恶性肿瘤的诊断与治疗 文章编号：0253-3626（2011）05-0531-04

牛膝多糖联合 5- 氟尿嘧啶对食管癌的作用及相关机制的探讨

冯 婷[1]，刘 霞[2]，赵明耀[3]，程慧敏[2]

（1. 郑州大学护理学院基础教研室，郑州 450052；2. 徐州医学院附属第三医院病理科，徐州 221003；
3. 郑州大学基础医学院病理生理学教研室，郑州 450052）

【摘 要】目的：探讨牛膝多糖（Achyranthes bidentata polysaccharides，ABPS）及其联合 5- 氟尿嘧啶（5- fluorouracil，5-Fu）对食管癌 EC9706 细胞的作用及可能机制。方法：通过 MTT 法检测 ABPS（3 个浓度 100、200、300 μg/ml）及联合 5-Fu 对食管癌细胞的增殖的作用；用流式细胞术检测细胞周期改变及凋亡率，Western blot 检测 ABPS 对食管癌细胞周期相关基因 p21 和 p27表达的影响；免疫细胞化学检测凋亡相关基因 bax、bcl-2 的表达。结果：（1）ABPS 可以抑制食管癌 EC9706 细胞的增殖；ABPS 与 5-Fu 联合应用对食管癌细胞的增殖抑制作用强于两者单用；（2）ABPS 作用后的 EC9706 出现了 G_0/G_1 期的阻滞和早期凋亡；其机制可能分别涉及 p21 和 p27 基因表达的增加以及 bax 基因表达的增加和 bcl-2 基因表达的减少。结论：ABPS 对食管癌细胞的增殖有抑制作用；ABPS 与 5-Fu 联合使用具有协同抗肿瘤作用。

【关键词】牛膝多糖；5- 氟尿嘧啶；EC9706；协同抗肿瘤作用

【中国图书分类法分类号】R735.1；R730.231 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-05

Study of the killing action of ABPS and 5 - fluorouracil for esophagus cancer cell and its related mechanism

FENG Ting[1], LIU Xia[2], ZHAO Ming-yao[3], CHENG Hui-ming[2]

(1. Department of Basic Medicine, School of Nursing, Zhengzhou University; 2. Department of Pathology, the Third Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College; 3. Department of Pathophysiological, College of Basic Medicine, Zhengzhou University)

【Abstract】*Objective*: To discuss the effect of achyranthes bidentata polysaccharide and its combination with 5-fluorineuracils on esophagus cancer EC9706 cell function and the possible mechanism. *Methods*: Three different concentration of ABPS100, 200, 300 μg/ml, and combined with 5-fluorouracil cell multiplication suppression rate was detected through cell strain growth inhibition curve (MTT); the cell cycle change and apoptosis were examined through rate flow cytometry; the effect of achyranthes bidentata polysaccharides on cell cycle related gene p21, p27 expressions of esophagus cancer cell was detected through Western blot; cell apoptosis related gene bax and bcl-2expression were detected through immunohistochemistry. *Results*: 1) The acetyltalatisamine achyranthan could suppress esophagus cancer EC9706 cell's multiplication and proliferation; the killing action to esophagus cancer cell was stronger when combined with 5-fluorouracil than when they were used separately. 2) After using achyranthes bidentata polysaccharides, the esophagus cancer EC9706 was blocked in G_0/G_1 phase, and the cells expressed the early time apoptosis. Its mechanism possibly involves the increase of p21 and p27 gene expressions separately as well as the increase of bax gene expression with the bcl-2 gene expression reduction. *Conclusion*: The achyranthes bidentata polysaccharides has the inhibitory action to the esophagus cancer cell multiplication; the acetyltalatisamine achyranthan has the anti-tumor function with 5-fluorouracil.

【Key words】achyranthes bidentata polysaccharides; 5-fluorouracil; EC9706; anti-tumor cooperation action

目前，由于生存环境的逐渐恶化，恶性肿瘤已成为危害人类健康最严重的一类疾病。据世界卫生组织统计，肿瘤的发病率呈逐年递增趋势。对于恶性肿瘤的治疗目前仍以手术治疗为主，术后加以化学治疗，而化疗药物在杀伤肿瘤细胞的同时，对正常细胞也产生杀伤作用，导致化疗效果不尽人意。河南是食道癌高发区，食管癌死亡率仅次于胃癌，居恶性肿瘤死亡率的第二位，尽管早期食管癌可以通过手术缓解，但大多数患者发现时已是晚期，化疗药物的使用显得至关重要。如何使化疗药物对肿瘤细胞产生最大的杀伤效应，而对正常细胞的毒性减弱到最小是化疗药物亟待解决的问题。牛膝多糖（Achyranthes bidentata polysaccharides，ABPS）是从牛膝根（Achyranthes bidentata blume）中分离出的一种的具有抗肿瘤能力的小分子水溶性多糖化合物[1]。许多研究表明，它

作者介绍：冯 婷（1972-），女，讲师，硕士，
研究方向：肿瘤病因发病学、免疫及生物治疗。

通信作者：程慧敏，男，主任医师，Email：Chenghuimin530323@yahoo.cn。

具有增强机体免疫力以及抑制肿瘤生长的作用[2-7]，对正常细胞几乎没有毒性[8-10]，单独应用 ABPS 并不能对所有的肿瘤细胞产生毒性作用，5-氟尿嘧啶（5- fluorouracil，5-Fu）是食管癌患者的主要化疗药物之一，而大剂量的化疗药物对机体组织造成了相当的副作用，如骨髓抑制、肝脏损害等。因此，联合用药治疗肿瘤成为较热门的研究方向，但 ABPS 与化疗药物联合应用的报道不多，因此，本实验以食管癌 EC9706 为研究对象，用 MTT、流式细胞术和免疫细胞化学等技术，研究 ABPS 对食管癌细胞周期阻滞和凋亡的作用，以及 ABPS 联合 5-Fu 对食管癌细胞的杀伤作用及相关机制的探讨。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

食管癌细胞株 EC9706 由郑州大学病理生理学教研室提供；ABPS 粉末购自山东泰安医药有限公司；5-Fu 购自上海旭东药业公司，RPMI1640 购自 GibcoBRL 公司；胎牛血清购自天津 TBD 生物有限公司；p21、p27、bcl-2、bax 鼠抗人单抗购自美国 Santa Cruz；MTT 购自 Sigma 公司；ECL 显色试剂盒购买于北京中杉。蛋白垂直电泳仪和印迹转膜仪购自美国 Bio-Rad 公司。流式细胞仪（FACSsort，BD 公司）等。

1.2 细胞培养

EC9706 细胞用含 10%胎牛血清、100 mg/ml 链霉素、100 mg/ml 青霉素的 RPMI 1640 培养液培养，放在 37℃，5%CO_2 培养箱中培养至对数生长期。

1.3 细胞生长抑制试验 MTT 法检测细胞抑制率

EC9706 细胞经 0.05%胰蛋白酶消化处理制成 3×10^4 个/ml 的细胞悬液，接种在 96 孔板中，每个浓度设 6 个复孔，分 3 组。ABPS 单独用药组：每孔分别加入 100、200、300 μg/ml的 ABPS，5-Fu 单独用药组 25 μg/ml，联合用药组：每孔加入不同浓度的 ABPS 和 5-Fu(10 μg/ml)；以未加药细胞作为对照组，培养 48 h 后，加入 20 μl MTT（5 mg/ml）在 5%CO_2、37℃的恒温培养箱培养 4 h 后弃上清，每孔再加入 150 μl DMSO，待充分溶解后轻微摇床振荡 10 min，上酶标仪检测用波长570 nm 比色测定 OD 值，并测定药物半数抑制浓度(IC_{50})，计算抑制率。生长抑制率（%）=（1- 实验孔平均 OD 值/对照孔平均 OD 值）×100%$IC_{50}=lg^{-1}[Xm-i(\Sigma P-0.5)]^3$，重复 6 次，取平均值[11]。

Xm：设计的最大浓度的对数值；i：各浓度倍比浓度的对数值；ΣP：各组生长抑制率之和；0.5：经验常数。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期的 EC9706 细胞，以无血清的 RPMI1640 培养 24 h 后，按照上述分组作用 48 h 后，以 PBS 洗涤，用70%的冷乙醇在 4℃以下固定 24 h 以上，然后离心弃乙醇（3 000 r/min，10 min），再加入 1 ml PBS 制成细胞悬液后加入 RNA 酶（终浓度为 10 μg/ml），室温放置 30 min，再用 50 μg/ml 的碘化丙啶（Propidium iodide，PI）染色后，流式细胞仪分析周期细胞。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

取对数生长期的 EC9706 细胞，以无血清的 RPMI1640 培养 24 h 同步后，按照上述分组作用 48 h 后，0.05%胰蛋白酶消化，离心（3 000 r/min，10 min），制备成各组单细胞悬液计数，取 10^6 个细胞转移至 15 ml 离心管中，190 μl 冰预冷 1×结合缓冲液重悬细胞，加入 10 μl AnnexinV-FITC 吹打均匀，室温避光放置 10 min，再用 3 000 r/min，5 min，弃上清，加入 195 μl 冰预冷的 1×结合缓冲液重悬细胞，加入 5 μl PI，室温避光孵育 10 min，设置未染色管、单染管 AnnexinV-FITC 和 PI 管，用未染色细胞调零机器，以 AnnexinV-FITC 和 PI 单染管作为基准对照，测定每个检测管数据，利用 cellQuest3.0 软件进行参数分析，计算凋亡细胞百分比。

1.6 Western blot 检测 P21、P27 蛋白的表达

严格参照《分子克隆实验指南》提取各处理组细胞总蛋白，测定浓度后，在标准蛋白曲线下算出 50 μg 蛋白上样量，以 β-actin 为内参照，50 μg 上样量分别用 12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶进行垂直电泳分离，转移至 PVDF 膜上，用含 50 g/L 牛血清白蛋白（Bovine serum albumin，BSA）封闭 3 h，加入 p21、p27 鼠抗人一抗，4℃过夜。将膜放于 TBST 稀释的二抗中，室温轻摇 2 h，用 TBST 洗涤 3 次，使用辣根过氧化分物酶 HRP-ECL 发光法进行显影，结果用以 Gel-Doc 图像分析软件检测各条带的灰度值，将各处理组的灰度值与对照组灰度值比较，得到实验组与对照组增加的倍数。

1.7 免疫细胞化学检测 bax、bcl-2 蛋白的表达

严格采用免疫细胞化学法试剂盒进行检测，随机挑选制作好的细胞爬片；将封闭好的爬片用 PBS 洗涤 3 min×3 次；用 5%的正常羊血清于室温下封闭非特异性抗原 15 min；弃去多余的血清，滴加适当稀释的一抗（1:50），在湿盒内 4℃冰箱过夜，隔日室温复温 1 h 后用 PBS 洗涤 3 min×3 次，滴加适当二抗（1:200）孵育 30 min。阴性对照用 PBS 代替一抗。显色、脱水、封片。倒置显微镜下观察表达情况。

1.8 统计学处理

应用 SAS 9.1.3 统计软件进行统计学处理。计量资料采用均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；采用单因素方差分析比较各单独处理因素效应；采用析因设计方差比较各联合处理因素效应；对方差分析有显著性差异的资料，进一步采用 REGWQ 法进行多组均数间的两两比较。检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 不同浓度 ABPS 对 EC9706 细胞增殖的影响

见表 1，MTT 比色法显示，对照组细胞呈现正常的生长周期，不同浓度的 ABPS 随着浓度增加与对照组相比较有明显差异，而联合组与单独用药组相比抑制率差异更加明显，也表现出一定的剂量依赖性($P<0.05$)。同时从表 2 可以看出，ABPS、5-Fu 及二者之间具有交互作用($P<0.05$)，ABPS 对 EC9706细