

# 吲哚美辛对胃癌细胞株 MKN-45 细胞增殖的影响

苏 媛<sup>1</sup>, 荆梦杰<sup>2</sup>

关键词: 吲哚美辛; 胃肿瘤; 细胞凋亡  
 中图分类号: R735.2 文献标识码: D  
 文章编号: 1000-8578 (2004) 05-0315-02

## 0 引言

流行病学研究发现长期服用非甾体消炎药 (NSAIDs) 的人群消化道肿瘤的发生率显著低于未服用人群<sup>[1]</sup>, 目前基础研究认为 NSAIDs 主要作用点为环氧酶 (COX)。本实验研究环氧酶抑制剂吲哚美辛 (indomethacin) 对胃癌细胞株 MKN-45 细胞增殖的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

胃癌细胞株 MKN-45 (低分化腺癌) 由山东大学医学院生化教研室提供; 吲哚美辛、MTT 购自 Sigma 公司; RP-MI1640 培养液购自 Hyclone 公司; 其余还有酶联免疫检测仪 (DG3022); 激光流式细胞仪 (FACSscan); 透射电镜 (HITACHI H-800); 细胞培养箱 (FORMA SCIENTIFIC); 倒置显微镜 (COIC) 等。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 吲哚美辛对 MKN-45 细胞形态的影响

将对数生长期的 MKN-45 细胞以  $1 \times 10^6$ /瓶接种于培养瓶中。37 ℃, 5% (体积分数) CO<sub>2</sub> 条件下孵育 24h 后更换培养液, 并加入吲哚美辛, 使其终浓度分别 50、100、250、500 μmol/L, 倒置显微镜下观察细胞形态变化。

#### 1.2.2 吲哚美辛对 MKN-45 细胞的生长抑制作用

将对数生长期的 MKN-45 细胞以  $1 \times 10^4$ /孔接种于 96 孔培养板中, 24 小时后换液, 并加入吲哚美辛, 使其浓度分别 50、100、250、500 μmol/L, 设不加吲哚美

辛的对照组, 每组设 3 复孔, 分别培养 12、24、36 和 48h, 加入 MTT (5mg/ml) 20 μl, 作用 4 小时后, 加入 DMSO 100 μl, 孵育 30min, 在酶标仪 570nm 处测吸光度 A 值, 按公式计算生长抑制率

生长抑制率 = (A 对照 - A 加药) / A 对照 × 100%。

#### 1.2.3 流式细胞仪检测

收集经吲哚美辛 50、100、250、500 μmol/L 作用 24h 的 MKN-45 细胞。取  $1 \times 10^6$  细胞, 70% 乙醇固定, 加无 DNA 酶活性的 RNA 酶处理, 溴化丙啶避光染色后上机检测。

#### 1.2.4 透射电镜观察

收集吲哚美辛 100 μmol/L 作用 24h 的 MKN-45 细胞  $5 \times 10^6$  个经 2.5% 戊二醛前固定、1% 四氧化锇后固定, 梯度酒精脱水, Epon812 树脂包埋, ULTRA-CUTE 型超薄切片机制片, 醋酸铀-枸橼酸铅双染色法染色, HITACHI H-800 透射电子显微镜下观察照相。

### 1.3 统计学分析

吲哚美辛对 MKN-45 细胞的生长抑制率用平均生长抑制率 ± 标准差表示, 采用 t 检验。

## 2 结果

### 2.1 吲哚美辛对 MKN-45 细胞形态的影响

吲哚美辛作用的 MKN-45 细胞失去正常的多角形或梭形, 变圆变小, 部分脱落漂浮于培养液中, 浓度越高, 时间越长, 上述表现越明显, 漂浮细胞越多 (图略)。

### 2.2 生长抑制率

结果见图 1。吲哚美辛对 MKN-45 细胞的生长抑制率呈浓度依赖性, 且差异有显著性。

### 2.3 吲哚美辛对 MKN-45 细胞的促凋亡作用

#### 2.3.1 流式细胞仪检测

未经处理的 MKN-45 细胞凋亡率为 2.80%, 吲哚美辛 50、100、250、500 μmol/L 作用 24 小时的 MKN-45 细胞的凋亡率分别为 5.22%、8.57%、16.53%、8.85%。

#### 2.3.2 透射电镜观察

吲哚美辛 100 μmol/L 作用 24 小时的细胞染色质浓缩成细小团块聚集于核膜处成环状和胞膜出芽。

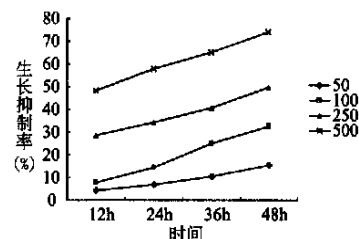


图 1 吲哚美辛对 MKN-45 细胞的生长抑制率 (%)

## 3 讨论

NSAIDs 抗肿瘤的机制尚不明了。目前国外研究热点在于 NSAIDs 对结肠癌的作用机制。有研究表明 NSAIDs 主要通过抑制 COX-2 活性来诱导细胞凋亡。环氧酶 (cyclooxygenase, COX) 是前列腺素合成中的限速酶。目前已发现 COX 的两种同功酶: COX-1 和 COX-2, 两者的结构和生理功能各不相同<sup>[2-4]</sup>。Uefuji K<sup>[5]</sup>、Ristimaki<sup>[6]</sup>、Murata<sup>[7]</sup> 研究发现 COX-2 mRNA 及蛋白在胃癌组织中过表达, 且同胃癌 TNM 分期显著相关。Sheng 发现选择性 COX-2 抑制剂 SC-58125 可使 HCA-7 细胞 PGE<sub>2</sub> 产量、肿瘤细胞集落的大小和数量呈剂量依赖性下降, 细胞凋亡百分比呈剂量依赖性上升。加入外源性 PGE<sub>2</sub> 可逆转 SC-58125 的抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>。

本实验发现吲哚美辛明显抑制 MKN-45 细胞增殖, 透射电镜下观察到典型的细胞凋亡形态特征。通过流式细胞仪测定发现, 当吲哚美辛作用浓度不

大于 250 $\mu\text{mol/L}$  时, MKN-45 细胞的凋亡率随着作用浓度的升高而升高。当吡哆美辛作用浓度为 250 $\mu\text{mol/L}$  时, 凋亡率达到最高; 当其浓度 >250  $\mu\text{mol/L}$  时, 细胞死亡以坏死为主, 凋亡率反而下降。从细胞周期分析来看, 低浓度吡哆美辛作用主要使细胞周期阻滞于 S 期, 因此推断吡哆美辛主要通过诱导 S 期细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用。总之, 吡哆美辛对 MKN-45 细胞有明显生长抑制作用, 主要是通过诱导 S 期细胞的凋亡实现的。

#### 参考文献:

- [1] Thun MJ, Namboodiri MM, Calle EE, et al. Aspirin use and risk of fatal cancer[J]. *Cancer Res*, 2002, 62(10): 2459-2467.
- [2] Morita I, Schindler M, Reigier MK, et al. Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide synthase-1 and 2[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(18): 10902-10908.
- [3] Wu KK, Sanduja R, Tsai AL, et al. Aspirin inhibits interleukin-1-induced prostaglandin synthase expression in cultured endothelial cells[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1991, 88(6): 2384-2387.
- [4] Lee SH, Soyoal E, Chanmuang P, et al. Selective expression of mitogen-inducible cyclooxygenase in macrophages stimulated with lipopolysaccharide[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267(36): 25934-25938.
- [5] Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H, et al. Expression of cyclooxygenase-2 protein in gastric adenocarcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 1998, 69(3): 168-172.
- [6] Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, et al. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma[J]. *Cancer Res*, 1997, 57(7): 1276-1280.
- [7] Murata H, Kawano S, Tsujisaka S, et al. Cyclooxygenase overexpression enhances lymphatic invasion and metastasis in human gastric carcinoma[J]. *Am J Gastroenterol*, 1999, 94(2): 451-455.
- [8] Shen H, Shao J, Morrow JD, et al. Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(2): 362-366.

[编辑: 安凤; 校对: 杨卉]

(上接第 310 页)

在机体可耐受的范围内, 最大程度地杀灭癌细胞, 以进一步提高肝癌的治疗效果, 将是今后努力的方向。

#### 参考文献:

- [1] Tang ZY. Hepatocellular carcinoma[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2000, 15(suppl): G1.
- [2] 周信达. 肝癌诊治的若干进展及展望[J]. *中华消化杂志*, 1999, 19(1): 5-7.
- [3] Ono Y, Yoshimasa T, Ashikaga R, et al. Long-term result of lipiodol transcatheter arterial embolization with cisplatin and doxorubicin for unresectable hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Clin Oncol*, 2000, 23(6): 564-568.
- [4] Okusaki T, Odada U, Ueno H, et al. Evaluation of therapeutic effect of transcatheter arterial embolization for hepatocellular carcinoma[J]. *Oncology*, 2000, 58(4): 293-299.
- [5] 李忱瑞, 郭彦君, 田光辉, 等. 肝癌的肝外动脉供血及其介入治疗[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(2): 163-166.
- [6] 王轩, 广福, 司岑, 等. 经皮肝选择门静脉栓塞化治疗在原发性肝癌合并门静脉癌栓治疗中的应用[J]. *肝胆外科杂志*, 1999, 7(1): 13-14.
- [7] Zelefsky MJ, Fuks Z, Harper S, et al. Clinical experience with intensity modulated radiation therapy (IMRT) in prostate cancer[J]. *Radiother Oncol*, 2000, 55(3): 241-249.
- [8] Risse JH, Grunwald F, Kersjes W, et al. Intraarterial HC therapy with I-131-lipiodol[J]. *Cancer Biother Radiopharm*, 2000, 15(1): 65-70.
- [9] 陈夷, 陈汉, 吴孟超, 等. 经皮微波热凝治疗肝癌的疗效观察[J]. *中华肿瘤杂志*, 2002, 24(1): 9-27.
- [10] Siperstein A, Garland A, Engle K, et al. Laparoscopic radiofrequency ablations[J]. *Surg Endosc*, 2000, 14(4): 400-405.
- [11] Dodd GD, Soulen MC, Kane RA, et al. Minimal invasive treatment of malignant hepatic tumors: at the threshold of major breakthrough[J]. *RadioGraphics*, 2000, 20(1): 9-27.
- [12] 刘剑仑, 韦长元, 李航, 等. 超声引导下经皮冷冻治疗原发性肝癌[J]. *实用肿瘤学杂志*, 1999, 13(3): 224-226.
- [13] 李桂生. 肝癌的非手术局部治疗[J]. *中国医学文摘·肿瘤学*, 2002, 16(2): 189-192.

[编辑: 周永红; 校对: 杨卉]