

· 论 著 ·

白藜芦醇联合化疗药物抑制胃癌 SGC-7901 细胞增殖作用研究

张 红¹, 周 静¹, 姜 政^{2△}

(1. 重庆医药高等专科学校临床医学系 401331; 2. 重庆医科大学附属第一医院消化科 400016)

摘要:目的 分别探讨白藜芦醇(Res)联合 5-氟尿嘧啶(5-FU)在体外对胃癌 SGC-7901 细胞增殖和凋亡的作用及其机制, 为将来临床上以 Res 基础的联合用药提供理论和实验依据。方法 分别采用不同浓度的 5-FU 单独或与半抑制浓度(IC₅₀)的 Res 联合处理 SGC-7901 细胞 24、48、72 h 后, 采用 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)法检测细胞增殖抑制率, 计算 5-FU 单独或与 Res 联合处理对 SGC-7901 细胞增殖抑制的中效浓度, 以检测二者有无联合增效作用; 以 MTT 法检测细胞增殖抑制率; 以流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率; 原位末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡等, 观察联合应用对肿瘤细胞的抑制作用。结果 MTT 法显示: 5-FU 单独作用于 SGC-7901 细胞, 其 IC₅₀ 11.44 μg/mL, 而与 150 μmol/L Res 联合作用时, 则 IC₅₀ 6.65 μg/mL, 说明两种药物联合应用有协同增效作用; FCM 结果显示: 5-FU 分别与 Res 联合应用, 其凋亡率 15.68%, 与 5-FU 单独应用相比(11.60%), 差异有统计学意义(P<0.05); TUNEL 法显示: 联合应用与单独应用相比, 细胞核明显棕黄色深染, 且阳性染色细胞数目明显增多, 表明 5-FU 与 Res 联合作用, 凋亡细胞明显增加。结论 Res 联合 5-FU 可显著抑制肿瘤细胞增殖和促进肿瘤细胞凋亡, 说明 Res 与 5-FU 具有协同作用。

关键词: 细胞增殖; 细胞凋亡; 白藜芦醇; SGC-7901 细胞

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.28.002

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)28-2812-03

The experiment study on the effects and mechanisms of resveratrol combined with As₂O₃ and 5-FU in inducing apoptosis and inhibiting proliferation of SGC-7901 cell

Zhang Hong¹, Zhou Jing¹, Jiang Zheng^{2△}

(1. Department of Clinical Medicine, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China;

2. Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects and mechanisms of Resveratrol(Res) combined with 5-FU on the proliferation and apoptosis of the gastric cancer lines SGC-7901, to provide experimental and theoretical foundation in clinical tumortherapies of Res. **Methods** Having processed SGC-7901 cell with a series of concentration including 5-FU alone or combined with Res for 24 h, 48 h and 72 h respectively, the inhibition rate of cell proliferation were detected at different periods by methyhhiazdyl tetrazolium (MTT) method, and the effective concentration fo 5-FU alone or 5-FU combined with Res for inhibition of cell proliferation was calculated. **Results** The IC₅₀ was 11.44 μg/mL when SGC-7901 cell was processed by 5-FU alone, while it was 6.65 μg/mL when both 5-FU and 150 μmol/L of Res were used. It was shown that there was synergistic effect when Res was used combined with 5-FU. The apoptosis rate of SGC7901 cells in Res combined with 5-FU group (15.68%) was higher than that with 5-FU alone (11.60%) (P<0.05). Karyopycnosis, nuclear chromosomal condensation and segmentation were observed in Res combined with 5-FU group by TUNEL. **Conclusion** Res could significantly intensified the effects of 5-FU in inhibiting the proliferation, inducing and promoting apoptosis of tumor cell and there was synergistic effect when Res was combined with 5-FU.

Key words: cell proliferation; apoptosis; resveratrol; SGC-7901 cell

由于大多数胃癌患者发现较晚, 失去了根治手术的机会或姑息手术治疗后, 采取以化疗为主的综合治疗模式, 以提高胃癌总体疗效已得到了大家的认同, 然而肿瘤的化疗药物普遍存在特异性差、不良反应大以及容易产生耐药等缺点, 因此临床上多采用联合用药, 其目的是为了获得协同作用, 产生最大的抑瘤效应, 减少投药量, 降低不良反应等。因此寻找具有选择性杀伤肿瘤细胞同时赦免正常细胞的抗癌药物是抗肿瘤研究的最终目标。

大量的研究表明, 化疗药物如 As₂O₃ 或 5-FU 在体内、外皆具有抑制肿瘤细胞的增殖和诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[1-3], 由于不良反应明显, 在临床上的应用就受到了一定的限制^[4]。据研究上述药物分别与其他化疗药物联合应用不但增强临床疗效, 同时可减轻临床上不良反应^[5-6], 而白藜芦醇(Resveratrol, Res)能够通过多种途径抑制肿瘤细胞的生长, 因此本实验选择 Res 联合 5-FU 在体外探讨是否具有协同作用及其可能

作用机制, 以期为临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人胃癌细胞株 SGC-7901 购于上海细胞研究所; Res 购自西安冠宇生物有限公司, 其纯度为 99%, 采用二甲亚砜(DMSO)溶解配成 100 mmol/L 的原溶液, -20℃避光保存备用; 实验前以洛斯基维公园纪念研究所(RPMI)1640 培养液稀释成不同浓度, DMSO 终浓度小于 0.2%; MTT、DMSO 购自 Sigma 公司; RPMI 1640 培养液为 Gibco 产品; 小牛血清为杭州四季青公司产品; Roche 试剂盒为中杉公司产品。5-FU 购自重庆医科大学附属一院门诊西药房。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肿瘤细胞株培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 置于 37℃ 孵箱, 5% CO₂ 饱和湿度条件下培养。细胞单层贴壁培养, 每 2~3 天传代 1 次, 细胞传代时用 0.1% 的胰酶消化, 800 r/min 离心 5 min, 去除上清液, 加适

△ 通讯作者, E-mail: jiangz1753@163.com.

量新鲜培养液,吹打混匀成细胞悬液后接种。实验时取对数生长期细胞,细胞存活率均大于 98%。

1.2.2 MTT 检测 Res 联合 5-FU 对细胞增殖抑制率 收集对数生长期肿瘤细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 /L,以 1×10^4 个/孔(每孔 100 μ L)接种于 96 孔板中,调零组只加入等体积培养液。随机分为阴性对照组(加入等体积培养液)、5-FU 单药实验组(分别加入终浓度为 1、2、4、8、16 μ g/mL 的 5-FU)、5-FU 与 Res 联合实验组[分别加入半抑制浓度(IC_{50})的 Res 与不同浓度的 5-FU 配伍]和调零组(加入等体积培养液)。每组设 5 个平行孔,37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 条件下分别培养 24、48、72 h 后,加 5 g/L MTT 20 μ L(调零组除外),继续培养 4 h 后小心吸去上清液,每孔加入 150 μ L DMSO 溶解样品,震荡混匀。用酶联免疫检测仪测定各孔 490 nm 吸光度(A)值,取 5 孔 A 值的均数按公式计算细胞生长抑制率(IR): $IR(\%) = (1 - \text{试验孔 A 均值} / \text{对照孔均值}) \times 100\%$,比较联合用药前后 5-FU 对肿瘤细胞的 IC_{50} 的变化,推断两药是否有协同或拮抗作用。

1.2.3 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率 培养细胞和分组同前,作用 48 h 后,收集联合用药组(加入终浓度为 $1/2 IC_{50}$ 的 Res 与 $1/2 IC_{50}$ 5-FU 联合作用),单药实验组(加入终浓度为 IC_{50} 的 5-FU)和对照组(加入等体积培养液)细胞,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,70%冷乙醇固定过夜,PBS 离心洗涤 2 次,加入 10 μ L RNA 酶(50 μ g/mL),37 $^{\circ}$ C 温浴 30 min 后,碘化丙啶(PD)染液冰浴作用 30 min,流式细胞仪分析细胞凋亡。

1.2.4 原位末端标记(TUNEL)法检测细胞凋亡 收集对数生长期肿瘤细胞,接种于放有盖玻片的 24 孔板中(3×10^4 个/孔),随机分为对照组(加入等体积培养液)、单药实验组(加入终浓度为 IC_{50} 的 5-FU)和联合用药组(加入终浓度为 $1/2 IC_{50}$ 的 Res 与 $1/2 IC_{50}$ 5-FU 联合作用),培养 72 h 后吸弃培养液,37 $^{\circ}$ C PBS 洗 3 次,吸干净孔内液体,加新鲜配制的 4%多聚甲醛,室温固定 60 min。PBS 洗 3 次,吸干净孔内液体,再加 3%过氧化氢-甲醇室温作用 10 min,PBS 洗 3 次,把培养孔板放在冰上,加 0.1% Triton-X-100,冰浴 5 min,用 PBS 洗 3 次,加 TUNEL 反应液,DAB 显色,光镜观察结果并照相。

1.3 统计学处理 使用 SPSS12.0 统计软件对数据进行处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。细胞的生长抑制率采用方差分析,细胞凋亡率采用方差分析(One-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MTT 检测 Res 联合 5-FU 对细胞增殖抑制率 以 1、2、4、8、16 μ g/mL 的 5-FU 分别单独或联合 IC_{50} 的 Res 共同作用处理细胞 24、48、72 h,MTT 法测定 5-FU 对胃癌 SGC-7901 细胞的生长抑制作用,结果显示:5-FU 单独作用于 SGC-7901 细胞的 IC_{50} 为 11.44 μ g/mL(以后实验采用近似浓度 11.4 μ g/mL),5-FU 与 150 μ mol/L Res 联合作用的 IC_{50} 为 6.65 μ g/mL,联合作用后 5-FU 半数抑制浓度降低。检测细胞生长抑制率并绘制出生长抑制曲线所示,曲线表明 Res 与 5-FU 有协同增效作用,见封 2 图 1。

2.2 FCM 检测细胞凋亡率 作用 48 h 后,收集联合用药组(加入终浓度为 75 μ mol/L 的 Res 与 5.7 μ g/mL 5-FU 联合作用)、单药实验组(加入终浓度为 11.4 μ g/mL 的 5-FU)和对照组(加入等体积培养液)细胞,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。结果联合用药组与单独用药组和对照组相比,细胞凋亡率明显增高,见封 2 图 2。

2.3 TUNEL 法检测细胞凋亡 经 TUNEL 检测结果显示:5.7 μ g/mL 5-FU 与 75 μ mol/L Res 共同作用处理 72 h 的

SGC-7901 细胞,与 11.4 μ g/mL 的 5-FU 单独应用相比较,细胞核明显棕黄色深染,且阳性染色细胞数目明显增多,而对照组细胞核染色较淡,染色细胞数目较少或没有,表明 5-FU 与 Res 联合作用,凋亡细胞明显增加,见封 2 图 3。

3 讨 论

Res 的化学名为 3,4',5 三羟基-反-均二苯代乙烯,属于非黄酮类多酚化合物,广泛存在于种子植物中,并以新鲜葡萄皮中含量最高。随着研究的深入,人们发现 Res 对人类具有抗肿瘤特性和抗氧化性、抗突变等作用,可显著抑制多种人类肿瘤细胞的生长、诱导肿瘤细胞凋亡,这可能与抑制细胞色素酶^[7-8]、抑制环氧合酶^[9-10]、促进肿瘤细胞凋亡和诱导肿瘤细胞分化^[11-14]以及提高机体抗肿瘤免疫应答水平,调节细胞因子分泌等^[15]有关。

前期实验已证实 Res 具有肯定的诱导胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的作用,这一作用具有明显的时间与剂量依赖性,而且 Res 诱导肿瘤细胞凋亡的机制可能是多方面的。通过 MTT 法研究发现,Res 对胃癌 SGC-7901 细胞有明显的抑制作用,而且在一定浓度范围内,表现出明显的时间依赖性和浓度依赖性;同时研究发现 Res 不仅能抑制 Bcl-2 和诱导 Bax 表达,转而诱发 Caspase-3 的激活,而且可以诱导 Fas 的表达,提示了 Res 诱导肿瘤细胞凋亡可以通过多种途径的共同作用,与文献报道一致^[11-14]。

5-FU 是临床应用较为广泛的化疗药物,对多种肿瘤细胞具有杀伤作用。动物实验表明,5-FU 抑瘤率较高,但同时不良反应也较重,主要表现为腹胀、厌食、精神萎靡、消瘦等症状,而 Res 单用时无此类症状的发生。据 Bernhaus 等^[16]报道 DIG(Digalloyl resveratrol,DIG)能够诱导人结肠肿瘤细胞系 HT-29 的凋亡,同时抑制细胞从 S 到 G2/M 期的转化。与 5-FU 联合应用,则发现一个累加的生长抑制效应。Chan 等^[17]报道,5-FU 主要是激活 Caspase-6 而诱导肿瘤细胞的凋亡,当 Res 为 200 μ mol/L,可增强 5-FU 激活 Caspase-6 而诱导细胞的凋亡作用,当 Res 位于 25 或 50 μ mol/L 时,则抑制 5-FU 介导的细胞凋亡,也就是当两药合用指数为 $CI < 0.9$ 时,具有增效作用,而 $CI > 1.1$ 时,则具有拮抗作用。本实验以胃癌 SGC-7901 细胞为研究对象,Res 联合 5-FU 后,SGC-7901 细胞的生长抑制曲线明显比单用 5-FU 的生长抑制曲线明显向上偏移,说明 Res 能明显增强化疗药物 5-FU 的抑瘤效果,两药联合应用有明显的协同效应。通过流式细胞技术和 TUNEL 法检测细胞凋亡也证实了这一结论,与文献报道相一致。

综上所述,Res 不仅单独应用对胃癌 SGC-7901 细胞有诱导凋亡的作用,而且和其他化疗药物(As_2O_3 或 5-FU)共同作用可以明显增强其他化疗药物的抗肿瘤活性,增强抑制肿瘤细胞生长并诱导其凋亡,同时减少化疗药物的不良反应,因此对胃癌的治疗具有潜在的应用前景,值得深入研究并逐渐向临床应用过渡。

参考文献:

- [1] Raoul JL, Van Laethem JL, Peeters M, et al. Cetuximab in combination with irinotecan/5-fluorouracil/folinic acid (FOLFIRI) in the initial treatment of metastatic colorectal cancer: a multicentre two-part phase I / II study [J]. BMC Cancer, 2009, 9(1): 112-123.
- [2] Sablin MP, Italiano A, Spano JP. Colorectal cancers: prognostic and predictive factors of response to treatment [J]. Bull Cancer, 2009, 96(4): 417-423.

- [3] Pettersson HM, Pietras A, Munksgaard Persson M, et al. Arsenic trioxide is highly cytotoxic to small cell lung carcinoma cells[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(1):160-170.
- [4] Dalzell JR, Samuel LM. The spectrum of 5-fluorouracil cardiotoxicity[J]. *Anticancer Drugs*, 2009, 20(1):79-80.
- [5] Huq A, Singh B, Meeker T, et al. The metal-binding domain of IGFBP-3 selectively delivers therapeutic molecules into cancer cells[J]. *Anticancer Drugs*, 2009, 20(1):21-31.
- [6] 程翼飞, 张乐萍, 陆爱东, 等. 砷剂可以改善儿童急性早幼粒细胞白血病长期预后吗? ——单中心的经验[J]. *中华血液学杂志*, 2008, 29(7):454-458.
- [7] Sengottuvelan M, Viswanathan P, Nalini N. Chemopreventive effect of trans-resveratrol—a phytoalexin against colonic aberrant crypt foci and cell proliferation in 1,2-dimethylhydrazine induced colon carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(5):1038-1046.
- [8] Wang Y, Lee KW, Chan FL. The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells[J]. *Toxicol Sci*, 2006, 92(1):71-77.
- [9] Miller ME, Holloway AC, Foster WG. Benzo-[a]-pyrene increases invasion in MDA-MB-231 breast cancer cells via increased COX- II expression and prostaglandin E2 (PGE2) output[J]. *Clin Exp Metastasis*, 2005, 22(2):149-156.
- [10] Kim YA, Lim SY, Rhee SH. Resveratrol inhibits inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression in beta-amyloid-treated C6 glioma cells[J]. *Int J Mol Med*, 2006, 17(6):1069-1075.
- [11] Kim AL, Zhu Y, Zhu H. Resveratrol inhibits proliferation of human epidermoid carcinoma A431 cells by modulating MEK1 and AP-1 signalling pathways[J]. *Exp Dermatol*, 2006, 15(7):538-546.
- [12] Cao Y, Wang F, Liu HY. Resveratrol induces apoptosis and differentiation in acute promyelocytic leukemia(NB4) cells[J]. *Asian Nat Prod Res*, 2005, 7(4):633-641.
- [13] Sun C, Hu Y, Liu X. Resveratrol downregulates the constitutive activation of nuclear factor-kappaB in multiple myeloma cells, leading to suppression of proliferation and invasion, arrest of cell cycle, and induction of apoptosis[J]. *Cancer Genet Cytogenet*, 2006, 165(1):9-19.
- [14] Lanzilli G, Fuggetta MP, Tricarico M. Resveratrol downregulates the growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro[J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(3):641-648.
- [15] Mainardi T, Kapoor S, Bielory L. Complementary and alternative medicine: herbs, phytochemicals and vitamins and their immunologic effects[J]. *Allergy Clin Immunol*, 2009, 123(2):283-294.
- [16] Bernhaus A, Fritzer-Szekeres M, Grusch M, et al. Digalloylresveratrol, a new phenolic acid derivative induces apoptosis and cell cycle arrest in human HT-29 colon cancer cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 274(2):299-304.
- [17] Chan JY, Phoo MS, Clement MV, et al. Resveratrol displays converse dose-related effects on 5-fluorouracil-evoked colon cancer cell apoptosis; the roles of caspase-6 and p53[J]. *Cancer Biol Ther*, 2008, 7(8):1305-1312.

(收稿日期:2011-04-30 修回日期:2011-06-14)

(上接第 2811 页)

- [7] 汤葳, Chan A, Chik S, 等. 细胞因子诱导支气管上皮细胞表达嗜酸粒细胞趋化因子[J]. *现代免疫学*, 2005, 25(1):61-65, 81.
- [8] Matsukura S, Stellato C, Georas SN, et al. Interleukin 13 upregulates eotaxin expression in airway epithelial cells by a STAT6-dependent mechanism[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001, 24(6):755-761.
- [9] Odaka M, Matsukura A, Kuga H, et al. Differential regulation of chemokine expression by Th1 and Th2 cytokines and mechanisms of eotaxin/CCL-11 expression in human airway smooth muscle cells[J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2007, 143(1):84-88.
- [10] Chiu PR, Lee WT, Chu YT, et al. Effect of the Chinese herb extract osthonol on IL-4-induced eotaxin expression in BEAS-2B cells[J]. *Pediatr Neonatol*, 2008, 49(4):135-140.
- [11] Ashino S, Wakita D, Zhang Y, et al. CpG-ODN inhibits airway inflammation at effector phase through down-regulation of antigen-specific Th2-cell migration into lung[J]. *Int Immunol*, 2008, 20(2):259-266.
- [12] Mann MJ. Transcription factor decoys: a new model for disease intervention[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1058:128-139.
- [13] 索立俊, 施毅, 张方, 等. 核因子- κ B 圈套寡核苷酸转染对小鼠成熟树突状细胞生物学特性的影响[J]. *中国呼吸与危重监护杂志*, 2009, 8(3):271-274.
- [14] Lührmann A, Tschernig T, von der Leyen H, et al. Decoy oligodeoxynucleotide against STAT transcription factors decreases allergic inflammation in a rat asthma model[J]. *Exp Lung Res*, 2010, 36(2):85-93.
- [15] Igawa K, Satoh T, Yokozeki H. A therapeutic effect of STAT6 decoy oligodeoxynucleotide ointment in atopic dermatitis; a pilot study in adults[J]. *Br J Dermatol*, 2009, 160(5):1124-1126.
- [16] Templin MV, Levin AA, Graham MJ, et al. Pharmacokinetic and toxicity profile of a phosphorothioate oligonucleotide following inhalation delivery to lung in mice[J]. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, 2000, 10(5):359-368.
- [17] 陈贵华, 李代先, 周丽华. 哮喘患者使用吸入激素的依从性调查及对策[J]. *重庆医学*, 2009, 38(17):2213-2214.

(收稿日期:2011-04-28 修回日期:2011-06-04)