DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.03.016

联合细胞毒诱导分化对胃癌 SGC-7901细胞株作用的研究*

夏 锋** 王代科 刘宝华 冯素珍 陈 林 李义兵 (第三军医大学附属大坪医院普通外科) 重庆, 400042

提 要 目的: 探讨诱导分化剂联合细胞毒药物对胃癌细胞的作用效能,寻找治疗胃癌的新途径。方法: 应用全反式维甲酸(ATRA)、α干扰素(α-IFN)和5-Fu,分别以单用、两两双用和联用对胃癌细胞系SGC-7901细胞作用,用MTT法、流式细胞术、图像分析和CEA测定等方法观察细胞的形态和功能变化。结果:① 随着单用、双用和联用对胃癌细胞的抑制率逐渐升高,平皿克隆形成率逐渐下降,细胞周期示 G_0/G_1期细胞相对积聚,DNA合成受抑制。② 癌细胞恶性表型逐渐消失,成熟细胞特征逐渐增多,培养液CEA滴度逐渐下降。③ 药物作用后细胞凋谢现象明显,可见大量凋谢小体。结论: 3种药物联合使用时可对胃癌细胞产生显著的抑制增殖、诱导分化和促凋谢作用。联合细胞毒诱导分化对胃癌细胞有明显的抗肿瘤作用。

关键词 全反式维甲酸;α干扰素;联合细胞毒诱导分化;胃癌
中图法分类号 R735.2

随着维甲类(Retinoids)药物在治疗白血病中取得显著疗效,肿瘤的诱导分化治疗(Induction differentiation therapy, IDT)这一新概念被提了出来[1]。继而美国Waxman教授联合应用诱导分化剂和细胞毒药物对白血病细胞进行作用,产生了显著抗癌效应,于是即提出了联合细胞毒诱导分化治疗(Combination cytotoxic-differentiation therapy, CCDT)的新概念[2]。本研究应用诱导分化剂全反式维甲酸(ATRA)、细胞毒药物5-Fu和生物调节剂α干扰素,在实体瘤领域对胃癌细胞株SGC-7901进行作用,以探索这一联合作用的抗肿瘤效应。

1 材料与方法

1.1 药物及剂量

主要试剂为全反式维甲酸(Sigma公司),用无水酒精溶解,乙醇终浓度为0.1%~0.2%。α干扰素(军事医学科学院提供)于临用前用RPMI 1640培养液溶解稀释备用。5-Fu(上海第十二制药厂产品)、噻唑氮蓝(MTT)(瑞士FLUKA公司产品)。试验分组并确定药物浓度如下:① ATRA(10^6 mol/L);② 5-Fu(2.5μg/ml);③ α-IFN(2000 IU/ml);④ ATRA+5-Fu;⑤ 5-Fu+α-IFN;⑥ ATRA+α-IFN;⑦ ATRA+α-IFN+5-Fu

1.2 细胞及培养

体外培养SGC-7901人胃中分化转移腺癌细胞株,采用RPMI 1640培养基加入10%小牛血清和适量抗生素,于37℃、5% CO_2恒温箱内饱和湿度培养。癌细胞贴壁生长,裸鼠接种成瘤率100%。

1.3 体外培养SGC-7901细胞观测指标

① MTT法测定细胞增殖能力: 参照Mosman方法[2]并加以改进。在加药培养至66 h时;向各孔加入MTT应用液10μl(5 mg/ml),37℃孵育6 h,再加入十二烷基硫酸钠(SDS Sigma产品),充分溶解后用BIO-TEKEL312酶标仪测定570 nm波长处各孔吸光值。② 软琼脂集落形成: 采用鄂征的方法[4]。③ 流式细胞术: 应用FACS star plus型流式细胞仪进行检测,采用Barlogie的细胞周期分析法,细胞增殖指数(Proliferation index, PI)按下列方式计算: PI=[(S+G_2M)/(G_0/G_1+S+G_2M)]×100%。④ 形态学观察: 光镜、电镜观察,并应用IA-I型图像分析仪进行自动扫描测量,求出核浆面积比值。⑤ CEA-EIA(单克隆抗体)测定: 试剂盒由军科院提供。

2 结果

2.1 ATRA、5-Fu和α-IFN单用、双用和联用对SGC-7901细胞增殖能力的影响

2.1.1 3药单用、双用和联用时对SGC-7901细胞株的增殖抑制作用不同。各组作用3 d和6 d后自身对比抑制率差异显著($P<0.01$),3种药物单用、双用和联用时其抑制率呈梯形上升,三种用法间抑制率相比较差异显著($P<0.01$),见图1。

2.1.2 分组作用后平皿克隆形成率。随单用、双用和联用呈梯形下降,见图2。

2.1.3 SGC-7901细胞经分组作用后可见有明显 G_0/G_1期积聚,而S G_2M期相对减少。单用时5-Fu可使S期细胞相对增高,而 G_0/G_1期细胞基本与对照组相似,ATRA和α-IFN作用后 G_0/G_1期积聚现象明显,与对照组比较差异显著($P<0.05$)。双用和联用时 G_0/G_1期积聚更为明显,与1、3组相比较

* 重庆市科委资助项目
** 夏 锋 男,29岁,住院医师,博士研究生

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

差异显著。增殖指数的变化随单用、双用和联用而呈逐渐下降趋势,见表 1

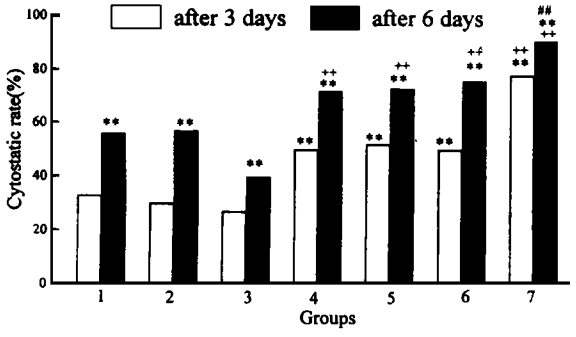


图 1　各药物组细胞抑制率

Fig 1　Effects of different treatment (medicine) on the cytostatic rate of SGC-7901 cell line

** : $P < 0.01$ *vs* 3 days after;++ : $P < 0.01$ *vs* 1, 2, 3 groups; ## : $P < 0.01$ *vs* 4, 5, 6 groups

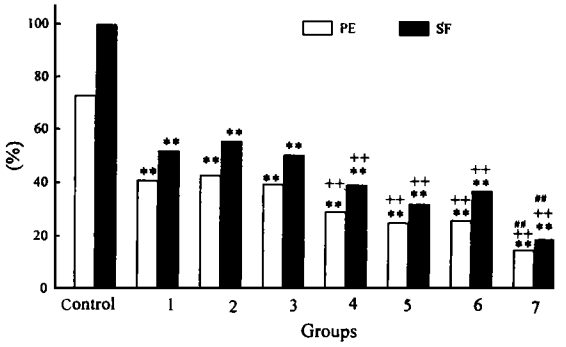


图 2　各药物组平皿克隆形成率

Fig 2　Effect of different medicicine on the plating efficiency of SGC-7901 cell line

** : $P < 0.01$ *vs* control;++ : $P < 0.01$ *vs* 1, 2, 3 group;## : $P < 0.01$ *vs* 4, 5, 6 group

表 1　药物作用 3 d后各组细胞周期及增殖指数的变化 (%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　The ratio of cell cycles and PI of each group after administrationfor 3 days (%, $\bar{x} \pm s$)

	Control	1	2	3	4	5	6	7
G_0/G_1	38.7± 2.74	60.3± 1.91**	43.3± 2.01	51.6± 1.34**	72.4± 2.28**#	61.5± 1.84**	69.2± 2.75**#	78.7± 3.26**#
S	26.4± 2.76	25.5± 3.22	48.5± 2.11	21.3± 2.20	31.8± 1.86	24.0± 2.17	17.6± 1.49	
G_2M	24.9± 1.99	14.2± 1.89	8.2± 2.63	16.3± 2.27	6.3± 2.64	6.7± 1.73	6.8± 2.78	4.7± 1.78
PI	51.3± 1.99	39.7± 2.39**	56.7± 3.64	48.4± 2.78	27.6± 2.13**#	38.5± 3.29**	30.8± 1.77**#	28.3± 3.26**#

* : $P < 0.05$ *vs* control;# : $P < 0.05$ *vs* 1, 3 group

2.2　SGC-7901细胞的作用后形成变化

2.2.1　经 ATRA和 α-IFN作用后细胞胞体突受抑制,细胞大多呈圆形成椭圆形,形态相对规则,对照组细胞则呈多形性,"长角样"现象多见。细胞堆集现象减少,大多散在生长,培养至第 6天可有胞浆空泡出现,细胞逐渐老化。电镜观察示处理后细胞胞核变得相对规则,呈圆形或卵圆形,核膜平整,未见深切迹,多数细胞仅有一个核仁,染色质变得细而分散。细胞浆相对增多,细胞器发达,分泌泡增多。细胞膜较对照组相对规则,微绒毛变化不明显。

2.2.2　细胞经作用后可见凋谢现象出现,细胞核染色质浓缩密结,于核膜内侧边集,核膜破裂,出现由胞膜包囊的染色质块即凋谢小体 (Apoptotic body)。各实验组 6 d后均可见到普遍凋谢现象。

2.2.3　图像分析结果表明　经 ATRA及联用组作用 6 d后测胞浆和胞核面积,见细胞核平均面积下降,胞浆平均面积上升见表 2

表 2　药物作用对细胞核浆面积比例的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Changes of ratio of the cell nuclear square and cytoplasm square after administration ($\bar{x} \pm s$)

Group	Number of cells	SC/μm²	SN/μm²	SN/SC
Control	100	491.2± 78.7	305.6± 89.1	0.622
ATRA	100	659.8± 78.7	306.7± 53.9	0.313**
ATRA+ α-IFN + 5-Fu	100	632.1± 87.3	193.7± 43.7	0.306**

* : $P < 0.01$ *vs* control; SN: the square of cell nuclear; SC: the square of cytoplasm

2.3　培养液 CEA含量测定表明

培养 3 d后与 6 d后 CEA的浓度与对照组比较明显下降,6 d后双用组及联用组较之单用组和同组 3 d后,浓度亦明显下降。联用组下降尤其明显,见图 3

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

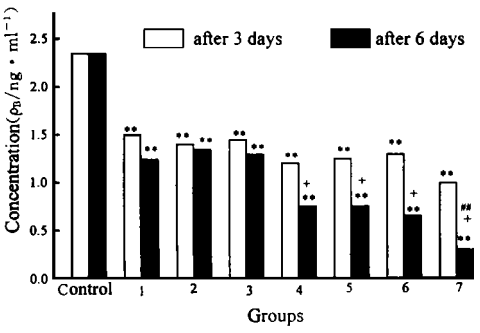


图3 各组作用后对细胞培养液 CEA浓度的影响

Fig 3 Effect of different medicine on concentration of CEA in the culture-medium

** : $P < 0.01$ *vs* control; + : $P < 0.05$ *vs* 3 days after and 1, 2, 3 group; ## : $P < 0.01$ *vs* 4, 5, 6 group

3 讨论

本实验表明 ATRA 5-Fu和 α-IFN对胃腺癌SGC-7901细胞株产生了明显的增多殖抑制、诱导分化和促凋谢作用。ATRA是维生素 A的一种衍生物,是已被证实的一种强有力的诱导分化剂,它可促使多种未分化或低分化细胞向终未分化[5]。α-IFN是一种作用较复杂的细胞因子[6],本实验证明其对胃腺癌细胞系 SGC-7901具有诱导分化作用。SGC-7901细胞的增殖抑制、克隆形成能力降低、堆叠样生长状态逐渐消失、G_0/G_1期积聚、培养液 CEA浓度下降和细胞超微结构的变化显示了癌细胞向终未分化,已具备一些成熟细胞的特征。凋谢是细胞的一种特征性死亡方式[7]。本实验表明 3药联用有明显的促凋谢作用。药物联用后作用明显大于单用,其机制可能与以下因素有关:① 5-Fu与诱导分化剂之间的偶联协同作用;② ATRA与α-IFN之间的不同作用通路互补;③ α-IFN促进 5-Fu代谢为 5-dump而抑制了胸腺嘧啶脱氧核苷的合成。

本实验从新的角度为探索胃癌治疗的新疗法指出了方向。其作用机制仍有待于进一步研究。联合细胞毒诱导分化是一种在不杀伤肿瘤细胞的基础上,诱导其向成熟方向分化从而使肿瘤细胞丧失其恶性生理学特征,并进而产生凋谢的新方法。其理论意义深远,实际应用前景亦较广泛。

参考文献

1 Colling S J, Ruscetti F W, Gallagher R E *et al*. Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cell (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. J Exp Med, 1979; 149(5): 969

2 Waxman S, Mickley L A, Okabe-kado J *et al*. Enhancement of differentiation and cytotoxicity of leukemia cells by combinations of flaorinater pyrimidines and differentiation inducers. Biomed Pharacother, 1992; 46(1): 183

3 Kantor J O, Mccormick B, Steeg P S *et al*. Inhibition of cell motility after nm23 transfection of human and murine tumor cells. Cancer Res, 1995; 54(8): 1971

4 鄂 征.组织培养技术.第2版.北京:人民卫生出版社, 1988: 96~99

5 Lotan R. Retinoids as modulators of tumor cell invasion and Metastasis. Semin Cancer Biol, 1991; 6(2): 197

6 Farrar M, Ealick S, Langer J *et al*. The molecular cell biology of interferon-γ and its receptor. Annual Review of Immunology, 1993; 11(3): 571

7 Distelhorst C, Bilon R L, Diatan H *et al*. Glucocorticosteroids induce DNA fragmentation in human lymphoid leukemia cells. Blood, 1988; 72(4): 1305

(收稿: 1997-12-05;修回: 1998-04-27)

(编辑 张大春)

Effects of differentiation inducers in combination with cytotoxic agents on human gastric carcinoma cell line SGC-7901

Xia Feng, Wang Daike, Liu Baohua, Feng Shuzheng, Cheng Lin, Li Yibin (Department of General Surgery, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400042)

Abstract Objective: To investigate the effects of differentiation inducers in combination with cytotoxic agents on human gastric carcinoma cell line and explore a new approach of treatment to the cancer. Methods: The effects of ATRA in combination with α-IFN and 5-Fu on human gastric carcinoma cell line SGC-7901 were observed *in vitro*. The gastric carcinoma cell line was exposed to the three agents in single, two-agent-combining or three-agent-combining manner respectively. The morphological and functional changes of the

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

cell line were observed with MTT, flow cytometry, image analysis and CEA. **Results**: ① The cytostatic rates of the cell line were gradually increased while plating efficiency decreased after the treatment in three manners. The cells at G_0/G_1 phase were relatively increased and synthesis of DNA inhibited. ② The malignant phenotype of the cell line gradually disappeared while characteristics of mature cell were progressively increased. ③ Obvious cell apoptosis and plenty of apoptotic bodies were seen after treatment. **Conclusion**: The combined use of the three agents can significantly inhibit proliferation, induce differentiation and promote apoptosis in the gastric carcinoma cells.

Key words　ATRA; α-IFN; induction; differentiation; cytotoxicity; gastric cancer

(上接 216页)

屑性间质性肺炎。例 2大体观察见气管粘膜略显浅红色,腔内有少许粘液性液体流出。双肺饱满,表面、切面暗红色,以双下叶明显。切面未见有明显泡沫状液体流出,质地较实。镜下见双肺组织病变相同,肺泡腔、细支气管腔内有大量脱落的肺泡上皮细胞及少量羊水成分,右下肺叶病变明显,大量脱落上皮阻塞肺泡腔,其内有新生毛细血管长入,间质明显充血,少量炎细胞浸润。肺膜(胸膜脏层)轻度充血。气管腔上皮部分脱落。病理诊断: 新生儿脱屑性肺炎。

讨论

DIP在小儿较少见,国内自鄢氏等于 1965年首次报告以来陆续有病例报告[1-3]。小儿 DIP起病急,来势凶猛,病死率高,故应及早诊断及时治疗。

目前对 DIP的病因尚不清楚,是异物反应还是感染后遗症或自身免疫性疾病,或与遗传有关,尚无定论。一般认为 DIP分为两种类型:① 原发性: 发病急骤,无其他疾病;② 继发性: 常见于其他疾病如肺炎、肝炎、各种感染之后突然起病。本组例 1左肘部有一小脓肿,尸解脑膜可见炎性细胞浸润,故考虑其为继发性,起病与感染及自身免疫低下有关;例 2发生于肺炎恢复期,也属继发性。

DIP的临床表现以咳嗽、气促、发绀、进行性呼吸困难为主,可有心衰,病程长者可出现杵状指(趾),多数有低热。外周血白细胞及中性粒细胞增高,胸片可因不同病期表现为: 肺纹粗糙、模糊,呈现片状影乃至毛玻璃样改变。其病理特点为:① 肺多呈暗紫色,有不同程度实变;② 肺泡内聚集大量含 PAS颗粒的巨噬细胞;③ 肺泡上皮细胞(II 型肺泡细胞为主)增生并脱落到肺泡腔内;④ 肺泡间质有炎性细胞浸润,无明显纤维化及坏死;⑤ 肺泡壁由于充血水肿及细胞浸润而增厚。

因无特异性的临床表现及实验室检查指标,DIP的诊断较困难,尤其是起病急进展迅速者,钟氏[1]报道 17例均为尸检确诊。一般认为患儿突然咳嗽、发绀、进行性呼吸困难、心力衰竭加上胸片改变,患儿又无其他疾病或在其他疾病的基础上出现上述情况应疑及本病,但确诊需做肺活检。Hewitt[4]报道儿童 DIP患病者临床经过多数较急,病情重,且年龄越小症状越重,最小的发病年龄为生后 1 d[3]。

目前尚无经治疗存活的婴儿病例报道[1,2,3,5],因此及早诊断及治疗显得格外重要。早期即用肾上腺皮质激素治疗有效,一般用强的松(1~ 2) mg/kg· d^{-1}, 4周~ 8周后逐渐减量,维持用药 1年~ 2年或更长时间,约对 10%~ 15%的患儿有效。亦有用强的松(3~ 5) mg/kg· d^{-1}或强的松龙 2 mg/kg· d^{-1}获得较好疗效,此外还可用环磷酰胺、氯喹等免疫抑制剂。本文 2例患儿起病急,迅速恶化,例 2在肺炎已好转时突然出现上述表现,均酷似本病,但因对 DIP警惕性不高,加之例 1胸片仅为肺纹增粗,又有小脓肿,例 2有腹泻,且两例均有皮肤花斑纹,故考虑感染性休克而忽略了本病。虽然用了激素,但由于病情进展迅速,可能大量脱落肺泡上皮细胞、炎性分泌物阻塞气道,致全身缺氧、酸中毒、多脏器功能受累,终因呼吸循环衰竭而死亡。因此我们认为对 DIP第一要警惕,遇有临床表现及体征患儿应想到此病的可能而进行必要的检查如胸片、乳酸脱氢酶、血象、免疫球蛋白、类风湿因子等;第二要及时治疗,可用激素静脉给药;第三,当气道阻塞严重者及早行气管插管、气道冲洗,并给以相应的对症治疗。

关键词　肺炎,脱屑性;肺炎,间质性

中图法分类号　R563.1

参考文献

1 钟天然,潘凯丽.小儿脱屑性间质性肺炎—— 附 17例报告.实用儿科杂志, 1989; 7(6): 334

2 范永琛.激素治疗小儿脱屑性间质性肺炎 5例.中华儿科杂志, 1990; 28(2): 109

3 孔淑卿,姜凤英,翟景芝等.婴儿脱屑性间质性肺炎 13例报告.实用儿科杂志, 1992; 7(6): 310

4 Hewitt C J. Fibrosing alveolitis infancy and childhood. Arch Dis Child, 1977; 52: 22

5 Asher T. Fatal desquamative interstitial pneumonia in three infants siblings. J Pediatr, 1984; 104: 873

(收稿: 1996-05-05;修回: 1997-09-25)

(编辑　刘　鹏)

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