

Survivin 和 bax 在人食管癌细胞 Ec-9706 细胞中表达及中药干预作用※

● 杨旭东^{1*} 张 杰¹ 王 巍²

摘要 目的:探讨 survivin、bax 基因在白毛藤总苷诱导人食管癌 Ec-9706 细胞凋亡中的作用。方法:荧光显微镜观察不同浓度白毛藤总苷诱导 Ec-9706 细胞凋亡作用情况,RT-PCR 检测 survivin、bax 基因表达量的变化。结果:白毛藤总苷能诱导 Ec-9706 细胞凋亡,并且能上调 bax、降低 survivin 表达。结论:白毛藤总苷能促进 Ec-9706 细胞凋亡,其机制可能与激活 bax、抑制 survivin 表达有关。

关键词 白毛藤 食管癌 bax 基因 survivin 基因

白毛藤(*Solamum lyratum* Thunb, ST)系茄科植物白英的全草,具有清热利湿、消肿解毒之功效^[1]。白毛藤作为抗癌中药之一,已有研究表明,白毛藤水提物体外有较强的肿瘤细胞增殖抑制活性^[2],但对其主要抗肿瘤有效成分及抗癌作用机理的研究并不明确。本研究通过荧光显微镜观察 ST 总苷对人食管癌 Ec-9706 细胞是否具有诱导凋亡作用,并初步探讨其作用机制,为 ST 总苷是否为白毛藤抗癌有效成分提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞株 人食管癌 Ec-9706 细胞株,由武汉中美科技有限公司提供。

1.2 药物、试剂与仪器 白毛藤全草(牡丹江保健大药房)由牡丹江医学院医学与药物中心袁晓环教授鉴定;MTT 试剂(泰伦生物科技有限公司,批号 041025);Trizol(Sigma 公司,批号 15596-018);引物核苷酸片段(上海生工生物技术有限公司)。荧光显微镜(OLYPUS)。

1.3 实验方法

※基金项目 黑龙江省卫生厅科研课题(No:2007-003)

*作者简介 杨旭东,男,药学硕士。研究方向:中药的药理与毒理研究。著作:《色谱技术在医药研究中的应用》。承担多项省级科研课题,并获黑龙江省高校科学技术进步奖二等奖一项,三等奖一项。

•作者单位 1.黑龙江省牡丹江医学院(157011);2.黑龙江省哈尔滨市中医医院(150040)

1.3.1 药物处理 取白毛藤全草干品 1000.0g,用 95% 正丁醇适量浸泡过夜后,回流提取 3 次,每次 1h,自然冷却,过滤,挥去溶剂得浸膏,浸膏以适量水分散,等量石油醚萃取 3 次,水层再以等量正丁醇萃取 3 次,正丁醇层减压干燥,得 ST 总苷 10.0g。

1.3.2 实验分组 实验组(用 RPMI-1640 培养液倍比稀释的 40、80、160 μ g/ml ST 总苷);对照组(用含 Ec-9706 细胞的 RPMI-1640 培养液)。

1.3.3 细胞凋亡检测 取指数生长期的癌细胞,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 个/mL 的细胞悬液,于 6 孔板中每孔接种 1mL。将普通洁净盖玻片置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱。24h 后加入不同浓度的 ST 总苷;对照组加相同体积的培养液。48h 后细胞用胰酶消化,冷 PBS(pH7.2)洗 3 遍,固定液甲醇-冰醋酸(3:1),4 $^{\circ}$ C 固定 10min,弃固定液,蒸馏水洗 3 遍,室温干燥,用 5mg/L Hoechst33258 染色,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中孵育 15min,将孔中的盖玻片取出,盖在已滴好甘油的载玻片上,置于荧光显微镜上观察细胞形态并拍照。

1.3.4 RT-PCR 测定 survivin、bax 表达 设计引物如下:survivin 引物,上游:5'-TTGGCAGGTGCCTGTTGAAT-3';下游:5'-AGCCAGTCCCCACAGCAT-3',扩增片段 329bp。bax 引物,上游:5'-GTTTCATC-CAGG ATCGAGC-3';下游:5'-GGAAGTCCAATGTCCAGC-3',扩增片段 345bp。 β -actin 引物,上

游:5' - ATGTGGCACCACACCTTCTA - 3', 下游:5' - CGTCATACTCCTGCTTGCTG - 3', 扩增片段 838bp。反应条件为:95℃ 预变性 2min, 94℃ 45s, 55℃ 退火 1min, 72℃ 延伸 1min, 35 个循环, 72℃ 复性 5min。经凝胶成像系统分析, 分别计算 survivin、bax 与内参扩增带荧光强度 × 面积的比值, 得出 survivin、bax mRNA 的相对表达量。经凝胶成像系统分析, 通过 survivin/ β -actin 和 bax/ β -actin 的灰度比值作相对定量。

1.4 统计学分析 实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 统计学处理采用 SPSS 11.5 软件, 进行 *t* 检验。 $P < 0.01$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光显微镜检测细胞凋亡情况 不同浓度 ST 总苷作用 48h 后, 可见蓝色深染的凋亡细胞, 并可见细胞核碎裂, 细胞体积缩小。40、80、160 μ g/mlST 总苷组细胞凋亡率分别为 13.51%、20.81%、25.08%; 对照组细胞凋亡率为 4.07%。ST 总苷组与对照组比较有显著性差异($P < 0.01$) (见图 1、2)。

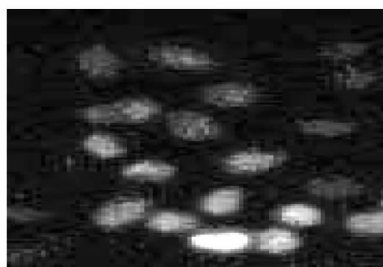


图 1 对照组 (400 ×)

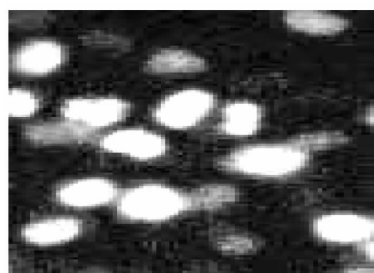


图 2 160 μ g/mlST 总苷组 (400 ×)

2.2 各组 survivin 和 bax 基因表达情况 与对照组 (0.71 ± 0.05) 相比, 不同浓度 ST 总苷作用 48h 后, 肿瘤细胞中 survivin 基因表达逐渐降低, 160 μ g/mlST 总苷组 (0.19 ± 0.01) 降低最明显; 与对照组 (0.33 ± 0.02) 相比, bax 基因表达逐渐增加, 160 μ g/mlST 总苷组增加最明显 (0.67 ± 0.04)。

3 讨论

食管癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一, 化学治

疗在食管癌治疗中占有很重要的地位, 但存在一定的不良反应和耐药性。随着医学水平的不断提高, 天然药物已经成为当今治疗肿瘤的重要手段, 其优势在于天然药物不仅对肿瘤具有抑制作用, 不易产生耐药性, 而且对机体的损伤和副作用也较小。细胞凋亡又称为程序性细胞死亡 (Programed cell death, PCD), 是在精密调节下的细胞的主动死亡过程, 在个体发育生长过程中起重要作用。细胞凋亡的异常与多种病理生理过程相关, 如肿瘤的发生发展等。bax 在多种肿瘤的细胞凋亡调控中发挥重要作用。Bax 的促凋亡作用是通过与自身形成 bax/bax 同源二聚体的形式发挥的, Bax 促进细胞凋亡的机制可能是与增高 Caspase - 3 活性有关, Bax 是 Caspase - 3 活化的重要调节因子^[3]。Survivin 是 1997 年, 由 Altieri^[4] 等发现的, 是凋亡抑制蛋白 (inhibitor of apoptosis protein, IAP) 家族中一个成员, 具有抑制细胞凋亡、促进细胞转化并且参与细胞的有丝分裂、血管的生成和肿瘤细胞耐药性产生等作用, 是迄今发现最强的凋亡抑制因子。体外实验表明, Survivin 与效应细胞死亡蛋白酶 Caspase - 3 和 Caspase - 7 结合, 抑制它们的活性和细胞凋亡^[5], 使一些转化细胞逃避机体免疫系统的监视而无法清除, 从而异常存活、累积, 形成优势克隆参与肿瘤的发生。

实验结果显示: 白毛藤全草中总苷成分可以诱导食管癌细胞凋亡, 并明显上调 bax 基因表达, 降低 survivin 基因表达。其抗癌机制可能与通过调节 bax、survivin 基因表达从而诱导细胞凋亡有关。但白毛藤全草中其它有效单体的抗癌作用有待进一步的筛选比较。

参考文献

- [1] 冯洪钱. 民间兽医本草[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1993: 307 - 308.
- [2] 施文荣, 刘 艳. 白英对人急性早幼粒白血病 HL60 细胞生长的影响[J]. 福建中医学院学报, 2002, 12(1): 36 - 38.
- [3] Cregan SP, Maclautin J G, Craig CG, et al. Bax - dependent caspase - 3 activation is a key determinant in p53 - induced apoptosis in neurons [J]. J Neurosci, 1999, 19: 7860 - 7869.
- [4] Ducken CS, Li F, Wang Y, et al. Human IAP - like protein regulates programmed cell death Downstream of Bcl - xl and cytochrome c [J]. Mol Cell Biol, 1998, 18(1): 608 - 615.
- [5] Suzuki A, Ito T, Kawano H, et al. Survivin initiates pricaspase3/p21 complex formation as a result of interaction with CDK4 to resist Fas mediate cell death [J]. Oncogene, 2000, 19 (10): 1346 - 1353.