

冰片与顺铂联用对 Eca109(DDP^r)细胞增殖、细胞周期和凋亡的影响

戴翠萍,张徐宁,薛彩萍,季宁东*

(淮阴卫生高等职业技术学校,淮安市消化道肿瘤重点实验室,江苏 淮安 223300)

[摘要] 目的:探讨冰片与顺铂(cisplatin,DDP)联用对耐 DDP 的食管癌细胞 Eca109(DDP^r)增殖、细胞周期和凋亡的影响。方法:采用递增药物浓度持续作用诱导法建立耐 DDP 的食管癌细胞 Eca109(DDP^r),将冰片联合 DDP 作用于 Eca109(DDP^r)细胞,MTT 法检测 Eca109(DDP^r)细胞增殖情况;流式细胞术检测细胞周期及细胞凋亡。结果:递增药物浓度持续作用诱导 6 个月后,细胞可以在含 1 μg/ml DDP 的培养液中稳定生长,其对 DDP 的耐药指数为 15.886;单用冰片浓度 ≤ 1.560 μg/ml 时,对 Eca109(DDP^r)细胞无明显抑制作用($P > 0.05$),但与 1 μg/ml DDP 合用能显著促进 DDP 对 Eca109(DDP^r)细胞增殖的抑制作用($P < 0.05$),并促进 DDP 诱导 Eca109(DDP^r)的细胞周期改变、细胞凋亡增加,细胞周期表现为 G1 期细胞明显增多($P < 0.05$),S 期细胞、G2 期细胞明显减少($P < 0.05$),细胞的凋亡率明显增加($P < 0.05$)。结论:冰片促进 DDP 对 Eca109(DDP^r)细胞增殖的抑制作用,可能与改变 Eca109(DDP^r)细胞周期、增加细胞凋亡有关。

[关键词] 冰片;顺铂;Eca109(DDP^r);细胞增殖;细胞周期;细胞凋亡

[中图分类号] R735.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1388-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20131011

Effects of borneol combined with cisplatin on cell proliferation and cell cycle and apoptosis of human esophageal carcinoma cell line Eca109(DDP^r)

Dai Cuiping, Zhang Xuning, Xue Caiping, Ji Ningdong*

(Huaiyin Advanced Vocational and Technical Health School, Huaian Key Laboratory of the Tumor of Digestive System, Huaian 223300, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of borneol combined with cisplatin (DDP) on cell proliferation and cell cycle and apoptosis of human esophageal carcinoma cell line Eca109(DDP^r). **Methods:** The human esophageal carcinoma cell line Eca109 was exposed to continuous stepwise-increased concentration of DDP. Drug-sensitivity was measured by MTT. The cell cycle and apoptosis were determined by flow cytometry. **Results:** After 6 months of stepwise drug exposure, the cell could normally grow and propagate in the medium with 1 μg/ml of DDP, and exhibited a resistance index of 15.886 against DDP. The cell line was named Eca109(DDP^r). MTT assay showed that borneol at the concentration of no more than 1.560 μg/ml had no obvious inhibition on the growth of Eca109(DDP^r) cells ($P > 0.05$), but it could significantly promote the inhibition of DDP (1 μg/ml) on the proliferation of Eca109(DDP^r) cells ($P < 0.05$). Compared with using DDP alone, borneol combined with DDP could change the cell cycle, significantly increase the number of cells in G1 stage ($P < 0.05$) and decrease the number of cells in S stage and G2 stage ($P < 0.05$), and obviously promote the apoptosis of Eca109(DDP^r) cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** Borneol can promote the inhibition of DDP on the proliferation of Eca109(DDP^r) cells, the mechanism may be related to change cell cycle and increase apoptosis of Eca109(DDP^r) cells.

[Key words] borneol; DDP; Eca109(DDP^r); cell proliferation; cell cycle; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(10):1388-1391]

细胞凋亡和细胞周期是生命活动中两个相互联系的过程,细胞凋亡是调节机体正常发育的重要

[基金项目] 江苏省中医药局科技项目(LB09077);淮安市科技支撑计划项目(HAS2009002-2)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:hywxjnd1@163.com

机制。对细胞凋亡和细胞周期的深入研究发现,诱导肿瘤细胞凋亡和周期改变,可遏制肿瘤细胞的增殖^[1-2],因此寻找有效的诱导肿瘤细胞凋亡和周期改变的药物是目前肿瘤治疗研究的热点。顺铂(cisplatin, DDP)为临床治疗食管癌常用药,但往往因食

管癌细胞产生多药耐药(multidrug resistance, MDR)现象影响疗效。本实验室以递增药物浓度持续作用诱导法建立的耐 DDP 的食管癌细胞 Eca109(DDP^r)为模型,采用冰片与 DDP 联用,研究冰片能否通过影响细胞凋亡和细胞周期而抑制 Eca109(DDP^r)细胞增殖,从而逆转 Eca109(DDP^r)细胞对 DDP 的耐药性,为将冰片用于食管癌的辅助治疗提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

食管癌细胞株 Eca109 购自南京凯基生物科技发展有限公司。

冰片(北京同仁堂),注射用 DDP(山东齐鲁制药有限公司),RPMI1640(Gibco 公司,美国),小牛血清(上海生物工程技术有限公司),MTT(Amersco 公司,美国),DMSO(上海久亿化学试剂有限公司),细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

细胞在含有 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液中,37℃、5%CO₂ 相对湿度为 90%的细胞培养箱内培养。

1.2.2 耐 DDP 的食管癌细胞 Eca109(DDP^r)的诱导

采用递增药物浓度持续作用诱导法^[3]:Eca109 细胞常规培养,细胞处于对数生长期时加入 DDP,使其终浓度为 0.020 μg/ml(根据预实验约 10%的抑制浓度),根据细胞的增殖情况不断提高 DDP 浓度,直到细胞能在含 1 μg/ml DDP 的培养基中稳定生长。

1.2.3 MTT 检测 Eca109、Eca109(DDP^r)细胞对 DDP 的敏感性

调整两组对数生长期细胞密度为 5×10⁴ 个/ml,以每孔 5×10³ 个接种于 96 孔细胞培养板,培养 24 h,加入倍比稀释的 DDP,DDP 终浓度分别为 4.000、2.000、1.000、5.000×10⁻¹、2.500×10⁻¹、1.250×10⁻¹、6.250×10⁻²、3.125×10⁻²、15.625×10⁻³、78.125×10⁻⁴ μg/ml,培养 72 h,每组 5 个复孔,MTT 法检测各孔吸光度(A)值。取平均值计算细胞生长抑制率(IR),应用 SPSS17.0 通过机率单位加权回归法(Bliss 法)计算 DDP 对 Eca109、Eca109(DDP^r)细胞的半数抑制浓度(IC₅₀),计算 Eca109(DDP^r)细胞耐药指数(resistance index, RI)。

$IR = (1 - \text{实验孔 A 均值} / \text{对照孔 A 均值}) \times 100\%$; $RI = \text{Eca109(DDP}^r\text{)细胞的 IC}_{50} / \text{Eca109 细胞的 IC}_{50}$ 。

1.2.4 MTT 法检测 Eca109(DDP^r)细胞增殖情况

取对数生长期的 Eca109(DDP^r)细胞,胰酶消化,每孔 5×10³ 个接种于 96 孔细胞培养板,培养 24 h,分 4 组实验:①Control 组:只加培养基和细胞;②DDP 组:加入终浓度为 1 μg/ml 的 DDP;③冰片组:由高浓度至低浓度加入倍比稀释的冰片,冰片终浓度为 0.195、0.390、0.780、1.560、3.120 μg/ml;④冰片 + DDP 组:先加入终浓度为 1 μg/ml 的 DDP,再加入上述不同浓度的冰片,设 5 个平行复孔。培养 72 h 后,MTT 法检测各孔吸光度值,计算 IR。

1.2.5 流式细胞术检测 Eca109(DDP^r)细胞凋亡和细胞周期

将对数生长期的细胞消化接种于 6 孔细胞培养板,培养 24 h,分两组实验:①DDP 组:加入终浓度为 1 μg/ml 的 DDP;②冰片+DDP 组:先加入 1 μg/ml DDP,再加入 1.560 μg/ml 冰片。药物作用 72 h 后,收集并调整细胞浓度为 1×10⁶ 个/ml,流式细胞仪检测细胞周期中不同时相的细胞数及细胞凋亡情况^[4]。

1.3 统计学方法

用 SPSS17.0 统计软件对数据进行分析,计量数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本均数比较采用 *t* 检验,多样本均数比较采用方差分析。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞的诱导结果

采用递增药物浓度持续作用诱导法,Eca109 细胞经 6 个月的诱导能在含 1 μg/ml DDP 的培养基中稳定生长,所得细胞命名为耐 DDP 的食管癌细胞 Eca109(DDP^r)。

2.2 Eca109(DDP^r)细胞的耐药指数

相同浓度的 DDP 作用于 Eca109、Eca109(DDP^r)细胞,对细胞增殖的影响有显著性差异(表 1)。应用 SPSS17.0 通过机率单位加权回归法(Bliss 法)计算出 DDP 对 Eca109、Eca109(DDP^r)细胞的 IC₅₀ 分别为 0.280 和 4.448 μg/ml,得到 Eca109(DDP^r)细胞对 DDP 的耐药指数为 15.886。

2.3 冰片促进 DDP 抑制 Eca109(DDP^r)细胞增殖

与对照组相比,单用冰片浓度 ≤ 1.560 μg/ml 时对 Eca109(DDP^r)细胞的生长无明显抑制作用($P >$

表1 DDP对Eca109、Eca109(DDP^r)细胞增殖的影响
Table 1 Effects of DDP on cell proliferation of Eca109 and Eca109(DDP^r) cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

DDP 浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	Eca109		Eca109(DDP ^r)	
	吸光度值	IR(%)	吸光度值	IR(%)
0	1.215 ± 0.068	-	0.745 ± 0.020	-
78.125 × 10 ⁻⁴	1.142 ± 0.011	5.975	0.742 ± 0.018	0.376
15.625 × 10 ⁻³	1.089 ± 0.009	10.387	0.723 ± 0.022	2.899
3.125 × 10 ⁻²	1.030 ± 0.033	15.193	0.715 ± 0.006	3.973
6.250 × 10 ⁻²	0.813 ± 0.021	33.070	0.695 ± 0.006	6.658
1.250 × 10 ⁻¹	0.606 ± 0.027	50.107	0.672 ± 0.023	9.852
2.500 × 10 ⁻¹	0.502 ± 0.049	58.683	0.655 ± 0.009	12.107
5.000 × 10 ⁻¹	0.436 ± 0.027	64.148	0.642 ± 0.010	13.772
1.000	0.394 ± 0.043	67.539	0.550 ± 0.014	26.148
2.000	0.342 ± 0.036	71.819	0.484 ± 0.004	35.060
4.000	0.311 ± 0.010	74.370	0.393 ± 0.008	47.195

0.05); 0.390、0.780、1.560 $\mu\text{g/ml}$ 冰片与 1 $\mu\text{g/ml}$ DDP 联用能显著促进 DDP 对 Eca109(DDP^r) 细胞增殖的抑制作用 ($P < 0.05$), 即冰片具有逆转 Eca109(DDP^r) 细胞对 DDP 的耐药作用, 以 1.560 $\mu\text{g/ml}$ 的冰片作用最强(表 2)。

表2 冰片促进 DDP 对 Eca109(DDP^r) 细胞增殖的抑制
Table 2 Borneol promoted DDP to inhibit the proliferation of Eca109(DDP^r) cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别($\mu\text{g/ml}$)	吸光度值	IR(%)
Control	0.917 ± 0.033	-
DDP(1)	0.656 ± 0.028*	28.462
冰片(0.195)	0.899 ± 0.058#	1.941
冰片(0.390)	0.888 ± 0.032#	3.141
冰片(0.780)	0.875 ± 0.048#	4.537
冰片(1.560)	0.871 ± 0.040#	4.995
冰片(3.120)	0.834 ± 0.030**	9.051
冰片(0.195) + DDP(1)	0.666 ± 0.026*	27.396
冰片(0.390) + DDP(1)	0.579 ± 0.034**	36.824
冰片(0.780) + DDP(1)	0.572 ± 0.035**	37.674
冰片(1.560) + DDP(1)	0.484 ± 0.025**	47.257
冰片(3.120) + DDP(1)	0.515 ± 0.056**	43.818

与 control 组比较, * $P < 0.05$; 与 DDP 比较, # $P < 0.05$ 。

2.4 冰片与 DDP 联用对 Eca109(DDP^r) 细胞周期的影响

与单独使用 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 DDP 相比, 1.560 $\mu\text{g/ml}$ 的冰片和 DDP 联用后 G1 期细胞明显增多, S 期和 G2 期细胞明显减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 3), 提示冰片与 DDP 联用后, 改变了细胞周期群体中各期的百分比。

2.5 冰片促进 DDP 诱导 Eca109(DDP^r) 细胞凋亡

与单用 DDP 相比, 1.560 $\mu\text{g/ml}$ 的冰片和 1 $\mu\text{g/ml}$ DDP 联用后, Eca109(DDP^r) 细胞凋亡率从 (24.10 ±

表3 冰片与 DDP 联用对 Eca109(DDP^r) 细胞周期的影响
Table 3 Effects of borneol combined with DDP on cell cycle of Eca109(DDP^r) cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别($\mu\text{g/ml}$)	细胞周期百分比(%)		
	G1	S	G2
DDP(1)	39.60 ± 3.72	37.89 ± 2.39	22.51 ± 1.96
冰片(1.560) + DDP(1)	54.49 ± 4.43*	30.06 ± 3.14*	15.45 ± 1.75*

与 DDP 组比较, * $P < 0.05$ 。

2.75)% 上升为 (43.23 ± 4.54)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1)。结果表明冰片能促进 DDP 诱导 Eca109(DDP^r) 细胞凋亡。

3 讨论

细胞周期由细胞间期(G1 期、S 期、G2 期)以及分裂期(M 期)组成, 其中细胞 G1 期向 S 期进展和 G2 期进入 M 期分别存在 1 个细胞周期的检测点, 即 G1/S 和 G2/M 检测点。当肿瘤细胞在有害物质刺激下, 通过激活肿瘤细胞的细胞周期检测点, 阻止肿瘤细胞周期的进展, 使肿瘤细胞停滞于 G1 期或 G2 期, 细胞以凋亡的方式发挥抗肿瘤作用[5]。

食管癌是人类常见的恶性肿瘤, 全世界每年约有 20 万人死于食管癌。我国是全世界食管癌的高发地区之一, 化疗是治疗食管癌的主要手段之一, 然而食管癌细胞对化疗药物的 MDR 往往导致化疗的失败。因此, 如何优化化疗方案, 改善化疗药物的疗效成为目前研究的热点。研究表明, 诱导食管癌细胞凋亡和周期改变可抑制食管癌细胞的增殖[6-10]。本文研究结果显示, 单用冰片浓度 $\leq 1.560 \mu\text{g/ml}$ 时, 对 Eca109(DDP^r) 细胞的生长无明显抑制作用, 而与 DDP(1 $\mu\text{g/ml}$) 联用能显著抑制 Eca109(DDP^r) 细胞的增殖, 以 1.560 $\mu\text{g/ml}$ 冰片效果最好, 其作用的发

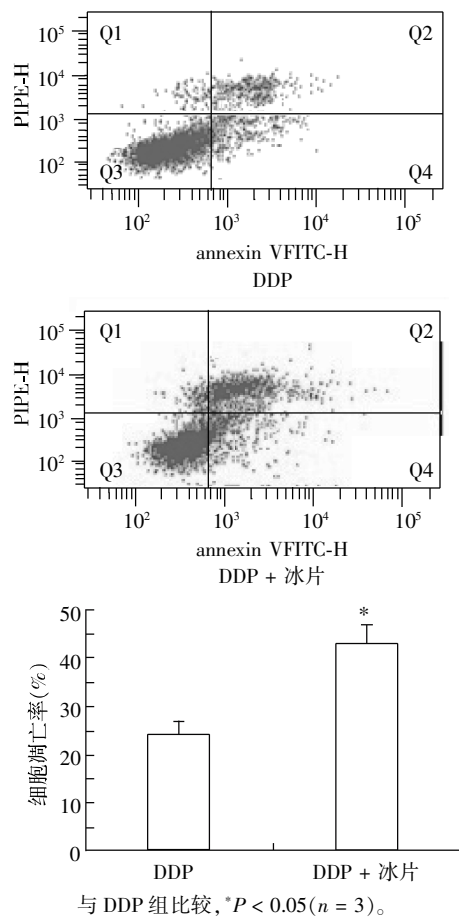


图 1 冰片与 DDP 联用促进 Eca109(DDP^r)细胞凋亡

Figure 1 Borneol combined with DDP promoted apoptosis of Eca109(DDP^r) cells

生可能与 Eca109(DDP^r)细胞周期改变和凋亡增加有关。以 1.560 μg/ml 的冰片做进一步研究表明,冰片联用 DDP 后 G1 期细胞明显增多,S 期细胞、G2 期细胞明显减少,Eca109(DDP^r)细胞发生 G1 期阻滞,细胞的凋亡率亦显著增加。

冰片为龙脑香科植物龙脑香树脂的加工品或菊科植物艾纳香叶提取的结晶,或以樟脑、松节油等为原料,经化学方法合成的精制品。冰片的药理作用广泛,研究较多的是其镇静抗惊厥、抗菌、消炎、止痛等作用^[11],而在肿瘤治疗中的作用研究很少,仅有陈艳明等^[12]研究证实冰片增强了长春新碱对 HeLa 和 MDCK 细胞的毒性,但并未对可能的机制作出进一步研究。本文研究表明冰片可能通过促进 DDP 诱导 Eca109(DDP^r)细胞周期改变、增加细胞凋亡而增强

DDP 对 Eca109(DDP^r)细胞毒性,从而逆转 Eca109(DDP^r)细胞对 DDP 的耐药,具体的信号通路有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Zhao W,Zhou SF,Zhang ZP,et al. Gambogic acid inhibits the growth of osteosarcoma cells in vitro by inducing apoptosis and cell cycle arrest [J]. *Oncol Rep*,2011, 25 (5): 1289-1295
- [2] 张永奎,李建民,王东隶,等. 大蒜素对体外人骨肉瘤细胞周期和细胞凋亡的影响[J]. *肿瘤*,2013,33(3):214-222
- [3] 王开雷,李乐平,靖昌庆. 两种人大肠癌多药耐药株的建立及耐药性比较 [J]. *山东大学学报: 医学版*, 2011,49(4):75-79
- [4] 刘静容,姜旭,肖卫. 硫酸铜对 L929 细胞周期及细胞凋亡的影响[J]. *工业卫生与职业病*,2012,38(2):65-68
- [5] 夏昕晖,何莉,戴福宏,等. 调控组蛋白乙酰化水平抑制膀胱癌细胞周期的研究[J]. *现代肿瘤医学*,2009,17(4):613-617
- [6] Kim SJ,Lee JS,Kim SM. 3,3'-Diindolylmethane suppresses growth of human esophageal squamous cancer cells by G1 cell cycle arrest[J]. *Oncol Rep*,2012,27(5):1669-1673
- [7] He JK,Wu XS,Wang Y,et al. Growth inhibitory effects and molecular mechanisms of crotoxin treatment in esophageal Eca-109 cells and transplanted tumors in nude mice [J]. *Acta Pharmacol Sin*,2013,34 (2):295-300
- [8] Liu D,Yang Y,Liu Q,et al. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells [J]. *Med Oncol*,2011,28(1):105-111
- [9] 朱爱莲,王锋,樊青霞,等. 复方苦参注射液对人食管癌 EC9706 细胞凋亡及生长抑制的影响[J]. *中华医学杂志*,2011,91(39):2797-2800
- [10] Xu Y,Wang G,Chen Q,et al. Intrinsic apoptotic pathway and G2/M cell cycle arrest involved in tubeimoside I-induced EC109 cell death[J]. *Chin J Cancer Res*,2013,25(3):312-321
- [11] 姜建昌,曹雷,姚瑜洁,等. 冰片的临床应用研究概况 [J]. *现代中西医结合杂志*,2013,22(2):221-224
- [12] 陈艳明,王宁生. 冰片对 P-糖蛋白的影响[J]. *中国新药与临床药理*,2003,14(2):96-99

[收稿日期] 2013-07-11