

鬼臼毒素衍生物 CIP-36 诱导 KBV 200 细胞凋亡

吕晶晶, 陈虹, 曹波, 张元, 陆艳玲

天津职业病与环境危害生物标记重点实验室, 天津 300162

摘要 目的: 研究鬼臼毒素衍生物 CIP-36 对多药耐药人口腔鳞状上皮癌细胞 KBV 200 的抗肿瘤活性及其作用机制。方法: MTT 法考察 CIP-36 对 KBV 200 体外增殖的抑制作用; Giemsa 染色、DNA ladder 和流式细胞仪等方法进行细胞凋亡检测; 免疫荧光法观察 CIP-36 对细胞骨架的作用; western-blot 法检测 CIP-36 对 KBV 200 细胞 P-gp 表达的影响。结果: CIP-36 对 KBV 200 细胞有明显的抑制作用, IC_{50} 值为 $(2.06 \pm 0.38) \mu\text{mol} / \text{L}$, 能够诱导细胞产生凋亡小体和 DNA ladder。流式细胞检测到了细胞凋亡峰, 并观察到细胞周期出现 S/G₂+M 期阻滞。Western-blot 结果显示 P-gp 表达降低, 并且观察到 CIP-36 可破坏 KBV 200 细胞的细胞骨架。结论: CIP-36 可能通过降低 P-gp 的表达, 破坏细胞骨架等多靶点克服 KBV 200 细胞株的多药耐药性。

关键词 CIP-36; 鬼臼毒素衍生物; 细胞周期; 多药耐药; P 糖蛋白; 微管

中图分类号: R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2010) 04-0267-05

CIP-36, a novel podophyllotoxin derivative, induces apoptosis of KBV 200 cells

LV Jing-jing, CHEN Hong, CAO Bo, ZHANG Yuan, LU Yan-ling

Key Laboratory for Biomarkers of Occupational and Environmental Hazard, Tianjin 300162, China

Abstract Objective: To study the antitumor activity of CIP-36 on multidrug resistance human oral squamous carcinoma cells (KBV 200 cells) *in vitro* and the feasible anticancer mechanisms. **Methods:** MTT assay, morphological study, DNA gel electrophoresis, flow cytometry, western-blot, and immunofluorescence were carried out. **Results:** The IC_{50} value of CIP-36 on KBV 200 cells was $(2.06 \pm 0.38) \mu\text{mol} / \text{L}$. After treated with CIP-36, the apparent morphological characteristic and typical DNA ladder of KBV 200 cells were all detected. Both the number of apoptosis cells and the cell cycle were measured by flow cytometric; A typical "Sub-G₁ peak" was checked and CIP-36 blocked the cell cycle at S/G₂ + M phase. Western-blot showed that the expression of P-glycoprotein was decreased. CIP-36 could interfere with microtubule polymerization and disrupt cytoskeleton. **Conclusions:** CIP-36 has the potentiality to overcome P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in the KBV 200 cell line.

Key words CIP-36; Podophyllotoxin derivative; cell cycle; multidrug resistance; P-glycoprotein; microtubule

肿瘤是严重威胁人类生命的常见病和多发病, 而鬼臼毒素虽然具有显著的抗肿瘤活性, 但水溶性差, 且对人体有严重的毒副作用。因此寻找低毒、水溶性更好的鬼臼毒素衍生物已成为现在抗肿瘤药物研究的热点^[1-2]。目前临床上应用较为广泛的依托泊苷 (VP-16) 和替尼泊苷 (VM-26) 均为半合成鬼臼毒素衍生物, 对小细胞肺癌、睾丸癌、急性白血病以及恶性淋巴瘤等均有良好的疗效^[3]。但该类药

物长时间应用容易引起耐药性, 限制了其在临床上的使用^[4]。本课题组通过改造鬼臼毒素, 获得了一系列新的具有自主知识产权的化合物。其中 CIP-36 因其良好的体外抑制肿瘤细胞增殖活性而极具开发前景。本文旨在研究 CIP-36 对 KBV 200 细胞的增殖抑制及促凋亡作用, 从而探讨其抗多药耐药的机制。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期: 2010-02-26

基金项目: 国家自然科学基金 (No 30873363); 天津市自然科学基金重点资助项目 (No 08JCYBJC070000); 天津市自然科学基金重点支持项目 (No 09ZCKFNC01200)

作者简介: 吕晶晶 (1984—), 女, 硕士, 主要从事肿瘤药理学研究。Tel: (022) 60578195, E-mail: jing-840222@163.com;

* 通讯作者 陈虹 (1957—), 女, 教授, 博士。Tel: (022) 60578193, E-mail: chenhongtian06@yahoo.com.cn

CIP-36 相对分子质量为 614.6, 由武警医学院生药教研室提供, 体外实验用 DMSO 配置成 0.01 mol / L 原液, 置 4 °C 冰箱保存备用, DMSO 的终浓度控制在体积分数 1% 以下, 使其不对细胞产生附加毒性^[5]。依托泊苷为江苏恒瑞医药股份有限公司产品, 批号: 07073131; 注射用硫酸长春新碱为深圳万乐药业有限公司产品, 均用生理盐水稀释配制 0.1 mol / L 原液, 置 4 °C 冰箱保存备用。溴化四氮唑蓝 (MTT), 溴化乙啶 (EB) 为 Sigma 公司产品。Giemsa 染色剂为 Serva 公司产品, 琼脂糖为 Promega 公司产品, DMSO 为 Gibeco 公司产品。DAB Kit (20×) 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司。兔抗 P-gp 多克隆抗体, 辣根过氧化物酶标记的小鼠抗兔二抗, 均购自 (BIOS) 北京博奥森生物技术有限公司。小鼠抗 α -tubulin 单克隆抗体, FITC 标记的山羊抗小鼠二抗均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

KBV 200 和 KB 细胞株培养于 RPMI 1640 培养基中, 培养基内含 10% 胎牛血清、100 kU / L 青霉素、100 mg / L 链霉素, 置 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中进行体外培养。KBV 200 培养基中加入终浓度 200 nmol / L 的长春新碱以维持细胞的耐药性, 实验前 2 周停药。

1.2.2 MTT 法检测 CIP-36 对 KBV 200 细胞体外增殖的抑制作用

取对数生长期的细胞等量接种于 96 孔培养板。接种 24 h 后, 实验组加入不同浓度的 CIP-36, 阴性对照组加入等量溶媒, 置 37 °C、5% CO₂ 孵育箱中培养 48 h 后, 每孔加入 1 g / L MTT 溶液 (培养基配制) 50 μ L; 37 °C 孵育 4 h, 弃去上清, 每孔加入 DMSO 150 μ L 溶解甲臞颗粒, 轻度振荡后, 用酶标仪测定吸光度值 (*A*), 计算 IC₅₀ 值。

1.2.3 Giemsa 染色检测肿瘤细胞凋亡

不同浓度 CIP-36 作用于 KBV 200 细胞 24 h 后, 离心收集细胞, 涂片, 进行 Giemsa 染色, 光学显微镜观察细胞形态变化并照相。

1.2.4 DNA ladder 检测肿瘤细胞凋亡

收集不同浓度 CIP-36 作用 24 h 后的 KBV 200 细胞, 用磷酸-柠檬酸缓冲液抽提富集相对分子质量小的 DNA, 并于 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳。

1.2.5 流式细胞仪检测肿瘤细胞凋亡

不同浓度 CIP-36 作用于 KBV 200 细胞, 于 12 和 24 h 收集细胞, PBS 洗 1 次, 70% 的乙醇-20 °C 固定过夜; 弃乙醇, PBS 洗 3 次, 加入 RNaseA 溶液, 37 °C 水浴 30 min, 加 PI 染色液, 混匀, 4 °C 下避光放置 30 min, 以 488 nm 激发光波长上机检测。

1.2.6 免疫荧光法测定 CIP-36 对细胞骨架的影响

取对数生长期 KBV 200 细胞接种于 6 孔板内, 每个孔内放置一块玻片, 每孔 3 mL 细胞液; 次日加入不同浓度的药物, 12 h 后取出载有单层培养细胞的盖玻片, 分别加入一抗和二抗孵育后在激光扫描共聚焦显微镜下观察并照相^[6]。

1.2.7 Western-blot 法检测 CIP-36 对 KBV 200 细胞 P-gp 表达的影响

CIP-36 作用于 KBV 200 细胞 24 h 后, 加入适量裂解液提取蛋白, 用考马斯亮蓝法测定蛋白量并定量使各组蛋白浓度一致, 上样进行 SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭, 一抗 4 °C 孵育过夜, 次日加入二抗孵育 1 h, DAB 显色照相。条带经 Quantity One 系统软件分析并计算平均吸光度值。

1.2.8 统计学分析

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 *t* 检验。

2 结果

2.1 CIP-36 对肿瘤细胞增殖的抑制作用

CIP-36 对耐药细胞 KBV 200 有较好的杀伤作用, 且其效果优于阳性对照药依托泊苷, IC₅₀ 分别为 2.06、12.1 μ mol / L, 结果见表 1。

表 1 CIP-36 对肿瘤细胞的细胞毒作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Cytotoxic effect of CIP-36 on cancer cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IC ₅₀ / (μ mol·L ⁻¹)		耐药指数
	KB	KBV 200	
对照组	0.49 ± 0.03	33.56 ± 2.32	68.49
依托泊苷	1.71 ± 0.14	12.10 ± 1.23	7.08
CIP-36	1.41 ± 0.16	2.06 ± 0.38	1.46

2.2 CIP-36 对 KBV 200 细胞形态学的影响

KBV 200 细胞经不同浓度的 CIP-36 作用 24 h 后, Giemsa 染色显示未加药的细胞体积大, 多呈圆形, 核圆形或椭圆形, 偶可见分裂相细胞; 给药组

细胞分散, 体积缩小, 胞浆浓缩, 核浆比例减小, 核碎裂, 随着给药浓度的加大, 凋亡细胞比例逐渐增大, 并出现凋亡小体 (图 1)。

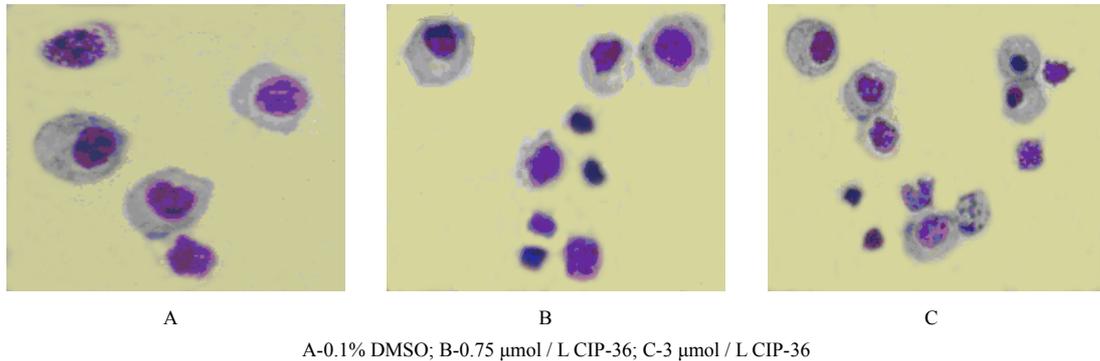


图 1 CIP-36 作用 24 h 后 KBV 细胞的形态学变化

Fig.1 Morphological appearance of KBV 200 cells after treated with CIP-36 for 24 h

2.3 CIP-36 对 KBV 200 细胞染色体 DNA 断裂的影响

不同浓度的 CIP-36 作用于 KBV 200 细胞 24 h 后呈现典型的“梯子状”条带, 为 180~200 bp 的寡核苷酸片段, 而阴性对照组 DNA 无断裂 (图 2)。

2.4 CIP-36 对 KBV 200 细胞周期及凋亡率的影响

CIP-36 对 KBV 200 细胞各时相都有所抑制, 细胞周期主要被阻断在 S/G₂+M 期, 且呈明显的剂量依赖性 (表 2, 3)。同时, 凋亡细胞的比例随 CIP-36 浓度以及作用时间的增加而增大, 呈一定的剂量时间依赖性 (图 3, 4)。

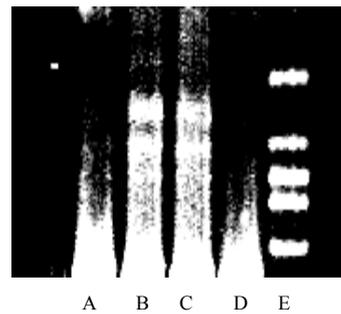


图 2 CIP-36 作用 24 h 后 KBV 细胞的电泳分析

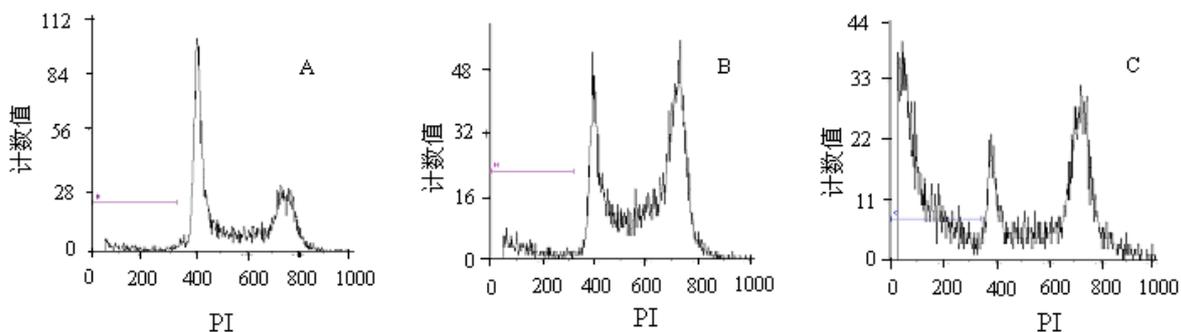
Fig.2 Electrophoresis analysis of KBV 200 cells after treated with CIP-36 for 24 h

表 2 CIP-36 作用 12 h 对 KBV 200 细胞周期的阻断作用 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 Effect of CIP-36 on KBV 200 cell cycle kinetics for 12 h ($\bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	不同细胞周期的细胞/%		
		G ₁	S	G ₂ +M
对照组	—	51.6±3.7	26.5±2.3	21.9±2.6
CIP-36 组	0.75	18.7±1.5	37.7±3.2	43.6±3.1
	3	18.0±1.7	44.9±4.0	37.1±3.3

表 3 CIP-36 作用 24 h 对 KBV 200 细胞周期的阻断作用 ($\bar{x} \pm s$)
Table 3 Effect of CIP-36 on KBV 200 cell cycle kinetics for 24 h ($\bar{x} \pm s$)

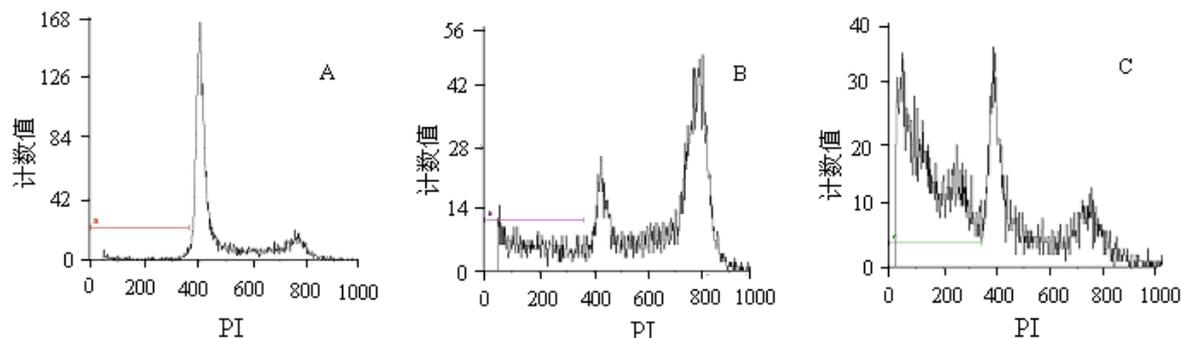
组别	浓度/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	不同细胞周期的细胞/%		
		G ₁	S	G ₂ +M
对照组	—	57.9±2.7	26.9±6.3	15.2±1.6
CIP-36 组	0.75	21.5±3.5	16.4±3.2	62.1±2.1
	3	5.8±2.7	27.7±2.9	66.5±2.6



A-Control, 2.67%; B-0.75 μmol / L, 6.83%; C-3 μmol / L, 39.9%

图3 CIP-36 作用 12 h 后 KBV 200 细胞的凋亡率

Fig.3 Proportion of apoptosis of KBV 200 cells treated by CIP-36 for 12 h



A-Control, 4.69%; B-0.75 μmol / L, 18.6%; C-3 μmol / L, 50.9%

图4 CIP-36 作用 24 h 后 KBV 200 细胞的凋亡率

Fig.4 Proportion of apoptosis of KBV 200 cells treated by CIP-36 for 24 h

2.5 CIP-36 对 KBV 200 细胞微管形态的影响

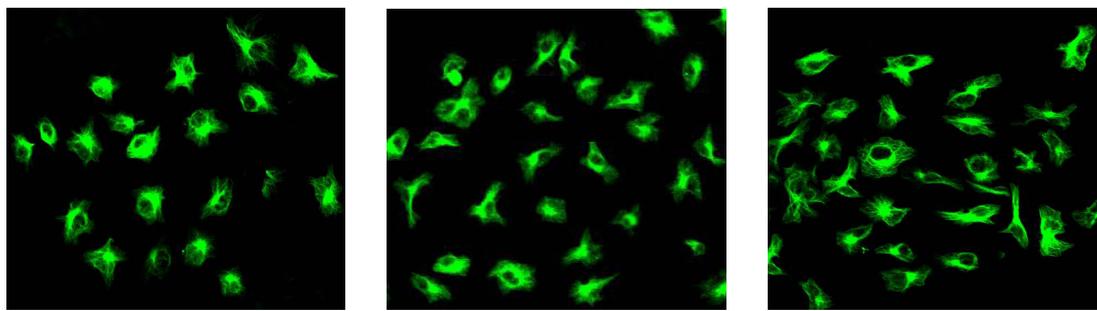
不同浓度的 CIP-36 作用于 KBV 200 细胞 12 h 后, 阴性对照组的 KBV 200 细胞微管形态结构完整, 0.75 μmol / L CIP-36 处理后微管结构受到一定程度的破坏, 而 3 μmol / L 的 CIP-36 则使绝大部分微管结构破坏, 仅在核周残留少量点状不规则荧光 (图 5)。

2.6 CIP-36 对 KBV 200 细胞 P-gp 表达的影响

Western-blot 法结果显示随着剂量的增加, CIP-36 有降低 P-gp 表达的趋势, 且呈明显的浓度依赖性 (图 6)。

3 讨论

化疗是目前治疗癌症的主要手段^[7], 而肿瘤细胞对化疗药物的耐受性却是肿瘤治疗的主要障碍, 因此, 逆转肿瘤细胞的耐药性, 是提高化疗疗效的关键。多药耐药 (multidrug resistance, MDR)^[8]是



A

B

C

A-control; B-0.75 μmol / L; C-3 μmol / L

图5 CIP-36 对 KBV 200 细胞微管形态的影响

Fig.5 Effect of CIP-36 on microtubule structures in KBV 200 cells

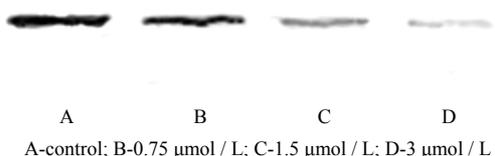


图 6 CIP-36 作用 24 h 对 KBV 200 细胞 P-gp 表达的影响

Fig.6 Expression of P-gp in KBV 200 cells after treated with CIP-36 for 24 h

指肿瘤细胞对一种抗肿瘤药物产生耐药性的同时，对结构和作用机制完全不同的其他多种抗肿瘤药物产生交叉耐药性。P-gp 能利用 ATP 水解释放的能量主动地将疏水亲脂性药物转运到细胞外，导致细胞内药物浓度低于杀伤浓度；还可以使药物在细胞内再分布，导致药物集聚于与药物作用无关的细胞器如溶酶体内，从而导致耐药，P-gp 表达程度与耐药程度成正比^[9]。本实验 Western-blot 法结果显示 CIP-36 可剂量依赖性降低 P-gp 的表达，说明 CIP-36 可能通过抑制 P-gp 的表达来抑制多药耐药细胞的生长。

微管由微管蛋白和微管结合蛋白构成，是构成细胞网骨架的主要成分。近年来，微管蛋白已成为抗癌药物研究的新靶点，并已发现了许多作用于不同位点的微管抑制剂^[10]。作用于微管的药物一般分为 2 类：抑制微管解聚的药物和抑制微管聚合的药物。前者如紫杉醇、埃坡霉素类^[11]等，后者如长春碱类、秋水仙碱类、鬼臼毒素类等。本实验用不同浓度 CIP-36 处理细胞微管后发现，CIP-36 可呈浓度依赖性的破坏 KBV 200 细胞骨架，并使细胞有丝分裂停滞，引起多药耐药细胞的凋亡，但其作用位点与长春新碱、秋水仙碱是否相同，还有待进一步的实验确定。

药物抗肿瘤的作用机制不是单一的，而是多种因素相互作用的结果。CIP-36 不仅能够作用于细胞的微丝微管系统，破坏微管蛋白 / 微管循环的机制，从而引起细胞的凋亡，而且能够减少多药耐药细胞

P-gp 表达量，增加耐药细胞对化疗药物的敏感性，具有很好的开发前景。

参考文献

[1] 万宗明, 陈虹, 曹鸿, 等. 大黄酸鬼臼毒素酯对人骨肉瘤细胞作用机制的研究[J]. 中草药, 2008, 39 (1): 67-71.

[2] 许重远, 贾江滨. 4'-去甲表鬼臼毒素衍生物 4β-取代结构修饰研究进展[J]. 中草药, 2000, 31 (5): 389-392.

[3] Issell B F. The podophyllotoxin derivatives VP16-213 and VM26 [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1982, 7 (2/3): 73-80.

[4] Lum B L, Kaubisch S, Yahanda A M, et al. Alteration of etoposide pharmacokinetics and pharmacodynamics by cyclosporine in a phase I trial to modulate multidrug resistance [J]. *J Clin Oncol*, 1992, 10 (10): 1635-1642.

[5] 纪舒昱, 翁稚颖, 周轶平, 等. 8 种有机溶剂对肿瘤细胞的细胞毒作用[J]. 云南大学学报, 2001, 23 (6): 457-460.

[6] Bacher G, Nickel B, Emig P, et al. D-24851, a novel synthetic microtubule inhibitor, exerts curative antitumoral activity *in vivo*, shows efficacy toward multidrug-resistant tumor cells, and lacks neurotoxicity [J]. *Cancer Res*, 2001, 61 (1): 392-399.

[7] 王辉, 雷志勇, 陈虹, 等. 土槿乙酸衍生物 PB-LY 体外抗肿瘤作用及其机制研究[J]. 中国药理学通报, 2008, 24 (9): 1204-1208.

[8] 于韬, 赵桂森, 臧恒昌, 等. 肿瘤 MDR 逆转剂研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2003, 13 (3): 172-178.

[9] Marzolini C, Paus E, Buclin T, et al. Polymorphism in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 2004, 75 (1): 13-33.

[10] Kiselyov A, Balakin K V, Tkachenko S E, et al. Recent progress in discovery and development of antimetabolic agents [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2007, 7 (2): 189-208.

[11] Fumoleau P, Coudert B, Isambert N. Novel tubulin-targeting agents: anticancer activity and pharmacologic profile of epothilones and related analogues [J]. *Ann Oncol*, 2007, 18 (5): 9-15.