维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)05－0654－03

尼美舒利对人胃癌细胞株 SGC－7901 增殖和凋亡的影响

谯 敏，高 青，王丕龙，张俊文

(重庆医科大学临床学院消化内科，重庆 400016)

【摘 要】目的：体外研究尼美舒利对人胃癌细胞株 SGC－7901 增殖的影响，并探讨其可能的作用机制。方法：采用 MTT 法、流式细胞仪(FCM)、电镜等技术，体外研究尼美舒利对人胃癌细胞株 SGC－7901 增殖和影响及可能的机制。结果：MTT 显示尼美舒利(12.5～400μmol/L)呈时间—剂量依赖方式抑制人胃癌细胞株 SGC－7901 的增殖。FCM 显示，DNA 直方图上出现典型的亚二倍体"凋亡峰"。S 期、G_2/M 期细胞比例升高，G_1 期细胞比例下降，阻止细胞周期的进展。电镜下见典型的细胞凋亡形态特征：细胞核染色质致密浓缩、凋亡小体形成等。结论：尼美舒利体外能显著抑制人胃癌细胞株 SGC－7901 生长，可能与诱导细胞凋亡阻止细胞周期进展有关。

【关键词】人胃癌细胞株 SGC－7901；尼美舒利；细胞凋亡；增殖

【中国图书分类法分类号】R735.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－12－31

Effects of nimesulide on proliferation and apoptosis of human gastric carcinoma cells SGC－7901

QIAO Min, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the effects of nimesulide on proliferation and apoptosis of human gastric carcinoma cells SGC－7901 in vitro, and provide an experimental basis for clinical application. *Methods*: Proliferation of human gastric carcinoma cells SGC－7901 was assessed by MTT, and apoptosis was detected by transmission electron microscope and flow cytometry. *Results*: Proliferation of SGC－7901 was inhibited significantly by nimesulide(range from 12.5 to 800μmol/L) in a dosage－dependant manner ($P<0.05$). Under transmission electron microscope and fluorescent microscope, some SGC－7901 cells undergo a typical apoptosis after 4 days incubation with nimesulide. There is an apoptosis peak. *Conclusion*: Nimesulide can suppress proliferation of SGC－7901 cells, which may be related to the mechanism of inducing cell apoptosis and preventing development of cell cycle.

【Key words】SGC－7901; Nimesulide; Apoptosis; Proliferation

流行病学资料显示：在很多胃癌组织中还氧化酶－2(Cyclooxygenase－2，COX－2)呈高表达状态，与胃癌的发生发展有密切的关系。长期服用 COX－2 抑制剂可降低胃癌的发病危险性，具有一定的化学预防作用[1,2]。近年来，选择性环氧化酶－2 抑制剂的抗肿瘤作用日益引起重视。尼美舒利是一种人工合成的环氧化酶－2 特异性抑制剂，为磺酰胺类消炎镇痛药，能抑制炎症组织内前列腺素的合成，而不抑制胃黏膜内前列腺索的合成，因而能缓解炎症症状，对胃及十二指肠等的不良反应则较轻。本研究通过 MTT、流式细胞仪、电镜等检查，观察体外尼美舒利对人胃癌细胞株 SGC－7901 的作用，并探讨其可能的作用机制，为临床上开辟新的抗癌途径提供实验室依据。

1 材料和方法

1.1 人胃癌细胞株 SGC－7901

购自重庆医科大学医学超声工程研究所，置于 RPMI－1640 培养基中，37℃、5% CO_2 孵箱内培养，取对数生长期细胞实验。

1.2 主要试剂

尼美舒利(Nimesdlide，购自 Sigma 公司)，RPMI－1640 培养基、小牛血清、MTT(Fluka 公司)。

1.3 尼美舒利对 SGC－7901 细胞增殖的抑制

将对数生长期 SGC－7901 细胞制备成 5×10^4/ml 的细

作者介绍：谯 敏(1977－)，女，博士，

主要研究方向：胃肠疾病。

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞悬液，接种于 96 孔培养板中，每孔 200μl，于 37℃，5% CO_2 的培养箱中培养。24h 后换上含有不同浓度尼美舒利(12.5，25，50，100，200，400μmol/L)的培养液。每个药物浓度设 3 个复孔，设不接种细胞的空白对照和只加等体积溶剂 DMSO 的对照组。分别继续培养 2，3，4，5 天，每孔分别加入 0.5% MTT(5mg/ml)20μl，37℃ 孵育 4h 后弃去上清，每孔均加入二甲基亚砜 100μl，轻微振荡使紫蓝色沉淀溶解。用酶标仪测定 490nm 波长处的吸光度值(A)，计算尼美舒利对 SGC－7901 细胞增殖的抑制率(IR)以及中效浓度。并在倒置显微镜下观察经尼美舒利作用后的 SGC－7901 细胞形态。

抑制率(%)＝(1－试验孔 A/对照组 A)×100%

1.4 透射电镜

收集中效浓度尼美舒利处理后的细胞，制成超薄切片，拘檬酸铅染色，透射电镜观察细胞超微结构的变化并摄片。

1.5 流式细胞仪(FCM)检测

将 90μmol/L 尼美舒利处理 4 天后的实验组细胞和对照组细胞制成单细胞悬液，加 4℃ 预冷无水乙醇 2ml，固定 12h 以上。PBS 洗涤 2 次，加 1% RNA 酶 150μl，37℃ 水浴中孵育 30min。加入 100μl PI(终浓度为 50μg/ml)，室温孵育 20min，计数 50000 个以上细胞，低于 G_1 期 DNA 含量的亚二倍体细胞群体为凋亡细胞，进行细胞周期分析。

1.7 统计学分析

采用 SAS 软件对数据进行配对 t 检验。

2 结 果

2.1 尼美舒利对 SGC－7901 细胞增殖的作用

各种浓度的尼美舒利均可抑制 SGC－7901 细胞的生长增殖，第 2，3，4 天随药物浓度的增大，作用时间的延长抑制作用更明显，呈时间一剂量依赖方式。第 5 天抑制作用下降。不同浓度尼美舒利作用不同时间对 SGC－7901 细胞的增殖的影响见图 1。其中第 4 天抑制作用最明显，12.5μmol/L 浓度的尼美舒利即可抑制 SGC－7901 细胞的生长增殖($P<0.01$)，由此推测出中效浓度(IC_{50})值为如 90μmol/L。不同浓度尼美舒利作用 4 天后对 SGC－7901 细胞的增殖的影响见表 1。

2.2 倒置显微镜下观察对 SGC－7901 细胞形态：

在正常培养情况下 SGC－7901 细胞形态生长良好，表现为梭形或多角形。经尼美舒利处理后，出现细胞变小、变圆，部分细胞脱落飘浮于培养基中。并随尼美舒利作用时间的延长，剂量的增大，其飘浮细胞也增多。

2.3 透射电镜观察细胞凋亡

尼美舒利(90μmol/L)作用 4 天后，部分 SGC－7901 细胞体积明显缩小，细胞表面微绒毛显著减少甚至消失；细胞膜上出现一些小泡；胞浆内结构密度增大，胞质肿胀，内质网和线粒体等细胞器可辨认，其数目减少。细胞核固缩，核膜皱褶完整，核内染色质浓集成块，有的呈月牙状，边集在核膜下。可见一些由膜状物包裹的小体，内含残存的染色质和退变的细胞器。凋亡小体形成(图 2)。

表 1 不同浓度尼美舒利对 SGC－7901 细胞的抑制率($n=3, \bar{x}\pm s$)

尼美舒利浓度(μmol/L)	SGC－7901 抑制率(%)
25.00	25.5±6.30
50.00	33.5±5.29
100.00	45.4±3.75
200.00	55.2±3.90
400.00	89.7±0.92

各组抑制率与对照组相比均有，$P<0.01$

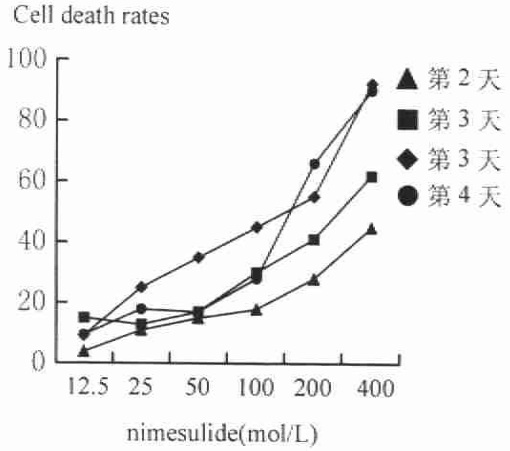


图 1 不浓度尼美舒利作用不同时间对 SGC－7901 细胞的增殖的影响



图 2 90μmol/L 尼美舒利作用 4 天后 SGC－7901 细胞凋亡形态×5000

2.4 流式细胞仪检测

30μmol/L 尼美舒利(中效浓度的 1/3)作用 SGC－7901 细胞 4 天后，流式细胞仪 DNA 直方图上出现典烈的亚二倍体凋亡峰，胃癌细胞凋亡率为

维普资讯 http://www.cqvip.com

10.12%。SGC－7901 细胞的细胞周期变化明显，G_0/G_1，期细胞从 66.80%下降到 49.75%，S 期细胞与对照相比从 25.41 上升到 44.65%，G_2/M 期细胞从 7.79%下降到 5.59%，说明尼美舒利主要引起 S 期细胞堆积，阻止细胞周期的进展。

3 讨 论

COX－2 是一种诱导型酶，静息状态下不表达，难以检测到。当细胞接受到相应的刺激后才开始迅速合成升高。研究表明，在胃癌组织和癌前病变的腺瘤或增生性组织中，均发现 COX－2 的表达明显增高。Murata H 等[3]采用 Western 印迹方法检测 15 例胃癌的 COX－2 水平，发现 66.7%病例癌组织的 COX－2 水平明显增高。Ristimaki 等[4]采用 Northern blot 法检测了 12 例胃腺癌活标本的 COX－2，结果发现胃癌组织 COX－2mRNA 水平明显高于正常胃粘膜。免疫组化检测发现 COX－2 蛋白局限于细胞质和过度增殖的腺体，但在周围间质细胞及胃粘膜的正常腺管未见表达。目前认为 COX－2 的致癌机制可能包括：诱导癌前物质的活化[5]；诱导肿瘤血管生成[6,7]；抑制凋亡[8,9]；增加肿瘤发生和侵袭的能力[10]；免疫抑制[11]等。因此以 COX－2 为靶向的肿瘤治疗很有可能是一种较特异而有效的治疗方法。

尼美舒利是一种选择性 COX－2 抑制剂。有研究认为尼美舒利通过选择性抑制环氧化酶－2 的活性，导致 PGE_2 生成减少，削弱其对 T 细胞、自然杀伤细胞活性的抑制，起动细胞免疫监视作用，帮助清除新生细胞[12]。Zhu 等[13]在体外研究中发现，环氧化酶抑制剂能抑制胃癌细胞生长，诱导其凋亡，存在剂量和时间的依赖关系，对细胞周期无影响。但有研究认为：体外尼美舒利对肿瘤细胞的作用不是诱导细胞凋亡，而是通过阻滞细胞周期的进展，使细胞在 S 期或 G_2/M 期堆积，在高浓度时直接导致细胞死亡，并认为这与肿瘤细胞体外长时间接触环氧化酶抑制剂有关。

本研究经 MTT 试验，证实体外尼美舒利对 SGC－7901 的增殖有抑制作用，其抑制率与尼美舒利的浓度和作用时间有相关性。这为临床上使用选择性 COX－2 抑制剂作为抗癌药物提供了实验室的依据，从而避免长期使用非选择性 COX 抑制剂所导致的胃肠道的副作用。流式细胞仪显示，经尼美舒利处理后，细胞周期发生变化，G_0/G_1 期细胞减少，S 期、G_2/M 期细胞增多。而肿瘤细胞的 G_0 期细胞是肿瘤复发的根源，处于 DNA 复制前期阶段的 G_1 期细胞的减少会导致细胞增殖的抑制，提示尼美舒利对 SGC－7901 增殖的抑制主要作用于 G_0/G_1 期、阻滞细胞周期的进程。目前对细胞凋亡的检测方法较多，迄今为止，观察细胞超微结构的改变仍是确定细胞形态的最可靠的方法之一[14]。此外应用流式细胞术检测细胞凋亡也具有很高的灵敏性，并能进行凋亡细胞的定量分析[15]。本研究将这二种方法结合：发现尼美舒利能诱导 SGC－7901 细胞凋亡。但这种诱导细胞凋亡的机制还不十分清楚，有待于进一步的研究。

总之本文研究证实，尼美舒利在体外能有效抑制胃癌细胞株增殖，这无疑将开拓选择性 COX－2 抑制剂的应用前景。因而深入研究其作用机理和体内抗癌理想剂量，以求提高疗效，减少药物的副作用，将有重大的临床意义。

参 考 文 献

[1] 高 青，刘 兴，王丕龙. 胃癌组织 COX－2 的表达及其与细胞增殖和凋亡的关系[J]. 重庆医科大学学报，2003；28(3)：276－278.

[2] Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, et al. Expression of cyclooxygenase－2 in human gastric carcinoma[J]. Cancer Res, 1997；57：1276－1280.

[3][10] Murata H, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase－2 overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma[J]. Am J Gastroenterol, 1999；94：451－455.

[4][9] Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, et al. Expression of cyclooxygenase－2 in human gastric carcinoma[J]. Cancer Res, 1997；57：1276－1280.

[5] Levy GN. Prostagland H syntnase, nonstreoidal anti－inflammatory drugs, and colon cancer[J]. FASEB J, 1997；11(4)：234－247.

[6] Masferrer JL, Leahy KM, Koki AT, et al. The relationship between cyclooxygenase－2 inhibitors[J]. Can Res, 2000；60(5)：1306－1311.

[7] Gallo O, Franchi A, Magnelli L, et al. Cyclooxygenase－2 pathway correlates with VEGFexpression in head and neck cancer, implications for tumor angiogenesis and metastasis[J]. Neoplasia, 2001；3(1)：53－61.

（下转第 660 页）

维普资讯 http://www.cqvip.com

认为,在产后卫生保健服务中有关盆肌保健操的宣传教育亟待重视和加强。应大力普及盆肌保健操,通过锻炼耻骨尾骨肌(PC 肌)的强度,以加强盆底肌肉张力。

妇女产后有对即将承担母亲角色的压力,因分娩、哺乳和照顾婴儿造成的疲劳以及生活重心向孩子的转变,这些都削弱了妇女产后对盆肌保健操锻炼的重视程度。本调查中,产后仅 11.8% 妇女经常锻炼盆肌。故而需要对她们予以积极鼓励,让他们充分理解盆肌锻炼的重要性,掌握技巧,且感知到了练习的益处,才能使她们坚持锻炼,并最终成为她们长期甚至终身的自我保健手段。

3.3 盆肌保健操

(1)开始练习时应循序渐进,尤其是第 1 周,因过多的用力收缩耻尾肌会使该肌酸痛乏力,动摇孕产妇坚持下去的信心。Amoid Kegel 认为每天练习 2～3 个 15min,每次有 80～100 次肌肉收缩已足够达到锻炼的目的。(2)在练习中持续收缩的时间延长比同样时间内的多次短促的收缩更有效,对此亦应遵守循序渐进的原则。(3)指导妇女正确进行盆肌保健操锻炼是难点。练习时应尽可能的收缩盆底肌,避免收缩大腿肌肉,因这些辅肌的收缩只会增加体力的消耗,使肌肉酸胀不适,而并不能使盆底肌得到有效的锻炼。简捷有效的方法是就在妇检之后指导她做缩肛或憋尿的动作,直到正确掌握动作要领[4]。总之,盆肌保健操对维护女性生殖健康非常重要,其收效的关键是坚持长期锻炼。我们建议应将妇女 PC 肌强度的检测及指导妇女正确锻炼盆肌作为产后保健的内容之一。

参 考 文 献

[1] 王 波,郎景和. 女性生殖系统解剖. 见:曹泽毅主编,中华妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,1999;15－33.

[2] 马晓年. 为什么要锻炼耻骨尾骨肌. 见:马晓年主编。女性学咨询[M]. 北京:科学出版社,1993;157－162.

[3] 孙卫国,卢盛波. 性反应周期. 见:卢盛波主编. 性医学教程[M]. 北京:中医古籍出版社,1994.

[4] 谷祖善,赵 霞. 陈旧性产道损伤的防治[J]. 实用妇产科杂志,1993;9(5):240－241.

[5] Bex PJ, Hofmeyr GJ. Perineal management during childbirth and subsequent dyspareunia [J]. Clin Exp Obstet Gynaecol, 1987;14:97－100.

[6] Brown S, Lumley J. Maternal health after childbirth: results of an Australian population based survey[J]. Br J obstet gynaecol, 1998;105:156－161.

[7] MacArthur C, Lewis M, Knox EG. Health after childbirth [M]. London: HMSO, 1991.

[8] Rockner G, Jonasson A, Olund A: The effect of mediolateral episiotomy at delivery on pelvic floor muscle strength evaluated with vaginal cones[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 1991; 70:51－54.

(上接第 656 页)

[8] Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpreesing prostaglandin endoperoxide synthase 2[J]. Cell, 1995;83(3):493－501.

[9] Sheng H, Shao J, Morrow JD, et al. Modulation of apoptosis and Bcl－2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells[J]. Cancer Res, 1998;58(2):362－366.

[10] Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells[J]. Cell, 1998; 93(5):705－716.

[11] Kambayashi t, Alexander HR, Fong M, et al. Potential involvement of IL－10 in suppressing tumor－associated macrophages. Colon－26－derived prostaglandin E2 inhibits TNF－alpha release via a mechanism involving IL－10[J]. J Immunoi, 1995;154(7):3383－3390.

[12] Lawrence J, Mamett. Aspirin and the potential role of PGE in cancer[J]. Cancer Res, 1992;52:5575－5589.

[13] Zhu GH, Wong BC, Eggo MC, et al. Non－steroidal anti－inflammatory drug induced apoptosis in gastric cancer cells is blocked by protein kinase C activation through inhibition ofc－myc[J]. Br J Cancer, 1999;79(3－4):393－400.

[14] 王振义,陈 竺. 肿瘤的诱导分化和凋亡疗法[M]. 上海:上海科学技术出版社,1998;(1):162－246.

[15] 郑泽铣,李宁丽,沈厉华,等. 流式细胞术定量检测凋亡细胞[J]. 上海免疫杂志,1995;15(5):273－276.