

# 抗氧化剂 Isoverbascoside 对 MGC80-3 细胞 抗氧化酶活性和癌基因表达的影响<sup>1</sup>

陈瑞川<sup>1</sup> 李 立<sup>2</sup> 苏金华<sup>1</sup> 李 忌<sup>1</sup> 王天叫<sup>1</sup> 徐 洵<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>厦门大学抗癌研究中心, <sup>2</sup>厦门大学生物学系, <sup>3</sup>国家海洋局第三研究所 厦门 361005)

**摘要** 以苔酚蓝拒染法、核黄素-NBT 还原法、DTNB 还原法及 RNA 斑点杂交分析法分别对经不同浓度 Isoverbascoside(Isov) 处理的 MGC80-3 细胞的生长速率、II 期抗氧化酶(超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶和过氧化氢酶)活性和 N-ras、C-myc 及 p53 基因表达作了检测。结果显示:经 Isov 处理后,细胞生长明显受抑;II 期抗氧化酶活性较处理前明显上升;癌基因 N-ras、C-myc 的表达较处理前下降,而抑癌基因 p53 表达上升。表明 Isov 的抑癌作用与诱导 II 期抗氧化酶活性升高和癌基因表达改变有关。

**关键词** MGC80-3, Isoverbascoside, 抗氧化酶, 抗氧化剂, 癌基因

**中国图书分类号** Q 2.24

近年研究发现一些抗氧化剂具有抑制癌细胞生长的作用<sup>[1]</sup>。我们的前期研究也证实中草药马先蒿(*Pedicularis striata*) 中提取的天然抗氧化剂 Isoverbascoside(Isov) 具有抑制人早幼粒白血病株 HL-60 和人胃腺癌 MGC80-3 细胞生长的作用<sup>[2,3]</sup>。本文以 MGC80-3 细胞为材料,研究 Isov 对其胞内 II 期抗氧化酶活性及 p53、N-ras 和 C-myc 基因表达的影响, 以期为阐明 Isov 的抑癌作用机理提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞及试剂

细胞株及培养条件:人胃腺癌细胞 MGC80-3 株由厦门大学抗癌研究中心保存,培养条件同文献[3]。

试剂和仪器:氯化硝基四唑氮蓝(NBT)、5,5'-二硫对硝基苯甲酸(DTNB)、还原型谷胱甘肽(GSH)、甲硫氨酸、核黄素、蛋白酶 K、鲑精 DNA 均为 Sigma 公司产品, p53、N-ras 及 C-myc cDNA 探针购自北京天象人公司,地高辛 DNA 标记检测试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司,硝酸纤维膜为 Amershan 产品, Isov 及其配制同文献[3],其余均为国产分析纯试剂。吸光值均以 DU 640 紫外/可见分光光度计(BECKMAN 公司)测定。

### 1.2 药物处理及细胞收集

Isov 处理方法同文献[3]报道。苔酚蓝拒染法同时计数活及死亡细胞。药物处理组及对照组细胞经胰酶消化后 800 g 离心 10 min 收集, 0.1 mol/L、pH7.4 PB 洗涤两遍, 0.5 mL PB 重悬

细胞并置于冰浴中超声破碎, 10 000 g 离心 20 min 收集上清, Lowry 法<sup>[4]</sup>测蛋白浓度后以 PB 将各样品调至相同蛋白浓度备测定酶活性. 实验均重复 3 次, 取平均值. 酶活性均以 unit/mg 表示.

### 1.3 超氧化物歧化酶(SOD) 活性测定

核黄素-NBT 还原法<sup>[5]</sup>测定.

### 1.4 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px) 活性测定

DTNB 还原法<sup>[5]</sup>测定.

### 1.5 过氧化氢酶(CAT) 活性测定

紫外吸收法<sup>[6]</sup>测定.

### 1.6 RNA 斑点杂交分析

探针标记及 RNA 斑点杂交均按前文报道<sup>[7]</sup>.

## 2 结 果

### 2.1 IsoV 对 MGC80-3 细胞增殖的影响

由图 1A 结果可见, 活细胞计数显示 IsoV 对 MGC80-3 细胞生长有明显抑制作用, 并具药物浓度和处理时间依赖关系. 死亡细胞计数结果(见图 1B)显示在 5 ~ 20 mol/L 范围内, IsoV 对 MGC80-3 细胞生长的抑制作用并非来自细胞毒杀伤作用.

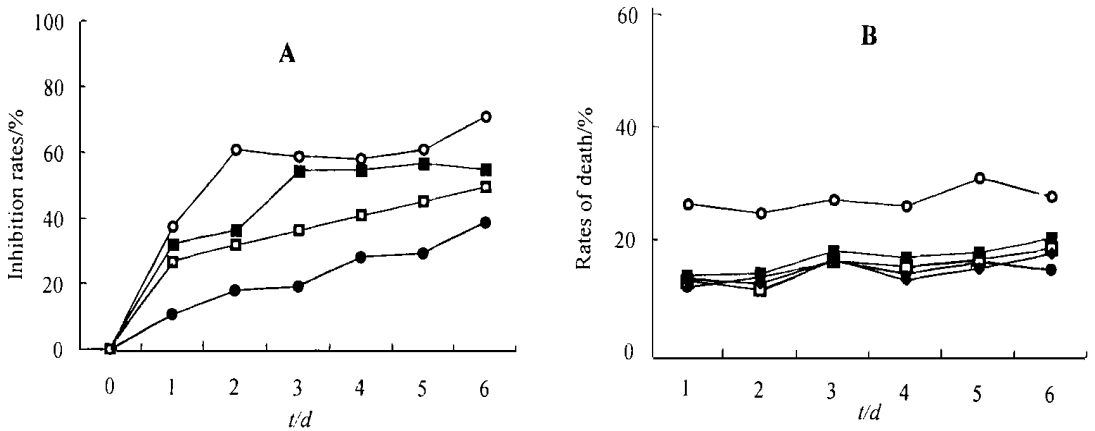


图 1 IsoV 对 MGC80-3 细胞生长(A) 及死亡(B) 的影响

- 5 μmol/L IsoV
- 10 μmol/L IsoV
- 20 μmol/L IsoV
- 30 μmol/L IsoV
- 对照组

Fig. 1 Effect of IsoV on cell growth(A) and cell death(B) of MGC80-3

### 2.2 IsoV 对 MGC80-3 细胞 SOD、GSH-Px 及 CAT 酶活性的影响

结果见图 2. 经 10 和 20 μmol/L 终浓度的 IsoV 处理后 MGC80-3 细胞的 SOD、GSH-Px 及 CAT 酶活性均有上升, 且在处理时间内酶活性随着 IsoV 浓度提高和处理时间延长而提高.

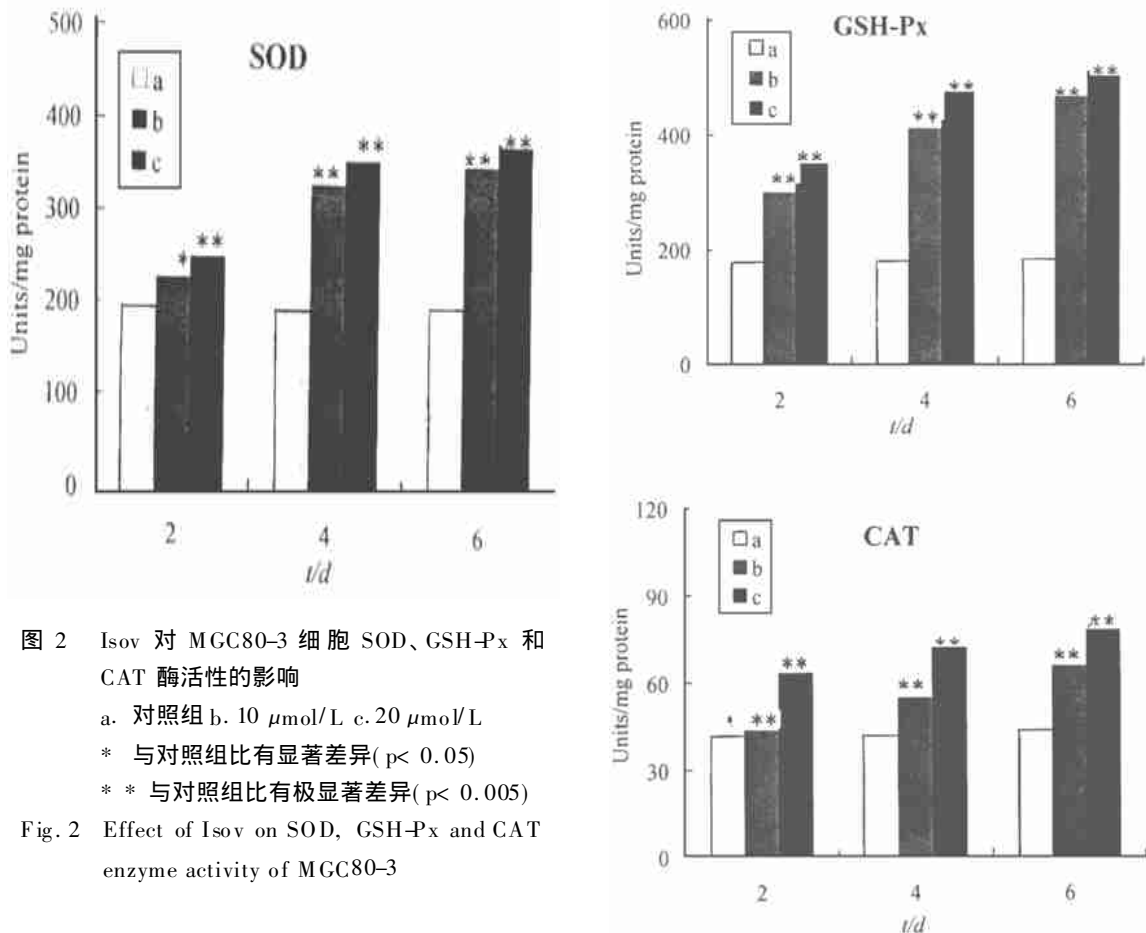


图 2 Isov 对 MGC80-3 细胞 SOD、GSH-Px 和 CAT 酶活性的影响

a. 对照组 b. 10  $\mu\text{mol/L}$  c. 20  $\mu\text{mol/L}$

\* 与对照组比有显著差异 ( $p < 0.05$ )

\*\* 与对照组比有极显著差异 ( $p < 0.005$ )

Fig. 2 Effect of Isov on SOD, GSH-Px and CAT enzyme activity of MGC80-3

### 2.3 Isov 对 MGC80-3 细胞 p53、N-ras 及 C-myc 基因表达的影响

MGC80-3 细胞经 20  $\mu\text{mol/L}$  Isov 处理 2、8、24、48 h 后, 每组再分别以的  $1 \times 10^4$ 、 $5 \times 10^4$  及  $1 \times 10^5$  个细胞点膜。膜经处理后分别与 p53、N-ras 及 C-myc 探针进行杂交, 结果见图 3。显示抑癌基因 p53 在 Isov 处理后转录表达加强, 24 h 达高峰, 48 h 有所下降。癌基因 C-myc 和 N-ras 在 Isov 处理后转录水平均下降; C-myc 的表达在 Isov 处理 2 h 后即有明显下降, N-ras 则在处理 8 h 后显著下调。

## 3 讨论

近年的研究成果显示活性氧自由基 (ROS) 是维持肿瘤细胞增殖及恶性表型的必需成分<sup>[1,8]</sup>。ROS 是氧分子还原成水时产生的许多活性中间体的统称, 包括超氧阴离子自由基 ( $\cdot\text{O}_2^-$ )、羟自由基 ( $\cdot\text{OH}$ )、过氧化氢 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 等, 有证据表明 ROS 在胞内可能作为第二信使起转导生长信号的作用<sup>[1,8]</sup>, 并认为抗氧化剂的抑癌作用可能与其清除 ROS 的性质有关<sup>[1,9]</sup>。本文所采用的 Isov 是从中草药马先蒿中提取的多酚类天然产物, 已被证实具有清除超氧阴离子自由基 ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) 的作用<sup>[9]</sup>, 并具有抑制 HL-60 及 MGC80-3 细胞生长作用<sup>[2,3]</sup>。本文的实验结果进一步显示: 在 5~20  $\mu\text{mol/L}$  范围内, Isov 对 MGC80-3 细胞生长的抑制作用与细胞毒杀伤作用无关; 当 Isov 浓度为 30  $\mu\text{mol/L}$  时死亡细胞显著增高, 光镜观察可见坏死细胞与凋亡细胞并存, 但

DNA 电泳未能显示出梯形带(结果未显示).

有报道表明从绿茶中提取的多酚类抗氧化剂茶多酚可诱导癌细胞内抗氧化酶活性升高<sup>[10]</sup>. 我们的结果也显示: 经 Isov 处理 MGC80-3 细胞 24 h 及 72 h 后, SOD 酶、GSH-Px 酶、CAT 酶活性均上升. 细胞内的抗氧化体系主要由 SOD、GSH-Px、CAT 等具有清除 ROS 及过氧化物的酶和生物活性物质组成, 癌细胞的抗氧化酶活性低下, 致使胞内 ROS 积累, 形成促进细胞增殖的微环境<sup>[1,8]</sup>. 已有报道表明<sup>[11]</sup>, 诱导转染的 Mn-SOD 表达, 可显著抑制癌细胞的恶性增殖. 因此诱导提高癌细胞内抗氧化酶活性, 消除 ROS 的积累, 促使细胞增殖减缓, 可能也是抗氧化剂抑制癌细胞生长的作用途经之一.

C-myc 作为早期反应基因及核转录因子, 其表达下降常与细胞下调增殖相关基因及启动分化相关基因表达相关<sup>[12]</sup>. N-ras 基因表达产物是细胞内 ras 生长信号转导通道的起点, 其表达下降可引起该信号通道所调控的基因表达改变<sup>[13]</sup>, 作用可能比 C-myc 更广泛及持久. p53 基因作为抑癌基因, 是细胞周期、生长分化及细胞凋亡调控的关键点, 并被认为是一种分化因子, 其表达上调是细胞生长速率放慢及走向分化的信号<sup>[14]</sup>. 对 Isov 处理的 MGC80-3 细胞 C-myc、N-ras 及 p53 基因转录产物所作的检测结果表明 Isov 可下调 C-myc 和 N-ras 基因的表达及上调 p53 基因表达, 提示在 20 μmol/L 浓度以下的 Isov 的抑癌效应可能主要来自诱导分化途经, 有关工作尚待进一步研究.

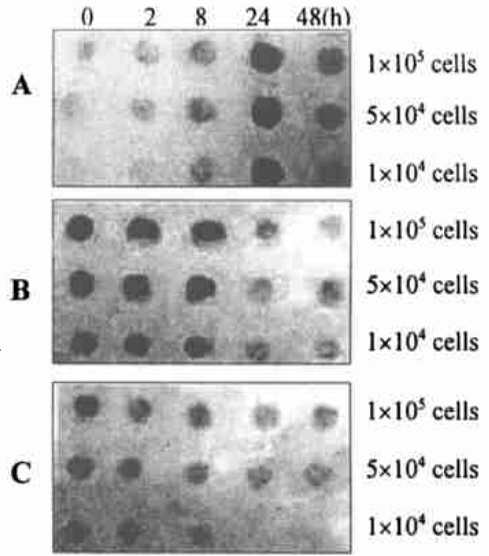


图3 Isov 对 MGC80-3 细胞 p53(A)、N-ras(B) 及 C-myc(C) 基因表达的影响  
Fig. 3 Effect of Isov on p53(A), N-ras (B) and C-myc(C) gene expression on MGC80-3cells

### 参 考 文 献

- 1 杨瑞仪. 超氧化物致癌与抗氧化剂防治癌症新进展. 国外医学肿瘤学分册, 1997, 24(6): 323 ~ 325
- 2 周红, 颜青, 林炳珍等. Isoverbascoside 对 HL-60 细胞生长和超微结构调整的影响. 癌症, 1997, 16(1): 29 ~ 31
- 3 李忌, 周红, 郑耘等. 天然抗氧化剂 Isoverbascoside 对人胃癌癌细胞生长和超微结构的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, 34(5): 795 ~ 798
- 4 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193: 256 ~ 260
- 5 陈奇主编. 中药药理学研究方法. 北京: 人民卫生出版社(第一版), 1993: 953 ~ 964
- 6 Lu D, Maulik N, Moraru H et al. Molecular adaptation of vascular endothelial cell to oxidative stress. Am. J. Physiol., 1993, 264: C715 ~ C722
- 7 陈瑞川, 张铮, 杨善民等. 视黄酸对 BEL-7402 细胞酶活性及基因表达的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 1998, 37(2): 259 ~ 264

- 8 Irani K, Xia Y, Zweier J et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in ras-transformed fibroblasts. *Science*, 1997, 275: 1 649 ~ 1 652
- 9 李忌, 林兴瞬, 郑耘等. Isoverbasoside 在体外清除超氧阴离子自由基保护小鼠红细胞膜蛋白巯基. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1994, 33(6): 887 ~ 889
- 10 谭晓华, 周殿元, 张亚历等. 茶叶抗癌机理研究进展. *国外医学肿瘤学分册*, 1998, 25(1): 4 ~ 6
- 11 Zhong WX, Oberley LW, Oberley TD et al. Suppression of the malignant phenotype of human glioma cells by overexpression of manganese superoxide dismutase. *Oncogene*, 1997, 14(4): 481 ~ 490
- 12 糜漫天, 张乾勇, 朱俊杰等. 视黄酸诱导细胞分化分子机制的研究进展. *国外医学分子生物学分册*, 1998, 20(1): 17 ~ 22
- 13 熊舜斌, 唐朝宇, 许根俊等. Ras 的结构和功能及其参与的信号传导. *生物化学与生物物理进展*, 1995, 22(6): 482 ~ 486
- 14 Madden SL, Galella EA, Riley D et al. Induction of cell growth regulatory gene by p53. *Cancer Res.* 1996, 56: 5 384 ~ 5 390

## Effect of Antioxidant Isoverbasoside on Antioxidant Enzyme Activity and Oncogenes Expression of MGC80-3 Cell

Chen Ruichuan<sup>1</sup> Li Li<sup>2</sup> Su Jinhua<sup>1</sup> Li Ji<sup>2</sup> Wang Tianjiao<sup>2</sup> Xu Xun<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>Cancer Res. Cent. <sup>2</sup>Biological Dept. of Xiamen Univ., Xiamen 361005)  
<sup>3</sup>National Third Ocence Res. Institute, Xiamen 361005)

**Abstract** The growth of MGC80-3 cell was inhibited after treatment with different concentration of Isoverbasoside from one to six days, respectively. The activities of II phase antioxidant enzymes(SOD, GSH-Px and CAT) were up induced while MGC80-3 cell was treated with 10  $\mu\text{mol/L}$  and 20  $\mu\text{mol/L}$  Isoverbasoside from two to six days. Also, the N-ras and C-myc oncogenes were regulated down and the p53 gene was regulated up, which was detected by in situ Northern hybridization, after treating MGC80-3 cell with same procedure. These results suggest that the inhibition effect on Isoverbasoside on cancer cells may be associated with the induce effects on II phase antioxidant enzymes and its effects on the oncogenes' transcription regulation.

**Key words** MGC80-3, Isoverbasoside, Antioxidant enzymes, Oncogenes