

• 基础医学 •

文章编号: 1002-0217(2018)02-0113-03

## 皖南蝮蛇抑瘤组分 I 对人胃癌 SGC-7901 细胞作用机制的初步探讨

赵容<sup>1</sup>, 卢林明<sup>2</sup>, 张根葆<sup>1</sup>, 柴琳<sup>3</sup>, 周珏<sup>2</sup>

(皖南医学院 1. 病理生理学教研室; 2. 病理学教研室; 3. 口腔医学院, 安徽 芜湖 241002)

**【摘要】目的:** 探讨皖南蝮蛇抑瘤组分 I (AHVAC-I) 对人胃癌 SGC-7901 细胞作用的基本机制。**方法:** 本实验选择 SGC-7901 细胞作为研究对象, 体外条件下传代培养。按实验目的分为正常对照组和 AHVAC-I 浓度组。MTT 法检测不同浓度的 AHVAC-I 对 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用, 通过化学荧光法对细胞内线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ ) 分析。**结果:** AHVAC-I 能抑制 SGC-7901 细胞增殖, 在一定范围内(3~30 mg/L) 呈剂量依赖性, 引起 SGC-7901 细胞出现死亡并伴有染色质聚集、核破碎、凋亡小体等典型的凋亡形态学特征; 此外还检测到有  $\Delta\Psi_m$  降低现象。**结论:** AHVAC-I 对 SGC-7901 细胞的作用与线粒体凋亡途径有关, 作用机制之一是通过降低  $\Delta\Psi_m$  诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡。

**【关键词】** 胃癌; 蛇毒; 凋亡; 线粒体途径

**【中图分类号】** R 329.25; R 735.2 **【文献标志码】** A

**【DOI】** 10.3969/j.issn.1002-0217.2018.02.004

## Preliminary study on the mechanism of *Aghkistrodon halys* venom antitumor component-I in human gastric cancer SGC-7901 cells

ZHAO Rong, LU Linming, ZHANG Genbao, CHAI Lin, ZHOU Jue

Department of Pathology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

**【Abstract】Objective:** To investigate the primary mechanisms of *Aghkistrodon halys* venom antitumor component-I (AHVAC-I) in human gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods:** SGC-7901 cells were used, and sub-cultured with in vitro technique. The experiment was performed as normal control group and different AHVAC-I concentration treatment group. MTT method was used to examine the inhibitory effects of different concentrations of AHVAC-I on SGC-7901 cell proliferation, and the changes of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) were detected by chemiluminescence method. **Results:** MTT determination showed that the inhibition rate of cell proliferation was increased with added AHVAC-I concentration (3-30 mg/L), which resulted in SGC-7901 cell death with chromatin aggregation, nuclear fragmentation, apoptotic bodies and other typical apoptotic morphological features. Additionally, decreased mitochondrial membrane potential was observed. **Conclusion:** AHVAC-I affecting SGC-7901 cells is associated with mitochondrial apoptosis pathway. One of the potential mechanisms is to induce apoptosis of human gastric cancer SGC-7901 cells via reducing the mitochondrial membrane potential.

**【Key words】** SGC-7901 cells; AHVAC-I; apoptosis; mitochondrial pathway

胃癌是全球常见肿瘤之一, 占全世界病死率的第二位<sup>[1]</sup>, 我国胃癌发病率占全球的 42.7%, 且我国胃癌的发病率及病死率均占有恶性肿瘤的前三位<sup>[2]</sup>。由于胃癌早期症状往往并不明显, 大多患者就诊时已是胃癌晚期, 失去了手术机会, 所以寻求新一代天然安全高效的抗肿瘤药物成为我们进一步延长患者生命、提高患者生存质量的重要课题<sup>[3-4]</sup>。蛇毒是由蛇的毒腺分泌的一种天然毒蛋白, 成分复

杂, 主要含蛋白质、多肽及一些酶类, 具有广泛的生物学活性, 可作为天然的药用资源。蛇毒可导致神经和细胞毒性, 水肿, 血小板减少症和血液凝固因子的损害, 并存在可以损害细胞完整性的 L-氨基酸氧化酶和解联蛋白, 国内外实验表明, 蛇毒对多种肿瘤等都有较好的抑制作用<sup>[5-8]</sup>。皖南蝮蛇毒抑瘤组分 I (*Aghkistrodon halys* venom antitumor component-I, AHVAC-I) 是由皖南医学院蛇毒研究所通过改良

基金项目: 安徽省高校省级自然科学重点项目(KJ2014A276)

收稿日期: 2017-02-19

作者简介: 赵容(1989-), 女, 硕士, (电话) 18531561493, (电子信箱) 510228873@qq.com;

卢林明, 男, 副教授, 硕士生导师, (电子信箱) llm7172@sina.com, 通信作者。

蛇毒分离纯化技术,从皖南产蝮蛇蛇毒中提取的一种抑癌组分,前期课题组发现 AHVAC-I 对胃癌细胞株的作用机制可能通过诱导凋亡来抑制肿瘤细胞生长增殖<sup>[8]</sup>,因线粒体凋亡途径是重要的凋亡方式之一,故本实验选择探讨线粒体凋亡途径在 AHVAC-I 对胃癌细胞株的可能作用机制。

### 1 材料与方 法

1.1 人胃癌细胞 SGC-7901 的体外培养 试剂及药品: AHVAC-I 干冻粉由皖南医学院蛇毒研究所提供。RPMI 1640 细胞培养基(凯基生物 Hyclone)、胎牛血清(杭州四季青公司)、青霉素-链霉素溶液、胰酶消化液、MTT 试剂盒(美国 Sigma 公司)、JC-1 线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential,  $\Delta\Psi_m$ ) (碧云天生物技术公司)。RPMI 培养基与胎牛血清按 9: 1 的比例配制细胞培养液(按双抗说明书建议比例滴加双抗),4℃ 冰箱保存备用,使用前于 37℃ 复温。细胞株常规培养,胰酶消化 1: 2 传代,置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 的培养箱中孵育,每隔 1~2 d 换液、传代,至对数增长期,收集细胞实验。

1.2 MTT 法筛选 AHVAC-I 对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖的影响 选择传代培养第 3~5 代生长速度快、形态好的 SGC-7901 细胞常规消化,调整细胞密度为  $1 \times 10^4$  个/mL,按每孔 200  $\mu$ L 的量均匀接种于 96 孔板中,培养箱孵育过夜。将 AHVAC-I 干冻粉溶解于培养液中,稀释、配制成各浓度 AHVAC-I (3、5、10、20、30 mg/L),设空白对照组、正常对照组,每孔设 5 复孔。培养箱内孵育 24 h 后各孔中加入 10  $\mu$ L MTT 溶液,继续培养 4 h,轻轻吸掉上清液,向每孔中加入 150  $\mu$ L DMSO,在水平振荡仪上避光振荡 10 min,酶标仪在波长 490 nm 处进行检测。计算 AHVAC-I 各个浓度作用 24 h 对细胞的增殖抑制率(inhibition ratio, IR),计算公式:  $IR = [1 - (\text{实验组 OD 值} - \text{调零孔 OD 值}) / (\text{对照孔 OD 值} - \text{调零孔 OD 值})] \times 100\%$ 。

1.3 JC-1 检测  $\Delta\Psi_m$  改变 设置正常对照组,3、10、20 mg/L AHVAC-I 培养箱内孵育 6 h。按 JC-1 说明书加入 JC-1 工作液 37℃ 避光孵育 20 min,洗净。多功能酶标仪设置检测单体时激发光为 490 nm,发射光为 530 nm;检测聚合物时激发光为 525 nm,发射光为 590 nm。计算红光/绿光的荧光强度变化。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 18.0 统计软件处理,实验数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组均数比较用单因素方差分析,组间比较采用 SNK-q 法, $P <$

0.05 为差异有统计学意义。

### 2 结果

2.1 MTT 如图 1、表 1 示,在 24 h 时实验组随 AHVAC-I 浓度的增加(3~30 mg/L)细胞增殖抑制率逐渐增加( $P < 0.05$ ),差异有统计学意义。20 mg/L 组与 30 mg/L 组对 SGC-7901 细胞的增殖抑制差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),其他组间比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),故选择 3、10、20 mg/L 作为实验浓度。

表 1 AHVAC-I 对 SGC-7901 细胞的增殖抑制( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

AHVAC-I /(mg/L)	24 h	
	OD 值	IR/%
空白组	0.155 $\pm$ 0.013	-
正常对照组	0.547 $\pm$ 0.044 <sup>a</sup>	-
3	0.463 $\pm$ 0.006 <sup>b</sup>	0.152
5	0.403 $\pm$ 0.022 <sup>c</sup>	0.263
10	0.315 $\pm$ 0.010 <sup>d</sup>	0.423
20	0.202 $\pm$ 0.034 <sup>e</sup>	0.630
30	0.163 $\pm$ 0.022 <sup>e</sup>	0.701
F	162.463	-
P	0.000	-

注:字母不同代表组间差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),字母相同代表组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

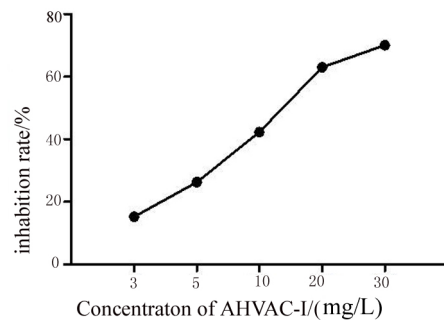
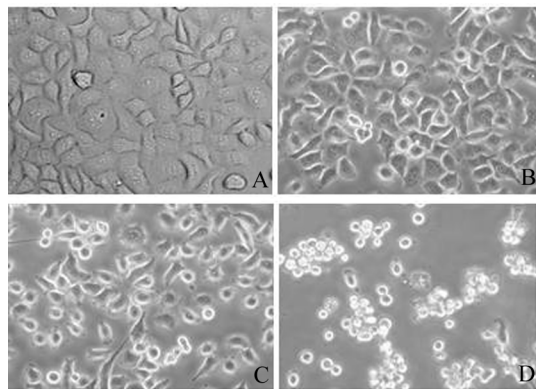


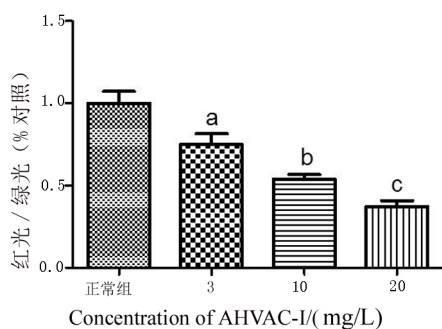
图 1 AHVAC-I 对 SGC-7901 细胞增殖抑制的影响

2.2 显微镜下细胞形态改变 正常对照组细胞贴壁生长,且贴壁较为紧密,形态为不规则多边形,核分裂像较多。经 AHVAC-I 处理 24 h 后,倒置显微镜下观察到随浓度增加细胞密度逐渐稀疏,细胞悬浮、固缩等凋亡现象逐渐增加。低浓度组的形态基本是多边形,但可以看见细胞边缘变亮,细胞的贴壁率有所下降;中浓度时可见细胞固缩变圆,体积缩小,细胞间隙变大,出现凋亡小体;而高浓度组可见细胞抱团体呈现小、圆、亮的特征,可见较多的凋亡小体。详见图 2。



A: 正常对照组; B: 5 mg/L 组; C: 10 mg/L 组; D: 20 mg/L。  
图2 AHVAC-I 处理 24 h 后 SGC-7901 细胞形态变化 (×400)

2.3 AHVAC-I 处理 6 h 后 SGC-7901 细胞  $\Delta\Psi_m$  变化 酶标仪检测分析低、中、高浓度组 JC-1<sub>聚合物</sub> / JC-1<sub>单体</sub> 依次是 (0.713 ± 0.044)、(0.492 ± 0.082)、(0.374 ± 0.033), 可以看出与对照组(1 ± 0.075) 比较, AHVAC-I 处理 6 h 后实验组的  $\Delta\Psi_m$  均降低 ( $P < 0.01$ ), 随 AHVAC-I 浓度的增加 (3 ~ 20 mg/L)  $\Delta\Psi_m$  逐渐下降, 差异有统计学意义 ( $F = 71.29, P < 0.05$ )。详见图 3。



AHVAC-I 不同浓度组与对照组比较  $P < 0.01$ ; 字母不同代表组间比较  $P < 0.05$ 。

图3 AHVAC-I 处理 6 h 后 SGC 7901 细胞  $\Delta\Psi_m$  变化

### 3 讨论

细胞凋亡是细胞程序死亡的方式, 目前主要有三条已知的途径, 即死亡受体途径, 线粒体凋亡途径以及内质网凋亡途径, 而早在 20 世纪 90 年代中期, 线粒体在凋亡途径中的中心地位就得到了认可<sup>[9]</sup>。  $\Delta\Psi_m$  的改变是线粒体凋亡途径的早期事件, 检测  $\Delta\Psi_m$  的变化可以反映 PTP 孔开放的情况。  $\Delta\Psi_m$  的下降反映 PTP 孔的异常开放, PTP 孔的异常开放引起线粒体促凋亡蛋白(如 Cyt-c、AIF 等) 释放, 激

活 Caspase-9 酶的活性形成的凋亡复合体, 进一步激活有死亡蛋白酶称号的 Caspase-3, 从而引起细胞凋亡<sup>[10-11]</sup>。 JC-1 是一种广泛用于检测  $\Delta\Psi_m$  的理想荧光探针, 本实验选用 JC-1 检测试剂盒检测 AHVAC-I 对 SGC-7901 细胞  $\Delta\Psi_m$  的影响, 发现随着 AHVAC-I 浓度的增加 (3 ~ 20 mg/L), 细胞形态学呈明显的凋亡特征,  $\Delta\Psi_m$  从 (0.713 ± 0.044) 下降到 (0.374 ± 0.033), 说明 AHVAC-I 对 SGC-7901 的促凋亡作用与  $\Delta\Psi_m$  的下降呈正相关。 而此线粒体凋亡途径的具体机制以及是否还有其他凋亡途径的参与尚需要进一步的研究探讨。

### 【参考文献】

- [1] CORSO S, GHISO E, CEPERO V, *et al.* Activation of HER family members in gastric carcinoma cells mediates resistance to MET inhibition [J]. *Molecular cancer*, 2010, 9: 121 - 134.
- [2] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013 年中国恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. *中国肿瘤*, 2017, 26(1): 1 - 7.
- [3] 郭晓冬, 韩克起, 方盛泉, 等. 紫杉醇、顺铂和替吉奥联合化疗方案治疗晚期胃癌的疗效和安全性 [J]. *肿瘤*, 2012, 32(6): 453 - 457.
- [4] CHRISTINE P. PETERSEN, JASON C. MILLS, JAMES R. GOLDENRING. Murine models of gastric corpus preneoplasia [J]. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 2017, 3(1): 11 - 26.
- [5] TÁSSIA R. COSTA, DANILO L. MENALDO, KARINA F. ZOCAL, *et al.* CR-LAAO, an L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* venom, as a potential tool for developing novel immunotherapeutic strategies against cancer [J]. *Scientific Reports*, 2017, 2(16): 1 - 12.
- [6] ZHOU B, ZHANG GB, DUAN T, *et al.* Component I from *Agkistrodon Acutus* Venom Induces Apoptosis of K562/A02 Cells by Promoting Caspase 3 Expression [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2012, 20(2): 273 - 276.
- [7] 王国光, 许敏, 张根葆, 等. 蝮蛇毒提取物诱导白血病细胞 K562 凋亡 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16(3): 516 - 519.
- [8] 卢林明, 周珏, 张根葆. 皖南蝮蛇毒抑制组分 I 对人胃癌细胞 SGC-7901 荷瘤鼠体内抑制作用的研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012, 17(5): 491 - 496.
- [9] J LOPEZ, SWG TAIT. Mitochondrial apoptosis: killing cancer using the enemy within [J]. *British Journal of Cancer*, 2015, 112(6): 957 - 962.
- [10] 赵彦超, 顾耘. 细胞凋亡通路研究进展 [J]. *现代医学*, 2013, 41(4): 285 - 288.
- [11] PETIT-PAITEL A, BRAU F, CAZARETH J, *et al.* Involvement of cytosolic and mitochondrial GSK-3 $\beta$  in mitochondrial dysfunction and neuronal cell death of MPTP/MPP-treated neurons [J]. *Plos one*, 2009, 4(5): 1 - 12.