

- 33 Pearl-Yafe M, Halperin D, Scheuerman O, Fabian I. The p38 pathway partially mediates caspase-3 activation induced by reactive oxygen species in Fanconi anemia C cells. *Biochem Pharmacol* 2004;67:539-546
- 34 Schmidt C, Peng B, Li Z, Sclabas GM, Fujioka S, Niu J, Schmidt-Supprian M, Evans DB, Abbruzzese JL, Chiao PJ. Mechanisms of proinflammatory cytokine-induced biphasic NF-kappaB activation. *Mol Cell* 2003;12:1287-1300
- 35 Hsu YC, Chiu YT, Lee CY, Lin YL, Huang YT. Increases in fibrosis-related gene transcripts in livers of dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2004;11:408-417
- 36 Schierano G, Bellone G, Manzella C, Preti G, Emanuelli G. In vitro effect of transforming growth factor-beta on adhesion molecule expression by human gingival fibroblasts cultured in the presence of a titanium abutment. *J Periodontol* 2001;72:1658-1665

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2004 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对 IGF- I、IGF- II 表达的影响

何必立, 吕 宾, 徐 毅, 苗 青, 范一宏

何必立, 浙江省台州医院消化科 浙江省临海市 317000
吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏, 浙江省中医院消化科 浙江省杭州市 310006
项目负责人: 吕宾, 310006, 浙江省杭州市, 浙江省中医院消化科.
lvbin@medmail.com.cn
电话: 0571-87032028 传真: 0571-87077785
收稿日期: 2004-08-30 接受日期: 2004-09-25

摘要

目的:探讨温郁金对人胃癌细胞SGC-7901的抑制作用及其作用机制。

方法:采用超临界二氧化碳萃取法提取温郁金挥发油成分。以氟尿嘧啶(5-Fu)为阳性对照药物, 采用MTT法, 测定温郁金提取物对体外培养胃癌细胞SGC-7901增生的影响; 应用放射免疫测定法分析温郁金提取物对细胞培养液中IGF- I、IGF- II 浓度水平的影响。

结果:超临界二氧化碳萃取法提取温郁金获得温郁金提取物1和提取物2。温郁金提取物1、提取物2对胃癌细胞的生长有显著的抑制作用(均 $P < 0.01$), 且抑制率随药物浓度的升高而增高, 存在明显的量效关系。200 mg/L浓度的温郁金提取物1和提取物2对胃癌细胞生长的抑制率分别为64.44%、60.80%, 在这个浓度水平, 其抑制肿瘤细胞生长作用与阳性对照药物5-Fu效果相当。温郁金提取物1、提取物2能降低胃癌细胞培养液中IGF- I、IGF- II 的浓度水平(均 $P < 0.05$)。

结论:温郁金提取物对人胃癌细胞SGC-7901生长有抑制作用, 其抑癌作用的机制可能与抑制胃癌细胞分泌IGF- I、IGF- II 有关。

何必立, 吕宾, 徐毅, 苗青, 范一宏. 温郁金对胃癌细胞的抑制作用及其对IGF- I、IGF- II 表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(11):2761-2763
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/2761.asp>

0 引言

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)同肿瘤的关系近年来受到了广泛的关注^[1]。温郁金具有行气破血、消积止痛等作用, 是抗肿瘤复方中常见的药物, 前期在其抗肿瘤作用方面已有报道^[2], 但有关其对胰岛素样生长因子的影响研究鲜见。我们研究温郁金提取物对体外培养的胃癌细胞株SGC-7901的抑制作用, 并从此对胰岛素样生长因子 I (IGF- I)、胰岛素样生长因子 II (IGF- II)分泌的影响来分析其作用的机制。

1 材料和方法

1.1 材料 胃腺癌细胞(SGC-7901)株(购自中科院上海细胞所), RPMI-1640 培养基为 Gibco 公司产品, 胎牛血清购自杭州四季青生物工程公司, 噻唑蓝(MTT)、胰蛋白酶为上海生物工程公司产品, 氟尿嘧啶(5-Fu)为上海旭东海普药业有限公司产品, IGF- I 放免试剂盒购自天津九鼎医学生物工程有限公司, IGF- II 放免试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放免所, 二甲基亚砜为浙江杭州双林化工试剂厂产品, 温郁金购自浙江省中医院中药房, HA121-50-01型超临界萃取装置为江苏南通华安超临界实业公司产品, CO₂ 细胞培养箱为美国 Thermo Forma 公司产品, ELX800 酶标仪为美国 Bio-Tek 公司生产, SN-682 放射免疫γ计数器由中科院上海原子核研究所日环仪器厂生产。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SGC-7901 细胞常规培养于含 100 mL/L 灭活胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置 37 °C、50 mL/L 的 CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养。

1.2.2 温郁金提取物的制备 采用超临界CO₂流体萃取技术提取温郁金有效成分。萃取温度 40 ℃, 压力 3×10^7 Pa, 时间为 120 min/循环, CO₂ 流量为 50 kg/h, 分离 1 的反应条件为: 压力 1.25×10^7 Pa, 温度 50 ℃; 分离 2 的反应条件为压力 5.5×10^6 Pa, 温度 40 ℃。获温郁金提取物 1、温郁金提取物 2 后 4 ℃ 避光冷藏保存。药物在使用前新鲜配制, 先用适量 DMSO 溶解, 再以 RPMI-1640 培养液进行稀释, 使其浓度达到用药需求。

1.2.3 细胞增生抑制试验(MTT 还原法) 对数生长期细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养液调整细胞悬液浓度为 1.0×10^7 /L 接种细胞于 96 孔培养板, 每孔 200 μ L, 置 37 ℃、50 mL/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养; 24 h 后, 更换不含胎牛血清的 1640 培养液再培养 24 h, 使细胞同步化; 换上含浓度依次为 25、50、100、200 mg/L 温郁金提取物 1、提取物 2 的完全培养液, 阴性对照组为不含温郁金的培养液, 空白对照组不含细胞, 阳性对照组加入含浓度依次为 25、50、100、200 mg/L 的 5-Fu 的完全培养液, 每个药物浓度设 6 个复孔; 分别继续培养 48 h; 每孔加入 5 g/L MTT 溶液 20 μ L, 37 ℃ 孵育 4 h, 再加入 150 μ L DMSO, 上微量振荡器振荡 10 min, 立即用酶标仪测定 490 nm 波长吸光度值(A)。

抑制率(%) = [(阴性对照 A - 空白 A) - (实验 A - 空白 A)] / (阴性对照 A - 空白 A) \times 100%

1.2.4 条件培养液中 IGF- I、IGF- II 含量的测定 对数生长期细胞用含 100 mL/L 胎牛血清的 1640 培养液调整细胞悬液浓度为 5.0×10^7 /L, 接种细胞于 24 孔培养板中, 每孔 1 000 μ L, 37 ℃、50 mL/L CO₂ 及饱和湿度的培养箱内培养; 24 h 后, 更换不含胎牛血清的 1640 培养液再培养 24 h, 使细胞同步化; 换上含浓度依次为 25、50、100 mg/L 温郁金提取物 1、提取物 2 的完全培养基, 阴性对照组细胞更换为 1 000 μ L 完全培养基, 分别继续培养 48 h, 收集各处理组培养液。按照 IGF- I、IGF- II 放免试剂盒的说明步骤测定培养液中 IGF- I 和 IGF- II 浓度, 由自动 γ 计数器预先编制的程序(以 B-NSB/B0-NSB 计算标准及待测样品结合百分率, 半对数绘制标准曲线)直接给出有关参数、标准曲线和样品浓度。

统计学处理 结果以均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 组间比较采用方差分析, 量效关系采用相关与回归分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 温郁金对SGC-7901细胞增值的影响 温郁金提取物 1、提取物 2 随剂量的增加, 其对胃癌细胞的抑制率也增加(图 1, 表 1), 有显著相关性(P 均 < 0.01)。200 mg/L 的温郁金提取物 1、提取物 2 和对照药物 5-Fu 对胃癌细胞株生长的抑制作用无显著差异($P > 0.05$), 其抑制作用相当。

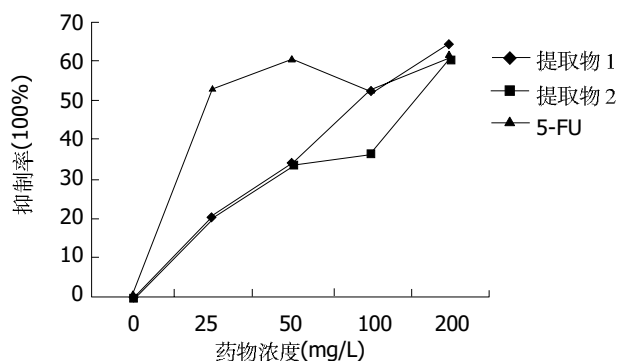


图 1 不同浓度药物对胃癌细胞生长的影响。

表 1 不同药物对胃癌细胞生长的影响

处理组	药物浓度(mg/L)	n	A 值	细胞抑制率(%)
提取物 1	200	6	0.2752 \pm 0.0242 ^b	64.44
提取物 1	100	6	0.3547 \pm 0.0332 ^b	51.59
提取物 1	50	6	0.4697 \pm 0.0270 ^b	33.00
提取物 1	25	6	0.5492 \pm 0.0278 ^b	20.15
提取物 2	200	6	0.2977 \pm 0.0075 ^d	60.80
提取物 2	100	6	0.4493 \pm 0.0291 ^d	36.29
提取物 2	50	6	0.4678 \pm 0.0111 ^d	33.30
提取物 2	25	6	0.5582 \pm 0.0330 ^d	18.70
5-Fu 对照组	200	6	0.2920 \pm 0.0146 ^f	61.72
5-Fu 对照组	100	6	0.3492 \pm 0.0210 ^f	52.48
5-Fu 对照组	50	6	0.2978 \pm 0.0270 ^f	60.78
5-Fu 对照组	25	6	0.3448 \pm 0.0274 ^f	53.18
阴性对照组	0	6	0.6738 \pm 0.0559	0

^b $P < 0.01$, ^d $P < 0.01$, ^f $P < 0.01$ vs 阴性对照组。

2.2 温郁金对胃癌细胞培养液中 IGF- I、IGF- II 含量的影响 和对照组相比, 25、50、100 mg/L 浓度的温郁金提取物 1、提取物 2 对胃癌细胞培养液中 IGF- I 及 IGF- II 的含量均有较明显的下调作用 (P 均 < 0.01 , 表 2)。

表 2 温郁金对胃癌细胞培养液中 IGF- I、IGF- II 浓度的影响

处理组	药物浓度(mg/L)	n	IGF- I 含量(ug/L)	IGF- II 含量(ug/L)
对照组	0	4	28.2160 \pm 2.0554	0.1818 \pm 0.0504
提取物 1	25	4	13.5133 \pm 3.1200 ^b	0.1223 \pm 0.0219 ^e
提取物 1	50	4	10.5938 \pm 4.2190 ^b	0.1058 \pm 0.0067 ^f
提取物 1	100	4	7.6120 \pm 3.6616 ^b	0.0815 \pm 0.0211 ^f
提取物 2	25	4	20.0393 \pm 2.6845 ^c	0.1253 \pm 0.0192 ^b
提取物 2	50	4	15.6623 \pm 3.4037 ^d	0.1168 \pm 0.0122 ^b
提取物 2	100	4	12.7520 \pm 2.7613 ^d	0.0803 \pm 0.0095 ⁱ

^b $P < 0.01$, ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$, ^e $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$, ^g $P < 0.05$, ^h $P < 0.01$ vs 对照组。

3 讨论

超临界CO₂萃取技术是近20 a来在国际上取得迅速发展的化工分离技术, 在中药有效成分提取方面有诸多优

势^[3]. 我们运用超临界 CO₂ 萃取技术, 从温郁金中提取出其药用成分, 根据提取条件不同, 获得提取物 1、提取物 2, 所设定萃取条件大致相当于以乙醇和乙醚萃取所得, 提取物 1 主要含姜黄素, 而提取物 2 主要为挥发油成分. MTT 结果显示, 和阴性对照组比较, 浓度范围为 25–200 mg/L 的温郁金提取物 1、提取物 2 对 SGC-7901 均有显著的抑制作用 (P 均 < 0.05), 且有明显的量效关系.

以往温郁金中抗肿瘤成分研究较多的有两大类成分, 即姜黄素和挥发油. 研究者从直接细胞毒作用, 诱导细胞凋亡, 诱导肿瘤细胞分化等多个角度进行了其抗肿瘤作用机制的探讨^[2,4], 但针对细胞生长因子的研究少见.

胰岛素样生长因子系统 (IGFs) 由胰岛素样生长因子 I (IGF-I)、胰岛素样生长因子 II (IGF-II)、他们相应的受体 IGF-IR、IGF-IIR 及其 6 种胰岛素样生长因子相关蛋白 (IGFBPs) 组成. IGF-I 对各种细胞活动既有即刻作用又有远期影响, 而这些作用的发挥依赖于其和 IGF-IR 的结合. IGF-I 通过刺激细胞糖原和蛋白合成以及增强细胞摄取氨基酸和葡萄糖的能力而直接促进细胞蛋白质和碳水化合物代谢^[5]. IGF-I 也对细胞增生、分化、凋亡有间接的影响. 对很多细胞系而言, IGF-I 是强有力的有丝分裂促进剂, 他可通过增加 DNA 合成、上调细胞周期蛋白 D1 表达, 从而加速细胞从 G1 期向 S 期过渡^[6-7]. 另外, IGF-I 又通过上调 Bcl 蛋白表达, 下调 Bax 蛋白表达而提高 Bcl/Bax 二聚体含量, 这一变化可封闭细胞凋亡程序的启动^[8-9]. 同样, IGF-II 也具有促有丝分裂、抗细胞凋亡、促进细胞增生和分化作用.

鉴于 IGFs 在细胞增生、分化、凋亡、突变等过程中起着重要的作用, 最近数十年人们对 IGFs 在肿瘤细胞生长和发展中的作用进行了大量的研究, 结果表明: IGFs 与多种肿瘤包括白血病细胞、肉瘤、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、食管癌、肠癌、肝癌、胰腺癌、肾癌等各种肿瘤的发生发展关系密切^[10-11]. IGFs 和胃癌的关系最初在体外细胞实验中被观察到, Thompson *et al*^[12] 在 1990 年报道在人胃癌细胞系 LIM-1839 中存在 IGF-II 的自分泌. Chung and Antoniades^[13] 于 1992 年用原位杂交法在 3 个人胃癌标本中检测到 IGF-I mRNA 的表达.

IGFs 和 IGF-IR 的结合激活酪氨酸激酶的活性, 从而促发一系列分子介导的信号转导级联反应. 目前已经清楚的信号转导途径有两个, 其一途径为激活 Ras 蛋白、Raf 蛋白和有丝分裂活化的蛋白激酶. 另一途径为激活三磷酸腺苷激酶而发挥作用^[5]. 除和 IGFs 结合而调节细胞有丝分裂和凋亡过程外, IGF-IR 还和细胞转化相关. 体外实验表明从细胞膜表明除去 IGF-IR 基因后, 可抑制细胞的转化^[14]. IGF-IIR 可通过和 IGF-II 结合而降低 IGF-II 的生物学活性.

鉴于 IGF 在肿瘤发生发展中的作用意义, 有学者采用阻断 IGF 的方法对肿瘤进行治疗, 方法有两种: 第

一, 阻断 IGF 的合成或分泌; 第二, 阻断 IGF 与受体的结合, 应用这些方法, 已取得了初步的效果^[15].

为了探讨温郁金提取物是否抑制胃癌细胞分泌 IGF, 我们采用放射免疫测定法检测不同浓度温郁金提取物 1、提取物 2 对胃癌细胞培养液中 IGF-I、IGF-II 含量的影响. 结果提示, 25、50、100 mg/L 温郁金两种提取物对胃癌细胞培养液中 IGF-I、IGF-II 含量均有显著的下调 (P 均 < 0.05), 提示温郁金可能通过影响胃癌细胞 IGF 的分泌起到抗肿瘤作用的.

温郁金对肿瘤细胞的调控机制复杂, 我们的研究仅提示温郁金提取物对体外培养的 SGC-7901 具有抑制其增生作用; 抑制胃癌细胞分泌 IGF-I 和 IGF-II 可能是其作用机制的一方面, 温郁金对胃癌细胞 IGF-I 和 IGF-II 基因表达及其受体的影响有待于进一步深入研究.

另外, 我们的研究中提取物化学成分不明确, 有待于进一步分离纯化, 但温郁金资源丰富, 在胃癌的化学防治中值得深入研究.

4 参考文献

- 1 Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 2000;21:215-244
- 2 王琰, 王慕邹. 姜黄属常用中药的研究进展. *中国药学杂志* 2001; 36:80-84
- 3 毛中兴, 赖炳森. 超临界二氧化碳技术在中药有效成分萃取中的应用. *北京中医* 2001;1:34-35
- 4 李国栋, 许付, 沈爱军. 莪术油的研究进展. *中国药学杂志* 2002; 37:806-809
- 5 Jones JL, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 1995;16:3-34
- 6 Furlanetto RW, Harwell SE, Frick KK. Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells *in vitro*. *Mol Endocrinol* 1994;8:510-517
- 7 Dufourny B, Alblas J, van Teeffelen HA, van Schaik FM, van der Burg B, Steenbergh PH, Sussenbach JS. Mitogenic signaling of insulin-like growth factor I in MCF-7 human breast cancer cells requires phosphatidylinositol 3-kinase and is independent of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 1997;272:31163-31171
- 8 Parrizas M, LeRoith D. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology* 1997;138:1355-1358
- 9 Wang L, Ma W, Markovich R, Lee WL, Wang PH. Insulin-like growth factor I modulates induction of apoptotic signaling in H9C2 cardiac muscle cells. *Endocrinology* 1998;139:1354-1360
- 10 LeRoith D, Baserga R, Helman L, Roberts CT Jr. Insulin-like growth factors and cancer. *Ann Intern Med* 1995;122:54-59
- 11 Macaulay VM. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer* 1992;65:311-320
- 12 Thompson MA, Cox AJ, Whitehead RH, Jonas HA. Autocrine regulation of human tumor cell proliferation by insulin-like growth factor-II: an *in vitro* model. *Endocrinology* 1990;126:3033-3042
- 13 Chung CK, Antoniades HN. Expression of c-sis platelet derived growth factor-B, insulin-like growth factor-I and transforming growth factor messenger RNA and their respective receptor messenger RNA in primary human gastric carcinomas: *in vivo* studies with *in situ* hybridization and Immunocytochemistry. *Cancer Res* 1992;52:3453-3459
- 14 Oates AJ, Schumaker LM, Jenkins SB, Pearce AA, DaCosta SA, Arun B, Ellis MJ. The mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor 2 receptor (M6P/IGF2R), a putative breast tumor suppressor gene. *Breast Cancer Res Treat* 1998;47:269-281
- 15 Huynh HT, Tetenes E, Wallace L, Pollak M. *In vivo* inhibition of insulin-like growth factor 1 gene expression by amoxifen. *Cancer Res* 1993;53:1727-1730