

鸦胆子油乳抑制胃癌细胞增殖及其机制的研究

Study on emulsion of seminal oil of Brucea javanica inhibiting proliferation of gastric cancer cells and its mechanism

甘肃省兰州市兰州医学院第二附属医院消化内科 (730030) 张月宁 马力
山东省东营市胜利医院麻醉手术科 王录洁

Department of Gastroenterology, Second Affiliated Hospital, Lanzhou Medical College, Lanzhou (730030) Gansu Province, China Zhang Yuening MaiLi

Abstract Objective To explore the anti-tumor mechanism of emulsion of seminal oil of Brucea javanica by studying in vitro its effects on cell proliferation, apoptosis, cell cycle and expression of p53 in human gastric cancer cell line BGC-823. Methods: Anti-proliferation effect was measured by MTT assay. The flow cytometry was used to detect apoptotic rates and changes of cell cycle distribution. The levels of P53 protein were examined by immunocytochemical staining. Results: Emulsion of seminal oil of Brucea javanica could remarkably inhibit the proliferation of human gastric cancer cell BGC-823 in a time- and concentration- dependent manner. After 12, 24, 48h incubation with 0.1g/L emulsion of seminal oil of Brucea javanica, the cell cycle was arrested at G0/G1 phase, apoptotic rate upward and the expression of p53 upregulated. Conclusions Emulsion of seminal oil of Brucea javanica could significantly inhibit the proliferation of human gastric cancer cell BGC-823 in vitro with a mechanism of inducing apoptosis and arresting cell cycle at G0/G1 phase through up-regulating the expression of p53.

Key words Emulsion of seminal oil of Brucea javanica Gastric cancer cells Apoptosis Cell cycle p53

摘要 目的 研究鸦胆子油乳体外对人胃癌细胞 BGC-823 抑制增殖的作用及对细胞周期、细胞凋亡及 p53 表达的影响, 探讨其抗肿瘤机制。方法: MTT 法检测鸦胆子油乳对 BGC-823 细胞的毒性作用; 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期分布; 免疫细胞化学染色检测 p53 表达。结果: 鸦胆子油乳对人胃癌细胞有显著的增殖抑制作用, 且有时间和浓度依赖性。0.10g/L 鸦胆子油乳作用 12、24、48h 后, 凋亡率明显上升, 细胞周期被阻滞于 G0/G1 期; p53 表达水平增高。结论: 鸦胆子油乳体外对胃癌细胞 BGC-823 有显著的抑制增殖作用, 上调 p53 的表达从而能诱导凋亡、阻滞细胞周期于 G0/G1 期是其重要机制。

关键词 鸦胆子油乳 胃癌细胞 细胞凋亡 p53 细胞周期

鸦胆子系苦木科鸦胆子属植物 Brucea javanica (L) Merr 的成熟果实。1973 年 Kupchan 等^[1]报道了鸦胆子的醇提取物鸦胆亭 (brucantoin) 对多种动物瘤株有明显的抑制作用。以后相继从该科 30 多种植物中分离出一系列抗癌活性成分。目前已提取鸦胆子油, 制成鸦胆子油乳注射液并应用于临床。临床应用对消化道肿瘤、乳腺癌、肺癌等有显著的疗效, 引起国内外重视并对其化学成分、药理学等进行了深入研究。我们研究了鸦胆子油乳体外对人胃癌细胞 BGC-823 的抑制增殖作用, 并观察其对细胞周期、细胞凋亡及 p53 表达的影响, 以进一步探讨鸦胆子油乳抗肿瘤的有关机制, 为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞 BGC-823 引自兰州医学院生化教研室; 10% 鸦胆子油乳由浙江三九邦而康药业有限公司提供, 用培养液稀释成工作浓度; RPMI1640: Gibco 公司; 小牛血清: 杭州四季青生物工程材料研究所; MTT、SDS: Sigma

公司; 野生型 p53 单克隆抗体: Amersham pharmacia 公司; sp 药盒、DAB 显液: Biotech 公司。细胞在含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的孵箱中培养。

1.2 方法

1.2.1 鸦胆子油乳对 BGC-823 细胞的毒性作用

采用 MTT 比色法。取对数生长期的细胞以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板中培养, 24h 后弃培养液。实验组加入鸦胆子油乳, 据预实验结果设立 0.01、0.05、0.10、0.25、0.50、1.00g/L6 个浓度组; 对照组仅加入与药物等量的培养液 (以下同); 调零组为等量培养液, 不含细胞及药物。每组设 4 个复孔。分别培养 8、20、44、68、92h 后弃培养液, 每孔加入 MTT (1g/L) 50 μ l, 继续培养 4h, 弃上清液, 每孔加入 10% SDS100 μ l, 37℃ 孵育 30min, 酶标仪 (EXL800 型, 威士达公司) 测定各孔于 570nm 波长处的吸光度值 A (OD 值)。用以下公式计算抑制率 (IR): $IR = (1 - \text{实验组的 A 值} / \text{对照组的 A 值}) \times 100\%$ 。

1.2.2 流式细胞仪分析

将对照组及 0.10g/L 鸡胆子油乳作用 12、24、48h 的细胞消化, 制成单细胞悬液 (每个样本细胞数 $> 10^6$ 个/ml)。离心, 4℃ 预冷的 70% 乙醇固定 12h, 后用流式细胞仪 (EPOIC SXL 型: COULTER 公司) 检测凋亡百分率和各细胞周期所占百分比。

1.2.3 免疫细胞化学染色

收集对照组及 0.10g/L 鸡胆子油乳作用 12、24、48h 的细胞, 制成细胞悬液, 均匀涂于防脱片, 40g/L 多聚甲醛固定, 采用 SP 染色法, DAB 显色。操作步骤按说明书。一抗和二抗工作浓度均为 1:200。阴性对照取 PBS 代替一抗; 阳性对照为已知 p53 阳性的乳腺癌组织切片。图像分析系统 (THW-5002 型: 四川联合大学) 下测定 p53 阳性细胞数, 测量窗面积为 $100\mu\text{m}^2$, 放大倍数为 40 倍。

1.2.4 统计学处理

实验数据均由 3 次以上独立的实验得出, 结果用 $\bar{X} \pm S$ 表示。应用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析。

2 结 果

2.1 鸡胆子油乳对 SMMC-7721 细胞的毒性作用

MTT 检测结果显示鸡胆子油乳处理胃癌细胞后, 其生长增殖被抑制, 实验组与对照组相比有显著性差异 ($P < 0.01$)。这种作用存在着明显的量效和时效关系, 表现为随着药物浓度提高和作用时间延长, 抑制率亦相应增大。

2.2 流式细胞仪分析

经鸡胆子油乳作用后, G₁ 期前均出现典型的亚二倍体峰, 且随时间延长而增高, 48h 达 $(29.8 \pm 3.4)\%$, 显著高于对照组 ($P < 0.01$)。G₀/G₁ 期细胞比率上升, S 期和 G₂/M 细胞比率下降, 表明细胞周期被阻滞于 G₀/G₁ 期。

2.3 鸡胆子油乳作用后 p53 表达的变化

阳性细胞染色成棕黄色或棕褐色, p53 免疫反应定位于细胞核。对照组 p53 表达较弱, 经 0.10g/L 鸡胆子油乳作用后表达增强, 这种作用有时间依赖性。

3 讨 论

从鸡胆子中可以分离出一系列苦木内酯成分, 其抗癌活性主要与其所含的不饱和脂肪酸, 特别是油酸、亚油酸有关。鸡胆子抗肿瘤的机制包括: ① 不饱和脂肪酸抑制癌细胞 DNA 合成; ② 破坏肿瘤生物膜结构; ③ 增强机体细胞免疫能力; ④ 增强自然杀伤细胞对肿瘤细胞的敏感性; ⑤ 通过激活凝血系统形成血栓起栓塞作用; ⑥ 鸡胆子油乳可促进骨髓干细胞形成, 与放疗和/或化疗联合应用有一定的

防止白细胞和血小板降低的作用^[2]。

p53 基因是迄今发现的与人类肿瘤相关性最强的基因, 在调控细胞凋亡和细胞周期中发挥重要作用。野生型 p53 蛋白能使 DNA 受损的细胞停止在 G₁ 期, 抑制 DNA 合成并诱导 DNA 修复, 修复不成功则诱导其凋亡。突变型 p53 失去这种监视作用。p53 基因的表达状态影响肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。Handa 等^[3] 发现含野生型 p53 基因的胃癌病人对放疗和化疗的敏感性显著高于含突变型 p53 基因的病人。

诱导肿瘤细胞凋亡与化疗敏感性有关, 凋亡调控机制障碍对刺激不敏感是肿瘤耐药的主要原因^[6]。本实验研究表明, 鸡胆子油乳对胃癌细胞有明显的生长抑制作用, 并能诱导其凋亡, 阻滞细胞周期于 G₀/G₁ 期, 与文献报告相符^[4,5]。俞丽芬等^[7] 研究表明鸡胆子油乳对人胃癌细胞的耐药性具有逆转作用, 推测鸡胆子油乳影响胃癌细胞的凋亡调控机制上, 诱导其凋亡发挥了重要作用。研究结果还显示, 鸡胆子油乳作用后, 胃癌细胞 p53 表达明显增强, 提示鸡胆子油乳诱导细胞凋亡并阻滞细胞周期于 G₀/G₁ 期的机制与上调野生型 p53 的表达有关, 其详细机制需进一步研究。

参考文献

- 1 Kupchan SM, Bear A, Kuo-Hsing, et al. Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolid from brucea antidysenterica. J Org Chem. 1973, 38 (3): 178-184
- 2 俞进友, 朱良志, 夏曙祥. 浅谈鸡胆子在原发肝癌介入治疗中的作用. 中国肿瘤临床与康复, 1995, 2: 49-50
- 3 Handa M, Fu jiwara T, Hizata A, et al. The p53 gene is a potent determination of chemosensitivity and radiosensitivity in gastric and colorectal cancers. J Cancer Res Clin Oncol, 1996, 22 (6): 360-365
- 4 刘悦, 王禾, 符庆吉等. 鸡胆子油乳诱导膀胱癌 BIU-87 细胞凋亡的研究. 中国中西医结合外科杂志, 2001, 7 (2): 76-78
- 5 金嫣丽. 关于生药抗肿瘤作用的研究: 鸡胆子油乳对人体癌细胞增殖的抑制作用. 国外医学. 中医中药分册, 1995, 17: 33
- 6 Yamamoto M, Maehara Y, Oda S, et al. The p53 tumor suppressor gene in anticancer agent-induced apoptosis and chemosensitivity of human gastrointestinal cancer cell lines. Cancer Chemother Pharmacol, 1999, 43: 43-46
- 7 俞丽芬, 吴云林, 张永平. 鸡胆子油乳剂对人胃癌长春新碱耐药细胞株 MKN28/VCR 的逆转作用. 世界华人消化杂志, 2001, 9 (4): 376-378

(收稿: 2002-09-20 修回: 2002-10-24) Lotus

宣郁降气汤治疗胆汁返流性胃炎 35 例/融真//中国医学文摘

本方含姜半夏、柴胡、白芍、厚朴各 10g, 郁金、丹参 15g, 黄连 5g。肝胃不和型加沉香、川楝子、旋覆花各 10g; 脾胃湿热型加竹茹、茵陈各 15g; 脾胃虚弱型加党参 15g, 白术 10g, 砂仁 5g。日 1 剂水煎餐后服。对照组 15 例, 用多潘立酮 10mg/日 3 次餐前, 雷尼替丁 150mg/日 2 次, 口服。均 4 周为 1 疗程。结果: 两组分别痊愈 15、4 例, 显效 6、4 例, 有效 10、3 例, 无效各 4 例, 总有效率 88.6%、73.4% ($P < 0.05$)。