

视黄酸对胃癌细胞的诱导分化及其相关酶活性的影响

陈玉强 陈正明 吴 乔 苏文金

摘要:目的 研究视黄酸对胃癌细胞的诱导分化及其相关酶活性的影响。方法 10^{-6} mol/L 的全反式视黄酸(ATRA)处理胃癌细胞株 BGG-823 和 MKN-45, 用流式细胞术检测细胞周期的分布, 以酶标仪测定相关分化标志酶的活性, 用 $^3\text{H-TdR}$ 掺入法测定 DNA 合成速度和 MTT 法检测细胞的生长。结果 ATRA 使 BGG-823 细胞出现 G0/G1 期停滞, 分化标志酶 LDH、ALP 和 $\beta\text{-G}$ 的活性下降, 抑制率分别为 22.4%, 32.94% 和 41.35%, 使 DNA 合成速率下降 41.43%, 生长抑制率为 61.03%; 但不能改变 MKN-45 细胞的上述指标。结论 ATRA 能诱导 BGG-823 细胞分化并抑制其恶性生长, 对 MKN-45 细胞则没有这种作用。

关键词: 视黄酸; 胃癌细胞; 诱导分化; 细胞周期; 酶活性

视黄酸是维生素 A 的衍生物, 对于细胞生长和分化具有重要的作用^[1], 已成功地用于诱导早幼粒白血病细胞分化, 临床治疗早幼粒细胞白血病的完全缓解率达 88%~91%^[2]。有报道视黄酸通过诱导细胞分化等途径抑制肿瘤细胞生长, 在此过程中多伴有细胞周期的 G1 期停滞, 并使乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(ALP)、 β -葡萄糖醛酸转移酶($\beta\text{-G}$)和神经氨酸苷酶(NANase)等分化标志酶的活性发生变化^[3,4]。本文研究全反式视黄酸(ATRA)对胃癌细胞株 BGG-823 和 MKN-45 的诱导分化作用及其相关酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养和 ATRA 处理 胃癌细胞株 BGG-823 和 MKN-45(购自上海细胞所细胞库)用含 10% 小牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 RPMI-1640(GIBCO 产品)培养液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的孵育箱中培养。细胞接种 24 小时后, 加入 ATRA(Sigma 产品)连续处理, 终浓度为 10^{-6} mol/L。隔天换液, 4 天传代。

1.2 细胞周期分布的测定 消化、收集细胞, 以 1000 rpm 离心 5 分钟, 弃上清, 用预冷的 PBS 洗涤三次, 将细胞迅速固定在预冷的 75% 乙醇中, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。测定时离心去乙醇, 用 PBS 洗两次, 加 70 μl RNA 酶(1 g/L)于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 30 分钟以消化细胞质, 立即冰浴, 避光加入 0.5 ml 的 50 mg/L 的碘化丙啶(Sigma 产品)染色 30 分钟。用流式细胞仪分析细胞周期分布。

1.3 LDH、ALP 和 $\beta\text{-G}$ 活性的测定 分别参照文献 [5][6][7] 方法进行。

1.4 ^3H 脱氧腺苷($^3\text{H-TdR}$) 掺入实验 消化、收集细胞, 用培养液重悬并计数, 调整细胞浓度为 $10^8/\text{L}$, 吸 100 μl 至 96 孔板(每孔 10^4 个细胞)。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 小时后加 10 μl $^3\text{H-TdR}$ /PBS 溶液(100 uCi/ml), 终浓度为 10 uCi/ml。继续孵育 6 小时。每孔加 0.2% EDTA 消化液 100 μl , 细胞全部脱壁后, 收集到玻璃纤维滤膜上, 于 Beckman 闪烁计数器测定 cpm 值。

1.5 细胞生长测定(MTT 法) 参照文献 [8] 方法进行。

2 结果

2.1 ATRA 对胃癌细胞细胞周期分布的影响

如表 1 所示, 经 ATRA 处理后 BGG-823 的细胞周期分布出现显著变化, G0/G1 期细胞明显增多, S 期细胞则相应减少, G2/M 期细胞也略有减少。而 MKN-45 的细胞周期分布与对照组相比无明显改变。

表 1 ATRA 对胃癌细胞细胞周期分布的影响

细胞株	组别	G0/G1	S	G2/M
BGG-823	对照组	44.6	45.2	10.2
	处理组	78.2	15.0	6.8
MKN-45	对照组	46.6	38.5	14.9
	处理组	48.5	33.5	18.0

** $P < 0.01$, 与对照组比较(下同)

2.2 ATRA 对胃癌细胞 LDH、ALP 和 $\beta\text{-G}$ 活性的影响

如表 2 所示, BGG-823 细胞经 ATRA 处理后 LDH、ALP 和 $\beta\text{-G}$ 活性均明显降低, 抑制率分别为 22.4%、32.94% 和 41.35%; MKN-45 的 LDH、ALP 和 $\beta\text{-G}$ 活性则无明显变化, 抑制率仅为 2.1%、5.34%

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(C96002)

作者单位: 361003 厦门, 中国人民解放军第 174 医院(陈玉强); 厦门大学肿瘤细胞工程国家专业实验室(陈正明、吴乔、苏文金)

和0.88%。另外,对照组MKN-45的ALP活性与对照组 BGC-823比较,相差近10倍,统计学上有显著差异。

表2 ATRA对胃癌细胞LDH、ALP和β-G活性的影响#

细胞株	组别	LDH	ALP	β-G
BGC-823	对照组	0.837±0.064	1.022±0.063	0.212±0.018
	处理组	0.639±0.027**	0.686±0.035**	0.129±0.034**
MKN-45	对照组	0.619±0.045	0.105±0.008	0.226±0.004
	处理组	0.606±0.025	0.099±0.008	0.224±0.006

5次平行实验, n=5

2.3 ATRA对胃癌细胞³H-TdR掺入率的影响

如表3所示, ATRA使BGC823细胞的³H-TdR掺入率显著下降, 抑制率为41.43%; 但不能改变MKN-45细胞的³H-TdR掺入率。

表3 ATRA对胃癌细胞³H-TdR掺入率的影响

细胞株	对照组	处理组	抑制率(%)
BGC823	33665.8±1410.6	19718.4±1998.5	41.43**
MKN-45	59144.3±7014.8	58574.0±3557.1	0.96

2.4 ATRA对胃癌细胞生长的影响

如表4所示, ATRA能够有效抑制BGC-823细胞的恶性生长, 使相对细胞数下降61.03%; 对MKN-45细胞的生长抑制率仅为3.87%, 无统计学意义。表明不同的胃癌细胞株对ATRA的敏感性不同。

表4 ATRA对胃癌细胞生长的影响

细胞株	对照组	处理组	抑制率(%)
BGC823	0.680±0.022	0.265±0.005	61.03**
MKN-45	0.620±0.031	0.596±0.022	3.87

3 讨论

细胞分化的主要标志是合成特异性的功能蛋白, 出现组织或细胞类型的功能性改变, 同时进行该细胞表型的形态结构变化, 所有这些变化基本上都是在细胞周期的G1期完成, 因此有人提出G1期是细胞分化期^[9]。肿瘤细胞去分化的一个重要特征就是G1→S控制点失常, 进入S期的细胞异常增多。实验表明ATRA在诱导白血病细胞株HL-60和人肝癌细胞株SMMG-7721等分化过程中, 都有细胞周期的G1期停滞^[10~12]。因此G1期的细胞停滞可以作为ATRA诱导分化的判断指标。本实验结果表明ATRA能使BGC-823的细胞周期停滞于G0/G1期, 而不能改变MKN-45细胞周期分布。说明ATRA对前者有诱导分化作用, 而对后者没有这种作用。

乳酸脱氢酶和碱性磷酸酶是胃细胞分化标志酶, β-葡萄糖醛酸酶也是一种与细胞分化有关的酶, 它们在正常的细胞中活性不高或是不表达, 但恶性转化后其表达增强。这种变化可作为判断细胞分化程度的一个指标^[3, 13]。我们的实验结果表明用ATRA处理后, 这三种酶的活性在BGC-823细胞中

普遍下降, 与处理前相比均有非常显著差别; 而在MKN-45细胞中酶活性基本不变。表明ATRA对分化标志酶活性的抑制与改变细胞周期的分布呈平行关系。值得注意的是: MKN-45的碱性磷酸酶基础水平较低, 与BGC-823细胞比较相差近10倍, 有显著差别。这是否与ATRA不能诱导MKN-45细胞分化有直接关系, 值得进一步研究。

细胞分化与细胞分裂密切相关。从某种意义上讲, 诱导分化可抑制分裂, 抑制分裂又可以促进分化。本文同时以³H-TdR掺入法和MTT法进一步判定ATRA对细胞分裂增殖的影响, 发现ATRA通过抑制BGC-823细胞的DNA合成, 使细胞增殖速率减慢并诱导其向正常方向分化, 这对胃癌细胞恶性表型的逆转十分重要。ATRA不能诱导MKN-45细胞分化和抑制细胞增殖, 也就不能逆转其恶性表型。

参考文献:

- [1] Gudas LJ, et al. Cellular biology and biochemistry of the retinoids. In "The Retinoids", 2nd ed., 1994, p443-520, Raven Press, New York
- [2] 刘卫, 房殿春. 维甲酸化合物诱导肿瘤细胞分化研究进展. 国外医学内科学分册, 1996, 23: 160~163
- [3] Kim YS, et al. Effects of sodium butyrate, dimethyl sulfoxide and retinoic acid or glycolipids on human renal adenocarcinoma cells. Cancer Res, 1984, 44: 1648~1652
- [4] 孙月霞, 等. 维甲酸对人胃癌细胞表型的逆转作用. 肿瘤, 1994, 14: 85~87
- [5] M. Machlas, et al. The Determination of Lactic Dehydrogenase with a Tetrazolium Salt. Anal. Biochem, 1960, 1: 317~326
- [6] Gracia-Rozas C, et al. Alkaline Phosphatase Activity as a Membrane Marker for Activated B cells. J Immunol, 1982, 129(1): 52~53
- [7] Fichman WH, et al. Human Serum β-Glucuronidase: Its Measurement and Some of Its Properties. Clin Chim Acta, 1967, 15(3): 435~447
- [8] 吴乔, 等. ATRA受体转录水平的改变与癌细胞生长的关系. 厦门大学学报(自然科学版), 1997, 36: 787~794
- [9] 糜漫天, 等. ATRA诱导细胞分化分子机制的研究进展. 国外医学分子生物学分册, 1998, 20: 17~22
- [10] Mehta K, et al. Activation of retinoid receptors RARα and RXRα induces differentiation and apoptosis, respectively, in HL60 cells. Cell Growth Differ, 1996, 7: 179~186
- [11] Shao Z-M, et al. p53 independent G0/G1 arrest and apoptosis induced by a novel retinoid in human breast cancer cells. Oncogene, 1995,

11:493~ 504

[12] 汤钊猷主编. 现代肿瘤学. 上海: 上海医科大学出版社, 1993: 47~ 70

[13] Nowak G, et al. Hypoxia and proliferation are primary responsible for induction of lactate dehydrogenase activity in cultured cells. J Toxicology & Environmental Health, 1996, 49: 439~ 452

Effects of Retinoic Acid on Gastric Cancer Cells' Differentiation and Relevant Enzyme Activity

CHEN Yu-qiang, CHEN Zheng-ming, WU Qiao, et al

The State Lab. for Tumor Cell Engineering of Xiamen University, Xiamen 361005

Abstract: Objective To explore effects of retinoic acid on gastric cancer cells' differentiation and relevant enzyme activity. **Methods** Treated with 10^{-6} mol/L all-trans retinoic acid(ATRA), gastric cancer cells, BGG-823 and MKN-45, were measured by flow cytometry for cell cycle distribution, by microplate reader for enzyme activity, by $^3\text{H-TdR}$ incorporation method for DNA synthetic speed and by MTT method for cell growth rate. **Results** After treated with ATRA, BGG-823 was lead to stay in G0/G1 phase, while LDH, ALP and $\beta\text{-G}$ activity was suppressed, the inhibition rates were 22.40%, 32.94% and 41.35%, respectively. DNA synthetic speed was decreased by 41.43% and growth inhibition rate was 61.03%. Nevertheless, MKN-45 can't be changed as BGG-823. **Conclusion** BGG-823, but not MKN-45, can be induced differentiation and cell growth can be suppressed by ATRA.

Key words: Retinoic acid; Gastric cancer cells; Differentiation; Cell cycle; Enzyme activity

改良 EAP 方案治疗胃中低分化腺癌 22 例

汪令胜 盛蓉 范黎 张燕军

我科于 1994 年~ 1995 年开始应用改良 EAP 方案对细胞分化较差的胃癌全身化疗,其方法是用卡铂代替顺铂,用表阿霉素代替阿霉素,加足叶乙甙组成联合化疗方案。共治疗 22 例胃中低分化腺癌,取得了较好的疗效。现将结果报告如下。

1 一般资料

共收治经病理学证实的胃中低分化腺癌 22 例,男 20 例,女 2 例,年龄 30~ 67 岁,含低分化腺癌 10 例,中分化腺癌 12 例。近一月内未作化疗,卡氏评分 70 分以上,治前血常规、肝肾功能及心电图均正常,预计生存 ≥ 3 个月。其中 9 例按 UICC-TNM 分期为 IV 期(肝转移 5,胸腹腔转移 3,皮下转移 1)评价近期疗效,其余 13 例为术后辅助化疗,作 3 年随访。

2 治疗方法

VP-16 按 $60\text{mg}/\text{m}^2$, 静滴, $d_{4,5,6}$; E_{10} -ADM $30\text{mg}/\text{m}^2$, 静注, $d_{1,7}$; CBP $200\text{mg}/\text{m}^2$, 静滴, $d_{2,8}$ 。21 天为一个周期,至少治两个周期。疗效及毒性评价按 WHO(1981 年)统一标准。

3 治疗结果

9 例 IV 期病人,无 CR, PR 5 例, S 2 例, P 2 例,总有效率 55.6% (5/9); 中位缓解期 6 个月,中位生存期 7 个月。13 例术后辅助化疗病人,经随访,三年生存率为 69.2% (9/13)。限制剂量毒性主要为骨髓抑制。白细胞减少 IV、V 度为 54.5%, III、IV 度为 18.2%, 白细胞最低为 $1.5 \times 10^9/\text{L}$, 降至最低点的中位时间为第 14 天。血色素及血小板 III、IV 度下

降分别为 18.2% 和 9.1%。胃肠反应较轻, III、IV 度恶心呕吐为 18.2%。心电图有 ST-T 段改变显示心肌缺血者 2 例,无其他异常。无转氨酶、肌酐及尿素氮升高。无化疗致死病例。

4 讨论

用 EAP 方案治疗进展期胃癌于 1989 年由 Preusser P 等首先报道,总有效率 64%, CR 占 21%^[1]。但随后报告的疗效下降,并有严重毒性反应,化疗死亡率达 11% 或 13%^[2]。因而限制了该方案的使用。国内报告 EAP 方案治疗晚期胃癌有较好的近期疗效^[3]。本组病人均为恶性程度较高的胃癌,采用改良 EAP 方案全身化疗,取得了较好的疗效,并显著降低了毒性反应,故值得进一步研究应用。

参考文献:

- [1] Preusser P, Wilke H, Achterath W., et al. Phase III study of the combination of etoposide, doxorubicin, and cisplatin in advanced measurable gastric cancer. J Clin Oncol, 1989, 7: 1310~ 1317
- [2] Lerner A, Gonin R, Steele G., et al. Etoposide, doxorubicin, and cisplatin chemotherapy for advanced gastric cancer: Results of a phase III trial. J Clin Oncol, 1992, 10: 536~ 540
- [3] 肖菊香, 钱高松, 薛颖. EAP 方案治疗 21 例晚期胃癌的近期疗效观察. 肿瘤防治研究, 1993, 20(1): 39~ 43

作者单位: 710032. 西安, 第四军医大学西京医院肿瘤中心