

网络出版时间: 2016-10-19 13:54:51 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20161019.1354.001.html>

◇ 基础医学研究 ◇

β-榄香烯对人胃癌细胞 SGC7901 的抑制作用及部分机制

赵晓晓¹, 张 蕾², 史天陆², 邓明影², 汪国玉¹, 姜 玲^{1,2}, 魏 伟¹

摘要 目的 研究 β-榄香烯对胃癌细胞 SGC7901 的增殖、凋亡、迁移及赖氨酰氧化酶(LOX)的影响。方法 体外培养人胃癌 SGC7901 细胞,MTS 法及流式细胞术检测不同浓度 β-榄香烯对 SGC7901 细胞增殖与凋亡的影响,划痕实验、Transwell 小室迁移实验检测 β-榄香烯对细胞迁移的影响,酶标仪法检测 β-榄香烯对 LOX 酶活性的影响,Western blot 法检测 LOX 蛋白表达的变化。结果 β-榄香烯(50~800 μmol/L)对 SGC7901 细胞的抑制作用呈时间依赖和浓度依赖性。β-榄香烯(100、200、400、800 μmol/L)处理 SGC7901 细胞 24 h 后,凋亡率分别为 8.1%、8.2%、18.7%、41.9%,与对照组(4.9%)比较,凋亡率明显升高($P < 0.05$)。划痕实验、Transwell 实验结果显示 β-榄香烯对 SGC7901 细胞的迁移有明显抑制作用($P < 0.05$)。β-榄香烯浓度依赖性降低 SGC7901 细胞 LOX 酶活性($P < 0.05$)。Western blot 结果显示 β-榄香烯可下调 SGC7901 细胞 LOX 的蛋白表达。结论 β-榄香烯对胃癌细胞 SGC7901 有明显抑制增殖、迁移及促进凋亡作用,抑制 LOX 酶活性和蛋白表达可能是其发挥作用的机制之一。

关键词 β-榄香烯; SGC7901 细胞; 增殖; 凋亡; 迁移

中图分类号 R 966; R 735.2; R 285.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1717-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.001

胃癌是一种常见的恶性肿瘤,尤其在我国其发病率和死亡率是仅次于肺癌的常见肿瘤之一^[1]。化疗目前是治疗进展期胃癌的主要方法之一,但由于肿瘤细胞的可获得性耐药以及化疗药物的严重不

良反应,患者的生存质量未得到明显改善,因此寻找天然有效成分用于胃癌治疗显得尤为迫切。β-榄香烯是从中国传统中药莪术的根茎中提取分离的一种非细胞毒性的抗肿瘤药物,其有效的抗肿瘤活性已被广泛认可^[2]。β-榄香烯对卵巢癌、黑色素瘤等均有显著的抗肿瘤活性^[3-4],对胃癌细胞系也具有放射增敏作用^[5],但 β-榄香烯对胃癌细胞的作用特点和机制尚不清楚。该实验观察 β-榄香烯对胃癌细胞 SGC7901 的增殖、凋亡以及迁移的影响,并探讨 β-榄香烯对 SGC7901 细胞赖氨酰氧化酶(lysyl oxidase, LOX)酶活性及蛋白表达的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 β-榄香烯(大连金港制药有限公司);紫杉醇(南京泽朗有限公司);CellTiter 96® AQueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒(MTS)(普洛麦格北京生物技术有限公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海贝博生物有限公司);LOX 活性检测试剂盒、LOX 抗体(英国 Abcam 公司);Transwell 小室(美国 Corning Costar 公司);RIPA 裂解液(强)、PMSF(100 mmol/L)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);ScanLater™ 免疫印迹检测试剂盒(美国 MD 公司)。

1.2 细胞培养 SGC7901 细胞(安徽医科大学药学院细胞库)复苏后加 DMEM 高糖培养基(含 10% 胎牛血清、20 U/ml 的青霉素和链霉素),置条件培养箱培养(37 °C、5% CO₂)。待细胞长至 80%~90% 时用胰酶消化进行细胞传代,选择细胞状态良好、对数生长期细胞进行具体实验操作。

1.3 MTS 法检测细胞增殖抑制情况 胰酶消化对数生长期的 SGC7901 细胞,以每孔 5 000 个细胞接种到 96 孔板中,每孔 100 μl,待细胞长至 50%~70% 时依次加入 β-榄香烯药物组(50、100、200、300、400、600、800 μmol/L)。其中二甲基亚砷为对照组,紫杉醇为阳性药物组(终浓度 0.05 μmol/L),并加设一个空白对照组,每组设 6 个复孔。分别处理 12、24、48 h 后,显微镜观察细胞生长状况。相应时

2016-07-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81603339);安徽省自然科学基金(编号:1408085MH198);安徽省高等学校省级自然科学基金项目(编号:KJ2013A163)

作者单位:¹安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、抗炎免疫药物安徽省协同创新中心,合肥 230032

²安徽医科大学附属省立医院药剂科,合肥 230001

作者简介:赵晓晓,女,硕士研究生;

姜玲,女,主任药师,硕士生导师,责任作者,E-mail:ah-slyyj@126.com;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail:wwei@ahmu.edu.cn

间后加入 MTS/PMS 的混合物 20 μl 30 min 后 490 nm 波长下测定各孔吸光度(optical density ,OD) 值。结果以细胞活力大小表示 ,细胞活力(%) = (药物组 OD - 空白组 OD) / (阴性对照组 OD - 空白组 OD) × 100% 。

1.4 细胞凋亡检测 胰酶消化对数生长期的 SGC7901 细胞 ,细胞密度为 1 × 10⁵ 个/ml ,接种于 6 孔板进行细胞铺板。待细胞长至 50% ~ 70% 时依次加入 β-榄香烯药物组(100、200、400、800 μmol/L)、DMSO 组和紫杉醇(0.05 μmol/L) 组 ,置培养箱中培养 24 h ,每组 3 个复孔。用胰酶消化细胞 ,并进行细胞计数 ,取 4 × 10⁵ 个细胞进行凋亡检测实验。首先用冷 PBS 洗 2 次 ,洗去胰酶 ,并分别离心 ,再用 400 μl 1 × Binding Buffer 悬浮细胞 ,在悬浮液中加入 5 μl Annexin V-FITC ,轻轻混匀后于 2 ~ 8 ℃ 避光孵育 15 min ,加入 10 μl PI 轻轻混匀同等条件孵育 5 min ,1 h 内上机检测。

1.5 划痕实验 将对数生长期 SGC7901 细胞接种于 6 孔板中 ,待细胞接近长满时 ,用 200 μl Eppendorf Tip 枪头进行划痕 ,造成损伤模型 ,PBS 冲洗划掉的细胞 ,用无血清的培养基配置 100、200、400 μmol/L β-榄香烯作为药物处理组 ,DMSO 为对照组 ,处理 0、24 h 后 ,倒置显微镜(100 倍) 观察细胞运动情况及迁移距离。

1.6 Transwell 细胞迁移实验 按照 1 × 10⁶ 个/ml 细胞的密度在 Transwell 小室上室中加入 100 μl β-榄香烯(100、200、400 μmol/L) 的细胞悬液 ,每组设 3 个复孔。下室加入 600 μl 20% FBS 的培养基 ,培养箱孵育 24 h。用湿棉签轻柔地擦去上室未穿膜细胞 ,甲醇固定 20 min 后用吹风机的冷风轻轻吹干 ,过滤的结晶紫染色液染色 10 min ,用清水冲洗染色后的小室 ,同样方法风干 ,于倒置显微镜(100 倍) 下随机选取 5 个视野 ,计穿膜细胞数 ,并取其平均数用来表示肿瘤细胞迁移能力。

1.7 LOX 活性检测 胰酶消化对数生长期的 SGC7901 细胞 ,接种于 96 孔板。待细胞约 70% 时更换无血清无酚红的 DMEM 高糖培养基进行培养。同时设置 LOX 标准品组、β-榄香烯组(100、200、400、800 μmol/L)、DMSO 对照组 ,每组同时设 3 个复孔。培养箱孵育 24 h 后 ,收集细胞上清液 ,1 200 r/min 离心 5 min ,收集 100 μl 上清液至 96 孔黑色底透板。按 LOX 活性检测试剂盒说明书进行操作。于酶标仪以激发波长 540 nm 和发射波长 590 nm 检测其荧光值。酶活性大小以相对荧光值(%) 表示。

结果将对对照组的荧光值设为 100% ,实验组相对荧光值(%) = 对照组荧光值 / 实验组荧光值 × 100% 。

1.8 Western blot 法检测 LOX 蛋白表达 β-榄香烯(100、200、400、800 μmol/L)、DMSO 对照组处理 SGC7901 细胞 24 h 后 ,提取各组细胞总蛋白 ,对蛋白定量后 ,采用 Western blot 法检测各组蛋白水平。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,所有实验重复 3 次以上。多组资料比较采用单因素方差分析 ,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 β-榄香烯对 SGC7901 细胞增殖的影响 与对照组比较 ,β-榄香烯处理细胞 24 h 后 ,细胞存活数减少、部分不贴壁、细胞皱缩且形态模糊。见图 1。紫杉醇阳性药物组细胞呈现明显的皱缩变圆。β-榄香烯在 50 ~ 800 μmol/L 范围内抑制细胞增殖 ,呈明显的时间和剂量依赖性(*F* = 38.52、48.67、51.96 ,*P* < 0.05) 。见图 2。

2.2 β-榄香烯对 SGC7901 胃癌细胞凋亡的影响 采用 β-榄香烯(100、200、400、800 μmol/L) 处理 SGC7901 胃癌细胞 24 h 结果显示 ,β-榄香烯可以诱导 SGC7901 细胞出现凋亡 ,对照组细胞凋亡率为 4.9% ,β-榄香烯药物组的凋亡率分别为 8.1%、8.2%、18.7%、41.9%。当浓度增大时 ,SGC7901 细胞出现明显的凋亡(*F* = 70.22 ,*P* < 0.05) 。见图 3。

2.3 细胞划痕实验 不同浓度 β-榄香烯处理 SGC7901 细胞 24 h 后 ,结果显示 ,药物组能够显著

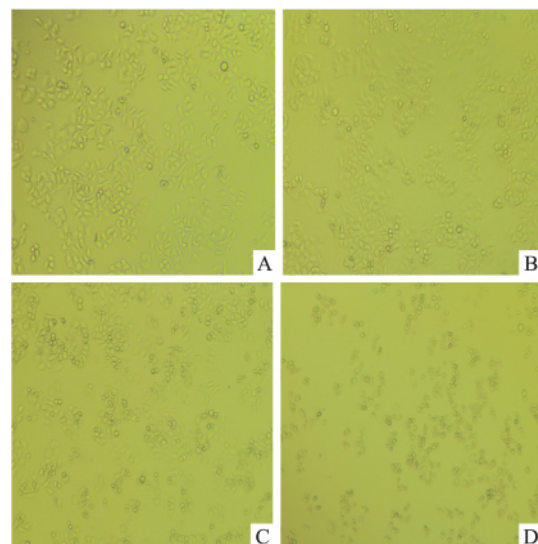


图 1 β-榄香烯处理 SGC7901 细胞 24 h 细胞形态情况 × 100
A: 对照组; B: β-榄香烯 100 μmol/L; C: β-榄香烯 200 μmol/L;
D: β-榄香烯 400 μmol/L

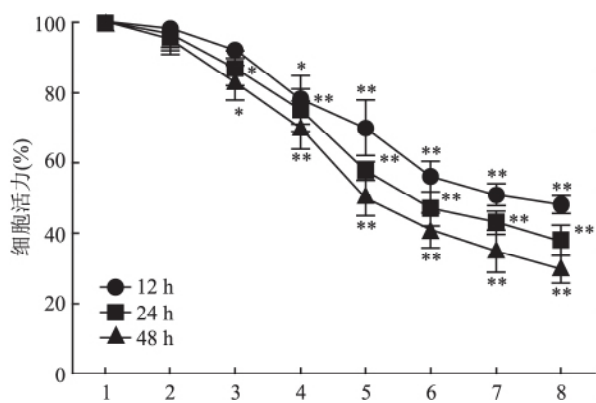


图2 β-榄香烯对 SGC7901 细胞增殖的影响

1: 对照组; 2: β-榄香烯 50 μmol/L; 3: β-榄香烯 100 μmol/L; 4: β-榄香烯 200 μmol/L; 5: β-榄香烯 300 μmol/L; 6: β-榄香烯 400 μmol/L; 7: β-榄香烯 600 μmol/L; 8: β-榄香烯 800 μmol/L; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

抑制划痕距离 ($F = 310.26, P < 0.05$)。药物组划痕区域内细胞数少。见图 4。

2.4 Transwell 迁移实验 SGC7901 细胞经过不同浓度 β-榄香烯处理 24 h 后, 下室细胞数明显少于对照组, 并呈浓度依赖性 ($F = 64.24, P < 0.05$) , 见图 5。

2.5 β-榄香烯对 LOX 酶活性的影响 SGC7901 细胞经过不同浓度 β-榄香烯处理 24 h 后, LOX 酶活性呈剂量依赖性降低。与对照组比较, 当 β-榄香烯浓度大于 200 μmol/L 时, LOX 酶活性的差异有统计学意义 ($F = 16.90, P < 0.05$)。见图 6。

2.6 Western blot 法分析 β-榄香烯对 SGC7901 细胞 LOX 蛋白表达的影响 β-榄香烯药物处理 SGC7901 细胞 24 h 后, 与对照组比较, LOX 蛋白表达明显上调 ($F = 49.51, P < 0.05$)。见图 7。

3 讨论

肿瘤细胞的化疗耐药是化疗药物后期效果差的主要原因, 严重的毒副作用对预后的改善也是十分有限。在治疗中联合中药的治疗方案已广泛应用于临床^[6-7], 中药的辅助治疗在降低化疗药物的毒副作用、增加疗效以及改善患者生活质量方面有其特殊的应用价值。温郁金(温莪术)是临床广泛应用的一种中草药。β-榄香烯作为化疗辅助药物已广泛应用于临床。本研究表明, β-榄香烯能够抑制胃癌 SGC7901 细胞的增殖, 呈浓度-时间依赖性。流式细胞术结果也显示 β-榄香烯处理 SGC7901 细胞 24 h 后, 随着 β-榄香烯浓度的增加, 细胞凋亡率明显增加, 说明 β-榄香烯作为中药有效活性成分能够诱导

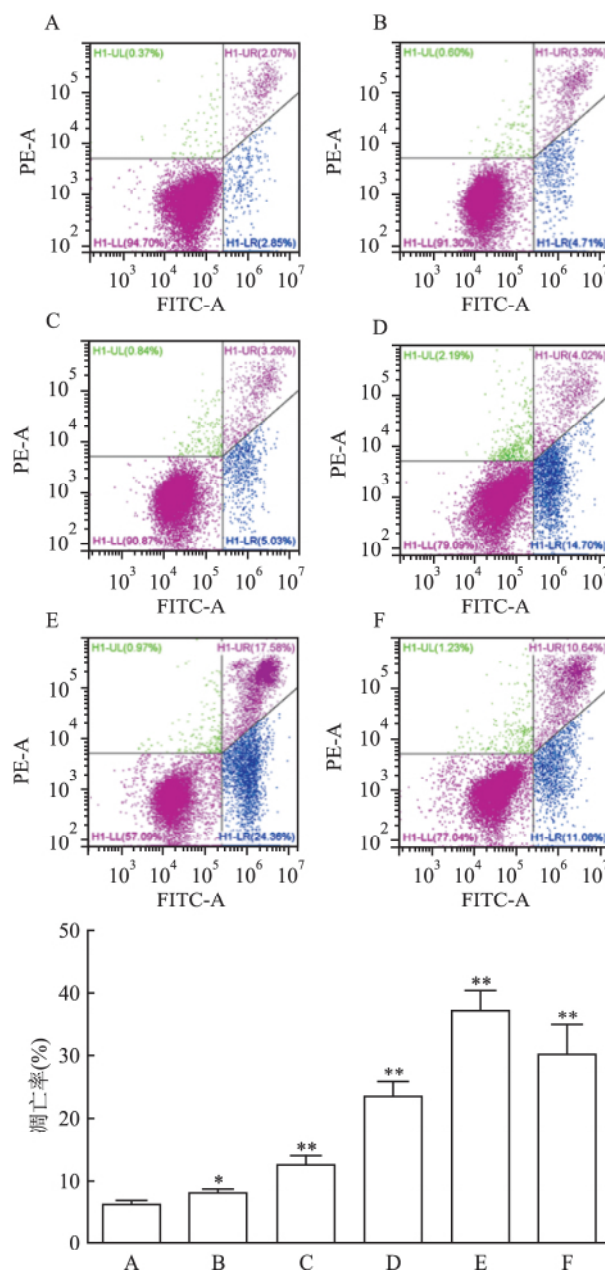


图3 β-榄香烯对 SGC7901 细胞凋亡的影响

A: 对照组; B: β-榄香烯 100 μmol/L; C: β-榄香烯 200 μmol/L; D: β-榄香烯 400 μmol/L; E: β-榄香烯 800 μmol/L; F: 阳性药物组紫杉醇 0.05 μmol/L; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

胃癌细胞 SGC7901 的凋亡, β-榄香烯可能作为有效药物应用于胃癌治疗。

β-榄香烯对多种肿瘤细胞有抑制作用, 但其机制并不十分清楚。研究^[8]表明, β-榄香烯通过增加 ERK1/2、Akt 和 AMPK α 的磷酸化以及抑制 DNA 甲基转移酶 1 的活性抑制人非小细胞肺癌 (NSCLC) 的细胞生长。也可以介导多药耐药相关的 miRNA 表达的细胞, 从而影响了外泌体, 通过外泌体减少耐药传输, 逆转乳腺癌耐药细胞^[9]。另外, β-榄香烯可

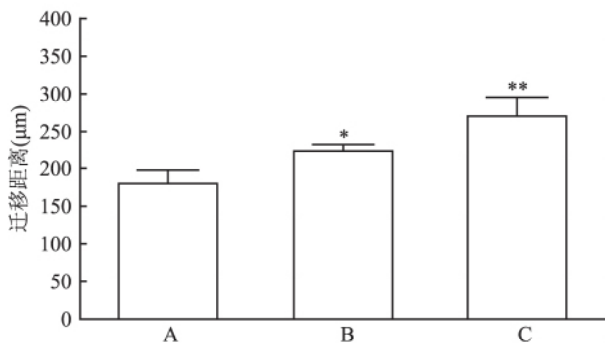
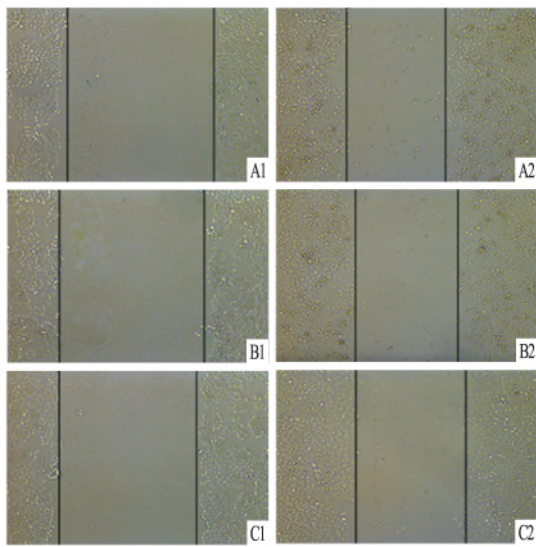


图4 划痕实验检测 β-榄香烯对 SGC7901 细胞迁移能力的影响 ×100

A: 对照组; B: β-榄香烯 100 μmol/L; C: β-榄香烯 200 μmol/L; 1: 0 h; 2: 24 h; 与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

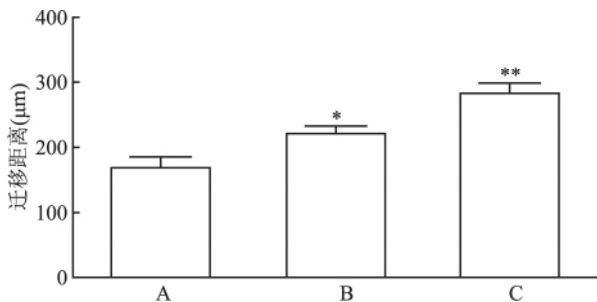
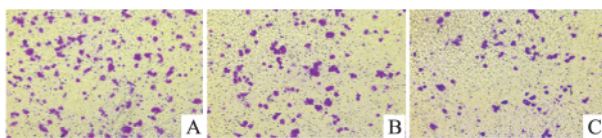


图5 Transwell 小室实验检测 β-榄香烯对 SGC7901 细胞迁移的影响 ×100

A: 对照组; B: β-榄香烯 100 μmol/L; C: β-榄香烯 200 μmol/L; 与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

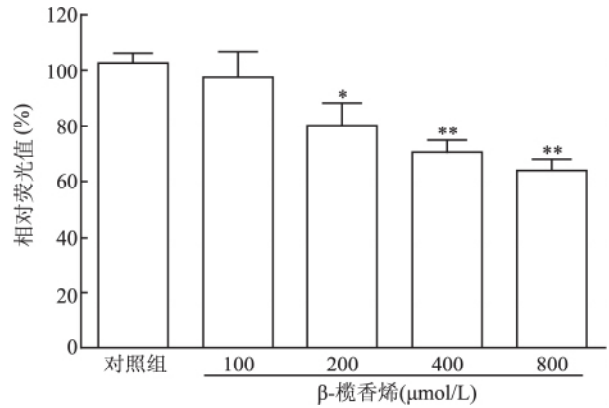


图6 β-榄香烯对 LOX 酶活性的影响 与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

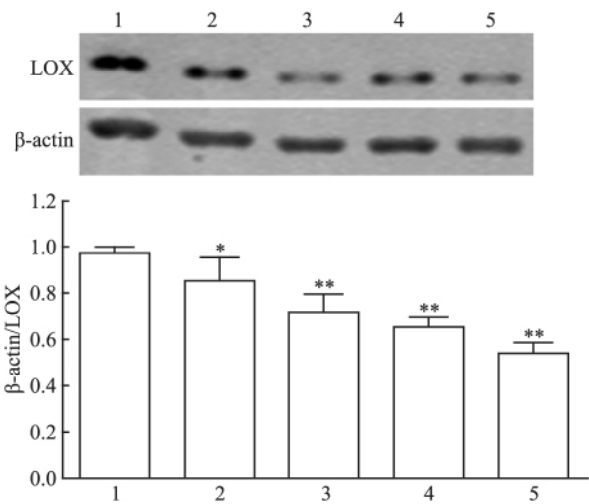


图7 β-榄香烯对 LOX 蛋白表达的影响

1: 对照组; 2: β-榄香烯 100 μmol/L; 3: β-榄香烯 200 μmol/L; 4: β-榄香烯 400 μmol/L; 5: β-榄香烯 800 μmol/L; 与对照组比较: * P < 0.05, ** P < 0.01

以通过调节人肝癌细胞中拓扑异构酶 I (TOPO I) 和人肝癌 HepG-2 细胞的拓扑异构酶 II α (TOPO II α) 表达和活性从而抑制肝癌细胞增殖^[10]。而在本次研究中,选择 LOX 可能是 β-榄香烯发挥作用的机制之一,主要原因是因为 β-榄香烯对纤维化疾病有很好的治疗作用,其能抑制胶原沉积,实现细胞外基质(extracellular matrix, ECM)重构。LOX 能通过催化胶原和弹性蛋白赖氨酸残基的共价交联,从而稳定 ECM,而 LOX 所造成的胶原异常交联和不溶性基质沉积实现了肿瘤 ECM 重构,从而为肿瘤的黏附和运动提供了支架,发挥其抗肿瘤作用。

肿瘤转移是一种涉及多个步骤、高度复杂的、动态的过程,占癌症患者死亡的 90% 以上^[11]。肿瘤转移微环境的形成有利于转移性肿瘤细胞的生长,

其中 LOX 的发挥着关键作用^[12]。Cox et al^[12] 发现,在两种肺纤维化模型中,LOX 均是高表达。利用 LOX 功能阻断性抗体抑制 LOX 的活性后,纤维化的程度也相应发生了降低,同时肿瘤转移能力得到了抑制。另外, Kim et al^[13] 在探究 ECM 对果蝇的胶质瘤的迁移作用时也证明 LOX 是调节 ECM 的关键因素。Kanapathipillai et al^[14] 利用纳米材料将 LOX 的抑制性抗体包被结合到细胞外基质,这种方法比可溶性的 LOX 抗体能更有效地抑制体内肿瘤的生长、发展和侵袭性。研究^[15] 显示, LOX 是乳腺癌骨转移前肿瘤微环境形成的重要靶点之一。说明 LOX 可能是其发挥抗肿瘤作用的重要靶点。

鉴于 LOX 在抗肿瘤中的重要作用,本研究观察了 β -榄香烯对 LOX 的影响,结果显示随着 β -榄香烯浓度的增加,胃癌 SGC7901 细胞 LOX 表达下调,提示 LOX 信号通路可能在 β -榄香烯抑制胃癌中发挥重要作用,为其用于胃癌治疗提供新的依据。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–32.
- [2] Shi H, Liu L, Liu L, et al. β -elemene inhibits the metastasis of B16F10 melanoma cells by downregulation of the expression of uPA, uPAR, MMP-2, and MMP-9 [J]. *Melanoma Res*, 2014, 24(2): 99–107.
- [3] Li Q Q, Lee R X, Liang H, et al. β -Elemene enhances susceptibility to cisplatin in resistant ovarian carcinoma cells *via* downregulation of ERCC-1 and XIAP and inactivation of JNK [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(3): 721–8.
- [4] Zhang X, Li Y, Zhang Y, et al. β -Elemene blocks epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cell line MCF-7 through Smad3-mediated down-regulation of nuclear transcription factors [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58719.
- [5] 贺仕才, 刘俊松, 张正良, 等. β -榄香烯对胃癌 MKN28 细胞株放射增敏作用的研究 [J]. *中华外科杂志*, 2014, 52(6): 442–5.
- [6] Xu H B, Zheng L P, Li L, et al. Elemene, one ingredient of a Chinese herb, against malignant tumors: a literature-based meta-analysis [J]. *Cancer Invest*, 2013, 31(2): 156–66.
- [7] Fu X, Zhang Y, Wang X, et al. Low dose decitabine combined with Taxol and Platinum chemotherapy to treat refractory/recurrent ovarian cancer: an Open-Label, Single-Arm, Phase I / II Study [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2015, 16(4): 329–36.
- [8] Zhao S, Wu J, Zheng F, et al. β -elemene inhibited expression of DNA methyltransferase 1 through activation of ERK1/2 and AMPK signaling pathways in human lung cancer cells: the role of Sp1 [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(3): 630–41.
- [9] Zhang J, Zhang H D, Yao Y F, et al. β -elemene reverses chemoresistance of breast cancer cells by reducing resistance transmission *via* exosomes [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 36(6): 2274–86.
- [10] Gong M, Liu Y, Zhang J, et al. β -elemene inhibits cell proliferation by regulating the expression and activity of topoisomerases I and II α in human hepatocarcinoma HepG-2 cells [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 153987.
- [11] Barker H E, Cox T R, Erler J T. The rationale for targeting the LOX family in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(8): 540–52.
- [12] Cox T R, Bird D, Baker A M, et al. LOX-mediated collagen crosslinking is responsible for fibrosis-enhanced metastasis [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(6): 1721–32.
- [13] Kim S N, Jeibmann A, Halama K, et al. ECM stiffness regulates glial migration in *Drosophila* and mammalian glioma models [J]. *Development*, 2014, 141(16): 3233–42.
- [14] Kanapathipillai M, Mammoto A, Mammoto T, et al. Inhibition of mammary tumor growth using lysyl oxidase-targeting nanoparticles to modify extracellular matrix [J]. *Nano Lett*, 2012, 12(6): 3213–7.
- [15] Cox T R, Rumney R M, Schoof E M, et al. The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase [J]. *Nature*, 2015, 522(7554): 106–10.

Study of β -elemene on tumor inhibition and partial mechanism of human gastric cancer SGC7901 cell

Zhao Xiaoxiao¹, Zhang Lei², Shi Tianlu², et al

(¹ Dept of Clinical Pharmacology of Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Medicine of Education Ministry, Hefei 230032;

² Dept of Pharmacy, Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect of β -elemene on the proliferation, apoptosis, migration and LOX activity of the gastric cancer SGC7901 cell line. **Methods** MTS was performed to reveal the inhibitory effect on cell proliferation with different concentrations β -elemene on SGC7901 cell, flow cytometry was used to determine the apoptosis of the gastric cancer SGC7901 cell line after the treatment of β -elemene. Effects of β -elemene on the

CLIC1 及其点突变体与 Sedlin 蛋白的共定位研究

沙启飞, 潘林鑫, 耿慧武, 王梦媛, 印叶盛, 李子剑, 刘晓颖, 范礼斌

摘要 目的 构建胞内氯离子通道蛋白 1 (CLIC1) 点突变体的真核表达质粒, 进行 CLIC1 突变体的表达、定位及其与迟发性脊椎骨骺发育不良病蛋白 (Sedlin) 的共定位研究, 为进一步揭示其功能奠定基础。方法 以 CLIC1 全长 cDNA 序列为模板, 构建 3 个真核表达质粒即 pcDNA3.1-CLIC1 (C24A)-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 (C59A)-FLAG、pcDNA3.1-CLIC1 (C24A-C59A)-FLAG; Western blot 法检测 CLIC1 及其点突变体在 HEK 293T 细胞中的表达; 免疫荧光技术了解 CLIC1 及其点突变体蛋白在 COS7 细胞中的定位及与 Sedlin 的共定位情况。结果 成功构建了 CLIC1 点突变体的真核表达质粒; Western blot 结果显示 3 个点突变体蛋白在 HEK293T 细胞中均能表达, 突变体的分子量低于野生型的; 免疫荧光实验表明 CLIC1 蛋白在细胞质和细胞核都有表达, 但主要在细胞核。CLIC1 点突变体蛋白定位在胞质中, 细胞核中无分布, 与 Sedlin 蛋白在胞质存在共定位。结论 CLIC1 的 3 种点突变体均能在哺乳动物细胞中有效表达; CLIC1 及其点突变体与 Sedlin 蛋白均存在共定位, 提示两种蛋白之间可能存在相互作用。

关键词 CLIC1; 质粒构建; 免疫荧光; Western blot
中图分类号 Q 28; R 392.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)12-1722-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2016.12.002

胞内氯离子通道蛋白 (CLIC) 基因有 7 个同源家族成员 (p64 和 CLIC1~6) 组成了哺乳类通道蛋白家族, 并以可溶性和膜结合性两种状态分布于细胞中^[1]。CLIC1 是第一个被明确的人类细胞和细胞器的离子通道, 蛋白分子量为 27 ku。该蛋白处于氧化状态下结构发生变化, 在 H₂O₂ 孵育环境中可致分子内两个半胱氨酸残基 (Cys-24 和 Cys-59) 形成二硫键, 进而使 CLIC1 从单体形式向二聚体形式转变, 在还原环境中这种转变是可逆的^[2]。CLIC1 二聚体形式暴露出疏水膜, 该膜是形成二聚体接口界面的关键。氧化状态下的 CLIC1 在人工脂双层和囊泡中保持氯离子通道活性, 而在还原状态中通道活性消失。Cys-24 在所有的 CLIC 家族成员中高度保守, 在单体形式中该半胱氨酸在谷胱甘肽结合位点的正中心, 然而 CLIC1 中的 Cys-59 相对于其他成员高度保守的 Ala 是独一无二的。CLIC1 的活性部位半胱氨酸与酶活性直接相关, 进而可能影响氯离子通道活性, 表明 Cys-24 和 Cys-59 对氯离子通道活性发挥着无可替代的作用^[2-3]。该研究将构建下游带有 FLAG 标签的 3 种点突变体, 并比较与野生型

2016-06-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (编号: 81201368)

作者单位: 安徽医科大学生命科学院生物教研室, 合肥 230032

作者简介: 沙启飞, 男, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 副教授, 责任作者, E-mail: liuxiaoying@ahmu.edu.cn;

范礼斌, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: lfan@ahmu.edu.cn

migration of SGC7901 cells were detected by wound healing assay and transwell assay respectively. Changes of LOX activity were determined by colorimetric method and changes of LOX expression were determined by Western blot. **Results** β -elemene (100, 200, 400, 800 μ mol/L) significantly inhibited the proliferation on SGC7901 cells in a time and dose-dependent manner. After β -elemene treatment for 24 h in SGC7901 cells, the apoptotic ratios were 8.1%, 8.2%, 18.7% and 41.9% with concentrations of β -elemene at 100, 200, 400, 800 μ mol/L. Compared with the control (4.9%), apoptosis rate increased obviously. Effects of migration on SGC7901 cells were significantly inhibited by Wound healing assay and Transwell assay. LOX activity was decreased in a dose-dependent manner. Western blot showed that β -elemene SGC7901 cells could down-regulate expression of LOX. **Conclusion** The proliferation, apoptosis and migration of the gastric cancer SGC7901 cell line can be inhibited after the treatment of β -elemene and the molecular mechanism for those effects may be related to its down-regulated LOX activity and the express of LOX.

Key words β -elemene; SGC7901 cells; proliferation; apoptosis; migration