DOI:10.16016/j.1000-5404.1999.10.010

文章编号:1000-5404(1999)10-0720-03

5-氟脲嘧啶诱导人胃癌细胞凋亡的研究*

刘海峰** 刘为纹 房殿春 (第三军医大学附属西南医院消化内科)重庆,400038

提 要 **目的**:探讨5-氟脲嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)诱导人胃癌细胞凋亡的规律及在胃癌化疗中的意义。**方法**:应用细胞形态观察、琼脂糖凝胶电脉、流式细胞仪检测和观察5-FU对胃癌细胞SGC-7901增殖周期的影响以及杀伤细胞的方式,并检测了SGC-7901细胞表面bcl-2、bax蛋白的表达情况。**结果**:5-FU能显著诱导SGC-7901细胞凋亡,细胞DNA裂解片段呈现典型的"阶梯状"排列的条带。**结论**:5-FU诱导细胞凋亡可能是其发挥抗癌作用的重要机制之一,可能与其下调bcl-2基因表达有关。

关键词 胃肿瘤;细胞凋亡;5-氟脲嘧啶
中图法分类号 R735.2 **文献标识码**:A

化疗仍然是目前临床上治疗肿瘤的主要措施之一。设计更加合理有效的化疗方案须深入、全面理解化疗药物杀灭肿瘤细胞的机制。既往将化疗药物的治疗效应归结于其损伤DNA或抗代谢的基因毒性,但多数情况下,药物有效浓度引致的杀灭效率不足以解释其实际治疗效应[1]。近年来一些研究表明,诱导细胞凋亡可能是化疗药物抑制肿瘤的主要机制之一[2]。因此,从细胞凋亡的角度研究化疗药物治疗肿瘤的机制具有重要意义。为此,我们观察了临床上胃癌化疗常用的5-氟脲嘧啶(5-FU)体外诱导人胃癌细胞系SGC-7901胃癌细胞凋亡的规律,并初步探讨了其内在机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胃癌细胞株SGC-7901,生长在含10%小牛血清和1%青、链霉素的RPMI 1640培养液中,培养箱内含5% CO_2,温度37 ℃。

1.2 流式细胞术分析

以10 μg/ml的5-FU(南通制药总厂)处理SGC-7901细胞24 h后,收集细胞,PBS洗2次,重新悬浮细胞于75%乙醇中,4℃过夜。PBS洗2次,与含1% RNA酶的Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)共同孵育30 min,37 ℃。加溴化乙锭(EB)染液进行DNA染色。经荧光染色的细胞样品通过流式细胞仪FACScan(Becton Dickinson)测定细胞周期分布及凋亡率。设未处理的SGC-7901细胞为空白对照。每组设3复孔。所有资料均经Becton Dickinson软件收集,储存和分析。

1.3 核酸电泳

基本按照文献[3]的方法进行。消化收集经药物处理24 h的细胞,加0.5 ml裂解液(10 mmol/L Tris-HCl,pH 8.0,5 mmol/L EDTA,0.5% SDS)及RNA酶100 μg/ml,37 ℃水浴保温1 h。加蛋白酶K 200 μg/ml,50 ℃水浴保温3 h。然后分别用等体积酚、酚/氯仿、氯仿各抽提1次。加2倍体积无水乙醇和1/10体积3 mol/L醋酸钠沉淀上层水相中的DNA,-20 ℃过夜。12 000 r/min离心10 min,沉淀用70%乙醇洗2次,离心,沉淀干燥后溶于TE缓冲液。DNA上样于1.5%的琼脂糖凝胶,50 V电泳2 h,EB染色,紫外灯下拍照记录。

1.4 Bcl-2、bax蛋白表达的检测

消化诱导处理后的细胞,PBS洗2次,重新悬浮细胞于70%乙醇中,4 ℃过夜。PBS洗2次,加入1∶100稀释的兔抗人bcl-2单克隆抗体、兔抗人bax多克隆抗体(Santa Cruz)100 μl,在37 ℃恒温水浴中温育30 min,PBS洗2次,加1∶20稀释的FITC标记的二抗100 μl,37 ℃,30 min,PBS洗2次,离心去上清,除去未结合的多余荧光抗体。加入1.0 ml PBS,经400目滤网过滤,流式细胞仪(FACS)测定bcl-2、bax阳性率及荧光强度。测定前以鸡血红细胞标准样品调整仪器的*CV*值在5%以内。设未处理的SGC-7901细胞为空白对照。每组设3复孔。

1.5 统计学分析

采用*t*检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 5-FU对SGC-7901细胞的抑制效应与细胞周期时相的关系

用含5-FU的培养液处理细胞后,以流式细胞仪测定细胞DNA含量。结果见表1。

表1 5-FU对SGC-7901细胞周期及细胞增殖的影响

Tab 1 The effects of 5-fluorouracil on cell cycle and cell proliferation of SGC-7901 cells

Group	Cell cycle(%)			PI(%)
	G_0/G_1	S	G_2M	
Control	53.06±5.17	17.89±2.33*	20.39±3.05*	38.30±3.22*
5-FU	78.70±6.43*	9.60±1.92	10.00±1.99	19.60±2.17

PI:$(S+G_2M)/(G_0/G_1+S+G_2M)$; *:$P<0.05$ *vs* control

* 全军医药卫生"九五"重点课题资助项目,No. 96Z047

** 刘海峰,男,33岁,主治医师,讲师,博士

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　流式细胞仪检测凋亡细胞及 DNA 电泳

经 5-FU 处理的 SGC-7901 胃癌细胞，用流式细胞仪分析细胞 DNA 含量分布，显示典型的凋亡细胞群，细胞凋亡指数为 14.30%，显著高于对照组的 1.23%（$P<0.01$）。DNA 凝胶电泳发现 5-FU 处理组胃癌细胞出现明显的不连续的梯状电泳条带，见图 1。

2.3　5-FU 对 SGC-7901 胃癌细胞表达 bcl-2、bax 蛋白的影响

5-FU 处理 SGC-7901 胃癌细胞后，bcl-2 蛋白表达明显减少，与对照组比较相差显著（$P<0.05$）；bax 蛋白表达增加，但与对照组比较无统计学意义，见表 2。

表 2　5-FU 对 SGC-7901 细胞表达 bcl-2、bax 蛋白的影响

Tab 2　The effects of 5-FU on bcl-2、bax protein expression in SGC-7901 cells

Group	Bcl-2 protein expression		Bax protein expression	
	Percentage of positive cells (%)	Mean fluorescence intensity	Percentage of positive cells (%)	Mean fluorescence intensity
Control	43.16±4.01	77.53±3.51	29.67±2.37	67.03±2.02
5-FU	29.90±2.72*	67.39±2.51	36.92±2.26	61.45±3.55

*：$P<0.05$ *vs* control

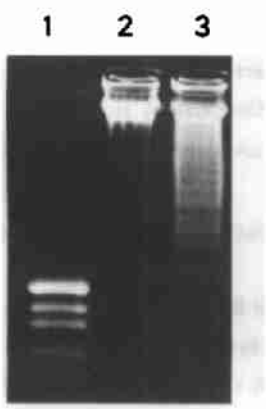


图 1　5-FU 诱导 SGC-7901 细胞凋亡的 DNA 片段电泳图谱

Fig 1　Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from cultured SGC-7901 gastric carcinoma cells

1：Marker；2：Control；3：5-FU

3　讨论

细胞凋亡是一个非常复杂的生理和病理过程，是细胞主动参与的"自杀"机制。近年来的研究表明，许多抗肿瘤药物均可诱导肿瘤细胞凋亡，可能是这些药物抑制肿瘤细胞生长的机理之一。细胞凋亡现象为肿瘤药物治疗提供了新的思路，其新观点是：抗肿瘤治疗的效果与癌细胞生成反应的内在能力密切相关，而恶性变是肿瘤细胞丧失自发凋亡反应能力的最终结果。所以，就肿瘤治疗而言，诱导肿瘤细胞凋亡，较抑制肿瘤细胞增殖更为可取。胃癌是最常见的恶性肿瘤之一，但其凋亡情况及药物对其的影响所知甚少，本研究则提供了一些 5-FU 诱导胃癌细胞凋亡的依据。

本研究结果显示，5-FU 能阻滞 SGC-7901 胃癌细胞从 S 期进入 G_2 期，并有通过引发凋亡而抑制其生长的作用。经 5-FU 处理后的胃癌细胞，可出现明显的梯状图谱，细胞凋亡指数较对照组显著增高。结果表明，5-FU 可诱导胃癌细胞凋亡，诱导细胞凋亡可能是 5-FU 杀伤胃癌细胞的主要机制之一。

细胞凋亡是一种主动的受基因调控的细胞自杀过程。许多人体基因如 p53、c-myc、bcl-2、bax、Fas、FasL 等参与凋亡的调控[4,5]。其中 bcl-2 基因尤为重要，它被看作是细胞凋亡调控的最后通路之一[6]。bcl-2 的抗凋亡机制虽尚未能完全阐明，但最近的资料揭示 bcl-2 能与几种 bcl-2 相关蛋白，尤其是 bax 形成异二聚体，bcl-2 的效应有赖于和 bax 的相互作用。在本实验中，我们发现经 5-FU 处理的 SGC-7901 胃癌细胞 bcl-2 蛋白表达显著减少，bax 蛋白表达增加，其结果是 bcl-2/bax 比值减少，这可能是 5-FU 诱导 SGC-7901 胃癌细胞凋亡的机制之一。这一结果为进一步揭示化疗药物杀灭肿瘤细胞的机制提供了新的思路。临床上可以通过检测肿瘤细胞的凋亡率，估计化疗药物的疗效及周期特异性，从而有助于化疗方案的设计及预后的评估。

参考文献

1　Lowe S W, Ruley H E, Jacks S, *et al*. p53 dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell, 1993,74(6):957

2　Ueda M, Kumagai K, Ueki K, *et al*. Growth inhibition and

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

apoptotic cell death in uterine cervical carcinoma cells induced by 5-fluorouracil. Int J Cancer, 1997, 71(4): 668
3 Shih S C, Stutman O. Cell cycle-dependent tumor necrosis factor apoptosis. Cancer Res, 1996, 56(7): 1591
4 Hale A J, Smith C A, Sutherland L C, *et al*. Apoptosis: Molecular regulation of cell death. Eur J Biochem, 1996, 236(1): 1
5 Golstein P. Controlling cell death. Science, 1997, 275(5303): 1081
6 Reed J C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. J Cell Biol, 1994, 131(1): 256

(收稿: 1999-01-15; 修回: 1999-08-06)
(编辑 冷怀明)

5-fluorouracil-induced apoptosis of human gastric carcinoma cell line SGC-7901

Liu Haifeng, Liu Weiwen, Fang Dianchun (Department of Gastroeneterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract **Objective**: To observe the pattern of 5-fluorouracil-induced apoptosis of the cells of gastric cardinoma cell line and evaluate the role of the drug in the chemotherapy of the malignancy. **Methods**: The effects of 5-fluorouracil on the growth cycle and apoptosis of the cells of SGC-7901 cell line were observed with cell morphology, electrophoresis on agarose gel and flow cytometry and the expression of bcl-2 and bax protein in the carcinomatous cells also examined. **Results**: 5-fluorouracil induced significant apoptosis of SGC-7901 cells and internucleosomal DNA fragmentation displayed the chracteristic ladder-lide arrangement of the electrophoretic bands. The expression of bcl-2 was downregulated. **Conclusion**: It is possible that 5-fluorouracil exercises its chemotherapeutic effects on gastric carcinoma through its induction of cell apoptosis.

Key words gastric carcinoma; apoptosis; 5-fluorouracil

(上接 719 页)

线回归相关系数 $r=0.996$，用直线回归方程将所测样品 A 值代入计算得样品 sIL-2R 含量。

2 结果

健康献血员血清 sIL-2R 含量：10 例男性献血员血清 sIL-2R 含量为(126.2±76.4)pmol/L；10 例女性献血员为(142.3±73.7)pmol/L，两者相差不显著($P>0.05$)。全部 20 例健康献血员血清 sIL-2R 含量为(134.2±76.5)pmol/L。喉癌患者血清 sIL-2R 含量为(251.3±164.1)pmol/L，与献血员比较，$P<0.05$，差别显著。

3 讨论

文献[2]报道，肺、胃、宫颈、乳腺等实体肿瘤患者血清 sIL-2R 水平显著高于正常人，在发生转移的患者增高更为明显。我们的实验结果表明：喉癌患者血清中 sIL-2R 明显高于正常人。其升高的机制大多数学者认为可能与活化 mIL-2R P_{55}蛋白阳性细胞数目增加引起 sIL-2R 释放增多有关。另一方面，喉癌患者细胞免疫功能低下，而其 sIL-2R 水平却显著增高，这很可能是因为 sIL-2R 与 IL-2 结合使 IL-2 廓清加速，活化的 T 淋巴细胞静息下来，其次大量的 sIL-2R 从细胞膜上脱落，使活化的淋巴细胞功能处于衰竭状态所致[3]。李光宇等[4]对不同病理分化程度、临床分型及分期的喉癌患者血清 sIL-2R 水平比较，发现均具有明显的相关趋势。

我们认为，血清 sIL-2R 作为一种肿瘤的相关物质，检测其水平变化，可作为临床上喉癌患者的血清学监测指标之一。

关键词 喉癌；sIL-2R
中图法分类号 R739.65 **文献标识码**：B

参考文献

1 Lai K N, Frep M D, Mphil S H, *et al*. Soluble interleukin-2 receptors in patients with nosopharyngeal carcinoma. Cancer, 1991, 67(8): 2180
2 Lissori P, Barni S, Rovelli F, *et al*. The biological significance of soluble interleukin-2 receptors in solid tumors. Eur J Cancer, 1990, 26(1): 33
3 马玲国，刘学仁. 可溶性白细胞介素 2 受体与头颈肿瘤. 国外医学. 耳鼻喉科学分册，1994，18(1)：14
4 李光宇，郑 敏. 喉癌病人血清可溶性白细胞介素Ⅱ受体的实验性研究及临床意义. 临床耳鼻咽喉科杂志，1994，8(2)：72

(收稿：1998-09-19；修回：1999-05-19)
(编辑 张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net