

文章编号: 0258-5898(2009)04-0370-04

· 论 著 ·

槐耳清膏诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的实验研究

吴志慧¹, 蒋建伟¹, 曹明溶², 陈涛¹, 张小鹰¹, 吴风云¹

(1. 暨南大学医学院生化教研室, 广州 510632; 2. 暨南大学第一医院普外科, 广州 510630)

摘要: 目的 研究槐耳清膏对胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制和凋亡诱导的作用, 并探讨其作用机制。方法 用终浓度为 0、0.5、1、2、4、6 mg/mL 的槐耳清膏和 10 μg/mL 的 5-氟尿嘧啶(5-Fu) 作用于 SGC-7901 细胞, 分别于 24 h 和 48 h 后采用 MTT 法检测细胞增殖抑制率; 48 h 后收集各组胃癌 SGC-7901 细胞, 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA, 流式细胞术检测细胞凋亡率, RT-PCR 检测 survivin mRNA 表达。结果 MTT 法检测显示, 槐耳清膏对胃癌 SGC-7901 细胞有增殖抑制作用, 并存在浓度和时间依赖关系 ($P < 0.05$); 槐耳清膏 6 mg/mL 组的抑制率 48 h 后达到 $(77.9 \pm 2.3)\%$, 5-Fu 组为 $(53.4 \pm 1.6)\%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。流式细胞术检测显示, 槐耳清膏 4 mg/mL 组的细胞凋亡率最高, 早期凋亡细胞达 33.2%; 6 mg/mL 组早期凋亡细胞 6.3%, 而晚期凋亡细胞为 19.9%。RT-PCR 结果显示, 槐耳清膏组胃癌 SGC-7901 细胞 survivin mRNA 表达下调。结论 槐耳清膏在体外对胃癌 SGC-7901 细胞有明显的增殖抑制和凋亡诱导作用, 初步推断槐耳清膏诱发胃癌细胞凋亡与其对 survivin 基因表达的抑制有关。

关键词: 槐耳清膏; 胃癌; 凋亡; 生存素

中图分类号: R735.2; Q28 文献标志码: A

Experimental study on apoptosis of human gastric carcinoma SGC-7901 cells induced by *Trametes robinophila*WU Zhi-hui¹, JIANG Jian-wei¹, CAO Ming-rong², CHEN Tao¹, ZHANG Xiao-ying¹, WU Feng-yun¹

(1. Department of Biochemistry, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Department of Surgery, First Affiliated Hospital, Jinan University, Guangzhou 510630, China)

Abstract: *Objective* To study the effects of *Trametes robinophila* on the proliferation inhibition and apoptosis induction of human gastric carcinoma SGC-7901 cells, and explore the mechanism. *Methods* Human gastric carcinoma SGC-7901 cells were treated with 0, 0.5, 1, 2, 4, 6 mg/mL *Trametes robinophila* and 10 μg/mL 5-fluorouracil (5-Fu), and the cell proliferation inhibition rates were determined by MTT assay 24 h and 48 h after treatment. Gastric carcinoma SGC-7901 cells were collected, DNA was isolated 48 h after treatment and was subjected to agarose gel electrophoresis. In addition, cell apoptosis rates were determined by flow cytometry, and RT-PCR was employed to detect the expression of survivin mRNA. *Results* It was demonstrated by MTT assay that the growth of SGC-7901 cells was inhibited by *Trametes robinophila* in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.05$). The inhibition rate of the group of 6 mg/mL *Trametes robinophila* reached the peak 48 h after treatment, significantly different from that in the group of 10 μg/mL 5-Fu [$(77.9 \pm 2.3)\%$ vs $(53.4 \pm 1.6)\%$] ($P < 0.05$). It was revealed by flow cytometry that the cell apoptosis rate was the highest in the group of 4 mg/mL *Trametes robinophila*, and the early apoptosis rate was 33.2%, while the early apoptosis rate and late apoptosis rate were 6.3% and 19.9%, respectively for the group of 6 mg/mL *Trametes robinophila*. It was indicated by RT-PCR that the expression of survivin mRNA in SGC-7901 cells in the groups of *Trametes robinophila* was down-regulated. *Conclusion* *Trametes robinophila* has inhibitory effects on SGC-7901 cell proliferation and can induce cell apoptosis, which may be related to the inhibition of the expression of survivin mRNA.

Key words: *Trametes robinophila*; gastric carcinoma; apoptosis; survivin

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 死亡率高, 常规治疗方法效果不明显, 多年来, 人们一直致力于寻找新的治疗靶点。细胞凋亡调控机制失常而引起细胞凋亡阻滞和致癌因子作用导致细胞的恶性增殖是

恶性肿瘤细胞的主要特征, 因此, 诱导细胞凋亡成为肿瘤治疗的研究热点。槐耳清膏是一种真菌类抗肿瘤新药, 其主要活性成分为多糖蛋白^[1], 本实验主要研究槐耳清膏对胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制和凋

基金项目: 广东省医学科研基金(A2007322)(Medical Science Research Foundation of Guangdong Province, A2007322)。

作者简介: 吴志慧(1974-), 女, 助理实验师, 硕士; 电子信箱: zhihuijnu@126.com。

通讯作者: 蒋建伟, 电子信箱: jjw703@163.com。

亡诱导的作用,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 槐耳清膏由江苏启东盖天力药业有限公司提供(药品批号:FD17)。称取槐耳清膏 10 g,用 100 mL 无血清 RPMI-1640 培养液溶解,过滤除菌,制成 100 mg/mL 的槐耳清膏浓缩药液,临用前用培养液稀释成相应浓度的工作液。人胃癌 SGC-7901 细胞由本实验室保存。其他试剂有转染试剂 Lipofectamin2000 (Invitrogen)、总 RNA 分离试剂 TRIzol (Gibco)、ReverTra Dash™ RT-PCR 试剂盒 (Toyobo)和 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(长瑞生物技术公司)。

1.2 分组 实验分终浓度为 0、0.5、1、2、4、6 mg/mL 的槐耳清膏组和 10 μg/mL 的 5-氟尿嘧啶(5-Fu)组,其中 0 mg/mL 的槐耳清膏组(即未加任何药物)为阴性对照组,10 μg/mL 的 5-Fu 组为阳性对照组,分别作用于胃癌 SGC-7901 细胞,每组设 5 个平行孔。取对数生长期的胃癌 SGC-7901 细胞,调整细胞浓度为 6×10^4 /mL,传代接种于 96 孔板内;37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,约 80% 的细胞融合时接种药物。

1.3 MTT 法检测细胞增殖抑制率 于 24 h 和 48 h 后分别采用 MTT 法检测细胞的增殖抑制率,在波长 570 nm 处测定吸光度($D_{570\text{ nm}}$),按以下公式计算:细胞增殖抑制率 = (对照孔 $D_{570\text{ nm}}$ - 实验孔 $D_{570\text{ nm}}$) / 对照孔 $D_{570\text{ nm}} \times 100\%$ 。

1.4 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 条带 取 1×10^6 个对数生长期的胃癌 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板,常规条件下培养 24 h,分别用槐耳清膏 2、4、6 mg/mL 和 5-Fu 10 μg/mL 作用 48 h 后,离心收集细胞,常规酚-氯仿法抽提 DNA,2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析仪下观察电泳条带并拍照。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 取 1×10^6 个对数生长期的胃癌 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板,常规条件下培养 24 h,阴性对照组和槐耳清膏 1、2、4、6 mg/mL 作用 48 h 后,离心收集细胞。将收获的各细胞制成单细胞悬液,取 1×10^6 个细胞,用 PBS 洗 2 次,加入结合缓冲液 100 μL 和 FITC 标记的 Annexin V (20 μg/mL) 10 μL,室温避光 30 min,再加入 PI (50 μg/mL) 5 μL,避光反应 5 min 后,加入结合缓冲液 400 μL,立即用流式细胞仪进行定量检测。阴性对照组不加 Annexin V 和 PI。根据 FITC 和 PI 荧光作双参数散点图,可获得由 4 个象限组成的双参数散点图。左下象限为活细胞:Annexin V-FITC (-),

PI (-);右下象限为早期凋亡细胞:Annexin V-FITC (+),PI (-);右上象限为晚期凋亡细胞和坏死细胞:Annexin V-FITC (+),PI (+);左上象限为细胞收集过程中产生的坏死细胞:Annexin V-FITC (-),PI (+)。

1.6 RT-PCR 测定 survivin mRNA 表达 Survivin 上游引物为 5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3',下游引物为 5'-GCACCTTCTTCGCGAGTTTCC-3';内参照 β-actin 上游引物为 5'-TACACTGAATTCACCCAC-3',下游引物为 5'-CATCCAATCCAAATGCGGCA-3',均由英伟创津公司合成。提取细胞总 RNA,采用 ReverTra Dash™ RT-PCR 试剂盒逆转录为 cDNA。逆转录条件:30 ℃ 10 min,42 ℃ 20 min,99 ℃ 5 min,4 ℃ 5 min,瞬时离心后 4 ℃ 保存。取逆转录产物进行 PCR,检测 survivin mRNA 表达,β-actin 为内参照。PCR 复合扩增条件:94 ℃ 预变性 5 min,94 ℃ 变性 30 s,50 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 30 个循环,最后 72 ℃ 延伸 5 min。用 Gel-Doc 1000 型紫外凝胶图像分析仪自带软件分析 survivin 和 β-actin 的扩增条带,计算 survivin mRNA 表达的抑制率,以阴性对照组 survivin 表达率 (survivin mRNA/β-actin mRNA) 为 1。

1.7 统计学处理 采用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槐耳清膏对胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制 槐耳清膏对胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制率随作用时间和浓度的增加而上升。与阴性对照组比较,槐耳清膏 1、2、4、6 mg/mL 组对胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制率显著升高 ($P < 0.05$),6 mg/mL 组 48 h 的抑制率为 $(77.9 \pm 2.3)\%$,与 5-Fu 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制率的比较 ($\bar{x} \pm s, \%$)

Tab 1 Comparison of proliferation inhibitory rate of gastric carcinoma SGC-7901 cells in different groups ($\bar{x} \pm s, \%$)

Group	24 h	48 h
5-Fu	30.1 ± 2.9	53.4 ± 1.6
Trametes biniophila (mg/mL)		
0	0	0
0.5	4.1 ± 2.2	7.3 ± 2.5
1	7.5 ± 3.6 ^①	18.7 ± 1.4 ^①
2	16.3 ± 4.4 ^①	31.2 ± 3.8 ^①
4	28.6 ± 3.1 ^①	57.3 ± 4.7 ^①
6	41.2 ± 1.7 ^{①②}	77.9 ± 2.3 ^{①②}

^① $P < 0.05$ vs Trametes obiniophila 0 mg/mL group; ^② $P < 0.05$ vs 5-Fu group

2.2 DNA 条带的特征 槐耳清膏 2、4、6 mg/mL 组与 5-Fu 组作用于胃癌 SGC-7901 细胞 48 h 后, 均可见明显凋亡的特征性阶梯状 DNA 条带 (图 1)。

2.3 各组胃癌 SGC-7901 细胞凋亡率比较 流式细胞术检测结果显示, 与阴性对照组比较, 不同浓度槐耳清膏组胃癌 SGC-7901 细胞均出现明显早期凋亡群。槐耳清膏 1、2、4 mg/mL 组的早期凋亡率分别为 8.7%、19.9% 和 33.2%; 6 mg/mL 组早期凋亡率为 6.3%, 而晚期凋亡细胞占 19.9% (图 2)。

2.4 Survivin mRNA 表达水平 Survivin 和 β -actin 扩增片段长度分别为 338 bp 和 145 bp。槐耳清膏 2 mg/mL 组 survivin 表达抑制率为 20.24%, 槐耳清膏 4、6 mg/mL 组抑制率分别高达 68.11% 和 83.99% (图 3)。

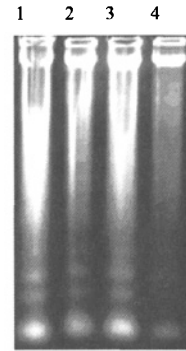


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测胃癌 SGC-7901 细胞 DNA 条带
Fig 1 DNA ladders of gastric carcinoma SGC-7901 cells detected by agarose gel electrophoresis
1: 5-Fu group; 2-4: Trametes obiniophila 2, 4, 6 mg/mL group

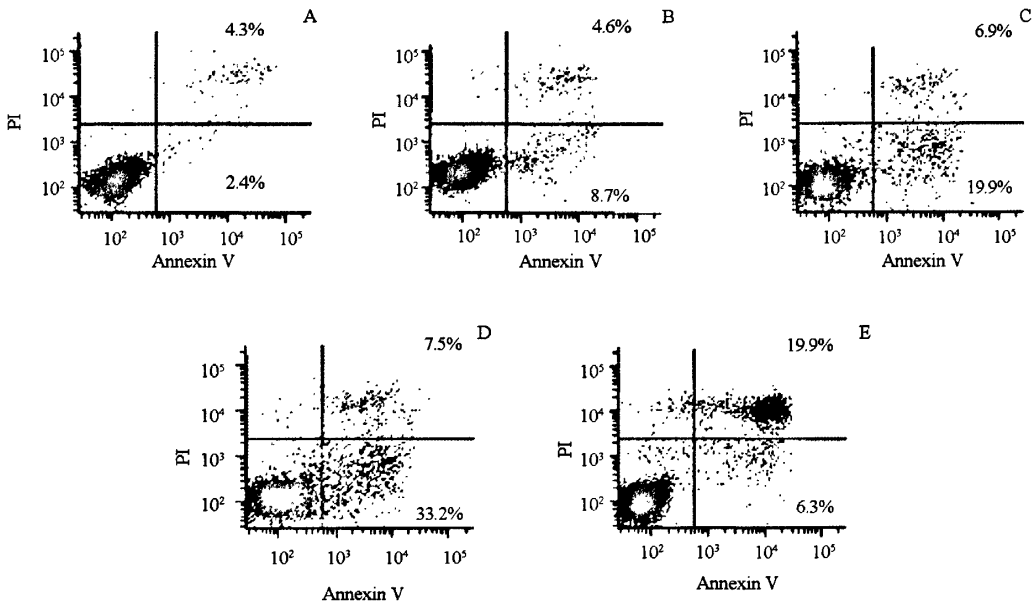


图 2 流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况
Fig 2 Cell apoptosis in different groups detected by flow cytometry
A-E: Trametes obiniophila 0, 1, 2, 4, 6 mg/mL group

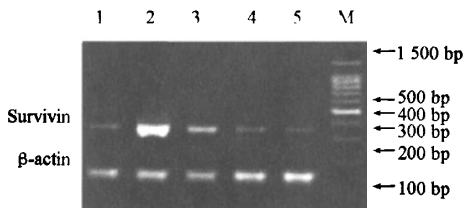


图 3 RT-PCR 检测 survivin mRNA 的表达
Fig 3 Expression of survivin mRNA detected by RT-PCR
1: 5-Fu group; 2-5: Trametes obiniophila 0, 2, 4, 6 mg/mL group; M: marker

3 讨论

槐耳又名槐栓菌, 是寄生在中回槐上的一种药用真菌。槐耳清膏是槐耳菌质经热水提取所得 (相对体积质量比 1.33 以上)^[1], 含有多种有机成分和 10 余种矿物元素, 其主要抗癌活性成分为蛋白多糖。槐耳清膏作为一种真菌类抗肿瘤新药, 不仅具有免疫调节作用^[2-3], 而且可以抑制肿瘤细胞增殖, 诱导细胞凋亡^[4-7]。

本实验用不同浓度槐耳清膏作用于对数生长期的胃癌 SGC-7901 细胞, MTT 法检测其增殖抑制率。槐耳清膏 4 mg/mL 组的抑制率与 5-Fu (10 μ g/mL) 组抑制率比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 槐耳清膏 6 mg/mL 组 48 h 抑制率达到 (77.9 \pm 2.3)%; 槐耳清膏对胃癌细胞 SGC-7901 的增殖抑制率随作用时间和药物浓度增加而上升 ($P < 0.05$)。流式细胞术 (Annexin V 和 PI 双染) 检测显示, 胃癌细胞 SGC-7901 凋亡率随槐耳清膏浓度增加而升高, 4 mg/mL 槐耳清膏作用 48 h 后, 早期细胞凋亡率为 33.2%; 而 6 mg/mL 组早期凋亡率虽仅为 6.3%, 但晚期凋亡率为 19.9%, 可能与细胞凋亡进程末期细胞裂解和碎片增多有关。结果表明, 槐耳清膏可抑制胃癌细胞 SGC-7901 增殖, 诱导其凋亡。

Survivin^[8-10] 是近年来发现的凋亡抑制蛋白 (inhibitors of apoptosis protein, IAPs) 家族中的一个成员, 可直接和间接抑制 caspase-3 和 caspase-7 的活性, 抑制细胞凋亡。Survivin mRNA 在胚胎发育时期广泛表达, 而在成人正常分化的组织中除胸腺和胎盘等少数组织外很少表达, 但在人类肿瘤组织中, survivin mRNA 又重新大量表达。有研究^[11-12] 表明, survivin mRNA 表达与胃癌的发生发展有关。正常胃黏膜组织中无 survivin 蛋白表达, 胃癌组织 survivin 的阳性表达率为 34.5% ~ 88%。本研究显示, 胃癌 SGC-7901 细胞 survivin mRNA 表达水平较高, 同样证实该说法。

为减少毒性, 提高药物对 SGC-7901 细胞的增殖抑制效果, 我们设计了槐耳清膏与 survivin 的反义核酸联合作用, 但并没有出现预期中的增效结果。因此, 本研究以不同浓度的槐耳清膏作用于 SGC-7901 细胞, 以 β -actin 为内参照, RT-PCR 检测 survivin mRNA 表达水平, 发现与阴性对照组相比, 槐耳清膏组胃癌细胞 survivin mRNA 表达水平受到不同程度抑制, 而且随槐耳清膏浓度增加, 抑制作用增强。周进等^[6] 在用槐耳诱导胰腺癌细胞 Panc-1 凋亡的实验中, 发现 3 mg/mL 槐耳清膏可提高胰腺癌细胞

Panc-1 细胞凋亡基因 caspase-3 的表达, 进而诱导细胞凋亡。Caspase-3 的表达上调可能与 survivin 蛋白表达抑制有关, 佐证了本实验结果。

槐耳清膏在体外对胃癌细胞 SGC-7901 有明显的增殖抑制作用和凋亡诱导作用, 初步推断槐耳清膏诱发胃癌细胞凋亡与其对 survivin mRNA 表达的抑制有关。

参考文献:

- [1] 庄毅. 抗癌新药槐耳冲剂的研究[J]. 中国药学杂志, 1998, 33(5): 273-275.
- [2] 陆鹏, 陈莉, 陆正鑫. 实验性肝癌中比较槐耳与 IL-2 对 PTEN 和 IL-2R 阳性细胞的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(15): 1982-1985.
- [3] 袁明, 黄桂林, 李志刚, 等. 槐耳颗粒配合化疗对大肠癌患者术后免疫功能的影响[J]. 中国肿瘤, 2005, 14(7): 487-488.
- [4] 程若川, 汤礼贵, 兰丽琴, 等. 槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡的实验研究[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2003, 10(6): 568-571.
- [5] 李保庆, 李勇, 王其彰, 等. 槐耳颗粒对食管癌细胞凋亡及免疫功能的影响[J]. 中国肿瘤, 2003, 12(12): 752-753.
- [6] 周进, 李德春, 匡玉庭, 金克(槐耳清膏) 抑制胰腺癌细胞 Panc-1 生长转移的实验研究[J]. 苏州大学学报: 医学版, 2005, 25(2): 226-228.
- [7] 陈孝平, 何松青, 赵旭, 等. 槐耳清膏联合肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体对肝癌细胞生长的影响[J]. 中华外科杂志, 2005, 43(23): 1524-1527.
- [8] Zaf N, Pen M, Dai MC. Survivin as a target for new anticancer interventions[J]. J Cell Mol Med, 2005, 9(2): 360-372.
- [9] Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell cycle regulation in cancer[J]. Prog Cell Cycle Res, 2003, 5: 447-452.
- [10] Sah NK, Khan Z, Khan GJ, et al. Structural, functional and therapeutic biology of survivin[J]. Cancer Letters, 2006, 244(2): 164-171.
- [11] 张建娜, 刘倩. 胃癌组织中 Survivin 和 Ki-67 的表达及其临床意义[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2004, 13(6): 605-608.
- [12] Kania J, Konturek SJ, Marlicz K, et al. Expression of survivin and caspase-3 in gastric cancer[J]. Dig Dis Sci, 2003, 48(2): 266-271.

收稿日期: 2008-12-04

本文编辑: 周珠凤