

• 药理与临床 •

白藜芦醇诱导胃癌细胞脱落凋亡

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*}

(1. 第四军医大学 生物化学与分子生物学教研室, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学 病理生理学教研室, 陕西 西安 710032; 3. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要:目的 研究白藜芦醇诱导胃癌细胞脱落凋亡的作用。方法 采用细胞形态学观察、Annxin-V 和 PI 细胞染色和流式细胞仪检测, 观察白藜芦醇 (0.1、0.2、0.5 mmol/L) 对脱落培养胃癌细胞 BGC823、SGC7901 和 HGC27 的生长状态、细胞周期的影响及诱导脱落凋亡的作用。结果 倒置显微镜下发现脱落培养的胃癌细胞聚集成团生长, 0.1 mmol/L 白藜芦醇作用细胞后可抑制抗脱落凋亡的胃癌细胞聚集成团; 流式细胞仪检测和 Annxin-V 和 PI 细胞染色表明 0.5 mmol/L 白藜芦醇可分别阻滞脱落培养的 BGC823、SGC7901 和 HGC27 细胞于 G₀/G₁、S、G₂/M 期, 并可诱导这 3 株胃癌细胞发生脱落凋亡, 其中白藜芦醇诱导 HGC27 细胞脱落凋亡比例达 19.3%, 远高于其他两株胃癌细胞。结论 白藜芦醇可诱导胃癌细胞发生脱落凋亡。

关键词:白藜芦醇; 脱落凋亡; 胃癌细胞

中图分类号: R286.91

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)10-1138-03

Inducing effect of resveratrol on anoikis of gastric cancer cells

LI Ying¹, YAO Li-bo², WANG Li-feng¹, HAN Jiong¹, HAN Yue-heng¹,LIU Xin-ping¹, LIN Shu-xin², YU Qiang^{3*}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology; 2. Department of Pathophysiology, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China; 3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: **Object** To study the inducing of resveratrol on anoikis of gastric cancer cells. **Methods** Cell morphology observation, Annxin-V and PI staining, and Flow cytometry (FCM) assay were used to observe the inducing effect of resveratrol (0.1, 0.2, 0.5 mmol/L) on cell growth, cell cycles and anoikis of the gastric cancer cells (BGC823, SGC7901, and HGC27) cultured in suspension. **Results** Cluster growth of gastric cancer cells cultured in suspension was observed by invert microscope. Resveratrol (0.1 mmol/L) could inhibit the gastric cancer cells resistant to anoikis to form cluster by FCM assay and Annxin-V and PI staining. Resveratrol (0.5 mmol/L) could arrest the suspended gastric cancer cells (BGC823, SGC7901, and HGC27) to G₀/G₁, S, G₂/M phase respectively and induce the gastric cancer cells to anoikis, and the anoikis rate of HGC27 was around 19.3%, which was higher than that of other two cells. **Conclusion** Resveratrol can induce gastric cancer cells to anoikis.

Key words: resveratrol; anoikis; gastric cancer cells

正常来源的上皮细胞或内皮细胞如果失去基质的支持, 会发生凋亡, 这一现象称为脱落凋亡 (anoikis)^[1]。脱落凋亡的意义在于防止脱落的细胞种植于其他不适当的地方继续生长。然而很多恶性肿瘤细胞从瘤体上脱落后并不发生凋亡, 而是迁徙到其他部位再次生长, 这种存在于肿瘤细胞的抗脱落凋亡现象是肿瘤发生转移的主要原因之一^[2~4]。胃癌的发病率和恶性程度比较高, 是易于转移的恶

性肿瘤。本实验在前期实验中所获得的具有抗脱落凋亡特性的胃癌细胞株的基础上^[5], 选择近年非常有发展前景的天然抗肿瘤药物白藜芦醇, 观察其阻止肿瘤转移的活性, 即诱导胃癌细胞脱落凋亡的作用, 以期为临床治疗肿瘤和肿瘤转移提供理论依据。

1 材料

1.1 普通实验材料: 人胃癌细胞株 BGC823 和 HGC27 购自中国科学院上海细胞库, SGC7901 由

收稿日期: 2003-12-26

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)

作者简介: 李莹 (1968—), 女, 安徽六安人, 博士, 讲师, 主要从事肿瘤细胞信号转导及抗肿瘤药物的筛选。Tel: (029) 83374516

E-mail: liying@fmmu.edu.cn

* 通讯作者 Tel: (021) 50801790 E-mail: qyu@sibs.ac.cn

西安西京医院消化内科全军重点实验室惠赠。RP-MI-1640 培养基, Gibco 公司; 新生牛血清, 杭州四季青生物工程公司; DMSO、poly-HEMA, Sigma 公司; 琼脂粉: 北京百灵克公司 (Sigma 分装); FACS Calibur 流式细胞仪, B-D 公司。

1.2 药物: 白藜芦醇由西安市天行健生物制品有限公司提供, 由虎杖中提取, 纯度 > 95%, 用 DMSO 配成 100 mmol/L, 分装, -20 °C 储存。

2 方法

2.1 细胞培养: 细胞采用含 10% 小牛血清的 RP-MI-1640 培养基, 置于 37 °C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。0.25% 胰蛋白酶和 0.02% EDTA 消化、传代细胞。

2.2 细胞脱落培养模型的建立: 参照文献方法^[6], 将 2 mL 溶于无水乙醇的 10 g/L poly-HEMA 铺于直径为 55 mm 的 Petri 培养皿中, 室温干燥, 重复上述步骤一次。使用前用 PBS 洗 4 遍, 紫外线消毒, 将细胞接种于 poly-HEMA 包被的 Petri 培养皿中。由于 poly-HEMA 为一种阴离子聚合物, 铺在平皿底部, 细胞无法贴壁, 只能在培养皿中悬浮生长, 借此来模拟细胞的脱落培养状态。

2.3 形态学观察细胞生长状态: 调整单细胞至 5×10^5 /mL, 接种于上述制备好的脱落培养皿内, 实验组加入白藜芦醇 (0.1、0.2、0.5 mmol/L), 对照组加入等体积 DMSO, 孵育 6 h 后, 倒置显微镜下连续时间点观察细胞的形态学改变。

2.4 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡: 调整单细胞至 5×10^5 /mL, 接种于 poly-HEMA 包被的培养皿中, 同时加入 0.5 mmol/L 白藜芦醇与细胞共同孵育, 对照组加入同体积 DMSO。培养 24 h 后收集细胞, 1 500 r/min 离心 5 min, 吸弃上清液, PBS 洗 1 次, 沉淀细胞后用含小牛血清的 PBS 重悬, 加入无水乙醇, 使含小牛血清 3%, 含乙醇 70%, 总体积为 1 mL, 于 1.5 mL EP 管中置 -20 °C 固定保存。检测时, 用 PBS 洗细胞 2 次, 吸弃上清液, 加入 0.2 mL RNase A, 37 °C 水浴消化 30 min, 再加入 0.3 mL PI 置暗处染色 20 min 后上机检测。用 CELLQuest 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, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS10.0 统计软件进行两组样本均数 *t* 检验。

2.5 Annexin-V 和 PI 染色检测细胞凋亡: 调整单细胞至 5×10^5 /mL, 接种于上述制备好的脱落培养皿内, 实验组加入 0.5 mmol/L 白藜芦醇, 对照组加

入同体积 DMSO, 作用 24 h 后收集细胞, PI 和 Annexin-V 双染细胞 (Annexin-V 是一种 Ca²⁺ 依赖性结合蛋白, 能与翻转到膜外的 PS 高亲和力特异性结合), 流式细胞仪检测分析, 获得 4 个象限的值。第 1 象限代表细胞收集过程中出现的损伤细胞 (An⁻PI⁺), 第 2 象限代表晚期凋亡细胞和坏死细胞 (An⁺PI⁺), 第 3 象限代表正常细胞 (An⁻PI⁻), 第 4 象限代表早期凋亡细胞 (An⁺PI⁻)。实验重复 4 次, 统计各组凋亡、坏死细胞 + 早期凋亡细胞所占比例, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS10.0 统计软件进行组间 *t* 检验。

3 结果

3.1 对脱落培养胃癌细胞形态学的影响: 胃癌细胞 BGC823、SGC7901 和 HGC27 脱落培养时, 聚集成比较大的细胞团, 正常生长, 具有抗脱落凋亡的特性^[3]。这种聚集现象是其保持存活的方式之一。0.1 mmol/L 白藜芦醇作用于细胞 12 h, 细胞聚集成团的现象受到明显抑制, 0.5 mmol/L 白藜芦醇作用 12 h 时, 细胞完全呈现单个散在的状态, 药物浓度越高, 作用时间越长, 抑制现象越明显。

3.2 对脱落培养胃癌细胞周期的影响及诱导脱落凋亡的作用: 将 0.5 mmol/L 白藜芦醇分别作用于脱落培养的 BGC823、SGC7901 和 HGC27 细胞 24 h。流式细胞仪 (FCM) 分析细胞周期发现, 药物对脱落培养的不同胃癌细胞系的细胞周期的影响是不一致的, 分别使 BGC823、SGC7901 和 HGC27 细胞阻滞于 G₀/G₁、S、G₂/M 期。同时 FCM 还检测到细胞出现了不同程度的凋亡峰, 其中白藜芦醇诱导 HGC27 细胞脱落凋亡比例达 (19.3 ± 0.03)%, 高于其他两株胃癌细胞, 表示 HGC27 细胞比其他两种细胞对药物更加敏感, 结果见表 1。

将 0.5 mmol/L 白藜芦醇作用于脱落培养的

表 1 白藜芦醇对脱落培养的胃癌细胞周期及脱落凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

Table 1 Effect of resveratrol on cell cycles and anoikis of suspended gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

细胞	组别	细胞周期/%			凋亡率/%
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
BGC823	对照	62.43 ± 7.68	24.76 ± 6.11	12.81 ± 3.98	0.11 ± 0.01
	白藜芦醇	72.67 ± 5.69	19.93 ± 4.76	7.40 ± 1.12	2.80 ± 0.01*
SGC7901	对照	68.70 ± 9.74	15.81 ± 6.60	15.39 ± 4.01	0.70 ± 0.11
	白藜芦醇	66.92 ± 5.32	23.32 ± 7.54	9.76 ± 2.01	2.19 ± 0.03*
HGC27	对照	70.04 ± 8.67	23.96 ± 7.20	6.00 ± 1.21	0.94 ± 0.09
	白藜芦醇	61.29 ± 10.01	13.90 ± 5.11	24.81 ± 1.11	19.30 ± 0.03**

与对照组比较: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01

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

BGC823、SGC7901 和 HGC27 细胞 24 h 后,用 Annxin-V 和 PI 染色,FCM 分析凋亡细胞和死亡细胞,结果表明,与对照组相比,白藜芦醇组出现了较多凋亡和死亡的细胞,见表 2。

表 2 白藜芦醇对胃癌细胞的诱导脱落
凋亡作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

Table 2 Inducing effect of resveratrol on anoikis
of gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

细胞	组别	凋亡坏死细胞比例/%
BGC823	对照	5.29 ± 1.99
	白藜芦醇	21.60 ± 7.11**
SGC7901	对照	11.30 ± 3.11
	白藜芦醇	52.70 ± 9.21**
HGC27	对照	17.15 ± 2.56
	白藜芦醇	51.80 ± 11.67**

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

4 讨论

白藜芦醇,化学名为芪三酚,分子式 $C_{14}H_{12}O_3$,相对分子质量 228.25,是一种天然的植物抗毒素。目前在桑葚、花生、葡萄等 72 种植物中发现有白藜芦醇^[7]。近年研究发现白藜芦醇对乳腺癌、前列腺癌、皮肤癌等多种肿瘤细胞的生长均具有显著的抑制作用^[8~10],是非常有前景的天然抗肿瘤药物。虽然有多种因素可以促进肿瘤细胞发生脱落凋亡,从而抑制肿瘤的转移,但迄今少有关于中药在脱落凋亡方面的研究。因此,本实验在前期实验所获得的抗脱落凋亡胃癌细胞株的基础上^[5],观察白藜芦醇诱导胃癌细胞脱落凋亡的作用,为寻找有效的抗肿瘤药物,尤其是抑制肿瘤转移的药物提供理论依据。

本实验所选择的胃癌细胞 BGC823、SGC7901 和 HGC27 均具有抗脱落凋亡的特性,脱落培养时细胞聚集成团^[5]。肿瘤细胞这种相互聚集成团的表现是其逃离脱落凋亡的自救反应。白藜芦醇作用于脱落培养的胃癌细胞后,细胞聚集成团的现象受到抑制,细胞转变为单个散在的状态。这一现象的发生可能是由于白藜芦醇影响了与细胞黏附相关的信号分子的改变,导致细胞表面黏附分子表达水平下降的结果,因而这一现象可能是白藜芦醇诱导胃癌

细胞脱落凋亡的机制之一。本实验还观察到白藜芦醇使 3 株胃癌细胞阻滞于不同的细胞周期,此结果一方面说明白藜芦醇可能通过影响细胞周期蛋白,从而抑制细胞周期,进一步抑制细胞的生长,另一方面也说明白藜芦醇对不同细胞的细胞周期的影响方式是不一致的,因此其对不同细胞周期蛋白的调控也是不一致的。流式细胞仪检测、Annxin-V 和 PI 染色实验都证明,白藜芦醇可诱导这 3 株胃癌细胞发生不同程度的脱落凋亡,其中 HGC27 细胞对药物诱导凋亡的敏感性强于其他两种胃癌细胞。本实验结果表明,白藜芦醇可诱导胃癌细胞发生脱落凋亡,并且不同的细胞对于药物的反应性和敏感性是不一致的,其确切的作用机制还有待于进一步研究。

References:

- [1] Grossmann J. Molecular mechanisms of "detachment-induced apoptosis-anoikis" [J]. *Apoptosis*, 2002, 7(3): 247-260.
- [2] Frisch S M, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis [J]. *J Cell Biol*, 1994, 124(4): 619-626.
- [3] Frisch S M, Screaton R A. Anoikis mechanisms [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2001, 13: 555-562.
- [4] Han J, Li Y, Liu X P, et al. Inducing effect of proanthocyanidin from seed of *Vitis vinifera* on anoikis of breast cancer cells MCG-7 [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(18): 722-724.
- [5] Li Y, Han J, Wang L F, et al. Analysis of the characteristic of the anoikis resistance of the gastric cancer cells [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2003, 24(6): 485-488.
- [6] Wei L, Yang Y, Yu Q. Tyrosine kinase-dependent phosphatidylinositol 3'-kinase, and mitogen-activated protein kinase-independent signaling pathways prevent lung adenocarcinoma cells from anoikis [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(6): 2439-2444.
- [7] Gusman J, Malonne H, Atassi G. A reappraisal of the potential chemopreventive and chemotherapeutic properties of resveratrol [J]. *Carcinogenesis*, 2001, 22(8): 1111-1117.
- [8] Scarlatti F, Sala G, Somenzi G, et al. Resveratrol induces growth inhibition and apoptosis in metastatic breast cancer cells via de novo ceramide signaling [J]. *FASEB J*, 2003, 17(5): 2339-2341.
- [9] Stewart J R, Artime M C, O'Brain C A. Resveratrol: a candidate nutritional substance for prostate cancer prevention [J]. *J Nutr*, 2003, 133(7 Suppl): 2440S-2443S.
- [10] Bode A M, Dong Z. Signal transduction pathways: targets for chemoprevention of skin cancer [J]. *Lancet Oncol*, 2000, 1: 181-188.

《中国药学文摘》、中国药学文摘数据库网络版、光盘(2005 年)征订启事

中国药学文献数据网络系统即《中国药学文摘》刊物、数据库网络版、数据库光盘是国家科技部重点扶植、国家食品药品监督管理局主管的我国药学文献大型检索和查询系统。该系统于 1981 年创建,主要收载国内外公开发行的 700 余种医药学及相关学科期刊的药学文献,以文摘、简介、题录等形式进行报道。

《中国药学文摘》为月刊,内容同中国药学文摘数据库,16 开本,每期 260 页左右,每期约 65 万字,全年 476 元。订阅者可直接与国家食品药品监督管理局信息中心《中国药学文摘》编辑部联系。开户名称:国家食品药品监督管理局信息中心;开户行:建设银行北京展览路支行;账号:6510003042610002517;发行部:北京市西城区北礼士路甲 38 号(邮编:100810);编辑部:北京市海淀区文慧园南路甲 2 号(邮编:100088);电话:(010) 62214715、62214665、68313344-3803;传真:(010) 68313344-3803、62214866;联系人:郭媛媛 刘琪。