

· 论 著 ·

曲格列酮对人胃癌细胞株 BGC-823 增殖和凋亡的影响

王 静¹, 王春晖^{2△}

(1. 成都医学院第一附属医院消化内科, 成都 610500; 2. 四川大学华西医院消化内科, 成都 610041)

摘要:目的 研究曲格列酮对人胃癌细胞株 BGC-823 增殖和凋亡的影响。方法 将不同浓度(0.5、1.0、5.0、15.0、25.0 $\mu\text{mol/L}$)的曲格列酮分别作用于人胃癌细胞株 BGC-823 48 h 后,通过免疫细胞化学测定胃癌细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)表达情况,并通过原位末端标记(TUNEL)法测定其凋亡率。结果 人胃癌细胞株 BGC-823 表达 PCNA 强阳性,经曲格列酮作用 48 h 后,表达水平减弱。随曲格列酮浓度的递增,PCNA 表达逐步递减。同时 BGC-823 凋亡率随药物浓度增加而明显递增。结论 曲格列酮能够抑制人胃癌细胞株 BGC-823 增殖和诱导其凋亡,其效应具有浓度依赖性。

关键词: 胃肿瘤;增殖;凋亡;曲格列酮

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.31.007

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)31-3138-02

Effects of troglitazone on proliferation and apoptosis of BGC-823 cells

Wang Jing¹, Wang Chunhui^{2△}

(1. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610500, China; 2. Department of Gastroenterology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of troglitazone on proliferation and apoptosis in gastric cancer cell line BGC-823. **Methods** BGC-823 cells were treated with different concentrations(0.5, 1.0, 5.0, 15.0 and 25.0 $\mu\text{mol/L}$) of troglitazone for 48 h, then the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) on the cells were detected by immunocytochemistry and the induction of apoptosis were investigated by TUNEL assay. **Results** The expression of PCNA could be observed in BGC-823 and down-regulated by troglitazone at the end of 48 h. The level of PCNA was gradually become weakened on the concentration range from 0.5 $\mu\text{mol/L}$ to 25.0 $\mu\text{mol/L}$. At the same time, the apoptosis indexes of BGC-823 were significantly increased. **Conclusion** Troglitazone can inhibit the proliferation and induce apoptosis of the gastric cancer cell line BGC-823 in a dose dependent manner.

Key words: stomach neoplasms; proliferation; apoptosis; troglitazone

胃癌是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,预后较差,病死率位居中国恶性肿瘤首位。现有的治疗手段疗效不尽人意,因此寻找胃癌新的治疗方法改善患者预后一直是消化病学和肿瘤学界不断探索的课题。近年来,非细胞毒性药物在肿瘤治疗中因其不良反应轻,疗效显著受到广泛关注^[1]。曲格列酮(troglitazone)作为其中之一,研究证实实在多种组织及部位恶性肿瘤的防治中具有一定应用前景。然而,其与胃癌的关系国内鲜有报道。本研究将曲格列酮作用于人胃癌细胞株 BGC-823(简称 8GC-823 细胞),了解其对胃癌细胞增殖和凋亡的影响,为寻求胃癌新的治疗方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料 BGC-823 细胞系人低分化胃腺癌细胞,由四川大学人类疾病相关多肽实验室惠赠。曲格列酮和胰蛋白酶购自 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基购自 Invitrogen 公司;新生牛血清购自成都哈里生物公司;鼠抗人增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体、免疫组织化学染色试剂盒、浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥公司;细胞凋亡检测试剂盒购自 Roche 公司。

1.2 细胞培养 将 BGC-823 细胞置于含有 10% 新生牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,在 CO₂ 孵箱中于 37℃、5% CO₂、饱和湿度的条件下孵育。每 2~3 天传代 1 次。

1.3 接种、培养及干预细胞 取对数生长期细胞,0.25% 胰

蛋白酶消化单层培养细胞,用含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液配成 $8 \times 10^4/\text{mL}$ 的单个细胞悬液,滴加于含有爬片的 24 孔培养板中,使每孔爬片细胞接近 8×10^4 个,将其放入 CO₂ 孵箱中孵育。24 h 后更换培养液使其达到同步化。实验分成 6 组,每组设 3 个复孔。分别加入 5 种不同浓度的曲格列酮,终浓度依次为 0.5、1.0、5.0、15.0、25.0 $\mu\text{mol/L}$ 。其分别作用于 BGC-823 细胞,对照组不加药物,继续培养 48 h。

1.4 从形态学角度观察细胞生长情况 用 Olympus 倒置相差显微镜观察不同浓度曲格列酮干预后的 BGC-823 细胞,对其生长速度、细胞形态、悬浮细胞比例进行比较。

1.5 免疫细胞化学检测 PCNA 表达 药物干预 48 h 后取出细胞爬片,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 3 次,4% 多聚甲醛固定 30 min,免疫细胞化学染色方法参照 SP 免疫组织化学染色说明书。结果判定:PCNA 免疫细胞化学染色阳性为棕黄色颗粒,定位于细胞核。其着色程度采用 Leica 图像采集系统进行半定量分析,以平均光密度值(OD)对结果进行评价,细胞着色越浅,OD 值越低。

1.6 原位末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡 药物干预 48 h 后取出细胞爬片, PBS 清洗 3 次,4% 预冷多聚甲醛固定 60 min,3% H₂O₂ 甲醇溶液于室温下避光孵育 10 min 消除内源性过氧化物酶活性, PBS 清洗 3 次。配置 TUNEL 反应液, Label Solution 和 Enzyme Solution 按 9:1 配成 TUNEL 反应液,每张爬片滴加 15 μL 此反应液,于 37℃ 孵箱中避光孵育 1 h,

△ 通讯作者, Tel:13558843968; E-mail: chwangsc@yahoo.com.cn.

PBS 清洗后滴加 10 μL Converter-POD, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵箱中孵育 30 min, PBS 清洗后滴加约 50 μL 新鲜配制的 DAB 溶液, 室温显色。结果判定: 光镜下, 凋亡细胞的细胞核染色呈棕褐色。凋亡率计算方法: 高倍视野($\times 400$)下, 随机选择 10 个视野, 分别计数 100 个肿瘤细胞内凋亡细胞数目^[2]。

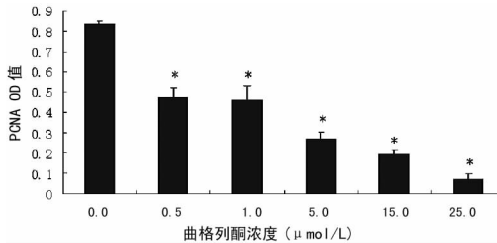
凋亡率 = (凋亡细胞数 / 总细胞数) $\times 100\%$

1.7 统计学处理 实验数据用 SPSS13.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 曲格列酮干预后细胞形态学观察 未经药物干预的 BGC-823 细胞贴壁生长旺盛, 细胞连接紧密, 单个细胞轮廓分明、核仁清楚、胞质丰富。经过曲格列酮处理 48 h 后, 肿瘤细胞附壁疏松、脱落, 细胞间隙增大、胞膜皱缩、核仁模糊、细胞质内空泡样变、细胞碎片增多。随着曲格列酮干预浓度的增加, 这种变化越发显著。

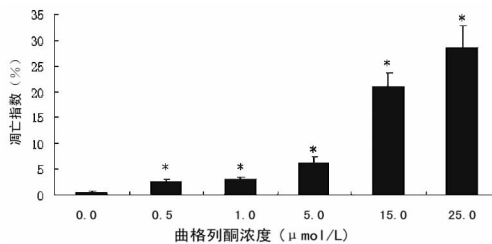
2.2 免疫细胞化学显示 PCNA 表达情况 经免疫细胞化学染色后, 未加药物干预的空白对照组胃癌细胞核弥漫性表达棕黄色颗粒, 着色较深, OD 值较高, 为 0.834 ± 0.018 。而曲格列酮药物干预 48 h 后各药物处理组肿瘤细胞核表达棕黄色颗粒较少, 着色较浅, OD 值较低。且随着药物浓度的递升, 核着色逐渐变浅, OD 值分别为 0.474 ± 0.046 、 0.463 ± 0.066 、 0.268 ± 0.034 、 0.199 ± 0.014 、 0.072 ± 0.027 。不同浓度的曲格列酮组 PCNA 的表达水平均明显低于对照组 ($P < 0.05$), 见图 1。



*: $P < 0.05$, 与 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 比较。

图 1 曲格列酮对 BGC-823 细胞 PCNA 表达的影响

2.3 TUNEL 检测结果 对照组中仅有个别胃癌细胞显示出凋亡迹象, 核被染成棕褐色, 凋亡率为 0.6 ± 0.17 。曲格列酮干预 48 h 后, 视野中的凋亡细胞明显增多。在 0.5 ~ 25.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, 随着曲格列酮浓度增高, 肿瘤细胞凋亡率递增, 分别为 $(2.6 \pm 0.56)\%$ 、 $(3.1 \pm 0.36)\%$ 、 $(6.2 \pm 1.08)\%$ 、 $(21.1 \pm 2.71)\%$ 、 $(28.5 \pm 4.16)\%$, 与 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 2。



*: $P < 0.05$, 与 0.0 $\mu\text{mol/L}$ 比较。

图 2 曲格列酮对 BGC-823 细胞凋亡率的影响 (%)

3 讨 论

曲格列酮系噻唑烷二酮类化合物, 最初作为胰岛素增敏剂

用于糖尿病研究。后来发现它不仅调节糖脂代谢, 改善胰岛素抵抗、控制血糖, 还具有广泛的生物学活性, 包括抗动脉粥样硬化^[3]、抑制炎症反应^[4]、抗肿瘤等效应^[5]。本研究试图通过曲格列酮作用于胃癌细胞, 初步了解它对其生长调节的作用, 为胃癌生物治疗提供一定理论依据。

在胃癌发生、发展过程中, 肿瘤细胞异常增殖, 失去分化成熟能力, 凋亡减少而具有永生性趋向。针对这一特性, 人们从抑制癌细胞增殖和诱导凋亡的途径寻找攻克肿瘤的有效方法。本研究通过细胞形态学观察发现, 曲格列酮能够明显影响胃癌细胞活力, 导致细胞增殖减慢, 细胞形态受损。PCNA 为酸性细胞周期蛋白, 是 DNA 聚合酶 δ 的辅助因子, 作为细胞增殖周期中 DNA 合成的必需蛋白, 在 G_1 期表达逐渐增高, S 期达到高峰, G_2/M 期迅速降低, 可作为细胞周期中 S 期特异标记, 其含量多少反应了细胞增殖能力。由于肿瘤细胞增殖旺盛, PCNA 在许多肿瘤细胞或组织中均有明显表达, 被认为是一种衡量肿瘤增殖能力和恶性程度的可靠指标。本研究采用免疫细胞化学方法检测发现: 胃癌细胞与其它肿瘤细胞一样, PCNA 表达呈强阳性。经曲格列酮作用后, PCNA 表达水平下降, 且与药物浓度呈负相关。说明胃癌细胞经曲格列酮处理后增殖减慢, 生长受抑, 并表现出浓度依从性。因 PCNA 系细胞增殖周期所必需, 也进一步说明曲格列酮对胃癌细胞的抗增殖效应可能与它影响细胞周期进程有关。同时, 本研究使用 TUNEL 即原位细胞凋亡检测技术了解胃癌细胞凋亡情况。研究发现, 对照组细胞爬片偶见极少着色的凋亡细胞, 凋亡率小于 1%, 随着曲格列酮浓度的增高, 凋亡细胞逐渐增多, 凋亡率呈递增趋势, 不同浓度曲格列酮组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明曲格列酮在细胞水平诱导胃癌细胞凋亡, 其促凋亡效应亦具有浓度依从性。

本实验充分说明曲格列酮能够有效抑制 BGC-823 细胞增殖和诱导其凋亡。但它如何发挥抗肿瘤的生物学活性目前尚不完全清楚, 可能与作用靶点有关, 即与过氧化物酶增殖物激活受体 (peroxisome proliferator activated receptors, PPARs) 有关^[6]。PPARs 分为 α 、 β 和 γ 3 种亚型, 是一类由配体激活的核转录因子, 属于 II 型核受体超家族成员, 主要功能是调节基因转录。其中 PPAR γ 生物学功能复杂, 参与多种病理生理过程。Sato 等^[7]报道, 在高、中、低分化胃腺癌及伴有肠化的胃黏膜组织中均发现有 PPAR γ 不同程度表达。因此, 在胃癌细胞中曲格列酮可能作为配体与 PPAR γ 结合发挥抗肿瘤效应。另外, Yamaguchi 等^[8]发现, 作为 PPAR γ 配体的噻唑烷二酮类药物衍生物 MCC-555 在结肠癌细胞中能够以 PPAR γ 非依赖方式上调一种近年来新发现的抑癌基因——NAG-1 (nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene) 表达^[9]。那么, 同样作为 PPAR γ 配体的曲格列酮是否也存在相似的非 PPAR γ 途径还不得而知, 有待于今后的实验证实。

参考文献:

[1] 唐承薇. 非细胞毒性药物治疗胃癌的研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2005, 25(12): 1062-1063.
[2] 刘纯伦, 唐承薇, 周旭春, 等. 罗非昔布与奥曲肽联合应用增强抑制人胃癌细胞株的生长[J]. 基础医学与临床, 2004, 24(3): 277-281.
[3] Wijk JP, Rabelink TJ. Impact of thiazolidinedione therapy on atherogenesis[J]. Curr Atheroscler Rep. 2005, 7(5): 369-374.
(下转第 3142 页)

超过 7 d 开始行高压氧治疗的疗效,提示高压氧治疗介入越早,疗程越长,患者的神经功能和 ADL 的改善越好,与同类结果相似。同时本研究结果也认为 7 d 后行高压氧治疗,只要疗程足够仍可部分改善患者神经功能和患者 ADL 能力。

脑电图对脑缺血、缺氧的变化比较敏感,脑电图异常与脑缺血的程度有关,脑缺血越严重,脑细胞坏死、水肿就越严重,脑电图改变就越明显。有研究表明脑梗死时病灶内血流量减少,脑细胞发生不可逆坏死,而缺血半暗带的脑细胞处于存活而功能丧失状态,高压氧治疗可以改善红细胞的刚性指数、聚积指数、变形能力及血液黏稠度,使已形成而未破裂的动脉斑块更稳定,对已破裂的动脉硬化斑块脱落导致梗死缺血灶的发生和脑组织半暗区水肿带的扩散起到限制和预防作用^[17]。本研究也表明高压氧治疗介入时间越早,疗程越长,脑电图的改善越明显。

本研究表明,脑梗死后及早行高压氧治疗可以有效改善患者脑血管缺血状态,并提高患者神经功能、ADL;高压氧治疗疗程越长,神经功能、ADL 及脑缺血状态的改善就越明显。本结果提示在脑梗死发生后越早行高压氧治疗,疗效越好,如能在发病后 12 h 内行高压氧治疗,疗效最佳,7 d 后行高压氧治疗仍有临床效果;如果不能及时行高压氧治疗,延长足够疗程亦有效。

参考文献:

[1] 全国第四次脑血管病学术会议. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志,1996,29(6):379.
[2] Mikulik R, Ribo M, Hill MD, et al. Accuracy of serial national institutes of health stroke scale scores to identify artery status in acute ischemic stroke[J]. Circulation, 2007,115(20):2660-2665.
[3] 冯应琨. 临床脑电图学[M]. 北京:人民卫生出版社,1998:60.
[4] Ingvar HD, Lassen NA. Treatment of focal cerebral ischemia with hyperbaric oxygen[J]. Acta Neurol Scand,1965,41:92-95.
[5] Sunami K, Takeda Y, Hashimoto M, et al. Hyperbaric oxygen reduces infarct volume in rats by increasing oxygen supply to the ischemic periphery[J]. Crit Care Med, 2000,28(8):2831-2836.

[6] Nighoghossian N, Trouillas P, Adeleine P, et al. Hyperbaric oxygen in the treatment of acute ischemic stroke. A double-blind pilot study[J]. Stroke, 1995,26(8):1369-1372.
[7] Singhal AB. A review of oxygen therapy in ischemic stroke[J]. Neurol Res, 2007,29(2):173-183.
[8] Krakovsky M, Rogatsky G, Zarchine N, et al. Effect of hyperbaric oxygen therapy on survival after global cerebral ischemia in rats[J]. Surg Neurol, 1998,49(4):412-416.
[9] 周永炜, 俞丽华. 高压氧对脑血管病的治疗进展[J]. 国外医学脑血管病分册, 1995,3(2):90-92.
[10] Lou M, Eschenfelder CC, Herdegen T, et al. Therapeutic window for use of hyperbaric oxygenation in focal transient ischemia in rats[J]. Stroke, 2004,35(2):578-583.
[11] Rusyniak DE, Kirk MA, May JD, et al. Hyperbaric oxygen therapy in acute ischemic stroke[J]. Stroke, 2003,34(2):571-574.
[12] Henninger N, Kuppers TL, Sicard KM, et al. Neuroprotective effect of hyperbaric oxygen therapy monitored by MR-imaging after embolic stroke in rats[J]. Exp Neurol, 2006,201(2):316-323.
[13] Hirata T, Cui YJ, Funakoshi T, et al. The temporal profile of genomic responses and protein synthesis in ischemic tolerance of the rat brain induced by repeated hyperbaric oxygen[J]. Brain Res, 2007,1130(1):214-222.
[14] 冯爱琼, 曾少霞, 覃丽红. 高压氧治疗介入时间对急性脑梗死疗效的影响[J]. 中国基层医药, 2006,13(2):215-216.
[15] 唐月学, 颜永忠, 石婉丽, 等. 高压氧治疗脑梗死的时机选择[J]. 中国康复, 2007,22(3):161-162.
[16] 王庆红, 杨于嘉, 湛崇峰, 等. 增加高压氧疗程对治疗时间窗延迟的新生大鼠缺血缺血性脑损伤的保护作用[J]. 中国当代儿科杂志, 2009,11(6):464-470.
[17] 郭志强. 高压氧疗法对急性脑梗死患者运动功能及血液流变学的影响[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2008,11(11):68-69.

(收稿日期:2011-06-22 修回日期:2011-04-13)

(上接第 3139 页)

[4] Sung BY, Park S, Yu BP, et al. Amelioration of age-related inflammation and oxidative stress by PPAR γ activator; suppression of NF- κ B by 2, 4-thiazolidinedione[J]. Exp Geronto, 2006,41(6):590-599.
[5] Weng JR, Chen CY, Pinzone JJ, et al. Beyond peroxisome proliferators-activated receptor gamma signaling: the multi-facets of the antitumor effect of thiazolidinediones[J]. Endocr Relat Cancer, 2006,13(2):401-413.
[6] Lemann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, et al. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ)[J]. J Biol Chem, 1995,270(22):12953-12956.
[7] Sato H, Ishihara S, Kawashima K, et al. Expression of

peroxisome proliferators-activated receptor(PPAR) gamma in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR gamma agonists[J]. Br J Cancer, 2000,83(10):1394-1400.
[8] Yamaguchi K, Lee SH, Eling TE et al. A novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand, MCC-555, induces apoptosis via posttranscriptional regulation of NAG-1 in colorectal cancer cells[J]. Mol Cancer, 2006,5(5):1352-1361.
[9] Baek SJ, Kim KS, Nixon JB, et al. Cyclooxygenase inhibitors regulate the expression of a TGF-beta superfamily member that has proapoptotic and antitumorigenic activities[J]. Mol Pharmacol, 2001,59(4):901-908.

(收稿日期:2011-06-09 修回日期:2011-08-12)