

维生素 E 琥珀酸酯体外防护顺铂肝细胞毒性并增强其抗肿瘤细胞增殖活性

李秋娟, 卢永科, 仲来福*

(大连医科大学毒理学研究室, 辽宁 大连 116027)

摘要: 目的 研究维生素 E 琥珀酸酯(VES)对顺铂(CP)肝细胞毒性及联合用药增强抗肿瘤活性的可能。方法 用二步灌注法分离人和大鼠肝细胞,接种于胶原铺被的 96 孔板,细胞贴壁后,分别加入一系列浓度的 CP, VES 及 CP + VES, 于 48 h 用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞存活率,并计算半数抑制浓度(IC₅₀);同样方法用于检测 CP, VES 及 CP + VES 对人前列腺癌细胞系 DU-145 和人大肠癌细胞系 CCL229 的抗增殖作用。结果 CP, VES, CP + VES 1 mg·L⁻¹, CP + VES 5 mg·L⁻¹, CP + VES 10 mg·L⁻¹ 对人肝细胞的 IC₅₀ 分别为 2.35, >100, 2.26, 4.25, 6.93 mg·L⁻¹; CP, VES, CP + VES 5 mg·L⁻¹, CP + VES 10 mg·L⁻¹, CP + VES 25 mg·L⁻¹ 对大鼠肝细胞的 IC₅₀ 分别为 4.70, >100, 10.94, 17.57, 23.24 mg·L⁻¹; CP, VES, CP + VES 5 mg·L⁻¹, CP + VES 10 mg·L⁻¹, CP + VES 25 mg·L⁻¹ 对 DU-145 和 CCL229 的 IC₅₀ 分别为 6.36, 55.36, 5.04, 4.85, 0.58 和 9.58, 39.47, 7.29, 4.22, 2.43 mg·L⁻¹。结论 VES 能明显减低 CP 所致人和大鼠肝细胞毒性,增强 CP 对 DU-145 和 CCL229 细胞的抗增殖作用。

关键词: 肝细胞; 肿瘤细胞, 培养的; 顺铂; 维生素 E 琥珀酸酯

中图分类号: R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3002(2004)03-0208-04

维生素 E 琥珀酸酯(vitamin E succinate, VES)是维生素 E 中活性最强的一种同型物。近年研究表明, VES 对胃癌、乳腺癌、前列腺癌、结肠癌等肿瘤细

胞的增殖有抑制作用,并可诱发肿瘤细胞凋亡,但不抑制正常分裂细胞的生长^[1,2]。化疗药物则没有这种选择性。顺铂(cisplatin, CP)是临床上最常用的抗肿瘤药物之一,肝肾毒性是限制其临床剂量的毒副作用。本文旨在研究 VES 对 CP 肝细胞毒性的影响,并探讨 VES 与 CP 合用增强抗肿瘤活性的可能性。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂及仪器

人肝组织块,约 1 cm³,取自外伤肝脾破裂急诊手术病人。SD 大鼠,♂,体重 180~220 g,本校实验动物中心提供。人前列腺癌细胞系 DU-145 购自中国协和医科大学基础所细胞室,人大肠癌细胞系 CCL229 由中国医科大学医学分子生物学研究所宋今丹教授惠赠。SK601 型酶标仪系日本 Seikagaku 公司产品,胶原铺被的 96 孔板购自日本 Iwaki 公司,胎牛血清为 Gibco 公司产品,CP, VES, IV 型胶原酶、噻唑蓝[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide, MTT]和 RPMI1640 均为 Sigma 公司产品。

1.2 原代肝细胞分离与培养

大鼠肝细胞的分离按文献[3]方法并加以修改。无菌条件下将乙醚麻醉的大鼠开腹暴露门静脉,经门静脉以 20 mL·min⁻¹ 的流速灌注 10 min,灌注液为含 10 mmol·L⁻¹ HEPES 和 2 mmol·L⁻¹ EGTA 的无钙镁 Hanks 溶液,再以同样的流速灌注含 10 mmol·L⁻¹ HEPES, 5 mmol·L⁻¹ CaCl₂ 和质量分数为 0.5 g·L⁻¹ 胶原酶的 Hanks 溶液 10 min,使肝脏变软。取出肝脏,钝性分离肝细胞,悬浮于 Hanks 溶液,以 100 μm 的筛网过滤,2000 × g 离心 1 min,沉淀即为肝实质细胞,弃上清,用质量分数为 0.4% 的台盼蓝溶液检测肝实质细胞存活率,若存活率低于 80%,则用 30% Percoll 溶液分离去除死细胞以提高存活率。用培养液将细胞浓度调至 2 × 10⁸ L⁻¹,接种于胶原

收稿日期: 2003-09-09 接受日期: 2004-02-10

作者简介: 李秋娟(1965-),女,辽宁省海城人,实验师,主要从事生物化学与分子毒理学研究。

* 联系作者 E-mail: rldczhong@dlmedu.edu.cn Tel: (0411)84720583 Fax: (0411)84720661

铺被的96孔板,每孔0.1 mL。

人肝细胞的分离按文献[4]方法并加以修改。所用灌流液、胶原酶溶液等同大鼠肝细胞的分离。将约1 cm³人肝组织块用灌流液冲洗,暴露血管,以20 mL·min⁻¹的流速灌流10~20 min,肝脏变灰白色,再以同样的流速灌流含胶原酶的Hanks溶液。至肝脏变软,取出肝脏,钝性分离肝细胞,悬浮于Hanks溶液,以下处理同大鼠肝细胞分离。

1.3 肝细胞处理与细胞毒性检测

大鼠肝细胞3 h后贴壁,人肝细胞4 h后贴壁,弃去原培养液,加入含有不同浓度药物的新鲜培养液,即一系列浓度的CP, VES及二者的混合溶液,与细胞一起孵育48 h。VES用无水乙醇溶解,乙醇终浓度为0.2%。药物处理分成5组,分别为CP, VES, CP+VES 5 mg·L⁻¹, CP+VES 10 mg·L⁻¹, CP+VES 25 mg·L⁻¹组。其中CP(mg·L⁻¹)的剂量为0.2, 0.4, 0.8, 1.5, 3, 6, 12.5, 25, 50, 100, VES除注明剂量外,与CP剂量相同。考虑到人肝细胞对药物耐受性比大鼠肝细胞差,所以给药剂量稍有变化。人肝细胞不做联合用药的最高剂量CP+VES 25 mg·L⁻¹,而做一个最低剂量CP+VES 1 mg·L⁻¹。在37℃培养48 h后,弃去培养液,代之以含MTT(5 mg·L⁻¹)的培养液,继续培养1 h,弃去培养液,加酸化的异丙醇溶解液,1 h后,紫色结晶完全溶解,在SK601型酶标仪检测595 nm/630 nm波长下的吸光度值,计算细胞相对存活率。

1.4 人前列腺癌细胞和人大肠癌细胞培养与处理

将DU-145和CCL229接种于5 cm×5 cm培养瓶中,加入含10%小牛血清及青霉素、链霉素各100 kU·L⁻¹的RPMI1640培养基,于37℃, 5% CO₂条件下按常规传代培养,待细胞处于对数生长期时,以每孔1×10⁵接种于96孔板,培养24 h。按CP, VES, CP+VES 5 mg·L⁻¹, CP+VES 10 mg·L⁻¹和CP+VES 25 mg·L⁻¹剂量分成5组进行处理,处理方法、检测及计算方法与上述肝细胞处理相同。

1.5 统计学处理

绘制人和大鼠原代肝细胞CP, VES, CP+VES 1 mg·L⁻¹, CP+VES 5 mg·L⁻¹, CP+VES 10 mg·L⁻¹, CP+VES 25 mg·L⁻¹各组药物浓度-细胞存活率曲线图,绘制CP, VES, CP+VES 5 mg·L⁻¹, CP+VES 10 mg·L⁻¹, CP+VES 25 mg·L⁻¹各组对DU-145和CCL229药物浓度-细胞存活率曲线。用Bliss法计算各组半数抑制浓度(IC₅₀)及95%可信区间。

2 结果

2.1 维生素E琥珀酸酯对顺铂肝细胞毒性的影响

如图1所示,CP对原代人肝细胞的IC₅₀为2.35(2.00~2.75)mg·L⁻¹;CP对原代大鼠肝细胞的IC₅₀为4.70(3.96~5.57)mg·L⁻¹,后者是前者的2倍。两者之间有显著的种属差异($P < 0.05$)。VES对原代人和大鼠肝细胞的IC₅₀均大于100 mg·L⁻¹。表明CP对正常的人与大鼠肝细胞均有明显细胞毒性,并且对人肝细胞的细胞毒性大于对大鼠肝细胞的细胞毒性。VES则未见明显细胞毒性。

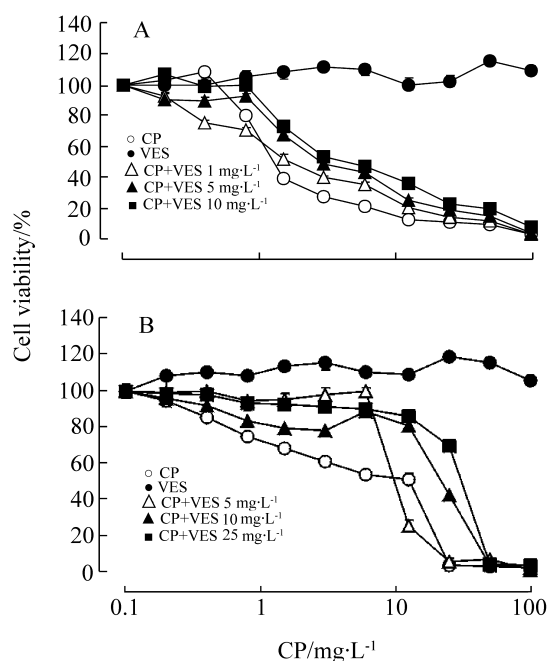


Fig 1. Effect of vitamin E succinate(VES) on cisplatin(CP)-induced cytotoxicity to human hepatocytes (A) and rat hepatocytes (B). The hepatocytes were incubated with CP and/or VES for 48 h. MTT assays were performed to evaluate cytotoxicity. $\bar{x} \pm s, n = 3$.

不同浓度的CP,加入VES 1,5,10 mg·L⁻¹,对于人肝细胞的IC₅₀为2.26(1.85~2.75), 4.25(3.55~5.09)和6.93(5.88~8.18)mg·L⁻¹。显示随VES剂量增大,CP对人肝细胞的细胞毒性减小,且呈剂量依赖关系,有显著性差异($P < 0.05$)。

不同浓度的CP,加入VES 5,10,25 mg·L⁻¹,对于大鼠肝细胞的IC₅₀为10.94(10.44~11.90), 17.57(15.39~20.07)和23.24(20.47~22.75)mg·L⁻¹。显示随VES剂量增大,CP对大鼠肝细胞的细胞毒性

减小,且呈剂量依赖关系,有显著性差异($P < 0.05$)。

不同浓度的 CP,加入 VES $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和不同浓度的 CP,加入 VES $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 两个剂量对于大鼠肝细胞的 IC_{50} 分别是对人肝细胞 IC_{50} 的 2.57 和 2.53 倍。进一步表明,CP 对人肝细胞的细胞毒性大于对大鼠肝细胞的细胞毒性。

2.2 维生素 E 琥珀酸酯对顺铂抗增殖活性的影响

图 2A 显示,CP 和 VES 对 DU-145 的 IC_{50} 分别为 $6.36(5.69 \sim 7.11)$ 和 $55.36(51.56 \sim 59.44) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,显示 CP 和 VES 均可抑制 DU-145 细胞的增殖活性,且 CP 作用更强。不同浓度的 CP,加入 VES 5, VES 10 和 VES $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,对于 DU-145 的 IC_{50} 分别为 $5.04(4.35 \sim 5.83)$, $4.85(4.26 \sim 5.53)$ 和 $0.58(0 \sim 0.7) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。CP 与 VES $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 合用的 IC_{50} 仅是单独 CP IC_{50} 的 1/10,表明 VES 可明显增强 CP 的抗 DU-145 增殖活性。并呈剂量依赖关系,且后两个剂量之间差异显著($P < 0.05$)。

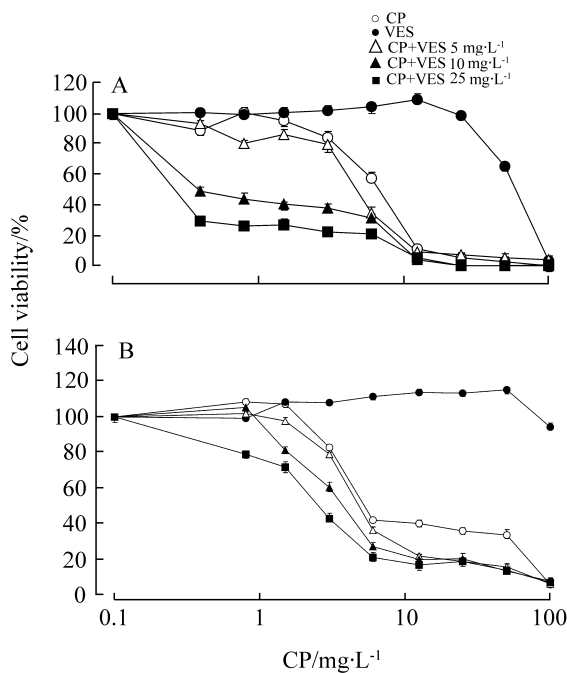


Fig 2. Effect of VES on antiproliferative activities of CP against cancer cell lines. A: human prostate cancer cell line DU-145; B: human colon cancer cell line CCL229. See Fig 1 for the treatment. $\bar{x} \pm s$, $n = 3$.

图 2B 显示,CP 和 VES 对 CCL229 的 IC_{50} 分别为 $9.58(7.52 \sim 12.19)$ 和 $39.47(34.92 \sim 44.62) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,显示 CP 和 VES 均可抑制 CCL229 细胞的增殖

活性,且 CP 作用更强。不同浓度的 CP,加入 VES 5, VES 10 和 VES $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,对于 CCL229 的 IC_{50} 分别为 $7.29(6.22 \sim 8.55)$, $4.22(3.34 \sim 5.34)$ 和 $2.43(1.73 \sim 3.41) \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。显示 VES 3 个水平与 CP 联合用药的 IC_{50} 均小于单独 CP 或单独 VES 的 IC_{50} ,两个高水平 VES 与 CP 联合用药 IC_{50} 显著地小于 CP 的 IC_{50} ($P < 0.05$)。表明 VES 可明显增强 CP 抗 CCL229 增殖的活性。

3 讨论

CP 作为细胞毒药物在治疗肿瘤时,可引起肝肾细胞毒性作用。本研究发现,人肝细胞对 CP 细胞毒性比大鼠肝细胞更敏感,表明 CP 对人和大鼠肝细胞毒性存在种属差异。

VES 对正常肝细胞无明显细胞毒性,但可促进肿瘤细胞分化,诱导 DNA 合成抑制,导致细胞凋亡^[5,6]。VES 抑制肿瘤细胞生长的机制不同于维生素 E,其主要作用是增加分泌和活化潜在的上皮细胞生长抑制剂——转移生长因子 β (transforming growth factor, TGF- β),并且增加需要 TGF- β 信号传导的细胞表面蛋白表达,这可能与 VES 诱导肿瘤细胞凋亡有关。

本研究结果提示,CP 对人肝细胞毒性大于对大鼠肝细胞毒性,VES 对正常细胞无明显细胞毒性,与 CP 联合使用能明显减低 CP 肝细胞毒性,并呈剂量依赖关系。VES 单独使用可以抑制某些肿瘤细胞的增殖,与 CP 联合使用可以增强 CP 的抗肿瘤活性,即二者可以协同杀伤肿瘤细胞。

4 参考文献:

- [1] Prasad KN, Kumar A, Kochupillai V, Cole WC. High doses of multiple antioxidant vitamins: essential ingredients in improving the efficacy of standard cancer therapy[J]. *J Am Coll Nutr*, 1999, 18(1):13 - 25.
- [2] Neuzil J, Weber T, Gellert N, Weber C. Selective cancer cell killing by alpha-tocopheryl succinate[J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(1):87 - 89.
- [3] Fautrel A, Chesné C, Guillouzo A, de Sousa G, Placidi M, Rahmani RF. A multicentre study of acute *in vitro* cytotoxicity in rat liver cells[J]. *Toxic In Vitro*, 1991, (5):543 - 547.
- [4] Gomez-Lechon MJ, Lopez P, Donato T, Montoya A, Larrauri A, Gimenez P, et al. Culture of human hepatocytes

- from small surgical liver biopsies. Biochemical characterization and comparison with *in vivo*[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1990, **26**(1):67-74.
- [5] Charpentier A, Simmons-Menchaca M, Yu W, Zhao B, Qian M, Heim K, *et al*. RRR-alpha-tocopheryl succinate enhances TGF-beta 1, -beta 2, and -beta 3 and TGF-beta R-II expression by human MDA-MB-435 breast cancer cells [J]. *Nutr Cancer*, 1996, **26**(2):237-250.
- [6] Israel K, Sanders BG, Kline K. RRR-alpha-tocopheryl succinate inhibits the proliferation of human prostatic tumor cells with defective cell cycle/differentiation pathways[J]. *Nutr Cancer*, 1995, **24**(2):161-169.

Vitamin E succinate ester prevents from cytotoxicity of cisplatin in hepatocytes and enhances its antiproliferative activities

LI Qiu-Juan, LU Yong-Ke, ZHONG Lai-Fu*

(Department of Toxicology, Dalian Medical University, Dalian 116027, China)

Abstract: **AIM** To investigate the effects of vitamin E succinate ester (VES) on cytotoxicity of cisplatin (CP) and to explore the possibility of enhancing antitumor activity by the combination of VES and CP. **METHODS** Hepatocytes isolated from rats and humans by two-step perfusions were used to evaluate cytotoxicity of CP and antiproliferative activity of CP in human prostate cancer cell line DU-145 and human colon cancer cell line CCL229; MTT assays were performed to evaluate cell viabilities. **RESULTS** Concentration of CP which inhibited 50% cell growth (IC_{50}) was 2.35 and 4.70 $mg \cdot L^{-1}$ in primary cultures of human and rat hepatocytes, respectively. VES increased

IC_{50} of CP to 6.93 $mg \cdot L^{-1}$ and more than 100 $mg \cdot L^{-1}$, respectively; IC_{50} of CP in DU-145 and CCL229 were 6.36 $mg \cdot L^{-1}$ and 9.58 $mg \cdot L^{-1}$, respectively. VES decreased IC_{50} to 0.58 $mg \cdot L^{-1}$ and 2.43 $mg \cdot L^{-1}$, respectively. **CONCLUSION** VES can decrease CP-induced cytotoxicity in human and rat hepatocytes, and enhance antiproliferative activity of cisplatin in DU-145 and CCL229.

Key words: hepatocytes; tumor cell, cultured; cisplatin; vitamin E succinate ester

* Corresponding author.