

DM 协同放疗抑制人胃癌细胞增殖的实验研究

殷海涛^{1,2}, 王彩莲¹, 刘宝瑞^{3*}

(1. 东南大学附属中大医院, 江苏 南京 210009; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏 南京 210046; 3. 南京大学医学院附属鼓楼医院, 江苏 南京 210008)

摘要:目的 观察连翘中分离所得三萜类化合物达玛-24-烯-3 β -乙酰氧基-20S-醇(Dammar-24-ene-3 β -acetate-20S-ol, DM)对人低分化胃癌细胞 BGC-823 的增殖抑制作用及 DM 的放疗增敏作用。方法 流式细胞仪检测不同浓度 DM 液对 BGC-823 细胞周期、凋亡的影响;克隆形成法测定细胞存活分数;计算各项放射学参数 D₀、Dq、N 及放疗增敏比。结果 DM 可以诱导 BGC-823 细胞凋亡,引起细胞周期中 G₁ 期比例增高,而 S 期比例降低。25 μ g/mL DM 液作用 BGC-823 细胞 48 h 显示出有放疗增敏作用,放疗增敏比达 1.97。结论 DM 可以引起 BGC-823 细胞凋亡,DM 有放疗增敏作用。

关键词:连翘;达玛-24-烯-3 β -乙酰氧基-20S-醇;放射治疗;胃癌

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2011)04-0355-03

Experimental Study on the Inhibition of DM Accompanied with Radiotherapy for Proliferation of Human Gastric Cancer Cells YIN Hai-tao^{1,2}, WANG Cai-lian¹, LIU Bao-rui^{3*}

(1. Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing, 210009, China; 2. The First Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210046, China; 3. Nanjing Drum Tower Hospital Affiliated to Nanjing University Medical School, 210008, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To observe the inhibition of Dammar-24-ene-3 β -acetate-20S-ol (DM) obtained from *Fructus Forsythiae* through separation for the proliferation of human poor differentiated gastric cancer cells BGC-823 as well as DM's radio therapeutic sensitization. **METHODS** The effects of DM solutions of different concentrations on BGC-823 cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. Clonogenic assay was applied for cellular survival fraction. Radiological indexes including D₀, Dq, N and enhanced sensitivity rate were calculated. **RESULTS** DM induced the apoptosis of BGC-823, increased the ratio of G₁ period, but reduced the ratio of S period. 25 μ g/mL DM solution acting on BGC-823 for 48 h showed enhanced sensitivity after radiotherapy with the rate of 1.97. **CONCLUSION** DM can induce BGC-823's apoptosis and is of radiation-sensitivity enhancing effect.

KEY WORDS: *Fructus Forsythiae*; Dammar-24-ene-3 β -acetate-20S-ol; radiotherapy; gastric cancer

三萜类化合物是最近 3 年来备受瞩目的从中药(植物药)中分离获得的、具有抗肿瘤活性和巨大应用潜力的一类新的单体化合物。前期研究中我们首次从连翘中分离提取了三萜类化合物达玛-24-烯-3 β -乙酰氧基-20S-醇(Dammar-24-ene-3 β -acetate-20S-ol, DM), 并发现 DM 与紫杉醇、多西紫杉醇具有明显的协同效应^[1]。在此工作基础上,我们进一步探讨了 DM 对胃癌细胞株放疗的增敏作用。

1 材料

连翘购自南京市同仁药房;RPMI-1640 培养液(GIBCO 公司产品);二甲基亚砜(DMSO, 上海凌峰公司产品,分析纯);新生牛血清(兰州明海生物有限公司);Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(南京凯基生物公司产品)。细胞培养箱(SANYO, 日本);流式细胞仪(BD FACS Canton, BD, 美国);电子天平(Adventure, 美国);恒温水浴箱(上海精宏实验设备有限公司);超净工

收稿日期:2011-03-18;修稿日期:2011-04-21

基金项目:南京市医学科技发展基金(YKK09097)

作者简介:殷海涛(1977-),男,江苏如皋人,东南大学附属中大医院副主任医师,南京中医药大学 2010 级博士研究生。*通信作者:025-83106666

作台(苏州净化设备厂);微量振荡器(ZW-A型,江苏金坛荣华仪器制造公司)。

2 方法与结果

2.1 连翘三萜类化合物的分离

连翘果实粉碎呈粉末状,8倍量95%乙醇浸提3次,乙醇提取物挥干得浸膏采用水和石油醚、乙酸乙酯分步萃取的方法,获得连翘乙酸乙酯提取物,干燥后上硅胶柱经石油醚、乙酸乙酯混合溶液(分别为8:1和10:1)分次洗脱,收集洗脱液,旋转蒸发仪旋干,真空干燥箱40℃过夜,粉末状保存。

2.2 细胞培养与传代

人低分化胃癌细胞BGC-823购自于上海细胞生物所,为本实验室常规保存的细胞株。传代、培养于含15%小牛血清的RPMI-1640培养液中,同时加入100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素,在37℃、5%CO₂培养箱中培养。取对数生长期的细胞进行实验。

2.3 Annexin-V/PI染色流式细胞术测定细胞的凋亡率

以10⁶ mL⁻¹的细胞密度2 mL接种培养瓶中,待细胞贴壁后,将DM溶液按照终浓度分为1.57、3.13、6.25、12.5、25、50 μg/mL 6组,各组分别加2 mL到培养瓶中,每个浓度培养5瓶。24 h或48 h后,消化、收集经药物作用的细胞,离心2次,PBS液洗涤2次,4℃乙醇固定过夜。上机测定前,离心去乙醇,用PBS液洗涤1次,过滤后用PBS液悬浮细胞制成单细胞悬液,加入RNA酶、PI染色液,作用30 min后,按照公司的Annexin V-FITC kit的说明书进行操作,流式细胞仪检测细胞凋亡和周期。

2.4 照射处理及集落形成实验

用6 MV X线对接种贴壁后的细胞进行照

射,照射剂量取0、1、2、3、4、6 Gy 6个剂量点,分单纯放疗组和联合放疗组。联合放疗组在放疗的同时按25 μg/mL终浓度加DM溶液2 mL,接种细胞数较单纯放疗组适当增多,且随照射剂量的增加而增多。作用48 h后,PBS洗涤以除去DM液,孵箱中继续静置培养10~14 d后终止培养。弃去培养基,用PBS小心浸洗2次,纯甲醇固定15 min。弃去固定液,加适量Gimsa应用液(1:9 PBS稀释)染色20 min。然后流水缓慢洗去染色液,空气干燥后于显微镜下计数>50个细胞数的克隆数,以0 Gy组集落形成率作为对照,计算出各剂量组的细胞存活分数。公式如下:

$$\text{细胞存活分数} = \frac{\text{某剂量的集落形成率}}{\text{未照射组集落形成率}} \times 100\%$$

运用sigmaplot软件得出细胞存活曲线的D₀与N值,D_q=D₀×ln(N)。

2.5 统计学方法

采用SPSS 11.5统计学软件,多组间均数比较用方差分析。P<0.05为差异有统计学意义。

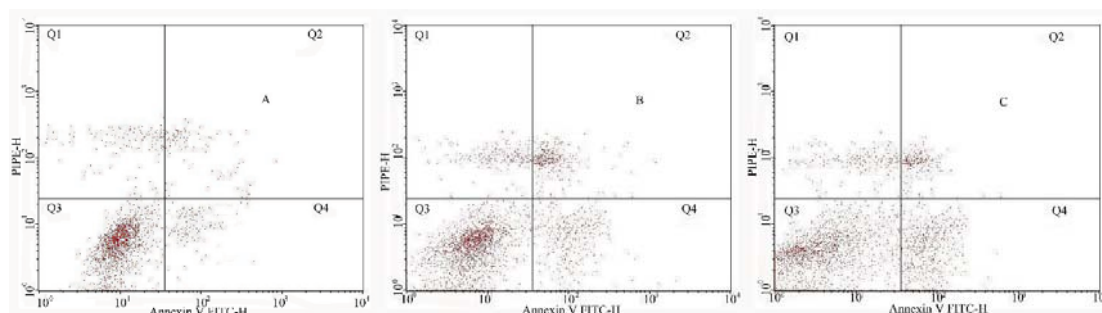
2.6 结果

2.6.1 细胞凋亡

24 h时,不同DM浓度作用的BGC-823细胞凋亡率均无统计学差异。48 h时,6.25、12.5、25、50 μg/mL组的细胞凋亡率比1.57、3.13 μg/mL组高(P<0.05),12.5、25、50 μg/mL组的细胞凋亡率比6.25 μg/mL组高(P<0.05)。见图1、表1。

2.6.2 细胞周期

DM可以引起BGC-823细胞周期的重新分布,增加G₁期细胞的比例,减少S期细胞的比例,且随着作用时间的延长和浓度的增加,这种趋势更明显。见图2。



注:A. DM 3.13 μg/mL; B. DM 12.5 μg/mL; C. DM 50 μg/mL

图1 DM诱导BGC-823细胞凋亡

表1 不同时间、药物浓度作用的 BGC-823 细胞凋亡率($\bar{x} \pm s, \%$)

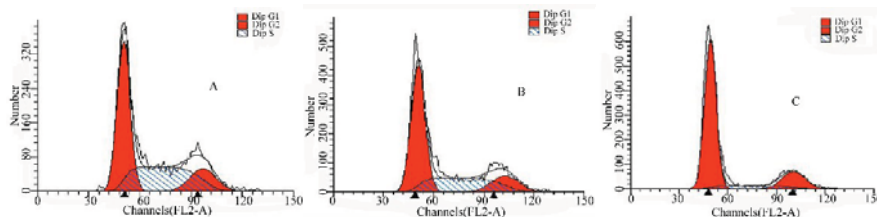
时间	1.57 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	3.13 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	12.5 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$
24 h	8.36 \pm 0.42	8.59 \pm 0.86	10.07 \pm 0.43	9.98 \pm 0.63	10.12 \pm 0.54	10.24 \pm 1.32
48 h	12.52 \pm 1.38	14.38 \pm 2.53	28.08 \pm 3.09*	45.87 \pm 4.91 Δ *	48.34 \pm 3.78 Δ *	49.38 \pm 5.52 Δ *

注:与 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较, * $P < 0.05$; 与 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.6.3 单纯放疗和联合放疗细胞存活分数比较

DM 联合放疗组细胞存活分数较单纯放疗组低($P < 0.05$), 见表 2。单纯放疗组 D_0 值 3.409、N 值 1.570、 D_q 值 1.537; DM 联合放疗组 D_0 值

2.988、N 值 1.298、 D_q 值 0.780, DM 对 BGC-823 细胞具有放射增敏作用, 放射增敏比(单纯放疗组 D_q 与 DM 联合放疗组 D_q 之比)为 1.97。



注: A. DM 3.13 $\mu\text{g}/\text{mL}$; B. DM 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C. DM 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$

图2 DM对BGC-823细胞周期阻滞作用

表2 不同放疗剂量照射 BGC-823 细胞的存活分数

照射剂量/Gy	单纯放疗/%	DM 联合放疗/%
0	97.47 \pm 2.18	94.84 \pm 3.23
1	88.26 \pm 3.24	78.57 \pm 2.48
2	76.95 \pm 2.32	65.63 \pm 3.08*
3	54.56 \pm 1.98	43.49 \pm 4.04*
4	41.14 \pm 2.37	31.34 \pm 2.79*
6	29.45 \pm 1.67	18.53 \pm 1.72*

注:与单纯放疗组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

胃癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,死亡率居我国恶性肿瘤之首。化放疗是目前治疗胃癌的重要手段,但疗效并不理想,寻找新的低毒有效的药物及新的治疗策略势在必行。连翘为木犀科植物连翘(*Forsythia suspense* (Thunb.) Vahl)的干燥果实。绝大多数连翘单体化合物的功能研究均集中在抗炎、抗病毒等方面^[2],已有部分研究涉足于抗肿瘤领域,并发现连翘的提取物具有较好的抗肿瘤活性^[3-4]。

实验发现 DM 可以引起细胞凋亡和细胞周期的阻滞,且细胞凋亡和 G_1 期抑制随着时间的延长、药物浓度的增加而更加明显。这些结论符合三萜类化合物的抗肿瘤机制。由于 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DM 液显示出较高的细胞凋亡率,故选用该浓度作为放疗增敏浓度。放疗联合应用 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DM 液,一是使细胞存活曲线的 D_0 值从单纯放疗

组的 3.409 Gy 降至 2.988 Gy,直接增加细胞对放射线的敏感性, D_0 为细胞生存曲线斜率的倒数,它反映细胞在相对高剂量区对射线的敏感性, D_0 值愈大,细胞对放射愈抗拒;二是使细胞存活曲线的肩区变窄, D_q 值从单纯放疗组的 1.537 Gy 降至 0.78 Gy, D_q 值表明细胞亚致死性损伤修复能力的大小,本实验中联合放疗组 D_q 值明显降低,表明细胞对放射线所致的亚致死性损伤修复能力减弱,提示 DM 液对 BGC-823 细胞具有放射增敏作用。

参考文献:

[1]禹立霞,谢丽,魏嘉,等.6种中药提取物对胃癌细胞株细胞毒作用及多西紫杉醇增敏作用的研究[J].医学研究生学报,2010,23(9):962-966.
 [2]Kang HS, Lee JY, Kim CJ. Anti-inflammatory activity of arctigenin from Forsythiae Fructus[J]. J Ethnopharmacol,2008,116(2):305-312.
 [3]胡文静,钱晓萍,涂云霞,等.连翘乙醇提取物抗肿瘤作用的实验研究[J].南京中医药大学学报,2007,23(6):973-975.
 [4]Sun J, Liu BR, Hu WJ, et al. In vitro anticancer activity of aqueous extracts and ethanol extracts of fifteen traditional Chinese medicines on human digestive tumor cell lines[J]. Phytother Res,2007,21(11):1102-1104.

(编辑:李伟东 董宇)