

白藜芦醇对胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF 表达的影响

曹文涛 廖爱军 曾斌 胡光胜 石巍

(南华大学第一附属医院消化内科 湖南 衡阳 421001)

摘要 目的:探讨白藜芦醇(resveratrol, Res)在体外对胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF 表达的影响。方法:体外培养胃癌 SGC - 7901 细胞,MTT 法检测白藜芦醇对 SGC - 7901 细胞的增殖抑制作用,RT - PCR 方法检测 VEGF mRNA 表达,免疫细胞化学检测 VEGF 蛋白的表达。结果:白藜芦醇呈时间剂量性抑制胃癌细胞 SGC7901 的增殖;胃癌 SGC - 7901 细胞高水平表达 VEGF,白藜芦醇能显著降低胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF mRNA 和蛋白表达。结论:白藜芦醇可以下调胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF 的表达,抑制胃癌细胞的增殖。

关键词:胃肿瘤;血管内皮生长因子;白藜芦醇

中图分类号:R285, R735.2 **文献标识码:**A

Effects of Resveratrol on the expression of VEGF in human gastric cancer SGC - 7901 cells

CAO Wen - tao, LIAO Ai - jun, ZENG Bin, HU Guang - sheng, SHI Wei

(Department of Gastroenterology of The First Affiliated Hospital of Nanhua University; Hengyang Hunan 421001 China)

ABSTRACT Objective: To investigate whether resveratrol could inhibit the vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of human gastric cancer SGC - 7901 cells in vitro. **Methods:** Human gastric cancer SGC - 7901 cell line was cultured in vitro, proliferation inhibitory effect was tested by MTT assay; VEGF mRNA was measured quantitatively by RT - PCR method, Expression of VEGF protein in gastric cancer cells were measured by immunohistochemistry. **Results:** Resveratrol could inhibit the proliferation of SGC - 7901 cells, with dose and time - related effects; VEGF mRNA expressed in high level in SGC - 7901 cells, in which, resveratrol significantly decreased the expression of VEGF mRNA and protein. **Conclusion:** Resveratrol could inhibit proliferation and lower the expression of VEGF in human gastric cancer SGC - 7901 cell line in vitro.

Key words: Gastric cancer; Vascular endothelial growth factor(VEGF); Resveratrol

白藜芦醇(resveratrol, Res)广泛地存在于葡萄、花生和多种药用植物中的一种多酚类化合物,目前至少已经在 21 个科、31 个属的 72 种植物中发现了白藜芦醇。早期的研究发现,白藜芦醇具有保护心血管、调节血脂、抗病原微生物、护肝等多种生物学作用。自从 Jang 等^[1]于 1997 年系统地报道了白藜芦醇的抗肿瘤作用后,迄今已发现白藜芦醇能通过多种途径抑制肿瘤细胞的起始、促进、发展三个阶段,但其作用机制仍未明确。本实验初步研究白藜芦醇体外对胃癌细胞 SGC7901 的增殖抑制及 VEGF 的表达下调作用,为胃癌的临床治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 药品和主要试剂

白藜芦醇(Res)购自 Sigma 公司,用 DMSO 配成 10mmol/L - 20℃ 贮存备用。甲氮甲唑蓝(MTT)为 Sigma 产品, RPMI1640 培养基,美国 GIBCO 公司产品,新生牛血清为杭州四季青公司

产品。RNA 提取试剂盒、MMLV 逆转录试剂盒、PCR 试剂盒均购自上海生工生物公司。VEGF 小鼠单克隆抗体为 Santa cruz 公司产品,SP 试剂盒及 DAB 试剂均购自北京中杉试剂有限公司。

1.2 细胞培养

人胃癌 SGC - 7901 细胞株购自中科院上海细胞所,培养于含 100mL/L 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中,加入 1×10^5 u/L 青霉素, 100mg/L 链霉素,置于孵箱,在 37℃, 50mL/L CO₂ 饱和湿度的条件下培养,实验时取对数生长期细胞。

1.3 MTT 检测白藜芦醇对胃癌细胞增殖的影响

收集细胞,将细胞重新接种至 96 孔板中,使其每孔细胞数为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ 个,分别以终浓度为 25、50、75 和 100μmol/L Res 的 RPMI 1640 培养液 100μL 作用细胞,对照组和调零组加 100μL 完全培养基,每组设 6 个平行孔,分别再培养 24、48、72 小时后,加 5g/L MTT 20μL/孔(调零组除外),再培养 4 小时,然后吸去上清液,每孔加入 150μL DMSO 溶解样品,用酶联免疫检测仪测定各孔 490 nm 吸光度 A 值。取 6 孔 A 值的均数按公式:细胞生长抑制率(IR): $IR(\%) = (1 - \text{试验孔 A 均值} / \text{对照孔均值}) \times 100\%$ 。

1.4 半定量 RT - PCR 检测 VEGF mRNA 的表达

采用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,获得的 RNA 按 MMLV 第一链 cDNA 合成试剂盒说明书合成 cDNA。VEGF 的上游引物为:5' - CTA CCT CCA CCA TGC CAA GT - 3' ;下游引物为:

作者简介:曹文涛,男,1979 年出生,湖南祁阳县人,硕士研究生
研究方向为:胃癌的发病机制和防治。

Email:20040327caowentao@163.com 电话:13762448379

通讯作者:石巍,男,(1959 -),教授,主任医师,硕士研究生导师,
研究方向为消化道肿瘤的发病机制和防治。Email:sw1959@sina.com

(收稿日期:2006 - 07 - 24 接受日期:2006 - 08 - 30)

5' - ATG TTG GAC TCC TCA GTG GG - 3';扩增产物为 258 个碱基对。内参 GAPDH 上游引物为: 5' - GTGGACATCCG-CAAAGAC - 3';下游引物为: 5' - TCAACGCAATGTGGAAAG - 3';扩增产物为 697 个碱基对。PCR 引物由上海生物工程技术有限公司合成。PCR 的反应条件为(1)94℃, 1min; (2)94℃, 30s; (3)59℃, 30s; (4)72℃, 1min; (5)72℃, 10min 延伸, 共 30 个循环。扩增产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 采用凝胶成像系统测定各组 VEGF/GAPDH 的光密度比值表示 VEGF mRNA 的相对表达。

1.5 免疫细胞化学法检测 VEGF 蛋白表达

将 SGC - 7901 细胞 0.25% 胰酶消化后稀释为 1×10^5 个/ml, 每孔 5ml 接种于 6 孔培养板, 每培养孔放置直径 18mm 的

无菌盖玻片, 置 37℃, 5% CO₂ 及饱和湿度条件下, 待 24h 细胞贴壁生长后, 吸除培养液, 分别加入终浓度为 50、100μmol/L 白藜芦醇的 RPMI 1640 培养液, 继续培养 48h 后去掉培养液, 按照 SP 试剂盒说明操作, 一抗、二抗孵育, DAB 显色, 对照: PBS 替代一抗作为空白对照。免疫细胞化学检测以细胞膜呈棕染或者胞浆有棕色颗粒者视为免疫阳性细胞。

1.6 统计学处理

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.0 统计分析软件进行单因素方差分析。P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 白藜芦醇对胃癌细胞增殖的影响(表 1)

表 1 Res 对胃癌 SGC - 7901 细胞的抑制作用
Tab 1 Antiproliferation effect of Res on SGC - 7901 cells

RES μmol/L	24h		48h ^A		72h ^B	
	吸光度值 A($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	吸光度值 A($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	吸光度值 A($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
Control	0.6463 ± 0.0165		0.8620 ± 0.0247		1.0800 ± 0.2165	
25	0.6278 ± 0.0178	2.9	0.7773 ± 0.0129a	9.8	0.9551 ± 0.0172a	11.2
50	0.6016 ± 0.0188ab	6.9	0.7210 ± 0.0163ab	16.4	0.8311 ± 0.0560ab	23.0
75	0.5758 ± 0.0197abc	10.9	0.6117 ± 0.0072abc	29.0	0.7005 ± 0.0402abc	35.1
100	0.5478 ± 0.0196abcd	15.2	0.5730 ± 0.0085abcd	33.5	0.5425 ± 0.0345abcd	49.8

a: P < 0.05, 与对照组比较 b: P < 0.05, 与 25μmol/L 白藜芦醇处理组比较
c: P < 0.05, 与 50μmol/L 白藜芦醇处理组比较 d: P < 0.05, 与 75μmol/L 白藜芦醇处理组比较
A: P < 0.01, 与第 24 小时白藜芦醇处理组比较 B: P < 0.01, 与第 48 小时白藜芦醇处理组比较
a: P < 0.05, compared with the control b: P < 0.05, compared with the Res at 25μM
c: P < 0.05, compared with the Res at 50μM d: P < 0.05, compared with the Res at 75μM
A: P < 0.01, compared with 24h group B: P < 0.01, compared with 48h group

不同浓度的白藜芦醇作用于 SGC - 7901 细胞不同时间后, 时间组之间 P < 0.01, 说明各浓度组随时间不同其效应之间有极显著性差异。除 24h 内 25μmol 与对照组比较 P > 0.05 外, 各时间内剂量组之间的比较 P < 0.05, 说明各剂量组之间效应有显著性差异, 且随着时间浓度的增加, 抑制率增加, 这表明了白藜芦醇抑制胃癌 SGC - 7901 细胞的增殖呈剂量和时间依赖性。

2.2 RT - PCR 检测胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF mRNA 表达变化(图 1、表 2)

表 2 Res 对胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, n = 3)

Tab 2 The Ratio of VEGF/GAPDH mRNA treated with Res($\bar{x} \pm s$, n = 3)

group	VEGF/GAPDH mRNA Ratio
Control	0.9460 ± 0.01300
25μmol/L Res	0.8860 ± 0.01230*
50μmol/L Res	0.8297 ± 0.01626*
75μmol/L Res	0.7787 ± 0.02479*
100μmol/L Res	0.7183 ± 0.04141*

* p < 0.05 与对照组比较。* p < 0.01 与对照组比较
* p < 0.05 vs control group。* p < 0.01 vs control group

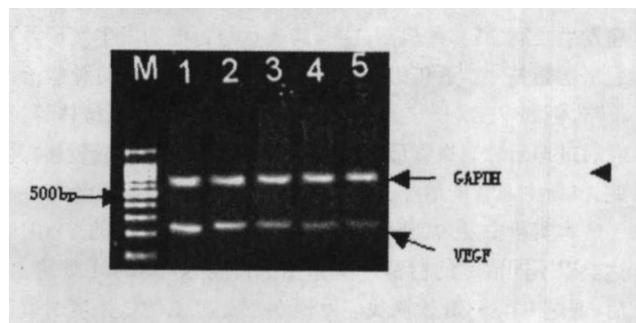


图 1 Res 对胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF mRNA 表达的影响
M: 标准参照物 1: 对照组 2: 25μmol/L 白藜芦醇; 3: 50μmol/L 白藜芦醇;
4: 75μmol/L 白藜芦醇; 5: 100μmol/L 白藜芦醇

Fig 1 RT - PCR analysis of VEGF mRNA expression in SGC - 7901 cells treated with Res

M: marker 1: control 2: 25μmol/L RES; 3: 50μmol/L RES; 4: 75μmol/L RES; 5: 100μmol/L RES

结合图 1、表 2, 未加药物处理的对照组胃癌 SGC - 7901 细胞高水平表达 VEGF mRNA, 经 25、50、75、100μmol/L 白藜芦醇处理 48h 后, 25μmol/L 白藜芦醇处理胃癌 SGC - 7901 细胞后 VEGF mRNA 的电泳条带亮度比对照组的暗(P < 0.05), 随着浓度的

增加,条带亮度越暗($P < 0.01$),提示白藜芦醇在转录水平呈剂量依赖性下调胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF mRNA 表达。

2.3 免疫细胞化学检测胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF 蛋白表达变化(图 2)

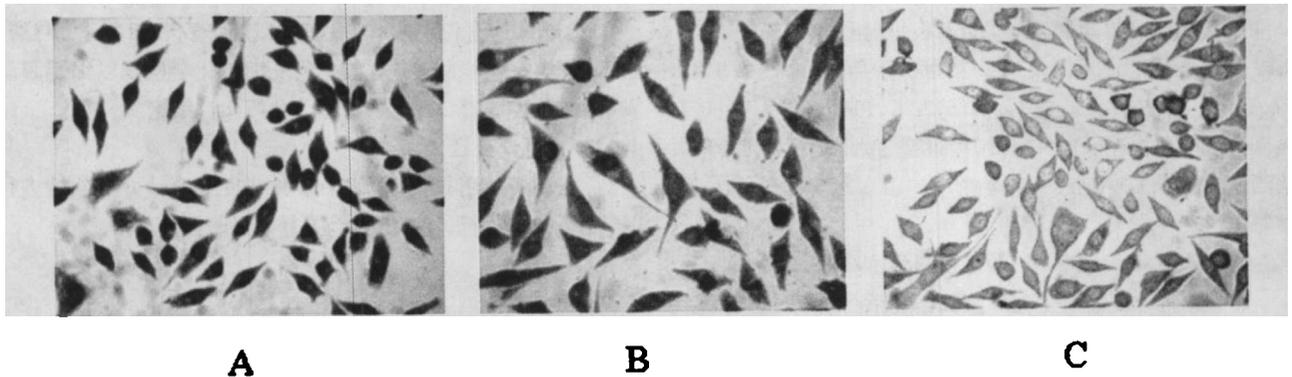


图 2 Res 对胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF 蛋白表达的影响(SP×400)

A 对照组; B 50 μ mol/L 白藜芦醇; C 100 μ mol/L 白藜芦醇

Fig 2 Expression of VEGF protein in SGC - 7901 cells treated with Res(SP×400)

A control; B 50 μ mol/L Res; C 100 μ mol/L Res

图 2 免疫组化图片结果显示,对照组胃癌 SGC - 7901 细胞经 VEGF 抗体染色后,细胞膜和胞浆棕染较深,50、100 μ mol/L 白藜芦醇处理胃癌 SGC - 7901 细胞 48h 后,细胞棕染减弱,表明细胞经白藜芦醇处理后,其 VEGF 的蛋白表达量随着药物浓度的增加逐渐下降。

3 讨论

胃癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一,在我国居各类恶性肿瘤之首。近年来的研究表明,胃癌的发生发展是一个多基因参与的多阶段过程,其中肿瘤血管的形成起着至关重要的作用,而血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是促进血管增生和形成的最重要的因子之一。大量研究表明,VEGF 在胃癌中广泛表达,VEGF 促进血管的形成是胃癌发生浸润、转移的机制之一,其表达与胃癌的发生发展及预后密切相关^[2]。近年出现了许多以 VEGF 为靶点的肿瘤治疗策略,例如 VEGF 反义寡核苷酸、抗 VEGF 的单克隆抗体等,都能通过抑制肿瘤血管形成而间接抑制胃癌的生长或转移。因此,抗新生血管的治疗,将成为胃癌治疗的一个新靶点。

本实验中发现,胃癌 SGC - 7901 细胞有明显的 VEGF 表达。以不同浓度的白藜芦醇作用于胃癌 SGC - 7901 细胞 48h 后,通过 RT - PCR 检测我们发现在 25 μ mol/L 的低浓度时就能抑制 VEGF mRNA 的表达,随着药物剂量的增大,VEGF mRNA 表达依次下调($p < 0.05$)。同时用免疫细胞化学检测胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF 蛋白表达时,发现 VEGF 的蛋白表达量随着药物浓度的增加也逐渐下降。以上实验结果表明,白藜芦醇能特异性降低胃癌 SGC - 7901 细胞 VEGF mRNA 和蛋白的表达,从而呈剂量和时间依赖性地抑制胃癌细胞的增殖。大量资料显示,肿瘤组织内存在低氧区,低氧诱导因子 - 1 α (hypoxia - inducible factor 1 α , HIF - 1 α)表达升高,进而诱导的 VEGF 表达上调是导致肿瘤新生血管化的关键事件^[3]。而白藜芦醇可以通过蛋白酶体水解途径增加对 HIF - 1 α 的降解,抑制 AKT

和 MAPK 的活性及转录调节因子(如 P70(S6K),真核启动因子 4E 连接蛋白 1,真核起始因子 4E)对 HIF - 1 α 的转录的激活作用,下调 HIF - 1 α 的表达,抑制 VEGF 的表达^[4]。另有研究发现,COX - 2 的表达可显著诱导 VEGF 的产生,其机制可能是当 COX - 2 的表达被诱导时,其产物 PGE2 产生增加并可通过激活 MAPK 和(或)PI3K 信号转导途径参与了对 HIF - 1 α 蛋白表达的调控,进而诱导 VEGF 表达,引发血管生成和肿瘤血管生成^[5],这种诱导作用可被 COX - 2 的特异性抑制剂 NS - 398 所阻断^[6]。近年来研究发现,Res 能抑制多种肿瘤细胞 COX - 2 的活性^[7]。在胃癌 SGC - 7901 细胞系中,我们推测白藜芦醇可能也通过上述途径抑制 VEGF 的转录和翻译,但是具体机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes[J]. Science, 1997, 275(5297):218 - 220
- [2] 周哲,谷小虎.原发性胃癌中 VEGF 检测与临床病理因素的相关性研究[J].实用肿瘤学杂志,2006,20(2):103 - 105
- [3] Semenza GL. Involvement of hypoxia - inducible factor 1 in human cancer[J]. Intern Med, 2002,41(2):79 - 83
- [4] Cao Z., Fang J, Xia C, et al. trans - 3, 4, 5' - Trihydroxystibene inhibits hypoxia - inducible factor 1 α and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2004.,10(15),5253 - 5263
- [5] Fukuda R, Kelly B, Semenza GL. Vascular endothelial growth factor gene expression in colon cancer cells exposed to prostaglandin E2 is mediated by hypoxia - inducible factor 1[J]. Cancer Res, 2003,63(9):2330 - 2334
- [6] Tajiri M, Kawano S, Tajiri S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. Cell, 1998,93(5):705 - 716
- [7] de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an anti - inflammatory and anti - aging agent: mechanisms and clinical implications[J]. Mol Nutr Food Res. 2005,49(5):405 - 430