



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.024
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3860.shtml

· 简要论著 ·

芍药苷对 5- 氟尿嘧啶耐药的 CD44 阳性胃癌细胞的抑制作用

李跃军, 卓德斌

(湖南中医药高等专科学校第一附属医院 肿瘤科, 湖南 株洲 412000)

摘要

目的: 探讨芍药苷对 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) 耐药的 CD44 阳性胃癌细胞株 SGC-7901 (CD44⁺SGC-7901/5-FU) 细胞增殖与凋亡的影响。

方法: 采用反复短期暴露并逐步递增药物浓度法建立 5- 氟尿嘧啶耐药胃癌细胞株 SGC7901/5-FU, 鼠抗人 CD44 抗体, 流式细胞术检测分选 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞。将不同浓度的芍药苷作用于体外扩增培养的 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞后, 分别用倒置显微镜观察细胞形态学改变、MTT 法检测细胞的增殖情况、流式细胞仪检测细胞凋亡率。

结果: 各浓度芍药苷作用于 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞后, 细胞形态与对照组细胞比较发生了明显变化; 与对照组比较细胞生长明显受到抑制、细胞凋亡率明显增加, 且呈明显的时间与浓度依赖性 (均 $P < 0.05$)。

结论: 芍药苷能在体外抑制 5-FU 耐药的人胃癌细胞的生长。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(4):521-524]

关键词

胃肿瘤; 抗药性; 肿瘤; 芍药甙; 细胞增殖; 细胞凋亡
中图分类号: R735.2

胃癌是临床上极为常见的肿瘤^[1]。其发病率和病死率都很高, 根据有关资料显示: 胃癌的发病率和病死率居于居各类肿瘤的第 3 位, 5- 氟尿嘧啶 (5-FU) 是临床治疗胃癌常用化疗药物, 但有效率低, 且容易产生耐药性, 如何克服其耐药是目前胃癌治疗的难点^[2]。芍药苷为芍药的主要活性单体成分, 其对肿瘤细胞增殖有明显的抑制作用^[3]。本实验通过体外观察芍药苷对体外扩增培养的 5-FU 耐药的 CD4 阳性 SGC-7901 (CD44⁺SGC-7901/5-FU) 胃癌细胞生长、增殖的影响, 旨在为其在抗肿瘤的基础及临床研究中提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株及主要试剂

SGC-7901 细胞购自中科院上海生物研究所; 5-FU (Sigma, 美国), 芍药苷 (四川省什邡市鸿运生物化工有限公司); 鼠抗人 CD44 抗体 (Biolegend, 美国); MTT (Sigma, 美国); 胰蛋白酶 (Amreseo, 美国); 新生牛血清 (Sigma, 美国)。RPMI-1640 (Gibco, 美国)。Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (北京宝赛公司)。

1.2 实验设备

生物安全柜 (THERMO, 美国); CO₂ 培养箱 (德国); 倒置显微镜 (OLYMPUS, 日本); 酶标仪 (Biorad, 美国); FACSAria 流式细胞仪 (Biolegend, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养 用含 10% 灭活小牛血清和青、链霉素 (100 U/mL) 的 RPMI1640 培养液体外培养胃癌细胞 SGC-7901。培养条件为 37 °C、5% CO₂, 根据细胞生长情况, 每 1~2 天换液。

基金项目: 湖南省科技厅课题资助项目 (2012SK3022);
湖南省卫生厅课题资助项目 (C2912-029)。

收稿日期: 2013-12-24; **修订日期:** 2014-02-20。

作者简介: 李跃军, 湖南中医药高等专科学校第一附属医院住院医师, 主要从事恶性肿瘤综合治疗方面的研究。

通信作者: 卓德斌, Email: 75988487@qq.com

1.3.2 5-FU 耐药的 SGC-7901/5-FU 胃癌细胞模型建立 采用反复大剂量冲击结合逐步递增药物浓度法。取对数生长期的 SGC7901 细胞, 加入 5 mg/L 5-FU, 于 37 °C、5% CO₂、全湿度培养箱内孵育 24 h, 用不含 Ca²⁺、P³⁻ 的磷酸盐缓冲液 D-Hanks 洗 1 次, 将细胞培养于无药 RPMI-1640 完全培养液中, 待细胞恢复生长后 (7~10 d), 反复用 5-FU 冲击处理, 同时逐渐增加药物浓度 (5、10、15、20、25、35、40 mg), 经过 8 次冲击至 5-FU 药物浓度达 40 mg/L, 建立其耐药细胞株 SGC7901/5-FU。待细胞恢复生长后将其维持培养于含 5-FU 10 mg/L 的 RPMI1640 完全培养液中, 每 2~3 天传代 1 次。撤药 2 周后进行细胞实验。

1.3.3 流式细胞仪检测分选 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞^[4] 取对数生长期 SGC-7901/5-FU 细胞, 胰酶消化后用 10%FBS DMEM/F12 终止消化, 2 500 r/min 离心 5 min 后弃上清。PBS 洗涤 2 次后, 重悬于含 2%BSA 的 4 °C 预冷 PBS 中, 调整细胞密度为 1 × 10⁹/L。取 300 μL SGC-7901/5-FU 细胞, 每 100 μL 细胞悬液加入 CD44-FITC 均匀混合, 4 °C 避光孵育 30 min 后, PBS 洗涤 2 次, 2 500 r/min 离心 5 min 后弃上清, 将细胞沉淀悬浮于 500 μL PBS 中。使用 FACS Aria 流式细胞仪进行检测和分选。

1.3.4 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞形态学观察 取对数生长期 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞用培养液将其调节至 1 × 10⁴ 个 /mL 悬液。每孔 2 mL 接种于 24 孔板中。分别取 20、40、80、160、320 mg/mL 的芍药苷溶液 20 μL 加入对应的孔内。37 °C、5% CO₂ 培养 48 h 后, 倒于置显微镜下拍照, 观察其形态学变化。

1.3.5 MTT 法检测芍药苷对于 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞生长抑制作用 用 0.25% 胰蛋白酶消化生长至对数期的 CD44⁺ SGC-7901/5-FU 细胞, 将细胞稀释至以 1 × 10⁴ 个 /mL 接种到 96 孔培养板, 每孔加入 100 μL 混悬液。待细胞贴壁后, 与 1.3.2 类似, 每块培养板上相应孔内分别加入 5 个浓度的含芍药苷的培养液, 每个浓度重复 3 次。培养板上同时设立不加药物的阴性对照孔以及不加细胞的空白孔。采用 MTT 法测量 24、48 h 后, 不同的芍药苷浓度对于 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞生长的影响。具体为: 每孔加入 MTT 溶液 (5 mg/mL) 20 μL, 置 37 °C、5%CO₂ 条件下继续孵育 4 h 终止培养, 吸干净培养液。每孔加入 150 μL DMSO, 振荡 10 min, 使结晶充分溶解。在 490 nm 波长下, 将空白孔调零, 在酶标仪

上测定对应的吸光度值, 并求出 3 个孔的平均值。按下列公式计算细胞抑制率: 细胞增殖抑制率 (%) = (阴性对照组 OD₄₉₀ - 用药组 OD₄₉₀) / 对照组 OD₄₉₀ × 100%。

1.3.6 流式细胞仪检测芍药苷对于细胞凋亡的影响 用 20、40、80、160、320 mg/mL 的芍药苷作用 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞, 培养 48 h 后用胰蛋白酶消化, 收集 1 × 10⁶ 个细胞用 PBS 冲洗 2 次, 400 μL 结合缓冲液重悬, 加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μL。避光染色 15 min 后, 用流式细胞仪检测。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 16.0 统计软件, 所有数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, P < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 芍药苷对于胃癌细胞 CD44⁺SGC-7901/5-FU 的形态影响

将空白对照组的细胞与加入药物以后的实验组细胞置于倒置显微镜下观察细胞形态改变。可见空白对照组细胞数量较多, 细胞贴壁且细胞间结构紧密。而实验组细胞大部分细胞胞体增大、变圆, 胞内有大小不等的空泡样结构, 细胞核边移; 有细胞出现漂浮、不贴壁现象; 细胞数量与对照组比较明显减少, 且随着药物浓度的增加, 以上现象愈加明显。

2.2 芍药苷对 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞的生长抑制作用

不同浓度的芍药苷作用于胃癌 SGC7901 细胞 24、48 h 后, 细胞生长均受到抑制, 并且随着芍药苷浓度的增加, 受到的抑制作用也增加, 趋势检验有统计学意义 (P < 0.05)。在同一浓度下, 随着作用时间的增加, 细胞生长受到的抑制作用也增加 (表 1)。

表 1 不同浓度芍药苷对于 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞的生长抑制率 (%)

浓度 (mg/mL)	24 h	48 h
20	19.33 ± 0.12	28.89 ± 0.17
40	24.06 ± 1.26	35.34 ± 0.28
80	33.26 ± 0.78	46.32 ± 1.92
160	45.23 ± 1.64	63.24 ± 2.13
320	53.24 ± 0.78	76.23 ± 1.24

2.3 芍药苷对于 CD44⁺SGC-7901/5-FU 细胞凋亡的影响

用 20、40、80、160、320 mg/mL 的芍药苷处理细胞 48 h 后的凋亡率均高于阴性对照

组,且随着浓度的增加,细胞凋亡率增加,趋势检验有统计学意义($P<0.05$);凋亡率分别为(14.53 ± 2.24)%、(22.37 ± 4.23)%、(37.74 ± 9.52)%、(55.83 ± 12.95)%、(77.12 ± 11.03)%(表2)。

表2 不同浓度芍药苷对SGC-7901细胞凋亡影响

浓度(mg/mL)	凋亡率(%)
阴性对照	2.02 ± 0.12
20	14.53 ± 2.24
40	22.37 ± 4.23
80	37.74 ± 9.52
160	55.83 ± 12.95
320	77.12 ± 11.03

3 讨论

根据中国疾病监测系统所获得的恶性肿瘤资料,胃癌处于2004—2008年恶性肿瘤死因第3位^[5]。另有学者^[6]报道,胃癌处于山东省疾病经济负担的第3位。由此可见,胃癌对于家庭和社会的危害极大。化疗是目前胃癌治疗的重要手段。但在临床治疗过程中,发现有很多患者对5-FU等化疗药物存在耐药性^[7-8],而寻找新的化疗药物,也成为研究人员的新的课题。

近年来,越来越多的研究结果认为CD44⁺胃癌细胞具有自我更新和分化能力,该亚群细胞是胃癌肿瘤干细胞,并且可能是肿瘤耐药的主要原因^[9-12]。然而,Zheng等^[13]的研究却认为CD44只是胃癌干细胞的其中一种标志物。Rocco等^[14]发现胃癌患者肿瘤标本的CD44阳性细胞并不具备干细胞潜能,在试验动物内不具有成瘤能力。本研究结果发现,CD44⁺SGC-7901/5-FU细胞可进行体外扩增培养,对扩增后的CD44⁺SGC-7901/5-FU耐药机理有待进一步研究。

芍药苷为常用中药芍药的主要有效成分。有学者^[15-16]通过比较3种措施(阴性无药对照、阳性阿霉素对照及芍药苷)下肿瘤细胞的增殖结果证实芍药苷对人肝癌细胞株Bel-7402和HepG2细胞增殖有影响增殖抑制作用随药物浓度增高而加强,呈显著的量效关系。另外还有研究^[17]发现芍药能够抑制大肠癌HT29细胞的增殖。最近也有研究^[16]认为芍药对胃癌细胞的增殖也有抑制作用。

本实验的结果发现,芍药苷可以明显抑制5-FU耐药的CD44⁺SGC-7901/5-FU细胞的增殖,同时具有时间和剂量依赖的方式,表现为随着芍药苷药物浓度和作用时间的增加,CD44⁺SGC-7901/5-FU细胞的存活率降低,这与上文提到的研究结果一

致。另外,流式细胞仪的结果表明芍药苷可以增加CD44⁺SGC-7901/5-FU细胞的凋亡率,也同样呈剂量效益关系。

虽然已经证实芍药苷能够有效地抑制胃癌、肝癌等癌细胞生长,但是毒理学实验证实机体正常细胞对其显示出良好的耐受性。有学者^[18-19]发现,正常胸腺细胞中加入0.1~1 000.0 mg/L的芍药苷并无明显毒性作用;160~640 mg/L浓度的芍药苷对人骨髓单核细胞系也没有发现有毒性作用。由此可见芍药苷有在对癌细胞有效浓度下对正常细胞却低毒乃至无毒的优点,在肿瘤临床治疗中应该具有广泛的应用前景,值得将来进一步研究。

参考文献

- [1] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. GLOBOCAN 2008 v1.2. Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2008. IARC CancerBase No. 10[DB/CD]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010. [Accessed December 1, 2011].
- [2] Macdonald JS. Clinical overview: adjuvant therapy of gastrointestinal cancer[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2004, 54(Suppl 1): S4-S11.
- [3] Hung JY, Yang CJ, Tsai YM, et al. Antiproliferative activity of paeoniflorin is through cell cycle arrest and the Fas/Fas ligand-mediated apoptotic pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2008, 35(2):141-147.
- [4] 刘竞争,王前,郑磊,等.脐带血CD34⁺细胞免疫磁珠分选及其意义[J].医学临床研究,2008,25(3):399-401.
- [5] 王明月,杨光,王刚,等.中国2004—2008年恶性肿瘤城乡死亡率分析[J].中国公共卫生,2013,29(7):1038-1040.
- [6] 郭晓雷,孙建东,马吉祥,等.山东省恶性肿瘤经济负担分析[J].中国公共卫生,2010,26(7):813-816.
- [7] Oh SY, Kwon HC, Seo BG, et al. A phase II study of oxaliplatin with low dose leucovorin and bolus and continuous infusion 5-fluorouracil (modified FOLFOX-4) as first line therapy for patients with advanced gastric cancer[J]. Acta Oncol, 2007, 46(3):336-341.
- [8] Kim YS, Hong J, Sym SJ, et al. Oxaliplatin, 5-fluorouracil and leucovorin (FOLFOX-4) combination chemotherapy as a salvage treatment in advanced gastric cancer[J]. Cancer Res Treat, 2010, 42(1):24-29.
- [9] Sun M, Zhou W, Zhang YY, et al. CD44⁺ gastric cancer cells with stemness properties are chemoradioresistant and highly invasive[J]. Oncol Lett, 2013, 5(6):1793-1798.
- [10] Chen W, Zhang X, Chu C, et al. Identification of CD44⁺ cancer stem cells in human gastric cancer[J]. Hepatogastroenterology, 2013, 60(124):949-954.
- [11] Yu L, Yang L, An W, et al. Anticancer bioactive peptide-3 inhibits human gastric cancer growth by suppressing gastric cancer stem cells[J]. J Cell Biochem, 2014, 115(4):697-711.
- [12] Yang L, Levi E, Zhu S, et al. Cancer stem cells biomarkers in gastric carcinogenesis[J]. J Gastrointest Cancer, 2013, 44(4):428-435.



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.025
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3861.shtml

· 临床报道 ·

改良中线入路并左手控制技术在右半结肠癌完整结肠系膜切除中的应用

王有财, 韩广森, 王松涛, 王刚成, 任莹坤, 马鹏飞

(郑州大学附属肿瘤医院 / 河南省肿瘤医院 普通外科, 河南 郑州 450003)

摘要

目的: 介绍改良中线入路并左手控制技术在右半结肠癌完整结肠系膜切除中的应用体会。

方法: 回顾性分析河南省肿瘤医院普外科同一治疗组在2009年10月至2012年10月86例采用改良中线入路并左手控制技术行右半结肠癌完整结肠系膜手术患者临床资料, 对手术时间、术中出血量、淋巴结清扫个数、术后排气时间、住院时间等指标进行统计。

结果: 本组无手术死亡病例; 手术时间41.6~75.3 (46.7±6.3) min; 术中出血量30~100 (36.8±9.6) mL; 淋巴结清扫数12~18 (14.4±2.4) 枚/例; 术后排气时间2~6 (3.0±1.2) d; 住院时间12~23 (12.5±2.4) d; 手术并发症6例(7%), 胃瘫1例, 乳糜漏3例, 切口感染2例, 分别给予促胃肠减压、鼻肠管营养支持治疗、留置腹腔引流管及切口换药后等保守治疗后痊愈出院。

结论: 在CME理念的基础上采用改良中线入路并运用左手控制技术, 有效缩短手术时间, 提高手术的安全性, 保证手术的根治性; 同时降低术中副损伤、术后谵妄及肺部感染的发生率; 该术式可操作性强, 易于推广。

[中国普通外科杂志, 2014, 23(4):524-526]

关键词

结肠肿瘤 / 外科学; 右半结肠癌; 左手控制
中图分类号: R735.3

过去的研究资料认为, 由于结肠的解剖简单,

手术操作相对容易, 结肠癌的预后明显优于直肠癌。1988年Heald等^[1]提出了全直肠系膜切除术(total mesorectal excision, TME)作为直肠癌的规范化手术, 明显改善了直肠癌患者的预后, 5年生存率接近结肠癌。近年来, 如何使结肠癌手术规范化, 以改善结肠癌患者的预后, 提高手术的质量

收稿日期: 2013-10-10; 修订日期: 2014-03-11。

作者简介: 王有财, 郑州大学附属肿瘤医院 / 河南省肿瘤医院硕士研究生, 主要从事腹部肿瘤方面的研究。

通信作者: 韩广森, Email: wangyoucaiad@126.com

- [13] Zheng Q, Gong F, Xu Y, et al. Floating cells with stem cell properties in gastric cell line SSGC-7901[J]. Tumori, 2011, 97(3):393-399.
- [14] Rocco A, Liguori E, Pirozzi G, et al. CD133 and CD44 cell surface markers do not identify cancer stem cells in primary human gastric tumors[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(6):2686-2693.
- [15] 晏雪生, 李瀚旻, 彭亚琴, 等. 芍药苷对人肝癌细胞 HepG-2 凋亡及其调控基因的影响[J]. 中华中医药学刊, 2007, 25(7):1346-1347.
- [16] Hu S, Sun W, Wei W, et al. Involvement of the prostaglandin E receptor EP2 in paeoniflorin-induced human hepatoma cell apoptosis[J]. Anticancer Drugs, 2013, 24(2):140-149.
- [17] Wang H, Zhou H, Wang CX, et al. Paeoniflorin inhibits growth of human colorectal carcinoma HT 29 cells in vitro and in vivo[J]. Food Chem Toxicol, 2012, 50(5):1560-1567.
- [18] Li CR, Zhou Z, Zhu D, et al. Protective effect of paeoniflorin on irradiation-induced cell damage involved in modulation of reactive

- oxygen species and the mitogen-activated protein kinases[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39(2):426-438.
- [19] Salunga TL, Tabuchi Y, Takasaki I, et al. Identification of genes responsive to paeoniflorin, a heat shock protein-inducing compound, in human leukemia U937 cells[J]. Int J Hyperthermia, 2007, 23(6):529-537.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 李跃军, 卓德斌. 芍药苷对5-氟尿嘧啶耐药的CD44阳性胃癌细胞的抑制作用[J]. 中国普通外科杂志, 2014, 23(4):521-524. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.024
Cite this article as: LI YJ, ZHUO DB. Inhibitory effect of paeoniflorin on CD44-positive and 5-fluorouracil-resistant gastric cancer cells[J]. Chin J Gen Surg, 2014, 23(4):521-524. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.04.024