维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)01-0070-04

丝裂霉素 C 联合蛙皮素增强抗胃癌作用的体外实验

叶序卷,王 立,宁敏曼

(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨丝裂霉素 C 联合蛙皮素在体外诱导人胃癌细胞的凋亡作用。方法:利用体外细胞培养、MTT 比色技术及流式细胞仪等方法,在对照组、丝裂霉素 C(MMC)组、蛙皮素(BOM)组和 MMC+BOM 组中,用不同浓度的 BOM 及 MMC,对人胃癌细胞株 SGC7901 的生长曲线、细胞抑制率和细胞凋亡率的影响。结果:在一定浓度范围内,BOM 对胃癌细胞的促生长作用及 MMC 的抑制作用均呈时间 - 剂量依赖性。BOM 组、对照组、MMC 组和 MMC + BOM 组的胃癌细胞生存率依次为 90.00%、82.96%、65.07%、60.14%;凋亡率在 MMC + BOM 组明显增高(29.26%),与对照组(4.72%)或 BOM 组(5.13%)两两比较时,具有显著性差异($P<0.01$);MMC + BOM 组凋亡率(29.26%)较 MMC 组(25.11%)高,在统计学上具有差异性意义($P<0.05$)。结论:虽然 BOM 在体内外能刺激胃癌细胞增殖,但与抗癌药 MMC 联合后,可协同 MMC 对胃癌细胞的凋亡,提高抗癌药的疗效。

【关键词】蛙皮素;丝裂霉素;胃癌

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 09 - 29

Reinforcement of anticancer effect of combined mitomycin and bombesin on human gastric cancer cell in vitro

YE Xujuan, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the effects of combined mitomycin (MMC) and bombesin (BOM) on apoptosis of human gastric cancer cell in vitro. *Methods*: Four groups were formed: control group, MMC group, BOM group and MMC+BOM group. The effects of different concentrations of MMC and BOM, on the rate of cell existence, and cell apoptosis in human gastric cancer line SGC 7901 were studied in four groups by using cell culture, MTT assay and flow cytometry. *Results*: Within the scope of certain density, the multiplication effect of BOM, and the inhibitory action of MMC on stomach cancer cell line SGC 7901 were in a time and dose dependent manner. The rates of cell existence in four groups were respectively 90.00% in BOM group、82.96% in control group、65.07% in MMC group and 60.07% in MMC+BOM group, lowered one by one in order. There was significant difference in statistics about the rate of apoptosis between MMC+BOM group (29.26%) and control group (4.72%) or BOM group (5.13%) ($P<0.01$). The rates of apoptosis in MMC+BOM group (29.26%) and MMC group (25.11%) had difference in statistics ($P<0.05$). *Conclusion*: BOM cooperating with MMC could effectively induce the apoptosis of gastric cancer cells though it accelerates the multiplication of human gastric cancer cells in vivo or in vitro. So it could increase curative effects of anticancer agent (MMC) on cancer cells.

【Key words】Bombesin; Mitomycin; Gastric carcinoma

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,且具有恶性程度高及转移早的生物学特性,临床上发现的病例多为进展期胃癌,手术疗效不尽完美,所以化疗成为治疗胃癌的主要辅助治疗手段;对于进展期胃癌特别是化疗疗效不显著者,G_0 期细胞比较多,在胃癌的常规化疗中 G_0 期细胞往往存活下来,且大多数化疗药对 G_0 期细胞是不起作用的,这就成为复发和转移的根源;探索化疗药物如丝裂霉素 C 联合其它药物,促使 G_0 期细胞尽可能进入增殖期,充分发挥化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用,成为目前临床上关注的热点之一。本实验从体外胃癌细胞培养的角度,观察并探讨丝裂霉素 C 联合蛙皮素对人胃癌细胞株 SGC7901 生长情况的影响,为化疗药物以及蛙皮素相关制剂对胃癌进行生物学治疗提供依据。

作者介绍:叶序卷(1975—),男,硕士,
主要研究方向:消化系疾病治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 肿瘤细胞株

人 SGC7901 胃癌细胞株由本校病理生理教研室提供，用含 5% 胎牛血清的 RPMI－1640 完全培养液，37℃，5% CO_2 条件下培养。

1.2 主要试剂及仪器

胎牛血清购于杭州四季青生物工程材料公司；RPMI－1640 培养粉为美国 Gibco 公司产品，蛙皮素（Bombesin，BOM）、噻唑蓝（MTT）为美国 Sigma 公司产品；丝裂霉素 C（MMC）为日本京都协和发酵工业株式会社制造；二甲亚砜（DMSO）购于美国 Merck 公司；Annexin V-FITC 试剂盒为晶美生物工程有限公司产品；自动酶标仪型号为美国的 Bio-Tek Elx800；流式细胞仪为美国 FACS Calibur BD。

1.3 实验分组

本实验以模拟临床用药剂量时，人体血浆最大浓度、相关文献报道[1]及体外预实验结果为参考，将 MMC 的剂量分为：20、10、5、2.5、1.25mg/L 5 个浓度。BOM 则根据文献[2-4]结合本研究的预实验制定五个浓度等级（40、20、10、5、2.5μg/L）。实验分为：对照组（C）、丝裂霉素组（M）、蛙皮素组（B）及 MMC＋BOM 组（M＋B），M 组和 B 组根据药物浓度不同各分为 5 个亚组，M+B 组中药物浓度根据预实验结果计算 MMC 的中效浓度（IG_{50}）及 BOM 参照文献[3]所设定，详见（表 1）。

1.4 MTT 显色法

检测 MMC 和 BOM 分别作用于胃癌细胞的时效量效关系（M 组和 B 组），将备用的细胞悬液接种于 96 孔板，90μl/孔，每组设 5 个复孔。4h 细胞完全贴壁后加入受试药物（10μl/孔），药物剂量见表 1，置于培养箱中分别培养 1、2 和 3 天。另外 C、M3、B3 和 M+B 组按上述方法重新接种 96 孔板培养 24h 用于检测细胞抑制率，同样每组设 5 个复孔。实验终止前 4h，每孔加入 MTT 液（5g/L）20μl，实验结束后去除每孔溶液，加入 DMSO 150μl/孔，振荡 10min，用自动酶标仪在 570nm 波长下测定每孔的 A 值。

表 1 实验分组和药物剂量

组别	药物剂量	
	MMC（mg/L）	BOM（μg/L）
C	0	0
M1	1.25	0
M2	2.5	0
M3	5	0
M4	10	0
M5	20	0
B1	0	2.5
B2	0	5
B3	0	10
B4	0	20
B5	0	40
M+B	5	10

1.5 流式细胞仪样品制备

将细胞悬液接种于 6 孔板中，2ml/孔，每组设 3 个复孔，4h 细胞完全贴壁后加入药物。有 C、M3、B3 和 M+B 四组检测细胞凋亡，加药方案见表 1。培养 24h 后收集细胞，按 Annexin V-FITC 试剂盒说明书操作，上流式细胞仪进行分析。

1.6 统计学处理

数据用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；应用配对 t 检验和 F 检验进行分析。

2 结 果

2.1 MTT 显色法测定

2.1.1 时效量效关系比较 由结果可见（见表 2、3），随着浓度增加，BOM 促胃癌细胞增殖效应增强，而 MMC 对胃癌细胞的抑制率增大；随着时间延长，BOM 促胃癌细胞生长作用增强，而 MMC 对胃癌细胞的抑制率也增大，即在一定浓度范围内，BOM 对胃癌细胞的促生长作用及 MMC 对胃癌细胞的抑制作用均呈时间－剂量依赖性。BOM、MMC 对胃癌细胞的量效时效关系曲线见图 1、2。

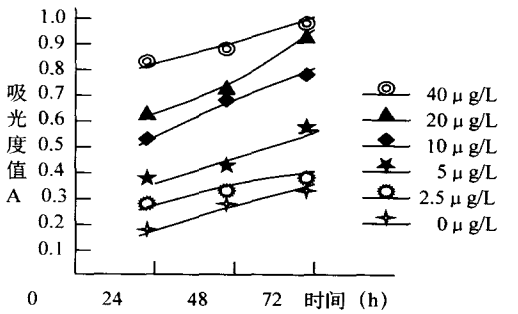


图 1 对照组、BOM 组生长曲线

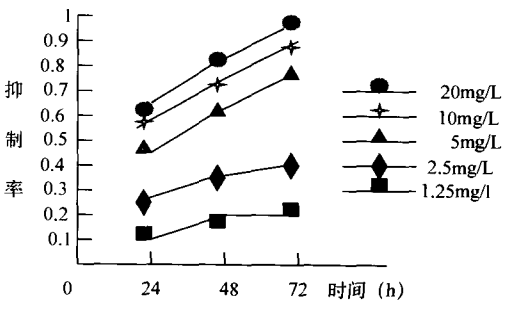


图 2 MMC 组生长曲线

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 MTT 法检测不同浓度、不同时间 BOM 刺激胃癌细胞的增殖($\bar{x}\pm s$)

组别	BOM浓度（μg/L）	吸光度值（A）		
		24h	48h	72h
C	0	0.19 ± 0.01	0.25 ± 0.02	0.31 ± 0.01
B1	2.5	0.26 ± 0.02	0.33 ± 0.01	0.39 ± 0.02
B2	5	0.37 ± 0.03**	0.42 ± 0.01**	0.58 ± 0.02**
B3	10	0.49 ± 0.01*	0.68 ± 0.03*	0.79 ± 0.02*
B4	20	0.61 ± 0.02*	0.74 ± 0.01*	0.90 ± 0.01*
B5	40	0.83 ± 0.01*	0.89 ± 0.02*	0.94 ± 0.02*

注：与对照组相比，*P<0.01， **P<0.05。

表 3 MTT 法检测不同浓度、不同时间 MMC 对胃癌细胞的抑制率($\bar{x}\pm s$)

组别	MMC浓度（mg/L）	抑制率			
		24h	48h	72h	
M1	1.25	0.091 ± 0.028	0.158 ± 0.019	0.210 ± 0.020	F=41.743
M2	2.5	0.244 ± 0.089	0.347 ± 0.045	0.384 ± 0.025	P<0.01
M3	5	0.490 ± 0.088	0.613 ± 0.151	0.782 ± 0.078	
M4	10	0.583 ± 0.084	0.750 ± 0.087	0.900 ± 0.039	
M5	20	0.679 ± 0.011	0.850 ± 0.042	0.961 ± 0.048	
F' =151.328					
P' <0.01					

注：F' 和 P' 值为时间组之间比较的方差分析（F 检验）结果；F 和 P 值为浓度组之间比较的方差分析（F 检验）结果。

2.1.2 细胞抑制率 M 组和 M+B 组对胃癌细胞的生长产生明显抑制作用，与对照组比较，细胞生长抑制率明显提高；M+B 组与对应 B 组配对比较，细胞抑制率也高于后者；M+B 组与 M 组比较两者也有差异性（P<0.05），前者高于后者；BOM 组与对照组比较，细胞生存率显著增加，具有统计学意义（P<0.05），提示 BOM 在体外能促进胃癌细胞增殖。

2.2 Annexin V 联合 PI 双参数检测胃癌细胞凋亡

有 C、M3、B3、M+B 四组胃癌细胞进行了凋亡检测，结果见表 4，B 组、C 组、M 组和 M + B 组的细胞生存率依次降低，凋亡率则从 C 组、B 组、M 组到 M + B 组依次升高，M + B 组的凋亡率与 C 组、B 组两两比较具有显著差异性（P<0.01），M + B 组的凋亡率较 M 组高，两组之间比较有差异性（P<0.05）。

表 4 丝裂霉素 C、蛙皮素干预胃癌细胞的生长情况

组别	MMC (mg/L)	BOM (μg/L)	胃癌细胞	
			生存率（%）	凋亡率（%）
C	0	0	82.96	4.72
M3	5	0	65.07	25.11
B3	0	10	90.00	5.13
M+B	5	10	60.14	29.26

3 讨 论

在临床上，胃癌患者进行化疗的目的是为了有效地诱导胃癌细胞凋亡，从而最终杀灭胃癌细胞。MMC 是临床上治疗胃癌最常用和较有效的化疗药物，该药物是一种烷化剂抗癌药，它的两个烷化中心可与 DNA 形成交叉连接，使细胞中 DNA 解聚，抑制 DNA 复制，还可引起 DNA 单链断裂。所以 MMC 主要作用于细胞增殖各期，尤其是对 G_1 晚期细胞最为敏感，但对 G_0 期细胞则不敏感[5]。Szepeshazi[6]等试验研究证实，人类胃癌细胞表达高亲和力的蛙皮素（BOM）受体 I 型；目前认为 BOM 是胃癌细胞增殖的刺激因子，BOM 与胃癌细胞膜上受体的结合是通过蛋白激酶 C 和酪氨酸激酶信号途径，快

维普资讯 http://www.cqvip.com

速诱导基因 c-jun 和 jun-B mRNA 的表达以及增强激活蛋白 AP-1 DNA 的活性，来发挥其刺激胃癌等肿瘤细胞的增殖作用；由此可见，BOM 能够促使胃癌 G_0 期细胞进入 G_1 期、S 和 M 期，理论上 MMC 联合 BOM 用于胃癌的化疗，更有利于 MMC 发挥诱导胃癌细胞凋亡并最终杀灭的作用。

在体外 BOM 和 MMC 单独作用于胃癌细胞，BOM 能使 G_0 期的胃癌细胞进入增殖期，而 MMC 对增殖期的胃癌细胞具有明显杀伤作用；如将两者联合作用于胃癌细胞，应表现出更强的杀伤作用。本研究结果提示，M + B 组的细胞抑制率和凋亡率均高于 M 组，其差异均具有显著性（$P<0.05$）；这说明 MMC 可以有效地抑制由 BOM 所导致的 DNA 合成和胃癌细胞的增殖作用，从而促使胃癌细胞凋亡。因此，应用化疗药物 MMC 联合 BOM 有良好的协同作用，可有效诱导胃癌细胞凋亡，提高抗癌的疗效；但 BOM 有促进胃癌细胞增殖的作用，BOM 和 MMC 联合使用，在体内的利弊还有待多方面的深入研究研讨。

国内学者陈嘉勇[7]等人用生长激素联合抗癌药奥沙利铂体外干预胃癌细胞生长，得出生长激素与抗肿瘤药合用可以增强抗肿瘤药对胃癌细胞的杀伤作用；其原理与本研究相似。国外 Szepeshazi[6]等人证实，蛙皮素细胞毒性模拟剂 AN-215 能抑制此类肿瘤的生长；Terry[8]等也研究了高亲和力喜树碱 - 蛙皮素共扼物，此类物质对具有蛙皮素受体的肿瘤细胞有细胞毒性作用。利用共扼物治疗肿瘤，是肿瘤治疗学中新的发展方向，即制备抗癌药与相关激素的共扼物，通过与肿瘤细胞膜上激素受体的结合，对肿瘤细胞起杀伤作用。对于丝裂霉素 C，是否可以制备丝裂霉素 - 蛙皮素共扼物，其蛙皮素能使胃癌细胞从 G_0 期进入 G_1 等期，以利于丝裂霉素作用于胃癌细胞，使其死亡或凋亡，这些都有待进一步去探讨或尝试。本研究结果提示蛙皮素与丝裂霉素有协同效应，但还有很多问题比如对其具有蛙皮素受体的正常细胞是否具有杀伤作用，其作用的机制及强度，体内给蛙皮素是否会导致胃癌病情的加重或促进其转移，等等诸多问题有待更深入研究。

参 考 文 献

[1] 段 红.5- 氟脲嘧啶及丝裂霉素 C 对人胃癌细胞株 SGC-7901 及 BGC-823 的相互作用的体外观察[J]. 中国病理生理杂志, 2002;18(3):259-261.

[2] 李景南.蛙皮素对人胃粘膜上皮永生细胞系 cyclin D_1/ cdk4 的影响[J]. 中华内科杂志, 2001;40(6):374-376.

[3] 孙 涛. 蛙皮素对人胃黏膜上皮永生细胞系 GES-1 细胞生长作用和机制的研究 [J]. 中华消化杂志, 2003;23(6):327-331.

[4] Valeria P, Makarenkova, Galina V, et al. Lung cancer-derived bombesin-like peptides down-regulate the generation and function of human dendritic cells[J]. Journal of Neuroimmunology, 2003;145:55-67.

[5] GIBOM J B. Anticancer drug targets: growth factors and growth factor signaling[J]. Clin Invest, 2000;105(1):9.

[6] Szepeshazi K, Schally AV, Nagy A, et al. Preclinical evaluation of therapeutic effects of targeted cytotoxic analogs of somatostatin and bombesin on human gastric carcinomas[J].Cancer, 2003;98(7):1401-1410.

[7] 陈嘉勇. 生长激素在体外对人胃癌细胞的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2004;21(5):521-523.

[8] Terry W, Moody, Samuel A, et al. Development of High Affinity Camptothecin-Bombesin Conjugates That Have Targeted Cytotoxicity for Bombesin Receptor-containing Tumor Cells[J]. J. Biol. Chem., 2004; 279(22): 23580-23589.

（上接第 57 页）

488-499.

[2] Neckers L, Schulte TW, Mimnaugh E . Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity[J]. Invest New Drugs , 1999 ;17:361-373.

[3] Thompson EW, Reich R, Shima TB, et al. Differential regulation of growth and invasiveness of MCF-7 breast cancer cells by antiestrogens[J]. Cancer Res, 1988;48:6764-6768.

[4] Roe SM, Prodromou C, O'Brien R, et al. Structural basis for inhibition of the HSP90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin [J]. J Med Chem, 1999;42:260-266.

[5] Solit DB, Scher HI, Rosen N. Hsp90 as a therapeutic target in prostate cancer [J]. Semin Oncol, 2003;30(5):709-716.

[6] Nguyen DM, Desai S, Chen A, et al. Modulation of metastasis phenotypes of non-small cess lung cancer cells by 17-allylamio-17-desmethoxygel-danamycin [J]. Ann Thoracsurg,2000;70(6):1853-1860.

[7] Park Fin-Woo, Yeh Michael W, Wong Mariwil G, et al. The heat shock protein90-binding geldanamycin inhibits cancer cell proliferation, down-regulates oncoproteins,and inhibits epidermal growth factor-induced invasion in thyroid cancer cell lines[J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2003;88(7):3346-3353.