

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2004)19-1797-03

虎仗提取物白藜芦醇诱导胃癌细胞 HGC27 凋亡

李莹¹, 药立波¹, 王立峰¹, 韩炯¹, 韩月恒¹, 刘新平¹, 林树新², 俞强³ (第四军医大学基础部¹: 生物化学与分子生物学教研室,²病理生理学教研室, 陕西 西安 710033,³中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

Effect of resveratrol derived from *Rhizoma polygoni Cuspidati* on apoptosis of gastric cancer cells HGC27

LI Ying¹, YAO Li-Bo¹, WANG Li-Feng¹, HAN Jiong¹, HAN Yue-Heng¹, LIU Xin-Ping¹, LIN Shu-Xin², YU Qiang³

¹Department of Biochemistry & Molecular Biology, ²Department of Pathophysiology, School of Basic Medicine, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China, ³Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

【Abstract】 AIM: To explore the inductive effects of the resveratrol from *Rhizoma polygoni Cuspidati* on the cell cycles, growth and apoptosis of the gastric cancer cells HGC27. METHODS: MTT method and soft agar assay were performed to observe the effects of the resveratrol on the cell growth. Annxin-V & PI staining assay and FCM assay were used to examine the inductive effects of resveratrol on the cell cycles and apoptosis. RESULTS: MTT results manifested that the cell survival rate decreased significantly and in dose dependent manner 24 h after HGC27 was incubated with 0.5 mmol/L resveratrol ($P < 0.01$ vs control). Soft agar assay results indicated that HGC27 could not form cell colony when it was incubated with 0.5 mmol/L resveratrol. Annxin-V & PI staining assay and FCM assay showed that resveratrol could inhibit the HGC27 to G1 phase and induce cells to apoptosis (8.39%). CONCLUSION: Resveratrol can inhibit the growth of HGC27 and induce the cells to apoptosis.

【Keywords】 resveratrol; apoptosis; stomach neoplasm; tumor cells; HGC27

【摘要】目的 观察虎仗提取物白藜芦醇对胃癌细胞 HGC27 细胞周期和增殖的影响及凋亡诱导作用。方法:采用 MTT 法

收稿日期 2004-06-08; 修回日期 2004-09-10

基金项目 国家自然科学基金(30170465, 30000067)军队“十五”科研基金重点课题(01Z080)

通讯作者:俞强. Tel.(021)50801790 Email. qyu@sibs.ac.cn

作者简介:李莹(1968-),女(汉族),安徽省六安市人. 讲师,博士.

Tel.(029)83374516 Email. liying@fmmu.edu.cn

和软琼脂集落形成实验观察白藜芦醇对细胞增殖的影响, Annxin-V & PI 染色及流式细胞仪检测观察白藜芦醇对细胞周期的影响及诱导凋亡的作用。结果:MTT 实验发现白藜芦醇作用 HGC27 细胞 24 h 后,细胞存活率显著下降($P < 0.01$)并呈剂量依赖性,软琼脂集落形成实验发现 HGC27 细胞在 0.5 mmol/L 白藜芦醇作用下无细胞集落的形成, Annxin-V & PI 染色及流式细胞仪检测发现白藜芦醇可引起 HGC27 阻滞于 G1 期,并可诱导 HGC27 发生凋亡(8.39%)。结论:白藜芦醇可抑制胃癌细胞 HGC27 增殖并可诱导细胞发生凋亡。

【关键词】白藜芦醇;凋亡;胃肿瘤;肿瘤细胞;HGC27

【中图分类号】R286.1 **【文献标识码】**A

0 引言

从天然生物中寻找低毒、高效的抗肿瘤药物已成为近年的研究热点^[1]。白藜芦醇是植物在遇到真菌感染、紫外线照射等恶劣环境下自身分泌的一种天然抗毒素,广泛存在于百合科、蓼科、豆科等 21 个科 31 个属的 72 种植物中。研究发现白藜芦醇不仅具有调节脂质代谢、抑制血小板聚集、保护心血管等多方面的作用,而且对乳腺癌、前列腺癌和白血病等一些肿瘤细胞系的生长具有显著抑制作用^[2-5]。我们采用软琼脂集落形成实验、MTT 实验、Annexin-V&PI 细胞染色实验、流式细胞仪检测方法对白藜芦醇抑制胃癌细胞增殖、诱导细胞凋亡及对细胞周期的影响进行研究如下。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 HGC27 购自中国科学院上海细胞研究所细胞库;RPMI 1640 培养基(Gibco 公司);新生牛血清(杭州四季青生物工程公司);MTT(华美公司 Sigma 分装);DMSO(Sigma 公司)琼脂粉(北京百灵克公司 Sigma 分装);NUAIRE CO₂ 细胞培养箱(autoFlow 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(B-D 公司)。白藜芦醇由西安市天行健生物制品有限公司提供,中药虎仗中提取,纯度 >95%,用 DMSO 配制成 100 mmol/L 溶液,分装, -20℃ 储存。细胞采用含 100 mL/L 小牛血清的 RPMI 1640 培养基,置于 37℃ 含 50 mL/L CO₂ 的细胞培养箱中培养。2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 g/L EDTA 消化、传代。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法 调整单细胞密度 $1 \times 10^7/L$, 接种于 96 孔培养皿内, 24 h 后试验组分别加入含有不同浓度的白藜芦醇 (0.1 ~ 1.0 mmol/L), 对照组细胞加入同体积的药物溶剂, 空白对照孔不加细胞, 作本底对照调零. 实验做 6 个平行复孔. 细胞分别培养 24, 48 和 72 h 后, 吸尽旧培养液, 加入含 5 g/L MTT 的培养基 150 μL , 继续培养 4 h, 吸尽培养液, 加入二甲基亚砜, 振荡至紫色结晶完全溶解, 用酶标仪测定每孔的 $A_{570\text{nm}}$ 值 (选择波长 570 nm, 参考波长 620 nm). 计算瘤细胞存活率 = (实验组 $A_{570\text{nm}}$ 值 / 对照组 $A_{570\text{nm}}$ 值) $\times 100\%$ 绘制药物浓度-存活率曲线.

1.2.2 Soft agar assay 配制底层 5 g/L 软琼脂, 顶层 3 g/L 软琼脂的生长体系, 接种 $7 \times 10^{10}/L$ 个细胞于顶层软琼脂, 实验组同时加入白藜芦醇 (使其终浓度为 0.5 mmol/L), 每个样品做 3 个复孔, CO_2 培养箱中培养 2 wk 后显微镜下观察集落形成情况并计数. 集落计数方法: 在镜下随机计数 10 个视野中的集落数 (集落确定标准: 4 个细胞以上), 取其平均数作比较.

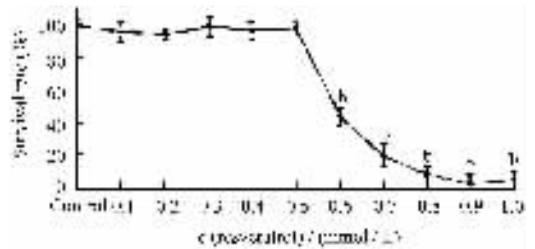
1.2.3 检测细胞周期和凋亡 调整单细胞密度 $0.5 \times 10^9/L$ 接种于培养皿中, 24 h 后加白藜芦醇 (0.5 mmol/L) 共同孵育, 对照组加入同体积的 DMSO. 药物作用 24 h 后收集细胞, 1500 r/min 离心 5 min, 吸弃上清, PBS 洗 1 次, 加无水乙醇 (终体积分数为 70%), 置 $-20^\circ C$ 固定保存. 检测时用 PBS 洗细胞 2 次, PI 暗处染色 20 min 后上流式细胞仪检测. Cell Quest 软件获取单个细胞 20 000 个, 用 ModFit LT 软件分析细胞周期及凋亡峰. 实验重复 3 次. 调整单细胞密度 $0.5 \times 10^9/L$ 接种于培养皿内, 培养 24 h 后实验组加白藜芦醇 (0.5 mmol/L), 对照组加相同体积的 DMSO, 作用 24 h 后收集细胞, PI & Annexin-V 双染细胞 (Annexin-V 是一种 Ca^{2+} 依赖性结合蛋白, 能与翻转膜外的 PS 高亲和力特异性结合), 流式细胞仪检测凋亡细胞和死亡细胞. 实验重复 3 次.

统计学处理 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 10.0 统计软件进行分析, 组间差异比较采用方差分析, 两两比较用 Dunnett 法及 *t* 检验, 方差不齐时采用秩和检验.

2 结果

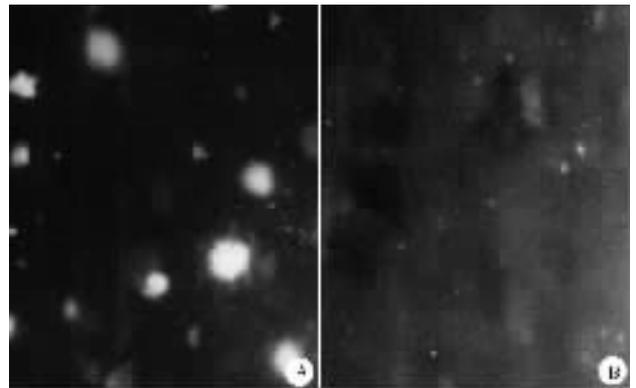
2.1 白藜芦醇抑制胃癌细胞 HGC27 增殖 HGC27 细胞在白藜芦醇的作用下存活率显著下降, 并呈浓度依赖性 ($n = 6$, Fig 1). 白藜芦醇作用于 HGC27 细胞的 IC_{50} 为 0.508 mmol/L. HGC27 细胞在软琼脂中培养 2 wk 后可形成多个、比较大的细胞集落 (对照组细

胞集落数为 13 ± 3) 选取 0.5 mmol/L 白藜芦醇作用细胞 2 wk 后, 则未见细胞集落的形成 (Fig 2). 实验结果表明: 白藜芦醇可以抑制 HGC27 细胞非锚着依赖性生长. 软琼脂集落形成实验和 MTT 实验表明白藜芦醇可以抑制胃癌细胞 HGC27 的生长.



$^b P < 0.01$ vs control, $n = 6$.

Fig 1 Effect of resveratrol on the survival rate of HGC27
图 1 白藜芦醇对 HGC27 细胞存活率的影响



A : Control ; B : Resveratrol.

Fig 2 Resveratrol inhibited the anchorage independent growth of the HGC27 ($\times 40$)

图 2 白藜芦醇抑制 HGC27 非锚着依赖性生长

2.2 白藜芦醇诱导胃癌细胞 HGC27 凋亡及 G1 期阻滞

HGC27 细胞在 0.5 mmol/L 白藜芦醇作用下 G0-G1 期升高, S 期下降, 并出现了凋亡峰 (Fig 3). 0.5 mmol/L 白藜芦醇作用于 HGC27 细胞 24 h 后, 用 Annexin-V & PI 进行染色, 流式细胞仪进行分析发现,

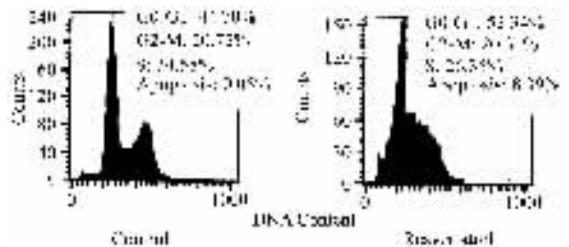


Fig 3 Resveratrol arrested HGC27 to G1 phase and induced cell apoptosis by FCM assay

图 3 FCM 检测白藜芦醇阻滞 HGC27 细胞于 G1 期并诱导凋亡

早期凋亡细胞(4.1±0.8)%和晚期凋亡细胞及死亡细胞的总和(42.7±9.7)%明显多于对照组早期凋亡细胞(1.9±0.4)%和晚期凋亡细胞及死亡细胞的总和(2.3±0.3)% ($P < 0.01$ vs control group, $n = 3$)。上述两实验结果表明白藜芦醇不仅可引起HGC27细胞周期阻滞于G1期而且可以诱导细胞发生凋亡。

3 讨论

白藜芦醇显著抑制多种肿瘤的生长并诱导肿瘤细胞发生凋亡,如鼠肝细胞癌、人肝母细胞瘤、乳腺癌、前列腺癌、口腔鳞癌、白血病、恶性黑色素瘤及卵巢癌等^[2-5]。我们观察到白藜芦醇不仅对胃癌细胞HGC27的生长具有显著的抑制作用而且可以诱导细胞发生凋亡,为白藜芦醇抗肿瘤作用的研究提供了佐证。虽然白藜芦醇对肿瘤的生长具有抑制作用,但是具体的作用机制并不明确。我们发现白藜芦醇可引起胃癌细胞HGC27发生G1期阻滞,这可能是白藜芦醇抑制HGC27增殖的原因。但白藜芦醇对不同细胞系细胞周期的影响是不一致的,白藜芦醇可引起乳腺癌细胞系和表皮细胞系发生G0/G1→S期阻滞^[2,3],但是却引起人结肠癌细胞系、白血病细胞系和肺上皮癌细胞系发生S→G2/M期阻滞^[4],而在人的淋巴瘤细胞,白藜芦醇在低浓度(30~60 mmol/L)时可诱导细胞发生S期阻滞,浓度过高反而无此活

性,同时认为这一阻断过程是可逆的^[5]。因此,白藜芦醇对不同肿瘤细胞系细胞周期的调控方式应该是不一致的,诱导不同肿瘤细胞系凋亡的机制亦是不一致的。其确切的作用机制还有待我们深入的研究。

【参考文献】

- [1] 李永琦,许才媛,黄裕新,等. 复方中药CCM-AT13抗胃癌的作用机制[J]. 第四军医大学学报 2001;22(9):831-834.
Li YQ, Xu CF, Huang YX, et al. Antitumor effects and mechanism of a compound Chinese traditional medicine (CCM-AT13) on xenografted human gastric cancer[J]. *J Fourth Mil Med Univ*, 2001; 22(9):831-834.
- [2] Ahmad N, Adhami VM, Afaq F, et al. Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2001;7(5):1466-1473.
- [3] Hsieh TC, Burfeind P, Laud K, et al. Cell cycle effects and control of gene expression by resveratrol in human breast carcinoma cell lines with different metastatic potentials[J]. *Int J Oncol*, 1999;15(2):245-252.
- [4] Delmas D, Passilly-Degrace P, Jannin B, et al. Resveratrol, a chemopreventive agent, disrupts the cell cycle control of human SW480 colorectal tumor cells[J]. *Int J Mol Med*, 2002;10(2):193-199.
- [5] Park JW, Choi YJ, Jang MA, et al. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells[J]. *Cancer Lett* 2001;163(1):43-49.

编辑 许昌泰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2004)19-1799-01

中药痹痛汤治疗坐骨神经痛 36 例

张继元

(河南大学第一医院中医科,河南 开封 475001)

【关键词】痹痛汤 坐骨神经痛

【中图分类号】R692.5 【文献标识码】B

1 临床资料 1998-09/2002-10 以中药痹痛汤门诊治疗坐骨神经痛 36(男 24,女 12)例,年龄 20~62 岁,病程 1 mo~11 a。全部病例均有腰痛,腰部向下肢放射样疼痛,直腿抬高试验阳性。痹痛汤 独活 12 g 威灵仙 12 g 桑寄生 30 g 杜仲 12 g 牛

膝 15 g 土元 10 g 鸡血藤 30 g 当归 15 g 白芍 20 g 细辛 3 g,甘草 6 g。每日 1 剂,水煎服。偏寒者,加仙茅 10 g,淫羊藿 10 g,偏湿者,加薏苡仁 30 g,防己 10 g,腰痛加川断 15 g,狗脊 15 g,次痛有瘀者桃仁 10 g,红花 6 g,10 d 为 1 个疗程。结果治愈(腰腿痛完全消失,行动自如)15 例(41.6%)显效(腰腿痛基本消失)12 例(33.3%),有效(部分症状与体征减轻)7 例(19.4%)无效(症状无减轻)2 例(5.5%),总有效率 94.4%。

2 讨论 坐骨神经痛属祖国医学的痹证范畴。《素问·痹论》曰：“风寒湿三气杂至，合而为痹”。《巢氏病源》指出：“劳则肾虚，虚则受于风冷，冷与真气相争，故腰脚痛”。说明本病的发生，多因正气不足，肝肾先虚，风寒湿邪乘虚而入，以致气血阻滞，筋脉挛急不通而致疼痛。痹痛汤中杜仲、牛膝、桑寄生补肝肾、强筋骨，独活、细辛搜筋骨风湿，通络止痛，鸡血藤温通经络，当归、白芍和营养血，土元活血通络，威灵仙、防风祛风除湿止痛。全方有补肝肾，祛风湿止痹痛之效。再根据临症适当加减，故疗效较为满意。

编辑 潘伯荣

收稿日期 2004-08-23; 修回日期 2004-09-01

作者简介 张继元(1963-)男(汉族),河南省原阳县人,副主任医师。

Tel.(0378)6661785