

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.09.005

丝裂霉素对体外胃癌细胞 DNA 损伤和增殖的影响

贾金海¹, 李 勇², 张晓琳³, 何英辉¹

Effect of Mitomycin on DNA Damage and Proliferation of Gastric Cancer Cell *in vitro*

Jia Jinhai¹, Li Yong², Zhang Xiaolin³, He Yinghui¹

1. Clinic of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China; 2. Cardiothoracic Surgery, Fourth Hospital of Hebei Medical University; 3. Department of Epidemiology and Statistics, Hebei Medical University

Corresponding Author: Zhang Xiaolin, E-mail lukyjia@163.com

Abstract: Objective To study mitomycin - induced DNA damage and proliferation inhibition of gastric cancer cells by detection of γ H2AX *in vitro*. **Methods** Mitomycin with different concentrations was used to incubate gastric cancer cell line SGC-7901 cells *in vitro*. Focus formation and protein levels of γ H2AX were detected by immunofluorescence and western-blotting techniques, respectively, MTT assay was used to detect the proliferation of gastric cancer cell. **Results** The mitomycin existed concentration and time interaction effect. Except 400 μ g/ml, the average number of γ H2AX foci and focus cell rate were gradually increased ($P<0.05$). At 400 μ g/ml, in 6 h group average number of γ H2AX foci and focus of cell rate were less than those in 4 h group ($P<0.05$). With time of mitomycin treatment prolonged, γ H2AX protein levels were increased and then decreased ($P<0.05$). MMC significantly inhibited the proliferation of SGC-7901 ($P<0.05$). **Conclusion** γ H2AX was a sensitive marker to predict DNA damage and proliferation inhibition of gastric cancer cell induced by Mitomycin C *in vitro*.

Key words: Mitomycin; Gastric cancer SGC-7901 cells; γ H2AX; DNA double-strand break; Proliferation

摘 要:目的 探讨丝裂霉素对体外胃癌细胞 DNA 损伤和增殖的影响。**方法** 选用不同浓度丝裂霉素处理体外培养的胃癌细胞 SGC-7901,利用免疫荧光和 Western blot 技术,分别检测 γ H2AX 的焦点形成和蛋白水平变化;使用 MTT 法检测 SGC-7901 细胞的增殖情况。**结果** 丝裂霉素的作用浓度和作用时间存在交互效应,除 400 μ g/ml 外,平均 γ H2AX 焦点数和焦点细胞率呈逐渐增加趋势($P<0.05$);400 μ g/ml 时,6 h 组平均 γ H2AX 焦点数和焦点细胞率低于 4 h 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。随丝裂霉素作用时间延长, γ H2AX 蛋白水平呈先升后降趋势,差异有统计学意义($P<0.05$)。MTT 结果显示,丝裂霉素对 SGC-7901 细胞的增殖有明显抑制作用($P<0.05$)。**结论** γ H2AX 可敏感反应丝裂霉素对胃癌细胞 DNA 的损伤,丝裂霉素对体外胃癌细胞增殖抑制明显。

关键词: 丝裂霉素;胃癌 SGC-7901 细胞; γ H2AX;DNA 双链断裂;增殖

中图分类号:R73-36⁺ 1;R735. 2 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2012)09-1060-04

0 引言

全球范围内,胃癌是发病率最高的恶性肿瘤之一,特别是在中国,胃癌的发病率和死亡率均居世界首位^[1]。丝裂霉素是治疗胃癌的常用药物,可以与 DNA 发生交叉联结,引起 DNA 双链断裂(double-strand break, DSB),抑制 DNA 复制^[2]。 γ H2AX 是磷酸化的组蛋白 H2AX,是检测 DSB 存在的“金标准”^[3]。本研究以 γ H2AX 为检测指标,

分析丝裂霉素对体外胃癌 SGC-7901 细胞 DNA 的损伤,并利用 MTT 法观察丝裂霉素对 SGC-7901 细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

人胃癌细胞 SGC-7901 购自中国科学院上海生命科学研究院,选用含 10% 胎牛血清、100 u/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI1640 培养液培养,置于 37℃、5%CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2 主要试剂和仪器

丝裂霉素由日本协和发酵工业株式会社富士工厂生产,RPMI 1640 培养液购自美国 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,小鼠抗人 γ H2AX 单克隆抗体和小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,山羊血清工作液、FITC 标记山羊抗小鼠

收稿日期:2012-01-29;修回日期:2012-05-09
基金项目:河北省卫生厅医学科学研究重点课题资助项目(20100033)
作者单位:1. 050017 石家庄,河北医科大学门诊部;2. 河北医科大学附属第四医院心胸外科;3. 河北医科大学流行病学与统计学教研室
通信作者:张晓琳, E-mail: lukyjia@163.com
作者简介:贾金海(1976-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤病学预防研究

IgG 抗体和辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京中山生物技术有限公司。XDS-1B 倒置生物显微镜由重庆光学仪器厂生产,FV1000 激光共聚焦扫描显微镜购自 Olympus 公司。

1.3 免疫荧光检测 γ H2AX 焦点

调整细胞浓度至 1×10^5 /ml,按每孔 2 ml 的体积,接种细胞于已放有盖玻片的 6 孔板中,设对照组和不同浓度丝裂霉素实验组(50、100、200 和 400 μ g/ml),各组分别处理 0、0.5、1、2、4 和 6 h,处理结束,4%多聚甲醛冰上固定,一抗室温孵育 2 h,加入荧光二抗 37℃ 孵育 1 h,DAPI 室温孵育 15 min。激光共聚焦扫描显微镜观察计数、采集图像,每组实验重复 3 次,每张玻片至少计数 50 个细胞,用 Image Pro Plus 软件计算各组平均 γ H2AX 焦点数(细胞焦点的总数/细胞数)和 γ H2AX 焦点细胞率(含 γ H2AX 焦点的细胞比例)。

1.4 Western blot 检测 γ H2AX 蛋白

将细胞以 1×10^7 个/瓶种入培养瓶,分组处理后,预冷 PBS 洗涤,刮取细胞,移至 EP 管,冰上操作,加入含 PMSF 的裂解液,抽提核蛋白。Lowry 法定量蛋白质。15% SDS-PAGE 凝胶电泳,4℃、80V 转膜 1 h,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,一抗孵育 2 h,Tween-PBS 洗膜,辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1 h,Tween-PBS 洗膜,ECL 化学发光法显影和定影。凝胶成像分析系统进行灰度扫描,计算各组条带的灰度值。实验选用 β -actin 为内参对照。

1.5 MTT 细胞毒实验

取对数生长期的 SGC-7901 细胞种于 96 孔培养板,每孔 1×10^4 个细胞,每组设 3 个复孔,37℃ 贴壁培养 24 h,加入丝裂霉素,取处理后 0.5、1、2、4 和 6 h 的细胞进行实验,以不含丝裂霉素组为阴性对照,以空白孔进行调零。各组处理结束,分别加 MTT 20 μ l,

4 h 后弃去上清液,每孔加 DMSO 150 μ l,置酶标仪振荡 10 min,570 nm 处测定各孔吸光度值(A 值)。按照下列公式计算抑制率:抑制率(%) = (1 - 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值) $\times$ 100%。

1.6 统计学方法

所有数据均为计量资料,符合正态分布,用 $\bar{x} \pm s$ 表示,细胞平均焦点数和焦点细胞率比较采用析因方差分析,细胞增殖抑制率比较采用 *t* 检验,*P* < 0.05 为差异有统计学意义,使用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 丝裂霉素对 SGC-7901 细胞 γ H2AX 焦点形成的影响

对照组仅有少量 γ H2AX 焦点形成,各实验组 γ H2AX 的焦点数明显增加,见图 1。表 1 和表 2 的析因方差分析结果表明,丝裂霉素作用时间和作用浓度对平均 γ H2AX 焦点数(*F*_{浓度 $\times$ 时间} = 87.089; *P*_{浓度 $\times$ 时间} = 0.000)和焦点细胞率(*F*_{浓度 $\times$ 时间} = 15.923; *P*_{浓度 $\times$ 时间} = 0.000)的影响,均存在交互效应。实验结果还显示,除 400 μ g/ml 外,随丝裂霉素浓度增加和处理时间延长,SGC-7901 细胞平均焦点数和焦点细胞率呈逐渐增加趋势(*P* < 0.05);400 μ g/ml 时,6 h 组平均焦点数和焦点细胞率低于 4 h 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 2。

2.2 丝裂霉素对 SGC-7901 细胞 γ H2AX 蛋白水平的影响

用 400 μ g/ml 的丝裂霉素处理细胞,Western blot 结果表明,除 6 h 组外,随处理时间延长, γ H2AX 蛋白水平呈逐渐增加趋势(*P* < 0.05);6 h 组 γ H2AX 的蛋白水平低于 4 h 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05),见图 3、4。

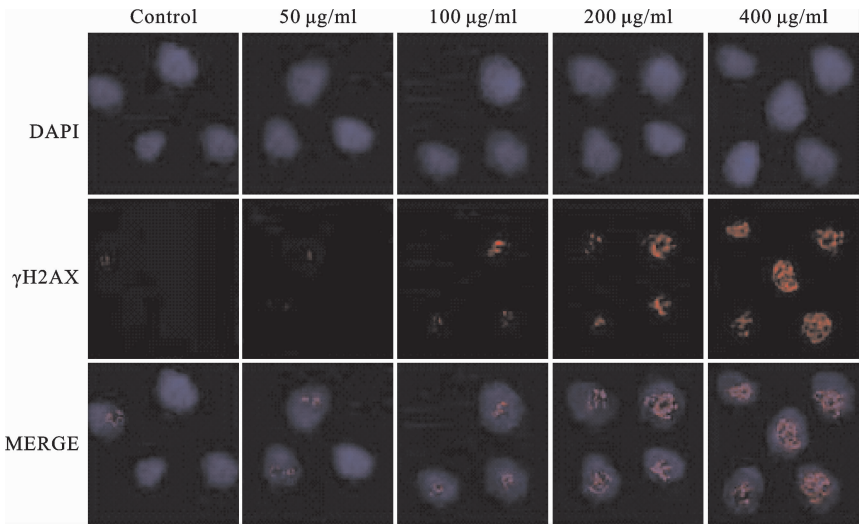


图 1 丝裂霉素致 SGC-7901 细胞 γ H2AX 焦点形成
Figure 1 The formation of γ H2AX focus in SGC-7901 cells treated with Mitomycin

表 1 对照组和实验组平均 γ H2AX 焦点数比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 The mean value of γ H2AX focus in the control and experimental groups($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Groups	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	F_{time}	P_{time}
Control	2.76 $\pm$ 0.23	2.57 $\pm$ 0.20	2.43 $\pm$ 0.13	2.22 $\pm$ 0.13	2.89 $\pm$ 0.12		
50 μ g/ml	2.92 $\pm$ 0.16	3.28 $\pm$ 0.13	3.57 $\pm$ 0.11	4.24 $\pm$ 0.21	5.18 $\pm$ 0.24		
100 μ g/ml	3.42 $\pm$ 0.35	3.93 $\pm$ 0.18	5.85 $\pm$ 0.33	7.78 $\pm$ 0.03	9.24 $\pm$ 1.13	344.970	0.000
200 μ g/ml	5.76 $\pm$ 0.79	8.43 $\pm$ 0.82	13.57 $\pm$ 1.31	18.92 $\pm$ 1.07	25.15 $\pm$ 2.06		
400 μ g/ml	9.86 $\pm$ 0.72	15.21 $\pm$ 1.82	23.04 $\pm$ 1.13	35.35 $\pm$ 1.13	30.27 $\pm$ 1.65		
$F_{concentration}$			1410.554			87.089 [#]	
$P_{concentration}$			0.000				0.000 [#]

Note: [#]: $F_{concentration * time}$ and $P_{concentration * time}$

表 2 对照组和实验组 γ H2AX 焦点细胞率比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 The percentage of γ H2AX positive cells in the control and experimental groups($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Groups	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h	F_{time}	P_{time}
Control	24.60 $\pm$ 3.12	23.82 $\pm$ 2.58	25.32 $\pm$ 2.02	25.86 $\pm$ 0.63	23.28 $\pm$ 0.85		
50 μ g/ml	27.73 $\pm$ 1.69	31.83 $\pm$ 1.85	26.21 $\pm$ 2.01	31.59 $\pm$ 1.35	38.14 $\pm$ 2.05		
100 μ g/ml	30.81 $\pm$ 2.34	33.53 $\pm$ 2.92	37.07 $\pm$ 1.18	45.32 $\pm$ 3.30	44.55 $\pm$ 1.08	98.910	0.000
200 μ g/ml	39.36 $\pm$ 1.71	43.62 $\pm$ 3.08	47.75 $\pm$ 1.19	58.72 $\pm$ 2.50	60.21 $\pm$ 2.56		
400 μ g/ml	42.37 $\pm$ 2.58	45.00 $\pm$ 1.05	53.76 $\pm$ 2.97	75.31 $\pm$ 5.24	64.51 $\pm$ 4.49		
$F_{concentration}$			408.580			15.923 [#]	
$P_{concentration}$			0.000				0.000 [#]

Note: [#]: $F_{concentration * time}$ and $P_{concentration * time}$

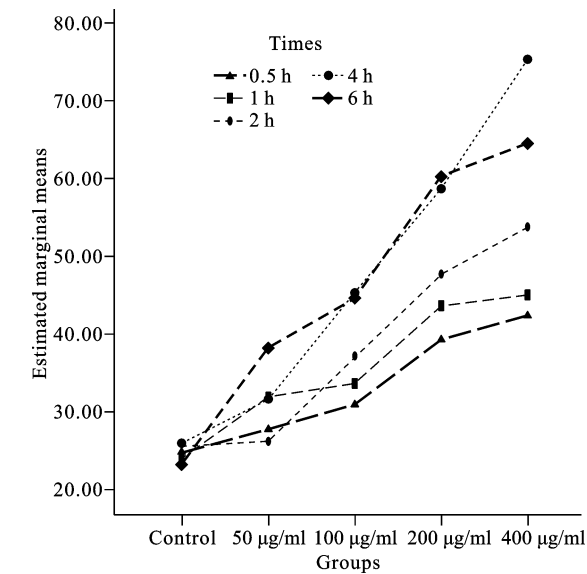


图 2 丝裂霉素对 γ H2AX 焦点细胞率影响的浓度与时间交互作用

Figure 2 The interactions of concentration and time in γ H2AX treated by Mitomycin positive cells

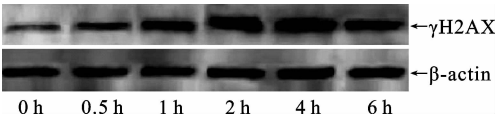
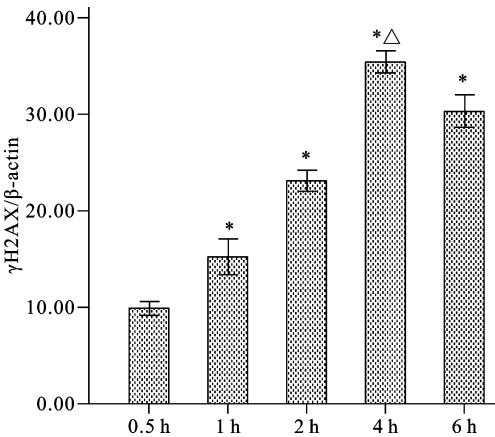


图 3 Western blot 检测 SGC-7901 细胞 γ H2AX 水平变化

Figure 3 The levels of γ H2AX in SGC-7901 cells detected by Western blot

2.3 丝裂霉素对 SGC-7901 细胞增殖的影响

丝裂霉素对 SGC-7901 细胞的增殖呈明显抑制作用,随作用时间延长,抑制率逐渐增高,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。



*: $P < 0.05$, vs. 0.5h group; Δ : $P < 0.05$, vs. 6h group

图 4 各组 SGC-7901 细胞 γ H2AX 水平变化($\bar{x} \pm s$)

Figure 4 The levels of γ H2AX in each group of SGC-7901 cells($\bar{x} \pm s$)

表 3 对照组和实验组抑制率比较($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 The inhibition rate in the control and experimental groups($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Groups	N	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h
Control	3	0.91 $\pm$ 0.11	1.02 $\pm$ 0.18	1.10 $\pm$ 0.10	1.03 $\pm$ 0.09	1.13 $\pm$ 0.08
400 μ g/ml	3	3.51 $\pm$ 0.07	7.69 $\pm$ 0.74	13.38 $\pm$ 1.08	26.76 $\pm$ 1.49	28.04 $\pm$ 1.99
t		-34.238	-15.173	-19.580	-29.870	-23.395
P		0.000	0.003	0.002	0.001	0.002

3 讨论

胃癌是最常见和危害最严重的恶性肿瘤之一^[4]。在我国,男性和女性胃癌发病率均占恶性肿瘤的首位,提高胃癌防治水平已刻不容缓^[5]。化疗是胃癌治疗的重要手段,化学抗癌药物主要通过损伤胃癌细胞 DNA,特别是导致胃癌细胞发生双链 DNA 断裂(double strand break,DSB),阻止胃癌细胞 DNA 复制,从而抑制胃癌细胞的增殖。DSB 的早期生物效应标志之一,就是组蛋白 H2AX 的快速和大量磷酸化,即形成 γ H2AX, γ H2AX 招募修复蛋白并在 DSB 周围形成焦点,一个 γ H2AX 焦点就代表着一处 DSB, γ H2AX 的焦点数越多,表明细胞内的 DSB 越多, γ H2AX 已成为检测 DSB 的“金标准”^[6]。因此,本研究选择 γ H2AX 作为检测指标,分析了丝裂霉素对体外胃癌细胞 DNA 的损伤。

5-氟脲嘧啶、阿霉素、自力霉素和丝裂霉素等,是临床上常用的胃癌化疗药物。然而,只有丝裂霉素一类药物,能够引起胃癌细胞 DNA 的双链交叉联结或断裂,从而发挥其抑制胃癌细胞增殖作用。本研究免疫荧光和 Western blot 结果表明,SGC-7901 细胞 γ H2AX 焦点形成与丝裂霉素作用浓度关系密切,随丝裂霉素作用浓度的增加, γ H2AX 焦点细胞率、平均焦点数和 γ H2AX 蛋白水平都呈明显增加趋势($P<0.05$),提示丝裂霉素作用浓度越高,细胞发生 DSB 的部位越多,这与丝裂霉素的抗肿瘤机制相佐证。结果还显示,当丝裂霉素作用浓度低于 200 $\mu\text{g/ml}$ 时, γ H2AX 焦点细胞率、平均焦点数和 γ H2AX 蛋白水平呈明显的时间依赖性($P<0.05$);然而,当丝裂霉素作用浓度超过 200 $\mu\text{g/ml}$ 时,上述结果呈先升后降趋势,可能原因是随丝裂霉素孵育时间延长,细胞内 DNA 的修复作用超过了损伤作用, γ H2AX 的去磷酸化水平超过了磷酸化水平,这与邹鹏等^[7]研究结果一致。

多年来,人们一直试图在化疗前评估对肿瘤细胞杀伤有效的药物,以便使抗癌治疗更有针对性。MTT 法是近年来发展起来的有效药敏测定法,此方法操作简便迅速,倍受基础和临床研究者欢迎^[8]。

以丝裂霉素为代表的抗癌药物在胃癌及胃癌前病变的化学防治中具有重要作用。本研究细胞毒性实验结果表明,丝裂霉素对 SGC-7901 细胞的增殖呈明显抑制作用,随作用时间延长,抑制率逐渐增高,与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),这也进一步验证了本研究的免疫荧光实验结果。

参考文献:

[1] Wu YJ,Tang Y,Zhang Y,et al. Clinicopathological significance of cofilin1 in gastric cancer tissues [J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu,2012,39(3):295-98. [吴勇军,唐仪,张漾,等. cofilin1 在胃癌组织中表达的临床病理意义[J]. 肿瘤防治研究,2012,39(3):295-98.]

[2] Bai JJ,Jiang YN,Sun L,et al. Effects of mitomycin on ultrastructure and expression of TOPO II α in human gastric cancer cells [J]. Hebei Bei Fang Xue Yuan Xue Bao(Yi Xue Ban),2008,25(4):22-4. [白金君,蒋亚楠,孙黎,等. 丝裂霉素对人胃癌细胞超微结构和拓扑异构酶表达的影响[J]. 河北北方学院学报(医学版),2008,25(4):22-4.]

[3] Rothkamm K,Horn S. Gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure [J]. Ann Ist Super Sanita,2009,45(3):265-71.

[4] Parkin DM, Bray F,Ferlay J,et al. Global cancer statistics,2002 [J]. CA Cancer J Clin,2005,55(2):74-108.

[5] Mao DL,Ye W,Li FQ,et al. The relationship between spatial distribution of gastric cancer and geographical environment [J]. Zhejiang Yu Fang Yi Xue,2011,23(6):5-8. [毛德玲,叶玮,李凤全,等. 胃癌空间分布与地理环境关系的研究[J]. 浙江预防医学,2011,23(6):5-8.]

[6] Redon CE,Dickey JS,Bonner WM,et al. γ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin [J]. Adv Space Res,2009,43(8):1171-8.

[7] Zou P,Yang XL,Chen X. The effect of bleomycin on DNA damage and H2AX interacting proteins in hepatocellular carcinoma(HCC) cells [J]. Fudan Xue Bao(Zi Ran Ke Xue Ban),2011,50(2):172-7. [邹鹏,杨晓丽,陈先. 博来霉素对肝癌细胞 DNA 损伤以及 H2AX 相互作用蛋白的影响[J]. 复旦学报(自然科学版),2011,50(2):172-7.]

[8] Ai J,He LX,Liang SY. Inhibitory effect of antitumor drugs on growth of gastric cancer cell in vitro [J]. Hebei Yi Ke Da Xue Xue Bao,2002,23(1):19-21. [艾军,何兰欣,梁锁源,等. 抗癌药物对体外胃癌细胞生长的抑制作用[J]. 河北医科大学学报,2002,23(1):19-21.]

[编辑:刘红武;校对:周永红]