

柠檬酸钠与三氧化二砷联合应用对胃癌 SGC-7901 细胞的作用

郑步平, 张晓东, 陆云飞

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:0832118)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院胃肠腺体外科

作者简介: 郑步平(1983-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 抗能量药物抑制肿瘤的研究。E-mail: zhengbuping8@163.com

通讯作者: 陆云飞(1953-), 男, 医学硕士, 博士生导师, 研究方向: 乳腺癌、肝癌、胃癌的基础与临床研究。E-mail: luyunfei5351360@yahoo.com.cn

[摘要] **目的** 探讨柠檬酸钠(sodium citrate, CT)与三氧化二砷(As_2O_3 , AS)联合应用对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及作用机制。**方法** 用 sodium citrate(终浓度为 5 mmol/L, CT5)和 As_2O_3 (终浓度依次为 5 μ mol/L, AS5)处理体外传代培养的胃癌 SGC-7901 细胞株。应用 DAPI 细胞核染色和流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期的变化; RT-PCR 法观察抗凋亡相关基因 bcl-2 表达的变化。**结果** sodium citrate 与 As_2O_3 联合应用相对于单用 sodium citrate 或 As_2O_3 可显著提高诱导胃癌细胞凋亡率($P < 0.05$); 与空白组相比, 用药后 G_0/G_1 期细胞比例下降, G_2/M 期细胞比例上升, 细胞周期阻滞于 G_2/M 期, 抗凋亡基因 bcl-2 表达明显下降。**结论** sodium citrate 与 As_2O_3 联合应用具有协同抗胃癌细胞的作用, 其机制可能与细胞周期阻滞、增强诱导胃癌细胞凋亡以及调控凋亡相关基因的表达有关。

[关键词] 胃癌; 柠檬酸钠; 三氧化二砷; 凋亡; bcl-2 基因

[中图分类号] R 573 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2012)03-0187-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.03.01

Anti-tumor effect of sodium citrate in combination with arsenic trioxide on gastric cancer cell line SGC-7901 in vitro ZHENG Bu-ping, ZHANG Xiao-dong, LU Yun-fei. Department of Gastrointestinal and Glands Surgery, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To study the anti-tumor effects of sodium citrate combined with arsenic trioxide on human gastric cancer cell line SGC-7901 in vitro and to explore its possible mechanism. **Methods** The passaged and cultured gastric cancer cell line SGC-7901 in vitro were treated with sodium citrate (final concentration was 5 mmol/L, CT5) and (or) As_2O_3 (final concentration were 5 μ mol/L, AS5). Cell proliferation was observed by fluorescent inverse microscopy; Cell apoptosis was explored by DAPI fluorescent stain, then the cell apoptosis rate and phases of cell cycle were determined by flow cytometry. The expression of apoptosis-related genes of bcl-2 was observed by RT-PCR. **Results** Sodium citrate combined with As_2O_3 had a stronger inhibition effect on human gastric cancer cell line SGC-7901 than sodium citrate or As_2O_3 ($P < 0.05$). Compared with blank group, the cell cycle distribution was altered and the ration of G_0/G_1 phase cell decreased and G_2/M phase increased ($P < 0.05$). After intervened by sodium citrate combined with As_2O_3 , the expression of bcl-2 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Sodium citrate combined with As_2O_3 has the synergistic effects on gastric cancer cell line SGC-7901, and the mechanisms may be related to cell cycle blocking and apoptosis-inducing effects through regulating the expression of the related genes.

[Key words] Gastric cancer; Sodium citrate; Arsenic trioxide; Apoptosis; bcl-2

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一,发病率居各类肿瘤的前位,每年约有 17 万人死于胃癌,几乎接近全部恶性肿瘤死亡人数的 1/4。随着诊疗技术、手术方法和综合治疗措施的发展,胃癌的治愈率有所提高,但术后 5 年生存率仍徘徊于 25% 左右^[1]。

柠檬酸钠(sodium citrate, CT)是糖酵解限速酶 6-磷酸果糖激酶-1(PFK-1)的直接抑制剂,同时亦可间接抑制糖酵解限速酶己糖激酶(HK)。但柠檬酸钠对肿瘤细胞的作用研究国内外报道却较少。本实验组先前的实验研究表明柠檬酸钠具有明显的抗癌作

用^[2,3]。三氧化二砷(As_2O_3)是中药砒霜的主要成分,自上世纪70年代被成功应用于治疗急性早幼粒细胞白血病后,已逐渐成为国内外研究的热点,现已证实 As_2O_3 能够诱导肿瘤细胞凋亡^[4],抑制肿瘤细胞增殖。我们选择将 sodium citrate 与 As_2O_3 联合应用于人胃癌细胞株 SGC-7901,以进一步观察两者联合应用是否具有协同作用,并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人胃癌细胞株 SGC-7901 购于湘雅医学院细胞库,倍增周期 24 h。

1.1.2 试剂 RPMI-1640 (Hyclone 公司);新生胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司);胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);柠檬酸钠(sodium citrate, CT)、三氧化二砷(As_2O_3 , AS)购于 Sigma Aldrich 公司;细胞凋亡 DAPI 染色试剂盒、Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒购于南京凯基科技发展有限公司;RNA 总提取试剂盒(离心柱型)购于天根生化科技(北京)有限公司;cDNA 逆转录试剂盒由立陶宛 MBI 公司提供;bcl-2、GAPDH 基因引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司(Invitrogen)设计、合成。

1.1.3 仪器 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司 CKX41);流式细胞仪(美国 BD 公司 FASCalibur);PCR 仪为美国 Thermo 公司产品;凝胶成像系统为美国 Bio-Rad 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养和分组加药 人胃癌细胞株 SGC-7901 复苏后,在 37 °C、5% CO_2 条件下培养于含 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 中,传代至指数生长期进行实验。每株细胞各取 12 个培养瓶(75 cm^2),每瓶加入 $(0.5 \sim 1.0) \times 10^6$ 个细胞,24 h 后观察细胞贴壁生长良好后,将 12 个培养瓶分为 4 组,即空白对照组、CT 5 mmol/L 组、AS 5 μ mol/L 组、CT 5 mmol/L 合用 AS 5 μ mol/L 组,每组 3 瓶。用细胞培养液配制含 CT 5 mmol/L、AS 5 μ mol/L 和 CT 5 mmol/L 合用 AS 5 μ mol/L 的培养液。每组分别加入相应的含药物培养液,对照组仅加入培养液。培养 24 h、48 h 后每组各取 3 瓶细胞用于实验。

1.2.2 细胞凋亡 DAPI 染色 将分别收获的细胞以细胞涂片离心机机制备细胞涂片,用无水乙醇固定晾干,滴适量 DAPI 染液(1 μ g/ml)染色,避光 15 min,去离子水漂洗,晾干,封片后置于 Zeiss Axiovert 200

倒置相差荧光显微镜(德国卡尔·蔡司公司)下进行观察拍照(200 \times)。

1.2.3 流式细胞仪凋亡检测(Annexin V-FITC/PI staining) 各组培养 24 h、48 h 及用无 EDTA 的 0.25% 胰酶消化细胞后,PBS 液清洗 2 遍,离心弃上清,细胞样本均分 3 份。加入细胞凋亡检测试剂盒中的 binding buffer 500 μ l 缓冲液重悬细胞,5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 标记细胞置于黑暗处 15 min 孵化后,使用 BD 流式细胞仪行凋亡检测用分析软件行 cell Quest 样本分析,样本最少细胞数 1×10^4 个。每株细胞测试前分别进行空白、Annexin V-FITC 及 PI 三组阴性对照测试。以上操作重复 3 遍。

1.2.4 流式细胞仪细胞周期检测 各组细胞在培养 24 h、48 h 及用无 EDTA 的胰酶消化细胞后(1 000 rpm,5 min)收集细胞,具体操作按试剂盒说明书。加入 100 μ l RNaseA,37 °C 水浴 30 min;再加入 400 μ l 碘化丙啶(PI)染色混匀,4 °C 避光 30 min。样本在美国 BD 流式仪上检测,每份样本分析 2×10^4 个细胞事件,通过 ModFit 软件分析数据。以上操作重复 3 遍。

1.2.5 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)检测 bcl-2 上游引物 5'-CCTCGCTGCACAAATACTCC-3';下游引物 5'-GAGAATGTTGGCTCTTGTT-3',扩增条件当 94 °C 5 min 预变性,94 °C 30 s,58 °C 45 s,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 7 min 延伸。扩增片段为 180 bp。选择 GAPDH 作为内参照质控指标,上游引物 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3';下游引物 5'-TCACACCCATGACGAACAT-3',扩增条件与 bcl-2 基因相同。扩增片段为 401 bp。PCR 扩增产物采用 2% 琼脂糖凝胶电泳,核酸燃料 II 染色,以 DNA-600Marker 作为对照,在紫外光下显影,扫描成像,记录结果。

1.3 统计学方法 应用统计学软件 SPSS17.0 进行数据统计学分析,计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用重复测量方差分析及单变量方差分析,两两比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

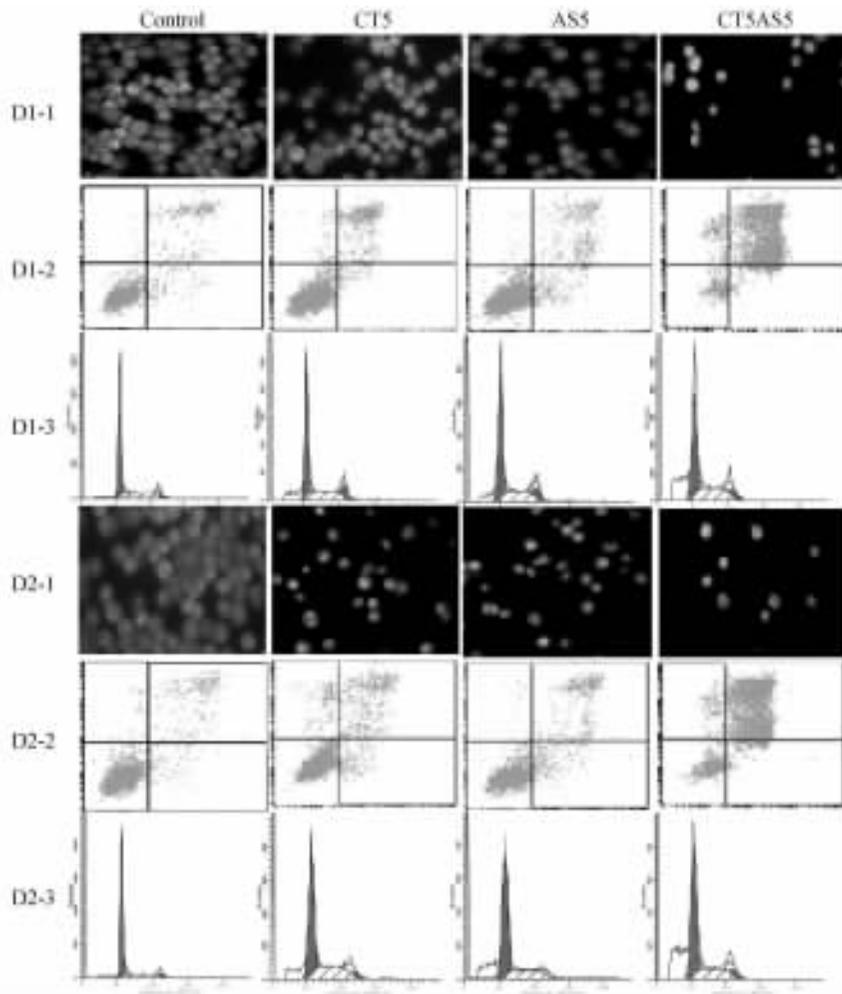
2 结果

2.1 细胞核形态学改变 通过荧光显微镜观察 CT 5mmol/L、AS 5 μ mol/L、CT 5mmol/L 合用 AS 5 μ mol/L 组 24 h 后,表现为细胞核蓝染,体积缩小,染色质浓聚、深染,核碎裂成大小不等的碎片,可见多个凋亡小体;48 h 后,核碎片增多,凋亡小体数量增加。对

对照组只见零星凋亡。结果见图 1 中 D1-1、D2-1。

2.2 流式细胞仪凋亡和周期检测 两株细胞分别经 CT 5 mmol/L、AS 5 μmol/L 和 CT 5 mmol/L 合用 AS 5 μmol/L 处理 24 h、48 h 后,经流式细胞仪检测,细胞明显被阻滞于 G₂/M 期,G₂/M 期细胞上升;G₀/G₁ 期显著减少,细胞分裂受到抑制,凋亡率增加。对照组未见到明显的亚二倍体峰,各实验组均检测到典型的亚二倍体峰。四组比较见表 1 及图 1D1-2、D2-2。各实验组凋亡率与对照组相比显著升

高,同一时间段 CT 5 mmol/L 合用 AS 5 μmol/L 组的凋亡率显著高于单用 CT 5 mmol/L 或 AS 5 μmol/L 组($P < 0.05$);同一细胞同一药物浓度 48 h 与 24 h 两两比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。实验结果显示,柠檬酸钠与三氧化二砷联合用药后对胃癌细胞凋亡率有增加作用。根据检测结果用以下公式计算出细胞凋亡率:凋亡率(%) = 右上象限(晚期凋亡细胞) + 右下象限(早期凋亡细胞)。四组比较见表 2 及图 1D1-3、D2-3。



D1-1:24 h 细胞形态学图;D1-2:24 h 流式细胞仪凋亡检测图;D1-3:24 h 流式细胞仪检测周期图;D2-1:48 h 细胞形态学图;D2-2:48 h 流式细胞仪凋亡检测图;D2-3:48 h 流式细胞仪检测周期图

图 1 胃癌细胞株 SGC-7901 经 citrate 和 As₂O₃ 处理后 24 h、48 h 的细胞形态学、流式细胞仪凋亡检测图及流式细胞仪周期检测图

表 1 四组胃癌细胞株 SGC-7901 加药处理后细胞周期变化比较 [$n = 3, (\bar{x} \pm s)$]

组别	24 h			48 h		
	G ₁	G ₂	S	G ₁	G ₂	S
对照组	76.30 ± 2.14	3.70 ± 1.46	20.10 ± 5.32	78.40 ± 3.07	4.10 ± 1.54	17.50 ± 5.30
CT 5 mmol/L 组	64.50 ± 5.63 [△]	14.80 ± 2.13 [△]	20.70 ± 3.15	50.30 ± 3.29 [△]	30.30 ± 3.46 [△]	19.40 ± 3.52
AS 5 μmol/L 组	60.00 ± 5.28 [△]	20.50 ± 1.82 [△]	19.50 ± 4.27	48.80 ± 3.25 [△]	32.30 ± 3.52 [△]	19.90 ± 3.55
CT 5 mmol/L + AS 5 μmol/L 组	45.70 ± 4.92 ^{△#}	32.80 ± 4.63 ^{△#}	21.50 ± 3.00	32.60 ± 3.76 ^{△##*}	44.70 ± 4.18 ^{△##*}	22.70 ± 2.35

与同一细胞株、同一时间的对照组比较, $\Delta P < 0.05$; 与同一细胞株、同一时间的 CT 5 mmol/L 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$; 与同一细胞株、同一时间的 AS 5 μmol/L 组比较, $\# P < 0.05$; 与同一细胞株 24 h 的 CT 5 mmol/L + AS 5 μmol/L 组比较, $* P < 0.05$ 。

万方数据

表2 四组胃癌细胞株 SGC-7901 加药处理后
凋亡率变化比较 [n=3, ($\bar{x} \pm s$)]

组别	时间	
	24 h	48 h
对照组	6.44 ± 0.21	5.81 ± 0.80
CT 5 mmol/L 组	18.47 ± 0.23 [△]	30.69 ± 0.43 [△]
AS 5 μmol/L 组	16.39 ± 0.56 [△]	28.35 ± 0.46 [△]
CT 5 mmol/L + AS 5 μmol/L 组	43.37 ± 2.15 ^{△▲#}	86.77 ± 5.31 ^{△▲#*}

与同一细胞株、同一时间的对照组比较, [△]P < 0.05; 与同一细胞株、同一时间的 CT 5 mmol/L 组比较, [▲]P < 0.05; 与同一细胞株、同一时间的 AS 5 μmol/L 组比较, [#]P < 0.05; 与同一细胞株 24 h 的 CT 5 mmol/L + AS 5 μmol/L 组比较, ^{*}P < 0.05。

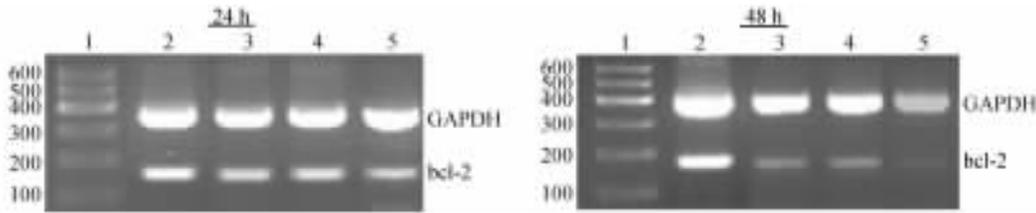
2.3 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR) RT-PCR 电泳条带灰度分析半定量比较发现, 实验组 bcl-2 基因相对表达量比对照组下降; 同一时间段 CT 5 mmol/L 合用 AS 5 μmol/L 组的基因相对表达量较单用 CT

5 mmol/L 或 AS 5 μmol/L 组下降 (P < 0.05); 实验结果提示随着药物作用时间的增加, 基因相对表达量下降。四组基因相对表达量比较见表 3, 图 2。

表3 四组胃癌细胞株 SGC-7901 加药处理 24 h、48 h 后
bcl-2 的相对表达量比较

组别	灰度值	
	24 h bcl-2/GAPDH	48 h bcl-2/GAPDH
对照组	0.87 ± 0.96	0.90 ± 0.07
CT 5 mmol/L 组	0.69 ± 0.11 [△]	0.57 ± 0.20 [△]
AS 5 μmol/L 组	0.65 ± 0.09 [△]	0.54 ± 0.08 [△]
CT 5 mmol/L + AS 5 μmol/L 组	0.47 ± 0.04 ^{△▲#}	0.31 ± 0.07 ^{△▲#*}

与同一细胞株、同一时间的对照组比较, [△]P < 0.05; 与同一细胞株、同一时间的 CT 5 mmol/L 组比较, [▲]P < 0.05; 与同一细胞株、同一时间的 AS 5 μmol/L 组比较, [#]P < 0.05; 与同一细胞株 24 h 的 CT 5 mmol/L + AS 5 μmol/L 组比较, ^{*}P < 0.05。



1: Marker; 2: 对照组; 3: CT 5 mmol/L 组; 4: AS 5 μmol/L 组; 5: CT 5 mmol/L 合用 AS 5 μmol/L 组

图2 胃癌细胞株 SGC-7901 经 CT 5 mmol/L、AS 5 μmol/L 和 CT 5 mmol/L 合用 AS 5 μmol/L 处理 24 h、48 h 后的 PCR 电泳图

3 讨论

3.1 柠檬酸钠是糖酵解限速酶-6-磷酸果糖激酶-1 (PFK-1) 的抑制剂, 能够抑制肿瘤细胞的糖酵解, 阻止细胞的能量供应, 进而抑制肿瘤细胞的生长。在本实验组之前 Zang 等^[2] 的研究已证明柠檬酸钠能够抑制恶性胸膜间皮瘤细胞的生长。Lu 等^[3] 关于柠檬酸钠对胃癌细胞凋亡的研究也证实了柠檬酸钠能够抑制胃癌细胞的生长和细胞发生了线粒体途径的凋亡。近年来的大量研究表明, 小剂量的三氧化二砷可抗肿瘤, 现已证实三氧化二砷能够抑制白血病^[4]、乳腺癌^[5]、胆管癌^[6] 等恶性肿瘤细胞的增殖。本实验表明柠檬酸钠与三氧化二砷联合用药对胃癌细胞的抑制和凋亡优于单用柠檬酸钠或三氧化二砷, 作用具有协同性, 且随药物作用时间延长而凋亡率增加。

3.2 关于柠檬酸钠和三氧化二砷对肿瘤的抑制作用的可能机制, 认为 bcl-2 是典型的抑制肿瘤细胞凋亡基因。周军等^[6] 的研究表明三氧化二砷作用于肿瘤细胞后 bcl-2 表达下降。细胞凋亡时, 线粒体的结构和功能发生重大变化, 并释放细胞色素 C

(cytC) 促凋亡因子入细胞浆后激活 Caspases 凋亡蛋白酶^[7]。被激活后的 Caspases 能特异性地切割开某些与细胞活性相关的蛋白质, 使得: (1) 细胞周期阻碍; (2) 细胞内环境平衡遭到破坏, 并损伤其修复机制; (3) 细胞从周围的组织结构膜脱落; (4) 维持细胞结构的物质解体破坏, 引发细胞的凋亡^[8]。而 bcl-2 的抗凋亡作用主要是抑制细胞色素 C 从线粒体释放及 Caspases 的激活。

3.3 本实验显示, 柠檬酸钠联合三氧化二砷可诱导胃癌细胞凋亡, 联合用药组细胞凋亡率显著高于各单用药组, 且随着联合用药作用时间的延长而增加。另外, 本实验联合用药后, 胃癌 G₀/G₁ 期细胞比例降低, G₂/M 期细胞比例相对升高, 细胞分裂受到抑制。bcl-2 原癌基因是目前研究最多的与细胞凋亡关系密切的基因, 我们的实验结果表明, SGC-790 细胞 bcl-2 基因大量表达, 经联合用药处理后, 较单药组更为明显的下调 bcl-2 基因, 这可能是柠檬酸钠联合三氧化二砷诱导人胃癌细胞株 SGC-7901 凋亡的分子机制。

参考文献

- 1 汤钊猷. 现代肿瘤学[M]. 第2版. 上海:上海医科大学出版社, 2000:695-732.
- 2 Zhang XD, Varin E, Allouche S, et al. Effect of Citrate on Malignant Pleural Mesothelioma Cells: A Synergistic Effect with Cisplatin[J]. Anticancer Res, 2009, 29(4):1249-1254.
- 3 Lu Y, Zhang X, Zhang H, et al. Citrate induces apoptotic cell death: a promising way to treat gastric carcinoma? [J]. Anticancer Res, 2011, 31(3):797-805.
- 4 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷注射液治疗72例急性早幼粒细胞白血病[J]. 中华血液学杂志, 1996, 17(2):58-60.
- 5 陈鑫, 吴诚义. 三氧化二砷对人乳腺癌裸鼠移植瘤的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(8):722-723.
- 6 周军, 汤恢煥, 马列, 等. bcl-2/bax mRNA在三氧化二砷体外诱导人胆管癌细胞株凋亡中的表达[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(8):908-911.
- 7 Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1):33-42.
- 8 Pawlowski J, Kraft AS. Bax-induced apoptotic cell death[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(2):529-531.

[收稿日期 2011-10-27][本文编辑 谭毅 黄晓红]

课题研究·论著

中老年人群肾动脉粥样硬化缺血性肾病 相关因素探讨

伍秋霞, 唐盛, 曾春, 李瑾瑜, 彭小梅

基金项目: 广西自然科学基金资助项目(编号:桂科青0728039)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院肾内科

作者简介: 伍秋霞(1967-), 女, 大学本科, 医学学士, 主任医师, 研究方向: 肾内科疾病诊治。E-mail: gbbjkwx@163.com

[摘要] **目的** 探讨中老年人群肾动脉粥样硬化缺血性肾病的相关因素, 为早期诊断和早期干预创造条件。**方法** 以2007-01~2007-12 在我院进行健康体检、年龄为40~85岁的中老年人群3 000名为研究对象, 通过问卷调查方式及健康体检资料进行资料搜集, 调查肾动脉粥样硬化缺血性肾病患者及人群的知晓率, 并分析中老年人群中发病情况、病因构成比、临床特点、治疗现况和各种独立危险因素。**结果** (1) 患者知晓率为3.29%, 人群知晓率为0.70%。(2) 患病率为5.07%, 随着年龄增长, 患病率明显增加; 男性与女性之间患病率差异无统计学意义。(3) 临床特点主要表现为高血压(83.56%)和肾功能减退(63.16%); 主要合并症为冠心病(63.82%)、脑血管疾病(27.63%)、颈动脉粥样硬化(55.92%)、糖尿病(29.61%)、血脂代谢异常(53.29%)。**结论** 肾动脉粥样硬化缺血性肾病患者及人群知晓率低; 随着年龄增长, 患病率明显增加; 独立危险因素包括吸烟、高龄、冠状动脉病变严重程度、收缩期高血压、脑血管病、颈动脉粥样硬化、糖尿病、高密度脂蛋白胆固醇血症等。

[关键词] 缺血性肾病; 中老年人群; 相关因素**[中图分类号]** R 586 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2012)03-0191-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2012.03.02

Investigation on related factor of ischemic renal disease in middle-aged and elderly population WU Qiu-xia, TANG Sheng, ZENG Chun, et al. Department of Nephrology, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To investigate the related factor of ischemic renal disease in middle and elderly population, to provide the possibility for early diagnosis and detection. **Methods** The research object included 3 000 employees and retirees (aged from 40~85 years) from the Physical Examination Center of our hospital from Jan to Dec in 2007. Their related data were collected by using questionnaire and surveying medical examination information. (1)

万方数据