

## 二去水卫矛醇对四种肿瘤细胞的体外抑制作用 Inhibitory Effect of 1, 2: 5, 6 - dianhydrogalactitol on Four Different Kinds of Tumor Cells in Vitro

张慧玲<sup>1</sup>, 王稼农<sup>2</sup>, 梁 霜<sup>1</sup>, 刘华钢<sup>1\*</sup>

ZHANG Hui-ling<sup>1</sup>, WANG Jia-nong<sup>2</sup>, LIANG Shuang<sup>1</sup>, LIU Hua-gang<sup>1</sup>

(1. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021; 2. 广西食品药品检验所, 广西南宁 530021)

(1. Pharmacy College, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China;

2. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning, Guangxi, 530021, China)

**摘要:**采用噻唑蓝(MTT)比色法检测不同浓度二去水卫矛醇(DAG)对人胃癌细胞 SGC-7901、人肺癌细胞 H460、人鼻咽癌细胞 CNE 和人肝癌细胞 BEL-7404 的抑制率研究 DAG 对 4 种肿瘤细胞的体外抑制作用。结果表明, DAG 对 4 种癌细胞: CNE、H460、SGC-7901 和 BEL-7404 有较强的抑制作用, 作用 72h 后半数抑制浓度(72h- $IC_{50}$ ) 分别为  $4.12\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $15.98\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $16.00\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  和  $16.73\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。显微镜下可见经药物作用后细胞圆缩、胞质浓缩、胞浆内颗粒集中边缘化甚至细胞溶解等损伤现象。DAG 在体外对上述 4 种癌细胞有明显的抑制生长作用。

**关键词:**二去水卫矛醇 肿瘤细胞 MTT 试验 生长抑制

中图分类号: R965.1, R73-35<sup>+</sup>4, Q2-33 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2013)01-0082-03

**Abstract:** The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry essay was adopted to test the inhibitory effects of 1, 2: 5, 6-dianhydrogalactitol (DAG) on human gastric tumor SGC-7901, lung tumor cell H460, nasopharyngeal carcinoma cell CNE and liver cancer BEL-7404, which were exposed to different concentration of DAG. The results showed that DAG had potential antiproliferative activity on these 4 types of human tumor cells, the  $IC_{50}$  value of DAG treatment for 72h was  $4.12\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $15.98\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ,  $16.00\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  and  $16.73\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  for CNE cells, H460 cells, SGC-7901 cells and BEL-7404 cells, respectively. The microscopic observation showed the cell damages such as cells circular retracted, cell matrix concentrated, granules of inner cellular gathered and marginalized even cytolysis after the drug administration. DAG has potential inhibitory effect on the four kinds of tumor cells above-mentioned in vitro.

**Key words:** 1, 2: 5, 6-diacetylgalactitol, tumor cells, MTT essay, antiproliferative activity

二去水卫矛醇(1, 2: 5, 6 - dianhydrogalactitol, DAG) 是以主产于广西的卫矛科植物蜜花美登木 (*Maytenus confertiflorus* J. Y. Lao ex X. X. Chen) 中分离出的卫矛醇(dulcitol)<sup>[1]</sup> 为原料, 经溴化、消除反应而制得的 1, 6-二溴卫矛醇(1, 6-dibromidulcitol) 的双环氧化物, 具有易溶于水, 抗肿瘤活性高等

优点<sup>[2]</sup>, 是新型的植物生物碱类抗肿瘤药。DAG 对慢性粒细胞白血病有较好的近期疗效, 对肺癌、胃肠道肿瘤、原发性脑瘤等也有一定疗效<sup>[3]</sup>。关于 DAG 的文献报道, 对其前体药物卫矛醇及相关衍生物的报道比较少而且多集中在对血液肿瘤的研究<sup>[4~10]</sup>, 对 DAG 其他可能的抗肿瘤作用以及分子机制研究在国内外尚未见详尽报道。近年来大量研究表明生物碱抗肿瘤作用机制的研究有助于发现靶向制剂, 如靶向作用于细胞周期、细胞凋亡、微管、多药耐药等方面<sup>[11]</sup>, 同时, 也能给联合用药提供理论基础。为此, 本研究采用噻唑蓝(MTT)比色法检测 DAG 体外抗肿瘤活性, 为扩大其抗癌谱并进一步做结构改造和进

收稿日期: 2011-01-07

作者简介: 张慧玲(1985-), 女, 硕士研究生, 主要从事抗肿瘤药物与药物毒理研究。

\* 通讯作者: 刘华钢, 女, 教授, 博士生导师, 主要从事药物毒理学与抗肿瘤药物研究。E-mail: lhg@gxfda.gov.cn.

行分子机制研究提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 药物与细胞株

二去水卫矛醇由广西梧州制药(集团)股份有限公司提供,批号:120302;临用前用完全培养基液配成所需浓度。RPMI 1640 培养基是赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司产品,批号:NXA0547。胎牛血清是赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司产品,批号:NVA0227。0.25%胰蛋白酶(1×)溶液是赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司产品,批号:NWG0447。磷酸盐缓冲液(PBS,0.01mol·L<sup>-1</sup>)是福州迈新生物技术开发有限公司产品,批号:1111080101。青链霉素混合液(100×)是北京索莱宝科技有限公司产品,批号:20120321。噻唑蓝(MTT)是北京索莱宝科技有限公司产品,批号:M8180。

人胃癌细胞 SGC-7901、人鼻咽癌细胞 CNE、人肝癌细胞 BEL-7404 和人肺癌细胞 H460 购自中科院上海细胞库。

### 1.2 主要仪器设备

倒置显微镜:重庆光学仪器厂出品,型号 XDS-1B。CO<sub>2</sub> 培养箱:Thermo Fisher scientific, USA, 型号 311。酶标仪:Tecan Austria GmbH, 型号 Sunrise。

### 1.3 细胞培养方法

将细胞用含 10%胎牛血清和青链霉素混合液(终浓度为青霉素 100 IU·ml<sup>-1</sup>,链霉素 100μg·ml<sup>-1</sup>)的 RPMI1640 完全培养液培养在 37℃,5% CO<sub>2</sub> 培养箱中,隔天换液,待细胞长至覆盖培养瓶 80%左右用 0.25%胰蛋白酶溶液消化传代。取生长至对数生长期的细胞用于实验。

表 1 不同 DAG 浓度下 CNE,H460,SGC-7901,BEL-7404 细胞的 OD 值及细胞生长抑制率(n=5)

Fig. 1 OD value and cell growth inhibition rate of CNE,H460,SGC-7901 and BEL-7404 cells in different DAG concentrations

DAG (μg·ml <sup>-1</sup> )	CNE		H460		SGC-7901		BEL-7404	
	OD( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 Inhibition rate(%)	OD( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 Inhibition rate(%)	OD( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 Inhibition rate(%)	OD( $\bar{x} \pm s$ )	抑制率 Inhibition rate(%)
0.0	1.398±0.19	/	1.760±0.26	/	1.733±0.11	/	1.843±0.25	/
0.5	1.183±0.11	15.38						
1.0	1.023±0.09	26.84						
2.0	0.880±0.11	37.06	0.998±0.06	43.30	1.367±0.10	21.14	1.544±0.19	16.24
4.0	0.662±0.07	52.63	0.909±0.06	48.38	1.195±0.10	31.01	1.475±0.20	19.94
8.0	0.364±0.07	73.95	0.827±0.04	53.04	1.149±0.12	33.68	1.337±0.13	27.44
12.0	0.237±0.06	83.06	0.700±0.04	60.24			1.167±0.15	36.67
16.0	0.196±0.05	85.95	0.487±0.06	72.36	0.708±0.07	59.16	0.875±0.15	52.51
20.0					0.349±0.02	79.88	0.493±0.11	73.24
24.0					0.265±0.04	84.68	0.219±0.08	88.10

### 1.4 MTT 试验方法

取对数生长期的 SGC-7901、CNE、BEL-7404 和 H460 细胞,分别以每孔 6×10<sup>3</sup>、5×10<sup>3</sup>、7×10<sup>3</sup>和 6×10<sup>3</sup>个细胞接种于 96 孔板,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中,(37±1)℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 24h。弃去培养液,在上述各细胞中分别加入 0.5μg·ml<sup>-1</sup>,1.0μg·ml<sup>-1</sup>,2.0μg·ml<sup>-1</sup>,4.0μg·ml<sup>-1</sup>,8.0μg·ml<sup>-1</sup>,12.0μg·ml<sup>-1</sup>,16.0μg·ml<sup>-1</sup>,20.0μg·ml<sup>-1</sup>,24.0μg·ml<sup>-1</sup> DAG 完全培养液,同时设空白对照组,每组设 5 个复孔,其余边缘孔以灭菌 PBS 填充满,置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养 72 h。倒置显微镜下观察细胞形态,并于每孔中加入 MTT 溶液 20μl,继续置于培养箱中,4h 后终止培养。倾去培养液,每孔加入 DMSO 200μl 显色,置振荡器适度水平振荡 10min,使孔内溶液颜色均匀。用酶标仪测定吸光度值(OD),采用双波长测定,测定波长为 570 nm,参比波长为 630nm。按下式计算 72h 抑制率:

抑制率=(1-实验组平均 OD 值÷对照组平均 OD 值)×100%,计算细胞生长抑制率达 50%的 DAG 浓度,以 72h-IC<sub>50</sub> 表示。在倒置显微镜下观察细胞形态的变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 IC<sub>50</sub> 测定结果

不同浓度的 DAG 对 SGC-7901,CNE,BEL-7404 及 H460 细胞作用 72h 的 OD 值及细胞增殖抑制率见表 1。表 1 结果显示,经不同浓度 DAG 作用 72h 后,上述肿瘤细胞的 OD 值与对照组相比均呈下降趋势,且有明显的浓度-效应关系。

用 spss13.0 软件正规几率单位法计算 DAG 对 4 种细胞的  $IC_{50}$  值。鼻咽癌细胞 CNE 的 72h- $IC_{50}$  值为  $4.12 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (95% 置信区间为  $2.18 \sim 5.73 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 提示鼻咽癌细胞 CNE 对 DAG 较为敏感, 即较低浓度的药物就可以使该细胞的生长抑制率达到 50%; 而肺癌细胞 H460, 胃癌细胞 SGC-7901 和肝癌细胞 BEL-7404 的 72h- $IC_{50}$  分别为  $15.98 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (95% 置信区间为  $12.13 \sim 18.54 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ),  $16.00 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (95% 置信区间为  $12.18 \sim 17.94 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) 和  $16.73 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  (95% 置信区间为  $14.85 \sim 18.07 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), 提示这 3 种肿瘤细胞对该 DAG 的敏感性相对较低。

## 2.2 细胞形态观察结果

DAG 作用于 SGC-7901、CNE、BEL-7404 和 H460 细胞 72h 后, 在倒置显微镜下观察, 各给药组细胞均不同程度出现贴壁能力减弱、细胞圆缩、胞质浓缩、胞浆内颗粒集中边缘化甚至细胞溶解等损伤现象, 而各对照组细胞均生长良好, 细胞形态完整, 胞质透亮。

## 3 结论

本研究初步探讨了 DAG 对 SGC-7901、CNE、BEL-7404 及 H460 四种肿瘤细胞的体外抑制作用。结果表明, 经不同浓度 DAG 作用 72h 后, 四种肿瘤细胞的 OD 值与对照组相比均呈下降趋势, 且有明显的浓度-效应关系。DAG 作用于 H460 细胞的 72h- $IC_{50}$  为  $15.98 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; 作用于 SGC-7901 细胞的 72h- $IC_{50}$  为  $16.00 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; 作用于 BEL-7404 的 72h- $IC_{50}$  为  $16.73 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ ; 而 CNE 细胞对 DAG 较为敏感, 72h- $IC_{50}$  为  $4.12 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ , 即较低浓度的药物就可以使该细胞的生长抑制率达到 50%。镜下观察显示, DAG 给药组细胞不同程度出现细胞圆缩、胞质浓缩、胞浆内颗粒集中边缘化甚至细胞溶解等损伤现象。本研究结果提示 DAG 对胃癌、鼻咽癌、肝癌及肺癌等有潜在治疗价值。DAG 对胃癌、鼻咽癌、肝癌及肺癌等的作用机制有待于下一步深入研究, 以

便于发现新的作用靶点, 对其进行相应的结构改造, 开发抗肿瘤靶向制剂。

## 参考文献:

- [1] Shirota O, Morita H, Takeya K, et al. Isolation of antitumor substance, dulcitol, from *Maytenus ebenifolia* [J]. Natural Medicines, 1998, 52(2): 184-186.
- [2] Németh L, Institóris L, Somfai S, et al. Pharmacologic and antitumor effects of 1, 2: 5, 6-dianhydrogalactitol (NSC-132313) [J]. Cancer Chemother Rep, 1972, 56(5): 593-602.
- [3] 樊亦军, 韦焕营, 邢邦华, 等. 1, 2: 5, 6-二去水卫矛醇抗肿瘤作用及毒性[J]. 华西药学杂志, 1987, 2(3): 161-165.
- [4] 许建功, 何瑞芳, 赵营, 等. 二乙酰二脱水卫矛醇对白血病 L1210 细胞增殖的抑制作用[J]. 华西药学杂志, 2006, 21(1): 56-58.
- [5] 杨锦南, 李平法, 李彩莲, 等. 二乙酰二脱水卫矛醇诱导人白血病 HL-60 细胞凋亡与 Bcl-2 家族的关系[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(4): 405-408.
- [6] 梁东良, 李平法, 杨锦南, 等. 二乙酰二脱水卫矛醇对小鼠白血病 L1210 细胞增殖的影响[J]. 热带医学杂志, 2002, 2(2): 150-156.
- [7] 刘敬弢, 郭维, 徐波, 等. 二乙酰二脱水卫矛醇对小鼠移植性肝癌 H22 肿瘤生长和血管生成的抑制作用[J]. 中国新药杂志, 2011, 20(2): 115-119.
- [8] 曹林枝, 滕少康, 廖志红. 二乙酰去水卫矛醇对胃癌细胞系 HGC27 生长和凋亡的影响[J]. 广西医科大学学报, 2008, 25(3): 417-418.
- [9] 赖祥进, 曹林枝, 周瑛, 等. 野生型 p53 基因与双脱水二乙酰卫矛醇联合诱导肝癌 HLE 细胞凋亡的研究[J]. 癌症, 2004, 23(10): 1139-1143.
- [10] 曹林枝, 滕少康, 廖志红, 等. 双脱水二乙酰卫矛醇对 3 种肝癌细胞生长的影响[J]. 广西医科大学学报, 2007, 24(4): 572-574.
- [11] 欧贤红, 刘华钢, 徐恒. 天然生物碱及衍生物抗肿瘤机制研究进展[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6): 708-710.

(责任编辑: 邓大玉)