

【基础研究】

通信作者:高福莲(1963-),女,山西吕梁人,博士,教授,研究方向:器官发育与肿瘤;E-mail:GFL@xxmu.edu.cn

the concentration of GA was more than $150.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the number of hypodiploid cell reduced gradually. When the concentration of GA was less than $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the number of 2N cell increased gradually; the number of 4N and 2N-4N cells reduced gradually. When the concentration of GA was more than $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, the number of 2N cells reduced and the number of 4N cells increased gradually; but the change of the 2N-4N cell number was not obvious. **Conclusion** GA can inhibit the growth of human gastric cancer SGC7901 cells. The change of apoptosis and the cell cycle may involved in the process of inhibition.

Key words: glycyrrhetic acid; SGC7901 cell; proliferation inhibition; DNA

甘草次酸(glycyrrhetic acid, GA)又称甘草亭酸,属于齐墩果烷型五环三萜化合物。GA是甘草的主要活性物质之一,还有甘草酸、甘草甜素及甘草黄酮。甘草在中医治疗中应用非常广泛,是我国比较常用的中草药,俗称十药九草。《神农本草经》中记载“甘草,主五脏六腑寒邪气,坚筋骨,长肌肉,倍气力,金疮肿,解毒。”研究发现,GA的药理作用较广泛,能抑制人淋巴细胞性白血病、肝癌和肺癌的细胞增殖等^[1-2]。进展期胃癌在身体条件允许时采取全身联合化学治疗已成为积极治疗的主要手段^[3],有报道GA可抑制胃癌细胞增殖^[4],但其抑制机制研究较少,本研究就GA对人胃癌SGC7901细胞增殖的作用及其可能机制进行了研究,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 主要药品、试剂及仪器 GA购自大连美仑生物技术有限公司, RPMI-1640细胞培养基购自美国Gibco公司,胎牛血清购自上海联硕生物科技有限公司,二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)购自美国Sigma公司,胰蛋白酶、四甲基偶唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)购自郑州宝信生物科技有限公司,碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液购自上海碧云天生物技术研究; CO_2 培养箱购自美国SHELL-LAB公司,台式高速低温离心机购自德国Eppendorf公司, ThermoMK3酶标仪购自上海热电器有限公司,流式细胞仪购自美国Beckman公司。

1.2 细胞与细胞培养 人胃癌SGC7901细胞由陕西师范大学赠送。将其接种于含体积分数10%胎牛血清、 $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 青霉素、 $100 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ 链霉素的RPMI-1640培养液中,置于 37°C 、含体积分数5% CO_2 的细胞培养箱中培养; $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 胰蛋白酶消化传代。

1.3 实验分组 设实验组1~7组和阴性对照组,实验组1~7组为培养细胞加入GA的DMSO溶液,使GA的终浓度分别为6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、150.00、200.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[5-7],阴性对照组加入与终浓度GA相同体积的DMSO。

1.4 MTT法检测GA对人胃癌SGC7901细胞的增殖作用 取对数生长期的人胃癌SGC7901细胞,调节细胞密度至 $2 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$,加入96孔培养板,每孔200 μL ,置于 37°C 、含体积分数5% CO_2 的细胞培养箱中培养24 h。另设培养基调零组(为无细胞的含不

同浓度药物的培养液),实验组1~7组、阴性对照组和培养基调零组均设3个复孔。药物作用48 h后,每孔加入终浓度为 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的MTT溶液20 μL ,继续培养4 h。轻轻倒扣出培养液,每孔加入DMSO 200 μL ,在微量振荡器避光轻轻振摇15~30 min,待甲瓞结晶完全溶解。在酶标仪上选择492 nm波长,测定各孔的吸光度值(optical density, OD)。实验重复3次,计算GA对肿瘤细胞的抑制率。抑制率 = $(\text{OD}_{\text{校正阴性对照组}} - \text{OD}_{\text{校正实验组}}) / \text{OD}_{\text{校正阴性对照组}}$ 。其中, $\text{OD}_{\text{校正阴性对照组}} = \text{OD}_{\text{阴性对照组}} - \text{OD}_{\text{培养基调零组}}$, $\text{OD}_{\text{校正实验组}} = \text{OD}_{\text{实验组}} - \text{OD}_{\text{培养基调零组}}$ 。

1.5 流式细胞仪检测细胞DNA 人胃癌SGC7901细胞以每孔 $20 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 的密度接种于6孔培养板,培养24 h。实验组和阴性对照组加入相应药物,继续培养48 h。先将每个孔的细胞培养液分别转移到相应的离心管中,加2 mL磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered saline, PBS)轻轻洗涤贴壁细胞1次,并将洗涤液并入相应的离心管中,以收集悬浮的凋亡或坏死细胞;用胰蛋白酶消化收集贴壁细胞,轻轻吹打使其悬浮。合并收集的悬浮和贴壁细胞于相应的离心管中, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清。各离心管均加入500 μL PBS和4.5 mL的体积分数70%乙醇固定细胞,室温30 min以上, $4\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心8 min,弃上清。PBS洗1次,转移到1.5 mL的相应离心管中, $1\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃上清。加入500 μL 的PI染液,避光,室温放置25~30 min后,使用流式细胞仪检测细胞DNA。

1.6 统计学处理 应用SPSS 19.0软件进行统计学处理,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用方差分析;构成比分析采用行与列的 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

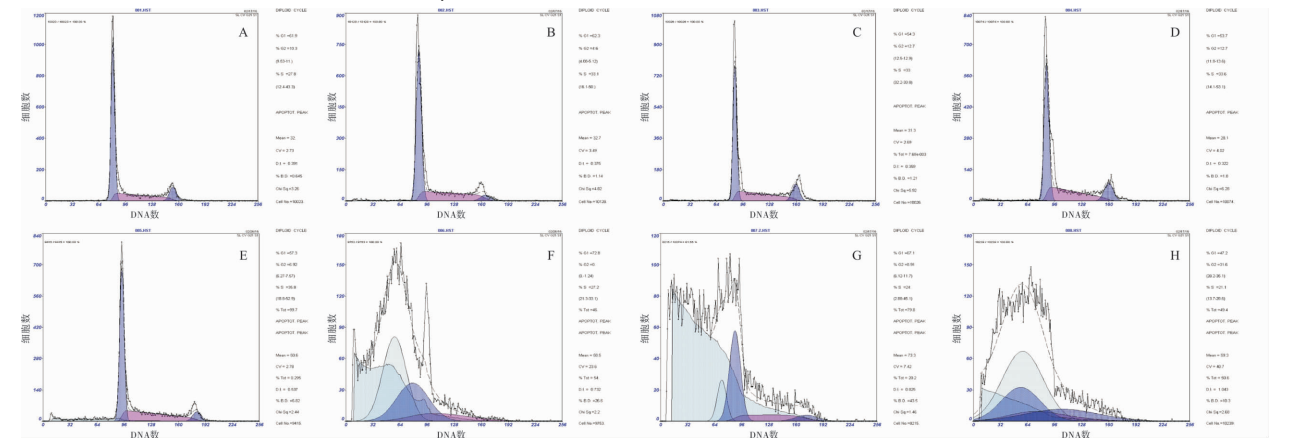
2.1 GA对人胃癌SGC7901细胞增殖的影响 MTT法测定结果显示,终浓度为6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、150.00、200.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的GA作用于人胃癌SGC7901细胞48 h时细胞抑制率分别为 $(8.27 \pm 1.80)\%$ 、 $(13.74 \pm 3.16)\%$ 、 $(25.85 \pm 4.35)\%$ 、 $(46.03 \pm 5.88)\%$ 、 $(97.78 \pm 1.10)\%$ 、 $(99.56 \pm 0.21)\%$ 、 $(98.86 \pm 0.35)\%$;GA终浓度低于100.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,人胃癌SGC7901细胞抑制率随GA浓度的增加逐渐增加,呈明显的剂量依赖关系

($P < 0.05$),半数抑制浓度为 $74.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 GA 对人胃癌 SGC7901 细胞 DNA 的影响

流式细胞仪检测结果显示,终浓度为 6.25 、 12.50 、 25.00 、 50.00 、 100.00 、 150.00 、 $200.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 作用于人胃癌 SGC7901 细胞 48 h 后,DNA 处于亚二倍体、二倍体、四倍体、介于二倍体和四倍体之间的细胞数量差异有统计学意义($P < 0.001$),见图 1 和表 1。GA 终浓度低于 $150.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,DNA 处于亚二倍体的细胞数量逐渐增加,且呈浓度依赖性(图 2A),GA 终浓度 $12.50 \sim 150.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,

其比邻浓度的增加引起 DNA 处于亚二倍体的细胞数量差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1);浓度高于 $150.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,亚二倍体的细胞数量逐渐减少。细胞周期的改变因 GA 浓度高低而异,浓度低于 $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,二倍体的细胞数量逐渐增加,介于二倍体与四倍体之间、四倍体的细胞数量则逐渐减少;当浓度超过 $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,二倍体的细胞数量逐渐减少,四倍体的细胞数量逐渐增加,介于二倍体与四倍体之间的细胞数量变化不大(图 2B)。



A:对照组;B: $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组;C: $12.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组;D: $25.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组;E: $50.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组;F: $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组;G: $150.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组;H: $200.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 实验组。

图 1 GA 作用 48 h 各组人胃癌 SGC7901 细胞 DNA 的流式细胞仪检测图

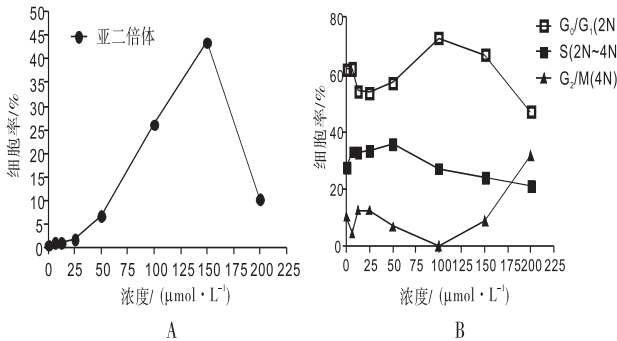
Fig.1 Flow cytometry figure of DNA of human gastric cancer SGC7901 cells after GA acted for 48 h in each group

表 1 不同浓度 GA 对人胃癌 SGC7901 细胞 DNA 影响

Tab.1 Effect of different concentration of GA on DNA content in human gastric cancer SGC7901 cells

GA 浓度	亚二倍体/%	细胞周期/%		
		$G_0/G_1(2N)$	$S(2N \sim 4N)$	$G_2/M(4N)$
$0.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.65	61.90	27.80	10.30
$6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.14	62.30	33.10	4.60
$12.50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.21	54.30	33.00	12.70
$25.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.80 ^a	53.70	33.60	12.70
$50.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	6.82 ^a	57.30	35.80	6.92
$100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	26.60 ^a	72.80	27.20	0.00
$150.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	43.50 ^a	67.10	24.00	8.91
$200.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	10.30 ^a	47.20	21.10	31.60

注:与比邻组亚二倍体细胞比较^a $P < 0.05$ 。



A:细胞凋亡;B:细胞周期。

图 2 不同浓度 GA 对人胃癌 SGC7901 细胞 DNA 影响

Fig.2 Effect of different concentration of GA on DNA content in human gastric cancer SGC7901 cells

3 讨论

大量文献报道,GA 对人肝癌、宫颈癌、乳腺癌、早幼粒细胞白血病等多种肿瘤具有良好的抗癌活性^[8-9]。尹素改等^[10]报道,GA 在 $95 \sim 200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时能有效抑制 Eca9706 细胞增殖。李泽良等^[11]报道, $18\beta\text{-GA}$ 在终浓度为 8 、 12 、 $16 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,能显著抑制 LNCaP 细胞的增殖。LIN 等^[4]用 0 、 25 、 50 、 100 、 $150 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 和 0 、 100 、 200 、 300 、 $350 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 11-脱氢甘草次酸 作用人胃癌细胞 SGC7901 和 BGC823 细胞 6 、 12 、 24 、 36 h ,发现 GA 与 11-DOGA 均能呈时间和浓度依赖性地抑制 SGC7901 和 BGC823 细胞增殖。本研究应用 0.00 、 6.25 、 12.50 、 25.00 、 50.00 、 100.00 、 150.00 、 $200.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 作用人胃癌 SGC7901 细胞 48 h ,得出 GA 终浓度低于 $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,人胃癌 SGC7901 细胞抑制率随 GA 浓度的增加而逐渐增加,呈明显的剂量依赖关系,与 LIN 等^[4]报道一致;在 150.00 、 $200.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与 LIN 等^[4]报道的人胃癌 SGC7901 细胞抑制率明显增加有不一致,这可能与 GA 的作用时间延长有关。本研究提示,GA 对 SGC7901 细胞有效作用时间可达到 48 h ,而且高于 $100.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 对 SGC7901 细胞抑制的浓度递增效应不明显。

GA 的抗肿瘤机制主要有诱导肿瘤细胞凋亡、

阻滞细胞周期、抑制肿瘤细胞侵袭和诱导分化等途径^[12-13]。细胞凋亡是指细胞受基因编码控制的自主性死亡过程,也叫程序性细胞死亡,是机体维持自身平衡所必需的。由于正常细胞与肿瘤细胞的凋亡相关基因存在差异,所以,诱导肿瘤细胞凋亡既可以有效地杀死肿瘤细胞,又对正常的组织细胞无影响。TANG等^[14]报道,在非小细胞肺癌 A549 和 NCI1299 细胞中,GA 抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡,同时也引起自噬标记物 LC3-II 表达的激活。SONG等^[15]报道,GA 能够诱导非小细胞肺癌 NCI-H460 细胞凋亡。黄炜等^[16]研究结果显示,GA 抑制人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖,诱导其凋亡。LEE等^[17]研究显示,18 β -GA 能够诱导人宫颈癌 SiHa 细胞凋亡,主要是通过提高线粒体膜的通透性,造成膜电位损伤、细胞色素 C 释放以及 caspase-3 激活。本研究结果显示,终浓度为 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、150.00、200.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 作用于人胃癌 SGC7901 细胞 48 h 后,浓度低于 150.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,亚二倍体的细胞数量逐渐增加,且呈浓度依赖性;高于 150.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 后,亚二倍体的细胞数量逐渐减少,提示 GA 抑制人胃癌 SGC7901 细胞增殖中有细胞凋亡的参与,与 LIN 等^[4]研究结果相似。

ZONG等^[18]研究显示,GA 抑制肝星状细胞增殖,显著增加 G_0/G_1 期细胞的比例。ZHU等^[19]报道,GA 阻滞 A549 和 NCI-H460 细胞周期于 G_0/G_1 。徐淑梅等^[20]报道,GA 能诱导骨髓瘤 U266 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期,同时下调 survivin 基因表达。本研究结果显示,终浓度为 6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、150.00、200.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA 作用人胃癌 SGC7901 细胞 48 h 后,浓度低于 100.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,二倍体的细胞数量逐渐增加,介于二倍体与四倍体之间、四倍体的细胞数量则逐渐减少;当超过 100.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,二倍体的细胞数量逐渐减少,四倍体的细胞数量逐渐增加,介于二倍体与四倍体之间的细胞数量变化不大,提示低浓度 GA 能将人胃癌 SGC7901 细胞阻滞于 G_0/G_1 期,高浓度则阻滞于 G_2/M 期。低浓度 GA 能将人胃癌 SGC7901 细胞阻滞于 G_0/G_1 期,与其他研究^[18-20]相似;高浓度则阻滞于 G_2/M 期,与 LIN 等^[4]报道一致,这可能与本研究的作用时间长和浓度跨度大有关。

综上所述,GA 能够明显抑制人胃癌 SGC7901 细胞的生长,且呈浓度依赖性。在抑制过程中,可能有细胞凋亡的参与,也可能有细胞周期的阻滞,相关分子机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 金敏,吴红金.甘草次酸药理作用的研究进展[J].医学综述,2009,15(11):1712-1715.
- [2] 黄微,王平,王蔚,等.甘草次酸修饰 PEG-PLGA 纳米粒的制备及与肝癌细胞的亲和[J].高等学校化学学报,2011,32(2):

416-420.

- [3] 姬颖华,杨晓煜,张清琴. FOLFOXIRI 方案治疗晚期胃癌疗效观察[J]. 新乡医学院学报,2015,32(3):270-272.
- [4] LIN D,ZHONG W,LI J,et al. Involvement of BID translocation in glycyrrhetic acid and 11-deoxy glycyrrhetic acid-induced attenuation of gastric cancer growth[J]. *Nutr Cancer*,2014,66(3):463-473.
- [5] GAO Z B,KANG X,HU J,et al. Induction of apoptosis with mitochondrial membrane depolarization by a glycyrrhetic acid derivative in human leukemia K562 cells[J]. *Cytotechnology*,2012,64(4):421-428.
- [6] 徐淑梅,周蕾,刘卓刚,等.甘草次酸诱导 U266 细胞凋亡及对 SurvivinU 表达的影响[J].中国实验血液学杂志,2011,19(3):652-655.
- [7] 王银环,范钰,张允历,等.18- β 甘草次酸对人胃癌细胞 BGC823 增殖的抑制[J].江苏大学学报(医学版),2007,17(3):251-253.
- [8] 木合布力·阿不力孜,郑大成,热娜·卡斯木,等.甘草次酸类化合物的制备和抗肿瘤活性的研究[J].新疆医科大学学报,2012,35(2):125-133.
- [9] 赵龙铨,贺兴隆,金礼吉,等.齐墩果酸和甘草次酸衍生物的合成与表征及抗癌活性研究[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),2010,33(4):474-479.
- [10] 尹素改,周凌,吴耀松,等.甘草次酸对人食管癌 Eca9706 细胞生长的抑制作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(4):112-114.
- [11] 李泽良,孙丹,杨宇翀,等.18- β 甘草次酸对 17 β 羟基类固醇脱氢酶 III 表达的抑制及诱导前列腺癌细胞 LNCaP 凋亡的研究[J].中国医科大学学报,2012,41(10):882-885.
- [12] TANG Z H,LI T,TONG Y G,et al. A systematic review of the anticancer properties of compounds isolated from licorice (gancao) [J]. *Planta Med*,2015,81(18):1670-1687.
- [13] 高振北,康潇,许传莲,等.甘草次酸抗肿瘤作用机制的研究进展[J].中国中药杂志,2011,36(22):3213-3216.
- [14] TANG Z H,ZHANG L L,LI T,et al. Glycyrrhetic acid induces cytoprotective autophagy via the inositol-requiring enzyme 1 α -c-Jun N-terminal kinase cascade in non-small cell lung cancer cells[J]. *Oncotarget*,2015,226(41):43911-43936.
- [15] SONG J H,KO H S,SOHN E J,et al. Inhibition of protein kinase C α/β II and activation of c-Jun NH2-terminal kinase mediate glycyrrhetic acid induced apoptosis in non-small cell lung cancer NCI-H460 cells[J]. *Bioorgan Med Chem Lett*,2014,24(4):1188-1191.
- [16] 黄炜,陈新美,张志凌,等.18 β -甘草次酸诱导人乳腺癌细胞凋亡及其细胞内 Ca^{2+} 水平的变化[J].中国癌症杂志,2006,16(2):102-106.
- [17] LEE C S,KIM Y J,LEE M S,et al. 18 β -glycyrrhetic acid induces apoptotic cell death in SiHa cells and exhibits a synergistic effect against antibiotic anti-cancer drug toxicity[J]. *Life Sci*,2008,83(13/14):481-489.
- [18] ZONG L,YING Q U,MING Y X,et al. 18 α -glycyrrhetic acid extracted from Glycyrrhiza radix inhibits proliferation and promotes apoptosis of hepatic stellate cell line[J]. *J Digest Diseases*,2013,14(6):328-363.
- [19] ZHU J,CHEN M,CHEN N,et al. Glycyrrhetic acid induces G_1 phase cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cells through endoplasmic reticulum stress pathway[J]. *Inter J Oncol*,2015,46(3):981-988.
- [20] 徐淑梅,周蕾,刘卓刚,等.甘草次酸诱导 U266 细胞凋亡及对 SurvivinU 表达的影响[J].中国实验血液学杂志,2011,19(3):652-655.

(本文编辑:徐刚珍 英文编辑:孟月)