

雷公藤甲素对人胃癌细胞株 SGC-7901 增殖的抑制作用及其机制

肖婧薇^{1,4}, 江振洲^{1,3}, 刘晶¹, 邵婷¹, 王涛¹, 张陆勇^{1,2*}

1. 中国药科大学 江苏省新药筛选中心, 江苏 南京 210009

2. 中国药科大学 江苏省药效研究与评价服务中心, 江苏 南京 210009

3. 中国药科大学 药物质量与安全预警教育部重点实验室, 江苏 南京 210009

4. 广州市药品检验所, 广东 广州 510160

摘要: **目的** 观察雷公藤甲素对激素依赖性人胃癌细胞株 SGC-7901 增殖的抑制作用, 并初步探讨可能的机制。**方法** MTT法检测雷公藤甲素对SGC-7901细胞增殖的抑制作用, 流式细胞仪检测雷公藤甲素对SGC-7901细胞周期的影响, Western blotting 法观察雷公藤甲素对SGC-7901细胞内雌激素受体(ER- α)蛋白表达的影响。**结果** 雷公藤甲素对SGC-7901细胞增殖有显著的抑制作用, 并呈现良好的量-效关系。雷公藤甲素还能有效地使SGC-7901的细胞周期阻滞在S期, 同时明显下调ER- α 蛋白的表达。**结论** 雷公藤甲素能抑制人胃癌细胞SGC-7901增殖并且使细胞周期阻滞在S期, 其对SGC-7901细胞增殖的抑制作用和周期阻滞作用的机制可能与其下调ER- α 的表达有关。

关键词: 雷公藤甲素; 胃癌; SGC-7901细胞; 细胞周期; 雌激素受体(ER) α ; 增殖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)06-1174-03

Inhibition of triptolide on proliferation in human gastric cancer cells line SGC-7901 and its mechanism

XIAO Jing-wei^{1,4}, JIANG Zhen-zhou^{1,3}, LIU Jing¹, TAI Ting¹, WANG Tao², ZHANG Lu-yong^{1,2}

1. Jiangsu Center for Drug Screening, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

2. Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

3. Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

4. Guangzhou Institute For Drug Control, Guangzhou 510160, China

Key words: triptolide; gastric cancer; SGC-7901 cells; cell cycle; ER α ; proliferation

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 系卫矛科雷公藤属木质藤本植物, 化学成分复杂, 其中二萜内酯为主要活性成分; 其药理活性较广泛, 具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤、抗生育等作用^[1-2]。目前其抗肿瘤活性成分较明确且研究最多的为雷公藤甲素(triptolide, 亦称雷公藤内酯)、雷公藤乙素。雷公藤甲素是一种环氧二萜单体成分, 具有很好的抗排异、抗肿瘤、免疫抑制及抗生育作用^[3-5]。为进一步考察雷公藤甲素的抗肿瘤作用, 本实验研究雷公藤甲素对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制作用及其机制。

1 材料与方法

1.1 试药

雷公藤甲素由中国医学科学院皮肤病研究所提供, 质量分数>98%。

1.2 细胞培养

人胃癌细胞株 SGC-7901 购自中国科学院上海细胞生物化学研究所。将 SGC-7901 细胞接种于含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基(pH 7.2~7.4)中, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养, 细胞贴壁生长。每 2~3 天换液 1 次, 3~5 d 用 0.25%胰蛋白酶消化后以 1:2 传代。

1.3 MTT 检测雷公藤甲素对 SGC-7901 细胞增殖的影响

收稿日期: 2010-10-15

基金项目: “十一五”科技重大专项(2009ZX09302-002); 中医药行业科研专项(200707008)

作者简介: 肖婧薇(1985—), 女, 江西吉安人, 硕士, 研究方向为中药毒效关系。Tel: 15920522637 E-mail: 0213rainy@163.com

SGC-7901 细胞经 0.25%胰蛋白酶消化后吹散均匀,接种到 96 孔板,细胞密度为 $5 \times 10^4/\text{mL}$,每孔 180 μL 。培养 24 h 后更换新鲜培养基,加入不同浓度的雷公藤甲素 20 μL 分别培养 24、48、72 h,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL ,继续孵育 4 h 形成甲臜结晶。小心吸弃上清液,每孔加入二甲基亚砜(DMSO) 150 μL ,置摇床上充分溶解甲臜结晶。在 Tecan Safire² 全波长多功能酶标仪上于 490 nm 波长处测定吸光度(A)值。计算细胞存活率。

1.4 流式细胞仪检测雷公藤甲素对 SGC-7901 细胞周期的影响

将 SGC-7901 细胞以 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 接种于 50 cm^2 培养瓶中,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h,更换新鲜培养基,并加入不同浓度(50、70、100 nmol/L)雷公藤甲素,培养 48 h。收集 0.25%胰蛋白酶消化后的细胞于离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,用 PBS 洗两遍,加入 75%乙醇(无水乙醇以 PBS 配制),制成单细胞悬液,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存过夜。离心去除乙醇,PBS 洗两遍,加入含 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI、1 mg/mL RNaseA、0.5% Triton X-100 染液,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、避光孵育 30 min,用流式细胞仪(BDFACSCanto Flow Cytometer)检测细胞周期分布。

1.5 Western blotting 法检测雷公藤甲素对雌激素受体 α (ER- α) 蛋白表达的影响

取细胞核蛋白 40 μg ,加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,煮沸变性 5 min,于 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳(110 V, 1.5 h),然后用电转移膜仪将蛋白转移至硝酸纤维素膜上。硝酸纤维素膜用 5%脱脂奶粉于室温封闭 1 h,分别加入一抗小鼠雌激素受体(ER) α 抗体(1:600)和内参 β -actin 抗体,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,TBS-T 漂洗 3 次,每次 10 min,再加入辣根过氧化物酶标记的抗鼠二抗(1:5 000),室温孵育 1 h,TBS-T 漂洗 4 次,每次 10 min。化学发光试剂盒显色,曝光,对 ER- α 和内参 β -actin 表达情况进行检测。

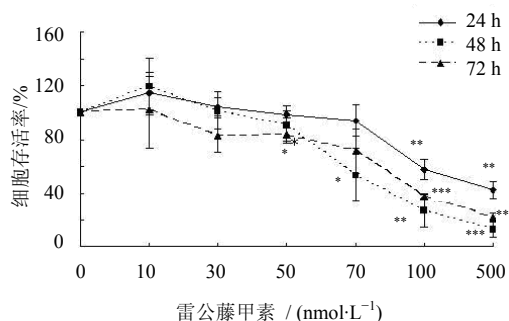
1.6 数据处理及统计方法

各计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,以单因素方差分析和 Dunnett's t 检验进行组间比较。

2 结果

2.1 雷公藤甲素对 SGC-7901 细胞增殖的影响

MTT 检测结果显示,雷公藤甲素对 SGC-7901 细胞具有显著的抑制作用,并呈明显的剂量依赖性。见图 1。



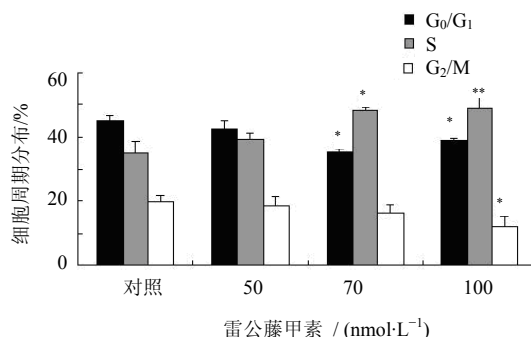
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图 1 雷公藤甲素对 SGC-7901 细胞增殖的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of triptolide on proliferation of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.2 雷公藤甲素对 SGC-7901 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示,雷公藤甲素能有效引起 SGC-7901 细胞周期阻滞在 S 期,并呈剂量依赖性。见图 2。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

图 2 雷公藤甲素对 SGC-7901 细胞周期的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of triptolide on cell cycle of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.3 雷公藤甲素对 ER- α 蛋白表达的影响

Western blotting 法检测结果显示,与对照组对比,雷公藤甲素能明显下调 ER- α 蛋白的表达,且呈明显的剂量依赖性。见图 3。

3 讨论

雷公藤甲素的抗肿瘤作用及其机制研究越来越受到关注^[4, 6-8]。大量的研究资料表明雷公藤甲素是广谱的抗肿瘤药物,对某些肿瘤,如卵巢癌等作用尤其显著。高小平等^[8]对人 5 种组织(乳房、结肠、

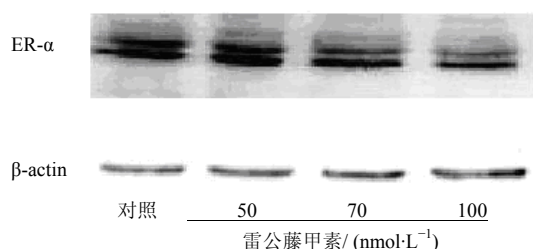


图 3 雷公藤甲素对 SGC-7901 细胞 ER- α 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of triptolide on ER- α protein expression in SGC-7901 cells

黑瘤、卵巢、肾)的 15 个恶性肿瘤细胞系进行研究,以 IC_{50} 为指标测定了雷公藤甲素的体外抗癌活性,结果发现雷公藤甲素对所测肿瘤细胞的生长均有显著的抑制作用,尤其对卵巢癌细胞及乳腺癌细胞的作用明显强于其他 3 种组织来源的肿瘤细胞。雷公藤甲素对人宫颈癌 HeLa 细胞也有杀伤作用。Kiviharju 等^[6]报道雷公藤甲素对人前列腺正常上皮细胞及癌细胞均有剂量依赖性效应。

胃癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一。目前治疗胃癌的主要手段仍以外科手术和化疗为主。20 世纪 80 年代,日本学者首先发现胃癌组织中有雌激素受体表达^[9]。目前许多研究也表明,胃癌组织中有性激素受体,如雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)表达^[10-11],而正常胃黏膜中则未见。杨留才等^[11]的研究结果表明,ER(包括 ER- α 和 ER- β)在人胃癌癌细胞中表达为阳性。在 ER 表达为阳性的胃癌中,雌激素与 ER 相结合,通过多种直接、间接机制增强致癌因素,进而促进肿瘤发展。同时发现,生理剂量雌激素可促进胃癌细胞的生长,而雌激素受体拮抗剂则可抑制肿瘤的生长^[12]。因此,对于激素依赖性胃癌的治疗,目前采用抗雌激素治疗或化疗加内分泌治疗的方法^[13]。

本实验研究了雷公藤甲素对 ER- α 表达阳性的人胃癌细胞株 SGC-7901 的作用。结果表明,雷公藤甲素对 SGC-7901 细胞具有明显的抑制作用,并呈浓度依赖性;同时雷公藤甲素还能引起 SGC-7901 细胞周期阻滞在 S 期;蛋白印迹法表明雷公藤甲素能明显下调 SGC-7901 细胞中雌激素信号转导通路关键蛋白 ER α 的表达。综上所述,雷公藤甲素对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用和细胞周期阻滞作用的机制可能与下调 ER- α 的蛋白表达有关。深入探讨雷公藤甲素对 ER- α 蛋白及其相关通路的

影响,将为研究雷公藤甲素的抗肿瘤作用及其机制提供重要的理论依据和线索。

参考文献

- [1] Brinker A M, Ma J, Lipsky P E, *et al.* Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae) [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68: 732-766.
- [2] 刘为萍, 刘素香, 唐慧珠, 等. 雷公藤研究新进展 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1215-1218.
- [3] Shamon L A, Pezzuto J M, Graves J M, *et al.* Evaluation of mutagenic, cytotoxic, and antitumor potential of triptolide, a highly oxygenated diterpene isolated from *Tripterygium wilfordii* [J]. *Cancer Lett*, 1997, 112: 113-117.
- [4] 吴少辉, 刘光明. 雷公藤内酯的提取、分析和药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2011, 26(1): 36-39.
- [5] 刘媛, 陈燕, 赵菲, 等. 雷公藤内酯醇对多发性骨髓瘤 RPMI 8226 细胞周期及 P21wip1/cip1 和 P27kip1 表达的影响 [J]. 中草药, 2010, 41(11): 1819-1823.
- [6] Kiviharju T M, Lecane P S, Sellers R G, *et al.* Antiproliferative and proapoptotic activities of triptolide (PG490), a natural product entering clinical trials, on primary cultures of human prostatic epithelial cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8: 2666-2674.
- [7] Yang S, Chen J, Guo Z, *et al.* Triptolide inhibits the growth and metastasis of solid tumors [J]. *Mol Cancer Ther*, 2003, 2: 65-72.
- [8] 高小平, 李伯刚. 雷公藤内酯醇体外抗癌作用和诱导细胞凋亡的研究 [J]. 天然产物研究与开发, 1999, 12(1): 18-21.
- [9] Tokunaga A, Nishi K, Matsukura N, *et al.* Estrogen and progesterone receptors in gastric cancer [J]. *Cancer*, 1986, 57(7): 1376-1379.
- [10] 石晓毅, 沈明, 江萍. 胃癌 109 例雌激素受体与孕激素受体的检测研究 [J]. 中国肿瘤临床, 1995, 22(5): 348-350.
- [11] 杨留才, 索艳君. 雌激素受体在胃癌癌细胞株和胃癌高侵袭转移细胞系中的表达 [J]. 山东医药, 2008, 48(45): 16-18.
- [12] 谭端军, 谷志运, 汪鸿志. 雌激素及其受体抑制剂在体外对人胃癌细胞增殖的影响 [J]. 中华肿瘤杂志, 1995, 17(2): 93-96.
- [13] Harrison J D, Morris D C, Ellis I O, *et al.* The effect of tamoxifen and estrogen receptor status on survival in gastric carcinoma [J]. *Cancer*, 1989, 64(5): 1007-1010.