

N-马来酰-*L*-缬氨酸酯姜黄素对胃癌 MGC-803 细胞周期的影响

孟爱国¹, 刘春艳²

(1. 河北联合大学附属医院, 河北唐山 063000; 2. 河北联合大学药学院, 河北唐山 063000)

[摘要] 目的: 研究 *N*-马来酰-*L*-缬氨酸酯姜黄素(MVC)对胃癌 MGC-803 细胞周期的作用机制。方法: 采用 MTT 法检测 MVC 对肿瘤细胞的生长抑制作用; 采用流式细胞术检测 MVC 对 MGC-803 细胞周期的影响; 采用 Western blot 印迹法检测 MVC 对 MGC-803 细胞周期相关基因蛋白 p21^{WAF1/CIP1}, Cdc 2 和 Cyclin B1 表达的影响。结果: 20 μmol·L⁻¹ MVC 可明显抑制 MGC-803 细胞生长, 可明显诱导 MGC-803 细胞 S₂/M 期阻滞。20 μmol·L⁻¹ MVC 作用 MGC-803 细胞 24 h, p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达增高, Cdc 2 蛋白表达减少。结论: MVC 可通过增加细胞周期相关基因 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达和下调 Cdc 2 蛋白表达, 使 MGC-803 细胞的周期阻滞在 S₂/M 期, 从而抑制 MGC-803 细胞的生长。

[关键词] *N*-马来酰-*L*-缬氨酸酯姜黄素; 细胞周期; MGC-803 细胞

[中图分类号] R73.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)14-0186-03

Effect of *N*-Maleoyl-*L*-Valine Curcumin Ester on Cell Cycle of Gastric Cancer MGC-803 Cell

MENG Ai-guo¹, LIU Chun-yan²

(1. Affiliated Hospital Hebei United University, Tangshan 063000, China;

2. School of pharmacy, Hebei United University, Tangshan 063000, China)

[Abstract] **Objective:** To study on the influence and mechanisms of *N*-Maleoyl-*L*-Valine Curcumin Ester (MVC) on MGC-803 cell cycle. **Method:** The role of MVC on cell growth was tested *in vitro* by MTT. Cell cycle was analyzed by flow cytometry. The level of the protein involved in cell cycle arrest metabolism was detected by western blotting. **Result:** MVC markedly inhibited MGC-803 cell growth and significantly blocked cell cycle progression in the S and G₂/M phase in MGC-803 cells. The expression of p21^{WAF1/CIP1} was increased, and while expression of Cdc 2 was decreased in MGC-803 cell treated with 20 μmol·L⁻¹ MVC for 24 hour. **Conclusion:** MVC induces S and G₂/M arrest in MGC-803 cells via a mechanism linked with up-regulation of p21^{WAF1/CIP1} and down-regulation of Cdc 2.

[Key words] *N*-maleoyl-*L*-valine curcumin ester; cell cycle; MGC-803 cells

N-马来酰-*L*-缬氨酸酯姜黄素 (*N*-maleoyl-*L*-valine curcumin ester, MVC) 是天然产物姜黄素的前体药物, 具有水溶性好, 生物利用度高等优点。体外研究表明其能有效的抑制人膀胱癌细胞增殖^[1]。本课题组前期研究发现, MVC 能明显抑制人胃癌

MGC-803 细胞生长, 诱导细胞周期阻滞, 但有关的分子作用机制尚未清楚。因此, 我们选择 MGC-803 细胞作为细胞模型, 初步探讨 MVC 诱导细胞周期阻滞的作用机制。

1 材料

1.1 试剂 *N*-马来酰-*L*-缬氨酸酯姜黄素(MVC, 分子式 C₃₀H₂₉NO₉, 相对分子质量 547.18, 纯度 > 99%, 由本课题组合成所得), 无菌条件下, 用二甲基亚砜(DMSO, Sigma 公司, 批号 080916) 配成 1 × 10⁻² mol·L⁻¹ 原液, -20 °C 冻存, 使用时用细胞培养液稀释

[收稿日期] 20110117(009)

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目(C2010001758)

[第一作者] 孟爱国, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事肿瘤发生的分子机制研究, E-mail: leymag@ yahoo.com.cn

至终浓度,培养液中 DMSO 终浓度 < 0.1% (当 DMSO < 0.1% 一般认为没有影响)。RPMI1640 培养液为 GIBCO 公司产品。胎牛血清为中国医学科学院血液学研究所生产,批号 0801021。碘化丙啶 (PI) 为 Sigma 公司产品。Anti-p21^{waf1/cip1}, anti-Cdc 2 和 anti-Cyclin B 1 抗体,噻唑蓝 (MTT, 批号 090153) 均购自 SantaCruz 公司。

1.2 细胞株 人胃癌 MGC-803 细胞株由北京医科大学肿瘤研究所提供,由河北联合大学中心实验室传代保存。细胞于 RPMI1640 培养液中 (含灭活 10% 胎牛血清,庆大霉素 8 万单位/L),置 37 °C, 5% CO₂ 孵育箱中培养。

1.3 仪器 EPICS-XL 型流式细胞仪,美国 Coulter 公司。

2 方法

2.1 MTT 法检测人肿瘤细胞增殖 以 MGC-803 细胞为研究对象,细胞用 MCV 处理,处理分组为:10, 20, 30, 40 μmol·L⁻¹。将处在对数生长期的 MGC-803 细胞经消化液处理后按 3.0 × 10⁵/mL 接种于 96 孔板,孵育 24 h 待细胞贴壁后根据实验设计每组分别加入药物,同时设一空白对照组 (仅加入含培养液和药物同等稀释度的 DMSO 孔,无细胞),每组处理设定 8 个复孔。于 12, 24, 48, 72 h 时每孔加入 20 μL MTT (5 g·L⁻¹), 37 °C 温育 4 h,离心去上清后,每孔加入 200 μL DMSO,振荡 10 min,于全自动酶标仪测定 570 nm 处吸光度 (A)。

$$\text{存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

2.2 流式细胞术检测 MGC-803 细胞周期 在加药 (20 μmol·L⁻¹ MCV) 后分别于 24, 48, 72 h 后收集 2 × 10⁶ 个细胞,冷 PBS 洗 2 次,加入 1.5 mL 预冷的 PBS,将细胞吹打均匀成单细胞悬液,再加入 3.5 mL 预冷的无水乙醇固定细胞, -20 °C 储存。固定的细胞用 PBS 洗 1 次, 800 r·min⁻¹ 离心 5 min,加入 PI 终浓度 20 mg·L⁻¹ 和 RNAase 终浓度 50 mg·L⁻¹, 37 °C 避光染色 30 min,上机前将细胞混匀,过 200 目尼龙网,流式细胞仪进行检测,结果选用 Multicycle 软件进行分析。

2.3 Western blot 检测细胞周期相关基因的蛋白表达 MGC-803 细胞培养于 75 mL 培养瓶中, MCV 作用后,应用 0.25% 胰酶-0.02% EDTA 消化液消化收集 1.0 × 10⁶/mL 细胞。按文献 [2] 的方法检测。

2.4 统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 来表示,采用

SPSS 10.0 软件处理系统进行统计学分析。组间数值采用方差分析,配对数据采用 *t* 检验。P < 0.05 有统计学意义。

3 结果

3.1 MCV 对人胃癌 MGC-803 细胞增殖的影响 结果表明, MCV 对 MGC-803 肿瘤细胞的生长有明显抑制作用且呈剂量依赖性,确定 MCV 浓度 20 μmol·L⁻¹ 为实验浓度。见表 1。

表 1 MCV 对 MGC-803 细胞的增殖抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	终浓度 /μmol·L ⁻¹	存活率/%			
		12 h	24 h	48 h	72 h
空白对照	0	100 ± 1.2	100 ± 2.3	100 ± 1.5	100 ± 1.8
MCV	10	85.8 ± 1.3 ¹⁾	73.7 ± 1.5 ¹⁾	58.3 ± 1.8 ¹⁾	51.5 ± 0.7 ¹⁾
	20	83.4 ± 1.7 ¹⁾	71.3 ± 1.6 ¹⁾	34.4 ± 1.5 ¹⁾	20.2 ± 0.9 ¹⁾
	30	83.5 ± 1.5 ¹⁾	68.4 ± 0.9 ¹⁾	17.6 ± 0.9 ¹⁾	13.8 ± 1.3 ¹⁾
	40	82.8 ± 1.4 ¹⁾	63.6 ± 1.3 ¹⁾	12.9 ± 1.3 ¹⁾	13.5 ± 1.8 ¹⁾

注:与空白对照组比较¹⁾P < 0.05 (表 2 同)。

3.2 MCV 诱导人胃癌 MGC-803 细胞周期阻滞 MCV (20 μmol·L⁻¹) 作用 MGC-803 细胞 48, 72 h 后,与对照组相比 G₁/G₀ 期比例显著降低, S, G₂/M 期比例均显著增高。显示 MCV 诱导 MGC-803 细胞 S, G₂/M 期阻滞。见表 2。

表 2 MCV 对 MGC-803 细胞周期的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 12$) %

分组	终浓度 /μmol·L ⁻¹	时间 /h	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白对照	-	24	68.1 ± 1.2	25.2 ± 0.8	6.7 ± 0.5
MCV	20	24	65.6 ± 1.7	26.9 ± 0.7	7.5 ± 0.6
空白对照	-	48	66.8 ± 1.3	26.3 ± 1.0	6.9 ± 1.1
MCV	20	48	56.4 ± 1.8 ¹⁾	34.2 ± 1.1 ¹⁾	9.4 ± 1.2 ¹⁾
空白对照	-	72	69.3 ± 1.0	23.4 ± 0.4	7.3 ± 0.9
MCV	20	72	51.9 ± 1.2 ¹⁾	37.1 ± 1.6 ¹⁾	11.0 ± 0.9 ¹⁾

3.3 MCV 对 G₂/M 期相关细胞周期蛋白的作用 MCV (20 μmol·L⁻¹) 作用 MGC-803 细胞 24 h, 明显抑制 Cdc 2 蛋白表达, 而 CyclinB 仅轻微上调。见图 1。

细胞周期蛋白激酶抑制因子 p21^{WAF1/CIP1} 是 p53 下游靶基因之一, 其生物学功能是与 Cdc 2-CyclinB1 复合物结合, 抑制 Cdc 2 活性, 诱导细胞周期 S, G₂/M 期阻滞^[3]。本研究结果显示, MCV (20 μmol·L⁻¹) 作用 MGC-803 细胞 24 h, p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达呈剂量依赖性上调 (图 1), 提示 MCV 可诱导 p21^{WAF1/CIP1} 表达, 降低了 Cdc 2 激酶活性, 引起细胞

周期 S, G₂ 期阻滞。

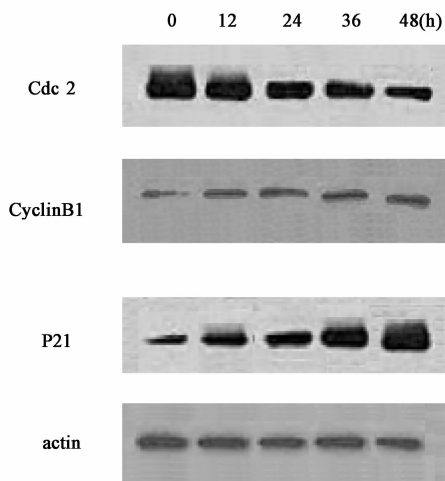


图 1 MCV 作用 MGC803 细胞不同时间后 Cdc 2, CyclinB 和 p21 蛋白表达

4 讨论

细胞周期的不同时期存在着关键的调控点。在调节时相的转换及细胞周期的进程中,有 2 个重要的调控点:G₁→S 期调控点和 S, G₂→M 期调控点。细胞周期蛋白(cyclin),细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent-kinase, CDK)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor, CKI)及某些癌基因或抑癌基因表达产物,通过各自的表达水平不同,磷酸化和非磷酸化状态的改变以及蛋白质之间的相互作用对细胞周期进行调控。

Cdc 2 和 CyclinB1 被认为在细胞 S, G₂ 期到 M 期的转换过程中发挥重要作用^[4]。当生长信号通过信号转导途径和早期应答基因传递到细胞周期调控环节时,在 G₂ 期,CyclinB1 的表达增加,并与 Cdc 2 结合形成 CyclinB1-Cdc 2 复合物。此时由于 Cdc 2 被 Wee1 激酶磷酸化,Cdc 2 无活性。在细胞进入 M 期前一瞬间,一方面 Wee1 激酶的活性下降,另一方面 Cdc 25 C 磷酸酶使 Cdc 2 去磷酸化,使 Cdc 2 迅速活化,进而推动细胞周期进入有丝分裂期^[5-6]。反之,Cdc 2 的活性降低则引起细胞周期 S, G₂/M 阻滞。另外,p21^{WAF1/CIP1}能与 CyclinB1-Cdc 2 复合物上

的 Cdc 2 结合抑制其活性,诱导细胞周期阻滞^[7]。

本研究发现,MCV 能明显诱导 MGC-803 细胞 S, G₂/M 期阻滞。MCV 作用于 MGC-803 细胞 24 h 后,Cdc 2 蛋白表达水平与 MCV 时间依赖性降低,p21^{WAF1/CIP1}蛋白表达时间依赖性提高。由此,我们推测,MCV 诱导人胃癌 MGC-803 细胞 S, G₂/M 期阻滞,主要是由于 Cdc 2 蛋白表达减少及不断增加的 p21^{WAF1/CIP1}蛋白与 CyclinB1-Cdc 2 复合物结合,两方面共同作用结果导致 Cdc 2 活性降低,诱导细胞 S, G₂/M 期阻滞。本研究结果为土槿乙酸临床治疗人胃癌提供了实验数据和理论依据。

[参考文献]

- [1] 陆鹏,童强松,姜凤超,等. 姜黄素前体药物的合成及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国药学通报,2006, 22 (3): 321.
- [2] Meng Aiguu, Jiang Lingling. Induction of G₂/M arrest by Pseudolaric acid B is mediated by activation of the ATM signalling pathway[J]. Acta Pharmacol Sin, 2009, 30 (4):442.
- [3] Deveraux Q L, Reed J C. IAP family proteins-suppressors of apoptosis[J]. Genes Dev,1999, 13(3): 239.
- [4] Li L, Zou L. Sensing, signaling, and responding to DNA damage: organization of the checkpoint pathways in mammalian cells [J]. J Cell Biochem, 2005, 94 (2): 298.
- [5] Sebastian B, Kakizuka A, Hunter T. Cdc 25M2 activating of cyclin-dependent kinase by dephosphorylation of threonine-14 and tyrosine-15[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90(8): 3521.
- [6] Gould K L, Nurse P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc 2⁺ protein kinase regulation entry into mitosis[J]. Nature,1989, 342(6245): 39.
- [7] Aprelikova O, Xiong Y, Liu E T. Both p16 and p21^{WAF1/CIP1} families of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase [J]. J Biol Chem, 1995, 270 (3): 18195.

[责任编辑 聂淑琴]