

二氢青蒿素对胃癌细胞株 SGC7901 增殖的影响

王爱军 冯俊伟 王红钰 郑宝军 施华 吴肖

【摘要】 目的 观察二氢青蒿素(DHA)对胃癌细胞株 SGC7901 增殖的影响及作用机制。**方法** SGC7901 细胞分为 DHA 组和对照组, DHA 组分别加入浓度为 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ DHA 的培养基, 对照组加入等体积含 0.1% DMSO 的培养基。不同浓度 DHA 处理 SGC7901 细胞 24、48 和 72 h 后, MTT 法检测细胞的增殖情况。不同浓度 DHA 处理 SGC7901 细胞 24 h 后, 流式细胞仪测定细胞周期的分布; 100 $\mu\text{mol/L}$ DHA 处理细胞 24 h 后, 采用 Western blot 法测定细胞周期蛋白 A(Cyclin A)、Cyclin D1、Cyclin E、细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4) 和 P16 蛋白的表达水平; 免疫共沉淀检查 CDK4 与 Cyclin D1 和 P16 之间的相互作用。采用单因素方差分析和 t 检验进行统计学分析。**结果** 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ DHA 分别处理 SGC7901 细胞 24、48 和 72 h, 均明显抑制细胞增殖 ($F = 78.66, 235.37, 93.75, P < 0.05$); 与对照组比较, 不同浓度 DHA 组 G_0/G_1 期细胞比例均明显上升 ($F = 18.42, P < 0.05$); 100.00 $\mu\text{mol/L}$ DHA 处理细胞 24 h, Cyclin D1 和 CDK4 蛋白的相对表达量分别为 $0.17 \pm 0.05, 0.24 \pm 0.06$, 较对照组的 $0.67 \pm 0.15, 0.64 \pm 0.18$ 明显下降 ($t = 7.746, 5.164, P < 0.05$); DHA 组 Cyclin E 蛋白的相对表达量为 0.35 ± 0.06 , 较对照组的 0.42 ± 0.06 也有下降, 但差异无统计学意义 ($t = 2.021, P > 0.05$); DHA 组和对照组 Cyclin A 蛋白的相对表达量分别为 0.38 ± 0.08 和 0.35 ± 0.09 , 两组比较, 差异无统计学意义 ($t = 1.266, P > 0.05$); 与对照组 P16 蛋白相对表达量 (0.29 ± 0.07) 比较, DHA 组 P16 蛋白相对表达量 (0.54 ± 0.12) 显著升高 ($t = 4.408, P < 0.05$)。免疫共沉淀结果示 DHA 处理 SGC7901 细胞后, CDK4 与 Cyclin D1 结合减少, 与 P16 结合增加。**结论** DHA 将 SGC7901 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期, 其主要机制可能与下调 Cyclin D1 和 CDK4 表达、上调 P16 表达, 抑制 Cyclin D1 与 CDK4 的结合, 促进 P16 与 CDK4 的结合有关。

【关键词】 胃肿瘤; 二氢青蒿素; 增殖; 细胞周期

Effects of dihydroartemisinin on the proliferation of gastric cancer cell line SGC7901 WANG Ai-jun, FENG Jun-wei, WANG Hong-yu, ZHENG Bao-jun, SHI Hua, WU Xiao. Department of Tumor Surgery, Tangshan Gongren Hospital, Tangshan 063000, China

Corresponding author: WANG Ai-jun, Email: wajts@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of dihydroartemisinin (DHA) on the proliferation of gastric cancer cell line SGC7901 and its mechanism. **Methods** SGC7901 cells were divided into the DHA group and the control group. SGC7901 cells in the DHA group were treated with DHA of different concentrations (6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 $\mu\text{mol/L}$), SGC7901 cells in the control group were cultured in the 0.1% DMSO medium. The proliferation of SGC7901 cells was detected by the MTT method at different time points (24, 48, 72 hours). Cell cycles of SGC7901 in the DHA group were observed by flow cytometry at 24 hours after treatment. The expressions of Cyclin A, Cyclin D1, Cyclin E, Cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) and P16 were detected by Western blot after treating SGC7901 with DHA at concentration of 100 $\mu\text{mol/L}$ for 24 hours. The interaction between CDK4 with Cyclin D1 or P16 was examined using the co-immunoprecipitation assay. All data were analyzed using the one-way analysis of variance or the t test. **Results** The proliferation of SGC7901 cells was significantly inhibited after the treatment with DHA at different concentrations (6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 $\mu\text{mol/L}$) for 24, 48 and 72 hours ($F = 78.66, 235.37, 93.75, P < 0.05$). Compared with control group, the number of SGC7901 cells in the G_0/G_1 phase in the DHA group was significantly increased ($F = 18.42, P < 0.05$). After treating SGC7901 cells with DHA for 24 hours, the protein expressions of Cyclin D1 and CDK4 were 0.67 ± 0.15 and 0.64 ± 0.18 in the control group, which were significantly higher than 0.17 ± 0.05

and 0.24 ± 0.06 in the DHA group ($t = 7.746, 5.164, P < 0.05$). The protein expressions of Cyclin E were 0.42 ± 0.06 in the control group and 0.35 ± 0.06 in the DHA group, with no significant difference ($t = 2.021, P > 0.05$). The protein expressions of Cyclin A were 0.35 ± 0.09 in the control group and 0.38 ± 0.08 in the DHA group, with no significant difference between the 2 groups ($t = 1.266, P > 0.05$). The protein expressions of P16 were 0.29 ± 0.07 in the control group and 0.54 ± 0.12 in the DHA group, with significant difference between the 2 groups ($t = 4.408, P < 0.05$). The results of co-immunoprecipitation assay showed that DHA decreased the interaction between CDK4 and Cyclin D1, and increased the interaction between CDK4 and P16.

Conclusion DHA induces SGC7901 cells arrested in G_0/G_1 phase, and the effect may be related with its down-regulation of Cyclin D1 and CDK4, up-regulation of P16, decreasing the interaction between CDK4 and Cyclin D1, and increasing the interaction between CDK4 and P16.

【Key words】 Gastric neoplasms; Dihydroartemisinin; Proliferation; Cell cycle

青蒿素于 20 世纪 70 年代由我国科学家自主研发,现已成为世界范围首选的抗疟疾药物。青蒿素及其衍生物具有广泛的药理作用,尤其抗肿瘤作用近年来备受关注。二氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)为青蒿素类药物在体内的主要活性代谢产物,其口服生物利用度是青蒿素的 10 倍以上。现已证实,DHA 具有很强的抗肿瘤活性,而对正常组织细胞的毒性很低^[1-2]。本研究以胃癌细胞株 SGC7901 为对象,观察 DHA 对胃癌细胞生长的影响,并探讨其作用机制。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

人胃癌细胞株 SGC7901 购自中国科学院上海细胞所;DHA(批号:100184-200402)购自中国药品生物制品检定所;MTT 购自美国 Sigma 公司;兔抗人多克隆抗体细胞周期蛋白 A(Cyclin A)、Cyclin D1、Cyclin E、细胞周期蛋白依赖性激酶 4(Cyclin-dependent kinase 4, CDK4)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 2A/P16-INK4a(下文简称 P16)以及 β -肌动蛋白均购自美国 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞分组

人胃癌细胞株 SGC7901 于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中 37°C 、5% CO_2 培养。将细胞分为 DHA 组(分别以 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHA 处理)和对照组,共 6 组。

1.3 MTT 分析检测细胞增殖抑制率

取对数生长期的 SGC7901 细胞接种于 96 孔板,每组设 6 个复孔。DHA 组分别加入不同浓度的 DHA 的培养基 100 μl ,对照组加入等体积含 0.1% DMSO 的培养基。各组细胞分别孵育 24、48 和 72 h,各孔中加入 20 μl MTT(浓度为 5 g/L),培养 4 h,每孔加入 DMSO 150 μl ,室温振荡 15 min。酶标仪于 490 nm 处测其吸光度(A)值,求其平均值。细胞抑制

率(%) = $(1 - \text{DHA 组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期分布

分组处理细胞后 37°C 培养 24 h, PBS 清洗培养孔 3 次, 0.25% 胰酶消化并离心收集细胞,加入 70% 乙醇 1 ml, 使用 Becton Dickinson FACScan 流式细胞仪检测细胞周期。

1.5 Western blot 法检测细胞周期相关蛋白的表达

SGC7901 细胞分别加入 100.00 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHA 培养 24 h 后,收集细胞,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min,离心后,上层澄清液即为蛋白裂解液。Bradford 定量,各组取等量蛋白变性后经 10% SDS-聚丙烯酰胺分离,转移到 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,用各目标分子特异性一抗(Cyclin A、Cyclin D1、Cyclin E、CDK4、P16,稀释浓度为 1:1000) 4°C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次,加相应二抗(稀释浓度为 1:3000),室温孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次,采用化学发光法显色,对条带进行吸光度积分扫描。 β -肌动蛋白作为内参照。目的蛋白表达水平以各目的蛋白条带 A 值与内参照 A 值的比值表示。

1.6 免疫共沉淀分析 CDK4 与 Cyclin D1、P16 的结合

SGC7901 细胞分别加入 100.00 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHA 培养 24 h 后,收集细胞,进行蛋白提取及定量。取 80 μg 蛋白与 1 μg CDK4 抗体混合, 4°C 摇动 2 h 后加入 20 μl 琼脂糖蛋白 A, 4°C 摇动过夜, 12 000 r/min (离心半径为 8.5 cm) 4°C 离心 2 min,收集蛋白 A-抗原-抗体三元复合物,用 2 \times SDS 上样缓冲液悬浮沉淀, 100°C 煮沸 5 min,室温下 12 000 r/min 离心 1 min,取上清液进行 SDS-PAGE、转膜、5% 脱脂奶粉 4°C 封闭过夜后,加入抗 Cyclin D1 或 P16 一抗(稀释浓度为 1:400),室温结合反应 3 h 后, TTBS 洗膜, 10 min \times 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:5000),室温结合反应 2 h,用洗膜液充分洗膜后,抗体结合区带用化学发光法检测。

1.7 统计学分析

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 Dunnett *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHA 对 SGC7901 细胞增殖的抑制作用

6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ DHA 分别处理 SGC7901 细胞 24、48、72 h,均显著抑制细胞增殖($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 不同浓度 DHA 处理 SGC7901 细胞不同时间后的增殖抑制率($\bar{x} \pm s, \%$)

DHA 浓度($\mu\text{mol/L}$)	样本量	24 h	48 h	72 h
6.25	6	8.6 \pm 1.4	8.6 \pm 1.5	12.1 \pm 2.1
12.50	6	17.6 \pm 4.2	19.6 \pm 4.6	23.4 \pm 5.7
25.00	6	22.3 \pm 4.6	25.3 \pm 5.1	35.3 \pm 5.9
50.00	6	41.1 \pm 6.5	47.9 \pm 7.3	59.6 \pm 7.8
100.00	6	63.3 \pm 8.9	74.2 \pm 8.9	83.1 \pm 11.0
<i>F</i> 值		78.66	235.37	93.75
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:DHA:二氢青蒿素

2.2 DHA 对细胞周期分布的影响

不同浓度 DHA 处理 SGC7901 细胞 24 h 后,与对照组比较,6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 G_0/G_1 期平均细胞比例明显上升,差异有统计学意义($t = -2.93, -3.50, -4.32, -4.88, -5.14, P < 0.05$);S 期平均细胞比例相应减少,差异有统计学意义($t = 3.71, 4.86, 6.10, 7.74, 10.04, P < 0.05$); G_2/M 期平均细胞比例差异无统计学意义($t = -0.04, 0.00, 0.17, 0.43, -0.38, P > 0.05$)。见表 2。

表 2 不同浓度 DHA 处理 SGC7901 细胞 24 h 后细胞周期分布比较($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	样本量	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
对照组	6	47.6 \pm 6.8	35.5 \pm 6.1	16.9 \pm 3.7
DHA 组				
6.25 $\mu\text{mol/L}$	6	60.5 \pm 7.1 ^a	22.6 \pm 4.8 ^a	17.0 \pm 3.8
12.50 $\mu\text{mol/L}$	6	63.5 \pm 7.5 ^a	19.5 \pm 4.1 ^a	16.9 \pm 3.1
25.00 $\mu\text{mol/L}$	6	67.9 \pm 8.0 ^a	15.6 \pm 4.0 ^a	16.5 \pm 3.9
50.00 $\mu\text{mol/L}$	6	72.6 \pm 9.2 ^a	11.5 \pm 3.3 ^a	15.9 \pm 3.6
100.00 $\mu\text{mol/L}$	6	75.4 \pm 10.0 ^a	6.8 \pm 1.9 ^a	17.8 \pm 3.7
<i>F</i> 值		18.42	48.8	1.94
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	>0.05

注:^a 与对照组比较, $P < 0.05$; DHA:二氢青蒿素

2.3 DHA 对细胞周期相关蛋白表达的影响

100.00 $\mu\text{mol/L}$ DHA 处理细胞 24 h, Cyclin D1 和 CDK4 蛋白的相对表达量分别为 $0.17 \pm 0.05, 0.24 \pm 0.06$, 较对照组的 $0.67 \pm 0.15, 0.64 \pm 0.18$ 明显下降($t = 7.746, 5.164, P < 0.05$);DHA 组 Cyclin E 蛋白的相对表达量为 0.35 ± 0.06 , 较对照组的 0.42 ± 0.06 也有下降,但差异无统计学意义($t = 2.021, P > 0.05$);DHA 组和对照组 Cyclin A 蛋白的相对表达量分别为 $0.38 \pm 0.08, 0.35 \pm 0.09$, 两组比较,差异无统计学意义($t = 1.266, P > 0.05$);与对照组 P16 蛋白的相对表达量(0.29 ± 0.07)比较, DHA 组 P16 蛋白的相对表达量(0.54 ± 0.12)显著升高($t = 4.408, P < 0.05$)。见图 1。

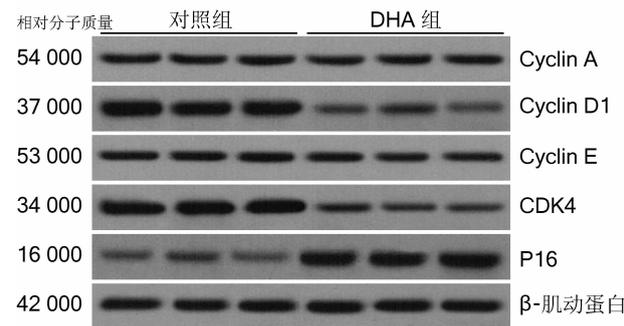


图 1 Western blot 检测对照组和 100.00 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 SGC7901 细胞中细胞周期相关因子的蛋白表达 DHA:二氢青蒿素

2.4 DHA 对 CDK4 与 Cyclin D1、P16 结合的影响

免疫共沉淀检测结果显示:对照组中均可检出 CDK4 与 Cyclin D1 及 P16 的相互作用,但是 CDK4 主要以结合 Cyclin D1 为主。100.00 $\mu\text{mol/L}$ DHA 处理细胞 24 h,细胞内与 CDK4 结合的 Cyclin D1 明显减少,而与 CDK4 结合的 P16 显著增加。见图 2。

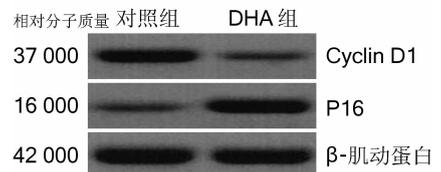


图 2 免疫共沉淀检测对照组和 100.00 $\mu\text{mol/L}$ DHA 组 SGC7901 细胞中 CDK4 与 Cyclin D1、P16 的结合 DHA:二氢青蒿素

3 讨论

胃癌细胞是一类不受正常细胞增殖机制调控的增殖异常旺盛的细胞,故有关肿瘤与细胞周期调控的研究已成为研究热点之一^[3-5]。DHA 具有较强的抗肿瘤活性,且对机体毒性较低^[6-7]。本研究以 SGC7901 胃癌细胞为对象观察了 DHA 对肿瘤细胞

的作用及可能机制。本研究结果发现:6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{mol/L}$ DHA 均可抑制胃癌细胞的生长。由于许多新型抗癌药物的研发都选择以细胞周期调控相关因子作为作用靶点,本研究重点观察了 DHA 对胃癌细胞周期的影响。其结果表明:DHA 可将肿瘤细胞阻滞于 G_1 期。为探讨其作用机制,本研究进一步检测了在肿瘤细胞周期调控中发挥重要作用的 Cyclins、CDK 的蛋白表达水平。

Cyclin 的表达呈周期性变化,其家族中 Cyclin D1 在 G_1 期早期表达增加,是细胞周期运行的起始因子。Cyclin E 表达开始于 G_1 期中期,控制细胞是否能够进入 S 期。Cyclin A 在 G_1 期晚期于 Cyclin E 后表达,在 S 期与 G_2 期达到高峰。本研究结果表明:DHA 作用后 Cyclin D1 表达显著下降,Cyclin E 表达略有下降,而 Cyclin A 表达变化不明显,提示 DHA 主要通过下调 Cyclin D1 将细胞阻滞于 G_1 期。

CDK4 是调控网络的核心分子,其含量及活化程度在细胞增殖 G_1/S 转换过程中起限速作用^[8]。Cyclins 及 CDK 抑制蛋白对 CDKs 活性调节的平衡为正常细胞生长增殖所必需。在 Cyclins 中存在一段高度保守的氨基酸序列,被称为“周期蛋白盒”,是 Cyclins 与 CDK 互相结合的关键区。在 G_1 期,主要发挥作用的 Cyclin D1 可与 CDK4 结合,激活 CDK4 蛋白激酶,可促进细胞由 G_1 期向 S 期转化,导致细胞增殖。P16 蛋白又称为多肿瘤抑制基因,是 CDKs 中的一个抑癌基因,它可竞争性与 Cyclin D1 共同调节 CDK4 活性,若 Cyclin D1 表达过多或者 P16 表达过少都可导致肿瘤的发生。本研究结果发现:对照组胃癌细胞 Cyclin D1 和 CDK4 表达较高;DHA 处理细胞后,Cyclin D1 和 CDK4 蛋白表达明显下降,P16 的表达则呈现增高的趋势。P16 作

为负向调节细胞周期因子,可同 Cyclin D1 竞争性与 CDK4 结合形成复合物,抑制 CDK4 的活性进而抑制细胞周期 G_1/S 转换^[9]。进一步的免疫共沉淀结果证实:对照组细胞中,CDK4 主要与 Cyclin D1 形成复合物,而 DHA 处理细胞后,CDK4 与 Cyclin D1 结合减少,与 P16 结合增加。本研究结果表明:DHA 能通过下调细胞周期蛋白 Cyclin D1 和 CDK4 表达,上调 P16 表达,改变 CDK4 与 Cyclin D1 和 P16 的结合,阻滞细胞周期,在治疗胃癌方面具有良好的前景。

参考文献

- [1] He R, Mott BT, Rosenthal AS, et al. An artemisinin-derived dimer has highly potent anti-cytomegalovirus (CMV) and anti-cancer activities. *PLoS One*, 2011, 6(8):e24334.
- [2] 赵飞,刘秋玲.青蒿素类药物联合化疗对肿瘤细胞的作用. *武警医学院学报*, 2012, 21(3):221-223, 228.
- [3] Xu Y, Xia F, Ma L, et al. MicroRNA-122 sensitizes HCC cancer cells to adriamycin and vincristine through modulating expression of MDR and inducing cell cycle arrest. *Cancer Lett*, 2011, 310(2):160-169.
- [4] Wang H, Zhang C, Rorick A, et al. CCI-779 inhibits cell-cycle G2-M progression and invasion of castration-resistant prostate cancer via attenuation of UBE2C transcription and mRNA stability. *Cancer Res*, 2011, 71(14):4866-4876.
- [5] 耿明,王琳,曹永成,等.细胞周期蛋白 D1 和 P21 WAF1 在胃癌中的表达及其与化疗药物敏感性的关系. *中华胃肠外科杂志*, 2009, 12(6):615-617.
- [6] 李傲,周慧君.二氢青蒿素诱导 HL-60 细胞凋亡. *中国药理学与毒理学杂志*, 2007, 21(3):217-222.
- [7] 王国丽,刘莹,宿文辉,等.二氢青蒿素对结肠癌细胞 HCT116 凋亡基因表达图谱的影响. *中国医科大学学报*, 2011, 40(3):213-216.
- [8] Li W, Kotoshiba S, Berthet C, et al. Rb/Cdk2/Cdk4 triple mutant mice elicit an alternative mechanism for regulation of the G_1/S transition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(2):486-491.
- [9] Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet*, 2001, 10(7):699-703.

(收稿日期:2012-05-16)

(本文编辑:龙志敏)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊收集已发表论文获奖材料的通知

为了解《中华消化外科杂志》刊论文所产生的社会效益及其在医疗科研工作中的重要价值,评估期刊学术质量,请作者将所发表论文的科技成果获奖证明(包括新设备、新工艺等专利证书或成果鉴定书)复印后邮寄至本刊编辑部,或将证书扫描后的电子版发至本刊邮箱:digsurg@263.net。

地址:重庆市沙坪坝区高滩岩正街 29 号西南医院《中华消化外科杂志》编辑部 邮编:400038