

甲基莲心碱对 Saos-2 细胞体外增敏作用的研究

席雅文¹,唐小卿²,包杰³,曹建国⁴(1.南华大学附一医院骨科,湖南 衡阳 421001;2.中山大学医学院生理教研室;3.中南大学湘雅医院骨科;4.南华大学肿瘤研究所)

摘要:目的 探讨甲基莲心碱(Neferine, Nef)对骨肉瘤细胞(Saos-2 cells)的体外化疗增敏作用。方法 以人骨肉瘤细胞株(Saos-2 cells)为研究对象,MTT法测定药物的细胞生长抑制率,流式细胞仪(Flow Cytometry, FCM)检测细胞凋亡。结果 Nef(5,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)分别为与阿霉素(ADM),5-氟尿嘧啶(5-Fu),顺铂(CDDP),鬼臼乙叉苷(VP16)合用,可增加它对Saos-2细胞的生长抑制率, $q > 1$ 。Nef(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)可增强不同浓度ADM诱导Saos-2细胞凋亡。结论 Nef对Saos-2细胞有化疗增敏作用。

关键词:甲基莲心碱;化疗增敏剂;凋亡

中图分类号:R285.5;R738 文献标识码:A 文章编号:1007-7693(2004)01-0004-02

Enhancement of cytotoxicity of anticancer drugs in vitro by neferine in Saos-2 cells

XI Ya-wen, TANG Xiao-qing, BAO Jie, CAO Jian-guo (Department of Orthopaedic Surgery, the First Affiliated Hospital of Nan Hua University, Hengyang 421001, China)

ABSTRACT:OBJECTIVE To study the enhancement of cytotoxicity of anticancer drugs *in vitro* by neferine (Nef) in Saos-2 cells. **METHOD**

Cytotoxicity assay was tested by MTT method, modulation of adriamycin (ADM)-induced apoptosis by Nef in Saos-2 cells was detected by Flow cytometer (FCM). **RESULTS** The inhibitory rates (IR) of Nef (5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) combined with ADM, 5-Fu, CDDP and VP16 were higher than those of these drugs used alone, and q values were more than 1. Nef (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) promoted apoptosis induced by ADM in Saos-2 cells. **CONCLUSION:** Nef increases the sensitivity of Saos-2 cell to anticancer drugs.

KEY WORDS: neferine; chemosensitizer; apoptosis

肿瘤的多药耐药(multidrug resistance, MDR)的主要机制是细胞膜P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)过度表达,P-gp为一能量依赖型药泵,能将抗癌药物从肿瘤细胞内泵出,使化疗药物不能聚积于癌细胞内,而化疗失效。钙通道阻滞剂(Calcium channel blocker, CCB)能逆转P-gp介导的MDR,维拉帕米(Verapamil, VRP)作为钙通道阻滞剂,是一种经典的化疗耐药逆转剂。但其严重的心血管不良反应限制了其在化疗中的运用。莲心碱作为一种中药单体的CCB,体外实验证明BEL-7402细胞中,对VCR的体外增敏作用有类似VRP逆转细胞的MDR作用。而中药又具有不良反应小,安全性高的优点,所以从中药中寻找化疗耐药逆转剂,为增强化疗疗效提供了一条有用的途径。我们以前的研究表明甲基莲心碱能增强化疗药物抑制人乳腺癌细胞MCF-7的增殖和诱导其凋亡的作用^[1-2],骨肉瘤是一种化疗不敏感的恶性肿瘤,甲基莲心碱(Neferine, Nef)是否能增强化疗药物对骨肉瘤细胞(Saos-2)的抑制,促进其凋亡,还没有相关报道,本研究旨在探讨甲基莲心碱对骨肉瘤细胞的体外化疗增敏作用。

1 材料与实验方法

1.1 药品与试剂

阿霉素(ADM)购自浙江海正药业有限公司,批号

020201;5-氟尿嘧啶(5-FU)购自天津氨基酸公司,批号20000430;顺铂(CDDP)购自山东齐鲁制药厂,批号0203012;鬼臼乙叉苷(VP16)购自北京制药工业研究所,批号0112006,均用0.01 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,pH7.4的PBS配成2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液,抽滤灭菌后,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冻存备用。甲基莲心碱(Nef)购自香港国威公司,用1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶解,再用0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠将溶液调至pH6.8,200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。抽滤灭菌后,4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存备用。以上药物临用时用完全培养基稀释至所用浓度。MTT(Sigma产品)临用时用PBS配成5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,碘化丙啶(PI)(Sigma产品);Rnase A(Sigma产品)。

1.2 仪器

流式细胞仪(美国BD公司,FACS420),酶联免疫仪(华东电子管厂,DG3022)。

1.3 人骨肉瘤细胞(Saos-2)由中山医科大学肿瘤所引进,培养于含10%小牛血清的DMEM中,取对数生长期细胞用于实验。

1.4 细胞毒性试验(MTT法)

取对数生长期细胞,0.5 $\times 10^5$ 个/mL接种于96孔培养板,每孔100 μL ,于37 $^{\circ}\text{C}$,5%CO₂,饱和温度条件下培养24h后,用药组每孔100 μL 的药液,对照组和调零组加

基金项目:湖南省教委科研基金资助项目(No:96155)

通讯作者:曹建国, Tel:0734-8281481, Fax:0734-8280907

100 μ L 完全培养基, 每组设 4 个平行孔, 再培养 72h 后, 每孔加 5g \cdot L⁻¹ MTT20 μ L (调零组除外), 再培养 4h, 然后吸去上清, 加 DMSO 100 μ L \cdot L⁻¹ 孔, 待 MTT 完全溶解后, 用酶联免疫仪于 570nm 波长下调零组调零校正后测吸光度 A, 按下列公式计算药物对细胞的生长抑制率 (IR): IR = (1 - A_{用药用} / A_{对照组}) \times 100%。合并用药效果根据文献^[3]提供的金氏公式求 q 值进行判断: q = Ea + b / Ea + Eb - Ea \times Eb (其中 Ea + b 为两药合用的抑制率, Ea 和 Eb 为各药单用时的抑制率), 当 q < 1 时表示两药合用有拮抗作用, q > 1 时, 表示有增效作用。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期细胞, 弃去旧培养基, 给药组换上含一定药物浓度的培养基, 对照组换上等量完全培养基。培养 24h 后, 收集细胞, 用 75% 乙醇 4 $^{\circ}$ C 固定过夜, PBS 洗一遍, 加 PI 荧光染液 (5 μ g \cdot mL⁻¹ PI, 20 μ g \cdot mL⁻¹ RNase A) 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中放置 45 min, 300 目尼龙网滤过, 上流式细胞仪检测。计数 10 000 个细胞, 以亚 G1 峰细胞为凋亡细胞, 计算凋亡率。

2 结果

2.1 Nef 的细胞毒性效应

1, 5, 10 μ mol \cdot L⁻¹ Nef 对 Saos-2 的抑制率分别为 3.91%, 4.77%, 10.68%, 无明显细胞毒作用。

2.2 Nef 对化疗药物细胞毒性的影响

用 MTT 法测定不同浓度的 Nef 分别与 ADM, 5-Fu, VPI6, CDDP 合用时对 Saos-2 细胞的杀伤作用, 发现 5, 10 μ mol \cdot L⁻¹ 的 Nef 均可不同程度地增强化疗药物对 Saos-2 的杀伤作用, q > 1, 表明 Nef 具有化疗增效作用。见表 1。

表 1 Nef 合用抗肿瘤药物对 Saos-2 细胞生长的抑制作用

Tab 1 The influence of Nef on inhibitory effect on Saos-2 cell growth induced by anticancer drugs

药物处理 (μ g \cdot mL ⁻¹)	单用 (IR%)	合用 5 μ mol \cdot L ⁻¹ Nef IR (%)	q	合用 10 μ mol \cdot L ⁻¹ Nef IR (%)	q
ADM					
0.04	29.49	43.00	1.12	46.94	1.13
0.01	13.27	25.58	1.39	42.95	1.18
0.004	9.51	16.96	1.43	34.91	1.89
VPI6					
0.3	52.20	62.21	1.12	56.78	1.15
0.1	19.16	48.62	1.96	54.91	1.98
0.03	11.44	42.90	2.43	47.19	2.27
CDDP					
0.1	61.33	73.89	1.18	81.90	1.23
0.03	32.03	61.32	1.63	63.70	1.64
5-Fu					
1	59.2	76.82	1.23	80.66	1.27
0.25	19.21	73.48	2.97	76.79	2.73
0.1	8.35	50.1	3.75	70.14	3.35

2.3 Nef 对 ADM 诱导 Saos-2 凋亡的影响

Saos-2 细胞自然凋亡率 4.86%。10 μ mol \cdot L⁻¹ Nef 与细

胞作用 24h 后, 凋亡率 7.91%。经 χ^2 检验, P > 0.05 在显著性差异, 说明 Nef 并不显著诱导细胞凋亡。不同浓度的 AND 能诱导 Saos-2 凋亡, 但与 10 μ mol \cdot L⁻¹ Nef 同用时, 其凋亡率有显著增加。见表 2。

表 2 Nef 对不同浓度的 ADM 诱导 Saos-2 凋亡的影响

Tab 2 The effect of Nef on Saos-2 cell apoptosis induced by different concentration of ADM

ADM (mg \cdot mL ⁻¹)	Control	Apoptosis 合用 10 μ mol \cdot L ⁻¹ Nef
0.002	11.0	19.1 ¹⁾
0.008	17.8	29.9 ¹⁾
0.02	21.7	35.6 ¹⁾

注: 与对照组相比, ¹⁾ P < 0.05

Note: ¹⁾ P < 0.05 Vs control

3 讨论

骨肉瘤细胞对化疗不敏感, 影响了治疗效果而且化疗又有不同程度的不良反应, 即药物在杀伤肿瘤细胞的同时, 对某些正常组织有一定的损害, 寻找化疗增效药物变得尤为重要。因而我们试图寻找一种化疗增敏剂用于骨肉瘤的治疗以增强化疗药物对肿瘤细胞的杀伤作用并降低它对正常细胞的毒性。甲基莲心碱系睡莲科植物莲的成熟种子绿色胚芽提取的一种双苄基异喹啉类生物碱, 最近我们发现甲基莲心碱能增强阿霉素抑制人乳腺癌细胞增殖, 表明甲基莲心碱是一种化学增敏剂^[1-2]。叶祖光等^[4]也发现甲基莲心碱有增强长春新碱诱导 MCF-7 细胞凋亡的作用。

本实验结果显示无明显不良反应的 Nef 使 ADM, 5-Fu, CDDP, VPI6 对 Saos-2 细胞不良反应增强, 表明 Nef 对 Saos-2 细胞有化疗增效作用。诱导凋亡可能是不同作用机制的抗癌药发挥作用的共同途径^[5]。我们通过流式细胞仪检测 Nef 对 ADM 诱导细胞凋亡的影响, 结果表明 Nef 并不诱导 Saos-2 细胞凋亡, 但可显著增强 ADM 诱导 Saos-2 细胞凋亡作用。提示增强抗癌药物诱导细胞凋亡可能是 Nef 增敏机制之一。

参考文献

- [1] 唐小卿, 曹建国. 甲基莲心碱对 MCF-7 细胞体外化疗增敏作用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2001, 18(5): 345.
- [2] 唐小卿, 曹建国, 廖端芳. 甲基莲心碱对耐阿霉素人乳腺癌细胞多药耐药性的逆转[J]. 癌症, 2001, 20(8): 831.
- [3] Jin ZJ. Addition in drug combination[J]. Acta Pharmacol Sin, 1980, 1: 70.
- [4] 叶祖光, 王金华, 孙爱续, 等. 粉防己碱、甲基莲心碱和蝙蝠葛碱增强长春新碱诱导人乳腺癌 MCF-7 多药耐药细胞凋亡[J]. 药学报, 2001, 36(2): 96.
- [5] Hickman JA. Apoptosis induced by anticancer drug[J]. Cancer Metastasis Rev, 1992, 11(1): 121.

收稿日期: 2002-07-15