

升阳十一味丸对胃癌细胞凋亡 及细胞周期的影响

邓秀玲¹ 王 栋² 刘淑萍¹

(内蒙古医学院生物化学与分子生物学教研室¹, 呼和浩特 010059; 内蒙古自治区医院神经内科², 呼和浩特 010017)

摘 要 研究复方蒙药升阳十一味丸对体外培养的人胃癌 MGC—803 细胞凋亡及细胞周期的影响。以不同浓度的蒙药处理 MGC—803 细胞, 通过 MTT 法检测药物作用后细胞的增殖情况, 并计算生长抑制率。利用倒置光学显微镜、Hoechst33342/PI 荧光染色、流式细胞术, 研究蒙药诱导细胞凋亡的作用及对细胞周期的影响。结果蒙药能抑制 MGC—803 细胞的增殖, 并具有良好的量效关系。2.5 mg/mL 药物作用 MGC—803 细胞 48 h 后, 光镜下可见核固缩、核碎裂等凋亡细胞形态学变化。流式细胞仪检测到“亚 G₁ 峰”, 细胞周期分析表明 S 期细胞较对照组增多, G₂/M 期细胞下降, 阻滞于 S 期。说明蒙药升阳可明显抑制胃癌 MGC—803 细胞的增殖, 并在一定浓度范围内诱导细胞凋亡, 这可能是其发挥抗肿瘤的作用主要途径之一。

关键词 升阳十一味丸 胃癌细胞 凋亡 细胞周期

中图分类号 R979.1; **文献标志码** A

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 其早诊率低, 死亡率高, 常规疗法效果不明显, 所以寻找高效、低毒的抗肿瘤新药已成为胃癌治疗的主要课题之一。蒙药作为传统的少数民族医药, 取材广泛, 多用成药且剂量小, 具有高效、低毒发挥复合药理作用、疗效可靠等特点^[1], 已成为当今抗肿瘤新药开发的研究热点之一。本实验采用体外培养的方法, 观察蒙药升阳十一味丸对胃癌(MGC—803)细胞生长的影响, 对其可能的作用机制进行初步探讨, 为抗肿瘤民族医药的进一步开发提供一些理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

培养基 DMEM 为 Gibco 公司产品, 胎牛血清为中国医学科学院血液学研究所生产, Hoechst33342、

碘化丙啶(PI)、塞唑蓝(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)均为 Sigma 公司产品。蒙药升阳十一味丸(以下简称升阳)由内蒙古中蒙医院制剂室生产, 用 PBS 配成 50 mg/mL 贮液, 0.2 mm 滤膜过滤除菌 4 ℃ 保存, 实验时用培养液稀释到所需浓度。

1.2 细胞培养

MGC—803 细胞由北京肿瘤研究所提供, 于含庆大霉素 80 u/mL、10% 灭活胎牛血清的 DMEM 的培养液中培养, 置 37 ℃、5% CO₂ 温箱中孵育, 取对数生长期细胞用于实验。

1.3 升阳对 MGC—803 细胞的杀伤作用

采用 MTT 法^[2]。将培养瓶中的 MGC—803 细胞消化, 调整细胞浓度为 3×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板上, 每孔 0.2 mL, 培养 24 h, 实验组加入不同浓度的十一味丸, 使终浓度分别为: 2.5 mg/mL、1.25 mg/mL、0.63 mg/mL、0.31 mg/mL、0.15 mg/mL。另设只有肿瘤细胞的为对照组, 只含培养基的为空白组, 每组都为 8 复孔。培养 72 h, 每孔加入 MTT(5 mg/mL) 20 μ L, 37 ℃ 温育 4 h, 离心弃上清后加入 DMSO 200 μ L, 振荡 10 min, 全自动酶标仪(日本 550 型)测定 570 nm 处吸光度 A 值。按

2011 年 6 月 22 日收到

第一作者简介: 邓秀玲(1978—), 女, 内蒙古通辽人, 讲师, 医学硕士。E-mail: dengxiuling78@sohu.com。

下列公式计算生长抑制率:

抑制率(%) = (对照组 A 值—实验组 A 值)/
(对照组 A 值—空白组 A 值)。

1.4 细胞形态观察

1.4.1 倒置光学显微镜观察

将 MGC—803 细胞以 6×10^5 个/mL 接种于 75 mL 培养瓶中,培养 24 h,更换培养液,对照组细胞用 DMEM 继续培养,实验组细胞加入含不同浓度升阳 (2.5 mg/mL、2.0 mg/mL、1.0 mg/mL、0.5 mg/mL、0.25 mg/mL) 的培养基,于培养后每 6 h 观察细胞形态变化并作照相记录。

1.4.2 荧光双染检测

收集不同浓度升阳处理的细胞,离心、洗涤后制成细胞悬液,hochest33342 和 PI 荧光染色、洗涤后滴片,在荧光显微镜(日本 Nikon)观察并照相。

1.5 流式细胞仪检测凋亡峰和细胞周期

收集细胞,PBS 洗一次,无水乙醇固定;离心弃上清,细胞重悬于 PBS 中;碘化丙啶(PI)处理后,于 EPICS 流式细胞仪检测。

1.6 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析和 T 检验进行统计。

2 结果

2.1 升阳对 MGC—803 的细胞毒作用

表 1MTT 结果显示,升阳可抑制胃癌细胞的生长,细胞半数抑制浓度(IC_{50} 值)为 1.13 mg/mL 左右(表 1)。

表 1 蒙药升阳十一味丸对 MGC—803 细胞毒作用

组别	药物浓度 /(mg · mL ⁻¹)	$A_{570} (n = 12)$	抑制率/%
对照组		1.256 ± 0.035	
空白组		0.066 ± 0.002	
实验组	2.5	0.261 ± 0.056	83.5
	1.25	0.569 ± 0.059	57.3
	0.63	0.808 ± 0.142	37.6
	0.31	0.942 ± 0.099	26.3
	0.15	1.014 ± 0.102	20.3

注:实验组与对照组比较 $P < 0.05$

2.2 细胞形态变化观察

2.2.1 倒置光学显微镜观察

对照组细胞呈贴壁型生长,细胞形态不规则,核大居中,核仁明显。2.5 mg/mL 药物作用 24 h 后镜下可见,部分细胞变圆、缩小、呈半悬浮状态。加药后 48 h 镜下可见,细胞亮度明显下降,胞膜皱缩、内陷,呈梅花状小体(图 1、图 2)。

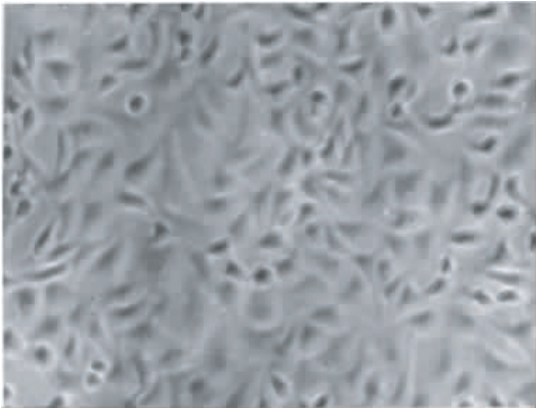


图 1 MGC—803 对照组 光镜 200 ×

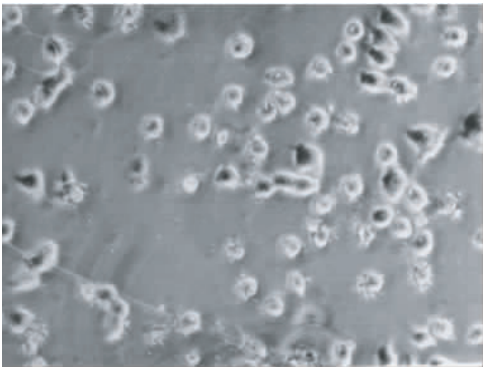


图 2 2.5 mg/mL 处理 48 h 光镜 200 ×

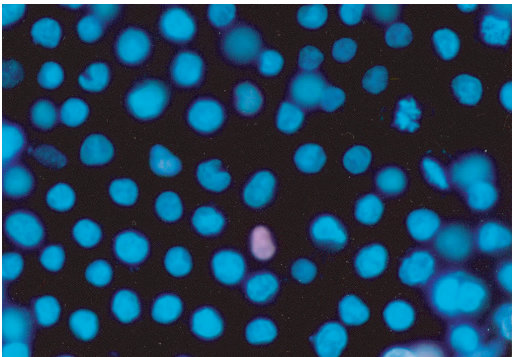


图 3 MGC—803 对照组 荧光显微镜 200 ×

2.2.2 荧光双染观察

经 Hoechst33342/PI 双染后,可见对照组细胞核均匀一致,被 Hoechst33342 染成蓝色荧光。2.5 mg/mL 药物作用 48 h 细胞核染色质凝集、碎裂、凋亡小体。形成,典型凋亡细胞比率明显增加达 25.7% (图 3、图 4)。

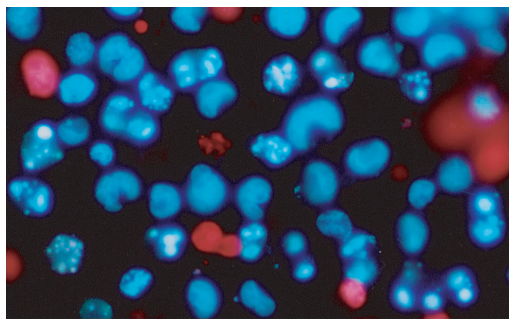


图 4 2.5 mg/mL 处理 48 h 荧光显微镜 200 ×

2.2.3 流式细胞术(FCM)检测

升阳 2.5 mg/mL 处理 MGC—803 细胞 12 h、24 h、36 h、48 h 在 DNA 含量直方图上,二倍体峰(G_1 峰)前均可见“亚 G_1 峰”,且凋亡峰随药物作用时间的延长而增高,尤以 48 h 最为显著。对细胞周期分析表明:MGC—803 细胞经娜仁处理后 S 期细胞由 36.4% 上升到 50.7% ($P < 0.01$), G_0/G_1 期由 36.1% 下降至 23.8% ($P < 0.01$), G_2/M 期 27.5% 下降至 25.5%,细胞周期可能受阻于 S 期。

3 讨论

升阳十一味丸由红花、萆薢、黄精、玉竹、天花粉、天冬等十一味单方组成的复方蒙药,具有温肾、利水,燥“协日乌素”之功效。组方中有许多成分具有抗肿瘤的药理作用,有报道玉竹提取物可诱导人结肠癌、食管癌^[3,4]等细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。丁波泥等^[5]曾研究天花粉蛋白抑制乳腺癌生长,黄益玲^[6]等研究天花粉蛋白对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和细胞凋亡的影响等等。但单方或提取物并不能反映复方的复杂成分,因此我们以体外培养的胃癌细胞为对象,观察复方蒙药抗肿瘤的作用。实验中发现,升阳对人胃癌(MGC—803)细胞

生长具有明显的抑制作用,且随着药物浓度的增加,抑制作用愈明显,呈现出浓度依赖性。为探讨其作用机制,我们通过 Hoechst33342/PI 荧光双染色,在镜下观察到 2.5 mg/mL 药物处理 48 h 后的部分细胞出现核染色质凝集、碎裂呈大小不等、形态不规则的碎片状,为典型凋亡细胞形态。形态学观察提示升阳可诱导细胞凋亡。在此基础上,我们又利用检测细胞凋亡有效而灵敏的方法流式细胞仪,观察经升阳处理的 MGC—803 细胞在不同时间均出现“亚 G_1 峰”,且凋亡峰随药物作用时间的延长而增高,尤以 48 h 最为显著。表明该药对细胞生长发挥抑制作用可能是通过诱导细胞凋亡实现的。对细胞周期分析表明:升阳处理 48 h, S 期细胞数量显著增加, G_0/G_1 期减少, G_2/M 下降但改变不明显,推测细胞可能受阻于 S 期,该药可能诱导 S 期细胞发生凋亡,这可能是该药体外对抗肿瘤细胞生长的主要途径之一。

大量资料显示,胃癌在发生、发展中存在细胞凋亡明显受抑制的现象^[7-9],所以寻找毒性小、能诱导肿瘤细胞凋亡的药物已成为当前治疗胃癌的重要课题之一。蒙药作为传统的少数民族医药,通过精细选方合理配伍后,经传统的炮制方法加工而成,具有毒副作用小、疗效强的特点,是值得挖掘的医药宝库。蒙药用于抗肿瘤的深入研究,国内少见报道。本实验结果显示蒙药升阳十一味丸在体外一定浓度范围内可诱导 MGC—803 细胞凋亡,并影响细胞周期的进程,使细胞受阻于 S 期。可为该蒙药抗肿瘤研究提供一定的理论基础,并为寻找诱导细胞凋亡的少数民族医药提供新思路。

参 考 文 献

- 1 松 林,乌云斯日古楞. 试论中国蒙药的研究概况. 中国民族医药杂志,2006;2(1):26—29
- 2 温汉平,王小宁,等. 肿瘤体外药敏试验 MTT 分析法. 中华肿瘤杂志,1993;15(6):470—471
- 3 李尘远,刘艳华,等. 玉竹提取物 B 诱导人结肠癌 CL-187 细胞凋亡的实验研究. 锦州医学院学报,2003;24(2):26—29
- 4 张 岚,杜亚明,王中彬. 玉竹提取物 B 对人食管癌细胞 Eca—109 增殖与凋亡的影响. 山东医药,2010;50(18):3—6
- 5 丁波泥,陈道谨,李小荣,等. 天花粉蛋白抑制乳腺癌生长的实验

研究. 实用肿瘤杂志,2008;23(4):310—314

6 黄益玲,黄力鸣,等. 天花粉蛋白对人宫颈癌 HeLa 细胞增殖和细胞凋亡的影响. 中国药理学通报,2005;21(2):253—254

7 代二庆,张明华,等. 中药调控肿瘤细胞凋亡机制研究进展. 武警医学院学报,2008;17(11):1009—1011

8 朱艳琴. 苦参素诱导人胃癌细胞系 MGC—803 凋亡的研究. 中国社区医师,2006;8(20):21—22

9 陈必新,唐万和,王 扬,等. 央芪汤对胃癌凋亡的实验研究. 现代中西医结合杂志,2010;19(3):272—274

Effect of Shengyangshiweiwan on Cell Apoptosis and Cell Cycle in Gastric Cancer

DENG Xiu-ling¹,WANG Dong² LIU Shu-ping¹

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Inner Mongolia Medical College¹, Hohhot 010059,P. R. China;
Department of Neurology ,Inner Mongolia People's Hospital², Hohhot 010017,P. R. China)

[Abstract] To studay the effect of Inner Mongolia Drug Shengyangshiweiwan on cell apoptosis and cell cycle in humand gastric cancer MGC—803 cell, MTT assay was used to examine the proliferation inhibitory effect of shengyangshiweiwan on MGC—803 cell, and calculate the inhibitory rate of growth. Morphologic changes of apoptosis were observed by reverse discrepancy and offluorescent light microscope; flow cytometry was used to analysis cell cycle. MTT assay showed that shengyang has proliferation inhibiting effect on MGC—803 cell in dose and time dependent manners. The cells treated with shengyang (2.5 mg/mL) for 48 hours showed characters of apoptosis under light microscope. An ‘sub-G₁ peak was detected by flow cytometry, the result analysis of cell cycle indicated that the number of cells of S phase increased, that of G₀/ G₁ and G₂/M phase decreased after treatment on MGC—803,it was arrested S phase. It is concluded that shengyang has proliferation inhibiting effect and may induce apoptosis in gastric cancer MGC—803 cell in a certain dose range, which may be one of the antitumor mechansim.

[Key words] Shengyangshiweiwan gastric cancer cell apoptosis cell cycle



(上接第 6568 页)

month after irradiation, the exposed bladder next to the prostate and non-irradiated regions of the bladder (as control) were taken as biopsy. The bladder biopsy for optical microscopy, scanning and transmission electron microscopy. It is resulted that after irradiation, no significant change of urinating occurred, and drugs, treatment were not given. According to RTOG acute radiation injury standard, the damage were evaluated as grade 0 to 1. Compared with the pre-irradiation,it could be seen by optical microscopy obvious necrosis, disorganization, suspension off of the epithelial cells and hole left behind the partial detachment of the epithelial cells, the disordered muscle and bare fiber. It could be seen by transmission electron microscope: the connection of damaged, epithelial cells detached,proliferation of collagen fibrils and radiation fibroblasts. It is concluded the pathological change of radiocystitis such as necrosis and shedding of epithelial cells, collagen proliferation, and radiation fibroblasts occurred after irradiation in the dose lower than the currently accepted thresholds.

[Key words] three-dimensional conformal radiation therapy bladder injury canine