

口虾蛄总生物碱对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的抑制作用

齐相薇¹, 蔡康荣², 林荣文², 王槐高^{3*} (广东医科大学 1. 临床技能培训中心; 2. 科研中心; 3. 病理生理学教研室, 广东东莞 523808)

摘要: **目的** 探讨口虾蛄总生物碱对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖的影响。**方法** 酸提碱沉法结合乙酸乙酯萃取法取得口虾蛄总生物碱; 用 CCK-8 法观察口虾蛄总生物碱对 A549 细胞生长的影响; 平板克隆实验观察其对 A549 细胞克隆形成能力的影响; 流式细胞术检测其刺激 A549 细胞的细胞周期变化。**结果** 口虾蛄总生物碱明显抑制 A549 细胞增殖、克隆形成, 细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 呈一定的时间-剂量效应关系。**结论** 口虾蛄总生物碱对 A549 细胞增殖有明显抑制作用, 其机制可能通过细胞周期阻滞作用。

关键词: 口虾蛄; 总生物碱; A549 细胞; 细胞周期

中图分类号: R734.2

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610(2021)04-0381-04

Inhibition of total alkaloids of *Squilla oratoria* in proliferation of non-small cell lung cancer A549 cells

QI Xiang-wei¹, CAI Kang-rong², LIN Rong-wen², WANG Huai-gao^{3*} (1. Clinical Skills Training Center; 2. Scientific Research Center; 3. Department of Pathophysiology; Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of total alkaloids of *Squilla oratoria* on proliferation of A549 cells. **Methods** Total alkaloids were extracted from *Squilla oratoria* using acid extraction, alkaline deposition and ethyl acetate extraction. The growth and cell cycle of A549 cells were respectively detected by CCK-8, colony-forming assay, and flow cytometry. **Results** The total alkaloids suppressed proliferation and clone formation and arrested cell cycle in G₂/M phase of A549 cells in time- and dose-dependent manner. **Conclusion** The total alkaloids of *Squilla oratoria* can inhibit proliferation of A549 cells, which may be mediated by cell cycle arrest.

Key words: *Squilla oratoria*; total alkaloids; A549 cells; cell cycle

原发性支气管肺癌(简称肺癌)是我国最常见的恶性肿瘤之一,其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌总发病率的 85% 左右^[1]。NSCLC 细胞对放疗和化疗的敏感度相对较低,对于不能手术切除的癌症患者,多数患者接受放化疗后病情虽然得到局部控制,但只有少数患者能够治愈^[2]。随着对 NSCLC 相关驱动基因的发现,对 NSCLC 患者的治疗迎来了更个体化的靶向治疗时代。在临床应用中,靶向治疗如何克服靶向药物应用过程中出现的原发及获得性耐药问题,是其最大挑战。确定基因突变患者的耐药机制和非突变非小细胞肺癌患者的新治疗方法仍然是一个需深入

研究的领域^[3]。因此,寻找高效、低毒的抗癌药物对肺癌的防治及提高中晚期肺癌患者的生存质量,也是肺癌防治研究的发展趋势之一。海洋生物不仅具有独特、新颖的结构,而且具有强大的药理活性,海洋来源的天然产物已经成为抗肿瘤药物的重要来源^[4]。海洋生物碱是一类重要的海洋生物次级代谢产物,具有抗菌、抗炎和抗肿瘤等多方面的生物活性,是优良的药物先导化合物。研究证明,中国广西北海涠洲岛海域的陵水山海绵 *Mycale lingshuiensis* 中含有 4 个单吡啶生物碱^[5]。有研究发现海洋生物碱 Ropalladins 类似物对宫颈癌 Caski 细胞有抑制增殖和诱导凋亡的作用^[6]。现已发现 70 多个不同的 Lamellarins 及与它们结构类似的天然吡咯类生物碱,具有优良抗肿瘤活性、多药耐药逆转活性及抗菌活性,是医药发展领域潜在的候选药物^[7]。近年来本课题组研究发现,口虾蛄乙酸乙酯提取物与传统化疗药物的联合用药,增加了传统化疗药物对肝癌细胞的毒性作用,呈现出低浓

基金项目: 国家自然科学基金资助(No.81572782), 广东建设中医药强省科研资助项目(No.20141155)

收稿日期: 2021-03-08; **修订日期:** 2021-03-15

作者简介: 齐相薇(1985-),女,硕士,实验师

通信作者: 王槐高(1978-),男,硕士,讲师, E-mail: wang-huagao@gdmu.edu.cn

度拮抗,高浓度协同的作用^[8]。本文结合前期的研究结果,通过改进提取方法得到口虾蛄总生物碱,并观察其对A549细胞的增殖抑制活性,为进一步的开发应用提供实验理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人非小细胞肺癌A549细胞由广东医科大学肿瘤研究所提供。新鲜口虾蛄(经鉴定属节肢动物门,甲壳纲,口足目,虾蛄科品种)。RPMI 1640培养基(GIBCO),小牛血清(四季青生物材料工程公司),Cell Counting Kit-8(CCK-8)(日本同仁株式会社化学研究所),DMSO(Sigma);DMSO(Sigma),细胞周期检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 口虾蛄总生物碱的提取

新鲜口虾蛄绞碎,以水调入浓盐酸浸泡过夜,离心后取上清液,调入浓氨水碱化至pH>10。静置过夜,离心后沉淀以乙酸乙酯萃取3次,减压浓缩沉淀,得到提取物即总生物碱。

1.3 CCK-8法检测体外抗癌效果

选用对数生长期的人肺癌A549细胞,培养24h,加入总生物碱使终质量浓度分别为5、25、125、625 mg/L,培养48 h后,进行CCK-8实验,于酶标仪上450 nm波长处检测各孔的光密度OD值,按试剂盒说明,计算细胞增殖抑制率。抑制率%=(1-实验组OD值/对照组OD值)×100%。采用Bliss法计算48 h各提取物的IC₅₀值。

1.4 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力

取对数生长期A549细胞,以400个细胞/孔接种到6孔板,培养24 h后给予不同质量浓度(0、50、100 mg/L)总生物碱处理,每组设3个平行孔,连续培养约2周;用PBS清洗细胞2次,甲醇固定15 min后,0.4%结晶紫染色15 min,流水冲洗;将平皿倒置并叠加1张带网格的透明胶片,在显微镜(低倍镜)计数大于10个细胞的克隆数,最后计算克隆形成率。克隆形成率=(克隆数/接种细胞数)×100%。

1.5 流式细胞仪检测细胞周期分布

取对数生长期A549细胞接种于6孔板,待细胞长至合适满度后换无血清培养基培养24 h,再给予不同质量浓度(0、50、100 mg/L)总生物碱处理24 h,每组设3个平行孔;收集细胞,加入预冷的70%乙醇固定,4℃过夜;离心后加入终质量浓度为100 mg/L RNAase和100 mg/L PI染色液400 μL,混匀,室温避光染色30 min;采用BD FACSCanto II流式细胞仪进

行检测分析。

1.6 统计学处理

应用SPSS 18.0及Graph-pad prism统计学软件处理和分析实验数据,计量资料采用单因素方差分析及q检验,P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 口虾蛄总生物碱对A549细胞生长的影响

作用24、48、72 h后,口虾蛄总生物碱对A549细胞活性的抑制如图1所示,呈时间-剂量效应关系降低A549细胞的存活率。采用Bliss算法软件统计得到,其作用于A549细胞24、48和72 h的IC₅₀分别为(628.93±0.81)、(135.31±0.50)、(81.51±0.46) mg/L。

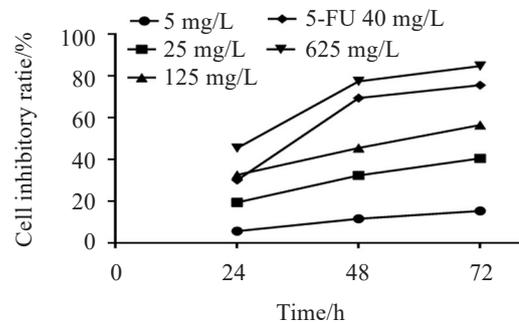


图1 总生物碱对A549细胞增殖的抑制作用

2.2 口虾蛄总生物碱对A549细胞克隆形成能力的影响

口虾蛄总生物碱(0、50、100 mg/L)作用2周后,各组细胞克隆形成率分别为62%、38.25%、24.25%。随着总生物碱质量浓度的增加,A549细胞克隆形成数目和克隆形成大小均降低,差异有统计学意义(P<0.05),见图2。表明口虾蛄总生物碱呈时间-剂量效应关系抑制A549细胞的增殖。

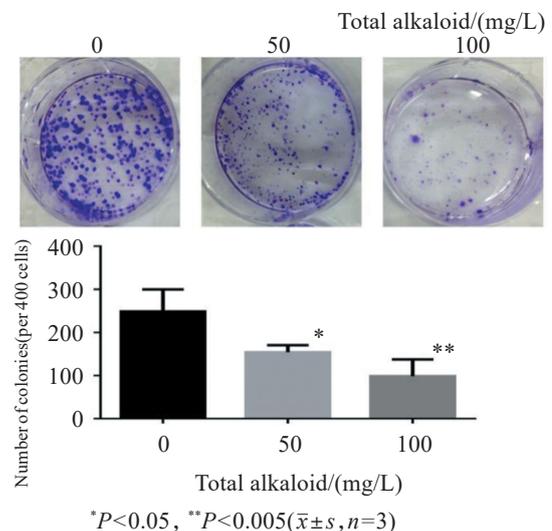


图2 总生物碱抑制A549细胞的克隆形成能力

2.3 口虾蛄总生物碱对 A549 细胞周期的影响

与对照组相比,口虾蛄总生物碱能诱导 A549 细胞周期的 G_0/G_1 期比例由 84% 下降为 59.8%, G_2/M 期比例由 2.27% 上升为 12.4%, 呈时间-剂量效应关系, 见图 3。

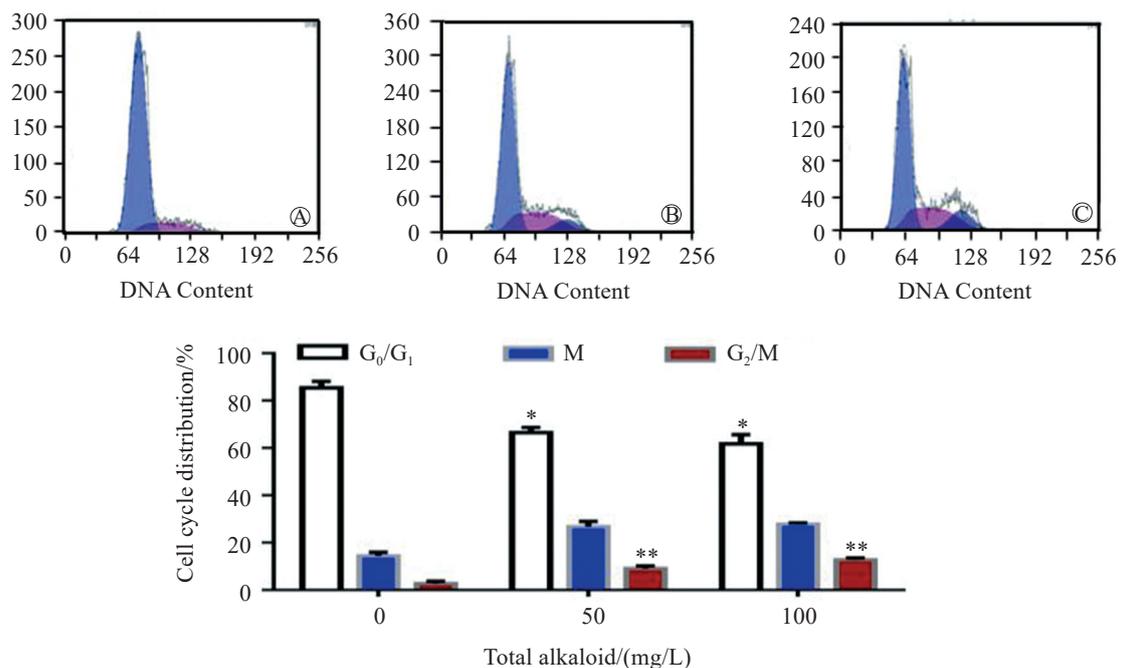
3 讨论

肺癌是肺部原发性肿瘤中最常见的类型。全球范围内,肺癌的发病率、死亡率都极高且呈现上升趋势。目前晚期 NSCLC 一线化疗仍以含铂双药方案为主, DDP+PEM/GEM 为优选的基准方案, 化疗联合 EGFR-TKI/VGFR-TKI 均有获益, 化疗后维持治疗目前在临床上也广泛应用。EGFR 和 RAS/MEK/ERK 双通路抑制联合应用有望成为潜在的治疗方式, 有研究发现一线运用吉非替尼治疗 EGFR 敏感突变的晚期非小细胞肺癌疗效优于采用化疗者^[9], 而 EGFR 靶点可能是鳞状细胞肺癌治疗的新方向^[10], 但由于肿瘤耐药性的产生^[11], 迫切需要疗效好、不良反应小和安全性高的抗 NSCLC 药物。

丰富多样的海洋生物及次生代谢产物, 有着多样性的结构和丰富的生物活性, 使其成为新药研发中先导化合物的重要来源^[12]。目前世界上广泛使用的抗癌药物中近半数源自海洋天然产物, 如海鞘来源属于生物碱类化合物的曲贝替定已经上市, 它在结构上属于四氢异喹啉类天然产物, 其四氢异喹啉环能够嵌入 DNA 小沟并产生相互作用, 从而诱发 DNA 双链断裂

导致细胞死亡, 这意味着以往对紫杉醇及艾日布林耐药的患者, 以曲贝替定治疗可能有不错的效果^[13]。目前尚有 2 类生物碱来源的化合物(红树海鞘来源的 Lurbinectedin 及河豚来源的替曲朵辛)已进入三期临床相关抗肿瘤试验^[14]。我们前期的研究发现口虾蛄乙醇提取物在体外能有效地抑制鼻咽癌 CNE-2Z 细胞增殖的生长^[15], 在体内对 CNE-2Z 裸鼠移植瘤的生长能具有一定的抑制作用^[16]。但前期应用乙醇提取法及系统溶剂提取法所得的提取物, 成分复杂且抗肿瘤活性物质含量不高, 故本文采用酸碱沉淀法剔除部分杂质, 再采用乙酸乙酯萃取, 以便提取成分更简单的总生物碱。本文中, 经 CCK8 法检测, 发现口虾蛄总生物碱可以明显抑制 A549 细胞的增殖, 作用 48 h 后 IC_{50} 比以往方法的提取物更低。经不同质量浓度的口虾蛄总生物碱作用 2 周后, 随着总生物碱质量浓度的增加, A549 细胞克隆形成数目和克隆形成大小均降低, 提示口虾蛄总生物碱呈时间-剂量效应关系抑制 A549 细胞的增殖。口虾蛄总生物碱能诱导 A549 细胞周期的 G_0/G_1 期比例下降, 而 G_2/M 期比例上升, 并呈时间-剂量效应关系, 表明口虾蛄总生物碱能诱导 A549 细胞周期阻滞于 G_2/M 期。

综上所述, 本文所采用的提取方法所得总生物碱体外抗肿瘤活性较高, 其抑制 A549 细胞增殖的机制可能是诱导了细胞周期阻滞, 总生物碱的纯化及体内抗肿瘤活性仍需进一步实验研究。



A: 对照组; B: 50 mg/L; C: 100 mg/L; * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$ ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

图3 总生物碱对 A549 细胞周期分布的影响

参考文献:

- [1] LU S, YU Y, YANG Y. Retrospect and prospect for lung cancer in china: clinical advances of immune checkpoint inhibitors[J]. *Oncologist*, 2019, 24(Suppl 1):S21-S30.
- [2] 魏玉春, 袁双虎. 2018年非小细胞肺癌放疗进展盘点[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2019, 5(1):20-23.
- [3] MICHELA T, CHIARA C, ALDO P, et al. Drugresistance in non-small cell lung cancer (NSCLC): Impact of genetic and non-genetic alterations on therapeutic regimen and responsiveness[J]. *Pharmacol Ther*, 2019, 10(202):140-148.
- [4] 李聪, 许焕丽, 刘明, 等. 诱导细胞凋亡的海洋抗肿瘤药物研究进展[J]. *药学学报*, 2016, 51(9):1394-1400.
- [5] 王嘉慧, 王春华, 王建荣, 等. 广西北海涠洲岛陵水山海绵 *Mycale lingshuiensis* 的化学成分研究[J]. *中国海洋药物*, 2017, 36(5):28-32.
- [6] 徐欢欢, 柯丽娜, 黄慧敏, 等. Ropalladins类似物对宫颈癌 Caski细胞增殖、凋亡的影响[J]. *山东医药*, 2020, 60(5):23-26.
- [7] 姜龙, 尹瑞娟, 张南, 等. Neolamellarin A及其相关吡咯类海洋生物碱合成和结构改造研究进展[J]. *中国海洋药物*, 2014, 33(4):63-72.
- [8] 邵松军, 李明勇, 张湘宁, 等. 口虾蛄乙酸乙酯提取物联合阿霉素或顺铂对人肝癌 HepG2细胞的增殖抑制效应研究[J]. *中国医药生物技术*, 2013, 8(5):344-348.
- [9] 劳逸, 黄璐, 王辉, 等. 吉非替尼与化疗交叉应用于EGFR敏感突变型晚期非小细胞肺癌一、二线治疗的效果观察[J]. *广东医科大学学报*, 2018, 36(2):207-210.
- [10] 林小峰, 陈龙. 晚期非小细胞肺癌化疗现状及进展[J]. *广西医科大学学报*, 2019, 36(5):850-855.
- [11] MUMENTHALER S M, FOO J, LEDER K, et al. Evolutionary modeling of combination treatment strategies to overcome resistance to tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2011, 8(6):2069-2079.
- [12] KHALIFA S A M, ELIAS N, FARAG M A, et al. Marine natural products: a source of novel anticancer drug[J]. *Mar Drugs*, 2019, 17(9):491.
- [13] 李东, 姜雪峰. 来自海洋的馈赠: 神奇抗癌分子曲贝替定[J]. *科学通报*, 2019, 64(1):6-8.
- [14] 王成, 张国建, 刘文典, 等. 海洋药物研究开发进展[J]. *中国海洋药物*, 2019, 38(6):35-69.
- [15] 李明勇, 黄培春, 孔霞. 口虾蛄乙酸乙酯提取物对鼻咽癌 CNE-2Z细胞增殖和周期的影响[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17(2):98-100.
- [16] 顾帝水, 孔霞, 陈锦等. 口虾蛄提取物对人鼻咽癌裸鼠移植瘤生长的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2005, 14(14):1825-1826, 1828.

~~~~~

## 版权声明

为适应我国信息化建设,扩大本刊及作者知识信息交流渠道,本刊编辑部已将《广东医科大学学报》的文献数据在中国知网、万方数据—数字化期刊群、维普网、中教数据库等以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播,其作者文章著作权使用费与本刊稿酬一次性给付(在收取发表费时折扣),作者向本刊提交文章发表的行为即视为同意我编辑部上述声明。

本刊编辑部