

白屈菜红碱对人胃癌 BGC823 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用

宗永立, 刘艳平*

(中南大学生物科学与技术学院 细胞生物学系, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 观察白屈菜红碱(chelerythrine)对人胃癌 BGC823 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用。方法 通过 MTT 实验检测白屈菜红碱对细胞生长的抑制率, AO/EB 的荧光核染色观察细胞形态, DNA 琼脂糖凝胶电泳及流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡。结果 MTT 实验显示白屈菜红碱抑制 BGC823 细胞的生长呈时间、浓度依赖的方式, 显微镜下观察到 AO/EB 的荧光核染后凋亡的细胞, 琼脂糖凝胶电泳出现 DNA 的片段化, 在白屈菜红碱质量浓度为 1.5、2.0、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 且培养 24 h 时, 流式细胞仪可以检测到凋亡峰, 且细胞被阻滞在 S 和 G_2/M 期。结论 白屈菜红碱能有效地诱导 BGC823 细胞凋亡, 而且其诱导的凋亡具有周期依赖性。

关键词:白屈菜红碱; 增殖抑制; 凋亡诱导; 人胃癌 BGC823 细胞

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)07-1054-03

Proliferation inhibition and apoptosis induction of chelerythrine in human gastric carcinoma BGC823 cells

ZONG Yong-li, LIU Yan-ping

(Department of Cells Biology, College of Bioscience and Biotechnology, Central South University, Changsha 410013, China)

Key words: chelerythrine; proliferation inhibition; apoptosis; human gastric carcinoma BGC823 cells

博落回 *Macleaya cordata* (Willd.) R. Brown 具有败毒抗癌、消肿杀虫的药理作用, 白屈菜红碱是博落回主要有效成分之一。在体外试验中证实白屈菜红碱对肿瘤细胞 (HT29、MCF7、MCF7ADR、DaOY、SQ20B、SCC61、JSQ3、SCC35、LnCaP) 呈现细胞毒性^[1,2], 但国内关于白屈菜红碱药理作用的研究文章却很少见到。本研究采用四甲基偶氮唑盐 (MTT) 实验、DNA 凝胶电泳以及流式细胞术等方法, 观察白屈菜红碱对人胃癌 BGC823 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用, 为其开发和临床应用提供必要的理论依据。

1 材料与与方法

1.1 主要材料及仪器: 人胃癌细胞系 BGC823 由本室保存, 白屈菜红碱 (HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$) 购自成都思科毕生物技术有限公司, 细胞培养基 RPMI-1640 (美国 Promega 公司), 胎牛血清为北京鼎国公司产品。MTT、吖啶橙/溴乙啶 (AO/EB)、碘化丙啶 (PI) (Sigma 公司), 细胞裂解液 (20 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Tris, pH 8.0, 0.8% SDS), DNA 提取液, 1.5% 琼脂糖凝胶。流式细胞仪 (美国 Coulter 公司), 酶联免疫检测仪 (美国

Biotek 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人胃癌细胞 BGC823 常规培养于含 10% 热灭活的胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养, 取对数生长期细胞进行各项实验。

1.2.2 MTT 试验: 取对数生长期人胃癌 BGC823 细胞, 0.25% 胰酶消化, 用细胞培养液制成 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 单细胞悬液接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 及饱和湿度条件下培养 12 h。实验设含正常细胞培养液的对照组, 白屈菜红碱 (白屈菜红碱溶于细胞培养液, 质量浓度分别为 1.0、1.5、2.0、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 实验组, 每组 4 个复孔。12 h 后将对照组换上 100 μL 新鲜培养液, 实验组则去除细胞培养液后换上 100 μL 含白屈菜红碱的培养液。分别培养 24、48、72 h 后, 吸去培养液, 各孔加入 MTT (5 mg/mL) 20 μL , 继续培养 4 h, 小心吸去上层液体, 加 DMSO 各 120 μL , 振荡 10 min, 使结晶充分溶解, 在酶标仪上读取 490 nm 处吸光度 (A) 值。

细胞生长抑制率 = $(A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$

收稿日期: 2005-11-23

作者简介: 宗永立 (1976—), 男, 长沙市人, 硕士, 研究方向为细胞周期与细胞凋亡。

Tel: 13874921543 Fax: (0731) 2650230 E-mail: zy17687@126.com

* 通讯作者 刘艳平 Tel: (0731) 2650418 E-mail: ypliu@xysm.net

1.2.3 细胞形态学观察:倒置显微镜下观察对照组和实验组细胞生长状况和形态变化并拍照;在荧光显微镜下观察并拍照。操作过程如下:收集对照组和实验组细胞进行荧光染色,取各组细胞用 PBS 洗涤并制成 1×10^7 /mL 的细胞悬液,取 95 μ L 的细胞悬液加入 5 μ L AO/EB (100 mg/L) 染液,混匀,1 min 后,吸 1 滴混合液置载玻片上,加上盖玻片,上镜观察及拍照。

1.2.4 细胞 DNA 片段化分析:收获对照组和实验组的细胞 (约 2×10^6 个),PBS 洗涤,加 100 μ L 细胞裂解液,小心混匀,于 37 $^{\circ}$ C 水浴至混合物变清亮;12 000 r/min 离心 5 min,将上清液转移至另一离心管中,以苯酚-氯仿 (1:1)、苯酚-氯仿-异丙醇 (25:24:1) 和氯仿各抽提 1 次,在上清液中加入 1/10 体积的醋酸钠和 2 倍体积的冷乙醇,-20 $^{\circ}$ C 沉淀过夜;4 $^{\circ}$ C 条件下 12 000 r/min 离心 10 min,收集沉淀,溶于 20 μ L TE 缓冲液中,加入 RNase A (10 mg/mL) 1 μ L,37 $^{\circ}$ C 保温 1 h。取 10 μ L 样品缓冲液加入到含 0.5 μ g/mL 溴化乙啶的 1.2% 琼脂糖凝胶点样孔中,恒压 (10 V/cm) 电泳 2 h,紫外

灯下观察结果并拍照。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡:收集对照组和实验组细胞各 1×10^6 个,加入 70% 冷乙醇 1 mL,4 $^{\circ}$ C 固定过夜。染色前 800~1 000 r/min 离心 5 min,除去固定液,PBS 洗 2~3 次,加 500 μ L PBS 重悬细胞,加入 RNaseA 和 PI (PI 终质量浓度 50 μ g/mL,RNaseA 终质量浓度 20 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 避光水浴 30 min,流式细胞仪检测细胞周期各个阶段细胞的百分率和凋亡细胞百分率。

1.2.6 统计学分析:数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 统计软件进行处理,组间比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 MTT 试验结果:白屈菜红碱对人胃癌细胞株 BGC823 生长抑制作用结果见表 1。1.0 μ g/mL 白屈菜红碱不能抑制人胃癌细胞株 BGC823 的生长,在质量浓度为 1.5、2.5 μ g/mL 时明显抑制细胞的生长 ($P < 0.01$),且随药物浓度增加和作用时间延长,其抑制作用也增强,具有明显的时间和剂量依赖性。白屈菜红碱作用 24、48、72 h 的 IC_{50} 值分别为 2.87、0.903、0.468 μ g/mL。

表 1 白屈菜红碱对人胃癌 BGC823 细胞的生长抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Inhibition of chelerythrine on growth of human gastric carcinoma BGC823 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	ρ / (μ g \cdot mL $^{-1}$)	A			生长抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照	-	0.248 \pm 0.037 7	1.191 \pm 0.131 3	0.734 \pm 0.110 8	-	-	-
白屈菜红碱	1.0	0.349 \pm 0.067 0**	1.027 \pm 0.113 2**	0.821 \pm 0.265 3**	-	-	-
	1.5	0.182 \pm 0.041 0**	0.511 \pm 0.355 5**	0.159 \pm 0.047 9**	26.65	59.08	78.35
	2.0	0.149 \pm 0.025 0**	0.484 \pm 0.072 8**	0.124 \pm 0.038 0**	39.84	59.32	83.08
	2.5	0.123 \pm 0.017 0**	0.395 \pm 0.049 0**	0.099 \pm 0.005 4**	50.50	66.82	86.41

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

2.2 细胞形态学改变:倒置显微镜下观察可见,未经药物处理的肿瘤细胞呈梭形或不规则形,贴壁生长。经药物作用 24 h 后,细胞先变圆、变小,折光性增强,许多细胞脱落成漂浮生长状态,出现细胞气泡化及细胞碎片;荧光显微镜下观察,对照组胃癌细胞的细胞核 DNA 呈绿色荧光,核饱满、大小均匀;实验组细胞核呈橘黄色或红色浓集荧光或荧光减弱,核固缩大小不均匀。

2.3 琼脂糖凝胶电泳检测细胞 DNA 片段化结果:对照组细胞提取的 DNA 经琼脂糖凝胶电泳后只检测到一条总 DNA 条带,实验组细胞 DNA 均可见细胞凋亡形成的梯状条带,见图 1。

2.4 流式细胞仪检测结果:不同质量浓度药物作用 24 h,流式细胞仪检测细胞周期结果显示随着药物质量浓度的增加, G_0/G_1 期细胞相对减少, $S/G_2/M$

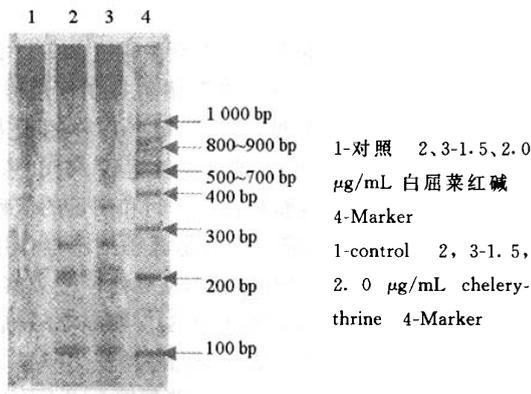


图 1 白屈菜红碱作用 24 h BGC823 细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA of BGC823 cells treated with chelerythrine for 24 h

期细胞相对增多,白屈菜红碱使胃癌 BGC823 细胞阻滞于 S、G₂/M 期。细胞的凋亡率与 S、G₂/M 期细胞数成正相关。见表 2。

表 2 白屈菜红碱作用 BGC823 细胞 24 h 细胞周期和凋亡率的变化 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Changes of cell cycle and apoptosis rate of BGC823 cells treated with chelerythrine for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	p/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞周期/%			凋亡率/ %
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	
对照	-	63.5±0.11	28.8±1.06	7.7±0.45	3.44±0.55
白屈菜红碱	1.5	61.7±1.01*	*31.6±0.15*	*6.8±0.88**	*6.48±0.66**
	2.0	54.9±2.03*	*31.9±0.88*	*13.2±0.44**	*11.99±1.11**
	2.5	48.0±0.25*	*34.4±1.04*	*17.6±0.36**	*23.42±0.88**

与对照组比较: * P<0.01

** P<0.01 vs control group

3 讨论

Chmura 等^[2]在体外实验中证实白屈菜红碱对 9 种肿瘤细胞 (HT29、MCF7、MCF7ADR、DaOY、SQ20B、SCC61、JSQ3、SCC35、LnCaP) 显示细胞毒性。细胞经过不同浓度的白屈菜红碱处理后在 37℃ 下孵育 4 h,其 ED₅₀为 2~5 μmol/L。对化学和放射耐受的肿瘤细胞株包括 SQ-20B、JSQ-3、SCC-35 (都是 p53 突变型) 和对放射敏感的 SCC61 表现出与其他细胞株相同的剂量-效应曲线。Hennequin 等^[3,4]的研究证明在对 SQ-20B 细胞产生相同的作用时,白屈菜红碱和顺铂的药物剂量相当。在体内,对 SQ-20B 大鼠移植 HNSCC 肿瘤模型导致肿瘤生长抑制,而且接受药物处理组的大鼠体重减少小于 10% (说明白屈菜红碱有微小的全身毒性),提示白屈菜红碱可能是一个很有用的抗肿瘤药物。

普遍认为,对肿瘤细胞周期抑制和诱导凋亡是目前治疗肿瘤的重要手段。本实验在通过 MTT 实验来检测白屈菜红碱对肿瘤细胞增殖抑制作用时,发现白屈菜红碱质量浓度为 1.5 μg/mL 作用于人胃癌 BGC823 细胞 24 h,其抑制率就达到 26.65%,其 IC₅₀约 2.87 μg/mL,而且具有时间和剂量的依赖性;为进一步分析这种抑制作用是源于细胞毒作用引起的细胞坏死还是诱导的凋亡,从形态学上观察,结果观察到白屈菜红碱作用 BGC823 细胞 24 h 后出现了大量的凋亡细胞。凋亡的标准特征之一是基因组 DNA 断裂为 180~200 bp 的多条寡核小体片

段。用常规琼脂糖凝胶电泳检测,发现有 DNA 的断裂条带。流式细胞仪对细胞周期和细胞凋亡率进行检测,结果凋亡峰出现,同时 S、G₂/M 期细胞随白屈菜红碱质量浓度的增加相对增多。因此可以得出结论:白屈菜红碱能够抑制人胃癌 BGC823 细胞的增殖并且诱导凋亡。

流式细胞仪检测的结果显示,随着白屈菜红碱质量浓度的增加,G₀/G₁期细胞减少,S、G₂/M 期细胞增加,凋亡的细胞增多,这表明白屈菜红碱诱导的是 S+G₂/M 期细胞发生凋亡,且白屈菜红碱促使细胞凋亡的作用具有明显的药物剂量依赖性、周期选择性。已有研究证明细胞在 G₂期的一个重要事件就是与细胞有丝分裂相关的微管蛋白的合成,抑制了这些蛋白的合成,细胞就停留在 G₂期而不能进行有丝分裂,在有丝分裂过程中,细胞内许多结构成分都发生剧烈运动,消耗大量的能量,因此,在 G₂期还必须有能量的储备。如果细胞在分裂前抑制其呼吸或者氧化磷酸化,则有丝分裂受到抑制,Ruben 等^[5]证实白屈菜红碱能够抑制线粒体能量传递和呼吸耦联,Wolff 等^[6]研究表明白屈菜红碱能够抑制微管蛋白的聚合,阻止细胞有丝分裂的进行。这些可能提供白屈菜红碱将人胃癌 BGC823 细胞阻滞在 S、G₂/M 期而不是其他时期的一些依据。

References:

- [1] Shao R G, Cao C X, Shimizu T, et al. Abrogation of an S-phase checkpoint and potentiation of camptothecin cytotoxicity by 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) in human cancer cell lines, possibly influenced by p53 function [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 4029-4035.
- [2] Chmura S J, Dolan M E, Cha A, et al. *In vitro* and *in vivo* activity of protein kinase C inhibitor chelerythrine chloride induces tumor cell toxicity and growth delay *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 737-742.
- [3] Hennequin C, Giocanti N, Favaudon V. Interaction of ionizing radiation with paclitaxel (Taxol) and docetaxel (Taxotere) in HeLa and SQ20B cells [J]. *Cancer Res*, 1996, 56: 1842-1850.
- [4] Zhang L, Wan X S, Donahue J J, et al. Effects of the Bowman-Birk inhibitor on clonogenic survival and cisplatin- or radiation-induced cytotoxicity in human breast, cervical, head, and neck cancer cells [J]. *Nutr Cancer*, 1999, 33: 165-173.
- [5] Vallejos R H, Rizzotto M G. Effect of chelerythrine on mitochondrial energy coupling [J]. *FEBS Lett*, 1972, 21 (2): 195-198.
- [6] Wolff J, Knippling L. Antimicrotubule properties of benzophenanthridine alkaloids [J]. *Biochemistry*, 1993, 32(48): 13334-13339.