

黄酮类化合物 GL-V9 对人胃低分化黏液腺癌细胞株的 凋亡作用及其机制

李国君^{1,2}, 赵凯^{1,2}, 姚或远^{1,2}, 申乐^{1,2}, 郭青龙^{1,2*}

(中国药科大学¹江苏省肿瘤发生与干预重点实验室;²天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 南京 210009)

摘要 探讨黄酮类化合物 GL-V9 对人体低分化胃黏液腺癌细胞系 MGC-803 和 BGC-823 的凋亡作用及其机制。采用 MTT 法观察不同浓度的 GL-V9 作用于两种胃癌细胞后对其细胞活力的影响。采用 Annexin V-FITC/PI 双染法、DAPI 染色法观察 GL-V9 对 MGC-803 细胞株凋亡率和细胞核形态的影响。采用免疫印迹法观察 GL-V9 对 MGC-803 细胞株中主要凋亡蛋白 caspase-9, caspase-3 的影响。应用钙离子荧光探针 Fluo-3 AM 检测 GL-V9 对 MGC-803 细胞株内钙离子浓度变化的影响。实验结果表明, GL-V9 可以抑制胃癌细胞株 MGC-803, BGC-823 细胞活性, 改变 MGC-803 细胞核形态, 激活 caspase-9, caspase-3 蛋白, 诱导细胞凋亡。同时, GL-V9 可以显著上调 MGC-803 细胞中钙离子水平, 这可能与 GL-V9 作用下的胃癌细胞株中线粒体凋亡通路的激活相关。

关键词 黄酮类化合物; GL-V9; 胃腺癌; MGC-803 细胞; 凋亡; 钙离子

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)04-0464-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150413

Effects and mechanism of programmed cell death of human gastric cancer cell under the treatment of flavonoid compound GL-V9

LI Guojun^{1,2}, ZHAO Kai^{1,2}, YAO Yuyuan^{1,2}, SHEN Le^{1,2}, GUO Qinglong^{1,2*}

¹Jiangsu Key Laboratory of Carcinogenesis and Intervention;

²State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To investigate the apoptotic effect of flavonoid compound GL-V9 on human gastric cancer cells and its potential mechanism, MGC-803 and BGC-823 cells were treated with GL-V9. MTT assay was performed to assess the growth inhibition effects on MGC-803 and BGC-823 cells under different concentrations of GL-V9. Annexin V-FITC/PI staining assay was employed to observe the apoptotic rate of GL-V9 cells with the treatment of GL-V9. DAPI staining was performed to observe the nuclear morphological changes using fluorescence microscopy. Activation of caspase-9 and caspase-3 was analyzed by Western blotting. Ca^{2+} concentration in gastric cancer cells was detected by Fluo-3 AM staining assay. Results showed that GL-V9 could inhibit cell viability, change the nuclear morphology, activate caspase-9 and caspase-3 and induce the apoptosis in gastric cancer cells. The mechanism of the induction of apoptosis in MGC-803 cells under the treatment of GL-V9 may activate the Ca^{2+} associated mitochondrial apoptosis pathway.

Key words flavonoid compound; GL-V9; gastric adenocarcinoma; MGC-803 cell; apoptosis; Ca^{2+}

This study was supported by China National Key High-Tech Innovation Project for the R&D of Novel Drugs (No. 2013ZX09103-001-007)

胃癌是一种常见的恶性肿瘤, 据报道 2008 年全球胃癌患者的 5 年生存率约为 20%^[1]; 2010 年

胃癌成为全球第 2 大肿瘤致死因素^[2], 而绝大多数胃部肿瘤都属于胃腺癌, 本研究中应用的 MGC-

803 细胞,是一种低分化的胃腺癌细胞株。尽管手术和化疗使早期胃癌患者有较高的生存率,但大多数的晚期胃癌患者预后仍然较差。同时,胃癌术后复发率较高,因此,亟需研究对胃癌更有效的治疗手段。

GL-V9(图 1)是一种新合成的黄酮类化合物,以往的研究证明其有较好的抗肿瘤效果:在 HepG2 细胞中,GL-V9 可以诱导 G₂/M 期细胞周期阻滞和细胞凋亡^[3]。在人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞株中,GL-V9 可抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[4]。本研究首次证明了 GL-V9 在人胃癌细胞中的抗肿瘤效果,并阐明了 GL-V9 诱导 MGC-803 细胞的线粒体凋亡,可能是依赖于细胞内钙离子浓度的升高。这些研究表明,GL-V9 可能作为一种新型的治疗人胃腺癌的新化合物。

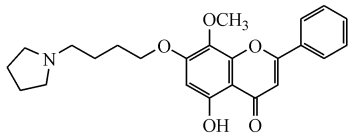


Figure 1 Chemical structure of flavonoid compound GL-V9

1 材 料

1.1 试 剂

GL-V9(橙黄色晶体,纯度 99%,中国药科大学江苏省肿瘤发生与干预重点实验室),使用前用 DMSO 配成母液,临用前用细胞培养液配成所需浓度;RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司);MTT(美国 Fluca 公司);DMSO(上海化工有限公司);caspase-9 抗体、caspase-3 抗体、 β -actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 细胞株

MGC-803、BGC-823 细胞株(中国科学院上海生物化学与细胞生物学细胞库)贴壁生长,采用 100 U/mL 青霉素,100 U/mL 链霉素和 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI 1640 培养基、5% CO₂、37 °C、饱和湿度下培养。

2 方 法

2.1 体外细胞培养

将胃癌细胞株以适宜浓度接种于培养瓶,置于恒温 5% CO₂、37 °C、饱和湿度培养箱(以下同)中

培养,细胞呈贴壁生长状态。每 2~3 天用 EDTA、胰酶消化,传代 1 次,加入新鲜培养液吹打均匀,按所需细胞量移入新培养瓶中,添加完全培养液至适量。

2.2 MTT 法检测 GL-V9 对胃癌细胞株的生长抑制作用

取对数生长期的胃癌细胞,以每孔 100 μ L 接种于 96 孔细胞培养板中,培养 24 h;对照组加入培养基 100 μ L,其他各组加入含不同浓度的 GL-V9 培养基 100 μ L,每组设 5 个复孔。培养 12 h 后每孔加入 MTT 20 μ L,37 °C 孵育 4 h,弃上清液,加入 DMSO 100 μ L,振荡混匀使 MTT 还原产物充分溶解后,于酶标仪检测 570 nm 波长处吸收度,计算细胞的生长抑制率和 IC₅₀。以上实验重复 3 次。

2.3 双染法流式术检测细胞凋亡

将适量胃癌细胞点于 6 孔板中,待融和至 70%,给药 GL-V9 10, 20, 40 μ mol/L,继续培养 12 h。收集细胞,PBS 洗 3 遍,将细胞混悬于结合缓冲液 500 μ mol/L 中,依次加入 AnnexinV-FITC 和 PI 各 5 μ L,混匀,利用流式细胞术检测细胞凋亡情况,激发波长及发射波长分别为 488 和 530 nm。

2.4 免疫印迹法检测 GL-V9 对 MGC-803 细胞中凋亡相关蛋白表达情况的影响

给予 GL-V9 的剂量为 10, 20, 40 μ mol/L 处理 12,收集并裂解细胞,提取细胞总蛋白,用 BCA 法对蛋白进行定量,取等量蛋白样品用 10% SDS-PAGE 进行电泳,恒压将蛋白转至醋酸纤维膜上,室温将膜在含 1% BCA 的 PBS 中封闭 1 h,按照一定的稀释度加入一抗 4 °C 孵育过夜,二抗(1:2 000)37 °C 孵育 1 h,近红外荧光扫描仪扫描。

2.5 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 GL-V9 对 MGC-803 和 BGC-823 细胞增殖的影响

如图 2 所示,随着 GL-V9 给药浓度和给药时间的增加,胃癌细胞的生长抑制率逐渐升高,且呈现时间-剂量依赖性。给药 12 h 后,MGC-803 和

BGC-823 细胞对 GL-V9 的 IC_{50} 分别为 $(30.24 \pm 4.63) \mu\text{mol/L}$ 和 $(52.42 \pm 6.35) \mu\text{mol/L}$ 。实验结果表明,经 12 h 不同浓度的 GL-V9 处理后,MGC-803 和 BGC-823 细胞活性抑制率有所差异,其中 MGC-803 对 GL-V9 更为敏感,因此,后续实验均采用 MGC-803 细胞株。

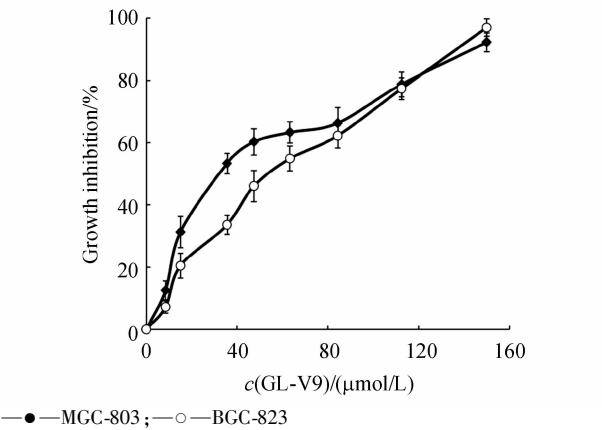


Figure 2 Growth inhibition of MGC-803 and BGC-823 cells treated with various concentrations of GL-V9 for 12 h by MTT ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2 DAPI 法检测 GL-V9 对胃癌细胞核形态的影响

如图 3 所示,运用 DAPI 染色实验来观察 GL-V9 对胃癌细胞株 MGC-803 细胞核形态的影响。结果表明,在不同浓度(10,20,40 $\mu\text{mol/L}$) GL-V9 作用 12 h 后,MGC-803 细胞核出现明显的凋亡现象:核内的染色质不规则凝集,边缘化,细胞核破碎成块状或半月状,凋亡小体出现。给药前细胞核呈现均匀且明亮的荧光,且细胞核形态学变化与 GL-

V9 的给药剂量成正相关。

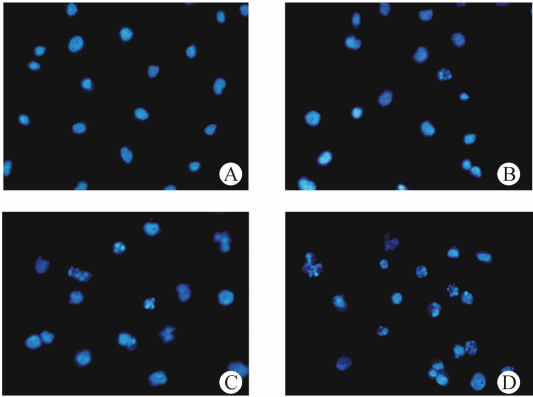


Figure 3 MGC-803 cells were treated with 10,20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ GL-V9 for 12 h and the nucleolus morphologic changes were observed by fluorescent microscope ($\times 400$)
A: Control; B: GL-V9(10 $\mu\text{mol/L}$); C: GL-V9(20 $\mu\text{mol/L}$); D: GL-V9(40 $\mu\text{mol/L}$)

3.3 双染流式法检验 GL-V9 对 MGC-803 细胞株凋亡的影响

用 10,20,40 $\mu\text{mol/L}$ 的 GL-V9 作用于 MGC-803 细胞 12 h 后,收集细胞,采用 Annexin V-FITC/PI 双染,流式细胞仪检测胃癌细胞凋亡情况。结果表明:MGC-803 细胞的凋亡率随着 GL-V9 给药浓度的增加而增加。40 $\mu\text{mol/L}$ GL-V9 处理细胞 12 h 后,MGC-803 细胞的凋亡率达到 37%。与对照组相比,20,40 $\mu\text{mol/L}$ 的 GL-V9 诱导的细胞凋亡有显著性差异($P < 0.05, P < 0.01$),结果如图 4 所示,实验重复 3 次,结果具有统计学意义。

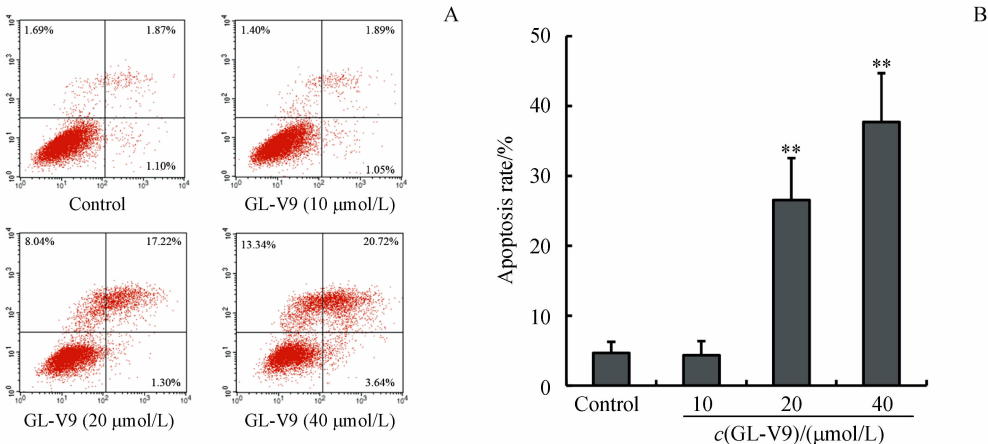


Figure 4 MGC-803 cells treated with 10,20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ GL-V9 for 12 h
A: Annexin V/PI double-staining assay was analyzed by flow cytometry; B: Quantification of the apoptotic rates of MGC-803 cells under the treatment of GL-V9 ($\bar{x} \pm s, n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group)

3.4 免疫印迹法检测 GL-V9 对 MGC-803 细胞中凋亡相关蛋白表达情况的影响

用 10,20,40 μmol/L 的 GL-V9 处理 MGC-803 细胞 12 h 后,收集细胞,提取蛋白,采用免疫印迹法检测 caspase-9 和 caspase-3 蛋白的激活情况。

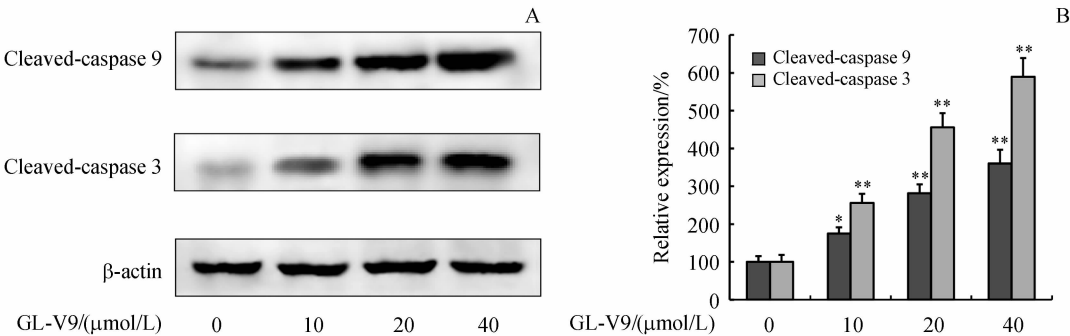


Figure 5 MGC-803 cells treated with 10,20 and 40 μmol/L GL-V9 for 12 h
A: Expression of cleaved-caspase 3 and cleaved-caspase 9 were measured with Western blotting; B: Densitometric analysis of cleaved-caspase 9/β-actin, cleaved-caspase 3/β-actin ratios ($\bar{x} \pm s, n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group)

3.5 Fluo-3AM 荧光探针法检测 GL-V9 对 MGC-803 细胞内钙离子浓度的影响

用 10,20,40 μmol/L GL-V9 处理 MGC-803 细胞 12 h 后,收集细胞,用 Fluo-3AM 荧光探针检测细胞中钙离子浓度变化。实验结果表明:10,20,40

实验结果(图 5)表明,给药浓度为 20,40 μmol/L 时,caspase-9 和 caspase-3 蛋白的激活形式,与对照组相比有显著性差异。由此可见,GL-V9 可以诱导人体低分化胃黏液腺癌细胞株 MGC-803 细胞的程序性死亡。

μmol/L GL-V9 作用于 MGC-803 细胞 12 h 后,钙离子浓度均有显著性提高,如图 6 所示。结果表明, GL-V9 可能通过提高胃癌细胞中钙离子浓度,打破细胞内钙离子平衡,增加线粒体对钙离子的吸收,进而促使胃癌细胞发生依赖于线粒体的细胞凋亡。

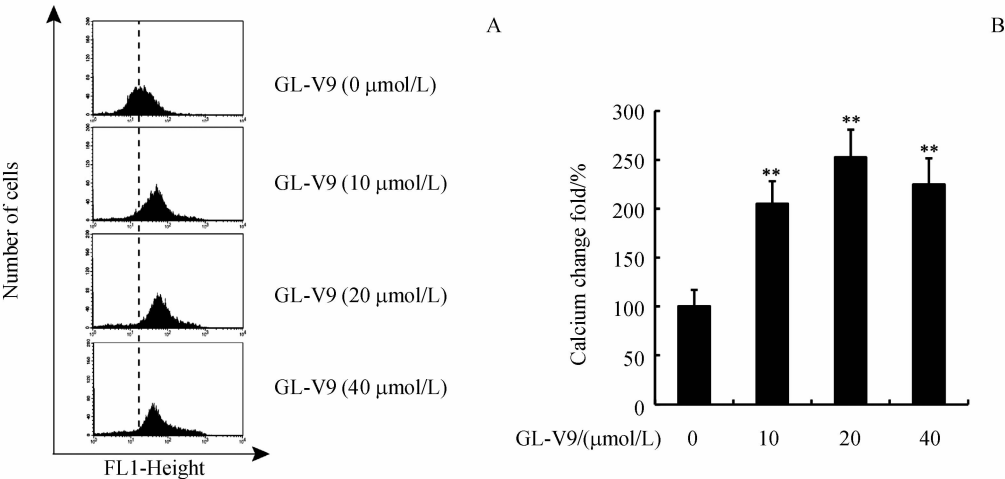


Figure 6 MGC-803 cells were treated with 10,20 and 40 μmol/L GL-V9 for 12 h
A: Calcium released from MGC-803 cells were measured by flow cytometry; B: Calcium change fold ($\bar{x} \pm s, n = 3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group)

4 讨 论

全球每年约新增 100 万胃癌病例,而大多数都属于胃癌晚期,普通的治疗手段效果欠佳^[5]。而从中药中提取的化合物正逐渐成为药物研发人员

关注的重点,这些化合物多数具有高效且低毒特点,应用广泛,包括抗炎、抗病毒、心血管疾病以及肿瘤治疗等领域^[6]。

GL-V9 是黄酮类化合物汉黄芩素的衍生物,具有良好的诱导人体肝癌细胞 HepG2 的凋亡^[3]和抑

制人体乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 的侵袭转移的作用^[4], 但对人胃低分化黏液腺癌的研究尚未见报道。本研究表明, GL-V9 可以有效诱导人胃癌细胞株 MGC-803 的凋亡, 且呈现显著的时间-剂量依赖性。

Caspase-9 和 caspase-3 同属于半胱氨酸蛋白酶家族, 在细胞内源性程序性死亡中起着关键作用, 因此, caspases 蛋白的激活也是细胞凋亡的重要标志之一^[7-8]。同时, 在细胞内源性凋亡中, 作为第二信使的钙离子, 在线粒体依赖的凋亡信号通路激活中有着重要的作用。以往研究表明, 细胞内持续高浓度的钙离子, 会影响多种细胞功能, 包括细胞自噬和细胞凋亡^[9-10]。本实验研究表明, GL-V9 可能通过持续上调细胞内钙离子浓度, 促进“细胞内钙离子超载”的细胞内环境形成, 最终打破细胞内钙离子稳态, 诱导胃癌细胞株 MGC-803 的凋亡。本研究初步证明, 黄酮类化合物 GL-V9 在胃癌治疗领域是一种有潜力的抗肿瘤候选化合物。

参考文献

[1] Shi J, Qu YP, Hou P, *et al.* Pathogenetic mechanisms in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, **20** (38): 13804–13819.

[2] Shum H, Rajdev L. Multimodality management of resectable gastric cancer: a review [J]. *World J Gastrointestinal Oncol*, 2014, **6** (10): 393.

[3] Li L, Lu N, Dai Q, *et al.* GL-V9, a newly synthetic flavonoid derivative, induces mitochondrial-mediated apoptosis and G₂/M cell cycle arrest in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, **670** (1): 13–21.

[4] Li L, Chen P, Ling Y, *et al.* Inhibitory effects of GL-V9 on the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression and activity of matrix metalloproteinase-2/9 [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, **43** (5): 393–399.

[5] Pasechnikov V, Chukov S, Fedorov E, *et al.* Gastric cancer: prevention, screening and early diagnosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, **20** (38): 13842.

[6] Baumann S, Fas SC, Giaisi M, *et al.* Wogonin preferentially kills malignant lymphocytes and suppresses T-cell tumor growth by inducing PLC γ 1- and Ca²⁺-dependent apoptosis [J]. *Blood*, 2008, **111** (4): 2354–2363.

[7] Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease [J]. *Cell*, 2011, **147** (4): 742–758.

[8] Yuan J, Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond [J]. *Genes Dev*, 2010, **24** (23): 2592–2602.

[9] Pinton P, Giorgi C, Siviero R, *et al.* Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca²⁺ transfer in the control of apoptosis [J]. *Oncogene*, 2008, **27** (50): 6407–6418.

[10] Clapham DE. Calcium signaling [J]. *Cell*, 2007, **131** (6): 1047–1058.