维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)02－0249－04

西咪替丁对人结肠癌细胞株 LoVo 生长及凋亡的影响

张宏宇，张才全

(重庆医科大学临床学院普外科，重庆 400016)

【摘 要】目的：探讨西咪替丁对体外培养的人结肠癌细胞株 LoVo 的抑制和诱导细胞凋亡的作用。方法：采用 MTT 比色法、流式细胞术、形态学观察和 TUNEL 法检测不同浓度的西咪替丁溶液处理 LoVo 细胞后的生长状况、形态学、分子生物学改变。结果：西咪替丁可抑制 LoVo 细胞的增殖，且有剂量依赖性的趋势：1×10^{-2}mol/L 西咪替丁处理 LoVo 细胞 48h 后，在光镜、电镜检测中，可见典型的凋亡细胞；流式细胞术检测凋亡率为 32.7%，bcl－2 相关蛋白表达率为 36.74%；TUNEL 法进一步从分子生物学角度证实凋亡的发生。结论：西咪替丁对结肠癌细胞 LoVo 有抑制作用，主要机制为诱导其发生凋亡，凋亡发生的原因与西咪替丁可下调 bcl－2 蛋白的表达有关。

【关键词】西咪替丁；结肠癌细胞株；凋亡；bcl－2 蛋白

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－07－19

Effect of cimetidine on proliferation and apoptosis of human colon cancer cell LoVo

ZHANG Hongyu, et al

(*Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the regulatory effect of cimetidine on proliferation and apoptosis of colon cancer cells LoVo in vitro. *Methods*: Colon cancer cell line LoVo originated from human colon carcinoma was cultured in vitro. Cell proliferation was measured by MTT colorimetric assay. Cell cycle and apoptotic percentage were detected by flow cytometry (FCM), morphological changes of apoptotic cell were observed by light and electron microscopy, and apoptotic cells were quantitatively determined by terminal deoxynucleotidyl transferase－mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). In addition, expression of intracellular bcl－2 protein was analysed by flow cytometric indirect immunofluorescent technique. *Results*: Cimetidine (1×10^{-2}mol/L～3×10^{-2}mol/L) inhibited LoVo cells growth significantly in a dose－dependent manner. After 48 hours of exposure to cimetidine(1×10^{-2}mol/L), the enhanced degree of apoptotic percentage was 32.7%. There were many morphologic features of apoptosis, including cell shrinkage, nuclear condensation, DNA fragmentation and formation of apoptotic bodies; apoptotic cells were also statistically significant than those of control group($P<0.05$). The analysis on expression of intracellular bcl－2 protein showed cimetidine could down－regulate bcl－2 to 36.74% compared with 67.41% in the control. *Conclusion*: It is suggested that cimetidine can inhibit the proliferation of LoVo cell. Its anticancer effect may be related to induction of apoptosis, which appeared as a result of down－regulation of the anti－apoptotic protein bcl－2. Advanced research need to be done.

【Key words】Cimetidine; Colon cancer cell LoVo; Apoptosis; Bcl－2 protein

近年来对大肠恶性肿瘤的研究中发现，西咪替丁(Cimetidine，CMD)能够提高部分患者的生存率，推测其作用机理可能是直接或间接地抑制了肿瘤细胞的生长[1～3]。本实验旨在探讨西咪替丁体外抑制肿瘤细胞生长的机制和方式。

1 材料与方法

作者介绍：张宏宇(1968－)，男，讲师
主要研究方向：胃肠道肿瘤。

1.1 实验材料

西咪替丁(泰为美针剂 0.2g/ml，中美天津史克制药有限公司天津)，结肠癌细胞株 LoVo(购自中科院上海细胞生物学研究所)，流式细胞仪(FACScan Becton Dickison 美国)，透射电子显微镜(HITACHI－600 型日本)，细胞凋亡原位检测试剂盒和 bcl－2 单克隆抗体(Boehringer Mannheim 德国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 LoVo 细胞常规培养在 15% FCS RPMI1640 完全培养基中，培养条件为：37℃，5% CO_2，相对湿度为 90%。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2.2 MTT 比色法 按实验设计共分 6 组,分别为细胞对照组、生理盐水对照组、实验组:根据中效原理、MTT 预实验的结果,把实验组分为 4 组:5×10^{-3}、1×10^{-2}、2×10^{-2}、3×10^{-2}mol/L,每组 8 个平行孔。将对数生长期的 LoVo 细胞,调配细胞浓度为 5×10^{4} 个/ml,以每孔 1×10^{4} 个细胞数加入 96 孔培养板中,培养 24h,然后分别加入生理盐水和不同浓度的 CMD 生理盐水溶液 20μl,使终浓度达上述要求,分别培养 24、48、72h 继后按 MTT 比色法操作进行,自动酶标仪在波长为 570nm 时,测出每孔光密度值(A 值),A 值与活细胞数量成正比,实验重复 3 次。

1.2.3 流式细胞仪的检测 将细胞对照组、1×10^{-2}mol/L 组和 2×10^{-2}mol/L 组的细胞培养 48h 后固定,碘化丙啶染色上机作细胞周期和凋亡的分析。

1.2.4 形态学观察 将浓度为 5×10^{4} 个/ml 的 LoVo 细胞悬液接种于 24 孔培养板中,培养 24h 后,加入 CMD 生理盐水溶液,设为 1×10^{-2}mol/L 组和对照组,共同培养 48h 后用瑞氏染液染色,光镜下观察。另外选用 1×10^{-2}mol/L 组和对照组,培养 48h 后,交我校电镜室处置并进行电镜观察。

1.2.5 TUNEL 法原位检测细胞凋亡 将 1×10^{-2}mol/L 组和对照组培养 48h 的单细胞贴片,接照 TUNEL 试剂盒说明书进行操作。光镜下观察若细胞核呈现出棕褐色着染为阳性细胞,不呈现棕褐色则为阴性。以每片阳性率≥10%者为发生凋亡。

1.2.6 LoVo 细胞中 bcl-2 相关蛋白的测定 将 1×10^{-2} mol/L 组和对照组培养 48h 的细胞分别制备成单细胞悬液,按说明书操作规程固定。然后分组加入按 1:50 稀释的鼠抗人 bcl-2 Ⅰ抗 20ul,混合后 4℃ 冰浴 1h。加入Ⅱ抗 FITC—标记羊抗鼠 IgG20ul,4℃ 避光放置 30min,上流式细胞仪检测并用 Cell Quest 软件分析计算。

1.2.7 统计 计量资料采用 SAS 统计软件进行方差分析,用 SNK 法进行两两比较;计数资料用 χ^2 检验和秩和检验进行统计分析,$P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结 果

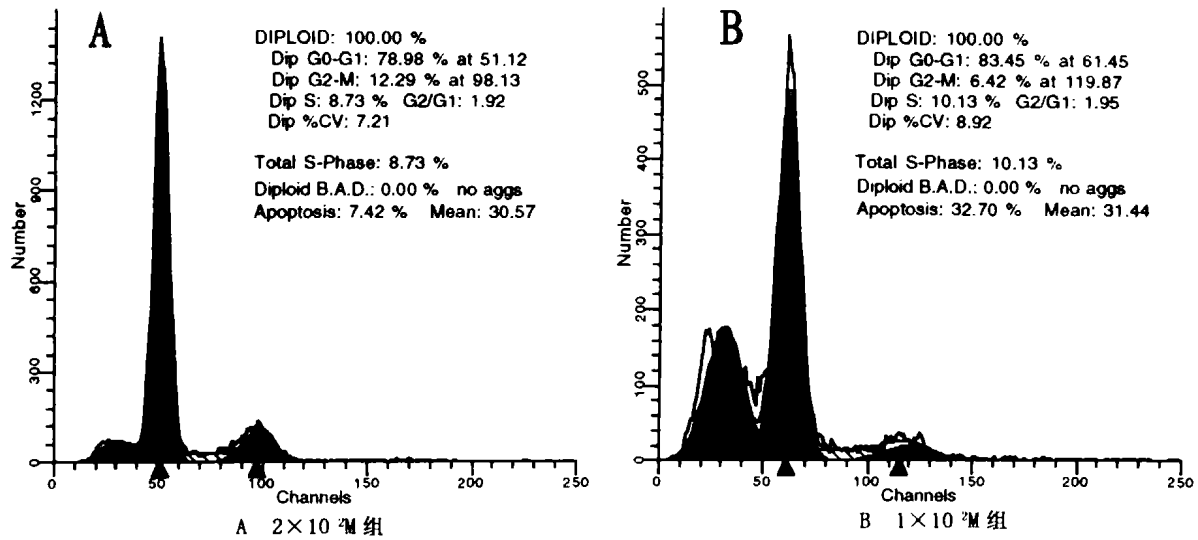
2.1 西咪替丁对 LoVo 细胞生长的抑制作用

表 1 的结果显示:在不同时段,随 CMD 浓度的增加,各实验组 A 值逐渐减小($P<0.05$),说明西咪替丁抑制 LoVo 细胞生长,呈剂量依赖性的趋势;培养 48h,各实验组的西咪替丁对 LoVo 细胞的生长均有抑制作用。

表 1 不同浓度的 CMD 作用 24、48、72h 后 LoVo 细胞的 A 值($\bar{x}\pm s$)

时间(h)	N	对照组		实验组			
		细胞组	N.S 组	5×10^{-3}mol/L	1×10^{-2}mol/L	2×10^{-2}mol/L	3×10^{-2}mol/L
24	16	0.3862±0.123	0.3626±0.05	0.3250±0.090	0.3401±0.131	0.2341±0.039*△	0.1338±0.378*□△
48	16	0.703±0.133	0.6503±0.043	0.5333±0.134*	0.4573±0.102*	0.2331±0.041*△□	0.05175±0.021*□△☆
72	16	0.9619±0.113	1.0136±0.155	0.8118±0.236*	0.6485±0.113*△	0.2246±0.044*△□	0.0404±0.017*□△☆

注:*与对照组比较 $P<0.05$;△与 5×10^{-3}mol/L 组比较 $P<0.05$,□与 1×10^{-2}mol/L 组比较 $P<0.05$,☆与 2×10^{-2} mol/L 组比较 $P<0.05$。



A 2×10^{-2}M 组 B 1×10^{-2}M 组

图 1 FCM 分析 CMD 对 LoVo 细胞周期分布和凋亡的影响

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 2 1×10^{-2}mol/L 组:细胞核碎裂,微核形成 瑞氏染色×400

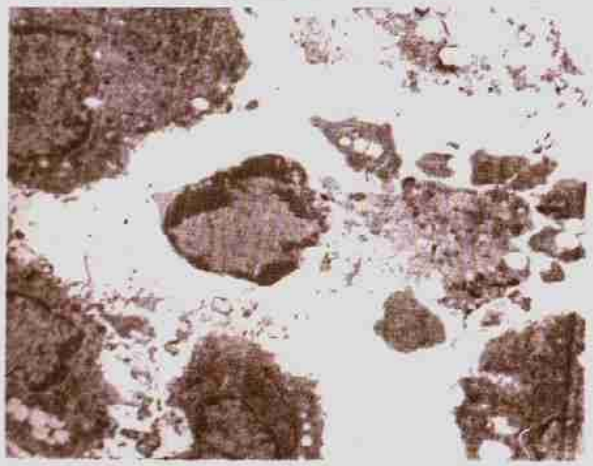


图 3 1×10^{-2}mol/L 组:染色质固缩、碎裂、聚集于细胞膜边缘成新月状 透射电镜×6,000

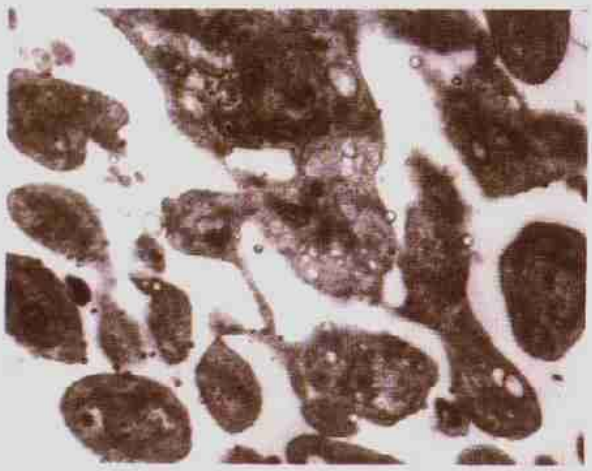


图 4 1×10^{-2}mol/L 组:凋亡小体,内可见固缩碎裂的染色质和完整的细胞器 透射电镜×17,000

2.2 流式细胞仪的检测结果

1×10^{-2}mol/L 组和 2×10^{-2}mol/L 组的 CMD 作用 LoVo 细胞 48h 后,可分别使 83.45%,78.98%的细胞停滞于静息期 G_0/G_1,并诱导 32.70%,7.42%细胞凋亡。流式细胞仪 DNA 直方图上出现典型的亚二倍体的"凋亡峰"(图 1)。

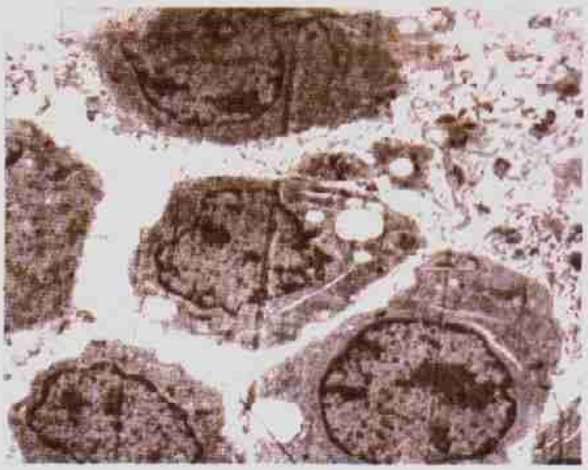


图 5 1×10^{-2}mol/L 组:未发生凋亡的 LoVo 细胞 透射电镜×5,000

2.3 形态学对凋亡的观察结果

1×10^{-2}mol/L 组培养 48h,光镜下可见凋亡细胞形态学改变,主要为核染色质致密、固缩,核破裂为大小不一的核片段(图 2);电镜下易观察到较多的凋亡细胞,表现为体积变小,胞膜皱缩,细胞核染色质密度增高、固缩成不规则状,或染色质碎裂、边集呈新月状(图 3)。可见较多包膜完整的凋亡小体(图 4)。坏死细胞和 1×10^{-2}mol/L 组中未凋亡的 LoVo 细胞无上述特征(图 5)。

2.4 TUNEL 法检测凋亡细胞的结果

1×10^{-2}mol/L 组和细胞对照组的阳性着染率分别为 12.5%和 75.0%,具有显著性差异($P<0.05$)。

2.5 FCM 对 LoVo 细胞中 bcl-2 相关蛋白的检测结果

FCM 定量分析 bcl-2 蛋白的表达情况,对照组 bcl-2 相关蛋白的表达率为 67.41%,而 1×10^{-2} mol/L 组的表达率为 36.74%。

3 讨 论

3.1 西咪替丁对大肠癌细胞株 LoVo 增殖的抑制作用

已有研究表明部分胃肠激素可刺激胃肠道细胞的增殖和分化,这些激素同时也能促进部分胃肠肿瘤的生长,其中自馈性调节具有重要的作用。在消化系统中,组织胺被报告有营养胃肠上皮细胞的作用,其增强上皮细胞的增生率与肿瘤的发病机理有一定关系[4]。Adams[5]分组给裸鼠种植了 C170 和 LIM2412 人结肠癌细胞株,同时让其饮用含有 CMD 的水,24~28 天后终止实验。发现 CMD 呈剂

维普资讯 http://www.cqvip.com

量依赖性的抑制肿瘤的生长。在起源于 C170 癌株的肿瘤局部注射组织胺可刺激肿瘤生长,每天服用 CMD 剂量为 200mg/kg 时可抑制这种现象,低浓度无效。认为:CMD 可能直接对肿瘤细胞产生抑增殖作用;亦可能是通过阻断组织胺对肿瘤细胞表面 H_2 受体作用,从而降低了与 H_2 受体介导相关的细胞内腺苷酸环化酶的活性,致使细胞内 cAMP 产生减少。在本实验中,单独使用 CMD 浓度达 0.5×10^{-2} mol/L 时,便显示出对 LoVo 细胞增殖的抑制作用,在浓度为 1×10^{-2}、2×10^{-2} 和 3×10^{-2} mol/L 时这种作用更为显著,亦呈现出剂量依赖性的趋势,这与 Adams 的实验结果相符。

通过进一步对 CMD 作用了 48h 的 LoVo 细胞进行 DNA 周期分析,发现 CMD 明显抑制了 LoVo 细胞从 G_0/G_1 期过渡到 S 和 G_2/M 期,从而抑制了 LoVo 细胞的分裂和增殖,这有助于更深层次地探讨 CMD 对大肠癌细胞的作用机理。

3.2 CMD 诱导 LoVo 细胞发生凋亡

凋亡是一种由细胞内部基因调控的细胞生理性死亡。这个过程又被称为细胞程序性死亡[6]。本实验在用 FCM 对 LoVo 细胞进行 DNA 周期分析时,发现实验组 G_0/G_1 期前存在一个与对照细胞峰值曲线明显不同的亚二倍体(亚 G_1 期)细胞峰值,即凋亡征象峰(AP 峰)[7]。在随后的光镜和电镜观察中,1×10^{-2}mol/L 组细胞可看到不同时期的凋亡细胞,成为凋亡发生的又一个有力佐证。

本实验采用 TUNEL 检测方法中的 POD 法对凋亡细胞进行原位检测,在光镜下观察和计数凋亡的细胞,发现实验组(1×10^{-2}mol/L)的凋亡发生率(75.0%)明显高于对照组(12.5%),χ^2 检测 $P<0.05$,具有统计学差异。从而进一步从分子生物学的角度证明了凋亡的发生。

综合上述的实验结果,可以得出:CMD 在一定浓度范围内可诱导结肠腺癌细胞株 LoVo 发生凋亡这一结论。

3.3 CMD 的浓度及 bcl-2 相关蛋白的表达与凋亡的关系

在对 CMD 作用了 48h 的 LoVo 细胞进行的 FCM 检测中,发现 1×10^{-2}mol/L 组诱导的凋亡率为 32.7%,2×10^{-2}mol/L 组则为 7.42%。在同一时间段,凋亡率没有随浓度的增高而增高,相反有所降低。王宪涛等[8]在其实验中发现 8-氯腺苷在其低剂量时,可诱导 MOLT-4 白血病等肿瘤细胞凋亡;而在其高剂量时,则可引起细胞坏死。认为细胞受到伤害导致的死亡(凋亡或坏死)方式,主要取决于细胞所受伤害的水平。所以细胞受到低剂量伤害时发生凋亡,随着伤害水平(如浓度或暴露于药物刺激的时间)的升高,细胞死亡方式则由凋亡转向坏死。这样,可以得出 CMD 诱导 LoVo 细胞凋亡存在着一个最适的剂量和最佳的时间,而不是简单的递增或递减的关系,这一看法我们也认为适应其它诱导细胞凋亡的药物。当然,这还需进一步的研究和探讨。

细胞凋亡最终能否发生是由细胞内部的基因决定,目前普遍认为是受原癌基因和抑癌基因调控。原癌基因 bcl-2 是细胞凋亡调控中最重要的基因,是能够特异性地抑制细胞发生凋亡的所谓存活基因[9]。它的相关蛋白是分子量为 25,000Da 的膜结合蛋白,在大肠癌等多种肿瘤中均有过度表达。

本实验用 FCM 对 LoVo 细胞中 bcl-2 相关蛋白的表达进行定量分析,发现 bcl-2 相关蛋白在对照组 LoVo 细胞中,有较高的表达率为 67.41%,说明 bcl-2 高表达形式可能提供了同类腺癌细胞的存活优势;而实验组 LoVo 的 bcl-2 表达率仅为 36.74%,比前者有明显的降低,说明 CMD 诱导 LoVo 细胞凋亡是通过降低了 bcl-2 蛋白的表达。CMD 是通过何种方式降低了 bcl-2 蛋白的表达,还需进一步研究。根据以上实验结果,认为 CMD 能够抑制大肠癌 LoVo 细胞的增殖,并诱导其发生凋亡;但是 CMD 能否抑制其它大肠癌细胞株及大肠癌患者肿瘤细胞的增殖,仍需要进一步地研究,这对挖掘包括经典药物在内的治疗潜力有着重要的意义,可以作为设计肿瘤治疗的新思路。

参 考 文 献

[1] Matsumoto S. Cimetidine and survival with colorectal cancer[J]. Lancet, 1995;346:115.

[2] Adams W, Morris D. Cimetidine and Colorectal[J]. Dis Colon Rectum, 1996;39:111-112.

[3] 张宏宇,张才全.西咪替丁在大肠癌围手术期应用的临床意义[J].中国肛肠病杂志,2004;24(2):32-34.

[4] Hahm KB, Park IS, King HC, et al. Comparison of antiproliferative effects of 1-histamine-2 receptor antagonist,

(下转第 309 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 2 EN 与 PN 营养支持后并发症比较

并发症	EN 组	PN 组
机械性并发症	8	10
鼻饲管堵塞	8	0
气胸	0	2
臂丝神经损伤	0	2
中心静脉导管阻塞	0	6
消化道并发症	20	12
非颅高压性呕吐	6	0
腹泻(≥3 日/d)	10	4
上消道道出血	3	8
胆汁淤积	1	0
代谢性并发症	10	30
高血糖症	2	6
高渗性昏迷	0	2
氮质血症	2	6
代谢性酸中毒	2	8
低蛋白血症	4	6
胸腹水	0	2
感染性并发症	6	20
肺部感染	4	8
切口感染	0	2
尿路感染	2	2
真菌性肠炎	0	2
急性腹膜炎	0	2
败血症	0	4
合　计	44	72

养支持 2 周,PN 组营养并发症主于 EN 组,EN 组机械性并发症发生率为 12.5%,PN 组为 15.6%。EN 组 8 例均为导管阻塞,PN 组中除 6 例为导管阻塞外,4 例在穿刺时发生所胸、臂丛神经损伤等严重并发症。EN 组消化道并发症发生率高于 PN 组(20/12),但 80% 表现为腹泻、呕吐,一般经调整输液速度及营养液温度或浓度后,症状很快减轻或消失。PN 组由于肠粘膜萎缩,上消化道出血发生率高于 EN 组(64%)。PN 时营养物质不经肠道吸收,缺乏代谢调整作用,PN 组代谢并发症显著高于 EN 组(30/10)。由于技术原因,PN 营养液中不含谷氨酰胺、纤维素等营养物质,因此,PN 时肠屏障功能受损,易致肠道菌群易位。本研究结果显示,PN 组感染并发症明显高于 EN 组,从死亡病例来看,EN 组死亡者无 1 例与营养支持并发症有关,而 PN 组中 4 例因肺部及导管感染致败血症死亡,与营养并发症有密切关系。PN 时营养液的配制和管理及中心静脉插管均要求较高的设备条件和操作水平,而 EN 时插管安全,维护方便,置管成功率达 100%,所有患者行气管切开,避免了鼻肠管误入呼吸道及吸入性肺炎等危险并发症的发生。

因此,早期 PN 与 EN 均能改善机体的营养状况,但 EN 较 PN 更具有营养全面、符合生理、置管安全、维护方便、价格低廉、并发症少且易于处理及预防等诸多优点,应作为重型颅脑损伤患者营养支持的首选途径。对少数严重胃肠功能障碍或上消化道出血患者行短期 PN 后一旦病情缓解,就应尽早过渡到 EN(见表 1、2)。

参 考 文 献

[1] 陈强谱.能量的需要量[M].第 1 版,北京:人民卫生出版社,1998:58-60.

[2] Clifton, Robertson. CS, choi sc. Assessment of nutritional requirements of head-injured patients[J]. J Neurosurg, 1986; 64:595-897.

[3] 杨慕龙.颅脑外伤后的代谢变化与营养支持[J].中华创伤杂志,1994;10:97-98.

[4] 李 宁,黎介涛,顾寿年,等.肠道营养支持在外科危重患者的应用[J].实用外科杂志,1991;11:491-492.

(上接第 252 页)

cimetidine, ranitidine, and famotidine, in gastric cancer cells[J]. Int J Immunopharmacol, 1996; 18:393-399.

[5] Adams W, Lawson J, Morris D. Cimetidine inhibits in vivo and in vitro growth of human colon cancer and reverses histamine stimulated in vitro and in vivo grwoth[J]. Gut, 1994; 35:1632-1636.

[6] 杨锡强.细胞凋亡和程序性细胞死亡[J].重庆医科大学学报,1996;21(T10):213-217.

[7] Mccloskty TW, Oyaizu N, Coronesi M, et al. Use of a flow cytometric assay to quantiate apoptosis in human lyphocyets[J]. Clin Immunol Immupoathal, 1994; 71:14-18.

[8] 王宪涛,郑德先.8-氯腺苷诱导 MOLT-4 细胞凋亡[J].科学通报,1997;42:189-193.

[9] 郑 军.Bcl-2 及 Bax 基因对肿瘤细胞凋亡的调控[J].重庆医科大学学报,1999;24(1):107-109.