

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X·2008·04·014

白藜芦醇对人胃癌 SGC7901 细胞的抑制及其可能的机制

金 松, 辛国荣, 孟繁石, 范东旭, 董智强 (佳木斯大学第一附属医院 普外科, 黑龙江 佳木斯 154002)

[摘要] 目的: 探讨白藜芦醇(resveratrol, Res)对人胃癌 SGC7901 细胞的抑制及其可能的作用机制。方法: 以 Res(10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)作用人胃癌 SGC7901 细胞,同时设溶剂二甲亚砜(DMSO)和培养液作用为对照组;采用 MTT 法检测 Res 对人胃癌 SGC7901 细胞生长的抑制情况,相差显微镜观察细胞形态变化,比色法检测 Res 对 SGC7901 细胞 Caspase-3 活性的影响,流式细胞术检测 Res 对 SGC7901 细胞周期的影响。结果: Res 对 SGC7901 细胞生长有明显抑制作用,且有剂量和时间依赖性,最大抑制率达(53.39 \pm 5.32)%; Res 作用于 SGC7901 细胞后可见悬浮细胞增多,细胞胞体缩小、变圆、碎裂,细胞内出现颗粒样物质,在 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48 h 变化最明显; Res 能明显上调 SGC7901 细胞 Caspase-3 活性,这种作用呈时间与浓度依赖性;流式细胞术发现, Res 通过阻滞 SGC7901 于 S 期而抑制细胞分裂。结论: Res 明显抑制人胃癌 SGC7901 细胞的生长,其机制可能是与激活 Caspase-3 从而诱导细胞凋亡、以及影响肿瘤细胞周期有关。

[关键词] 白藜芦醇; 胃癌细胞; 增殖抑制; caspase-3; 细胞周期

[中图分类号] R735.2, R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)04-0365-04

Inhibitory effect of resveratrol on human gastric cancer cell line SGC7901 and the possible mechanism

JIN Song, XIN Guo-rong, MENG Fan-shi, FAN Dong-xu, DONG Zhi-qiang (Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154002, Heilongjiang Province, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of Resveratrol (Res) on human gastric cancer cell line SGC7901 and the related mechanism. **Methods:** Human gastric cancer SGC7901 cells were treated with different concentrations of Res(10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$); cells treated with DMSO and culture medium served as controls. The growth inhibition rate of SGC7901 cells was examined by MTT assay; the morphological changes of cells were observed under phase-contrast microscope; caspase-3 activity was assessed by colorimetry; and the cell cycle was detected by flow cytometry (FCM). **Results:** Res inhibited the growth of SGC7901 cells in a time- and dose-dependent manner, with maximal inhibitory rate being (53.39 \pm 5.32)%. After Res treatment the amount of suspended cell increased and the cells shrank, became round and smashed, with particle-like substance found in the cells. The most obvious changes were found 48 h after treatment with 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Res. Besides, Res upregulated the Caspase-3 activity in SGC7901 cells in a time- and concentration-dependent manner. Flow cytometry revealed that Res induced the S phase arrest of SGC7901 cells. **Conclusion:** Res can obviously inhibit the growth of human gastric cancer SGC7901 cells, possibly through activating Caspase-3, inducing cell apoptosis and influencing cell cycle.

[Key words] Res; SGC7901 cell; mechanism

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(4): 365-368]

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤,严重危害人类健康,占恶性肿瘤病死率前几位,其发病机制至今尚未完全清楚。目前西医治疗主要采用手术、放疗、化疗及生物治疗等四大疗法,但效果均不理想。中药辅助治疗在胃癌治疗中占有重要地位,可保持人体免疫功能,提高生存率和生活质量,在临床应用中取得较满意的效果。

白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种多酚类化合物,具有抗炎、抗氧化、抑制血小板聚集等作用,用于治疗炎症、脂类代谢和心脏疾病等^[1]。随着研究的

深入,人们发现白藜芦醇能够治疗肿瘤及其他增生性疾病,对皮肤癌、乳腺癌、前列腺癌都有明显的治疗作用^[2-3];对胃癌也有治疗作用,但具体作用机制如何还有待于研究。本实验利用分子生物学技术探讨 Res 对胃癌细胞增殖的抑制及其可能的作用机制,为 Res 应用于胃癌治疗提供实验依据。

[基金项目] 黑龙江省教委资助项目(No. 11521282)。Supported by the Education Commission Foundation of Heilongjiang Province (No. 11521282)
[作者简介] 金松(1964-),男,鲜族,黑龙江省齐齐哈尔市人,主任医师,教授,主要从事抗肿瘤药物方面的研究

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

人胃癌 SGC7901 细胞株购自协和医科大学基础医学研究所细胞中心。Res(美国 Sigma 公司, 纯度 >99%)用二甲基亚砷(DMSO)溶解, 0.22 μm 尼龙滤膜过滤除菌, 母液质量浓度为 100 μg/ml, -20℃避光保存。RPMI 1640 培养液为美国 Gibco 公司产品, 胎牛血清为 Hyclone 公司产品。二甲基亚砷、胰蛋白酶、乙二胺四乙酸(EDTA)、噻唑蓝(MTT)为 Sigma 公司产品, Caspase-3 凋亡试剂盒购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。

1.2 人胃癌 SGC7901 细胞培养及收集

将 SGC-7901 细胞按 1×10^5 /ml 的密度接种在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640(含 100 U/ml 的青霉素和 100 U/ml 的链霉素)培养瓶内, 置入 37℃、5% CO₂ 培养箱, 3 d 传代 1 次。所有实验均在细胞对数生长期进行。

1.3 MTT 法检测 Res 对人胃癌 SGC7901 细胞生长的抑制作用

SGC7901 细胞接种于 96 孔培养板中(每孔 5×10^4 个)培养 12 h, 加入不同量的 Res, 使其终质量浓度分别为 10、20、40 μg/ml, 每孔 200 μl(DMSO 控制在 0.1% 以下); 同时设 DMSO 对照组(加入培养液和同等稀释浓度的 DMSO), 每个浓度设 4 个平行复孔, 并设空白调零孔(只加完全培养液和 DMSO, 不加细胞), 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中分别继续培养 12、24 和 48 h, 然后每孔加入 MTT 20 μl, 继续培养 4 h 后, 加入 150 μl DMSO 溶解, 于酶标仪 492 nm 处检测, 计算药物的体外生长抑制率。

细胞生长抑制率(%) = (对照组 D 值 - 用药组 D 值) / 对照组 D 值 × 100%

1.4 细胞形态学观察

将处于对数生长期的 SGC7901 细胞接种于培养瓶中, 待细胞长至约 80% 时, 分别加入终质量浓度为 10、20、40 μg/ml 的 Res, 同时设 DMSO 对照组, 作用 48 h 后在相差显微镜下观察细胞形态学变化, 并拍照记录。

1.5 流式细胞术检测人胃癌 SGC7901 细胞周期的变化

取对照和药物处理过的 SGC7901 细胞悬液 (1×10^6 /ml) 1 ml, PBS 洗 2 次, 然后加入预冷的结合缓冲液, 再加入 Annexin V-FITC 液 5 μl 和 PI 液 10 μl, 混匀, 室温避光染色 15 min。PBS 洗 2 次, 去除多余染料, 流式细胞仪检测(激发波长 488 nm)。

1.6 比色法检测 Caspase-3 活性

取对数生长期的细胞 (5×10^5 /ml), 同时设 DMSO 对照组, 实验组加入不同浓度(10、20、40 μg/ml) Res 12、24、48 和 72 h 后, 收集细胞, $1000 \times g$ 离心 5 min, 以 PBS 洗 2 次, 尽量去除 PBS 上清; 在收集的沉淀细胞中加入 50 μl 冰冷裂解缓冲液; 置冰上裂解 20 min, 涡旋振荡 10 s, $10000 \times g$, 4℃, 离心 1 min; 把离心上清液转移至新的试管中, 并放置冰上; 测定蛋白浓度; 吸取 50 μl 含 50~200 μg 蛋白的细胞裂解上清, 如体积不足 50 μl 用裂解缓冲液补足; 加入 50 μl 的 2 × 反应缓冲液; 加入 5 μl Caspase-3 底物并于 37℃ 避光孵育 4 h; 用酶标仪以 405 nm 波长测定其光密度值。

1.7 统计学处理

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS10.0 统计软件进行处理, 相关指标用 one-way ANOVA 中 Scheffe Test 分析。

2 结 果

2.1 Res 对人胃癌 SGC7901 细胞生长的抑制作用

采用 MTT 法测定 Res 对 SGC7901 细胞的生长抑制作用, 结果显示, 不同质量浓度的 Res 作用于 SGC7901 细胞不同时间后, 细胞生长均受到不同程度的抑制; 随着药物浓度的增加, 抑制率亦升高, 实验组与对照组比较差异均有统计学意义 ($P < 0.01$, 表 1)。结果表明 Res 对 SGC7901 细胞的生长抑制作用呈时间和剂量依赖关系。

表 1 白藜芦醇对胃癌 SGC7901 细胞生长的抑制作用(%)

Tab.1 Inhibitory effect of Res on growth of gastric cancer SGC7901 cells

Resveratrol ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Action time (t/h)		
	12	24	48
0	1.26 ± 4.06	0.10 ± 3.37	0.87 ± 7.25
10	11.16 ± 1.97*	22.31 ± 1.36**	29.36 ± 2.31**
20	30.32 ± 2.37**	36.42 ± 2.67**	42.39 ± 3.76**
40	43.12 ± 3.16**	47.34 ± 4.36**	53.39 ± 5.32**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 μg/ml

2.2 Res 作用后 SGC7901 细胞形态的变化

正常情况下 SGC7901 细胞生长良好, 形状不规则, 呈梭形或多角形, 核异型, 可见异常分裂相。不同质量浓度的 Res 作用于 SGC7901 细胞后可见悬浮细胞增多, 细胞质浑浊, 细胞胞体缩小、变圆、核固缩、碎裂, 细胞折光性减弱, 细胞内出现颗粒样物质,

培养液中有较多的碎片。在 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Res 作用 48 h 时这些变化最明显(图 1)。

2.3 Res 对人胃癌 SGC7901 细胞周期变化的影响

流式细胞术细胞周期分析发现,40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Res 作用 12 h,可见 SGC7901 细胞 G_2/M 百分比增高为 36.19%;作用 36 h, G_2/M 百分比为 29.33%,相应的 S 期细胞明显增加;未经 Res 作用的 SGC7901 细胞增殖正常。提示 Res 通过阻滞 S 期抑制 SGC7901 细胞分裂而降低其增殖能力(表 2)。

2.4 Res 对人胃癌 SGC7901 细胞 Caspase-3 活性的影响

Res 能明显上调 SGC7901 细胞 Caspase-3 活性,不同剂量的 Res 作用时间不同,Caspase-3 活性检测结果不同。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Res 作用 12 h 时,Caspase-3 活性并不明显上升;作用 24 h 后 Caspase-3 活性才开始增加;作用 72 h 后活性明显增加。20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和

40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Res 作用 12 h, Caspase-3 活性即开始增加,至 72 h 活性显著增加。统计学分析发现,这种作用呈时间与浓度依赖性(表 3)。

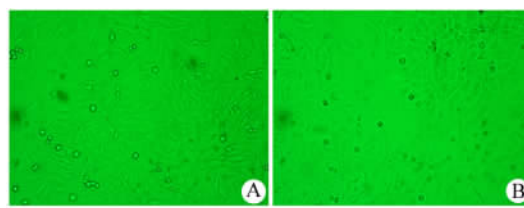


图 1 倒置显微镜下 Res 作用致 SGC7901 细胞形态的改变(×100)

Fig. 1 Morphological changes of SGC7901 cells after treatment with Res under inverted phase-contrast microscope(×100)

A: Control group; B: After treatment (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 48 h)

表 2 白藜芦醇作用不同时间诱导 SGC7901 细胞周期的变化(%)

Tab. 2 Cell cycle distribution of SGC7901 cells after treatment with Res for different periods (%)

Group	Cell cycle			
	G_0/G_1	G_2/M	S	G_2/G_1
Control(24 h)	54.20 ± 1.32	16.31 ± 2.34	27.90 ± 1.56	1.59 ± 1.23
Res 12 h	33.39 ± 2.12	36.19 ± 1.46	28.71 ± 0.56	1.71 ± 0.78
24 h	13.40 ± 0.98	29.50 ± 1.45	55.35 ± 1.65	29.33 ± 2.31
36 h	11.71 ± 1.06	29.33 ± 2.31	57.27 ± 1.76	1.69 ± 0.21

表 3 白藜芦醇对胃癌 SGC7901 细胞中 Caspase-3 表达的诱导作用

Tab. 3 Effect of resveratrol on Caspase-3 expression in SGC7901 cells

Resveratrol ($\rho_B/\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Action time (t/h)			
	12	24	48	72
0	0.09 ± 0.02	0.10 ± 0.03	0.15 ± 0.04	0.24 ± 0.03
10	0.10 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.20 ± 0.02	0.32 ± 0.04*
20	0.17 ± 0.02	0.25 ± 0.03*	0.44 ± 0.05**	0.72 ± 0.06**
40	0.26 ± 0.03*	0.43 ± 0.03**	0.56 ± 0.06**	0.93 ± 0.09**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$

3 讨论

有研究^[2-3]指出,Res 具有抗癌作用,它可以降低小鼠皮肤癌瘤的发生率达 98%,能有效抑制人乳腺癌细胞增殖。Res 对肿瘤作用的研究主要涉及白血病、食管癌、前列腺癌、大肠癌、脑瘤、肝癌、鼻咽癌等,但其抗癌作用的机制尚不清楚。

本实验观察 Res 对胃癌 SGC7901 细胞的作用,结果显示,10、20 和 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Res 能显著抑制 SGC7901 细胞增殖;随着培养时间的延长,细胞被抑制的数量增加;随药物浓度的增加,抑制率也升高。

多种药物可以诱导人类肿瘤细胞周期阻滞,提示细胞周期阻滞在肿瘤细胞凋亡中发挥一定的作用。已有研究^[4]表明,Res 抑制肿瘤细胞增殖的机

制主要影响细胞周期,但对于不同的肿瘤细胞,Res 在细胞周期中的作用机制不尽相同。本实验用不同浓度的 Res 处理细胞 12、24 和 36 h 后 S 期的百分比增加,而 G₀/G₁ 期细胞的百分比降低,G₂/M 期细胞的百分比变化不大,细胞发生了 S 期阻滞。结果提示干扰 DNA 的复制很可能是 Res 抑制 SGC7901 细胞增殖的重要机制。

Caspase 家族属于天冬氨酸蛋白酶,在介导细胞凋亡的过程中起着非常重要的作用,其中 Caspase-3 为关键的效应分子,它可催化多种细胞内特异蛋白的激活,在凋亡信号转导的许多途径中发挥着重要功能。Caspase-3 以酶原的形式存在于胞质中,活化的 Caspase-3 由两个大亚基(17 103)和两个小亚基(12 103)组成,裂解相应的胞质胞核底物,最终导致细胞凋亡^[5-9]。近年来发现,Res 诱导一些肿瘤细胞凋亡中都有 Caspase-3 的参与^[10-12]。Cao 等^[13]发现白藜芦醇引起急性白血病细胞凋亡需要 caspase-3 激活。

本实验将 Res(10 ~ 40 μg/ml)直接作用于 SGC7901 细胞,发现 Res 不仅可明显地抑制细胞生长,并且在一定范围内作用强度呈现对浓度和时间的依赖性。因此,本实验认为 Res 是一个有广泛应用前景的抗癌新药,其抑制肿瘤细胞生长是治疗胃癌的重要机制,为临床使用提供一定的实验基础。

[参 考 文 献]

[1] 毕红彬,阎晓卓,邵攀科. 白藜芦醇的研究进展[J]. 河北化工, 2006, 29(6): 22-23.
 [2] 史 丽,刘 燕,许现辉. 白藜芦醇的生物活性研究进展[J].

食品与药品,2006, 8(11): 5-8.
 [3] 付丽华,胡玉红,孙盛梅,等. 白藜芦醇抗肿瘤作用的研究进展[J]. 黑龙江医药科学, 2006, 29(6): 98-100.
 [4] Aziz MH, Kumar R, Ahamd N. Cancer chemoprvention by resveratrol *in vitro* and *in vivo* studies and the underlying mechanisms [J]. *Int Oncol*, 2003, 23(1): 17-28.
 [5] Sarin A, Hadid EK, Henkart PA. Caspase dependence of target cell damage induced by cytotoxic T lymphocytes[J]. *J Immunol*, 1998, 161(6): 2810-2813.
 [6] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, *et al.* A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD [J]. *Nature*, 1998, 391(6662): 43-50.
 [7] Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1312-1313.
 [8] Harvey NL, Kumar S. The role of caspase in apoptosis[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1998, 62: 107-128.
 [9] Cohen GM. Caspase: the executioners of apoptosis[J]. *Biochem J*, 1997, 326(Pt1): 1-16.
 [10] Tedesco I, Nappo A, Petitto F, *et al.* Antioxidant and cytotoxic properties of lyophilized beer extracts on HL-60 cell line[J]. *Nutr Cancer*, 2005, 52(1): 74-83.
 [11] Mertens-Talcott SU, Percival SS. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells[J]. *Cancer Lett*, 2005, 218(2): 141-151.
 [12] Chan WH. Effect of resveratrol on high glucose-induced stress in human leukemia K562 cells[J]. *J Cell Biochem*, 2005, 94(6): 1267-1279.
 [13] Cao Y, Wang F, Liu HY, *et al.* Resveratrol induces apoptosis and differentiation in acute promyelocytic leukemia (NB4) cells[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(4): 633-641.

[收稿日期] 2008 - 05 - 10 [修回日期] 2008 - 07 - 12
 [本文编辑] 王 莹

欢迎订阅《肿瘤》杂志

《肿瘤》杂志(中国标准连续出版物号:CN 31-1372/R, ISSN 1000-7431)是上海市肿瘤研究所、癌基因及相关基因国家重点实验室和世界卫生组织癌症研究合作中心共同主办的专业学术期刊,于 1981 年 1 月创刊,是国内最早报道肿瘤相关领域成果和进展的专业期刊之一。自创刊以来,该刊一直被北京大学图书馆出版的《中文核心期刊要目总览》、中国科学院的“中国科学引文数据库”和中国科学技术信息中心的“中国科技论文核心数据库”收录,并被 Cambridge Scientific Abstracts (CSA, 美国)、Chemical Abstracts (CA, 美国)、EMBASE (Elsevier, 荷兰)、VINI Abstracts Journal(俄罗斯)、Index Copernicus(波兰)、JST (日本) 等数据库收录,是经卫生部和国家食品药品监督管理局共同审核认定的可以发布处方药广告的医学、药学专业刊物。

《肿瘤》杂志报道国内外肿瘤基础和临床研究的新理论、新成果、新经验、新技术、新方法和新动态,设有专家论坛、研究快报、专题报道、基础研究、临床研究、流行病学研究、技术与方法、病例报告、临床病理讨论、综述、讲座等栏目。为从事肿瘤防治和研究的医药卫生工作者、医学院校师生及其他有关学科人员提供了学术交流平台,旨在推动和促进我国肿瘤事业发展和国内外学术交流。

《肿瘤》杂志为月刊,大 16 开本,每册定价人民币 12.00 元,全年 144 元。每月 25 日出版,国内外公开发售。邮发代号 4-289,国外发行代号 BM 4731。全国各地邮局均可订阅,亦可与编辑部直接联系订购(联系人:周老师,可享受 9 折优惠)。联系地址:上海市斜土路 2200 弄 25 号(邮编:200032);联系电话:021 - 64436792;传真:021 - 64032388; E-mail:tumor@cjtsci.com; 网址:http://www.cjtsci.com。