

二去水卫矛醇对人肺癌细胞株体外抗癌活性及机制探讨

苏桂玉¹, 刘华钢^{2*}, 黄慧学¹, 彭晓丽¹, 梁乔芳¹, 徐红娟¹, 王小洁²

(1. 广西中医药大学药学院, 南宁 530299; 2. 广西医科大学药学院, 南宁 530021)

[摘要] 目的:研究二去水卫矛醇(DAG)对人肺癌细胞株的体外增殖及凋亡的影响。方法:Cell Counting Kit-8(CCK-8)法检测 DAG 对 11 株人肺癌细胞株 Calu-1, NCI-H1650, NCI-H358, NCI-H1299, HCC827, PC-9, A549, NCI-H661, NCI-H292, 95-D 和 NCI-H446 的体外增殖抑制率,筛选出抑制率相对较高且生长状态良好的细胞;应用台盼蓝拒染法检测 DAG 作用后的细胞存活率,透射电镜观察细胞凋亡亚显微结构的改变,实时定量荧光 PCR(Real-time PCR)检测 DAG 对细胞内 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)和半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)mRNA 表达水平的影响。结果:DAG 对 11 株肺癌细胞株均有明显的抑制作用,并呈现出良好的浓度-效应相关性,与空白组比较,随着浓度的增加,细胞的增殖抑制率上升($P < 0.01$);台盼蓝拒染实验显示随着药物浓度的增加,蓝染细胞数量增多,即死亡或细胞膜遭到破坏的细胞增多;药物作用 48 h 以后,透射电镜下可见凋亡细胞整体圆缩,微绒毛脱落,核固缩、边集,核内出现高电子密度的异染色质,浓缩成块状,边集于核膜,线粒体肿胀,细胞内出现空泡样变;Real-time PCR 结果显示,促凋亡基因 Bax 表达上调,抗凋亡基因 Bcl-2 表达下调, Caspase-3 被激活。结论:DAG 能够抑制肺癌细胞的增殖,并诱导其凋亡,其作用机制可能与上调 Bax, 下调 Bcl-2, 激活 Caspase-3 有关。

[关键词] 二去水卫矛醇; 人肺癌细胞; 抗癌活性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)10-0122-06

[doi] 10.13422/j.cnki.sjfx.2016100122

In Vitro Anticancer Activity and Mechanisms of 1, 2;5, 6-Dianhydrogalactitol on Human Lung Cancer Cell Lines

SU Gui-yu¹, LIU Hua-gang^{2*}, HUANG Hui-xue¹, PENG Xiao-li¹,

LIANG Qiao-fang¹, XU Hong-juan¹, WANG Xiao-jie²

(1. School of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530299, China;

2. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of 1, 2;5, 6-dianhydrogalactitol (DAG) *in vitro* proliferation and apoptosis of human lung cancer cell lines. **Method:** Cell counting Kit-8 (CCK-8) method was used to measure the inhibition rate of DAG *in vitro* proliferation of 11 kinds of human lung cancer cells: Calu-1, NCI-H1650, NCI-H358, NCI-H1299, HCC827, PC-9, A549, NCI-H661, NCI-H292, 95-D and NCI-H446, then cells with higher inhibition rates and good growth conditions were selected for subsequent research. Trypan blue exclusion method was used to detect the cell survival rate after treatment by DAG. Transmission electron microscope was used to observe the changes in submicroscopic structure after apoptosis. Real-time PCR was used to detect the effect of DAG on Bax, Bcl-2 and Caspase-3 mRNA expression levels within the cells. **Result:** DAG significantly inhibited the 11 kinds of human lung carcinoma cell lines with a good concentration-effect relationship. As compared with the blank group, the inhibition rate on cells proliferation was increased with the increase of dose ($P < 0.01$). Trypan blue exclusion results showed that, with the increase of drug concentrations, the count of

[收稿日期] 20151013(026)

[基金项目] 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 12237007)

[第一作者] 苏桂玉,在读硕士,从事中药新制剂、新剂型研究, E-mail:175055880@qq.com

[通讯作者] *刘华钢,博士,教授,从事药物新剂型与中药药理研究, Tel:0771-5700208, E-mail:hgliu@263.net

cells in blue (dead cells or cells with damaged membrane) was increased. Transmission electron microscope results indicated that, after 48 h treatment, apoptotic cells were rounded overall, microvilli fell off, with karyopyknosis and margination, heterochromatin with high electron density in the nucleus was condensed into lumps and aggregated on nuclear membranes, with mitochondrial swelling and vacuolar degeneration within cells. Real-time PCR results indicated that the expression of pro-apoptosis gene Bax was up-regulated, expression of anti-apoptosis gene Bcl-2 was down-regulated, and Caspase-3 was activated. **Conclusion:** DAG can inhibit the human lung carcinoma cells growth and induce their apoptosis, and the potential mechanism may be associated with up-regulating the expression of Bax, down-regulating the expression of Bcl-2 and activating Caspase-3.

[**Key words**] 1, 2; 5, 6-dianhydrogalactitol; human lung cancer cell; anticancer activity; mechanisms

肺癌为我国最为常见和危害性较为严重的恶性肿瘤之一,死亡率呈逐年上升趋势^[1]。由于目前肺癌早期症状不明显以及缺乏有效的筛查和诊断,所以 70% 以上的肺癌患者在确诊时已经是晚期或者发生了转移^[2],化疗是治疗晚期肺癌的主要方法之一,医学研究者一直都在寻找高效、低毒的治疗肺癌的药物。二去水卫矛醇(DAG)来源于卫矛科植物密花美登木 *Maytenus confertiflorus*^[3],为新型己糖醇类抗肿瘤药。该药目前已经上市,主要用于治疗慢性粒细胞白血病。天津胸科医院、湖北省肿瘤医院、北京结核病肺部肿瘤研究所等 9 个单位应用 DAG 治疗肺癌及胸部恶性肿瘤 109 例,取得了良好的疗效,其中以肺癌的疗效最佳,效果仅次于氮芥、丝裂霉素和氨甲喋呤,位于第 4 位^[4]。尹素云等^[5-6]应用 DAG 配合中药治疗晚期肺癌也取得了明显的疗效。Eagan 等^[7]研究也发现 DAG 对肺腺癌、鳞癌及大细胞肺癌的疗效与环磷酰胺相似甚至更好。本课题组张慧玲等^[8]应用 DAG 作用于大细胞肺癌 NCI-H460 细胞等 4 种肿瘤细胞,发现 DAG 对 NCI-H460 细胞株具有明显的抑制其增殖并诱导细胞凋亡的作用,结果提示 DAG 对肺癌具有潜在的治疗价值。因此,应用 DAG 治疗各型肺癌具有良好的疗效,且毒副作用较小^[4,9],可以作为一种抗癌新药推荐应用于临床。虽然已有文献对 DAG 在临床上对肺癌的有效作用进行了报道^[4-6],但 DAG 的作用机制以及诱导肺癌细胞凋亡的机制尚未明确,药物的量效关系理论也没有足够的临床前研究提供支持。本研究采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8),台盼蓝拒染和透射电镜观察 DAG 对人肺癌细胞的体外增殖抑制及诱导凋亡的作用,并应用实时定量荧光 PCR (Real-time PCR) 技术检测凋亡相关基因的表达,初步探讨其诱导细胞凋亡的机制,为深入研究 DAG 对人肺癌细胞的体内外抑制作用及其分子机制提供理论依据。

1 材料

1.1 药物及试剂 注射用 DAG[广西梧州制药(集团)股份有限公司,批号 131101],CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所,批号 20150128),RPMI-1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号 8115111),McCoy's 5A 培养基(南京建成生物工程研究所,批号 K40201),南美血清特级胎牛血清[FBS,维森特生物技术(中国)有限公司,批号 086110019],0.25% 胰蛋白酶溶液(Thermo Scientific 公司,批号 MWH0402),磷酸盐缓冲液(PBS,武汉博士德生物工程有限公司,批号 20150316),台盼蓝染色液(北京索莱宝科技有限公司,批号 20141210),RNAiso Plus 试剂盒,PrimeScript™ RT reagent Kit,SYBR Premix Ex Taq™ II 均购于日本 Takara 公司,批号分别为 AA1302-1,AK3001,AK6503。

1.2 细胞株 人肺癌细胞 Calu-1,人非小细胞肺癌细胞 NCI-H1650,NCI-H358,NCI-H1299 和 HCC827,人大细胞肺癌细胞 NCI-H661,人淋巴结转肺癌细胞 NCI-H292 以及人高转移肺癌细胞 95-D 均购于中国科学院细胞库;人小细胞肺癌细胞 NCI-H446 购于上海中乔新舟生物科技有限公司;人肺癌细胞 PC-9 由杭州市第一人民医院提供;人肺癌细胞 A549 由本实验室提供。培养于含 10% ~ 15% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,常规传代培养。

1.3 仪器 3111 型 CO₂ 培养箱,Micro17R 型台式高效冷冻离心机(美国 Thermo 公司),CKX-41 型荧光倒置显微镜(日本奥林巴斯株式会社),SpectraMaxplus384 型连续光谱酶标仪(香港分子仪器公司),H-7650 型日立透射电子显微镜[日本日立高新技术(上海)国际贸易有限公司],7300 型 Real-time PCR System(美国 ABI 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 采用 FBS(体积百分数为 10% ~ 15%),RPMI-1640 完全培养基于 37 °C 5% CO₂ 条

件下培养肺癌细胞。显微镜下可见细胞呈单层贴壁生长,隔天换液,待细胞生长至约 80% 即细胞对数生长期时,用 0.25% 胰酶细胞消化液消化传代。

2.2 细胞增殖抑制率检测 以预实验结果为依据,细胞培养收集参照 2.1,细胞计数并调整至适宜的细胞浓度,于 96 孔板中每孔加入细胞悬液 100 μL ,将培养板置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养 24 h,待细胞贴壁后弃去上清液。用完全培养基溶解 DAG 并逐级梯度稀释成 6 个质量浓度:200,100,50,25,12.5,6.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。空白组给以等量的完全培养基。每组设 5 个复孔,药物作用 48 h 后向每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL ,继续孵育 1~4 h。置摇床上充分摇匀,用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度 A,根据公式计算细胞抑制率。实验重复 3 次。

$$\text{细胞生长抑制率} = 1 - (A_{\text{DAG组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.3 台盼蓝拒染检测细胞存活率 细胞培养收集参照 2.1,完全培养基重悬计数并调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL 并接种于 6 孔板中,每孔 1.5 mL。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 至细胞贴壁,弃上清,每孔分别给以不同质量浓度 DAG (8.00,16.00,32.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 48 h,空白组给以等量的完全培养基。药物作用后收集所有细胞,1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 1 min,弃上清液,PBS 重悬,将细胞浓度调成 1×10^5 个/mL,加入终浓度为 0.04% 的台盼蓝染色液染色 3 min,死细胞可被染成蓝色,活细胞不被染色。在 10 min 内用细胞计数板计数,并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{活细胞总数}}{\text{活细胞总数} + \text{死细胞总数}} \times 100\%$$

2.4 透射电镜观察细胞凋亡形态学改变 细胞培养收集参照 2.1,待细胞贴壁达到瓶底的 70%~80% 时,给予终质量浓度为 16.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 DAG,空白组加入等量完全培养基。待药物作用 48 h 后,收集所有细胞,用预冷 PBS 洗涤细胞 2 次,收集细胞,加入 2.5% 戊二醛固定过夜,PBS 洗去固定液,用 1% 的锇酸固定,洗涤,乙醇-丙酮逐级脱水,环氧树脂包埋,超薄切片,醋酸铀-柠檬酸铅双重染色,电镜观察并照相。

2.5 Real-time PCR 检测凋亡相关基因表达 细胞前期处理同 2.4,DAG (8.00,16.00,32.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 作用 48 h,参照 Trizol 说明书提取 RNA,核酸检测仪进行 RNA 定量和纯度分析,反转录得到 cDNA 后进行 Real-time PCR 反应,预变性 (95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s),变性 (95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s),退火 (60 $^{\circ}\text{C}$ 31 s),循环数 40。基因序

列来源于 Gene Bank,由宝生物工程(大连)有限公司合成,Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax): 上游 5'-GACGAACTGGACAGTAACATGGA-3',下游 5'-GCAAAGTAGAAAAGGGCGACA-3';B 淋巴细胞瘤-2 (Bel-2): 上游 5'-AACATCGCCCTGTGGATGAC-3',下游 5'-AGAGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG-3';半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3): 上游 5'-GACTCTGGAATATCCCTGGACAACA-3',下游 5'-AGGTTTGTGCATCGACATCTG-3';内参 GAPDH: 上游 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3',下游 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGA-3'。根据说明书制备目的基因与内参基因的标准曲线、PCR 产物溶解曲线及扩增曲线,以目的基因/内参照基因作为 mRNA 的相对表达量。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 DAG 对肺癌细胞增殖抑制的影响 6 个不同浓度的 DAG 作用细胞 48 h 后,DAG 组 A 均明显低于空白组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$);随着浓度的增高,DAG 组 A 不断减低,其抑制效应呈现浓度-效应关系。DAG 对不同的人肺癌细胞株体现了不同的增殖抑制作用,半数抑制浓度 (IC_{50}) 从 (43.02 ± 2.29) ~ (15.06 ± 2.89) $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 不等。见表 1,2。

3.2 DAG 对肺癌细胞存活率的影响 选择增殖抑制率较高且生长状态较好的 NCI-H292 细胞进行台盼蓝染色,随着药物浓度的增加,被台盼蓝染成蓝色的细胞数增多,活细胞数减少,DAG 组细胞存活率均明显低于空白组 ($P < 0.05$),且随着浓度的增高,DAG 组的细胞存活率降低。见图 1。

3.3 DAG 对肺癌细胞凋亡形态学的改变 正常组 NCI-H292 细胞大多呈类椭圆形,细胞膜表面有丰富的微绒毛,细胞连接不紧密,间隔清晰,胞浆内细胞器清晰可见,细胞核完整,核仁清晰,核浆比约为 1:1,线粒体嵴结构完整,粗面内质网多见,脂滴偶见;DAG 组凋亡细胞整体圆缩,微绒毛脱落,细胞间连接紧密,边界不清晰,胞内核固缩、边集,核内出现高电子密度的异染色质浓缩成块状,边集于核膜,线粒体肿胀,细胞内出现空泡样变,核膜、胞膜、各细胞器膜尚完整,凋亡小体偶见;坏死细胞呈不规则形状,细胞膜不完整,胞内细胞核固缩、分成小块或者溶解,染色质呈不规则的团块状,细胞器结构不完整,细胞崩解,胞浆及其内容物外泄。见图 2。

表 1 DAG 对 11 株人肺癌细胞株抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Inhibition rate of 11 human lung carcinoma cell lines treated with different concentrations of DAG ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 /mg·L ⁻¹	Calu-1		NCI-H1650		NCI-H358		NCI-H1299	
		细胞增殖 A	抑制率/%	细胞增殖 A	抑制率/%	细胞增殖 A	抑制率/%	细胞增殖 A	抑制率/%
空白	-	1.11 ± 0.029	-	1.50 ± 0.046	-	1.18 ± 0.012	-	1.25 ± 0.033	-
DAG	6.25	1.03 ± 0.033 ¹⁾	9.16	1.36 ± 0.030 ¹⁾	8.08	1.02 ± 0.039 ¹⁾	13.92	1.14 ± 0.047 ¹⁾	19.44
	12.5	1.00 ± 0.031 ¹⁾	12.13	1.16 ± 0.029 ¹⁾	22.81	0.87 ± 0.025 ¹⁾	28.43	1.05 ± 0.034 ¹⁾	25.58
	25	0.90 ± 0.016 ¹⁾	22.08	0.91 ± 0.031 ¹⁾	41.71	0.75 ± 0.025 ¹⁾	39.57	0.89 ± 0.035 ¹⁾	40.38
	50	0.57 ± 0.024 ¹⁾	56.31	0.70 ± 0.003 ²⁾	58.02	0.57 ± 0.023 ¹⁾	56.53	0.48 ± 0.008 ²⁾	69.98
	100	0.30 ± 0.007 ²⁾	83.45	0.43 ± 0.004 ²⁾	78.71	0.36 ± 0.035 ¹⁾	76.18	0.19 ± 0.006 ²⁾	92.9
	200	0.25 ± 0.011 ¹⁾	89.07	0.39 ± 0.005 ²⁾	82.02	0.31 ± 0.018 ¹⁾	81.33	0.17 ± 0.005 ²⁾	94.5

组别	浓度 /mg·L ⁻¹	HCC827		PC-9		A549		NCI-H661	
		细胞增殖 A	抑制率/%	细胞增殖 A	抑制率/%	细胞增殖 A	抑制率/%	细胞增殖 A	抑制率/%
空白	-	1.15 ± 0.032	-	1.29 ± 0.026	-	1.71 ± 0.033	-	1.22 ± 0.028	-
DAG	6.25	0.94 ± 0.010 ¹⁾	23.31	1.05 ± 0.032 ¹⁾	19.16	1.44 ± 0.020 ¹⁾	16.99	0.88 ± 0.031 ¹⁾	31.31
	12.5	0.82 ± 0.013 ¹⁾	35.69	0.88 ± 0.038 ¹⁾	33.66	1.29 ± 0.047 ¹⁾	27.11	0.88 ± 0.018 ¹⁾	31.36
	25	0.70 ± 0.019 ¹⁾	47.97	0.75 ± 0.021 ¹⁾	45.03	1.08 ± 0.017 ¹⁾	40.58	0.74 ± 0.003 ²⁾	43.57
	50	0.62 ± 0.029 ¹⁾	56.93	0.47 ± 0.018 ¹⁾	68.29	0.53 ± 0.012 ¹⁾	76.69	0.55 ± 0.021 ¹⁾	61.60
	100	0.46 ± 0.006 ²⁾	73.73	0.23 ± 0.012 ¹⁾	88.32	0.20 ± 0.007 ²⁾	97.07	0.26 ± 0.015 ¹⁾	87.70
	200	0.45 ± 0.012 ¹⁾	75.18	0.20 ± 0.014 ¹⁾	90.73	0.17 ± 0.004 ²⁾	98.67	0.19 ± 0.002 ²⁾	93.84

组别	浓度 /mg·L ⁻¹	NCI-H292		95-D		NCI-H446	
		细胞增殖 A	抑制率/%	细胞增殖 A	抑制率/%	细胞增殖 A	抑制率/%
空白	-	1.05 ± 0.025	-	1.20 ± 0.026	-	1.74 ± 0.032	-
DAG	6.25	0.86 ± 0.031 ¹⁾	20.49	0.86 ± 0.027 ¹⁾	31.73	1.36 ± 0.027 ¹⁾	23.43
	12.5	0.71 ± 0.029 ¹⁾	36.68	0.67 ± 0.017 ¹⁾	49.29	1.07 ± 0.029 ¹⁾	42.15
	25	0.46 ± 0.014 ¹⁾	62.12	0.49 ± 0.022 ¹⁾	59.49	0.60 ± 0.016 ¹⁾	71.39
	50	0.22 ± 0.012 ¹⁾	87.68	0.39 ± 0.022 ¹⁾	66.12	0.40 ± 0.005 ²⁾	83.02
	100	0.16 ± 0.005 ²⁾	94.02	0.29 ± 0.025 ¹⁾	79.33	0.23 ± 0.004 ²⁾	93.95
	200	0.15 ± 0.007 ²⁾	95.31	0.18 ± 0.023 ¹⁾	94.00	0.18 ± 0.005 ²⁾	96.96

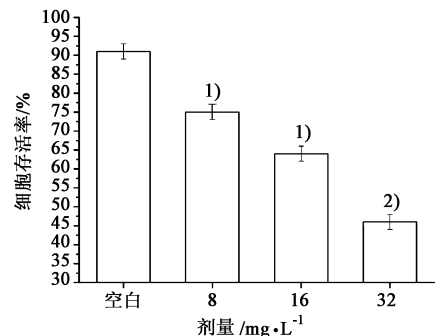
注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

表 2 DAG 对 11 株不同的人肺癌细胞株培养 48 h 后的 IC₅₀ 的影响

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 IC₅₀ of 11 human lung carcinoma cell lines treated with DAG for 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

细胞株	IC ₅₀	细胞株	IC ₅₀
Calu-1	43.02 ± 2.29	A549	23.17 ± 3.74
NCI-H1650	39.22 ± 3.52	NCI-H661	22.82 ± 0.64
NCI-H358	37.05 ± 4.19	NCI-H292	17.07 ± 1.74
NCI-H1299	32.86 ± 0.89	95-D	16.14 ± 2.76
HCC827	31.10 ± 2.44	NCI-H446	15.06 ± 2.89
PC-9	25.07 ± 3.90		



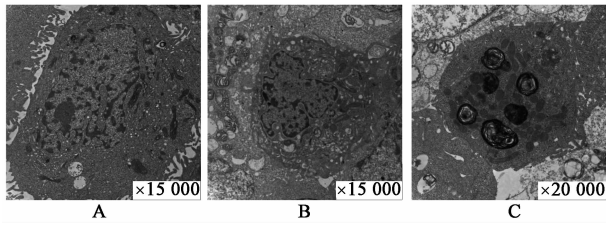
与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (图 3 同)

图 1 DAG 对 NCI-H292 细胞的存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Survival rate of NCI-H292 cells treated with different concentrations of DAG ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 DAG 对 NCI-H292 细胞内凋亡相关基因相对表

达量的影响 随着浓度的升高(8, 16, 32 mg·L⁻¹),



A. 空白组; B~C. DAG 16.00 mg·L⁻¹ 组

图 2 DAG 处理后 NCI-H292 细胞形态超微结构的改变(电镜)

Fig. 2 Ultrastructural changes of NCI-H292 cells treated with DAG (electron microscope)

NCI-H292 细胞内促凋亡基因 Bax 的相对表达量增加 ($P < 0.05$), 抗凋亡基因 Bcl-2 的相对表达量减少 ($P < 0.05, P < 0.01$), 细胞内 Caspase-3 基因被激活 ($P < 0.05, P < 0.01$)。内参基因和 3 个目的基因的溶解曲线均为单一锐利的主峰, 说明 PCR 扩增产物无引物二聚体等非特异性扩增, 且扩增曲线平滑, 有明显的指数扩增期。见图 3。

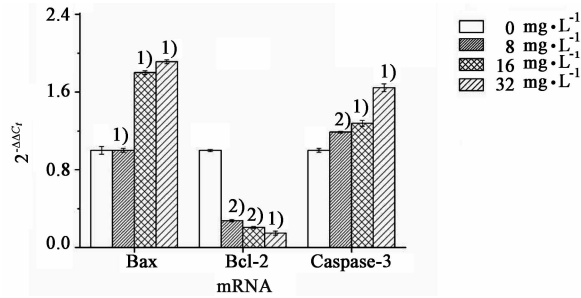


图 3 DAG 对 NCI-H292 细胞内 Bax, Bcl-2 和 Caspase-3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of DAG on Bax, Bcl-2 and Caspase-3 mRNA expression levels within NCI-H292 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

细胞增殖和细胞凋亡是生命两个重要的本质属性, 二者之一出现异常均会导致生物的稳态失衡而引起疾病。细胞凋亡是细胞自主进行的自杀行为, 这种固有的调控作用可以清除多余、损伤或者感染的细胞, 保证生物的稳态平衡^[10]。相关研究表明, 细胞凋亡在肿瘤的发生发展和消退中起负调控作用, 诱导细胞凋亡也成为了抗肿瘤药物最普遍的作用机制之一^[11-13]。

DAG 是一种由己糖醇衍生得到的细胞毒性类抗肿瘤药, 其主要的作用机制是通过本身或派生的环氧基团的烷基化作用, 使 DNA 烷基化, 从而抑制 DNA 合成, 进而诱导细胞凋亡。其他推测的作用机制包括抑制 RNA 和蛋白质合成。该药目前已经上市并主要用于治疗慢性粒细胞白血病以及肺癌^[14]。

本研究采用 CCK-8 方法检测 DAG 对 11 株人肺

癌细胞株的增殖抑制率, 预实验观察了 DAG 作用 24, 48, 72 h 后的抑瘤率, 发现药物作用 24 h 后效果不明显, 而作用 72 h 后 DAG 对各细胞株均表现出了较强的抑制作用, 相比之下, 药物作用 48 h 后能更好地区分上述 11 株肺癌细胞株对 DAG 的敏感性, 故本文采用药物作用 48 h 后进行检测, 结果可知 DAG 作用对上述细胞株均有明显的增殖抑制作用并呈现出良好的浓度-效应相关性, 当给药浓度达到 200 mg·L⁻¹ 时, 对 55% 的肺癌细胞株的抑制率均达到了 90% 以上, 对 A549 细胞株的抑制率高达 98.67%。在最小的给药浓度 (6.25 mg·L⁻¹) 下, 抑制率也可以达到 8.08% ~ 31.73%, IC₅₀ < 20 mg·L⁻¹, 即对 DAG 最为敏感的细胞株为人淋巴结转移肺癌细胞 NCI-H292, 人高转移肺癌细胞 95-D 和人小细胞肺癌细胞 H446。根据肺癌细胞在显微镜下组织学上的大小和外观的不同, 临床上将肺癌分为小细胞肺癌 (SCLC) 和非小细胞肺癌 (NSCLC), 在确诊的肺癌病例中, 主要为 NSCLC, 占 80% 以上。综上, 本研究选取了抑制率较高且生长状态良好的 NCI-H292 细胞株进行后续研究。

细胞凋亡过程中必然伴随着一系列显著的形态学改变, 而形态学特征分析是鉴定细胞凋亡的最基本方法。本研究根据 IC₅₀ 选取了 8, 16, 32 mg·L⁻¹ 药物质量浓度, 采用台盼蓝拒染法进行 DAG 作用细胞 48 h 后的检测。结果发现随着 DAG 浓度的增加, 细胞膜完整性被破坏的细胞数量增多, 细胞存活率也随之降低, 跟 CCK-8 检测结果基本一致, 说明 DAG 明显降低了肺癌细胞的体外存活率。透射电镜的结果显示, 16 mg·L⁻¹ 的 DAG 作用后, 肺癌细胞的亚微结构出现了典型的凋亡形态学特征。根据形态学特征观察结果, 可以推测 DAG 作用肺癌细胞后可能会发生一系列大致的凋亡形态学的改变。

死亡受体途径和线粒体途径为细胞凋亡的两条经典的途径。Bax 和 Bcl-2 同属于 Bcl-2 家族, 主要是在线粒体参与的细胞凋亡途径中起调控作用, 二者均为抗肿瘤药物作用机制的研究重点。Caspase 家族基因是凋亡过程的中心环节之一, 其中 Caspase-3 作为凋亡信号传递的共同通路, 可被多种凋亡信号激活, 参与细胞凋亡的调控, 目前研究较多^[15-16]。本研究结果显示 DAG 作用细胞后促凋亡基因 Bax 表达上调, 抗凋亡基因 Bcl-2 表达下调, Caspase-3 被激活, 结果提示 DAG 作用细胞后可能激活了细胞凋亡的线粒体途径, 从而诱导细胞凋亡。

综上所述, DAG 能够抑制肺癌细胞的增殖, 并诱

导其凋亡,其作用机制可能与上调 Bax,下调 Bcl-2,同时激活 Caspase-3 有关。本研究为进一步研究 DAG 对肺癌细胞的体内外作用机制提供了重要的理论依据。同时,本研究也存在一些局限性,如考察的药物作用时间过于单一,其他的基因表达谱如死亡受体途径的相关基因以及蛋白表达谱的变化等有待进一步研究。

[参考文献]

[1] 邓伟,利基林,余家华,等. 广西肺癌死亡的流行特征及趋势[J]. 现代预防医学,2012,39(12):2932-2934.

[2] Julian R M, Alex A A, James R J. Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer[J]. Chest, 2006,130(4):1211-1219.

[3] Yan X L, Xu B, Li M, et al. Inhibition of diacetyl dianhydrogalactitol on ornithin decarboxylase activity and its possible mechanisms [J]. J Chin Pharm, 2009, 44(12):904-908.

[4] 陶瑞芳,林宝爵. 抗癌新药——二去水卫矛醇[J]. 新药与临床,1985,4(4):56.

[5] 尹素云,陈延昌. 卫康醇配合中药治疗晚期肺癌 42 例疗效分析[J]. 肿瘤防治研究,1990(2):130.

[6] 尹素云. 卫康醇治疗肺癌出现心脏毒性一例报告[J]. 肿瘤防治研究,1987(4):202.

[7] Eagan R T, Ingle J N, Frytak S, et al. Platinum-based polychemotherapy versus dianhydrogalactitol in advanced non-small cell lung cancer[J]. Cancer Treat Rep,1977, 61(7):1339-1345.

[8] 张慧玲,王稼农,梁霜,等. 二去水卫矛醇对四种肿瘤细胞的体外抑制作用[J]. 广西科学,2013,20(1):82-84.

[9] 广西医学院内科血液组. 1,2:5,6-二去水卫矛醇治疗慢性粒细胞白血病 21 例的近期疗效[J]. 广西医学,1984,6(2):72-75.

[10] Salvesen G S, Duckett C S. IPA proteins: Blocking the road to death's door[J]. Nat Revmol Cell Biol,2002,3(6):401-410.

[11] Soria G, Orea S. Apoptosis[J]. Rev Alerg Mex,2002,49(4):121-128.

[12] Thompsin C. Apoptosis in pathogenesis and treatment of disease[J]. Science,1995,267(5302):1456-1462.

[13] Chen G, Sin F, Leung B, et al. Glioblastoma cells deficient in DNA-dependent protein kinase are resistant to cell death [J]. J Cell Physiol, 2005, 203(1):127-132.

[14] 广西中医药研究所. 卫康醇(去水卫矛醇)[J]. 药学通报,1986,21(3):158-159.

[15] Slee E, Keogh S, Martin S. Cleavage of BID during cytotoxic drug and UV radiation-induced apoptosis occurs downstream of the point of Bcl-2 action and is catalysed by Caspase-3: a potential feedback loop for amplification of apoptosis-associated mitochondrial cytochrome c release [J]. Cell Death Differ, 2000, 7(6):556-565.

[16] 樊亦军,韩锐,周军,等. 抗癌药 1,2:5,6-二去水卫矛醇与长春新碱联合用药的实验研究[J]. 药理学报,1987,22(2):98-102.

[责任编辑 张丰丰]