

· 基础研究 ·

白藜芦醇诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡的分子机制

于明, 荣家闵, 葛雅琨, 张仁文, 劳军, 张元新*

吉林化工学院生物与食品工程学院, 吉林 吉林 132022

[摘要] 目的:探究白藜芦醇对人胃癌细胞 BGC823 的作用及其分子机制。方法:采用 MTT 法检测白藜芦醇对 BGC823 细胞增殖的影响;流式细胞术测定白藜芦醇对 BGC823 细胞凋亡、活性氧水平和线粒体膜电位的影响;Western blot 法检测白藜芦醇对 BGC823 细胞 cleaved caspase-3 和 cleaved caspase-9 蛋白表达的影响。结果:MTT 结果显示白藜芦醇对胃癌 BGC823 细胞具有明显的增殖抑制作用,且呈时间和剂量依赖关系;31.25~500.00 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇作用 24 h 和 48 h 可诱导 BGC823 细胞凋亡,500 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 和 48 h,细胞凋亡率分别达(40.42 \pm 2.64)%和(75.02 \pm 2.36)%。流式细胞术结果显示白藜芦醇作用 24 h 后可使 BGC823 细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)增多;与对照组相比,62.50~500.00 $\mu\text{mol/L}$ 白藜芦醇作用细胞 24 h 后,细胞出现了显著的线粒体膜电位降低($P < 0.05$);Western blot 结果显示白藜芦醇以浓度依赖方式上调 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 的表达。结论:白藜芦醇可以显著诱导细胞凋亡,其诱导细胞凋亡与 ROS 增多、线粒体膜电位降低和调节 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 的表达有关。

[关键词] 白藜芦醇;胃癌;凋亡;细胞周期**[中图分类号]** R735.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)09-1292-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190906

Molecular mechanism of apoptosis in gastric cancer BGC823 cells induced by resveratrol

Yu Ming, Rong Jiamin, Ge Yakun, Zhang Renwen, Lao Jun, Zhang Yuanxin*

College of Food & Engineering, Jilin Institute of Chemical Technology, Jilin 132022, China

[Abstract] **Objective:** This study aims to investigate the anticancer activities and molecular mechanisms of resveratrol on human gastric cancer BGC823 cells. **Methods:** Growth of BGC823 cells affected by resveratrol was detected by MTT assay. Effects of resveratrol on apoptosis, reactive oxygen species levels and mitochondrial membrane potential of BGC823 were determined by flow cytometry. Expression changes of cleaved caspase-3 and cleaved caspase-9 proteins in BGC823 cells affected by resveratrol were detected by Western blot. **Results:** The results of MTT showed resveratrol inhibited the proliferation of BGC823 in a time- and dose-dependent manner. Treatment with 31.25-500.00 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol for 24 h and 48 h induced apoptosis of BGC823 cells, and the apoptosis rate reached (40.42 \pm 2.64)% and (75.02 \pm 2.36)% in resveratrol concentration of 500 $\mu\text{mol/L}$ at 24 h and 48 h, respectively. Flow cytometric analysis showed that BGC823 cells treated with resveratrol were accumulated in ROS levels in cells for 24 h. Compared with the control group, BGC823 cells showed a significantly decreased in mitochondrial membrane potential after treated with 62.50-500.00 $\mu\text{mol/L}$ resveratrol for 24 h ($P < 0.05$). Western blot showed that expressions of cleaved caspase-9 and cleaved caspase-3 protein in BGC823 cells were increased after resveratrol treatment in a dose-dependent manner. **Conclusion:** Resveratrol can significantly induce cell apoptosis, which is related to the increase of ROS, the decrease of mitochondrial membrane potential and the regulation of cleaved caspase-9 and cleaved caspase-3 expression.

[Key words] resveratrol; gastric cancer; apoptosis; cell cycle

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(09): 1292-1297]

[基金项目] 吉林省省级产业创新专项资金项目(2018C049-4);吉林省教育厅科研项目[吉教科合字(2016)第133号];吉林市科技局项目(201750259);吉林化工院校级重大项目(20180101)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: yxzhang@jlicet.edu.cn

胃癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,也是第二大癌症疾病,每年影响约100万人^[1]。我国胃癌发病率较高,在全球所占比例较大,接近40%^[2]。目前,化疗在胃癌治疗过程中起着重要作用,但是化疗容易使细胞产生耐药并且不良反应明显。因此寻找高效、低毒的天然药物非常必要。

白藜芦醇(3,4',5-三羟基-反式-二苯乙烯)是从葡萄、花生、蓝莓和蔓越橘中提取出来的一种多酚类二苯乙烯化合物,白藜芦醇具有多种生物活性,包括抗氧化^[3]、抗炎症^[4]和预防心脑血管疾病^[5]等,近年来,已有报道白藜芦醇对乳腺癌^[6]、皮肤癌^[7]、胃癌^[8]、结肠癌^[9]和膀胱癌^[10]等多种肿瘤细胞均有显著抑制作用,但对其抗肿瘤活性的确切机制尚不清楚。本研究采用BGC823细胞株观察白藜芦醇对胃癌细胞增殖、生长的作用,并进一步探索其抗癌机制,为今后胃癌的临床治疗提供新方向。

1 材料和方法

1.1 材料

白藜芦醇(大连美仑公司),MTT(Amresco公司,美国),二甲基亚砜(DMSO,Sigma公司,美国),RPMI 1640(Gibco公司,美国),新生牛血清(浙江天杭生物科技股份有限公司);线粒体膜电位检测试剂盒(上海碧云天有限公司),凋亡检测试剂盒、Mouse Anti-Active Caspase 3、Mouse Anti-Caspase-9、Mouse Anti- β -actin和HRP标记的抗鼠IgG(Bioss公司,美国);流式细胞仪(Beckman公司,美国),CO₂培养箱(Thermo公司,美国),酶标仪(Biotek公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞及药物

胃癌细胞BGC823购自中科院细胞库,用含新生牛血清(10%)、链霉素(100 U/mL)、青霉素(100 U/mL)的RPMI 1640完全培养基,在恒温37℃含5%CO₂的培养箱中培养。白藜芦醇用DMSO配制成500 mmol/L的母液,再用培养基稀释成实验所需浓度。

1.2.2 MTT比色法检测BGC823细胞活力

取生长状态良好的BGC823细胞,按照 5×10^3 个/孔均匀铺在96孔板中,待细胞覆盖率达到70%~80%,分别用白藜芦醇(7.812 5、15.625 0、31.250 0、62.500 0、125.000 0、250.000 0、500.000 0 $\mu\text{mol/L}$)作用于细胞,每个浓度和空白组设置4个复孔,24、48、72 h后,加入100 μL 不完全培养基和10 μL 0.5 mg/mL MTT,在37℃恒温CO₂培养箱中继续培养4 h,出现

蓝色结晶后吸出孔内培养基,每孔加入150 μL DMSO,震荡10 min,在酶标仪570 nm波长下检测细胞吸光度,计算细胞存活率。

1.2.3 细胞凋亡检测

取状态良好的BGC823细胞,按照 2×10^5 个/孔均匀铺在6孔板中,分别用白藜芦醇(31.25、62.50、125.00、250.00、500.00 $\mu\text{mol/L}$)作用于细胞,药物处理24 h和48 h后,收集细胞,用冰预冷的PBS洗细胞两次,按照试剂盒说明书,用1×Binding Buffer结合液调节细胞浓度为 1×10^6 个/mL,吸取100 μL 细胞液于1.5 mL离心管中,加入4 μL Annexin V-FITC和4 μL PI染料室温避光孵育5 min,流式上机检测。

1.2.4 细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平的测定

细胞培养和药物处理条件同上,药物处理24 h后收集细胞,每组加入无血清培养基稀释好的DCFH-DA染料1 mL,37℃细胞培养箱内孵育20 min。孵育后用无血清细胞培养液洗涤细胞3次,流式细胞仪检测。

1.2.5 细胞线粒体膜电位的检测

细胞培养和药物处理同上,药物处理24 h后离心收集细胞,用500 μL 完全培养基重悬细胞,加入配制好的500 μL JC-1染色工作液37℃下温育20 min,离心收集细胞,用JC-1染色缓冲液洗涤细胞2次,最后流式细胞仪观察红绿荧光相对比来衡量线粒体膜电位。变化率= $R_{\text{红}}/R_{\text{绿}}$ 。

1.2.6 凋亡相关蛋白表达水平的检测

按浓度分组处理细胞24 h后,收集细胞,每组加入含1 mmol/L PMSF(蛋白酶抑制剂)的细胞裂解液,冰上充分裂解30 min,4℃13 000 g离心5 min,收上清,用BCA法进行蛋白定量实验。取30 μg 总蛋白,经12%的SDS-PAGE分离后,转移到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST室温封闭2 h;分别加入用TBST稀释的Mouse Anti-Active Caspase 3(1:500)、Mouse Anti-Caspase-9(1:1 000)和Mouse Anti- β -actin(1:500)的一抗,4℃过夜孵育,用TBST洗膜3次,每次10 min,加入HRP标记的抗鼠IgG(1:2 000稀释),室温孵育2 h,TBST洗膜3次,每次10 min,用ECL超敏化学发光试剂盒显影。

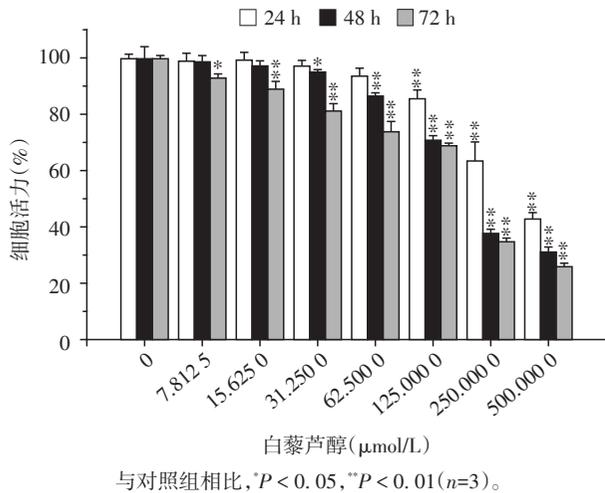
1.3 统计学方法

采用SPSS19.0统计分析软件处理。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对BGC823细胞增殖的影响

通过MTT法测定不同浓度白藜芦醇作用BGC823细胞24 h、48 h和72 h后,对细胞活力的影响(图1)。31.250 0、62.500 0、125.000 0、250.000 0、500.000 0 μmol/L白藜芦醇作用BGC823细胞24 h后,细胞活力分别为(95.32 ± 1.55)%、(91.31 ± 1.65)%、(85.56 ± 1.23)%、(63.51 ± 1.12)%、(42.91 ± 1.20)%;而不同浓度白藜芦醇作用BGC823细胞72 h后,对BGC823细胞增殖的抑制作用明显高于24 h和48 h。



与对照组相比,*P < 0.05,**P < 0.01(n=3)。

图1 白藜芦醇对BGC823细胞活力的影响

Figure 1 The effect of resveratrol on the viability of BGC823 cells

2.2 白藜芦醇对BGC823细胞凋亡的影响

Annexin-V/PI双标流式细胞术检测不同浓度白藜芦醇作用24 h和48 h,对BGC823细胞凋亡的作用(表1,图2)。发现随着白藜芦醇浓度增加,BGC823细胞凋亡率递增;白藜芦醇作用48 h的细胞凋亡率明显高于24 h。白藜芦醇以时间和浓度依赖方式诱导BGC823细胞凋亡。

2.3 白藜芦醇对BGC823细胞内ROS水平的影响

用流式细胞仪检测细胞内ROS的变化(图3)。发现不同浓度白藜芦醇作用BGC823细胞24 h后,随着药物浓度的增加,BGC823细胞内ROS含量逐渐增多。当药物浓度为125.000 0~500.000 0 μmol/L时,相比于空白组,ROS水平差异有统计学意义(P < 0.05)。

2.4 白藜芦醇对BGC823线粒体膜电位的影响

JC-1单标流式细胞术检测细胞线粒体膜电位

表1 白藜芦醇对细胞凋亡的影响

Table 1 The effect of resveratrol on cell apoptosis (x̄ ± s, n=3)

组别	白藜芦醇 (μmol/L)	24 h 凋亡率 (%)	48 h 凋亡率 (%)
对照组	0	5.30 ± 1.25	5.05 ± 1.24
实验组	31.250 0	6.01 ± 2.31	11.56 ± 3.10*
	62.500 0	8.02 ± 3.21	12.01 ± 2.56*
	125.000 0	10.50 ± 2.31*	21.01 ± 3.17**
	250.000 0	28.90 ± 2.16**	57.93 ± 3.20**
	500.000 0	40.42 ± 2.64**	75.02 ± 2.36**

与对照组相比,*P < 0.05,**P < 0.01。

的变化(表2、图4)。不同浓度白藜芦醇作用BGC823细胞24 h后,JC-1单体占比分别为(7.14 ± 1.24)%、(9.51 ± 2.10)%、(12.10 ± 2.56)%、(13.20 ± 3.17)%、(14.30 ± 3.20)%、(20.52 ± 2.36)% ,与对照组相比,随着药物浓度增加,膜电位下降,差异均有统计学意义(P均 < 0.05)。

2.5 白藜芦醇对相关凋亡蛋白的影响

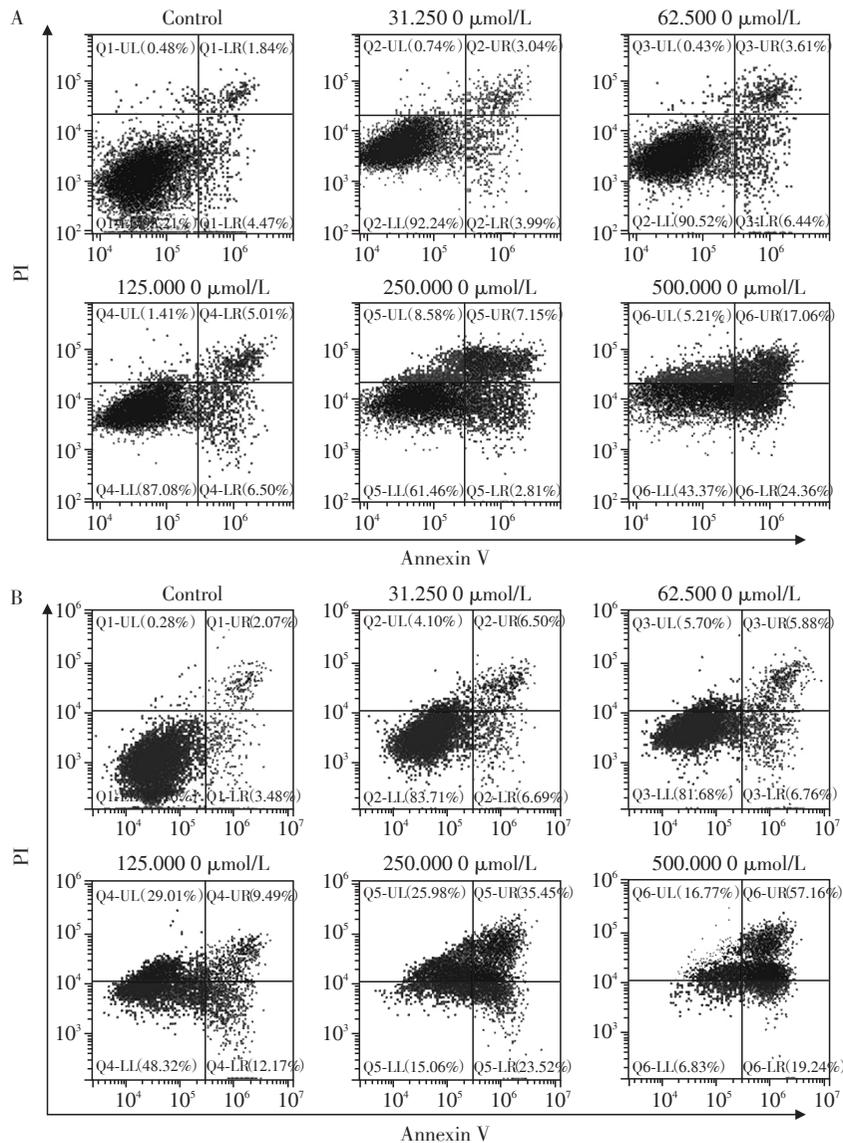
采用蛋白质免疫印迹法检测相关凋亡蛋白cleaved caspase-9和cleaved caspase-3的表达水平(图5)。随着白藜芦醇浓度增加,cleaved caspase-9和cleaved caspase-3蛋白表达水平逐渐增加,并且表现出对白藜芦醇浓度的依赖性。与对照组比较,白藜芦醇处理后,BGC823细胞中cleaved caspase-3和cleaved caspase-9的表达差异有统计学意义(P < 0.05),说明白藜芦醇活化了caspase-9和caspase-3。

3 讨论

白藜芦醇是从花生、葡萄中提取的一种酚类化合物,大量研究表明白藜芦醇能抑制多种肿瘤细胞增殖,其抗肿瘤机制可能与DNA合成、干扰相关信号转导通路、阻滞细胞周期^[11]、导致细胞凋亡有关^[12]。

本研究发现,白藜芦醇对胃癌细胞BGC823的增殖具有明显抑制作用,并呈时间和剂量依赖关系,流式细胞仪分析显示白藜芦醇作用24 h和48 h后,AnnexinV-FITC阳性细胞数增多,说明白藜芦醇具有诱导BGC823细胞凋亡的作用。AnnexinV-FITC阳性细胞数随着药物浓度和时间的增加显著增多。

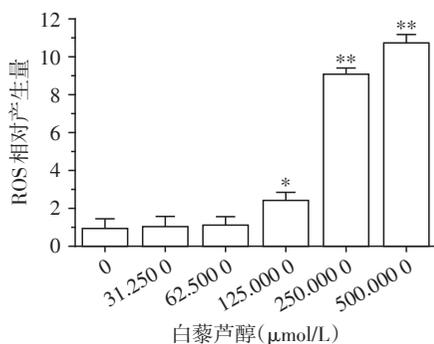
氧化应激是为了维持体内ROS动态平衡的反应。近年来研究表明氧化应激会造成细胞凋亡,主要通过线粒体途径和非线粒体途径。和正常细胞比较,大多数肿瘤细胞表现出有氧糖酵解增加(Warburg效应)和高氧化应激状态,高氧化应激状



A: 白藜芦醇作用24 h时的流式分析结果; B: 白藜芦醇作用48 h时的流式分析结果。

图2 流式细胞仪分析白藜芦醇对BGC823细胞凋亡的影响

Figure 2 Apoptosis of BGC823 cells treated with resveratrol was detected by FCM



与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图3 流式细胞仪分析白藜芦醇对BGC823细胞内ROS的影响

Figure 3 ROS levels of BGC823 treated with resveratrol was detected by FCM

表2 白藜芦醇对BGC823细胞线粒体膜电位的影响

Table 2 The effect of resveratrol on mitochondrial membrane potential of BGC823 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	白藜芦醇 ($\mu\text{mol/L}$)	$R_{\text{红}}$	$R_{\text{绿}}$	$R_{\text{红}}/$ $R_{\text{绿}}$
对照组	0	91.40 ± 1.25	7.41 ± 1.24	12.33
实验组	31.2500	89.21 ± 2.31	9.51 ± 2.10	9.35*
	62.5000	86.32 ± 3.21	12.10 ± 2.56	7.13*
	125.0000	85.13 ± 2.31	13.20 ± 3.17	6.44*
	250.0000	82.13 ± 2.16	14.30 ± 3.20	5.74*
	500.0000	76.61 ± 2.64	20.52 ± 2.36	3.73**

与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

态的肿瘤细胞更容易受到外源性ROS诱导剂的损伤,因此调控ROS水平可以作为杀死肿瘤细胞的一

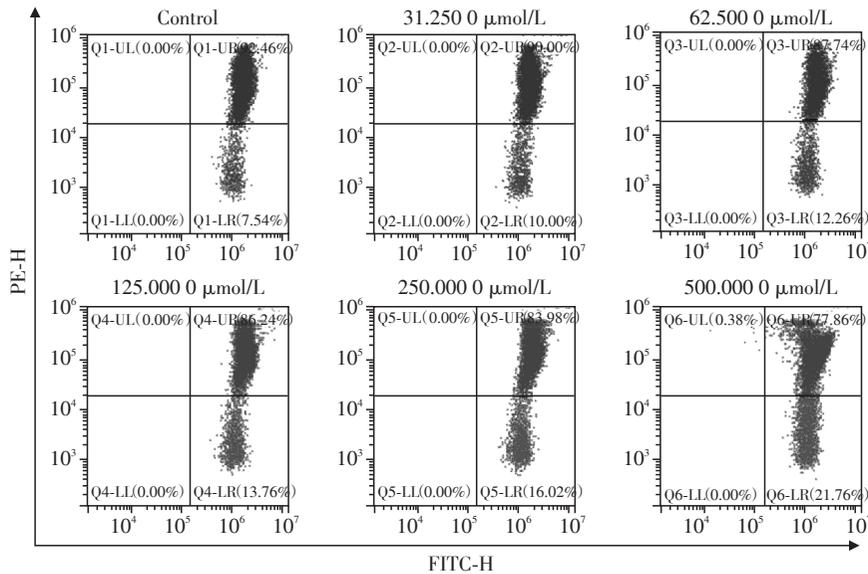
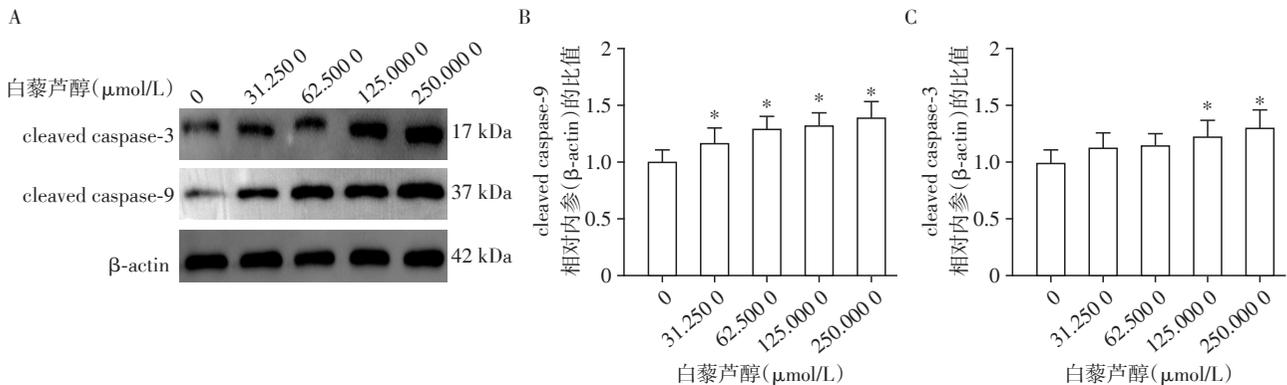


图4 流式细胞仪分析白藜芦醇作用BGC823细胞后线粒体膜电位变化

Figure 4 Changes of mitochondrial membrane potential in BGC823 cells treated with resveratrol were detected by FCM



A: Western blot 检测细胞中 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 的表达; B: cleaved caspase-9 蛋白定量分析结果; C: cleaved caspase-3 蛋白定量分析结果。与对照组相比, $P < 0.05$ 。

图5 白藜芦醇干预后BGC823细胞内 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 的表达

Figure 5 Expressions of cleaved caspase-9 and cleaved caspase-3 proteins in BGC823 cells treated with resveratrol

种方法^[13], Emilia 等^[14]研究发现 150 μmol/L 反式白藜芦醇可以使细胞产生 ROS, 进而激活 caspase-3, 诱导结肠癌细胞 HT-29 凋亡。也有研究发现线粒体膜电位下降与细胞凋亡密切相关, 线粒体膜电位降低, 会导致细胞色素 C 释放, 从而激活 caspase-9 和 caspase-3, 最终导致细胞凋亡^[15]。本研究发现用不同浓度的白藜芦醇刺激细胞, 会导致细胞内 ROS 增多、线粒体膜电位下降、和凋亡相关的 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3 蛋白表达量增多, 所以本研究表明白藜芦醇可能通过线粒体途径诱导细胞凋亡, 其诱导细胞凋亡的作用和细胞内 ROS 增多, 导致线粒体膜电位降低, 进而增加凋亡相关蛋白 cleaved caspase-9 和 cleaved caspase-3

的表达有关。

[参考文献]

- [1] 左婷婷, 郑荣寿, 曾红梅, 等. 中国胃癌流行病学现状[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(1): 52-58
- [2] 白慧霞. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展[J]. 临床医药文献电子杂志, 2019, 6(7): 192
- [3] 张雪, 邢宝恒, 曹亚磊, 等. 白藜芦醇对妊娠期糖尿病大鼠肾脏组织抗氧化和抗炎的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2): 131-137
- [4] 王丽君, 邓同兴, 张景亮, 等. 白藜芦醇抗炎镇痛作用的 COX-2/PGE₂ 信号通路机制研究[J]. 中药药理与临床, 2017, 33(4): 35-38
- [5] Shin JA, Oh S, Ahn JH, et al. Estrogen receptor-mediated resveratrol actions on blood-brain barrier of ovariectomized mice[J]. J Neurochem, 2011, 117(1): 105-115

- mized mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(2): 993-1006
- [6] Kim YN, Choe SR, Cho KH, et al. Resveratrol suppresses breast cancer cell invasion by inactivating a RhoA/YAP signaling axis [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(2): e296
- [7] 李慧. 白藜芦醇下调 Cyclin 家族表达调节皮肤癌 HS-4 细胞的增殖 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(8): 1802-1804
- [8] 李运红, 陈敏, 邹晓平, 等. 白藜芦醇对胃腺癌细胞株增殖和凋亡的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(8): 1192-1195, 1211
- [9] 劳玲娟, 宋新江, 徐佳. PTEN 在白藜芦醇对体外直肠癌细胞生长和凋亡的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(9): 1730-1735
- [10] 刘晓明, 朱智伟, 王刚, 等. 白藜芦醇通过抑制膀胱癌细胞的糖代谢增强顺铂的抗肿瘤活性 [J]. *中国现代应用药理学*, 2016, 33(10): 1262-1267
- [11] 董成龙, 游娜, 许向红, 等. 白藜芦醇对人甲状腺乳头状癌 IHH4 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(8): 1096-1103
- [12] 何蕾, 倪敏, 樊志敏. 虎杖提取物白藜芦醇抗肿瘤机制的研究进展 [J]. *中医药导报*, 2017, 23(08): 40-43
- [13] 杨梦祺, 刘盼盼, 黄蓬. 肿瘤氧化还原代谢与干预 [J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(9): 16-23
- [14] Emilia JM, Wenzel U, Daniel H, et al. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(12): 4813-4818
- [15] 周珏, 陈丹丹, 王炳昕, 等. 水飞蓟宾通过诱导活性氮生成增多介导人表皮癌 A431 细胞死亡 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33(10): 807-813
- [收稿日期] 2019-01-05

(上接第 1279 页)

- LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells [J]. *J Cell Biol*, 1998, 142(1): 129-138
- [28] Blair HJ, Reed V, Gormally E, et al. Positioning of five genes (CASK, ARX, SAT, IMAGE cDNAs 248928 and 253949) from the human X chromosome short arm with respect to evolutionary breakpoints on the mouse X chromosome [J]. *Mamm Genome*, 2000, 11(8): 710-712
- [29] Venter JC, Smith HO, Adams MD. The sequence of the human genome [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(9): 1207-1208
- [30] Stevenson D, Laverty HG, Wenwieser S, et al. Mapping and expression analysis of the human CASK gene [J]. *Mamm Genome*, 2000, 11(10): 934-937
- [31] Laconte L, Mukherjee K. Structural constraints and functional divergences in CASK evolution [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(4): 1017-1022
- [32] Najm J, Horn D, Wimplinger I, et al. Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(9): 1065-1067
- [33] Hori Y, Gu X, Xie X, et al. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells [J]. *PLoS Med*, 2005, 2(4): e103
- [34] Fujimoto K, Shibasaki T, Yokoi N, et al. Piccolo, a Ca²⁺ sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(52): 50497-50502
- [35] Ohara - Imaizumi M, Ohtsuka T, Matsushima S, et al. ELKS, a protein structurally related to the active zone-associated protein CAST, is expressed in pancreatic beta cells and functions in insulin exocytosis: interaction of ELKS with exocytotic machinery analyzed by total internal reflection fluorescence microscopy [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(7): 3289-3300
- [36] Zhu ZQ, Wang D, Xiang D, et al. Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase is involved in exendin-4-induced insulin secretion in INS-1 cells [J]. *Metabolism*, 2014, 63(1): 120-126
- [收稿日期] 2018-12-26