

Effect Mechanism of Resveratrol Induces SGC-7901 Apoptosis via Ca^{2+} Signal Pathway

Peng An, Zitao Jiang

Tianjin University of Commerce, Tianjin
Email: anpeng19831021@tjcu.edu.cn

Received: Sep. 6th, 2011; revised: Sep. 21st, 2011; accepted: Sep. 29th, 2011.

Abstract: Objective: To study effect of resveratrol (Res) induce SGC-7901 cell apoptosis via Ca^{2+} signal. **Methods:** Use the MTT method to test the inhibition rates of Res in SGC-7901 tumor cells; Use FCM to detect the influence of the Res on tumor cell apoptosis and cell cycle; Use fluorescence microscope to identify the tumor cell apoptosis in the morphology. **Results:** Res inhibit SGC-7901 cell proliferation in a dose-dependent manner, Its IC_{50} is $164.69 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. When the concentration of Res is 44, 88, $176 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, the rates of proliferation are 29.693%, 33.986%, 85.634%. G_1 term is gradually diminished, S term become gradually increasement. G_2/M term become gradually reduction. According to the morphology, the apoptosis body become increase, tumor cell's caryoplasm become reduction and tumor cell karyopyknosis, the extent of the colour become deeply with the concentration of the Res. content of Ca^{2+} are 18.046 ± 1.0798 ; 19.7550 ± 2.1129 ; 26.6300 ± 2.0813 respectively. **Conclusion:** Res can inhibit the tumor cell proliferation and induce the tumor cell apoptosis via Ca^{2+} signal pathway.

Keywords: Resveratrol; SGC-7901; Cell Proliferation; Cell Cycle; Ca^{2+}

Ca^{2+} 信号通路介导白藜芦醇诱导 SGC-7901 肿瘤细胞凋亡的研究

安 鹏, 姜子涛

天津商业大学, 天津

Email: anpeng19831021@tjcu.edu.cn

收稿日期: 2011 年 9 月 6 日, 修回日期: 2011 年 9 月 21 日; 录用日期: 2011 年 9 月 29 日

摘要: 目的: 研究白藜芦醇(Res)诱导 SGC-7901 肿瘤细胞凋亡的 Ca^{2+} 信号通路的机制。 **方法:** MTT 法测定 Res 对 SGC-7901 细胞抑制率; 流式细胞仪检测 Res 对肿瘤细胞凋亡和肿瘤细胞周期的影响; 荧光显微镜从形态学鉴定肿瘤细胞凋亡。激光共聚焦法测定白藜芦醇对肿瘤细胞 Ca^{2+} 活性的影响。 **结果:** Res 明显抑制肿瘤细胞的增值, 且呈一定剂量依赖关系, 其 IC_{50} 为 $164.69 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 当 Res 剂量为 44、88、 $176 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 肿瘤细胞的抑制率为: 29.693%, 33.986%, 85.634%; 此外, 肿瘤细胞周期 G_1 期细胞的比例减少, S 期细胞的比例增加, G_2/M 期减小; 通过形态学观察发现, 随着 Res 剂量的增加, 镜下凋亡细胞比例逐渐增加, 肿瘤细胞的核浆比减小, 细胞核高度固缩, 染色程度加深, 凋亡小体的数量不断增加。其对 Ca^{2+} 含量的影响分别为 18.0463 ± 1.0798 、 19.7550 ± 2.1129 和 26.6300 ± 2.0813 。 **结论:** Res 明显抑制 SGC-7901 细胞的增殖且诱导其凋亡并影响 Ca^{2+} 信号通路。

关键词: Res; SGC-7901; 细胞增殖; 细胞周期; Ca^{2+}

1. 引言

白藜芦醇(Resveratrol Res)属非黄酮类多酚物质,

是植物在恶劣环境下或遭到病原体侵害时自身分泌的一种植物抗毒素, 已在 72 种植物中被发现^[1]。早期研究发现, Res 具有保护心血管、抗病原微生物和护肝

等多种生物学作用,自从 Jang et al.^[2]于 1997 年系统地报道了 Res 的抗肿瘤作用后,迄今发现他能抑制多种癌细胞的生长,包括胃癌、肠癌、乳腺癌、白血病等,但其作用机制仍未明确。本实验旨在研究 Res 对人胃腺癌 SGC-7901 细胞增殖的影响。

2. 材料与方法

2.1. 材料

人胃腺癌细胞(SGC-7901)由哈尔滨商业大学药物研究所博士后科研工作站传代保种;白藜芦醇(Res,纯度为 98%,分子量为 228.2)和 Hoechst 33258 购于 Sigma 公司;RPMI1640 培养基和胰蛋白酶购于 GIBCO;胎牛血清购于 Hyclone;PI 购于 Invitrodrion;SANYO MC0175 型 CO₂ 培养箱(日本三洋公司);CLOUTER EPICS-XL 流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司);荧光显微镜(Leica 公司);SUNRISE 酶标仪(瑞士 TECAN 公司)。

2.2. 方法

2.2.1. 细胞培养

实验所用细胞于含 5% CO₂ 的 37°C 培养箱中培养传代,培养基为 RPMI1640 培养液(含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素);用 0.25%胰酶-EDTA 消化传代,每周传代两次。

2.2.2. MTT 法测定 Res 对肿瘤细胞抑制作用

将对数生长期的 SGC-7901 细胞用胰酶消化后配制成浓度为 1×10^4 细胞/ml 的细胞液,按 1000 个/孔接种于 96 孔板,每孔加 100 μl。次日加入低、中、高剂量(分别为 44, 88, 176 μmol·L⁻¹)的 Res 及相应溶剂对照的新鲜培养液,每孔加 100 μl,每组设三个平行孔,重复三次,于 37°C 继续培养 72 h 后,弃上清,每孔加 100 μl 新鲜配制的含 0.5 mg/ml MTT 的无血清培养液,继续培养 4 h,弃培养上清,每孔加 200 μl DMSO 溶解 MTT 甲簪沉淀,用微型振荡器振荡混匀,用 SUNRISE 型酶标仪在参考波长 450 nm,检测波长 570 nm 条件下测定光密度值(OD),以溶剂对照处理的肿瘤细胞为对照组,用下面公式计算药物对肿瘤细胞的抑制率,并按中效方程计算 IC₅₀^[3]:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照组平均OD值} - \text{给药组平均OD值}}{\text{对照组平均OD值}} \times 100\%$$

2.2.3. 形态学检测 Res 对肿瘤细胞凋亡研究

取指数生长期的人胃腺癌细胞 SGC-7901 加入适量 0.25%胰蛋白酶液消化细胞,使贴壁细胞脱落。用含 10%胎牛血清的培养基制备成浓度为 3×10^5 /ml 的细胞悬液,于 6 孔板中每孔接种 1 ml。将培养板置于 37°C、5%CO₂ 培养箱。24 h 贴壁后加入不同浓度的 Res(终浓度为 44, 88, 176 μmol·L⁻¹);阳性对照组加终浓度为 153.8 μmol·L⁻¹ 的 5-FU;阴性对照组加入等体积不含药物的培养液。48 h 后细胞用胰酶消化,PBS 洗一遍,将细胞收集利用 Hoechst 33258 染色利用荧光显微镜进行观察^[4]。

2.2.4. Res 对肿瘤细胞凋亡作用的研究

将对数生长期细胞接种于 6 孔培养板中,细胞浓度为 1×10^6 个/ml,置于 37°C,5%CO₂ 条件培养箱中,24 h 后加入不同浓度的 Res(终浓度为 44, 88, 176 μmol·L⁻¹);阳性对照组加终浓度为 153.8 μmol·L⁻¹ 的 5-FU;阴性对照组加入等体积不含药物的培养液。48 h 后细胞用胰蛋白酶消化,PBS 洗 2 次,70%冷乙醇固定,置入 4°C 冰箱中保存 12 h 以上,离心,用 PBS 液除尽乙醇,离心后的细胞重悬于浓度为 50 μg/ml PI 染液,37°C 避光温育 30 min,300 目尼龙网过滤后,在 CLOUTER EPICS-XL 型流式细胞仪上测定凋亡细胞所占比例。检测细胞数为 10⁴ 个。激发波长 488 nm,发射波长 630 nm^[5]。

2.2.5. Res 对肿瘤细胞周期作用的研究

取指数生长期的人胃腺癌细胞 SGC-7901, PBS 洗 2 遍后,加入适量 0.25%胰蛋白酶液消化,使贴壁细胞脱落。用含 10%胎牛血清的培养基制备成浓度为 3×10^5 /ml 的细胞悬液,于 6 孔板中每孔接种 1 ml。将培养板置于 37°C、5% CO₂ 培养箱。24 h 贴壁后加入不同浓度的 Res(终浓度为 44, 88, 176 μmol·L⁻¹);阳性对照组加终浓度为 153.8 μmol·L⁻¹ 的 5-FU;阴性对照组加入等体积不含药物的培养液。48 h 后细胞用胰酶消化,离心收集细胞,细胞沉淀用 70%乙醇悬浮,在 4°C 冰箱固定 12 h 以上。固定后的细胞用 PBS 洗两遍并悬浮之,加入 PI 染液(终浓度为 50 μg/ml),37°C 避光温育 30 min,300 目尼龙网过滤后,在 CLOUTER EPICS-XL 型流式细胞仪上分析细胞周期(激发波长 488 nm,发射波长 630 nm)^[6]。

2.2.6. Res 对肿瘤细胞 Ca²⁺含量的影响

指数生长期的人胃腺癌细胞 SGC-7901、人肝癌细

胞 HepG-2, 加入适量 0.25% 胰蛋白酶液消化细胞, 使贴壁细胞脱落。用含 10% 胎牛血清的培养基制备成浓度为 $3 \times 10^5/\text{ml}$ 的细胞悬液, 于 6 孔板中每孔接种 1ml。将平板置于 37°C 、5% CO_2 培养箱。24 h 后不同浓度的 RES, 使其终浓度分别 44、88、176 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 阳性对照组加 5-FU, 其终浓度为 153.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 阴性对照组加入不含药物相同体积的培养液。药物作用 48 h 后吸出培养皿中的培养液, 加胰酶消化, 用无钙台式液洗一遍; 加入浓度为 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 Fluo-3/AM 荧光探针 200 μl , 37°C 避光温育 30 min; 将孔中的盖玻片取出, 盖在载玻片上, 避光, 激光共聚焦显微镜扫描观察。激发波长 488 nm, 发射波长 540~570 nm。

3. 结果

3.1. MTT 法测定 Res 对肿瘤细胞抑制作用

阴性对照抑制率为 0, 阳性对照抑制率为 34.76%, 明显高于阴性对照; Res 各剂量组抑制率明显高于阴性对照, 并呈剂量 - 效应关系, 其中 IC_{50} 为 164.69 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (见图 1)。

3.2. 形态学观察 Res 对肿瘤细胞凋亡影响

加入 Res 后, 出现大量凋亡细胞, 且呈剂量依赖效应; 凋亡细胞染色体 DNA 断裂并聚集成细小的凝聚块, 细胞形态不整齐, 部分细胞胞核染色质分布不均匀, 胞核染色质浓缩, 边集, 其中 Res($176 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组多数细胞死亡 (见图 2)。

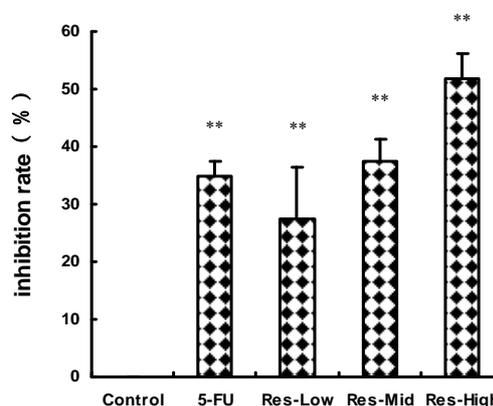
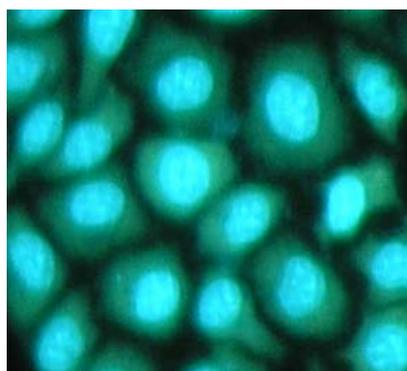
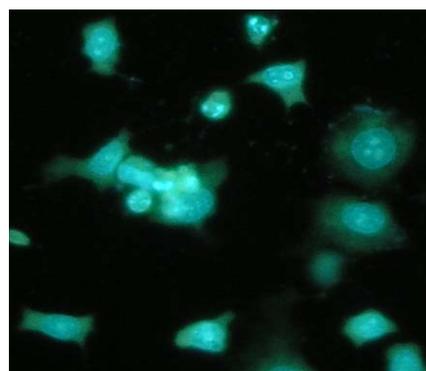


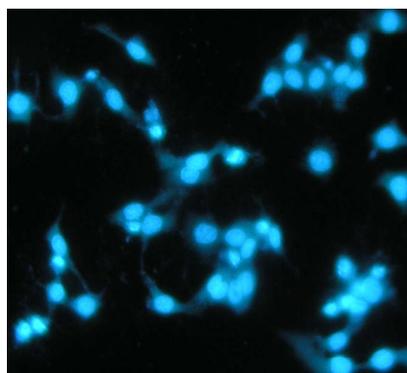
Figure 1. The relationship between the Res concentration and the Inhibition rates in SGC-7901. ** $P < 0.01$ vs Control
图 1.



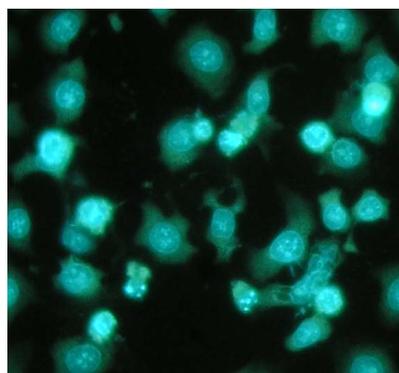
SGC-7901 treated with RPMI1640



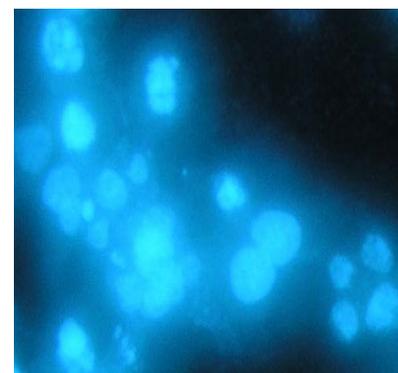
$153.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-FU



$44 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Res



$88 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Res



$176 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Res

Figure 2. Morphological appearance of SGC-7901 cells by fluorescence detection ($\times 400$)

图 2.

3.3. Res 对肿瘤细胞凋亡作用研究

流式细胞仪测定“亚 G1 细胞群”的含量结果发现: 各剂量 Res 诱导 SGC-7901 细胞的凋亡率为 29.693%, 33.986%, 85.634%, 且呈一定的剂量效应关系(见图 3)。

3.4. Res 对肿瘤细胞周期作用研究

流式细胞仪观察 Res 作用于 SGC-7901 细胞 48 h 对其细胞周期分布的影响表明: Res 对各时相均明显抑制, 同时使 G_1 期细胞的比例减少, S 期细胞的比例增加, G_2 期细胞的比例增加, 且呈明显的剂量依赖性(见图 4)。

3.5. Res 对肿瘤细胞 Ca^{2+} 作用的研究

利用激光共聚焦显微镜观察白藜芦醇对肿瘤细胞中钙离子信号的影响, 研究结果表明: 在 48 小时白藜芦醇药物作用下, 肿瘤细胞中的钙离子浓度随着药物含量的逐渐增加而增加并且呈现一定的量效关系(如图 5)。

4. 讨论

本研究用 MTT 法观察 Res 对 SGC-7901 细胞生长的影响, 结果显示: Res 对 SGC-7901 细胞具有较强的杀伤作用, 其杀伤作用不亚于阳性对照药 5-FU。

细胞凋亡是受基因控制的细胞死亡过程, 大多数细胞凋亡受其刺激因子作用后出现基因表达的变化或表达新的基因, 而这些基因直接控制细胞凋亡的发生和发展。细胞外部因素则通过信号传递而影响这些基因的表达, 从而间接地调节细胞凋亡, 这些作用的最终结局是激活细胞内 DNA 酶, 引起染色质的异常凝聚和 DNA 的裂解, 从而触发细胞凋亡。

本文通过荧光显微镜和流式细胞术等仪器检测了 Res 诱导肿瘤细胞凋亡的作用。流式细胞仪检测发现, 随着 Res 浓度的不断增大, 肿瘤细胞凋亡率不断升高; 光学显微镜, 荧光显微镜以及电子显微镜等观察发现: 细胞胞质浓缩, 细胞核染色质密度增高, 染色加深, 呈半月形凝集在核膜周边, 核仁裂解, 进而胞膜内陷,

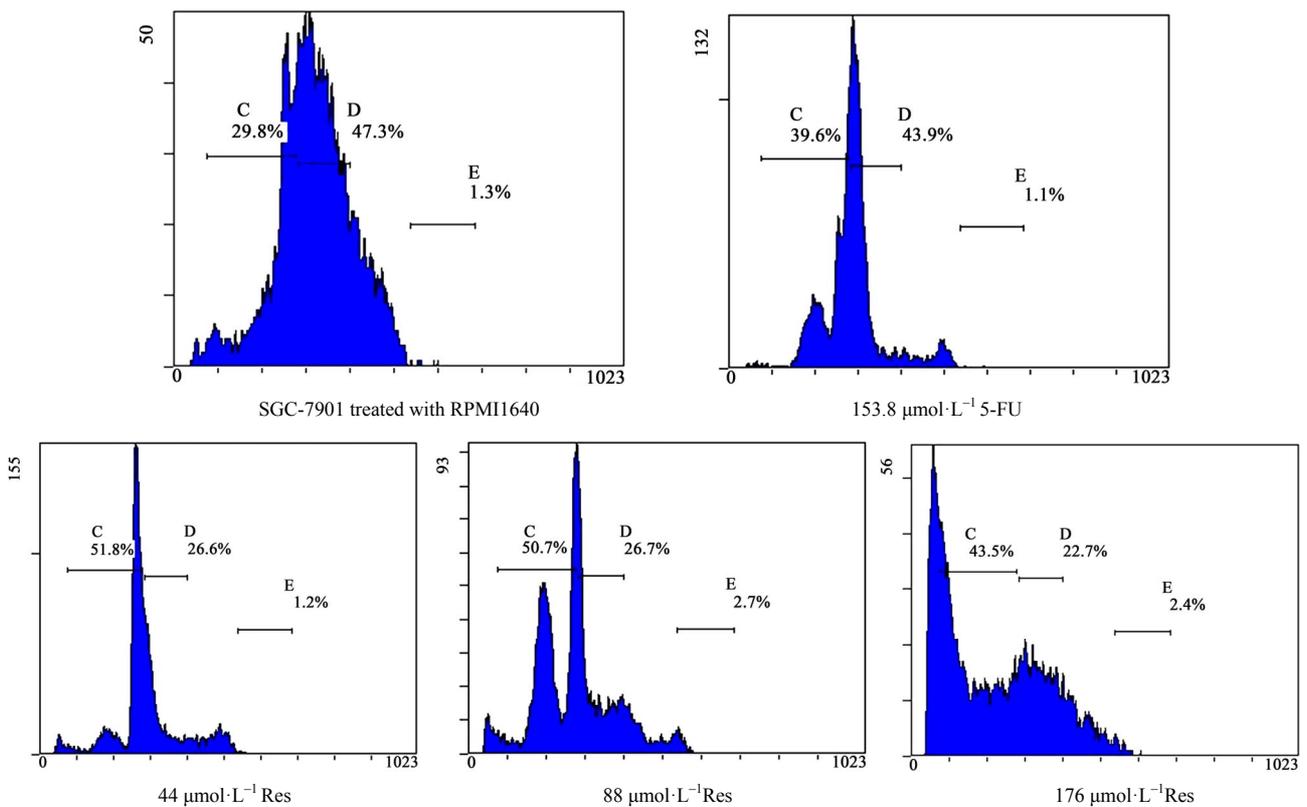


Figure 3. The effects of Res induced SGC-7901 cell apoptosis
图 3.

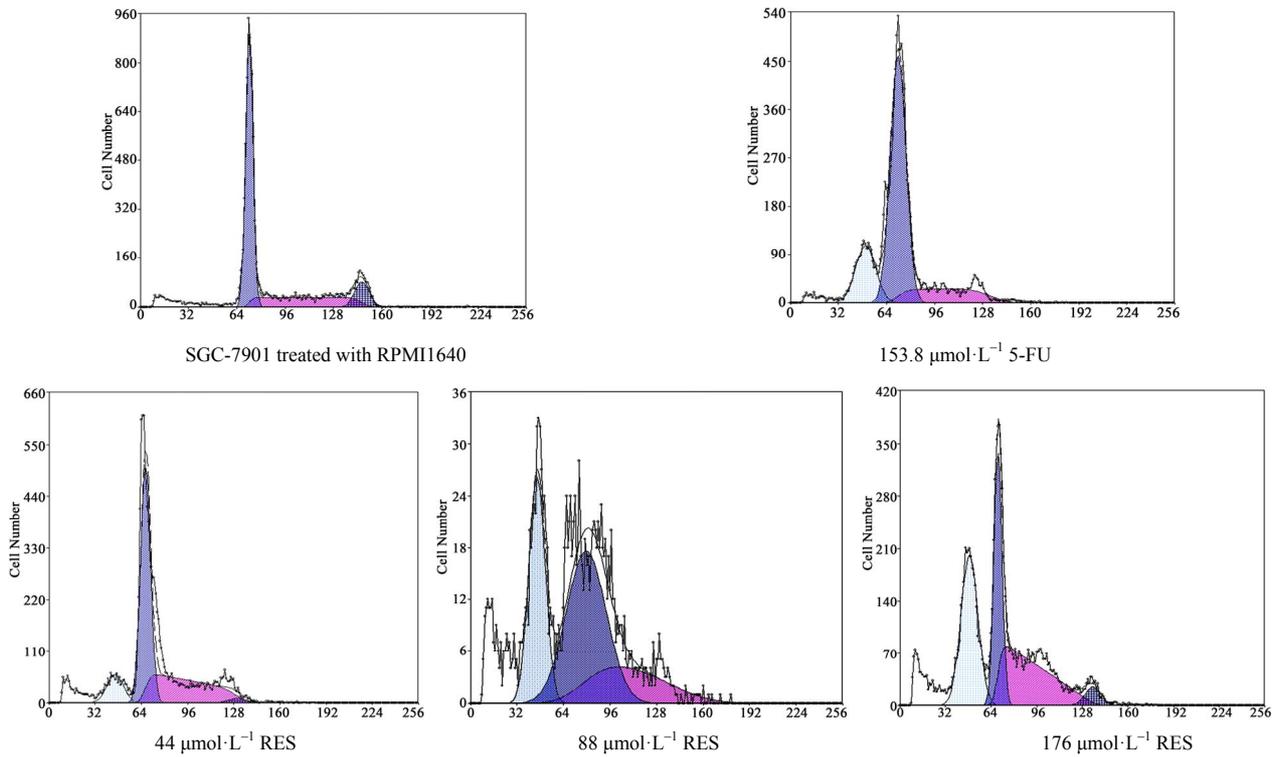


Figure 4. The effect of RES on the cell cycle of SGC-7901 cells

图 4.

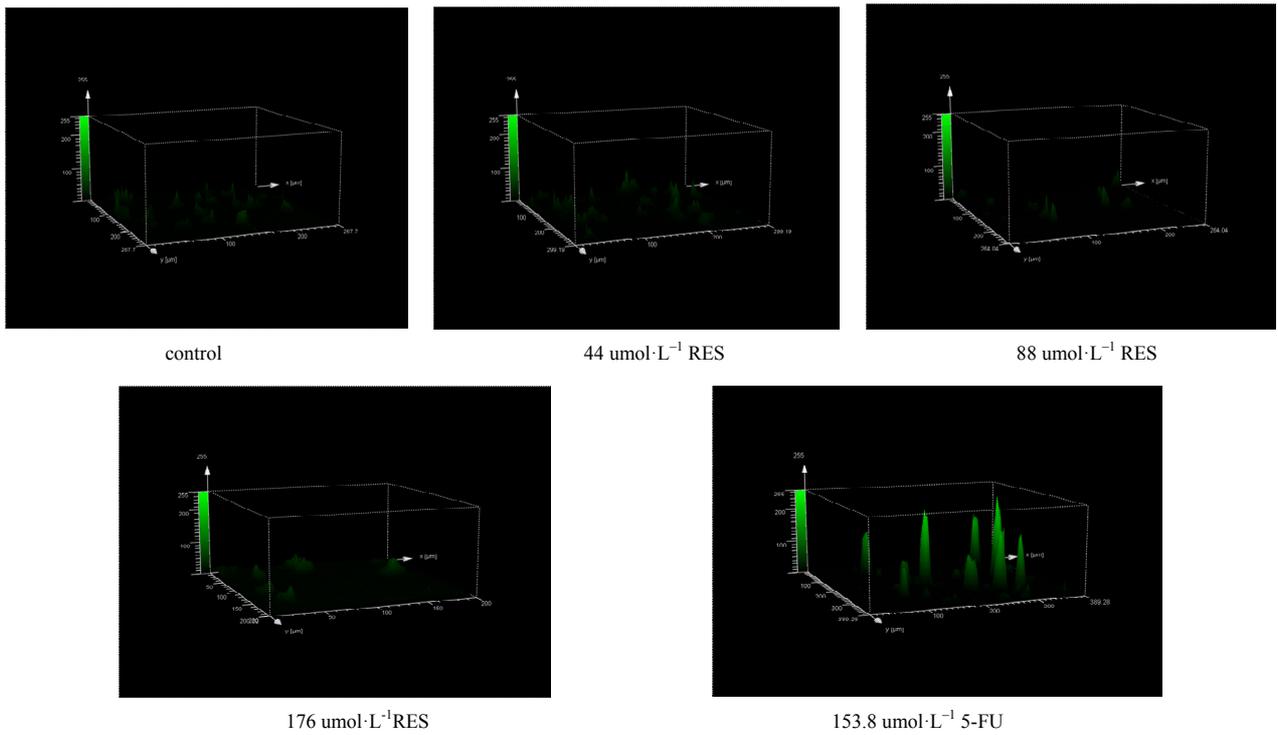


Figure 5. Laser scanning confocal microscope(LSCM) analysis Ca^{2+} in SGC-7901. Cells are pretreated with differential dose RES or without RES for 48h. After 48h cells are washed by PBS and stained with Fluo-3 for 30min, then washed by PBS 2 times again and underwent LSCM analysis. Content of Ca^{2+} are shown above the arrows

图 5.

随即与邻周细胞脱离,自行分割成为多个外有膜包裹,内含物不外溢的凋亡小体。同时还可以看出,随着 Res 浓度的不断加大,凋亡小体的数量不断增大。这些研究进一步表明,Res 能够诱导 SGC-7901 肿瘤细胞凋亡,且凋亡作用与 Res 的浓度呈现一定的剂量依赖关系。

细胞周期(cell cycle)是指细胞从上一次分裂结束开始生长到下一次分裂终止所经历的过程。细胞周期中的间期细分为 G_1 期(DNA 合成前期),S 期(DNA 合成期), G_2 期(DNA 合成后期),M 期(细胞有丝分裂期)。细胞周期调控(cell cycle regulation)是一个非常复杂和精细的调节过程,它与细胞的分化、生长和死亡有着紧密的关系。DNA 或纺锤体损伤通常会触发细胞周期阻滞或凋亡,细胞周期阻滞经常发生在 G_1/S 期或 G_2/M 期交界处。肿瘤细胞周期的特点是细胞群主体分布于 DNA 合成活跃的 S 期。抗肿瘤药可使细胞周期动力学发生明显变化。细胞凋亡的特点就是细胞内 DNA 的含量发生了变化。正常增殖细胞在各个时期其 DNA 含量各不相同,并呈周期性变化:在细胞开始合成 RNA 和蛋白质的 G_1 期,其 DNA 含量仍然保持二倍体;进入 S 期后, DNA 合成开始,此时细胞的 DNA 含量介于二倍体与四倍体之间;当 DNA 合成结束后,细胞进入 G_2 期,并继续合成 RNA 和蛋白质,直到进入 M 期, G_2 期和 M 期的 DNA 含量都是四倍体;随后细胞发生有丝分裂,形成两个子细胞,它们可能进入下一个细胞周期,也可能进入静止期(G_0 期), G_0 期与 G_1 期的 DNA 含量均为二倍体。在核酸染料饱和的前提下,每个细胞内核酸染料的多少取决于细胞的 DNA 含量^[7-10]。因此,通过分析细胞的荧光强度,可以了

解细胞群体中各周期的分布状况,进而分析细胞的生长状态,以判断细胞的凋亡程度。本实验结果显示:Res 对肿瘤细胞各期变化均有影响,使 G_1 期细胞的比例减少,S 期细胞的比例增加, G_2 期细胞的比例增加,且呈明显的剂量依赖性,表明 Res 对肿瘤细胞增殖具有抑制作用。

参考文献 (References)

- [1] 张红雨,徐长庆,李宏霞等.白藜芦醇抗心律失常和抗心肌缺血作用研究[J].中国药理学通报,2006,22(3):383-384.
- [2] M. Jang, L. Cai, G. O. Udeani, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, 1997, 275(5297): 20-218.
- [3] N. G. Azios, L. Krishnamoorthy, M. Harris, et al. Estrogen and Resveratrol regulate Rac and Cdc42 signaling to the Actin Cytoskeleton of metastatic breast cancer cells. *Neoplasia*, 2007, 9(2): 147-158.
- [4] S. Emilie, V. T. Celine and L. Kim. Resveratrol interferes with AKT activity and triggers apoptosis in human uterine cancer cells. *Molecular Cancer*, 2006, 5(1): 45.
- [5] D. M. Huang, Y. C. Shen, C. Wu, et al. Investigation of extrinsic and intrinsic apoptosis pathways of new clerodane diterpenoids in human prostate cancer PC-3 cells. *European Journal of Pharmacology*, 2004, 503(1-3): 17-24.
- [6] B. J. Thomas. Cell-cycle control during development: Taking it up a notch. *Developmental Cell*, 2005, 8(4): 451-452.
- [7] D. Delmas, C. Rebe, S. Lacour, et al. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the tafts and the formation of a deathinducing signaling complex in colon cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(42): 41482-41490.
- [8] N. A. Thornberry, Y. Lazebnik. Caspases: Enemies within. *Science*, 1998, 281(5381): 1312-1316.
- [9] B. Kadenbach, S. Arnold, I. Lee, et al. The possible role of cytochrome oxidase in stress-induced apoptosis and degenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2004, 1655(1-3): 400-408.
- [10] R. C. Koya, H. Fujita, S. Shimizu, et al. Gelsolin inhibits apoptosis by blocking mitochondrial membrane potential loss and cytochrome c release. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(20): 15343-15349.