

丹皮酚体内外抗人食管癌 Eca-109 细胞增殖及诱导凋亡的作用

杨震¹, 孙国平¹, 徐淑萍¹, 宛新安¹, 桂双英²

(1. 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 安徽合肥 230022; 2. 安徽中医学院药学院药剂学教研室, 安徽合肥 230031)

中国图书分类号: R 282.71; R 329.24; R 329.25;
R 735.102.2; R 735.105.3

文献标识码: A 文章编号: 1001-1978(2007)05-0654-05

摘要:目的 研究丹皮酚(paeonol, Pae)在体内外对人食管癌细胞 Eca-109 的抑瘤作用及其对细胞凋亡的影响。方法 采用噻唑蓝(MTT)体外试验法和灌胃给药体内抗肿瘤试验。光镜及电镜观察各组的肿瘤组织的形态学变化。应用末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)法测定细胞凋亡指数。结果 丹皮酚在体外对 Eca-109 细胞有明显的细胞毒作用, 半数抑制浓度(IC₅₀)为 0.342 mmol·L⁻¹; 体内灌胃给予丹皮酚 25、50、100 和 200 mg·kg⁻¹ 对裸鼠移植人食管癌 Eca-109 的抑制率分别为 10.67%、23.54%、27.91% 和 34.46%; 顺铂 5 mg·kg⁻¹ 组抑瘤率为 58.71%; 丹皮酚在 100 mg·kg⁻¹ 剂量下与顺铂 5 mg·kg⁻¹ 联合用药抑制率为 77.91%。光镜下用药组可见较多凋亡的肿瘤细胞。透射电镜下可见肿瘤细胞核染色质浓缩边聚、胞质浓缩、核碎裂以及凋亡小体形成等典型的凋亡表现。用药组凋亡指数较对照组明显增加。结论 丹皮酚在体内外具有抑制人食管癌 Eca-109 细胞增殖及诱导其凋亡作用。

关键词: 丹皮酚; 食管肿瘤; 细胞 Eca-109; 抗肿瘤作用; 凋亡

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤, 我国是世界上食管癌发病率最高的国家。以顺铂(cisplatin, CDDP)为基础的辅助化疗是目前治疗食管癌的重要手段, 但是化疗有较大的毒副作用, 部分患者难以耐受。因此积极寻找一种低毒的化疗药物成为当前亟需解决的问题。研究表明, 丹皮酚(paeonol, Pae)具有一定的抗肿瘤活性, 体外实验发现它对多种肿瘤细胞株有增殖抑制作用, 灌胃给药有抗小鼠肝肿瘤作用^[1-4]。但有关 Pae 对人食管癌作用的实验研究尚未见报道, 本研究通过体内外实验, 探讨 Pae 对人食管癌细胞 Eca-109 的抑瘤作用及其与化疗药物

顺铂的联合抗肿瘤效果, 并且初步探讨该药对肿瘤细胞凋亡的影响。

1 材料与方

1.1 材料

1.1.1 药物和试剂 丹皮酚注射液: 购自上海第一制药厂(规格 5 g·L⁻¹)。丹皮酚试药: 购自铜陵市天时制药厂; 顺铂注射液: 南京制药厂有限公司(规格 1 g·L⁻¹); RPMI1640 培养粉购于美国 Gibco 公司; 噻唑蓝购于美国 Sigma 公司。末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)试剂盒购自美国 Promega 公司。

1.1.2 细胞株和实验动物 人食管癌细胞株 Eca-109 购自中科院上海细胞库。BALB/c 裸鼠 6~8 周龄, SPF 级, ♀♂ 兼用, 安徽医科大学动物中心提供。

1.2 方法

1.2.1 体外抑瘤试验 采用 MTT 法, 设不同浓度的丹皮酚组、细胞对照组和空白对照组, 取对数生长期的细胞(1~5) × 10⁷·L⁻¹ 接种于 96 孔板上, 每组设 6 个复孔, 每孔接种 100 μl, 置 37℃、5% CO₂ 的培养箱培养 24 h, 弃上清, 丹皮酚组每孔分别加入 200 μl 不同浓度的丹皮酚注射液(Pae 的终浓度为 0.047、0.094、0.188、0.376、0.752、1.504 mmol·L⁻¹); 细胞对照组和空白对照组只加入等量培养液, 继续培养 48 h, 在终止培养前 4 h 丹皮酚组及对照组每孔加入 20 μl MTT(5 g·L⁻¹), 再培养 4 h 后, 小心吸弃上清, 并加入 150 μl DMSO 溶解 MTT 沉淀, 用振荡器混匀后, 在酶标仪用 490 nm 测定吸光值(A), 按下列公式求出生长抑制率。生长抑制率/% = (1 - 用药组 A 值/对照组 A 值) × 100%。以药物浓度为横轴, 抑制率作纵轴, 绘出生长曲线。以药物浓度的对数与抑制率进行直线回归并求出 IC₅₀。

1.2.2 体内抑瘤试验 取对数生长期的食管癌细胞 Eca-109 制成细胞悬液, 加入培养基制成细胞浓度约为 1 × 10¹⁰·L⁻¹, 接种于每只裸鼠左侧腋窝皮下, 随机将 42 只裸鼠分成 7 组: 对照组、顺铂 5 mg·kg⁻¹ 组、丹皮酚不同剂量组(25、50、100 mg·kg⁻¹ 及 200 mg·kg⁻¹) 和丹皮酚 100 mg·kg⁻¹ + 顺铂 5

收稿日期: 2006-11-25, 修回日期: 2007-02-27

基金项目: 安徽省自然科学基金资助项目(No 050430901); 安徽省科技厅年度重点资助项目(No 05023090)

作者简介: 杨震(1978-), 男, 硕士生, E-mail: yangzhen311@gmail.com;

孙国平(1961-), 男, 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 通讯作者

mg · kg⁻¹组。每组6只裸鼠,接种24 h后丹皮酚试药灌胃给药,每日1次,连用14 d。顺铂腹腔注射,每周2次,共2 wk。实验结束时处死裸鼠称体重,剥离瘤体称瘤重。按下列公式计算抑瘤率。抑瘤率/% = (对照组瘤重 - 用药组瘤重)/对照组瘤重 × 100%。

1.2.3 两药联合作用评价^[5] 采用两药相互作用指数(CDI)评价两药相互作用性质, $CDI = AB/(A \times B)$ 。根据瘤重进行计算, AB为两药联用组与对照组瘤重的比值; A或B是各药物单独使用组与对照组瘤重的比值。当 $CDI < 1$ 时两药作用性质为协同; 当 $CDI < 0.7$ 时, 协同作用明显。

1.2.4 HE染色标本制备 留取各组瘤体, 4%甲醛固定新鲜肿瘤组织, 常规脱水, 石蜡包埋切片, 脱蜡至水 HE染色封片, 光镜高倍视野下观察肿瘤细胞形态并摄片。

1.2.5 透射电镜样品制备 留取各组瘤体, 取1 mm³ 肿瘤组织, 按常规法2.5%戊二醛前固定, 再用1%的锇酸后固定, 脱水, 包埋后70 nm连续超薄切片, 醋酸铅铀染色, 日本JEM-1011透射电镜(日本电子株式会社产品)观察肿瘤细胞的超微结构并摄片。

1.2.6 原位细胞凋亡检测 采用TdT(末端脱氧核苷酸转移酶)介导的dUTP缺口末端标记法——TUNEL法。各组裸鼠瘤体组织切片常规脱蜡至水, 20 mg · L⁻¹蛋白酶K消化30 min, 室温; 100 μl平衡缓冲液5~10 min; 100 μl TdT反应液作用60 min, 37℃; 0.3%过氧化氢封闭内源性过氧化物酶活性; 链酶亲和素-辣根过氧化物酶(SP-HRP)作用30 min, 室温; 二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木精复染, 脱水、透明、封片。实验设加DNase I的为阳性对照, 加不含TdT反应液的为阴性对照。普通光学显微镜选取5个高倍视野(×400), 计数其中凋亡细胞数, 并算出凋亡细胞占肿瘤细胞的百分比值, 即凋亡指数AI(apoptosis index)。

1.2.7 统计学处理 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间显著性检验采用方差分析。

2 结果

2.1 丹皮酚在体外对人食管癌细胞 Eca-109 生长的抑制作用 丹皮酚 0.047~1.504 mmol · L⁻¹ 对人食管癌细胞 Eca-109 的生长有抑制作用, 抑制率随着药物的浓度升高而升高, Pae 0.047、0.094、0.188、0.376、0.752、1.504 mmol · L⁻¹ 对 Eca-109 细胞的抑制率依次为 5.44%、12.28%、27.99%、39.53%、84.41%、89.98%。以浓度的对数与抑制

率进行直线相关分析: $Pae: r = 0.964, P < 0.01$ 。IC₅₀ 为 0.342 mmol · L⁻¹。见 Fig 1, Tab 1。

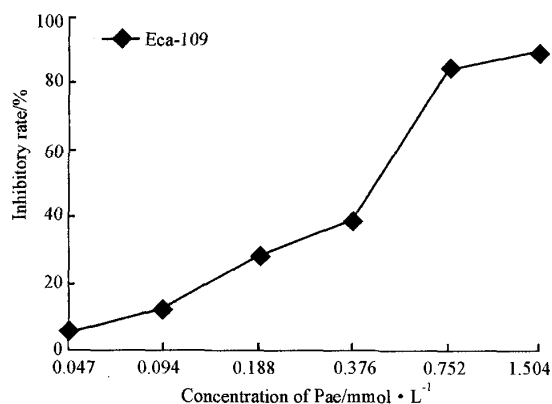


Fig 1 Inhibitory effect of Pae on proliferation of Eca-109 cells

Tab 1 Effect of Paeonol on Eca-109 cell line proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Pae / mmol · L ⁻¹	A value	Inhibitory rate / %	IC ₅₀ / mmol · L ⁻¹
0	0.570 ± 0.035	-	
0.047	0.539 ± 0.047	5.44	
0.094	0.450 ± 0.027 *	12.28	
0.188	0.410 ± 0.024 **	27.99	0.342
0.376	0.345 ± 0.012 **	39.53	
0.752	0.089 ± 0.028 **	84.41	
1.504	0.057 ± 0.008 **	89.98	

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group (Pae = 0)

2.2 丹皮酚对裸鼠移植人食管癌细胞 Eca-109 的抑制作用 丹皮酚在 25 mg · kg⁻¹ 剂量时对裸鼠移植 Eca-109 抑瘤率为 10.67%, 与对照组相比差异无显著性。丹皮酚在 50, 100 及 200 mg · kg⁻¹ 剂量时对裸鼠移植 Eca-109 的抑瘤率分别为 23.54%、27.91% 和 34.46%; 顺铂 5 mg · kg⁻¹ 组抑瘤率为 58.71%; 丹皮酚 100 mg · kg⁻¹ + 顺铂 5 mg · kg⁻¹ 组的抑瘤率分别为 77.91%。此 5 组与对照组相比, $P < 0.05$ 。丹皮酚 100 mg · kg⁻¹ + 顺铂 5 mg · kg⁻¹ 组分别与顺铂 5 mg · kg⁻¹ 组及丹皮酚 100 mg · kg⁻¹ 相比差异有显著性 ($P < 0.05$), 且计算 $CDI = 0.74$, 提示两药合用具有协同作用。实验过程中各组均无裸鼠死亡。见 Tab 2。

2.3 肿瘤组织光镜下形态学观察 各组瘤体 HE 染色后光镜下可见: 对照组肿瘤组织中肿瘤细胞弥散成片, 排列紊乱, 细胞异型性明显, 核大而深染, 核分裂像易见, 胞质少; Pae 不同剂量组、顺铂组以及两药联合(丹皮酚 100 mg · kg⁻¹ + 顺铂 5 mg · kg⁻¹) 组作用后肿瘤组织中可见肿瘤细胞数量减少, 部分

细胞见核染色质边集,核内出现空泡,核固缩、核碎裂。见 Fig 2。

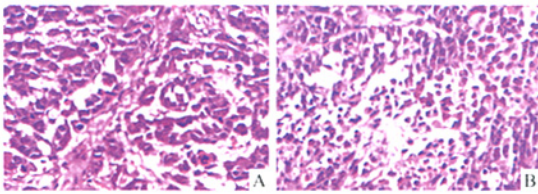


Fig 2 The results of HE stain in different groups(HE ×400)

A:Control group;B:Pae 100 mg · kg⁻¹ group

Tab 2 Inhibition of tumor growth of Eca-109 by Pae and cisplatin in BALB/c nude mice($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Dose /mg · kg ⁻¹	Change of weight/g	Tumor weight/g	Inhibitory rate/%
Control	-	+0.57	0.412 ± 0.061	-
Pae	25	+0.46	0.368 ± 0.036	10.67
	50	+0.35	0.315 ± 0.074 *	23.54
	100	+0.43	0.297 ± 0.094 * ^Δ	27.91
	200	+0.36	0.270 ± 0.099 *	34.46
CDDP	5	-0.95	0.170 ± 0.033 * ^Δ	58.71
Pae + CDDP	100 + 5	-1.05	0.091 ± 0.020 *	77.91

* P < 0.05 vs control group; ^Δ P < 0.05 vs Pae + CDDP group

2.4 肿瘤组织透射电镜下形态学观察 透射电镜下检测各组肿瘤组织,用药组肿瘤组织中可见较多凋亡的肿瘤细胞,表现为明显的凋亡形态学改变,细胞核染色质浓缩边聚、胞质浓缩、核碎裂并可见凋亡小体形成。见 Fig 3。

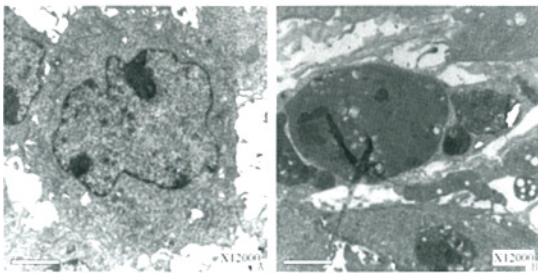


Fig 3 Ultrastructure of Eca-109 cells in different groups(×12000)

A:Control group;B:Pae 100 mg · kg⁻¹ group

2.5 TUNEL 检测细胞凋亡 光镜下见凋亡细胞明显固缩,核致密,为棕褐色,多叶状或新月状颗粒,常聚集在核周边,非凋亡细胞的核呈蓝色。对照组有少许细胞核深染为棕褐色的凋亡细胞,在丹皮酚不同剂量组,顺铂 5 mg · kg⁻¹组以及丹皮酚 100 mg · kg⁻¹ + 顺铂 5 mg · kg⁻¹组,凋亡细胞明显多于对照组(Fig 4)。用药组凋亡指数与对照组相比差异有显著性(P < 0.05 或 P < 0.01)。见 Tab 3。

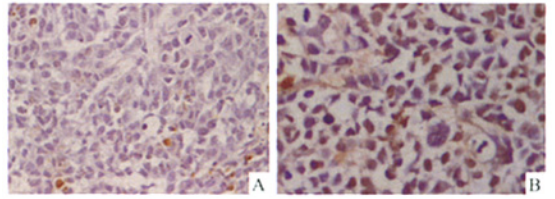


Fig 4 Light microscopic view of the transplanted tumor tissue in BALB/c nude mice(TUNEL, ×400)

A:Control group;B:Pae 100 mg · kg⁻¹ group

Tab 3 Detection of apoptosis index of each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Group	Dose/mg · kg ⁻¹	Apoptosis index/%
Control	-	4.81 ± 0.83
Pae	25	11.02 ± 2.58 *
	50	19.80 ± 2.77 **
	100	24.48 ± 4.35 **
	200	27.13 ± 4.39 **
CDDP	5	34.28 ± 3.91 **
Pae + CDDP	100 + 5	39.26 ± 3.56 **

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs control group

3 讨论

丹皮酚又称牡丹酚,是毛茛科植物牡丹 *Paeonia Suffruticosa Andr* 根皮和萝藦科植物徐长卿 *Pycnostelma Paniculatum (Bunge) K Schum* 干燥根或全草的主要有效成分,具有解热镇痛、镇静催眠、抗炎抗菌、抗动脉粥样硬化、抑制血小板聚集以及增强细胞免疫功能和抗氧化作用^[6]。我们前期研究结果表明,丹皮酚在体外对人红细胞白血病细胞系 K₅₆₂、人乳腺癌基因细胞系 T₆₋₁₇及肝癌细胞系 BEL-7404 的增殖有抑制作用,灌胃给药对荷瘤小鼠 HepA 肝癌有抗肿瘤作用^[1-4]。计春燕等^[7]和刘长青等^[8]也发现丹皮酚可抑制人大肠癌 TH-29 细胞的增殖。本实验考察了丹皮酚对人食管癌细胞 Eca-109 的抗肿瘤作用。丹皮酚在 0.047 ~ 1.504 mmol · L⁻¹浓度下对人食管癌细胞 Eca-109 具有明显的生长抑制作用,药物浓度越高,抑制作用越强,具有明显的浓度依赖关系(r = 0.964, P < 0.01),IC₅₀为 0.342 mmol · L⁻¹。表明丹皮酚在体外具有良好的抗肿瘤活性以及抗瘤谱广的特点。

丹皮酚 50 mg · kg⁻¹剂量下连续灌胃 14 d,可抑制裸鼠移植人食管癌 Eca-109 的生长,其抑制率达到 23.54%,随着剂量的增加抗肿瘤作用增强。尤其是一定剂量下的丹皮酚(100 mg · kg⁻¹)与顺铂(5 mg · kg⁻¹)联合应用时抑瘤率高达 77.91%,较丹皮酚、顺铂单独应用的抑瘤率的差异有显著性,提示丹皮酚与顺铂具有协同作用。实验过程中各组均无裸鼠死亡。实验结果提示丹皮酚在食管癌的治疗

上可能具有良好的应用前景。

丹皮酚对人食管癌细胞 Eca-109 的抗肿瘤作用机制尚不清楚。本研究结果发现,通过光镜和电镜形态学观察可见用药组有较多的肿瘤细胞凋亡的现象。电镜下肿瘤细胞形态呈典型的凋亡细胞特征表现,如细胞核染色质浓缩边聚、胞质浓缩、核碎裂以及凋亡小体形成,目前电镜形态学观察被认为是证实凋亡的最可靠方法^[9]。TUNEL 可以原位检测凋亡细胞,细胞凋亡时, DNA 出现不对称的断裂点而形成缺口,末端脱氧核苷酸转移酶可将标记的 dUTP 结合在 DNA 缺口末端的 3'-OH 上,通过标记物显色在组织细胞原位检测凋亡细胞,并可以在显微镜下计数凋亡细胞,常用于检测石蜡组织切片的细胞凋亡及定量研究,是检测细胞凋亡敏感性和特异性较高的实验^[10]。本实验结果显示用药组的凋亡指数明显高于对照组,与对照组的差异具有显著性。上述实验结果表明丹皮酚的抗肿瘤可能是通过细胞凋亡途径而发挥作用的,其具体机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 孙国平,沈玉先,张玲玲,等.丹皮酚的体内外抗肿瘤作用[J].安徽医科大学学报,2002,37(3):183-5.
- [1] Sun G P, Shen Y X, Zhang L L, et al. Anti-tumor effect of paeonol *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2002, 37(3):183-5.
- [2] 孙国平,沈玉先,张玲玲,等.丹皮酚对 HepA 荷瘤小鼠免疫调节和抑瘤作用研究[J].中国药理学通报,2003,19(2):160-2.
- [2] Sun G P, Shen Y X, Zhang L L, et al. Study on immunomodulation and antitumor activity of paeonol in HepA tumor mice [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2003, 19(2):160-2.
- [3] 孙国平,王华,沈玉先,等.丹皮酚诱导 K₅₆₂ 细胞凋亡的研究[J].中国药理学通报,2004,20(5):550-2.
- [3] Sun G P, Wang H, Shen Y X, et al. Study on effects of paeonol in inhibiting growth of K562 and inducing its apoptosis [J]. *Chin*

- Pharmacol Bull*, 2004, 20(5):550-2.
- [4] 孙国平,王华,沈玉先,等.丹皮酚在体外对 4 种肿瘤细胞株的增殖抑制作用[J].安徽医药,2004,8(2):85-7.
- [4] Sun G P, Wang H, Shen Y X. Inhibitory effects of paeonol on the proliferation of four tumor cell lines [J]. *Anhui Med Pharmac J*, 2004, 8(2):85-7.
- [5] Cao S S, Zhen Y S. Potentiation of antimetabolite antitumor activity *in vivo* by dipyrindamole and amphotericin B [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1989, 24(3):181-6.
- [6] 孙言才,沈玉先,孙国平.丹皮酚的主要药理活性研究进展[J].中成药,2004,26(7):579-82.
- [6] Sun Y C, Shen Y X, Sun G P. Advances in research on the main pharmacology of paeonol [J]. *Chin Trad Pat Med*, 2004, 26(7):579-82.
- [7] 计春燕,谭诗云,刘长青.丹皮酚对大肠癌 HT-29 细胞的增殖抑制作用[J].临床消化病杂志,2005,17(3):122-4.
- [7] Ji C Y, Tan S Y, Liu C Q. Inhibitory effect of paeonol on the proliferation of human colorectal cancer cell line HT-29 and its synergistic effect with chemotherapy agents [J]. *Chin J Clin Gastroenterol*, 2005, 17(3):122-4.
- [8] 刘长青,谭诗云,计春燕,等.丹皮酚对大肠癌 HT-29 细胞的增殖抑制作用及其机制的探讨[J].中国药理学通报,2005,21(10):1251-4.
- [8] Liu C Q, Tan S Y, Ji C Y, et al. The effects of paeonol on inhibiting the proliferation of human colorectal cancer cell line HT-29 and its molecule mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2005, 21(10):1251-4.
- [9] 李文生,姜德咏,丁建光,等.吲哚美辛诱导视网膜色素上皮细胞凋亡的实验研究[J].中国临床康复,2004,8(20):4126-7.
- [9] Li W S, Jiang D Y, Ding J G, et al. An experimental study on the apoptosis of retinal pigment epithelial cells induced by indomethacin [J]. *Chin Clin Rehab*, 2004, 8(20):4126-7.
- [10] Sheridan M T, Cooper R A, West C M. A high ratio of apoptosis to proliferation correlates with improved survival after radiotherapy for cervical adenocarcinoma [J]. *In J Radiat Oncol Biol Phys*, 1999, 44(3):507-12.

Studies on anti-proliferation and inducing apoptosis effects of paeonol on human esophageal cancer cell line Eca-109 *in vitro* and *in vivo*

YANG Zhen¹, SUN Guo-ping¹, XU Shu-ping¹, WAN Xin-an¹, GUI Shuang-ying²

(1. Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022, China;

2. School of Pharmacy, Anhui College of TCM, Hefei 230031, China)

Abstract: **Aim** To investigate the inhibitory effect of paeonol (Pae) on the human esophageal cancer cell line Eca-109 *in vitro* and *in vivo* and its effect on apoptosis. **Methods** Cytotoxic effect of Pae on Eca-109 cells cultured *in vitro* was measured by MTT assay. An-

ti-tumor activity was performed on BALB/c nude mice xenografts model. The morphologic changes of tumor tissue were observed under light microscope and transmission electron microscope. The apoptosis index was assessed by TUNEL. **Results** Pae had significant in-

查看完整版

付费下载



【百万古籍库】

<https://www.fozhu920.com/list/>

【易】【医】【道】【武】【文】【奇】【画】【书】

1000000+ 高清古书籍

打包下载





【风水】风水命理资料合集_9500 本

阴宅阳宅、风水堪舆、八字命理、手相面相、符咒卦象、奇门遁甲、紫微斗数.....



【中医】中华传统医学资料大全_15000 本

针灸、推拿、正骨术、汉医、苗医、民间秘方偏方、药洒药方、祖传医术、珍本...



【道术】道家法术\茅山术\符咒术\气术_3000 套

修真秘籍、丹道、道家秘术、胎息功、内丹术、茅山法术、道家符咒、巫术、...



【武术】传统武术与现代搏击术_6200 册

少林、武当、太极拳、形意拳、八极拳、咏春拳、气功、散打、格斗、拳击、...



【集藏】经史子集库_13300 卷

【经史子集】楚辞、汉赋、诗集、词集、宝卷、正史、编年、别史、纪事本末、地理志...



【国画】传世名画 _ 6100 卷

唐、金、辽、宋、元、明、清 800 多位画家近 6000 多幅传世...



【县志】方志\地方县志\乡志\地理志_8100 册

府志、区志、乡志、地理志..... 此合集为全国范围地方县志\府志古籍影印电子版，...



【国学】中华古籍库—32 万册古籍书

32 万册《中华古籍库》【32 万册影印古籍 + 20 多亿字，带检索器和阅读工具】包括各地方志、日本内...

【更多】 >> <https://www.fozhu920.com/list/>