

健脾补肾方对胃癌细胞系 MGC-803 线粒体膜电位和细胞内活性氧的影响

唐晓颀¹, 孙桂芝¹, 吴 洁¹, 裴迎霞¹, 祁 鑫¹, 郭建友², 李 杰¹

(1. 中国中医研究院广安门医院, 北京 100053; 2. 中国中医研究院中药研究所, 北京 100700)

摘要: 目的: 研究健脾补肾方对 MGC-803 细胞凋亡的诱导作用及对线粒体膜电位和细胞内活性氧水平的影响。方法: 应用流式细胞仪检测健脾补肾方含药血清诱导的 MGC-803 细胞凋亡及其线粒体膜电位和细胞内活性氧水平(分别用 Annexin V、rhodamine 123 和 dihydrorhodamine 123)。结果: 药物作用 36h 后, 各用药组的细胞凋亡率显著高于空白血清组, 药物作用有明显的时-效关系($P < 0.05$); 药物作用 36h 后, 中药组的细胞内活性氧水平基本稳定, 而中西药组低于空白血清组和中药组($P < 0.05$); 各用药组的线粒体膜电位水平随药物作用时间延长逐渐降低。结论: 健脾补肾方可时间依赖地诱导 MGC-803 细胞凋亡, 并可降低其线粒体膜电位, 稳定细胞内活性氧水平; 而且健脾补肾方与 DDP 具有协同作用。

关键词: 细胞凋亡; MGC-803 细胞; 线粒体膜电位; 活性氧; 健脾补肾方

中图分类号: R283.6 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2005)06-0061-04

Effect of Jianpi Bushen Formulation on the Level of Mitochondrial Membrane Potential and Endocellular Reactive Oxygen Species in MGC-803 Cells

TANG Xiaopo, SUN Gui-zhi, WU Jie, PEI Ying-xia, QI Xin, GUO Jian-you, LI Jie

(1. Guanganmen Hospital, China Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100053, China;

2. Institute of Materia Medica, China Academy of TCM, Beijing 100700, China)

Abstract: Objective: To study the inducing effect of Jianpi Bushen Formulation (JPBS) on apoptosis, the levels of mitochondrial membrane potential (MMP) and endocellular reactive oxygen species (ROS) in MGC-803 cells. Methods: Apoptosis induced by JPBS-containing serum. MMP and ROS in MGC-803 cells was detected using flow cytometry (FCM) (Annexin V, rhodamine 123 and dihydrorhodamine 123 were used, respectively). Results: After 36 hours of treatment, the apoptosis of the drug-treated groups was obviously higher than that of the control group, and the drug action showed significant time-effect relationship ($P < 0.05$); The endocellular ROS level of JPBS group maintained substantially constant, and the level of JPBS+ DDP group was lower than that of the serum control group and JPBS group ($P < 0.05$) after 36 hours of treatment; and the MMP level of JPBS group, DDP group and JPBS+ DDP group reduced gradually with extended action duration. Conclusion: Apoptosis induced by JPBS in MGC-803 cells may show time-dependent, the MMP level may be reduced and the endocellular ROS level may keep constant; and, there were synergetic effect between JPBS and DDP.

Key words: Apoptosis; MGC-803 cell; Mitochondrial membrane potential; Reactive oxygen species; Jianpi Bushen formulation

线粒体在细胞凋亡中的作用日益受到重视, 随着对细胞凋亡研究的不断深入, 对线粒体与细胞凋亡的关系的认识也在不断加深。健脾补肾方是广安门医院肿瘤科经过多年临床实践总结出来的治疗胃

癌的有效方剂, 为了进一步阐释其作用机制, 我们对健脾补肾方诱导胃癌细胞系 MGC-803 的凋亡及线粒体机制进行以下研究。

1 材料

1.1 药物和试剂 人胃低分化黏液腺癌细胞系 MGC-803(简称 MGC-803), 中国医学科学院基础医学研究所病理室提供; 健脾补肾方(生晒参、白术、枸杞子、女贞子等按 1: 1.5: 1.5: 1.5 水煎浓缩制备)由广

收稿日期: 2004-12-28

基金项目: 国家自然科学基金资助(No. 30271656)

通讯作者: 唐晓颀, Tel: (010) 88001192, E-mail: tangxiaopo@sohu.com

安门医院制剂中心提供; 顺氯氨铂 (DDP), 齐鲁制药厂 (0410038); MTS 试剂, Promega 公司 (lot # 19359701); Annexin V (AV) 凋亡检测试剂盒, 北京宝赛生物技术有限公司 (批号 20040518); Rhodamine123 (Rh), Sigma 公司 (lot # 014K3689); dihydrorhodamine 123 (DHR), Sigma 公司 (lot # 104K1127); RPMI-1640 培养基, Gibco 公司 (lot # 11 30519); 超级新生牛血清, 杭州四季青生物工程材料有限公司 (批号 030218)。

1.2 仪器 FACSsort 流式细胞仪, 美国 Becton-Dickinson 公司生产。

2 方法

2.1 含药血清制备 将 12 只日本大耳白兔 (雄性, 体重 2.5~3.0kg) 随机分为 4 组, 每组 3 只。空白组经胃管给予纯净水 20mL, 每天 2 次, 共给药 5 次; 其余 3 组分别经胃管给予高、中、低剂量健脾补肾方 20mL (生药含量分别为 28.8g/kg、14.4g/kg 和 7.2g/kg 体重), 每天 2 次, 共给药 5 次。各组均于末次给药前禁食 12h, 分别在末次给药后 1、2、3h 经耳中央动脉采血, 离心分离血清, 56℃30min 灭活, 0.20μm 滤膜过滤灭菌, -20℃保存备用。

2.2 健脾补肾方对 MGC-803 的生长抑制作用 (MTS 法) MGC-803 细胞在 37℃含 5% CO₂ 的培养箱中培养, 培养基为 RPMI-1640 (含 10% 灭活新生牛血清、100u/mL 青霉素和 100u/mL 链霉素, pH 为 7.2~7.4)。将处于对数生长期的 MGC-803 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后, 接种于 96 孔板中, 每孔 100μL (1×10⁵ 个细胞/mL), 孵育 48h, 随机分为健脾补肾方高、中、低剂量组 (各组再分为 1、2、3h 血清组) 及空白血清组、对照组和化疗组。中药组分别加入 5%、10%、20% 的含药血清, 化疗组为 DDP 2、4、8μg/mL, 空白血清组加入 10% 的空白血清 (末次给药后 2h 的血清), 对照组加入含 10% 新生牛血清的培养基, 另设培养基对照组 (不含血清)。每组设 3 复孔, 置培养箱中孵育 46h 后, 加入 MTS 试剂 20μL, 继续培养 2h, 振荡器轻微振荡后, 用 EL311 型全自动酶标仪检测 OD 值, 检测波长 490nm, 根据 OD 值计算对细胞生长的抑制率 (%)。取具有最佳细胞生长抑制率的血清用于以下实验。

2.3 Annexin V 法检测细胞凋亡率^[1] 取 15 瓶处于对数生长期的 MGC-803 细胞, 随机分为对照组、空白血清组、西药组、中药组、中西药组, 每组 3 瓶细胞。于细胞 80% 汇合时加药, 加药方案为对照组给予含

10% 新生牛血清的培养基, 中药组和中西药组给予前述取得最佳细胞生长抑制的含药血清, 空白血清组的血清浓度与中药组相同, 西药组和中西药组给予 DDP 2μg/mL。加药后分别于 12、24 和 36h 各组分别取 1 瓶细胞, 0.25% 胰酶消化, 收获细胞, 离心 (4℃, 1000r/min, 10min), 弃上清, 加入 1mL 冷 PBS, 轻轻振荡重悬细胞, 离心 (4℃, 1000r/min, 10min, 3 次), 调整细胞数为 1×10⁶ 个/mL, 按照试剂盒说明书分别加入 AV 10μL 和 PI 5μL, 室温下避光孵育 15min, 1h 内流式细胞仪测定。

2.4 健脾补肾方对 MGC-803 细胞线粒体膜电位 (Δm) 和线粒体活性氧的影响 取 15 瓶处于对数生长期的 MGC-803 细胞, 分组及处理同前。于孵育 12、24 和 36h 各组分别取出 1 瓶细胞, 经 0.25% 胰酶消化, 用不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 离心洗涤 2 次 (1000r/min, 10min), 调整细胞数为 1×10⁶ 个/mL, 荧光探针标记, 流式细胞仪测定线粒体膜电位、细胞内活性氧水平:

2.4.1 测定线粒体膜电位^[2] 将 Rh 用 DMSO 配成 1mg/mL 的储备液, 加入细胞悬液中, 终浓度为 10μg/mL (约 25 μmol/mL), 37℃孵育 30min, 用不含 Ca、Mg 的 PBS 液洗涤 3 次, 流式细胞仪测定平均荧光强度 (mean fluorescence intensity, MFI);

2.4.2 测定细胞内活性氧水平^[3] 将 DHR 用 DMSO 配成 2μmol/mL 的储备液, 向细胞悬液中加入 2μL 的储备液, 37℃孵育 45min, 用不含 Ca²⁺、Mg²⁺ 的 PBS 液洗涤 3 次, 流式细胞仪测定 MFI。

2.5 统计方法 采用 SPSS11.0 软件进行统计学处理, 多组间比较采用方差分析, 各组前后比较采用 *t* 检验。

3 实验结果

3.1 健脾补肾方含药血清对 MGC-803 的生长抑制作用 根据所测定的 OD 值, 按照下面所给公式计算细胞生长抑制率 (%): 抑制率 = (对照组平均 OD 值 - 药物组平均 OD 值) / (对照组平均 OD 值 - 空白组的平均 OD 值) × 100%。结果如表 1 所示, 低剂量组于末次给药后 2h 采集的血清以 20% 给药时的细胞抑制率最佳。DDP 2μg/mL 的抑制率为 86.8%。

3.2 健脾补肾方含药血清对 MGC-803 细胞凋亡的诱导 如表 2 所示, 药物作用 12h 后各组之间细胞凋亡的差异无显著性; 药物作用 24h 后, 中西药组显著高于空白血清组 (*P* < 0.05), 中药组和西药组的凋亡率均高于空白血清组, 但差异无显著性 (*P* = 0.17

和 $P = 0.11$); 药物作用 36h 后, 中西药组、西药组与中药组、空白血清组比较, 差异显著 ($P < 0.05$), 中药组的凋亡率高于空白血清组; 中药组、西药组及中西药组凋亡率均随着药物作用时间的延长而增高, 药物作用 36h 与作用 12h 前后比较, 差异显著 ($P < 0.05$)。药物作用不同时间后, 空白血清组与对照组比较, 差异均无显著性 ($P > 0.05$)。

表 1 不同采血时间的健脾补肾方含药血清对 MGC-803 的生长抑制作用(h)

清浓度	含药血清高剂量组抑制率(%)			中剂量组抑制率(%)			低剂量组抑制率(%)		
	1h	2h	3h	1h	2h	3h	1h	2h	3h
5%	7.0	7.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
10%	9.8	0.0	8.2	0.0	0.0	3.1	0.0	0.0	4.4
20%	11.0	10.7	8.4	4.5	8.5	0.5	0.0	11.4	0.0

表 2 健脾补肾方含药血清不同作用时间的细胞凋亡率 ($n = 2$)

组别	给药剂量 (或血清浓度)	药物不同作用时间的细胞凋亡率(%)		
		12h	24h	36h
对照组	10% 小牛血清	1.32 ± 1.34	1.66 ± 0.33	3.22 ± 2.35
空白血清组	20% 空白血清	1.67 ± 1.50	0.99 ± 1.39	2.62 ± 0.42
西药组	DDP 2 μ g/mL+ 10% 小牛血清	2.45 ± 0.02	5.38 ± 0.77	57.11 ± 24.24 ²⁾³⁾
中药组	20% 含药血清	1.99 ± 1.40	4.55 ± 1.50	9.46 ± 2.23 ³⁾
中西药组	DDP 2 μ g/mL+ 20% 含药血清	2.56 ± 1.99	10.60 ± 4.48 ¹⁾	74.23 ± 13.51 ²⁾³⁾

24h 作用后与空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$; 36h 作用后与空白血清组、中药组和对照组比较²⁾ $P < 0.05$; 36h 各给药组与 12h 前后比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 健脾补肾方对 MGC-803 细胞内活性氧的影响

如表 3 所示, 药物作用 12h 和 24h 后各组之间细胞内活性氧水平的差异无显著性 ($P > 0.05$); 药物作用 36h 后, 中药组细胞内活性氧低于对照组而高于西药组和中西药组 ($P < 0.05$), 中西药组低于空白血清组、中药组和对照组 ($P < 0.05$), 西药组与中西药组比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$); 对照组的细胞内活性氧水平随时间的延长逐渐增高, 中药组细胞内活性氧水平在不同药物作用时间基本保持稳定。

3.4 健脾补肾方对 MGC-803 细胞线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的影响

如表 4 所示, 药物作用 12h 和 24h 后各组之间差异无显著性 ($P > 0.05$); 药物作用 36h 后, 中西药组和西药组的线粒体膜电位低于空白血清组和中药组 ($P < 0.05$), 中药组、西药组、中西药组的线粒体膜电位水平随药物作用时间的延长有逐渐降低趋势。

表 3 健脾补肾方含药血清不同作用时间对细胞内活性氧的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

组别	给药剂量 (或血清浓度)	药物不同作用时间后的 MFI		
		12h	24h	36h
对照组	10% 小牛血清	2.25 ± 0.12	2.40 ± 0.02	2.65 ± 0.06 ²⁾
空白血清组	20% 空白血清	1.97 ± 1.00	1.86 ± 0.23	1.85 ± 0.23 ¹⁾
西药组	DDP 2 μ g/mL+ 10% 小牛血清	3.08 ± 0.55	2.70 ± 0.22	1.20 ± 0.08 ¹⁾²⁾³⁾
中药组	20% 含药血清	2.20 ± 0.43	2.02 ± 0.01	2.08 ± 0.11 ¹⁾
中西药组	DDP 2 μ g/mL+ 20% 含药血清	2.26 ± 0.38	2.26 ± 0.43	1.13 ± 0.00 ¹⁾²⁾³⁾

36h 后, 与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$, 与中药组比较²⁾ $P < 0.05$, 与空白血清组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

表 4 健脾补肾方含药血清不同作用时间对 MGC-803 细胞线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 2$)

组别	给药剂量 (或血清浓度)	药物不同作用时间后的 MFI		
		12h	24h	36h
对照组	10% 小牛血清	1094 ± 404	868 ± 192	883 ± 189
空白血清组	20% 空白血清	927 ± 292	826 ± 105	836 ± 102
西药组	DDP 2 μ g/mL+ 10% 小牛血清	1180 ± 403	954 ± 301	187 ± 219 ¹⁾²⁾
中药组	20% 含药血清	1040 ± 335	852 ± 152	760 ± 135
中西药组	DDP 2 μ g/mL+ 20% 含药血清	1116 ± 512	831 ± 256	157 ± 206 ¹⁾²⁾

36h 后, 与空白血清组、对照组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与中药组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

细胞凋亡是一种细胞生理性死亡, Jacobson 等人发现, 用溴化乙锭除去线粒体 DNA 诱导一株人成纤维细胞凋亡, 表明线粒体在细胞凋亡中起作用^[4]。Zamzami 等人证明线粒体膜电位低于正常水平的细胞发生凋亡, 并证实线粒体膜电位下降和线粒体活性氧合成增多代表了凋亡早期的两个明显不同的阶段, 活性氧在线粒体膜电位下降后才产生并起作用^[5]。有研究表明, 细胞内活性氧的产生与癌症的发生密切相关, Gupta 等人发现在小鼠角化细胞癌变过程中, 细胞内活性氧水平升高, 引起与肿瘤细胞增殖相关激酶活性上升, 由此促进了肿瘤细胞的增殖^[6]。细胞内活性氧的产生与许多生物因子对细胞的作用密切相关, 这些因素影响细胞的多种功能, 若以抗氧化剂等消除细胞内活性氧, 其功能就会受到抑制^[4]。张培彤等研究表明扶正解毒中药具有抗氧化剂活性^[7]。本项研究提示, 具有扶正作用的健脾补肾方可以诱导胃癌细胞系 MGC-803 细胞凋亡, 这种作用具有时间依赖性, 同时具有降低其线粒体膜电位的趋势, 并稳定细胞内活性氧水平。本组资料中, 中药组的结果与空白血清组比较未显示统计学

差异,可能由于样本数较少($n=2$)的原因,有待于扩大样本数进行深入研究。结果还提示 DDP 可诱导细胞凋亡、降低线粒体膜电位和细胞内活性氧水平,健脾补肾方与 DDP 具有协同作用,这与我们的临床实践以及前期工作基础相吻合。线粒体参与细胞凋亡的机制,例如细胞内钙和 pH 值等是否参与,以及健脾补肾方对这些因素的影响等还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 黄健,沈永生,周宏平,等. Annexin V/PI TdT 利 PI 法检测细胞凋亡的比较[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2000, 20(4): 387-388.
- [2] Bino D, Lassota P, Darzynkiewicz Z. The S-phase cytotoxicity of camptothecin[J]. Exp Cell Res, 1991, 193(1): 27-35.
- [3] 施广璞,杜洪震,刘子文,等. H_2O_2 致 WB-F344 细胞内活性氧的产生及机理[J]. 生物物理学报, 2002, 18(4): 462-466.
- [4] Jacobson MD, Bume JF, King MR et al. Bcl-2 blocks apoptosis cells lacking mitochondrial DNA [J]. Nature, 1993, 361 (6410): 365-369.
- [5] Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death[J]. J Exp Med, 1995. 182(2): 367-377.
- [6] Gupta A, Rosenberger SF & Bowden GT. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP Kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines[J]. Carcinogenesis, 1999, 20(11): 2063-2073.
- [7] 张培彤,余桂清,孙桂芝,等. 扶正防癌液对胃肠肿瘤患者血清 SOD 活性的影响及其临床意义[J]. 中国中西医结合外科杂志, 1998, 4(2): 65-68.