

# 世界华人消化杂志

**WORLD CHINESE  
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

**Shijie Huaren Xiaohua Zazhi**

**2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (Volume 13 Number 14)**



**14/2005**

名誉总编辑

潘伯荣

总编辑

马连生

世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊,  
2003年百种中国杰出学术期刊,

《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学  
类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊.

世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》,  
荷兰《医学文摘库/医学文摘》,  
俄罗斯《文摘杂志》收录.

# 世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

● 目 次 ● 2005 年 7 月 28 日 第 13 卷 第 14 期 (总第142期)

述 评	1645 进一步加强慢性肝炎、肝纤维化治疗研究 姚希贤, 崔东来 1650 胃肠道生理功能的再认识与肠衰竭 丁连安, 黎介寿
胃 癌	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众
肝 癌	1658 Maxizyme对肝癌突变抑癌基因p53的抑制作用 李岩, 林菊生, 孔心涓 1663 肝癌组织中TGF- $\beta$ 1、TGF- $\beta$ 1R II和NF- $\kappa$ B的表达 缪林, 张锁林, 季国忠, 范志宁, 刘政, 张平, 杨春 1667 肝细胞癌组织和外周血中肿瘤/睾丸抗原SSX-2和SSX-5的表达 吴力群, 王新建, 张斌, 卢云, 杨金镛 1673 肝细胞肝癌患者肿瘤/睾丸抗原SSX-1及NY-ESO-1mRNA的表达意义 吴力群, 王新建, 卢云, 张斌, 杨金镛 1679 重组人内皮抑素真核表达载体pCD-sEndo的构建和表达 邵俊伟, 刘然义, 易继林, 卢绮萍, 黄文林 1684 蛋白质芯片飞行质谱技术检测体外培养的肝癌细胞株与转染HBV的肝癌细胞株蛋白质的差异表达 丁守怡, 钱冬萌, 闫志勇, 宋旭霞, 牟文凤, 王斌
病毒性肝炎	1688 酵母双杂交技术筛选白细胞cDNA文库中新基因NS2TP蛋白结合蛋白基因 张黎颖, 成军, 邓红, 郭江, 郭风劲, 王巧侠 1692 抗HBV多聚酶TP区VH抗体体外可抑制HBV复制 于俊岩, 兰林, 王宇明, 丁世涛 1696 黑龙江地区乙型肝炎病毒耐药变异与基因型 李迪, 张淑云, 谷鸿喜, 程险峰, 王晓燕 1700 丙型肝炎病毒非结构蛋白2反式调节基因NS2TP的克隆化 张黎颖, 成军, 邓红, 刘妍, 王琳
基础研究	1705 苷脱氨酶基因对小鼠大剂量化疗的保护作用 路平, 王永来, 金锋, 陈波, 姚凡, 王舒宝, 陈峻青, 徐惠绵, 赵实诚 1713 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用 刘静冰, 秦叔逵, 李进 1717 消炎痛和阿斯匹林对C57BL/6和Balb/c小鼠胃酸分泌的效应 王昌成 1721 $^{103}$ Pd诱导犬胆管增殖平滑肌细胞凋亡及对相关基因的影响 何贵金, 吴荣, 高沁怡, 许书河, 高红, 姜维国, 蒋涛, 戴显伟, 马凯
文献综述	1725 热休克蛋白家族与肝癌的关系 吴顺华, 成军, 郑玉建 1731 HCV的基因型及其变异与肝细胞癌的关系 韩苏夏, 刘正稳, 马瑾璐 1734 移植肝细胞基因调控研究 林勇, 曾欣 1737 三氧化二砷治疗肝癌的分子机制 吴顺华, 成军, 郑玉建 1744 丁酸钠抗肿瘤作用的新进展 崔路佳, 高善玲, 裴风华 1747 聚乙二醇 $\alpha$ -干扰素治疗慢性乙型肝炎的研究进展 周平, 谢仁江 1750 人类免疫缺陷病毒与黏膜免疫 杨贵波, 邵一鸣
研究快报	1760 胰腺外分泌功能研究大鼠模型的建立 陈小燕, 李兆申, 屠振兴, 曹晓鹏 1762 乳杆菌细胞壁表面黏附相关蛋白的提取和鉴定 王斌, 魏泓 1766 幽门螺杆菌和促胃液素在胃癌前病变中的作用 郑宗茂, 吴灵飞, 冯家琳, 李国平, 王炳周 1768 表皮生长因子及其受体mRNA在胃溃疡发生与愈合过程中的表达 谭永港, 舒晴, 邱猛进, 张永锋 1770 巢式PCR-RFLP法对湖南省乙型肝炎病毒Bj和Ba基因亚型的初步鉴定 温志立, 谭德明, 杨铁一, 徐铿 1773 阿霉素对胃癌细胞内游离Ca $^{2+}$ 浓度的影响 邢承忠, 路平, 郭晓临, 刘瑾, 徐惠绵, 袁媛 1776 BALB/C小鼠炎症性肠病动物模型建立方法探讨 刘敬军, 郑长青, 潘丽丽, 闻英, 胡刚正

临床经验	1779 社会因素对老年人群幽门螺杆菌感染的影响 张玫, 汤哲, 汤欣, 蔡玲, 牛小羽, 孙书春 1781 口服药物致食管溃疡22例 王孟春, 张丽瑶, 钟琳琳 1782 经内镜乳头括约肌预切开术在困难ERCP中的应用 王庆, 秦明放, 勾承月, 李宁, 王震宇, 邹富胜 1785 肠镜检查肠道准备无效率的影响因素 蔡文智, 智发朝, 李凤伶, 陈秀云, 姜泊 1787 中国人与非洲黑人 <i>H. pylori</i> 相关胃十二指肠疾病发生情况比较及分析 廖常奎, Geojanna GA 1790 大肠癌术后时辰化疗联合中医时间医学治疗的临床研究 张思奋, 罗湛滨, 吴文江, 何晶, 范小华 1792 幽默疗法辅助治疗慢性萎缩性胃炎53例 阮鹏, 阮浩然 1794 肝炎肝硬化患者血清IL-10、IL-18水平及意义 谭永港, 刘俊, 丁世华, 刘新民 1797 暴发性胰腺炎时腹腔室隔综合征的联合治疗40例 孙早喜, 孙诚谊
致 谢	1800 致谢世界华人消化杂志编委
封面故事	1652 AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响 黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657 <a href="http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm">http://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v13/i14/1652.htm</a>
国际会议	13th United European Gastroenterology Week, UEGW October 15-20, 2005  American College of Gastroenterology Annual Scientific Meeting October 28-November 2, 2005  ISGCON 2005 November 11-15, 2005 <a href="mailto:isgcon2005@yahoo.co.in">isgcon2005@yahoo.co.in</a> <a href="http://www.isgcon2005.com">isgcon2005.com</a>  Advanced Capsule Endoscopy Users Course November 18-19, 2005 <a href="http://www.asge.org/education">www.asge.org/education</a>  II Latvian Gastroenterology Congress November 29, 2005 <a href="mailto:gec@stradini.lv">gec@stradini.lv</a> <a href="http://www.gastroenterologs.lv">www.gastroenterologs.lv</a>  2005 CCFA National Research and Clinical Conference - 4th Annual Advances in the Inflammatory Bowel Diseases December 1-3, 2005 <a href="mailto:c.chase@imedex.com">c.chase@imedex.com</a> <a href="http://www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm">www.imedex.com/calendars/therapeutic.htm</a>  10th World Congress of the International Society for Diseases of the Esophagus February 22-25, 2006 <a href="mailto:isde@sapmea.asn.au">isde@sapmea.asn.au</a> <a href="http://www.isde.net">www.isde.net</a>

<div>世界华人消化杂志</div> <div>Shijie Huaren Xiaohua Zazhi</div> <div>吴阶平 题写封面刊名 陈可冀 题写版权刊名 (半月刊)  创 刊 1993-01-15 改 刊 1998-01-25 出 版 2005-07-28 原刊名 新消化病学杂志</div> <div>名誉总编辑 潘伯荣 社长总编辑 马连生 编辑部主任 张海宁 中文编辑 潘伯荣 张海宁 英文编辑 张海宁 排版校对 张敏 张勇 李琪</div>	<div>编辑 世界华人消化杂志编辑委员会 030001, 山西省太原市双塔西街77号 出版 世界胃肠病学杂志社 100023, 北京市2345信箱 E-mail: <a href="mailto:wcjd@wjgnet.com">wcjd@wjgnet.com</a> <a href="http://www.wjgnet.com">http://www.wjgnet.com</a> 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893 印刷 北京科信印刷厂 发行 国内: 北京报刊发行局 国外: 中国国际图书贸易总公司 (100044, 北京市399信箱) 订购 全国各地邮电局 邮购 世界胃肠病学杂志社发行部 (100023, 北京市2345信箱) 电话: 010-85381901 传真: 010-85381893</div>	<div>世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 2003年百种中国杰出学术期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录.</div> <div>特别声明 本刊刊出的所有文章不代表世界胃肠病学杂志社和本刊编委会的观点, 除非特别声明. 本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换.</div> <div>2005年版权归世界胃肠病学杂志社所有</div>
--	---	---

ISSN 1009-3079	邮发代号	国外代号	国内定价	广告经营许可证
CN 14-1260/R	82-262	M 4481	每期24.00元 全年576.00元	1401004000050

[www.wjgnet.com](http://www.wjgnet.com)

# AGS细胞系中12-LOX的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响

黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众

黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众, 福建医科大学附属协和医院  
消化内科 福建省福州市 350001

黄彩云, 女, 1979-02-26 生, 福建省漳州市人, 汉族. 2003 年福建医科大学  
硕士生, 主要从事胃肠道肿瘤的研究.

福建省教育厅基金项目, No. JA03094

通讯作者: 陈丰霖, 350001, 福建省福州市新权路 29 号, 福建医科大学附属  
协和医院消化内科.

电话: 0591-83357896-8482

收稿日期: 2005-04-11 接受日期: 2005-05-14

## Expression of 12-lipoxygenase and its inhibitor's effect on proliferation of human AGS cell line

Cai-Yun Huang, Feng-Lin Chen, Jian-Ying Li, Zhi-Xin Chen,  
Xiao-Zhong Wang

Cai-Yun Huang, Feng-Lin Chen, Jian-Ying Li, Zhi-Xin Chen, Xiao-Zhong  
Wang, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medi-  
cal University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Supported by the Fund from Education Commission of Fujian Province,  
China, No. JA03094

Correspondence to: Feng-Lin Chen, Department of Gastroenterology,  
Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian  
Province, China.

Received: 2005-04-11 Accepted: 2005-05-14

## Abstract

**AIM:** To investigate the expression of 12-lipoxygenase (12-LOX) and the possible effect of its inhibitor on proliferation of human gastric cancer cell line AGS.

**METHODS:** AGS cells were cultured in RPMI-1640 medium with 100 mL/L fetal bovine serum (FBS), 100 kU/L penicillin and 100 kU/L streptomycin. 12-LOX mRNA was analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The effect of baicalein on the proliferation of the cells was detected by thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) method. The morphological changes of cellular and subcellular structures were observed under inverted microscope and electron microscopy. AO-EB double and TUNEL staining were used to evaluate the apoptotic index of AGS cells.

**RESULTS:** 12-LOX mRNA was expressed in human AGS cells. At concentrations from 20 to 80  $\mu\text{mol/L}$ , baicalein inhibited the proliferation of AGS cells in a concentration- and time-dependent manner from 24 to 72 hours. There were significant differences between any other groups ( $P < 0.01$ ) except 40  $\mu\text{mol/L}$  group at 24 h and 48 h. The

maximum survival rate of the cells was 82.1% and the minimum one was 38.4%. Morphological changes such as chromatin condensatio, apoptotic bodies were observed after treated with baicalein, and some cells become round and suspended. Significant apoptosis was also induced by baicalein, and the apoptotic indexes detected by AO-EB staining showed marked differences between any other groups ( $P < 0.01$ ) except in 0  $\mu\text{mol/L}$  group. The apoptotic index detected by TUNEL staining showed marked difference between 80 and 0  $\mu\text{mol/L}$  at 48 h ( $38.37 \pm 0.36\%$  vs  $7.27 \pm 0.21\%$ ,  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** 12-LOX mRNA is expressed in AGS cell line. Baicalein not only promotes proliferation, but also induces apoptosis of human gastric cancer cells *in vitro*.

**Key Words:** 12-lipoxygenase; Baicalein; Gastric cancer; Proliferation; Apoptosis; Reverse transcription polymerase chain reaction

Huang CY, Chen FL, Li JY, Chen ZX, Wang XZ. Expression of 12-lipoxygenase and its inhibitor's effect on proliferation of human AGS cell line. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(14):1652-1657

## 摘要

**目的:** 探讨人胃癌细胞系 AGS 中 12-脂肪氧化酶(12-lipoxygenase, 12-LOX)的表达情况及其抑制剂黄芩素元(baicalein)对 AGS 细胞增殖的影响.

**方法:** AGS 在含 100 mL/L 小牛血清 + 100 kU/L 青、链霉素的 RPMI1640 培养基中常规培养. 用 RT-PCR 检测 12-LOX 在 AGS 中的表达情况, 分别以 20, 40, 80  $\mu\text{mol/L}$  baicalein 干预细胞, 用四氮唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)法在 24, 48, 72 h 测量细胞吸光度, 检测 baicalein 对细胞增殖的影响; 用倒置显微镜和电子显微镜进行形态观察; 通过脱氧核糖核酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL)和吖啶橙-溴化乙锭(AO-EB)染色法检测细胞凋亡指数.

**结果:** AGS 细胞中存在 12-LOX mRNA 表达; MTT 显示 baicalein 大致呈时间、剂量依赖性抑制细胞增殖(各组间  $P < 0.01$ , 除外 40  $\mu\text{mol/L}$  24 h 组与 48 h 组); AGS 细胞存活率最高为 82.1%, 最低为 38.4%. 倒置显微镜下可见 baicalein 干预后的细胞皱缩, 部分细胞胞体变圆, 脱离贴壁状态, 成为悬浮细胞; 电镜下可见 baicalein 干预后的细胞出现了凋亡的特征性改变: 核染色质边集及凋亡

小体形成; AO-EB 染色法显示除 0  $\mu\text{mol/L}$  组不同时间点细胞凋亡指数无显著差异外( $P>0.05$ ), 其余各干预组细胞凋亡指数均有显著差异( $P<0.01$ ); TUNEL 染色法显示 48 h 时, baicalein 80  $\mu\text{mol/L}$  细胞凋亡指数为  $38.37 \pm 0.36\%$  而 0  $\mu\text{mol/L}$  组细胞凋亡指数为  $7.27 \pm 0.21\%$ , 两组间存在显著差异 ( $P<0.01$ ).

**结论:** 人胃癌细胞 AGS 中存在 12-LOX mRNA 表达, 其特异性抑制剂 baicalein 能抑制 AGS 细胞增殖并促进其凋亡.

**关键词:** 12- 脂肪氧化酶; 黄芩甙元; 胃癌; 增殖; 凋亡; 逆转录聚合酶链反应

黄彩云, 陈丰霖, 李建英, 陈治新, 王小众. AGS 细胞系中 12-LOX 的表达及其抑制剂对细胞增殖的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(14):1652-1657 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1652.asp>

## 0 引言

12-LOX 是脂肪氧化酶家族(Lipoxygenases:5, 8, 12, 15-LOX)中的成员之一<sup>[1-4]</sup>, 他是催化花生四烯酸(arachidonic acid, AA)转化为 12-羟基廿碳四烯酸(12-hydroxyeicosatetraenoic acid, 12-HETE)的关键酶<sup>[5]</sup>, 其与肿瘤的关系已成为近年来的研究热点. 尽管 12-LOX 已被证实在多种肿瘤组织及细胞系中表达<sup>[6-10]</sup>, 但其在胃癌细胞系 AGS 中的表达情况及其确切作用却少有报道. baicalein 是从中草药黄芪中提取的一种具有抗炎、抗氧化和抗癌活性的黄酮类化合物, 作为 12-LOX 的特异性抑制剂, 他在体和离体实验均显示有较强的抑制生长和诱导凋亡的作用<sup>[11-16]</sup>. 我们用 RT-PCR 检测 12-LOX mRNA 在 AGS 中的表达情况, 应用 12-LOX 的特异性抑制剂 baicalein 对体外培养的 AGS 细胞进行干预, 分别采用 MTT、电镜、AO-EB 和 TUNEL 对 AGS 细胞增殖与凋亡进行研究, 试图探讨 12-LOX 的特异性抑制剂 baicalein 对胃癌 AGS 细胞增殖与凋亡的影响.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人胃癌细胞系 AGS (中分化胃腺癌细胞系)购自中国科学院上海细胞生物研究所, baicalein 购自 Alexis Biochemicals 公司, 四甲基偶氮唑盐(MTT)购自 Fluka 公司, RPMI1640 购自 Gibco 公司, 胰蛋白酶购自 Sigma 公司, 小牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司, TUNEL 试剂购自北京中山公司, RT-PCR 体系购自深圳晶美公司, RNA 提取试剂(RNA isolation kit)购自 Gentra Systems Inc, 其余试剂均为国产生化试剂.

**1.2 方法** AGS 细胞在含 100 mL/L 小牛血清+100 U/L 青、链霉素的 RPMI1640 培养基中, 于 37℃, 50 mL/L CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养. 收集未经药物干预的 AGS 细胞  $2 \times 10^6$ , PBS 洗涤 2 遍后, 按 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞总 RNA, 测其  $A_{260}$  为 0.1880 ( $A_{260}/A_{280} =$

1.8970), 取 RNA 样品 4  $\mu\text{g}$ , 42℃, 60 min, 95℃, 5 min 合成 cDNA, 12-LOX 基因上游引物:5'-CTTCCCGTGCTACCGCTG-3', 下游引物:5'-TGGGGTTGGCACCATTGAG-3, 337 bp; 内参  $\beta$ -actin 基因上游引物:5'-CTATTGGCAACGAGCGGTTTC-3', 下游引物:5'-CTTAGGAGTGGGGGTGGCTT-3', 776 bp. 取 RT 反应产物 2.0  $\mu\text{L}$  进行 PCR 扩增(反应体系 25  $\mu\text{L}$ ), 扩增条件:94℃, 5 min; 94℃, 45 s; 50℃, 30 s; 72℃, 60 s; 35 个循环; 72℃, 7 min. PCR 产物 10  $\mu\text{L}$  在 17 g/L 琼脂糖凝胶上(含 0.5 g/L 溴化乙锭)进行电泳分离, 在紫外光下自显影, 经计算机扫描成像. 取对数生长期的 AGS 细胞, 经 2.5 g/L 胰蛋白酶消化后, 以  $3 \times 10^4$ /孔接种于 6 孔培养板中, 常规培养 24 h 后, 换成无血清的 RPMI1640 培养液同步化 24 h 后进行分组, 即: 对照组(含等体积无水乙醇), baicalein(baicalein 溶于无水乙醇中, 用含 10 mL/L 小牛血清的 RPMI1640 稀释至 baicalein 终浓度, 使乙醇浓度 <1 mL/L) 20  $\mu\text{mol/L}$  组、40  $\mu\text{mol/L}$  组、80  $\mu\text{mol/L}$  组, 加试剂后继续培养 72 h, 分别于加试剂后 24, 48 和 72 h 取各浓度实验组和对照组细胞, 倒置显微镜下观察细胞形态. 所有实验均独立重复 3 遍. 取未干预细胞和经 80  $\mu\text{mol/L}$  baicalein 干预 48 h 的细胞经 30 g/L 戊二醛-15 g/L 多聚甲醛前固定 2 d(4℃), 10 g/L 锇酸-15 g/L 亚铁氰化钾后固定 1.5 h, PBS 漂洗; 700 mL/L 乙醇饱和醋酸铀块染, 乙醇-丙酮梯度脱水, 环氧树脂 618 包埋, 超薄切片 80 nm, 醋酸铀、柠檬酸铅染色各 5 min; 在日立 Hu-12A 型透射电镜下观察、摄影.

**1.2.1 MTT 法检测 AGS 增殖情况** 以  $5 \times 10^3$ /孔接种 AGS 细胞于 96 孔培养板中, 药物干预同前, 于加试剂后的 24, 48 和 72 h 每组各取 7 孔用 0.01 mol/L PBS 冲洗两遍后加入 MTT 溶液(5 g/L)20  $\mu\text{L}$ , 37℃ 孵育 4 h, 吸去孔内培养液, 每孔加入 DMSO 溶液 150  $\mu\text{L}$  于振荡器上振荡 10 min, 以空白孔调零, 在酶联免疫检测仪上测 490 nm 波长每孔的吸光度值(absorbance), 求其平均值. 细胞存活率 = (实验组吸光度值/对照组吸光度值)  $\times 100\%$  (假定加药时细胞的存活率为 100%, 此时记为 0 h).

**1.2.2 AGS 凋亡情况的检测** TUNEL 染色法按 TUNEL 试剂盒的产品说明书, 以 PBS 代替 TdT 溶液作阴性对照, DNAase I 处理的切片作阳性对照, 具体步骤如下: 制备好的含有细胞的盖玻片干燥后加 40 g/L 多聚甲醛 50  $\mu\text{L}$  于室温固定 1 h, PBS 漂洗  $3 \times 5$  min; 加 3 mL/L 过氧化氢甲醇溶液 50  $\mu\text{L}$  于室温孵育 30 min, PBS 漂洗  $3 \times 5$  min; 加 50  $\mu\text{L}$  含 1 g/L TritonX-100 的枸橼酸钠溶液 4℃ 通透 3 min, PBS 漂洗  $3 \times 5$  min;

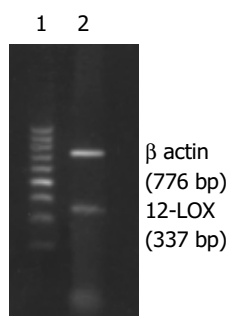


图1 12-LOX 基因电泳图(约 337 bp 阳性扩增带).

加 50  $\mu\text{L}$  TUNEL 反应液于 37 $^{\circ}\text{C}$  湿盒中孵育 1 h, PBS 漂洗 3  $\times$  5 min; 加 50  $\mu\text{L}$  Converter-POD 于 37 $^{\circ}\text{C}$  湿盒中孵育 30 min, PBS 漂洗 3  $\times$  5 min; 加 50  $\mu\text{L}$  DAB 底物显色液室温孵育 10 min, 双蒸水洗涤 10 min, 苏木素复染 10 s, 中性树胶封片, 光镜下观察、计数并拍照, 每片计数 500 个细胞, 计算细胞凋亡指数(即每 100 个细胞中 TUNEL 阳性细胞所占的百分比). AO-EB 双染色法 细胞培养于培养瓶中, 药物干预同前, 于规定时间分别取各浓度干预细胞和未干预细胞, 常规胰蛋白酶消化并制成单个细胞悬液, 取细胞悬液 90  $\mu\text{L}$ , 加 AO 染液(acridine orange, AO, 100 mg/L 溶于 PBS)和 EB 染液(ethidium bromide, EB, 100 mg/L 溶于 PBS)各 5  $\mu\text{L}$ , 用前混合, 盖玻片封片后立即于 490 nm 蓝色荧光下观察、计数并拍照. 每片计数 500 个细胞, 计算细胞凋亡指数, 凋亡指数 = (早期凋亡细胞 + 晚期凋亡细胞) / 总细胞数  $\times$  100%.

**统计学处理** 数据以平均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示, 采用 SPSS10.0 for windows 软件包进行分析, 均数间两两比较用方差分析, 率间比较用  $\chi^2$  检验.

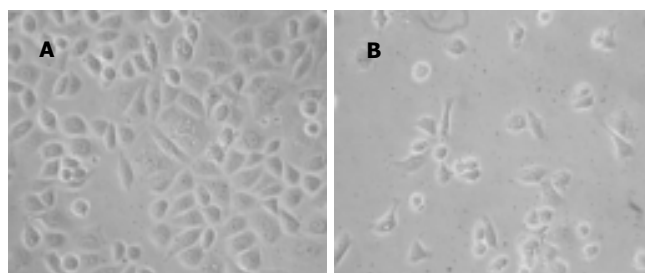


图2 AGS 细胞倒置显微镜图像  $\times 200$ . A: 未经 baicalein 干预的 AGS 细胞; B: 经 80  $\mu\text{mol/L}$  baicalein 干预 48 h 的 AGS 细胞.

## 2 结果

AGS 细胞 RT-PCR 产物经电泳分析, 可见 1 条约 776 bp 的内参  $\beta$ -actin 基因扩增带和 1 条约 337 bp 的 12-LOX 基因扩增带(图 1). 倒置显微镜下干预组细胞皱缩, 部分细胞肿胀明显, 细胞质内可见泡状结构, 部分细胞细胞体变圆, 脱离贴壁状态, 成为悬浮细胞, baicalein 对 AGS 细胞形态变化的影响与时间和剂量有关, 随着时间的延长, 药物浓度的加大, 正常形态细胞数明显减少, 异常形态细胞数逐渐增多(图 2B); 未干预组细胞则呈多边形贴壁生长, 悬浮细胞很少(图 2A). 透射电镜下未经 baicalein 干预的细胞表面存在丰富的微绒毛, 胞膜完整, 各细胞器形态结构无异常改变, 核染色质分布均匀(图 3A); 经 baicalein 干预的细胞表面微绒毛减少甚至消失, 胞膜完整, 细胞皱缩, 核染色质固缩, 边集于核膜下, 部分凋亡细胞可见核碎裂及凋亡小体形成(图 3B-D).

**2.1 baicalein 干预后 AGS 细胞的生长情况** 不同浓度 baicalein 在 72 h 内大致呈时间、剂量依赖性抑制 AGS 增殖(除 40  $\mu\text{mol/L}$  48 h 组与 24 h 组  $P = 0.122$

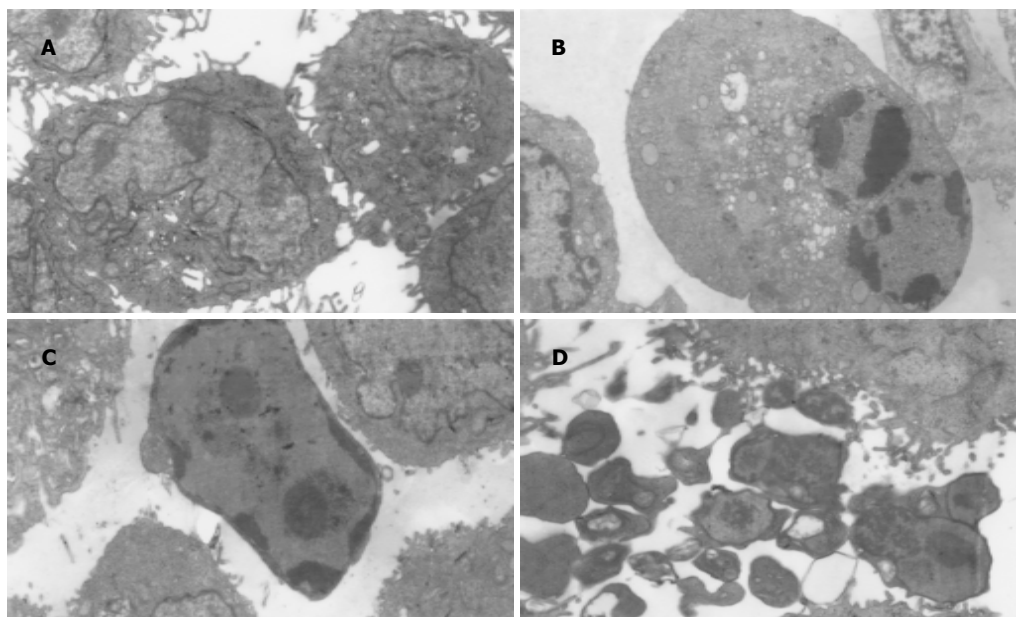


图3 AGS 细胞电镜图像. A: 未经 baicalein 干预的 AGS 细胞( $\times 6000$ ); B: 80  $\mu\text{mol/L}$  baicalein 干预 48 h 的典型凋亡细胞( $\times 4800$ ); C: 含核的凋亡小体( $\times 6000$ ); D: 典型凋亡小体形成( $\times 7000$ ).



外, 其余各组间两两比较  $P < 0.01$ ), 细胞存活率呈下降趋势, baicalein 干预 72 h, AGS 细胞存活率最高为 82.1%, 最低为 38.4% (图 4)。

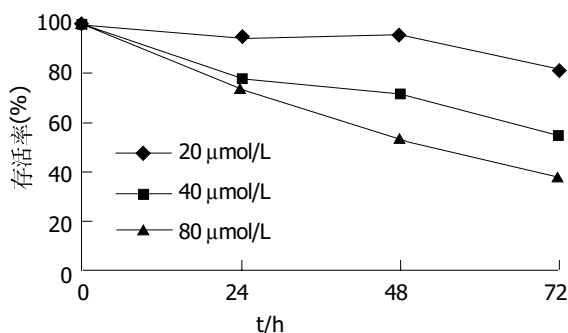


图 4 baicalein 干预后胃癌细胞 AGS 的存活率(MTT 法)。

**2.2 baicalein 干预后 AGS 细胞的凋亡指数** AO-EB 双染色法: 正常活细胞核染色质被 AO 染成均匀一致的绿色或黄绿色, 核染色质结构正常 (图 6A 或图 6B 中 1 所示); 早期凋亡细胞核染色质也被 AO 染成绿色或黄绿色, 但染色不均匀, 荧光增强, 核染色质呈固缩状或圆珠状 (图 6B 中 2 所示); 晚期凋亡细胞核染色质被 EB 染成橙色呈固缩状或圆珠状 (图 6B 中 3 所示); 死细胞核染色质也被 EB 染成橙色或红色, 但细胞核染色质结构尚正常 (图 6B 中 4 所示)。同一时间点不同浓度的细胞凋亡指数均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ) (图 5A); 实验组 48 h 细胞凋亡指数比 24 h 明显增多 ( $P < 0.01$ ), 但 72 h 细胞凋亡指数却比 48 h 明显减少 ( $P < 0.01$ ), 而对照组 3

个时间点细胞凋亡指数均无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 5B), 各实验组中以 80 μmol/L 组作用 48 h 引起 AGS 凋亡的作用最明显, baicalein 诱导 AGS 细胞凋亡呈现剂量依赖性。经 TUNEL 染色与苏木素复染后, 80 μmol/L baicalein 干预 48 h 的 AGS 非凋亡细胞, 细胞核染成蓝色, 但细胞大小不一, 形态各异; 凋亡细胞皱缩, 细胞核染成棕色 (图 7B); 对照组凋亡细胞少见 (图 7A), 细胞大小一致, 在不同视野下进行细胞计数, 测得其凋亡指数为  $7.27 \pm 0.21\%$  ( $n = 3$ ), 而干预组 AGS 细胞凋亡指数明显高于未干预组, 凋亡指数为  $38.37 \pm 0.36\%$  ( $n = 3$ ), 二者之间有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

胃癌是消化系统常见的恶性肿瘤, 其机制迄今未明, 但胃黏膜上皮细胞增殖过度及凋亡受抑是胃癌发生发展的重要原因。随着对胃癌发病机制研究的进一步深入, 花生四烯酸代谢与胃癌的关系已越来越受到人们的关注。花生四烯酸代谢至少有两条途径, 即: 环氧化酶途径和脂肪氧化酶途径。其中环氧化酶代谢途径在胃癌的发生发展中起重要作用已有大量文献报道<sup>[17-20]</sup>, 而脂肪氧化酶代谢途径与胃癌形成的关系国内外报道较少, 尤其是 12-LOX 与胃癌的研究更是罕见报道。在本次研究中我们发现, 12-LOX 参与了胃癌细胞 AGS 增殖与凋亡之间的调控。12-LOX 有 3 个亚型, 即: 白细胞型、表皮型和血小板型<sup>[21]</sup>, 其中,

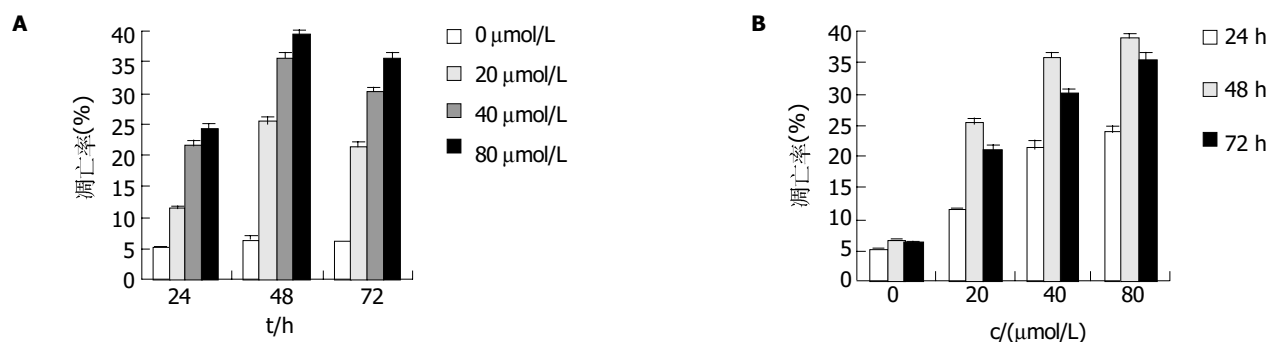


图 5 baicalein 干预后胃癌细胞 AGS 的凋亡指数(AO-EB 法)。A: 时间效应 t/h; B: 浓度效应 c/(μmol/L)。

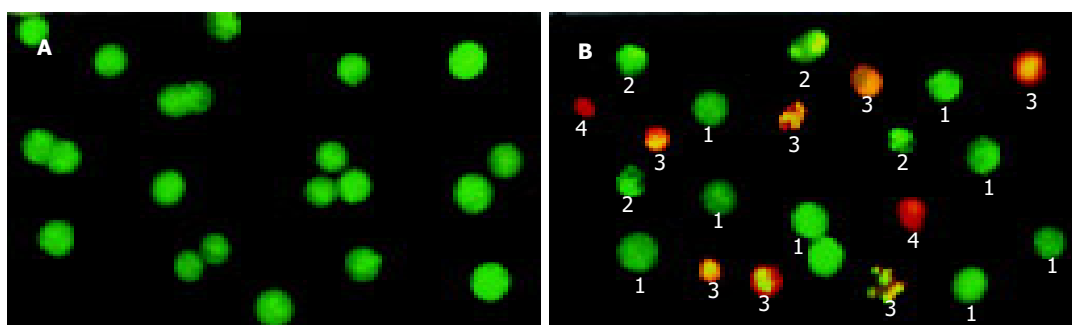


图 6 AGS 细胞 AO-EB 染色  $\times 400$ 。A: 未经 baicalein 干预组; B: 80 μmol/L baicalein 干预 48 h 组。

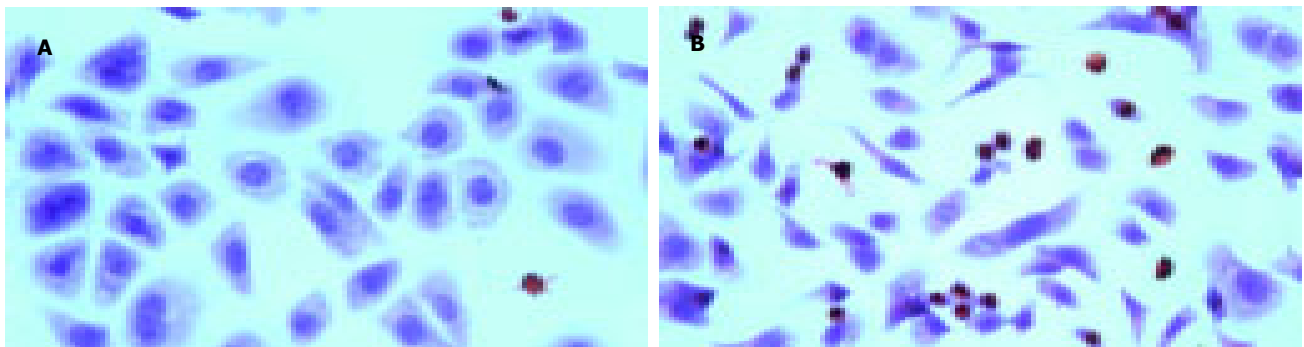


图7 AGS细胞TUNEL染色×400. A: 未经baicalein干预组; B: 经80 μmol/L baicalein干预组.

血小板型 12-LOX 及其代谢产物 12-HETE 被认为具有刺激肿瘤细胞生长与增殖, 提高肿瘤细胞侵袭能力及诱导肿瘤血管形成等作用, 而这些作用又均可被 12-LOX 特异性抑制剂 baicalein 所抑制<sup>[22-25]</sup>. Baicalein 作为 12-LOX 的特异性抑制剂, 其作用机制仍在探讨中, 但目前比较一致的观点认为 baicalein 是通过阻断细胞周期, 启动线粒体凋亡途径而发挥其生物学作用的<sup>[13, 26-29]</sup>. 12-LOX 在正常组织中低表达或不表达, 在肿瘤组织中却过度表达<sup>[8, 10]</sup>, 因此, 12-LOX 过度表达可能是其促进肿瘤发生发展的原因之一.

我们在体外培养 AGS 细胞的基础上, 使用 RT-PCR 技术从 mRNA 水平证实了 12-LOX 在胃癌细胞系 AGS 中存在表达. 实验还从细胞水平证明了 baicalein 可能具有抑制 AGS 增殖和促进 AGS 凋亡的作用. 在研究 baicalein 对 AGS 增殖的影响中, 我们发现, baicalein 大致呈时间、剂量依赖性的抑制 AGS 细胞增殖, 这点与文献[30]报道一致, 但 baicalein 只有达到较高浓度并且作用足够的时间方能起到显著抑制作用, 与文献[30]报道的低浓度作用较短时间即可起到显著抑制作用略有不同; 在研究 baicalein 对 AGS 凋亡的影响中, 倒置显微镜下可见 baicalein 干预后, 细胞形态发生了显著变化, 透射电镜下可以见到典型的凋亡细胞. TUNEL 结果显示, 实验组细胞的凋亡指数与对照组存在显著性差异, 在用 AO-EB 双染色法计算细胞凋亡指数时我们发现, 细胞凋亡指数与药物浓度成正比, 但和时间却没有明显的线性关系, 细胞的凋亡指数至 72 h 反而呈现下降趋势, 这可能与 72 h 细胞死亡率相应增加有关, 此现象提示, baicalein 抑制细胞生长除与诱导凋亡有关可能还存在其他机制, 因为在实验中我们还发现, 随着时间的推移, 实验组的死亡细胞数也随之增加, 尤以药物作用 72 h 最为明显, 而此现象在对照组却不明显. 总之, 胃癌细胞 AGS 中存在 12-LOX mRNA 表达, 且 12-LOX 还参与了胃癌细胞 AGS 增殖与凋亡的调控, 12-LOX 具有促进胃癌细胞增殖并抑制其凋亡的作用, 至于 12-LOX 是如何促进胃癌细胞

增殖并抑制其凋亡, 其机制有待进一步探索.

致谢: 福建医科大学电镜室.

#### 4 参考文献

- Smith WL. The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem J* 1989;259:315-324
- Shimizu T, Wolfe LS. Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J Neurochem* 1990;55:1-15
- Kuhn H, Thiele BJ. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* 1999;449:7-11
- Brash AR. Lipoxygenases: occurrence, functions, catalysis, and acquisition of substrate. *J Biol Chem* 1999;274:23679-23682
- Hamberg M, Samuelsson B. Prostaglandin endoperoxides. novel transformations of arachidonic acid in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:3400-3404
- Yoshimura R, Inoue K, Kawahito Y, Mitsuhashi M, Tsuchida K, Matsuyama M, Sano H, Nakatani T. Expression of 12-lipoxygenase in human renal cell carcinoma and growth prevention by its inhibitor. *Int J Mol Med* 2004;13:41-46
- Yoshimura R, Matsuyama M, Tsuchida K, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Expression of lipoxygenase in human bladder carcinoma and growth inhibition by its inhibitors. *J Urol* 2003;170:1994-1999
- Yoshimura R, Matsuyama M, Mitsuhashi M, Takemoto Y, Tsuchida K, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Relationship between lipoxygenase and human testicular cancer. *Int J Mol Med* 2004;13:389-393
- Jiang WG, Douglas-Jones A, Mansel RE. Levels of expression of lipoxygenases and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2003;69:275-281
- Matsuyama M, Yoshimura R, Mitsuhashi M, Hase T, Tsuchida K, Takemoto Y, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T. Expression of lipoxygenase in human prostate cancer and growth reduction by its inhibitors. *Int J Oncol* 2004;24:821-827
- Ikemoto S, Sugimura K, Kuratukuri K, Nakatani T. Antitumor effects of lipoxygenase inhibitors on murine bladder cancer cell line (MBT-2). *Anticancer Res* 2004;24:733-736
- Chang WH, Chen CH, Gau RJ, Lin CC, Tsai CL, Tsai K, Lu FJ. Effect of baicalein on apoptosis of the human HepG2 cell line was induced by mitochondrial dysfunction. *Planta Med* 2002;68:302-306
- Pidgeon GP, Kandouz M, Meram A, Honn KV. Mechanisms controlling cell cycle arrest and induction of apoptosis after 12-lipoxygenase inhibition in prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:2721-2727
- Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:942-948
- Ikemoto S, Sugimura K, Yoshida N, Yasumoto R, Wada S,



- Yamamoto K, Kishimoto T. Antitumor effects of Scutellariae radix and its components baicalein, baicalin, and wogonin on bladder cancer cell lines. *Urology* 2000;55:951-955
- 16 Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 2002;1:929-935
  - 17 Fan XM, Zheng FS, Liu HY, Ma YH, Wong B. Mechanism of apoptosis induced by specific COX-2 inhibitor SC236 in gastric cancer cells. *Zhonghua Zhongliu Zazhi* 2005;27:145-147
  - 18 Wu CY, Wang CJ, Tseng CC, Chen HP, Wu MS, Lin JT, Inoue H, Chen GH. *Helicobacter pylori* promote gastric cancer cells invasion through a NF-kappa B and COX-2-mediated pathway. *World J Gastroenterol* 2005;11:3197-3203
  - 19 Fu YG, Sung JJ, Wu KC, Wu HP, Yu J, Chan M, Chan VY, Chan KK, Fan DM, Leung WK. Inhibition of gastric cancer-associated angiogenesis by antisense COX-2 transfectants. *Cancer Lett* 2005;224:243-252
  - 20 Chen XL, Su BS, Sun RQ, Zhang J, Wang YL. Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2005;11:1228-1231
  - 21 Yamamoto S, Suzuki H, Ueda N. Arachidonate 12-lipoxygenases. *Prog Lipid Res* 1997;36:23-41
  - 22 Pidgeon GP, Tang K, Cai YL, Piasentin E, Honn KV. Overexpression of platelet-type 12-lipoxygenase promotes tumor cell survival by enhancing alpha (v) beta (3) and alpha (v) beta (5) integrin expression. *Cancer Res* 2003;63:4258-4267
  - 23 Nie D, Nemeth J, Qiao Y, Zacharek A, Li L, Hanna K, Tang K, Hillman GG, Cher ML, Grignon DJ, Honn KV. Increased metastatic potential in human prostate carcinoma cells by overexpression of arachidonate 12-lipoxygenase. *Clin Exp Metastasis* 2003;20:657-663
  - 24 Nie D, Hillman GG, Geddes T, Tang K, Pierson C, Grignon DJ, Honn KV. Platelet-type 12-lipoxygenase in a human prostate carcinoma stimulates angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 1998;58:4047-4051
  - 25 Timar J, Raso E, Dome B, Li L, Grignon D, Nie D, Honn KV, Hagmann W. Expression, subcellular localization and putative function of platelet-type 12-lipoxygenase in human prostate cancer cell lines of different metastatic potential. *Int J Cancer* 2000;87:37-43
  - 26 Lee HZ, Leung HW, Lai MY, Wu CH. Baicalein induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung squamous carcinoma CH27 cells. *Anticancer Res* 2005;25:959-964
  - 27 Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 2002;1:929-935
  - 28 Tong WG, Ding XZ, Adrian TE. The mechanisms of lipoxygenase inhibitor-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;296:942-948
  - 29 Tong WG, Ding XZ, Witt RC, Adrian TE. Lipoxygenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway. *Mol Cancer Ther* 2002;1:929-935
  - 30 Wong BC, Wang WP, Cho CH, Fan XM, Lin MC, Kung HF, Lam SK. 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis* 2001;22:1349-1354

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

## 2006 年世界华人消化杂志由半月刊改为旬刊出版发行

**本刊讯** 世界华人消化杂志主要报道食管癌、胃癌、肝癌、大肠癌、病毒性肝炎、幽门螺杆菌、中医中药、中西医结合等胃肠病学和肝病学的最新进展及原创性等基础或临床研究的文章。

据中国科技期刊引证报告(潘云涛, 马峥著. 北京: 科学技术文献出版社, 2004: 1-289)统计, 世界华人消化杂志 2003 年发表文章 594 篇, 地区分布 25 个, 机构分布 191 个, 基金论文比 31%, 总被引频次 5249 次, 影响因子 2.924, 即年指标 0.529, 引用期刊数 260 种, 被引半衰期 3.06. 中国科学技术信息研究所每年出版的《中国科技期刊引证报告》定期公布收录的中国科技论文统计源期刊的 10 个科学计量指标, 并根据此指标评选出中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志获得 2001 年和 2003 年中国百种杰出学术期刊。

据《中文核心期刊要目总览 2004 年版》(戴龙基, 蔡蓉华主编. 北京: 北京大学出版社, 2004: 1-678), 采用了被引量、被摘量、被引量、他引量、被摘率、影响因子、获国家奖或被国内外重要检索工具收录等 7 个评价指标, 选作评价指标统计源的数据库有 51 种, 统计到的文献数量共计 9435301 篇次, 涉及期刊 39893 种次. 参加核心期刊评审的学科专家达 1873 位. 经过定量筛选和专家定性评审, 从中国正在出版的近 1 万 2 千种中文期刊中评选出 1800 种核心期刊. 世界华人消化杂志被评为中文核心期刊要目总览。

世界华人消化杂志发表的英文摘要被美国《化学文摘 (Chemical Abstracts)》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘 (EMBASE/Excerpta Medica)》, 俄罗斯《文摘杂志 (Abstracts Journals)》收录。

世界华人消化杂志 2006 年由北京报刊发行局发行, 国内统一刊号 CN 14 1260/R, 邮发代号 82-262, 出版日期 8, 18, 28 日, 页码 160, 月价 72.00. (世界胃肠病学杂志社 2005-06-29)