

抑制因子减少,机体的免疫状况得以改善,患者免疫功能有所恢复。术后 10 d 时,完全性切除和不完全性切除的 CD3⁺、CD4⁺、CD4⁺/CD8⁺ 和 NK 细胞显著高于剖胸探查组,而 CD8⁺ 则显著低于后者。说明通过手术切除,减少或消除肿瘤对机体的免疫的抑制作用。完全性切除组和不完全性切除组之间 CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺、NK 之间没有显著性差异,说明无论是完全性肿瘤切除还是不完全性肿瘤切除都可以通过减少肿瘤负荷提高患者的细胞免疫功能。手术的目标是要尽可能的完全性肿瘤切除,但不完全性切除也能够提高患者免疫功能,优于不切除,也为以后的放疗或化疗取得更好的疗效创造较好的条件。

参考文献

1 王亚娟,王爱芬. 肺癌患者外周血 T 淋巴细胞亚群检测的临床研

究[J]. 肿瘤防治杂志,2004,11(7):726-727.
2 姜维洁,董静懿. 肺癌患者血管内皮生长因子和 T 细胞亚群表达的变化[J]. 标记免疫分析与临床,2006,13(4):201-202.
3 段新民,刘 琨. 肺癌患者红细胞免疫功能与外周血 T 淋巴系表亚群的变化及其相关因素的研究[J]. 武警医学,2000,11(9):518-523.
4 Sharma S, Stolina M, Luo J, et al. Secondary lymphoid tissue chemokine mediates T cell-dependent antitumor responses in vivo [J]. J Immunol, 2000,164(9):4558-4563.
5 Kennedy RC, Shearer MH, Watts AM, et al. CD4⁺ T lymphocytes play a critical role in antibody production and tumor immunity against simian virus 40 large tumor antigen [J]. Cancer Res, 2003,63(5):1040-1045.
6 万会平,曾杏生,喻建华,等. 肺癌患者红细胞免疫功能、T 细胞亚群和 B 细胞的检测及临床意义[J]. 中国肺癌杂志,2001,4(5):351-354.
[收稿日期 2009-03-29][本文编辑 谭 毅 黄晓红]

论 著

钒酸钠抑制人胃癌 SGC7901 细胞增殖的作用机理

黄丽华, 吕 军, 潘小平, 周立社, 闫少春, 邵 国, 付玉华

作者单位: 014010 内蒙古,包头医学院基础医学部(黄丽华,吕 军,周立社,闫少春,邵 国); 包头医学院第二附属医院(潘小平); 包头医学院生物医学研究中心(付玉华)
作者简介: 黄丽华(1976-),女,硕士研究生,讲师,研究方向:神经分子生物学。E-mail: Huanglihua858@163.com
通讯作者: 吕 军(1969-),男,硕士研究生导师,副教授,研究方向:细胞信号传导与肿瘤分子生物学。E-mail: LVJun929@163.com

[摘要] 目的 通过观察钒酸钠对人胃癌 SGC7901 细胞周期蛋白 cyclinD1 表达的影响,探讨其对胃癌 SGC7901 细胞增殖抑制的作用机理。方法 应用 MTT 法测定钒酸钠对人胃癌 SGC7901 细胞的生长抑制作用;用 Western-blot 法检测钒酸钠对人胃癌 SGC7901 细胞周期蛋白 cyclinD1 表达水平的变化。结果 一定浓度的钒酸钠使人胃癌 SGC7901 细胞增殖周期密切相关的 cyclinD1 蛋白表达降低。结论 一定浓度的钒酸钠能明显抑制人胃癌 SGC7901 细胞的生长,钒酸钠的抗肿瘤机制可能与 cyclinD1 蛋白表达降低有关。

[关键词] 钒酸钠; SGC7901; cyclinD1
[中图分类号] R 329.25 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2010)04-0315-04
doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.04.06

Mechanism of inhibiting proliferation of human gastric cancer cell line SGC7901 by sodium vanadate
HUANG Li-hua, LV Jun, PAN Xiao-ping, et al. Department of Basic Medicine, Baotou Medical College, Inner Mongolia 014010, China

[Abstract] Objective To investigate the effect of sodium vanadate on cyclinD1 expression in human gastric cancer cell line SGC7901 and explore its potential mechanisms of inhibiting proliferation. Methods Cell growth inhibition in vitro was evaluated with MTT assay in human gastric cancer cell line SGC7901. Western blot analysis was applied to determine modification of cyclinD1 proteins of human gastric cancer cell line SGC7901. Results The expression of cyclinD1 was evidently decreased by sodium vanadate of certain concentration. Conclusion Sodium van-

sodium vanadate inhibits the proliferation of human gastric cancer cell line SGC7901 significantly, the antitumor mechanism of sodium vanadate may be related to down-regulation of CyclinD1 expression.

[Key words] Sodium vanadate; SGC7901; CyclinD1

目前,抗肿瘤药物的研究从传统的细胞毒药物向针对多环节作用机制的新型药物发展,其中以细胞信号转导分子为靶点的研究是主要发展方向之一^[1]。广泛存在于自然界中的钒是化学元素周期表中VB族的过渡元素,参与人体许多不同的生理过程,如细胞的生长和分化、糖类及脂类的代谢等^[2]。随着对钒研究的深入,酪氨酸去磷酸化酶抑制剂钒化钠的抗癌作用引起了人们的注意。Ray等^[3]研究显示钒化钠可以促进乳腺癌MCF7细胞凋亡抑制其增殖,显示其作为有效的化疗制剂的潜能。胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤,严重危害人类健康,占恶性肿瘤病死率第二位。但钒化钠与胃癌细胞方面的研究尚未见报道。本研究通过观察体外实验钒化钠对胃癌细胞系SGC7901的作用,了解钒化钠是否对胃癌细胞系SGC7901具有增殖或抑制,进一步揭示其抗肿瘤作用的分子机制,扩大抗肿瘤谱,并为钒化钠发展成新型的抗肿瘤药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药品及抗体 钒化钠购买于北京化学试剂公司,纯度为分析纯。MTT和RPMI1640培养基购自GIBCO公司。胎牛血清购自杭州四季青生物材料有限公司。二甲基亚砜、十二烷基硫酸钠、丙烯酰胺等化学试剂购自SIGMA公司。BCA蛋白分析试剂盒、ECL反应试剂盒购自PIERCE公司。抗actin兔多克隆抗体、抗cyclinD1兔多克隆抗体、辣根酶标记的山羊抗兔IgG均购自Santa Cruze公司。

1.1.2 细胞株 人胃癌SGC7901细胞株购自协和医科大学基础医学研究所细胞中心。人胃癌细胞系SGC7901在37℃、饱和湿度及5% CO₂条件下,用培养瓶在含10%胎牛血清、 1×10^5 U·L⁻¹青链霉素的RPMI1640培养液中传代培养。

1.2 方法

1.2.1 生长抑制实验(MTT法) 常规培养人胃癌细胞系SGC7901,将对数生长期的细胞调整细胞浓度为 5×10^7 L⁻¹,待培养24 h细胞贴壁生长后分为对照组和实验组,对照组加入RPMI-1640培养液,实验组加入用无血清培养基配制的终浓度分别为0.1、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0和200.0 μmol·L⁻¹钒化钠试剂,每一浓度设6个复孔。分别于加药

后培养4、12、24、48 h检测各组细胞增殖抑制的差异。

1.2.2 免疫蛋白印迹实验(Western Blot) 将人胃癌细胞系SGC7901悬液接种于六孔培养皿中,培养至贴壁面积达80%~90%时弃去培养液,换上无血清培养基培养12 h,按实验分组分别加入不同浓度的钒化钠,分别为0.1、1.0、5.0、10.0、50.0、100.0、200.0 μmol·L⁻¹,对照组不加药物。作用一定时间后,用RIPA+PMSF细胞裂解液在冰上裂解细胞,低温离心15 min提取蛋白,BCA法蛋白定量。加上样缓冲液,100℃变性5 min。每孔50 μg蛋白上样,10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。将蛋白电转到硝酸纤维素膜上,用5%脱脂奶粉封闭1 h,加一抗稀释液(1:1 000稀释)4℃过夜,TTBS洗膜,结合辣根过氧化物酶标记二抗(1:5 000稀释),TTBS洗膜,用ECL化学发光试剂在X线胶片上曝光、显影、定影。以actin为内参照,应用凝胶成像分析系统进行条带扫描分析结果,结果以蛋白条带的面积积分值与actin的面积积分比值表示。实验重复3次。

1.3 统计学方法 应用SPSS11.0软件包对数据进行统计学处理,统计数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,不同时间段的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 钒化钠对人胃癌细胞系SGC7901的增殖抑制作用 MTT法检测钒化钠在0.1~200 μmol·L⁻¹浓度范围内对人胃癌细胞系SGC7901细胞增殖的影响。结果显示:用钒化钠处理人胃癌细胞系SGC7901细胞4 h,只有100 μmol·L⁻¹和200 μmol·L⁻¹浓度组对人胃癌细胞系SGC7901细胞有抑制作用($P < 0.05$);用钒化钠处理人胃癌细胞系SGC7901细胞12~48 h,在0.1~10 μmol·L⁻¹浓度范围内对人胃癌细胞系SGC7901细胞无抑制作用,药物作用组与对照组之间的OD值差异无统计学意义($P > 0.05$);但在50~200 μmol·L⁻¹浓度范围内对人胃癌细胞系SGC7901细胞的抑制作用呈剂量依赖效应关系和时间依赖效应关系,药物作用组与对照组之间的OD值相比差异有统计学意义($P < 0.05$);随药物作用时间的延长,药物浓度越高,其抑制作用越强(见图1)。

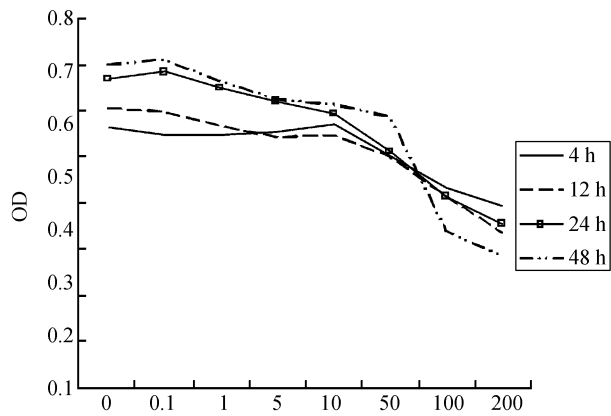


图 1 不同浓度钌化钠在不同时间内对胃癌细胞系 SGC7901 细胞增殖抑制的影响

2.2 钌化钠对 cyclin D1 蛋白表达的影响 为进一步探讨钌化钠对人胃癌细胞系 SGC7901 细胞的增殖抑制作用的机制,用 Western-Blot 的方法,检测了与细胞周期相关蛋白 cyclinD1 的表达情况。实验结果显示,用钌化钠处理人胃癌细胞系 SGC7901 细胞 4 h,只有 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组人胃癌细胞系 SGC7901 细胞 cyclinD1 的表达减少 ($P < 0.05$);用钌化钠处理人胃癌细胞系 SGC7901 细胞 12、24、48 h 后,在 100.0 ~ 200.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度范围内随着药物浓度的增加,药物处理时间的延长,cyclinD1 的表达呈现逐渐下降的趋势 ($P < 0.05$) (见表 1,图 2)。

表 1 钌化钠作用人胃癌细胞系 SGC7901 不同时间后对 cyclinD1 蛋白表达的影响

含量分组 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	cyclinD1/actin			
	4 h	12 h	24 h	48 h
0	0.453 ± 0.058	0.486 ± 0.033	0.497 ± 0.036	0.542 ± 0.046
0.1	0.471 ± 0.054	0.493 ± 0.053	0.533 ± 0.046	0.536 ± 0.042
1.0	0.457 ± 0.049	0.478 ± 0.045	0.517 ± 0.041	0.533 ± 0.076
5.0	0.479 ± 0.035	0.467 ± 0.057	0.513 ± 0.035	0.508 ± 0.052
10.0	0.469 ± 0.076	0.461 ± 0.063	0.489 ± 0.082	0.521 ± 0.063
50.0	0.441 ± 0.024	0.455 ± 0.039	0.457 ± 0.073	0.483 ± 0.074
100.0	0.435 ± 0.053	0.345 ± 0.046 *	0.351 ± 0.036 *	0.314 ± 0.053 *
200.0	0.331 ± 0.068 Δ	0.305 ± 0.047 *	0.298 ± 0.077 *	0.268 ± 0.084 *

注: $n = 3$,与对照组比较 * $P < 0.01$, $\Delta P < 0.05$

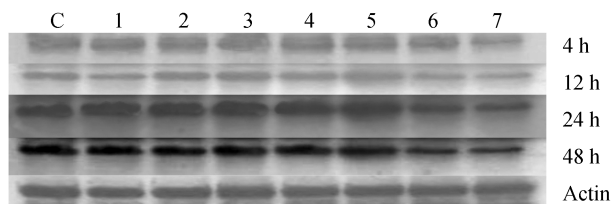


图 2 Western blot 检测不同浓度钌化钠作用 4、12、24、48 h 对 SGC7901 细胞 cyclinD1 蛋白表达的影响

(C = 对照组, 1 = 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 2 = 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3 = 5.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 4 = 10.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 5 = 50.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 6 = 100.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 7 = 200.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

3 讨论

3.1 钌化钠以其无致命毒副作用而用于糖尿病病人的干预治疗^[4],表明钌化钠已经是应用于临床治疗药物。Bishayee 等^[5]报道了一系列钌制剂对动物模型系统的抗肿瘤活性。生长细胞对钌化钠的毒性作用更敏感,通过皮下注射,钌化钠有效地抑制了小鼠肿瘤生长,抑制癌细胞生长增殖^[6]。本研究利用 MTT 法和 Western-Blot 等研究方法,分析钌化钠对

肿瘤细胞生长的抑制作用及其分子机理。为进一步将钌化钠研发成一种新的化疗药物提供理论基础。

3.2 无论是正常细胞还是肿瘤细胞的增殖都依赖于细胞周期的正常运行。细胞周期中实际上是指以“细胞周期蛋白/细胞周期蛋白依赖性激酶”为中心的细胞周期调控网络^[7]。细胞周期蛋白与细胞周期蛋白依赖性激酶构成全酶。其中 CDKs 是全酶的催化亚单位,而细胞周期蛋白是全酶的调节亚单位。CDKs 在整个细胞周期中都处于一种恒定超量表达的状态,且单独并不表现出活性作用,CDKs 活性的发挥及其亚细胞水平的定位和作用底物及细胞周期时相的特异性均有赖于细胞周期蛋白。其中,细胞周期蛋白 D1 作用在 G 期,具有细胞外增殖分裂信号传感器的作用,又参与 G0/G1 期转换调控^[7]。有研究显示,58% 的胃癌组织中 cyclinD1 的表达量显著高于相应的正常胃黏膜组织,并且与多项临床病理指标和患者的 5 年生存率相关,胃癌组织中 cyclinD1 的高表达有可能提示恶性程度较高和预后不

良^[8]。本研究结果表明高实验浓度钒化钠对人胃癌细胞系 SGC7901 细胞有明显的生长抑制作用,随药物作用时间的延长,药物浓度越高,其抑制作用越强。进一步观察了钒化钠对人胃癌细胞系 SGC7901 细胞 cyclinD1 表达的影响。研究发现在一定的作用时间范围内,低浓度钒化钠组对 cyclinD1 蛋白表达无影响,而高浓度钒化钠可下调人胃癌细胞系 SGC7901 细胞中 cyclinD1 蛋白的表达,这一变化趋势与 MTT 的结果基本一致。提示钒化钠可能通过抑制 cyclinD1 蛋白的表达进而发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用,这一结果为钒化钠防治胃癌的临床应用奠定理论基础。但其具体机制仍需进一步研究。作为一种分布广、造价低廉的微量元素,钒在胃癌防治领域有良好的临床应用前景。

参考文献

1 秦 葵,任雷鸣.三磷酸腺苷对国人食管癌 Eca-109 和肝癌 SMM C-7721 细胞增殖的影响[J].中国药理学通报,2006,22(1):31-34.
2 Stern A, Yin X, Tsang SS, et al. Vanadium as a modulator of cellular

regulatory cascades and oncogene expression[J]. Biochem Cell Biol, 1993, 71(3-4): 103-112.
3 Ray RS, Rana B, Swami B, et al. Vanadium mediated apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 cell line[J]. Chem Biological Interact 2006, 163(3):239-247.
4 Goldfine AB, Simonson DC, Folli F, et al. In vivo and in vitro studies of vanadate in human and rodent diabetes mellitus[J]. Mol Cell biochem, 1995, 153(1-2):217-231.
5 Bishayee A, Chatterjee M. Inhibitory effect of vanadium on rat liver carcinogenesis initiated with diethylnitrosamine and promoted by Phenobarbital[J]. Br Cancer, 1995, 71(6):1214-1220.
6 Cruz TF, Morgan A, Min W. In vitro and in vivo antineoplastic effects of orthovanadate[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1995, 153(1-2):161-166.
7 Dragnev KH, Freemantle SJ, Spiella MJ, et al. Cyclin proteolysis as a retinoid cancer prevention mechanism[J]. Ann NY Acad Sci, 2001, 952:13-22.
8 姜可伟,王 杉,叶颖江,等.胃癌组织中细胞周期蛋白 D1 和细胞周期蛋白质依赖激酶 6 的表达与预后的关系[J].中华普通外科杂志,2005,20(12):800-802.

[收稿日期 2009-11-09][本文编辑 谭 毅 刘京虹]

论 著

老年人慢性缺血性肾病患者血清 MMP-9 及 TIMP-1 的检测及意义

赵海霞, 吴玉梅, 孙 辉, 周清华

作者单位: 250062 济南,山东省医学科学院(赵海霞); 272111 济宁,山东省医学科学院附属济宁市第一人民医院(吴玉梅,孙 辉,周清华)

作者简介: 赵海霞(1980-),女,在读研究生,研究方向:慢性缺血性肾病。E-mail:nephrae@163.com

通讯作者: 吴玉梅(1967-),女,硕士,副教授,硕士研究生导师,研究方向:急慢性肾功能不全的防治及血液净化技术。E-mail:wumeimei2003@163.com

[摘要] 目的 通过观察老年人慢性缺血性肾病患者血清基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)及其抑制物金属蛋白酶组织抑制因子-1(tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1, TIMP-1)水平的变化,探讨其在慢性缺血性肾病发病机理中的可能作用及意义。方法 用双抗体夹心 ELISA 法检测 30 例老年慢性缺血性肾病患者及 22 例对照组血清中 MMP-9 及 TIMP-1 的水平,并分析两者与血清总胆固醇及肌酐的相关性。结果 慢性缺血性肾病患者血清 MMP-9 和 TIMP-1 的水平分别为 (346.9 ± 14.3) ng/ml、(112.9 ± 10.5) ng/ml,显著高于对照组血清两者的水平(91.6 ± 7.5) ng/ml、(57.4 ± 3.9) ng/ml,结果差异有统计学意义(P < 0.01);MMP-9、TIMP-1 水平与总胆固醇水平呈明显正相关(r = 0.7231, r = 0.6415, P 均 < 0.05),与血清肌酐无相关性。结论 MMP-9 和 TIMP-1 参与了慢性缺血性肾病的发病机理,可能是肾缺血损伤的一个独立危险因素。

[关键词] 基质金属蛋白酶-9; 金属蛋白酶组织抑制因子-1; 慢性缺血性肾病