

文章编号:1005-6947(2006)09-0654-05

· 胃癌专题研究 ·

联合应用华蟾素与氟尿嘧啶对胃癌细胞增殖抑制及诱导凋亡的作用

韩鸿彬^{1,2}, 陈嘉勇¹, 袁勇¹, 梁道明¹, 张毅¹

(1. 昆明医学院第二附属医院 急诊外科, 云南 昆明 650031; 2. 河南省洛阳市中心医院 普通外科, 河南 洛阳 471009)

摘要:目的 探讨单一华蟾素体外对人胃癌细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用以及与5-氟尿嘧啶(5-FU)联合应用对胃癌细胞的影响。方法 实验分为对照组;华蟾素(cino)组;5-FU组和cino+5-FU组。利用体外细胞培养、倒置显微镜和荧光显微镜、MTT比色技术及流式细胞仪等方法,观察细胞形态,检测cino和5-FU对人胃癌细胞株BGC823细胞抑制率、细胞凋亡和细胞周期。结果 cino对人胃癌细胞有显著的增殖抑制作用,呈时间剂量依赖性。cino+5-FU对BGC-823细胞的增殖抑制率显著高于单独使用组($P < 0.05$)。定量分析显示cino+5-FU组的凋亡细胞发生率显著高于cino组和5-FU组($P < 0.05$)。cino+5-FU可使G₀/G₁期细胞比例降低,S期细胞比例升高,且大多数被阻滞于S期。结论 cino对胃癌BGC-823细胞具有增殖抑制和诱导凋亡作用,与5-FU联用可显著提高后者的化疗效果,且呈时间剂量依赖关系。

关键词:华蟾素/治疗应用;氟尿嘧啶/治疗应用;胃肿瘤/药物疗法;肿瘤细胞,培养的/药物疗法;细胞凋亡

中图分类号:R735.2;R979.12

文献标识码:A

The effect of cinobufacin combined with 5-FU on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of human gastric carcinoma cells

HAN Hong-bin^{1,2}, CHEN Jia-yong¹, YUAN Yong¹, LIANG Dao-ming¹, ZHANG Yi¹

(1. Department of Emergency Surgery, the Second Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Yunnan 650031, China; 2. Department of General Surgery, Central Hospital of Luoyang, Luoyang, Henan, 471009 China)

Abstract: Objective To study the effects of cinobufacin (cino) combined with fluorouracil (5-FU) on inhibiting proliferation and inducing apoptosis of human gastric carcinoma cells in vitro. **Methods** The experiment was divided into control group, cinobufacin group, 5-FU group and cino + 5-FU group. Cell morphological variation, cell inhibitory rate, cell cycle and ratio of apoptotic cell of human gastric carcinoma cell line BGC-823 were studied by cell culture, inverse microscopy, fluoroscopy, MTT assay and flow cytometry on different concentrations of cino and 5-FU. **Results** Cino could markedly inhibit proliferation of human gastric carcinoma cells in time- and dose-dependent response. The cino + 5-FU group inhibited the rate of proliferation of BGC-823 cells was significantly more than either cino or 5-FU alone group ($P < 0.05$). The quantitative analysis showed the same result. Cino + 5-FU can decrease the proportion of G₀/G₁ phase and increase of S phase in cell cycle. Most of the cells were arrested in the S phase. **Conclusions** Cino has the effect of inhibition on the proliferation and induction of apoptosis in human BGC-823 gastric carcinoma cell. Cino combined with 5-FU could enhance the antineoplastic effect of 5-FU, and showed time- and dose-dependent response.

Key words: Cinobufacin/ther use; Fluorouracil/ther use; Stomach Neoplasms/drug ther; Tumor Cells, Cultured/drug ther; Apoptosis

CLC number: R735.2; R979.12

Document code: A

收稿日期:2005-09-17; 修订日期:2006-01-10。

作者简介:韩鸿彬,男,河南洛阳人,昆明医学院第二附属医院(现在河南省洛阳市中心医院)主治医师,主要从事胃肠道肿瘤基础与临床方面的研究。

通讯作者:陈嘉勇 E-mail:cjv125@126.com。

华蟾素(cinobufacin, cino)是从传统中药蟾皮中提取的水溶性成分而制成的注射液,其主要成分是吲哚类生物碱、还原糖、氨基酸以及蟾蜍色胺等^[1],有抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡的作用。本研究采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)还原法^[2]、荧光显微镜和流式细胞仪等方法探讨cino和5-氟尿嘧啶(5-FU)联合应用对体外培养的人胃腺癌BGC-823细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响,旨在为寻找一种能提高临床晚期胃癌治疗效果,并毒性小的化疗药物提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌BGC-823细胞(人低分化胃腺癌细胞株),购自中科院上海细胞生物化学研究所;cino为安徽金蟾生化股份有限公司产品;5-FU为上海旭东海普药业有限公司产品;MTT为Sigma公司产品;小牛血清为杭州四季青生物工程材料研究所生产;吲哚橙和碘化丙啶RNA酶A购自华美生物工程公司;CO₂培养箱购自德国 Heraeus 公司;荧光显微镜为:Olympus公司,BH2型;倒置相差显微镜自日本Olympus公司,BH-2型;流式细胞仪自美国COULTER公司,EPICXU型。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌BGC-823细胞用含10%小牛血清的RPMI1640培养液培养,置于37℃,5%CO₂培养箱中。取对数生长期的细胞用0.25%的胰蛋白酶消化,行细胞计数。调整细胞悬液浓度为1×10⁵个/mL备用。

1.2.2 药物干预分组 对照组用RPMI1640液,5-FU组单用5-FU,cino组单用cino,cino+5-FU组为联合用药组;后两组又按药物的不同浓度分为3个亚组(表1)。

表1 实验分组及药物浓度

组别	浓度
对照	RPMI1640液
5-FU	25μg/mL
cino1	0.1μg/mL
cino2	1μg/mL
cino3	10μg/mL
cino1+5-FU	0.1μg/mL+25μg/mL
cino2+5-FU	1μg/mL+25μg/mL
cino3+5-FU	10μg/mL+25μg/mL

1.2.3 检测项目及方法

1.2.3.1 改良MTT显色法检测癌细胞活性 将备用的细胞悬液接种于96孔板,90μL/孔,每组设4个复孔。将细胞置于5%CO₂,37℃培养箱中孵育。24h后加入5-FU和不同稀释浓度的cino,10μL/孔,同时设溶剂RPMI1640培养液作为对照组。将细胞置于培养箱中分别培养24h,48h,72h,96h。实验终止前每孔加入5mg/mL的MTT10μL,继续孵育4h;加入三联液(10%SDS,5%异丁醇及0.012mol/LHCl;w/v/v)100μL,孵育过夜(>12h);用EL340酶联免疫仪在570nm,630nm双波长下测定每孔的OD值。求平均值,计算细胞增殖抑制率。

细胞增殖抑制率(%)=[1-(实验组OD值-空白组OD值)/(对照组OD值-空白组OD值)]×100%。

1.2.3.2 荧光染色凋亡细胞核形态观察 取对数生长期的BGC-823细胞,按每孔1×10⁵个细胞/mL接种于6孔板中,置于37℃,5%CO₂培养箱中培养;24h后换液,加入5-FU和不同浓度的cino,于24h后取上述各细胞培养液;0.25%胰蛋白酶消化收集细胞,离心(1000r/min,10min);弃上清液后分别加入100μg/mL的吲哚橙染液100μL,避光放置15min,用冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗2遍;加入适量的PBS重悬细胞,滴片,置荧光显微镜下观察。

1.2.3.3 流式细胞仪检测细胞凋亡和细胞周期 分别取24h和48h的各组细胞,用冷PBS洗2次后,加入70%的冷乙醇,4℃固定过夜。离心(1000r/min,10min)弃上清,加入Triton X-100及200μg/mL的RNaseA各200μL,置37℃15min,再加入100μg/mL的PI染料1mL,室温避光静置15min后,在流式细胞仪上对细胞凋亡和细胞周期进行荧光检测及分析(激发波长488nm,发射波长670nm)。

1.3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS11.0统计软件和PEMS3.1软件进行方差分析及 q 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 cino 和 5-FU 对 BGC-823 细胞形态及增殖的影响

2.1.1 对细胞形态的影响 药物与 BGC-823 细胞作用 24h 后,对照组细胞贴壁生长,细胞呈多角形、梭形,细胞体积大,生长紧密。cino 组,5-FU 组和 cino + 5-FU 组处理的 BGC-823 细胞形态变化明显,细胞变圆,胞内颗粒增多,细胞透明度下降;大部分细胞体积变小,分散存在,细胞边界清楚;可见部分圆形漂浮的细胞,其胞质内有许多颗粒。荧光显微镜下:对照组细胞核碎裂,胞浆橙红色变浅,有典型凋亡小体形成(图1);而在 cino 高浓度组合联合组随时间延长上述变化明显,漂浮细胞和凋亡小体增多。

2.1.2 对细胞增殖的影响 药物分别与 BGC-823 细胞作用 24,48,72,96h 结果表明:cino 组同一时点不同浓度和同一浓度不同时间增殖抑制率

不同;随着时间的延长,增殖抑制率逐渐升高(表2)。4个不同时间之间,cino1,cino2和cino3之间增殖抑制率差别具有显著性($P < 0.05$),且随浓度的升高而增高;浓度为 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的 cino 组的细胞抑制率显著高于 5-FU 组($P < 0.05$)。说明高浓度的 cino 具有与 5-FU 相当的增殖抑制作用。联合用药组的增殖抑制作用显著高于各 cino 或 5-FU 组,差别有统计学意义($P < 0.01$);随着时间的延长和 cino 浓度的增加联合组对 BGC-823 细胞的增殖抑制率逐渐升高。

图1 荧光显微镜照片所观察的细胞($\times 400$ 倍)

表2 各组药物对 BGC-823 细胞的增殖抑制率比较($\bar{x} \pm s$)

药物	浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	作用时间			
		24h 抑制率(%)	48h 抑制率(%)	72h 抑制率(%)	96h 抑制率(%)
对照组	1%	0.00	0.00	0.00	0.00
5-FU	25.0	30.95 ± 3.39	42.63 ± 3.47	56.32 ± 3.35	64.63 ± 5.37
cino1	0.1	18.25 ± 3.55	30.73 ± 2.53	37.25 ± 3.75	48.73 ± 2.51
cino2	1.0	25.64 ± 1.23	41.41 ± 3.75	56.64 ± 4.24	63.41 ± 4.73
cino3	10.0	$38.42 \pm 4.41^{1)}$	$64.27 \pm 2.14^{1)}$	$72.42 \pm 4.41^{1)}$	$78.27 \pm 3.25^{1)}$
cino1 + 5-FU	10.1 + 25.0	$37.51 \pm 2.71^{2)}$	$48.12 \pm 2.24^{2)}$	$64.54 \pm 4.61^{2)}$	$73.12 \pm 3.04^{2)}$
cino2 + 5-FU	1.0 + 25.0	$45.24 \pm 5.54^{2)}$	$67.28 \pm 5.13^{2)}$	$73.25 \pm 5.41^{2)}$	$83.28 \pm 4.23^{2)}$
cino3 + 5-FU	10.0 + 25.0	$55.27 \pm 7.23^{2)}$	$75.35 \pm 6.37^{2)}$	$81.21 \pm 4.25^{2)}$	$90.35 \pm 4.32^{2)}$

注:1)与5-FU组比较 $P < 0.05$;2)与5-FU组比较 $P < 0.01$

2.2 cino 和 5-FU 对 BGC-823 细胞的诱导凋亡作用

流式细胞仪分析发现,药物作用 24h 和 48h 后,cino 和 5-FU 均可诱导 BGC-823 细胞凋亡;在 DNA 直方图上的 G_0/G_1 期出现亚二倍体凋亡峰,该峰随浓度增加和时间延长而逐渐升高。cino1,cino2 和 cino3 的 24h 诱导细胞凋亡率分别是 9.1%,10.8% 和 20.8%,48h 的诱导细胞凋亡率分别是 11.6%,15.3% 和 25.5%。5-FU 的 24h 和 48h 诱导细胞凋亡率分别为 10% 和 15.5%。各药物处理

组与对照组比较,诱导 BGC-823 细胞凋亡率明显增加(均 $P < 0.01$)。cino1 + 5-FU,cino2 + 5-FU 及 cino3 + 5-FU 组的 24h 诱导细胞凋亡率是 20.4%,26.5% 和 31.3%,48h 的细胞凋亡率是 31.4%,35% 和 39.6%,联合用药组细胞凋亡率显著高于各单药组($P < 0.05$)。随着 cino 浓度的增加和时间的延长,cino 组和联合组细胞凋亡率随之升高,示其诱导凋亡作用具有一定的时间剂量依赖性(表3)。

表3 药物对 BGC-823 细胞的诱导凋亡作用 ($\bar{x} \pm s$)

分组	浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	作用时间	
		24h 抑制率(%)	48h 抑制率(%)
RPMI1640	1%	1.52 \pm 0.211)	2.31 \pm 1.24 ¹⁾
5-FU	25	10.13 \pm 0.35	15.21 \pm 2.21
cino1	0.1	9.91 \pm 0.17	11.60 \pm 0.36
cino2	1	11.14 \pm 0.21	15.27 \pm 0.19
cino3	10	20.54 \pm 0.81 ²⁾	25.10 \pm 0.34 ²⁾
cino1 + 5-FU	0.1 + 25	20.09 \pm 0.13 ^{2),3)}	31.36 \pm 0.21 ^{2),3)}
cino2 + 5-FU	1 + 25	26.12 \pm 1.06 ^{2),3)}	34.83 \pm 1.25 ^{2),3)}
cino3 + 5-FU	10 + 25	32.37 \pm 1.51 ^{2),3)}	39.74 \pm 1.01 ^{2),3)}

注:1)与各实验组比较 $P < 0.01$;2)与 5-FU 组比较 $P < 0.05$;3)与 cino 各亚组比较 $P < 0.05$

2.3 对细胞周期分布的影响

单用 cino 使 S 期细胞比例较对照组明显增多 ($P < 0.05$), G_2/M 期和 G_0/G_1 期细胞比例减少; 使用 5-FU 后使 G_0/G_1 期细胞比例减少, S 期细胞比例增多, 细胞被阻滞于 S 期。 G_2/M 期细胞比例各实验组与对照组比较差异无显著性 ($P > 0.05$), cino + 5-FU 组细胞的 S 期阻滞更明显, 与对照组和各单药组比较差异均有显著性 ($P < 0.01$) (表 4, 图 2)。

表4 药物对 BGC-823 细胞的细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

分组	浓度	G_0/G_1	S 期	G_2/M
对照	69.54 \pm 0.57	17.26 \pm 0.52	13.21 \pm 0.84	
5-FU	25.0	65.32 \pm 0.74 ¹⁾	23.25 \pm 0.53 ¹⁾	11.45 \pm 0.67
cino1	0.1	63.23 \pm 0.58 ¹⁾	25.24 \pm 0.75 ¹⁾	11.64 \pm 0.79
cino2	1.0	60.38 \pm 0.64 ¹⁾	29.36 \pm 0.34 ¹⁾	10.25 \pm 0.51
cino3	10.0	57.12 \pm 0.56 ¹⁾	33.36 \pm 0.42 ¹⁾	9.51 \pm 0.96
cino1 + 5-FU	0.1 + 25.0	56.51 \pm 0.75 ^{2),3)}	32.23 \pm 0.51 ^{2),3)}	11.21 \pm 0.74
cino2 + 5-FU	1 + 25.0	54.64 \pm 0.42 ^{2),3)}	35.35 \pm 0.58 ^{2),3)}	10.37 \pm 0.76
cino3 + 5-FU	10.0 + 25.0	51.12 \pm 0.41 ^{2),3)}	37.75 \pm 0.54 ^{2),3)}	11.12 \pm 0.53

注:1)与对照组比较 $P < 0.05$;2)与对照组和 5-FU 组比较;3)与 cino 各亚组比较 $P < 0.01$

对照组

5-FU 组

cino 组

cino + 5-FU 组

图2 流式细胞仪扫描图

3 讨论

由于化疗和放疗对正常组织、器官不可避免地产生损害或毒性作用,常成为增加剂量、提高疗效的主要障碍。因此,寻找一种高效低毒的化疗辅助药物治疗晚期肿瘤已成为许多学者研究的方向。中药具有毒副作用小、易被患者接受等优点,从中

药中筛选高效低毒的凋亡诱导剂,对肿瘤的临床治疗具有重要意义。

cino 注射液在肿瘤临床中已广泛应用^[3]。cino 可抑制白血病、肺癌、胃癌和肝癌等多种肿瘤细胞增殖和诱导其凋亡^[4-6]。近年来对 cino 药理作用的深入研究和临床应用,已证实 cino 能有效抑制消化道肿瘤细胞的增殖和诱导凋亡,但其在体外与化疗

药物联用对胃癌细胞影响的研究较少。在此基础上笔者采用体外细胞培养的方法观察了 cino 与 5-FU 联用对人胃腺癌 BGC-823 细胞增殖、凋亡和细胞周期的影响。通过改良 MTT 法、荧光显微镜观察和流式细胞仪检测方法的研究结果表明, cino 和 5-FU 分别单用对胃癌细胞作用较弱, 联合应用对 BGC-823 细胞的增殖抑制和诱导凋亡作用显著增强 ($P < 0.05$), 并且随 cino 浓度的升高和作用时间的延长, 其抗肿瘤细胞增殖和促凋亡作用逐渐增强。细胞周期分析显示, cino 与 5-FU 联合应用后细胞的 S 期所占比例明显高于单药组 (均为 $P < 0.05$), 说明两者存在一定的协同效应; cino 具有对化疗药物的增效作用。其作用机制可能是 cino 使该细胞阻滞于 S 期, 使其不能进入 S 期进行 DNA 复制, 从而抑制肿瘤的生长; 而 5-FU 系主要作用于 S 期肿瘤细胞的药物。故认为 cino 增加了肿瘤细胞对化疗的敏感性, 从而起到抑制肿瘤细胞增殖和促进细胞凋亡的作用。

我国 cino 临床使用已有多年的历史, 其单独使用的安全性已有保证, 若能证实其配伍化疗药物治疗肿瘤的增效性和安全性, 将有较大意义, 可为胃癌等易产生耐药现象的实体瘤的治疗提供有益的方法和实验依据。本研究证实 cino 通过抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用, 为胃癌治疗中使用 cino 增效化疗效果提供了实验依据。临床上 cino 与化疗同步治疗胃癌, 即可发挥化疗作

用, 又具有化疗增敏作用, 使化疗的联合更加优化。故认为 cino 是很有开发潜力的抗肿瘤药物。但究竟是 cino 中的何种成分有诱导凋亡的作用, cino 与其他抗肿瘤单味中药或其他化疗药物联合使用时, 是否增强对胃癌细胞的杀伤效果, 凋亡调控基因表达开始的时相和凋亡不同阶段对表达的影响以及其他凋亡相关基因表达的数量与种类等问题均有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 何玉玲, 荆莉清. 华蟾素的药理作用及临床应用[J]. 中国临床医药研究杂志, 2003, (90): 8865 - 8867.
- [2] 陈亚军, 叶古详, 孙国娣. MTT 法体外测定胃癌化疗药物敏感性[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(1): 47 - 49.
- [3] Lau CB, Ho CY, Kim CF. Cytotoxic activities of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on human leukemia and lymphoma cells by induction of apoptosis[J]. Life Sci, 2004, 75(7): 797 - 808.
- [4] 吴万垠, 柴小妹, 刘伟胜. 华蟾素联合长春瑞滨对小鼠 Lewis 肺癌细胞周期的影响[J]. 中国癌症杂志, 2004, 11(4): 363 - 366.
- [5] 朱宁希, 沈建平, 扬海燕, 等. 华蟾素对 HL-60 细胞凋亡诱导作用及与三氧化二砷的协同作用[J]. 中国肿瘤, 2002, 11(5): 305 - 306.
- [6] 陈小义, 胡文亮, 徐瑞成, 等. 蟾蜍灵对肝癌细胞 SMMC-7721 的细胞毒作用及生长相关基因表达的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2001, 15(4): 293 - 396.

本刊 2007 年各期重点内容安排

本刊 2007 年各期重点内容安排如下, 欢迎赐稿。

第 1 期	乳腺、甲状腺外科	第 7 期	胆道外科
第 2 期	胆道外科	第 8 期	肝脏外科
第 3 期	肝脏外科	第 9 期	胃肠道外科
第 4 期	胃肠道外科	第 10 期	胰腺外科
第 5 期	胰腺外科	第 11 期	甲状腺、乳腺外科
第 6 期	血管、腔镜外科	第 12 期	其他