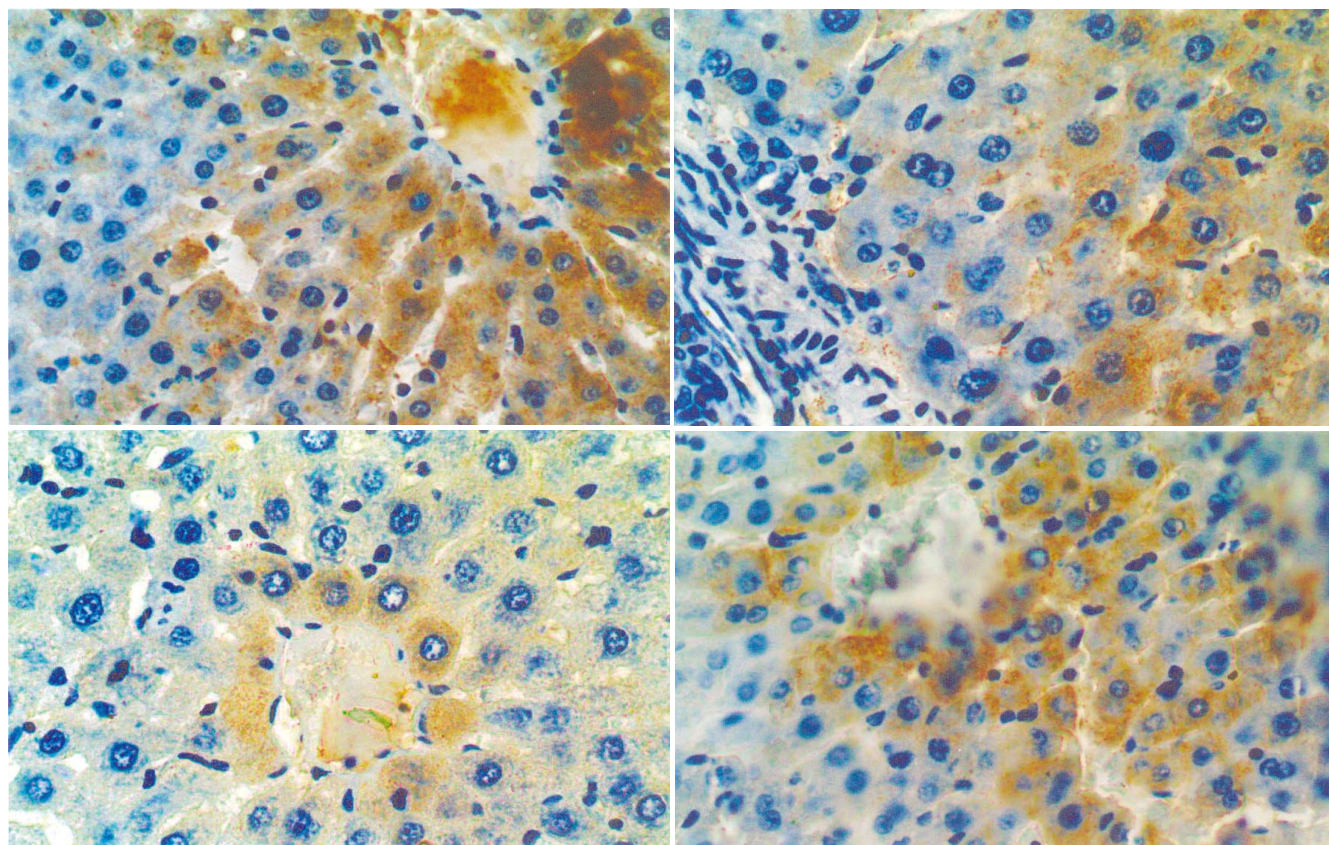


世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2005 年 10 月 15 日 第 13 卷 第 19 期 (Volume 13 Number 19)



19/2005

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,
俄罗斯《文摘杂志》收录.

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

目次

2005年10月15日

第13卷

第19期

(总第147期)

述评

- 2289 胃癌表遗传学的研究进展 滕玥, 戴冬秋
2294 胃肠癌术后应用抗生素致伪膜性肠炎 马振海, 戴冬秋, 徐惠绵

基础研究

- 2297 谷氨酰胺对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时肝组织谷胱甘肽含量和Bcl-2、Bax蛋白表达的影响
贾昌俊, 戴朝六, 张旭, 徐锋, 崔凯, 许永庆
2302 生存素siRNA表达质粒对MGC-803细胞增殖的影响
赵伟红, 郭俊明, 肖丙秀, 管忠, 肖东升
2306 人F3-GRIM19基因的克隆与表达 孙厚良, 刘洋, 李甲初, 曾昭淳
2310 解偶联蛋白-2在大鼠非酒精性脂肪肝中的表达
顾小红, 张云东, 冯爱娟
2314 COX-2在Barrett食管和食管腺癌中的表达及意义
刘心娟, 王邦茂, 阎雪燕, 刘文天, 吕宗舜, 张洁
2318 奥曲肽联合汉防己甲素对人胃癌细胞增殖的影响
王龙, 朱金水, 陈维雄, 朱励, 达伟, 王秀玲
2323 EB潜伏膜蛋白表达与肠上皮化生胃黏膜幽门螺杆菌感染的相关性
刘东屏, 于继红, 李茵茵, 王炳元
2327 瘦素及硬脂酰CoA去饱和酶-1在高脂饮食大鼠非酒精性脂肪肝发病中的作用
陆元善, 范建高, 方继伟, 丁晓东, 杨兆瑞
2332 从肠肌间神经丛抑制性神经递质的改变探讨IBS不同亚型的发病机制
徐俊荣, 罗金燕, 尚磊, 孔武明

临床研究

- 2339 便秘型肠易激综合征结肠黏膜组织蛋白质组双向凝胶电泳分析
彭丽华, 杨云生, 孙刚, 王巍峰
2343 生理盐水冲洗提高多层CT门脉造影图像质量的临床研究 肖亮, 徐克

文献综述

- 2349 与胃癌相关的DNA甲基化研究进展 张晔, 袁媛
2355 胃肠黏膜抗损伤和修复新进展 王玮, 孙梅
2360 钙和维生素D预防结直肠癌的机制及其临床应用 陆嵘, 房静远
2364 重症急性胰腺炎并发肾损害的发病机制 张喜平, 王蕾

研究快报

- 2371 应用抑制性消减杂交技术克隆乙型肝炎病毒DNA PTP1的反式调节基因
高学松, 成军, 甄真, 郭江, 张黎颖, 陶明亮
2375 活血健脾补肾法对结肠炎小鼠结肠组织TNF- α 及其mRNA表达的影响
张永锋, 陈如山, 吴正治, 李明, 陈曼茵
2378 蜜调通关散及其拆方对家兔肠道作用机制 梁劲军, 黄阳勇, 庆方
2381 复方甘草甜素下调细胞周期素依赖性激酶1启动子表达
王志凌, 成军, 张连峰, 邵凤娟, 刘蔚, 刘妍, 陶明亮

临床经验

- 2386 内镜下双重色素法联合超声内镜对食管早期癌及癌前病变的诊断价值
刘一品, 黄留业, 李延青
2389 中医药对乙型肝炎患者肝癌前期状态的干预17例
屠红, 张菁, 成伟中, 韩镭, 陆敏, 曹宏伟, 陈复华, 耿沁
2392 奥沙拉秦钠对溃疡性结肠炎一氧化氮合酶表达的影响 郝俊鸣, 江学良, 佟艳铭
2395 应用SELDI-TOF-MS技术建立直肠癌筛选血清蛋白质指纹图谱模型
闫志勇, 钱冬萌, 丁守怡, 宋旭霞, 王斌
2398 消化道肿瘤CT动脉造影分析83例 朱晓玲, 冯妹婷
2401 脐血与新鲜冰冻血浆治疗慢性重型肝炎的疗效比较
卢家桀, 唐红, 王晓辉, 刘真真, 叶慧

致 谢	2404 致谢世界华人消化杂志编委
消 息	2293 欢迎订阅2006年《世界华人消化杂志》 2301 第11届全国中西医结合结直肠肛门病学术会议征文通知 2309 2006年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行 2317 第一届全国临床营养支持学术会议通知 2326 2006年即将召开的国际会议 2331 消化道肿瘤外科治疗2006高级论坛征文通知 2338 《世界华人消化杂志》欢迎投稿 2348 WJG和世界华人消化杂志全文网站免费开通 2363 首届北京地坛感染病学术会议 2385 2006年第5届全国肝脏疾病学术研讨会议征文通知
封面故事	贾昌俊, 戴朝六, 张旭, 徐锋, 崔凯, 许永庆. 谷氨酰胺对大鼠肝脏缺血再灌注损伤时肝组织谷胱甘肽含量和 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(19):2297-2301 http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2297.asp
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005 American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005 ISGCON 2005 November 11-15, 2005 isgcon2005@yahoo.co.in isgcon2005.com Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 www.asge.org/education II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 gec@stradini.lv www.gastroenterologs.lv 2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 c.chase@imedex.com www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm 10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 isde@sapmea.asn.au www.isde.net

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
(半月刊)

创 刊 1993-01-15
改 刊 1998-01-25
出 版 2005-10-15
原刊名 新消化病学杂志

名 誉 总 编 辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生
编 辑 部 主 任 张海宁 中文 编 辑 潘伯荣 张海宁
英 文 编 辑 张海宁 排 版 校 对 张敏 张勇 李琪

编辑 世界华人消化杂志编辑委员会
030001, 山西省太原市双塔西街77号
出版 世界胃肠病学杂志社
100023, 北京市2345信箱
E-mail: wcjd @ wjgnet.com
<http://www.wjgnet.com>
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893
印刷 北京科信印刷厂
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, 北京市399信箱)
订购 全国各地邮电局
邮购 世界胃肠病学杂志社发行部
(100023, 北京市2345信箱)
电话: 010-85381901
传真: 010-85381893

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.

特别声明

本刊刊出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. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.

2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有

ISSN 1009-3079
CN 14-1260/R

邮发代号 82-262
国外代号 M 4481

国内定价
每期24.00元 全年576.00元

广告经营许可证
1401004000050

www.wjgnet.com

World Chinese Journal of Digestology

October 2005 Contents in Brief Volume 13 Number 19

EDITORIAL

Advancement in research of gastric cancer epigenetics

Teng Y, Dai DQ 2289

Pseudomembrane colitis induced by usage of antibiotic after gastric intestinal cancer operation

Ma ZH, Dai DQ, Xu HM 2294

BASIC RESEARCH

Effects of glutamine on glutathione content and expression of Bcl-2 and Bax protein during hepatic ischemia and reperfusion injury in rats

Jia CJ, Dai CL, Zhang X, Xu F, Cui K, XU YQ 2297

Effects of survivin siRNA expression plasmid on proliferation of MGC-803 cells

Zhao WH, Guo JM, XIAO BX, Guan Z, Xiao DS 2302

Cloning and expression of human F3-GRIM19 gene

Sun HL, Liu Y, Li JC, Zeng ZC 2306

Expression of uncoupling protein 2 in nonalcoholic fatty liver of rats

Gu XH, Zhang YD, Feng AJ 2310

Expression of COX-2 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma and its significance

Liu XJ, Wang BM, Yan XY, Liu WT, LV ZS, Zhang J 2314

Inhibitory effects of tetrandrine combined with octreotide on proliferation of gastric cancer cell lines cultured *in vitro*

Wang L, Zhu JS, Chen WX, Zhu L, Da W, Wang XL 2318

Relationship between expression of Epstein-Barr virus latent membrane protein and *H pylori* infection in gastric mucosa with intestinal metaplasia

Liu DP, Yu JH, Li YY, Wang BY 2323

Roles of leptin and stearyl-CoA desaturase-1 in pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease induced by a fat-rich diet

Lu YS, Fan JG, Fang JW, Ding XD, Yang ZR 2327

Role of inhibitory neurotransmitter of myoenteric plexus in carcinogenesis of irritable bowel syndrome with different subtypes

Xu JR, Luo JY, Shang L, Kong WM 2332

CLINICAL RESEARCH

Proteomic analysis of colonic mucosa by two-dimensional gel electrophoresis in constipation-predominant irritable bowel syndrome

Peng LH, Yang YS, Sun G, Wang WF 2339

Clinical application of normal saline flush in multi-detector CT photography on portal vein

Xiao L, Xu K 2343

REVIEW

Advancement in research of gastric cancer related DNA methylation

Zhang Y, Yuan Y 2349

New advancement in rehabilitation and anti-damage of gastric intestinal mucosa

Wang W, Sun M 2355

Mechanism and clinical usage of calcium and vitamin D in prevention of rectal cancer

Lu R, Fang JY 2360

Mechanism of severe acute pancreatitis combined with renal damage

Zhang XP, Wang L 2364

BRIEF REPORT

Cloning of hepatitis B virus DNA PTP1 transactivating genes by suppression subtractive hybridization technique

Gao XS, Cheng J, Zhen Z, Guo J, Zhang LY, Tao ML 2371

Effects of *Huoxue*, *Jianpi* and *Bushen* recipe on expression of TNF- α and its mRNA in mice with colitis

Zhang YF, Chen RS, Wu ZZ, Li M, Chen MY 2375

Effects of *Mitiao Tongguansan* decoction and its different ingredients on function of intestinal tract in rabbits

Liang JJ, Huang YY, Qing F 2378

Down-regulatory effects of glycyrrhizin on expression of cyclin-dependent kinase 1 gene promoter

Wang ZL, Cheng J, Zhang LF, Shao FJ, Liu W, Liu Yan, Tao ML 2381

CLINICAL PRACTICE

Evaluation of double staining combined with endosonography in detection of early esophageal cancer and precancerous lesions

Liu YP, Huang LY, Li YQ 2386

Traditional Chinese Medicine intervention for development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B: an analysis of 17 cases

Tu H, Zhang J, Cheng WZ, Han L, Lu M, Cao HW, Chen FH, Geng Q 2389

Effects of olsalazine sodium on expression of nitric oxide synthase in patients with ulcerative colitis: an analysis of 36 cases

Hao JM, Jiang XL, Tong YM 2392

Establishment of serum protein pattern model for screening rectal carcinoma by SELDI-TOF-MS

Yan ZY, Qian DM, Ding SY, Song XX, Wang B 2395

Analysis of artery computed tomography angiography for digestive tumor in 83 cases

Zhu XL, Feng ST 2398

Indexed/Abstracted by Chemical Abstracts, EMBASE/ Excerpta Medica and Abstract Journals

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

World Chinese Journal of Digestology Monthly
Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date October 15, 2005

Honorary-Editor-in-Chief

Bo-Rong Pan

President and Editor-in-Chief

Lian-Sheng Ma

Edited by Editorial Board of

World Chinese Journal of Digestology
PO Box 2345, Beijing 100023, China

Published by The WJG Press

PO Box 2345, Beijing 100023, China

Overseas Distributor

China International Book Trading Corporation
PO Box 399, Beijing 100044, China

Code No.M4481

Mail-Order Circulation Section, The WJG Press
PO Box 2345, Beijing 100023, China

Telephone: +86-10-85381901

Fax: +86-10-85381893

Email: wcjd @ wjgnet.com

http://www.wjgnet.com

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

Copyright © 2005 by The WJG Press

奥曲肽联合汉防己甲素对人胃癌细胞增殖的影响

王 龙, 朱金水, 陈维雄, 朱 励, 达 炜, 王秀玲

王龙, 朱金水, 陈维雄, 朱励, 达炜, 上海交通大学附属上海市第六人民医院消化科 上海市 200233

王秀玲, 上海交通大学附属新华医院消化科 上海市 200092

王龙, 男, 1971-10-09生, 陕西省泾阳县人, 汉族, 1997年上海第二医科大学硕士研究生, 主治医师, 目前为上海交通大学博士研究生, 主要从事胃癌的基础和临床研究。

通讯作者: 王龙, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属上海市第六人民医院消化科。 wanglonglong@smmail.cn

电话: 021-64369181-8969, 8970 传真: 021-64837019

收稿日期: 2005-08-10 接受日期: 2005-08-25

Inhibitory effects of tetrandrine combined with octreotide on proliferation of gastric cancer cell lines cultured *in vitro*

Long Wang, Jin-Shui Zhu, Wei-Xiong Chen, Li Zhu, Wei Da, Xiu-Ling Wang

Long Wang, Jin-Shui Zhu, Wei-Xiong Chen, Li Zhu, Wei Da, Department of Gastroenterology, the Sixth Affiliated Shanghai People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China

Xiu-Ling Wang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Shanghai Xinhua Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200092, China

Correspondence to: Dr. Long Wang, Department of Gastroenterology, the Sixth Affiliated Shanghai People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, 600 Yishan Road, Shanghai, 200233, China. wanglonglong@smmail.cn

Received: 2005-08-10 Accepted: 2005-08-25

Abstract

AIM: To observe the inhibitory effects of tetrandrine (Tet), octreotide alone and in combination on the gastric cancer cell lines cultured *in vitro*, and to explore their possible mechanisms.

METHODS: The human gastric cell lines SGC7901 and MKN45 were cultured *in vitro*. The influences of Tet, octreotide alone and in combination on both kinds of the cells were observed by MTT spectrophotometry, and their effects on the concentration of cytosolic free Ca^{2+} were measured by Fura-2/AM.

RESULTS: Octreotide at high concentrations such as 2.4×10^{-5} , 2.4×10^{-6} mol/L, and Tet at concentrations of 10-160 $\mu\text{mol/L}$ significantly inhibited the proliferation of SGC7901 and MKN45 cells, and the inhibitory rates (IR) were 40.76%, 23.2% and 30.5-70.0% for the former, respectively, and 24.9%, 21.7% and 20.4-79.01% for the latter, respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Different

concentrations of octreotide (2.4×10^{-6} , 2.4×10^{-9} , 2.4×10^{-12} mol/L) increased the IR of Tet (10 $\mu\text{mol/L}$) for SGC7901 and MKN45 cells from 32.8% and 27.0% to 50.5% and 60.3%, 55.0% and 47.7%, 67.8% and 63.0%, respectively ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The concentrations of free Ca^{2+} in SGC 7901 and MKN 45 cells were significantly reduced as compared with those in the normal controls (394.2 ± 18.4 nmol/L vs 505.0 ± 15.8 nmol/L, 412.1 ± 20.8 nmol/L vs 512.0 ± 16.0 nmol/L, both $P < 0.01$), and similar results were found in octreotide (2.4×10^{-6} mol/L) group (SGC7901: 450.8 ± 20.1 nmol/L, $P < 0.01$; MKN45: 413.1 ± 10.4 nmol/L, $P < 0.01$). However, octreotide combined with Tet could not reduce the concentration of free Ca^{2+} to a lower degree.

CONCLUSION: Tet inhibits the proliferation of gastric cancer cell lines cultured *in vitro* in a dose-dependent manner, and the reduction of the cytosolic free Ca^{2+} concentration may be involved in its anti-proliferation mechanism. The antiproliferation of octreotide at high concentrations may relate to its anti-calcium effect. Different concentrations of octreotide can enhance the anti-proliferation of Tet at low doses, which may not relate to the reduction of the cytosolic calcium concentration.

Key Words: Somatostatin; Tetrandrine; Octreotide; Gastric cancer cell line; Proliferation; Calcium²⁺

Wang L, Zhu JS, Chen WX, Zhu L, Da W, Wang XL. Inhibitory effects of tetrandrine combined with octreotide on proliferation of gastric cancer cell lines cultured *in vitro*. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2005;13(19):2318-2322

摘要

目的: 观察奥曲肽、汉防己甲素单独及联合应用对体外培养人胃癌细胞株增殖的影响, 并初步探讨其可能的作用机制。

方法: 以MTT比色法观察奥曲肽(善宁)、汉防己甲素(Tet)单独及联合应用对体外培养人胃癌细胞株SGC 7901和MKN 45增殖的影响, 并用Fura-2/AM荧光标记法测定了其对胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响。

结果: 2.4×10^{-5} mol/L、 2.4×10^{-6} mol/L高浓度奥曲肽、10-160 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围的Tet对体外培养人胃癌细胞株SGC 7901和MKN 45均有显著的抑制作用。

用, 其增殖抑制率(IR)分别为, 对SGC 7901: 40.76%、23.2% 和30.5-70.0%; 对MKN 45: 24.9%、21.7% 和20.4-79.01% ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 奥曲肽 2.4×10^{-6} 、 2.4×10^{-9} 、 2.4×10^{-12} mol/L分别与Tet 10 μ mol/L联合应用, 可将其对SGC7901和MKN 45的IR分别由32.8%和27.0%提高至50.5%和60.3%、55.0%和47.7%、67.8%和63.0%(vs Tet组 $P<0.05$ 或 $P<0.01$). 10 μ mol/L Tet作用于SGC 7901和MKN 45, 其细胞内游离 Ca^{2+} 浓度较对照组显著降低(394.2 ± 18.4 nmol/L vs 505.0 ± 15.8 nmol/L, 412.1 ± 20.8 nmol/L vs 512.0 ± 16.0 nmol/L, $P<0.01$); 2.4×10^{-6} mol/L奥曲肽亦可显著降低胃癌细胞内的钙离子浓度(SGC 7901 450.8 ± 20.1 nmol/L, $P<0.01$; MKN45 413.1 ± 10.4 nmol/L, $P<0.01$). 但奥曲肽联合Tet并不能进一步降低胃癌细胞内钙离子浓度.

结论: Tet对体外培养人胃癌细胞有剂量依赖性的抑制作用, 其机制可能是通过降低细胞内游离 Ca^{2+} 浓度发挥其抗增殖作用. 高浓度奥曲肽的抗增殖作用亦可能与其抗钙作用有关; 各浓度奥曲肽可显著提高小剂量Tet对胃癌细胞的抑制作用, 但与其抗钙作用无关.

关键词: 生长抑素; 汉防己甲素; 奥曲肽; 胃癌细胞; 增殖; 钙离子

王龙, 朱金水, 陈维雄, 朱励, 达玮, 王秀玲. 奥曲肽联合汉防己甲素对人胃癌细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(19):2318-2322
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/2318.asp>

0 引言

目前化疗是中晚期失去手术机会的胃癌患者最主要的治疗手段之一, 但疗效欠佳, 副反应大, 对患者生存期限和生活质量都无显著改善, 故探寻更有益的治疗药物意义重大. 生长抑素是人体内自然产生的一种环十四肽激素, 众多研究显示其对多种恶性肿瘤的生长有抑制作用, 但单独应用疗效有限, 联合细胞毒药物或血管生成抑制剂等其它药物可能是新的研究方向^[1]. 汉防己甲素(Tetrandrine, Tet)是从植物粉防己(又名汉防己)的根中提取的生物碱, 有研究提示它对许多恶性肿瘤细胞有抑制或杀伤作用, 且其价格低廉, 药源丰富, 动物实验及临床应用均未见任何副作用, 故其抗肿瘤作用值得进一步研究^[2]. 为此, 我们选择作用更强、半衰期更长的生长抑素八肽类似物奥曲肽(Octreotide, 商品名善宁, Sandostatin)和Tet, 观察其对体外培养人胃癌细胞增殖的影响, 并初步探讨其作用机制, 以期为后序的动物实验提供依据.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及其培养 胃癌细胞株 SGC 7901 和 MKN

45 均购于中科院上海细胞生物研究所. 培养条件: 37°C 、50 mL/L CO_2 、950 mL/L 空气及饱和湿气培养箱中孵育, 培养液用含 100 mL/L 灭活小牛血清的 RPMI 1640, pH 7.0-7.2.

1.1.2 药物及主要试剂 Tet 购于浙江金华制药厂, 奥曲肽(善宁)由瑞士 Sandoz 药厂惠赠; MTT(四甲基偶氮唑蓝)为 Sigma 公司产品, 以 PBS 缓冲液配成 5 g/L 之溶液, 过滤除菌, 4°C 避光贮存; DMSO, 上海硫酸厂产品; Fura-2/AM, Sigma 公司产品, 用 DMSO 溶解配成 1 g/L 之储存液, -20°C 保存, 使用前用 D-Hanks 液稀释至 0.5 g/L, 终浓度为 5 μ mol/L.

1.2 方法

1.2.1 MTT 比色法测定细胞增殖率 根据 Mosmann 首创的 MTT 法^[3], 略加改进: 对数生长期胃癌细胞, 以 2×10^7 /L 之浓度接种, 200 μ L/孔; 24 h 后加入不同浓度的药物, 对照组为无血清培养液; 72 h 后加入 MTT, 20 μ L/孔, 培养 4-6 h 后弃去上清液, 每孔加入 200 μ L DMSO, 震荡、摇匀, 放置 10-15 min, 以 540 nm, 用自动酶标仪测定吸光值(A_{540}), 以下列公式计算细胞增殖抑制率(IR).

$$\text{IR}(\%) = (\text{对照组 } A_{540} - \text{实验组 } A_{540}) / \text{对照组 } A_{540} \times 100\%$$

1.2.2 Fura-2/AM 荧光标记法测定细胞内 Ca^{2+} 浓度^[4] 以 2×10^8 /L 之浓度接种细胞于 6 孔培养板, 24 h 后加入不同浓度的药物, 24 h 后收集单细胞悬液, 避光加入 Fura-2/AM, 37°C 温育 50 min, 使其负载入细胞内; 之后用 D-Hanks 液洗涤细胞两次以除去细胞外未负载的 Fura-2, 并重悬细胞, 再 37°C 温育 15 min, 即可用 RF-540 型分光光度计测定. 测定条件: Ex 340 nm, Em 510 nm, Ex 光栅 10 nm, Em 光栅 10 nm. 计算公式: $[\text{Ca}^{2+}]_i = \text{Kd} \cdot (\text{F} - \text{F}_{\text{min}}) / (\text{F}_{\text{max}} - \text{F})$, F 为实测荧光值, F_{max} 和 F_{min} 分别为加入 Triton X-100 所测的最大荧光值和加入 EGTA 所测的最小荧光值, Kd 为 Fura-2/AM 的解离常数, 为 224 nmol/L.

统计学处理 实验数据采用 SPSS 11.0 进行处理分析, 数据以 mean \pm SD 表示, $P<0.05$ 为有统计学意义.

2 结果

2.1 奥曲肽单独应用对胃癌细胞增殖的影响(表1) 我们选用 2.4×10^{-12} - 2.4×10^{-5} mol/L 浓度之奥曲肽作用于体外培养人胃癌细胞株, 结果显示 2.4×10^{-5} mol/L 和 2.4×10^{-6} mol/L 等高浓度奥曲肽可显著抑制 SGC 7901 和 MKN 45 的生长, 其 IR 分别为 40.76% 和 23.2%, 24.9% 和 21.7%, 且各组与对照组相比较都有统计学差异. 2.4×10^{-12} - 2.4×10^{-7} mol/L 奥曲肽对人胃癌细胞株的增殖无明显的抑制作用, 在 MKN 45 组, 有些浓度的 IR 为负值, 即可轻度刺激癌细胞的增殖, 但均无统计学意义.

表1 奥曲肽对胃癌细胞株增殖的影响 ($n = 6$)

奥曲肽 (mol/L)	SGC 7901 $A_{540}(\text{mean} \pm \text{SD})$	IR(%)	MKN 45 $A_{540}(\text{mean} \pm \text{SD})$	IR(%)
对照组	0.314 ± 0.054	/	0.469 ± 0.024	/
2.4×10^{-5}	0.186 ± 0.006	40.76 ^b	0.352 ± 0.007	24.9 ^b
2.4×10^{-6}	0.241 ± 0.048	23.2 ^a	0.367 ± 0.022	21.7 ^b
2.4×10^{-7}	0.289 ± 0.019	8.0	0.456 ± 0.022	2.8
2.4×10^{-8}	0.293 ± 0.037	6.7	0.502 ± 0.041	-7.0
2.4×10^{-9}	0.306 ± 0.026	2.5	0.519 ± 0.056	-10.7
2.4×10^{-10}	0.299 ± 0.026	4.8	0.493 ± 0.030	-5.1
2.4×10^{-11}	0.295 ± 0.033	6.1	0.533 ± 0.054	-13.6
2.4×10^{-12}	0.306 ± 0.054	2.5	0.493 ± 0.024	-5.1

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.2 Tet单独应用对胃癌细胞增殖的影响 Tet对体外培养的人胃癌细胞株SGC 7901和MKN 45均有明显的抑制作用, 且呈剂量依赖性(表2). 在10-160 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围, 其对SGC 7901和MKN 45细胞的增殖抑制率(IR)分别为30.5-70.0%, 20.4-79.0% ($P < 0.01$). 实验中可见, 用药组MKN 45细胞变小, 呈透亮的小球状, 而SGC 7901细胞则呈球状或梭形.

2.3 奥曲肽联合Tet对胃癌细胞增殖的影响(表3) 奥曲肽 2.4×10^{-6} mol/L、 2.4×10^{-9} mol/L、 2.4×10^{-12} mol/L分别与Tet 10 $\mu\text{mol/L}$ 联合应用, 可将Tet对SGC7901和MKN 45的IR分别由32.8%和27.0%提高至50.5%和60.3%、55.0%和47.7%、67.8%和63.0% (vs Tet组

表2 Tet对胃癌细胞增殖的影响 ($n = 6$)

Tet($\mu\text{mol/L}$)	SGC 7901 $A_{540}(\text{mean} \pm \text{SD})$	IR(%)	MKN 45 $A_{540}(\text{mean} \pm \text{SD})$	IR(%)
对照组	0.367 ± 0.027	/	0.486 ± 0.145	/
160	0.111 ± 0.010	70.00 ^b	0.102 ± 0.049	79.0 ^b
40	0.147 ± 0.009	60.0 ^b	0.113 ± 0.010	76.7 ^b
10	0.255 ± 0.027	30.5 ^b	0.387 ± 0.040	20.4 ^b
4	0.325 ± 0.045	11.4 ^a	0.506 ± 0.082	-4.1
2.5	0.332 ± 0.040	9.5	0.474 ± 0.096	2.5

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.表3 奥曲肽及Tet联合应用对胃癌细胞株增殖的影响 ($n = 6$)

组别	SGC 7901 $A_{540}(\text{mean} \pm \text{SD})$	IR(%)	MKN 45 $A_{540}(\text{mean} \pm \text{SD})$	IR(%)
对照组	0.658 ± 0.056	/	0.633 ± 0.082	/
奥曲肽(mol/L)				
2.4×10^{-6}	0.497 ± 0.056	24.5 ^b	0.484 ± 0.056	23.5 ^b
2.4×10^{-9}	0.648 ± 0.035	1.5	0.600 ± 0.014	5.21
2.4×10^{-12}	0.700 ± 0.127	-6.4	0.589 ± 0.032	6.95
Tet10 $\mu\text{mol/L}$	0.442 ± 0.038	32.8 ^b	0.462 ± 0.046	27.0 ^b
奥曲肽(mol/L)				
2.4×10^{-6} +Tet	0.326 ± 0.054	50.5 ^{bc}	0.251 ± 0.022	60.3 ^{bd}
2.4×10^{-9} +Tet	0.296 ± 0.056	55.0 ^{bc}	0.331 ± 0.055	47.7 ^{bc}
2.4×10^{-12} +Tet	0.212 ± 0.019	67.8 ^{bd}	0.234 ± 0.013	63.0 ^{bd}

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs Tet组. $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$).

2.4 奥曲肽和Tet对胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响 奥曲肽 2.4×10^{-6} mol/L作用于胃癌细胞株SGC 7901和MKN 45时其细胞内游离 Ca^{2+} 浓度分别为 450.8 ± 20.1 nmol/L和 413.1 ± 10.4 nmol/L, 分别较其对照组505.0 nmol/L和512.0 nmol/L显著降低. 而 2.4×10^{-9} mol/L和 2.4×10^{-12} mol/L奥曲肽对胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度无显著影响. 10 $\mu\text{mol/L}$ 的Tet亦可显著降低胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度($P < 0.01$), 与三种浓度奥曲肽联合应用后, 细胞内 Ca^{2+} 浓度较对照组均显著降低, 但与Tet组相比均无统计学差异(表4).

表4 奥曲肽和Tet对胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度的影响 (mean ± SD, nmol/L, $n = 6$)

组别	SGC7901	MKN45
对照组	505.0 ± 15.8	512.0 ± 16.0
奥曲肽(mol/L)		
2.4×10^{-6}	450.8 ± 20.1 ^a	413.1 ± 10.4 ^b
2.4×10^{-9}	460.8 ± 44.4	480.5 ± 15.4
2.4×10^{-12}	466.5 ± 12.1	473.1 ± 10.4
Tet(10 $\mu\text{mol/L}$)	394.2 ± 18.4 ^b	412.1 ± 20.8 ^b
奥曲肽(mol/L)		
2.4×10^{-6} +Tet	370.9 ± 27.8 ^b	386.5 ± 15.3 ^b
2.4×10^{-9} +Tet	400.7 ± 12.6 ^b	423.5 ± 10.3 ^b
2.4×10^{-12} +Tet	383.8 ± 17.5 ^b	396.5 ± 16.4 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

3 讨论

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤, 全世界每年发病率为17.6/10万. 在我国, 胃癌的死亡率高居恶性肿瘤的首位, 发病率在恶性肿瘤中位居第二. 因此进行胃癌治疗的研究有重大的现实价值. 中药Tet是从防己科植物汉防己或粉防己(Stephania tetrandra S.Moore)和千金藤(Stephania japonica Miers)中分离的一种生物碱, 系双苄基异喹啉类化合物, 具有消炎、解热、镇痛、抗过敏、降血压及抗肿瘤等作用^[2,5-7]. 很多研究表明Tet在体外和体内对多种恶性肿瘤的生长有抑制作用,

其中的机制可能涉及: (1) 直接抗肿瘤作用: 一方面 Tet 可能通过抑制 DNA 和 RNA 的合成起作用, 另一方面可能通过诱导癌细胞凋亡而发挥其抗瘤活性^[8-11]; (2) 放疗增敏: 临床和实验研究均显示 Tet 可明显增强放射线对肿瘤细胞的杀伤作用^[12-14]; (3) 减毒作用: 低剂量 Tet (2 g/L) 可以在体外预防单次高剂量照射 (10 Gy) 对正常人单核细胞的损害, 呈剂量依赖性^[15]; Tet 还可减轻鼠急性放射性皮炎^[6]; (4) 逆转肿瘤细胞的多药耐药性: Tet 是一种多药耐药调节剂, 其作用可能与 P-糖蛋白有关而不一定与其抗钙作用有关^[16-18]; 有研究显示无细胞毒作用的 Tet 可增强阿霉素对抗三尖杉酯碱的 HL60 细胞的生长抑制作用, 但不增加阿霉素对敏感的 HL60 细胞的毒性, 其机制除 Tet 可逆转肿瘤细胞多药耐药 (MDR) 外还可能与其逆转 MCF/Adr 细胞的凋亡抗性有关^[19,20]; (5) 抑制血管形成: Kobayashi *et al*^[21] 的研究表明 Tet 在慢性炎症过程中可以通过 IL-1a 和 PDGF-BB 的受体后机制下调血管内皮细胞管腔形成, 具有抗血管生成作用。目前有关 Tet 在胃癌中的研究较少, 故我们用 MTT 比色法观察了 Tet 对体外培养的人胃癌细胞株增殖的影响, 结果显示其在 10-160 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围, 对体外培养的人胃癌细胞株 SGC 7901 和 MKN 45 均有显著的抑制作用, 且呈剂量依赖性。现有的研究已证实 Tet 是一种中草药来源的钙拮抗剂 (calcium antagonist, CaA)^[22], 本研究也显示 10 $\mu\text{mol/L}$ Tet 可明显降低细胞内游离 Ca^{2+} 浓度, 而此浓度 Tet 对两株胃癌细胞都有一定的抑制作用。 Ca^{2+} 是细胞内重要的第二信使物质, 参与包括增殖等在内的许多细胞功能, 故推断 Tet 抗增殖作用可能与其降低细胞内游离 Ca^{2+} 浓度有关。Tet 的抗钙机制目前还不十分明确, 它可能是通过阻滞细胞膜上电压依赖性钙通道, 减少细胞外 Ca^{2+} 的内流起作用^[23]; 其可否抑制细胞内钙库释放 Ca^{2+} 还不明确。

生长抑素 (somatostatin, SS) 是一种脑肠肽, 分布于中枢神经系统及消化道中, 可抑制多种内分泌激素和胃肠胰等消化道外分泌腺体的分泌, 具有广泛的生物活性。近年的研究显示, SS 除了具有广泛的抗分泌作用外, 对小细胞肺癌、前列腺癌、胰腺癌等恶性实体肿瘤也具有抑制作用^[24,25]。奥曲肽是人工合成的生长抑素八肽类似物 (somatostatin analogues, SSAS), 其作用显著增强, 且半衰期延长, 故更具研究和应用价值。本研究显示高浓度奥曲肽可显著抑制两株人胃癌细胞的增殖, 与对大肠癌的有效剂量相似^[26], 但似乎不如对乳腺癌及小细胞肺癌有效^[24]。

生长抑素及其类似物的抗增殖机制大致可分为两个方面: 一方面通过抑制可促进肿瘤生长的内分泌激素 (如胃泌素、胰泌素、胆囊收缩素) 或生长因子 (如

EGF、IGF-I) 等的释放或 / 和作用发挥间接作用; 另一方面可与靶细胞膜上特异性高亲和力的生长抑素受体结合发挥直接的抗增殖作用。已知 SS 有五种亚型的受体, 其中 II 型和 III 型受体可能介导其抗增殖作用^[27-29]。本研究显示高浓度奥曲肽可显著降低胃癌细胞内游离 Ca^{2+} 浓度, 与其抑制细胞增殖的浓度相一致, 提示其抗增殖作用与降低细胞内游离 Ca^{2+} 浓度有关。已有研究显示^[30], SS 及 SSAS 通过百日咳毒素敏感 G 蛋白与钙通道直接相连, 故可能是抑制了细胞外钙离子的内流而降低了细胞内游离 Ca^{2+} 浓度。但生长抑素的受体后机制除 Ca^{2+} 通道外, 可能还涉及到环磷酸腺苷 (cAMP) 和酪氨酸磷酸酶 (Tyrosine phosphatase) 等其它几个信号传导机制^[27,31], 哪一种机制占主导地位抑或这几种机制不过是同一事件的不同阶段, 还有待于进一步研究。

我们研究显示不同浓度的奥曲肽与小剂量 Tet 联合应用, 其细胞增殖抑制率均显著增加, 其中 2.4×10^{-12} mol/L 低浓度奥曲肽联合 Tet 对两株胃癌细胞的抑制率更高, P 均小于 0.01, 提示小剂量 Tet 联合小剂量奥曲肽对胃癌细胞的抑制作用更强, 目前还无相关的报道, 其中的机制亦不十分清楚。而在对细胞内钙离子浓度检测的实验中, 联合用药组细胞内钙离子浓度与单独应用 Tet 组并无显著性差异, 提示奥曲肽增强 Tet 抗增殖作用可能与降低细胞内钙离子无关, 可能还存在其它的机制。

总之, Tet 作为一种中草药来源的生物碱对胃癌细胞的抑制作用显著而稳定, 可能具有多方面的抗癌机制, 且其毒副作用少, 在肿瘤治疗中具有广阔的应用前景。奥曲肽单独用于治疗肿瘤所需浓度较高, 两者小剂量联合应用可能为治疗胃癌等消化道恶性肿瘤提供新的思路和方法, 值得进一步体内外研究, 以发扬中药独特的优势。

4 参考文献

- 1 Jenkins SA, Kynaston HG, Davies ND, Baxter JN, Nott DM. Somatostatin analogs in oncology: a look to the future. *Chemotherapy* 2001; 47 (Suppl 2): 162-196
- 2 Chen YJ. Potential role of tetrandrine in cancer therapy. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 1102-1106
- 3 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63
- 4 Malgaroli A, Milani D, Meldolesi J, Pozzan T. Fura-2 measurement of cytosolic free Ca^{2+} in monolayers and suspensions of various types of animal cells. *J Cell Biol* 1987; 105: 2145-2155
- 5 万江华, 方玉华. 粉防己碱的药理与临床应用进展. *中国药学杂志* 1996; 31: 454-457
- 6 Chen YJ, Dai YS, Chen BF, Chang A, Chen HC, Lin YC, Chang KH, Lai YL, Chung CH, Lai YJ. The effect of tetrandrine and extracts of *Centella asiatica* on acute radiation dermatitis in rats. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 703-706
- 7 Xie QM, Tang HF, Chen JQ, Bian RL. Pharmacological actions

- of tetrandrine in inflammatory pulmonary diseases. *Acta Pharmacol Sin* 2002; 23: 1107-1113
- 8 Dong Y, Yang MM, Kwan CY. *In vitro* inhibition of proliferation of HL-60 cells by tetrandrine and coriolus versicolor peptide derived from Chinese medicinal herbs. *Life Sci* 1997; 60: PL135-PL140
- 9 Oh SH, Lee BH. Induction of apoptosis in human hepatoblastoma cells by tetrandrine via caspase-dependent Bid cleavage and cytochrome c release. *Biochem Pharmacol* 2003; 66: 725-731
- 10 Teh BS, Chen P, Lavin MF, Seow WK, Thong YH. Demonstration of the induction of apoptosis (programmed cell death) by tetrandrine, a novel anti-inflammatory agent. *Int J Immunopharmacol* 1991; 13: 1117-1126
- 11 Fang LH, Zhang YH, Ma JJ, Du GH, Ku BS, Yao HY, Yun YP, Kim TJ. Inhibitory effects of tetrandrine on the serum- and platelet-derived growth factor-BB-induced proliferation of rat aortic smooth muscle cells through inhibition of cell cycle progression, DNA synthesis, ERK1/2 activation and c-fos expression. *Atherosclerosis* 2004; 174: 215-223
- 12 高令山. 汉防己甲素合并小剂量放射治疗肺癌97例的临床研究. *中医杂志* 1980; 8: 597-599
- 13 徐和平, 王成业, 祝和成, 顾焕华, 刘双珍, 许雪亮. 汉防己甲素对视网膜母细胞瘤细胞系HXO-Rb44放射敏感性的影响. *中国实用眼科杂志* 1995; 13: 668-670
- 14 Chang KH, Chen ML, Chen HC, Huang YW, Wu TY, Chen YJ. Enhancement of radiosensitivity in human glioblastoma U138MG cells by tetrandrine. *Neoplasma* 1999; 46: 196-200
- 15 Chen YJ, Tu ML, Kuo HC. Protective effect of tetrandrine on normal human mononuclear cells against ionizing irradiation. *Biol Pharm Bull* 1997; 20: 1160-1164
- 16 陈宝安, 周云, 程坚, 董颖, 钱习军, 盛茗, 王婷, 高峰. 细胞内钙与K562/A02细胞多药耐药相关性的研究. *中国实验血液学杂志* 2004; 12: 159-162
- 17 Fu L, Liang Y, Deng L, Ding Y, Chen L, Ye Y, Yang X, Pan Q. Characterization of tetrandrine, a potent inhibitor of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53: 349-356
- 18 Fu LW, Zhang YM, Liang YJ, Yang XP, Pan QC. The multidrug resistance of tumour cells was reversed by tetrandrine *in vitro* and in xenografts derived from human breast adenocarcinoma MCF-7/adr cells. *Eur J Cancer* 2002; 38: 418-426
- 19 何琪扬, 李玉梅, 李岩, 沈旭生, 张鸿卿, 薛绍白. 柔红霉素在人敏感和抗三尖杉酯碱的HL-60细胞中分布和积聚变化. *中国组织化学与细胞化学杂志* 1996; 5: 6-11
- 20 符立梧, 潘启超, 黄红兵, 梁永钜, 冯公侃, 田晖. 粉防己碱逆转肿瘤多药抗药性细胞的凋亡抗性作用. *中国药理学通报* 1998; 14: 309-311
- 21 Kobayashi S, Inaba K, Kimura I, Kimura M. Inhibitory effects of tetrandrine on angiogenesis in adjuvant-induced chronic inflammation and tube formation of vascular endothelial cells. *Biol Pharm Bull* 1998; 21: 346-349
- 22 方达超, 江明性. 粉防己碱抗钙作用的研究. *中华医学杂志* 1983; 63: 772-774
- 23 陈金明, 陈思聪, 钟纪根, 张国元, 龚肖崎, 吴宗贵. 粉防己碱对大鼠心肌细胞电压依赖性钙通道的作用. *中国药理学通报* 1996; 12: 226-228
- 24 Evers BM, Parekh D, Townsend CM Jr, Thompson JC. Somatostatin and analogues in the treatment of cancer. A review. *Ann Surg* 1991; 213: 190-198
- 25 O'Byrne KJ, Schally AV, Thomas A, Carney DN, Steward WP. Somatostatin, its receptors and analogs, in lung cancer. *Chemotherapy* 2001; 47 Suppl 2: 78-108.
- 26 Romani R, Morris DL. SMS 201-995 (Sandostatin) enhances *in vitro* effects of 5-fluorouracil in colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol* 1995; 21: 27-32
- 27 Lewin MJ. The somatostatin receptor in the GI tract. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 455-468
- 28 Liu HL, Huo L, Wang L. Octreotide inhibits proliferation and induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25: 1380-1386
- 29 Smitha MC, Maggi M, Orlando C. Somatostatin receptors in non-endocrine tumours. *Dig Liver Dis* 2004; 36 Suppl 1: S78-S85
- 30 Reisine T. Cellular mechanism of somatostatin inhibition of calcium influx in the anterior pituitary cell line AtT-20. *J Pharmacol Exp Ther* 1990; 254: 646-651
- 31 Pollak MN, Schally AV. Mechanisms of antineoplastic action of somatostatin analogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998; 217: 143-152

电编 张勇 编辑 张海宁