

甲磺酸加贝酯对人胰腺癌BxPC-3细胞增殖及其裸鼠移植瘤生长的抑制作用

母齐鸣*, 廖波(成都三六三医院肝胆胰外科, 成都 610041)

中图分类号 R965;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)33-3090-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.33.07

摘要 目的:研究甲磺酸加贝酯(GM)对人胰腺癌BxPC-3细胞增殖及其裸鼠移植瘤生长的抑制作用。方法:采用细胞计数法检测0、0.01、0.1、0.25、0.5、1.0 mmol/L GM分别作用24、48、72 h后BxPC-3细胞的生长抑制率;流式细胞术观察0、0.25、0.5、1.0 mmol/L GM作用24 h后BxPC-3细胞的凋亡率;建立胰腺癌裸鼠移植瘤模型,随机分为实验(GM 5 mg/kg)组和对照(0.9%氯化钠溶液)组,每组7只,于接种瘤组织后1 d腹腔注射相应药物,每日2次,连续14 d,每周测量两组裸鼠肿瘤大小,连续测量6周,计算抑瘤率。结果:与未给药比较,GM在0.01、0.1 mmol/L浓度时对BxPC-3细胞的生长没有抑制作用($P>0.05$),在0.25、0.5、1.0 mmol/L浓度时对BxPC-3细胞的生长抑制率明显增加($P<0.05$),且呈剂量和时间依赖性;0.25、0.5、1.0 mmol/L GM作用后BxPC-3细胞的凋亡率分别为7%、15.2%、21.4%,明显高于未给药的2%($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与对照组比较,实验组大鼠瘤块体积在给药2周内差异无统计学意义($P>0.05$),从第3周开始明显减小($P<0.05$),GM对裸鼠移植瘤的抑瘤率为41.43%。结论:GM可明显抑制BxPC-3细胞的生长,并诱导该细胞凋亡,呈剂量和时间依赖性;可有效抑制裸鼠异体移植瘤的生长。

关键词 甲磺酸加贝酯;人胰腺癌BxPC-3细胞;生长抑制;移植瘤;裸鼠

Inhibitory Effects of Gabexate Mesylate on the Proliferation of Human Pancreatic Cancer BxPC-3 Cells and the Growth of Transplantable Tumor in Nude Rats

MU Qi-ming, LIAO Bo (Dept. of Hepatopancreatobiliary Surgery, Chengdu 363 Hospital, Chengdu 610041, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of gabexate mesylate (GM) on the proliferation of human pancreatic cancer BxPC-3 cells and the growth of transplantable tumor in nude rats. METHODS: The inhibitory rates of 0, 0.01, 0.1, 0.25, 0.5 and 1.0 mmol/L GM on the growth of BxPC-3 cells were detected by cytometry after treated for 24, 48 and 72 h, respectively. Apoptosis rates of BxPC-3 cells were detected by flow cytometry after treated with 0, 0.25, 0.5 and 1.0 mmol/L GM for 24 h. The transplantable tumor model of nude rats was established and randomly divided into trial group (GM 5 mg/kg) and control group (0.9% sodium chloride) with 7 rats in each group. A day after inoculated with tumor tissues, both groups were given relevant medicines intraperitoneally twice a day for consecutive 14 days. The size of tumor in nude rats was determined in 2 groups each week, and anti-tumor rate was calculated after consecutive 6 weeks of measurement. RESULTS: Compared with non-administration, 0.01 and 0.1 mmol/L GM had no inhibitory effect on the growth of BxPC-3 cells ($P>0.05$); the inhibitory effect of 0.25, 0.5 and 1.0 mmol/L GM on the growth of BxPC-3 cells were increased significantly ($P<0.05$), in dose-dependent and time-dependent manner. The apoptotic rates of BxPC-3 cells were 7%, 15.2% and 21.4% after treated with 0.25, 0.5, 1.0 mmol/L GM, which were significant higher than 2% of BxPC-3 cells without treatment ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with control group, there was no statistical significance in the tumor volume of rats in trial group within 2 weeks of treatment ($P>0.05$), but the tumor volume of rats decreased significantly since third week ($P<0.05$). Anti-tumor rate of GM in nude rats was 41.43%. CONCLUSIONS: GM can inhibit the growth of BxPC-3 cells and induce the apoptosis of the cells in dose-dependant and time-dependant manner. It also can inhibit the growth of transplantable tumor in nude rats.

KEY WORDS Gabexate mesylate; Human pancreatic cancer BxPC-3 cells; Growth inhibition; Transplantable tumor; Nude rats

胰腺癌是一种消化系统常见的恶性肿瘤,起病隐匿、进展快、预后差、死亡率极高^[1]。我国胰腺癌死亡率为0.000 026 2,居恶性肿瘤死因第10位^[2]。20世纪50年代,胰腺癌的总5年存活率 $<1\%$,20世纪末也只不过接近5%^[3]。手术治疗是胰腺癌目前唯一的根治性治疗手段,但手术切除率低、死亡率高。胰腺癌目前还没有特异性治疗药物,所用化疗药物均为细胞毒性药物,疗效尚不满意,患者亦难以耐受^[4]。甲磺酸加贝酯(Gabexate mesylate, GM)是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,可抑制胰蛋白酶、激肽释放酶、纤维蛋白酶溶酶、凝血酶等蛋白酶的活

性,从而制止这些酶所造成的病理生理变化。目前临床上常用于急性轻型(水肿型)胰腺炎的治疗,也可用于急性出血坏死型胰腺炎的辅助治疗。近年来有国外研究报道GM可通过多种途径抑制肿瘤的生长^[5-6],国内目前尚未见相关报道。本文拟通过研究GM对人胰腺癌BxPC-3细胞增殖及其裸鼠移植瘤生长的抑制作用,观察其对胰腺癌的影响。

1 材料

1.1 仪器

5410型二氧化碳培养箱(美国Napco公司);SW-CJ-1FD型单人单面超净工作台(苏州净化设备有限公司);细胞计数板(海门市天龙实验器材厂);FACS Vantage型流式细胞仪(美

* 主治医师。研究方向:肝胆胰外科疾病的微创治疗。电话:028-61810410。E-mail:mqm363@163.com

国伯乐公司)。

1.2 药品与试剂

注射用GM(哈尔滨誉衡药业有限公司,批号:08030115,规格:每支100 mg);胎牛血清(中国科学院成都分院生物制品研究所);胰酶(美国Sigma公司);RPMI 1640培养基(美国Invitrogen公司);Annexin V-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啉(PI)双染细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物公司);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞与动物

人胰腺癌BxPC-3细胞株(四川大学生物治疗国家重点实验室惠赠)。

BALB/c nu/nu 裸鼠,鼠龄4~6周,体质量18~22 g,均由四川大学华西医学动物中心提供,合格证编号:SCXK(川)2008-74。裸鼠饲养于屏障系统的洁净层流架内(SPF级),室内定期进行紫外照射,笼、垫料、饮水、饲料均高压灭菌消毒。室温控制在(25±1)℃,相对湿度为40%~60%。

2 方法

2.1 细胞培养

取人胰腺癌BxPC-3细胞常规培养于含10%胎牛血清、100 u/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI 1640培养液中,培养条件为37℃、5%CO₂饱和湿度。细胞单层贴壁生长至70%~80%融合时用0.25%胰酶消化传代。

2.2 细胞增殖活性检测

取处于对数生长期的BxPC-3细胞,调整细胞密度计数并稀释成1×10⁵ ml⁻¹,按每孔100 μl接种于6孔板中,于37℃、5%CO₂培养箱中培养24 h使细胞贴壁,用0、0.01、0.1、0.25、0.5、1.0 mmol/L的GM作用于细胞24、48、72 h,除未给药的作为空白对照组外,其余给药的作为不同的试验组。药物作用结束时用细胞计数板计数,计算细胞生长抑制率(Inhibition rate, IR)=(1-试验组的细胞数/空白对照组的细胞数)×100%。

2.3 细胞凋亡检测

用0、0.25、0.5、1.0 mmol/L的GM处理细胞24 h后,用4℃预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,0.25%胰酶消化,1 000 r/min离心5 min,按试剂盒说明用500 μl结合缓冲液重悬细胞,调节各组细胞浓度为1×10⁶ ml⁻¹。取100 μl细胞悬液于5 ml流式管中,加入FITC 5 μl和20 μg/ml的PI溶液10 μl,混匀后避光室温孵育15 min,然后用流式细胞仪进行分析,检测细胞数,计算凋亡率。激发波长488 nm,发射波长530 nm,Cell quest 软件分析处于各生长期细胞数。

2.4 人胰腺癌裸鼠移植瘤实验

取对数生长期的BxPC-3细胞,移除培养基,用PBS洗2次,加入0.25%胰酶消化2 min,用不含小牛血清的RPMI 1640培养基终止消化,制备成细胞悬液接种于裸鼠左腋窝皮下,1个月后可扪及肿瘤,待肿瘤生长至直径约1.5 cm时,无菌条件下剥除瘤体,切成约1.0 mm³的瘤块,分别种植于另一批裸鼠背部皮下,随机分为实验组和对照组,每组7只。裸鼠饮用水及饲料均经无菌消毒处理,饲养环境为层流环境,12 h昼夜交替。人胰腺癌瘤块接种后每日定时观察裸鼠饮食、精神状况以及肿瘤生长情况。实验组于接种后1 d开始,每只裸鼠腹腔注射GM 5 mg/kg(临床常用剂量换算),每日2次,连续14 d;对照组裸鼠腹腔注射等量的0.9%氯化钠溶液(生理盐水)。每周记录两组裸鼠移植瘤的长径(a)、短径(b)以判断肿

瘤生长情况,实验结束时(接种瘤块后6周)处死全部裸鼠,再次测量两组裸鼠移植瘤的a、b。计算瘤体积(V)^[7]=1/2ab²,抑瘤率=(对照组瘤体积-实验组瘤体积)/对照组瘤体积×100%。

2.5 统计学方法

细胞抑制率通过人工细胞计数并人工计算得到,细胞凋亡率由Cell quest 软件分析处于各生长期细胞数自动生成。肿瘤体积采用均数±标准差表示。应用SPSS 15.0进行方差分析,两两比较采用配对t检验,肿瘤体积组间比较采用单因素方差分析,α=0.05。P<0.05为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞增殖活性比较

与空白对照组比较,GM在0.01、0.1 mmol/L浓度时作用不同时间对BxPC-3细胞的生长均无抑制作用(P>0.05);在0.25、0.5、1.0 mmol/L浓度时对BxPC-3细胞的生长抑制率明显增加(P<0.05),且呈剂量和时间依赖性,结果见表1(N/A:为负值,即实验组细胞数多于对照组)。

表1 不同浓度GM作用不同时间后BxPC-3细胞生长抑制率比较(n=4)

Tab 1 Effects of different concentrations of GM on the proliferation of BxPC-3 cells after treated for different time(n=4)

作用时间, h	GM浓度, mmol/L				
	0.01	0.1	0.25	0.5	1.0
24	1.21%	N/A	20.59%	44.12%	76.47%
48	12.15%	8.94%	51.56%	64.21%	84.82%
72	6.33%	N/A	65.00%	77.69%	91.03%

3.2 细胞凋亡率比较

0.25、0.5、1.0 mmol/L GM作用24 h后BxPC-3细胞的凋亡率分别为7%、15.2%、21.4%,明显高于未给药的2%(P<0.05或P<0.01),且呈剂量依赖性。不同浓度GM作用24 h后BxPC-3细胞的散点图见图1。

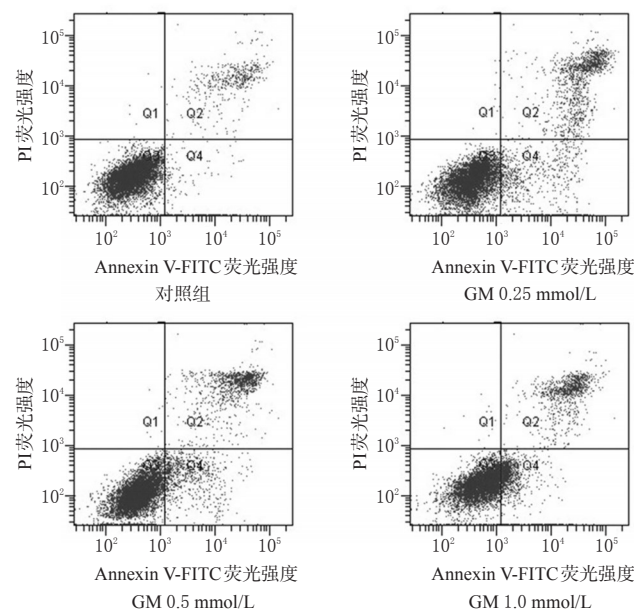


图1 不同浓度GM作用24 h后BxPC-3细胞的流式细胞图
Fig 1 Flow cytometry graph of BxPC-3 cells after treated with different concentrations of GM for 24 h

3.3 GM对裸鼠移植瘤肿瘤生长的影响

两组裸鼠均有皮下移植瘤生长,瘤体多数呈椭圆形或近

圆形,表面不规则。开始给药2周内两组裸鼠瘤块体积间差异无统计学意义($P>0.05$);从第3周开始停止给药后,对照组肿瘤生长速度明显高于实验组($P<0.05$);实验结束时(接种后6周),对照组裸鼠瘤体积为($6\ 958\pm 869$) mm^3 ,实验组裸鼠瘤体积为($4\ 075\pm 533$) mm^3 ,抑瘤率为41.43%,两组裸鼠瘤体积间差异有统计学意义($P<0.05$)。两组裸鼠移植瘤的照片见图2,移植瘤的体积-时间曲线见图3。



图2 两组裸鼠移植瘤的照片

Fig 2 Photograph of transplantable tumor of nude rats in 2 groups

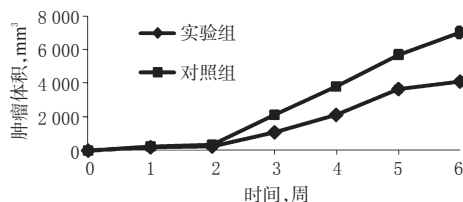


图3 两组裸鼠移植瘤的体积-时间曲线

Fig 3 Volume-time curves of transplantable tumor of nude rats in 2 groups

4 讨论

药物治疗是胰腺癌治疗的一个重要辅助手段,但在过去很长的时间里,临床医学界并不认为以化疗为主的非手术治疗比支持治疗好。直到1983年Andrén S等^[8]发表的前瞻性报告证实5-FU化疗较支持治疗可以延长患者的生存期,化疗才逐渐被接受为治疗胰腺癌的一种选择。但目前尚无标准的胰腺癌非手术治疗方案,也没有一种传统化疗药物对胰腺癌治疗效果非常理想。

本研究中发现,GM对体外培养的胰腺癌细胞株BxPC-3在一定药物浓度下有生长抑制作用,呈明显的时间和剂量依赖性。流式细胞术结果显示,GM作用于BxPC-3细胞可以诱导出更多的早期凋亡细胞,并且也随剂量的增加而增多。细胞增殖实验和流式细胞检测结果相吻合,说明促进细胞凋亡是GM抑制BxPC-3细胞生长的机制之一。另外,体内研究结果显示,GM可以有效抑制异体移植瘤的生长。本研究结果将为GM用于临床胰腺癌治疗提供一定的实验依据,其潜在的临床治疗意义值得重视。

参考文献

- [1] Li DH, Xie KP, Wolff R, *et al.* Pancreatic cancer[J]. *The Lancet*, 2004, 363(9 414):1 049.
- [2] 吕文超,崔云甫.胰腺癌流行病学和病因学研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2011, 19(27):2 805.
- [3] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2007[J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57(1):43.
- [4] 余亮.阻遏miR-155表达对胰腺癌SW-1990细胞株增殖和凋亡影响的实验研究[D].苏州:苏州大学,2012:1-3.
- [5] Yoon WH, Jung YJ, Kim TD, *et al.* Gabexate mesilate inhibits colon cancer growth, invasion, and metastasis by reducing matrix metalloproteinases and angiogenesis[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(13):4 517.
- [6] Uchima Y, Sawada T, Nishihara T, *et al.* Inhibition and mechanism of action of a protease inhibitor in human pancreatic cancer cells[J]. *Pancreas*, 2004, 29(4):123.
- [7] 《细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则》课题组.细胞毒类抗肿瘤药物非临床研究技术指导原则[S].2006-01.
- [8] Andrén S, Ihse I. Factors influencing survival after total pancreatectomy in patients with pancreatic cancer[J]. *Ann Surg*, 1983, 198(5):605.

(收稿日期:2013-04-08 修回日期:2013-05-14)

欢迎订阅2014年《医药导报》杂志

《医药导报》杂志系中国药理学会、华中科技大学同济医学院附属同济医院联合主办的医药专业期刊,国内外公开发行。本刊是国家科技部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),北京大学图书馆《中文核心期刊要目总览》中文核心期刊;被美国《化学文摘》(CA)、《国际药文摘》(IPA)和波兰《哥白尼索引》(IC)收录,还被万方数据库、中国学术期刊网络出版总库、中文科技期刊数据库等国内多家大型数据库收录。设有“特约稿”“药物研究”“药物与临床”“药学进展”“药物制剂与药品质量控制”“用药指南”“新药介绍”“临床药师交流园地”“药物不良反应”“药事管理”“作者·编者·读者”等栏目。读者对象是临床医师、药师、医药院校师生和医药研究所、药品检验所的科技工作者及药品监督管理、医药工商企业经营。

《医药导报》于1982年创刊,始终坚持刊物的科学性、实用性、信息性,以普及、运用、服务为宗旨,着重报道国内外医药

研究新成果、新技术、新方法,关注药物临床疗效和不良反应,指导临床合理用药,重视药品质量控制,宣传医药政策法规,在医药科研、生产、经营、使用间发挥纽带和桥梁作用。本刊网站为<http://www.yydbzz.com>或www.yydb.cn,可免费阅读和下载《医药导报》过刊文章,了解国内外最新医药动态和编辑部有关信息,并与编者互动交流。

《医药导报》杂志为月刊,每月1日出版,国内统一出版物号:CN42-1293/R,国际标准出版物号:ISSN1004-0781。2014年每期25.00元,全年300.00元(含邮资)。欢迎广大读者积极到当地邮局订阅,如错过邮局订阅时间,可随时向我刊编辑部邮订。地址:武汉市解放大道1095号同济医院《医药导报》编辑部,邮政编码:430030, E-mail: yydbzz@163.com。电话及传真:(027)83643083、83666619、83663559。邮发代号:38-173。全国各地邮局均可订阅。

《医药导报》编辑部