

天然抗氧化剂 Isoverbasin 诱导人胃癌 MGC 803 细胞分化作用研究

陈瑞川¹, 苏金华¹, 蔡克瑕¹, 付永贵², 李力²

(1. 厦门大学生命科学学院抗癌研究中心, 福建 厦门 361005;

2. 厦门大学生命科学学院生物学系, 福建 厦门 361005)

摘要: 人胃癌 MGC 803 细胞经天然抗氧化剂 Isoverbasin(IsoV) 处理后, 细胞生长和增殖呈现 IsoV 浓度和处理时间依赖性抑制, 群体倍增时间也相应延长; 20 $\mu\text{mol/L}$ IsoV 处理可使细胞形态和超微结构发生正常化变化, 集落形成率受抑; 胃癌分化标志酶碱性磷酸酶和乳酸脱氢酶活性均呈时间依赖性下降, 周期表现为 G₁ 期阻滞. 表明 IsoV 具有诱导 MGC 803 细胞分化的作用, 并可能与细胞周期阻滞有关.

关键词: 抗氧化剂; 胃癌细胞; 诱导分化; Isoverbasin

中图分类号: Q 2.24

文献标识码: A

Isoverbasin(IsoV) 是从中草药马先蒿(*Pedicularis strata*) 中分离纯化的苯丙素甙类化合物, 具有抗氧化作用^[1]. 我们的前期研究发现 IsoV 对人胃腺癌 MGC 803 细胞及人早幼粒白血病 HL-60 细胞生长及超微结构均有明显影响^[2,3], 并可上调 MGC 803 细胞 p53 基因转录表达和下调 N-ras 及 c-myc 基因的转录表达, 推测 IsoV 可能具有诱导细胞分化的作用^[4]. 本文仍以 MGC 803 细胞为研究对象, 着重探讨 IsoV 对人胃癌 MGC 803 细胞的诱导分化作用, 并初步探讨其作用机制.

1 材料与方法

1.1 试剂

RPMI 1640 购自美国 GIBCO 公司, 小牛血清为杭州四季青生物工程公司产品. 苏木色精、伊红为 Fluka 公司产品, 碱性磷酸酶和乳酸脱氢酶活性检测试剂盒购自上海联阳生物技术公司, 其余均为国产分析纯试剂.

收稿日期: 2000-03-09

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C97108)

作者简介: 陈瑞川(1963-) 男, 副研究员.

1.2 细胞培养及药物处理

按前文报道^[4]。

1.3 细胞计数及形态观察

常规台盼蓝拒染法计数细胞。培养于盖玻片上的细胞以 HE 染色后光镜观察并随机计数 1 000 个细胞中的分裂相细胞,计算分裂指数。透射电镜样品制备及观察按常规方法。

1.4 软琼脂集落试验

采用双层软琼脂法^[5],实验于 24 孔细胞培养板孔内进行,每组 4 孔,继续培养 2~3 周后观察并计数阳性集落数,以细胞数大于 30 个为阳性集落。

1.5 流式细胞仪分析(FACS)

按前文报道^[6]。每样品取 $1 \sim 2 \times 10^4$ 细胞。流式细胞仪为 FACSot FCM(美国 BD 公司),结果分析软件为 CellFIT Cell-Cycle Analysis Version 2.01.2。

1.6 碱性磷酸酶(AKP)和乳酸脱氢酶(LDH)活性检测

实验组和对照组细胞的收集按前文报道方法^[7]。匀浆离心上清的蛋白定量按文献报道方法^[8]。AKP 及 LDH 酶活性检测按试剂盒说明书略作如下修改:酶活性检测程序基本不变,检测 AKP 时各试剂及样品加样量均减半,检测 LDH 时各试剂及样品加样量均减为五分之一,检测反应于回收洗净的 24 孔细胞培养板内进行,反应后按说明书要求于 Backman DU640 型紫外/可见分光光度计(美国)测定光吸收值,并计算酶活性。实验均重复 3 次,取平均值作图分析。

2 结果

2.1 Isov 对 MGC 803 细胞生长和分裂的影响

以 $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 及 $30 \mu\text{mol/L}$ Isov 处理 MGC 803 细胞,计数结果显示: IsoV 对 MGC 803 细胞生长具有显著抑制作用,并呈浓

度和处理时间依赖性(图 1),细胞平均群体倍增时间也呈相似的依赖性关系;处理至第 6 d, $10 \mu\text{mol/L}$ 、 $20 \mu\text{mol/L}$ 和 $30 \mu\text{mol/L}$ Isov 对 MGC 803 细胞生长抑制率分别为 27.7%、51.3% 及 67.3%,相应的细胞平均群体倍增时间也由对照组的 33.3 h 延长至 37.8 h、43.3 h 和 49.9 h。 $20 \mu\text{mol/L}$ Isov 处理后,分裂指数计数结果显示:分裂高峰由对照组的第 4 d 前移至第 3 d,分裂高峰指数值由 47.1‰ 降到 27.7‰(见图 2),较对照组下降了 41.2‰。

2.2 Isov 对 MGC 803 细胞形态和集落形成率的影响

图 3 所示为 MGC 803 细胞经处理 6 d 后光镜及电镜观察结果。除一些处于分裂阶段和衰老退化而变圆的细胞,各群落以及散在 MGC 803 细胞中,以多边形扁平状上皮样细胞居多,细胞大小不一,形状不规则,常见分裂相细胞、巨大癌细胞及多核细胞(2~3 个核);核质比大,胞质富含多聚核糖体,而粗糙型内质网少而短;线粒体多且呈区域性散乱分布,常见肿胀、弯曲及

表 1 天然抗氧化剂 Isov 对 MGC 803 细胞平均群体倍增时间的影响
Tab.1 Effect of natural antioxidant Isov on average double time of cell population of MGC 803

IsoV 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	平均细胞群体倍增时间/h					
	1	2	3	4	5	6(d)*
0	31.4	28.8	29.5	29.8	31.7	33.3
10	42.4	36.6	32.6	33.2	35.6	37.8
20	35.4	36.3	37.5	36.6	39.3	43.3
30	39.7	45.4	41.8	42.5	48.0	49.9

* : 为 Isov 处理天数

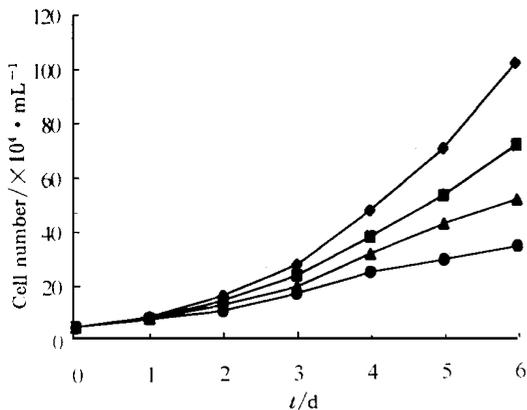


图 1 天然抗氧化剂 Isov 对 MGC 803 细胞生长的影响

—— 对照组; —— 10 μmol/L;
 —— 20 μmol/L; —— 30 μmol/L

Fig. 1 Effect of natural antioxidant Isov on cell growth of MGC 803

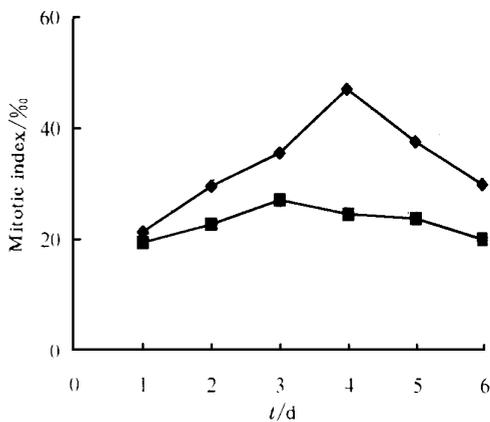


图 2 天然抗氧化剂 Isov 对 MGC 803 细胞分裂指数的影响

—— 对照组; —— 20 μmol/L

Fig. 2 Effect of natural antioxidant Isov on cell mitotic index of MGC 803

长条形等畸形线粒体, 线粒体嵴少, 基质电子密度较高, 空泡化明显; 核形有卵圆、肾形及蹄形等不规则核形, 核内异染色质团块较多, 核基质电子密度不均; 核仁数可多达 3~4 个, 体积和形状均不规则. 经 20 μmol/L Isov 处理后, 细胞趋于铺展, 体积增大, 核质比例下降, 分裂相细胞、巨大细胞及多核细胞均明显减少; 胞内多聚核糖体明显减少, 而粗糙型内质网趋于发达; 同时线粒体形状多呈棒状或椭圆形, 线粒体嵴数量增多, 排列较规则, 基质电子密度较均匀, 无明显空泡化; 细胞核畸形减少, 趋于圆整, 核内异染色质团块明显减少, 基质电子密度趋于均匀, 核仁数量及体积均明显减少. 表明经 Isov 处理的 MGC 803 细胞形态趋向正常上皮细胞形态.

在软琼脂上, 未处理 MGC 803 细胞可形成集落, 经 20 μmol/L Isov 处理后, 细胞的集落形成率明显下降, 仅为对照组的 65.5% (表 2).

2.3 Isov 对 MGC 803 细胞周期的影响

以 20 μmol/L Isov 处理 MGC 803 细胞, 2 d、4 d 及 6 d 后取样检测细胞周期分布, 结果见表 3, 显示 Isov 以阻滞细胞 G₁ 期为主. 从细胞周期分

表 2 天然抗氧化剂 Isov 对 MGC 803 细胞集落形成的影响
 Tab. 2 Effect of natural antioxidant Isov on cloning efficiency of MGC 803 cell

组别	克隆数				抑制率	
	1	2	3	4*	X ± SD	(%)
Control	34	29	30	32	31.3 ± 00	
20 μmol/L	18	20	23	21	20.5 ± 00	34.5

表 3 天然抗氧化剂 Isov 对 MGC 803 细胞周期分布的影响
 Tab. 3 Effect of natural antioxidant Isov on 8cycles distribution of MGC 803 cell

组别	处理时间/d	周期分布/%		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
Control	0	45.5	49.2	5.4
	2	51.2	43.2	5.7
20 μmol/L	4	60.6	30.0	9.3
	6	66.0	27.4	6.6

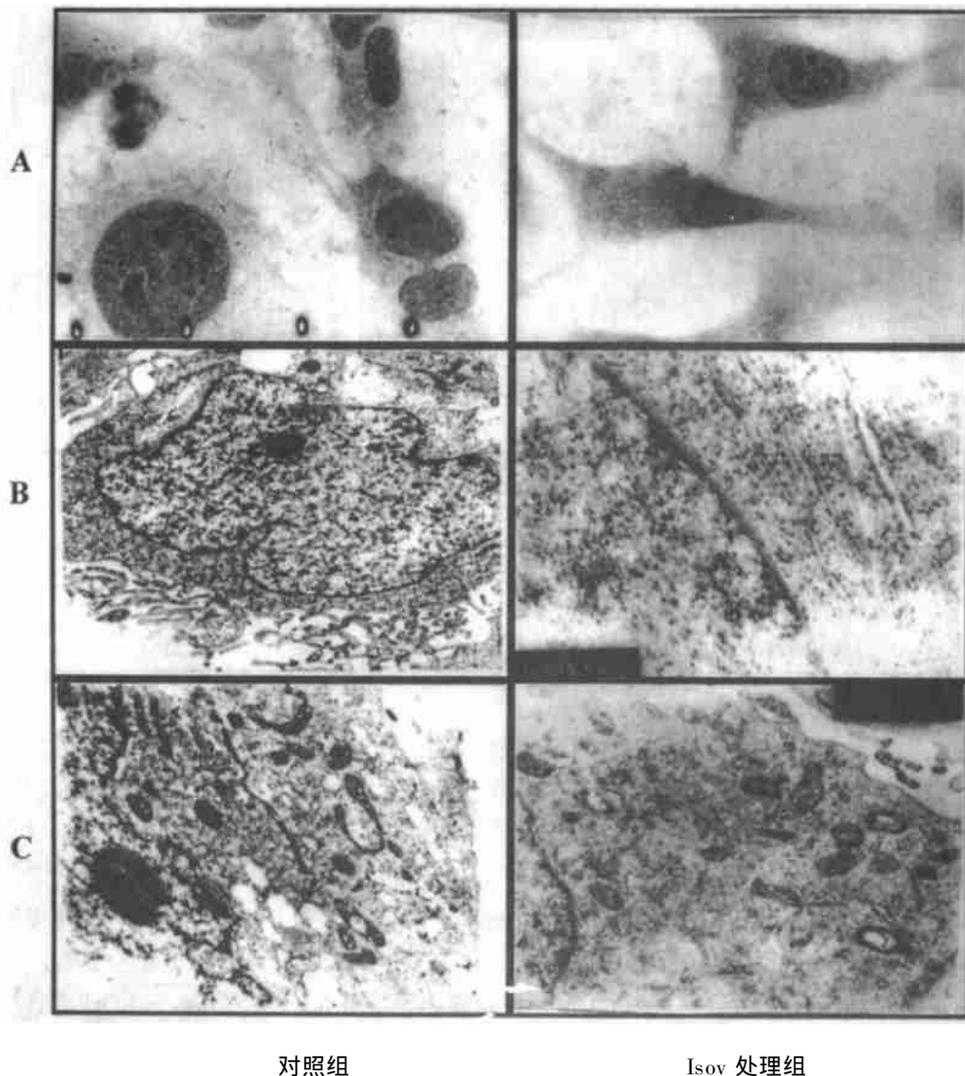


图 3 Isov 对 MGC 803 细胞形态及超微结构的影响

A: 光镜观察(HE 染色, $\times 1\ 000$); B、C: 透射电镜观察($\times 10\ 000$)

Fig. 3 Effects of Isov on morphology and ultrastructure of MGC 803 cell

布比例来看,经 $20\ \mu\text{mol/L}$ Isov 处理 6 d, S 期细胞比例较对照组下降了 21.6%, 而 G_1 期细胞比例则上升了 20.5%, 差异显著, G_2/M 细胞百分比则变化不大。

2.4 Isov 对 MGC 803 细胞 AKP 和 LDH 活性的影响

图 4 为 AKP 及 LDH 酶活性检测结果。显示: 对照组 MGC 803 细胞具有较高的基础 AKP 酶活性, 在细胞培养过程酶活性波动不大; 经 $20\ \mu\text{mol/L}$ Isov 处理后, AKP 酶活性明显下降, 且呈随处理时间依赖性持续下降关系, 至第 6 d, 处理组 AKP 活性降至 $97.2\ \text{IU/mg}$ 蛋白, 仅为对照组 $238.8\ \text{IU/mg}$ 蛋白的 40.7% (图 4A)。LDH 在 MGC 803 细胞中的基础酶活性为 $58\sim 60\ \text{IU/mg}$ 蛋白左右, 经 $20\ \mu\text{mol/L}$ Isov 处理后, LDH 酶活性也呈随处理时间依赖性持续下

降趋势,至第 6 d, 酶活性较对照组下降了 39.8% (见图 4B).

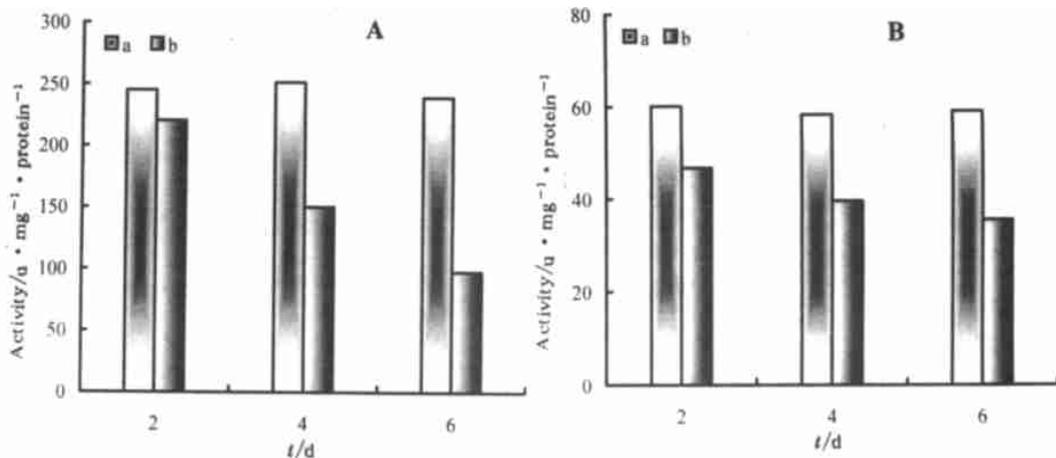


图 4 天然抗氧化剂 Isov 对 MGC 803 细胞 AKP(A) 及 LDH(B) 酶活性的影响
a: 对照组; b: 20 μmol/L Isov 处理组

Fig. 4 Effects of natural antioxidant Isov on AKP(A) and LDH(B) enzyme activity of MGC 803 cell

3 讨论

恶性增殖是肿瘤细胞的基本特征之一, 因此抑制肿瘤细胞恶性增殖也就成为诱导分化的前提条件; 软琼脂集落形成试验则常用于观察诱导分化剂对癌细胞终末分化的诱导作用. 实验结果表明: Isov 不仅对 MGC 803 细胞的生长速率和增殖指数有显著的抑制作用, 也能抑制细胞的软琼脂集落形成率. 细胞形态和超微结构观察表明: 20 μmol/L Isov 处理可明显诱导 MGC 803 细胞形态和超微结构向正常上皮细胞形态变化(图 3), 为 Isov 的诱导分化作用提供了另一有力证据. AKP 酶活性在正常胃粘膜细胞呈阴性反应, 但胃粘膜细胞癌变后常出现 AKP 酶活性; 因此, AKP 酶活性的高低可用作胃癌细胞诱导分化的一个指标^[9]. LDH 则是细胞糖酵解终产物丙酮酸形成乳酸的催化酶, 生长旺盛的癌细胞多以糖酵解途径来获取能量; 因此, LDH 活性也较正常细胞高. 本文的检测结果显示 MGC 803 细胞的 AKP 和 LDH 在 Isov 处理后均明显下降, 由此表明 MGC 803 细胞恶性增殖活动受到 Isov 抑制的同时走向分化.

许多文献指出^[10]: 在细胞周期进程中, G₁ - S 期之间存在一个周期转换点(也称限制点“restriction point”), 该点是决定细胞继续进入 S 期进行 DNA 复制, 或让细胞周期在此终止并转为 G₀ 细胞进而走向分化的关键点. 本文实验表明: Isov 可使 MGC 803 细胞周期阻滞于 G₁ 期, 虽然尚不清楚 Isov 调控细胞周期的确切机制, 但可以肯定 Isov 诱导 MGC 803 细胞分化作用与 G₁ 期阻滞有关. 我们在前文报道中已证实 Isov 在上调 MGC 803 细胞 p53 基因转录表达的同时可下调 c-myc 基因的表达^[4]. 已知 p53 蛋白可直接调控细胞周期抑制基因 p21/WAF1 的转录而参与对 G₁ - S 期转换点的调控; 而作为原癌基因, 高表达的 C-myc 蛋白则起到推进细胞周期、促进细胞增殖和抑制细胞分化的作用^[10]. 因此上述结果提示: 通过诱导 p53 基因表达进而诱导 p21/WAF1 基因转录以及抑制 c-myc 基因表达可能是 Isov 调控细胞周期的途径之一.

近年报道证实活性氧自由基(ROS)是维持肿瘤细胞恶性增殖的必要成分^[11]。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、羟自由基、过氧化氢等。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,而不少化学结构各异的抗氧化剂具有显著抑制癌细胞生长的作用,而这些抗氧化剂大多兼具清除 ROS 的功能,因此有人认为抗氧化剂的抑癌作用可能与其清除 ROS 的性质有关^[11,12]。本文所采用的 IsoV 属多酚类天然产物,不仅具有清除超氧阴离子自由基的作用^[1],还可诱导 MGC 803 细胞内一些 II 期抗氧化酶如超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶的活性^[4],这些酶均为 ROS 的有效清除剂,提示 IsoV 对细胞生长的抑制作用可能与其清除胞内 ROS 作用有关,但其清除 ROS 作用与其诱导 MGC 803 细胞恶性表型逆转作用是否相关,尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李忌,林兴瞬,郑耘,等. Isoverbascoside 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[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1994, 33(6): 887- 889.
- [2] 周红,颜青,林炳珍,等. Isoverbascoside 对 HL-60 细胞生长和超微结构的影响[J]. 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 MGC 803 细胞生长和超微结构的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1995, 34(5): 795- 799.
- [4] 陈瑞川,李力,苏金华,等. 抗氧化剂 Isoverbascoside 对 MGC 803 细胞抗氧化酶活性和癌基因表达的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(6): 913- 917.
- [5] Salmin SE, Buick RN. Preparation of permanent slides of intact soft-agar colony cultures of Hematopoietic and tumor stem cells[J]. Cancer Res, 1979, 39: 1 133- 1 138.
- [6] 陈瑞川,苏金华,马胜平,等. 光敏化姜黄素诱导胃癌细胞凋亡[J]. 癌症, 2000, 19(1): 27- 30.
- [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[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1998, 37(2): 259- 264.
- [8] 郭敏亮,姜涌明. 考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6): 558- 561.
- [9] 杨善民. DMSO 对人胃癌腺癌 MGC 803 细胞的诱导分化作用[J]. 实验生物学报, 1994, 24(3): 281- 287.
- [10] Planas-Silva M D, Weinberg R A. The restriction point and control of cell proliferation[J]. Curr Opin Cell Biol, 1997, 9(6): 768- 772.
- [11] Gamaley I A, Klyubin I V. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions [J]. Int Rev Cytol, 1999, 188: 203- 255.
- [12] Rhee S G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger[J]. Exp Mol Med, 1999, 31(2): 53- 59.
- [13] Lin J K, Liang Y C, Lin-Shiau S Y. Cancer chemoprevention by tea polyphenols through mitotic signal transduction blockade[J]. Biochem Pharmacol, 1999, 58(6): 911- 915.

Differentiation of Human Gastric Cancer MGC 803 Cell Induced by Natural Antioxidant Isoverbascoside

CHEN Rui-chuan¹, SU Jin-Hua¹, CAI Ke-xia¹, FU Yong-gui², LI Li²

(1. Cancer Res. Centr. of Life Science College, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China;

2. Dept. of Biology of Life Science College, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

Abstract: While treated with natural antioxidant Isoverbascoside (Isov), the growth and proliferation of human gastric carcinoma MGC 803 cell were markedly inhibited and the average cell population double time was correspondingly prolonged, with dependence on concentration and treatment time of Isov. Compared with control group, the cell morphology changed toward normality and cloning efficiency on soft-agar was also inhibited while treated with 20 $\mu\text{mol/L}$ Isov. As marker enzymes of differentiation, the activities of alkaline phosphatase (AKP) and lactate dehydrogenase (LDH) were respectively down regulated, depending on treatment time. Detected by flow cytometer, the cell cycle distribution showed G₁ arresting. These results suggested that differentiation of MGC 803 cell induced by natural antioxidant Isov and may associate to cell cycle arresting.

Key words: antioxidant; gastric cancer cell; induced differentiation; isoverbascoside