

# 舒林酸对胃癌细胞株 BGC-823作用的实验研究

周 蕾, 于东红, 王 萍, 承泽农

[摘要]目的: 研究舒林酸对胃癌细胞株 BGC-823 增殖、凋亡的作用, 探讨其作用机制。方法: 体外培养的胃癌细胞株 BGC-823 加入不同浓度的舒林酸作用不同时间后, 用倒置显微镜观察细胞形态学变化, 四甲基噻唑氮蓝 (MTT) 法检测细胞生长抑制率, 流式细胞术 (flow cytometry FCM) 检测细胞周期; 透射电镜观察细胞超微结构变化及凋亡形态变化, DNA 电泳检测细胞凋亡 DNA 片段。结果: 舒林酸可以改变胃癌细胞株 BGC-823 的形态, 抑制其生长, 影响其细胞周期分布, 透射电镜观察到细胞凋亡的形态, DNA 电泳检测出典型的细胞凋亡的特征性梯状条带。结论: 舒林酸有抑制胃癌细胞株 BGC-823 增殖, 诱导其凋亡的作用, 并且可能与舒林酸影响其细胞周期分布、抑制了环氧合酶-2 (COX-2) 表达有关。

[关键词] 胃肿瘤; 细胞株; 舒林酸; BGC-823 细胞; 增殖、凋亡; 细胞周期

[中国图书资料分类法分类号] R 735.2 [文献标识码] A

## Experimental study for effect of sulindac for gastric cancer cell BGC-823

ZHOU Lei YU Dong hong WANG Ping CHEN Ze nong

(Department of Pathology, Bengbu Medical College Bengbu 233030 China)

[Abstract] **Objective** To study the effects of sulindac on proliferation and apoptosis in gastric cancer cells and the probable mechanism involved. **Methods** The BGC-823 cells were cultured with sulindac at various concentrations for different time. Morphological changes of BGC-823 cells were observed by inversion microscopy. The inhibitory rate of cell growth was assessed by MTT spectrophotometric analysis. The cell cycle distribution was measured by flow cytometry (FCM). The ultrastructure of cells and the apoptotic morphology were examined by transmission electronic microscopy. Apoptosis of the cells was examined by DNA electrophoresis. **Results** Sulindac can make gastric cancer cells BGC-823 morphologic change, inhibit its growth and change the cells cycle distribution. The apoptotic morphology of BGC-823 cells were observed by transmission electronic microscopy. The notably DNA ladders of the cells apoptosis were detected by DNA electrophoresis. **Conclusions** Sulindac can inhibit the BGC-823 cell proliferation and induce cell apoptosis, the mechanism may be related to changing cell cycle distribution and downregulate the expression of COX-2.

[Key words] stomach neoplasms; cell line; sulindac; BGC-823 cells; proliferation; apoptosis; cell cycle

非甾体消炎药 (nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 如阿司匹林、舒林酸、布洛芬等是一类常见的消炎镇痛药, 临床上广泛用于抗炎、解热、镇痛和抗血小板聚集。舒林酸 (sulindac) 作为 NSAIDs 之一, 对家族性腺瘤性息肉病显示出独特的疗效, 能显著减少息肉的数量, 降低结肠腺癌的发生率<sup>[1]</sup>。目前, 国内外有关舒林酸防治结肠肿瘤的研究较多<sup>[2]</sup>, 对舒林酸防治胃癌的研究较少, 而胃癌是我国一种最常见的恶性肿瘤, 据 1990~1992 年中国 1/10 人口死因抽样调查结果显示, 胃癌死亡率分别列男、女恶性肿瘤死亡第一位<sup>[3]</sup>。有鉴于此, 本实验选择舒林酸作用于人胃癌 BGC-823 细胞株进行体外实验, 观察舒林酸对胃癌细胞株 BGC-823 的影响, 以期对胃癌的防治提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胃癌上皮细胞株 BGC-823 购自中国科学院上海生物研究所。

1.1.2 主要试剂 舒林酸、RPMI 1640 培养基、四甲基噻唑氮蓝 (MTT)、二甲基亚砷 (DMSO) 均购自 Sigma 公司; 小牛血清购自杭州四季青公司。

1.1.3 主要仪器 流式细胞仪 (FACS Calibur BD 公司); JEM-1200EX 透射电镜 (日本产); CO<sub>2</sub> 培养箱 (Harris HW 0301 T VBA 型, 美国产); 倒置相差显微镜 (梧州 WJ12-50 XSB-14 型); 酶联免疫检测仪 (DG3022 型, 南京华东电子管厂)。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌细胞株 BGC-823 置于含 10% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养、传代。

1.2.2 舒林酸作用后 BGC-823 细胞的形态学观察 收集胃癌 BGC-823 细胞稀释为单细胞悬液, 调整浓度  $5 \times 10^4$  ml 加入 24 孔培养板中, 每孔 2 ml 共

[收稿日期] 2006-07-01

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目 (2003KJ257); 蚌埠市 2003 年第一批科技项目 (10)

[作者单位] 蚌埠医学院 病理学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 周 蕾 (1974-), 女, 硕士, 助教。

8孔,待细胞贴壁后,加入不同浓度的舒林酸,使每2孔的药物终浓度分别为0.6 mmol/L、0.9 mmol/L、1.2 mmol/L。不加药的2孔为对照组。分别培养24 h、48 h、72 h,在3个时点上用倒置相差显微镜直接观察。

1.2.3 电镜形态学观察 贴壁生长已2/3满的培养瓶内细胞,加入舒林酸使每瓶终浓度分别为0.3 mmol/L、0.6 mmol/L、0.9 mmol/L、1.2 mmol/L,设不加药对照组。培养24 h后收获细胞,3 000 r/min离心10 min,弃上清,PBS洗涤一遍,4℃预冷的2%戊二醛固定,PBS洗涤,1%锇酸固定,系列丙酮脱水包埋,制备超薄切片,醋酸、双氧铀及铅染液染色,透射电镜观察。

1.2.4 MTT比色法检测药物对胃癌细胞增殖的影响 取对数生长期的BGC-823细胞,调整细胞浓度为 $5 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup>接种于96孔培养板,每孔200 μl贴壁后加入舒林酸使其终浓度为0.3 mmol/L、0.6 mmol/L、0.9 mmol/L、1.2 mmol/L,每个浓度设4个复孔,设不加药对照组,不含细胞的空白组,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱分别培养24 h、48 h、72 h,终止前4 h加入20 μl MTT,继续孵育4 h,弃去上清,加入150 μl DMSO,微振荡使紫蓝色结晶沉淀完全溶解,用DG3022型酶标控制仪测定570 nm和630 nm波长吸光度值(A<sub>570</sub>、A<sub>630</sub>)。整个实验重复4次,按下列公式计算细胞增殖率(PR)和细胞生长抑制率(IR), $PR(\%) = \frac{\text{试验组平均值}}{\text{对照组平均值}} \times 100\%$ , $IR\% = 1 - PR$ 。

1.2.5 流式细胞仪测定细胞周期分布 以 $0.5 \times 10^4$  ml<sup>-1</sup>的细胞浓度接种于24孔板,每孔2 ml贴壁后加入不同剂量的舒林酸,使其终浓度为0.6 mmol/L、0.9 mmol/L、1.2 mmol/L,每孔容量均为2 ml,每个浓度设2个复孔,设不加药的阴性对照。分别培养24 h、48 h收获细胞,PBS洗涤,300目尼龙网过滤。10 ml PBS,1 000 r/min 5 min,洗3次,弃上清。70%冷乙醇固定4 h,PBS 1 000 r/min 5 min,洗2次,加入100 μl PI染液,室温避光20 min上流式细胞仪检测。

1.2.6 DNA电泳检测细胞凋亡DNA片段 分别收集1.2 mmol/L舒林酸作用24 h后的BGC-823细胞和未加药的长势良好的BGC-823细胞,常规提取DNA,在1.5%琼脂糖凝胶上80 V电泳1~2 h,自动凝胶成像系统摄影。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 $q$ 检验和Poisson分布资料的 $u$ 检验。

## 2 结果

2.1 舒林酸对BGC-823细胞形态的影响 倒置显微镜下,没有加药的BGC-823细胞生长良好,细胞为不规则的多边形,贴壁生长,可融合成集落,并见到较多的瘤巨细胞。经舒林酸处理后,细胞伪足回缩,变小、变圆,细胞悬浮,不见瘤巨细胞。随着舒林酸作用浓度的增加和作用时间的延长,上述表现逐渐明显(见图1)。透射电镜下,对照组细胞结构完整,核仁、核膜清晰。而0.9 mmol/L、1.2 mmol/L舒林酸作用24 h出现凋亡细胞的形态学特征,可见细胞皱缩、核质比例减小,核仁不清晰,核染色质边集及新月状结构,并可见凋亡小体(见图2)。

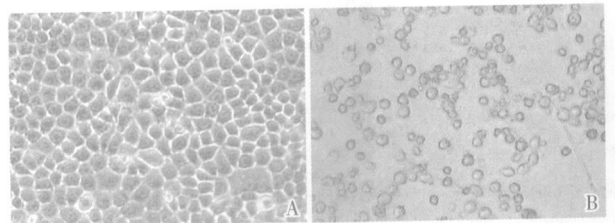


图1 舒林酸作用48 h后的细胞形态变化  
A 对照组48 h (×100); B 1.2 mmol/L舒林酸作用48 h (×100)

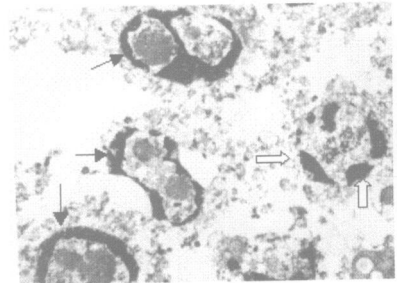


图2 舒林酸作用后BGC-823细胞出现核染色质边集(实箭头)、新月状结构(空箭头)等凋亡形态特征(×60 000)

2.2 舒林酸对BGC-823细胞增殖的影响 舒林酸对胃癌BGC-823细胞有明显的生长抑制作用,随着作用时间的延长和剂量的增大,抑制作用明显,呈时间和剂量依赖性,实验组与对照组以及各实验组与0.3 mmol/L组之间差异均有统计学意义( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )(见表1)。

2.3 舒林酸对BGC-823细胞周期的影响 舒林酸作用后,细胞周期中DNA合成前期(G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期)的比例增高,DNA合成期(S期)比例降低,与对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),各药物组间比较差异也有统计学意义( $P < 0.05$ ),且随着药物浓度增大和作用时间延长,以上变化更加明显(见表2)。

2.4 DNA电泳 对照组细胞无DNA降解,呈现为一条模糊的条带;而舒林酸作用24 h后细胞DNA则降解为180~200 bp左右成倍数的寡核苷酸片段,琼脂糖凝胶上出现典型的细胞凋亡的特征性梯状条带(见图3)。

表 1 舒林酸对 BGC-823 细胞的生长抑制作用 ( $n_i=4$ )

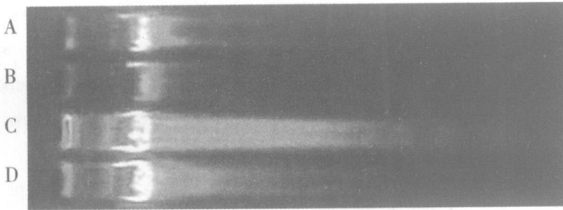
舒林酸 (mmol/L)	吸光度值 ( $A_{570} - A_{630}$ ) ( $\bar{x} \pm s$ )			F	P	MS <sub>组内</sub>	抑制率 (%)		
	24 h	48 h	72 h				24 h	48 h	72 h
对照组	0.55 ± 0.03	0.63 ± 0.04	0.71 ± 0.02	26.48	<0.01	0.0010	—	—	—
0.3	0.52 ± 0.01	0.49 ± 0.03**	0.43 ± 0.01 <sup>##</sup>	22.91	<0.01	0.0004	6.20	20.6	37.45
0.6	0.48 ± 0.02 <sup>△*</sup>	0.45 ± 0.02**	0.35 ± 0.03 <sup>##△△</sup>	32.71	<0.01	0.0006	11.93	28.4	45.62
0.9	0.38 ± 0.03 <sup>△△*</sup>	0.29 ± 0.03 <sup>##△△</sup>	0.15 ± 0.02 <sup>##△△</sup>	73.27	<0.01	0.0007	31.8	51.8	76.86
1.2	0.35 ± 0.02 <sup>△△*</sup>	0.24 ± 0.02 <sup>##△△</sup>	0.06 ± 0.01 <sup>##△△</sup>	285.78	<0.01	0.0003	35.7	71.7	92.45
F	56.52	118.10	683.16	—	—	—	—	—	—
P	<0.01	<0.01	<0.01	—	—	—	—	—	—
MS <sub>组内</sub>	0.0005	0.0008	0.0004	—	—	—	—	—	—

q 检验: 与对照组比较 \*\*  $P < 0.01$ ; 与 0.3 mmol/L 比较  $\Delta P < 0.05$   $\Delta\Delta P < 0.01$ ; 与 24 h 比较  $\# P < 0.01$

表 2 舒林酸对 BGC-823 细胞周期的影响 ( $n_i=4$ )

舒林酸 (mmol/L)	作用 24 h				作用 48 h					
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	u	S	u	G <sub>2</sub> /M	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	u	S	u	G <sub>2</sub> /M
对照组	30.1	—	44.6	—	25.3	24.3	—	48.8	—	26.9
0.6	47.3	1.96	37.5	0.78	13.8	54.6	3.41**	30.4	2.07*	15.0
0.9	53.4	2.55*	30.2	1.66	16.4	63.8	4.21**	22.1	3.17**	14.1
1.2	68.7 <sup>##</sup>	3.88**	20.7 <sup>#</sup>	2.96**	10.4	93.8 <sup>△△</sup>	6.39**	3.4 <sup>▲▲</sup>	6.29**	2.8

Poisson 分布资料的 u 检验: 与对照组比较 +  $P = 0.05$  \*  $P < 0.05$  \*\*  $P < 0.01$ ; 与 0.6 mmol/L 组比较  $\# u = 2.20 P < 0.05$   $\# \# u = 3.43 P < 0.01$   $\Delta\Delta u = 3.22 P < 0.01$   $\Delta\Delta\Delta u = 4.66 P < 0.01$  与 24 h 比较, 作用 48 h  $G_0/G_1$ :  $u = 1.97 P < 0.05$   $S$ :  $u = 3.52 P < 0.01$



A、B 为对照组, C、D 为药物处理组  
图 3 胃癌细胞 BGC-823 DNA 电泳

### 3 讨论

本实验在倒置显微镜下发现, 经舒林酸处理后的胃癌细胞的伪足回缩, 细胞变小、变圆, 细胞悬浮, 瘤巨细胞消失等形态改变, 且有时间和剂量依赖效应, 表明舒林酸对 BGC-823 细胞生长有抑制作用。通过 MTT 比色法检测舒林酸对 BGC-823 细胞增殖的影响, 发现舒林酸对胃癌 BGC-823 细胞也有明显的生长抑制作用, 且随着作用时间的延长和剂量的增大, 抑制作用越来越明显, 其差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。本实验 FCM 检测 BGC-823 细胞的细胞周期分布, 发现未经舒林酸作用的 BGC-823 细胞 (对照组) 多数处于 S 期, 少数处于 G<sub>1</sub> 期, 说明大多数的胃癌细胞在合成 DNA, 处于增殖能力旺盛阶段; 而不同浓度的舒林酸作用于 BGC-823 细胞后, 细胞周期发生明显变化, 表现为 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例增高, S 期比例下降, 与对照组差异均有统计学意义

( $P < 0.05 \sim P < 0.01$ )。由此可见, 舒林酸可使胃癌细胞阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期, 影响细胞周期的进程, 从而抑制细胞增殖。舒林酸影响细胞周期的机制尚不明确, Shiff 等<sup>[4]</sup> 发现舒林酸可降低结肠癌 HT-29 细胞周期依赖性激酶 (CDK) 的表达, 认为舒林酸可能通过影响细胞的信号传导途径, 改变细胞周期调控蛋白的表达来抑制细胞增殖。

细胞凋亡是多细胞生物体中, 在一定的生理或病理条件下, 单个细胞受其内在基因的编码调节, 通过主动生化过程自己结束其生命的过程, 它是维持正常生理情况下机体内环境稳定的关键因素之一<sup>[5]</sup>。随着细胞学与分子生物学研究的快速发展, 人们日益认识到细胞凋亡在肿瘤发生和发展中所起的作用。我们的实验发现舒林酸处理后的 BGC-823 细胞, 通过透射电镜, 观察到了较为典型的细胞凋亡的形态学变化; 琼脂糖凝胶电泳结果显示对照组的细胞结构完整, 无 DNA 降解, 而药物处理组的细胞发生了凋亡, 出现典型的梯状条带, 进一步证实了舒林酸可以诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡。

大量研究表明, COX-2 过表达与胃癌的发生、发展密切相关<sup>[6-8]</sup>。COX-2 可促进前列腺素 E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) 的合成, 抑制细胞凋亡, 促进肿瘤新生血管生成, 而舒林酸在体内发挥作用的靶酶就是 COX-2, 它可直接抑制 COX-2 的活性。此外, 舒林酸还可抑制细胞质磷脂酶 A<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) mRNA 表达, 减弱 cPLA<sub>2</sub> 水解膜磷脂的作用, 减少花生四烯酸的产生, 进而减少 COX-2 的生成。因此舒林酸抑制胃癌细胞增殖和诱导其凋亡的机制与抑制 COX-2 的表达有关。

在我国, 胃癌死亡人数居消化道肿瘤之首, 其防治十分重要, 目前许多抗肿瘤药物临床疗效不理想<sup>[9]</sup>。本研究证实舒林酸可抑制细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 而且舒林酸对肾脏损害作用小, 对胃肠损伤

[文章编号] 1000-2200(2007)02-0135-02

· 基础医学 ·

# 喉癌患者血清中白细胞介素-18的检测意义

石莹, 陈素莲, 杨琦, 夏俊, 陈治文

[摘要]目的: 探讨血清白细胞介素-18(IL-18)的变化与喉癌的关系。方法: 采用双抗体夹心ELISA法检测22例喉癌患者(喉癌组)和10名健康者(对照组)血清中IL-18的含量。结果: 喉癌组血清IL-18含量为 $(68.44 \pm 39.42)$  pg/ml, 明显高于对照组 $(28.47 \pm 2.29)$  pg/ml ( $P < 0.001$ )。结论: 喉癌患者血清IL-18含量增高, 可作为喉癌辅助诊断及观察患者病情变化的一项重要生化指标。

[关键词] 喉肿瘤; 白细胞介素-18 酶联免疫吸附测定

[中国图书资料分类法分类号] R 739.65 R 392.12 [文献标识码] A

## Significance of serum level of interleukin-18 in laryngeal cancer

SHI Ying CHEN Sulian YANG Qi XIA Jun CHEN Zhiwen

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College Bengbu 233030 China)

[Abstract] **Objective** To investigate the serum level of interleukin(IL)-18 in laryngeal cancer. **Methods** The IL-18 concentration in sera was measured in 22 patients with laryngeal cancer and 10 health control subjects by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The concentration of IL-18 in patients with laryngeal cancer [ $(68.44 \pm 39.42)$  pg/ml] was significantly higher than that of health control subjects [ $(28.47 \pm 2.29)$  pg/ml] ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** The IL-18 is higher in patients with laryngeal cancer. The concentration of IL-18 may be an important biochemistry predictive sign in assistant diagnoses and monitoring the changes in patients with laryngeal cancer.

[Key words] laryngeal neoplasm; interleukin-18; enzyme linked immunosorbent assay

人白细胞介素-18(IL-18)是近年发现的一种免疫细胞因子,可增加人体吞噬细胞的数量及其移动能力,使吞噬细胞能靠近肿瘤细胞并吞噬肿瘤细胞<sup>[1]</sup>。IL-18具有多种生物学功能,广泛参加机体的天然免疫和获得性免疫。笔者检测了喉癌患者血清

IL-18的含量,并与正常成人进行比较,为揭示血清IL-18的变化与喉癌的关系提供可靠的实验依据。

### 1 资料与方法

1.1 检测对象 (1)喉癌组22例,男17例,女5例;年龄51~72岁。(2)正常对照组10名,均为健康者,男7名,女3名;年龄50~72岁。每例喉癌患者均经临床、实验室及组织病理学确诊。

1.2 血清标本 采外周静脉血3ml,2500 r/min

[收稿日期] 2006-02-24

[作者单位] 蚌埠医学院 生物化学与分子生物学教研室 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 石莹(1970-),女,实验师。

也较其它NSAIDs小<sup>[10]</sup>,因此它的临床应用前景可能较大。

### [参 考 文 献]

- [1] Sandler RS, Glnko JC, Murray SC, et al. Aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory agents and risk for colorectal adenomas[J]. *Gastroenterology*, 1998; 114(3): 441-447.
- [2] Zhang Z, Dubois RN. Par-4, a proapoptotic gene, is regulated by NSAIDs in human colon carcinoma cells[J]. *Gastroenterology*, 2000; 118(6): 1012-1017.
- [3] 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 等. 中国1990~1992年胃癌死亡调查分析[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002; 24(1): 4-8.
- [4] Shiff SJ, Qiao L, Tsai LL, et al. Sulindac sulfide, an aspirin-like compound, inhibits proliferation, causes cell cycle quiescence and induces apoptosis in HT-29 colon adenocarcinoma cells[J]. *J Clin Invest*, 1995; 96(1): 491-503.
- [5] 彭黎明, 王曾礼主编. 细胞凋亡的基础与临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000; 167.

- [6] Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, et al. Cyclooxygenase 2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2000; 6(1): 135-138.
- [7] Stolina M, Shama S, Lin Y, et al. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis[J]. *Immunol*, 2000; 164(1): 361-370.
- [8] Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, et al. Effects of NSAIDs on proliferation of gastric cancer cells *in vitro*: Possible implication of cyclooxygenase 2 in cancer development[J]. *J Clin Gastroenterol*, 1998; 27(Suppl 1): S47-S52.
- [9] 翟云芝, 郑荣生. 奥沙利铂联合亚叶酸钙、氟尿嘧啶治疗晚期胃癌[J]. *蚌埠医学院学报*, 2006; 31(3): 323-325.
- [10] Gardie LB, Hanilton SR, Kusch AJ, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis[J]. *N Engl J Med*, 1993; 328(18): 1313-1316.