

木姜子乙酸乙酯提取物对肺癌 A549 细胞的作用

任思淼 余明霞 张止雨 王静*

宿州学院, 生物与食品工程学院, 中国·安徽 宿州 234000

摘要: 为研究木姜子乙酸乙酯提取物对肺癌 A549 细胞增殖、转移及凋亡等能力的影响。采用回流萃取方法得到木姜子乙酸乙酯提取物后, 用系列浓度的药物培养 A549 细胞, 设置空白对照, 观察细胞加药前后的形态变化; CCK8 法检测木姜子提取物对细胞增殖的影响; 平板克隆形成实验检测木姜子提取物对细胞克隆形成能力的影响; hoechst 33342 染色法检测木姜子提取物对细胞凋亡的影响; 划痕试验检测木姜子提取物对细胞转移能力的影响。结果发现木姜子乙酸乙酯提取物可以抑制 A549 细胞的转移能力并且能够促进其凋亡。

关键词: 木姜子提取物; 肺癌 A549 细胞; 凋亡; 转移

The Effect of Ethyl Acetate Extract of Wood Ginger on Lung Cancer A549 Cells

Simiao Ren Mingxia Yu Zhiyu Zhang Jing Wang*

Suzhou University, College of Biology and Food Engineering, Suzhou, Anhui, 234000, China

Abstract: To investigate the effects of ethyl acetate extract on the proliferation, metastasis, and apoptosis of lung cancer A549 cells. After obtaining the ethyl acetate extract of Litsea using reflux extraction method, A549 cells were cultured with a series of concentrations of μg s, and a blank control was set to observe the morphological changes of the cells before and after μg addition; CCK8 assay was used to detect the effect of ethyl acetate extract on cell proliferation; Plate clone formation experiment was used to detect the effect of ethyl acetate extract on cell clone formation ability; detect the effect of ethyl acetate extract on cell apoptosis using hoechst 33342 staining method; scratch experiment was used to detect the effect of ethyl acetate extract on cell metastasis ability. A series of experimental results were obtained, and it was found that ethyl acetate extract can inhibit the metastasis ability of A549 cells and promote their apoptosis. The ethyl acetate extract can inhibit the expression level of target pathway proteins. The conclusion is that the ethyl acetate extract of Litsea can significantly inhibit the proliferation and metastasis of lung cancer A549 cells, and promote their apoptosis.

Keywords: litsea extract; lung cancer A549 cells; apoptosis; transwell

0 前言

恶性肿瘤是现代社会的威胁人类健康的重要杀手, 而肺癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。肺癌确诊时多属晚期。目前, 肺癌的治疗主要依靠外科切除、外科联合辅助治疗、化疗、放疗、靶向治疗等治疗方法, 虽然治疗方案和给药系统的更新在一定程度上使患者的生存率得到提高, 但肿瘤的复发以及耐药性所带来的沉重经济负担难免会给患者的家庭、生活带来冲击。因此, 积极开展不同的治疗模式, 致力于解决成本、疗效问题, 具有一定的意义。天然产物以其明确的抗癌活性、候选资源具有丰富性等优势, 成为抗癌药物研发的重中之重。木姜子, 系樟科木姜子属, 落叶小乔木木姜子种, 目前研究表明它具有抗菌、消炎、抗肿瘤等生物活性。目前国内外对木姜子属植物的研究很少, 且木姜子的抗肿瘤作用研究报道不多。本实验将有助于提高临床对木姜子提取物的认识和了解其合理利用的方法, 主要通过实验探究木姜子提取物对肺癌细胞 A549 的增殖、转移及凋亡能力的影响, 为临床上对肺癌的治疗提供理论依据^[1]。

1 实验与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器

旋转蒸发仪、水浴锅、烘箱、恒温培养箱、移液枪、细胞培养平板、marker 笔、离心机、无菌操作台、OLYMPUSCX-40 倒置相差显微镜 (日本 OLYMPUS) 等。

1.1.2 主要试剂

肺癌 A549 细胞, hamsF-12k 基础培养液 (规格 500mL, 批号 WH01152101XP01), 黔产的木姜子果实, PBS (自配灭菌), 胰蛋白酶, 冻存液 (基础培养液: 胎牛血清: DMSO=7:2:1), DMSO, 去离子水, 胎牛血清 (规格 100mL, 批号 140208, 杭州四季青公司), 95% 的乙醇、乙酸乙酯、乙醚等。

1.2 实验方法

1.2.1 制备木姜子乙酸乙酯提取物

称取 250.00g 木姜子, 40℃干燥 24h, 研碎。按照料液比 1:5 (g/mL) 量加入石油醚浸泡。浸泡 24h 后, 利用真空泵进行抽滤, 将滤渣加入圆底烧瓶中, 按照料液比

1 : 5 (g/mL) 的量加入无水乙醇 70℃回流提取 3 次, 每次 2h, 合并 3 次滤液, 弃滤渣, 45℃, 转速 80 对滤液进行浓缩, 得木姜子粗提取物浸膏。向木姜子粗提取物中加入适量水分散, 再加入适量乙酸乙酯进行萃取, 重复上述操作三次, 合并有机相液体, 丢弃水相。后用旋转蒸发器浓缩乙酸乙酯萃取所得有机相, 设置温度 50℃, 转速 80。浓缩后将浓缩液分别放置于蒸发皿中, 水浴锅 75℃水浴至乙酸乙酯完全蒸发即得到木姜子乙酸乙酯提取物。

1.2.2 肺癌 A549 细胞的培养

在含 10% 的胎牛血清的 hamsF-12k 完全培养液中接种 A549 细胞, 放置于 37℃, 5%CO₂ 饱和湿度下的标准培养箱中进行培养, 定时观察肺癌 A549 细胞的形态。

1.2.3 CCK8 法检测木姜子乙酸乙酯提取物对肺癌细胞 A549 的增殖的影响

取处于对数生长期、生长状况良好的肺癌 A549 细胞, 以每孔 1×10^4 个肺癌 A549 细胞接种 96 孔培养板, 分别加入 $200\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $25\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $12.5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $6.25\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的木姜子乙酸乙酯提取物, 每孔分别加入 100 μL , 每一组设置 6 个复孔; 将培养板置于 37℃的 5%CO₂ 饱和湿度的标准培养箱中培养 24h, 48h 和 72h, 加 10 μL 质量浓度为 $5\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ CCK8 溶液, 用酶联免疫检测仪检测 A450nm 值。通过公式计算 A549 细胞增殖抑制率 (inhibition ratio) = (对照组 A450nm- 实验组 A450nm) \times 100/ 对照组 A450nm, 求 IC50 值。

1.2.4 平板克隆形成实验检测细胞 A549 克隆形成能力

将处于对数生长期的肺癌 A549 细胞以每孔 1000 个接种于六孔板中, 培养过夜, 加入浓度梯度为 $0\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $25\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $50\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $100\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 木姜子乙酸乙酯提取物供试液, 放置 37 摄氏度, 5%CO₂ 及饱和湿度的标准培养箱中正常培养 48h, 弃去含药培养基, 加入新鲜的完全培养基继续培养, 2~3 天换液一次, 直到观察到培养皿中出现 A549 细胞克隆时终止培养, 加入 5mL 4% 多聚甲醛固定液固定细胞 15 分钟, 吸去甲醛, 加 1mL 结晶紫染色液染色 20 分钟, 加入 PBS 清洗染色液 2 次, 每次 2 分钟。在显微镜下找到大于 10 个细胞的克隆并记录克隆形成数。

1.2.5 细胞迁移实验检测木姜子乙酸乙酯提取物对 A549 细胞迁移能力的影响

取处于对数生长期的肺癌 A549 细胞接种在 35mm 培养皿中, 用 10 μL 的移液枪小心地划出划痕, 用无菌 PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木姜子乙酸乙酯提取物作用 48h, 每组 3 个复孔, 于 24h 及 48h 时, 在显微镜下拍照记录, 而后测量划痕宽度, 计算细胞迁移率, 实验重复进行 3 次。

1.2.6 Hoechst33342 染色法检测细胞凋亡

Hoechst33342 染色法: 将处于对数生长期的肺癌 A549 细胞, 按照 1×10^6 个细胞 / 孔的浓度接种于六孔板中, 放

置于孵箱中培养过夜。细胞培养过夜后加入系列木姜子乙酸乙酯提取物, 其终浓度为 $0\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $50\mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $100\mu\text{g}/\text{mL}$, 继续培养 24h。弃去培养基, 加入 PBS 缓冲液轻轻洗, 加入 1mL4% 多聚甲醛固定液, 在 4℃环境下固定半小时, 吸弃固定液, 加入 PBS 缓冲液洗涤 3min, 每孔加入 1mL 的 Hoechst33324 染色液, 置于摇床上, 染色 5min, 置于荧光显微镜下观察细胞的凋亡情况, 并拍照保存。

2 结果与分析

2.1 CCK8 法检测木姜子正丁醇提取物和乙酸乙酯提取物对肺癌细胞 A549 的增殖的影响

木姜子乙酸乙酯提取物作用 24h、48h、72h 的抑制率见表 1。

表 1 木姜子乙酸乙酯提取物作用 24h、48h、72h 的抑制率

木姜子乙酸乙酯提取物 / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	24h 抑制率 / %	48h 抑制率 / %	72h 抑制率 / %
0	0 ± 3.33	0.01 ± 2.41	0 ± 6.68
3.125	6.63 ± 2.51	1.88 ± 4.48	$(-1.58) \pm 1.07$
6.25	15.38 ± 7.98	4.31 ± 4.41	$(-0.88) \pm 1.07$
12.5	$23.76 \pm 1^{**}$	$20.21 \pm 3.56^{**}$	$27 \pm 2.63^{**}$
25	$42.61 \pm 2.6^{**}$	$40.2 \pm 0.96^{**}$	$48.23 \pm 1.87^{**}$
50	$47.17 \pm 2.07^{**}$	$60.74 \pm 1.84^{**}$	$73.62 \pm 1.59^{**}$
100	$53.87 \pm 1.84^{**}$	$65.61 \pm 1.07^{**}$	$75.39 \pm 0.29^{**}$
200	$53.55 \pm 0.74^{**}$	$68.34 \pm 0.4^{**}$	$78.2 \pm 0.41^{**}$

CCK8 实验结果如上, 培养 24h 随着乙酸乙酯提取物浓度的提高抑制率提高抑制效果明显, 在 $50\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及以上浓度作用效果和对照组相比差异明显 ($P < 0.05$), IC50 值 $84.5 \pm 6 \mu\text{g}/\text{mL}$; 培养 48h 随着乙酸乙酯提取物浓度的提高抑制率提高在大于 $25\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度作用效果与对照组相比差异明显 ($P < 0.05$), IC50 值 $52.1 \pm 2.4\mu\text{g}/\text{mL}$ 。培养 72h 随着乙酸乙酯提取物浓度的提高抑制效果明显, 当浓度大于 $12.5\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 抑制效果和对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), IC50 值 $28.2 \pm 1.5\mu\text{g}/\text{mL}$, 综上木姜子乙酸乙酯提取物对肺癌细胞 A549 的抑制有时间和浓度依赖性。

2.2 Hoechst33342 染色观察木姜子乙酸乙酯提取物处理 48h 后 A549 细胞

Hoechst33342 染色观察木姜子乙酸乙酯提取物处理 48h 后 A549 细胞见图 1。

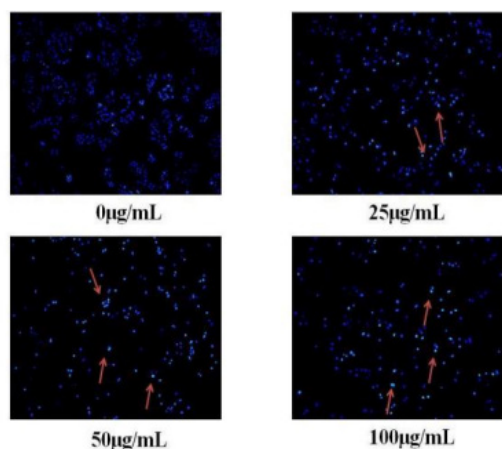


图 1 Hoechst333342 染色观察木姜子乙酸乙酯提取物处理 48h 后 A549 细胞

Hoechst 染色观察结果显示用不同浓度的乙酸乙酯提取物 (0 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$) 处理细胞, 细胞增殖速度明显减慢, 细胞逐渐分散, 细胞变圆且与周围环境脱离, 折光率明显减弱, 细胞核浓缩, 且部分 A549 细

胞不再贴壁生长, 悬浮分散于完全培养液中, 高剂量组可明显观察到蓝色 DNA 荧光较强的细胞 (见红色箭头所指), 被判定为凋亡细胞。综上所述, 木姜子乙酸乙酯提取物能够促进肺癌 A549 细胞的凋亡, 且此作用呈浓度依赖性。

2.3 平板克隆形成实验

如图 2 所示, 与空白对照相比, 加药浓度梯度为 25 $\mu\text{g/mL}$ 、50 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 的木姜子乙酸乙酯提取物组 A549 细胞克隆形成率明显降低, 有统计学意义 ($P < 0.05$); 与空白对照相比, 木姜子乙酸乙酯提取物低浓度组 (12.5 $\mu\text{g/mL}$) A549 的克隆形成率和细胞活性差异不明显 ($P > 0.05$), 木姜子乙酸乙酯提取物中浓度组 (25 $\mu\text{g/mL}$) 及木姜子乙酸乙酯提取物高浓度组 (50 $\mu\text{g/mL}$) A549 细胞的克隆形成数明显降低, 差异显著 ($P < 0.05$)。

2.4 细胞迁移实验检测木姜子乙酸乙酯提取物对 A549 细胞迁移能力的影响

与对照组相比, 木姜子乙酸乙酯提取物组中细胞迁移率明显降低, 对照组 48h 迁移率为 33%, 给药组迁移率仅有 7% (见图 3)。

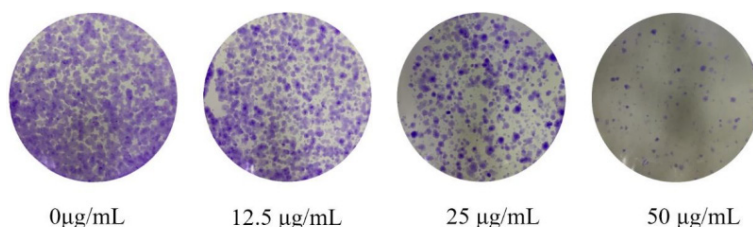


图 2 A549 细胞克隆形成数

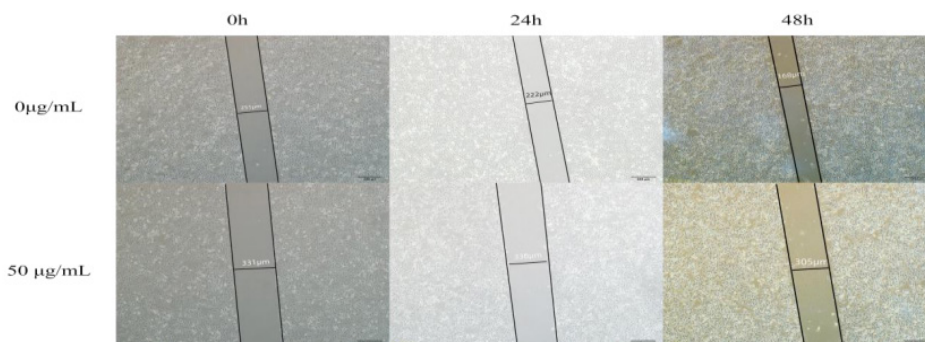


图 3 胞迁移实验观察木姜子乙酸乙酯提取物处理 24h、48h 后对 A549 细胞迁移影响

3 讨论

肺癌是所有癌症中比较难以解决的存在, 它的危险性系数位居所有癌症第一。国内外关于木姜子治疗肺癌方面的研究很少, 因此通过研究木姜子抗肺癌来探寻天然药物治疗肿瘤方面的进展是有重大意义的。本实验首先通过 CCK8 法检测木姜子乙酸乙酯提取物对肺癌 A549 细胞增殖能力的影响, 而后通过细胞划痕试验探究 A549 细胞的迁移情况, 与空白组相比, 给药组细胞迁移能力明显降低, 这就明显说明木姜子乙酸乙酯提取物有抑制肺癌细胞转移的能力。肺癌

细胞的快速增殖是加快患者死亡的主要原因之一^[2], 传统的化疗过程对于患者的副作用相对较大, 因此为了避免化疗等物理疗法的较大副作用, 本课题组在致力寻找一个副作用相对较小, 获取资源丰富的抗癌药物, 减少对患者治疗过程的伤害, 郭晨旭等^[3,4]发现藏族药翼首草正丁醇部位提取物可体外抑制人肝癌 Hep3B 细胞增殖和侵袭转移。近些年木姜子这一中草药出现在人们的视野, 实验研究也表明这一药物对于肺癌细胞的抑制作用明显。本实验以肺癌细胞 A549 为体外研究模型, 首先通过 CCK8 实验检测木姜子乙酸乙酯提取物对肺癌细胞 A549 增殖的抑制率和 IC50 值^[5,6]。并通

过倒置显微镜观察加药后 A549 细胞的形态变化^[7]。平板克隆形成实验检测木姜子乙酸乙酯提取物对肺癌细胞 A549 增殖的影响。实验结果表明在用药时间大于 48h 的情况下,质量浓度 $50\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 及以上的木姜子乙酸乙酯提取物对 A549 细胞的增殖抑制率达到 70% 以上。综上所述,木姜子乙酸乙酯提取物可以有效抑制肺癌细胞 A549 的增殖,对于抑制增殖的机制和安全剂量要求还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 谭冠文,朱朱,周文静.苦参碱通过TLR3下调PI3K/Akt通路抑制子宫肌瘤细胞的增殖、侵袭和迁移[J].中国免疫学杂志,2022,38(21):2601-2605.
- [2] 米卫国,张伟,刘建军,等.土贝母含药血清对人肺癌细胞增殖和凋亡影响[J].陕西汉中,2021,7(7):16-23.
- [3] 郭晨旭,吴迎春,朱元章,等.藏族药翼首草正丁醇部位提取物体外抑制人肝癌Hep3B细胞增殖和侵袭转移[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(3):100-105.
- [4] 王丽娟,张迎春.大豆苷抑制A549细胞增殖和迁移的实验研究[J].沈阳医科大学学报,2021,30(2):3069-3078.
- [5] 舒琪瑾,李萍,王彬彬.南方红豆杉水提取物对人肺癌A549细胞增殖/抑制作用的研究[J].首届“之江中医药论坛”暨浙江省中医药学会2011年学术年会论文集,2011,8(11):36-63.
- [6] 刘倩,汤建华,张志华.雷公藤甲素对非小细胞肺癌细胞系A549增殖的抑制和凋亡的诱导[J].基础医学与临床,2020,12(3):12-23.
- [7] Chen J, Zhao J, Ma R, et al. Pognostic significance of E-cad-herin expression in hepatocellular carcinoma. A meta-analysis[J]. PLoS One,2014,9(8):e103952.

作者简介:任思淼(2004-),女,中国安徽合肥人,本科,从事天然产物抗肿瘤活性研究。

通信作者:王静(1989-),女,中国安徽宿州人,博士,副教授,从事抗炎及抗肿瘤药物的机制研究。

基金项目:安徽省自然科学基金青年资助项目(项目编号:2208085QH261);宿州学院博士启动基金项目(项目编号:2019jb06);省级大学生创新创业训练计划项目(项目编号:ZCXM24-188)。