

DOI:10.3969/j.issn.1005-1678.2016.07.05

# 胃铋镁对胃癌细胞凋亡的诱导作用及机制研究

乔巍<sup>1†</sup>, 邸军<sup>2†</sup>, 汪小莞<sup>1</sup>, 孙佳昕<sup>1</sup>, 张琦<sup>1</sup>, 李江<sup>3Δ</sup>, 李晓萌<sup>1Δ</sup>

(1. 东北师范大学 生命科学学院 分子表观遗传学教育部重点实验室, 吉林 长春 130024;  
2. 吉林省人民医院 病理科, 吉林 长春 130000; 3. 吉林大学口腔医院 口腔修复科, 吉林 长春 130041)

**[摘要]** **目的** 研究胃铋镁对胃癌细胞株 SGC-7901 增殖和凋亡的作用及可能机制。**方法** 以三联药(三种市售胃炎胃溃疡类药物联合用药)、胃铋镁、胃铋镁中药总组分、胃铋镁化药总组分为实验组, 分别作用于胃癌细胞 SGC-7901, MTT 法检测细胞的增殖状态; Hoechst33342 染色法检测细胞的凋亡; 流式细胞仪检测细胞周期; Western blot 法检测 STAT3 信号通路相关蛋白的表达。**结果** 4 种药物分别处理细胞后, 相比于对照组和三联药组, 胃铋镁组和胃铋镁中药总组分能够显著抑制细胞增殖且具有剂量依赖性; 凋亡百分数显著增高( $P < 0.05$ ); 能将细胞周期阻滞于 G1 期( $P < 0.05$ ); Western blot 结果显示 SGC-7901 细胞中 STAT3、磷酸化 STAT3(p-STAT3)、CyclinD1、Bcl-2 蛋白表达量显著降低。**结论** 胃铋镁及其中药总组分可以显著抑制胃癌细胞 SGC-7901 增殖, 促进细胞凋亡, 阻滞细胞周期, 其作用机制可能与抑制 STAT3 信号通路相关蛋白 p-STAT3、CyclinD1、Bcl-2 表达有关。

**[关键词]** 胃铋镁; 胃癌; STAT3 信号通路

**[中图分类号]** R735.2 **[文献标识码]** A

## Study on functions and mechanisms of Weibimei in inducing gastric cancer cell apoptosis

QIAO Wei<sup>1†</sup>, DI Jun<sup>2†</sup>, WANG Xiao-wan<sup>1</sup>, SUN Jia-xin<sup>1</sup>, ZHANG Qi<sup>1</sup>, LI Jiang<sup>3Δ</sup>, LI Xiao-meng<sup>1Δ</sup>

(1. Key Laboratory of Molecular Epigenetics of MOE, School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024, China;  
2. Department of Pathology, People's Hospital of Jilin Province, Changchun 130000, China; 3. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Stomatologic Hospital, Jilin University, Changchun 130041)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the proliferative and apoptotic effects of Weibimei on gastric cancer cell and the possible mechanisms. **Methods** Gastric cancer SGC-7901 cell were cultured with four drugs: Sanlianyao (three kinds of drugs for the treatment of gastric ulcer), Weibimei, Chinese medicine of Weibimei, and Chemical drugs of Weibimei as the experimental groups. The proliferation of SGC-7901 cell was determined by MTT assays. The cell apoptosis was evaluated by Hoechst33342 staining. The effect on SGC-7901 cell cycle was measured by flow cytometry. The protein expression related to STAT3 signaling pathway in SGC-7901 cell was examined by Western blot. **Results** After SGC-7901 cells were treated line with each four drug for 24h, Weibimei or its Chinese medicine portion could obviously inhibit the proliferation of SGC-7901 cells in a dose-dependent manner and increase the percentage of apoptosis rate significantly ( $P < 0.05$ ). In addition, the cell cycle of SGC-7901 arrested at G1 phase with the general or Chinese medicine portion of Weibimei supplement. Furthermore, Weibimei and its Chinese medicine portion down-regulated the expression of STAT3, phosphorylated STAT3(p-STAT3), CyclinD1, and Bcl-2 in SGC-7901 cells. **Conclusion** Weibimei, and its Chinese medicine portion exerted potent anticancer activity by inhibiting cell proliferation, inducing apoptosis and arresting the cell cycle in gastric cancer SGC-7901 cells, and this function was associated with STAT3 signaling inhibition.

**[Keywords]** Weibimei; gastric cancer; STAT3 signaling pathway

资助项目: 科技部国际合作项目资助课题(2010DFA31430); 国家自然科学基金(30871301, 30700827); 吉林省科技厅科研基金资助课题(20130521010JH, 20150101187JC, 20150414007GH); 吉林省教育厅科研基金资助课题(2015-526, 2015-551); 高校基本科研业务费专项基金(2412015ZH005, 130017507); 高校人才引进项目资助课题(B07017); 吉林省产业创新专项(2016C047-3)

作者简介: 乔巍, 女, 硕士在读, 研究方向: 肿瘤信号转导, E-mail: qiaow634@nenu.edu.cn; 邸军, 共同第一作者, 男, 主任医师, 研究方向: 肿瘤信号转导, E-mail: Dijun1991@163.com; 李晓萌, 通信作者, 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 肿瘤信号转导, E-mail: lixm441@nenu.edu.cn; 李江, 共同通信作者, 男, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 肿瘤信号转导, E-mail: ljjiang@jlu.edu.cn.

胃癌(gastric cancer)是胃上皮来源的恶性肿瘤,据统计,2015年我国胃癌的新发病例为67.91万,死亡病例为49.8万,占我国消化道恶性肿瘤的首位,成为我国第二大致死癌症<sup>[1]</sup>。近年研究表明,萎缩性胃炎及其伴有的肠化生、细胞异型增生与胃癌的发生关联紧密;提示对萎缩性胃炎具有显著疗效的药物,特别是多靶点的组方药物可能具有预防和治疗胃癌的潜在功能<sup>[2]</sup>。胃铋镁颗粒是我国具有自主知识产权的国药准字药物,对临床上各种胃炎、胃溃疡和胃黏膜损伤有很好的疗效。胃铋镁为复方制剂,由中药总组分(甘草浸膏粉、弗朗鼠李皮、茴香粉、石菖蒲和芦荟)和化药总组分(铝酸铋、重质碳酸镁和碳酸氢钠)组成。该药物不仅具有胃黏膜保护作用,其中多种中药活性组分还具有细胞信号的调节功能和机体免疫的调节功能,具有很好的抗肿瘤功能的开发前景<sup>[3]</sup>。本研究旨在从细胞学角度探讨胃铋镁对胃癌SGC-7901细胞株增殖能力的影响,研究胃铋镁调节SGC-7901细胞内STAT3信号的作用机制,为胃铋镁药物在胃癌防治方面的应用和可能组分开发提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株:胃癌SGC-7901细胞系由本实验室保存。

1.1.2 药品与试剂:DMEM培养基和胎牛血清(FBS)购自美国GIBCO公司。MTT Hoechst33342染色液购自北京鼎国昌盛生物技术有限公司;胃铋镁药物及其各组分药物由弘美制药中国有限公司提供;三联药:克拉霉素片购自上海雅培制药有限公司;阿莫西林胶囊购自联邦制药股份有限公司;埃索美拉唑镁肠溶片购自阿斯利康制药有限公司。

1.1.3 仪器:酶标仪(ELx808,美国Bio-Tek公司);流式细胞仪(EPICS-ELITE-ESP);荧光显微镜(Olympus, Japan);电泳仪(JM-250,大连捷迈科贸有限公司);电转槽(Biorad)。

### 1.2 方法

1.2.1 药物浓度设定:药物浓度根据说明书定量,将如下浓度作为药物处理的标准浓度,分别是三联药:克拉霉素片1.8 μg/mL、阿莫西林胶囊5.6 μg/mL、埃索美拉唑镁肠溶片0.1 μg/mL;胃铋镁100 μg/mL;胃铋镁中药总组分71.4 μg/mL;胃铋镁化药总组分28.6 μg/mL。同时设置此浓度条件下的1/3浓度作为低浓度,3倍浓度作为高浓度,每种药物采用3个浓度作为实验浓度作用于胃癌SGC-7901细胞。

1.2.2 细胞培养和分组:利用含10%的标准胎牛血清培养SGC-7901细胞,置于5%的CO<sub>2</sub>、37℃恒温孵箱中,平均3~4d传代一次。取对数生长期的SGC-7901细胞进行实验。按照1.2.1下浓度设定分为对照组、三联药组、胃铋镁组、胃铋镁中药总组分组和胃铋镁化药总组分组。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖:利用0.25%胰蛋白酶消化胃

癌SGC7901细胞,用含10%胎牛血清的DMEM制成细胞悬液,以每孔 $2 \times 10^3$  cells接种于96孔板中,每孔培养液100 μL,第2天细胞更换成1% FBS的DMEM培养,按1.2.2下分组加入各种药物,培养24 h后,每孔加入MTT溶液(5 g/L)20 μL,37℃,继续孵育4 h,终止培养,小心吸弃孔内培养上清液,每孔加入150 μL DMSO,振荡10 min,使结晶物充分溶解。选择450 nm波长和620 nm波长,用A450 nm-A620 nm表示吸光度,在酶标仪上测定各孔光吸收值。以时间为横轴,吸收值为纵轴绘制细胞增殖曲线。实验重复3次。

1.2.4 Hoechst33342染色观察凋亡细胞核:利用0.25%胰蛋白酶消化胃癌SGC7901细胞,用含10%胎牛血清的DMEM制成细胞悬液,以每孔 $1 \times 10^5$  cells接种于6孔板中,每孔培养液2 ml,第2天细胞更换成1% FBS的DMEM培养,按1.2.2下分组加入各种药物,作用24 h后,直接加入配置好的Hoechst33342染色液,37℃染色30 min。PBS洗2次后,加入新的PBS液,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期:利用0.25%胰蛋白酶消化胃癌SGC7901细胞,用含10%胎牛血清的DMEM制成细胞悬液,以每孔 $1 \times 10^6$  cells接种于6孔板中,每孔培养液2 mL,第2天细胞更换成1% FBS的DMEM培养,按1.2.2下分组加入各种药物,作用24 h,胰酶消化离心收集并悬于PBS中,70%乙醇固定30 min,用含RNase及碘化丙锭的染色液染色30 min,流式细胞仪测定DNA含量变化,用MULTICYCLE软件处理结果。流式细胞术测定细胞周期。

1.2.6 Western blot法检测STAT-3信号通路相关蛋白的表达:按1.2.2下分组处理细胞,RIPA消化提取蛋白,并配置成相同浓度的蛋白质溶液。配置12%分离胶和5%浓缩胶,调整电压80~120 V电泳2 h,300 mA恒定电流转膜4 h,室温牛奶封闭1 h,加一抗(STAT3、p-STAT3、CyclinD1、Bcl-2稀释倍数均为1:200)4℃过夜,TBST洗涤3次,每次5 min。加入二抗室温反应1 h,TBST洗涤3次,每次10 min。进行化学发光反应、曝光并进行灰度值分析。

1.3 统计学方法 应用SPSS 17.0软件和Excel 2007进行数据分析,正态计量数据用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,2组间比较采用 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 胃铋镁对胃癌SGC-7901细胞株增殖的影响 MTT结果显示:与对照组和三联药组相比,胃铋镁组和胃铋镁中药总组分能显著抑制细胞增殖,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );且随着药物浓度的增加,胃铋镁和胃铋镁中药总组分对细胞的增殖抑制率逐渐上升并且呈现量效关系。表明胃铋镁和胃铋镁中药总组分能够显著抑制SGC-7901细胞增殖且具有剂量依赖性。见表1。

表 1 胃铋镁对 SGC-7901 细胞增殖的影响( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )  
Tab. 1 Inhibition effect of Weibimei on SGC-7901 cell( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

组别	1/3 倍标准浓度		标准浓度		3 倍标准浓度	
	OD <sub>490</sub>	抑制率(%)	OD <sub>490</sub>	抑制率(%)	OD <sub>490</sub>	抑制率(%)
对照组	0.328 ± 0.032	0.122 ± 0.02	0.337 ± 0.019	0.032 ± 0.01	0.343 ± 0.021	0.013 ± 0.12
三联药组	0.276 ± 0.051	17.98 ± 5.21	0.269 ± 0.031	20.12 ± 2.83	0.288 ± 0.051	14.50 ± 5.18
胃铋镁组	0.172 ± 0.028*	48.96 ± 2.77	0.146 ± 0.004*	56.69 ± 3.31*	0.117 ± 0.012**	65.40 ± 1.14**
胃铋镁中药总组分	0.264 ± 0.019	21.56 ± 2.04	0.248 ± 0.012*	26.26 ± 3.74	0.206 ± 0.037*	38.95 ± 0.59
胃铋镁化疗总组分	0.264 ± 0.052	21.60 ± 5.32	0.238 ± 0.010	35.17 ± 5.98	0.265 ± 0.071	21.10 ± 1.11

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, 与对照组比较, compared with control group

2.2 胃铋镁对胃癌 SGC-7901 细胞株凋亡的影响 荧光显微镜下显示:对照组、三联药组及胃铋镁化疗总组分细胞核均呈卵圆形,染色质均匀着色并分布于整个细胞核,荧光强度较强。胃铋镁组和胃铋镁中药总组分组的细胞染色质凝聚、断裂、呈点状,着色不均匀呈亮点状,见图 1。对凋亡细胞进行统计,结果显示胃铋镁组和胃铋镁中药总组分较对照组能显著抑制细胞凋亡(P < 0.05);而三联药组的凋亡诱导效应不显著,见表 2。

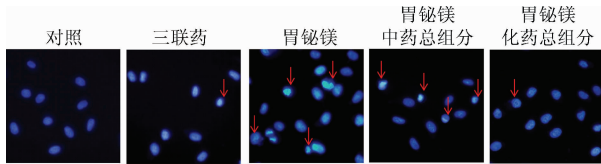


图 1 胃铋镁对胃癌 SGC-7901 细胞株凋亡的影响  
Fig. 1 Apoptosis effect of Weibimei on SGC-7901 cell

表 3 胃铋镁对 SGC-7901 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Tab. 3 Cell cycle of SGC-7901 cells treatment by Weibimei( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	G1(%)	S(%)	G2(%)
对照组	54.029 ± 2.454	40.370 ± 1.752	5.601 ± 0.715
三联药组	41.160 ± 1.741*	57.040 ± 1.331*	1.800 ± 0.419*
胃铋镁组	75.785 ± 1.874**	22.075 ± 1.396**	2.141 ± 0.560*
胃铋镁中药总组分	73.293 ± 1.184*	21.107 ± 0.990**	5.599 ± 0.197
胃铋镁化疗总组分	43.343 ± 1.248	52.614 ± 2.131*	4.042 ± 0.961

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, 与对照组比较, compared with control group

2.4 胃铋镁对胃癌细胞 SGC-7901 细胞中 STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示:与对照组相比,胃铋镁组及胃铋镁中药总组分 SGC-7901 细胞中的 STAT3、p-STAT3 蛋白表达量均减少,且 STAT-3 信号靶基因 CyclinD1、Bcl-2 的蛋白表达也明显降低。其中,胃铋镁中药单组分中的弗朗鼠李皮、茴香和石菖蒲处理后 STAT-3 信号通路蛋白的下降最为显著。这些结果说明胃铋镁可通过抑制 STAT3 信号通路来影响胃癌细胞的增殖活性,且主要是通过其中药组分中的弗朗鼠李皮、茴香和石菖蒲。见图 2。

表 2 胃铋镁对 SGC-7901 细胞的凋亡率( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Tab. 2 The apoptosis rate of SGC-7901 after treatment by Weibimei( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	细胞凋亡率(%)
对照组	5.594 ± 3.816
三联药组	7.605 ± 2.586
胃铋镁组	30.764 ± 7.770**
胃铋镁中药总组分	17.070 ± 4.824*
胃铋镁化疗总组分	10.232 ± 1.869

\* P < 0.05, \*\* P < 0.01, 与对照组比较, compared with control group

2.3 胃铋镁对胃癌 SGC-7901 细胞周期的影响 流式结果显示:与对照组比较,胃铋镁组和胃铋镁中药总组分 G1 期细胞数量显著增多,S 期细胞明显减少(P < 0.05),说明胃铋镁及其中药总组分能阻滞 SGC-7901 细胞周期在 G1 期,见表 3。

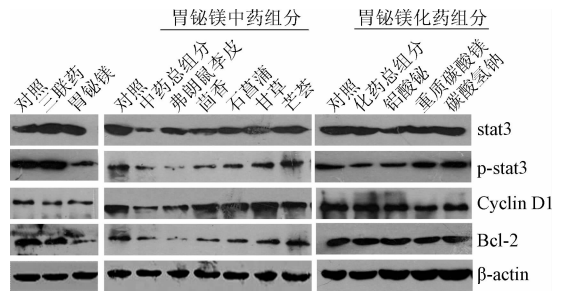


图 2 胃铋镁对胃癌细胞 SGC-7901 细胞中 STAT3 信号通路相关蛋白表达的影响  
Fig. 2 The protein expression related to STAT3 signaling pathway in SGC-7901 cell treatment by Weibimei

### 3 讨论

胃癌严重威胁人类的健康,是全世界最常见的消化道肿瘤之一<sup>[4]</sup>。SGC-7901 细胞株是人胃腺癌细胞株,具有相对较高的转移特性,是具有代表性的胃癌细胞株。本研究以该细胞株为模型,应用 MTT,Hoechst 33342 染色方法来检测胃铍镁和胃铍镁各组分对胃癌 SGC-7901 细胞株增殖/凋亡能力的影响。结果表明,胃铍镁可以显著抑制胃癌细胞 SGC-7901 增殖,促进细胞凋亡,并且这种作用效果主要来自胃铍镁中药总组分。

胃癌发生发展过程中存在着细胞周期调控机制的紊乱,细胞周期失控是肿瘤恶性增殖的根本原因<sup>[5]</sup>。本研究通过细胞周期实验检测了胃铍镁对胃癌细胞 SGC-7901 周期的影响。结果表明,胃铍镁作用 SGC-7901 细胞后,细胞 G1 期细胞增加,S 期细胞减少,细胞发生了 G1 期阻滞;提示胃铍镁通过影响细胞 G1/S 期转换作用实现了对胃癌细胞增殖的抑制效应。

STAT3 作为一种转录因子,促进细胞增殖信号的开启,在胃癌发生发展过程中发挥重要作用<sup>[6]</sup>。大量研究数据表明,STAT3 持续激活是肿瘤细胞异常增殖和恶性转化的关键变化。异常活化的 STAT3 信号增强了肿瘤的抗凋亡抗耐药能力,促进了肿瘤的侵袭、转移及血管新生<sup>[7-9]</sup>。STAT3 信号的异常活化与胃癌的发生发展、转移、预后都有密切关系<sup>[10]</sup>。本实验研究结果表明,与对照组相比,胃铍镁能下调 STAT3 和 p-STAT3 的表达,说明胃铍镁可以抑制 STAT3 激活,并抑制 STAT3 信号调节下的 cyclinD1 和 Bcl-2 等增殖基因。

研究发现早期胃癌、进展期胃癌组织中的 cyclinD1 表达率显著高于正常胃黏膜组织<sup>[11]</sup>。cyclinD1 是常见的细胞周期蛋白,是 STAT3 下游重要的靶基因,主要功能是促进细胞增殖和分裂,干扰 cyclinD1 的表达可以使胃癌细胞阻滞在 G1 期<sup>[12]</sup>。本实验研究也发现,胃铍镁作用胃癌细胞 SGC-7901 后,细胞周期阻滞在 G1 期,与对照组相比,cyclinD1 的表达减弱。在细胞凋亡程序中,有一个关键基因 Bcl-2,它具有抑制细胞凋亡的功能,在胃癌细胞中,它通过延长细胞生存期、增加肿瘤侵袭能力来有效抑制细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本实验发现,与对照组相比,胃铍镁能够显著下调 Bcl-2 的表达,促进细胞凋亡。

综上所述,胃铍镁能显著抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖,促进细胞凋亡,阻滞细胞周期,这种作用效果主要来自胃铍镁中药总组分。胃铍镁抗肿瘤的作用机制可能与中药组分能降低 STAT3 信号通路相关蛋白 p-STAT3、CyclinD1、Bcl-2 的表达有关。下一步将研究胃铍镁中药各组分的作用机制。□

### 参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [2] 陈宗营. 胃癌的发病机制及治疗的研究进展[J]. 社区医学杂志, 2012, 10(4):56-58.
- [3] 刘宁宁,李琦. 中药复方治疗胃癌的机制研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 9(19):2163-2165.
- [4] 张海芳,卫星,陈海华,等. 芬太尼对胃癌细胞 SGC-7901 增殖影响及机制研究[J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(9):38-40.
- [5] Frantz DJ, Hughes BG, Nelson DR. Cell cycle arrest and differential gene expression in HT-29 cells exposed to an aqueous garlic wextract[J]. Nutr Cancer, 2000, 38(2):255-264.

- [6] 俞丽芬,朱延波,乔敏敏,等. Stat3 在人胃癌细胞株和组织中的组成性激活及其临床意义[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(24):2064-2069.
- [7] Fan Y, Zhang YL, Wu Y, et al. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses invasion through inducing anoikis in human colon cancer cells[J]. World J Gastroenterol, 2008, 14(3):428-434.
- [8] Li GH, Wei H, Lv SQ, et al. Knockdown of STAT3 expression by RNAi suppresses growth and induces apoptosis and differentiation in glioblastoma stem cells[J]. International J Oncology, 2010, 37(1):103-110.
- [9] Cascio S, D'Andrea A, Ferla R, et al. miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells[J]. Cell Physiol, 2010, 224(1):242-249.
- [10] 张荣贵. STAT3 和胃癌的研究进展[J]. 中华临床医师杂志, 2011, 5(13):3898-3900.
- [11] Wu H, Huang M, Cao P, et al. MiR-135a targets JAK2 and inhibits gastric cancer cell proliferation[J]. Cancer Biol Ther, 2012, 13(5):281-288.
- [12] Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, et al. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma [J]. Cancer Res, 2002, 62(12):3351-3355.
- [13] 朱清芳. Bcl-2 和 NF-κB 在慢性胃炎及胃癌中的表达及临床意义[J]. 中国当代医药, 2014, 21(33):98-102.

(编校:吴茜)