

鱼藤素和氟尿嘧啶对胃癌细胞株 MGC-803 的协同抗肿瘤作用

鲁露,李争光,吴昌平,吴骏,蒋敬庭

(苏州大学附属第三医院,江苏 常州 213003)

摘要: [目的] 观察鱼藤素与氟尿嘧啶联用对胃癌细胞的作用。[方法] 胃癌 MGC-803 细胞经鱼藤素、氟尿嘧啶单药及两药联合处理 48h 后,MTT 法检测其对细胞生长增殖抑制水平,采用等效图解法分析其作用;流式细胞术检测经鱼藤素处理后 MGC-803 细胞周期的变化。[结果] 鱼藤素可剂量依赖性抑制 MGC-803 细胞增殖,有 G₁ 期阻滞作用,与氟尿嘧啶联用可明显增强细胞杀伤作用。[结论] 鱼藤素与氟尿嘧啶联用可产生明显协同作用,机制为两者作用于不同细胞周期,增强了细胞对氟尿嘧啶的敏感性。

关键词: 鱼藤素;氟尿嘧啶;胃肿瘤;协同作用

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)07-0523-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.07.B005

Synergistic Antitumor Effect of Deguelin Combined with 5-Fluorouracil on Gastric Carcinoma Cell Line MGC-803

LU Lu, LI Zheng-guang, WU Chang-ping, et al.

(The Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213003, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effects of deguelin combined with 5-Fluorouracil on gastric carcinoma cells. [Methods] Human gastric carcinoma cell line MGC-803 was used in present study. The inhibition effect on cell proliferation was determined by the MTT assay 48h after treated with deguelin, 5-Fluorouracil and the combination. The results of MTT assays were analyzed by isobologram. Cell cycle distribution was determined by flow cytometry after treated with deguelin. [Results] Deguelin inhibited proliferation of MGC-803 cells in dose-dependent manner. After treated with deguelin, the cell cycle was arrested in G₁ phase. The killing effect of 5-Fluorouracil to MGC-803 cells markedly increased after combination with deguelin. [Conclusion] Combination of deguelin and 5-Fluorouracil exhibits synergistic effects on MGC-803 cells because the two drugs act on different cell cycle phase.

Subject words: deguelin; 5-Fluorouracil; gastric neoplasms; chemosensitization

近年来胃癌发病呈下降趋势,但在我国胃癌仍居肿瘤谱前列,且早期发现率低,多数患者需要术前或术后辅助化疗。氟尿嘧啶类药物是消化系统肿瘤化疗的基础药物,尤其在胃癌治疗中,多数化疗方案均由氟尿嘧啶类药物参与构成。目前,胃癌的治疗效果仍不尽人意,5 年生存率不到 30%,开发新的化疗药物是提高胃癌疗效的有效策略之一。鱼藤素是一种天然鱼藤酮类化合物,在多种肿瘤细胞和动物模型中均证实具有较强的肿瘤化学预防、抗肿瘤及化疗增敏作用^[1-5]。本研究将观察鱼藤素与氟尿嘧啶

对胃癌细胞株 MGC-803 的联合抗肿瘤作用,并探讨其作用机理,为鱼藤素的进一步研究开发及其在胃癌治疗中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

鱼藤素、二甲亚砜(DMSO)、碘化丙锭(PI)、噻唑蓝(MTT)购自 Sigma-Aldrich 公司,氟尿嘧啶购自天津金耀有限公司,RPMI 1640 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司,实验中所用其他常规试剂均为国产分析纯。

通讯作者: 李争光,主治医师,博士;苏州大学附属第三医院肿瘤中心,江苏省常州市局前街 185 号(213003); E-mail: lzg1029@gmail.com。
收稿日期: 2013-01-16; **修回日期:** 2013-03-30

1.2 细胞培养

人胃癌细胞株 MGC-803 为本实验室保藏并常规传代培养,生长于含有 10% 灭活胎牛血清、青霉素(100U/ml)和链霉素(100U/ml)的 RPMI 1640 培养基中,于 37℃、5%CO₂、饱和湿度的培养箱内培养。细胞常规每 3~4d 传代 1 次,所有实验采用对数生长期细胞。所用鱼藤素首先溶于 DMSO 作为储备液,然后稀释于 RPMI 1640 培养基中作为工作液,保证工作液 DMSO 浓度小于 0.1%。

1.3 MTT 法测定细胞活力

取对数生长期细胞,常规胰酶消化成单个细胞悬液,3×10³~5×10³ 个细胞/孔,接种于 96 孔板,于培养箱内孵育过夜后,每孔加含不同浓度鱼藤素(0~50μg/ml)和不同浓度氟尿嘧啶(0~50μg/ml)的 RPMI 1640,联合处理组鱼藤素浓度分别为 0.78μg/ml、1.56μg/ml、3.12μg/ml 与不同浓度氟尿嘧啶(0~50μg/ml)联合处理。孵育 48h 后,每孔加入 5mg/ml 的 MTT 20μl,继续孵育 4h。弃去上清后,每孔加入 150μl DMSO,室温振荡摇匀,用酶标仪于 570nm 波长测定吸光度值。按照下列公式计算药物对细胞的抑制率:抑制率(%)=[(对照组 A-实验组 A)/对照组 A]×100。根据所得抑制率计算各组 IC₅₀。

1.4 联合指数计算

采用等效图解法计算和分析鱼藤素与氟尿嘧啶联用的效果,并据此绘制协同曲线。联合指数(combination index, CI) 根据以下公式计算:CI=(D₁/D_{x1})+(D₂/D_{x2}),其中 D₁、D₂ 为两药合用产生 x 效应时两药各自所需浓度,D_{x1}、D_{x2} 为两药单独使用产生 x 效应时两药各自的浓度(本文中 x 为对 MGC-803 细胞产生 50% 抑制率)^[6,7]。若计算所得 CI < 1 则两药联合为协同作用,CI=1 为相加作用,CI>1 为拮抗作用。

1.5 细胞形态学观察

取对数生长期细胞,常规胰酶消化成单个细胞悬液,1×10⁴ 个细胞/孔,接种于 6 孔板,于培养箱内孵育过夜。细胞贴壁后,如上分别以 1.56μg/ml 鱼藤素、6.25μg/ml 氟尿嘧啶及两药联合

处理细胞 48h,70%冷乙醇固定细胞后,以 1μg/ml 的 PI 染色倒置荧光显微镜下观察,同时未处理组细胞为对照。

1.6 流式细胞术检测

取对数生长期细胞,常规胰酶消化成单个细胞悬液,1×10⁴ 个细胞/孔,接种于 6 孔板,于培养箱内孵育过夜。细胞贴壁后,以 1.56μg/ml 鱼藤素处理细胞 48h 后,0.25%胰酶消化收集细胞,70%冷乙醇固定细胞后,以 1μg/ml 的 PI 染色,以流式细胞术检测细胞周期分布,同时未处理组细胞为对照。

1.7 统计学处理

数据采用 SPSS13.0 统计软件分析,两组之间比较采用 t 检验,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞活力

MTT 实验结果显示,与未行预处理的对照组相比较,鱼藤素和氟尿嘧啶均可剂量依赖性抑制 MGC-803 细胞的增殖,其 IC₅₀ 分别为 (12.59±2.28) μg/ml 和 (26.75±3.65) μg/ml (P=0.012) (Figure 1)。与不同浓度鱼藤素(0.78μg/ml、1.56μg/ml、3.12μg/ml)联合作用后,氟尿嘧啶明显 IC₅₀ 下降,分别为 (14.6±1.34) μg/ml、(12.6±2.54) μg/ml、(9.1±0.89) μg/ml,分

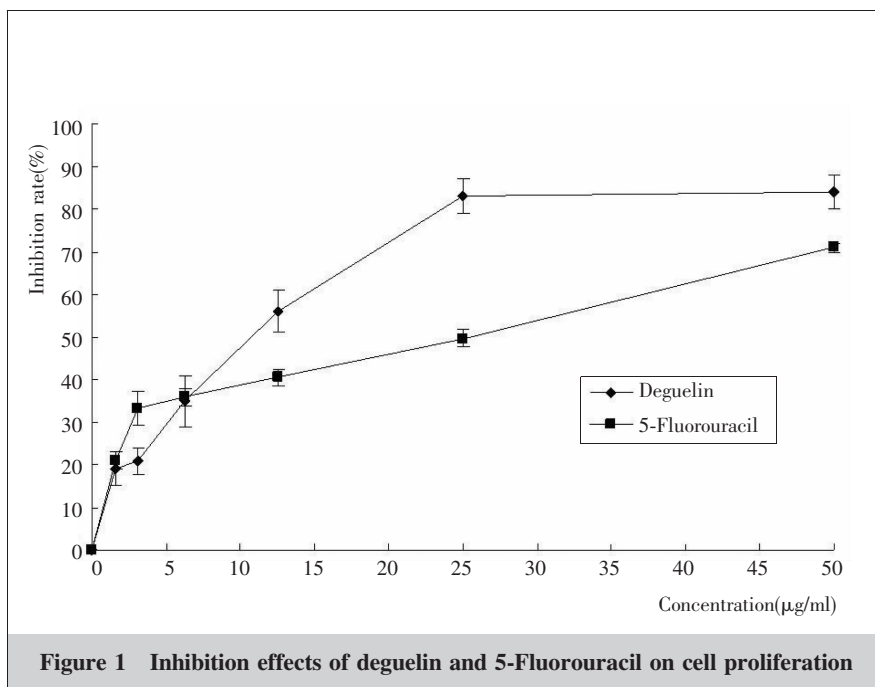


Figure 1 Inhibition effects of deguelin and 5-Fluorouracil on cell proliferation

别下降 45%、53%、66%，其下降程度与鱼藤素浓度呈剂量依赖性。

数据分析表明,在鱼藤素浓度分别为 0.78 μ g/ml、1.56 μ g/ml、3.12 μ g/ml 时,两药联合 CI 分别为 0.62、0.61、0.63,其值均<1,提示两药在所选浓度联合应用时均呈明显协同作用(Figure 2)。

2.2 细胞形态学

处理 48h 后经 PI 染色在荧光显微镜下观察,与未处理对照组相比,氟尿嘧啶单药和鱼藤素单药组细胞数量减少;两药联合组细胞数量较两单药组均明显减少,凋亡细胞数增加(Figure 3)。结果提示鱼藤素与氟尿嘧啶联合作用可明显增强对 MGC-803 细胞的凋亡诱导作用,进一步证实两药的协同作用。

2.3 细胞周期分布

MGC-803 细胞经 1.56 μ g/ml 鱼藤素处理 48h 后,检测可见其细胞总量明显减少, G_1 期细胞由 49.2% 升至 65.1%,S 期细胞由 40.1% 降至 23.9%, G_2/M 期无明显变化(Figure 4)。由此可见鱼藤素作用呈细胞周期特异性,导致 G_1 期阻滞。

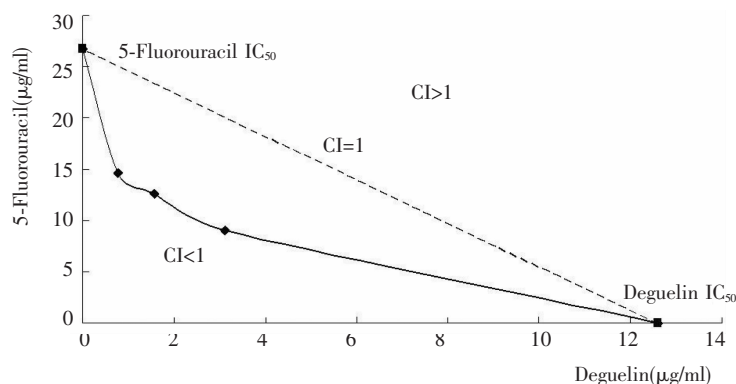
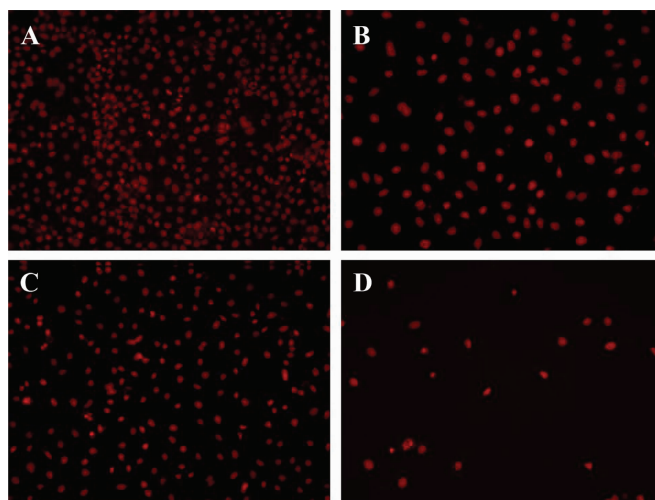
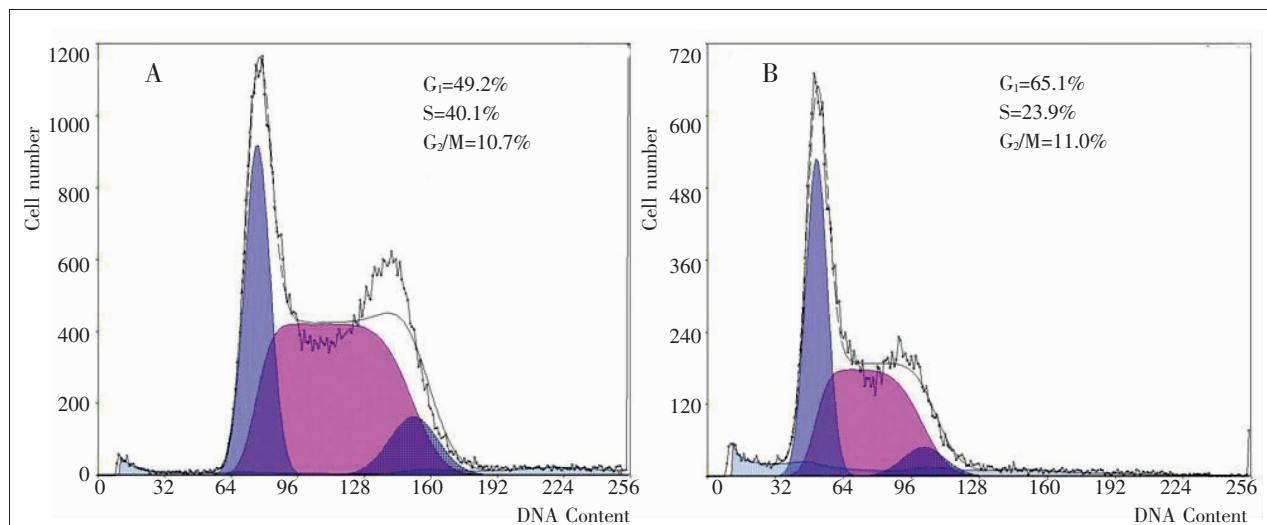


Figure 2 Analysis of the combination effect of deguelin and 5-Fluorouracil



A:Untreated group;B:Deguelin group;C:5-Fluorouracil group;D:Combination group

Figure 3 Morphology of PI staining



A:Untreated group;B:48h after treated with deguelin

Figure 4 Detection of cell cycle

3 讨论

我国为胃癌高发区,早期发现率低,导致多数胃癌患者均需要辅助化疗,但目前胃癌化疗效果仍不理想,5年生存率偏低,且近年来治疗水平无明显提高,亟需开发新的治疗策略和药物。氟尿嘧啶类药物是消化系统肿瘤治疗的基础药物之一,在胃癌的治疗过程中具有不可替代的作用,多数胃癌的化疗方案均在氟尿嘧啶类药物基础上与其他药物联合构成^[8,9]。

鱼藤素是一种天然鱼藤酮类化合物,最初被用作杀虫剂,但进一步的研究表明鱼藤素对恶性肿瘤具有较强的预防和治疗作用。本研究证实,鱼藤素可明显地抑制胃癌细胞株 MGC-803 的生长增殖,其作用呈剂量依赖性。在联合应用时,使氟尿嘧啶对 MGC-803 细胞的 IC₅₀ 明显降低。分析表明,鱼藤素与氟尿嘧啶两药联合 CI<1, 作用为协同作用,对 MGC-803 细胞的抑制和杀伤作用明显强于单药。

氟尿嘧啶在体内先转变为 5-氟-2-脱氧尿嘧啶核苷酸,后者抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶,阻断脱氧尿嘧啶核苷酸转变为脱氧胸腺嘧啶核苷酸,抑制 DNA 的生物合成,从而杀伤肿瘤细胞。氟尿嘧啶为细胞周期特异性药物,主要作用于 S 期细胞。本研究证明,鱼藤素与氟尿嘧啶作用于不同的细胞周期,鱼藤素阻滞细胞周期于 G₁ 期,两药联合应用既抑制了 G₁ 期到 S 期的转化,又抑制了 S 期到 G₂/M 期的转化,从而产生协同作用。另有研究报道鱼藤素可降低细胞 DNA 损伤修复能力^[10],推测两药协同作用也可能与此相关,其具体机制尚待进一步明确。

总之,本研究结果证实,鱼藤素与氟尿嘧啶联用可产生协同作用,明显增强对 MGC-803 细胞杀伤和抑制作用,作为一种潜在的化疗增敏剂,值得进一步研究。

参考文献:

[1] Bortul R, Tazzari PL, Billi AM, et al. Deguelin, A PI3K/

AKT inhibitor, enhances chemosensitivity of leukaemia cells with an active PI3K/AKT pathway[J]. Br J Haematol, 2005, 129 (5):677-686.

- [2] Hecht SS. Deguelin as a chemopreventive agent in mouse lung tumorigenesis induced by tobacco smoke carcinogens [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97 (22):1634-1635.
- [3] Li Z, Wu J, Wu C, et al. Deguelin, a natural rotenoid, inhibits mouse myeloma cell growth in vitro via induction of apoptosis[J]. Oncol Lett, 2012, 4 (4):677-681.
- [4] Suh YA, Kim JH, Sung MA, et al. A novel antitumor activity of deguelin targeting the insulin-like growth factor (IGF) receptor pathway via up-regulation of IGF-binding protein-3 expression in breast cancer[J]. Cancer Lett, 2013, 332(1):102-109.
- [5] Yang YL, Ji C, Bi ZG, et al. Deguelin induces both apoptosis and autophagy in cultured head and neck squamous cell carcinoma cells[J]. PLoS One, 2013, 8 (1): e54736.
- [6] Chou TC, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors [J]. Adv Enzyme Regul, 1984, 22:27-55.
- [7] Hou W, Chen L, Yang G, et al. Synergistic antitumor effects of liposomal honokiol combined with adriamycin in breast cancer models[J]. Phytother Res, 2008, 22(8):1125-1132.
- [8] Lu XL, Zou Y, Lu WD, et al. Paclitaxel liposome combined with oxaliplatin and fluorouracil chemotherapy for advanced gastric cancer[J]. Journal of Chinese Oncology, 2012, 18(7):524-526. [陆筱灵, 左云, 卢玮冬, 等. 紫杉醇脂质体联合奥沙利铂、氟尿嘧啶治疗晚期胃癌[J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(7):524-526.]
- [9] Bi YZ, Zeng DX, Jiang Z. Weekly docetaxel combined with cisplatin with 5-fluorouracil as second-line chemotherapy in the treatment of 32 cases with advanced gastric carcinoma[J]. Journal of Chinese Oncology, 2011, 17(4): 257-259. [毕延智, 曾冬香, 姜藻. 周剂量多西紫杉醇联合顺铂、氟尿嘧啶二线治疗晚期胃癌 32 例[J]. 肿瘤学杂志, 2011, 17(4):257-259.]
- [10] Ji BC, Yu CC, Yang ST, et al. Induction of DNA damage by deguelin is mediated through reducing DNA repair genes in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells[J]. Oncol Rep, 2012, 27 (4):959-964.