

榄香烯乳联合5-氟尿嘧啶对人胃癌细胞AGS增殖的抑制作用研究

管振华*,李学良[#](南京医科大学第一附属医院,南京 210029)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)25-2332-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.25.10

摘要 目的:研究榄香烯乳联合5-氟尿嘧啶(5-FU)对人胃癌细胞AGS增殖的抑制作用。方法:取对数生长期AGS细胞,分为榄香烯乳各剂量[0(对照组)、20、40、60、80 $\mu\text{g/ml}$]组、5-FU组(40 $\mu\text{g/ml}$)及其混合组(榄香烯乳80 $\mu\text{g/ml}$ +5-FU 40 $\mu\text{g/ml}$),每个浓度3个复孔,采用MTT法考察榄香烯乳各剂量组作用12、24、48 h,5-FU组和混合组作用24 h后细胞的增殖抑制率;采用流式细胞仪、蛋白质印迹法检测对照组、榄香烯乳组(80 $\mu\text{g/ml}$)、5-FU组和混合组作用24 h的细胞周期和细胞周期蛋白D1(Cyclin D1)的表达情况。以接种AGS细胞的裸鼠为模型,考察模型组、5-FU组[17 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]、榄香烯乳组[75 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$]及其混合组荷瘤鼠体内的抑瘤率。结果:榄香烯乳能呈浓度依赖性抑制细胞增殖($P<0.05$);混合组对细胞的抑制作用强于二者单用组;与对照组比较,榄香烯乳组、5-FU组和混合组细胞 G_0/G_1 期比例增加,差异具有统计学意义($P<0.05$);后3组细胞中Cyclin D1表达依次减弱,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与模型组比较,榄香烯乳组、5-FU组和混合组的体内抑瘤率分别为45.16%、52.68%、65.59%。结论:榄香烯乳与5-FU具有协同抑制AGS细胞增殖的作用。

关键词 榄香烯乳;5-氟尿嘧啶;人胃癌细胞AGS;增殖;裸鼠

Inhibitory Effect of Elemenum Emulsion Combined with 5-FU on the Proliferation of Human Gastric Cancer Cells AGS

GUAN Zhen-hua, LI Xue-liang (The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effect of elemenum emulsion combined with 5-fluorouracil (5-FU) on the proliferation of human gastric cancer cells AGS. METHODS: AGS at logarithmic growth phase were divided into elemenum emulsion different dose groups [0 (control group), 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g/ml}$], 5-FU group (40 $\mu\text{g/ml}$) and mixture group (elemenum emulsion 80 $\mu\text{g/ml}$ +5-FU 40 $\mu\text{g/ml}$). There were 3 repeated holes for each concentration. MTT method was used to determine the inhibitory effect of elemenum emulsion groups on the proliferation of AGS after 12, 24, 48 h, and that of 5-FU group and mixture group on the proliferation of AGS after 24 h. The cell cycle and the expression of Cyclin D1 in control group, elemenum emulsion group (80 $\mu\text{g/ml}$), 5-FU group and mixture group were analyzed by flow cytometry and Western blotting. The anti-tumor effects of model group, 5-FU group [17 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$], elemenum emulsion [75 $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$] and mixture group were also evaluated, taking nude mice vaccinated with AGS as model. RESULTS: The elemenum emulsion inhibited cell proliferation in concentration-dependent manner ($P<0.05$); inhibitory effect of mixture group was better than other single drug groups; compared with control group, the proportion of elemenum emulsion group, 5-FU group and mixture group increased; there was statistical significance ($P<0.05$). The expression of Cyclin D1 in latter 3 groups decreased with statistical significance ($P<0.05$). Compared with model group, the anti-tumor rates of elemenum emulsion group, 5-FU group and mixture group were 45.16%, 52.68% and 65.59%, respectively. CONCLUSIONS: Elemenum emulsion combined with 5-FU has synergistic effects on the proliferation of AGS cells.

KEYWORDS Elemenum emulsion; 5-Fluorouracil; Human gastric cancer cells AGS; Proliferation; Nude mice

胃癌是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤,我国胃癌发病率占各种恶性肿瘤的前3位,病死率居各种恶性肿瘤首位^[1]。5-氟尿嘧啶(5-FU)于1957年被首次合成成功^[2],目前是常用的化疗药物,临床上被用于胃肠道、泌尿系统等多种恶性肿瘤的治疗。榄香烯乳是我国为数不多的拥有自主知识产权的抗肿瘤新药,是从中药莪术中提取的抗癌活性成分,属于挥发油类。临床研究表明榄香烯乳是一种高效、广谱、副作用小的抗

肿瘤药物。本文选择人胃癌细胞AGS为模型,研究榄香烯乳、5-FU单独给药以及两者联合给药对细胞株的抑制作用和细胞凋亡情况及对荷瘤鼠的体内抑瘤作用,以期临床用药提供依据。

1 材料

1.1 仪器

FACs流式细胞仪(美国Becton Dickinson公司);凝胶成像分析系统和680型酶标仪(美国Bio-Rad公司);层流超净工作台(美国Forma Scientific公司)。

1.2 药品与试剂

榄香烯乳注射液(大连金港制药公司,批号:1112251,规

* 住院医师,硕士研究生。研究方向:消化系统肿瘤。电话:0518-85605329。E-mail: zhenhua_guan@163.com

[#] 通信作者:主任医师,教授。研究方向:消化内科常见病、疑难病的诊治。电话:025-83718836。E-mail: ligakur@aliyun.com

格:每支 100 mg);5-FU(上海旭东海普药业有限公司,批号:120305,规格:每支 250 mg);RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(羊抗兔 IgG-HRP)、兔抗人细胞周期蛋白 D1(Cyclin D1)单克隆抗体(中国博士德公司);小牛血清(上海实生细胞生物技术有限公司);四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)均购自美国 Sigma 公司。

1.3 细胞与动物

AGS 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所;Bala/c 裸鼠,♀,5~6 周龄,体质量(20±2)g,由北京维通利华实验动物技术有限责任公司提供,实验动物质量合格证号:SCXK(京)2002-0003。

2 方法

2.1 细胞的培养

将 AGS 细胞放置于 RPMI 1640 培养基(含 10% 新鲜小牛血清、100 u/ml 青霉素以及 100 μg/ml 链霉素),在 5% CO₂、37 ℃、饱和湿度培养箱内培养,2~3 d 传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

2.2 动物模型的建立

收集处于对数生长期的 AGS 细胞,台盼蓝检测细胞活力在 90% 以上,用不含小牛血清的 RPMI 1640 培养基溶液配制成浓度为 1×10⁷ ml⁻¹ 的单细胞悬液。取 0.2 ml 悬液接种于裸鼠颈后右肩胛皮下,建立荷瘤鼠模型,以皮下瘤体结节直径>0.5 cm 为接种成瘤标准。

2.3 MTT 法检测细胞的增殖

将 AGS 细胞浓度调整至 1×10⁴ ml⁻¹,接种于 96 孔板,次日起分别加入含不同药物的完全培养基,以 RPMI 1640 培养基空白对照,首先考察榄香烯乳不同浓度对细胞的抑制作用。实验分为榄香烯乳各剂量[0(对照组)、20、40、60、80 μg/ml]组、5-FU(40 μg/ml)组及其混合(榄香烯乳 80 μg/ml+5-FU 40 μg/ml)组,每个浓度 3 个复孔。榄香烯乳各剂量组细胞作用 12、24、48 h,5-FU 组和混合组作用 24 h,然后弃培养液,每孔加入 20 μl 5 mg/ml 的 MTT,于 37 ℃ 孵育 4 h,弃上清,每孔加入 150 μl DMSO 溶液,震荡 10 min 后充分溶解,于 490 nm 波长处测定吸光度(A)。计算增殖抑制率=[1-(用药组 A 值/对照组 A 值)]×100%,实验重复 3 次。

2.4 流式细胞仪检测细胞的周期

实验分为对照组、榄香烯乳(80 μg/ml)组、5-FU(40 μg/ml)组及其混合组,按“2.3”项下方法加药培养 24 h。分别收集各组细胞 1×10⁶ 个,以 70% 乙醇固定过夜后,冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,1 000 r/min(离心半径 2 cm)离心 5 min,弃上清,用 1 ml PBS 重悬细胞,加入 12.5 μl 800 μg/ml 的核糖核酸酶(RNaseA),37 ℃ 水浴 30 min,加 10 μl 1 mg/ml 的碘化丙啶混匀,4 ℃ 避光染 40 min,上流式细胞仪检测细胞的周期。

2.5 蛋白质印迹法检测细胞中 Cyclin D1 蛋白的表达

实验分为对照组、榄香烯乳(80 μg/ml)组、5-FU(40 μg/ml)组及其混合组,按“2.3”项下方法加药培养 24 h。常规提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白含量,95 ℃ 变性 5 min,上样 40 μg 细胞总蛋白,在 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)中进行电泳,转印至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭

2 h,加入兔抗人 Cyclin D1 单克隆抗体,4 ℃ 孵育过夜,加入羊抗兔 IgG-HRP,37 ℃ 孵育 2 h,滴加化学发光试(ECL)剂,暗室 X 线压片曝光,显影定影。用 Bandscan 5.0 软件分析灰度值,以 GAPDH 为内参,考察细胞中 Cyclin D1 蛋白的表达情况。

2.6 体内肿瘤抑制考察

以接种 AGS 细胞的荷瘤鼠为模型,实验分为模型组、5-FU 组、榄香烯乳组及其混合组,每组 10 只。模型组荷瘤鼠腹腔注射等体积 0.9% 氯化钠注射液(生理盐水),按临床给药剂量折算设计给药浓度:5-FU 组荷瘤鼠腹腔注射 5-FU 17 mg/(kg·d),榄香烯乳组荷瘤鼠腹腔注射榄香烯乳注射液 75 mg/(kg·d),混合组荷瘤鼠腹腔注射 5-FU 和榄香烯乳注射液的混合液,给药浓度同上。每周 2 次,连续给药 3 周,用药结束 2 d 后处死荷瘤鼠,取瘤称质量。计算肿瘤抑制率=[1-(用药组平均瘤质量/模型组平均瘤质量)]×100 %。

2.7 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析和卡方检验, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖抑制率

与对照组比较,榄香烯乳对细胞的增殖抑制率明显增加,且呈浓度和时间依赖性($P<0.05$)。与榄香烯乳(80 μg/ml)组和 5-FU 组比较,混合组细胞的增殖抑制率增加,差异具有统计学意义($P<0.01$)。榄香烯乳对 AGS 细胞的增殖抑制作用见表 1,榄香烯乳与 5-FU 单用或联用对 AGS 细胞增殖的抑制作用见图 1。

表 1 榄香烯乳对 AGS 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab 1 Inhibitory effect of elemenum emulsion on the proliferation of AGS cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

质量浓度, μg/ml	增殖抑制率, %		
	12 h	24 h	48 h
0	0	0	0
20	3.73 ± 0.84	6.31 ± 1.08 [*]	10.84 ± 1.75 [#]
40	8.06 ± 1.59 [*]	14.62 ± 2.13 ^{**}	19.47 ± 0.60 ^{**}
60	17.54 ± 1.44 [*]	25.39 ± 0.88 ^{**}	33.21 ± 1.72 ^{**}
80	30.19 ± 1.61 [*]	35.22 ± 1.81 ^{**}	42.50 ± 2.17 ^{**}

与 20 μg/ml 比较: * $P<0.05$; 与 12 h 比较: * $P<0.05$
vs. 20 μg/ml: * $P<0.05$; vs. 12 h: * $P<0.05$

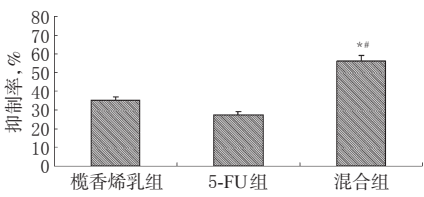


图 1 榄香烯乳与 5-氟尿嘧啶单用或联用对 AGS 细胞增殖的抑制作用($n=3$)

与榄香烯乳组比较: * $P<0.01$; 与 5-FU 组比较: * $P<0.01$

Fig 1 Inhibitory effect of elemenum emulsion alone or combined with 5-FU on cell proliferation of AGS cells($n=3$)
vs. elemenum emulsion group: * $P<0.01$; vs. 5-FU group: * $P<0.01$

3.2 细胞的周期变化

与对照组比较,榄香烯乳组、5-FU 组和混合组细胞均表现

为G₀/G₁期阻滞,AGS细胞周期中DNA合成前期(G₀/G₁期)细胞比例均增加,差异具有统计学意义($P<0.05$),DNA合成期(S期)细胞比例下降,其中混合组处于G₀/G₁期的细胞比例超过了50%,作用强于榄香烯乳组和5-FU组,表现出协同作用。各组细胞的细胞周期变化见表2。

表2 各组细胞的细胞周期变化($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞周期, %		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照组	29.35 ± 1.66	46.31 ± 0.89	24.34 ± 1.71
榄香烯乳组	39.25 ± 2.41 ^{*#}	37.19 ± 1.40 ^{**}	23.56 ± 0.94
5-FU组	41.91 ± 2.85 ^{*#}	35.82 ± 1.91 ^{**}	22.27 ± 3.06
混合组	53.16 ± 3.83 [*]	22.73 ± 2.36 [*]	24.11 ± 1.11

与对照组比较: $*P<0.05$; 与混合组比较: $*P<0.05$
vs. control group: $*P<0.05$; vs. mixture group: $*P<0.05$

3.3 细胞中Cyclin D1蛋白的表达

结果显示,榄香烯乳组、5-FU组和混合组细胞中Cyclin D1蛋白表达相对于对照组的灰度比值分别为0.81、0.64、0.32。表明混合组对细胞中Cyclin D1蛋白表达的抑制作用强于榄香烯乳组和5-FU组。各组细胞中Cyclin D1蛋白电泳图见图2。

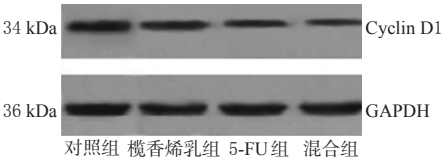


图2 各组细胞中Cyclin D1蛋白电泳图

Fig 2 Electrophoretogram of protein expression of Cyclin D1 in each group

3.4 体内肿瘤抑制情况

与模型组比较,榄香烯乳组、5-FU组和混合组荷瘤鼠的肿瘤质量均降低,差异具有统计学意义($P<0.05$)。与榄香烯乳组、5-FU组比较,混合组的抑瘤率分别提高了约20%和13%,提示两药合用具有协同抗肿瘤作用。各组荷瘤鼠体内的抑瘤率比较见表3。

表3 各组模型鼠体内的抑瘤率比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Tab 3 Comparison of *in vivo* anti-tumor rate in mice with tumor in each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	肿瘤质量, g	抑瘤率, %
模型组	0.93 ± 0.18	
榄香烯乳组	0.51 ± 0.25 ^{**}	45.16
5-FU组	0.44 ± 0.20 ^{**}	52.68
混合组	0.32 ± 0.13 [*]	65.59

与模型组比较: $*P<0.05$; 与混合组比较: $*P<0.05$
vs. model group: $*P<0.05$; vs. mixture group: $*P<0.05$

4 讨论

胃癌是全世界常见的恶性肿瘤之一,预后较差,具有发病率高、转移率高、死亡率高的特点。并且胃癌早期诊断率低,早期诊断率比例不足10%^[3],因此多数患者就诊时已经处于发展期;即便是根治性切除,局部复发率仍然高达50%以上^[4]。目

前,全球范围内对进展期胃癌并没有标准治疗方案,胃癌的临床治疗面临着巨大的挑战。积极探索有效的质量方案,对于延长患者的生存期、提高生存质量具有重要意义。

单纯化疗治疗胃癌的有效率很低,但联合用药体现出较好的效果。经典联合用药化疗方案为丝裂霉素+5-FU+长春新碱,其中5-FU为方案的主药。有报道表明,榄香烯及5-FU联合用药治疗胃肠道肿瘤具有良好的临床疗效,与单纯化疗相比,可以减轻化疗毒副反应,提高患者的免疫功能和生存质量^[5]。本研究的思路就是从基础研究角度证明榄香烯乳及5-FU联用的合理性。

榄香烯乳注射液是我国具有独立知识产权的二类抗癌药物,其主要活性成分为 β -榄香烯。目前榄香烯乳注射液在临床上被用于多种肿瘤的治疗,临床试验表明其对消化道肿瘤、脑肿瘤、肝肿瘤等均具有较好的疗效。其主要作用机制是干扰肿瘤细胞生长代谢的途径,抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡^[6]。研究表明,榄香烯乳注射液与其他化疗药物联合使用后能起到良好的效果,可以显著提高胃癌对化疗药物的敏感性,有效逆转胃癌晚期患者对化疗药物的耐药^[7-8]。

本研究表明,榄香烯乳注射液对AGS细胞的增殖抑制作用具有时间和浓度依赖性,联合用药结果表明其与5-FU具有协同抑制作用。榄香烯乳作用于AGS细胞后,细胞发生了G₀/G₁期阻滞,与5-FU联合使用后阻滞作用明显增强。榄香烯乳处理AGS细胞后,与细胞增殖密切相关的Cyclin D1蛋白表达降低,且榄香烯乳与5-FU联合使用后作用更强。体内抑瘤实验进一步证实了榄香烯乳与5-FU的协同抗肿瘤作用。

综上所述,榄香烯乳与5-FU具有协同抑制AGS细胞增殖的作用,可为今后胃癌的临床治疗提供一定的实验依据。

参考文献

[1] 廖毅,邓媛,傅建伟.胃癌分子机制的研究进展[J].中国肿瘤,2014,23(1):58.
[2] 杨贤,葛卫红.5-氟尿嘧啶剂量选择研究进展[J].中国药房,2013,24(40):3 838.
[3] Archie V, Kauh J, Jones DV, et al. Gastric cancer: Standards for the 21st century[J]. Criti Rev Oncol Hematol, 2006,57(2):123.
[4] 李涌健,张晓迪.中西医结合治疗胃癌的临床与实验研究进展[J].医学信息:中旬刊,2010(11):3 429.
[5] 尚宇.榄香烯乳注射液/5-Fu生化调节方案治疗胃肠道癌临床疗效观察[D].北京:北京中医药大学,2008:38-46.
[6] 余佳文,程斌.榄香烯诱导肿瘤细胞凋亡分子机制研究进展[J].中国药房,2013,24(35):3 348.
[7] 张晔,赵明芳,曲秀娟. β -榄香烯联合紫杉醇诱导胃癌细胞凋亡的体外研究[J].现代肿瘤医学,2013,21(5):965.
[8] 张晔,宋娜,刘云鹏,等. β -榄香烯增强奥沙利铂抑制人胃癌细胞的增殖及其机制[J].现代肿瘤医学,2011,19(11):2 150.

(收稿日期:2014-01-23 修回日期:2014-04-11)