

# 奥沙利铂和 7-羟基星形孢菌素联合用药 对 HCT116 细胞的抑杀作用

喻录容, 何先元\*, 苏咏梅, 张义兵  
(重庆医科大学中医药学院, 重庆 401331)

**[摘要]** **目的:**观察奥沙利铂(Oxaliplatin, L-OHP)与 7-羟基星形孢菌素(7-hydroxystaurosporine, UCN-01)单独及联合应用对结肠癌细胞 HCT116 的增殖抑制作用,探讨其诱导细胞死亡的作用机制。**方法:**应用 MTT 法检测 L-OHP,UCN-01 单药及联用对 HCT116 细胞的增殖抑制作用;应用流式细胞术、Western blot 方法检测药物处理的结肠癌细胞凋亡;应用 HE 染色法检测丝裂灾变的形态改变。**结果:**低浓度 L-OHP( $6.25 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )与 UCN-01( $100 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ )联用对结肠癌 HCT116 细胞的杀伤可产生协同作用,效果明显强于单独用药组;两药联用 Annexin V 阳性细胞率与 UCN-01 单用无明显差别,但死亡细胞明显增加;两药联用 HCT116 细胞的形态发生改变,巨核多核细胞较单独用药组增多约 10%。**结论:**L-OHP 与 UCN-01 联用对 HCT116 细胞的增殖具有协同抑制作用,诱导细胞发生凋亡和丝裂灾变。

**[关键词]** 奥沙利铂; 7-羟基星形孢菌素; 增殖抑制; 结肠癌细胞 HCT116

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)18-0241-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013180241

## Study on the Lethal Effect and Mechanisms of Oxaliplatin and UCN-01 on HCT116 Colon Cancer Cell Line

YU Lu-rong, HE Xian-yuan\*, SU Yong-mei, ZHANG Yi-bin

(Institute of Traditional Chinese Medicine, Chongqing Medical University, Chongqing 401331, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the growth inhibitory effect of Oxaliplatin (L-OHP) and (7-hydroxystaurosporine, (UCN-01) on HCT116 colon cancer cell line in single or combination treatment, and to investigate its mechanisms. **Method:** The growth inhibitory effect was evaluated by MTT assay in single agent or combination treatment. Apoptosis was investigated by flow cytometry and Western blotting, and mitotic catastrophe was determined by HE staining. **Result:** Combination treatment of L-OHP in low concentration and UCN-01 has synergistic effect on killing HCT116 colon cancer cell line, which was more effective than single treatment. AnnexinV positive cell rate showed no difference between combination treatment or UCN-01 alone. Cellular morphology of HCT116 cell was changed in combination treatment, and megakaryocytes and polykaryocytes in combination treatment were increased by approximately 10% compared with the single treatment. **Conclusion:** Combination treatment of L-OHP and UCN-01 has synergistic inhibitory effect on HCT116 cell proliferation through inducing cell apoptosis and mitotic catastrophe.

**[Key words]** L-OHP; UCN-01; proliferation inhibition; HCT116 colon cancer cell

奥沙利铂(Oxaliplatin, L-OHP)是第三代铂类 抗癌药,化学名为左旋反式二氨环己烷草酸铂,分子

**[收稿日期]** 20121217(647)

**[基金项目]** 重庆市卫生局科技项目(2012-2-144)

**[第一作者]** 喻录容,讲师,硕士,从事药物制剂以及药理学研究,Tel:13350383721,E-mail:136817118@qq.com

**[通讯作者]** \*何先元,副教授,硕士,从事中药资源开发利用以及药理学研究,Tel:13101327285,15923028173,E-mail:yulurong1976@163.com

式  $C_8H_{14}N_2O_4Pt$ 。L-OHP 的药理学特性与其他铂类药物相同,以 DNA 为靶作用部位,铂原子与 DNA 链进行交联,从而阻断其复制和转录<sup>[1]</sup>。在体外实验中对人、鼠多种肿瘤细胞系具有增殖抑制作用,对 5-氟尿嘧啶耐药的结肠癌细胞有效。L-OHP 能明显延长复发、转移性结肠癌病人的生存期<sup>[2]</sup>。L-OHP 主要副作用是神经系统毒性,超过 70% 的用药患者出现感觉神经障碍<sup>[3]</sup>。L-OHP 是治疗晚期结直肠癌的临床一线药物,可明显延长复发、转移性结直肠癌病人的生存期<sup>[4]</sup>,以 L-OHP 为主联合应用希罗达、替加氟<sup>[5]</sup>卡培他滨治疗晚期大肠癌的疗效非常明显。7-羟基星形孢菌素(7-hydroxystaurosporine)可直接抑制细胞周期依赖性激酶 1 (Cyclin-dependent Kinase 1)、2 (Cyclin-dependent Kinase 2) 的活性和细胞周期检测点激酶(checkpoint kinase1)的活化<sup>[6]</sup>。已有实验证实 7-羟基星形孢菌素可通过去除 G<sub>2</sub> 期阻滞,增加肿瘤细胞对放疗的敏感性<sup>[7-9]</sup>。本实验将 L-OHP 与 7-羟基星形孢菌素联用,以同时诱导大肠癌细胞发生凋亡和非凋亡途径的死亡,提高化疗药物对大肠癌细胞的杀伤作用。

## 1 材料

**1.1 细胞** 人结肠癌细胞系 HCT116 由大阪大学消化外科门田守人教授馈赠。

**1.2 试剂** L-OHP 和 7-羟基星形孢菌素购自 Sigma 公司,Annexin V/PI 试剂盒购自 BD 公司,DMEM 培养基购自 Hyclone 公司,PARP 抗体购自 Calbiochem 公司,化学发光底物购自 Pierce 公司。

**1.3 仪器** Annexin V-FITC 试剂盒为晶美生物工程有限公司,恒温培养箱(SHEL LAB 2323),超净工作台(上海博迅),倒置相差显微镜(Olympus),酶联免疫检测器(Bio-Rad 550 型),液体闪烁计数仪,流式细胞仪(美国 FACS Calibur BD)等均由重庆医科大学实验动物中心与分子生物学实验室提供。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** HCT116 细胞常规传代培养于含 10% 胎牛血清、100 U·mL<sup>-1</sup>青、链霉素的 DMEM 培养基中,置于 37 ℃,95% 湿度,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。

**2.2 MTT 比色法检测细胞增殖抑制率** 将 HCT116 细胞接种于 96 孔板,每孔约 3 000 个细胞,培养 24 h 后加入梯度浓度的 L-OHP (20, 40, 60, 80, 100 μmol·L<sup>-1</sup>),UCN-01 (200, 400, 800, 1 600 nmol·L<sup>-1</sup>),以培养液和 DMSO 为对照组,设 3 个平行孔。加药后继续培养 24 h,之后每孔加入 5 g·L<sup>-1</sup> MTT 溶液 20

μL,培养 4 h 后弃上清,每孔加入 200 μL 二甲基亚砷(DMSO),震荡 1 min,在 570 nm 波长处测得吸光度(A)。重复 3 次取平均值,绘制抑制曲线。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}} \times 100\%$$

**2.3 药物协同作用分析** 用 CalcuSyn2.0 软件计算药物半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>);根据周氏中效原理计算不同浓度 L-OHP 和 UCN-01 组合的联合用药指数(CI)。CI < 1 表示协同作用,CI = 1 表示相加作用,CI > 1 表示拮抗作用。

**2.4 Annexin V 法检测细胞凋亡** 将 HCT116 细胞接种于培养皿培养 24 h。将 6.25 μmol·L<sup>-1</sup> L-OHP 及 100 nmol·L<sup>-1</sup> UCN-01 单独及联合作用于 HCT116 细胞,培养 24 h 后收集细胞,以不加药细胞作对照组,具体检测步骤参照试剂盒说明书。

**2.5 HE 染色观察细胞形态变化** 将 6 × 10<sup>4</sup> 个 HCT116 细胞接种于 10% 多聚赖氨酸包被的玻片上,培养 24 h,加入 6.25 μmol·L<sup>-1</sup> L-OHP, 100 nmol·L<sup>-1</sup> UCN-01 单独及两药联合作用 16 h,染色,显微镜下观察拍照。

**2.6 细胞蛋白提取及浓度测定** 将 6 × 10<sup>4</sup> 个 HCT116 细胞接种于 6 孔板,培养 24 h,加入 6.25 μmol·L<sup>-1</sup> L-OHP, 100 nmol·L<sup>-1</sup> UCN-01 单独及两药联合作用 16 h,4 ℃ 预冷 PBS 洗 2 次,加入细胞蛋白裂解液 200 μL,冰浴 5 min,4 ℃ 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,收集上清液,BCA 法测定蛋白含量。

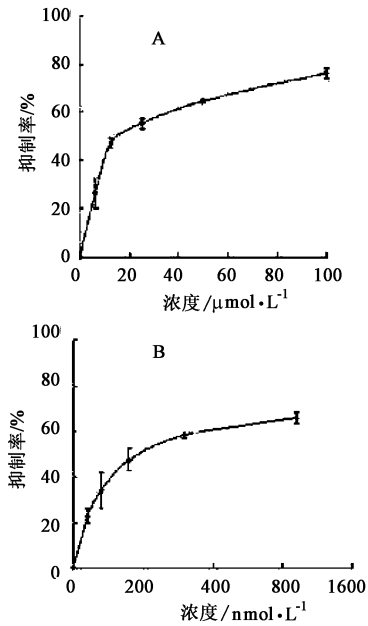
**2.7 Western 印迹法检测 Cleaved-PARP 蛋白表达** 将含等量蛋白的样品(30 μg)与上样缓冲液混合,100 ℃ 变性 5 min,上样,经 10% SDS-PAGE 蛋白电泳分离后电转移至 PVDF 膜,用含 5% 脱脂奶的 TBST 缓冲液室温封闭 2 h 后加入兔抗人 cleaved-PARP (1:1 000) 抗体,4 ℃ 孵育过夜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体(1:2 000)室温摇床孵育 2 h,ECL 化学发光法显色。重复试验 3 次。选用 β-actin 作为内参,1:1 000 稀释。

**2.8 统计学方法** 应用 SPSS 统计软件,运用 χ<sup>2</sup> 精确检验法、秩和检验、spearman 相关分析;显著性采用方差分析,P < 0.05 为有统计学差异。

## 3 结果

**3.1 L-OHP 和 UCN-01 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用及 IC<sub>50</sub> 测定** 以 MTT 法测定不同浓度 L-OHP, UCN-01 作用于 HCT116 细胞 24 h 后的细胞增殖抑制率,绘制生长抑制曲线,结果显示在一定浓度范围内,L-OHP 和 UCN-01 增殖抑制作用呈浓度依赖性。CalcuSyn2.0 软件计算 L-OHP 和 UCN-01 的 IC<sub>50</sub> 分

别( $17.63 \pm 1.37$ )  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r = 0.99$ ), ( $193.88 \pm 21.32$ )  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ( $r = 0.94$ )。见图1。



A. L-OHP; B. UCN-01

图1 L-OHP与UCN-01作用24h

对HCT116细胞的生长抑制曲线( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.2 L-OHP与UCN-01对HCT116细胞增殖抑制作用的协同作用分析** 检测浓度L-OHP(6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )和UCN-01(100, 200, 400, 800, 1 600  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )单独及联合应用对HCT116细胞的增殖抑制作用。结果显示:低浓度L-OHP与UCN-01联用的细胞增殖抑制率明显高于单药组, 6.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  L-OHP的增殖抑制率为27.2%, 100  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  UCN-01的增殖抑制率为25.4%, 两药联合的增殖抑制率为51.2% ( $P < 0.05$ )。12.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  L-OHP的增殖抑制率为46.6%, 200  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  UCN-01的增殖抑制率为32.3%, 两药联合的增殖抑制率为62.5% ( $P < 0.05$ ), 两药有协同作用。见图2。

**3.3 L-OHP和UCN-01单独及联合用药对细胞凋亡的影响** 两药联用组抗体caspase底物(cleaved-PARP)蛋白表达水平增高。低浓度L-OHP诱导HCT116细胞凋亡, 6.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  L-OHP的AnnexinV阳性细胞率为11.67%, 死亡率为13.75%, 100  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  UCN-01的AnnexinV阳性细胞率为8.73%, 死亡率为12.46%, 两药联用组的AnnexinV阳性细胞率为8.28%, 与UCN-01单独用药组无明显差异, 但死亡细胞约占31.44%, 高于单药( $P < 0.05$ )。

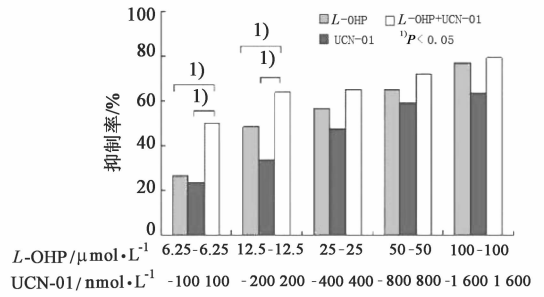
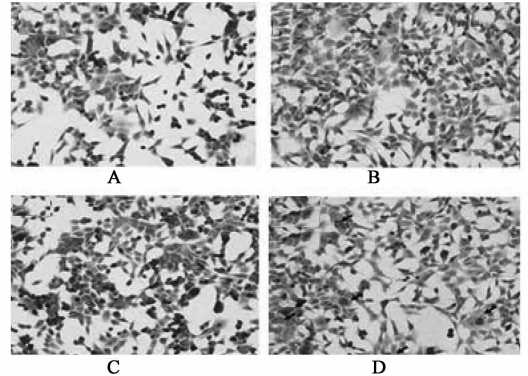


图2 不同浓度L-OHP和UCN-01单独及联合应用对HCT116细胞的增殖抑制作用( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

**3.4 L-OHP和UCN-01单独及联合用药对结肠癌HCT116细胞形态学变化的影响** 对照组多核巨核细胞为0.34%, 6.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  L-OHP组为1.66%, 100  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  UCN-01为2.84%, 联合用药组多核巨核细胞为10.36%, 高于单用组( $P < 0.05$ ), 见图3。



A. 正常对照组; B. L-OHP 6.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. UCN-01 100  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. L-OHP 6.25  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和UCN-01 100  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 联用组

图3 L-OHP和UCN-01单独及联合用药对结肠癌细胞HCT116细胞形态学变化的影响

#### 4 讨论

本研究表明, 低浓度L-OHP与亚毒性剂量UCN-01联用明显增强对结肠癌细胞HCT116的增殖抑制作用。两药联用cleaved-PARP(caspase的底物, 用以表达凋亡水平)蛋白表达水平增高, AnnexinV阳性细胞率为8.28%, 与UCN-01单用基本一致, 但死亡细胞率明显增高, 为31.44%, 因此可能存在凋亡之外的其他死亡方式。HE染色显示联合用药组约有10.36%的细胞出现多核、巨核改变。提示低浓度L-OHP与亚毒性剂量UCN-01联用出现了凋亡及丝裂灾变的死亡方式。

早期结肠癌症状隐匿, 故确诊时大部分为中、晚期, 其中30%~40%属于晚期, 有一半以上的患者在手术后5年内发生复发或转移<sup>[10]</sup>。L-OHP是治

疗中晚期结肠癌的一线用药,但有神经毒性,且随用药剂量增加,其耐药性增强。临床上,联合用药可以降低细胞毒性、减少化疗药物的剂量、防止肿瘤细胞耐药。因此笔者选择低浓度  $L$ -OHP 与 UCN-01 联合用药进行实验,  $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $L$ -OHP +  $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  UCN-01 联合用药组的细胞增殖抑制率约为 51.2%,明显高于相应  $L$ -OHP 单药(27.2%),UCN-01 单药(25.4%),与  $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $L$ -OHP 单药的细胞增殖抑制率相似。胃癌细胞实验证实, $L$ -OHP 通过抑制增殖细胞核抗原(PCNA)和周期素  $D_1$ (cyclin  $D_1$ )蛋白的表达,影响细胞增殖<sup>[11-12]</sup>。UCN-01 通过抑制  $\text{PDK}_1$  激酶活性,下调 AKT 磷酸化激活水平,从而影响细胞代谢、增殖<sup>[13]</sup>。提示低浓度  $L$ -OHP 联合亚毒性剂量 UCN-01 能明显抑制人结肠癌 HCT116 细胞的增殖,同时降低了用药剂量。

胃癌细胞研究证实  $L$ -OHP 可增加 BGC-823 细胞  $G_1$  期细胞比例,降低 S 期细胞比例,将细胞阻滞于  $G_1$  期,抑制 BGC-823 细胞的生长,并诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。Nitta M 等的研究显示结肠癌细胞主要借助细胞周期检测点激酶(CHK)的激活实现  $G_2$  期阻滞,避免放化疗杀伤,在 DNA 损伤持续存在情况下,如果抑制 CHK 的活性,解除  $G_2$  期阻滞,促使细胞关键蛋白合成未完成进入 M 期,将使大肠癌细胞发生丝裂灾变<sup>[15]</sup>。UCN-01 能够解除大肠癌细胞的  $G_2$  期阻滞,从而增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,诱导大肠癌细胞发生凋亡和非凋亡途径死亡。本实验中  $6.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   $L$ -OHP 的 Annexin V 阳性细胞率为 11.67%, $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  UCN-01 的 Annexin V 阳性细胞率为 8.73%,两药联用组的 Annexin V 阳性细胞率为 8.28%,联用组细胞凋亡率未见明显变化,但死亡细胞约占 31.44%,高于单药组,表明可能出现除凋亡以外的细胞死亡方式。结合 HE 染色观察,联合用药后 HCT116 细胞沿细胞长轴方向拉伸,拉伸的细胞相互交联,体积增大,出现 10.36% 多核、巨核细胞,说明低浓度  $L$ -OHP 与亚毒性剂量 UCN-01 联用可诱导 HCT116 细胞发生丝裂灾变。

本实验虽然证明低浓度  $L$ -OHP 联合亚毒性剂量 UCN-01 能够明显提高人结肠癌细胞 HCT116 增殖抑制率,诱导其发生凋亡及丝裂灾变,但具体机制有待进一步研究,而且该结果来自体外实验,在体内效果有待进一步实验验证。

#### [参考文献]

[1] 吕雪莹. 低剂量奥沙利铂增强紫杉醇对胃癌细胞系

的抗肿瘤效应[D]. 北京:中国农业科学院,2006.

- [2] Me Whinney S R, Goldberg R M, McLeod H L. Platinum neurotoxicity pharmacogenetics [J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(1):10.
- [3] 杨中,唐武军,杨国旺,等. 中药泡洗防治奥沙利铂所致神经毒性的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(10):107.
- [4] Royce S G, Alsop K, Haydon A, et al. The role of SMAD4 in early-onset colorectal cancer[J]. Colorectal Dis, 2010, 12(3):213.
- [5] 刘艳,刘佳丽,许崇安,等. 以奥沙利铂为基础的联合化疗方案治疗晚期胃癌的临床对照研究[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(8):1595.
- [6] Yves Pommier. Abrogation of Chk1-mediated S/G<sub>2</sub> checkpoint by UCN-01 enhances ara-C-induced cytotoxicity in human colon cancer cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2004, 25(6):756.
- [7] Bunch R T, Eastman A. 7-hydroxystaurosporine (UCN-01) cause redistribution cell nuclear antigen and abrogates ciplantin-induced S-phase arrest in Chinese hamster ovary cells[J]. Cell Growth Differ, 1997, 8(7):779.
- [8] Hill D L, Tillery K F, Rose L M, et al. Disposition in mice of 7-hydroxystaurosporine, a protein kinase inhibitor with antitumor activity [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1994, 35(1):89.
- [9] Mudduluru G, George-william J N, Muppala S, et al. Curcumin regulates miR-21 expression and metastasis in colorectal cancer [J]. Biosci Rep, 2011, 31(3):185.
- [10] Sileri P, Dugo S, Bennaoli D, et al. Metachronous splenic amelanosis from colonic carcinoma five years after surgery: A case report and literature review [J]. South Med J, 2009, 102(7):733.
- [11] 任峰,陈伟,王英杰,等. 培美曲塞联合奥沙利铂对胃癌 BGC-823 细胞生长的影响[J]. 肿瘤, 2011, 31(12):1067.
- [12] Saravanan K, Barlowh C, Barton M, et al. Nucleoside transport inhibitors: structure-activity relationships for pyrimido 5, 4-d pyrimidine derivatives that potentiate pemetrexed cytotoxicity in the presence of a (1)-acid glycoprotein [J]. J Med Chem, 2011, 54(6):1847.
- [13] Komander D, Kulae G S, Bain J, et al. Structural basis for UCN-01 (7-hydroxystaurosporine) specificity and PDK1 (3-phosphoinositide-dependent protein kinase 1) inhibition [J]. Biochem, 2003, 375(2):255.
- [14] 马望,高明. 奥沙利铂联合替尼泊昔抑制胃癌 BGC-823 细胞生长和诱导凋亡的作用[J]. 肿瘤, 2010, 30(1):31.
- [15] Nitta M, Kobayashi O, Honda S, et al. Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by DNA-damaging agents [J]. Oncogene, 2004, 23(39):6548.

[责任编辑 何伟]