

蛇葡萄素钠协同卡铂对肺癌 Lewis 细胞增殖的抑制作用

缪苗苗^{1,3*}, 张艳霞^{2,3#}, 吴勇杰³, 覃红³(1.兰州市第二人民医院, 兰州 730046; 2.甘肃中医学院科研实验中心, 兰州 730000; 3.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)19-2664-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.22

摘要 目的:研究蛇葡萄素钠(AMP-Na)协同卡铂对肺癌 Lewis 细胞增殖的抑制作用。方法:以 6.25、12.5、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na+3.125、6.25、12.5、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 卡铂培养细胞 4 h,测定细胞活力并计算抑制率与半数抑制浓度(IC_{50})。以 12.5、25、50、100 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na+12.5 $\mu\text{g/ml}$ 卡铂培养细胞 12 h,流式细胞仪检测细胞半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3(Caspase-3)表达。结果:系列质量浓度 AMP-Na 与系列质量浓度卡铂联用后对细胞生长有明显抑制作用,随质量浓度的升高,卡铂对 Lewis 细胞的 IC_{50} 逐渐降低;AMP-Na 质量浓度范围在 6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ 时,与 3.125~25 $\mu\text{g/ml}$ 卡铂联用后,对 Lewis 细胞增殖的协同抑制作用最强。AMP-Na 与卡铂联合培养细胞 12 h 后,细胞 Caspase-3 表达明显增强。结论:AMP-Na 与卡铂合用对 Lewis 细胞增殖具有协同抑制效应,其机制可能与 AMP-Na 激活细胞 Caspase-3,从而诱导细胞凋亡有关。

关键词 蛇葡萄素钠;卡铂;肺癌 Lewis 细胞;半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3

Inhibitory Effects of Ampelopsin Sodium Combined with Carboplatin on the Proliferation of Lewis Cell of Lung Cancer

MIAO Miao-miao^{1,3}, ZHANG Yan-xia^{2,3}, WU Yong-jie³, QIN Hong³(1.The Second People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou 730046, China; 2.Scientific Research Center, Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 3.Institute of Pharmacology, School of Basic Medical Science, Lanzhou University/Gansu Key Laboratory of Preclinical Study for New Drugs, Lanzhou 730000, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the inhibitory effects of ampelopsin sodium (AMP-Na) combined with carboplatin on the proliferation of Lewis cell of lung cancer. **METHODS:** 6.25, 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na and 3.125, 6.25, 12.5, 25 and 50 $\mu\text{g/ml}$ carboplatin were used to culture the cells for 4 h, and the cell viability was determined and the inhibition rate and half inhibition concentration (IC_{50}) were calculated. 12.5, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ AMP-Na and 12.5 $\mu\text{g/ml}$ carboplatin were used to culture the cells for 12 h, and the flow cytometry was used to determine the expression of Caspase-3. **RESULTS:** AMP-Na with serial concentrations combined with carboplatin with serial concentrations had obvious inhibitory effects on the cell proliferation. With the increase of mass concentration, the IC_{50} of carboplatin on the Lewis cells was gradually decreased; when the AMP-Na of 6.25-50 $\mu\text{g/ml}$ was combined with carboplatin of 3.125-25 $\mu\text{g/ml}$, it showed the strongest inhibitory effects on the Lewis cell proliferation. When cells were cultured with AMP-Na and carboplatin for 24 h, the expression of Caspase-3 increased significantly. **CONCLUSIONS:** AMP-Na combined with carboplatin has synergistic inhibitory effect on the Lewis cell proliferation by a mechanism that may be related to the apoptosis induced by Caspase-3 activated by AMP-Na.

KEYWORDS Ampelopsin sodium; Carboplatin; Lewis cells of lung cancer; Caspase-3

and other inflammatory rheumatic diseases: systematic literature review and metaanalysis informing a consensus statement[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(4):583.

[9] Feldmann M, Maini SR. Role of cytokines in rheumatoid arthritis: an education in pathophysiology and therapeutics [J]. *Immunol Rev*, 2008, 223(1):7.

* 主管药师。研究方向:临床药理学。电话:0931-8361931。E-mail:pharm2005miao@126.com

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

[10] 钟丽雁,李凤珍,谢爱泽,等.类风湿关节炎中西医治疗现状及展望[J].*云南中医中药杂志*, 2008, 29(6):57.

[11] 周静,赵宁,贾红伟,等.雷公藤多苷对大鼠胶原免疫性关节炎及佐剂性关节炎黏膜免疫功能影响的对比研究[J].*中国中西医结合杂志*, 2005, 25(8):723.

[12] 肖诚,周静,贾红伟,等.雷公藤多苷对大鼠胶原免疫性关节炎黏膜免疫的影响[J].*中国中医基础医学杂志*, 2005, 11(7):499.

(收稿日期:2014-10-24 修回日期:2014-12-17)

(编辑:邹丽娟)

蛇葡萄素(Ampelopsin)是我国华南地区广泛分布的蛇葡萄属植物粤蛇葡萄或是显齿蛇葡萄的提取物^[1],是一种小分子黄酮类化合物^[2],具有多种药理活性^[3],尤其可以预防和治疗肿瘤^[4-8]。目前的研究表明,蛇葡萄素在体内外对多种肿瘤细胞的增殖具有抑制作用,提示蛇葡萄素具有广谱抗肿瘤药的潜力。蛇葡萄素钠(Ampelopsin sodium, AMP-Na)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高水溶性钠盐。AMP-Na与化疗药物卡铂联用对肺癌 Lewis 细胞的作用尚未见文献报道。细胞凋亡的发生与半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶(Caspase)家族成员中的 Caspase-3 密切相关。基于此,笔者考察 AMP-Na 单用及与卡铂合用对小鼠肺癌 Lewis 细胞生长的抑制作用及对凋亡相关基因 Caspase-3 表达的影响,探讨其抗肿瘤的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

ELX800 型酶联免疫检测仪(美国 Bio-Tek 公司);2306 型 CO₂ 培养箱、2323 型 CO₂ 培养箱(美国 Shellab 公司);Epics XL 型流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司);CX31 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);SW-CJ-IFD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);Anke TDI-5 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

AMP-Na 冻干剂(批号:051115,规格:50 mg/支,纯度:98.8%)、AMP-Na 冻干剂专用稀释液(批号:051118,规格:5 ml/支,浓度:0.1 mol/L)均购自广东泰禾医药科技有限公司;卡铂(齐鲁制药有限公司,批号:6120152DA,规格:100 mg/支);胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司,批号:050126);Z-VD-FMK、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

Lewis 细胞购自中科院上海细胞生物研究所细胞库,为兰州大学新药临床前研究重点实验室传代保种。

2 方法

2.1 细胞抑制率测定

取对数生长期细胞,制成细胞密度为 5×10^4 ml⁻¹ 的单细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,移入培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁。以 6.25、12.5、25、50、100、200 μg/ml AMP-Na, 3.125、6.25、12.5、25、50、100 μg/ml 卡铂, 6.25、12.5、25、50、100 μg/ml AMP-Na+3.125、6.25、12.5、25、50 μg/ml 卡铂培养细胞 48 h,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)。置培养箱中过夜,次日于波长 570 nm 处测定光密度(OD),计算细胞抑制率与半数抑制浓度(IC₅₀)。抑制率(%)=[(阴性对照 OD-空白对照 OD)-(受试药 OD-受试药颜色对照 OD)]/(阴性对照 OD-空白对照 OD)×100%。试验设空白对照(仅有常规培养基)、阴性对照(细胞+常规培养基)、AMP-Na 单用颜色对照、AMP-Na 与卡铂合用颜色对照。每一质量浓度重复 3 孔。

2.2 细胞 Caspase-3 表达测定

取对数生长期细胞,制成细胞密度为 5×10^4 ml⁻¹ 的单细胞悬液,接种于 96 孔培养板中,移入培养箱中培养 24 h 使细胞贴壁。以 12.5 μg/ml 卡铂、12.5、25、50、100 μg/ml AMP-Na、

12.5、25、50、100 μg/ml AMP-Na+12.5 μg/ml 卡铂培养 12 h。试验终止时收集细胞,用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次,细胞沉淀中加入 300 μl 洗涤缓冲液,然后加入 1 μl Caspase-3 抑制剂 Z-VAD-FMK,摇匀后置于 37 ℃、5% CO₂ 孵箱中孵育 30 min。以离心半径 5 cm、3 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 0.5 ml 洗涤缓冲液重悬细胞沉淀,再次离心弃上清,再以 0.5 ml 洗涤缓冲液重悬细胞沉淀。流式细胞仪检测,用 Multicycle 软件分析 Caspase-3 的表达。试验设阴性对照(细胞+常规培养基)。每一质量浓度重复 3 孔。

2.3 统计学方法

采用 Excel 2003 软件处理试验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验进行分析。IC₅₀ 用 Curve Expert 1.3 软件作曲线回归计算。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞抑制率测定结果

6.25、12.5、25、50、100、200 μg/ml AMP-Na 培养细胞 48 h 后,对细胞生长有明显抑制作用,且呈明显浓度依赖性,IC₅₀ 为 (63.06 ± 7.93) μg/ml。3.125、6.25、12.5、25、50、100 μg/ml 卡铂培养细胞 48 h 后,对细胞生长有明显抑制作用,且呈明显浓度依赖性,IC₅₀ 为 (21.56 ± 0.80) μg/ml。6.25、12.5、25、50、100 μg/ml AMP-Na+3.125、6.25、12.5、25、50 μg/ml 卡铂培养细胞 48 h 后,卡铂对细胞的 IC₅₀ 逐渐下降,作用依次增强;6.25~50 μg/ml AMP-Na+3.125~25 μg/ml 卡铂联用后,对细胞增殖的协同抑制作用最强。细胞抑制率测定结果见表 1、表 2(表 2 中 0 μg/ml 为阴性对照)。

表 1 AMP-Na、卡铂作用下细胞抑制率测定结果(48 h, $\bar{x} \pm s$, *n*=3)

Tab 1 Determination results of apoptosis rate in the treatment of AMP-Na and carboplatin (48 h, $\bar{x} \pm s$, *n*=3)

药物	质量浓度, μg/ml	抑制率, %	IC ₅₀ , μg/ml
阴性对照	0		
AMP-Na	6.25	2.83 ± 1.73	
	12.5	8.20 ± 1.68	
	25	15.18 ± 4.46*	63.06 ± 7.93
	50	42.49 ± 8.01**	
	100	74.51 ± 5.16**	
卡铂	200	91.01 ± 2.19**	
	3.125	8.80 ± 1.42	
	6.25	16.11 ± 1.53	
	12.5	30.72 ± 1.32**	21.56 ± 0.80
	25	52.66 ± 4.73**	
	50	98.21 ± 1.69**	
	100	102.56 ± 0.84**	

注:与阴性对照比较,**P*<0.05,***P*<0.01

Note: vs. negative control,**P*<0.05,***P*<0.01

3.2 细胞 Caspase-3 表达测定结果

与阴性对照比较,25、50、100 μg/ml AMP-Na 培养细胞 12 h 后,细胞 Caspase-3 表达增强;12.5、25、50、100 μg/ml AMP-Na+12.5 μg/ml 卡铂培养细胞 12 h 后,细胞 Caspase-3 表达增强,差异有统计学意义(*P*<0.01 或 *P*<0.05)。与相应质量浓度 AMP-Na 或卡铂(12.5 μg/ml)比较,12.5、25、50 μg/ml AMP-Na+12.5 μg/ml 卡铂培养细胞 12 h 后,细胞中 Caspase-3 表达增强,差异有统计学意义(*P*<0.01 或 *P*<0.05)。细胞 Caspase-3 表达测定结果见表 3。

表2 AMP-Na与卡铂联合作用下细胞抑制率测定结果(48 h, $\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Determination results of apoptosis rate in the treatment of AMP-Na combined with carboplatin (48 h, $\bar{x} \pm s, n=3$)

卡铂, $\mu\text{g/ml}$	AMP-Na不同质量浓度下的抑制率, %						IC ₅₀ , $\mu\text{g/ml}$
	0 $\mu\text{g/ml}$	6.25 $\mu\text{g/ml}$	12.5 $\mu\text{g/ml}$	25 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	
0	0	2.83 ± 1.73	8.20 ± 1.68	15.18 ± 4.46*	42.49 ± 8.01**	74.51 ± 5.16*	63.06 ± 7.93
3.125	8.80 ± 1.42	26.93 ± 6.36	33.18 ± 6.66	51.09 ± 9.98*** $\Delta\Delta$	70.18 ± 4.29*** Δ	81.44 ± 4.46***	42.43 ± 6.17
6.25	16.11 ± 1.53	44.76 ± 6.07*** $\Delta\Delta$	45.71 ± 6.27*** $\Delta\Delta$	56.38 ± 4.87*** $\Delta\Delta$	73.11 ± 3.14*** Δ	82.48 ± 4.59***	38.69 ± 5.80
12.5	30.72 ± 1.32**	49.42 ± 5.52*** $\Delta\Delta$	48.69 ± 6.50*** $\Delta\Delta$	60.94 ± 5.86*** $\Delta\Delta$	76.73 ± 3.24*** Δ	84.00 ± 5.30***	28.26 ± 2.83
25	52.66 ± 4.73**	68.49 ± 1.97*** $\Delta\Delta$	67.57 ± 3.35*** $\Delta\Delta$	77.18 ± 2.68*** $\Delta\Delta$	84.14 ± 1.29*** $\Delta\Delta$	84.29 ± 4.51***	
50	98.21 ± 1.69**	89.87 ± 3.84*** $\Delta\Delta$	95.83 ± 1.89*** $\Delta\Delta$	97.81 ± 1.43*** $\Delta\Delta$	103.04 ± 4.38*** $\Delta\Delta$	99.09 ± 0.55*** $\Delta\Delta$	
IC ₅₀ , $\mu\text{g/ml}$	21.56 ± 0.80	15.83 ± 0.97	15.08 ± 1.23	10.57 ± 2.37			

注:与阴性对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与卡铂比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与AMP-Na比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

Note: vs. negative control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. carboplatin, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; vs. AMP-Na, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

表3 细胞Caspase-3表达测定结果(12 h, $\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Determination results of Caspase-3 expression (12 h, $\bar{x} \pm s, n=3$)

药物	质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	阳性表达率, %	平均荧光强度
阴性对照	0	16.6 ± 1.62	1.45 ± 0.03
卡铂	12.5	32.23 ± 5.84	1.59 ± 0.03
AMP-Na	12.5	29.46 ± 6.54	1.81 ± 0.06
	25.0	32.37 ± 2.33*	1.86 ± 0.03*
	50.0	34.97 ± 4.07*	2.06 ± 0.11*
	100.0	83.35 ± 0.92**	2.45 ± 0.08**
卡铂+AMP-Na	12.5+12.5	75.57 ± 2.56*** Δ	2.29 ± 0.07***
	12.5+25.0	86.57 ± 1.61*** $\Delta\Delta$	2.43 ± 0.07***
	12.5+50.0	77.85 ± 2.71*** Δ	2.48 ± 0.03***
	12.5+100.0	78.00 ± 1.16***	2.52 ± 0.02***

注:与阴性对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与卡铂比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与AMP-Na比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

Note: vs. negative control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; vs. carboplatin, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; vs. AMP-Na, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

4 讨论

近年来肺癌已成为恶性肿瘤患者死亡的主要疾病,其中非小细胞肺癌(NSCLC)占肺癌发病率的80%左右,预后较差。而化疗是晚期NSCLC的主要治疗方法,以铂类药物为基础的联合化疗虽能改善晚期NSCLC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^[9]。提高疗效的关键在于推出高效低毒的新药。本研究结果表明,6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ 的AMP-Na对卡铂(3.125~25 $\mu\text{g/ml}$)抑制小鼠Lewis细胞增殖的作用具有协同效应。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,Caspase的激活是关键环节之一。Caspase家族是Fas/Apo21介导的凋亡信号转导途径的关键效应分子,通过靠近天冬氨酸残基的切割效应,使得Caspase家族成员以类似于酶原激活的方式相互激活,并形成级联放大效应。而Caspase-3是位于级联下游操纵底物酶切的重要效应因子,是目前已知与凋亡关系最密切的Caspase家族成员之一。Caspase-3通过激活DNase、酶切多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶片段化、降解细胞骨架蛋白及一些癌蛋白等机制,使细胞赖以生存的关键物质不可逆性地破坏,最终导致细胞凋亡^[10]。

本研究通过流式细胞仪检测得到,AMP-Na单用及与卡铂联合作用下细胞Caspase-3的表达明显增强,且存在浓度效应关系。由于100 $\mu\text{g/ml}$ 的AMP-Na单用对Lewis细胞的抑制率已达到74.51%,50 $\mu\text{g/ml}$ 的卡铂单用对Lewis细胞的抑制率已达到98.21%,无法判断AMP-Na对卡铂抗Lewis细胞作用的

影响。因此,AMP-Na 6.25~50 $\mu\text{g/ml}$ 与3.125~25 $\mu\text{g/ml}$ 卡铂联用对Lewis细胞增殖的协同抑制作用最强。本结果表明,AMP-Na单用及与卡铂联合作用可以活化细胞内的Caspase-3,而活化的Caspase-3能裂解DNA修复相关分子、凋亡抑制蛋白、细胞外基质蛋白及骨架蛋白等,促使细胞凋亡。此外,由于Caspase-3是多种凋亡途径共同作用的因子,其蛋白表达水平的高低决定着细胞凋亡程度^[11]。因此本研究提示,AMP-Na单用及与卡铂联合作用诱导肿瘤细胞凋亡的机制之一是通过活化细胞Caspase-3,从而促进凋亡的发生。

参考文献

- [1] 罗高琴,曾飒,刘德育.蛇葡萄素的血管生成抑制作用[J].中药材,2006,29(2):146.
- [2] 刘吉华,高山林,朱丹妮,等.蛇葡萄素的抑菌作用研究[J].中国药科大学学报,2002,33(5):86.
- [3] 何桂霞,杨伟丽,裴刚,等.二氢杨梅素抗脂质过氧化作用的研究[J].中国中药杂志,2003,28(12):1188.
- [4] 叶建涛,郑义磊,刘德育.蛇葡萄素对K562/ADR细胞耐药性的逆转作用及机制研究[J].中国中药杂志,2009,34(6):761.
- [5] 郑作文,郭成贤,唐云丽,等.蛇葡萄素对人胃癌细胞SGC-7901裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J].肿瘤防治研究,2010,37(3):284.
- [6] 郑作文,吕林艳,王小琴,等.蛇葡萄素诱导人胃癌细胞凋亡的研究[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(24):292.
- [7] 倪峰,姚欣,郭丹,等.蛇葡萄素对人前列腺癌PC3细胞增殖与凋亡的影响[J].中药药理与临床,2012,28(3):39.
- [8] 张艳霞,吴勇杰,李文广. AMP-Na协同卡铂对人肺腺癌GLC-82细胞增殖的抑制作用[J].中国药房,2015,26(4):488.
- [9] 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.
- [10] Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, et al. A Caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD[J]. Nature, 1998, 391(6662):43.
- [11] 韦星,万福生,涂硕,等.花边莲提取液对人肺癌SPC-A-1细胞凋亡相关基因survivin和Caspase-3表达的影响[J].时珍国医国药,2007,18(1):17.

(收稿日期:2015-01-17 修回日期:2015-03-12)

(编辑:张静)