

榄香烯对肺癌 A549 细胞凋亡影响及分子机制研究

王斌梁, 蔡媛媛, 张蓉映

浙江省台州市第一人民医院呼吸内科, 浙江 台州 318020

摘要: **目的** 研究榄香烯对肺癌 A549 细胞的抑制作用及分子机制。 **方法** 取肺腺癌细胞株 A549, 分别以 10 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、160 $\mu\text{g/mL}$ 榄香烯处理, 标记为观察组 1~5, 并设空白对照组 6。于处理 24 h、48 h、72 h 后, 以流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡率, 以 Western Bolt 法检测真核起始因子 4E(eIF4E) 蛋白水平。 **结果** ①处理 24 h 后, 各组细胞周期无明显变化, G_2/M 期、sub- G_1 期细胞比例差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 处理 48 h、72 h 后, 观察组 G_2/M 期细胞比率较对照组显著性下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 但观察组组内时点比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 榄香烯浓度越高, 抑制作用越明显。②随药物浓度增长, 细胞凋亡率显著性提升。③相较于对照组, 处理 24 h 后, 观察组 eIF4E 表达呈下降趋势, 且浓度越高, 表达越低。 **结论** 榄香烯对肺癌 A549 细胞抑制作用强, 其对细胞周期的影响存在剂量与时间依耐性; 细胞凋亡率随药物浓度增加而增加, 但过高剂量可能导致毒副作用, 降低凋亡率; 对 A549 细胞增殖抑制的生理机制可能与抑制 eIF4E 表达有关。

关键词: 榄香烯; 肺癌 A549 细胞; 细胞凋亡; 分子机制

中图分类号: R 734.2 **文献标志码:** A

Elemene's effect on apoptosis of human lung cancer cells of A549 and its related molecular mechanisms

WANG Bin-liang, CAI Yuan-yuan, ZHANG Rong-ying

Department of Respiratory Disease, the First People's Hospital of Taizhou, Zhejiang 318020, China

Abstract: **Objective** To study the inhibitory effect and molecular mechanism of elemene on A549 lung cancer cells. **Methods** Lung adenocarcinoma cancer cells A549 were treated with elemene of 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$, 80 $\mu\text{g/mL}$, 160 $\mu\text{g/mL}$, marked as observation group 1~5, with a blank control group 6 set up. The cell cycle and cell apoptosis rate were detected with flow cytometry at 24 h, 48 h, 72 h after elemene treatment, and eIF4E protein levels by Western Bolt method. **Results** (1) At 24 h after treatment, there was no obvious change in each cell cycle, and the difference in cell percentage in G_2/M phase, the sub- G_1 phase was of no statistical significance ($P > 0.05$); and at 48 h, 72 h after treatment, the cell ratio in observation group during G_2/M phase was significantly decreased compared with control group, and the difference between the two was statistically significant ($P < 0.05$), but compared within the observation point, there was no statistical difference ($P > 0.05$); The higher the concentration of elemene was, the more obvious was its inhibitory effect. (2) With the growth of drug concentration, the cell apoptosis rate was markedly elevated. (3) In comparison with control group, 24 h after treatment, eIF4E expression in observation group was on the decline. And the higher the concentration was, the lower was the expression. **Conclusion** The inhibitory effect of elemene on A549 lung cancer cell is strong, and its influence on cell cycle is of dependency on dose and time; Cell apoptosis rate increased with the increase of drug concentration, but higher doses can cause side effects, reduce the apoptosis rate; Physiological mechanism of A549 cell proliferation inhibition may be related to expression of inhibiting eIF4E.

Key words: Elemene; Lung cancer cells of A549; Cell apoptosis; Molecular mechanisms

榄香烯是温莪术挥发油提取物, 临床研究提示其

有一定抗肿瘤能力, 且可逆转常规化疗所致多药耐药性^[1]。其抗肿瘤能力主要表现为阻滞细胞周期, 诱

【作者简介】王斌梁(1978—), 男, 副主任医师, 硕士

导细胞凋亡,可与其他部分抗肿瘤药物协同作用^[2]。部分研究指出其对肺癌具有确切的疗效^[3],但现阶段对其最佳作用时间、最佳作用浓度及相关分子机制研究尚不深入,临床应用可能错误估计药物毒性及与其它药物的拮抗作用,造成不良后果。真核起始因子 4E (eIF4E) 蛋白是 eIF 家族成员之一,与 mRNA 5' 帽子结合,eIF4E 作为真核生物起始因子参与 mRNA 翻译。有研究证实,eIF4E 高表达对细胞生长有加速作用,使细胞发生形态改变,少数可出现癌变,而 eIF4E 低表达时则表述细胞生长缓慢。因此,eIF4E 蛋白可反映细胞存活状态,已成为肺癌细胞 A549 细胞凋亡的主要观察因子。基于此,本研究应用不同浓度榄香烯处理肺癌 A549 细胞,试图探究其分子作用机制,以期有效指导临床用药。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

肺腺癌 A549 细胞株由华中科技大学同济医学院检验科惠赠;RPML1640 培养基由 Gibco Co. US 生产;胎牛血清由杭州四季青公司生产;榄香烯注射液由大连金港制药公司生产;庆大霉素由贵州天地药业有限责任公司生产;Western Blot 试剂盒由上海生物工程有限公司生产;ECL 发光试剂盒由 ABI Co. US 生产。

1.2 主要仪器

流式细胞仪:型号 FAC Scma,由 Becton Dickison Co. US 生产;电子显微镜:型号 HITACHI - 600,由日本 HITACHI 公司生产;自动酶标读数仪:型号 Bio - Rad - 2500,由 Becton Dickison Co. US 生产。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 以 RPML1640 培养基混合 10% 胎牛血清、100 U/mL 庆大霉素培养 A549 细胞株,置入 5% CO₂ 恒温细胞培养箱,环境温度为 37℃。以 0.02% 乙二胺四乙酸 (EDTA)、0.25% 胰蛋白酶配置消化液。每周换液 2~3 次,以消化液处理后传代。配置榄香烯培养液,控制浓度分别为 10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL、80 μg/mL、160 μg/mL (标记为观察组 1~5)。以对数成长期细胞为对象,消化液处理,计数,稀释,接种 200 μL 于三块 96 孔板,分别加入不同浓度榄香烯培养液 20 μL,并设空白对照组 (仅接种细胞,标记为对照组 6),空白组排除溶剂影响,另设 1 组肺上皮细胞正常系 (7 组)。每时间段都包含 9 组相同标本,用于计算平均值降低误差。

1.3.2 细胞周期及细胞凋亡率检测 置入 5% CO₂ 恒温细胞培养箱。分别于培养 24 h、48 h、72 h 后,各

取 1 块 96 孔板开展试验。消化并离心,磷酸盐缓冲液冷洗 2 次,以预冷 70% 乙醇 1 mL 固定,恒温保存至次日。弃上清液,置入 0.5 mL 磷酸盐缓冲液,加入 10 μL 核糖核酸酶 (10 mg/mL),水浴 0.5 h,加入 10 μL 碘化丙啶 (0.5 mg/mL) 染色,避光混合 0.5 h,以流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡率。

1.3.3 eIF4E 蛋白表达 用 Western Bolt 法检测 eIF4E 蛋白水平,以经榄香烯处理的 A549 细胞为对象,冰上裂解,离心,取上清液备用;配置分离胶,浓缩胶,电泳,转膜;加入一抗 3 mL,4℃ 环境下孵育至次日,弃一抗,洗涤;加入二抗 6 mL,室温环境下摇床孵育 1 h,弃二抗,洗涤;行 ECL 显色,显影并定影。

1.4 统计学方法

计量资料均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组内多时点比较行重复测量方差分析检验,两时点比较行 *t* 检验;组间比较行 Dunnett - *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具备统计学意义。

2 结果

2.1 A549 细胞周期变化

组间比较:作用 24 h 后,观察组 1~5 较对照组 6,A549 细胞周期无显著变化;作用 48 h 及 72 h 后,G₂/M 期细胞比例显著性下降,sub - G₁ 期比例显著性提升,上述差异均具备统计学意义 ($P < 0.05$),且观察组 4 作用效果显著性强于观察组 3 ($P < 0.05$)。组内时点比较:观察组 1~5 G₂/M 期细胞比例均呈显著下降趋势,而 sub - G₁ 期比例呈显著上升趋势 ($P < 0.05$),但 48 h 和 72 h 相关比例对比,差异则无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 A549 细胞凋亡结果

作用 24 h、48 h 及 72 h 后,A549 细胞均出现凋亡,组间对比提示,药物浓度越高,凋亡率越高;组内时点对比提示,作用时间越长,凋亡率越高。上述差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

形态学分析进一步提示:作用 72 h 后,10 μg/mL 药物浓度下,细胞形态无明显变化;20 μg/mL 及 40 μg/mL 下细胞体积缩小,异形细胞数量增加;80 μg/mL 下,出现一定量坏死细胞,多散在膨大,染色质疏松,部分胞膜破裂;160 μg/mL 下,可见大量细胞碎片,正常形态细胞不可见,多为固缩或膨大细胞。结合 7 组正常肺细胞系结果,榄香烯培养液浓度为 80 μg/mL 时为最佳用量。

2.3 A549 细胞 eIF4E 蛋白表达结果

作用 24 h、48 h 及 72 h 后,A549 细胞 eIF4E 蛋

白表达阳性率均出现下降,组间对比提示,药物浓度越高,阳性率越低;组内时点对比提示,作用时间越长,阳性率越低。上述差异均具备统计学意义($P < 0.05$)。见表 3。

表 1 A549 细胞周期变化($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	项目	24 h	48 h	72 h	F 值
1	G ₂ /M 期	15.83 ± 0.25	12.87 ± 1.37 ^a	11.20 ± 1.52 ^a	5.331 ^b
	sub - G ₁	0.71 ± 0.06	1.84 ± 0.42 ^a	1.88 ± 0.51 ^a	5.942 ^b
2	G ₂ /M 期	15.71 ± 0.29	11.79 ± 1.52 ^a	11.17 ± 1.82 ^a	6.371 ^b
	sub - G ₁	0.69 ± 0.05	1.93 ± 0.53 ^a	2.01 ± 0.63 ^a	6.660 ^b
3	G ₂ /M 期	15.75 ± 0.28	10.24 ± 1.27 ^a	9.43 ± 1.88 ^a	6.942 ^b
	sub - G ₁	0.70 ± 0.08	2.37 ± 0.67 ^a	2.45 ± 0.73 ^a	7.258 ^b
4	G ₂ /M 期	15.68 ± 0.22	7.21 ± 0.82 ^{c a}	6.59 ± 1.05 ^{c a}	15.761 ^b
	sub - G ₁	0.72 ± 0.05	5.84 ± 1.21 ^{c a}	6.03 ± 1.08 ^{c a}	22.581 ^b
5	G ₂ /M 期	15.73 ± 0.24	6.17 ± 0.93 ^a	5.91 ± 0.87 ^a	18.384 ^b
	sub - G ₁	0.73 ± 0.08	6.68 ± 0.57 ^a	6.73 ± 0.82 ^a	28.541 ^b
6	G ₂ /M 期	15.84 ± 0.22	15.82 ± 0.27	15.80 ± 0.52	0.518
	sub - G ₁	0.72 ± 0.06	0.73 ± 0.08	0.77 ± 0.09	0.628

注:a 表示与组 6 对比,差异有统计学意义($P < 0.05$);b 表示 $F < 3.40$,差异有统计学意义($P < 0.05$);c 表示与组 3 对比,差异有统计学意义($P < 0.05$)

表 2 A549 细胞凋亡结果($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	24 h	48 h	72 h	F 值
1	0.94 ± 0.12 ^{a b}	2.82 ± 0.67 ^{a b}	7.31 ± 1.13 ^{a b}	4.835 ^c
2	1.33 ± 0.18 ^{a b}	4.59 ± 0.54 ^{a b}	9.72 ± 1.03 ^{a b}	6.941 ^c
3	1.93 ± 0.22 ^{a b}	8.37 ± 1.52 ^{a b}	15.51 ± 2.31 ^{a b}	12.854 ^c
4	3.52 ± 0.31 ^a	15.63 ± 1.82 ^{a b}	22.51 ± 2.61 ^{a b}	18.541 ^c
5	6.31 ± 1.42 ^{a b}	19.54 ± 3.51 ^{a b}	28.54 ± 3.05 ^{a b}	21.215 ^c
6	0.12 ± 0.05	0.14 ± 0.08	0.16 ± 0.08	0.954
7	3.48 ± 0.28	3.31 ± 0.52	3.21 ± 1.25	1.013

注:a 表示与组 6 对比,差异有统计学意义($P < 0.05$);b 表示与组 7 比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);c 表示 $F < 3.40$,差异有统计学意义($P < 0.05$)

表 3 A549 细胞 eIF4E 蛋白阳性率($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	24 h	48 h	72 h	F 值
1	76.4 ± 1.2 ^a	69.4 ± 1.1 ^a	61.0 ± 1.8 ^a	6.371 ^b
2	68.6 ± 2.0 ^a	60.2 ± 1.2 ^a	51.0 ± 1.5 ^a	6.052 ^b
3	60.3 ± 1.2 ^a	55.8 ± 1.3 ^a	48.2 ± 2.1 ^a	5.153 ^b
4	51.7 ± 2.1 ^a	44.2 ± 1.8 ^a	36.1 ± 1.3 ^a	8.631 ^b
5	40.3 ± 1.3 ^a	28.3 ± 1.5 ^a	20.3 ± 0.9 ^a	7.232 ^b
6	88.9 ± 2.5	86.3 ± 1.7	87.4 ± 1.6	0.753

注:a 表示与组 6 对比,差异有统计学意义($P < 0.05$);b 表示 $F < 3.40$,差异有统计学意义($P < 0.05$)

3 讨论

肺癌极具威胁性,5 年致死率高达 85.0% 以上,其发病隐秘,初期往往无明显表现,以至于患者接受治疗时已处于中晚期,错过最佳手术时机。因此,药物及化疗方案已成为治疗肺癌最主要的方案之一。

榄香烯为国家批准二类抗癌药物,本研究可直接证实其对肺癌 A549 细胞具有较好的抵抗作用,主要表现为:阻滞细胞进入 G₂/M 期,并诱导凋亡,此论点在谢恬等^[4]的综述性研究中有系统性的总结。本研究各组对比还可进一步提示,榄香烯的抗肿瘤作用与药物浓度及作用时间有关:浓度越高、作用时间越长,肺癌 A549 细胞 G₂/M 期比例越低,sub - G₁ 期比例越高,细胞凋亡率亦呈现相类似趋势。然而从凋亡细

胞形态学分析却能看出,盲目加大药物剂量、延长作用时间,有可能带来较强的毒副作用:当药物浓度达到 160 μg/mL 后,细胞坏死率提升,而自发性死亡率下降,这显然不利于肺癌的长期治疗^[5-6]。在王晓瑾等^[7]关于胃癌的研究中获得了类似的结论。因此我们建议,应用榄香烯 80 μg/mL,持续作用 48 h 以达到最佳效果。

考虑榄香烯诱导凋亡主要通过阻滞细胞周期引起,而 eIF4E 为真核生物主要起始因子之一,与细胞生长有直接关系^[8],且部分研究提示,eIF4E 高表达可能导致细胞形态变化,形成癌变细胞^[9]。因此,我们推测,榄香烯抗癌的分子机制可能是抑制 eIF4E 的高表达。行 Western Bolt 法检测 eIF4E 蛋白水平直接

证实了该论点:组 1~5 eIF4E 蛋白表达均受到抑制,且抑制效果与药物浓度及作用时间成正比。

eIF4E 在正常机体中亦有一定表达,主要作用为抑制正常细胞凋亡,保证细胞存活率。临床研究显示,其在多类恶性肿瘤组织及周围组织中均有过度表达,且表达越高,肿瘤侵袭转移能力越高^[10]。亦有研究提示,eIF4E 表达越高,癌症预后越差。因此,榄香烯的抗 eIF4E 作用可能为治疗肿瘤另辟一条有效途径。

本研究主要获得了两方面的成果:第一,以 80 $\mu\text{g/mL}$ 榄香烯持续作用 48 h,对肺癌 A549 细胞的抑制效果最佳,药物毒性相对可控;第二,榄香烯的抗肿瘤作用分子机制可能在于其可有效抑制 eIF4E 蛋白的表达。

参考文献

- [1] 黄汉昌,朱宏吉,姜招峰,等. 银离子配位色谱法分离香茅次油中 β -榄香烯的研究[J]. 无机化学学报,2009,25(3):433-438.
- [2] 周蕾. 榄香烯联合紫杉醇脂质体加顺铂化疗治疗非小细胞肺癌的疗效分析[J]. 中国肿瘤临床,2010,37(7):411-412.

- [3] 肖震宇,刘华峰,邓江华,等. 榄香烯注射液联合放疗治疗肺癌脑转移的疗效及对血清基质金属蛋白酶-2 和-9 的影响[J]. 中国老年学杂志,2012,32(15):3209-3210.
- [4] 谢恬,花宝金,孙敏,等. 榄香烯临床研究进展[J]. 中国肿瘤临床,2009,36(22):1318-1320.
- [5] 范钰,满昌峰,徐娟,等. 榄香烯超顺磁性隐形纳米脂质体对肿瘤 Hep-2 细胞克隆形成和侵袭的影响[J]. 中华实验外科杂志,2014,31(3):619-620.
- [6] 王丽华,沈芳. 榄香烯乳剂联合 NP 方案治疗晚期非小细胞肺癌的疗效观察[J]. 中国癌症杂志,2010,20(7):547-550.
- [7] 王晓瑾,赵晓莹,诸琦,等. β -榄香烯对胃癌及胃癌耐药细胞杀伤作用的实验研究[J]. 中华消化杂志,2010,30(3):189-192.
- [8] 蔡东焱,高翔,吴小红,等. β -榄香烯注射液联合紫杉醇注射液对乳腺癌 MB-468 细胞体外协同作用研究[J]. 中国中西医结合杂志,2013,33(7):978-982.
- [9] 贺仕才,刘俊松,张正良,等. β -榄香烯对胃癌 MKN28 细胞放射增敏作用的研究[J]. 中华外科杂志,2014,52(6):442-445.
- [10] 张晔,宋娜,刘云鹏,等. β -榄香烯逆转胃癌细胞株阿霉素耐药性的作用及机制研究[J]. 中国医科大学学报,2011,40(11):968-970,993.

(收稿日期:2015-06-24)

(上接第 689 页)

② 高血压的诊治:患者高血压病史 4 年,无肾功能改变,排除继发性高血压的可能,诊断为原发性高血压伴有糖尿病。复方短效制剂降压药对血糖及血压的控制较不利,改用长效 ARB 或者 ACEI 类对血压控制及靶器官均有保护作用,目前患者单药应用血压控制在 130/80 mmHg 以下较为理想。

③ 高脂血症的诊治:根据患者的血脂检查结果诊断为高脂血症,且结合有糖尿病、高血压病史,并伴有颈动脉有斑块形成,LDL-C 应控制在 1.8 mmol/L 以下,口服他汀类药物后定期随访复查肝功能及肌酸激酶同工酶(CK-MB)。

④ 糖尿病的并发症:患者糖尿病病程 6 年,颈动脉及下肢动脉有斑块形成,考虑大血管病变。出现双足底蚁行感考虑周围神经病变的可能性较大,可以在社区医院应用 TCSS^[1] 评分,大于 6 分者为阳性。TCSS 阳性者可以转至上级医院做肌电图进一步明确诊断。社区卫生服务中心为社区居民解决常见病、多发病,随着病情的变化,有些社区不具备的检查项目可以通过双向转诊的绿色通道为患者提供便捷有效的服务,加强与上级医院的沟通,形成一个有机的整体,使患者得到完整、连续的治疗。

⑤ 辅助检查:肌电图检查明确诊断,皮肤感染不

愈为继发性感染,患者还应做眼底检查排除微血管病变可能。如出现视网膜病变应去二、三级医院眼科进行进一步诊治。

⑥ 降糖药的选择:由于病程长,且胰岛功能逐年减退,口服降糖药效果差,特别是急性皮肤感染时改用胰岛素治疗,在短期内能使血糖控制正常,有利于伤口愈合。在选择胰岛素的种类时可根据血糖的情况而定,如胰岛素控制血糖不理想可联合口服药物。治疗的同时应监测空腹、三餐后及临睡前血糖,根据血糖变化灵活调整用量,控制血糖的同时也要避免低血糖的发生。

⑦ 加强门诊随访:其目的为加强糖尿病患者健康教育,提高对疾病的认识,同时提高患者对糖尿病的并发症的认识,合理饮食,戒烟限酒,改善生活方式,建立患者长效自我管理机制(定期监测血糖、HbA_{1c}、血压、心电图、肝肾功能、眼底、尿微量白蛋白,定期作 B 超、周围神经等检查)。

参考文献

- [1] 胡泓,李红,郑芬萍,等. 不同神经病变评分系统在不症状糖尿病周围神经病变筛查中的临床价值比较[J]. 中华内科杂志,2012,51(1):13-17.

(收稿日期:2015-09-25)