

蜂胶黄酮 pinobanksin-3-acetate 对胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的影响及机制

其曼古丽·吐尔洪, 夏米西丁·阿不都热依木, 阿依努尔·玉苏普, 胡尼其古丽·阿巴克, 依米提·热合曼
(新疆大学生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

摘要: [目的] 探讨蜂胶黄酮 pinobanksin-3-acetate 对体外培养的胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡及部分基因表达的影响。 [方法] 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)显色法检测不同浓度 PB3A 作用不同时间对 SGC-7901 细胞生长所产生的影响, 计算生长抑制率和 IC₅₀ 值; 倒置显微镜观察 PB3A 干预后细胞的形态变化; Annexin V-FITC/PI 双染色、流式细胞仪检测细胞凋亡率; Western blot 法检测 PB3A (40、80 μg/ml) 干预 24h 后 SGC-7901 细胞 FOS、GEM、RGS2、GADD45G 及 HSPA6 的蛋白表达水平, 利用 Spearman 进行候选基因相关性分析。 [结果] PB3A 可明显抑制 SGC-7901 细胞的增殖 ($P < 0.05$), 且抑制作用呈时间和剂量依赖性。随 PB3A 剂量的增多, SGC-7901 细胞的凋亡率渐增, 细胞的早期凋亡率从 25.6% 提高到 50.2%。通过 40 μg/ml 和 80 μg/ml PB3A 干预胃癌 SGC-7901 细胞 24h 后与对照组相比, 高浓度组 GADD45G、HSPA6、GEM、RGS2 及 FOS 蛋白表达有极显著性差异 ($P < 0.01$), 而低浓度组 GADD45G、GEM 和 HSPA6 蛋白表达有显著性差异 ($P < 0.05$)。 [结论] PB3A 在体外可明显抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖并诱导凋亡的作用, 并呈剂量依赖性变化趋势。机制可能与其诱导 GEM、RGS2、FOS 及 HSPA6 蛋白的上调表达有关, 以上基因可能相互协同导致肿瘤细胞增殖信号通路的抑制并促进胃癌细胞的凋亡。

关键词: PB3A; 胃肿瘤; SGC-7901 细胞株; 细胞凋亡

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2017)10-0812-08
doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2017.10.A013

Effect of Propolis Flavonoid Pinobanksin-3-acetate on Proliferation, Apoptosis of Gastric Cancer SGC-7901 Cells and Related Mechanism

Chimengul·Turghun, Shamshidin·Abduriyim, Ayinuer·Yusupu, et al.
(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi 830046, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of propolis flavonoid pinobanksin-3-acetate (PB3A) on proliferation, morphology and apoptosis in human gastric cancer cell line SGC-7901 and the possible mechanism. [Methods] Human gastric cancer AGC-7901 cells were treated with PB3A at concentration of 10, 20, 40 or 80 μg/ml for 24, 48 or 72h. The proliferation of SGC-7901 cells was analyzed by the MTT assay; the morphological changes of SGC-7901 cells were observed by the inverted microscopy; cell apoptosis was determined by FCM with Annexin V-FITC/PI double labeling; the expression of FOS, GEM, RGS2, GADD45G and HSPA6 proteins in SGC-7901 cells were detected by Western blot. [Results] PB3A inhibited SGC-7901 cell proliferations in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.01$). The FCM analysis showed that the PB3A significantly increased the apoptosis of SGC-7901 cells in a dose-dependent manner. Compared with control group, the expression of FOS, GEM, RGS2, GADD45G and HSPA6 was significantly increased in SGC-7901 cells treated with 80 μg/ml PB3A for 24h ($P < 0.01$); while the expression of GADD45G, GEM and HSPA6 was increased in SGC-7901 cells treated with 40 μg/ml PB3A ($P < 0.05$). [Conclusion] PB3A can inhibit the proliferation of SGC-7901 cells by inducing apoptosis through up-regulation of FOS, GEM, RGS2, GADD45G and HSPA6 expression.

Key words: PB3A; gastric neoplasms; SGC-7901 cells; cell apoptosis

恶性肿瘤的发生是一个由体内正常细胞经过六

项生物学功能的改变而发生的过程, 包括增殖信号的保持、躲避增殖、抵抗生理性死亡、获取永久性增殖活性、诱导血管生成和激活浸润与转化^[1]。由于尚

收稿日期: 2016-05-11; 修回日期: 2017-03-25

基金项目: 国家自然科学基金 (31260280)

通讯作者: 依米提·热合曼, E-mail: yimitrahman@sohu.com

未发现具有选择性的抑制或杀死肿瘤细胞而对正常细胞无毒的抗肿瘤药物,使得传统化疗技术的应用受到限制^[2]。胃癌是在中国发病率高且最常见的消化道肿瘤。近年来,我国胃癌患者的人数占全世界的42%^[3],研究人员不仅试图提高治疗效果,也在努力寻找新的方法和药物来治疗胃癌。从天然药物和传统民族药中提取和寻找抑制肿瘤的有效成分已成为治疗肿瘤的希望和新线索^[4]。蜂胶是蜜蜂从植物嫩芽、针叶林树皮或者树缝上采集树脂,混入花粉、蜂蜡和蜜蜂上颌腺分泌物后经咀嚼加工形成的一种天然树脂状物质,具有特殊芳香气味的黏稠胶状固体物^[5]。研究证明,蜂胶具有多种生物活性,这与其含有种类丰富、数量繁多的黄酮类化合物是密不可分。依米提·热合曼等^[6]从蜂胶醇溶性组分中分离了黄酮单体成分短叶松素-3-乙酸酯(pinobanksin-3-acetate, PB3A),呈黄色,密度 1.46g/cm³,溶解于二甲基亚砜(DMSO)中,是各种抗癌植物、蜂蜜和蜂胶的主要活性成分,具有一定的抗菌、抗氧化活性,蜂胶中含量较丰富,体外实验研究发现该物质对人白血病 Jurkat 细胞表现出强烈的增殖抑制作用,调节细胞周期并通过剂量和时间依赖性方式促进细胞凋亡^[7]。有研究分析了墨西哥索诺拉州蜂胶的化学成分和抗增殖活性,发现索诺兰蜂胶对小鼠和人类肿瘤细胞株具有强烈的抗增殖活性,其活性与药物的剂量有关,而索诺兰蜂胶最丰富的成分是 PB3A^[8]。

本研究通过体外实验,检测 PB3A 对胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用,以及凋亡相关基因 *HSPA6*、*RGS2*、*FOS*、*GADD45G*、*GEM* 等蛋白表达水平的影响,旨在找出 PB3A 对癌细胞作用的特异性基因靶点,分析 PB3A 对胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用,并探究其作用机制与候选基因表达之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

质量分数≥99%的蜂胶黄酮 PB3A 为新疆大学生命科学与技术学院依米提·热合曼教授提供;胃癌 SGC-7901 细胞株购自上海细胞生物研究所细胞库。二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑盐(MTT)为 MP 公司产品。DMEM 培养基由 Hyclone 公司提供,胎牛血清由 Gibco 公司提供。Annexin V-FITC 凋亡

检测试剂盒为美国 BD 公司产品。流式细胞仪为美国贝克曼库尔特(Beckman)公司所生产。 β -actin、GADD45G、HSPA6、GEM、RGS2 及 FOS 单克隆抗体(兔抗人)购自博奥森公司。兔抗人 IgG 二抗购自 Signa 公司。RIPA 蛋白裂解液、预染蛋白相对分子质量标准选自 Thermo 公司,BCIP/NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒购自武汉博士德公司。上养缓冲液、SDS-PAGE 制胶试剂盒购自北京 Solarbio 公司。PVDF 膜、垂直蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

SGC-7901 细胞置孵箱(37℃,50ml/L CO₂)内培养,给予 100ml/L 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,其内另加 1.0×10⁵U/L 青霉素和链霉素,pH 调至 7.2,根据细胞生长状况每 2~3d 换一次液。当细胞生长进入对数生长期时,分别给予 PB3A,临用前以 DMSO 溶解配成浓度为 100μg/ml 的母液,用 DMEM 培养液稀释成不同浓度(DMEM 培养液中 DMSO 浓度<0.1%)。

1.2.2 蜂胶黄酮 PB3A 对胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制作用的检测

取对数生长期的 SGC-7901 细胞,用 2.5g/L 胰蛋白酶消化培养,用 10%胎牛血清的 DMEM 培养液配成单个细胞悬液,以每孔 4×10³ 个细胞接种于 96 孔培养板培养,将培养板移入 CO₂ 孵箱中,在 37℃ 下常规培养 24h 后吸除原培养液,加入含 PB3A 浓度分别为 10、20、40、80μg/ml 的 DMEM 培养液 200μl,并设对照组(仅加同溶剂剂量的 DMSO),以上各组均设 6 个复孔,分别将各组细胞继续培养 24、48、72h 后,进行 MTT 实验。每孔加入 MTT 溶液(5g/L)20μl,继续培养 4h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入 DMSO 150μl,轻轻振荡 10min,使结晶充分溶解,用酶联免疫标记分析仪在 490nm 波长处测定各孔的吸光度 A 值(A₄₉₀),按下列公式计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率 R = [1 - (A_{实验组} - A_{空白组}) / (A_{对照组} - A_{空白组})] × 100%。

1.2.3 用倒置显微镜动态观察细胞形态学变化

取对数生长期的 HCT-116 细胞,用 2.5g/L 胰蛋白酶消化后,以每孔 5×10⁴ 个细胞接种于 6 孔培养板培养,24h 后吸除原培养液,加入 PB3A 浓度分别为 20、40、80μg/ml 的 DMEM 培养液 2ml,继续培养 24、48、72h 后,用倒置显微镜观察细胞形态学变化。

1.2.4 蜂胶黄酮 PB3A 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响

取对数生长期的 SGC-7901 细胞经 2.5g/L 胰蛋白酶消化后,以每孔 5×10^4 个细胞接种于 6 孔培养板培养,24h 后吸除原培养液,加入 PB3A 浓度分别为 20、40、80mg/L 的 DMEM 培养液 2ml,设培养液中不加药物(加相同浓度的 DMSO)为对照组,继续培养 24h 后收集细胞,离心(1500r/min,4°C)5min 后弃上清,用 PBS 重悬细胞并计数,取大约 1.5×10^5 细胞悬浮液,离心(1500r/min,4°C),弃上清,再次重悬离心后弃上清,分别加入 400 μ l 的 1 \times Binding Buffer(用蒸馏水稀释,10 \times Binding Buffer),轻轻地充分悬浮细胞,在室温下避光孵育 20min,再加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI,轻轻混匀,在 1h 内进行流式细胞仪检测,检测时激发波长 $E_x=488\text{nm}$,发射波长 $E_m=530\text{nm}$,FITC 的绿色荧光 FITC 通道为 FL1,PI 红色荧光 PI 通道为 FL2。

1.2.5 蛋白表达分析

提取蛋白前将 PMSF 10 μ l 加入 1ml RIPA 蛋白裂解液,取细胞约 1×10^7 个,加入细胞裂解液。BCA 蛋白定量法检测总蛋白浓度,根据标准曲线计算出蛋白浓度。灌制 8% 和 12% 的分离胶,5% 的 SDS-PAGE 浓缩凝胶中将蛋白分离并转移至 PVDF 膜上,封闭液中常温封闭 2h,加入稀释后的一抗稀释液(β -actin 1:200,FOS 1:300,HSPA6 1:300,GADD45G 1:300,GEM 1:100,RGS2 1:200),4°C 过夜,取出后洗膜再加入二抗 (1:10 000),室温孵育 2h,再洗膜进行 BCIP/NBT 显色。细胞中 GADD45G、HSPA6、GEM、RGS2 及 FOS 及 β -actin 条带的强度比值平均值(校准值),UVI 凝胶成像系统摄像,采用相关图像分析软件进行条带灰度值扫描分析软件分析各组蛋白条带灰度值,与 β -actin 相对灰度比代表目的蛋白表达的相对含量,实验重复 5 次,目的蛋白表达的相对强度=目的条带灰度值/ β -actin 条带的灰度值,以 $\bar{x} \pm \text{SD}$ 来表示。

1.2.6 统计学处理

实验数据以 $\text{mean} \pm \text{SD}$ 表示,以 SPSS19.0 版专用统计分析软件对各组数

据进行一般线性模型单变量方差分析,并进行回归分析计算 IC_{50} ,数据分析采用 Graphpad Prism6 软件。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PB3A 对人胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用

PB3A(浓度为 10、20、40、80mg/L)作用 SGC-7901 细胞 24、48、72h 后,随着 PB3A 浓度的增加和作用时间的延长,SGC-7901 细胞的增殖抑制率逐渐升高, IC_{50} 值分别为 99.067、44.486 和 11.216 $\mu\text{g}/\text{ml}$,能显著抑制 SGC-7901 细胞的增殖,且呈现时间和剂量依赖性($P < 0.01$)(Table 1, Figure 1)。

2.2 PB3A 对胃癌 SGC-7901 细胞形态学的影响

浓度分别为 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PB3A 作用于 SGC-7901 细胞不同时间段(24、48、72h)后,与对照组的生长状况相比,加药组细胞生长稀疏,变圆并有脱落现象,而且随着药物剂量的加大、作用时间的延长,细胞形态的变化越显著(Figure 2、3)。

Table 1 The effect of different concentrations of PB3A on the proliferation of gastric cancer SGC-7901 cells (n=6)

PB3A concentrations ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Inhibition rate (%)		
	24h	48h	72h
Control	0	0	0
10	10.893 \pm 1.046 ^a	19.519 \pm 2.171 ^a	55.212 \pm 0.943 ^a
20	16.774 \pm 1.602 ^{ab}	35.630 \pm 1.332 ^{ab}	65.615 \pm 1.901 ^{ab}
40	29.880 \pm 0.856 ^{abc}	56.164 \pm 1.006 ^{abc}	69.731 \pm 1.293 ^{abc}
80	38.692 \pm 0.996 ^{abcd}	67.924 \pm 1.019 ^{abcd}	74.654 \pm 0.891 ^{abcd}
IC_{50}	99.067	44.486	11.216

Note: a; vs. control, $P < 0.01$; b; vs. 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group, $P < 0.01$; c; vs. 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group, $P < 0.01$; d; vs. 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group $P < 0.01$.

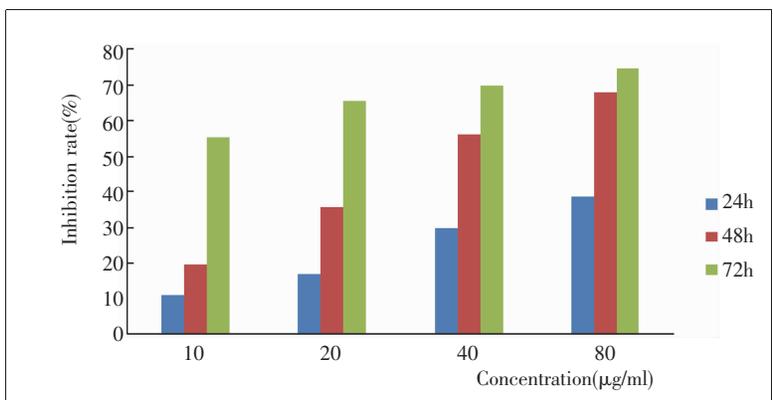


Figure 1 The inhibition curve of different concentrations of PB3A on proliferation of gastric cancer SGC-7901 cells

2.3 PB3A 对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

自然状态下 SGC-7901 细胞的凋亡率为 3.7%，浓度为 20、40、80 $\mu\text{g/ml}$ PB3A 干预 SGC-7901 细胞 24h 后，早期凋亡率分别为 25.6%、42.4%、50.25%，均显著高于对照组（同时设置 DMSO 溶剂对照组做参比，凋亡率为 5.2%）。高浓度药物干预组（80 $\mu\text{g/ml}$ ）凋亡率（50.25%）与顺铂（40 $\mu\text{g/ml}$ ）凋亡率（31.5%）比较差异有显著性（ $P<0.01$ ）。随着 PB3A 剂量的加大，SGC-7901 细胞的凋亡率有不同程度增加（Figure 4）。

2.4 PB3A 对 SGC-7901 细胞 HSPA6、GADD45G、GEM、RGSR 及 FOS 蛋白表达的影响

SGC-7901 细胞经药物（PB3A 40、80 $\mu\text{g/ml}$ ）干预 24h 后，与对照组相比，GADD45G、HSPA6、GEM、RGSR 及 FOS 蛋白条带均呈逐级变深趋势（Figure 5）。40 $\mu\text{g/ml}$ 的 PB3A 干预组与相应的对照组灰度值比较，GADD45G、GEM 和 HSPA6 蛋白表达强度与相应的对照组相比差异有显著性（ $P<0.05$ ）。80 $\mu\text{g/ml}$ 的 PB3A 干预组与相应的对照组灰度值比较 GADD45G、HSPA6、GEM、RGSR 及 FOS 蛋白表达情况均发生极显著的变化并呈剂量依赖性（ $P<0.01$ ）（Table 2）。

3 讨论

胃癌是在中国发病率高且最常见的消化道恶性肿瘤，

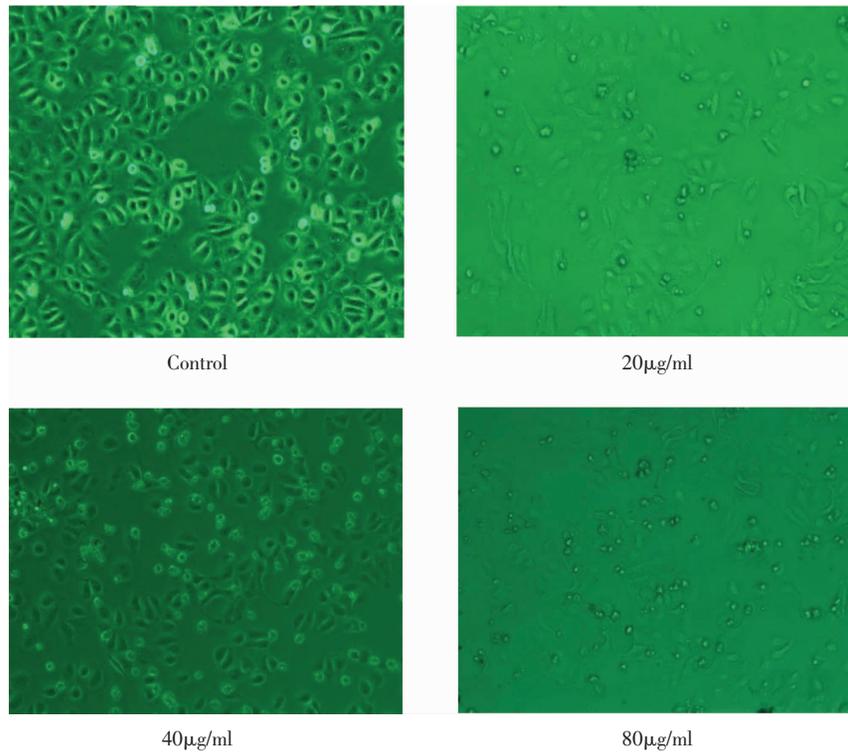


Figure 2 Morphological appearance of SGC-7901 cells under inverted microscope after cultured(24h) with PB3A(20,40,80 $\mu\text{g/ml}$) suggesting a concentration dependent manner

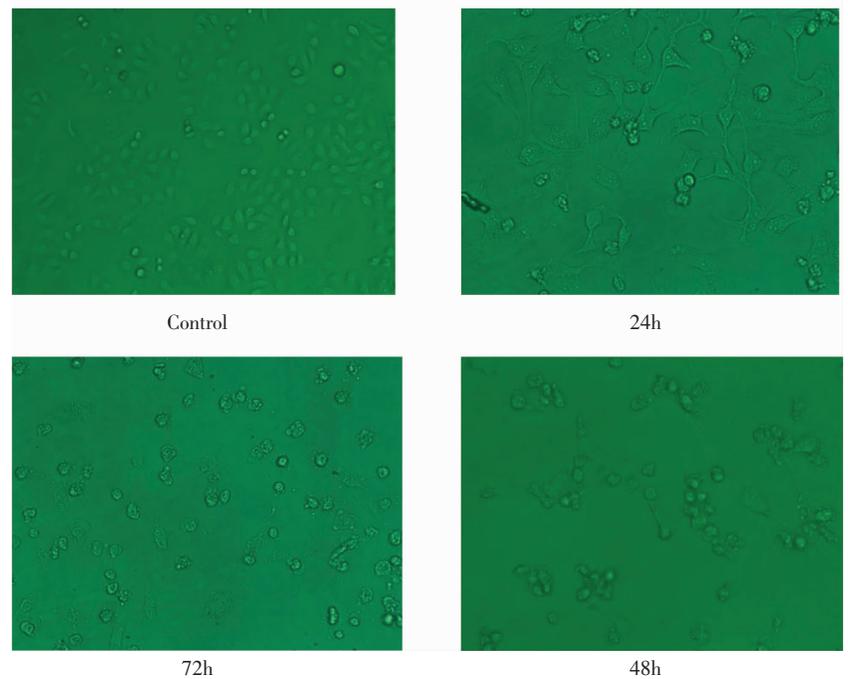


Figure 3 Morphological appearance of SGC-7901 cells under inverted microscope after cultured(24,48,72h) with PB3A(40 $\mu\text{g/ml}$) suggesting a time dependent manner

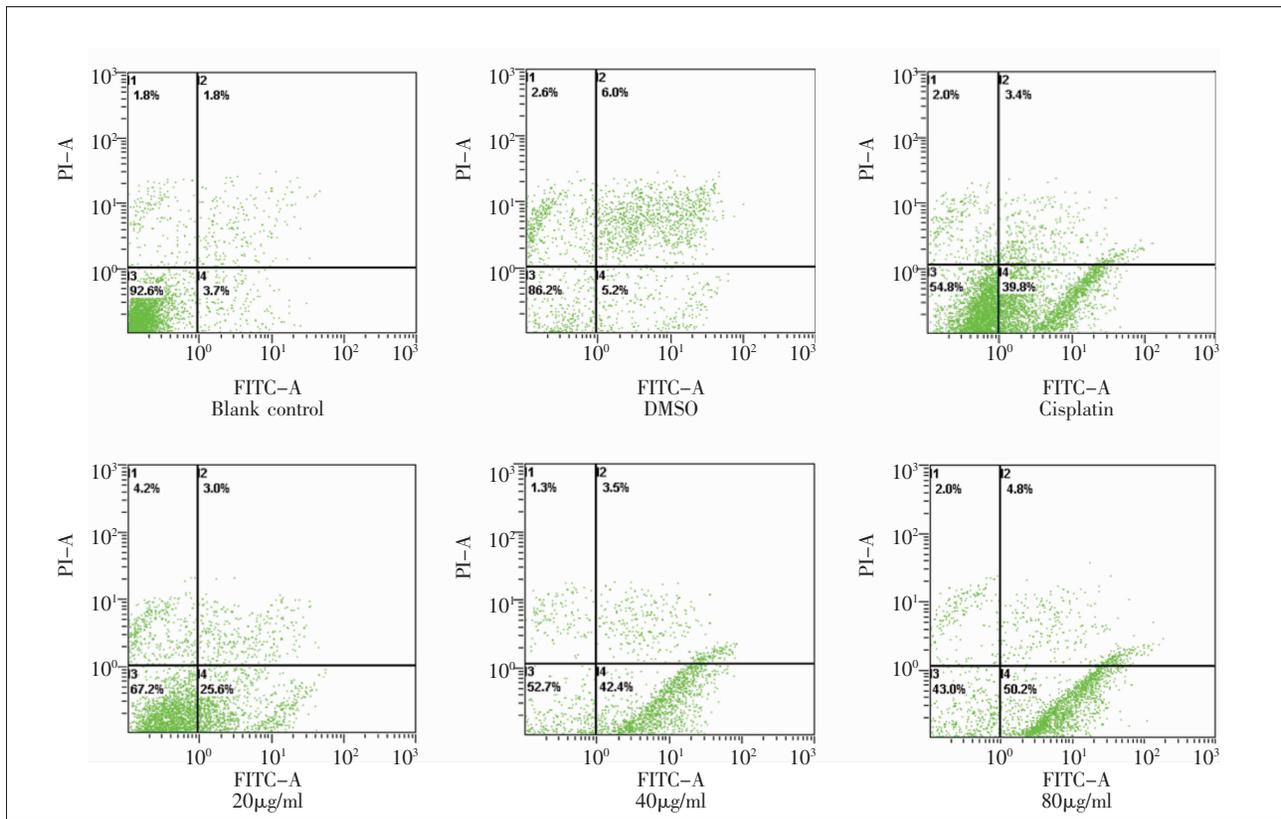
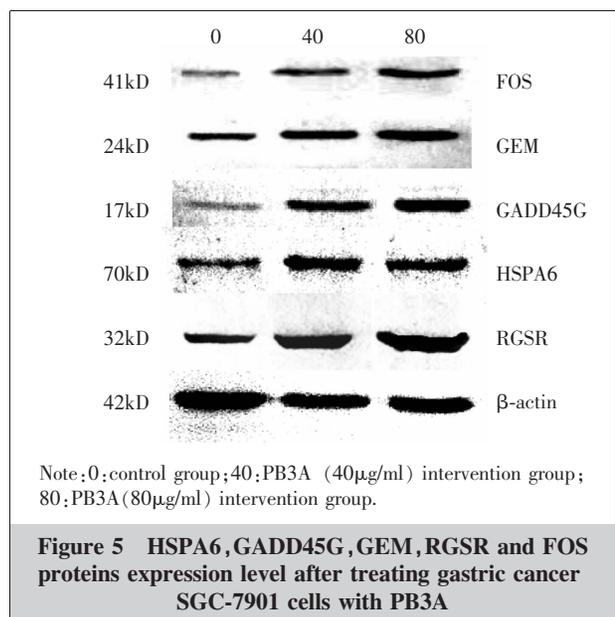


Figure 4 The effect of different concentrations of PB3A increased the apoptotic rate in gastric cancer SGC-7901 cells suggesting a dose-dependent manner

病死率高且有效治疗方法缺陷,是威胁人类健康的恶性肿瘤之一,研究人员不仅试图提高治疗效果,也在努力寻找新的方法和药物来治疗胃癌。

本研究通过 MTT 法检测不同浓度的 PB3A 对胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用,研究发现 PB3A 对胃癌 SGC-7901 细胞有显著的增殖抑制作用,随药物浓度的增加以及作用时间的延长,PB3A 对 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用越显著。PB3A 干预后倒置显微镜观察 SGC-7901 细胞的形态,发现悬浮细胞增多,细胞变成不规则状、与周围细胞分离并不规则突起,皱缩、变圆、细胞间颗粒增多、细胞质混浊等典型的凋亡形态学特征。随着 PB3A 作用时间的延长和浓度的增加,发生的形态学特征更为明显。

细胞凋亡是一个主动的、高度有序的基因控制的细胞死亡过程。很多中草药成分能诱导肿瘤细胞凋亡,如槲皮素、叶秋碱、天花粉蛋白熊果酸等都对肿瘤细胞有凋亡诱导作用^[9]。本项研究使用 Annexin V-FITC/PI 双染色法检测 PB3A 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响。结果显示,BP3A 作用 SGC-7901 细胞 24h 后,明显诱导 SGC-7901 细胞凋亡。随药物



Note: 0: control group; 40: PB3A (40 μg/ml) intervention group; 80: PB3A (80 μg/ml) intervention group.

Figure 5 HSPA6, GADD45G, GEM, RGSR and FOS proteins expression level after treating gastric cancer SGC-7901 cells with PB3A

浓度的增多,细胞早期凋亡率明显增高,呈剂量依赖性特点。与 40 μg/ml 的顺铂处理组相比,40、80 μg/ml 的 PB3A 干预组凋亡率均高于顺铂干预组,可见 PB3A 对 SGC-7901 细胞有较强的诱导凋亡作用。PB3A 对 SGC-7901 细胞的增殖抑制及诱导凋亡作

Table 2 The testing HSPA6, GADD45G, GEM, RGS2 and FOS proteins expression level in gastric cancer SGC-7901 cells using Western blot method (n=5)

Groups	FOS	GADD45G	GEM	HSPA6	RGS2
Control	0.34±0.05	0.27±0.07	0.62±0.05	0.45±0.04	0.84±0.08
40μg/ml	0.59±0.16	0.57±0.15*	0.87±0.13*	0.96±0.11*	1.06±0.27
80μg/ml	0.97±0.10**	0.89±0.10**	1.30±0.12**	1.19±0.14**	1.85±0.15**

Note: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

用可能是通过激活凋亡调控基因的表达、抑制凋亡相关基因或启动细胞凋亡过程等有关。所以在分子水平上进一步检测其抗肿瘤机制十分重要。

FOS 蛋白是早期基因家族中一类 c-FOS 的蛋白产物,在多种刺激下,通过不同的第二信使(Camp、 Ca^{2+} 、甘油二酯等)引起神经元 c-FOS 转录增多,形成 c-FOS mRNA,再翻译成 FOS 蛋白^[10]。FOS 蛋白细胞内的出现指示神经细胞向分子和形态方面的变化与功能状态^[11]。通过 FOS-shRNA 沉默 FOS 基因,抑制胶质瘤细胞的侵袭并促进细胞凋亡^[12]。在人类癌症样本的 Northern blot 分析显示,在非小细胞肺癌组织和甲状腺乳头状癌组织中 FOS mRNA 的表达显著低于正常组织,说明它有促凋亡的功能^[13,14]。凡是能引起细胞内游离钙浓度异常增高的因素均可诱导 c-FOS 基因表达,凡是能降低细胞内钙因素的均可诱导 c-FOS 基因表达^[15]。根据以上的研究报道,我们初步认为 PB3A 可能是引起细胞内提升游离钙离子的浓度而诱导 c-FOS 基因的上调表达。FOS 蛋白表达水平的上调与 PB3A 抑制 SGC-7901 细胞的生长及促进凋亡作用密切相关。

热休克蛋白家族中 HSPA6(heat shock 70kDa protein 6)也称为 HSP70B',热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)构成了一个庞大的分子伴侣蛋白。研究表明,在结肠癌细胞 CRL-1807 中,硫酸锌诱导 HSP70B' 的上调表达,这表明 HSP70B' 可能在硫酸锌应激反应中发挥主要作用,在病理状态下 HSP70B' 有助于细胞生存,这表明 HSPA6 蛋白在保护细胞应激,诱导的细胞死亡过程中发挥不可缺少的角色^[16]。由于 HSPA6 基因具有细胞保护作用,因此对外面应激非常敏感,从而对药物抗癌作用具有良好的耐药性,限制药物作用。

生长阻滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45(growth arrest and DNA damage inducible protein 45, GADD45)基因家族成员 GADD45G,具有抑制细胞增殖和促进细

胞凋亡的作用,其表达缺失导致细胞的无限增殖,从而引起肿瘤的形成,相反其过度表达可减慢体内细胞碱基的摄取速度,下降细胞形成克隆的能力,从而影响 DNA 的修复并引起肿瘤的形成

^[17]。研究显示, GADD45G 表达缺失或降低,都是因 GADD45G 启动子被甲基化而导致的^[18]。在脑垂体腺瘤^[19]、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、鼻咽癌、宫颈癌和肺癌^[20]、胃癌、结肠癌和胰腺癌^[21]中表达降低,其机制涉及到启动子甲基化或转录后修饰的改变^[22,23]。根据实验结果我们可推测 PB3A 对胃癌 SGC-7901 细胞的增殖及诱导凋亡作用可能是与 GADD45G 基因的去甲基化而促使 DNA 修复的性能密切相关。

G 蛋白信号转导调节因子 2(regulator of G-protein signaling 2)属于调节 G-蛋白信号转导蛋白(RGS)家族。通过流式细胞仪 DNA 片段化分析,Western blot 等实验分析证明,缺氧性压力诱导 RGS2 蛋白表达水平的上调,促进细胞凋亡,其机制可能涉及到 PKC 和 p38 MAPK 信号途径^[24]。研究证明,RGS2 的下调表达可能在大肠癌转移中期和晚期大肠癌患者预测中发挥重要作用^[25]。RGS2 通过激活与 p38 MAPK 信号途径相关基因从而发挥促进凋亡并抑制癌细胞的增殖作用^[26]。基于 RGS2 基因的以往研究报道,PB3A 可能引起 RGS2 基因的去甲基化作用方式抑制 SGC-7901 细胞的增殖并诱导凋亡或者 PB3A 通过激活 p38 MAPK 信号途径来诱导 SGC-7901 细胞的凋亡。

GTP 结合丝裂原诱导蛋白 (GTP binding protein over expressed in skeletal muscle, GEM) 在骨骼肌中高表达^[27]。近期研究认为 GEM 是原发性肝细胞癌重要的候选预后指标^[28]。EM 在一些上皮细胞、造血细胞和造血癌细胞中下调表达,GEM 的表达缺失可能被细胞的分化状态的错乱或转录有关信号通路的亏损而引起的^[29]。GEM 在细胞骨架重新调理方面起重要作用^[30]。研究显示,5-AZA-CDR 和 SAHA 干预人乳腺癌细胞 MCF-7 后,GEM 等基因上调表达,抑制肿瘤细胞增殖,这表明 GEM 与癌症治疗具有一定的相关性^[31]。据查新,GEM 基因与胃癌发生与发展相关的研究报道尚未见。该基因的上调与 PB3A

药物的抗癌活性存在一定的内在关系。

肿瘤的发生是一个由体内正常细胞经过多阶段发生的过程,涉及多基因,然而药物的抗癌活性也是通过多个基因及相关因子的相互作用而实现的。差异表达基因相互关联在一起协同导致肿瘤细胞增殖信号通路的抑制并促进胃癌细胞的凋亡,这为进一步研究 PB3A 和基因表达的关系以及细胞对药物的应答反应提供了方向。

本实验通过胃癌 SGC-7901 细胞体外培养,深入研究蜂胶黄酮 PB3A 对 SGC-7901 细胞的生长抑制和诱导凋亡作用,在胃癌 SGC-7901 细胞中检测候选基因 *GADD45G*、*HSPA6*、*GEM*、*RGSR* 及 *FOS* 的蛋白表达情况。本研究指出 PB3A 的部分分子机制,为该药物的开发提供实验基础和理论依据。

参考文献:

- [1] Sadanandam A, Wang X, Melo FSE, et al. Reconciliation of classification systems defining molecular subtypes of colorectal cancer [J]. *Cell Cycle*, 2014, 13(3): 353–357.
- [2] Rissetti RA, Eleidiane SMN, Soares MC, et al. Green propolis modulates gut microbiota, reduces endotoxemia and expression of TLR4 pathway in mice fed a high-fat diet [J]. *Food Res Int*, 2015, 3: 796–803.
- [3] Zhao XJ. The secrets of “purple gold” [J]. *Civilization Technology*, 2011, 5(3): 146–150. [赵小军. 蜂胶“紫色黄金”的奥秘[J]. *文明*, 2011, 5(3): 146–150.]
- [4] Alday E, Valencia D, Carreño AL, et al. Apoptotic induction by pinobanksin and some of its ester derivatives from Sonoran propolis in a B-cell lymphoma cell line [J]. *Chemico-Biol Interact*, 2015, 242: 35–44.
- [5] Duan QQ, Gao Q, Li KT, et al. Effects of alone-emodin nanoliposome-induced photodynamic therapy on human gastric cancer cells [J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2014, 3(39): 305–309. [段勤勤, 高青, 李开庭, 等. 芦荟大黄素纳米脂质体介导的光动力对胃癌细胞的作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2014, 3(39): 305–309.]
- [6] Reheman YMT, Otsuka YSSN, Kure XW, et al. Screening of antitumor active components included in Chinese propolis [J]. *Pharmacol Function Foods Nutrition*, 2005, 5(2): 17–21. [热合曼·依米提, 大塚靖之, 吴晓闻, 等. 中国産プロポリス中に含まる抗腫瘍活性成分の探索[J]. *機能性食品と薬理栄養*, 2005, 5(2): 17–21.]
- [7] Reheman YMT, Kure XW, Yamada PRD, et al. Extracted from propolis flavonoids Pinobanksin-3-acetate the effects

of cell growth inhibition and apoptosis on Jurkat cells. The Japanese Society of agricultural chemistry [C]. 2006 annual meeting and Collection of papers, 2006.67. [热合曼·依米提, 吴晓闻, 山田バリダ, 等. プロポリスから抽出した Pinobanksin-3-acetate の Jurkat 細胞に対する細胞増殖抑制とアポトーシス作用 [C]. 日本農芸化学会 2006 年度大会论文集, 2006.67.]

- [8] Cheng YH, Guo YS, Han HZ, et al. Synthesis and activity of some new histone deacetylases inhibitors [J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2010, 6(45): 735–741. [程永浩, 郭彦伸, 韩海珠, 等. 新型组蛋白去乙酰化酶抑制剂的合成及抗肿瘤活性研究[J]. *药科学报*, 2010, 6(45): 735–741.]
- [9] Corrêa FRS, Schanuel FS, Moura-Nunes N, et al. Brazilian red propolis improves cutaneous wound healing suppressing inflammation associated transcription factor NFκB [J]. *Biomed Pharma*, 2017, 86: 162–171.
- [10] Ramirez VP, Krueger W. TNIP1 reduction of HSPA6 gene expression occurs in promoter regions lacking binding sites for known TNIP1-repressed transcription factors [J]. *Gene*, 2015, 555(2): 430–437.
- [11] Ye DF, Zheng YH, Ding T, et al. Construction of recombinant RNAi plasmid pGMLV-SC1 and its effects on c-Fos gene expression in porcine ovarian granulosa cells [J]. *Guangdong Medical Journal*, 2014, 3(35): 336–339. [叶丹凤, 郑艳华, 丁涛, 等. 重组质粒 pGMLV-SC1 RNAi 的构建及其对猪卵巢颗粒细胞 c-FOS 的影响[J]. *广东医学*, 2014, 3(35): 336–339.]
- [12] You QY, Wang P, Zhang SB, et al. Effect of suanzao-rentang on neuronal apoptosis and c-fos gene expression of aged rats with rapid eye movement sleep deprivation [J]. *World Journal of Sleep Medicine*, 2014, 2(1): 71–74. [游秋云, 王平, 张舜波, 等. 酸枣仁汤对 REM 睡眠剥夺老年大鼠脑神经细胞凋亡及 c-FOS 基因表达水平的影响[J]. *世界睡眠医学杂志*, 2014, 2(1): 71–74.]
- [13] Liang T, Li R, Lin X, et al. Effects of l-dopa methyl ester on the c-fos expression in retina of monocular deprivation cats [J]. *Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae*, 2013, 8(19): 194–197. [梁韬, 黎荣, 林兴, 等. 左旋多巴甲酯对剥夺性弱视猫视网膜 c-fos 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 8(19): 194–197.]
- [14] Simayi ZLBY, Ababaikeri BWHLQM, Aierken MRYM, et al. Effect of PB3A on CXCL1 and FOS gene expression in human colorectal cancer SW480 cells [J]. *Journal of Practical Oncology*, 2014, 3(29): 213–218. [祖丽比亚·司马义, 布威海丽且木·阿巴拜科日, 买热艳木·艾尔肯. 蜂胶黄酮 PB3A 对人大肠癌 SW480 细胞株 CXCL1 和 FOS 基因表

- 达的影响[J]. 实用肿瘤杂志, 2014, 3(29):213-218.]
- [15] Sherwood DR, Butler JA, Kramer JM, et al. FOS-1 promotes basement-membrane removal during anchor-cell invasion in *C. elegans*[J]. *Cell*, 2005, 121(6):951-962.
- [16] Wang YZ, Wu YM, Zhou F, et al. The heat shock protein HSP70-1 and HSP70-2 gene polymorphism and susceptibility to lung cancer[J]. *Journal of Environment and Occupation Medicine*, 2010, 5(27):305-309.[王玉珍, 吴逸明, 周舫, 等. HSP70-1、HSP70-2 基因多态性与肺癌易感性的相关性[J]. 环境与职业医学, 2010, 5(27):305-309.]
- [17] Dang XH, Zuo YH, Duan ZK, et al. Effects of GADD45A gene expression in human peripheral blood after 60 Co γ - ray irradiation[J]. *Chinese Journal of Radiology Health*, 2011, 3(20):262-264.[党旭红, 左雅慧, 段志凯, 等. Co 射线诱发人外周血 GADD45A 基因表达的变化研究[J]. 中国辐射卫生, 2011, 3(20):262-264.]
- [18] Liu WJ, Zhang LY, Shao CW, et al. Molecular characterization and functional divergence of two Gadd45g homologs in sex determination in half-smooth tongue sole (*Cynoglossus semilaevis*)[J]. *Biochem Mol Biol*, 2014, 177(178):56-64.
- [19] Loosse C, Pawlas M, Bukhari HSS, et al. Nuclear spheres modulate the expression of BEST1 and GADD45G[J]. *Cellular Sig*, 2016, 28(1):100-109.
- [20] Jia QZ, Xu JZ, Sun JH, et al. Sequence alignment of exons of candidate gene SH3GL1: a study on adolescent idiopathic scoliosis[J]. *Medical Journal of Chinese People's Liberation Army*, 2009, 10(7):848-850.[贾全章, 许建中, 孙景海, 等. 青少年特发性脊柱侧凸疾病候选基因 SH3GL1 外显子序列比对分析[J]. 解放军医学杂志, 2009, 10(7):848-850.]
- [21] Kaufmann LT, Gierl MS, Niehrs C, et al. Gadd45a, Gadd45b and Gadd45g expression during mouse embryonic development[J]. *Gene Expression Patterns*, 2011, 11(8):465-470.
- [22] Matsunaga E, Nambu S, Oka M. Comparative analysis of developmentally regulated expressions of Gadd45a, Gadd45b, and Gadd45g in the mouse and marmoset cerebral cortex[J]. *Neuroscience*, 2015, 284:566-580.
- [23] Zhang L, Yang ZJ, Liu YZ. Stress sensor Gadd45G inhibits cell proliferation of human colon cancer cell in vitro[J]. *Tumor*, 2013, 33(3):207-213.[张力, 杨兆娟, 刘永忠. 应激蛋白 Gadd45G 对人结肠癌细胞增殖影响的研究[J]. 肿瘤, 2013, 33(3):207-213.]
- [24] Luessen DJ, Hinshaw TP, Sun H, et al. RGS2 modulates the activity and internalization of dopamine D2 receptors in neuroblastoma N2A cells[J]. *Neuropharmacology*, 2016, 110:297-307.
- [25] Greenbaum L, Lifschytz T, Zozulinsky P, et al. Alteration in RGS2 expression level is associated with changes in haloperidol induced extrapyramidal features in a mutant mouse model[J]. *Eur Neuropsychopharm*, 2012, 22(5):379-386.
- [26] Ota A, Sawai M, Sakurai H, et al. Stress-induced transcription of regulator of G protein signaling 2 (RGS2) by heat shock transcription factor HSF1[J]. *Biochimie*, 2013, 95(7):1432-1436.
- [27] Huang XD, Cong X, Yang DP, et al. Identification of Gem as a new candidate prognostic marker in hepatocellular carcinoma[J]. *Pathol Res Prac*, 2014, 210(11):719-725.
- [28] Fischer R, Wei Y, Anagli J, et al. Calmodulin binds to and inhibits GTP binding of the Ras-like GTPase Kir/Gem[J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(25):25067-25070.
- [29] Yang CY, Tian TN, Liu W, et al. Screening the drug sensitivity genes related to GEM and CDDP in the lung cancer cell-lines[J]. *Chinese Journal of Lung Cancer*, 2009, 10(12):1061-1068.[杨春雨, 田振因, 刘炜, 等. 肺癌细胞株中 GEM 和 CDDP 药物敏感性相关基因的研究 [J]. 中国肺癌杂志, 2009, 10(12):1061-1068.]
- [30] Obisesan TO. Gene, exercise, and memory study (GEMS): a randomized controlled clinical trial to evaluate the effects of standardized aerobic exercise on cognition and neurodegeneration in african americans with mild Alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11(7):834.
- [31] Miguel A, Campodonico M, Andrews BA, et al. Generation of an atlas for commodity chemical production in *Escherichia coli* and a novel pathway prediction algorithm, GEM-Path[J]. *Metab Eng*, 2014, 25:140-158.