

小归芍超临界提取物对人胃癌细胞端粒酶活性及凋亡相关蛋白表达的影响

苗庆峰* 陈雪彦 孟 静 裴庭梅 张 伟 张振亚

(河北医科大学药理学教研室, 石家庄 050017)

摘要 研究小归芍超临界提取物诱导人胃癌 BGC-823 细胞凋亡的可能机制。采用 PCR-ELISA 法检测端粒酶活性, 采用 Western 印迹方法观察端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)及凋亡相关蛋白 p16、bax 和突变型 p53 (mutant p53, mt p53)表达的变化。结果表明, 小归芍超临界提取物作用 48 h 能够抑制 BGC-823 细胞端粒酶的活性和 hTERT 的表达, 并能够明显上调 p16 和 bax 的表达, 下调 mt p53 的表达, 这些作用可能是其诱导人胃癌 BGC-823 细胞凋亡的主要机制。

关键词 小归芍超临界提取物; 端粒酶; 突变型 p53; p16; bax

小归芍药物组方由当归芍药散和小陷胸汤原方和方而成, 是经 20 多年的临床实践总结出的经验方, 对慢性萎缩性胃炎癌前病变有较好的疗效, 且病人连续使用 3 个月未见心肝肾等不良反应^[1]。早期研究发现小归芍组方可精简化为 4 味中药, 即当归、白芍、白术和瓜蒌(1:1:1:2), 并通过超临界提取的方法获得了这 4 味药物的有效成分。已往的研究表明, 小归芍超临界提取物可明显抑制人胃癌 BGC-823 细胞的增殖, 诱导其凋亡^[2]。为了阐明其诱导细胞凋亡的机制, 本试验研究了小归芍超临界提取物对人胃癌 BGC-823 细胞端粒酶活性、端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)及凋亡相关蛋白突变型 p53 (mutant p53, mt p53)、p16、bax 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验药物的制备 小归芍药物组方中当归、白芍、白术、瓜蒌四味中药分别用冻干机干燥 2 h 后粉碎成 75 目粒度, 然后按 1:1:1:2 比例混匀, 投入萃取釜中, 萃取条件为: 萃取釜压力 25 Mpa, 温度 40 °C; 分离釜 I 压力 8 Mpa, 温度 50 °C; 分离釜 II 压力 6 Mpa, 温度 50 °C; CO₂ 流量为 15 L/h, 萃取时间 2 h, 得到草绿色液体。

1.1.2 细胞株 人胃癌 BGC-823 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学

研究所。

1.1.3 试剂及仪器 RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(中国杭州四季青公司); 端粒酶活性检测试剂盒(美国 Invitrogen 公司); 一抗(hTERT、bax、mt p53、p16 羊抗人单克隆抗体、 β -肌动蛋白兔抗人多克隆抗体)、二抗(辣根过氧化物酶标记的鼠抗羊或抗兔 Ig) (美国 Santa Cruz 公司); BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Pirece 公司); HA121-50-02 超临界萃取装置(中国江苏南通华安超临界萃取有限公司); DYY-III 7B 型转移电泳仪和 DYC-Z22A 型电泳槽(中国北京六一仪器厂); 酶标仪(德国 BMG 公司); 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); CO₂ 培养箱(日本 Hitachi 公司); AlphaImager™1200 型读胶仪(美国 ST 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物干预 取 RPMI 1640 无血清培养基, 加入新鲜小牛血清(56 °C、30 min 灭活补体), 使其终浓度为 15%。将冻存的人胃癌 BGC-823 细胞复苏, 接种于上述培养基中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 每隔 48 h 换培养基, 用 0.25% 胰蛋白酶消化、收集细胞并传代。取对数生长期的细胞, 配制成 1×10^5 个/ml 的单细胞悬液, 分装于 96 孔培养板中, 每孔 195 μ l。将小归芍超临界提取物溶于丙酮, 用培养液稀释至终浓度为 12.5、25.0、50.0

收稿日期: 2009-02-11 接受日期: 2009-04-10

河北省中医药管理局资助课题(No.2008009)

* 通讯作者。Tel: 0311-86265644, E-mail: mqf2031@126.com

和 100.0 mg/L, 培养液中的丙酮浓度不超过 0.5%, 对照组加入终浓度为 0.5% 的丙酮, 每个稀释度设 6 个复孔。

1.2.2 PCR-ELISA 法检测端粒酶活性 药物干预 48 h 后收集细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后, 将细胞放入加有 200 μ l 预冷 SDS 裂解液的灭菌反应管中, 置冰上裂解 30 min 后, 12 000 g、4 $^{\circ}$ C 离心 20 min, 取上清液置于 DEPC 水处理过的离心管中备用。提取总蛋白并定量后取 2 μ l 样品(含 5 μ g 蛋白质)进行引物延伸: 置 30 $^{\circ}$ C 下 30 min, 循环 1 次。PCR 扩增条件: 置于 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 50 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 90 s, 共循环 33 次, 72 $^{\circ}$ C 平衡 10 min。产物杂交检测过程按试剂盒说明书操作, 最后用酶标仪测定 450 nm 和 690 nm 波长处的吸光度值(A_{450} 和 A_{690}), 计算样本 A 值($A=A_{450}-A_{690}$), 即可代表端粒酶活性, 并根据下列公式计算抑制率: 抑制率(%)=(对照组活性-给药组活性)/对照组活性 $\times$ 100%

1.2.3 Western 印迹分析 取上述蛋白质定量后的样品, 进行 SDS-PAGE, 上样量为 25 μ l, 用水浴式电转仪将凝胶内的蛋白质转至硝酸纤维素膜上(3 h), 用含 1% 小牛血清白蛋白的 TBST 溶液室温封闭 1.5 h, 然后分别与一抗于 4 $^{\circ}$ C 温育过夜, 经 TBST 溶液洗涤 3 次后, 再与二抗室温温育 1 h, 经 TBST 溶液洗 3 次后, 与 ECL 试剂反应 1 min。X 光胶片扫描后, 采用 UVP lab work 4.60 软件测定阳性条带的灰度值, 以 β -肌动蛋白作为内参照物, 计算目的条带与内参产物条带灰度值的比值, 作为衡量该组样品蛋白水平的相对表达量。

1.2.4 统计学分析 所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 应用 SPSS 统计软件, 采用单因素方差分析比较各组变量的差异, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 小归芍超临界提取物对人胃癌 BGC-823 细胞端粒酶活性的影响

结果表明, 不同浓度的小归芍超临界提取物作用于人胃癌 BGC-823 细胞 48 h 后, 均能不同程度地降低端粒酶的活性, 且这种作用呈浓度依赖性, 见表 1。

2.2 小归芍超临界提取物对人胃癌 BGC-823 细胞 hTERT 及凋亡相关蛋白表达的影响

Western 印迹分析结果显示, β -肌动蛋白呈稳定表达, 表达量不随药物干预变化; 随着药物浓度的增大, bax、p16 条带明显变宽、变深, 说明蛋白质的

表达量增加, 而 mt p53、hTERT 的表达量呈相反的变化(图 1 和表 2)。

3 讨论

细胞凋亡是有机体组织细胞衰老和死亡的主要形式, 而肿瘤细胞的增殖与凋亡决定了肿瘤的发生、发展和转归。端粒具有重要的生物学功能, 它可维

Table 1 The effect of supercritical fluid extract of Xiaoguishao on the telomerase activity in BGC-823 cells ($\bar{x}\pm s$)

Groups	n	Telomerase activity	Inhibition rate (%)
Control	6	1.90 $\pm$ 0.04	0
12.5 mg/L	6	1.86 $\pm$ 0.04	2.1
25.0 mg/L	6	1.82 $\pm$ 0.07*	4.2
50.0 mg/L	6	1.76 $\pm$ 0.11*	7.4
100.0 mg/L	6	1.70 $\pm$ 0.10**	10.5

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. control group by one-way ANOVA.

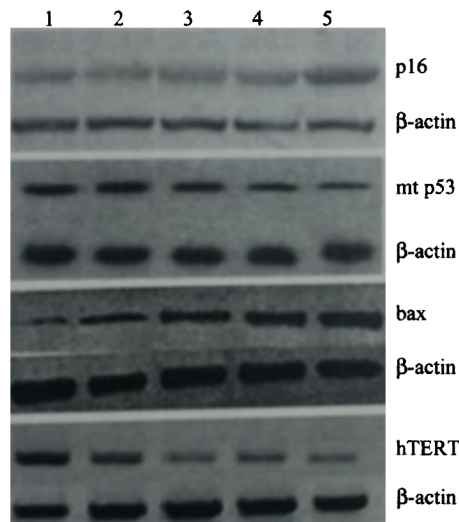


Fig.1 The effects of supercritical fluid extract of Xiaoguishao on the expressions of p16, bax, mt p53 and hTERT in BGC-823 cells

1: control; 2: 12.5 mg/L; 3: 25.0 mg/L; 4: 50.0 mg/L; 5: 100.0 mg/L.

Table 2 The effects of supercritical fluid extract of Xiaoguishao on the expressions of p16, bax, mt p53 and hTERT in BGC-823 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Groups	p16	bax	mt p53	hTERT
Control	0.45 $\pm$ 0.07	0.37 $\pm$ 0.06	0.90 $\pm$ 0.07	0.53 $\pm$ 0.07
12.5 mg/L	0.53 $\pm$ 0.05*	0.41 $\pm$ 0.05	0.82 $\pm$ 0.06	0.46 $\pm$ 0.06
25.0 mg/L	0.62 $\pm$ 0.07**	0.48 $\pm$ 0.10**	0.72 $\pm$ 0.06**	0.43 $\pm$ 0.06*
50.0 mg/L	0.65 $\pm$ 0.09**	0.64 $\pm$ 0.07**	0.60 $\pm$ 0.07**	0.35 $\pm$ 0.07**
100.0 mg/L	0.85 $\pm$ 0.07**	0.70 $\pm$ 0.09**	0.51 $\pm$ 0.06**	0.31 $\pm$ 0.06**

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs. control group by one-way ANOVA.

持染色体的稳定和DNA的完整复制,防止染色体互相融合、重组,保证细胞的正常分化和增殖,而端粒的合成又依赖于端粒酶。端粒酶是一种特殊的DNA聚合酶,它能以自身的RNA作为模板合成端粒,弥补端粒丢失,对维持端粒长度、使细胞获得永生起重要作用。恶性肿瘤组织中的端粒酶检出率达84%~95%,而良性肿瘤和正常组织中端粒酶的检出率仅为4%左右^[3]。人端粒酶包含3个组分:端粒酶RAN (human telomerase RNA, hTR)、端粒酶相关蛋白(telomerase associated protein, TEPI)和hTERT,其中最重要的组分是hTERT。在人正常组织细胞中,hTERT的表达在出生后即被抑制,端粒酶无活性,但若在端粒酶阴性组织中发现hTERT的表达,则即可检测到端粒酶的活性^[4]。同时研究认为,hTERT是端粒酶活性的重要调控亚单位,与端粒酶活性具有直接的相关性,hTERT表达与端粒酶的表达一致,与肿瘤发生有密切关系^[5]。由于hTERT与恶性肿瘤有密切的关系,因此抑制hTERT基因的表达可能是治疗肿瘤的一个有效途径。本实验研究发现,不同浓度的小归芍超临界提取物作用48 h,可以浓度依赖性地降低端粒酶的活性,降低hTERT的表达。

细胞癌基因和抑癌基因对细胞增殖与凋亡起正、负调控作用,某些癌基因与抑癌基因产物作为细胞周期调控的关键蛋白,其表达异常可引起细胞增殖与凋亡异常,进而导致肿瘤的发生。因而相关癌基因、抑癌基因表达的变化成为鉴定外源物质抗肿瘤作用的一个重要依据^[6]。Bax基因为bcl-2家族中的抑癌基因,与癌基因bcl-2共同调控细胞凋亡。Bcl-2可稳定细胞内质膜系统、抑制线粒体内离子及细胞色素c的释放从而抑制凋亡的发生,bax具有对抗bcl-2的作用,可促进线粒体内细胞色素c的释放,促进细胞凋亡的产生^[7]。P53在控制细胞周期和细胞凋亡过程中发挥重要作用,在细胞严重损伤以致无法修复的情况下,野生型p53作为凋亡活化基因,抑制抗凋亡蛋白bcl-2的表达,从而触发细胞凋亡,可防止潜在恶性细胞生长和存活,而突变的p53则不能引起细胞增殖的停滞或凋亡,导致细胞生长失控,肿瘤发生。野生型p53半衰期短,用常规的免疫印迹法

不易检出,而mt p53半衰期延长,因此目前用免疫印迹法检测到的p53均为mt p53^[8]。P16抑癌基因产物特异结合CDK34和CDK6,阻止细胞G₁/S期转化,使细胞周期停止在G₁期,避免细胞的过度增生,在胃癌的研究中发现,该基因缺失与肿瘤分化、浸润、转移密切相关^[9]。以往的研究发现,小归芍超临界提取物可以明显诱导人胃癌BGC-823细胞的凋亡,抑制增殖^[2]。本研究结果显示,小归芍超临界提取物处理后的人胃癌BCG-823细胞与对照组相比,细胞内的bax、p16表达明显升高,而mt p53表达明显降低,提示该提取物使bax和p16的表达上调、mt p53的表达下调。

综上所述,小归芍超临界提取物可以抑制hTERT的表达,降低端粒酶的活性,上调bax和p16的表达,下调mt p53的表达,从而诱导胃癌细胞的凋亡。

参考文献(References)

- [1] 王志坤, 刘晓辉, 白海燕, 等. 小归芍颗粒治疗胃癌前病变临床观察, *上海中医药杂志*, 2006, 40(8): 25-26
- [2] 张伟, 贾会珍, 王志坤, 等. 小归芍超临界提取物抑制胃癌细胞系BGC-823增殖的实验研究, *河北医科大学学报*, 2008, 29(3): 337-339
- [3] Shats I, Milyavsky M, Tang X, *et al.* p53-dependent down-regulation of telomerase is mediated by p21waf1, *J Biol Chem*, 2004, 279(49): 50976-50985
- [4] Fujita Y, Fujikane T, Fujiuchi S, *et al.* The diagnostic and prognostic relevance of human telomerase reverse transcriptase mRNA expression detected in situ in patients with nonsmall cell lung carcinoma, *Cancer*, 2003, 98(5): 1008-1013
- [5] Evan GI, Vousden KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer, *Nature*, 2001, 411(6835): 342-348
- [6] Stewart ZA, Westfall MD, Pietenpol JA. Cell-cycle dysregulation and anticancer therapy, *Trends Pharmacol Sci*, 2003, 24(3): 139-145
- [7] Tsujimoto Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria, *Biosci Rep*, 2002, 22(1): 47-58
- [8] Azarhoush R, Keshtkar AA, Amirani T, *et al.* Relationship between p53 expression and gastric cancers in cardia and antrum, *Arch Iran Med*, 2008, 11(5): 502-506
- [9] Song SH, Jong HS, Choi HH, *et al.* Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16 (INK4a) expression in gastric adenocarcinoma, *Int J Cancer*, 2000, 87(2): 236-240

Effects of the Supercritical Fluid Extract of Xiaoguishao on Telomerase Activity and Expression of Apoptosis-related Proteins in Human Gastric Cancer Cell Line

Qing-Feng Miao*, Xue-Yan Chen, Jing Meng, Ting-Mei Pei, Wei Zhang, Zhen-Ya Zhang
(Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract To investigate the potential mechanism of apoptosis induced by the supercritical fluid extract of Xiaoguishao on human gastric cancer cell line BGC-823, PCR-ELISA assay was used to detect the telomerase activity and Western blot was used to analyze the expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT), p16, bax, and mutant p53 (mt p53). PCR-ELISA assay showed that in the extract of Xiaoguishao treating groups, the telomerase activity was significantly decreased compared with that in control group. Western blot results indicated that the expression of hTERT and mt p53 was decreased but the expression of p16 and bax was increased by the extract. The activation of p16 and bax and the suppression of telomerase activity and p53 might contribute to the apoptosis induced by the extract.

Key words supercritical fluid extract of Xiaoguishao; telomerase; mutant p53; p16; bax

Received: February 11, 2009

Accepted: April 10, 2009

This work was supported by the Administration of Traditional Chinese Medicine of Hebei Province (No.2008009)

*Corresponding author. Tel: 86-311-86265644, E-mail: mqf2031@126.com