

去甲斑蝥素诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的机制研究

石 钺¹, 张一昕¹, 李 猛², 刘 宇¹, 韩 雪¹, 郝 蕾¹, 王 茜¹, 曹丽静¹, 郭秋红¹
(1. 河北中医学院, 河北 石家庄 050200; 2. 河北医科大学附属第二医院, 河北 石家庄 050000)

摘 要: [目的] 探讨去甲斑蝥素对人胃癌 SGC-7901 细胞抑制和诱导凋亡作用。[方法] 采用不同浓度的去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)作用于胃癌 SGC-7901 细胞, 在扫描电镜下观察其形态特点, 采用流式细胞术测定经 NCTD 作用后的细胞生长周期及凋亡率, Western-blot 检测 Bcl-2、Mcl-1、Bax 的表达。[结果] 扫描电镜下可见, SGC-7901 细胞出现凋亡形态学改变。经去甲斑蝥素处理 SGC-7901 细胞后, 实验组 G₂/M 细胞明显多于对照组 ($P < 0.05$)。10 μg/ml 和 20 μg/ml 浓度去甲斑蝥素均能诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡 ($P < 0.05$), 其抑制率与 NCTD 浓度及作用时间相关。Western-blot 检测 Bcl-2、Mcl-1 蛋白表达减少, Bax 蛋白表达增加, 呈明显的剂量关系。[结论] 去甲斑蝥素对人胃癌 SGC-7901 细胞有抑制作用, 可能与其阻滞细胞周期诱导细胞凋亡有关。

关键词: 去甲斑蝥素; 胃癌; 细胞周期; 细胞形态

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)12-0999-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.12.A011

Norcantharidin Induces Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells SGC-7901

SHI Cheng¹, ZHANG Yi-xin¹, LI Meng², et al.

(1. Hebei University of Chinese Medicine, Shijiazhuang 050200, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

Abstract: [Purpose] To explore inhibition and apoptosis of norcantharidin on human gastric cancer SGC-7901 cell. [Methods] Gastric cancer SGC-7901 cells were treated with different concentrations (5, 10, 20, 40 μg/ml) of norcantharidin (NCTD) for 24, 48, 72h in vitro, morphological characteristics of apoptosis were observed with electron microscope, the cell growth cycle and apoptosis rate were determined by flow cytometry. Bcl-2, Mcl-1 and Bax expression were detected with Western blot. [Results] Under the electron microscope, SGC-7901 cells appeared morphological changes of apoptosis. After SGC-7901 treated with norcantharidin, G₂/M cells in the experimental group were significantly higher than that in control group ($P < 0.05$). The 10 μg/ml and 20 μg/ml norcantharidin induced apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells ($P < 0.05$), in a concentration and time-dependent manner. The expression of Bcl-2 and Mcl-1 protein expression was decreased, the Bax protein expression increased in a dose-dependent manner. [Conclusion] Norcantharidin has an inhibitory effect on human gastric cancer SGC-7901 cells, which is related to cell cycle arrest and apoptosis.

Key words: norcantharidin; gastric cancer; cell cycle; cell morphology

胃癌发病率居第 2 位, 死亡率居第 3 位, 严重威胁着人们的生命健康。近年来, 人们从祖国医学出发, 应用中医药及其提取物治疗胃癌, 取得了一定成效。本研究应用去甲斑蝥素(norcantharidin, NCTD)作用于人胃癌 SGC-7901 细胞, 通过观察其形态学变化、对细胞生长周期的抑制、对凋亡相关蛋白表达

的影响, 探讨 NCTD 诱导细胞凋亡的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材 料

人胃癌 SGC-7901 细胞株由河北医科大学基础实验室惠赠。去甲斑蝥素购自美国 Sigma 公司, RPMI-1640 培养基购自美国 Gibico 公司, 四甲基偶

收稿日期: 2016-03-23; 修回日期: 2016-07-20

基金项目: 河北中医学院青年科研基金(QNZ2015010)

通讯作者: 郭秋红, E-mail: qiuqiong70105@163.com

氮唑蓝 (MTT) 购自北京广源恒信科技发展有限公司, DMSO 购自美国 Sigma 公司, 胎牛血清购自杭州四季青公司, AnnexinV-FITC 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物试剂有限公司, 碘化丙啶(PI)为南京凯基生物技术发展公司产品, 兔抗人多克隆 Bax 抗体、兔抗人 Bcl-2、兔抗人 Mcl-1、兔抗人 β -actin 单克隆抗体均购自美国 Bioworld 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基内, 置于饱和湿度 5% 孵育箱中培养, 培养温度为 37℃, 细胞贴壁生长。取指数生长期的细胞进行体外实验。

1.2.2 药物处理

去甲斑蝥素溶于 DMSO, 配成 100mg/ml 储存浓度后冻存于 -20℃ 备用, 临用时采用细胞培养液配制成工作浓度 (10 μ g/ml 和 20 μ g/ml)。

1.2.3 扫描电镜观察细胞形态学变化

于加药后 24、48、72h 收集各组细胞浸入 PBS 中漂洗细胞表面, 用 4% 戊二醛溶液 4℃ 固定 2h, 然后吸出固定剂, 用 PBS 浸洗 2 次, 每次 10min, 再用 4℃ 预冷的锇酸 4℃ 固定 2h, 接着用 PBS 浸洗 2 次 (10min/次), 然后用 50%、70%、90%、100% 丙酮梯度脱水, 每级 10min, 完成后用 50%、70%、90%、100% 醋酸异戊酯置换, 每级 10min, 应用临界点干燥仪、CO₂ 液体进行干燥, 真空喷镀法进行样品导电处理, 最后在扫描电镜下观察细胞形态。

1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

取指数生长期细胞, 制成悬液, 分别加入 10 μ g/ml 和 20 μ g/ml 浓度的 NCTD, 于加药后 24h 收集细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后加入冰预冷的 70% 乙醇在 4℃ 条件下固定过夜, 离心弃去固定液后用 3ml PBS 重悬 10min, 400 目筛网过滤 1 次, 然后 800v/min 离心 5min, 弃去 PBS 后用 10 μ mol/L 碘化丙啶(PI)染色 5min, 4℃ 避光 30min 后混匀, 过 300 目筛网, 置于流式管中上流式细胞仪检测, LYSIS 软件分析细胞凋亡率。

1.2.5 AnnexinV/PI 染色检测 NCTD 对人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响

以 10、20 μ g/ml NCTD 处理胃癌 SGC-7901 细胞 24、48、72h 后, 分别消化收集各组细胞, 调整细胞密度至 1 $\times$ 10⁵/ml, 4℃ PBS 洗涤 2 次后弃上清, 然后加

入 100 μ l 重悬细胞, 置冰浴。加 10 μ l AnnexinV-FITC 和 10 μ l PI 于细胞悬液中, 轻轻混匀, 将试管置于室温避光染色 15min, 然后补加 400 μ l 混悬细胞, 流式细胞仪检测凋亡细胞的百分率。

1.2.6 Western blot 法检测 Bcl-2、Mcl-1、Bax 蛋白表达

收集对照组和药物组 (5、10、20、40 μ g/ml) 作用 24h 后细胞, PBS 洗涤 2 遍, 分别加入 300 μ l 蛋白裂解液, 冰上作用 1h, 12 000r/min, 离心 10min, 取上清液, 样品置于 -80℃ 保存, Bradford 法测定蛋白质浓度, 每个样品孔加入 50 μ g 蛋白, 进行 12% SDS-PAGE 分离蛋白, 将蛋白转移到 PVDF 膜上, 1% BSA 37℃ 封闭 1h, 加入 1:500 稀释的 Bcl-2、Mcl-1 和 Bax 多克隆抗体, 室温振荡 5h, 洗膜后, 荧光二抗 (抗兔 IgG) 避光孵育 1h, 洗膜, 发光。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 对各组数据均进行方差齐性检验, 方差齐时不同组间用单因素方差分析, 两两比较用 SNK *q* 检验; 方差不齐用 K-WH 检验, 两两比较用 Neminy 法。检验水准 $\alpha < 0.05$ 。

2 结 果

2.1 细胞形态学变化

扫描电镜下, 未经 NCTD 处理的空白对照组细胞形态正常, 细胞表面微绒毛舒展, 细胞间连接紧密。经浓度为 10 μ g/ml 的 NCTD 处理 24h 后, 细胞固缩变小, 细胞表面微绒毛消失变得光滑, 细胞间连接稀疏, 48h 后细胞表面更光滑, 细胞间连接消失, 72h 后胞核碎裂, 胞浆溶解, 细胞呈现凋亡状态。经浓度 20 μ g/ml 的 NCTD 处理 24h 后, 胞核开始碎裂, 胞浆溶解, 48h 后细胞溶解凋亡, 72h 后细胞完全裂解凋亡 (Figure 1)。

2.2 去甲斑蝥素对人胃癌 SGC-7901 细胞周期的作用

经 10 μ g/ml、20 μ g/ml 去甲斑蝥素处理人胃癌 SGC-7901 细胞后, 流式细胞仪分析结果显示: SGC-7901 细胞 G₀/G₁ 期和 S 期细胞逐渐减少, G₂/M 期细胞逐渐增多 (Table 1, Figure 2)。

2.3 去甲斑蝥素诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡

经 10 μ g/ml 及 20 μ g/ml NCTD 作用于人胃癌 SGC-7901 细胞均明显诱导其凋亡, 分别作用 24、48、72h 后, SGC-7901 细胞受到不同程度地抑制, 并

呈剂量和时间依赖性,随着作用时间及药物浓度的增大,细胞凋亡率逐渐升高,在 20μg/ml 作用 72h 时出现最大抑制率(Table 2)。

2.4 Bcl-2、Mcl-1 和 Bax 蛋白的表达
 Bcl-2、Mcl-1 蛋白表达减少,Bax 蛋白表达增加,且随药物浓度的增加其表达也增加(Figure 3),呈明

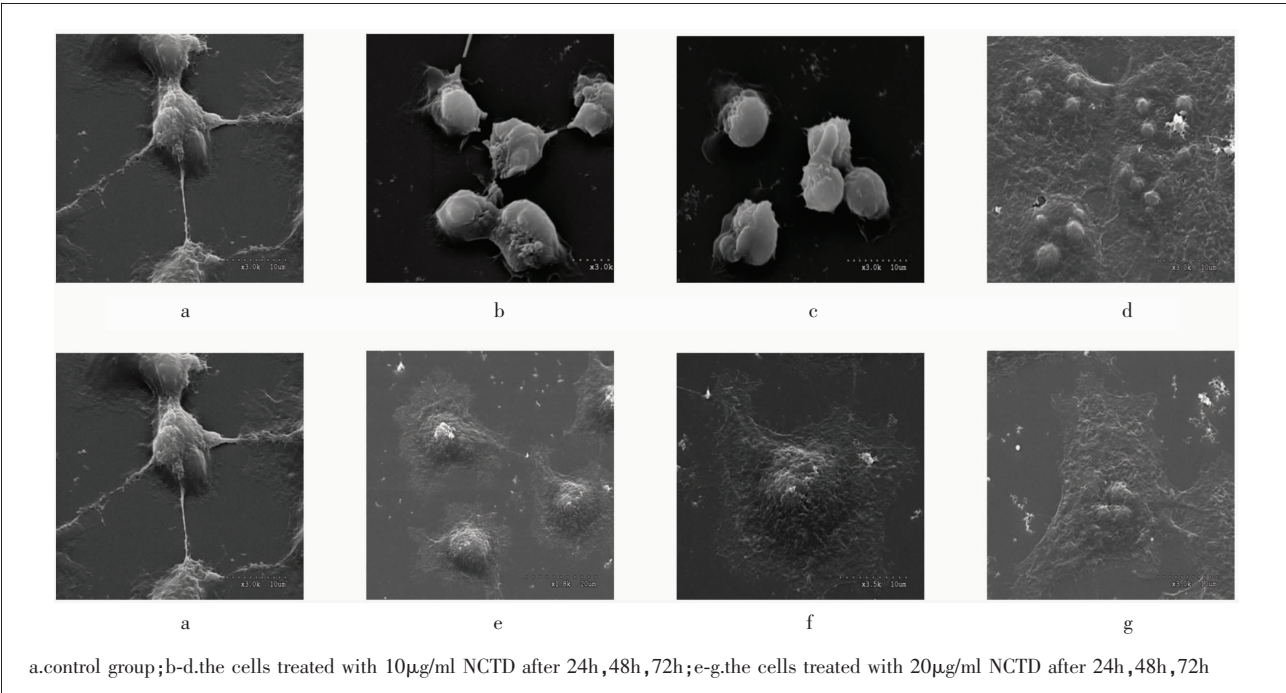


Figure 1 Effect of norcantharidin on apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells

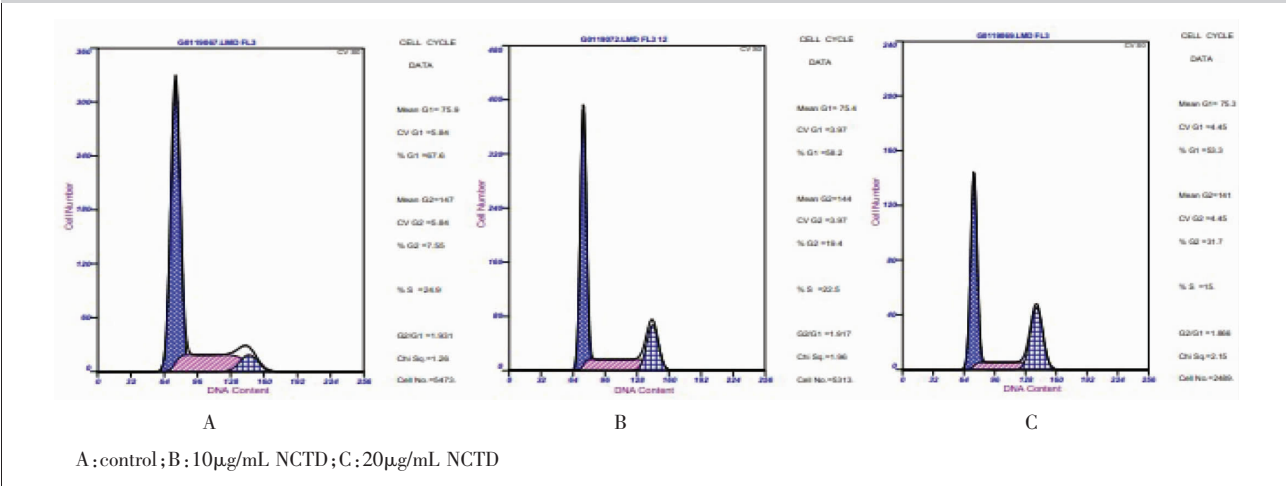


Figure 2 Apoptosis of gastric cancer SGC-7901 cells induced by NCTD

Table 1 NCTD on cell cycles of SGC-7901 cells in 24 hours($\bar{x}\pm s$)

Group	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	67.39±1.46	24.47±1.35	7.64±1.63
NCTD 10μg/ml	58.31±1.49	22.34±0.98	18.36±1.03 [☆]
NCTD 20μg/ml	43.82±1.06	20.27±1.05	34.85±1.27 ^{☆*}

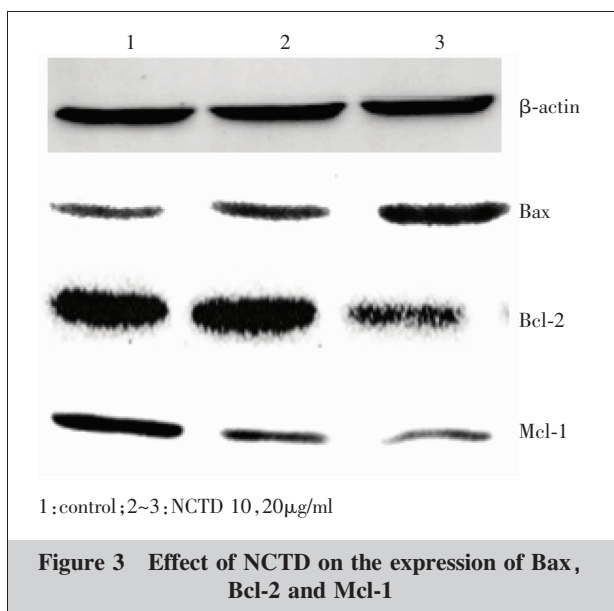
Note: [☆] Compared with control group, $P<0.05$;
^{☆*} Comparison between the two treatment groups, $P<0.05$.

Table 2 NCTD on SGC-7901 cell apoptosis rate in different time($\bar{x}\pm s$)

Group	24h	48h	72h
Control	0.62±0.03	1.13±0.02	1.84±0.15
NCTD 10μg/ml	15.62±1.09	49.85±0.96	76.91±0.93 [*]
NCTD 20μg/ml	29.82±1.16	65.37±0.92	90.35±1.07 ^{**}

Note: ^{*} Compared with control group, $P<0.05$;
^{**} Compared with control group, $P<0.01$.

显的剂量关系。



3 讨论

斑蝥 (cantharidies) 在我国应用于消化道肿瘤及肝炎等疾病的治疗已有近两千多年的历史,但由于其对泌尿系统的毒副作用限制了其在临床的大规模应用。斑蝥素 (cantharidin, CTD) 是从斑蝥的干燥虫体中提取的有效活性成分,临床上可以用于治疗多种肿瘤。有研究发现,斑蝥素可以抗风湿、抗炎^[1],也可以升高白细胞^[2],而且没有骨髓抑制作用^[3]。然而,内服斑蝥素可以引起胃黏膜的炎症反应,损伤肾功能^[4]。去甲斑蝥素 (noncantharidin, NCTD) 为斑蝥素的衍生物,是斑蝥素经人工合成的一种新型的抗癌药物,其化学结构与斑蝥素相似,其毒副作用明显减低,同时还有独特的升高白细胞作用,且保留了较强的抗癌作用^[5],抗癌谱较广,其抗癌作用机制为提高癌细胞呼吸控制率及溶酶体酶活性,干扰癌细胞分裂,抑制其 DNA 合成。

NCTD 作为斑蝥素衍生物具有很好的抗癌作用。近年来,诸多医家对 NCTD 研究发现其对肺癌、肝癌、食管癌、结肠癌^[6-12]等多种恶性肿瘤细胞均有很好的抑制生长、诱导凋亡作用。

凋亡基因 *Bax*、*Mcl-1* 是反映细胞凋亡的重要指标。*Bax* 家族主要包括 *Bcl-2*、*Bax*、*Bcl-xL* 和 *Mcl-1* 等。其中 *Bcl-2*、*Mcl-1* 及 *Bcl-xL* 抑制细胞凋亡,而 *Bax* 则促进凋亡。*Bax* 是一个非常受关注的细胞凋亡

抑制基因,可以延长细胞存活期,抑制各种因素对细胞凋亡的诱导,阻断引起细胞凋亡的最后通路,促使肿瘤细胞异常生长。当细胞 DNA 受损时,*Bax* 能与 *Bcl-2* 形成二聚体,拮抗 *Bcl-2* 的抗凋亡功能,导致细胞凋亡的发生。髓样细胞白血病-1 (myeloid cell leuke-lia-1, *Mcl-1*) 基因是 *Bcl-2* 抗凋亡家族成员之一,自 1993 年在研究髓白血病细胞系的过程中第一次被发现后,人们发现 *Mcl-1* 在多种细胞系中表达,并且证实了它是凋亡调控分子家族重要成员之一,该基因表达与肿瘤的发生发展有着密切的联系。

本研究应用不同浓度的去甲斑蝥素作用于人胃癌 SGC-7901 细胞,用 Western-blot 法检测抗凋亡蛋白 *Mcl-1*、*Bcl-2* 及促凋亡蛋白 *Bax* 的表达,采用扫描电镜及流式细胞分析,动态观察胃癌细胞的变化特点。结果表明,去甲斑蝥素处理 SGC-7901 细胞后,抗凋亡蛋白 *Mcl-1*、*Bcl-2* 表达减少,促凋亡蛋白 *Bax* 表达增加,NCTD 对细胞生长产生了明显的抑制作用,细胞结构破坏、形态改变,生长周期停滞在 G₂/M 期,细胞停止生长增殖,呈现凋亡状态,且其凋亡与药物作用时间及药物浓度呈依赖性,随着作用时间延长及去甲斑蝥素浓度的增加,细胞凋亡率逐渐升高 ($P<0.05$),说明 NCTD 可以通过调控抗凋亡蛋白 *Mcl-1*、*Bcl-2* 及促凋亡蛋白 *Bax* 的表达来达到抑制胃癌细胞增殖,诱导其凋亡的目的。

细胞凋亡进程是由多种因素、多种基因参与的复杂的生命过程。本实验研究证实,去甲斑蝥素可能通过调控抗凋亡蛋白 *Mcl-1*、*Bcl-2* 及促凋亡蛋白 *Bax* 的表达来破坏细胞结构,阻断细胞生长,使细胞的生长周期停滞在某一期,从而达到诱导细胞凋亡,抑制细胞增殖和生长的作用,最终为临床上该疾病的治疗提供新的思路与理论依据。

参考文献:

- [1] He TP, Mo LE, Liang NC. Effect of norcantharidin on the expression of NAG-1 in HO-8910PM cell line[J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2007, 38(4): 356-359. [何太平, 莫丽儿, 梁念慈. 去甲斑蝥素对 HO-8910PM 细胞中 NAG-1 表达的影响[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(4): 356-359.]
- [2] Huang L, You WW. Research progress of cantharidin and its derivatives [J]. Guangdong Chemical Industry, 2009, 36(9): 246-248. [黄兰, 游文玮. 斑蝥素及其衍生物的研究进

- 展[J].广东化工,2009,36(9):246-248.]
- [3] Wang CC, Wu CH, Hsieh KJ, et al. Cytotoxic effects of cantharidin on the growth of normal and carcinoma cells [J]. Toxicology, 2000, 147(2): 77-87.
- [4] An ZY, Wang Z, Zhao Y. The anti-tumor research progress of cantharidin and its derivatives [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine, 2009, 5(1): 128-130. [安中原, 王正, 赵越. 斑蝥素及其衍生物的抗肿瘤研究进展[J]. 亚太传统药, 2009, 5(1): 128-130.]
- [5] Cao BJ, Wang JZ. Cantharidin synthesis process improvements [J]. Tinajin Phrame, 1995, 7(2): 35-36. [曹炳军, 王俊忠. 去甲斑蝥素合成工艺的改进[J]. 天津药学, 1995, 7(2): 35-36.]
- [6] Shen HS, Song ZQ, Li SW, et al. Experiment study on antineoplastic effect of cantharidin and norcantharidin for bladder squamous cell carcinoma [J]. J Clin Urology (China), 2014, 29(7): 620-624. [沈海山, 宋志强, 李胜文, 等. 斑蝥素和去甲斑蝥素抑制膀胱鳞状细胞癌增殖的实验研究[J]. 临床泌尿外科杂志, 2014, 29(7): 620-624.]
- [7] Yao KT, Chen JS, Chen CL. Effect of norcantharidin on the proliferation, apoptosis, cell cycle and activity of NF- κ B on human leukemia cell line K562 [J]. Chinese Clinical Oncology, 2015, 20(5): 406-410. [姚铠涛, 陈江声, 陈春莉. 去甲斑蝥素对白血病细胞系 K562 的增殖、凋亡、细胞周期及 NF- κ B 活性的影响 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2015, 20(5): 406-410.]
- [8] Xue XJ, Wang HL, Chen T. Hypermethylation of PTPRO and expression of hTERT in human esophageal cancer cell line Eca-109 treated with norcantharidin [J]. Chinese Clinical Oncology, 2016, 21(4): 293-296. [薛晓婕, 汪宏良, 陈婷. 去甲斑蝥素对食管癌细胞株 Eca-109 中 hTERT 的表达和 PTPRO 基因启动子甲基化影响的实验研究[J]. 临床肿瘤学杂志, 2016, 21(4): 293-296.]
- [9] Fu YY, Li L, Zhang J, et al. Effect of NCTD on immune function of mice with non-small cell lung cancer [J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2015, 18 (6): 662-665. [付盈盈, 李林, 章激, 等. 去甲斑蝥素对非小细胞肺癌模型小鼠免疫功能的影响 [J]. 实用药物与临床, 2015, 18(6): 662-665.]
- [10] Liu XY, Li J, Gan L, et al. Inhibition effect of norcantharidin on proliferation of human pancreatic cancer cell PANC-1 in vitro [J]. China Journal of Modern Medicine, 2015, 25(13): 1-4. [刘晓燕, 李娟, 甘淋, 等. 去甲斑蝥素体外抑制人胰腺癌细胞株 PANC-1 增殖的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25(13): 1-4.]
- [11] Ren J, Li G, Zhao W, et al. Norcantharidin combined with ABT-737 for hepatocellular carcinoma: therapeutic effects and molecular mechanisms [J]. World J Gastroenterol, 2016, 22(15): 3962-3968.
- [12] Liu MC, Liu L, Wang XR, et al. Folate receptor-targeted liposomes loaded with a diacid metabolite of norcantharidin enhance antitumor potency for h22 hepatocellular carcinoma both in vitro and in vivo [J]. International Journal of Nanomedicine, 2016, 11: 1395-1412.

作者/通讯作者校对文稿须知

作者/通讯作者自校拟发排校样稿,是期刊出版工作中不可缺少的重要环节,也是确保期刊质量的重要手段。特此重申,请作者/通讯作者务必按以下要求进行校对:

1. 首先全面校对全文,对编辑提出的校样稿中需特别注意校对及需补充的内容,必须予以改正或解释。
2. 所有需修改和补充的内容,均请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范的汉字);必须改动的字符,直接在校样稿的空白处写出,所增删字数最好相符。
3. 文题、作者、单位名称、邮政编码、通讯作者等信息,务必确认无误。
4. 对正文文字(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等应认真细致逐一校对;请用规范的通用药品名称(不用商品名)和医学名词,认真核查并使用标准计量单位及药物剂量。
5. 参考文献缺项的部分,应按本刊规定的著录格式进行补充。请作者务必认真核实所引用文献是否正确,并核查正文中角码是否与文后所列参考文献序号对应。
6. 校对完毕请作者/通讯作者签名,并在规定的日期内将校样稿寄回编辑部。如有要求补充的资料,也需一并寄回。
7. 由于出版周期的限制,如作者/通讯作者不能在规定时间内校对寄回,请及时联系本刊编辑部说明原因,否则可能造成该文稿延期出版,或者取消刊发。

《中国肿瘤》编辑部