

鱼藤素对人食管癌 Ec-109 细胞增殖及凋亡影响的实验研究

白美玲 李海军 张林西

摘要 **目的** 观察鱼藤素对人食管癌 Ec-109 细胞增殖及凋亡的影响并探讨其可能的作用机制。方法体外培养人食管癌 Ec-109 细胞,并将其分为空白对照组及 5、10、20、40 nmol/L 鱼藤素组 5 组。运用 CCK-8 法检测各组细胞 24、48、72 h 的增殖抑制情况;流式细胞仪检测各组 24 h 细胞早期凋亡率及 24、48 h 凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达。**结果** 与空白对照组同期比较,5、10、20、40 nmol/L 鱼藤素组生长抑制率在 24、48、72 h 均增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。5、10、20、40 nmol/L 鱼藤素组细胞早期凋亡率分别为(4.37 ± 0.35)%、(6.71 ± 0.14)%、(15.62 ± 0.21)%及(19.78 ± 0.15)% ,与空白对照组自发早期凋亡率[(1.10 ± 0.08)%]比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。与空白对照组同期比较,10、20、40 nmol/L 鱼藤素组 Bcl-2 蛋白表达明显下降,Bax 蛋白表达明显上升,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。上述指标均呈时间和剂量依赖性。**结论** 鱼藤素对 Ec-109 细胞具有明显的抑制细胞增殖和促进细胞凋亡的作用,与上调 Bax 蛋白和使 Bcl-2 蛋白表达下降有关。

关键词 鱼藤素;食管癌;增殖;凋亡

Effects of Deguelin on the Proliferation and Apoptosis of Human Esophageal Cancer Cell Ec-109: an Experimental Research BAI Mei-ling, LI Hai-jun, and ZHANG Lin-xi Department of Forensic Pathology, Hebei North College, Hebei (075000), China

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of deguelin on the apoptosis and proliferation of human esophageal cancer cell Ec-109, and to explore its possible mechanisms. **Methods** Human esophageal cancer cells Ec-109 were *in vitro* cultured. They were divided into the blank control group, and 5, 10, 20, and 40 nmol/L deguelin groups. The inhibition on the proliferation was detected at 24, 48, and 72 h using CCK-8 assay. The early apoptosis rate at 24 h was detected by flow cytometry. The expressions of apoptosis-related proteins Bcl-2 and Bax were detected at 24 and 48 h respectively. **Results** Compared with the blank control group at the same point, the growth inhibition rate in all deguelin groups increased at 24, 48, and 72 h, showing statistical difference ($P < 0.05$). The early apoptosis rate was 4.37% ± 0.35%, 6.71% ± 0.14%, 15.62% ± 0.21%, and 19.78% ± 0.15% in 5, 10, 20, and 40 nmol/L deguelin groups, respectively, showing statistical difference when compared with that of the blank control group (1.10% ± 0.08%, $P < 0.05$). Compared with the blank control group, Bcl-2 protein expression obviously decreased, and Bax protein expression obviously increased in 10, 20, and 40 nmol/L deguelin groups, showing statistical difference ($P < 0.05$). The aforesaid indices were in time- and dose-dependent manners. **Conclusion** Deguelin showed obvious effects on inhibiting the proliferation of Ec-109 cells and promoting their apoptosis, which was correlated with up-regulating Bax protein expression and down-regulating Bcl-2 protein expression.

KEYWORDS deguelin; esophageal cancer; proliferation; apoptosis

鱼藤素 (Deguelin) 是除鱼藤酮之外鱼藤属植物

中最常见的鱼藤酮类化合物,分子式为 $C_{23}H_{22}O_6$, 分子量为 394.4。其存在于毒灰叶、鱼藤和毕澄茄的根中,以及浮氏灰叶的叶中,是一种存在于多种植物中的黄酮类化合物。最近的研究表明,鱼藤素具有抗病毒、抗肿瘤作用,是一种具有潜在临床应用价值的抗癌新药^[1,2],而目前国内外对其抗肿瘤机制的研究还不深

基金项目:张家口市 2011 年度市科学技术研究与发展指导计划项目(No.1101111D)

作者单位:河北北方学院法医系病理教研室(河北张家口 075000)

通讯作者:张林西, Tel: 0313 - 4029351, E-mail: linoxizhang@so-

hu.com

人,尤其未见其对食管癌的作用和相关机制研究。本实验以不同浓度鱼藤素处理人食管癌 Ec-109 细胞,分别通过 CCK-8 法和流式细胞术检测细胞增殖及凋亡情况,探讨鱼藤素对食管癌细胞的作用机制。

材料与方 法

1 细胞 人食管癌细胞株 Ec-109 购自中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所,河北北方学院实验中心冻存保留。

2 药物、试剂及仪器 鱼藤素购自瑞士 ALEXIS 公司(ALX-350-118-M025),纯度为 95.6%,用二甲亚砜(DMSO)溶解配成 10 mmol/L 的储存液,等量分装,-20℃保存,使用前用 RPMI 1640 稀释成各种浓度。RPMI 1640 培养基(11875-101)为美国 GIBCO 公司产品;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;细胞计数试剂盒-8(CCK-8)购自上海玛佳公司;Annexin V/PI 双染试剂盒(BMS1031)为美国 BD 公司产品。流式细胞仪为美国 BD 公司(型号:FACS Aria),透射电子显微镜(型号:H-7650)为日本日立公司产品,酶标仪(型号 Stat Fax-2100)为美国 BD 公司产品。

3 细胞培养及分组 将人食管癌细胞株 Ec-109 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基在含有 5%CO₂、37℃恒温培养箱中进行培养。细胞生长进入对数生长期后,用 0.25%胰蛋白酶(Trypsin)消化细胞,细胞计数后进行传代培养,待细胞贴壁后,将细胞分为 5 组:空白对照组(即加入与实验组等量的培养液)及 5、10、20、40 nmol/L 鱼藤素组。

4 CCK-8 法检测细胞增殖抑制 采用 CCK-8 法,每组设 4 个复孔,按上述分组方法分别作用 24、48、72 h 后,选择 490 nm 波长,在全自动荧光酶标仪上检测各孔的吸光度(OD)值。通过下列公式计算各组细胞生长抑制率:生长抑制率(%)=(实验组 OD₄₉₀值-对照组 OD₄₉₀值)/对照组 OD₄₉₀值×100%。

5 透射电镜观察细胞凋亡情况 将不同浓度鱼藤素作用 24 h 的 Ec-109 细胞 1×10⁶ 个,离心,弃上清;分别用 2.5%的戊二醛和 1%锇酸固定细胞,PBS 缓冲液充分洗涤;梯度丙酮脱水,浸透、包埋与聚合,超薄切片并进行醋酸双氧铀、枸橼酸铅双染色,观察各组细胞器的超微结构变化。

6 流式细胞仪检测细胞早期凋亡 收集不同浓度鱼藤素作用 24 h 的 Ec-109 细胞,每组计数 1×10⁶ 个细胞,离心,弃上清液,用 PBS 缓冲液洗涤 2 遍,再按照流式试剂盒的说明向细胞中分别加入 185 μL 缓

冲液,5 μL Annexin V 和 10 μL PI,混匀避光 20 min,离心后弃上清,再加入冷 PBS 洗涤 1 次,用 500 μL PBS 缓冲液悬起细胞,采用流式细胞仪进行细胞早期凋亡检测。

7 流式细胞仪检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达 不同浓度鱼藤素作用 Ec-109 细胞 24、48 h 后,经消化、磷酸盐缓冲液洗涤、离心 3 次。各组均分别加入 FITC-Bax 抗体 100 μL 及 PE-Bcl-2 抗体 10 μL 室温下避光温育 30 min,再用 PBS 缓冲液离心洗涤 2 次,弃上清,用 400 μL PBS 缓冲液悬起细胞,上流式细胞仪,检测各组细胞 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达情况。Bax、Bcl-2 蛋白表达的阳性判定标准均以对数方式采集数据,并以荧光指数(FI)表示基因蛋白的相对含量,公式为:FI=实验组蛋白表达的平均荧光强度/对照组蛋白表达的平均荧光强度。FI>1,判定为表达水平升高,反之则为降低。

8 统计学方法 应用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *q* 检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组细胞生长抑制率比较(表 1) 与空白对照组同期比较,5、10、20、40 nmol/L 鱼藤素组生长抑制率在 24、48、72 h 均增加,差异有统计学意义(*P*<0.05),且 20、40 nmol/L 鱼藤素组生长抑制率明显高于同期 10 nmol/L 鱼藤素组(*P*<0.05)。随着干预时间延长,10、20、40 nmol/L 鱼藤素组生长抑制率亦逐渐增加。

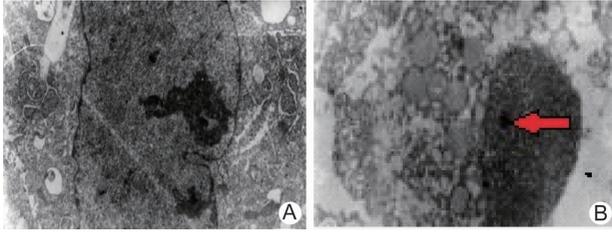
表 1 各组细胞生长抑制率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	生长抑制率		
		24 h	48 h	72 h
空白对照	9	1.47±0.31	2.12±0.54	3.67±0.82
5 nmol/L 鱼藤素	9	3.51±0.40 [▲]	4.92±0.32 [▲]	7.50±1.12 [▲]
10 nmol/L 鱼藤素	9	4.68±0.53 [▲]	7.61±0.87 [▲]	19.56±1.64 ^{▲▲}
20 nmol/L 鱼藤素	9	13.67±1.01 ^{▲○}	18.06±0.61 ^{▲○}	32.61±0.67 ^{*▲▲○}
40 nmol/L 鱼藤素	9	22.58±0.84 ^{▲○}	33.14±1.21 ^{*▲○}	49.46±2.93 ^{*▲▲○}

注:与本组 24 h 比较,**P*<0.01;与本组 48 h 比较,△*P*<0.01;与空白对照组同期比较,▲*P*<0.05;与 10 nmol/L 鱼藤素组同期比较,○*P*<0.05

2 各组细胞透射电镜下形态学比较(图 1) 空白对照组 Ec-109 细胞周边可伸出大小不等的微绒毛,细胞质中有丰富的游离核糖体,可见线粒体,内质网,溶酶体等细胞器。5 nmol/L 鱼藤素组 Ec-109 细胞体积变小,出现明显凋亡结构,主要表现为异染色质

增多,染色质浓缩成团块,边集在核膜下,呈现新月形,细胞器数量减少;而 40 nmol/L 鱼藤素组 Ec-109 细胞溶酶体增多,内质网扩张,胞质水肿,出现空泡,逐渐形成凋亡小体,部分可见核碎裂。



注:A 为空白对照组;B 为 40 nmol/L 鱼藤素组;图 2 同;箭头所示为凋亡的细胞核碎裂

图 1 空白对照组和 40 nmol/L 鱼藤素组细胞透射电镜图像 (×5 800)

3 各组细胞早期凋亡率比较(图 2) 鱼藤素对 Ec-109 细胞有明显的诱导细胞凋亡和促进细胞死亡作用,5、10、20、40 nmol/L 鱼藤素组细胞早期凋亡率分别为 (4.37 ± 0.35)%、(6.71 ± 0.14)%、(15.62 ± 0.21)% 及 (19.78 ± 0.15)% ,与空白对照组自发早期凋亡率 [(1.10 ± 0.08)%] 比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中以 40 nmol/L 鱼藤素作用更明显。

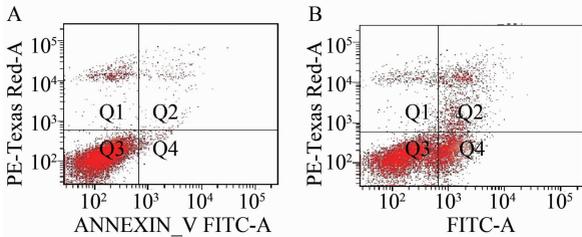


图 2 空白对照组和 40 nmol/L 鱼藤素组细胞早期凋亡比较

4 各组细胞凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达比较(表 2) 与空白对照组同期比较,10、20、40 nmol/L 鱼藤素组 Bcl-2 蛋白 FI 值明显降低,而 Bax 蛋白 FI 值明显升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$),且 20、

40 nmol/L 鱼藤素较 10 nmol/L 鱼藤素作用明显 ($P < 0.05$)。与本组干预 24 h 比较,48 h 时 40 nmol/L 鱼藤素组 Bcl-2 蛋白 FI 值明显降低,20、40 nmol/L 鱼藤素组 Bax 蛋白 FI 值明显升高,差异均有统计学意义 ($P < 0.01, P < 0.05$)。

讨 论

食管癌是我国较多见的消化系统恶性肿瘤之一,由于其起病隐匿,患者自觉症状不明显,确诊时多数已属中晚期,许多患者已失去手术及放疗的机会,而以化疗为主要治疗手段,但效果欠佳,病情不稳定,故新抗癌药物的开发迫在眉睫。

中药的细胞毒作用通常明显低于化疗药物,因此应将研究的目标立足于中药逆转肿瘤细胞增殖、分化、凋亡等生物学行为异常^[3]。近年来从天然动植物体内寻找敏感且无毒副反应的抗癌活性成分已成为国内外学者研究的热点之一。鱼藤素从植物鱼藤中提取,国内外学者对其生物学活性研究较少。国外有报道通过基因芯片分析评估鱼藤素作用于 4 个人类乳腺癌细胞系来探索其抗肿瘤的机制,结果显示鱼藤素通过 Wnt 或其他信号传导通路来抗乳腺癌细胞增殖^[4],为临床上评估鱼藤素对乳腺癌的治疗效果做出理论依据。另外由于常规化疗效果不佳,导致许多白血病患者预后差,故有研究显示鱼藤素可通过不同途径抑制白血病细胞增殖,并诱导其发生凋亡^[5,6]。本实验结果发现,鱼藤素能明显抑制食管癌 Ec-109 细胞增殖,其抑制作用与药物作用时间和药物浓度正相关,呈时间-剂量依赖性,这与文献^[7]报道的药物浓度范围一致。

为了更好地了解细胞凋亡的形态学特点,笔者还通过透射电镜观察发现 40 nmol/L 鱼藤素组 Ec-109 细胞溶酶体增多,内质网扩张,胞质水肿,出现空泡,逐渐形成凋亡小体,部分可见核碎裂。而流式细胞仪检测到凋亡峰进一步证实凋亡的存在。由此认为鱼藤素可诱导 Ec-109 细胞凋亡,且细胞凋亡的形态学改变明显。

表 2 各组细胞 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的 FI 值比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bcl-2		Bax	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白对照	9	1.08 ± 0.12	1.03 ± 0.30	1.02 ± 0.22	1.06 ± 0.15
5 nmol/L 鱼藤素	9	1.01 ± 0.07	0.98 ± 0.21	1.94 ± 0.15	2.65 ± 0.19
10 nmol/L 鱼藤素	9	0.88 ± 0.13 [△]	0.82 ± 0.03 [△]	2.31 ± 0.09 [△]	4.59 ± 0.61 [△]
20 nmol/L 鱼藤素	9	0.45 ± 0.01 ^{△▲}	0.39 ± 0.14 ^{△▲}	4.76 ± 0.11 ^{△▲}	9.60 ± 0.16 ^{*△▲}
40 nmol/L 鱼藤素	9	0.13 ± 0.24 ^{△▲}	0.05 ± 0.24 ^{**△▲}	9.19 ± 0.21 ^{△▲}	19.42 ± 0.33 ^{**△▲}

注:与本组 24 h 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与空白对照组同期比较, [△] $P < 0.05$;与 10 nmol/L 鱼藤素组同期比较, [▲] $P < 0.05$

Bcl-2 蛋白表达于线粒体膜上,其主要作用是增强线粒体膜电位,维持线粒体膜的完整性,从而抑制线粒体释放促凋亡蛋白。此外,Bcl-2 蛋白还可以抑制线粒体钙离子的释放^[8],使核酸内切酶无法活化,从而抑制细胞凋亡而延长细胞的寿命。有研究表明 Bcl-2 蛋白还具有直接抗氧化作用,可以抑制促凋亡蛋白 Bax、Bak 的细胞毒作用,抑制凋亡蛋白酶的激活^[9]。Bax 蛋白在正常细胞中主要定位表达于细胞浆,在细胞受到死亡信号刺激后,发生构像变化,从细胞浆转移到细胞器膜上,尤其是线粒体外膜上,与抗凋亡蛋白 Bcl-2 形成异源二聚体^[10],拮抗 Bcl-2,使 Bcl-2 丧失对凋亡的抑制作用,引起细胞器功能丧失和各种促凋亡因子的释放,最终导致细胞的凋亡,故 Bcl-2 和 Bax 之间的平衡对细胞凋亡的调节起重要作用。本实验结果发现,不同浓度鱼藤素作用下的 Ec-109 细胞中抗凋亡的 Bcl-2 蛋白表达均明显下降,并呈时间依赖性;而促进凋亡的 Bax 蛋白表达却稳步升高,由此可见鱼藤素通过某些途径激活了促进食管癌细胞凋亡的基因,同时也能够下调抑制凋亡的基因,使食管癌细胞内 Bcl-2 与 Bax 蛋白表达比例降低,最终导致细胞凋亡。

总之,本实验结果显示鱼藤素可有效抑制 Ec-109 细胞增殖,诱导 Ec-109 细胞凋亡,其作用机制与调节凋亡的相关蛋白表达有关,为临床上抗癌药物的进一步开发提供实验依据。

参 考 文 献

- [1] Ji BC, Yu CC, Yang ST, et al. Induction of DNA damage by deguelin is mediated through reducing DNA repair genes in human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells [J]. *Oncol Rep*, 2012, 27 (4): 959 - 964.
- [2] Chu ZH, Liang XH, Zhou XL, et al. Effects of deguelin on proliferation and apoptosis of MCF-7 breast cancer cells by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway [J]. *J Chin Integr Med*, 2011, 9(5): 533 - 538.
- [3] 吴雄志. 运用新一代抗肿瘤药物分类系统指导中医学研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2009, 29(9): 838 - 840.
- [4] Rodenberg JM, Brown PH. A novel look into estrogen receptor-negative breast cancer prevention with the natural, multifunctional signal transduction inhibitor deguelin [J]. *Cancer Prev Res*, 2009, 2(11): 942 - 950.
- [5] Ito S, Oyake T, Murai K, et al. Deguelin suppresses cell proliferation via the inhibition of survivin expression and STAT3 phosphorylation in HTLV-1-transformed T cells [J]. *Leuk Res*, 2010, 34(3): 352 - 357.
- [6] Li R, Chen Y, Shu WX, et al. Involvement of SRC-3 in deguelin-induced apoptosis in Jurkat cells [J]. *Int J Hematol*, 2009, 89(5): 628 - 635.
- [7] Liu HL, Chen Y, Cui GH, et al. Effect of deguelin on proliferation and apoptosis of lymphoma Daudi cells and its mechanism [J]. *J Chin Integr Med*, 2007, 9(3): 176 - 180.
- [8] Chami M, Prandini A, Campanella M, et al. Bcl-2 and Bax exert opposing effects on Ca²⁺ signaling, which do not depend on their putative pore forming region [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 54581 - 54589.
- [9] Métrailer RI, Pagano A, Carnesecchi S, et al. Bcl-2 protects against hyperoxia-induced apoptosis through inhibition of the mitochondria dependent pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2007, 42(7): 1062 - 1074.
- [10] Lalier L, Cartron PF, Juin P, et al. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis [J]. *Apoptosis*, 2007, 12(5): 887 - 896.

(收稿:2012-02-24 修回:2012-12-16)

本刊网站改版升级

中国中西医结合杂志社网站自 2013 年 1 月 1 日起改版升级。升级后的网站包含新闻、会议征文、论坛、专家博客、常用资料下载等功能,同时新增全文下载功能,读者可免费注册并登陆后进行免费下载,欢迎广大读者点击查看。欢迎各位作者、读者访问我社网站 <http://www.cjim.cn>,希望能够为中医、中西医结合医学领域专业人员提供一个展示、交流、学习的平台。

(本刊讯)