

松萝烟酰胺对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡、细胞周期及迁移的影响

尤雨桐¹, 贺小琼^{1*}, 陆 地², 连文静¹, 屈倩倩³, 段 灵¹, 周樟屏¹

1. 昆明医科大学公共卫生学院, 云南 昆明 650500

2. 云南昆明医科大学 生物医学工程中心, 云南 昆明 650500

3. 昆明医科大学附属口腔医院, 云南 昆明 650500

摘 要: **目的** 探讨松萝烟酰胺对胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用及机制。**方法** 体外培养 SGC-7901 细胞, 分为对照组和不同浓度的松萝烟酰胺实验组, 显微镜观察各组细胞形态; MTT 法测定 SGC-7901 细胞增殖; AnnexinV/PI 双染和 DAPI 荧光染色检测细胞凋亡; 流式细胞术检测细胞周期; 细胞划痕实验检测细胞的迁移。**结果** 松萝烟酰胺处理 SGC-7901 细胞后, 细胞发生皱缩、变形, 贴壁细胞脱落; MTT 结果显示, 松萝烟酰胺对 SGC-7901 增殖抑制作用呈明显的浓度依赖性和时间依赖性; AnnexinV/PI 双染结果显示, 松萝烟酰胺使 SGC-7901 细胞的晚期凋亡率增加, 且 DAPI 染色可观察到明显的细胞凋亡的核浓缩、核碎裂; 流式结果显示, 松萝烟酰胺使 SGC-7901 细胞周期停滞在 S 期; 划痕实验显示, 随着时间的延长、浓度的增加, 松萝烟酰胺使 SGC-7901 细胞迁移率下降越明显。**结论** 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞具有增殖抑制作用, 其作用机制可能是通过诱导细胞凋亡、阻滞细胞于 S 期, 从而抑制细胞的迁移。

关键词: 松萝烟酰胺; 胃癌 SGC-7901 细胞; 增殖; 细胞凋亡; 细胞周期; 细胞划痕实验

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)04-1024-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.04.028

Effects of usnicoyinamide on proliferation, apoptosis, cell cycle, and migration of SGC-7901 gastric cancer cells

YOU Yu-tong¹, HE Xiao-qiong¹, LU Di², LIAN Wen-jing¹, QU Qian-qian³, DUAN Ling¹, ZHOU Zhang-ping¹

1. School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

2. Biomedical Engineering Center of Kunming Medical University, Kunming 650500, China

3. School of Stomatology, Kunming Medical University, Kunming 650500, China

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of usnicoyinamide on the proliferation of gastric cancer cell line SGC-7901 and its mechanism. **Methods** SGC-7901 cells were cultured *in vitro* and divided into two groups: control group and experimental group with different concentrations of usnicoyinamide. The morphology of each group of cells was observed by a microscope; Proliferation of SGC-7901 cells was measured by MTT assay; The mechanism of apoptosis was studied by AnnexinV/PI double staining and DAPI fluorescence staining; Flow cytometry was used to detect the effect of usnicoyinamide on the cell cycle; Effect of usnicoyinamide on invasion and migration of SGC-7901 cells was detected by cell scratch test. **Results** After SGC-7901 cells were treated with usnicoyinamide, the cells were wrinkled, deformed and adherent cells fell off; The results of MTT showed that the inhibition of the proliferation of SGC-7901 cells was a significant dose-effect relationship and time-dependent; The results of AnnexinV/PI double staining showed that nicotine increased the late apoptosis rate of SGC-7901 cells, and DAPI staining showed obvious nuclear concentration and nuclear fragmentation of apoptosis. The results of flow cytometry showed that the cell cycle of SGC-7901 cells stagnated in S phase; Scratch test showed that the mobility of SGC-7901 cells was decreased more obviously with the prolongation of time and the increase of concentration. **Conclusion** Usnicoyinamide can inhibit the proliferation of gastric cancer cell line SGC-7901, and its mechanism may be achieved by inducing late apoptosis, inducing S phase cell arrest and inhibiting the invasion and migration of SGC-7901 cells.

Key words: usnicoyinamide; SGC-7901 gastric cancer cells; proliferation; apoptosis; cell cycle; cell wound scratch assay

收稿日期: 2019-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81760538); 云南省科技厅科技计划项目(2018FE001); 昆明医科大学重大成果培育项目(CGPY201603)

作者简介: 尤雨桐(1993—), 女, 山东淄博人, 研究生在读, 从事抗肿瘤药物研发和作用机制研究。Tel: 18987495400 E-mail: 2364195925@qq.com

***通信作者** 贺小琼, 男, 教授, 硕士生导师, 从事天然产物活性成分与抗肿瘤药物研发。Tel: 13759589108 E-mail: hexqcn@aliyun.com

近年来,胃癌的发病率呈逐年上升趋势^[1]。我国胃癌新发病例数约占全球总数的 46.8%,而死亡人数占全球胃癌死亡总数的 47.8%^[1],死亡率在我国高发消化系统肿瘤中占第 1 位,已成为严重威胁我国人民健康的癌症。目前,胃癌确诊时通常已为晚期,治疗手段有限,常以手术结合放化疗为主,但疗效和预后差^[2],临床上迫切需要开发一种疗效好且副作用小的治疗方法^[3]。其中,寻找新型抗胃癌药物已经成为当前胃癌治疗的主要研究方向之一。天然药用植物中存在许多毒副作用小、靶向性强的具有抗癌作用的活性物质^[4],常采用与化疗药物联用的治疗方法^[5]。本课题组前期研究表明,松萝 *Usneae Filum* 中存在多种抗癌活性物质^[6-14],其中,天然活性化合物奥科呋喃($C_{18}H_{17}NO_6$)是首次在松萝中提取出的具有较强抗癌作用的新物质^[15-16]。为完善知识产权保护,发现具有抗癌活性的衍生产物,以及解决其水溶性差^[17]的问题,本课题组对奥科呋喃进行了结构修饰改造,得到松萝烟酰胺,并对其进行抗癌活性研究。

松萝烟酰胺,分子式为 $C_{24}H_{20}N_2O_7$,相对分子质量为 448,是奥科呋喃与烟酸酰化反应形成的产物,为新结构的活性化合物。松萝烟酰胺的抗肿瘤作用及其机制尚不清楚。因此,本研究通过体外抗癌实验和侵袭迁移实验进行抗癌活性评价,同时通过细胞凋亡、周期检测进行抗癌机制探讨,为松萝烟酰胺的开发利用提供研究资料。

1 材料

1.1 细胞

胃癌 SGC-7901 细胞由云南省肿瘤研究所提供。

1.2 药物与试剂

松萝烟酰胺由本课题组实验室合成,化学结构见图 1。反应底物是奥科呋喃和烟酸,通过柱色谱、高相液相色谱等药物分离方法,得到质量分数为 99.8% 的松萝烟酰胺,室温保存。使用前用 DMSO 溶解。

DMEM/F12 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)购自 Hyclone 公司;青霉素、链霉素购自哈尔滨制药总厂;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自北方同正生物制品公司;Annexin V FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒购于上海七海复泰生物科技有限公司;CyStain DNA 1 step 购于德国 Sysmex 公司;二甲基亚砜(DMSO)、DAPI 溶液、抗荧光衰减封片剂均购于北京索莱宝科技有限公司;爬片购于无锡耐思生物科技有限公司。

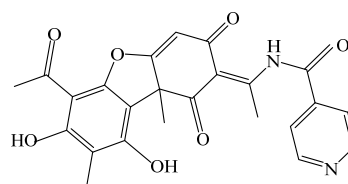


图 1 松萝烟酰胺的化学结构

Fig. 1 Structure of usnicoyinamide

1.3 仪器

旋转蒸发器(上海科捷分析仪器有限公司);超声破碎仪(美国 Sonics 公司);超净工作台(上海博迅实业有限公司);二氧化碳培养箱、高速低温离心机(Thermo 公司);倒置显微镜(Olympas 公司);Spectrum 酶标仪(Thermo Fisher 公司);超高速流式细胞仪(德国 Partec GmbH 公司);荧光显微镜(德国卡尔蔡司公司);恒温搅拌循环水浴锅(常州国华电器有限公司)。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞增殖

将对数生长期的 SGC-7901 细胞用完全培养液(DMEM/F12 培养基+10%胎牛血清+1%青链霉素)调整密度为 7×10^4 个/mL,以每孔 100 μ L 细胞悬液接种于 96 孔培养板,放置于 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 的培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁生长融合至 80%~90%时,加入不同浓度(0.625、1.25、2.5、5、10 μ mol/L)的松萝烟酰胺完全培养液进行干预,每孔 200 μ L,同时设置空白组(无细胞)、对照组(DMSO)、阳性对照组(顺铂),每组设 6 个复孔。培养 72 h 后,弃培养液,每孔中加 200 μ L 含 10% MTT (5 μ mol/L)继续孵育 4 h。吸尽孔内培养液,每孔加 150 μ L DMSO,避光振荡 10 min 后,用酶标仪检测在 490 nm 波长处检测其吸光度(A)值。根据公式计算细胞增殖抑制率,使用 Graphpad 计算半数抑制浓度(IC_{50})。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 MTT 法检测松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞作用的时效关系

取状态良好、处于对数生长期的 SGC-7901 细胞,经计数后,按 7×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔板中,培养 24 h 后,弃培养液,加入浓度为 0.625、1.25、2.5、5、10 μ mol/L 的松萝烟酰胺完全培养液,同时设置对照组(DMSO),每组设 6 个复孔。分别在 5% CO_2 、37 $^{\circ}C$ 培养箱培养 24、48、72 h 之后,按“2.1”项下方法进行 MTT 检测,计算细胞增殖抑制率。并在显微镜观察 2.5、5、10 μ mol/L 组细胞

形态并拍照。

2.3 Annexin V FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

取对数生长期的 SGC-7901 细胞, 用完全培养液重悬后, 以 6×10^5 个/mL 密度接种于 25 cm^2 培养瓶中, 继续培养 24 h 后吸弃原培养液, 分别加入 1.25、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$ 的松萝烟酰胺完全培养液, 同时设置对照组。继续培养 48 h 后, 收集各组细胞, 用预冷的 PBS 重悬洗涤, 计数细胞不少于 1×10^6 个, $500 \times g$ 离心 5 min, 弃上清收集细胞。严格按照 Annexin V FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒操作, 加入 5 μL FITC 混匀室温避光孵育 15 min 后, 加入 10 μL PI 混匀, 冰浴避光孵育 5 min 后, 用流式细胞仪进行检测分析。

细胞凋亡率 = 早期细胞凋亡率 + 晚期细胞凋亡率

2.4 DAPI 荧光染色法检测细胞凋亡

无菌直径 14 mm 的爬片置于 24 孔板中, 取对数生长的 SGC-7901 细胞, 调整密度为 5×10^4 个/mL, 每孔 500 μL , 置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱培养 24 h 后, 更换加入松萝烟酰胺的完全培养液, 使其终浓度分别为 1.25、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$, 每组设置 2 个复孔。继续培养 48 h 后弃培养液, 以 4% 多聚甲醛固定爬片 20 min, 经磷酸缓冲液 (PBS) 漂洗 3 次, 每次 3 min, 以质量浓度 10 $\mu\text{g/mL}$ 的 DAPI 避光染色 10 min, PBS 漂洗 2 次后取出爬片放于载玻片上, 加一滴抗荧光淬灭剂, 于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.5 流式细胞术检测细胞周期

约 6×10^5 个/mL 的 SGC-7901 细胞接种于 25 cm^2 培养瓶中, 培养 24 h 后, 分别用终浓度为 2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的松萝烟酰胺作用 48 h 后, 将各组细胞用胰酶消化并离心, 16 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 同时设置对照组。用 PBS 重悬后离心, 弃上清, 收集细胞。每个样品加入 1 mL 预冷的 CyStain DNA 1 step 溶液, 混匀, 室温避光孵育 10 min。上

流式细胞仪检测, 结果用 FlowJo 软件进行分析计算 G_1 期、S 期和 G_2 期细胞百分率。

2.6 细胞划痕法检测松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞迁移的影响

取对数生长期的 SGC-7901 细胞, 按 2×10^5 个/L 密度、每孔 500 μL 接种在 6 孔板中, 培养 24 h。当细胞融合到 90% 左右时, 用 200 μL 的枪头划破单层细胞, 在孔中划“井”字, 吸出培养基, 用 PBS 冲洗 2 次, 将脱落的坏死细胞洗掉。然后加入 1.25、2.5、5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的松萝烟酰胺培养液, 每孔 2 mL, 并设置对照组, 每组设置 2 个复孔。将细胞置于 5% CO_2 、37 $^\circ\text{C}$ 培养箱培养, 分别于 12、24、36、48 h 后, 观察不同组 SGC-7901 细胞向致伤区域的迁移状况, 拍照并确定划痕边缘区域及相对距离, 实验图像结果通过 Image J 软件分析不同组细胞的迁移距离。根据公式计算出细胞实际迁移距离。

细胞迁移率 = (0 h 划痕距离 - 不同时间点划痕距离) / 0 h 划痕距离

2.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件和 Graphpad Prism 7.0 软件进行数据分析。所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 样本数据服从正态分布, 多组间比较采用单因素和双因素方差分析。

3 结果

3.1 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞增殖的影响

MTT 结果显示, 不同浓度的松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞增殖均有抑制作用。与对照组比较, 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞生长的抑制作用呈浓度和时间依赖性。48 h 后, 5、10 $\mu\text{mol/L}$ 松萝烟酰胺对细胞的增殖抑制率大于阳性对照顺铂。与 24 h 比较, 48、72 h 各加药组细胞增殖抑制率增加 ($P < 0.01$)。见表 1。24 h 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞的 IC_{50} 为 2.998 $\mu\text{mol/L}$, 见图 2。

表 1 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

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

组别	浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	0	0	0
顺铂	2.000 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	86.63 $\pm$ 0.07**	75.76 $\pm$ 0.21**	85.96 $\pm$ 0.15**
松萝烟酰胺	0.625	0.28 $\pm$ 0.27	-7.54 $\pm$ 0.60	2.95 $\pm$ 0.42**\$
	1.250	17.70 $\pm$ 0.14**	29.17 $\pm$ 0.11**\$	27.73 $\pm$ 0.43**\$
	2.500	52.14 $\pm$ 0.30**	71.14 $\pm$ 0.00**\$	83.98 $\pm$ 0.63**\$&
	5.000	68.53 $\pm$ 0.22**	87.98 $\pm$ 0.08***\$	94.92 $\pm$ 0.14***\$&
	10.000	77.86 $\pm$ 0.47**	92.55 $\pm$ 0.05***\$	95.82 $\pm$ 0.23***\$&

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与顺铂组比较: *** $P < 0.01$; 与相同浓度 24 h 比较: \$ $P < 0.01$; 与相同浓度 48 h 比较: & $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; *** $P < 0.01$ vs cisplatin group; \$ $P < 0.01$ vs the same concentration for 24 h; & $P < 0.01$ vs the same concentration for 48 h

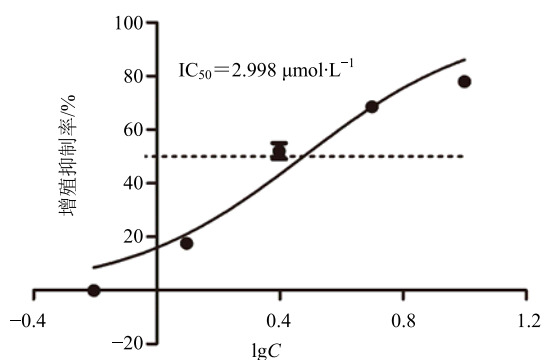


图 2 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞的 IC_{50} ($\bar{x} \pm s, n=3$)
Fig. 2 IC_{50} of usnicoyinamide on SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

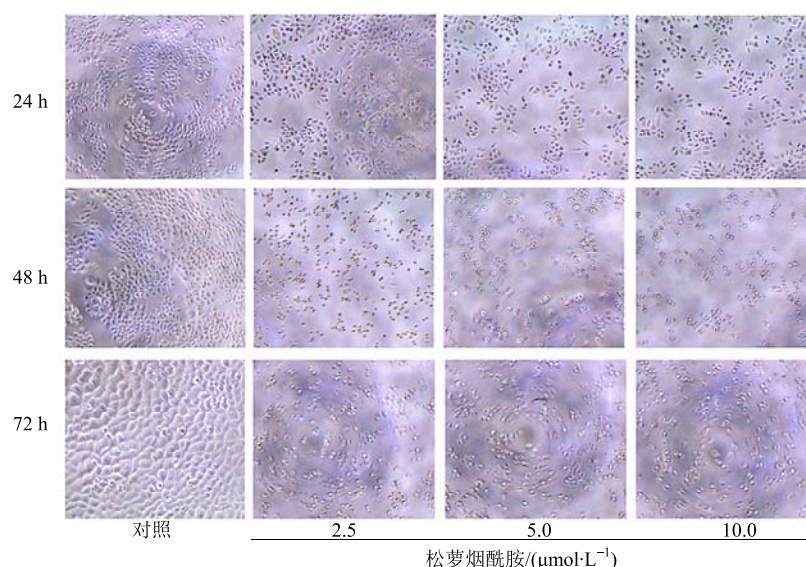


图 3 各组 SGC-7901 细胞形态 ($\times 10$)
Fig. 3 Morphology of SGC-7901 cells of each group ($\times 10$)

流式细胞术结果显示, 松萝烟酰胺可显著增加细胞早期凋亡和晚期凋亡率。与对照组比较, 1.25、2.5、5 $\mu\text{mol/L}$ 松萝烟酰胺处理 SGC-7901 细胞 48 h 后, 细胞凋亡率均显著增加 ($P<0.05$), 见图 4。

DAPI 荧光染色结果显示, 1.25、2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 松萝烟酰胺处理 SGC-7901 细胞 48 h 后, 细胞增殖抑制明显, 且出现典型的细胞凋亡形态学改变: 核染色质聚集浓缩伴随边缘化, 细胞核碎裂呈现点状蓝色荧光, 出现凋亡小体。随着松萝烟酰胺浓度的增加, 细胞凋亡的变化趋势越明显。而对照组视野中, SGC-7901 细胞以正常椭圆形、染色均匀的正常细胞核为主, 细胞核呈均匀的蓝色荧光, 见图 5。

3.3 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞周期的影响

流式细胞仪检测结果显示, 与对照组比较, 2.5、

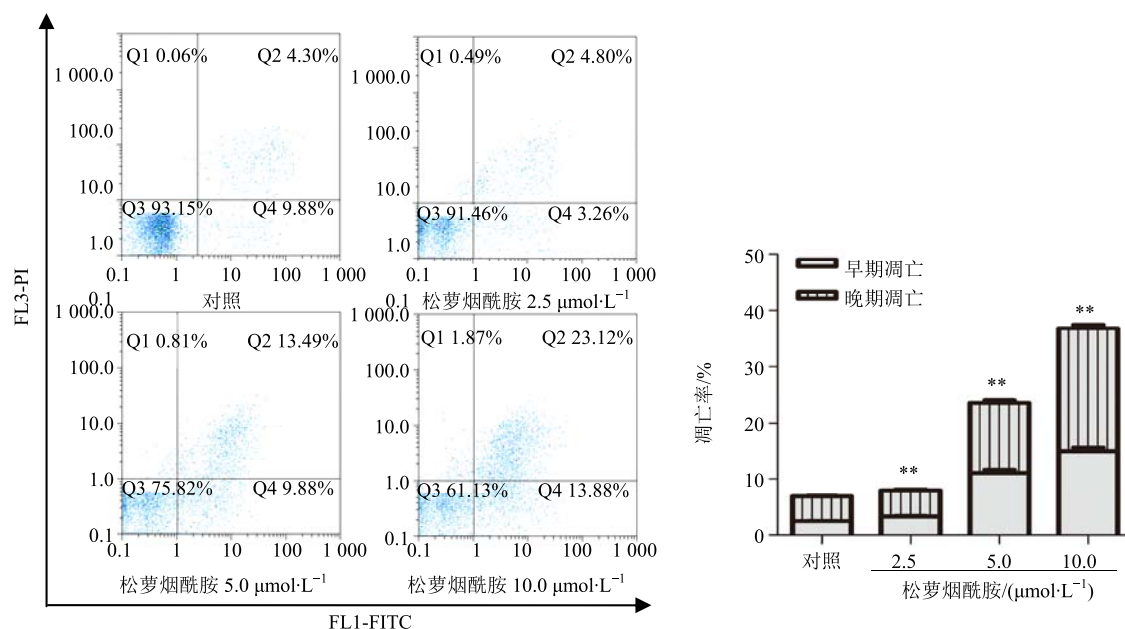
3.2 松萝烟酰胺对 SGC791 细胞凋亡的影响

倒置显微镜观察, 与对照组比较, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 松萝烟酰胺处理 SGC-7901 细胞 24、48、72 h 后, 细胞生长速度缓慢。5、10 $\mu\text{mol/L}$ 松萝烟酰胺处理 SGC-7901 细胞 48 h 后, 细胞形态发生明显改变, 细胞发生皱缩、体积变小、变形, 胞内出现空泡, 同时部分贴壁细胞变圆、脱落, 大量细胞碎片漂浮于培养液表。72 h 后, 10 $\mu\text{mol/L}$ 松萝烟酰胺组多数细胞呈死亡状态。随着松萝烟酰胺浓度的增加和药物作用时间的延长, 细胞形态变化趋势越明显, 提示松萝烟酰胺处理能抑制 SGC-7901 细胞增殖并诱导其凋亡, 见图 3。

5、10 $\mu\text{mol/L}$ 松萝烟酰胺组 S 期细胞占比明显提高 ($P<0.05$ 、0.01), 而 G_2 期细胞占比无显著差异。 G_1 期细胞占比显著降低 ($P<0.01$)。提示松萝烟酰胺可将 SGC-7901 细胞阻滞在 S 期, 见图 6 和表 2。

3.4 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞迁移的影响

显微镜观察结果显示, 不同浓度的松萝烟酰胺均可有效抑制 SGC-7901 细胞的迁移。划痕 36 h 后, 对照组划痕变窄, SGC-7901 细胞向划痕内部迁移至划痕区中部, 而松萝烟酰胺组细胞迁移距离明显缩短, 划痕间隙明显加宽。与对照组比较, 2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 松萝烟酰胺组细胞迁移率在 12、24、36、48 h 均显著下降 ($P<0.01$)。同时, 随着松萝烟酰胺浓度的增加, SGC-7901 细胞迁移率下降越明显。说明松萝烟酰胺能抑制 SGC-7901 细胞的迁移能力, 见图 7。



与对照组比较: ** $P < 0.01$, 图 7 同
 ** $P < 0.01$ vs control group, same as fig. 7

图 4 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of usnicoyinamide on apoptosis of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

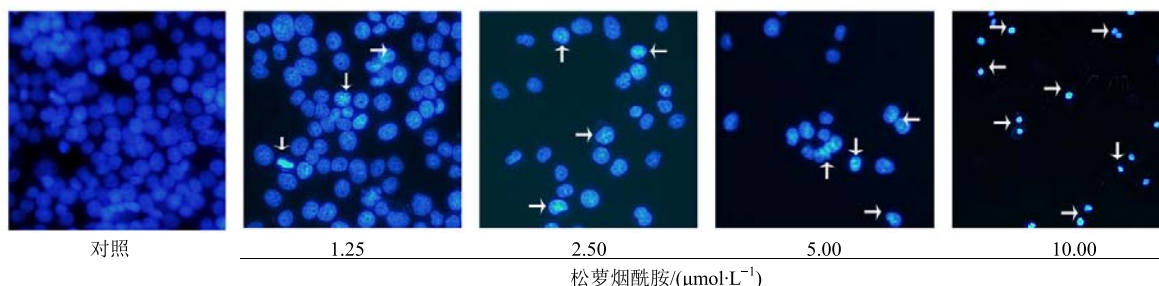


图 5 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞凋亡的影响 (DAPI 荧光染色, $\times 10$)

Fig. 5 Effect of usnicoyinamide on apoptosis of SGC-7901 cells (DAPI fluorescence staining, $\times 10$)

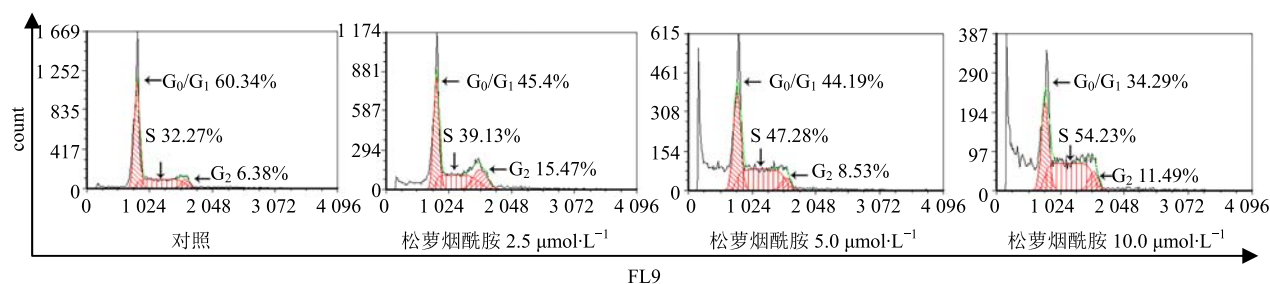


图 6 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞周期的影响

Fig. 6 Effect of usnicoyinamide on cell cycles of SGC-7901 cells

4 讨论

胃癌发病率和致死率高, 表现为起病隐匿、发展快、早期诊断率低等特征, 晚期胃癌患者常因手术和放化疗产生一些不良反应和并发症^[18]。诱导细

胞凋亡并抑制其增殖是目前预防和治疗恶性肿瘤的一个非常重要的研究方向^[19]。近年来, 中医药在抗肿瘤方面展现较好作用, 如稳定癌灶、减轻放化疗副作用及改善患者预后等^[20]。

表 2 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of usnicoyinamide on cell cycles of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	占比/%		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂
对照	—	60.34 ± 0.39	32.27 ± 0.58	6.38 ± 1.52
松萝烟酰胺	2.5	45.40 ± 0.14**	39.13 ± 4.49*	15.47 ± 5.60
	5.0	44.19 ± 0.41**	47.28 ± 1.47**	8.53 ± 1.07
	10.0	34.29 ± 1.10**	54.23 ± 2.63**	11.49 ± 1.81

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

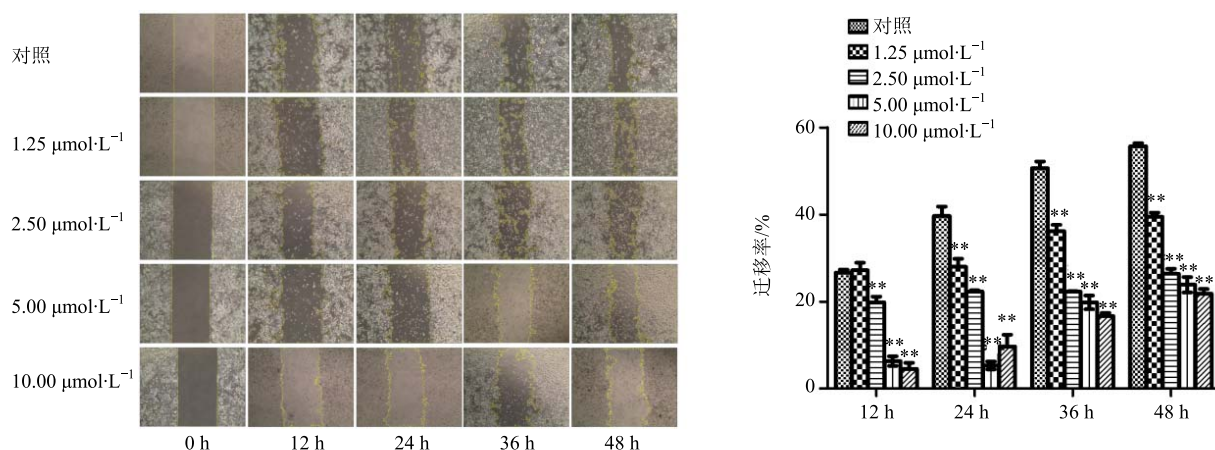


图 7 松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of usnicoyinamide on migration of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

松萝烟酰胺是首次合成的新结构物质, 该化合物合成的反应底物是奥科呋喃, 前期研究表明, 奥科呋喃具有抗肿瘤作用, 可阻滞细胞周期、通过上调 Fas 相关因子作用机制促进细胞凋亡^[15], 也可以通过磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) 信号通路在体内和体外抑制骨肉瘤 MNNG 细胞的侵袭和迁移^[16]。前期实验表明, 松萝烟酰胺具有体外抑制癌细胞增殖作用, 为了发现其是否能够治疗胃癌, 需要深入研究松萝烟酰胺对肿瘤细胞的增殖抑制作用及其作用机制。

本实验结果表明, 松萝烟酰胺可通过诱导细胞发生 S 期阻滞, 使其发生凋亡, 从而有效抑制细胞的增殖和迁移。松萝烟酰胺对 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用具有浓度依赖性。细胞周期是细胞生长的基本生命活动, 在整个周期中细胞的大部分生命活动都处在分裂间期, 分裂间期又包括 DNA 合成前期 (G₁ 期), DNA 合成期 (S 期) 和 DNA 合成后期 (G₂ 期)^[21-22]。S 期为 DNA 复制期, 该期主要进 DNA 和染色体的复制, 组蛋白、非组蛋白的合成。实验数据显示, 松萝烟酰胺以剂量依赖的方

式阻滞 SGC-7901 细胞于 S 期, 抑制其 DNA 复制, 从而发挥增殖抑制作用^[20,23]。松萝烟酰胺诱导细胞发生 S 期阻滞的机制是否与抑制相关蛋白表达的上调或下调有关, 还需进一步实验验证^[24]。细胞周期停滞, 无法得到修复的细胞则发生凋亡, 凋亡是通过一种内在自杀机制的激活而死亡, 这是程序性细胞死亡的类型。目前诱导癌细胞凋亡的化学药很多, 但开发费用昂贵且不良反应较大。许多天然产物对癌细胞的生长具有抑制作用, 包括诱导细胞凋亡^[25]。流式细胞术和 DAPI 染色结果显示, 松萝烟酰胺可显著诱导 SGC-7901 细胞凋亡, 细胞凋亡比例随着浓度增加而增加, 同时可抑制 SGC-7901 细胞的存活能力, 如细胞体积发生皱缩、凋亡小体显著增多、镜下可见大量细胞碎片漂浮于培养液表面等。即松萝烟酰胺可以诱导细胞凋亡, 而不是坏死。侵袭转移是恶性肿瘤最具特征性的生物行为之一, 肿瘤微环境的改变、基质降解、新血管形成、肿瘤细胞的脱黏附、迁移及免疫逃逸等多因素参与其中^[26]。划痕实验证明, 松萝烟酰胺可显著抑制胃癌细胞 SGC-7901 的迁移, 随着药物作用时间的延长, 细

胞迁移能力逐渐降低。

综上所述,本研究首次证实松萝烟酰胺在胃癌的发生和进展过程中发挥一定抑制作用,对 SGC-7901 细胞具有增殖抑制作用,其作用机制可能通过诱导细胞凋亡、阻滞细胞于 S 期,从而抑制细胞的迁移。本研究结果可为松萝烟酰胺的深入研究,如体内抗癌、分子机制研究提供基础,对其进一步开发利用具有重要价值。

志谢:昆明医科大学科研实验中心、昆明医科大学生物医学工程中心、云南省肿瘤研究所。

参考文献

- [1] 张永海. 汉黄芩素体外对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、迁移和侵袭的实验性研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(2): 89-95.
- [2] 刘威羽. BST2 表达与胃癌的关系及侵袭迁移的机制研究 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2018.
- [3] 滕晓晶, 董学妍, 王智毅, 等. 扶正康复合剂联合顺铂抑制胃癌 SGC-7901 细胞荷瘤裸鼠肿瘤增殖作用的实验研究 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2019, 24(7): 744-749.
- [4] 王娜, 侯琳, 祝兆怡, 等. 2,3-吡啶酮对人神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 凋亡和端粒酶表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2007, 23(5): 680-684.
- [5] 项航. 吡硫翁锌对胃癌细胞的杀伤作用与机制研究 [D]. 合肥: 中国科学技术大学, 2019.
- [6] 姜重阳, 贺小琼, 姚乾, 等. 地衣活性化合物 $C_{11}H_{12}O_5$ 体外抗肿瘤作用 [J]. 昆明医科大学学报, 2017, 38(9): 7-10.
- [7] 税靖霖. 赤星衣酸甲酯的抗癌作用及机制研究 [J]. 中草药, 2017, 48(12): 2474-2480.
- [8] 王静, 贺小琼, 姚乾, 等. 松萝抗癌活性部位对人泌尿生殖系统肿瘤的抑制作用 [J]. 肿瘤防治研究, 2017, 44(6): 403-408.
- [9] 贺云发, 贺小琼, 姜重阳, 等. 地衣抗癌活性部位 AMH-T 的毒理学研究_贺云发 [J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(11): 1-4.
- [10] 贺云发, 贺小琼. 地衣抗癌活性部位 AMH-T 的毒理学 [J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(9): 26-30.
- [11] 王静, 贺小琼. AMH-T 体外抗肿瘤作用的研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2016, 37(4): 4-7.
- [12] 王子睿, 贺小琼, 姚乾, 等. 4-乙氧基-2-羟基-6-甲基苯甲酸体外抗肿瘤作用及与顺铂联合作用研究 [J]. 昆明医科大学学报, 2014, 35(9): 4-8.
- [13] 原茵, 贺小琼, 王子睿, 等. 真菌植物提取物体内抗小鼠 S180 作用及与环磷酰胺联合作用 [J]. 昆明医科大学学报, 2013, 34(9): 16-19.
- [14] 贺小琼, 李凝诗, 李凤, 等. 真菌提取物 AMH 的肿瘤化学预防活性组分追踪 [J]. 癌变·畸变·突变, 2011, 23(3): 166-170.
- [15] Qu Q, He Z, Jiang Y, et al. $C_{18}H_{17}NO_6$ inhibits invasion and migration of human MNNG osteosarcoma cells via the PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2019, doi: 10.12659/MSM.918431.
- [16] He X Y, Xiong L L, Xia Q J, et al. $C_{18}H_{17}NO_6$ and its combination with scutellarin suppress the proliferation and induce the apoptosis of human glioma cells via upregulation of Fas-associated factor 1 expression [J]. *Biomed Res Int*, 2019, doi: 10.1155/2019/6821219.
- [17] 范丹, 贺小琼, 李仁秋, 等. 天然活性化合物奥科呋喃纳米脂质体抗肿瘤作用研究 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1636-1640.
- [18] 时妍梅, 李娟, 刘燕, 等. 人 β 防御素-2 通过 TGF- β /Smad 信号通路对胃癌 SGC7901 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2019, 41(7): 1301-1307.
- [19] 吕兴, 吕高虹, 叶冠. 香参壳方对人胃癌细胞上皮间质转化及转移的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2019, 35(6): 687-690.
- [20] 王楠, 宋小骏, 蒋凤, 等. 维拉帕米及艾灸对长春新碱耐药胃癌细胞株 SGC7901 逆转增效作用 [J]. 东南国防医药, 2017, 19(6): 587-591.
- [21] 张梓, 夏莎莎, 夏瑞祥. EZH2 抑制剂 DZNep 对 NK/T 淋巴瘤细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(6): 851-855.
- [22] 李亚雄. 莲心碱诱导胰腺癌细胞发生 S 期阻滞和凋亡及其机制探究 [D]. 太原: 山西医科大学, 2019.
- [23] 孙巍, 李文涛, 孙献甫. 雷公藤甲素增强三阴性乳腺癌细胞对顺铂敏感性的实验研究 [J]. 中国现代普通外科进展, 2019, 22(8): 589-592.
- [24] 柳香香. MPST 过表达干预 NaAsO₂ 对 SH-SY5Y 细胞周期的影响及机制研究 [D]. 贵阳: 贵州医科大学, 2019.
- [25] Lee D H, Park T, Kim H W. Induction of apoptosis by disturbing mitochondrial-membrane potential and cleaving PARP in jurkat T cells through treatment with acetoxyscirpenol mycotoxins [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(4): 648-654.
- [26] 郭称明, 彭会云, 高典, 等. ELMO1 在胃癌细胞侵袭和迁移中的作用 [J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(5): 782-787.