

巴豆生物碱对人胃癌 SGC-7901 细胞 PCNA、Ki-67 及 Bax、Fas 表达的影响

宋红春¹ 谷雨² 陆为民² 耿燕楠¹

(1.南京中医药大学,江苏南京 210029; 2.江苏省中医院,江苏南京 210029)

摘要 目的:观察巴豆生物碱(Croton Alkaloid,CA)对人胃癌 SGC-7901 细胞 PCNA、Ki-67 及 Bax、Fas 表达的影响,初步探讨其抗肿瘤的分子机制。方法:体外培养 SGC-7901 细胞,给予不同浓度的巴豆生物碱干预。免疫组化法检测不同浓度 CA 作用于 SGC-7901 细胞后,PCNA、Ki-67、Bax、Fas 蛋白表达的情况。结果:随着巴豆生物碱浓度的升高,SGC-7901 细胞中 PCNA、Ki-67 表达逐渐下降,Bax、Fas 表达逐渐上升,具有剂量依赖性。结论:巴豆生物碱抑制 SGC-7901 细胞增殖的作用机制可能与其下调 PCNA、Ki-67 表达相关,而其上调 Bax、Fas 表达可能是其诱导 SGC-7901 细胞凋亡的机制之一。

关键词 巴豆生物碱 SGC-7901 PCNA Ki-67 Bax Fas 体外实验

中图分类号 R285.5 文献标识码 A 文章编号 1672-397X(2014)06-0077-03

巴豆,系大戟科植物巴豆的种子,味辛,性热。巴豆从很早之前就被用于抗肿瘤治疗,巴豆制剂及其复方对胃癌、肝癌、乳腺癌、卵巢癌、宫颈癌等多种肿瘤的治疗作用已从化学、药理、临床等多方面研究确定。有实验研究证实,巴豆生物碱(CA)能诱导 SGC-7901 细胞分化,抑制细胞增殖,并诱导其凋亡^[1-4]。本文即从体外实验的角度,初步探讨巴豆生物碱抑制 SGC-7901 细胞增殖及诱导其凋亡的分子机制。

1 实验材料

1.1 细胞株 人胃癌 SGC-7901 细胞株购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.2 药物与试剂 巴豆生物碱由中国药科大学药理学室制备;RPMI 1640 培养基、小牛血清、胰蛋白酶购自南京凯基生物科技发展有限公司;免疫组化相关抗体试剂盒购自 Bioworld 公司;免疫组化 MaxVision™ 试剂盒、DAB 显色试剂盒购自福州迈新生物公司。

1.3 实验仪器 细胞培养瓶、培养板:Fisher Scientific 公司(美国);微量加样器:Eppendorf 公司(德国);二氧化碳培养箱:3111 型,Thermo 公司(美国);台式离心机:80-2 型,上海医疗器械(集团)有限公司;光学显微镜:LEICA DM-1000 型,LEICA 公司(德国);MiniSee 图像采集系统:康克新柏图文分析软件。

2 实验方法

2.1 细胞培养 SGC-7901 细胞接种于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,每日显微镜下观察,待细胞生长状态良好,铺满瓶底时,用 0.25% 胰蛋白酶溶液常规消化、传代。

2.2 免疫组化法检测巴豆生物碱对 SGC-7901 细胞 PCNA、Ki-67、Bax 及 Fas 表达的影响 取处于对数生长期细胞,调整细胞浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,以 2000 μL 每孔接种于 6 孔塑料板,6 孔塑料板每孔底部交错放置两块 24mm \times 24mm 经多聚赖氨酸处理的无菌盖玻片,置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。待培养 24h 细胞贴壁后,吸弃旧培养液,每孔加入 1000 μL 不同浓度的巴豆生物碱,使终浓度为 25、50、100、200、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$,并设 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的空白对照,每个浓度设 3 个复孔。继续培养 72h 后,取出盖玻片,PBS 冲洗,4% 多聚甲醛 4℃ 固定过夜,3% H₂O₂ 室温孵育 20min,滴加一抗 4℃ 过夜,次日滴加二抗,最后 DAB 显色,苏木素轻染,脱水,透明,封片。

每张细胞片选取 6 个不同视野在高倍镜下观察,以此来判断细胞染色的着色率。PCNA 和 Ki-67 阳性判断标准是以细胞核出现淡黄色至棕黄色颗粒沉着为阳性细胞,而 Bax 和 Fas 主要以胞浆出现淡黄色至棕黄色颗粒沉着为阳性细胞。染色结果以染色阳性细胞数百分比计算,即在观察的高倍视野中,计数 100 个细胞中阳性细胞所占百分比,并取 6 个视野的平均值。

2.3 统计学方法 实验重复 3 次,结果以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示。所有数据均采用 SPSS16.0 统计分析软件进行方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

如图 1 和图 2 中所见,PCNA、Ki-67 蛋白主要在胞核中表达,并随着巴豆生物碱浓度的升高,PCNA 和 Ki-67 蛋白表达阳性率降低。如图 3 和图 4 中所见,Bax 和 Fas 蛋白表达主要在胞浆中,随着巴豆生物碱浓度的升高,Bax 及 Fas 表达显著增多。见表 1。

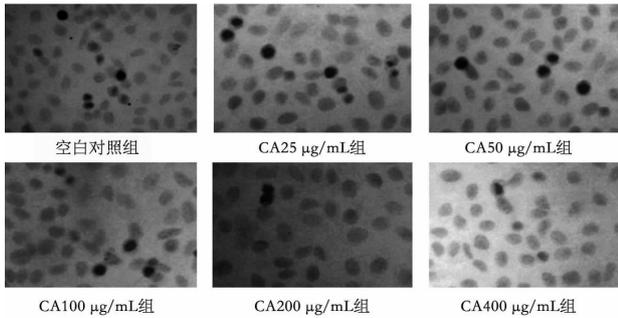


图1 免疫组化 SGC-7901 细胞中 PCNA 蛋白的表达(10×40)

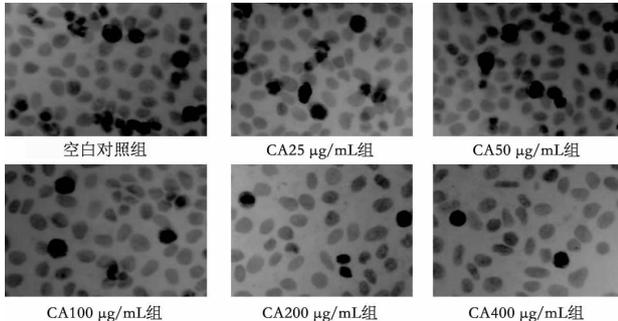


图2 免疫组化 SGC-7901 细胞中 Ki-67 蛋白的表达(10×40)

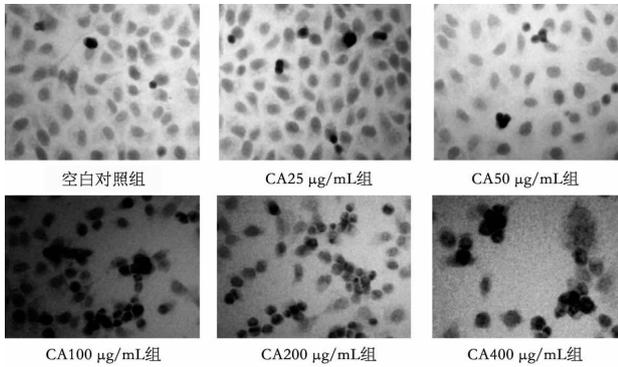


图3 免疫组化 SGC-7901 细胞中 Bax 蛋白的表达(10×40)

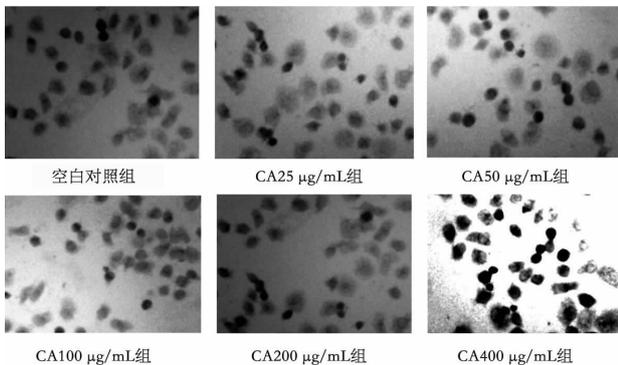


图4 免疫组化 SGC-7901 细胞中 Fas 蛋白的表达(10×40)

表1 各组 SGC-7901 细胞中 PCNA、Ki-67、Bax、Fas 蛋白表达阳性率($\bar{x} \pm s$) %

组别	样本数	PCNA	Ki-67	Bax	Fas
空白对照组	3	12.97±1.23	23.80±1.10	3.90±0.43	13.30±0.80
CA25μg/mL组	3	11.80±1.28	21.30±1.00*	9.70±0.80*	20.70±0.84*
CA50μg/mL组	3	9.50±1.40*	17.60±1.20**	14.90±0.35*	28.30±0.89**
CA100μg/mL组	3	6.73±0.95**	13.70±1.23**	26.70±3.28**	38.70±2.34**
CA200μg/mL组	3	4.33±0.80**	9.50±0.23**	39.80±2.51**	51.30±2.02**
CA400μg/mL组	3	2.03±1.05**	4.90±0.41**	56.70±2.17**	65.30±2.37**

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

4 讨论

目前,胃癌的治疗仍以手术治疗为主,联合放化疗,然而仍有部分患者不适宜手术,传统化疗药物有严重的不良反应和化疗耐药,多药耐药是造成肿瘤化疗失败的重要原因之一。因此,研究中药对于肿瘤的作用,开发新型有效的抗肿瘤药物具有广阔的前景。近年来,生物碱类药物在肿瘤防治方面的作用越来越受到人们的重视。

目前认为肿瘤的发生发展与细胞增殖失控和细胞凋亡失衡有关。PCNA、Ki-67 是与细胞增殖相关的核抗原,在增殖的细胞中呈阳性表达,反映细胞的增殖活性,是细胞增殖的重要标记物^[5-6]。PCNA 为 S 期广泛表达的酸性蛋白,定位于细胞核,S 期高水平表达,而在 M 期和 G₀ 期不表达。因此 PCNA 的阳性程度可直接反映 DNA 复制的活跃程度。Ki-67 表达在 G₀ 期和 G₁ 早期缺如,在 S、G₂ 和 M 期等细胞中均有表达,其表达活性随细胞周期进展而增加,可准确地反映细胞增殖活性。本研究免疫组化结果显示,随着巴豆生物碱作用浓度的升高,SGC-7901 细胞中 PCNA、Ki-67 表达下降,表明巴豆生物碱抑制 SGC-7901 细胞增殖的作用机制与其下调 PCNA、Ki-67 表达相关,并呈浓度依赖性。肿瘤恶性程度与其细胞的增殖速度密切相关,细胞增殖活跃者,其生物学行为不佳,预后不良。巴豆生物碱可抑制 SGC-7901 细胞的增殖,表明其可一定程度地抑制胃癌的分化和转移,改善预后。

细胞凋亡,又称程序性细胞死亡,是一种细胞自主的生理性死亡。细胞凋亡与机体清除病毒、抗肿瘤及肿瘤形成均有密切关系,Bcl-2 家族蛋白和 Fas/FasL 系统是重要的凋亡调节因子。根据在细胞凋亡调控中的不同作用,Bcl-2 蛋白家族分为抗凋亡蛋白和促凋亡蛋白两大类。bax 是 bcl-2 家族中主要的促凋亡蛋白,bax 定位于细胞浆,自身可形成同源二聚体或与 bcl-2 形成异源二聚体。当 bax 过度表达时,bax 本身形成的同源二聚体占主导,则易于发生凋亡^[7]。很多细胞凋亡中有 bax 表达升高,其能通过直接影响线粒体功能和膜的完整性而调节凋亡,并降低细胞凋亡的阈值^[8]。bax 促进细胞凋亡的机理主要有线粒体渗透性转换、氧化磷酸化和 ATP 的合成功能被破坏;细胞氧化还原作用改变;线粒体中的凋亡相关分子 Apaf-1 释放出来,与细胞色素 C 相互作用,激活胱冬肽酶(caspase)信号转导途径。有研究表明 bax 表达与肿瘤发生发展过程呈负相关,bax 在癌组织中的表达随着病理分级、临床分期的增高而降低,且 bax 在淋巴结转移的患者中低表达^[7]。本研究免疫组化结果显示,巴豆生物碱可调高 SGC-7901 细胞 bax 蛋白的表达,并呈浓度依赖性,表明巴豆生物碱可能通过上调 bax 的表达,促进 SGC-7901 细胞凋亡,从而抑制胃癌的发生与发展。

Fas 是有关细胞凋亡的膜表面分子,是 I 型跨膜糖蛋白,属于肿瘤坏死因子受体超家族成员。FasL 是 Fas 配体,属于 TNF 家族 II 型跨膜蛋白。Fas 一旦和其配体 FasL 结合,诱导 Fas 形成能传递信号的活性形式 Fas 三聚体,其中的死亡域可与一种死亡结构域相关蛋白结合,并将凋亡信号传递给 caspase-8,caspase-8 的激活将产生一系列连锁反应,诱导细胞凋亡^[9]。本实验结果表明,随着巴豆生物碱

慢性肾小球肾炎中医研究进展

吴斌¹ 孙伟²

(1.南京中医药大学,江苏南京 210029; 2.江苏省中医院,江苏南京 210029)

摘要 慢性肾小球肾炎起病隐匿,临床表现多样,轻重程度悬殊,病程长且进展缓慢,最致导致终末期肾病。本病的四大临床表现为血尿、蛋白尿、水肿、高血压,控制此四大症状为治病之关键。综合文献分析,大都认为本病蛋白尿与脾肾两虚有关,脾虚清浊不分,肾虚精微下泄;肾性血尿以脾肾亏虚为本,湿热蕴结下焦,热伤肾络或瘀血阻于肾络为标;水肿与肺脾肾三脏有关,以肾脏为主;高血压病变在肝,根源在肾,关键在脾。中医在临床辨证分型论治方面取得了较为满意的疗效,但在多样本研究、实验造模、中药有效成分等方面尚存不足,亟待解决。

关键词 慢性肾炎 中医病机 中医药疗法 综述**中图分类号** R277.523.1**文献标识码** A**文章编号** 1672-397X(2014)06-0079-03

慢性肾小球肾炎(CGN)是一组起病隐匿,病程迁延,伴有不同程度蛋白尿、血尿、高血压和进行性肾功能减退的肾小球疾病综合征。中医学属“水肿”、“腰痛”、“虚劳”、“血尿”、“淋证”等范畴,该病临床表现多种多样,轻重程度悬殊,病程长且多以缓慢进行为特点,有时亦可无明显的自觉症状,只是尿常规检查时偶然发现有异常,是导致终末期肾病(ESRD)最常见的原因,积极预防和治疗本病可以有效延缓其进展。目前西医治疗本病疗效不甚理想,中医药或中西医结合治疗有望提高疗效。现将近年来中医针对慢性肾炎主要临床表现的诊治情况概述如下。

1 蛋白尿

麻金木认为蛋白尿的形成与脾肾两虚有关:脾虚则健运失司,清浊不分;肾虚则气化无权,封藏失司,以致精微下泄。

故其临床将健脾益气、活血清利作为蛋白尿根本治法^[1]。任云城等^[2]则认为正虚邪实是导致蛋白尿的根本原因。其中以湿热、瘀血症型最为常见。王亿平等^[3]用人参汤(方用红参、茯苓、熟地、五味子、桑螵蛸、鸡内金、川芎等)治疗蛋白尿,总有效率为85.7%。胡顺金等^[4]认为“脾虚、湿停、血瘀”为该病中医基本病机的特点,使用肾康冲剂(黄芪、薏苡仁、白花蛇舌草、白茅根、益母草等)治疗该病,结果显示患者24h尿蛋白定量可明显下降,降尿蛋白有效率为86.67%。杨保成^[5]在相对固定组方(黄芪12g,白术、茯苓、山萸肉、生山楂、芡实、五味子、女贞子各10g,生山药15g,玉米须15~20g,乌梅炭3~5g)的基础上,将慢性肾炎蛋白尿分为脾虚湿困、脾肾阳虚、肝肾阴虚3型进行辨证论治,结果疗效显著。邵燕燕^[6]采用健脾利湿益肾固涩法治疗慢性肾炎蛋白尿42例,药用益智仁、川牛膝、

浓度的升高,SGC-7901细胞中Fas表达增多,表明巴豆生物碱能上调SGC-7901细胞Fas的表达,并呈浓度依赖性,说明巴豆生物碱诱导SGC-7901细胞凋亡的作用机制可能与此相关。

胃癌的发生与发展受多基因、多途径的调控,各种因素可协同或拮抗发挥调节作用。本研究从体外角度发现巴豆生物碱对SGC-7901细胞的增殖抑制及诱导凋亡作用与其下调PCNA、Ki-67表达及上调bax、Fas表达相关。这为我们进一步研究巴豆生物碱抗肿瘤分子机制打下基础,并为临床应用提供了一定的依据,在胃癌的治疗方面,巴豆生物碱可能成为一种有潜在应用前景的抗肿瘤药物。

5 参考文献

- [1] 狄渊,许冬青,王明艳,等.巴豆生物碱对人胃癌细胞SGC-7901 p53基因表达的影响.辽宁中医杂志,2003,30(12):1019
- [2] 赵凤鸣,许冬青,王明艳,等.巴豆生物碱对人胃癌细胞SGC-7901的诱导分化作用研究.中医药学刊,2005,23(1):134
- [3] 许冬青,王明艳,翟融.巴豆生物碱对人胃癌细胞SGC-7901 Fas基因表达影响的研究.中医药学报,2005,33(2):9

- [4] 王明艳,翟融,许冬青.巴豆生物碱诱导人胃癌细胞SGC-7901细胞凋亡的研究.南京中医药大学学报,2010,26(5):368
- [5] 钱金方.增殖细胞核抗原在常见肿瘤的研究进展.肿瘤基础与临床,2008,21(1):86
- [6] 马文群,李利敏,宋国智.增殖细胞核抗原与肿瘤关系的研究进展.河北医药,2011,33(4):600
- [7] 杨连君.bcl-2、bax与肿瘤细胞凋亡.中国肿瘤生物治疗杂志,2003,10(3):232
- [8] Jrgensmeier JM,Xie Z,Deveraux Q,et al.Bax directly induces release of cytochrome C from isolated mitochondria.Proc Natl Acad Sci USA,1998,95(9):4997
- [9] 陆茜,李宇丽.Fas介导细胞凋亡及相关免疫调节作用.细胞生物学杂志,2006,28(4):543

第一作者:宋红春(1987-),女,硕士研究生,研究方向:中医内科脾胃病。

通讯作者:谷雨,guyugg@hotmail.com

收稿日期:2014-01-26

编辑:吴宁