

• 研究论文 •

白藜芦醇对人胃癌 SGC-7901 细胞形态、线粒体膜电位、活性氧及钙离子浓度的影响

张秀娟^{1,2}, 包钰涵^{1,2}, 贾绍华³, 季宇彬^{1,2*}

1. 哈尔滨商业大学 生命科学与环境科学研究中心生物安全评价研究所, 黑龙江 哈尔滨 150076

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076

3. 哈尔滨商业大学 药学院, 黑龙江 哈尔滨 150076

摘要: 目的 研究白藜芦醇对人胃癌 SGC-7901 细胞的影响。方法 SGC-7901 细胞体外培养 48 h, 分为白藜芦醇低、中、高剂量组 (44、88、176 $\mu\text{mol/L}$), 阳性对照组 (5-FU 153.8 $\mu\text{mol/L}$); 阴性对照组 (不含药物同体积培养液), 荧光显微镜观察不同浓度的白藜芦醇对 SGC-7901 细胞的形态学影响; 流式细胞仪检测白藜芦醇对肿瘤细胞中线粒体膜电位、活性氧的影响; 激光共聚焦显微镜观察白藜芦醇对肿瘤细胞中钙离子浓度的影响。结果 显微镜下可见肿瘤细胞染色程度加深, 染色质聚集、断裂, 产生大小不等的凋亡小体, 且随着白藜芦醇浓度加大, 现象越来越明显, 表明细胞凋亡的比例不断增加; 白藜芦醇能够明显降低肿瘤细胞中线粒体膜电位, 随着白藜芦醇浓度不断增加, 肿瘤细胞中活性氧也不断增加, 说明白藜芦醇能够提高肿瘤细胞中的活性氧水平来诱导其凋亡; 白藜芦醇对肿瘤细胞中钙离子的浓度有一定的作用, 其中高剂量能够显著提高肿瘤细胞中钙离子的浓度, 且呈现一定的剂量依赖关系。结论 白藜芦醇通过影响 SGC-7901 肿瘤细胞线粒体膜电位、活性氧及钙离子浓度导致肿瘤细胞凋亡, 且与剂量相关。

关键词: 白藜芦醇; 线粒体膜电位; 活性氧; 钙离子浓度

中图分类号: R 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2012)03-0161-04

Effects of resveratrol on cell morphology, mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, and intracellular calcium concentration in SGC-7901

ZHANG Xiu-Juan^{1,2}, BAO Yu-han^{1,2}, JIA Shao-hua³, JI Yu-bin^{1,2}

1. Institute of Bio-safety Evaluation, Center of Research and Development on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

2. Engineering Research of Natural Anticancer drugs, Ministry of Education, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

3. School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China

Abstract: Objective To investigate the effect of resveratrol on human gastric cancer SGC-7901 cell line. **Methods** SGC-7901 cell line was cultured *in vitro* for 48 h. The end concentration of resveratrol low-, mid-, and high-dose groups was 44, 88, and 176 $\mu\text{mol/L}$, respectively; The end concentration of positive control group (5-FU) was 153.8 $\mu\text{mol/L}$; Negative control group was administrated with the same volume of culture medium without drugs. Morphology of tumor cells treated with different concentration of resveratrol was identified by fluorescence microscope. Flow cytometry was used to detect the influence of resveratrol on the changes of mitochondrial membrane potential (MMP) and reactive oxygen species (ROS) in tumor cells. After the tumor cell was exposed to resveratrol, the intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) was measured with laser scanning confocal microscope. **Results** According to the morphology, the tumor cell staining was deepened; Chromatin aggregation and fragmentation were observed, and the apoptosis bodies were generated. With increasing the concentration of resveratrol, the phenomenon was more obvious, which indicated that the proportion of apoptosis increased. Resveratrol could reduce MMP of tumor cells, and ROS of tumor cells has also increased

收稿日期: 2012-04-05

基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D201043)

作者简介: 张秀娟 (1962—), 女。E-mail: zxj1717@yahoo.com.cn

*通讯作者 季宇彬, 教授, 博士生导师, 研究方向为肿瘤药理学。

with increasing concentration of resveratrol. It indicated that resveratrol could induce tumor cell apoptosis by affecting the content of ROS. The high doses could improve $[Ca^{2+}]_i$ significantly in a dose-dependent manner. **Conclusion** Resveratrol could induce tumor cell apoptosis by affecting MMP, ROS, and $[Ca^{2+}]_i$.

Key words: resveratrol; mitochondrial membrane potential (MMP); reactive oxygen species (ROS); intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$)

白藜芦醇(resveratrol)为非黄酮类多酚化合物,是一种广泛存在于葡萄属植物中的物质,目前已在70多种植物中被发现^[1-3]。作为一种天然抗氧化剂,白藜芦醇不仅可以有效降低血液黏稠度,还可以抑制血管舒张和血小板凝集,且对于血栓动脉粥样硬化的形成有很好的活性。进一步研究表明,白藜芦醇还具保护神经系统,消炎、抗菌、抗病毒,保肝、利胆,调节免疫,抗氧化、抗自由基、抗衰老等多种药理作用,并可通过抑制肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞分化、诱导肿瘤细胞凋亡等产生显著的抗肿瘤作用^[4-10],本研究以人胃癌 SGC-7901 细胞为研究对象,探讨白藜芦醇对人胃癌 SGC-7901 细胞的影响,为白藜芦醇的广泛应用提供理论基础。

1 材料与仪器

1.1 材料

人胃腺癌细胞(SGC-7901)由哈尔滨商业大学药物研究所博士后科研工作站传代保种;白藜芦醇(质量分数98%,美国Sigma公司),5-氟脲嘧啶(5-FU)(浙江海正药业股份有限公司),RPMI 1640(Gibco公司),胎牛血清(FCS)(Hyclone公司),小牛血清白蛋白(BSA),核糖核酸酶A(RNase A, Sigma公司),碘化丙啶(PI),罗丹明123(Invitrogen),Fluo-3/AM(Molecular Probe公司)。

1.2 仪器

MC0175型Sanyo CO₂培养箱(日本三洋公司),JJT-900/1300超净工作台(苏净集团),荧光显微镜、激光共聚焦显微镜(Leica公司),Clouter Epics-XL流式细胞仪、CKX-41-32倒置显微镜(Olympus公司),Adventurer 万分之一电子天平(Ohaus公司)。

2 方法

2.1 白藜芦醇对 SGC-7901 细胞形态的影响

取指数生长期的人胃腺癌细胞 SGC-7901,加入适量0.25%胰蛋白酶液消化细胞,使贴壁细胞脱落。将含10%胎牛血清的培养基制备成浓度为 3×10^5 个/mL的细胞悬液,于6孔板中每孔接种1 mL。将平板置于37℃、5% CO₂培养箱。24 h后加入白藜芦醇,使终浓度分别为44、88、176 μmol/L;阳

性对照组加入5-FU(153.8 μmol/L);阴性对照组为相同体积不含药物的培养液。48 h后将给药处理的细胞用PBS洗一遍,加入固定液甲醇-冰醋酸(3:1),置4℃冰箱固定10 min后,加入5 mg/L荧光探针Hoechst 33258,37℃、5% CO₂培养箱中孵育15 min,荧光倒置显微镜观察细胞形态^[11]。

2.2 白藜芦醇对 SGC-7901 细胞线粒体膜电位的影响

48 h后细胞用胰酶消化,加PBS洗2遍,分别加入终浓度为10 μmol/L的罗丹明123置于37℃孵育30 min,孵育后2 000 r/min离心10 min, PBS洗2次,300目尼龙网滤过后,流式细胞仪检测细胞荧光强度。激发波长488 nm,发射波长525 nm。

2.3 白藜芦醇对 SGC-7901 细胞中活性氧的影响^[12]

48 h后细胞用胰酶消化,加PBS洗2遍,分别加入终浓度5 μmol/L的DCFH-DA置于37℃孵育30 min,孵育后2 000 r/min离心10 min, PBS洗2次,再用300目尼龙网滤过,流式细胞仪检测细胞荧光强度。激发波长488 nm,发射波长525 nm。

2.4 白藜芦醇对 SGC-7901 细胞中钙离子的影响

药物作用48 h后吸出培养皿中的培养液,加胰酶消化,用无钙台式液洗一遍;加入200 μL Fluo-3/AM荧光探针(4 μg/mL),37℃避光温育30 min;激光共聚焦显微镜扫描观察。激发波长488 nm,发射波长540~570 nm。

3 结果与讨论

3.1 白藜芦醇对 SGC-7901 细胞形态的影响

荧光显微镜下可见,随着药物浓度的不断增加,细胞凋亡量也不断加大,凋亡细胞特征形态明显,染色体DNA断裂并聚集成细小的凝聚块,细胞形态不整齐,部分细胞胞核染色质分布不均匀,胞核染色质浓缩,聚集,当白藜芦醇浓度达到最大时,细胞数量很少,多数细胞死亡,并呈现大量凋亡形态(图1)。

3.2 白藜芦醇对肿瘤细胞中线粒体膜电位的影响

SGC-7901细胞中强荧光部分细胞所占比例逐渐减少,而且随着药物浓度的升高其比例的减少更加显著,呈一定的剂量相关关系,表明白藜芦醇可以导致SGC-7901细胞内线粒体膜电位明显下降,

见图2。

3.3 白藜芦醇对肿瘤细胞中活性氧的影响

SGC-7901 细胞内活性氧水平分别为 90.1%、92.3%、99.7% (空白组的活性氧水平为 84.5%); 表明白藜芦醇药物浓度增大过程中, 荧光较强的细胞

也随之逐渐增多, 见图3。

3.4 白藜芦醇对 SGC-7901 细胞中钙离子浓度的影响

白藜芦醇可升高SGC-7901细胞内Ca²⁺的浓度, 并且随着白藜芦醇剂量的增加, 细胞内Ca²⁺浓度增

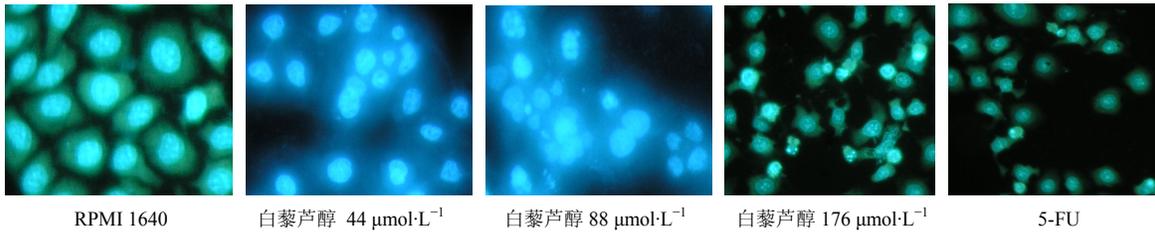


图1 荧光显微镜观察 SGC-7901 细胞形态学

Fig. 1 Morphology of SGC-7901 cells by fluorescence microscopy

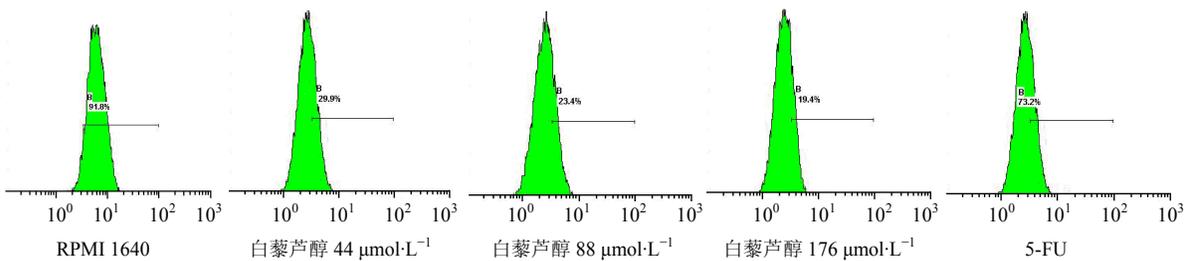


图2 白藜芦醇对 SGC-7901 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 2 Effect of resveratrol on MMP of SGC-7901 cells

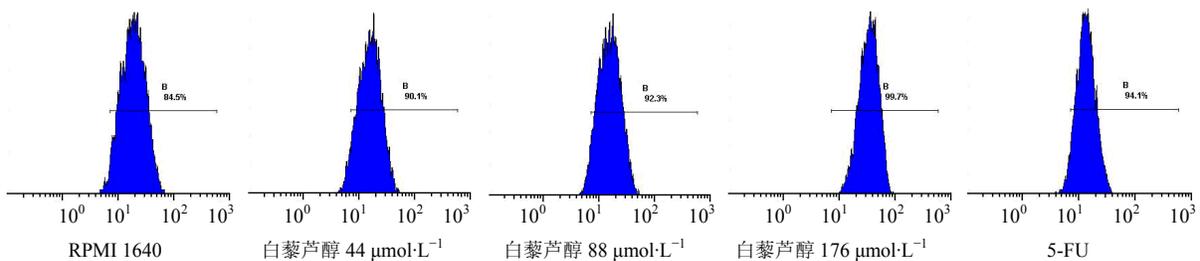


图3 白藜芦醇对 SGC-7901 细胞内活性氧水平的影响

Fig. 3 Effects of resveratrol on intracellular ROS levels in SGC-7901 cells

幅也相应增大, 且与对照组相比具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表1。

随着对细胞凋亡机制研究的进一步深入, 目前学者普遍认为, 线粒体在细胞凋亡过程中起着中心地位作用, 线粒体是介导细胞凋亡的执行官^[13-14]。有研究证明, 凋亡因素作用于细胞后, 线粒体膜电位的下降是最早能被记录到的变化。一旦出现线粒体膜电位降低, 细胞将进入凋亡过程^[15]。线粒体既是细胞内钙的储存库, 又是极为重要的钙调控器官。Ca²⁺可以通过调节线粒体PT孔(即线粒体的一种通透性转变孔道)的开放而诱导凋亡。随着线粒体内

表1 白藜芦醇对 SGC-7901 细胞内[Ca²⁺]_i变化的影响

Table 1 Effect of resveratrol on changes of [Ca²⁺]_i in SGC-7901 cells

| 分组 | 剂量/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) | [Ca ²⁺] _i 变化 |
|------|--|-------------------------------------|
| 对照 | — | 15.330 0 ± 1.010 4 |
| 5-FU | 153.8 | 62.856 7 ± 4.265 6** |
| 白藜芦醇 | 44 | 18.046 3 ± 1.079 8 |
| | 88 | 19.755 0 ± 2.112 9* |
| | 176 | 26.630 0 ± 2.081 3** |

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

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

的 Ca^{2+} 缓慢积累,一旦引起线粒体 Ca^{2+} 超载,就会使高导电性 PT 孔开放,导致线粒体膜电位下降,线粒体外膜破裂和膜间质的溢出,诱导细胞凋亡。越来越多的实验证实真核细胞跨膜信号转导途径中有 Ca^{2+} 参与,其作为第二信使参与和细胞凋亡相关的核酸酶和蛋白激酶的活化,从而介导细胞凋亡。在细胞凋亡过程中,细胞内 ROS 积累和 Ca^{2+} 浓度升高是两个同时产生的事件。凋亡早期,贮存于内质网或线粒体的 Ca^{2+} 释放使胞内 Ca^{2+} 水平轻度升高,并协同 GSH 下降等因素,导致线粒体产生大量 ROS。一般情况下,多数 Ca^{2+} 被禁锢于内质网、肌质网等,而此刻大量 ROS 可能导致贮存的细胞器、线粒体膜和细胞膜的破坏,致使胞外 Ca^{2+} 内流和胞内 Ca^{2+} 重新分布,从而进一步使胞内 Ca^{2+} 水平持续升高。总之, Ca^{2+} 水平升高和 ROS 产生并积累两者相互促进,当 Ca^{2+} 达到一定程度时,造成线粒体功能不可逆的损伤,最终导致细胞凋亡。

4 讨论

本实验研究结果表明,白藜芦醇处理肿瘤细胞 48 h 后,肿瘤细胞中的线粒体膜电位普遍下降,且随着白藜芦醇浓度的不断增加,线粒体膜电位变化呈现一定的剂量相关关系;活性氧普遍上升,而且随着白藜芦醇浓度的不断增加,活性氧变化呈现一定的剂量相关关系;细胞内钙离子浓度提高,且呈明显的剂量相关性。综上所述,白藜芦醇可能通过影响肿瘤细胞线粒体膜电位、活性氧及钙离子浓度而引起肿瘤细胞的凋亡。

参考文献

[1] Tyler V E. Grape expectations (compound in grapes may fight cancer; includes related article on grape seed extract and on echinacea) [J]. *Prevention*, 1997, 49(6): 80-84.
 [2] 韩晶晶, 刘 炜, 毕玉平. 白藜芦醇的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2008, 24(11): 1851-1859.
 [3] 王夏青, 於洪建, 赵余庆. 干红葡萄酒中儿茶素、表儿茶素、白藜芦醇和原花青素的测定 [J]. *中草药*, 2009,

40(5): 745-747.

- [4] 陈 玲, 陈复兴, 刘军权, 等. 白藜芦醇对人 $\gamma\delta\text{T}$ 细胞生长和杀伤功能的影响 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 2056-2059.
 [5] 刘宏胜, 王金环, 徐新女, 等. 白藜芦醇对 U251 脑胶质瘤细胞 Bcl-2、Bcl-XL、CyclinD1 和 STAT-3 蛋白表达的影响 [J]. *国外医药: 植物药分册*, 2008, 23(2): 72-74.
 [6] Ates O, Cayli S, Altinoz E, *et al.* Neuroprotection by resveratrol against traumatic brain injury in rats [J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 294(1/2): 137-144.
 [7] 李国洪, 金美娟. 白藜芦醇对氧化型 LDL 所致血管内皮细胞损伤的保护作用 [J]. *解放军医学杂志*, 2008, 33(6): 719-721.
 [8] Martin A R, Villegas I, La Casa C, *et al.* The effects of resveratrol, a phytoalexin derived from redwines, on chronic inflammation induced in an experimentally induced colitis model [J]. *Br J Pharmacol*, 2006, 147(8): 873-885.
 [9] 周福成, 周艳琴, 郭婷婷, 等. 白藜芦醇的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2009, 6(8): 11-13.
 [10] 陈卫琼. 白藜芦醇抗肿瘤作用机制的研究进展 [J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2008, 28(5): 404-407.
 [11] 陈立军, 靳秋月, 王瑞琪, 等. 芸香苷诱导 K562 细胞凋亡机制 [J]. *中草药*, 2006, 37(5): 738-741
 [12] Armstrong J S, Steinauer K K, Hornung B, *et al.* Role of glutathione depletion and reactive oxygen species generation in apoptotic signaling in a human B lymphoma cell line [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9(3): 252-263.
 [13] Grazzini E, Puma C, Roy M O, *et al.* Sensory neuron-specific receptor activation elicits central and peripheral nociceptive effects in rats [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(18): 7175-7180.
 [14] Zeng X, Huang H, Hong Y. Effects of intrathecal BAM22 on noxious stimulus-evoked c-fos expression in the rat spinal dorsal horn [J]. *J Brain Res*, 2004, 2008(2): 170-179.
 [15] K roemerG, Zamzam I N, Susin S A. Mitochondrial control of apoptosis [J]. *Immunol Today*, 1997, 18: 44-51.