

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00484

土槿皮乙酸对大鼠脑胶质瘤 C6 细胞增殖的抑制作用

陈振军*, 孙冬弢, 袁 媛

沈阳医学院沈洲医院神经外科, 沈阳 110002

[摘要] **目的** 研究土槿皮乙酸(pseudolaric acid B, PAB)对大鼠脑胶质瘤 C6 细胞增殖的抑制作用。**方法** 采用 MTT 法检测 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、8、16 $\mu\text{g/ml}$ PAB 对 C6 细胞增殖能力的影响;流式细胞术检测碘化丙啶(PD)染色后细胞周期的变化;皮下注射 C6 细胞建立 C6 种植瘤大鼠模型并测量种植瘤体积;免疫组化法测定大鼠脑胶质瘤 C6 细胞种植瘤组织中增殖细胞核抗原(PCNA)的表达变化。**结果** 体外实验结果表明,PAB 呈剂量依赖性地抑制胶质瘤 C6 细胞生长,半数致死剂量(IC_{50})为 0.03 $\mu\text{g/ml}$,同时,可使 C6 细胞周期阻滞于 G_2/M 期;体内实验结果表明,PAB 给药后大鼠种植瘤体积有所降低,种植瘤组织中 PCNA 表达呈下降趋势。**结论** PAB 可抑制大鼠脑胶质瘤 C6 细胞增殖,阻滞细胞周期中 G_2/M 期、下调 PCNA 表达为其可能的作用机制。

[关键词] 土槿皮乙酸;神经胶质瘤;细胞增殖;增殖细胞核抗原

[中图分类号] R 739.41 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2012)05-0484-04

Inhibitory effect of pseudolaric acid B on proliferation of rat glioma C6 cells

CHEN Zhen-jun*, SUN Dong-tao, YUAN Yuan

Department of Neurosurgery, Shenzhou Hospital Affiliated to Shenyang Medical College, Shenyang 110002, Liaoning, China

[Abstract] **Objective** To observe the inhibitory effects of pseudolaric acid B (PAB) on the proliferation of rat glioma C6 cells *in vivo* and *in vitro*. **Methods** MTT assay was used to examine the inhibitory effect of 0, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 8, and 16 $\mu\text{g/ml}$ PAB on C6 cells; the distribution of cell cycle was determined by flow cytometry. C6 cells were injected subcutaneously to establish glioma-bearing rat model and the tumor volume was measured. The expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was detected immunohistochemically in the implanted glioma. **Results** *In vitro* results showed that PAB inhibited C6 cell growth in a dose-dependent manner, with the IC_{50} being 0.03 $\mu\text{g/ml}$. It also arrested the cells in G_2/M phase. *In vivo* results showed that the tumor size of PAB group was decreased compared with the control group; moreover, PCNA expression was also decreased by PAB. **Conclusion** PAB can inhibit rat glioma C6 cell growth, which might be associated with cell arrest in G_2/M phase and down-regulation of PCNA expression.

[Key words] pseudolaric acid B; glioma; cell proliferation; proliferating cell nuclear antigen

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(5):484-487]

脑胶质瘤是中枢神经系统肿瘤,其恶性程度高,具有向周围组织浸润性生长的特征,与正常脑组织无明显分界,因其较高的致死率成为众所周知的恶性肿瘤。此肿瘤常常生长在中枢神经系统深部,目前临床上采用的手术切除术和放射疗法对患者都具有潜在的危险性,因此,寻找新的有效药物及治疗方法尤为重要。

土槿皮乙酸(pseudolaric acid B, PAB)是从松科植物金钱松的根皮中分离出的有效成分,现代药理学实验研究表明,PAB 具有明显的抗肿瘤活性,

对胃癌、肝癌、肺癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞具有抑制作用^[1-2]。本研究从体外和体内两方面探讨了 PAB 对胶质瘤的作用,为抗癌药物的研发提供了一条新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 F12K 培养液购自 AppliChem 公司,胎牛血清和马血清购自 Hyclone 公司;大鼠胶质瘤 C6 细胞购自中国科学院上海细胞库;PAB 购自中国药品生物制品检定所,批号 110880-200502,纯度 >

[收稿日期] 2012-01-16 **[接受日期]** 2012-03-22

[基金项目] 沈阳市科技计划项目(F10-149-9-31). Supported by Shenyang Science and Technology Plan Project (F10-149-9-31).

[作者简介] 陈振军,硕士,主任医师,硕士生导师.

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 024-22824430, E-mail: szchenzhenjun@163.com

98%；四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自 Sigma 公司；Wistar 大鼠，4 周龄，体质量 150~200 g，购自中国医科大学实验动物中心；增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 抗体购自 Santa Cruz 公司。

1.2 细胞培养 大鼠胶质瘤 C6 细胞培养于含 10% 胎牛血清、2% 马血清的 F12K 培养液中，在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。

1.3 MTT 法检测细胞增殖能力 将大鼠胶质瘤 C6 细胞以每孔 200 μl 接种于 96 孔培养板，细胞密度为每孔 10⁴ 个，培养 12 h，使其充分贴壁，然后换为终浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、8、16 μg/ml PAB 的 F12K 培养液培养，每个浓度设 5 个复孔，置 CO₂ 培养箱中孵育 36 h。每孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl，继续放入 5% CO₂ 培养箱中染色 4 h，吸去上清，加入 200 μl DMSO 溶解细胞内形成的结晶，用酶标仪 (BioTek ELX-800, USA) 测定 490 nm 处光密度 (D) 值，计算 PAB 对 C6 细胞的抑制率。抑制率 (%) = (空白孔 D 值 - 实验孔 D 值) / 空白孔 D 值 × 100%。

1.4 碘化丙啶 (PI) 染色检测细胞周期变化 以 0、0.15、0.3、0.6 μg/ml PAB 处理 C6 细胞 36 h 后，消化、收集各组细胞，小心吸除上清，PBS 漂洗，70% 乙醇 4℃ 固定过夜，加入 PI 染色液，37℃ 避光温浴 30 min，进行流式细胞术检测，分析细胞周期变化情况。

1.5 C6 种植瘤大鼠模型的建立及给药 取健康雄性 Wistar 大鼠，在各大鼠右前肢皮下接种处于对数生长期的 C6 细胞，每只 1 × 10⁷ 个细胞。接种 C6 细胞后，实验组 I 灌胃给药 7 mg/kg (PAB)、实验组 II 灌胃给药 15 mg/kg (PAB)、实验组 III 灌胃给药 30 mg/kg (PAB)，对照组灌胃给予相应剂量的生理盐水，每天 1 次，每组 10 只大鼠。20 d 后，将对照组和不同浓度梯度给药组大鼠皮下的细胞瘤完整取下，拍照，测量肿瘤体积，设长径为 *a*，短径为 *b*，体积计算公式为 $a \times b^2 / 2$ ，而后用 10% 甲醛溶液固定用于免疫组化检测。

1.6 免疫组化法检测种植瘤组织中 PCNA 的表达 将对照组和各实验组大鼠种植瘤组织常规石蜡包埋，5 μm 厚连续石蜡切片，微波加热修复，3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶后，滴加 PCNA (1:50) 抗体，4℃ 过夜，滴加二抗，37℃ 孵育 30 min，DAB 显色、苏木精复染，脱水、透明、封片，显微镜下

拍照，观察染色效果，呈棕黄色或黄色为阳性反应。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行数据分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间差异比较采用单因素方差分析。检验水平 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 PAB 对大鼠胶质瘤细胞 C6 体外增殖的抑制作用 图 1 所示为 PAB 对 C6 细胞增殖的抑制作用，PAB 作用于 C6 细胞 36 h 后，细胞增殖能力明显受到抑制，当 PAB 浓度为 0.4 μg/ml 时，增殖抑制率达到 61.4%，并且随着 PAB 浓度的增加，抑制率呈现上升趋势。PAB 处理 C6 细胞 36 h 条件下的半数致死剂量 (IC₅₀) 值为 0.30 μg/ml。

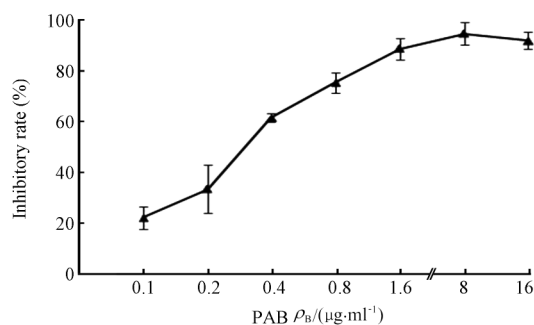


图 1 PAB 作用 36 h 对胶质瘤 C6 细胞体外增殖的抑制作用

Fig 1 Inhibitory effect of pseudolaric acid B (PAB) on proliferation of glioma C6 cells after 36 h incubation *in vitro*

n = 5, $\bar{x} \pm s$

2.2 PAB 对大鼠胶质瘤 C6 细胞周期变化的影响 由图 2 可见，经 0.15、0.3、0.6 μg/ml PAB 作用 36 h 后，G₀/G₁ 期和 S 期细胞比例有所下降；G₂/M 期有所增加，分别由对照组的 7.13% 增加至 31.78%、57.58% 和 82.46%；同时，G₀/G₁ 期前出现凋亡小峰，说明 PAB 可使 C6 细胞周期阻滞于 G₂/M 期，同时诱导 C6 细胞凋亡，0.15 μg/ml PAB 作用下细胞凋亡比例为 8.23%。

2.3 PAB 对大鼠种植瘤的抑制效应 PAB 给药后大鼠种植瘤体积变化如图 3 所示，对照组肿瘤体积为 (1.003 ± 0.36) cm³，经 7、15 和 30 mg/kg PAB 给药治疗后，肿瘤体积 (cm³) 分别降低至 (0.381 ± 0.06)、(0.218 ± 0.08) 和 (0.326 ± 0.09)，与对照组比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。灌胃给药 15 mg/kg PAB 20 d，抑瘤率达到 78.26%。

2.4 各组大鼠种植瘤组织中 PCNA 的表达 对照

组种植瘤中可见棕黄色颗粒, PAB 治疗组中棕黄色颗粒减少, 说明与对照组相比, PAB 治疗组大鼠种

植瘤中 PCNA 表达呈下降趋势(图 4), 表明 PAB 可降低种植瘤组织中 PCNA 高表达。

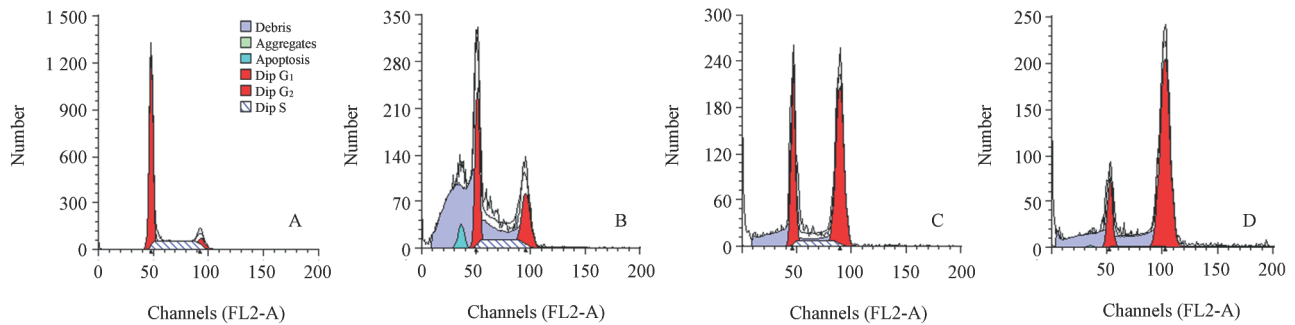


图 2 PAB 对胶质瘤 C6 细胞作用 36 h 后的细胞周期变化

Fig 2 Effect of pseudolaric acid B (PAB) on the cycle of glioma C6 cells after 36 h incubation

A: Control group; B: 0.15 μg/ml PAB group; C: 0.3 μg/ml PAB group; D: 0.6 μg/ml PAB group

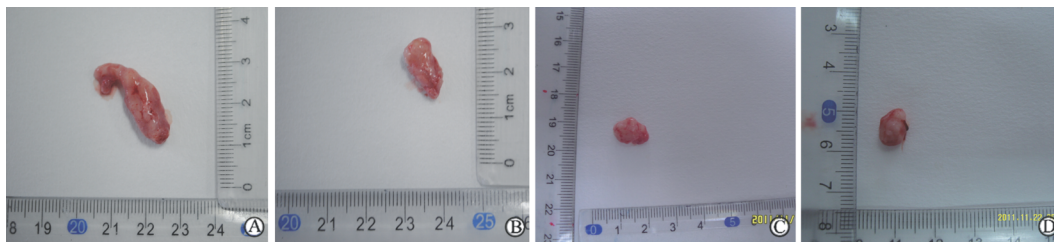


图 3 大鼠种植瘤组织体积变化

Fig 3 Size of implanted glioma in rats of different groups

PAB: Pseudolaric acid B. A: Control group; B: 7 mg/kg PAB group; C: 15 mg/kg PAB group; D: 30 mg/kg PAB group

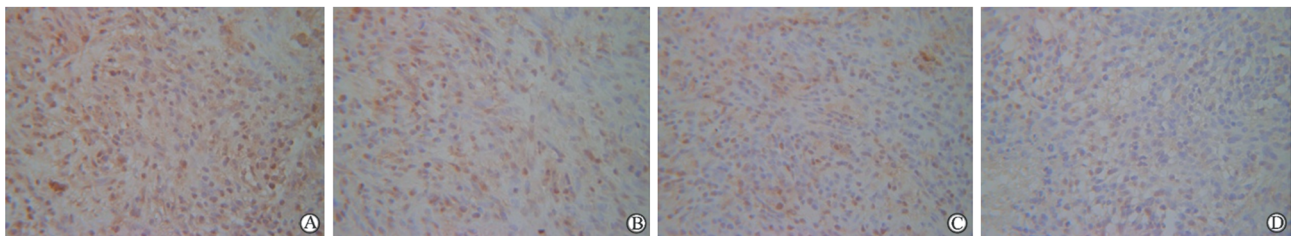


图 4 大鼠种植瘤组织中 PCNA 表达的免疫组化染色结果

Fig 4 Expression of PCNA by immunohistochemical method in implanted glioma in rats

PCNA: Proliferating cell nuclear antigen; PAB: Pseudolaric acid B. A: Control group; B: 7 mg/kg PAB group; C: 15 mg/kg PAB group; D: 30 mg/kg PAB group. Original magnification: ×400

3 讨论

脑胶质瘤亦称神经胶质细胞瘤, 由神经上皮组织衍化而来, 具有发病率高、病死率高和治愈率低的特点, 手术切除是当前最主要的临床治疗手段。由于胶质瘤本身固有的浸润性生长的病理特点, 手术后的复发仍不可避免, 采用安全有效的方法进行胶质瘤的治疗成为亟待解决的问题^[3-5]。天然药物单体化合物可通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞分化或凋亡从而发挥抗肿瘤作用^[6]。研究表明,

PAB 可通过调节 Th1 和 Th17 平衡进行炎症疾病的治疗^[7], 同时可作为抗血管生成试剂治疗癌症^[8]; 可通过促进微管蛋白解聚、干扰二极纺锤体形成、阻滞有丝分裂等抑制人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖, 促进其凋亡^[9]; 同时, PAB 还可通过 Chk-Cdc25C 和 p53 途径诱导人黑素瘤细胞凋亡, 抑制其增殖^[10-11]; 也有报道发现 PAB 可通过上调 bax 和下调 bcl-2 表达, 导致线粒体膜电位下降, 激活 caspase, 最终导致胃癌细胞凋亡^[12-13]。

本研究体外实验结果显示 PAB 可抑制大鼠胶

质瘤细胞 C6 增殖,同时,用流式细胞术分析经 PI 染色的 C6 细胞,发现 G₂/M 期所占比例有所升高,说明 PAB 可诱导 G₂/M 期阻滞,从而达到抑制肿瘤细胞增殖的作用。皮下注射 C6 细胞建立种植瘤 Wistar 大鼠模型并进行 PAB 灌胃给药治疗,发现治疗组肿瘤体积有所减小,说明 PAB 可有效抑制肿瘤发展;并且,经免疫组织化学染色发现,PAB 治疗组中 PCNA 表达量有所降低。PCNA 参与调节肿瘤形成,在 DNA 合成和细胞增殖方面起重要作用^[14]。综上所述,PAB 可抑制大鼠脑胶质瘤 C6 细胞增殖,阻滞细胞周期中 G₂/M 期、下调 PCNA 的表达为其可能的作用机制,但 PAB 对 C6 细胞生长影响的确切作用机制还有待于进一步的深入研究。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Li K S, Gu X F, Li P, Zhang Y, Zhao Y S, Yao Z J, et al. Effect of pseudolaric acid B on gastric cancer cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11: 7555-7559.
- [2] Wong V K, Chiu P, Chung S S, Chow L M, Zhao Y Z, Yang B B, et al. Pseudolaric acid B, a novel class of microtubule-destabilizing agent circumvents a multi-drug resistant phenotype and exhibits antitumor activity *in vivo* [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11: 6002-6011.
- [3] 田 鹏. 脑胶质瘤的手术治疗探讨[J]. *中国实用医药*, 2010, 5: 125-126.
- [4] 陈菊祥, 卢亦成, 徐 涛, 孙克华, 胡国汉, 骆 纯, 等. 胼胝体胶质瘤的显微手术及综合治疗策略[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30: 364-368.
- Chen J X, Lu Y C, Xu T, Sun K H, Hu G H, Luo C, et al. Microsurgery and comprehensive treatment strategies for callosal

- gliomas[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30: 364-368.
- [5] 陈宏颖, 曹 磊, 王守森, 郑兆聪. Livin siRNA 重组腺病毒对胶质瘤 U251 细胞的增殖、凋亡的作用研究[J]. *第二军医大学学报*, 2011, 32: 603-607.
- Chen H J, Cao L, Wang S S, Zheng Z C. The effect study of recombinant adenovirus Livin siRNA on the proliferation and apoptosis of U251 cells[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2011, 32: 603-607.
- [6] 胡立宏, 徐吉庆. 基于经典天然产物的药物发现研究[J]. *药理学学报*, 2009, 44: 11-18.
- [7] Li T, Chen H, Yang Z, Wei N, Zhang S, Mei X. Topical application of Pseudolaric acid B improve DNFB-induced contact hypersensitivity via regulating the balance of Th1/Th17/Treg cell subsets[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2012, 45: 668-676.
- [8] Tong Y G, Zhang X W, Geng M Y, Yue J M, Xin X L, Tian F, et al. Pseudolaric acid B, a new tubulin-binding agent, inhibits angiogenesis by interacting with a novel binding site on tubulin [J]. *Mol Pharmacol*, 2006, 69: 1226-1233.
- [9] 段绍维, 徐 波, 陈云利, 李 敏, 傅宏征, 崔景荣. 高内涵法探讨土槿皮乙酸对 MCF-7 细胞抑制作用的机制[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2010, 37: 1313-1322.
- [10] Meng A G, Jiang L L. Induction of G₂/M arrest by pseudolaric acid B is mediated by activation of the ATM signaling pathway [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30: 442-450.
- [11] Gong X F, Wang M W, Tashiro S I, Onodera S, Ikejima T. Pseudolaric acid B induces apoptosis through p53 and Bax/Bcl-2 pathways in human melanoma A375-S2 cells[J]. *Arch Pharm Res*, 2005, 28: 68-72.
- [12] 徐永红, 王学清, 鞠晓华, 赵立杰, 李 岩. 土槿皮乙酸诱导人胃癌 SGC7901 细胞凋亡及机制[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24: 601-606.
- [13] Meng A G, Jiang L L. Pseudolaric acid B-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human gastric carcinoma cells[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2009, 11: 142-152.
- [14] Naryzhny S N, Lee H. Proliferating cell nuclear antigen in the cytoplasm interacts with components of glycolysis and cancer [J]. *Febs Lett*, 2010, 584: 4292-4298.

[本文编辑] 尹 茶