

蒿甲醚联合依托泊苷对小细胞肺癌细胞株 H446 增殖及侵袭的抑制作用

陈佳佳, 贝云成, 张冬梅, 沈萍萍*

(南京大学生命科学院, 南京 210093)

摘要 探讨蒿甲醚与依托泊苷联用对小细胞肺癌细胞 H446 增殖及侵袭能力的抑制作用。采用 MTT 法检测蒿甲醚、依托泊苷单用及联合作用对 H446 细胞增殖的影响; 采用 Annexin V/PI 荧光双染法检测蒿甲醚、依托泊苷单用及联合作用对 H446 细胞凋亡的影响; 采用 PI 单染法检测蒿甲醚、依托泊苷单用及联合作用对 H446 细胞周期分布的影响。采用基质胶侵袭实验检测蒿甲醚、依托泊苷单用及联合作用对 H446 侵袭能力的影响。结果表明, 蒿甲醚、依托泊苷单用以及联合使用均能有效抑制 H446 的增殖, 且呈剂量依赖性, 两药联用具有协同作用。蒿甲醚单用不能明显促进细胞凋亡, 但与依托泊苷 (300 nmol/L) 联用 72 h 可以比较明显促进 H446 凋亡, 具有统计学意义 ($P < 0.05$)。蒿甲醚单用对 H446 的细胞周期没有显著影响, 联合作用 48 h 对细胞周期 G₂ 期阻滞主要是依托泊苷的作用。单用蒿甲醚、依托泊苷以及二者联合使用都能显著抑制 H446 的侵袭能力。

关键词 蒿甲醚; 依托泊苷; 小细胞肺癌; 联合用药; 增殖; 侵袭

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2017)02-0201-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170211

引用本文 陈佳佳, 贝云成, 张冬梅, 等. 蒿甲醚联合依托泊苷对小细胞肺癌细胞株 H446 增殖及侵袭的抑制作用 [J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(2): 201–207.

Cite this article as: CHEN Jiajia, BEI Yuncheng, ZHANG Dongmei, et al. Combination of artemether with etoposide inhibits cell proliferation and invasion in small cell lung cancer cell line H446 [J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(2): 201–207.

Combination of artemether with etoposide inhibits cell proliferation and invasion in small cell lung cancer cell line H446

CHEN Jiajia, BEI Yuncheng, ZHANG Dongmei, SHEN Pingping*

School of Life Science, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract This study was to investigate the inhibitory effects of artemether in combination with etoposide on the proliferation and invasion ability of human small cell lung cancer cell line H446. H446 cells were treated with different concentrations of artemether or etoposide alone or their combination. The inhibitory effects on proliferation were detected by MTT assay, while cell cycle and apoptosis of H446 cells in each group were analyzed by flow cytometry using PI and Annexin V/PI-staining, respectively. The invasion capability of H446 cells in different groups was tested with matrigel-coated transwell. The results implicated that artemether or etoposide or their combination does inhibit proliferation of H446 cells dose-dependently. Artemether alone had little effect on the apoptosis of H446 cells while its combination with etoposide resulted in significantly apoptosis of H446 cells comparing with other groups ($P < 0.05$). Etoposide blocked H446 progression markedly by arresting cell cycle in G₂ phase with percentage of cells in G₁ phase decreasing significantly while artemether alone or in combination with etoposide had little synergistic effect on cell cycle. Artemether or etoposide alone or their combination could dramatically inhibit the invasion ability of H446 cells.

Key words artemether; etoposide; small cell lung cancer; drug combination; proliferation; invasion

This study was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81473220)

小细胞肺癌患者约占总肺癌患者的14%，在美国每年有超过3万个患者被诊断为小细胞肺癌。由于生长迅速、易于转移扩散以及难以避免的药物抵抗性，小细胞肺癌的恶性程度极高且预后较差。目前局限期小细胞肺癌主要采用放化疗同步进行的治疗方法，而广泛期小细胞肺癌只采用化疗，局限期小细胞肺癌目前最先进的方法是将顺铂和依托泊苷联用与放疗结合起来，而广泛期小细胞肺癌的一线治疗方法是铂放疗结合依托泊苷或顺铂^[1]。虽然小细胞肺癌患者对上述一线放化疗方法都比较敏感，但大多数小细胞肺癌患者治疗后2年会复发并死于系统性转移^[2]。

青蒿素是中国学者屠呦呦等人于1972年从草本植物青蒿中分离的活性化学物质，用于治疗疟疾^[3]，屠呦呦也因此获得了2015年诺贝尔生理学或医学奖。

近年来，越来越多的体内外研究发现青蒿素及其单体衍生物如青蒿琥酯、双氢青蒿素以及蒿甲醚等都可以选择性地抑制某些肿瘤的生长、转移、血管生成以及炎症^[4–7]，特效草本植物提取物以其独特的广谱抗菌、抗肿瘤活性以及微弱的副作用等特性正成为抗肿瘤化疗药物的新选择^[8]。青蒿素新用途的开发研究也在不断进行中^[9]。本研究将蒿甲醚与依托泊苷联合使用，考察其对人小细胞肺癌细胞株H446增殖及侵袭能力的抑制作用，为进一步的体内及临床研究提供科学依据。

1 材料

1.1 试剂

蒿甲醚、依托泊苷(vp-16)(阿拉丁试剂有限公司)；RPMI-1640培养基(美国Gibco公司)；胎牛血清(维森特生物技术有限公司)；MTT(碧云天生物技术有限公司)用PBS配成质量浓度为5 mg/mL；细胞凋亡和细胞周期试剂盒、荧光实时定量PCR mix(南京诺唯赞生物科技有限公司)；基质胶(美国BD公司)用无血清培养基稀释1:10备用；MMP2抗体(美国Bioworld生物科技有限公司)。其他试剂均为市售分析纯。

1.2 仪器

FACS Calibur分析型流式细胞仪(美国BD公司)；全波长酶标仪(美国Thermo Fisher公司)；倒置显微镜(上海精密仪器仪表有限公司)；血球计数板(上海求精生化试剂仪器有限公司)；Satorius天平(精确度0.1 mg, 德国赛多利斯股份有限公司)。

1.3 细胞株

人小细胞肺癌细胞株H446，购于江苏凯基生物技术股份有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养

细胞培养在37℃、5% CO₂的条件下进行。H446细胞用含双抗和10%胎牛血清的RPMI-1640培养基传代培养。

2.2 MTT法检测蒿甲醚及vp-16对H446细胞增殖的影响

选取对数生长期的细胞，消化悬浮并按每孔3 000个细胞接种于96孔板培养过夜。分别用1 nmol/L~100 μmol/L浓度范围的蒿甲醚处理细胞24, 48和72 h；用100 nmol/L~100 μmol/L vp-16处理细胞24和48 h；用100, 300 nmol/L蒿甲醚和100 nmol/L vp-16组合使用处理H446细胞24 h；培养结束后每孔中加入MTT溶液(5 mg/mL)100 μL, 37℃温孵4 h；1 000 r/min离心5 min，小心地扣去上清液后加入DMSO溶液200 μL，振摇至颜色均匀；用酶标仪在490 nm检测吸收度，计算抑制率。

2.3 流式细胞仪检测蒿甲醚及vp-16对H446细胞凋亡及周期的影响

取对数生长期H446细胞，以每孔2×10⁵个细胞的密度接种于6孔板，12 h后加入0.1~1 μmol/L蒿甲醚以及100~300 nmol/L vp-16处理48和72 h后，胰酶消化收集全部细胞，进行细胞周期和细胞凋亡检测。细胞周期检测方法：70%乙醇固定过夜，PBS洗涤后进行PI染色，37℃避光反应30 min，运用流式细胞仪检测并分析各时期细胞百分数；细胞凋亡检测方法：加入Annexin V-FITC

5 μ L, PI 10 μ L室温避光反应20 min,流式细胞仪检测,分析凋亡率。

2.4 基质胶实验检测蒿甲醚及vp-16对H446侵袭能力的影响

将孔径8 μ m的24孔transwell小室的多聚碳酸酯膜的上表面用Matrigel(Matrigel和无血清培养基以1:9稀释后,37℃凝固12 h)预先包被。用0.1~1 μ mol/L蒿甲醚以及300 nmol/Lvp-16处理肿瘤细胞36 h后胰酶消化,再用含0.1%BSA的无血清培养基重悬,调整细胞密度至每毫升 5×10^5 个。在小室内加入含有肿瘤细胞的完全培养基200 μ L。12~24 h后,用4%多聚甲醛常温固定30 min,用0.2%结晶紫染色15 min,然后擦去小室内未穿过膜的肿瘤细胞。PBS洗涤3次后直接用于显微镜放大100倍下随机选择5个视野,计算细胞总数。或者用10%乙酸溶液溶解结晶紫,在酶标仪上600 nm测定吸收度。

2.5 统计学处理

用GraphPad Prism 4软件进行统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间用Student's t-test进行显著性检验。 $P < 0.05$, $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$ 认为是存在显著性差异。

3 结果

3.1 蒿甲醚对H446细胞增殖的抑制作用

1 nmol/L~100 μ mol/L蒿甲醚单独处理24 h对H446的增殖基本没有影响,只有在100 μ mol/L浓度下才出现较为明显的抑制作用;而1 nmol/L~100 μ mol/L蒿甲醚处理H446 48 h后对其增殖的抑制作用开始出现,但10 nmol/L蒿甲醚处理48 h

对H446的增殖没有明显影响,100 nmol/L蒿甲醚处理48 h后抑制作用比较明显,抑制率达到18%,1 μ mol/L蒿甲醚处理48 h对H446的抑制率达到24%;1 nmol/L~100 μ mol/L蒿甲醚处理H446 72 h后对其增殖的抑制作用与48 h类似,但100 nmol/L蒿甲醚处理72 h后对H446的抑制率达到21%,1 μ mol/L蒿甲醚处理72 h后对H446的抑制率达到30%,而100 μ mol/L蒿甲醚处理H446 72 h后对其抑制率达到62%,如图1所示。

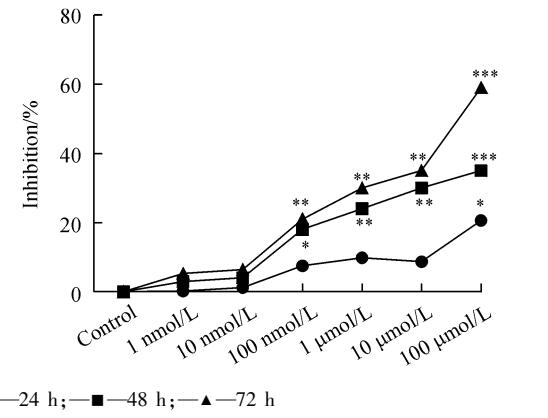


Figure 1 Inhibitory effects of artemether on the proliferation of H446 cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)

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

3.2 vp-16对H446细胞增殖的抑制作用

与蒿甲醚相比,H446细胞对vp-16的敏感性要高,单独vp-16处理H446 24 h后,10 μ mol/L浓度对其增殖具有较明显的抑制作用,抑制率达到30%;48 h后vp-16对H446的增殖抑制作用呈剂量依赖性,100 nmol/L浓度的抑制率达到30%。如图2所示。

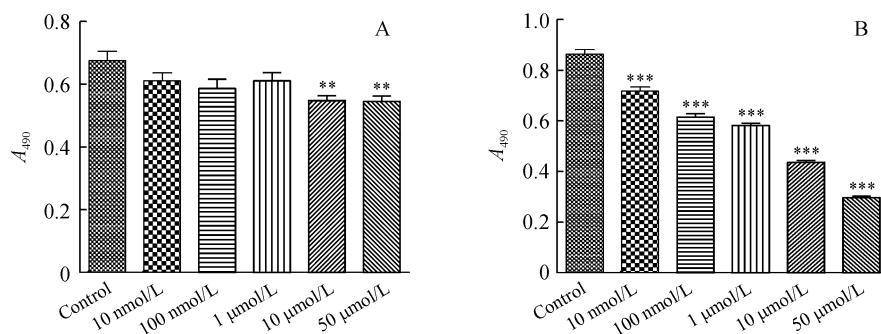


Figure 2 Inhibitory effects of etoposide (vp-16) on the proliferation of H446 cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A:24 h;B:48 h

** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

3.3 蒿甲醚与vp-16联用对H446细胞增殖的抑制作用

在vp-16单独作用实验中发现100 nmol/L vp-16处理48 h能比较明显地抑制H446增殖,而且前期减小浓度差距的增殖实验中以3倍的浓度梯度分别考察蒿甲醚和vp-16处理24 h对H446增殖的影响,结果发现100和300 nmol/L的蒿甲醚和vp-16处理24 h对H446的增殖没有影响(图3-A),因此考虑用100、300 nmol/L的vp-16以及100、300 nmol/L蒿甲醚联合使用考察其对H446

增殖的影响,结果发现,与单独蒿甲醚或vp-16组相比,蒿甲醚与vp-16联合使用24 h后,H446的增殖明显被抑制,从柱状图结果来看,100 nmol/L蒿甲醚和300 nmol/L vp-16的组合效果最好(抑制率最高),而300 nmol/L蒿甲醚和100 nmol/L vp-16的组合对H446的抑制显著性最高($P < 0.001$),虽然单独的vp-16对H446的增殖有一定的抑制效果,但显著性没有联合用药明显,说明二者有协同增效作用,如图3所示。

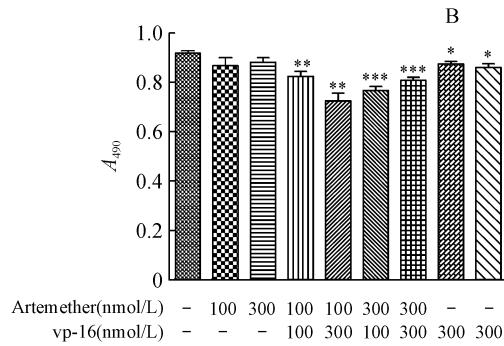
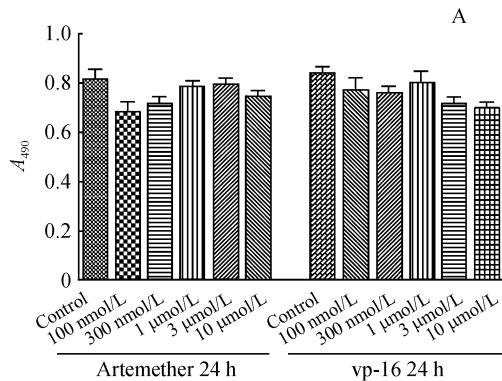


Figure 3 Inhibitory effects of artemether in combination with etoposide on the proliferation of H446 cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)

A: Artemether 100 nmol/L-10 μ mol/L, vp-16 100 nmol/L-10 μ mol/L 24 h; B: Artemether 100 nmol/L-300 nmol/L, vp-16 100-300 nmol/L (24 h)
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group

3.4 蒿甲醚与vp-16联用对H446细胞的促凋亡作用

鉴于100 nmol/L、300 nmol/L蒿甲醚和vp-16对H446的抑制作用,进一步考察二者的组合对H446凋亡的影响。结果发现,100、300 nmol/L蒿甲醚和vp-16的联合作用48 h对H446的凋亡并没有明显诱导作用,其中二者100 nmol/L和100 nmol/L的组合效果凋亡率达到12.5% (对照组7.84%),蒿甲醚(100 nmol/L)+vp-16(300 nmol/L)的联用凋亡率达到13.2%,蒿甲醚(300 nmol/L)和vp-16(100 nmol/L)联用的凋亡率达到13.3%,而蒿甲醚(300 nmol/L)和vp-16(300 nmol/L)的联用凋亡率达到14.2%,总的来说联合用药48 h并不能有效促进H446细胞凋亡(图4-A);但联合用药处理72 h后发现蒿甲醚(300 nmol/L)和vp-16(300 nmol/L)组合诱导H446细胞凋亡率达到23.3% (对照组6.89%),并且比单独蒿甲醚(凋亡率约8%)以及单独vp-16(凋亡率约12%)的诱导率都高,说明蒿甲醚与vp-16具有协同增效

作用,如图4-B所示。

Western blot结果显示,100 nmol/L~1 μ mol/L蒿甲醚单独作用或与300 nmol/L vp-16联合作用48 h后各组PARP没有出现明显切割,且下游凋亡相关caspase-3和caspase-9也没有出现明显切割,但联合用药72 h后PARP全长条带(116 kD)明显减少,但未能检测到明显的切割带(86 kD),联合组caspase-3以及caspase-9的切割带比单独组增加,说明联合用药组确实促进了H446的凋亡,如图5所示。

3.5 蒿甲醚与vp-16联用对H446细胞周期的影响

已证实依托泊苷主要作用于DNA拓扑异构酶II,从而引起细胞周期阻滞于晚S期或G₂期。实验发现100 nmol/L~1 μ mol/L蒿甲醚处理48 h对H446的细胞周期基本没有影响,300 nmol/L vp-16可将H446的细胞周期阻滞于G₂期,联合组对G₂期的阻滞主要是由于vp-16的作用,蒿甲醚对H446的周期没有作用,因为联合组与vp-16单独处理对G₂期的阻滞率相近。结果如图6所示。

3.6 蒿甲醚与 vp-16 联用对 H446 侵袭能力的影响

单独 100 nmol/L ~ 1 μ mol/L 蒿甲醚处理 H446 36 h 能明显抑制其侵袭能力, 300 nmol/L vp-16 单独处理 36 h 也能明显抑制其侵袭能力, 联合组对其侵袭能力的抑制更明显, 抑制效果比单独

组都明显。QPCR 检测侵袭相关蛋白的 mRNA 水平的表达量发现 MMP1 和 MMP3 的 mRNA 表达量明显减少, 但 MMP2 的 mRNA 水平没有明显降低, 只有 300 nmol/L 和 300 nmol/L 联合组明显降低, Western blot 水平发现联合组 MMP2 的表达比单独蒿甲醚、vp-16 都少, 如图 7-C 所示。

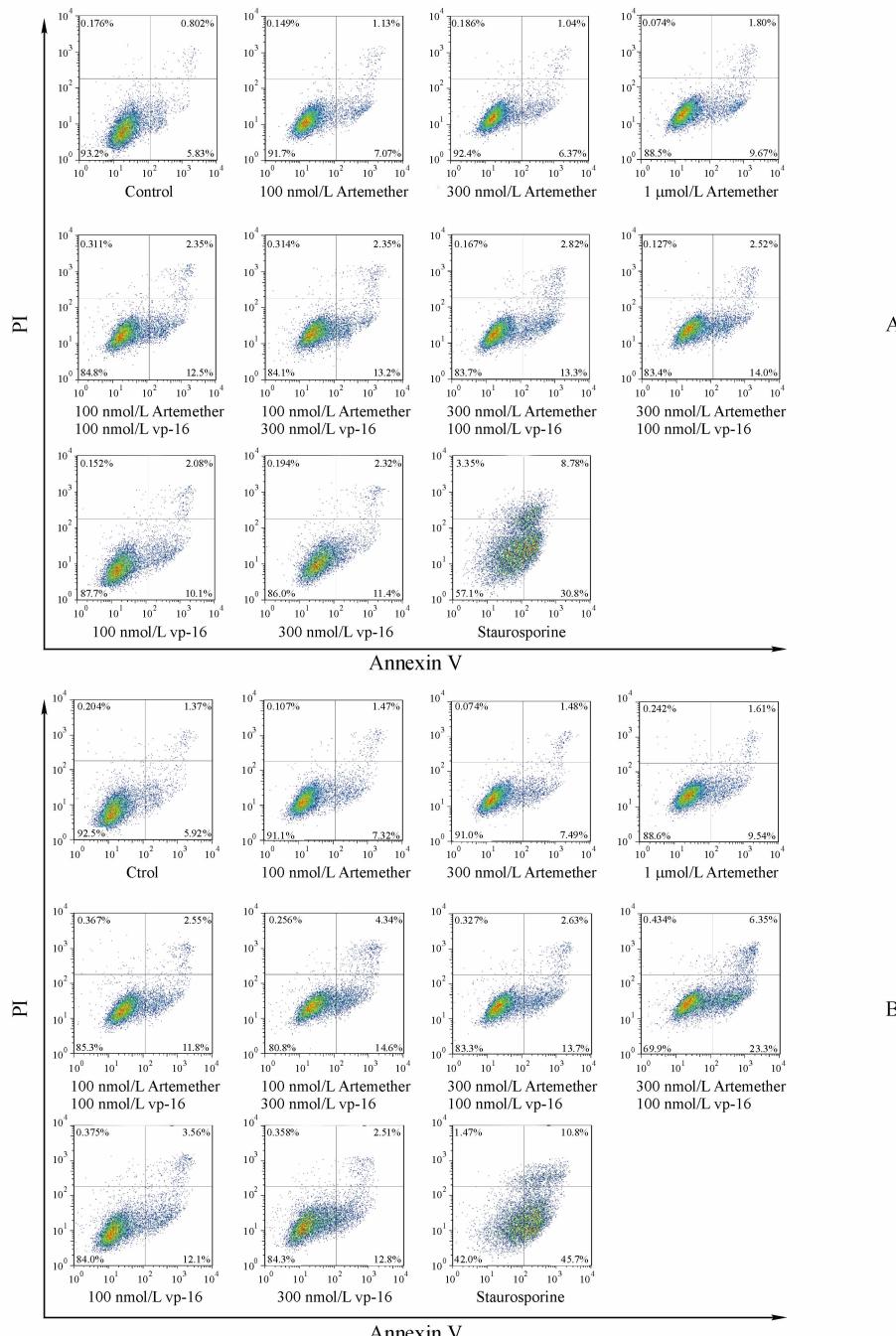


Figure 4 Annexin V-FITC/PI assay of apoptosis of H446 cells treated by artemether (Area), etoposide (vp-16) or their combination
A:Artemether 100 nmol/L-1 μ mol/L, vp-16 100-300 nmol/L 48 h; B:Artemether 100 nmol/L-1 μ mol/L, vp-16 100 nmol/L-300 nmol/L 72 h

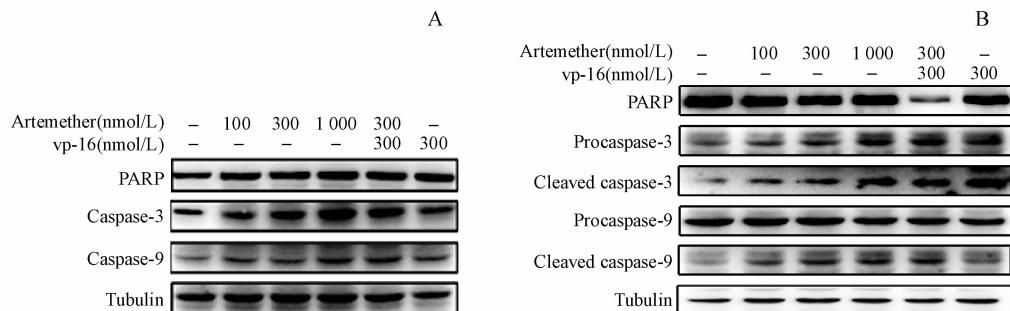


Figure 5 PARP, caspase-3 and caspase-9 from H446 treated with artemether of different concentrations or in combination with vp-16 were analyzed by Western blot

A: Artemether 100 nmol/L-1 μmol/L 48 h, vp-16 300 nmol/L 48 h; B: Artemether 100 nmol/L-1 μmol/L 72 h, vp-16 300 nmol/L 72 h

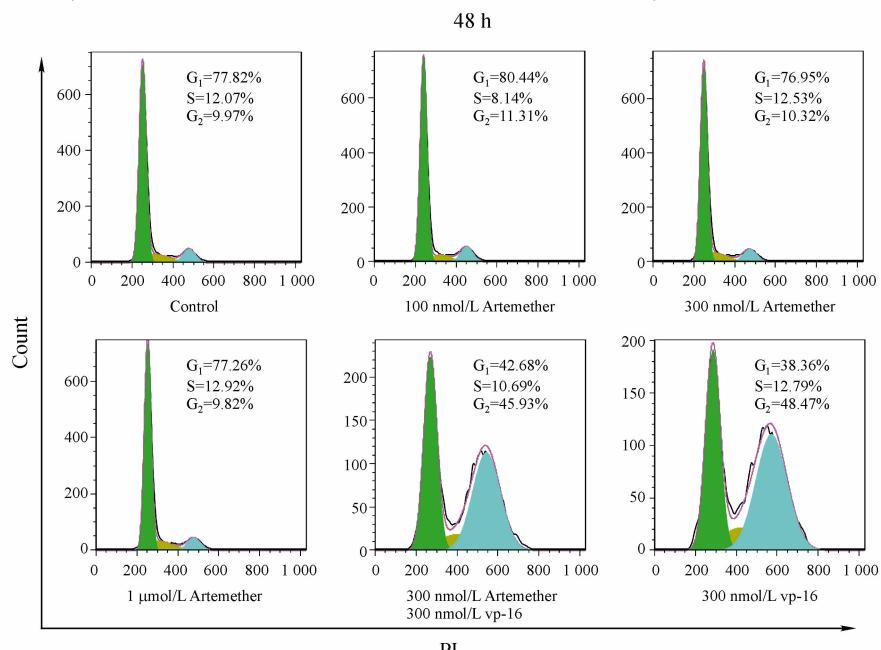


Figure 6 Influence of artemether, vp-16 or their combination on the cycle of H446 cells

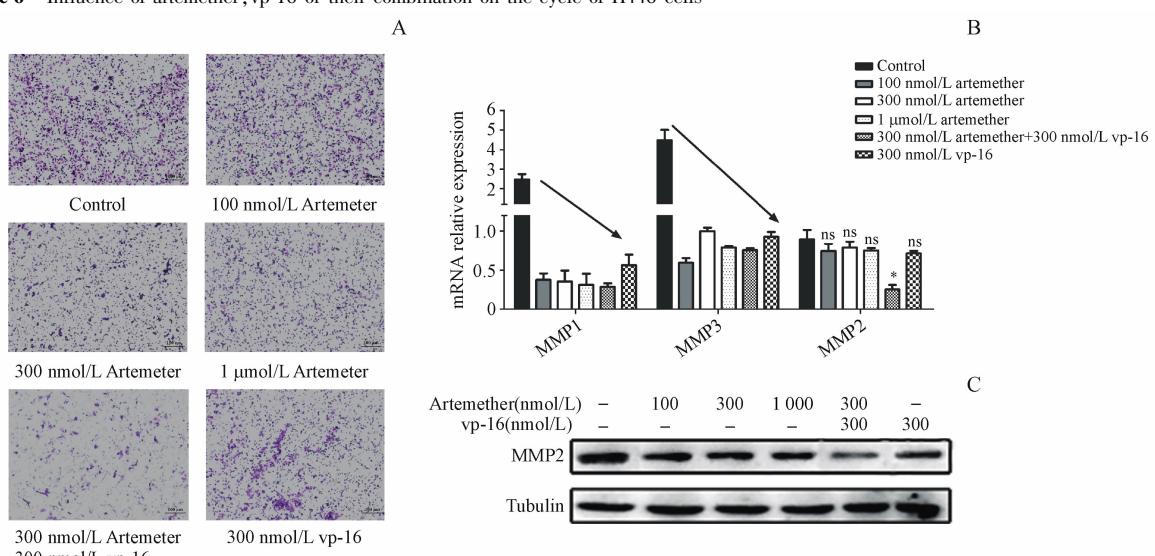


Figure 7 Influence of artemether, vp-16 or their combination on invasion ability of H446 cells

A: Invasion ability of H446 cells in each group was tested with Matrigel-coated transwell; B: MMPs and TIMPs are analyzed by Q-PCR; C: The expression level of MMP2 was assayed by Western blot in different groups

4 讨 论

尽管依托泊苷以其毒性较低、LS 总生存期长等优势替代了环磷酰胺、阿霉素以及长春碱等肿瘤的一线治疗药物,但它还是存在诸如不良反应大、易复发等缺点,目前对于 SCLC 的二线、三线治疗药物也在临床前及临床研究中^[9]。SCLC 复发率高与其极高的转移率有关,因此,一线治疗药物辅以靶向抑制小细胞肺癌增殖或转移的药物成为目前肿瘤治疗新选择。青蒿素及其衍生物在包括鳞状细胞癌、皮肤癌、垂体大腺瘤以及非小细胞肺癌中都显示出较好的抑制活性,且不良反应小,目前正在多种肿瘤的联合治疗中进行研究^[10]。青蒿素及其衍生物的抗肿瘤作用主要体现在对细胞增殖和血管形成的抑制,对细胞凋亡的诱导作用,其活性作用的发挥与其内源性过氧桥结构以及形成的活性氧自由基密切相关,但具体的分子机制目前还缺乏研究^[11]。

研究结果显示,100 nmol/L 蒿甲醚单独作用 H446 48~72 h 能显著抑制其增殖,而 100 nmol/L vp-16 单独作用 H446 48 h 就能显著抑制其增殖,300 nmol/L 蒿甲醚和 100 nmol/L vp-16 联合使用 24 h 就能显著抑制 H446 增殖。细胞凋亡实验发现,300 nmol/L ~ 1 μmol/L 蒿甲醚单独使用 48 h 并不能显著促进 H446 细胞凋亡的发生,300 nmol/L 蒿甲醚联合 300 nmol/L vp-16 处理 72 h 能显著诱导 H446 凋亡达 23%,具有协同增效作用,Western blot 结果发现联合组全长 PARP 表达减少,凋亡相关 caspase-3、caspase-9 的活性切割条带减少;细胞周期实验发现蒿甲醚单独作用 H446 48 h 对其细胞周期没有显著影响,联合 vp-16 后对细胞周期的抑制主要是 vp-16 在发挥作用,与单独蒿甲醚处理 48~72 h 相比,300 nmol/L + 300 nmol/L 的组合用药明显使细胞周期阻滞于 G₂ 期,但阻滞率与单独 vp-16 相近,说明与单独 vp-16 相比,联用组对 H446 细胞周期并没有显著的阻滞作用,但联用组处理 H446 72 h 却能显著诱导肿瘤细胞凋亡,说明联用组凋亡率的增加并不仅仅归因于 vp-16 对周期的阻滞,因为细胞凋亡与细胞周期之间没有必然的内在关联,细胞周期的阻滞具有双重意义:它既为损伤 DNA 的修复提供了“缓冲时间”,但也增加了 DNA 及其修复系统暴露于外源刺激的时间和概率,从这

一点来说,本实验中 vp-16 诱导的细胞周期阻滞很可能促使肿瘤细胞对蒿甲醚的敏感性增强,因此导致联用后肿瘤细胞对药物的敏感性也增强从而使得整体的凋亡率较单独用药组增加。总之,两种药物联合使用后对细胞内信号转导的机制是很复杂的,具体的分子机制需要进一步探究。侵袭实验发现,蒿甲醚单独处理 36 h 能显著抑制 H446 的侵袭能力,vp-16 单独处理也能抑制 H446 侵袭能力,两药联合使用对 H446 侵袭能力的抑制效果增强,Western blot 结果也发现两药联合使用后侵袭相关蛋白 MMP2 的表达减少,联合组 mRNA 水平的表达显著减少,提示蒿甲醚和 vp-16 联用后可能通过 mRNA 水平或者蛋白翻译后修饰影响了 MMPs 的活性。

参 考 文 献

- [1] Byers LA, Rudin CM. Small cell lung cancer: where do we go from here [J]? *Cancer*, 2015, **121**(5): 664~672.
- [2] Asai N, Ohkuni Y, Kaneko N, et al. Relapsed small cell lung cancer: treatment options and latest developments [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2014, **6**(2): 69~82.
- [3] Chaturvedi D, Goswami A, Saikia PP, et al. Artemisinin and its derivatives: a novel class of anti-malarial and anti-cancer agents [J]. *Chem Soc Rev*, 2010, **39**(2): 435~454.
- [4] Chen T, Li M, Zhang R, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and sensitizes human ovarian cancer cells to carboplatin therapy [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, **13**(7): 1358~1370.
- [5] Gong Y, Gallis BM, Goodlett DR, et al. Effects of transferrin conjugates of artemisinin and artemisinin dimer on breast cancer cell lines [J]. *Anticancer Res*, 2013, **33**(1): 123~132.
- [6] Lai HC, Singh NP, Sasaki T. Development of artemisinin compounds for cancer treatment [J]. *Invest New Drugs*, 2013, **31**(1): 230~46.
- [7] Lu JJ, Chen SM, Zhang XW, et al. The anti-cancer activity of dihydroartemisinin is associated with induction of iron-dependent endoplasmic reticulum stress in colorectal carcinoma HCT116 cells [J]. *Invest New Drugs*, 2011, **29**(6): 1276~1283.
- [8] Das AK. Anticancer effect of antimalarial artemisinin compounds [J]. *Ann Med Health Sci Res*, 2015, **5**(2): 93~102.
- [9] Guo T, Li HY, Yin XZ, et al. Mechanism of cyclodextrin inclusion of artemisinins in vacuum [J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2010, **41**(6): 513~519.
- [10] Simos D, Sajjadi G, Sergi M, et al. Third-line chemotherapy in small-cell lung cancer: an international analysis [J]. *Clin Lung Cancer*, 2014, **15**(2): 110~118.
- [11] Ho WE, Peh HY, Chan TK, et al. Artemisinins: pharmacological actions beyond anti-malarial [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, **142**(1): 126~139.