

去甲斑蝥素对人胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡作用的研究

张日沅 林胜璋 陈肿 王盈盈 徐贤绸

【摘要】目的 探讨去甲斑蝥素对人胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡的作用及其机制。**方法** 将 PANC-1 细胞株随机分为处理组和对照组,处理组加入不同浓度的去甲斑蝥素培养 24h 后,CCK-8 法检测细胞增殖情况;流式细胞术分析细胞的凋亡情况;免疫印迹法检测细胞内质网应激和凋亡相关蛋白的表达;荧光定量 PCR 技术检测细胞内质网应激和凋亡相关蛋白 mRNA 表达。**结果** 不同浓度去甲斑蝥素处理 PANC-1 细胞 24h 后,与对照组相比,能降低细胞的存活率并诱导其凋亡。与对照组相比,处理组中内质网应激和凋亡相关蛋白的表达水平均上调(均 $P<0.05$),同时其 mRNA 的表达水平亦均上调(均 $P<0.05$)。**结论** 去甲斑蝥素能明显抑制人胰腺癌 PANC-1 细胞的生长并诱导其凋亡,并且具有浓度依赖性,这一作用可能是通过内质网应激介导的凋亡途径实现的。

【关键词】 胰腺癌 去甲斑蝥素 凋亡 内质网应激

Effect of norcantharidin on human pancreatic cancer PANC-1 cells ZHANG Riyuan, LIN Shengzhang, CHEN Chong, et al. Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325027, China

【Abstract】Objective To investigate the effect of norcantharidin on human pancreatic cancer PANC-1 cells. **Methods** PANC-1 cells were cultured with 0.1% DMSO and norcantharidin (0, 10, 50, 75, 100, 150, 200 $\mu\text{mol/L}$) for 24h. The growth inhibitory effect was observed by using CCK-8, cell apoptosis was determined by flow cytometry (FCM). The expressions of endoplasmic reticulum stress (ERS) markers were detected by Western blot, expressions of GRP78 and GADD153 mRNA were detected by real-time PCR after exposure to norcantharidin. **Results** CCK-8 assay showed that norcantharidin significantly inhibited the growth of PANC-1 cells. Apoptosis rates of PANC-1 cells treated with norcantharidin were significantly higher than those of control group. Western blot analysis showed that norcantharidin up-regulated ERS markers ($P<0.05$). Real-time PCR showed that the expression of GRP78 and GADD153 mRNA in PANC-1 cells treated with norcantharidin was higher than that of control group ($P<0.05$). **Conclusion** Norcantharidin can inhibit the growth of human pancreatic cancer PANC-1 cells and induce cell apoptosis. ERS-mediated apoptosis pathway may be involved in norcantharidin-induced apoptosis in pancreatic cancer PANC-1 cells.

【Key words】 Pancreatic cancer Norcantharidin Apoptosis Endoplasmic reticulum stress

胰腺癌是一种恶性程度极高的消化道肿瘤,其起病隐袭,病情进展迅速,且早期诊断率低,预后差^[1]。近年来寻找新型的抗肿瘤药是治疗肿瘤的趋势^[2]。体内外研究证实中药单体能高效、安全地抑制肿瘤细胞增殖,并且无肝肾功能损害,不引起骨髓抑制还能增强免疫功能。本研究探讨中药单体去甲斑蝥素抗胰腺癌的机制,为其治疗胰腺癌提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 去甲斑蝥素(美国 Sigma 公司);人胰腺癌

作者单位:325027 温州医科大学附属第二医院普外科(张日沅、林胜璋,张日沅为研究生,现在平阳县人民医院普外科工作);平阳县人民医院普外科(陈肿、王盈盈、徐贤绸)

通信作者:张日沅, E-mail:pyzry2013@163.com

细胞系 PANC-1 (中国科学院上海细胞库);胎牛血清(杭州四季青公司);青霉素-链霉素(北京索莱宝科技有限公司);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);细胞增殖检测试剂盒(CCK-8 kit)(日本 Dojindo 公司);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BioVision 公司);小鼠抗人 GADD153 抗体、小鼠抗人 ATF4 抗体、兔抗人 GRP78 抗体(英国 Abcam 公司);兔抗人 phospho-PERK (Thr980)抗体、兔抗人 phospho-eIF2 α (Ser51) 抗体、兔抗人 cleaved caspase-3(Asp175)抗体、兔抗人 β -tubulin 抗体(美国 CST 公司)。

1.2 方法

1.2.1 PANC-1 细胞培养 PANC-1 细胞在含 10% 灭活胎牛血清、100U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的 DMEM 培养基中,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳条件下培养。使用容积

为 60ml、培养面积为 25cm² 的斜颈带滤膜的培养瓶培养,盛约 5ml 的完全培养基。细胞呈单层贴壁生长,生长至 80%~90% 时传代。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖 收集对数生长期 PANC-1 细胞,接种于 96 孔培养板中常规培养。每孔总体积 100 μ l,细胞培养 24h 后加药物处理,分对照组(0.1% DMSO 溶液)和处理组;处理组再根据添加的去甲斑蝥素浓度分为 A 组(10 μ mol/L)、B 组(50 μ mol/L)、C 组(75 μ mol/L)、D 组(100 μ mol/L)、E 组(150 μ mol/L)、F 组(200 μ mol/L);每组设 6 个复孔,继续培养 24h。然后每孔加入 10 μ l 的 CCK-8 溶液和 100 μ l 不含血清的培养基,培养 4h,酶标仪测 A450 值,实验重复 3 次,计算 24h 细胞存活率[细胞存活率=(处理组 A450 值-空白调零 A450 值)/(对照组 A450 值-空白调零 A450 值) $\times$ 100%]。

1.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期 PANC-1 细胞,接种于 6 孔培养板中常规培养。细胞培养 24h 后加药物处理分组(分组法同前),实验重复 3 次。将细胞重悬于 500 μ l Binding buffer 中,加入 5 μ l Annexin V-FITC 和 10 μ l PI,室温下避光孵育 5min 后在流式细胞仪上进行检测。流式细胞仪激发光波长用 488 nm,用一波长为 515nm 的通带滤器检测 FITC 荧光,另一波长 $>$ 560nm 的滤器检测 PI。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达 于 6 孔板中收集对数生长期 PANC-1 细胞,药物处理分组(分组法同前),细胞裂解液作用后,提取细胞总蛋白,采用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳,转膜,之后将 PVDF 膜置于 5%脱脂奶粉中室温封闭 1.5 h,并置于内质网应激和凋亡相关蛋白 GRP78、phospho-PERK、phospho-eIF2 α 、ATF4、GADD153、cleaved caspase-3 和内参蛋白 β -tubulin 中参与免疫反应,最后化学发光、显影、定影,胶片扫描,以各蛋白与 β -tubulin 灰度比值表示蛋白表达水平。

1.2.5 荧光定量 PCR 收集对数生长期 PANC-1 细胞,接种于 6 孔培养板中常规培养。细胞培养 24 h 后加药物处理分组(分组法同前)。实验重复 3 次。进行 RNA 提取以及 RNA 浓度的测定,采用美国 Fermentas 公司的 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 进行逆转录,采用日本 Toyobo 公司的 SYBR Green Real-time PCR Master Mix-Plus- 试剂盒进行 PCR 扩增,检测基因表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用方差分析,组间比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 各组 PANC-1 细胞 24h 存活率、凋亡率的比较 见表 1。

表 1 各组 PANC-1 细胞 24h 存活率、凋亡率的比较(%)

组别	细胞存活率	细胞凋亡率
A 组	94.30 $\pm$ 3.22	8.80 $\pm$ 1.18
B 组	83.11 $\pm$ 4.29*	11.34 $\pm$ 1.23*
C 组	70.96 $\pm$ 2.63*	13.75 $\pm$ 0.59*
D 组	53.35 $\pm$ 5.49*	21.12 $\pm$ 2.31*
E 组	44.37 $\pm$ 2.21*	41.30 $\pm$ 2.94*
F 组	22.08 $\pm$ 1.78*	57.30 $\pm$ 2.14*
对照组	100.00 $\pm$ 0.00	8.47 $\pm$ 1.56

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

由表 1 可见,除 A 组外,处理组与对照组的细胞 24h 存活率、凋亡率比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);并且,去甲斑蝥素对 PANC-1 细胞 24h 存活率的半抑制浓度约 100 μ mol/L。

2.2 Western blot 检测各组 PANC-1 细胞内质网应激和凋亡相关蛋白表达水平 见图 1、表 2。

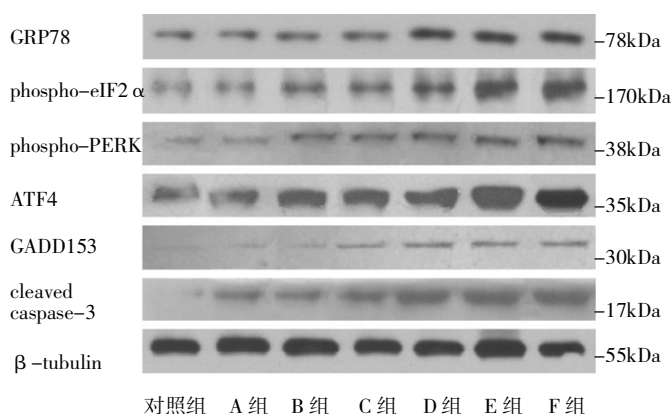


图 1 Western blot 检测各组 PANC-1 细胞内质网应激和凋亡相关蛋白表达水平电泳图

由图 1 可见,处理组较对照组 Western blot 结果蛋白表达灰度高。由表 2 可见,除 A 组外,处理组较对照组 GRP78、phospho-eIF2 α 、phospho-PERK、ATF4、cleaved caspase-3 蛋白的表达水平均上调(均 $P < 0.05$);除 A、B、C 组外,D、E、F 组较对照组 GADD153 蛋白的表达水平均上调(均 $P < 0.05$)。

2.3 各组 PANC-1 细胞内质网应激和凋亡相关蛋白 mRNA 表达水平比较 见表 3。

由表 3 可见,除 A 组外,处理组与对照组比较,PANC-1 细胞 GRP78、phospho-eIF2 α 、phospho-PERK、

表 2 各组 PANC-1 细胞内质网应激和凋亡相关蛋白表达水平比较

组别	GRP78	phosphor-eIF2 α	phosphor-PERK	ATF4	GADD153	cleaved caspase-3
A 组	0.29 $\pm$ 0.02	0.33 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.03	0.02 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.02
B 组	0.39 $\pm$ 0.03*	0.43 $\pm$ 0.02*	0.32 $\pm$ 0.03*	0.99 $\pm$ 0.02*	0.03 $\pm$ 0.02	0.34 $\pm$ 0.02*
C 组	0.44 $\pm$ 0.02*	0.51 $\pm$ 0.02*	0.37 $\pm$ 0.02*	1.12 $\pm$ 0.01*	0.04 $\pm$ 0.01	0.69 $\pm$ 0.03*
D 组	0.59 $\pm$ 0.02*	0.61 $\pm$ 0.03*	0.42 $\pm$ 0.03*	1.22 $\pm$ 0.02*	0.11 $\pm$ 0.02*	0.82 $\pm$ 0.02*
E 组	0.71 $\pm$ 0.02*	0.82 $\pm$ 0.02*	0.57 $\pm$ 0.02*	1.92 $\pm$ 0.03*	0.19 $\pm$ 0.02*	1.27 $\pm$ 0.02*
F 组	0.90 $\pm$ 0.03*	0.93 $\pm$ 0.02*	0.71 $\pm$ 0.03*	2.23 $\pm$ 0.02*	0.27 $\pm$ 0.03*	1.42 $\pm$ 0.03*
对照组	0.25 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.04	0.02 $\pm$ 0.01	0.04 $\pm$ 0.02

注:与对照组比较,* $P<0.05$

表 3 各组 PANC-1 细胞内质网应激和凋亡相关蛋白 mRNA 表达水平比较

组别	GRP78 mRNA	phosphor-eIF2 α mRNA	phosphor-PERK mRNA	ATF4 mRNA	GADD153 mRNA	cleaved caspase-3 mRNA
A 组	1.24 $\pm$ 0.02	1.11 $\pm$ 0.21	1.09 $\pm$ 0.01	1.33 $\pm$ 0.02	1.08 $\pm$ 0.02	1.32 $\pm$ 0.29
B 组	1.97 $\pm$ 0.13*	1.95 $\pm$ 0.24*	1.86 $\pm$ 0.20*	1.98 $\pm$ 0.02*	2.01 $\pm$ 0.03	2.27 $\pm$ 0.11*
C 组	2.53 $\pm$ 0.09*	2.63 $\pm$ 0.30*	2.69 $\pm$ 0.31*	2.71 $\pm$ 0.20*	2.89 $\pm$ 0.22	3.11 $\pm$ 0.19*
D 组	3.40 $\pm$ 0.21*	3.48 $\pm$ 0.42*	3.70 $\pm$ 0.26*	3.66 $\pm$ 0.46*	4.39 $\pm$ 0.27*	4.15 $\pm$ 0.20*
E 组	4.46 $\pm$ 0.12*	4.51 $\pm$ 0.43*	4.66 $\pm$ 0.44*	4.94 $\pm$ 0.33*	5.04 $\pm$ 0.22*	5.31 $\pm$ 0.32*
F 组	5.87 $\pm$ 0.22*	5.90 $\pm$ 0.25*	5.98 $\pm$ 0.54*	5.89 $\pm$ 0.41*	6.02 $\pm$ 0.31*	6.41 $\pm$ 0.37*
对照组	1.00 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.19	1.00 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.21

注:与对照组比较,* $P<0.05$

ATF4、cleaved caspase-3 mRNA 的表达水平均上调(均 $P<0.05$);除 A、B、C 组外,D、E、F 组较对照组 GADD153 mRNA 的表达水平亦均上调(均 $P<0.05$)。

3 讨论

去甲斑蝥素是从传统中药中提取并经人工合成的一种新型低毒的抗肿瘤药物,具有较强的抗肿瘤活性和独特的升高血白细胞作用。去甲斑蝥素抑制肝癌和结肠癌等肿瘤细胞的增殖,可能机制是诱导细胞凋亡^[3-4],但对于其抗胰腺癌作用的机制仍没有完全的认识。本研究观察了去甲斑蝥素对人胰腺癌 PANC-1 细胞增殖和凋亡的影响,结果显示,去甲斑蝥素对 PANC-1 细胞的生长有明显抑制作用,并呈浓度依赖关系。流式细胞术检测结果显示去甲斑蝥素可通过诱导细胞凋亡而发挥抑制 PANC-1 细胞生长的作用。

介导肿瘤细胞凋亡的途径很多,内质网应激介导的凋亡途径是一种新的凋亡途径^[5-7]。内质网是各种分泌蛋白和膜蛋白合成与折叠的一种细胞器。多种生理或病理情况下,例如蛋白质糖基化的抑制、蛋白质不能形成正常的二硫键结合、突变蛋白表达以及氧化还原状态的改变等均会引起未折叠蛋白或错误折叠蛋白在内质网聚集,损伤内质网的正常生理功能,称为内质网应激(ERS)^[8]。发生 ERS 时,细胞内 GRP78 结合未折叠或错误折叠蛋白质,诱发非折叠蛋白反应,激活 ERK/eIF2 α /

ATF4、ATF6 和 IRE-1/XBP-1 3 条信号途径,增强对蓄积在内质网内的未折叠或错误折叠蛋白质的处理能力,以利于维持细胞的正常功能^[9]。其中,GRP78 是 ERS 的标志性特异分子。如果细胞损伤太过严重或时间太过长久,内环境稳定不能及时恢复,ERS 可以激活下游的凋亡信号分子 GADD153,诱导细胞凋亡,从而去除受损伤的细胞^[10]。以此假设:去甲斑蝥素亦可通过 ERS 介导的凋亡途径诱导胰腺癌细胞凋亡。Western blot 和荧光定量 PCR 结果显示,去甲斑蝥素明显上调 GRP78 蛋白和基因的表达水平,并且 GRP78 上调的水平 and 细胞凋亡的水平一致。此外 Western blot 结果还显示,ERS 的其他反应蛋白,如磷酸化 PERK、磷酸化 eIF2 α 和 ATF4 在经去甲斑蝥素处理 PANC-1 细胞中表达明显增高。这些结果表明 ERS 在去甲斑蝥素诱导的 PANC-1 细胞凋亡中起了重要作用。

综上所述,本研究显示去甲斑蝥素对 PANC-1 细胞具有生长抑制和凋亡诱导的作用,其可能的机制是去甲斑蝥素可通过 ERS 介导的凋亡途径诱导 PANC-1 细胞凋亡。此结果对去甲斑蝥素在抗胰腺癌的临床应用及其机制研究有指导作用。本实验仅在体外条件下研究了去甲斑蝥素对人胰腺癌 PANC-1 细胞的生长抑制和凋亡诱导作用及其机制,还需完成在动物体内进一步的实验研究。

(下转第 1128 页)

4 参考文献

- [1] 赫捷, 赵平, 陈万青. 2011 中国肿瘤登记年报[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2012: 26.
- [2] Heist R S, Engelman J A. SnapShot: non-small cell lung cancer[J]. *Cancer Cell*, 2012, 21(3): 448.e1-e2.
- [3] 杨企铮, 贾淑杰, 李德华. 中药藤黄的近代研究[J]. *中国肿瘤临床*, 1994, 21(6): 464-466.
- [4] Lee P N, Ho W S. Antiproliferative activity of gambogic acid isolated from *Garcinia hanburyi* in Hep3B and Huh7 cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2013, 29(5): 1744-1750.
- [5] Fang L, Chen B, Liu S, et al. Synergistic effect of a combination of nanoparticulate Fe₃O₄ and gambogic acid on phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/Bad pathway of LOVO cells[J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 4109-4118.
- [6] 翟万银, 周双雯, 贾春平, 等. 藤黄酸抗肿瘤细胞生物学机制[J]. *细胞生物学杂志*, 2009, 31(4): 481-485.
- [7] 钱婧, 王科明. 藤黄酸抗肿瘤作用靶点的研究进展[J]. *中国肿瘤*, 2011, 20(6): 441-446.
- [8] Gupta S C, Kim J H, Prasad S, et al. Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2010, 29(3): 405-434.
- [9] 张洪明, 朱晓莉, 陈保安, 等. 藤黄酸诱导 SPC-A-1 肺腺癌细胞凋亡机制的探讨[J]. *实用临床医药杂志*, 2009, 13(2): 44-47.
- [10] Martindale J L, Holbrook N J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival[J]. *J Cell Physiol*, 2002, 192(1): 1-15.
- [11] Wang J, Yuan Z. Gambogic acid sensitizes ovarian cancer cells to doxorubicin through ROS-mediated apoptosis[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(1): 199-206.
- [12] Ichijo H, Nishida E, Irie K, et al. Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways[J]. *Science*, 1997, 275(5296): 90-94.
- [13] Kim D A, Jeon Y K, Nam M J. Galangin induces apoptosis in gastric cancer cells via regulation of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase isozyme L1 and glutathione S-transferase P[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(3-4): 684-688.
- [14] Davis R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. *Cell*, 2000, 103(2): 239-252.
- [15] Wagner E F, Nebreda A R. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development[J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(8): 537-549.
- [16] Shamas-Din A, Kale J, Leber B, et al. Mechanisms of action of Bcl-2 family proteins[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, 5(4): a008714.
- [17] 郭剑英, 李英, 潘家强, 等. 线粒体通透性转换孔及其与细胞凋亡的关系[J]. *动物医学进展*, 2009, 30(8): 101-105.
- [18] Bratton S B, Salvesen G S. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome[J]. *J Cell Sci*, 2010, 123(Pt 19): 3209-3214.
- [19] Riedl S J, Shi Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004, 5(11): 897-907.
- [20] Gan F F, Nagle A A, Ang X, et al. Shogaols at proapoptotic concentrations induce G₂/M arrest and aberrant mitotic cell death associated with tubulin aggregation[J]. *Apoptosis*, 2011, 16(8): 856-867.

(收稿日期: 2013-10-24)

(本文编辑: 胥昀)

(上接第 1123 页)

4 参考文献

- [1] Vincent A, Herman J, Schulick R, et al. Pancreatic cancer [J]. *Lancet*, 2011, 378(9791): 607-620.
- [2] 刘岸, 罗江, 张坚红, 等. 大黄素联合吉西他滨抑制体外胰腺癌生长及其机制研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(5): 652-656.
- [3] 王清, 贾雪梅, 王淑玉, 等. 姜黄素对人卵巢癌裸鼠皮下移植瘤生长的影响[J]. *江苏医药*, 2005, 31(3): 217-218.
- [4] Chen Y N, Chen J C, Yin S C, et al. Effector mechanisms of norcantharidin-induced mitotic arrest and apoptosis in human hepatoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2002, 100(2): 158-165.
- [5] Zinszner H, Kuroda M, Wang X, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum[J]. *Genes Dev*, 1998, 12(7): 982-995.
- [6] Marciniak S J, Yun C Y, Oyadomari S, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum[J]. *Genes Dev*, 2004, 18(24): 3066-3077.
- [7] Rao R V, Ellerby H M, Bredesen D E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program[J]. *Cell Death Differ*, 2004, 11(4): 372-380.
- [8] Rasheva V I, Domingos P M. Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2009, 14(8): 996-1007.
- [9] Walter P, Ron D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation[J]. *Science*, 2011, 334(6059): 1081-1086.
- [10] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. *Nat Cell Biol*, 2011, 13(3): 184-190.

(收稿日期: 2014-03-26)

(本文编辑: 李媚)