

· 药理实验与临床观察 ·

海嘧啶对 SGC-7901人胃癌细胞凋亡的影响

季宇彬,高世勇,孔琪,张秀娟,杨宝峰*

(哈尔滨商业大学 制药工程系,黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 揭示海嘧啶的抗肿瘤作用机制 方法 采用流式细胞仪测定海嘧啶对人胃癌细胞凋亡及细胞周期的影响;采用激光扫描共聚焦技术观察海嘧啶对人胃癌细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响及 $[Ca^{2+}]_i$ 变化时 Ca^{2+} 的来源 结果 海嘧啶可诱导肿瘤细胞凋亡,可升高肿瘤细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的浓度, $[Ca^{2+}]_i$ 升高时 Ca^{2+} 来源于细胞外钙内流和细胞内钙释放 结论 海嘧啶的抗肿瘤机制为诱导肿瘤细胞凋亡,通过开放细胞膜钙通道和引起细胞内钙释放两条途径升高肿瘤细胞内 $[Ca^{2+}]_i$,启动细胞凋亡机制,从而诱导肿瘤细胞凋亡

关键词: 海嘧啶;人胃癌细胞;细胞凋亡; Ca^{2+}

中图分类号: R286.91; R979.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2001)10-0901-04

Effect of sea pyrimidine on apoptosis of human gastric cancer cell SGC-7901

Ji Yu-bin, GAO Shi-yong, KONG Qi, ZHANG Xiu-juan, YANG Bao-feng

(Department of Pharmaceutical Engineering, Harbin Commercial University, Harbin Heilongjiang 150076, China)

Abstract Object To uncover the antitumor mechanism of sea pyrimidine (SP), a compound Chinese-Western medicinal preparation containing 5-fluorouracil, extracts of *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bunge, *Sophora flavescens* Ait. and certain sea weeds. **Methods** Effect of SP on SGC-7901 gastric cancer cell cycle and apoptosis were determined by FCM and the source of Ca^{2+} during intracellular $[Ca^{2+}]_i$ change, observed by laser scanning confocal microscopy. **Results** SP can induce apoptosis of SGC-7901 tumor cell, and elevate its $[Ca^{2+}]_i$ level. The source of Ca^{2+} originated from extra-cellular $[Ca^{2+}]_i$ and intracellular Ca^{2+} release. **Conclusion** The antitumor mechanism of SP is its action to induce apoptosis of tumor cell through opening of calcium channel and release of intracellular calcium to initiate cellular degradation resulting in tumor cell apoptosis.

Key words sea pyrimidine (sp); human gastric cancer cell; apoptosis; Ca^{2+}

海嘧啶是一种中西药复方抗癌制剂,由抗癌药 5-Fu(5-fluorouracil, 5-Fu)和中药海藻、昆布、黄芪、苦参提取的有效成分组方而成的中西药复方抗癌制剂。近年来,随着分子生物学的发展,其重要意义受到广泛重视,特别是与肿瘤的关系已成为当前研究的热点。新的观点认为肿瘤的发生不仅是分裂失控导致的细胞过度增生所致,同时也可能是细胞凋亡通路受阻,使本该死亡的细胞继续存在而产生肿瘤。

研究已证实海嘧啶抗肿瘤疗效确切^[1,2],为进一步揭示海嘧啶抗肿瘤的作用机制,本研究观察海嘧啶对人胃癌细胞凋亡及细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的影响,试图从分子水平阐明海嘧啶抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 癌细胞株: SGC-7901人胃癌细胞株,由哈尔滨医科大学公共卫生学院提供。

1.2 主要化学试剂:海嘧啶由哈尔滨商业大学药物研究所提供,批号:960517;5-Fu 上海制药十二厂,批号:960217;Fluo-3/AM 荧光探针,美国 Molecular probe 公司;RPMI1640培养基, Gibco 产品;维拉帕米,江苏恒瑞制药厂,批号:980506;56℃灭活小牛血清,天津市生化制药厂。

1.3 主要实验仪器: FACSC ablibur 流式细胞仪(美国 D-D 公司), CO₂恒温培养箱(日本三洋公司),激光扫描共聚焦显微镜(Insight Plus-IQ 型,美国 Meridian 公司),恒温水箱(厦门医疗电子仪

收稿日期: 2000-04-11

基金项目: 国家科委生命中心博士基金资助(项目编号: 96-901-06-10);中国优秀博士后基金资助(中博号[1999]17号);黑龙江省杰出青年基金资助(19906);黑龙江省自然科学基金项目资助(项目编号: D9801)

作者简介: 季宇彬,男,博士,教授,硕士、博士研究生导师,44岁。多年来一直致力于中药药理、肿瘤药理、分子药理学研究,1999年进入哈尔滨医科大学博士后工作流动站工作。

* 哈尔滨医科大学博士后导师

器厂),超净工作台(苏州净化设备厂)。

2 实验方法

2.1 海嘧啶对胃癌细胞凋亡的影响

2.1.1 细胞培养:人胃癌细胞系 SGC-7901 常规细胞复苏后,培养于质量分数为 0.1 的小牛血清 RPMI1640 培养液中,置于 CO₂ 培养箱(37℃,体积分数为 0.05 的 CO₂,相对湿度 95%) 培养 2~3 d 传代 1 次。

2.1.2 分组与给药:将含有人胃癌细胞 SGC-7901 培养瓶分为 5 组,每组 10 瓶。各组培养瓶中分别加入海嘧啶、5-Fu 和培养液,使海嘧啶 3 个剂量组的终浓度为 50, 100 和 200 μg/mL; 5-Fu 的终浓度为 100 μg/mL; 其余一组加入相同体积的培养液。然后放入 CO₂ 培养箱孵育 24 h。

2.1.3 流式细胞仪检测细胞凋亡^[3]:1 体积细胞悬液(约 10⁶ 细胞)加 9 体积 70% 乙醇,于 -20℃ 固定细胞 12 h(可保存 2~3 周)离心,用 PBS 液洗涤除尽乙醇,离心后的细胞重悬于 1 mL PI 染液,室温染色 30 min 用激光(488 nm)或蓝光(BG12 滤光镜)激发后检测红色荧光,FCM。

2.2 海嘧啶对胃癌细胞内 [Ca²⁺] 的影响

2.2.1 细胞培养:同 2.1.1。

2.2.2 分组与给药:用台盼蓝染色记录细胞数量,用培养液将其调整为 2×10^5 个/毫升,分装于各培养瓶中。实验共分为 6 组,4 个时间段。6 组分别为 A, B, C₁, C₂, C₃, D 组,其中 A, B 分别为阴性对照组和阳性对照组, C₁, C₂, C₃ 分别为海嘧啶高、中、低 3 个剂量组, D 为海嘧啶中剂量加维拉帕米组。4 个时间段分别为 12, 24, 36 和 48 h。细胞培养贴壁后,分别换上含各药品的不同浓度的培养液,使各药品终浓度分别为: B 组 50 μg/mL, C₁ 组 200 μg/mL, C₂ 组 100 μg/mL, C₃ 组 50 μg/mL, D 组为 100 μg/mL 海嘧啶和 20 μg/mL 维拉帕米, A 组则用含 10% 小牛血清的 RPMI1640 完全培养液。给药分别培养 12, 24, 36, 48 h 后,收集细胞。

2.2.3 细胞内游离 Ca²⁺ 浓度的测定:胃癌细胞系 SGC-7901 加药后分别于不同时间收集细胞,消化后,用质量分数为 0.1 的 RPMI1640 洗两次,用质量分数为 0.25 的台盼蓝染色,计数活细胞为 95% 以上,细胞悬液 37℃ 预温 5 min 后,用 PBS 及无钙台氏液清洗 2~3 次。加入 100 μL Fluo-3/AM 染液,37℃ 放置 45 min 用适量无钙台氏液制成细胞悬液,在激光扫描共聚焦显微镜下观察细胞内 Ca²⁺ 的变化,并记录细胞的荧光强度,以细胞的荧光强度

反映 Ca²⁺ 的浓度。实验条件:激发波长 488 nm, 40 倍物镜下观察。

2.3 数据处理:数据统计分析进行组间 *t* 检验,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 实验结果

3.1 海嘧啶对肿瘤细胞凋亡及细胞周期的影响:见表 1, 2。

表 1 海嘧啶对人胃癌细胞周期的影响

组别	剂量 (μg/mL)	例数	G ₀ /G ₁ (%)	G ₂ /M (%)	S (%)
对照组	-	10	22.20±5.06	4.09±1.27	73.56±12.10
5-Fu	50	10	44.8±10.25	0.03±0.01	55.13±7.28*
海嘧啶	50	10	22.63±3.34	11.0±3.56	63.38±7.31*
	100	10	26.70±7.99	19.33±4.67	52.83±10.03*
	200	10	12.65±2.43	31.36±7.06	54.27±8.33*

与对照组比较: * *P* < 0.05 ** *P* < 0.01

表 2 海嘧啶对人胃癌细胞凋亡的影响

组别	剂量(μg/mL)	例数	APO(%)
对照组	-	10	0.15±0.04
5-Fu	50	10	0.17±0.06
海嘧啶	50	10	1.16±0.23*
	100	10	1.14±0.20*
	200	10	1.72±0.41*

与对照组比较: ** *P* < 0.01

海嘧啶对肿瘤细胞周期及细胞凋亡的研究结果表明:海嘧啶具有一定程度上的诱发细胞凋亡的作用,与对照组比较差异显著(*P* < 0.01), 5-Fu 则基本没有诱发细胞凋亡的作用。海嘧啶可使 S 期细胞数目明显减少,其结果是促进细胞分化为 G₀-G₁ 和 G₂-M 期,但随剂量的加大,肿瘤细胞主要停留于 G₂-M 期。

3.2 海嘧啶对肿瘤细胞内 [Ca²⁺] 的影响

3.2.1 人胃癌细胞给海嘧啶 12, 24, 36 和 48 h 后细胞内 [Ca²⁺] 的变化:见表 3。

实验结果表明:海嘧啶可显著升高肿瘤细胞内游离钙离子的浓度(*P* < 0.001),且具有剂量依赖性。维拉帕米组(D组)钙离子浓度处于阴性对照组和海嘧啶中剂量组之间,且与二者相比均具有统计学差异(*P* < 0.01)。

3.2.2 人胃癌细胞给海嘧啶不同时间后 [Ca²⁺] 的变化:见表 4。

实验结果表明:海嘧啶作用于肿瘤细胞不同时间后,均可使肿瘤细胞内游离钙离子浓度升高,但相比较而言,海嘧啶作用初期(12 h)肿瘤细胞内游离钙离子浓度升高的幅度最大。

4 讨论

细胞凋亡作为机体的一种主动过程,与细胞病

表 3 人胃癌细胞给海嘧啉 12, 24, 36和 48 h后细胞内 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化

组别	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	细胞数 (<i>n</i>)	$[Ca^{2+}]_i$ (FI)			
			12 h	24 h	36 h	48 h
A	-	20	320.26±147.99	323.50±141.35	339.97±150.19	328.45±135.15
B	50	22	386.00±163.85*	382.67±135.02*	399.83±159.52*	380.42±151.46*
C ₁	200	25	1367.56±133.98**	824.63±155.65**	833.84±133.10**	1119.55±193.94**
C ₂	100	28	916.78±151.46**	672.65±165.16**	684.3±148.45**	787.00±178.19**
C ₃	50	26	724.26±151.33**	532.46±146.76**	519.00±170.92**	547.29±142.25**
D	100+ 20	24	776.36±144.10 [△]	579.16±147.20 [△]	583.67±144.80 [△]	693.38±168.15 [△]

与 A组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与 C₂及 A组比较: [△] $P < 0.01$

表 4 给药不同时间后 $[Ca^{2+}]_i$ 的变化

给药时间 (h)	细胞数 (<i>n</i>)	$[Ca^{2+}]_i$ (FI)
12	28	916.78±151.46
24	23	672.65±165.16
36	26	684.3±148.41
48	28	787.00±178.19

死亡是凋亡

肿瘤细胞的周期动力学特点是细胞群主体分布于 DNA合成活跃的 S期,而分化细胞群主体分布于 DNA合成的静止的 G₁/G₀期^[3]。抗肿瘤药物可使细胞周期动力学发生明显变化。海嘧啉也对 S₁₈₀小鼠肿瘤细胞的细胞周期产生了明显的影响,而且,不同剂量的海嘧啉对肿瘤细胞周期有不同的影响,小剂量 (50 $\mu\text{g/mL}$) 和中剂量 (100 $\mu\text{g/mL}$) 海嘧啉可使细胞阻断在 G₁/G₀期, S期细胞较对照组有明显下降,海嘧啉大剂量则使细胞停止于 G₂和 M期,可见 G₂和 M期细胞明显增多,揭示海嘧啉不同剂量对抑制癌细胞的机制有所不同,海嘧啉对细胞凋亡的诱导存在着多种途径

海嘧啉能通过诱导肿瘤细胞凋亡而达到抗肿瘤的作用。Ca²⁺是细胞凋亡传导系统中的一个重要组成部分,为了进一步确定海嘧啉诱导细胞凋亡而抗肿瘤的作用机制,我们采用激光扫描共聚焦技术观察了海嘧啉对肿瘤细胞内 Ca²⁺浓度的影响。钙在体内以两种形式存在:结合状态和离子状态 (Ca²⁺),而只有 Ca²⁺才具有生理活性,所谓钙离子又分为细胞外 Ca²⁺和细胞内 Ca²⁺两种。研究表明:细胞外液的 Ca²⁺浓度约为 10⁻³ mol/L,细胞内 Ca²⁺浓度为 10⁻⁷ mol/L,经常保持在一定的水平上,细胞内 Ca²⁺仅为细胞外的 1/10 000 但正是在这种细胞内 Ca²⁺变化的参与下,调节众多的生理和代谢过程,特别是在细胞信号传递过程中的作用,日趋受到重视。Ca²⁺目前被认为是一种比较重要的第二信使,同时也参与或协调其他第二信使的代谢和对细胞功能的调节。

在细胞信号转导系统中,内源或外源信号经过细胞膜、胞浆传入细胞核,引起基因表达的变化。信号跨越细胞膜传入胞浆常经过 3条途径:酪氨酸蛋白激酶介导, G蛋白介导和离子通道介导^[5]。而胞浆内信号传导过程中主要包括 3个信使系统^[6]:腺苷酸环化酶系统,肌醇脂质系统和钙调蛋白系统。而由这三个信使系统衍化出 5个相应的传导途径均

理性死亡(坏死)有着本质区别,如果说,坏死是细胞在损伤等病理状况下的死亡,那么,细胞凋亡就是在生理状况下细胞自我选择和控制积极主动的“自杀”过程,尽管凋亡亦参与一些病理进程的发展,但其对正常机制功能的恢复和维持,无疑具有重要意义。肿瘤的发生不仅是因为细胞增殖与分化异常,还要考虑细胞凋亡机制的失常所导致的癌变、发展、演进、转移及带瘤宿主的死亡。肿瘤发病学中的细胞凋亡机制可能有:诱导凋亡基因的失活突变或抑制凋亡基因的过程表达;化学致癌剂、病毒通过影响凋亡机制进而致癌;前癌细胞凋亡机制不全;机体免疫应答诱导肿瘤细胞凋亡的功能不全;宿主细胞粘附因子、生长因子等抑制肿瘤细胞凋亡;肿瘤细胞通过对生存信号的依赖性降低及竞争力增强等逃避凋亡,促进肿瘤转移与恶化。

细胞凋亡与肿瘤发病的关系为抗癌药物的研究提供了新的药理学机制和新靶点。作为抗肿瘤药若能大量地诱发癌细胞的凋亡,激活其自发的程序性死亡过程,就可避免因大量细胞坏死而释放胞内物质引起的各种副作用,减轻化疗对正常组织的损伤,延长患者的生存期。海嘧啉对人胃癌细胞凋亡的影响实验结果表明:海嘧啉对人胃癌细胞的凋亡有一定的促进作用,但是加大剂量后,并不能进一步促进凋亡,这可能是大剂量药物引起坏死细胞增多的缘故。阳性对照药 5-Fu 则基本不能诱发细胞凋亡,这与文献报道 5-Fu 可使细胞凋亡的耐受性增强的结果相吻合^[4]。因此,在海嘧啉组方中可诱发细胞凋亡的有效成分可能是多糖成分,海藻多糖有直接抑制和杀伤癌细胞的细胞毒性,而在低浓度的细胞毒药物的刺激下可发生细胞凋亡;黄芪多糖可增强小鼠 NK 细胞的细胞毒活性,而 NK 细胞引起的靶细胞

可诱导细胞凋亡,这5个途径是(1)胞内 Ca^{2+} 信号系统;(2) cAMP/PKA信号系统;(3) DG/PKC信号系统;(4)酪氨酸蛋白系统;(5)神经酰胺途径。在这些信使系统中主要的信号分子包括 cAMP、 IP_3 、PKC、 Ca^{2+} 等,而 Ca^{2+} 在信号传导中起重要作用,是各条信号传导通路的枢纽^[5]。细胞内含量甚微的 Ca^{2+} 对细胞凋亡起着重要作用。因此我们选择 Ca^{2+} 作为研究肿瘤细胞凋亡信号传导机制的突破点。

本研究应用 Fluo-3/AM 为 Ca^{2+} 的荧光指示剂,采用激光扫描共聚焦技术测定 SGC-7901 人胃癌细胞给药不同时间长度细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的动态变化,因此分为 12、24、36 和 48 h 4 个时间段,同时各时间段又分为对照组及不同剂量给药组,以观察海嘧啉影响细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的剂量依赖性。实验结果表明有:各时间段给药组 Ca^{2+} 浓度均显著高于阴性对照组 ($P < 0.001$),且海嘧啉高、中、低 3 个剂量组升高 Ca^{2+} 浓度的强度具剂量依赖性。而从不同给药时间长度 Ca^{2+} 浓度变化值来看,给药组 Ca^{2+} 浓度 12 h 最高,其他时间段则有所降低,但均显著高于阴性对照组。这与文献报道 Ca^{2+} 升高对细胞凋亡早期细胞凋亡的启动有关相一致。阳性对照组 5-Fu 也具有升高胃癌细胞内 Ca^{2+} 浓度的作用,与文献报道一致^[7],但其强度不及海嘧啉。

Cohen 等^[8]用糖皮质激素诱导胸腺细胞凋亡,发现 $[\text{Ca}^{2+}]$ 持续升高。进一步研究发现引起 DNA 片段化的内源性核酸内切酶是 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖性的,且胞浆浓度升高时,此酶活性明显增强。同样用 Vp16 诱导乳腺癌细胞凋亡以及用肿瘤坏死因子诱导乳腺癌细胞凋亡时,也发现 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高,激活 Ca^{2+} 依赖性的核酸内切酶引起 DNA 片段化和细胞凋亡^[9]。海嘧啉可诱导肿瘤细胞凋亡,同时本实验研究表明海嘧啉可以引起胃癌细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的升高,与其他肿瘤细胞凋亡时 $[\text{Ca}^{2+}]$ 变化一致,说明 Ca^{2+} 在胃癌细胞凋亡过程中激活了 Ca^{2+} 依赖性的核酸内切酶,使细胞凋亡。

海嘧啉可通过升高肿瘤细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 而达到诱导肿瘤细胞凋亡的目的。细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高时, Ca^{2+} 有两方面的来源:一是细胞外 Ca^{2+} 内流,主要是通过钙通道开放引起 Ca^{2+} 内流;二是细胞内钙库

Ca^{2+} 的释放,细胞内 Ca^{2+} 主要贮存于内质网肌浆网中,主要受 IP_3 调节。为了观察海嘧啉引起胃癌细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高时 Ca^{2+} 的来源,我们设计了维拉帕米组:在给药时,加入中剂量的海嘧啉和维拉帕米的混合物,维拉帕米是细胞膜钙通道阻滞剂。由此本组将可能产生三种可能的实验结果:(1)如果 Ca^{2+} 只来源于细胞外钙内流,则此时维拉帕米组 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的值应与阴性对照组相当;(2) Ca^{2+} 只来源于内钙释放,则维拉帕米组 $[\text{Ca}^{2+}]$ 值应与海嘧啉中剂量组值相当;(3) Ca^{2+} 既来源于外钙内流又来源于内钙释放,则维拉帕米组 $[\text{Ca}^{2+}]$ 的值应处于阴性对照组与中剂量组之间且与二者均具有显著性差异。本实验结果表明维拉帕米组 $[\text{Ca}^{2+}]$ 高于阴性对照组而低于中剂量组且统计学差异显著 ($P < 0.001$),由此提示:海嘧啉升高细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 诱导细胞凋亡过程中, $[\text{Ca}^{2+}]$ 升高源于细胞外 Ca^{2+} 的进入和细胞内钙库 Ca^{2+} 的释放,即海嘧啉通过引起细胞膜钙通道开放和结合膜表面受体而引起 IP_3 产生进而引起细胞内钙库 Ca^{2+} 释放两条途径达到升高胞浆 Ca^{2+} 浓度的作用。

海嘧啉通过开放细胞膜钙通道和引起细胞内钙库释放升高肿瘤细胞内 $[\text{Ca}^{2+}]$ 浓度,从而启动细胞凋亡机制,诱导肿瘤细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。

参考文献:

- [1] 季宇彬,高世勇,孔琪,等.海嘧啉抗肿瘤作用的实验研究[J].中草药,2001,32(6):524-527.
- [2] 季宇彬,张秀娟,孔琪,等.海嘧啉对 H_2 小鼠完整细胞膜脂流动性及人胃腺癌细胞内 DNA 含量影响的研究[J].中草药,2001,32(8):713-715.
- [3] 韩锐.抗癌药物研究与实验技术[M].北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997.
- [4] 赵卫红.细胞凋亡[M].郑州:河南医科大学出版社,1997.
- [5] Cole K A, Kohn E C. Calcium-mediated signal transduction biology, biochemistry and therapy [J]. Cancer Metastasis Rev, 1994, 13: 33-34.
- [6] 曹泽毅.激素受体及临床应用[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1993.
- [7] 陈葳,李旭.5-氟尿嘧啶诱导人卵巢癌细胞凋亡的实验研究[J].肿瘤防治研究,1988,25(2):100.
- [8] Cohen J J, Duke R C. Glucocorticoid activation of a calcium-dependent endonuclease in thymocyte nuclei to cell death [J]. J Immunol, 1984, 132: 38-42.
- [9] Robinson J M, Smith D F, Davis E M, et al. Partial characterization of rat hepatoma cell-surface glycoproteins possess concanavalin A receptor activity [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1976, 72: 81-88.