

肿瘤相关巨噬细胞共培养体系中人参及其主要成分对肺癌 A549 细胞的作用

毕 蕾, 高 静, 江玉翠, 陈鹰娜, 陈卫平*

(南京中医药大学基础医学院, 南京 210023)

摘要 通过人参水提液(water extract of Ginseng, WEG)、人参多糖(Ginseng polysaccharides, GPS)、人参皂苷(Ginseng total saponins, GTS)对肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)与肿瘤细胞共培养体系中肺癌 A549 细胞增殖、迁移和细胞骨架的影响研究, 探讨人参抗肿瘤的作用机制。建立 THP-1 诱导的 TAMs 体外模型, 采用上清液共培养体系, 以肺癌 A549 细胞为研究对象, 并采用 MTT 法观察不同浓度的 WEG、GPS、GTS 作用于共培养体系中对肺癌 A549 细胞增殖的影响及量效关系; 通过实时细胞分析技术(RTCA)检测 WEG、GPS、GTS 对共培养体系中肺癌 A549 细胞迁移能力的影响, 免疫荧光高内涵细胞分析系统(HCS)检测细胞骨架蛋白 F-actin 的表达。结果显示: WEG 能明显抑制共培养体系中 A549 细胞的增殖、迁移能力和减少骨架面积及微丝数量($P < 0.01$); GPS 能明显抑制共培养体系中 A549 细胞迁移能力、骨架面积和微丝数量($P < 0.01$), 但对 A549 细胞的增殖作用无明显影响; GTS 能明显抑制共培养体系中 A549 细胞的增殖($P < 0.01$), 而对 A549 细胞的迁移能力、骨架面积和微丝无影响。通过对 WEG、GPS、GTS 的研究对比, 发现人参及两种主要成分对 TAMs 共培养体系中肺癌 A549 细胞都有影响, 但作用存在差异, 提示人参抗肿瘤作用与其多成分对肿瘤免疫微环境调控相关, 且不同成分间可能存在协同关系。

关键词 肿瘤相关巨噬细胞; 共培养; 人参; 人参多糖; 人参皂苷; A549 细胞

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)06-0744-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160619

引用本文 毕蕾, 高静, 江玉翠, 等. 肿瘤相关巨噬细胞共培养体系中人参及其主要成分对肺癌 A549 细胞的作用[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(6): 744-748.

Cite this article as: BI Lei, GAO Jing, JIANG Yucui, et al. Effect of Ginseng, Ginseng polysaccharides and Ginsenoside on the human lung cancer cells A549 in co-culture system of TAMs with A549 cells[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(6): 744-748.

Effect of Ginseng, Ginseng polysaccharides and Ginsenoside on the human lung cancer cells A549 in co-culture system of TAMs with A549 cells

BI Lei, GAO Jing, JIANG Yucui, CHEN Yingna, CHEN Weiping*

School of Preclinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

Abstract This study was aimed to explore the anti-tumor functions of Ginseng on the human lung cancer cells A549, through investigating the effects of water extract of Ginseng (WEG), Ginseng polysaccharides (GPS) and Ginseng total saponins (GTS) on cell proliferation, cell migration and cytoskeleton of A549 cells. Using A549 cells as target cells, the TAMs model *in vitro* was established from THP-1. MTT method was used to observe the effects of different concentrations of WEG, GPS, GTS on A549 cells in co-culture system of TAMs with A549 cells. The cell migration of A549 cells was assayed by real-time cell analysis (RTCA). The cytoskeleton of A549 cells was detected by high content screening (HCS). It showed that in the co-culture system, WEG inhibited the proliferation, migration, and the area of cytoskeleton on A549 cells significantly ($P < 0.01$). GPS inhibited A549

cell migration and the area of cytoskeleton ($P < 0.01$) in co-culture system, but it showed no significant effect on the proliferation of A549 cells. Moreover, GTS can significant inhibit the proliferation of A549 cells ($P < 0.01$), and the effect on the cell migration and the area of cytoskeleton was in conspicuous in the co-culture system. It was found that the two main components of ginseng showed different functions by the comparison of WEG, GPS, GTS in TAMs co-culture system. Results indicate that the antitumor effects of ginseng may be due to its multi-component regulation in the tumor microenvironment.

Key words tumor-associated macrophages; co-culture; Ginseng; Ginseng polysaccharides; Ginseng total saponins; A549 cells

This study was supported by the National Natural Sciences Foundation of China (No. 81273638, No. 81503486); the Natural Science Research Project of Jiangsu Provincial Education Department (No. 14KJD360004); and the grants from a project funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions (Integration of Traditional Chinese and Western Medicine)

扶正固本是中医治疗肿瘤的基本大法。据统计,在治疗肿瘤中药处方中用药频度最高的为补益扶正类药^[1],其中位居首位的为补气药,作为补气代表药的人参为临床常用。人参(*Panax ginseng* C. A. Mey)为五加科多年生草本植物,主要活性成分为人参皂苷(Ginseng total saponins, GTS)和人参多糖(Ginseng polysaccharides, GPS)。研究表明,人参的抗肿瘤作用机制广泛^[2-5],但对肿瘤相关巨噬细胞(tumor-associated macrophages, TAMs)的作用尚缺乏研究。

TAMs 存在于肿瘤间质中,是肿瘤免疫微环境中的主要成分,最多可以占据肿瘤的 50%^[6]。本课题组前期研究已建立了共培养模型,可模拟肿瘤免疫微环境,并发现人参能调节 TAMs 表型,改善肿瘤免疫微环境^[7]。本研究拟通过观察人参水提液(WEG)、人参多糖(GPS)、人参皂苷(GTS)对肿瘤相关巨噬细胞(TAMs)共培养体系中肺癌 A549 细胞增殖、迁移能力和细胞骨架的影响,研究人参及其不同成分通过 TAMs 对肺癌 A549 细胞的作用,探讨其抗肿瘤免疫机制。

1 材 料

1.1 药品与试剂

人参饮片(铜陵禾田中药饮片公司);人参总皂苷(南京泽朗医药科技有限公司,纯度 80%);人参总多糖(南京泽朗医药科技有限公司,纯度 70%)。

人参水提液(WEG):称取人参饮片 20 g,加入蒸馏水煎煮 1 h,重复煎煮 1 次,水浴浓缩至 20 mL,得到 1 g/mL 人参水提原液,离心 12 000 r/min,10 min 取上清液,过滤除菌分装后 -20 ℃ 保存,高效液相色谱法检测水提液中人参皂苷 Rg1、Re、

Rb1 的含量符合药典要求。

RPMI-1640 培养液,胎牛血清(美国 Gibco 公司);DMSO,佛波酯(PMA),4% 多聚甲醛(美国 Sigma 公司);MTT(中国 Solarbio 公司);CIM-plate16 细胞迁移检测板(瑞士 Roche 公司);免疫荧光细胞骨架分析试剂盒(美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 细胞株

人急性白血病单核细胞株 THP-1 和人肺癌细胞株 A549 均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.3 仪 器

实时细胞分析仪(美国 Roche 公司);高内涵细胞分析系统,多功能冷冻离心机(美国 Thermo Scientific 公司);倒置相差显微镜(德国 Leica 公司);多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

2 方 法

2.1 TAMs 体外模型建立

取对数生长期的 THP-1 细胞,1 000 r/min,5 min 离心,以每升 1×10^9 个细胞的密度重悬,接种于 6 孔板中。加 320 nmol/L PMA 诱导细胞 48 h,期间 6 h 贴壁后以 20 ng/mL 质量浓度加入 IL-4 和 IL-13,模型鉴定采用 qPCR 技术测定 TAMs 细胞中 M1、M2 型主要标志物表达。

2.2 TAMs 与 A549 细胞上清液共培养模型建立

用 PBS 冲洗 3 次诱导后的 TAMs 细胞,用无血清 RPMI-1640 培养基配制 WEG、GPS、GTS 高、中、低 3 个浓度的药物样品,给药处理,模型组用等体积的无血清培养基,处理 48 h 后收集上清液,进行以下实验。

2.3 MTT 法观察不同浓度的 WEG、GPS、GTS 作用于共培养体系中肺癌 A549 细胞增殖的影响

取对数生长肺癌 A549 细胞, 0.25% 胰酶消化, 调整细胞密度为每毫升 5×10^4 个, 每孔 100 μL 接种于 96 孔板中, 设给药组、模型对照组, 各组均设 5 个复孔, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养。孵育 24 h 后, 然后每孔加入不同浓度的药物样品 100 μL , 根据前期实验结果, 给药组设置 WEG 终浓度为 5, 10, 20 mg/mL ; GPS 终浓度为 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL ; GTS 终浓度为 0.01, 0.02, 0.04 mg/mL , 模型对照组用 TAMs 上清液培养, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养 48 h 后, 加 5 mg/mL MTT 溶液 20 μL 继续培养 4 h; 轻轻吸弃上清液, 每孔加入 DMSO 溶液 150 μL , 置于摇床上低速振荡 10 min; 酶标仪于 450 nm 波长处测定吸收度 (A)。计算给药前后对肿瘤细胞生长的抑制率和半数抑制率 IC_{50} 。实验重复 3 次。

2.4 实时细胞分析技术(RTCA)检测 WEG、GPS、GTS 对共培养体系中肺癌 A549 细胞迁移的影响

取出 CIM-Plate 16 孔板, 在下板中加入含血清培养基 165 μL , 将 Tool 逆时针旋转 90 $^{\circ}$, 快速扣压组装上板, 并于上板内加入无血清培养基 30 μL , 将 CIM-Plate 放入培养箱平衡 30 min 测基线。消化 A549 细胞, 调整浓度为每毫升 1×10^5 个, 100 μL 接种于各孔中, 6 h 贴壁后吸去上层培养液 100 μL 。实验分组: 模型对照组加入 TAMs 上清液; 给药组加入 WEG、GPS、GTS 处理 TAMs 48 h 后的上清液。每组设 3 个复孔, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱培养, RTCA-DP 仪器实时监测 72 h。

2.5 免疫荧光高内涵细胞分析系统(HCS)检测细胞骨架蛋白 F-actin 的表达

配制免疫荧光细胞骨架试剂盒, 取对数生长期 A549 细胞, 胰酶消化, 调整浓度为每毫升 1×10^7 个接种于 96 孔板, 每孔接种细胞悬液 100 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱培养 24 h 贴壁后弃培养液, 设模型对照组和给药组, 给药组加入不同药物浓度处理 TAMs 上清液各 100 μL , 每组设 5 个复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱培养 48 h 后弃去上清液, 加多聚甲醛 200 μL , 常温孵育 30 min 固定, 弃多聚甲醛, 每孔加入洗液洗涤两次并弃去, 再加入 100 μL 的渗透液常温孵育 15 min, 弃去液体加入封闭液 100 μL 孵育 15 min, 弃去细胞培养上清

液, 每孔加入 50 μL 的一抗 F-actin 探针和 DAPI 溶液孵育 1 h, 弃去溶液, 洗液清洗 3 次后待测, HCS 仪器读板并应用 Thermo HCS Studio 软件中的形态生物学模块进行系统分析。

2.6 数据分析

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 各组定量检测数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用单因素方差(One-Way ANOVA)分析, 组间比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。半数抑制率 IC_{50} 采用 GraphPad Prism 5.0 软件进行计算。

3 结 果

3.1 MTT 法检测人参及其主要成分对共培养体系中肺癌 A549 细胞增殖的影响

人参及其主要成分对上清液共培养体系中肺癌 A549 细胞 MTT 实验结果如图 1 所示: WEG、GTS 组明显抑制共培养体系中 A549 细胞的增殖, 较对照组有统计学意义($P < 0.01$); 而 GPS 组对肺癌 A549 增殖作用无明显影响。

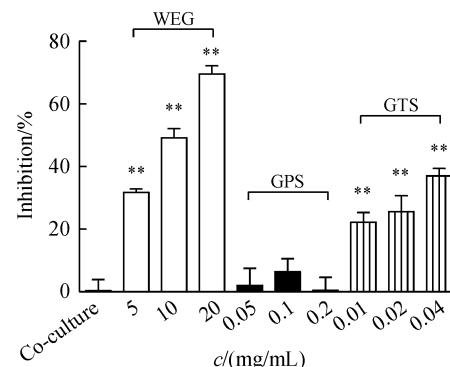


Figure 1 Effect of WEG, GPS and GTS on cell proliferation of lung cancer A549 in supernatant co-culture system ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs co-culture group

3.2 人参及其主要成分对共培养体系中肺癌 A549 细胞迁移能力的影响

WEG、GPS、GTS 对共培养体系中肺癌 A549 细胞迁移能力的影响如图 2 所示, GTS 给药后穿过上室膜的细胞数量与对照组比较无明显差异, 而 WEG、GPS 给药后穿过上室膜的细胞数量与对照组比较均明显减少, 结果显示 GTS 对共培养体系中 A549 细胞的迁移能力无明显的抑制作用, 而 WEG 和 GPS 可显著抑制 A549 细胞的迁移能力。

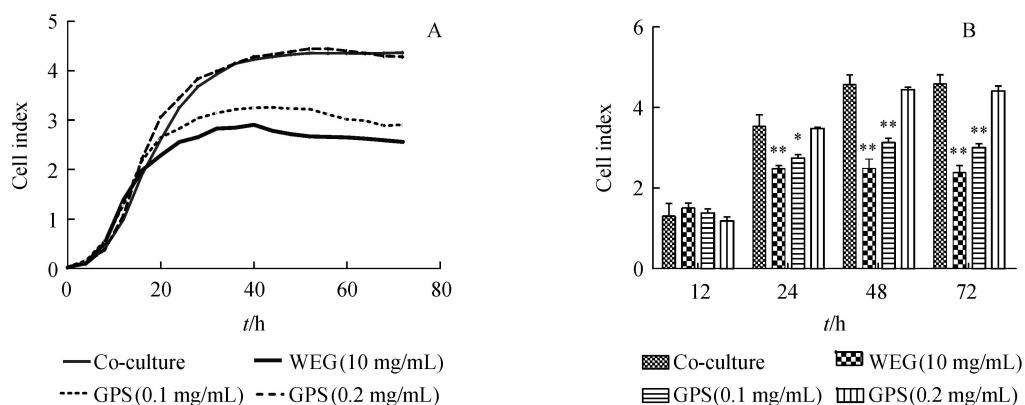


Figure 2 Effect of WEG, GPS and GTS on cell migration of lung cancer A549 in supernatant co-culture system ($\bar{x} \pm s, n=3$)

A: Line chart; B: Histogram

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs co-culture group

3.3 人参及其主要成分对共培养体系中肺癌A549细胞骨架的影响

HCS 检测 WEG、GPS、GTS 对共培养体系中肺癌 A549 细胞骨架的影响,结果显示(图 3~4),与共培养模型对照组比较, WEG 给药组 A549 细胞骨架面积明显降低,且有一定的浓度依赖性,高、中浓度组有统计学差异($P < 0.05$); GPS 给药组 A549 细胞骨架面积显著降低,高、中、低浓度均有统计学意义($P < 0.01$); GTS 使共培养体系下的 A549 细胞骨架结构排列紊乱,但骨架面积无明显影响。人参及其主要成分对共培养体系中肺癌 A549 细胞骨架微丝条数影响的荧光值结果如图 3 和图 5 所示,与共培养模型组比较, WEG 给药组 A549 细胞骨架

微丝条数降低,且有一定的浓度依赖性,其中高浓度组有统计学差异($P < 0.01$); GPS 给药组 A549 细胞骨架微丝显著降低,高、中、低浓度均有统计学意义($P < 0.01$);而 GTS 对共培养体系下的 A549 细胞骨架微丝无明显影响。

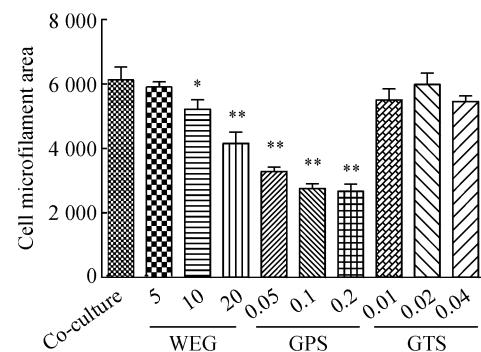


Figure 4 Effect of WEG, GPS and GTS on cell microfilament area of lung cancer A549 in co-culture system by immunofluorescence HCS techniques ($\bar{x} \pm s, n=5$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

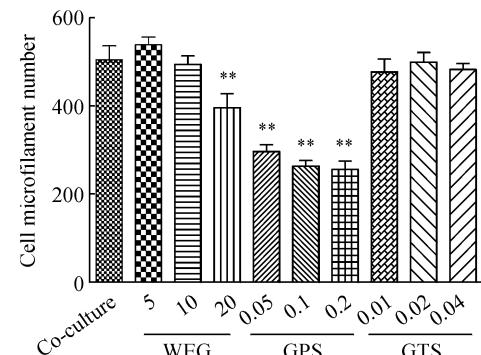
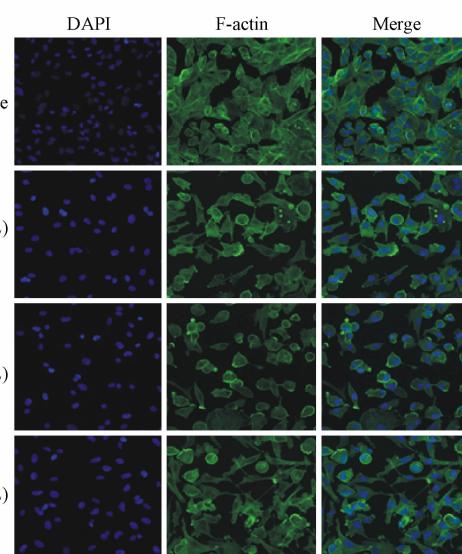


Figure 5 Effect of WEG, GPS and GTS on cell microfilament number of lung cancer A549 in co-culture system by immunofluorescence HCS techniques ($\bar{x} \pm s, n=5$)

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

Figure 3 Effect of WEG, GPS and GTS on F-actin protein expression of lung cancer A549 in co-culture system by immunofluorescence HCS techniques ($\times 100$)



4 讨 论

中医药是我国治疗恶性肿瘤的独特手段之一,中医药治疗不仅针对肿瘤本身,更重视调整机体整体状态,包括肿瘤微环境。调整机体的免疫功能是人参抗肿瘤作用的重要机制,也是中医治疗恶性肿瘤的重要法则——益气扶正法的主要内涵。

TAMs 通过分泌特殊的细胞因子、生长因子等作用于肿瘤相关基质和细胞,促进肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤血管的新生以及增强肿瘤细胞的迁移及侵袭能力等^[8-9]。

本研究在前期实验表明人参能调节 TAMs 功能、改善免疫微环境的基础上,进一步研究人参及其主要成分对在与 TAMs 共培养环境下肺癌 A549 细胞生物行为的影响。实验结果显示:WEG 能明显抑制共培养体系中 A549 细胞的增殖、迁移能力;GPS 能明显抑制共培养体系中 A549 细胞迁移能力,但对 A549 细胞的增殖作用无明显影响;GTS 能明显抑制共培养体系中 A549 细胞的增殖,而对 A549 细胞的迁移能力无影响。WEG 通过调节模拟的微环境有效抑制肿瘤细胞增殖、迁移,其主要成分多糖 GPS 对增殖无影响,皂苷 GTS 对肿瘤细胞迁移无明显作用,提示水提液 WEG 中除了多糖和皂苷成分,可能还有其它有效成分通过调节微环境而发挥作用,以及不同成分间可能存在协同关系。为了探讨其相关的分子机制,本文同时检测了细胞迁移的关键分子细胞骨架蛋白 F-actin, F-actin 是微丝的结构蛋白。结果表明 WEG、GPS 在 TAMs 共培养环境中可使肺癌 A549 细胞骨架面积减小结构重排,抑制细胞的侵袭转移能力;GTS 使肺癌 A549 细胞骨架结构排列紊乱,有较多细长微丝生成,对细胞侵袭转移的能力无明显影响,提示人参及其不同成分对 TAMs 相关的肿瘤免疫微环境有不同的调控机制。

综上所述,通过 WEG、GPS、GTS 之间的比较发现,人参两种主要成分均为有效成分,且调控机制

各有差异,对 TAMs 共培养环境中肿瘤细胞生物学行为的抑制以 WEG 效果最佳,从而提示人参抗肿瘤作用与其多成分对肿瘤免疫微环境调控相关,且不同成分间可能存在协同关系。

致 谢 本实验在南京中医药大学中药性效研究重点实验室完成。

参 考 文 献

- [1] Shen CM, Li QL, Zhang HY, et al. Analysis of Chinese medicine prescriptions for cancer [J]. *Chin Archives Tradit Chin Med* (中华中医药学刊), 2013, 31(11): 2475-2477.
- [2] Jin YH, Yook J, Lee YH, et al. Caspase3-mediated cleavage of p21WAF1/CIP1 associated with the cyclin A-cyclin-dependent kinase 2 complex is a prerequisite for apoptosis in SK-HEP-1 cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(39): 30256-30263.
- [3] Mochizuki M, Yoo YC, Matsuzawa K, et al. Inhibitory effect of tumor metastasis in mice by saponins, ginsenoside-Rb2, 20(R)- and 20(S)-ginsenoside-Rg3, of renginseng [J]. *Biol Pharm Bull*, 1995, 18(9): 1197-1202.
- [4] Kim HE, Oh JH, Lee SK, et al. Ginsenoside RH-2 induces apoptotic cell death in rat C6 glioma via a reactive oxygen-and caspase-dependent but Bcl-X(L)-independent pathway [J]. *Life Sci*, 1999, 65(3): PL33-40.
- [5] Wang P, Du X, Xiong M, et al. Ginsenoside Rd attenuates breast cancer metastasis implicating derepressing microRNA-18a-regulated Smad2 expression [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 33709.
- [6] Solinas G, Germano G, Mantovani A, et al. Tumor-associated macrophages (TAMS) as major players of the cancer-related inflammation [J]. *J Leukoc Biol*, 2009, 86(5): 1065-1073.
- [7] Jiang YC, Bi L, Gao J, et al. Research of immune modulation of Cinseng water extracts on TAMs and its regulation effects on cell proliferation of A549 [J]. *Chin Tradit Patent Med* (中成药), 2016, 38(8): 1689-1695.
- [8] Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis [J]. *Cell*, 2006, 124: 263-266.
- [9] Wallerius M, Wallmann T, Bartish M, et al. Guidance molecule SEMA3A restricts tumor growth by differentially regulating the proliferation of tumor-associated macrophages [J]. *Cancer Res*, 2016, 76: 3166-3178.