

蜂毒素对人胃癌细胞株 BGC-823 凋亡及其细胞周期的影响*

黄舒然¹, 王瑞平^{1,2Δ}, 邹玺^{1,2}, 周锦勇^{1,2}

1 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210046; 2 江苏省中医院

[摘要] 目的: 观察蜂毒素体外对人胃癌细胞株 BGC-823 增殖、凋亡及细胞周期的影响。方法: 采用 MTT 法观察不同浓度的蜂毒素 (32, 16, 8, 4, 2 μg/mL) 体外对人胃癌细胞株 BGC-823 增殖的影响, 并用流式细胞仪检测其诱导的细胞凋亡和周期阻滞效应。结果: ①与对照组比较, 蜂毒素有抑制人胃癌细胞株 BGC-823 增殖的作用 ($P < 0.01$), 随着药物浓度的增大, 其对细胞的抑制率也明显增大, 呈现剂量依赖性。②蜂毒素浓度从 4 μg/mL 开始, 即可诱导细胞产生凋亡, 随着剂量的增加诱导凋亡的效果更加明显。③在细胞周期方面, 与阴性对照比较, 蜂毒素作用 24 小时后 S 期细胞比例上升, 而 G₀/G₁ 期比例明显下降, 蜂毒素浓度达到 16 μg/mL 时 G₀/G₁ 期前出现明显的亚二倍体区。结论: 蜂毒素对人胃癌细胞株 BGC-823 的增殖具有抑制作用, 且能够引起该细胞的凋亡及改变其细胞周期。

[关键词] 蜂毒素; 人胃癌细胞株 BGC-823; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期

[中图分类号] R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-6852(2012)10-0015-03

Effects of Melittin on Apoptosis and Cell Cycle of Human Gastric Cancer Cell Line BGC-823

HUANG Shu-ran¹, WANG Rui-ping^{1,2}, ZOU Xi^{1,2}, ZHOU Jin-yong^{1,2}

1 Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;

2 Jiangsu Province Hospital of Traditional Chinese Medicine

Abstract Objective: To investigate effect of melittin in vitro on proliferation, apoptosis and cell cycle of human gastric cancer cell line BGC-823. Method: Effects of different concentrations of melittin (32, 16, 8, 4 or 2 μg/mL) on proliferation of human gastric cancer cell line BGC-823 were investigated with MTT assay; induced apoptosis and cycle blocking were detected with flow cytometer (FCM). Result: ① Compared with control group, melittin inhibited proliferation of human gastric cancer cell line BGC-823 ($P < 0.01$). The inhibition effects increased with the dose. ② Melittin induced cell apoptosis when the concentration reached to 4 μg/mL, the apoptosis-inducing effect rose with the dose of melittin. ③ As cell cycle, the percentage of cells in S phase increased after melittin working for 24 hours while the ratio of the cells in G₀/G₁ phase decreased compared with negative control group, when the concentration of melittin reached to 16 μg/mL, the sub-diploid peak showed obviously before G₀/G₁ phase. Conclusion: Melittin could inhibit the proliferation of human gastric cancer cell line BGC-823, induce the apoptosis of cells and change its cell cycle.

Keywords melittin; human gastric cancer cell line BGC-823; cell proliferation; apoptosis; cell cycle

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率占所有恶性肿瘤的第 4 位, 病死率为第 2 位^[1], 而在我国其发病率及病死率均占第 1 位^[2]。目前治疗胃癌的主要手段为手术治疗, 胃癌早期可达到临床治愈的效果, 但术后复发转移率较高。对于中晚期胃癌, 则手术治疗效果较差。对此, 多数学者认为胃癌术后配合中医中药治疗能取得更好的疗效。蜂毒素为工蜂毒腺和副腺分泌出的蜂毒的主要成分, 近年来其抗肿瘤作用日益引起人们的重视。为了解蜂毒素对胃癌细胞生长的影响及初步探索其作用机制, 本实验对蜂毒素作用于人胃癌细胞 BGC-823 进行观察, 了解其对细胞生长、凋亡及细胞周期的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 人胃癌细胞株 BGC-823 由江苏省中医院肿瘤科实验室常规保种。用含 10% 的小牛血清的 1640 培养基, 在 37℃、5% CO₂、完全饱和湿度条件下常规培养, 取对数生长期的细胞进行实验。

1.1.2 药物及试剂 蜂毒素购自深圳伽马科技有限公司, 浓度 ≥ 98%。实验前用完全培养液稀释后得 5 种终浓度: 32、16、8、4、2 μg/mL; 1640 培养液购自 Gibco 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司; 二甲亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 购自 Biosharp 公司; Annexin-V/PI 流式凋亡试剂盒为

凯基公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT法检测蜂毒素对BGC-823细胞增殖的影响 取对数生长期细胞接种于96孔板中, 5×10^3 个/孔, 培养24小时后, 实验组加入含不同浓度蜂毒素(32、16、8、4、2 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的1640培养液, 对照组则加入无药物的1640培养液, 共6组, 每组6个复孔。继续培养48小时后, 弃去培养液, PBS洗2次, 每孔加入100 μL 1640培养液和20 μL MTT溶液, 继续培养4小时。弃上清, 每孔加入150 μL DMSO, 置摇床上低速振荡10分钟, 使结晶物充分溶解。使用酶标仪490 nm波长测量各孔的吸光度值。计算抑制率 = (1 - 实验组值 / 空白对照组值) $\times 100\%$, 重复3次。

1.2.2 Annexin-V/PI双染法检测蜂毒素对BGC-823细胞凋亡的诱导作用 将BGC-823细胞用1640培养液稀释细胞浓度为 2×10^5 个/mL, 每3 mL细胞悬液培养于直径60 mm培养皿中, 贴壁12小时后吸弃培养基, 分别加入浓度为16、8、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蜂毒素溶液(用完全培养基配制), 继续培养6小时后以不含EDTA的胰酶消化并收集细胞于流式管中, 1 000 rpm离心5分钟, 弃上清, 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷PBS洗涤细胞2次, 离心弃上清, 用Binding Buffer 500 μL 重悬细胞, 分别加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI染料后混匀, 避光室温孵育15分钟后, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.3 细胞周期的检测 将BGC-823细胞用1640培养液稀释细胞浓度为 2×10^5 个/mL, 每9 mL细胞悬液培养于直径为10 cm培养皿中, 贴壁12小时后吸去培养基, 分别加入浓度为16、8、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蜂毒素溶液(用完全培养基配制)培养, 于24小时后以不含二胺四乙酸的胰酶消化并收集细胞于流式管中, 1 000 rpm离心5分钟, 弃上清, 预冷PBS洗涤细胞3次, 离心弃上清, 加入预冷75%乙醇, 于4 $^{\circ}\text{C}$ 固定过夜。离心收集细胞, 预冷PBS洗涤细胞3次, 加入100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ RNAse 15 μL , 涡旋振荡

混合均匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光放置15分钟, 加入500 μL 含50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PI的PBS, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30分钟, 流式细胞仪检测细胞周期分布情况。在 G_0/G_1 期峰之前出现一个亚二倍体峰判定为凋亡细胞峰, 以凋亡率评价其凋亡程度。

1.3 统计学方法 数据采用SPSS 13.0统计软件分析, 以($\bar{x} \pm s$)表示, 各组之间比较采用one-way ANOVA检验, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 蜂毒素对BGC-823细胞增殖的影响 不同浓度(2~32 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的蜂毒素作用BGC-823细胞48小时, 与对照组比较, 随着药物浓度的增大, 其对细胞的抑制率也明显增大($P < 0.01$), 当药物浓度达到32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对BGC-823细胞的抑制作用最强。见表1。

表1 蜂毒素对BGC-823细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	OD值	48 h抑制率 / %
实验组 1	32	0.209 \pm 0.044*	87.33 \pm 4.04*
实验组 2	16	0.464 \pm 0.111*	71.33 \pm 1.53*
实验组 3	8	0.788 \pm 0.206*	51.25 \pm 11.91*
实验组 4	4	1.313 \pm 0.195	17.67 \pm 7.23
实验组 5	2	1.435 \pm 0.192	10.00 \pm 8.54
对照组	0	1.631 \pm 0.116	-

注: *表示和对照组相比, $P < 0.01$ 。

2.2 蜂毒素对BGC-823细胞凋亡的影响 以16、8、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蜂毒素作用于BGC-823细胞6小时后, 流式细胞仪检测细胞凋亡的情况(图中右下角表示的是Annexin V阳性PI阴性的细胞, 表示的是早期凋亡的细胞), 结果显示随着药物浓度的增加, 凋亡率由(3.14 \pm 0.73)%, 分别增加为(10.30 \pm 4.67)%、(30.32 \pm 1.38)%和(44.69 \pm 5.05)%, 实验组与对照组具有显著性差异($P < 0.01$)。结果见表2、图1。

表2 蜂毒素作用6 h后细胞凋亡比例的流式检测结果

药物浓度	第1次结果 / %	第2次结果 / %	第3次结果 / %	$\bar{x} \pm s$
16 $\mu\text{g}/\text{mL}$	50.07	40.06	43.95	44.69 \pm 5.05*
8 $\mu\text{g}/\text{mL}$	31.67	28.92	30.38	30.32 \pm 1.38*
4 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10.05	5.75	15.09	10.30 \pm 4.67
对照	3.93	2.48	3.01	3.14 \pm 0.73

注: *表示与对照组比较, $P < 0.01$ 。

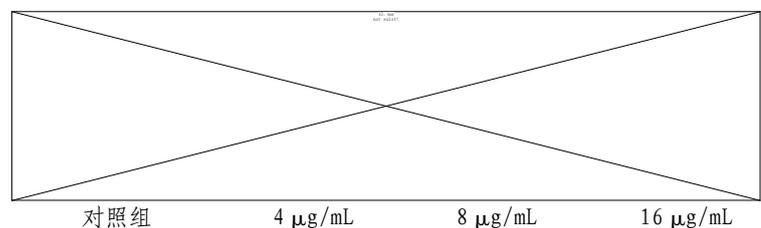


图1 蜂毒素作用后流式细胞凋亡检测

2.3 蜂毒素对BGC-823细胞周期的影响 以16、8、4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的蜂毒素作用于BGC-823细胞24小时后, 流式细胞仪检测细胞周期, 结果显示当药物浓度达16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时 G_0/G_1 期前出现明显的亚二倍体峰(黑色箭头所示), S期细胞比例由空白组的35.40%上升至46.54%, 而 G_0/G_1 期比例明显下降, 由55.84%下降至41.62%。结果见表3、图2。

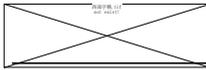


表3 蜂毒素对 BGC-823 细胞周期的影响

组别	浓度 / ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	G ₀ /G ₁	G ₂ /M	S	Apoptosis
实验组	16	41.62	11.84	46.54	39.98
	8	51.93	16.49	31.58	2.20
	4	50.14	14.32	35.54	1.48
对照组	0	55.84	8.76	35.40	-

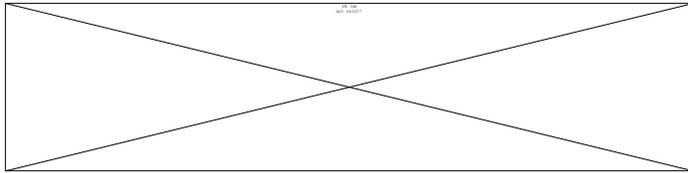


图2 蜂毒素作用后流式细胞周期检测

3 讨论

蜂毒是存在于工蜂毒腺和副腺的具有芳香气味的淡黄色透明毒液,含碳、氢、硫、磷、钙、氯、氮等元素,系透明液体,呈酸性反应^[3]。蜂毒是具有多种药理学和生物学活性的复杂混合物^[4],主要包括多肽类:蜂毒肽(Melittin)、原蜂毒肽(Promelittin)、蜂毒明肽(Apamin)、MCD-多肽等;活性酶类:磷脂酶A2(Phospholipase, PLA2)、透明质酸酶(Hyaluronidase)等;此外还有组胺、胆碱、甘油、氨基酸等。蜂毒中起药理作用和生物学活性的主要成分是蜂毒素(melittin),约占蜂毒干重30%~40%,其具有抗炎、抗菌、抗病毒、镇痛、抑制血小板凝聚和抗肿瘤等多种生物学作用^[5]。蜂毒素由26个氨基酸组成,是不对称的线性多肽,第1位至第20位的氨基酸是疏水基团,第21至第26位的氨基酸是亲水基团^[6]。我国应用蜂毒治疗风湿、类风湿性关节炎、肩周炎等疾病已有悠久的历史,临床疗效较好。近年来,随着分离纯化技术的不断提高,在研究蜂毒成分、基本结构的基础上,探讨了其功能及作用机理,发现蜂毒素尚有抗肿瘤的作用^[7]。研究发现,蜂毒素对多种肿瘤细胞具有强烈的杀伤作用^[8-12],但目前对其抗肿瘤的机制尚无统一认识,提示可能是多种机制协同作用的结果。

肿瘤细胞的失控性生长是恶性肿瘤的特征之一,这可能与细胞周期紊乱、增殖过快及凋亡减少有关。细胞凋亡早期改变发生在细胞膜表面,改变之一是磷脂酰丝氨酸(PS)从细胞膜内转移到细胞膜外,使PS暴露在细胞膜外表面。Annexin-V是一种Ca²⁺依赖的磷脂结合蛋白,具有易于结合到磷脂类如PS的特性,对PS有高度的亲和性。因此,该蛋白可作为敏感的探针检测暴露在细胞膜表面的PS。碘化丙啶(propidine iodide, PI)是一种核酸染料,它不能透过完整的细胞膜,但在凋亡中晚期的细胞和死细胞中,PI能够透过细胞膜而使细胞核红染。因此将Annexin-V与PI配合使用,就可以将凋亡早期的细胞以及死细胞区分开来。本实验运用流式细胞技术通过Annexin-V/PI双染法证明了蜂毒素作用BGC-823细胞后6小时即出现明显的早期凋亡,16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的凋亡率分别达(44.69±5.05)%和(30.32±1.38)%。通过细胞周期的检测证实蜂毒素可将

BGC-823细胞阻滞于S期,药物浓度达16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时G₀/G₁期前出现明显的亚二倍体区,从另一方面说明蜂毒素具有诱导人胃癌细胞凋亡的作用。

参考文献

- [1] Parkin DM, Bray F, Pisani P. Global cancer statistics, 2002[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(2): 74-108.
- [2] 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 等. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测[J]. 中华肿瘤杂志, 2004, 26(1): 4-9.
- [3] 卫应, 杨申, 江明华. 蜂毒的药理研究、临床应用及开发现状[J]. 中国医院药学杂志, 2000, 20(11): 682-683.
- [4] 刘红云, 童富淡. 蜂毒的研究进展及其临床应用[J]. 中药材, 2003, 26(6): 456-458.
- [5] Raghuraman H, Chattopadhyay A. Melittin: a membrane active peptide with diverse functions[J]. Biosci Rep, 2007, 27(4-5): 189-223.
- [6] Hewish DR, Barnham KJ, Werkmeister JA, et al. Structure and activity of D-pro¹⁴ melittin journal articles refereed[J]. J Protein Chem, 2002, 21(4): 243-253.
- [7] 王硕丰, 杨本明, 李立标, 等. 蜂毒素的药理作用研究及展望[J]. 天津中医, 2003, 15(4): 53-57.
- [8] Tu WC, Wu CC, Hsieh HL, et al. Honeybee venom induces calcium-dependent but caspase-independent apoptotic cell death in human melanoma A2058 cells[J]. Toxicol, 2008, 52(2): 318-329.
- [9] 张晨, 万旭英, 李柏, 等. 蜂毒素对肝癌细胞系BEL-7402细胞凋亡的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2003, 22(4): 44-46.
- [10] 王怡苹, 吕雄文, 赵斌, 等. 蜂毒素对胃癌细胞系SGC-7901细胞增殖抑制作用及机制[J]. 安徽医科大学学报, 2010, 45(4): 503-508.
- [11] Chen Wang, Taoyong Chen, Ning Zhang, et al. Melittin a major component of bee venom, sensitizes human hepatocellular carcinoma cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by activating CaMKII-TAK1-JNK/p38 and inhibiting I κ B kinase-NF κ B[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2009, 284(6): 3804-3813.
- [12] Moon DO, Park SY, Choi YH, et al. Melittin induces Bcl-2 and caspase-3-dependent apoptosis through downregulation of Akt phosphorylation in human leukemic U937 cells[J]. Toxicol, 2008, 51(1): 112-120.

收稿日期: 2012-04-12

* 基金项目: 江苏省六大高峰人才项目, 江苏省中医药管理局领军人才项目(编号LJ200908), 江苏省高校优势学科资助项目。

作者简介: 黄舒然(1986—), 女, 硕士研究生。研究方向: 肿瘤疾病的中西医结合诊治。

△ 通讯作者: 王瑞平(1961—), 女, 博士研究生导师, 博士学位, 教授, 主任医师。研究方向: 肿瘤疾病的中西医结合诊治。