

血三七醋酸乙酯提取物促进肺癌细胞凋亡的调控机制研究

梁大焱, 王 齐, 严 珮, 杨卉卉, 彭勇波*

中南民族大学生命科学学院, 武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430074

摘要: 目的 研究血三七 *Polygonum amplexicaule* var. *sinense* 醋酸乙酯提取物 (EAEP) 对人肺癌 A549 和 H1299 细胞凋亡的影响及其机制。方法 通过 CCK-8 细胞增殖检测试剂盒及流式细胞术检测 EAEP 对 A549 和 H1299 细胞增殖、细胞周期及凋亡的影响; 通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 及 Western blotting 法检测 EAEP 对 A549 和 H1299 细胞凋亡相关因子 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 及蛋白表达的影响。结果 EAEP 能显著促进 A549 和 H1299 细胞凋亡; 显著提高促凋亡因子 Bax、Caspase-3 mRNA 表达水平, 降低抗凋亡因子 Bcl-2 mRNA 的表达水平; 显著提高 Bax 蛋白表达水平, 降低 Bcl-2 蛋白表达水平。结论 EAEP 能通过促进 Bax 的表达和抑制 Bcl-2 的表达诱导肺癌细胞凋亡。

关键词: 血三七醋酸乙酯提取物; A549 细胞; H1299 细胞; Bax; Bcl-2; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)16-3904-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.16.024

Mechanism of apoptosis induced by ethyl acetate extract from *Polygonum amplexicaule* var. *sinense* in lung cancer cells

LIANG Da-yan, WANG Qi, YAN Pei, YANG Hui-hui, PENG Yong-bo

Hubei Provincial Key Laboratory for Protection and Application of Special Plant Germplasm in Wuling Area of China, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China

Abstract: Objective To study the influence of ethyl-acetate extract of *Polygonum amplexicaule* var. *sinense* (EAEP) on lung cancer cellular proliferation and apoptosis and the underlying mechanisms. **Methods** The cell growth of A549 and H1299 cells was measured by cell counting kit-8 experiment and apoptosis was analyzed by flow cytometry. The treated cellular total mRNAs and proteins related to the apoptosis of A549 and H1299 cells were extracted, and then used for qRT-PCR and Western blotting experiments. **Results** The apoptosis rate of A549 and H1299 cells was observed to be markedly promoted by EAEP, and flow cytometry statistics suggested that this effect may mainly be produced by its pro-apoptotic procedures. qRT-qPCR and Western blotting assays also proved that EAEP significantly promoted expression of Bax and Caspase-3, and inhibited expression of Bcl-2. **Conclusion** EAEP may contain components that play a role in regulating cellular growth via influencing Bax and Bcl-2 pathway.

Key words: ethyl-acetate extract of *Polygonum amplexicaule* D. Don var. *sinense* Forb.; A549; H1299; Bax; Bcl-2; apoptosis

世界卫生组织的调查数据指出, 肺癌患者在全世界新发癌症患者中占 11.6%, 其死亡率占 18.4%, 是排名首位威胁人类健康的肿瘤疾病^[1]。肺癌常见 2 种类型, 即小细胞肺癌和非小细胞肺癌, 其中后者在肺癌发生中占 85% 以上^[2]。目前使用的抗非小细胞肺癌一线药物随着使用量和使用时间的增加, 肺癌患者的耐药性会逐渐加大。因此, 开发出耐药性低、价格低廉且具有高效抗肿瘤生长活性的药物成为迫切需求。

血三七为中华抱茎蓼 *Polygonum amplexicaule*

D. Don var. *sinense* Forb. 根茎, 是鄂西地区常用的民族植物药, 传统上常用于跌打损伤及骨折等疾病的治疗。近年研究发现, 血三七及其同属植物提取物中可能含有促癌细胞凋亡的有效成分, 通过影响 Bax 信号诱导细胞凋亡, 起到抑制癌症的作用^[3-5], 但其对于肺癌细胞凋亡的影响还未见报道。本研究以人肺癌 A549 和 H1299 细胞为研究对象, 通过萃取得到血三七醋酸乙酯提取物 (ethyl-acetate extract of *Polygonum amplexicaule* var. *sinense*, EAEP), 探讨其对肺癌细胞凋亡及相关通路的影响, 为进一步了解其诱导细胞凋

收稿日期: 2019-05-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31371307); 湖北重点实验室建设基金资助项目 (2018BFC360)

作者简介: 梁大焱 (1995—), 硕士研究生, 主要从事中药资源、肿瘤细胞增殖的研究。

*通信作者 彭勇波 (1980—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为疾病相关基因功能研究。E-mail: 30952054@qq.com

亡的作用机制及相关抗癌药物的开发提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞

H1299 和 A549 细胞购自于上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.2 药材与试剂

血三七购自于北京同仁堂健康药业股份有限公司, 批号 20180716, 经中南民族大学药学院陈旅翼副教授鉴定为蓼科蓼属植物中华抱茎蓼 *Polygonum amplexicaule* D. Don var. *sinense* Forb. 的干燥根茎。

TRIzol RNA 提取试剂、逆转录 cDNA 合成试剂盒、蛋白 Marker、RPMI 1640 基础培养基和磷酸盐缓冲液购自美国 Thermo Scientific 公司; 胎牛血清购自德国 PAN-Biotech 公司; 青霉素-链霉素双抗购自北京索莱宝科技有限公司; CCK-8 试剂和 qRT-PCR SYBR Green Mix 购自于上海翊圣生物科技有限公司; Annexin V-FITC 凋亡检测及周期检测试剂盒购自武汉安特捷生物技术有限公司; 无水乙醇和醋酸乙酯购自国药化学试剂有限公司; 兔源 Bax 和 β -actin 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 山羊抗兔 IgG 二抗和 RIPA (强) 裂解液购自北京康为世纪生物科技有限公司; SDS-PAGE 快速凝胶试剂盒购自武汉谷歌生物科技有限公司。

1.3 仪器

二氧化碳恒温细胞培养箱 (德国 Memmert 公司); 分析型流式细胞仪 (美国 BD 公司); 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 仪 (美国 Applied Biosystems 公司); 酶标仪 (美国 Tecan 公司); 核酸定量仪 (美国 Thermo Scientific 公司); Gel Doc XR+ 型核酸凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 药材提取与分离

将 500 g 血三七研成粉末, 经 95% 乙醇回流提取 3 次, 药渣经 70% 乙醇再提取 2 次, 合并提取液, 浓缩干燥形成浸膏 (90 g)。将浸膏用少量乙醇溶解, 再用醋酸乙酯萃取, 通过干燥工艺形成 EAEP 20 g, 并用 DMSO 配制为 1 g/mL 的储存液。采用超高效液相色谱系统 (UPLC) 检测 EAEP 中含香兰素 2.36 mg/g、阿魏酸 0.4 mg/g。

2.2 细胞培养

H1299 和 A549 细胞均使用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 RPMI 1640 培养液, 置于 37 °C、含 5% CO₂ 的细胞恒温培养箱中培养。

2.3 CCK-8 实验

将细胞按 2×10^4 个/mL 密度、100 μ L/孔接种至 96 孔板, 细胞贴壁后分别换上含有 EAEP 不同质量浓度 (0、5、15、25、35、80、160 μ g/mL) 的培养液, 另设对照组和无细胞空白对照组, 48 h 后加入 10 μ L 的 CCK8 试剂, 孵育 2 h 后检测 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖抑制率及 EAEP 的半数抑制浓度 (IC₅₀)。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - (A_{\text{药物}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

将细胞以 3×10^5 个/mL 的密度接种在 6 孔板中, 分为对照组和 EAEP 组, 待细胞贴壁后将培养液吸出, 换上含有 IC₅₀ EAEP 的培养液, 处理 48 h 后收取细胞, 采用碘化丙啶法 (PI) 检测细胞周期, Annexin V-FITC 法检测细胞的凋亡, 按照试剂盒说明书对细胞进行染色处理, 通过流式细胞仪检测细胞周期及凋亡。

2.5 qRT-PCR 检测细胞凋亡相关基因表达

细胞分组及处理同“2.4”项下, 收集细胞, 通过 Trizol 法提取 RNA 并按照说明步骤合成 cDNA。以 GAPDH 为内参基因, 利用上海翊圣生物科技有限公司的 qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒检测 Bax 基因的表达, 每组实验重复 3 次, 以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析目的基因的相对表达量。使用的引物序列为 GAPDH-F: 5'-CTTTGTCAAGCTCATTCCTGG-3', GAPDH-R: 5'-TCTTGCTCAGTGTCCCTTGC-3'; Bax-F: 5'-GACATGTTTTCTGACGGCAAC-3', Bax-R: 5'-AAGTCCAATGTCCAGCCC-3'; Bcl-2-F: 5'-GTGGATGACTGAGTACCTGAAC-3', Bcl-2-R: 5'-GCCAGGAGAAATCAAACAGAGG-3'; Caspase 3-F: 5'-ACTGGACTGTGGCATTGAG-3', Caspase 3-R: 5'-GAGCCATCCTTTGAATTTCGC-3'。

2.6 统计学分析

实验均重复 3 次以上, 使用 PhotoshopCC 2019 软件作图, 采用 Excel 和 GraphPad 公司 Prism 8 软件进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 通过 t 检验进行差异显著性分析。

3 结果

3.1 EAEP 对肺癌细胞增殖的影响

结果表明, EAEP 处理 A549 和 H1299 细胞 48 h 后, 能够显著抑制细胞生长, 且呈现出明显的剂量依赖性 (图 1)。表明 EAEP 对肺癌细胞的增殖具有显著的负调控作用。计算得到 EAEP 对 A549 和

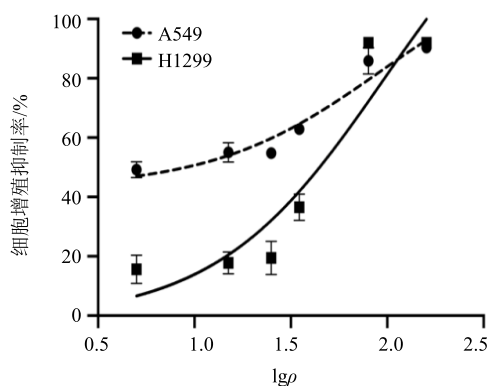


图1 EAEP对A549和H1299细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 1 Effects of EAEP on growth of A549 and H1299 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

H1299 细胞的 IC_{50} 分别为 $(85.25 \pm 2.60) \mu\text{g/mL}$ 和 $(96.13 \pm 1.90) \mu\text{g/mL}$, 用于后续实验。

3.2 EAEP 对肺癌细胞周期和凋亡的影响

采用流式细胞术检测了 EAEP 对肺癌细胞周期和凋亡的影响。结果表明 EAEP 对 2 种肺癌细胞的细胞周期无显著影响 (图 2), 但能显著诱导细胞凋亡 (图 3), 其中对 A549 细胞的影响主要体现在早期凋亡 ($P < 0.01$), 对 H1299 细胞的影响主要体现在晚期凋亡 ($P < 0.05$)。上述结果表明 EAEP 可能通过诱导细胞凋亡从而调控其生长。

3.3 EAEP 对肺癌细胞中凋亡相关因子 mRNA 表达的影响

qRT-PCR 结果表明, 与对照组比较, EAEP 能

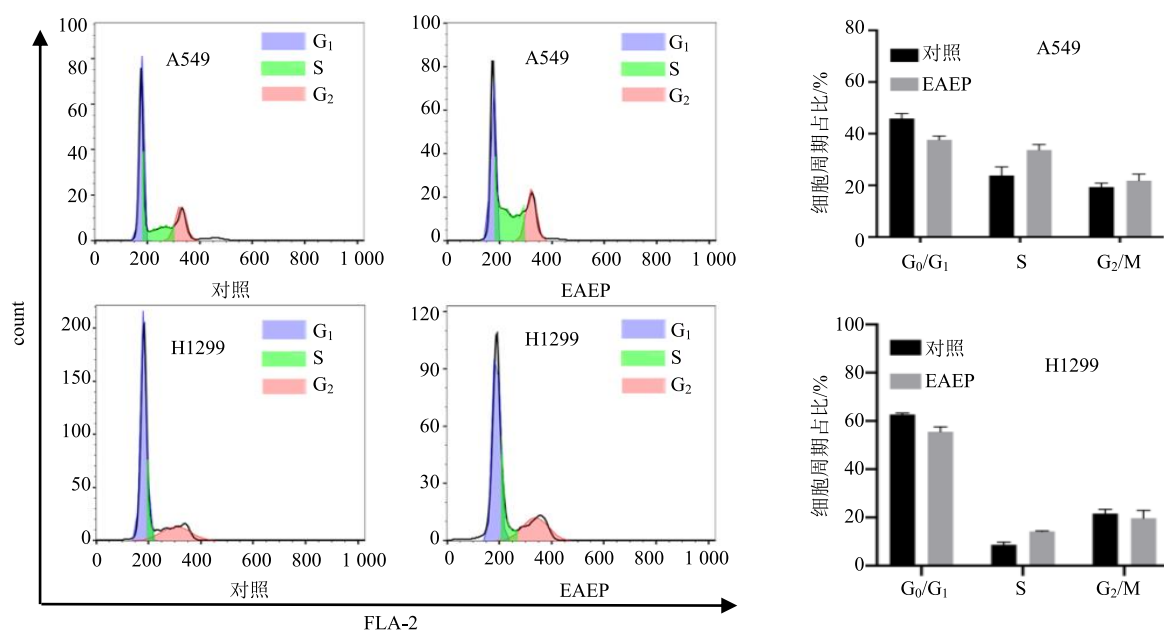


图2 EAEP对A549和H1299细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 Effects of EAEP on cell cycle of A549 and H1299 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

显著降低 A549 和 H1299 细胞中抗凋亡因子 Bcl-2 mRNA 表达水平 ($P < 0.05, 0.01$), 并显著提高促凋亡因子 Bax、Caspase-3 mRNA 表达水平 ($P < 0.05, 0.01$, 图 4)。提示 EAEP 对肺癌细胞凋亡的诱导作用依赖于 Bax 凋亡途径。

3.4 EAEP 对肺癌细胞中凋亡相关因子蛋白表达的影响

Western blotting 结果表明, 与对照组比较, EAEP 能显著降低 A549 和 H1299 细胞中抗凋亡因子 Bcl-2 蛋白表达水平 ($P < 0.05, 0.01$), 并显著提高促凋亡因子 Bax 蛋白表达水平 ($P < 0.05$, 图 4)。

提示 EAEP 对肺癌细胞凋亡的诱导作用依赖于 Bax 凋亡途径。

4 讨论

蓼科植物提取物中含有香叶醇、 β -榄香烯、香茅醇等^[3-6]抗肿瘤的的成分, 且血三七中也分离发现了其含有包括槲皮素、二氢山柰酚等多种具有抗肿瘤作用的活性成分, 能促进人肝癌细胞^[7]和乳腺癌细胞凋亡^[8]。还有研究表明血三七中表儿茶素、槲皮素能通过调控核转录因子- κB (NF- κB) 通路促进人急性 T 细胞白血病细胞凋亡^[9-14], 其分子机制可能是通过上调 Bax 表达与下调 Bcl-2 的表达诱导细胞

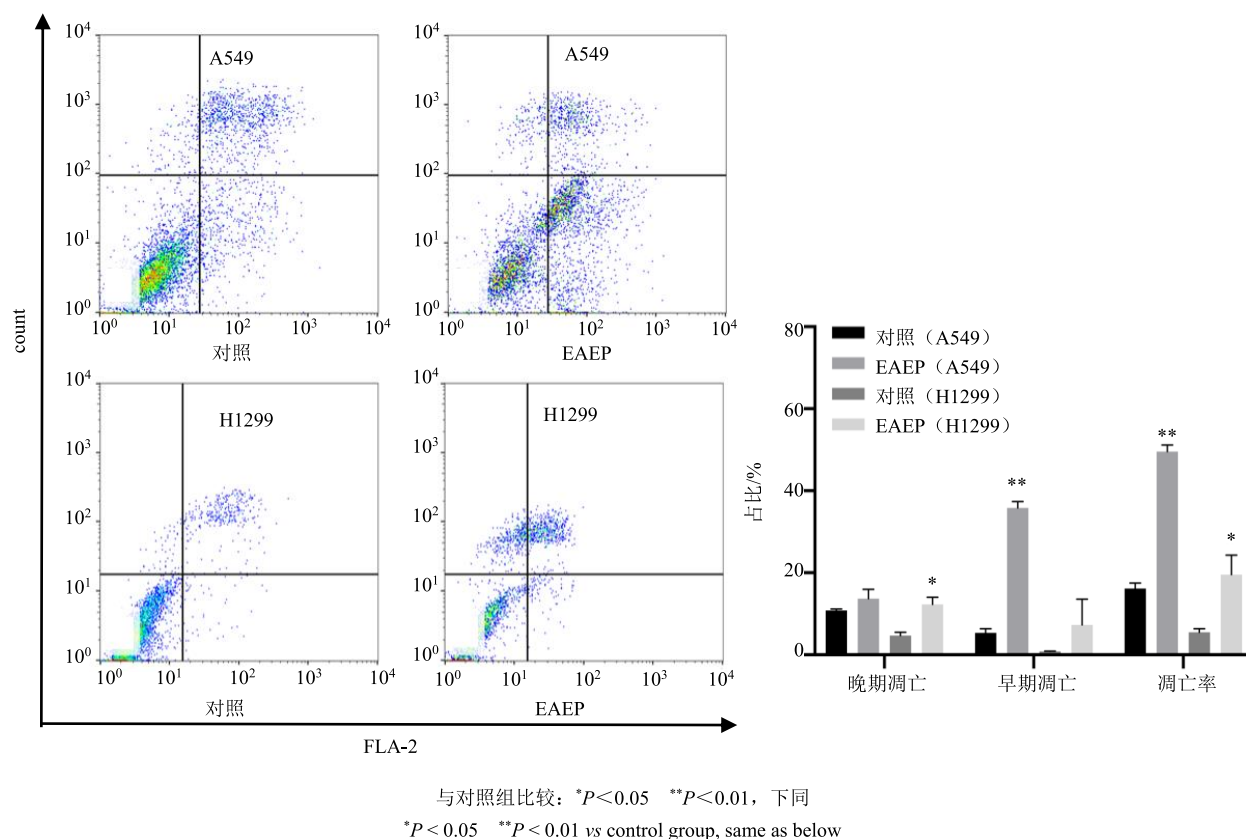


图 3 EAEP 对 A549 和 H1299 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of EAEP on apoptosis of A549 and H1299 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

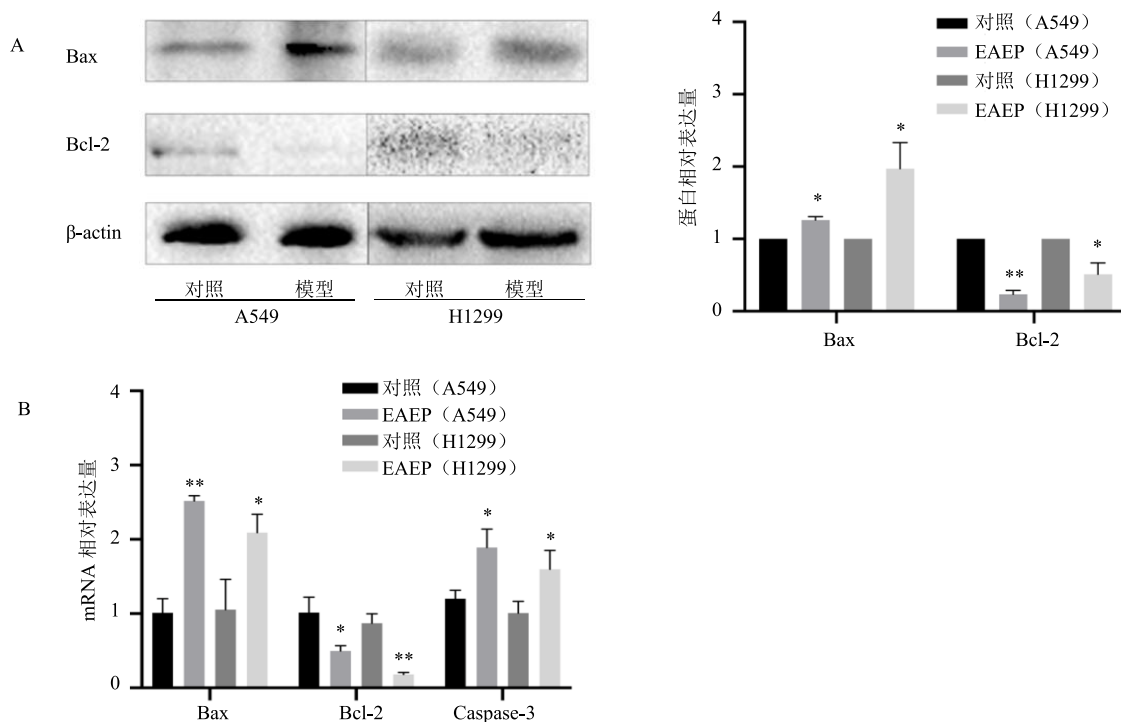


图 4 EAEP 对凋亡相关因子蛋白 (A) 及 mRNA (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of EAEP on apoptotic factors expression of A549 and H1299 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

凋亡,从而达到抗癌的作用,且在肺部炎症疾病治疗中显示良好的治疗作用^[15]。

本研究发现 EAEP 能显著诱导人肺癌细胞凋亡,从而影响癌细胞生长,其对 A549 和 H1299 细胞的 IC₅₀ 分别为 (85.25±2.60) μg/mL 和 (96.13±1.90) μg/mL。上述结果与血三七提取物对肝癌、乳腺癌等细胞具有显著凋亡诱导作用的报道一致。促凋亡因子 Bax 及抑制凋亡因子 Bcl-2 等信号通路是调节细胞凋亡的重要途径^[16]。为阐明 EAEP 诱导肺癌细胞凋亡的潜在机制,本实验进一步检测了细胞促凋亡和抑制凋亡相关的重要基因如 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 等的表达。结果表明 EAEP 能显著促进促凋亡因子 Bax 的表达,同时抑制抗凋亡因子 Bcl-2 基因的表达,从而激活细胞凋亡途径,导致细胞凋亡发生,该结果与在其他肿瘤细胞中研究报道一致^[17-19]。

本研究发现 EAEP 通过调控 Bax 和 Bcl-2 基因的表达诱导肺癌细胞凋亡,为血三七及其提取物应用于肺癌的治疗提供一定的参考依据。但本研究所采用的体外细胞模型具有一定局限性,如使用的血三七提取物浓度偏高,在活体水平很难通过口服达到该有效浓度。另外,对于该提取物中到底是哪些成分诱导细胞凋亡还不十分清楚。因此,在后续研究还需进一步明确其醋酸乙酯提取物中的抗肺癌活性成分,去除其非药效成分,并在活体水平阐明其抗肿瘤作用和机制。

参考文献

- [1] Freddie B, Jacques F, Isabelle S, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA-Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Rodriguez J, Cortes J, Calvo E, *et al.* Paclitaxel, cisplatin, and gemcitabine combination chemotherapy within a multidisciplinary therapeutic approach in metastatic nonsmall cell lung carcinoma [J]. *Cancer*, 2015, 89(12): 2622-2629.
- [3] 梅全喜, 高玉桥, 钟希文, 等. 12 种广东地产清热解毒中药对 EB 病毒壳抗原表达的抑制作用及其细胞毒作用 [J]. *中药材*, 2011, 34(11): 1760-1762.
- [4] 韦金育, 李 延, 韦 涛, 等. 50 种广西常用中草药、壮药抗肿瘤作用的筛选研究 [J]. *广西中医药大学学报*, 2003, 6(4): 3-7.
- [5] 麻 杰, 陈 娟, 赵冰洁, 等. 抗癌药物 β-榄香烯及其衍生物的研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(5): 1184-1191.
- [6] 李康兰, 吕金顺. 珠芽蓼挥发油化学成分的研究 [J]. *西北师范大学学报*, 1999, 35(3): 65-67.
- [7] Xiang M, Su H, Hong Z, *et al.* Chemical composition of total flavonoids from *Polygonum amplexicaule* and their pro-apoptotic effect on hepatocellular carcinoma cells: Potential roles of suppressing STAT3 signaling [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, doi: 10.1016/j.fct.2015.02.020.
- [8] Xiang M, Su H, Shu G, *et al.* Amplexicaule a exerts anti-tumor effects by inducing apoptosis in human breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 18521-18530.
- [9] 向梅先, 胡亚京, 闫云君. 血三七乙酸乙酯部位化学成分研究 [J]. *中药材*, 2012, 35(10): 1610-1614.
- [10] 任恒春, 万定荣, 邹忠梅. 血三七化学成分的研究 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(2): 183-185.
- [11] Shay J, Elbaz H A, Lee I, *et al.* Molecular mechanisms and therapeutic effects of (-)-epicatechin and other polyphenols in cancer, inflammation, diabetes, and neurodegeneration [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, doi: 10.1155/2015/181260.
- [12] 童观珍, 付晓萍, 杨 艳, 等. 表儿茶素的分布及药理活性研究进展 [J]. *云南农业大学学报*, 2018, 33(2): 343-349.
- [13] Fabiola I F, Herlinda S V, Elizabeth P, *et al.* Antioxidant activity and diffusion of catechin and epicatechin from antioxidant active films made of poly (L-lactic acid) [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(26): 6515-6523.
- [14] Mackenzie G G, Carrasquedo F, Delfino J M, *et al.* Epicatechin, catechin, and dimeric procyanidins inhibit PMA-induced NF-kappaB activation at multiple steps in Jurkat T cells [J]. *Feder Am Soc Exper Biol J*, 2004, 18(1): 167-169.
- [15] 俞文英, 张欢欢, 吴月国, 等. 黄酮类化合物的构效关系及其在肺部炎症疾病中的应用 [J]. *中草药*, 2018, 49(20): 4912-4918.
- [16] Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease [J]. *Cell*, 2011, 147(4): 742-758.
- [17] Jiang Z, Zhang H. Curvature effect and stabilize ruptured membrane of BAX derived peptide studied by molecular dynamics simulations [J]. *J Mol Graph Model*, 2019, doi: 10.1016/j.jmgm.2019.01.013.
- [18] Hengartner M O. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 770-776.
- [19] Martinou J C, Youle R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics [J]. *Dev Cell*, 2011, 21(1): 92-101.