

银杏叶提取物对胃癌SGC7901细胞增殖与凋亡的影响

陈海挺*, 胡江飏, 卢敏攀(永康市第一人民医院中医康复科, 浙江永康 321300)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3510-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.19

摘要 目的:研究银杏叶提取物(GBE)对胃癌SGC7901细胞增殖与凋亡的影响。方法:0、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ GBE培养细胞48 h后,MTT法测定细胞活力并计算抑制率。0、10、50、200 $\mu\text{g/ml}$ GBE培养细胞48 h后,流式细胞仪检测细胞周期分布及凋亡率。结果:5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ GBE培养细胞48 h后,对细胞生长有明显抑制作用,且呈剂量依赖关系。10、50、200 $\mu\text{g/ml}$ GBE培养细胞48 h后细胞凋亡率升高。结论:GBE可一定程度上抑制SGC7901细胞增殖,诱导其凋亡,以前者为主。

关键词 银杏叶提取物;胃癌SGC7901细胞;增殖;凋亡

Effects of *Ginkgo biloba* Extract on Proliferation and Apoptosis of Gastric Cancer Cell Line SGC7901

CHEN Hai-ting, HU Jiang-biao, LU Min-pan (Dept. of TCM Rehabilitation, the First People's Hospital of Yongkang City, Zhejiang Yongkang 321300, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of *Ginkgo biloba* extract (GBE) on proliferation and apoptosis of gastric cancer cell line SGC7901. METHODS: After the cells were cultured in 0, 5, 10, 20, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ GBE for 48 h, cell viability was determined by MTT method and inhibition rate was calculated. After the cells were cultured in 0, 10, 50 and 200 $\mu\text{g/ml}$ GBE for 48 h, flow cytometry was used to detect cell cycle distribution and the apoptosis rate. RESULTS: Following 48 h culture of cells in 5, 10, 20, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ GBE, the growth of cells were obviously inhibited in a dose-dependent manner. After 48 h culture of cells in 10, 50 and 200 $\mu\text{g/ml}$ GBE, the apoptosis rate was increased. CONCLUSIONS: GBE can inhibit the proliferation of SGC7901, and induces it apoptosis, the former dominated.

KEYWORDS *Ginkgo biloba* extract; Gastric cancer cell line SGC7901; Proliferation; Apoptosis

银杏树(*Ginkgo biloba*)又名公孙树,是我国独有的名贵树种。银杏种核的外层肉质皮与银杏叶含有增强免疫、抑制肿瘤细胞生长、杀灭病菌及延缓衰老的生物活性物质^[1]。临床试验研究显示,使用水提醇沉法所得银杏叶提取物(GBE)可有效抑制胃癌细胞增殖及促进其凋亡,具有较强的抗癌效果^[2]。笔者在本试验中研究GBE对胃癌SGC7901细胞增殖的抑制作用,以为其临床应用提供试验依据。

1 材料

1.1 仪器

DG5031型酶联免疫检测仪(上海珂准仪器有限公司);CO₂培养箱(上海纳诺实业有限公司);TC5300型显微镜(日本MeiJi公司);EPICS-XL型流式细胞仪(美国Beckman-Coulter公司)。

1.2 试剂

GBE(由笔者按发明专利方法制备,专利申请号:201010251050.9,纯度:75%)^[3];注射用顺铂(齐鲁制药有限公司,批号:20140308,规格:10 mg/瓶);MTT、RPMI 1640培养液(北京寰宇科创科技发展有限公司);小牛血清(广东环凯微生物科技有限公司)。

1.3 细胞

SGC7901细胞购自深圳百恩维生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

采用含25%小牛血清的培养液对SGC7901细胞进行体外培养,每4~5天进行1次传代培养^[4]。取对数生长期SGC7901

细胞,采用0.5%胰蛋白酶进行细胞消化,以磷酸盐缓冲液(PBS)进行反复冲洗后计数,随后以RPMI 1640培养液调节细胞密度至 $2 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$,置37℃、5% CO₂培养箱中培养细胞12~36 h。

2.2 细胞抑制率测定

采用MTT法测定细胞活力^[5]。取“2.1”项下细胞用RPMI 1640培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$,接种于96孔培养板中,移入培养箱中培养24 h使细胞贴壁。以0(阴性对照)、5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ GBE与50 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂培养细胞48 h。于试验终止前4 h每孔加入MTT(5 mg/ml)10 μl ,于37℃继续孵育4 h,终止培养,每孔加入10%十二烷基硫酸钠(SDS)100 μl ,37℃过夜。次日早晨从培养箱中拿出96孔培养板,振荡10 min,使结晶物充分溶解,于560 nm波长处测定光密度(OD)以代表细胞活力并计算细胞抑制率 $[\text{IR} = (1 - \text{加药 OD} / \text{阴性对照 OD}) \times 100\%]$ ^[6]。采用高倍显微镜进行细胞生长增殖状态的监测,进行数据分析和图像采集。同一质量浓度测定6次。

2.3 细胞凋亡率与周期百分比测定^[6]

取“2.1”项下细胞用RPMI 1640培养液调整细胞密度至 $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$,移入培养箱中培养24 h使细胞贴壁。以0(阴性对照)、10、50、200 $\mu\text{g/ml}$ GBE与50 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂培养细胞48 h。以离心半径为7.5 cm、1 000 r/min离心10 min收集细胞,弃上清,用PBS(pH 7.4)重复洗2遍。细胞沉淀中加入300 μl PBS(pH 7.4),制成细胞悬液,以75%乙醇溶液低温环境中进行固定。测定前将细胞沉淀用冷PBS液洗1遍,弃上清。加入含有RNase(50 mg/L)的碘化丙啶(PI, 50 mg/L)溶液0.5 ml,室温下避光放置30 min。采用流式细胞仪测定细胞凋亡率与周期百分比。同一质量浓度测定6次。

* 主治中医师。研究方向:中药临床。E-mail: chen9hait@126.com

2.4 统计学方法

采用SPSS 15.0软件处理试验数据。各组数据均为计量资料,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 χ^2 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞抑制率测定结果

与阴性对照比较,5、10、20、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ GBE 与 50 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂培养细胞 48 h 对细胞生长具有明显抑制作用($P < 0.01$)。随 GBE 质量浓度升高,细胞抑制率升高,半数抑制浓度(IC_{50})为 8 $\mu\text{g/ml}$ 。细胞抑制率测定结果见表 1;细胞生长情况见图 1(GBE 仅以 10、50、200 $\mu\text{g/ml}$ 为代表)。

表 1 细胞抑制率测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Determination results of inhibition rates in cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

药物	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	OD	抑制率, %
阴性对照	0	0.835 \pm 0.048	
顺铂	50	0.391 \pm 0.039*	54.83 \pm 3.68
GBE	5	0.665 \pm 0.026*	21.59 \pm 3.02
	10	0.554 \pm 0.027*	35.15 \pm 2.89
	20	0.482 \pm 0.029*	43.71 \pm 2.76
	50	0.457 \pm 0.038*	46.82 \pm 3.51
	100	0.436 \pm 0.037*	49.32 \pm 3.77
	200	0.404 \pm 0.038*	53.24 \pm 2.64

注:与阴性对照比较, * $P < 0.01$

Note: vs. negative control, * $P < 0.01$

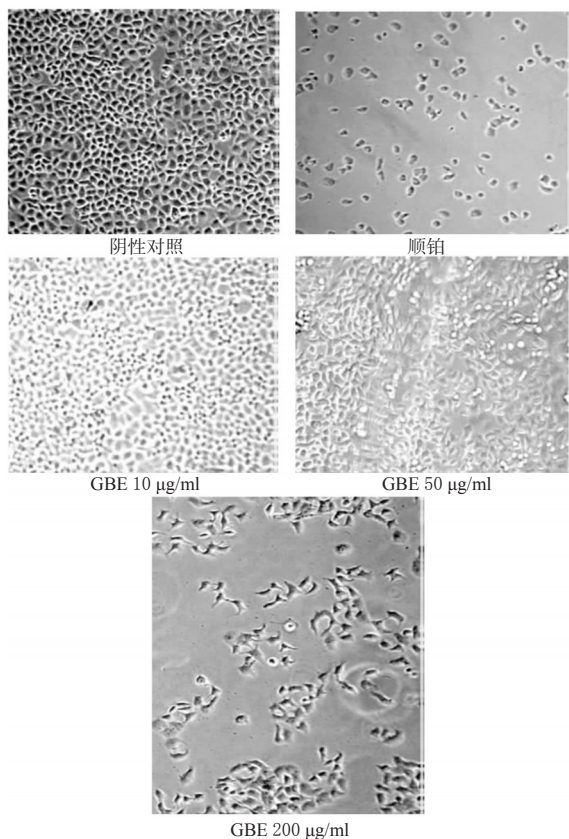


图 1 细胞生长情况(HE, $\times 200$)

Fig 1 Growth of cells(HE, $\times 200$)

3.2 细胞凋亡和细胞周期测定结果

与阴性对照比较,10、50、200 $\mu\text{g/ml}$ GBE 与 50 $\mu\text{g/ml}$ 顺铂

培养细胞 48 h 后,细胞凋亡率升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);10、50、200 $\mu\text{g/ml}$ GBE 培养细胞 48 h 后 G_0/G_1 期和 S 期占比差异无统计学意义($P > 0.05$)。这提示 SGC7901 细胞凋亡随 GBE 质量浓度的升高而加重,但 GBE 对 SGC7901 细胞周期的作用不明显。细胞周期分布和凋亡率测定结果见表 2。

表 2 细胞周期分布和凋亡率测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Determination results of cell cycle and apoptosis rates in all groups ($\bar{x} \pm s, n=6$)

药物	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	$G_0/G_1, \%$	S, %	$G_2/M, \%$	凋亡率, %
阴性对照	0	55.37 \pm 4.63	23.90 \pm 2.87	20.73 \pm 2.15	7.46 \pm 2.81
顺铂	50	51.99 \pm 3.85	37.66 \pm 2.57	10.35 \pm 1.05	22.38 \pm 2.06*
GBE	10	57.07 \pm 3.24	20.12 \pm 2.64	22.81 \pm 2.37	17.74 \pm 2.33*
	50	61.68 \pm 3.52	17.90 \pm 2.43	20.42 \pm 2.64	21.56 \pm 2.67*
	200	59.38 \pm 4.08	18.58 \pm 2.53	22.04 \pm 3.27	33.31 \pm 3.29*

注:与阴性对照比较, * $P < 0.01$

Note: vs. negative control, * $P < 0.01$

4 讨论

胃癌是一种常见恶性病症,近年来其发病率和病死率日益增加。肿瘤的发生、发展不仅与细胞分化异常有关,还与其凋亡减少有关。针对其侵袭机制,目前临床中大多数抗肿瘤药物均具有抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡的作用。近年来随着药物作用机制研究的逐渐深入,以 GBE 为代表的一系列新型药物在胃癌患者的治疗中效果显著。GBE 是来源于银杏叶分离纯化的一种生物活性物质,近年来已被用于心、脑血管疾病和恶性肿瘤的预防与治疗,具有生物利用度好、药理作用广泛、疗效显著、毒性弱、代谢完全等优点^[7]。研究表明,GBE 抑制人胃癌 SGC7901 细胞增殖,可能与抑制 SGC7901 细胞中端粒酶的表达有关^[8-9]。

本研究从增殖与凋亡作用两方面进行 GBE 对 SGC7901 细胞的影响研究。各质量浓度 GBE 对 SGC7901 细胞增殖均存在一定程度的抑制,且随着 GBE 质量浓度上升,抑制作用逐渐增强。SGC7901 细胞凋亡率随 GBE 质量浓度升高而上升,但 GBE 对 SGC7901 细胞的细胞周期作用不明显($P > 0.05$)。本研究表明,GBE 抗肿瘤机制主要在于明显抑制 SGC7901 细胞增殖,而一定程度上亦可诱导 SGC7901 细胞凋亡,但以前的效果为主。

综上所述,GBE 有利于抑制 SGC7901 细胞增殖并促进其凋亡,但还需作进一步深入研究。

参考文献

- [1] 吴倩,许爱华,杨茜,等.银杏外种皮提取物有效部位 GBEE-2 对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其通路的影响[J]. 中药新药与临床药理,2011,22(3):270.
- [2] 毛业波,刘诗权,谭林,等. EGb761 对顺铂和足叶乙苷诱导的胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的增敏作用[J]. 世界华人消化杂志,2013,21(31):3330.
- [3] 刘乐习.银杏叶提取物联合治疗消化性溃疡的临床研究[J]. 中国医学创新,2012,9(23):27.
- [4] 刘金娟,杨成流.鱼腥草地下茎提取物诱导胃癌细胞 SGC-7901 凋亡机制的研究[J]. 中国药理学通报,2014,30(2):257.
- [5] 王庆庆,欧阳臻,赵明,等.茅苍术提取物对胃癌 BGC-823 和 SGC-7901 细胞增殖抑制作用研究[J]. 中药新药与临床药理,2012,23(2):152.

高山辣根菜水提物的止咳与抗炎作用研究

贺拥军^{1*}, 泽仁拉姆², 张勇仓², 段亚平², 袁瑞瑛², 王聚乐^{2#}(1. 西藏民族学院, 陕西 咸阳 712082; 2. 西藏大学医学院, 拉萨 850000)

中图分类号 R285;R974 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)25-3512-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.25.20

摘要 目的: 研究高山辣根菜水提物的止咳与抗炎作用。方法: 实验分为模型组、阳性对照[可待因 30(小鼠)、18.38(豚鼠) mg/kg; 吡哌美辛 20(小鼠)、15(大鼠) mg/kg]组、高山辣根菜低、中、高剂量[小鼠予以 2.0、4.0、8.0 g(生药)/kg; 豚鼠予以 1.2、2.4、4.8 g(生药)/kg; 大鼠予以 1.4、2.8、5.6 g(生药)/kg]组, 每组 10 只, 连续 ig 给药 4 d。分别采用浓氨水喷雾法和二氧化硫刺激法致咳考察小鼠的咳嗽潜伏期和咳嗽次数, 枸橼酸喷雾法致咳考察豚鼠的咳嗽潜伏期和咳嗽次数, 耳肿胀法考察二甲苯诱发的小鼠耳片肿胀度, 足爪肿胀法考察角叉菜胶诱发的大鼠足爪肿胀度。结果: 与模型组比较, 阳性对照组和高山辣根菜中、高剂量组小鼠浓氨水喷雾和二氧化硫刺激诱发咳嗽潜伏期延长、咳嗽次数减少, 高山辣根菜中、高剂量组豚鼠咳嗽潜伏期延长、咳嗽次数减少; 高山辣根菜中、高剂量组小鼠由二甲苯诱发的耳片肿胀度减小; 高山辣根菜中、高剂量组大鼠由角叉菜胶诱发的足爪肿胀度减小; 以上差异均具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论: 高山辣根菜水提物对实验动物具有止咳、抗炎作用。

关键词 高山辣根菜; 水提物; 止咳作用; 抗炎作用; 大鼠; 豚鼠; 小鼠

Study on Anti-tussive and Anti-inflammatory Effects of Aqueous Extract of *Pegaeophyti Radix Et Rhizoma*

HE Yong-jun¹, Tsering Lhamo², ZHANG Yong-cang², DUAN Ya-ping², YUAN Rui-ying², WANG Ju-le²(1. Xizang University for Nationalities, Shaanxi Xianyang 712082, China; 2. Medical College of Tibet University, Lhasa 850000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the anti-tussive and anti-inflammatory effects of aqueous extract of *Pegaeophyti Radix Et Rhizoma* (*P. Radix Et Rhizoma*). METHODS: In the experiment, there were a model group, a positive control group [30 mg/kg codeine for mice, 18.38 mg/kg codeine for guinea pigs, 20 mg/kg indometacin for mice and 15 mg/kg indometacin for rats] and *P. Radix Et Rhizoma* low-dose, medium-dose and high-dose groups [2.0, 4.0 and 8.0 g (medicinal materials)/kg for mice; 1.2, 2.4 and 4.8 g (medicinal materials)/kg for guinea pigs; 1.4, 2.8 and 5.6 g (medicinal materials)/kg for rats], with 10 animals in each group. The above-mentioned animals were given corresponding drug ig for 4 consecutive days, and then strong ammonia spraying method and sulfur dioxide stimulation method were employed to induce cough in mice and citric acid spraying method to induce cough in guinea pigs to observe the incubation period and times of cough, auricular swelling method to observe xylene-induced auricular swelling in mice and pedal swelling method to observe carrageenin-induced pedal swelling in rats. RESULTS: Compared to the model group, Aqueous extract of *P. Radix Et Rhizoma* could prolong the incubation period and reduce times of cough induced by strong ammonia spraying and sulfur dioxide stimulation in mice of positive control group and *P. Radix Et Rhizoma* medium-dose and high-dose groups; it could prolong the incubation period of and reduce times of cough induced by citric acid spraying in guinea pigs of positive control group and *P. Radix Et Rhizoma* medium-dose and high-dose groups; it could alleviate xylene-induced auricular swelling in mice of positive control group and *P. Radix Et Rhizoma* medium-dose and high-dose groups; it could alleviate carrageenin-induced pedal swelling in rats of positive control group and *P. Radix Et Rhizoma* medium-dose and high-dose groups. There were statistically significances ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). CONCLUSIONS: Aqueous extract of *P. Radix Et Rhizoma* has anti-tussive and anti-inflammatory effects on the experimental animals.

KEYWORDS *Pegaeophyti Radix Et Rhizoma*; Aqueous extract; Anti-tussive effect; Anti-inflammatory effect; Rat; Guinea pig; Mouse

[6] 马哲, 薛惠荣, 黄秀英. 银杏叶提取物对 SKOV3 种植性卵巢癌 Bcl-2、Bax 的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(11): 3 186.

[7] 涂龙霞, 吴亚欧, 张林杰, 等. TRAIL 联合紫杉醇诱导胃腺癌 SGC-7901 细胞凋亡作用研究[J]. 中国免疫学杂志,

2012, 28(4): 308.

[8] 姜佳佳, 孙文广, 屠越华, 等. γ -生育三烯酚与 5-氟尿嘧啶联用对人胃癌细胞 SGC-7901 的增殖抑制作用[J]. 医学研究杂志, 2015, 44(2): 59.

[9] 彭亮, 赵鹏, 李彬. 银杏叶提取物对大鼠血脂调节作用的研究[J]. 应用预防医学, 2012, 18(4): 249.

(收稿日期: 2015-04-09 修回日期: 2015-05-08)

(编辑: 张 静)

* 副教授。研究方向: 疾病预防与干预。电话: 029-33755950

通信作者: 教授。研究方向: 藏药作用机制与毒理学。电话:

0891-6827681