

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.13.010

网络首发 http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1097.r.20190531.1042.002.html(2019-06-04)

白花蛇舌草对 A549 肺癌干细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响

曾 珠¹,何成诗^{2△},孙剑峰¹,刘 磊¹,杨秀丽¹,肖 玮²

(1. 成都中医药大学临床医学院,成都 610075;2. 成都中医药大学附属医院呼吸科,成都 610072)

[摘要] **目的** 探讨白花蛇舌草对肺癌干细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响。**方法** 诱导培养 A549 肺癌干细胞球,免疫组织化学检测 Sox2、Oct4 表达,CCK-8 检测白花蛇舌草提取物对细胞增殖的影响,流式细胞检测白花蛇舌草提取物对细胞凋亡率及细胞周期的影响。**结果** A549 肺癌干细胞中的 CD133 阳性率(70.483 30±0.092 92)%,A549 细胞中仅为(5.056 70±0.185 83)%。Sox2、Oct4 表达在 A549 细胞及 A549 肺癌干细胞中均呈阳性,主要在细胞质,在 A549 肺癌干细胞中染色强度更强。白花蛇舌草能抑制 A549 肺癌干细胞增殖,且呈时间依赖性($P<0.05$);白花蛇舌草使 A549 肺癌干细胞的细胞凋亡率增加($P<0.05$),G₁ 期细胞数目增多($P<0.05$)。**结论** 白花蛇舌草能抑制 A549 肺癌干细胞增殖,促进细胞凋亡,阻滞细胞周期于 G₁ 期。

[关键词] 白花蛇舌草;A549 细胞;肺肿瘤;干细胞

[中图分类号] R285.6

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)13-2202-04

Effect of hedyotis diffusa on proliferation, apoptosis and cell cycle of A549 lung cancer stem cells

ZENG Zhu¹, HE Chengshi^{2△}, SUN Jianfeng¹, LIU Lei¹, YANG Xiuli¹, XIAO Wei²

(1. School of Clinical Medicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610075, China; 2. Respiratory Department, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu, Sichuan 610072, China)

[Abstract] **Objective** To study the effect of hedyotis diffusa on proliferation, apoptosis and cell cycle of lung cancer stem cells. **Methods** The A549 lung cancer stem cell spheres were cultured and induced. The expressions of Sox2 and Oct4 were detected by immunohistochemistry. The CCK8 assay was used to detect the effect of hedyotis diffusa extract on cell proliferation. The flow cytometry was used to detect the effect of hedyotis diffusa extract on the apoptosis rate and cell cycle. **Results** The CD133 positive rate of A549 lung cancer stem cells was (70.483 30±0.092 92)%, which in A549 cells was only (5.056 70±0.185 83)%. Sox2 and Oct4 all showed positive expression in A549 cells and A549 lung cancer stem cells, which was mainly in cytoplasm. The staining intensity was stronger in A549 lung cancer stem cells. Hedyotis diffusa could inhibit the proliferation of A549 lung cancer stem cells, moreover which showed the time dependence ($P<0.05$). Hedyotis diffusa increased the cellular apoptosis rate of A549 lung cancer stem cells ($P<0.05$) and the number of cells in G₁ stage ($P<0.05$). **Conclusion** Hedyotis diffusa can inhibit the proliferation of A549 lung cancer stem cells, promote the cell apoptosis and block the cell cycle at G₁ stage.

[Key words] hedyotis diffusa; A549 cells; lung neoplasms; stem cells

肺癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,随着环境污染及社会、经济等因素的影响,肺癌的发病率和病死率逐年升高。国家癌症中心 2018 年发布的数据显示,我国男性肺癌发病率及病死率均排名第一,我国女性肺癌发病率排名第二,病死率排名第一^[1]。目前国内外研究表明,对于肺癌的治疗依然首选手术,但对大多数患者来说就诊时已属于中晚期肺癌,失去了手术机会,而放、化疗已成为其治疗中不可或缺的重要手段,但其对人体毒副作用大,长期使用降低肿瘤

细胞对其敏感性的缺点限制了临床疗效。中药具有减轻放、化疗毒副作用,改善肿瘤细胞耐药性,增强抗肿瘤作用的重要特点^[2]。白花蛇舌草为茜草科植物的全草,现代研究发现白花蛇舌草在体内均有抗肿瘤作用,其主要作用机制包括抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,增强免疫功能,抑制侵袭和肿瘤细胞的多耐药性等。本实验通过研究白花蛇舌草作用于 A549 肺癌干细胞,探讨其对肺癌干细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响,进一步阐明其抗肿瘤可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肺癌 A549 细胞系购于上海中国科学院细胞库。

1.1.2 主要试剂与仪器 白花蛇舌草(成都中医药大学附属医院中药房);DMEM 培养、胎牛血清(美国 Gibco 公司);青霉素-链霉素溶液 100×(碧云天公司);CD133 抗体(美国 RD 公司);CCK-8 试剂盒(美国 Sigma 公司);Annexin V-PE/7-AAD 流式试剂盒(美国 BD 公司);一抗 Anti Sox2、Anti Oct4(兔来源,美国 Abcam 公司);Cell Cycle and Apoptosis Analysis Kit(美国 BD 公司);低速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);倒置显微镜、照相系统(日本 Olympus 公司);流式细胞检测仪(美国 BD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人肺癌 A549 细胞培养于含 10% 优质胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素双抗的 DMEM 培养基中,2~3 d 换液 1 次,细胞 80% 融合度时传代,可按照 1:3 传代比例进行,于 37 °C 5% CO₂ 及饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 A549 肺癌干细胞诱导 取对数生长期的 A549 细胞,以 1×10⁵ 个/mL 的密度接种到 6 孔板中,用无血清干细胞培养基(DMEM 培养基+4 U/L 胰岛素+1X B27+20 ng/mL EGF+20 ng/mL bFGF)悬浮培养,隔 1~2 d 更换培养基,2~3 周后可见肿瘤细胞球形成,传代用于后续实验。

1.2.3 流式细胞检测 CD133 表达 取对数生长期的 A549 细胞,接种到 6 孔板中,待细胞生长达到 60%~70% 用 0.25% 胰酶消化细胞,离心后用 PBS 重悬细胞,在每个流式检测管或板式微孔中加入 50 μL 的稀释后的抗体(抗体用 Staining Buffer 稀释成合适的浓度)。在空白管/孔中加入 50 μL Staining Buffer,在各管/孔中分别加入 50 μL 细胞悬液,常温孵育 30 min 后加入 Staining Buffer(每个流式检测管中加 2 mL,而每微孔中加 200 μL),离心后重复洗涤 3 次,100 μL 重悬细胞后上流式仪检测^[3-6]。

1.2.4 免疫组织化学检测 Sox2、Oct4 表达 将细胞消化后,用完全培养基重悬调整细胞密度至 2×10⁴ 个/mL,取细胞悬液滴在无菌的 12 孔板中铺上的细胞爬片上,30 min 后在培养皿中补加完全培养液放于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养,用 PBS 漂洗 2 次后用 4% 多聚甲醛固定,再分别经 0.5% Triton X-100 处理(室温)60 min、3% H₂O₂ 处理(室温)15 min,处理前后均用 PBS 洗涤 3 次。山羊血清室温封闭 60 min,取出甩干封闭液(不漂洗),一抗孵育(稀释比 1:200)4 °C 过夜,阴性对照用 PBS 液代替一抗,PBS 清洗标

本 3 次各 5 min,二抗(生物素标记)工作液孵育 37 °C 30 min,PBS 清洗标本 3 次各 5 min,碱性磷酸酶标记的链霉卵白素工作液(湿盒)37 °C 30 min,PBS 清洗标本 3 次各 5 min,DAB 显色(避光,镜下观察至棕色),再用苏木素复染,自来水洗返蓝,梯度乙醇脱水后封片至镜下观察^[7-8]。

1.2.5 CCK-8 检测细胞增殖 取正常生长的 A549 细胞,调整细胞浓度至 1×10⁵ 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μL,每组细胞设 9 个复孔,将 96 孔板移入培养箱中培养(37 °C 5% CO₂),培养 24 h 后实验组按白花蛇舌草提取物 0.5 g/mL 加入细胞中,分别培养 24、48、72 h,每孔加入 10 μL CCK-8 溶液(注意不要产生气泡),于培养箱内孵育 1~4 h,同时设置空白孔(培养基、CCK-8)、对照孔(未经处理的细胞、培养基、CCK-8),用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度值(A 值)^[9]。细胞活力(%)=[A(实验组)-A(空白组)]/[A(对照组)-A(空白组)]×100%,细胞抑制率(%)=[A(对照组)-A(实验组)]/A(对照组)×100%。

1.2.6 流式细胞检测细胞凋亡和周期 将 A549 细胞用 6 孔板培养,待细胞生长达到 60%~70%,对照组加入 DMEM 培养基,实验组加入白花蛇舌草提取物 1 g/mL,胰酶消化收集细胞,用 PBS 洗涤细胞 2 次。在 50 μL 的 Binding Buffer 中加入 5 μL 7-AAD 染液混匀,室温、避光并反应 5~15 min 后再加入 450 μL 的 Binding Buffer 混匀,加入 1 μL AnnexinV-PE 混匀室温、避光、反应 5~15 min,1 h 内进行流式细胞仪的观察和检测。用 70% 乙醇 4 °C 固定 2 h 或更长时间。检测前 PBS 冲洗细胞 1 次,加入 0.5 mL 碘化丙啶染色液,37 °C 避光温浴 30 min。随后 4 °C 或冰浴避光存放,24 h 内用流式细胞仪在激发 488 nm 波长处检测红色荧光,同时检测光散射情况。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞中 CD133 表达情况 A549 肺癌干细胞中 CD133 阳性率(70.483 30±0.092 92)%,A549 细胞中仅为(5.056 70±0.185 83)%,经传代培养后诱导形成的细胞球富含肺癌干细胞。

2.2 细胞中 Sox2、Oct4 表达情况 通过免疫组织化学检测出 Sox2、Oct4 表达在 A549 细胞及 A549 肺癌干细胞中均呈阳性,主要在细胞质中表达,在 A549 肺癌干细胞中染色强度更强,见图 1~3。在视野为 200 倍的高倍镜下选取 10 个视野求平均阳性细胞率,Sox2 在 A549 细胞及 A549 肺癌干细胞中的阳性细胞

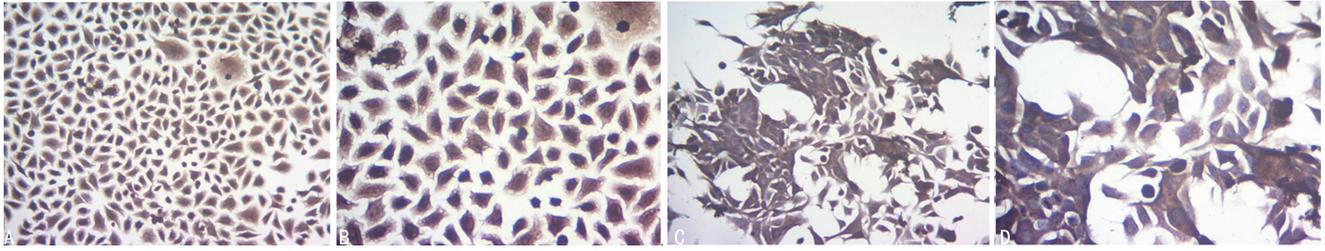


图 1 DAB 免疫组织化学染色检测 Sox2 表达

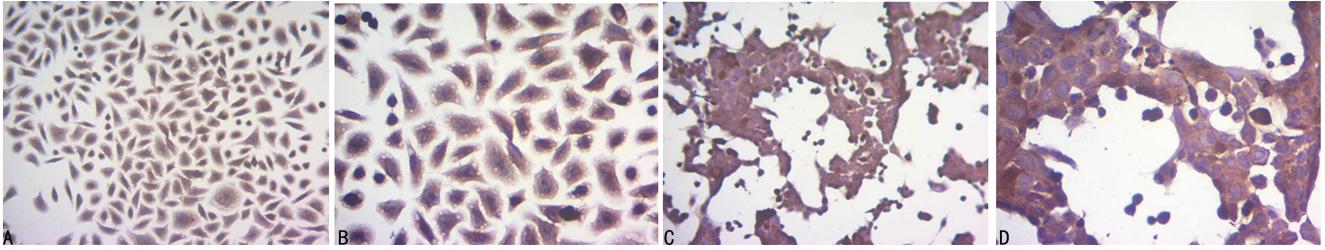


图 2 DAB 免疫组织化学染色检测 Oct4 表达

率分别为 63.33%、86.67%，Oct4 阳性细胞率分别 74.30%、84.30%，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

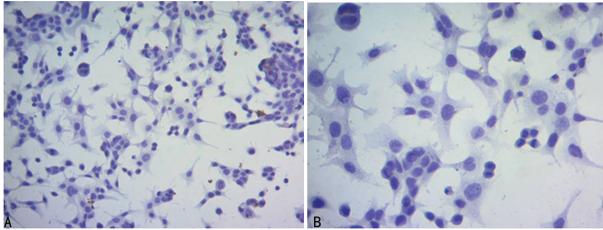


图 3 阴性对照免疫组织化学检测

2.3 白花蛇舌草对 A549 肺癌干细胞增殖的影响
空白组各时间点 A 值差异无统计学意义($P > 0.05$), 其余两组在不同时间点 A 值差异有统计学意义($P < 0.05$), 实验组 A 值较对照组低($P < 0.05$), 见表 1。白花蛇舌草作用于肺癌干细胞 24、48、72 h 对细胞增殖的抑制力分别为 9.88%、19.35%、26.20%，随着时间的延长细胞的活力越来越低, 细胞的抑制率越来越高。

表 1 各组不同时间段 A 值($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	48 h	72 h
空白组	0.000 600 ± 0.000 529	0.000 967 ± 0.001 097	0.000 667 ± 0.000 416
对照组	0.363 270 ± 0.004 910	0.550 900 ± 0.002 257	0.736 000 ± 0.012 046
实验组	0.324 700 ± 0.006 154	0.444 300 ± 0.012 733	0.543 200 ± 0.021 554

2.4 白花蛇舌草对 A549 肺癌干细胞凋亡的影响
经白花蛇舌草干预后细胞凋亡率为(27.903 30 ± 0.405 26)%, 对照组细胞凋亡率为(5.063 30 ± 0.150 11)%, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 见表 2。

2.5 白花蛇舌草对 A549 肺癌干细胞细胞分裂周期

的影响 经白花蛇舌草干预后处于 G₁ 期的细胞数明显增多, S 期的细胞数明显减少, 细胞分裂停滞于 G₁ 期, 见表 3。

表 2 两组细胞凋亡率比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
对照组	4.570 00 ± 0.095 39	0.493 30 ± 0.550 80	5.063 30 ± 0.150 11
实验组	23.896 70 ± 0.380 18	4.006 70 ± 0.025 17	27.903 30 ± 0.405 26

表 3 两组细胞周期分布($\bar{x} \pm s$)

组别	G ₁	S	G ₂
实验组	67.246 70 ± 0.598 69	12.926 70 ± 0.550 80	19.830 00 ± 0.565 60
对照组	57.170 00 ± 0.517 30	31.843 30 ± 0.150 11	10.986 70 ± 0.620 11

3 讨论

肺癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 严重威胁着人类生命健康, 其发病的分子机制尚未完全明确。肺癌干细胞是来源于肺癌组织中可被特异性标志物标记, 具有多向分化、自我更新、无限增殖等生物学特征的异质性细胞群, 其与肺癌的侵袭、复发转移、耐药等恶性生物学特征密切相关^[10]。肿瘤干细胞多呈静息状态, 不仅能逃脱针对此细胞增殖的损伤, 而且凭借其较强的修复能力, 能对已造成的损伤进行最大程度的修复。肺癌干细胞表面转运蛋白能将化疗药物转运至胞外, 降低细胞内药物浓度以减轻化疗产生的影响^[11-12]。随着对肺癌研究的不断深入, 越来越多的证据表明肺癌的复发、转移及其对放、化疗的耐受等生物学特性均与肺癌干细胞有关。中医因思路独到, 治疗方案个体化, 化学结构特殊而具有作用多靶点、疗效确切及不良反应轻等特点, 近年来成为肺

癌干细胞研究领域的新方向。

在古代中医并没有肺癌的病名,可归入“肺积”“肺壅”“肺疽”“肺痛”“痞癖”“咳嗽”“咯血”等范畴。肺癌的病性属于本虚标实,基本病因病机属于正虚邪毒,与痰浊聚肺、情志失调、烟毒内蕴等有关。正气亏虚,脏腑气血阴阳失调,成为肺癌发病的基础。一方面肺为娇脏,邪气从外而入,邪毒内蕴,导致肺失宣降,肺气闭郁,气滞血瘀,日久积块;另一方面津液输布不利,积聚成痰,痰阻脉络,血行不畅,痰瘀互结,从而形成肿块^[13]。有研究表明,在肺癌发生、发展的某些阶段,热毒是肺癌的主要致病因素之一,热邪稽留,蒸灼津液,炼液为痰,痰阻经络,气血运行不畅,热、痰、瘀互结,形成热毒,阻塞脏腑经络形成癌肿,临床表现为发热、疼痛、局部灼热、肿块增大等症状,治疗应以清热解毒为主^[14]。

白花蛇舌草属于清热解毒类中药,微苦、甘、寒。归胃、大肠、小肠经,具有清热解毒、利湿通淋等功效,临床上多应用于痈肿疮毒、咽喉肿痛、毒蛇咬伤、热淋涩痛、湿热黄疸等症^[15]。有研究表明^[16],其主要化学成分有蒽醌类、环烯醚萜苷类、黄酮类、三萜类、甾醇类、香豆素类、烷烃等,能增强免疫活性、抗氧化和抗肿瘤活性。

本研究结果显示,经白花蛇舌草干预后的 A549 肺癌干细胞培养 24、48、72 h 后细胞的增殖力明显受到抑制,细胞凋亡率增加,其细胞周期处于 G₁ 期的细胞数大幅度增加,处于 S 期的细胞数明显减少,表明白花蛇舌草能促进细胞凋亡,阻滞肺癌干细胞的细胞周期。与普通体细胞相比,机体成体干细胞的细胞周期多处于 G₁ 期,当机体组织受到损伤或刺激时,干细胞可由静息期进入增殖、分化期,通过完成细胞的增殖和分化以修复机体。肝癌干细胞也具备这个特点,处于 G₁ 期的细胞具有较强的增殖和分化潜能。白花蛇舌草的干预明显减少了 A549 肺癌干细胞 G₁ 期细胞的数量,从而抑制了恶性细胞的增殖和分化能力。

综上所述,肺癌干细胞是肿瘤细胞增殖、分化及自我更新的母细胞,白花蛇舌草能有效地抑制肺癌干细胞的增殖,促进肺癌干细胞凋亡,阻滞肺癌干细胞的细胞周期,从而达到治疗肺癌的目的,但其具体的作用机制还有待进一步研究。

参考文献

[1] 陈万青,孙可欣,郑荣寿,等. 2014 年中国部分地区恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2018,27(1):1-14.

- [2] 凌昌全. 中医药在防治肿瘤中的作用和地位[J]. 中国中西医结合杂志,2007,27(5):390-391.
- [3] 马雪曼,张培彤. CD133 肿瘤干细胞标志物在肺癌中的应用进展[J]. 中国肿瘤,2014,23(3):224-227.
- [4] 王耀焯,张培彤. 肺癌干细胞标志物研究现状[J]. 中国肿瘤,2015,24(8):671-676.
- [5] SARVI S, MACKINNON A C, AVLONITIS N, et al. CD133⁺ cancer stem-like cells in small cell lung cancer are highly tumorigenic and chemoresistant but sensitive to a novel neuropeptide antagonist[J]. Cancer Res,2014,74(5):1554-1565.
- [6] TAN Y, CHEN B, XU W, et al. Clinicopathological significance of CD133 in lung cancer: a meta-analysis[J]. Mol Clin Oncol,2014,2(1):111-115.
- [7] ZHU J Y, YANG X, CHEN Y, et al. Curcumin suppresses lung cancer stem cells via inhibiting wnt/ β -catenin and sonic hedgehog pathways[J]. Phyt Res,2017,31(4):680-688.
- [8] ZAKARIA N, MOHD YUSOFF N, ZAKARIA Z, et al. Inhibition of NF- κ B signaling reduces the stemness characteristics of lung cancer stem cells[J]. Front Oncol,2018,8:166.
- [9] 杨明,陈静,易娟,等. 纳米雄黄对肺癌 A549 细胞及其肿瘤干细胞的凋亡诱导作用[J]. 中药药理与临床,2010,26(6):39.
- [10] LIU L, ZHANG L, YANG L, et al. Anti-CD47 antibody as a targeted therapeutic agent for human lung cancer and cancer stem cells[J]. Front Immunol,2017,404(8):3389-3398.
- [11] SHIOTANI B, KOBAYASHI M, WATANABE M, et al. Involvement of the ATR and ATM dependent checkpoint responses in the cell cycle arrest evoked by pierisin-1[J]. Mol Cancer Res,2006,4(2):125-133.
- [12] 杨栋,张培彤. 肺癌干细胞研究进展[J]. 中国肿瘤,2015,24(7):574-580.
- [13] 苏婉,徐振彤. 历代中医医籍中肺癌相关文献概述[J]. 中医文献杂志,2010,28(1):53-55.
- [14] 石文静,谭佳妮,沈卫星,等. 清热解毒与以毒攻毒治法在肿瘤治疗中的比较研究[J]. 时珍国医国药,2017,28(9):2184-2186.
- [15] 马超,朴惠善. 白花蛇舌草的研究进展[J]. 时珍国医国药,2006,17(2):269-270.
- [16] 于亮,王芳,郭琪,等. 白花蛇舌草的化学成分及其药理活性研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2017,34(12):1104-1114.

(收稿日期:2019-01-16 修回日期:2019-04-04)