

冬凌草甲素抑制人胃癌 SGC-7901 细胞生长的 G₂/M 期阻滞机制研究

季宇彬^{1,2}, 洪宝^{1,2}, 高世勇^{1,2}

(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 150072; 2 黑龙江省肿瘤预防与抗肿瘤药物研究重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 研究冬凌草甲素抑制人胃癌 SGC-7901 细胞生长作用及 G₂/M 期阻滞机制。方法 MTT 法检测冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞生长的抑制作用; 流式细胞术检测冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞周期的影响; Western blotting 法检测冬凌草甲素对 Cdk1、Cyclin B1 两种蛋白表达的影响。结果 冬凌草甲素作用于 SGC-7901 细胞的 IC₅₀ 为 15.64 μmol/L; 冬凌草甲素对 G₂/M 期细胞的阻滞作用随着浓度的增加而增强; Cdk1 和 Cyclin B1 蛋白的表达量随着冬凌草甲素浓度的增大显著降低。结论 冬凌草甲素通过下调 SGC-7901 细胞内 Cdk1、Cyclin B1 两种蛋白的表达, 阻滞细胞于 G₂/M 期而抑制 SGC-7901 细胞生长。

关键词: 冬凌草甲素; 人胃癌 SGC-7901 细胞; Cdk1; Cyclin B1; 细胞周期

中图分类号: R286.91 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)12-2024-03

Inhibitory mechanism of oridonin on G₂/M phase arrest in SGC-7901 cell growth

Ji Yubin^{1,2}, Hong Bao^{1,2}, Gao Shirong^{1,2}

(1. Life Sciences and Environmental Sciences Research Center of Harbin Commerce University, Harbin 150072, China; 2. Key Research Laboratory of Cancer Prophylaxis and Anticancer Drugs of Heilongjiang Province, Harbin 150076, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of oridonin on G₂/M phase arrest of human stomach cancer SGC-7901 cell growth *in vitro* and its molecular mechanism. **Methods** The inhibition of oridonin on SGC-7901 cells was detected by MTT assay. Effect of oridonin on the phase distribution of SGC-7901 cell cycle was observed by flow cytometry (FCM). Western blotting was used to analyze the expression of Cdk1 and Cyclin B1. **Results** IC₅₀ of oridonin on SGC-7901 cells was 15.64 μmol/L. The effect of oridonin on SGC-7901 cells presented the increasing percentages of cells in G₂/M phase as the concentration of oridonin increased. With the increase of oridonin dose, the expression of Cdk1 and Cyclin B1 proteins was remarkably decreased. **Conclusion** Oridonin can downregulate the expression of Cdk1 and Cyclin B1, which may be the mechanism of arresting SGC-7901 cells in G₂/M phase.

Key words: oridonin; human stomach cancer SGC-7901 cells; Cdk1; Cyclin B1; cell cycle

冬凌草甲素 (oridonin) 是一种贝壳杉烯二萜类天然有机化合物^[1,2], 主要来源于唇形科香茶菜属植物。有研究表明, 冬凌草甲素对多种组织来源的肿瘤细胞的增殖有抑制作用, 如对 BeF-7402、NB49、MB4 等具有明显的抑制作用^[3-6], 能够影响肿瘤细胞周期、钠泵活性和蛋白质的合成并增强其他化疗疗效^[7]。但冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞周期阻滞作用尚未见报道, 本实验以 SGC-7901 细胞为研究对象, 观察不同浓度的冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞的生长抑制及周期阻滞作用, 并检测了周期相关蛋白表达的变化, 探讨冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞的生长抑制及周期阻滞作用, 并检测了周期相关蛋白表达的变化, 探讨冬凌草甲素对 SGC-7901

细胞的生长抑制及周期阻滞作用机制。

1 材料

1.1 肿瘤细胞株: 人胃癌 SGC-7901 细胞株, 由哈尔滨商业大学药物研究所传代保种。

1.2 药物与主要试剂: 冬凌草甲素 (质量分数 > 98%) 由中国药品生物制品检定所提供, 羟基喜树碱 (HCPT) 由上海龙翔生物医药开发有限公司提供; MTT 购自美国 Molecular Probe 公司; RPMI 1640 培养基, 购自美国 Gibco 公司; 二甲基亚砜 (DMSO)、胰蛋白酶、溴化丙啶 (PI), 购自美国 Sigma 公司。兔抗 Cyclin B1 一抗、兔抗 Cdk1/Cdc2 一抗、碱磷酶标记山羊抗兔 IgG, 由碧云天生物技术研究所提供; 其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2010-06-27

基金项目: 黑龙江省普通高等院校新世纪优秀人才培养计划; 哈尔滨商业大学校内研究生创新基金项目 (YJSCX2009-113HSD)

作者简介: 季宇彬 (1956—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理及分子药理学研究。

1.3 主要仪器: CO-150 型 CO₂ 培养箱 (美国 NBS); 680 型酶标仪 (美国伯乐公司)、电泳仪、电转仪 (北京六一仪器厂); EPICS-XL 流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); 低温高速离心机 (美国 Beckman Coulter 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法检测冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用: 取对数生长期的 SGC-7901 细胞, 胰酶消化后, 调整细胞浓度为 1×10^4 /mL, 按每孔 100 μ L 接种于 96 孔板中, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h 后, 每孔加 100 μ L 不同浓度的冬凌草甲素, 使冬凌草甲素的终浓度分别为 3.125、6.25、12.5、25、50 μ mol/L, 每个浓度设 8 个平行孔; 阴性对照组加相同体积的培养液; 阳性对照组为 HCPT (10 μ mol/L), 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中继续培养 72 h 后, 弃上清, 每孔加入 0.5 mg/mL MTT 溶液 100 μ L, 继续孵育 4 h, 弃上清液, 每孔加 150 μ L DMSO, 振荡混匀后用酶标仪检测波长 570 nm 条件下的吸光度 (A) 值, 计算抑制率及 IC₅₀。

抑制率 = (对照组 A 值 - 给药组 A 值) / 对照组 A 值 \times 100%

2.2 流式细胞仪检测冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞周期的影响: 将浓度为 1.5×10^5 /mL 对数生长期 SGC-7901 细胞接种于 6 孔培养板, 每孔 1 mL, 置培养箱内培养 24 h 后加入不同浓度的冬凌草甲素 (0.375、0.75、1.50 μ mol/L), 48 h 后分别用胰蛋白酶消化细胞, PBS 洗 3 次, 用 70% 冰乙醇固定, 4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 洗 1 次后, 用 50 μ mol/L PI 染色, 37 $^{\circ}$ C 避光培养 30 min, 300 目尼龙网滤过后上机检测, 激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm^[8]。

2.3 Western blotting 法检测冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞 Cdk1 和 CyclinB1 蛋白表达的影响: 将浓度为 2×10^5 /mL 对数生长期 SGC-7901 细胞接种于 150 mL 培养瓶中, 每孔 5 mL, 培养箱中孵育 24 h 后, 加入不同浓度的冬凌草甲素 (0.375、0.75、1.50 μ mol/L), 48 h 后倒掉培养液, PBS 洗 2 次, 刮下细胞, 每瓶细胞加 40 μ L 含 PMSF 的细胞裂解液, 冰浴放置 30 min。然后于 4 $^{\circ}$ C 下 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 采用考马斯亮蓝法进行蛋白定量后, 分装转移至离心管中放于 -80 $^{\circ}$ C 保存。取蛋白进行电泳, 并转移到 NC 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉 TTBS 室温封闭 2 h, 将膜与稀释的一抗 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜, TTBS 液充分洗膜 3 次, 每

次振摇 10 min, 再与碱磷酶标记山羊抗兔 IgG 室温孵育 2 h, 冲洗未结合二抗, TTBS 洗 3 次, 每次 10 min, 取出 NC 膜显色后, 用凝胶成像系统照相扫描, 图像凝胶成像分析系统进行分析。实验重复 3 次。

2.4 统计学处理: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验对数据进行处理。

3 结果

3.1 冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞增殖的影响: MTT 结果表明冬凌草甲素明显抑制 SGC-7901 细胞的增殖, 冬凌草甲素作用于 SGC-7901 细胞的 IC₅₀ 为 15.64 μ mol/L。

3.2 冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞周期的影响: 结果见表 1。0.375、0.75、1.5 μ mol/L 冬凌草甲素作用 SGC-7901 细胞 48 h 后, G₂/M 期的细胞比例明显升高。

表 1 冬凌草甲素对 SGC 7901 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)
Table 1 Effect of oridonin on cell cycle of SGC 7901 cells ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

组别	C/ (μ mol \cdot L ⁻¹)	细胞周期/%		
		G ₁ /G ₀	S	G ₂ /M
阴性对照	-	59.98 \pm 1.05	32.54 \pm 0.59	7.48 \pm 0.46
HCPT	10.00	48.14 \pm 0.71	35.11 \pm 1.96	16.75 \pm 2.47 ^{**}
冬凌草甲素	0.375	55.99 \pm 1.63	30.15 \pm 1.06	13.87 \pm 0.57 ^{**}
	1.75	53.14 \pm 1.10	32.62 \pm 0.49	14.24 \pm 0.62 ^{**}
	1.50	53.16 \pm 1.20	31.84 \pm 1.92	14.98 \pm 0.69 ^{**}

与阴性对照组比较: ** *P* < 0.01

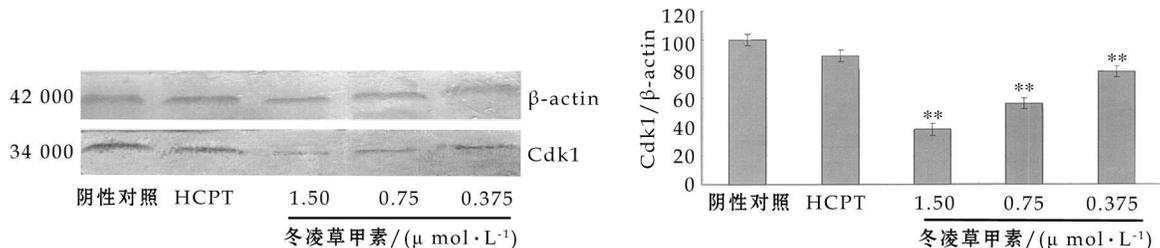
** *P* < 0.01 vs negative control group

3.3 冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞内 Cdk1 蛋白表达的影响: 随着冬凌草甲素浓度的增加, Cdk1 的蛋白表达量逐渐降低, 与阴性对照组比较差异显著 (*P* < 0.01)。结果见图 1。

3.4 冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞内 CyclinB1 蛋白表达的影响: 随着冬凌草甲素浓度的增加, CyclinB1 的蛋白表达量逐渐降低, 与阴性对照组比较差异显著 (*P* < 0.05、0.01)。见图 2。

4 讨论

冬凌草甲素对肿瘤细胞周期的阻断作用, 是其抗肿瘤的重要途径之一, 研究表明冬凌草甲素对 MCF-10A、HepG2、喉癌等细胞具有周期阻滞作用^[9-11]。本研究 MTT 结果显示冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞的 IC₅₀ 是 15.64 μ mol/L, 表明冬凌草甲素对 SGC-7901 细胞增殖有较强的抑制作用。进一步通过流式细胞仪检测分析表明不同浓度的冬凌草甲素作用 SGC-7901 细胞 48 h 后, 各组 G₂/M 期细胞比例随着药物浓度增加而升高。1.5 μ mol/L



与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 图 2 同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs negative control group, Fig. 2 is same

图 1 冬凌草甲素对 SGC 7901 细胞 Cdk1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of oridonin on protein expression of Cdk1 in SGC 7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

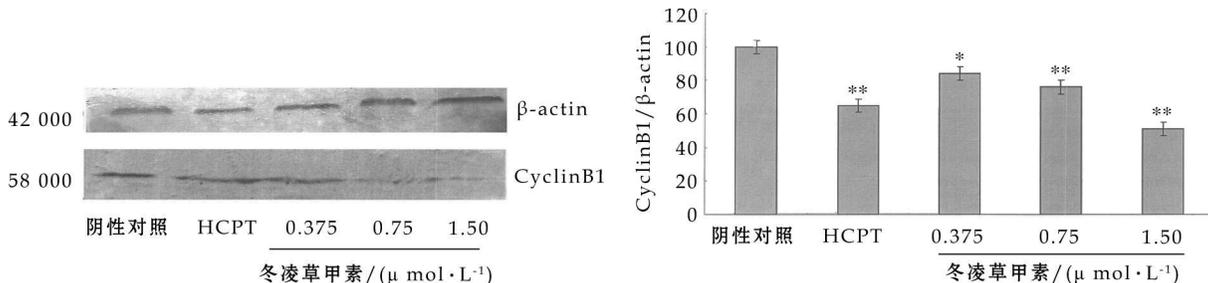


图 2 冬凌草甲素对 SGC 7901 Cyclin B1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of oridonin on protein expression of Cyclin B1 in SGC 7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

冬凌草甲素对 G₂/M 期的细胞影响最大,这说明冬凌草甲素可将 SGC 7901 细胞阻滞于 G₂/M 期。

细胞周期蛋白 (cyclins) 和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶 (CDKs) 是主要的细胞周期调控分子,与 G₂/M 期有关的 cyclins 和 CDKs 分别为 Cyclin B1 和 Cdk1。Cyclin B1 能与 Cdk1 形成细胞促分裂因子,是参与 G₂/M 期转变的调节复合物,是启动有丝分裂的关键因子。本研究采用 Western blotting 法检测 Cyclin B1 和 Cdk1 蛋白表达,发现冬凌草甲素能够显著降低 SGC 7901 细胞中 Cdk1 和 Cyclin B1 蛋白的表达,直接导致 Cyclin B1-Cdk1 复合物的形成显著减少^[12],启动有丝分裂关键因子减少,从而抑制了细胞的有丝分裂,最终导致细胞发生 G₂/M 期阻滞。

综上所述,冬凌草甲素通过下调 SGC-7901 细胞内 Cdk1、Cyclin B1 两种蛋白的表达,阻滞细胞于 G₂/M 期而抑制 SGC-7901 细胞生长。

参考文献:

[1] 王宁, 谢国祥, 史晓浩, 等. 冬凌草甲素的提取工艺研究 [J]. 中草药, 2003, 34(10): 901-902
 [2] 陈莹, 吕惠生, 张敏华. 冬凌草中冬凌草甲素的超临界 CO₂ 萃取工艺研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 232-234
 [3] 车宪平, 韩瑞发, 周晶, 等. 冬凌草甲素诱导膀胱癌 M B49 细胞凋亡及机制研究 [J]. 中草药, 2008, 29(8): 1219-1222

[4] 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.
 [5] Liu J J, Li Q, Pan X L, *et al.* Apoptotic effect of oridonin on NB4 cells and its mechanism [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1188-1192
 [6] 郭萍, 李玉山, 郭远强. 冬凌草化学成分和药理活性研究进展 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(2): 144-147
 [7] 刘净, 梁敬钊, 谢韬. 冬凌草研究进展 [J]. 海峡药学, 2004, 16(2): 1-7.
 [8] Choi S, Lew K L, Xiao H, *et al.* D, L-Sulforaphane induced cell death in human prostate cancer cells is regulated by inhibition of apoptosis family proteins and Apaf 1 [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(1): 151-162
 [9] Hsieh T C, Wijeratne E K, Liang J Y, *et al.* Differential control of growth, cell cycle progression, and expression of NF-κB in human breast cancer cell MCF7, MCF10A and MDA-MB231 by Ponicidin and oridonin, diterpenoid from the Chinese herb Rabdosiarubescens [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(1): 224-231
 [10] Wang H, Ye Y, Chui J H, *et al.* Oridonin induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis through MAPK and p53 signaling pathways in HepG2 cells [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(3): 647-651
 [11] Kang N, Zhang J H, Qiu F, *et al.* Induction of G₂/M phase arrest and apoptosis by oridonin in human laryngeal carcinoma cells [J]. *J Nat Prod*, 2010, 73(6): 1058-1063
 [12] Chen H, Huang Q, Don J, *et al.* Over expression of CDC2/Cyclin B1 in gliomas, and CDC2 depletion inhibits proliferation of human glioma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *BMJ Cancer*, 2008, 8(29): 1-11.