



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.011  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.011  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(10):1401-1405.

· 基础研究 ·

## 硫利达嗪对胃癌细胞生长的抑制作用与机制研究

王磊<sup>1</sup>, 汪宏<sup>2</sup>

(1. 安徽医科大学, 安徽 合肥 230022; 2. 安徽医科大学第三附属医院 / 安徽省合肥市第一人民医院 微创外科, 安徽 合肥 230061)

### 摘要

**目的:** 探讨硫利达嗪对胃癌细胞体外生长的抑制作用及其机制。

**方法:** 不同浓度的硫利达嗪作用于胃癌 SGC-7901 细胞 24 h 后, 分别用 MTT 法与流式细胞仪检测胃癌细胞的增殖与凋亡情况, 以及用 Western blot 检测凋亡相关蛋白 bax、bcl-2、caspase-3 的表达情况。

**结果:** 硫利达嗪作用后, SGC-7901 细胞的增殖明显抑制, 凋亡率明显增加, 抗凋亡蛋白 bcl-2 表达下调、促凋亡蛋白 bax 表达上调、caspase-3 蛋白表达上调, 且均呈浓度依赖性 (均  $P < 0.05$ )。

**结论:** 硫利达嗪对人胃癌细胞体外的生长有明显抑制作用, 该作用可能与其并活化 caspase-3 依赖的凋亡途径有关。

### 关键词

胃肿瘤; 硫利达嗪; 细胞凋亡; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

中图分类号: R735.2

## Inhibitory effect of thioridazine on growth of gastric cancer cells and its mechanism

WANG Lei<sup>1</sup>, WANG Hong<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, Anhui Medical University, Hefei 230022, China; 2. Department of Minimally Invasive Surgery, the third Affiliated Hospital, Anhui Medical University/the First People's Hospital of Hefei, Hefei 230061, China)

### Abstract

**Objective:** To investigate the inhibitory effect of thioridazine on growth of gastric cancer cells in vitro and the mechanism.

**Methods:** Gastric cancer SGC-7901 cells were exposed to different concentrations of thioridazine for 24 hours, and then the proliferation and apoptosis of the gastric cells were detected by MTT assay and flow cytometry, and the expressions of apoptosis-related proteins that included bax, bcl-2 and caspase-3 were measured by Western blot analysis, respectively.

**Results:** In SGC-7901 cells after exposure to thioridazine, the proliferation was decreased, apoptosis was increased significantly, the expression of antiapoptotic protein bcl-2 was down-regulated, and proapoptotic protein bax as well as caspase-3 was up-regulated significantly, and all effects showed a concentration-dependent manner (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** Thioridazine has evident inhibitory effect on human gastric cancer in vitro, which may possibly be associated with its activating the caspase-3-dependent apoptotic pathway.

### Key words

Stomach Neoplasms; Thioridazine; Apoptosis; Caspase 3

CLC number: R735.2

收稿日期: 2015-06-24; 修订日期: 2015-09-14。

作者简介: 王磊, 安徽医科大学硕士研究生, 主要从事普通外科方面的研究。

通信作者: 汪宏, Email: whsurgery1958@163.com

胃癌在我国是最常见的消化系统恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>；在西欧、北美等发达国家也是最常见的恶性肿瘤<sup>[2-3]</sup>。硫利达嗪为哌啶类衍生物，其早先被广泛用于治疗严重的精神和情绪障碍，如精神分裂症，躁狂症<sup>[4-5]</sup>。在恶性肿瘤疾病上，该药起初被用于治疗肿瘤的相关发热、出汗与抑郁症<sup>[6]</sup>。最新研究<sup>[7]</sup>结果表明，硫利达嗪在体外有抗多种肿瘤细胞活性的作用，这提示其可能成为一种新型的抗肿瘤药物。本研究是以硫利达嗪作用于胃癌细胞，并观察其对胃癌细胞凋亡发生的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

**1.1.1 主要仪器** 680全自动酶标仪购于美国BIO-RAD公司；FACS Calibur流式细胞仪购于美国BD公司；8000DH型二氧化碳培养箱购于美国Thermo公司；CKX41型倒置显微镜购于日本OLYMPUS公司。

**1.1.2 实验药物与细胞株** 硫利达嗪购自美国Gibco公司，人胃癌SGC-7901细胞由安徽医科大学第三附属医院保存。

**1.1.3 试剂** 改良型RPMI 1640培养基购自Hyclone公司，胎牛血清购自浙江天航生物科技有限公司，四甲基偶氮唑蓝（MTT）检测试剂盒购于美国Sigma公司，actin、bax、bcl-2、caspase-3一抗均购自美国CST（cell signaling technology）公司，辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗购自中杉金桥公司，细胞凋亡检测试剂盒和Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒购自BestBio公司。

### 1.2 方 法

**1.2.1 细胞培养** 细胞接种于10%FBS、1%双抗（100 μg/mL的青霉素和链霉素）的改良型RPMI 1640培养基，于37℃、5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的细胞培养箱中培养。1~2 d换液，0.25%胰酶细胞消化液消化传代，实验取对数生长期的细胞。硫利达嗪原药以生理盐水、DMSO辅助溶解，配成0.1 mol/L的原液，并分装放置于-80℃冰箱待用，实验时将分装好的原液配制成100 μmol/L的工作液。DMSO终浓度<0.1%。

**1.2.2 细胞增殖抑制实验** MTT测定硫利达嗪处理后的细胞存活率。取对数生长期的SGC-7901细胞，将细胞接种于含10%FBS的改良型RPMI 1640培养基，细胞密度以3×10<sup>4</sup>个/mL为佳，将含有细胞的培养基以100 μL/孔种至96孔板。实

验组和对照组均设4个复孔。4~6 h后于细胞贴壁后换液，37℃培养箱孵育过夜，以不同浓度的硫利达嗪工作液（10、20、30、40、50、60、70、80 μmol/L）加入到各孔中，对照组加入培养基，继续培养。于6、12、24 h在倒置显微镜下观察细胞形态学变化，在细胞明显变圆、脱壁时取10 μL MTT溶液（5 mg/mL）加入到每个孔中（包括对照组）。避光37℃培养箱培养4 h，小心吸取上清，再加入100 μL DMSO，常温振荡器振荡摇匀10 min。酶标仪在490 nm双波长检测相应的吸光度（A），取每组5个平行孔吸光值的均数，按照公式计算细胞生长抑制率（IR）：IR=（1-加药组吸光值均数/对照组吸光值均数）×100%。实验重复3次。

**1.2.3 流式细胞术测定细胞凋亡的变化** 取对数生长期SGC细胞，调整细胞数量至3×10<sup>4</sup>个/mL，以每孔2 mL种于6孔板，实验组3孔，对照组1孔，4~6 h后在细胞贴壁后换液，37℃培养箱孵育过夜。硫利达嗪分别以30、40、50 μmol/L加入实验组孔，对照组换液不加药，继续培养24 h后，小心吸取每组上清悬浮的凋亡细胞，并胰酶消化贴壁细胞，将各组上清悬浮的凋亡细胞和消化下来的贴壁细胞混合后1 000 r/min离心5 min，弃上清液，预冷PBS洗涤细胞2遍，取40 μL Annexin V结合液、10 μL Annexin V-FITC和5 μL PI混匀后加入各组细胞，4℃避光孵育30 min，1 000 r/min离心3 min，去上清，PBS冲散细胞以流式细胞仪检测细胞凋亡程度。Annexin V-FITC和PI标记的细胞即为凋亡细胞。细胞凋亡率（%）=凋亡细胞数/总细胞数×100%。

**1.2.4 Western blot法检测蛋白表达** 设置实验组3组细胞，对照组1组细胞。取对数生长期的SGC细胞，硫利达嗪分别以30、40、50 μmol/L加入到实验组，对照组不做处理，于培养箱培养24 h，PBS小心洗涤2遍，胰酶消化收集细胞。蛋白裂解液冰上裂解30 min，100℃变性15 min，4℃12 000 r/min离心10 min提取总蛋白，按照10 μL/孔上样，12%SDS-PAGE凝胶电泳，恒压80 V电泳至分离胶，恒压120 V至电泳结束，电转印至PVDF膜上（220 mA、100 min），TBST配制5%脱脂牛奶室温封闭2 h，加入小鼠抗actin（1:1 000）、小鼠抗bax（1:1 000）、兔抗bcl-2（1:1 000）、兔抗caspase-3（1:1 000）一抗室温孵育1 h，TBST冲洗3次，每次10 min，辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗（1:5 000）、山羊抗

兔二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 冲洗 3 次, 每次 10 min, ECL 显影, 暗室曝光成像。

### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。两组间比较采用 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 硫利达嗪对胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响

MTT 法检测结果显示, 硫利达嗪对 SGC-7901 细胞的增殖抑制效应呈浓度依赖性增强 ( $P < 0.05$ ); 通过 SPSS 16.0 软件计算, 硫利达嗪对 SGC-7901 细胞的  $IC_{50}$  为  $(49.51 \pm 3.95) \mu\text{mol/L}$  (图 1)。细胞光镜 ( $\times 200$ ) 下观察, 硫利达嗪作用 24 h 后, 对照组细胞呈现标准的贴壁生长, 轮廓明确、清楚, 生长旺盛, 而随着药物浓度的增加, 细胞明显轮廓不清、贴壁不紧、体积缩小、边缘透亮、间隙增加, 甚至出现漂浮状细胞。

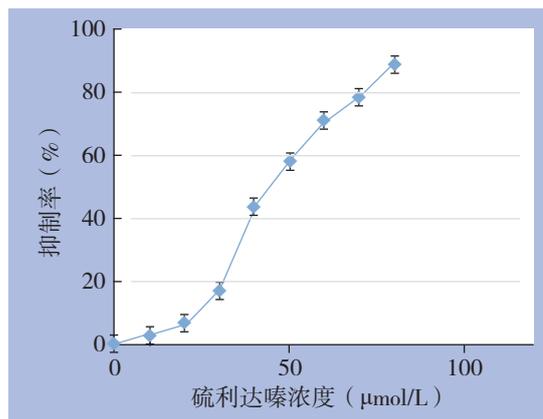


图 1 MTT 法检测胃癌 SGC-7901 细胞的增殖抑制率  
Figure 1 Determination of inhibition rate of SGC-7901 cells by MTT assay

### 2.2 硫利达嗪对胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的影响

流式细胞仪检测结果显示, 30、40、50  $\mu\text{mol/L}$  硫利达嗪作用 24 h 后, SGC-7901 细胞的凋亡率分别为 9.67%、19.06%、25.90%, 各浓度间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图 2)。

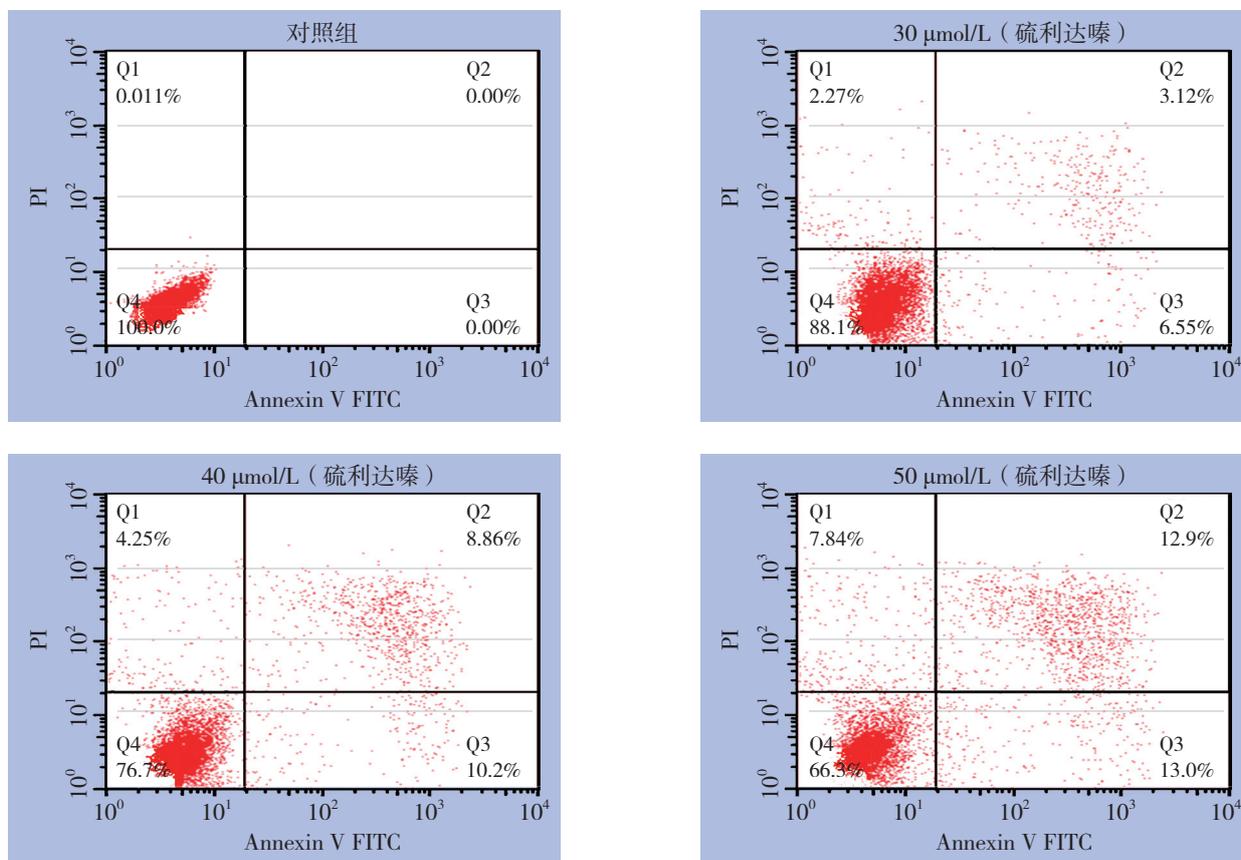


图 2 流式细胞仪检测胃癌 SGC-7901 细胞的凋亡情况  
Figure 2 Measurement of apoptosis in SGC-7901 cells by flow cytometry

### 2.3 硫利达嗪对胃癌 SGC-7901 细胞相关凋亡蛋白表达的影响

不同浓度的硫利达嗪作用细胞 24 h 后, Western blot 结果显示, 随着药物浓度的增加,

抗凋亡蛋白 bcl-2 下调、促凋亡蛋白 bax 上调, caspase-3 蛋白上调 (图 3), 各实验组与对照组比较, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。

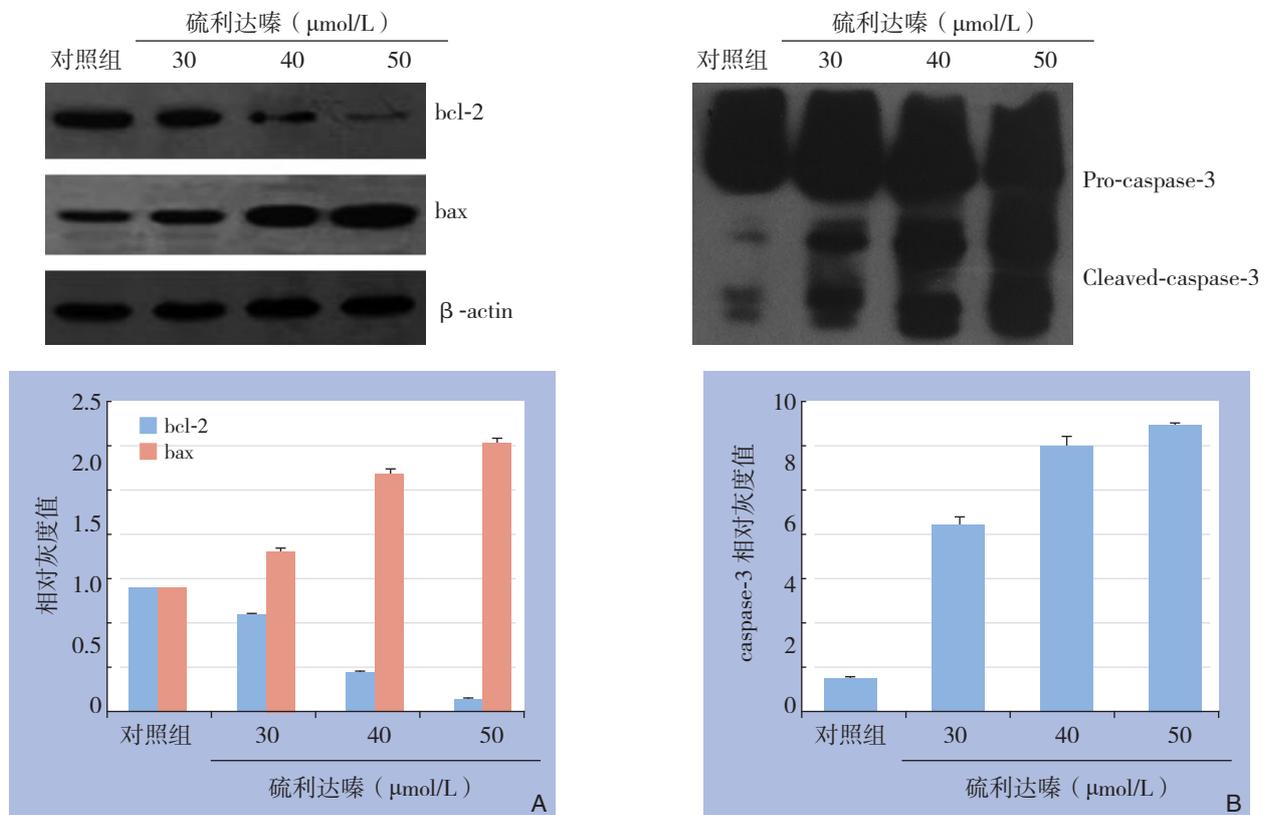


图 3 Western blot 检测结果 A: bcl-2 与 bax 蛋白的表达; B: caspase-3 蛋白的表达

Figure 3 Results of Western blot analysis A: Bcl-2 and bax expressions; B: Caspase-3 expression

## 3 讨论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 除手术切除外, 化疗也是其最常用的治疗方法, 但传统的化疗药物效果差, 不良反应较多, 患者不耐受等, 这都成为胃癌临床治疗中的难题。硫利达嗪本身作为一种已经广泛运用的治疗精神疾病的药物, 其抗肿瘤的特性也随着研究的深入而得到了证实。国外多篇文献<sup>[8-14]</sup>均报道了硫利达嗪的抗肿瘤增殖活性。研究<sup>[15-16]</sup>显示硫利达嗪可显著降低人类急性髓细胞白血病细胞的增殖与自我更新能力。

细胞凋亡是细胞在受环境刺激后, 基因调控下产生主动死亡的过程。bcl-2 家族抗凋亡蛋白的表达, 与凋亡的发生密切相关<sup>[17]</sup>。bcl-2 家族蛋白是以通过维持线粒体外膜的完整性从而控制线粒体内细胞色素 C 等促凋亡分子的释放。其中 bcl-2

蛋白是维持线粒体膜的稳定性, bax 蛋白则是通过破坏线粒体膜的完整性来发挥促凋亡作用<sup>[18]</sup>。bcl-2/bax 正常情况下在细胞中比例相对固定, 若外界刺激使得 bcl-2 表达增高时, 可致 bax 的同源二聚体分离并促使细胞出现抗凋亡作用, 从而引起肿瘤的发生和发展<sup>[19]</sup>。而 caspase-3 则是凋亡发生信号通路下游最主要的执行蛋白之一<sup>[20-21]</sup>。

本研究结果显示, 硫利达嗪在体外可明显抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖, 增殖抑制率随着浓度的增加而提升, 在 50 μmol/L 浓度时, 即可在光镜下观察到肿瘤细胞明显的变圆, 皱缩, 甚至脱壁。流式细胞术显示, 高浓度硫利达嗪组的胃癌细胞凋亡率远高于低浓度组。同时, 胃癌细胞的抗凋亡蛋白 bcl-2 表达下调, 促凋亡蛋白 bax 表达上调, 提示其促凋亡机制可能是: 硫利达嗪下调抗凋亡蛋白 bcl-2、上调促凋亡蛋白 bax, 从而破坏线粒体膜的

完整性。

综上所述, 硫利达嗪对胃癌细胞株 SGC-7901 有着明显凋亡效应。但是, 硫利达嗪对肿瘤细胞的其他凋亡调节蛋白的影响, 及与其他化疗药物等治疗手段的配伍协同效应, 以及在动物模型上抗癌效应及机制的证实尚需进一步研究。

## 参考文献

- [1] 赵志杰, 李永翔, 孙若川. THBS2 表达与胃癌血管生成以及预后的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(10):1343-1348.
- [2] 吴生华, 俞继卫, 郑林海, 等. 胃癌 VEGF-C、VEGFR-3 及 CNTN-1 的表达及其与淋巴转移的关系[J]. 中国普通外科杂志, 2010, 19(10):1065-1070.
- [3] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [4] von Bahr C, Movin G, Nordin C, et al. Plasma levels of thioridazine and metabolites are influenced by the debrisoquin hydroxylation phenotype[J]. Clin Pharmacol Ther, 1991, 49(3):234-240.
- [5] Weingarten JC, Thompson TL 2nd. The effect of thioridazine on prolactinoma growth in a schizophrenic man: case report[J]. Gen Hosp Psychiatry, 1985, 7(4):364-366.
- [6] Cowap J, Hardy J. Thioridazine in the management of cancer-related sweating[J]. J Pain Symptom Manage, 1998, 15(5):266.
- [7] Kamiwatari M, Nagata Y, Kikuchi H, et al. Correlation between reversing of multidrug resistance and inhibiting of [3H] azidopine photolabeling of P-glycoprotein by newly synthesized dihydropyridine analogues in a human cell line[J]. Cancer Res, 1989, 49(12):3190-3195.
- [8] Byun HJ, Lee JH, Kim BR, et al. Anti-angiogenic effects of thioridazine involving the FAK-mTOR pathway[J]. Microvasc Res, 2012, 84(3):227-234.
- [9] Rho SB, Kim BR, Kang S. A gene signature-based approach identifies thioridazine as an inhibitor of phosphatidylinositol-3'-kinase (PI3K)/AKT pathway in ovarian cancer cells[J]. Gynecol Oncol, 2011, 120(1):121-127.
- [10] Strobl JS, Kirkwood KL, Lantz TK, et al. Inhibition of human breast cancer cell proliferation in tissue culture by the neuroleptic agents pimozide and thioridazine[J]. Cancer Res, 1990, 50(17):5399-5405.
- [11] Strobl JS, Peterson VA. Tamoxifen-resistant human breast cancer cell growth: inhibition by thioridazine, pimozide and the calmodulin antagonist, W-13[J]. J Pharmacol Exp Ther, 1992, 263(1):186-193.
- [12] Kang S, Dong SM, Kim BR, et al. Thioridazine induces apoptosis by targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in cervical and endometrial cancer cells[J]. Apoptosis, 2012, 17(9):989-997.
- [13] Min KJ, Seo BR, Bae YC, et al. Antipsychotic agent thioridazine sensitizes renal carcinoma Caki cells to TRAIL-induced apoptosis through reactive oxygen species-mediated inhibition of Akt signaling and downregulation of Mcl-1 and c-FLIP(L)[J]. Cell Death Dis, 2014, 5:e1063. doi: 10.1038/cddis.2014.35.
- [14] Mu J, Xu H, Yang Y, et al. Thioridazine, an antipsychotic drug, elicits potent antitumor effects in gastric cancer[J]. Oncol Rep, 2014, 31(5):2107-2114.
- [15] Burgess DJ. Stem cells. Antipsychotic to anticancer agent?[J]. Nat Rev Cancer, 2012, 12(7):452-453.
- [16] Sachlos E, Risueño RM, Laronde S, et al. Identification of drugs including a dopamine receptor antagonist that selectively target cancer stem cells[J]. Cell, 2012, 149(6):1284-1297.
- [17] Gómez-Fernández JC. Functions of the C-terminal domains of apoptosis-related proteins of the Bcl-2 family[J]. Chem Phys Lipids, 2014, 183:77-90.
- [18] Anilkumar U, Prehn JH. Anti-apoptotic BCL-2 family proteins in acute neural injury[J]. Front Cell Neurosci, 2014, 8:281. doi: 10.3389/fncel.2014.00281.
- [19] Ji M, Yuan L, Lv X, et al. EBP50 regulates the apoptosis of pancreatic cancer cells by decreasing the expression levels of Bcl-2[J]. Exp Ther Med, 2014, 8(3):919-924.
- [20] Zheng HC, Sun JM, Wei ZL, et al. Expression of Fas ligand and caspase-3 contributes to formation of immune escape in gastric cancer [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(7):1415-1420.
- [21] 张洪, 张阳德, 王大平, 等. Caspase-3、XIAP 在骨关节炎中的表达及意义[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(3):325-327.

(本文编辑 姜晖)

**本文引用格式:** 王磊, 汪宏. 硫利达嗪对胃癌细胞生长的抑制作用与机制研究[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(10):1401-1405. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.011

**Cite this article as:** WANG L, WANG H. Inhibitory effect of thioridazine on growth of gastric cancer cells and its mechanism[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(10):1401-1405. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.011