

ZnPPIX 对胃癌腹膜转移细胞凋亡的影响

仇学明¹, 杜云翔¹, 罗红来¹, 厉 琴¹, 白飞虎², 惠亮亮²

(1. 解放军第 82 医院消化内科, 江苏淮安 223001; 2. 第四军医大学全军消化病研究所, 陕西西安 710032)

[摘 要] 目的 研究 ZnPPIX 对人胃癌腹膜细胞 GC9811-P 凋亡的影响。方法 采用 MTT 法测定 GC9811-P 细胞在 ZnPPIX 作用 48 h 后生长抑制情况; 流式细胞仪观察 ZnPPIX 对 GC9811-P 细胞周期和细胞凋亡的影响; western blot 免疫印迹法观察 ZnPPIX 对细胞系 CIAPIN1、Bcl-2、Bax 蛋白表达水平的影响。结果 各浓度值的 ZnPPIX 均可抑制 GC9811-P 细胞增殖, 并促进肿瘤细胞凋亡, 并降低 CIAPIN1 和 Bcl-2/Bax 蛋白的表达水平。结论 ZnPPIX 可诱导 GC9811-P 细胞的凋亡, 其作用机制可能通过调控 CIAPIN1 基因影响 Bcl-2/Bax 分子的表达。

[关键词] 胃癌; 腹膜转移; ZnPPIX; 凋亡

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2009)06-0495-04

Effect of ZnPPIX on apoptosis of human gastric cancer cell line with peritoneal metastasis

QIU Xue-ming¹, DU Yun-Xiang¹, LUO Hong-lai¹, LI Qin¹, BAI Fei-hu², HUI Liang-liang² (1. Department of Gastrointestinal, the 82th Hospital of PLA, Huai'an 223001, Jiangsu, China; 2. Institute of Digestive, Xijing Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, Shanxi, China)

[Abstract] **Objective** To explore the effect of ZnPPIX on the apoptosis of human gastric cancer cell line GC9811-P with peritoneal metastasis. **Methods** After GC9811-P cells were treated with ZnPPIX for 48 hours, cell proliferation was detected using MTT assay. Flow cytometry was used to detect the apoptosis of GC9811-P cells, and western blot was used to check the expression of CIAPIN1, Bcl-2/Bax. **Results** ZnPPIX inhibited the proliferation of GC9811-P cells at the concentrations of 1×10^{-2} to 1×10^{-9} mol/L, and cell arrested in G₁/S phase. The proportions of apoptosis cells were significantly increased compared with controls. The expression of CIAPIN1 and Bcl-2/Bax was decreased after incubated for 3h with 1×10^{-5} mol/L ZnPPIX. **Conclusion** ZnPPIX induce the apoptosis of gastric cancer cell lines GC9811-P with peritoneal metastasis by suppressing of the expression of CIAPIN1, and affection of its downstream apoptosis factors Bcl-2 and Bax.

[Key words] Gastric cancer; Peritoneal metastasis; ZnPPIX; Apoptosis

我们先前通过噬菌体随机肽库技术筛选出与胃癌腹膜转移细胞表面受体特异性结合的多肽 PⅢ^[1], 进一步获得了多肽 PⅢ的受体分子—血红素氧合酶-1 (Heme oxygenase-1, HO-1)。锌原卟啉 IX (ZnPPIX) 是 HO-1 的抑制剂。本研究利用人胃癌腹膜转移细胞株 GC9811-P^[2] 和 ZnPPIX 体外共孵育, 研究 ZnPPIX 对胃癌腹膜转移细胞凋亡的影响, 从细胞凋亡角度阐明 HO-1 参与胃癌腹膜转移的机制, 为开发具有阻断胃癌腹膜转移作用的药物做前期研究。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃腺癌腹膜转移细胞株 (GC9811-P) 由第四军医大学全军消化病研究所提供。ZnPP ZnPPIX 为日本 Wako Pure Chemical Industries 公司产品, RPMI 1640 培养基、胰蛋白酶均为 Gibco 公司产品; MTT (塞唑蓝), DMSO (二甲基亚砷), RNA (核糖核酸) 酶均为 Sigma 公司产品; 鼠抗人 CIAPIN1 单克隆抗体 (cytokine-induced apoptosis inhibitor 1, 细胞因子诱导的凋亡抑制因子-1) (CHEMICON 公司),

作者简介: 仇学明 (1966-), 男, 贵州威宁人, 本科, 副主任医师, 从事消化内科临床研究。

鼠抗人 Bcl-2、Bax 多抗(Santa Cruz Biotechnology)及鼠抗人 β -actin 抗体均为 Sigma 公司产品。

1.2 ZnPPiX 对细胞增殖的影响 GC9811-P 生长于含 100 ml/L 小牛血清的 RPMI1640 培养基中,常规培养。采用 MTT 法即选择指数生长期的 GC9811-P 细胞,调整细胞悬液浓度为 1×10^5 /L,接种于 96 孔板,每孔接种 100 μ l,另加培养基 100 μ l,37℃,5 ml/L CO₂ 条件下培养 24 h,更换无血清培养基继续培养 24 h,吸去上清液。分组:设空白组(不加细胞)、对照组(不加药)、ZnPPiX 组(分为 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} mol/L),每组 6 个复孔。继续培养 48 h。终止培养前 4 h 加入 MTT 40 μ L/孔,使 MTT 终浓度为 1 g/L。结束培养时,吸去全部上清液,加入 DMSO 150 μ L/孔,只加培养液不加细胞的空白对照孔调零。酶联检测仪上测定吸光度 A 值($\lambda = 492$ nm)。按下列公式计算细胞生长抑制率:抑制率 = [(对照组 A - 空白组 A) - (实验组 A - 空白组 A)]/(对照组 A - 空白组 A) \times 100%。

1.3 细胞周期和细胞凋亡率的测定 取指数生长期的 GC9811-P 细胞,分为 0、12、18、24、48 h 组,各组分别设对照(不加药)、ZnPPiX 组(1×10^{-5} mol/L),培养结束时吸去上清,加 2.5 g/L 胰蛋白酶和 0.2 g/L EDTA 1:1 消化,1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞,700 ml/L 冷乙醇 1 ml 固定细胞,过夜后上机检测。

1.4 ZnPPiX 对 CIAPIN1、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 采用 WesternBlot 法即各时间段 ZnPPiX (1×10^{-5} mol/L)处理组细胞及对照组细胞(未加 ZnPPiX)吸入裂解液中裂解,Bradford 法定量即取 60 微克细胞蛋白通过十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳(10% 凝胶),电转移至硝酸纤维素滤膜上,滤膜用 10% 的脱脂牛奶室温下封闭 2 h 然后分别和鼠抗人 CIAPIN1 单抗 MAb 和鼠抗人 Bcl-2、Bax 隔夜孵育。 β -actin 用抗 β -actin 4℃孵育。经 ECL 显色、曝光。每项实验均做 3 次,以 β -actin 作为内参照。采用 bandscan5.0 软件测定蛋白条带的灰度值,以目的条带灰度值与相对应 β -actin 的灰度值之

比作为样本表达量的指标,比较配对样本间的差异。

1.5 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SAS 8.0 软件对结果进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ZnPPiX 对 GC9811-P 细胞增殖的影响 1×10^{-9} 至 1×10^{-3} mol/L 的 ZnPPiX 对 GC9811-P 细胞的增殖均有抑制作用,ZnPPiX 对 GC9811-P 细胞株的抑制作用随浓度增高而增强 ($P < 0.05$, 表 1), $IC_{50} = 3 \times 10^{-6}$ mol/L。

2.2 GC9811-P 细胞周期、细胞凋亡的影响 ZnPPiX 可明显诱导 GC9811-P 细胞的凋亡,18 h 时凋亡细胞比例显著增加,细胞阻滞于 G₁/S 期,随着时间延长,凋亡比例增高 ($P < 0.05$),见表 1、表 2、表 3。

2.3 ZnPPiX 对细胞 CIAPIN1、Bcl-2/Bax 表达的影响 GC9811-P 细胞 CIAPIN1 基因呈阳性表达,细胞经 ZnPPiX 作用后,CIAPIN1 蛋白水平的表达自孵育 3 h 起下调,18 h 后与对照组比较有显著性差异 ($P < 0.05$, 图 1),Bcl-2/Bax 的表达分别在孵育 6 h 后下调(图 2、3),24 h 后与对照组相比下降有显著差异 ($P < 0.05$)。

表 1 ZnPPiX 对 GC9811-P 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

药物浓度(mol/L)	吸光度(A492)	抑制率(%)
0	0.644 \pm 0.092	-
10^{-9}	0.611 \pm 0.072	6.01 \pm 1.08 *
10^{-8}	0.581 \pm 0.082	10.94 \pm 1.10 *
10^{-7}	0.541 \pm 0.072	26.34 \pm 2.92 *
10^{-6}	0.503 \pm 0.068	43.35 \pm 4.49 *
10^{-5}	0.450 \pm 0.050	61.02 \pm 6.11 *
10^{-4}	0.321 \pm 0.043	79.05 \pm 8.11 *
10^{-3}	0.280 \pm 0.023	96.07 \pm 9.71 *
10^{-2}	0.221 \pm 0.020	96.06 \pm 9.61 *

注:与对照组比较,* $P < 0.05$ (对照组是指药物浓度为 0 mol/L)

表 2 ZnPPiX 对 GC9811-P 细胞系凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

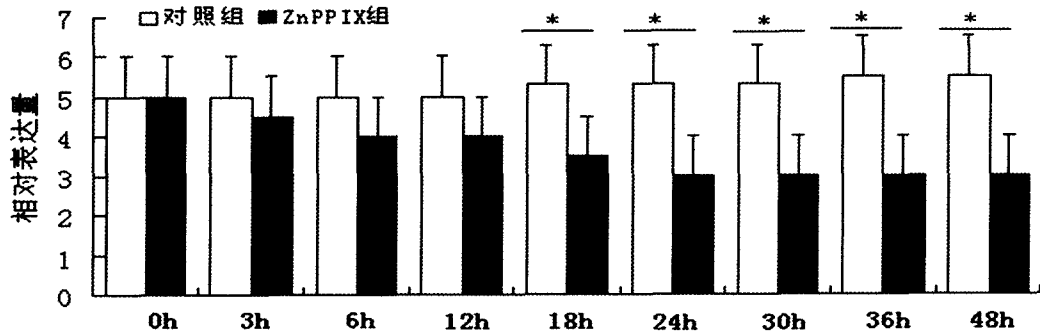
组别	n	0 h	12 h	18 h	24 h	48 h
对照组	3	0.97 \pm 0.12	2.01 \pm 0.27	2.09 \pm 0.23	2.41 \pm 0.35	3.80 \pm 0.39
实验组	3	0.97 \pm 0.12	3.47 \pm 0.51	8.15 \pm 0.90 *	12.14 \pm 1.33 *	21.23 \pm 3.07 *

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

表 3 ZnPPiX 对 GC9811-P 细胞系周期(G_1/S)的影响($\bar{x} \pm s, \%$)

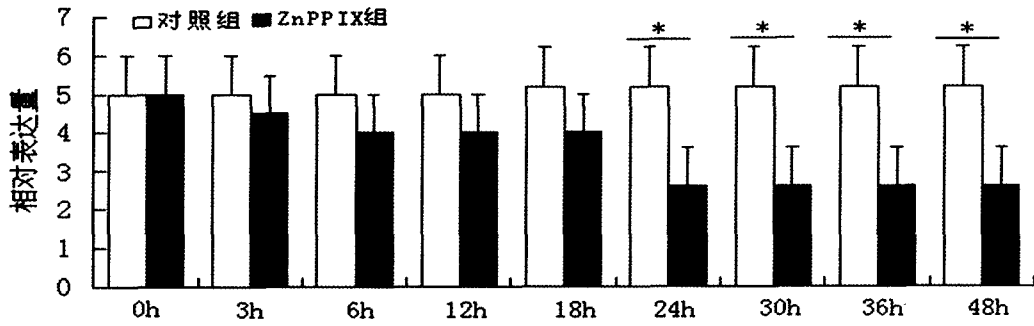
组别	n	0 h	12 h	18 h	24 h	48 h
对照组	3	30.1 \pm 3.22	30.9 \pm 3.13	31.3 \pm 4.02	31.7 \pm 3.92	32.1 \pm 3.81
实验组	3	30.1 \pm 3.22	33.1 \pm 4.52	48.15 \pm 5.90*	53.14 \pm 6.33*	58.23 \pm 3.07*

注:与对照组比较,* $P < 0.05$



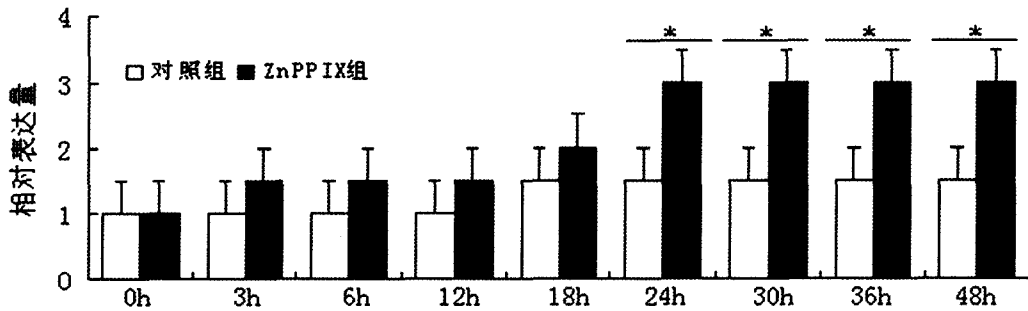
* $P < 0.05$

图 1 不同时间段 ZnPPiX 对 GC9811-P 细胞 CIAPIN1 表达量的影响



* $P < 0.05$

图 2 不同时间段 ZnPPiX 对 GC9811-P 细胞 Bcl-2 表达量的影响



* $P < 0.05$

图 3 不同时间段 ZnPPiX 对 GC9811-P 细胞 Bax 表达量的影响

3 讨论

血红素氧合酶-1 (HO-1) 是血红素降解的限速酶,是具有抗凋亡作用的酶,HO-1 表达上调的结肠癌^[3]、胰腺癌^[4]细胞显著抑制癌细胞的凋亡。近年

来文献报道胃癌组织中 HO-1 的表达与凋亡因子 P21 水平增高有关,并且在两者共同调控下抑制胃癌细胞的凋亡^[5]。然而 HO-1 与胃癌腹膜转移细胞的增殖、凋亡的关系及其相关机制的研究较少。

CIAPIN1 是新近发现的凋亡抑制因子,普遍表

达于成人和胎儿众多组织的细胞质和细胞核^[6]。最近的研究表明, CIAPIN1 的表达与胃癌的耐药基因有关, 并可能参与胃癌的发生、发展^[7]。本研究发现 CIAPIN1 蛋白表达下调与流式细胞仪检测细胞凋亡时间大致一致, 说明 CIAPIN1 很可能是参与调控 ZnPPIX 诱导细胞凋亡过程中重要的调节因子。本研究还发现 CIAPIN1 表达下调时间显著早于 Bcl-2/Bax 表达的改变, 说明 CIAPIN1 基因很可能是调控胃癌腹膜转移细胞凋亡的上游调控基因, ZnPPIX 通过影响 CIAPIN1 的表达来调控细胞凋亡信号转导通路, 但具体通路有待进一步研究。ZnPPIX 对 GC9811-P 细胞的增殖抑制作用可通过影响细胞周期和诱导细胞凋亡来实现。通过流式细胞仪检测发现细胞与 ZnPPIX 共孵育 18h, GC9811-P 细胞凋亡显著增加, 并使细胞阻滞于 (G_1/S) 期, 初步分析认为与 CIAPIN1 诱导抑制蛋白 P27/cyclinD1 的增高有关, 这些抑制蛋白进而抑制细胞周期蛋白-依赖于细胞周期蛋白的激酶-细胞周期抑制蛋白 (CKI), 使细胞周期 G_1/S 期进程延长, 细胞周期进展受阻。

本研究发现 ZnPPIX 可抑制胃癌腹膜转移细胞的生长、诱导细胞凋亡, 其机制可能通过调控 CIAPIN1 基因影响 Bcl-2/Bax 分子的表达, 进一步说明 HO-1 参与胃癌腹膜转移的调控, HO-1 的抗凋亡作用可能是胃癌腹膜转移的发生机制之一。本研究为阐明胃癌腹膜转移的发生机制, 并为研制开发特异

性抗胃癌腹膜转移药物提供了新线索。

参考文献

- [1] Bai F, Wu K, Fan D, et al. Inhibitory effects of a specific phage-displayed peptide on high peritoneal metastasis of gastric cancer [J]. J Mol Med, 2007, 85(2): 169-180.
- [2] Feihu Bai, Kaichun Wu, Daiming Fan, et al. Establishment and characterization of a high metastatic potential in the peritoneum for human gastric cancer by orthotopic tumor cell Implantation [J]. Dig Dis Sci, 2007, 52(6): 1571-1578.
- [3] Busserolles J, Megias J, Terencio MC, et al. Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(9): 1510-1517.
- [4] Sunamura M, Duda DG, Ghattas MH, et al. Heme oxygenase-1 accelerates tumor angiogenesis of human pancreatic cancer [J]. Angiogenesis, 2003, 6(1): 15-24.
- [5] Liu ZM, Chen GG, Ng EK, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 and p21 confers resistance to apoptosis in human gastric cancer cells [J]. Oncogene, 2004, 23(2): 503-513.
- [6] Hao Z, Zhang G, Fan D, et al. Subcellular localization of CIAPIN1 [J]. J Histochem Cytochem, 2006, 54(12): 1437-1444.
- [7] Li X, Liu D, Fan D, et al. CIAPIN1 inhibits gastric cancer cell proliferation and cell cycle progression by downregulating CyclinD1 and upregulating P27 [J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6(10): 1539-1545.

(收稿日期: 2009-07-02; 修回日期: 2009-09-07)

(本文编辑: 潘雪飞; 英文编辑: 王建国)

(上接第 494 页) 复正常机能。热效应能破坏膀胱颈、前列腺等部位平滑肌上的 α 受体, 有利于缓解疼痛及排尿症状。因此, 我们这一多药物多途径综合治疗方案理论上有其合理性, 本组资料证明实际疗效较为满意, 值得尝试推广应用。

参考文献

- [1] Litwin MS, McNaughton-Collins M, Fowler FJ, et al. The National Institutes of Health chronic prostatitis symptom index: development and validation of a new outcome measure [J]. J Urol, 1999, 162(2): 369-375.
- [2] 徐 罡, 鲁 军, 唐孝达, 等. 前列安栓治疗慢性前列腺炎: 多中心双盲随机安慰剂对照试验 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2002, 23(5): 296-297.
- [3] Nichel JC, Downey J, Clork J, et al. Antibiotic pharmacokinetics in the inflamed prostate [J]. J Urol, 1995, 153(2): 527-529.

- [4] 王 平, 王 侠, 刘屹立, 等. 慢性前列腺炎诊治及疗效评价 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2001, 22(9): 528-529.
- [5] Fowler FJ. Antimicrobial therapy for bacterial and nonbacterial prostatitis [J]. Urology, 2002, 60A: 24-26.
- [6] 倪云峰, 尚垣生. 男康片加复方利福平治疗慢性前列腺炎 132 例 [J]. 山西医药杂志, 1995(6): 378.
- [7] Shafik A. Anal submucosal injecting: a new route for drug administration. VI. chronic prostatitis: a new modality of treatment with report of 11 cases [J]. Urology, 1991, 37(1): 61-64.
- [8] 窦 科, 邹建华, 黄 翔, 等. 前列安栓治疗慢性非细菌性前列腺炎的临床研究 [J]. 西部医学, 2006, 18(1): 38-39.
- [9] 韩 平, 魏 强, 石 明, 等. 前列安栓治疗慢性前列腺炎疗效的荟萃分析 [J]. 华西医学, 2006, 21(1): 1-2.
- [10] 陈胜辉, 熊国根, 陈 伊, 等. 体外短波热疗对慢性前列腺炎疗效分析 [J]. 中国康复医学杂志, 2008, 23(1): 61-62.

(收稿日期: 2009-02-03; 修回日期: 2009-03-17)

(本文编辑: 黄攸生; 英文编辑: 王建国)