

基础研究

ATRA 和 5-FU 对胃癌细胞端粒酶活性的影响及其抗癌作用

何守搞, 夏忠胜, 朱兆华

(中山医科大学孙逸仙纪念医院消化内科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】观察全反式维甲酸(ATRA)、5-FU 单用和合用对胃癌细胞端粒酶活性的影响及其抗癌作用。【方法】ATRA、5-FU 单用和合用处理体外培养的胃癌 MGC-803 细胞和荷胃癌裸鼠, 用 MTT 法测定细胞活力, 测量裸鼠用药前后的瘤体积, 用端粒重复序列扩增法测定端粒酶活性。【结果】随着 ATRA、5-FU 浓度增高, 作用时间延长, 胃癌细胞活力逐渐下降。40 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 组、5 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU 组和合用组(AF 组, 40 $\mu\text{mol/L}$ ATRA 加 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU)处理胃癌细胞 3 d 细胞活力分别为 46%、47%和 8% ($P < 0.01$), 端粒酶活性分别为 45.7% ($P < 0.01$)、100%和 46.1% ($P < 0.01$)。用药后 ATRA 组、合用组(AF 组)瘤体积显著小于溶剂对照组(不加药), 5-FU 组瘤体积显著小于对照组, 用药后 ATRA 组、5-FU 组、合用组端粒酶活性分别为 61%、100%和 63%。【结论】ATRA、5-FU 在体外、体内均能显著抑制胃癌细胞的生长, 二者合用对体外培养的胃癌细胞生长有协同抑制作用。抑制胃癌细胞端粒酶活性可能是 ATRA 抗肿瘤效应的机制之一。

关键词: 维甲酸; 氟尿嘧啶; 胃肿瘤; 端粒; 末端转移酶

中图分类号: R735.205

文献标识码: A

文章编号: 1000-257X(2000)05-0325-04

Influences of ATRA and 5-FU on Telomerase Activity of Gastric Cancer Cells and Their Antitumor Effects

HE Shou-gao, XIA Zhong-sheng, ZHU Zhao-hua

(Department of Gastroenterology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510120, China)

Abstract:【Objective】To investigate the influences of ATRA or/and 5-FU on telomerase activity of gastric cancer cells and their antitumor effects.【Methods】MGC-803 gastric cancer cells were treated with all-trans-retinoic acid (ATRA) and 5-FU singularly and in combination. Nude mice bearing subcutaneous xenografts were also treated. Cell activities were measured by MTT assay. The volumes of xenografts were measured at the 1st day and the 11th day of experiment. Telomerase activities were measured by telomere repeat amplification protocol(TRAP).【Results】Cell activities of gastric cancer cells decreased when the concentrations of ATRA and 5-FU and the time of culture were increased. The activities of gastric cancer cells cultured with 40 $\mu\text{mol/L}$ ATRA, 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU and 40 $\mu\text{mol/L}$ ATRA combined with 5 $\mu\text{mol/L}$ 5-FU for 3 days were 46%, 47% and 8% respectively ($P < 0.01$). The telomerase activities were 45.7% ($P < 0.01$), 100% ($P > 0.05$), and 46.1% ($P < 0.01$) respectively. At the 11th day of experiment in vivo, the sizes of tumors in ATRA group and AF group were significantly smaller than those in solvent control group, the sizes of tumors in 5-FU group were significantly smaller than those in control group. Meanwhile, the telomerase activity of xenografts in

收稿日期: 2000-03-16

基金项目: 美国中华医学基金会(CMB)资助课题

作者简介: 何守搞(1966-), 男, 广西百色人, 学士, 讲师, 99 级 CMB 访问学者, 现在广西右江医学院附院内二科, 邮编: 533000; 朱兆华, 消化内科主任、教授, 本课题的指导老师。Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

ATRA group, 5-FU group and AF group were 61% ($P < 0.01$), 100% ($P > 0.05$) and 63% ($P < 0.01$) respectively. 【Conclusions】 Both ATRA and 5-FU inhibited the growth of gastric cancer cells in vitro and vivo. Combination of ATRA and 5-FU play a synergistic inhibitory effect on the growth of gastric cancer cells in vitro. The possible mechanism, by which ATRA inhibited tumor growth, is the inhibition of telomerase activity of gastric cancer cells.

Key words: retinoic acid; fluorouracil; stomach neoplasms; telomerase

端粒酶与肿瘤之间关系密切, 已发现 90% 肿瘤细胞端粒酶阳性, 而正常体细胞几乎阴性^[1]。端粒酶的激活可能是各种基因改变导致肿瘤细胞获得“永生化”的最后共同通路, 因此, 通过抑制端粒酶活性阻断肿瘤细胞“永生化”通路, 可达到治疗肿瘤的目的。本研究在体外和体内实验条件下探讨全反式维甲酸、5-FU 单用和合用对胃癌细胞端粒酶活性的影响及其抗肿瘤效应。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人低分化胃粘液腺癌 MGC-803 细胞株, 由中科院生物物理研究所提供。SPF 级雌性 Bal b/c 裸小鼠(6~8 周龄), 由中山医科大学实验动物中心提供。全反式维甲酸(all-trans-retinoic acid, ATRA, 上海第六制药厂生产), 5-FU(上海旭东海普药业有限公司提供), TS、ACX 引物由加拿大 Gender 公司合成。

1.2 细胞生长抑制作用的检测

胃癌 MGC-803 细胞在含 15 mL/L 胎牛血清的 RPMI1640 培养液中, 于 37 °C、50 mL/L CO₂ 条件下培养。分别设对照组(不加药物)和不同浓度药物组(ATRA 40、20、10、5、2.5 μmol/L 组和 5-FU 25、10、5、2、1 μmol/L), 每组设 5 个重复孔, 分别培养 1、3、5 d 后倾去培养液, 各孔加入 5 g/L MTT 20 μL, 再孵育 4 h。然后倾去培养液, 每孔加入 200 μL DMSO, 振荡 15 min, 酶标仪检测吸光度, 以对照组细胞活力为 100%, 按公式: 细胞活力(%) = (药物组吸光度 ÷ 对照组吸光度) × 100%, 计算各组细胞活力, 找出 ATRA 和 5-FU 第 1、3、5 天的 IC₅₀。

1.3 体外培养胃癌细胞抑制实验

根据测得 ATRA 和 5-FU 的 IC₅₀, 分别采用 40 μmol/L ATRA、5 μmol/L 5-FU 和 40 μmol/L ATRA + 5 μmol/L 5-FU 处理胃癌细胞, 对照组为培养液, 每组设 8 瓶。培养 3 d 后收集细胞定量检

测端粒酶活性, MTT 法测不同组的细胞活力。

1.4 胃癌裸鼠皮下移植瘤抑制实验

1.4.1 药物的配制 5-FU 用生理盐水配制成 3 g/L; ATRA 先用 DMSO 溶解, 再加溶剂配制成 4 g/L, 该溶剂^[2] 内含 20 mmol/L NaOH、5 g/L Tween-80、30 mL/L 乙醇, pH7.4。溶剂与 DMSO 按 9:1 体积比混合即为溶剂对照。

1.4.2 荷瘤裸鼠的制备 制备胃癌 MGC-803 细胞悬液, 将细胞悬液注入裸鼠颈背皮下, 制备成瘤源裸鼠。处死瘤源裸鼠, 取出移植瘤剪碎成 2 mm³ 大小瘤块, 接种至各实验鼠。无菌喂养 1 周制备成荷瘤裸鼠。

1.4.3 实验分组及给药 实验设对照组、溶剂对照组、ATRA 组、5-FU 组及合用组(AF 组), 分别用生理盐水、溶剂、ATRA、5-FU、ATRA+5-FU 腹腔给药, 每次以 0.1 mL/10 g 裸鼠的剂量腹腔注射(5-FU 为 30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹[3]; ATRA 为 40 mg · kg⁻¹ · d⁻¹[2]), 每天 1 次, 共 10 d。停药 24 h 后处死裸鼠。用药第 1 天及停药 24 h 测量肿瘤长短径, 按公式: 瘤体积(T) = a²b/2(a 为瘤短径, b 为瘤长径)计算瘤体积^[4]。

1.4.4 移植瘤的处理 无菌取出移植瘤, 常规病理 HE 染色检查, 确证为胃癌组织; 液氮速冻后放入 -85 °C 超低温冰箱保存待测端粒酶。

1.5 端粒酶定量检测

采用 Kim^[1] 创建的端粒重复序列扩增法(TRAP 法), 引物采用 Kim^[5] 报道的序列, TS 引物: 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3', ACX 引物: 5'-GCGCGG(CTTACC)₃CTAACC-3'。电泳凝胶银染显色后用 CS-930 薄层扫描仪, 测定最大吸收峰面积值。以对照组端粒酶活性为 100%, 按公式: 端粒酶活性(%) = (药物组最大吸收峰面积值 ÷ 对照组最大吸收峰面积值) × 100%, 计算各组端粒酶活性。

1.6 统计学处理

两组资料的均数比较用 *t* 检验, 多组资料的均数比较用方差分析。

2 结果

2.1 体外实验

2.1.1 ATRA 对胃癌细胞活力的影响 随着 ATRA 作用时间的延长和浓度的加大, 体外培养的胃癌 MGC-803 细胞的细胞活力逐渐下降, ATRA 第 1、3、5 天的 IC₅₀ 分别为: > 40 μmol/L、20 ~ 40 μmol/L、10 ~ 20 μmol/L, 见图 1。

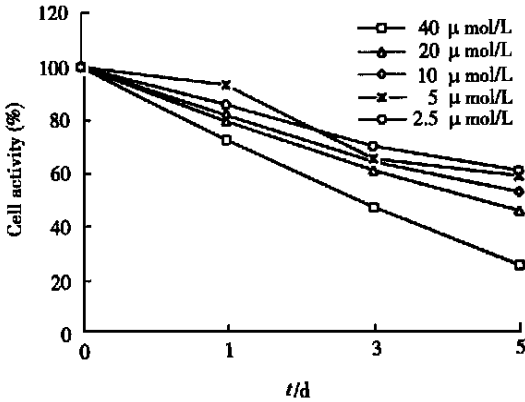


图 1 ATRA 对胃癌细胞活力的影响

Fig. 1 The effect of ATRA on cell activities of gastric cancer cells

2.1.2 5-FU 对胃癌细胞活力的影响 随着 5-FU 作用时间的延长和浓度的加大, 体外培养的胃癌 MGC-803 细胞的细胞活力逐渐下降, 5-FU 第 1、3、5 天的 IC₅₀ 分别为: > 25 μmol/L、2 ~ 5 μmol/L、2 ~ 5 μmol/L, 见图 2。

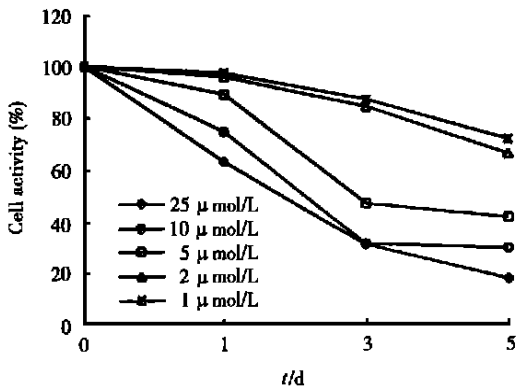


图 2 5-FU 对胃癌细胞活力的影响

Fig. 2 The effect of 5-FU on cell activities of gastric cancer cells

酶活性 ATRA 组、5-FU 组及合用组细胞活力显著低于对照组, 且合用组细胞活力显著低于 ATRA 组和 5-FU 组(表 1)。图 3 显示的是体外实验各处理组端粒酶反应产物一端粒 DNA 序列, 经 PCR 扩增后的 DNA 电泳凝胶银染条带。从表 2 可见, ATRA 组及合用组端粒酶活性显著低于对照组, 而 5-FU 组端粒酶活性与对照组比较无显著差别。

表 1 各组胃癌细胞活力

Table 1 Cell activities of gastric cancer cells in different groups

Group	n	Absorbances(A)	Cell activity(%)
Control	8	1.46 ± 0.11	100
ATRA	8	0.67 ± 0.12	46 ¹⁾
5-FU	8	0.69 ± 0.10	47 ²⁾
ATRA+5-FU	8	0.12 ± 0.03	8 ³⁾

1) 2) 3) P < 0.01, vs control group; 3) P < 0.01, vs either ATRA group or 5-FU group

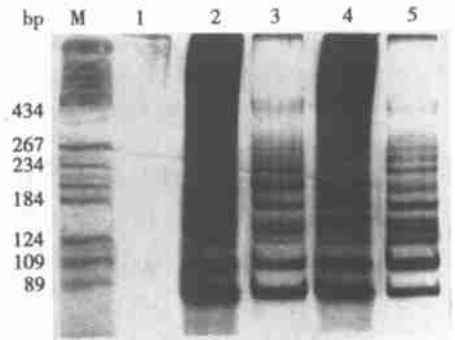


图 3 体外培养各组端粒酶检测的电泳条带

Fig. 3 Electrophoresis ladders in detection of telomerase activity in different groups in vitro

M: DNA marker; 1: negative control; 2: self-positive control; 3: ATRA group; 4: 5-FU group; 5: ATRA+5-FU group

表 2 体外各组端粒酶活性

Table 2 The telomerase activity in different groups in vitro

Group	n	Maxim absorbances(A)	Telomerase activity(%)
Control	8	66.695 ± 14.164	100.0
ATRA	8	30.466 ± 8.001	45.7 ¹⁾
5-FU	8	69.430 ± 14.638	100.0
ATRA+5-FU	8	30.744 ± 8.539	46.1 ²⁾

1) 2) P < 0.01, vs control group

2.2 体内实验

2.2.1 3 组体外实验 3 d 时胃癌细胞活力及端粒

2.2.1 用药前后各组裸鼠移植瘤体积 用药前各

组之间裸鼠移植瘤体积无差别 ($P > 0.05$)。用药后 ATRA 组、合用组裸鼠移植瘤体积明显小于溶剂对照组; 5-FU 组裸鼠移植瘤体积明显小于对照组。用药后 5-FU 组、合用组裸鼠移植瘤体积明显小于用药后 ATRA 组。用药后对照组、溶剂对照组、ATRA 组与用药前自身比较裸鼠移植瘤体积明显增加, 而用药后 5-FU 组、合用组裸鼠移植瘤体积与用药前自身比较无显著差别 ($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 用药前后各组移植瘤体积

Table 3 The volume of xenografts in different groups before and after medication ($\bar{x} \pm s, V/\text{mm}^3$)

Group	n	Before medication	After medication
Control	5	7.8 ± 3.0	13.2 ± 2.6 ¹⁾
Solvent control	5	6.4 ± 4.2	13.4 ± 3.1 ²⁾
ATRA	8	5.5 ± 1.5	9.3 ± 0.8 ³⁾
5-FU	8	5.6 ± 1.8	5.9 ± 1.3 ⁴⁾
ATRA+5-FU	8	6.8 ± 2.3	5.9 ± 0.9 ⁵⁾

3) 5) $P < 0.01$, vs solvent control group after medication; 4) $P < 0.01$, vs control group after medication; 4) 5) $P < 0.01$, vs ATRA group; 1) 2) 3) $P < 0.01$, vs itself before medication

2.2.2 ATRA、5-FU 及合用对移植瘤端粒酶活性的影响 图 4 显示体内实验各组端粒酶反应产物一端粒 DNA 序列, 经 PCR 扩增后的 DNA 电泳凝胶银染条带。从表 4 可见, ATRA 组和合用组端粒酶活性显著低于溶剂对照组, 而 5-FU 组端粒酶活性与对照组比较无显著差别。

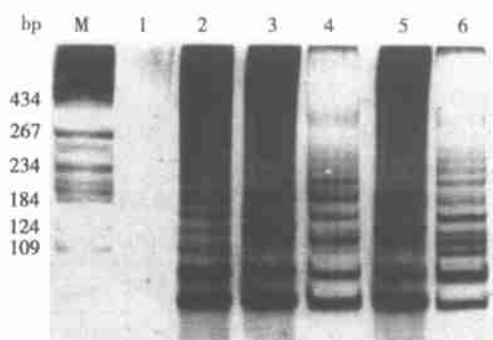


图 4 各组移植瘤端粒酶活性检测的电泳条带

Fig. 4 Electrophoresis ladder in detection of telomerase activity of xenografts in different groups

M: DNA marker; 1: negative control; 2: self-positive control; 3: solvent control group; 4: ATRA group; 5: 5-FU group; 6: ATRA+5-FU group

表 4 体内实验各组端粒酶活性

Table 4 The telomerase activity in different groups in vivo

Group	n	Maxim absorbances ($\bar{x} \pm s$)	Telomerase activity (%)
Control	5	45 490 ± 9 715	100
Solvent control	5	45 743 ± 7 029	100
ATRA	8	27 922 ± 5 279	61 ¹⁾
5-FU	8	46 243 ± 5 820	100
ATRA+5-FU	8	28 814 ± 5 266	63 ²⁾

1) 2) $P < 0.01$, vs solvent control group

3 讨论

端粒的维持通过 3 种途径, 即端粒酶的激活、染色体的重排和转位^[6]。抑制端粒酶活性可导致端粒净丢失、细胞死亡。因此, 可以通过抑制端粒酶活性治疗肿瘤。本研究发现 ATRA、5-FU 对体外培养的胃癌细胞生长均有显著抑制作用, 且呈时间和浓度依赖性, 药物浓度越高抑制作用越强, 作用时间越长抑制作用也越强。ATRA、5-FU 单用应用不仅均能显著抑制胃癌细胞生长, 且合用对胃癌细胞的生长具有协同抑制作用。

Xu 等^[7]用 ATRA 诱导白血病 HL-60 细胞分化时, 发现 HL-60 细胞端粒酶活性显著下降。杨骅等^[8]报道用 ATRA 诱导分化大肠癌时, 大肠癌细胞端粒酶活性下降。本研究发现, 用 ATRA 处理胃癌细胞 3 d, 胃癌细胞端粒酶活性抑制率达 54.3%。Ku 等^[9]报道 5-FU 在抑制鼻咽癌细胞生长时未发现其端粒酶活性下降。Asai 等^[10]报道 5-FU 对食道癌细胞端粒酶活性无影响。本研究亦证实上述实验结果, 5-FU 能明显抑制胃癌细胞生长, 但对端粒酶活性无影响。

5-FU 作为消化道肿瘤的首选化疗药物, 能特异地作用于细胞周期中的 S 期, 通过抑制胸腺嘧啶合成酶阻止 DNA 复制, 阻止细胞分裂, 抑制细胞生长, 导致细胞死亡, 这是 5-FU 的经典作用机制。本研究发现 5-FU 对胃癌细胞端粒酶活性无影响, 但能显著抑制胃癌细胞生长, 说明 5-FU 抑制胃癌细胞生长不是通过抑制端粒酶途径来实现的。我们目前仍认为 5-FU 是通过经典的作用机制来实现其抗肿瘤作用。

从以上分析可以看出, ATRA、5-FU 是分别通过两种不同的机制来抑制胃癌细胞的生长, 而且二

者体外联合应用时发现具有协同抗肿瘤作用。Odom^[11]在治疗皮肤癌前病变光敏性角化病时亦观察到这一现象。我们推测合用时产生协同抗肿瘤作用的机制是:当 ATRA 与 5-FU 合用时,5-FU 杀灭大量的肿瘤细胞,残存少量未杀灭的肿瘤细胞通过 ATRA 对胃癌细胞端粒酶活性的抑制作用,来抑制胃癌细胞的生长。

体内实验发现,ATRA 和 5-FU 均能抑制裸鼠胃癌皮下移植瘤的生长,但未发现 ATRA 与 5-FU 合用对裸鼠移植瘤的生长具有协同抑制作用,这与体外实验中发现二者合用具有协同抗肿瘤作用不同。经处理 10 d 后,对照组、溶剂对照组、ATRA 组瘤体积较用药前增加,5-FU 组瘤体积轻度增加,合用组用药后的瘤体积小于用药前,尽管没有统计学的显著性差异,但可能提示 ATRA 与 5-FU 合用对肿瘤生长有更强的抑制作用。分析造成 ATRA 与 5-FU 合用体外、体内结果不一致的可能原因:①在体内实验条件下,药物经过体内代谢过程并受到体内各种药物外因素的影响,其作用方式、效应都可能与体外实验不同,因而也有可能 ATRA 与 5-FU 合用在体内实验条件下确实没有协同抗肿瘤效应;②用药剂量的因素;③用药时间的因素。

参考文献:

[1] Kim N W, Piatyszk M A, Prowse K R, *et al.* Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer[J]. *Science* 1994, 266(5193): 2011.
[2] Breitman T, Sherman M. *In vivo* model system for differentiation therapy of leukemia and solid tumors[M]. In: Waxman S, Rossi G, Takaker F eds. *The status of differentiation therapy of cancer*. New York: NY Ravek

Press. 1988. 263~275..
[3] Kubota T, Fujita S, Kodaiva S, *et al.* Antitumor activity of fluopyrimidines and thymidylate synthetase inhibition[J]. *Jpn J Cancer Res* 1991, 82(4): 476.
[4] Imaizumi M, Kondo T, Taguchi T, *et al.* A standardized method of using nude mice for the *in vivo* screening of antitumor drugs for human tumors[J]. *Surg Today*, 1993, 23(2): 412.
[5] Kim N W, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomere repeat amplification protocol (TRAP) [J]. *Nucleic Acids Res* 1997, 25(13): 2595.
[6] Autexier C, Greider C W. Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis[J]. *Trends Biochem Sci*, 1996, 21(10): 387.
[7] Xu D, Gruber A, Peterson L, *et al.* Suppression of telomerase in HL-60 cells after treatment with differentiating agents[J]. *Leukemia*, 1996, 10(8): 1354..
[8] 杨 骅,张 行,蔡心涵,等. 维甲酸诱导大肠癌细胞分化与抑制端粒酶活性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 1997, 4(3): 245.
[9] Ku W C, Cheng A J, Wang T C. Inhibition of telomerase activity by PKC inhibitors in human nasopharyngeal cancer cells in culture[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 241(3): 730.
[10] Asai A, Kiyozuka Y, Yoshida R, *et al.* Telomere length, telomerase activity and telomerase RNA expression in human esophageal cancer cells: correlation with cell proliferation, differentiation and chemosensitivity to anticancer drugs[J]. *Anticancer Res* 1998, 18(3A): 1465.
[11] Odom R. Managing actinic keratoses with retinoids[J]. *J Am Acad Dermatol*, 1998, 39(2): 74.

(编辑 黄小延)

简 讯

中山医附一院成功孕育我国首例第 3 代试管婴儿

4月23日晚,我国首例第3代试管婴儿在中山医附一院诞生,目前母婴平安,标志着中山医附一院生殖医学中心已经掌握了第3代试管婴儿技术,即显微辅助授精与现代分子生物学技术的成功结合。

产妇钟女士来自广东河源,1998年第2次怀孕,产前经羊水及脐血检查,证实是男胎。但是,该男胎第8因子缺陷,即血友病,只得中止妊娠。经查,钟女士为血友病携带者。

去年8月,钟女士夫妇求助于我院生殖医学中心,经植入前诊断,取出7个卵子,采用荧光杂交技术筛选出2个女胚胎,最后获得1个单胎妊娠,避免了遗传病的发生,4月23日顺利生产1个体重3.9kg,身长50cm的女婴。

(吴金泉)