

• 药理 •

反左金丸水提物对人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡及 bcl-2 bax 基因表达的影响

余惠旻^{1*}, 彭求贤^{1,2}, 刘塔斯², 杨大坚¹, 陈新滋¹

(1. 普尔药物科技开发(深圳)有限公司, 广东 深圳 518057; 2. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410007)

[摘要] 目的: 观察反左金丸水提物(water extracts of Retro-zuojin Pill, WERZP) 对人胃癌细胞(SGC-7901) 生长的抑制和凋亡诱导效果, 及其对 bcl-2 和 bax 表达的影响。方法: 采用 MTT 比色法观察不同浓度的 WERZP 对 SGC-7901 的生长抑制情况; 流式细胞仪检测细胞凋亡率; Hoechst 33258 染色观察细胞形态学变化以及 Western blot 方法检测 WERZP 对人胃癌细胞 SGC-7901 中 bcl-2 bax 蛋白表达的影响。结果: WERZP 作用 SGC-7901 细胞 24 h 后, 细胞存活率显著降低($P < 0.05$), 且与时间、剂量呈依赖关系。流式细胞仪 PI 单染亚二倍体峰分析, 0.1, 0.5, 1, 5 和 10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ WERZP 作用 SGC-7901 细胞 24 h, 细胞凋亡率分别为 (4.02 \pm 1.33), (36.10 \pm 0.23), (55.91 \pm 0.95), (56.50 \pm 1.55) 和 (60.27 \pm 3.58)%, 其中 (0.5~10) $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组与对照组 (2.66 \pm 1.33)% 比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。Hoechst 染色结果显示细胞出现核固缩状和颗粒状荧光等典型的凋亡学特征。WERZP 可降低 SGC-7901 细胞 bcl-2 基因表达和增加 bax 基因表达。结论: WERZP 对 SGC-7901 生长有明显的抑制作用并可诱导 SGC-7901 的凋亡。bcl-2 基因表达降低和 bax 基因表达增加可能是其凋亡机制之一。

[关键词] 反左金丸; 人胃癌细胞; 凋亡; 凋亡机制

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2008)11-0028-05

Effect of Retro-Zuojin Pill on Apoptosis and Bcl-2, Bax Gene Expression in SGC-7901 Cells

YU Hui-min^{1*}, PENG Qiu-xian^{1,2}, LIU Ta-si², YANG Da-jian¹, CHEN Xin-zi¹

(1. Pearl Materia Medica Development (Shenzhen) Ltd., Shenzhen 518057, China;

2. Hunan University of TCM, Changsha, 410007, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of water extracts of Retro-Zuojin Pill (WERZP) on proliferation and apoptosis of human gastric carcinoma cells (SGC-7901), and the relationship between apoptosis and bcl-2, bax expression. **Methods:** The cell viability was measured by MTT; the apoptotic rate was investigated by FCM and the morphology was observed by Hoechst 33258 staining. Detection of bcl-2, bax gene and protein expression of WERZP-treated gastric cancer cells were carried out with Western blot method. **Results:** After treatment with WERZP for 24 h, the proliferation of SGC-7901 cells was significantly inhibited ($P < 0.05$). Inhibited cell proliferation and induced cell death were in a dose-dependent and time-dependent manner, with apoptotic rate of (4.02 \pm 1.33), (36.10 \pm 0.23), (55.91 \pm 0.95), (56.50 \pm 1.55) and (60.27 \pm 3.58) % accordingly. All the concentrations except the lowest induced significant apoptosis compared with the control ($P < 0.01$). The nucleuses were positively stained with fluorochrome Hoechst 33258. WERZP could reduce the bcl-2 gene expression and increase gene expression of bax. **Conclusion:** WERZP could significantly inhibit the growth of SGC-7901 cells and induce apoptosis, reduce the bcl-2 gene expression. The increased

[收稿日期] 2008-03-24

[基金项目] 973 计划前期研究专项(2006CB708516)

[通讯作者] * 余惠旻, Tel: (0755) 26737461, Fax: (0755) 26972852; E-mail: yuhuiming72@yahoo.com.cn

gene expression of bax may be involved in apoptosis mechanism.

[**Key words**] Retro-Zuojin Pill; SGC-7901; apoptosis; apoptosis mechanism

反左金丸源于《丹溪心法》中左金丸,将原方左金丸中黄连与吴茱萸配伍比改为 1:6。现代药理研究证实原方左金丸具有抑制胃酸分泌、抑菌、影响红细胞膜 ATP 酶活性等作用^[1-3]。体外研究显示,加味左金丸能下调 EGFR、VEGF、Bcl-2、COX-2 蛋白表达^[4-6]。但反左金丸对体外细胞影响的研究较少,也未见其对癌基因 Bax 表达的研究。本实验以体外培养的人胃癌细胞 SGC-7901 为研究对象,探讨反左金丸对 SGC-7901 细胞凋亡的影响及其可能的分子机制,为胃癌的防治提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料 反左金丸水提物,每 1 g 提取物干粉相当于生药 3 g,由深圳市中药药学与分子药理学研究重点实验室中药制剂实验室提供。bcl-2 和 bax 抗体购于 SANTA CRUZ 公司,β-actin 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 细胞培养和条件 SGC-7901 胃腺癌细胞株获得自中山大学医学院动物细胞中心(细胞源自美国 ATCC 细胞库)。

1.3 MTT 测定细胞存活率 取对数生长期细胞,用 DMEM 培养基制成细胞悬液($5 \times 10^4 \cdot \text{mL}^{-1}$)加入 96 孔板,100 μL/孔,培养 24 h 后加药,实验组分别加入不同浓度药物使其终浓度为 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别培养 20, 44, 68 h,加入 MTT 10 μL/孔培养 4 h,吸去培养基,加入 DMSO 150 μL/孔,震荡 10 min。波长 490 nm 测吸光值(OD)。细胞抑制率 = (1 - 实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) × 100%,以空白组 OD 值调零。

1.4 流式细胞术检测 调整细胞密度 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,以 1.5 mL/孔种入 6 孔板。每组 6 个复孔。药物作用 72 h 后,细胞刮刮取细胞,1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,去上清,PBS 漂洗两次,沉淀中缓慢依次加入 70% 的冰乙醇固定。-20 °C 固定 24 h。然后 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,去上清,PBS 漂洗两次,调整细胞浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。加 RNase 至终浓度 100 μg $\cdot \text{mL}^{-1}$,37 °C 水浴 30 min。加 PI 至终浓度 50 μg $\cdot \text{mL}^{-1}$,350 目尼龙网滤膜过滤去除细胞团块,4 °C 避光染色 30 min 后,上流式细胞仪检测(激发波长:488 nm;发射波长:610 nm)各期细胞 DNA 的含量。测定

数据按流式细胞仪所配置的软件进行数据处理,以 DNA 组方图出现低于 G₁ 期 DNA 含量的亚 G₁ 峰的大小代表凋亡细胞的多少。

1.5 荧光显微镜观察 将 SGC-7901 细胞($2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$)接种于 6 孔板内的盖玻片上,各实验组按要求给予不同的处理因素后,加入新鲜配制的 4% 多聚甲醛(pH 为 7.4)于 37 °C 固定细胞 30 min,PBS 液洗两次,加 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hoechst 33258 染色液染色 30 min,PBS 液洗后,用封片液(20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸,50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸氢二钠,50% 甘油,pH 5.5)封片后荧光显微镜观察、摄片。

1.6 细胞形态学观察 1.0 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 WERZP 分别作用细胞 0, 24, 48, 72 h 后,用倒置相差显微镜观察,随机选取视野记录图象。

1.7 Western blot 检测 Bcl-2 和 Bax 的表达 提取蛋白前将 PMSF 10 μL 加入 1 mL 细胞裂解液 RIPA,取经左金丸作用后细胞约 2.4×10^6 个加入 RIPA,冰上裂解 30 min,10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清。BCA 测定蛋白浓度,酶标仪测定波长为 A562,根据标准曲线计算出蛋白浓度。灌制 12% 分离胶,4% 浓缩胶的 SDS-PAGE 凝胶。吸取 80 μg 总蛋白,恒压 100 V 电泳直到溴酚蓝到达分离胶底部。湿法电转恒压 100 V,120 min,将蛋白从 SDS-PAGE 凝胶转至 PVDF 膜。3% 的脱脂奶粉/PBS-T 封闭。3% 的脱脂奶粉/PBS-T 按 1:500 稀释 Rabbit anti-bcl2/-survivin,4 °C 孵育过夜。1:3000 稀释二抗 Goat anti-Rabbit IgG,孵育 1 h,增强化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显影。UVI 凝胶成像系统摄像。

1.8 统计学处理 全部数据采用 SPSS10.0 统计软件进行统计分析,数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验。

2 结果

2.1 反左金丸对 SGC-7901 的抑制率的影响 实验结果显示:对照组细胞生长良好,经 WERZP 作用后的细胞,随着浓度逐渐增高,作用时间的不断延长,SGC-7901 细胞的生长抑制程度增强。10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ WERZP 对细胞抑制作用明显,作用 24 h,细胞抑制(64.20 ± 2.59)%,作用 48 h 后细胞几乎全部死亡。如图 1。

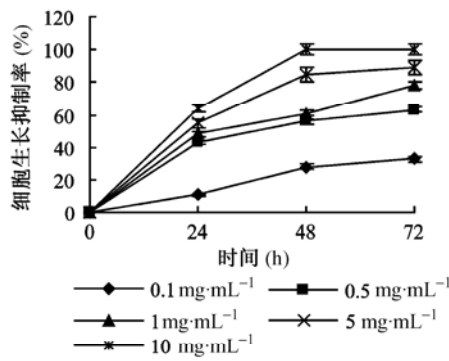


图 1 WERZP 不同浓度与作用时间对 SGC-7901 生长抑制率的影响 (n=6)

2.2 反左金丸对 SGC-7901 的凋亡率的影响 凋亡细胞在流式细胞仪直方图上可以出现特征性的亚二倍体峰 (sub-G1 peak), 对照组的自然凋亡率为 (2.66 ± 1.33) % (图 2A), 用不同浓度的 WERZP (0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg·mL⁻¹) 作用 SGC-7901 细胞 24 h 后, 凋亡率分别为 (4.02 ± 1.33) %, (36.10 ± 0.23) %, (55.91 ± 0.95) %, (56.50 ± 1.55) % 和 (60.27 ± 3.58) %, 除 0.1 mg·mL⁻¹ 组外与对照组比较差异均有显著性 (P < 0.01) (图 2)。表明随 WERZP 浓度增加, 细胞凋亡率增高。

2.3 荧光显微镜观察 Hoechst 33258 染色结果如图 3 所示, 空白对照组细胞生长良好, 细胞大小均匀、完整、饱满, 密度一致, (图 3A), 而 WERZP 作用 24 h 后随着药物浓度的增加, 凋亡细胞逐渐增多, 即核质浓聚成大小不等的多边形, 细胞多出现固缩形

成新月体, 出现凋亡小体 (图 3)。

2.4 细胞形态学观察 正常条件下 SGC-7901 细胞呈圆形或椭圆形, 传代培养 48 h, 细胞贴壁生长, 边缘透亮, 有聚团现象; 1.0 mg·mL⁻¹ WERZP 对 SGC-7901 细胞作用 24 h, 细胞开始发生形态学改变, 贴壁细胞的边界模糊, 部分细胞收缩, 分裂相减少, 并出现凋亡小体; 48 h 时部分细胞浮于培养基中; 作用时间达 72 h 时, 大部分细胞漂浮, 细胞碎片增多 (图 4)。作用时间为 24 h, WERZP 对 SGC-7901 细胞诱导凋亡作用最明显。因此, 本实验选取 24 h 作为最适作用时间来探讨其作用机制。

2.5 Western bolt 检测 Bcl-2 和 Bax 表达 随着 WERZP 药物浓度的增加, Bax 的表达逐渐增加, 而 Bcl-2 的表达逐渐减少 (图 5)。

3 讨论

现代医学研究表明, 肿瘤组织内部存在细胞增生和死亡的动态平衡, 肿瘤的生长除了瘤细胞的无限增生外, 细胞分化和凋亡失调与肿瘤的形成和发展密切相关^[7]。目前普遍认为凋亡与细胞分裂、细胞分化类似, 受细胞内多种基因调控, 是一个级联式 (cascade) 基因表达的结果^[8]。bcl-2 基因家族在控制细胞凋亡中起重要作用, 该家族包括凋亡抑制基因 bcl-2 和凋亡促进基因 bax。bax 的过表达已经证明可以促进细胞的死亡^[9], 然而, 抑制细胞凋亡蛋白质的过表达则可以抑制 bax 引起的细胞凋亡^[10]。这

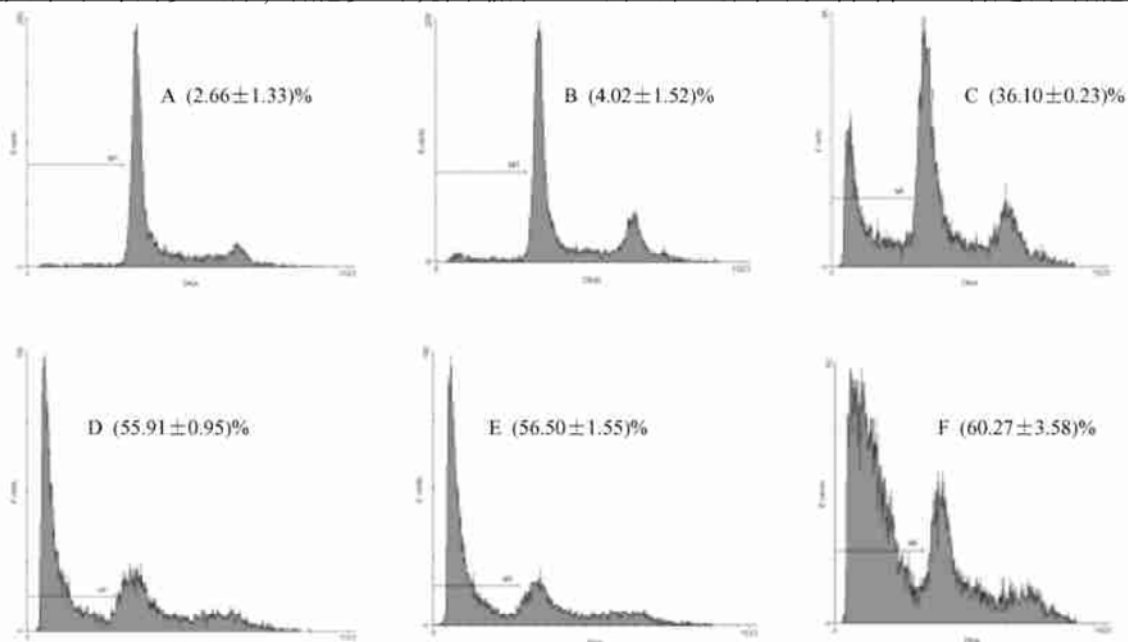


图 2 WERZP 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 (n=6)

(A) 对照; (B)-(F) WERZP 浓度: (B) 0.1 mg·mL⁻¹; (C) 0.5 mg·mL⁻¹; (D) 1.0 mg·mL⁻¹; (E) 5.0 mg·mL⁻¹; (F) 10.0 mg·mL⁻¹

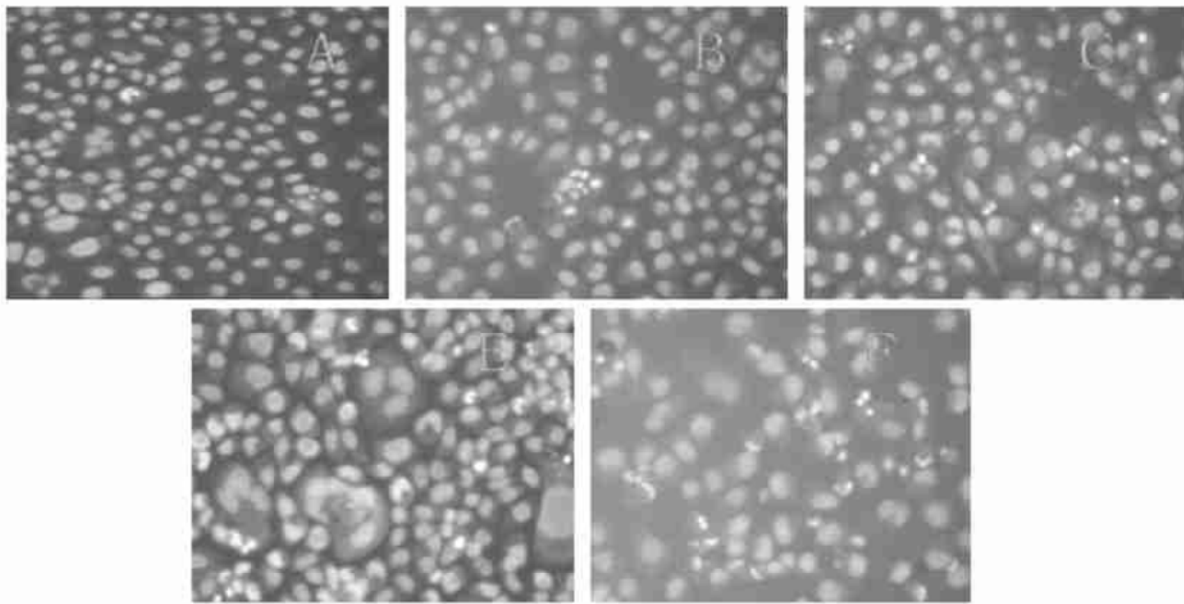


图 3 不同浓度 WERZP 作用 24 h 后对 SGc-7901 细胞凋亡的影响 (× 200)

(A) 对照; (B)-(E) WERZP 浓度: (B) 0.1 mg·mL⁻¹; (C) 0.5 mg·mL⁻¹; (D) 1.0 mg·mL⁻¹; (E) 5.0 mg·mL⁻¹

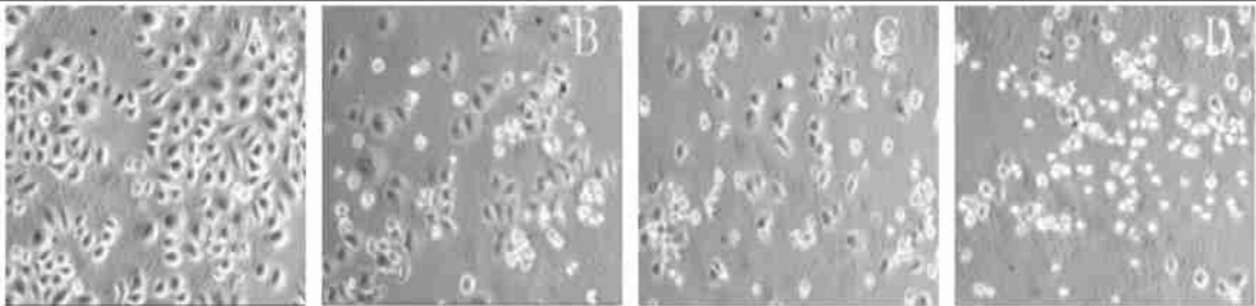


图 4 1.0 mg·mL⁻¹ WERZP 对 SGc-7901 细胞形态的影响 (× 200)

(A) 对照; (B) 24 h; (C) 48 h; (D) 72 h

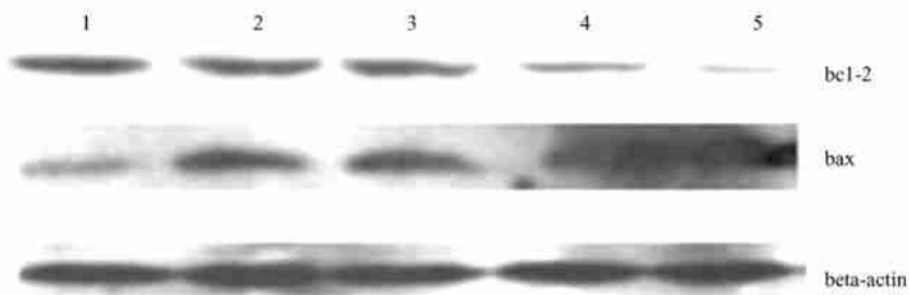


图 5 不同浓度 WERZP 作用于 SGc-7901 细胞 24 h 后 Bcl-2 与 Bax 的蛋白表达

1. 对照组; 2-5 WERZP 浓度: 0.1, 0.5, 1.0, 5.0 mg·mL⁻¹ 作用 SGc-7901 细胞 24 h

样, bcl-2 和 bax 的比率就成为细胞是否发生凋亡的关键因素^[11, 12]。本研究结果显示, 经 (0.1~ 5.0) mg·L⁻¹ 的 WERZP 作用 24 h 后, 人 SGc-7901 细胞中 bcl-2 随着浓度增加而明显减低。bax 蛋白表达率随着浓度增加而明显升高。提示反左金丸可减少 bcl-2 的表达, 提高 bax 的表达。Bcl-2 和 bax 的比率随着浓度的增加而降低, 这可能是其诱导 SGc-7901 细胞凋亡的机制之一。

本研究结果可以看出, WERZP 可以在体外以剂量依赖方式抑制 SGc-7901 细胞的生长。电镜下观察, 随着药物浓度的增加, 培养液中悬浮聚集成团的细胞增多, 而贴壁细胞数量减少, 出现胞膜破裂, 胞内容物释放。Hochest 染色结果显示, 经 WERZP 作用 24 h 后, 细胞核质浓聚成大小不等的多边形, 细胞多出现固缩形成新月体, 部分细胞失去其正常生

(下转第 48 页)

(上接第 31 页)

长状态,变成杆形、哑铃形,有的呈新月体,核染色质浓密,从形态学的角度证明 WERZP 诱导 SGC-7901 细胞凋亡。

流式细胞仪结果显示,随着 WERZP 浓度的升高,诱导凋亡的趋势增大。

综上所述,反左金丸水提物有诱导人胃腺癌细胞凋亡的作用,这种凋亡可能是受到抑制凋亡基因 bcl-2 表达下调和促进凋亡的基因 bax 表达上调的调节。但反左金丸作为一种新的防治胃癌的治疗药物,还需进一步进行动物体内药理研究和临床研究。

[参考文献]

- [1] 陈艳芬,陈蔚文,李柳茹,等.左金丸和反左金丸对大鼠胃腺粘膜保护机制的比较研究[J].广州中医药大学学报,2003,20(2):133-135.
- [2] 陈奇.中成药名方药理与临床[M].北京:人民卫生出版社,1998:59-260.
- [3] 黄兆胜,李盛青,何丽春,等.黄连与吴茱萸的不同比例配伍对大鼠红细胞膜 ATP 酶活性的影响[J].中药药理与临床.2001,17(5):1-2.
- [4] Yur-Lian Hu, Jiang Nan, Da-Qi Tan. Effect of Jiawei Zuojin Wan on expression of epifermal growth factor receptor, vascular endothelial growth factor, C-met, Bcl-2 and P53 protein in rats with gastric precancerous lesions[J]. World J Gastroenterol, 2006, 14(7): 650-654.

- [5] NAN Xing-chu, HU Yur-lian, LI Qiu-hua, *et al.* Effect of Adjusted Zuojin Pills on Cyclooxygenase-2 Protein Expression in Rats with Gastric Precancerous Lesions [J]. Journal of Hubei College of TCM, 2007, 9(1): 34-36.
- [6] HU Yur-lian, SUN Li-qun, TAN Da-qi, *et al.* Effect of adjusted Zuojin pills on protein expression of proliferating cell nuclear antigen and Bcl-2 in rats with gastric precancerous lesions [J]. Chin J Integr Trad West Med Dig, 2005, 13(2): 78-80.
- [7] DENG Xu-kun. Comparison of morphological feature and ultrastructure changes of apoptosis of SGC-7901 and HEPG-2 cell lines induced by cisplatin[J]. Acta anatomica sinica. 2006, 37(5): 538-540.
- [8] 胡野,凌志强,单小云.细胞凋亡的分子医学[M].北京:军事医学科学出版社,2002:60-66.
- [9] Jang M, Shin M, Shin H, *et al.* Alcohol induces apoptosis in TM3 mouse Leydig cells via bay-dependent caspase-3 activation[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 449(1-2): 39-45.
- [10] Ferlini C, Raspaglio G, Mozzetti S, *et al.* Bcl-2 down regulation is a novel mechanism of paclitaxel resistance [J]. Mol-Pharmacol, 2003, 64(1): 51-58.
- [11] Pettersson F, Dalglish AG, Bissonnette RP, *et al.* Retinoids cause apoptosis in pancreatic cancer cells via activation of RAR-gamma and altered expression of bcl-2/bax[J]. Br J Cancer, 2002, 87(5): 555-561.
- [12] 王卫东. Bcl-2/Bax 比率与细胞“命运”[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(4): 393-395.