

## · 药理与临床 ·

## 熊果酸体外抗胃癌细胞 SGC7901 机制的研究

张奕颖<sup>1</sup>, 邓涛<sup>1</sup>, 胡志芳<sup>2</sup>, 张秋萍<sup>2</sup>, 江华<sup>2</sup>

(1. 武汉大学人民医院 消化内科, 湖北 武汉 430060; 2. 武汉大学医学院 免疫系, 湖北 武汉 430071)

**摘要:**目的 探讨熊果酸(ursolic acid, UA)体外抑制胃癌细胞 SGC7901 生长的作用机制。方法 体外培养人胃癌细胞株 SGC7901, MTT 法观察不同浓度 UA 作用不同时间对细胞生长的影响; 不同浓度 UA (0~40  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 SGC7901 细胞 24 h 后, 倒置显微镜观察细胞形态变化; 荧光染料 Hoechst 33258 染色和流式细胞仪检测细胞凋亡情况, Western Blotting 法检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 的表达。结果 20~40  $\mu\text{mol/L}$  UA 可抑制 SGC7901 的生长, 并呈浓度和时间依赖性, 其作用 12、24、36、48 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 (57.50 $\pm$ 1.18)、(34.28 $\pm$ 2.05)、(27.54 $\pm$ 1.11)、(24.83 $\pm$ 1.02)  $\mu\text{mol/L}$ 。20~40  $\mu\text{mol/L}$  UA 作用 24 h 后, SGC7901 细胞变圆, 出现不同程度的漂浮; 同时细胞被阻滞于 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期并发生凋亡, 随药物浓度升高, 凋亡率增加, 凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达减少, Bax 无明显变化。结论 熊果酸对 SGC7901 细胞具有较强的抗肿瘤活性, 其机制可能与细胞毒作用、增殖抑制作用以及下调凋亡相关蛋白 Bcl-2 表达而促进凋亡有关。

**关键词:**熊果酸; 胃癌细胞 SGC7901; 细胞毒性; 增殖; 细胞凋亡; Bcl-2

**中图分类号:** R286.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2006)04-0555-04

Antitumor mechanism of ursolic acid on human gastric cancer cell lines SGC7901 *in vitro*ZHANG Yi-ying<sup>1</sup>, DENG Tao<sup>1</sup>, HU Zhi-fang<sup>2</sup>, ZHANG Qiu-ping<sup>2</sup>, JIANG Hua<sup>2</sup>

(1. Department of Gastroenterology, People's Hospital, Wuhan University, Wuhan 430060, China;

2. Department of Immunology, Medical College, Wuhan University, Wuhan 430071, China)

**Abstract: Objective** To investigate the potential mechanism of inhibition of ursolic acid (UA) on growth of human gastric cancer cell lines SGC7901 *in vitro*. **Methods** SGC7901 cells were cultured *in vitro*, MTT assay was used to observe the effect of UA on growth of SGC7901 cells in various concentrations for different times. After SGC7901 cells were treated by 0—40  $\mu\text{mol/L}$  UA for 24 h, morphological changes were observed by inverted microscope. Apoptotic changes were detected by fluorescence microscopy and flow cytometry (FCM). Protein expressions of Bcl-2 and Bax were determined by Western blotting. **Results** UA (20—40  $\mu\text{mol/L}$ ) could significantly inhibit the growth of SGC7901 cells in a dose- and time-dependent manner, the  $\text{IC}_{50}$  value of UA for SGC7901 cells for 12, 24, 36, and 48 h were (57.50 $\pm$ 1.18), (34.28 $\pm$ 2.05), (27.54 $\pm$ 1.11), and (24.83 $\pm$ 1.02)  $\mu\text{mol/L}$ , respectively. After UA (20—40  $\mu\text{mol/L}$ ) treatment for 24 h, SGC7901 cells turned round and floated at different levels; SGC7901 cells were arrested at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase and apoptosis was induced, and the apoptotic rate was increased along with the increase of UA concentration. Meanwhile Bcl-2 protein expression decreased, whereas Bax protein expression unchanged. **Conclusion** UA has a stronger antitumor effect on SGC7901 cells. Cytotoxic effect, proliferation inhibition, and apoptosis may be involved in the mechanism of UA, and the apoptosis caused by UA may be enhanced by decrease of Bcl-2 protein expression.

**Key words:** ursolic acid (UA); gastric cancer cell lines SGC7901; cytotoxicity; proliferation; apoptosis; Bcl-2

熊果酸(ursolic acid, UA)又名乌索酸、乌苏酸,属于三萜类化合物,广泛分布于熊果、白花蛇舌草等多种天然植物中。UA 可抑制多种肿瘤细胞增

殖并诱导其凋亡<sup>[1~4]</sup>,但其作用机制尚不十分清楚。本研究旨在观察 UA 体外对人胃癌细胞 SGC7901 的影响,进一步探讨 UA 的抗癌作用机制。

收稿日期:2005-09-26

基金项目:湖北省教育厅基金资助项目(2001A14012)

作者简介:张奕颖(1979—),女,河南省洛阳市人,武汉大学 2003 级在读硕士研究生,主要从事消化道肿瘤药物预防研究。

Tel: (027) 87319474 88047144 E-mail: clickclik@you.com

## 1 材料

小牛血清为三利公司产品, RPMI-1640 培养基为 Hyclone 公司产品。UA [质量分数 > 90%, 用二甲亚砜 (DMSO) 溶解, 并调整 DMSO 终体积分数为 0.06%]、碘化丙啶 (PI) 和 Hoechst 33258 染料均为 Sigma 公司产品。四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 为 Amresco 公司产品。小鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体、小鼠抗人 Bax 单克隆抗体分别为 Neomarkers 公司和 Santa Cruz 公司产品。ECL 化学发光试剂盒为 Kirkegaard Perry Laboratories 公司产品。XDS-1B 倒置显微镜为重庆光电仪器有限公司产品。GENIOS VA200 荧光酶标仪为澳大利亚 Tecan 公司产品。BX51 荧光显微镜为日本 Olympus 公司产品。EPICS ALTRA II 流式细胞仪为美国 Beckman 公司产品。

## 2 方法

2.1 细胞培养: 胃癌细胞株 SGC7901 购自上海细胞研究所。将 SGC7901 细胞接种于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 置 37 C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 取对数生长期细胞用于实验。

2.2 MTT 法检测细胞生长抑制率: 将 SGC7901 细胞制成  $2 \times 10^4$  /mL 的细胞悬液, 以每孔 200  $\mu$ L 接种于 96 孔培养板。待细胞贴壁后, 加入 UA 使其终浓度分别为 0、10、20、30、40  $\mu$ mol/L, 每个药物浓度组各设 3 个平行孔。于 UA 作用 12、24、36、48 h 时分别加入 MTT, 4 h 后离心弃上清液, 每孔均加入 DMSO 100  $\mu$ L, 混匀后置于酶标仪于 570 nm 波长处测吸光度 (A) 值。计算生长抑制率 [抑制率 =  $(1 - A_{\text{处理组}} / A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ ], 并采用 Bliss 法计算半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>)。实验重复 3 次。

2.3 倒置显微镜观察细胞形态变化: SGC7901 细胞用 0、10、20、30、40  $\mu$ mol/L UA 分别处理 24 h 后, 倒置显微镜下观察细胞形态变化并进行摄影。

2.4 Hoechst 33258 染色检测凋亡细胞: 用 0、20、40  $\mu$ mol/L UA 分别处理 SGC7901 细胞 24 h, 胰酶消化后, 1 500 r/min 离心 5 min, 收集细胞, 加入固定液 [甲醇-冰醋酸 (3:1)] 4 C 固定 15 min, 离心弃固定液, 加入 Hoechst 33258 染液 37 C 避光染色 40 min。离心弃染液, PBS 洗涤 2 次后, 滴片, 紫外光激发下荧光显微镜观察并拍照。实验重复 3 次。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡及细胞周期的改变: 0、10、20、30、40  $\mu$ mol/L UA 分别处理 SGC7901 细胞 24 h 后, 收集  $2 \times 10^6$  个细胞, 用 70% 乙醇 4 C 固定 12 h。离心弃乙醇, 加入 RNA 酶 (1 mg/mL),

37 C 水浴 30 min 后, 加入 PI 综合染液 (PI 质量浓度为 124  $\mu$ g/mL, TritonX-100 体积分数为 0.124%) 1 mL, 4 C 避光染色 30 min, 流式细胞仪进行检测。实验重复 3 次。

2.6 Western Blotting 检测 Bcl-2、Bax 蛋白表达: 分别收集 0、10、20、30、40  $\mu$ mol/L UA 作用 24 h 的细胞  $3 \times 10^6$  个, 加入裂解液 100  $\mu$ L, 冰浴 30 min 后, 离心提取上清液, 并用荧光酶标仪测定蛋白浓度。以 SDS-PAGE 电泳分离蛋白 (每泳道 150  $\mu$ g) 后, 4 C、60 mA 转印过夜至硝酸纤维素 (NC) 膜, 封闭后分别加入一抗 (Bcl-2、Bax) 孵育 2 h, 漂洗后用辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h, 再次漂洗后用 ECL 化学发光试剂盒进行检测。结果进行灰度扫描后, Quantity One 分析软件测定平均吸光度。实验重复 3 次。

2.7 统计学处理: 所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行 *t* 检测。

## 3 结果

3.1 UA 对 SGC7901 细胞生长的影响: 与对照组 (0  $\mu$ mol/L UA 组) 相比, 20~40  $\mu$ mol/L UA 呈剂量和时间依赖性地抑制 SGC7901 生长, 而 10  $\mu$ mol/L UA 无抑制作用, 见图 1。UA 作用 12、24、36 和 48 h 的 IC<sub>50</sub> 分别为 (57.50  $\pm$  1.18)、(34.28  $\pm$  2.05)、(27.54  $\pm$  1.11)、(24.83  $\pm$  1.02)  $\mu$ mol/L。

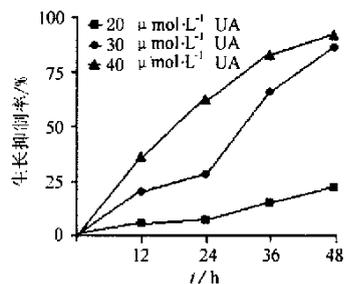
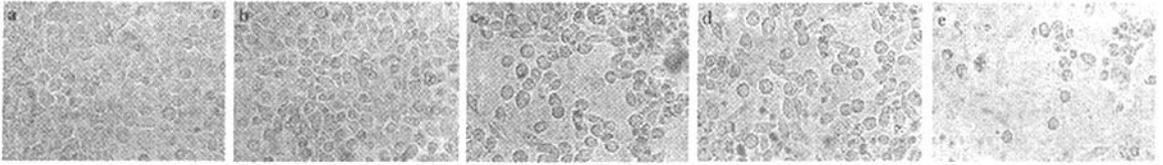


图 1 UA 对 SGC7901 细胞的生长抑制作用 ( $n=3$ )

Fig. 1 Inhibition of UA on growth of SGC7901 cells ( $n=3$ )

3.2 UA 对 SGC7901 细胞形态的影响: 对照组 (0  $\mu$ mol/L UA 组) 与 10  $\mu$ mol/L UA 组细胞生长旺盛, 成多边形, 胞膜光滑, 轮廓明显, 状态良好; 20、30  $\mu$ mol/L UA 组细胞生长均轻度抑制, 部分细胞变圆漂起, 胞膜皱缩, 但胞膜完整; 40  $\mu$ mol/L UA 组细胞生长重度受抑, 绝大部分细胞漂起、变圆、肿胀或缩小, 细胞体积大小不一致, 并有细胞碎片形成, 见图 2。

3.3 UA 对 SGC7901 细胞凋亡的影响: 荧光显微



a~e-0,10,20,30,40 μmol/L UA

图 2 不同浓度 UA 作用 24 h 后 SGC7901 细胞形态的改变

Fig. 2 Morphologic change of SGC7901 cells after UA treatment for 24 h in various concentrations

镜观察发现:不同浓度 UA 作用 24 h 后,0 μmol/L UA 作用组染色质分布均匀,呈弥散均匀蓝白色荧光;而 20 μmol/L UA 作用组部分细胞染色质呈染的块状或颗粒状,聚集于核周边或裂解成碎片,并出现凋亡小体;40 μmol/L UA 作用组较多细胞胞内染色质分布不均,形成荧光斑点,呈凋亡特征性改变。

3.4 UA 对 SGC7901 细胞周期和凋亡率的影响:流式细胞仪分析表明,不同浓度 UA 作用 24 h 后,与对照组 (0 μmol/L UA) 相比,20、30、40 μmol/L UA 可使 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例随 UA 浓度增加而逐渐增加,而 S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例下降,同时细胞凋亡率逐渐升高,差异均具有显著性 (P<0.05);而 10 μmol/L UA 则与对照组差异无显著性 (P>0.05),见表 1。

表 1 不同浓度 UA 作用 24 h 对 SGC7901 细胞周期和凋亡率的影响 (x̄±s, n=3)

Table 1 Effect on cell cycle and apoptotic rate of SGC7901 cells after UA treatment for 24 h in various concentrations (x̄±s, n=3)

UA/ (μmol·L <sup>-1</sup> )	细胞周期比例/%			凋亡率/ %
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M	
0(对照)	21.50±2.82	48.97±3.96	29.53±5.97	1.47±0.25
10	20.87±1.79	42.77±3.18	36.36±4.92	1.63±0.25
20	38.77±3.27**	41.83±1.37*	19.40±1.91*	9.10±2.39**
30	51.10±2.21**	40.73±1.57*	8.17±2.83**	26.30±1.25**
40	57.83±1.60**	22.97±1.12**	19.20±2.17*	35.20±2.26**

与 0 μmol/L UA 组比较: \*P<0.05 \*\*P<0.01

\*P<0.05 \*\*P<0.01 vs 0 μmol/L UA group

3.5 UA 对 SGC7901 细胞 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响:Western Blotting 结果表明,不同浓度 UA 作用 24 h 后,20~40 μmol/L UA 组 Bcl-2 蛋白表达水平下降,并呈浓度依赖性,与对照组相比差异具有显著性 (P<0.01),而 Bax 的表达无明显改变;10 μmol/L UA 组两种蛋白的表达与对照组相比差异均无显著性 (P>0.05),见表 2。

#### 4 讨论

近年来 UA 抗肿瘤作用日益受到重视,研究发

表 2 不同浓度 UA 作用 24 h 对 SGC7901 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响 (x̄±s, n=3)

Table 2 Effect on Bcl-2 and Bax protein expressions of SGC7901 cells after UA treatment for 24 h in various concentrations (x̄±s, n=3)

UA 浓度/ (μmol·L <sup>-1</sup> )	平均吸光度		
	Bcl 2	Bax	Bcl-2/Bax
0(对照)	0.238±0.018	0.254±0.013	0.945±0.067
10	0.245±0.014	0.247±0.019	0.971±0.032
20	0.151±0.027**	0.262±0.015	0.581±0.136**
30	0.101±0.010**	0.263±0.011	0.386±0.053**
40	0.077±0.011**	0.253±0.008	0.304±0.042**

与 0 μmol/L UA 组比较: \*\*P<0.01

\*\*P<0.01 vs 0 μmol/L UA group

现 UA 对人结肠癌细胞系 HT-29、人白血病细胞系 HL-60、人肺癌细胞系 A549、人表皮样癌细胞系 A431 等多种肿瘤细胞系均有较强的抗肿瘤活性<sup>[1~4]</sup>。本研究发现 UA 对人胃癌细胞系 SGC7901 也有较强的抑制作用,并呈浓度和时间依赖性,UA 作用 24 h 的 IC<sub>50</sub> 为 (34.28±2.05) μmol/L。用低于 IC<sub>50</sub> 的 UA (20~30 μmol/L) 处理 SGC7901 细胞 24 h 后,细胞生长受到抑制,但形态完整,同时 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞增多,S 期及 G<sub>2</sub>/M 细胞减少,细胞凋亡率增加;而用高于 IC<sub>50</sub> 的 UA (40 μmol/L) 作用相同时间后,细胞除发生 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期阻滞和凋亡外,还有较多细胞出现肿胀以及细胞碎片形成等坏死表现,提示 UA 可通过细胞毒、增殖抑制和诱导凋亡作用抑制 SGC7901 细胞的生长。

细胞凋亡是由凋亡相关基因进行调控的细胞自主性死亡过程,凋亡相关基因包括凋亡抑制基因,如 Bcl-2、P53 和凋亡促进基因如 Bax、Fas 等,通过其相应蛋白产物发挥调控凋亡的作用。Bcl-2 和 Bax 同属于 Bcl-2 家族,Bcl-2 蛋白通过维持线粒体完整性抑制细胞色素 C (cytochrome C, cyt-C) 释放、拮抗 Bax 等凋亡促进蛋白的作用以及调节内质网内 Ca<sup>2+</sup> 流动进而影响细胞内 Ca<sup>2+</sup> 水平来抑制细胞凋亡。Bcl-2/Bax 升高,细胞不易凋亡,反之则易于凋亡<sup>[5,6]</sup>。本研究证实随 UA 浓度增加,Bcl-2 蛋白的

表达逐渐减弱,Bax 蛋白的表达无明显变化,Bcl-2/Bax 逐渐降低,细胞凋亡率逐渐增加。有学者认为 UA 通过抑制 Bcl-2 表达并同时增加 Bax 表达而促进肿瘤细胞凋亡<sup>[3,7]</sup>,这与本实验结果不尽相同。由此推测:UA 对凋亡相关基因的影响可能因细胞不同而有所差异,UA 可能通过下调凋亡抑制基因 Bcl-2 表达,进而下调 Bcl-2/Bax,从而促进 SGC7901 细胞凋亡。

综上所述,本研究证实 UA 对胃癌细胞 SGC7901 有明显的生长抑制作用,其具体机制可能与细胞毒作用、干扰细胞周期而抑制细胞增殖以及下调凋亡相关蛋白 Bcl-2 的表达促进凋亡有关。

References:

[1] Subbaramaiah A D, Liu J J, Nilsson A, et al. Ursolic acid stimulates apoptosis in HT29 cells following activation of alkaline sphingomyelinase [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(4): 3317-3322.

[2] Baek J H, Lee Y S, Kang C M, et al. Intracellular Ca<sup>2+</sup> release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells [J]. *Int J Cancer*, 1997, 73(5): 725-728.

[3] Hsu Y L, Kuo P L, Lin C C. Proliferative inhibition, cell-cycle dysregulation, and induction of apoptosis by ursolic acid in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Life Sci*, 2004, 75(19): 2303-2316.

[4] Hollosv F, Ldei M, Csorba G, et al. Activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(5): 3485-3491.

[5] Kanzler S, Galle P R. Apoptosis and the liver [J]. *Semin Cancer Biol*, 2000, 10(3): 173-184.

[6] Jo E H, Hong H D, Ahn N C, et al. Modulations of the Bcl-2/Bax family were involved in the chemopreventive effects of livorice root (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.) in MCF-7 human breast cancer cell [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(6): 1715-1719.

[7] Harmand P O, Duval R, Delage C, et al. Ursolic acid induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway and caspase-3 activation in M4Beu melanoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2005, 114(1): 1-11.

## 女贞子对去卵巢大鼠钙代谢及维生素 D 依赖型基因表达的影响

张 岩<sup>1,2</sup>, 黄文秀<sup>2,4</sup>, 陈 斌<sup>3</sup>, 梁秉中<sup>5</sup>, 吴春福<sup>1</sup>, 姚新生<sup>3</sup>

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中药及分子药理国家重点实验室, 广东 深圳 518057;  
3. 沈阳药科大学中药学院, 辽宁 沈阳 110016; 4. 香港理工大学 应用生物与化学技术系, 香港;  
5. 香港中文大学 矫形外科及创伤学系, 香港)

摘要:目的 研究补肾中药女贞子对去卵巢大鼠钙代谢及维生素 D 依赖型基因表达的影响。方法 大鼠去卵巢手术处理 4 周后,ig 给药治疗 14 周。血清、尿液及粪便中钙水平采用比色法测定。RT-PCR 技术分析小肠及肾脏基因表达。结果 大鼠去卵巢后体内钙流失显著增加,表现在血钙下降,尿钙及粪钙排泄增加。女贞子可以有效防止尿钙及粪钙排泄增加,并恢复血钙水平。RT-PCR 分析表明雌二醇和女贞子都可以抑制去卵巢引起的小肠维生素 D 受体 (VDR) mRNA 表达下降。女贞子对肾脏 25-羟基维生素 D 1-羟化酶 (1-OHase) 及 25-羟基维生素 D 24-羟化酶 (24-OHase) mRNA 无明显作用,但却可以提高肾脏钙结合蛋白-9k (CaBP-9k) 及钙结合蛋白-28 k (CaBP-28k) 的基因表达。结论 女贞子能够改善雌激素缺乏所引起的钙失衡状态,主要是通过提高小肠对活性维生素 D 的敏感性加强肾脏对钙的重吸收而发挥作用的。

关键词:女贞子; 钙代谢; 维生素 D; 基因表达; 去卵巢

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:0253-2670(2006)04-0558-04

## Effect of *Fructus Ligustri Lucidi* on calcium metabolism and vitamin D-dependent gene expressions in ovariectomized rats

ZHANG Yan<sup>1,2</sup>, WONG Man-sau<sup>2,4</sup>, CHEN Bin<sup>3</sup>, LEUNG Ping-Chung<sup>5</sup>,  
WU Chun-fu<sup>1</sup>, YAO Xin-sheng<sup>3</sup>

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. State Key Laboratory of China Medicine and Molecular Pharmacology, Shenzhen 518057, China; 3. School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 4. Department of Applied Biology and Chemical Technology, the Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong SAR, China; 5. Department of Orthopaedics and Traumatology, the Chinese University of Hong Kong, Hong Kong SAR, China)

收稿日期:2005-07-13

基金项目:香港特别行政区科技研究发展计划 (AOE/P-10/01) 项目资助课题 (B-Q767,3-ZF89)

作者简介:张 岩(1978-),男,河北省石家庄市人,沈阳药科大学药理学在读博士研究生,研究方向为抗骨质疏松中药筛选及作用机制研究。Tel: (0755) 26737176 E-mail: medicineyan@yahoo.com.cn