

急性子中 balsaminone A 和 balsaminone B 对人肺癌 A549 细胞生长及周期的影响

裴 慧^{1,2}, 钱士辉^{2,①}

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046; 2. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210028)

摘要: 应用 MTT 法和流式细胞仪研究了急性子(*Impatiens balsamina* L.) 中双萜呋喃-7,12-酮类化合物 balsaminone A 和 balsaminone B 对人肺癌 A549 细胞生长及周期的影响。结果表明:20、40、60 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A 和 B 作用 48 h 均对 A549 细胞生长的抑制作用显著($P < 0.05$), 其吸光值均显著低于阴性对照且随浓度的提高逐渐降低, 但均高于阳性对照(100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-氟尿嘧啶); 各处理组 A549 细胞的生长抑制率均低于阳性对照组, 其中 60 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A 处理组的生长抑制率接近阳性对照。balsaminone A 作用 48 h 使 DNA 合成前期(G_0/G_1 期)的细胞比例减少, DNA 合成期(S 期)和 DNA 合成后期(G_2/M 期)的细胞比例增加, 但无明显的量效关系; 而 balsaminone B 作用 48 h 使 G_0/G_1 期的细胞比例减少, S 期的细胞比例明显增加, 呈明显的量效关系。研究结果显示: balsaminone A 和 B 对 A549 细胞的生长均具有显著的抑制作用, 二者的作用机制可能与诱导细胞周期阻滞有关但有一定的差异。

关键词: 急性子; balsaminone A; balsaminone B; 人肺癌 A549 细胞; 生长抑制; 细胞周期

中图分类号: Q949.755.7; R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2011)02-0015-04

Effects of balsaminone A and balsaminone B from *Impatiens balsamina* seed on growth and cycle of human lung cancer A549 cell PEI Hui^{1,2}, QIAN Shi-hui^{2,①} (1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China; 2. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2011, 20(2): 15-18

Abstract: The effects of dinaphthofuran-7, 12-dione derivatives, which are balsaminone A and balsaminone B, from *Impatiens balsamina* L. seed on growth and cycle of human lung cancer A549 cell were studied by MTT assay and flow cytometry. The results show that both balsaminone A and B with 20, 40, 60 and 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ have significant inhibition effects on growth of A549 cell after 48 h ($P < 0.05$), and their absorption values, which gradually decrease with enhancing of concentrations, all are lower than those of the negative control but higher than those of the positive control (100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-FU). The growth inhibition rate of A549 cell in all treatment groups is lower than that of the positive control group, in which, that in 60 and 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A treatment groups is close to that of the positive control. Balsaminone A leads to decreasing of cell proportion in DNA presynthesis phase (G_0/G_1 phase) and to increasing of cell proportion in DNA synthesis phase (S phase) and DNA postsynthesis phase (G_2/M phase) after 48 h with an unobvious dose-effect relationship. While balsaminone B leads to decreasing of cell proportion in G_0/G_1 phase and to evidently increasing of cell proportion in S phase after 48 h with an obvious dose-effect relationship. It is suggested that balsaminone A and B have significant inhibition effects on growth of A549 cell, their action mechanism may be related to induction of cell cycle arrest but their effects exist some differences.

Key words: seed of *Impatiens balsamina* L.; balsaminone A; balsaminone B; human lung cancer A549 cell; growth inhibition; cell cycle

收稿日期: 2010-12-23

基金项目: 江苏省公益研究项目(BM2006104)

作者简介: 裴 慧(1987—), 女, 江苏连云港人, 硕士研究生, 主要从事中药品质评价方面的研究。

①通信作者 E-mail: njqsh2005@126.com

中药急性子为凤仙花科(Balsaminaceae)植物凤仙花(*Impatiens balsamina* L.)的干燥成熟种子^[1],中国大部分地区均有分布,资源丰富。急性子具有破血软坚、消积的功效,其味微苦、性温,有小毒;入肝、脾经、降气行瘀,主治经闭、噎膈、腹部肿块、骨哽咽喉和外疡坚块^[1];临床上可用于避孕^[2],终止早孕^[3],食管贲门癌及梗阻、癌症、肿瘤^[4],闭经和骨质增生等^[5]。现代药理学研究表明:急性子具有促透皮、抗生育、抗肿瘤及抗菌等作用。

细胞异常增殖是恶性肿瘤的生物学特征之一,检测药物是否影响肿瘤细胞的增殖活性通常是筛选抗肿瘤药物的主要方法。MTT法(噻唑蓝法)是最为常用的方法之一,该法灵敏度高,线性关系好,简便、经济、快速,广泛应用于大规模抗肿瘤药物筛选、细胞毒性实验以及肿瘤放射敏感性测定等方面^[6]。

作者以人肺癌A549细胞株为实验对象,对从急性子中分离得到的双萜呋喃-7,12-酮类化合物balsaminone A和balsaminone B体外抑制肿瘤细胞生长的作用以及对细胞周期的影响进行研究,以期为抗肿瘤中药的开发和临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人肺癌A549细胞株购自中国科学院上海生命科学研究所生物化学与细胞生物学研究所。

急性子购自江苏省盱眙县中药饮片厂,经江苏省中医药研究院钱士辉研究员鉴定为凤仙花的干燥成熟种子。采用体积分数80%和60%乙醇加热回流提取,并经溶剂萃取、D101大孔树脂富集、硅胶柱层析、Sephadex LH-20和ODS柱层析以及重结晶等方法获得提取物,再经¹H-NMR、¹³C-NMR、MS、IR和UV等方法鉴定结构,并参照文献^[7]的数据鉴定提取物为balsaminone A和balsaminone B,经HPLC检测纯度均大于98%。临用时用DMEM培养液分别配制成不同浓度备用,其中DMSO终浓度小于体积分数0.5%。

主要试剂包括:DMEM完全培养基(美国GIBCO公司,批号:450542)、新生牛血清(兰州民海生物工程公司,批号:080508)、MTT(美国AMRESCO公司,批号:0793)、胰酶(美国AMRESCO公司,批号:0458)、碘化吡啶(PI染液,美国Sigma公司)、核糖核酸酶(美国Sigma公司)、TritonX-100(美国

AMRESCO公司,批号:010T0405)、DMSO(美国AMRESCO公司,批号:019D0404)和5-氟尿嘧啶(天津金耀氨基酸有限公司,批号:0710052)。

主要仪器包括:HERA Cell 150 CO₂细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific Inc.)、CKX31 SF倒置相差显微镜(日本OLYMPUS公司)、Thermo Scientific Multiskan Spectrum全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific Inc.)、MH-1403平板振荡器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司)和FACS Calibur流式细胞仪(美国BD公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将A549细胞接种在含体积分数10%灭活小牛血清的DMEM完全培养基上,置于温度37℃、饱和湿度、5%CO₂培养箱内培养。细胞呈单层生长,当细胞单层面积长至培养瓶瓶底面积70%~80%时传代。实验均在细胞对数生长期进行。

1.2.2 细胞生长抑制率的测定 采用MTT法^[8]测定A549细胞的生长抑制率。取对数生长期的A549细胞,用质量体积分数0.25%胰酶和质量体积分数0.02%EDTA混合消化液消化,用含体积分数10%灭活小牛血清的DMEM完全培养基将细胞密度调整至 $5 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,接种到96孔培养板中,每孔100 μL细胞悬液;继续培养24 h后,吸弃培养液;处理组分别添加含不同浓度balsaminone A和balsaminone B的培养液90 μL至终浓度为20、40、60和80 μmol·L⁻¹,阴性对照添加含PBS的DMEM完全培养基90 μL,阳性对照添加含5-氟尿嘧啶的DMEM完全培养基90 μL至最终质量浓度100 mg·L⁻¹;每处理及阴性、阳性对照均设6个复孔,并设空白调零孔;继续培养48 h,每孔加入5 g·L⁻¹MTT 10 μL;继续培养4 h,吸弃上清液,每孔加入100 μL DMSO,振荡10 min,溶解结晶;用酶标仪测定波长570 nm处的吸光值(A),实验重复3次。计算A549细胞的生长抑制率,公式为:生长抑制率=[(A_{阴性对照}-A_{用药})/A_{阴性对照}]×100%。

1.2.3 细胞周期检测 取对数生长期的A549细胞制成单细胞悬液,调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,接种于6孔板中,每孔2 mL细胞悬液;培养24 h后,处理组分别添加含不同浓度balsaminone A和B的培养液2 mL至终浓度为20、40、60和80 μmol·L⁻¹,对照组添加含体积分数10%灭活小牛血清的DMEM完全培养基2 mL,重复3次;培养48 h后分别收集细胞,并于1500 r·min⁻¹离心5 min,PBS洗涤后,经300目

尼龙网过滤,调整细胞密度至 $1 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$;加入由 $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ PI 和 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ RNase A 组成的染液 1 mL , $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光染色 30 min 后采用流式细胞仪检测,参照文献[9]的方法分析 A549 细胞的周期。

1.3 数据统计处理

采用 SPSS 15.0 统计软件对数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有统计学差异。用 Modfit 软件对荧光强度进行分析,并据此计算出 DNA 合成前期、DNA 合成期和 DNA 合成后期细胞的比例。

2 结果和分析

2.1 对 A549 细胞的生长抑制作用

采用 MTT 法检测不同浓度 balsaminone A 和 B 对人肺癌 A549 细胞的生长抑制作用,结果见表 1。与阴性对照组相比,20、40、60 和 $80 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A 和 B 对 A549 细胞生长有显著抑制作用 ($P < 0.05$),各处理组的吸光值均显著低于阴性对照组;且随着二者浓度的提高,对 A549 细胞的生长抑制率均呈逐渐增加的趋势,这一作用具有明显的量效关系。但各处理组的吸光值均大于阳性对照组 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-氟尿嘧啶),其中, balsaminone B 各处理组的吸光值与阳性对照组有较大差异,而 20 和 $40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A 处理组的吸光值与阳性对照组也有较大差异,但 60 和 $80 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A 处理组的吸光值与阳性对照组的差异较小。由生长抑制率可见:各处理组对 A549 细胞的

表 1 不同浓度 balsaminone A 和 balsaminone B 对人肺癌 A549 细胞的生长抑制作用 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾
Table 1 The growth inhibition effect of different concentrations of balsaminone A and balsaminone B on human lung cancer A549 cell ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

处理 Treatment	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	A_{570}	生长抑制率/% Growth inhibition rate
CK1	-	1.379 ± 0.701	-
CK2	-	0.305 ± 0.026 *	77.882
Balsaminone A	20	0.692 ± 0.043 *	49.819
	40	0.423 ± 0.036 *	69.326
	60	0.351 ± 0.008 *	74.547
	80	0.328 ± 0.041 *	76.215
Balsaminone B	20	0.617 ± 0.053 *	55.257
	40	0.605 ± 0.031 *	56.128
	60	0.551 ± 0.007 *	60.044
	80	0.532 ± 0.020 *	61.421

¹⁾ CK1: 阴性对照 Negative control; CK2: 阳性对照 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-氟尿嘧啶) Positive control ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-FU). *: 与阴性对照相比差异显著 ($P < 0.05$) Significant difference compared with the negative control ($P < 0.05$).

生长抑制率均低于阳性对照组,其中 20、40、60、 $80 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone B 处理组和 20、 $40 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A 处理组的生长抑制率与阳性对照组差异较大,而 60 和 $80 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A 对 A549 细胞的生长抑制率接近阳性对照组。

2.2 对 A549 细胞周期分布的影响

人肺癌 A549 细胞的细胞周期特点是细胞群分布于细胞的各个时期。经不同浓度 balsaminone A 和 B 处理后 A549 细胞各时期的比例见表 2。

表 2 不同浓度 balsaminone A 和 balsaminone B 对人肺癌 A549 细胞周期分布的影响 ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾
Table 2 Effects of different concentrations of balsaminone A and balsaminone B on distribution of cycle of human lung cancer A549 cell ($\bar{X} \pm SD$)¹⁾

处理 Treatment	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration	比例/% Proportion		
		G_0/G_1	S	G_2/M
对照 CK	-	82.393 ± 1.764	13.108 ± 1.255	4.498 ± 0.592
Balsaminone A	20	75.785 ± 3.696 *	17.483 ± 2.411	6.733 ± 1.366
	40	74.427 ± 6.014 *	17.750 ± 4.627 *	7.820 ± 2.415 *
	60	74.485 ± 4.466 *	18.553 ± 2.809 *	6.960 ± 2.312
	80	74.380 ± 6.226 *	16.713 ± 3.740	8.905 ± 2.573 *
	对照 CK	-	82.091 ± 2.015	14.152 ± 2.698
Balsaminone B	20	78.643 ± 2.393	17.903 ± 0.080 *	3.913 ± 2.800
	40	77.493 ± 2.955	19.090 ± 0.635 *	3.417 ± 2.503
	60	75.467 ± 3.147 *	20.713 ± 1.832 *	3.863 ± 1.386
	80	74.740 ± 2.681 *	21.417 ± 1.381 *	3.843 ± 1.519

¹⁾ G_0/G_1 : DNA 合成前期 DNA presynthesis phase; S: DNA 合成期 DNA synthesis phase; G_2/M : DNA 合成后期 DNA postsynthesis phase. *: 与各自的对照相比差异显著 ($P < 0.05$) Significant difference compared with the respective control ($P < 0.05$).

20、40、60 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A 作用于 A549 细胞 48 h 后,各处理组 DNA 合成前期(G_0/G_1 期)的细胞比例均较对照显著减少($P < 0.05$);DNA 合成期(S 期)的细胞比例均较对照有所增加,其中,40 和 60 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A 处理组与对照差异显著;DNA 合成后期(G_2/M 期)的细胞比例也均较对照有所增加,其中,40 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone A 处理组与对照差异显著。研究表明;balsaminone A 作用于 A549 细胞,但无明显的量效关系。

20、40、60 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone B 作用于 A549 细胞 48 h 后,各处理组 G_0/G_1 期的细胞比例均较对照减少,其中,60 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone B 处理组与对照差异显著;S 期的细胞比例均较对照显著增加;各处理组 G_2/M 期的细胞比例与对照差异不大,但 20、60 和 80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone B 处理组较对照小幅增加,而 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ balsaminone B 处理组较对照小幅减少。研究表明;balsaminone B 作用于 A549 细胞的 G_0/G_1 期和 S 期,且有明显的量效关系。

3 讨 论

恶性肿瘤细胞异常增殖是其生物学特征之一,而肿瘤的发生是细胞增殖与细胞凋亡相互拮抗的最终结果,由于细胞凋亡的存在,拮抗了细胞的加速增殖,维持细胞自身稳定,在临床上常通过各种方法和手段诱发肿瘤细胞发生凋亡,从而达到治疗肿瘤目的。

本文的研究结果表明:从急性子中分离得到的 balsaminone A 和 balsaminone B 对人肺癌 A549 细胞的生长均具有较为显著的抑制作用,其生长抑制率随 2 个化合物浓度的提高而增强,具有明显的量效关系。但这 2 个化合物对 A549 细胞生长的抑制作用低于常用的药物 5-氟尿嘧啶,推测其原因与化合物浓度、抑制作用的机制等多种因素有关,有待进一步的研究证实。

供试的 2 个化合物对人肺癌 A549 细胞周期均有

影响。balsaminone A 能导致 A549 细胞 DNA 合成前期(G_0/G_1 期)的细胞比例减少、DNA 合成期(S 期)和 DNA 合成后期(G_2/M 期)的细胞比例增加,说明 balsaminone A 主要是将人肺癌 A549 细胞的生长周期阻滞在 S 期和 G_2/M 期,从而抑制 A549 细胞生长。balsaminone B 则能导致 A549 细胞中 G_0/G_1 期的细胞比例减少、S 期的细胞比例增加,且这一作用具有明显的量效关系,而对 G_2/M 期细胞则无明显作用,说明 balsaminone B 主要是将 A549 细胞的生长周期阻滞在 S 期,阻止细胞进入 G_2/M 期,从而抑制 A549 细胞的生长。推测这 2 个化合物对人肺癌 A549 细胞不同的作用机制可能与 balsaminone A 结构中包含羟基而 balsaminone B 结构中包含葡萄糖苷基有关。balsaminone A 和 B 对 A549 细胞周期的影响机制可能是影响细胞周期蛋白的合成,也可能是通过其他途径影响基因表达,其作用机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版(一部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 247.
- [2] 肖培根. 新编中药志: 第二卷 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2002: 523-524.
- [3] 赵良倩. 中西医结合终止早孕 120 例临床观察 [J]. 江苏中医药, 2002, 23(9): 25-26.
- [4] 李秉英, 田文军. 自拟参河口服液结合化疗治疗晚期消化道肿瘤临床观察 [J]. 山西中医, 1993, 9(5): 11-12.
- [5] 马有运. 急性子临床应用举隅 [J]. 上海中医药杂志, 2007, 41(1): 78.
- [6] Ishiguro K, Ohira Y, Oku H. Antipruritic dinaphthofuran-7,12-dione derivatives from the pericarp of *Impatiens balsamina* [J]. J Nat Prod, 1998, 61(9): 1126-1129.
- [7] 张均田. 现代药理实验方法: 上册 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998: 819.
- [8] Spector D L, Goldman R D, Leinwand L A. 细胞实验指南: 上册 [M]. 黄培堂, 等, 译. 北京: 科学出版社, 2001: 119.
- [9] Theiszová M, Jantová S, Dragúňová J, et al. Comparison the cytotoxicity of hydroxyapatite measured by direct cell counting and MTT test in murine fibroblast NIH-3T3 cells [J]. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2005, 149(2): 393-396.

(责任编辑: 张明霞)