

猫人参醇提取物对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响

曾志^{1,2} 王霞² 张丹² 魏睦新^{1,2}

(1.南京医科大学第一附属医院,江苏南京 210029; 2.南京医科大学中西医结合研究所,江苏南京 210029)

摘要 目的:探讨猫人参醇提取物对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响及其作用机制。方法:制备猫人参醇提取物。以人胃癌细胞系 SGC-7901 细胞株为研究对象,将不同浓度的猫人参醇提取物作用于 SGC-7901 细胞,通过 CCK8 法检测猫人参醇提取物对胃癌细胞增殖的影响。采用 DAPI 荧光染色,观察经 100mg/mL 猫人参醇提取物处理后 SGC-7901 细胞形态学的变化。结果:CCK8 实验结果显示,与阴性对照组比较,经猫人参醇提取物 100、200mg/mL 作用 12、24、48h 后,SGC-7901 细胞存活率显著降低($P<0.05$)。经过 100mg/ml 猫人参醇提取物处理 24h 后 SGC-7901 细胞贴壁疏松,密度变低,细胞变扁长,形状不规则,经过 DAPI 染色后可见细胞核边缘残缺,染色质聚集,并伴有细胞核固缩或断裂现象及出现凋亡小体。结论:猫人参醇提取物对胃癌细胞 7901 增殖具有抑制作用,是具有治疗前景的抗肿瘤药物。

关键词 猫人参 植物提取物 胃癌 SGC-7901 细胞增殖 病理学

中图分类号 R282.710.5 文献标志码 A 文章编号 1672-397X(2015)10-0077-03

胃癌是临床上常见的消化道恶性肿瘤之一,在我国发病率呈上升趋势。每年世界范围内近 100 万人被诊断为胃癌,70 万人死于胃癌^[1],致死率高于其他临床常见的恶性肿瘤,排在我国恶性肿瘤和致死因素的第四位^[2]。猫人参是猕猴桃科植物对萼猕猴桃(*Actinidia valvata*)或大籽猕猴桃(*A. macrosperma*)的干燥根及粗茎,其中对萼猕猴桃产自安徽、浙江、湖北、湖南等省份,福建省建宁等地亦有分布,大籽猕猴桃产于广东、湖北、江西、浙江、江苏、安徽等省份^[3]。在民间,猫人参用于治疗深部脓肿、骨髓炎、风湿痹痛、疮疡肿毒等常见外科疾病。现代医学临床主要用其治疗消化道肿瘤、原发性肝癌以及肺癌^[4]。既往研究表明,单味猫人参注射液对肝癌、白血病及结肠癌细胞株有一定的抑制作用,从猫人参中提取分离而来的蒽醌类和皂苷类的复合物均被证实有抗肿瘤活性,能够抑制小鼠皮下移植瘤的生长。本实验通过猫人参醇提取物作用于 SGC-7901 细胞,探讨其抗癌作用和机制。

1 实验材料

1.1 药物与试剂 RPMI-1640 培养基(Gibco 公司),胎牛血清 FBS 及胰酶蛋白(HyClone 公司),人胃癌细胞株 SGC-7901(中科院上海细胞库),CCK8(Gibco 公司),细胞计数 CCK8 试剂盒(碧云天生物科技有限公司),磷酸盐缓冲液 PBS(北京中衫金桥生物技术有限公司)。猫人参醇提取物参考张亚妮

等^[5]的提取方法,由江苏省医药公司提供。

1.2 仪器 酶标仪(美国,Thermo Scientific Multiskan FC),二氧化碳培养箱(美国,Thermo Fisher),倒置相差显微镜(德国,徕卡 DM500/DM750 显微镜),96 孔培养板(美国 Corning 公司),Mill-Q 型超纯水机(美国 Millipore 公司)。

2 实验方法

2.1 猫人参醇提取物的制备 取猫人参药材粗粉 20kg(本研究所使用的猫人参产自江苏省,选用大籽猕猴桃干燥根及根茎部分),购自江苏省药物研究所,经江苏省药物研究所鉴定,符合《江苏省中药饮片炮制规范》。猫人参粗粉用 8 倍体积 80%乙醇作为提取溶剂回流提取 3 次,每次 1h,合并提取液,滤过得醇提取液,减压回收溶剂得浸膏。将浸膏冷冻干燥呈粉末,精密称取干燥粉末,用培养基制成 10mg/mL 母液,过 0.22 μ m 微孔滤器过滤除菌,4 $^{\circ}$ C 备用。

2.2 细胞培养 人胃癌细胞株 SGC-7901 在含 10%的胎牛血清 1640、100U/mL 青霉素和 100U/mL 链霉素的培养液中生长,并置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 相对湿度度的孵育箱中培养,细胞呈贴壁生长,取对数生长期的细胞进行实验。

2.3 CCK8 法检测肿瘤细胞存活率 选取对数生长期 SGC-7901 细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化制成单细胞悬液后,将细胞密度调整为 5 \times 10⁴ 个/mL,每孔接种 100 μ L 细胞悬液于 96 孔板中,置于 37 $^{\circ}$ C、5%

基金项目:江苏省中医药局资助项目(YB2015163,LZ13247)

CO₂ 孵育箱中过夜,至细胞完全贴壁,分别加入猫人参醇提取物稀释液,浓度分别为 50、100、200mg/mL,每组设 5 个复孔,对照组加入相同体积培养基,置于 37℃、5%CO₂ 饱和湿度下的培养箱内继续培养 12、24、48h^[6]。终止培养前 1h,每孔加入 100μL CCK8 溶液,混匀,在细胞培养箱继续孵育 1h 后,弃上清,加入 PBS,室温低速震荡 10min,待结晶物溶解后,以酶标免疫测定仪测定波长 490nm 处的吸光度 (A),计算细胞存活率。

肿瘤细胞存活率(%)=(A 实验组/A 空白对照组)×100%

2.4 DAPI 染色观测肿瘤细胞核的形态学变化 将对数期 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板中,培养过夜,待细胞贴壁生长良好,加入终浓度为 100mg/mL 的猫人参醇提取物,对照组用等体积的 PBS 代替,37℃、5%CO₂ 培养 24h 后收集细胞,等预冷的 PBS 洗涤后重悬于固定液中 30min,之后将悬液低速离心,收集沉淀,用同样缓冲溶液洗涤 2 次后将细胞悬液滴在载玻片上,用 2g/mL 的 DAPI 避光染色 15min,荧光显微镜下观察细胞核的形态学变化。

2.5 统计学方法 所有数据用 3 次独立实验的平均值表示,应用 SPSS13.0 统计软件进行分析,实验数据用($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料采用 χ^2 检验,计量资料组间比较采用方差分析。组间两两比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 不同浓度猫人参醇提取物作用不同时间对肿瘤细胞生存率的影响 见表 1。100、200mg/mL 猫人参醇提取物作用 12、24、48h 后,肿瘤细胞 SGC-7901 存活率明显低于 PBS 对照组 ($P < 0.05$),50mg/mL 猫人参醇提取物降低肿瘤细胞存活率的效果不明显,提示猫人参醇提取物对 SGC-7901 存在浓度—效应关系。随着作用时间的延长,猫人参醇提取物对肿瘤细胞 SGC-7901 增殖的抑制作用越强。

表 1 猫人参醇提取物对肿瘤细胞 SGC-7901 存活率的影响 %

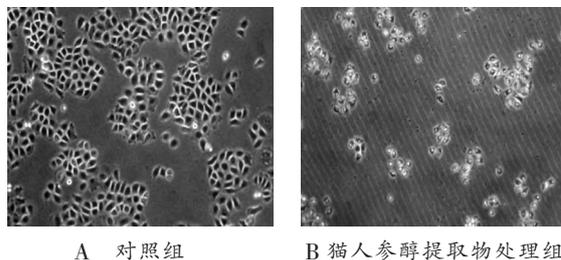
| 组别 | 样本数 | 作用时间(h) | | |
|--------------------|-----|---------|--------|--------|
| | | 12h | 24h | 48h |
| 猫人参醇提取物 50mg/mL 组 | 5 | 88.41 | 87.54 | 86.37 |
| 猫人参醇提取物 100mg/mL 组 | 5 | 60.89* | 55.12* | 51.11* |
| 猫人参醇提取物 200mg/mL 组 | 5 | 44.64* | 42.10* | 37.18* |
| PBS 对照组 | 5 | 92.33 | 91.21 | 89.92 |

注:*与 PBS 对照组比较, $P < 0.05$ 。

3.2 猫人参醇提取物对肿瘤细胞形态学的影响

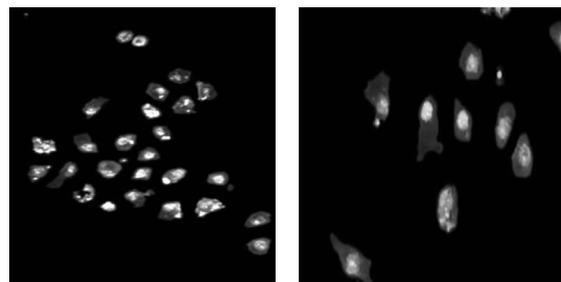
由图 1 可见,对照组细胞生长旺盛,贴壁情况较好,处于正常对数生长阶段;而经过 100mg/mL 猫人参醇提取物处理 24h 后细胞形态发生了较大变化,贴

壁疏松,密度变低,细胞变扁长,形状不规则。由图 2 可见,经 DAPI 染色后,100mg/mL 猫人参醇提取物处理 24h 后肿瘤细胞核边缘残缺,染色质聚集,并伴有细胞核固缩或断裂现象及出现凋亡小体,为细胞凋亡的典型特征;对照组细胞的细胞核近似椭圆形,边缘较清晰,染色均匀。



A 对照组 B 猫人参醇提取物处理组

图 1 各组 SGC-7901 细胞(×100)



A 对照组 B 猫人参醇提取物处理组

图 2 DAPI 荧光染色后各组 SGC-7901 细胞形态(×200)

4 讨论

中医药对于肿瘤的治疗有其独特的优势,如减轻化疗毒副作用、治疗并发症等。猫人参作为民间及民族常用中药,文献报道其有一定的抗肿瘤作用^[7]。浙江大学对猫人参有效成分研究发现,其中富含人体所需的各种无机元素,根茎部位含有丰富的氨基酸,特别是一些具有特殊生理活性的氨基酸含量较高,猫人参乙醇提取物的醋酸乙酯萃取部分得 24-三羟基-12 烯-齐墩果烷、积雪草酸、儿茶素、isotachioside、表儿茶素、熊果酸、胡萝卜苷、β-谷甾醇等有效成分。文献报道从猫人参中提取的单体化合物科罗索酸(CRA)在体外对人结肠癌细胞 HCT-8、K-562 白血病细胞、人宫颈腺癌 Hela 细胞、人胃癌细胞 SNU-601 等具有明显抑制作用,能诱导细胞周期阻滞,导致细胞凋亡^[8-9]。

本研究采用人胃癌 SGC-7901 细胞为实验细胞株进行体外实验,观察了猫人参醇提取物对其增殖的抑制作用以及对其形态学的改变。结果显示,猫人参醇提取物对 SGC-7901 细胞的增殖有较明显的抑制作用,且作用程度与浓度、作用时间相关。DAPI 荧光检测到 SGC-7901 细胞在猫人参醇提取物的作用下,形态学发生明显变化,出现细胞凋亡的典型

(下转第 82 页)

- 态疗效观察.辽宁中医杂志,2007,34(11):1574
- [6] 李增图,杨丽婷.掌振神阙法治疗心脾两虚型失眠临床观察.浙江中西医结合杂志,2013(10):785,836
- [7] 兰天,郭群英.自我指压穴位按摩治疗失眠症的疗效观察.河北中医,2009,31(11):1681
- [8] 李志永.按摩治疗失眠应注重补泻手法的运用.临床合理用药杂志,2012,5(31):122
- [9] 白伍泉,杨栋.辨证选穴按摩治疗失眠探讨.按摩与导引,2006,22(10):29
- [10] 柳汉杰,张欣.抓痧调神法推拿干预失眠患者多导睡眠图(PSG)特征的临床观察.中国民族民间医药,2011,20(14):13
- [11] 贺旭林.经穴推拿治疗失眠的临床观察.湖北中医杂志,2012,34(1):63
- [12] 李成人.不同推拿方法治疗失眠症的临床对比观察.中医临床研究,2011,3(16):99
- [13] 刘幸.浅析中医推拿点穴治疗心脾两虚型失眠的疗效观察.中国民康医学,2014(15):92
- [14] 黄曼博.按摩手法治疗阴虚火旺型不寐的临床观察.北京中医药,2008,27(4):281
- [15] 周运峰,魏玉龙,张璞璘,等.三部推拿法治疗心脾两虚型不寐:多中心对照研究.中国针灸,2006,26(6):385
- [16] 刘鹏,韩永和.健脾安神推拿法治疗心脾两虚失眠30例.吉林中医药,2007,27(6):43
- [17] 赵铎,张媛媛,朱立国,等.通脉调神手法干预心理生理性失眠与血中5-羟色胺的相关性研究.浙江中医药大学学报,2013,37(7):909
- [18] 蔡俊萍,冯睿,张雅丽,等.引阳入阴推拿配合气息导引法对失眠患者的影响.上海护理,2011,11(2):34
- [19] 罗仁瀚,源援基,谭金庆,等.按摩治疗亚健康状态下的失眠症疗效观察.按摩与导引,2005,21(2):6
- [20] 李明君.中医推拿治疗失眠的疗效分析.中国医药指南,2012,10(1):223
- [21] 唐庆,杜进璇,白雪,等.穴位按摩联合脑反射仪治疗失眠症的临床研究.新疆医学,2012,42(10):70
- [22] 宋鸿权,魏晖,徐勇刚,等.点穴推拿治疗失眠症的临床观察.中华中医药学刊,2007,25(5):1065
- [23] 何育凤,黄锦军,赖耀铭,等.推拿手法治疗失眠49例临床观察.江苏中医药,2009,41(6):49
- [24] 吕明,刘晓艳.推拿二步七法治疗失眠(肾阴虚型)临床研究.长春中医药大学学报,2012,28(5):859
- [25] 吕明,刘晓艳.推拿二步八法治疗失眠的临床研究.南京中医药大学学报,2010,26(3):236
- [26] 王永泉,刘爱华.从营卫运行理论探讨背部推拿治疗失眠症的机制.中医药导报,2013(3):72
- [27] 王继红,林国华.灵龟八法保健推拿术治疗人体亚健康状态120例疗效观察.按摩与导引,2006,22(11):2
- [28] 邱智兴,赵志勇,夏惠明,等.夏惠明教授内功推拿治疗失眠经验.云南中医中药杂志,2010,31(3):1
- [29] 伦轼芳,庞军,雷龙鸣,等.足反射疗法对亚健康状态调理作用的临床观察.辽宁中医杂志,2008(12):1910
- [30] 沈飞珍,徐双双.全息足底按摩对失眠症患者睡眠质量的影响.中国中医药科技,2013(5):514
- 第一作者:**张怡洁(1991—),女,硕士研究生,中医内科学专业。
- 通讯作者:**赵毅,本科学历,教授,硕士生导师。
tuinazhao@163.com
- 收稿日期:2015-04-14
- 编辑:王沁凯 吕慰秋

(上接第78页)

特征。下一步拟从细胞凋亡角度进一步阐明胃癌中医理论本质,揭示猫人参醇提取物对胃癌的作用机制及有效靶点。

参考文献

- [1] 王霞,魏睦新,刘皓,等.猫人参提取物对亚硝基胍诱发的胃癌发生的预防作用.时珍国医国药,2014,25(11):2649
- [2] Shi Y,Zhou Y.The rele of surgery in the treatment of gastric cancer. J Surg Oncol,2010,101(8):678
- [3] 浙江省食品药品监督管理局.浙江省中药炮制规范.杭州:浙江科学技术出版社,2006:99
- [4] 陈豪,潘坤官,何丽君.抗癌中药猫人参研究概况.海峡药学,2011,23(12):9
- [5] 张亚妮,姜远英.猫人参抗肿瘤有效部位的筛选及相关实验研究.上海:第二军医大学,2005
- [6] 张玲艳,高翔,王晓玲.苕草的体外抗肿瘤活性研究.中国民族民间医药,2015(8):33
- [7] 曲刚,李天文,崔洪斌,等.植物甾醇抑制SGC-7901胃癌细胞生长和诱导DNA损伤的研究.黑龙江八一农垦大学学报,2008,20(1):66
- [8] Ahm Ks,Hahm MS,Park EJ,et al. Corosolic acid isolated from the fruit of Crataegus pinnatifida var. psilosa is a protein kinase C inhibitor as well as a cytotoxic agent. Planta Med,1988,64(50):468
- [9] Xu Ye,Ge RL,Du J,et al. Corosolic acid induces apoptosis through mitochondrial pathway and caspases activation in human cervix adenocarcinoma HeLa cells. Cancer Lett,2009,284(4):229
- 第一作者:**曾志(1989—),女,硕士研究生,中医内科学专业中西医结合消化方向。
- 通讯作者:**魏睦新,医学博士,教授,主任医师,博士研究生导师。weimuxin@njmu.edu.cn
- 收稿日期:2015-07-01
- 编辑:吴宁