

告达庭激活 Caspase-3 诱导人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡

朱赴东¹, 周霞², 陶雪芬³, 杨波³, 王一奇³

(1.浙江省口腔医院, 浙江 杭州 310006; 2.浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022;

3.浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要: [目的] 评价告达庭体外诱导人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡的作用。[方法] MTT 法检测细胞活性; 吖啶橙染色观察核形态; 流式细胞术检测细胞凋亡率; Western-blot 及比色法检测 Caspase-3 表达及活性。[结果] 告达庭抑制 SGC-7901 细胞的活性, 具有浓度、时间依赖性; 告达庭 70 μ M 能使 SGC-7901 细胞出现核染色体浓聚等典型的凋亡形态学改变, 告达庭 35、70 μ M 使细胞凋亡率升高, 并使 Caspase-3 蛋白表达量和蛋白活性显著升高。[结论] 告达庭可能通过激活 Caspase-3 诱导 SGC-7901 细胞凋亡。

关键词: 告达庭; 胃癌; 凋亡; Caspase-3; SGC-7901

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2014)06-0523-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.06.A017

Caudatin Induced Apoptosis of Gastric Cancer Cell Line SGC-7901 by Activation of Caspase-3

ZHU Fu-dong¹, ZHOU Xia², TAO Xue-feng³, et al.

(1.Zhejiang Stomatology Hospital, HangZhou, China, 310006; 2. Zhejiang Cancer Hospital, HangZhou, China, 310022; 3. Zhejiang Chinese Medical University, HangZhou, China, 310053)

Abstract: [Purpose] To investigate the apoptosis inducing effects and molecular mechanisms of Caudatin in gastric cancer cell SGC-7901. [Methods] SGC-7901 cells were cultured in vitro and treated with various concentrations of Caudatin. Cell proliferation was examined by MTT assay and apoptosis were detected by Flow cytometry. Morphological changes were detected by acridine orange staining. The protein expression of caspase-3 was detected by Western blot analysis and the activity of caspase-3 was detected by Colorimetric assay. [Results] Caudatin inhibited the growth of SGC-7901 cells in a time and concentration-dependent manner. Caudatin could also induce cell nuclear morphological changes, and increase the expression and activity of caspase-3. [Conclusion] Caudatin may inhibit cell proliferation and induce the apoptosis of SGC-7901 by activating caspase-3.

Key words: Caudatin; gastric cancer; apoptosis; Caspase-3; SGC-7901

白首乌系萝藦科鹅绒藤属植物耳叶牛皮消(*Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight)的干燥块根, 是传统的补益中药。研究表明, C-21 甾体苷是白首乌的主要活性成分, 具有调节免疫、保护肝脏、神经和胃肠道细胞等药理作用^[1-3]。近来的研究还表明白首乌 C-21 甾体苷类成分具有显著的抗肿瘤作用^[4-8]。已有多种具有抗肿瘤作用的 C-21 甾体苷类化合物从白首乌中分离得到。其中, 告达庭(Figure 1)是从

白首乌中分离得到的一种 C-21 甾体苷元。近期有研究报道告达庭对人胃癌、结肠癌、肺癌等多种人源性肿瘤细胞株的生长具有抑制作用^[9-11]。本实验在前期研究基础上, 进一步探讨告达庭诱导人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系及药物

人胃癌细胞(SGC-7901)购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。培养于含 10%胎牛

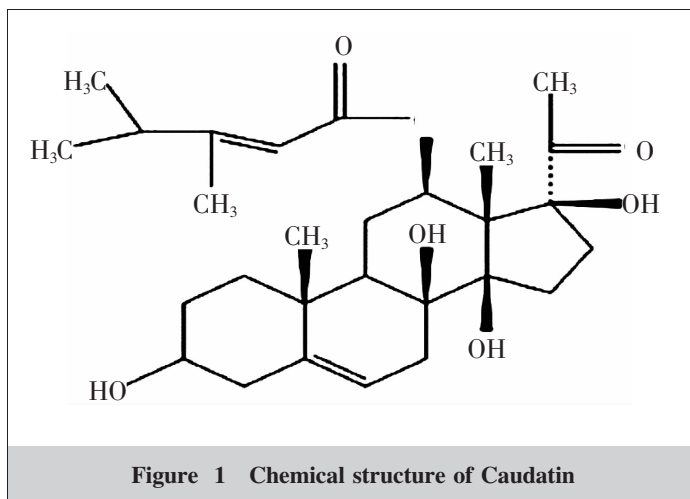
收稿日期: 2014-01-15; 修回日期: 2014-02-25

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQ12H28004);

浙江省医药卫生科技计划(2007QN011, 2010Z006);

浙江省医药卫生科技计划(2011KYB024)

通讯作者: 王一奇, E-mail: wangyiqi2011@126.com



血清的 RPMI1640 培养液中, 于 37℃、5%CO₂ 恒温培养箱中培养, 细胞呈贴壁生长, 达 90% 左右时传代。

告达庭由浙江中医药大学张如松教授提供, 经检测纯度 >99%。

1.2 试剂

RPMI1640 培养基、胰蛋白酶为 Gibco 公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青生物材料公司; MTT 购自上海生工生物工程有限公司; 凋亡检测试剂盒购自联科生物技术有限公司; Caspase-3 活性检测试剂盒购自凯基生物技术有限公司; Caspase-3 抗体、β-actin 及抗兔和抗鼠二抗均为 Santa Cruz 公司产品。

1.3 细胞培养及细胞活性检测

收集对数生长期的 SGC-7901 细胞, 以 $3 \times 10^7/L$ 的密度接种于 96 孔培养板, 每孔 100 μl。设只加培养液、不加细胞和药物的空白调零孔和不加药、加细胞、溶剂及培养液的对照孔, 均设 4 个复孔, 预培养 24h 后加入告达庭, 使药物终浓度为 35、70 μM, 继续培养 24h、48h 或 72h 后, 每孔加入 5g/L MTT 溶液 20 μl, 孵育 4h, 吸净孔内液体, 每孔加入 DMSO 150 μl, 震荡 10 min, 使结晶物充分溶解, 用酶标仪于 570nm 处测各孔吸光度 (OD) 值。

1.4 细胞核形态观察

接种 SGC-7901 细胞 2×10^5 /孔于 6 孔培养板中, 预培养 24h 后加入告达庭, 使药物终浓度为 35、70 μM。继续培养 72h 后, 弃去培养液, 细胞用 PBS 洗 2 遍, 用吖啶橙染色 10min 后, 荧光显微镜下观察。

1.5 细胞凋亡率检测

细胞以每瓶 1×10^6 个接种于 50ml 培养瓶, 培养 24h 细胞贴壁后加入告达庭, 使药物终浓度为 35、70 μM, 继续培养 72h, 收集细胞, 按照试剂盒说明用 PI 染色后, 流式细胞仪测细胞凋亡率。

1.6 Caspase-3 蛋白表达量检测

细胞以每瓶 1×10^6 个接种于 50ml 培养瓶, 预培养 1d 后加入告达庭, 使药物终浓度为 35、70 μM, 继续培养 24h, PBS 洗 2 遍, 用 100 μl 细胞裂解液冰上裂解 30min 后, 12 000g 离心 1min; BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度后, 等量 2×上样缓冲液混匀煮沸 10min, 取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后电转印至 PVDF 膜上; 封闭后加入相应的一抗 (Caspase-3 抗体), 室温孵育 3h, 洗膜后分别使用辣根过氧化物酶标记的二抗, 室温孵育 1h, ECL 试剂盒孵育后暗盒曝光。

1.7 Caspase-3 活性检测

细胞培养及给药同 Caspase-3 蛋白表达量检测。根据试剂盒说明书操作步骤检测 Caspase-3 蛋白活性。收集细胞用 PBS 洗两遍, 加入细胞裂解液, 融冻 3 次, 10 000g 离心 1 min。上清液测蛋白浓度后, 将 100 μg 蛋白加入反应液和底物, 37℃ 反应 4h 后, 用分光光度计于 400 nm 处检测吸光度。用 OD_{给药}/OD_{对照} 比值表示 Caspase-3 活性增高的倍数。

1.8 统计学处理

采用 SPSS16.0 进行统计学处理, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据分析采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 告达庭对 SGC-7901 细胞活性的影响

告达庭 35、70 μM 给药 24h、48h、72h 后, 细胞活性降低。MTT 结果显示随给药浓度的增加和给药时间的延长, 告达庭对胃癌细胞 SGC-7901 活性的抑制作用增强 (Figure 2)。

2.2 告达庭对 SGC-7901 细胞形态的影响

溶剂对照组 SGC-7901 细胞生长旺盛, 细胞透光性好, 细胞核染色质分布均匀。经告达庭处理 72h 后的 SGC-7901 细胞生长缓慢, 细胞数量明显减少,

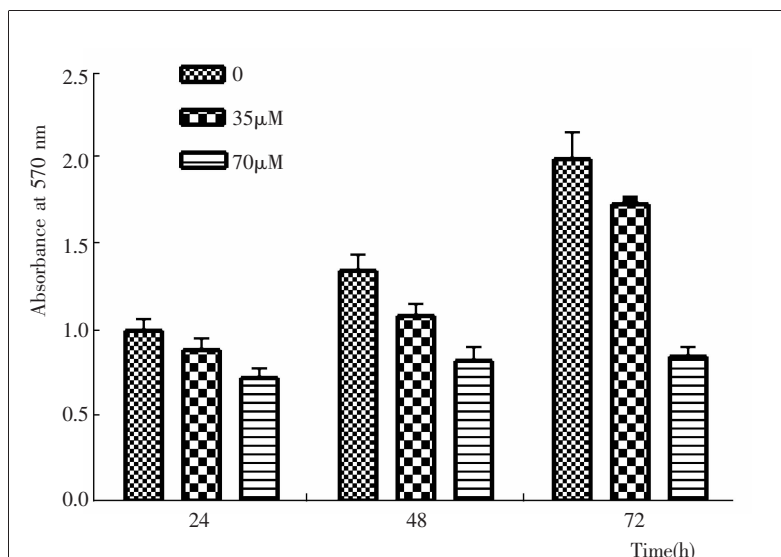


Figure 2 Viability inhibitory effect of caudatin on SGC-7901 cell

细胞皱缩变圆,细胞间隙增大,细胞染色质浓聚,荧光显微镜下观察到凋亡的细胞核染色质呈现为染色增强,荧光更为明亮,团块状结构,呈固缩状或圆珠状,并且随着药物浓度的增加,上述变化更加明显(Figure 3)。

2.3 告达庭对细胞凋亡率的影响

对照组的 SGC-7901 细胞凋亡率为 2%,经告达庭 35、70 μ M 处理 72h 后的 SGC-7901 细胞凋亡率明显增高,分别为 10.8%、34.4%。药物处理后细胞出现明显的 DNA 亚二倍体峰,处于各增殖周期的细胞数减少(Figure 4)。

2.4 告达庭对 Caspase-3 活性和蛋白表达量的影响

SGC-7901 细胞经告达庭 35、70 μ M 处理后,Western blot 法检测显示 Caspase-3 蛋白(19kD 和 17kD)表达明显增加,Caspase-3 活性检测试剂盒检测结果提示 Caspase-3 活性分别增高至对照组的 1.40 和 2.76 倍,与对照组比较有显著性差异($P<0.05$)(Figure 5)。

3 讨论

天然化合物由于其高效、低毒等特点而在肿瘤化学治疗药物的开发中占重要地位。白首乌含有 C-

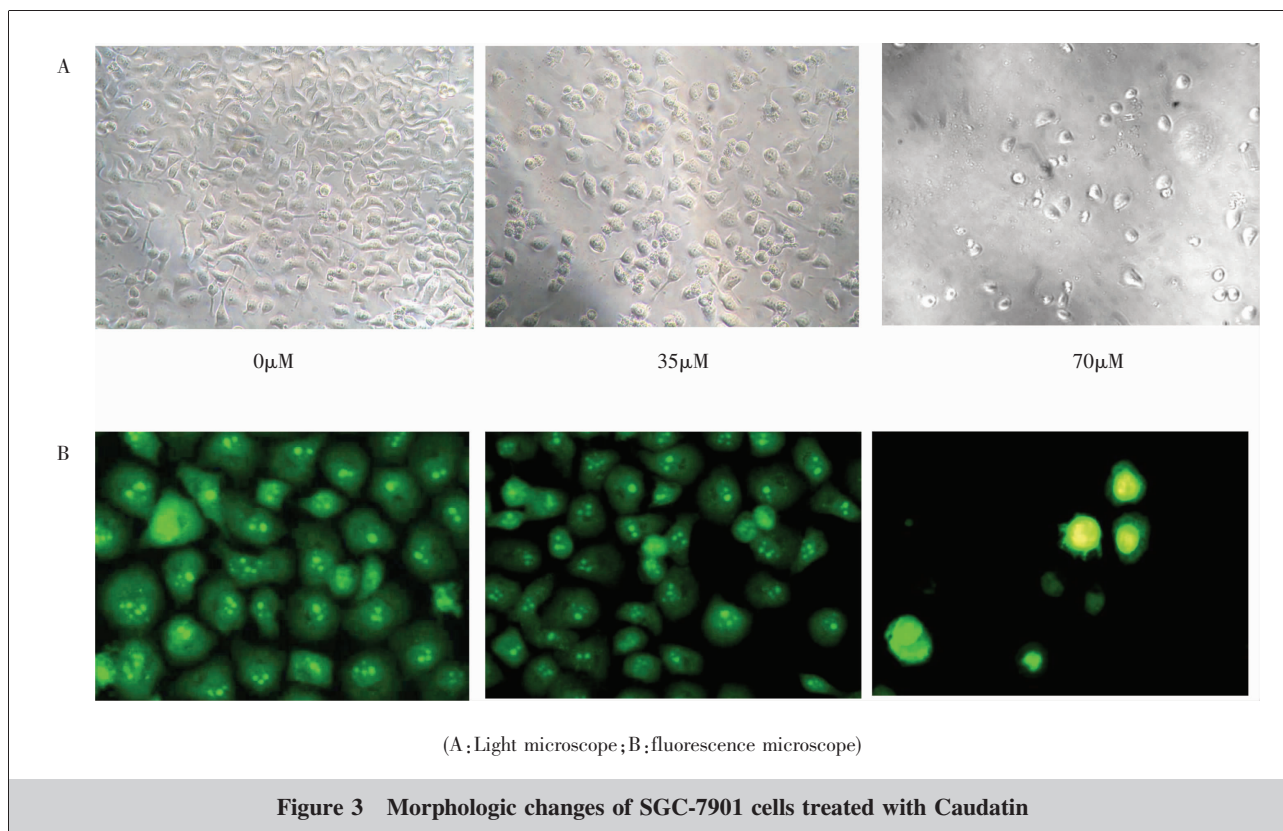


Figure 3 Morphologic changes of SGC-7901 cells treated with Caudatin

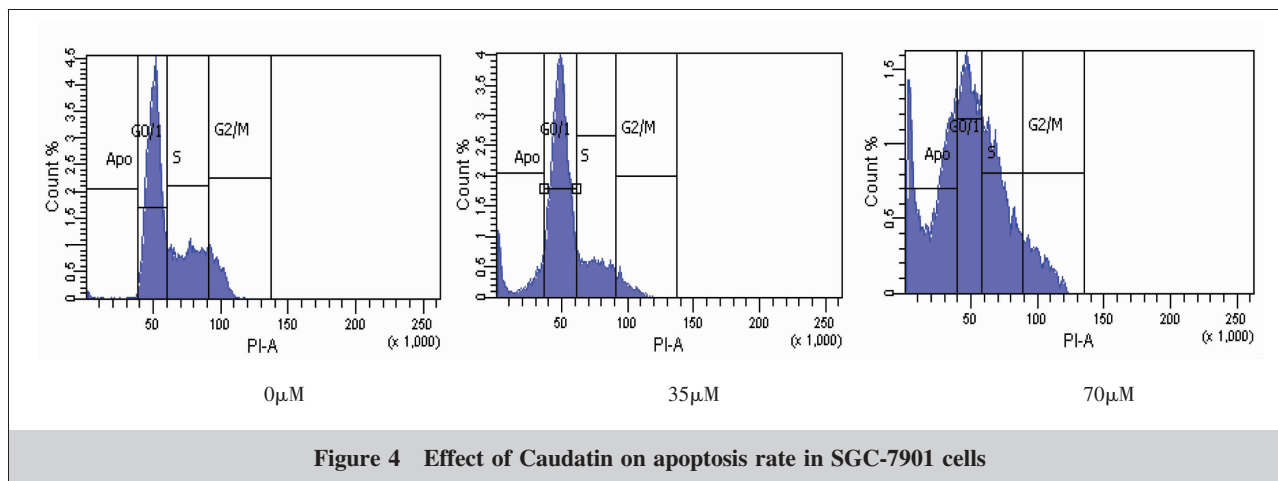


Figure 4 Effect of Caudatin on apoptosis rate in SGC-7901 cells

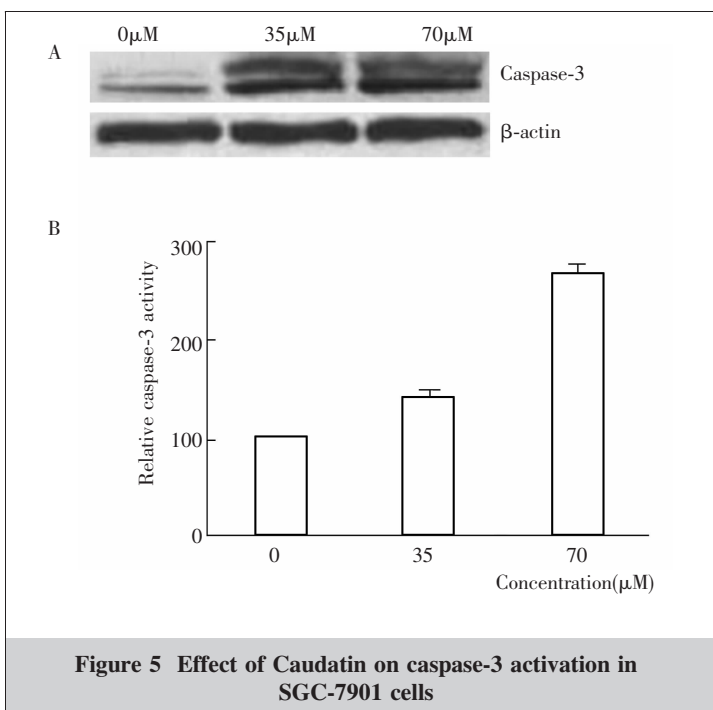


Figure 5 Effect of Caudatin on caspase-3 activation in SGC-7901 cells

21 甾体苷、生物碱、萜类、黄酮类,以及苯乙酮类等成分,具有抗肿瘤、抗癫痫、抗氧化、免疫调节和抗病毒等作用。目前已证明,C-21 甾体苷是白首乌的主要活性成分,它可以有效清除羟自由基和氧自由基,调节免疫。研究发现,C-21 甾体苷类化合物对体内外肿瘤细胞均有明显的抑制作用。

告达庭是从白首乌中分离得到的一种具有较高活性的成分的 C-21 甾体苷元,有报道其有抑制消化道肿瘤细胞增殖的作用。本实验结果进一步证实告达庭呈剂量、时间依赖性地抑制人胃癌细胞 SGC-7901 细胞的生长并能诱导细胞凋亡,使细胞凋亡率

增高并出现染色体浓聚等典型的凋亡形态学变化。这与我们以前报道的白首乌 C-21 甾体苷类成分作用相似且活性更高^[12-14]。

细胞凋亡主要存在两条通路:线粒体通路和死亡受体通路,两条途径都是一系列高度调控的半胱氨酸蛋白酶 Caspase 级联反应(cascade)事件的结果,Caspase-3 被证实处于该级联反应的下游,它通过降解细胞内相应底物使细胞死亡,在细胞凋亡中起着不可替代的作用。以往文献报道告达庭作用肝癌细胞 24h 时能明显激活 Caspase-3,通过 Caspase 途径诱导肿瘤细胞凋亡^[9,10]。因此本实验选择相同时间点对告达庭作用胃癌细胞 SGC-7901 的 Caspase-3 蛋白表达量和活性进行了检测,结果表明告达庭 70 μM 能明显增加剪切型 Caspase-3 蛋白(19kD 和 17kD)的表达,并使蛋白活性显著增高。综上,我们的实验结果表明告达庭具有抑制胃癌细胞

SGC-7901 增殖和诱导胃癌细胞发生凋亡的作用,其机制是通过激活 Caspase-3 级联反应诱导胃癌细胞的凋亡。

参考文献:

- [1] Shan L, Liu RH, Shen YH, et al. Gastroprotective effect of a traditional Chinese herbal drug "Baishouwu" on experimental gastric lesions in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 107(3): 389-394.
- [2] Lee MK, Yeo H, Kim J, et al. Protection of rat hepatocytes exposed to CCl₄ in vitro by cynandione A, a biacetophenone from Cynanchum wilfordii [J]. J Pharm Pharmacol,

2000,52(3):341-345.

- [3] Lee MK, Yeo H, Kim J, et al. Cynandione A from *Cynanchum wilfordii* protects cultured cortical neurons from toxicity induced by H₂O₂, L-glutamate, and kainate [J]. *J Neurosci Res*, 2000, 59(2): 259-264.
- [4] Li Y, Zhang J, Gu X, et al. Two new cytotoxic pregnane glycosides from *Cynanchum auriculatum* [J]. *Planta Med*, 2008, 74(5): 551-554.
- [5] Peng YR, Ding YF, Wei YJ, et al. Caudatin-2,6-dideoxy-3-O-methyl-β-D-cymaropyranoside 1 induced apoptosis through caspase 3-dependent pathway in human hepatoma cell line SMMC7721[J]. *Phytother Res*, 2011, 25(5): 631-637.
- [6] Shan L, Zhang WD, Zhang C, et al. Antitumor activity of crude extract and fractions from root tuber of *Cynanchum auriculatum* Royle ex Wight [J]. *Phytother Res*, 2005, 19(3): 259-261.
- [7] Zhang RS, Ye YP, Shen YM, et al. Two new cytotoxic C-21 steroidal glycosides from the root of *Cynanchum auriculatum* [J]. *Tetrahedro*, 2000, 56(24): 3875-3879.
- [8] Zhang RS, Ye YP, Shen YM, et al. Studies on the cytotoxic constituents of *Cynanchum Auriculatum* Royle ex Wight [J]. *Acta Pharm Sinica*, 2000, 35(6): 431-437. [张如松, 叶益萍, 沈月毛, 等. 白首乌体外抑制肿瘤细胞的成分研究[J]. *药学报*, 2000, 35(6): 431-437.]
- [9] Fei HR, Chen HL, Xiao T, et al. Caudatin induces cell cycle arrest and caspase-dependent apoptosis in HepG2 cell [J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(1): 131-138.
- [10] Peng YR, Li YB, Liu XD, et al. Apoptosis induced by Caudatin in human hepatoma cell line SMMC7721 [J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2008, 6(3): 210-213.
- [11] Fei HR, Cui LY, Zhang ZR, et al. Caudatin inhibits carcinomic human alveolar basal epithelial cell growth and angiogenesis through modulating GSK3β/β-catenin pathway [J]. *J Cell Biochem*, 2012. [Epub ahead of print]
- [12] Wang YQ, Yang B, Zhang RS, et al. Inhibitive effect of C-21 steroidal glycosides of *Cynanchum auriculatum* on rat glioma cells in vitro [J]. *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)*, 2011, 40(4): 402-407. [王一奇, 杨波, 张如松, 等. 白首乌 C-21 甾体苷体外抑制大鼠胶质瘤细胞生长的作用评价[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2011, 40(4): 402-407.]
- [13] Wang YQ, Liu YL, Zhang RS. Antitumor activity of cynanauriculoside A and its effect of apoptosis induction in tumor cells [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2009, 40: 920-924. [王一奇, 刘玉兰, 张如松. 白首乌新苷 A 抗肿瘤及诱导肿瘤细胞凋亡作用的研[J]. *中草药*, 2009, 40: 920-924.]
- [14] Zhang RS, Liu YL, Wang YQ, et al. Cytotoxic and apoptosis-inducing properties of auriculoside A in tumor cells [J]. *Chem Biodivers*, 2007, 4(5): 887-892.