

宁夏密点麻蜥不同部位含药大鼠血清 对人胃癌细胞凋亡的影响研究

李卫强^{1,2*}, 王 骄¹, 关 芳¹, 艾梦环¹

¹宁夏医科大学中医学院; ²宁夏医科大学回医药现代化教育部重点实验室, 银川 750004

摘要:为探讨宁夏密点麻蜥不同部位含药大鼠血清对人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡影响及其抗癌机制。研究选取 SPF 级雄性 SD 大鼠分别以生理盐水、宁夏密点麻蜥不同部位水煎液灌胃, 制备含药血清加于胃癌细胞, 通过 MTT 检测细胞活性, Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡, Western-blot 检测胃癌细胞 Sirt1 和 P53 蛋白表达。结果显示, 宁夏密点麻蜥不同部位各组可明显降低 Sirt1 和 P53 蛋白表达水平, 抑制细胞增殖, 促进凋亡, 以尾部组最明显。综上所述, 宁夏密点麻蜥不同部位可能通过抑制 SIRT1, 降低 P53, 诱导细胞凋亡, 其中以宁夏密点麻蜥尾部抗肿瘤作用最显著。

关键词:宁夏密点麻蜥; 含药血清; 人胃癌细胞; 细胞凋亡

中图分类号: R282. 74

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)8-1447-05

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.8.021

Effects of drugs containing serum from rats fed with Ningxia dense point lizard different body parts on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer cells

LI Wei-qiang^{1,2*}, WANG Jiao¹, GUAN Fang¹, AI Meng-huan¹

¹College of Traditional Chinese Medicine;

²Key Laboratory of Hui Medicine Ministry of Education, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China

Abstract: To explore the effects of drugs containing SD rats serum in the different body parts of Ningxia dense point lizard on the apoptosis of the line SGC-7901 human gastric cancer cell, and its anticancer mechanism. The SPF male SD rats were randomly divided into different groups, given corresponding drug intervention to prepare drug containing serum, added to gastric cancer cells, and detected cell viability by MTT, the cell apoptosis with Annexin V-FITC/PI double staining, and the expression of Sirt1 and P53 protein in gastric cancer cells by Western-blot. The results showed that the expression levels of Sirt1 and P53 proteins could be reduced significantly in different parts of the lizard, inhibiting cell proliferation and promoting apoptosis. In summary, different parts of Ningxia dense point lizard may inhibit Sirt1, reduce P53, and induce apoptosis, and the anti-tumor effect of Ningxia dense point lizard tail is the most significant.

Key words: Ningxia dense point lizard; containing drug Sserum; human gastric cancer cells; cells apoptosis

胃癌是一个多基因、多阶段、多因素参与的病理过程, 多数学者认为肠型胃癌发生遵循从慢性浅表性胃炎→慢性萎缩性胃炎→肠上皮化生→异型增生→胃癌这一过程^[1]。从正常胃黏膜到胃癌的发展过程中, 细胞凋亡渐受抑制, 细胞恶性增生逐渐显

现。因此, 胃黏膜细胞凋亡较少是胃癌发生的重要机制, 而如何促进细胞凋亡、抑制增殖是阻断肿瘤发生的关键环节。我们采用宁夏密点麻蜥为主的复方蜥蜴散治疗慢性萎缩性胃炎、胃癌前病变及胃癌, 均取得较好的临床疗效。同时, 前期通过复方蜥蜴散及单味宁夏密点麻蜥干预胃癌细胞的体外实验研究也表明, 该方及单味密点麻蜥可改善胃黏膜细胞缺血缺氧的微环境, 促进细胞凋亡, 阻断癌变^[2-8]。本实验即在以上研究的基础上, 进一步研究宁夏密点

收稿日期: 2019-01-16 接受日期: 2019-06-06

基金项目: 国家自然科学基金(81560769, 81860807); 宁夏自然科学基金(2018AAC03081); 宁夏高等学校中医学一流学科建设资助项目(NXYKXK2017A06)

* 通信作者 E-mail: lwq200309@163.com

麻蜥不同部位对人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡的影响及其机制, 以期为深入探究密点麻蜥抗癌物质基础提供科学依据。

1 材料

1.1 动物和试剂

4~6 周龄雄性 SD 大鼠 120 只, SPF 级, 体重 150~180 g, 合格证号 SCXK(宁)2015-0001, 大鼠生长繁殖饲料(No. 18053223, 北京科澳协力饲料公司), 大鼠和饲料均由宁夏医科大学实验动物中心提供。RPMI-1640 培养基、胎牛血清(Gibco 公司); MTT 细胞增殖及毒性检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份公司, No. 20171213); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物公司, NO: BB17091); 兔抗 P53 多克隆抗体、兔抗 SIRT1 单克隆抗体(艾博抗(上海)贸易有限公司)。人胃腺癌细胞株 SGC-7901(中科院上海生科院细胞资源中心提供)。

1.2 药物

宁夏密点麻蜥由宁夏医科大学附属回医中医医院提供, 分别制备其头部、四肢部、躯干部、尾部及全身组, 按照人鼠之间用量比例折算, 配成浓度为 0.28 g/mL 水煎液装瓶备用; 0.9% 氯化钠注射液(湖南科伦制药公司, No. D17090607-1)。

1.3 仪器

超净工作台(苏州安泰公司); HealForce 二氧化碳培养箱(香港力康公司); OLYMPUS 显微镜 BH-2RFCA; BIO-TEK 酶标仪 ELx800 型等。

2 方法

2.1 含药血清制备

120 只 SPF 级 SD 大鼠适应性喂养 7 天后, 随机分 6 组: 生理盐水对照组、宁夏密点麻蜥头部组、四肢部组、躯干部组、尾部组、全身组, 每组 20 只。按每只 2.5 mL/100 g 给药, 对照组给予等量生理盐水, 连续灌胃 7 天。末次给药 1 h 后, 腹腔麻醉, 腹主动脉取血、离心, 制备含药血清, -20 °C 冷藏备用。

2.2 胃癌细胞培养

生长于 RPMI-1640 培养液中的人胃癌细胞 SGC-7901, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中, 每隔 48 h 更换 1 次培养基; 实验时, 消化并接种于 96 孔板或 6 孔板培养皿中。

2.3 MTT 检测细胞增殖

将对数生长期细胞分别以 2×10^3 个/mL 浓度接种于 96 孔培养板中, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液。

培养 24 h 后吸去上清液, 按照实验分组分别加入用 RPMI1640 培养液配置的含 10% 药物血清 100 μ L, 每组均做 5 个复孔。各组细胞分别培养 24 h, 每孔加入 50 μ L 的 1xMTT。继续培养 4 h 后, 吸去上清液, 每孔加入 150 μ L 的 DMSO, 振荡仪振荡 10 min, 待结晶物充分溶解后, 用酶标仪在 490 nm 波长下测吸光值。

2.4 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡

对数生长期细胞分别以 6×10^5 /mL 接种于 6 孔板, 培养 24 h, 待细胞贴壁后, 吸去上清液, 加入含 10% 大鼠血清的培养液, 继续培养 24 h, PBS 清洗细胞 1 次, 用不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞, 进行 4 °C 2 000 rpm, 离心 5 min, 弃上清, 冷 PBS 洗涤细胞 2 次, 吸尽 PBS, 用 400 μ L 1 \times Annexin V 结合液悬浮细胞, 在细胞悬浮液中加入 5 μ L Annexin V-FITC 染色液, 混匀后 2~8 °C 避光孵育 15 min, 再加入 10 μ L PI 染色液, 混匀于 28 °C 避光条件下孵育 5 min, 以流式细胞定量分析。

2.5 Western-blot 检测 Sirt1 和 P53 蛋白表达

用含 10% 大鼠含药血清的 RPMI-1640 培养液, 转染对应各组细胞 72 h 后收集细胞总蛋白, 用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取 25 μ g 样品上样于十二烷基硫酸钠-上样缓冲液(SDS-PAGE), 电泳至溴酚蓝跑到胶底部。将其转至硝酸纤维脂膜上, 以 5% 脱脂奶粉 4 °C 过夜封闭; 分别加入 Sirt1 和 P53 一抗, 摇床孵育 2 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min, 分别加入二抗, 摇床孵育 2 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min, 进行图像采集, 计算 Sirt1 和 P53 蛋白与内参 p-actin 灰度值的比值, 重复 3 次。

2.6 统计分析

SPSS 20.0 For Windows 统计分析。对数据进行正态分布检验, 符合正态分布者采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)的最小显著差法, 不符合正态分布者进行数据转化后比较, 结果以均数 \pm 标准差表示(显著性水准取 $\alpha = 0.05$)。

3 结果

3.1 宁夏密点麻蜥不同部位含药大鼠血清干预后各组吸光度(OD)值

宁夏密点麻蜥各组 OD 值低于生理盐水对照组, $P < 0.05$, 表明密点麻蜥各组可较好抑制胃癌细胞增殖; 宁夏密点麻蜥各组间比较, 以尾部组 OD 值最低, $P < 0.05$, 说明尾部组对胃癌细胞增殖的抑制作用最强(见表 1)。

表1 宁夏密点麻蜥不同部位各组含药血清干预后 OD 值($\bar{x} \pm s$)Table 1 OD value of drugs containing serum interventions of dense point lizard different body parts($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	OD 值 Optical density	存活率 Survival (%)
生理盐水对照组 Saline control group	110 ± 11.15	99.1 ± 0.09
宁夏密点麻蜥头部组 Dense point lizard head group	79.41 ± 10.04 **	90.3 ± 1.51 **
宁夏密点麻蜥四肢部组 Dense point lizard limb group	67.42 ± 7.02 **	83.2 ± 3.11 **
宁夏密点麻蜥躯干部组 Dense point lizard trunk group	65.01 ± 6.46 **	79.4 ± 2.64 **
宁夏密点麻蜥全身部组 Dense point lizard body group	48.86 ± 6.21 **	70.1 ± 2.32 **
宁夏密点麻蜥尾部组 Dense point lizard tail group	39.62 ± 4.56 *	60.2 ± 1.22 *

注: * 各组与生理盐水对照组比较, * $P < 0.05$; * 各组与尾部组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group of saline, * $P < 0.05$; Compared with tail group, * $P < 0.05$ 。

3.2 宁夏密点麻蜥不同部位含药大鼠血清对 SGC-7901 胃癌细胞凋亡影响

宁夏密点麻蜥各组促进人胃癌细胞的总凋亡率高于生理盐水对照组, $P < 0.05$, 表明密点麻蜥各组可较好促进胃癌细胞凋亡; 宁夏密点麻蜥各组间比较, 以尾部组总凋亡率最高, $P < 0.05$, 说明尾部组促进胃癌细胞凋亡的作用最强(见表2、图1)。

3.3 Western blot 检测 STIR1 和 P53 蛋白表达

从图2可知, 与生理盐水对照组比较, 各含药血清处理组 Sirt1 和 P53 蛋白表达均降低, $P < 0.05$ 。图3、图4中 Western blot 检测结果表明, 宁夏密点麻蜥尾部组 Sirt1 和 P53 蛋白水平下降最明显, 各组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

胃癌属“胃脘痛”“伏梁”“噎膈”“积聚”等范畴。中医学认为, 饮食、情绪失调及 Hp 湿热“虫”毒

感染等引起脾胃升降清降浊功能失常, 气血生化乏源, 胃黏膜失却濡养, 久则浊毒稽留, 络脉瘀阻而致癌病形成。因此, 我们结合文献及临床研究, 提出毒瘀交阻、气阴不足是胃癌的主要病机, 此与现代医学细胞缺血缺氧微环境改变而致细胞凋亡失常、细胞恶性增殖致胃癌发生的病理相一致。

因此, 促进细胞凋亡、抑制恶性增殖是阻断肿瘤发生的关键环节。现代胃癌机制研究主要集中在能够引起细胞增殖、分化的基因和蛋白质表达上^[9,10], 如 SIRT1、P38、P53、Stats 通路、Wnt 通路、survivin-caspase-3 基因表达、NF- κ B 等。而 SIRT1 调控的 P53 及 P53 正向细胞凋亡调控因子 (P53 up-regulated modulator of apoptosis protein, PUMA), 也称为 bcl-2 binding component 3 protein (BBC3), 因作用独特、促凋亡活性强大而受到越来越多的关注, 在胃癌阻断机制中起重要的调控作用^[11-13]。

表2 宁夏密点麻蜥不同部位含药大鼠血清对胃癌细胞凋亡影响($\bar{x} \pm s$)Table 2 Effect on apoptosis of gastric cancer cells of rats containing drugs Serum in Lizard different parts($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	总凋亡率 Total apoptosis rate (%)
生理盐水对照组 Saline control group	9.7 ± 1.12
宁夏密点麻蜥头部组 Dense point lizard head group	12.9 ± 1.24 **
宁夏密点麻蜥四肢部组 Dense point lizard limb group	14.4 ± 2.16 **
宁夏密点麻蜥躯干部组 Dense point lizard trunk group	15.5 ± 2.60 **
宁夏密点麻蜥全身部组 Dense point lizard body group	20.6 ± 2.12 **
宁夏密点麻蜥尾部组 Dense point lizard tail group	22.9 ± 2.51 *

注: * 各组与生理盐水对照组比较, * $P < 0.05$; * 各组与尾部组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group of saline, * $P < 0.05$; Compared with tail group, * $P < 0.05$ 。

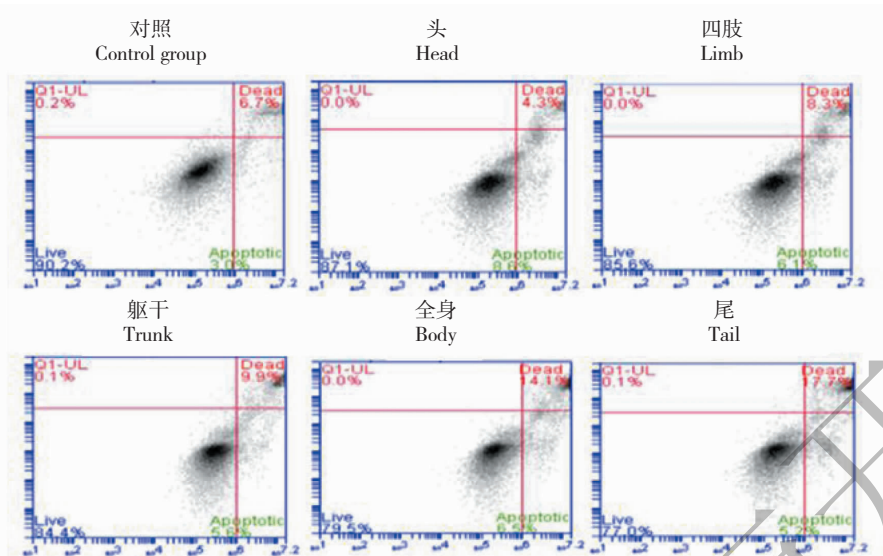


图1 宁夏密点麻蜥不同部位含药大鼠血清对胃癌细胞凋亡影响

Fig. 1 Effect of drug containing rats serum in lizard's different parts on apoptosis of gastric cancer cells

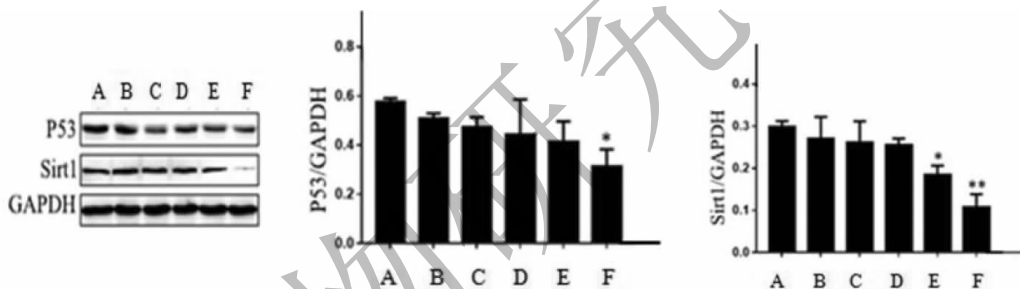


图2 Sirt1 and P53 蛋白表达

Fig. 2 Sirt1 and P53 expression levels

注:A 对照组;B 头部组;C 四肢组;D 躯干组;E 全身组;F 尾部组。

Note: A. control group; B. head group; C. limb group; D. trunk group; E. body group; F. tail group.

目前,发现人类 sirtuin 家族成员有 7 个, SIRT1 是与酵母 Sir2 基因同源性最高的一个参与细胞衰老、凋亡、分化等生理活动,可能是所有生物共有的寿命调节基因之一^[14]。研究表明, SIRT1 作用底物中 P53 是很重要的一个。P53 是目前研究最多的抑癌基因,发生变异者为突变体,不但丧失抑癌活性,反而可促进恶性转化,由抑癌基因转变为癌基因。已经证实,当细胞处于缺血缺氧致使 DNA 损伤等应激情况时, P53 蛋白表达与多种恶性肿瘤的发生、发展、浸润、转移及预后有关。同时, P53 过度表达又可导致肿瘤血管生成增加,是与血瘀证相关的重要因子^[15]。

我们前期开展了蜥蜴相关文献研究,李时珍《本草纲目》载蜥蜴可“滑窍破血,消水饮阴”,《中药大辞典》亦指出,蜥蜴具有破结利水、消瘿散结之

效,表明其功效与毒瘀交阻的胃癌病机相符合,临床以蜥蜴胃康方治疗胃癌前病变疗效显著。此外,通过宁夏密点麻蜥干预胃癌前病变(PLGC)模型大鼠的实验研究表明,宁夏密点麻蜥能抑制 PLGC 模型大鼠 HIF-1 α 和 VEGF 表达,可改善胃黏膜细胞缺血缺氧的微环境,抑制凋亡相关蛋白 P53、PUMA 表达,可有效逆转胃黏膜增生肠化,抑制癌变趋势,具有较好的生物活性。进而我们以宁夏密点麻蜥含药大鼠血清干预人胃癌细胞,发现其能升高 P53、Bax 及 E-cad 蛋白表达水平,降低 MMP-9 蛋白表达,抑制人胃癌细胞 BCG-823 细胞增殖,促进细胞凋亡,阻断癌变, E-cad、MMP-9 均为细胞上皮间质转化相关因子,与胃癌浸润转移有关,表明宁夏密点麻蜥可干预胃癌的浸润转移,疗效优于 5-FU 及华蟾素片

组^[2-8]。以上研究说明宁夏密点麻蜥具有较好阻断癌变的作用,但其活性部位尚不明确。

宁夏密点麻蜥生活在沙漠中,从临床及前期实验研究结果来看,其生物活性较草原蜥更强,蜥蜴断尾再生表明蜥蜴尾部含有较强的生物活性物质。陈绍军也指出,蜥蜴尾部再生分化对机体有较好的保护和功能恢复作用^[16],但缺乏有力实验数据的支持,基于此,我们进一步开展了宁夏密点麻蜥不同部位抗肿瘤细胞凋亡的研究,以其明确蜥蜴抗肿瘤活性部位,为进一步探讨其抗肿瘤活性物质奠定基础。

本实验研究结果表明,宁夏密点麻蜥不同部位各组可明显抑制 SGC-7901 胃癌细胞增殖,诱导凋亡,以尾部组吸光度值小于其他组, $P < 0.05$ 。各含药大鼠血清干预组细胞总凋亡率大于生理盐水对照组,宁夏密点麻蜥尾部组细胞总凋亡率大于其他各组,宁夏密点麻蜥不同部位含药大鼠血清干预组 Sirt1 和 P53 蛋白表达各组比较, $P < 0.05$,以尾部组下降最明显, $P < 0.05$ 。表明宁夏密点麻蜥尾部干预人胃癌细胞 SGC-7901 细胞增殖,诱导凋亡,以尾部组作用最强,表明尾部为蜥蜴抗肿瘤活性最强的部位,含有较多的活性成分,其机制可能与解毒通络、养血活血,改善胃黏膜营养供给,改变缺血缺氧微环境,进而抑制 Sirt1,降低 P53 蛋白表达有关,这为我们下一步研究宁夏密点麻蜥尾部抗癌活性成分提供了科学依据。

参考文献

- Guo CX, Liu JB, Zhao Y, et al. Atractylodes inhibits the proliferation and promotes apoptosis of gastric cancer cell SGC-7901 [J]. *Chin J Histochem Cytochem* (中国组织化学与细胞化学杂志), 2017, 26: 468-474.
- Li WQ, Wei XH, Zhu XJ. Intervention of combined different particle of fufang xiyi san on precancerous lesions in gastric cancer rats via the stat3 pathway [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2014, 20: 142.
- Li WQ, Zhu XJ, Wei XH. Correlation of gastric precancerous lesions TCM syndromes and nail fold microcirculation [J]. *Pract Tradit Chin Intern Med* (实用中医内科杂志), 2012, 26: 8.
- Li WQ, Wei XH, Zhu XJ. Study on the clinical efficacy and CEA dynamic relationship between yin deficiency and blood stasis syndrome on precancerous lesions in gastric cancer of combined different particle of fufang xiyi san [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2012, 23: 2383-2384.
- Li WQ, Hou ZC, Guan F, et al. P53 and bax expression level effect of SD rats drug containing serum in compound lizard powder and square split on human BCG-823 gastric cancer cells [J]. *Jiangsu J Tradit Chin Med* (江苏中医药), 2017, 49: 76-79.
- Zhang DY, Li WQ, Gan DJ. Influence of eremias multiocellata from niangxia on HIF- α , VEGF in model rat with gastric precancerous lesions [J]. *Shanxi J Tradit Chin Med* (山西中医), 2017, 33: 50-53.
- Li WQ, Hou ZC, Gan DJ. P53 and PUMA expression effects of ningxia dense point lizard on the precancerous lesions in gastric cancer rats [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2017, 28: 525-528.
- Hou ZC, Li WQ, Bai LG. Effects of drugs containing serum from rats feeded with ningxia dense point lizard on the apoptosis of human gastric cancer cells BCG-823 [J]. *World Chin J Dig* (世界华人消化杂志), 2017, 25: 43-48.
- Ma L, Wang SJ, Sun WW. Comparative study on the activity of oxymatrine to SGC-7901 and ECV304 [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2018, 30: 773-776.
- Chen DH, Deng YR, Mou JJ, et al. Structural modification and antitumor activity of baicalein [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31: 1-10.
- Ding JJ, He S, Zhang JB, et al. Expression of sirt1 in gastric cancer tissue and its effect on prognosis [J]. *Acta Univ Med Nanjing* (南京医科大学学报), 2011, 31: 1142-1146.
- Bao W. PRIMA-1Met/APR-246 induces wild-type P53-dependent suppression of malignant melanoma tumor growth in 3D culture and in vivo [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10: 301-307.
- Zhang B, Wang JT, He J, et al. Expression and clinical significance of sirt 1 and p55 PIK in gastric carcinoma [J]. *J Huazhong Sci Tech Univ: Med* (华中科技大学学报: 医学版), 2012, 41: 735-736.
- Zhu H, Xia I, Zhang Y. Activating transcription factor 4 confers a multidrug resistance phenotype to gastric cancers cells through transactivation of sirt1 expression [J]. *PLoS One*, 2012, 7: e31431.
- Zhang J, Ying RC, Wei W, et al. Relationship between expression of p53 and VEGF in gastric cancer tissue in patients with blood stasis syndrome [J]. *Chin J Chin Med Pharm* (中华中医药学刊), 2014, 32: 2715-2717.
- Chen SJ. The harm of tumor to the body from lizard tail regeneration [J]. *The J Med Theory Pract* (医学理论与实践), 2004, 1: 4-6.