

# 大黄酰缬氨酸对人宫颈癌Hela细胞生长的抑制作用与放射增敏作用研究

陈玩珊<sup>1\*</sup>, 原文鹏<sup>1#</sup>, 胡新华<sup>1</sup>, 李瑞峰<sup>2</sup>(1.暨南大学医学院第二附属医院/深圳市人民医院, 广东深圳 518020; 2.中国科学院微生物研究所技术转移转化中心, 北京 100019)

中图分类号 R965.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)10-1360-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.10.20

**摘要** 目的:研究大黄酰缬氨酸对人宫颈癌Hela细胞生长的抑制作用和放射增敏活性。方法:不同浓度大黄酰缬氨酸(0、6.03、18.09、54.28、162.85、488.56、732.84、1 465.68  $\mu\text{mol/L}$ )作用于Hela细胞24、48 h后采用MTT法测定细胞活力,计算抑制率、半数抑制浓度( $\text{IC}_{50}$ )与20%抑制浓度( $\text{IC}_{20}$ )并绘制浓度-抑制率曲线。试验分为模型(等容培养液)6组与大黄酰缬氨酸(30  $\mu\text{mol/L}$ )6组,培养细胞24 h后分别接受0、1、2、4、6、8 Gy  $\gamma$ 射线照射(剂量率:0.78 Gy/min),再继续培养24 h,绘制照射剂量-存活比曲线,计算N(外推数)、 $\text{D}_0$ (平均致死剂量)、 $\text{SF}_2$ (单次照射2 Gy的细胞存活比)、SER(模型组 $\text{D}_0$ 与用药组 $\text{D}_0$ 之比或模型组 $\text{SF}_2$ 与用药组 $\text{SF}_2$ 之比)。结果:54.28、162.85、488.56、732.84、1 465.68  $\mu\text{mol/L}$ 大黄酰缬氨酸作用24 h时和6.03、18.09、54.28、162.85、488.56、732.84、1 465.68  $\mu\text{mol/L}$ 大黄酰缬氨酸作用48 h时均可明显抑制细胞活力;其对宫颈癌HeLa细胞的抑制作用呈剂量依赖性, $\text{IC}_{50}$ 分别为179.423  $\mu\text{mol/L}$ (24 h)和84.192  $\mu\text{mol/L}$ (48 h), $\text{IC}_{20}$ 分别为52.943  $\mu\text{mol/L}$ (24 h)和30.505  $\mu\text{mol/L}$ (48 h)。与模型组比较,大黄酰缬氨酸组细胞N、 $\text{D}_0$ 、 $\text{SF}_2$ 降低,SER升高。结论:大黄酰缬氨酸体外能明显抑制Hela细胞生长,增加Hela细胞的放射敏感性。

**关键词** 大黄酰缬氨酸;人宫颈癌细胞;放射增敏

## Study on the Growth Inhibition Effect and Radiosensitization Effect of Acyl-valine from *Rheum palmatum* on Human Cervical Cancer Hela Cells

CHEN Wan-shan<sup>1</sup>, YUAN Wen-peng<sup>1</sup>, HU Xin-hua<sup>1</sup>, LI Rui-feng<sup>2</sup>(1.The Second Affiliated Hospital of Medical College of Jinan University/Shenzhen People's Hospital, Guangdong Shenzhen 518020, China; 2.Technology Transfer Center, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100019, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the growth inhibition effect and radiosensitization effect of acyl-valine from *Rheum palmatum* on human cervical cancer Hela cells. METHODS: MTT method was used to determine cell viability after the acyl-valine from *R. palmatum* varying in concentration (0, 6.03, 18.09, 54.28, 162.85, 488.56, 732.84 and 1 465.68  $\mu\text{mol/L}$ ) had acted on Hela cells for 24 h and 48 h. The inhibition rate and median inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) and twenty percent inhibitory concentration ( $\text{IC}_{20}$ ) were calculated. The concentration-inhibition rate curves were drawn. In the experiment, there were 6 model groups (isovolumic culture solutions) and 6 groups of acyl-valine from *R. palmatum* (30  $\mu\text{mol/L}$ ). After being cultured for 24 h, the cells were irradiated with  $\gamma$ -ray at doses of 0, 1, 2, 4, 6 and 8 Gy (dose rate: 0.78 Gy/min), followed by culture for another 24 h. Then the dose-survival ratio curves were drawn to get N (extrapolation number),  $\text{D}_0$  (mean lethal dose),  $\text{SF}_2$  (survival ratio after single irradiation at a dose of 2 Gy) and SER (ratio of  $\text{D}_0$  of model group to that of medication group or ratio of  $\text{SF}_2$  of model group to that of medication group). RESULTS: The acyl-valine from *R. palmatum* with the concentration of 54.28, 162.85, 488.56, 732.84 and 1 465.68  $\mu\text{mol/L}$  after 24 h and that with the concentration of 6.03, 18.09, 54.28, 162.85, 488.56, 732.84, 1 465.68  $\mu\text{mol/L}$  after 48 h could significantly inhibit the cell viability. The inhibition effect of acyl-valine from *R. palmatum* on cervical cancer Hela cells was manifested in a dose-dependent manner.  $\text{IC}_{50}$  was 179.423 mol/L (24 h) and 84.192 mol/L (48 h),  $\text{IC}_{20}$  was 52.943  $\mu\text{mol/L}$  (24 h) and 30.505  $\mu\text{mol/L}$  (48 h), respectively. Compared with model group, N,  $\text{D}_0$  and  $\text{SF}_2$  were decreased and SER was increased. CONCLUSIONS: The acyl-valine from *R. palmatum* can significantly inhibit the growth of cervical cancer Hela cells *in vitro* and increase the radiosensitivity.

**KEYWORDS** Acyl-valine from *Rheum palmatum*; Human cervical cancer Hela cells; Radiosensitization

目前,恶性肿瘤的治疗仍以手术、放射治疗和化学治疗为主。由于肿瘤的治疗是一个复杂的过程,为了达到治愈的目的,

\* 主管中药师。研究方向:中药鉴定与中药临床药学。电话:0755-22942678。E-mail:2008chenws@163.com

# 通信作者:主任中药师。研究方向:中药、民族药的鉴定、整理,新制剂、新剂型开发及质量控制,医院药事管理。电话:0755-22942682。E-mail:yuanwpsz@163.com

的,既要消灭肿瘤的原发病灶,又要根除可能存在的淋巴结转移灶或潜在性转移灶,因此临床上多采用几种方法综合治疗。目前,70%左右的肿瘤都采用放射疗法,但是,在肿瘤的发生和发展过程中,由于实体肿瘤中普遍存在10%~50%的乏氧细胞<sup>[1]</sup>,造成肿瘤对射线不敏感、产生放射抗拒,从而限制了肿瘤的放疗效果,引起肿瘤的复发和转移。因此,寻找肿瘤放射增敏剂,对于提高肿瘤对射线的敏感性、降低照射剂量、

改善患者的生存状况具有重要的意义<sup>[2]</sup>。

目前,已经研究的放射增敏剂类型较多<sup>[3-4]</sup>,除传统的亲电子型放射增敏剂外,还有生物还原活性物、修复抑制剂、巯基抑制剂、类氧化合物以及中草药等<sup>[5-6]</sup>,具体药物如甘氨双唑钠(CM-Na)<sup>[7]</sup>、丝裂霉素C(Mitomycin C)、紫杉醇<sup>[8]</sup>等已经应用于临床。前期研究发现,芦荟大黄素和大黄酸对人宫颈癌Hela细胞具有较为明显的放射增敏作用<sup>[9]</sup>。为了寻找高效低毒的放射增敏剂,笔者选择大黄酸为母体,对其进行结构修饰得到其氨基酸衍生物——大黄酰缬氨酸,并对其抑制Hela细胞的作用及放射增敏活性开展了试验研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Napco公司);超净工作台(苏州净化设备有限公司);CX31型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);MK3型酶标仪(美国Thermo Fisher公司);XP205DR型分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);II 40型137Cs伽马射线照射仪(加拿大Gamma公司)。

### 1.2 药品与试剂

大黄酰缬氨酸(中国医学科学院放射医学研究所,批号:20100601,纯度:>98%);DMEM培养基(美国Invitrogen公司);胎牛血清(中国医学科学院血液研究所);胰酶、MTT(美国Genview公司);二甲基亚砜(DMSO,天津光复精细化工研究所);结晶紫(天津市化学试剂研究所)。

### 1.3 细胞

Hela细胞购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

Hela细胞接种于DMEM培养基中(含10%胎牛血清与青霉素、链霉素各100 u/ml),于37℃、含5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养,每2~3 d更换培养液,细胞铺满培养瓶后用0.25%胰蛋白酶消化后传代。

### 2.2 大黄酰缬氨酸对宫颈癌Hela细胞生长的抑制作用

取对数生长期细胞,经0.25%胰蛋白酶消化制成单细胞悬液,计数并稀释使细胞密度至 $2 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ 。按每孔200 μl细胞液接种于96孔培养板中,于37℃、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养24 h使细胞贴壁生长。以不同浓度大黄酰缬氨酸(0、6.03、18.09、54.28、162.85、488.56、732.84、1 465.68 μmol/L)分别作用于Hela细胞24、48 h。终止培养前4 h加入MTT(5 mg/ml)15 μl。终止培养后吸出培养液,每孔加入DMSO 150 μl,振荡10 min,使完全混匀且无结晶。在酶标仪492 nm波长处测定光密度(OD),以OD代表细胞活力。按下列公式计算生长抑制率:生长抑制率(%)=(1-试验组OD/对照组OD)×100%;拟合剂量存活曲线,并计算半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)和20%抑制浓度(IC<sub>20</sub>)。设0 μmol/L为对照,每组5个复孔。

### 2.3 大黄酰缬氨酸对细胞体外放射增敏活性的促进作用

于37℃、5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h使细胞贴壁生长。试验分为模型(等容培养液)6组与大黄酰缬氨酸(30 μmol/L)6组,每组同时设3个平行样。给药培养24 h后细胞分别接受0、1、2、4、6、8 Gy γ射线照射(剂量率:0.78 Gy/min),照射后再继

续培养24 h,然后弃去原液,更换培养基培养8~10 d后,弃培养液,先用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,再用甲醇固定,然后以0.1%结晶紫染液染色,计数细胞集落(细胞数为50个以上)数。采用下列公式计算细胞存活率:细胞存活率(%)=试验组集落数/(细胞种植数×细胞贴壁率)×100%;抑制率=100%-细胞存活率。采用GraphPad Prism 5软件处理,得单靶多击模型拟合细胞存活曲线:SF=1-(1-e<sup>-D/D<sub>0</sub></sup>)<sup>N</sup>,式中:SF为单次照射2 Gy的细胞存活比;D为吸收剂量(Gy);D<sub>0</sub>为平均致死剂量;N为外推数。根据上述公式计算N、D<sub>0</sub>、单次照射2 Gy的细胞存活比(SF<sub>2</sub>)、SER(模型组D<sub>0</sub>与用药组D<sub>0</sub>之比或模型组SF<sub>2</sub>与用药组SF<sub>2</sub>之比)。

### 2.4 统计学方法

采用SPSS 17.0软件处理实验数据。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 大黄酰缬氨酸对宫颈癌Hela细胞生长的抑制作用

作用于细胞24 h后,在54.28、162.85、488.56、732.84、1 465.68 μmol/L浓度下,大黄酰缬氨酸可明显抑制Hela细胞活力,IC<sub>50</sub>、IC<sub>20</sub>分别为179.423、52.943 μmol/L;作用于细胞48 h后,在6.03、18.09、54.28、162.85、488.56、732.84、1 465.68 μmol/L浓度下,大黄酰缬氨酸可明显抑制Hela细胞活力,IC<sub>50</sub>、IC<sub>20</sub>分别为84.192、30.505 μmol/L。大黄酰缬氨酸对细胞活力的抑制呈剂量依赖性。各组细胞活力与抑制率结果见表1;浓度-抑制率曲线见图1。

表1 各组细胞活力与抑制率结果( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 1 Results of cell viability and inhibition rates of all groups( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

浓度, μmol/L	OD <sub>492</sub>		抑制率,%	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	0.421 ± 0.064	0.770 ± 0.058	0	0
6.03	0.392 ± 0.051	0.673 ± 0.068**	6.90	12.62
18.09	0.365 ± 0.065	0.610 ± 0.024**	13.47	20.77
54.28	0.345 ± 0.037*	0.541 ± 0.022**	18.10	29.82
162.85	0.179 ± 0.041**	0.093 ± 0.008**	57.51	87.95
488.56	0.098 ± 0.019**	0.047 ± 0.007**	76.66	93.85
732.84	0.057 ± 0.034**	0.023 ± 0.008**	86.39	97.08
1 465.68	0.040 ± 0.023**	0.029 ± 0.010**	90.54	96.28

注:与0 μmol/L比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. 0 μmol/L, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$

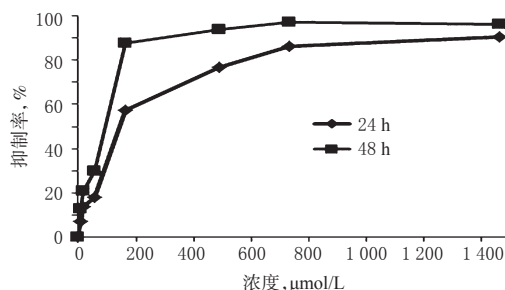


图1 浓度-抑制率曲线

Fig 1 Concentration-inhibition rate curves

### 3.2 大黄酚缬氨酸对细胞体外放射增敏活性的促进作用

与模型组比较,大黄酚缬氨酸组细胞N、D<sub>0</sub>、SF<sub>2</sub>降低,SER升高。照射剂量-存活比曲线见图2;各组放射生物学参数见表2。

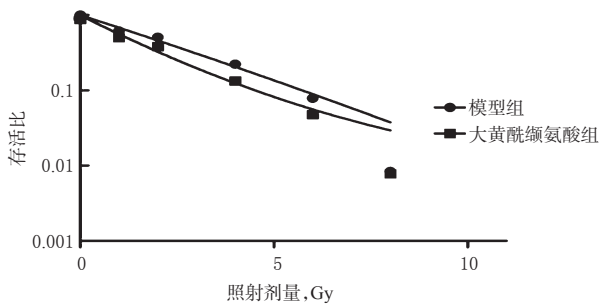


图2 照射剂量-存活比曲线

Fig 2 Irradiation-survival ratio curves

表2 各组放射生物学参数(n=3)

Tab 2 Results of radiobiological parameters of all groups (n=3)

组别	放射生物学参数			
	N	D <sub>0</sub>	SF <sub>2</sub>	SER
模型组	0.909 8	2.739 7	0.450 2	1.00
大黄酚缬氨酸组	0.673 5	2.527 2	0.334 1	1.35

### 4 讨论

大黄酸为中药大黄的主要活性成分之一。大量研究表明,大黄酸等蒽醌类化合物对胃癌、乳腺癌、口腔鳞癌等多种肿瘤细胞具有抑制作用。其作用机制主要是通过调控与肿瘤细胞凋亡和增殖密切相关的信号转导通路、诱导细胞凋亡以及形成DNA交联造成损伤等途径对肿瘤细胞发挥抑制作用<sup>[10-13]</sup>。放射增敏剂作用机制研究表明,放射增敏涉及细胞周期紊乱、DNA损伤、辐射所致细胞信号转导过程、血管形成、凋亡等多个复杂的领域,其增敏作用与增加射线对肿瘤细胞的原发性损伤、减弱肿瘤细胞放射后亚致死性损伤与潜在致死性损伤的修复能力、促进肿瘤细胞凋亡以及影响信号通路有关<sup>[1]</sup>。基于此,笔者设想对大黄酸类化合物开展放射增敏作用的研究。由于大黄酸类化合物的溶解性不好,同时为了增加药物对肿瘤细胞的亲和性,本研究设计合成大黄酚缬氨酸,通过体外试验研究表明,其对Hela细胞具有较好的放射增敏作用。

蒽醌类化合物具有一个三环共平面结构,这种结构特点使其能插到DNA特定的碱基对中,形成DNA交叉连接,造成DNA损伤。同时由于蒽醌类化合物分子中含有共轭羰基,具有亲电子性,能够转移受电离辐射损伤的生物靶分子上的电子,而使靶分子的损伤固定下来,从而具有放射增敏作用。另外也有研究表明,蒽醌类化合物可以通过影响HIF-1 $\alpha$ 基因达到放射增敏的作用<sup>[13]</sup>,也可以通过抑制DNA-PKcs<sup>[14]</sup>, ATM (Ataxia-telangiectasia mutant) 基因<sup>[15]</sup>抑制DNA损伤的修复,发挥放射增敏作用。大黄酚缬氨酸类化合物是通过哪种途径

发挥的放射增敏作用还有待进一步的研究。

### 参考文献

- [1] 赵维勇.放射治疗增敏的研究现状[J].临床肿瘤学杂志, 2012,17(7):655.
- [2] 江曼,钱晓萍,刘宝瑞.恶性肿瘤放射增敏剂研究进展[J].现代肿瘤医学,2014,22(1):226.
- [3] Wardman P. Chemical radiosensitizers for use in radiotherapy[J]. *J Clin Oncol*, 2007, 19(6): 397.
- [4] 李宁,周晓靓,施培基,等.放射增敏剂的研究进展[J].中国药房,2011,22(13):1 223.
- [5] 宋梦姣,刘宏,申玉莉.黄酮类放射增敏剂的研究进展[J].中国医院药学杂志,2013,33(12):997.
- [6] 丛霄霞,丁库克,张新.中药对宫颈癌Hela细胞放射增敏作用的实验研究进展[J].中国肿瘤,2012,21(4):289.
- [7] 刘少兵,李明,盘玉飞,等.甘氨酸双唑钠(CMNa)对中晚期鼻咽癌放射治疗的增敏作用[J].现代肿瘤医学,2010,18(11):2 137.
- [8] 温本,杨志华,颜劲,等.多西紫杉醇对鼻咽癌放疗增敏作用的临床观察[J].肿瘤药学,2014,4(2):135.
- [9] 李瑞峰,杨福军,吕丽娟,等.大黄素型羟基蒽醌类化合物对宫颈癌HeLa细胞放射敏感性的影响[J].中国药房,2011,22(15):1 353.
- [10] 郑合勇,胡建达,郑志宏,等.大黄素可能通过抑制Akt信号通路诱导HL-60细胞凋亡[J].药学学报,2007,42(11):1 142.
- [11] Huang ZW, Chen GC, Shi P. Emodin induced apoptosis in human breast cancer BCap-37 cells through the mitochondrial signaling pathway[J]. *Arch Pharm Res*, 2008, 31(6):742.
- [12] Jen-chung Ko, Ying-Jhen Su, Szu-Ting Lin, et al. Suppression of ERCC1 and Rad51 expression through ERK1/2 inactivation is essential in emodin-mediated cytotoxicity in human non-small cell lung cancer cells[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(4):655.
- [13] 罗艳,侯华新,黎丹戎,等.广西何首乌GXHSAQ I在鼻咽癌细胞放射增敏过程中对基因HIF-1 $\alpha$ 的影响[J].广西医科大学学报,2007,24(3):331.
- [14] 刘瑛,侯华新,黎丹戎,等.大黄素对乏氧鼻咽癌细胞的放射增敏性与DNA修复基因的关系[J].中国药理学通报,2009,25(3):348.
- [15] 罗艳,侯华新,黎丹戎,等.广西何首乌GXHSAQ I对鼻咽癌细胞的放射增敏作用[J].中华放射医学与防护杂志,2007,27(5):460.

(收稿日期:2014-10-31 修回日期:2015-01-06)

(编辑:张 静)