



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.024  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.024  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(10):1471-1474.

· 简要论著 ·

## 顺铂与三甲氧基二苯乙烯对胃癌 BGC823 细胞作用的研究

李彩莉<sup>1</sup>, 李小凡<sup>2</sup>, 王启民<sup>3</sup>

(山东省肥城矿业中心医院 1. 肿瘤科 3. 病理科, 山东 肥城 271608; 2. 北京大学肿瘤医院 放疗科, 北京 100142)

### 摘要

**目的:** 研究三甲氧基二苯乙烯与顺铂对人胃癌 BGC823 细胞的抑制作用。

**方法:** 设空白对照组、顺铂治疗组、三甲氧基二苯乙烯治疗组、顺铂及三甲氧基二苯乙烯联合治疗组。用 MTT 法测定顺铂和三甲氧基二苯乙烯对细胞的抑制作用; 用电镜、流式细胞仪观察其细胞变化。

**结果:** 顺铂与三甲氧基二苯乙烯合用, 细胞存活率较单用时明显降低。顺铂 100  $\mu\text{g/L}$  细胞存活率为 (67.23  $\pm$  8.91) %, 三甲氧基二苯乙烯 100  $\mu\text{g/L}$  细胞存活率为 (51.42  $\pm$  9.56) %; 细胞存活率在合并用药时细胞存活率明显下降, 顺铂 10  $\mu\text{g/L}$  和三甲氧基二苯乙烯 10  $\mu\text{g/L}$  的细胞存活率为 (43.62  $\pm$  8.34) %, 浓度 150  $\mu\text{g/L}$  时细胞存活率最低为 (17.33  $\pm$  7.93) %。联合用药后, 顺铂使用量的  $\text{IC}_{50}$  是 (110.0  $\pm$  9.8)  $\mu\text{g/L}$ , 三甲氧基二苯乙烯使用量的  $\text{IC}_{50}$  是 (18.0  $\pm$  10.0)  $\mu\text{g/L}$ , 增效倍数分别为 2.51、4.03 合并指数  $\text{CI}_{50}$  是 0.58,  $\text{CI}_{50} < 0.95$ 。细胞生长多停滞在 S 期 (58.0  $\pm$  4.0) %。

**结论:** 顺铂对胃癌 BGC823 细胞有抑制作用, 少量的顺铂与三甲氧基二苯乙烯合用后可达到大剂量顺铂单药化疗的效果, 产生了协同作用。

### 关键词

胃肿瘤 / 病理学; 顺铂; 三甲氧基二苯乙烯; 人胃癌 BGC823 细胞

中图分类号: R732.2

胃癌是我国常见的恶性肿瘤之一, 临床常见的化疗药物有顺铂、5-氟脲嘧啶、紫杉醇、多西紫杉醇等, 由于其单独使用可引起的骨髓抑制、胃肠道反应、免疫抑制等不良反应, 临床常采用联合配伍用药。而白藜芦醇为天然的肿瘤化学预防剂, 能够抗突变、抗氧化、抑制自由基并诱导 II 期药代酶<sup>[1-3]</sup>, 在肿瘤的起始及发展阶段均发挥了抑制作用<sup>[4-6]</sup>。然而研究<sup>[7-9]</sup>显示: 白藜芦醇并不稳定, 极其容易氧化, 在血液中的药物半衰期短, 生物利用度低, 三甲氧基二苯乙烯是白藜芦醇的衍生物, 与白藜芦醇的药理活性相似, 其活性、选择性、生物利用度及稳定性均优于白藜芦醇。人胃癌 BGC823 细胞对多种化疗药物较为敏感, 为此, 本研究联合临床常用化疗药物顺铂, 观察两者对胃癌细胞的作用, 并进一步研究两者联合使用对胃癌细胞的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、仪器

人胃腺癌细胞[BGC-823, 北京大学肿瘤医院; 三甲氧基二苯乙烯(北京亚盛集团博士后科研工作站)]; 顺铂(DDP, 山东齐鲁制药厂, 国药准字 H37021362), 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 上海华舜生物工程有限公司); RPMI 1640(Gibco 公司)(含链霉素 0.1 mg/mL, 10% 热灭活胎牛血清, 青霉素 100 U/mL, 0.2%  $\text{NaHCO}_3$ )。仪器: 光学显微镜(邦亿精密量仪有限公司, 型号 4XB)、透射电镜(日立高新技术公司, 型号 HT7700)、流式细胞仪(FACS Calibur BD, 美国)、 $\text{CO}_2$  培养箱(上海喆图科学仪器有限公司, 型号 CP-TW-II)、酶标仪(Bio-Rad)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组** 在北京大学肿瘤医院完成实验, 研究时间为 2015 年 1 月—2 月。设空白对照组、顺铂治疗组、三甲氧基二苯乙烯治疗组、顺铂及三甲氧基二苯乙烯联合治疗组。

**1.2.2 人胃癌 BGC823 细胞培养及收集** 将

收稿日期: 2015-07-18; 修订日期: 2015-09-12。

作者简介: 李彩莉, 山东省肥城矿业中心医院主治医师, 主要从事肿瘤化疗方面的研究。

通信作者: 李小凡, Email: lxflp@163.com

BGC823 细胞按  $1 \times 10^5$  个/mL 的密度接种在经过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜过滤的 RPMI-1640 培养液中 (含 10% 热灭活胎牛血清, 0.2%  $\text{NaHCO}_3$ , 青霉素 100 U/mL 和链霉素 0.1 mg/mL), 在 37  $^\circ\text{C}$ 、5% 的  $\text{CO}_2$  培养箱饱和湿度下培养, 用 PBS 配制的 0.15% 的胰蛋白酶 (含有 0.02% 的 EDTA) 消化细胞传代。每 2 天传代 1 次, 所有实验均在细胞对数生长期进行。

**1.2.3 测定顺铂与三甲氧基二苯乙烯对细胞的作用** 采用 MTT 法进行测定, 在 96 孔培养板内加入单细胞悬液 (每毫升  $5 \times 10^4$  个), 各孔种加培养液 200  $\mu\text{L}$ , 在孵箱 (37  $^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ ) 中培养 1 d, 并加入倍比稀释成五种浓度的不同抗癌药物 (三甲氧基二苯乙烯、顺铂) 各 20  $\mu\text{L}$ , 重复 3 个复孔, 对照组加进等体积 PBS, 空白对照组加等量的培养液, 设调零孔, 孵箱 (5%  $\text{CO}_2$ 、37  $^\circ\text{C}$ ) 中培养 68 h 后吸去上清液; 其他三组分别加入不同浓度 (10、100、150  $\mu\text{g/L}$ ) 的单药顺铂、不同浓度

(10、100、150  $\mu\text{g/L}$ ) 的单药三甲氧基二苯乙烯、混合加入顺铂与三甲氧基二苯乙烯。每天取 1 块培养板, 弃去培养液, 各孔中加入无血清的培养液 (180  $\mu\text{L}$ ) 及其 MTT 20  $\mu\text{L}$ , 再培养 4 h 后吸去上清液。加入二甲基亚砜 150  $\mu\text{L}$ , 振荡 5 min。利用自动酶标仪测量 570 nm 各孔吸光光度值, 收集  $1 \times 10^6$  个/mL 细胞, PBS 洗涤 2 次, 冷乙醇 (70%) 固定过夜, PBS 洗涤 2 次, PI 染液冰浴 30 min, 通过流式细胞仪分析细胞周期分布。通过显微镜观察细胞存活率。

**1.2.4 判定方法** 低度敏感: 细胞存活率 >50%; 中度敏感: 细胞存活率 30%~50%; 高度敏感: 细胞存活率 <30%。通过合并指数 ( $\text{CI}_{50}$ ) 的数值判断两种药物对细胞作用时的关系, 若 <0.95 说明两种药物呈协同作用, >1.05 说明呈拮抗作用,  $0.96 < \text{CI}_{50} < 1.04$  说明呈相加作用。细胞存活率、 $\text{CI}_{50}$  公式如下。

$$\text{细胞存活率 \%} = 1 - \frac{\text{空白对照孔吸收度值} - \text{药物处理后的吸收度值}}{\text{空白对照孔吸收度值}} \times 100\%$$

$\text{CI}_{50}$  = 联合用药  $\text{IC}_{50}$  时 A 用药量 / A 单用时  $\text{IC}_{50}$  用量 + 联合用药  $\text{IC}_{50}$  时 B 用药量 / B 单用时  $\text{IC}_{50}$  用量。半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 见公式<sup>[10]</sup>。

$$\text{半数抑制浓度 \%} = 1 - \frac{\text{A 用药量}}{\text{A 空白对照}} \times 100\%$$

### 1.3 统计学处理

用 SPSS 16.0 统计学软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 统计描述, 采用  $F$  或  $t$  检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 四组 MTT 法检测的结果

三甲氧基二苯乙烯与顺铂合并用药的增效浓度分别是 100、150  $\mu\text{g/L}$ , 镜下细胞形态学变化, 不同浓度的三甲氧基二苯乙烯、顺铂与人胃癌 BGC823 细胞作用后, 细胞的存活率与药物浓度正相关 ( $r = 0.80 \sim 0.99$ ), 浓度越高, 细胞存活率越低。细胞存活率在合并用药时细胞存活

率明显下降, 浓度 150  $\mu\text{g/L}$  时细胞存活率最低为 17.33% (图 1) (表 1)。单独使用顺铂的  $\text{IC}_{50}$  是 (295.0  $\pm$  10.0)  $\mu\text{g/L}$ , 单独使用三甲氧基二苯乙烯的  $\text{IC}_{50}$  是 (80.0  $\pm$  10.0)  $\mu\text{g/L}$ , 联合用药后, 顺铂使用量的  $\text{IC}_{50}$  是 (110.0  $\pm$  9.8)  $\mu\text{g/L}$ , 三甲氧基二苯乙烯使用量的  $\text{IC}_{50}$  是 (18.0  $\pm$  10.0)  $\mu\text{g/L}$ , 增效倍数分别为 2.51、4.03 合并指数  $\text{CI}_{50}$  是 0.58,  $\text{CI}_{50} < 0.95$ 。

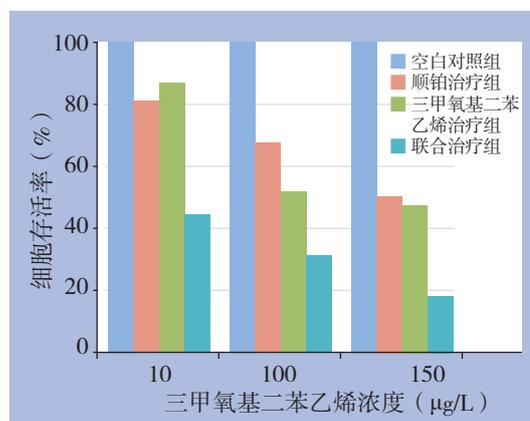


图 1 各组细胞存活率

表1 不同药物浓度细胞存活率(%,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	10 $\mu\text{g/L}$	100 $\mu\text{g/L}$	150 $\mu\text{g/L}$	F	P	r
顺铂治疗组	80.54 $\pm$ 7.33	67.23 $\pm$ 8.91	50.31 $\pm$ 8.15	11.32	<0.05	0.80
三甲氧基二苯乙烯治疗组	86.20 $\pm$ 9.56	51.42 $\pm$ 9.56	46.11 $\pm$ 6.84	10.94	<0.05	0.88
联合治疗组	43.62 $\pm$ 8.34	30.10 $\pm$ 6.72	17.33 $\pm$ 7.93	8.46	<0.05	0.99
t	5.18 <sup>1)</sup> , 5.76 <sup>2)</sup>	5.76 <sup>1)</sup> , 4.93 <sup>2)</sup>	5.02 <sup>1)</sup> , 4.76 <sup>2)</sup>			
P	<0.05	<0.05	<0.05			

注: 1) 顺铂治疗组与联合治疗组比较,  $P < 0.05$ ; 2) 三甲氧基二苯乙烯治疗组与联合治疗组比较,  $P < 0.05$

## 2.2 细胞周期分布情况

FCM显示BGC823细胞周期发现, 空白对照组细胞S期所占分数为(14.0  $\pm$  1.0)%, 单用顺铂和三甲氧基二苯乙烯, S期所占分数分别为(41.0  $\pm$  3.0)%、(40.0  $\pm$  3.0)%, 合用顺铂和三甲氧基二苯乙烯, S期所占比例为(58.0  $\pm$  4.0)%,  $G_2/M$ 期为(15.4  $\pm$  5.0)%,  $G_0/G_1$ 期为(26.6  $\pm$  4.5)%。单用顺铂和三甲氧基二苯乙烯细胞S期所占分数比较, 差异无统计学意义( $t=0.40$ ,  $P>0.05$ ), 与合用顺铂和三甲氧基二苯乙烯比较, 差异有统计学意义( $t=5.89$ ,  $6.23$ ,  $P<0.05$ )。

## 2.3 细胞形态学

光镜下: BGC823细胞呈多角形单层排列, 细胞呈圆形或椭圆形, 大小不一, 核大, 边界清楚; 加入药物后, 细胞边界显示不清, 核破裂, 核固缩(图2)。

透射电镜下: BGC823细胞正常的状态, 核仁多个, 边界清晰, 细胞质丰富, 表面微绒毛丰富。加入药物后, 可见空泡变性, 核固缩, 糖原及线粒体减少, 边界不清等改变。

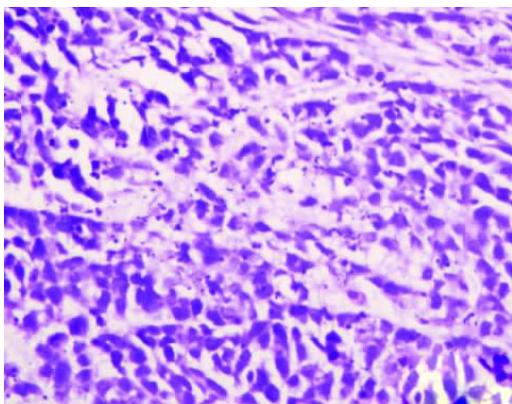


图2 BGC823细胞光镜下切片成像(HE  $\times$  400)

## 3 讨论

胃癌是消化系统常见多发肿瘤, 铂类药物为胃癌化疗的常用药物, 怎样能使铂类药物发挥最大疗效, 又能减少药物剂量, 减少副反应及耐药的发生, 是当前需要进一步解决的问题。

顺铂为无机铂的金属络合物。类似于双功能烷化剂, 可与DNA形成链内和链间交叉联结, 破坏DNA的功能, 阻止DNA复制, 为细胞周期非特异性药物。近年来被广泛应用各大肿瘤的化疗, 是临床常用的抗肿瘤药物<sup>[11-12]</sup>。三甲氧基二苯乙烯是白藜芦醇的衍生物, 白藜芦醇是天然芪类化合物的一个代表, 其化学名称为3, 4, 5-三羟基-1, 2-二苯乙烯。最早是在1940年由日本人Tokaoaka首次从毛叶藜芦的根部分离得到白藜芦醇。该类物质多存在于植物的木质部, 存在白藜芦醇的植物多是常见的药用植物, 如决明、藜芦、虎杖等; 有的是食物, 如葡萄、花生、桑葚等<sup>[1]</sup>。研究<sup>[4-5, 13]</sup>表明白藜芦醇对人体具有调节脂质代谢、抑制血小板聚集、保护心血管、抗炎、抗肿瘤等多种药理作用。三甲氧基二苯乙烯与白藜芦醇的药理活性相似<sup>[14-15]</sup>, 其不但可抑制内皮细胞生长、增殖以及形态生成等, 发挥较强的抗血管生成作用, 还在血管靶向性方面发挥较大优势, 显著促使微管分解和微管蛋白解聚, 且有抗过敏和雌激素受体调节剂作用<sup>[7-9]</sup>。研究<sup>[7, 16-18]</sup>显示: 白藜芦醇分子中包括三个酚羟基, 白藜芦醇并不稳定, 极其容易氧化, 在血液中的药物半衰期短, 生物利用度低, 而三甲氧基二苯乙烯弥补了白藜芦醇的缺陷, 其活性、选择性、生物利用度及稳定性均优于白藜芦醇。调查显示: 三甲氧基二苯乙烯在抗血管生成作用方面是白藜芦醇的30~100倍<sup>[19]</sup>。

本项实验以人胃癌BGC823细胞株为研究对象, 研究观察了单用顺铂、单用三甲氧基二苯乙烯和此两种药物联合使用对体外培植的胃癌

BGC823细胞株的作用。用MTT法检测细胞的存活情况。发现药物浓度与细胞成活率正相关，且联合用药细胞成活率更低。合并指数 $CI_{50}$ 是0.58， $CI_{50}<0.95$ ，说明联合用药对人胃癌BGC823细胞有协同作用。另有试验<sup>[20]</sup>表明顺铂在抑制肿瘤细胞的同时，对人体的正常细胞并无抑制作用，所依应用相对安全。

本研究应用FCM检测发现单用顺铂和单用三甲氧基二苯乙烯S期所占分数分别为 $(41.0 \pm 3.0)\%$ 、 $(40.0 \pm 3.0)\%$ ，说明两种药物单独使用对细胞增殖周期的影响不明显，合用顺铂和三甲氧基二苯乙烯后S期所占分数为 $(58.0 \pm 4.0)\%$ ，说明合用顺铂和三甲氧基二苯乙烯对细胞增殖周期的影响较为显著，细胞被阻滞在S期，对细胞的有丝分裂具有抑制作用，减少了肿瘤细胞数目，最终抑制了细胞生长。顺铂的作用是将细胞阻滞于 $G_0/G_1$ 期，抑制细胞进入有丝分裂周期。三甲氧基二苯乙烯主要将细胞阻滞于S期，使开始增殖的细胞无法进行分裂，故说明三甲氧基二苯乙烯也可以抑制细胞有丝分裂，两者合用可以在细胞周期的两个阶段发挥细胞抑制作用，解释了两者的协同作用的原因。

以上结果可以总结出顺铂对胃癌BGC823细胞有抑制作用，少量的顺铂与三甲氧基二苯乙烯合用后可达到大剂量顺铂单药化疗的效果，减少了顺铂的用量，降低了副作用。对于临床上化疗方案的制定提供了理论上的依据。

## 参考文献

- [1] 李晓芳, 柴雅玫, 文小岗, 等. 白藜芦醇对BGC-823细胞人程序化死亡分子5表达及凋亡的影响[J]. 郑州大学学报:医学版, 2010, 45(6):943-946.
- [2] 高倩, 彭琼, 甘惠中, 等. 白藜芦醇对BGC-823胃癌细胞株增殖抑制作用的体外研究[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2014, 23(10):1131-1133.
- [3] 刘俊, 徐云虹. 虎杖提取物白藜芦醇对人胃癌7901细胞增殖和凋亡的影响[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7):1627-1629.
- [4] 李延华, 王伟君, 张兰威, 等. 白藜芦醇的研究现状及应用前景[J]. 中国酿造, 2008, 27(7):10-12.
- [5] 夏丽萍, 谢金洲. 白藜芦醇的药理作用进展[J]. 中国误诊学杂志, 2006, 6(2):220-222.
- [6] 成薇, 沈长波, 王莉, 等. 白藜芦醇预处理对氧糖剥夺/再复氧损伤大鼠皮质神经干细胞增殖的影响[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(1):113-117.
- [7] 陈国良, 耿春梅, 刘湘永. 白藜芦醇衍生物及类似物的研究进展[J]. 药学进展, 2006, 30(4):145-150.
- [8] Chabert P, Fougerousse A, Brouillard R. Anti-mitotic properties of resveratrol analog (Z)-3,5,4'-trimethoxystilbene[J]. Biofactors, 2006, 27(1/4):37-46.
- [9] Simoni D, Roberti M, Invidiata FP, et al. Stilbene-based anticancer agents: resveratrol analogues active toward HL60 leukemic cells with a non-specific phase mechanism[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2006, 16(12):3245-3248.
- [10] Tsaic M, Hsiao SH, Freyf CM, et al. Combination cytotoxic effects of cis-diamminedichloroplatinum(II) and 5-fluorouracil with and without leucovorin against human non-small cell lung cancer cell lines[J]. Cancer Res, 1993, 53(5):1079-1084.
- [11] 邱国钦, 许丽贞, 林智才, 等. 替吉奥联合顺铂治疗进展期胃癌的近期疗效观察[J]. 临床肿瘤学杂志, 2011, 16(8):728-731.
- [12] 曹锋, 王亚军, 李非. 胃癌辅助放疗研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(1):202-205.
- [13] 梁戎, 苏布道. 白藜芦醇对自发性高血压大鼠血管平滑肌细胞增殖、迁移的影响及机制研究[J]. 医学临床研究, 2015, 32(2):244-248.
- [14] 王风光. 白藜芦醇衍生物及类似物的药理活性与分析方法研究[J]. 当代医药论丛:下半月, 2014, 12(2):280-281.
- [15] 刘伟, 于沛, 王玉强. 白藜芦醇衍生物的药理活性研究进展[J]. 医药导报, 2010, 29(7):901-906.
- [16] 孙水平, 孙中杰, 吴胜利, 等. 白藜芦醇对肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(2):149-151.
- [17] 管秋香. 白藜芦醇酰胺类衍生物的合成及抗肿瘤活性评价[D]. 合肥:合肥工业大学, 2014:14-37.
- [18] 赵坤, 于秀文, 费洪新, 等. 三甲氧基二苯乙烯对胃癌细胞凋亡及抑制的作用[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2015, 36(23):3433-3435.
- [19] Belleri M, Ribatti D, Nicoli S, et al. Antiangiogenic and vascular-targeting activity of the microtubule-destabilizing trans-resveratrol derivative 3,5,4'-trimethoxystilbene[J]. Mol Pharmacol, 2005, 67(5):1451-1459.
- [20] Miller LD, Liu ET. Expression genomics in breast cancer research: microarrays at the crossroads of biology and medicine[J]. Breast Cancer Res, 2007, 9(2):206.

( 本文编辑 姜晖 )

本文引用格式: 李彩莉, 李小凡, 王启民, 等. 顺铂与三甲氧基二苯乙烯对胃癌BGC823细胞作用的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2015, 24(10):1471-1474. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.024  
Cite this article as: LI CL, LI XF, WANG QM, et al. The inhibition of the human gastric cancer cell line BGC823 cells by cisplatin and 3, 5, 4-trimethoxystilbene[J]. Chin J Gen Surg, 2015, 24(10):1471-1474. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.10.024