

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.007

对羟基桂皮醛诱导食管癌 TE-13 细胞分化及其作用机制

单亚楠^{a,b},董佩^b,武一鹏^b,魏思思^b,崔雯莹^b,马鸣^a,赵连梅^a,单保恩^a(河北医科大学第四医院 a. 河北省肿瘤基因诊断、预防和治疗重点实验室; b. 科研中心,河北石家庄 050011)

[摘要] **目的:** 探讨木鳖子单体化合物对羟基桂皮醛(p-hydroxycinnamaldehyde, CMSP)对食管癌细胞株 TE-13 的分化作用及其机制。**方法:** 用流式细胞术检测质量浓度为 10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ 的 CMSP 处理 TE-13 细胞对该细胞凋亡和细胞周期分布的影响,用吉姆萨染色、电镜观察 TE-13 细胞形态学改变,Real-time PCR 和 ELISA 方法检测 TE-13 细胞中肿瘤相关抗原 CEA 和 SCC 的表达,用克隆集落形成实验、Transwell 迁移实验检测不同质量浓度 CMSP 对 TE-13 细胞的增殖、迁移能力的影响,Western blotting 检测 CMSP (20 $\mu\text{g/ml}$)对 TE-13 细胞中 MAPK 通路中各蛋白水平的影响。**结果:** CMSP 可抑制食管癌 Kyse30、TE-13、Eca109 和 Kyse180 细胞的增殖[(1.6 \pm 0.2) $\times 10^4$ vs (3.8 \pm 0.3) $\times 10^4$ 、(1.7 \pm 0.3) $\times 10^4$ vs (4.5 \pm 0.4) $\times 10^4$ 、(2.5 \pm 0.1) $\times 10^4$ vs (4.0 \pm 0.4) $\times 10^4$ 、(1.5 \pm 0.1) $\times 10^4$ vs (2.5 \pm 0.3) $\times 10^4$ 个细胞,均 $P < 0.01$],而对人食管上皮细胞无明显作用($P > 0.05$)。CMSP 处理 TE-13 细胞后:(1) 随 CMSP 质量浓度(10、20、40 $\mu\text{g/ml}$)和处理时间的增加(24、48、72 h), G_0/G_1 期细胞数量均增加、S 期细胞数量减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),但细胞凋亡率无明显变化($P > 0.05$);(2) 细胞出现典型分枝状突起,且随 CMSP 质量浓度增加更显著($P < 0.05$);(3) CEA 和 SCC 水平显著降低($P < 0.01$);(4) 抑制 TE-13 细胞的增殖和迁移能力,诱导细胞分化;(5) p-P38 蛋白水平明显升高($P < 0.01$),而 p-ERK、p-SPKA/JNK 蛋白水平明显降低($P < 0.01$)。**结论:** CMSP 抑制食管癌 TE-13 细胞的增殖、诱导其分化,其作用机制可能与上调 MAPK 信号通路中 p-P38 和下调 p-ERK、p-SPKA/JNK 有关。

[关键词] 对羟基桂皮醛;食管癌;TE-13 细胞;分化;MAPK 通路

[中图分类号] R730.54; R735.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)01-0030-08

p-hydroxycinnamaldehyde induces the differentiation of esophageal carcinoma TE-13 cells

SHAN Yanan^{a,b}, DONG Pei^b, WU Yipeng^b, WEI Sisi^b, CUI Wenxuan^b, MA Ming^a, ZHAO Lianmei^a, SHAN Baoen^a(a. Key Laboratory of Tumor Gene Diagnosis, Prevention and Treatment of Hebei Province; b. Scientific Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of p-hydroxycinnamaldehyde (CMSP), a novel compound extracted from cochinchina momordica seed, on differentiation of esophageal carcinoma TE-13 cells and its possible mechanism. **Methods:** FCM was used to evaluate the effect of CMSP (at concentrations of 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) on the apoptosis and cell cycle distribution of TE-13 cells. Wright-Giemsa staining and electron microscope were used to observe the morphological changes of TE-13 cells. RT-qPCR and ELISA were used to evaluate the expressions of tumor associated antigens CEA (carcino-embryonic antigen) and SCC (squamous cell carcinoma antigen) in TE-13 cells after the treatment with CMSP. Influence of different concentrations of CMSP on proliferation and migration of TE-13 cells were determined by colony forming assay and transwell assay. Western blotting was used to evaluate the expression of the proteins in MAPK pathway of TE-13 cells that treated by CMSP (20 $\mu\text{g/ml}$). **Results:** CMSP significantly inhibited the growth of esophagus cancer

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目(No. 81502032);河北省医学科学研究重点课题计划项目(No. 20120120)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China for Young Scholars (No. 81502032), and the Key Project of Medical Science Research in Hebei Province (No. 20120120)

[作者简介] 单亚楠(1992-),女,硕士生,主要从事抗肿瘤中药的研究,E-mail: yananshanchina@163.com

[通信作者] 单保恩(SHAN Bao en, corresponding author),博士,教授,博士生导师,主要从事肿瘤免疫学、基因诊断、抗肿瘤中药和生物治疗研究,E-mail: shanbaoen@163.com

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20170110.1509.010.html>

cell lines Kyse30, Te-13, Eca109 and Kyse180 ($[1.6 \pm 0.2] \times 10^4$ vs $[3.8 \pm 0.3] \times 10^4$, $[1.7 \pm 0.3] \times 10^4$ vs $[4.5 \pm 0.4] \times 10^4$, $[2.5 \pm 0.1] \times 10^4$ vs $[4.0 \pm 0.4] \times 10^4$, $[1.5 \pm 0.1] \times 10^4$ vs $[2.5 \pm 0.3] \times 10^4$, all $P < 0.01$), but had no significant effect on normal esophageal epithelial cells ($P > 0.05$). After the treatment with CMSP, (1) the number of TE-13 cells at G₀/G₁ phase increased in a dose (10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) and time (24, 48, 72 h) dependent manner ($P < 0.01$, $P < 0.05$), while the number of cells at S phase decreased ($P < 0.01$, $P < 0.05$); however, the apoptosis rate showed no obvious change ($P > 0.05$); (2) TE-13 cells showed typical dendrite-like cellular protrusions, and the percentage of such elongated cells was significantly and progressively increased with the increase in CMSP concentration ($P < 0.05$); (3) the expressions of CEA and SCC in TE-13 cells significantly decreased ($P < 0.01$); (4) CMSP significantly inhibited the proliferation and migration ability of TE-13 cells and induced cell differentiation; (5) the protein level of p-P38 was significantly increased while protein levels of p-ERK, p-SPKA/JNK were significantly decreased in TE-13 cells ($P < 0.01$). **Conclusion:** CMSP suppressed TE-13 cell proliferation and induced the differentiation of TE-13 cells by up-regulating the level of p-P38 and down-regulating the levels of p-ERK, p-SPKA/JNK in MAPK signaling pathway.

[**Key words**] p-hydroxycinnamaldehyde; esophageal carcinoma; TE-13 cell; differentiation; MAPK pathway

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(1): 30-37. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.01.007]

食管癌是消化系统恶性肿瘤之一,每年全世界新发患者约为 477 900 人^[1-2]。尽管手术、放化疗是食管癌治疗的主要方法,但食管癌患者 5 年病死率仍大于 60%^[2-3]。已有研究^[3-6]表明,一些药剂如全反式维甲酸(all-transretinoic acid, ATRA)、组织型纤溶酶原激活剂(tissue plasminogen activator, TPA)、福司柯林(forskolin)具有诱导包括食管癌在内的肿瘤细胞的分化功能。然而,从中草药中提取的化学制剂却鲜见报道。木鳖子(*Cochinchina momordica seed*, CMS)为葫芦科苦瓜属植物木鳖的干燥成熟种子,主要功效为消肿散结、解毒和追风止痛。有研究^[7-8]表明,CMS 可能在免疫应答中起作用,已被广泛用于多种癌症的治疗,但其作用机制尚未明了。木鳖子单体化合物对羟基桂皮醛(p-hydroxycinnamaldehyde, CMSP)是木鳖子醇提取物中重要成分。笔者以往研究^[9]发现,CMSP 通过诱导黑色素瘤细胞 B16 分化,抑制其增殖,并且 MAPK 信号通路可能参与其中。本课题通过观察 CMSP 对食管癌细胞株 TE-13 增殖、分化的影响,探讨其抗肿瘤的作用机制,为其抗肿瘤临床应用提供参考依据。

1 材料与方 法

1.1 细胞系、试剂与仪器

人食管癌细胞株 Kyse30 及正常人食管上皮细胞株 HEEC 由中国医学科学院肿瘤医院国家肿瘤分子生物学重点实验室赠送,TE-13、Eca109 细胞购自中国科学院上海生命科学研究细胞资源中心。中药木鳖子购自石家庄乐仁堂药店(中国河北省,经华北制药集团新药研发中心任凤芝教授鉴定为正品)。CMSP 采用本课题组以往提取方法提取并鉴

定。RPMI 1640、胎牛血清和 PBS 购自 Gibco-BRL 公司,ATRA 购自 Sigma 公司,CEA 和 SCC ELISA 试剂盒购自 Invitrogen 公司,全 p44/42MAPK (ERK1/2)、p-p44/42 (ERK1/2)、全 SAPK/JNK、p-SAPK/JNK、p38MAPK、p-p38MAPK 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司, β -actin 抗体购自 Abcam 公司,TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司。Go Taq[®] qPCR Master Mix 购自 Promega 公司,RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kits 购自 MBI Fermentas 公司,Annexin V fluorescein isothiocyanate (FITC)和 PI 购自 BD Pharmingen 公司。

1.2 细胞培养

所有细胞系培养于 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,含 100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养。以 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞并传代,每 1~2 d 换液 1 次,取对数生长期的细胞用于实验。

1.3 流式细胞术检测 CMSP 对 TE-13 细胞凋亡和周期的影响

FITC 和 PI 双染检测细胞凋亡,细胞周期分析用 PI 染色。TE-13 单细胞悬液 100 μl (细胞数量为 1×10^6)分别与 70% 冰乙醇混合,核糖核酸酶 A 处理。PI 染色,冰乙醇细胞悬液 15 min,流式细胞仪进行荧光激活细胞分选术(FACS)分析。

1.4 光镜下观察 TE-13 细胞的增殖与分化

将 TE-13 细胞以 5×10^4 个细胞/孔接种于 6 孔板,检测 CMSP 对细胞分化影响。CMSP 处理细胞 72 h 后,4% 多聚甲醛室温固定 15 min,吉姆萨染色 30 min,光镜下观察细胞增殖与分化(细胞分化率:胞质多于 3 个胞体的细胞数与细胞总数的比值)。

1.5 扫描电镜下观察 CMSP 处理后 TE-13 细胞的形态

将指数增长期 TE-13 细胞以 1×10^6 个细胞/孔接种于 6 孔板,CMSP(20 $\mu\text{g/ml}$)或 ARTA(1×10^{-5} mmol/L)处理 48 h。常规制片、干燥和涂金,在 S-3500 n SEM 电镜下观察 TE-13 细胞的形态。

1.6 Real-time PCR 检测 TE-13 细胞 CEA 和 SCC mRNA 转录水平

用 TRIzol 试剂从 TE-13 细胞提取总 RNA。RNA 浓度常规使用分光光度计测量,质量经琼脂糖凝胶电泳和溴化乙锭染色检测。将 1 μg 总 RNA 反转录成单链 cDNA,cDNA 特异性引物 $\beta\text{-actin}$:Forward 5'-GTTGTGATGGGTTCTGA-3', Reverse 5'-GAGCAATAGCGTCTGTG-3'; CEA: Forward 5'-CGCTGAGTTCCTGCGTACC-3', Reverse 5'-TCTGCGGTGCTGTTGTGG-3'; SCC: Forward 5'-GGCTC GATTGTTATTCCAC-3', Reverse 5'-GGTGTAGAATTAAGAATAGC-3'进行 Real-time PCR 扩增。每个目标基因的表达量用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示, $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{实验组目标基因 Ct 值} - \text{实验组 } \beta\text{-actin Ct 值}) - (\text{对照组目标基因 Ct 值} - \text{实验组 } \beta\text{-actin Ct 值})$ 。实验重复 3 次。

1.7 克隆形成实验检测 CMSP 对 TE-13 细胞克隆形成能力的影响

分别用 1 ml 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基重悬细胞接种于 6 孔板(500 个/孔),在含 5% CO_2 的湿润环境培养 10 d,每 72 h 换液。此后,常规固定、2% 结晶紫染色、光镜下计数。

1.8 Transwell 小室法检测 TE-13 细胞的迁移能力

肿瘤细胞迁移实验在一个 24 孔 Transwell 小室中进行,其中包含一个 8 μm 孔径的聚碳酸酯膜过滤器。调整经 CMSP 不同质量浓度(0、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$)处理后,用 400 μl 无胎牛血清的 RPMI 1640 培养基重悬细胞,接种于上层小室(2×10^5 个/小室)。下层小室加 600 μl 含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在含 5% CO_2 的湿润环境培养 24 h。用棉签擦去小室上层细胞,并用 PBS 清洗。小室下

层细胞用 4% 多聚甲醛固定,并用 1% 结晶紫染色 5 min。下层细胞即为迁移细胞,每个小室在 200 倍下计数 5 个任意区域。

1.9 ELISA 检测 TE-13 细胞的 CEA 和 SCC 蛋白水平

将 TE-13 细胞接种于 6 孔板(2×10^5 个/孔),分别用 0、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$ CMSP 处理,于 37 $^\circ\text{C}$ 5% CO_2 条件下培养。分别于 24、48、72 h 收集上清,根据 ELISA 说明书操作检测 CEA 和 SCC 蛋白水平。实验重复 3 次。

1.10 Western blotting 检测 TE-13 细胞中 MAPK 信号通路相关蛋白

取对数生长期 TE-13 细胞,加入终质量浓度为 20 $\mu\text{g/ml}$ 的 CMSP,置于 37 $^\circ\text{C}$ 培养箱中培养不同时间后,分别提取各组细胞总蛋白,并检测各组相关蛋白相对量。蛋白样品 40 μg ,经 SDS-PAGE 分离、转膜、封闭 2 h 后,分别加入 P-38、p-P38、ERK1/2、p-ERK、SAPK/JNK、p-SPKA/JNK、 $\beta\text{-actin}$ 抗体,4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜,TBST 洗膜 3 次,加入二抗(1:10 000)后室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,膜经 Odyssey 红外成像系统分析。实验重复 3 次。

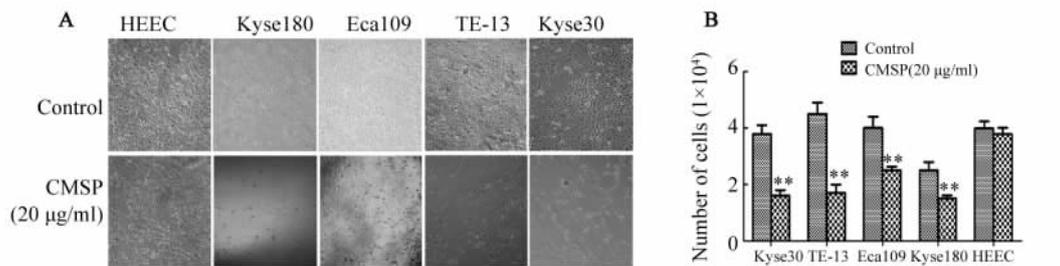
1.11 统计学处理

使用 SPSS 13.0 统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用两独立样本 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 SNK-q 检验;计数资料采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CMSP 抑制多种食管癌细胞的增殖

CMSP 对食管癌细胞系 Kyse30、TE-13、Eca109 和 Kyse180 细胞增殖均有抑制作用($P < 0.01$),而对正常人食管上皮细胞无影响($P > 0.05$,图 1)。因 CMSP 对 TE-13 细胞抑制作用明显,故后续实验选择该细胞。



** $P < 0.01$ vs control group

A:CMSP changes morphology of esophageal cancer cells and esophageal epithelial cells ($\times 100$); B:CMSP inhibits cell number

图 1 CMSP 对食管癌细胞株增殖的抑制作用

Fig.1 Inhibitory effects of CMSP on proliferation of esophageal cancer cell lines

2.2 CMSP 将 TE-13 细胞阻滞在 G_0/G_1 期而对其凋亡无影响

流式细胞术检测 Annexin V/PI 染色 TE-13 细胞凋亡数, 与对照组相比, CMSP 处理组 Annexin V-FITC(+) 细胞数量没有明显改变 ($P > 0.05$) (图

2)。流式细胞术检测结果(图 3)显示, 随着药物浓度和时间的增加, CMSP 可分别增加 G_0/G_1 期细胞数量、减少 S 期细胞数量(分别为 $P < 0.01$ 和 $P < 0.05$)。结果表明, CMSP 可以将细胞周期阻滞在 G_1 期。

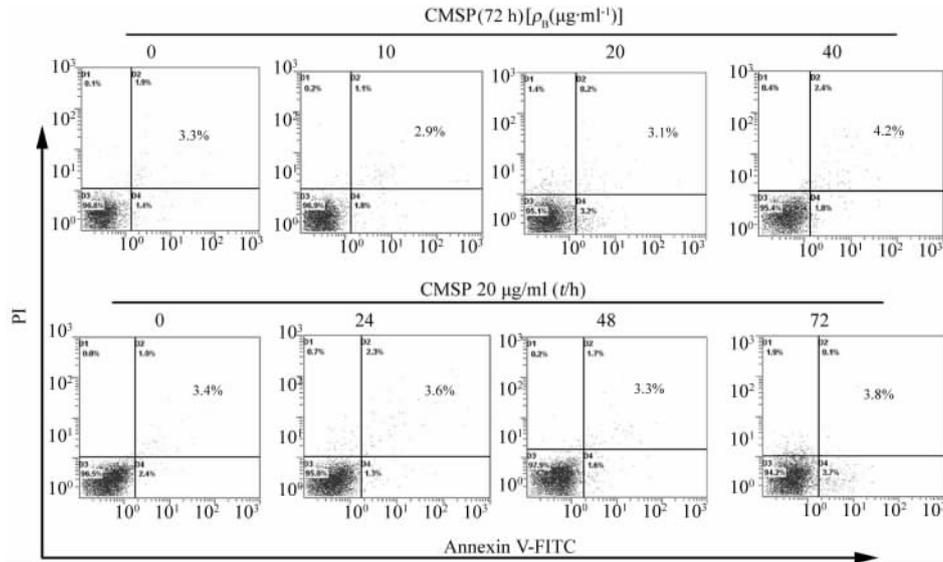
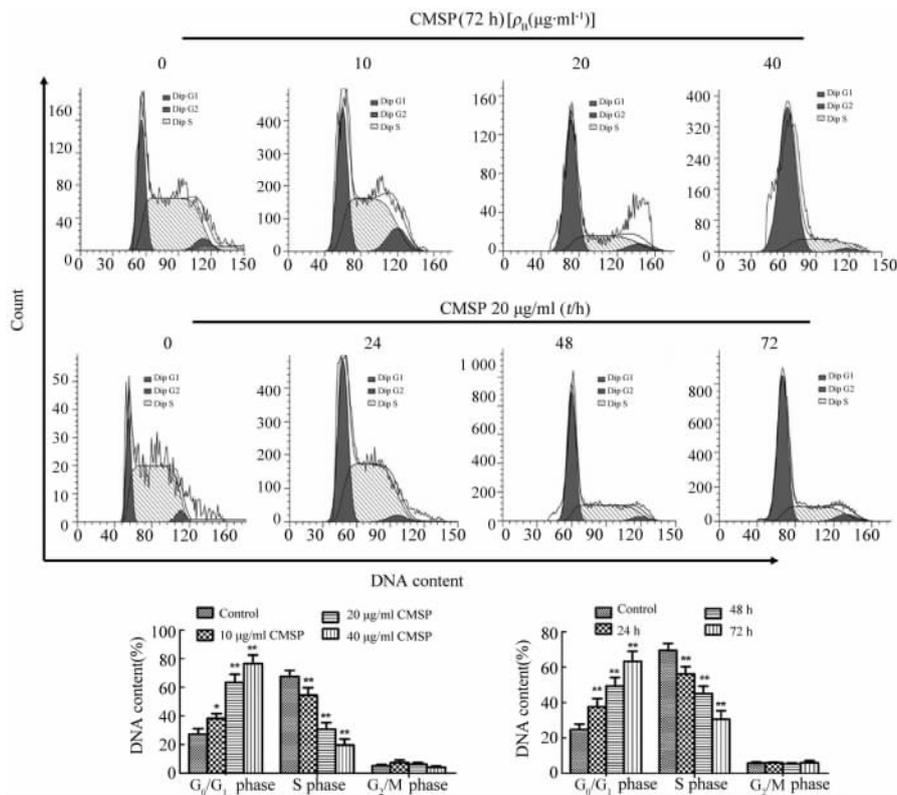


图 2 CMSP 对食管癌 TE-13 细胞凋亡的影响
Fig. 2 Effects of CMSP on apoptosis of TE-13 cells



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

图 3 CMSP 对食管癌 TE-13 细胞周期的影响
Fig. 3 Effects of CMSP on cell cycle distribution of TE-13 cells

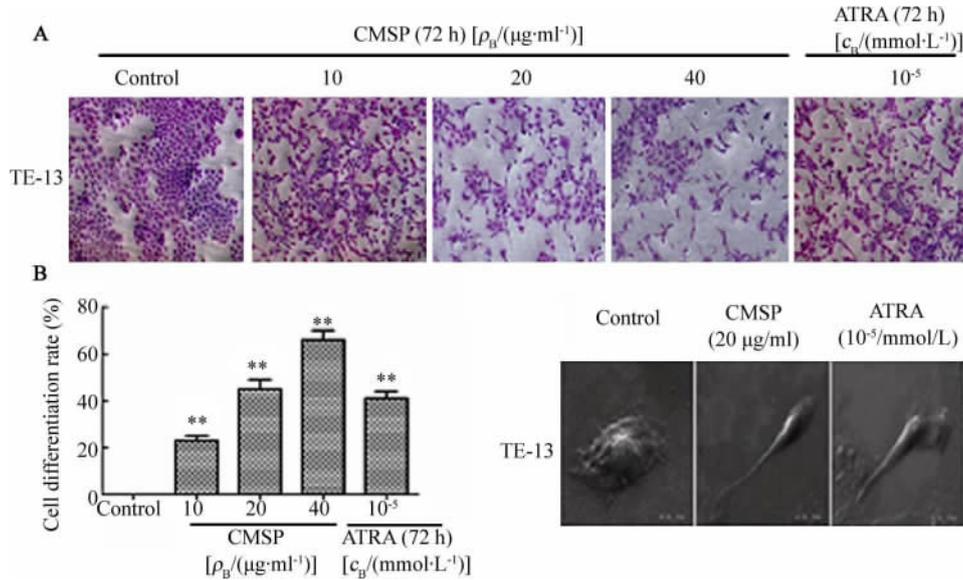
2.3 CMSP 对食管癌 TE-13 细胞形态的影响

吉姆萨染色结果(图 4A)显示, 10 ~ 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 CMSP 处理后, 光镜下细胞呈现典型分枝状细胞突起, 并随 CMSP 浓度增加其突起更加明显、数目也增多(图 4B)。扫描电镜(图 4C)下也证实 CMSP 处理后的 TE-13 细胞具有典型分枝状细胞突起。

2.4 CMSP 对 TE-13 细胞 CEA 和 SCC mRNA 表达

的影响

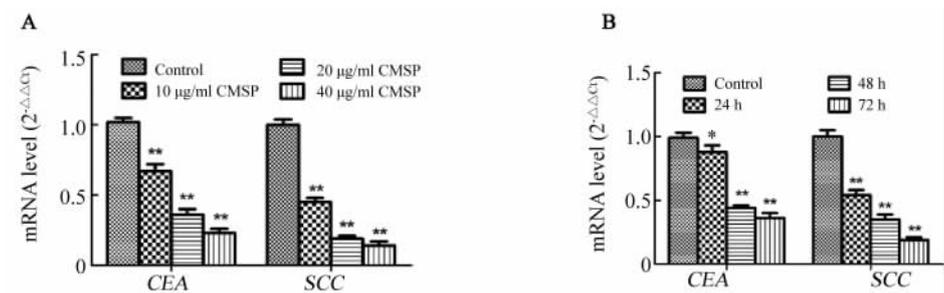
Real-time PCR 检测结果(图 5)显示, 10、20、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CMSP 处理 24、48、72 h 后的 TE-13 细胞中 CEA 和 SCC mRNA 表达水平显著低于对照组, 且呈时间和剂量依赖性。此外, 经 CMSP 处理后 TE-13 细胞上清中 CEA 和 SCC 蛋白含量也显著降低(图 6)。



A: Morphology(Giemsa staining, $\times 400$); B: Differentiation rate; C: SEM photographs($\times 1\ 500$)
** $P < 0.01$ vs control group

图 4 CMSP 处理后 TE-13 细胞分化和形态的变化

Fig. 4 Changes of morphology and differentiation of TE-13 cells after treatment with CMSP



A: CMSP(10, 20, 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated TE-13 cells for 72 h ; B: CMSP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treated TE-13 cells for 24, 48, 72 h
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group

图 5 CMSP 处理后 TE-13 细胞 CEA 和 SCC mRNA 表达

Fig. 5 Expressions of CEA and SCC mRNA in TE-13 cells after CMSP treatment

2.5 CMSP 抑制 TE-13 克隆形成和迁移能力

在体外, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CMSP 处理后, TE-13 细胞的克隆数量显著低于对照组[(88. 67 \pm 1. 53) vs (207. 00 \pm 2. 52)个, $P < 0. 01$]。细胞迁移实验结果(图 7)显示, 经 10、20 和 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CMSP 处理后,

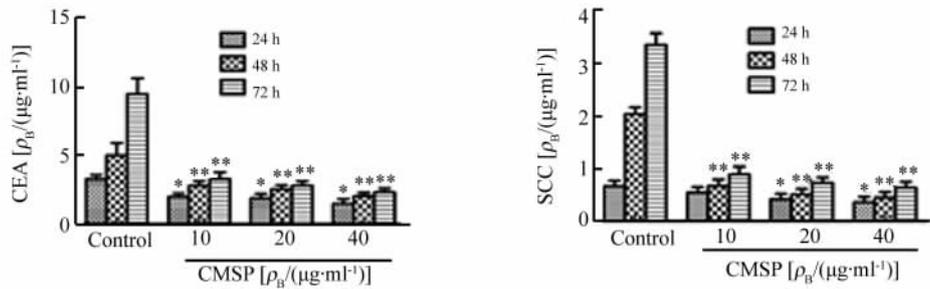
TE-13 细胞迁移数量明显低于对照组($P < 0. 05$ 或 $P < 0. 01$)。

2.6 MAPK 信号途径参与 CMSP 诱导 TE-13 细胞的分化

20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CMSP 处理 TE-13 细胞 0、30、60、90

min 后, p-P38 蛋白水平明显升高, p-ERK、p-SPKA/JNK 蛋白水平明显降低(图 8); 而 P-38、ERK1/2、SAPK/JNK 蛋白水平无明显改变。因此, MAPK 信

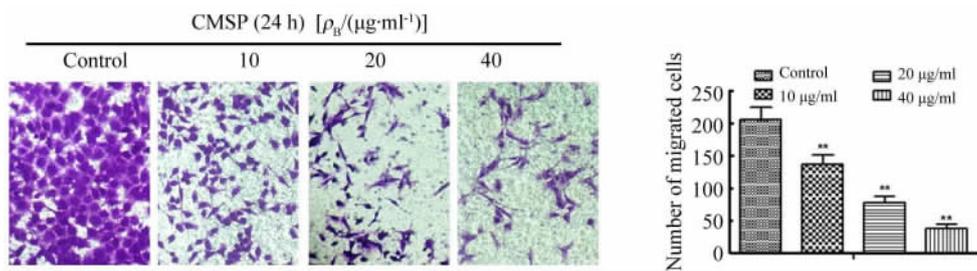
号途径可能参与 CMSP 诱导 TE-13 细胞的分化过程。



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

图 6 CMSP 处理对 TE-13 细胞上清中 CEA 和 SCC 蛋白水平的影响

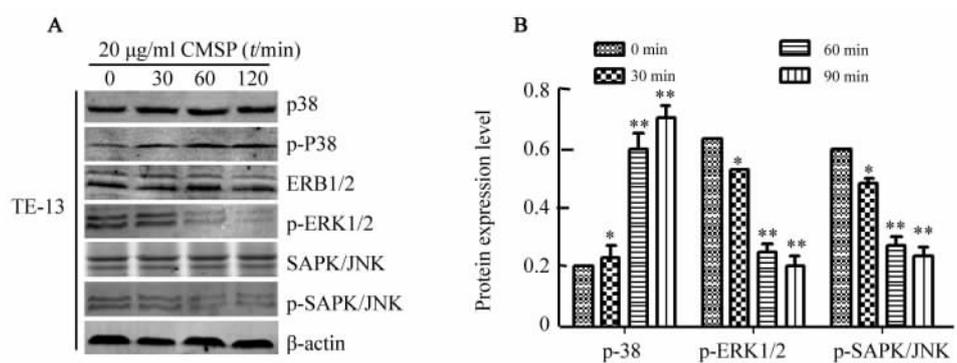
Fig. 6 Effects of CMSP on CEA and SCC protein levels in supernatant of TE-13 cells



** $P < 0.01$ vs control group

图 7 CMSP 对 TE-13 细胞迁移能力的影响

Fig. 7 Effects of CMSP on the migration of TE-13 cells



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

图 8 CMSP 对 TE-13 细胞中 MAPK 信号通路蛋白水平的影响

Fig. 8 Effects of CMSP on expressions of MAPK signaling pathway related proteins in TE-13 cells

3 讨论

使用诱导癌细胞分化的试剂是一种潜在的毒性较低的治疗癌症的方法,称为“分化疗法”,已成为一种新的治疗癌症的方法^[8]。笔者以往的研究^[9]

表明,CMSP 能在体外和体内抑制黑色素瘤细胞 B16 增殖并诱导其分化。CMSP 抑制增殖,阻滞细胞周期,诱导细胞分枝,并减少肿瘤标志物的表达。既往研究^[3-5]发现,cAMP 增强剂、ATRA、TPA 和毛喉素能够诱导食管癌细胞分化。本研究首次阐释了

CMSP是潜在的能够诱导食管癌细胞分化和抑制其增殖、转移的中草药提取物,发现 10 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ 的 CMSP 均能有效抑制 TE-13 细胞的增殖,且呈剂量和时间依赖性;CMSP 处理后其细胞周期被阻滞在 G_0/G_1 期,但并不影响细胞的凋亡。结果表明,CMSP对 TE-13 细胞增殖活性的影响并不包括诱导其凋亡。

病理学家们研究细胞分化与形态特征的关系已经有一百多年^[8-19]。在本研究中,10 ~ 40 $\mu\text{g/ml}$ CMSP 处理 TE-13 细胞 24、48 和 72 h 后细胞生长出树突状突起。电镜下观察到的分枝状轮廓可以确定为细胞的形态改变。CMSP 处理的细胞中肿瘤相关抗原 CEA 和 SCC mRNA 和蛋白水平均减少,提示食管癌细胞逐渐失去了其恶性表型。此外,TE-13 细胞的细胞集落形成能力和迁移能力在 CMSP 处理后均减弱,同时证实了其诱导分化作用。

为了深入研究 CMSP 诱导 TE-13 细胞分化的机制,分析了 MAPK 信号转导途径的活化。众所周知,MAPK 途径(如 ERK 1/2、SAPK/JNK、P38 MAPK 激酶或 ERK5/BMK)在包括食管癌细胞在内的各种癌细胞的分化中起重要作用^[20-23]。有研究^[8,23]证实,P38 激酶的活化和 ERK 及 SAPK/JNK 途径的抑制都可刺激各种肿瘤细胞分化。在笔者以往的研究^[8]中,经 CMSP 处理的黑色素瘤细胞 B16 中检测到 P38 MAPK 活性增强,而 ERK1/2、SAPK/JNK 活性降低。本研究中也得到了相同结果,表明 p-ERK1/2 和 p-SAPK/JNK 活性降低和 p-P38 MAPK 的活性增强是 CMSP 诱导食管癌细胞分化的重要机制之一。

总之,CMSP 对食管癌细胞的增殖、转移具有明显的抑制作用,并能诱导其分化。因而 CMSP 可能成为临床治疗食管癌的潜在药物。

[参 考 文 献]

[1] CHEN W, ZHENG R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.

[2] ZHAO L, YAN X, SHI J, et al. Ethanol extract of forsythia suspensa root induces apoptosis of esophageal carcinoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(2):871-880. DOI:10.3892/mmr.2014.2874.

[3] LU T Y, LI W C, CHEN R Y, et al. Inhibition effects of all trans-retinoic acid on the growth and angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma in nude mice[J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(17): 2708-2714. PMID: 22040429.

[4] OZAWA A, LICK A N, LINDBERG I. Processing of proaugarin is required to suppress proliferation of tumor cell lines[J]. Mol En-

docrinol, 2011, 25(5): 776-778. DOI: 10.1210/me.2010-0389.

[5] ZHANG X D, XIE J J, LIAO L D, et al. 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induces up-regulated transcription of variant 1 but not variant 2 of VII2 in esophageal squamous cell carcinoma cells via ERK1/2 /AP-1/Sp1 signaling[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(4): e0124680 [2016-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4411055/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0124680.

[6] HATA K, HORI K, TAKAHASHI S, et al. Role of p38 MAPK in lupeol-induced B16 2F2 mouse melanoma cell differentiation[J]. J Biochem, 2003, 134(3):441-445. PMID:14561730.

[7] XIAO C, RAJPUT Z I, LIU D, et al Enhancement of serological immune responses to foot-and-mouth disease vaccine by a supplement made of extract of cochinchina momordica seeds[J]. Clin Vaccine Immunol, 2007, 14(12):1634-1639. DOI: 10.1128/CVI.00339-07

[8] ZHAO L M, HAN L N, REN F Z, et al. An ester extract of cochinchinamomordica seeds induces differentiation of melanoma B16 F1 cells via MAPK signaling[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2012, 13(8):3795-3802.

[9] ZHAO L M, SUN G G, HAN L N, et al. P-hydroxycinnamaldehyde induces B16-F1 melanoma cell differentiation via the RhoA-MAPK signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(6): 2247-2260. DOI: 10.1159/000445580.

[10] ZHANG J, ZHU Z, LIU Y, et al. Diagnostic value of multiple tumor markers for patients with esophageal carcinoma[J/OL]. PLoS One, 2015, 10(2):e0116951 [2016-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC433286/>. DOI:10.1371/journal.pone.0116951.

[11] WANG X B, JIANG X R, Yu X Y, et al. Macrophage inhibitory factor 1 acts as a potential biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma and is a target for antibody-based therapy [J]. Cancer Sci, 2014, 105(2): 176-185. DOI: 10.1111/cas.12331.

[12] CAO X, ZHANG L, FENG G R, et al. Preoperative Cyfra21-1 and SCC-Ag serum titers predict survival in patients with stage II esophageal squamous cell carcinoma[J/OL]. J Transl Med, 2012, 10:197 [2016-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3548759/>. DOI: 10.1186/1479-5876-10-197.

[13] BECK T N, CHICWEM A J, SOLANKI N R, et al. Bioinformatic approaches to augment study of epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer[J]. Physiol Genomics, 2014, 46(19): 699-724. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00062.2014.

[14] LI P, LIU X, DONG Z M, et al. Epigenetic silencing of HIC1 promotes epithelial-mesenchymal transition and drives progression in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Oncotarget, 2015, 6(35): 38151-38165. DOI: DOI:10.18632/oncotarget.5832.

[15] OVERALL C M, DEAN R A. Degradomics: systems biology of the protease web. Pleiotropic roles of MMPs in cancer[J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(1):69-75. DOI: 10.1007/s10555-006-7890-0.

[16] JAYAKUMAR T, CHIU C C, WANG S H, et al. Anti-cancer

- effects of CME-1, a novel polysaccharide, purified from the mycelia of *Cordyceps sinensis* against B16-F10 melanoma cells[J]. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10(1): 43-49. DOI: 10. 4103/0973-1482. 131365.
- [17] SANCHEZ-MIR L, SOTO T, FRANCO A, et al. Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast[J/OL]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e88020[2016-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3909290/>. DOI: 10. 1371/journal.pone.0088020.
- [18] MUSCELLA A, VETRUGNO C, CALABRISO N, et al. [Pt (O, O'-acac) (γ -acac) (DMS)] alters SH-SY5Y cell migration and Invasion by the inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 occurring through a PKC- ϵ /ERK/mTOR pathway[J/OL]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0118490[2016-08-10]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4221608/>. DOI: 10. 1371/journal.pone.0112186.
- [19] SHAMSARA J. A study on drug ability of MIA as a promising approach for inhibition of metastasis[J]. *Int J Comput Biol Drug Des*, 2014, 7(1): 80-95. DOI: 10. 1504/IJCDD. 2014. 058594.
- [20] BRUMBY A M, GOULDING K R, SCHLOSSER T, et al. Identification of novel Ras-cooperating oncogenes in *Drosophila melanogaster*: a Rho GEF/Rho-family/JNK pathway is a central driver of tumorigenesis[J]. *Genetics*, 2011, 188(1): 105-125. DOI: 10. 1534/genetics. 111. 127910.
- [21] ROTTMAR M, MHANNA R, GUIMOND-LISCHER S, et al. Interference with the contractile machinery of the fibroblastic chondrocyte cytoskeleton induces re-expression of the cartilage phenotype through involvement of PI3K, PKC and MAPK[J]. *Exp Cell Res*, 2014, 320(2): 175-187. DOI: 10. 1016/j. yexcr. 2013. 11. 004.
- [22] MOON M Y, KIM H J, KIM J G, et al. Small GTPase Rap1 regulates cell migration through regulation of small GTPase RhoA activity in response to transforming growth factor- β 1[J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(11): 2119-2126. DOI: 10. 1002/jcp. 24383.
- [23] DING Q, WANG Q, Evers B M. Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 284(2): 282-288. DOI: 10. 1006/bbrc. 2001. 4969.
- [收稿日期] 2016 - 08 - 18 [修回日期] 2016 - 11 - 15
[本文编辑] 党瑞山

· 科技动态 ·

抑制 DNA 拓扑异构酶 I 可抑制炎性基因的表达并保护机体免受炎症损伤

固有免疫反应是机体抵御病原微生物的第一道防线。机体感染病原微生物后,有许多基因的转录和表达异常与过度炎症导致的组织损伤相关。来自美国西奈山伊坎医学院的 Marazzi 研究团队在对 DNA 拓扑异构酶 I (DNA topoisomerase I, Top I) 的研究中发现, Top I 能够在病原微生物感染后特异地地上调 RNA 聚合酶 II 的转录活性,从而引起过度炎症反应和组织损伤。

该研究通过筛选 9 种靶向染色质结构的化学抑制剂,在流感和 SEV 病毒感染模型中发现 FVD、JQ-1 和 CPT 这三种抑制剂随着浓度的增加能够显著抑制 IFN- β 的转录。通过质谱分析也验证了 Top I 的抑制剂(CPT)可使相关蛋白的表达显著下降。并且在干扰了 Top I 后,用芯片检测到了 84 种表达明显下调的基因,发现这些基因与炎症细胞因子和干扰素诱导基因的表达密切相关,但是管家基因的表达没有显著变化。

随后,通过检测感染模型中病毒的复制水平进一步发现, Top I 的降低使 IFN 诱导基因的表达显著降低的同时,并没有影响病毒复制水平。而且通过 ChIP-Seq 检测发现 RNA 聚合酶 II 只有在 IFN 诱导基因启动子区域的富集会随着 Top I 的抑制而显著降低。有 75% 受到 Top I 影响基因的表达激活是依赖核小体重塑复合体的。该研究还采用细菌和外源细胞因子感染和刺激细胞后发现,诱导引起细胞因子的表达在使用 Top I 抑制剂后有显著降低。而且,这些炎症相关细胞因子启动子区域的 RNA 聚合酶 II 和 Top I 的表达水平在 Top I 抑制后也会降低。所以对 Top I 的抑制能够广谱地降低机体对外源感染的炎症反应水平。

在小鼠细菌感染模型中,研究者发现在抑制 Top I 的表达后, LPS 诱导的炎症相关细胞因子在血清中的水平显著降低。在 LPS 刺激 90 min 后,小鼠脾脏中炎症因子的 RNA 表达水平也会发生很大程度地下降。而且采用 CPT 保护的小鼠存活率比未保护组高。对小鼠进行流感病毒接种后,发现小鼠的致死率降低了 94%。在内毒素引发的小鼠急性肝损伤的模型中,小鼠致死率降低了 90%。以上研究证实了 Top I 在感染引起的急性炎症反应中的特异性调控作用,揭示了 Top I 的抑制剂可以作为一种潜在的药物来应对机体感染后由于免疫反应异常引起的急性组织损伤。

[李江雪 摘译, 于益芝 审阅. RIALDI A, CAMPISI L, ZHAO N, et al. Topoisomerase 1 inhibition suppresses inflammatory genes and protects from death by inflammation[J]. *Science*, 2016, 352(6289): aad7993. DOI: 10. 1126/science. aad7993]