

氧化苦参碱诱导胃癌 BGC-823 细胞发生 caspase-12 依赖性内质网应激凋亡的机制研究



房伟, 马世勋, 马云涛, 詹渭鹏, 李渊, 李一平, 狐鸣

甘肃省人民医院普外一科(兰州 730000)

【摘要】 目的 研究氧化苦参碱对胃癌 BGC-823 细胞增殖和凋亡的影响, 并探讨内质网应激参与氧化苦参碱诱导胃癌细胞的凋亡情况并阐明其机制。方法 将对数生长期的胃癌 BGC-823 细胞分为对照组、单药组(用 10、30、60 和 90 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的氧化苦参碱处理)和联合组(各浓度的氧化苦参碱联合 2 $\mu\text{mol/L}$ 内质网应激抑制剂 salubrinal 处理)。用 MTT 法观察氧化苦参碱对胃癌 BGC-823 细胞生长的抑制作用, 用流式细胞仪分析氧化苦参碱诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡及其对细胞周期的影响, 用 Western blot 和 RT-PCR 法分别检测内质网应激标志分子 GRP78/Bip 和内质网应激介导凋亡分子 caspase-12 蛋白和基因的表达情况。结果 ① 与对照组比较, 氧化苦参碱能明显抑制胃癌 BGC-823 细胞生长且呈浓度-时间依赖性 ($P < 0.05$), 其 IC_{50} (48 h) 值为 $(59.5 \pm 0.5) \mu\text{mol/L}$; 与相应浓度单药组比较, 30、60 和 90 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱联合作用对细胞的抑制作用明显减弱 ($P < 0.05$)。② 与对照组比较, 随着氧化苦参碱浓度的增加, G_2/M 期细胞数和细胞凋亡率呈增加(或增高)趋势 ($P < 0.05$); 与 60 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱单药组比较, 60 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱联合组处理胃癌 BGC-823 细胞 48 h 后明显降低细胞凋亡率和减少 G_2/M 期细胞数 ($P < 0.05$)。③ 与对照组比较, 随着氧化苦参碱浓度的增加(除外 10 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱组 caspase-12 蛋白及基因), 单药组 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白及基因表达水平呈明显增高趋势 ($P < 0.05$); 与相应浓度单药组比较, 60 及 90 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱联合作用时胃癌 BGC-823 细胞中 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白及基因表达水平均明显降低 ($P < 0.05$)。结论 氧化苦参碱对人胃癌 BGC-823 细胞有明显的生长抑制作用, 该作用可能与 caspase-12 依赖性诱导凋亡及上调 GRP78/Bip 表达水平有关, 该结论需要进一步实验验证。

【关键词】 氧化苦参碱; 胃肿瘤; 凋亡; 内质网应激

Mechanism of caspase-12-dependent endoplasmic reticulum stress apoptosis induced by oxymatrine in gastric cancer BGC-823 cells

FANG Wei, MA Shixun, MA Yuntao, ZHAN Weipeng, LI Yuan, LI Yiping, HU Ming

Department of General Surgery 1, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou 730000, P. R. China

Corresponding author: MA Yuntao, Email: lzdxl20@sina.com

【Abstract】 Objective To study effects of oxymatrine on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line BGC-823 and explore role of endoplasmic reticulum stress in apoptosis of gastric cancer cells induced by oxymatrine and elucidate its mechanism. **Methods** The gastric cancer BGC-823 cells at the logarithmic phase were divided into a control group, oxymatrine alone group (oxymatrine at 10, 30, 60 and 90 $\mu\text{mol/L}$ concentrations), and combination group (oxymatrine at various concentrations combined with 2 $\mu\text{mol/L}$ endoplasmic reticulum stress inhibitor salubrinal). The MTT assay was used to observe the inhibitory effect of the oxymatrine on the growth of BGC-823 cells. The flow cytometry was used to analyze the apoptosis and cell cycle. The Western blot and RT-PCR methods were used to detect the expressions of GRP78/Bip and the caspase-12 protein and gene, respectively. **Results** ① Compared with the control group, the oxymatrine could significantly inhibit the growth of gastric cancer BGC-823 cells in a concentration-time dependent manner ($P < 0.05$) and its IC_{50} (48 h) value was $(59.5 \pm 0.5) \mu\text{mol/L}$. The inhibitory effect of the combination

DOI: 10.7507/1007-9424.201811043

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目(项目编号: 1508RJZA043)

通信作者: 马云涛, Email: lzdxl20@sina.com

group of 30, 60, and 90 $\mu\text{mol/L}$ oxymatrine was significantly weakened as compared with the the corresponding oxymatrine alone group ($P<0.05$). ② The oxymatrine could significantly induce the apoptosis and arrest the G_2/M phase in the gastric cancer BGC-823 cells in a concentration-dependent manner ($P<0.05$). The combination group of 60 $\mu\text{mol/L}$ oxymatrine could significantly decreased the apoptosis rate and the number of cells in the G_2/M phase in the gastric cancer BGC-823 cells after treating 48 h ($P<0.05$). ③ The protein and gene levels of GRP78/Bip and caspase-12 showed significant increases with the increase of oxymatrine concentrations in the oxymatrine alone group (except the protein and gene levels of caspase-12 at 10 $\mu\text{mol/L}$ oxymatrine) as compared with the control group ($P<0.05$), which in the combination group of 60 $\mu\text{mol/L}$ and 90 $\mu\text{mol/L}$ oxymatrine were significantly decreased as compared with the corresponding oxymatrine alone group ($P<0.05$). **Conclusion** Oxymatrine can inhibit growth of human gastric cancer cell line BGC-823, which maybe related to caspase-12-dependent induction of apoptosis and up-regulation of GRP78/Bip expression, which needs further experimental verification.

【Keywords】 oxymatrine; gastric neoplasm; apoptosis; endoplasmic reticulum stress

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一^[1]。由于化疗药物治疗胃癌存在毒副作用、耐药性等许多局限性^[2-3]，我们需要找到既有抗肿瘤活性并且低毒性的药物。氧化苦参碱是从传统中药苦参中提取的一种生物碱，具有抗肿瘤等多种药理作用。凋亡是细胞死亡的主要形式之一^[4]。目前已阐明的细胞凋亡途径有线粒体途径、死亡受体途径和内质网应激途径^[5-7]。内质网应激介导的细胞凋亡有自身的信号传导通路，能独立诱导细胞凋亡，是目前的研究热点之一^[8]。氧化苦参碱是否可以通过内质网应激途径诱导胃癌细胞凋亡目前仍未阐明。本研究拟通过观察氧化苦参碱对胃癌 BGC-823 细胞增殖和凋亡的影响来证明内质网应激参与氧化苦参碱诱导的胃癌细胞的凋亡，为氧化苦参碱抗肿瘤机制研究提供新的思路，为中药单体及联合用药治疗胃癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞系和主要试剂及设备

人胃癌 BGC-823 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。氧化苦参碱由上海阿拉丁生化科技股份有限公司提供，为分析标准品。RPMI 1640 和 DMEM 培养基，Hyclone 公司；胎牛血清，元亨金马公司。Western blot 全部抗体及内质网应激抑制剂 salubrinal，Sigma 公司；逆转录 (RT-PCR) 试剂盒，北京全式金生物技术公司；二氧化碳 (CO_2) 孵箱、离心机、低温离心机及酶标仪，Thermo 公司；普通 PCR 仪、聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 仪和电转印系统，Bio-Rad 公司；流式细胞仪，BD Biosciences。

1.2 细胞培养及分组

人胃癌 BGC-823 细胞被培养在含 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养液中，培养基含硫酸链霉素

(100 U/mL)、青霉素 (100 U/mL)。培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 ，饱和湿度。于 24 h 后观察细胞的生长及贴壁情况并更换培养液。将对数生长期的胃癌 BGC-823 细胞分为对照组、氧化苦参碱单药组 (简称“单药组”，10、30、60 和 90 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的氧化苦参碱处理) 和联合组 (各浓度的氧化苦参碱联合 2 $\mu\text{mol/L}$ 内质网应激抑制剂 salubrinal 处理)。

1.3 MTT 法检测氧化苦参碱对人胃癌 BGC-823 细胞生长的抑制作用

收集对数生长期细胞，调整细胞悬液浓度，在 96 孔平底板中每孔加入 100 μL 细胞悬液，铺板调待测细胞密度至 (1 000 ~ 10 000) 个/孔，边缘孔用无菌磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 填充，于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育至细胞单层铺满孔底。对照组每孔加入培养液 110 μL ；单药组每孔分别加入 10、30、60 和 90 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的氧化苦参碱溶液 100 μL 及培养液 10 μL ；联合组每孔分别加入不同浓度的氧化苦参碱 100 μL 及 2 $\mu\text{mol/L}$ 内质网应激抑制剂 salubrinal 10 μL 。各组均设 5 个复孔。于 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24、48 及 72 h 时分别于倒置显微镜下观察。每孔加入 20 μL MTT 溶液 (5 mg/mL，即 0.5% MTT) 继续培养 4 h 后终止培养，小心吸去孔内培养液。每孔加入 150 μL 二甲基亚砜，置摇床上低速振荡 10 min，使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的吸光度值并计算细胞抑制率，细胞抑制率 = $(1 - \text{吸光度值}_{\text{处理组}} / \text{吸光度值}_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.4 流式细胞术检测细胞周期

取对数生长期的细胞，按 1×10^6 个/mL 以 2 mL 接种于 6 孔板内，给予不同浓度药物处理 48 h 后终止培养。800 r/min ($r=10$ cm) 离心 5 min，收集细胞沉淀，弃上清，用预冷 PBS 洗涤 2 次，加入预冷 75% 乙醇，于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 4 h 以上；再以 1 500 r/min ($r=10$ cm) 离心 5 min，弃上清，以 3 mL 的 PBS 洗

涂 1 次, 加入 400 μL 溴化乙锭 (PI, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 100 μL RNase A (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。以标准程序用流式细胞仪检测, 一般计数 $(2 \sim 3) \times 10^4$ 个细胞, 结果用细胞周期拟和软件 ModFit 分析。

1.5 流式细胞 Annexin V-PI 双标染色法检测细胞凋亡

对照组采用胰酶消化细胞, 单药组用 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 氧化苦参碱处理细胞, 联合组采用 60 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 氧化苦参碱联合 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ salubrinal 处理细胞, 处理 48 h 时收集上述溶液并离心, 细胞沉淀用 PBS 洗 2 次, 加入 500 μL Binding Buffer 制成 1×10^6 个/mL 单细胞悬液, 加入 5 μL Annexin V, 再加入 5 μL PI, 室温, 避光, 反应 10 min。用流式细胞仪在激发波长 488 nm、吸收波长 600 nm 测定细胞凋亡, 实验重复 5 次。

1.6 Western blot 法检测 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白表达

收集对照组、单药组 (10、30、60 和 90 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 氧化苦参碱) 和联合组 (各浓度的氧化苦参碱联合 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ salubrinal) 处理 48 h 的细胞 (1×10^6 个/mL 单细胞悬液各 2 mL), 3 000 r/min ($r=10$ cm) 离心 5 min, 沉淀加入适量蛋白裂解液, 冰上裂解 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 \times g 离心 10 min, 吸取上清, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。制备电泳样品, 配制 10% 的 SDS-PAGE 分离胶及浓缩胶, 上样 (根据样品蛋白浓度调整上样量为 20 ~ 30 μL , 对照孔中加入 Marker 3 ~ 5 μL), 电泳 (先恒压 60 V 电泳, 跑出浓缩胶后调至 90 V, 恒压电泳至蛋白样品中的溴酚蓝跑至距分离胶下缘 1 cm 处), 准备 PVDF 膜, 电转移 (恒压 60 V, 转印 180 min)。取出 PVDF 膜, 5% 的脱脂牛奶室温封闭 60 min。TBST 洗 3 遍, 每次 10 min。取出 PVDF 膜, 分别用 1 : 1 000 比例 GRP78/Bip、caspase-12 和 GAPDH 的抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 旋转孵育过夜。再用 TBST 洗 3 遍, 每次 10 min。用稀释比例为 1 : 10 000 二抗室温孵育 1 h。用 TBST 洗 3 遍, 每次 10 min。取出 PVDF 膜, ECL 发光液 A 液和 B 液 1 : 1 混匀后, 均匀滴在 PVDF 膜上, 再将 PVDF 膜放入 Chemiscope 凝胶成像系统进行拍照并进行分析处理。

1.7 RT-PCR 法检测 GRP78/Bip 和 caspase-12 基因的表达

收集对照组、单药组 (10、30、60 和 90 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 氧化苦参碱) 和联合组 (各浓度的氧化苦参碱联合 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ salubrinal) 处理 48 h 时的细胞, 移入 1.5 mL EP 管中, 3 000 r/min ($r=10$ cm) 离心 5 min, 去上清, 加入 1 mL Trizol 混匀; 加入 200 μL 三氯甲烷,

振荡 15 s, 室温放置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 \times g 离心 15 min, 吸取上层液体移入 1.5 mL EP 管中, 加入 500 μL 异丙醇后混匀, 室温放置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 \times g 离心 15 min, 弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇混匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 7 500 \times g 离心 5 min, 沉淀加入 20 μL 水溶解, 通过紫外分光光度计测定 RNA 浓度和纯度。通过反转录试剂盒用普通 PCR 仪将提取的 mRNA 反转录为 cDNA。mRNA 为 50 ng, 反应体系为 20 μL : 2 \times TS Reaction Mix 10 μL , Random Primer 1 μL , Trans-Script RT/RI Enzyme Mix 1 μL , H₂O 和 RNA 8 μL 。使用普通 PCR 仪对 cDNA 进行扩增。反应体系为 20 μL : 上游引物 0.5 μL , 下游引物 0.5 μL , Taq 酶 10 μL , H₂O 8 μL , cDNA 1 μL 。所有引物由北京天一辉远生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。配制 DNA 电泳凝胶, 将扩增好的 cDNA 加入电泳槽中, 上样量 20 μL , 电压 120 V, 电流 80 mA, 电泳结束后用紫外分析仪进行拍照保存, 各基因表达水平按该基因条带与 GAPDH 条带的吸光度值比表示。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件对数据进行分析。实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析和最小显著差异 t 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 氧化苦参碱对胃癌 BGC-823 细胞生长的影响

随着氧化苦参碱浓度升高, 与对照组比较, 各观察时间点单药组胃癌 BGC-823 细胞的吸光度值呈下降趋势 ($P < 0.05$), 相应地细胞抑制率呈上升趋势 ($P < 0.05$), 见图 1a、1b; 经分析, 氧化苦参碱作用 48 h 时对 BGC-823 细胞的抑制率影响最明显, 此时的 IC₅₀ 为 (59.5 ± 0.5) $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。不同浓度氧化苦参碱联合 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ salubrinal 处理 48 h 时的胃癌 BGC-823 细胞生长情况见图 1c、1d, 从图中可见, 与单药比较, 联合用药时的吸光度值升高、抑制率

表 1 PCR 引物序列

基因	方向	引物序列	扩增片段长度 (bp)
hGRP78/Bip	上游	5'-GACATCAAGTCTTGCCTGTT-3'	260
	下游	5'-CTCATAACATTTAGGCCAGC-3'	
hcaspase-12	上游	5'-GGAGAAGGAGGGACGAA-3'	450
	下游	5'-AGAGTTGCCTGTGCTAA-3'	
hGAPDH	上游	5'-AACGGATTTGGTCGTATTG-3'	300
	下游	5'-GTACTCCAGAAGACCAGAGG-3'	

h: 代表人

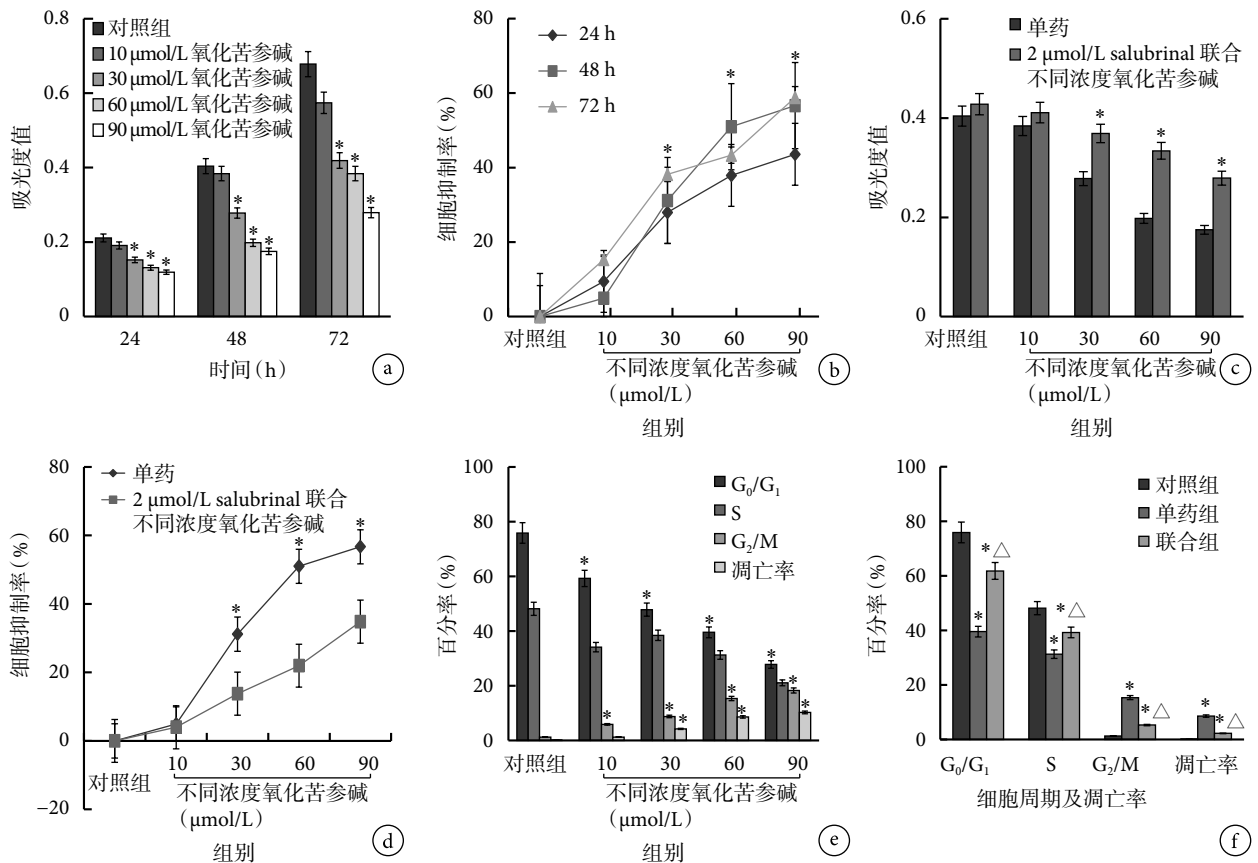


图 1 示氧化苦参碱对胃癌 BGC-823 细胞生长、细胞周期及凋亡影响的结果

a, b: 分别为不同浓度氧化苦参碱处理胃癌 BGC-823 细胞 24、48、72 h 时的吸光度值 (a) 和抑制率 (b), 与相应时间点对照组比较, * $P < 0.05$ 。c, d: 分别为不同浓度氧化苦参碱联合 2 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal 处理胃癌 BGC-823 细胞 48 h 时的吸光度值 (c) 和抑制率 (d), 与相应浓度单药比较, * $P < 0.05$ 。e: 不同浓度氧化苦参碱处理后胃癌 BGC-823 细胞周期及凋亡率变化结果; f: 60 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱联合 2 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal 处理后胃癌 BGC-823 细胞周期和凋亡率变化结果; 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与相应浓度单药比较, $\Delta P < 0.05$

明显降低, 尤其是氧化苦参碱为 30、60 和 90 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.2 氧化苦参碱对胃癌 BGC-823 细胞周期和凋亡的影响

① 与对照组比较, 随着氧化苦参碱浓度的增加, G_2/M 期细胞数和细胞凋亡率呈增加 (或增高) 趋势 ($P < 0.05$), G_0/G_1 期细胞数呈下降趋势 ($P < 0.05$), S 期细胞数变化不明显 ($P > 0.05$), 见图 1e。② 与对照组比较, 处理 48 h 后, 单药组及联合组的胃癌 BGC-823 细胞的 G_0/G_1 期和 S 期细胞数均明显减少 ($P < 0.05$), G_2/M 期细胞数增多 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率增高 ($P < 0.05$); 与单药组比较, 联合组的胃癌 BGC-823 细胞 G_0/G_1 期和 S 期细胞增多 ($P < 0.05$), G_2/M 期细胞数减少 ($P < 0.05$), 细胞凋亡率降低 ($P < 0.05$), 见图 1f。

2.3 Western blot 和 RT-PCR 法检测 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白和基因表达结果

① 经不同浓度氧化苦参碱单独处理 48 h 后各组胃癌 BGC-823 细胞中 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋

白和基因表达结果见图 2a-2c, 从图中可见, 与对照组比较, 随着氧化苦参碱药物浓度的增加 (除 10 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱组 caspase-12 蛋白和基因外), GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白和基因表达水平均呈升高趋势且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。② 经不同浓度氧化苦参碱联合 2 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal 处理 48 h 后各组胃癌 BGC-823 细胞中 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白和基因表达结果见图 2d-2f, 从图中可见, 与对照组比较, 单独 2 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal 处理组的 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白和基因表达变化均不明显 ($P > 0.05$), 但随着氧化苦参碱浓度的增加 (除 60 $\mu\text{mol/L}$ 氧化苦参碱联合组中 GRP78/Bip 蛋白和基因外), 联合用药各组细胞中 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白和基因表达水平均呈升高趋势且呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。③ 与相应浓度单药比较, 30、60 及 90 $\mu\text{mol/L}$ 浓度氧化苦参碱联合 2 $\mu\text{mol/L}$ salubrinal 处理 48 h 后各组细胞中 GRP78/Bip 蛋白 (除外 30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度氧化苦参碱联合组) 和 caspase-12 蛋白和基因表达均降低 ($P < 0.05$), 见图 2g-2j。

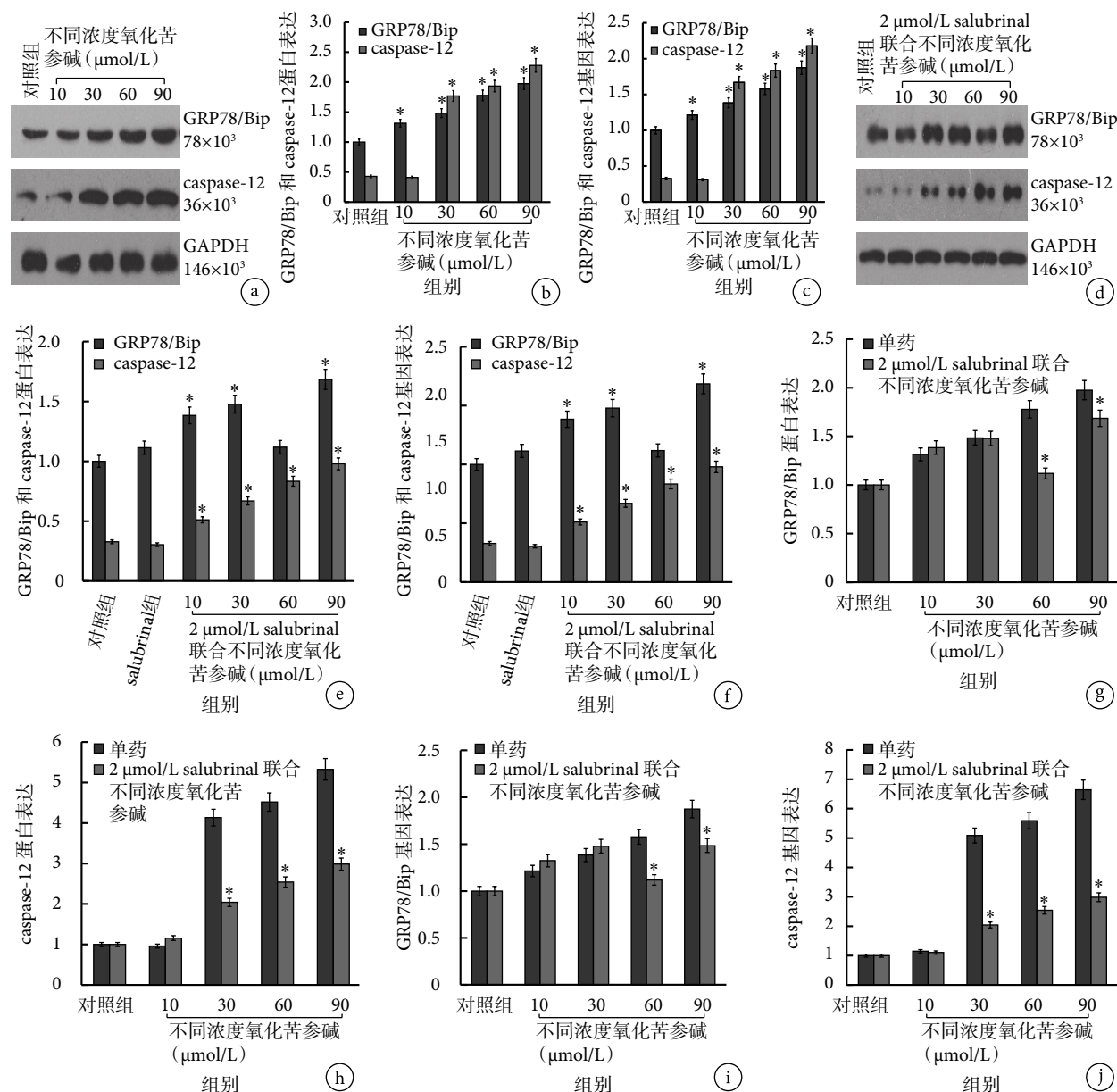


图 2 示 Western blot 和 RT-PCR 法检测 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白和基因表达结果

a-c: 分别为经不同浓度氧化苦参碱单药处理 48 h 后各组胃癌 BGC-823 细胞中 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白 (a, b) 和基因 (c) 表达结果, 与对照组比较, *P<0.05; d-e: 分别为不同浓度氧化苦参碱及其联合抑制剂处理 48 h 后胃癌 BGC-823 细胞中 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白 (d, e) 和基因 (f) 表达结果, 与对照组比较, *P<0.05; g-j: 分别为经不同浓度氧化苦参碱单药或 2 μmol/L salubrinal 联合处理 48 h 后各组胃癌 BGC-823 细胞中 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白 (g, h) 和基因 (i, j) 表达结果, 与相应浓度单药比较, *P<0.05

3 讨论

目前胃癌的治疗措施主要有手术、化疗、放疗、免疫治疗等, 我们需要找到既有抗肿瘤活性且又低毒性的药物, 尤其是从天然产品中提取活性有效成分已成为一种趋势^[9]。氧化苦参碱是从传统中药苦参中提取的一种生物碱, 具有多种药理作用^[10]。有研究^[11]表明, 氧化苦参碱可抑制胰酶活性、抗炎、抑菌、抗氧化、利尿、免疫调节、保护肝肾、松弛血管、促进胃肠蠕动、抑制血小板聚集、改善微循环

等; 另有研究^[12]认为, 氧化苦参碱可抑制多种肿瘤细胞增殖及诱导肿瘤细胞凋亡, 可逆转肿瘤细胞的多药耐药性, 还可抑制肿瘤血管生成及肿瘤侵袭及转移, 而且还具有明显的肿瘤化疗增敏及减毒作用。尽管目前关于氧化苦参碱抗肿瘤作用的研究较多, 然而其抗肿瘤的分子机制仍不完全清楚。

本研究对氧化苦参碱的抗肿瘤作用的分子机制进行了研究, 研究目标是中药诱导胃癌细胞凋亡的内质网应激途径^[13]。采用 MTT 法检测细胞生长情况、流式细胞术检测细胞周期改变、Annexin V-

PI 双标染色法检测细胞凋亡情况,同时联用内质网应激抑制剂 salubrinal 调控氧化苦参碱诱导的胃癌细胞凋亡,以期为胃癌的治疗和预后提供基础资料;又从蛋白水平和基因水平分别检测 GRP78 和 caspase-12 表达,以证明氧化苦参碱诱导肿瘤细胞凋亡的信号传导通路并阐明氧化苦参碱对胃癌治疗的作用机制,为其治疗胃癌提供理论依据。本研究结果发现,氧化苦参碱对人胃癌 BGC-823 细胞具有明显的生长抑制作用,该作用可能与 caspase-12 依赖性诱导凋亡及 GRP78/Bip 表达水平上调有关;而内质网应激抑制剂 salubrinal 联合作用时能够有效逆转由氧化苦参碱引起的肿瘤细胞生长抑制、凋亡增加及 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白及基因表达水平的升高,结果提示,氧化苦参碱对人胃癌 BGC-823 细胞生长抑制及凋亡诱导机制可能是其通过激活 caspase-12 依赖性内质网应激、上调 GRP78/Bip 表达水平,从而引起细胞周期阻滞,最终诱导细胞凋亡,但仍需进一步实验验证。

凋亡是细胞死亡的主要形式之一。目前已阐明的细胞凋亡途径主要有线粒体途径、死亡受体途径和内质网应激途径 3 个^[14]。内质网应激是真核细胞内正常存在的一种应激机制,维持细胞的生存,而过度的内质网应激则可导致细胞凋亡。内质网应激介导的细胞凋亡有自身的信号传导通路,能独立诱导细胞凋亡。已有的研究^[15]证明,氧化苦参碱可通过线粒体途径介导多种细胞的凋亡,但氧化苦参碱是否可以通过内质网应激途径诱导细胞凋亡还未见阐明。Hu 等^[14]研究发现,在内质网应激凋亡通路中 caspase-12 激活介导的大鼠肝细胞凋亡的纤维化肝脏中 GRP78、GRP94、Procaspase-12、活性 caspase-12 蛋白表达仍保持高水平。在本研究中发现,氧化苦参碱可抑制人胃癌细胞株 BGC-823 的生长且呈时间-浓度依赖性,与文献^[16]报道一致;还通过流式细胞仪探讨了氧化苦参碱抑制胃癌 BGC-823 细胞增殖的机制^[17],结果发现,氧化苦参碱能诱导该细胞凋亡,发生 G₂/M 期细胞阻滞。Western blot 和 RT-PCR 检测结果显示,内质网应激抑制剂 salubrinal 联合作用时能够有效逆转由氧化苦参碱引起 GRP78/Bip 和 caspase-12 蛋白及基因表达水平的升高。因此我们推测,氧化苦参碱抑制胃癌 BGC-823 细胞增殖及诱导凋亡可能与 caspase-12 作用激活 GRP78 信号分子从而启动凋亡程序有关,这也是在后期的实验中需要进一步证实的。

从本研究初步研究的结果提示,氧化苦参碱具有抑制细胞增殖及凋亡的作用,其在开发和选择胃

癌化疗药物的过程中具有很大的潜力,这为从中药成分中研制和开发新的有效化疗药物开拓了新思路。

参考文献

- Zhou YJ, Guo YJ, Yang XL, *et al.* Anti-cervical cancer role of matrine, oxymatrine and sophora flavescens alkaloid gels and its mechanism. *J Cancer*, 2018, 9(8): 1357-1364.
- 朱栋良,尹小平,王芳元. 异鼠李素对胃癌细胞增殖及凋亡的影响. *中国普外基础与临床杂志*, 2018, 25(3): 350-353.
- 王建,安华松,宋正霞,等. 曲妥珠单抗对 SW-620 人结肠癌细胞增殖凋亡的影响及其与奥沙利铂协同作用的研究. *中国普外基础与临床杂志*, 2018, 25(12): 1433-1438.
- Zhang B, Wang X, Li Y, *et al.* Matrine is identified as a novel macropinocytosis inducer by a network target approach. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 10.
- Yin W, Han J, Zhang Z, *et al.* Aloperine protects mice against bleomycin-induced pulmonary fibrosis by attenuating fibroblast proliferation and differentiation. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6265.
- Yin LL, Wen XM, Lai QH, *et al.* Lenalidomide improvement of cisplatin antitumor efficacy on triple-negative breast cancer cells. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 6469-6474.
- Xue JX, Zhu ZY, Bian WH, *et al.* The traditional Chinese medicine Kangai injection as an adjuvant method in combination with chemotherapy for the treatment of breast cancer in Chinese patients: A meta-analysis. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2018, 2018: 6305645.
- Xu XX, Bi JP, Ping L, *et al.* A network pharmacology approach to determine the synergetic mechanisms of herb couple for treating rheumatic arthritis. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 967-979.
- Meng LQ, Wang Y, Luo YH, *et al.* Quinalizarin induces apoptosis through reactive oxygen species (ROS)-mediated mitogen-activated protein kinase (MAPK) and Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) signaling pathways in colorectal cancer cells. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 3710-3719.
- Li W, Yu X, Tan S, *et al.* Oxymatrine inhibits non-small cell lung cancer via suppression of EGFR signaling pathway. *Cancer Med*, 2018, 7(1): 208-218.
- Hou X, Du H, Yang R, *et al.* The antitumor activity screening of chemical constituents from *Camellia nitidissima* Chi. *Int J Mol Med*, 2018, 41(5): 2793-2801.
- Gu LL, Shen ZL, Li YL, *et al.* Oxymatrine causes hepatotoxicity by promoting the phosphorylation of JNK and induction of endoplasmic reticulum stress mediated by ROS in LO2 cells. *Mol Cells*, 2018, 41(5): 401-412.
- Dai JP, Wang QW, Su Y, *et al.* Oxymatrine inhibits influenza A virus replication and inflammation via TLR4, p38 MAPK and NF- κ B pathways. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): pii: E965.
- Hu Z, Qin F, Gao S, *et al.* Paeoniflorin exerts protective effect on radiation-induced hepatic fibrosis in rats via TGF- β 1/Smads signaling pathway. *Am J Transl Res*, 2018, 10(3): 1012-1021.
- Aghvami M, Ebrahimi F, Zarei MH, *et al.* Matrine induction of ROS mediated apoptosis in human ALL B-lymphocytes via mitochondrial targeting. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2018, 19(2): 555-560.
- Zhu C, Li X, Zhang B, *et al.* Quantitative analysis of multi-components by single marker—a rational method for the internal quality of Chinese herbal medicine. *Integr Med Res*, 2017, 6(1): 1-11.
- Zhang Y, Liang Y, He C. Anticancer activities and mechanisms of heat-clearing and detoxicating traditional Chinese herbal medicine. *Chin Med*, 2017, 12: 20.

收稿日期: 2018-11-15 修回日期: 2019-02-01

本文编辑: 李缨来/蒲素清