

猫儿眼植物酸对人 SGC-7901 细胞的抑制作用

俞发荣, 连秀珍, 冯书涛(甘肃政法学院公安分院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:目的 分离提取猫儿眼植物酸并探讨其对人胃癌(SGC-7901)细胞抑制作用机制。方法 采用色-质联用仪、流式细胞仪、MTT法和克隆形成法对猫儿眼植物酸组分及其对SGC-7901细胞的抑制作用进行分析检测。结果 分别给予猫儿眼植物酸(浓度分别为10.0, 1.0和0.1 $\mu\text{g/mL}$)48h, 用MTT法测定其对SGC-7901细胞的抑制率分别为86.9%, 77.9%和70.6%; 克隆形成抑制率分别为67.8%, 55.7%和30.9%; 凋亡率分别为39.4%, 31.2%和20.2%。结论 猫儿眼植物酸对SGC-7901细胞具有显著抑制作用, 其效果随给药浓度的增加而递增。

关键词:猫儿眼; 植物酸; 人SGC-7901细胞; 抑制作用

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)06-0451-04

Inhibitory effects of Maoeryan vegetable acid on human SGC-7901 cells

YU Fa-rong, LIAN Xiu-zhen, FENG Shu-tao(School of Public Security, Gansu Institute of Political Science and Law, Lanzhou 730070, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the inhibitory effect and mechanism of Maoeryan vegetable acid on human SGC-7901 cells. **METHODS** The component of Maoeryan vegetable acid and the inhibitory effect of Maoeryan vegetable acid on human SGC-7901 cells were determined by chromatography mass spectrometry, flow cytometry, methods of MTT and clone forming. **RESULTS** Maoeryan vegetable acid at concentrations of 10.0, 1.0 and 0.1 $\mu\text{g/mL}$ were added to the cultures of human SGC-7901 cells for 48h, respectively, and the inhibitory rates were 86.9%, 77.9% and 70.6%, respectively; clone forming inhibitory rates were 67.8%, 55.7% and 30.9%, respectively; apoptosis rates were 39.4%, 31.2% and 20.2%, respectively. **CONCLUSION** Maoeryan vegetable acid has significantly inhibitory effect on human SGC-7901 cells with concentration-dependent way.

KEY WORDS: Maoeryan; vegetable acid; human SGC-7901 cells; inhibitory effect

猫儿眼(*Euphorbia kansui* L.)为大戟科(Euphorbiaceae)多年生肉质草本植物, 广泛分布于我国西北和华北地区, 根入药。在民间曾有用猫儿眼生药治疗食管癌的记载。本实验选甘肃天水产的猫儿眼, 经分离提取取得植物酸对人SGC-7901细胞的抑制作用进行实验研究, 以期对猫儿眼植

物酸的开发研究和临床应用提供资料。

1 材料和方法

1.1 药物、试剂和仪器猫儿眼植物酸

由兰州大学化工学院天然植物研究所分离提取取得, 其组分由中国科学院兰州化学物理研究所鉴定(所用原植物猫

基金项目:甘肃政法学院“135人才工程”项目基金资助(GZF 04-75)

作者简介:俞发荣(1959-), 男, 博士, 研究员, 硕士生导师。研究方向: 肿瘤药理学, 行为生理学。E-mail: yufarong@tom.com; Tel: 0931-3979019

儿眼购于甘肃省医药公司,经甘肃省药品监督所张伯崇主任药师鉴定)。实验时,以二甲基亚砒助溶加 RPMI1640 培养液配制所需浓度(二甲基亚砒含量<0.003%)。5-氟尿嘧啶(5-FU):上海旭东海普药业有限公司生产,批号 0000306; RPMI1640:Grand Island N. Y. 14072 USA;胎牛血清:中美合资兰州民海生物工程有限公司生产,批号:20030709;MTT:上海生工生物工程技术有限公司;酶联免疫检测仪:上海雷勃分析仪器有限公司(MULTISKAN MK3);流式细胞仪:Coulter EPICS XL 型,USA 色-质联用仪:HP6890/5973. 96 孔板:Costar 3599, Corning, NY14831, USA。

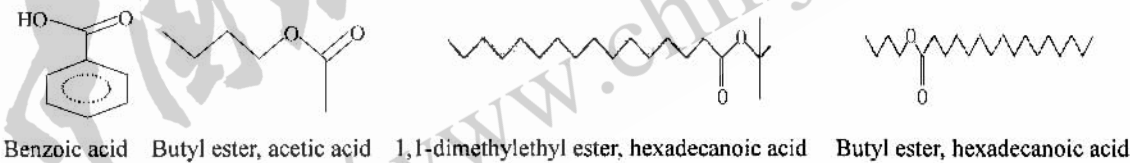
1.2 细胞系

人胃癌 SGC-7901 细胞系,由兰州军区总医院药局实验室惠赠。全部实验在甘肃省医学科学研究院药理毒理学实验室完成。

1.3 MTT 法实验

将 SGC-7901 细胞置于内含 10% 的胎牛血清、2mmol/L 谷氨酰胺、100u/mL 青霉素、100u/mL 链霉素的 RPMI1640 培养液,5% CO₂, 37℃, 饱和湿度条件中培养。取培养细胞以 2.5 × 10⁵/mL 的密度分别接种于 96 孔板,每孔 180μL。给药组:设 3 个浓度(10.0, 1.0 和 0.1 μg/mL),每孔加药 20μL;5-FU 组:每孔加 5-FU(10 μg/mL)20μL;对照组加等量 PBS 液。每组 3 个重复孔。培养 48h 后,加 MTT(5mg/mL, PBS 液配制)每孔 10μL,孵育 4h,去培养液,每孔加 DMSO 100μL,振荡 10min,用酶联免疫检测仪在 494nm 处测其 A 值,计算细胞生长抑制率(inhibitory rate, IR)。

细胞生长抑制率(IR) = (1 - $\frac{\text{实验组平均 A 值}}{\text{对照组平均 A 值}}$) × 100%



2.2 MTT 法测定结果

分别给予 SGC-7901 细胞 5-FU 和猫儿眼植物酸 10.0, 1.0 和 0.1 μg/mL 培养 48h,用 MTT 法测定,其 A 值随给药浓度增加而降低,抑瘤率则升高,与对照组比,有差异有显著性意义(P<0.001),结果见图 1。

2.3 克隆形成数

分别给予 SGC7-901 细胞 5-FU 和猫儿眼植物酸 10.0、1.0 和 0.1 μg/mL,静置培养 7d 后计算克隆数发现,克隆的形成随给药浓度增加而减少,抑制率则升高,与对照组比,差异有显著性意义(P<0.001),结果见图 2。

2.3 流式细胞仪检测结果

给药培养 48h 后用流式细胞仪检测发现,对照组在 G1 峰左侧未见明显的 AP(apoptosis peak)峰,5-FU 组和给药组在 G1 峰左侧均出现细胞凋亡峰,凋亡率随剂量增加而递增,分别为:23.6%, 39.4%、31.2% 和 20.2%,结果见图 3~7。

1.4 克隆形成实验

将瘤细胞以 4 × 10² 个/mL 接种于 16 孔板(每孔 1mL),每孔再加 1mL 培养液,于 37℃,5% CO₂ 的温箱中培养 24h,各组加入相应的药物,每孔 20μL,对照组加等量的 PBS 液,各设 3 个重复孔,静置培养 7d,用姬姆萨氏液染色 10min,流水缓慢洗去染色液,在 × 10 倒置显微镜下计数含 50 个细胞以上的克隆,计算克隆形成抑制率。

克隆形成抑制率(IR) = $(\frac{\text{对照组克隆形成数} - \text{实验组克隆形成数}}{\text{对照组克隆形成数}}) \times 100\%$

1.5 流式细胞仪检测

取培养细胞,加 0.1% 胰蛋白酶消化液 2mL 进行消化后,加含 10% 的胎牛血清的 RPMI1640 培养液终止消化,1 000r/min 离心 5min,弃去上清液,收集细胞,稀释为 2 × 10⁶ 个/mL。取 20mL 培养瓶 5 个,每瓶加 RPMI1640 培养液 4mL,加细胞液 1mL。给药组:每瓶加药 500μL;5-FU 组:每瓶加 5-FU(10 μg/mL)500μL;对照组加等量的 PBS 液。培养 48h 后,取培养细胞加 0.1% 胰蛋白酶消化液 2mL 消化后,1 000r/min 离心 5min,弃去上清液,收集细胞,加 75% 的冷乙醇 2mL 固定,按流式细胞检测要求进行染色,测定凋亡率。

1.6 统计学分析

实验数据采用 SPSS10.0 统计软件中 Dunnett 单因素方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 猫儿眼植物酸组分分析结果

用色-质联用仪分析结果如下:

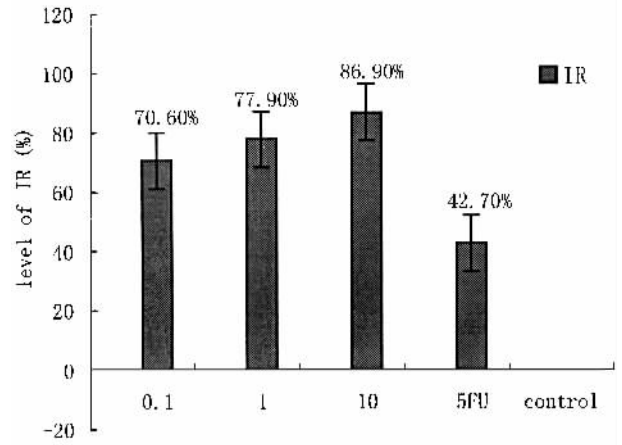


图 1 猫儿眼植物酸对 SGC-7901 细胞生长的抑制作用(与对照组比:均 P<0.001)

Fig 1 Inhibitory effect of Maoeryan vegetable acid on human SGC-7901 cells(compared with the control, ** P<0.001)

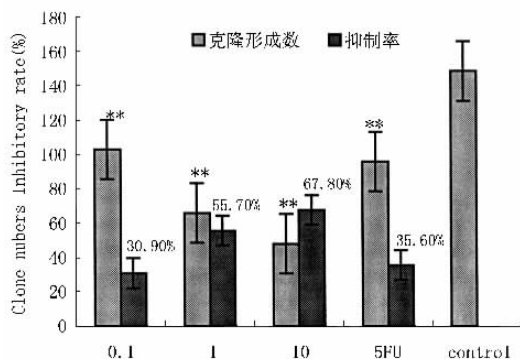


图2 猫耳眼植物酸对 SGC-7901 克隆形成的抑制作用(与对照组比: ** $P < 0.001$)

Fig 2 Clone inhibitory rate of Maoryan vegetable acid on human SGC-7901 cells(compared with the control, ** $P < 0.001$)

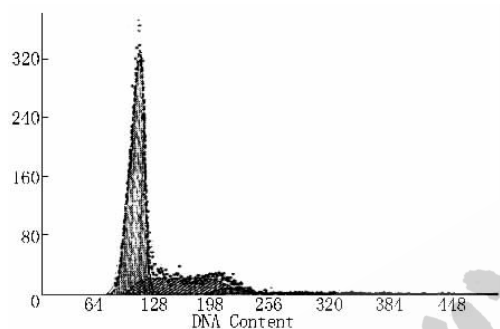


图3 对照组: 未出现凋亡峰

Fig 3 Control group: no apoptosis peak

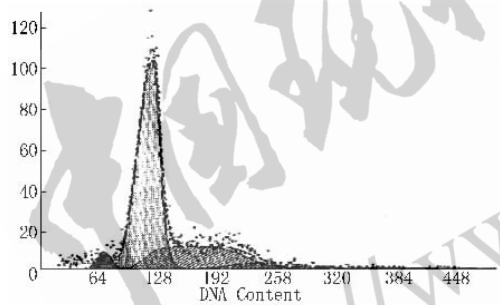


图4 5-FU 组: 出现凋亡峰, 凋亡率为 23.6%

Fig 4 5-FU group: appeared a apoptosis peak, apoptosis rate was 23.6%

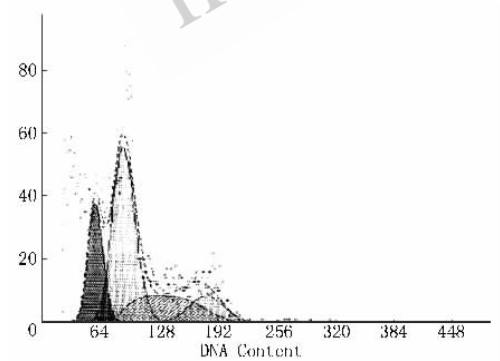


图5 10 μg/mL 组: 出现凋亡峰, 凋亡率为 39.4%

Fig 5 10 μg/mL group: appeared a apoptosis peak, apoptosis rate was 39.4%

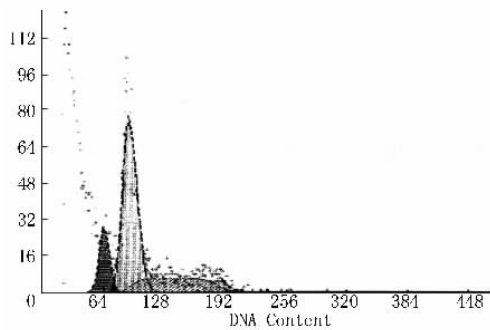


图6 1 μg/mL 组: 出现凋亡峰, 凋亡率为 31.2%

Fig 6 1 μg/mL group: appeared a apoptosis peak, apoptosis rate was 31.2%

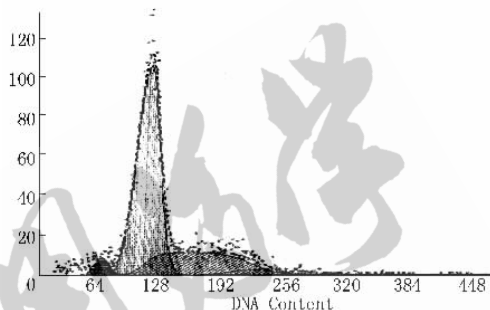


图7 0.1 μg/mL 组: 出现凋亡峰, 凋亡率为 20.2%

Fig 7 0.1 μg/mL group: appeared a apoptosis peak, apoptosis rate was 20.2%

3 讨论

Wang 等^[1,2]从猫耳眼中分离提取出 12 种多环二萜类化合物和 4 种巨大戟二萜醇型二萜类化合物,并对早期 *Xenopus laevis* 胚胎分离细胞的分裂作用进行了实验研究,发现巨大戟二萜醇衍生物给药量在 0.5 ~ 200 μg/mL 之间,对胚胎细胞分裂具有明显的抑制作用。Wu 等^[3]对 P388 白血病小鼠分别给予甘遂宁 A 和 B 100,500 μg/kg, T/C 值分别为 176、177%。Yasukawa 等^[4]在用佛波酯(TPA)和二甲基苯蒽(DMBA)诱发小鼠皮肤癌之前给予从猫耳眼中分离提取出的三萜类化合物,20 周后测得三萜类化合物对皮肤癌诱发半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.2 ~ 1.0 mg/kg。陈静等^[5]采用猫耳眼水提取物对 L₆₁₅ 白血病抑制作用及其抗氧化作用实验结果显示,灌胃 10.0 g/kg 水提取物,白细胞数比模型组降低了 70.1%,肝脏 SOD、GSH-Px 分别增加了 59.9% 和 44.3%。本实验采用色-质联用仪对猫耳眼植物酸组分进行了分析,其抗肿瘤活性实验结果表明,分别给予剂量为 0.1, 1.0, 10.0 μg/mL 猫耳眼植物酸,对人 SGC-7901 细胞均有显著的抑制作用,对细胞凋亡有明显的促进作用,效果接近或高于 5-FU 组,以上作用随给药浓度的增加而递增,其作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Wang LY, Wang LN, Yao XS, *et al.* Diterpenes from the Roots of *Euphorbia kansui* and their *in vitro* effects on the cell division of *Xenopus* [J]. *J Nat Prod*, 2002, 65: 1246-1251.

- [2] Wang LY, Wang LN, Yao XS, *et al.* Diterpenes from the Roots of *Euphorbia kansui* and their *in vitro* effects on the cell division of *Xenopus*(2)[J]. Chem Pharm Bull, 2003, 51(8):935-941.
- [3] Wu TS, Lin YM, Haruna M. Antitumor agents, 119. Kansuiphorins A and B, two novel tileukemic diterpenesters from *Euphorbnia kansui*[J]. J Nat Prod, 1991, 54(3):823-826.
- [4] Yasukawa K, Akihisa T, Yoshida ZY, *et al.* Inhibitory effect of euphol, a triterpene alcohol from the roots of *Euphorbia kansui*, on tumour promotion by 12-o-tetradecanoylphorbol-13-acetate in two-stage carcinogenesis in mouse skin[J]. J Pharm Pharmacol, 2000, 52(1):119-124.
- [5] 陈静, 侯相麟, 俞发荣. 猫儿眼提取物对 L615 白血病抑制及其抗氧化作用的研究[J]. 兰州大学学报, 2003, 39:453-460.

收稿日期:2004-06-01