

# 雷公藤内酯酮抑制胃癌细胞恶性行为的作用与机理研究<sup>※</sup>

● 王振飞<sup>1</sup> 贾永峰<sup>1</sup> 牟永平<sup>1</sup> 杨永燕<sup>1</sup> 李景权<sup>2▲</sup>

**摘要** 目的:观察雷公藤内酯酮对人胃癌细胞恶性行为的抑制作用,并初步探讨其作用机理。方法:CCK-8法检测雷公藤内酯酮对BGC 823胃癌细胞增殖能力的影响,软琼脂集落形成法检测雷公藤内酯酮对BGC 823细胞锚定非依赖性生长能力的影响,荧光定量PCR法检测雷公藤内酯酮对BGC 823细胞中piRNA651表达的影响。结果:雷公藤内酯酮显著地抑制了BGC 823细胞的增殖能力,IC<sub>50</sub>为165.17 nmol/L;当浓度等于或大于100 nmol/L时,雷公藤内酯酮有效地抑制了BGC 823细胞的锚定非依赖性生长能力;雷公藤内酯酮有力地下调了BGC 823细胞中piRNA651的表达。结论:雷公藤内酯酮可以降低胃癌细胞中促癌的非编码RNA的表达,使其恶性行为受到显著抑制,在胃癌的治疗上具有良好的应用价值。

**关键词** 雷公藤内酯酮 胃癌 增殖 锚定非依赖性生长 piRNA

我国是胃癌的高发国家,每年新发病例占全球的50%<sup>[1]</sup>。很多胃癌患者早期无明显症状,就诊时已处于中晚期,治疗以药物为主。常规化疗药物效果有限,毒副作用巨大,复发转移率高<sup>[2]</sup>。亟需开发出高效的、无毒的新型抗胃癌药物,以贡献于人类。

中国医药学博大精深,尤其在肿瘤治疗方面,经过几千年的临床实践,积累了丰富的经验,很值得深入发掘,加以提高。雷公藤是一味传统中药,味苦,性凉,有活血通络、破瘀镇痛之功效<sup>[3]</sup>。雷公藤内酯酮是从雷公藤中分离出的一种环氧二萜内酯化合物。动物实验表明,它在较高的剂量下对肝脏、肾脏等器官均无毒性作用<sup>[4]</sup>,也不会降低血液中红细胞、白细胞的数量<sup>[5]</sup>,显示出很高的安全性。以往对它的研究多集中于免疫抑制、抗炎和抗生育等方面<sup>[6,7]</sup>。对其抗肿瘤活性的报道甚少。本实验中,我们首次观察了雷公藤内酯酮对

胃癌细胞增殖能力的影响,并从改变促癌的非编码小RNA表达的角度探讨了它的作用机理。

## 1 材料

1.1 细胞株 人胃癌细胞BGC 823购自中国科学院细胞库。

1.2 试剂 雷公藤内酯酮由陕西辰光生物技术有限公司提供,批号:20151125,纯度>98%,溶于二甲基亚砜(DMSO),配成浓度为100mmol/L的贮存液。胎牛血清(10099133)、RPMI-1640培养液(11875093)、胰蛋白酶消化液(25200056)、DMSO(1572C502)均购自Gibco公司,CCK-8试剂盒(C16038)购自上海碧云天生物技术有限公司,低熔点琼脂糖(358608)购自santacruz公司,小RNA提取试剂盒EasyPure miRNA Kit(J21204)、miRNA反转录和荧光定量PCR试剂盒TransScript Green miRNA Two-Step qRT-PCR SuperMix(AQ202-01)均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 仪器 二氧化碳恒温培养箱(Thermo),超净工作台(苏州金燕),倒置相差显微镜(Nikon TE2000),多功能酶标仪SpectraMax i3x(Molecular Devices),7500 Real-Time PCR Systems(Applied Biosystem)。

※基金项目 国家自然科学基金(No. 81760552);内蒙古自然科学基金(No. 2016MS0824);内蒙古自治区高等学校创新团队发展计划(No. NMGIRT-A1604)

▲通讯作者 李景权,男,助理研究员。主要研究方向:药学。E-mail:wzsub12@126.com

•作者单位 1.内蒙古医科大学(010020);2.巴彦淖尔市食品药品检验所(015000)

## 2 方法

**2.1 胃癌细胞的培养** 人胃癌细胞 BGC 823 培养于含 10% 胎牛血清、0.1% 双抗的 RPMI - 1640 培养基 (完全 RPMI - 1640 培养基) 中, 37℃、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中常规培养, 取对数生长期细胞进行实验。

**2.2 CCK - 8 法检测细胞增殖能力** 将 BGC 823 细胞悬于完全 RPMI - 1640 培养基中, 调整浓度为  $2 \times 10^4$  个/ml, 接种于 96 孔板 (0.2ml/孔)。培养 24h 后, 药物组加入雷公藤内酯酮 (终浓度为 50nmol/L、100nmol/L、150nmol/L、200nmol/L、250nmol/L), 对照组加入 DMSO。继续培养 48h, 每孔加入 CCK - 8 溶液 20 $\mu$ l, 培养箱内孵育 1h。以 450nm 为检测波长、以 650nm 为参考波长, 测定吸光度。计算相对增殖率 (药物组吸光度/对照组吸光度)。

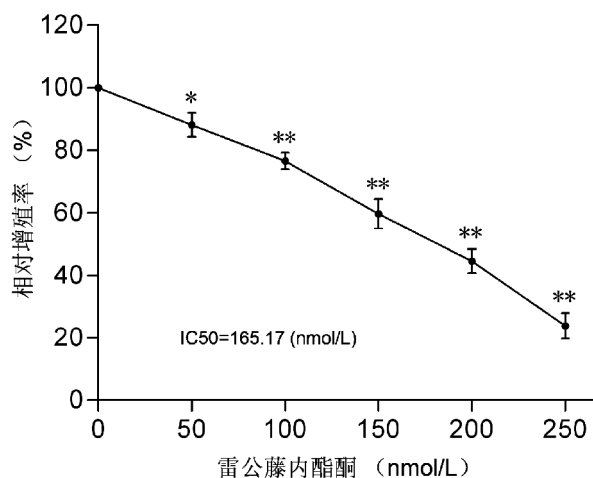
**2.3 软琼脂集落形成法检测细胞锚定非依赖性生长能力** 向 6 孔板每孔中加入 1ml 含 0.6% 低熔点琼脂糖的完全 RPMI 1640 培养液, 摇匀后 4℃ 静置 5min。将  $10^4$  个细胞悬于 0.5ml 含 0.3% 低熔点琼脂糖的完全 RPMI 1640 培养液中, 药物组加入雷公藤内酯酮 (终浓度分别为 50nmol/L、100nmol/L、150nmol/L、200nmol/L、250nmol/L), 对照组加入 DMSO, 覆于底层琼脂糖之上。37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养 3 周, 在显微镜下计大于 100 $\mu$ m 的集落数。

**2.4 荧光定量 PCR 法检测 piRNA651 表达水平** BGC 823 细胞传代培养 24h 后, 药物组加入雷公藤内酯酮 (终浓度分别为 50nmol/L、100nmol/L、150nmol/L、200nmol/L、250nmol/L), 对照组加入 DMSO, 作用 48h 后, 使用 EasyPure miRNA Kit 试剂盒提取 RNA, 使用 TransScript Green miRNA Two - Step qRT - PCR Super-Mix 进行反转录和荧光定量 PCR, 操作按试剂盒说明书进行。荧光定量 PCR 条件为: 94℃ 30s, (94℃ 5s, 60℃ 34s)  $\times$  40 个循环。所用引物序列为: piRNA651 上游引物 5' - AGAGAGGGGCCCGTGCCTTG - 3', piRNA651 下游引物 Universal miRNA qPCR primer; U6 上游引物 5' - CTCGCTTCGGCAGCACACA - 3', U6 下游引物 Universal miRNA qPCR primer。以 U6 为内参, 采用 2 - DDCT 法计算 piRNA651 的相对表达量。

**2.5 统计分析** 使用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计分析, 计量资料用均数  $\pm$  标准差表示, 采用单因素方差分析进行检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 雷公藤内酯酮抑制 BGC 823 细胞的增殖能力** CCK - 8 检测结果显示, 雷公藤内酯酮对 BGC 823 细胞的增殖能力具有显著的抑制作用, 并呈明显的剂量依赖性, IC<sub>50</sub> 为 165.17nmol/L。见图 1。



注: 与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 1 雷公藤内酯酮对 BGC 823 细胞增殖能力的影响

**3.2 雷公藤内酯酮抑制 BGC 823 细胞的锚定非依赖性生长能力** 软琼脂集落形成实验显示, 当浓度等于或大于 100nmol/L 时, 雷公藤内酯酮对 BGC 823 细胞的锚定非依赖性生长能力具有显著的抑制作用, 尤其当浓度达到 250nmol/L 时, BGC 823 细胞生长形成集落的能力完全丧失。见表 1。

表 1 雷公藤内酯酮对 BGC 823 细胞锚定非依赖性生长能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	集落数 (个)
对照组	155 $\pm$ 18
50 nmol/L 雷公藤内酯酮组	133 $\pm$ 15 *
100 nmol/L 雷公藤内酯酮组	113 $\pm$ 11 **
150 nmol/L 雷公藤内酯酮组	76 $\pm$ 13 **
200 nmol/L 雷公藤内酯酮组	25 $\pm$ 9 **
250 nmol/L 雷公藤内酯酮组	0 $\pm$ 0 **

注: 与对照组相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

**3.3 雷公藤内酯酮抑制 BGC 823 细胞中 piRNA651 的表达** 荧光定量 PCR 结果显示, 雷公藤内酯酮对 BGC 823 细胞中 piRNA651 的表达具有显著的抑制作用。见表 2。

表2 雷公藤内酯酮对 BGC 823 细胞中 piRNA651 表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	piRNA651 相对表达量
对照组	1.000 ± 0.000
100 nmol/L 雷公藤内酯酮组	0.766 ± 0.043 **
150 nmol/L 雷公藤内酯酮组	0.531 ± 0.041 **
200 nmol/L 雷公藤内酯酮组	0.397 ± 0.039 **
250 nmol/L 雷公藤内酯酮组	0.287 ± 0.001 **

注:与对照组相比, \*\*  $P < 0.01$ 。

## 4 讨论

雷公藤为卫矛科雷公藤属一年生藤本植物,在祖国医学中有着悠久的药用历史,在临床上对多种肿瘤都显示了良好的治疗效果。但其严重的毒副作用,限制了它在临床上的应用<sup>[8]</sup>。随着现代生物技术的提高,从雷公藤中分离纯化出了一系列单体,其中是否有抗肿瘤活性高、毒副作用低的单体,是一个值得深入研究的问题。已有的工作主要集中在雷公藤甲素和雷公藤红素<sup>[9,10]</sup>这两种物质上,发现它们虽有较好的抗肿瘤活性,但对肝脏、泌尿系统、生殖系统、消化系统、血液系统等会产生较大的毒性作用<sup>[11,12]</sup>。从雷公藤中分离出的雷公藤内酯酮,与雷公藤甲素和雷公藤红素的分子结构不同,所产生的药理作用也有差异。动物实验表明:它对肝脏、肾脏和血液系统均无毒性作用<sup>[4,5]</sup>。对于雷公藤内酯酮是否具有抗胃癌活性,迄今尚未见报道。本研究首次选用雷公藤内酯酮作用于胃癌细胞,发现它可以有效抑制胃癌细胞的增殖能力和锚定非依赖性生长能力,可以有力抑制胃癌细胞中促癌的非编码 RNA 的表达。这说明雷公藤内酯酮有望成为一种安全、高效的抗胃癌药物。

非编码 RNA 表达的异常是胃癌发生发展的一个重要原因。piRNA 是近年新发现的一类非编码 RNA,长度 25-36 个核苷酸,它们在调控转座因子活动、染色质完整性、DNA 甲基化、mRNA 稳定性等多个过程中发挥重要作用<sup>[13]</sup>。在肝癌<sup>[14]</sup>、胃癌<sup>[15]</sup>和乳腺癌<sup>[16]</sup>中,已发现一些 piRNA 的表达异常升高,使得抑癌基因启动子区发生超甲基化而引起转录失活,使得癌基因 mRNA 的降解受到抑制而增强其翻译活动,从而有力地促进了肿瘤的发生发展。已有研究证实:piRNA651 在胃癌组织中处于高表达状态,极大地促进了胃癌细胞的增殖活动<sup>[15]</sup>。本研究发现,雷公藤内酯酮可以下调胃癌细胞中 piRNA651 的表达,这为阐明雷公藤的抗癌机理提供了一条新途径。

很多有抗肿瘤活性的中药,都有一定的毒副作用,

使其在临床上的应用受到限制。但是,每味中药都是一个天然的化合物库,其中含有很多种活性物质,每种活性物质的毒性和药理作用是各不相同的,对它们进行细致的筛选,并加以针对性的研究,是可以寻找到低毒、甚至无毒,同时又有较好抗肿瘤活性的物质的,进而开发出属于我们中华民族自己的、具有独特疗效的抗肿瘤新药,造福于人类。

## 参考文献

- [1] 季加孚. 我国胃癌防治研究三十年回顾[J]. 中国肿瘤临床, 2013, 40(22): 1345-1351.
- [2] Harrold K, Gould D, Drey N. The management of cytotoxic chemotherapy extravasation: a systematic review of the literature to evaluate the evidence underpinning contemporary practice[J]. Eur J Cancer Care, 2015, 24(6): 771-800.
- [3] 李松伟, 郭洪涛, 王子华, 等. 雷公藤多苷治疗类风湿关节炎肺间质病变的临床研究[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(07): 1662-1664.
- [4] Li XX, Du FY, Liu HX, et al. Investigation of the active components in *Tripterygium wilfordii* leading to its acute hepatotoxicity and nephrotoxicity[J]. J ethnopharmacol, 2015, 162: 238-243.
- [5] Pan Y, Meng M, Zheng N, et al. Targeting of multiple senescence-promoting genes and signaling pathways by triptonide induces complete senescence of acute myeloid leukemia cells[J]. Biochem Pharmacol, 2017, 126: 34-50.
- [6] He L, Liang Z, Zhao F, et al. Modulation of IL-37 expression by triptolide and triptonide in THP-1 cells[J]. Cell Mol Immunol, 2015, 12(4): 515-518.
- [7] Qiu, D, Kao, PN. Immunosuppressive and anti-inflammatory mechanisms of triptolide, the principal active diterpenoid from the Chinese medicinal herb *Tripterygium wilfordii* Hook. F[J]. Drugs R D, 2003, 4: 1-18.
- [8] 高妍, 于婉婷, 余东来, 等. 雷公藤毒性机制的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(9): 2265-2266.
- [9] 陈将华, 郑维威, 姜旭东, 等. 雷公藤甲素通过抑制逆转录病毒 HERV-KNp9 基因转录诱导人急性 T 淋巴细胞白血病 Jurkat 细胞凋亡[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(5): 702-706.
- [10] 袁菱, 童德银. 雷公藤红素及其制剂的抗肿瘤研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(14): 1224-1229.
- [11] 王贝, 江振洲, 张陆勇. 雷公藤甲素毒性及减毒的研究进展[J]. 药物评价研究, 2012, 35(3): 211-215.
- [12] 赵小梅, 浦仕彪, 赵庆国, 等. 基于谱-效相关分析的雷公藤致肝毒性物质基础的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(15): 2915-2921.
- [13] Huang Y, Bai JY, Ren HT. piRNA biogenesis and its functions[J]. Russ J of Bioorg Chem, 2014, 40(3): 293-299.
- [14] Law PTY, Qin H, Ching AKK, et al. Deep sequencing of small RNA transcriptome reveals novel non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2013, 58(6): 1165-1173.
- [15] Cheng J, Guo JM, Xiao BX, et al. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(17): 1621-1625.
- [16] Zhang H, Ren Y, Xu H, et al. The expression of stem cell protein Piwil2 and piR-932 in breast cancer[J]. Surg Oncol, 2013, 22(4): 217-223.