

红景天苷对胃癌细胞 NU-GC-3 凋亡及 TGF β 1 蛋白表达的影响

Effects of Rhodioidine on Apoptosis of NU-GC-3 Cell and Expression of TGF β 1 Protein
ZHANG Guang-ling, XIONG Ya-nan, WANG Mei-mei, et al.

章广玲¹, 熊亚南¹, 王梅梅¹, 袁丽杰¹, 李宏杰¹, 刘志勇², 朱丽华¹

(1.河北联合大学基础医学院, 河北 唐山 063000;

2.河北联合大学附属医院, 河北 唐山 063000)

摘要: [目的] 研究红景天苷对胃癌细胞 NU-GC-3 增殖的影响。[方法] 细胞计数法、MTT 法、流式细胞术检测分析不同浓度红景天苷对胃癌细胞 NU-GC-3 增殖的抑制作用, 相差显微镜下观察形态学改变。RT-PCR、Western Blot 法分别检测加药组 (20 μ g/ml 红景天苷) 和不加药组 TGF β 1 mRNA 以及蛋白的表达水平。[结果] 加药组细胞 S 期、G₂/M 期细胞数、增殖指数 PI 显著低于对照组, 而细胞凋亡百分比、G₀/G₁ 期细胞数则显著高于不加药组。加药组 TGF β 1 mRNA 以及 TGF β 1 蛋白的表达水平均高于不加药组。[结论] 红景天苷对胃癌细胞 NU-GC-3 具有抑制其增殖并诱导其凋亡的作用。红景天苷作用于 NU-GC-3 细胞后明显促进了 TGF β 1 mRNA 以及 TGF β 1 蛋白的表达。

关键词: 红景天苷; 胃肿瘤; NU-GC-3; 流式细胞术; 转化生长因子 β 1

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)05-0321-04

红景天苷取自生长在长白山海拔 2 000 米苔原带的高山红景天^[1], 具有增强免疫功能和清除体内过剩的自由基、促进细胞凋亡、抗肿瘤作用^[2], 但其抗肿瘤作用及其机制还在实验研究阶段。本文以胃癌细胞 NU-GC-3 为材料, 应用流式细胞术分析红景天苷对胃癌细胞的生长抑制及其诱导凋亡的作用, RT-PCR、Western Blot 分别检测不同细胞组 TGF β 1 mRNA 以及蛋白的表达水平, 探讨红景天苷抑制胃癌细胞 NU-GC-3 增殖的可能机制, 为红景天苷治疗恶性肿瘤提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 实验细胞

人胃上皮细胞系 NU-GC-3 由日本北海道大学医学部遗传医学研究所肿瘤病毒学部门高田贤藏教授惠赠, 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中, 在 37 $^{\circ}$ C 含 5% CO₂ 的饱和湿度条件下培养。

通讯作者: 朱丽华, 副教授, 博士; 河北联合大学基础医学院病原微生物学教研室, 河北省唐山市建设南路 57 号 (063000);
E-mail: zhguangling@yahoo.com.cn.

收稿日期: 2011-12-15; **修回日期:** 2012-03-27

1.1.2 实验试剂

红景天苷由白求恩医科大学化学教研室提供, 将其配成 100 μ g/ml 贮存液, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。RPMI-1640 培养液由 Gibco BRL 公司出品。胎牛血清由天津生化制品厂出品。

1.1.3 仪 器

采用美国 Beckman Coulter 公司生产的 Epics-XL II 型流式细胞仪。

1.2 方 法

1.2.1 细胞形态学观察

实验 a 组: 红景天苷浓度为 10 μ g/ml; 实验 b 组: 药物浓度为 20 μ g/ml; 对照组: 不加红景天苷。于倒置相差显微镜下进行形态学观察并照相。

1.2.2 细胞计数法测定红景天苷对胃癌细胞的抑制率

同样实验分为对照组、实验 a 组 (10 μ g/ml)、实验 b 组 (20 μ g/ml)。将 1 \times 10⁵ 细胞/ml 接种于 24 孔培养板中, 每孔 1ml, 24h 贴壁后加入不同浓度的红景天苷, 每浓度设 4 个复孔, 3 组均培养 6d, 每天进行细胞计数。

1.2.3 MTT 法测定红景天苷对胃癌细胞的抑制率

将 1 \times 10⁵ 细胞/ml 接种于 96 孔培养板中, 每孔 0.1ml, 24h 贴壁后加入不同浓度的红景天苷, 每浓度

设 6 个复孔, 分别培养 48h、72h, 距培养结束 4h 前, 每孔加入 MTT 溶液 (5mg/ml) 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 继续孵育至相应时间, 终止培养, 弃上清, PBS 洗两遍, 每孔加入 150 μ l DMSO, 振荡 10min, 使结晶物充分溶解。选择 492nm 波长, 在酶联免疫检测仪上测定各孔光吸收值, 记录结果, 实验重复 4 次。

1.2.4 流式细胞术

取加药 72h 的实验组及对照组的 1 \times 10⁵ 细胞/ml 的单细胞悬液 0.1ml, 加入 10% 鸡红细胞作为内参标准, 与样品同步染色, 加入碘化丙啶 (PI) (50mg/L, triton-X100 1.0%) 1ml, 在 4 $^{\circ}$ C 冰箱染色 30min, 以 500 目铜网过滤, 使样品成为合格的单细胞悬液, 上机检测。采用美国 Beckman Coulter 公司生产的 Epics-XL II 型流式细胞仪, 激发光源为 15mW 氩离子激发光, 激发波长为 488nm, 应用 Expo32 ADC 进行免疫荧光数据分析, 用 Muticycle AV 分析软件对 DNA 细胞周期拟合分析。细胞发出的荧光信号以组方图或点阵图及数字表的形式在多道脉冲分析仪上显示。所得数据经计算机处理, 调整仪器的 CV 值, 使稳定在 2% 之内。采用 Barlogie 细胞周期分析法^[6]将处于不同时期的细胞分成 3 部分, 即 G₀/G₁ 期、S 期和 G₂/M 期。细胞增殖指数 (PI) 公式: $PI = (S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M) \times 100\%$ 。

1.2.5 RT-PCR 和 Western Blot 检测

转染后 48h, 实验 b 组和不加药对照组细胞分别提取总 RNA。据 *TGF β 1* 基因序列, 设计 PCR 反应引物。上游 5'-GGTCCCGACTCACTCAGACCCGCC-CCGGCAG-3', 下游 5'-AACTCACTCAGTCCCCGCTG CCTTGCCCATGG-3', 进行 RT-PCR 反应, 总反应体系 50 μ l。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 60 $^{\circ}$ C 退火 40s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。

转染后 48h, 实验 b 组和不加药对照组细胞用 RIPA 裂解液进行细胞裂解收集蛋白。10% 的 SDS-PAGE 凝胶, 取 32 μ l 总蛋白和 8 μ l 的 5 \times Loading Buffer 经煮沸 3min 后立即冰置 3min 后, 上样。100V 电压电泳 1h。转膜 2h 后, 将膜浸入 Blotto 封闭液中室温封闭 1.5h。与一抗的结合, 在摇床上 4 $^{\circ}$ C 轻轻摇动过夜。1 \times TBST 中摇动浸洗 3 次 \times 5min。将膜分别浸入含相应二抗 (辣根过氧化物酶标记) 的 Blotto 中, 室温轻轻摇动 2h。在 1 \times TBST 中摇动浸洗 3 次 \times

5min, 洗去非特异结合的二抗。最后用化学发光检测试剂盒 (Perkin Elmer, USA) 检测, 显影。

1.3 统计学处理

将实验数据整理, 用 Excel 建立数据库, 用 SPSS11.5 软件包进行统计分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 红景天苷对 NU-GC-3 细胞形态学影响

对照组 NU-GC-3 细胞贴壁生长, 细胞呈多边形, 细胞贴壁生长状态良好, 胞膜完整, 胞浆饱满, 立体感显著, 增长密度适中 (图 1)。实验 a 组和 b 组大部分细胞形态呈不规则或变圆, 体积增大, 细胞贴壁生长较差, 凋亡增多, 少数细胞可见胞膜不完整, 胞浆饱满度较差, 立体感不显著, 胞浆中黑色颗粒增多。实验 b 组较实验 a 组细胞形态变化程度高 (图 2、3)。

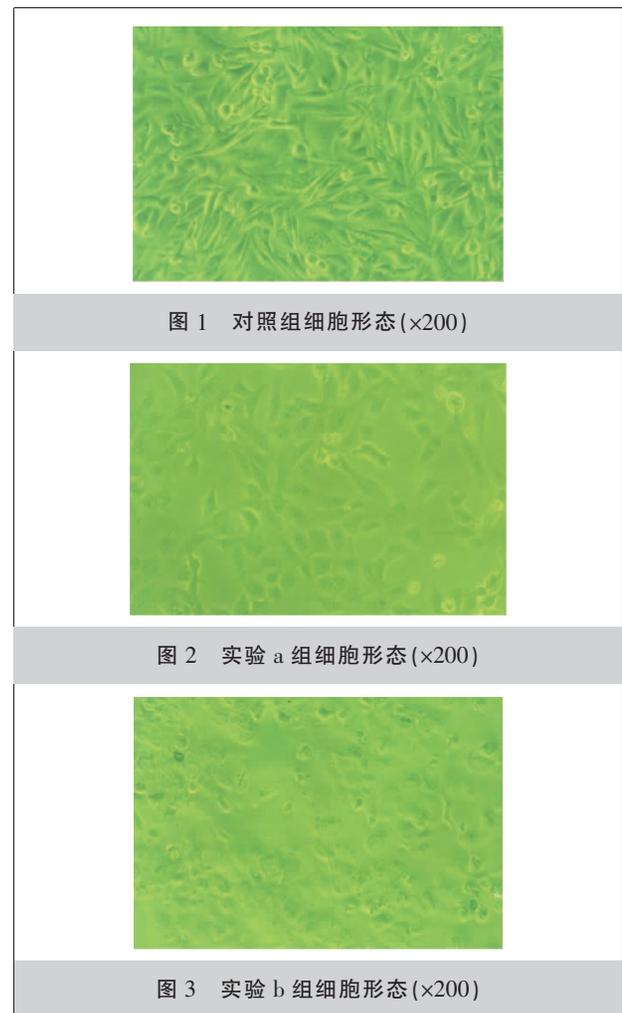


图 1 对照组细胞形态 (\times 200)

图 2 实验 a 组细胞形态 (\times 200)

图 3 实验 b 组细胞形态 (\times 200)

2.2 细胞计数法检测红景天苷抑制 NU-GC-3 细胞生长结果

实验 a 组与 b 组 NU-GC-3 细胞生长增殖速度明显低于对照组,其中 b 组抑制 NU-GC-3 细胞生长的作用更显著(表 1)。

表 1 实验组与对照组各时间点细胞数($\bar{x}\pm s, n=4$)

分组	细胞数($\times 10^4$ 个)					
	1d	2d	3d	4d	5d	6d
对照组	0.43 \pm 0.04	0.93 \pm 0.06	2.13 \pm 0.08	3.90 \pm 0.06	6.83 \pm 0.07	10.05 \pm 0.07
实验 a 组	0.30 \pm 0.04	0.68 \pm 0.04	1.09 \pm 0.08	2.09 \pm 0.07	3.37 \pm 0.06	4.86 \pm 0.08
实验 b 组	0.25 \pm 0.06	0.55 \pm 0.02	0.90 \pm 0.05	1.98 \pm 0.07	2.96 \pm 0.05	4.06 \pm 0.09
P_1	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
P_2	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

注: P_1 :实验 a 组分别与对照组相比; P_2 :实验 b 组分别与对照组相比。

2.3 MTT 检测红景天苷抑制 NU-GC-3 细胞生长结果

MTT 检测随着药物浓度增加,细胞抑制率升高,有剂量依赖关系;其次随着时间的延长,抑制细胞生长的作用也增加,说明有时间依赖关系(表 2)。

表 2 实验组与对照组各时间点细胞增殖的 MTT 值($\bar{x}\pm s, n=4$)

分组	OD 值	
	48h	72h
对照组	0.60 \pm 0.04	0.87 \pm 0.06
实验 a 组	0.47 \pm 0.04	0.67 \pm 0.05
实验 b 组	0.43 \pm 0.03	0.64 \pm 0.04
P_1	0.003	0.001
P_2	0.000	0.000

P_1 :实验 a 组分别与对照组相比; P_2 :实验 b 组分别与对照组相比。

2.4 红景天苷对胃癌细胞 NU-GC-3 影响的流式细胞术分析

实验 a、b 组细胞凋亡百分率分别为 2.43%、5.20%,明显高于不加药对照组 1.59%,与对照组相比有显著性差异($P<0.05$);而 G_0/G_1 期细胞数实验 a、b 组均显著高于对照组($P<0.05$); $S_2/G_2/M$ 、增殖指数 $PI(\%)$ 均低于对照组。实验 b 组 PI 与对照组相比有显著性差异($P<0.05$),见表 3。

表 3 红景天苷对胃癌细胞 NU-GC-3 细胞周期、增殖指数的影响($\bar{x}\pm s, n=4$)

分组	G_0/G_1	S	G_2/M	$PI(\%)$
对照组	34.30 \pm 2.88	53.80 \pm 8.56	14.87 \pm 1.36	68.77 \pm 7.41
实验 a 组	40.17 \pm 0.75	49.60 \pm 3.52	10.23 \pm 3.48	59.83 \pm 0.84
实验 b 组	44.90 \pm 2.39	47.97 \pm 6.21	7.17 \pm 5.51	55.14 \pm 2.41
P_1	0.039	0.717	0.365	0.113
P_2	0.003	0.543	0.109	0.024

注: P_1 :实验 a 组分别与对照组相比; P_2 :实验 b 组分别与对照组相比。

2.5 红景天苷对胃癌细胞 NU-GC-3 中 $TGF\beta 1$ mRNA 和 $TGF\beta 1$ 的影响

实验 b 组细胞中 $TGF\beta 1$ mRNA 的水平为(设定对照组为 1)1.80 \pm 0.05,明显高于对照组($P<0.05$),有显著性差异(见图 4A);实验 b 组细胞中 $TGF\beta 1$ 蛋白的表达水平为(设定不加药组为 1)1.79 \pm 0.06,明显高于对照组($P<0.05$),有显著性差异(见图 4B)。

3 讨论

肺癌是一种炎症相关的肿瘤^[3]。

当机体受到创伤或病原体侵入时,机体的免疫系统会被激活并且招募大量的炎症细胞至损伤的部位,并且后者会分泌多种细胞因子,包括炎症因子、趋化因子、黏附分子等。这些因子将与细胞及细胞外基质在局部形成新的微环境,从而用于维持慢性炎症,并且促进肿瘤的发生发展。其中,一个研究比较透彻的重要的细胞因子是转化生长因子(transforming growth factor β , $TGF\beta$)。以往的研究表明, $TGF\beta$ 与细胞的增殖、分化、迁移及凋亡有关;在机体中参与了炎症反应、组织修复、骨骼形成、胚胎发育等一系列重要的生物学过程。 $TGF\beta$ 信号通路某些人类疾病的发生密切相关,是人类癌症中最常改变的细胞信号通路之一^[4]。在哺乳动物细胞中, $TGF\beta 1$ 是 $TGF\beta$ 家族中最丰富的亚型(包括 $TGF\beta 1$ 、 $TGF\beta 2$ 和 $TGF\beta 3$)。 $TGF\beta$ 信号通路关键的信号传导分子为胞浆蛋白 smads, smads 可将 $TGF\beta$ 信号由胞膜受体转导入胞核内。研究发现,

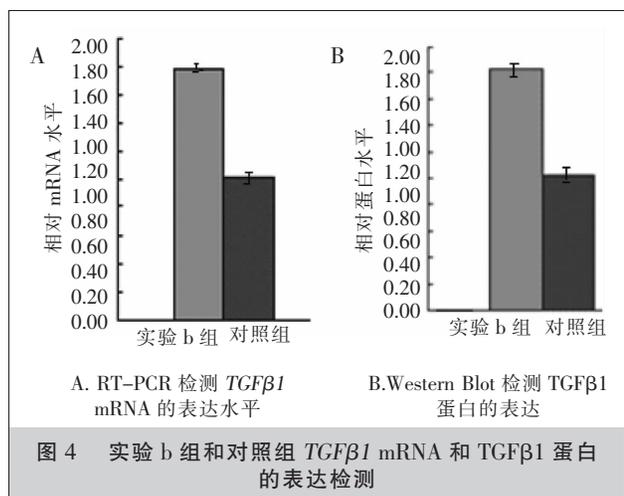


图 4 实验 b 组和对照组 $TGF\beta 1$ mRNA 和 $TGF\beta 1$ 蛋白的表达检测

TGF β —smads 信号转导通路调控了多种与基质降解、肿瘤细胞侵袭有关的酶,如 cathepsin 家族、MMPs、uPA、COX-2 等,以及一些细胞因子如 VEGF。研究表明, TGF β 1 抑制正常肠上皮细胞增殖,促进大肠癌恶性细胞的生长^[5]。在正常细胞癌变初期, TGF β 1 启动细胞分化或凋亡,抑制细胞增殖,通常被认为是肿瘤抑制基因。然而,在晚期肿瘤,由于 TGF β 1 能够刺激血管生成,促进上皮向间质转化,促进细胞运动和转移,反而成为促进因子^[6]。因此, TGF β 1 扮演着肿瘤抑制基因和癌基因的双重角色。TGF 超家族的许多成员受到 miRNAs 调控,如 miR-224 通过靶定 smad4 调控 TGF β /smads 途径^[7]; TGF β 1 的 3'-UTR (307 nt 长)区有多个 miRNAs 的靶位点,某些 miRNAs 的表达水平也受到 TGF β 信号通路的调节^[8,9]。

红景天苷是一种抗氧化剂^[1],可清除自由基,防止过剩自由基对细胞内核酸、蛋白质酶系及脂质等形成破坏性改变而导致基因表达失控,因此,具有抗缺氧、抗衰老、抗病毒、抗疲劳、抗肿瘤、增强免疫力等作用。细胞凋亡是一种非常复杂的生理和病理过程,是细胞主动参与的自杀机制。近来认识有所深入,无论药物的靶点何在,多种化疗药物最终是通过凋亡或肿瘤细胞坏死而达到治疗目的。本研究中通过形态学观察、细胞计数法和 MTT 法对 NU-GC-3 细胞的增殖检测结果进行分析,实验组细胞较对照组增殖明显减慢,说明红景天苷可能起到抑制癌细胞增殖的作用。通过流式细胞术分析细胞凋亡和细胞周期改变,发现一定浓度的红景天苷可以抑制 NU-GC-3 细胞的增殖,并可诱导其细胞发生凋亡。红景天苷对胃癌细胞 NU-GC-3 的影响具有剂量依赖性和时间依赖性。 G_0/G_1 期细胞数实验 a、b 组均显著高于对照组 ($P < 0.05$), S、 G_2/M 、增殖指数 PI (%) 均低于对照组,说明红景天苷抑制细胞的增殖是通过抑制细胞从 G_0/G_1 进入 DNA 合成期,和细胞的分裂期,而使过多的细胞处于静止期,促进了胃癌细胞 NU-GC-3 的凋亡。为了进一步研究红景天苷促进胃癌细胞 NU-GC-3 凋亡的分子机制,分别用 RT-PCR 和 Western Blot 检测了红景天苷对 NU-GC-3 细胞中 TGF β 1 mRNA 水平和蛋白水平表达的影响。结果显示,红景天苷促进胃癌细胞 NU-GC-3 中 TGF β 1

mRNA 和 TGF β 1 蛋白的表达。提示 TGF β 信号通路在肿瘤的发生发展中发挥重要的作用。可能是由于 TGF β 1 阻滞 CyclinE、CyclinD 的表达及其与相应的 CDK2、CDK4、CDK6 的结合,使细胞不能从 G_1 期进入 S 期,促进了胃癌细胞 NU-GC-3 的凋亡。在胃癌 NU-GC-3 细胞中,红景天苷抑制细胞增殖,促进了 TGF β 1 的表达,从而影响了细胞周期,使静止期细胞增加,促进了凋亡。总之,研究结果提示,红景天苷可阻抑 NU-GC-3 细胞的生长增殖及促进其凋亡,其可能机制之一是通过促进 TGF β 1 的表达,从而干扰了细胞周期。这对研究红景天苷对胃癌的作用以及临床用药提供了一些依据,但其具体的作用机制仍有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 冯摇敏,蒋摇春,高雪华.细胞融合构建红景天苷高转化菌株及固态发酵工艺优化 [J]. 时珍国医国药, 2011, 21(17):2868-2870.
- [2] 李婷,张莹,李琳.红景天苷抑制低氧诱导的心肌细胞凋亡机理的实验研究[J]. 航天医学与医学工程, 2011, 24(1):21-24.
- [3] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation[J]. Nature, 2008, 454(7203): 436-444.
- [4] Brierie B, Moses HL. Transforming growth factor beta (TGF-beta) and inflammation in cancer [J]. Cytokine and Growth Factor Rev, 2010, 21(1): 49-59.
- [5] Padua D, Massagué J. Roles of TGF β in metastasis[J]. Cell Res, 2009, 19(1): 89-102.
- [6] Tian M, Schiemann WP. The TGF β paradox in human cancer: an update[J]. Future Oncol, 2009, 5(2):259-271.
- [7] Yao GD, Yin MM, Lian J, et al. MicroRNA-224 is involved in transforming growth factor- β -mediated mouse granulosa cell proliferation and granulosa cell function by targeting smad4[J]. Mol Endocrinol, 2010, 24(3):540-551.
- [8] Tili E, Michaille JJ, Adair B, et al. Resveratrol decreases the levels of miR-155 by upregulating miR-663, a microRNA targeting JunB and JunD [J]. Carcinogenesis, 2010, 31(9): 1561-1566.
- [9] Tili E, Michaille JJ, Alder H, et al. Resveratrol modulates the levels of microRNAs targeting genes encoding tumor suppressors and effectors of TGF β signaling pathway in SW480 cells[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 80(12): 2057-2065.