

· 博士之窗 ·

甘草提取物诱导胃癌 MGC-803 细胞凋亡的初步研究*

马 靖¹ 彭文烈¹ 梁 东¹ 庞大本² 徐安龙¹

内容提要 目的:研究甘草提取物诱导胃癌 MGC-803 细胞发生凋亡。方法:用荧光双染、琼脂糖凝胶电泳、流式细胞仪等方法,观察甘草提取物处理 MGC-803 细胞后细胞形态和染色质 DNA 等的变化,以双重免疫标记法和免疫组化法检测处理前后 p53 基因表达的变化。结果:激光扫描共聚焦显微镜观察到处于不同凋亡进程中的细胞;流式细胞仪检测到显著的凋亡峰,且凋亡百分率呈浓度、时间依赖性;高浓度甘草提取物处理的 MGC-803 细胞的 DNA 琼脂糖凝胶电泳呈现典型的“ladder”;甘草提取物对 p53 基因表达没有影响。结论:甘草通过 p53 非依赖途径诱导 MGC-803 细胞凋亡,可望作为一种新的细胞凋亡诱导剂用于胃癌的治疗。

关键词 甘草 MGC-803 细胞 细胞凋亡 抗癌新药

Apoptosis of Human Gastric Cancer Cell Line MGC-803 Induced by Glycyrrhiza Uralensis Extract MA Jing, PENG Wenlie, LIANG Dong, et al. *Department of Biochemistry, College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou (510275)*

Objective: To study the apoptosis in human gastric cancer cell MGC-803 induced by the extract of glycyrrhiza uralensis Fisch. **Methods:** Apoptosis was detected by laser scanning confocal microscope, agarose gel electrophoresis and flow cytometry. The p53 gene expression was analyzed by double immunolabelling and immunohistochemistry technique. **Results:** Chromatin condensation of different phases of apoptotic cells were observed by laser scanning confocal microscope, the percentage of apoptosis determined by flow cytometry was time- and dose-dependent, agarose gel electrophoresis of DNA exhibited obvious “ladder” in the cells treated with higher concentration of the extract of glycyrrhiza uralensis. The p53 gene expression was unchanged after treatment. **Conclusion:** Glycyrrhiza can induce human gastric cancer cell line MGC-803 to apoptosis by p53-independent pathway and can be used as a potential, natural apoptosis-inducing agent for gastric cancer therapy.

Key words glycyrrhiza uralensis, MGC-803 cell line, apoptosis, new anti-tumor drug

细胞凋亡是一种与细胞坏死具有不同形态及生化特征,且受基因调控的主动性细胞死亡。大量研究表明,抗肿瘤药物的作用机理之一是诱导肿瘤细胞发生凋亡^[1],因此诱导肿瘤细胞凋亡已成为抗癌药设计和筛选的新靶点。与诱导细胞坏死相比,通过诱导细胞凋亡杀死癌细胞不会引起机体强烈的炎症反应;由于正常细胞与肿瘤细胞在表达某些凋亡相关基因方面存在差异,诱导肿瘤细胞凋亡还给有效杀死肿瘤保护正常组织带来新的曙光。利用笔者建立的基于体外诱导肿瘤细胞凋亡的抗癌中药快速筛选体系,发现了甘草提取物诱导胃癌 MGC-803 细胞发生凋亡的新功能,现报道如下。

材料和方法

1 药物 取内蒙古产的甘草切碎,50%乙醇溶液在 80℃水浴中回流提取 2 次,每次 30 min,提取液过滤,喷雾干燥得粉末,取适量粉末用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解,离心,上清液用 0.22 μm 的滤膜过滤,配制成浓度分别为 5、7.5 和 10 mg/ml 甘草提取物溶液。

2 细胞 胃癌 MGC-803 细胞株由中国科学院生物物理研究所提供。

3 主要试剂 RPMI 1640 培养基为 GIBCO 公司产品,荧光染料碘化丙啶(propidium iodide, PI)和 Hoechst 33342 为 Sigma 公司产品,核糖核酸酶 A(RNase A)和蛋白酶 K(Proteinase K)均为 Sigma 公司产品,羊抗鼠 FITC-IgG 为军事医学科学院产品,p53 鼠抗人单克隆抗体(DO-1)为 Santa Cruz 公司产品,ABC 试剂盒为 Vector Lab 公司产品,DAB 染色试剂盒购自迈新生物技

* 广州市科委重点项目(97-Z-12-01)和国家新药博士基金(96-901-06-36)资助课题

1. 中山大学生命科学学院生物化学系(广州 510275); 2. 中国中医研究院基础理论研究所

术开发公司,胎牛血清(FBS)购自天津川页生化制品有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

4 主要仪器 ACAS 570 型激光扫描共聚焦显微镜,美国 Meridian 公司产品。EPICSXL 型流式细胞仪,美国 Coulter 公司产品。

5 实验方法

5.1 细胞培养和药物处理 MGC-803 细胞,以含 100u/ml 青霉素,100 μ g/ml 链霉素,10% FBS 的 RPMI 1640 培养基,37℃,5% CO₂ 的培养箱中培养,细胞生长至对数增殖期,更换新鲜培养基,加入甘草提取物,终浓度分别为 0.5、0.75 和 1.0 mg/ml,作用时间相同,或在同一甘草提取物浓度下作用不同时间,以加入等量 PBS 为对照。

5.2 光学显微镜观察 经甘草提取物处理和对照 MGC-803 细胞直接置于光学显微镜下观察细胞形态。

5.3 激光扫描共聚焦显微镜观察 药物处理的 MGC-803 细胞,经胰酶消化收集细胞,用新鲜培养基重悬收集的细胞,加入 PI(终浓度为 50 μ g/ml)和 Hoechst 33342(终浓度 10 μ g/ml),37℃恒温染色 30 min,离心去掉大部分染液,滴片,置 Meridian ACAS 570 型激光扫描共聚焦显微镜观察细胞核染色质的形态。

5.4 流式细胞仪检测 分别取经甘草提取物处理和对照 MGC-803 细胞约 1×10^6 个,经 PBS 离心冲洗两次,70%乙醇固定过夜,PBS 离心冲洗去乙醇,加入 RNase A(终浓度为 60 μ g/ml),摇匀,37℃温育 30 min,加入 PI(终浓度为 50 μ g/ml),4℃暗染 30 min,用 Coulter EPICS XL 型流式细胞仪测定 DNA 含量。

5.5 DNA 琼脂糖凝胶电泳 分别收集甘草提取物处理和对照组细胞 1×10^6 个,按酚,氯仿,异戊醇抽提,乙醇沉淀等常规方法^[2]提取细胞总 DNA,1.5%琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下观察 DNA 条带。

5.6 p53 抗体双重免疫标记 分别收集甘草提取物处理(0.75 mg/ml,作用 20h)和对照组细胞各 1×10^6 个,PBS 洗 1 次,4%多聚甲醛 4℃固定 40 min,PBS 洗涤,加入 1:100 稀释的 p53 鼠抗人单克隆抗体(该抗体与野生型和突变型的 p53 蛋白均结合),4℃标记 40 min,PBS 洗涤,加入 1:10 稀释的羊抗鼠 FITC-IgG,4℃标记 40 min,PBS 洗涤,加入适量 PBS,过滤,用流式细胞仪检测荧光强度判断抗体结合量。省略一抗为阴性对照。

5.7 p53 基因表达的免疫组化分析 取甘草提取物处理组(0.75 mg/ml,作用 20h)和对照组细胞进行免疫组化染色,p53 鼠抗人单克隆抗体按 1:60 稀释,采用常规 ABC 法,具有操作步骤按说明书进行,根

据颜色判断 p53 基因表达情况。苏木素复染细胞核,以细胞核出现棕黄色颗粒为阳性细胞。

结 果

1 细胞形态观察 光学显微镜观察到甘草提取物处理的 MGC-803 细胞生长受到抑制,并出现贴壁生长细胞典型的凋亡形态变化现象,即细胞由梭状逐渐变成圆形,细胞透明度和细胞粘附力降低。

2 激光扫描共聚焦显微镜观察 见图 1(插页 2)。染色质凝集是细胞程序性死亡最为普遍的特征^[3],因此 DNA 变化的形态学观察往往具有不可替代的重要意义。MGC-803 细胞经甘草提取物作用后,可观察到处于染色质凝集变化不同时期的凋亡细胞。

3 流式细胞仪检测 MGC-803 细胞凋亡 见图 2(插页 2)和图 3。流式细胞仪测定凋亡细胞 DNA 含量的变化基于细胞凋亡时 DNA 产生断裂,经乙醇固定改变细胞膜通透性后,断裂的 DNA 片段大量外漏导致细胞内 DNA 含量下降,因此经 PI 染色后,在 G₁ 期前出现荧光强度下降的 sub-G₁ 期,也称为凋亡峰(图 2)。结果表明,甘草提取物能有效地诱导 MGC-803 细胞发生凋亡,且凋亡细胞的百分率随着药物浓度升高而升高,或在同一浓度药物处理下随作用时间延长而升高,结果以 3 次独立实验的均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示(图 3)。

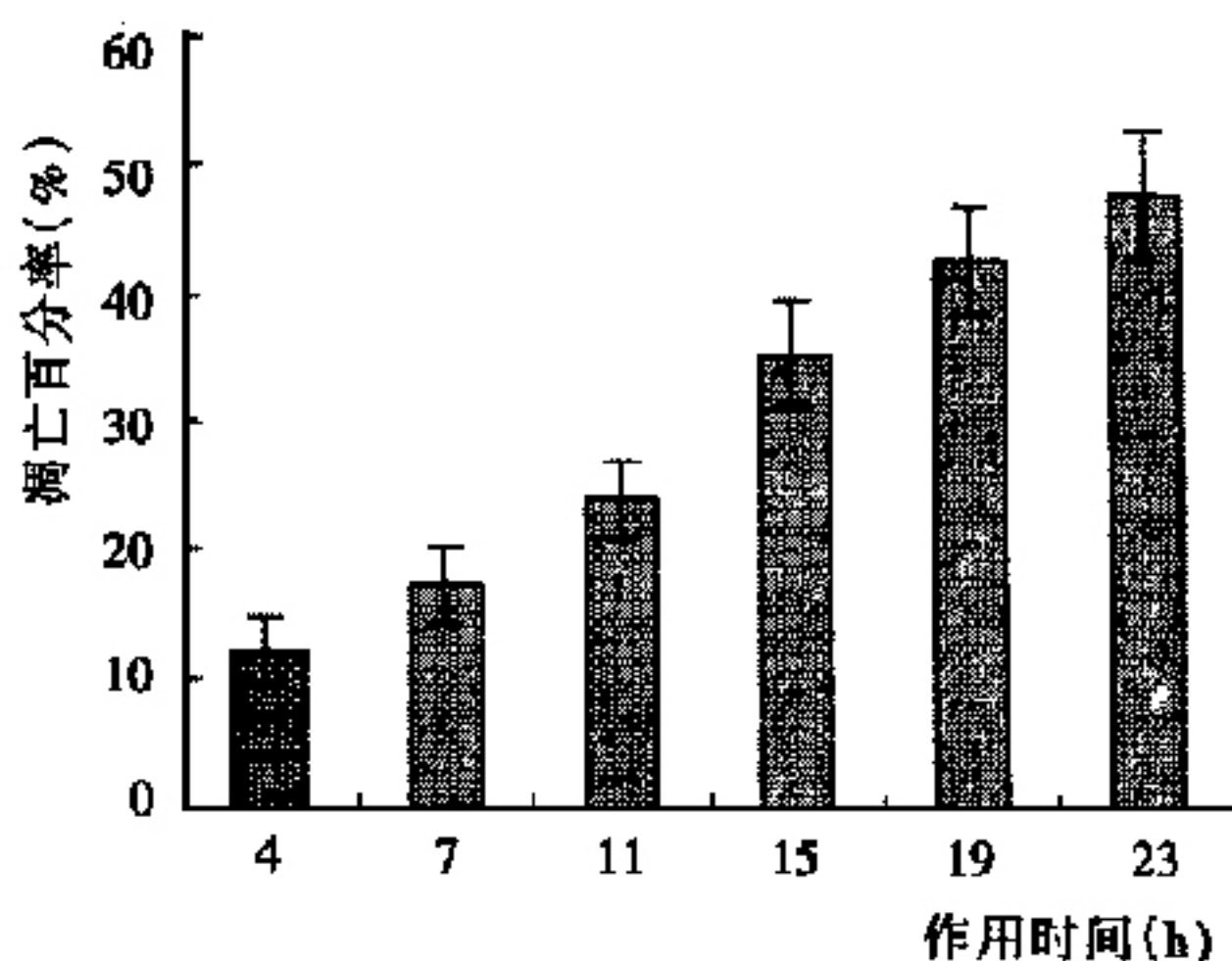


图 3 MGC-803 细胞凋亡百分率与甘草提取物作用时间的关系

4 DNA 琼脂糖凝胶电泳 见图 4(插页 2)。尽管激光扫描共聚焦显微镜和流式细胞仪分析的结果均表明 0.5 mg/ml 甘草提取物作用 20h 能明显诱导 MGC-803 细胞凋亡,但琼脂糖凝胶电泳未见明显的“ladder”,说明低浓度甘草提取物处理 MGC-803 细胞 DNA 断裂不够充分。但是 1.0 mg/ml 甘草提取物处

理 MGC-803 细胞 20h 后,琼脂糖凝胶电泳可见典型的“DNA ladder”。

5 p53 基因表达分析 p53 抗体双重免疫标记和免疫组化分析均表明 p53 基因在 MGC-803 细胞表达量很低,与文献^[4]报道一致。经甘草提取物处理后 p53 基因表达没有明显变化(图略)。

讨 论

过去认为细胞癌变是由于细胞内癌基因激活使细胞获得了无限增殖的能力,但目前从细胞凋亡的角度分析发现,细胞通过发生凋亡进行细胞自杀的途径被抑制,也是细胞癌变的重要原因之一。研究表明,除了大剂量化疗、放疗可能引起细胞坏死外,许多抗癌药物都是通过诱导肿瘤细胞发生凋亡来达到治疗目的。因此,通过诱导细胞凋亡来杀伤和清除肿瘤细胞,不仅应成为临床上评估化疗、放疗和热疗等效果的一项新指标,同时应成为一种筛选抗癌药的快速有效方法。

甘草自古以来在中医学中应用广泛,认为其具有补脾益气、清热解毒、润肺止咳、缓急止痛、调和诸药之功效。近年来,甘草及其活性成分的抗癌研究已有报道。甘草次酸能抑制巴豆油(其成分 TDA 为强促癌剂)诱发的小鼠耳肿胀和鸟氨酸脱羧酶活性,对强致癌剂苯并芘诱发的 DNA 损伤有一定保护作用,还可抑制苯并芘引起的非程序 DNA 合成^[5]。甘草甜素(GL)对黄曲霉毒素 B₁ 和二乙基亚硝胺(DEN)致大鼠肝癌前病变的发生均有明显抑制作用,并且 GL 在抑制 DEN 致肝癌前病变发生过程中,对 DNA 损伤修复有明显保护作用,使 DNA 修复功能接近正常水平,从而降低了 DEN 的致癌性^[6]。长期服用加入甘草甜素的饮用水可以抑制 7,12-二甲基-苯并蒽(DMBA)引起的小鼠皮癌^[7]。从甘草中提取的多糖也发现有抗癌作用^[8]。但本研究证明了甘草抗癌的机理与诱导肿瘤细胞凋亡有关,并从细胞形态、DNA 凝集、凋亡小体形

成、流式细胞仪检测 DNA 含量时凋亡峰的出现及“DNA ladder”等凋亡细胞的典型的形态和生化特征得到有力证实。甘草酸和甘草次酸普遍被认为是甘草抗癌的主要活性成分,但笔者的研究表明甘草酸和甘草次酸及其混合物均不能诱导 MGC-803 细胞凋亡(数据未出示),甘草诱导凋亡的活性成分有待于进一步分离纯化和进行结构分析,但不排除多种有效成分协调发挥作用。

基因水平的研究表明,甘草提取物诱导 MGC-803 细胞凋亡通过 p53 非依赖型途径,其他凋亡相关基因表达在甘草提取物诱导的 MGC-803 细胞凋亡的变化及凋亡的调控机制都尚在深入研究之中。

参 考 文 献

1. Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drugs. *Cancer and Metastasis Reviews* 1992;11: 121—139.
2. Morgenbeaser SD, Williams BO, Jacks T, et al. p53-dependent apoptosis produced by Rb-deficiency. *Nature* 1992;371: 21—22.
3. Schwartz LM, Smith SW, Jones ME, et al. Do all programmed cell death occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci* 1993;90: 980—984.
4. 陈正明,吴 乔,陈玉强,等.视黄酸对胃癌细胞生长和 p53 及 c-myc 基因表达的影响. *癌症* 1998;17(6): 421—424.
5. 陈晓光,韩 锐.甘草次酸对苯并芘诱发 DNA 损伤及非程序 DNA 合成的影响. *药学学报* 1994;29(10): 725—729.
6. 严瑞琪,李俊丽,黄玫玲,等.甘草甜素抑制致癌过程中对 DNA 损伤修复的影响. *癌症* 1995;14(4): 245—247.
7. Agarwal R, Wang ZY, Mukhtar H. Inhibition of mouse skin tumor-initiating activity of DMBA by chronic oral feeding of glycyrrhizin in drinking water. *Nutr Cancer* 1991;15(3—4): 187—193.
8. 徐 红,帕丽达,堵年生,等.甘草多糖的提取及含量测定. *天津药学* 1998;10(1): 74—76.

(收稿:1999-10-15 修回:2000-03-01)

· 消 息 ·

中国中西医结合学会中青年学术论坛会在广州召开

由中国中西医结合学会中青年工作委员会主办、广东省中西医结合学会承办的中青年学术论坛会于 2000 年 5 月 8~11 日在广州举行。这次大会也是全国中西医结合学会中青年工作委员会的第六次会议,共有来自 20 个省、市的中青年学者 150 人参加。本次会议以 21 世纪的中西医结合事业为主题,共收到论文 206 篇,对 20 世纪中西医结合的科技成果进行了回顾,展示了中青年中西医结合研究者的科研成果,交流了临床经验,同时还对中西医结合发展方向、思路方法等问题作了广泛的研讨,在一定程度上反映了中西医结合中青年学术研究的水平及进展。会上还就艾滋病防治、糖尿病中西医结合治疗,以及中西医结合 7 年制教育、21 世纪人才培养模式、现代中西医结合教学手段的改革等问题进行了交流。

(卞兆祥)

《中国中西医结合杂志》2000 年总目录

临床论著

- 川芎嗪对体外循环心内直视手术患者心肌保护的
临床研究……………李伦明等 20(1):13
- 2/100Hz 跨皮肤电刺激对男性海洛因成瘾者性机
能障碍及血清性激素水平的影响……………吴盛桢等 20(1):15
- 心脉通胶囊对冠心病患者心肌缺血总负荷影响
及其作用机制探讨……………丘瑞香等 20(1):19
- 心怡康口服液治疗病毒性心肌炎 92 例临床观察
……………吉海旺等 20(1):22
- 川芎嗪对心脏瓣膜患者血小板聚集功能的影响
……………王万铁等 20(1):25
- 清胃泻火养阴法治复发性口疮的临床及实验
研究……………过伟峰等 20(1):26
- 肺瘤平二号对中晚期肺癌患者血小板表面糖蛋
白表达的影响……………张培彤等 20(1):31
- 感热宁颗粒治疗感冒的临床观察……………杜宝俊等 20(1):34
- 高血压肝阳上亢证的分子机理研究……………金益强等 20(2):87
- 龙寿丹对急性脑梗塞患者血清肿瘤坏死因子及
循环内皮细胞含量的影响……………吴苏宁等 20(2):91
- 丹参注射液加胞二磷胆碱治疗高血压脑出血的
临床观察……………于文等 20(2):94
- 还原注射液对急性脑出血患者血浆内皮素与降
钙基因相关肽的影响……………张春燕等 20(2):97
- 中西医结合治疗老年人原发性肾病综合征临床
观察……………魏连波等 20(2):99
- 调激宁冲剂配合激素治疗小儿原发性肾病综合
征临床观察……………李荣辉等 20(2):102
- 大黄素对人肾成纤维细胞增殖的影响……………宁英远等 20(2):105
- 慢性肾功能衰竭患者尿白细胞介素 6 的检测及
大黄对其影响……………宋海翔等 20(2):107
- 乳腺癌患者淋巴细胞功能相关抗原表达水平的
临床研究……………张瑾等 20(2):110
- 颅脑手术穴位电刺激结合全麻行异氟醚控制性
降压的效果评价……………王均炉等 20(3):167
- 针刺麻醉在幕上开颅手术中的进一步临床应用
研究……………张建民等 20(3):170
- 生血合剂治疗再生障碍性贫血的临床研究……………周永明等 20(3):173
- 胃复康治疗脾虚证胃癌前病变的疗效及其作用
机理的研究……………尹光耀等 20(3):176
- 活血益气养阴方防治急性放射损伤的研究……………王炳胜等 20(3):180
- 腹腔镜与中药结合治疗卵巢子宫内膜囊肿的临
床研究……………吴育宁等 20(3):183
- 当归注射液对慢性阻塞性肺疾病伴肺动脉高压
患者近期疗效观察……………许军阳等 20(3):187
- 高血压病患者血清胰岛素、C 肽水平与中医辨证
分型的关系……………黄俊山等 20(3):190
- 热毒清抗人巨细胞病毒作用的临床及实验研究
……………邢玮等 20(4):245
- 养血安胎冲剂防治习惯性流产及对短寿命抑制
性 T 细胞的影响……………李恩棠等 20(4):248
- 孕安冲剂治疗先兆流产的临床及实验研究……………张晋峰等 20(4):251
- 黄芪首乌化纤汤与金水宝胶囊抗乙型肝炎肝纤
维化疗效比较……………陈汉诚等 20(4):255
- 抗 IV 型变态反应中药治疗湿疹的研究……………林熙然等 20(4):258
- 复方苔藓片调节口腔扁平苔藓患者红细胞免疫
功能的研究……………武云霞等 20(4):261
- 中医激光血疗对老年肾虚脑梗塞患者免疫功能

- 的影响……………肖学长等 20(4):264
- 新生口服液治疗海洛因依赖戒断 424 例临床观
察……………沙丽君等 20(4):267
- 虚证便秘患者肛管直肠压力测定及益气润肠液
对其影响……………余苏萍等 20(5):325
- 参麦注射液促进乳腺癌患者术后恢复的临床观
察……………刘鹏等 20(5):328
- 鼻炎喷雾剂治疗慢性单纯性和慢性肥厚性鼻炎
的临床初步观察……………刘志军等 20(5):330
- 雷公藤多甙对格林-巴利综合征患者白细胞介
素 6 的影响……………张旭等 20(5):332
- 中西医结合治疗早期糖尿病肾病的临床观察
……………边芳等 20(5):335
- 畅脉舒治疗冠心病高粘滞血症的疗效观察……………刘同美等 20(5):338
- 利心丸治疗充血性心力衰竭的临床研究……………李立志等 20(5):341
- 中西医结合治疗轻、中度充血性心力衰竭的临
床研究……………何焕友等 20(5):344
- 腰椎管内突出髓核的临床意义探讨——附 44
例腰椎间盘突出症患者与 73 例正常人 CT
资料的三维分析……………冯天有等 20(5):347
- 川芎嗪治疗闭塞性动脉硬化症及其对血管内皮细
胞作用的临床观察……………李尚珠等 20(6):412
- 复方丹参滴丸对冠心病不稳定性心绞痛患者血小
板活化功能的影响……………金露 20(6):415
- 冠心病血瘀证患者血浆和单核细胞水平凝血/纤
溶活性研究……………吕中等 20(6):418
- 利培酮治疗首发精神分裂症不同中医辨证分型
的疗效观察……………曹欣冬等 20(6):421
- 中药消郁汤加心理治疗功能性消化不良的临床
观察……………江波等 20(6):424
- 中药配合同步放、化疗对晚期非小细胞肺癌的影
响……………刘秀芳等 20(6):427
- 红花注射液综合治疗对慢性肺心病急性期血液
流变学的影响……………金晔等 20(6):430
- 甲眼消合并他巴唑治疗甲状腺机能亢进症突眼
的临床观察……………廖世煌等 20(6):433
- 原发性高血压左室舒张功能与中医辨证分型关
系的研究……………潘仰中等 20(6):436
- 芎芎胶囊预防冠状动脉介入治疗后再狭窄的临
床研究……………徐浩等 20(7):494
- 逐瘀消肿合剂结合立体定向引流治疗高血压脑
出血的临床研究……………贾映海等 20(7):498
- 急性脑梗塞血瘀证与一氧化氮、内皮素相关性
研究……………余运贤等 20(7):501
- 黄芪注射液配伍川芎嗪抗心肌缺血再灌注损伤
的临床研究……………周苏宁等 20(7):504
- 益脉降压流浸膏对老年高血压病患者血小板活
化、纤溶活性及血管紧张素 II 的影响……………段学忠等 20(7):508
- 针箭颗粒改善高血压病胰岛素抵抗的临床研究
……………唐蜀华等 20(7):511
- 大黄对胃肠道血流灌注影响的临床与实验研究
……………陈德昌等 20(7):515
- 参麦注射液与氨茶碱治疗膈肌疲劳的临床对照
研究……………熊盛道等 20(7):519
- 益气养阴活血方对气阴两虚血瘀型糖尿病患者
血浆内皮素与一氧化氮水平的影响……………王莒生等 20(8):571
- 葛根素治疗糖尿病视网膜病变的疗效观察……………任平等 20(8):574