

【基础研究】

通信作者:路平(1969-),女,河南新乡人,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:恶性肿瘤的综合治疗;E-mail: lupingdoctor@126.com。

食管癌是常见的消化道恶性肿瘤,严重影响着人类的生命健康。目前,食管癌的治疗主要依靠手术治疗、化学治疗和放射治疗等综合治疗^[1]。由于食管癌早期缺乏特异性症状,多数患者发现时已进入中晚期,常需化学治疗。顺铂作为食管癌的常用化学治疗药物,由于其耐药性及不良反应的存在,有效率及缓解率尚不令人满意^[2]。因此,如何提高食管癌的化学治疗效果具有重要临床意义。研究发现,雷公藤内酯醇(triptolide, TPL)具有抗肿瘤作用,且能联合其他化学治疗药物协同抗肿瘤^[3-5]。然而,关于 TPL 能否联合顺铂协同抗食管癌的研究目前较少。本研究选取人食管鳞癌细胞 109(esophageal squamous carcinoma cell 109, ECA-109)作为研究对象,观察 TPL 及 TPL 联合顺铂对 ECA-109 细胞增殖的抑制作用,并探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人食管鳞癌细胞株 ECA-109 由新乡医学院第一附属医院神经病学研究所提供。

1.2 主要试剂及仪器 TPL 购自美国 Sigma 公司,顺铂注射液(国药准字 H37021358, 10 mg · 10 mL⁻¹) 购自齐鲁制药有限公司, RPMI-1640 (roswell park memorial institute medium 1640) 培养基、胰蛋白酶、青霉素/链霉素、胎牛血清均购自美国 Gibco 公司,牛血清白蛋白(albumin from bovine serum, BSA) 购自广州威佳科技有限公司,四甲基偶氮唑蓝(methylthiazolyl tetrazolium, MTT)、二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)、1 mol · L⁻¹ 盐酸三羟甲基氨基甲烷溶液(tris hydrochloride, Tris-HCl) 购自北京索莱宝生物技术有限公司,吐温-20、氯化钠购自合肥博美生物科技有限公司,鼠抗人半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3(cysteiny aspartate specific proteinase-3, caspase-3) 抗体、鼠抗人 β -actin 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 试剂盒、Super-Bradford 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 上样缓冲液(5 ×)、裂解液(radio immunoprecipitation assay, RIPA)、蛋白酶抑制剂混合物(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF) 购自上海碧云天生物技术有限公司,超敏化学发光液(allergic chemiluminescence liquid, ECL)、Scientific1385 生物安全柜、Forma371 CO₂ 培

养箱、CL31R 多功能台式高速冷冻离心机、Multiskan Spectrum 全波长扫描酶标仪、Scientific EC300XL 电泳系统购自美国 Thermo 公司,电泳仪购自美国 Bio-rad 生物技术公司。

1.3 试剂配制 配制含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,用于细胞培养及其他试剂的配制。顺铂注射液为 $3.33 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 避光常温保存; TPL 用丙二醇配制成 $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 用 $0.22 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜过滤除菌, -20°C 保存备用。实验时,按设计要求,使用含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基将上述 2 种药物稀释至所需浓度。配制盐酸三羟甲基氨基甲烷缓冲盐溶液(tris buffered saline with tween, TBST): 取 Tris-HCl 溶液 10 mL、氯化钠 8.8 g、吐温-20 1 mL, 加蒸馏水定容至 1 000 mL。

1.4 细胞分组及培养 取处于对数生长期的人食管鳞癌 ECA-109 细胞制成 $5 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$ 的细胞悬液, 种植于 6 孔板内, 根据加入培养基的不同分为空白对照组、TPL 组、顺铂组和 TPL 联合顺铂组。(1) 空白对照组: ECA-109 细胞不经药物处理, 用含体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养;(2) TPL 组: 将 ECA-109 细胞分别培养在含不同浓度 (6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) TPL 及体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中;(3) 顺铂组: 将 ECA-109 细胞培养在含 $4.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂及体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中;(4) TPL 联合顺铂组: 将 ECA-109 细胞培养在含 $25.00 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL、 $4.17 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺铂及体积分数 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中。将上述 4 组细胞置于 37°C 、含体积分数 5% CO₂ 培养箱内培养。

1.5 MTT 法测定细胞增殖抑制情况 取处于对数生长期的上述 4 个处理组 ECA-109 细胞, 制成细胞悬液, 分别用各组相对应的 RPMI-1640 培养基调整细胞密度至 $1 \times 10^5 \text{ L}^{-1}$, 加入到 96 孔板内, 每孔 100 μL , 每处理组设 5 个复孔(其中 TPL 组按 TPL 浓度梯度的不同设置复孔), 将 96 孔板置于细胞培养箱内培养。分别于培养 24、48、72 h 后向每孔加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 20 μL , 放入培养箱内继续培养; 4 h 后吸弃各孔内的液体, 每孔加入 150 μL DMSO, 震荡 15 min, 置于酶标仪上, 在 570 nm 下测定各孔吸光度值。实验重复 3 次。细胞增殖抑制率 = (对照组细胞吸光度均值 - 给药组细胞吸光度均值) / 对照组细胞吸光度均值 $\times 100\%$ 。2 种药物联合应

用的交互作用采用金正均法计算 Q 值(Q 值表示 2 种药物相互作用的指数)进行判断^[6], 公式为 $Q = E_{AB} / [E_A + (1 - E_A) \times E_B]$, 其中 E_{AB} 为 2 种药合用时的细胞生长抑制率, E_A 、 E_B 分别为单药应用时的细胞抑制率, $Q > 1.15$ 表示 2 药联合作用为协同, Q 值在 0.85 ~ 1.15 之间表示 2 药联合作用为相加, $Q < 0.85$ 表示 2 药联合作用为拮抗。

1.6 Western blot 检测各组细胞内 caspase-3 表达
选取空白对照组、TPL 组(TPL 浓度为 25.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)、顺铂组、TPL 联合顺铂组培养 24 h 后的细胞, 用 4 $^{\circ}\text{C}$ PBS 洗涤 3 次, 加入 RIPA 裂解细胞 30 min(在冰上进行), 取各组裂解物 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集各组离心后上清液, 测定上清液内蛋白浓度, -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。采用 SDS-PAGE, 按设计顺序加入上述 4 组蛋白提取物(每上样孔加入的蛋白样品为 20 μg), 90 V 电泳, 90 V、90 min 转膜至硝酸纤维素膜。BSA 封闭 1 h, 吸弃封闭液, 加入鼠抗人 caspase-3 抗体, 鼠抗人 β -actin 抗体作为内参, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入含辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 抗体, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 加入超敏化

表 1 不同条件对 ECA-109 细胞增殖的抑制率比较

Tab.1 Comparison of cell proliferation inhibition rate of ECA-109 cells in different environment ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞增殖抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白对照组	3	0.000 \pm 1.541	0.000 \pm 1.062	0.000 \pm 1.336
6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组	3	6.352 \pm 1.157 ^a	12.503 \pm 0.814 ^{af}	21.586 \pm 1.202 ^{afg}
12.50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组	3	11.389 \pm 2.219 ^{ab}	21.687 \pm 1.632 ^{abf}	32.385 \pm 1.574 ^{abfg}
25.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组	3	32.258 \pm 1.786 ^{abc}	43.104 \pm 1.339 ^{abcf}	52.733 \pm 1.615 ^{abcfg}
50.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组	3	49.980 \pm 1.627 ^{abcd}	61.779 \pm 1.518 ^{abcdf}	74.527 \pm 2.126 ^{abcdfg}
100.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组	3	67.522 \pm 2.071 ^{abcde}	80.168 \pm 1.427 ^{abcdef}	92.928 \pm 2.341 ^{abcdefg}
顺铂组	3	24.693 \pm 1.304	34.750 \pm 1.981	47.476 \pm 1.293
TPL 联合顺铂组	3	59.359 \pm 1.219 ^{dh}	74.332 \pm 1.850 ^{dh}	87.561 \pm 2.021 ^{dh}

注:与空白对照组比较^a $P < 0.05$;与 6.25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组比较^b $P < 0.05$;与 12.50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组比较^c $P < 0.05$;与 25.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组比较^d $P < 0.05$;与 50.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组比较^e $P < 0.05$;与培养 24 h 比较^f $P < 0.05$;与培养 48 h 比较^g $P < 0.05$;与顺铂组比较^h $P < 0.05$ 。

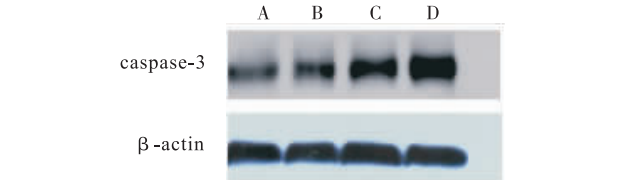
2.2 培养 24 h 后各组细胞中 caspase-3 蛋白水平比较 结果见图 1。采用 Image J 进行图像分析处理,以 β -actin 灰度值作为参照,空白对照组、顺铂组、25.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组、TPL 联合顺铂组细胞中 caspase-3 的相对表达量分别为 0.206 \pm 0.046、0.371 \pm 0.131、0.504 \pm 0.027、0.819 \pm 0.104, 25.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组、顺铂组、TPL 联合顺铂组细胞内 caspase-3 蛋白表达量均高于空白对照组($P < 0.05$);且 TPL 联合顺铂组细胞内 caspase-3 蛋白表达量高于同药物浓度条件下顺铂组和 TPL 组($P < 0.05$)。

学发光液发光,在暗室内 X 线片显影,扫描并保存图像信息。采用 Image J 进行图像分析处理。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 21.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多样本均数比较采用单因素方差分析,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 ECA-109 细胞增殖抑制率比较 结果见表 1。同一时间点,不同浓度的 TPL 组细胞增殖抑制率均显著高于空白对照组($P < 0.05$);且随 TPL 药物浓度的增加,其细胞抑制率也相应增加($P < 0.05$),即呈剂量依赖性。同一药物浓度条件下,随作用时间的延长,细胞增殖抑制率逐渐增高($P < 0.05$),即呈时间依赖性。同一时间点,TPL 联合顺铂组对 ECA-109 细胞增殖的抑制率高于同药物浓度条件下单用顺铂或单用 TPL 对细胞增殖的抑制率($P < 0.05$),且根据金正均法计算,TPL 联合顺铂组在 24、48、72 h 的 Q 值分别是 1.21、1.18、1.16,均大于 1.15,说明 2 种药物联合应用有协同作用,可增强对 ECA-109 细胞增殖的抑制。



A:空白对照组;B:顺铂组;C:25.00 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ TPL 组;D:TPL 联合顺铂组。
图 1 不同处理组细胞内 caspase-3 蛋白表达情况
Fig.1 Expression of caspase-3 in ECA-109 cells in each group

3 讨论

食管癌在我国特别是豫北地区发病率及病死率

较高,严重威胁着人类的生命健康。据统计,我国每年新发食管癌病例占全球新发病例的 50% 以上^[7]。食管癌早期症状不显著,临床确诊时多数患者已进展为中晚期,常需以手术为主的多种手段相结合的综合治疗。顺铂作为食管癌化学治疗的一线药物,在控制病情进展方面取得了一定疗效,但由于耐药性的存在,其治疗效果并不理想。因此,提高顺铂的化学治疗有效率及缓解率,或寻求更高效的化学治疗药物,已成为临床上的研究热点。

TPL 是一种从植物雷公藤中提取的二萜内酯类化合物^[8],具有免疫抑制、抗炎、抗增殖等多种生物活性^[9],是临床上公认的免疫抑制剂,主要用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等疾病。近年来研究发现,TPL 对乳腺癌、肺癌、肝癌、胰腺癌等多种肿瘤均有抑制作用^[10-11],其作用机制与抑制肿瘤细胞增殖、抑制肿瘤细胞的侵袭与转移、促进肿瘤细胞凋亡有关^[12]。PIGNEUX 等^[13]研究发现,TPL 联合低剂量的阿糖胞苷可显著促进急性白血病细胞凋亡。研究发现,TPL 可显著增强羟基喜树碱对胰腺癌细胞增殖的抑制作用,并促进其凋亡^[4]。

细胞凋亡涉及 3 条信号通路:死亡受体通路、内质网通路和线粒体通路,且通路间相互影响。Caspase 是一类与细胞凋亡密切相关的蛋白酶类,参与了上述 3 条信号通路,并起重要作用^[14]。Caspase 通常以无活性的酶原形式存在于细胞质内,经过一系列激活反应,可分解细胞内多种底物,进而导致细胞凋亡的发生。Caspase-3 是 caspase 家族中重要一员,是细胞凋亡过程中的主要效应因子^[15]。

本实验以人食管鳞癌细胞 ECA-109 为研究对象,采用 MTT 法检测了不同浓度 TPL 对 ECA-109 细胞增殖的抑制作用,同时还检测了 TPL 联合顺铂对 ECA-109 细胞增殖的抑制作用;并采用 Western blot 检测各组细胞培养 24 h 后 caspase-3 的表达情况。结果表明,TPL 对 ECA-109 细胞增殖有显著的抑制作用,且呈剂量-时间依赖性;TPL 联合顺铂组对 ECA-109 细胞增殖的抑制率显著高于同药物浓度条件下单用顺铂或单用 TPL 对细胞增殖的抑制率,表明 TPL 可协同顺铂增强对 ECA-109 细胞增殖的抑制作用;TPL 组、顺铂组、TPL 联合顺铂组细胞内 caspase-3 的表达量显著高于空白对照组,且 TPL 联合顺铂组细胞内蛋白表达量高于同药物浓度条件下顺铂组和 TPL 组,提示 TPL、TPL 联合顺铂可能通过增加 caspase-3 的表达,促进 ECA-109 细胞的凋

亡,抑制细胞增殖。

综上所述,TPL 可抑制人食管鳞癌细胞 ECA-109 的增殖,联合顺铂有协同作用,其机制可能与促进凋亡相关蛋白 caspase-3 的表达有关。该研究结果可为食管癌的化学治疗提供新的思路。

参考文献:

[1] SIEGEL R, WARD E, BRAWLEY O, *et al.* Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(4): 212-236.

[2] 李玮浩, 赵松, 崔广晖. 食管癌患者术前行新辅助化学治疗相关危险因素分析[J]. *新乡医学院学报*, 2013, 30(7): 384-385.

[3] BORJA-CACHO D, YOKOYAMA Y, CHUGH R K, *et al.* TRAIL and triptolide: an effective combination that induces apoptosis in pancreatic cancer cells[J]. *J Gastrointest Surg*, 2009, 14(2): 252-260.

[4] YANG S W, WANG W, XIE X Y, *et al.* In vitro synergistic cytotoxic effect of triptolide combined with hydroxycamptothecin on pancreatic cancer cells[J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(1): 121-134.

[5] ZHU W, LI J, WU S, *et al.* Triptolide cooperates with Cisplatin to induce apoptosis in gemcitabine-resistant pancreatic cancer[J]. *Pancreas*, 2012, 41(7): 1029-1038.

[6] 张效文, 严名, 王芷芬, 等. 用 Q 值估计合并用药效果的新方法: “双 30 法”[J]. *上海第二医学院学报*, 1985, 5(5): 353-354.

[7] JEMAL A, BRAY F, CENTER M M, *et al.* Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.

[8] 杨旭光, 徐晓煜, 李家璜, 等. 雷公藤内酯醇靶蛋白的筛选及其结合的初步验证[J]. *分析化学*, 2012, 40(3): 365-370.

[9] LIU Q. Triptolide and its expanding multiple pharmacological functions[J]. *Int Immunopharmacol*, 2011, 11(3): 377-383.

[10] 刘娜, 刘铭耀, 李晔. 雷公藤内酯醇体内外实验研究进展[J]. *海峡药学*, 2015, 27(12): 99-101.

[11] 朱四红. 雷公藤内酯醇联合紫杉醇对人卵巢癌耐顺铂细胞株体外活性影响及机制的研究[J]. *山东医药*, 2011, 51(47): 15-17.

[12] 王恒邦, 许建华, 温彩霞, 等. 雷公藤内酯醇体内外抗肿瘤作用[J]. *福建医科大学学报*, 2007, 41(4): 304-307.

[13] PIGNEUX A, MAHON F X, UHALDE M, *et al.* Triptolide cooperates with chemotherapy to induce apoptosis in acute myeloid leukemia cells[J]. *Exp Hematol*, 2008, 36(12): 1648-1659.

[14] WOLF B B, GREEN D R. Suicidal tendencies: apoptotic cell death by caspase family proteinases[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(29): 20049-20052.

[15] 孙运良, 吴红玉, 金晶, 等. 雷公藤内酯醇联合吉西他滨对胰腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *重庆医学*, 2014(5): 578-581.