

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.09.005

文章编号: 1005-8982 (2024) 09-0030-09

实验研究·论著

钩吻总碱对肺腺癌细胞增殖和凋亡作用的研究*

金明静¹, 李艳萍², 周欢思¹, 杨梅², 赵昱倩¹, 卢春花³

(1. 广西中医药大学附属国际壮医医院, 广西 南宁 530200; 2. 广西国际壮医医院壮瑶医药研究
实验室, 广西 南宁 530200; 3. 南宁市第一人民医院 医学实验中心, 广西 南宁 530021)

摘要: 目的 以人肺腺癌细胞(A549、SPCA1)为研究对象, 通过在培养液中加入不同浓度的钩吻总碱(TAG)研究其抗肿瘤作用。**方法** 采用加热回流、萃取等方法提取TAG, 利用薄层色谱法鉴定TAG的提取, 通过Incucyte S3活细胞动态分析系统拟合不同浓度的TAG作用A549、SPCA1细胞的细胞融合度并观察A549、SPCA1细胞的形态, 采用CCK-8法、集落形成实验检测细胞增殖, Hoechst33258染色、Rhodamine123染色检测细胞凋亡, 碘化丙啶单染法检测细胞周期, Western blotting检测凋亡指标蛋白Bax、Bcl-2、Caspase-3蛋白表达。**结果** 经薄层色谱法鉴定成功提取TAG。Incucyte S3活细胞动态分析系统拟合出TAG作用A549、SPCA1细胞的EC50值分别是99.2、82.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 由此确定TAG作用A549、SPCA1细胞的低、中、高浓度依次为50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 且细胞拍照观察到随着药物浓度增加细胞融合度下降、细胞数目减少。CCK-8法和集落形成实验结果表明TAG抑制A549、SPCA1细胞增殖($P < 0.05$)。Hoechst 33258细胞核染色实验发现给药组细胞出现核碎裂; 流式细胞术检测Rhodamine123探针发现给药组出现荧光信号强度增加, 检测细胞周期发现TAG使A549、SPCA1细胞周期阻滞在G₂/M期; Western blot结果显示TAG诱导Bcl-2蛋白表达下调, Bax表达上调、Caspase-3蛋白切割活化增加, 通过细胞染色实验、流式细胞术及Western blotting表明TAG促进A549、SPCA1细胞凋亡($P < 0.05$)。**结论** TAG抑制肺腺癌细胞增殖, 诱导细胞凋亡。

关键词: 肺腺癌; 钩吻总碱; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R734.2

文献标识码: A

Effects of total alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth. on proliferation and apoptosis of lung adenocarcinoma cells*

Jin Ming-jing¹, Li Yan-ping², Zhou Huan-si¹, Yang Mei², Zhao Yu-qian¹, Lu Chun-hua³

(1. Guangxi International Zhuang Medicine Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530200, China; 2. Research Laboratory of Zhuang & Yao Medicine, Guangxi International Zhuang Medicine Hospital, Nanning, Guangxi 530200, China; 3. Medical Experimental Center, The First People's Hospital of Nanning, Nanning, Guangxi 530021, China)

Abstract: Objective To explore the antitumor effects of total alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. (TAG) on human lung adenocarcinoma cells (A549, SPCA1) by incorporating various concentrations of TAG into the culture medium. **Methods** TAG was extracted using heating reflux and extraction methods, and identified through thin-layer chromatography. The Incucyte S3 Live Cell Analysis System was used to fit the concentration-response of TAG on A549 and SPCA1 cells and to observe changes in cell morphology. Cell proliferation was

收稿日期: 2023-11-27

* 基金项目: 广西自然科学基金项目(No: 2018GXNSFDA050009); 广西中医药大学博士启动基金项目(No: 2020BS034); 广西研究生教育创新计划项目(No: YCSW2023388); 广西中医药大学青年基金项目(No: 2022QN026); 广西国际壮医医院引进人才科研启动基金项目(No: GZ2021RC016)

[通信作者] 卢春花, E-mail: chl-bb@163.com

measured using the CCK-8 assay and colony formation tests. Cell apoptosis was assessed using Hoechst 33258 staining and Rhodamine 123 staining, while the cell cycle was examined using propidium iodide staining. Western blotting was employed to detect the expression of apoptosis-related proteins Bax, Bcl-2, and cleaved Caspase-3.

Results Successful extraction of TAG was confirmed via thin-layer chromatography. The EC₅₀ values of TAG for A549 and SPCA1 cells were 99.2 and 82.0 μg/mL, respectively, determining the low, medium, and high concentrations of TAG as 50, 100, and 150 μg/mL. Observations showed a decrease in cell confluence and a reduction in cell numbers with increasing concentrations of TAG. The CCK-8 and colony formation assays indicated that TAG inhibited the proliferation of A549 and SPCA1 cells ($P < 0.05$). Hoechst 33258 staining revealed nuclear fragmentation in treated cells, and flow cytometry using Rhodamine123 probe showed increased fluorescence intensity, indicating apoptosis. Cell cycle analysis revealed that TAG induced cell cycle arrest at the G₂/M phase in A549 and SPCA1 cells. Western blot results showed that TAG induced a decrease in Bcl-2 expression, an increase in Bax expression, and activation of Caspase-3 cleavage, suggesting that TAG promotes apoptosis in A549 and SPCA1 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** TAG inhibits the proliferation of lung adenocarcinoma cells and induces apoptosis.

Keywords: lung adenocarcinoma; total alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth.; cell proliferation; cell apoptosis; cell cycle

肺癌作为癌症死亡最主要的原因,是癌症发病的第2大原因^[1],已成为严重危害人类健康的疾病,2020年肺癌发病率和病死率均随着年龄和人类发展指数等级的升高而逐渐升高^[2],由于肺癌早期临床症状及体征隐匿,被确诊时多数已错过最佳治疗时机,其传统手术治疗有限,且对正常组织器官损伤较大,因此寻找新的治疗药物,完善抗肿瘤药物数据显得格外重要。

钩吻(*Gelsemium elegans* Benth.)为马钱科胡蔓藤属植物全草,有毒,以根、叶及全草入药。其别名较多,如断肠草、大茶药、猪人参、葛根、大炮叶、山砒霜等,主要分布在我国广西、云南、福建等长江以南的地区。《千金翼方》中载:钩吻味辛,温,有大毒。主金疮乳痈,中恶风,咳逆上气,水肿,杀鬼疰蛊毒,破瘕积,除脚膝痠痛,四肢拘挛,恶疮疥虫,杀鸟兽^[3]。吲哚类生物碱是钩吻的主要有效成分,其中含量最多的是钩吻素子(koumine),其次包括钩吻绿碱(gelsevirine)、钩吻素甲(gelsemine)、胡蔓藤碱乙(humantenine)和钩吻素己(gelsenicine)等^[4]。钩吻具有明显的抗肿瘤及镇痛作用,同时具有抗焦虑、修复放射损伤及放射增敏、造血保护、抗炎、抗曲霉菌等作用^[5]。早在1984年,就有学者将钩吻碱注射液应用于临床,观察到其对内脏平滑肌痉挛引起的绞痛和癌性疼痛均有较强的镇痛作用,总有效率高达90%,推测钩吻止痛效果较为可靠,且不具有成瘾性,可作为吗啡、盐酸哌替啶的替代品^[6],钩吻醇提取物具有一定的抗肿瘤作用,其促进Hela细胞凋亡,

并使Hela细胞周期阻滞在G₂/M期,G₀/G₁期也有一定阻滞作用^[7],将其与玉叶金花混合提取,既可保持钩吻抗肿瘤的疗效,又降低毒性^[8]。有实验发现钩吻总碱(total alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth., TAG)能抑制人结肠癌细胞HT-29和人脐静脉内皮细胞的增殖,促进凋亡,并且TAG对人脐静脉内皮细胞的迁移、侵袭和管腔形成均有抑制作用,从而推测TAG抗肿瘤作用的机制可能与抑制肿瘤血管新生有关^[9-11]。TAG呈剂量依赖性抑制人舌癌细胞Tca8113增殖、促进凋亡,推测与调控JAK2/STAT3/Survivin通路有关^[12]。对TAG进行分离纯化得到的9种吲哚类生物碱对人肝癌细胞HepG2、人肺癌细胞A549、人慢性髓系白血病细胞K562、小鼠胚胎成纤维细胞NIH3T3均具有抑制作用^[13]。MTT法观察到钩吻生物碱化合物对人肝癌细胞HepG2、人胃癌细胞MGC80-3、人食管癌细胞TE-11和人结肠癌细胞SW480增殖有抑制作用,并且发现钩吻生物碱化合物具有抗消化系统肿瘤活性,并具有构效关系^[14]。基于此,本文从细胞增殖和凋亡的角度采用形态学、细胞生物学、分子生物学等方法研究TAG对肺腺癌A549、SPCA1细胞的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞系、药品及试剂

肺腺癌细胞系(A549、SPCA1)由广西国际壮医医院壮瑶医药研究实验室保存。钩吻生药材购自玉林市银丰国际中药港,经广西国际壮医医院壮

瑶医药研究实验室陈少峰副主任药师鉴定确认。钩吻素子对照品(纯度:99.45%,编号:T5S0661),钩吻碱甲对照品(纯度:98%,编号:T5S0662)均购自上海陶术生物科技有限公司。DMEM培养基(美国Gibco公司,编号:C11995500BT),胎牛血清[依科赛生物科技(太仓)有限公司,编号:FSP500],PBS缓冲液(编号:P1020)、胰蛋白酶(编号:T1300)均购自北京索莱宝科技有限公司,青霉素-链霉素溶液(编号:C0222)、ECL化学发光试剂盒(编号:P0018FS)、增强型CCK-8试剂盒(编号:C0042)、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(编号:C1052)、Hoechst 33258染色液(编号:C1018)、Rhodamine 123(编号:C2007)均购自上海碧云天生物技术有限公司,二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)[安倍医疗器械贸易(上海)有限公司,编号:196055],Caspase-3(编号:19677-1-AP)、Bcl-2(编号:12789-1-AP)、Bax(编号:50599-2-Ig)、GAPDH抗体(编号:60004-1-Ig)均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 仪器设备

活细胞动态功能分析系统(美国Sartorius公司,型号:Incucyte S3),全自动激光四色流式细胞仪(美国BD公司,型号:BD FACSVia),荧光倒置显微镜(日本Olympus公司,型号:CKX53),细胞计数器(美国Beckman Coulter公司,型号:Z I型),多功能酶标仪(美国BioTek公司,型号:SYNERGY H1M),二氧化碳培养箱(新加坡Esco公司,型号:CCL-240B-8),高速台式离心机(德国Eppendorf公司,型号:5424R),置入-80℃超低温冰箱冷冻(中国海尔公司,DW-86L626),近红外双色荧光成像系统(德国耶拿公司,型号:UVP Chem Studio 815)。

1.3 方法

1.3.1 TAG的提取及配制 将钩吻生药材用氢氧化钠NaOH水溶液浸湿,采取加热回流、减压旋蒸、萃取及蒸干的实验方法提取TAG,配制前溶解于浓度为4 g/mL的DMSO储存液,于4℃下避光保存。

1.3.2 薄层色谱法 ①对照品溶液的制备:分别称取0.5 mg钩吻碱甲、钩吻素子对照品,加甲醇溶解制成浓度均为1 mg/mL的对照品溶液;②供试品溶液的制备:称取0.5 mg TAG,加甲醇溶解制成浓度分别为1 mg/mL的供试品溶液。吸取制备的供试品和钩

吻素子、钩吻碱甲对照品溶液各6 μL分别点于以羧甲基纤维素钠为黏合剂的硅胶G板上,以三氯甲烷-甲醇(9:1)为展开剂,将薄层板饱和10 min,展开、取出、晾干、喷以碘化铯钾试液,可见光下检视。溶质移动距离与流动相前沿移动距离之比值(Rf值)=原点到斑点中心的距离/原点到溶剂前沿的距离。

1.3.3 细胞培养 A549、SPCA1细胞用含10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM培养基培养,于37℃、5%二氧化碳培养箱中培养。

1.3.4 Incucyte S3活细胞动态分析系统拟合细胞融合度、EC50值及观察细胞形态 将处于对数生长期的A549、SPCA1细胞以4 000个/孔的细胞密度接种于96孔板,置于培养箱中培养至细胞贴壁生长,以不加TAG为对照组,不同浓度的TAG作为实验组处理细胞,每组设置3个重复孔,将96孔板置于活细胞动态分析系统中动态检测48 h,系统根据细胞融合度拟合EC50值及观察细胞凋亡形态,实验重复3次。

1.3.5 CCK-8法检测细胞增殖 将处于对数生长期的A549、SPCA1细胞消化后,重悬计数调整细胞密度以4 000个/孔接种于96孔板,置于细胞培养箱中过夜培养。以不加TAG为对照组,不同浓度的TAG(50、100和150 μg/mL)作为实验组处理细胞,每组设置3个复孔,分别培养24和48 h,移除各孔中原有的培养基,每孔加入含有10 μL CCK-8的溶液,将96孔板重新放回37℃、5%二氧化碳培养箱中避光孵育2 h,酶标仪测定450 nm波长处吸光度,计算细胞生长抑制率,细胞生长抑制率(%)=1-(实验组平均吸光值-背景值)/(对照组平均吸光值-背景值)。实验重复3次。

1.3.6 集落形成实验检测细胞增殖 选择处于对数生长时期的A549、SPCA1细胞,重悬计数调整细胞密度以2 500个/孔接种于12孔板中,于37℃、5%二氧化碳培养箱培养至合适克隆团时,以不加TAG为对照组,不同浓度的TAG(50、100和150 μg/mL)作为实验组处理细胞48 h,每组设置3个复孔,结晶紫染色。扫描仪扫描12孔板,用Image J软件对克隆团进行分析。实验重复3次。

1.3.7 Hoechst 33258染色检测细胞凋亡 取对数生长期A549、SPCA1细胞,重悬计数调整细胞密度以5 000个/孔接种于12孔板中,置于细胞培养箱中

培养,细胞贴壁后以不加TAG为对照组,不同浓度的TAG(50、100和150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为实验组处理细胞48 h,染色时各孔加入500 μL Hoechst 33258染色液,充分覆盖住待染色的样品,放置细胞培养箱中避光培养30 min后弃染色液,用无菌PBS洗3次,荧光倒置显微镜观察细胞凋亡情况。

1.3.8 Rhodamine123染色检测细胞凋亡 取对数生长期A549、SPCA1细胞,重悬计数调整细胞密度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于6孔板中,置于细胞培养箱中培养,细胞贴壁后以不加TAG为对照组,不同浓度的TAG(50、100和150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为实验组处理细胞48 h,染色时吸除旧培养基,用无菌PBS洗涤2次,在37 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗环境下用2 μmol Rhodamine 123染色30 min,用无菌PBS洗涤2次收集细胞,流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3.9 Western blotting检测Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达 以不加TAG为对照组,不同浓度的TAG(50、100和150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为实验组处理细胞48 h,胰酶消化细胞,PBS清洗2次,组织裂解液(RIPA)提取蛋白。蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)并转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,封闭液封闭,加入Caspase-3、Bcl-2、Bax及内参蛋白GAPDH抗体孵育,ECL显色液在PVDF膜上显色,在近红外双色荧光成像系统中测定各组蛋白条带。

1.3.10 PI染色法检测细胞周期 选取对数生长期的A549、SPCA1细胞,细胞密度以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于6孔板中,细胞贴壁后以不加TAG为对照组,不同浓度的TAG(50、100和150 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作为实验组处理细胞48 h,胰酶消化后使用PBS洗涤2次,加入经预冷后的乙醇,4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜,PI染色液37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温浴30 min。染色后使用流式细胞仪检测细胞周期的分布。

1.4 统计学方法

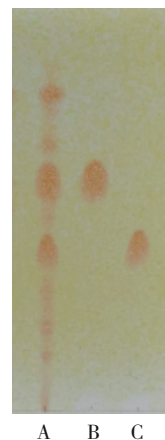
数据分析采用GraphPad Prism 9.5统计软件,数据分析以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 薄层色谱法鉴定结果

在TAG供试品薄层色谱中(见图1),与钩吻素

子、钩吻碱甲对照品相应位置显现相同橙色斑点,对照品的斑点的Rf值分别为0.63和0.45,斑点清晰,Rf值适中,因此可鉴别TAG中含有钩吻素子、钩吻碱甲。



A:TAG; B:钩吻素子对照品; C:钩吻碱甲对照品。

图1 TAG薄层色谱图

2.2 Incucyte S3活细胞动态分析系统拟合细胞融合度、EC50值及观察细胞形态

根据不同浓度的TAG作用细胞48 h的细胞融合度改变,Incucyte S3活细胞动态分析系统拟合出A549、SPCA1细胞的EC50值分别是99.2、82.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (见图2),因此确定后续TAG对A549、SPCA1细胞增殖、凋亡等实验中的低、中、高浓度,依次为50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。随着TAG浓度的增加,细胞数量逐渐减少,细胞融合度降低,生长状态逐渐变差,部分细胞形态变小变圆,大小不一,药物作用呈浓度依赖性(见图3)。

2.3 TAG抑制A549、SPCA1细胞的增殖

采用CCK-8法检测TAG对A549、SPCA1细胞增殖的影响,结果显示,与对照组比较,TAG100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组干预A549、SPCA1细胞后能明显抑制细胞的增殖,随着TAG作用浓度增加和时间的延长,A549、SPCA1细胞抑制率逐渐升高($P < 0.05$)(见表1)。集落形成实验结果显示,100和150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的TAG处理A549细胞48 h后,TAG细胞克隆形成显著减少(见图4和表2)。

2.4 TAG促进A549、SPCA1细胞凋亡

与对照组比较,50、100和150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的TAG处理A549、SPCA1细胞48 h,经Hoechst 33258染色发现对照组A549、SPCA1细胞着色均匀,呈规

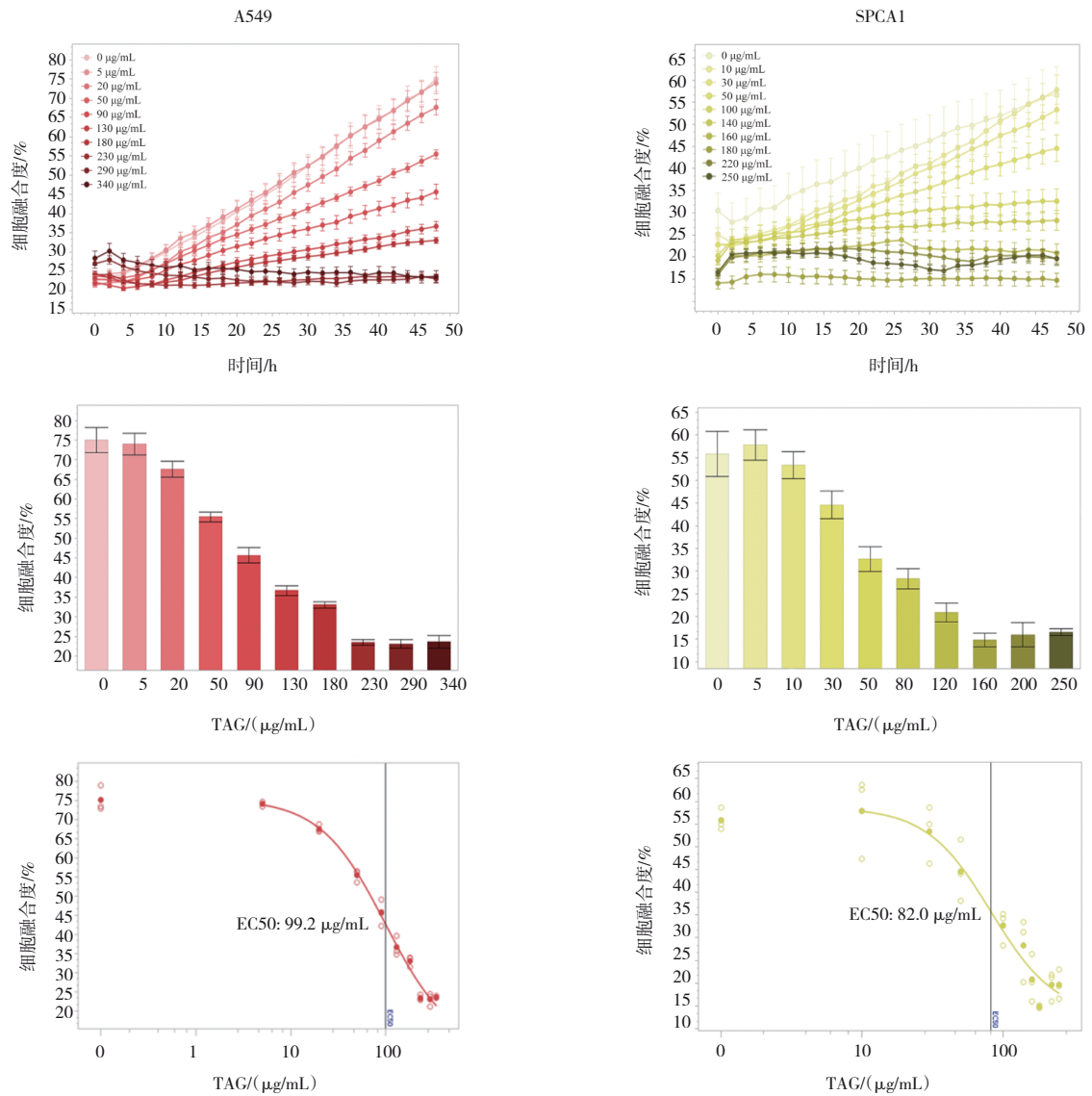


图2 TAG作用A549、SPCA1细胞48 h细胞融合度的改变及EC50值

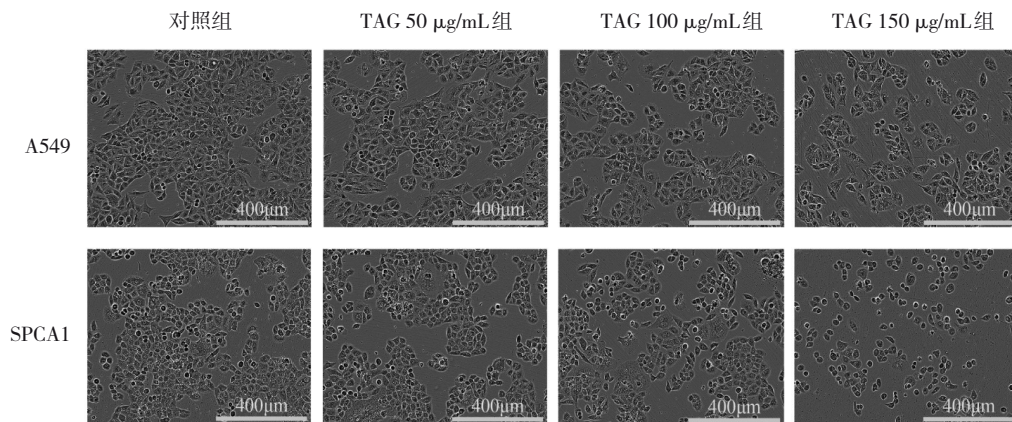


图3 各组A549、SPCA1细胞48 h的细胞形态 (×10)

表 1 各组 A549、SPCA1 细胞 24 和 48 h 细胞抑制率的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	A549		SPCA1	
	24 h	48 h	24 h	48 h
对照组	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
TAG 50 μg/mL 组	9.22 ± 5.10	10.93 ± 3.46	12.04 ± 3.45 [†]	13.19 ± 5.16 [†]
TAG 100 μg/mL 组	20.6 ± 11.22 [†]	29.95 ± 13.98 [†]	20.60 ± 3.83 [†]	27.06 ± 3.31 [†]
TAG 150 μg/mL 组	34.24 ± 6.84 [†]	53.15 ± 14.66 [†]	28.37 ± 2.29 [†]	40.86 ± 5.52 [†]
F 值	13.200	15.450	55.870	54.720
P 值	0.002	0.001	0.000	0.000

注: †与对照组比较, $P < 0.05$ 。

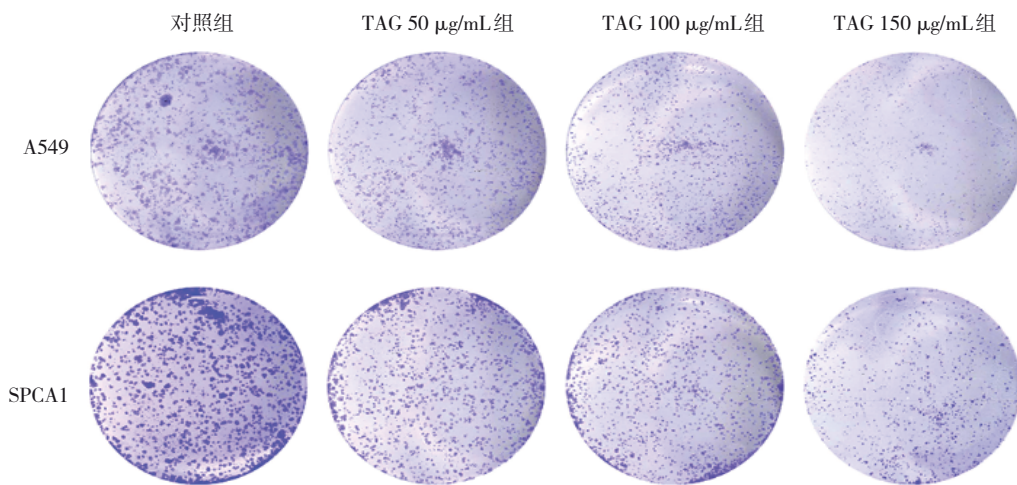


图 4 TAG 抑制 A549、SPCA1 细胞集落形成

表 2 各组 A549、SPCA1 细胞集落面积的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	A549	SPCA1
对照组	20.74 ± 1.01	40.26 ± 9.56
TAG 50 μg/mL 组	18.32 ± 1.08	38.17 ± 9.06
TAG 100 μg/mL 组	16.84 ± 1.61	31.59 ± 11.33
TAG 150 μg/mL 组	9.78 ± 1.04 [†]	19.11 ± 4.66
F 值	45.460	3.366
P 值	0.000	0.075

注: †与对照组比较, $P < 0.05$ 。

则的圆形, TAG 50、100 和 150 μg/mL 组均出现细胞核碎裂、边缘不规则, 大小不一, 细胞数量减少(见图 5)。采用流式细胞术检测 Rhodamine123 探针染色荧光强度, 发现 TAG 50、100 和 150 μg/mL 组均出现荧光信号强度增强(见图 6)。Western blotting 检

测结果显示, 给药组 Bcl-2 表达下调, Bax 表达上调, Bcl-2/Bax 的比率降低, Caspase-3 的切割活化增加, 其中以浓度为 150 μg/mL 的 TAG 作用最显著 ($P < 0.05$), 见图 7 和表 3。以上结果提示 TAG 促进 A549、SPCA1 细胞凋亡的发生。

2.5 TAG 对 A549、SPCA1 细胞周期的影响

用不同浓度的 TAG 处理细胞 48 h 后, 与对照组比较, 细胞周期各个时相的占比发生相应的变化, 处于 G₂/M 期的细胞比例随着 TAG 作用浓度的升高而增加, 这在 A549 细胞中表现得更为明显, 当 TAG 浓度为 150 μg/mL 时, G₂/M 期的比例达 15.55%, 而对照组 G₂/M 期的比例仅 8.02%。这表明 TAG 使 A549、SPCA1 细胞周期阻滞在 G₂/M 期, 诱导细胞凋亡。见图 8。

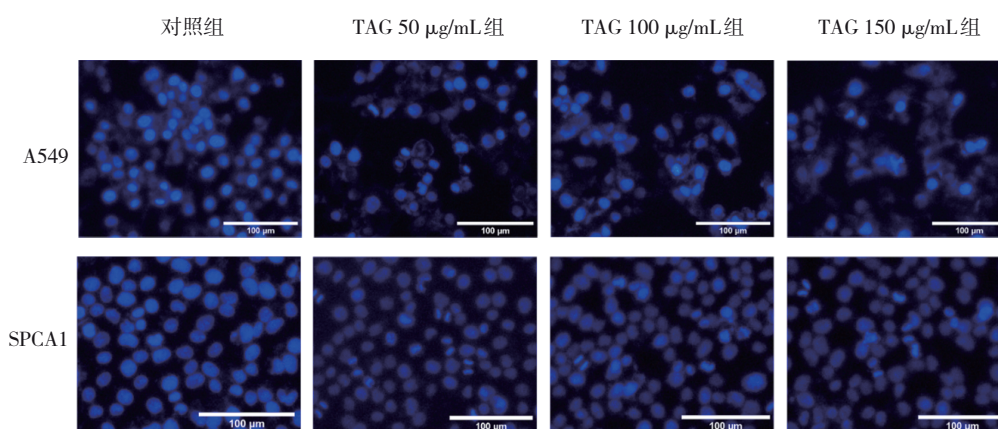


图5 TAG作用A549、SPCA1 48 h染色后细胞核形态

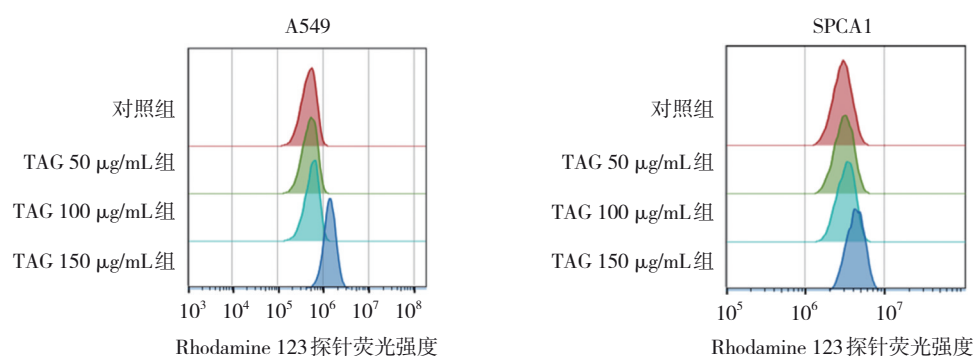
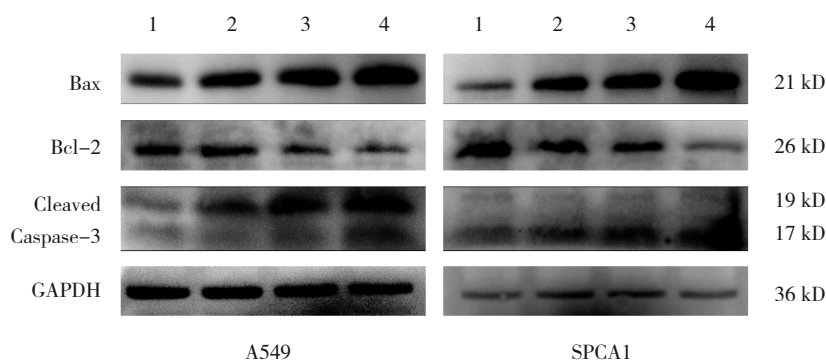


图6 TAG对A549、SPCA1细胞染色荧光强度变化



1:对照组; 2:TAG 50 μg/mL组; 3:TAG 100 μg/mL组; 4:TAG 150 μg/mL组。

图7 TAG对A549、SPCA1细胞相关蛋白表达的影响

表3 TAG对A549、SPCA1细胞相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	A549细胞				SPCA1细胞			
	Bcl-2	Bax	Cleaved Caspase-3	Bcl-2/Bax	Bcl-2	Bax	Cleaved Caspase-3	Bcl-2/Bax
对照组	1.23 ± 0.22	0.52 ± 0.08	0.36 ± 0.09	2.36 ± 0.05	1.73 ± 0.20	0.63 ± 0.06	0.51 ± 0.13	2.76 ± 0.57
TAG 50 μg/mL组	1.03 ± 0.12	0.84 ± 0.15 [†]	0.82 ± 0.12 [†]	1.23 ± 0.08 [†]	0.85 ± 0.17 [†]	0.77 ± 0.10	0.51 ± 0.11	1.09 ± 0.09 [†]
TAG 100 μg/mL组	0.61 ± 0.05 [†]	0.88 ± 0.07 [†]	0.84 ± 0.09 [†]	0.70 ± 0.11 [†]	0.72 ± 0.08 [†]	1.32 ± 0.59	0.74 ± 0.15	0.59 ± 0.20 [†]
TAG 150 μg/mL组	0.41 ± 0.02 [†]	1.11 ± 0.08 [†]	1.13 ± 0.06 [†]	0.37 ± 0.00 [†]	0.54 ± 0.08 [†]	2.70 ± 0.47 [†]	1.78 ± 0.41 [†]	0.20 ± 0.00 [†]
F值	17.110	12.180	22.120	299.900	27.210	12.250	13.140	27.170
P值	0.010	0.018	0.006	0.000	0.004	0.018	0.015	0.004

注: †与对照组比较, $P < 0.05$ 。

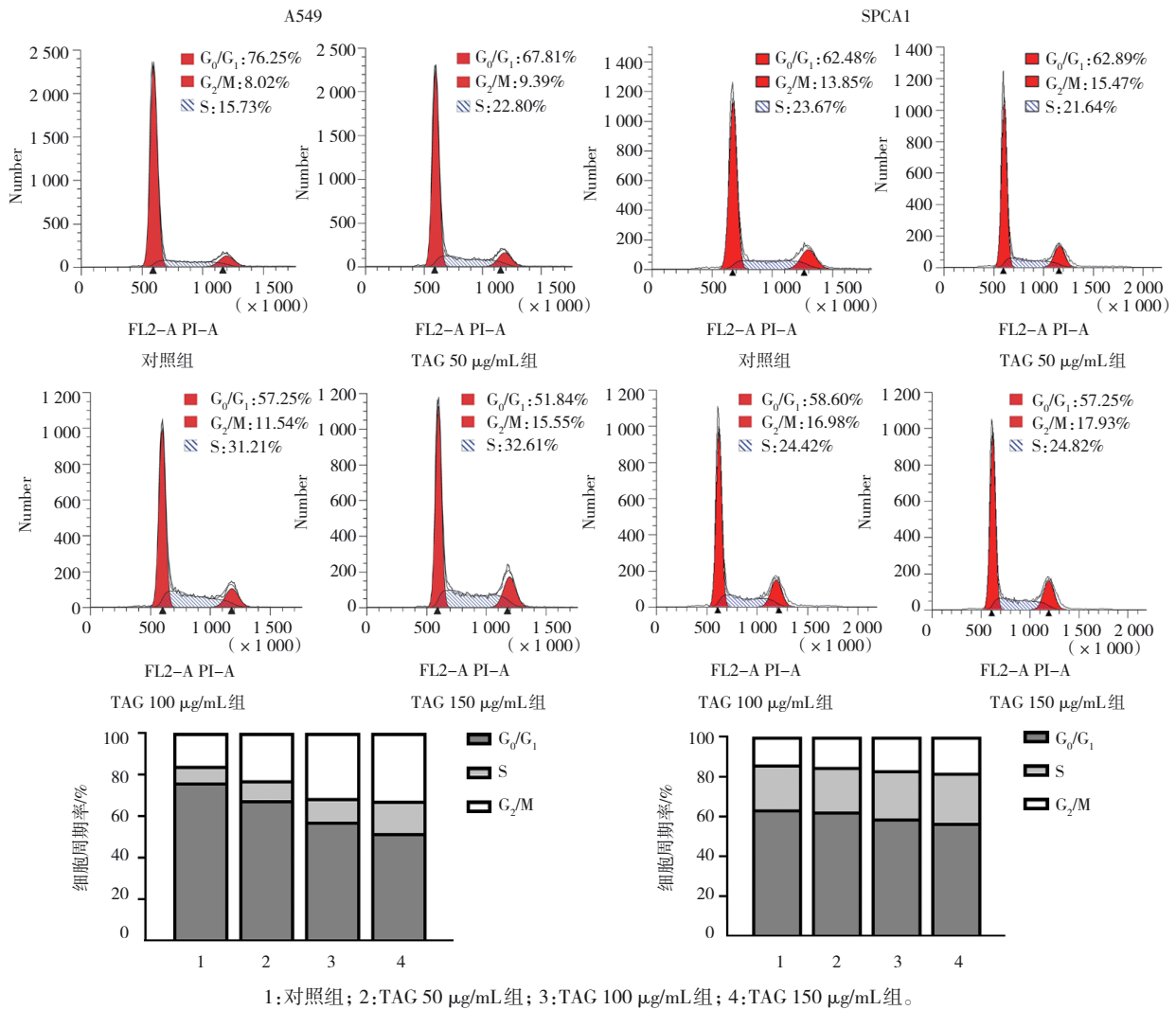


图8 TAG对A549、SPCA1细胞周期的影响

3 讨论

自20世纪后半叶起,全球科学家们从天然药物中研发小分子抗肿瘤药物,如长春碱(类)、喜树碱(类)、秋水仙碱和高三尖杉酯碱等生物碱在全球范围内批准使用,且至今为临床上常用化疗药物^[15]。钩吻作为中国传统瑶药,其化学成分丰富,药理作用广泛,钩吻注射液与放射疗法相结合,可提高肿瘤细胞的放射敏感性,提升治疗肿瘤的疗效^[16],有研究发现,钩吻素子依赖ROS通过NF-κB和ERK/p38 MAPK信号通路抑制肝细胞癌的增殖并促进凋亡^[17],也能够显著减轻神经损伤后的神经性疼痛,并同时保留对神经性疼痛的抗炎反应^[18]。

本课题组前期研究表明,TAG对人结肠癌细胞HT29、HCT116、人肝癌细胞SMMC7721、HepG2、人舌鳞癌细胞CAL27、人乳腺癌细胞MCF7等均具有较明

显的生长抑制作用,在此基础上本研究进一步探究TAG对人肺腺癌细胞A549、SPCA1的作用。首先从钩吻植物中提取TAG,采用薄层色谱法鉴定TAG中含有的化合物钩吻素子、钩吻碱甲,然后从TAG抑制肺腺癌细胞增殖、促进其凋亡的角度分别采取实验验证。从抑制肺腺癌细胞增殖的角度使用了Incucyte S3活细胞动态分析系统、CCK-8法和集落形成实验;Incucyte S3活细胞动态分析系统拟合出A549、SPCA1细胞的EC₅₀值分别是99.2和82.0 µg/mL,并且观察到给药组细胞融合度降低,细胞数量逐渐减少,生长状态逐渐变差,部分细胞出现凋亡;CCK-8法观察到TAG干预A549、SPCA1细胞后能明显抑制细胞的增殖,且具有浓度和时间依赖性;集落形成实验结果显示TAG作用A549、SPCA1细胞后,细胞形成克隆团数下降。从促进肺腺癌细胞凋亡的角度采用Hoechst 33258细胞核染色、Rhodamine123线粒体染

色、Western blotting 及 PI 染色法等实验：Hoechst 33258 细胞核染色后发现给药组出现细胞核碎裂、核固缩，且细胞数目下降；流式细胞术检测 Rhodamine123 探针染色荧光强度发现给药组荧光信号强度增强；Western blotting 结果显示 Bcl-2/Bax 的比率降低，Caspase-3 的切割活化明显增加；流式细胞术检测到 TAG 使 A549、SPCA1 细胞周期阻滞在 G₂/M 期，诱导细胞凋亡。以上研究结果证实 TAG 具有抑制肺腺癌细胞增殖、促进凋亡的作用。

细胞凋亡涉及一系列基因的激活、表达及调控，也是评价抗癌药物有效性的指标之一。恶性肿瘤的特征之一是细胞凋亡程序性失控导致的细胞增殖，因此凋亡相关通路可能作为 TAG 抗肿瘤研究的重点。Bcl-2 蛋白家族属于线粒体凋亡通路，又被称为内源性凋亡通路，通过调节线粒体功能来调节凋亡，属于凋亡通路中最经典的通路，其中 Bcl-2 和 Bax 分别作为抗凋亡和促凋亡蛋白。细胞凋亡的线粒体途径表现为线粒体外膜透化作用和细胞色素 C 的活化，Bcl-2 蛋白家族成员之间通过蛋白-蛋白相互作用来调控线粒体凋亡通路。当细胞受到刺激时 Bcl-2/Bax 的比率发生改变，细胞会发生凋亡^[19-20]。当凋亡发生时 Bax 作用于线粒体外膜，使线粒体通透性发生改变，导致细胞色素 C 释放，以诱导 Caspase 通路级联反应，放大死亡信号，最终引发凋亡。本研究 TAG 作用肺腺癌细胞后 Bcl-2/Bax 的比率下降，Caspase-3 切割活化增加，推测 TAG 促进肺腺癌细胞凋亡与此相关。Rhodamine123 染色经流式细胞术检测后发现线粒体跨膜电位的增加，可能与 Bcl-2/Bax 的比率下降、线粒体通透性改变有关。由此推测 TAG 通过降低 Bcl-2/Bax 的比率引起线粒体跨膜电位的改变从而激活 Caspase-3 发生凋亡。

综上所述，本研究发现 TAG 抑制 A549、SPCA1 增殖并促进凋亡，TAG 具有显著的抗肿瘤作用，是前景广阔的抗肿瘤药物，后续也将进一步研究 TAG 抗肿瘤作用的分子机制。

参 考 文 献：

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] 朱小琼, 蒋栋铭, 沈佳莹, 等. 不同人类发展指数国家肺癌发病率和死亡率分析[J]. 上海预防医学, 2023, 35(4): 305-313.
- [3] 唐孙思邈. 千金翼方[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2010.
- [4] 孙铭学, 徐庆强, 孟文琪, 等. 钩吻药理及毒理机制研究进展[J]. 毒理学杂志, 2020, 34(4): 336-341.
- [5] 宋恩峰, 张彩蝶. 钩吻现代功效研究进展[J]. 现代中药研究与实践, 2017, 31(5): 74-77.
- [6] 陈忠良. 钩吻碱的提取及初步临床应用[J]. 海军医学杂志, 1984, 2(3): 52-53.
- [7] 安飞云, 陈翠梅, 梁维君. 钩吻 B2 组分对 HeLa 细胞增殖和细胞周期的影响[J]. 湖南师范大学学报(医学版), 2008, 5(4): 20-23.
- [8] 杨帆, 陆益, 李艳, 等. 钩吻提取物抗肿瘤作用的实验研究[J]. 广西中医药, 2004, 27(1): 51-53.
- [9] 陈亮, 杨樱, 卢伊, 等. 钩吻总碱对人脐静脉内皮细胞增殖及迁移的影响[J]. 福建中医药大学学报, 2013, 23(4): 41-43.
- [10] 林满遍, 陈亮, 吴水生. 钩吻总碱对人结肠癌细胞增殖、凋亡的影响及其机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(4): 149-153.
- [11] 王文义, 檀兴慧, 张萍萍, 等. 钩吻总碱抑制人结肠癌细胞增殖及血管新生的作用研究[J]. 中国药房, 2020, 31(8): 957-962.
- [12] 魏薇, 唐伟, 代婧, 等. 钩吻总碱通过 JAK2/STAT3/Survivin 通路调控人舌癌细胞株 Tca8113 增殖、凋亡的作用探讨[J]. 临床和实验医学杂志, 2020, 19(2): 140-144.
- [13] 沈锦煌, 杨娜娜, 张艺凡, 等. 胡蔓藤根茎总生物碱的化学成分和抗肿瘤活性研究[J]. 天然产物研究与开发, 2021, 33(10): 1675-1680.
- [14] 黄静, 苏燕评, 俞昌喜, 等. 钩吻生物碱化合物体外抗消化系统肿瘤的活性[J]. 海峡药学, 2010, 22(3): 197-200.
- [15] 张倪. 已批准上市的抗肿瘤天然小分子药物概述[J]. 中国药师, 2019, 22(9): 1702-1705.
- [16] 陆健敏, 齐子荣, 刘国康, 等. 钩吻碱注射液对肿瘤细胞增殖能力的影响[J]. 癌症, 1990, 9(6): 472-474.
- [17] YUAN Z H, LIANG Z E N, YI J N, et al. Koumine promotes ROS production to suppress hepatocellular carcinoma cell proliferation via NF- κ B and ERK/p38 MAPK signaling[J]. Biomolecules, 2019, 9(10): 559.
- [18] JIN G L, HE S D, LIN S M, et al. Koumine attenuates neuroglia activation and inflammatory response to neuropathic pain[J]. Neural Plast, 2018, 2018: 9347696.
- [19] LEUNG L K, WANG T T. Differential effects of chemotherapeutic agents on the Bcl-2/Bax apoptosis pathway in human breast cancer cell line MCF-7[J]. Breast Cancer Res Treat, 1999, 55(1): 73-83.
- [20] 王耿, 何国祥, 宋治远, 等. 血管球囊损伤后血管紧张素 II 型受体与凋亡相关基因表达的变化[J]. 重庆医学, 2001, 30(4): 301-303.

(张蕾 编辑)

本文引用格式：金明静, 李艳萍, 周欢思, 等. 钩吻总碱对肺腺癌细胞增殖和凋亡作用的研究[J]. 中国现代医学杂志, 2024, 34(9): 30-38.

Cite this article as: JIN M J, LI Y P, ZHOU H S, et al. Effects of total alkaloids of *Gelsemium elegans* Benth. on proliferation and apoptosis of lung adenocarcinoma cells[J]. China Journal of Modern Medicine, 2024, 34(9): 30-38.