基础研究 文章编号：0253-3626(2009)05-0562-05

齐留通对胃癌 SGC-7901 细胞生长的影响

潘 敏，刘纯伦，方晓杰，石建华
（重庆医科大学附属第一医院消化内科，重庆 400016）

【摘 要】目的：观察 5-脂氧合酶抑制剂齐留通对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、凋亡的影响，初步探讨齐留通影响胃癌细胞生长的机制。方法：MTT 法测定齐留通对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响；TUNEL 染色法计数细胞凋亡率；RT-PCR和免疫细胞化学检测齐留通处理前后 SGC-7901 细胞 Bax、Bcl-2 和 caspase-3 mRNA 和其蛋白表达的改变。结果：齐留通以时间剂量依赖的方式抑制 SGC-7901 细胞生长；TUNEL 染色法显示 6.2×10^{-5} mol/L、3.1×10^{-5} mol/L 齐留通作用 72 h 后细胞凋亡率为 19.6%±6.3% 和 28.9%±2.3%，均显著高于对照组 0.6%±0.1%（$P<0.01$）；RT-PCR 和免疫细胞化学显示 6.2×10^{-5} mol/L 齐留通作用胃癌 SGC-7901 细胞 72 h 后，可显著促进 Bax、caspase-3 mRNA 和其蛋白的表达（$P<0.05$），抑制 Bcl-2 mRNA 及其蛋白的表达（$P<0.05$）。结论：齐留通能抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖，并通过促进 Bax 和 caspase-3的表达，抑制 Bcl-2表达，诱导其凋亡，从而抑制胃癌 SGC-7901 细胞生长。

【关键词】齐留通；胃癌；SGC-7901 细胞；5-脂氧合酶抑制剂；凋亡
【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-25

作者介绍：潘 敏（1982- ），女，硕士，
研究方向：消化道肿瘤。
通讯作者：刘纯伦，男，副教授，E-mail：lcl728@medmail.com.cn。
基金项目：重庆市卫生局课题（05-2-155）。

（由于肿瘤团块内压力太大，阻碍了肿瘤内淋巴管的生长），而且可促使淋巴管内肿瘤的生长和转移，在淋巴管转移通路中具有举足轻重的作用。VEGF-C 可以作为肿瘤新生淋巴管的特异性标记物。我们前期的实验也证实了这一点[1]。故我们期望针对 VEGF-C 这一新靶点设计一段反义核苷酸来观察其抗肿瘤生长及转移的作用。本实验证实：反义 VEGF-C 在体外有抑制人胃癌细胞生长，促进其调亡的作用，为我们下一步实验研究反义 VEGF-C 基因转染对人胃癌细胞成瘤性和新生淋巴管生成的影响奠定了基础。但反义 VEGF-C 基因转染在体内是否能抑制肿瘤细胞的生长，促进肿瘤细胞的凋亡，其又是通过什么途径来发挥其生物学特性的等一系列问题还有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] 彭庆弟，朱 鹏，时 德.VEGF-C 表达与微血管和淋巴管的关系及其在胃癌转移中的作用[J]. 重庆医科大学学报，2008，33（2）：159-162.

[2] 朱 鹏，张剑波，代远斌，等.血管内皮因子 -C 正、反义真核表达载体的构建及鉴定[J]. 解放军医学杂志，2008，33(12)：1455-1458.

[3] Krishnan J，Kirkin V，Steffen A，et al. Differential in vivo and in vitro expression of vascular endothelial growth factor（VEGF）-C and VEGF-D in tumors and its relationship to lymphatic metastasisin immunocompetent rats [J]. Cancer Res，2003，63(3)：713-722.

[4] Hung C J，Ginzinger D G，Zameger R，et al. Expression of vascular endothelial growth factor C in benign and malignant thyroid tumors[J]. J Clin Endocrinol Meta，2003，88(8)：3694-3699.

[5] Onogawa S，Kitadai Y，Tanaka S，et al. Expression of VEGF-C and VEGF-D at the invasive edge correlates with lymph nodemetastasis and prognosis of patients with colorectal carcinoma[J]. Cancer Sci，2004，95(1)：32-39.

[6] 高 渝，张唯力，曾 翔，等.VEGF 反义寡核苷酸对裸鼠膀胱癌移植瘤的抑制作用研究[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(9)：1084-1087.

[7] Koyama Y，Kaneko K，Akazawa K，et al. Vascular endothelial growth factor C and vascular endothelial growth factor D messenger RNA expression in breast cancer：association with lymph node metastasis[J]. Clin Breast Cancer，2003，4(5)：354-360.

[8] Jennbacken K，Vallbo C，Wang W，et al. Expression of vascular endothelial growth factor C（VEGF-C）and VEGF receptor-3 in human prostate cancer is associated with regional lymph node metastasis [J]. Prostate，2005，65(2)：110-116.

（责任编辑：冉明会）

Zileuton, a 5-LOX inhibitor, inhibits proliferation and induces apoptosis of SGC-7901 gastric cancer cells

PAN Min, et al

(*Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the efficacy of 5-LOX inhibitor zileuton on the proliferation and apoptosis of human gastric carcinoma cell line SGC-7901, and to explore the mechanisms of apoptosis induced by zileuton. *Methods*: The proliferation of SGC-7901 cells was detected by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assays. TUNEL staining was used to evaluate the apoptosis of SGC-7901 cells. The changes of Bax, Bcl-2 and caspase-3 mRNA expression were studied by reverse transcription polymerase chain reaction. Bax, Bcl-2 and caspase-3 protein expression were analyzed by immunocytochemistry in SGC-7901 cells treated with zileuton. *Results*: Zileuton can decrease the proliferation significantly in a dose-dependent and time-dependent manner in SGC-7901 cells. TUNEL staining showed that the apoptosis rate was elevated with the increase of zileuton concentration ($P<0.01$). 6.2×10^{-5} mol/L zileuton effectively inhibited the mRNA and protein expression of Bcl-2 ($P<0.05$), but increased Bax and caspase-3 expression ($P<0.05$). *Conclusion*: 5 LOX inhibitor zileuton can inhibit proliferation and induce apoptosis of SGC-7901 cells by down regulating the expression of Bcl-2 and up regulating Bax and caspase-3.

【Key words】Zileuton; Gastric cancer; SGC-7901 cells; 5-LOX inhibitor; Apoptosis

脂氧合酶(Lipoxygenase, LOX)是催化花生四烯酸(Arachidonic acid, AA)转化为羟基二十碳四稀酸(Hydroxyeicosatetraenoic acids, HETEs)、过氧化羟基二十碳四稀酸(Hydroperoxyeicosatetraenoic acid, HPETEs)和白三烯(Leukotrienes, LTs)的关键酶。AA代谢酶可通过调控体内氧化还原平衡和调节凋亡、增殖相关因子影响细胞生长[1-3]。齐留通能通过抑制5-LOX活性,抑制AA转化为白三烯B4(Leukotrienes B4, LTB4),是特异性5-LOX抑制剂。本研究用5-LOX抑制剂齐留通作用于胃癌SGC-7901细胞株,检测用药后胃癌细胞增殖、凋亡的变化,并从基因和蛋白水平检测用药前后B细胞淋巴瘤/白血病-2(B cell lymphoma/leukemia, Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein, Bax)和含半胱氨酸的门冬氨酸特异水解酶-3 (Cystein-containing aspartate-specific protease-3, Caspase-3)的变化,初步探讨齐留对胃癌细胞生长的影响及其可能的机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株:胃癌细胞株SGC-7901由本实验室传代培养。主要试剂:齐留通(北京高盟化工有限公司),TUNEL试剂盒(Roche公司),Bax、Bcl-2、caspase-3抗体(北京中衫生物有限公司),RT-PCR试剂盒(Takara公司),PCR引物由Intringen公司合成。

1.2 方法

细胞在含100 ml/L新生牛血清的RPMI 1640培养基中,于37℃,50 ml/L CO_2培养箱中常规培养。收集对数生长期细胞进行实验。齐留通溶于无水乙醇中,置于-20℃避光保存。使用时用无血清的RPMI 1640培养液稀释至终浓度,所有处理组的乙醇浓度均<0.1%(该浓度对细胞无明显损害)。

1.2.1 细胞毒性实验(MTT实验) 取对数生长期细胞接种

表1 引物序列

引物名称	序列	产物长度
Bax	上游序列:5'-CTGACATGTTTTCTGACGGC-3'	289 bp
	下游序列:5'-TCAGCCCATCTTCTTCCAGA-3'	
Bcl-2	上游序列:5'-ACACTGTTAAGCATGTGCCG-3'	318 bp
	下游序列:5'-CCAGCTCATCTCACCTCACA-3'	
caspase-3	上游序列:5'-AAGCGAATAATGGACTCTG-3'	383 bp
	下游序列:5'-GACTTCTACAACGATCCCCTC-3'	
β-actin	上游序列:5'-CCACGAAACTACCTTCAACTCC-3'	272 bp
	下游序列:5'-ACTCGTCATACTCCTGCTTGCT-3'	

于 96 孔板,实验组加入药物终浓度分别为 4×10^{-5} mol/L、8×10^{-5} mol/L、1.2×10^{-4} mol/L、1.6×10^{-4} mol/L、2×10^{-4} mol/L 的培养基。对照组加含等体积 PBS 培养液,分别培养 24 h、48 h 和 72 h,加入 MTT 溶液(5 g/L) 20 μl,37℃孵育 4 h 后吸去上清,每孔加 DMSO 200 μl,振荡 10 min。测 560 nm 波长处每孔的吸光度值(A 值),求平均值。实验组按照下列公式计算细胞抑制率:抑制率(IR%)=(对照组 A 值 - 实验组 A 值)/ 对照组 A 值 × 100%。

1.2.2 TUNEL 染色法测细胞凋亡 将经 6.2×10^{-5} mol/L、3.1×10^{-5} mol/L 齐留通处理 72 h 的实验组及对照组的细胞爬片用 4%多聚甲醛固定,按照 TUNEL 试剂盒的产品说明书操作。DAB 显色,光镜下观察、计数,每片计数 500 个细胞,计算细胞凋亡率(即每 100 个细胞中 TUNEL 阳性细胞所占的百分比)。

1.2.3 RNA 抽提和 RT-PCR 检测 设 6.2×10^{-5} mol/L 齐留通处理组和不加药物的对照组,72 h 后收集细胞,常规提取 RNA,再按 RT-PCR 试剂盒说明书,逆转录得 cDNA。合成的引物序列见表 1。常规 PCR 扩增。循环参数如下:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,最佳退火温度 30 s,72℃延伸 30 s。35 个循环后,72℃ 延伸 10 min。取 PCR 反应产物 5 μl 于 1.5 % 琼脂糖凝胶上电泳,用凝胶成像系统对 DNA 条带进行半定量分析,以目的基因/β-actin 的比值表示相对表达水平。实验重复 3 次。

1.2.4 免疫细胞化学 将经 6.2×10^{-5} mol/L 齐留通处理 72 h 的实验组及对照组细胞爬片用 4%多聚甲醛固定,严格按照免疫组化试剂盒的产品说明书操作,DAB 显色。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,同时设立阳性对照。应用北航 CM 2000 B型生物医学图像分析系统对免疫细胞化学结果进行图像采集,然后用 Image Pro Plus 5.0 图像分析系统分析结果,取平均光密度值(Average Optical density,AOD)。

1.2.5 统计学处理 所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS 10.0 软件进行数据统计分析。两组均数间比较采用 t 检验,多组比较采用方差分析,率间比较采用 χ^2 检验,回归分析采用线性回归分析。$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 齐留通对 SGC-7901 细胞生长的影响

齐留通对 SGC-7901 细胞表现出抑制作用,且随时间延长剂量增加,抑制作用增强,差异有统计学意义($P<0.05$)。不同浓度的齐留通作用不同时间对 SGC-7901 增殖的影响见表 2、图 1。计算出 24 h、48 h、72 h 的 IC_{50} 值分别为 2.24×10^{-4} mol/L、1.62×10^{-4} mol/L、1.25×10^{-4} mol/L。以 SGC-7901 细胞增殖抑制率对药物浓度值作药物量效的线性回归分析,可见两者间存在线性关系,显示出给药浓度与抑制率呈正相关。

(24 h:Y=0.021X-0.012,r=0.975,P<0.01;48 h:Y= 0.032X-0.016,r=0.993,P<0.01;72 h:Y=0.395X+0.008,r=0.985,P<0.01;X 为药物浓度,Y 为抑制率)。

2.2 齐留通对 SGC-7901 细胞凋亡的影响

对照组细胞凋亡指数为 0.6% ± 0.1%,3.1×10^{-5} mol/L、6.2×10^{-5} mol/L 齐留通组细胞凋亡指数分别为 19.6%± 6.3%、28.9% ± 2.3%。随着药物浓度的增加,细胞的凋亡指数升高。对照组与实验组及各实验组间比较,差异均有统计学意义(P<0.01),见图 2。

2.3 齐留通对 SGC-7901 细胞 Bax、Bcl-2、caspase-3 mRNA 的影响

胃癌细胞 SGC-7901 经 6.2×10^{-5} mol/L 齐留通处理 72 h 后,Bcl-2 mRNA 显著减弱,Bax、caspase-3 mRNA 显著增加(P<0.05),(表 3、图 3)。

2.4 免疫细胞化学

SGC-7901 细胞经 6.2×10^{-5} mol/L 齐留通处理 72 h 后,Bcl-2 蛋白表达显著减弱,Bax 和 caspase-3 蛋白表达显著增强, 前后 AOD 值差异有统计学意义(P<0.05),见表 4、图 4。

3 讨 论

AA 在流行病学研究中被认为是多种肿瘤的高危因素,而且 AA 通过环氧合酶-2(Cyclooxygenase-2,COX-2)及几种 LOX 的代谢产物已被大量实验证实具有促进肿瘤发生与发展的作用[2,3]。我们的前期研究中观察到 COX-2 抑制剂对胃癌、肝癌有抑制

表 2 齐留通对 SGC-7901 增殖的抑制率($\bar{x}\pm s$,n=6)

浓度($\times10^{-5}$ mol/L)	24 h	48 h	72 h
4	0.04±0.01	0.09±0.02	0.16±0.01
8	0.19±0.01	0.28±0.01	0.29±0.02
12	0.24±0.01	0.36±0.04	0.52±0.05
16	0.35±0.02	0.48±0.03	0.69±0.02
20	0.38±0.06	0.63±0.02	0.75±0.03

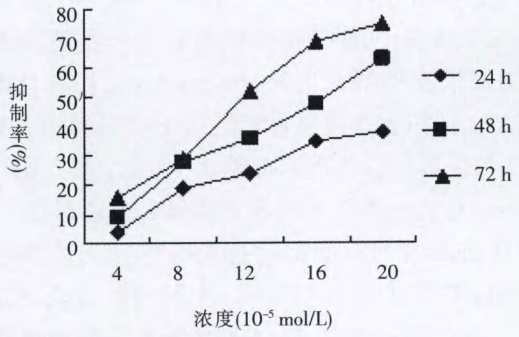
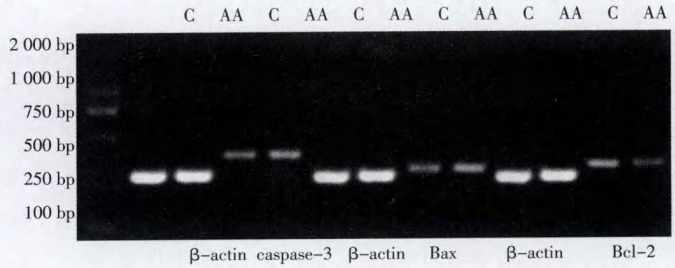
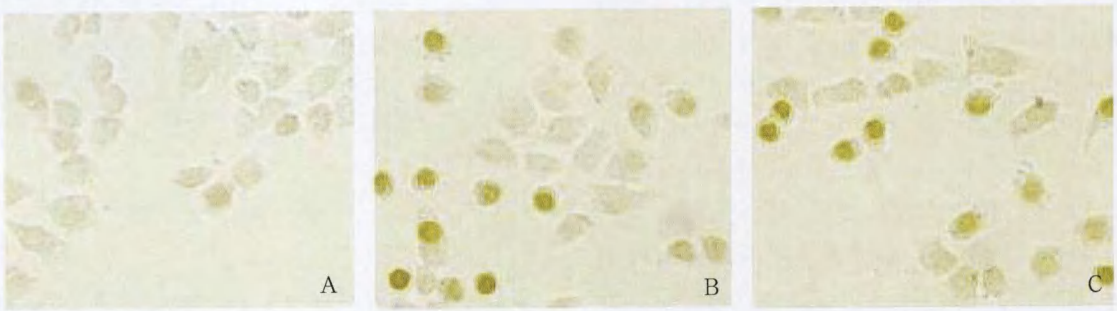


图 1　齐留通对胃癌 SGC-7901 细胞株增殖的抑制率



C. 对照组；AA. 6.2×10^{-5} mol/L 齐留通处理组

图 3　6.2×10^{-5} mol/L 齐留通处理 SGC-7901 72 h 后 Bax、Bcl-2、caspase-3 mRNA 的变化



A. 对照组；B. 3.1×10^{-5} mol/L 组；C. 6.2×10^{-5} mol/L 组

图 2　齐留通作用 72 h 后 SGC-7901 细胞凋亡指数(TUNEL 法×200)

表 3　齐留通对 SGC-7901 细胞中 Bax、Bcl-2，caspase-3 mRNA 的影响($\bar{x}\pm s$，n=3)

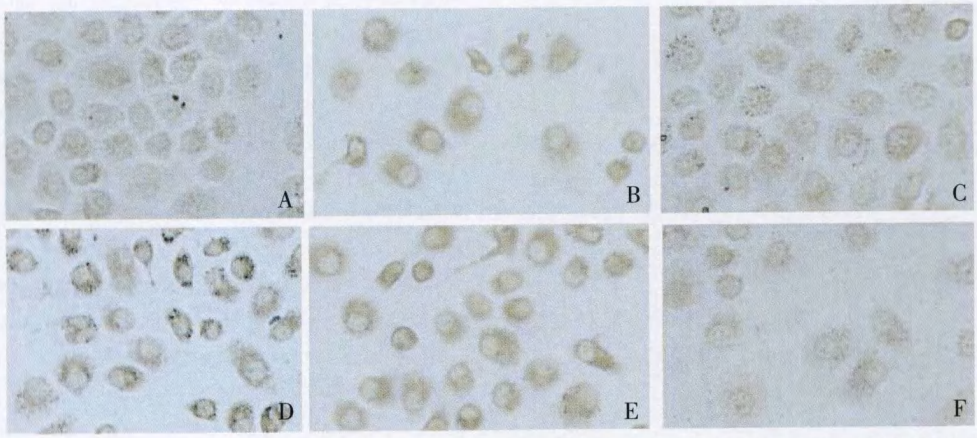
分组	Bax	Bcl-2	caspase-3
对照组	0.15 ± 0.02	0.25 ± 0.02	0.13 ± 0.02
处理组	0.28 ± 0.03*	0.14 ± 0.01*	0.39 ± 0.03*

同对照组比较，*P<0.05

表 4　齐留通对 SGC-7901 细胞中 Bax、Bcl-2，caspase-3 蛋白表达的影响(AOD)($\bar{x}\pm s$，n=5)

分组	Bax	caspase-3	Bcl-2
对照组	0.06 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.23 ± 0.02
处理组	0.27 ± 0.01*	0.19 ± 0.03 *	0.11 ± 0.01*

同对照组比较，*P<0.05



A. 对照组 Bax；B. 处理组 Bax；C. 对照组 caspase-3；D. 处理组 caspase-3；E. 对照组 Bcl-2；F. 处理组 Bcl-2

图 4　免疫组化图片(SP 法×200)

生长的作用[4,5]。LOX 是一种二氧合酶,能够识别 AA 的 1,4-戊二烯结构,并可以将单个氧分子结合到脂肪酸骨架的特殊碳原子上。在人体组织根据 AA 上氧合位点的不同将 LOX 分为 4 种主要类型,分别为 5-LOX、8-LOX、12-LOX 和 15-LOX。目前由于 5-LOX 产物的重要性而使 5-LOX 受到了足够的重视。有研究表明 5-LOX 活性及表达在多种肿瘤组织中都明显升高,且 5-LOX 抑制剂抑制肿瘤生长的作用比 COX-2 抑制剂强[6,7]。肿瘤的发生发展是多阶段、多因素、多基因变化的结果。肿瘤细胞的生物学特征之一就是恶性增殖,恶性增殖主要是细胞内周期素依赖性激酶(Cyclin dependent kinase,CDK)活性增高所致,而 CDK 的活性依赖与其正调节亚基周期素(Cyclin)的顺序性表达及其负调节亚基CDK 抑制因子(Cyclin dependent kinase inhibitor,CDI)的浓度,同时也与检查点及检查机制障碍有关。本研究 MTT 结果显示 5-LOX 抑制剂齐留通能以时间剂量依赖方式抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖,提示齐留通可通过抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖而抑制其生长,其具体机制有待进一步研究。

细胞凋亡不足是肿瘤的另一生物学特征。凋亡信号转导激活凋亡基因,进一步激活凋亡执行者,导致细胞结构全面解体。目前,细胞凋亡相关基因多达数十种,根据功能不同可分为 3 类:抑制凋亡基因,如:凋亡蛋白抑制因子(Inhibitor of apoptosis protein,IAP)、Bcl-2,促进凋亡的基因,如:Bax、白介素-1β 转换酶(Interlenkin-1β converting enzyme,ICE)等,双向调节基因,如:Bclx。其中 Bcl-2 和 Bax 研究得较为详细而系统。凋亡的执行者是核酸内切酶和 Caspase,目前已发现 Caspase 家族有 10 多个成员,caspase-3 是其中的一个重要成员。本研究TUNEL 结果显示,齐留通可引起胃癌细胞凋亡增加,且药物浓度的越高,诱导细胞的凋亡作用越强。RT-PCR 和免疫细胞化学显示齐留通可使 Bax、caspase-3 mRNA 及其蛋白的表达增加,Bcl-2 mRNA 及其蛋白表达减少。这与一些研究结果相似[8]。Bcl-2 基因是一原癌基因,能抑制细胞凋亡[9],Bax 是一种诱导凋亡的基因。Bcl-2 可与促凋亡 Bax 形成二聚体,如果 Bax 相对量高于 Bcl-2,则 Bax 同二聚体的数量增多,从而促进细胞死亡;而如果 Bcl-2 相对量高于 Bax,则促进形成 Bcl-2/Bax 异二聚体,并使 Bcl-2 同二聚体的量增多,从而抑制细胞死亡[10]。齐留通使 Bcl-2 与 Bax 的比例明显下降,caspase-3 蛋白和基因表达增加。这提示齐留通可能通过下调抑制凋亡基因 Bcl-2 与促进凋亡基因 Bax 的比例,激活凋亡执行者 caspase-3,从而诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡。

目前国内外对齐留通抗肿瘤作用的研究还很不全面,如将其应用于临床,许多问题还缺乏系统研究。本实验观察到 5-LOX 抑制剂齐留通既能抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖,又通过促进 Bax 和 caspase-3 的表达,抑制 Bcl-2 表达,诱导其凋亡,从而抑制胃癌 SGC-7901 细胞生长,表明齐留通具有潜在的临床应用价值,但对体内胃癌生长的影响有待动物实验等进一步研究。

参 考 文 献

[1] Zykova T A,Zhu F,Zhai X,et al. Resveratrol directly targets COX-2 to inhibit carcinogenesis[J]. Mol Carcinog,2008,47(10):797-805.

[2] Demke W,Rie C,Grothey A,et al. Cyclooxygenase-2:a novel target for cancer chemoterapy[J]. J Cancer Res Clin Dncol,2001,127(7):411-417.

[3] Goossens L,Pommery N. COX-2/5-LOX dual acting anti-inflammatory drugs in cancer chemotherapy[J]. Curr Top Med Chem,2007,7(3):283-296.

[4] 刘纯伦,唐承薇,周旭春. 3 种选择性环氧合酶 -2 抑制剂对肝细胞癌生长的影响[J]. 胃肠病学,2004,9(1):5-8.

[5] 刘纯伦,唐承薇,周旭春,等.罗非昔布与奥曲肽联合应用增强抑制人胃癌细胞株的生长[J]. 基础医学与临床,2004,24(3):277-281.

[6] Nielsen C K,Ohd J F,Wikstrom K,et al. The leukotriene receptor CysLT1 and 5- Lipoxygenase are upregulated in colon cancer[J]. Adv Exp Biol,2003,5(25):201-204.

[7] Li N,Sood S,Wang S,Fang M,et al. Overexpression of 5-Lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in hamster and human oral cancer and chemopre ventive effects of zileuton and celecoxib[J]. Clin Cancer Res,2005,11(5):2089-2096.

[8] Fan X M,Tu S P,Lam S K,et al. Five- lipoxygenase- activating protein inhibitor MK-886 induces apoptosis in gastric cancer through upregulation of $p27^{kip1}$ and bax[J]. J Gastroenterol Hepatol,2004,19(1):31-37.

[9] Coultas L,Strasser A. The role of the Bcl-2 protein family in cancer [J]. Semin Cancer Biol,2003,13(2):115-123.

[10] Yi X,Yin X M,Dong Z.Inhibition of Bid-induced apoptosis by Bcl-2.tBid insertion,Bax translocation,and Bax/Bak oligomerization suppressed[J]. Biol Chem,2003,78(19):16992-16999.

(责任编辑:关蕴良)