

蛇葡萄素钠协同卡铂对人肺腺癌GLC-82细胞增殖的抑制作用

张艳霞^{1,2*}, 吴勇杰², 李文广²(1.甘肃中医学院科研实验中心,兰州 730000;2.兰州大学基础医学院药理学研究所/甘肃省新药临床前研究重点实验室,兰州 730000)

中图分类号 R965.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)04-0488-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.04.18

摘要 目的:研究蛇葡萄素钠(AMP-Na)协同卡铂对人肺腺癌GLC-82细胞增殖的抑制作用。方法:以25、50、100 μg/ml AMP-Na, 3.12、6.25、12.5、25、50 μg/ml卡铂, 25、50、100 μg/ml AMP-Na+3.12、6.25、12.5、25、50 μg/ml卡铂作用于GLC-82细胞48 h,采用MTT法测定细胞增殖抑制率。以25 μg/ml卡铂, 12.5、25、50、100 μg/ml AMP-Na, 12.5、25、50、100 μg/ml AMP-Na+25 μg/ml卡铂作用于细胞48 h,采用流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果:25~100 μg/ml AMP-Na对GLC-82细胞的增殖具有抑制作用,且呈浓度依赖性。25 μg/ml卡铂与AMP-Na(12.5、25、50、100 μg/ml)对GLC-82细胞增殖的抑制作用较单用卡铂增强。结论:AMP-Na单用对GLC-82细胞的增殖具有一定的抑制作用;与卡铂合用,对GLC-82细胞增殖具有协同抑制效应。

关键词 蛇葡萄素钠;卡铂;人肺腺癌GLC-82细胞;细胞凋亡

Inhibitory Effects of Ampelopsin Sodium Combined with Carboplatin on the Proliferation of Human Lung Adenocarcinoma Cell Line GLC-82

ZHANG Yan-xia^{1,2}, WU Yong-jie², LI Wen-guang²(1.Center of Research and Test, Gansu College of TCM, Lanzhou 730000, China;2.Institute of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Gansu Key Laboratory of Preclinical Study for New Drugs, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of ampelopsin sodium (AMP-Na) combined with carboplatin on the proliferation of human lung adenocarcinoma cell line GLC-82. METHODS: After treated with 25, 50 and 100 μg/ml AMP-Na, 3.12, 6.25, 12.5, 25 and 50 μg/ml carboplatin, 25, 50, 100 μg/ml AMP-Na+3.12, 6.25, 12.5, 25 and 50 μg/ml carboplatin for 48 h, the inhibitory rate of GLC-82 cell proliferation was determined by MTT assay. After treated with 25 μg/ml carboplatin, 12.5, 25, 50, 100 μg/ml AMP-Na, 12.5, 25, 50, 100 μg/ml AMP-Na+25 μg/ml carboplatin for 48 h, flow cytometry (FCM) was adopted to detect cell apoptotic rate. RESULTS: 25-100 μg/ml AMP-Na could inhibit the proliferation of GLC-82 cells in concentration-dependent manner. The inhibitory effect of AMP-Na (12.5, 25, 50, 100 μg/ml) combined with carboplatin (25 μg/ml) was stronger than that of carboplatin alone on the proliferation of GLC-82 cells. CONCLUSIONS: AMP-Na alone can inhibit the proliferation of GLC-82 cells to certain extent, it also strengthened inhibition of cell proliferation when combined with carboplatin.

KEYWORDS Ampelopsin sodium; Carboplatin; Human lung adenocarcinoma cell line GLC-82; Cell apoptosis

蛇葡萄素(Ampelopsin)为存在于葡萄科、杨梅科、杜鹃科、藤黄科、大戟科及柳科等植物中的一种重要的黄酮类化合物^[1]。蛇葡萄素钠(Ampelopsin sodium, AMP-Na)为蛇葡萄素高水溶性钠盐,是甘肃省新药临床前研究重点实验室为了提高蛇葡萄素的溶解性及稳定性,使其更适合临床使用而制备的一种化合物^[2]。近年研究发现,蛇葡萄植物具有抑制酪氨酸酶活性^[3]、抑制肿瘤细胞增殖的作用^[4-7],引起了国内外学者普遍关注。但是,AMP-Na与化疗药物卡铂联用对人肺腺癌GLC-82细胞是否有抑制作用?作用机制是什么?尚未见文献报道。为此,本研究考察了AMP-Na单用及与卡铂联用对人肺腺癌GLC-82细胞的生长抑制、诱导凋亡作用,以探讨其抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 仪器

Coulter EpicsXL型流式细胞仪(美国Beckman-Coulter公司);IX31型倒置显微镜(日本Olympus公司);2306型CO₂培养箱(美国Shellab公司);SW-CJ-IFD型超净工作台(苏州净化

设备有限公司);ELX800型酶联免疫检测仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 药品与试剂

AMP-Na注射用无菌粉末(批号:051115,纯度:98.8%,规格:50 mg/支)、AMP-Na注射用无菌粉末专用稀释液(批号:051118, pH 6.8,规格:5 ml/支)均购自广东泰禾医药科技有限公司;注射用卡铂无菌粉末(齐鲁制药有限公司,批号:6120152DA,规格:100 mg/支);新生小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司,批号:050126);RPMI 1640培养基(美国Gibco公司);MTT(美国Fluka公司);其余试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞

人肺腺癌GLC-82细胞购自中科院上海细胞生物研究所细胞库。

2 方法

2.1 各组细胞增殖抑制率的检测

取对数生长期的GLC-82细胞,调整细胞密度至 5×10^4 ml⁻¹,以90 μl/孔加入96孔培养板中培养24 h,待细胞贴壁后加入药物10 μl/孔,继续培养48 h。试验以3.12、6.25、12.5、25、50

* 讲师。研究方向:新药药理学。电话:0931-8765468。E-mail: yx.hope1981@163.com

μg/ml 卡铂, 25、50、100 μg/ml AMP-Na, 3.12、6.25、12.5、25、50 μg/ml 卡铂+25、50、100 μg/ml AMP-Na 联合作用于 GLC-82 细胞, 同时设空白对照(仅常规培养液)组、阴性对照(细胞+培养液)组。于试验终止前 4 h 加入 MTT(10 μl/孔), 试验终止时加入 10% 十二烷基硫酸钠(SDS, 100 μl/孔), 置于培养箱中过夜。次日于波长 570 nm 处测定光密度(OD), 按下式计算抑制率。抑制率(IR, %) = [(阴性对照组 OD - 空白对照组 OD) - 受试药组 OD] / [(阴性对照组 OD - 空白对照组 OD) × 100%]。每板各质量浓度设 3 个复孔。

2.2 各组活细胞、凋亡细胞、坏死细胞占比的测定

取对数生长期的 GLC-82 细胞, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液调节细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$, 以 9 ml/瓶接种于 10 个培养瓶。试验分为阴性对照(常规培养液)组, 卡铂(25 μg/ml)组, AMP-Na①、②、③、④(12.5、25、50、100 μg/ml)组与联合用药①、②、③、④(AMP-Na 12.5、25、50、100 μg/ml + 卡铂 25 μg/ml)组。培养 24 h 待细胞贴壁后, 分别以 1 ml/瓶加入药物或生理氯化钠溶液, 继续培养 48 h 后收集细胞, 制备样本, 以流式细胞仪检测分析。公式: 细胞占比(%) = 活细胞或凋亡细胞或坏死细胞数/总细胞数 × 100%。

2.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件处理数据。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布, 后以 LSD 法进行统计。P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组细胞增殖抑制率的检测结果

质量浓度在 25~100 μg/ml 范围内时, AMP-Na 对 GLC-82 细胞的增殖具有抑制作用, 且与质量浓度呈正相关; 质量浓度在 50~100 μg/ml 范围内, AMP-Na 对 3.12、6.25、12.5、25、50 μg/ml 卡铂抑制 GLC-82 细胞增殖具有协同效应。各组细胞增殖抑制率的检测结果见表 1(表中 AMP-Na 0 μg/ml + 卡铂 0 μg/ml 为阴性对照)。

表 1 各组细胞增殖抑制率的检测结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 The inhibitory rate of Amp-Na to cell proliferation in each group($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

AMP-Na, μg/ml	卡铂, μg/ml	0	3.12	6.25	12.5	25	50
0	0	0	4.57 ± 4.82	4.76 ± 5.43	11.93 ± 7.96**	27.97 ± 13.09**	72.13 ± 17.79**
25	2.84 ± 4.00*	5.60 ± 6.46**	6.49 ± 10.93**	9.94 ± 7.24**	22.87 ± 15.35**	62.30 ± 13.97**	
50	54.46 ± 15.25**	35.98 ± 14.68***	39.46 ± 13.31***	44.78 ± 9.42***	62.94 ± 12.33***	80.20 ± 8.53***	
100	79.18 ± 5.43**	70.67 ± 5.60***	70.56 ± 3.16**	73.54 ± 2.68**	75.38 ± 2.96**	80.92 ± 8.53***	

注: 与阴性对照比较, *P < 0.05, **P < 0.01; 与相应质量浓度卡铂比较, #P < 0.01

Note: vs. negative control, *P < 0.05, **P < 0.01; vs. the corresponding concentration carboplatin, #P < 0.01

3.2 各组活细胞、凋亡细胞、坏死细胞占比的检测结果

与阴性对照组比较, 卡铂组, AMP-Na④组与联合用药①、③、④组活细胞占比减少, 凋亡细胞占比增加; 卡铂组, AMP-Na③、④组与联合用药①、②、③、④组坏死细胞占比增加, 差异有统计学意义(P < 0.01 或 P < 0.05)。与卡铂组比较, 联合用药①、③、④组活细胞占比减少, 凋亡细胞占比增加; 联合用药③、④组坏死细胞占比增加, 差异有统计学意义(P <

0.01 或 P < 0.05)。各组活细胞、凋亡细胞、坏死细胞占比的检测结果见表 2; 各组细胞凋亡和坏死变化见图 1。

表 2 各组活细胞、凋亡细胞、坏死细胞占比的检测结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

Tab 2 The proportion of living cell, apoptosis cell and dead cell in each group($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	活细胞占比, %	凋亡细胞占比, %	坏死细胞占比, %
阴性对照组	93.05 ± 1.48	6.47 ± 1.42	0.42 ± 0.11
卡铂组	88.08 ± 1.56**	11.10 ± 1.46**	0.76 ± 0.13**
AMP-Na④组	72.83 ± 4.44**	21.78 ± 4.86**	5.35 ± 0.71**
AMP-Na③组	90.80 ± 3.18	8.60 ± 3.12	0.62 ± 0.08*
AMP-Na②组	92.45 ± 2.89	6.92 ± 2.71	0.41 ± 0.05
AMP-Na①组	93.63 ± 3.25	5.82 ± 3.30	0.44 ± 0.08
联合用药④组	63.03 ± 8.90***	31.33 ± 8.5***	5.63 ± 0.61***
联合用药③组	73.53 ± 5.62***	25.43 ± 5.64***	1.02 ± 0.14***
联合用药②组	84.67 ± 9.72	14.34 ± 9.77	0.99 ± 0.18*
联合用药①组	79.63 ± 0.55**	19.37 ± 5.40**	0.99 ± 0.19*

注: 与阴性对照组比较, *P < 0.05, **P < 0.01; 卡铂组比较, #P < 0.05, ##P < 0.01

Note: vs. negative control group, *P < 0.05, **P < 0.01; vs. carboplatin group, #P < 0.05, ##P < 0.01

4 讨论

肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌发病率的 80% 左右。由于其发现时往往已属晚期, 丧失了手术机会, 且预后较差, 故化疗是晚期 NSCLC 的主要治疗方法。近半个世纪以来, 肿瘤药物的发展均集中在细胞毒化疗药物上。虽然在蒽环类(如阿霉素、表阿霉素)、铂类(如顺铂、卡铂)之后又有很多强有力的药物如紫杉醇、盐酸伊立替康注射液等相继问世, 但化疗药物单独使用由于疗效低、毒性大, 所以并未对进展期 NSCLC 的治疗及生存期带来突破性进展。至今对于 NSCLC 的治疗, 仍主张应用联合化疗, 以达到增加疗效、提高患者生存期的目的。含铂方案目前仍是治疗晚期 NSCLC 的标准方案。以铂类药物为基础的联合化疗虽能改善晚期非小细胞肺癌患者的生存期、症状和生活质量, 但其疗效已经达到了平台期^[8], 提高疗效关键在于推出高效低毒的新药。中药(有效提取成分^[9]、单味药^[10]、复方成分^[11])诱导肿瘤细胞凋亡已成为一条很有希望治疗肿瘤的新途径^[12]。本研究结果表明, AMP-Na 25~100 μg/ml 与系列质量浓度的卡铂合用后, 对卡铂抑制 GLC-82 细胞的增殖有协同作用。

细胞凋亡的发生是一个极其复杂的过程, 受多种机制调节和制约。流式细胞 Annexin V-PI 双染色法利用 Annexin V 能与凋亡细胞表面的磷脂酰丝氨酸特异结合, PI 能特异透过死细胞膜使其染色的原理, 可将凋亡早期、晚期细胞以及死细胞区分开, 是目前常用的细胞凋亡检测方法。本研究用 Annexin V-PI 双染色法检测 AMP-Na 单用及与卡铂联合作用 GLC 细胞 48 h 后的细胞存活状态, 结果显示 25~100 μg/ml 的 AMP-Na 作用于 GLC-82 细胞 48 h 后, 处于凋亡和坏死状态的细胞随着 AMP-Na 质量浓度的增加而增多。卡铂 25 μg/ml 与 AMP-Na 12.5~100 μg/ml 联合应用后, 凋亡和坏死状态的细胞比 AMP-Na 单独应用时明显增加。本研究结果表明, AMP-Na 可以诱导 GLC-82 细胞凋亡并产生细胞毒, 进而诱导 GLC-82 细胞凋亡, 且对卡铂的细胞增殖抑制起到协同作用, 具体机制

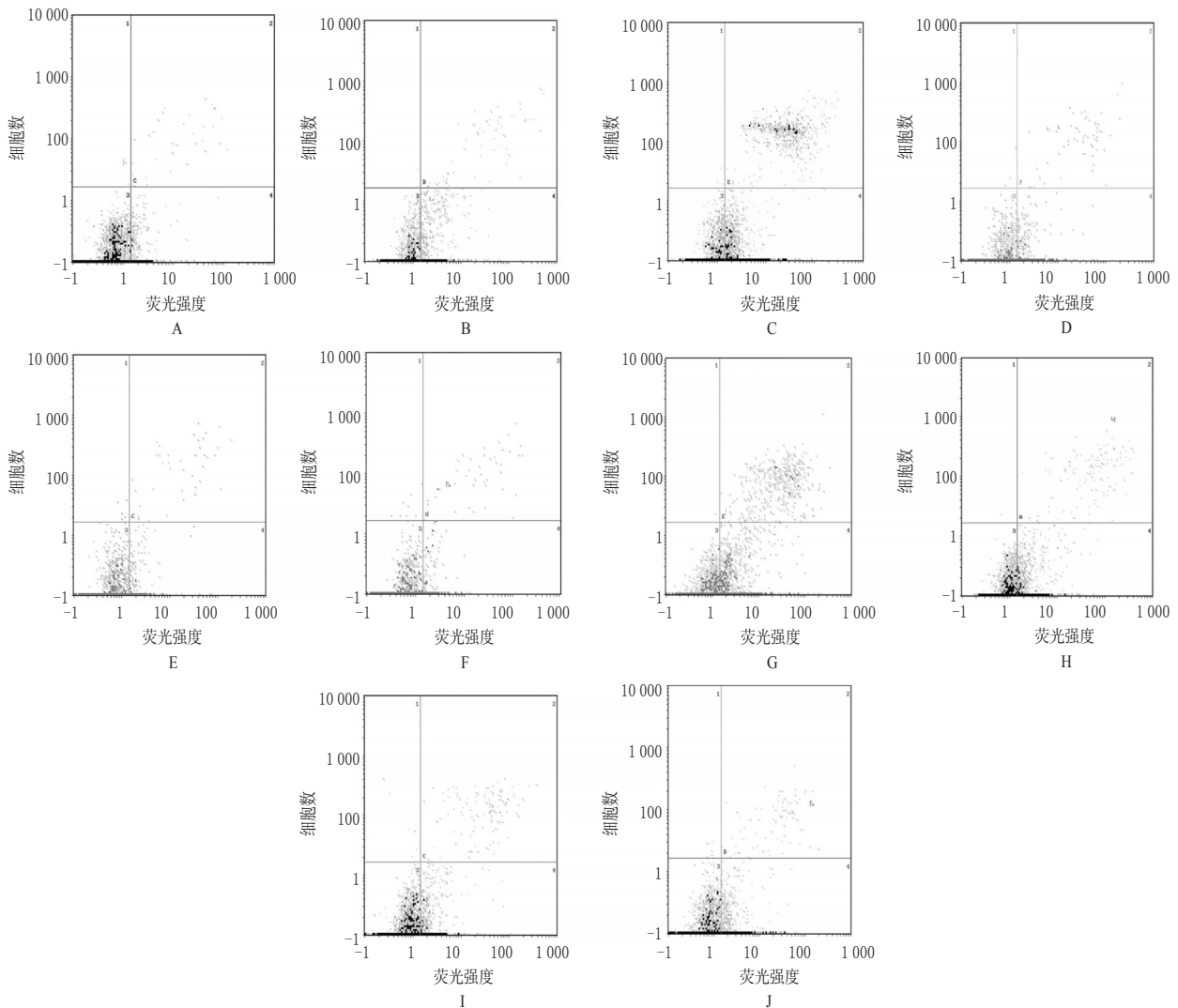


图1 各组细胞凋亡和坏死变化(48 h)

A. 阴性对照组; B. 卡铂组; C. AMP-Na④组; D. AMP-Na③组; E. AMP-Na②组; F. AMP-Na①组; G. 联合用药④组; H. 联合用药③组; I. 联合用药②组; J. 联合用药①组

Fig 1 The change of cell apoptosis and necrosis in each group(48 h)

A. negative control group; B. carboplatin group; C. AMP-Na ④ group; D. AMP-Na ③ group; E. AMP-Na ② group; F. AMP-Na ① group; G. drug combination ④ group; H. drug combination ③ group; I. drug combination ② group; J. drug combination ① group

有待进一步研究。

参考文献

- [1] 张友胜,杨伟丽,熊皓平.显齿蛇葡萄基本成分研究[J].天然产物研究与开发,2001,13(5):46.
- [2] 秦红岩.高水溶性蛇葡萄素钠盐的制备及其抗肿瘤活性研究[D].兰州:兰州大学,2006.
- [3] 刘德育,丘明祺,梁婷韵.无刺根中蛇葡萄素的提取及其对黑色素瘤的抑制作用[J].中山医科大学学报,1999,20(2):127.
- [4] 刘德育,罗曼.血清药理学方法研究蛇葡萄素抗B16黑色素瘤的作用[J].中药材,2000,24(5):348.
- [5] 朱孝峰,谢冰芬,刘宗潮,等.蛇葡萄素诱导肝癌细胞凋亡及周期影响[J].中药材,1999,30(增刊):165.
- [6] 周宁宁,朱孝峰,谢冰芬,等.无刺根中蛇葡萄素体外抗菌素肿瘤作用研究[J].广东药学,2000,10(4):7.
- [7] 曾飒,刘德育,叶燕丽,等.蛇葡萄素对人肺腺癌GLC-82裸鼠移植瘤的抑制作用[J].中药材,2004,27(11):842.
- [8] 张雪艳,陈玉蓉,王慧敏,等.紫杉醇联合卡铂治疗晚期非小细胞肺癌临床分析[J].临床肿瘤学杂志,2007,12(2):112.
- [9] 左云飞,魏巍,张耀铮,等.榄香烯诱导肝癌腹水瘤细胞系Hca-F25/CL-16A3凋亡的实验研究[J].中药药理与临床,1998,9(2):21.
- [10] 胡明昕,安超,李泉旺,等.中药土贝母诱导人乳腺癌细胞凋亡的实时成像[J].中华中医药杂志,2012,27(7):1 810.
- [11] 龚继勇,刘利胜,魏玲,等.加味当归补血汤含药血清对人肺癌细胞株A549增殖的影响[J].中华中医药学刊,2008,26(9):1 941.
- [12] 马慧萍,谢景文.中药诱导肿瘤细胞凋亡的研究进展[J].中国药房,2001,12(4):242.

(收稿日期:2014-03-27 修回日期:2014-07-02)

(编辑:张 静)