

# 酒石酸锑钾诱导人胃癌细胞凋亡

郭光云, 徐少勇, 邓长生

郭光云, 徐少勇, 鄢阳医学院附属人民医院消化内科 湖北省十堰市 442000  
邓长生, 武汉大学中南医院消化内科 湖北省武汉市 430071  
郭光云, 女, 1971-08-16 生, 湖北省十堰市人, 汉族, 武汉大学在读硕士。  
湖北省教育厅资助项目, No. 2000A43003  
项目负责人: 徐少勇, 442000, 湖北省十堰市, 鄢阳医学院附属人民医院消化内科。xushaoyong195571@sina.com.cn  
电话: 0719-8652119-6208  
收稿日期: 2003-10-09 接受日期: 2003-11-06

## Potassium antimonyl tartrate induces apoptosis in human gastric carcinoma cells

Guang-Yun Guo, Shao-Yong Xu, Chang-Sheng Deng

Guang-Yun Guo, Shao-Yong Xu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China  
Chang-Sheng Deng, Department of Gastroenterology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei Province, China  
Supported by the Education Department Foundation of Hubei Province, No. 2000A43003  
Correspondence to: Shao-Yong Xu, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Yunyang Medical College, Shiyan 442000, Hubei Province, China. xushaoyong195571@sina.com.cn  
Received: 2003-10-09 Accepted: 2003-11-06

## Abstract

AIM: Potassium antimonyl tartrate (PAT), an antiparasitic agent has recently been shown to induce apoptosis of leukaemia cells. Its effects on human gastric cancer SGC-7901 cells and possible mechanism were investigated in this study.

METHODS: The growth inhibition of cells induced by various concentrations of PAT in different time course was analyzed by using MTT assay. The nuclei were stained by Hoechst 33 258 and the morphologic changes were observed by fluorescence microscope. TUNEL staining, double-staining, and flow cytometry were used to detect apoptosis of cells.

RESULTS: SGC-7901 cells' growth inhibitory rates by PAT were significantly different in dose-and time-dependent manners (analysis of variance,  $P < 0.01$ ). Chromatin condensation and nuclear fragmentation were seen under fluorescence microscope in the cells treated with Hoechst 33 258, and apoptotic cells were also detected by flow cytometry and TUNEL staining method.

CONCLUSION: PAT can induce the apoptosis of SGC-7901 cells, and PAT may be a promising apoptosis-inducer in gastric cancer therapy.

Guo GY, Xu SY, Deng CS. Potassium antimonyl tartrate induces apoptosis in human gastric carcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004;12(3):520-522

## 摘要

目的: 用于治疗寄生虫病的酒石酸锑钾能抑制白血病细胞及淋巴瘤细胞生长, 并诱导其凋亡. 本文探讨其对胃癌 SGC-7901 细胞株的作用及可能的机制.

方法: 采用 MTT 法检测不同浓度酒石酸锑钾对胃癌 SGC-7901 细胞的生长抑制作用; 经 Hoechst 33 258 染色后用荧光显微镜观察细胞核的形态变化; DNA 末端原位标记染色法、双染法(annexin-V/PI)和流式细胞术检测细胞凋亡.

结果: 酒石酸锑钾能明显抑制胃癌细胞生长, 抑制作用呈时间和剂量依赖性(方差分析,  $P < 0.01$ ); Hoechst 33 258 染色后荧光显微镜观察细胞核固缩, 呈致密的强荧光; DNA 末端原位标记染色法、流式细胞仪检测均检测到凋亡细胞. 结论: 酒石酸锑钾能诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡. 有望作为一种新的凋亡诱导剂用于胃癌的治疗.

郭光云, 徐少勇, 邓长生. 酒石酸锑钾诱导人胃癌细胞凋亡. 世界华人消化杂志 2004;12(3):520-522

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/520.asp>

## 0 引言

胃癌是威胁人类健康最常见的恶性肿瘤之一<sup>[1-10]</sup>. 近年来随着诊断技术的进步, 使得早期胃癌的治疗取得了满意的疗效<sup>[11-12]</sup>, 可是对中晚期胃癌, 化疗的效果仍较差. 因此, 寻找新的方法治疗胃癌, 延长患者的生存期, 具有重要临床意义<sup>[13-15]</sup>. 研究表明三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病疗效显著, 并能诱导多种实体瘤细胞凋亡<sup>[16]</sup>, 但因具有致癌性及其他副作用而使临床使用受限<sup>[17]</sup>. 新近的研究表明, 酒石酸锑钾曾用于治疗寄生虫感染, 能显著抑制白血病细胞、恶性 B 淋巴细胞生长, 诱导肿瘤细胞凋亡, 而副作用比三氧化二砷小<sup>[18-19]</sup>. 酒石酸锑钾对胃癌细胞的作用尚未见报道, 现探讨如下.

## 1 材料和方法

1.1 材料 酒石酸锑钾(potassium antimonyl tartrate)购自 Sigma-Adrich 公司; Hoechst 33 258 购自 Sigma 公司; 四甲基偶氮唑盐[3-(4, 5-dimethylthiazo-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT]购自北京华美公司; RPMI 1640 培养基、小牛血清购自 Gibco 公司; SGC-7901 胃癌细胞株购自中科院上海细胞生物所; Annexin-V/PI 试剂盒购自 Bender Medsystems 公司. TUNEL 试剂盒购自武汉博士德公司. Olympus BX51 荧光显微镜  $\Sigma$ 960

酶标仪 Coulter Epics XL 流式细胞仪等。

1.2 方法 细胞培养用 RPMI 1640 培养液(含 100 mL/L 小牛血清、100 KU/L 青霉素、100 KU/L 链霉素), 在 37℃, 50 mL/L 的 CO<sub>2</sub> 孵箱中常规培养。取对数生长期的 SGC-7901 胃癌细胞用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化成单细胞悬液, 调整细胞密度为  $3 \times 10^7$  /L, 接种于 96 孔培养板, 每孔加细胞悬液 200  $\mu$ L, 细胞培养 24 h 贴壁后, 加入酒石酸锑钾。设立阴性对照组和实验组, 酒石酸锑钾浓度为(5  $\mu$ mol/L, 10  $\mu$ mol/L, 20  $\mu$ mol/L, 40  $\mu$ mol/L)每组均设立 4 个复孔。培养 24 h, 48 h, 72 h 每孔加入 MTT (5 g/L, PBS 配制) 20  $\mu$ L 再培养 4 h, 吸弃上清, 加入 DMSO 200  $\mu$ L, 震荡 10 min。于酶标仪 490 nm 处测量吸光度 A 值。实验重复 3 次, 取其均值。计算细胞增生的抑制率。细胞生长抑制率=(1- 实验组 A 值)/对照组 A 值  $\times$  100%。

1.2.1 细胞核的变化 取指数生长期的细胞, 以  $1 \times 10^8$  /L 的密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 细胞贴壁后加入 5  $\mu$ mol/L, 10  $\mu$ mol/L, 20  $\mu$ mol/L 酒石酸锑钾及不加药物的阴性对照, 24 h 后吸尽培养液, 加入固定液(甲醇 V: 冰醋酸 V = 3 : 1) 0.5 mL, 固定 10 min, 去固定液, 用 PBS 洗两遍。加入 Hoechst 33 258 (5 mg/L) 染色液 0.5 mL, 染色 5 min。紫外光激发, 荧光显微镜观察并照相。

1.2.2 细胞凋亡的检测 取指数生长期的细胞, 以  $1 \times 10^8$  /L 的密度接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后加入 5  $\mu$ mol/L, 10  $\mu$ mol/L, 20  $\mu$ mol/L 酒石酸锑钾及不加药物的阴性对照。收集药物作用 24 h 后的细胞, 按照试剂盒说明书操作, 用 Annexin-V 和 PI 染色, 流式细胞仪检测。另培养 24 h 后, 40 g/L 多聚甲醛固定 30 min, 按照试剂盒说明书操作。高倍光镜下记数 1 000 个细胞, 计算凋亡指数 (apoptosis index, AI)= 凋亡细胞数 / 总细胞数  $\times$  100%。

统计学处理 采用 SPSS10.0 软件处理系统, 细胞生长抑制率用 F 检验, 细胞凋亡率用  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

2.1 细胞增生抑制率 酒石酸锑钾能有效抑制体外培养的 SGC-7901 细胞生长, 其抑制率随时间延长和浓度升高而升高(<sup>b</sup>P < 0.01 F = 276.81 表 1), 呈时间效应和剂量效应关系。

表 1 酒石酸锑钾对 SGC-7901 细胞的生长抑制率(mean $\pm$ SD, %)

PAT( $\mu$ mol/L)	t/ h		
	24	48	72
5	8.5 $\pm$ 4.4	12.2 $\pm$ 3.3	19.5 $\pm$ 5.2
10	14.2 $\pm$ 5.0	33.4 $\pm$ 4.3	38.4 $\pm$ 5.4
20	25.7 $\pm$ 3.8	47.2 $\pm$ 5.1	54.1 $\pm$ 7.5
40	27.7 $\pm$ 4.0	59.7 $\pm$ 5.5	66.6 $\pm$ 6.0

<sup>b</sup>P < 0.01, F = 276.81.

2.2 细胞核形态特征 酒石酸锑钾作用 24 h 行 Hoechst

33 258 染色后, 在荧光显微镜下观察, SGC-7901 细胞核明显变小, 并可见致密强荧光(图 1)。而对照组细胞所发荧光较弱, 较均匀。

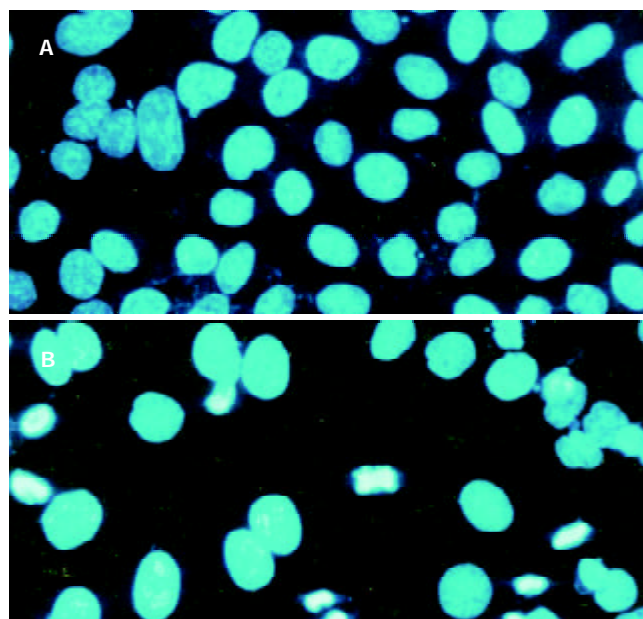


图 1 作用 24 h SGC-7901 细胞核形态  $\times$  400。A: 对照组; B: 酒石酸锑钾。

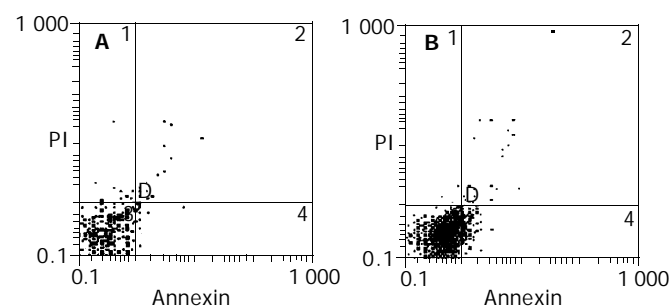


图 2 Annexin V - FITC 和 PI 双染检测 SGC-7901 细胞早期凋亡。A: 对照组; B: 酒石酸锑钾。

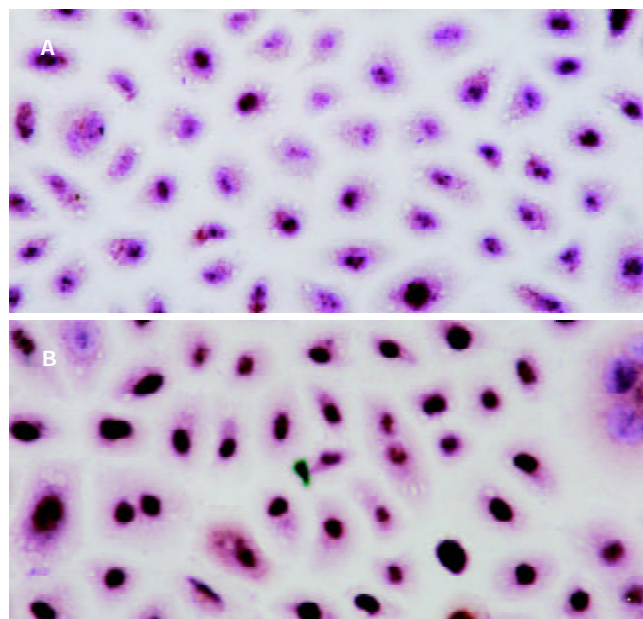


图 3 SGC-7901 细胞凋亡 TUNEL  $\times$  400。A: 对照组; B: 20  $\mu$ mol/L 酒石酸锑钾。

2.3 细胞凋亡检测结果 酒石酸锑钾作用于 SGC7901 细胞, 用 Annexin V 和 PI 染色流式细胞仪检测双参数图上可见对照组细胞主要分布于第三象限(Annexin V - PI-), 酒石酸锑钾处理后细胞分布发生明显改变, 第四象限细胞(Annexin V + PI-)增加, 代表早期凋亡细胞, 第二象限细胞(Annexin V + PI+)分布也增加, 代表坏死细胞(图 2)。酒石酸锑钾处理 SGC7901 细胞 24 h 后, 早期细胞的凋亡率 3.4%, 8.2% 和 12.9%, 呈一定的剂量效应关系。TUNEL 检查细胞核中有棕红色颗粒为阳性细胞(图 3)。细胞的凋亡指数为 7.5%, 16.7%, 38.1%, 阴性对照组为 4.6%, ( $P < 0.01$ ,  $\chi^2 = 47.454$ )。可见在一定时间内, 随着作用浓度增大, 凋亡细胞的百分率也随着增加。

### 3 讨论

凋亡异常在肿瘤发生发展中具有重要作用, 逃避凋亡机制的调控在肿瘤细胞对常规化疗药物耐药中起关键作用。随着凋亡研究的深入, 人们致力于开发新的药物以选择性诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[20]</sup>。酒石酸锑钾能抑制急性早幼粒细胞白血病细胞 NB4 和 NB4R4 生长, 通过降解 PML/PML-RAR $\alpha$  混合蛋白, 而诱导 NB4 和 NB4R4 凋亡。其微摩尔浓度可诱导 NB4, NB4R4 细胞凋亡, 机体能很好耐受而无明显毒副作用, 锑剂与 RA 之间无交叉耐药, 副作用比三氧化二砷小。Lecureur et al<sup>[18]</sup> 研究表明, 酒石酸锑钾能诱导其他白血病细胞(K562, HL60, U937 和 KGLa)凋亡。他可能作用于谷胱甘肽过氧化物酶或巯基, 导致氧化应激, 线粒体跨膜电位下降, 触发细胞凋亡的级联反应; 因诱导的凋亡不能被广谱 caspase 酶的抑制剂所阻滞, 推测凋亡过程可能不需 caspase 酶的激活, 但凋亡诱导因子是否参与凋亡过程尚需研究。Lecureur et al<sup>[19]</sup> 研究亦发现酒石酸锑钾能抑制多种淋巴细胞株的生长, 包括来源于急性淋巴细胞白血病的 Jurkat, Molt-4, Nalm-6 细胞和来源于淋巴瘤 Dudi, Raji, Recl 细胞。并能诱导 Dudi, Jurkat 细胞凋亡。凋亡依赖于 caspase 酶的活性, 并与线粒体跨膜电位下降和细胞内活性氧类物质增多有关。酒石酸锑钾能显著抑制恶性淋巴细胞生长, 而对正常的淋巴细胞无影响。提示酒石酸锑钾诱导凋亡对正常组织的影响小, 使其在治疗血液系统恶性肿瘤中具有一定的应用前景<sup>[18-19]</sup>。

我们发现微摩尔浓度酒石酸锑钾能明显抑制体外培养的胃癌 SGC-7901 细胞的生长, 且其抑制细胞增生在一定范围内, 随酒石酸锑钾的浓度而增加, 作用时间延长, 细胞增生抑制率相应增加, 具有时效及量效关系。通过荧光显微镜观察到酒石酸锑钾作用后, 细胞的染色质浓缩、边聚, 等凋亡的形态改变; 用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的连接素(Annexin V - FITC)和 PI 双染法检测细胞凋亡, 因 Annexin V 能与暴露在凋亡早期细胞膜外表面的磷脂酰丝氨酸特异性结合与其连接的 FITC 发出绿色荧光, 而此时细胞维持膜的完整性, 变性染色质着色的荧光染

料 PI 不能进入细胞; 凋亡晚期及继发性坏死细胞膜失去完整性, 故 FITC 和 PI 双染; 坏死、机械性损伤的细胞只能 PI 与结合。故通过双染可区分早期的凋亡细胞与凋亡晚期坏死、继发性坏死细胞。酒石酸锑钾作用后 SGC-7901 细胞呈典型的凋亡细胞分布图。TUNEL 法亦检测到凋亡细胞。TUNEL 法和 Annexin V /PI 法检测细胞凋亡率有一差别, TUNEL 法检测凋亡率稍高, 可能因为 TUNEL 无法区分死亡细胞与凋亡细胞, 少数坏死细胞也呈阳性染色有关<sup>[3]</sup>。

### 4 参考文献

- Zhou YN, Xu CP, Han B, Li M, Qiao L, Fang DC, Yang JM. Expression of E-cadherin and beta-catenin in gastric carcinoma and its correlation with the clinicopathological features and patient survival. *World J Gastroenterol* 2002;8:987-993
- Song ZJ, Gong P, Wu YE. Relationship between the expression of iNOS, VEGF, tumor angiogenesis and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2002;8:591-595
- 林万隆, 李定国, 陈强, 陆汉民, 马小明, 孙培龙. 奥沙利铂综合治疗胃癌的疗效及机制. *世界华人消化杂志* 2003;11:1535-1539
- 孙利平, 李岩, 张宁, 姜乃佳, 付伟, 薛一雪. MDM2 基因扩增和蛋白表达与胃癌相关性的研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:1800-1801
- 任群, 王振宁, 罗阳, 敖杨, 鲁冲, 姜莉, 徐惠绵, 张学. 胃癌中 18 号染色体的杂合性丢失研究. *世界华人消化杂志* 2003;11:310-313
- 潘传敬, 刘宽宇. 胃癌增生凋亡与调节基因的表达. *世界华人消化杂志* 2003;11:526-530
- Qiu GB, Gong LG, Hao DM, Zhen ZH, Sun KL. Expression of MTLN gene in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:2160-2163
- Ding YB, Chen GY, Xia JG, Zang XW, Yang HY, Yang L. Association of VCAM-1 overexpression with oncogenesis, tumor angiogenesis and metastasis of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1409-1414
- 张晓兵, 刘泽军. 胃癌 DNA 甲基化谱研究进展. *世界华人消化杂志* 2002;10:1454-1457
- Shi H, Xu JM, Hu NZ, Xie HJ. Prognostic significance of expression of cyclooxygenase-2 and vascular endothelial growth factor in human gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:1421-1426
- Zheng HC, Sun JM, Wei ZL, Yang XF, Zhang YC, Xin Y. Expression of Fas ligand and caspase-3 contributes to formation of immune escape in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2003;9:1415-1420
- Yang L, Kuang LG, Zheng HC, Li JY, Wu DY, Zhang SM, Xin Y. PTEN encoding product: a marker for tumorigenesis and progression of gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003;9:35-39
- Sun L, Wang X. Effects of allicin on both telomerase activity and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:1930-1934
- 刘文超, 穆怀兴, 任军, 张学庸, 潘伯荣. 防御素对胃癌细胞系体外的杀伤作用. *世界华人消化杂志* 2001;9:622-626
- Li JY, Wang XZ, Chen FL, Yu JP, Luo HS. Nimesulide inhibits proliferation via induction of apoptosis and cell cycle arrest in human gastric adenocarcinoma cell line. *World J Gastroenterol* 2003;9:915-920
- Wang ZY. Arsenic compounds as anticancer agents. *Cancer Chemother Pharmacol* 2001;48(Suppl 1):S72-76
- Ratnaike RN. Acute and chronic arsenic toxicity. *Postgrad Med J* 2003;79:391-396
- Lecureur V, Lagadic-Gossman D, Fardel O. Potassium antimonyl tartrate induces reactive oxygen species-related apoptosis in human myeloid leukemic HL60 cells. *Int J Oncol* 2002;20:1071-1076
- Lecureur V, Le Thiec A, Le Meur A, Amiot L, Drenou B, Bernard M, Lamy T, Fauchet R, Fardel O. Potassium antimonyl tartrate induces caspase- and reactive oxygen species-dependent apoptosis in lymphoid tumoral cells. *Br J Haematol* 2002;119:608-615
- Kasibhatla S, Tseng B. Why target apoptosis in cancer treatment? *Mol Cancer Ther* 2003;2:573-580