

清热解毒方与软坚散结方对人肺腺癌A549细胞增殖及Bcl-2表达的影响

冯欣¹, 孙晓伟², 王丽君², 高哲², 林存智^{2*}

¹青岛大学, 山东 青岛

²青岛大学附属医院, 山东 青岛

Email: *lindoc@126.com

收稿日期: 2021年2月8日; 录用日期: 2021年2月28日; 发布日期: 2021年3月9日

摘要

目的: 研究清热解毒方与软坚散结方对人肺腺癌A549细胞增殖及Bcl-2表达的影响。方法: 将不同浓度的清热解毒方、软坚散结方分别作用于人肺腺癌A549细胞, CCK8法检测细胞生长抑制率, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, RT-PCR检测Bcl-2 mRNA表达。结果: 清热解毒方、软坚散结方均呈剂量依赖性抑制A549细胞生长($P < 0.05$), 并下调Bcl-2 mRNA表达($P < 0.05$)。结论: 清热解毒方、软坚散结方均能不同程度地抑制人肺腺癌A549细胞的增殖, 其机制可能与下调Bcl-2 mRNA表达有关, 从而促进人肺腺癌A549细胞凋亡。

关键词

清热解毒方, 软坚散结方, 人肺腺癌A549细胞, Bcl-2

Effects of Qingrejiedu Formula and Ruanjiansanjie Formula on Proliferation and Bcl-2 Expression of A549 Cells

Xin Feng¹, Xiaowei Sun², Lijun Wang², Zhe Gao², Cunzhi Lin^{2*}

¹Qingdao University, Qingdao Shandong

²The Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao Shandong

Email: *lindoc@126.com

Received: Feb. 8th, 2021; accepted: Feb. 28th, 2021; published: Mar. 9th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 冯欣, 孙晓伟, 王丽君, 高哲, 林存智. 清热解毒方与软坚散结方对人肺腺癌 A549 细胞增殖及 Bcl-2 表达的影响[J]. 临床医学进展, 2021, 11(3): 918-924. DOI: 10.12677/acm.2021.113132

Abstract

Objective: To study the effects of Qingrejiedu Formula and Ruanjiansanjie Formula on proliferation and Bcl-2 expression of human lung adenocarcinoma cancer cell A549. **Methods:** We added different concentrations of Qingrejiedu Formula and Ruanjiansanjie Formula to human lung adenocarcinoma cells A549 and CCK8 method was used to detect cellular proliferation. Flow cytometric was used to detect cell apoptotic. RT-PCR method was used to detect the mRNA expression of Bcl-2. **Results:** Qingrejiedu Formula and Ruanjiansanjie Formula inhibited the proliferation of A549 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$), and down-regulated the expression of Bcl-2 ($P < 0.05$). **Conclusion:** Qingrejiedu Formula and Ruanjiansanjie Formula can inhibit the proliferation of A549 cell line in varying degrees, and the mechanism may down-regulate the expression of Bcl-2, so as to induce apoptosis of human lung adenocarcinoma cancer cell A549.

Keywords

Qingrejiedu Formula, Ruanjiansanjie Formula, Human Lung Adenocarcinoma Cancer Cell A549, B-Cell Lymphoma-2

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

肺癌是临床上常见的恶性肿瘤，其发病率和死亡率均居全世界首位。在肺癌的分型中，非小细胞肺癌(NSCLC)约占肺癌总数的 80%，其中腺癌是目前最常见的肺癌病理类型[1]。肺癌的传统治疗手段是手术、化疗或放疗，但大多数肺癌患者在确诊时已处于晚期，往往对传统治疗手段不能耐受，而中医药在治疗中晚期 NSCLC 具有稳定病灶、防止肿瘤细胞转移、改善临床症状、提高患者生存质量、延长生存期等显著的优势[2]。周仲瑛认为治疗肺癌祛邪重于扶正，治法上以清热解毒、化痰散结、活血化瘀、益气养阴等复法组方为主[3]。本研究旨在通过体外实验，检测清热解毒方、软坚散结方对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响，并初步探讨其作用机制。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 细胞株

人肺腺癌细胞 A549，由青岛大学附属医院中心实验室提供。

2.1.2. 实验药品

清热解毒方(牡丹皮 15 g, 栀子 10 g, 连翘 10 g, 夏枯草 15 g, 鱼腥草 15 g, 金荞麦 15 g), 软坚散结方(牡蛎 20 g, 夏枯草 10 g, 山慈菇 10 g, 白花舌蛇草 20 g, 瓜蒌 10 g, 半夏 10 g), 两组中药方剂配方均由青岛大学附属医院中医科提供，药材均购自青岛大学附属医院中药房。以分析天平精密称取两种按原方比例配伍的各中药免煎颗粒，将其粉碎后置入试管中，分别加入 100℃去离子水 80 ml 振荡溶解，静置

放凉,此时所得中药免煎颗粒溶剂浓度相当于原饮片 1 g/ml,超净工作台内将药液经 0.22 μm 微孔滤膜除菌,得清热解毒方、软坚散结方原液,4℃冰箱保存备用。根据预实验情况确定两种方剂有效抑制浓度范围,实验时将上述原液用培养液稀释后配置成所需终浓度,分别为 2.5、5、10、20、40、80、160 mg/ml 后使用。药物均为实验前新鲜配用。

2.1.3. 实验试剂

CCK8 试剂盒购自大连美仑生物技术有限公司,Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海优宁维生物科技股份有限公司,SYBR® Premix Ex Taq™ II PCR 扩增试剂盒购自日本 TaKaRa 公司,Bcl-2 及 β -actin (内参)上下游引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2.2. 方法

2.2.1. 人肺腺癌 A549 细胞培养及处理

将 A549 细胞用 DMEM 培养基(含 10%血清、青霉素 100 ug/L,链霉素 100 ug/L)于 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养,以 0.25%胰蛋白酶消化,选择对数生长期,且生长状态良好的 A549 细胞随机分为 3 组:两种不同功效中药方剂组,DMEM 培养基阴性对照组。

2.2.2. CCK8 法检测细胞生长抑制率

选择对数生长期,且生长状态良好的 A549 细胞,以 $3 \times 10^4/\text{ml}$ 的密度接种到 96 孔板中,培养过夜。向细胞中添加终浓度分别为 2.5、5、10、20、40、80、160 mg/ml 的两种不同功效中药方剂,设置添加 DMEM 培养基的 A549 细胞为阴性对照组,设置添加 DMEM 培养基为空白组。每组设 3 复孔。培养 48 h 后,常规 CCK8 显色,用全自动酶标仪在波长 450 nm 测定各孔吸光度(OD 值)。计算细胞生长抑制率,抑制率(%) = $[1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}) / (\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值})] \times 100\%$ 。应用加权直线回归分析法计算 IC₅₀ 值。以下实验均选用两种中药方剂的 IC₅₀ 值作为实验浓度。每组实验至少重复 3 次,下同。

2.2.3. 流式细胞仪检测细胞凋亡率

选择对数生长期,且生长状态良好的 A549 细胞,按照 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种到 6 孔板中,培养过夜。向细胞中添加两种不同功效的中药方剂,药物浓度为相对应中药方剂的 IC₅₀ 值,设置添加 DMEM 培养基的 A549 细胞为阴性对照。培养 48 h 后,用不含 EDTA 胰酶消化、离心收集细胞。用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)重悬冲洗、离心收集细胞。用 300 μl Binding Buffer (1:10)重悬细胞,加入 5 μl Annexin V-FITC,混匀后室温避光孵育 15 分钟,再加入 5 μl 溴化丙锭(PI),混匀后室温避光孵育 5 分钟,上流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.2.4. RT-PCR 法检测 A549 细胞 Bcl-2 mRNA 表达

选择对数生长期,且生长状态良好的 A549 细胞,按照 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 的密度接种到 6 孔板中,培养过夜。向细胞中添加两种不同治法的中药方剂,药物浓度为相对应中药方剂的 IC₅₀ 值,设置添加 DMEM 培养基的 A549 细胞作为阴性对照。每组设 3 复孔。培养 48 h 后,用预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗一次,Trizol 裂解细胞,提取 RNA 并检测 RNA 浓度和纯度。将 RNA 反转录为 cDNA。RT-PCR 检测 Bcl-2 mRNA 表达。

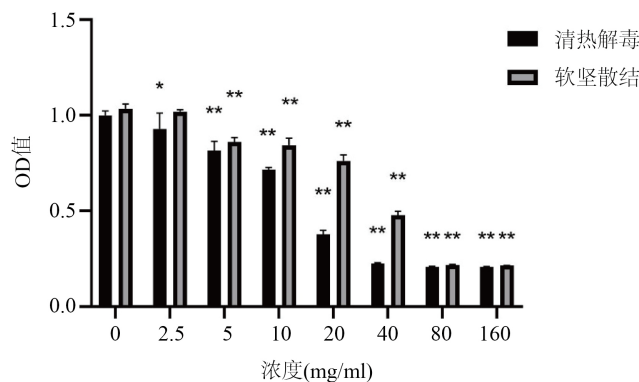
2.2.5. 统计学方法

应用 SPSS 22.0 软件将实验所得数据进行统计分析,所得数据用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用方差分析。 $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, 差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 不同浓度两组中药方剂对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响(图 1)

不同浓度两组中药方剂均呈剂量依赖性抑制人肺腺癌 A549 细胞的增殖。与阴性对照组比较, 2.5 mg/ml 软坚散结方作用于 A549 细胞后吸光度下降, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 余不同浓度两组中药方剂作用于 A549 细胞后吸光度下降, 差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。清热解毒方、软坚散结方的 IC50 值分别为 11.313 mg/ml、23.874 mg/ml。



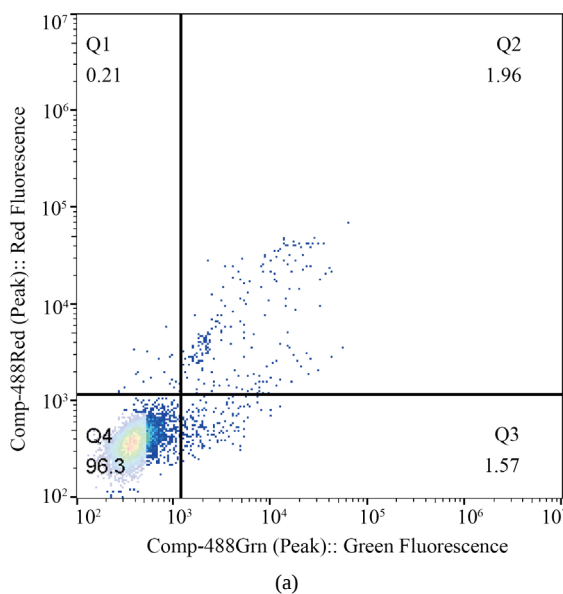
注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

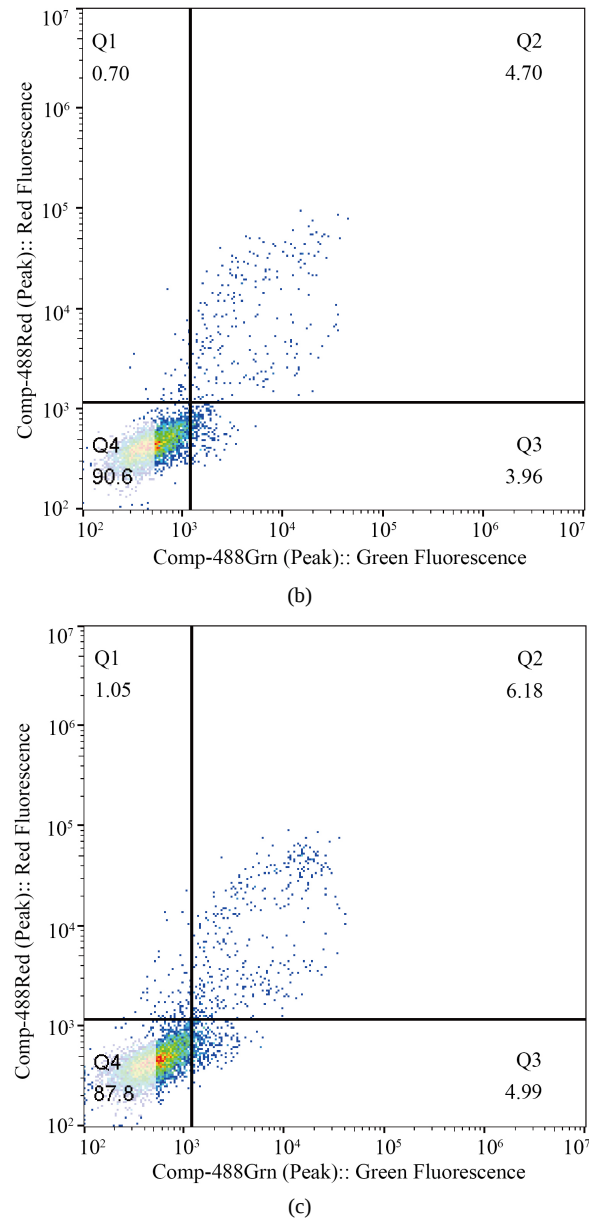
Figure 1. Comparison of absorbance of A549 cells treated with different concentrations of traditional Chinese medicine prescriptions

图 1. 不同浓度两组中药方剂作用于 A549 细胞后吸光度比较

3.2. 细胞凋亡情况(图 2)

细胞经 Annexin V-FITC/PI 染色后, 利用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 清热解毒方、软坚散结方作用于 A549 细胞 48 h 后检测细胞凋亡率(早期凋亡 + 晚期凋亡)分别为 8.66%、11.17%, 与空白对照组(3.53%)比较, 细胞凋亡率增加, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。





注: (a)为阴性对照组, (b)为清热解毒组, (c)为软坚散结组。

Figure 2. Comparison of apoptosis rate of A549 cells treated by two groups of traditional Chinese medicine prescriptions
图 2. 两组中药方剂作用于 A549 细胞后凋亡率比较

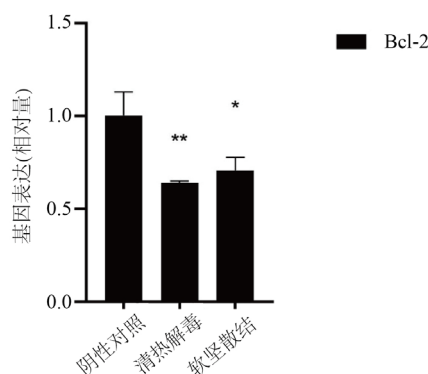
3.3. Bcl-2 mRNA 表达(图 3)

与阴性对照组比较, 清热解毒方、软坚散结方均能不同程度下调 Bcl-2 mRNA 表达, 差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4. 讨论

中医认为, 肿瘤的发生与正气虚损、阴阳失衡、脏腑功能失调、留滞客邪有关, 致使气滞血瘀、痰凝毒聚, 相互胶结日久形成肿瘤[4], 故痰淤热毒、气阴两伤是肺癌的基本病机, 而清热解毒、软坚散结

即成为治疗肺癌的重要治则[3]。



注：与阴性对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

Figure 3. Comparison of relative expression of Bcl-2 mRNA in A549 cells treated with two groups of traditional Chinese medicine

图 3. 两组中药方剂作用于 A549 细胞后 Bcl-2 mRNA 相对表达量比较

研究证实，抑制肿瘤增殖、诱导肿瘤细胞分化和凋亡是中医药抗肿瘤的重要机制[2]。细胞凋亡包括外在的死亡受体通路和内在的线粒体信号通路。Bcl-2 凋亡信号通路为内源性通路，可分为促凋亡蛋白和抑凋亡蛋白两大类，其中 Bax 和 Bcl-2 分别是典型的促凋亡和抑凋亡蛋白。当 Bax 高表达或者 Bcl-2 基因低表达所致其比值上升，Bax 同源二聚体增多，可引起细胞凋亡增加[5]。李小江等观察到具有益气滋阴、活血祛瘀、清热解毒、扶正祛邪功效的消岩汤及其拆方组(清热解毒组、活血化瘀组、益气扶正组)在体外实验中均能抑制人肺腺癌 A549 细胞的生长[6]。研究证实，软坚散结方中多种药物均具有抑制人肺腺癌 A549 细胞的增殖，诱导人肺腺癌 A549 细胞凋亡的作用，其中白花蛇草乙醇提取物可呈剂量依赖性抑制人肺腺癌 A549 细胞的增殖[7]。

本实验采用 CCK8 法观察不同浓度清热解毒方、软坚散结方对人肺腺癌 A549 细胞体外增殖作用的影响，结果提示：不同浓度两组中药方剂均呈剂量依赖性抑制 A549 细胞的增殖，说明清热解毒方、软坚散结方在体外均具有较强的细胞毒性和抑制肿瘤细胞增殖的作用。采用流式细胞仪观察发现，清热解毒方、软坚散结方作用于 A549 细胞 48 h 后细胞凋亡率(早期凋亡 + 晚期凋亡)明显增加，提示两组中药方剂均能不同程度诱导 A549 细胞凋亡。采用 PCR 法观察发现，清热解毒方、软坚散结方均能不同程度下调 Bcl-2 表达，提示两组中药方剂诱导 A549 细胞凋亡的作用机制可能与下调 Bcl-2 mRNA 表达有关。

5. 结论

综上所述，清热解毒方、软坚散结方均具有较强的抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖及诱导细胞凋亡的能力，其共同作用机制可能为通过下调 Bcl-2 mRNA 表达来诱导 A549 细胞凋亡。因此，清热解毒方、软坚散结方均具有较强的抗肿瘤作用，两种中药方剂不同的作用机制有待进一步阐明。

基金项目

山东省中医药科技发展计划项目编号：2017-199；青岛市中医课题编号：2020-zyy062。

参考文献

- [1] Bray, F., et al. (2018) Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide

for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, **68**, 394-424.

<https://doi.org/10.3322/caac.21492>

- [2] 成娅婷, 田成旺, 任涛, 张铁军, 冯霞. 中药治疗非小细胞肺癌的临床应用及作用机制研究进展[J]. 药物评价研究, 2016, 39((2): 293-299.
- [3] 王珊珊. 周仲瑛教授从痰瘀热毒辨治肺癌的临床经验及益肺解毒汤的抗肿瘤实验研究[D]: [博士学位论文]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [4] 郑婷婷, 焦丽静, 阙祖俊, 吴静, 许玲. 中药诱导肿瘤凋亡相关机制研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2016, 50(10): 103-109.
- [5] Singh, R., Letai, A. and Sarosiek, K. (2019) Regulation of Apoptosis in Health and Disease: The Balancing Act of BCL-2 Family Proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **20**, 175-193.
<https://doi.org/10.1038/s41580-018-0089-8>
- [6] 李小江, 贾英杰, 于建春, 张小青, 杜晓玲, 朱津丽, 孟醒. 消岩汤剂拆方配伍对 A549 肺腺癌细胞体外生长抑制作用研究[J]. 天津中医药, 2015, 32(7): 424-427.
- [7] Kuo, Y.J., *et al.* (2015) Ethanol Extract of *Hedyotis diffusa* Willd Upregulates G0/G1 Phase Arrest and Induces Apoptosis in Human Leukemia Cells by Modulating Caspase Cascade Signaling and Altering Associated Genes Expression Was Assayed by cDNA Microarray. *Environmental Toxicology*, **30**, 1162-1177. <https://doi.org/10.1002/tox.21989>