

doi:10.3969/j.issn.1671-038X.2013.11.006

# 槐耳对人胃癌细胞 MGC803 增殖和凋亡的影响

卢洁

(舟山市舟山医院 药剂科, 浙江 舟山 316000)

**摘要:** [目的] 观察中药槐耳对胃癌细胞株 MGC803 增殖和凋亡的影响。 [方法] 以不同浓度的槐耳 (4、8、16、32、64 mg/ml) 分别作用于体外培养的人胃癌细胞 MGC803, 通过 MTT 法、划痕实验等检测槐耳对 MGC803 细胞增殖和迁移的作用, 倒置显微镜下观察细胞的形态变化, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。 [结果] MTT 实验显示槐耳可抑制 MGC803 细胞的生长, 呈时间及浓度依赖性; 显微镜下可观察到细胞肿胀、破裂、呈坏死状; 划痕实验显示, 4、8 mg/ml 槐耳分别作用 MGC803 细胞, 划痕愈合明显慢于对照组, 呈剂量依赖关系; 流式细胞仪可检测到 MGC803 细胞凋亡率明显增加, 呈时间及浓度依赖性。 [结论] 槐耳可抑制人胃癌 MGC803 细胞的迁移, 且能通过诱导细胞凋亡的方式有效地抑制人胃癌细胞 MGC803 的生长。

**关键词:** 抗肿瘤药; 胃肿瘤; 槐耳; 人胃癌细胞 MGC803; 迁移; 细胞凋亡

中图分类号: R979.1; R 735.2 文献标志码: A 文章编号: 1671-038X(2013)11-0580-04

## Inhibition effect of Huaier on apoptosis and proliferation of MGC803 human gastric cancer cell in vitro

LU Jie

(Department of Pharmacy, Zhoushan Hospital, Zhoushan 316000, China)

**Abstract:** [Objective] To investigate the effects of Huaier on MGC803 human gastric cancer cell in terms of inhibition of proliferation and induction of apoptosis. [Methods] MGC803 cells in cultural medium in vitro were respectively given 4 mg/ml, 8 mg/ml, 16 mg/ml, 32 mg/ml, and 64 mg/ml Huaier. The inhibitory rate of cells was measured by TEM, MTT assay, FCM and so on. [Results] The results indicated that Huaier inhibited the proliferation of MGC803 cells significantly. The suppression was both in a time-dependent and dose-dependent manner. Morphological examination of Huaier-treated samples showed cells with chromatin condensation and cell shrinkage. Scratch experiments showed that MGC803 treated with 4 mg/ml and 8 mg/ml Huaier healed slower than the control group. [Conclusion] Huaier can not only inhibit migration of MGC803 human gastric cancer cells, but also can inhibit the growth of MGC803 human gastric cancer cells in vitro by inducing programmed cell death.

**Key words:** antineoplastic; Human gastric cancer cells MGC803; Huaier; migration; cell apoptosis

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤, 对化疗敏感性差, 对放射线的耐受力也低, 其发病率和病死率居各种恶性肿瘤的首位。因此, 寻找更有效的抗胃癌药物是目前的重要任务。近年来, 中医中药在癌症治疗中的作用日益受到重视。槐耳颗粒作为国家级一类抗癌新药, 具有良好的免疫增强作用, 能抑制肿瘤的生长, 逆转肿瘤细胞对化疗药物的耐药问

题<sup>[1-2]</sup>。本实验拟研究槐耳在体外对人胃癌细胞 MGC803 增殖的抑制作用, 为后期抗胃癌药物的研发提供理论依据。

### 1 材料与方

#### 1.1 仪器和试剂

CO<sub>2</sub> 培养箱 (HERAEUS); 酶标仪 (MAGEL-LAN); CKX41 型倒置显微镜 (OLYMPUS); 流式细胞仪 (FACS cadibur); 槐耳颗粒 (江苏盖天力药物有限公司) 溶于 RPMI-1640 培养液中, 配成 4、8、16、32、64 mg/ml, 20 μm 滤膜过滤除菌待用; RPMI-

收稿日期: 2013-07-30

作者简介: 卢洁, 女, 大学本科, 药剂师, 从事药物研究

1640 干粉(美国 Gibco 公司产品);小牛血清(杭州四季青公司);四甲基偶氮唑盐(MTT, Sigma 公司)

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞株 MGC803 购自南京凯基生物科技有限公司。MGC803 细胞用含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素、100  $\mu$ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养;以 0.25% 胰蛋白酶(含 0.02% EDTA)消化,按实验所需细胞密度接种,所有实验均在细胞对数生长期进行。

1.2.2 MTT 测定细胞抑制率 取对数生长期的胃癌 MGC803 细胞消化,配制成  $1 \times 10^5$  个/ml 细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,每孔 200  $\mu$ l,培养 24 h 后,设 5 个浓度的药物组、空白对照组,每组 12 个复孔。药物组加不同浓度的槐耳使其终浓度分别为 4、8、16、32、64 mg/ml;空白对照组为不加药物的培养基。置 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中分别培养 24、48、72 h 后每孔加 MTT 20  $\mu$ l,继续培养 4 h 后取出,吸弃培养基,每孔加 150  $\mu$ l DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,于酶标仪 490 nm 处测定其 OD 值,以正常组 OD 值为对照,计算各孔细胞抑制率(%) = (1 - 各孔 OD 值 / 正常组 OD 值均数)  $\times$  100%。

1.2.3 划痕试验 将  $2 \times 10^6$  个 MGC803 细胞接种于 6 孔板,培养至 80% 融合状态,无血清培养液洗 3 次,加入新鲜无血清培养基;10  $\mu$ l Eppendorf Tip 在

细胞板上划痕,无血清培养液洗 3 次,加入新鲜无血清培养基;加入不同浓度槐耳,37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养 12、48、72 h,观察划痕距离。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 将 MGC803 细胞于培养基中正常培养 24 h 后,加入不同浓度(4、8、16 mg/ml)槐耳培养 24 h 后,收集细胞,以 PBS 清洗,加入 1  $\mu$ l annexin V-FITC, 5  $\mu$ l 碘化丙啶(propidium iodide, PI)至细胞悬液中,轻轻摇匀,置冰浴中避光反应 10 min,加入 400  $\mu$ l 预冷的  $10 \times$  binding buffer 至样品中,轻轻摇匀,1 h 内上机检测<sup>[3-4]</sup>。

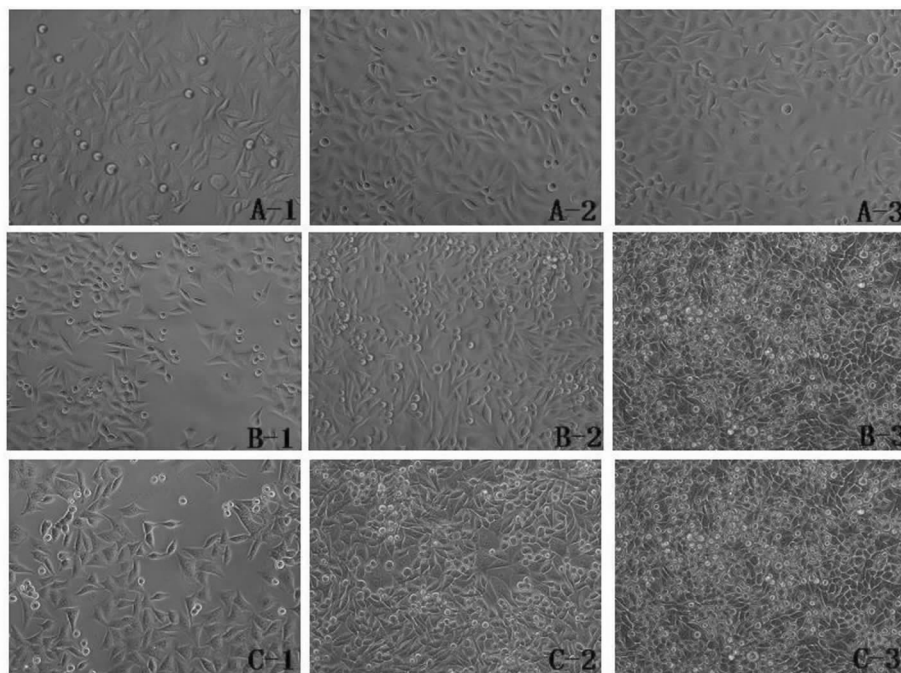
## 2 结果

### 2.1 不同时间段倒置显微镜下细胞形态学改变

与正常细胞相比,低浓度的槐耳作用于 MGC803 细胞 24 h 后部分细胞变圆,体积变小,细胞形态不规则,部分细胞破裂;作用 48 h 后,过半的细胞脱落,漂浮于培养基中,多数细胞肿胀、破裂,呈坏死状。见图 1。

### 2.2 不同浓度槐耳对 MGC803 细胞的生长抑制作用

实验结果表明,槐耳可抑制 MGC803 细胞的增殖,其抑制程度随剂量增加呈增强趋势,但当槐耳浓度达到 16 mg/ml 时,对 MGC803 细胞的抑制程度达到最大且随着剂量的增大其抑制程度没有显著变化。同一浓度下,槐耳对 MGC803 细胞的抑制程度随作用时间延长呈增强趋势。见图 2。



A-1~A-3:分别为正常细胞培养 12、24、48 h 后形态变化( $\times 10$ );B-1~B-3:4 mg/ml 槐耳作用于 MGC803 细胞 12、24、48 h 后细胞形态的变( $\times 10$ );C-1~C-3:8 mg/ml 槐耳作用于 MGC803 细胞 12、24、48 h 后细胞形态的变( $\times 10$ )

图 1 不同时间段细胞形态学变化

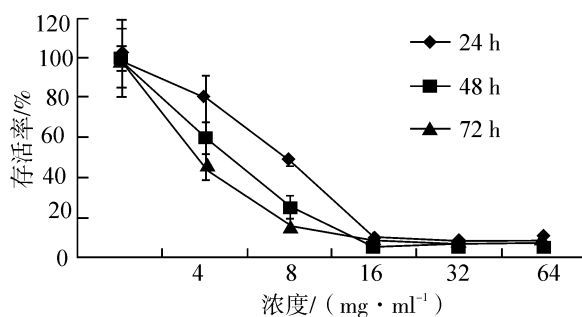


图 2 不同浓度的槐耳作用 24、48、72 h 对 MGC803 细胞存活率的影响

### 2.3 槐耳对人胃癌 MGC803 细胞迁移能力的影响

空白对照组细胞在培养 48、72 h 后,细胞划痕距离明显减少,表明 MGC803 细胞具有较强的迁移能力。而经 4、8 mg/ml 槐耳处理的 MGC803 细胞在作用 48 h 后,较空白对照组划痕距离明显增大,呈浓度依赖性。表明槐耳可抑制 MGC803 细胞迁移。见图 3。

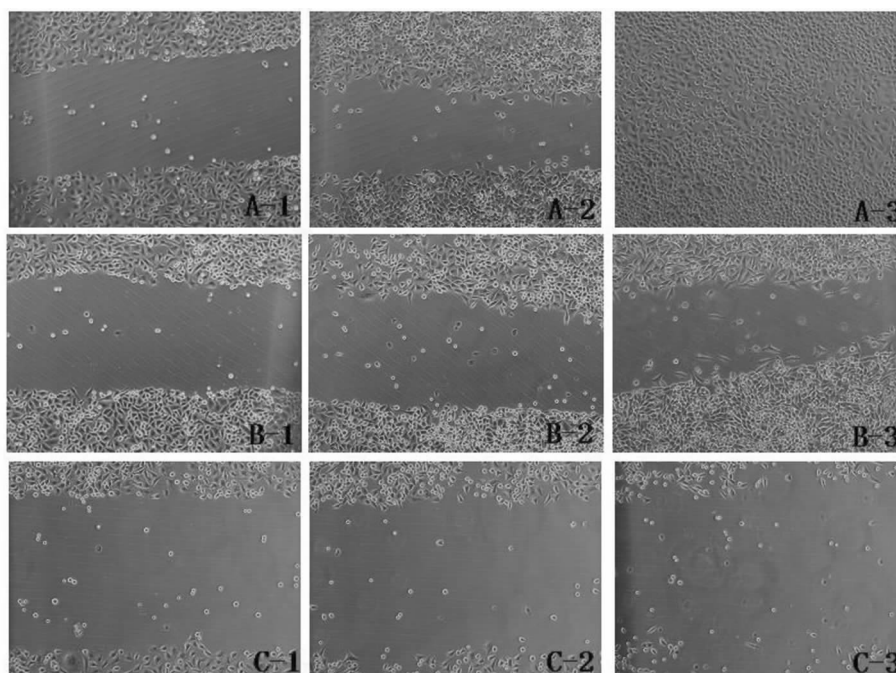
### 2.4 Annexin V-FITC /PI 标记细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示,不同浓度的槐耳作用于胃癌 MGC803 细胞后,空白对照组与药物组相比,槐耳能显著诱导 MGC803 细胞发生凋亡。见图 4。

## 3 讨论

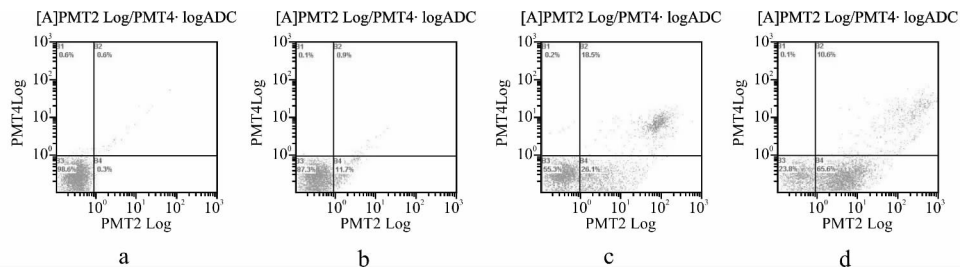
肿瘤的发生和发展是细胞无限过度积累的过程,概括其原因主要是细胞的异常增生与细胞本身

的凋亡受到抑制<sup>[5]</sup>,因而对肿瘤的治疗不应仅仅是杀死肿瘤细胞和抑制肿瘤细胞增殖,而是应启动凋亡机制进而诱导凋亡<sup>[6]</sup>。临床上,越来越多的患者死于肿瘤的转移,肿瘤细胞的迁移行为是发生转移最关键的因素,因而明确肿瘤细胞迁移机制,是近几年来研究的热点。最近,中药已成为开发新药的丰富的资源,越来越多的中药被发现能够诱导细胞凋亡<sup>[7]</sup>。中医中药在癌症治疗中的作用日益受到重视<sup>[8]</sup>。槐耳颗粒是国家一类新药,它曾经是中国历史上著名的药用真菌,民间多用于治疗癌症及炎症。具有扶正固本,活血化瘀的作用。其主要活性成分为多糖蛋白(PS-T),并含有矿物元素,不仅能抑制肿瘤细胞的生长,还可增强机体的免疫力,改善患者的生活质量,在治疗肝癌、肺癌、胃癌、乳腺癌中均有很好的效果<sup>[9-11]</sup>,其治疗肿瘤的机制近年来也成为一研究热点<sup>[12]</sup>。本实验将槐耳在体外作用于具有高转移潜力的人胃癌细胞株 MGC803,采用 MTT 法、透射电镜、划痕实验等观察其对 MGC803 的体外抑制作用。在研究中,我们发现槐耳能抑制细胞的活力和迁移能力,并且还会引起细胞形态学的变化。MTT 实验结果表明,当槐耳浓度在 0~16 mg/ml 时,槐耳对 MGC-803 细胞活力抑制作用表现为时间和剂量的依赖性。但当槐耳浓度达 16 mg/ml 时,对 MGC803 细胞的抑制程度达到最大,且随着剂量的增大其抑制程度无显著变化。



A-1~A-3 未经处理的 MGC803 细胞 12、48、72 h 镜下形态;B-1~B-3:经过 4 mg/ml 槐耳处理的 MGC803 细胞 12、48、72 h 镜下形态;C-1~C-3:经 8 mg/ml 槐耳处理的 MGC803 细胞 12、48、72 h 镜下形态

图 3 划痕试验损伤愈合过程延迟



a. 空白组; b. 4 mg/ml 槐耳干预 24 h; c. 8 mg/ml 槐耳干预 24 h; d. 16 mg/ml 槐耳干预 24 h.

图 4 流式细胞仪检测 MGC803 细胞凋亡

综上所述,我们的实验结果表明,槐耳可通过诱导胃癌细胞凋亡而抑制细胞增殖。这些结果有助于今后从分子生物学机制上揭示槐耳的抗癌机制。

#### 参考文献

- [1] 李思维, 邹立勇, 尹宜发. 槐耳颗粒在肿瘤临床中的应用[J]. 中国肿瘤, 2005, 14(10): 698-700.
- [2] 黄涛, 孔庆志, 卢宏达, 等. 槐耳清膏对耐顺铂人肺腺癌细胞系 A549/DDP 逆转的实验研究[J]. 中国药师, 2002, 5(9): 517-521.
- [3] AGUILAR LEMARROY A, KIRCHHOFF S, WHITAKER N, et al. Differential sensitivity of human papillomavirus type 16(+) and type 18(+) cervical Carcinoma cells to CD95-mediated apoptosis[J]. Int J Cancer, 2001, 93: 823-831.
- [4] 韩锐. 抗癌药物研究与实验技术[M]. 北京: 北京医科大学 中国协和医科大学联合出版社, 1997: 116-146.
- [5] LARSEN J E, PAVEY S J, PASSMORE L H, et al. Expression profiling defines a recurrence signature in lung squamous [J]. Carcinogenesis, 2007, 28: 760-766.
- [6] 刘学军, 杜娟. 槐耳清膏对荷瘤小鼠瘤细胞 Bc-1 2、Bax 表达的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2010, 29(2): 60-61.
- [7] THATTE U, BAGADEY S, DAHANUKAR S. Modulation of programmed cell death by medicinal plants [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2000, 46: 199-214.
- [8] 种铁, 牛建强, 王子明, 等. 苦参碱抑制人肾癌细胞系 GRC-1 细胞株增殖和促凋亡的实验研究[J]. 中西医结合学报, 2006, 7(4): 388-391.
- [9] 郑有合, 刘英杰, 景琴, 等. 槐耳颗粒对晚期原发性肝癌疗效分析[J]. 医学信息, 2006, 19(10): 1815-1817.
- [10] 李学兵. 金克槐耳颗粒对Ⅲ期非小细胞肺癌患者免疫细胞活性的影响[J]. 临床肺科杂志, 2006, 11(4): 472-473.
- [11] 邓艾平, 毛德莉. 槐耳颗粒治疗消化系统恶性肿瘤 74 例临床观察[J]. 中国医院药学杂志, 2005, 25(5): 453-454.
- [12] 李立新, 叶胜龙, 王艳红, 等. 槐耳浸膏诱导肝癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国临床医学, 2005, 12(6): 1152-1153.

## 《中国中西医结合消化杂志》2014 年征订启事

《中国中西医结合消化杂志》是由中华人民共和国教育部主管, 华中科技大学同济医学院、中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会、中华中医药学会脾胃病分会主办的国家级学术期刊。本刊为中国科技论文统计源期刊, 已被俄罗斯《文摘杂志》(AJ of VINITI)、美国《化学文摘》(CA)、波兰《哥白尼索引》(IC)等收录。

本刊宗旨是发掘祖国医学有关脾胃学说的精华, 报道中西医结合消化系统疾病的理论与临床经验, 重点着眼于国内外有关消化系统疾病研究的新成果、新技术、新进展、新经验。设有专家笔谈、论著、研究报告、名医经验、学术探讨、经验交流、短篇报道、基层园地和综述等栏目, 突出中西医相结合、理论与临床相结合、提高与普及相结合三大特点, 为促进国内外学术交流和中西医结合事业的繁荣和发展提供宽阔的途径。欢迎订阅, 欢迎投稿(可通过杂志网站、电子邮箱投稿)。

本刊从 2012 年起, 改为月刊, 国内统一刊号: CN 42-1612/R; 国际标准刊号: ISSN 1671-038X。邮发代号: 38-212(国内), NTE1065(国际)。每期 48 页, 定价 10 元/册, 全年 120 元。广告经营许可证: 武工商广字 02-16 号。

地址: 武汉市解放大道 1277 号, 华中科技大学同济医学院附属协和医院内 邮政编码: 430022 电话: 027-85726835

E-mail: zgzyxhzz2011@sina.com

网址: zgzyx.cnjournals.net