

猕猴桃多糖对前胃癌 MFC 细胞及其原位移植瘤细胞凋亡的影响

申力, 张光霁*, 张广顺, 宋文瑛, 许冠华

浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 探索猕猴桃多糖对前胃癌(MFC)细胞及其原位移植瘤细胞凋亡的分子机制。方法 采用MTT法检测猕猴桃多糖对MFC细胞增殖抑制率, Western blotting法检测MFC细胞Mcl-1、Bcl-2、Bak和Bcl-xl蛋白的表达; OB吻合胶粘贴法建立胃癌原位移植瘤模型, 采用TUNEL法检测肿瘤组织中细胞凋亡情况, 免疫组织化学方法检测Bcl-2、Bax的表达情况。结果 MTT实验表明随着猕猴桃多糖质量浓度的增加对MFC细胞增殖的抑制作用增强, 且随着作用时间的延长, 其抑制作用增强; Western blotting实验表明猕猴桃多糖作用于MFC细胞24 h下调Mcl-1、Bcl-2、Bcl-xl蛋白的表达, 上调Bak蛋白的表达; 体内实验表明: 与模型组比较, 猕猴桃多糖中、高剂量组及5-氟尿嘧啶(5-Fu)阳性对照组中TUNEL检测细胞凋亡的平均阳性指数明显升高($P < 0.01$); 各给药组均能够显著下调Bcl-2的表达、上调Bax的表达($P < 0.01$)。结论 猕猴桃多糖能够诱导胃癌MFC细胞凋亡, 下调MFC细胞Mcl-1、Bcl-2、Bcl-xl蛋白和上调Bax、Bak蛋白表达, 提示猕猴桃多糖的抗肿瘤机制与其通过Bcl-2家族蛋白所参与的细胞凋亡途径有关。

关键词: 猕猴桃多糖; 胃癌; 原位移植瘤; MFC; 细胞凋亡

中图分类号: R286.91 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)05-0673-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.05.015

Effect of *Actinidia chinensis* polysaccharide on apoptosis of MFC and their orthotopic transplanted tumor of gastric cancer

SHEN Li, ZHANG Guang-ji, ZHANG Guang-shun, SONG Wen-ying, XU Guan-hua

Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: Objective To explore the effect of *Actinidia chinensis* polysaccharide (ACP) on apoptosis of MFC cells and their orthotopic transplanted tumor of gastric cancer and the molecular mechanism. **Methods** MTT method was used to detect the inhibitory rate of ACP on MFC cell proliferation and the expression of Mcl-1, Bcl-2, Bak, and Bcl-xl protein was detected by Western blotting; The model of orthotopic transplanted tumor of gastric cancer was established with OB anastomosis adhesive stick method; Cell apoptosis in tumor tissue was detected by TUNEL method; The expression of Bcl-2 and Bax was detected by immunohistochemistry method. **Results** MTT results showed that with the increasing of ACP concentration, the inhibition of ACP on MFC cell proliferation became stronger and with the prolongation of time, the inhibition was increasing. Western blotting showed that ACP would downregulate the expression of Mcl-1, Bcl-2, and Bcl-xl protein and upregulate the expression of Bak protein when the MFC cells were treated for 24 h by ACP. The animal experiment showed that compared with the model group, the average positive indexes of ACP in mid- and high-dose ACP and 5-FU positive control groups in the detection of apoptosis by TUNEL were significantly increased ($P < 0.01$); Meanwhile, in all ACP groups the expression of Bcl-2 could be reduced and the expression of Bax was upregulated significantly ($P < 0.01$). **Conclusion** ACP could induce apoptosis of gastric cancer cells, downregulate the expression of Mcl-1, Bcl-2, and Bcl-xl protein, and upregulate the expression of Bak and Bax protein, prompting that the antitumor mechanism of ACP is related with the apoptosis pathway in which the Bcl-2 family proteins are involved.

Key words: *Actinidia chinensis* polysaccharide; gastric cancer; orthotopic transplanted tumor; MFC; apoptosis

胃癌是世界上第2大常见的癌症, 全世界每年约有70万人死于胃癌^[1]。我国是胃癌高发区, 每年新发现的胃癌患者, 占世界发病人数的42%^[2]。但

常用的联合化疗方案如5-氟尿嘧啶(5-Fu)+阿霉素+丝裂霉素、足叶乙苷+阿霉素+顺铂、5-氟尿嘧啶+顺铂的总体反应率也只有44%~49%^[3], 人

收稿日期: 2013-09-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273904); 浙江省自然科学基金资助项目(Y2100827); 浙江中医药大学校级重点课题资助项目(2010ZZ10)

作者简介: 申力(1978—), 女, 天津人, 讲师, 硕士研究生, 研究方向为中医药抗肿瘤研究。

Tel: 15858256870 Fax: (0571)86613586 E-mail: shenli1116@126.com

*通信作者 张光霁 Tel: (0571) 86633168 E-mail: zgj@zjtcn.net

们期待着更好的方法来治疗胃癌。中医中药是我国独具特色的宝贵资源,在寻找抗肿瘤药物方面有独特的优势。猕猴桃根为猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch. 的根或根皮,又称藤梨根,是临床用于抗肿瘤的常用中药之一,近年来研究表明猕猴桃多糖 (*Actinidia chinensis* polysaccharide, ACP) 具有显著的抗肿瘤作用^[4-5]。本实验在以往研究的基础上,进一步探讨猕猴桃多糖对前胃癌 MFC 细胞及其原位移植瘤细胞凋亡的影响,为其临床应用提供参考。

1 材料

1.1 药品与试剂

猕猴桃多糖 (15 mg/mL, 多糖质量分数 $\geq 80\%$), 由浙江中医药大学药学院提供; 5-氟尿嘧啶注射液 (5-Fu, 10 mL, 0.25 g) 购自天津金耀氨基酸有限公司 (批号 1205301)。

OB 吻合胶, 购自广州白云医用胶有限公司; 多克隆兔一抗 Bcl-2、Bax 均购自 Santa Cruz 公司; TUNEL 检测试剂盒购自美国 Roche 公司; 一抗 Mcl-1、Bcl-2、Bak 和 Bcl-xl 均购自 CST 公司。

1.2 动物及细胞

615 近交系小鼠, SPF 级, 雄性, 6~7 周龄, 体质量 (20 \pm 2) g, 购于中国医学科学院血液学研究所实验动物中心, 动物合格证号 SCXR (津) 2009-0002。小鼠饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心 SPF 级小鼠饲养室; 小鼠前胃癌 MFC 细胞株购自中国科学院细胞库。

1.3 仪器

STP120 脱水机/AP280—2 包埋机/HM335E 切片机, Microm 公司; Nikon eclipse 80i 显微镜, Nikon 公司; Carl Zeiss 成像系统, Carl Zeiss 公司; 微波炉, Galanz 公司; DRP—9052 型电热恒温箱, 上海森信实验仪器有限公司; CO₂ 细胞培养箱, Thermo 公司; 超净工作台, 苏州精华设备公司; 多功能全波长酶标仪, Thermo 公司; 蛋白印记检测系统, Bio-Rad 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

MFC 细胞复苏后以 2×10^6 /mL 密度接种于 25 cm² 细胞培养瓶中, 加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 细胞在 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 隔天换液, 待细胞生长至 80%~90% 时用 0.1% 胰酶消化并传代, 选取对数生长期 MFC 细胞用于实验。

2.2 MTT 法检测 MFC 细胞增殖

取对数生长期 MFC 细胞, 消化计数后, 按 $6 \times$

$10^3 \sim 9 \times 10^3$ 个/孔 (100 μ L) 接种于 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h 待细胞贴壁后, 用不同质量浓度 (0.125~1.000 mg/mL) 的猕猴桃多糖处理, 每孔设 3 个复孔。用 MTT 法分别检测药物与肿瘤细胞作用 24、48、72 h 后的吸光度 (*A*) 值, 各平行孔的 *A* 值取平均数, 将各测试孔的 *A* 值减去本底 *A* 值。计算肿瘤细胞的抑制率。

$$\text{抑制率} = 1 - \text{给药组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}$$

2.3 Western blotting 法检测 MFC 细胞 Mcl-1、Bcl-2、Bak 和 Bcl-xl 蛋白的表达

用不同质量浓度 (0~2.5 mg/mL) 猕猴桃多糖作用于 MFC 细胞 24 h 后, 收集 MFC 细胞, 加入细胞裂解液, 冰上放置 30 min, 每 10 分钟振荡 1 次, 13 300 r/min 离心 15 min, 取上清, 以 BSA 法作蛋白定量后置 -30 °C 贮存备用。灌制 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶, 常规电泳, 转膜, 封闭, 一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, 二抗 (1:1 000), 室温孵育 2 h, ECL 显色。 β -actin 检测作为内对照, 进行细胞间蛋白表达的比较。

2.4 OB 吻合胶粘贴法制备胃癌原位移植瘤模型^[6]

首先制备胃癌皮下移植瘤模型: 待肿瘤长至直径约为 1 cm 时处死荷瘤小鼠, 作为原位移植用瘤源; 再制备原位移植瘤模型: 将瘤源剪成约 1 mm³ 的小瘤块, 手术植入小鼠胃组织, OB 胶凝固胃复位, 然后分层关腹。逐日观察, 以出现可触及的包块为成瘤标志。

2.5 分组与给药

术后第 4 天, 将 40 只 615 小鼠随机分为 5 组, 每组 8 只。设为猕猴桃多糖低、中、高剂量 (50、100、200 mg/kg) 组、5-Fu 阳性对照组 (20 mg/kg) 和模型组 (等体积的生理盐水)。各组 ip 给药, 且注射量均用生理盐水调节至相同体积, 猕猴桃多糖各组及模型组连续每天给药, 5-Fu 阳性对照组隔日给药 1 次, 共给药 9 d。

2.6 标本制备

停药后第 2 天脱臼处死小鼠, 分离出肿瘤组织及脾脏组织, 并称质量, 计算抑瘤率和脾指数。而后保存于福尔马林中, 制备石蜡切片。

2.7 TUNEL 检测细胞凋亡

组织切片经脱蜡至水, 转移至装有柠檬酸盐缓冲液 (pH 6.0) 的器皿中, 将器皿放于微波炉中, 350 W 照射 5 min; 迅速冷却, PBS 漂洗 2 次; 浸于 0.1 mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.5, 含 3% 牛血清蛋

白和30%牛血清)中,室温反应30 min, PBS漂洗2次;玻片干后,加50 μL TUNEL反应混合液(阴性对照组仅加50 μL 荧光素标记的dUTP液)于标本上,在37 °C湿盒中避光反应1 h, PBS漂洗3次;玻片干后加50 μL converter-POD于标本上,在37 °C湿盒中避光反应30 min, PBS漂洗3次;在组织处加50~100 μL DAB底物,室温反应5~10 min,经复染、脱水、封片;显微镜拍照。

2.8 免疫组化法检测 Bcl-2、Bax 的表达

切片置60 °C烤箱烘烤2 h;脱蜡至水;蒸馏水洗2 min;高压热修复2 min;自来水冷却;3% H₂O₂溶液阻断过氧化物酶10 min; PBS洗5 min×3次;分别滴加一抗(阴性对照以 PBS 代替),37 °C孵育60 min, PBS洗5 min×3次;滴加二抗,37 °C孵育60 min, PBS洗5 min×3次;DAB显色5~10 min;苏木素复染;脱水、透明、封片;显微镜拍照。

2.9 图像分析与指标评价

显微镜下每张切片随机选择3~5个高倍视野拍摄照片,进行图像分析,计算每张照片阳性指数(总A值/1 228 800),取平均值,以此评价切片所对应的组织中待检测指标表达的阳性程度。用DAB显色的免疫组化切片阳性区域为棕黄色,照片显色的棕黄色程度越大,阳性指数值越大。

2.10 统计学处理

所得数据采用SPSS 16.0统计软件进行处理。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,进行单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 MFC 细胞增殖的影响

不同质量浓度的猕猴桃多糖作用于 MFC 细胞后,随着猕猴桃多糖质量浓度的增加对 MFC 细胞增殖的抑制作用增强,且随着作用时间的延长,其抑制作用增强。结果见图1。

3.2 对 MFC 细胞 Mcl-1、Bcl-2、Bak 和 Bcl-xl 蛋白表达的影响

猕猴桃多糖作用于 MFC 细胞24 h,下调 Mcl-1、Bcl-2、Bcl-xl 蛋白表达,上调 Bak 蛋白表达。结果见图2。

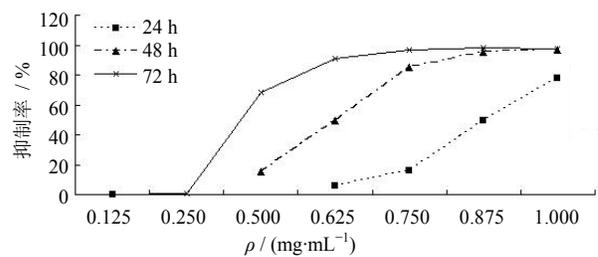


图1 猕猴桃多糖对 MFC 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of ACP on MFC cell proliferation

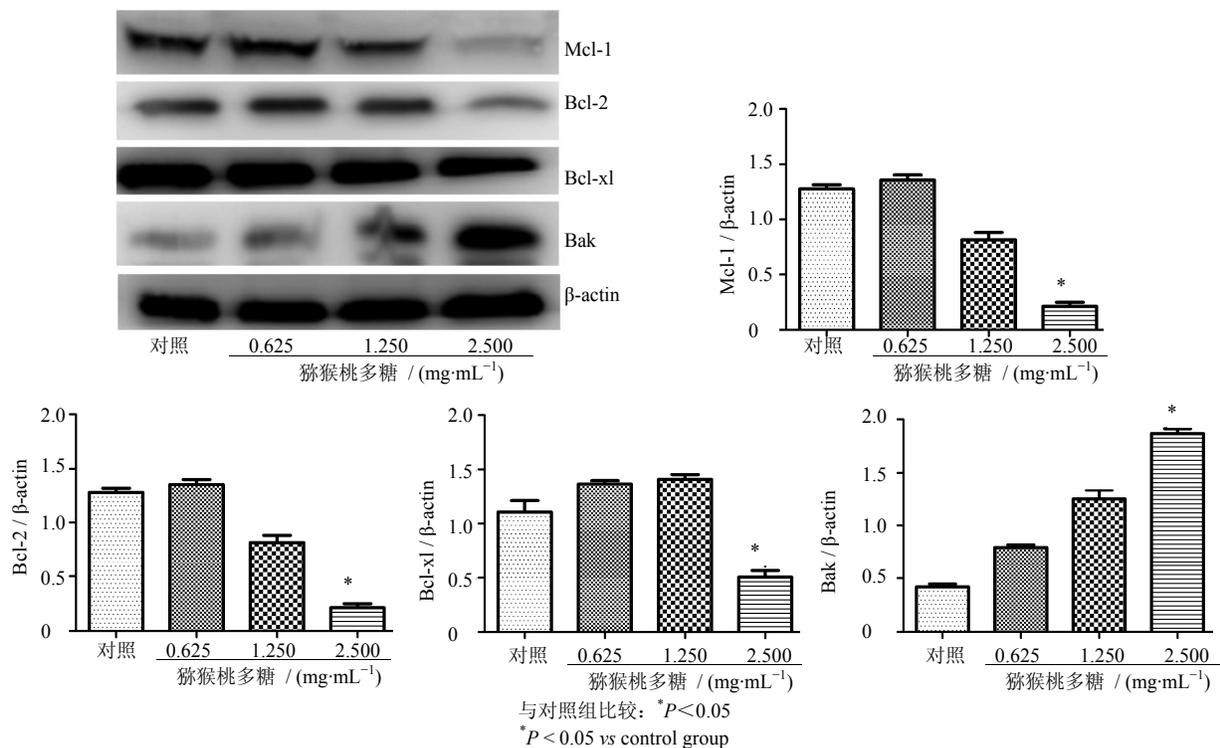


图2 猕猴桃多糖对 MFC 细胞 Mcl-1、Bcl-2、Bak 和 Bcl-xl 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of ACP on expression of Mcl-1, Bcl-2, Bak, and Bcl-xl protein ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 对移植瘤小鼠肿瘤质量及脾指数的影响

与模型组比较,各给药组小鼠瘤质量均显著降低 ($P < 0.01$)。与 5-Fu 阳性组比较,猕猴桃多糖中、高剂量组的抑瘤率有统计学差异 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较,5-Fu 阳性组、猕猴桃多糖低剂量组的脾指数无显著差异 ($P > 0.05$); 而猕猴桃多糖中、高剂量组小鼠脾指数显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结果见表 1。

3.4 TUNEL 检测结果

与模型组比较,猕猴桃多糖中、高剂量组及 5-Fu 阳性组中 TUNEL 检测细胞凋亡的平均阳性指数明显升高,具有显著性差异 ($P < 0.01$); 而猕猴桃多糖低剂量组相应的平均阳性指数无统计学差异 ($P > 0.05$)。结果见图 3 和表 2。

3.5 对肿瘤组织 Bcl-2、Bax 表达的影响

与模型组比较,各给药组均能够显著下调 Bcl-2

的表达 ($P < 0.01$)、上调 Bax 的表达 ($P < 0.01$)。见图 4、5 和表 2。

表 1 猕猴桃多糖对移植瘤小鼠肿瘤质量和脾指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of ACP on tumor weight and spleen index of mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	抑瘤率 / %	脾指数
模型	—	—	5.05 ± 1.95
猕猴桃多糖	50	45.44	5.96 ± 1.87
	100	58.66 [#]	7.50 ± 2.05 ^{*#}
	200	64.13 ^{##}	9.85 ± 2.20 ^{**##}
5-Fu	20	48.80	4.90 ± 1.22

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与 5-Fu 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs 5-Fu group

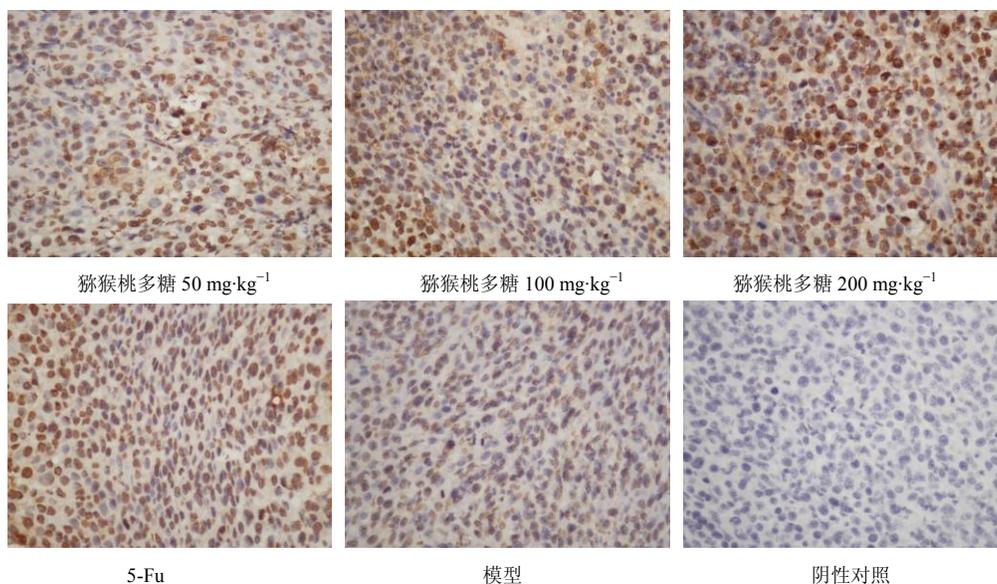


图 3 TUNEL 检测肿瘤组织中 MFC 细胞凋亡

Fig. 3 MFC cell apoptosis in tumor tissue by TUNEL

表 2 猕猴桃多糖对移植瘤小鼠肿瘤组织细胞凋亡和 Bcl-2、Bax 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effects of ACP on tumor cell apoptosis and expression of Bcl-2 and Bax in mice with transplanted tumor ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	TUNEL 阳性指数	Bcl-2 ($\times 10^{-2}$)	Bax ($\times 10^{-2}$)
模型	—	0.033 4 ± 0.004 8	8.85 ± 0.82	4.24 ± 0.14
猕猴桃多糖	50	0.034 8 ± 0.004 6	6.52 ± 0.67 ^{**}	6.21 ± 0.22 ^{**}
	100	0.040 5 ± 0.004 4 ^{**}	5.31 ± 0.68 ^{**}	6.56 ± 0.10 ^{**}
	200	0.050 0 ± 0.005 1 ^{**}	4.19 ± 0.72 ^{**}	8.06 ± 0.10 ^{**}
5-Fu	20	0.047 0 ± 0.003 9 ^{**}	4.23 ± 0.63 ^{**}	6.89 ± 0.23 ^{**}

与模型组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs model group

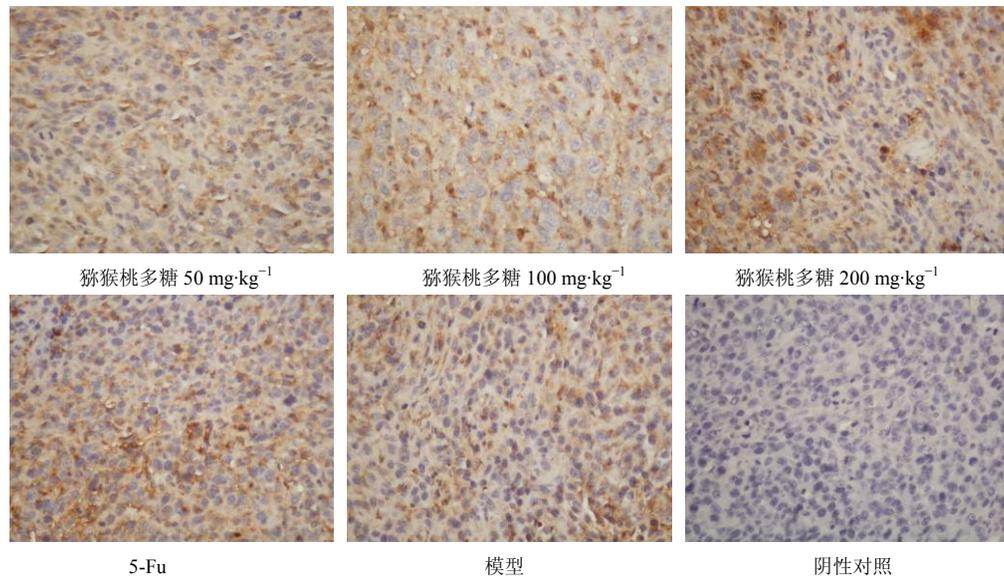


图 4 Bax 蛋白表达

Fig. 4 Expression of Bax protein

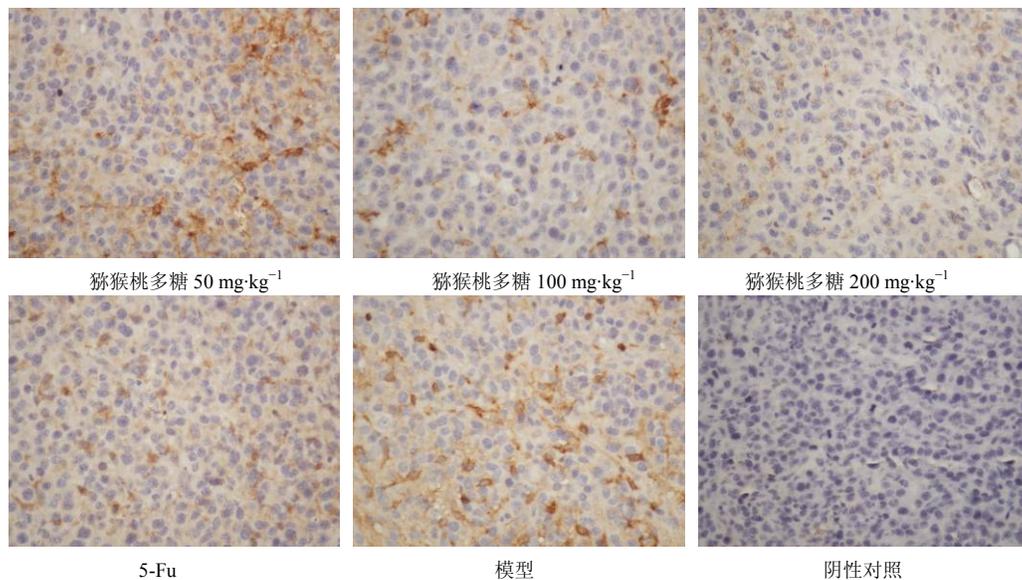


图 5 Bcl-2 蛋白表达

Fig. 5 Expression of Bcl-2 protein

4 讨论

细胞凋亡又称为程序性细胞死亡,是普遍存在于多细胞生物体内的在基因调控下的一种自发、主动的细胞死亡过程,是维持正常新陈代谢的主要机制^[7]。本实验研究发现:体外实验 MTT 中不同质量浓度的猕猴桃多糖作用于 MFC 细胞后,随着猕猴桃多糖质量浓度的增加对 MFC 细胞增殖的抑制作用增强,且随着作用时间的延长,其抑制作用增强;体内实验 TUNEL 法表明猕猴桃多糖中、高剂量组及 5-Fu 阳性对照组均可以不同程度促进肿瘤细胞的凋亡,且猕猴桃多糖质量浓度增加,其促进胃癌

细胞凋亡的作用越强。

Bcl-2 家族蛋白位于线粒体的上游,对线粒体诱导的细胞凋亡具有重要的调节作用^[8],其包括抗凋亡的 Bcl-2、Bcl-x1、Mcl-1 等亚家族和促凋亡的 Bax、Bak 等亚家族,该家族是细胞凋亡各种信号转导途径的一个共同通路和交汇点。

Bcl-2 是一种抑制细胞凋亡的线粒体膜蛋白,对凋亡具有直接调节作用,其在细胞内表达增强可以抑制或防止多种因素或因子诱发的细胞凋亡,是许多生理或病理凋亡的关键性调节因子^[9]。Bcl-x1 能抑制线粒体膜通透性运转孔的开放,阻止细胞色素

C 和凋亡诱导因子的释放;可与 Bax 形成异二聚体,抑制 Bax 的促凋亡作用,最终抑制细胞凋亡^[10]。Mcl-1 功能主要是参与维持细胞线粒体膜的稳定,抑制细胞色素 C 的释放,从而促进细胞的生存,阻止细胞凋亡的发生^[11]。

Bax 是最早发现的促凋亡因子,在正常细胞中主要定位于细胞浆^[12]。Bak 是迄今发现的仅有的一个定位于线粒体的促凋亡蛋白质成员,细胞受到凋亡刺激后, Bak 发生构象变化,与 Bcl-x1 分离,与裂解激活的 Bid 结合,进而形成细胞色素 C 的输出通道,从而引起细胞凋亡^[13]。

本研究结果显示,猕猴桃多糖作用于 MFC 细胞 24 h 可下调 Mcl-1、Bcl-2、Bcl-x1 蛋白的表达,上调 Bak 蛋白水平的表达;猕猴桃多糖各剂量组及 5-Fu 阳性对照组均能够下调肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白的表达,上调 Bax 蛋白的表达;提示猕猴桃多糖的抗肿瘤机制与其通过 Bcl-2 家族蛋白所参与的细胞凋亡途径有关。

综上所述,本实验在以往研究的基础上,进一步证实了猕猴桃多糖的抗肿瘤作用,部分阐述了其诱导细胞凋亡可能的作用机制,为猕猴桃多糖的进一步开发研究提供重要的实验依据。

参考文献

- [1] Ismail G, Baris D, Mesut T. Gastric carcinogenesis [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(37): 5164-5170.
- [2] 王 婧, 田劭丹, 陈信义. 中医药治疗中晚期胃癌进展 [J]. *世界中西医结合杂志*, 2009, 4(8): 596-600.
- [3] Kubota T, Weisenthal L. Chemotherapy sensitivity and resistance testing: to be "standard" or to be individualized, that is the question [J]. *Gastric Cancer*, 2006, 9(2): 82-87.
- [4] 石森林, 潘国风, 张晓东, 等. 中华猕猴桃多糖对小鼠皮下移植瘤 B16 抑制的机制研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2009, 24(6): 777-779.
- [5] 张光霁, 韩江余. 猕猴桃根多糖对 S180 荷瘤小鼠 PCNA 表达的影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2010, 28(8): 1659-1660.
- [6] 张光霁, 申 力, 张广顺, 等. 猕猴桃多糖对 615 小鼠胃癌原位移植瘤 PCNA、p53 表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(9): 2538-2541.
- [7] Nbier P, Finch A, Evan G, *et al.* Apoptosis indevelopment [J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 796-801.
- [8] Shimizu S, Ide T, Yanagida T, *et al.* Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage dependent anionchannel that is permeable to cytochrome [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(16): 12321-12325.
- [9] 喻 玲, 彭 梅, 丁依玲. Fas、Bcl-2 蛋白在胎盘组织中的表达及其与子痫前期、子痫的相关性研究 [J]. *中华中医学杂志*, 2007, 31(6): 429-430.
- [10] Kang M H, Reynolds C P. Bcl-2inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(4): 1126-1132.
- [11] Mills J, Hippo Y, Robert F, *et al.* mTORC1 promotes survival through translational control of Mcl-1 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(31): 10853-10858.
- [12] Gogvadze V, Robertson J D, Enoksson M, *et al.* Mitochondrial cytochrome c release may occur by volume-dependent mechanisms not involving permeability transition [J]. *Biochem J*, 2004, 378(1): 213-217.
- [13] Krauskopf A, Eriksson O, Craigen W J, *et al.* Properties of the permeability transition in VDAC1 (-/-) mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1757(5/6): 590-595.