下观察,和对照组相比,芝麻素干预组较发生显著改变,表达增高。与对照组相比,有明显的差异,见图5~7、表4。

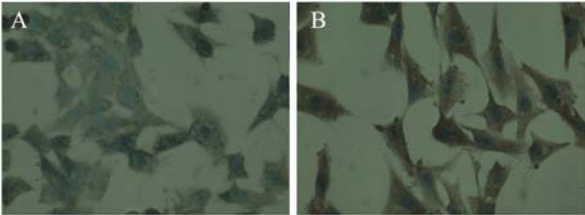
3 讨论



A:control group;B:24 h after 40 μg/ml sesamin treatment

图5 对照组人肺腺癌A549细胞和 40 μg/ml芝麻素作用48 h Caspase-3的表达(SABC法 ×400)

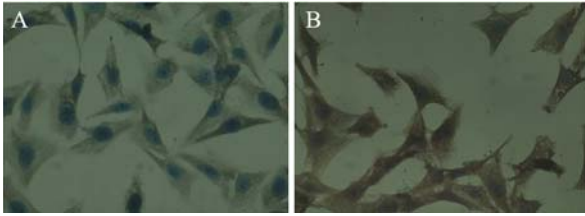
Figure5 The expression of Caspase-3 in human lung adenocarcinoma cell line A549 and 24 h after 40 μg/ml sesamin treatment(SABC ×400)



A:control group;B:24 h after 40 μg/ml sesamin treatment

图6 对照组人肺腺癌A549细胞和 40 μg/ml芝麻素作用48 h Caspase-8的表达(SABC法 ×400)

Figure6 The expression of Caspase-8 in human lung adenocarcinoma cell line A549 and 24 h after 40 μg/ml sesamin treatment(SABC ×400)



A:control group;B:24 h after 40 μg/ml sesamin treatment

图7 对照组人肺腺癌A549细胞和 40 μg/ml芝麻素作用48 h Caspase-9的表达(SABC法 ×400)

Figure7 The expression of Caspase-9 in human lung adenocarcinoma cell line A549 and 24 h after 40 μg/ml sesamin treatment(SABC ×400)

细胞凋亡是在一定的生理或病理条件下主动的遵循自身程序结束其生命的过程^[5],故又称为程序性死亡(programmed cell death,PCD)。近年来

表3 检测芝麻素干预组细胞抑制率(%)

Table3 Inhibitory rates to cells were detected in sesamin treatment(%)

Groups (μg/ml)	Bcl-2	Bax	Bcl-2/Bax	Annexin V/PI
Control	3.33±0.37	4.88±1.83	0.77±0.29	6.53±2.11
Sesamin	1.50±0.32 [#]	30.06±6.15 [*]	0.05±0.12 ^{\$}	31.79±7.69 [*]

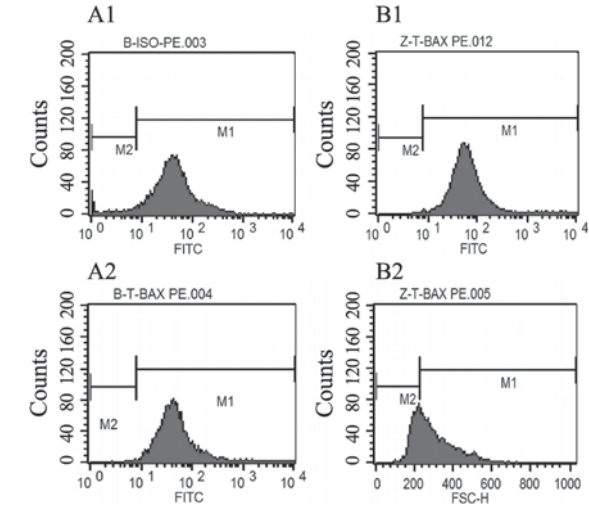
Notes:[#]:compared to control group, $P<0.01$;^{\$}:compared to control group, $P<0.01$;^{*}:compared to control group, $P<0.01$

表4 芝麻素作用48 h后Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9表达(%)

Table4 Expression of Caspase-3, 8, 9 in 48 h after sesamin treatment(%)

Groups (μg/ml)	Caspase-3	Caspase-8	Caspase-9
Control	21.00±4.64	24.20±5.02	23.4±5.86
Sesamin	54.20±6.06 [*]	51.40±7.09 [*]	51.40±8.73 [*]

Notes:^{*}:compared to control group, $P<0.01$



A1,A2: control group; B1, B2:experiment group

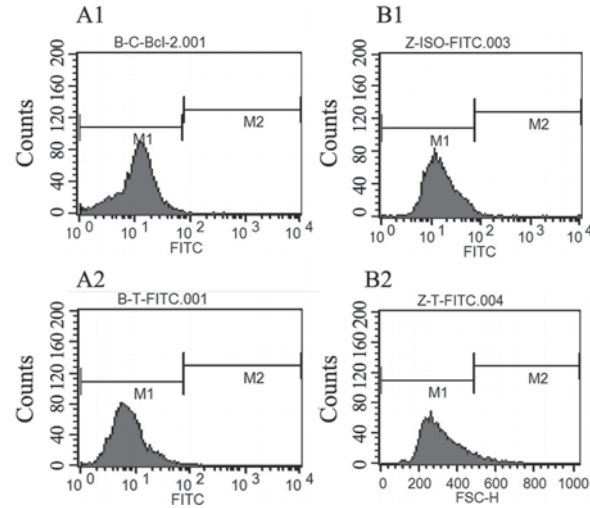
图4 流式细胞仪检测凋亡蛋白Bax表达

Figure4 Bax expression detected by flow cytometry

A549细胞有很好的抑制作用，我们以接近半数抑制浓度（ IC_{50} ）为参考，采用相同条件下检测芝麻素来观察对肺腺癌A549细胞的抑制作用，结果显示，48 h芝麻素的 IC_{50} 为40 μg/ml，芝麻素对肺腺癌A549的最大抑制率为71.06%。利用倒置显微镜及HE染色观察到，随着药物浓度的增加细胞凋亡特征性形态逐渐明显，提示芝麻素具有抑制肿瘤细胞增殖及诱导凋亡作用。

本实验经流式细胞术分析结果显示，芝麻素对人肺腺癌细胞有凋亡诱导效应，同时，肺腺癌细胞周期产生了影响，细胞周期结果分析显示，芝麻素处理过的细胞大部分阻滞在S期，考虑芝麻素抑制了A549细胞的分裂，并通过启动凋亡机制阻止肿瘤细胞恶性增殖。

Annexin V-FITC与PI双染荧光标记法是区别早期凋亡和晚期凋亡的较可靠的常用方法之一。在肿瘤的基础与临床研究中，Annexin V-FITC与PI双染荧光标记可以协同MTT检测细胞凋亡情况，便于上市的药物或化合物的药理和毒理分析、新的抗肿瘤药物的筛选、抗肿瘤药物 IC_{50} 剂量确定、抗肿瘤药物干预或联合干预的疗效评判以及新的诱导肿瘤细胞凋亡机制研究等。实验显示：芝麻素干预组出现早期凋亡细胞。提示芝麻素在早期就具有抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡作用，推测芝麻素参与肿瘤细胞脂质代谢，改变A549细胞膜双层脂质镶嵌模型的完整性与通透性，导致细胞膜及线粒体膜上 Ca^{2+} 泵的活性异常，致使细胞内 Ca^{2+} 含量及分布异常，呈现胞质内 Ca^{2+} 增多（钙超载）、线粒体内 Ca^{2+} 减少，从而激活线粒体凋亡途



A1,A2: control group; B1,B2:experiment group

图3 流式细胞仪检测凋亡蛋白Bcl-2表达

Figure3 Bcl-2 expression detected by flow cytometry

研究发现，各种抗癌药物引发细胞死亡的主要方式是促进肿瘤细胞的凋亡，通过对细胞凋亡的相关研究，为肿瘤治疗提供了新的思路及靶点，诱导肿瘤细胞凋亡成为肿瘤治疗的一条新途径^[6]。文献表明^[7]，肿瘤治疗机制之一可能是在肿瘤细胞中诱导凋亡，而各种细胞凋亡阈值的不同造成了治疗效果的不同。凋亡诱导剂已经应用于肿瘤的治疗，并且展示了其广阔而乐观的应用前景^[8]。国内外学者已相继证实芝麻素对人类淋巴瘤白血病Molt4B细胞^[9]、胃癌KATO III细胞^[10]、小鼠肝癌II 22细胞^[11]及S180肿瘤细胞^[12]均具有增殖抑制生长作用。凋亡诱导作用是常规抗肿瘤治疗包括放射线和化疗药物发挥作用的一个主要途径。

本实验中，采用MTT法测得芝麻素对肺腺癌

径及细胞内ROS水平表达，引起氧化应激反应，诱导细胞凋亡。

细胞凋亡的实现主要通过两种通路，即内源性通路和外源性通路，均最终导致Caspase-3的活化，切割底物产生凋亡效应。本实验采用免疫组织化学法以及流式细胞术对凋亡相关蛋白Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9以及Bcl-2/Bax蛋白进行检测。结果显示芝麻素作用肺腺癌A549细胞48 h后Caspase-8、Caspase-9和Caspase-3活性与阴性对照组比较均显著增高，芝麻素可能对细胞凋亡的内源性通路有上调的作用，芝麻素诱导肿瘤细胞凋亡可能与其激活了Caspase-3、Caspase-8和Caspase-9有关。Bcl-2/Bax是Bcl-2家族两个具有代表性的重要成员，凋亡通路受到抑制时会有Bcl-2过度表达，而Bax的过度表达时使Caspase-9活化并引发Caspase的级联反应，进而下游的Caspase-3的激活促进线粒体通路诱导细胞凋亡^[13]。本实验中，实验组Bcl-2阳性表达率明显下降（ $P<0.01$ ），而Bax阳性表达率明显升高（ $P<0.01$ ），结合线粒体通路的凋亡机制，考虑芝麻素诱导凋亡可能是通过抑制信号转导通路上的关键酶来实现的，通过下调Bcl-2和上调Bax影响细胞凋亡的线粒体通路；Bcl-2/Bax比值降低（ $P<0.01$ ），芝麻素可能通过改变Bcl-2和Bax的平衡，诱导Bax表达，从而抑制Bcl-2表达，进而诱导A549细胞凋亡，这可能是芝麻素抗肿瘤作用的机制之一。

综上所述，芝麻素可使人肺癌A549细胞株细胞在细胞增殖周期的静止期聚集，从而干扰细胞周期的进程抑制肿瘤细胞的增殖生长。芝麻素诱导凋亡机制可能是通过下调bcl-2，上调Bax蛋白的表达，Bcl-2/Bax比值降低，激活了Caspase-3、Caspase-8和Caspase-9，从而影响凋亡通路实现。根据实验结果，可初步判断芝麻素对人肺癌A549细胞株的细胞周期及凋亡通路有影响，其机制可能是芝麻素作用于人肺癌A549细胞株的凋亡相关基因调控来实现。这些结果显示芝麻素在临床治疗肺癌或辅助治疗肺癌方面具有一定潜力，并为临床用药的开发提供了实验依据。

参考文献:

[1] Zhang XR, Zhang C, Wang XY,*et al.*Effects of LAAO on

proliferation and apoptosis of human lung cancer cell A549[J]. Zhongguo Yao Fang, 2011,22(25):2325-7.[张小润, 张程, 王晓宇, 等. L-氨基酸氧化酶对人肺腺癌A549细胞增殖、凋亡的影响研究[J]. 中国药房, 2011,22(25):2325-7.]

[2] Mitsuo Namiki.The chemistry and physiological functions of sesame[J].Food Rev Intern,1995,211:281-329.

[3] Tang CH,Peng ZY. Survey on studies of sesame lignun “sesame” [J]. Liang Shi Yu You Zhi,2000,6:37-39.[唐传核, 彭志英. 芝麻木酚素“芝麻素”研究概况[J].粮食与油脂,2000,6:37-9.]

[4] Shen XL. Nutritive ingredients and health value of sesame[J]. Zhongguo Shi Wu Yu Ying Yang,2006,7:51-2.[沈旭丽.芝麻的营养成分及保健价值[J].中国食物与营养,2006,7: 51-2.]

[5] Razavi HM, Hamilton JA, Feng Q. Modulation of apoptosis by nitric oxide: implications in myocardial ischemia and heart failure[J]. Pharmacol Ther,2005, 106(2):147-62.

[6] Koike K,Takaki A,Tatsukawa M,*et al.*Combination of 5-FU and IFN α enhances IFN signaling pathway and caspase-8 activity,resulting in marked apoptosis in hepatoma cell lines[J]. Int J Oncol,2006,29(5):1253-61.

[7] CrightonD, KM Ryan. Splicing DNA-damage responses to tumour cell death[J]. Biochim Biophys Acta,2004,1705(1):3-15.

[8] Sun C L,Yang W G,Li H X,*et al.*The anti-cancer effect carboxymethylglucanin vitro[J].Zhongguo Sheng Hua Yao Wu Za Zhi,2006,27(3):153-5.[羧甲基葡聚糖体外抗肿瘤作用的研究[J].中国生化药物杂志,2006,27(3):153-5.]

[9] MiyaharaY,Komiya T,Katsuzaki H,*et al.*Sesamin and episesamin induce apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells[J].Int J Mol Med,2000,6(1):43-6.

[10] Hibasami H, Fujikawa T, Takeda H,*et al.* Induction of apoptosis by Acanthopanax senticosus HARMS and its component,ssamin in human stomach cancer KATO III cell[J]. Oncol Rep, 2000, 7(6): 1213-6.

[11] Wei YJ,Bian HL,Yu WJ,*et al.* Effect of Sesamin on liver cancer H22 cells proliferation and influence of tumor growth H22 mice a tumor-burdened [J].Zhong Cao Yao,2008,39(8):1222-4.[魏艳静,卞红磊,余文静,等.芝麻素对肝癌H22细胞增殖及H22荷瘤小鼠肿瘤生长的影响[J].中草药,2008,39(8):1222-4.]

[12] Bian HL.Effect of sesamin on immune function and proliferating cell nuclear antigen in S180 sarcoma-bearing mice[J].Zhongguo Xian Dai Yi Xue Za Zhi,2008,18(23):3411-3.[卞红磊. 芝麻素对S180荷瘤小鼠免疫功能及对增殖细胞核抗原表达的影响[J].中国现代医学杂志,2008,18(23):3411-3.]

[13] Li TF,Luo YM,Lv CZ. Cell apoptosis and the mechanism of Caspase regulation [J].Zhongguo Lin Chuang Shen Jing Ke Xue,2003,11(3):313-5.[李天富, 罗玉敏, 吕传真. 细胞凋亡与Caspase机制调控[J].中国临床神经科学,2003,11(3):313-5.]

[编辑: 黄园玲; 校对: 邱颖慧]