

卡介菌多糖对胰腺癌细胞系增殖及凋亡影响的研究

吴翔¹, 高戈², 卓书伟¹

1. 海南省中医院, 海南 海口 570203; 2. 中南大学湘雅医学院检验系

摘要: **目的** 探讨卡介菌多糖对胰腺癌细胞系增殖和抗凋亡机制。 **方法** 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide, MTT) 比色法 MTT 法检测卡介菌多糖对胰腺癌 PANC-1、SW1990、原代细胞的增殖抑制作用; 流式细胞术检测卡介菌多糖对胰腺癌 PANC-1、SW1990、原代细胞的凋亡率。 **结果** 高、中、低浓度的卡介菌多糖组对 PANC-1、SW1990、原代细胞增殖抑制率(高浓度分别为: 9.53±0.82%、10.02±0.95%、9.08±0.78%; 中浓度分别为: 8.84±0.77%、9.62±0.95%、8.18±0.71%; 低浓度分别为: 5.72±0.48%、6.48±0.48%、5.06±0.44%) 明显高于空白对照组的 3.92±0.28%、4.72±0.40%、2.91±0.26% 和卡介菌多糖核酸组的 4.82±0.48%、5.46±0.46%、4.22±0.38%; 卡介菌多糖与吉西他滨联用对 PANC-1、SW1990、原代细胞增殖抑制率分别为 16.54±1.56%、18.28±1.86%、15.88±1.92%, 优于 GEM 或卡介菌多糖单独使用, 也高于卡介菌多糖核酸与吉西他滨联用的 13.82±1.42%、14.88±1.72%、12.32±1.18%, 其差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。在对 PANC-1、SW1990、原代细胞凋亡率方面同样高、中、低浓度的卡介菌多糖组明显高于空白对照组和卡介菌多糖核酸组, 卡介菌多糖与 GEM 联用, 优于 GEM 或卡介菌多糖单独使用, 也高于卡介菌多糖核酸与 GEM 联用, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。 **结论** 卡介菌多糖具有抗肿瘤作用, 其作用效果优于卡介菌多糖核酸, 与吉西他滨联合作用效果更显著。

关键词: 卡介菌多糖; 胰腺癌; 增殖; 凋亡

中图分类号: R392.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2018)09-1046-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2018.09.006

基金项目: 海南省自然科学基金面上项目(818MS159)

作者简介: 吴翔(1972-), 男, 副主任检验师, 主要从事生化免疫工作。

通信作者: 高戈, E-mail: ggboxy@163.com。

效、实用、环保、安全、方便使用、更低成本的最佳氯硝柳胺新剂型产品^[18-19], 是值得大力推广的新型血防灭螺产品。

本次现场灭螺效果观察仅仅观察了 50% 杀螺胺乙醇胺盐悬浮剂小面积机械喷洒杀灭钉螺效果, 未观察大面积机械喷洒杀灭钉螺效果, 并且忽略了对其它底栖生物的影响, 特别是对水生生物(鱼类)的影响还有待于进一步观察, 因为如果在境内推广使用该灭螺药需要考虑到对水产养殖的影响。

参考文献

- [1] 雷正龙, 郑洁, 张利娟, 等. 2010 年全国血吸虫病疫情通报[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(6): 599-604.
- [2] 李胜明, 罗志红, 赵正元, 等. 湖南省 2000-2012 年血吸虫病主要疫情指标的综合分析[J]. 实用预防医学, 2013, 20(12): 1416-1418.
- [3] 中华人民共和国卫生部疾病控制司. 血吸虫病防治手册[M]. 第 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 206.
- [4] 周晓农. 实用钉螺学[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 300-306.
- [5] 中华人民共和国农业部. NY/T 1617-2008 农药登记用杀灭钉螺剂药效试验方法和评价[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 1-20.
- [6] 中华人民共和国卫生部疾病预防控制局. 血吸虫病预防控制工作规范[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 1-20.
- [7] 周艺彪, 依火伍力, 刘刚明, 等. 氯硝柳胺堆敷灭螺法用药剂量的探

- 讨[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 22(4): 374-376.
- [8] 戴建荣, 朱荫昌, 黄铭西. 灭螺药物的研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2000, 12(3): 189-192.
- [9] 戴建荣, 梁幼生, 徐年凤, 等. 氯硝柳胺悬浮剂杀螺效果研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(3): 173-176.
- [10] 鲍子平, 曹淳力, 戴建荣, 等. 26% 四聚·杀螺胺悬浮剂杀螺效果评价[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2011, 23(1): 48-53.
- [11] 操治国, 汪天平. 我国药物灭螺研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2008, 35(5): 276-280.
- [12] 张楚霜, 李广平, 阳桂芬, 等. 氯硝柳胺悬浮剂杀螺效果评价[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(4): 291-293.
- [13] 戴建荣, 徐年凤, 梁幼生, 等. 氯硝柳胺悬浮剂的研制及其杀螺效果评价[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(1): 3-6.
- [14] 陈昌. 我国的杀螺剂及其应用[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(5): 321-322.
- [15] 荆云天, 戴建荣. 杀螺药物氯硝柳胺研究进展[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2010, 22(5): 504-508.
- [16] 谭先玉, 何亮才, 王加松, 等. 湖沼地区不同剂型灭螺药现场灭螺效果观察[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2016, 28(3): 313-318.
- [17] 神学慧, 张联恒, 纪长生, 等. 氯硝柳胺悬浮剂现场喷洒灭螺效果观察[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(1): 3-6.
- [18] 戴建荣, 梁幼生, 徐年凤, 等. 氯硝柳胺悬浮剂杀螺效果研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2003, 15(3): 173-176.
- [19] 元艺, 蔡顺祥, 贺正文. 50% 杀螺胺乙醇胺盐悬浮剂灭螺效果评价[J]. 中国血吸虫病防治杂志, 2017, 29(4): 416-419.

收稿日期: 2017-11-30

Effect of polysaccharide purified from *Bacillus Calmette-Guerin* formulation on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cell lines

WU Xiang*, GAO Ge, ZHUO Shu-wei

* Hainan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Haikou, Hainan 570203, China

Corresponding author: GAO Ge, E-mail: ggboxy@163.com

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of polysaccharide purified from *Bacillus Calmette-Guerin* (BCG) formulation on proliferation and anti-apoptosis of pancreatic cancer cell lines. **Methods** The inhibitory effect of polysaccharide purified from BCG formulation on cell growth of pancreatic cancer cell line PANC-1, SW1990 and primary cells was detected by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Flow cytometry was used to detect the cell apoptosis rates. **Results** The inhibitory rates of PANC-1, SW1990 and primary cell proliferation were respectively $(9.53 \pm 0.82)\%$, $(10.02 \pm 0.95)\%$, $(9.08 \pm 0.78)\%$ in the high-concentration group of purified polysaccharide from BCG formulation, $(8.84 \pm 0.77)\%$, $(9.62 \pm 0.95)\%$, $(8.18 \pm 0.71)\%$ in the medium-concentration group, and $(5.72 \pm 0.48)\%$, $(6.48 \pm 0.48)\%$, $(5.06 \pm 0.44)\%$ in the low-concentration group, which were all significantly higher than those of the blank control group ($(3.92 \pm 0.28)\%$, $(4.72 \pm 0.40)\%$, $(2.91 \pm 0.26)\%$) and BCG-polysaccharide nucleic acid group ($(4.82 \pm 0.48)\%$, $(5.46 \pm 0.46)\%$, $(4.22 \pm 0.38)\%$). The inhibitory rates of PANC-1, SW1990 and primary cell proliferation in the group of purified polysaccharide combined with gemcitabine (GEM) were $(16.54 \pm 1.56)\%$, $(18.28 \pm 1.86)\%$ and $(15.88 \pm 1.92)\%$ respectively, which were superior to those of GEM or purified polysaccharide alone group as well as those of BCG-polysaccharide nucleic acid plus GEM group ($(13.82 \pm 1.42)\%$, $(14.88 \pm 1.72)\%$, $(12.32 \pm 1.18)\%$), with statistically significant differences (all $P < 0.05$). The apoptosis rates of PANC-1, SW1990 and primary cell proliferation were significantly higher in the groups of high-, medium- and low-concentration of purified polysaccharide than in the blank control group and BCG-polysaccharide nucleic acid group. The apoptosis rates of PANC-1, SW1990 and primary cell in the group of purified polysaccharide combined with GEM were superior to those of GEM or purified polysaccharide alone group as well as those of BCG-polysaccharide nucleic acid plus GEM group, showing statistically significant differences (all $P < 0.05$). **Conclusions** The purified polysaccharide from BCG formulation has an anti-tumor effect prevailing against that of BCG-polysaccharide nucleic acid. The efficacy is more remarkable when it is combined with GEM.

Key words: polysaccharide purified from *Bacillus Calmette-Guerin* formulation; pancreatic cancer; proliferation; apoptosis

胰腺癌作为一种常见的消化系统恶性肿瘤,其发病隐匿、进展迅速、恶性化程度高^[1]。近年来,在我国发病率和死亡率呈逐渐上升趋势,2015 年胰腺癌的死亡率已居第六位^[2],术后的 5 年生存率仅为 7%~25%^[3],是预后最差的恶性肿瘤之一。目前临床上对胰腺癌的治疗的主要药物是破坏细胞复制的二氟核苷类抗代谢物抗癌药吉西他滨 (gemcitabine, GEM) 等药物治疗,但是病情缓解率不到 20%^[4]。卡介菌多糖是课题组在卡介菌多糖核酸基础上改进的具有自主知识产权的制剂^[5],其为从卡介菌细胞壁中提取的多糖复合物,其单糖构成有阿拉伯糖、甘露糖、葡萄糖和半乳糖,分子量范围为 2 000~36 000 道尔顿。它可刺激人的免疫系统,通过使多种免疫细胞的活化及细胞因子的产生,发挥免疫调节效应。该制剂在卡介菌多糖核酸的基础成分上,去掉无效的核酸组分,增强了其利用率,可用于防治感冒、哮喘、过敏性疾病、胞内感染性疾病、辅助抗肿瘤治疗。本文用胰腺癌临床常用有效治疗药物 GEM 做对照,阐述研究不同浓度卡介菌多糖对胰腺癌细胞株增殖、凋亡的影响及 bax、bcl-2 在细胞中的表达,有助于进一步探讨其对用于胰腺癌治疗的

可能潜在机制。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂 卡介菌多糖由课题组自行提取,专利号:ZL 201310262024. X^[5];卡介菌多糖核酸(斯奇康)购自九芝堂生物制药公司;GEM 购自江苏豪森药业集团有限公司;PBS (pH7.4 500 ml/瓶, Sigma);MTT Assay 试剂盒 (Sigma),小牛血清购自杭州四季青公司,DMEM 培养基 (北京中山生物公司)。

1.2 仪器 流式细胞仪、超净工作台、CO₂ 培养箱、倒置显微镜、酶标仪。

1.3 细胞 胰腺癌细胞株 PANC-1 (ATCC CRL-1469)、SW1990 (ATCC CRL-2172)、原代培养细胞:收集手术切除人胰腺癌组织,进行胰腺癌细胞的原代培养。先将上述组织块 PBS 漂洗 2 次,无菌组织剪剪成 1 mm³,加入 0.175% IV 型胶原酶、1% 牛血清白蛋白、无血清 DMEM 培养基 37 ℃ 消化过夜。消化离心,加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基分瓶培养,取传代 1 次后的细胞进行下一步处理。

1.4 实验方法

1.4.1 分组 分别将对数生长期的 PANC-1 细胞、SW1900 细胞、原代细胞分为 8 组,即空白对照组、GEM 对照组 (2 $\mu\text{mol/L}$)、卡介菌多糖低浓度组 (5 $\mu\text{mol/L}$)、卡介菌多糖中浓度组 (TMS 10 $\mu\text{mol/L}$)、卡介菌多糖高浓度组 (20 $\mu\text{mol/L}$)、卡介菌多糖核酸对照组 (50 $\mu\text{mol/L}$)、卡介菌多糖 + GEM 组 (10 $\mu\text{mol/L}$)、卡介菌多糖核酸 + GEM 组 (50 $\mu\text{mol/L}$),每组设 6 个复孔。空白对照组细胞仅加入完全培养基 (含 10% 小牛血清 DMEM),其余组细胞加入含有相应设定药物的完全培养基。

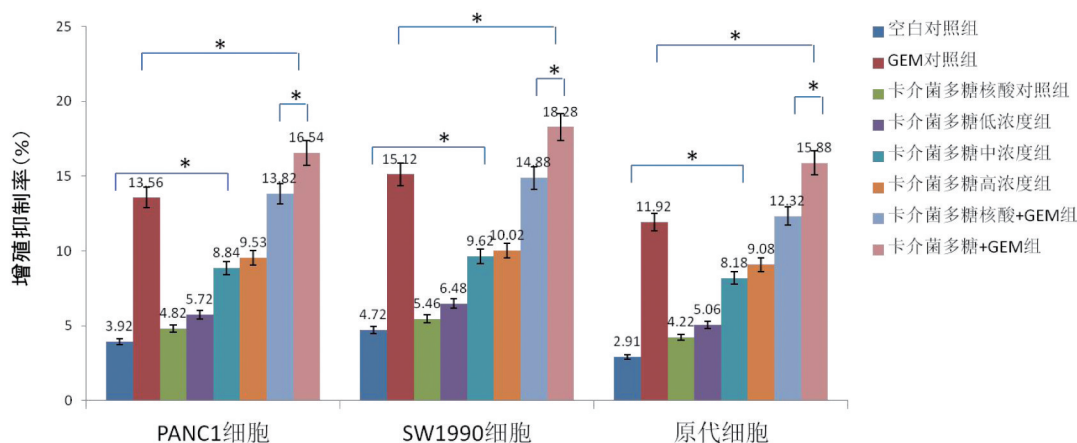
1.4.2 MTT 法检测卡介菌多糖对胰腺癌 PANC-1、SW1900、原代细胞的增殖抑制作用 用含有 10% 新生牛血清的 DMEM 培养基,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞培养箱中分别培养 PANC-1 细胞、SW1900 细胞、原代细胞,并均取其对数生长期,用 0.25% 的胰蛋白酶消化并制备成单细胞悬液,台盼蓝染色法计算活细胞数达 98% 以上时,以每孔 2 000 个细胞密度均匀接种于 96 孔培养板上。常规培养条件下作用 48 h 后,每孔加 MTT 液 20 μl ,继续孵育 4 h,去上清液,每孔加 DM-SO150 μl ,震荡 10 min。用酶标仪测量 490 nm 波长时各孔的光密度 (OD 值)。各组取平均值,并以阴性对照组细胞 (HPC-Y5 细胞) 活力为 100%,计算各组细胞的增殖抑制率 (IR)。IR (%) = $(1 - A_{\text{test}}/A_{\text{control}}) \times 100\%$ 。

1.4.3 流式细胞术检测卡介菌多糖对胰腺癌 PANC-1、SW1900、原代细胞的凋亡率 各组细胞置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,取出培养板,经消化获得细胞悬液。取浓度为 3×10^5 的细胞悬液,加入 5 ml 的 FITC-AnnexinV 及 5 ml 的 PI (浓度 250 mg/ml),混匀置冰浴暗处温育 10 min, PBS 洗 2 遍,上机测定卡介菌多糖对 PANC-1 细胞、SW1900 细胞、原代细胞凋亡的影响。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。对正态分布且齐方差的两样本均数的比较用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法检测卡介菌多糖对胰腺癌 PANC-1、SW1900、原代细胞增殖的影响 高、中、低浓度的卡介菌多糖组对 PANC-1、SW1900、原代细胞增殖抑制率明显高于空白对照组和卡介菌多糖核酸组,差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$),中浓度组为最佳有效剂量;卡介菌多糖与 GEM 联用,抑制效果得到明显效果,优于 GEM 或卡介菌多糖单独使用,也高于卡介菌多糖核酸与 GEM 联用,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。



注:卡介菌多糖+GEM 与 GEM 对照组比较, $P < 0.05$;卡介菌多糖+GEM 与卡介菌多糖核酸+GEM 对照组比较, $P < 0.05$;卡介菌多糖中浓度组与空白组对照比较, $P < 0.05$ 。下同。

图 1 MTT 法检测卡介菌多糖对胰腺癌 PANC-1、SW1900、原代细胞增殖的影响

2.2 流式细胞术检测 TMS 对胰腺癌 PANC-1、SW1900、原代细胞凋亡率的影响 流式 AnnexinV/PI 法检测结果显示:高、中、低浓度的卡介菌多糖组对 PANC-1、SW1900、原代细胞凋亡率明显高于空白对照组和卡介菌多糖核酸组,差异有统计学意义 ($P <$

0.05),其中中浓度组为最佳有效剂量;卡介菌多糖与 GEM 联用,明显致凋亡效果,优于 GEM 或卡介菌多糖单独使用,也高于卡介菌多糖核酸与 GEM 联用,其差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 2。

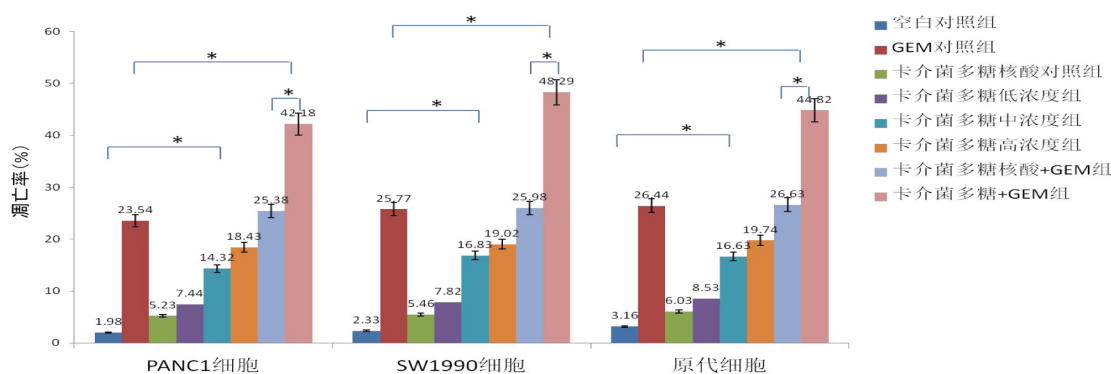


图2 流式细胞术检测 TMS 对胰腺癌 PANC-1、SW1990、原代细胞凋亡率的影响

3 讨论

随着科学技术的不断发展,人们对胰腺癌的认识正在逐渐深入,但因其早期发现少、病程进程迅速、患者预后差,胰腺癌作为恶性程度最高的消化道肿瘤,目前,确诊后的五年生存率低于 5%。自 1997 年以来,吉西他滨作为治疗胰腺癌进展期的一线化疗药物,能缓解患者的临床症状,但耐药现象已十分常见,治疗效果欠佳^[6-7]。胰腺癌因其独特的代谢特征,随着对其代谢组学的不断探索,人们逐渐认识到胰腺癌独特的代谢生物学特征与其本身的癌基因特征及肿瘤微环境中各种细胞的相互作用有关^[8]。近期研究认为糖代谢会影响吉西他滨的耐药,美国埃普利癌症研究中心 Shukla 等^[9]发现,MUC1 可以调节并稳定 HIF-1 α 的表达,从而引起肿瘤细胞非氧化磷酸戊糖途径增加和嘧啶合成增加,增加三磷酸脱氧胞苷的含量,从而竞争吉西他滨的结合位点,使胰腺癌对吉西他滨产生耐药。此外,胰腺癌细胞大范围的表现遗传学改变也与非氧化磷酸戊糖途径相关,特殊的糖代谢活动可以帮助转移的肿瘤细胞迅速适应微环境^[10]。

卡介菌多糖是在卡介菌多糖核酸基础上的改进型制剂,是原湖南医科大学卡介菌多糖核酸研发课题组历经 20 多年科研沉淀,对卡介菌多糖核酸各个组分做进一步研究,挖掘卡介菌细胞壁中的复合多糖对免疫调节的更大作用,从而研发的具有自主知识产权的,作用机制更加具有针对性的一类新型制剂。本研究显示,本品具有抗过敏、抗胞内感染、抗肿瘤等较强的免疫调节药理作用。本文用针对胰腺癌的多种细胞系,研究不同浓度的卡介菌多糖及卡介菌多糖与 GEM 联合用药的方式对其增殖抑制的影响。结果显示:对胰腺癌 PANC1 细胞系,10 $\mu\text{mol/L}$ 的卡介菌多糖的生长抑制率达到了 $(8.84 \pm 2.71)\%$,较卡介菌多糖核酸对照组的 $(4.82 \pm 0.88)\%$ 作用强,差异有统计学意义 ($P <$

0.05);而中浓度卡介菌多糖和 GEM 联合用药,其生长抑制率达到了 $(16.54 \pm 4.62)\%$,明显高于 GEM 组和卡介菌多糖核酸加 GEM 联合用药组的 $(13.56 \pm 4.48)\%$ 和 $(13.82 \pm 4.74)\%$,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。同样,在对 PANC1 细胞的致凋亡作用中也表现出同样的作用。而在对胰腺癌的 SW1990、原代细胞的作用呈同样的影响。证明卡介菌多糖胰腺癌的 PANC-1、SW1990、原代细胞均有诱导其凋亡的作用。但是对于卡介菌多糖是否为具有抗肿瘤细胞作用的化合物,及其是否还有更多的作用和其作用的机制还需要更系统和深入的研究。同时,是否可以通过联合用药更好的解决当前的一线抗癌药物的耐药性也是非常值得研究和探讨的。

参考文献

- [1] Jiang J, Yu C, Chen M, et al. Reduction of miR-29c enhances pancreatic cancer cell migration and stem cell-like phenotype [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(6):2767-2778.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [3] Salman B, Zhou D, Jaffee EM, et al. Vaccine therapy for pancreatic cancer [J]. *Oncoimmunology*, 2013, 2(12):e26662.
- [4] 赵江桥, 薛芝敏, 杨佳平, 等. 胰腺癌相关危险因素的病例对照研究 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(8):1229-1232.
- [5] 高戈, 高梓博, 高洁生. 卡介菌复合多糖及其制备方法和用途 [P]. 中国, ZL 201310262024. X, 2015. 9. 30.
- [6] Lin QJ, Yang F, Jin C, et al. Current status and progress of pancreatic cancer in China [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(26):7988-8003.
- [7] Xu Z, Pothula SP, Wilson JS, et al. Pancreatic cancer and its stroma: a conspiracy theory [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(32):11216-11229.
- [8] Halbrook CJ, Lyssiotis CA. Employing metabolism to improve the diagnosis and treatment of pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(1):5-19.
- [9] Shukla SK, Purohit V, Mehla K, et al. MUC1 and HIF-1 α signaling crosstalk induces anabolic glucose metabolism to impart gemcitabine resistance to pancreatic cancer [J]. *Cancer Cell*, 2017, 32(3):392.
- [10] McDonald OG, Li X, Saunders T, et al. Epigenomic reprogramming during pancreatic cancer progression links anabolic glucose metabolism to distant metastasis [J]. *Nat Genet*, 2017, 49(3):367-376.

收稿日期:2018-04-02