

三七提取物对经 MNNG 转化后的 GES-1 细胞增殖抑制及促凋亡作用

李军祥¹ 王志斌¹ 朱陵群² 朱福玲² 崔巍²

摘要 目的 通过细胞培养方法,研究灌服三七提取物后犬血清对胃癌前病变细胞增殖抑制及促凋亡作用。**方法** 采用永生化的人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 细胞被 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)进一步转化后的细胞(简称 MC 细胞)作为胃癌前病变细胞的体外研究模型;以三七提取物给彼格犬一次性灌胃,取给药前的血清及给药后不同时点的血清作为实验药物血清。以四甲基固氮唑盐(MTT)法分别检测每个采血时间点上含药血清对 MC 细胞作用 72h 后的抑制情况,找出最佳含药血清时点(2h、6h);根据以上结果,以流式细胞仪(flow cytometry)分别检测 2h 和 6h 药物血清对 MC 细胞作用 72h 后的促凋亡作用。**结果** 2h 和 6h 时点的药物血清对 MC 细胞的抑制率最高,分别达到 45.3% 和 42.4%,与空白血清组比较差异有显著性($P<0.01$);其能明显促进 MC 细胞的凋亡,与空白血清组比较其凋亡比例增加($P<0.05$)。在 2h 和 6h 药物血清的作用下 MC 细胞在 G_0/G_1 期细胞比例明显下降($P<0.05$);而 G_2/M 期细胞显著增加($P<0.05$);但 S 期并没有一致性的变化。**结论** 灌服三七提取物后 2h、6h 药物血清对 MC 细胞的增殖抑制作用最强;均对 MC 细胞有显著的促凋亡作用,且能降低 MC 细胞在 G_0/G_1 期的比例及增加 G_2/M 期的比例,这可能是其抑制 MC 细胞增殖及促凋亡的原因之一。

关键词 三七;胃癌;细胞培养;凋亡

Cell Proliferation Inhibitive and Apoptosis Promoting Effects of Sanchi Extract on GES-1 Cell after Being Transformed by MNNG LI Jun-xiang, WANG Zhi-bin, ZHU Ling-qun, et al *Department of Digestive Diseases, Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078)*

Abstract Objective To study the effect drug contained canine serum, prepared by gastric perfusion with Sanchi extract (SE), in inhibiting proliferation and promoting apoptosis of cultured precancerous gastric cells by cell culture. **Methods** The precancerous model cells (MC) used in the experiment were prepared through transforming eternalized human gastric mucosa epithelial cells GES-1 by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine (MNNG). After once gastric perfusion of SE extract to dogs, the canine serum gotten before and at different time points after medication was used for test. The inhibitory effect of the drug serum obtained at different time points on MC after acting for 72 hrs was detected by 3-(4,5)-dimethyl thiazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium-bromide (MTT) method to find the optimal time point for drug serum preparation, that were 2 hrs and 6 hrs after medication. Then the cell apoptosis promoting effect after acting for 72 hrs of the drug serum obtained at the optimal time points was determined by flow cytometry. **Results** The drug serum obtained at 2-hr and 6-hr after medication showed the highest inhibitive effect on MC cells, reaching 45.3% and 42.4% respectively, as compared with the effect of blank serum, the difference was significant ($P<0.01$). They could evidently promote the MC cell apoptosis, the apoptosis rate also showed significant difference to that of the blank serum ($P<0.05$). Under their action, the proportion of MC cells in G_0/G_1 phase was obviously decreased ($P<0.05$) while that in the G_2/M phase significantly increased ($P<0.05$). However, the change of cells in S phase was not uniform. **Conclusion** The drug contained canine serum gotten 2 hr and 6 hr after SE feeding shows the optimal MC proliferation inhibitive effect and significant apoptosis promoting effect. Besides, it could significantly

基金项目:教育部科学技术重点项目课题(No.2024)
作者单位:1. 北京中医药大学东方医院消化内科(北京 100078);2. 北京中医药大学东直门医院中医内科学重点实验室
通讯作者:李军祥, Tel:010-67689751, E-mail:lijx1226@263.net

decrease the proportion of MC cells in G₀/G₁ phase and significantly increase that in G₂/M phase, this effect might be one of the mechanisms of ES in inhibiting MC cell proliferation and promoting its apoptosis.

Key words Sanchi; gastric cancer; cell culture; apoptosis

胃癌是人类发生率和死亡率最高的恶性肿瘤之一,因此加强胃癌前病变的研究和防治对降低胃癌的发病率和病死率具有重要意义。近年来出现了一些处于实验阶段的治疗胃癌前病变的药物^[1],但尚无突破性进展。中医药在治疗胃癌前病变的临床和机理研究的报道很多,具有疗效较好、毒副反应小等优势。传统中药三七用于治疗胃癌前病变的应用和研究已有开展,并取得了一定进展^[2,3]。本实验通过细胞培养方法,选取被 N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)转化的永生化人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 细胞(即 MC 细胞)^[4]作为胃癌前病变细胞的体外模型,以排除复杂的体内因素影响,并从研究灌服三七提取物后的犬血清对胃癌前病变细胞的抑制作用入手,找出三七提取物入血后对胃癌前病变细胞增殖抑制作用的最佳作用时间点,并进一步研究其促凋亡机理,为开发治疗胃癌的新药提供理论依据。

材料与方法

1 材料

1.1 细胞来源 胃癌前病变细胞系 MC 细胞均由北京市肿瘤研究所遗传室建系转化并惠赠。

1.2 药物 三七提取物制备:三七 10kg,加水煎煮。第 1 次加水 100L,煎煮 2h,第 2 次加水 80L,煎煮 1.5h,合并 2 次水煎液,浓缩至 50L,加 95%乙醇 50L,冷藏 24h,滤过,滤液减压回收溶剂,残留物 70℃减压干燥,由北京中医药大学中药学院提供。

1.3 主要试剂 DMEM 培养基、胰酶,美国 GIBCO 公司提供;MTT,染色液,碘化丙啶(PI),RNA 酶,Sigma 公司产品;标准胎牛血清(国产),购自天津川页公司;6 孔、24 孔、96 孔细胞培养板,丹麦 NUNC 公司产品。

1.4 仪器 CO₂ 培养箱,美国 NAPCO5 410 型;酶标仪,Thermo labsystem 公司 DSX SYSTEM;倒置相差显微镜,日本 Olympus IM2 型。DNA 周期及凋亡分析软件:Modit LT;流式细胞分析仪器及软件:FACS Calibur(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 药物血清制备 取给药前纯种雄性彼格犬血清;然后用三七提取物给纯种雄性彼格犬一次性灌胃,剂量为 0.16g/kg。取给药后 30、60min 及 2、3、4、

5、6、8、10h 各时点的血清,灭活补体后于 -20℃冰箱冷冻备用。

2.2 培养基的配制 基本培养基:DMEM 培养基以三蒸水配制,加 3.6g/L 的 NaHCO₃,0.22μm 微孔滤膜过滤除菌,4℃下保存。完全培养基的配置:90%基本培养基和 10%标准胎牛血清,及青霉素、链霉素各 10 万 u/L。含药培养基配置:按比例加入空白血清及不同时点的药物血清,配制成空白血清培养基和含药培养基。

2.3 MC 细胞的培养 细胞以完全培养基培养于 37℃ 5%CO₂ 的培养箱中。当细胞长到适当密度(80%~90%融合)后,按 1:3 传代。

2.4 药物血清对 MC 细胞的增殖抑制作用

2.4.1 实验分组及给药方法 配制不同时点的含药培养基作为治疗组,以空白血清配制的培养基为空白对照组。取对数生长期的 MC 细胞,使用 0.1%胰酶和 0.1%乙二胺四醋酸(EDTA)的混合消化液消化,用完全培养基将细胞悬液的浓度调至 4×10^4 个/ml,接种于 96 孔板,每孔加入细胞悬液 0.1ml。于培养箱中培养 24h 后,更换含药培养基,继续培养 72h,每板设一组常规培养细胞,作为正常对照组。

2.4.2 活细胞形态观察 倒置相差显微镜下观察 MC 细胞的形态以及在不同时点的药物血清刺激后形态变化情况。

2.4.3 MTT 法检测 MC 细胞增殖抑制情况 使用含药培养基培养足够时间后,吸净培养基,每孔加入 MTT(5mg/ml)20μl,及 0.1ml 基本培养基,继续培养 4h。吸去上清,每孔加入二甲基亚砷(DMSO)100μl,避光振荡 10min。自动酶标仪 540nm 读取 OD 值。抑制率按照以下公式计算:抑制率(%)=(不加药的对照组平均 OD 值 - 给药组平均 OD 值)/不加药的对照组平均 OD 值 × 100%。根据结果找到最佳的药效时点。

2.5 流式细胞法检测药物血清对 MC 细胞的促凋亡作用

2.5.1 实验分组及给药方法 含药培养基中所含药物血清不同,分 2h 药物血清组及 6h 药物血清组,并以空白血清配制的培养基作为空白对照组。取对数生长期的 MC 细胞,使用 0.1%胰酶和 0.1%乙二胺四醋酸(EDTA)的混合消化液消化,用完全培养基将细胞悬液的浓度调至 4×10^4 个/ml,接种于 6 孔板,每孔

加入细胞悬液 3 ml。于培养箱中培养 24 h 后,更换含药培养基,继续培养 72 h,每板设一组常规培养细胞。

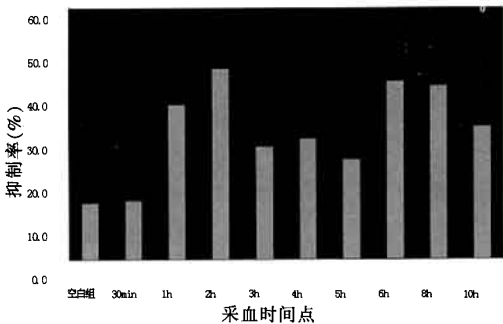
2.5.2 流式细胞法检测药物血清对 MC 细胞的促凋亡作用 使用消化液消化,离心收集细胞及培养上清,PBS 洗涤 1 次;70% 冷乙醇 4℃ 分散固定过夜;PBS 洗涤 1 次,RNA 酶(20mg/L)37℃ 消化 30 min;PBS 洗涤 1 次,PI 染液(50mg/L)4℃ 避光染色 30 min;流式细胞仪分析细胞凋亡及细胞周期情况。

2.6 统计学方法 用 SPSS 10.0 软件统计,成组计量资料比较采用 student's *t* 检验。

结 果

1 倒置相差镜下观察药物血清对 MC 细胞的增殖抑制作用 倒置相差镜下观察发现:正常培养的 MC 细胞形态多数呈三角型、多边形或梭形,但细胞折光性增强,偶尔出现体积明显大于其他细胞的大细胞,MC 细胞在正常培养条件下,细胞稀疏时就会有少量细胞脱落,但其中部分脱落细胞形态仍保持完好,无老化出现。在更换含药血清培养基后,在 2 h 含药物血清的含药培养基作用下,MC 细胞的增殖速度明显减慢,部分细胞逐渐出现胞浆收缩,细胞呈梭形或长圆形,贴壁不充分,甚至脱落。

2 MTT 法检测药物血清对 MC 细胞的增殖抑制作用的结果 见图 1。在 2 h 和 6 h 时点的药物血清对 MC 细胞的抑制率最高,分别达到 45.3% 和 42.4%,与空白对照组比较,差异有显著性($P < 0.01$)。



注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;每组 $n = 7$

图 1 不同时点的药物血清对 MC 细胞的抑制情况

3 流式细胞法检测含药血清促 MC 细胞凋亡作用及其对细胞周期的影响

3.1 药物血清对 MC 促凋亡作用比较 正常培养的 MC 细胞存在一定比例的凋亡,在含药血清的完全培养基中培养 72 h 后,经流式细胞仪检测发现被挑选出来的两个时间点的含药血清能明显促进 MC 细胞的凋亡,和同样条件下用空白血清培养的 MC 细胞比

较,其凋亡比例显著增加($P < 0.05$),见表 1。

表 1 药物血清对 MC 促凋亡作用比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡率
2h 药物血清	6	13.13±1.32*
6h 药物血清	6	6.02±1.47*
空白对照	6	1.09±0.40

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$

3.2 药物血清对于 MC 细胞细胞周期的影响 见表 2。在含 2 h、6 h 药物血清的含药培养基作用下,MC 细胞在 G_0/G_1 期细胞比例明显下降($P < 0.05$);而 G_2/M 期细胞显著增加($P < 0.05$);但 S 期并没有一致性的变化;在含空白血清的培养基作用下 S 期出现显著的比例升高。

表 2 药物血清对 MC 细胞细胞周期的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	G_0/G_1	G_2/M	S
2h 药物血清	6	27.43±1.22*	40.11±4.29*	32.46±2.26*
6h 药物血清	6	30.36±1.90*	35.23±6.97*	33.94±4.46*
空白对照	6	45.48±2.54	6.86±0.96	47.67±2.76

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$

通过比较正常培养的 MC 细胞、空白血清和药物血清刺激后 MC 细胞的 DNA 周期的数据分析可以看出:空白血清对 MC 细胞有一定促增殖作用;而药物血清组与空白对照组比较时发现 G_0/G_1 期所占比例下降,但 G_2/M 期增高,这说明在药物血清作用后的 MC 细胞被阻滞于 G_2/M 期。

讨 论

本实验中的 GES-1 细胞是由人胎儿胃黏膜上皮细胞转染了 SV-40 病毒后获得的永生化细胞系^[5];而 MC 细胞为其进一步经大剂量 MNNG 打击后,GES-1 细胞表型发生一些改变,染色体畸变增多,骨架微丝异常,克隆形成率增加,并获得软琼脂集落形成能力,但仍不能在裸鼠体内致瘤^[4,6]。因此,可以认为 GES-1 细胞和 MC 细胞可能分别代表了癌变的不同阶段。

传统中药三七作为治疗胃癌前病变的常用中药,在治疗胃癌前病变的研究中已广受重视,已有研究证明三七总皂苷对体外培养的 GES-1 细胞及 MC 细胞的增殖有明显的抑制作用^[7]。但由于中药成分复杂,其进入人体后又发生了十分复杂的生化反应才最终发挥其药理作用,因此中药体外实验中发挥作用的有效成分并不一定是药物在体内发挥作用的真正有效成分。因此本实验中我们采用了中药血清为受试药物,通过采取给药后不同时点的药物血清作用于胃癌前病变细胞,从而模拟了三七在体内发生作用的时效机理过程,避免了体外实验中这一问题。

实验中我们发现 2h 和 6h 所取的药物血清对 MC 细胞作用 72 h 后的抑制作用最为明显。根据以往文献^[8], 由于三七总皂苷在胃肠道的吸收入血过程较慢, 推测在第 2 个高抑制率时点主要是三七总皂苷入血后的作用结果。

通过实验我们发现在 2 h、6 h 两个时点的含药血清对 MC 细胞均有显著的促凋亡作用, 这和以往的文獻是一致的^[3]。但其使 MC 细胞各周期都发生了改变, 尤其是对 G₀/G₁ 期、G₂/M 期的影响, 似是以往未曾报道的。药物血清促进了 MC 细胞向有丝分裂前期的发育, 加速其成熟, 但又抑制了其有丝分裂的发生, 使 G₂/M 期的细胞比例显著增加, 达到了抑制增殖的作用。但参与细胞周期调控的因子很多, 也比较复杂, 而由于本实验中未能涉及具体机制方面的研究, 尚不清楚这种变化的作用机理。传统的研究认为, P21^{waf1/cip1}蛋白是 G₁ 期细胞周期调节因子, 但现在已有越来越多的试验发现, P21^{waf1/cip1}与 G₂/M 期阻滞有关^[9,10]。国内也有学者发现豆类作物和齿状植物中提取的天然异黄酮化合物金雀异黄素(Gen)能明显抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的增殖, 并使细胞生长发生 G₂/M 期阻滞, 且与其稳定 cyclinB 蛋白和上调 P21^{waf1/cip1}蛋白表达有关^[11]。那么本实验结果的机理是否与之类似尚需进一步研究验证。

参 考 文 献

- 1 陈洁平, 林 晨, 张雪艳, 等. 维甲酸诱导基因 RA538 诱导人胃癌细胞系凋亡及其分子机制的研究. 中华微生物学和免疫学杂志 2000;6(20):551—555.
Chen JP, Lin C, Zhang XY, et al. Study on the apoptosis process and molecular mechanism of recombinant RA 538 adenovirus on a human gastric cancer cell line-SGC7901. Chin J Microbiol Immunol 2000;6(20):551—555.
- 2 沈洪薰, 陈 莉, 周树军, 等. 复方参七汤治疗胃癌的临床与实验研究. 世界华人消化杂志 1998;6(10):837—840.
Sheng HX, Chen L, Zhou SJ, et al. Clinical and experimental study on therapeutic effect of compound Shenqitang on gastric carcinoma. World Chin J Digestol 1998;6(10):837—840.
- 3 石雪迎, 赵凤志, 戴 欣, 等. 三七对胃癌前病变大鼠胃黏膜癌基因蛋白异常表达的影响. 北京中医药大学学报 2001;24(6):37—39.
Shi XY, Zhao FZ, Dai X, et al. Effects of the root of panax notoginseng on the abnormal expressions of oncogene proteins in gastric mucosa in the rats with precancerous lesions. J Beijing Univ Chin Med 2001;24(6):37—39.

- 4 苏秀兰, 柯 杨, 舍 英, 等. 亚硝胺类化合物 MNNG 诱导人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 恶性转化的研究. 内蒙古医学杂志 1995;15(2):65—67.
Su XL, Ke Y, She Y, et al. Chemical carcinogen MNNG induced malignant transformation of human gastric epithelia cells. Neimenggu Med J 1995;15(2):65—67.
- 5 柯 杨, 宁 涛, 王 冰, 等. 人胃黏膜上皮细胞系 GES-1 的建立及其生物学特性. 中华肿瘤杂志 1994;16(1):7—8.
Ke Y, Ning T, Wang B, et al. Establishment and characterization of a SV40 transformed human fetal gastric epithelial cell LINE-GES-1. Chin J Oncol 1994;16(1):7—8.
- 6 苏秀兰, 宁 涛, 柯 杨. 化学致癌剂 MNNG 对人胃黏膜上皮细胞骨架作用的研究. 解剖学报 1995;26(4):291—293.
Su XL, Ning T, Ke Y. Study of cytoskeletons in human gastric epithelial cell treated with N-Methyl-Nitro-N-Nitrosoguanidine. Acta Anatomica Sinica 1995;26(4):291—293.
- 7 石雪迎, 赵凤志, 戴 欣, 等. 三七总皂甙对转化的人胃黏膜上皮细胞增殖的抑制作用. 北京中医药大学学报 2001;24(5):29—33.
Shi XY, Zhao FZ, Dai X, et al. Inhibitory effects of the total saponin of panax notoginseng on the proliferation of the transformed human gastric mucosal epithelial cells. J Beijing Univ Chin Med 2001;24(5):29—33.
- 8 马郁琪, 肖建初, 李 彤, 等. ³H 三七皂甙 Rg1 在大鼠体内的药代动力学研究. 中草药 1987;18(9):21—24.
Ma YQ, Xiao JC, Li T, et al. Pharmacokinetic study of ³H total saponin Rg1 in rats. Chin Tradit Herbal Drugs 1987;18(9):21—24.
- 9 Shao ZM, Alpaugh ML, Fontana JA, et al. Genistein inhibits proliferation similarly in estrogen receptor-positive and negative human breast carcinoma cell lines characterized by P21^{waf1/cip1} induction, G₂/M arrest, and apoptosis. J Cell Biochem 1998;69(1):44—54.
- 10 Frey RS, Li J, Singletary KW. Effects of genistein on cell proliferation and cell cycle arrest in nonneoplastic human mammary epithelial cells: involvement of Cdc2, P21 (waf/cip1), P27 (kip1), and Cdc25C expression. Biochem Pharmacol 2001;61(8):979—989.
- 11 崔洪斌, 宋丹凤, 那晓琳, 等. 金雀异黄素抑制人胃癌细胞增殖与 G₂/M 期阻滞作用的体外研究. 营养学报 2003;25(1):10—13.
Cui HB, Song DF, Na XL, et al. Study on the inhibited proliferation and G₂/M arrest of human gastric carcinoma cells induced by genistein *in vitro*. Acta Nutriment Sinica 2003;25(1):10—13.

(收稿:2004-09-29 修回:2005-01-11)