此外,对于 HepG2 和 3T3 - L1 细胞,锌与胰岛素共同作用的效果也分别好于胰岛素和相同剂量锌的单独作用效果;但该效应在 L6 细胞中并不明显。与模型对照组相比,随着锌浓度的增加,葡萄糖消耗量也逐渐增加,但 3 种细胞的产生效应的初始浓度不同,L6 细胞产生效应的锌初始浓度为20 μmol/L,3T3 - L1 细胞、HepG2 为 50 ~ 100 μmol/L 才出现变化趋势;不同浓度锌与胰岛素共同刺激后,与上述趋势基本一致。说明不同靶细胞对锌的敏感性不同,同时由于不同细胞的造模方法不同和造模剂量不同,即使在同种干预条件下对锌的敏感性也不同。与此同时,本研究也注意到,无论是正常细胞还是胰岛素抵抗细胞,HepG2 和 3T3 - L1 脂肪细胞对胰岛素敏感性均较大,达到未加胰岛素组的 2 ~ 3 倍,而 L6 细胞则相对仅为 1.3 倍,可能是由于肌肉组织缺乏葡萄糖 - 6 - 磷酸酶,在调节血糖方面效果不及肝脏和脂肪组织,也可能是在体外条件下不同细胞对胰岛素的敏感性存在一定差异的结果。

综上所述,一定浓度的锌对正常细胞和胰岛素抵抗细胞的葡萄糖摄取具有促进作用,但其效果远远低于胰岛素的作用效果,且不同细胞具有不同的适宜作用剂量;其有关相应机制仍需进一步探讨。

参考文献

[1] Samuel VT, Shulman GI. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links[J]. Cell, 2012, 148(5): 852 - 871.

[2] 王锦泓,徐慧兰. 2 型糖尿病危险因素交互作用研究进展[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(4): 615 - 617.

[3] 刘信艳,吴蕴棠,孙忠,等. 锌对高糖高脂饲料喂养大鼠胰岛素敏感性影响[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(5): 691 - 693.

[4] Seet RCS, Lee CYJ, Lim ECH, et al. Oral zinc supplementation does not improve oxidative stress or vascular function in patients with type 2 diabetes with normal zinc levels[J]. Atherosclerosis, 2011, 219: 231 - 239.

[5] Foster M, Samman S. Zinc and redox signaling: perturbations associated with cardiovascular disease and diabetes mellitus[J]. Antioxidants and Redox Signaling, 2010, 13: 1549 - 1573.

[6] Liu J, Zhang JF, Lu JZ, et al. Astragalus polysaccharide stimulates glucose uptake in L6 myotubes through AMPK activation and AS160/TBC1D4 phosphorylation[J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(1): 137 - 145.

[7] Ruz M, Carrasco F, Rojas P, et al. Zinc as a potential coadjuvant in therapy for type 2 diabetes[J]. Food Nutr Bull, 2013, 34(2): 215 - 221.

收稿日期: 2014-10-16　　(韩仰欢编辑　郑新校对)

中国公共卫生 CPH

· 实验研究 ·

秦皮甲素对人肺癌细胞 A549 凋亡影响*

王晶

摘　要: 目的　探讨秦皮甲素对肺癌细胞 A549 增殖、凋亡的影响及机制。**方法**　人肺癌细胞 A549 分为对照组、阳性对照组(5-Fu 0.77 mmol/L)、秦皮甲素 0.4、0.8、1.6 mmol/L 组,四甲基偶氮噻唑蓝比色法检测肺癌细胞 A549 的增殖率,流式细胞仪检测细胞周期、细胞凋亡率和线粒体膜电位的变化,免疫印迹法检测 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达改变。**结果**　秦皮甲素可抑制人肺癌细胞 A549 的增殖,IC_{50} 为 0.4 mmol/L;降低线粒体膜电位并诱导凋亡;与对照组比较,人肺癌细胞 A549 经秦皮甲素 1.6 mmol/L 组处理后,S 期细胞比例[(20.35 ± 0.26)%]升高,G2/M 期细胞比例[(25.46 ± 0.17)%]降低;与对照组比较,秦皮甲素 1.6 mmol/L 组细胞凋亡率(29.15%)明显升高,Bax 和 Caspase-3 蛋白表达增强,Bcl-2 蛋白表达受到抑制,呈剂量 - 效应关系。**结论**　秦皮甲素可以通过线粒体途径诱导人肺癌细胞 A549 凋亡。

关键词: 秦皮甲素; 肺癌细胞; 凋亡

中图分类号: R 563　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2015)04-0464-03　DOI: 10.11847/zgggws2015-31-04-25

Impact of esculin on apoptosis of A549 lung cancer cells

WANG Jing (*First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning Province* 121000, China)

Abstract: Objective　To explore the effect of esculin on proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells. **Methods**　The A549 lung cancer cells were assigned into a negative control group, a positive control group (0.77 mmol/L of 5-fluorouracil), and three esculin groups (0.4, 0.8, and 1.6 mmol/L esculin). Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method was used to observe the growth of A549 cells. Cell cycle, cell apoptosis and mitochondrial membrane potential of the A549 lung cancer cells were detected with flow cytometry, and the expressions of Bax, Bcl-2, and caspase-3 protein

* **基金项目**: 辽宁省自然科学基金(2013022063)
作者单位: 辽宁医学院附属第一医院,辽宁 锦州 121000
作者简介: 王晶(1974 -),女,辽宁锦州人,主管药师,硕士,主要从事中药抗肿瘤药理研究。
数字出版日期: 2015 - 3 - 16 14:03
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20150316.1403.014.html

were detected with Western blot. **Results**　Esculin could inhibit the growth of A549 lung cancer cells, with a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) of 0.4 mmol/l, and reduce mitochondrial membrane potential of the cells. Compared with the control group, the proportion of cells in S phase (20.35 ± 0.26%) and cell apoptosis rate (29.15%) increased, and the ratio of cells in G2/M phase decreased (25.46 ± 0.17%) for the A549 lung cancer cells treated with 1.6 mmol/L esculin. In addition, esculin could enhance the expressions of Bax and caspase-3 protein and inhibit the expression of Bcl-2 protein in dose-dependent manner. **Conclusion**　Esculin can induce apoptosis of A549 lung cancer cells through mitochondrial pathway.

Key words: esculin; lung cancer cell; apoptosis

秦皮甲素是中药秦皮中的主要成分,又称七叶苷,七叶灵,马栗树皮苷。秦皮甲素在中药秦皮中含量最高,为 1.436% ~3.043%[1]。研究表明,秦皮甲素具有止咳平喘、抗炎镇痛、抗病原微生物、抗病毒、抗肿瘤等作用[1],秦皮甲素可以促进人肺癌细胞H-125凋亡[2]。本研究拟观察秦皮甲素对肺癌细胞 A549 增殖、凋亡的影响,并对其作用机制进行探讨。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　人肺癌细胞 A549(中国医科大学)用含 10% 胎牛血清 1640 培养液,在 37 ℃、5% CO_2 细胞培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次,待细胞长至对数生长期时进行试验;秦皮甲素(北京中国食品药品检定研究所),兔抗人 Bax、Bcl-2 抗体(北京博奥森生物技术有限公司),兔抗人 caspase-3 抗体(上海领成生物科技有限公司),线粒体膜电位试剂盒(JC-1)、细胞周期检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);annexinV-PI 凋亡试剂盒(北京宝赛生物有限公司),胰蛋白酶(上海慧颖生物科技有限公司),1 640 培养基(南京凯基公司);四甲基偶氮噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(西格玛奥德里奇上海贸易有限公司)。XD-101 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),流式细胞仪(美国 BD 公司),凝胶成像仪(美国 BioRad 公司),二氧化碳培养箱(美国杜邦公司),9602A 酶标仪(北京普朗公司)。

1.2　指标与方法

1.2.1　细胞增殖抑制率检测　采用 MTT 法,取对数生长期肺癌细胞 A549,用 0.25% 胰酶消化,以 $(5 \sim 10) \times 10^3$ 个/孔接种于 96 孔板中,待细胞贴壁后,将细胞分为阴性对照组,阳性对照组[5-氟尿嘧啶(5-Fu) 0.77 mmol/L)],秦皮甲素组(秦皮甲素 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mmol/L),每孔 200 μL,培养 48 h 后中止反应,每孔加入 MTT 20 μL,继续培养 4 h,上清弃去,每孔加入二甲基亚砜 150 μL,在摇床上振动混匀 10 min,在酶标仪上 490 nm 波长处检测各孔吸光度(A)值. 细胞增殖抑制率(%) = (1 − 处理组 A 值/对照组 A 值) × 100%。实验重复 3 次,计算平均抑制率。

1.2.2　秦皮甲素对 A549 细胞周期影响　采用流式细胞仪检测,取对数生长期的肺癌细胞 A549,用 1640 培养液培养 24 h 后,将细胞分为阴性对照组,阳性对照组(5-Fu 0.77 mmol/L),秦皮甲素组(0.4、0.8、1.6 mmol/L),继续培养 48 h 后收集各组细胞,4 ℃70% 冷乙醇固定 24 h,800 r/min 离心6 min弃去固定液,50 μg/mL 碘化丙啶 1 mL 染色,4 ℃避光 30 min,试验重复 5 次,流式细胞仪分析细胞周期。

1.2.3　秦皮甲素对 A549 细胞凋亡影响　采用流式细胞仪检测,分组与处理同 1.2.2,各组细胞用 0.25% 胰酶消化,800 r/min 离心 5 min 收集细胞,用预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 3 次,4 ℃1 000 r/min 离心 10 min,加入 10 μL annexin V-FITC,轻轻混匀,避光室温反应 15 min,再加入 5 μL 碘化丙啶,1 h 内用流式细胞仪检测,分析细胞凋亡率。试验重复 5 次。

1.2.4　秦皮甲素对 A549 细胞线粒体膜电位影响　采用流式细胞仪检测,取对数生长期的肺癌细胞 A549 用 1640 培养液培养 24 h,分组预处理同 1.2.2,收集各瓶细胞,800 r/min 离心 5 min,PBS 洗 2 遍,加入 0.5 mL 1 640 培养液和 0.5 mL JC-1 染色工作液,混匀,37 ℃孵育 20 min;孵育结束后,600 r/min离心 4 min,沉淀细胞,去上清。用 JC-1 染色工作液(1 ×)洗涤 2 次,再用 0.5 mL JC-1 染色工作液(1 ×)重悬后,流式细胞仪检测,采用绿色荧光细胞百分率表示线粒体膜电位变化。

1.2.5　秦皮甲素对 A549 细胞凋亡相关蛋白表达影响　采用细胞免疫印迹法,细胞分组与处理同 1.2.2,4 ℃ 12 500 r/min 离心 5 min,收集上清,测定蛋白浓度;15% 聚丙烯酰胺凝胶分离蛋白样品,电泳后将蛋白转至硝酸纤维素膜上,加入 1∶1 000 稀释一抗(Bax、Bcl-2、caspase-3),4 ℃过夜,洗膜 3 次。加入 1∶2 000 稀释的二抗孵育 50 min,洗膜 3 次。显色、照相。试验重复 5 次。

1.3　统计分析　数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行单因素方差分析及最小显著差法进行组间两两比较,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　秦皮甲素对 A549 细胞增殖影响　秦皮甲素 0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 mmol/L 组、5-Fu 组人肺癌细胞 A549 增殖抑制率分别为 35.9%、46.1%、50%、

65.4%、71.8%、64.2%，明显低于对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；秦皮甲素可明显抑制肺癌细胞 A549 增殖，且随着秦皮甲素浓度升高，抑制率也明显增大，IC_{50}值为 0.4 mmol/L。

2.2　秦皮甲素对 A549 细胞周期影响（表 1）　与对照组比较，秦皮甲素各剂量组 A549 细胞 G2/M 期细胞比例减少，S 期细胞比例增加，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

表 1　秦皮甲素对人肺癌细胞 A549 细胞周期影响（%，$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

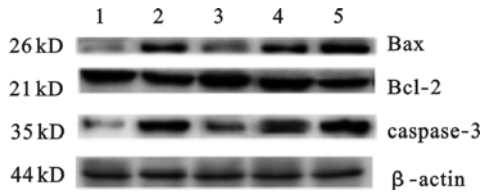
组别（mmol/L）	G0/G1	S	G2/M
对照组	42.1 ± 0.11	3.97 ± 0.07	45.75 ± 0.13
5 - Fu	44.9 ± 0.18	13.76 ± 0.14[b]	36.45 ± 0.19[a]
秦皮甲素 0.4	43.7 ± 0.09	7.99 ± 0.08	45.19 ± 0.08
0.8	45.1 ± 0.24	17.64 ± 0.17[b]	33.75 ± 0.21[a]
1.6	44.6 ± 0.19	20.35 ± 0.26[b]	25.46 ± 0.17[a]

注：与对照组比较，a $P<0.05$，b $P<0.01$。

2.3　秦皮甲素对 A549 细胞凋亡影响　结果显示，对照组、秦皮甲素 0.4、0.8、1.6 mmol/L 组和 5-Fu 组 A549 细胞凋亡率分别为 2.17%、14.93%、22.41%、29.15% 和 24.76%；与对照组比较，秦皮甲素各剂量组与 5-Fu 组 A549 细胞凋亡率明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；呈剂量 - 效应关系。

2.4　秦皮甲素对 A549 细胞线粒体膜电位影响　结果显示，对照组、秦皮甲素 0.4、0.8、1.6 mmol/L 组和5-Fu 组 A549 细胞绿色荧光细胞百分率分别为 0.09%、13.75%、24.31%、32.58% 和 23.49%；与对照组比较，差异有统计学意义（$P<0.05$）；提示 A549 细胞线粒体膜电位随着秦皮甲素浓度增高而降低。

2.5　秦皮甲素对 A549 细胞凋亡相关蛋白表达影响（图 1、表 2）　秦皮甲素作用于人肺癌 A549 细胞 48 h 后，与对照组比较，秦皮甲素组 A549 细胞 Bax 和 caspase-3 蛋白表达增强，Bcl-2 蛋白表达减弱。



注：1：对照组，2：5-Fu 组，3 ~ 5：秦皮甲素0.4、0.8、1.6 mmol/L 组。

图 1　秦皮甲素对人肺癌 A549 细胞凋亡相关蛋白表达影响

表 2　秦皮甲素对人肺癌 A549 细胞凋亡相关蛋白表达影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别（mmol/L）	Bax	Bcl-2	caspase - 3
对照组	0.24 ± 0.08	0.75 ± 0.04	0.21 ± 0.06
5-Fu	0.61 ± 0.05[b]	0.59 ± 0.06[a]	0.62 ± 0.09[b]
秦皮甲素 0.4	0.41 ± 0.07[a]	0.71 ± 0.14	0.35 ± 0.07[a]
0.8	0.56 ± 0.06[b]	0.63 ± 0.07[a]	0.59 ± 0.06[b]
1.6	0.69 ± 0.11[b]	0.42 ± 0.13[b]	0.74 ± 0.15[b]

注：与对照组比较，a $P<0.05$，b $P<0.01$。

3　讨　论

细胞周期是正常连续分裂的细胞从前一次有丝分裂到下一次有丝分裂完成所经历的连续动态过程。细胞凋亡是一种重要的生命现象，Bcl-2 基因家族在细胞凋亡的线粒体途径中作为重要的调节因子，直接参与细胞凋亡的调控。Bcl-2 是抗凋亡因子，当促凋亡因子 Bax 高表达时，形成同源二聚体，抑制 Bcl-2 抗凋亡作用，从而诱导细胞凋亡[3-6]。本研究结果表明，秦皮甲素可将 A549 细胞周期阻滞于 S 期，G2/M 期细胞减少，从而抑制细胞增殖；同时秦皮甲素可使 Bax 蛋白表达增强，Bcl-2 蛋白表达减弱，诱导人肺癌 A549 细胞凋亡。

在细胞凋亡过程中，caspase-3 是 caspase 家族中引发细胞凋亡的关键酶，当细胞发生凋亡时变为有活性的 caspase-3，并作用于 caspase 家族的其他成员，最终降解靶细胞内的结构蛋白和对细胞周期起调控作用的蛋白等，从而导致细胞凋亡[5-6]。而线粒体是细胞凋亡发生发展的关键场所，在致凋亡因子的刺激下，线粒体膜电位降低或丧失，线粒体产生形态和功能的改变，生物膜通透性改变，孔道开放[7-10]。本研究结果显示，秦皮甲素作用后，A549 细胞 caspase-3 蛋白表达呈剂量依赖性增强，细胞线粒体膜电位下降。提示秦皮甲素可抑制人肺癌细胞 A549 增殖，将细胞周期阻滞于 S 期，并通过使线粒体膜电位下降而诱导细胞凋亡。然而，秦皮甲素诱导 A549 细胞凋亡具体机制尚需进一步研究。

参考文献

[1]　方莲花，吕扬，杜冠华. 秦皮的药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志，2008，33（23）：2732 - 2736.
[2]　王晶. 秦皮甲素对人肺癌细胞 H - 125 体外增殖的影响[J]. 时珍国医国药，2011，22（2）：507 - 509.
[3]　张丽志，翟全新，温克. ERK 信号转导通路对肿瘤细胞生物学行为的调控[J]. 医学综述，2011，17（6）：836 - 838.
[4]　万巧凤，顾立刚，殷胜骏，等. 黄芩苷对 FM1 肺炎小鼠肺组织细胞凋亡 FAS/FAS - L 系统的影响[J]. 中国药理学通报，2011，27（11）：1555 - 1559.
[5]　方芳，王立国，张巍，等. 胡桃醌对人前列腺癌 PC - 3 细胞抑制作用[J]. 中国公共卫生，2013，29（10）：1458 - 1460.
[6]　陈礼仪，田金举，任婧，等. 植物花色苷对血小板凋亡通路中 Bcl2 家族影响[J]. 中国公共卫生，2014，30（1）：67 - 69.
[7]　宋少华，郭闻渊，傅志仁，等. 丹参多酚酸盐通过线粒体途径诱导人肝癌 SMMC - 7721 细胞的凋亡[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2010，17（1）：62 - 66.
[8]　任秀聪，张宏熠，李彦敏. 芹菜素诱导人卵巢癌细胞凋亡作用及机制研究[J]. 现代中西医结合杂志，2010，19（15）：1821 - 1826.
[9]　曲佳，郭坤元，吴秉毅，等. 冬凌草甲素诱导人多发性骨髓瘤 ARH - 77 凋亡及其可能机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志，2010，17（2）：134 - 138.
[10]　林箐，彭华毅. 黄葵素诱导小鼠黑色素瘤 B - 16 细胞凋亡的研究[J]. 中国药理学通报，2010，26（12）：1630 - 1634.

收稿日期： 2014 - 03 - 19　　（张翠编辑　郑新校对）

中国公共卫生 CPH