

胃康舒宁促胃癌细胞凋亡机制与线粒体凋亡途径

蒋时红*, 吴耀松, 刘燕

(河南中医学院方剂学科, 郑州 450046)

[摘要] 目的:以线粒体凋亡通路为中心在分子水平上探讨胃康舒宁诱导人胃癌细胞株 SGC-7901 细胞凋亡的作用机制。方法:将胃癌 SGC-7901 细胞分别培养于 200,400,800 mg·L⁻¹胃康舒宁培养药液中 48,72 h 后,收集细胞并采用流式细胞术检测胃康舒宁对胃癌细胞线粒体膜电位的影响;利用 ELISA 方法检测用药后胃癌细胞细胞色素 C(Cyt c)的变化情况;制作胃癌细胞爬片后,给予不同浓度水平的胃康舒宁处理胃癌 SGC-7901 细胞不同时间后采用免疫细胞化学方法检测胃癌细胞中 B 细胞性淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)和 Bcl-2 基因相关蛋白 X(Bax)蛋白的表达情况。结果:胃康舒宁可以使胃癌细胞线粒体膜电位下降($P < 0.05$),促进细胞色素 C 释放($P < 0.05$);胃康舒宁各浓度组均能显著增强胃癌细胞株 SGC-7901 内 Bax 蛋白的表达($P < 0.05$),而显著抑制 Bcl-2 蛋白的表达($P < 0.05$),且有一定的浓度依赖性。结论:胃康舒宁在体外诱导胃癌细胞凋亡的机制可能与线粒体凋亡通路有关。

[关键词] 胃康舒宁方; 胃癌细胞凋亡; 线粒体凋亡通路; 体外实验研究

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)21-0203-04

[doi] 10.11653/syjf20131210203

Mechanism of Promoting Gastric Cancer Apoptosis by Weikang Shuning and Mitochondrial Apoptosis Pathway

JIANG Shi-hong*, WU Yao-song, LIU Yan

(Science of Prescriptions of Traditional Chinese Medicine of Henan University
of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China)

[收稿日期] 20130604(007)

[基金项目] 河南省科技攻关项目(102102310147)

[通讯作者] * 蒋时红,医学硕士,教授,从事方剂学(中药防治肿瘤作用机制及应用)研究,Tel:0371-65680027,E-mail:jsh0418@163.com

[参考文献]

- [1] 王忠雷,张小华,杨丽燕,等. 拮合原理在降血糖新药研发中的应用设想[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(4):351.
- [2] 于淑池,苏涛,杨建民,等. 安吉白茶多糖对实验性糖尿病小鼠的降血糖作用研究[J]. 茶叶科学,2010,30(3):223.
- [3] Rubio M A, Arrieta J L, Ruiz M, et al. Design and validation of a scale to assess preferences of type 2 diabetic patients towards different nutritional supplements [J]. Nutr Hosp, 2008,23(3):253.
- [4] Judith E Fradkin. Confronting the urgent challenge of diabetes:an overview[J]. Health Aff,2012,31:12.

- [5] 罗良胜,屈磊磊,杨丽英,等. 紫茉莉对高血糖模型小鼠降血糖作用研究[J]. 云南中医中药杂志, 2009, 30(4):51.
- [6] 梁燕,王岳飞,谢争珍,等. 茶桑混合袋泡茶降血糖作用的实验研究[J]. 茶叶科学, 2008, 28(5):358.
- [7] 王道清,李敏,石万银. 藏药“俄色”的资源调查及生药学研究[J]. 中药与临床, 2011, 2(3):14.
- [8] 张拥军,孟祥河,李佳,等. 南瓜多糖对糖尿病小鼠降血糖作用的实验研究[J]. 食品与生物技术学报, 2009, 28(4):493.
- [9] 杨耀芳,钱巍,金蕾. 2型糖尿病大鼠应用土鳖虫与黄芪对体液免疫及补体的影响[J]. 中国免疫学杂志,2011,26(12):1094.

[责任编辑 聂淑琴]

[Abstract] Objective: To study the apoptosis-inducing effects of Weikang Shuning in human gastric cancer cells *in vitro*. **Method:** The SGC-7901 cells were cultured in the Weikang Shuning liquid with the concentration is 200, 400, 800 mg·L⁻¹ for 48 and 72 hours, then the cells were collected and the flow cytometry was used to detect the change of mitochondria electric potential. ELISA method was used to detect the change of cytochrome (Cyt c). Prepare of cell slides, the immunocytochemistry method was used to study the effects of Weikang Shuning on the indexes of the induced SGC-7901 including Bcl-2 and Bax. **Result:** Weikang Shuning could decreased the membrane potential and release of Cyt c of gastric cancer cells ($P < 0.05$). The expression of Bax was strengthened ($P < 0.05$), and the expression of Bcl-2 was lessened ($P < 0.05$). **Conclusion:** The mechanism of promoting gastric cancer apoptosis by Weikang Shuning *in vitro* may be associated with the mitochondrial apoptotic pathway.

[Key words] Weikang Shuning; gastric cancer apoptosis; mitochondrial apoptosis pathway; experimental study *in vitro*

胃癌(gastric cancer)是东亚国家的常见肿瘤,全球胃癌死亡者每年超过 70 万。我国是胃癌的高发地区,据 2005 年我国公布的数据显示^[1],我国胃癌发病率在男性中达 37.1/10 万,女性中为 17.4/10 万,死亡率分别为 15/10 万和 13.3/10 万^[2]。所以寻找治疗胃癌的药物和方法是目前抗肿瘤研究的一个重要课题。中医药疗法是胃癌综合治疗的重要手段之一,中药对于减轻放化疗不良反应、降低手术后复发率、改善患者的生活质量、延长患者生存期、均有着重要的意义。本研究采用中度分化的人胃癌细胞株 SGC-7901 为肿瘤实验模型,以体外实验方法为载体,观察了胃康舒宁对胃癌细胞凋亡诱导情况,并进一步检测了经胃康舒宁处理的胃癌细胞中细胞色素 C、线粒体膜电位及凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达情况,旨在阐明胃康舒宁抗胃癌作用机制。

1 材料

1.1 试剂及细胞株 人胃癌细胞株 SGC-7901,由河南省生物工程技术研究中心提供,本实验室传代培养。氟脲嘧啶(上海旭东海普药业有限公司,批号 H31020593); RPMI1640 (Solarbio 公司,批号 31800-500);人细胞色素 C(Cyt c) ELISA 检测试剂盒(凯基公司,批号 KG22230);线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(凯基公司,批号 KGA);兔抗人 B 细胞性淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)单克隆抗体(博奥森公司,批号 bs-0032R,bs-0127R);免疫组化染色试剂盒(博奥森生物有限公司,批号 SP-0023);DAB 显色试剂盒(博士德公司,批号 AR1022)。

1.2 仪器 ELx800 型酶标仪(BIO-TEK 公司); FACS Vantage SE 型流式细胞仪(美国 BD 公司),

8000WJ 型二氧化碳培养箱(Thermo 电子公司), BCM-1000A 型生物洁净工作台(苏州安泰空气技术有限公司),35 型低速离心机(ROTINA 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将胃癌细胞置于(37±0.3)℃,相对湿度≥95%,CO₂为(5±0.1)%的二氧化碳培养箱内培养。细胞完全培养液为含 10%小牛血清、青霉素 100 U·mL⁻¹、链霉素 100 mg·L⁻¹和 L-谷氨酰胺 2 mol·L⁻¹的 1640 培养液。

2.2 胃康舒宁完全培养药液的制备 胃康舒宁方由半枝莲、石见穿、太子参、石斛、白术、当归、白芍、竹茹、地鳖虫、黄连和佛手组成,方中各味药剂量比为 6:6:3:3:2:2:3:2:2:1:2。上述药物均购于河南中医学院第三附属医院,经我校中药鉴定学学科鉴定皆为正品。将胃康舒宁全方置于砂锅常规煎煮后,浓缩药汁至 163 mL(即含生药 1 g·mL⁻¹),与 95%乙醇 1:1 混匀,静置于 4℃冰箱 24 h 后过滤,回收乙醇后将药液干燥成粉末。以 RPMI-1640 将粉末充分溶解后高速离心,过滤除菌,减重法测药物浓度,加入 10%的胎牛血清,分装于无菌玻璃瓶中 4℃冰箱备用。

2.3 Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达的检测 用免疫细胞化学法制作细胞爬片,空白对照组六孔板孔内加入完全培养液 3 mL,其他孔分别加入胃康舒宁含药培养液,质量浓度分别为 200,400,800 mg·L⁻¹和 5-FU 含药培养液质量浓度为 25 mg·L⁻¹各 3 mL,分别培养 48,72 h 后取出盖玻片,用 PBS 洗涤 3 次,然后用 95%乙醇固定细胞 30 min,采用常规 SP 法,所有操作严格按照说明书步骤进行,用 PBS 代替一抗作阴性对照。由于 Bax 和 Bcl-2 蛋白均为胞浆表达,以细胞浆或核膜出现黄色、棕黄色和棕褐色颗粒为阳

性细胞区域进行分析。用 Smart scape 图像分析系统对每张图像阳性染色细胞区域进行分析。参照 Fromowit Z 等的综合计分法,根据阳性细胞数比例及染色程度综合判断染色结果^[3]。每张片子随机选取 10 个高倍视野(×400 倍),计数阳性细胞,根据阳性染色细胞百分数进行系统分析。

2.4 Cyt c 的检测 用 ELISA 法,实验分组同免疫细胞化学检测法,待细胞培养结束后,收集各组细胞于离心管中,以预冷的 PBS 洗涤细胞 3 次,于离心管中加入冰冷的细胞裂解液(10⁶ 个 cell/mL),冰浴 20 min,吹打均匀。2 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,上清部分蛋白定量后用于细胞色素 C 检测,细胞色素 C 定量按细胞色素 CELISA 检测试剂盒说明操作。

2.5 线粒体膜电位的检测 用流式细胞术收集各组细胞 5 × 10⁵ 个,PBS 洗涤两次(2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min),弃去上清液,加入质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 的 JC-1 染液 500 μL 重悬细胞,于 37 °C 避光反应 20 min 后,室温离心(2 000 r·min⁻¹, 5 min),弃上清,以 500 μL 的 JC-1 染色液重悬细胞后,将细胞移入流式上机管内,用流式细胞仪检测(Ex = 488 nm; Em = 530 nm)细胞凋亡的情况,绿色荧光通过 FITC 通道通常为 FL₁ 来检测;红色荧光通过 PI 通道通常为 FL₂ 来检测,结果以 FL₁/FL₂ 表示。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,药物组间比较采用完全随机设计的方差分析,各药物组与对照组比较采用 Dunnett *t* 检验,以 *P* < 0.05 为有统计意义。

3 结果

3.1 对胃癌细胞 Bax 与 Bcl-2 蛋白表达的影响 胃康舒宁处理细胞 48,72 h 后,随着胃康舒宁浓度的升高 Bcl-2 蛋白的表达量与空白对照组比较显著降低(*P* < 0.05)。胃康舒宁各浓度组作用 SGC-7901 细胞 48,72 h 后除胃康舒宁 200 mg·L⁻¹ 浓度组作用 48 h 后 Bax 的表达量与空白对照组比较无显著差异外。其余与空白对照组比较均升高(*P* < 0.05),以胃康舒宁 800 mg·L⁻¹ 组效果最佳。而 Bcl-2 与 Bax 的比值随着胃康舒宁浓度的升高而降低,随着处理时间的延长而降低。见表 1~2。

3.2 对胃癌细胞细胞色素 C 和线粒体膜电位的影响 随着胃康舒宁药物浓度的升高和作用时间的延长,细胞色素 C 的浓度也随着增大(*P* < 0.05),细胞线粒体膜电位下降(*P* < 0.05),说明胃康舒宁可能在一定程度上促进胃癌 SGC-7901 细胞细胞色素 C 的释放和线粒体膜电位下降。见表 3~4。

表 1 胃康舒宁作用 SGC-7901 细胞 48 h 后 Bax 与 Bcl-2 蛋白的表达量($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Bax/%	Bcl-2/%	Bcl-2 /Bax
空白对照	-	10.74 ± 1.19	51.85 ± 1.14	4.61
胃康舒宁	800	30.26 ± 4.08 ^{2,4)}	17.79 ± 3.19 ^{2,3)}	0.59
	400	22.86 ± 1.92 ^{2,4,5)}	25.96 ± 2.34 ^{2,4,5)}	1.14
	200	15.66 ± 0.86 ^{4,6)}	34.04 ± 2.41 ^{2,4,6,7)}	2.17
氟脲嘧啶	25	45.49 ± 4.46 ²⁾	11.12 ± 1.27 ²⁾	0.24

注:与空白对照比较¹⁾ *P* < 0.05, ²⁾ *P* < 0.01;与氟脲嘧啶比较³⁾ *P* < 0.05, ⁴⁾ *P* < 0.01;与胃康舒宁 800 mg·L⁻¹ 比较⁵⁾ *P* < 0.05, ⁶⁾ *P* < 0.01;与胃康舒宁 400 mg·L⁻¹ 比较⁷⁾ *P* < 0.05, ⁸⁾ *P* < 0.01(表 2~4 同)。

表 2 胃康舒宁作用 SGC-7901 细胞 72 h 后 Bax 与 Bcl-2 蛋白的表达量($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Bax/%	Bcl-2/%	Bcl-2 /Bax
空白对照	-	9.84 ± 1.13	53.91 ± 3.53	5.38
胃康舒宁	800	54.00 ± 5.33 ^{2,4)}	23.17 ± 4.35 ^{2,3)}	0.43
	400	32.00 ± 5.08 ^{2,4,6)}	30.63 ± 3.13 ^{2,4)}	0.96
	200	25.97 ± 4.41 ^{2,4,6)}	30.22 ± 6.30 ^{2,4)}	1.16
氟脲嘧啶	25	78.31 ± 2.03 ²⁾	10.81 ± 0.48 ²⁾	0.14

表 3 胃康舒宁作用 SGC-7901 细胞 48 h 后对 Cyt c 和线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Cyt c /A	线粒体膜电位 FL ₁ /FL ₂
空白对照	-	0.09 ± 0.01	2.51 ± 0.25
胃康舒宁	800	0.56 ± 0.06 ^{2,4)}	2.06 ± 0.07 ¹⁾
	400	0.22 ± 0.09 ^{1,4,6)}	2.18 ± 0.18 ¹⁾
	200	0.10 ± 0.01 ^{4,6,8)}	2.22 ± 0.18
氟脲嘧啶	25	1.01 ± 0.10 ²⁾	1.95 ± 0.09 ^{2,4)}

表 4 胃康舒宁作用 SGC-7901 细胞 72 h 后对 Cyt c 和线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Cyt c /A	线粒体膜电位 F1/F2
空白对照	0	0.10 ± 0.02	2.64 ± 0.21
胃康舒宁	800	0.67 ± 0.07 ^{2,4)}	2.07 ± 0.09 ²⁾
	400	0.30 ± 0.15 ^{1,4,6)}	2.26 ± 0.11 ^{2,3)}
	200	0.10 ± 0.01 ^{4,6,7)}	2.23 ± 0.15 ²⁾
氟脲嘧啶	25	1.09 ± 0.17 ²⁾	1.98 ± 0.12 ²⁾

4 讨论

胃癌严重威胁者人类健康,而临床大多数胃癌患者的死因是术后复发和转移,所以寻找手术以外的治疗胃癌的药物和方法是目前抗肿瘤研究的一个

重要课题。在治疗胃癌药物的寻找过程中,使用中药对胃癌进行治疗很有可能成为其新的途径之一。与许多临床应用与治疗胃癌的化疗药相比较,中药的优点主要表现于毒副作用小、药源充足、价格低廉等方面^[4]。因此对抗胃癌中药的基础研究和开发已经成为现代中医药学研究的热点。

胃康舒宁方是本课题组在大量临床肿瘤治疗经验中,立足于解毒化浊、补气养阴为治则,将多法合于一方,总结出来的。前期的研究已证明胃康舒宁能诱导胃癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞的凋亡,且对凋亡相关蛋白和细胞因子有一定程度的影响^[5-6]。该方是针对胃癌和胃癌前病变临床症状治疗,以及手术后放化疗期间症状改善的有效方剂,能在很大程度上改善胃癌患者的生存质量,延长患者的生存期^[7]。胃康舒宁虽然临床治疗胃癌效果明显,但作用机制不明确,为探明其机制,所以本研究首先从线粒体凋亡途径着手研究。

线粒体是介导细胞凋亡的重要细胞器,已成为多类药物的细胞内作用靶点^[8]。目前认为线粒体途径引起细胞凋亡的机制为:在正常情况下,绝大多数线粒体内外膜之间的通透性转换孔(PTP)处于关闭状态。在各种凋亡诱导因素作用下 PTP 开放,线粒体膜电位发生去极化,使细胞凋亡的启动子如细胞色素 C、凋亡蛋白酶激活因子(Apaf)和凋亡诱导因子(AIF)等从线粒体内释放,细胞色素 C 与 Apaf 相互作用可激活 Caspase-9, AIF 可增强 Caspase-3 的水解活性,引起一系列的酶激反应, Caspase 能灭活细胞凋亡的抑制物,导致细胞解体,形成凋亡小体^[9]。线粒体内膜跨膜电位是反映线粒体内膜通透性的最佳指标之一。细胞色素 C 则是线粒体途径发挥作用的重要指标。

Bcl-2 家族是线粒体通路调节细胞凋亡的主要因素。Bcl-2 家族成员按结构和功能的不同,分为两大类:抑制凋亡的家族成员(包括 Bcl-2, Bcl-xL 等)和促进凋亡的家族成员(包括 Bcl-xS, Bax, Bak, Bid, Bad, Bim 等)。这两类物质相互结合、彼此抑制,依据其数量的相对多少决定凋亡的发生与否^[10-12]。另外当细胞受到凋亡信号刺激时, Bax 和 Bcl-2 可以在线粒体内结合形成异源二聚体,而调节细胞色素 C 的释放、激活 Caspase,而导致细胞凋亡。

上述研究结果表明:胃康舒宁作用于人胃癌

SGC-7901 细胞后,可以使线粒体膜电位下降,促进细胞色素 C 释放,可以调节 Bcl-2 与 Bax 蛋白在胃癌细胞中的表达,且前期研究已经证明胃康舒宁可以促进 SGC-7901 细胞内 Caspase-3, Caspase-9, Bid 蛋白的表达。综合研究结果说明胃康舒宁诱导 SGC-7901 细胞的体外凋亡是通过线粒体途径起作用的。

[参考文献]

- [1] Yang L. Incidence and mortality of gastric cancer in China [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(1):17.
- [2] Ferlay J, Shin H, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008; GLOBOCAN 2008 [J]. Int Cancer, 2010, 127(12):2719.
- [3] Fromowitz F B, Viola M V, Chao S, et al. Ras p21 expression in the progress of breast cancer [J]. Hum Pathol, 1987, 18(12):1268.
- [4] 立丽. 养胃抗癌冲剂对中晚期胃癌预后的影响及诱导细胞凋亡的分子机制 [D]. 北京:中国中医科学院, 2010.
- [5] 刘旺根, 王守东, 冯黎. 胃康舒宁对胃癌前病变大鼠胃黏膜上皮细胞凋亡及其相关调控基因表达的影响 [J]. 河南中医, 2007, 27(9):20.
- [6] 杨丽萍, 张文娟, 蒋时红. 胃康舒宁对大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变癌相关细胞因子的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(19):1978.
- [7] 蒋时红, 蔡小平, 张文娟, 等. 胃康舒宁联合西药治疗慢性萎缩性胃炎 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(1):196.
- [8] Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis [J]. Science, 1998, 281:1309.
- [9] Martinou J C, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome C release from mitochondria: all or nothing [J]. Nat Cell Biol, 2000, 2:E41.
- [10] Reed J C, Jurgensmeier J M, Matsuyama S. Bcl-2 family proteins and mitochondria [J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1366(1/2):127.
- [11] Kroemer G, Reed J C. Mitochondrial control of cell death [J]. Nat Med, 2000, 6(5):513.
- [12] Degli Esposti M, Dive C. Mitochondrial membrane permeabilisation by Bax/Bak [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2003, 304(3):455.

[责任编辑 聂淑琴]