

吐温化合物对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响

张良运,彭 军,宋 颖,周建国,梁晓秋,苏 琦
(南华大学 肿瘤研究所,湖南 衡阳 421001)

摘要:目的 研究吐温化合物对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响,确定诱导分化剂二烯丙基二硫(DADS)的溶媒。方法 采用 MTT 比色、生长曲线分析、细胞活力检测和流式细胞仪观察溶媒 Tween 20、Tween 80 与二烯丙基二硫(DADS)对 MGC803 细胞生长的影响。结果 Tween 80 稀释浓度由 1 000 倍 ~ 16 000 倍时,其他浓度组均具有抑制作用,并呈浓度依赖性(IR 6.2% ~ 92.6%, $P < 0.05$)。Tween20 稀释浓度由 5 000 倍 ~ 30 000 倍时,均对 MGC803 细胞具有促生长作用(PR 3.6% ~ 16.1%, $P < 0.05$)。Tween 80 稀释浓度 32 000 倍对 MGC803 细胞生长、生长曲线、细胞群体倍增时间、细胞周期均无影响,与对照组、DADS 处理组细胞存活率差异无显著性($P > 0.05$),而以此作为溶媒的不同浓度 DADS 具有抑制 MGC803 细胞生长的效果,与对照组和 Tween 80 组的差异均具有显著性($P < 0.05$),抑制率呈现时间 - 效应依赖关系($P < 0.05$),对细胞群体倍增时间延长($P < 0.05$),并且可阻滞 MGC803 细胞于 G_2/M 期。结论 Tween 80 具有抑制 MGC803 细胞生长作用,而 Tween20 对 MGC803 细胞具有促生长作用。选择 Tween 80 稀释浓度 32 000 作为 DADS 溶媒,用于 DADS 对人胃癌 MGC803 细胞影响的研究比较合适。

关键词:吐温化合物; 二烯丙基二硫; 人胃癌 MGC803 细胞

中图分类号:R735.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000 - 2510(2004)01 - 0020 - 06

Effect of Tween Compounds on Human Gastric Cancer Cell Line MGC803 in Vitro

ZHANG Liang - yun , PENG Jun , SONG Yin , et al

(Institute of Oncology , Nanhua University , Hengyang , Hunan 421001 , China)

Abstract : Objective To investigate the effects of Tween compounds on human gastric cancer MGC803 cell line in vitro and to ascertain the menstruum of diallyl disulfide. **Methods** The influence of Tween20 , Tween80 and diallyl disulfide were confirmed by MTT , cell growth curve analysis , cell viability detection and flow cytometry on human gastric cancer MGC803 cells in vitro. **Results** 1 000 ~ 16 000 times groups of the dilute concentration of Tween 80 have significant inhibition effect (IR 6.2 ~ 92.6% , $P < 0.05$) , but 5 000 ~ 30 000 times groups of the dilute concentration of Tween 20 have promote effect (PR 3.6 ~ 16.1% , $P < 0.05$) for growth of human gastric cancer MGC803 cell in vitro. Tween 80 (32 000 times) had not influence for cell growth , growth curvers , average doubling time and cell cycle , and its cell viability is not significantly , different from that of control group and DADS group ($P > 0.05$) . DADS with the menstruum Tween 80 (32 000 times) in vitro inhibited the growth of MGC803 cells and exhibited a dose - dependent model ($P < 0.05$) , with average doubling time retarded ($P < 0.05$) , and

基金项目:湖南省自然科学基金(N0101J Y2146 , N0201J Y2026)和湖南省教育厅科研重点项目(N01A016) .

作者简介:张良运,南华大学病理学硕士,现在广东省佛山市人民医院病理科工作。彭军,南华大学病理学硕士,现在株洲市中心医院病理科工作。

通讯作者:苏琦,南华大学肿瘤研究所病理学教授,联系电话:0734 - 8281547, E - mail : suqi1 @hotmail . com.

arresting the cell cycle in G₂/M phase. **Conclusion** Tween 80 have inhibition effect and Tween 20 have promote effect for growth of human gastric cancer MGC803 cell in vitro. The menstruum Tween 80 (32 000 times) did not influence cell growth, growth curvers, Average doubling time and cell cycle.

Key words: tween compounds; diallyl disulfide; MGC803 cell line

吐温类(Tweens)化合物是最常见的表面活性物质之一,在制药工业中得到广泛的应用,同时,还作为蛋白稳定剂或溶媒在医学研究中发挥着重要作用^{1~3}。它们对肿瘤细胞的生长以及肿瘤细胞多药耐药性的影响也有报道^{4~6}。本文在研究二烯丙基二硫(diallyl disulfide,DADS)对体外培养的人胃癌MGC803细胞的抑制增殖和细胞周期调控的过程中^{7,8},选择DADS的溶媒时,发现Tween 80、Tween 20对MGC803细胞生长有着截然不同的作用,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂 MGC803细胞为人胃低分化粘液癌,山东师范大学生物系建株,从湖南医科大学肿瘤研究所引进。Tween 80(比重1.050~1.10,HLB 15.0)、Tween 20(比重1.080~1.13,HLB 16.7)为SABC产品。培养液:GIBCO公司产品,RPMI-1640培养基10.4g溶于1000mL蒸馏水中,加NaHCO₃2g,用1N HCl调pH值为7.0,抽滤除菌,4℃冰箱保存,临用时加10%小牛血清。MTT:Amresco公司产品,将5mg的MTT溶于1.0mL 0.01mmol/L pH7.4 PBS液中,经0.22μm微孔滤膜抽滤除菌,即为5mg/mL的MTT/PBS溶液。DMSO:Sigma公司产品。DADS:Fluka公司产品, $d_4^{20}=1.0$,Mr146.28,纯度80%,含10%~20% DAS。

1.2 细胞培养 MGC803细胞用含10%小牛血清的RPMI-1640培养液培养于37℃,含5%CO₂,恒湿,恒温培养箱中培养,细胞呈单层生长达70%~80%密度饱和时传代。

1.3 MTT比色实验 参阅文献⁷,将Tween 80、Tween 20与0.9%生理盐水等比混合至澄清,然后用含10%小牛血清的RPMI 1640液稀释至实验所需浓度。取对数生长期细胞传代置96孔培养板培养,细胞接种密度为10⁴个/孔。待细胞完全贴壁后6h,换上不同浓度的Tween 80、Tween 20溶液、DADS液,并设立空白对照、0对照,培养96h,

然后每孔加5g/L MTT溶液20μL(空白对照除外),继续孵育4h即终止。弃上清,每孔加入150μL DMSO(SIGMA,USA)充分震荡,以空白对照调零,于酶联免疫检测仪上读取各孔在波长570nm处的光吸收值。细胞生长抑制率或促生长率按公式计算:细胞生长抑制率或促生长率=(1-实验组OD₅₇₀值/0对照组OD₅₇₀)×100%。

1.4 生长曲线绘制 取对数生长期细胞,常规胰酶消化传代,接种于24孔培养板培养6h,待细胞贴壁后,分别加用培养液稀释的不同浓度的DADS液,Tween 80+0.9%生理盐水,阳性对照组应用2.0%DMSO(v/v),阴性对照组则为常规培养液。每24小时取3瓶细胞记数,每瓶记数4次,然后求出3瓶细胞的均值,连续96h,将每次所得的细胞数标记在坐标纸上,并将各点连接成线。肿瘤细胞群体倍增时间按公式计算: $T_D = t \times \lg 2 / \lg(N_t / N_0)$ 计算(N_t为t时间的细胞数,N₀为初种细胞数)。

1.5 细胞活力检测 采用台盼蓝排斥法,将处理的MGC803细胞常规消化,吹打成单细胞悬液。取9滴细胞悬液,加1滴0.4%台盼蓝染液染色3min,滴加染色后的细胞悬液至血球计数板,倒置显微镜下计数活细胞与死细胞(台盼蓝染成蓝色者为死细胞,拒染者为活细胞)按公式计算细胞活力:细胞活力(%)=活细胞数/(活细胞数+死细胞数)×100%。

1.6 流式细胞仪检测 收集培养细胞,离心,1000rpm×5min,用预冷PBS液重悬细胞,离心,1000rpm×5min,重复一次;将收集的细胞团用4℃预冷的75%乙醇固定细胞,置冰箱4℃保存24h。样本上机前作如下处理:乙醇固定的细胞离心洗涤,去上清,摇匀;加RNA酶50μL(浓度为0.5mg/mL),37℃水浴30min。加碘化丙啶(PI)50μL,浓度为1mg/mL,振荡混匀,避光置冰箱30min;300目尼龙网滤过,上机检测,计数10000个细胞,进行细胞周期和DNA含量分析。

1.7 统计分析 采用SPSS 10.0 for windows one-way ANOVA统计方法Bonferroni过程,确定P<0.05为统计学有显著性意义。

2 结 果

2.1 Tween 80 对 MGC803 细胞生长的影响 表 1 所示, Tween 80 在一定浓度范围内对 MGC803 细胞生长具有抑制效应。当 Tween 80 稀释浓度由 1 000 倍提高到 32 000 倍时, MGC803 细胞生长抑制率由 92.6 % 递减为 0。经方差分析, 除稀释浓度

32 000 倍外, 其他各组 OD_{570} 值与对照组比较, 差异均具有显著性 ($P < 0.05$)。本实验中, Tween 80 的最小稀释倍数为 32 000, 此时, MGC803 细胞的生长抑制率为 0, 方差分析显示, 其 OD_{570} 值与对照组之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。因而在该浓度下, Tween 80 对 MGC803 细胞生长无影响, 可以作为 DADS 的溶媒。

表 1 吐温 80 + 0.9 % 生理盐水处理 MGC803 细胞的 OD_{570} 值

n = 6	0 对照	Tween 80 + 0.9 % 生理盐水(稀释倍数)					
		1 000	2 000	4 000	8 000	16 000	32 000
\bar{x}	0.81	0.06	0.06	0.14	0.63	0.76	0.81
s	0.024	0.020	0.032	0.034	0.031	0.015	0.020
抑制率 (%)		92.6	92.6	82.7	22.2	6.2	0

2.2 Tween20 对 MGC803 细胞生长的影响 表 2 显示, Tween20 对 MGC803 细胞具有一定程度的促生长作用。当 Tween20 稀释浓度由 5 000 倍增加到 30 000 倍时, MGC803 细胞的生长促进率由 3.6 % 增大到 21.4 %, 方差分析有显著性差异 ($P < 0.05$)。由于 Tween20 对 MGC803 细胞具有促生长作用, 如以 Tween20 作为 DADS 的溶媒, 其稀释倍数在 10 000 ~ 20 000 倍之间, 此时, Tween20 对 MGC803 细胞的促生长率为 16.1 % ~ 21.4 %, 干扰了实验结果的分析, 不适宜作为 DADS 的溶媒。比较表 1 与表 2 的结果, Tween80 更适合作为 DADS 的溶媒。

媒, DADS 浓度由 20 mg/L 增至 45 mg/L 时, MGC803 细胞的生长抑制率由 15.1 % 提高到 65.8 %, 与对照组和 Tween 80 组的差异均具有显著性意义 ($P < 0.05$), 且表明 DADS 对 MGC803 细胞的 IC_{50} 在 25 ~ 30 mg/L 之间(表 3)。方差分析显示, 各浓度组之间均有显著性差异, 呈明显的浓度依赖关系 ($P < 0.05$)。

2.3 Tween 80 与 DADS 对 MGC803 细胞生长的影响 Tween 80 稀释倍数为 32 000 时处理 MGC803 细胞, 其生长抑制率为 0, 与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$)。稀释倍数 32 000 的 Tween 80 作为溶

表 2 吐温 20 + 0.9 % 生理盐水处理 MGC803 细胞 OD_{570} 值

n = 6	0 对照	Tween 20 + 0.9 % 生理盐水(稀释倍数)			
		5 000	10 000	20 000	30 000
\bar{x}	0.56	0.54	0.65	0.68	0.65
s	0.084	0.111	0.045	0.048	0.063
促生长率 (%)		3.6	16.1	21.4	16.1

表 3 Tween 80 与 DADS 处理 MGC803 细胞 96 h 内的 OD_{570} 值

n = 6	0 对照	T80	DADS(mg L ⁻¹)					
			20	25	30	35	40	45
\bar{x}	0.73	0.77	0.62	0.46	0.34	0.27	0.27	0.25
s	0.068	0.031	0.038	0.049	0.055	0.065	0.024	0.051
抑制率 (%)		0	15.1	37.0	56.2	63.1	63.1	65.8

2.4 生长曲线及时间 - 效应曲线 根据细胞生长曲线(图 1)绘制 35 mg · L⁻¹、25 mg · L⁻¹ 的

DADS、2.0 % DMSO 及 Tween 80 溶媒对 MGC803 细胞生长抑制作用的时间 - 效应关系曲线(图 2)。

Tween 80 对 MGC803 细胞生长抑制作用于第 24 小时为最大,而后随时间的延长,其对 MGC803 细胞生长抑制效应逐渐降低。DADS 在 35 mg · L⁻¹时,随培养时间的延长,细胞生长抑制率随之增加,72 h 后进入平台期,呈现时间 - 效应依赖关

系;DADS 在 25 mg L⁻¹时,随时间的延长,细胞生长抑制率稍有增加而近成直线,表明 25 mg L⁻¹ 的 DADS 对 MGC803 细胞生长抑制效应稳定,与时间无关($P < 0.05$)。

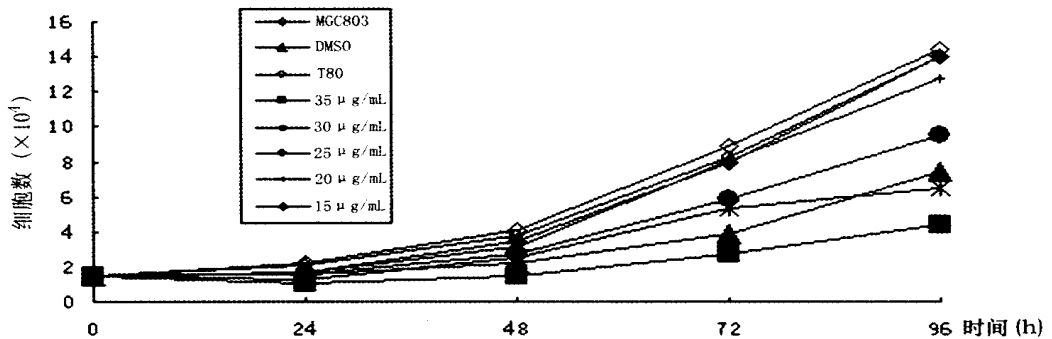


图1 MGC803 细胞生长曲线

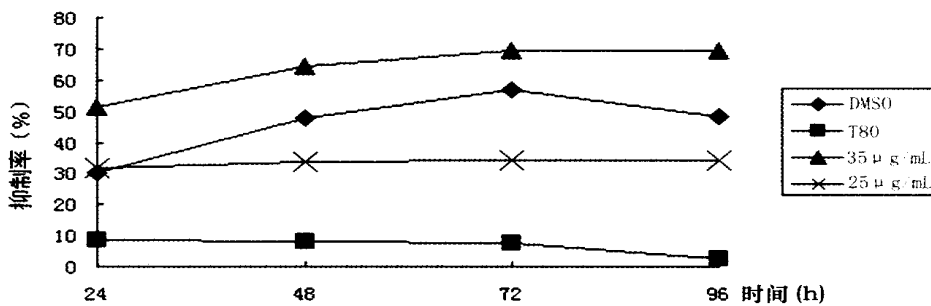


图2 DADS、T80 对 MGC803 细胞抑制作用的时间效应

2.5 细胞群体倍增时间和活力 对照组 MGC803 细胞群体倍增时间为 33.75 h, Tween 80 为 34.21 h, 对细胞群体倍增时间无影响。当 DADS 浓度由 20 mg/L 增加到 35 mg/L 时,其细胞群体倍增时间由 36.0 h 延长到 84.0 h,表明 DADS

处理后,其细胞增殖周期延长,从而细胞增殖速度减慢(表 4)。Tween 80 与对照组细胞存活率差异无显著性($P > 0.05$),DADS 处理组细胞存活率比 Tween 80 与对照组有所下降,但亦无统计学差异($P > 0.05$,表 5)。

表 4 处理前后 MGC803 细胞群体平均倍增时间

参数	MGC803	DMSO	T80	DADS(mg/L)			
				20	25	30	35
初种细胞数(×10 ⁴)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
细胞记数(×10 ⁴)	14.44	7.46	14.06	12.77	9.48	6.46	4.44
倍增时间(h)	33.75	50.74	34.21	35.99	42.90	56.99	83.96

2.6 Tween80 与 DADS 对 MGC803 细胞周期的影响 表 1 显示, Tween80 与未处理组比较, G₁ 期、S

期、G₂ 期细胞含量基本相同($P > 0.05$)。但 20、25、30、35 mg/L 不同浓度 DADS 处理的 MGC803 细

胞周期分布发生了变化, G_1 期细胞含量无影响, S 期细胞数减少, 而 G_2 期细胞则明显增加, 与 Tween80 和未处理组比较有显著性差异 ($P <$

0.05), 提示 DADS 可以将通过 S 期的 MGC803 细胞阻滞于 G_2 /M 期, 而 Tween80 对 MGC803 细胞周期无影响。

表 5 MGC803 细胞存活率改变

参数	MGC803	DMSO	T80	DADS(mg/L)			
				35	30	25	20
死细胞数	7	10	13	22	38	28	100
活细胞数	261	130	247	117	156	172	559
细胞活力(%)	97.37	92.87	95.00	84.21	80.38	86.00	84.83

表 6 DADS 处理后的 MGC803 细胞周期的百分含量

	MGC803	T80	DMSO	DADS(mg/L)			
				20	25	30	35
G_1	71.2	64.7	61.5	73.7	71.2	71.5	68.9
S	24.8	31.0	30.1	19.4	20.8	21.5	20.0
G_2	4.1	4.3	8.4	6.8	8.0	7.0	11.1

3 讨 论

在制药工业中, 常以司盘类或吐温类表面活性物质作为非水溶性化合物的助溶剂¹。我们曾运用表面活性物质 Tween 80 作为致癌剂的溶媒, 研究大蒜抑制 MNNG 诱发实验性腺胃腺癌与前胃鳞癌及其癌前病变的效应^{2,3}。本实验根据文献⁸, 在研究不同浓度的 DADS 对体外培养的人胃癌 MGC803 细胞的抑制增殖和细胞周期调控的过程中^{7,9}, 选择 DADS 的溶媒时, 采用 Tween 80、Tween 20 两种常用的吐温化合物在体外观察其对培养的 MGC803 细胞生长的影响, 以确定适合的 DADS 溶媒。结果表明, 一定浓度的 Tween 80 对 MGC803 细胞生长具有抑制作用, 并且呈浓度依赖性, 当其稀释倍数由 1 000 倍升高到 32 000 倍时, MGC803 细胞生长抑制率由 92.6% 下降到 0, 除稀释浓度 32 000 倍外, 其他各组与对照组比较, 差异均具有显著性 ($P < 0.05$), 而稀释浓度 32 000 倍与对照组之间无显著性差异 ($P > 0.05$), 证明在该浓度 Tween 80 对 MGC803 细胞生长无影响; 而 Tween 20 在稀释 5 000 倍至 30 000 倍时, 其对 MGC803 细胞生长不仅无抑制效果, 并且起着促进作用, 其对 MGC803 细胞的促生长率为 16.1% ~ 21.4%, 与对照组比较差异有显著性 ($P < 0.05$)。因此, 选择 Tween 80 稀释浓度 32 000 作

为 DADS 溶媒比较合适, Tween20 不适宜作为 DADS 的溶媒。

本研究进一步显示, Tween 80 稀释浓度 32 000 作为 DADS 溶媒时, 不同浓度 DADS 对 MGC803 细胞的生长具有抑制作用, 与对照组和 Tween 80 组的差异均具有显著性意义 ($P < 0.05$); 对 MGC803 细胞生长曲线及时间 - 效应曲线的影响, 随培养时间的延长, Tween 80 对 MGC803 细胞生长抑制效应逐渐降低, 而 DADS 随时间的延长, 细胞生长抑制率随之增加, 呈现时间 - 效应依赖关系 ($P < 0.05$); 细胞群体倍增时间和活力的改变, Tween 80 对细胞群体倍增时间无影响, 与对照组、DADS 处理组细胞存活率差异无显著性 ($P > 0.05$), 而 DADS 浓度由 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增加到 $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 其细胞群体倍增时间延长, 表明 DADS 处理后, 其细胞增殖周期延长, 从而细胞增殖速度减慢 ($P < 0.05$); 细胞周期检测结果表明, DADS 可以阻滞 MGC803 细胞于 G_2 /M 期, 而 Tween80 对 MGC803 细胞周期无影响。上述研究结果提示, Tween 80 稀释浓度 32 000 可作为 DADS 溶媒, 用于 DADS 对体外培养的人胃癌 MGC803 细胞的抑制增殖和细胞周期调控等研究^{7,9}。

有作者对表面活性剂的研究发现, Tween 80 在高浓度时对 HeLa 细胞、MGC803 细胞生长均有抑制作用^{4,5}, 与本研究结果一致。亦有研究证

实, Tween 20 的细胞毒性作用强于 Tween 80^{10,11}。本实验结果显示, Tween 20 与 Tween 80 对 MGC803 细胞生长具有截然不同的作用, 这可能与细胞类型有关, 也可能与 Tween 80 和 Tween 20 的化学构成及其构型的差异性有关。

参考文献:

- 1 Zampieri S, Ghirardello A, Doria A, et al. The use of Tween 20 in immunoblotting assays for the detection of autoantibodies in connective tissue diseases J. *J Immunol Methods*, 2000, 239 (1 - 2): 1 - 11.
- 2 苏琦, 罗招阳, 李一琴, 等. 大蒜抑制与逆转实验性胃癌及癌前病变的研究 J. *癌症*, 1996, 15 (3): 172 - 174.
- 3 凌晖, 苏琦, 谭晖, 等. 大蒜抑制实验性前胃鳞癌及癌前病变研究 J. *衡阳医学院学报*, 2000, 28 (1): 3 - 5.
- 4 Kan P, Chen ZB, Lee CJ, et al. Development of nonionic surfactant/ phospholipid o/w emulsion as a paclitaxel delivery system J. *J Control Release*, 1999, 58 (3): 271 - 278.
- 5 董怡民, 陈俊青. 表面活性剂加强双蒸水对体外培

养胃癌细胞系 MGC803 杀伤效应的实验研究 J. *中华肿瘤学杂志*, 1994, 16(1): 14 - 17.

- 6 Lo YL, Hsu CY, Huang JD. Comparisson of effects of surfactants with other MDR reversing agents on intracellular uptake of epirubicin in Caco - 2 cell line J. *Anti - cancer Res*, 1998, 18(4c): 3005 - 3009.
- 7 张良运, 凌晖, 苏琦, 等. 二烯丙基二硫对人胃癌 MGC803 细胞生长的影响 J. *世界华人消化杂志*, 2003, 11(9): 1290 - 1293.
- 8 Benassi L, Bertazzoni G, Seidenari S. In vitro testing of tensides employing monolayer cultures: a comparison with results of patch test on human volunteers J. *Contact Dermatitis*, 1999, 40(1): 38 - 44.
- 9 袁静萍, 凌晖, 张孟贤, 等. 二烯丙基二硫对人胃癌 MGC803 细胞 G₂/M 期的阻滞作用 J. *中国药理学通报*, 2003: 19(10).
- 10 Broson A, Wolf V, Mattheus A, et al. Use of XTT - assay to assess the cytotoxicity of different surfactants and metal salts in human keratinocytes (HaCaT), A feasible method for in vitro testing of skin irritants J. *Acta Derm Venereol*, 1997, 77(1): 26 - 28.

(收稿时间: 2003 - 11 - 21)

(上接第 7 页)

我们通过联合运用 SSH 和 RACE 技术, 获得了一条在甲状腺癌中特异性低表达的未知基因 TCRS30。虽然该基因的功能及其在甲状腺癌发生过程中的确切作用尚不明确, 但是, 通过对 TCRS30 基因进行进一步的研究, 可以为从分子生物学水平探讨甲状腺癌的发生、发展机制提供新的突破口, 也为临床上对甲状腺癌的预防、早期特异性诊断、基因治疗等研究提供了新的有效工具。

参考文献:

- 1 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, et al. *Molec μ Lar cloning: a Laboratory Manual*. 2nd M. Beijing: Science Press, 1992. 42 - 43.
- 2 Diatchenko L, Lau YFC, Campbell AP, et al. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially reg μ Lated or tissue - specific cDNA probes and libraries J. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, 93 (12):

6025 - 6030.

- 3 Gurskaya NG, Diatchenko L, Chenchik A, et al. Equalizing cDNA subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12 - myristate 13 - acetate J. *Anal Biochem*, 1996, 240 (1): 90 - 97.
- 4 Wong BR, Park CG, Lee SY, et al. Identifying T - cell signaling molecules with the Clontech PCR Select cDNA subtraction Kit J. *CLONTECHniques*, 1996, 6: 32 - 33.
- 5 Von Stein OD, Thies WG, Hofmann M. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes J. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25 (13): 2598 - 2602.
- 6 Carmeci C, Thompson DA, Kuang WW, et al. Moesin expression is associated with the estrogen receptor - negative breast cancer phenotype J. *Surgery*, 1998, 124: 211 - 217.

(收稿时间: 2003 - 10 - 05)