

· 基础研究 ·

百合提取物对胃癌细胞 SGC - 7901 增殖和凋亡的影响

陈雪梅, 黄兰燕, 刘如欲, 白 雨, 席 亮, 王爱红*

(延安大学医学院, 延安市肿瘤防治重点实验室, 陕西 延安 716000)

摘要:目的 初探百合的甲醇提取物、百合总生物碱对人胃癌 SGC - 7901 细胞增殖和凋亡的影响。方法 不同浓度的百合甲醇提取物、百合总生物碱作用 SGC - 7901 细胞, MTT 法检测 SGC - 7901 细胞的生长抑制率; 荧光显微镜观察 SGC - 7901 细胞的形态变化; 流式细胞仪检测 SGC - 7901 细胞周期改变及其凋亡率。结果 随着百合甲醇提取物、百合总生物碱作用 SGC - 7901 细胞的时间、浓度递增, 抑制 SGC - 7901 细胞增殖的作用越明显, 百合甲醇提取物最大浓度的抑制率可达到 98.32%; 百合总生物碱最大浓度的抑制率可达到 91.93%, 细胞逐渐失去正常的细胞形态, 细胞边缘不整齐, 细胞发生皱缩; 阻滞细胞周期于 G2/M 期; 可以诱导细胞的凋亡。结论 百合甲醇提取物、百合总生物碱阻滞 SGC - 7901 细胞于 G2/M 期, 诱导 SGC - 7901 细胞凋亡是抑制 SGC - 7901 细胞增殖的主要机制之一。

关键词: 生物碱; 胃癌细胞; 细胞周期; 凋亡

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1672 - 2639(2018)01 - 0008 - 06

The effect of extracts from *Lilium brownii* var. *viridulum* on proliferation and apoptosis of gastric carcinoma SGC - 7901 cells

CHEN Xue-mei, HUANG Lan-yan, LIU Ru-yu, BAI Yu, XI Liang, WANG Ai-hong*

(Medical College of Yan'an University, Yan'an Laboratory of Cancer Prevention and Control Research, Yan'an 716000, China)

Abstract: Objective The present study is to investigate the effect of carbinol extracts and alkaloids from *Lilium brownii* var. *viridulum* on the proliferation and apoptosis of SGC - 7901 cells. **Methods** SGC - 7901 cells were incubated with different concentrations of carbinol extract or alkaloid. MTT assay was used to measure the inhibition rate of SGC - 7901 cell proliferation. Fluorescence microscopes were used to observe morphological changes of SGC - 7901 cells. Flow cytometer was employed to detect cell cycle and apoptosis of SGC - 7901 cells. **Results** Inhibition of SGC - 7901 cell proliferation was enhanced as the increase of drug concentrations and the elapse of time. Treatment with alkaloid or carbinol extract deteriorated the morphology of SGC - 7901 cells in a dose - dependent manner. Alkaloid or carbinol extract arrested SGC - 7901 cells in G2/M phase. Treatment with alkaloid or carbinol extract induced apoptosis of SGC - 7901 cells in a dose - dependent manner. **Conclusion** The present study demonstrates that alkaloids and carbinol extracts from *Lilium brownii* var. *viridulum* inhibit the proliferation of gastric carcinoma SGC - 7901 cells by arresting the cells in G2/M phase. The induction of SGC - 7901 cell apoptosis may be an important mechanism.

Key words: Alkaloid; Gastric carcinoma; Cell cycle; Apoptosis

基金项目: 陕西省教育厅项目(16JK1859); 国家级大学生创新创业训练计划项目(201510719259); 2015 年省级大学生创新创业训练计划项目(1404)

作者简介: 陈雪梅(1993—), 女, 云南大理人, 延安大学医学院。研究方向: 营养与肿瘤。

* **通讯作者:** 王爱红(1973—), 女, 河南沁阳人, 博士, 副教授。研究方向: 营养与肿瘤。E - mail: aihong - wang@sohu.com

胃癌 (Gastric carcinoma) 是世界范围内严重影响人类生命健康的最常见恶性肿瘤之一^[1], 中国是胃癌的高发国家之一, 其病死率位居所有恶性肿瘤的第 1 位^[2], 由于胃癌发现率较低, 根治手术率较低, 即使在临床上发现早, 经手术治疗, 术后的复发、转移率也非常高^[3]。胃癌对于传统的放射治疗敏感性较差, 化学药物治疗在整个胃癌治疗中就占据了重要的地位, 但有效的抗胃癌药物不多, 大多都有一定的毒性, 实际疗效与期望又相差甚远。目前中药治疗肿瘤是我国在肿瘤治疗上的一大特色, 由于中药及其生物有效活性成分具有毒副作用低、不良反应少、没有残留、药理作用独特等优点^[4], 显示出了明显的优势, 中药及其有效成分抗肿瘤的机制研究是国内目前研究的热点之一。百合是很常见的植物, 除了观赏之外还有很好的药用价值^[5], 比如百合中一种成分秋水仙碱就被证实具有抗肿瘤作用。现已有部分文献报道百合的某些有效成分具有抗肿瘤的作用^[6], 但百合对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡影响的研究鲜见有报道, 因此本文初步研究百合的甲醇提取物、百合总生物碱对人胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用及其可能的机制。

1 材料与方 法

1.1 细胞株

人胃癌 SGC-7901 细胞购买于西安交通大学医学院消化实验研究院, 由延安大学医学院中心实验室保存。

1.2 实验药物

本次实验所用百合由西北农林科技大学张延龙教授提供, 百合甲醇提取物、百合总生物碱的提取方法参照文献—百合化学成分及其提取方法研究进展^[3]。百合甲醇提取物、总百合总生物碱的提取均采用有机溶剂甲醇提取法。百合甲醇提取物的浓度为 40 g/L, 百合总生物碱的浓度为 14 g/L, 所提取药物用 0.22 μm 的一次性针头过滤器过滤除菌, 放在 -20℃ 冰箱保存, 备用。

1.3 细胞培养试剂

胎牛血清 (FBS) 购于杭州四季青公司。胰蛋白酶和 RPMI-1640 培养基购于赛默飞世尔公司, 碘化丙啶 (PI) 和细胞级二甲基亚砜 (DMSO) 购于美国 Sigma 公司, 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购于北京索莱宝公司, 普通二甲基亚砜 (DMSO) 购于天津科密欧公司, AnnexinV-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购于碧云天公司, PBS 缓冲液购于西安热默尔生

物科技有限公司。

1.4 主要仪器设备

超净工作台 SW-CJ-2D、CO₂ 培养箱、酶标仪 Model680、微量移液器、倒置显微镜 CKX41、荧光显微镜 E600、纯水仪、流式细胞仪。

1.5 实验方法

1.5.1 SGC-7901 细胞的培养 复苏 SGC-7901 细胞株, 培养基为 RPMI-1640, 含有 10% 的胎牛血清、100 μg/mL 青霉素及 100 μg/mL 链霉素, 放于 37℃、5% CO₂、湿度饱和的无菌细胞培养箱中常规培养, 每 48 h 更换培养基一次。当 SGC-7901 细胞生长到 80% 时, 加 2 mL PBS 漂洗两次, 加入 0.25% 胰蛋白酶 0.5 mL 消化, 当细胞之间的间隙变大, 细胞开始变圆, 及时终止消化, 吸弃胰酶, 加入 RPMI-1640 培养基 2 mL 吹打, 将细胞悬液分装到两个培养瓶中, 每瓶加培养基 6 mL, 消化传代培养。等到细胞长到对数期的时候, 进行实验研究。

1.5.2 MTT 比色法检测 细胞增殖抑制率用 RPMI-1640 培养基调整单细胞悬液浓度, 使其细胞浓度达到 1×10^5 /mL, 96 孔板的每孔加入单细胞悬液 100 μL, 培养 24 h 后, 倒置光学显微镜下观察细胞均已经贴壁, 用移液器轻微吸尽旧的 RPMI-1640 培养基, 添加新的 RPMI-1640 培养基。实验设有空白组、对照组、甲醇对照组、实验组。空白组只加入含 5% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 孔内没有细胞; 对照组加入含 5% 胎牛血清 RPMI-1640 培养基, 孔内含有细胞; 甲醇对照组的浓度分别为 3.75%、4%; 实验组中的百合甲醇提取物浓度包括 0.8 g/L、0.9 g/L、1.0 g/L、1.1 g/L、1.2 g/L、1.3 g/L、1.4 g/L、1.5 g/L、1.6 g/L; 百合总百合总生物碱浓度包括 0.05 g/L、0.075 g/L、0.1 g/L、0.125 g/L、0.15 g/L, 每孔 200 μL, 每组设有 6 个复孔, 放置于细胞培养箱中继续培养 24 h、48 h、72 h 后, 每孔添加 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μL, 然后继续培养 4 h 后, 吸弃上清液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 在微量振荡器上震荡混匀 10~15 s, 酶标仪检测每个孔的吸光度值 (波长为 490 nm), 空白组调零, 记录对照组、甲醇对照组及各个实验组的 A₄₉₀。

细胞增殖抑制率 = (对照组 A₄₉₀ - 实验组 A₄₉₀) / 对照组 A₄₉₀ × 100%。

以上的实验重复三次, 取其平均值, 然后计算不同浓度、不同时间下百合甲醇提取物、百合总生物碱对 SGC-7901 细胞生长的抑制率。

1.5.3 细胞形态学的观察 取对数生长期的 SGC

-7901 细胞,调整浓度为 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种于六孔板内,每孔 2 mL,培养箱中培养到细胞贴壁后,吸出旧培养基,加入新的培养基和含药培养基,对照组加入含 5% 胎牛血清的 RPMI - 1640 培养基,甲醇对照组的甲醇浓度为 4%,实验组百合甲醇提取物浓度分别为 0.9 g/L、1.1 g/L、1.4 g/L,百合总生物碱浓度分别为 0.05 g/L、0.1 g/L、0.15 g/L,每孔 2 mL,继续培养 24 h、48 h、72 h 后,先在倒置相差显微镜下观察并照相,然后用 PBS 洗 3 次,将盖玻片移至载玻片上,滴加已经配置好的 AO/EB 染液,在荧光显微镜下观察并照相。

1.5.4 流式细胞仪分析细胞周期 将生长状态良好的 SGC - 7901 细胞接种于 25 mL 培养瓶中,培养 24 h 后,吸弃旧的培养基,更换为含 0.5% 胎牛血清的 RPMI - 1640 培养基,继续培养 24 h 后,再次更换培养基,对照组加入含 5% 胎牛血清的 RPMI - 1640 培养基,实验组加入含药培养基(用 5% 胎牛血清的 RPMI - 1640 培养基配置含药培养基),百合甲醇提取物和百合总生物碱浓度同 1.5.3 项下的处理一样。细胞继续培养 48 h 后,收集细胞悬液,用 PBS 洗 3 次,然后加入 PI 染液(含 50 mg/L PI, 10 mg/L RnaseA, 0.1% TritonX - 100, 0.1% 柠檬酸钠和 0.5% NaCl)。在室温下避光染色 30 min,用 400 目的筛网过滤,样品用流式细胞仪检测细胞周期的分布,实验重复三次。

1.5.5 Annexin V - FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率 SGC - 7901 细胞处理方法同 1.5.4,收集好的细胞加入 RNA 酶 50 μL (浓度为 0.5 mg/mL),37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 min,1000 rpm 离心 5 min 弃上清,用 PBS 洗 3 次,加入 10 μL 的 AnnexinV - FITC 试剂混匀,在室温避光孵育 30min,1000rpm 离心 5min 弃上清,再加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的碘化丙啶(PI)染色液 10 μL ,样品用流式细胞仪检测细胞的凋亡率,实验重复三次。

1.6 统计学处理

实验数据采用统计学软件包 SPSS22.0 分析。实验数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,各组数据之间的比较用单因素方差分析,两两比较时采用 LSD - *t* 检验。 $P < 0.05$,差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 比色法检测不同浓度的百合甲醇提取物、百合总生物碱对 SGC - 7901 细胞增殖的影响

实验结果显示,甲醇对照组与对照组相比,差异无统计学意义($P > 0.05$),说明甲醇对细胞无影响(见图 1)。实验组与对照组相比,百合总生物碱

物碱不同浓度组、不同时间组之间抑制率相比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见图 2)。百合甲醇提取物不同浓度组、不同时间组之间抑制率相比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)(见图 3)。随着百合甲醇提取物及百合总生物碱的药物浓度加大、时间推移,抑制作用越明显。

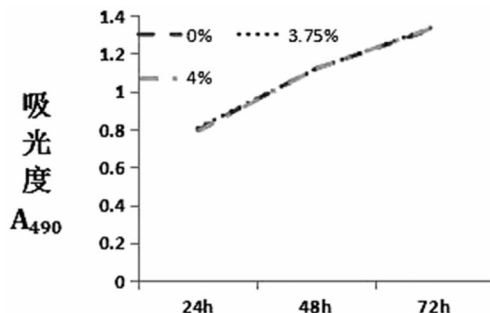


图 1 MTT 法测不同浓度甲醇对 SGC - 7901 细胞生长的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 12$)

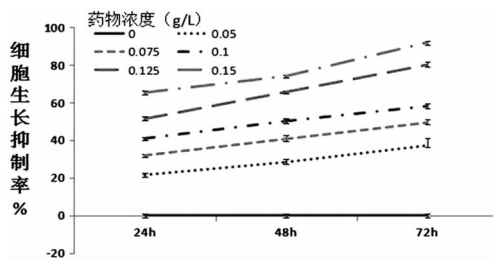


图 2 MTT 法测百合提取物生物碱对 SGC - 7901 细胞生长的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

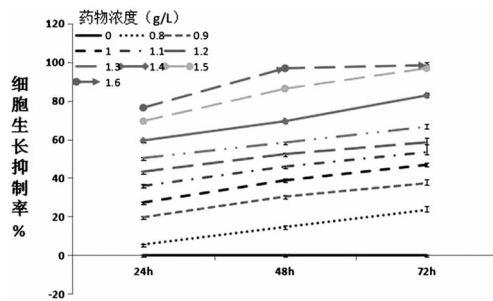
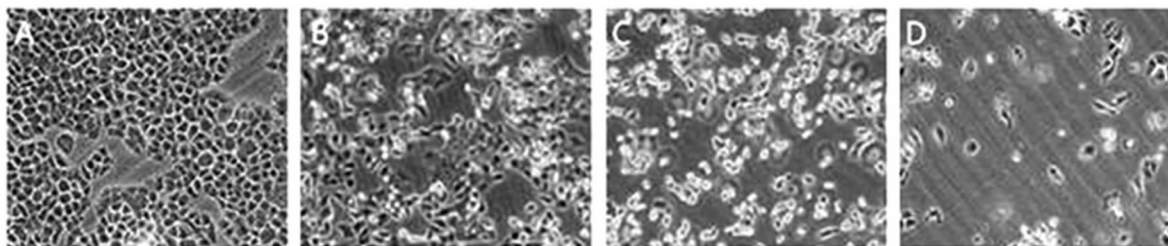


图 3 MTT 法测甲醇提取物对 SGC - 7901 细胞生长的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

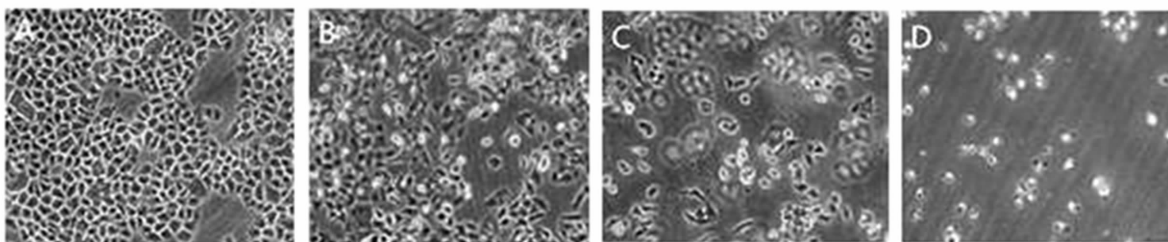
2.2 百合甲醇提取物、百合总生物碱作用 SGC - 7901 细胞 48 h 后的细胞形态变化

2.2.1 倒置相差显微镜观察 空白对照组 SGC - 7901 细胞饱满呈多边形,大小均一,细胞数量明显比较多,其增殖速度也快于加药组(见图 4A,彩图见封三)。实验组中的百合总生物碱、甲醇提取物作用 48 h 后的 SGC - 7901 细胞与对照组细胞相比,细胞生长缓慢,细胞形态改变,细胞的边缘不整齐,随着药物浓度加大,越来越明显(见图 4 和图 5,彩图见封三)。图 5A 为甲醇对照组,与对照组相比较,细胞形态并无明显改变。



A. Blank control B. 0.05 g/L alkaloid C. 0.1 g/L alkaloid D. 0.15g/L alkaloid

图4 倒置相差显微镜观察百合提取物生物碱作用 SGC-7901 细胞 48 h 的形态(×100)

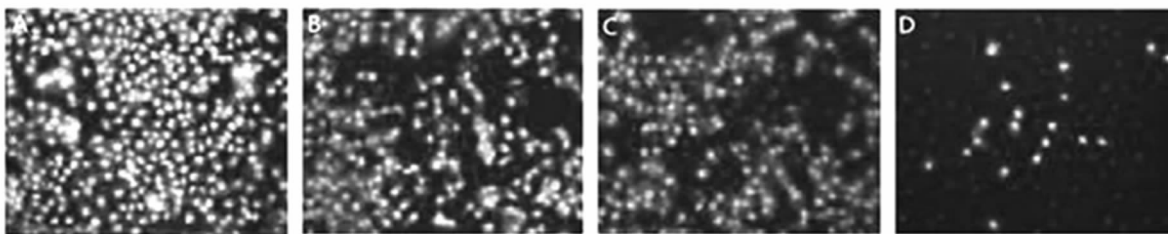


A. Carbinol control B. 0.9g/L extract C. 1.1 g/L extract D. 1.4 g/L extract

图5 倒置相差显微镜观察甲醇提取物作用 SGC-7901 细胞 48 h 的形态(×100)

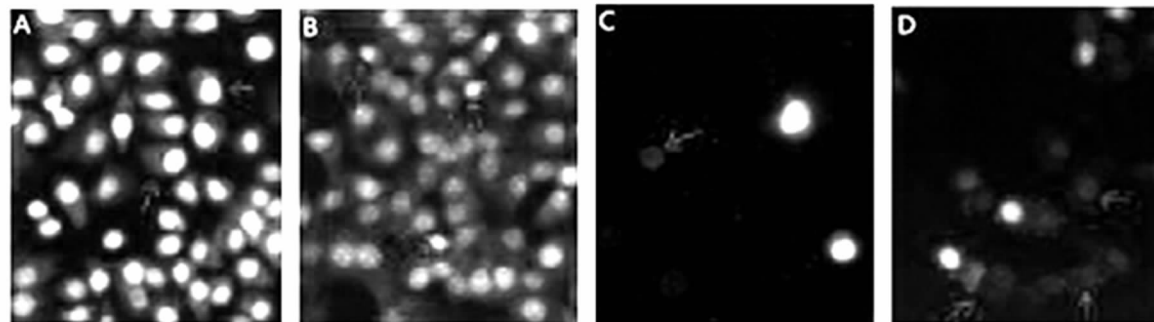
2.2.2 荧光显微镜观察 AO/EB 荧光染色后,对照组 SGC-7901 细胞状态良好,细胞大小均一,呈均匀的绿色荧光(见图 6A,彩图见封三)。实验组细胞与对照组细胞相比较,生长缓慢,出现红色荧光,随着药物浓度加大,越来越明显(见图 6 和图 7,彩图见封三)。图 7A 为甲醇对照组,与对照组相比较,细胞形态并无明显改变,呈均匀的绿色荧光。对照组,无明显的凋亡细胞(见图 8A,彩图见封三)。

实验组中可见早期凋亡的细胞,细胞核浓聚成新月形或颗粒状,着色为绿色,位于细胞的一侧(见图 8B,彩图见封三),药物浓度增大,早期凋亡和晚期凋亡的细胞也增多,晚期凋亡细胞的细胞核浓聚和偏向,着色为红色(见图 8C,彩图见封三),坏死细胞的体积变大,轮廓变得模糊不清,细胞核的着色为红色(见图 8D,彩图见封三)。



A. Blank control B. 0.05 g/L alkaloid C. 0.1 g/L alkaloid D. 0.15g/L alkaloid

图6 荧光显微镜观察百合提取物生物碱作用 SGC-7901 细胞 48 h 的形态(×100)



A. Carbinol control B. 0.9 g/L extract C. 1.1 g/L extract D. 1.4g/L extract

图7 荧光显微镜观察甲醇提取物作用 SGC-7901 细胞 48 h 的形态(×100)

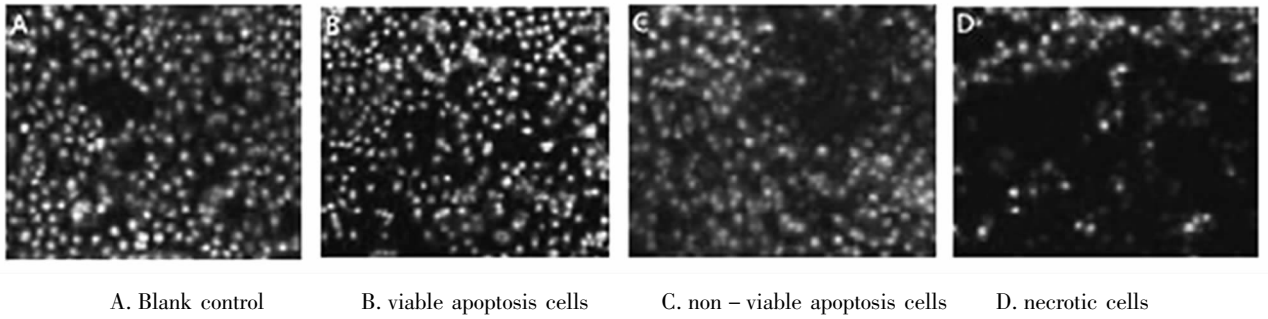


图 8 荧光显微镜观察百合提取物作用 SGC-7901 细胞 48h 的形态 (×200)

2.3 百合总生物碱、百合甲醇提取物对 SGC-7901 细胞周期的影响

细胞周期数据分析显示,百合总生物碱和百合甲醇提取物作用 SGC-7901 细胞 48 h 后,可将 SGC-7901 细胞阻滞在 G₂/M 期,并随着药物浓度的增大,细胞周期阻滞作用越明显,G₀/G₁ 期的细胞减少,而 G₂/M 期的细胞逐渐增多,与空白对照组比较具有显著的差异($P < 0.05$) (见图 9~10)。

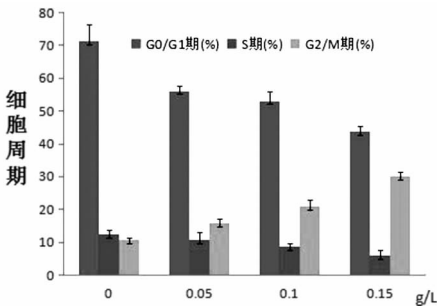


图 9 百合总生物碱对 SGC-7901 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

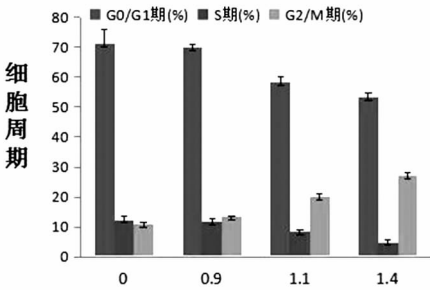
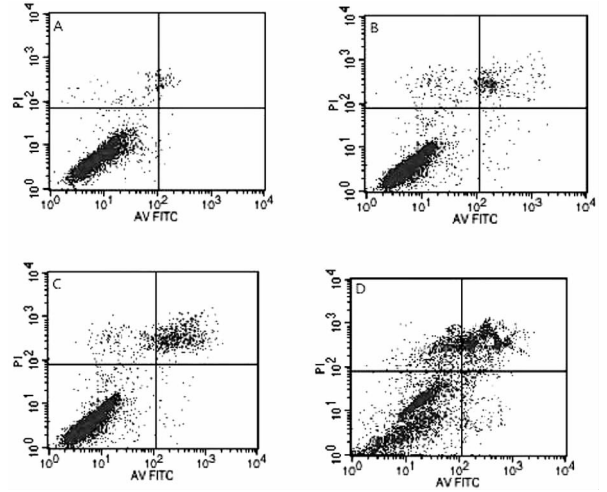


图 10 百合甲醇提取物对 SGC-7901 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

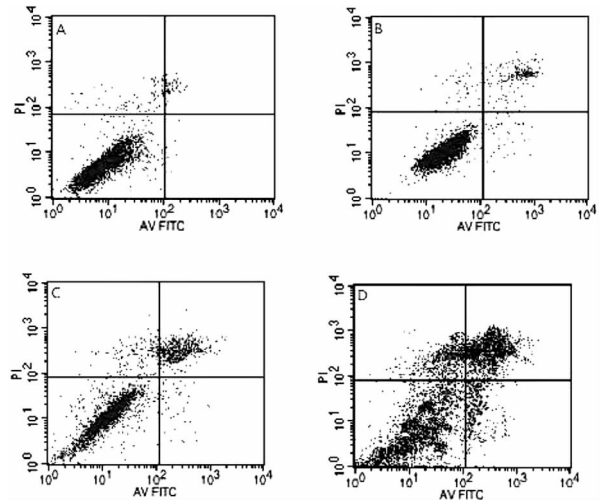
2.4 百合总生物碱、百合甲醇提取物对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测 SGC-7901 细胞的凋亡率的数据分析,SGC-7901 细胞的凋亡率与药物的剂量呈正比关系。随着药物浓度的增大,细胞凋亡率也增大,实验组的细胞凋亡率明显高于空白对照组的细胞凋亡率,同时各组别的细胞凋亡率具有统计学意义($P < 0.05$) (见图 11~12)。



注:A:空白对照组;B:生物碱 0.05 g/L 组
C:生物碱 0.1 g/L 组 D:生物碱 0.15 g/L 组

图 11 流式细胞术检测百合提取物生物碱作用 48 h 后对 SGC-7901 细胞凋亡的影响



A:空白对照组 B:甲醇提取物 0.9 g/L 组
C:甲醇提取物 1.1 g/L 组 D:甲醇提取物 1.4 g/L 组

图 12 流式细胞术检测甲醇提取物作用 48 h 后对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

3 讨论

有文献报道,中药及其生物活性有效成分具有

抗肿瘤的作用,中药在肿瘤的防治中可能有以下的作用:能增强机体的免疫力^[7]、激活胞内核因子 2 相关的因子、激活抗氧化的信号通路^[8]、下调 NF- κ B 的信号通路、影响细胞周期的分布^[9]、诱导肿瘤细胞的凋亡^[10]、影响肿瘤细胞端粒酶的活性及诱导肿瘤细胞向正常细胞方向分化^[11]等作用,研究表明中药在肿瘤的防治过程中的这些机制不是孤立的,而是联系紧密、相辅相成的。

细胞凋亡,是一个细胞自主的生理性的自我毁灭性死亡。它涉及到一系列基因的激活、表达、基因表达调控。细胞凋亡是为了能更好地适应生存环境而自发的一种死亡现象,如果细胞凋亡过程发生紊乱,可能直接或者间接的会导致包括肿瘤在内的多种疾病的发生^[12]。以前人们普遍认为化疗药物作用的发挥是利用细胞毒性直接杀伤肿瘤细胞,现在已认识到化疗药物的主要作用机制之一是诱导敏感的肿瘤细胞凋亡来发挥作用的^[13]。因此,现在的化疗药物研究方向之一为药物诱导细胞凋亡方面。据文献报道,含有百合的中药方剂已应用于多种癌症比如肺癌、淋巴瘤、食管癌、白血病、皮肤癌、宫颈癌的治疗过程中,百合中多糖、黄酮等一些有效活性成分抑制肿瘤细胞增殖,例如侯进等^[14]人实验研究得出百合多糖能抑制 MCF-7 细胞的增殖,阻滞细胞周期于 G₂ 期,百合多糖联合金雀异黄素可能影响 MCF-7 细胞的增殖、诱导细胞凋亡,可能涉及到多条信号转导通路。本研究结果显示,不同浓度的百合甲醇提取物、百合总生物碱作用 SGC-7901 细胞,时间越长,浓度越大,抑制作用越明显;细胞体积变小、核出现固缩;阻滞细胞于 G₂/M 期;诱导 SGC-7901 细胞凋亡,结合 MTT 实验数据分析,百合甲醇提取物、百合总生物碱对细胞可能还有直接的杀伤作用。百合提取物阻滞胃癌细胞于 G₂/M 期及诱导细胞凋亡的具体信号通路需要进一步研究。

国际上越来越倾向于从天然化合物中提取活性成分应用于肿瘤治疗,中草药应用于肿瘤的治疗是我国的一大特色,中草药具有毒性小、副作用少等优点,在肿瘤治疗上具有一定的优势,故对于中草药抗肿瘤作用的研究是非常有必要的。百合作为一种常见的中草药,含有的有效活性成分是否能抑制其他肿瘤细胞增殖、促进肿瘤细胞凋亡,还需要学者不断地进行探索、研究,使得百合在胃癌以及其他恶性肿瘤的治疗中发挥其最大的作用。

参考文献:

- [1] Liu X, Chen Z, Zhao X, et al. Effects of IGF2BP2, KCNQ1 and GCKR polymorphisms on clinical outcome in metastatic gastric cancer treated with EOF regimen [J]. *Pharmacogenomics*, 2015, 16(9): 959-970.
- [2] Obayashi N, Ohtsuka Y, Hosoi K, et al. Comparison of gene expression between pediatric and adult gastric mucosa with helicobacterpylori infection [J]. *Helicobacter*, 2016, 21(2): 114-123.
- [3] 彭程,周晓琛,敬黎,等. 百合化学成分及其提取方法研究进展 [J]. *西北民族大学学报(自然科学版)*, 2011, 32(04): 11-16.
- [4] Chen X, Guo J, Bao J, et al. The anticancer properties of *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen): a systematic review [J]. *Medicinal Research Reviews*, 2014, 34(4): 768.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 第 1 部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 129.
- [6] 李汾,袁秉祥,弥曼,等. 纯化百合多糖抗肿瘤作用和对荷瘤小鼠免疫功能的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(2): 188-189.
- [7] Mahoney KM, Freeman GJ, McDermott DF. The next immun-checkpoint inhibitors: PD-1/PD-L1 blockade in melanoma [J]. *Clinical Therapeutics*, 2015, 37(4): 764-782.
- [8] Geillinger KE, Kipp AP, Schink K, et al. Nrf2 regulates the expression of the peptide transporter PEPT1 in the human colon carcinoma cell line Caco-2 [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1840(6): 1747.
- [9] Li M, Yu X, Guo H, et al. Bufalin exerts antitumor effects by inducing cell cycle arrest and triggering apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Tumor Biol*, 2014, 35(3): 2461.
- [10] Yang H, Liu J, Dou QP. Targeting tumor proteasom with traditional Chinese medicine [J]. *Curr Drug Discov Technol*, 2010, 7(1): 46.
- [11] Ma H, Cheng L, Hao K, et al. Reversal effect of ST6GAL 1 on multidrug resistance in human leukemia by regulating the PI3K/Akt pathway and the expression of P-gp and MRP1 [J]. *PLoS one*, 2014, 9(1): 85113.
- [12] 岳原亦,张扬,张一奇,等. Caspase 家族与细胞凋亡 [J]. *中国医疗前沿*, 2011, 6(6): 25-26.
- [13] 马韬. 胃癌化疗与细胞凋亡研究进展 [J]. *国外医学消化系疾病分册*, 2003, 23(1): 15-18.
- [14] 侯进,李汾,李新华,等. 百合多糖联合金雀异黄素对人类乳腺癌细胞增殖的影响 [J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(1): 12-14.

[收稿日期 2017-11-27; 责任编辑 梁毅]