

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2014.04.011

· 基础研究 ·

去甲斑蝥素诱导人食管癌 Ec9706 细胞凋亡及其可能的机制

刘亮, 李慧, 左连富(河北医科大学第四医院 肿瘤研究所 流式细胞室, 河北 石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 研究去甲斑蝥素对人食管鳞癌 Ec9706 细胞的致凋亡作用及其可能的作用机制, 为去甲斑蝥素应用于临床抗癌治疗提供实验依据。**方法:** 不同质量浓度去甲斑蝥素 (0、5、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 分别作用 Ec9706 细胞不同时间 (12、24 和 48 h) 后, MTT 方法检测细胞增殖抑制率, 流式细胞术检测细胞凋亡及 Caspase-3 和 Survivin 蛋白表达的变化。**结果:** 去甲斑蝥素作用后 Ec9706 细胞呈现不同程度的增殖抑制, 而且细胞增殖抑制程度随作用剂量及时间增加不断增强, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 去甲斑蝥素作用 48 h 时, Ec9706 细胞增殖抑制率达 (80.00 \pm 2.15)%。去甲斑蝥素显著诱导 Ec9706 细胞凋亡, 其 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作用 48 h 时, Ec9706 细胞的凋亡率达 (38.57 \pm 1.76)%。去甲斑蝥素作用后, Ec9706 细胞中 Caspase-3 蛋白水平显著增高, 而 Survivin 蛋白水平显著降低 ($P < 0.05$)。**结论:** 去甲斑蝥素明显诱导食管癌 Ec9706 细胞凋亡, 其作用机制可能与下调细胞 Survivin 蛋白及上调 Caspase-3 蛋白表达有关。

[关键词] 食管鳞状细胞癌; Ec9706 细胞; 去甲斑蝥素; 细胞凋亡

[中图分类号] R735.1; R730.59

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2014)04-0419-04

Survivin- and caspase-dependent apoptosis of esophageal cancer Ec9706 cells after norcantharidin exposure

Liu Liang, Li Hui, Zuo Lianfu (Laboratory of FCM Analysis, Tumor Institute, HeBei Medical University-Affiliated Fourth Hospital, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of norcantharidin on apoptosis of esophageal cancer Ec9706 cells and the putative mechanism(s) underlying the effect. **Methods:** Ec9706 cells were treated with norcantharidin at 0, 5, 10, 20 or 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Cell viability was determined by MTT assays and apoptosis, caspase-3 and survivin protein levels in the treated Ec9706 cells were assessed by flow cytometry, respectively, at 12, 24 and 48 h after treatment. **Results:** Norcantharidin inhibited the growth of Ec9706 cells in a dose- and time-dependent manner; the growth inhibition rate was (80.00 \pm 2.15)% at 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 48 h. Norcantharidin induced apoptosis, significantly increased caspase-3 protein level ($P < 0.05$) and significantly decreased survivin protein level ($P < 0.05$) in Ec9706 cells in a dose- and time-dependent manner; the apoptosis rate was 38.57 \pm 1.76% at 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 48h. **Conclusion:** Norcantharidin may induce apoptosis of esophageal cancer Ec9706 cells through downregulation of survivin expression and upregulation of caspase-3 expression.

[Key words] esophageal squamous cell carcinoma; Ec9706 cell; norcantharidin; cell apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2014, 21(4): 419-422]

食管癌是我国较常见的恶性肿瘤, 并且河北省是食管癌的高发区, 发病率及病死率均较高, 严重威胁着人们的生命健康及生活质量。化疗是食管癌治疗的常规方法之一, 但化疗的实际效果并不佳, 主要原因是化疗药物的毒副作用及耐药性的产生, 临床上寻找高效、低毒的抗食管癌药物就显得十分重要。近年来, 从天然产物中寻找抗癌药物的研究受到人们的广泛重视。斑蝥抗癌的主要有效成分为斑蝥素, 对原发性肝癌、乳腺癌、消化道肿瘤有一定疗效,

[基金项目] 河北省自然科学基金资助项目 (No. H2012206107), 河北省普通高等学校强势特色学科肿瘤学建设经费 (No. [2005]52)。Project supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (No. H2012206107), and the Key Specific Discipline Foundation of Higher Institutions of Hebei Province (No. [2005]52)

[作者简介] 刘亮 (1981 -), 男, 河北省永年县人, 博士, 副主任医师, 主要从事食管癌早期诊断及治疗方面研究, E-mail: aliangdaziran@163.com。

[通信作者] 左连富 (Zuo Lianfu, corresponding author), E-mail: zuolianfu4909@sina.com

但由于对泌尿系统等的毒性作用限制了其在临床上的应用。去甲斑蝥素系根据斑蝥素的化学结构,去1,2位甲基全人工合成,不仅具有显著的抗癌作用^[1-3],且毒副作用较小,同时具有升白细胞、保护肝细胞、调节免疫功能等作用,临床上已用于多种恶性肿瘤的治疗^[4,6],但去甲斑蝥素抗食管癌的作用机制并未阐明。本实验通过细胞实验,初步探讨去甲斑蝥素抗食管癌的作用机制,为其应用于临床提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

去甲斑蝥素购自华北制药公司药物研究所,胎牛血清购自杭州四季青公司,鼠抗人单克隆抗体Caspase-3(ZM-0320)、Survivin(ZM-0468)购自北京中杉公司,FITC标记羊抗鼠二抗购自美国Jackson ImmunoResearch公司。Epics-XL II型流式细胞仪购自Beckman-Coulter公司。

1.2 细胞株来源和细胞培养

人食管鳞状细胞癌Ec9706细胞株由中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所分子肿瘤学实验室提供,本实验室传代培养:用含10% FBS的RPMI 1640培养基,于37℃、5% CO₂的饱和湿度培养箱中培养。

1.3 MTT法检测去甲斑蝥素对Ec9706细胞增殖的影响

取对数生长期的Ec9706细胞,调整其细胞密度为 1×10^4 /ml,向96孔板的每孔中加入细胞悬液180 μ l,加入不同质量浓度的去甲斑蝥素20 μ l使其最终质量浓度为(0、5、10、20、40 μ g/ml),同时设立空白对照组,每个质量浓度重复6孔,分别培养12、24和48 h后,每孔滴加MTT溶液(5 mg/ml)20 μ l,37℃培养箱中继续孵育4 h,然后终止培养,小心吸去每孔内的培养上清液。每孔滴加DMSO 200 μ l,轻轻振荡10 min,使结晶充分溶解。在酶联免疫检测仪上调零后测定各孔的490 nm波长光密度(D)值。计算细胞生长抑制率,生长抑制率(%)=(1 - 实验组D值/对照组D值) \times 100%。

1.4 流式细胞术检测去甲斑蝥素对Ec9706细胞凋亡的影响

取对数生长期的Ec9706细胞,调整其细胞密度至 1×10^6 个/ml,分别向每一培养瓶中接种细胞 1×10^6 个,加入不同质量浓度去甲斑蝥素使其最终质量浓度为0、5、10、20 μ g/ml,分别作用24和48 h后,常规收集细胞,PBS洗涤细胞2次,70%乙醇

4℃固定6 h,PBS洗涤细胞2次,加入50 μ g/ml碘化丙啶染液4℃染色30 min,流式细胞仪检测荧光强度。应用Expo32 ADC进行免疫荧光数据分析,以亚二倍体峰代表细胞凋亡峰,计算凋亡率。

1.5 流式细胞术检测去甲斑蝥素对Ec9706细胞中Caspase-3和Survivin蛋白表达的影响

取对数生长期的Ec9706细胞,调整其细胞密度至 1×10^6 /ml,分别向每一培养瓶中接种细胞 1×10^6 个,加入不同质量浓度去甲斑蝥素使其最终质量浓度为0、5、10、20 μ g/ml,分别作用24和48 h后,常规收集细胞,PBS洗涤细胞2次,70%乙醇4℃固定6 h,PBS洗涤细胞2次,分别加入Caspase-3及Survivin抗体100 μ l室温放置30 min,PBS洗涤细胞2次,加入FITC标记的羊抗鼠二抗100 μ l,室温避光放置30 min,PBS洗涤细胞2次,上流式细胞仪检测。应用Expo32 ADC进行免疫荧光数据分析,流式细胞术检测Caspase-3和Survivin蛋白表达水平以平均荧光强度表示。

1.6 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS11.5软件进行统计学分析,多组样本均数比较采用单因素方差分析,其中两两比较采用LSD检验,以 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 去甲斑蝥素明显抑制Ec9706细胞的生长

MTT检测结果(图1)显示,不同质量浓度的去甲斑蝥素(5、10、20、40 μ g/ml)作用Ec9706细胞不同时间(12、24和48 h)后均呈现不同程度的生长抑制作用,且随着药物浓度的增加及作用时间的延长,细胞生长抑制作用越强($P < 0.05$),其中,40 μ g/ml去甲斑蝥素作用48 h,对Ec9706细胞生长的抑制率高达 $(80.00 \pm 2.15)\%$,实验组各浓度作用不同时间与对照组相比,差异均有显著性($P < 0.05$)。

2.2 去甲斑蝥素明显诱导Ec9706细胞凋亡

流式细胞术检测结果(图2)显示,去甲斑蝥素具有诱导Ec9706细胞凋亡作用,且具有剂量和时间依赖性($P < 0.01$)。以20 μ g/ml作用48 h,细胞凋亡率达 $(38.57 \pm 1.76)\%$ 。

2.3 去甲斑蝥素明显增加Ec9706细胞中Caspase-3蛋白的表达

流式细胞术检测结果(图3)显示,去甲斑蝥素作用后,Ec9706细胞中Caspase-3蛋白表达水平呈显著增高趋势,而且具有剂量和时间依赖性。

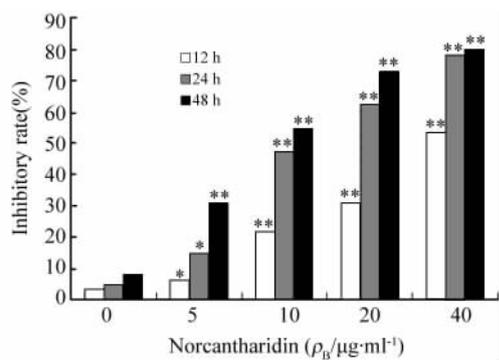


图 1 MTT 方法检测去甲斑蝥素对 Ec9706 细胞生长抑制作用

Fig. 1 Norcantharidin inhibited proliferation of Ec9706 cells as detected by MTT

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 μg/ml group

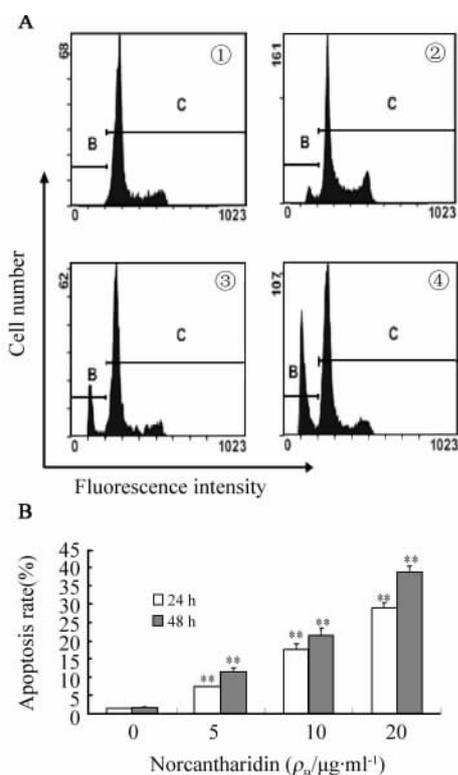


图 2 流式术检测去甲斑蝥素对 Ec9706 细胞诱导凋亡的作用

Fig. 2 Norcantharidin induced apoptosis of Ec9706 cells as detected by FCM

A: Flow cytometry assay; ① 0 μg/ml norcantharidin;

② 5 μg/ml norcantharidin; ③ 10 μg/ml norcantharidin;

④ 20 μg/ml norcantharidin; B: Quantitative analysis of apoptosis

** $P < 0.01$ vs 0 μg/ml group

2.4 去甲斑蝥素明显降低 Ec9706 细胞中 Survivin 蛋白的表达水平

流式细胞术检测结果(图 4)显示,去甲斑蝥素

作用后 Ec9706 细胞中 Survivin 蛋白表达水平呈显著降低趋势,与对照组相比差异具有显著性($P < 0.01$),而且具有剂量和时间依赖性。

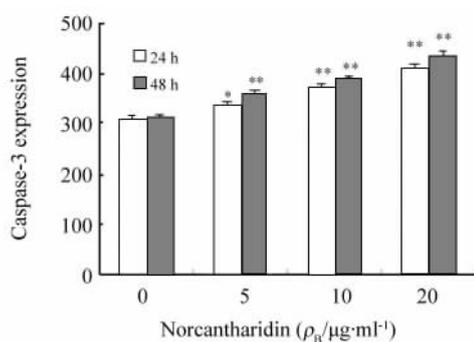


图 3 流式细胞术检测去甲斑蝥素作用后 Ec9706 细胞中 Caspase-3 蛋白表达

Fig. 3 Expression of Caspase-3 protein in Ec9706 cells after treated with norcantharidin as detected by FCM

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 μg/ml group

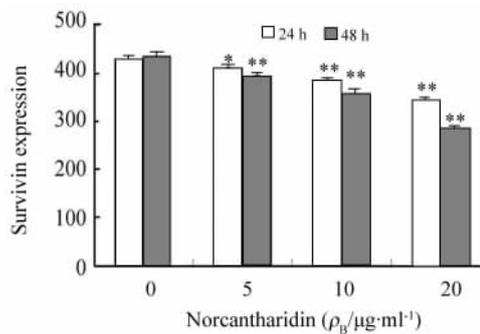


图 4 流式细胞术检测去甲斑蝥素作用后 Ec9706 细胞中 Survivin 蛋白表达

Fig. 4 Expression of Survivin protein in Ec9706 cells after treated with norcantharidin as detected by FCM

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 μg/ml group

3 讨论

去甲斑蝥素系根据斑蝥素的化学结构,由呋喃及顺丁烯二酸酐通过 Diels-Alder 反应合成,与斑蝥素构型相同^[7],但去掉了 1、2 位甲基。去甲斑蝥素毒副作用较小,对泌尿系统基本无刺激性,大量的体内外研究^[8-11]表明,去甲斑蝥素对常见肿瘤细胞生长有抑制作用,同时具有升白、保护肝细胞、调节免疫功能等作用,临床上已用于多种恶性肿瘤的治疗,但其作用机制目前尚未阐明。越来越多的研究者认为,肿瘤细胞周期及凋亡调控紊乱导致肿瘤的发生,寻找诱导肿瘤细胞凋亡的药物也为抗肿瘤药物的研

究开辟了新的途径^[12-14]。本研究探索去甲斑蝥素对食管癌细胞凋亡的影响及其可能的相关机制,为临床上研究去甲斑蝥素抗食管癌机制提供实验基础。

研究发现,去甲斑蝥素具有较强的抑制 Ec9706 细胞生长的作用,且具有时间及剂量依赖性,提示,去甲斑蝥素具有抗食管癌作用。推测去甲斑蝥素抑制食管癌 Ec9706 细胞生长的作用可能与去甲斑蝥素对 Ec9706 细胞诱导凋亡或直接杀伤引起有关,接下来重点研究了去甲斑蝥素诱导 Ec9706 细胞凋亡作用及其可能机制,直接杀伤作用会在以后的实验中进一步研究。去甲斑蝥素具有诱导 Ec9706 细胞凋亡的作用,而且随着去甲斑蝥素浓度的增加及作用时间的延长诱导细胞凋亡作用增强,提示,去甲斑蝥素可以通过诱导 Ec9706 细胞凋亡从而起到抗食管癌的作用。本研究初步探讨了去甲斑蝥素诱导 Ec9706 细胞凋亡的机制。去甲斑蝥素作用 Ec9706 细胞后,细胞中 Caspase-3 蛋白表达水平显著增高而 Survivin 蛋白表达水平显著降低,提示去甲斑蝥素诱导食管癌 Ec9706 细胞凋亡机制可能与调节 Caspase-3 及 Survivin 蛋白表达水平有关。

综上所述,去甲斑蝥素具有抑制食管癌细胞生长作用,与诱导细胞凋亡有关,下调 Survivin 蛋白表达及上调 Caspase-3 蛋白表达水平从而诱导细胞凋亡可能是去甲斑蝥素抗食管癌作用机制,本研究为去甲斑蝥素用于抗食管癌药物提供实验基础。去甲斑蝥素具有低毒高效的特点,作为抗癌药物应用于临床具有广阔的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Yu T, Hou F, Liu M, et al. Norcantharidin anti-angiogenesis activity possibly through an endothelial cell pathway in human colorectal cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(2): 499-503.
- [2] Zhang JT, Fan YZ, Chen CQ, et al. Norcantharidin: A potential antiangiogenic agent for gallbladder cancers in vitro and in vivo [J]. *Int J Oncol*, 2012, 40(5): 1501-1514.
- [3] Zhang L, Ji Q, Liu X, et al. Norcantharidin inhibits tumor angiogenesis via blocking VEGFR2/MEK/ERK signaling pathways [J]. *Cancer Sci*, 2013, 104(5): 604-610.
- [4] Guan M, Zhou Y, Zhu QL, et al. N-trimethyl chitosan nanoparticle-encapsulated lactosyl-norcantharidin for liver cancer therapy with high targeting efficacy [J]. *Nanomedicine*, 2012, 8(7): 1172-1181.
- [5] Lee YC, Lee LM, Yang CH, et al. Norcantharidin suppresses cell growth and migration with enhanced anticancer activity of gefitinib and cisplatin in human non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(1): 237-243.
- [6] Du HF, Yu LJ, Meng YF, et al. Norcantharidin enhances bortezomib-antimyeloma activity in multiple myeloma cells in vitro and in nude mouse xenografts [J]. *Leuk Lymphoma*, 2013, 54(3): 607-618.
- [7] Tarleton M, Gilbert J, Sakoff JA, et al. Synthesis and anticancer activity of a series of norcantharidin analogues [J]. *Eur J Med Chem*, 2012, 54: 573-581.
- [8] Yu CC, Ko FY, Yu CS, et al. Norcantharidin triggers cell death and DNA damage through S-phase arrest and ROS-modulated apoptotic pathways in TSGH 8301 human urinary bladder carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(3): 1050-1060.
- [9] Zhang S, Li G, Ma X, et al. Norcantharidin enhances ABT-737-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by transcriptional repression of Mcl-1 [J]. *Cell Signal*, 2012, 24(9): 1803-1809.
- [10] Yang PY, Chen MF, Kao YH, et al. Norcantharidin induces apoptosis of breast cancer cells: Involvement of activities of mitogen activated protein kinases and signal transducers and activators of transcription [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(3): 699-707.
- [11] Liao HF, Chen YJ, Chou CH, et al. Norcantharidin induces cell cycle arrest and inhibits progression of human leukemic Jurkat T cells through mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of interleukin-2 production [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(1): 206-212.
- [12] Liu L, Zuo LF, Guo JW. Reversal of multidrug resistance by the anti-malaria drug artesunate in the esophageal cancer Eca109/ABCG2 cell line [J]. *Oncol Lett*, 2013, 6(5): 1475-1481.
- [13] 刘亮, 左静, 左连富, 等. 青蒿琥酯诱导食管癌 Eca109 细胞凋亡 [J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(5): 548-553.
- [14] 刘亮, 王静, 郭建文, 等. 青蒿琥酯对人食管癌细胞的抑制作用及其可能的机制 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(3): 278-283.

[收稿日期] 2014-02-28

[修回日期] 2014-06-03

[本文编辑] 阮芳铭, 黄静怡

欢迎访问《中国肿瘤生物治疗杂志》网站 www.biother.org