

文章编号:1001-6880(2016)10-1622-05

索骨丹提取物对人胃癌细胞 MGC80-3 的抑制作用

王晓梅^{1*},赵岩²,王天赐¹,廖源¹,白桦¹¹宝鸡文理学院化学化工学院 陕西省植物化学重点实验室,宝鸡 721013; ²宝鸡市中医院,宝鸡 721001

摘要:用不同浓度的索骨丹乙酸乙酯提取物和乙醇提取物干预培养的人胃癌细胞,采用MTT法观察各浓度提取物对胃癌细胞活性的影响,免疫细胞化学方法检测胃癌细Bcl-2和Bax的表达,运用ELISA方法检测PGE₂生成量,以探讨索骨丹提取物抑制胃癌细胞生长的作用机制。结果显示不同浓度的两种提取物对胃癌细胞的增殖活性均有抑制作用,以48 h和72 h作用显著($P < 0.05$)。40 mg/mL和10 mg/mL提取物均可明显减少Bcl-2的表达而增强Bax的表达($P < 0.05$)。两种提取物均可降低胃癌细胞PGE₂的生成量,以浓度40 mg/mL和10 mg/mL作用显著($P < 0.05$)。推断索骨丹提取物可能通过调整Bcl-2和Bax的表达而促使细胞凋亡,并通过降低PGE₂的生成而抑制胃癌细胞的增殖。

关键词:索骨丹提取物;胃癌细胞;Bcl-2;Bax;PGE₂

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.10.023

Inhibition Effects of *Rodgersia aesculifolia* Batal Extracts on Human Gastric Cancer Cells MGC80-3

WANG Xiao-mei^{1*}, ZHAO Yan², WANG Tian-ci¹, LIAO Yuan¹, BAI Hua¹

¹College of Chemistry and Chemical Engineering, Baoji University of Arts and Sciences, Shaanxi Key Laboratory of Phytochemistry, Baoji 721013, China; ²Baoji Hospital of Traditional Chinese Medicine, Baoji 721001, China

Abstract: Human gastric cancer cells were cultured with different concentrations of ethyl acetate extract and ethanol extract from *Rodgersia aesculifolia* Batal. MTT method was used to observe the effects of the extracts on gastric cancer cell proliferation. Immunocytochemistry was used to detect the Bcl-2 and Bax expression of gastric cancer cells. Using ELISA method to detect PGE₂ production, so that to explore the inhibition mechanism of *R. aesculifolia* extracts on gastric cancer cell. Results showed that different concentrations of two kinds of extract can inhibit gastric cancer cell proliferation, inhibition was significant after 48 hours and 72 hours. Extracts with concentrations of 40 mg/mL and 10 mg/mL, can reduce the Bcl-2 expression and enhance the expression of Bax significantly ($P < 0.05$). The extracts with all the concentration levels can reduce the generation of PGE₂ of gastric cancer cells. Hence, it was concluded that *R. aesculifolia* extracts promoted cell apoptosis possibly by adjusting the expression of Bcl-2 and Bax and inhibited the proliferation and invasion of gastric cancer cells possibly by reducing the generation of PGE₂.

Key words: *Rodgersia aesculifolia* Batal extracts; gastric cancer cell; Bcl-2; Bax; PGE₂

胃癌是全世界高发的恶性肿瘤之一,其死亡率在所有恶性肿瘤中居首位,我国是胃癌的高发地区,每年新发病例约占世界总发病数的42%,严重威胁着人类的生命健康和生活质量^[1]。目前胃癌的治疗主要以手术治疗为主,早期治疗效果佳,但中晚期疗效差。索骨丹,又名鬼灯檠、秤杆七、老蛇盘等,为虎耳草科鬼灯檠属植物老蛇盘 *Rodgersia aesculifolia*

Batal. 的根状茎,主要分布于秦岭山区,味苦、涩,性平,具有良好的消肿解毒,止痛止血等效果,当地民间用于胃肠道疾病,感染性疾病,出血性疾病等多种疾病的治疗^[2]。但对其治疗机理的报道资料非常有限。本实验通过观察索骨丹提取物作用胃癌MGC-3细胞后凋亡率改变、凋亡相关基因Bcl-2和Bax表达的改变以及胃癌细胞PGE₂生成量的变化,探讨索骨丹抑制胃癌细胞的机理,旨在为胃癌的治疗筛选出疗效好且毒副作用低的植物药及作用组分,并为秦岭地方性药材的开发提供实验室依据。

收稿日期:2016-01-21 接受日期:2016-05-24

基金项目:陕西省科技厅资助项目(2010K01-201);陕西省植物化学重点实验室资助项目(14JS005);宝鸡文理学院重点项目(Zk15051)

* 通讯作者 Tel:86-917-3566589;E-mail:hywangxiaomei@126.com

1 材料与仪器

索骨丹,购自太白山区,经陕西中医药大学胡本祥教授鉴定。人胃癌细胞 MGC80-3(武汉博士德生物工程有限公司);1640 培养基、PGE₂ ELISA 试剂盒、Bax 及 Bcl-2 免疫组化试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);胰蛋白酶(Solon Ind. Pkwy);胎牛血清(赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司);四噻唑蓝(MTT,阿拉丁试剂上海有限公司);索骨丹乙酸乙酯提取物及索骨丹乙醇提取物均由本实验室制备。

Galaxy 170S 型 CO₂ 培养箱(德国 Eppendorf 公司);Power Wave XS2 型连续波长酶标仪(美国 Bio Tek 公司);SW-CJ-2D 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司);离心机(上海常思工贸有限公司);BX53 型 OLYMPUS 显微镜(日本奥林巴斯株式会社)。

2 实验方法

2.1 索骨丹提取物的制备

称取预先粉碎的索骨丹 100.0 g 若干份,按固液比 1:10 分别溶于乙酸乙酯和 70% 乙醇中,45 ℃ 超声提取 30 min 后,静置,倾出上清液,沉渣再次提取,合并两次滤液,离心,取上清液浓缩,干燥即得。

2.2 MTT 方法测定索骨丹提取物对胃癌细胞的抑制作用

将胃癌细胞 MGC80-3 加入含 10% 胎牛血清的 1640 培养基中,置于 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度的环境培养,每 2~3 d 换液 1 次,取第 3~10 代细胞进行实验。细胞悬液浓度调整为每毫升 10^{5~6} 个细胞,取 96 孔培养板,每孔接种细胞悬液 150 μL,随后每孔加入不同浓度的索骨丹提取物 50 μL,提取物浓度分别为 40、20、10、5 mg/mL 和 2.5 mg/mL,并设不加提取物的空白对照组和 5-氟尿嘧啶(5-FU)阳性对照组,在 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中分别培养 24、48、72 h。取出 96 孔板,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL,继续培养 4 h,弃去孔中的上清液,每孔加入二甲基亚砜 150 μL,震荡 10 min,用酶标仪测定波长 490 nm 处的吸光度值,各药物浓度平行设 6 个复孔,实验重复 3 次,取均值按公式计算药物对细胞生长的抑制率。

细胞生长抑制率(%) =

$$\frac{(\text{空白组吸光度 } A \text{ 值} - \text{药物组吸光度 } A \text{ 值})}{\text{空白组吸光度 } A \text{ 值}} \times 100\%$$

2.3 免疫细胞化学法检测 Bcl-2 和 Bax 的表达

胃癌细胞培养于放置有盖玻片的培养皿中,加入不同浓度的索骨丹提取物,提取物浓度分别为 40、10、2.5 mg/mL,并设不含索骨丹提取物的空白对照组。于 37 ℃、5% CO₂ 条件培养 48 h 后将有细胞贴附的盖玻片取出,进行免疫细胞化学检测。实验步骤严格按试剂盒方法操作,以 PBS 代替一抗作阴性对照,镜下观察染色结果,以细胞核或细胞浆出现棕黄色为阳性细胞。每张贴附细胞的盖玻片取 5 个视野,每个视野数 200 个细胞,并记录其中黄染细胞数。

2.4 酶联免疫吸附实验(ELISA)方法检测胃癌细胞 PGE₂ 含量

按 2.2 方法分组,将细胞培养于 6 孔板中,24 h 后收集培养液上清待检测,操作严格按照 ELISA 检测试剂盒说明书进行,在酶标仪上测定波长 450 nm 处各孔的吸光度值。每一个样品检测不少于 10 份。

2.5 统计学处理

所得数据采用 SPSS 统计软件进行分析。数据以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

3 实验结果

3.1 索骨丹提取物对胃癌细胞的抑制作用

索骨丹乙醇提取物和索骨丹乙酸乙酯提取物对胃癌细胞的抑制作用见表 1 和表 2。

由表 1 可知,索骨丹乙醇提取物各浓度在不同时间对胃癌细胞具有不同的抑制作用,当乙醇提取物干预 24 h 后,各个浓度具有不同程度的抑制作用,40 mg/mL 抑制率为 59.2% ($P < 0.05$),随着提取物浓度的降低抑制率也依次减少,2.5 mg/mL 时抑制率仅 31.0%。当乙醇提取物作用 48 h 后,各浓度的抑制率均有所增高,40 mg/mL 抑制率为 69.5% ($P < 0.01$),接近 5-Fu 的抑制率 71.4%,抑制率随着提取物浓度的降低而减低。提取物作用 72 h 后,各浓度的抑制作用均略有减低,最大为 62.5%,最小为 33.7%,抑制作用与浓度有相关关系。从时间看,抑制作用于 48 h 后最强,经 72 h 后略有减低可能是由于其中的有效成分在这个时间段基本已消耗完全,亦或是随着时间的进一步延长,微环境的酸碱性等因素发生了改变而不利于剩余药物继续发挥作用所致。

表 1 索骨丹乙醇提取物对胃癌细胞的抑制作用

Table 1 Inhibition of ethanol extract from *R. aesculifolia* on gastric cancer cells

组别 Group	24 h		48 h		72 h	
	A 值 Absorbance	抑制率 Inhibition (%)	A 值 Absorbance	抑制率 Inhibition (%)	A 值 Absorbance	抑制率 Inhibition (%)
空白组 Blank	0.287 ± 0.05		0.318 ± 0.10		0.323 ± 0.06	
40 mg/mL	0.117 ± 0.07 *	59.2	0.097 ± 0.06 * *	69.5	0.121 ± 0.03 *	62.5
20 mg/mL	0.124 ± 0.05 *	56.8	0.107 ± 0.04 * *	66.4	0.148 ± 0.05 *	54.2
10 mg/mL	0.132 ± 0.09 *	54.0	0.143 ± 0.05 *	55.0	0.166 ± 0.06 *	48.6
5 mg/mL	0.172 ± 0.04	40.1	0.163 ± 0.04 *	48.4	0.192 ± 0.09	40.6
2.5 mg/mL	0.201 ± 0.08	31.0	0.189 ± 0.07	40.6	0.214 ± 0.05	33.7
5-FU	0.106 ± 0.07 * *	63.2	0.091 ± 0.05 * *	71.4	0.106 ± 0.05 * *	67.2

注:与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 索骨丹乙酸乙酯提取物对胃癌细胞的抑制作用

Table 2 Inhibition of ethyl acetate extract from *R. aesculifolia* on gastric cancer cells

组别 Group	24 h		48 h		72 h	
	A 值 Absorbance	抑制率 Inhibition (%)	A 值 Absorbance	抑制率 Inhibition (%)	A 值 Absorbance	抑制率 Inhibition (%)
空白组 Blank	0.287 ± 0.05		0.318 ± 0.10		0.323 ± 0.06	
40 mg/mL	0.121 ± 0.04 *	57.8	0.096 ± 0.07 * *	66.4	0.108 ± 0.09 * *	66.6
20 mg/mL	0.131 ± 0.05 *	54.4	0.118 ± 0.04 *	62.9	0.130 ± 0.07 *	59.8
10 mg/mL	0.142 ± 0.05 *	50.5	0.124 ± 0.07 *	61.0	0.149 ± 0.04 *	53.9
5 mg/mL	0.184 ± 0.04	36.9	0.152 ± 0.04 *	52.2	0.181 ± 0.05	44.0
2.5 mg/mL	0.204 ± 0.06	28.9	0.211 ± 0.06	33.7	0.217 ± 0.06	32.8
5-FU	0.106 ± 0.07 * *	63.2	0.091 ± 0.05 * *	71.4	0.106 ± 0.05 * *	67.2

注:与空白组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

由表 2 得知,索骨丹乙酸乙酯提取物各个浓度在不同时间对胃癌细胞均有不同程度的抑制作用,当提取物干预 24 h 后,抑制率在 28.9% 至 57.8% 之间,抑制率随浓度增大而增强。当提取物干预 48 h 后,各浓度的抑制率均增强 ($P < 0.05$),最大为 40 mg/mL 组 66.4%,与 5-Fu 组的 71.4% 接近,最小抑制率是 2.5 mg/mL 组的 33.7%;当提取物干预 72 h 后,抑制作用略有减小,最大抑制率为 66.6% ($P < 0.01$),最小为 32.8%,3 个时间段的抑制作用略有差异,综合各浓度,以提取物作用 48 h 后抑制作用最强。

3.2 索骨丹提取物对胃癌细胞 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

由表 3 和图 1 可知,乙酸乙酯提取物能明显降低胃癌细胞 Bcl-2 的表达,与空白对照组 131.75 相

比,乙酸乙酯提取物各浓度的表达量分别为 31.75、53.25 和 80.63,与空白组相比,3 个浓度的酯提物均有显著性差异 ($P < 0.05$),且浓度越大降低作用越明显。反之,40 mg/mL 和 10 mg/mL 两种浓度的酯提物均能增强 Bax 的表达,与空白组比较,均有显著性差异 ($P < 0.01$)。在对 Bcl-2 和 Bax 表达的作用方面,乙酸乙酯提取物 40 mg/mL 组作用最强,而乙酸乙酯提取物 10 mg/mL 组和 2.5 mg/mL 组则作用明显减弱,也即浓度越高作用越强。由表中还可看出,乙酸乙酯提取物各浓度组可改变 Bax/Bcl-2 比率,40 mg/mL 组对 Bax/Bcl-2 比率的提高作用最强,其余两个浓度对 Bax/Bcl-2 比率有增强作用,但作用渐弱。说明索骨丹乙酸乙酯提取物具有增强促凋亡蛋白表达而抑制抗凋亡蛋白表达的作用。由表中还可知,乙醇提取物各浓度组可同样可明显降低

抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,且浓度越高作用越强,同乙酸乙酯提取物组相似,乙醇提取物组可显著增强 Bax 的表达,以 40 mg/mL 和 10 mg/mL 组作用显著

($P < 0.05$)。醇提物组同样具有提高 Bax/Bcl-2 比率的作用。

表 3 索骨丹提取物对胃癌细胞 Bcl-2 和 Bax 的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of *R. aesculifolia* extracts on the expression of Bcl-2 and Bax of gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	Bcl-2	Bax
空白组 Blank	131.75 ± 12.46	17.5 ± 1.58
乙酸乙酯 40 mg/mL Ethyl acetate 40 mg/mL	$31.75 \pm 3.73^{* *}$	$175.75 \pm 11.45^{* *}$
乙酸乙酯 10 mg/mL Ethyl acetate 10 mg/mL	$53.25 \pm 5.75^{* *}$	$57.88 \pm 16.41^{* *}$
乙酸乙酯 2.5 mg/mL Ethyl acetate 2.5 mg/mL	$80.63 \pm 12.66^{*}$	16.8 ± 3.14
乙醇组 40 mg/mL Ethanol 40 mg/mL	$32.61 \pm 6.41^{* *}$	$142.63 \pm 33.22^{* *}$
乙醇组 10 mg/mL Ethanol 10 mg/mL	$69.38 \pm 20.43^{* *}$	$36.87 \pm 12.76^{*}$
乙醇组 2.5 mg/mL Ethanol 2.5 mg/mL	73.13 ± 10.33	19.06 ± 4.44

注:与空白组相比, $^* P < 0.05$, $^{* *} P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, $^* P < 0.05$, $^{* *} P < 0.01$.

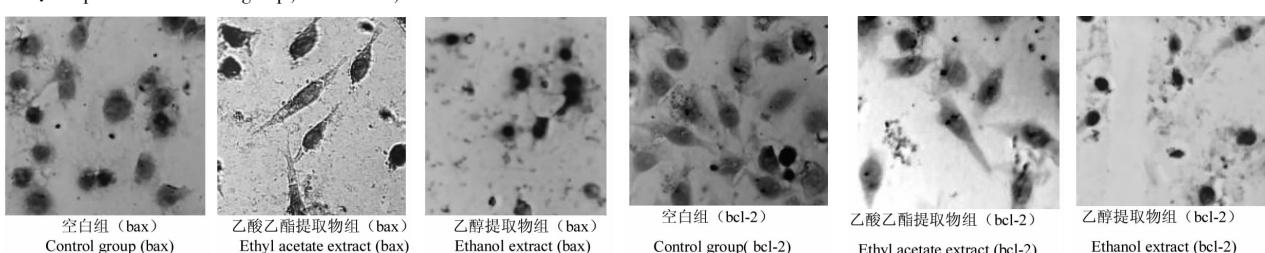


图 1 胃癌细胞免疫组化染色

Fig. 1 Immunohistochemical staining of gastric cancer cell

3.3 索骨丹提取物对胃癌细胞 PGE₂ 的作用

由表 4 可知,索骨丹乙酸乙酯提取物各浓度对胃癌细胞 PGE₂ 的产生均有显著的抑制作用($P < 0.05$),且抑制作用随着浓度的增大而增强,其中 40 mg/mL 和 10 mg/mL 组抑制作用最强。乙醇提取物 40 mg/mL 和 10 mg/mL 组也有显著的抑制作用($P < 0.05$),而且高浓度较低浓度作用强。

4 讨论与结论

胃癌细胞是多种因素,经过多个阶段而形成的变异细胞。对胃癌的药物治疗一方面是促进其凋亡和另一方面抑制其生长。细胞凋亡是生物体内的一种基本的生命活动,是细胞发育到一定阶段出现的程序性死亡。近年来细胞凋亡与肿瘤的关系日益引起研究者们的关注,肿瘤发生的重要因素之一即是细胞凋亡的紊乱,经研究发现 Bcl-2 家族蛋白在细胞凋亡过程中起重要的作用^[3],在无死亡信号刺激时,Bcl-2 家族中的大部分抗凋亡蛋白以细胞器膜的

表 4 索骨丹提取物对胃癌细胞 PGE₂ 的作用($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of *R. aesculifolia* extracts on PGE₂ of gastric cancer cells ($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	PGE ₂ (ng/mL)
空白组 Blank	123.55 ± 7.73
乙酸乙酯 40 mg/mL Ethyl acetate 40 mg/mL	$40.92 \pm 3.89^{* *}$
乙酸乙酯 10 mg/mL Ethyl acetate 10 mg/mL	$48.47 \pm 5.53^{* *}$
乙酸乙酯 2.5 mg/mL Ethyl acetate 2.5 mg/mL	$81.53 \pm 7.09^{*}$
乙醇组 40 mg/mL Ethanol 40 mg/mL	$29.43 \pm 3.14^{* *}$
乙醇组 10 mg/mL Ethanol 10 mg/mL	$75.31 \pm 8.22^{*}$
乙醇组 2.5 mg/mL Ethanol 2.5 mg/mL	116.59 ± 11.26

注:与空白组相比, $^* P < 0.05$, $^{* *} P < 0.01$ 。

Note: Compared with control group, $^* P < 0.05$, $^{* *} P < 0.01$.

整合膜蛋白形式存在,促凋亡蛋白以非活性的形式存在于细胞液中。当细胞受到死亡信号刺激,促凋亡蛋白被蛋白酶激活而发生构象改变后,从胞液中易位到细胞器的膜结构上,并与膜上的抗凋亡蛋白相互作用,致使抗凋亡蛋白丧失了对细胞凋亡的抑

制作用，并引起各种促凋亡因子的释放，最终导致细胞凋亡^[4]。研究发现 Bcl-2 和 Bax 两者之间的比例关系是决定细胞凋亡抑制作用强弱的关键^[5]，也是判断患者预后的一项指标。Poeta 等^[6-7]通过检测 225 例急性髓型白血病患者 Bax、Bcl-2 表达水平，发现 Bax/Bcl-2 比率高的患者完全缓解率明显升高，同时其无病生存期也明显延长。本实验中索骨丹乙酸乙酯提取物和乙醇提取物能不同程度地抑制胃癌细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达，同时能不同程度地增强促凋亡蛋白 Bax 的表达，对 Bcl-2/Bax 比率具有明显的降低作用，且随着提取物浓度的增高而降低作用增强，说明索骨丹可以通过促进细胞凋亡而发挥对胃癌细胞生长的抑制作用，其促进凋亡的机制可能是通过对 Bcl-2 家族的调节而实现的。

PGE₂ 是花生四烯酸的代谢产物之一，具有扩张血管、抗炎及免疫抑制等多种生物学活性。据报道^[8]，胃癌及大肠癌组织 PGE₂ 水平较正常组织明显增高。PGE₂ 可通过增加癌细胞与基质的粘附，促进肿瘤组织新生血管的形成，而促进肿瘤组织的浸润和转移^[9]。实验中，索骨丹乙酸乙酯提取物和乙醇提取物能明显降低胃癌细胞产生的 PGE₂ 含量，说明索骨丹抑制胃癌细胞的机制之一可能是通过减少 PGE₂ 的生成而实现的。同时对 PGE₂ 的抑制也可恢复机体免疫调节功能，从而发挥抗癌的作用。至于索骨丹是如何减少 PGE₂ 的将在今后的工作中进一步探讨。本实验所用药物为索骨丹经两种溶剂提取的两类混合物而非单一物质，通过实验中两类提取物对 Bcl-2 家族和 PGE₂ 都有作用来看，索骨丹对胃癌细胞的抑制作用可能有赖于多组分对于至少两个靶点的共同作用。

参考文献

- 1 Zou WB(邹文斌), Li ZS(李兆申). The research progress of gastric cancer morbidity and mortality in China. *Chin J Prac Int Med* (中国实用内科杂志), 2014, 34: 308-415.
- 2 Baoji City Health Bureau (宝鸡市卫生局). Records of Taibai Mountain Herbs. Xian: Shaanxi Science and Technology Press, 1987. 409-410.
- 3 JI HB, Zhai QW, Liu XY, et al. Transcription regulation of bcl-2 gene. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2000, 32(2): 95-99.
- 4 Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*, 1999, 13: 1899-1911.
- 5 Scopa CD, Vagianos C, Kardamakis D, et al. Bcl-2/Bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with rectal cancer. *Appl Immunohistochem Molecul Morphol*, 2001, 9: 329-334.
- 6 Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML). *Blood*, 2003, 101: 2125-2131.
- 7 Narayan S, Chandra J, Sharma M, et al. Expression of apoptosis regulators Bcl-2 and Bax in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Hematology*, 2007, 12(1): 39-43.
- 8 Ding YB, Shi RH, Tong JD, et al. PGE2 up-regulates vascular endothelial growth factor expression in MKN28 gastric cancer cells via epidermal growth factor receptor signaling system. *Exp Oncol*, 2005, 27: 108-113.
- 9 Dohadwala M, Batra RK, Luo J, et al. Autoerine/Paracrine prostaglandin E2 production by non-small cell lung cancer cells regulates matrix metalloproteinase-2 and CD44 in cyclooxygenase-2-dependent Invasion. *J Biol Chem*, 2002, 277: 50828-50833.