

甘草次酸对人食管癌 Eca9706 细胞生长的抑制作用及机制

尹素改, 周凌, 吴耀松, 王慧慧, 陈玉龙*
(河南中医学院 科研处分子生物实验中心, 郑州 450046)

[摘要] 目的:研究甘草次酸对人食管癌细胞生长的抑制作用及对细胞凋亡的影响。方法:Eca9706 细胞接种于 96 孔板,每孔 10^4 个细胞/100 μL ,培养 24 h 贴壁,分别加入含不同浓度甘草次酸的培养液 100 μL ,质量浓度分别为 95,114,138,166,200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,另设对照孔(加培养液 100 μL 和与溶解药物等量的 DMSO),每组设 8 个复孔。细胞培养 48 h,MTT 法检测甘草次酸对人食管癌细胞 Eca9706 增殖的抑制,用流式细胞仪和激光共聚焦显微镜检测细胞凋亡情况。结果:在 95~200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 质量浓度甘草次酸能有效抑制 Eca9706 细胞增殖,且呈剂量依赖性, ($P < 0.05$)。83,108,133 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的甘草次酸作用 Eca9706 细胞 48 h,细胞凋亡率明显增加,与对照组相比,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。激光共聚焦显微镜下对照组细胞膜绿色荧光,以早期凋亡为主,甘草次酸高、低剂量组细胞膜绿色荧光、核红色荧光较多,既有早期凋亡,又有晚期凋亡。结论:甘草次酸可能通过诱导细胞凋亡对食管癌 Eca9706 细胞增殖起抑制作用。

[关键词] 甘草次酸; 食管癌; Eca9706 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(2015)04-0112-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015040112

Inhibitory Effects and Mechanism of Glycyrrhetic Acid on Growth of Esophageal Carcinom Cell Line Eca9706 Cells YIN Su-gai, ZHOU Ling, WU Yao-song, WANG Hui-hui, CHEN Yu-long* (*Molecular Biological Experiment Center of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of glycyrrhetic acid on growth and apoptosis of human esophageal carcinoma cell. **Method:** Eca9706 cells were inoculated in 96-well plates, and 1×10^4 cells per hole. Cultured for 24 h 100 μL the culture medium containing different concentrations of glycyrrhetic acid was added respectively, the concentration was 95, 114, 138, 166, 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Inhibitive effect of glycyrrhetic acid on proliferation of esophageal carcinom Eca9706 cells was detected by MTT assay, and cell apoptosis was detected by flow cytometer and confocal laser scanning microscope. **Result:** In the range of 95-200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, glycyrrhetic acid with various concentrations effectively inhibited the proliferation of Eca9706 cells in dose dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the control group, glycyrrhetic acid in a concentration of 83, 108, 133 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly increased the apoptosis rate of Eca9706 cells in 48 h ($P < 0.01$). The confocal laser scanning microscope was used to observe cell membrane, for control group showed green fluorescence, which may be at the early apoptotic stage; cell membrane indicated green fluorescence and nuclear with red fluorescence after glycyrrhetic acid treatment, which was at early and late apoptosis. **Conclusion:** Glycyrrhetic acid could significantly inhibit the proliferation of Eca9706 cells through regulating cell apoptosis.

[Key words] glycyrrhetic acid; esophageal cancer; Eca9706 cell; apoptosis

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤之一,全世界每年约有 30 万人死于此疾病,其死亡率在癌症总死亡率中占第 4 位^[1],中医药治疗食管癌有独特优势和一定疗效。甘草为我国自古以来广为药用的植

物,其主要活性成分为甘草酸(glycyrrhizic acid)和甘草次酸(glycyrrhetic acid)。甘草酸在人体内经过肠道正常菌群水解作用分解为甘草次酸,后者为一种五环三萜类化合物,继而在人体内发挥强大的药

[收稿日期] 20140827(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173177);河南中医学院苗圃工程项目(MP2012-02)

[第一作者] 尹素改,硕士,讲师,从事肿瘤病机与防治研究,Tel:0371-65680206,E-mail:yinsugai@163.com

[通讯作者] *陈玉龙,博士,教授,从事肿瘤病机与防治研究,Tel:0371-65680206,E-mail:cyl72621@163.com

理学功效^[2]。近年来对甘草次酸的研究不断深入,发现甘草次酸除了传统的止咳平喘、抗炎、抗溃疡、抗过敏、抗病毒等作用外,对人体多种肿瘤如消化道肿瘤、妇科肿瘤、皮肤癌、黑色素瘤等有显著的抑制作用^[3]。有关甘草次酸对食管癌细胞生长作用的报道较少,对其抗肿瘤的确切机制亦不清楚。本研究观察甘草次酸对食管癌细胞系 Eca9706 细胞生长的抑制作用,探讨其可能的作用机制,为食管癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人食管癌癌细胞株 Eca9706 为河南中医学院分子生物试验中心保存。

1.2 药物与试剂 甘草次酸(成都曼斯特生物科技有限公司,批号 MUST-13071705,分子式 C₃₀H₄₆O₄,相对分子质量 470.69),把 20 mg 甘草次酸溶于 1 mL 的二甲基亚砜(DMSO)中,配成 20 g·L⁻¹ 储存浓度 MTT 和胰酶(索来宝公司,批号 T1320-100),RPMI1640 培养基(索来宝公司,批号 31800-500),胎牛血清(杭州四季青公司,批号 121005),Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒(凯基生物公司,批号 KGA107)。

1.3 仪器 FV1000S-LX81 型激光共聚焦显微镜(日本,Olympus),BioMate-5 型紫外分光光度计(美国,Thermo 公司),Heraeus 型细胞培养箱(德国 Kendro),Axiover 25 型倒置显微镜(ZESS),SG-603 型生物安全柜(美国 Baker),ELx800 型酶标仪(美国 Bio-tek)。FACS Calibur Flow Cytometre 型流式细胞仪(BD 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液,于 37 ℃、5% CO₂ 的孵箱中培养细胞,每 2~3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞进行实验。

2.2 检测甘草次酸对细胞的抑制率 Eca9706 细胞接种于 96 孔板,每孔 1 × 10⁴ 个细胞/100 μL,培养 24 h 贴壁,弃去培养液,分别加入含不同浓度甘草次酸的培养液 100 μL,质量浓度为 95,114,138,166,200 mg·L⁻¹,另设对照孔(加培养液 100 μL 和与溶解药物等量的 DMSO),每组设 8 个复孔。细胞培养 48 h 后,每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 液 15 μL,继续培养 4 h,吸去上液,每孔加入 DMSO 150 μL,轻轻振荡后用酶标仪检测,570/630 nm 处测各孔吸光度(A),计算抑制率。重复 4 次。

细胞抑制率 = (对照组 A - 实验组 A) / 对照组 A × 100%

2.3 检测药物作用后细胞的凋亡情况 Eca9706 细胞按每孔 1 × 10⁵/mL 的密度接种于培养皿中,培

养 24 h 后,加入含不同质量浓度甘草次酸的 RPMI 1640 培养液,对照组加培养液与溶解药物等量的 DMSO,细胞培养 48 h 后,用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化,收集细胞,4 ℃ PBS 洗,离心收集,计数 1 × 10⁵ 个细胞于流式管中,加结合液 Buffer 重悬细胞,然后加 Annexin V-FITC,避光 10 min,用流式细胞仪进行检测,采用 Cellquest 软件获取数据,Modfit LM 软件分析数据。重复 4 次试验。

2.4 观察药物作用后细胞形态变化 Eca9706 细胞按每孔 1 × 10⁵/mL 的密度接种于激光共聚焦专用的小培养皿中,培养 24 h 后,加入含不同浓度甘草次酸的 RPMI 1640 培养液,对照组加培养液与溶解药物等量的 DMSO,细胞培养 48 h 后,吸去培养液,用 PBS 洗 2 遍,然后加 500 μL 的 Buffer,然后 5 μL 的 Annexin V-FITC,避光 10 min,后加 PI 避光 5 min,Olympus FV1000 型激光共聚焦进行检测。Viewer 软件分析图片。

2.5 统计学处理 应用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行方差分析和回归分析。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

3 结果

3.1 甘草次酸对 Eca9706 细胞增殖的抑制作用 不同浓度的甘草次酸对 Eca9706 细胞有着不同程度的体外抑制作用,呈剂量依赖性,进行方差分析,差异有统计学意义($P < 0.05$)。回归分析法得 $R^2 = 0.942$, $Y = 0.562X - 9.478$,根据概率法得 IC₅₀ 为 108.539 mg·L,见表 1。

表 1 甘草次酸对食管癌 Eca9706 细胞作用 48 h 后的抑制率 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Inhibition rate of Eca9706 cells by glycyrrhetic acid after 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	细胞活力/A	抑制率/%
甘草次酸	200	0.070 ± 0.009 ²⁾	96.47
	166	0.137 ± 0.054 ¹⁾	93.11
	138	0.639 ± 0.128 ²⁾	67.79
	114	0.941 ± 0.021 ¹⁾	52.55
	95	1.151 ± 0.037 ¹⁾	41.96
对照	-	1.984 ± 0.119	-

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

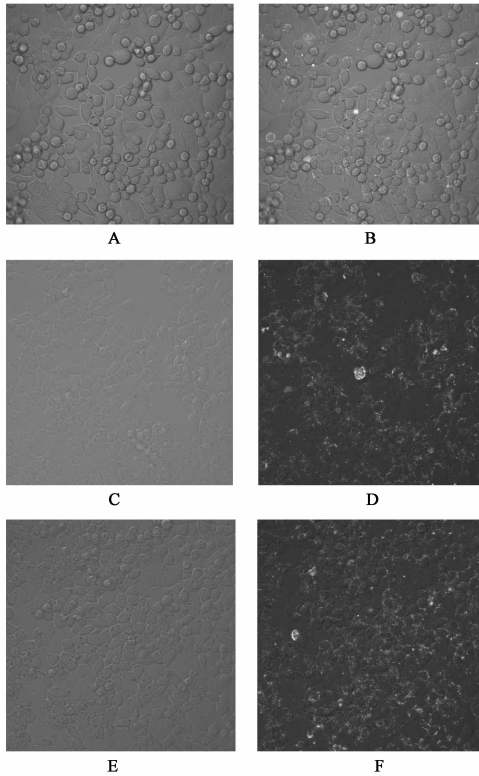
3.2 甘草次酸对 Eca9706 凋亡的作用 用甘草次酸高、中、低 3 个质量浓度作用于 Eca9706 细胞 48 h 后,与对照组比较,细胞凋亡率明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

表2 不同浓度甘草次酸处理后食管癌 Eca9706 细胞的凋亡情况 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Apoptotic rate of Eca9706 cells by glycyrrhetic acid ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
对照	-	1.77 ± 0.13
甘草次酸	83	5.38 ± 1.32 ²⁾
	108	11.99 ± 2.80 ²⁾
	133	16.85 ± 0.77 ²⁾

83, 108 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的甘草次酸处理 48 h 后的 Eca9706 细胞经 PI 和 Annexin V-FITC 染色, 在激光共聚焦显微镜下显示, 细胞核呈现不同程度的凋亡特征, 表现为体积变小, 变形, 细胞核裂解为碎块, 产生凋亡小体。对照组细胞膜绿色荧光, 说明以早期凋亡为主, 甘草次酸高、低剂量组细胞膜绿色荧光、核红色荧光较多, 说明既有早期凋亡, 又有晚期凋亡。随着药物浓度的增加, 凋亡特征表现越为显著(图 1)。



A. 对照(明场); B. 对照(荧光); C. 甘草次酸 108 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (明场);
D. 甘草次酸 108 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (荧光); E. 甘草次酸 83 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (明场);
F. 甘草次酸 83 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (荧光)

图1 甘草次酸作用 Eca9706 细胞 48 h 后激光共聚焦显微镜下细胞形态学变化

Fig. 1 Changes of cellular morphology of Eca9706 cells by glycyrrhetic acid after 48 h using confocal laser scanning microscope

4 讨论

国内外文献均有报道甘草次酸对多种肿瘤细胞有抗癌效应^[4-5]。但尚未见甘草次酸对食管癌细胞作用的报道。MTT 法是进行抗肿瘤药物筛选、细胞毒性试验的常用方法。本研究应用 MTT 法研究结果显示, 不同浓度甘草次酸能有效抑制食管癌 Eca9706 细胞增殖, 且具有剂量依赖性, 药物浓度越大, 抑制率越高。

肿瘤细胞存在周期调节失衡, 通过各种机制逃脱凋亡也是肿瘤细胞的重要特征^[6-7]。为了进一步研究甘草次酸抑制细胞生长的机制, 本研究用流式细胞术检测了甘草次酸对食管癌 Eca9706 细胞凋亡的影响, 并且用激光共聚焦观察了凋亡小体, 结果显示: 甘草次酸能诱导 Eca9706 细胞明显凋亡, 且具有剂量依赖性。表明甘草次酸通过诱导凋亡影响人食管癌 Eca9706 细胞生长, 具体的分子机制有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] Peter C, Enzinger M D, Robert J, et al. Esophageal cancer[J]. N Engl J Med, 2003, 349:2241-2252.

[2] Kim D H, Lee S W, Han M J. Biotransformation of glycyrrhizin to 18beta-glycyrrhetic acid-3-O-beta-D-glucuronide by Streptococcus LJ-22, a human intestinal bacterium [J]. Biol Pharm Bull, 1999, 22 (3): 320-322.

[3] Rossi T, Castelli M, Zandomenighi G, et al. Selectivity of action of glycyrrhizin derivatives on the growth of MCF-7 and HEP-2 cells [J]. Anticancer Res, 2003, 23 (5A):3813-3818.

[4] Huang R Y, Chu Y L, Huang Q C, et al. 18β-glycyrrhetic acid suppresses cell proliferation through inhibiting thromboxane synthase in non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2014 9(4):e93690.

[5] Kuang P, Zhao W, Su W, et al. 18β-glycyrrhetic acid inhibits hepatocellular carcinoma development by reversing hepatic stellate cell-mediated immunosuppression in mice[J]. Int J Cancer, 2013, 132 (8):1831-1841.

[6] Dibb M, Ang Y S. Targeting the cell cycle in esophageal adenocarcinoma; an adjunct to anticancer treatment [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(16):2063-2069.

[7] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer; the next generation [J]. Cell, 2011, 144(5):646-674.

[责任编辑 聂淑琴]