

• 基础实验研究论著 •

## 倍半萜类化合物 Chabranol 对胃癌细胞 BGC-823 细胞活性的影响\*

刘欣跃<sup>1</sup>, 吕廷洪<sup>1</sup>, 李 婧<sup>1</sup>, 陈 刚<sup>2</sup>, 李阳冰<sup>3</sup>

(1. 兰州大学第二医院检验医学中心, 甘肃兰州 730030; 2. 兰州大学第二医院普外科, 甘肃兰州 730030; 3. 甘肃省消化系肿瘤重点实验室, 甘肃兰州 730030)

**摘要:**目的 探讨倍半萜化合物 Chabranol 影响人低分化胃癌细胞 BGC-823 的增殖、细胞周期、凋亡和自噬的可能机制, 为 Chabranol 用于临床抗肿瘤治疗提供实验依据。方法 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)方法检测 Chabranol 对 BGC-823 的增殖抑制作用; 流式细胞仪检测 BGC-823 的细胞周期; 透射电子显微镜(TEM)观察其亚细胞结构; 凋亡细胞电泳检测细胞凋亡。结果 Chabranol 对 BGC-823 增殖有明显抑制作用, 并且表现为时间和剂量依赖性; Chabranol 干预后, BGC-823 细胞发生 G<sub>1</sub>-S 期阻滞、凋亡和自噬。结论 倍半萜化合物 Chabranol 对 BGC-823 具有潜在的抗肿瘤活性, 有可能成为治疗低分化胃癌的新药物。

**关键词:** 倍半萜化合物; 自噬; 凋亡; BGC-823 细胞

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.005

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)21-2798-03

## Effects of sesquiterpenes compounds Chabranol on activity of gastric cancer BGC-823 cells\*

Liu Xinyue<sup>1</sup>, Lv Tinghong<sup>1</sup>, Li Jing<sup>1</sup>, Chen Gang<sup>2</sup>, Li Yangbing<sup>3</sup>

(1. Center for Laboratories Medicine, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China; 2. Department of General Surgery, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730030, China; 3. Provincial Key Laboratory of Gastrointestinal Cancer of Gansu, Lanzhou, Gansu 730030, China)

**Abstract:** Objective To explore the possible mechanism of sesquiterpenes Chabranol effects on proliferation, cell cycle, apoptosis and autophagy of poorly differentiated gastric cancer BGC-823 cells and provide experimental basis for clinical anti-tumor therapy by application of Chabranol. Methods Methyl thiazolyl tetrazolium(MTT) was used to detect effects of Chabranol on proliferation of BGC-823 cells, flow cytometry was employed to measure cell cycle of BGC-823 cells, transmission electron microscope (TEM) was employed to observe the subcellular structure of BGC-823 cells, and electrophoresis was used to detect apoptosis. Results Chabranol showed markedly inhibitory effect on BGC-823 cells proliferation with time- and dose-dependent. BGC-823 cells were arrested at G<sub>1</sub>-S phase, and their apoptosis and autophagy were induced after Chabranol treatment. Conclusion Sesquiterpenes Chabranol shows potential anti-tumor activity on BGC-823 cells which may becomes a new treatment of poorly differentiated gastric cancer.

**Key words:** sesquiterpenes; autophagy; apoptosis; BGC-823 cell lines

据统计, 全世界每年约有 90 万的新增胃癌患者, 其中, 42% 的患者来自中国<sup>[1-2]</sup>, 其病死率占中国恶性肿瘤的第 2 位<sup>[3]</sup>。目前, 治疗癌症的主要方法有 3 种: 化疗、手术治疗及药物疗法。而每一种方法均存在不可避免的缺陷。其中, 化疗虽然能有效杀伤肿瘤, 但同时正常细胞也遭到了极大的伤害; 而手术治疗的缺陷在于存在局限性, 且恶性肿瘤存在扩散、转移和复发的可能性; 因此, 研发新的、行之有效的抗肿瘤药物势在必行。近年来, 国内、外大量研究发现, 肿瘤生长迅速主要由于肿瘤细胞的无限增殖和肿瘤细胞的凋亡相对或绝对减少<sup>[4]</sup>。因此, 越来越多的国内、外研究者开始重视通过此机制研发抗癌药物, 尤其是关于中草药及其提取物的研究<sup>[5]</sup>。倍半萜类化合物具有多种生理活性, 包括抑制细菌生长<sup>[6-7]</sup>, 诱导细胞毒性<sup>[7]</sup>, 抗炎反应<sup>[6, 8-10]</sup>, 抗肿瘤<sup>[10-11]</sup>等作用, 是研究者寻找和发现天然药物先导分子和其他功能分子的重要源泉。Chabranol 是从软珊瑚礁中分离得到的倍半萜天然产物, 其分子式为 C<sub>14</sub>H<sub>24</sub>O<sub>3</sub>。本研究旨在通过实验分析 Chabranol 对人低分化胃癌细胞 BGC-823 增殖的作用, 探讨其影响 BGC-823

凋亡和自噬的作用机制, 为 Chabranol 用于临床抗肿瘤治疗提供实验依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料与方法** 倍半萜化合物 Chabranol 由兰州大学功能有机分子化学国家重点实验室合成与共享。人低分化胃癌细胞 BGC-823 购自中科院上海生物细胞库。将 Chabranol 用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解后配制成 40 000 μg/mL 的储存液, 按每管 10 μL 分装保存, 使用前加入 RPMI 1640 培养基, 配制成为所需的药物终浓度。

**1.2 细胞培养及传代** 采用 RPMI 1640 培养液, 在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 环境下培养 BGC-823 细胞。细胞传代时采用 0.25% 的胰蛋白酶消化, 之后制成 1×10<sup>5</sup>/mL 的细胞悬液, 接种于新的培养瓶内, 置于 CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养。

**1.3 四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法检测细胞抑制率** 选取对数生长期的 BGC-823 细胞, 将细胞数调整为 3×10<sup>4</sup>/mL, 吸取单细胞悬液 150 μL 接种于 96 孔板中, 分别加入 200 μg/mL、100 μg/mL、50 μg/mL、25 μg/mL、

\* 基金项目: 甘肃省自然科学基金(1208RJZA192); 甘肃省消化系肿瘤重点实验室开放课题基金; 兰州大学中央高校基本科研业务费专项资金(Lzujbky-2011-t03-15); 兰州大学第二医院院内科研项目(YJ2010-05)。 作者简介: 刘欣跃(1960~), 男, 博士, 主任检验师, 主要从事药物基因组学的研究或工作。

12.5 μg/mL、6.25 μg/mL、3.125 μg/mL、1.562 5 μg/mL、0.781 25 μg/mL 和 0.390 625 μg/mL 的 Chabranol 进行干预,每个稀释浓度设立 5 个复孔,同时设立空白对照组和调零组,分别培养 24、48 及 72 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 18 μL,继续培养 4 h,将上清液去掉,每孔加入 DMSO 溶液 200 μL,测定 490 nm 处的光密度(optical density,OD)值。将以上实验重复 3 次,计算细胞增殖抑制率及半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,IC<sub>50</sub>)。IC<sub>50</sub>是指在用药后存活的细胞数量减少一半时所需的药物浓度<sup>[12]</sup>。细胞增殖抑制率计算公式为:细胞增殖抑制率=(1-处理组 OD 值/阳性对照组 OD 值)×100%。IC<sub>50</sub>按改良寇式法计算:lgIC<sub>50</sub> = Xm - I[P - (3 - Pm - Pn)/4], Xm:lg 最大剂量;I:lg(最大剂量/相临剂量);P:抑制率之和;Pm:最大抑制率;Pn:最小抑制率。

**1.4 流式细胞仪检测 BGC-823 细胞周期改变** 用浓度为 4.5 μg/mL 的 Chabranol 对 BGC-823 细胞进行干预,48 h 后收集经过干预的细胞,将其与未经 Chabranol 干预的对照组 BGC-823 细胞(≥1×10<sup>6</sup>)分别制成单细胞悬液,以 1 000 r/min 离心 5 min 后用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution,PBS)洗 2 遍,加预冷的 70%乙醇,于 4 ℃固定过夜。第 2 日检测前用 PBS 洗涤去除乙醇,以 1 000 r/min 离心 5 min,37 ℃下孵育 30 min 后进行流式细胞仪检测及细胞周期分析,染液为终浓度为 50 μg/mL 的碘化丙啶(propidium iodide,PI)。

**1.5 透射电子显微镜(transmission electron microscopy,TEM)检测 BGC-823 肿瘤细胞的自噬和凋亡** 用 4.5 μg/mL 浓度的 Chabranol 对 BGC-823 细胞进行干预,48 h 后收集经过干预的 BGC-823 细胞及未经 Chabranol 干预的对照组 BGC-823 细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min,经 3%的戊二醛固定过夜、10 g/L 的四氧化锇酸进行后固定、梯度乙醇脱水、环氧树脂包埋、超薄切片、醋酸双氧铀和枸橼酸铅染色晾干,最后用 TEM 观察凋亡现象及凋亡细胞的超微结构。

**1.6 凋亡细胞 DNA 电泳** 收集(1~10)×10<sup>6</sup> 个 BGC-823 细胞,分别经 4.5 μg/mL 的 Chabranol 干预 24、48 及 72 h,采用凋亡细胞 DNA 快速提取试剂盒(北京百泰克公司 DP2401)提取 Chabranol 干预过的 BGC-823 细胞及未干预的 BGC-823 细胞的 DNA,将 5 μL DNA 与 1 μL 1%的溴酚蓝混匀后进行电泳,电压为恒压 100 V,载体为 1%琼脂糖凝胶,电泳 1 h 后在紫外灯下观察凋亡细胞的 DNA 电泳结果。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间多样本均数的多重比较采用析因设计的双因素方差分析,以  $\alpha=0.05$  为检验水准,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 MTT 法检测 Chabranol 对 BGC-823 肿瘤细胞的抑制增殖效果** 人低分化胃癌细胞 BGC-823 经过不同浓度的 Chabranol 干预后,24、48 及 72 h 的 IC<sub>50</sub> 分别为 54.81、9.05 及 5.49 μg/mL。不同浓度的 Chabranol 对 BGC-823 生长均有抑制作用,在干预 24 h 后,细胞增殖受到不同程度的影响;在 100 μg/L 浓度下,细胞增殖抑制率均超过 50%;在 200 μg/mL 浓度下,72 h 的抑制率达到了 89%。在样品处理 48、72 h 后,胃癌细胞的 IC<sub>50</sub> 均小于 10 μg/mL,见表 1。Chabranol 诱导 BGC-823 细胞死亡,呈明显的时间及剂量依赖关系,不同浓度间的  $F=47.607, P<0.05$ ,不同时间的  $F=192.998, P<0.05$ 。

**2.2 流式细胞仪检测 BGC-823 的细胞周期变化** 经 4.5 μg/mL Chabranol 干预 48 h 后的 BGC-823 细胞与未经干预的对

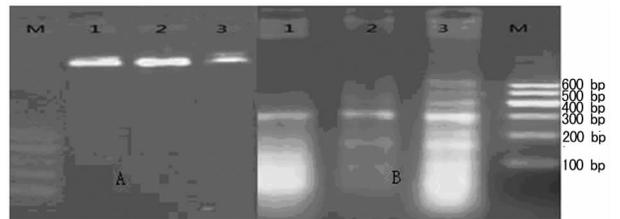
照组 BGC-823 细胞相比,S 期细胞比例呈显著降低趋势,由 (40.65±4.53)% 降至 (30.15±5.93)%,G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例呈显著增加趋势,由 (58.26±3.79)% 上升至 (65.83±5.57)%,而 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例基本不变化。

**表 1 MTT 法测定 Chabranol 对 BGC-823 细胞的作用 (n=3)**

药物浓度(μg/mL)	细胞增殖抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h
200	0.57	0.83	0.89
100	0.52	0.72	0.81
50	0.41	0.58	0.67
25	0.22	0.54	0.64
12.5	0.21	0.51	0.62
6.25	0.16	0.47	0.59
3.125	0.13	0.45	0.49
1.562 5	0.12	0.44	0.45
0.781 25	0.11	0.37	0.45
对照组	0.00	0.00	0.00

**2.3 TEM 下观察亚细胞结构** 在高倍 TEM 下,经 4.5 μg/mL 的 Chabranol 干预的 BGC-823 细胞出现了很多自噬空泡、异染色质、髓样体和脂肪滴,线粒体和粗面内质网附近有自噬体,内含细胞质样物质、损伤的线粒体或内质网等。细胞核中异染色质明显增多,髓样体增多,出现早期凋亡现象。而未经 Chabranol 干预的对照组 BGC-823 细胞结构完整。

**2.4 凋亡细胞 DNA 电泳** BGC-823 细胞经 Chabranol 分别干预 24、48 和 72 h 后,在凋亡早期未出现 DNA 降解的条带,而在晚期出现 DNA 弥散条带,在 Chabranol 作用 48 h 后,凋亡期出现梯状条带。见图 1。



A: 对照组 BGC-823 细胞 DNA 电泳图;B:泳道 1~3:经 Chabranol 作用 24、48 和 72 后的凋亡 BGC-823 细胞电泳图,泳道 1 表现为均一条带,泳道 2、3 表现为梯状条带,说明细胞发生了程序性死亡;M:标记物。

**图 1 凋亡细胞 DNA 电泳图**

**3 讨 论**

MTT 法检测显示倍半萜化合物 Chabranol 对人低分化胃癌细胞 BGC-823 有显著的增殖抑制作用。24 h 的 IC<sub>50</sub> 为 54.81 μg/mL,当 Chabranol 的浓度为 100 μg/mL 时,BGC-823 细胞抑制率超过了 50%,并且在低倍显微镜下,能够明显观察到细胞变圆、出现细胞碎片等,表明在 24 h 内 Chabranol 已经开始对 BGC-823 细胞的增殖产生抑制作用。48 h 及 72 h 的 IC<sub>50</sub> 分别为 9.05 μg/mL 和 5.49 μg/mL,当 Chabranol 浓度为 200 μg/mL 时,72 h 时的 BGC-823 细胞抑制率达到 89%,低倍显微镜下即可观察到细胞大面积死亡,表明倍半萜化合物 Chabranol 对 BGC-823 细胞有显著的增殖抑制作用,且其抑制作用呈显著的时间与剂量依赖关系。

流式细胞仪的细胞周期结果显示 4.5 μg/mL Chabranol 作用于 BGC-823 细胞 48 h 后,主要阻滞了细胞周期中 G<sub>1</sub> 期向

S 期的转变过程,使细胞周期停滞于 G<sub>1</sub>-S 期,其机制可能是抑制了 DNA 合成和有丝分裂,诱导了细胞分化,从而引起了细胞周期阻滞和细胞生长抑制。因此,Chabranol 可能是通过影响细胞周期来抑制肿瘤生长的,有望成为一种有效的抗肿瘤药物,但是其具体调控机制还有待进一步的研究。

TEM 下的亚细胞结构表明,Chabranol 能显著诱导 BGC-823 细胞发生自噬和凋亡。TEM 下观察到经 Chabranol 干预后的肿瘤细胞,其内部产生了较多的自噬空泡和脂肪滴,可能是 Chabranol 干预后肿瘤细胞需要通过自噬为自身提供营养;另外,镜下还出现了髓样体、胞体收缩及染色质边聚现象,这可能是凋亡的早期反应。

自噬是细胞维持稳态和防止外界侵入的一种防御机制在细胞的废物清除、结构重建和生长分化等方面发挥重要作用,同时也与多种疾病的病理、生理过程相关,当出现自噬过度或不足时均可引起疾病的发生。某些抗肿瘤药物可以通过诱导自噬活性,从而达到抑制肿瘤细胞增殖的目的。研究证明,对前列腺癌、乳腺癌以及结肠癌细胞系进行放疗时均可诱导细胞自噬性死亡<sup>[13-14]</sup>。凋亡是程序性细胞死亡,自噬和凋亡有非常密切的关系<sup>[15]</sup>。

凋亡细胞 DNA 琼脂糖电泳是一种检测凋亡的简单而经典的方法。若 DNA 电泳中出现梯状条带,则表明细胞发生了程序性死亡。其原理是凋亡细胞 DNA 发生断裂,导致胞内小分子量的 DNA 片段增加,而相对分子量大的 DNA 片段减少,细胞质内出现 DNA 片段。本实验的 DNA 电泳结果显示,Chabranol 可以诱导 BGC-823 细胞发生凋亡。

以上实验表明倍半萜化合物 Chabranol 可以抑制人低分化胃癌 BGC-823 细胞增殖并影响细胞周期的分布,可能的发生机制是促进肿瘤细胞自噬和凋亡。但因为细胞凋亡网络十分复杂,且肿瘤的发生是一个多因素、多步骤、多阶段和多基因共同作用的结果,因此,Chabranol 的抗肿瘤机制也比较复杂,其诱导细胞凋亡的分子机制有待进一步研究,但它仍有望成为治疗低分化胃癌的新药。

参考文献

[1] Roukos DH. Targeting gastric cancer with trastuzumab: new clinical practice and innovative developments to overcome resistance [J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17(1): 14-17.

[2] Yi JF, Li YM, Liu T, et al. Mn-SOD and CuZn-SOD polymorphisms and interactions with risk factors in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol* 2010, 16(37): 4738-4746.

(上接第 2797 页)

Med Public Health, 2003, 34(3): 473-479.

[10] 杨平,戴五星,刘朔捷,等. 血吸虫 Sj26 膜锚定表达 DNA 疫苗的构建、表达及其免疫原性 [J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2007, 36(2): 141-144.

[11] 李文桂,石佑恩. 日本血吸虫重组 BCG-Sj26GST 疫苗免疫小鼠保护力的观察 [J]. *中国地方病学杂志*, 2004, 23(4): 300-303.

[12] 沈定文,罗金萍,李雍龙,等. Sj26 基因转染的树突状细胞对日本血吸虫感染的免疫保护机制研究 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2007, 25(1): 17-21.

[13] Matteuzzi D, Brigidi P, Rossi M, et al. Characterization and molecular cloning of *Bifidobacterium longum* cryptic plasmid pMB1 [J]. *Lett Appl Microbiol*, 1990, 11(4): 220-223.

[3] Lee HE, Jee CD, Kim MA, et al. Loss of promyelocytic leukemia protein in human gastric cancers [J]. *Cancer Lett*, 2007, 247(1): 103-109.

[4] Ryu JK, Lee WJ, Lee KH, et al. SK-7041, a new histone deacetylase inhibitor, induces G2-M cell cycle arrest and apoptosis in pancreatic cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2006, 237(1): 143-154.

[5] 赵晓艳,胡玉娜,康向东,等. 熊果酸诱导人胃癌 BGC823 细胞凋亡及其作用机制初探 [J]. *中国癌症杂志*, 2010, 20(2): 101-104.

[6] Feltenstein MW, Schühly W, Warnick JE, et al. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects of sesquiterpene lactones from *Magnolia* and *Bear's foot* [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2004, 79(2): 299-302.

[7] Bach SM, Fortuna MA, Attarian R, et al. Antibacterial and cytotoxic activities of the sesquiterpene lactones cnicin and onopordopicrin [J]. *Nat Prod Commun*, 2011, 6(2): 163-166.

[8] Hehner SP, Hofmann TG, Dröge W, et al. The antiinflammatory sesquiterpene lactone parthenolide inhibits NF-kappa B by targeting the I kappa B kinase complex [J]. *J Immunol*, 1999, 163(10): 5617-5623.

[9] Cheng SY, Wen ZH, Wang SK, et al. Anti-inflammatory cembranolides from the soft coral *Lobophytum durum* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(11): 3763-3769.

[10] Mathema VB, Koh YS, Thakuri BC, et al. Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone, Expresses Multiple Anti-cancer and Anti-inflammatory Activities [J]. *Inflammation*, 2012, 35(2): 560-565.

[11] Kupchan SM, MA Eakin, AM Thomas. Tumor inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones [J]. *J Med Chem*, 1971, 14(12): 1147-1152.

[12] Amaravadi RK, Yu D, Lum JJ, et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a myc-induced model of lymphoma [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(2): 326-336.

[13] Opipari AW Jr, Tan L, Boitano AE, et al. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(2): 696-703.

[14] Kanzawa T, Kondo Y, Ito H, et al. Induction of autophagic cell death in malignant glioma cells by arsenic trioxide [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2103-2108.

[15] Shao Y, Gao Z, Marks PA, et al. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(52): 18030-18035.

(收稿日期:2013-07-25)

[14] Missich R, Sgorbati B, LeBlanc DJ. Transformation of *bifidobacterium longum* with pRM2, a constructed *escherichia coli*-*B. longum* shuttle vector [J]. *Plasmid*, 1994, 32(2): 208-211.

[15] Argnani A, Leer RJ, van Luijk N, et al. A convenient and reproducible method to genetically transform bacteria of the genus *Bifidobacterium* [J]. *Microbiology*, 1996, 142(Pt 1): 109-114.

[16] 张宁,李文桂. 日本血吸虫重组两歧双歧杆菌 pGEX-Sj14-3-3 疫苗构建及鉴定 [J]. *中国地方病学杂志*, 2011, 30(4): 357-360.

[17] 周必英,陈雅棠,李文桂,等. 细粒棘球绦虫重组 Bb-Eg95 疫苗的构建及鉴定 [J]. *中国地方病学杂志*, 2009, 28(2): 218-221.

(收稿日期:2013-06-11)