

二去水卫矛醇对人脑肿瘤细胞体外抑制作用*

Inhibitory Effect of 1,2:5,6-Dianhydrogalctitol on Human Brain Tumor Cells *in Vitro*

梁乔芳¹, 刘华钢^{2**}, 谭强¹, 苏桂玉¹, 彭晓丽¹, 徐红娟¹

LIANG Qiao-fang¹, LIU Hua-gang², TAN Qiang¹, SU Gui-yu¹, PENG Xiao-li¹, XU Hong-juan¹

(1. 广西中医药大学药学院, 广西南宁 530001; 2. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021)

(1. Pharmacy College, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, 530001, China; 2. Pharmacy College, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021, China)

摘要:【目的】探寻二去水卫矛醇(1,2:5,6-Dianhydrogalctitol, DAG)对人脑肿瘤细胞的抑制作用,为 DAG 抗肿瘤作用提供理论基础。【方法】通过体外实验,并采用噻唑蓝(MTT)比色法检测不同浓度 DAG 对 11 株人脑肿瘤细胞的体外抑制作用,观察 DAG 的半数抑制浓度。【结果】DAG 对 IMR-32、SH-SY5Y、U87、A172、BT325、T98G、SHG-44、U373、C6、SK-N-BE、U251 等 11 株人脑肿瘤细胞作用 72 h 后半数抑制浓度(72h-IC₅₀)分别为 24.28 μg/mL、19.24 μg/mL、21.55 μg/mL、25.13 μg/mL、20.63 μg/mL、21.03 μg/mL、24.91 μg/mL、23.52 μg/mL、22.06 μg/mL、22.92 μg/mL、23.44 μg/mL。【结论】DAG 在体外对上述 11 株人脑细胞均有抑制生长作用。

关键词:二去水卫矛醇 人脑肿瘤细胞 噻唑蓝试验 半数抑制浓度

中图分类号:R965.1, Q2-33 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2015)04-0454-03

Abstract:【Objective】The inhibitory effect of 1,2:5,6-Dianhydrogalctitol(DAG) on 11 strains of human brain tumor cells was investigated *in vitro*. 【Methods】MTT assay was performed to determine the half inhibitory concentration of DAG for the 11 strains of human brain tumor cells. 【Results】The half inhibitory concentration of DAG for IMR-32, SH-SY5Y, U87, A172, BT325, T98G, SHG-44, U373, C6, SK-N-BE and U251 within 72 h was 24.28 μg/mL, 19.24 μg/mL, 21.55 μg/mL, 25.13 μg/mL, 20.63 μg/mL, 21.03 μg/mL, 24.91 μg/mL, 23.52 μg/mL, 22.06 μg/mL, 22.92 μg/mL and 23.44 μg/mL, respectively. 【Conclusion】DAG exhibits the inhibitory activity on the above mentioned 11 strains of human brain tumor cells *in vitro*.

Key words:1,2:5,6-Dianhydrogalctitol, human brain tumor cells, MTT assay, the half inhibitory concentration

收稿日期: 2015-03-24

修回日期: 2015-04-25

作者简介: 梁乔芳(1988-), 女, 硕士研究生, 主要从事药物抗肿瘤与药物毒理学研究。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 12237007)资助。

** 通讯作者: 刘华钢(1956-), 女, 教授, 博士生导师, 主要从事药物抗肿瘤与药物毒理学研究, E-mail: lug@gxfda.gov.com。

0 引言

【研究意义】脑肿瘤是致命性疾病, 是肿瘤中最易危及生命, 最难治疗的疾病。由于化疗药物受限于血脑屏障, 加之药物的毒副作用, 目前脑肿瘤的治疗已成为公认的医学难题。二去水卫矛醇(1,2:5,6-dianhydrogalactitol, DAG)是 1,6-二溴卫矛醇脱溴生成的双环氧化物, 系新型的抗肿瘤药物, 它与烷化剂形

成交叉耐药,结构上可归为烷化剂类,毒性小,为广谱抗肿瘤药物,又可透过血脑屏障。而 1,6-溴卫矛醇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^[1]为原料,经溴化、消除反应而制得的。对人脑肿瘤细胞进行体外抗肿瘤活性研究,可以为 DAG 抗肿瘤作用提供理论基础。【前人研究进展】早期临床试验表明,DAG 对慢性粒细胞白血病、肺癌、原发性脑瘤、人胃癌细胞、人鼻咽癌细胞、人肺癌细胞、肾上腺肿瘤、膀胱癌、胃肠道肿瘤实体瘤等均有抑制作用^[2~7]。另外,还有研究表明 DAG 是周期非特异性药物,它可以与某些周期特异性药产生协同作用^[8]。【本研究切入点】目前,国内外关于 DAG 在抗人脑肿瘤作用研究的相关文献报道比较少。【拟解决的关键问题】通过不同浓度的 DAG 对 11 株人脑肿瘤进行体外抗肿瘤活性实验,探寻 DAG 对人脑肿瘤细胞的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 药物与细胞株

DAG 由广西梧州制药(集团)股份有限公司提供。胎牛血清(FBS)、RPMI1640、高糖 DMEM、低糖 DMEM 培养基、0.25%胰蛋白酶溶液均购于赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司。磷酸盐缓冲液(PBS)购于福州迈新生物技术开发有限公司。青链霉素混合液(100U/mL)、噻唑蓝(MTT)均购于北京索莱宝科技有限公司。11 株肿瘤细胞从通派(上海)生物科技有限公司购买。

1.2 主要仪器

CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher scientific)、酶

表 1 不同 DAG 浓度对 11 株细胞的 OD 值、细胞生长抑制率及 72h-IC₅₀ (n=5) 的影响

Table 1 OD value, cell growth inhibition rate and IC₅₀ of IMR-32, SH-SY5Y and U87 in different DAG concentrations (n=5)

DAG (μg/mL)	IMR32			SH-SY5Y			U87		
	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ (μg/mL)	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ (μg/mL)	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ (μg/mL)
0.00	0.78±0.02	0.00		0.68±0.01	0.00		0.81±0.01	0.00	
2.00	0.69±0.03	8.79		0.62±0.03	8.28		0.77±0.01	5.14	
4.00	0.62±0.02	18.12		0.57±0.03	16.35		0.72±0.04	10.84	
8.00	0.56±0.03	25.91	20.57	0.50±0.02	26.99	19.51	0.62±0.04	23.10	21.55
12.00	0.51±0.01	32.33		0.43±0.07	36.41		0.53±0.02	34.72	
16.00	0.42±0.03	43.81		0.36±0.04	46.70		0.46±0.01	42.94	
20.00	0.37±0.06	51.61		0.31±0.07	53.75		0.41±0.01	49.12	
50.00	0.21±0.02	72.26		0.20±0.05	70.02		0.24±0.02	70.64	

联免疫检测仪(Tecan Austria GmbH)。

1.3 细胞的培养

脑肿瘤细胞培养于 RPMI1640、高糖 DMEM 和低糖 DMEM 培养液中,且培养液中添加 10% 的 FBS 和青-链霉素混合液,于 37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。细胞贴壁生长,隔天换液。当细胞长满到瓶底的 80% 时,用 0.25% 的胰酶溶液进行消化传代,选取状态良好的细胞进行后续细胞增殖抑制实验。

1.4 肿瘤细胞增殖抑制试验

收集对数期生长细胞,调整细胞密度,接种于 96 孔板,每孔 100 μL,以细胞培养基为空白对照组,未加药物组为阴性对照,经 5 个不同浓度的 DAG 处理 72 h 后加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,放入 CO₂ 培养箱中,继续孵育 4 h,弃去孔内培养液,加入 100 μL DMSO,震荡 10 min,于 570 nm 波长酶标仪测定吸光度 OD 值。实验重复 3 次,取平均值为最终结果。计算增殖抑制率。细胞增殖抑制率=(1-实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)×100%。

2 结果与分析

不同浓度的 DAG 对细胞作用 72 h 的 OD 值及细胞增殖抑制率见表 1。可以看出,经不同浓度 DAG 作用 72 h 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。通过 SPSS 16.0 软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)值。DAG 对以上 11 株人脑肿瘤细胞均有毒性,说明 DAG 对人脑肿瘤细胞有抑制作用。

Continue table 1

DAG ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	A172			BT325			T98G		
	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.00	0.59±0.01	0.00		0.72±0.05	0.00		0.72±0.05	0.00	
2.00	0.52±0.05	11.82		0.65±0.01	9.08		0.61±0.05	14.58	
4.00	0.48±0.03	19.00		0.58±0.01	19.93		0.58±0.03	19.09	
8.00	0.45±0.02	24.23	21.90	0.51±0.01	28.56	19.07	0.51±0.02	28.62	21.02
12.00	0.41±0.01	31.47		0.46±0.02	35.56		0.48±0.01	33.34	
16.00	0.35±0.02	40.27		0.39±0.03	45.54		0.43±0.02	40.65	
20.00	0.29±0.07	50.14		0.34±0.02	52.77		0.35±0.07	51.05	
50.00	0.16±0.02	73.45		0.20±0.03	72.07		0.20±0.02	71.94	

Continue table 1

DAG ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SHG44			U373			C6		
	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.00	0.74±0.03	0.00		0.65±0.03	0.00		0.75±0.03	0.00	
2.00	0.68±0.02	8.30		0.60±0.03	7.46		0.65±0.02	14.14	
4.00	0.64±0.02	13.95		0.56±0.03	13.55		0.58±0.03	22.28	
8.00	0.59±0.01	20.78	23.46	0.49±0.04	23.80	20.41	0.52±0.01	30.41	22.06
12.00	0.52±0.03	29.53		0.42±0.03	35.06		0.48±0.01	36.52	
16.00	0.45±0.02	39.21		0.36±0.02	44.26		0.44±0.01	41.62	
20.00	0.38±0.02	49.52		0.30±0.02	53.54		0.38±0.01	49.39	
50.00	0.23±0.01	69.23		0.18±0.03	71.61		0.25±0.02	67.49	

Continue table 1

DAG ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	SK-N-BE			U251		
	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 Inhibition rate(%)	72 h-IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0.00	0.74±0.04	0.00		0.86±0.05	0.00	
2.00	0.70±0.02	6.19		0.82±0.06	3.79	
4.00	0.63±0.01	14.63		0.72±0.06	16.30	
8.00	0.57±0.01	23.38	23.22	0.68±0.01	20.26	22.00
12.00	0.51±0.01	31.57		0.63±0.05	26.31	
16.00	0.46±0.01	38.40		0.58±0.04	32.45	
20.00	0.39±0.01	46.92		0.47±0.06	45.52	
50.00	0.21±0.02	71.37		0.15±0.02	81.95	

3 结论

本文探讨 DAG 对人脑肿瘤细胞的抑制作用。结果显示, DAG 对 IMR-32、SH-SY5Y、U87、A172、BT325、T98G、SHG-44、U373、C6、SK-N-BE、U251 等 11 株人脑肿瘤细胞都有抑制作用, 具有明显的浓度-效应关系。但是 DAG 诱导人脑肿瘤细胞凋亡所发生的基因表达谱、蛋白表达谱变化、体内抑制人脑肿瘤效果等相关结论还需进一步研究。

参考文献:

[1] 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.

[2] Lin B J, Tao R F. New drugs of dianhydrogalactitol to chronic granulocyte leukemia[J]. New Medicine, 1980, 11(12): 619-620.

[3] Eagan R T, Ingle J N, Frytak S, et al. Platinum-based polychemotherapy versus dianhydrogalactitol in ad-

vanced non-small cell lung cancer [J]. Cancer Treat Rep, 1977, 61(7): 1339-1345.

[4] Robert T, Eagan, Edward T, et al. Phase II studies of dianhydrogalactitol-based combination chemotherapy for recurrent brain tumors[J]. Oncology, 1981, 38(1): 4-6.

[5] Zhang H L, Wang J N, Liang S, et al. Inhibition effect of 1, 2, 5, 6-dianhydrogalactitol on four different kinds of tumor cells *in vitro* [J]. Guangxi Sciences, 2013, 20(1): 82-84.

[6] Eagan R T, Moertel C G, Hahn R G, et al. Phase I study of a five-day intermittent schedule for 1, 2, 5, 6-dianhydrogalactitol[J]. J NAT Cancer Inst, 1976, 56(1): 179-181.

[7] De Jager R, Brugarolas A, Hansen H, et al. Dianhydrogalactitol (NSC - 132313): Phase II study in solid tumors. A report of the EORTC early clinical trial cooperative group[J]. Eur J Cancer, 1979, 15(2): 971-974.

[8] Fan Y J, Zhou J, Li M, et al. Experimental study of 1, 2, 5, 6-dianhydrogalactitol and maytenus on combinations [J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 1983, 18(9): 648-652.

(责任编辑: 尹 闯)