

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2018.03.007

· 基础研究 ·

乌苏酸联合吉西他滨对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖和凋亡的影响

江森¹, 郑希^{1,2}, 何燕¹, TINA Liao², 张焜^{1,3} (1. 广东工业大学轻工化工学院 绿色天然药物化学实验室, 广东 广州 510006; 2. Rutgers Cancer Institute of New Jersey, the State University of New Jersey, Piscataway 08854, N J, U S A; 3. 五邑大学, 广东 江门 529020)

[摘要] **目的:** 探讨乌苏酸联合吉西他滨对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖和凋亡的影响。**方法:** 以乌苏酸、吉西他滨单独用药作用于体外培养的胰腺癌细胞 PANC-1 细胞, 采用 MTT 法检测细胞半抑制浓度 (IC_{50}), 确定药物给药浓度; 以乌苏酸 (2 $\mu\text{mol/L}$)、吉西他滨 (0.2 $\mu\text{mol/L}$) 单独及联合作用于 PANC-1 细胞, 采用锥虫蓝染色法检测 PANC-1 细胞存活率, PI 染色后 PANC-1 细胞中检测细胞凋亡, 采用细胞划痕实验检测 PANC-1 细胞迁移和伤口愈合情况, 采用 Western blotting 检测对照组、乌苏酸组与吉西他滨组单独及联合用药组细胞中 P-JNK、Bcl-2、IL-6、P-Stat 3、NF- κ B 和 Cox-2 蛋白的表达。**结果:** 乌苏酸和吉西他滨对胰腺癌 PANC-1 细胞均有较强的抑制作用, 其 IC_{50} 分别是 13.67 和 2.78 $\mu\text{mol/L}$, 据此选择它们的实验浓度分别为 2 和 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 。两者联合用药比分别单独用药能更显著抑制癌细胞的增殖活性 [(46.47 \pm 5.07)% vs (78.38 \pm 8.65)%、(76.12 \pm 3.23)%], 均 $P < 0.05$, 能更明显诱导癌细胞凋亡 [(39.78 \pm 7.01)% vs (20.35 \pm 8.51)%、(20.35 \pm 8.51)%], 均 $P < 0.01$ 和抑制细胞迁移能力 ($P < 0.01$), 同时更显著抑制凋亡相关蛋白 Bcl-2、IL-6 的表达及促进 P-JNK 的表达。**结论:** 乌苏酸和吉西他滨协同增强抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖和迁移以及促凋亡作用, 其机制可能与抑制 Bcl-2、IL-6、P-Stat 3 和促进 P-JNK 蛋白表达有关。

[关键词] 胰腺癌; 乌苏酸; 吉西他滨; 增殖; 迁移; 凋亡

[中图分类号] R735.9; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2018)03-0252-06

Effect of ursolic acid combined with gemcitabine on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer PANC-1 cells

JIANG Sen¹, ZHENG Xi^{1,2}, HE Yan¹, TINA Liao², ZHANG Kun^{1,3} (1. Laboratory of Natural Medicinal Chemistry and Green Chemistry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, Guangdong, China; 2. Rutgers Cancer Institute of New Jersey, the State University of New Jersey, Piscataway 08854, N J, U S A; 3. Wuyi University, Jiangmen 529020, Guangdong, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of ursolic acid cooperated with gemcitabine on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer PANC-1 cells. **Methods:** Human pancreatic cancer cell line PANC-1 was cultured *in vitro* with ursolic acid and gemcitabine respectively; and MTT assay was used to determine the IC_{50} of ursolic acid and gemcitabine, thus obtaining the best drug concentration. Ursolic acid (2 $\mu\text{mol/L}$) and gemcitabine (0.2 $\mu\text{mol/L}$) alone or in combination was used to treat PANC-1 cells; trypan blue assay was used to test cell viability, and PI staining was used to examine the cell apoptosis; wound healing was used to detect the proliferation and migration of PANC-1 cells. The protein expressions of P-JNK, Bcl-2, IL-6, P-Stat 3, NF- κ B and Cox-2 in cells of each treatment group were detected using Western blotting. **Results:** Both ursolic acid and gemcitabine could significantly inhibit the proliferation of PANC-1 cells, and the IC_{50} is 13.67 and 2.78 $\mu\text{mol/L}$, respectively; and the final concentrations were determined at 2 and 0.2 $\mu\text{mol/L}$ for ursolic acid and gemcitabine, respectively. Compared with single drug treatment, the combined treatment exerted a more prominent cell proliferation inhibition effect [(46.47 \pm 5.07)% vs (78.38 \pm 8.65)%], [76.12 \pm 3.23]%, all $P < 0.05$, apoptosis-induction effect [(39.78 \pm 7.01)% vs [20.35 \pm 8.51]%, [20.35 \pm 8.51]%, all $P < 0.01$) and migration inhibition effect ($P < 0.01$) on PANC-1 cells. Western blotting showed that the combined treatment strongly inhibited Bcl-2 and IL-6 expression, accelerated P-JNK protein expression compared with single drug treatment. **Conclusion:** The synergistic effect of ursolic acid and gemcitabine enhanced the inhibition on proliferation, migration, and promoted cell apoptosis of human pancreatic cancer cell line PANC-1, the mechanism may be associated with inhibition of Bcl-2, IL-6, P-stat 3 proteins and promotion of P-JNK protein.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81272452)。Project supported by the National Nature Science Foundation of China (No. 81272452)

[作者简介] 江森 (1990-) 女, 博士生, 主要从事天然产物与分子生物学研究, E-mail: ahjxjiangsen@163.com

[通信作者] 张焜 (ZHANG Kun, corresponding author), 教授, 博士生导师, 主要从事天然药物和有机化学研究, E-mail: kzhang@gdut.edu.cn

[Key words] pancreatic cancer; ursolic acid; gemcitabine; proliferation; migration; apoptosis

[Chin J Cancer Biother, 2018, 25(3): 252-257. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2018.03.007]

胰腺癌是常见的致死率极高的消化道恶性肿瘤,其发病率和病死率近年来明显上升^[1]。中国胰腺癌的年发病率约为5.1例/10万,每年新增5~6万例患者^[2],其病死率亦迅速升高,占恶性肿瘤死因的第7位。吉西他滨(gemcitabine, GEM)能明显改善胰腺癌患者的生活质量^[3]。GEM的活性代谢产物主要通过干扰DNA复制并阻滞细胞周期进程,从而抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡^[4]。但是,临床上很多胰腺癌患者对GEM有先天或后天抗性,限制了GEM的临床应用。因此,胰腺癌患者对临床化疗药物产生的耐药性也成为其难以治愈的重要原因之一。为进一步提高GEM治疗晚期胰腺癌的效果,许多药物与GEM联合治疗晚期胰腺癌,包括顺铂、卡培他滨、多西紫杉醇等^[5]。虽然联合化疗的有效率得到一定提高,但上述药物与GEM联合用药的大规模临床研究都未能显示出比GEM单药具有更好的生存获益。乌苏酸(ursolic acid, UA)是从薊菜中分离出的一种五环三萜类化合物,具有抗肿瘤抗炎、抗高血脂的作用,而毒副作用很小。UA主要通过诱导细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤组织血管生成、抑制肿瘤侵袭和转移和干扰肿瘤微环境等达到抗肿瘤的目的^[6-7]。本研究旨在探讨UA联合GEM对胰腺癌PANC-1细胞体外增殖的影响及其作用机制,为临床用药提供有益的探索。

1 材料与方法

1.1 细胞株、主要试剂和仪器

人胰腺癌PANC-1株细胞来源于美国模式培养物保藏所(ATCC, USA),由美国Rutgers大学Susan Lehman Cullman肿瘤研究所常规体外细胞传代。

GEM购自美国Sigma-Aldrich公司,UA是本实验室从五加科五加属薊菜中分离的单体化合物。DMEM培养基及新生小牛血清购自美国Gibco公司,二甲基亚砜(DMSO)、3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)、碘化丙啶(PI)、聚偏二氟乙烯膜(PVDF)均购自美国Sigma-Aldrich公司,胎牛血清(FBS)购自美国Serum Source International公司,胰蛋白酶-EDTA溶液购自美国Sigma-Aldrich公司,0.4%锥虫蓝溶液购自美国Cambrex Bio Science公司,兔抗 β -actin一抗购自美国Millipore公司,兔抗P-Stat 3、兔抗P-JNK、兔抗IL-6、兔抗Cox-2和鼠抗NF- κ B一抗购自美国Cell Signaling公司,鼠抗Bcl-2一抗购自美国Santa Cruz公司,HRP标记的羊抗兔和羊抗鼠IgG二抗购自美国Santa Cruz公司。Nikon Opti-

phot光学显微镜和Nikon Eclipse TE200荧光显微镜均购自日本Nikon公司,Infinite M200 PRO多功能酶标仪购自奥地利TECAN公司。

1.2 细胞培养

胰腺癌PANC-1细胞在37℃、5%CO₂培养箱中培养,培养液为含10%胎牛血清的DMEM培养基,取对数生长期细胞用于实验。

1.3 MTT法检测UA和GEM对PANC-1细胞增殖抑制率

采用MTT法检测GEM和UA对PANC-1细胞增殖的抑制作用^[8]。将PANC-1细胞接种于96孔板(1×10³个/孔),同时设置空白调零孔和对照孔(DMSO为阳性对照),5% CO₂、37℃培养过夜,浓度梯度为2.5、5、10、15、20和30 μmol/L的UA和0.5、1、2、4、8和16 μmol/L的GEM进行处理,每个样品设3个复孔,置于37℃、5% CO₂孵育箱培养72 h后吸出培养液,每孔加入100 μl 0.5% MTT溶液,继续培养1 h后,吸去孔内培养液。每孔加入100 μl DMSO,使结晶物充分溶解;用酶标仪测量570 nm处各孔的光密度(D)值,用以下公式计算药物对细胞增殖抑制率:细胞增殖抑制率(%)=(1-D₅₇₀样品组/D₅₇₀对照组)×100%。计算GEM和UA的IC₅₀值。

1.4 实验分组和药物处理

用MTT法测试的UA和GEM对细胞致死率,根据其IC₅₀选择细胞致死率约为20%时药物的浓度值,确定UA、GEM浓度分别为2 μmol/L和0.2 μmol/L。实验分组(均以DMSO为溶剂)为对照(DMSO)组:DMSO, UA(2 μmol/L)组:2 μmol/L UA, GEM(0.2 μmol/L)组:0.2 μmol/L GEM;联合用药(UA+GEM)组:2 μmol/L UA+0.2 μmol/L GEM。将PANC-1细胞接种于6孔板(4×10⁴个/孔)或直径35 mm培养皿(4×10⁵个/培养皿),置5% CO₂、37℃孵育箱培养24 h后按上述分组分别给药,继续培养72 h后用于后续实验。

1.5 锥虫蓝染色法检测各组PANC-1细胞的存活率

将80 μl各实验组PANC-1细胞悬液与20 μl 0.4%锥虫蓝溶液均匀混合,静置2 min后,用显微镜观察和计数,光亮透明细胞计为活细胞,锥虫蓝染为蓝色细胞计为死细胞。每次实验DMSO浓度不超过0.1%。细胞存活率(%)=给药组活细胞数/对照组活细胞数×100%。

1.6 PI单染色观察检测PANC-1细胞凋亡率

将各实验组PANC-1细胞悬浮液,用细胞离心涂片器制成细胞涂片,经丙酮/甲醇(1:1)溶液固定10 min后,PI磷酸缓冲液(10 μg/ml)染色,使用荧光显微镜观察和形态分析,DNA呈红色荧光。观察细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染。每个样品于显微镜下随机观察数个视野,总共不少于200个细

胞,计算每个视野($\times 200$)的凋亡细胞百分比。

1.7 细胞划痕实验检测各组 PANC-1 细胞的迁移能力

PANC-1 细胞接种于直径 35 mm 培养皿(4×10^5 个/培养皿),置于 5% CO_2 、37 °C 培养 36~48 h。细胞汇合度达到 90%~100%时,用微量枪头在培养皿细胞生长的中央区域划线,用 PBS 洗除中央部分和部分漂浮细胞,换成无血清培养基继续培养,将药物按实验分组分别加入培养基进行处理后,于 0、5 和 24 h 时间点观察并拍照,记录细胞形态和其迁移情况。用 Image J 软件计算细胞划痕的面积,以 DMSO 组为阳性对照,用统计学方法分析细胞迁移情况。

1.8 Western blotting 检测各组 PANC-1 细胞凋亡相关蛋白的表达

将各实验组 PANC-1 细胞用冰浴的 PBS 清洗后,加入 200 μl RIPA 裂解缓冲液完全裂解细胞,4 °C 12 000 $\times g$ 离心 15 min,取上清液。用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。将 30 μg 蛋白与上样缓冲液混合,煮沸 5 min,离心。进行 SDS-PAGE 110 min。转至 PVDF 膜 90 min,5% 脱脂牛奶封闭 1 h,分别加鼠抗 BCL-2、兔抗 IL-6、鼠抗 NF- κB 、兔抗 Cox-2、兔抗

P-JNK、兔抗 P-Stat 3 和兔抗 β -actin 一抗(1:1 000)孵育过夜,TBST 清洗 4 次,每次 15 min。加 HRP 标记的抗鼠和抗兔 IgG 二抗(1:5 000)孵育 1 h,TBST 清洗 4 次,每次 15 min。使用的 SuperSignal West Femto 试剂盒(Thermo Scientific)进行化学发光和 Quantity One 系统进行扫描检测条带灰度值。

1.9 统计学处理

应用 SPSS17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.001$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UA 和 GEM 对 PANC-1 细胞具有较强抑制作用

MTT 法实验结果(图 1)表明,UA 和 GEM 对 PANC-1 细胞的抑制率与浓度呈现正相关的趋势,随 UA 和 GEM 药物浓度的增加,PANC-1 细胞抑制率逐渐增加。UA 和 GEM 的 IC_{50} 分别为 13.67 $\mu\text{mol/L}$ 和 2.78 $\mu\text{mol/L}$,表明 UA 和 GEM 具有较强的抑制 PANC-1 细胞生长的能力。由 IC_{50} 值选择后续实验中使用的药物剂量。

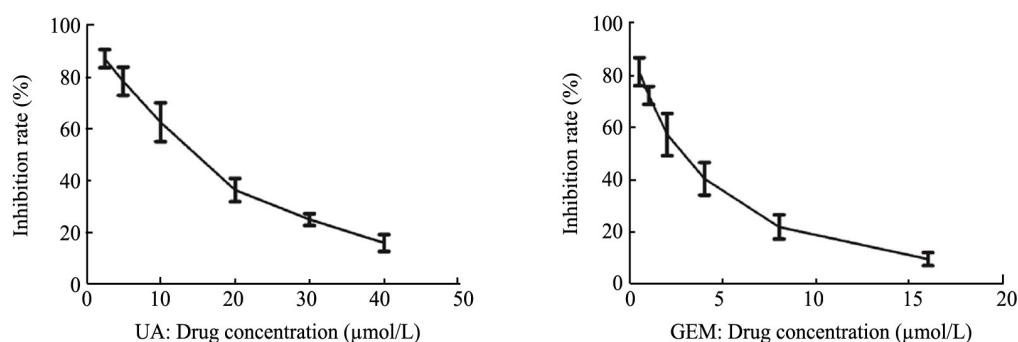


图 1 不同 UA 和 GEM 浓度的 PANC-1 细胞的抑制率

Fig. 1 Inhibitory rates of UA and GEM on PANC-1 cells at various concentrations

2.2 UA 和 GEM 联合用药显著抑制 PANC-1 细胞的增殖

锥虫蓝染色法检测结果显示,UA+GEM 组 PANC-1 细胞的存活率较 UA (2 $\mu\text{mol/L}$) 组和 GEM (0.2 $\mu\text{mol/L}$) 组显著降低[(46.47 \pm 5.07) % vs (78.38 \pm 8.65) %、(76.12 \pm 3.23) % , $P < 0.01$]。说明 UA 和 GEM 联合用药对胰腺癌细胞的杀伤率比单药给药高,在相同浓度下联合用药可以较单药给药更有效地抑制 PANC-1 细胞的增殖。

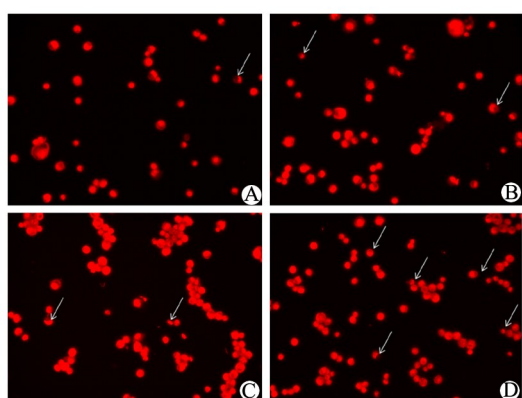
2.3 UA 和 GEM 联合用药显著促进 PANC-1 细胞凋亡

PI 染色后荧光显微镜观察 UA 和 GEM 单药或联合用药各组 PANC-1 细胞形态学结果(图 2)可见,凋亡细胞细胞核呈致密浓染,或呈碎块状致密浓染,图中箭头指出部分是具有代表性的凋亡细胞形态。

UA+GEM 组的凋亡细胞明显多于 UA (2 $\mu\text{mol/L}$) 组和 GEM (0.2 $\mu\text{mol/L}$) 组。不同实验组 PANC-1 细胞凋亡率结果显示,UA+GEM 组 PANC-1 细胞的凋亡率较 UA (2 $\mu\text{mol/L}$) 组和 GEM (0.2 $\mu\text{mol/L}$) 组显著增加 [(39.78 \pm 7.01) % vs (20.35 \pm 8.51) %、(23.37 \pm 4.99) % , $P < 0.05$]。结果表明,UA 和 GEM 药物联用促进细胞凋亡的作用比单药给药的效果更好,使细胞凋亡率增加 15%~20%。

2.4 UA 和 GEM 联合用药显著抑制细胞的迁移

细胞划痕实验测结果(图 3)显示,不同时间点各药物处理组的划痕面积和愈合程度都发生了不同的变化。随着时间的增长,细胞的划痕部位逐渐地愈合,划痕面积越来越小。UA+GEM 组较 UA (2 $\mu\text{mol/L}$)



A: DMSO; B: UA(2 μmol/L); C: GEM (0.2 μmol/L); D: UA+GEM

图2 各实验组凋亡细胞的荧光显微镜图片(×200)

Fig. 2 Apoptotic PANC-1 cells in various groups observed under fluorescence microscopy (×200)

组和GEM(0.2 μmol/L)组PANC-1细胞的划痕愈合程度较差,划痕面积较大,划痕部位细胞生长程度较差。24 h后,UA+GEM组PANC-1细胞的划痕愈合度较UA(2 μmol/L)组和GEM(0.2 μmol/L)组显著降低[(60.27±8.45)% vs (74.53±3.82)%、(78.72±6.17)%],均 $P<0.01$;图4]。结果表明,药物联合作用对PANC-1细胞划痕愈合度明显低于单药作用,即药物联用比单药作用能更有效地抑制细胞迁移。

2.5 UA和GEM联合用药抑制Bcl-2、IL-6和P-Stat 3蛋白表达和增强P-JNK蛋白表达

Western blotting检测结果(图5)显示,UA(2 μmol/L)组和GEM(0.2 μmol/L)组的Bcl-2、IL-6和P-Stat 3条带灰度较UA+GEM组深,说明蛋白表达水平较UA+GEM组高,药物联用下调蛋白的表达,降低蛋白浓度,发挥协同抑制胰腺癌细胞生长和等作用效果明显强于单药。UA(2 μmol/L)组和GEM(0.2 μmol/L)组的P-JNK条带较对照DMSO组微弱增强,而UA+GEM组该条带显著增强,药物联用增加该蛋白表达效果明显强于单药。UA(2 μmol/L)组、GEM(0.2 μmol/L)组和UA+GEM组的Cox-2条带灰度都较对照DMSO组深,说明药物联用和单药作用对该蛋白表达的作用都强于阳性对照,但是药物联用和单药作用无显著差异。UA(2 μmol/L)组、GEM(0.2 μmol/L)组和UA+GEM组的NF-κB条带灰度和对照DMSO组没有明显差异,说明该蛋白表达无明显变化。

3 讨论

胰腺癌是消化系统恶性程度最高的肿瘤,近年发病率呈稳步上升趋势,尤以工业化国家发病率最高,非洲和亚洲一些发展中国家的发病率较低。中国目前尚缺乏大规模的胰腺癌流行病学调查资料,但近30年来,随着饮食结构和生活水平提高以及糖尿病的高发,我国胰腺癌发病率亦呈上升趋势。

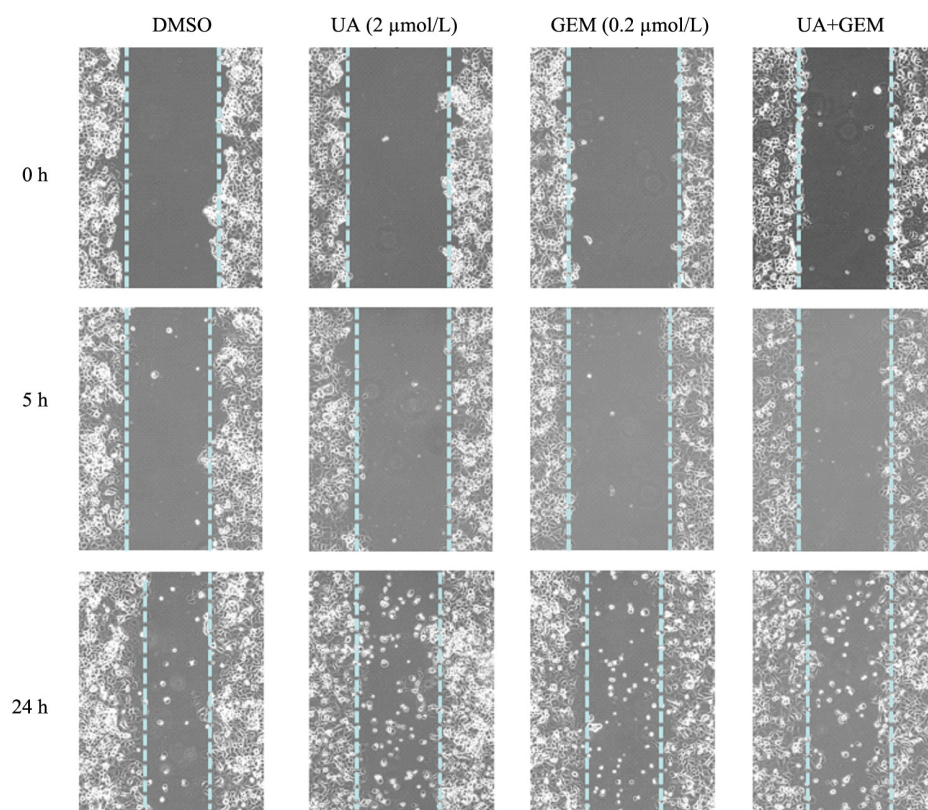
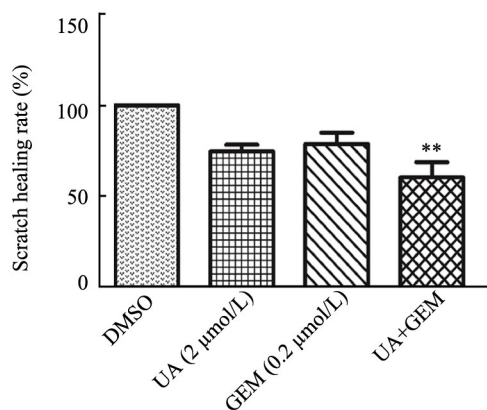


图3 细胞划痕实验不同时间点UA和GEM各组显微镜图像

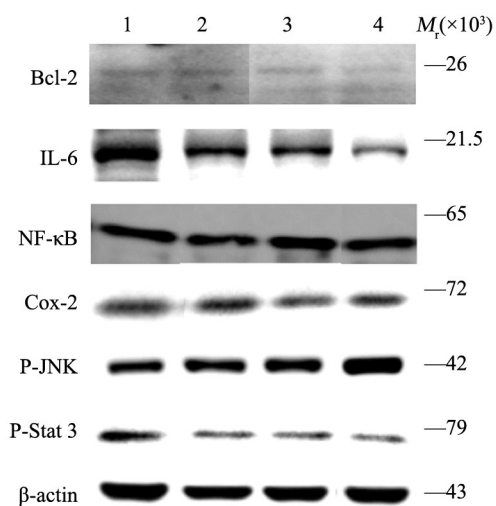
Fig. 3 Cell scratch assay results in various groups at different time points observed under microscope



** $P < 0.01$ vs UA (2 μmol/L) or GEM (0.2 μmol/L) group

图4 UA和GEM各组的相对划痕愈合率

Fig. 4 Scratch healing rate in various groups treated with UA, GEM or in combination



1: DMSO group; 2: UA group; 3: GEM group; 4: UA+GEM group

图5 UA和GEM各组PANC-1细胞凋亡相关蛋白的表达

Fig. 5 Expressions of apoptosis-related proteins in PANC-1 cells of each group

GEM是晚期胰腺癌的标准一线治疗用药,但是很多胰腺癌患者对GEM有先天或后天获得性化疗耐药性,限制了GEM在临床上的应用。UA能通过诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、抵抗肿瘤侵袭、抗氧化、化学预防、抗突变、细胞毒等作用来抑制肿瘤细胞的增殖和扩散。但目前对于抗胰腺癌的研究尚不够深入。UA对多种恶性肿瘤细胞有明显的细胞毒性、可抑制肿瘤形成和诱导肿瘤细胞凋亡。其特点是作用于NF-κB、COX-2、cyclin D1等分子靶点预防和抑制肿瘤的形成^[8]。UA能够有效杀伤某些具有耐药性的癌细胞。Li等^[9]采用抵抗多种化疗药物的细胞株为实验模型,包括对GEM产生耐药的胰腺癌细胞,以及对紫杉醇产生抵抗的子宫内膜腺癌细胞和对铂类药物耐药的卵巢癌细胞。UA是一种很

强的血管生成抑制剂,能抑制血管内皮细胞的增殖、迁移^[10],并且能降低人HT1080纤维肉瘤细胞中MMP-9基因的表达,从而产生抗侵袭作用^[11]。UA除具有单独的抗肿瘤活性外,还可提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,能够与某些常规化疗药物产生协同抗肿瘤疗效。有研究^[12]表明,UA预处理后,能够克服卵巢癌A2780细胞对顺铂的抵抗作用,增强顺铂和奥沙利铂的杀伤效应。本研究通过对UA和GEM单药和联合用药的深入研究,提供GEM药效以及降低胰腺癌PANC-1细胞对GEM耐药性的依据,试图通过联合用药降低GEM的临床使用剂量,减少大剂量使用GEM所产生的毒副作用,提高临床治疗安全指数,为临床应用GEM提供更多的可能性。

本研究结果表明,UA和GEM对PANC-1细胞的抑制增殖作用随时间增长和药物浓度增加而逐步提高。虽然这2种药物都有使PANC-1细胞失去活性并凋亡的能力,但是当药物浓度较低时,细胞生存抑制率都较低,作用效果不佳。然而,这2种药物联用的细胞生存率比单药用药降低,细胞凋亡率比单药用药明显增加,细胞迁移速度变慢,细胞伤口愈合程度更差,说明这2种药物联合用药产生了药物协同作用。达到了药物联用的预期实验效果。

尽管已有大量研究证实,GEM联合其他化疗药物能够发挥协同抗肿瘤作用,但其相关作用机制尚待进一步研究。为了证明对细胞凋亡影响的作用机制,本研究检测了细胞凋亡相关蛋白JNK、Bcl-2的表达。JNK属于促进分裂原活化蛋白激酶一族,多种细胞外刺激都会引起JNK磷酸化(phosphorylated JNK, P-JNK)。研究^[13]表明,P-JNK通过转录特异性转录因子上调促凋亡基因,或者直接调节线粒体上促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的磷酸化水平,诱导细胞凋亡。Bcl-2是Bcl-2家族中抑制细胞凋亡的重要因子,在细胞凋亡过程中,Bcl-2家族起到重要的双重调节作用,凋亡抑制蛋白Bcl-2能阻止细胞通过线粒体通道途径发生凋亡,从而抑制细胞发生凋亡^[14-15]。本研究结果表明,虽然UA和GEM单独用药都能抑制PANC-1细胞增殖、促进细胞凋亡,其Bcl-2蛋白表达减少,P-JNK蛋白表达增加。但是,UA和GEM联合用药对促进PANC-1细胞凋亡更有效,Bcl-2蛋白表达明显降低,P-JNK蛋白明显增加,说明P-JNK和Bcl-2通路可能是UA和GEM联合用药发挥协同抗胰腺癌作用的可能机制。因此,通过干预JNK/Bcl-2信号通路中关键信号分子P-JNK和Bcl-2表达,就有可能阻断其相关凋亡通路的信号转导途径。

为了进一步探索UA和GEM对抑制细胞增殖的作用机制,本研究检测了细胞凋亡和抑制细胞增殖

的相关蛋白 IL-6、P-Stat 3 的表达^[16-17]。IL-6 是一种多效细胞因子,对细胞的分化,生长具有调节、诱导的作用。并可激活相关下游因子发挥促肿瘤生长、迁移、演进的作用^[18]。在炎症和免疫细胞中 IL-6 明显激活并维持肿瘤细胞中 P-Stat 3 和 NF- κ B,导致联合用药抑制 PANC-1 细胞增殖的能力增强。Stat 3 是 Stat 家族中的重要成员,进入细胞核与特定的 DNA 序列结合后启动靶基因转录,参与细胞生长、分化及发育等多种生理过程。有研究证明^[19-20],Stat 3 的组成性活化与癌细胞的增殖、发展甚至恶性潜能相关,阻断 Stat 3 的活性可以抑制癌细胞的增殖,诱导其凋亡,并可以降低在体内的致癌性。本研究结果表明,UA 和 GEM 联合用药可有效抑制 PANC-1 细胞增殖,下调 IL-6 蛋白表达,降低 P-Stat 3 蛋白浓度,发挥协同抑制胰腺癌细胞增殖的作用。

综上所述,UA 不仅单药具有抗胰腺癌作用,且和 GEM 联合用药可产生协同作用。UA 和 GEM 联合用药,在体外能显著抑制人胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖,诱导人胰腺癌细胞发生凋亡,其机制可能与调控细胞凋亡和细胞周期相关蛋白表达有关。上调 P-JNK 表达,下调 Bcl-2 表达,直接调节线粒体上促凋亡蛋白和抗凋亡蛋白的磷酸化水平,以及其它途径共同参与作用。而下调 IL-6 蛋白表达,降低 P-Stat 3 蛋白浓度,对胰腺癌 PANC-1 株细胞具有显著的抑制作用,抑制胰腺癌细胞增殖,并促使 PANC-1 细胞凋亡,可能是 IL-6 激活 Stat 3 信号通路,从而发挥作用。这对临床进行联合用药治疗胰腺癌具有重要的指导作用。

[参 考 文 献]

- [1] SIGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013[J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30. DOI:10.3322/caac.21166.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*. 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [3] BURRIS H A 3rd, MOORE M J, ANDERSEN J, et al. Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial[J]. *J Clin Oncol*, 1997, 15(6): 2403-2413. DOI: 10.1200/JCO.1997.15.6.2403.
- [4] ALBAIN K S, NAG S, CALDERILLO-RUIZ G, et al. Global phase III study of gemcitabine plus paclitaxel (GT) vs. paclitaxel (T) as frontline therapy for metastatic breast cancer (MBC): first report of overall survival[J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(14 Suppl): 510.
- [5] NAKANO Y, TANNO S, KOIZUMI K, et al. Gemcitabine chemoresistance and molecular markers associated with gemcitabine transport and metabolism in human pancreatic cancer cells[J]. *Br J Cancer*, 2007, 96(3): 457-463. DOI:10.1038/sj.bjc.6603559.
- [6] SHYU M H, KAO T C, YEN G C. Oleonic acid and ursolic acid induce apoptosis in HuH7 human hepatocellular carcinoma cells through a mitochondrial-dependent pathway and downregulation of XIAP[J]. *J Agric Food Chem*, 2010, 58(10): 6110-6118. DOI: 10.1021/jf100574j.
- [7] YU Y X, GU Z L, YIN J L, et al. Ursolic acid induces human hepatocellular line SMMC-7721 apoptosis via p53-dependent pathway [J]. *Chin Med J(Engl)*, 2010, 123(14): 1915-1923. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0366-6999.2010.14.016.
- [8] LI J, LIANG X, YANG X. Ursolic acid inhibits growth and induces apoptosis in gemcitabine-resistant human pancreatic cancer via the JNK and PI3K/Akt/NF- κ B pathways[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28 (2): 501-510. DOI: 10.3892/or.2012.1827.
- [9] HUO F, YU J Q, BEALE P, et al. Combinations of platinum and selected phytochemicals as a means of overcoming resistance in ovarian cancer[J]. *Anticancer Res*, 2014, 34(1): 541-545.
- [10] KIRAN M S, VIJI R I, SAMEER KUMAR V B, et al. Modulation of angiogenic factors by ursolic acid[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008, 371(3): 556-560. DOI:10.1016/j.bbrc.2008.04.108.
- [11] AGGARWAL B B, SHISHODIA S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer[J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(10):1397-1421. DOI:10.1016/j.bcp.2006.02.009.
- [12] LAI M Y, LEUNG H W, YANG W H, et al. Up-regulation of matrix metalloproteinase family gene involvement in ursolic acid-induced human lung non-small carcinoma cell apoptosis[J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(1A): 145-153.
- [13] DHANASEKARAN D N, REDDY E P. JNK signaling in apoptosis [J]. *Oncogene*, 2008, 27(48): 6245-6251. DOI: 10.1038/onc.2008.301
- [14] LEE S J, KIM E A, SONG K S, et al. Antimycin A sensitizes cells to TRAIL-induced apoptosis through upregulation of DR5 and down-regulation of c-FLIP and Bcl-2[J]. *Int J Oncol*. 2012, 41(4): 1425-1430. DOI: 10.3892/ijo.2012.1575.
- [15] WANG M, LU X, DONG X, et al. PERK1/2 silencing sensitizes pancreatic cancer BXPC-3 cell to gemcitabine-induced apoptosis via regulating Bax and Bcl-2 expression[J]. *World J Surg Oncol*, 2015, 13: 66. DOI: 10.1186/s12957-015-0451-7.
- [16] DAUER D J, FERRARO B, SONG L, et al. Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer[J]. *Oncogene*, 2005, 24 (21): 3397-3408. DOI:10.1038/sj.onc.1208469.
- [17] ARRANZ-VALSERO I, SORIANO-ROMANÍ L, GARCÍA-POSADAS L, et al. IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay[J]. *Exp Eye Res*, 2014, 125: 183-192. DOI: 10.1016/j.exer.2014.06.012.
- [18] LESINA M, KURKOWSKI M U, LUDES K, et al. Stat3/Socs3 activation by IL-6 transsignaling promotes progression of pancreatic intraepithelial neoplasia and development of pancreatic cancer[J]. *Cancer Cell*, 2011, 19(4): 456-469. DOI:10.1016/j.ccr.2011.03.009
- [19] ALLEN J B, KENG T, PRIVALLE C. Nitric oxide and peroxynitrite production in ocular inflammation[J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106 (Suppl 5): 1145-1149.
- [20] NAGY G, CLARK J M, BUZAS E I, et al. Nitric oxide, chronic inflammation and autoimmunity[J]. *Immunol Lett*, 2007, 111(1): 1-5. DOI: 10.1016/j.imlet.2007.04.013.

[收稿日期] 2017-11-17

[修回日期] 2018-01-09

[本文编辑] 韩丹