# 槐耳清膏对人肺腺癌细胞 H1299 化疗 敏感性的影响

何 勇',胡义杰',范士志',蒋耀光',刘 苹',陈建明',李志平'(1.第三军医大学大坪医院野战外科研究所,重庆 400042; 2.第三军医大学大坪医院野战外科研究所分子生物学实验室,重庆 400042)

摘 要: [目的] 探讨槐耳清膏对 p53 基因表达缺失的人肺癌细胞系 H1299(p53-null)体外生长化疗敏感性的影响。[方法] 应用 MTT 法、流式细胞仪及克隆形成试验,检测槐耳清膏对 H1299 生长的影响及对化疗药物(DDP 和 ADM)敏感性的变化。 [结果] 槐耳清膏能使 H1299 细胞体外生长速度明显减慢,其抑制生长的作用具有剂量依赖性。MTT 实验提示槐耳清膏使顺铂和阿霉素的  $IC_{50}$  值分别减少了 4 倍和 45 倍,槐耳清膏(I.0g/L)联合原本没有明显抑制和杀伤作用的化疗药物( $I.25\mu$ mol/L 的顺铂或  $0.25\mu$ mol/L 的阿霉素)使 H1299 细胞生长明显受到抑制。流式细胞术显示槐耳清膏使顺铂诱导的细胞凋亡率从 12.8%升高到 33.5%(P<0.01),阿霉素诱导的细胞凋亡率从 22.7%升高到 51.0%(P<0.01)。克隆形成实验显示槐耳清膏能明显降低化疗后细胞的克隆形成数(P<0.01),对顺铂和阿霉素的化疗增效倍数分别为 1.9 和 1.6 倍。 [结论] 槐耳清膏可以抑制人肺腺癌细胞 H1299 体外生长并提高其对阿霉素、顺铂等化疗药的敏感性,且这种作用不依赖于 p53 基因。关键词:槐耳清膏;肺肿瘤;化疗敏感性;p53 基因

中图分类号:R73-36;R734.2 文献标识码:A 文章编号:1004-0242(2008)12-1053-04

# Impact of Polysaccharide of Trametes Robiniophila Murr (PS-T) on the Chemosensitivity in Human Lung Adenocarcionoma Cells H1299

HE Yong, HU Yi-Jie, FAN Shi-zhi, et al. (The Research Institute of Surgery, Daping Hospital, The Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the effect of PS-T on growth in vitro and chemosensitivity of H1299 cells (p53-null) of human lung adenocarcinoma. [Methods] The effect on growth of H1299 cells with PS-T was observed by MTT assay. The change of chemosensitivity on cisplatin (DDP), adriamycin (ADM) was observed by flow cytometry and colony formation assay. [Results] PS-T significantly inhibited growth of H1299 cells in vitro and the antiproliferatitive effect occurred in a dose dependent manner. MTT assay showed that the IC50 values for DDP and ADM were reduced to approximate 4 and 45 fold respectively when PS-T combined with chemotherapeutic agent. Chemotherapeutic drugs (1.25 µmol/L DDP or 0.25 µmol/L ADM) without inhibition essentially suppressed growth of H1299 cells markedly when they combined with PS-T (1.0g/L). The DDP-induced apoptosis rate increased from 12.8% to 33.5% (P<0.01) and the ADM-induced apoptosis rate increased from 22.7% to 51.0% (P<0.01) when they combined with PS-T by flow cytometry. In colony-formation assays, the colony number acted by chemotherapeutic agents significantly decreased when they combined with PS-T(P<0.01). The sensitive enhancement ratios were 1.9 and 1.6 for DDP and ADM, respectively. [Conclusion] PS-T is capable of inhibiting the growth in vitro of human lung adenocarcinoma cells H1299 and enhancing its sensitivity to chemotherapeutic agents(DDP or ADM). This role is not depend on p53 gene.

**Key words:** polysaccharide of trametes robiniophila murr (PS-T); lung neoplasms; chemotherapeutic sensitivity; p53 gene

收稿日期:2007-11-21;修回日期:2008-03-16

通讯作者:范士志

中国肿瘤 2008 年第 17 卷第 12 期

1053

槐耳清膏是药用真菌槐耳的热水提取物,其主要的活性成分是多糖蛋白[1],已应用于临床肿瘤的治疗[2-4]。体外研究表明,槐耳清膏对肿瘤细胞的抑制作用可能是通过诱导凋亡来实现的[5-7]。在大约 50%的非小细胞肺癌和 70%的小细胞肺癌中有 p53 基因功能的丧失[8]。为此,本研究检测槐耳清膏对 p53 基因缺失的肺腺癌细胞系 H1299(p53-null)细胞体外生长的影响,并观察槐耳清膏作用下 H1299 对化疗药顺铂和阿霉素的敏感性变化,为金克槐耳颗粒治疗肺癌提供实验依据。

# 1 材料与方法

# 1.1 材料和药品配制

MTT 为华美公司产品,连接素 (Annexin )-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC),碘化丙啶(propidium iodide, PI)为 Becton Dickinson 公司产品。槐耳清膏由江苏启东盖天力药业有限公司提供。精确称取干槐耳清膏 10.0g,将其溶于 100ml 培养液,以  $0.22\mu m$  超滤除菌器过滤除菌,制成 100g/L 的槐耳清膏浓缩含药培养液,临用前分别稀释成 1、2.5、5g/L 的工作液。顺铂(DDP)为山东齐鲁制药厂产品,阿霉素(ADM)为浙江海正药业股份有限公司产品。临用前均用培养液分别稀释成所需浓度的工作液。

### 1.2 细胞培养

人肺腺癌细胞株 H1299(p53-null)由美国德州大学 Annderson 癌症中心 Kalkunte S.Srivenugopal博士提供,其 p53 基因纯合缺失。用含 100U/ml 青霉素、100mg/L 链霉素及 10% 新生小牛血清 (FBS)的 DMEM 培养基培养 H1299 细胞。于  $37\%.5\%CO_2$ 、饱和湿度的培养箱中培养,0.25%胰蛋白酶、0.02%二乙烯四乙酸二钠(EDTA)消化传代。

# 1.3 槐耳清膏的体外抑瘤实验

采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应(MTT)比色法。H1299 细胞取对数生长期细胞悬液  $200\mu$ l/孔 (含  $2\times 10^3$  个细胞)接种至 96 孔板,于  $37^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、饱和湿度的培养箱中培养 24h。去除旧的培养液,每孔加入含不同浓度槐耳清膏(0、1.0、2.5、5.0g/L)的相应培养液  $200\mu$ l 继续培养,每天取 3 个复孔,每孔加入 $20\mu$ l MTT(5g/L),培养 4h 后弃培养液,每孔加入二甲基亚砜(dimathyl sulfoxide,DMSO) $200\mu$ l,振荡 10min 溶解结晶紫。酶联免疫检测仪测定 570mm 波长各孔

光吸收(OD)值 $(A_{570}$ 值)。按下列公式计算细胞生长抑制率: 抑制率=1-(实验孔 OD 值/对照孔 OD 值)×100%。

1.4 细胞药物敏感性试验(四甲基偶氮唑盐微量酶 反应比色法)

H1299 细胞均取对数生长期细胞 3×10<sup>4</sup>/孔接种 至 96 孔板,培养 24h 细胞贴壁后分别加入不同培养 基进行实验。实验分组:化疗药组和联合用药组。化 疗药组:对数生长期细胞 H1299 各孔分别加入 DDP 或 ADM 至终浓度 0、0.01、0.05、0.25、1.25 和 6.25μmol/L;联合用药组:各孔加入槐耳清膏 1.0g/L, 并分别加入 DDP 或 ADM 至终浓度 0、0.01、0.05、 0.25、1.25 和 6.25 \(\mu\text{mol/L}\); 每组 3 个复孔。培养 24h 后,每孔加入 20µl 浓度为 5g/L 四甲基偶氮唑盐 (MTT)、培养 4h 后弃上清、每孔加入二甲基亚砜 (DMSO)200µl,振荡 10min。酶联免疫检测仪测定 570nm 波长各孔光吸收值(A<sub>570</sub>)。以各组未加化疗药 的培养孔细胞的 A<sub>570</sub> 值为细胞 100%存活的标准对 照,计算各孔细胞存活率。细胞存活率=(试验孔光吸 收值/对照孔光吸收值)×100%。用细胞存活率对药 物剂量作图,并通过作图法估算细胞生存减少 50% 时的药物浓度即 ICso 值。

# 1.5 流式细胞术分析细胞凋亡

实验分组:对照组、单化疗药组、联合用药组。对照组:加入等体积的培养基。单化疗药组:对数生长期细胞 H1299 各瓶分别加入 DDP 1.25μmol/L 或加入 ADM 0.05μmol/L;联合用药组:对数生长期细胞 H1299 各孔加入槐耳清膏 1.0g/L 和 DDP 1.25μmol/L或加入 ADM 0.05μmol/L;药物诱导作用 48h。胰酶消化收获细胞(含悬浮及贴壁细胞),冷 PBS 液洗涤 2 遍,再以冷 PBS 悬浮,细胞浓度为 1×10<sup>6</sup>/ml。取 100μl 细胞悬液加入 5μl Annexin -FITC、10μl PI (50mg/L) 室温避光反应 30min 后,加入反应缓冲液 400μl,流式细胞术对凋亡细胞进行定量检测。

### 1.6 平板克隆形成实验

在六孔板中接种 500 个细胞,每种细胞做 3 个复孔,每隔 5~6d 更换培养基。单化疗药组和联合用药组于细胞接种 48h,细胞完全贴壁后,更换含化疗药或联合用药培养液作用 48h 后换成普通培养液。培养 2 周至培养皿中出现肉眼可见的细胞克隆后,弃去培养基,PBS 小心浸洗 2 次,用 1:3 醋酸甲醇固定 15min。弃固定液,加入适量姬姆萨染液染色 10~

中国肿瘤 2008 年第 17 卷第 12 期

30min,流水缓慢冲去染色液,空气干燥。镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。

A 100

### 1.7 统计学处理

实验数据以 SPSS10.0 软件包行统计分析。实验结果以平均数±标准差  $(\bar{x}\pm s)$ 表示,组内和组间差异显著性检验采用配对 t 检验和方差分析。 P<0.05 为差异有显著性。

#### 胞存活率(% 1存活率(%) 09 08 80 60 单化疗药组 细胞 联合用药组 40 40 单化疗药组 联合用药组 20 20 0.05 0.05 0.25 1.25 1.25 DDP浓度(µmol/L) ADM浓度(µmol/L) 槐耳作用下 H1299 对 DDP、ADM 敏感性的影响

B 100

# 2 结 果

# 2.1 槐耳清膏对 H1299 细胞的体外抑瘤效果

MTT 法结果显示, 槐耳清膏各浓度组的抑制率随浓度增加而上升, 呈一定的剂量依赖性; 槐耳清膏 2.5g/L 和 5.0g/L 组与槐耳清膏 1.0g/L 及无槐耳清膏作用组之间差异均有显著性 (P<0.05); 而槐耳清膏 1.0g/L 与无槐耳清膏作用组之间差异无显著性 (P>0.05)。槐耳清膏 2.5g/L 和 5.0g/L 能使 H1299 细胞增殖能力明显减慢, 槐耳清膏 1.0g/L 对 H1299 细胞则无明显的杀伤能力。

## 2.2 药物敏感试验

当 DDP 浓度大于  $1.25\mu\text{mol/L}$  或 ADM 浓度大于  $0.25\mu\text{mol/L}$  时,联合用药组的细胞存活率与单化疗药组有比较显著性差异(P<0.05);即在对 H1299细胞无明显杀伤能力的槐耳清膏浓度 1.0g/L 协同作用下,原本对 H1299细胞无明显杀伤抑制作用的  $1.25\mu\text{mol/L}$  的 DDP 或  $0.25\mu\text{mol/L}$  的 ADM 即可明显抑制 H1299细胞的增殖(P<0.01),抑制率均大于 50%(见图 1),DDP 和 ADM 的  $IC_{50}$  分别降低了约 4 倍和 45 倍(见表 1)。

### 2.3 化疗药诱导细胞凋亡

FITC-PI流式细胞术检测细胞凋亡显示,联合用药组细胞凋亡率明显高于单化疗药组(见表 2)。与对照组比较,单纯使用 DDP 或 ADM 细胞凋亡率分别增加 2.0 和 3.5 倍,而联合使用槐耳清膏后细胞凋亡率分别增加了 5.2 和 8.0 倍。由此可见,联合使用槐耳清膏使 DDP 和 ADM 作用于 H1299 细胞的凋亡率分别提高 2.6 和 2.3 倍。

### 2.4 克隆形成分析

联合用药组 H1299 细胞的克隆形成数比

表 1 联合槐耳前后 H1299 细胞对 DDP、ADM IC50 的变化

药物 DPP	槐耳清膏(g/L)		IC50 D 值
	0	1.0	IC <sub>50</sub> D 但
DDP	5.75	1.50	0.260
ADM	6.25	0.14	0.022

 $IC_{so}$  值是与对照比较,细胞生存减少 50%时的药物浓度,通过作图法 估算。 $IC_{so}$  D 值指联合指数,D<1 表示协同作用,D=1 表示累积作用,D>1 表示拮抗作用

表 2 流式细胞术分析 H1299 细胞细胞凋亡率的改变(x±s)

槐耳浓度		凋亡指数			
(g/L)	对照组	$\mathrm{DDP}(1.25\mu\mathrm{mol/L})$	$\mathrm{ADM}(0.25\mu\mathrm{mol/L})$		
0	6.4±0.7 8.9±1.5	12.8±1.1 33.5±2.7*	22.7±3.1 51.0±4.5*		

<sup>\*:</sup>联合用药组与单化疗药组比较,P<0.01。

表 3 联合槐耳前后 H1299 细胞在化疗药作用下 克隆形成数的改变

槐耳浓度		克隆形成数			
(g/L)	对照组	DDP(1.25µmol/L)	ADM(0.25 µmol/L)		
0	95.8±4.2	56.4±4.5	43.3±3.5		
1.0	86.6±3.7	20.3±3.1*	10.1±2.8*		

<sup>\*:</sup>联合用药组与单化疗药组比较,P<0.01

H1299 和单化疗药组 H1299 细胞明显减少 (P< 0.01),见表 3。与无化疗药作用的自身对照组相比,1.25 $\mu$ mol/L DDP 药作用组和联合用药组其克隆形成数分别下降 41.1%及 76.6%;0.25 $\mu$ mol/L ADM 作用组和联合用药组其克隆形成数分别下降 54.8%及 88.3%。联合使用 1.0g/L 的槐耳清膏对 DDP 和 ADM 的化疗增效倍数分别为 1.9 和 1.6 倍。

# 3 讨论

槐耳清膏是一种新型真菌类抗肿瘤新药、既往

中国肿瘤 2008 年第 17 卷第 12 期

1055

研究表明 時期 再清 高不仅能抑制肿瘤细胞的生长,促进肿瘤细胞凋亡,还可增强机体免疫力,是一种较理想的肿瘤抑制剂。目前,如何提高非小细胞肺癌对化疗药物的敏感性,降低化疗药物的使用剂量,减少毒副作用,提高疗效是其治疗所面临的关键问题之一

黄涛等 [5] 的研究表明槐耳清膏能诱导表达 wt-p53 基因的人肺腺癌细胞 A549 发生凋亡,从而抑制 A549 细胞的生长;进一步的研究[6]证实槐耳清膏多糖不仅能诱导耐顺铂 (DDP) 的人体肺癌细胞 A<sub>549</sub> <sup>DDP</sup> 耐药性 (A549) 一次能促进 DDP 耐药的 A<sub>549</sub> <sup>DDP</sup> 耐药性发生逆转,对化疗起到增敏作用。但是,p53 基因突变是人非小细胞肺癌中发生频率最高的遗传性改变,约50%的非小细胞肺癌和 70%的小细胞肺癌中有 p53 基因功能的丧失[8],肺癌细胞可能因为不能进入 p53 基因功能的丧失[8],肺癌细胞可能因为不能进入 p53 基因诱导的凋亡途径而对化疗药物产生耐药性。槐耳清膏对这部分 p53 基因功能丧失的肺癌能否起到抑瘤作用呢? 为此我们选用 p53 基因纯合缺失的人肺腺癌细胞株 H1299,在排除 p53 基因影响的前提下,研究槐耳清膏对肺癌细胞的抑制作用和化疗敏感性的影响。

结果表明:槐耳清膏对 H1299 细胞的抑制率随浓度增加而上升,呈一定的剂量依赖性;药敏实验结果 显示,1.25μmol/L DDP、0.25μmol/L ADM 对H1299 细胞没有表现出明显的抑制和杀伤作用,这可能是因为 p53 基因功能的丧失使肺癌细胞形成耐药性。而联合使用对 H1299 细胞无明显杀伤能力的1.0g/L 槐耳清膏后 DDP 和 ADM 的 IC<sub>50</sub> 分别降低了约 4 倍和 45 倍,1.25μmol/L DDP、0.25μmol/L ADM对 H1299 细胞的生长抑制率均大于 50%,原本不敏感的药物浓度在联用低浓度槐耳清膏后能使癌细胞的生长明显受到抑制。克隆形成实验显示,低浓度槐耳清膏使肺癌细胞经 DDP、ADM 作用后的克隆形成数下降最为明显,化疗增效倍数分别达 1.9 和 1.6倍。提示槐耳清膏可以使 p53 基因功能丧失的肺腺癌细胞对 DNA 损伤性化疗药物的敏感性显著升高。

有研究认为槐耳清膏能有效地抑制体外肝癌细胞生长,其机制可能与抑制肝癌细胞 DNA 合成及诱导肝癌细胞凋亡有关<sup>[9]</sup>。对直肠癌细胞的研究发现,槐耳清膏诱导直肠癌 HR8348 细胞凋亡可能与上调p53 基因表达有关<sup>[7]</sup>。但是本研究结果显示联合使用槐耳清膏使 DDP 和 ADM 作用于 H1299 细胞的凋亡率分别提高 2.6 和 2.3 倍,提示槐耳清膏即使在

p53 基因缺失的情况下亦能增强 DNA 损伤性化疗药物的诱导凋亡作用。因此,槐耳清膏还可以通过激活不依赖于 p53 基因的细胞凋亡途径而诱导凋亡,从而提高肿瘤细胞对化疗的敏感性。正如既往研究发现,槐耳清膏不仅能通过 p53 基因途径诱导凋亡,还可上调促凋亡基因 caspase-3<sup>[10]</sup>、Bak<sup>[7]</sup>和下调凋亡抑制基因 bcl-2<sup>[7]</sup>的表达而诱导凋亡。另外,槐耳清膏能抑制抑癌基因 PTEN 的缺失<sup>[11]</sup>亦可能是诱导凋亡的机制之一。但槐耳清膏作用于 H1299 细胞后诱导凋亡的具体机制有待进一步的研究证实。

总之, 槐耳清膏能够用于治疗 p53 基因不能发挥作用的肺癌,如与化疗联合应用,不仅能减少化疗药物的使用剂量,降低化疗药物的毒性和副作用,而且能更大程度地杀灭肿瘤细胞。本研究为槐耳清膏联合化疗提高非小细胞肺癌治疗效果提供了实验依据。

# 参考文献:

- [1] 庄毅.真菌抗癌药物槐耳颗粒的研制[J].中国肿瘤, 1999, 8(12):540.
- [2] 蒋梅, 周岱翰. 槐耳冲剂治疗中晚期原发性肝癌 98 例 [J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(6);21-22.
- [3] 赵文生. 金克联合化疗对复发性非霍奇金淋巴瘤的疗效[J]. 中国肿瘤, 1999, 8(5):237-238.
- [4] 赵红星, 张国政. 金克治疗老年晚期肝癌近期疗效观察 [J]. 中国肿瘤, 2001, 10(5):305-306.
- [5] 黄涛, 孔庆志, 卢宏达, 等. 槐耳清膏诱导人肺腺癌细胞 A549 凋亡的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2001, 24(8):503-504.
- [6] 黄涛, 孔庆志, 卢宏达, 等. 槐耳清膏对耐顺铂人肺癌细胞系  $A_{549}^{DDP}$  逆转的实验研究[J]. 中国药师, 2002, 5(9): 517-518
- [7] 程若川, 汤礼贵, 兰丽琴, 等. 槐耳清膏诱导人直肠癌 HR8348 细胞凋亡的实验研究[J]. 中国普外基础与临床 杂志, 2003, 10(6):568-571.
- [8] Fisher MD. Strategies to restore p53 function in patients with lung cancer[J]. Clin Lung Cancer, 2001, 3(2):99–101.
- [9] 金小顺, 耿小平, 朱立新, 等. 槐耳清膏体外诱导人肝癌 细胞凋亡的实验研究[J]. 肝胆外科杂志, 2007, 15 (2): 148-151.
- [10] 周进, 李德春, 匡玉庭. 金克(槐耳清膏) 抑制胰腺癌细胞 Panc21 生长转移的实验研究[J]. 苏州大学学报(医学版), 2005, 25(2):226-240.
- [11] 陆鹏, 陈莉, 陆正鑫. 实验性肝癌中比较槐耳与 IL-2对 PTEN 和 IL-2R 阳性细胞的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(15):1982–1985.

中国肿瘤 2008 年第 17 卷第 12 期

1056