文章编号:1000-5404(2006)14-1487-03

论著

2-(3-羧基-1-丙酰氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖对人食管癌细胞的抗增殖研究

吴 静[1],路 红[1],周 芸[1],姬 瑞[1],薛群基[2],王爱勤[2] ([1]兰州大学第一医院消化科,兰州 730000;[2]中国科学院兰州化学物理研究所,兰州 730000)

提 要:目的 探讨2-(3-羧基-1-丙酰氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖(COPADG)对人食管癌细胞Eca-109和TE-1的增殖及其细胞周期的影响。**方法** 采用体外细胞培养,通过MTT比色分析法观察不同浓度COPADG对Eca-109及TE-1细胞生长的抑制作用;流式细胞仪检测药物对细胞周期的影响;透射电镜下观察细胞的形态学变化。**结果** COPADG能有效的抑制人食管癌细胞Eca-109及TE-1的增殖,且存在时间及剂量依赖性($P<0.01$);不同浓度的COPADG作用48 h之后,流式细胞仪检测均显示G_0/G_1期细胞比例增加($P<0.01$),而S期细胞比例减少($P<0.01$),在Eca-109细胞中出现了典型的凋亡峰;电镜下可观察到凋亡的典型形态学变化。**结论** COPADG能有效抑制人食管癌细胞Eca-109及TE-1的增殖,改变其细胞周期分布,导致明显的G_0/G_1期阻滞,并在一定浓度下诱导肿瘤细胞凋亡。

关键词:2-(3-羧基-1-丙酰氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖;Eca-109细胞;TE-1细胞;增殖;凋亡
中图法分类号:R343.23;R73-36;R735.2 **文献标识码**:A

Role of anti-proliferation of 2-(3-carboxy-1-oxoprogy1) amino-2-deoxy-D-glucose in human esophageal cancer cells

WU Jing[1], LU Hong[1], ZHOU Yun[1], JI Rui[1], XUE Qun-ji[2], WANG Ai-qin[2] ([1]Department of Gastroenterology and Hepatology, First Teaching Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730000; [2]Lanzhou Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of 2-(3-carboxy-1-oxoprogy1) amino-2-deoxy-D-glucose (COPADG) on the proliferation and cell cycle of human esophageal cancer cells Eca-109 and TE-1. Methods *In vitro* experiments, MTT colorimetric assay was performed to determine the growth inhibitory rates of Eca-109 and TE-1 cells treated by COPADG. Flow cytometry was applied to observe the change of cell proliferation cycle and apoptosis index. Cell morphological change was observed by transmission electron microscopy. Results COPADG inhibited effectively the growth of esophageal cancer cells Eca-109 and TE-1 in a time- and dose-dependent manner ($P<0.01$). In Eca-109 and TE-1 cells treated by COPADG of different concentrations for 48 h, flow cytometry analysis showed that the percentage of G_0/G_1 phase was higher and the percentage of S phase was lower than that in untreated cells ($P<0.01$). A marked apoptosis peak was formed in Eca-109 cells, and the typical apoptotic morphological change was observed by transmission electron microscopy. Conclusion COPADG can inhibit effectively the proliferation of esophageal cancer cells Eca-109 and TE-1, and it can change the distribution of cell cycle and induce apoptosis of tumor cells at certain concentrations.

Key words: 2-(3-carboxy-1-oxoprogy1) amino-2-deoxy-D-glucose; Eca-109 cell; TE-1 cell; proliferation; apoptosis

D-氨基葡萄糖属于海洋生物制剂,它是由甲壳素脱除乙酰基而后再降解形成的具有生物活性的单糖分子,几乎分布于人体所有组织,参与构造人体组织和细胞膜[1]。实验表明[2,3],D-氨基葡萄糖不仅具有治疗关节炎、参与人体肝肾解毒、调节免疫等功能,而且可以抑制肿瘤细胞的生长。因此,目前已有种类繁多的相关衍生物被合成,且部分已被证实具有较强的抗肿瘤作用[4,5]。2-(3-羧基-1-丙酰氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖[2-(3-carboxy-1-oxoprogy1) amino-2-deoxy-D-glucose, COPADG]是包含羧基侧链的D-氨基葡萄糖衍生物[6]。目前,对于此衍生物仅在肝癌[7]研究中有过相关报道。本实验就COPADG对食管癌细胞Eca-109及TE-1增殖的影响进行了研究,以进一步探讨它的临床应用前景。

1 材料与方法

1.1 化学试剂

COPADG由中国科学院兰州化学物理研究所最新合成并

作者简介:吴 静(1964-),女,河北省唐山市人,博士,主任医师,教授,主要从事肿瘤分子生物学方面的研究,发表论文20余篇。电话:13893137503, E-mail: Wujing36@163.com

收稿日期:2005-03-14;修回日期:2006-03-24

提供，纯度为99.9%，分子量：279，将其用蒸馏水溶解，直径为0.22 μm的微孔滤膜正压过滤除菌，4 ℃保存备用。RPMI1640培养基干粉、小牛血清(FCS)购自Gibco BRL公司；二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自Sigma公司。

1.2 仪器

EPICS XL型流式细胞仪为美国Beckman Coulter公司产品；Wallac 1420型多功能时间分辨荧光酶联分析仪为芬兰Victor公司产品；JEM-100CX型透射电子显微镜为日本JEOL公司产品。

1.3 细胞株

人食管癌Eca-109和TE-1细胞株购自中国科学院上海细胞库。

1.4 细胞培养

人食管癌细胞株Eca-109和TE-1均为贴壁生长，培养于含10%灭活胎牛血清的RPMI1640全培养液(青霉素100 U/ml，链霉素100 mg/ml)中，置于37 ℃、相对湿度90%、5% CO_2孵箱中培养，隔日更换培养液，并在倒置显微镜下观察细胞形态。当细胞生长至覆盖瓶壁80%左右时进行传代，待传至3～4代后，取形态良好的指数生长期细胞用于实验。

1.5 MTT比色分析法测定细胞活力

取指数生长期的Eca-109及TE-1细胞，以每孔1×10^4个细胞接种于96孔培养板中，各孔体积均为100 μl。24 h后换液，并加入不同浓度的COPADG，使其终浓度分别为10、20、40、60、80 μmol/L，每组设4个复孔。另设不加药的阴性对照组和不接种细胞的空白对照组(只加入培养液，调零孔)。在含5% CO_2、相对湿度90%、37 ℃的孵箱中培养，待药物分别作用20、44、68 h后每孔加入5 g/L的MTT 10 μl，继续培养4 h后，弃去上清液，每孔加入50 μl的DMSO，振荡10 min，至紫色颗粒完全溶解，选择490 nm的波长，在荧光酶联分析仪上测定各孔的吸光度值$D(490)$，实验重复3次，计算各浓度药物对Eca-109及TE-1细胞的生长抑制率：

抑制率(%)=[1－加药组的$D(490)$/对照组的$D(490)$]×100%。

1.6 流式细胞仪测定细胞周期分布

取指数生长期的同一代细胞，分别加入不同浓度的COPADG(除了药物浓度不同之外，其他各项条件均完全相同)，并在同等条件下设一对照组。在培养24、48、72 h后分别收集加药组和对照组细胞，吹打成单细胞悬液(1×10^6～2×10^6/ml)，PBS洗涤2次之后，用70%的冰乙醇固定过夜。将固定后的细胞以1 000 r/min离心5 min，加入PBS洗涤2～3次，弃上清液，留细胞悬液0.5～1 ml，取PI混合液(含Rnase、Triton-100、柠檬酸钠)1 ml，于4 ℃暗室中染色至少30 min，上机，用Multicycle分析软件测定细胞周期的变化。

1.7 透射电镜下观察细胞超微结构

收集40 μmol/L COPADG作用48 h的细胞及对照组细胞，PBS洗涤2次，2 500 r/min离心10 min，弃去上清，加入4 ℃预冷的2.5%戊二醛于4 ℃下固定2 h，PBS洗涤3次，每次10 min，1%的锇酸4 ℃固定2 h后，PBS洗涤3次，梯度乙醇脱水、包埋、聚合、超薄切片，醋酸双氧铀染液于室温下染色10 min，双蒸水冲洗切片，滤纸吸干。铅染液(含醋酸铅、硝酸铅和枸橼酸铅)室温下染色10 min，透射电镜下观察凋亡细胞的超微结构特征。

1.8 统计学处理

用SPSS 11.0统计软件包对吸光度值采用方差分析，组间两两比较用LSD检验。

2 结果

2.1 COPADG对食管癌细胞株Eca-109及TE-1生长的影响

不同浓度的COPADG作用于食管癌细胞株Eca-109及TE-1不同时间后，细胞生长均受到不同程度的抑制，其$D(490)$与不加药阴性对照组相比，均有显著性差异($P<0.01$)。LSD法比较同一时间内不同浓度组之间$D(490)$结果显示，在浓度小于40 μmol/L的范围内，各浓度组之间两两比较，$D(490)$的差异均具有统计学意义($P<0.01$)，表现为随着用药浓度的增加，其$D(490)$逐渐下降，抑制率逐渐增加；当浓度大于40 μmol/L之后，各组之间$D(490)$的差异无统计学意义($P>0.05$)，其$D(490)$不再随浓度增加而有显著的下降，抑制率到达平台期(表1)。

2.2 细胞周期分布检测结果

20、40、60 μmol/L COPADG分别作用于食管癌细胞Eca-109及TE-1 48 h之后，其细胞周期分布发生显著的变化(表2)。各浓度组与不加药阴性对照组相比较，均表现为细胞大部分受阻于G_0/G_1期，而S期细胞数明显减少，其差异具有统计学意义($P<0.01$)，且随着用药浓度的增大，G_0/G_1期细胞数逐渐增加($P<0.01$)，而S期细胞数逐渐减少($P<0.01$)。在Eca-109细胞中，各浓度组均出现了典型的凋亡峰，即亚二倍体峰，凋亡率最高可达(23.8±0.8)%，但60 μmol/L组较40 μmol/L组的凋亡率有所下降，各组之间差异具有统计学意义($P<0.01$)；而在TE-1细胞中，凋亡率最高仅为(6.4±1.0)%，且与40 μmol/L相比，差异无统计学意义($P>0.05$)。

表1 COPADG对食管癌细胞Eca-109及TE-1生长的抑制作用[$D(490)$，$\bar{x}\pm s$]

组别	Eca-109			TE-1		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
不加药阴性对照组	1.505±0.090	1.686±0.067	1.745±0.077	0.714±0.055	0.755±0.089	1.745±0.077
COPADG(μmol/L)						
10	1.313±0.053[a]	1.336±0.057[a]	1.199±0.083[a]	0.649±0.033[a]	0.694±0.063[a]	1.199±0.083[a]
20	0.958±0.028	0.966±0.086	0.900±0.056	0.605±0.040	0.601±0.050	0.900±0.056
40	0.400±0.064[a]	0.429±0.065[a]	0.384±0.050[a]	0.419±0.028[a]	0.379±0.024[a]	0.384±0.050[a]
60	0.383±0.045	0.360±0.039	0.342±0.037	0.358±0.033	0.350±0.056	0.342±0.037
80	0.355±0.046	0.362±0.053	0.280±0.039	0.331±0.021	0.308±0.036	0.280±0.039
F	794.153	812.068	963.671	238.890	137.612	298.221
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

a：$P<0.01$，与同时间20 μmol/L COPADG组比较

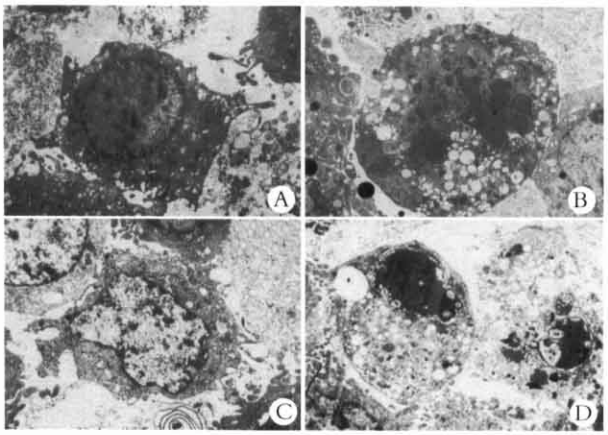
表 2　COPADG 对 Eca-109 及 TE-1 细胞周期和凋亡的影响(%，$\bar{x} \pm s$)

组别	Eca-109			凋亡率	TE-1			凋亡率
	G_0/G_1	S	G_2/M		G_0/G_1	S	G_2/M	
不加药阴性对照组	41.9±1.8	56.1±1.2	2.0±1.5	4.2±0.6	52.7±1.3	39.0±1.8	8.3±0.5	1.5±0.4
COPADG (μmol/L)								
20	52.7±1.3[a]	46.0±0.9[a]	1.3±0.4	10.6±0.5[a]	62.4±1.9[a]	31.5±2.4[a]	6.1±0.5	3.2±0.3[a]
40	58.9±1.0[a]	40.2±1.0[a]	0.9±0.7	23.8±0.8[a]	78.7±1.3[a]	20.6±1.4[a]	0.8±0.5	5.4±0.8[a]
60	72.0±1.0[a]	21.9±1.4[a]	6.1±0.4	20.5±0.7[a]	82.1±1.0[a]	16.6±1.2[a]	1.3±0.3	6.4±1.0

a：$P<0.01$，与对照组比较及各浓度组间比较

2.3　透射电镜下观察凋亡细胞超微结构

电镜下可观察到对照组 Eca-109 和 TE-1 细胞的细胞核较大，核膜清晰，核内染色质电子密度均匀，细胞质中细胞器正常，细胞膜完整，膜表面有许多微绒毛(图 1A、C)。经 40 μmol/L COPADG 处理后的食管癌细胞 Eca-109 皱缩，表面微绒毛减少，出现细胞核的形态学改变，核固缩，染色质成颗粒状或团块状，核碎裂，细胞质减少，电子致密度增大，出现空泡样变化(图 1B)，而在同样浓度、同样作用时间下，多数 TE-1 细胞肿胀，无凋亡的典型形态学变化，凋亡细胞的数量远少于 Eca-109 细胞(图 1D)。



A：不加药阴性对照组(Eca-109)；B：40 μmol/L 组(Eca-109)；C：不加药阴性对照组(TE-1)；D：40 μmol/L 组(TE-1)

图 1　COPADG 处理后 Eca-109 和 TE-1 细胞的形态学变化　(TEM ×5 000)

3　讨论

近年来有大量文献报道，DNA 损伤因子(包括化疗药物和射线等)在损伤 DNA 的同时，均可引起肿瘤细胞的 G_1 期阻滞、S 期积聚，甚至诱导细胞凋亡[8,9]。有学者认为，化疗药物可以引起肿瘤细胞特定靶成分的损失和功能丧失，经过复杂的信号转导通路引起细胞周期阻滞，进而诱导肿瘤细胞的凋亡，并指出细胞凋亡可能是不同化疗药物殊途同归的作用结果。本研究通过 MTT 比色分析法证实了 COPADG 能有效的抑制食管癌细胞 Eca-109 及 TE-1 的增殖，在浓度小于 40 μmol/L的范围内，其抑制作用呈现明显的浓度及时间依赖性，即随浓度增大及时间延长，其抑制率逐渐增强；当浓度升高到 40 μmol/L 之后，其抑制作用到达平台，不再随浓度及时间的增加而明显增强，说明其作用具有饱和性，这可能与物质进入细胞的方式有关，COPADG 为 D-氨基葡萄糖衍生物，推测它可能通过易化扩散进入肿瘤细胞内，在与细胞膜上的特异性载体蛋白结合进入细胞内的过程中，因载体数量有限，限制了进入细胞内的药量，当药物浓度达到一定的水平后，其抑制率不再发生明显变化。流式细胞仪分析进一步证实 COPADG 能够引起明显的细胞周期阻滞，G_0/G_1 期细胞显著增多，而 S 期细胞显著减少。在 Eca-109 细胞中，出现了典型的凋亡峰，其峰值最高可达为(23.8±0.8)%，而在 TE-1 细胞中未出现明显的凋亡峰，推测 COPADG 在两种细胞株中作用的差异可能与肿瘤细胞对药物的敏感性及细胞表面特异性转运蛋白的数量有关。通过透射电镜，我们从形态学方面进一步证实了 COPADG 的致凋亡作用。

我们在体外实验中证实，COPADG 能够有效的抑制食管癌细胞 Eca-109 及 TE-1 的增殖，改变细胞周期分布，导致明显的 G_0/G_1 期阻滞，并在一定浓度下诱导肿瘤细胞凋亡，这为 COPADG 在肿瘤的临床应用提供了重要的理论依据，但其在肿瘤细胞内通过何种途径来发挥作用及体内毒性实验，亟待进一步深入研究。

参考文献：

[1] 姚子昂，吴海歌，邢福有，等. 壳聚糖在组织工程中应用的研究进展[J]. 中国生物工程杂志，2003，23(10)：32－36.

[2] 乔　岩，王　丽，王爱勤. D-氨基葡萄糖的化学修饰及其在生物医药领域的应用[J]. 中国海洋药物，2003，22(6)：51－55.

[3] 王　哲，乔　岩，黄高升，等. 氨基葡糖及其盐酸盐诱导白血病细胞 K562 向巨噬细胞样分化[J]. 中国药理学通报，2003，19(3)：290－293.

[4] 王　哲，乔　岩，黄高昇，等. N-乙酰氨基葡萄糖诱导白血病细胞 K562 向巨噬细胞分化[J]. 第四军医大学学报，2003，24(1)：46－48.

[5] 梁　蓉，王　哲，乔　岩，等. 氨基葡萄糖硫酸盐对白血病细胞 K562 增殖的影响[J]. 中国药理学通报，2003，19(11)：1226－1230.

[6] 乔　岩，王爱勤，王　哲，等. 2-(3-羧基-1-丙酰氨基)-2-脱氧-D-葡萄糖的合成[J]. 化学试剂，2004，26(2)：107－108.

[7] 吴　静，寇　炜，李　娟，等. D-氨基葡萄糖衍生物诱导肝癌细胞凋亡的研究[J]. 中华肝脏病杂志，2004，12(11)：697.

[8] MARATHI U K，HOWELL S R，ASHMUN R A，*et al*. The Fanconi anemia complementation group C protein corrects DNA interstrand cross-link-specific apoptosis in HSC536N cells[J]. Blood，1996，88(6)：2298－2305.

[9] LEE T K，LAU T C，NG I O. Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines[J]. Cancer Chemother Pharmacol，2002，49(1)：78－86.

(编辑　陈聪连)