



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.012
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.012
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(4):535-540.

· 基础研究 ·

柠檬酸钠促胃癌 MGC-803 细胞凋亡的作用及机制研究

郭兴裕, 王婷安, 张晓东, 冼书林, 陆云飞

(广西医科大学第一附属医院 胃肠腺体外科, 广西南宁 530021)

摘要

目的: 探讨柠檬酸钠 (SCT) 促进胃癌 MGC-803 细胞凋亡的作用及机制。

方法: 胃癌 MGC-803 细胞分别经 SCT (5、10、20 mmol/L) 和 5-FU (0.5 mmol/L) 作用, 以未处理的 MGC-803 为阴性对照, 用流式细胞仪检测细胞周期分布及细胞凋亡率; 比色法检测细胞内乳酸含量、磷酸果糖激酶 1 (PFK-1) 活性及三磷酸腺苷 (ATP) 水平; Western blot 检测细胞中 Bcl-2、Bax、caspase-3 及 Cyt-c 蛋白的相对表达量。

结果: 与阴性对照细胞比较, SCT 处理的 MGC-803 细胞 G₂/M 期阻滞与细胞凋亡明显增加; 细胞内乳酸含量、PFK-1 的活性和 ATP 水平均明显降低; 细胞内 Bcl-2 的表达明显降低, 而 Bax、caspase-3 和 Cyt-c 表达明显升高 (均 $P < 0.05$)。5-FU 对 MGC-803 细胞乳酸含量、PFK-1 的活性无明显影响 (均 $P > 0.05$), 但其他作用与 SCT 相似。

结论: SCT 可促进 MGC-803 细胞凋亡, 其作用可能与其抑制 PFK-1 的活性, 降低糖酵解效率, 并与线粒体凋亡通路的激活有关。

关键词

胃肿瘤; 柠檬酸; 糖酵解; 细胞凋亡
中图分类号: R735.2

Promoting effect of sodium citrate on apoptosis in gastric cancer cells and its mechanism

GUO Xingyu, WANG Ting'an, ZHANG Xiaodong, XIAN Shulin, LU Yunfei

(Department of Gastrointestinal and Gland Surgery, the First Affiliated Hospital, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

Abstract

Objective: To investigate the effect of sodium citrate (SCT) on promoting apoptosis in gastric cancer cells and its mechanism.

Methods: Gastric cancer MGC-803 cells were exposed to SCT (5, 10, 20 mmol/L) or 5-FU (0.5 mmol/L) respectively, using untreated MGC-803 cells as negative control. Then, the cell cycle distribution and apoptotic rate were analyzed by flow cytometry, the intracellular lactate content, phosphofructokinase-1 (PFK-1) activity and adenosine triphosphate (ATP) level were examined by colorimetric assay, and the expression of Bcl-2, Bax, caspase-3 and Cyt-c in MGC-803 cells were determined by Western blot analysis.

Results: In SCT treated MGC-803 cells compared with negative control cells, the apoptosis and G₂/M arrest were significantly increased, the intracellular lactate content, PFK-1 activity and ATP level were significantly reduced and Bcl-2 expression was significantly down-regulated, while the expressions of Bax, caspase-3 and Cyt-c were significantly up-regulated (all $P < 0.05$). 5-FU exerted no significant effect on lactate content and PFK-1

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81260366)。

收稿日期: 2016-01-04; 修订日期: 2016-03-16。

作者简介: 郭兴裕, 广西医科大学第一附属医院硕士研究生, 主要从事胃肠道肿瘤方面的研究。

通信作者: 陆云飞, Email: doctorlife@126.com

activity in MGC-803 cells (all $P > 0.05$), but all other effects were similar to those of SCT.

Conclusion: SCT can promote apoptosis in MGC-803 cells, and the mechanism may be associated with its reducing glycolysis via inhibiting PFK-1 activity and activating mitochondria-dependent apoptotic pathway.

Key words: Stomach Neoplasms; Citric Acid; Glycolysis; Apoptosis

CLC number: R735.2

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一，其病死率居高不下，在全球范围内，每年大约700 000人死于肿瘤，其中死于胃癌的约占10%^[1]，在国内胃癌的致死率仅次于肺癌^[2]。尽管胃癌的诊治水平提高，患者的5年生存率仍低于40%^[3-4]，为进一步提高胃癌的治疗效果，寻找出新型的抗癌药物至关重要。值得注意的是，与正常细胞相比，肿瘤细胞在氧供充足的环境下仍主要以产能极低的糖酵解方式获取三磷酸腺苷（ATP），这被称为“瓦博格效应”（Warburg effect）^[5]，有研究^[6-8]证明，抑制糖酵解途径能够使DNA持续降解，能量供应不足而促进细胞凋亡。近年来，柠檬酸钠（SCT）作为一种抗能量药物引起了国内外的关注，SCT是一种天然物质，易从橘类水果获取。有研究^[9-12]发现，SCT能够抑制胶质细胞瘤、白血病、卵巢癌和甲状腺癌的生长。笔者前期研究^[1, 13-14]发现，SCT能通过抑制癌细胞的糖酵解，促进细胞凋亡，进而抑制胸膜间皮瘤及胃癌SGC-7901细胞生长和增殖。国内外尚未报道SCT对低分化胃癌MGC-803细胞的影响及其机制。本研究以胃癌细胞MGC-803为研究对象，探讨SCT抑制胃癌细胞生长以及诱导凋亡的作用机制，寻找胃癌治疗的新途径，为胃癌的临床治疗提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株MGC-803购于湘雅医学院细胞库；柠檬酸三钠购于Sigma公司；细胞凋亡检测试剂盒购于BD公司；细胞周期检测试剂盒购于凯基公司；乳酸含量检测试剂盒和磷酸果糖激酶1（PFK-1）活性检测试剂盒购于南京建成公司；ATP含量检测试剂盒购于碧云天公司；内参GAPDH购于上海艾博抗贸易有限公司，兔抗人Bcl-2多抗隆抗体、兔抗人Bax多抗隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司，兔抗人caspase-3多抗隆抗体、兔抗人Cyt-c多抗隆抗体购自美国Santa Cruz公司；羊抗兔IgG二抗购于北京中杉金桥生物

技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养与分组 胃癌MGC-803细胞常规培养于含有10%的胎牛血清及1%青霉素、链霉素双抗的RPMI-1640培养基中，置于37℃、5%CO₂的恒温细胞培养箱；实验将胃癌MGC-803细胞分为SCT（5、10、20 mmol/L）处理组，5-FU（0.5 mmol/L）阳性对照组和无处理的阴性对照组。

1.2.2 细胞周期检测 细胞经不同处理，药物作用24 h后，收集各组细胞，预冷PBS洗涤2次。离心弃上清后，各管加入70%冰冷的乙醇制成单细胞悬液，4℃固定过夜。离心弃去固定液后，各管加100 μL RNAase，37℃水浴30 min，加400 μL PI，4℃避光染色30 min，流式细胞仪检测细胞周期分布。

1.2.3 细胞凋亡率检测 细胞经不同处理，药物作用24、48 h后，收集各组细胞，预冷PBS洗涤2次。离心弃上清后。各管加5 μL PE及5 μL 7-ADD，避光染色15 min，流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.2.4 乳酸含量的检测 在药物分别作用24、48 h后，收集各组细胞并利用RIPA裂解提取总蛋白，BCA法测量蛋白浓度。按照乳酸含量检测试剂说明书进行操作，利用分光光度计检测样品在530 nm波长处吸光度值，通过以下公式来确定细胞内乳酸的含量：细胞乳酸含量（μmol/gprot）=（检测管OD值 - 空白测定管OD值）/（标准管OD值 - 空白测定管OD值）× 标准管浓度 / 总蛋白浓度。

1.2.5 PFK-1活性的检测 将细胞分别作用24、48 h后，以1.2.4方法获取蛋白。按照PFK-1活性检测试剂盒说明书进行操作，利用分光光度计检测样品在530 nm波长处吸光度值，通过以下公式来确定细胞内PFK-1活性：细胞PFK-1活性（U/gprot）=（检测管OD值 - 空白测定管OD值）/（标准管OD值 - 空白测定管OD值）× 标准管浓度 / 总蛋白浓度。

1.2.6 ATP水平的检测 药物作用4、8 h后，收集各组细胞，加入500 μL热双蒸水，置于100℃热水浴中匀浆破碎，后将细胞悬液于沸水浴中加热10 min，取出漩涡混匀1 min后按照A095的

ATP 含量检测试剂盒说明书操作, 利用分光光度计在 636 nm 波长处测定各管吸光度值。通过以下公式来确定细胞内 ATP 含量: ATP 浓度 ($\mu\text{mol/gprot}$) = (测定 OD 值 - 对照 OD 值) / (标准 OD 值 - 空白 OD 值) \times 标准品浓度 ($1 \times 10^3 \mu\text{mol/L}$) / 待测样品蛋白浓度 (gprot/L)。

1.2.7 Western blot 检测 Bcl-2、Bax、caspase-3 和 Cyt-c 蛋白的表达情况 药物作用 24、48 h 后, 收集各组细胞, 裂解细胞并提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 凝胶加样孔上样 50 μg 蛋白, GAPDH 做内参, 进行 15% SDS-PAGE 凝胶蛋白分离, 恒压将蛋白转至 NC 膜上, 在含 5% 脱脂奶粉的 PBST 溶液中室温下封闭 1 h, 加入兔抗人 Bcl-2 (1:1 000)、兔抗人 Bax (1:1 000)、兔抗人 caspase-3 (1:2 000)、兔抗人 Cyt-c (1:2 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, PBS 洗涤后, 室温下羊抗兔荧光二抗 (1:15 000) 避光孵育 1 h, 洗膜 3 次, 10 min/次; 使用红外扫膜仪 (Odyssey) 扫膜, Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值 / 内参蛋白的灰度值 $\times 100\%$ 。

1.3 统计学处理

计量资料结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 利用 SPSS 20.0 软件进行分析, 方差分析进行多样本均数的比较, 组间两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SCT 对胃癌 MGC-803 细胞的细胞周期与凋亡的影响

与阴性对照组比较, 随着 SCT 浓度增加, G_1 期和 S 期细胞减少, G_2/M 期细胞明显增多 (均 $P < 0.05$), 细胞周期阻滞在 G_2/M 期; 5-FU 处理组的细胞同样出现了明显的 G_2/M 期阻滞, G_2/M 期细胞数与阴性对照组相比明显增大 ($P < 0.05$) (图 1); 同时, 随着 SCT 浓度和作用时间的增加, 细胞凋亡率明显增大 (均 $P < 0.05$); 5-FU 组细胞凋亡率明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.2 SCT 对胃癌 MGC-803 细胞内乳酸含量和 PFK-1 活性以及细胞内 ATP 水平的影响

经 SCT 作用 24、48 h 后, 与阴性对照组比较, 细胞内 PFK-1 活性降低, 乳酸含量减少, 且随着 SCT 浓度增大、作用时间延长胞内乳酸含量减少更为明显 (均 $P < 0.05$); 而 5-FU 组对乳酸生成和 PFK-1 活性均无明显改变 (均 $P > 0.05$)。经 SCT 分别作用 4、8 h 后, 与阴性对照组比较, SCT 呈浓度与时间依赖性降低细胞内 ATP 水平 (均 $P < 0.05$); 5-FU 处理组对细胞 ATP 水平的影响与 SCT 的作用一致, 表现为降低胞内 ATP 水平 ($P < 0.05$) (图 3)。

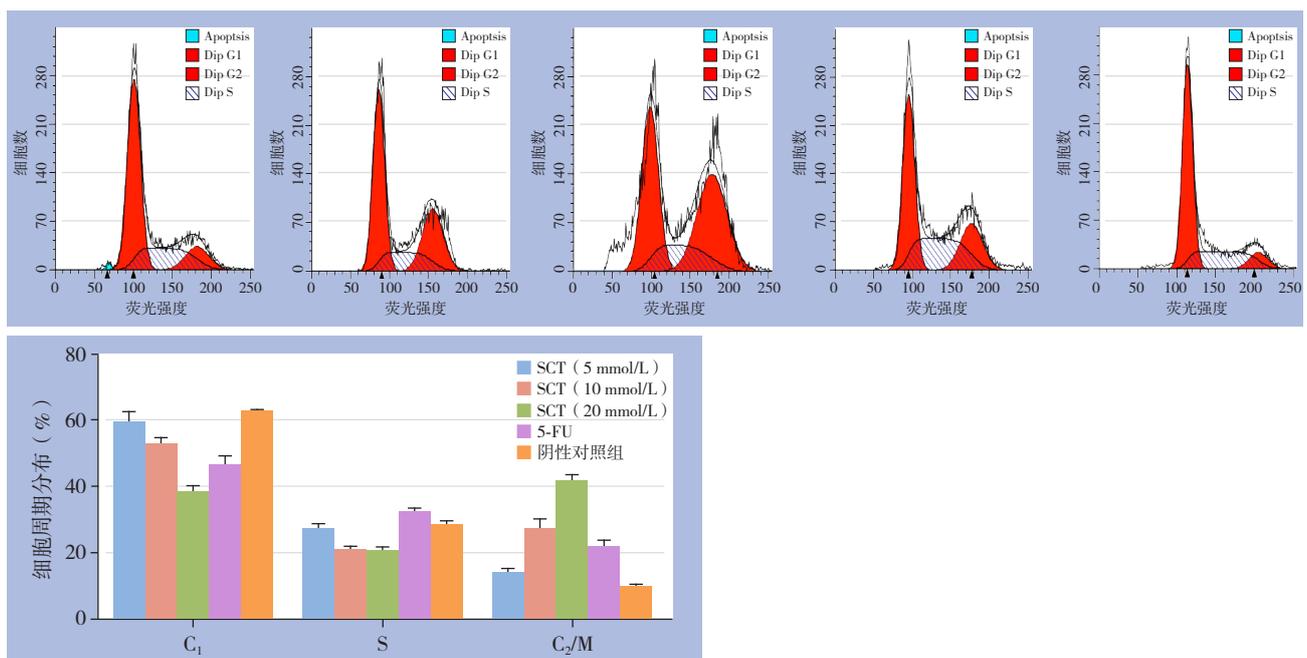


图 1 细胞周期检测

Figure 1 Cell cycle analysis

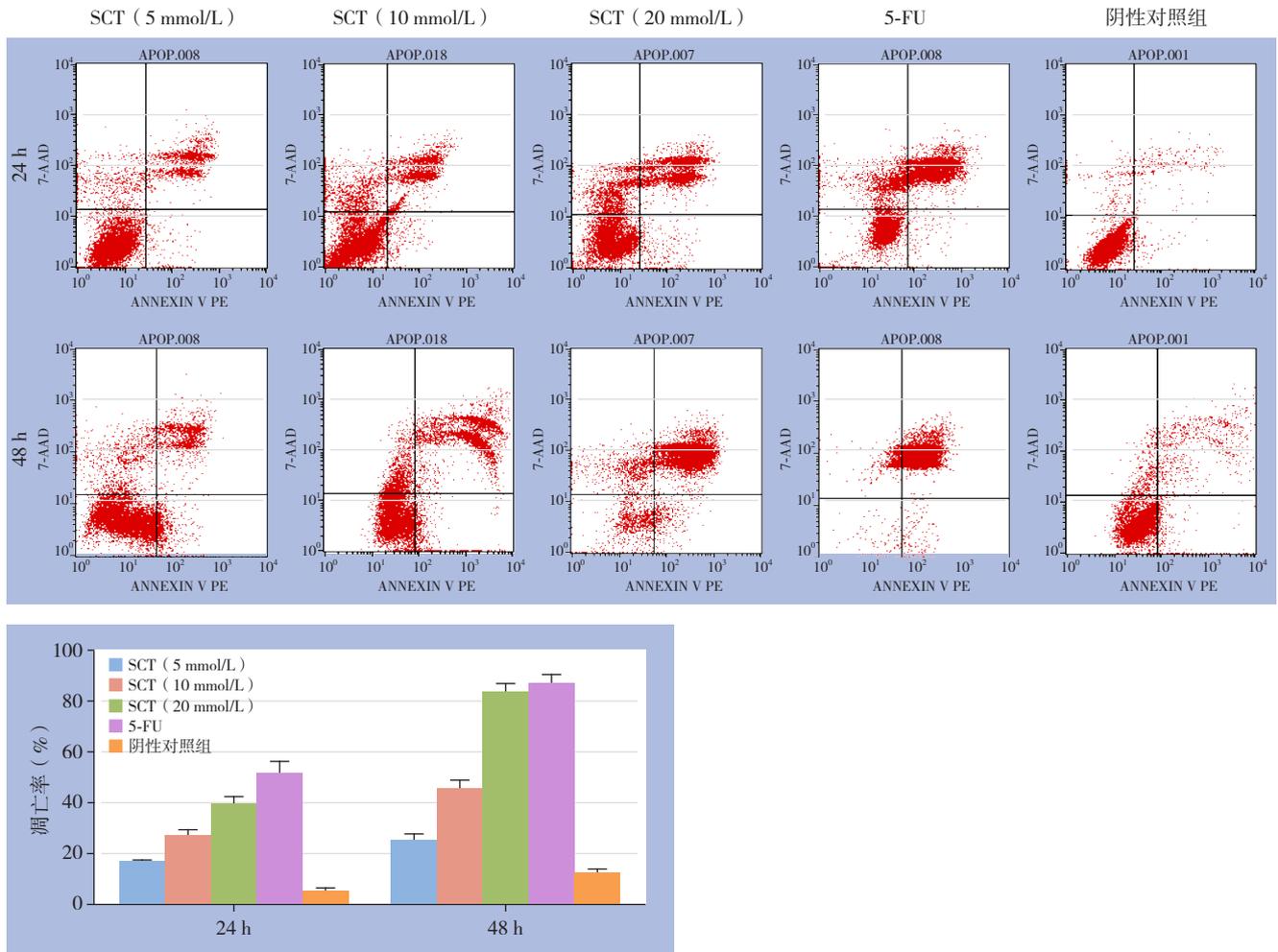


图 2 细胞凋亡检测
Figure 2 Apoptosis assay

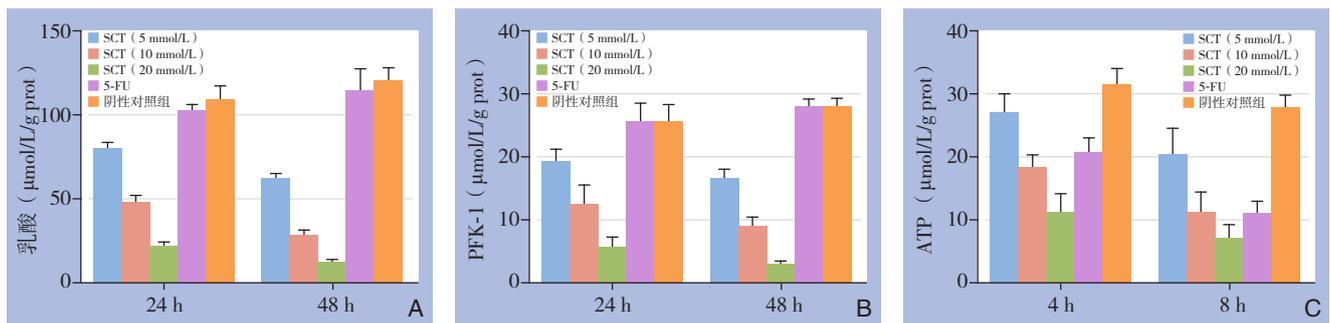


图 3 MGC-803 细胞糖酵解功能检测 A: 细胞内乳酸含量; B: 细胞内 PFK-1 活性; C: 细胞内 ATP 含量

Figure 3 Determination of the glycolysis function in MGC-803 cells A: Intracellular lactate content. B: PFK-1 activity; C: Intracellular ATP generation

2.3 SCT 对胃癌 MGC-803 细胞内 Bcl-2、Bax、caspase-3 和 Cyt-c 蛋白表达的影响

经 SCT 作用 24 h 后, 与阴性对照组相比, Bcl-2 蛋白的表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 而

Bax、caspase-3 和 Cyt-c 蛋白的表达水平明显增高 (均 $P < 0.05$), 且 5-FU 组对胃癌 MGC-803 细胞中 Bcl-2、Bax、caspase-3 和 Cyt-c 表达的影响与 SCT 一致 (图 4)。

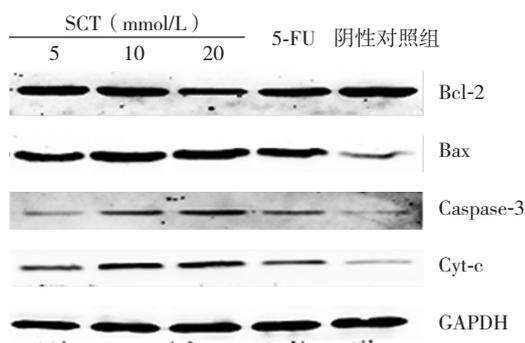
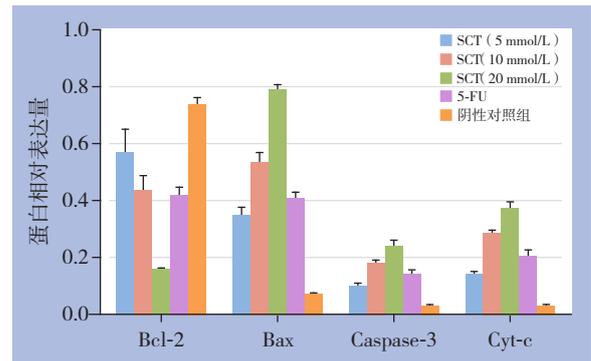


图4 凋亡相关蛋白表达检测

Figure 4 Measurement of the expressions of apoptosis-related proteins



3 讨论

有氧糖酵解是肿瘤细胞生长过程中的重要代谢改变,抑制糖酵解有望成为肿瘤治疗的有效途径^[15]。而糖酵解在肿瘤细胞中的作用机制尚未十分清楚。5-FU被广泛应用于临床的肿瘤化疗当中,其作用机制为干扰或阻断细胞核酸代谢而促使细胞死亡,对胃癌有明显的抑制作用^[16]。本研究利用5-FU作阳性对照药物,探讨和揭示SCT诱导胃癌MGC-803细胞凋亡的相关分子机制。

肿瘤细胞供应其生长与增殖的主要能量ATP来源于糖酵解途径,同时糖酵解的代谢中间产物可用于合成氨基酸、核苷酸和脂质^[17]。PFK-1是糖酵解途径的关键酶之一,其活性将直接影响细胞糖酵解产生ATP^[18],而乳酸则为葡萄糖经糖酵解途径的终产物,其含量能反映糖酵解的效率^[19]。本研究发现,SCT能降低MGC-803细胞内PFK-1的活性,抑制糖酵解效率,乳酸产生减少,降低ATP的产生,从而使细胞核酸合成障碍、周期发生阻滞,抑制其增殖,当细胞内能量消耗枯竭时,细胞内DNA发生持续性降解,从而促使胃癌细胞发生凋亡。此外,Bcl-2家族蛋白位于线粒体途径的上游,对线粒体途径诱导细胞凋亡具有重要的调节作用,其中Bcl-2/Bax对线粒体膜的稳定性与完整性起着决定性作用^[20-21]。Cyt-c为线粒体氧化呼吸链中的电子传递体,从线粒体中释放的Cyt-c能够诱导细胞发生凋亡,而caspase-3在线粒体凋亡途径中起着不可代替作用,激活的caspase-3能增高核酸内切酶的活性,裂解核小体的DNA,促进细胞凋亡。同时,Cyt-c的释放能够激活caspase-3的活性^[22]。本实验结果表明,SCT抑制抗凋亡蛋

白Bcl-2,增加促凋亡蛋白Bax的表达,增强线粒体的通透性、Cyt-c释放,从而激活caspase-3诱导MGC-803细胞发生凋亡。值得注意的是,实验中5-FU对于细胞内PFK-1活性和乳酸的含量均无明显改变,但其能阻滞细胞周期、降低细胞ATP水平,其对Bcl-2、Bax、caspase-3和Cyt-c的表达的影响与SCT一致,可推测5FU并非通过抑制糖酵解以抑制胃癌细胞的生长,而其可通过调节Bcl-2、Bax、caspase-3和Cyt-c的表达以及干扰核酸代谢实现其抗癌作用。

本研究中SCT与5-FU均有效地抑制胃癌细胞的生长,但与5-FU相比,SCT水溶性高,肝、肾毒性低^[23],有望成为新型有效的抗胃癌药物。本实验只在体外研究了SCT对胃癌MGC-803细胞的作用,仍需结合其他细胞模型和动物模型做进一步的研究以验证其抗胃癌效能。

参考文献

- [1] Lu Y, Zhang X, Zhang H, et al. Citrate induces apoptotic cell death: a promising way to treat gastric carcinoma?[J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(3):797-805.
- [2] 杨蔚,张毅,钟玲,等. 抑癌基因WTX对胃癌SGC-7901细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(4): 511-516.
Yang W, Zhang Y, Zhong L, et al. Influence of tumor suppressor WTX gene on proliferation, apoptosis and cell cycle of human gastric cancer SGC-7901 cells[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(4): 511-516.
- [3] Kim KW, Chow O, Parikh K, et al. Peritoneal carcinomatosis in patients with gastric cancer, and the role for surgical resection, cytoreductive surgery, and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy[J]. *Am J Surg*, 2014, 207(1):78-83.

- [4] Aurello P, D'Angelo F, Rossi S, et al. Classification of lymph node metastases from gastric cancer: comparison between N-site and N-number systems. Our experience and review of the literature[J]. *Am Surg*, 2007, 73(4):359-366.
- [5] Warburg O. On the origin of cancer cells[J]. *Science*, 1956, 123(3191): 309-314.
- [6] Danial NN, Gramm CF, Scorrano L, et al. BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis[J]. *Nature*, 2003, 424(6951):952-956.
- [7] 康冬梅. 恶性肿瘤糖代谢异常及临床对策[J]. *中国医学前沿杂志:电子版*, 2016, 8(1):11-14.
Kang DM. Abnormal sugar metabolism of malignant tumors and clinical counter measures[J]. *Chinese Journal of the Frontiers of Medical Science: Electronic Version*, 2016, 8(1):11-14.
- [8] 李阳, 张瑾. 基于糖酵解途径的乳腺癌治疗研究进展[J]. *中国肿瘤临床*, 2015, 42(21):1063-1066.
Li Y, Zhang J. Research progress in breast cancer treatment based on glycolytic pathway[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2015, 42(21):1063-1066.
- [9] El Sayed SM, El-Magd RM, Shishido Y, et al. 3-Bromopyruvate antagonizes effects of lactate and pyruvate, synergizes with citrate and exerts novel anti-glioma effects[J]. *J Bioenerg Biomembr.*, 2012, 44(1): 61-79.
- [10] Lincet H, Kafara P, Giffard F, et al. Inhibition of Mcl-1 expression by citrate enhances the effect of Bcl-xL inhibitors on human ovarian carcinoma cells[J]. *J Ovarian Res*, 2013, 6(1):72.
- [11] Halabe Bucay A. Hypothesis proved citric acid (citrate) does improve cancer: a case of a patient suffering from medullary thyroid cancer[J]. *Med Hypotheses*, 2009, 73(2): 271.
- [12] El Sayed SM, El-Magd RM, Shishido Y, et al. D-Amino acid oxidase-induced oxidative stress, 3-bromopyruvate and citrate inhibit angiogenesis, exhibiting potent anticancer effects[J]. *J Bioenerg Biomembr*, 2012, 44(5): 513-523.
- [13] Zhang X, Varin E, Allouche S, et al. Effect of citrate on malignant pleural mesothelioma cells: a synergistic effect with cisplatin[J]. *Anticancer Res.*, 2009, 29(4):1249-1254.
- [14] Wang TA, Zhang XD, Guo XY, et al. 3-Bromopyruvate and sodium citrate target glycolysis, suppress survivin, and induce mitochondrial-mediated apoptosis in gastric cancer cells and inhibit gastric orthotopic transplantation tumor growth[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(3):1287-1296.
- [15] Abliz G, Mijit F, Hua L, et al. Anti-carcinogenic effects of the phenolic-rich extract from abnormal Savda Munziq in association with its cytotoxicity, apoptosis-inducing properties and telomerase activity in human cervical cancer cells (SiHa)[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2015, 15:23. doi: 10.1186/s12906-015-0530-x.
- [16] Jiang YX. 多学科方法综合治疗胃癌[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(10):1354-1355.
Jiang YX. Multidisciplinary approach for the treatment of gastric cancer[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2015, 24(10):1354-1355.
- [17] Hyder F, Herman P, Bailey CJ, et al. Uniform distributions of glucose oxidation and oxygen extraction in gray matter of normal human brain: No evidence of regional differences of aerobic glycolysis[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2016, pii: 0271678X15625349. [Epub ahead of print]
- [18] Motawi TM, Sadik NA, Fahim SA, et al. Combination of imatinib and clotrimazole enhances cell growth inhibition in T47D breast cancer cells[J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 233:147-156. doi: 10.1016/j.cbi.2015.03.028.
- [19] Hoff J, Støren Ø, Finstad A, et al. Increased blood lactate level deteriorates running economy in World class endurance athletes[J]. *J Strength Cond Res*, 2016. [Epub ahead of print]
- [20] Gu X, Chen R, Hu G, et al. Cell apoptosis of caprine spleen induced by toxicity of cadmium with different levels of molybdenum[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015, 40(1): 49-56.
- [21] Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(6): 472-482.
- [22] Liu D, Zhou H, Wu J, et al. Infection by Cx43 adenovirus increased chemotherapy sensitivity in human gastric cancer BGC-823 cells: not involving in induction of cell apoptosis[J]. *Gene*, 2015, 574(2): 217-224.
- [23] Kim S, Yang JY, Jung ES, et al. Effects of sodium citrate on salt sensitivity and kidney injury in chronic renal failure[J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29(12):1658-1664.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 郭兴裕, 王婷安, 张晓东, 等. 柠檬酸钠促胃癌 MGC-803 细胞凋亡的作用及机制研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(4):535-540. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.012
Cite this article as: Guo XY, Wang TA, Zhang XD, et al. Promoting effect of sodium citrate on apoptosis in gastric cancer cells and its mechanism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(4):535-540. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.04.012