

生长抑素类似物联合丝裂霉素对胃癌细胞的抑制作用

苏海燕, 刘文天, 王邦茂, 张文治, 苏心

苏海燕, 刘文天, 王邦茂, 天津医科大学总医院消化科 天津市 300052

张文治, 苏心, 天津环湖医院神经细胞室 天津市 300060

作者贡献分布: 苏海燕与刘文天对此文所作贡献均等; 此课题由王邦茂与刘文天设计; 研究过程由张文治、苏海燕及苏心共同操作完成; 研究所用分析工具由苏海燕提供; 数据分析由苏海燕完成; 本文写作由刘文天与苏海燕完成。

通讯作者: 刘文天, 主任医师, 300052, 天津市, 天津医科大学总医院消化科。lwentian@sohu.com

收稿日期: 2009-11-25 修回日期: 2010-01-25

接受日期: 2010-02-01 在线出版日期: 2010-03-18

Octreotide enhances the inhibitory effects of mitomycin on the growth of gastric cancer SGC-7901 cells

Hai-Yan Su, Wen-Tian Liu, Bang-Mao Wang, Wen-Zhi Zhang, Xin Su

Hai-Yan Su, Wen-Tian Liu, Bang-Mao Wang, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China

Wen-Zhi Zhang, Xin Su, Laboratory of Neural Cells, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China

Correspondence to: Wen-Tian Liu, Department of Gastroenterology, Tianjin Medical University General Hospital, Tianjin 300052, China. lwentian@sohu.com

Received: 2009-11-25 Revised: 2010-01-25

Accepted: 2010-02-01 Published online: 2010-03-18

Abstract

AIM: To investigate the synergistic effects of somatostatin analogue octreotide (OCT) and chemotherapeutic drug mitomycin (MMC) on the growth of gastric cancer SGC-7901 cells.

METHODS: SGC-7901 cells were cultured *in vitro* and divided into four groups: control group, OCT group, MMC group and OCT plus MMC group. The proliferation of SGC-7901 cells was evaluated by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. The expression of apoptosis-related protein Bcl-2 was measured by immunohistochemistry.

RESULTS: OCT at concentrations ranging from 1×10^0 g/L to 1×10^3 g/L could exert inhibitory effects on the growth of SGC-7901 cells. OCT at a concentration of 1×10^5 g/L achieved a reduced rate of cell proliferation of 20.9%, significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$).

The reduced rates of cell proliferation varied from 14.1% to 71.1% when the concentrations of MMC increased from 1×10^{-4} g/L to 1×10^{-2} g/L. OCT in combination with MMC showed a synergistic effect on the growth of SGC-7901 cells: the reduced rates of cell proliferation varied from 22% to 45.8% when the concentration of MMC increased from 1×10^{-3} g/L to 5×10^{-3} g/L ($P < 0.05$). The combined inhibitory effects of MMC and OCT were higher than that of MMC (5×10^{-3} g/L) alone (54.8% vs 30.4%, $P < 0.05$). The percentages of Bcl-2-positive cells were reduced in the OCT group, MMC group and OCT plus MMC group (12.9%, 6.7% and 5.0%, respectively). The percentage of Bcl-2-positive cells was significantly lower in the OCT plus MMC group than in the OCT group and MMC group (both $P < 0.05$).

CONCLUSION: OCT can enhance the inhibitory effects of MMC on the growth of SGC-7901 cells.

Key Words: Somatostatin analogue; Gastric cancer; Chemotherapy; Apoptosis

Su HY, Liu WT, Wang BM, Zhang WZ, Su X. Octreotide enhances the inhibitory effects of mitomycin on the growth of gastric cancer SGC-7901 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(8): 815-818

摘要

目的: 探讨生长抑素类似物奥曲肽(OCT)联合细胞毒化疗药物丝裂霉素(MMC)对胃癌细胞系SGC-7901的抑制作用。

方法: 体外培养人胃癌细胞株SGC-7901, 分别设空白组、对照组、OCT组、MMC组以及OCT+MMC组。用MTT比色法观察对胃癌细胞生长的影响; 用免疫组织化学法分析对细胞凋亡调节基因Bcl-2表达的影响。

结果: 在OCT组中, 当浓度从 1×10^0 g/L到 1×10^3 g/L变化时, OCT对胃癌细胞均有抑制, 当OCT为 1×10^5 g/L时, 其抑制作用最明显(20.9%, $P < 0.05$)。MMC随着浓度由 1×10^{-4} g/L增加至 1×10^{-2} g/L其抑制率也由14.1%增加至71.1%, 呈递增趋势。OCT联合MMC的抑制作

■背景资料

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 发病率、死亡率高, 手术和化疗是主要治疗手段。但是由于恶性程度高、转移早以及术后复发和转移等, 远期疗效不理想。化疗药物不良反应大, 患者耐受性差, 因此本课题组希望找到一种不良反应小、具有抗肿瘤活性的药物, 能够增强化疗药的作用。

■同行评议者

宋于刚, 教授, 南方医科大学南方医院消化内科研究所

■研究前沿

生长抑素类似物-奥曲肽(OCT)对胃癌抑制作用和机制的研究已有报道,但是单独应用抑制率不高,效果不明显。因此本研究应用OCT联合丝裂霉素(MMC),结果显示联合应用抑制率高于MMC单独用药,其机制可能是通过下调细胞凋亡抑制基因Bcl-2的表达,今后仍需要进一步的进行动物实验,以明确其临床价值。

用随着MMC浓度由 1×10^{-3} g/L增加至 5×10^{-3} g/L,抑制率也由22%增加至45.8%(均 $P < 0.05$);当MMC为 5×10^{-3} g/L时,联合治疗组优于单独给药组(54.8% vs 30.4%, $P < 0.05$)。OCT、MMC及OCT+MMC均可以下调Bcl-2的表达,阳性细胞数分别为12.9%、6.7%和5.0%(均 $P < 0.05$),其中OCT+MMC组下调作用最明显。

结论: OCT联合MMC可以增强对胃癌细胞的抑制作用,联合应用可以减低MMC的剂量。

关键词: 生长抑素类似物;胃癌;化学治疗;细胞凋亡

苏海燕, 刘文天, 王邦茂, 张文治, 苏心. 生长抑素类似物联合丝裂霉素对胃癌细胞的抑制作用. 世界华人消化杂志 2010; 18(8): 815-818

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/815.asp>

0 引言

胃癌是消化系常见恶性肿瘤之一,其发病率占所有恶性肿瘤的第1位,近年我国胃癌死亡率呈上升趋势^[1]。手术是治疗胃癌的主要方法,但其恶性程度高、转移早及多药耐药等问题常导致进展期胃癌术后复发和转移、远期疗效不理想,因此化疗仍占有重要地位。近年来,生长抑素类似物(somatostatin analogue, SSTA)的抗肿瘤活性备受关注,本文将着重研究OCT对胃癌细胞的抑制作用以及联合MMC的抗肿瘤效果。

1 材料和方法

1.1 材料 人胃癌细胞株SGC-7901,由本实验室提供。标准胎牛血清(FBS)购自美国Hyclone公司。四甲基偶氮唑蓝(MTT)及二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司。胰蛋白酶购自美国Gibco公司。丝裂霉素(MMC)购自协和发酵工业株式会社。SSTA-奥曲肽(OCT)由瑞士诺华公司提供。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人胃癌细胞株SGC-7901培养于含100 g/L热灭活FBS的RPMI 1640培养基中,在37 °C、50 mL/L CO₂及饱和湿度培养箱中培养。

1.2.2 MTT实验: 取对数生长期的人胃癌细胞株SGC-7901,调整细胞浓度为 1×10^4 /mL,接种于96孔培养板中,每孔100 μL,同时进行以下实验: (1)空白组,不含细胞; (2)对照组,含细胞不加药物; (3)OCT组,每孔中加入OCT后其终浓度分别为 1×10^{-3} 、 1×10^{-4} 、 1×10^{-5} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-9} g/L; (4)MMC组,每

孔中加入MMC后其终浓度分别为: 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} 、 2.5×10^{-3} 、 5×10^{-3} 、 7.5×10^{-3} 、 1×10^{-2} g/L; (5)OCT(1×10^{-5} g/L)+MMC组: MMC取小于IC₅₀的3个浓度 1×10^{-3} 、 2.5×10^{-3} 和 5×10^{-3} g/L。每个浓度设8个平行复孔,培养24 h后加入MTT(5 g/L)每孔15 μL,再培养4 h,弃去上清液,每孔加入DMSO 150 μL,震荡至MTT完全溶解,酶联检测仪600 nm处测吸光度(A)值,求抑制率。抑制率 = (对照组A值-实验组A值)/对照组A值 × 100%。

1.2.3 免疫组织化学法测定Bcl-2蛋白在胃癌细胞的表达: 将实验分为对照组、OCT组(1×10^{-5} g/L)、MMC组(5×10^{-3} g/L)和OCT+MMC组,37 °C、50 mL/L CO₂孵育箱中培育24 h后, PBS冲洗,固定,室温孵育,血清封闭,加鼠抗人P53单克隆抗体4 °C过夜,次日加入山羊抗小鼠IgG,滴加SABC,加入DAB-H₂O₂显色,显微镜观察。在Olympus倒置光学显微镜下Bcl-2阳性细胞呈棕黄或棕黑色,与背景同色为阴性。而后200倍显微镜下计数5个视野,计算阳性细胞百分数。

统计学处理 实验数据均由3次以上独立的重复实验得出,计量资料以mean ± SD描述,数据统计用SAS统计软件进行t检验、组间资料的方差分析及χ²检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 OCT对人胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响 随着OCT浓度由 1×10^{-9} g/L增加至 1×10^{-5} g/L,其抑制率由7.9%增加至20.9%,再增加浓度至 1×10^{-3} g/L其抑制率转而下降为14.3%。当OCT为 1×10^{-5} g/L时,其A值与对照组相比有统计学差异($P < 0.05$)。

2.2 MMC对人胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响 随着MMC浓度由 1×10^{-4} g/L增加至 1×10^{-2} g/L其抑制率也由14.1%增加至71.1%,呈递增趋势。当MMC浓度为 1×10^{-4} g/L时,其A值与对照组相比无统计学差异($P > 0.05$),余治疗组与对照组相比均有统计学差异(均 $P < 0.05$)。

2.3 联合用药对人胃癌细胞株SGC-7901增殖的影响 随着MMC浓度由 1×10^{-3} g/L增加至 5×10^{-3} g/L, MMC+OCT的抑制率也由22%增加至45.8%。各治疗组与对照组相比均有统计学差异(均 $P < 0.05$)。

2.4 单独及联合用药的抑制率比较 当MMC为 1×10^{-3} g/L时, OCT、MMC及OCT+MMC三者的抑制率之间无统计学差异($P > 0.05$); 当

■创新盘点

OCT具有抗肿瘤活性,但其自身的抑癌活性较弱,单独用药尚不能达到满意的疗效,因此本课题组研究OCT联合经典的化疗药物MMC的作用,探讨OCT是否具有化疗药增敏剂的作用,并进一步从细胞凋亡调节基因Bcl-2表达上探讨了二者联合的机制和可能。

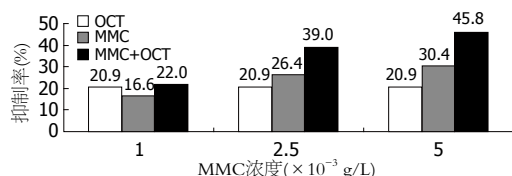


图 1 10^{-5} g/L 奥曲肽联合不同浓度 MMC 对胃癌细胞系 SGC-7901 的抑制。

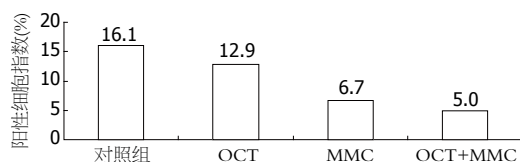


图 2 OCT、MMC、OCT+MMC 对胃癌细胞 Bcl-2 表达的影响。

MMC 为 2.5×10^{-3} g/L 时, OCT 与 MMC 及 MMC 与 OCT+MMC 之间无统计学差异 ($P > 0.05$), 但 OCT 与 OCT+MMC 之间有统计学差异 ($P < 0.05$); 当 MMC 为 5×10^{-3} g/L 时, OCT 与 MMC 之间无统计学差异 ($P > 0.05$), OCT+MMC 与 OCT 及 OCT+MMC 与 MMC 之间均有统计学差异 (均 $P < 0.05$, 图 1)。

2.5 单独及联合用药对胃癌细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响 OCT、MMC 及 OCT+MMC 均可以下调 Bcl-2 的表达, MMC 及 OCT+MMC 与对照组相比有统计学差异 ($P < 0.05$), 其中 OCT+MMC 组下调作用最明显 (图 2)。

3 讨论

生长抑素 (somatostatin, SST) 是一种下丘脑及胃肠道 D 细胞分泌的神经肽类激素, 具有抑制脑垂体生长激素分泌、调节胃肠激素分泌、消化系外分泌以及胃肠内脏血流的作用。天然 SST 的血浆半衰期较短 (不超过 3 min), 临床开发出几种 SSTA, 其血浆半衰期约为 120 min, 而且抑制生长激素从垂体释放的作用较 SST 强约 50 倍。目前, SSTA 已用于许多临床疾病的治疗, 例如: 垂体瘤、肝硬化食管静脉曲张出血以及急性胰腺炎等, 并取得良好疗效。由于 SST 具有诱导癌细胞凋亡和抑制肿瘤细胞生长等作用, 应用 SSTA 治疗肿瘤, 特别是胃肠道肿瘤已成为一个研究热点^[2,3]。OCT 是目前临床中常用的 SSTA。

生长抑素受体 (somatostatin receptor, SSTR) 在体内不仅存在于正常组织中, 多种肿瘤也表达 SSTR, 这是应用 SSTA 治疗肿瘤的分子基础^[4,5]。大量研究显示^[6-8], SSTA 抗肿瘤机制包括 (1) 与存在于肿瘤细胞表面的 SSTR 结合后发挥

的直接作用; (2) 与存在于正常细胞表面的 SSTR 结合的间接作用。Denzler 等报道, 在 1 例胃癌患者的肿瘤周围黏膜下层血管有成倍的 SSTR 表达, 而在来自食管或胰腺癌而没有胃部病变的对照组胃黏膜下层血管中 SSTR 表达就很少^[9]。SSTR 亚型的研究显示, 胃癌细胞膜上有 SSTR3 蛋白表达^[10]。还有研究显示胃癌肿瘤组织中存在 5 种 SSTR 亚型的表达, 并以 SSTR2 表达最为显著^[11]。胃癌细胞系 SGC-7901 是人低分化胃腺癌细胞, 细胞膜表达 SSTR2、3^[12,13]。因此, 这为 OCT 治疗胃癌提供了可能。间接的抗肿瘤作用是通过抑制 GH/IGF-1 轴, 从而抑制促肿瘤生长的细胞因子或激素 (EGF、胰岛素、IGF-1、CCK 等) 的合成与分泌、抑制肿瘤血管的形成、诱导肿瘤细胞发生凋亡。Ferjoux 等^[14]认为受体亚型不同, SSTA 抗增殖作用就会涉及不同的传导通路。

本研究显示, 单独应用 OCT 作用于胃癌细胞系 SGC-7901, 随着浓度的增加其抑制率也增加, 但当其浓度达到 1×10^{-5} g/L 时, 其抑制率最大为 20.9%, 再增加浓度其抑制率反而下降, 提示 OCT 对 SGC-7901 的抑制具有饱和性, 这也间接提示了 SGC-7901 表面存在与 OCT 结合的 SSTR。

当 OCT 与 MMC 联合应用时, 其抑制率与两药单独应用相比有所增加。随着 MMC 浓度由 1×10^{-3} g/L 增加至 5×10^{-3} g/L 时, 其抑制率由 16.6% 增加至 30.4%, 联合 OCT (1×10^{-5} g/L) 后其抑制率由 22.0% 增至 45.8%。由实验结果可见, 1×10^{-5} g/L OCT 及低浓度的 MMC 对 SGC-7901 的抑制无明显差异, 但当二者联合应用时, 轻度 MMC 浓度的增加, 可以导致对 SGC-7901 的明显抑制。该结果显示, OCT 可以增强 MMC 对胃癌细胞的抑制作用, 联合应用可以使小剂量的 MMC 抑制作用增加, 因而减少 MMC 的不良反应。

Bcl-2 是目前公认的调节细胞凋亡的重要基因之一, 其激活和过度表达能抑制细胞正常的凋亡, 延长细胞寿命, 使生理状态下细胞凋亡和增殖的动态平衡发生紊乱, 从而增加肿瘤发生的机会并促进肿瘤的发展。有研究证实 Bcl-2 基因在胃癌中呈高表达^[15,16]。本研究结果显示, OCT 可以下调 Bcl-2 的表达, 这可能是 OCT 抑制胃癌细胞生长的机制之一。OCT 联合 MMC 后, 使其阳性细胞指数由 6.7% 下降至 5.0%。由此可见, OCT 可协同 MMC 下调 Bcl-2 的表达, 减少 Bcl-2 对细胞凋亡的抑制, 进而达到抑制胃癌细胞生长的作用。

■应用要点

本研究从细胞水平探讨了 OCT 联合 MMC 对胃癌细胞的抑制作用, 为今后进一步的临床试验提供了细胞水平的应用基础。

■同行评价

本研究选题较好,设计基本合理,结果可靠,学术价值较好。

OCT是自身分泌的神经肽类激素,有较低的毒性,同时又具有一定的抗肿瘤特性;细胞毒化疗药物具有抑制肿瘤细胞生长的作用,但其存在抑制效率低、不良反应多的缺陷,二者的联合应用则有可能增强作用效率、减少用药剂量,从而减少不良反应,本研究的结果初步显示了OCT与MMC联合应用的优势。

4 参考文献

- 1 孙秀娣, 牧人, 周有尚, 戴旭东, 张思维, 皇甫小梅, 孙杰, 李连第, 鲁凤珠, 乔友林. 中国胃癌死亡率20年变化情况分析及其发展趋势预测. 中华肿瘤杂志 2004; 26: 4-9
- 2 Wängler C, Buchmann I, Eisenhut M, Haberkorn U, Mier W. Radiolabeled peptides and proteins in cancer therapy. *Protein Pept Lett* 2007; 14: 273-279
- 3 Parry JJ, Eiblmaier M, Andrews R, Meyer LA, Higashikubo R, Anderson CJ, Rogers BE. Characterization of somatostatin receptor subtype 2 expression in stably transfected A-427 human cancer cells. *Mol Imaging* 2007; 6: 56-67
- 4 Guillermet-Guibert J, Lahlou H, Cordelier P, Bousquet C, Pyronnet S, Susini C. Physiology of somatostatin receptors. *J Endocrinol Invest* 2005; 28: 5-9
- 5 Reubi JC, Maecke HR. Peptide-based probes for cancer imaging. *J Nucl Med* 2008; 49: 1735-1738
- 6 Charland S, Boucher MJ, Houde M, Rivard N. Somatostatin inhibits Akt phosphorylation and cell cycle entry, but not p42/p44 mitogen-activated protein (MAP) kinase activation in normal and

tumoral pancreatic acinar cells. *Endocrinology* 2001; 142: 121-128

- 7 徐秀英, 张岱, 姜若兰, 卢香兰, 宗志宏. 生长抑素对人胃癌细胞BGC-823生长的调控作用. 中国现代医学杂志 2007; 17: 1037-1040
- 8 邹奕, 肖小平, 李月琴, 张欣, 周天鸿. 生长抑素类似物通过细胞生长抑制和细胞溶解途径以SSTR2依赖的方式抑制癌细胞增殖. 暨南大学学报(自然科学与医学版) 2009; 30: 325-330
- 9 Denzler B, Reubi JC. Expression of somatostatin receptors in peritumoral veins of human tumors. *Cancer* 1999; 85: 188-198
- 10 Hu C, Yi C, Hao Z, Cao S, Li H, Shao X, Zhang J, Qiao T, Fan D. The effect of somatostatin and SSTR3 on proliferation and apoptosis of gastric cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 726-730
- 11 瞿卫, 王自正, 王书奎, 王峰. 胃癌生长抑素受体mRNA表达的研究. 中华肿瘤防治杂志 2006; 13: 498-500
- 12 王承党, 刘霞, 陈滢珊. 胃癌细胞株SGC-7901生长抑素2型受体表达和外源性生长抑素类似物的影响. 中国肿瘤临床 2008; 35: 109-112
- 13 王春晖, 唐承薇, 汤丽平. 奥曲肽抑制胃癌生长的实验研究. 胃肠病学 2002; 7: 158-162
- 14 Ferjoux G, Bousquet C, Cordelier P, Benali N, Lopez F, Rochaix P, Buscail L, Susini C. Signal transduction of somatostatin receptors negatively controlling cell proliferation. *J Physiol Paris* 2000; 94: 205-210
- 15 张子房, 唐炜, 尹江涛. 环氧化酶-2、p53和Bcl-2在胃癌组织中的表达及其意义. 中国医学创新 2009; 6: 12-15
- 16 李霆. Bcl-2家族在胃癌组织中的表达及意义. 山东医药 2008; 48: 37-38

编辑 李瑞敏 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》 2008年影响因子0.729

本刊讯 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统,在“万方数据-数字化期刊群”基础上,结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD),以我国正式出版的各项学科6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据,严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后,进行规范化处理和有效链接,经统计分析,编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次,影响因子0.729,即年指标0.142,引用期刊数732,学科扩散指标0.533,被引半衰期4.303,H指数8。(编辑部主任:李军亮 2010-01-08)