

## 冬凌草甲素注射剂诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其机制研究

季宇彬<sup>1,2</sup>, 江 剑<sup>1,2</sup>, 高世勇<sup>1,2</sup>

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

**摘要:** **目的** 研究冬凌草甲素注射剂诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及与细胞内  $Ca^{2+}$  浓度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 的关系。**方法** MTT 法检测冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞的细胞毒活性; 倒置显微镜观察冬凌草甲素注射剂对细胞形态学的影响; 流式细胞术测定细胞凋亡率; 激光共聚焦显微术检测 SGC-7901 细胞  $[Ca^{2+}]_i$  的变化; JC-1 单染, 激光共聚焦显微术检测 SGC-7901 细胞中线粒体膜电位的变化。**结果** 冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞的  $IC_{50}$  为  $21.74 \mu\text{mol/L}$ ; 作用 48 h 后, 细胞生长密度变疏, 细胞皱缩, 其中冬凌草甲素注射剂高浓度组大部分细胞破碎。冬凌草甲素注射剂 5.5、11、22  $\mu\text{mol/L}$  作用 24 h 后 SGC-7901 细胞凋亡率分别为 7.07%、18.57%、22.96%; 钙离子荧光强度高于对照组; 线粒体膜电位荧光强度显著低于对照组。**结论** 冬凌草甲素注射剂通过升高 SGC-7901 细胞  $[Ca^{2+}]_i$  诱导细胞凋亡。

**关键词:** 冬凌草甲素注射剂; 人胃癌 SGC-7901 细胞; 细胞凋亡; 钙离子; 线粒体膜电位

中图分类号: R282.71; R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)10-2051-05

## Inducement of Oridonin Injection to SGC-7901 cell apoptosis and its mechanisms

Ji Yu-bin<sup>1,2</sup>, GANG-jian<sup>1,2</sup>, GAO Shi-yong<sup>1,2</sup>

1. Life Sciences and Environmental Sciences Research Center, Harbin Commerce University, Harbin 150076, China

2. Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Ministry of Education, Harbin 150076, China

**Abstract: Objective** To study the apoptosis of Oridonin Injection against human gastric carcinoma SGC-7901 cell line and its relationship with intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ). **Methods** The cytotoxicity of Oridonin Injection against SGC-7901 cells was evaluated by MTT assay. Morphology of SGC-7901 cells was observed by inverted microscope. Cell apoptosis rate was measured by flow cytometry.  $[Ca^{2+}]_i$  of SGC-7901 cells and mitochondrial membrane potential (MMP) were determined by laser scanning confocal microscope. **Results**  $IC_{50}$  of Oridonin Injection to SGC-7901 cells was  $21.74 \mu\text{mol/L}$ . Cell density decrease, cell shrinkage, and cell breakage in high-dose group were observed 48 h after administration. The apoptosis rate values of 5.5, 11, and 22  $\mu\text{mol/L}$  Oridonin Injection groups 24 h after administration were 7.07%, 18.57%, and 22.96%, respectively. Fluorescence intensity (FI) values of  $[Ca^{2+}]_i$  were significantly higher than those in control group. And FI values of MMP were significantly lower than those in control group. **Conclusion** Oridonin Injection could induce cell apoptosis by increasing  $[Ca^{2+}]_i$  of SGC-7901 cells.

**Key words:** Oridonin Injection; human gastric carcinoma SGC-7901 cells; apoptosis; calcium; mitochondrial membrane potential

冬凌草甲素 (oridonin) 是从唇形科香茶菜属 [*Rabdosia* (Bl.) Hassk.] 植物中分得的一种贝壳杉烯二萜类化合物, 主要来源植物有香茶菜 *R. amethystoides* (Benth.) Hara、显脉叶香茶菜 *R. nervosa* (Hemsl.) C. Y. Wu et H. W. Li、毛叶香茶菜 *R. jabdsia* (Burm. f.) Hara、冬凌草 (亦称碎米亚) *R. rubescens* (Hemsl.) Hara 以及延命草 *Isodon japonicus* (N. Burman) H. Hara<sup>[1]</sup>。冬凌草中主要抗

癌活性成分是冬凌草甲素, 其味道极苦<sup>[2]</sup>, 具有清热解毒、消炎止痛、抗肿瘤之功效, 用于治疗扁桃体炎、咽喉肿痛, 对多种癌症有缓解症状和延长生存时间的作用, 也可作为增强放化疗疗效的辅药<sup>[3]</sup>。研究表明, 冬凌草甲素对 20 余种人癌细胞株生长均有明显的直接抑制作用<sup>[4]</sup>, 对多种肿瘤细胞如白血病细胞 NB4<sup>[5]</sup>、肝癌细胞 BEL-7402<sup>[6]</sup>、膀胱癌细胞 MB49<sup>[7]</sup>、黑色素瘤细胞 A357-S2<sup>[8]</sup> 等的增殖具有明

收稿日期: 2011-04-10

基金项目: 黑龙江省新世纪优秀人才支持计划 (1251-NCET-019); 黑龙江省研究生创新基金项目 (YJSCX2011-163HLJ)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药药理、肿瘤药理及分子药理学。

显的抑制作用。然而由于冬凌草甲素不溶于水，口服难吸收，静脉给药的剂型一直未得到很好地解决。鉴于冬凌草甲素注射剂的细胞毒活性相关报道很少，本课题组观察不同浓度的冬凌草甲素注射剂对人胃癌 SGC-7901 细胞生长的抑制作用及凋亡诱导作用，并观察细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度 ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) 与冬凌草甲素注射剂诱导 SGC-7901 细胞凋亡的关系，以探讨冬凌草甲素注射剂诱导 SGC-7901 细胞凋亡的作用机制。

## 1 材料与仪器

### 1.1 细胞株

人胃癌 SGC-7901 细胞株，由哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心药物研究所博士后科研工作站传代保种。

### 1.2 药品与试剂

冬凌草甲素注射剂 (1 mg/mL, 质量分数 98%)，由哈尔滨商业大学药物研究所制备提供；羟基喜树碱 (5 mg/支, 批号 20110301)，黄石飞云制药有限公司产品，批号；RPMI 1640 细胞培养基，购自美国 Gibco 公司；MTT 购自北京索莱宝科技有限公司；二甲基亚砜 (DMSO)、胰蛋白酶、溴化丙啶 (PI)，购自美国 Sigma 公司。Fluo-3/AM，购自美国 Molecular probe 公司。JC-1 试剂盒由碧云天生物技术研究所提供。

### 1.3 仪器

CO-150 型二氧化碳培养箱 (美国 NBS 公司)，EPICS-XL 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司)，CKX-41-32 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司)，SW-CJ-2F 型超净工作台 (苏州净化设备厂)，680 型酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)，SP-2 型激光共聚焦扫描显微镜 (德国 Leica 公司)。

## 2 方法

### 2.1 MTT 法检测冬凌草甲素注射剂的细胞毒活性

取对数生长期的 SGC-7901 细胞，胰酶消化后，调整细胞浓度为  $1 \times 10^4$  /mL，按每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中，于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  的培养箱中培养 24 h 后，分别加入终浓度为 3.125、6.25、12.5、25、50  $\mu\text{mol/L}$  冬凌草甲素注射剂药液 100  $\mu\text{L}$ ，每个浓度设 6 个平行孔，对照组加相同体积的培养液，阳性对照组加 2.5、5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  的羟基喜树碱 100  $\mu\text{L}$ ，于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养 72 h 后弃上清，每孔加入 0.5 mg/mL MTT 溶液 100  $\mu\text{L}$ ，于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中继续培养 4 h，弃上清，

每孔加 DMSO 150  $\mu\text{L}$ ，振荡混匀后用酶标仪在检测波长为 570 nm 条件下测吸光度 ( $A$ ) 值，计算细胞抑制率和  $\text{IC}_{50}$ 。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{给药组 } A \text{ 值}) / \text{对照组 } A \text{ 值}$$

### 2.2 倒置显微镜观察细胞形态学改变

取对数生长期的 SGC-7901 细胞，调整细胞浓度为  $1 \times 10^5$  /mL，接种于培养瓶中，24 h 后分别加入终浓度为 5.5、11、22  $\mu\text{mol/L}$  的冬凌草甲素注射剂，18  $\mu\text{mol/L}$  的羟基喜树碱，于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h 后，倒置显微镜下 (10 $\times$ 40 倍) 观察细胞形态。

### 2.3 流式细胞术测定细胞凋亡率

取对数生长期的 SGC-7901 细胞，培养 24 h 后分别加入终浓度为 5.5、11、22  $\mu\text{mol/L}$  冬凌草甲素注射剂，培养 24 h 后收集细胞，1 500 r/min 离心 5 min，PBS 洗 3 次，用 70% 冰乙醇并于 -20  $^{\circ}\text{C}$  固定过夜，然后 PBS 洗 3 次，加入 PI 染液 (含 PI 50 mg/mL、RNase 1 g/L、0.1% TritonX-100) 4  $^{\circ}\text{C}$  避光染色 30 min，调整细胞浓度至适当，300 目尼龙网滤过后上机检测，激发波长 488 nm，发射波长 525 nm<sup>[9]</sup>，收集测定 10 000 个细胞。

### 2.4 激光共聚焦扫描显微镜检测细胞中游离 $\text{Ca}^{2+}$ 的变化

取对数生长期的 SGC-7901 细胞并调整细胞浓度至适当，接种于 6 孔培养板中，每孔 1 mL，置  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 24 h 后，加入不同浓度的冬凌草甲素注射剂，使冬凌草甲素终浓度分别为 1.25、2.50、5.00  $\mu\text{mol/L}$ ，阳性对照组加羟基喜树碱 (终浓度为 2.50  $\mu\text{mol/L}$ )，对照组加相同体积的 RPMI 1640 培养液。置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养 24 h，收集细胞，加入终浓度为 1  $\mu\text{g/mL}$  的 Fluo-3/AM 荧光探针，37  $^{\circ}\text{C}$  避光培养 30 min，1 500 r/min 离心 5 min，弃上清，收集细胞用 PBS 洗 3 次后调整细胞浓度至适当，取 200  $\mu\text{L}$  用激光共聚焦扫描显微镜观察  $\text{Ca}^{2+}$  荧光强度，激发波长 488 nm，发射波长 540~570 nm。

### 2.5 激光共聚焦扫描显微镜检测线粒体膜电位

取对数生长期的 SGC-7901 细胞调整浓度至适当，接种于 6 孔培养板中，每孔 1 mL，置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱内培养 24 h 后，加入不同浓度的冬凌草甲素注射剂，使冬凌草甲素终浓度分别为 1.25、2.50、5.00  $\mu\text{mol/L}$ 。阳性对照组加羟基喜树碱 (终浓度为 2.50  $\mu\text{mol/L}$ )，对照组加相同体积的 RPMI 1640 培养液，作用 24 h 后收集细胞，加入 0.5 mL 的 JC-1 染色

试剂盒工作液混匀, 37 °C 培养 20 min, 1 500 r/min 激光共聚焦扫描显微镜观察线粒体膜电位荧光强度, 激发波长为 488 nm, 发射波长为 540~570 nm<sup>[10-12]</sup>。

### 2.6 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验法进行组间差异比较。

## 3 结果

### 3.1 对 SGC-7901 细胞的细胞毒活性

冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞的 IC<sub>50</sub> 为 21.74 μmol/L, 羟基喜树碱的 IC<sub>50</sub> 为 17.46 μmol/L。结果见图 1。

### 3.2 对 SGC-7901 细胞形态学的影响

对照组细胞贴壁生长, 细胞膜完整。冬凌草素注射剂各组细胞生长密度随给药浓度的增加而逐渐

变疏, 细胞表面起皱, 高浓度组大部分细胞破碎, 细胞形态不完整, 贴壁细胞数量减少。羟基喜树碱 18 μmol/L 组给药后细胞表面起皱, 大部分细胞破碎, 细胞形态不完整。结果见图 2。

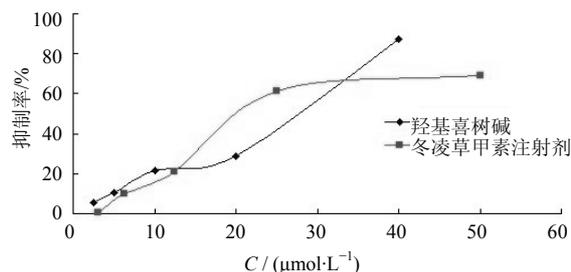


图 1 冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞的细胞毒活性 (n=6)

Fig. 1 Cytotoxic activity of Oridonin Injection on SGC-7901 (n=6)

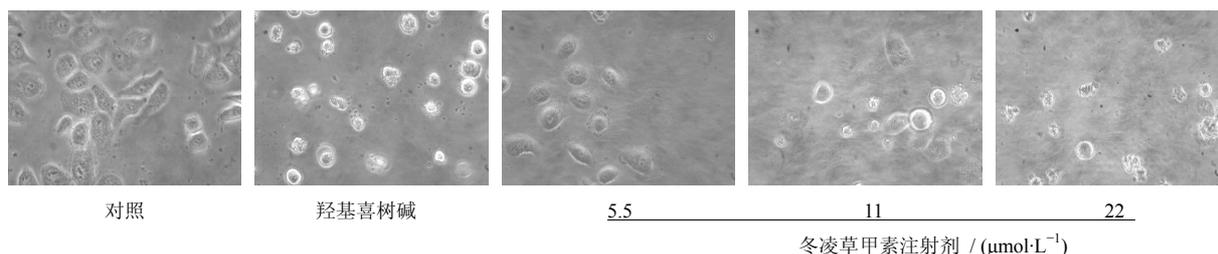


图 2 冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞形态的影响

Fig. 2 Effect of Oridonin Injection on morphology of SGC-7901 cells

### 3.3 对 SGC-7901 细胞凋亡的诱导作用

冬凌草甲素注射剂 5.5、11、22 μmol/L 分别作用于人胃癌 SGC-7901 细胞 24 h 后, 出现细胞凋亡的亚二倍体峰, 细胞凋亡率分别为 7.07%、18.57%、22.96%, 羟基喜树碱组的细胞凋亡率为 27.25%, 对照组细胞凋亡率为 4.95%。结果见图 3。

### 3.4 对 SGC-7901 细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 的影响

冬凌草甲素注射剂 1.25、2.50、5.00 μmol/L 对 SGC-7901 作用 24 h 后, 以浓度正相关方式增强细胞内 Ca<sup>2+</sup> 的荧光强度, 与对照组比较具有统计学意义 (P<0.05、0.01), 表明冬凌草甲素注射剂可升高 SGC-7901 细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>。结果见表 1。

### 3.5 对 SGC-7901 细胞膜电位的影响

冬凌草甲素注射剂 1.25、2.50、5.00 μmol/L 对 SGC-7901 作用 24 h 后, 细胞线粒体膜电位的荧光强度均降低, 且膜电位随冬凌草甲素注射剂浓度的增加而降低, 与对照组比较具有统计学意义 (P<0.01), 表明冬凌草甲素注射剂可降低 SGC-7901 细胞线粒体膜电位。结果见表 2。

## 4 讨论

冬凌草中的主要抗癌活性成分是冬凌草甲素和冬凌草乙素, 其中冬凌草甲素占冬凌草抗癌活性成分的 90%<sup>[13-14]</sup>。近 30 年来, 国内外学者对冬凌草甲素进行了多方面的研究, 体外实验显示冬凌草甲素对多种肿瘤细胞株, 如小鼠成纤维细胞 L929、人表皮癌细胞 A431、人肝癌细胞 HepG2、人肠癌细胞 Lovo 等均有凋亡诱导作用, 但作用机制因细胞系的不同而各异, 而对 SGC-7901 胃癌的研究较少。此外, 由于冬凌草甲素水溶性较差, 增加了其注射剂制备的难度, 限制了其使用, 冬凌草甲素注射剂的药理研究也较少。本实验观察了冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞生长的抑制及凋亡诱导作用, 并通过检测细胞 [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> 研究冬凌草甲素注射剂诱导 SGC-7901 细胞凋亡的作用机制。

MTT 法检测显示, 冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞有很好的细胞毒活性。形态学观察发现, 冬凌草甲素注射剂组细胞生长密度逐渐变疏, 细胞变小、皱缩, 细胞破碎, 细胞形态不完整、贴

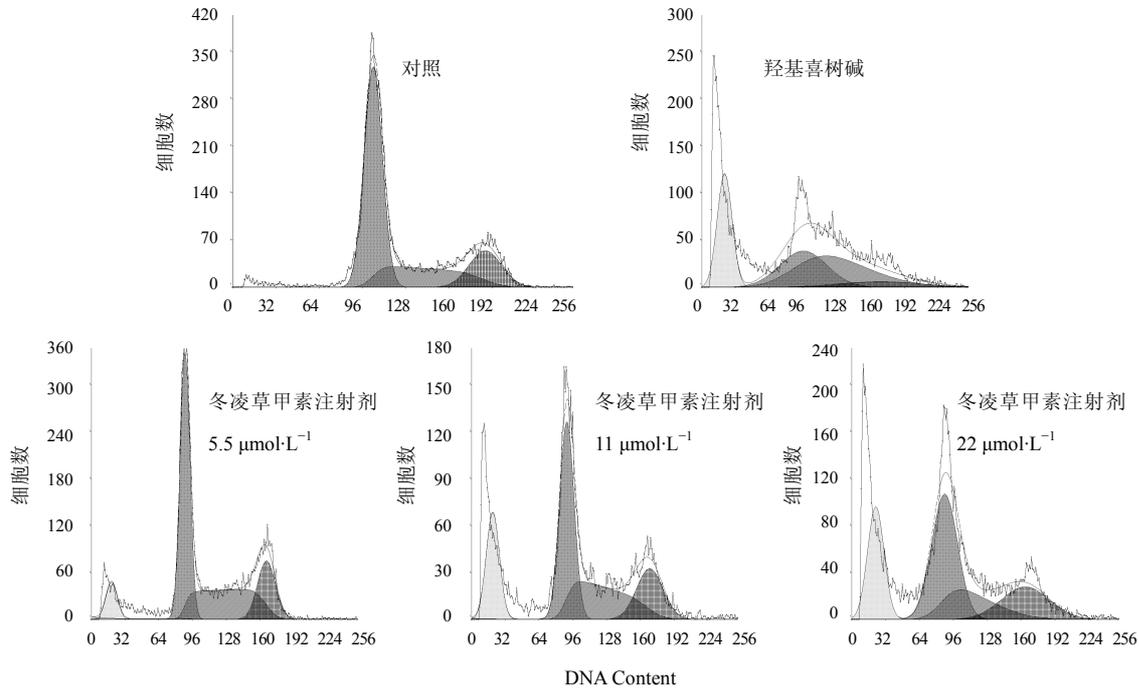


图 3 冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of Oridonin Injection on apoptosis of SGC-7901 cells

表 1 冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞  $[Ca^{2+}]_i$  的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 50$ )

Table 1 Effect of Oridonin Injection on  $[Ca^{2+}]_i$  in SGC-7901 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 50$ )

组别	C / ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	荧光强度
对照	—	17.72 ± 0.28
羟基喜树碱	2.50	19.00 ± 0.49*
冬凌草甲素注射剂	1.25	28.06 ± 0.45**
	2.50	28.51 ± 0.25**
	5.00	29.80 ± 0.31**

与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group

表 2 冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞线粒体膜电位的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 50$ )

Table 2 Effect of Oridonin Injection on mitochondrial membrane potential in SGC-7901 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 50$ )

组别	C / ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	荧光强度
对照	—	35.99 ± 0.13
羟基喜树碱	2.50	27.07 ± 0.51**
冬凌草甲素注射剂	1.25	32.03 ± 0.41**
	2.50	28.21 ± 0.18**
	5.00	24.67 ± 0.41**

与对照组比较: \*\* $P < 0.01$

\*\* $P < 0.01$  vs control group

壁减少, 且随给药浓度的增加作用增强, 表明冬凌草甲素注射剂对 SGC-7901 细胞有抑制作用。流式细胞仪检测表明, 不同浓度的冬凌草甲素注射剂作用 SGC-7901 细胞 24 h 后, 出现明显的凋亡峰, 说明该注射剂对 SGC-7901 细胞的抑制作用与其诱导细胞凋亡有关。细胞凋亡有 3 个主要的信号传导通路, 即线粒体通路、死亡受体通路、内质网通路。这 3 个信号转导通路都与  $Ca^{2+}$  关系密切。在正常情况下, 细胞质中  $Ca^{2+}$  维持在低水平, 而在细胞外、线粒体和内质网中的  $[Ca^{2+}]_i$  要比细胞质中高得多, 因此轻微的  $Ca^{2+}$  释放即可显著升高细胞质内  $Ca^{2+}$  水平。在诱导肿瘤细胞凋亡过程中, 外界的刺激因素与细胞表面受体相结合, 引起 4, 5-磷脂酰肌醇二磷酸水解产生 1, 4, 5-肌醇三磷酸, 使细胞  $[Ca^{2+}]_i$  上升;  $Ca^{2+}$  水平的改变可触发线粒体通透孔道 (permeability transition pore, PTP) 开放<sup>[15]</sup>, PTP 的开放允许相对分子质量  $> 1\ 500$  的分子通过, 使离子和呼吸链底物在线粒体基质和胞质之间达到平衡, 导致线粒体电子传递链与氧化磷酸化解偶联、膜电位降低、ATP 合成与还原性谷胱甘肽减少、细胞内活性氧增多, 导致线粒体基质膨胀, 外膜皱襞少, 表面积小, 易于破裂, 释放出膜间促凋亡蛋白, 最终引起细胞凋亡。本实验利用 Fluo-3/AM 荧光探针, 采用激光共聚焦扫描显微镜观察冬凌草甲素注射剂对

SGC-7901 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响,发现冬凌草甲素注射剂可升高 SGC-7901 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ ,且随给药浓度的升高作用增强。线粒体膜电位与细胞内钙库钙离子的释放是相互关联的,因此细胞内钙库释放引起的胞浆游离  $Ca^{2+}$ 浓度升高必将导致线粒体膜电位的改变。在本实验中采用激光共聚焦扫描显微术观察了膜电位的变化,发现冬凌草甲素注射剂可降低 SGC-7901 细胞的线粒体膜电位。以上结果表明凌草甲素注射剂通过升高 SGC-7901 细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 诱导细胞凋亡的发生。

#### 参考文献

- [1] 张典瑞,任天池.冬凌草甲素的药理学研究进展[J].中国药理学杂志,2003,38(11):817-820.
- [2] 刘家云,魏敏,顾琴龙.冬凌草甲素抗肿瘤的研究进展[J].中国新药与临床杂志,2010,29(2):81-84.
- [3] 刘净,梁敬钮,谢韬.冬凌草研究进展[J].海峡药理学,2004,16(2):1-7.
- [4] Chen J H, Wang S B, Chen D Y, *et al.* The inhibitory effect of oridonin on the growth of fifteen human cancer cell lines [J]. *Chin J Clin Oncol*, 2007, 4(1): 403-406.
- [5] 刘加军,李桥,潘祥林,等.冬凌草甲素对白血病 NB4 细胞的诱导凋亡作用及其机制 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1188-1193.
- [6] 张俊峰,刘加军,陆敏强,等.冬凌草甲素抑制人肝癌 BEL-7402 细胞生长及诱导细胞凋亡的机制研究 [J]. 中草药, 2006, 37(10): 1517-1521.
- [7] 车宪平,韩瑞发,周晶,等.冬凌草甲素注射剂诱导膀胱癌 MB49 细胞凋亡及机制研究 [J]. 中草药, 2008, 39(8): 1219-1222.
- [8] 张春玲,吴立军,左海军.冬凌草甲素通过线粒体途径诱导人黑色素瘤 A375-S2 细胞凋亡 [J]. 中草药, 2004, 35(4): 423-426.
- [9] Choi S, Karen L, Xiao H, *et al.* D, L-Sulforaphane-induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibit for of apoptosis family proteins and Apaf-1 [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(1): 151-162.
- [10] Wang Z, Tang X, Li Y, *et al.* 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid inhibits the apoptotic responses in pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 588(1): 9-17.
- [11] Xin H, Liu X H, Zhu Y Z. Herba leonurine attenuates doxorubicin-induced apoptosis in H9c2 cardiac muscle cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 612(1/3): 75-79.
- [12] Su X, Zheng X, Ni J. Lanthanum citrate induces anoikis of Hela cells [J]. *Cancer Lett*, 2009, 285(2): 200-209.
- [13] 戴一,孙隆儒.冬凌草甲素、乙素的研究进展 [J]. 食品与药品, 2008, 10(9): 72-75.
- [14] 冉倩,徐进宜,吴晓明,等.冬凌草甲素的研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2007, 15(2): 91-95.
- [15] Halestrap A P, Clarke S J, Javadov S A. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion a target for cardioprotection [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 61(3): 372-385.