文章编号:1000-5404(2011)07-0695-04

论著

土贝母皂苷甲增强人卵巢癌A2780/DDP细胞对顺铂的敏感性

刘海忠[1],于 超[2],杨 竹[1],王应雄[2],陈文娟[1],殷 娟[1],李文明[2],刘洪涛[2] (400010 重庆,重庆医科大学第二附属医院妇产科[1];400016 重庆,重庆医科大学生命科学研究院[2])

【摘要】 目的 探讨土贝母皂苷甲(tubeimoside 1,TBMS1)促进人卵巢癌A2780/DDP细胞对顺铂(cisplatin,DDP)的增敏作用。**方法** 采用MTT法分别检测顺铂和TBMS1对A2780/DDP细胞作用的半抑制浓度值(IC_{50}),将实验分为对照组:只加等量生理盐水;顺铂组:给予6 μmol/L顺铂处理;联合用药Ⅰ组:6 μmol/L顺铂+3 μmol/L TBMS1;联合用药Ⅱ组:6 μmol/L顺铂+6 μmol/L TBMS1。按上述方法处理细胞后,MTT法检测细胞活力;电泳法检测细胞内DNA损伤;流式细胞技术检测细胞凋亡及周期;Western blot分析周期蛋白A(Cyclin A)和周期蛋白D1(Cyclin D1)的表达。**结果** TBMS1(3、6 μmol/L)与顺铂(6 μmol/L)联用使人卵巢癌A2780/DDP细胞对顺铂的敏感性增强;细胞的DNA损伤随TBMS1浓度的增加而明显增多;细胞周期被阻滞在S期,联合用药Ⅰ和Ⅱ组S期所占比例分别为(51.23±3.53)%、(77.34±2.80)%;细胞凋亡率为(5.19±0.78)%、(7.11±1.06)%;Cyclin A的表达为1.89±0.28及2.91±0.43,Cyclin D1为0.66±0.09及0.28±0.05($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** TBMS1显著增加顺铂对A2780/DDP细胞增殖抑制作用,Cyclin A、Cyclin D1可能参与其调节。

【关键词】 土贝母皂苷甲;顺铂;细胞凋亡;周期蛋白;卵巢肿瘤;细胞系,肿瘤
【中图法分类号】 R282.71;R979.12;R737.31 **【文献标志码】** A

Tubeimoside 1 enhances chemosensitivity of drug-resistant ovarian cancer A2780/DDP cells to cisplatin

Liu Haizhong[1], Yu Chao[2], Yang Zhu[1], Wang Yingxiong[2], Chen Wenjuan[1], Yin Juan[1], Li Wenming[2], Liu Hongtao[2] ([1]Department of Gynaecology and Obstetrics, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010; [2]Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

【Abstract】 **Objective** To determine the effect of tubeimoside 1 (TBMS1) in enhancing chemosensitivity of drug-resistant ovarian cancer cell line (A2780/DDP) to cisplatin. **Methods** The A2780/DDP cells were treated with different concentrations of cisplatin and TBMS1 to analyze 50% inhibiting concentration (IC50) by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Experiment was divided into 4 groups. Control group: treatment with physiological saline; cisplatin group: treatment with 6 μmol/L cisplatin; Combination of drugs group Ⅰ: 6 μmol/L cisplatin + 3 μmol/L TBMS1; Combination of drugs group Ⅱ: 6 μmol/L cisplatin + 6 μmol/L TBMS1. After the cells were treated by the above methods, the cells viability was analyzed by MTT assay. The cellular DNA damage was measured by agarose gel electrophoresis. Apoptosis and cell cycles were measured by flow cytometry. The expression of Cyclin A and Cyclin D1 protein was determined by Western blotting. **Results** TBMS1 (3 and 6 μmol/L) combined with cisplatin (6 μmol/L) enhanced the chemosensitivity of A2780/DDP cells to cisplatin. After co-treatment with TBMS1, the level of cellular DNA damage was significantly increased with increase of TBMS1 concentration. Cell cycle was arrested in S phase, with a proportion of (51.23±3.53)% and (77.34±2.80)%, respectively for group Ⅰ and group Ⅱ. Apoptosis ratio was (5.19±0.78)%, and (7.11±1.06)% respectively, Cyclin A expression of was 1.89±0.28 and 2.91±0.43 respectively, while that of Cyclin D1 was 0.66±0.09 and 0.28±0.05 respectively for the 2 groups ($P<0.01$, 0.05). **Conclusion** TBMS1 inhibits the growth of A2780/DDP cells and enhances the sensitivity to cisplatin, and Cyclin A and Cyclin D1 might be involved in the processes.

【Key words】 tubeimoside 1; cisplatin; apoptosis; cyclin; ovarian neoplasms; cell line, tumor

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2009BA5083) and the Key Foundation of Chongqing Medical University (XBZD200806).
Corresponding author: Yang Zhu, Tel: 86-23-68485589, E-mail: cqyangz@vip.163.com

【基金项目】 重庆市自然科学基金(CSTC2009BA5083);重庆医科大学重点基金(XBZD200806)
【通信作者】 杨 竹,电话:(023)68485589,E-mail:cqyangz@vip.163.com

肿瘤耐药是制约临床治疗效果的主要因素，是造成患者总体预后不良的主要原因。如何减轻化疗耐药现象，有效地逆转化疗耐药及对耐药机制的阐明已成为相关研究的难点与热点。顺铂（cisplatin，DDP）有广泛的抗肿瘤作用，但对于实体瘤的治疗仍面临着肿瘤细胞对药物的摄取蓄积，细胞的解毒增强，DNA 修复增强，DNA 损伤的耐受性提高等耐药问题[1-2]。

通过联合用药来改善顺铂耐药性是临床上常用的手段，但耐药机制不明成为药物选择的主要障碍。中药土贝母具有散结、消肿、解毒的功效[3]，实验证明具有抗肿瘤作用，其活性成分土贝母皂苷甲（tubeimoside 1，TBMS1）主要表现为诱导肿瘤细胞周期阻滞和凋亡[4-5]。因此，本研究将 TBMS1 与顺铂联用，探讨其是否能增强人卵巢癌 A2780/DDP 细胞对顺铂的敏感性，旨在为降低卵巢癌的耐药提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂和药品 RPMI1640 及小牛血清购于 HyClone 公司及成都哈里生物公司；胰蛋白酶购于美国 Gibco 公司；细胞凋亡检测试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司；Tris-饱和酚、MTT 及二甲亚砜（DMSO）、顺铂购于 Sigma 公司；周期蛋白 A 抗体购于 Santa 公司，周期蛋白 D1 购于 CST 公司；TBMS1 由本课题组提取并鉴定，生理盐水溶解后备用。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.2 细胞培养 A2780/DDP 细胞（华中科技大学同济医学院附属协和医院妇产科实验室赠送）用含 10% 小牛血清 RPMI1640 培养基，置于 37 ℃，5% CO_2 培养箱中贴壁培养，待细胞 80% 融合时，用 0.125% 胰酶（含 0.02% EDTA）消化传代。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测细胞存活率 分别取对数生长期的 A2780/DDP 细胞胰酶消化后，加入 RPMI1640 培养液混悬均匀，调整细胞浓度为 5×10^4/ml，加入 96 孔板（200 μl/孔）培养至对数生长期，分别加入各含 6、12、24 μmol/L 的顺铂和 TBMS1 的培养液（各组设 5 个平行孔），分别计算顺铂和 TBMS1 的 IC_{50} 值，选取合适的给药浓度。在 TBMS1 的 IC_{50} 值内选取 3、6、12 μmol/L 3 个药物浓度，分别与 6 μmol/L 的 DDP 联合用药，并分别作用 A2780/DDP 细胞 12、24、48 h，计算联合用药的 IC_{50} 值。根据上述实验结果分组，①对照组：加等量生理盐水；②顺铂组：顺铂 6 μmol/L 处理；③联合用药Ⅰ组：6 μmol/L 顺铂 + 3 μmol/L TBMS1；④联合用药Ⅱ组：6 μmol/L 顺铂 + 6 μmol/L TBMS1。

1.2.2 DNA 损伤检测 取对数生长期细胞接种于 25 ml 培养瓶中，按前述分组培养，药物处理后，消化、离心收集细胞，加 Tris-饱和酚于漩涡器上振 10 min 抽提 DNA，离心吸上清并用无水乙醇洗 2 次，干燥后溶于 100 μl 灭菌双蒸水中，取 7 μl DNA 样品进行琼脂糖凝胶（1.5%）电泳，于 GelDoc2000 凝胶成像仪分析。

1.2.3 流式细胞技术检测细胞凋亡及周期 将细胞接种于 25 ml 细胞培养瓶中，按前述分组培养，药物处理后，消化、离心收集细胞并重悬为单细胞悬液，用 Annexin-V/PI 双染色法检测凋亡细胞。细胞周期检测时，将收集的细胞用 70% 的冰冻乙醇 4 ℃固定过夜，PBS 洗涤，加入 RNase，37 ℃水浴 30 min 以除去 RNA，冰浴终止消化。加入 50 μg/ml 碘化丙啶染液，染色 20 min，漩涡混匀，流式细胞仪分析各期细胞的百分比。

1.2.4 Western blot 检测 Cyclin A 和 D1 药物干预处理后收集细胞，加入细胞裂解液抽提蛋白，蛋白定量。各组样品加入 1×上样缓冲液后，100 ℃ 加热 10 min 使蛋白变性，依各组蛋白浓度上样，12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE）恒压电泳，先是 80 V 电压，待指示剂进入浓缩胶和分离胶之间时改为 100 V 电压电泳；于电转移槽中 250 mA 恒流的条件下将凝胶上蛋白转移至 PVDF 膜上。转移后的 PVDF 膜于脱脂牛奶中封闭 1 h，加入相应一抗孵育并过夜（4 ℃）；洗涤后，加入二抗室温孵育 1 h；PBST 洗膜，用 ECL（Pierce）试剂反应，在 Chemidoc XRS 化学发光成像仪上分析。

1.2.5 统计学分析 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 11.0 软件分析，2 组间差异用 Students' t 检验分析，多组间比较用方差分析法处理数据。

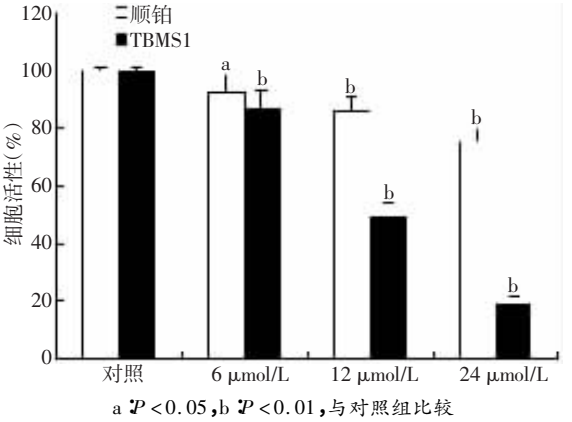
2 结果

2.1 TBMS1 增加顺铂对 A2780/DDP 细胞增殖抑制作用

将不同浓度的顺铂和 TBMS1 分别处理 A2780/DDP 细胞 24 h，细胞的存活率随药物浓度增加而下降（$P<0.05$，$P<0.01$，图 1）。依据顺铂、TBMS1 的 IC_{50} 值［顺铂（28.91 ± 0.25）μmol/L，TBMS1（16.10 ± 0.33）μmol/L］，采用低浓度顺铂（6 μmol/L）单独作用，以及联合不同浓度的 TBMS1（3、6、12 μmol/L）共同作用。当药物分别处理细胞 12、24、48 h 后，结果显示较低浓度顺铂单独作用细胞，肿瘤细胞的存活率随时间延续从 91% 降至 65%。当联合 TBMS1 作用后，细胞存活率随药物浓度的增加和作用时间的延长显著下降（$P<0.05$，$P<0.01$，表 1），表明 TBMS1 能增加顺铂对 A2780/DDP 细胞生长抑制作用。

2.2 TBMS1 增加顺铂对 A2780/DDP 细胞 DNA 的损伤

细胞发生凋亡，核酸内切酶在核小体之间剪切核 DNA，产生大量长度在 180～200 bp 的 DNA 片段。采用 DNA ladder 电泳的方法检测细胞内 DNA 损伤，结果显示：随着联合使用 TBMS1 药物浓度的增加，细胞 DNA 小片段显著增加，提示 TBMS1 能增强顺铂对 A2780/DDP 耐药细胞 DNA 的损伤（图 2）。



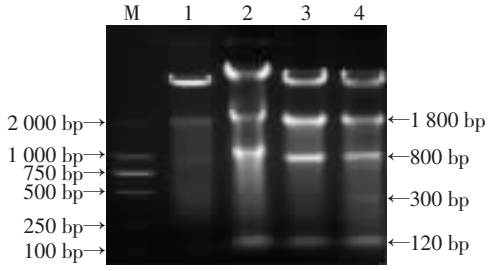
a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

图 1 不同浓度的顺铂和 TBMS1 对 A2780/DDP 细胞存活率的影响

表 1　不同浓度的顺铂和 TBMS1 作用不同时间对 A2780/DDP 细胞存活率的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	12 h	24 h	48 h
对照组	100.00 ± 0.01	100.00 ± 0.02	100.00 ± 0.01
顺铂 6 μmol/L 组	90.78 ± 0.01	89.97 ± 0.04	64.53 ± 0.05[a]
顺铂 6 μmol/L + TBMS1 3 μmol/L 组	78.48 ± 0.05[a]	64.86 ± 0.01[b]	42.89 ± 0.03[b]
顺铂 6 μmol/L + TBMS1 6 μmol/L 组	36.69 ± 0.01[b]	34.64 ± 0.03[b]	24.18 ± 0.04[b]
顺铂 6 μmol/L + TBMS1 12 μmol/L 组	19.47 ± 0.02[b]	18.38 ± 0.01[b]	9.97 ± 0.01[b]

a $P < 0.05$, b $P < 0.01$, 与对照组比较



M：Marker；1：对照组；2：顺铂 6 μmol/L 组；3：顺铂 6 μmol/L + TBMS1 3 mol/L 组；4：顺铂 6 μmol/L + TBMS1 6 μmol/L 组

图 2　TBMS1 增加顺铂对 A2780/DDP 细胞 DNA 损伤的电泳结果

2.3　TBMS1 调控顺铂对 A2780/DDP 细胞周期影响及促进细胞凋亡

不同浓度的 TBMS1 联合顺铂作用于细胞后，流式细胞仪分析各组细胞周期的变化，结果提示单独顺铂作用后细胞主要阻滞于 S 期(图 3)。联合用药后，TBMS1 明显增加了顺铂对细胞 S 期的阻滞作用，与对照组[(32.48 ± 2.14)%]比较，S 期细胞所占比例从联合用药Ⅰ组的(51.23 ± 3.53)%增加到联合用药Ⅱ组的(77.34 ± 2.80)%，组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

对细胞凋亡分析显示：与对照组[(4.14 ± 0.89)%]比较，联合 TBMS1 用药后明显促进细胞凋亡，其联合用药Ⅰ组及Ⅱ组凋亡发生率分别为(5.19 ± 0.78)%、(7.11 ± 1.06)%($P < 0.05$, $P < 0.01$)。表明联合 TBMS1 用药可以通过影响耐药细胞的周期从而促进细胞凋亡的发生。

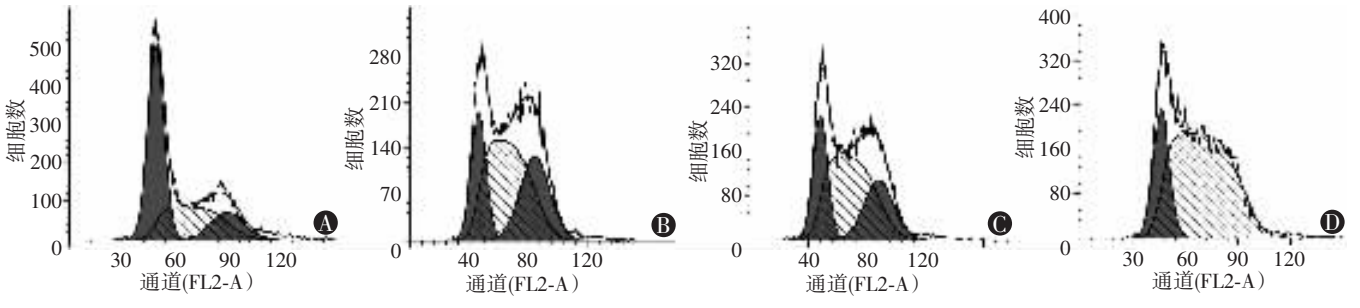
2.4　TBMS1 通过调控周期蛋白 A 和 D1 的表达而影响细胞周期

采用 Western blot 方法检测两者对周期蛋白 A 和 D1 的表达影响，结果表明与对照组比较，联合 3 μmol/L 顺铂及 6 μmol/L 的 TBMS1 时周期蛋白 A 的相对蛋白量增加(图 4A1A2)；周期蛋白 D1 的相对蛋白量降低(图 4B1B2)。组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3　讨论

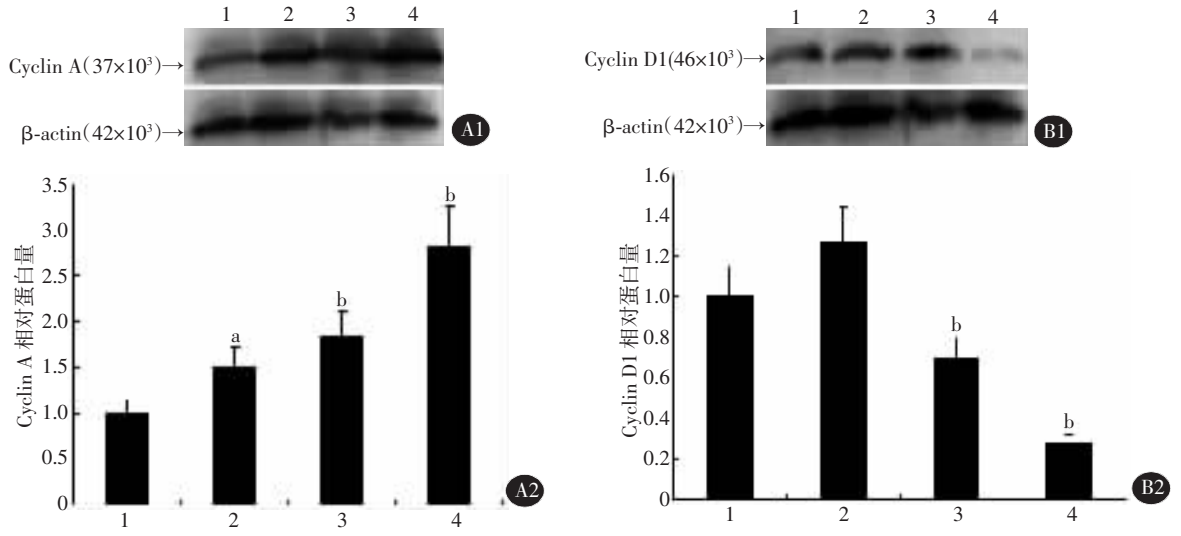
卵巢癌在妇科恶性肿瘤中病死率高居首位。卵巢癌的通常治疗手段是在细胞减灭术后辅以铂类为基础的联合化疗。以顺铂为主的联合化疗使晚期卵巢癌的疗效及预后得到一定程度的改善[6]，然而卵巢癌患者的 5 年生存率一直徘徊于 30% ~50% 之间，主要原因是卵巢癌对化疗药物产生耐受性。近年研究显示 75% ~80% 的卵巢上皮癌在化疗起初对化疗有反应，其余则表现为原发耐药，但最终约 80% 的化疗患者出现耐药性[7]。这提示耐药性是在化疗过程中逐渐产生的。

联合用药是降低肿瘤细胞耐药性的有效方法，临床上有顺铂联合 PC、PAC、VBP、PT 等用药方案，而 TBMS1 对卵巢癌顺铂耐药性的影响与机制探讨的报道尚少。本研究将低浓度顺铂(6 μmol/L)与不同浓度的 TBMS1 (3、6 μmol/L) 联合作用于人卵巢癌 A2780/DDP 细胞，结果表明 TBMS1 能够促进顺铂对人卵巢癌 A2780/DDP 细胞的增殖抑制作用，并随 TBMS1 浓度的增加细胞抑制作用增强。主要表现在诱导细胞凋亡和对细胞 DNA 损伤的增加，结果与于超等[8]研究结果相类似。以上提示 TBMS1 与顺铂联合作用时可增强人卵巢癌 A2780/DDP 细胞对顺铂的敏感性。以往研究显示 TBMS1 的抗肿瘤作用主要表现为诱导肿瘤细胞周期阻滞和凋亡，其抑制癌细胞增殖和诱导凋亡可能与多条通路共同调节有关[4-5]。为了验证 TBMS1 促进顺铂对 A2780/DDP 细胞增敏作用与细胞周期有关，本研究采用流式细胞仪检测不同浓度的 TBMS1 与顺铂联用后细胞周期的变化。顺铂单独作用，细胞被抑制于 S 期，但随着细胞凋亡的增加，S 期所占比例显著升高($P < 0.05$)，提示细胞凋亡与细胞被阻滞于 S 期有关。



A：对照组；B：顺铂 6 μmol/L 组；C：顺铂 6 μmol/L + TBMS1 3 μmol/L 组；D：顺铂 6 μmol/L + TBMS1 6 μmol/L 组

图 3　TBMS1 调控顺铂对 A2780/DDP 细胞周期影响的流式细胞术结果



A1:Cyclin A 蛋白 Western blot 检测结果;A2:Cyclin A 蛋白半定量分析结果;B1:Cyclin D1 蛋白 Western blot 检测结果;B2:Cyclin D1 蛋白半定量分析结果;1:对照组;2:顺铂 6 μmol/L 组;3:顺铂 6 μmol/L + TBMS1 3 μmol/L 组;4:顺铂 6 μmol/L + TBMS1 6 μmol/L 组;a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 4 Western blot 检测 TBMS1 调控顺铂作用的 Cyclin A 和 Cyclin D1 的表达

周期蛋白 A 是细胞周期进入 S 期所必需的调节蛋白,周期蛋白 D1 是大多数组织增殖所必需的,可能与肿瘤的发生、发展关系密切[9]。抑制周期蛋白 D1 的表达可抑制细胞进入 S 期的进程[10-12]。为了进一步说明周期蛋白与细胞凋亡的关系,本研究从蛋白水平验证周期蛋白 A、D1 的表达变化。结果发现周期蛋白 A 的表达随着 TBMS1 药物浓度的增加而上调,周期蛋白 D1 的表达随着 TBMS1 药物浓度的增加而下调,这种变化结果与流式细胞技术检测到细胞周期被阻滞在 S 期的变化结果相吻合,说明 TBMS1 对周期蛋白 A 和 D1 的表达有调控作用。通过对周期蛋白的调控,TBMS1 与顺铂联合作用增加了人卵巢癌 A2780/DDP 细胞对顺铂的敏感性,这可能是解决肿瘤细胞顺铂耐药性的关键靶点之一[13]。从以上周期蛋白表达的结果分析,可以推测周期蛋白 A、D1 与肿瘤的凋亡密切相关,但其机制有待更深入研究。

参考文献:

[1] Neubauer H, Stefanova M, Solomayer E, *et al*. Predicting resistance to platinum-containing chemotherapy with the ATP tumor chemosensitivity assay in primary ovarian cancer[J]. Anticancer Res, 2008, 28(2A): 949-955.

[2] Martin L P, Hamilton T C, Schilder R J. Platinum resistance: the role of DNA repair pathways[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(5): 1291-1295.

[3] 朱海鸥, 朱晓薇, 侯文彬, 等. 中药土贝母的现代研究进展[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2985-2987.

[4] 于超, 何俊琳, 邱宗荫. 土贝母中皂苷成分的分离及对 K562 细胞的作用[J]. 西南大学学报:自然科学版, 2007, 29(4): 89-95.

[5] 黄霈, 于超, 刘洪涛, 等. 土贝母皂苷甲作用线粒体途径促进人绒毛膜癌 Bewo 细胞凋亡[J]. 细胞生物学杂志, 2009, 31(6): 831-836.

[6] Tas F, Derin D, Guney N, *et al*. Chemotherapy with pegylated liposomal doxorubicin and cisplatin in recurrent platinum-sensitive epithelial ovarian cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2008, 13(4): 330-334.

[7] Rafii A, Mirshahi P, Poupot M, *et al*. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours[J]. PLoS One, 2008, 3(12): e3894.

[8] 于超, 邱宗荫, 汤为学, 等. 土贝母皂苷体外诱导 SW480 细胞凋亡作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(7): 880-884.

[9] 李素琴, 李文才, 黄明, 等. 宫颈腺癌组织中细胞周期素 D1 和 P27 蛋白的表达[J]. 郑州大学学报:医学版, 2008, 43(5): 878-880.

[10] 罗远琼, 糜漫天. CyclinD1/CDK4 在洛伐他汀抑制裸鼠乳腺癌移植瘤增殖中的作用[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(4): 319-323.

[11] 蒋力, 闵家新, 李学昌, 等. 细胞周期素 D1 反义脱氧寡核苷酸对 A549 细胞增殖及凋亡的调控作用[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(10): 1069-1071.

[12] 龙形涛, 唐良阎, 周敏, 等. 细胞周期蛋白 A 及 P21 在子宫内膜异位症患者在位和异位内膜组织中的表达[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(10): 1038-1042.

[13] Ma J, Xu S, Lai Y, *et al*. Correlation between cyclin A gene expression in adult patients with acute leukemia and drug resistance[J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2003, 23(3): 245-248.

(收稿:2010-11-01 修回:2010-12-04)

(编辑 邓强庭)