

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.006.html>

环孢素 A 对人胃癌 BGC823 细胞增殖与凋亡的影响

黄军祥¹, 胡咏梅², 石海³, 庞智¹, 卢凌云¹, 徐雄飞¹, 吴云龙¹, 邵欣宇¹, 周春立¹

摘要 目的 研究环孢素 A(CsA) 对人胃癌 BGC823 细胞的生长增殖以及凋亡的影响。方法 MTT 法检测不同浓度 CsA 处理 24、48、72 h 后对 BGC823 细胞增殖抑制率; 流式细胞术(FCM) 检测细胞周期、活性氧(ROS) 含量及细胞线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$) 改变; Annexin-V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率。结果 CsA 在 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内和 24~72 h 时间范围对 BGC823 细胞增殖有显著抑制作用, 与药物剂量、作用时间呈量效和时效的依赖性; FCM 结果显示 CsA 浓度依耐性使细胞周期阻滞于 G0/G1 期, 与对照组相比差异有统计学意义($F=33.45, P<0.05, P<0.01$); 细胞凋亡率随 CsA 作用浓度增加而增加; 5~20 $\mu\text{mol/L}$ CsA 浓度范围细胞内 ROS 含量显著增加($F=46.17, P<0.01$), 细胞线粒体膜电位明显降低。结论 CsA 对 BGC823 细胞有抑制增殖和诱导凋亡作用, 其机制可能与阻滞细胞生长周期、细胞内 ROS 含量增加以及线粒体膜电位下降相关。

关键词 胃肿瘤; 环孢素 A; BGC823 细胞; 增殖抑制; 细胞凋亡

中图分类号 R 329.25; R 329.28; R 735.2; R 979.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)11-1605-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.006

胃癌作为消化道系统最常见的恶性肿瘤, 是全球范围内发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一, 死亡率位居世界肿瘤死亡率第 2 位^[1]。我国为胃癌的高发地区, 胃癌年病率和年死亡率呈现逐年升高趋势, 严重威胁人们生存与健康。因此, 干预和探讨胃癌细胞的生长增殖与凋亡的发生机制, 成为目前广为研究的热点之一。

环孢素 A(cyclosporin A, CsA) 是由 11 个氨基酸组成的环状多肽, 是自然界中一种真菌的活性代谢产物^[2]; 且作为一种强效免疫剂, 被临床广泛应用

于肝脏、胰腺、肾脏以及心脏移植的抗免疫排斥反应^[3]。目前有文献^[4]报道在多种消化系统恶性肿瘤细胞系中包括胃癌细胞, CsA 均可显著抑制细胞增殖和诱导凋亡作用。而在低分化人胃腺癌 BGC823 细胞系中, 至今尚未见到 CsA 抑制细胞生长、增殖以及诱导凋亡作用的相关报道; 因此该实验选择 BGC823 细胞作为靶细胞, 研究 CsA 对 BGC823 细胞抑制增殖和诱导凋亡作用, 为临床针对中晚期胃癌治疗提供参考和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胃癌 BGC823 细胞株由安徽医科大学病理实验室赠送。生长于含 10% 胎牛血清和 12 U/ml 庆大霉素的 RPMI-1640 培养液中, 在 37.0 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下恒温恒湿培养箱内换液传代培养, 实验均采用对数期细胞。

1.1.2 药品、试剂和仪器 CsA 标准品(中国药品生物制品检定所生产, 批号 130495-200202, 纯度 98.8%) 为冻干粉, 经新鲜配制的 RPMI-1640 培养基溶解, 0.22 μm 微孔滤膜(美国 Pall 公司)过滤除菌并现配现用。RPMI-1640 培养基、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司); 胎牛血清(美国 Hyclone 公司); 活性氧(reactive oxygen species, ROS) 试剂盒(DCFH-DA)(中国上海碧云天生物技术有限公司); 罗丹明 123 染色试剂盒(南京凯基生物科技公司); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物公司); CO_2 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司); CK2 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 超净工作台(苏州净化设备厂); SPECTRAmax M2e 酶标仪(美国 MD 公司); 流式细胞仪(flow cytometry, FCM)(美国贝克曼公司); 碘化丙啶(propidium iodide, PI)(美国 Sigma 公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 检测细胞生存抑制率 胰酶消化取对数期 BGC823 活细胞悬液, 按细胞密度为 $5 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5/\text{ml}$ 接种于 96 孔板, 每孔 100 μl , 每组设 6 个复孔。实验组加不同浓度 CsA 溶液, 使其终浓度分

2017-06-13 接收

基金项目: 安徽省自然科学基金青年科学基金项目(编号: 11040606Q24)

作者单位: ¹ 苏州市立医院北区消化科, 苏州 215008

安徽医科大学第一附属医院² 科研处、³ 消化内科, 合肥 230022

作者简介: 黄军祥, 男, 医师, 硕士;

周春立, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: zhouchunli079@163.com

别为 5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$; 对照组加入等量培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱孵育 24、48、72 h。分别于不同时间段每孔加入 MTT 20 μl , 小心吸出上清液, 再加 DMSO 150 μl , 振荡混匀, 酶标仪检测每孔 490 nm 处的吸光度, 重复 3 次。细胞存活率(%) = 实验组吸光度/对照组吸光度 $\times 100\%$ 。

1.2.2 FCM 测定细胞周期 收集生长对数期密度为 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 活细胞悬液, 接种于 6 孔板, 贴壁培养 24 h 后吸出培养液, 对照组加入培养基, 实验组分别加入浓度为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ CsA 药液处理细胞, 继续培养 48 h。利用胰酶收集细胞置于离心管中, 低速离心 5 min, 冰 PBS 重悬细胞, 加入 PI 染液, 室温下避光染色 30 min, 400 目筛网过滤获得单细胞悬液, FCM 检测细胞 DNA 含量。ModFit 软件分析细胞周期, 重复 3 次(激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。

1.2.3 FCM 检测细胞内 ROS 含量 方法同上, 取对数生长期细胞贴壁培养 24 h, 设对照组, 实验组使用 CsA 浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 处理 48 h。小心吸去细胞培养液, 胰酶收集细胞并调整细胞密度约为 $1 \times 10^6/\text{ml}$, 加入 DCFH-DA 荧光染料并吹打混匀, 避免光照, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中孵育 20 min, 每隔 3 ~ 5 min 颠倒混匀 1 次, 使之和细胞充分接触。用不含血清的细胞培养液充分洗涤细胞 3 次, 去除尚未进入细胞的 DCFH-DA, 2 000 r/min 离心 5 min 后加入预冷工作液轻轻混匀细胞, 放入冰槽保存, 于条件为 485 nm 激发光和 530 nm 发射光下 FCM 检测 ROS。

1.2.4 罗丹明 123 染色检测细胞膜电位($\Delta\Psi_m$)变化 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ CsA 分别处理 BGC823 细胞 48 h 后, 通过胰酶消化液消化并收集细胞, Hanks 液洗涤 2 次, 加入罗丹明 123 染液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱孵育 30 min, 低速离心后培养基洗涤细胞 2 次并将细胞重悬于培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光温育 60 min, FCM 测定细胞线粒体膜电位, $\Delta\Psi_m$ 以细胞平均荧光强度(median fluorescence intensity, MFI) 表示。

1.2.5 FCM 检测细胞凋亡率 选取对数生长期 BGC823 细胞接种于 6 孔培养板, 设对照组, 实验组采用不同浓度 CsA 作用 48 h, 经胰酶收集细胞冰 PBS 洗涤 2 次, 调整细胞浓度 $5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7/\text{ml}$, 2 000 r/min 离心 5 min。加入 400 μl 缓冲液重悬细胞。然后在 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下加入 5 μl Annexin V-FITC 混匀后避光孵育 15 min, 再加 PI 10 μl 避光染色 5

min, FCM 检测细胞凋亡率。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 实验组与对照组之间采用 t 检验或单因素方差分析(ANOVA), 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CsA 对 BGC823 细胞系增殖的影响 如图 1 所示, MTT 法检测表明 CsA 在 5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内处理 BGC823 细胞 24、48、72 h 后实验组和对照组相比, 有显著抑制细胞增殖作用, 实验组细胞存活率随着药物作用剂量和时间增加而逐渐降低, 与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

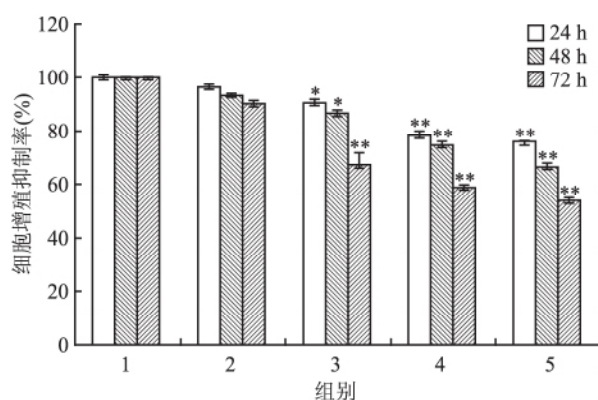


图1 CsA 对 BGC823 细胞增殖抑制的作用

1: 对照组; 2: 5 $\mu\text{mol/L}$ CsA; 3: 10 $\mu\text{mol/L}$ CsA; 4: 15 $\mu\text{mol/L}$ CsA; 5: 20 $\mu\text{mol/L}$ CsA; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 CsA 对 BGC823 细胞周期的影响 结果如图 2 所示, 实验组 CsA 浓度分别为 10、20 $\mu\text{mol/L}$, 作用 BGC823 细胞 24 h 后, 随着药物浓度的增加, G0/G1 期细胞呈现明显递加趋势, FCM 检测 G0/G1 期细胞 DNA 平均含量与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而 S 期、G2/M 期细胞比例与对照组相比差异无统计学意义。

2.3 CsA 对细胞线粒体功能的影响 FCM 检测结果: 10、20 $\mu\text{mol/L}$ CsA 作用 BGC823 细胞 48 h 后, 细胞 MFI 为(20.88 $\pm$ 1.70)%、(18.32 $\pm$ 1.50)%, 与对照组(30.95 $\pm$ 0.70)% 比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。表明 CsA 引起 BGC823 细胞线粒体膜电位的下降也呈浓度依赖性。实验结果显示随着 CsA 浓度增加, 细胞内 ROS 含量显著增加, 10、20 $\mu\text{mol/L}$ CsA 实验组与对照组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 3、4。

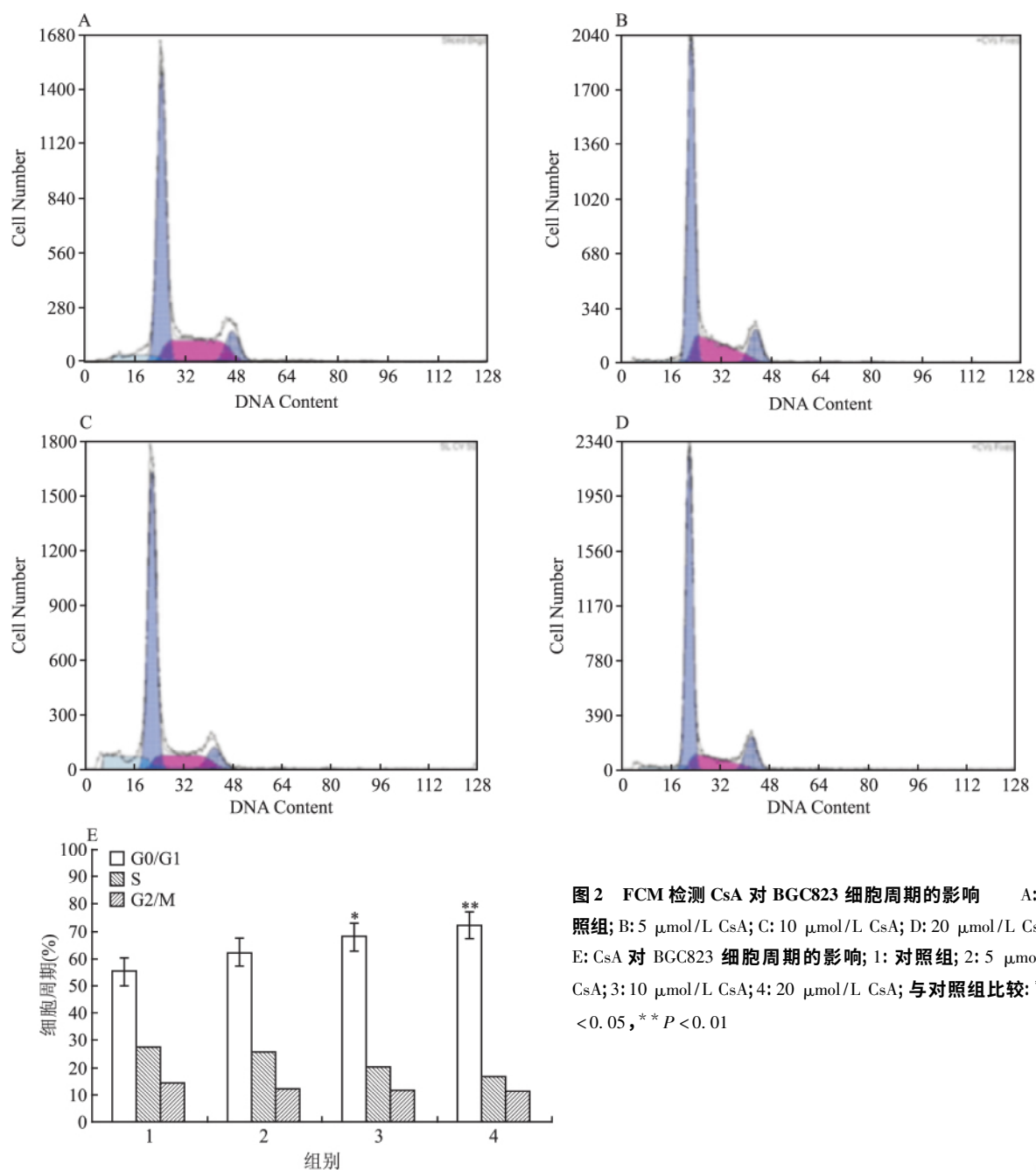


图2 FCM检测CsA对BGC823细胞周期的影响 A: 对照组; B: 5 μmol/L CsA; C: 10 μmol/L CsA; D: 20 μmol/L CsA; E: CsA对BGC823细胞周期的影响; 1: 对照组; 2: 5 μmol/L CsA; 3: 10 μmol/L CsA; 4: 20 μmol/L CsA; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.4 CsA 诱导细胞凋亡 FCM检测CsA作用BGC823细胞48 h后细胞凋亡率,实验结果见图5所示,10、20 μmol/L CsA实验组可见细胞发生显著凋亡,其凋亡率为 $(17.06 \pm 1.34)\%$ 、 $(23.15 \pm 2.10)\%$,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3 讨论

CsA具有抗肿瘤细胞谱广、毒性低的特点,联合多种化疗药物可协同增加化疗药物的抗肿瘤活性以及诱导细胞凋亡作用^[5-8]。本课题前期研究^[7-8]结

果表明单独使用CsA处理人MGC80-3细胞24、48、72 h,对细胞在体外的增殖也起到了明显抑制作用,呈现出时间依赖性和浓度依赖性;且CsA对MGC80-3细胞生长增殖抑制作用与细胞生长周期G0/G1阻滞有关。众所周知,细胞周期是细胞生命活动基本过程,肿瘤的发生也与细胞周期关系密切,当细胞生长周期被阻滞,细胞内DNA合成受损,细胞增殖和凋亡必然受影响。本实验结果显示CsA抑制BGC823细胞增殖也表现出时间依赖性和浓度依赖性,细胞在G0/G1期DNA明显增加,浓度依赖性使胃癌BGC823细胞周期阻滞于G0/G1期,这和

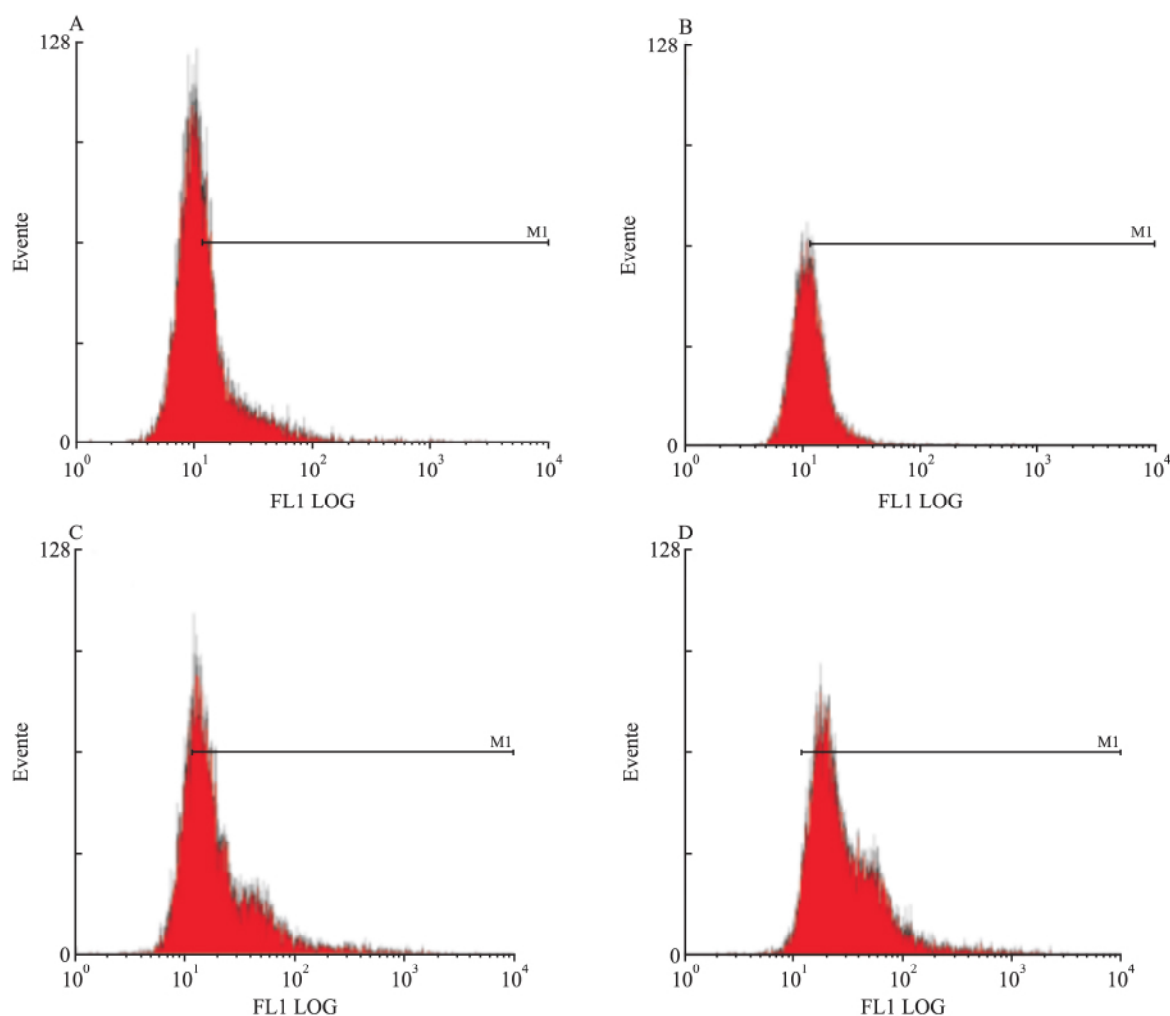


图3 FCM 检测 CsA 对 BGC823 细胞线粒体膜电位的影响

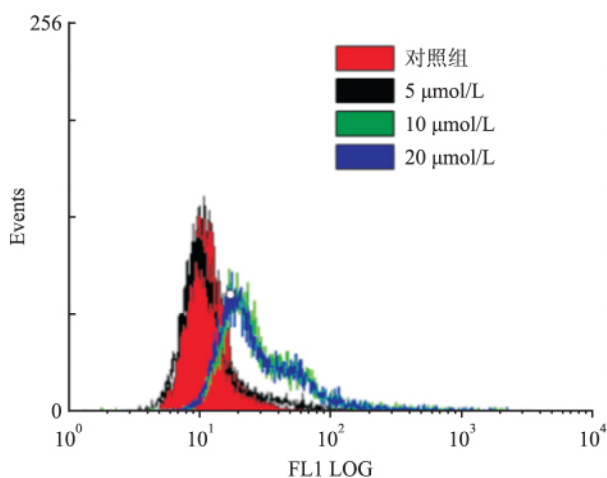
A: 对照组; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ CsA; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ CsA; D: 20 $\mu\text{mol/L}$ CsA

图4 FCM 检测 CsA 对 BGC823 细胞内 ROS 生成的影响

前期的实验结果^[7]相一致,再次印证 CsA 抑制胃癌细胞增殖与阻滞细胞生长周期相关。

诱导肿瘤细胞凋亡是目前针对胃部恶性肿瘤一种较为理想的治疗手段之一,特别对于进展期胃癌

失去手术机会的患者。因此,本实验研究的目的意义重大。但是肿瘤细胞的多发耐药性往往使得化疗药物难以达到治疗的效果,并导致胃癌化疗治疗的失败^[8]; CsA 作为第一代多发耐药性逆转剂,能明显抑制胃癌 MGC80-3 细胞内 P-糖蛋白表达,可浓度依赖性增加细胞凋亡率,通过 Pearson 相关性分析显示 CsA 抑制 P-糖蛋白表达与细胞凋亡有相关性^[9]。本研究利用 Annexin-V-FITC/PI 双染法检测 CsA 作用 BGC823 细胞 48 h 后,在 5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内细胞凋亡率呈现浓度依赖性增加,也可显著诱导凋亡。

线粒体是细胞能量代谢、ROS 自由基产生的主要场所,在细胞生长、增殖、衰老以及凋亡过程中起重要作用^[10]。线粒体呼吸链的损伤会引起细胞三磷酸腺苷生成减少、ROS 生成增加,通过改变线粒体通透性,使膜电位下降,导致线粒体基质肿胀,并通过一系列的级联反应,最终细胞发生凋亡^[11-12]

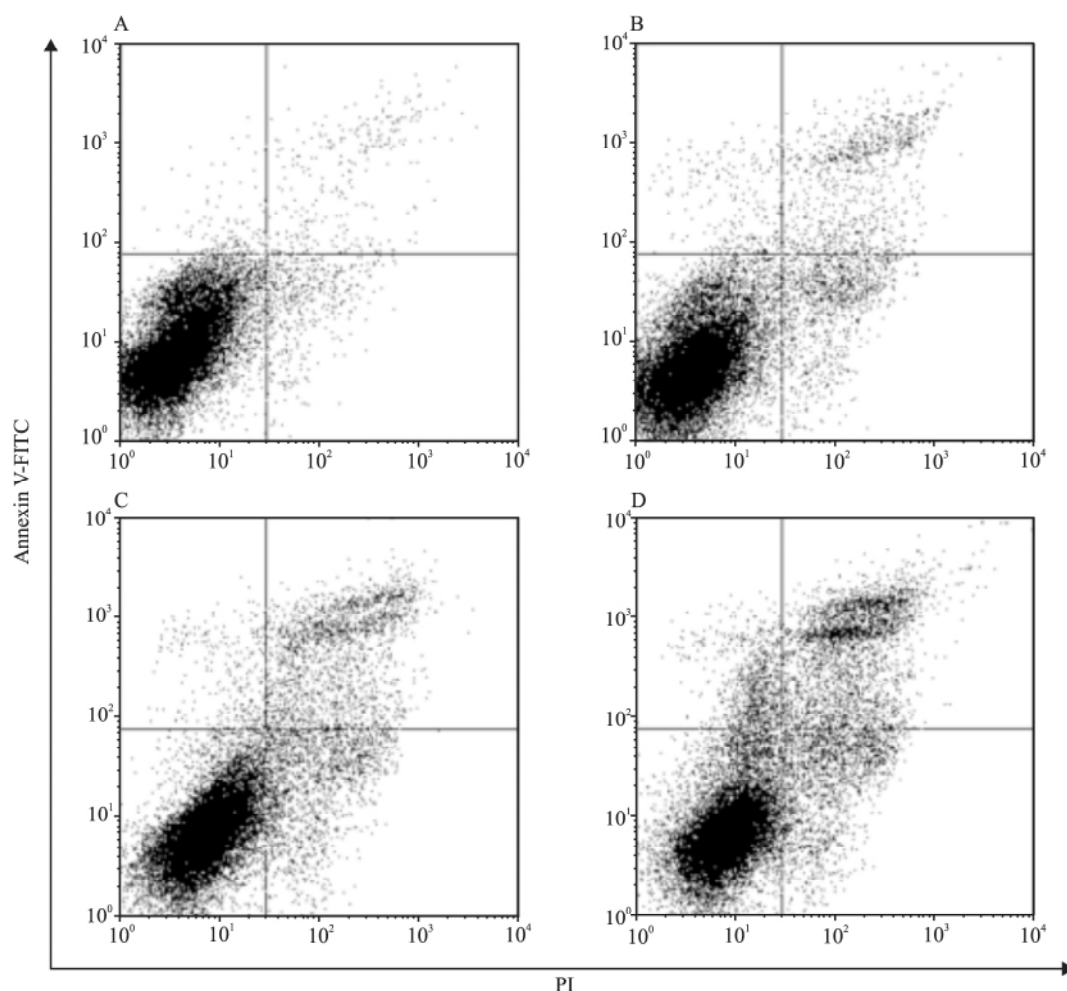


图5 CsA 诱导 MGC823 细胞的凋亡

A: 对照组; B: 5 $\mu\text{mol/L}$ CsA; C: 10 $\mu\text{mol/L}$ CsA; D: 20 $\mu\text{mol/L}$ CsA

与裂解。本研究即显示不同浓度 CsA 处理 BGC823 细胞后,细胞内 ROS 的含量显著增加,与 FCM 检测的细胞凋亡率结果成平行的递增趋势。通过荧光探针 Rh123 的荧光强度反应 $\Delta\Psi_m$ 水平,本实验结果还表明,随着 CsA 作用浓度的增加,BGC823 细胞内 $\Delta\Psi_m$ 明显降低;因此,考虑 CsA 诱导 BGC823 细胞凋亡可能与增加 ROS 生成以及降低线粒体跨膜电位有关;而其诱导胃癌细胞凋亡的内在分子机制是否涉及线粒体信号通路,这还有待于后期实验针对线粒体凋亡途径中的相关蛋白,如细胞色素 C、Bcl-2、P53 测定等研究来进一步验证。

目前胃恶性肿瘤仍是严重威胁人类健康的重大课题之一,胃癌细胞的生长、增殖与凋亡都与胃癌恶性程度直接相关。本研究显示细胞周期受阻与胃癌细胞增殖以及线粒体氧化应激在细胞凋亡中都起重要作用,这对今后研究以细胞周期和线粒体为靶位的新型抗肿瘤药物具有重要意义。

参考文献

- [1] Piazzuelo M B, Correa P. Gastric cancer: Overview [J]. Colomb Med(Cali), 2013, 44(3): 192 - 201.
- [2] Borel J F, Feurer C, Gubler H U, et al. Biological effects of cyclosporin A: a new anti-lymphocyte agent [J]. Agents Actions, 1976, 6(4): 468 - 75.
- [3] Salvadori M, Bertoni E. What's new in clinical solid organ transplantation by 2013 [J]. World J Transplant, 2014, 4(4): 243 - 66.
- [4] Muñoz M, Rosso M, González A, et al. The broad-spectrum anti-tumor action of cyclosporin A is due to its tachykinin receptor antagonist pharmacological profile [J]. Peptides, 2010, 31(9): 1643 - 8.
- [5] de Souza P S, da Cunha Vasconcelos F, Silva L F, et al. Cyclosporine A enables vincristine-induced apoptosis during reversal of multidrug resistance phenotype in chronic myeloid leukemia cells [J]. Tumour Biol, 2012, 33(4): 943 - 56.
- [6] Nakahara C, Nakamura K, Yamanaka N, et al. Cyclosporin-A enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of nuclear

- factor- κ B activation in human gastric carcinoma cells [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(14): 5409 – 16.
- [7] 黄军祥, 胡咏梅, 石 海, 等. 环孢素 A 诱导人胃癌 MGC80-3 细胞凋亡以及对 P 糖蛋白表达的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2012, 28(11): 1156 – 70.
- [8] 黄军祥, 胡咏梅, 石 海, 等. 环孢素 A 对人胃癌 MGC80-3 细胞周期的影响以及诱导其凋亡机制的研究 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(2): 169 – 73.
- [9] Zhang L, Hu J F, Li G Q, et al. Rosiglitazone reverses mitomycin C resistance in human gastric cancer cells [J]. *Am J Med Sci*, 2012, 343(5): 382 – 7.
- [10] Wang X, Peralta S, Moraes C T. Mitochondrial alterations during carcinogenesis: a review of metabolic transformation and targets for anticancer treatments [J]. *Adv Cancer Res*, 2013, 119: 127 – 60.
- [11] Huang Q R, Li Q, Chen Y H, et al. Involvement of anion exchanger-2 in apoptosis of endothelial cells induced by high glucose through an mPTP-ROS-Caspase-3 dependent pathway [J]. *Apoptosis*, 2010, 15(6): 693 – 704.
- [12] Deeb D, Gao X, Jiang H, et al. Oleanane triterpenoid CDDO-Me inhibits growth and induces apoptosis in prostate cancer cells through a ROS-dependent mechanism [J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(3): 350 – 60.

Effect of cyclosporin A on proliferation inhibition and apoptosis in gastric adenocarcinoma cell line BGC823

Huang Junxiang¹, Hu Yongmei², Shi Hai³, et al

(¹Dept of Gastroenterology, North Area of Suzhou Municipal Hospital, Suzhou 215008; ²Dept of Research, ³Dept of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the effect of cyclosporin A(CsA) on inhibitory proliferation and apoptosis in human gastric carcinoma cell line BGC823. **Methods** The proliferation inhibition of BGC823 cells was determined by MTT assay after different concentration at 24, 48, 72 h. The cell cycle arrest, intracellular reactive oxygen species(ROS) and mitochondrial membrane potential(MMP) were measured by utilizing flow cytometry(FCM) analysis. Annexin V-FITC/PI double staining was employed to detect cell apoptosis rate through FCM analysis. **Results**

CsA significantly inhibited the human BGC823 cell growth in a dose-dependent manner within the concentration ranging from 5 to 20.0 μ mol/L and time-dependent manner from 24 h to 72 h. FCM showed that CsA blocked the G0/G1 boundary of the cell cycle in a dose-dependent manner, compared with the control group, the difference was significant($F = 33.45$, $P < 0.05$, $P < 0.01$). It also demonstrated that the apoptosis rate increased in accordance with the increase of CsA concentration, and the intracellular ROS generation was obviously increased($F = 46.17$, $P < 0.01$) and MMP decreased after CsA treatment. **Conclusion** CsA suppressed the proliferation of BGC823 cells by inducing cell cycle arrest, and the underlying mechanism of apoptosis may be related to the increase of intracellular ROS content and the decrease of MMP.

Key words gastric carcinoma; cyclosporin A; BGC823 cells; proliferation inhibition; apoptosis