

附子生物碱对人胃癌细胞株 SGC-7901 凋亡及细胞周期的影响*

丁芸霞¹, 邹 玺², 吴 坚², 葛竑璐¹, 胡守友^{2**}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院 南京 210029; 2. 江苏省中医院 南京 210029)

摘 要:目的: 观察附子生物碱对人胃癌细胞株 SGC-7901 的增殖以及凋亡的影响。方法: 运用 MTT 法, 测定经附子生物碱处理后体外培养 SGC-7901 细胞的增殖活性。分别采用 Annexin-V/PI 双染法、流式细胞仪检测附子生物碱对细胞凋亡周期的影响。结果: ①附子生物碱分别作用人胃癌细胞株 SGC-7901 24 h、48 h、72 h 后的 IC₅₀ 为 0.231 8±0.002 2、0.160 1±0.022 7、0.103 1±0.023 1 mg·mL⁻¹, 与空白对照组比较有显著性差异 ($P<0.01$)。②当附子生物碱浓度达到 0.8 mg·mL⁻¹ 时出现明显的凋亡, 凋亡率为 (59.38±5.05)%。③流式细胞仪检测发现, 与空白对照组相比, 给药组处于 S 期细胞的比例显著增多, 并且 G0/G1 期前出现凋亡亚二倍体峰。结论: 附子生物碱体外对人胃癌细胞 SGC-7901 具有增殖抑制作用, 并促进其凋亡, 还可使 SGC-7901 细胞阻滞于 S 期。

关键词: 附子生物碱 人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞增殖 细胞凋亡 细胞周期

doi: 10.11842/wst.2013.05.024 中图分类号: R735.2 文献标识码: A

胃癌是一种消化道肿瘤, 在我国的发病率越来越高, 几乎位于各种恶性肿瘤的前列。最近几年胃癌的手术、化疗和放疗虽然都有长足的发展, 但不能从根本上真正解决肿瘤患者的长期生存和防治肿瘤复发转移等问题。中医药通过整体观念的疗法, 在肿瘤患者治疗疗效, 提高肿瘤患者生活质量上的优势日见突显。癌毒属于阴邪, 附子是温阳第一要品, 附子的化学成分主要有生物碱类成分、附子多糖及蛋白质油脂类成分^[1]。在以往研究中发现附子具有扩张血管、止痛、强心、调节心律、增强免疫力和延缓衰老等多种药理作用^[2]。最近几年发现附子在抗肿瘤方面也有显著疗效。任丽娅等^[3]通过动物实验研究证实, 附子提取物具有调节肝癌 H22 细胞相关信号传导通路, 从而促进其凋亡, 并发挥抑制细胞增殖的作用。附子总生物碱能用温阳的方

法减慢体寒血瘀的小鼠的肿瘤的生长^[4]。但未有关于附子生物碱进一步研究的报道, 本研究发现附子生物碱体外对人胃癌细胞株有明显的抑制作用, 报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株

人胃癌细胞株 SGC-7901, 由江苏省中医院肿瘤科实验室常规培养。

1.1.2 药物、试剂

附子生物碱由江苏省中医院制剂部提取, 提取步骤: 附子饮片 (1 kg) 粉碎成粗粉, 用 6 倍体积 PH9.0 的 CHCl₃/浓氨水于圆底烧瓶中常温浸润 12 h。再追加 2 倍体积 CHCl₃ 加热回流 1 h, 2 次 (第 2 次直接加 8 倍体积的 CHCl₃) 滤过, 合并滤液, 70℃减压浓缩至干, 即得附子生物碱。

收稿日期: 2013-08-27

修回日期: 2013-08-19

* 江苏省中医药管理局江苏省国家中医临床研究基地(脾胃病)开放项目(JD11029) 温阳健脾中药对胃癌细胞基因多态性和凋亡信号通路的实验研究, 负责人: 胡守友。

** 通讯作者: 胡守友, 主任医师, 南京中医药大学附属医院肿瘤科副主任, 主要研究方向: 中西医结合肿瘤内科学研究。

小牛血清(美国 GIBCO 公司,批号 945306),1640 培养液(凯基生物,批号 20130712),MTT 溶液(碧云天公司,批号 20130701),凋亡试剂盒(凯基生物,批号 20130806),二甲基亚砜(DMSO)分析纯(天津市大茂化学试剂厂,批号 20120926)。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 法检测附子生物碱对胃癌细胞株 SGC-7901 增殖的抑制作用

当 SGC-7901 细胞生长至对数期时,常规消化离心后,用完全培养液调整细胞浓度为 5×10^3 个/孔,加入 96 孔培养板中,每孔加入 100 μL ,放入 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后给不同浓度的附子生物碱。培养 24、48、72 h 后取出,每孔加入 MTT 20 μL ,培养箱中继续培养 4 h 后取出,弃培养上清,每孔加 DMSO 150 μL ,微量振荡器避光振荡 15 min,酶标仪比色(波长 490 nm),测定各组细胞的 OD 值,计算抑制率,增殖抑制率=(1-给药组值/空白对照组值) $\times 100\%$,本实验重复 3 次。

1.2.2 Annexin-V/PI 双染法检测附子生物碱对人胃癌细胞 SGC7901 细胞凋亡的影响

取处于对数生长期的人胃癌 SGC-7901 细胞,种入到直径为 6 cm 的培养皿中,每个皿加 5×10^5 个细胞,总体积为 4 mL,置于 CO_2 培养箱常规培养 24 h 后给药,分别加入浓度为 0.8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的附子生物碱。继续培养 24 h 后以不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞于流式管,1 000 rpm 离心 5 min,弃上清, 4°C 预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,离心弃上清,在避光条件下加入 Binding-Buffer、Annexin V-FITC 和 PI 各 300 μL 、3 μL 、3 μL ,室温下孵育 15 min,即可入流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.3 流式细胞仪检测附子生物碱对人胃癌细胞 SGC-7901 细胞周期的影响

取对数生长期的人胃癌细胞 SGC-7901,植入直径为 10 cm 的培养皿中,每个皿中加 2×10^6 个细胞,共 10 mL,培养 24 h 后给药,分别加入浓度为 0.4、0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 附子生物碱(用含 10% 的小牛血清 1640 配制)培养,于 24 h 后以不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞于流式管,1 000 rpm 离心 5 min,弃上清,冷 PBS 洗涤细胞 3 次,离心弃上清,加入预冷 75% 乙醇,于 4°C 固定过夜。离心收集细胞,冷 PBS 洗涤细胞 3 次,加入 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Rnase 15

μL ,涡旋振荡混合均匀, 4°C 避光放置 15 min,加入含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 溴化乙锭(PI)的 PBS 共 500 μL , 4°C 避光孵育 30 min,流式细胞仪检测细胞周期分布情况。在二倍体细胞峰前出现一个亚二倍体峰判定为凋亡细胞峰,以凋亡率表示凋亡状态。

1.3 统计学方法

数据以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,用 Excel 软件作 t 检验分析,不同处理的参数比较,以 $P < 0.05$ 为结果有显著性差异。

2 结果

2.1 附子生物碱对 SGC-7901 细胞增殖的影响

分别用不同浓度(0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)的附子生物碱作用 SGC-7901 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后,附子生物碱对 SGC-7901 的抑制随着浓度的增大而增大($P < 0.01$),当给药浓度达到 0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,对 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用明显,但继续增加增大附子生物碱的浓度,并不能使其增殖抑制率增大。具体见图 1,表 1。

2.2 附子生物碱对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

用 0.8、0.4、0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的附子生物碱处理 SGC-7901 细胞 24 h 后,采用 Annexin-V/PI 双染法检测各组细胞凋亡情况,研究结果表明附子生物碱可以促进细胞凋亡。空白组细胞凋亡率由 $(6.22 \pm 0.73)\%$,分别增加为 $(9.97 \pm 0.05)\%$ 、 $(13.82 \pm 0.38)\%$ 和 $(59.38 \pm 0.05)\%$,实验组与空白对照组相比,具有显著性差异($P < 0.05$)。具体见图 2。

2.3 附子生物碱对 SGC-7901 细胞周期的影响

不同浓度的附子生物碱作用 SGC-7901 细胞 24 h 后,细胞周期变化明显,0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的附子生物碱作用细胞 24 h 后,经流式细胞仪检测,细胞阻滞于 S 期。当给药浓度为 0.2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时 G0/G1 期前出现明显的凋亡亚二倍体峰(空心箭头所示),S 期细胞比例由空白组的 29.85% 上升至 44.13%、49.12%。具体见表 2,图 3。

3 讨论

细胞凋亡是指细胞在某些生理或病理因素作用下,自主结束生命的过程,是一种主动性,高度有序且由多种基因控制,并有一系列酶参与的过程^[5]。细胞凋亡的过程受多种基因的共同调控,与细胞坏

表 1 附子生物碱对 SGC-7901 细胞的增殖抑制率($\bar{x} \pm s$)

组别	药物浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	给药 24 h(%)	给药 48 h(%)	给药 72 h(%)
实验组 1	0.8	$87.66 \pm 1.28^{\Delta\Delta}$	$94.87 \pm 0.22^{\Delta\Delta}$	$95.88 \pm 0.22^{\Delta\Delta}$
实验组 2	0.4	$83.09 \pm 0.92^{\Delta\Delta}$	$92.89 \pm 0.08^{\Delta\Delta}$	$95.23 \pm 0.26^{\Delta\Delta}$
实验组 3	0.2	$24.76 \pm 1.13^{\Delta\Delta}$	$40.59 \pm 1.43^{\Delta\Delta}$	$75.16 \pm 0.50^{\Delta\Delta}$
实验组 4	0.1	$15.88 \pm 1.57^{\Delta\Delta}$	$18.46 \pm 1.10^{\Delta}$	$35.63 \pm 1.89^{\Delta\Delta}$
实验组 5	0.05	$12.42 \pm 1.95^{\Delta\Delta}$	$17.74 \pm 1.75^{\Delta}$	$27.07 \pm 0.91^{\Delta\Delta}$
空白组	0	—	—	—

注:与对照组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

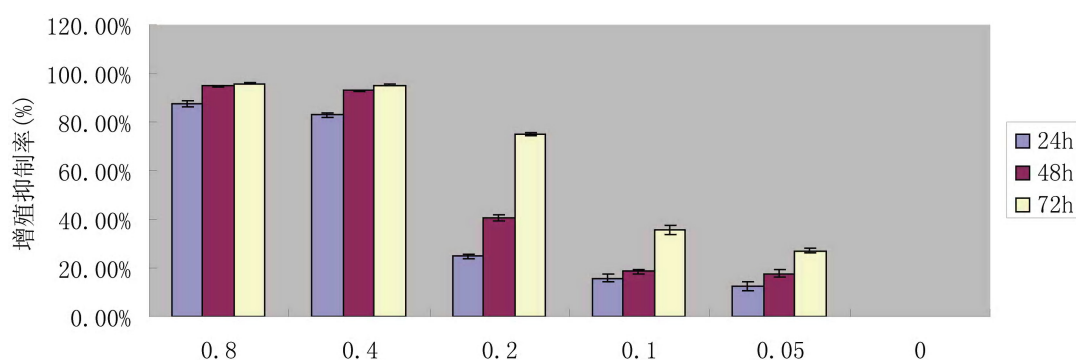


图 1 附子生物碱对 MGC-803 细胞增殖的抑制作用

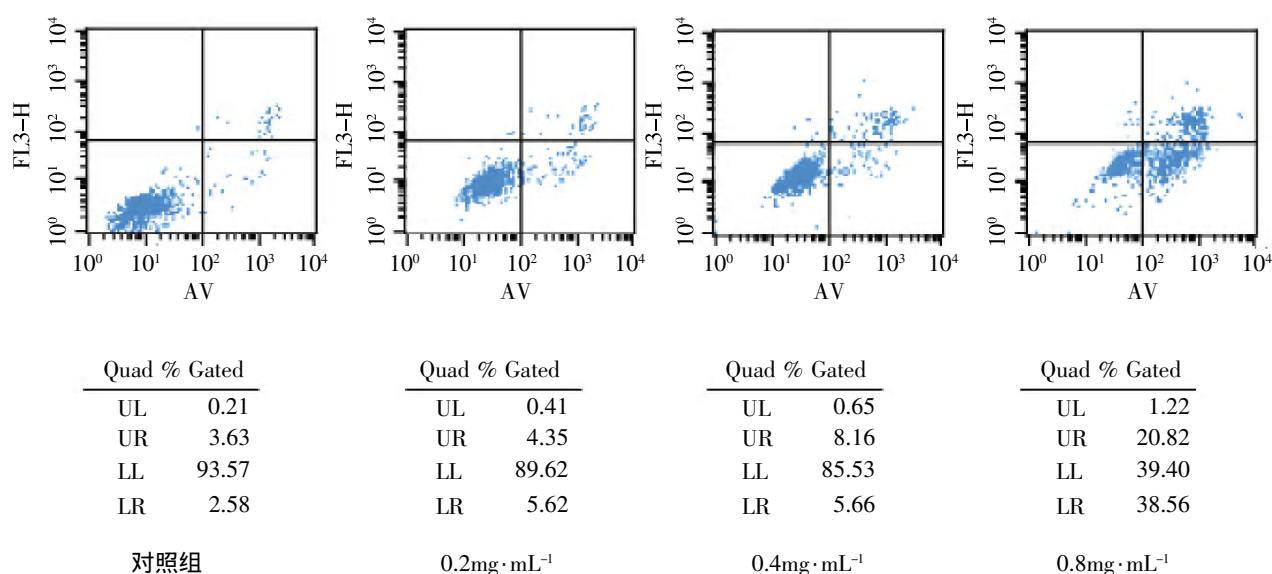


图 2 附子生物碱作用后流式细胞凋亡检测

表 2 附子生物碱对 SGC-7901 细胞周期的影响

组别	浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	G0/G1/%	G2/M/%	S/%	Apoptosis/%
实验组	0.4	39.27	11.61	49.12	14.69
实验组	0.2	44.70	11.17	44.13	7.09
空白对照组	0	52.98	17.17	29.85	5.29

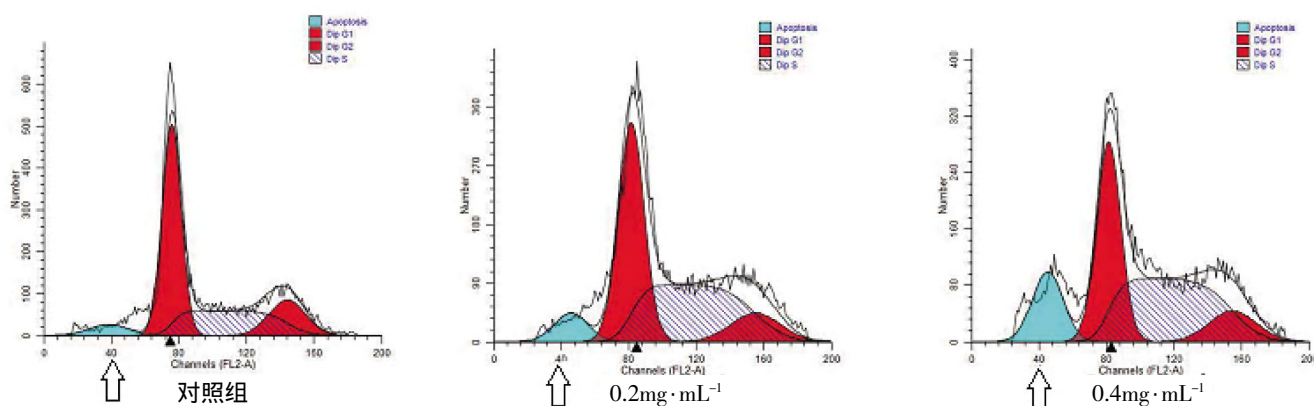


图 3 附子生物碱作用后流式细胞周期检测

死在形态学和生化学方面有显著的差别^[6,7]。目前临床上所用的放化疗等治疗方法就是促进肿瘤细胞凋亡,从而达到抑制癌细胞异常增殖的目的^[8]。肿瘤细胞的失控性增殖是恶性肿瘤的表现之一,这可能与癌细胞周期改变、过快繁殖和减少凋亡有关^[9]。在细胞凋亡早期,膜内的磷脂酰丝氨酸(PS)易位到细胞膜外,所以凋亡细胞的膜外可检测到 PS 的表达。Annexin-V 是一种磷脂结合蛋白,能特异性的与由膜内翻到膜外的 PS 结合,并依赖 Ca^{2+} 的参与。所以用此蛋白检测细胞膜外表达的 PS 十分敏感。碘化丙啶(PI)是一种核酸染料,因活细胞中细胞膜完好,阻碍了其于细胞核的接触,导致细胞核无法红染,但对处于凋亡中晚期和死亡的细胞来说,细胞膜已经破裂,故 PI 能够直接进入细胞内使核红染。故可通过 Annexin-V 与 PI 结合对细胞进行标记,通过流式细胞仪检测,可将早期凋亡的细胞跟死细胞区分开来。细胞周期可以分为 5 期:G₀ 期(静息期)、G₁ 期(DNA 合成前期)、S 期(DNA 合成期)、G₂ 期(DNA 合成后期)和 M 期(有丝分裂期)。流式细胞仪直方图上出现的亚二倍体峰值大小,表明给药后细胞中是否发生凋亡。细胞周期动态过程是多阶

段、多因子参与的调控过程。细胞周期失控极可能导致肿瘤的发生。因为细胞凋亡时 DNA 含量低于正常细胞,所以在直方图上会出现一个荧光强度比正常细胞要小的峰(亚二倍体峰)^[10]。

本实验通过 MTT 法检测发现附子生物碱对 SGC-7901 具有明显的增殖抑制作用,并且与附子生物碱的浓度、作用时间呈正相关,浓度越大、作用时间越长,抑制作用越明显。本次实验采用流式细胞技术,通过 Annexin-V/PI 双染的方法证明了附子生物碱作用 SGC-7901 细胞 24 h 后即出现明显的早期凋亡,0.8 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的凋亡率为 $(59.38 \pm 5.05)\%$ 和 0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的凋亡率为 $(13.82 \pm 1.38)\%$ 。通过细胞周期检测证实了附子生物碱可将 SGC-7901 细胞阻滞于 S 期,当加入 0.4 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的附子生物碱后,G₀/G₁ 期前出现了明显的亚二倍体峰,从另一方面验证了附子生物碱具有诱导人胃癌细胞凋亡的作用。

目前体外检测细胞凋亡的方法多样,本实验仅通过 MTT 法检测了附子生物碱对 SGC-7901 的增殖抑制作用,采用 AnnexinV-FITC 和 PI 两种染色结合的方法来检测细胞是否发生凋亡,流式法检测了

药物对细胞周期的影响。还需进一步通过 RT-PCR 方法、Western blot 的方法检测附子生物碱对细胞凋亡基因和蛋白表达的影响,条件允许可进一步进行小鼠体内试验。

参考文献

- 1 考玉萍,刘满军,袁秋贞.附子化学成分和药理作用.陕西中医, 2010,31(12):1658~1660.
- 2 王晓芬,朱英.附子化学成分分析及药理作用的研究进展.海峡药学,2010,22(11):37~40.
- 3 任丽娅.附子提取物抗移植性肝癌 H22 的实验研究.成都中医药大学硕士论文,2005:5.
- 4 张亚平,杜钢军,孙婷,等.附子总生物碱对乳腺癌小鼠的抗肿瘤作用.中草药,2012,43(10):1986~1990.
- 5 翟中和,王喜中,丁明孝.细胞生物学.北京:高等教育出版社,2007:442~452.
- 6 Kerr F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26(4):239~242.
- 7 Kerr J F, Winterford C M, Harmon B V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994, 73(8):2013~2026.
- 8 Vucic D. Apoptotic pathways as targets for therapeutic intervention. *Curr Cancer Drug Tar*, 2008, 8(2):86.
- 9 黄舒然,王瑞平,邹玺,等.蜂毒素对人胃癌细胞株 BGC-823 凋亡及其细胞周期的影响.西部中医药,2012,25(10):15~17.
- 10 谭晓华,张亚历,姜泊,等.PI 染色流式细胞仪检测细胞凋亡的影响因素.第一军医大学学报,2000,20(4):344~346.

Effects of Aconite Alkaloids on Apoptosis and Cell Cycle of Human Gastric Cancer Cell Line SGC-7901

Ding Yunxia¹, Zou Xi², Wu Jian², Ge Honglu¹, Hu Shouyou²

(1. College of the First Clinical Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
2. Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

Abstract: This study was aimed to investigate effect of aconite alkaloids on proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell line SGC-7901. Effects of different concentrations of aconite alkaloids on proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901 were investigated with MTT assay; induced apoptosis and cell cycle blocking were detected with flow cytometer (FCM). The results showed that the IC₅₀ of aconite alkaloids on human gastric cancer cell line SGC-7901 was 0.2318 ± 0.0022 , 0.1601 ± 0.0227 , 0.1031 ± 0.0231 mg/ml at 24 h, 48 h and 72 h, respectively, compared to the control group with significant difference ($P < 0.01$). When the aconite alkaloids concentration was 0.8 mg/ml, it appeared with obvious apoptosis. The apoptosis rate was $(59.38 \pm 5.05)\%$. The FCM detection showed that compared with control group, the percentage of S-phase cells increased in the treatment group. And a typical sub-diploid peak appeared before G₀ / G₁ phase. It was concluded that aconite alkaloids can inhibit the proliferation of human gastric cancer cell line SGC-7901 *in vitro*, induce the apoptosis of cells and make SGC-7901 cells remain in S phase.

Keywords: Aconite alkaloids, human gastric cancer cell line SGC-7901, cell proliferation, apoptosis, cell cycle

(责任编辑 张丰丰 张志华,责任译审 汪 晶)