

力达霉素诱导人胃癌 BGC823 细胞凋亡和抑制裸鼠移植瘤生长

张胜华¹, 陈静^{1,2}, 江敏¹, 甄永苏^{1*}

(1. 中国医学科学院 北京协和医学院 医药生物技术研究所, 北京 100050;

2. 华北煤炭医学院 生物科学系, 河北 唐山 063000)

摘要: 观察力达霉素(LDM)对人胃癌 BGC823 细胞的诱导凋亡作用及体内抗肿瘤活性。采用 MTT 法观察 LDM 对人胃癌 BGC823 细胞增殖的抑制作用。利用 Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞仪和脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记技术检测细胞凋亡的改变。采用 Western blotting 法检测细胞中 VEGF 蛋白的表达情况。建立裸鼠胃癌皮下移植瘤模型, 观察 LDM 的体内抗肿瘤活性。LDM 能够明显抑制 BGC823 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 降低细胞 VEGF 蛋白的表达, 抑制胃癌裸鼠移植瘤的生长。LDM 剂量 0.02 和 0.04 mg · kg⁻¹ 的抑瘤率分别为 57% 和 72% ($P < 0.01$)。LDM 可诱导胃癌细胞凋亡并抑制裸鼠移植瘤的生长。

关键词: 力达霉素; 人胃癌 BGC823 细胞; 血管内皮生长因子; 凋亡

中图分类号: R963 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2008)06-0601-04

Lidamycin induces apoptosis of human gastric carcinoma BGC823 cells and inhibits xenograft growth in nude mice

ZHANG Sheng-hua¹, CHEN Jing^{1,2}, JIANG Ming¹, ZHEN Yong-su^{1*}

1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. The North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

Abstract: To investigate the effect of lidamycin (LDM) on human gastric carcinoma BGC823 cells and xenograft growth in nude mice, MTT (methyl thiazolyl tetrazolium) assay was used to determine the inhibition of BGC823 cell proliferation by LDM. Induction of apoptosis was studied by flow cytometry and TUNEL assay. The expression of VEGF was detected by Western blotting analysis. Athymic nude mice were used to determine *in vivo* antitumor activity. Proliferation inhibition and apoptosis induction were studied in lidamycin-treated cells. The expression of VEGF in BGC823 cells decreased in a dose-dependent manner. LDM at 0.02 mg · kg⁻¹ and 0.04 mg · kg⁻¹ suppressed the growth of BGC823 xenografts in nude mice by 57% and 72%, respectively. LDM potently induces apoptosis in human gastric carcinoma BGC823 cells and inhibits xenograft growth.

Key words: lidamycin; BGC823 cell; vascular endothelial growth factor; apoptosis

力达霉素(lidamycin, LDM)是从我国湖北省潜江市土壤中分离得到的一株链霉菌(*Streptomyces globisporus* C-1027)产生的烯二炔类大分子抗肿瘤抗生素^[1]。它对体外培养的多种肿瘤细胞有强烈

的杀伤作用,按 IC₅₀ 值进行比较, LDM 比丝裂霉素和阿霉素强 1 000 倍以上^[2]; 动物体内实验表明, LDM 对一些小鼠移植性肿瘤如白血病 L1210、肝癌 22、结肠癌 26、肉瘤 S180、移植于裸鼠的人肝癌 Bel-7402 和胰腺癌 SW1990 等多种移植性肿瘤均有显著疗效^[3-6]; 实验研究表明, 多药耐药细胞对 LDM 仍高度敏感, 未显示抗药性^[7]。此外, 鸡胚尿囊膜实验表明 LDM 还具有显著的抗血管生成的作用^[8]。本研究选用人胃癌 BGC823 细胞系, 观察 LDM 对胃

收稿日期: 2008-01-03.

基金项目: 国家高科技研究发展计划资助项目(2003AA215090).

* 通讯作者 Tel: 86-10-83158065, Fax: 86-10-63131808,

E-mail: zhenys@public.bta.net.cn

癌细胞的诱导凋亡作用及裸鼠移植瘤生长的影响, 为力达霉素的临床研究与应用提供实验依据。

材料与amp;方法

药品与试剂 LDM 由医药生物技术研究所金莲舫教授提供; RPMI-1640 (Gibco); 新生牛血清 (Hyclone); 胰酶 (Gibco); 阿霉素 (ADM) 为浙江海门制药厂产品; 紫杉醇 (Taxol) 为中美施贵宝药业有限公司产品; 丝裂霉素 C (MMC) 为日本 Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd 产品; MTT (Sigma); Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒 (北京宝赛生物公司); 脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记 TUNEL 凋亡试剂盒 (Roche); VEGF 兔多抗 (sc-152, Santa Cruz); β -actin 鼠单抗 (Neomarkers); HRP 标记的羊抗兔、羊抗小鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥有限公司。

仪器 显微镜和图像处理系统 (Leica), 流式细胞仪 (BD), 凝胶成像仪 ChemiImager 5500 (Alpha Innotech Co.)。

细胞系 人胃癌细胞系 BGC823 由本室保种, 培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中, 常规传代培养。

动物 BALB/c (*nu/nu*) 雌性裸鼠, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, SPF 级, 许可证: SCXK (京) 2005-0013。购自中国医学科学院实验动物研究所。

MTT 试验检测药物对细胞增殖的影响 将对数生长期的细胞按 3×10^3 /孔接种到 96 孔细胞培养板中, 培养 24 h 后, 加入不同浓度的力达霉素、阿霉素、丝裂霉素 C 和紫杉醇, 作用 48 h 后每孔加入 20 μ L MTT 溶液 ($5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 4 h, 弃上清液, 每孔加入 150 μ L DMSO, 于 570 nm 处检测吸收度值, 计算细胞存活率和 IC_{50} 。

TUNEL 法检测药物对细胞凋亡的影响 按照 TUNEL 试剂盒的操作说明, 收集对照组和药物处理组的细胞, 制成细胞悬液, 在多聚赖氨酸包被的载玻片上涂片, 使其成为单细胞层, 自然风干后, 用 4% 多聚甲醛室温固定, PBS 浸洗, 滴加 0.1% Triton X-100 覆盖, PBS 浸洗, 加入反应底物, DAB 显色, 苏木精复染, 脱水, 中性树胶封片, 光镜观察, 拍照。

Annexin V-FITC/PI 双染法检测药物对细胞凋亡的影响 收集细胞, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染结合流式细胞术检测细胞凋亡比率。

Western blotting 检测蛋白表达 收集细胞, 裂解后, BCA 法测定蛋白含量。取等量蛋白样品进

行 SDS-PAGE 电泳。用半干转膜仪将蛋白转移到 PVDF 膜上, 封闭 1 h, 加入一抗室温过夜。洗膜后加入二抗, 室温 2 h 后洗膜, 用 Western blotting 发光液显色, 于 ChemiImager 5500 凝胶成像仪中观察拍照, 采用成像仪自带软件 ChemiImager 5500 (v 2.03) 对结果进行灰度测定, 用目的蛋白与内参照的灰度比进行半定量分析, 计算 VEGF 和 β -actin 蛋白条带的灰度面积值, 并计算二者的比值 (ratio of grey intensity)。

动物体内疗效观察 在裸鼠右腋皮下接种 BGC823 细胞, 待肿瘤生长后, 剥离瘤体, 切成 2 mm^3 大小的肿瘤块, 移植入裸鼠右腋皮下。接种后 d 7 将动物随机分为 4 个实验组: 对照组、LDM $0.02 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组、LDM $0.04 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组和 ADM $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组。LDM 静脉给药, 每周一次, 共给药两次, 每组 7 只动物。定期测量瘤块的长径 (a) 与短径 (b), 按以下公式计算肿瘤体积 (v): $v = a \times b^2 \times 1/2$ 。d 31 处死动物, 取瘤块称重, 计算抑瘤率。

统计学处理 数据在 SPSS 软件中进行计算和统计, 经正态分布和方差齐性检验后, 进行单因素方差分析和两两比较的 SNK 检验, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $\alpha = 0.05$ 。 IC_{50} 由 STAT 软件包 (Version 4) 的 Quantal Dose-Response: Probits 程序计算。

结果

1 LDM 对胃癌细胞 BGC823 增殖的影响

LDM 能够明显抑制人胃癌 BGC823 细胞的增殖, 随着作用浓度增加, 抑制作用增强, 呈现浓度依赖性 (图 1), 其 IC_{50} 值为 $3.44 \times 10^{-12} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 而临床常用化疗药物阿霉素 (ADM)、丝裂霉素 C (MMC) 和紫杉醇 (Taxol) 对 BGC823 细胞的 IC_{50} 值分别为 5.15×10^{-8} 、 2.32×10^{-7} 和 $2.28 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。按 IC_{50} 值进行比较, LDM 对胃癌 BGC823 细胞增殖的抑制作用显著比 ADM、MMC 和 Taxol 强。

2 LDM 诱导胃癌 BGC823 细胞凋亡的作用

TUNEL 实验结果显示, 随着 LDM 作用浓度的增加, 凋亡的细胞比率随之增多 (图 2A)。细胞经 Annexin V-FITC/PI 染色后, 利用流式细胞仪检测细胞凋亡比率, 结果显示细胞凋亡率随 LDM 浓度的增加而逐渐增高, 其中 0.5 、 1 和 $2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ LDM 作用组的细胞总凋亡率 (早期凋亡率和晚期凋亡率) 分别为 $(18.48 \pm 0.49)\%$ 、 $(45.03 \pm 1.34)\%$ 和 $(59.44 \pm 1.54)\%$, 显著高于对照组的 $(10.32 \pm 0.28)\%$ (图 2B)。

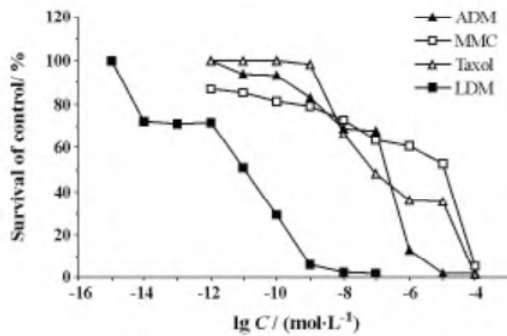


Figure 1 Growth inhibition of BGC823 cells by adriamycin (ADM), mitomycin C (MMC), Taxol and lidamycin (LDM). Cells were exposed to the drugs for 48 h and determined by MTT assay. Results were derived from three independent experiments

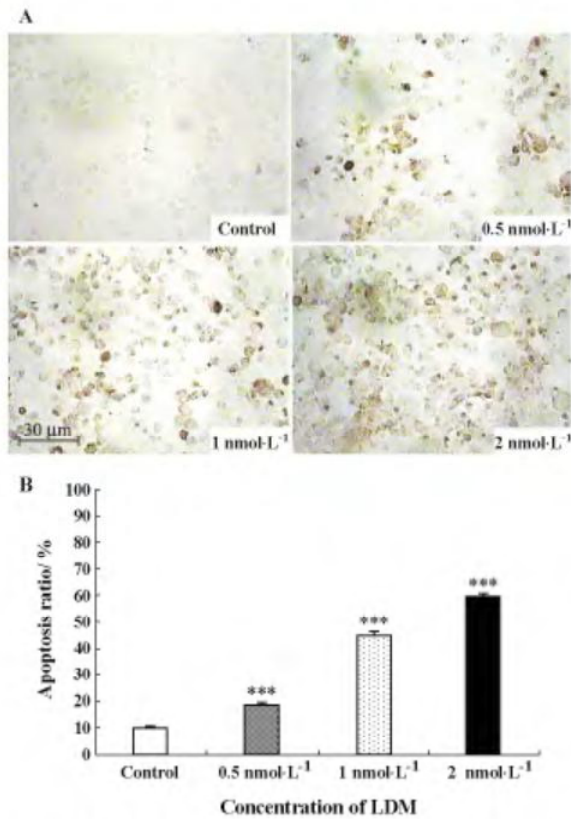


Figure 2 Induction of apoptosis in BGC823 cells treated with lidamycin was evaluated by TUNEL assay (A, 200 ×) and FITC-Annexin V/PI apoptosis assay (B). Data represent the means ± SD of three independent experiments. *** $P < 0.001$ vs control

3 LDM 对胃癌细胞 VEGF 蛋白表达的抑制作用

LDM 能够明显抑制胃癌 BGC823 细胞中 VEGF 的表达。Western blotting 结果表明 BGC823 细胞中 VEGF 蛋白的表达水平随 LDM 浓度的升高而下降,

呈现浓度依赖关系(图 3)。

4 LDM 对裸鼠移植瘤的抑制作用

动物实验结果显示,与对照组相比,LDM 组和 ADM 组的裸鼠移植瘤生长较缓慢(图 4),并且 LDM 0.04 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量组对肿瘤的生长抑制作用较 ADM 强。

实验 d 31 处死动物,剥取各组动物的肿瘤称重进行比较,ADM 组的抑瘤率为 62%,0.02 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 0.04 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 LDM 组的抑瘤率分别为 57% 和 72%,与对照组相比有显著的统计学差异(表 1)。

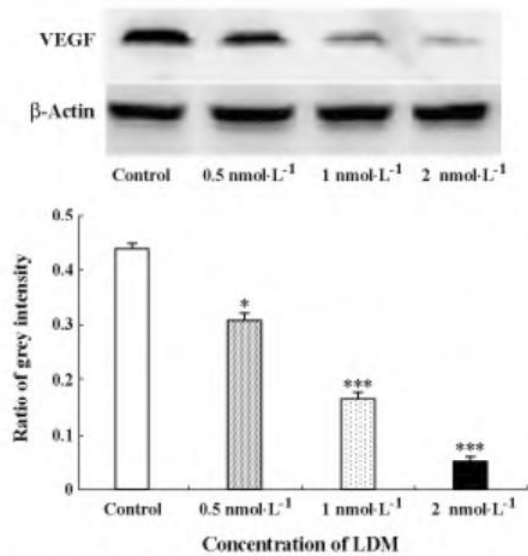


Figure 3 The level of VEGF and β -actin in BGC823 cells treated with various concentrations of lidamycin was determined by Western blotting analysis. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs control

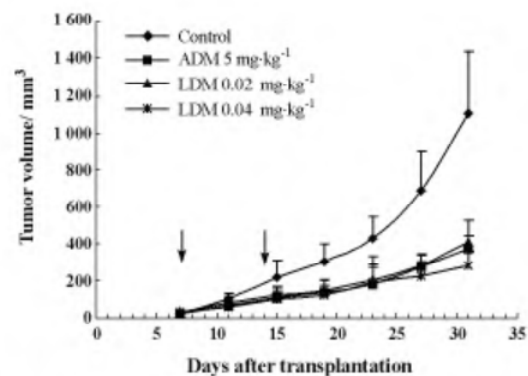


Figure 4 Effect of lidamycin on the growth of BGC823 xenografts in nude mice. Treatment started on day 7 and 14 after implantation shown by arrow, with once per week, iv, $\times 2$ regimen

Table 1 Inhibitory effects of LDM and ADM on the growth of human gastric carcinoma BGC823 xenografts in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

Group	Dose /mg · kg ⁻¹	Body weight change/g	Weight of tumor	Inhibition rate/%
Control	-	+2.70	1.28 ± 0.18	-
LDM	0.02	+1.54	0.55 ± 0.15 *	57
	0.04	+1.59	0.36 ± 0.10 *	72
ADM	5.00	-1.89	0.49 ± 0.15 *	62

Results were recorded on day 31 after tumor implantation, with all athymic mice alive ($n = 7$). * $P < 0.01$ vs control group

讨论

细胞凋亡是一种细胞死亡形式,是机体清除衰老和死亡细胞的有效方式。研究表明,肿瘤的发生与细胞凋亡异常有关,如果细胞凋亡受到抑制,则会引起细胞过度增殖,从而增加细胞恶变的可能;此外,凋亡机制的调控在肿瘤细胞对常规化疗药物耐药中也起到关键的作用。因此,诱导肿瘤细胞凋亡已经成为一个有效的抗肿瘤治疗策略^[9]。利用人肝癌 BEL-7402 和乳腺癌 MCF-7 细胞研究表明, LDM 可以经过线粒体依赖通路介导细胞凋亡^[10]。本研究表明, LDM 能显著诱导胃癌 BGC823 细胞凋亡,随着药物浓度的增高,凋亡率显著增高,从而显著抑制 BGC823 细胞的增殖和裸鼠移植瘤的生长。

肿瘤新生血管的形成是肿瘤生长、侵袭和转移的基础,抑制或破坏肿瘤新生血管的形成及生长,切断肿瘤赖以生存的“生命线”,可达到抑制肿瘤生长和转移的目的。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)是目前已知的最重要的促血管生成因子,是一种强效的内皮细胞特异性的有丝分裂原,在血管形成的过程中起重要调节作用。研究证实,VEGF 及其受体(VEGFR)在动物和人的许多恶性肿瘤中均有表达,VEGF 与 VEGFR 结合后,可激活下游的 MAPK、NOS、AKT、PKC 等信号通路,发挥促增殖、促迁移、抗凋亡以及血管生成等作用。大量实验研究^[11]表明,各种抑制 VEGF 和干扰 VEGF 信号通路的药物均可明显抑制血管生成而发挥显著的抗肿瘤效果。本实验结果表明, LDM 能够明显抑制胃癌 BGC823 细胞中 VEGF 的蛋白表达水平,提示其可能通过抑制 VEGF 表达水平从而抗肿瘤血管生成;此外,抑制肿瘤细胞 VEGF 的表达,也可抑制肿瘤细胞自分泌的促增殖和抗凋亡作用,从而发挥抗肿瘤作用。

胃癌是威胁人类健康最常见的恶性肿瘤之一,随着诊疗技术的进步,早期胃癌的治疗取得了满意的疗效,可是对中晚期胃癌的化疗效果仍较差,寻找新的化疗药物,延长患者的生存期,具有重要的临床意义。近年来,诱导凋亡和抗 VEGF 在肿瘤治疗策略方面均备受关注。LDM 兼具这两种作用,可能是其显著抗肿瘤作用的生物学基础。

References

- [1] Hu JL, Xue YC, Xie MY, et al. A new macromolecular antitumor antibiotic, C-1027, I. discovery, taxonomy of producing organism fermentation and biological activity [J]. J Antibiot (Tokyo), 1988, 41:1575-1579.
- [2] Zhen YS, Ming XY, Yu B, et al. A new macromolecular antitumor antibiotic. C-1027, III. antitumor activity [J]. J Antibiot (Tokyo), 1989, 42:1294-1298.
- [3] Xu YJ, Li DD, Zhen YS. Mode of action of C-1027, a new macromolecular antitumor antibiotic with highly potent cytotoxicity, on human hepatoma Bel-7402 cells [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1990, 27:41-46.
- [4] Jiang B, Li DD, Zhen YS. Induction of apoptosis by enediyne antitumor antibiotic C-1027 in HL-60 human promyelocytic leukemia cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1995, 208:238-244.
- [5] Sugimoto Y, Otani T, Oier S, et al. Mechanism of action of a new macromolecular antitumor antibiotic, C-1027 [J]. J. Antibiotic (Tokyo), 1990, 43:417-421.
- [6] Chen J, Ouyang ZG, Zhang SH, et al. Down-regulation of the nuclear factor-kappa B by lidamycin in association with inducing apoptosis in human pancreatic cancer cells and inhibiting xenograft growth [J]. Oncol Rep, 2007, 17:1445-1451.
- [7] Shi YK, Wu SY, Huang YH, et al. Chemosensitivity of *mdr1* gene overexpressed multidrug resistant cancer cells to lidamycin [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2006, 41:1146-1151.
- [8] Zhen HY, Xue YC, Zhen YS. Inhibition of angiogenesis by antitumor antibiotic C1027 and its effect on tumor metastasis [J]. Natl Med J China (中华医学杂志), 1997, 77:657-660.
- [9] Kawakubo T, Okamoto K, Iwata J, et al. Cathepsin E prevents tumor growth and metastasis by catalyzing the proteolytic release of soluble TRAIL from tumor cell surface [J]. Cancer Res, 2007, 67:10869-10878.
- [10] Qiu Q, Wang Z, Jiang JM, et al. Effect of lidamycin on mitochondria initiated apoptotic pathway in human cancer cells [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2007, 42:132-138.
- [11] Wang Y, Fei D, Vanderlaan M. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody *in vitro* [J]. Angiogenesis, 2004, 7:335-345.