

莪术醇 β -环糊精包合物对食管癌 TE-1 细胞增殖、凋亡的影响及其机制研究

景 钊¹ 谢聪颖¹ 吴志勤¹ 许 芳² 邹长林¹

摘要 **目的** 探讨莪术醇 β -环糊精包合物对食管癌 TE-1 细胞增殖、凋亡的影响及其作用机制。方法采用饱和溶液法制备莪术醇与 β -环糊精的包合物,红外光谱验证包合物的形成。不同浓度(25、50、100 mg/L)莪术醇 β -环糊精包合物处理食管癌 TE-1 细胞后,噻唑蓝 [3-(4,5)-dimethylthiazolyl-2-yl]-5-(3,5-di-phenyltetrazoliumromide, MTT) 比色法测定细胞增殖,流式细胞仪检测细胞周期与凋亡情况。实时荧光定量 PCR 及 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量分析不同处理组 Survivin mRNA 的相对表达量。Western blot 检测 Survivin 蛋白表达。**结果** MTT 法检测结果显示,与对照组比较,莪术醇 β -环糊精包合物各剂量组生长抑制率均明显升高,且随着剂量升高而增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。流式细胞术检测结果显示,莪术醇 β -环糊精包合物处理可使细胞阻滞在 G_0/G_1 期与 G_2/M 期,并且促进细胞凋亡。此外,与对照组比较,处理组细胞中 Survivin mRNA 与蛋白表达水平明显降低($P < 0.05$)。**结论** 莪术醇 β -环糊精包合物能够抑制食管癌细胞 TE-1 的增殖,促进凋亡,对 Survivin 的抑制与其抑制食管癌细胞的恶性表型的作用相关。

关键词 食管癌;莪术醇; β -环糊精;Survivin;TE-1 细胞

Effects and Mechanisms of Curcumol β -cyclodextrin Compound on the Proliferation and Apoptosis of Esophageal Carcinoma Cell Line TE-1 JING Zhao¹, XIE Cong-ying¹, WU Zhi-qin¹, XU Fang², and ZOU Chang-lin¹ 1 Department of Chemoradiation, First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical College, Zhejiang (325000), China; 2 Faculty of Lab Examinations, College of Life Science, Wenzhou Medical College, Zhejiang (325000), China

ABSTRACT **Objective** To investigate the effects and mechanisms of Curcumol β -cyclodextrin Compound (C β C) on the proliferation and apoptosis of esophageal carcinoma cell line TE-1. **Methods** The C β C was prepared by saturated solution and confirmed by infrared absorption spectroscopy. The effects of C β C (at 25, 50, 100 mg/L) on the proliferation of human esophageal carcinoma cell line TE-1 *in vitro* was analyzed by MTT assay. The cell cycles and apoptosis were detected by flow cytometer. The relative expression of survivin mRNA was detected by real-time fluorescent quantitative PCR and calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The protein expression of survivin was measured by Western blot. **Results** Compared with the control group, results of MTT showed that C β C at each dose significantly inhibited the proliferation of TE-1 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The results of flow cytometry showed that C β C resulted in the cell cycle arrest at G_0/G_1 and G_2/M phase, and promoted the cell apoptosis. Besides, when compared with the control group, the protein and mRNA expressions of survivin obviously decreased in each C β C group ($P < 0.05$). **Conclusions** C β C could inhibit the proliferation of esophageal carcinoma cell TE-1 and promote the apoptosis. Its inhibition on the survivin expression was correlated with its inhibition on the malignant phenotypes of esophageal carcinoma cells.

KEYWORDS esophageal neoplasms; curcumol; β -cyclodextrin; survivin; TE-1 cell

食管癌是我国常见的恶性肿瘤,尽管食管癌的综合治疗措施不断发展完善,但目前食管癌患者的预后仍然很差,治疗后 5 年生存率仅为 20% ~ 30%^[1]。寻找新的高效、低毒抗肿瘤药物以提高食管癌治疗效果是目前研究的热点。基础研究及临床实践表明中医药在抗肿瘤方面具有独特的优势^[2]。莪术醇是莪术油的主要成分,其对肿瘤有特殊疗效,且无明显不良反应,具有较好的研究和利用价值^[3]。由于其在水中溶解度极低,极大地限制了实验研究和临床使用^[4]。 β -环糊精作为经济易得的药用辅料,其安全性已被美国食品和药物管理局(FDA)认证^[5,6]。 β -环糊精可将低溶解度的药物包入其空腔中,从而提高药物溶解度和生物利用度。我们采用饱和溶液法制备莪术醇与 β -环糊精的包合物,红外光谱证实包合物的形成,气象色谱法测定莪术醇的溶解度较包合前提高了 10.3 倍。本研究对莪术醇 β -环糊精包合物的体外抗肿瘤活性及机制进行研究,为莪术醇制剂开发以及临床前应用奠定基础。

材料与方法

1 药品与试剂 莪术醇(中国药品生物制品检定所,生产批号:100185-200506); β -环糊精(天津市光复精细化工研究所,生产批号:20030603);胎牛血清(美国 GIBCO 公司,生产批号:1175736);DMEM 培养基(美国 GIBCO 公司,生产批号:MD205);碘化丙啶(propidium iodide,PI,美国 Sigma 公司,生产批号:P4170);Trizol(美国 Invitrogen 公司,生产批号:15596-018);MTT(美国 Invitrogen 公司,生产批号:M6494);兔抗人 Survivin 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,生产批号:SC-10811);Annexin V-FITC-PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技发展公司,生产批号:KGA106);SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒(美国 ABI 公司,生产批号:4309155)。

2 细胞培养 人食管鳞癌细胞株 TE-1 购自美国 ATCC 细胞库,以含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基、饱和湿度、5% CO₂、37 °C 环境传代培养。

3 分组 取指数生长期的 TE-1 细胞以 5×10^4 个/mL 细胞分别接种于 100 mL 的培养瓶中。采用随机数字表法将细胞随机分为 4 组,每组 3 瓶。4 组分别为 25、50、100 mg/L 莪术醇 β -环糊精包合物实验组与对照组。实验组细胞分别加入含不同浓度莪术醇 β -环糊精包合物的培养液后,连续培养 48 h;以未加药者作为对照组。

4 莪术醇 β -环糊精包合物的制备与验证 参照文献[7],采用饱和溶液法制备莪术醇 β -环糊精包合物,并采用红外光谱法验证包合物的形成^[8]。称量 0.7375 g β -环糊精溶解于水中定容至 50 mL。另称取 25 mg 莪术醇,用 1 mL 乙醇溶解。25 °C 磁力搅拌下,将莪术醇乙醇液加入 β -环糊精中,充分搅拌 1 h 放置,使沉淀充分析出。抽滤沉淀,少量水洗,减压干燥即得包合物。将莪术醇和 β -环糊精按摩尔比 1:1 物理混合,与制备的包合物粉末分别进行红外光谱检测,以验证包合物的形成。

5 检测指标及方法

5.1 MTT 比色法检测食管癌细胞的生长情况 各组细胞以每孔 10^4 个细胞接种于 96 孔培养板中,每组设 3 个复孔。37 °C、5% CO₂ 的孵箱中培养 24 h 后依次加入 25、50、100 mg/L 莪术醇 β -环糊精包合物的培养液,培养 48 h 后加入 MTT 溶液 50 μ L (5 g/L),37 °C 继续培养 4 h 后终止培养。每孔加入 150 μ L DMSO,摇床振荡 10 min,全自动酶标仪(570 nm)测定各孔的光吸收值(A)。重复 3 次取平均值。

$$\text{生长抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验组 A 值}}{\text{对照组 A 值}}\right) \times 100\%$$

5.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 应用 Annexin V-FITC-PI 双染细胞凋亡检测试剂盒在流式细胞仪进行细胞凋亡检测。具体过程:25、50、100 mg/L 莪术醇 β -环糊精包合物处理 TE-1 细胞 48 h 后,收集各组细胞。用 PBS 洗涤细胞 2 次(2 000 r/min,离心 5 min),加入 500 μ L 的 Binding Buffer 悬浮细胞,再加入 5 μ L Annexin V-FITC 混匀后,加入 5 μ L PI,混匀;室温、避光、反应 15 min 后,1 h 内进行流式细胞仪的检测。

5.3 流式细胞仪检测细胞周期 分别收集 25、50、100 mg/L 莪术醇 β -环糊精包合物处理 48 h 后的 TE-1 细胞,冷 PBS 洗涤 2 次,4 °C、70% 乙醇固定 2 h。调整细胞浓度为 10^6 个细胞/mL,取 1 mL 细胞悬液,PBS 洗 3 次,与含 20 μ g/mL RNA 酶的 Tris-HCl 缓冲液 37 °C 孵育 30 min,用 50 μ g/mL 的 PI 进行细胞 DNA 染色。流式细胞仪检测细胞周期,计算处于 G₀/G₁ 期、S 期和 G₂/M 期的细胞所占比例。

5.4 实时荧光定量 PCR 法检测 Survivin mRNA 的表达 用 Trizol 试剂提取不同浓度莪术醇 β -环糊精包合物处理 48 h 后各组细胞总 RNA,合成 cDNA,所用引物以 primer 3.0 软件设计。由南京金斯瑞生物科技有限公司设计合成。Survivin 基因上游引物序列:5'-GTGTTCTTCTGCTTCAAGG-3',下游引物序列:5'-ATAAACCTGGAAGTGGTG-3',扩增

产物长度为 200 bp。内参照甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 基因上游引物序列: 5'-CAATGACCCCTTCATTGACC-3', 下游引物: 5'-GACAAGCTTC-CCGTTCTCAG-3', 扩增长度为 106 bp。加样体系按照 SYBR Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒说明书操作。实时定量 PCR 仪为美国 ABI 公司 7900 型。反应条件为: 95 °C 5 min, 94 °C 20 s, 59 °C 退火 20 s, 72 °C 延伸 20 s, 共 40 个循环, 72 °C 延伸 5 min。应用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 分析目的基因和内参基因的 Ct 值^[9]。Survivin mRNA 相对表达量用以下公式计算: $\text{folds} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, 其中 $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{survivin}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{survivin}} - Ct_{\text{GAPDH}})_{\text{对照组}}$ 。实验重复 3 次, 取平均值。

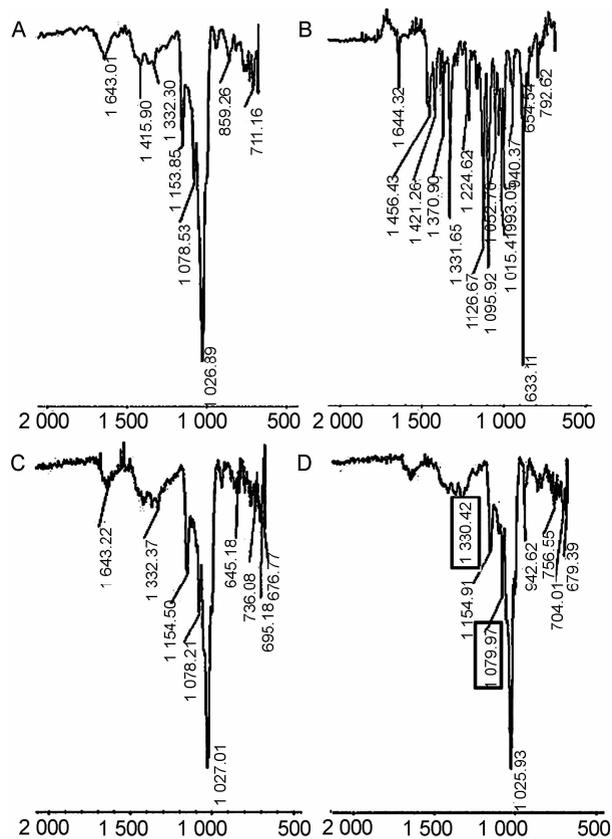
5.5 Western blot 法检测食管癌细胞中 Survivin 蛋白的表达 分别提取经不同浓度莪术醇 β-环糊精包合物处理 48 h 后的细胞总蛋白, 取 50 μg 总蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳转至硝酸纤维素膜。50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入兔抗人 Survivin 多克隆抗体 (1:500) 4 °C 过夜, 洗涤后加入 1:50 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG, 37 °C 作用 1 h, 增强化学发光法显色。以 GAPDH 为内参照。结果用灰度比值表示。实验重复 3 次取平均值。

6 统计学方法 本研究采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。差异显著性采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK-q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 莪术醇、β-环糊精、莪术醇和 β-环糊精物理混合物及莪术醇和 β-环糊精包合物的红外光谱图 (图 1) 对比发现: 包合物在 1 079.97 cm^{-1} 和 1 330.42 cm^{-1} 附近发生明显位移。分别对应莪术醇中仲醇结构的碳-氧伸缩振动和莪术醇中环醚结构的碳-氧-碳伸缩振动。包合物与其他 3 种物质在图谱上有明显的差异, 提示包合物已形成了一个新的物相, 表明莪术醇被 β-环糊精包合成功。

2 莪术醇 β-环糊精包合物处理对食管癌细胞增殖能力的影响 25、50、100 mg/L 莪术醇 β-环糊精包合物处理 TE-1 细胞 48 h 后, 细胞增殖能力下降。TE-1 细胞生长抑制率分别为 (8.87 ± 1.13)%, (16.57 ± 2.05)% 与 (21.14 ± 1.42)%, 各剂量组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明莪术醇 β-环糊精包合物以剂量依赖方式抑制 TE-1 细胞增殖。



注: A 为莪术醇组; B 为 β-环糊精组; C 为莪术醇和 β-环糊精物理混合物组; D 为莪术醇和 β-环糊精包合物组

图 1 莪术醇、β-环糊精、莪术醇和 β-环糊精物理混合物及莪术醇和 β-环糊精包合物的红外光谱图

3 莪术醇 β-环糊精包合物处理对食管癌细胞凋亡的影响 对照组及 25、50、100 mg/L 莪术醇 β-环糊精包合物处理 48 h 后, 各组细胞经流式细胞仪检测可见凋亡率分别为 (2.17 ± 0.19)%, (11.22 ± 0.936)%, (20.41 ± 0.79)%, (32.49 ± 0.86)%, 莪术醇 β-环糊精包合物处理组细胞凋亡率与对照组比较明显增加 ($P < 0.05$), 且随剂量升高而增加。表明莪术醇 β-环糊精包合物具有诱导 TE-1 细胞凋亡作用。

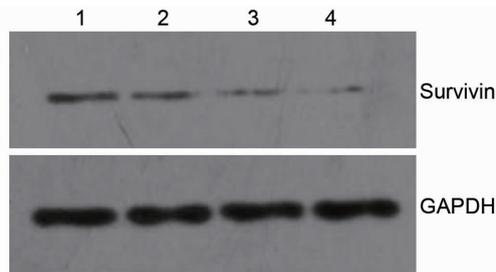
4 莪术醇 β-环糊精包合物处理对食管癌细胞周期的影响 (表 1) 从细胞周期分布情况来看, 经不同浓度莪术醇 β-环糊精包合物处理 48 h 后, TE-1 细胞周期各时相的细胞数占细胞总数的百分比有明显的不同。与对照组比较, 莪术醇 β-环糊精包合物各浓度组处于 S 期的细胞比例逐渐降低, 而处于 G₀/G₁ 与 G₂/M 期的细胞比例逐渐增多, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与浓度为 25 mg/L 莪术醇 β-环糊精包合物组比较, 浓度为 50、100 mg/L 组变化更为显著, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 莪术醇 β -环糊精包合物作用对 TE-1 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞周期各期细胞比例(%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
对照	3	61.10 ± 0.69	23.65 ± 0.18	10.53 ± 0.61
莪术醇 β -环糊精包合物 25 mg/L	3	63.56 ± 0.54 *	19.32 ± 0.37 *	12.67 ± 0.59 *
莪术醇 β -环糊精包合物 50 mg/L	3	65.07 ± 0.57 * Δ	18.23 ± 0.42 * Δ	13.87 ± 0.26 * Δ
莪术醇 β -环糊精包合物 100 mg/L	3	67.12 ± 0.85 * Δ	15.71 ± 0.65 * Δ	15.72 ± 0.45 * Δ

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与莪术醇 β -环糊精包合物 25 mg/L 浓度组比较, $\Delta P < 0.05$;下表同

5 莪术醇 β -环糊精包合物处理对食管癌细胞 Survivin 表达的影响(表 2,图 2) 荧光定量 PCR 检测显示:与对照组比较,经不同浓度莪术醇 β -环糊精包合物处理 48 h 后,TE-1 细胞中 Survivin mRNA 相对表达量呈进行性下降($P < 0.05$)(表 2)。Western blot 检测显示经莪术醇 β -环糊精包合物处理后 TE-1 细胞中 Survivin 蛋白的表达逐渐减弱(图 2)。Survivin 蛋白相对表达水平在对照组为(0.38 ± 0.05)%,25、50、100 mg/L 莪术醇 β -环糊精包合物各处理组分别为(0.25 ± 0.03)%,(0.18 ± 0.02)%及(0.12 ± 0.06)%,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。表明莪术醇 β -环糊精包合物以剂量依赖方式抑制 Survivin 的表达。



注:1 道为对照组;2 道为 25 mg/L 浓度组;3 道为 50 mg/L 浓度组;4 道为 100 mg/L 浓度组

图 2 莪术醇 β -环糊精包合物处理对 Survivin 蛋白表达水平的影响

表 2 莪术醇 β -环糊精包合物作用对 Survivin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	$\Delta\Delta Ct$	相对表达量 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)
对照	3	-2.44 ± 0.14	5.43 ± 0.52
莪术醇 β -环糊精包合物 25 mg/L	3	-1.88 ± 0.42 *	3.78 ± 1.10 *
莪术醇 β -环糊精包合物 50 mg/L	3	-0.95 ± 0.66 * Δ	2.43 ± 0.16 * Δ
莪术醇 β -环糊精包合物 100 mg/L	3	-0.44 ± 0.47 * Δ	1.17 ± 0.47 * Δ

讨 论

莪术醇作为传统的抗肿瘤药物,近年来被用于多种肿瘤的治疗,具有高效低毒的特点,但由于其微溶于

水,使其临床应用受到了限制。为了改善莪术醇的水溶性,近年来研究人员尝试用药剂学方法改变剂型以增加其水溶性。 β -环糊精是低毒、安全有效的药物增溶剂。我们前期研究制成的 β -环糊精包合物,可明显提高莪术醇的溶解度。

我们进一步观察了莪术醇 β -环糊精合成的包合物的体外抗肿瘤活性。MTT 检测结果显示,包合物可明显抑制肿瘤细胞增殖,并呈现出一定的剂量依赖性。流式细胞仪检测显示,包合物可诱导细胞周期发生 G₀/G₁ 期与 G₂/M 期阻滞,并增加了凋亡细胞的百分比。以上结果表明,莪术醇 β -环糊精包合物可抑制食管癌细胞的生长,促进细胞凋亡。

目前,莪术醇 β -环糊精包合物的抗肿瘤作用机制尚不清楚。王娟等^[10]研究表明莪术醇在体外能够以剂量依赖的方式诱导鼻咽癌 CNE-2 细胞发生凋亡,表明莪术醇对凋亡通路的调节可能是其发挥抗肿瘤作用的重要机制。Survivin 是凋亡抑制蛋白(Inhibitor of apoptosis, IAP)家族新成员,与细胞的凋亡和增殖密切相关,是目前已知最强的凋亡抑制剂。Survivin 通过直接抑制凋亡通路下游的凋亡终末效应器 Caspase-3 和 Caspase-7 活性,阻断各种刺激诱导的细胞凋亡过程,从而发挥抗凋亡作用。研究发现沉默 Survivin 表达可促进肿瘤细胞的凋亡,抑制增殖,并提高化疗敏感性^[11]。近年来,Survivin 逐渐成为抗肿瘤治疗中的关键靶点^[12]。在本实验中,我们应用实时荧光定量 PCR 与免疫印迹的方法研究了食管癌细胞中莪术醇 β -环糊精包合物对 Survivin mRNA 与蛋白表达的影响。结果显示,莪术醇 β -环糊精包合物能够以剂量依赖的方式抑制 Survivin 的表达。因此,莪术醇 β -环糊精包合物对 Survivin 表达的抑制,可能是其抑制食管癌细胞恶性表型的机制之一。

综上所述,莪术醇 β -环糊精包合物能够抑制食管癌细胞 TE-1 的增殖,促进凋亡,对 Survivin 的抑制可能与其抗肿瘤作用相关。此外,莪术醇 β -环糊精包合物体内药代动力学特点及与莪术醇抗肿瘤活性的比较尚需深入研究。研究结果有望为新型抗肿瘤制剂的开

发、药物靶点的创新研究提供理论依据和实验基础。

参 考 文 献

- [1] Herskovic A, Russell W, Liptay M, et al. Esophageal carcinoma advances in treatment results for locally advanced disease: a review[J]. *Ann Oncol*, 2012, 23(5): 1095-1103.
- [2] 黄恺飞. 蝎毒多肽提取物促进环磷酰胺抑制 Lewis 肺癌的作用机制研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(4): 537-542.
- [3] 曾建红, 黄庆龙, 陈旭, 等. 莜术抗癌活性成分的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2008, 23(5): 426-428.
- [4] 王耀霞, 徐立春. 莜术醇抗肿瘤研究进展[J]. *医学综述*, 2009, 15(22): 3843-3846.
- [5] Batalova TA, Dorovskich VA, Kurochkina GI, et al. Biological activity of some derivatives of β -cyclodextrin[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2011, 151(6): 698-701.
- [6] Tang J, Wang X, Wang X, et al. β -cyclodextrin-based biodegradable dendrimers for drug delivery[J]. *J Control Release*, 2011, 152(Suppl 1): e89-e90.
- [7] 赵国巍, 廖正根, 梁新丽, 等. 饱和溶液法制备木香挥发油 β -环糊精包合物[J]. *江西中医药*, 2009, 40(320): 73-75.
- [8] 郭涛, 孙方迪, 潘卫, 等. 紫杉醇包合物的制备与鉴定[J]. *中国药理学杂志*, 2010, 45(4): 283-286.
- [9] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [10] 王娟, 陈旭, 曾建红. 莜术醇对鼻咽癌细胞 CEN-2 增殖与凋亡的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2011, 27(7): 790-792.
- [11] Trabulo S, Cardoso AM, Santos-Ferreira T, et al. Survivin silencing as a promising strategy to enhance the sensitivity of cancer cells to chemotherapeutic agents[J]. *Mol Pharm*, 2011, 8(4): 1120-1131.
- [12] Pennati M, Millo E, Gandellini P, et al. RNA interference-mediated validation of survivin and Apollon/BRUCE as new therapeutic targets for cancer therapy[J]. *Curr Top Med Chem*, 2012, 12(2): 69-78.

(收稿:2012-08-07 修回:2012-09-28)

武汉市中西医结合学会耳鼻咽喉头颈外科专业委员会

成立暨学术交流会在武汉召开

武汉市中西医结合学会耳鼻咽喉头颈外科专业委员会大会于2012年9月26日在武汉市中西医结合医院学术报告厅隆重举行,湖北省人民医院耳鼻喉科主任、中国中西医结合耳鼻喉科学会常委华清泉教授,武汉市儿童医院耳鼻喉科主任徐忠强教授,武汉市中西医结合医院耳鼻喉科主任陈望燕教授等武汉市耳鼻喉知名专家学者参加了会议。会议由武汉市中西医结合学会理事长张家衡教授主持,根据武汉市中西医结合学会章程,本次会议推选陈望燕教授为武汉市中西医结合学会耳鼻咽喉头颈外科专业委员会首届主任委员,由华清泉教授、徐忠强教授担任名誉主任委员,肖才文教授、林友平教授等其他6位专家担任副主任委员。会议指出,武汉市中西医结合学会耳鼻咽喉头颈外科专业委员会是为广大耳鼻喉科医师提供的一个学术交流平台,促进耳鼻喉学科的发展,从而更好地为广大患者提供优质的医疗服务。大会成立后,与会的专家教授还举行了简短的学术交流活动,分别就咽异感症的中西医结合治疗、耳鸣的心理治疗、胸骨后甲状腺的手术方式等议题进行了交流和探讨。

(向元悌 整理)