

[药 理]

## 艾叶挥发油对 A549 细胞的抑制作用

丁圆平<sup>1</sup>, 刘靖怡<sup>2</sup>, 田 洋<sup>1</sup>, 李艳丽<sup>1</sup>, 吴明哲<sup>3</sup>, 赵志鸿<sup>4\*</sup>

[1. 郑州大学药物研究院, 河南 郑州 450001; 2. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083; 3. 郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052; 4. 河南省(郑州大学)医药科学研究所, 河南 郑州 450052]

**摘要:** 目的 研究艾叶挥发油对 A549 细胞的抑制作用。方法 MTT 法检测挥发油对 A549 细胞的抗增殖活性, 流式细胞仪检测细胞凋亡率及细胞周期。皮下注射 A549 细胞建立肺癌模型后, 裸鼠随机分为阴性对照组、5-氟尿嘧啶组(10 mg/kg)及艾叶挥发油低、中、高剂量组(57.5、115、230 mg/kg), 考察挥发油对肿瘤生长及体质量的影响。HE 染色观察病理组织。**结果** 挥发油明显抑制细胞增殖, 并呈浓度依赖性。424.8 μg/mL 挥发油处理细胞 48 h 后, 细胞凋亡率最高(67.1%), G0/G1 期细胞比例降低, G2/M 期细胞比例无明显变化, S 期细胞比例增加。与阴性对照组比较, 挥发油组肿瘤质量和体积显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 裸鼠体质量无明显变化( $P > 0.05$ )。**结论** 艾叶挥发油可阻滞 A549 细胞于 S 期, 从而抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 而且安全性高。

**关键词:** 艾叶挥发油; A549 细胞; 增殖; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)09-2063-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.009

## Inhibitory effects of volatile oils from *Artemisia argyi Folium* on A549 cells

DING Yuan-ping<sup>1</sup>, LIU Jing-yi<sup>2</sup>, TIAN Yang<sup>1</sup>, LI Yan-li<sup>1</sup>, WU Ming-zhe<sup>3</sup>, ZHAO Zhi-hong<sup>4\*</sup>

[1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. School of Chemical & Environmental Engineering, China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083, China; 3. The First Hospital Affiliated to Zhengzhou University, Zhengzhou 450002, China; 4. Henan Provincial (Zhengzhou University) Institute for Medical and Pharmaceutical Sciences, Zhengzhou 450002, China]

**ABSTRACT: AIM** To study the inhibitory effects of volatile oils from *Artemisia argyi Folium* on A549 cells.

**METHODS** The anti-proliferation activity of volatile oils on A549 cells was detected by MTT, cell apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry. The lung cancer nude mouse models induced by subcutaneous injection of A549 cells were randomly assigned into negative control group, 5-fluorouracil group (10 mg/kg) and low-dose, medium-dose, high-dose of volatile oils groups (57.5, 115, 230 mg/kg). The effects of volatile oils on tumor growth and body weight were investigated, and the pathological tissues were observed by HE staining. **RESULTS**

Volatile oils obviously inhibited cell proliferation in concentration-dependent manners. After cells were treated with 424.8 μg/mL volatile oils for 48 h, cell apoptosis rate reached the highest (67.1%), with decreased cell proportion in G0/G1 phase, no significantly changed cell proportion in G2/M phase, and increased cell proportion in S phase. Compared with the negative control group, the volatile oils groups demonstrated markedly reduced tumor weight and volume ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), and no obvious change was found in the body weight of nude mice ( $P > 0.05$ ). **CONCLUSION** Volatile oils from *Artemisia argyi Folium* can block A549 cells in S phase, thus inhibit cell proliferation and induce cell apoptosis, with high safety.

**KEY WORDS:** volatile oils from *Artemisia argyi Folium*; A549 cells; proliferation; apoptosis

收稿日期: 2019-02-04

作者简介: 丁圆平(1993—), 女, 硕士生, 从事中药新药研发。Tel: 15637845356, E-mail: dyp5356@163.com

\* 通信作者: 赵志鸿(1965—), 女, 研究员, 从事中药新药研发。Tel: (0371) 66997282, E-mail: zzh6598@163.com

肺癌是目前发病率、死亡率增长最快的恶性肿瘤<sup>[1]</sup>，大多数情况下由于癌细胞高侵袭性，手术无法达到预期效果，而化疗通常会产生严重的副作用，并且近年来新型靶向药物价格昂贵，大大限制了临床推广。前期报道<sup>[2-4]</sup>，中成药毒副反应少，对中外晚期肺癌患者具有提高机体免疫力、改善临床症状等作用，正成为当前研究热点。

艾叶为菊科植物艾 *Artemisia argyi* Lévl. et Vant. 的干燥叶，具有抗炎、抗菌、抗病毒、镇咳平喘等多种药理作用<sup>[5-8]</sup>，广泛应用于临床，其主要有效成分为艾叶挥发油，前期证实它具有抗HBV、抗肝癌活性<sup>[9-10]</sup>，但尚无其抗肺癌作用的报道。因此，本实验研究艾叶挥发油体内抗肺癌A549细胞活性，并初步探讨其作用机制，为相关抗肿瘤新药研发提供依据。

## 1 材料

1.1 试药 艾叶产自河南驻马店，经河南中医药大学董诚明教授鉴定为正品，其挥发油为实验室自提。RPMI 1640（北京索莱宝科技有限公司）；胎牛血清、MTT（美国Sigma公司）；AnnexinV-FITC细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒（江苏凯基生物技术股份有限公司）；5-氟尿嘧啶注射液（上海旭东海普药业有限公司）。

1.2 仪器 IL-161CT CO<sub>2</sub> 培养箱 [施都凯仪器设备（上海）有限公司]；168-1000XC 酶标仪（美国Bio-Rad公司）；XL-MCL 流式细胞仪（美国Beckman Coulter公司）。

1.3 动物 SPF级雌性BALB/c-nu裸鼠，周龄5~6周，体质量18~20 g，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，合格证号SCXK（京）2016-0006，在温度20~25℃、相对湿度40%~60%的无菌笼中饲养，定期喂食。

## 2 方法

2.1 挥发油提取 称取艾叶500 g，粉碎后置于10 000 mL圆底烧瓶中，加入5 000 mL蒸馏水浸泡过夜，水蒸气蒸馏法提取6 h，收集挥发油，无水硫酸钠除水后密封贮存于-20℃下，测得挥发油产率为0.39%。

2.2 细胞培养 A549细胞贴壁生长，RPMI 1640、胎牛血清以9:1比例配制成完全培养基，置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中培养，取对数生长期细胞进行实验。

2.3 供试品溶液制备 1 mL挥发油质量为944 mg。体外药效实验中，取挥发油16 μL，加入

24 μL DMSO混合均匀，培养基逐步稀释，即得（DMSO最高含有量为0.1%）；体内药效实验中，取挥发油1 mL，加入20 μL吐温-80，混合均匀，生理盐水逐步稀释，即得。

2.4 挥发油对A549细胞增殖影响 胰酶消化处于对数生长期的A549细胞，离心，调节细胞密度至 $5 \times 10^4 \sim 6 \times 10^4$ /mL，按每孔100 μL接种于96孔板中，37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h，吸去原培养基，加入188.8、283.2、377.6、472.0、566.4、660.8 μg/mL挥发油，阳性对照组加入10 μg/mL 5-氟尿嘧啶，阴性对照组加入100 μL空白培养基，每个质量浓度4个复孔。于24、48、72 h各加入20 μL MTT溶液，置于培养箱中孵育4 h，吸去原培养基，加入150 μL DMSO，微量振荡器上振荡10 min后上机检测，计算细胞增殖抑制率，增殖抑制率 =  $(1 - \text{给药孔吸光度} / \text{空白孔吸光度}) \times 100\%$ <sup>[11]</sup>，重复3次，SPSS软件计算IC<sub>50</sub>值。

2.5 细胞凋亡率检测 采用Annexin V-FITC/PI双染法。胰酶消化处于对数生长期的A549细胞，离心，调节细胞密度至 $1 \times 10^5$ /mL，按每孔2 mL接种于6孔板中，37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h，吸去原培养基，加入188.8、236.0、283.2、330.4、377.6、424.8 μg/mL挥发油培养48 h，不含EDTA的胰酶消化收集细胞，PBS缓冲液洗涤2次，加入Annexin V-FITC、PI各5 μL，流式细胞仪检测细胞凋亡，重复3次。

2.6 细胞周期检测 采用PI单染法。胰酶消化处于对数生长期的A549细胞，离心，调节细胞密度至 $1 \times 10^5$ /mL，按每孔2 mL接种于6孔板中，37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h，吸去原培养基，加入188.8、236.0、283.2、330.4 μg/mL挥发油培养48 h，胰酶消化收集细胞，PBS缓冲液洗涤1次，70%冷乙醇固定，4℃下过夜，PBS缓冲液洗去固定液，加入PI/RNase A后室温下避光30 min，流式细胞仪检测细胞周期，重复3次。

2.7 艾叶挥发油对A549荷瘤裸鼠肿瘤生长及体质量的影响 裸鼠右背部皮下注射 $1 \times 10^7$ 个A549细胞（0.2 mL/只），建立肺癌模型，当肿瘤体积增加到约100 mm<sup>3</sup>时随机分为5组，每组5只，实验组（3组）分别腹腔注射230、115、57.5 mg/kg挥发油，阳性组给予5-氟尿嘧啶（10 mg/kg），对照组给予等量生理盐水，连续15 d，每2 d测量1次肿瘤体积和体质量。第15天，裸鼠称定质量，

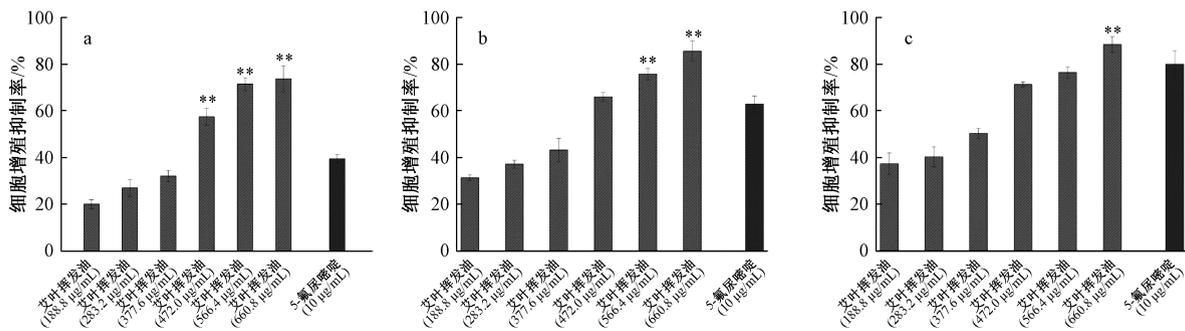
测量肿瘤体积后处死，称定瘤重，计算肿瘤生长抑制率，公式为体积 =  $1/2 \times a \times b^2$  (a、b 分别表示肿瘤长径、短径)、抑制率 = [ (阴性对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重) / 阴性对照组平均瘤重 ]  $\times 100\%$  [12]。

2.8 病理组织切片 每组随机取 2 只裸鼠，剖离组织器官，生理盐水清洗表面，吸水纸吸干水分，4% 甲醛固定，HE 染色法制备病理组织切片，显微

镜下观察、拍照。

### 3 结果

3.1 挥发油对 A549 细胞增殖影响 图 1 显示，挥发油对 A549 细胞增殖具有明显的抑制作用，并呈浓度依赖性。当其质量浓度为 660.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，48、72 h 细胞生长抑制率均在 80% 以上，24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  值分别为 513.54、495.60、484.27  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



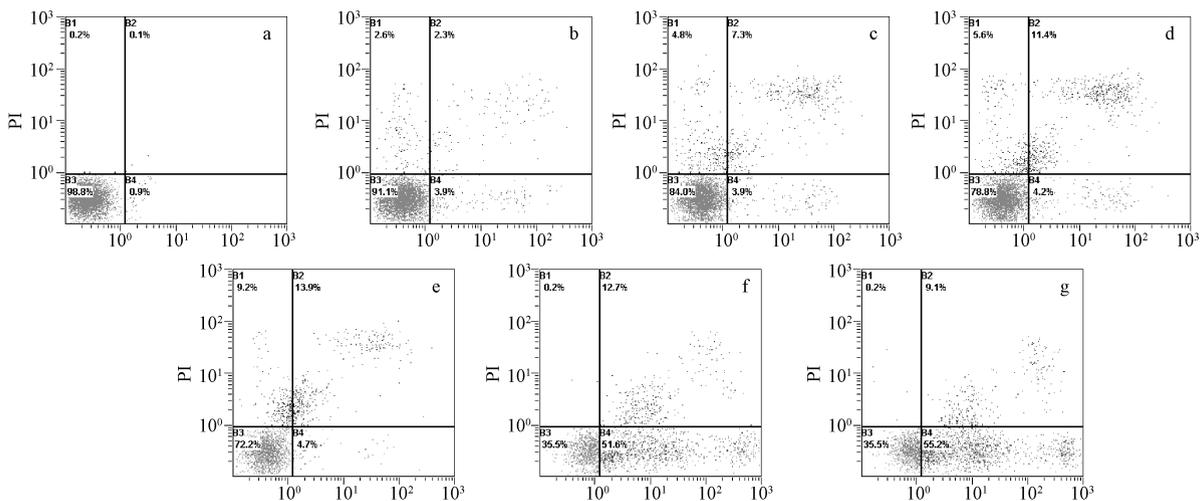
注：a~c 分别作用 24、48、72 h。与 5-氟尿嘧啶组比较，\*\*  $P < 0.01$

图 1 挥发油对 A549 细胞抑制率的影响

Fig. 1 Effect of volatile oils on the inhibition rate of A549 cells

3.2 挥发油对 A549 细胞凋亡的影响 图 2~3 显示，挥发油作用 A549 细胞 48 h 后随着其质量浓度增加，细胞凋亡率也逐渐升高。188.8 ~ 330.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，

细胞早期凋亡率无明显变化；继续增加至 377.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时，早期凋亡率骤增；424.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时凋亡率最高，为 67.1%。



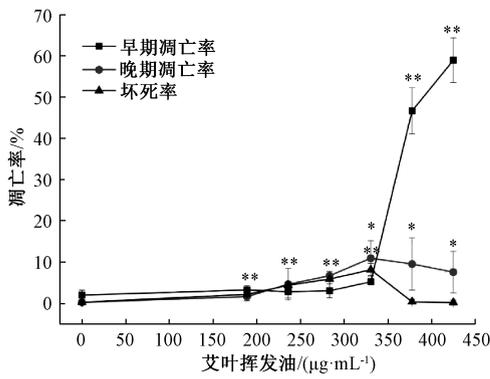
注：a~g 分别为阴性对照组及艾叶挥发油 188.8、236.0、283.2、330.4、377.6、424.8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组

图 2 各组 A549 细胞 48 h 凋亡率

Fig. 2 Apoptosis rates of A549 cells at 48 h in various groups

3.3 挥发油对 A549 细胞周期的影响 图 4~5 显示，挥发油作用于 A549 细胞 48 h 后，G0/G1 期细胞比例降低，G2/M 期无明显变化，S 期细胞比例增加。随着其质量浓度增加，S 期细胞比例逐渐增加，具有浓度依赖性。

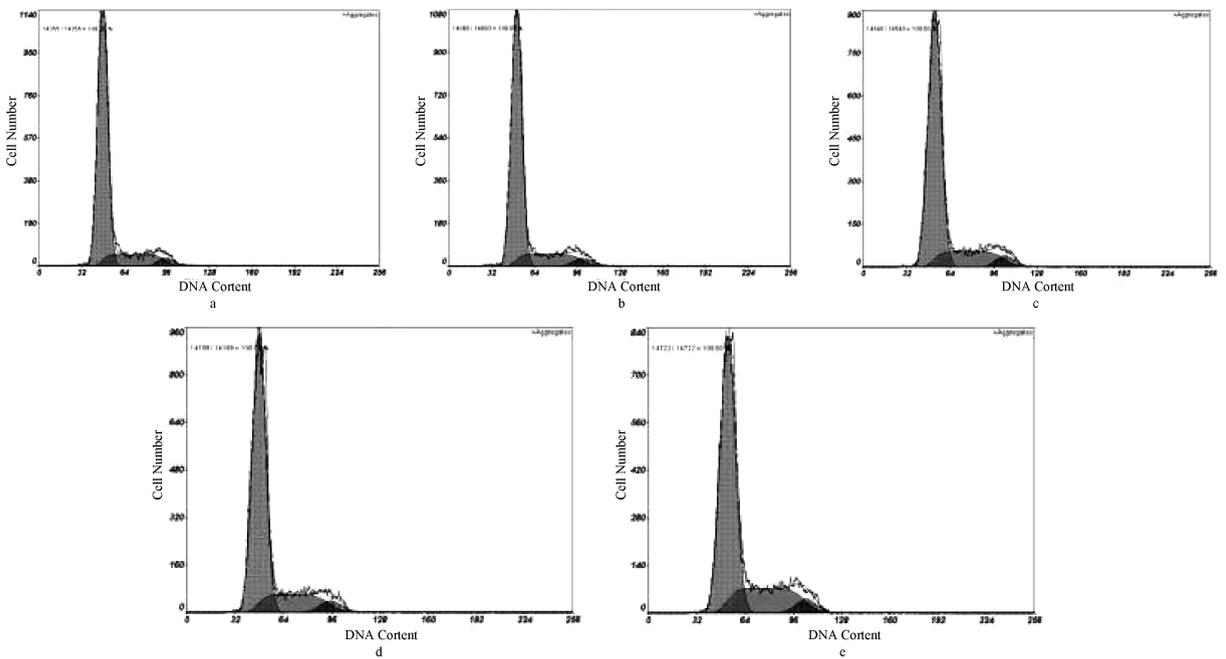
3.4 挥发油对肿瘤生长的影响 表 1、图 6~8 显示，230、115、57.5 mg/kg 挥发油的抑瘤率分别为 55.54%、33.85%、19.20%，低于 5-氟尿嘧啶组的 71.10%，但连续给药 5 d 后，5-氟尿嘧啶组裸鼠出现食欲不振、体质量明显下降的现象；挥发



注：与阴性对照组 (0 μg/mL) 比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

图3 A549细胞凋亡曲线

Fig. 3 Apoptosis curves for A549 cells



注：a~e 分别为阴性对照组及艾叶挥发油 188.8、236.0、283.2、330.4 μg/mL 组

图4 各组A549细胞48h周期分布 ( I )

Fig. 4 Cycle distributions of A549 cells at 48 h in various groups ( I )

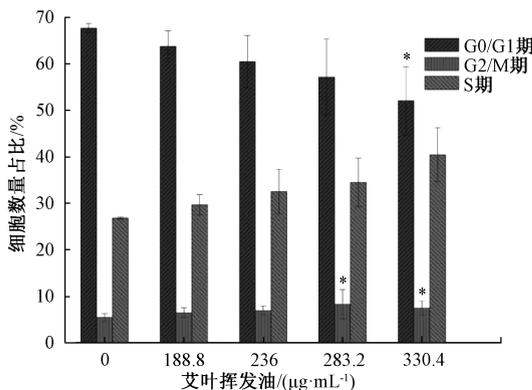


图5 各组A549细胞48h周期分布 ( II )

Fig. 5 Cycle distributions of A549 cells at 48 h in various groups ( II )

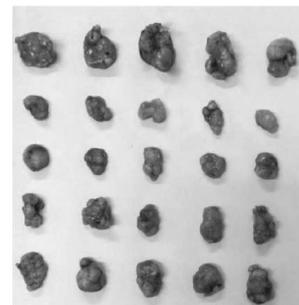
油组无明显变化, 并较阴性对照组能明显抑制肿瘤生长。

表1 各组肿瘤质量、抑瘤率的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Tab. 1 Comparison of tumor weights and tumor inhibition rates among various groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
阴性对照组	—	2.22 ± 0.36	—
艾叶挥发油组	230	0.99 ± 0.08**	55.54
艾叶挥发油组	115	1.47 ± 0.10*	33.85
艾叶挥发油组	57.5	1.79 ± 0.21*	19.20
5-氟尿嘧啶组	10	0.64 ± 0.06**	71.10

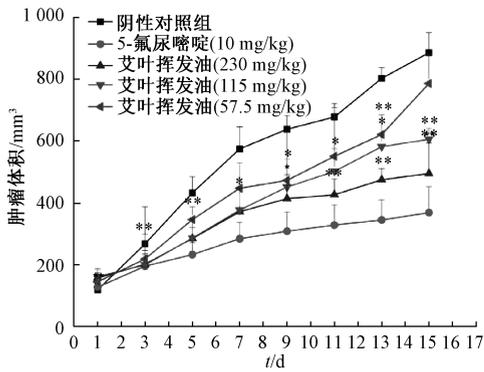
注：与阴性对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$



注：A~E 分别为阴性对照组、5-氟尿嘧啶组及艾叶挥发油 230、115、57.5 mg/kg 组

图6 各组裸鼠肿瘤体积

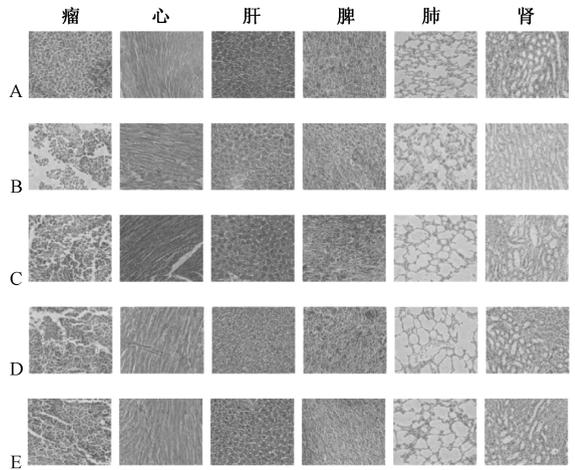
Fig. 6 Tumor volumes of nude mice in various groups



注：与阴性对照组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$

图7 裸鼠肿瘤体积变化曲线

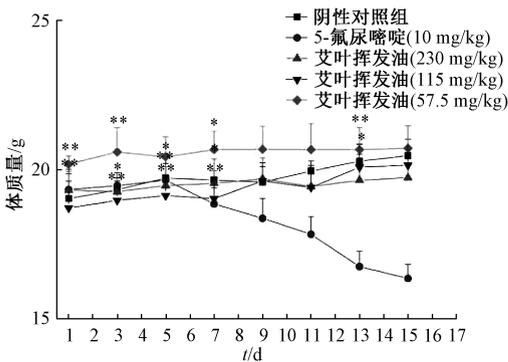
Fig. 7 Variation curves for tumor volumes of nude mice



注：A~E 分别为阴性对照组、5-氟尿嘧啶组及艾叶挥发油 230、115、57.5 mg/kg 组

图9 各组裸鼠组织病理学切片

Fig. 9 Histopathological sections of nude mice in various groups



注：与阴性对照组比较，\*  $P < 0.05$ ，\*\*  $P < 0.01$

图8 裸鼠体重变化曲线

Fig. 8 Variation curves for body weights of nude mice

3.5 病理组织分析 图9显示，阴性组裸鼠肿瘤细胞排列紊乱紧密，片块状弥散分布，细胞胞浆丰富，细胞核增大，深染，具有明显的异型性；5-氟尿嘧啶组裸鼠肿瘤组织出现明显局灶性坏死，肿瘤细胞核分裂相减少，核固缩、碎裂、溶解，出现大片坏死；艾叶挥发油低剂量组裸鼠肿瘤细胞细胞排列紧密，部分出现萎缩，细胞界限模糊，未呈现典型凋亡状态；艾叶挥发油高剂量组裸鼠肿瘤细胞体积减小，细胞间隙增大，核浆比例缩小，细胞胞核染色变浅，核分裂相减少，出现大量凋亡小体，呈现凋亡状态。与阴性对照组比较，5-氟尿嘧啶组裸鼠肺泡壁明显增生变厚，而艾叶挥发油组无明显变化，但出现肺大泡，表明肺部组织发生了病理变化；5-氟尿嘧啶组、艾叶挥发油高剂量组裸鼠肝组织切片中均出现细微裂缝，表明也有部分病变；各组裸鼠心、脾、肾组织 HE 病理组织切片显示，各组织内细胞结构紧凑，界限清晰，均未见明显病理学病变和转移瘤灶。

#### 4 讨论

肺癌具有恶化程度高、治疗效果差、早期症状体征不典型等特点，化疗是最常用的方法，但其自身毒副作用和耐药性又妨碍临床疗效<sup>[13-14]</sup>，临床常见的类型是非小细胞肺癌，其中肺腺癌所占比例最大。A549 细胞属于人肺腺癌细胞系，细胞学水平实验中常被作为标准模式细胞<sup>[15]</sup>。

艾叶挥发油为小分子物质，能被机体快速吸收，成分复杂，具有多种药理作用，故应用广泛，如呼吸系统、抗菌、抗炎、抗肿瘤等<sup>[16-18]</sup>。本实验首次发现，艾叶挥发油能明显抑制体外培养人肺癌 A549 细胞生长，并呈剂量-时间依赖关系；可通过抑制 DNA 合成来使细胞阻滞于 S 期，可能是诱导 A549 细胞凋亡的机制之一；对裸鼠皮下接种的 A549 细胞生长具有抑制作用，其机制可能为诱导 A549 细胞凋亡。

在本实验所测浓度范围内，艾叶挥发油抗肿瘤活性虽不如 5-氟尿嘧啶，但其对正常细胞毒性较低，而且与阴性对照组相比能明显抑制人肺癌 A549 细胞生长速度。故综合考虑，该成分体现出安全有效、低毒的优势，具有广阔的开发前景，为肺癌治疗提供了新选择。

#### 参考文献：

[ 1 ] Sakthivel R, Malar D S, Devi K P. Phytol shows anti-angiogenic activity and induces apoptosis in A549 cells by depolarizing the mitochondrial membrane potential[J]. *Biomed*

- Pharmacother*, 2018, 105: 742-752.
- [ 2 ] 孙婕怡. 肺癌的中医辨证及用药规律研究[J]. 内蒙古中医药, 2014, 33(6): 86-87.
- [ 3 ] 王 丹, 裴斯彪, 任小平. 艾叶的制剂开发及临床应用[J]. 临床合理用药杂志, 2013, 6(1): 83.
- [ 4 ] 王其美, 蒋益兰. 扶正祛邪法联合化疗治疗非小细胞肺癌38例临床观察[J]. 新中医, 2015, 47(11): 171-173.
- [ 5 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版第一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 89.
- [ 6 ] Jiang Z T, Jing T, Jin T, *et al.* Chemical components and molecular microcapsules of folium artemisia argyi essential oil with  $\beta$ -cyclodextrin derivatives [J]. *J Essent Oil Bear Pl*, 2016, 19(5): 1155-1169.
- [ 7 ] Xiang F, Bai J H, Tan X B, *et al.* Antimicrobial activities and mechanism of the essential oil from *Artemisia argyi* levl. *et Van. var. argyi cv. Qiai* [J]. *Ind Crop Prod*, 2018, 125: 582-587.
- [ 8 ] Chen L L, Zhang H J, Chao J, *et al.* Essential oil of *Artemisia argyi* suppresses inflammatory responses by inhibiting JAK/STATs activation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 204: 107-117.
- [ 9 ] 赵志鸿, 王丽阳, 郑立运, 等. 艾叶挥发油对HBV的抑制作用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2015, 50(2): 301-304.
- [ 10 ] 王春杰. 艾叶挥发油抗肝癌作用研究及其 $\beta$ -环糊精聚合物微球的制备[D]. 郑州: 郑州大学, 2018.
- [ 11 ] 黄开顺. 5-氟尿嘧啶诱导A549细胞凋亡细胞内外药物定量分析及蛋白质组学研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011.
- [ 12 ] 张 琪, 杨 扬. 草果挥发油对肝癌H22荷瘤小鼠的抑瘤作用[J]. 武汉大学学报(理学版), 2015, 61(2): 179-182.
- [ 13 ] 张艳霞, 蔺兴遥, 安方玉, 等. 当归挥发油对人肺腺癌GLC-82细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 23(1): 29-33.
- [ 14 ] 张艳霞, 张延英, 张正顺, 等. 当归挥发油对人肺腺癌SPC-A-1细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国药理与临床, 2016, 32(6): 102-105.
- [ 15 ] 刘 平. 艾烟可吸入颗粒物对人肺腺癌A549细胞增殖及基因表达谱的影响[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [ 16 ] Cha J D, Kim Y H, and Kim J Y. Essential oil and 1, 8-cineole from *Artemisia lavandulaefolia* induces apoptosis in KB cells via mitochondrial stress and caspase activation [J]. *Food Sci Biotechnol*, 2010, 19(1): 185-191.
- [ 17 ] 张璐敏, 吕学维, 邵邻相, 等. 野艾蒿挥发油诱导HeLa细胞凋亡与坏死[J]. 中药材, 2012, 36(12): 1988-1992.
- [ 18 ] 张璐敏, 吕学维, 邵邻相, 等. 野艾蒿挥发油对HeLa癌细胞形态与结构的影响[J]. 广西植物, 2014, 34(3): 393-397.

## 补益强心片对慢性心力衰竭大鼠的保护作用

冯庆涛, 杨 静, 张 燕, 吕尚增, 苗华为  
(河北省中医院, 河北 石家庄 050011)

**摘要:** 目的 研究补益强心片对慢性心力衰竭大鼠的保护作用。方法 60只大鼠随机分为正常对照组、假手术组、模型组及补益强心片低、中、高剂量组(0.18、0.36、0.72 g/kg), 结扎心脏左冠状动脉前降支的方法建立慢性心力衰竭模型。灌胃给药4周后, 超声仪检测血流动力学参数(LVEDd、LVESd、LVEF), ELISA检测BNP、ANP水平, 流式细胞术检测细胞凋亡率, RT-PCR检测*Bcl-2*、*Bax*、*caspase-3* mRNA表达, Western blot检测*Bcl-2*、*Bax*、*caspase-3*、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt蛋白表达。结果 与模型组比较, 补益强心片组血流动力学参数显著改善( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), BNP、ANP水平, 细胞凋亡率, *Bax*、*caspase-3* mRNA和蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ ), *Bcl-2* mRNA和蛋白表达、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt显著升高( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论 补益强心片对慢性心力衰竭大鼠具有保护作用, 其机制可能与激活PI3K/Akt信号通路、抑制凋亡有关。

**关键词:** 补益强心片; 慢性心力衰竭; 血流动力学; 凋亡; PI3K/Akt信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)09-2068-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2019.09.010

收稿日期: 2018-10-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573698); 河北省中医药管理局2014年度科研计划项目(2014025)

作者简介: 冯庆涛(1978—), 男, 硕士, 主治医师, 从事中医药防治心血管疾病研究。Tel: (0311) 69095269, E-mail: hxzhang76@163.com