

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2003 年 11 月 15 日 第 11 卷 第 11 期 (Volume 11 Number 11)



11/2003

ISSN 1009-3079



9 771009 307001

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

World Journal of Gastroenterology 被 SCI®-E, Research Alert®, Current Contents®/Clinical Medicine, Journal Citation Reports® Index Medicus, MEDLINE, Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录。2002 年 JCR® 报告 WJG 影响因子 2.532。世界华人消化杂志® 被 Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica 收录。2001 年中国科技期刊引证报告: 世界华人消化杂志® 影响因子 3.733, WJG 影响因子 2.920。

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2003 年 11 月 15 日 第 11 卷 第 11 期 (总第 115 期)

述 评	<p>1661 创办具有中国特色的国际先进水平的 WJG: 2004 年由月刊改为半月刊 马连生, 潘伯荣, 马景云, 徐家祚, 应协中, 王先林, 陆汉明, 夏华向, 张建中, 苏勤, 任师颜, 朱立, 朱丽虹, 吕有勇</p> <p>1665 细胞分化与食管鳞状细胞癌 孔建平, 刘芝华, 吴昊</p> <p>1670 轮状病毒致病机制研究进展 王大燕, 王健伟, 于修平, 洪涛</p>
肝 癌	<p>1674 小鼠甲胎蛋白基因的克隆真核表达载体构建及表达鉴定 田耕, 易继林</p> <p>1677 原发性肝细胞癌中 PITG 和 c-myc 基因表达的研究 金中元, 程瑞雪, 郑长黎, 郑晖</p> <p>1682 肝细胞癌变过程中 cyclin D1 的异常表达与端粒酶活性的相关分析及意义 李宝杰, 王新红, 曲波</p> <p>1686 HCC 合并阻塞性黄疸 ERCP164 例 樊彪, 潘亚敏, 沈丽, 胡冰, 吴萍, 王书智, 周岱云</p>
基础研究	<p>1690 巨噬细胞 Smad4 反义基因转移及对细胞外基质合成的抑制作用 徐新保, 冷希圣, 何振平, 梁志清</p> <p>1694 冷冻保存再灌注期间离体肝组织内氧自由基及 $[Ca^{2+}]_i$ 对 p38MAPK 激活的影响 王西, 田伏洲, 汤礼军, 张晓璋</p> <p>1699 大黄素对大鼠结肠环行平滑肌细胞 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响 马涛, 齐清会, 简序, 费乃昕</p> <p>1703 大肠癌细胞可产生趋化因子 IP-10 杨春康, 陈道达, 田源, 张景辉</p> <p>1706 干扰素对野生型 p53 转染的结肠癌细胞株 SW480 的影响 张桂英, 徐美华, 谢兆霞, 何春梅</p> <p>1711 大鼠胃黏膜损伤修复时早期应答基因 c-Jun 及 c-met 的表达 姚永莉, 徐波, 宋子刚, 张万岱</p>
临床研究	<p>1715 功能性消化不良患者症状分型、胃排空功能、胃肠激素水平的相关性 唐红卫, 黄裕新, 徐海峰, 高巍, 周润锁, 尚磊, 王庆莉, 高峰, 安晓丽</p> <p>1720 肝硬化患者血清和腹水 CA125 升高 肖文斌, 刘玉兰</p> <p>1723 α-2b 干扰素治疗慢性乙型肝炎的前瞻性研究 熊锦华, 胡大荣, 张成平, 范公愚, 刘勇, 闻炜</p>
焦点论坛	<p>1727 胃干细胞 王天德, 展玉涛</p> <p>1730 肠道干细胞 姜佳丽, 王虹, 展玉涛</p> <p>1732 胃肠道间质瘤干细胞 王虹, 展玉涛</p> <p>1735 肝性干细胞 展玉涛, 任继萍</p> <p>1738 肝脏干细胞 展玉涛, 毕泰山</p> <p>1740 胰腺干细胞 姜佳丽, 万小平, 张敏, 展玉涛</p>
文献综述	<p>1743 乙型肝炎病毒 e 抗原阴性慢性乙型肝炎患者抗病毒治疗 董青, 成军</p> <p>1749 HGF/SF、c-met 基因信号异常与胃肠道恶性肿瘤 李宏武, 单吉贤</p> <p>1752 幽门螺杆菌对胃激素的影响 郭王, 郭霞, 姚希贤</p> <p>1755 胃癌组织生长抑素及其受体的表达与 EGF、VEGF 的影响 李秋萍, 徐军全, 李红梅, 张利华</p> <p>1760 结、直肠癌临床病理分期系统及其临床意义 卿三华</p> <p>1764 铂佐剂机制及其纳米化前景 何萍, 吕凤林, 任建敏, 何凤慈</p> <p>1769 RNA 干扰的抗病毒效应 李中, 范学工</p> <p>1773 Peutz-Jeghers 综合征 赵喜荣, 康进春, 吕有勇</p> <p>1777 食管癌中的等位基因缺失 李洁, 刘芝华</p> <p>1782 溃疡性结肠炎发病机制及其研究进展 周琦, 林平, 潘慧, 梅林</p> <p>1787 蛋白酶激活受体-2 与胃癌疾病的研究进展 朱雄伟, 王强, 温光保, 李兆申</p>
研究快报	<p>1793 轮状病毒胃肠炎与表皮生长因子关系初步研究 吴建春, 姚英民</p> <p>1794 尿毒症患者透析前后胃肌电活动的研究 武立群, 王虹, 顾清, 张悦, 李松扬</p> <p>1796 消炎痛和幽门螺杆菌在胃溃疡致病中的相互作用研究 迟晶, 赵金满, 于继红, 傅宝玉</p> <p>1797 原发性肝癌乙型肝炎病毒 mRNA 的表达及其意义 陈晓晓, 刘颖斌, 时开同, 彭淑娟, 彭承宏, 史留斌, 沈宏伟</p> <p>1800 MDM2 基因扩增和蛋白表达与胃癌相关性的研究 孙利平, 李岩, 张宁, 姜乃佳, 付伟, 薛一雷</p> <p>1802 HBsAg 疫苗对非溶细胞性和溶细胞性细胞免疫应答的影响 熊一力, 贾彦征, 施理, 张宜俊</p>

研究快报

- 1804 P27kip1、CyclinE 和 CyclinA 在胃癌中的表达及意义 金顺花, 朴熙雄, 金海峰, 朴凤顺, 许强
1807 血管紧张素 II 对大鼠 HSC 合成 PAI-I 的影响及 NO 的干预作用 张磊, 李定国, 尤汉宇, 刘清华, 宗喜华, 陆汉明

临床经验

- 1809 TTF1 在正常及损伤胃黏膜中的表达改变 任建林, 卢雅正, 王琳, 陈建民, 施华芳, 叶震世, 吴艳环, 钟燕, 林近江, 林琛, 潘金水, 罗金燕
1811 肝性脊髓病 8 例 王春平, 冯永毅, 苏淑慧, 李迎新, 彭晓君
1812 直肠癌前哨淋巴结检测 102 例 魏寿江, 王树树, 赵国刚, 侯华芳
1814 功能性消化不良患者胃排空障碍与胃肠激素的关系 何美蓉, 宋子刚, 何春容
1816 上消化道流行病学研究 黄中平
1818 胃液抗 Hp IgA 测定对 Hp 根除治疗效果的判断 谢勇, 吕农华, 黄德强, 陈江, 徐泽, 王崇文
1820 原发性十二指肠癌 16 例 谢磊, 刘之武, 王志川
1822 丙型肝炎病毒母婴传播及羊水、乳汁和唾液的作用 王占英, 牛美智, 曹学强, 李颖, 乔光彦
1824 十二指肠癌 120 例 吴江, 邓长生
1825 乙肝病毒感染相关原发性肝癌 320 例 苏淑慧, 王春平, 李迎新, 冯永毅
1827 胆管癌组织 p53 和血管内皮生长因子表达与血管生成的相关性研究 陈勇军, 俞亚红, 丁志强
1830 奥曲肽治疗肠梗阻 25 例 张长青, 张荣珍, 吴伟岗, 黄贵毅
1832 理学检查慢性胃十二指肠炎症 280 例 谭允熙, 李增芬, 谭汇泉
1835 艾滋病患者中 HCV、HBV 及 HGV 的感染状况 骆嘉社, 桂希恩, 庄柯
1837 胆心反射及胆心综合征的诊治 卫洪波, 汪壮流, 杨柳, 李文胜, 陈勇, 唐秋林
1839 陕西部分农村 0-18 月婴幼儿肠道内微生物菌群状况研究 孙晓魁, 刘黎明, 郝炳华, 杨文方, 贾梅, Acheson K
1841 糖尿病患者胆囊排空功能与胃肠激素的关系 王艳军, 徐永泉, 林艳, 李士星
1843 慢性小肠性腹泻中的 IBS 吴杰, 邓昊, 贾贵贵, 陈时
1844 矿区居民幽门螺杆菌感染状况及危险因素分析 雷静静, 周力, 谭玉洁, 杨斌, 刘星峰, 杜纪恩
1848 直视微创胆道手术 52 例 姜伟青, 周建明, 陆军

病例报告

- 1851 分体联合手术治疗小儿原发性肝静脉海绵样变 1 例 方艳华, 朱新勇, 方石岗
1852 马内非青霉素 1 例 尹雯, 汪光强, 郑晓平, 彭国林
1853 胰性胸内 8 例 王平, 廖勇, 古敏, 刘子沛, 李锐鸣
1855 肾移植术后回肠结肠并出血、梗阻 1 例报告 金红旭, 张雪峰, 王正强

读者来信

- 1698 徐新保
1705 Ferenc SZALAY

封面故事

- 1664 复方健脾胃散 II 期临床研究方案讨论会在福州举行

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名
陈可冀 题写版权刊名
(月刊)
创刊 1993-01-15
改刊 1998-01-25
出版 2003-11-15
原名 新消化病学杂志

总编辑 陈可冀
黄家骝
黄志强
廖介寿
刘耕陶
袁法强
汤利敏
王宝忠
危北海
关益超
关成中

社长兼编辑 马进荣
中文编辑 潘柏松
王理晖
英文编辑 朱丽红
排版 廖少华
校对 李天华

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会

030001, 山西省太原市迎泽西大街 77 号

E-mail: wjcd@wjgnet.com

出版 世界胃肠病学杂志社

100023, 北京市 2345 信箱

E-mail: wjcd@wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

电话 010185381892

传真 010185381893

印刷 北京科德印刷厂

发行 国内 北京报刊发行局

国外 中国国际图书贸易总公司

(100044, 北京 399 信箱)

订购 全国各地邮局

邮编 世界胃肠病学杂志社发行部

(100023, 北京市 2345 信箱)

电话 010185381892

传真 010185381893

2003 年版权归世界胃肠病学杂志社所有

本刊已被国内外

检索系统收录

美国《化学文摘(CA)》

荷兰《医学文摘/医学文摘(EM)》

俄罗斯《文摘杂志(PJ)》

中国科技论文统计与分析

中国学术期刊文摘

中国中医药信息资源网

中国生物医学文献光盘数据库

《中文科技资料目录(医药卫生)》

中国生物医学期刊目录数据库

中国医学文摘外科学分册(英文版)

中国医学文摘内科学分册(英文版)

特别声明

本刊刊登的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印刷质量问题, 请向本刊编辑部联系。

ISSN 1009-3079

CN 14-1260/R

邮发代号

82-262

国外代号

M 4481

国内定价

每册 24.00 元 全年 288.00 元

广告经营许可证

1401004001

www.wjgnet.com

吡哌美辛对野生型p53转染的结肠癌细胞株SW480的影响

张桂英, 徐美华, 谢兆霞, 何春梅

张桂英, 徐美华, 谢兆霞, 中南大学湘雅医院消化内科 湖南省长沙市 410078
何春梅, 中南大学湘雅医学院 湖南省长沙市 410078
徐美华, 女, 1967-06-05 生, 湖南省桃江县人, 汉族, 1991 年湖南医科大学
本科毕业, 2002 年中南大学湘雅医学院博士研究生毕业, 主要从事消化道肿
瘤研究。

卫生部自然科学基金资助项目, No. 98-2-088

项目负责人: 张桂英, 410078, 湖南省长沙市湘雅路 141 号, 中南大学湘雅
医院消化内科. meihuaxu2001@yahoo.com.cn

电话: 0731-4327249

收稿日期: 2002-10-08 接受日期: 2003-05-21

Effect of indomethacin on induction of apoptosis in colonic cancer cell line SW480 transferred by wild-type p53 gene

Gui-Ying Zhang, Mei-Hua Xu, Zhao-Xia Xie, Chun-Mei He

Gui-Ying Zhang, Mei-Hua Xu, Zhao-Xia Xie, Department of
Gastroenterology, Xiangya Hospital, Zhongnan University, Changsha
410008, Hunan Province, China
Chun-Mei He, Cancer Research Institute, Xiangya Medical College,
Zhongnan University, Changsha 410078, Hunan Province, China
Supported by the Natural Science Foundation of the Ministry of Health
of China, No. 98-2-088

Correspondence to: Gui-Ying Zhang, Department of Gastroenterology,
Xiangya Hospital, Zhongnan University, 141 Xiangya Road, Changsha
410008, Hunan Province, China. meihuaxu2001@yahoo.com.cn

Received: 2002-10-18 Accepted: 2003-05-21

Abstract

AIM: To investigate the anti-tumor effect of indomethacin on colon cancer.

METHODS: SW480 cells were transferred by wtp53 gene, treated with different concentrations of indomethacin. Apoptosis was analyzed by acridine orange and ethidium bromide staining, and electron microscopy. Expressions of Bcl-2, Bax and p21^{WAF1/CIP1} protein were detected by Western blotting.

RESULTS: Indomethacin induced apoptosis in wtp53/SW480 cells. Typical cell morphological changes included cytoplasm and nuclear shrinkage, nuclear fragmentation and formation of apoptotic bodies. The count of apoptotic cells was dose and time-dependent, and the apoptotic cells accounted for 5.0±2.0 % in SW480 cells, 60.1±2.0 % in wtp53/SW480 cells treated with 600 μmol/L indomethacin for 72 h ($P < 0.01$), with a significant difference between the two groups. The expression of Bcl-2 protein of wtp53/SW480 cells was down-regulated by indomethacin in a dose dependent manner. The expression of Bax protein did not change, and the expressions of Bcl-2 and Bax protein of SW480 cells did not change either. The expression of p21^{WAF1/CIP1} protein of wtp53/SW480 cells was up-regulated, reaching the maximal level at the concentration of 400 μmol/L indomethacin and returning to control level at the concen-

tration of 600 μmol/L indomethacin

CONCLUSION: Indomethacin could induce apoptosis in wtp53/SW480 cells by down-regulating the expression of Bcl-2 protein and up-regulating the expression of p21^{WAF1/CIP1} protein, but no change in Bax protein.

Zhang GY, Xu MH, Xie ZX, He CM. Effect of indomethacin on induction of apoptosis in colonic cancer cell line SW480 transferred by wild-type p53 gene. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(11):1706-1710

摘要

目的: 探讨吡哌美辛抗结肠癌作用是否呈p53依赖性及其部分分子机制。

方法: 采用含突变型p53的SW480细胞株为研究对象, 利用基因转染技术, 将野生型p53转染SW480细胞。不同浓度的吡哌美辛进行干预, 采用吖啶橙、溴化乙锭荧光染色, 荧光显微镜及透射电镜下观察 wtp53/SW480 细胞凋亡; Western 斑点免疫印迹检测 wtp53/SW480 细胞中 Bcl-2、Bax 及 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达。

结果: 吡哌美辛诱导野生型p53转染的wtp53/SW480细胞凋亡, 出现形态学改变: 即细胞核固缩、裂解, 核碎片及凋亡小体形成。凋亡细胞计数显示该作用呈浓度-时间依赖性, 其中 600 μmol/L IN 作用于 wtp53/SW480 细胞 72 h, 其凋亡细胞百分率为 60.1 ± 2.5 %; 而对照组其凋亡细胞百分率为 5.0 ± 2.0 %, $P < 0.01$, 二者比较有显著性差异。吡哌美辛作用于 wtp53/SW480 细胞 24 h, 其 Bcl-2 蛋白表达水平下调, 呈浓度依赖性, 而 Bax 蛋白表达无改变; 未转染的 SW480 细胞中 Bcl-2, Bax 蛋白均无影响。吡哌美辛作用于 wtp53/SW480 细胞 24 h, 其 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达水平随着一定范围内吡哌美辛浓度的增加而逐渐上调, 以 400 μmol/L 吡哌美辛作用最强, 600 μmol/L 吡哌美辛作用后回到基础水平。而在未转的 SW480 细胞中 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达无明显改变。

结论: IN 通过下调 Bcl-2 蛋白, 上调 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达来诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡。

张桂英, 徐美华, 谢兆霞, 何春梅. 吡哌美辛对野生型 p53 转染的结肠癌细胞株 SW480 的影响. 世界华人消化杂志 2003;11(11):1706-1710

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1706.asp>

0 引言

转染野生型 p53 (wild-type p53, wtp53) 表达质粒, 可

引起 p53 缺失或突变的肿瘤细胞凋亡和/或抑制肿瘤细胞生长, 予烷化剂作用后 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达明显增加^[1]. 然而, 有研究者将 wtp53 转染至 SW480 细胞中, 结果显示 p53 表达的修复不足以引起转染的结肠癌细胞的凋亡^[2]. 研究证实, 非甾体类药物(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAID)可通过非选择性抑制环氧化酶(cyclo-oxygenase, COX), 而抑制对肿瘤生长和转移有明显促进作用的 PGE₂ 的产生^[3, 4]; 诱导凋亡是 NSAID 抗肿瘤作用的机制之一^[5-12]. 为探讨非甾体类药物吲哚美辛(indomethacin, IN)诱导肿瘤细胞凋亡时凋亡相关蛋白 Bcl-2, Bax 蛋白的表达是否下调或上调, p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达上调是否存在依赖性 p53-p21^{WAF1/CIP1} 途径, 我们将 wtp53 基因转染至 SW480 细胞后给予一定浓度的吲哚美辛干预, 吡啶橙和溴化乙锭染色后, 荧光显微镜及透射电镜下观察凋亡细胞形态学改变; Western 印迹检测 IN 诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡时 p21^{WAF1/CIP1}, Bcl-2 及 Bax 蛋白的表达.

1 材料和方法

1.1 材料 含 mtp53 的 SW480 人结肠癌细胞株, 购自 ATCC. wtp53/PLXSN 重组体质粒为湘雅医院周晓娟老师惠赠; DMEM 培养基, FuGENETM6 transfection reagent, G418 为湘雅医学院细胞生物室关勇军老师惠赠; Qiagen 质粒抽提纯化试剂盒、吡啶橙(AO)、溴化乙锭(EB)为 Sigma 公司产品; 兔源性多克隆抗体 Bcl-2、Bax、p21WAF1/CIP1 为 Santa Cruz 产品; β -action 抗体为湘雅医学院贺智敏老师惠赠; BCA 浓度测定试剂盒为 Pierce Chemical Co 产品; ECL 发光试剂盒为 NENTM Life Science Product; Trizol 试剂为 Gibco 公司产品; 逆转录试剂盒、辣根过氧化物酶标记羊抗兔、羊抗鼠二抗, NC 膜、Taq DNA 聚合物酶、dNTPs、PCR Marker 为华美生物工程公司或 Promega 公司产品.

1.2 方法 wtp53/PLXSN 质粒转染 SW480 细胞按(Clin Cancer Res 1996;2:1639)略加改进. 用脂质体将 wtp53/PLXSN 质粒转染至 SW480 细胞, 转染 48 h 后加 G418 800 mg/L, 以后保持 200 mg/L G418 筛选. 细胞克隆化, 随意挑选 G418 抗性克隆 wtp53/SW480 细胞, 200 mg/L G418 浓度维持扩大培养. 空白载体 PLXSN 转染 SW480 细胞作为对照. RT-PCR 检测 wtp53/SW480 细胞外源性 wtp53 基因的表达 按 Trizol 试剂盒操作说明抽取两组 wtp53/SW480 细胞、SW480 细胞、空白载体转染的 SW480 的总 RNA. cDNA 合成: 于 0.5 mL Eppendorf 内依次加入 25 mmol/L MgCl₂ 4 μ L, 10 \times RT buffer 2 μ L, 10 mmol/L dNTP 2 μ L, Rnasin 40 U, AMV 200 U, Oligo (dT)₁₅ 1 μ L, 反应终体积为 20 μ L, 离心后于 42 $^{\circ}$ C 反应 60 min, 95 $^{\circ}$ C 5 min. PCR 反应: 50 μ L 反应体系中含 cDNA 模板 5 μ L, 10 \times PCR buffer 5 μ L, 正向引物和反向引物各 50 pmol, 10 mmol dNTP 2 μ L, Taq 酶 2 U. 循环条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 50 s, 53 $^{\circ}$ C

30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min.

1.3 实验干预 取指数生长期 wtp53/SW480 细胞, 调整细胞浓度为 1×10^5 /L, 接种于含 150 mL/L FCS 的 DMEM 培养液的 6 孔培养板中, 设置空白对照组、实验对照组(DMSO)、实验组: 分别加入 IN 使其终浓度为 100, 200, 400, 600 μ mol/L, 培养 24 h, 48 h, 72 h 后, 进行相关检测.

1.3.1 wtp53/SW480 细胞荧光染色 各孔细胞用胰蛋白酶消化, 取细胞悬液 5 μ L (含细胞数 1×10^5 /L) 于载玻片上, 加荧光染色液 (含 200 mg/L AO+EB) 5 μ L 染色 1 min, 荧光显微镜下观察并摄影. 计算 200 个细胞及凋亡细胞百分率, 每次实验重复 3 次.

1.3.2 透射电镜检测 将细胞轻轻刮下来, 离心 (500 r/min 5 min), 戊二醛固定 2 h 以上; 0.1 mol/L PBS 清洗细胞团后, 用 20 g/L 锇酸固定 1 h; 0.1 mol/L PBS 清洗细胞团, 然后丙酮梯度脱水; 环氧树脂和丙酮 1:1, 37 $^{\circ}$ C 下浸泡 24 h; 纯环氧树脂包埋, 60 $^{\circ}$ C 烤箱, 24 h; LKB-III 型超薄切片机制片, 厚度 500-600 nm; 铅铀双重染色后 H-600 透射电镜下观察.

1.3.3 Western 斑点印迹法 PBS 漂洗提取上述各组细胞, 调整细胞数为 1×10^6 , 5 000 r/min 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min 收集细胞, 加入裂解液抽提蛋白, BCA 方法测定蛋白质浓度. 每样品取 80 μ g 总蛋白经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离 2-3 h 后, 100V 电转移至 NC 膜, PBS-T 溶解的 50 g/L 脱脂牛奶中封闭 4-6 h, 分别将兔源性多克隆抗体 Bcl-2 (1:500), Bax (1:500), P21WAF1/CIP1 (1:500) 一抗稀释于 50 g/L 脱脂牛奶中, 与膜温育 1 h, PBS-T 洗膜 4 \times 15 min, 辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗 (1:50) 与膜温育 1 h, PBS-T 洗膜 4 \times 15 min; ECL 检测试剂与膜作用 3 min 后暗室中曝光, X 线片显影、定影.

取出以上滤膜, 放入 PBS-T 中漂洗 30 min. 鼠抗人单克隆抗体 β -action 1:10 000 稀释于 50 g/L 脱脂牛奶中, 与 NC 膜温育 1 h, 辣根过氧化物酶标记羊抗鼠抗体 (1:50) 与膜温育 1 h, ECL 检测试剂与膜作用 3 min 后暗室中曝光, X 线片显影、定影.

统计学处理 凋亡细胞百分率均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异用 t 检验, 采用 SPSS 10.0 处理.

2 结果

wtp53/PLXSN 质粒转染 SW480 细胞系, 转染 48 h 后 800 mg/L G418 筛选. 经筛选 8-10 d 后可见抗 G418 克隆出现, 随机挑选 G418 抗性克隆 wtp53/SW480 扩大培养后作进一步鉴定. Trizol 一步法提取 wtp53/SW480 细胞的总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 并作模板进行 PCR 扩增, PCR 引物为: p53 基因的正向引物 Pf: AGA, ATG, CCA, GAG, GCT, GCT, C, 反向引物 Pr: CTC, GGA, TAA, GAT, GCT, GAG, GA, 扩增片段大小为 397 bp; GAPDH 上游引物 Pf: CCT, CAG, TTG, CCT, AAA, CCA, GCA, 下游引物 Pr: CCA, CTA, AAA, CCT, CCC,

TAG, AGC, 扩增片段大小为 240 bp. PCR 产物用 10 g/L 凝胶电泳(含 0.5 mg/L EB)检测, 并选用 GAPDH 作为内对照.

2.1 细胞凋亡形态学 荧光显微镜及透射电镜下观察, 未经 IN 处理的 wtp53/SW480 细胞, 染色后细胞形态显示肿瘤细胞核大, 染色质疏松细致, 外形较规则, 呈圆形或椭圆形. 大于或等 200 $\mu\text{mol/L}$ IN 作用于 wtp53/SW480 细胞 72 h 后引起凋亡典型的形态学改变, 主要包括细胞体积缩小, 细胞核固缩、偏向一边、裂解、核碎裂、呈桔红色等, 细胞器及细胞膜完整, 密度增高. 染色质浓集成块、靠边, 凋亡小体形成. 凋亡细胞计数结果显示未经 IN 作用的 wtp53/SW480 细胞凋亡不明显; 随着一定范围内 IN 浓度的增加及作用时间的延长, wtp53/SW480 细胞凋亡百分率而逐渐增加(表 1).

表 1 IN 促 wtp53/SW480 细胞凋亡 (%), $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

IN ($\mu\text{mol/L}$)	24 h	48 h	72 h
对照组	1.3 \pm 0.6	1.7 \pm 0.6	5.0 \pm 2.0
DMSO 组	1.0 \pm 0.0 ^b	2.3 \pm 0.6 ^b	5.5 \pm 1.0 ^b
100	6.0 \pm 2.0	10.2 \pm 0.6	24.5 \pm 1.7
200	7.8 \pm 0.6	13.7 \pm 2.5	39.3 \pm 2.5
400	10.3 \pm 0.6	20.8 \pm 1.0	46.0 \pm 2.0 ^b
600	14.2 \pm 1.2	28.0 \pm 2.0	60.1 \pm 2.5 ^b

^bP < 0.01, vs 对照组比较.

2.2 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达 不同浓度的 IN 作用于 wtp53/SW480 细胞 24 h 后, Western 印迹检测发现 wtp53/SW480 细胞中 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达水平在一定范围内随着 IN 作用浓度的增加而逐渐上调, 且于 400 $\mu\text{mol/L}$ IN 达到最高表达水平, 600 $\mu\text{mol/L}$ IN 作用后则下降至基础水平. 而在未转染的 SW480 细胞中 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达水平无变化(图 1).

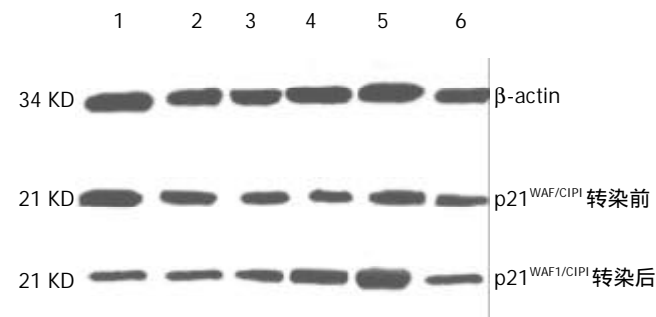


图 1 IN 影响 SW480 细胞转染前后 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达. 1: control; 2: DMSO; 3: 100 $\mu\text{mol/L}$ IN; 4: 200 $\mu\text{mol/L}$ IN; 5: 400 $\mu\text{mol/L}$ IN; 6: 600 $\mu\text{mol/L}$ IN.

2.3 Bcl-2、Bax 蛋白表达 wtp53/SW480 细胞中 Bcl-2 蛋白表达随着一定范围内 IN 的浓度增加而逐渐减弱, Bax 蛋白的表达无明显改变. SW480 细胞中 Bcl-2 蛋白、Bax 蛋白均无变化(图 2、3). 为确定 Bcl-2、Bax 蛋白表达在细胞中的相对含量, 我们测定了 Bcl-2、Bax 蛋白

的光密度值, 结果发现随着一定范围内 IN 浓度增加, Bcl-2/Bax 比率呈逐渐下降趋势(图 4).

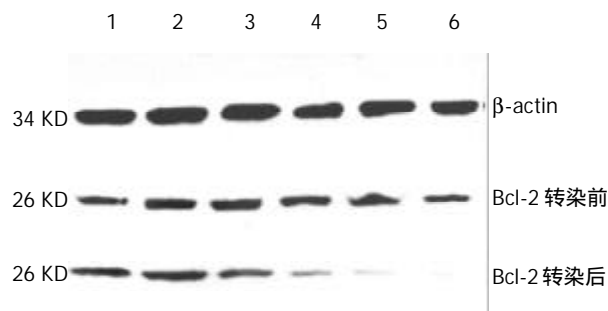


图 2 IN 影响 SW480 细胞转染前后 Bcl-2 蛋白表达. 1: control; 2: DMSO; 3: 100 $\mu\text{mol/L}$ IN; 4: 200 $\mu\text{mol/L}$ IN; 5: 400 $\mu\text{mol/L}$ IN; 6: 600 $\mu\text{mol/L}$ IN.

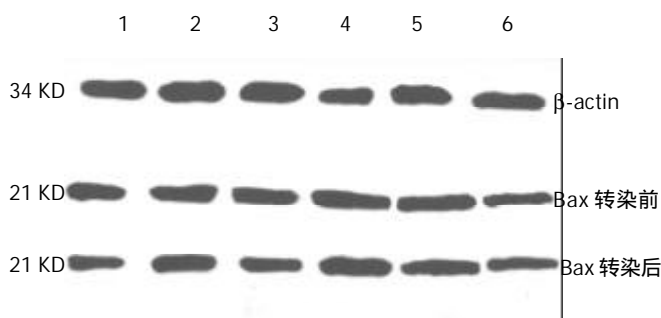


图 3 IN 影响 SW480 细胞转染前后 Bax 蛋白表达. 1: control; 2: DMSO; 3: 100 $\mu\text{mol/L}$ IN; 4: 200 $\mu\text{mol/L}$ IN; 5: 400 $\mu\text{mol/L}$ IN; 6: 600 $\mu\text{mol/L}$ IN.

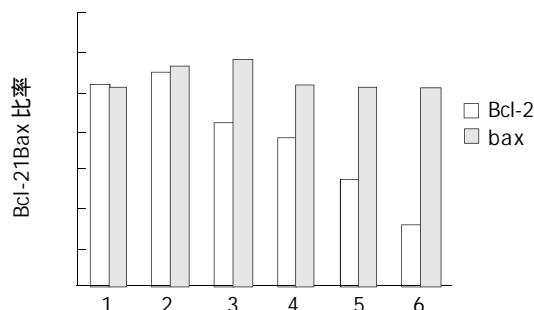


图 4 IN 影响 wtp53/SW480 细胞中 Bcl-2/Bax 比率. 1: control; 2: DMSO; 3: 100 $\mu\text{mol/L}$ IN; 4: 200 $\mu\text{mol/L}$ IN; 5: 400 $\mu\text{mol/L}$ IN; 6: 600 $\mu\text{mol/L}$ IN.

3 讨论

结肠癌中存在高频率的 p53 突变表达, 突变型 p53 既不使细胞生长停滞, 亦不能诱导细胞凋亡, 故结肠肿瘤对常规化疗药物呈现抵抗, 对 DNA 损伤剂的辅助治疗也不很敏感. p53 基因是基因研究中最广泛深入的肿瘤基因之一, 野生型 p53 基因转染结合放射、化疗治疗可明显诱导凋亡, 并减少化疗或放疗的剂量, 减少副作用^[13, 14]. 有作者认为对于存在 p53 突变或缺失的肿瘤, 放、化疗敏感性降低, 甚至不敏感, 可通过基因转染增强其对放、化疗的敏感性^[15-20].

SW480 细胞无自发性凋亡发生, 对非甾体类药物苏林达二硫化物反应呈现一定的凋亡抵抗^[2]. 我们将 wtp53 基因转染至 SW480 细胞, 通过 RT-PCR 证实转染成功后, 不同浓度的 IN 作用于 wtp53/SW480 细胞, 出

现细胞体积缩小, 细胞核体积缩小、固缩, 染色质浓集成块, 靠边, 凋亡小体形成, 从形态学上证实细胞发生了凋亡, 细胞形态及研究结果与 Dai et al^[21]的报道相一致. 未经 IN 处理的 wtp53/SW480 细胞, 72 h 后凋亡细胞的百分率仅为 $5.0 \pm 2.0\%$; 经 IN 处理的 wtp53/SW480 细胞, 随 IN 在一定范围内剂量的增加其凋亡细胞百分率明显增加, 600 $\mu\text{mol/L}$ IN 作用于 wtp53/SW480 细胞 72 h, 其凋亡细胞的百分率为 $60.1 \pm 2.5\%$. 荧光染色及电镜超微结构的变化从形态学上证实 IN 诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡. 我们的实验表明 IN 诱导 SW480 细胞凋亡存在 p53 依赖且呈剂量依赖.

肿瘤生长由细胞增生、生长停滞及细胞凋亡来调节, 随着人们对细胞凋亡的研究深入, 在细胞凋亡调控机制方面, Bcl-2 基因家族是迄今研究最为深入广泛的凋亡调控基因之一. 实验证明, Bcl-2 家族的凋亡调控效应并不要求新的蛋白翻译, 他的作用主要位于蛋白水平. 其家族中包括阻碍细胞死亡和促细胞死亡两组成员, 一般位于细胞质和细胞膜, 许多 BCL-2 相关蛋白包含一个 C-末端^[22]. Bcl-2 蛋白表达产物定位于线粒体膜、核膜和内质网^[23-25], 其主要生理功能是阻抑凋亡; Bax 蛋白为一胞质内蛋白, 与 Bcl-2 蛋白有高度同源性, 为 Bcl-2 抗凋亡效应的拮抗剂. 大多数 Bcl-2 家族蛋白既能自身形成同二聚体, 也能和家族中其他蛋白形成异二聚体^[26-28]. Bax 和 Bcl-2 蛋白形成异二聚体抑制细胞凋亡, 和 Bax 形成同二聚体有促凋亡作用, 但有研究表明 Bcl-2/Bax 比例可能是决定细胞对凋亡刺激信号的敏感性的重要因素之一, Bcl-2/Bax 比例比 Bcl-2/单独作用更为重要^[29,30]. 我们知道在大多数结直肠肿瘤中 Bcl-2 高表达, Bcl-2 蛋白在 p53 阳性肿瘤的表达明显高于 p53 阴性肿瘤. Bcl-2 蛋白在抑制 p53 介导的细胞死亡过程中起作用, 抑制 Bcl-2 有助于抗肿瘤治疗, 在 Bcl-2 基因的 5' 端非编码区存在一个 p53 负反应元件, 他与 p53 蛋白结合形成一个杂合性启动子, 使 p53 转录抑制作用得以发挥, 下调 Bcl-2 蛋白表达, 呈典型的 p53 依赖途径. Bax 基因启动子亦存在 p53 结合的序列, Bax 的表达受 p53 基因的上调, 表明 Bax 基因亦可能是 p53 诱导凋亡途径中的一个下游分子, 提示 p53 直接作用于 Bax 基因促进其转录, 研究表明有 p53 介导的凋亡 50% 需要 Bax 基因的参与^[31]. 因此, 许多研究表明肿瘤细胞的生长停滞和凋亡调控中 p53、p21^{WAF1/CIP1}、Bcl-2 和 Bax 起重要作用^[14].

为了进一步研究非甾体类消炎药 IN 抑制肿瘤细胞增生和诱导凋亡的作用机制, 本研究采用 Western blotting 方法检测了 wtp53 转染 SW480 细胞前后 p21^{WAF1/CIP1}、Bcl-2 和 Bax 蛋白的表达水平. 结果显示, IN 作用于 wtp53/SW480 细胞, 其 Bcl-2 蛋白的表达随一定范围内 IN 浓度的增加而逐渐减弱, Bax 蛋白表达水平无变化, 而在 SW480 细胞中其 Bcl-2 蛋白及 Bax 蛋白水平均无影响, 提示 IN 诱导结肠癌细胞凋亡的过程中依赖 p53 的存在.

测定 Bcl-2, Bax 蛋白的光密度值, 结果发现随着一定范围内 IN 浓度增加, Bcl-2/Bax 比率呈逐渐下降趋势, 结果表明 Bcl-2/Bax 比率下降可能是 IN 诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡的机制之一. 本研究同时发现: IN 作用于 wtp53/SW480 细胞, p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达明显增强, 且随 IN 在一定范围内的浓度增加而逐渐递增, 而在 SW480 细胞中 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白表达水平无变化, p53 转染 SW480 细胞导致 p21^{WAF1/CIP1} 表达水平增高, 二者相互作用, 提示 IN 诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡过程可能存在着 p53 介导 p21^{WAF1/CIP1} 途径. p21^{WAF1/CIP1} 蛋白是细胞周期素依赖激酶抑制剂(cycle-dependent kinase inhibitor, CDK)的主要家族成员之一, 具有与 p53 结合的特异核苷酸序列, 其表达由抑瘤基因 p53 调节^[32-34]. 后者为基因转录调节剂, 能促使 p21^{WAF1/CIP1} 活化^[35, 36]. p21^{WAF1/CIP1} 表达水平的增高可降低细胞周期素依赖激酶(cycle-dependent kinases, CDKs)活性, 导致细胞周期停滞在 G₁ 期, 最终导致细胞凋亡. 本结果提示: IN 通过下调 Bcl-2 蛋白表达, 上调 p21^{WAF1/CIP1} 蛋白的表达来诱导 wtp53/SW480 细胞凋亡, 存在 p53-p21^{WAF1/CIP1} 依赖途径.

4 参考文献

- 1 Shao J, Fujiwara T, Kadowaki Y, Fukazawa T, Waku T, Itoshima T, Yamatsuji T, Nishizaki M, Roth JA, Tanaka N. Overexpression of the wild-type p53 gene inhibits NF-kappaB activity and synergizes with aspirin to induce apoptosis in human colon cancer cells. *Oncogene* 2000;19:726-736
- 2 Richter M, Weiss M, Weinberger I, Furstenberger G, Marian B. Growth inhibition and induction of apoptosis in colorectal tumor cells by cyclooxygenase inhibitors. *Carcinogenesis* 2001; 22:17-25
- 3 Eli Y, Przedecki F, Levin G, Kariv N, Raz A. Comparative effects of indomethacin on cell proliferation and cell cycle progression in tumor cells grown in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol* 2001;61:565-571
- 4 Ricchi P, Zarrilli R, Di Palma A, Acquaviva AM. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs in colorectal cancer: from prevention to therapy. *Br J Cancer* 2003;88:803-807
- 5 Lonnroth C, Andersson M, Lundholm K. Indomethacin and telomerase activity in tumor growth retardation. *Int J Oncol* 2001;18:929-937
- 6 Thurnher D, Bakroeva M, Formanek M, Knerer B, Kornfehl J. Non-steroidal anti-inflammatory drugs inhibit telomerase activity in head and neck squamous carcinoma cell lines. *Head Neck* 2001;23:1049-1055
- 7 Ogino M, Hisatomi H, Murata M. Indomethacin suppresses the growth of colon 26, Meth-A and FM3A tumors in mice by reducing the prostaglandin E2 content and telomerase activity in tumor tissues. *Jpn J Cancer Res* 1999;90:758-764
- 8 Chan TA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, apoptosis, and colon-cancer chemoprevention. *Lancet Oncol* 2002;3:166-174
- 9 Kim TI, Jin SH, Kim WH, Kang EH, Choi KY, Kim HJ, Shin SK, Kang JK. Prolonged activation of mitogen-activated protein kinases during NSAID-induced apoptosis in HT-29 colon cancer cells. *Int J Colorectal Dis* 2001;16:167-173
- 10 Oliver L, Cordel S, Barbieux I, LeCabellec MT, Mefflah K, Gregoire M, Vallette FM. Resistance to apoptosis is increased during metastatic dissemination of colon cancer. *Clin Exp Metastasis* 2002;19:175-180
- 11 Kralj M, Kapitanovic S, Kovacevic D, Lukac J, Spaventi S, Pavelic K. Effect of the nonsteroidal anti-inflammatory drug indomethacin on proliferation and apoptosis of colon carci-

- noma cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:173-179
- 12 Loftin CD, Trivedi DB, Langenbach R. Cyclooxygenase-1-selective inhibition prolongs gestation in mice without adverse effects on the ductus arteriosus. *J Clin Invest* 2002;110:549-557
- 13 Sasaki Y, Morimoto I, Ishida S, Yamashita T, Imai K. Adenovirus-mediated transfer of the p53 family genes, p73 and p51/p63 induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cell lines: potential application to gene therapy of colorectal cancer. *Gene Ther* 2001;8:1401-1408
- 14 Bukholm IK, Nesland JM. Protein expression of p53, p21 (WAF1/CIP1), Bcl-2, Bax, cyclin D1 and pRb in human colon carcinomas. *Virchows Arch* 2000;436:224-228
- 15 Sasaki Y, Morimoto I, Ishida S, Yamashita T, Imai K. Adenovirus-mediated transfer of the p53 family genes, p73 and p51/p63 induces cell cycle arrest and apoptosis in colorectal cancer cell lines: potential application to gene therapy of colorectal cancer. *Gene Ther* 2001;8:1401-1408
- 16 Takahashi A, Ohnishi K, Ota I, Asakawa I, Tamamoto T, Furusawa Y, Matsumoto H, Ohnishi T. p53-dependent thermal enhancement of cellular sensitivity in human squamous cell carcinomas in relation to LET. *Int J Radiat Biol* 2001;77:1043-1051
- 17 Gao N, Hu YD, Cao XY. The exogenous wild-type p14ARF gene induces growth arrest and promotes radiosensitivity in human lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 2001;127:359-367
- 18 Riva CM. Restoration of wild-type p53 activity enhances the sensitivity of pleural metastasis to cisplatin through an apoptotic mechanism. *Anticancer Res* 2000;20:4463-4471
- 19 Bampoe J, Glen J, Hubbard SL, Sallia B, Shannon P, Rutka J, Bernstein M. Adenoviral vector-mediated gene transfer: timing of wild-type p53 gene expression in vivo and effect of tumor transduction on survival in a rat glioma brachytherapy model. *J Neurooncol* 2000;49:27-39
- 20 Badie C, Bourhis J, Sobczak-Thépot J, Haddada H, Chiron M, Janicot M, Janot F, Tursz T, Vassal G. p53-dependent G2 arrest associated with a decrease in cyclins A2 and B1 levels in a human carcinoma cell line. *Br J Cancer* 2000;82:642-650
- 21 Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y. Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system. *Blood* 1999;93:268-277
- 22 Moriishi K, Huang DC, Cory S, Adams JM. Bcl-2 family members do not inhibit apoptosis by binding the caspase activator Apaf-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9683-9688
- 23 Ahmed N, Laverick L, Sammons J. Effect of all-trans retinoic acid on chemotherapy induced apoptosis and down-regulation of Bcl-2 in human myeloid leukaemia CD34 positive cells. *Leuk Res* 1999;23:741-749
- 24 Zwata M, Harada K, Kono N, Kaneko S, Kobayashi K, Nakanuma Y. Expression of Bcl-2 familial proteins is reduced in small bile duct lesions of primary biliary cirrhosis. *Hum Pathol* 2000;31:179-184
- 25 Chou HK, Chen SL, Hsu CT, Chao YC, Tsao YP. Bcl-2 accelerates retinoic acid-induced growth arrest and recovery in human gastric cancer cells. *Biochem J* 2000;348(Pt 2):473-479
- 26 O'Reilly MA, Staversky RJ, Huyck HL. Bcl-2 family gene expression during severe hyperoxia induced lung injury. *Lab Invest* 2000;80:1845-1854
- 27 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Men RP. Expression and significance of proapoptotic gene Bax in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:15-17
- 28 Hoetelmans R, van Slooten HJ, Keijzer R, Erkeland S, van de Velde CJ, Dierendonck JH. Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death Differ* 2000;7:384-392
- 29 Liu HF, Liu WW, Fang DC, Liu FX, He GY. Clinical significance of Fas antigen expression in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 1999;5:90-91
- 30 Zhang G, Tu C, Zhang G, Zhong G. Indomethacin induces apoptosis and inhibits proliferation in chronic myeloid leukemia cells. *Leuk Res* 2000;24:385-392
- 31 Deng Y, Wu X. Peg3/Pw1 promotes p53-mediated apoptosis by inducing Bax translocation from cytosol to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:12050-12055
- 32 Javelaud D, Besancon F. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *J Biol Chem* 2002;277:37949-37954
- 33 Mahyar-Roemer M, Roemer K. p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. *Oncogene* 2001;20:3387-3398
- 34 Kobayashi N, Takada Y, Hachiya M, Ando K, Nakajima N, Akashi MI. TNF-alpha induced p21(WAF1) but not Bax in colon cancer cells WiDr with mutated p53: important role of protein stabilization. *Cytokine* 2000;12:1745-1754
- 35 Loging WT, Reisman D. Elevated expression of ribosomal protein genes L37, RPP-1, and S2 in the presence of mutant p53. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:1011-1016
- 36 Horikoshi N, Cong J, Kley N, Shenk T. Isolation of differentially expressed cDNAs from p53-dependent apoptotic cells: activation of the human homologue of the Drosophila peroxidase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;261:864-869



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,
CA 94588, USA
Fax: +1-925-223-8242
Telephone: +1-925-223-8243
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>



ISSN 1009-3079

