

菊米提取液对人胃癌细胞 AGS 增殖和凋亡的影响

司马军 金晨宇 方迪龙 金哲柱 郑鸣之

摘要 目的 观察菊米提取液对人胃癌细胞株 AGS 细胞增殖和凋亡的影响。方法 AGS 细胞与 0.001、0.002、0.005、0.010mg/ml 的菊米提取液共同孵育 48h 后,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖抑制率,流式细胞术分析细胞凋亡情况,分光光度法检测 caspase-3/7 酶及 caspase-6 酶活性。结果 不同浓度(0.001~0.010mg/ml)的菊米提取液对 AGS 细胞的生长具有明显的抑制作用,呈现出一定的剂量依赖性;含菊米提取液 0.002、0.005、0.010mg/ml 的药物组细胞凋亡发生率分别为 $(11.03 \pm 2.01)\%$ 、 $(15.53 \pm 1.96)\%$ 及 $(23.77 \pm 1.65)\%$,不含药的对照组细胞凋亡发生率为 $(1.77 \pm 0.60)\%$;与对照组相比,除最低浓度(0.001mg/ml)药物组以外,其余药物组(0.002、0.005、0.010mg/ml) caspase-3/7 酶及 caspase-6 酶活性有显著增强。结论 菊米提取液在体外可呈浓度依赖性抑制人胃癌细胞株 AGS 的增殖并通过 caspase-3、6、7 通路促进其凋亡。

关键词 菊米提取液 胃癌 增殖 凋亡

Effect of Jumi Extration on Proliferation and Apoptosis of Human Gastric Carcinoma Cell Line AGS. Sima Jun, Jin Chenyu, Fang Dilong, Jin Zhezhu, Zheng Mingzhi. Department of Surgery, Hangzhou Red Cross Hospital, Zhejiang 310004, China

Abstract Objective To explore the effect of Jumi extract on proliferation and apoptosis of human gastric carcinoma cell line AGS. **Methods** AGS cells and culure media containing Jumi extract (0.001, 0.002, 0.005, 0.01mg/ml) were co-incubated for 48h. Cell proliferation rate, cell apoptosis, caspase-3/7 and caspase-6 activity were determined by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay, flow cytometry analysis and spectrophotometric detection, respectively. **Results** The proliferation of AGS cells was significantly inhibited by Jumi extract (0.001-0.01mg/ml) in a dose-dependent manner. Apoptosis rates in the cells treated with Jumi extract (0.002, 0.005, 0.01mg/ml) were $(11.03 \pm 2.01)\%$, $(15.53 \pm 1.96)\%$, and $(23.77 \pm 1.65)\%$ respectively, which were higher than that in the control group $(1.77 \pm 0.60)\%$. Compared with the control group, except lower Jumi treated group (0.001mg/ml), caspase-3/7 and caspase-6 activity were significantly increased in all Jumi groups. **Conclusion** The Jumi extract can inhibit the proliferation of gastric carcinoma cell line AGS *in vitro* in a dose-dependent manner and promote cell apoptosis through caspase-3, caspase-7 and caspase-6 pathway.

Key words Jumi extration; Gastric carcinoma; Proliferation; Apoptosis

菊米多为菊科植物甘野菊(*chrysanthemum setic-uspe*)的花蕾制作而成。据《增广本草纲目》记载,菊米为处州一种山中野菊,土人采其蕾(蕊)干之,如半粒绿豆大,甚香且清圆黄亮。目前被广泛用于保健茶饮。经研究发现菊米富含挥发油、蛋白质、菊米内脂、野菊花素、黄酮等营养成分,也含有小白菊内酯、木犀草素、芹菜素、萜类化合物等成分。已有研究证实^[1-5],菊米提取液可通过影响 NO 途径,增加 NOS 活性和内皮细胞超极化因子(EDHF)释放,发挥舒张

血管、对抗实验性心律失常和心肌缺血再灌注损伤等作用;小白菊内酯可抑制大鼠血管平滑肌细胞的增殖;萜类化合物可诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡;木犀草素、芹菜素等可通过抗增殖和诱导凋亡抑制恶性肿瘤细胞的生长^[6,7]。故推测,菊米提取液可能对肿瘤细胞生长产生影响,为此笔者将不同浓度的菊米提取液与人胃癌细胞 AGS 共同培养,观察其对 AGS 细胞增殖和凋亡的影响。

材料与方法

1. 材料:人胃癌细胞 AGS 购自中科院上海细胞库,野菊米购自遂昌华昊菊米有限公司,DMEM(dulbeccos modified eagle medium)细胞培养液购自 Gibco 公司,噻唑蓝(thiazole blue, MTT)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)及二甲基亚砜(DMSO)均购自 Sigma 公司, casapase-3/7、casapase-6 活性检测试剂盒购于 Promega 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物制品公司。菊米提取液的制备:取干的野菊米加入 10 倍的

基金项目:浙江省医药卫生科研基金资助项目(2008A033);浙江省中医药科技计划资助项目(2010ZB022);浙江省嘉兴市科技计划资助项目(2010AY1017)

作者单位:310004 杭州红十字会医院普外科(司马军、方迪龙、金哲柱);310009 杭州,浙江大学附属第二医院国际保健中心(金晨宇);310053 杭州,浙江医学高等专科学校(郑鸣之)

通讯作者:郑鸣之,电子信箱:zmzjppdd181@sina.com

无水乙醇室温萃取 24h, 过滤去沉淀, 上清液用旋转蒸发器浓缩即可。

2. MTT 法测定细胞生存率: 用含 2% FBS(fetal bovine serum)的 DMEM 培养液调整细胞浓度至 3×10^4 个/毫升, 按 180 微升/孔 (6×10^3 个左右细胞量) 接种于 96 孔板中, 16h 后给予各种不同处理并于 37℃、5% CO₂ 条件下继续培养 48h。然后各孔中按 1:9 加入 5mg/ml MTT(用 pH 7.4 PBS 配制), 再置 37℃、5% CO₂ 条件下继续培养 4 h。弃去上清液, 加入 DM-SO 150 微升/孔, 摇床 30min 后, 在酶联检测仪上 570nm 波长处测吸光度(A)值, 以 A 值间接反映存活细胞数量, 计算细胞增殖抑制率。细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{给药}}/A_{\text{对照}}) \times 100\%$ 。

3. 细胞凋亡测定: 采用 PI 单染分析法用流式细胞仪测定细胞周期以反映细胞凋亡情况。收集各处理组细胞均匀打散, PBS(phosphate buffer saline)冲洗 3 次后于 70% 乙醇中 4℃ 固定 18h, 洗去乙醇, 加入 RNase (50mg/ml) 消化并用 PI (100mg/ml) 染色 30min, 用流式细胞仪检测细胞亚二倍体凋亡峰, 根据此亚二倍体峰计算凋亡细胞的百分率。

4. caspase-3/7, caspase-6 活性分析: 具体操作根据 Promega 试剂盒说明书, 即将细胞均匀接种于 96 孔板中, 给予不同处理后, 各孔加入与培养基等体积的 caspase-3/7, caspase-6 发光底物(分别为 Z-DEVD-R110, Z-VEID-氨基荧光素), 轻轻摇匀 30s, 室温孵育 3h 后于多功能荧光分析仪 Wallac 1420 Explorer 上测量荧光值(relative light units, RLU)。

5. 统计学方法: 各组资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用 SigmSata 软件包处理。两组数据采用 Student's *t*-test 进行显著性检验。多组数据采用单因素方差分析(ono-way ANOVA)和 Student-Newman-Keuls(SNK)检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 菊米提取液对 AGS 细胞增殖的影响: 随药物质量浓度 0.001 ~ 0.010mg/ml 增加, 细胞的增殖抑制率逐渐上升, 且与菊米提取液质量浓度呈正相关($r = 0.905, P < 0.05$), 0.01mg/ml 时对细胞增殖的抑制作用最大, 达到 $(58.32 \pm 2.68)\%$ (图 1)。

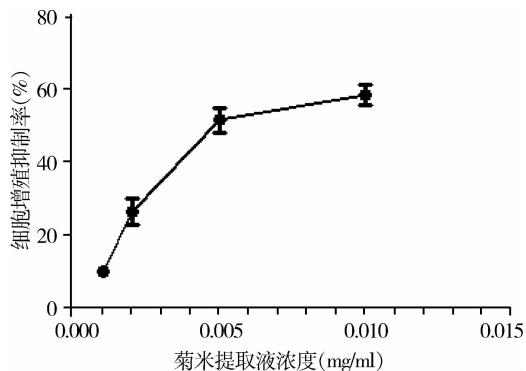


图 1 不同浓度菊米提取液对胃癌 AGS 细胞增殖的影响

2. 菊米提取液对 AGS 细胞凋亡的影响: AGS 细胞与含有菊米提取液 0.001 ~ 0.010mg/ml 的完全培

养基或不含药的完全培养基共同培养 48h 后, 收集全部培养细胞经流式细胞术检测, 不含药的对照组细胞凋亡发生率为 $(1.77 \pm 0.60)\%$, 含菊米提取液 0.001、0.002、0.005、0.010mg/ml 的药物组细胞凋亡率分别为 $(4.63 \pm 1.45)\%$ 、 $(11.03 \pm 2.01)\%$ 、 $(15.53 \pm 1.96)\%$ 及 $(23.77 \pm 1.65)\%$ 。与对照组相比, 除了 0.001mg/ml 药物浓度组, 其余 3 个药物浓度组均显著提高了细胞凋亡率($P < 0.05$), 且呈现一定的剂量依赖性(图 2)。

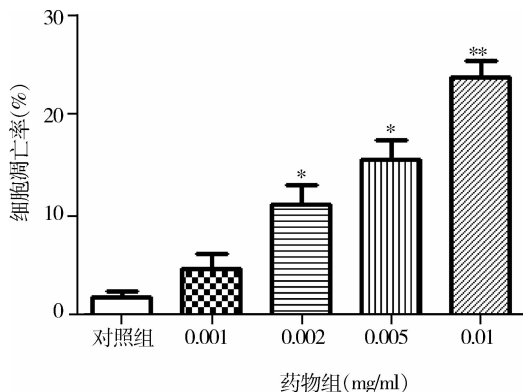


图 2 菊米提取液对胃癌 AGS 细胞凋亡的影响

与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3. 菊米提取液对 caspase-3/7、caspase-6 酶活性的影响: AGS 细胞与含有菊米提取液 0.001 ~ 0.01mg/ml 的完全培养基或不含药的完全培养基共同培养 48h 后, 与对照组相比, 除了 0.001mg/ml 药物浓度组, 其余 3 个药物浓度组的 caspase-3/7、caspase-6 酶活性均有显著增加($P < 0.05$), 且呈现一定的剂量依赖性(图 3)。

讨 论

诱导和促进肿瘤细胞凋亡是治疗肿瘤的重要策略之一^[8]。临床上常用的化疗药物多具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用, 但不良反应较大, 也易产生耐药性。因此, 从天然植物中获取不良反应小、不易产生耐药性的抗癌新药越来越受到人们的重视。

本实验研究发现, 菊米提取液在体外能明显抑制胃癌细胞 AGS 生长, 而且这种作用出现一定的浓度依赖性。菊米提取液对胃癌 AGS 细胞的增殖抑制率随着浓度的增加而增加($P < 0.05$), 在 4.713×10^{-3} mg/ml 可使半数细胞生长受抑制, 这可能与诱导细胞凋亡有关。流式细胞术检测菊米提取液对 AGS 细胞凋亡的影响, 结果显示, 菊米提取液可随着浓度的增加而增大细胞凋亡率, 0.01mg/ml 的菊米提取液处

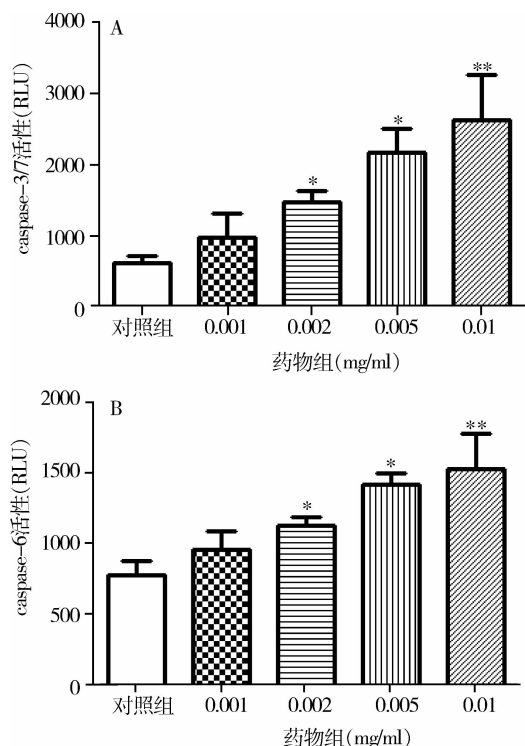


图3 菊米提取液对胃癌 AGS 细胞 caspase-3/7、caspase-6 酶活性的影响
与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

理 AGS 细胞 48h 后,其细胞凋亡率为对照组的 13.5 倍。在对 AGS 细胞 caspase-3/7 酶及 caspase-6 酶活性的检测实验中证实了菊米提取液可通过诱导细胞凋亡而抑制肿瘤细胞的生长。

细胞凋亡是基因控制的细胞自主性死亡过程,它是在基因调控下的一个严密完整的程序过程。其中 caspase 家族在凋亡过程中起到关键性的作用,能引起细胞在形态和生物学特性的改变。caspase-3、caspase-7 与 caspase-6 是主要的处于细胞凋亡下游的凋亡效应分子。caspase-3 被称为“死亡蛋白酶”,是细胞凋亡的生物学标志,其活化及活性受到多种因素的调节。已有研究表明, caspase-7 与 caspase-3 在诱导肿瘤细胞凋亡的过程存在正相关,但在细胞凋亡级联反应中 caspase-7 究竟位于 caspase-3 的下游,还是平行关系,意见不一^[9]。caspase-6 参与细胞凋亡的执行并可降低凋亡信号诱导细胞死亡的阈值,其与 caspase-3 二者有 38% 同源性,二者是不同凋亡途径共同的下游路径,但二者的调控机制及相互关系并不十分明确。有研究发现, caspase-3 蛋白早于 caspase-6 蛋白的激活,并与 caspase-6 蛋白的活化有密切关系,活化的

caspase-6 蛋白反过来又能活化 caspase-3 蛋白,形成对 caspase-3 蛋白活化的正性循环。本实验显示,随着菊米提取液浓度的增加,用荧光底物检测法观察到 caspase-3/7 酶和 caspase-6 酶活性的改变呈剂量依赖性增高,0.01mg/ml 的菊米提取液处理 AGS 细胞 48h,其酶活性分别为对照组的 4.3 倍和 2.0 倍。提示 caspase-3/7 基因和 caspase-6 蛋白基因的蛋白翻译水平同样可能是菊米提取液的作用位点,菊米提取液可能通过增加 caspase-3/7、caspase-6 蛋白表达、活化而促进细胞凋亡。有关 caspase 家族在细胞凋亡过程中的相互作用机制,还有待今后进一步的深入研究。

自由基导致 DNA 损伤且抑制损伤后的修复,是自由基诱导细胞癌变的主要原因。以往的研究结果显示,菊米提取液可通过增加内皮细胞内的一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS),使 NO 生成增加而发挥舒张血管的作用,该结果提示菊米提取液具有抗氧化的作用^[2]。因此,菊米提取液的抗氧化能力也可能是其抗肿瘤的机制之一,这有待进一步深入研究。

目前关于菊米提取液抗胃癌机制的相关研究还不多。本研究显示,菊米提取液能诱导胃癌细胞系 AGS 凋亡,抑制其增殖。为菊米提取液今后用于临床治疗胃癌提供一定的理论基础。

参考文献

- 徐策,叶挺梅,朱立,等. 菊米提取液抗实验性心律失常作用的研究[J]. 中国应用生理学杂志,2007, 23(4):399-402
- 叶挺梅,徐和靖,汪洋,等. 菊米提取液舒张血管作用及其机制研究[J]. 中国病理生理杂志,2007, 23(4):644-647
- 叶挺梅,陈文良,朱立,等. 菊米提取液对抗心肌再灌注损伤[J]. 中国病理生理杂志,2008, 24(12):2328-2332
- 翁少翔,单江,徐耕,等. 小白菊内酯抑制胎牛血清诱导的大鼠血管平滑肌细胞增殖及信号转导机理[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2002; 16(5):331-335
- 张琪,王勤,苗瑞东,等. 盘花垂头菊中两种新型倍半萜类化合物抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞生长[J]. 药学学报,2002, 37(12):993-995
- 张芳芳,沈汉明,朱心强. 木犀草素抗肿瘤研究作用的进展[J]. 浙江大学学报:医学版, 2006, 35(5):573-578
- 胡太平,曹建国. 芹菜素诱导人胃癌细胞凋亡作用及机制研究[J]. 国际病理科学与临床杂志, 2007, 27(1):6-11
- Gazit Y, Akay C. Arsenic trioxide: An anticancer missile with multiple warheads[J]. Hematology,2005, 10(3):205-213
- 胡会华,周士福,李青国. 新辅助化疗中凋亡效应因子 caspase-7、caspase-3 及凋亡抑制因子 survivin 关系初探[J]. 中国综合临床, 2007, 23(10):896-898

(收稿:2011-07-13)