

蛇葡萄素诱导人胃癌细胞凋亡的研究

郑作文^{*}, 吕林艳, 王小琴, 陶林
(广西中医药大学药学院, 南宁 530001)

[摘要] 目的:研究蛇葡萄素对人胃癌细胞(SGC-7901)凋亡的影响。方法:MTT 比色法测定细胞的增殖抑制率,流式细胞仪 Annexin-V FITC/PI 双染检测蛇葡萄素 33.3,50,75 mg·L⁻¹作用下 SGC-7901 细胞的凋亡及各细胞周期。结果:蛇葡萄素作用于 SGC-7901 48 h 后,可明显促进细胞早期凋亡,50,75 mg·L⁻¹细胞凋亡率为 (29.03 ± 6.21)%, (43.43 ± 1.00)%, 明显高于空白组 (11.83 ± 4.67) % (P < 0.05, P < 0.01) 且呈剂量依赖关系。蛇葡萄素 33.3,50,75 mg·L⁻¹作用于 SGC-7901 细胞 48 h 后,G₁ 期细胞分别为 (52.07 ± 4.41)%, (57.07 ± 2.70)%, (58.43 ± 2.66)% 明显高于空白对照组 (42.00 ± 3.04) % (P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01)。结论:蛇葡萄素能诱导 SGC-7901 细胞凋亡并使细胞周期阻滞在 G₁ 期。

[关键词] 蛇葡萄素; 人胃癌细胞; 细胞凋亡

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)24-0292-03

Study of Ampelopsin on Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells

ZHENG Zuo-wen^{*}, LV Lin-yan, WANG Xiao-qin, TAO Lin
(Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

[Abstract] **Objective:** To study ampelopsin on apoptosis in human gastric cancer cells (SGC-7901). **Method:** Cell proliferation inhibition rate was measured by MTT, The situation in different apoptosis phase was evaluated by flow cytometry (Annexin-V/PI double staining). **Result:** Ampelopsin could significantly promote early apoptosis in SGC-7901 after 48 h. Ampelopsin of 50 and 75 mg·L⁻¹ induced apoptosis of (29.03 ± 6.21)%, and (43.43 ± 1.00)% with a dose-dependent relationship, significantly higher than that in the control group (11.83 ± 4.67) % (P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01). Cells in G₁ phase was (52.07 ± 4.41)%, (57.07 ± 2.70)%, (58.43 ± 2.66)%, significantly higher than (42.00 ± 3.04)% in control group (P < 0.05, P < 0.01, P < 0.01). **Conclusion:** Ampelopsin could induce the SGC-7901 cell apoptosis and block the cells in G₁ phase.

[Key words] ampelopsin; human gastric cancer cells; apoptosis

蛇葡萄素为藤茶所富含的黄酮类化合物,其含量高达 27% ~ 28%^[1-2],又名双氢杨梅树皮素、二氢杨梅素、福建茶素、白茛素等。藤茶系葡萄科蛇葡萄属植物显齿蛇葡萄的嫩茎叶^[3],为广西瑶族民间药用的草药之一^[4]。有文献报道,蛇葡萄素对白血病细胞 HL-60, K562 以及肝癌 Bel-7402 细胞的生长具有抑制作用^[5]。我们的前期研究已证实蛇葡萄素对 SGC-7901 裸鼠移植瘤有较强的抑瘤作用^[6],但其作用机制不明。本实验采用流式细胞仪检测分析蛇葡萄素对 SGC-7901 细胞凋亡的影响。

1 材料

1.1 药物和试剂 蛇葡萄素来源于藤茶 Ampelopsis grossedentata (Hand. -Mazz.) W. T. Wang 的嫩茎叶,由广西中医药大学中药化学教研室提供,纯度为 98%。RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 755295);新生牛血清(浙江天杭生物科技有限公司,批号 100502),Trypsin, Solarbio(批号 T8150),Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(凯基生物,批号 KGA106)。

1.2 细胞 SGC-7901 细胞由广西中医学院药理教研室冻存保藏。

[收稿日期] 20120511(348)
[基金项目] 广西中医药大学校级重点课题(ZD2010006)
[通讯作者] ^{*} 郑作文,教授,硕士生导师,从事中草药抗肿瘤工作,Tel:18977112788,E-mail:zzw_nn@163.com

1.3 仪器 EPICSXL-流式细胞仪(美国贝克曼-特公司)。

2 方法

2.1 MTT 比色法检测 SGC-7901 增殖 取对数生长期 SGC-7901 以 0.25% 胰酶消化,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液制备成 2×10^4 个/mL 细胞悬液,接种至无菌 96 孔板内。每孔内加 200 μ L。置 37 $^{\circ}$ C ,5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,观察到细胞贴壁良好后,吸出旧培养液。以孔为单位分成 5 组(药物组加入用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 完全培养液稀释的药液,药液终质量浓度分别为 75.0,50.0,33.3,22.2,14.8,9.9 mg $\cdot$ L⁻¹。阳性组顺铂的终质量浓度 20 mg $\cdot$ L⁻¹。空白对照组只加含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 完全培养液),每组设 4 个平行孔,200 μ L/孔。置 37 $^{\circ}$ C ,5% CO₂ 培养 48 h。每孔加 MTT 溶液 10 μ L,37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h;小心吸弃上清液,每孔加 DMSO 150 μ L,室温下用微型超声振荡器振荡 2 min。用酶标仪于 450 nm 处测吸光度(A)。计算细胞增殖抑制率。

抑制率 = (1 - A_{药物} / A_{对照}) $\times$ 100%

2.2 流式细胞仪检测蛇葡萄素对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 取对数生长期 SGC-7901 以 0.25% 胰酶消化,用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液制成单细胞悬液,调细胞终浓度为 5×10^5 个/mL,接种于 50 mL 培养瓶培养,1 mL/瓶,设 1 个空白对照组和 3 个药物组,每组 3 个培养瓶。细胞接种后,每瓶加入 5 mL 含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液,在 CO₂ 培养箱培养 24 h。弃上清,药物组加入用含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液稀释的药液,8 mL/瓶,3 个药物终浓度分别为 75,50,33.3 mg $\cdot$ L⁻¹。空白对照组只加含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养液。加药后细胞在同条件的培养箱中培养 48 h。用不含 EDTA 的胰酶消化,收集细胞于 2 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 5 min, PBS 洗 2 次,1 000 r $\cdot$ min⁻¹,离心 5 min,收集 $1 \sim 5 \times 10^6$ 细胞;加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞;加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ L 碘化丙锭(PI),混匀;室温、避光、反应 5 ~ 15 min;在 1 h 内,进行流式细胞仪的观察和检测。

2.3 流式细胞仪检测蛇葡萄素对 SGC-7901 细胞周期的影响 取对数生长期的细胞以 0.25% 胰酶消化,细胞收集、计数、接种、分组、加培养液均同 2.1。

用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞于 2 000 r $\cdot$ min⁻¹离心 5 min, PBS 洗 2 次,1 000 r $\cdot$ min⁻¹离心

5 min,收集 $1 \sim 5 \times 10^6$ 个细胞;在沉积的 SGC-7901 细胞中加入冷冻 70% 乙醇 1 mL,混匀,置冰箱(4 $^{\circ}$ C)固定过夜,离心,用 PBS 洗 3 次,加入 RNase A 至终质量浓度为 50 mg $\cdot$ L⁻¹,37 $^{\circ}$ C 消化 30 min,用终质量浓度为 50 mg $\cdot$ L⁻¹碘化丙锭(PI)4 $^{\circ}$ C 避光染色 30 min,上机前将细胞悬液混匀,过 200 目尼龙网筛,用流式细胞仪测定 DNA 含量并分析细胞周期分布,进行凋亡峰拟合及细胞周期分析并绘制 DNA 分布图。

2.4 统计学处理 采用 SPSS 12.0 进行数据的统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 *t* 检验(方差不齐时采用 *t* 检验校正公式),*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 MTT 比色法检测 SGC-7901 增殖 蛇葡萄素作用于 SGC-7901 48 h 后,可明显抑制细胞增殖,且呈剂量依赖关系。见表 1。

表 1 蛇葡萄素对 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量 /mg $\cdot$ L ⁻¹	A	抑制率 /%	IC ₅₀ /mg $\cdot$ L ⁻¹
空白对照	-	0.316 $\pm$ 0.014	-	
顺铂	20.0	0.076 $\pm$ 0.012 ²⁾	76.13	
蛇葡萄素	75.0	0.103 $\pm$ 0.044 ²⁾	67.59	37.96
	50.0	0.114 $\pm$ 0.015 ²⁾	63.95	
	33.3	0.160 $\pm$ 0.009 ²⁾	49.57	
	22.2	0.218 $\pm$ 0.015 ²⁾	31.15	
	14.8	0.250 $\pm$ 0.014 ²⁾	20.87	
	9.9	0.297 $\pm$ 0.026	6.00	

注:与空白对照组比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01(表 2 ~ 3 同)。

3.2 蛇葡萄素对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 蛇葡萄素 50,75 mg $\cdot$ L⁻¹ 作用于 SGC-7901 48 h 后,可明显促进细胞早期凋亡,凋亡率分别为 (29.03 $\pm$ 6.21)%, (43.43 $\pm$ 1.00)%,明显高于空白对照组 (11.83 $\pm$ 4.67)%(*P* < 0.05, *P* < 0.01),呈剂量依赖关系。

3.3 蛇葡萄素对 SGC-7901 细胞周期的影响 蛇葡萄素 33.3,50,75 mg $\cdot$ L⁻¹ 作用于 SGC-7901 细胞 48 h 后,G₁ 期细胞数逐渐增多,与空白对照组比较 *P* < 0.05 ~ 0.01。提示蛇葡萄素可以诱导 SGC-7901 细胞周期阻滞于 G₁ 期。见表 2。

4 讨论

恶性肿瘤是严重危害人类健康的常见病。目前认为肿瘤的发生是正常细胞多重损伤的复杂过程,

表 2 蛇葡萄素对 SGC-7901 细胞周期的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·L ⁻¹	G ₁ /%	S/%	G ₂ /%	G ₂ /G ₁
空白对照	—	42. 00 ± 3. 04	39. 47 ± 0. 76	18. 54 ± 3. 69	1. 94 ± 0. 02
蛇葡萄素	33. 3	52. 07 ± 4. 41 ¹⁾	35. 57 ± 3. 95	12. 37 ± 8. 28	1. 96 ± 0. 05
	50. 0	57. 07 ± 2. 70 ²⁾	32. 10 ± 4. 25	10. 80 ± 3. 87	1. 97 ± 0. 04
	75. 0	58. 43 ± 2. 66 ²⁾	31. 20 ± 3. 31	10. 30 ± 5. 91	1. 95 ± 0. 04

其形成由细胞凋亡调控的紊乱、细胞增殖相对增加和/或凋亡相对减少导致。细胞周期调控异常与细胞凋亡异常被视为肿瘤发生的重要原因。许多抗肿瘤药可打破异常的肿瘤细胞周期动力改变,引起细胞周期阻滞,增加肿瘤细胞对药物的敏感性,因此,通过细胞周期阻滞来诱导凋亡成为抗肿瘤重要的一个新靶点^[7-8]。近年来从天然产物中寻找有效的抗癌物质取得了突破性的进展,研究发现天然植物中的黄酮类化合物具有明显的抗肿瘤作用。这是近年来的研究热点之一。本实验结果显示,蛇葡萄素 50,75 mg·L⁻¹作用于 SGC-7901 48 h 后,可明显促进细胞早期凋亡,蛇葡萄素 33. 3,50,75 mg·L⁻¹可使细胞周期中 G₁ 期细胞明显增多,使进入 S 期、M 期的细胞比例降低,影响细胞周期进程从而抑制细胞增殖。综上所述,蛇葡萄素不仅与细胞凋亡有关,还影响细胞周期进程。我们推测蛇葡萄素可能先使细胞周期阻滞在 G₁ 期,再启动这一时相的凋亡调控机制引发细胞凋亡。

[参考文献]

[1] 王定勇,刘佳铭,章骏德,等. 显齿蛇葡萄(藤菜)化学成分研究[J]. 亚热带植物通讯,1998,27(2):39.

[2] 何桂霞. 显齿蛇葡萄中总黄酮和二氢杨梅素的含量测定[J]. 中国中药杂志,2000,25(7):423.

[3] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴,第二册. 补编[M]. 北京:科学出版社,1983:349.

[4] 王文采. 葡萄科的新发现[J]. 植物分类学报,1979,17(3):73.

[5] 周宁宁,朱孝峰,谢冰芬,等. 无刺根中蛇葡萄素体外抗肿瘤作用研究[J]. 广东药学,2000,10(4):7.

[6] 郑作文,郭成贤,唐云丽,等. 蛇葡萄素对人胃癌细胞 SGC-7901 裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 肿瘤防治研究,2010,37(3):284.

[7] Hsieh T C,Wi jeratne E K,Liang J Y,et al. Differential control of growth,cell cycle progression,and expression of NF-JB in human breast cancer cells MCF-7, MCF-10A and MDA-MB-231 by poniceidin and oridonin,diterpenoids from the Chinese herb Rabdosia rubescens[J]. Biochem Biophys Res Commun 337. 2005:224.

[8] Vincent K W,Wong P C,Stephen S M,et al. Pseudolaric Acid B, a novel microtubule-destabilizing agent that circumvents multidrug resistance phenotype and exhibits Antitumor Activity *in vivo* [J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(16):6002.

[责任编辑 何伟]