

· 论 著 ·

# 左金丸醇提物抑制幽门螺旋杆菌感染人胃癌细胞增殖及诱导凋亡的实验研究\*

汤庆丰<sup>1#</sup>, 刘 宣<sup>2</sup>, 葛 艳<sup>1</sup>, 周 宁<sup>2</sup>, 周利红<sup>3</sup>, 孙 健<sup>3</sup>, 季 青<sup>3</sup>, 高 虹<sup>3</sup>, 李 琦<sup>3△</sup>

(1. 同济大学医学院, 上海 200092; 2. 上海中医药大学附属普陀医院 200062;

3. 上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所 200062)

**摘要:**目的 研究左金丸醇提物对幽门螺旋杆菌感染人胃癌 MKN45 细胞生长及凋亡的影响, 并探讨其作用机制。方法 以不同浓度(7.81、15.63、31.25、62.5、125、250、500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的左金丸醇提物分别作用于幽门螺旋杆菌感染的人胃癌 MKN45 细胞, 24、48、72 h 后用 Western blot 法检测不同浓度的左金丸醇提物作用于幽门螺旋杆菌感染人胃癌 MKN45 细胞时凋亡相关蛋白 Bax、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)的表达情况。结果 幽门螺旋杆菌感染 MKN45 细胞组、左金丸醇提物低剂量(40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )组、左金丸醇提物高剂量(180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )组凋亡细胞百分比分别为: (0.28 $\pm$ 0.105)%、(3.27 $\pm$ 0.702)%、(7.7 $\pm$ 0.721)%, 组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), 凋亡率呈剂量依赖性; Western blot 检测结果显示, 左金丸醇提物低、高剂量作用幽门螺旋杆菌感染 MKN45 细胞 24 h 后, PARP 蛋白( $89 \times 10^3$ )、Bax 蛋白表达明显增强, 凋亡率上升, 并呈现剂量依赖性。结论 左金丸醇提物能抑制幽门螺旋杆菌感染人胃癌 MKN45 细胞的增殖并诱导细胞发生凋亡。调控凋亡相关基因 Bax、PARP 的表达可能是其诱导幽门螺旋杆菌感染的人胃癌 MKN45 细胞凋亡的分子机制之一。

**关键词:** 左金丸醇提物; 幽门螺旋杆菌; 胃癌细胞; 增殖; 凋亡

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.15.003

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)15-1462-03

## Experimental study on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of Zuojinwan alcohol extracts on human gastric cancer cells infected by *Helicobacter pylori*\*

Tang Qingfeng<sup>1#</sup>, Liu Xuan<sup>2</sup>, Ge Yan<sup>1</sup>, Zhou Ning<sup>2</sup>, Zhou Lihong<sup>3</sup>, Sun Jian<sup>3</sup>, Ji Qing<sup>3</sup>, Gao Hong<sup>3</sup>, Li Qi<sup>3△</sup>

(1. School of Medicine, Tongji University, Shanghai 200092, China; 2. Affiliated Putuo Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China; 3. Interventional Oncology Institute of Integrated Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

**Abstract: Objective** To study the influence of Zuojinwan alcohol extracts on proliferation and apoptosis of human gastric cancer cells MKN45 infected by *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) and to investigate their mechanism. **Methods** The different concentrations of Zuojinwan alcohol extracts (7.81, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250, 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) acted on human gastric cancer cells MKN45 infected by *H. pylori* respectively. After 24, 48, 72 h, the cell proliferation activity and apoptosis were detected by MTT and FCM respectively, and the expression of Bax and PARP was detected by Western blot. **Results** FCM results showed that the percentage of apoptotic cells of MKN45 cells infected by *H. pylori*, Zuojinwan alcohol extracts low dose (40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and Zuojinwan alcohol extracts high dose (180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) were (0.28 $\pm$ 0.105)%, (3.27 $\pm$ 0.702)% and (7.7 $\pm$ 0.721)%, with statistical difference between any two groups ( $P < 0.05$ ). The apoptosis rate was dose-dependent. Western blot results showed that after 24 h action of high and low doses of Zuojinwan alcohol extracts on MKN45 cells, the expression of PARP (89 KD) and Bax protein was significantly increased in a dose-dependent manner. **Conclusion** Zuojinwan alcohol extracts can inhibit the proliferation of human gastric cancer cells MKN45 infected by *H. pylori* and induce apoptosis. Regulation of apoptosis-related genes Bax and PARP expression may be one of the molecular mechanisms for inducing apoptosis of human gastric cancer cell MKN45 infected by *H. pylori*.

**Key words:** Zuojinwan alcohol extracts; *H. pylori*; human gastric cancer cell; proliferation; apoptosis

胃癌是常见的恶性肿瘤, 幽门螺旋杆菌感染是胃癌重要的致病因素之一<sup>[1-2]</sup>。目前, 中药治疗已成为研究肿瘤治疗的热点问题。左金丸醇提物具有抑制癌细胞增殖、诱导癌细胞凋亡的抗癌活性。但在抑制幽门螺旋杆菌感染人胃癌细胞活性及诱导细胞凋亡方面的研究国内尚未报道。本研究以幽门螺旋杆菌感染人胃癌 MKN45 细胞作为研究对象, 检测左金丸醇提

物对其生长和凋亡的影响, 并探讨其相关机制。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 试剂与仪器** 琼脂培养基(英国 Oxoid 公司), RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司), 四甲基偶氮唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)试剂(美国 Sigma 公司), 蛋白抽提、定

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81072955); 上海市卫生局科研基金资助项目(2010019); 上海市卫生局青年基金资助项目(2011001); 上海市重点学科基金资助项目(S30302)。 # : 现就职于上海中医药大学附属普陀医院。 △ 通讯作者, Tel: (021)62572723; E-mail: Lzwf@hotmail.com。

量及凝胶电泳试剂(上海碧云天生物公司),兔抗人单克隆抗体 Bax、PARP(美国 CST 公司),抗兔二抗(美国 B&D 公司),塑料试管(广州阳普公司),BD 流式细胞仪、Biophotometer 生物分光光度计、5804R 高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司),三气培养箱(美国 Thermo 公司)及左金丸醇提物(上海中医药大学中药研究所负责制备及质量控制)。

**1.1.2 菌株与细胞** 幽门螺旋杆菌国际标准株 NCTC11637、MKN45 细胞株由上海中医药大学中西医结合肿瘤介入研究所提供。幽门螺旋杆菌接种于含 10% 脱纤维羊血的哥伦比亚琼脂培养基中,于 5% O<sub>2</sub>、10% CO<sub>2</sub>、85% N<sub>2</sub> 微需氧三气培养箱培养 48~72 h,经尿素酶、氧化酶及过氧化氢酶实验等证实幽门螺旋杆菌活性。MKN45 细胞置于含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 完全培养液中,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度条件下常规培养。

**1.2 方法**

**1.2.1 幽门螺旋杆菌感染人胃癌 MKN45 细胞** 取上述增殖活跃的 MKN45 细胞以每孔 2.5 × 10<sup>5</sup> 个细胞接种于 6 孔板中。当细胞贴壁后,更换不含抗生素的细胞培养液;用接种环刮取培养基上的幽门螺旋杆菌活菌,悬于磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)中,生物分光光度计测其吸光度(optical density, OD)值 600(1 OD = 10<sup>8</sup> CFU/mL)以调整细菌密度,按细菌和细胞数量 100 : 1 的比例向细胞培养皿中加入菌液,继续按文献[3]培养。

**1.2.2 药物的制备** 配置左金丸醇提物提取溶液 1 000 μg/mL(含 10% 新生牛血清的无抗生素 RPMI-1640 溶液稀释),用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,稀释成浓度为 15.63、31.25、62.5、125、250、500、1 000 μg/mL 的左金丸醇提物溶液,4 °C 冰箱保存备用。

**1.2.3 MTT 比色实验** 取对数生长期人胃癌 MKN45 细胞,以每孔密度为 5 × 10<sup>4</sup> 个/毫升的细胞接种于 96 孔培养板中,待细胞完全贴壁后,吸去 96 孔板中的液体,每孔加入 100 μL 的幽门螺旋杆菌菌液,培养 2 h 后每孔加入 100 μL 不同浓度的左金丸醇提物,共 7 个剂量,最终左金丸醇提物作用浓度为 7.81、15.63、31.25(低剂量组),62.5、125、250、500 μg/mL(高剂量组),以此为 7 个剂量组,每个剂量设 6 个复孔,并设不加药细胞为对照组,继续培养 24、48、72 h 3 个时相后,每孔加入 MTT(5 mg/mL)20 μL,4 h 后取出离心,弃上清液,加入 DM-SO 150 μL/孔,振荡混匀,酶标仪 570 nm 处检测 OD,计算各组药物浓度的抑制率及半数抑制浓度(50% inhibited concentration, IC<sub>50</sub>),实验重复 3 次,取平均值。

**1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡** 取对数生长期人胃癌 MKN45 细胞,将 2.5 × 10<sup>5</sup> 个细胞接种于 6 孔板中,分为幽门螺旋杆菌感染的 MKN45 细胞,左金丸醇提物 7 个剂量组,每组 3 个复孔。幽门螺旋杆菌感染后的 MKN45 细胞以不同浓度左金丸醇提物作用 24 h 后, PBS 洗涤 5 min × 3 次, 2 000 r/min 离心收集细胞,70% 冰乙醇固定。按 BD 试剂盒说明书进行操作,双染法检测不同浓度的左金丸醇提物作用 24 h 后的细胞凋亡率。

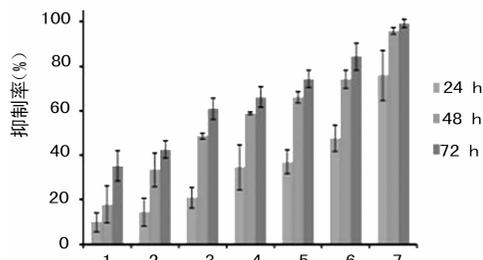
**1.2.5 Western blot 检测凋亡相关蛋白的表达** 取幽门螺旋杆菌感染后的 MKN45 细胞及 7 个剂量组左金丸醇提物处理幽门螺旋杆菌感染 MKN45 细胞,实验分 3 组,每组 3 个复孔。

预冷 PBS 洗涤, RIPA 强裂解液提取细胞总蛋白,采用二辛可宁酸(bicinchoninic acid, BCA)法测定蛋白含量,取 20 μg 总蛋白上样,10% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干转至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h 后加入兔抗人 Bax 单克隆抗体或兔抗人多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)单克隆抗体(1 : 500 稀释),4 °C 过夜,次日加入辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(1 : 10 000 稀释)室温 2 h 后, TBST 缓冲液清洗后柯达胶片显影曝光。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS14.0 软件进行统计学数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 左金丸醇提物对幽门螺旋杆菌感染 MKN45 细胞增殖的抑制作用** 不同浓度的左金丸醇提物处理细胞 24、48、72 h 后,其对细胞的增殖抑制作用呈剂量、时间依赖性。随着浓度逐渐增高,作用时间的不断延长,左金丸醇提物对幽门螺旋杆菌感染人胃癌 MKN45 细胞的生长抑制程度增强,见图 1。



1:7.81 μg/mL; 2:15.63 μg/mL; 3:31.25 μg/mL; 4:62.5 μg/mL; 5:125 μg/mL; 6:250 μg/mL; 7:500 μg/mL。

图 1 不同浓度左金丸醇提物对幽门螺旋杆菌感染的 MKN45 细胞增殖抑制柱状图

**2.2 左金丸醇提物对幽门螺旋杆菌感染 MKN45 细胞凋亡的影响** 左金丸醇提物作用于幽门螺旋杆菌感染 MKN45 细胞后,不同剂量下调亡细胞的百分比分别为:(0.28 ± 0.105)% (对照组)、(3.27 ± 0.702)% (低剂量组)、(7.7 ± 0.721)% (高剂量组),组间比较差异有统计学意义(*P* < 0.05)。在凋亡细胞比例方面,随左金丸剂量的增加,凋亡细胞百分比增多,见图 2。

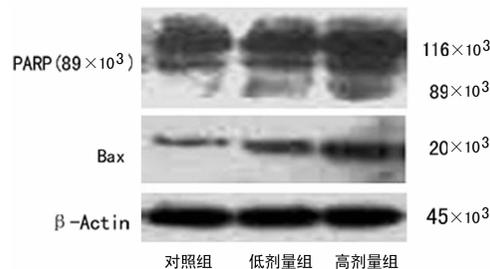


图 3 左金丸醇提物作用幽门螺旋杆菌感染的 MKN45 细胞 Bax、PARP(89 × 10<sup>3</sup>) 蛋白表达情况

**2.3 左金丸醇提物对凋亡相关蛋白表达的影响** Western blot 检测结果显示,与幽门螺旋杆菌感染 MKN45 细胞相比,

左金丸醇提物低、高剂量作用 24 h 后, PARP 蛋白(相对分子质量  $89 \times 10^3$ )表达增强, Bax 蛋白表达亦增强, 提示左金丸醇提物能诱导幽门螺旋杆菌感染的 MKN45 细胞凋亡, 而左金丸醇提物高剂量组与低剂量组比较, PARP 蛋白、Bax 蛋白表达明显增强, 说明左金丸醇提物诱导凋亡呈剂量依赖性, 见图 3。

### 3 讨 论

目前, 随着中医诊断、治疗技术的不断提高, 中医药在肿瘤治疗中的地位 and 作用逐渐显示出重要性<sup>[4]</sup>。研究表明, 左金丸抗肿瘤作用与其诱导肿瘤细胞凋亡有关。幽门螺旋杆菌作为致癌的重要因素与幽门螺旋杆菌感染后的细胞增殖和凋亡的失衡密切相关。本实验结果显示, 左金丸醇提物对幽门螺旋杆菌感染的人胃癌 MKN45 细胞增殖有明显的抑制作用, 细胞增殖活力随左金丸药物浓度增大和作用时间的延长而下降, 呈剂量和时间依赖性。幽门螺旋杆菌感染能诱导正常胃上皮细胞凋亡<sup>[5]</sup>, 但其在癌变上皮细胞中的凋亡作用目前并不十分明确。流式细胞仪检测结果说明左金丸醇提物能使幽门螺旋杆菌感染的人胃癌 MKN45 细胞凋亡百分比显著上升, 但对于幽门螺旋杆菌对胃癌 MKN45 细胞的凋亡作用还不清楚, 有学者认为, 幽门螺旋杆菌具有与细胞增殖和凋亡相关的两类因子, 当幽门螺旋杆菌的促细胞增殖因子发挥作用时, 其促细胞凋亡相关因子的作用可能被细胞的代偿机制所对抗<sup>[6]</sup>。

细胞凋亡与肿瘤发生、发展关系密切, Bax、Caspase 与细胞凋亡相关。Bax 转录产物编码的蛋白质可与 Bcl-2 形成异源二聚体<sup>[7]</sup>, 抑制后者的功能达到促进凋亡<sup>[8]</sup>。Caspase-3 是 Caspase 家族的重要成员, 大多数诱导细胞凋亡的因素均需通过 Caspase 途径来实现, Caspase 如何实现细胞凋亡的机制目前并不十分清楚。国外学者研究表明, Caspase-3 参与凋亡是通过特定蛋白底物的水解起作用的<sup>[9]</sup>, 而 Caspase-3 的作用底物中, PARP 作为少数的底物参与细胞凋亡的过程, 因此, 被称为“死亡底物”<sup>[10]</sup>。PARP 作为细胞程序死亡的一个早期分子标志<sup>[11]</sup>, 已成为近年国内外研究的热点之一。

本实验结果显示, 左金丸醇提物低、高剂量能诱导幽门螺旋杆菌感染的 MKN45 细胞 Bax、PARP 蛋白水平升高, 凋亡增加, 与国内外文献报道的结果一致。对于具体机制而言, 本研究认为, 左金丸醇提物诱导幽门螺旋杆菌感染的 MKN45 细胞凋亡可能通过下游 Bax 和 Caspase-3 途径实现的。

细胞凋亡可以被许多分子调控, 调控 Bax、PARP 基因的表达可能是左金丸醇提物诱导幽门螺旋杆菌感染的人胃癌 MKN45 细胞凋亡的分子机制之一。目前仅初步研究了以 Bax 和 Caspase 底物 PARP 为代表的促凋亡基因<sup>[12]</sup>, 更复杂的作用机制还需要进一步研究。

### 参考文献:

[1] Yanaoka K, Oka M, Yoshimura N, et al. Risk of gastric

cancer in asymptomatic, middle-aged Japanese subjects based on serum pepsinogen and Helicobacter pylori antibody levels[J]. Int J Cancer, 2008, 123(4): 917-926.

- [2] Hatakeyama M. Oncogenic mechanism of Helicobacter pylori [J]. Nihon Riosho Meneki Gakkai Kaishi, 2008, 31(3): 132-140.
- [3] Takehara H, Iwamoto J, Mizokami Y, et al. Involvement of cyclooxygenase-2-prostaglandin in E<sub>2</sub> pathway in interleukin-8 production in gastric cancer cells[J]. Dig Dis Sci, 2006, 51(12): 2188-2197.
- [4] 刘海兴. 中医药治疗胃癌的研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2007, 9(2): 2835-2838.
- [5] Ashktorab H, Dashwood RH, Dashwood MM, et al. H. pylori-induced apoptosis in human gastric cancer cells mediated via the release of apoptosis-inducing factor from mitochondria [J]. Helicobacter, 2008, 13(6): 506-517.
- [6] 杨艺, 邓长生, 姚学军, 等. 幽门螺杆菌对胃上皮细胞系列 SGC-7901 细胞生长的影响[J]. 中华消化杂志, 2001, 21(2): 113-115.
- [7] Oltval ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved hemology, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74(4): 609-619.
- [8] Brajuskovic G, Orolicki SV, Ceroviic S, et al. Bcl-2 and Bax protein interaction in B-lymphocytes of peripheral blood in patients with chronic lymphocytic leukemia[J]. Vojnosanit Pregl, 2005, 62(5): 357-363.
- [9] 赛燕, 刘勇, 董兆君. 死亡底物 PARP 与细胞凋亡[J]. 免疫学杂志, 2002, 18(1): 177-181.
- [10] Lakhani SA, Masud A, Kuida K, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis[J]. Science, 2006, 311(5762): 847-851.
- [11] Boulares AH, Zoltoski AJ, Yakovlev A, et al. Roles of DNA fragmentation factor and poly(ADP-ribose) polymerase in an amplification phase of tumor necrosis factor-induced apoptosis[J]. J Biol Chem, 2001, 276(41): 38185-38192.
- [12] Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death[J]. Cancer Res, 1999, 59(7 Suppl): S1693-1700.

(收稿日期: 2012-02-04 修回日期: 2012-03-10)

## 误 差

误差指测量值与真值之差, 也指样本指标与总体指标之差。包括系统误差、随机测量误差和抽样误差。系统误差指数据收集和测量过程中由于仪器不准确、标准不规范等原因, 造成观察(检测)结果呈倾向性的偏大或偏小, 是可避免或可通过研究设计解决的。随机测量误差指由于一些非人为的偶然因素使观察(检测)结果或大或小, 是不可避免的。抽样误差指由于抽样原因造成样本指标与总体指标的差异, 是不可避免但可减少的。