

汉防己甲素联合紫杉醇对胃癌细胞增殖和凋亡的影响

郑锡凤, 李晓林, 何晓璞, 徐 伟, 唐 丹, 张 皓, 孙为豪*

(南京医科大学第一附属医院老年消化科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 研究汉防己甲素(tetrandrine, TET)联合化疗药物紫杉醇(paclitaxel, PTX)对人胃癌细胞增殖和凋亡的影响。方法: MKN-45 细胞常规培养于 RPMI-1640 培养液中, 细胞长至亚单层后加 TET 和(或)PTX, 连续培养 48 h。四甲基偶氮唑盐(MTT)比色法分析细胞增殖情况, DAPI 染色和流式细胞仪检测细胞凋亡情况。结果: TET 和 PTX 单药或联合均呈剂量依赖性抑制 MKN-45 细胞增殖, 两药联合时 IC_{50} 较两药单用时显著降低($P < 0.05$)。DAPI 染色和流式细胞仪显示 TET 和 PTX 联合用药组细胞凋亡率显著高于单药组($P < 0.05$)。结论: TET 联合 PTX 对胃癌细胞的增殖抑制及凋亡诱导有良好的协同效应。

[关键词] 胃癌; 汉防己甲素; 紫杉醇; 增殖; 凋亡

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)03-333-05

Effects of tetrandrine in combination with paclitaxel on the proliferation and apoptosis of human gastric cancer cell line

ZHENG Xi-feng, LI Xiao-lin, HE Xiao-pu, XU Wei, Tang Dan, ZHANG Hao, SUN Wei-hao*

(Department of Geriatric Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of tetrandrine (TET) in combination with paclitaxel (PTX) on the proliferation and apoptosis in human gastric cancer cell line MKN-45. **Methods:** MKN-45 cells were routinely cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum. Subconfluent cell cultures were treated with either TET or PTX, or TET in combination with PTX for 48 h. Cell growth and proliferation of MKN-45 were analyzed with MTT assay. DAPI staining and flow cytometric analysis were used to detect the apoptosis of MKN-45. **Results:** Both TET and PTX alone or the combined treatment inhibited MKN-45 cell proliferation in a dose-dependent manner. The 50% inhibitory concentration (IC_{50}) for TET and PTX were significantly decreased when MKN-45 cells were treated simultaneously with TET plus PTX compared with the two drugs applied alone ($P < 0.05$). DAPI staining and flow cytometric analysis showed that the apoptosis rates in the cells treated with TET and PTX were much greater than TET or PTX applied singly ($P < 0.05$). **Conclusion:** TET and PTX exerted a synergistic effect on the inhibition of proliferation and the induction of apoptosis in gastric cancer cells.

[Key words] gastric cancer; tetrandrine; paclitaxel; proliferation; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(3): 333-337]

胃癌是常见的恶性肿瘤之一, 在我国其发病率居各类肿瘤的首位。化疗是中晚期胃癌治疗的主要手段之一, 近年来研究发现, 以紫杉醇(paclitaxel, PTX)类药物为主的新一代化疗方案在治疗中晚期胃癌时可以显著提高疗效, 但其单药有效率仅为 23%~32%^[1], 且大剂量的化疗药物应用常

常带来全身多系统的不良反应, 因此, 研究开发低毒高效的抗癌药物具有重要的临床意义。在我国, 中药或中药提取物用于胃癌的临床治疗已有一定的研究基础。汉防己甲素(tetrandrine, TET)又称粉防己碱, 是从防己科植物防己、粉防己或千金藤中分离出的双苄基异喹啉生物碱, 作为传统使用的中药, 具有抗炎、抗风湿、抗高血压等作用^[2]。研究发现, TET 对多种肿瘤尤其是消化系统肿瘤有较强的抗增殖和诱导凋亡作用^[3-4], 与化疗药物联合应用能够增强其体外抗肿瘤作用, 减少化疗药用

[基金项目] 国家自然科学基金(81001077); 江苏省卫生厅"135 工程"医学重点人才基金(RC2007046)

*通讯作者, E-mail: weihaosun@hotmail.com

量^[5]。本研究以低分化胃癌细胞株 MKN-45 为研究对象,探讨 TET 和 PTX 对胃癌细胞增殖和凋亡的影响,旨在明确 TET 联合 PTX 有无协同抗癌作用。

1 材料与方法

1.1 材料

TET 购自浙江海正药业;PTX 购自美国百时美施贵宝公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)、碘化丙啶(PI)、胰蛋白酶为美国 Sigma 公司产品,RPMI-1640 培养液和胎牛血清为美国 Gibco BRL 公司产品;4,6-二氨基-2-苯基吲哚(DAPI)染色试剂盒购自南京凯基科技发展有限公司;膜联蛋白 V(annexin V)-异硫氰酸荧光素(FITC)/PI 试剂盒为澳大利亚 Bender Medsystems 公司产品。其他试剂为国产分析纯级。荧光倒置显微镜为日本 Olympus 公司产品,酶联免疫检测仪为美国 Thermo 公司产品,流式细胞仪系美国 BD 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人胃癌细胞株 MKN-45 购自中国科学院上海细胞研究所,常规传代培养于含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 RPMI-1640 培养液中,37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。隔天换液,3 d 传代 1 次。

1.2.2 MTT 法检测 TET 和 PTX 对胃癌细胞增殖的影响

将传代后处于对数生长期的细胞经 0.25%胰蛋白酶消化,低速离心收集制成 5 × 10⁷ 个/L 的 MKN-45 单细胞悬液后接种于 96 孔细胞培养板,每孔 200 μl,常规培养 24 h 至细胞贴壁,换无血清 RPMI-1640 液再培养 24 h,分组进行 MTT 比色实验。TET 组:TET 终浓度为 0.80、1.61、3.21、6.42、12.84、19.26、25.68 μmol/L;PTX 组:PTX 终浓度为 2.34、4.68、9.36、18.72、37.44、74.88、149.76 nmol/L;TET + PTX 组:TET 终浓度为 0.40、0.80、1.61、2.41、3.21、4.82、6.42 μmol/L,PTX 终浓度为 0.29、0.59、0.94、1.17、1.41、1.87、2.34 nmol/L;对照组:不加药物;空白组:只加培养液不含细胞。各组细胞分别培养 48 h 后每孔加入 MTT(5 g/L)20 μl,继续孵育 4 h 后弃上清液,每孔加入 DMSO 150 μl 终止反应。将 96 孔板移入平板震荡器,水平震荡 10 min,使 MTT 充分溶解,以空白组调零,波长 570 nm 处测定各孔的吸光度值 *D* (570 nm)(每组设 4 个平行孔,独立重复 3

次)。药物作用效应(FA)即抑制率(%) = [1-实验组 *D*(570 nm)/对照组 *D*(570 nm)] × 100%。

1.2.3 CI 指数法判断药物间相互作用

通过两种协同计算方法检测 TET 与 PTX 的协同效果。

根据中效原理方法^[6]计算两种药物联合指数(combined index, CI): $CI = D_1/(D_x)_1 + D_2/(D_x)_2 + \alpha D_1 D_2 / (D_x)_1 (D_x)_2$, 其中, *D*₁、*D*₂ 为合用产生 X 效应时所需 TET、PTX 浓度; (*Dx*)₁、(*Dx*)₂ 为两药单独作用产生 X 效应时 TET、PTX 浓度, $\alpha = 1$ (两种药物为完全不同的作用途径)。CI < 1 表示两种药物有协同作用; CI = 1 表示相加作用; CI > 1 表示两种药物有拮抗作用。

根据 Chou-Talalay (1984) 所报道的 IC₅₀ 值协同测定法^[6], 首先测定出单药 TET 与 PTX 的 IC₅₀ 值。固定 TET 浓度为 1.61 和 3.21 μmol/L, PTX 浓度分别为 0.29、0.59、1.17、2.34、4.68、9.36、18.72、37.44 nmol/L。计算出联合不同浓度 TET 以后 PTX 的 IC₅₀ 值,若联合组的 IC₅₀ 值在两种单药 IC₅₀ 值连线范围内,则为协同(CI < 1);若联合组的 IC₅₀ 值在两种单药 IC₅₀ 值连线范围以外,则为拮抗(CI > 1);若联合组的 IC₅₀ 值在两种单药 IC₅₀ 值连线上,则为相加(CI = 1)。

1.2.4 DAPI 染色检测细胞凋亡形态学变化

DAPI 是一种 DNA 特异性染料,能与 DNA 产生非嵌入式结合,紫外光激发时发射明亮的蓝色荧光。细胞凋亡时细胞核染色体浓集,核固缩或碎裂,DAPI 染色后荧光强度增加。本实验以 TET(6.42 μmol/L) 和 PTX (2.34 nmol/L) 单药或联合处理 MKN-45 细胞 48 h 后,弃去上清,按说明书以甲醇将 DAPI 染液稀释成 1.5 mg/L 的工作液,漂洗细胞 1 次,再以工作液 37℃避光染色 15 min,弃去染液,甲醇漂洗细胞 1 次,滴加适量抗荧光淬灭液封片,置荧光倒置显微镜下以波长 340 nm/380 nm 紫外光激发,观察细胞核形态并拍照。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

用培养液调整细胞浓度为 1 × 10⁹ 个/L,接种于 6 孔培养板,每孔 1.2 ml。细胞贴壁后弃去培养液加 TET 和 PTX,实验分组和药物浓度同上,每组设 3 个复孔。培养 24 h 后分别收集每孔细胞,用冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 3 次,重混悬于 200 μl 结合缓冲液,加入 10 μl annexin V-FITC 和 5 μl PI,轻轻混匀后避光室温反应 15 min,再加入 300 μl 结合缓冲液,流式细胞仪检测读取细胞凋亡率(%)。

1.3 统计学方法

实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS13.0 统计软件包进行分析,各组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TET 和 PTX 对 MKN-45 细胞增殖的影响

随着药物浓度的增加,细胞增殖抑制率增加,TET 单药和 PTX 单药均呈剂量依赖性地抑制细胞增殖(图 1A,B)。联合用药细胞增殖抑制率曲线显示,TET 和 PTX 联合作用时抑制率较任一单药明显增大(图 2A)。如 TET 6.42 $\mu\text{mol/L}$ 和 PTX 2.34

nmol/L 单独作用 48 h 后的抑制率分别为 41.47% 和 11.31%,联合应用时抑制率为 83.17%,与单药组比较 $P < 0.01$ 。通过公式计算所得出的 IC_{50} 值,TET: $(10.03 \pm 0.33)\mu\text{mol/L}$;PTX: $(13.19 \pm 1.86)\text{nmol/L}$;TET 和 PTX 联合应用时的 IC_{50} 值分别为 $(1.99 \pm 0.03)\mu\text{mol/L}$ 和 $(1.23 \pm 0.01)\text{nmol/L}$,两药联合应用 IC_{50} 值较单药明显降低($P < 0.05$)。

2.2 CI 指数法判定药物间相互作用

根据中效原理计算,当两药联合作用于 MKN-45 细胞时,细胞抑制率(FA)为 0.2~0.8 抑制效应范围内所计算出的 $\text{CI} < 1$ (图 2B)。因此,在该范围内两药联合应用具有协同作用。

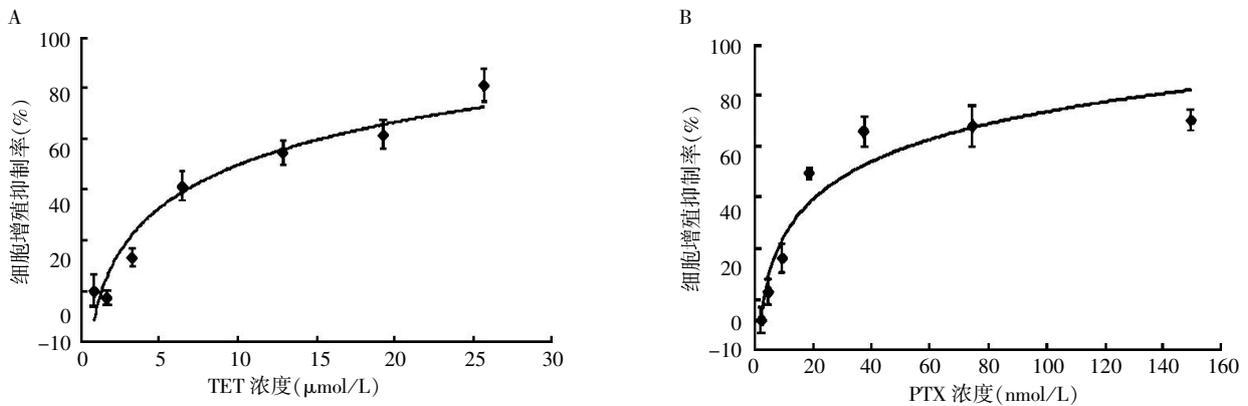
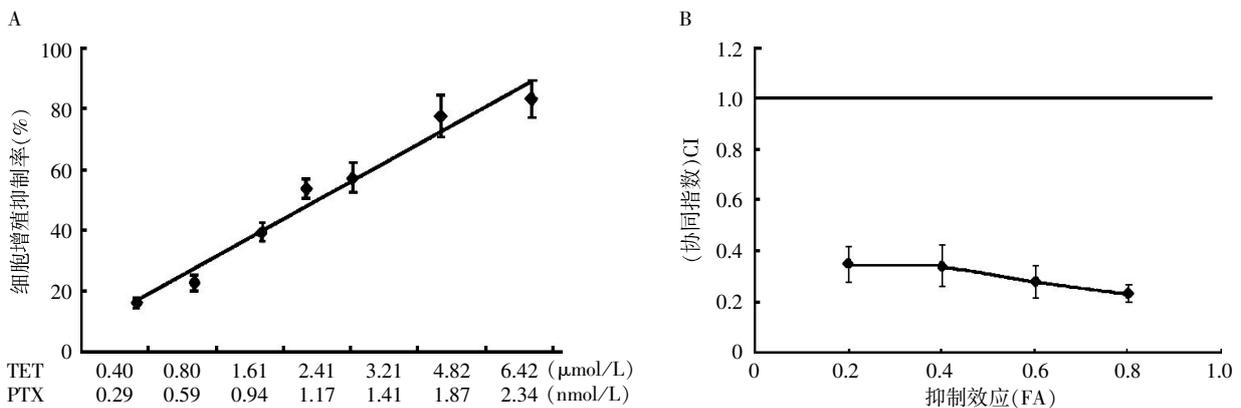


图 1 TET(A)和 PTX(B)单药对 MKN-45 细胞增殖的抑制效果

Figure 1 The inhibition effects of TET (A) or PTX (B) on MKN-45 cell proliferation at different concentrations



A: TET 和 PTX 不同浓度联用对 MKN-45 细胞增殖的抑制率曲线; B: 采用中效原理所计算出的两药联用时的 CI 值。(n = 3)

图 2 TET 和 PTX 联用对 MKN-45 细胞增殖的抑制效果

Figure 2 The inhibition effects of TET and PTX in combination on MKN-45 cell proliferation

本研究同时用 IC_{50} 法来判定 TET 和 PTX 之间的相互作用,由图 3 可见,当 TET 浓度为 1.61 和 3.21 $\mu\text{mol/L}$ 时,联合给药后 PTX 的 IC_{50} 分别为 3.54 和 2.27 nmol/L。两组联合给药的 PTX 的 IC_{50} 值均在两单药 IC_{50} 值连线的线内,显示两药联合作用 MKN-45 细胞后具有良好的协同抗肿瘤效果。

2.3 细胞凋亡形态学变化及流式细胞仪检测细胞

凋亡率

依据细胞增殖抑制实验结果,选择 TET 6.42 $\mu\text{mol/L}$ 、PTX 2.34 nmol/L 单药或联合作用于 MKN-45 细胞 48 h 后进行 DAPI 染色(图 4A),图中红色箭头所示为凋亡细胞。与对照组相比,单药组的细胞核呈波纹状或呈折缝样,部分染色质出现浓缩状态等细胞凋亡形态学改变。联合用药组则出现细胞

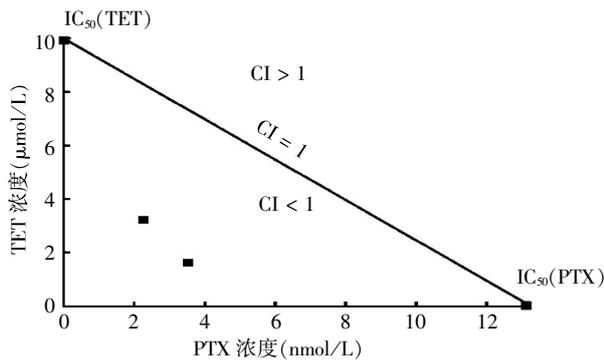


图 3 TET 与 PTX 单用或联用的 IC₅₀ 值曲线判定两药相互作用

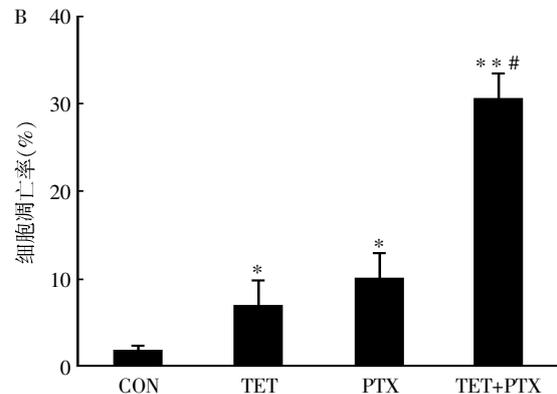
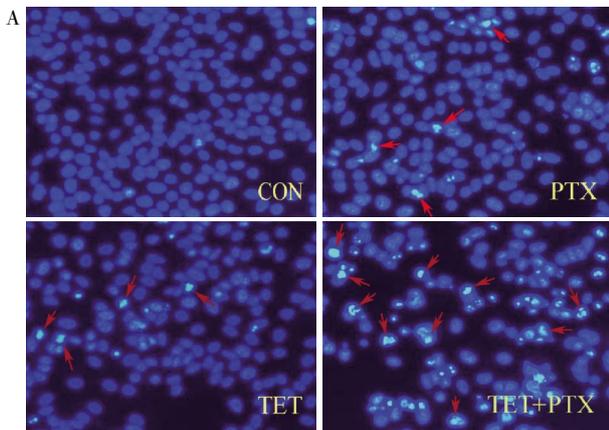
Figure 3 Interaction of the combination treatment; isoboles for the combination of PTX with TET in MKN-45 cells that were isoeffective (IC₅₀) for inhibition of the growth of MKN-45 cells

核的染色质高度凝聚、边缘化,细胞核裂解为碎块,产生凋亡小体等细胞凋亡形态学改变,与对照组和单药组相比,联合用药组细胞密度明显下降、凋亡细胞数量明显增加。

流式细胞仪检测结果显示,TET 组和 PTX 组细胞凋亡率显著高于对照组,联合用药组的细胞凋亡率显著高于单一用药组($P < 0.05$,图 4B)。

3 讨论

PTX 是治疗多种恶性肿瘤的一线药物,在胃癌治疗中也显示出显著疗效,2007 年美国国立综合癌症网络(NCCN)已将其纳入胃癌治疗的适用药物。但是,近年来临床和实验研究均发现,乳腺癌、肺癌、卵巢癌和胃癌等多种恶性肿瘤对 PTX 产生原发



A: DAPI 染色下 TET 及 PTX 单用或联用的 MKN-45 细胞凋亡照片;B:流式细胞仪检测 TET 及 PTX 单用或联用的 MKN-45 细胞的凋亡率。与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 TET 组或 PTX 组比较,# $P < 0.05$ ($n = 3$)。

图 4 DAPI 染色以及流式细胞仪检测 TET 与 PTX 单用或联用对 MKN-45 细胞凋亡的影响

Figure 4 Effects of TET or PTX alone or in combination on the apoptosis of MKN-45 cells analyzed by DAPI staining and flow cytometry

或继发性耐药^[7-8]。因此,积极开发低毒高效、能够逆转 PTX 耐药性的新药具有重要意义。研究发现,TET、白藜芦醇、姜黄素、藤黄酸等多种中药单体化合物能够增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性^[9-10]。

本研究结果初步证明,TET 与 PTX 联合应用对胃癌细胞的增殖抑制及凋亡诱导具有协同作用。两药联合应用时 PTX 的 IC₅₀ 值较单一用药时明显降低($P < 0.05$),且通过两种方法所计算的协同指数 CI 均小于 1。因此,在达到相同抑制效果条件下,TET 能够减少 PTX 用量,增加胃癌细胞对 PTX 的敏感性,降低大剂量化疗药物应用所带来的全身多系统的不良反应。但是目前 TET 在抗肿瘤治疗方面的临床研究报道尚不多见,主要集中在探讨 TET 对放疗的增敏作用及逆转肿瘤细胞多药耐药性的研究。

大量的实验研究表明 TET 抗肿瘤作用机制有:①直接细胞毒作用:TET 可引起细胞 DNA 链断裂直接抗肿瘤;②诱导凋亡:TET 通过上调促凋亡基因、下调抗凋亡基因的表达,使细胞周期阻滞于 G₁ 期,激活凋亡信号通路(如 caspase-3 的激活)等途径诱导肿瘤细胞凋亡;③放疗增敏减毒作用:TET 可能作为一种细胞周期调控剂发挥放疗增敏作用,其具体机制尚不明确;在减毒作用方面,TET 可能通过抑制炎症反应对放疗损害起保护作用;④化疗增敏减毒作用:其机制可能为 TET 与化疗药物有协同诱导肿瘤细胞凋亡作用,此外,TET 可减轻阿霉素引起的大鼠心肌损害、减轻肺纤维化形成前的肺泡炎症反应起到化疗减毒作用;⑤逆转肿瘤细胞耐药作用;⑥抗肿瘤细胞远处转移;⑦抗肿瘤血管新生作用^[11]。

研究表明氧化应激在细胞凋亡的过程中起关键作用。活性氧(ROS)是细胞有氧呼吸过程中氧的某些代谢产物和一些反应的含氧产物,包括超氧化物($\cdot\text{O}_2^-$)、过氧化氢(H_2O_2)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)等。有研究发现,有些抗癌药物诱导细胞凋亡伴有 ROS 产生,ROS 参与调节 NF- κ B 和 p53 的转位及 p53 介导的凋亡途径,参与调节 MAPK 信号转导途径^[12]。此外,有研究发现紫杉醇的耐药与肿瘤细胞内 ROS 水平及总抗氧化能力密切相关,增加细胞内 ROS 水平或者降低其抗氧化能力均可克服肿瘤细胞对紫杉醇的耐药性,从而增加化疗敏感性^[13]。近期文献提出了“氧化疗法(oxydation therapy)”策略,具体为向肿瘤组织定向输送能够刺激 ROS 水平增高的酶或药物来杀伤肿瘤^[14]。因此,能够诱导肿瘤细胞内 ROS 水平显著升高的新药物的发现和应用将给肿瘤治疗带来新突破。本课题组前期的研究表明,TET 能诱导结肠癌细胞内 ROS 增高,并通过影响其下游的 p-JNK 及凋亡蛋白的表达来诱导细胞凋亡^[15]。本实验前期研究显示 TET 和 PTX 均能增加细胞内 ROS 水平,联合用药时较单药显著增加,同时伴有细胞存活率明显降低($P < 0.05$);加用抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸(NAC)处理后,显著减少细胞内 ROS 水平的同时提高细胞存活率(数据未提供)。提示,增加细胞内 ROS 水平可能是 TET 和 PTX 协同诱导胃癌细胞 MKN-45 凋亡的机制之一。然而,凋亡是一个十分复杂的过程,ROS 通过哪些信号通路诱导凋亡还有待进一步的体内外实验研究证实。

本研究结果提示,中药 TET 和化疗药物 PTX 联合应用有望提高对胃癌的治疗效果,诱导肿瘤细胞凋亡可能是两者产生协同作用的机制之一。

[参考文献]

- [1] Wohrerl SS, Raderer M, Hejna M. Palliative chemotherapy for advanced gastric cancer [J]. *Ann Oncol*, 2004, 15 (11):1585-1595
- [2] Shen YC, Chou CJ, Chiou WF, et al. Anti-inflammatory effects of the partially purified extract of radix Stephaniae tetrandrae; comparative studies of its active principles tetrandrine and fangchinoline on human polymorphonuclear leukocyte functions [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 60 (5): 1083-1090
- [3] Nomura M, Yamazaki R, Takaya M, et al. Inhibition of tetrandrine on epidermal growth factor-induced cell trans-formation and its signal transduction [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(5A):3187-3193
- [4] Jang BC, Lim KJ, Paik JH, et al. Tetrandrine-induced apoptosis is mediated by activation of caspases and PKC-delta in U937 cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2004, 67 (10):1819-1829
- [5] Wei J, Liu BR, Wang L, et al. Synergistic interaction between tetrandrine and chemotherapeutic agents and influence of tetrandrine on chemotherapeutic agent-associated genes in human gastric cancer cell lines [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2007, 60(5):703-711
- [6] Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors [J]. *Adv Enzyme Regul*, 1984, 22:27-55
- [7] de Hoon JP, Veeck J, Vriens BE, et al. Taxane resistance in breast cancer: A closed HER2 circuit? [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1825(2):197-206
- [8] Papadaki C, Mavroudis D, Trypaki M, et al. Tumoral expression of TXR1 and TSP1 predicts overall survival of patients with lung adenocarcinoma treated with first-line docetaxel-gemcitabine regimen [J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(11):3827-3833
- [9] Garg AK, Buchholz TA, Aggarwal BB. Chemosensitization and radiosensitization of tumors by plant polyphenols [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2005, 7(11-12):1630-1647
- [10] 陈晓松, 包明红, 梅晓东. 粉防己碱对人口腔上皮癌多药耐药 KB-MRP1 细胞株多药耐药性的逆转作用 [J]. *癌症*, 2007, 26(8):846-850
- [11] 殷华芳, 钱晓萍, 刘宝瑞. 汉防己甲素抗肿瘤机制研究进展 [J]. *现代肿瘤学*, 2011, 19(3):582-584
- [12] 耿长新, 曾昭冲, 王吉耀. 多西紫杉醇抑制肝癌细胞生长及诱导凋亡 [J]. *中华消化杂志*, 2003, 23(6):381-382
- [13] Laurent A, Nicco C, Chéreau C, et al. Controlling tumor growth by modulating endogenous production of reactive oxygen species [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(3):948-956
- [14] Fang J, Seki T, Maeda H. Therapeutic strategies by modulating oxygen stress in cancer and inflammation. *Adv [J]. Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(4):290-302
- [15] Li X, Zhen D, Lu X, et al. Enhanced cytotoxicity and activation of ROS-dependent c-Jun NH2-terminal kinase and caspase-3 by low doses of tetrandrine-loaded nanoparticles in Lovo cells—a possible Trojan strategy against cancer [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 75(3):334-340

[收稿日期]2011-11-07