

和分泌均减少的 3 个突变 (SEMA3C V337M; SEMA3D H424Q, V457I) 都可能显著降低蛋白稳定性, 从而可能由于突变蛋白降解量增加导致上述变化。至于 SEMA3C S329G 是否可能干扰蛋白活性, 以及 SEMA3D P615T 合成量减少的原因, 则需要进一步开展功能实验予以探究。

参考文献

- 1 Amiel J, Sproat - Emison E, Garcia - Barcelo M, *et al.* Hirschsprung disease consortium. Hirschsprung disease, associated syndromes and genetics: a review [J]. J Med Genet, 2008, 45 (1): 1 - 14
- 2 Butler Tjaden NE, Trainor PA. The developmental etiology and pathogenesis of Hirschsprung disease [J]. Transl Res, 2013, 162 (1): 1 - 15
- 3 Eichler EE, Flint J, Gibson G, *et al.* Missing heritability and strategies for finding the underlying causes of complex disease [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11 (6): 446 - 450
- 4 Kolodkin AL, Matthes DJ, Goodman CS. The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules [J]. Cell, 1993, 75 (7): 1389 - 1399
- 5 Pasterkamp RJ. Getting neural circuits into shape with semaphorins [J]. Nat Rev Neurosci, 2012, 13 (9): 605 - 618
- 6 Osborne NJ, Begbie J, Chilton JK, *et al.* Semaphorin/neuropilin signaling influences the positioning of migratory neural crest cells within the hindbrain region of the chick [J]. Developmental Dynamics, 2005, 232 (4): 939 - 949

- 7 Carrillo RA, Olsen DP, Yoon KS, *et al.* Presynaptic activity and CaMKII modulate retrograde semaphorin signaling and synaptic refinement [J]. Neuron, 2010, 68 (1): 32 - 44
- 8 Yu HH, Moens CB. Semaphorin signaling guides cranial neural crest cell migration in zebrafish [J]. Dev Biol, 2005, 280 (2): 373 - 385
- 9 Wang LL, Zhang Y, Fan Y, *et al.* SEMA3A rs7804122 polymorphism is associated with Hirschsprung disease in the Northeastern region of China [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2012, 94 (2): 91 - 95
- 10 Luzón - Toro B, Fernández RM, Torroglosa A, *et al.* Mutational spectrum of Semaphorin 3A and Semaphorin 3D Genes in Spanish Hirschsprung patients [J]. PLoS One, 2013, 8 (1): e54800
- 11 Flanagan JG, Leder P. The kit ligand: a cell surface molecule altered in steel mutant fibroblasts [J]. Cell, 1990, 63 (1): 185 - 194, 11
- 12 Sasselli V, Pachnis V, Burns AJ. The enteric nervous system [J]. Dev Biol, 2012, 366 (1): 64 - 73
- 13 Gershon MD, Tennyson VM. Microenvironmental factors in the normal and abnormal development of the enteric nervous system [J]. Prog Clin Biol Res, 1991, 373: 257 - 276
- 14 Zhang Y, Kim TH, Niswander L. Phactr4 regulates directional migration of enteric neural crest through PP1, integrin signaling, and cofilin activity [J]. Genes Dev, 2012, 26 (1): 69 - 81
- 15 Wang LL, Fan Y, Zhou FH, *et al.* Semaphorin 3A expression in the colon of Hirschsprung disease [J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2011, 91 (9): 842 - 847 (收稿日期: 2014 - 06 - 15)
(修回日期: 2014 - 07 - 28)

γ - 生育三烯酚与 5 - 氟尿嘧啶联用对人胃癌细胞 SGC - 7901 的增殖抑制作用

姜佳佳 孙文广 屠越华 阎雅更 董凤丽 葛 声

摘 要 目的 离体条件下研究 γ - 生育三烯酚 (γ - tocotrienol, γ - T3) 与 5 - 氟尿嘧啶 (5 - FU) 联合应用对人胃癌细胞 SGC - 7901 增殖抑制的作用方式。**方法** 采用 CCK - 8 法用不同浓度 5 - FU (0、30、50、70、90、110 μmol/L)、不同浓度 γ - T3 (0、5、10、20、30、40 μmol/L) 以及不同浓度 5 - FU (0、30、50、70、90、110 μmol/L) 联合 γ - T3 (20 或 30 μmol/L) 分别作用于对数生长期的 SGC - 7901 细胞 48h, 测定各药物对 SGC - 7901 细胞增殖抑制率, 并通过两药相互作用系数 (coefficient of drug interaction, CDI) 值^[1]判定 5 - FU 和 γ - T3 联合作用效果。用 Annexin V - FITC/PI 双染的流式细胞术法分别检测 5 - FU (30 μmol/L) 和 γ - T3 (20 μmol/L) 单独应用及两药联合应用 48h 诱导 SGC - 7901 细胞凋亡情况。**结果** 5 - FU 和 γ - T3 均可抑制 SGC - 7901 细胞的增殖, 并随着浓度的增加抑制作用增强 ($P < 0.05$), 增殖抑制作用呈明显的剂量效应关系; 而联合应用与对照组和单药组相比对 SGC - 7901 细胞的增殖抑制作用增强, 有增效作用, 其差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 流式细胞术凋亡结果表明, 5 - FU 和 γ - T3 均可诱导 SGC - 7901 细胞发生凋亡的作用 ($P < 0.05$), 5 - FU 和 γ - T3 联合较单独应用, 诱导细胞凋亡的作用增强 ($P < 0.05$)。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (面上项目) (81273061)

作者单位: 150001 哈尔滨医科大学附属第一医院临床营养科 (姜佳佳、阎雅更、董凤丽); 201306 上海交通大学附属第六人民医院东院临床营养科 (孙文广、屠越华、葛声)

通讯作者: 孙文广, 电子信箱: kuerabc@126.com

结论 γ -T3 与 5-FU 联合用药与单独用药相比对人胃癌细胞 SGC-7901 的增殖抑制及诱导凋亡有明显的增效作用。

关键词 SGC-7901 γ -T3 5-FU 联合用药

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.02.016

Antiproliferative Effect of Combined Treatment with γ -Tocotrienol and 5-FU on Gastric Cancer SGC-7901 Cells. Jiang Jiajia, Sun Wenguang, Tu Yuehua, et al. Department of Clinic Nutrition, The First Clinical College of Harbin Medical University, Heilongjiang 150001, China

Abstract Objective To investigate the suppression of cell proliferation of SGC-7901 gastric cancer cells by combination γ -tocotrienol(γ -T3) with 5-FU in vitro. **Methods** The effect of γ -tocotrienol (0, 5, 10, 20, 30, 40 μ mol/L) and 5-FU (0, 30, 50, 70, 90, 110 μ mol/L) on proliferation of gastric cancer cell lines for 48h was examined by Cell Counting Kit-8 (CCK-8). To determine if the combined effect of γ -tocotrienol (20 or 30 μ mol/L) and 5-FU (30 μ mol/L) is synergistic, we calculated the value of coefficient of drug interaction (CDI). The apoptosis assay were tested by flow cytometric analysis. **Results** The treatment with γ -tocotrienol or 5-FU alone induced a significant dose-responsive growth inhibition ($P < 0.05$), whereas combination treatment with these agents synergistically inhibited the growth of SGC-7901 cells ($P < 0.05$). The results of flow cytometric analysis showed that the treatment with γ -tocotrienol or 5-FU alone initiate apoptosis ($P < 0.05$), and combination treatment had more significant effect in apoptosis than these agents alone ($P < 0.05$). **Conclusion** The finding indicates that γ -tocotrienol can potentiate the effects of antiproliferative and apoptosis-inducing in SGC-7901 cells treatment by 5-FU.

Key words SGC-7901; γ -T3; 5-FU; Combination treatment

5-FU 是胃癌化学治疗常用的一种细胞毒性药物,但其对患者产生的毒性不良反应及耐药性问题使其临床功效及应用受到很大的限制,因此临床以联合应用多见^[2-6]。

生育三烯酚是维生素 E 的一种亚型,目前其对多种肿瘤细胞系的抗增殖作用及其与某些药物联合的增敏作用已见报道,但 γ -T3 与 5-FU 联合应用对胃癌 SGC-7901 细胞系的增殖抑制作用却未曾报道^[7-9]。因此,本研究探讨了 γ -T3 与 5-FU 联合应用对 SGC-7901 细胞系增殖抑制的作用。

材料与方法

1. 材料: γ -T3,纯度 95%,溶于无水乙醇,购于美国 Hygeia 公司。人胃癌细胞系 SGC-7901,购自北京市肿瘤研究所。使用含 10% 胎牛血清 1% 青链霉素,1% 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养液于 37℃,5% CO₂ 恒温条件下培养,使用 0.02% 的 EDTA 消化传代。CCK-8 购于日本同仁化学研究所,Anexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒购于美国 BD 公司。

2. 方法:(1)细胞增殖抑制试验(CCK-8 法):将对数生长期细胞按照每孔 200 μ l 培养液(10% FBS),5000 个细胞接种于 96 孔板,后置于 37℃,5% CO₂ 培养箱内培养,待 24h 后,按照分组方式换成含有不同浓度的 γ -T3 和 5-FU 的 10% 胎牛血清培养液,继续培养,于 48h 后分别加入 CCK-8 检测液用酶标仪测其吸光度值。(2)流式细胞分析:取对数生长期细胞制成细胞悬液,按照每孔 2ml 培养液,3.0 $\times 10^4$ 个细胞,种于 6 孔板中,用 10% FBS 培养液种板,24h 后,换成含有不同浓度的 γ -T3 和 5-FU 的 2% 胎牛血清培养液,继续培养 48h 后,进行凋亡检测前处理加入 FITC 和 PI 染色剂进行染

色,之后上机检验。

3. 统计学方法:数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,组间分析采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。作图采用 GraphPad Prism 5 软件。

结 果

1. 细胞增殖抑制实验结果:5-FU 和 γ -T3 均可抑制 SGC-7901 细胞的增殖,并随着浓度的增加抑制作用增强, ($P < 0.05$,图 1 中 A、B),增殖抑制作用呈明显的剂量效应关系;而 γ -T3(20 或 30 μ mol/L) + 5-FU 联合应用与 5-FU 单药组相比对 SGC-7901 细胞的增殖抑制作用增强(图 1C),有增效作用,其差异有统计学意义($t = -3.57, P = 0.005; t = -6.856, P = 0.000$)。通过 CDI 值计算结果可以看出,CDI 值均 < 1 (表 1),说明两药联合的抗肿瘤作用为协同作用。

2. 流式细胞术细胞凋亡实验结果:5-FU (30 μ mol/L)单独用药组凋亡率(7.9% $\pm$ 0.9%),T3 (20 μ mol/L)单独用药组凋亡率(38.7% $\pm$ 1.2%)和 5-FU(30 μ mol/L) + γ -T3 (20 μ mol/L)联合用药组凋亡率(49.4% $\pm$ 2.2%)与对照组(3.9% $\pm$ 0.7%)相比差异均有统计学意义($P < 0.01$),详见图 2、图 3。

讨 论

5-FU 是胃癌治疗的常用药物之一,但是随着治疗的深入,其耐药性及不良反应的增加也成为重要的治疗难题^[6]。因此,如何提高 5-FU 敏感度,减少耐药性和不良反应就成为临床上需要迫切解决的

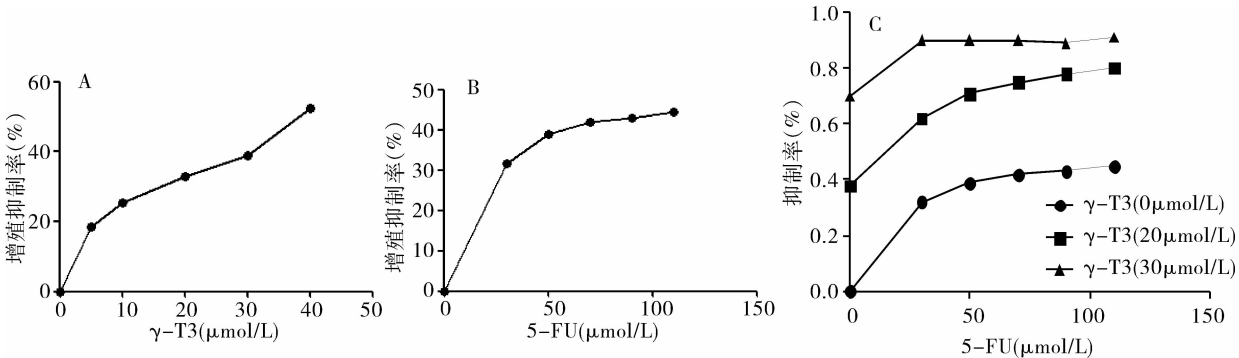


图 1 不同药物不同浓度下 SGC-7901 细胞 CCK-8 增殖抑制率

A. γ -T3 不同浓度下的增殖抑制曲线;B. 5-FU 不同浓度下的增殖抑制曲线;C. 5-FU 不同浓度下与 γ -T3 (0、20、30 $\mu\text{mol/L}$) 联合应用,其各自的增殖抑制曲线

表 1 5-FU、 γ -T3 及 5-FU + γ -T3 对 SGC-7901 细胞系生存指数的影响及其 CDI 值

5-FU ($\mu\text{mol/L}$)	T3				CDI
	0 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$	30 $\mu\text{mol/L}$	CDI	
0	1.00	0.62	0.30		
30	0.68	0.38	0.90	0.10	0.58
50	0.61	0.29	0.77	0.10	0.57
70	0.58	0.25	0.70	0.10	0.55
90	0.57	0.22	0.62	0.10	0.55
110	0.55	0.20	0.59	0.09	0.50

CDI = $ab/(a \times b)$, ab 是联合治疗组与空白对照组细胞生存指数的比率, a 和 b 是单独用药组生存率与空白对照组的比率, $\text{CDI} < 1$. 协同作用; $\text{CDI} = 1$. 相加作用; $\text{CDI} > 1$. 拮抗作用

问题^[2-6]。研究表明,生育三烯酚对多种肿瘤细胞具有增殖抑制与诱导凋亡的作用,而对正常组织上皮细胞不具有明显毒性不良反应^[7,8,10],因此,生育三烯酚被认为是一种非常有前途的潜在抗癌剂^[4]。

本实验的结果证明了 γ -T3 与 5-FU 单独应用与对照组相比对 SGC-7901 细胞具有抑制增殖的作用,并随着剂量的增加,抑制率也有明显地增高。两药联合应用与其单独应用相比对肿瘤细胞的抑制率具有明显的升高,这与 Guligena 等发表 γ -T3 与抑制素类的 SMV 和 ATV 联合应用与其分别单独用于两种间皮瘤细胞系与空白对照比较产生了非常

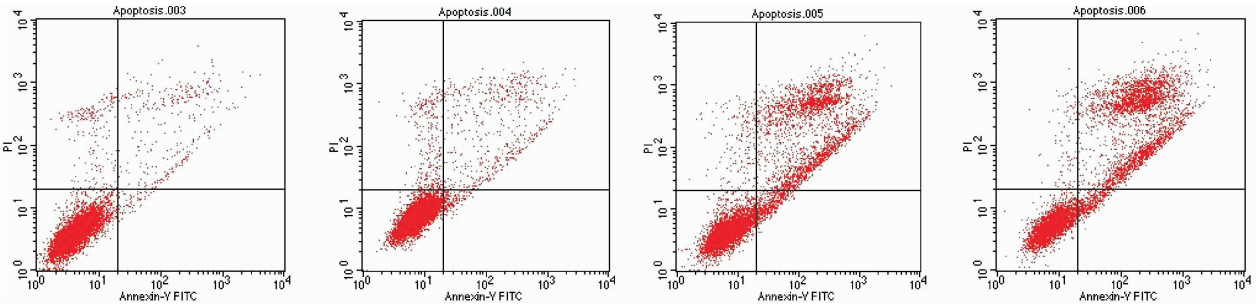


图 2 不同药物浓度 SGC-7901 细胞凋亡情况

A. 对照组;B. 5-FU (30 $\mu\text{mol/L}$) 单独用药组;C. γ -T3 (20 $\mu\text{mol/L}$) 单独用药组;D. 5-FU (30 $\mu\text{mol/L}$) + γ -T3 (20 $\mu\text{mol/L}$) 联合用药

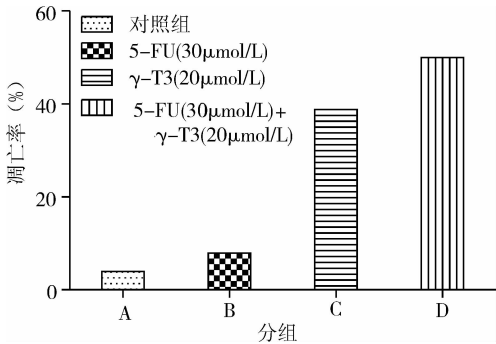


图 3 不同药物浓度下 SGC-7901 细胞凋亡率

4 组间两两比较, P 均 < 0.01

明显的生存抑制作用的结果相同^[11-17]。本实验通过计算国际通用的两药相互作用系数 CDI 来确定两药联合应用是否是协同作用,当 $\text{CDI} < 1$ 、 $= 1$ 、 > 1 时,分别说明两药联合是协同作用、相加作用和拮抗作用^[1]。本次联合用药实验 $\text{CDI} < 1$ 则表明 5-FU 与生育三烯酚联合是协同作用,其差异有统计学意义。联合用药增加了胃癌细胞系 SGC-7901 的凋亡比率,比对照组和单独用药组有更强的凋亡诱导作用。

以上研究结果表明 γ -T3 与 5-FU 联合应用与

其分别单独应用同对照组相比对 SGC - 7901 细胞的增殖抑制作用具有明显增效作用,并且其抑制作用可能与其促进细胞凋亡有关。

参考文献

- 1 Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose - effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul*, 1984, 22: 27 - 55
- 2 Zhang N, Yin Y, Xu SJ, *et al.* 5 - Fluorouracil: Mechanism of Resistance and Reversal Strategies [J]. *Molecules*, 2008, 13: 1551 - 1569
- 3 刘洁. LY294002 对胃癌 5 - 氟尿嘧啶化疗增敏作用及研究机制研究 [D]. 武汉: 武汉大学, 2011
- 4 黎伯培, 陈俊强, 刘金禄. 胃癌耐药细胞株 SGC - 7901/5 - FU 的建立及其耐药机制的初步探讨 [J]. *消化肿瘤杂志*, 2012, 4: 163 - 169
- 5 孙根林, 鲍扬漪. 1, 25 (OH)₂ 维生素 D₃ 和塞来昔布协同对 5 - FU 化疗的增敏作用 [J]. *医学研究杂志*, 2010, 39 (10): 74 - 77
- 6 邢国辉, 冯玉光, 宗绪山. 丹参酮 II A 联合 5 - FU 对低氧下人胃癌 SGC7901 细胞增殖、凋亡的影响及与 HIF - 1 α 和突变型 P53 表达的关系 [J]. *世界华人消化杂志*, 2012, 18 (3): 222 - 228
- 7 KA Manu, MK Shanmugam, Lalitha Ramachandran, *et al.* First Evidence That γ - Tocotrienol Inhibits the Growth of Human Gastric Cancer and Chemosensitizes It to Capecitabine in a Xenograft Mouse Model through the Modulation of NF - κ B Pathway [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18: 2220 - 2229
- 8 Amirah Abdul Rahman, A Rahman A Jamal, Roslan Harun, *et al.* Gamma - tocotrienol and hydroxyl - chavicol synergistically inhibits growth and induces apoptosis of human glioma cells [J]. *BMC Complement & Alternative Medicine*, 2014, 14: 213
- 9 Margarita González - Vallinas, Susana Molina, Gonzalo Vicente, *et al.* Antitumor effect of 5 - fluorouracil is enhanced by rosemary extract in both drug sensitive and resistant colon cancer cells [J]. *Pharmacological Research*, 2013, 72: 61 - 68

- 10 NM Ayoub, MR Akl, PW Sylvester. 2013: Combined γ - tocotrienol and Met inhibitor treatment suppresses mammary cancer cell proliferation, epithelial - to - mesenchymal transition and migration [J]. *Cell Prolif*, 2013, 46: 538 - 553
- 11 FA Behery, MR Akl, Suryatheja Ananthula, *et al.* Optimization of tocotrienols as antiproliferative and antimigratory leads [J]. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2013, 56: 329 - 341
- 12 Chen D, Jiao XL, Liu ZK, *et al.* Knockdown of PLA2G2A sensitizes gastric cancer cells to 5 - FU in vitro [J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2013, 17: 1703 - 1708
- 13 Yap WN, Chang PN, Han HY, *et al.* Gamma - tocotrienol suppresses prostate cancer cell proliferation and invasion through multiple - signalling pathways [J]. *Br J Cancer*, 2008, 99 (11): 1832 - 1841
- 14 Guligena Tuerdi, Saki Ichinomiya, Hiromi Sato, *et al.* Synergistic effect of combined treatment with gamma - tocotrienol and statin on human malignant mesothelioma cells [J]. *Cancer Letters*, 2013, 339: 116 - 127
- 15 MR Akl, NM Ayoub, PW Sylvester. Mechanisms Mediating the Synergistic Anticancer Effects of Combined γ - Tocotrienol and Sesamin Treatment [J]. *Original Papers*, 2012, 78: 1731 - 1739
- 16 AB Shirode, PW Sylvester. Synergistic anticancer effects of combined γ - tocotrienol and celecoxib treatment are associated with suppression in Akt and NF κ B signaling [J]. *NIH Public Access*, 2010, 64 (5): 327 - 332
- 17 Paul W, Sylvester. Synergistic anticancer effects of combined c - tocotrienol with statin or receptor tyrosine kinase inhibitor treatment [J]. *Genes Nutr*, 2012, 7: 63 - 74

(收稿日期: 2014 - 08 - 14)

(修回日期: 2014 - 09 - 01)

慢性胰腺炎患者并发糖尿病的发生率及影响因素分析

李博慧 王勤勇 王泽林

摘要 **目的** 观察慢性胰腺炎 (chronic pancreatitis, CP) 患者伴发糖尿病的发生率, 探讨影响其发生的相关因素。**方法** 分析笔者医院慢性胰腺炎患者的临床资料, 检测伴发糖尿病患者的胰岛功能, 通过寿命表法计算首次疼痛后糖尿病的累计发生率, 以 COX 比例风险模型分析可能导致胰腺炎患者发生糖尿病的危险因素。**结果** 入组病例共 342 例, 首发年龄 37.9 ± 16.7 岁, 随访时间 43.2 ± 29.7 个月; 总糖尿病发生率 16.1% (55/342)。内镜介入或外科手术治疗前 33 例已确诊, 治疗后新发 22 例; 两种糖尿病患者胰岛功能比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 其中 25.5% (14/55) 糖尿病发生于腹痛 1 年内; 首次腹痛后 1、3、5、10 年内的累积糖尿病发生率分别为 4.7%、6.3%、8.9%、19.8%; COX 风险比例模型回归分析显示, 治疗前糖尿病组中吸烟量 > 200 年支 (年支定义为每天吸烟支数 $\times$ 吸烟年数)、轻度腹痛、体重减轻、胰腺钙化为风险因素, 风险比 (HR) 分别为 3.3、5.3、2.4、

基金项目: 全军医学科技青年培育项目 (13QNPO18); 中国人民解放军总后勤部卫生部“十一五”滚动课题 (应用基础研究项目) (06BG033)

作者单位: 066100 北京军区北戴河疗养院