

王 泽, 张 林, 冯振兴, 等. 北虫草水提物对不同人肺腺癌细胞生长活性的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(6): 297–299.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.06.098

北虫草水提物对不同人肺腺癌细胞生长活性的影响

王 泽¹, 张 林¹, 冯振兴¹, 王升厚^{2,3}

(1. 沈阳师范大学化学与生命科学学院, 辽宁沈阳 110034; 2. 沈阳师范大学实验教学中心, 辽宁沈阳 110034;

3. 沈阳虫林密宝北虫草食品科技有限公司, 辽宁沈阳 110034)

摘要:用 MTT 法检测北虫草水提物(CME)抑制 3 组人肺癌细胞生长活性的时效和量效特征,通过 Hoechst33258 对 CME 处理的人肺癌细胞进行凋亡染色,分析 CME 对人肺腺癌细胞株 A549、SPC、LTE 生长活性的影响。结果表明: CME 对 3 株人肺癌细胞株的生长活性均具有明显抑制作用,但呈不同的剂量及时间依赖特征;A549 对 CME 浓度、时间变化比较敏感,其次为 SPC;LTE、SPC、A549 组半数抑制浓度分别为 250、500、2 000 mg/L, A549 组的抑制率低于其他 2 组;Hoechst33258 染色初步确定 CME 通过诱导细胞凋亡发挥抗肺癌作用;北虫草具有较为广泛的抗肺腺癌效果,其中对 LTE 的抑制效果最为稳定;CME 作为肺癌治疗的辅助抑制物具有较好的开发利用前景。

关键词:北虫草水提物;人肺腺癌细胞;凋亡

中图分类号: S567.3⁺50.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)06-0297-03

北虫草别称蛹虫草、武氏虫生菌、蛹草等,与冬虫夏草同为一类珍稀药用真菌,均为虫草属真菌的模式种。现代药理学试验证明,人工培育北虫草的主要药理活性成分与天然冬虫夏草十分相近^[1-3],被认为是最有希望成为日益枯竭的天然冬虫夏草的理想替代品,但其在抗肿瘤功效等方面仍存在较多质疑。目前对北虫草抗肺癌效果的评价多采用单一肺癌细胞株试验系统。本研究选用 3 株人肺癌细胞为研究对象,对北虫草的抗肺癌效果进行分析,旨在为推进其抗肿瘤的开发与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌细胞株 LTEP- α -2(LTE)、SPC-A-1(SPC)、A549,实验室常规培养,保存。鲜北虫草由沈阳虫林密宝北虫草食品科技有限公司提供。DMEM 基本培养液(Hy-Clone)、胎牛血清(四季青)等相关试剂均购于北京鼎国生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 北虫草水提物的获得 将北虫草子实体粉碎,过 100 目筛,称取 10 g 溶入 100 mL 超纯水中。超声波促提 30 min, 4 000 r/min 离心 10 min。取上清液过滤除菌,冻干,以 DMEM 基本培养液稀释制备北虫草水提物(CME),4℃保存待用。

1.2.2 肺癌细胞活性的检测 3 种肺腺癌细胞悬液分别以 5 万个/mL 浓度接种于 96 孔培养板,100 μ L/孔,贴壁后换液

为 CME,浓度分别为 125、250、500、1 000、2 000 mg/L, 200 μ L/孔;培养 1 d,MTT 法检测吸光度。以 CME 半数抑制浓度(IC₅₀)分别处理肺癌细胞 12、24、48、60、72 h,MTT 法检测吸光度。上述各检测试验均设立试验组、对照组、空白组,5 次重复。生长抑制率计算方法如下。

生长抑制率 = $(D_{\text{对照组}} - D_{\text{试验组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.2.3 Hoechst33258 染色 分别以半数抑制浓度处理各组细胞 1 d,Hoechst33258 常规染色,共聚焦显微镜下观察,采集图像并分析。

1.2.4 数据处理 采用软件 SPSS 16.0 软件进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 肺癌细胞的形态学改变

人肺腺癌细胞株 LTE、SPC、A549 均为上皮型贴壁细胞,药物处理后,细胞逐渐收缩、变圆,折光率变差。随着处理浓度增大及时间延长,细胞脱落现象加剧,细胞形态改变明显,细胞表面逐渐出现膜泡,有类似凋亡小体的结构出现(图 1)。

2.2 CME 抗肺癌的量效特征

随着 CME 处理浓度增大,3 组肺腺癌细胞的生长活性均呈明显下降趋势。参照半数抑制浓度确定 CME 最佳给药剂量,LTE 组为 250 mg/L,SPC 组为 500 mg/L,A549 组为 2 000 mg/L。LTE、SPC 组的抑制率整体高于 A549 组;LTE、A549 组在 125、250、500 mg/L 下的抑制率存在极显著差异($P < 0.01$);SPC 组在 125、500、2 000 mg/L 下的抑制率极显著高于 A549 组($P < 0.01$),LTE 组高于 SPC 组,但只在 2 000 mg/L 处理下低于 SPC 组,并存在显著差异($P < 0.05$)(表 1)。

2.3 CME 抗肺癌的时效特征

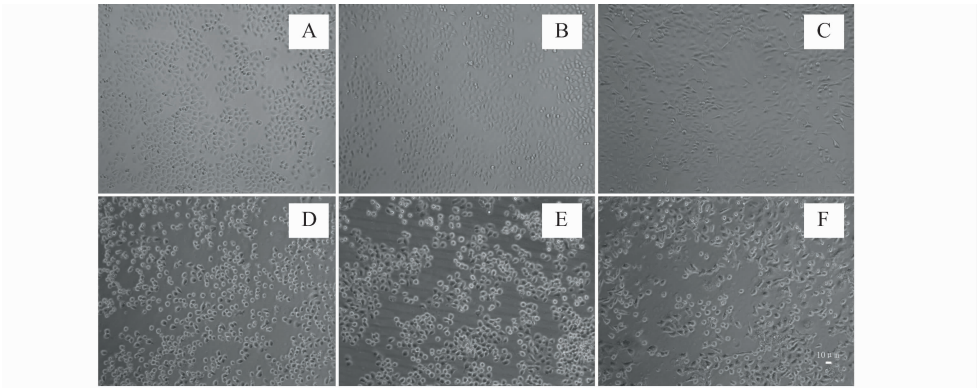
以半数抑制浓度分别处理 3 组肺腺癌细胞 12、24、48、60、72 h,3 组人肺癌细胞的生长抑制率均明显增高(表 2),相同组内处理 12 h 的抑制率与其他时间点均存在显著差异。LTE 组在各时间处理的抑制率高于 SPC、A549 组。

收稿日期:2015-01-15

基金项目:沈阳师范大学生态与环境研究中心主任基金(编号:EEERC-Y-201404)。

作者简介:王 泽(1979—),女,辽宁丹东人,博士,讲师,主要从事细胞药理学研究。E-mail:synu.wangze@aliyun.com。

通信作者:王生厚,教授,主要从事微生物制药研究。E-mail:1113243295@qq.com。



A—LTE对照组；B—SPC对照组；C—A549对照组；D—LTE试验组；E—SPC试验组；F—A549试验组

图1 CME处理 1 d 后各组肺癌细胞的形态学改变情况(100×)

表 1 CME 抑制人肺癌细胞生长活性的量效特征

组别	抑制率(%)				
	125 mg/L	250 mg/L	500 mg/L	1 000 mg/L	2 000 mg/L
LTE	45.44 ± 3.88aA	49.45 ± 5.85aA	55.31 ± 6.09aA	59.53 ± 6.03aA	62.69 ± 2.22bAB
SPC	35.10 ± 1.05aA	38.05 ± 8.31bAB	51.03 ± 9.09aA	59.02 ± 9.21aA	71.17 ± 4.06aA
A549	16.25 ± 8.11bB	24.45 ± 8.25cB	33.07 ± 8.67bB	44.59 ± 8.36bA	51.17 ± 9.51cB

注:同列数据后不同大写、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。

表 2 CME 抑制人肺癌细胞生长活性的时效特征

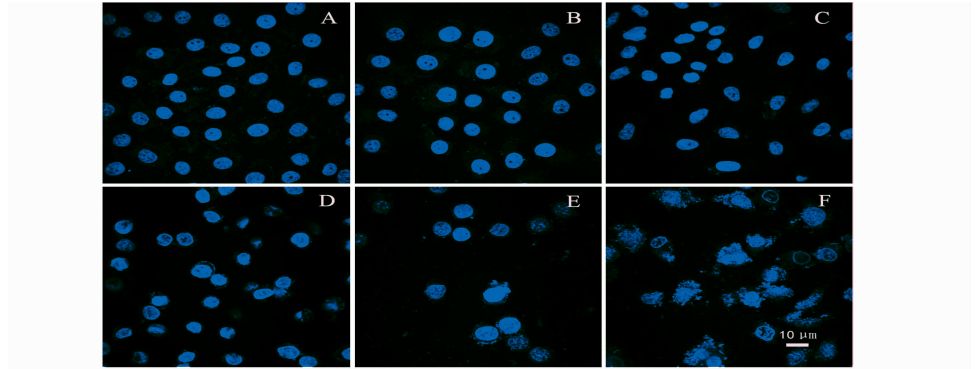
组别	抑制率(%)				
	12 h	24 h	48 h	60 h	72 h
LTE	26.79 ± 6.76aA	49.96 ± 1.95aA	77.70 ± 0.64aA	89.08 ± 0.89aA	94.05 ± 2.43aA
SPC	13.76 ± 6.79bA	44.05 ± 4.02aA	75.62 ± 8.01aA	80.21 ± 4.83aA	88.45 ± 6.30aA
A549	16.14 ± 6.13bA	48.80 ± 3.62aA	64.68 ± 8.60bA	77.67 ± 9.50bA	83.98 ± 7.92bA

注:同列数据后不同大写、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上差异显著。

2.4 凋亡检测

CME 以半数抑制浓度处理 3 组肺腺癌细胞 1 d 后, Hoechst33258染色结果显示各组细胞核均呈现核固缩、形态

不规则的特征,细胞核浓染,呈现致密的颗粒块状荧光,有的可见核内出现不连续的空洞,具典型凋亡特征(图 2)。



A—LTE对照组；B—SPC对照组；C—A549对照组；D. LTE试验组；E—SPC试验组；F—A549试验组

图2 CME 处理人肺癌细胞后 Hoechst33258 染色

3 结论与讨论

肺癌是临床常见的恶性肿瘤之一,在我国肺癌发病率已居各种癌症之首^[4]。根据现代药理学研究,冬虫夏草提取物能够明显抑制小鼠移植鼠肺癌细胞 Lewis 和人肺腺癌细胞 A549 的生长,并减少其转移灶数^[5-7],对肺癌细胞 A549、H157 NSCLC 的生长活性具有明显的抑制作用^[8-10],具有较好的抗肺癌效果。但是由于人为过度采挖,产地生态环境严

重退化,冬虫夏草的产量及质量呈逐年下降态势,替代性虫草的开发利用已成为该领域亟需解决的问题。北虫草是目前报道的 300 多种虫草中除冬虫夏草外唯一能大量产生虫草素的品种,被认为是天然冬虫夏草最理想的替代品。刘洁等证实,蚕蛹虫草水煎剂可以通过提高小鼠免疫力,明显抑制小鼠 Lewis 肺癌原发灶生长和自发肺部转移^[11]。研究表明,北虫草水提物可以抑制肺癌细胞株 A549、NCI - H460 等的增殖,发挥抗癌作用^[12-15]。

本研究表明,北虫草水提物对 3 组人肺癌细胞的形态产生了明显影响,如贴壁性变差、细胞明显皱缩等,其中人肺腺癌细胞 LTE、SPC 较为敏感,在 250mg/L 浓度处理下显示出较明显的形态学变化。MTT 试验结果显示,北虫草提取物对 3 株人肺癌细胞的体外生长活性均具有显著的抑制作用,且呈现明显的剂量及时间依赖特征,其中 A549 对北虫草提取物浓度变化比较敏感,其次为 SPC。不同浓度处理下,CME 对 LTE、SPC 组均有较好的抑制效果,两者之间无显著差异。Park 等研究证实,北虫草水提物在 NCI-H460 人肺癌细胞的异种移植模型中具有明显的剂量依赖特征^[15];而冬虫夏草对 Hela、NCI-H460 等多种癌症细胞增殖能力的抑制作用也具有浓度依赖特征^[16-17]。本研究参考半数抑制浓度作为 CME 抗人肺腺癌的最佳量效,进一步证实 3 组肺腺癌细胞中 CME 对 LTE 细胞具有更好的抑癌效果。同时,CME 对 3 组细胞生长活性的抑制具有明显的时间依赖特征。随着处理时间增加,各组抑制率呈现显著性增加的特征,北虫草体外抗肺癌的效果受处理时间的影响较为明显。徐晋等发现,冬虫夏草能促进顺铂诱导 Balb-c 裸鼠非小细胞肺癌 A549 凋亡,且呈现出一定的剂量、时间依赖关系^[8];颜晶晶等观察到 500 mg/L CME 对人肺癌细胞 A549 的抑制作用在 1 d 内具有剂量、时间依赖性^[12]。纵向比较 CME 对 3 组肺腺癌细胞在各时间点的抑制率,LTE 组稳定高于 A549 组,结合量效特征的试验结果可以证实,虽然 3 株细胞同为入肺腺癌细胞,但是对北虫草提取物敏感度存在明显差别,人肺腺癌细胞 LTE 相对敏感,A549 的敏感度较差。细胞株对 CME 敏感度的差别应该取决于细胞株本身的生物学属性,因此在评价北虫草的抗肺癌效果或虫草临床抗癌应用时,应注意区别对待。

细胞凋亡别称细胞程序性死亡,是多细胞有机体由基因控制的细胞自主性死亡过程,目前多数研究已经证实冬虫夏草通过凋亡的方式发挥抗癌效果^[18-19],但也有研究显示蝉虫草可以抑制人肝癌 MHCC97H 细胞停滞在 G2/M 期,却未检测到凋亡特征^[20]。本研究通过 Hoechst33258 染色及共聚焦显微镜观察北虫草以最佳量效处理 3 组肺腺癌细胞 1 d 后的形态学变化,结果显示 3 组细胞的细胞核及外部形态皆出现明显的凋亡特征,如细胞核聚缩、细胞核颗粒化、细胞膜出泡等行为,初步证明 CME 以凋亡的方式抑制肺癌细胞的增殖活性,发挥抗癌效果。颜晶晶等通过 Annexin V/PI 凋亡检测方法也证明 CME 具有诱导 A549 细胞凋亡的作用^[12],其凋亡机制还有待深入研究。

北虫草作为人肺腺癌的抑制物,具有较好的市场开发和医学利用前景,本研究显示北虫草提取物对 3 株人肺癌细胞体外生长活性具有明显的抑制效果,呈现典型的凋亡特征,但是具有不同的时间及剂量依赖特征,其中对人肺癌细胞株 LTE 生长活性的抑制效果最为稳定,可代替 A549 作为敏感细胞株进行机制相关研究。因此,虽然北虫草具有广泛的抗肺腺癌效果,但是针对不同类型的病理特征仍须甄别处理。

参考文献:

[1] Ng T B, Wang H X. Pharmacological actions of *Cordyceps*, a prized folk medicine[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2005, 57 (12): 1509-1519.

[2] 王 刚,麻兵继,刘吉开. 人工蛹虫草化学成分研究[J]. 中草药, 2004, 35(5): 493-495.

[3] 姜 泓,刘 珂,孟 舒,等. 人工蛹虫草子实体化学成分[J]. 药学学报, 2000, 35(9): 663-668.

[4] Jemal A, Siegel R, Xu J Q, et al. Cancer statistics, 2010[J]. Cancer Journal for Clinicians, 2010, 60(5): 277-300.

[5] 姜 平,黄淑光,吴国民. 冬虫夏草抗动物肿瘤作用的研究[J]. 青海医药, 1982(3): 23-24.

[6] 张淑兰,孙云汉,刘晓平,等. 冬虫夏草抗小鼠 Lewis 肺癌作用的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 1987(2): 53-54.

[7] Nakamura K, Yamaguchi Y, Kagota S, et al. Inhibitory effect of *Cordyceps sinensis* on spontaneous liver metastasis of Lewis lung carcinoma and B16 melanoma cells in syngeneic mice[J]. Japanese Journal of Pharmacology, 1999, 79(3): 335-341.

[8] 徐 晋,傅 雷,姚乐申. 冬虫夏草合用顺铂诱导非小细胞肺癌凋亡的研究[J]. 南京中医药大学学报: 自然科学版, 2008, 24 (6): 398-400.

[9] Ji N F, Yao L S, Li Y, et al. Polysaccharide of *Cordyceps sinensis* enhances cisplatin cytotoxicity in non-small cell lung cancer H157 cell line[J]. Integrative Cancer Therapies, 2011, 10(4): 359-367.

[10] Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, et al. Antitumor effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) on mouse melanoma and lung carcinoma cells involves adenosine A3 receptor stimulation[J]. Anticancer Research, 2006, 26(1A): 43-47.

[11] 刘 洁,陈 正,杨 旭,等. 蚕蛹虫草抗肿瘤作用的研究[J]. 白求恩医科大学学报, 1992, 18(5): 423-425.

[12] 颜晶晶,唐永范,陆魏杰,等. 北冬虫夏草水提物对人肺腺癌细胞 A549 的作用[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2011, 31(7): 922-926.

[13] 李 灿,闫 滨,孙 芳,等. 北虫草多糖和多肽提取物的体外抗肿瘤研究[J]. 山东中医杂志, 2013, 32(10): 744-746.

[14] Reis F S, Barros L, Calheta R C, et al. The methanolic extract of *Cordyceps militaris* (L.) Link fruiting body shows antioxidant, antibacterial, antifungal and antihuman tumor cell lines properties[J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 62: 91-98.

[15] Park S E, Kim J, Lee Y W, et al. Antitumor activity of water extracts from *Cordyceps militaris* in NCI-H460 cell xenografted nude mice[J]. Journal of Acupuncture and Meridian Studies, 2009, 2 (4): 294-300.

[16] Jy W, Zhang Q X, Leung P H. Inhibitory effects ethyl acetate extract of *Cordyceps sinensis* mycelium on various cancer cells in culture[J]. Phytomedicine, 2007, 14(1): 43-49.

[17] Chen Y, Guo H, Du Z, et al. Ecology-based screen identifies new metabolites from a *Cordyceps*-colonizing fungus as cancer cell proliferation inhibitors and apoptosis inducers[J]. Cell Proliferation, 2009, 42(6): 838-847.

[18] Siev M, Weinberg R, Penman S. The selective interruption of nucleolar RNA synthesis in HeLa cells by cordycepin[J]. Journal of Cell Biology, 1969, 41(2): 510-520.

[19] Müller W E, Seibert G, Beyer R, et al. Effect of cordycepin on nucleic acid metabolism in L5178Y cells and on nucleic acid-synthesizing enzyme systems[J]. Cancer Research, 1977, 37(10): 3824-3833.

[20] Wang H L, Zhang J, Sit W H, et al. *Cordyceps cicadae* induces G2/M cell cycle arrest in MHCC97H human hepatocellular carcinoma cells: a proteomic study[J]. Chinese Medicine, 2014, 9: 15-26.