

吲哚美辛和、或顺铂对胃癌细胞凋亡的影响

牛小平, 袁伟建, 张桂英

牛小平, 袁伟建, 张桂英, 中南大学附属湘雅医院消化科
湖南省长沙市 410008
牛小平, 女, 1975-05-05 生, 河南省洛阳市人, 中南大学附属湘雅医院消化科硕士研究生.
湖南省教育厅重点学科建设基金, No. 2002(15)
项目负责人: 袁伟建, 410008, 湖南省长沙市, 中南大学附属湘雅医院消化科. ywj59@hotmail.com
电话: 0731-4327106 传真: 0731-4327106
收稿日期: 2003-11-13 接受日期: 2003-12-29

Effects of indomethacin and/or casplatin on apoptosis of gastric cancer cells

Xiao-Ping Niu, Wei-Jian Yuan, Gui-Ying Zhang

Xiao-Ping Niu, Wei-Jian Yuan, Gui-Ying Zhang, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China
Supported by the Key-Subject Construction Fund of the Department of Education of Hunan Province, No.2002 (15)
Correspondence to: Wei-Jian Yuan, Department of Gastroenterology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China. ywj59@hotmail.com
Received: 2003-11-13 Accepted: 2003-12-29

Abstract

AIM: To investigate the effects of indomethacin (IN) and casplatin (CDDP) on apoptosis of gastric cancer cell line MGC803 and to provide the theoretic basis for gastric cancer therapy.

METHODS: Gastric cancer MGC803 cells were treated with IN and /or CDDP. Proliferation of the cells was detected by using MTT assay. Apoptosis of cells was measured by using fluorescence staining, and cell cycle kinetics by flow cytometry.

RESULTS: Both IN and CDDP were able to restrain the proliferation and induce apoptosis of the cells. There was dose-dependent and time-dependent cell proliferation induced by IN. High concentration of CDDP (10 mg/L) had also the time-effect, but a low dose of CDDP (0.1, 1 mg/L) did not. The percentage of apoptotic cells did not changed after 24h incubation with a low dose of CDDP. There also existed good dose-dependent and time-dependent effects when every concentration of CDDP combined with moderate dose IN (200 μ mol/L). Low dose CDDP with IN had the similar effect to that of high dose CDDP alone.

CONCLUSION: IN and CDDP have the synergistic action when they work together on gastric cancer cell line MGC-803 and perhaps IN can antagonize the chemo-resistance of gastric cancer to other chemical drugs.

Niu XP, Yuan WJ, Zhang GY. Effects of indomethacin and/or casplatin on apoptosis of gastric cancer cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(5):1021-1024

摘要

目的: 探讨吲哚美辛(indomethacin, IN)、顺铂(cisplatin, CDDP)对胃癌细胞株 MGC803 凋亡的影响, 为寻求新的胃癌治疗策略提供理论依据.

方法: MGC803 细胞经 IN、CDDP 处理后, 用 MTT 法检测药物对细胞增生的抑制; 荧光染色检测细胞凋亡率; 流式细胞仪测定细胞周期.

结果: IN、CDDP 均可抑制 MGC803 细胞的增生、并诱导其凋亡; IN对胃癌细胞系 MGC803的作用有较强的量效和时效依赖关系; 高浓度的CDDP (10 mg/L)对此胃癌细胞系有较强的时效依赖关系, 而低浓度的 CDDP (0.1 mg/L, 1 mg/L)在作用 24 h 后, 由于肿瘤细胞的耐药机制, 细胞凋亡率不再发生改变; 中等剂量IN(200 μ mol/L)加各种浓度 CDDP 对此胃癌细胞系也有较强的量效和时效依赖关系, 且加 IN 后, 低浓度的顺铂诱导凋亡作用接近于单独作用组高浓度顺铂的效用.

结论: 吲哚美辛与顺铂对胃癌细胞株 MGC803 有协同作用, IN 可能能够对抗胃癌对化疗药物的耐药.

牛小平, 袁伟建, 张桂英. 吲哚美辛和、或顺铂对胃癌细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(5):1021-1024
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1021.asp>

0 引言

细胞凋亡是一种不同于坏死的生理性死亡方式, 他与胃癌的发生、发展以及对放化疗的敏感性密切相关^[1-4], 研究表明, 大多数化疗药物的主要作用机制在于诱导敏感靶细胞发生凋亡, 对化疗耐药的肿瘤细胞, 其耐药机制除了肿瘤细胞能过度表达 mdrl 编码的 P 糖蛋白增加药物排出外, 还在于能抵抗药物诱导的凋亡^[5-11]. 近年来的研究表明, 非甾体抗炎药(NSAID)对恶性肿瘤尤其是消化系统肿瘤有较好的作用, 其可能机制: 抑制环氧化酶2(COX-2)、诱导细胞凋亡、抗血管生成等^[12-19]. NSAID 对结直肠癌的防治从流行病学观察、动物实验及体外研究均已得到证实^[20-22], 而对于胃癌, 这方面的研究尚处于初始阶段. 诱导癌细胞凋亡是NSAID与细胞毒性药物抗肿瘤共有的作用机制, 二者联合应用可能具有协同作用, 这一点已有人在肝细胞癌的动物实验中得到证实^[23]. 我们通过 MTT、流式细胞仪、荧光染色等方法, 观察吲哚美辛(IN)、顺铂(CDDP)在体外对胃癌细

胞株 MGC-803 凋亡的影响, 并探讨其可能作用机制, 为寻求新的胃癌治疗策略提供试验室依据。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞系 MGC803 购自湘雅医学院细胞中心; 主要试剂: RPMI1640 培养液(GibcoBRL 公司), 小牛血清(杭州四季青公司), 噻唑蓝(MTT, Sigma), 溴乙定(EB, Sigma), γ 吡啶橙(AO, Sigma), 顺铂(山东齐鲁制药厂, 培养基溶), 吡咯美辛(Sigma, 二甲基亚砜溶, 培养基稀释)

1.2 方法 MGC803 培养于含 100 mL/L 灭活小牛血清的 RPMI1640 培养液中, 置 37 °C, 50 mL/L 的 CO₂ 培养箱内培养。

1.2.1 药物对细胞增生的影响 以 5×10^3 /孔接种 MGC803 细胞于 96 孔培养板, 每孔设 3 个复孔, 与终浓度分别为 CDDP 0.1, 1.0, 10.0 mg/L; IN(1)50, 100, 200 μ mol/L; 中等剂量 IN (200 μ mol/L) + 上述各种浓度 CDDP(空白对照: 培养基加生理盐水, 试验对照: MGC803 细胞加生理盐水)。分别共同孵育 12, 24, 48, 72 h 后, 每孔加 20 μ L 的 MTT, 继续培养 4 h, 弃上清, 加 150 μ L 二甲基亚砜(DMSO)使 MTT 结晶完全溶解, 酶联免疫检测分析仪测定 570 nm 处的吸光度 A 值(A_{570nm}), 并计算该浓度下的抑制率 = [(对照组 A_{570nm} - 试验组 A_{570nm}) / 对照组 A_{570nm}] \times 100%, 根据回归计算各组半抑制浓度。

1.2.2 药物对细胞周期的影响 将终浓度分别为 CDDP 0.1, 1.0 mg/L, 10.0 mg/L; IN50, 100, 200 μ mol/L, 与 MGC803 细胞共同作用 48 h 后, 常规消化细胞, 离心, PBS 洗 2 次, 每管加入 700 mL/L 的冰乙醇 1-1.5 mL, 使每个样品含细胞数至少 10^6 个, -20 °C 固定 3 d 后, 经流式细胞仪测定细胞周期中不同时相的细胞数。

1.2.3 药物对细胞凋亡的作用 将细胞与终浓度分别为 CDDP0.1, 1, 10.0 mg/L; IN50, 100, 200 μ mol/L; IN(200 μ mol/L) + 上述各浓度的 CDDP 组分别作用 12, 24, 48 h, 将各组细胞全部收集离心, 弃上清加入 PBS 洗 3 次, 分别制成细胞悬液, 加入终浓度均为 100 mg/L 的 AO, EB, 充分混匀, 滴于玻片上, 分别计数至少 200 个细胞的凋亡比率。早期凋亡细胞核染色质着绿色, 呈固缩状或圆珠状。晚期凋亡细胞核染色质着桔红色, 呈固缩状或破裂状。坏死细胞核染色质着桔红色, 呈正常细胞结构。活细胞核染色质着绿色, 呈正常细胞结构^[24]。

2 结果

2.1 药物对胃癌细胞增生的影响 MTT 法测定各组药物对 MGC803 细胞株抑制作用, 并绘制时效依赖曲线。各浓度 IN 对胃癌细胞株 MGC803 的作用具有时间依赖性, 随着时间的延长, 吸光值减少, 表明活细胞数减少, 细胞增生受抑(图 1)。除高浓度(10.0 mg/L)的 CDDP 组曲线

有明显的持续下降趋势外, 低浓度(0.1, 1.0 mg/L) 的 CDDP 组两条曲线在作用 24 h 后均无明显下降趋势(图 2)。200 μ mol/L 的 IN 加各浓度的 CDDP 后各条曲线均可看到明显的持续下降趋势(图 3)。

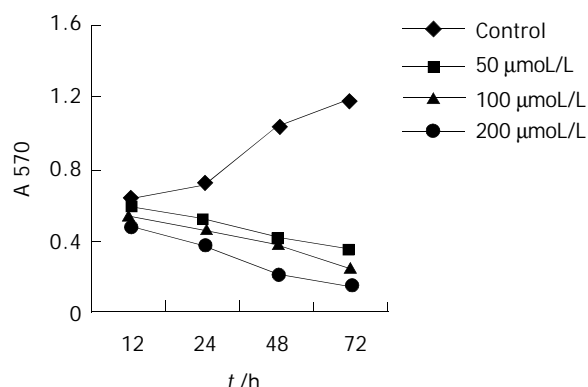


图 1 IN 对胃癌细胞 MGC803 作用。

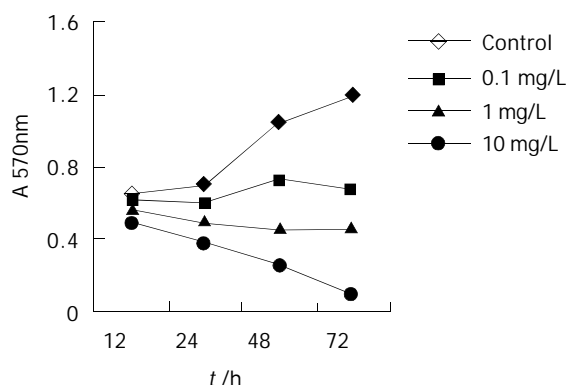


图 2 CDDP 对胃癌细胞 MGC803 作用。

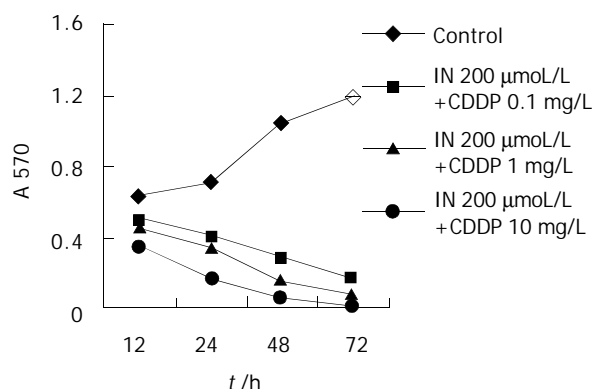


图 3 IN (200 μ mol/L) 加 CDDP 对 MGC803 作用。

2.2 药物对胃癌细胞周期的影响 MGC803 细胞经不同浓度的 IN、CDDP 作用 48 h 后, 细胞周期均发生明显的改变。IN 作用后表现为, G₀/G₁ 期细胞比例增加, S 期及 G₂/M 期下降; CDDP 作用后表现为, S 期增加, G₂/M 期下降。CDDP 和 IN 对细胞周期的影响均具有明显的量效依赖关系(表 1-2)。

2.3 药物对胃癌细胞凋亡的影响 荧光染色计算凋亡细胞数可发现, IN 对 MGC803 细胞凋亡具有明显的浓度、时间依赖性, 随着药物浓度的增加及时间的延

长, 凋亡率明显增加. 高浓度的 CDDP 细胞凋亡率随时间明显增加, 而低浓度的 CDDP (0.1, 1 mg/L) 作用于胃癌细胞 24 h 后, 细胞凋亡率不再发生改变. 中等剂量的 IN (200 μ mol/L) 加各浓度的顺铂作用后, 凋亡率随时间明显增加, IN 加小剂量的 CDDP 后, 细胞凋亡率接近于较大剂量顺铂(图 4).

表 1 IN 对 MGC803 细胞周期的影响

浓度(μ mol/L)	G0/G1	S	G2/M
0	0.58	0.30	0.11
50	0.67	0.23	0.10
100	0.72	0.18	0.09
200	0.80	0.15	0.04

表 2 CDDP 对 MGC803 周期的影响

浓度(mg/L)	G0/G1	S	G2/M
0	0.58	0.30	0.11
0.1	0.51	0.38	0.12
10	0.51	0.40	0.08
100	0.53	0.47	0.00

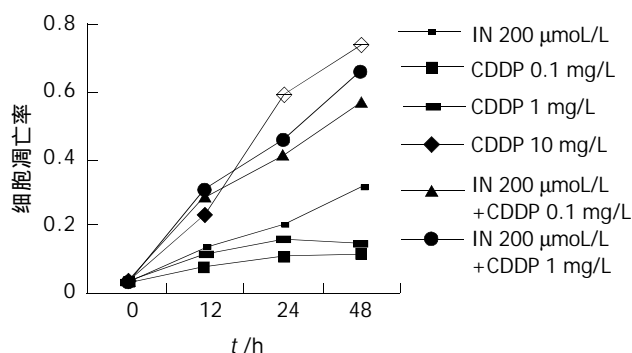


图 4 IN, CDDP 诱导胃癌细胞株 MGC803 凋亡.

3 讨论

胃癌化学治疗的主要作用机制为诱导肿瘤细胞凋亡, 诱导凋亡能力的强弱与化疗敏感性密切相关, 在化疗基础上辅以促凋亡药物可显著提高胃癌的化疗敏感性^[25]. NSAID 长期用于风湿、类风湿疾病的治疗, 近些年研究表明, 常规服用 NSAID 可显著降低消化系统恶性肿瘤的发病率和死亡率. 诱导癌细胞凋亡是 NSAID 与细胞毒性药物抗肿瘤共有的作用机制, 在常规化疗基础上辅以 NSAID 可增强治疗效果, 这在结肠癌的体内、体外试验中均已得到证实^[26]. Ogino et al^[27]通过对子宫颈癌细胞的体外研究发现, IN 对 CDDP, 5-FU 等化疗药物具有增效作用, 这些化疗药物与 IN 合用后, 其在细胞内的浓度与未加 IN 组相比, 明显增加. 也有人通过对胶质瘤、肺癌的研究发现, 虽然 IN 可增加其他一些化疗药物如阿霉素、长春新碱等的细胞毒作用, 但对 CDDP 无影响. 我们采用体外细胞培养的

方法, 观察 IN、CDDP 对胃癌细胞株 MGC803 增生和凋亡的影响. 研究发现, IN 对 CDDP 具有协同、增效作用; 经 IN 处理的 MGC803 细胞, 生长明显受抑, 其抑制率与 IN 的浓度和作用时间有相关性, 表明 IN 能有效地抑制 MGC803 细胞的生长, 提示可能会在胃癌的治疗中发挥作用. 经 CDDP 处理的 MGC803 细胞, 高浓度组 (10 mg/L) 有较好的时间相关性, 低浓度组 (0.1, 1 mg/L) 在药物作用 24 h 后, 对细胞增生的抑制作用逐渐丧失, 这可能与肿瘤细胞的耐药机制有关. CDDP 加 IN 处理后, 有较好的时效、浓度相关性, 且小剂量 CDDP 加 IN 后, 接近于大剂量 CDDP 的效用, IN 对 CDDP 具有协同、增效作用, 这与上述文献报道基本一致.

近些年来研究表明, 某些肿瘤细胞凋亡存在细胞周期的特异性, 表现为不同因素诱导的细胞凋亡发生在细胞周期的不同时期, 这类细胞凋亡的发生, 往往是细胞先被阻滞在细胞周期的某一时相, 然后发生细胞凋亡. 许多抗肿瘤药物正是通过诱导细胞周期特异性细胞凋亡, 达到治疗目的. 我们的研究发现, IN 处理后的胃癌细胞株 MGC803, 经流式细胞仪检测发现, 细胞周期发生了变化, 其中 G0/G1 期细胞比例增加, S 期及 G2/M 期下降, 说明 IN 作用在 S 期和 G2/M 期, 使 G0/G1 期细胞堆积, 这与有关文献研究结果相一致^[28-29]. MGC803 细胞经 CDDP 处理后, S 期增加, G2/M 期下降, 说明细胞受阻于 S 期, 不能进入 G2/M 期. IN 和 CDDP 分别作用于 MGC803 细胞周期的不同位点, 可能是 IN 对 CDDP 具有协同、增效作用原因之一.

肿瘤细胞对 CDDP 的耐药机制目前尚不十分清楚, 有研究表明, 化疗药物产生耐药的原因之一是化疗药物接触肿瘤细胞后可诱导肿瘤细胞 COX-2 表达增加, 进而诱导抗凋亡基因 Bcl-2 的表达. 在传统的化疗方案中联合应用 NSAID 可阻断这一耐药机制, 提高化疗疗效. Zhou et al^[30]报道了 IN 尚可通过上调胃癌细胞 bax、bak 的表达以及激活 caspase-3 而发挥抗肿瘤效果. 新近研究还表明, 胃癌细胞对 CDDP 的耐药机制之一是 CDDP 可诱导凋亡抑制基因家族 (IAP) 的新成员 survivin 的表达增加^[31-32]. 本研究显示, 随着作用时间的延长, MGC803 细胞对低剂量的 CDDP 易产生耐药, 而低剂量 CDDP 加 IN 后, 抑制胃癌细胞增生、诱导凋亡作用明显增加, 接近于大剂量 CDDP. 这可能与 IN 能够拮抗化疗药物诱导 COX-2 的表达有关. 此外, IN 是否能抑制胃癌细胞 survivin 的表达, 尚有待于进一步研究.

总之, 本实验发现 IN 能有效抑制胃癌细胞株 MGC803 的增生, 对 CDDP 有协同、增效作用, 能有效地克服胃癌细胞对低浓度 CDDP 的耐药的发生, 且 IN 价格低廉, 药源充分, 深入研究其作用机制和体内抗癌剂量, 以减少化疗药物的用量、提高疗效、减少药物的毒副作用, 无疑具有重大的临床意义.

4 参考文献

- 1 Xia HH, Talley NJ. Apoptosis in gastric epithelium induced by helicobacter pylori infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am J Gastroenterol* 2001;96:16-26
- 2 Wu K, Li Y, Zhao Y, Shan YJ, Xia W, Yu WP, Zhao L. Roles of Fas signaling pathway in vitamin E succinate-induced apoptosis in human gastric cancer SGC-7901 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:982-986
- 3 Liu LX, Liu ZH, Jiang HC, Qu X, Zhang WH, Wu LF, Zhu AL, Wang XQ, Wu M. Profiling of differentially expressed genes in human gastric carcinoma by cDNA expression array. *World J Gastroenterol* 2002;8:580-585
- 4 Zhou HB, Zhu JR. Paclitaxel induces apoptosis in human gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2003;9:442-445
- 5 陈春燕, 朱兆华. 胃癌 P-糖蛋白表达与化疗效果相关. *世界华人消化杂志* 2003;11:36-38
- 6 Yang JY, Luo HY, Lin QY, Liu ZM, Yan LN, Lin P, Zhang J, Lei S. Subcellular daunorubicin distribution and its relation to multidrug resistance phenotype in drug-resistant cell line SMMC-7721/R. *World J Gastroenterol* 2002;8:644-649
- 7 Wang H, Chen XP, Qiu FZ. Overcoming multi-drug resistance by anti-MDR1 ribozyme. *World J Gastroenterol* 2003;9:1444-1449
- 8 Nakamura M, Tsuji N, Asanuma K, Kobayashi D, Yagihashi A, Hirata K, Torigoe T, Sato N, Watanabe N. Survivin as a predictor of cis-diamminedichloroplatinum sensitivity in gastric cancer patients. *Cancer Sci* 2004;95:44-51
- 9 Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 2003;22:3138-3151
- 10 Chang Q, Liu ZR, Wang DY, Kumar M, Chen YB, Qin RY. Survivin expression induced by doxorubicin in cholangiocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2004;10:415-418
- 11 Zaffaroni N, Pennati M, Colella G, Perego P, Supino R, Gatti L, Pilotti S, Zunino F, Daidone MG. Expression of the anti-apoptotic gene survivin correlates with taxol resistance in human ovarian cancer. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:1406-1412
- 12 李建英, 于皆平, 罗和生, 余保平, 黄杰安. 非甾体抗炎药对胃癌 SGC7901 细胞增生及环氧化酶活性的影响. *世界华人消化杂志* 2002;10:262-265
- 13 Leng J, Han C, Demetris AJ, Michalopoulos GK, Wu T. Cyclooxygenase-2 promotes hepatocellular carcinoma cell growth through Akt activation: evidence for Akt inhibition in celecoxib-induced apoptosis. *Hepatology* 2003;38:756-768
- 14 Wu YL, Sun B, Zhang XJ, Wang SN, He HY, Qiao MM, Zhong J, Xu JY. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:796-800
- 15 Tian G, Yu JP, Luo HS, Yu BP, Yue H, Li JY, Mei Q. Effect of nimesulide on proliferation and apoptosis of human hepatoma SMMC-7721 cells. *World J Gastroenterol* 2002;8:483-487
- 16 Wu GS, Zou SQ, Liu ZR, Tang ZH, Wang JH. Celecoxib inhibits proliferation and induces apoptosis via prostaglandin E2 pathway in human cholangiocarcinoma cell lines. *World J Gastroenterol* 2003;9:1302-1306
- 17 Amin R, Kamitani H, Sultana H, Taniura S, Islam A, Sho A, Ishibashi M, Eling TE, Watanabe T. Aspirin and indomethacin exhibit antiproliferative effects and induce apoptosis in T98G human glioblastoma cells. *Neurol Res* 2003;25:370-376
- 18 Moody TW, Leyton J, Zakowicz H, Hida T, Kang Y, Jakowlew S, You L, Ozbun L, Zia H, Youngberg J, Malkinson A. Indomethacin reduces lung adenoma number in A/J mice. *Anticancer Res* 2001;21:1749-1755
- 19 Connolly EM, Harmey JH, O'Grady T, Foley D, Roche-Nagle G, Kay E, Bouchier-Hayes DJ. Cyclo-oxygenase inhibition reduces tumour growth and metastasis in an orthotopic model of breast cancer. *Br J Cancer* 2002;87:231-237
- 20 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
- 21 Falkowski M, Skogstad S, Shahzidi S, Smedsrod B, Sveinbjornsson B. The effect of cyclooxygenase inhibitor diclofenac on experimental murine colon carcinoma. *Anticancer Res* 2003;23:2303-2308
- 22 Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 2002;531:278-284
- 23 Li XH, Li XK, Cai SH, Tang FX, Zhong XY, Ren XD. Synergistic effects of nimesulide and 5-fluorouracil on tumor growth and apoptosis in the implanted hepatoma in mice. *World J Gastroenterol* 2003;9:936-940
- 24 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用. *世界华人消化杂志* 2000;8:532-535
- 25 马韬, 朱正纲. 胃癌化疗与细胞凋亡研究进展. *国外医学·消化系统疾病分册* 2003;23:15-18
- 26 Hattori K, Matsushita R, Kimura K, Abe Y, Nakashima E. Synergistic effect of indomethacin with adriamycin and cisplatin on tumor growth. *Biol Pharm Bull* 2001;24:1214-1217
- 27 Ogino M, Minoura S. Indomethacin increases the cytotoxicity of cis-platinum and 5-fluorouracil in the human uterine cervical cancer cell lines SKG-2 and HKUS by increasing the intracellular uptake of the agents. *Int J Clin Oncol* 2001;6:84-89
- 28 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
- 29 Detjen KM, Welzel M, Wiedenmann B, Rosewicz S. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit growth of human neuroendocrine tumor cells via G1 cell-cycle arrest. *Int J Cancer* 2003;107:844-853
- 30 Zhou XM, Wong BC, Fan XM, Zhang HB, Lin MC, Kung HF, Fan DM, Lam SK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak. *Carcinogenesis* 2001;22:1393-1397
- 31 Ikeguchi M, Liu J, Kaibara N. Expression of survivin mRNA and protein in gastric cancer cell line (MKN-45) during cisplatin treatment. *Apoptosis* 2002;7:23-29
- 32 Ikeguchi M, Nakamura S, Kaibara N. Quantitative analysis of expression levels of bax, bcl-2, and survivin in cancer cells during cisplatin treatment. *Oncol Rep* 2002;9:1121-1126