

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.25.009

二氢杨梅素对胃癌细胞 SGC7901 生长活性及凋亡的影响

武彦芳¹,路玉洁¹,鞠 境²

(1. 陕西省第四人民医院消化内科,西安 710043;2. 南京医科大学生物化学与分子生物学系 210029)

[摘要] 目的 研究藤茶中提取的二氢杨梅素(DMY)对胃癌细胞 SGC7901 生长的影响,以筛选高效低毒的抗肿瘤药物。

方法 使用超声中性水浸提法提取藤茶中的活性成分 DMY,反相高效液相色谱(RP-HPLC)对提取物进行分离纯化,纯度达 99%以上,CCK-8 比色法检测纯化后的 DMY 对肿瘤细胞存活率的影响;流式细胞术检测 DMY 促进细胞凋亡的能力。结果 直接从野生藤茶中提取 DMY,经过 RP-HPLC 分离纯化后的 DMY 的纯度达到 99%,DMY 在低浓度时(≤ 1 mmol)对肿瘤细胞具有显著的杀伤效应($P < 0.05$),且其抑制率与药物浓度呈剂量-效应关系;同时 DMY 具有促进细胞凋亡的能力,且其促凋亡作用随着浓度的增加而增强。结论 藤茶中提取的 DMY 具有显著杀伤胃癌细胞 SGC7901 的效应,将来可能成为治疗肿瘤的一类药物。

[关键词] 细胞凋亡;胃肿瘤;二氢杨梅素

[中图分类号] R735.2;R282.71

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)25-3485-03

Evaluation of anticancer efficacy of dihydromyricetin in gastric cancer cells SGC7901

Wu Yanfang¹,Lu Yujie¹,Ju Jing²

(1. Department of Gastroenterology, the Fourth People's Hospital in Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710043, China; 2. Biochemistry and Molecular Biology Department of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu 210029, China.)

[Abstract] Objective To investigate the anticancer efficacy of dihydromyricetin (DMY) in gastric cancer cells SGC7901.

Methods The DMY was purified using RP-HPLC was almost 98%. The cell viability was assessed by CCK-8 Assay. The cell apoptosis was assessed by flow cytometry. Using ultrasonic extraction with neutral water and reversed-phase high-performance liquid chromatography, DMY was purified from rattan tea. Results By using RP-HPLC, the purified DMY is almost 99%. DMY inhibited the growth of tumor cells in the low concentration (≤ 1 mmol) with a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Further study on DMY showed that it induced apoptosis in SGC7901 cell line with a dose-dependent manner. Conclusion DMY is a potential therapeutic agent for gastric cancer.

[Key words] apoptosis; gastric neoplasms; DMY

胃癌是目前全球范围内常见的恶性肿瘤之一。据 WHO 统计,在 2012 年,全球有 72.3 万人由于罹患胃癌而死亡。我国作为胃癌的高发区,其发病率占全球发病的 40%,居恶性肿瘤的第 3 位,仅次于肺癌和肝癌。目前胃癌的治疗,多采用多种干预措施,如外科手术、放射治疗和化学治疗等,其中化学治疗以治愈疾病或显著延长生命并改善患者生活质量的效果而受到广泛关注。但是化学治疗药物本身具有较大的毒副作用,易对患者产生较大生理、心理负担^[1],因此寻找高效低毒的化学治疗药物对胃癌的治疗具有重要意义。

藤茶(vine tea)又名“莓茶”,已鉴定出藤茶中含有 19 种人体必需的营养成分和微量元素。从藤茶的茎叶中可提取的一种二氢黄酮醇类化合物命名为二氢杨梅素(dihydromyricetin, DMY)^[2],它具有抗菌、抗氧化、保肝、抗肿瘤、调节血糖血脂等多种生物活性,但其抗癌作用机制尚不明确。既往研究报道,DMY 可联合丝裂霉素抑制胃癌细胞的生长^[3],但是从藤茶中直接提取的 DMY 对胃癌细胞的作用未见报道。

本研究通过超声中性水浸提法提取藤茶中的活性成分 DMY,经过反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离纯化后的 DMY 的纯度达到 99%以上;以人胃癌细胞 SGC7901 为研究对象,使用 CCK-8 比色法检测提取出来的 DMY 对胃癌细胞活性的抑制效应,并使用流式细胞术检测 DMY 促进细胞凋亡

的能力,为将来进一步研发 DMY 作为胃癌化学治疗药物奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要材料 人胃癌细胞 SGC7901 购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。细胞 SGC7901 培养于 RPMI1640(添加碳酸氢钠 1.5 g/L,葡萄糖 2.5 g/L,丙酮酸钠 0.11 g/L)。培养基含 10%胎牛血清,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养,2~3 d 传代。

1.1.2 试剂与仪器 野生藤茶购自湖南张家界旺盛商贸有限公司;DMY 标准品购自成都曼斯特生物科技有限公司(纯度为 98%),改良型 RPMI1640(GIBCO 公司,美国),胎牛血清(HyClone 公司,美国),CCK-8 试剂盒(碧云天生物技术研究所),凋亡试剂盒(上海贝博生物)。ALPAAI-4LSC 真空冷冻干燥机(Chris 公司,德国),LC-20AD 高效液相色谱仪(HPLC,Shimadzu 公司,日本),多功能酶标仪(Tecan 公司, infinite M200)。

1.2 方法

1.2.1 提取与纯化 将藤茶样品放入粉碎机进行粉碎混匀,采用超声中性水浸提法提取藤茶中的 DMY,其工艺参数为:超声功率 100 W,超声时间 60 min,液料比 50:1,提取温度

90 ℃。将提取液真空冷冻干燥进行下一步纯化,将提取物的粉末配成 25 mg/mL 的上样浓度,采用 RP-HPLC 分离纯化方法,HPLC 系统:Shimadzu LC-6AD;色谱柱:Chromstar AQ-C18 250 mm×10 mm,5 μm;检测器:SPD-M6A;检测波长:290 nm;进样量:5 mL;洗脱液流速:5 mL/min;洗脱条件如下:0~2 min,0~15%甲醇;>2~4 min,>15%~20%甲醇;>4~10 min,>20%~50%甲醇;>10~30 min,>50%~80%甲醇;>30~50 min,>80%~90%乙腈。将纯化后的提取物真空冷冻干燥,检测纯度,为细胞实验提供原材料。采用优化后的超声中性水浸提法提取藤茶中的活性成分 DMY,DMY 的提取率达 72%,由于粗提物的纯度不能达到做细胞实验的要求,故在此基础上经过反向 HPLC(RP-HPLC)进一步分离纯化。纯化后 DMY 的纯度达 99%以上,可进行下一步的实验。

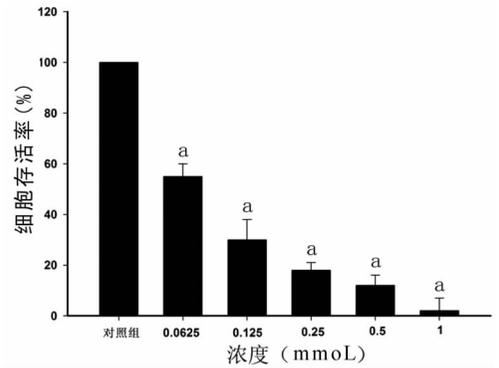
1.2.2 CCK-8 比色法检测细胞活率 将密度为 $(4\sim 5)\times 10^3$ /mL 的对数生长期细胞 SGC7901 接种在 96 孔板中,每孔 90 μL,于孵箱培养 24 h 后,加入 DMY(浓度分别为 0.062 5、0.125 0、0.250 0、0.500 0、1.000 0 mmol/L)继续培养。干燥后的 DMY 用 DMSO 溶解,同时用 1.000 0 mmol/L DMSO 处理作为对照组。处理后每孔体积 100 μL,每个浓度设 3 个平行孔。加药后继续培养 72 h 后,每孔分别加入 10 μL CCK-8 试剂溶液,孵箱培养 1 h 液体变黄后取出。用多功能酶标仪在 490 nm 处记录吸光度(A_{490})。每次实验均重复 3 次。细胞存活率= $[\text{处理组}(A_{490})/\text{对照组}(A_{490})]\times 100\%$

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的细胞 SGC7901,以 2×10^5 个/孔的密度接种在 6 孔板中,加入 DMY 进行处理,每组 2 个平行,加入 DMSO 作为对照组,48 h 后收集各组细胞和上清液,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 PBS 洗涤 1 次,以 400 μL $1\times$ 结合液重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 染色液,混匀后避光 15 min,再加入 10 μL PI,2~8 ℃避光孵育 5 min。流式细胞仪检测细胞凋亡。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

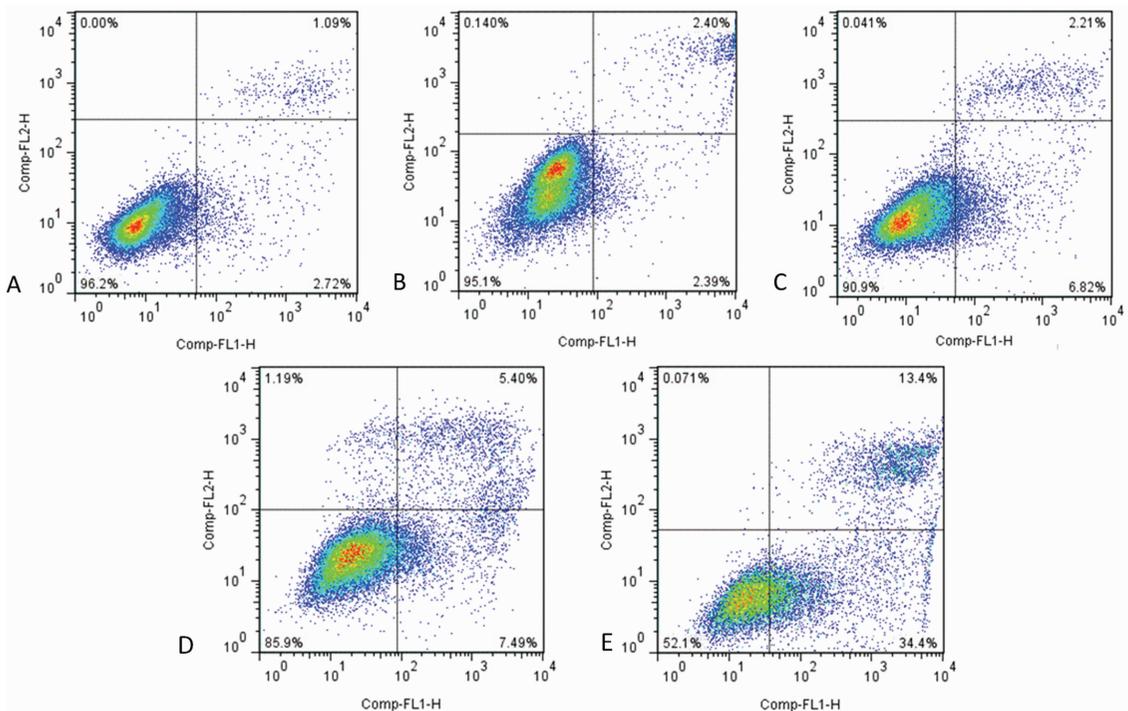
2.1 不同浓度 DMY 对胃癌细胞的杀伤效应 不同浓度的 DMY 处理胃癌细胞 72 h 后,CCK-8 比色法检测结果显示,DMY 具有显著的体外抗肿瘤作用,并且随着处理浓度的增加,0.062 5 mmol/L 及以上剂量实验组相对于对照组出现显著性差异。见图 1。



^a: $P<0.05$,与对照组比较。

图 1 DMY 对细胞 SGC7901 的杀伤效应

2.2 DMY 促进细胞 SGC7901 凋亡 运用流式细胞术检测细胞凋亡时,可将细胞划分为 4 个细胞亚群,分别为正常细胞、坏死细胞、早期凋亡细胞和晚期凋亡细胞。不同浓度的 DMY 处理 48 h 后,由于在显微镜下观察到 1.000 0 mmol/L DMY 处理组的细胞呈悬浮碎片状,无法完成细胞的收集,其余浓度处理的细胞,均可观察到早期凋亡、晚期凋亡和总凋亡细胞百分比显著增加($P<0.05$),见图 2 及表 1。



A: 对照组; B: 0.062 5 mmol/L DMY 处理组; C: 0.125 0 mmol/L DMY 处理组; D: 0.250 0 mmol/L DMY 处理组; E: 0.500 0 mmol/L DMY 处理组。

图 2 DMY 对 SGC7901 细胞凋亡的影响

表 1 DMY 对 SGC7901 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	早期凋亡细胞	晚期凋亡细胞	总凋亡细胞	坏死细胞
对照组	1.45±0.26	1.22±0.15	2.67±0.41	0.34±0.04
DMY 处理组 (mmol)				
0.062 5	3.36±0.46 ^a	2.53±0.15 ^a	4.95±0.2 ^a	0.73±0.05
0.125 0	5.53±0.38 ^a	3.75±0.13 ^a	8.99±0.84 ^a	1.23±0.11
0.250 0	7.72±0.25 ^a	5.43±0.42 ^a	12.59±0.39 ^a	1.71±0.16
0.500 0	32.96±0.5 ^a	13.01±0.48 ^a	43.90±1.19 ^a	1.95±0.12 ^a

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较。

3 讨 论

细胞凋亡又叫做“程序性细胞死亡”,是细胞的一种生理性、主动性的“自觉自杀行为”,而非病理性死亡;并且凋亡作为机体清除损伤细胞的一种机制,有效保持机体自身发育、组织和器官的动态稳定。既往研究表明,肿瘤的发生与细胞凋亡的调节紊乱有密切关系^[4]。细胞凋亡参与了癌症的起始过程,并对癌症的发生起负调控作用。癌前期细胞对细胞凋亡更为敏感,更易被清除,这是机体自我保护功能的表现^[5]。实验证明,细胞凋亡与肝癌生长呈负相关。肝癌细胞组织培养显示,广泛轻微损伤或刺激可诱导试管内肝癌细胞的凋亡。Kelner 等^[6]指出, TGF β -1 可促进体外培养的肝癌细胞中 DNA 降解,并可通过受体连接使肝癌细胞发生凋亡,从而达到杀伤癌细胞的目的。

越来越多的证据表明,植物提取化合物通过细胞凋亡机制发挥抗肿瘤作用已经成为癌症治疗研究的一个新热点^[7]。体外实验证明,DMY 对多种癌细胞如白血病、肝癌、乳腺癌和黑色素瘤等有明显的增殖抑制作用^[8-12]。Lin 等^[13]报道,DMY 可通过激活 Cyt c、caspase-9 and PARP 诱导肝癌细胞凋亡。线粒体释放 Cyt c 从而活化了 caspase-9,而 PARP 作为 caspase-9 的底物,在 DNA 损伤的修复、细胞死亡中起重要作用,它的活化是 DNA 损伤早期应答的指标。此外,有研究报道,DMY 可显著上调 P53 的表达,在 P53 的介导下下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平,诱导细胞凋亡^[14]。但是,关于 DMY 诱导胃癌细胞凋亡的研究尚未见报道。有研究显示,白藜芦醇可以通过对 Survivin 蛋白表达的调控从而诱导胃癌细胞凋亡,达到抑制肿瘤细胞生长的目的^[15]。因此,推测与白藜芦醇均有相似生物活性的 DMY 可能也有类似的抗癌作用机制。

本研究首先使用超声中性水浸提法提取藤茶中的 DMY,并将其纯化并且进行真空干燥使其可直接参与细胞实验。以胃癌 SGC7901 细胞为研究对象,用不同浓度的 DMY 进行处理,观察 DMY 对 SGC7901 细胞的存活率的影响,结果表明 0.062 5~1.000 0 mmol 的 DMY 均能不同程度地抑制肿瘤细胞增殖,并呈明显的浓度-效应关系。进一步用流式细胞术检测 DMY 处理过的细胞 SGC7901,结果发现肿瘤细胞的早期凋亡、晚期凋亡和总凋亡细胞百分比都成明显上升趋势。由于肿瘤细胞中的细胞增殖与凋亡的平衡失调,细胞凋亡程序被扰乱,导致肿瘤细胞中这一机制失去作用,所以它能够肆意增殖^[16]。促使肿瘤细胞凋亡已经作为一种治疗癌症的主要措施之一^[17]。大量对肿瘤细胞凋亡的研究提供了一个令人信服的解释,即肿瘤并非死于 DNA 损伤而是重新诱发了凋亡程序, DNA 损伤在凋亡诱导中也许十分重要,但是不可能直接杀死

细胞,因此凋亡可能是诱导肿瘤死亡的机制^[18]。既往研究表明,DMY 能有效促进乳腺癌细胞 MDA-MB-231、肝癌细胞 HepG2 的凋亡,有助于细胞凋亡程序的修复和维持内环境稳定,细胞增殖和凋亡间的平衡对抑制肿瘤的持续发展可能具有重要意义。因此,本研究结果提示 DMY 促进肿瘤细胞凋亡的发生可能是其防治胃癌发生发展的重要机制之一。

综上所述,本实验以人胃癌细胞 SGC7901 为研究对象,利用超声中性水浸提法提取藤茶中的 DMY,并观察 DMY 对肿瘤细胞生长活性的影响,结果发现 DMY 能够呈浓度依赖性地抑制肿瘤细胞的增殖能力,促进细胞凋亡。本研究明确了 DMY 促进胃癌细胞凋亡的作用,为进一步研究 DMY 抑制胃癌发生发展的分子机制提供了依据。

参考文献

- [1] 石瑞馥. 胃癌化学治疗患者的护理体会[J]. 中国医药指南, 2011(27): 318-319.
- [2] Zhu H, Luo P, Fu Y, et al. Dihyromyricetin prevents cardiotoxicity and enhances anticancer activity induced by adriamycin[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(5): 3254-3267.
- [3] 吴明彩, 蒋明, 毕富勇. 二氢杨梅素联合丝裂霉素对胃癌细胞的生长抑制作用[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(7): 1424-1427.
- [4] Wright SC, Zhong J, Larrick JW. Inhibition of apoptosis as a mechanism of tumor promotion[J]. *FASEB J*, 1994, 8(9): 654-660.
- [5] Daniel D, Wilson NS. Tumor necrosis factor: Renaissance as a cancer therapeutic[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2008, 8(2): 124-131.
- [6] Kelner MJ, Memorris TC, Montoya MA, et al. Characterization of acylfulvene histiospecific toxicity in human tumor cell lines[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1998, 41(3): 237-242.
- [7] Athar M, Back JH, Kopelovich L, et al. Multiple molecular targets of resveratrol: anti-carcinogenic mechanisms[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2009, 486(2): 95-102.
- [8] 周防震, 张晓元, 孙奋勇, 等. 二氢杨梅素对人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的体外抗增殖作用[J]. 肿瘤防治研究, 2012, 39(1): 95-97.
- [9] 周防震, 张晓元, 詹远京, 等. 二氢杨梅素抑制人乳腺癌细胞侵袭和下调 MMP-2/-9 蛋白表达研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2012(4): 352-358. (上接第 3590 页)

性, TNM 分期的影响并不显著, 总体趋势显示出分期越晚, PTC 组织中 Annexin A1 阳性表达率越高, 差异无统计学意义 ($P=0.391$), 这可能与本研究样本量少、地域等因素有关。Annexin A1 在 PTC 中的高表达为肿瘤的早期诊断提供新的标志物的可能性。Annexin A1 在 PTC 的发生、发展及转移的分子机制的进一步研究将对人 PTC 的诊治及预后起到重要作用。

由于受研究人群的地域、环境、样本量较少等的影响, 对于 Annexin A1 在 PTC 的进展作用需进一步研究证实, 相信随着 Annexin A1 基础研究的深入, 以 Annexin A1 为靶点的治疗可为 PTC 的治疗提供更多的新思路。

参考文献

- [1] Andrade LJO, Melo PRS, Neto WA, et al. Molecular markers in thyroid cancer[J]. *Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo*, 2013, 50(2): 84-89.
- [2] Harris PJ, Bible KC. Emerging therapeutics for advanced thyroid malignancies: rationale and targeted approaches [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2011, 20(10): 1357-1375.
- [3] Jemal A, Siegel R, Xu J, et al. Cancer statistics, 2010[J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5): 277-300.
- [4] Lee DB, Jamgotchian N, Allen SG, et al. Annexin A2 heterotetramer: role in tight junction assembly [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 287(3): 481-491.
- [5] 任媛媛, 何妙霞, 应明真, 等. 疱疹病毒相关性泛素特异性蛋白酶在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *中国癌症杂志*, 2009, 7(4): 491-496.
- [6] Bhaijee F, Nikiforov YE. Molecular analysis of thyroid tumors[J]. *Endocr Pathol*, 2011, 22(3): 126-133.
- [7] Barollo S, Pennelli G, Vianello F, et al. BRAF in primary and recurrent papillary thyroid cancers: the relationship with (131) I and 2-[18 F] fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake ability[J]. *Eur J Endocrinol*, 2010, 163(4): 659-663.

- [8] Rescher U, Gerke V. Annexins-unique membrane binding proteins with diverse functions[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 13): 2631-2639.
- [9] 赵玲, 王鹏, 崔全才. Annexin A2 在人甲状腺癌中表达的意义[J]. *诊断病理学杂志*, 2008, 15(2): 117-120.
- [10] Wang LP, Bi J, Yao C, et al. Annexin A1 expression and its prognostic significance in human breast cancer [J]. *Neoplasma*, 2010, 57(3): 253-259.
- [11] Faria PC, Sena AA, Nascimento R, et al. Expression of annexin A1 mRNA in peripheral blood from oral squamous cell carcinoma patients [J]. *Oral Oncol*, 2010, 46(1): 25-30.
- [12] Schaeffer EM, Marchionni L, Huang Z, et al. Androgen-induced programs for prostate epithelial growth and invasion arise in embryogenesis and are reactivated in cancer [J]. *Oncogene*, 2008, 27(57): 7180-7191.
- [13] 赵宪龙, 李增运, 文心, 等. 膜联蛋白 A1 在前列腺癌中的表达及意义[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2011, 25(8): 735-736.
- [14] 葛慧娟, 杨晓群, 余宏宇, 等. 结直肠癌及其淋巴结转移灶内 Annexin I 和 Annexin II 的表达及意义[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 26(3): 340-341.
- [15] 倪晓光, 白晓枫, 王贵齐, 等. 膜联蛋白 A1 和 Ki67 抗原在胰腺癌组织中的表达及其相互关系[J]. *中国肿瘤*, 2010, 19(4): 549-552.
- [16] 燕贞, 沈飞, 李智涛, 等. 肺鳞癌组织中 Annexin-1 的表达及意义[J]. *肿瘤防治研究*, 2011, 38(1): 38-40.
- [17] Stephen D. Farris, Jie Hong Hu, Ranjini Krishnan, et al. Mechanisms of urokinase plasminogen activator (uPA)-mediated atherosclerosis [J]. *J Biol Chem*, 2012, 286(25): 129-134.

(收稿日期: 2015-04-13 修回日期: 2015-05-16)

(上接第 3587 页)

- [10] 高倩倩, 杨秀芬, 欧敏, 藤茶总黄酮和二氢杨梅素含药血清对肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(4): 500-503.
- [11] Liu J, Shu Y, Zhang Q, et al. Dihydromyricetin induces apoptosis and inhibits proliferation in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2014, 8(4): 1645-1651.
- [12] Zeng G, Liu J, Chen H, et al. Dihydromyricetin induces cell cycle arrest and apoptosis in melanoma SK-MEL-28 cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(6): 2713-2719.
- [13] Lin B, Tan X, Liang J, et al. A reduction in reactive Oxygen species contributes to dihydromyricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 7041.

- [14] Wu S, Liu B, Zhang Q, et al. Dihydromyricetin reduced Bcl-2 expression via p53 in human hepatoma HepG2 cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e76886.
- [15] 李洁, 熊兴耀, 曾建国, 等. 白藜芦醇的研究进展[J]. *中国现代中药*, 2013, 15(2): 100-108.
- [16] Winter M, Sombroek D, Dauth I, et al. Control of HIPK2 stability by ubiquitin ligase Siah-1 and checkpoint kinases ATM and ATR [J]. *Nat Cell Biol*, 2008, 10(7): 812-824.
- [17] 姬俊成, 徐亮. 胃癌靶向化疗及相关治疗的研究进展[J]. *现代诊断与治疗*, 2009, 20(1): 43-47.
- [18] Haq R, Fisher DE. Improving apoptotic responses to targeted therapy [J]. *Oncotarget*, 2013, 4(9): 1331.

(收稿日期: 2015-03-08 修回日期: 2015-05-16)