

# NM-3含药血清对体外胃癌细胞株SGC-7901生长和VEGF及其受体KDR、Flt-1表达的影响

宋明全, 朱金水, 朱励, 张强, 李沁, 郭花, 张卫平

**背景资料**  
NM-3这种特异性肿瘤血管抑制剂对胃癌的抑制作用, 是通过抑制肿瘤血管还是通过调节胃癌细胞的凋亡相关基因, 仍然有争议。

宋明全, 朱金水, 朱励, 张强, 郭花, 张卫平, 上海交通大学附属第六人民医院消化科 上海市 200233  
李沁, 美国休斯顿大学药学院 美国休斯顿 77024  
通讯作者: 朱金水, 200233, 上海市宜山路600号, 上海交通大学附属第六人民医院消化科. zhujs1803@hotmail.com  
电话: 021-64369181-8970 传真: 021-64837019  
收稿日期: 2007-06-04 修回日期: 2007-09-01

## Effects of NM-3-containing serum on endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in human gastric cancer SGC-7901 cell line

Ming-Quan Song, Jin-Shui Zhu, Li Zhu, Qiang Zhang, Qin Li, Hua Guo, Wei-Ping Zhang

Ming-Quan Song, Jin-Shui Zhu, Li Zhu, Qiang Zhang, Hua Guo, Wei-Ping Zhang, Department of Gastroenterology, Shanghai JiaoTong University Affiliated Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China  
Qin Li, Pharmacy College of Houston University, Houston, TX 77024, USA

Correspondence to: Jin-Shui Zhu, Department of Gastroenterology, Shanghai JiaoTong University Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China. zhujs1803@hotmail.com  
Received: 2007-06-04 Revised: 2007-09-01

## Abstract

**AIM:** To study the inhibitory effect of anti-angiogenesis agent NM-3-containing serum on human gastric cancer SGC-7901 cell line.

**METHODS:** Human gastric cancer SGC-7901 cell line was cultured with high, medium and low doses of NM-3-containing serum, and two control groups were cultured with medium alone and medium with serum. Cell cycle distribution and apoptosis rate were determined by flow cytometry. After 72 hours incubation, mRNA for vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, including KDR and Flt-1, was detected by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** The apoptosis rate in the high- (25.20%  $\pm$  0.86%, 43.62%  $\pm$  3.53%, 54.35%  $\pm$  5.42%)

and medium-dose (16.80%  $\pm$  0.40%, 26.95%  $\pm$  3.25%, 39.85%  $\pm$  4.10%) groups was significantly increased compared with that in the two control groups were cultured with medium alone (5.34%  $\pm$  0.28%, 6.91%  $\pm$  1.06%; 6.87%  $\pm$  1.24%) and medium with serum (5.66%  $\pm$  0.72%, 8.90%  $\pm$  0.86%, 8.06%  $\pm$  0.78%) after 6, 24 and 72 hours culture. The apoptosis rate was increased with prolongation of incubation time and NM-3 dose. The apoptosis rate in the high-dose group was higher than in the medium and low dose groups ( $P < 0.05$ ). After 72 hours in the high-dose group, the proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase was higher, and the number in S, G<sub>2</sub>/M phase was lower than that in the medium- and low-dose groups. There were significant differences between the proportion of cells in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S and G<sub>2</sub>/M phase in the high- and medium-dose groups and the two control groups ( $P < 0.01$ ). mRNA of VEGF and its receptors KDR and Flt-1 decreased in SGC-7901 cells in the high-, medium- and low-dose NM-3 groups after 72 hours. Compared with the two control groups, the high-dose group significantly inhibited mRNA transcription for VEGF and its receptors KDR and Flt-1 ( $P < 0.01$ ), and the medium- and low-dose groups obviously inhibited mRNA transcription ( $P < 0.05$ ).

**CONCLUSION:** NM-3-containing serum can inhibit vascular formation in gastric carcinoma, and can induce apoptosis of human gastric carcinoma cells.

**Key Words:** Gastric cancer; Tumor cell lines; NM-3; Vascular endothelial growth factor; KDR; Flt-1; Reverse-transcriptase polymerase chain reaction

Song MQ, Zhu JS, Zhu L, Zhang Q, Li Q, Guo H, Zhang WP. Effects of NM-3-containing serum on endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in human gastric cancer SGC-7901 cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007; 15(25): 2704-2708

## 摘要

**目的:** 探讨NM-3含药血清对胃癌SGC-7901细胞的抑制作用。

**方法:** 将SGC-7901胃癌细胞分成空白对照组、血清对照组、NM-3含药血清低、中、高剂量实验组共5组. 在不同时间段以流式细胞仪检测细胞的凋亡率, 分析细胞周期分布; 应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)法检测各组胃癌细胞中VEGF及其受体KDR, Flt-1 mRNA的表达.

**结果:** NM-3含药血清3组随着时间的延长凋亡率增高, 呈时间剂量依赖性, 其高、中剂量组在6 h( $16.80\% \pm 0.40\%$ ,  $25.20\% \pm 0.86\%$ )、24 h( $26.95\% \pm 3.25\%$ ,  $43.62\% \pm 3.53\%$ )、72 h( $39.85\% \pm 4.10\%$ ,  $54.35\% \pm 5.42\%$ )内的细胞早期凋亡率与空白, 血清两个对照组相比有显著性差异( $5.34\% \pm 0.28\%$ ,  $5.66\% \pm 0.72\%$ ;  $6.91\% \pm 1.06\%$ ,  $8.90\% \pm 0.86\%$ ;  $6.87\% \pm 1.24\%$ ,  $8.06\% \pm 0.78\%$ ;  $P < 0.01$ ). 随着NM-3药物剂量的增加,  $G_0/G_1$ 期细胞增多, 而S期及 $G_2/M$ 期细胞则相应减少. 细胞培养72 h后, NM-3含药血清高、中、低剂量组与两对照组比较可显著抑制VEGF及其受体KDR, Flt-1 mRNA的表达( $P < 0.05$ ). 在72 h后细胞凋亡率, 细胞周期以及胃癌细胞中VEGF及其受体KDR, Flt-1 mRNA的表达上, 高剂量组与中低剂量组均有明显差异( $P < 0.05$ ).

**结论:** NM-3含药血清可抑制胃癌组织的血管生长, 并可诱导胃癌细胞凋亡.

**关键词:** 胃癌; 癌细胞株; NM-3; 血管内皮生长因子; KDR; Flt-1; 逆转录聚合酶链式反应

宋明全, 朱金水, 朱励, 张强, 李沁, 郭花, 张卫平. NM-3含药血清对体外胃癌细胞株SGC-7901生长和VEGF及其受体KDR、Flt-1表达的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(25):2704-2708 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/2704.asp>

## 0 引言

肿瘤的生长和转移与肿瘤内血管的形成有极为密切的关系, 肿瘤内血管不仅为肿瘤的生长提供了必需的营养成分, 还可为肿瘤细胞进入循环系统导致远处转移提供通道<sup>[1-4]</sup>. NM-3是一种新型的香豆素合成衍生物, 其全称2-[(8-羟基-6甲氧基-1-氧-1-氢-2-苯并吡喃-3-炔基)]丙酸, 可显著加强放疗对肿瘤新生血管的抑制作用, 选择性的抑制肿瘤血管内皮细胞的分化增殖, 延迟肿瘤生长<sup>[5-6]</sup>. 本实验室曾研究发现在人胃癌裸鼠模型中, NM-3对裸鼠内人胃癌具有明显的抗肿瘤疗效, 但是NM-3对胃癌的抑制作用是通过抑制肿瘤血管还是通过调节胃癌细胞的凋亡相关基因仍然存在争论<sup>[7]</sup>. 本试验通过NM-3含药血清对体外人胃癌细胞SGC-7901的作用,

进一步探讨NM-3抑制肿瘤细胞的作用机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** RPMI 1640培养基、小牛血清、胰蛋白酶(Gibico公司); MTT、DMSO(Sigma公司); ANNEXIN V试剂盒(Beckman Coulter公司); NM-3由纽约州立大学美国国家肿瘤研究中心Robert教授提供, 2.5 g/瓶的粉剂, 生理盐水溶解. 人胃腺癌细胞系SGC-7901(中科院上海细胞生物研究所). 仪器设备: 流式细胞仪: COULTER EPICS XL(Becton Coulter公司产品), 汞激光激发波长为488 nm, 运用CellQuest软件收集分析数据; 恒温CO<sub>2</sub>培养箱(Sheldon公司); 倒置显微镜(重庆光学仪器厂), 离心机(Eppendorf公司). Fisher344近交系 $\delta$ 大鼠40只, 中科院上海实验动物中心提供, 清洁级, SYXK010号, 体质量120-140 g.

### 1.2 方法

**1.2.1 NM-3含药血清的制备** 近交系大鼠40只, 随机分为4组. 给药组分别按NM-3低剂量10 mg/kg、中剂量20 mg/kg、高剂量30 mg/kg ip, 对照组给予相同体积的生理盐水, 每日1次, 连用1 wk, 末次用药后1 h, 在无菌条件下, 自腹主动脉采血8 mL/只, 1700 r/min离心制备含药血清; 将所采各组动物血清分别混合, -70℃冷藏备用, 临用前需56℃灭活备用.

**1.2.2 人胃癌细胞培养** 复苏SGC-7901细胞株, 用含100 mL/L FBS的RPMI 1640培养液, 置于37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub>培养箱中培养48-72 h, 每24 h换培养液1次. 待培养瓶底铺满胃癌细胞后, 弃去培养液, 用2.5 g/L胰酶消化胃癌细胞, 含100 mL/L FBS的RPMI 1640培养液3 min配成浓度为 $2 \times 10^6/L$ 接种于3 cm $\times$ 6 cm的培养瓶中. 设空白对照组、血清对照组、NM-3含药血清低剂量、中剂量、高剂量实验组共5组. 空白对照组给予常规培养液; 血清对照组给予常规培养液的同时加用正常生理盐水腹腔注射后所制备的大鼠血清; 低剂量组给予常规培养液的同时加用低剂量10 mg/kg NM-3 ip大鼠组的含药血清; 中剂量组给予常规培养液的同时加用中剂量20 mg/kg NM-3 ip大鼠组的含药血清; 高剂量组给予常规培养液的同时加用高剂量30 mg/kg NM-3 ip大鼠组的含药血清. 所加血清均为细胞培养液总体积的10%. 药物作用24 h后的细胞予以换液, 以恒定药物浓度. 共同培养2代后, 以倒置显微镜观察各组胃癌细胞株的细胞学形态变化及倍增指数, 用流式细胞仪检测细胞生长周期变化.

**研发前沿**  
VEGF是目前所知最强的直接作用于血管内皮细胞的促血管形成因子, 胃癌中VEGF过表达与淋巴结转移和预后显著相关, 生物靶向治疗时代的到来, 使目前寻找诸如NM-3靶向作用强的抗血管生成药物成为新的热点和研究方向.

## 创新盘点

NM-3含药血清避免了在体外实验中药物直接与细胞作用的各种干扰因素,接近药物在体内环境中产生药理效应的真实过程。本研究成功制备了NM-3含药血清,并诱导了人胃癌细胞SGC-7901凋亡。

表 1 VEGF, KDR, Flt-1引物序列

	正向引物	反向引物
VEGF	5'-AATGCTTTCTCCGCTCTG-3'	5'-TTGCTGCTCTACCTCCAC-3'
KDR	5'-ACGCTGACATGTACGGTCTAT-3'	5'-GCCAAGCTTGTACCATGTGAG-3'
Flt-1	5'-GTCACAGAAGAGGATGAAGGTGTCTA-3'	5'-CACAGTCCGGCAGCTAGGTGATT-3'
$\beta$ -actin	5'-ATCGTGGGGCGCCCCAGGCAC-3'	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'

由于Annexin V能特异地与细胞膜上凋亡早期的标志物磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)结合,因此其与异硫氰酸荧光素(Fluorescein Isothiocyanate, FITC)连结后能使凋亡细胞的膜特异地染上绿色。在细胞凋亡晚期或死亡时,其膜的完整性开始受到破坏,此时,碘化丙啶(Propidium Iodide, PI)就可进入细胞与染色体结合,使核呈红色。胃癌SGC-7901细胞在培养过程中也发生少量的细胞凋亡现象,但以正常细胞为主,此类细胞Annexin V-FITC及PI均无染色。将NM-3含药血清作用6, 24, 72 h的胃癌SGC-7901细胞用流式细胞仪检测细胞凋亡,每个样品记数 $3 \times 10^6$ 个细胞。

**1.2.3 胃癌细胞凋亡检测** 将5组作用好的胃癌SGC-7901细胞用4℃ PBS液洗涤2次,用2.5 g/L的胰酶在37℃下充分消化至细胞成流沙状,加4℃ PBS液终止消化,离心5 min,去除上清,加入Buffer 100 mL,悬浮沉淀细胞。流式细胞仪检测,用Buffer液调整细胞浓度,控制细胞流量为500个/s。加入ANNEXIN V 3.5  $\mu$ g,置冰上孵育10 min,再加入PI 4  $\mu$ L,置冰上5 min染色。用流式细胞仪测定细胞周期及凋亡细胞率。

**1.2.4 VEGF及其受体KDR, Flt-1的mRNA表达影响** 胃癌细胞内总RNA的提取用TRIzol试剂盒(Gibico公司)一步提取法,按说明书进行操作。提取后的RNA经紫外线分光光度计和琼脂糖电泳进行完整性、纯度及浓度测定,溶于DEPC水中, -70℃冰箱保存备用。引物设计合成参照人VEGF, KDR, Flt-1的序列设计引物,由上海生工生物工程有限公司设计合成(表1)。RT-PCR: 取2  $\mu$ g RNA溶于DEPC处理的水中,加入Oligo dT 0.5  $\mu$ L后, 70℃ 5 min,取出迅速置冰上1 min,加入 $2 \times 10^8$  U/L M-MLV逆转录酶1  $\mu$ L,  $4 \times 10^7$  U/L Rnasin 0.5  $\mu$ L, 5×RT Buffer 5  $\mu$ L, 10 mmol/L dNTPs 1.5  $\mu$ L, 42℃ 60 min,合成cDNA第一链, 65℃ 5 min灭活逆转录酶。取cDNA 5  $\mu$ L, 10×PCR Buffer 12.5  $\mu$ L, 2 mmol/L, dNTPs 3  $\mu$ L, 正链和负链引物终浓度均为0.8  $\mu$ mol/L, 5 IU/L LA

Taq酶0.5  $\mu$ L, 补加水至25  $\mu$ L。VEGF反应条件为: 94℃ 1 min, 55℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30个循环, 72℃延伸7 min; KDR, Flt-1反应条件为: 95℃ 2 min, 94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 2 min, 30个循环, 72℃延伸7 min。PCR产物经20 g/L琼脂糖凝胶电泳, EB染色后拍照,用全自动图像处理系统分析mRNA各条带的OPTDI(面积与平均光密度之乘积)与 $\beta$ -actin的OPTDI的比值(A)作为其相对的表达量。

**统计学处理** 采用SPSS10.5统计软件统计分析。两组间差别显著性检验进行方差分析及t检验分析,  $P < 0.05$ 为存在差异性,  $P < 0.01$ 为差异性显著。

## 2 结果

**2.1 NM-3含药血清对细胞形态学和细胞周期分布的影响** 细胞形态学观察显示, SGC-7901细胞经低、中、高剂量NM-3含药血清处理后,细胞出现逐渐变小变圆,间隙增宽,细胞内颗粒增多,折光度下降等细胞凋亡的典型特征,培养72 h后未见细胞密度明显增加,大部分细胞仍贴壁生长,少部分漂浮于培养液中;而对照组处理后的细胞无明显上述改变。流式细胞仪测定结果显示: NM-3含药血清高剂量、中剂量组在6、24、72 h内的凋亡率与两个对照组相差异显著增高( $P < 0.01$ ); NM-3含药血清低剂量组与两个对照组相比细胞凋亡率无明显差异( $P > 0.05$ ); NM-3含药血清高剂量组与中低剂量组比较,细胞凋亡率有明显差别( $P < 0.05$ )。结果示NM-3含药血清随着时间的延长,剂量的增加诱导胃癌细胞凋亡率增高,呈时间剂量依赖性(表2)。胃癌细胞株SGC-7901在常规生长状态下大多数处于S期,  $G_0/G_1$ 期次之,  $G_2/M$ 期最少。检测结果表明,用药组与对照组相比,处于不同细胞周期的细胞所占比例有明显的差异,并且随剂量的增加有所变化(表3),与对照组相比较, NM-3高、中剂量组 $G_0/G_1$ 期细胞比例显著增加( $P < 0.01$ );高剂量组与中低剂量组之间也存在明显差异( $P < 0.05$ )。随

表 2 各组SGC-7901细胞的凋亡率(mean ± SD, %)

时间(h)	重复次数	空白对照	血清对照	低剂量	中剂量	高剂量
6	3	5.34 ± 0.28	5.66 ± 0.72	9.28 ± 0.60	16.80 ± 0.4 <sup>ab</sup>	25.20 ± 0.86 <sup>b</sup>
24	3	6.91 ± 1.06	8.90 ± 0.86	14.80 ± 0.41	26.95 ± 3.25 <sup>ab</sup>	43.62 ± 3.53 <sup>b</sup>
72	3	6.87 ± 1.24	8.06 ± 0.78	26.50 ± 4.03 <sup>a</sup>	39.85 ± 4.10 <sup>ab</sup>	54.35 ± 5.42 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 高剂量组; <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 两对照组。

着NM-3药物剂量的增加, G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期细胞增多, 而S期及G<sub>2</sub>/M期细胞则相应减少。结果表明NM-高中剂量有显著诱导SGC-7901细胞凋亡的作用。

**2.2 NM-3含药血清对VEGF及其受体KDR, Flt-1 mRNA表达的影响** 检测结果表明, 胃癌细胞培养过程中均可见VEGF及其受体KDR、Flt-1的表达, 在细胞培养72 h后, 与两组对照组相比, NM-3含药血清组胃癌细胞中的VEGF、KDR、Flt-1 mRNA的表达相对减弱。高剂量组与两对照组有显著差异(*P*<0.01), 中低剂量组与两对照组有明显差异(*P*<0.05); 并且随着剂量的增加VEGF及其受体KDR、Flt-1 mRNA的表达逐渐减少; 高剂量组与中低剂量组也有明显差异(*P*<0.05)(表4)。

### 3 讨论

作为致死率较高的恶性肿瘤, 胃癌的早期患者仅占就诊患者的10%左右; 而无法行手术切除的晚期胃癌却占12.9%-32.1%。因此化疗成为中晚期胃癌患者的主要治疗手段。然而大剂量、全身静脉化疗存在选择性低, 毒副作用大等不良反应, 寻找一种治疗晚期胃癌的新方案具有重要的临床意义<sup>[1]</sup>。2-(8-羟基-6甲氧基-1-氧-1-氢-2-苯并吡喃-3-炔基)丙酸(NM-3)是一种合成的新型异构香豆素衍生物, 是近年研究的一种肿瘤血管抑制剂。该药物能调整肿瘤血管生长促进因子和抑制因子的平衡, 选择性的抑制肿瘤血管内皮细胞的增殖, 从而有效地抑制肿瘤生长、转移和复发, 是肿瘤防治的又一条新途径<sup>[2-4]</sup>。针对乳腺癌, 肺癌等化疗方案中, 用NM-3分别联合小剂量5-FU, 紫杉醇和CPA, 发现能有效抑制实体肿瘤生长, 甚至使肿瘤消失。NM-3联合小剂量卡铂腹腔化疗, 发现能明显提高卡铂对胃癌生长的抑制作用, 同时减少化疗药物的剂量, 从而降低毒副作用<sup>[5-7]</sup>。

VEGF是肿瘤细胞系中的一种生长因子, 他特异性的作用于血管内皮细胞, 促进血管内皮细胞增殖。VEGF是胃癌发生发展过程中促进血

表 3 各组SGC-7901细胞培养72 h后在不同细胞周期所占比例(mean ± SD)

分组	各细胞周期细胞比例(%)		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> 期	S期	G <sub>2</sub> /M
高剂量	73.2 ± 4.4 <sup>b</sup>	16.7 ± 4.8 <sup>b</sup>	5.1 ± 0.5 <sup>b</sup>
中剂量	61.1 ± 4.6 <sup>ab</sup>	27.6 ± 3.5 <sup>ab</sup>	9.6 ± 1.2 <sup>ab</sup>
低剂量	59.2 ± 4.6 <sup>a</sup>	38.3 ± 2.2	11.6 ± 0.1
血清对照	36.2 ± 5.6	46.7 ± 6.9	18.1 ± 3.7
空白对照	38.3 ± 7.3	42.5 ± 5.1	19.2 ± 3.1

<sup>a</sup>*P*<0.05 vs 高剂量组; <sup>b</sup>*P*<0.01 vs 两对照组。

管增生和形成的最关键的因子之一, 在胃癌细胞中广泛表达, VEGF的高表达可以促进胃癌发生浸润、转移, 其表达与胃癌的发生发展及预后密切相关, 特别是VEGF-C和VEGF-D的表达更是胃癌细胞淋巴结转移的重要标志。VEGF有2种特异性的受体: KDR和Flt-1。VEGF与2种受体中的任何一个结合, 经酪氨酸激酶受体的信号系统首先活化内在的酪氨酸激酶, 然后受体胞质区上的酪氨酸残基通过分泌血管源性因子产生作用。最近研究显示胃癌细胞广泛存在KDR和Flt-1<sup>[8-13]</sup>。本实验结果说明, NM-3含药血清能抑制胃癌组织中VEGF, KDR和Flt-1 mRNA的表达, 并且对胃癌组织中VEGF, KDR和Flt-1表达与用药时间和剂量呈正相关。

NM-3抗肿瘤虽然能间接地抑制肿瘤血管生长和形成, 但迄今为止的实验研究没有显示其有直接杀癌细胞的作用<sup>[14-16]</sup>。NM-3对胃癌的作用是仅仅局限于抑制肿瘤微血管生成还是直接作用于调节胃癌细胞的凋亡, 在这一观点上仍然存在争论<sup>[5-7]</sup>。

由于含药血清的血药浓度真实地反映了当时机体的血药浓度, 药物进入体内后, 不同药物剂量其在体内的吸收、分布、代谢、排泄不同, 血药浓度达峰时间亦不同, 起效时间亦不同。在其他条件一致的情况时, 主要与给药剂量有关, 在一定范围内, 动物给药剂量越多, 其

#### 应用要点

NM-3能抑制胃癌血管生成因子受体的信号传导并诱导胃癌细胞凋亡, 在治疗胃癌的初步实验中显示良好的应用前景, 有望成为临床治疗胃癌的新药物。

#### 名词解释

NM-3: 是一种新合成的异构香豆素小分子衍生物, 一种血管生成抑制剂。



## 同行评价

本文研究了NM-3含药血清对体外胃癌细胞株SGC-7901生长和血管内皮生长因子及其受体KDR、Flt-1表达的影响, 总体设计合理, 方法得当, 结果可靠, 有较好的实际指导意义。

表 4 NM-3含药血清培养72 h后对VEGF及其受体KDR, Flt-1 mRNA表达的影响( $n = 30$ , dmm<sup>2</sup>, mean  $\pm$  SD)

分组	VEGF	KDR	Flt-1
高剂量	63.45 $\pm$ 2.36 <sup>b</sup>	62.62 $\pm$ 1.78 <sup>b</sup>	78.43 $\pm$ 2.45 <sup>b</sup>
中剂量	85.26 $\pm$ 2.12 <sup>ac</sup>	76.53 $\pm$ 1.87 <sup>ac</sup>	114.34 $\pm$ 2.67 <sup>ac</sup>
低剂量	89.23 $\pm$ 2.32 <sup>ac</sup>	104.26 $\pm$ 2.24 <sup>ac</sup>	159.86 $\pm$ 3.24 <sup>ac</sup>
血清对照	139.24 $\pm$ 3.65	148.46 $\pm$ 2.56	236.23 $\pm$ 3.54
空白对照	140.34 $\pm$ 2.45	151.52 $\pm$ 2.62	257.23 $\pm$ 4.65

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 两对照组; <sup>c</sup> $P < 0.05$  vs 高剂量组。

吸收进入血循环的药物就越多, 血药浓度就高, 因而所取含药血清的体外药理效应就越强。本试验应用NM-3含药血清处理体外培养胃癌细胞SGC-7901, 发现NM-3能够在体外诱导胃癌SGC-7901细胞凋亡。NM-3和对照组相比较其凋亡率在统计学上具有显著性差异。同时检测NM-3含药血清对细胞周期分布的影响, 结果显示NM-3在诱导SGC-7901细胞凋亡的同时, 能够使细胞阻滞于G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期, 进入S期、M期细胞比例降低, 从而证实NM-3含药血清可能通过诱导细胞凋亡、影响细胞周期进程来抑制细胞增殖。本实验室曾经直接应用不同浓度NM-3对体外培养胃癌细胞SGC-7901的实验, 发现NM-3没有明显的诱导细胞凋亡<sup>[16]</sup>。与过去诸多直接应用NM-3细胞培养的实验认为该血管抑制剂仅能抑制肿瘤生长而没有直接杀伤癌细胞作用的结论相一致。本实验应用NM-3腹腔注射后使机体产生诱导胃癌细胞凋亡的血清, 因此我们认为NM-3除了对胃癌细胞新生血管内皮细胞特异性抑制作用外, 还可能通过对机体免疫系统的调节作用, 从而产生了其直接诱导胃癌细胞凋亡的效果, 为研究该药物的抗癌功效提出了新的研究思路。

#### 4 参考文献

- Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, Folkman J. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* 2000; 60: 1878-1886
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and

the near future. *Carcinogenesis* 2000; 21: 505-515

- Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257
- Hagedorn M, Bikfalvi A. Target molecules for anti-angiogenic therapy: from basic research to clinical trials. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000; 34: 89-110
- Yin L, Ohno T, Weichselbaum R, Kharbanda S, Kufe D. The novel isocoumarin 2-(8-hydroxy-6-methoxy-1-oxo-1H-2-benzopyran-3-yl) propionic acid (NM-3) induces lethality of human carcinoma cells by generation of reactive oxygen species. *Mol Cancer Ther* 2001; 1: 43-48
- Salloum RM, Jaskowiak NT, Mauceri HJ, Seetharam S, Beckett MA, Koons AM, Hari DM, Gupta VK, Reimer C, Kalluri R, Posner MC, Hellman S, Kufe DW, Weichselbaum RR. NM-3, an isocoumarin, increases the antitumor effects of radiotherapy without toxicity. *Cancer Res* 2000; 60: 6958-6963
- Zhu JS, Shen B, Chen JL, Chen GQ, Yu XH, Yu HF, Zhu ZM. Molecule action mechanisms of NM-3 on human gastric cancer SGC-7901 cells in vivo or in vitro. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 2366-2369
- Kaneko T, Konno H, Baba M, Tanaka T, Nakamura S. Urokinase-type plasminogen activator expression correlates with tumor angiogenesis and poor outcome in gastric cancer. *Cancer Sci* 2003; 94: 43-49
- Keyes KA, Mann L, Cox K, Treadway P, Iversen P, Chen YF, Teicher BA. Circulating angiogenic growth factor levels in mice bearing human tumors using Luminex Multiplex technology. *Cancer Chemother Pharmacol* 2003; 51: 321-327
- Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ, Schwall RH. Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med* 1998; 4: 336-340
- Zhang H, Wu J, Meng L, Shou CC. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1 in gastric cancer cells. *World J Gastroenterol* 2002; 8: 994-998
- Li QM, Kan FJ, Min CY. Effect of Weikangning on gastric cancer cell growth and expression of vascular endothelial growth factor and its receptors KDR and Flt-1. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 938-942
- Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count and vascular endothelial growth factor and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 1679-1684
- Kalluri R, Sukhatme VP. Fibrosis and angiogenesis. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2000; 9: 413-418
- Maeshima Y, Manfredi M, Reimer C, Holthaus KA, Hopfer H, Chandamuri BR, Kharbanda S, Kalluri R. Identification of the anti-angiogenic site within vascular basement membrane-derived tumstatin. *J Biol Chem* 2001; 276: 15240-15248
- 李沁, 朱金水. NM-3对体外胃癌细胞株SGC-7901的作用和机制探讨. *中国临床医学* 2006; 13: 77-79

编辑 程剑侠 电编 何基才