

土木香乙酸乙酯提取物对人胰腺癌 Capan-2 细胞增殖的抑制作用及机制研究^Δ

王霖玲^{1*}, 曾健梅¹, 阎优优², 张博², 林能明^{1,2#} (1. 浙江中医药大学附属杭州第一医院转化医学研究中心, 杭州 310006; 2. 杭州市第一人民医院/南京医科大学附属杭州医院转化医学研究中心, 杭州 310006)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)31-4384-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.31.17

摘要 目的: 研究土木香乙酸乙酯提取物(IHE)对人胰腺癌 Capan-2 细胞增殖的抑制作用及机制。方法: 采用 MTT 法测定 0、0.5、1、2、4、8 μg/mL 的 IHE 作用 48 h 后细胞的增殖抑制率, 克隆形成试验观察 0、1、2 μg/mL 的 IHE 作用 1 周后对细胞克隆形成的影响, Hoechst 33342 染色法观察 0、2、4 μg/mL 的 IHE 作用 48 h 后细胞核形态的变化, 流式细胞术检测 0、4、8、16 μg/mL 的 IHE 作用 48 h 后细胞的凋亡率, JC-1 染色法观察 0、4、8、16 μg/mL 的 IHE 作用 24 h 后细胞线粒体膜电位变化, Western blot 法检测 0、4、8、16 μg/mL 的 IHE 作用 48 h 后细胞线粒体凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、Mcl-1 和 p53 上调凋亡因子(PUMA)、多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)蛋白的表达。结果: 2、4、8 μg/mL 的 IHE 对细胞的增殖有明显抑制作用, 且呈浓度依赖性, 半数抑制浓度为 6.6 μg/mL; 1、2 μg/mL 的 IHE 可明显抑制细胞的克隆形成; 4 μg/mL 的 IHE 可明显造成细胞核固缩; 8、16 μg/mL 的 IHE 可明显促进细胞凋亡, 16 μg/mL 的 IHE 作用 48 h 后细胞凋亡率达到 45.53%; 16 μg/mL 的 IHE 作用 24 h 后可引起 82.47% 的细胞线粒体膜电位下降; 8 μg/mL 的 IHE 可明显下调细胞中 Bcl-2、Mcl-1、PUMA、PARP 蛋白表达, 16 μg/mL 的 IHE 可明显下调细胞中 Mcl-1、PUMA 表达。结论: IHE 可能通过引起细胞线粒体膜电位的下降, 下调细胞中 PUMA、Mcl-1 蛋白的表达, 引起细胞的凋亡, 从而发挥其抑制人胰腺癌 Capan-2 细胞增殖的作用。

关键词 土木香; 乙酸乙酯提取物; 人胰腺癌 Capan-2 细胞; 线粒体; 细胞凋亡

Study on the Inhibitory Effect and Mechanism of *Inula helenium* Ethyl Acetate Extract on Proliferation of Human Pancreatic Cancer Capan-2 Cells

WANG Linling¹, ZENG Jianmei¹, YAN Youyou², ZHANG Bo², LIN Nengming^{1,2} (1. Transformational Medicine Research Center, Hangzhou First Hospital Affiliated to Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310006, China; 2. Transformational Medicine Research Center, Hangzhou First People's Hospital/Hangzhou Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Hangzhou, 310006, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To study the inhibitory effect and mechanism of *Inula helenium* ethyl acetate extract (IHE) on proliferation of human pancreatic cancer Capan-2 cells. **METHODS:** MTT was used to determine the cell proliferation inhibition rate after treated by 0, 0.5, 1, 2, 4, 8 μg/mL IHE; clone formation test was used to observe the effects of 0, 1, 2 μg/mL IHE treating for 1 week on cell clone formation; Hoechst 33342 staining was used to observe the changes of nuclear morphology after treated by 0, 2, 4 μg/mL IHE for 48 h; flow cytometry was used to detect the cell apoptosis rate after treated by 0, 4, 8, 16 μg/mL IHE for 48 h; JC-1 staining was used to observe the changes of intracellular mitochondrial membrane potential after treated by 0, 4, 8, 16 μg/mL IHE for 24 h; Western blot was used to detect the expressions of mitochondrial apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, Mcl-1, p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA), and polymerase (PARP) after treated by 0, 4, 8, 16 μg/mL IHE for 48 h. **RESULTS:** 2, 4, 8 μg/mL IHE had obvious inhibitory effect on cell proliferation, showing concentration-dependent relationship, with IC₅₀ of 6.6 μg/mL; 1, 2 μg/mL IHE can obviously inhibit the clone formation of cells; 4 μg/mL IHE can obviously cause cell nuclear condensation; 8, 16 μg/mL IHE can obviously promote the cell apoptosis, and the cell apoptosis rate reached 45.53% after treated by 16 μg/mL IHE for 48 h; 16 μg/mL IHE treating for 24 h can cause the decrease of 82.47% cells' mitochondrial membrane potential; 8 μg/mL IHE can obviously down-regulate the protein expressions of Bcl-2, Mcl-1, PUMA and PARP, and 16 μg/mL IHE can obviously down-regulate the expressions of Mcl-1 and PUMA. **CONCLUSIONS:** IHE may show its

^Δ 基金项目: 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目 (No.2010-190-4)

* 硕士研究生。研究方向: 肿瘤药理学。电话: 0571-56007664。E-mail: sweetyling@126.com

通信作者: 教授, 主任药师, 博士生导师。研究方向: 临床药理学、临床毒理学。电话: 0571-56007809。E-mail: lnm1013@163.com

inhibitory effect on proliferation of human pancreatic cancer Capan-2 cells by causing the decrease of mitochondrial membrane potential in cells and down-regulating the protein expressions of Mcl-1 and PUMA to cause cell apoptosis.

KEYWORDS *Inula helenium*; Ethyl acetate extract; Human pancreatic cancer Capan-2 cells; Mitochondrion; Cell apoptosis

胰腺癌是恶性程度最高的肿瘤之一,预计在2030年将成为病死率第二高的恶性肿瘤^[1]。由于大多数胰腺癌患者确诊时已处于晚期,失去了手术机会,因此全身化疗对于晚期胰腺癌患者来说显得至关重要。尽管已有大量的研究致力于开发抗胰腺癌药物,但胰腺癌患者的5年生存率在过去40年没有明显提高,仍低于5%^[2]。我国中药资源丰富,尚有许多具有抗肿瘤活性的天然药物仍处于开发阶段。土木香系菊科旋覆花属植物,为多年生草本,其根供药用,具有健胃、利尿和驱虫的功效^[3]。有研究表明,土木香的醇提取物中富含倍半萜内酯类成分,而该类成分具有较强的抗肿瘤活性,对头颈部鳞状细胞癌、成胶质细胞瘤、前列腺癌等具有明显的细胞毒作用,但对胰腺癌的作用尚不明确^[4]。本研究在获得土木香醇提取物的基础上^[5-6],进一步用乙酸乙酯萃取,得到了富含倍半萜内酯类成分的土木香乙酸乙酯提取物(Inula helenium ethyl acetate extract, IHE),并探讨IHE对人胰腺癌Capan-2细胞增殖的抑制作用及机制。

1 材料

1.1 仪器

FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD公司);SpectraMax M3型全波长多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);高速冷冻离心机(美国Thermo Fisher公司);Microsystems CMS GmbH Am Friedensplatz 3型荧光显微镜(德国Leica公司);ChemiDoc XRS+型凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

RPMI 1640培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);胰蛋白酶-EDTA消化液(0.25%)、MTT(北京索莱宝科技有限公司);荧光素异硫氰酸(FITC)标记的膜联蛋白V(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒(美国BD公司,批号:6119908);线粒体膜电位检测试剂盒(美国SAB公司,批号:H16);Hoeschst 33258染色液(碧云天生物技术研究);兔源B细胞白血病2(Bcl-2)、Bax、p53上调凋亡因子(PUMA)、髓样细胞白血病1(Mcl-1)、多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)单克隆抗体和鼠源 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国Abcam公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(武汉艾美捷科技有限公司);其余试剂均为分析纯。

1.3 细胞

人胰腺癌Capan-2细胞购于中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所细胞库,以含10%胎牛血清的RPMI 1640为培养基,在37℃、5%CO₂培养箱中培养。

2 方法

2.1 IHE的提取

将10.0 kg干燥的土木香根茎磨成粗粉,95%乙醇浸泡48 h,在室温下用20倍的95%乙醇渗滤提取,真空浓缩,得到粗提物,约3.7 kg。将粗提物溶于1.5 L温水中,

并用3倍量的乙酸乙酯(3×1.5 L)萃取后,减压蒸发,得到370.16 g的IHE(产率为3.7%)。用香草醛-硫酸比色法验证IHE中含有生物活性化合物^[3]。临用时,用二甲基亚砜(DMSO)制备成高浓度母液后,用培养基稀释成不同质量浓度的IHE样品溶液。

2.2 MTT法检测细胞的增殖活性

收集对数生长期的Capan-2细胞,以离心半径为13.5 cm、1 000 r/min离心3 min,弃上清液,用培养基吹打成细胞悬液。然后分别以5×10³个细胞/孔的密度接种于96孔板中,每孔100 μ L,置于细胞培养箱中培养24 h,然后分别加入质量浓度分别为0(空白对照,含DMSO的培养液,下同)、1、2、4、8 μ g/mL的IHE。作用48 h后,弃培养液,加入50 μ L的MTT溶液,在细胞培养箱中继续孵育4 h后,离心去上清,每孔加入100 μ L的DMSO,轻微振荡使蓝色结晶完全溶解。用全波长多功能酶标仪测每孔的光密度(OD),检测波长为570 nm,参照波长为650 nm。试验重复3次,每次设定5个平行复孔。细胞增殖抑制率(%)=(1-给药孔OD均值/空白对照孔OD均值)×100%。使用GraphPad Prism 5软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

2.3 克隆形成试验检测细胞的克隆形成能力

收集对数生长期的Capan-2细胞,计数,以500个细胞/孔的细胞密度接种于6孔板中,置于细胞培养箱中培养72 h后,加入0(空白对照)、1、2 μ g/mL的IHE,置于培养箱中培养1周。取出,弃去原培养液,以磷酸盐缓冲液(PBS)洗2遍,然后用4%的多聚甲醛固定20 min,用吉姆萨(Giemsa)染液染色20 min。PBS洗干净后晾干,拍照观察细胞集落形成数量。试验重复3次。

2.4 Hoechst 33342染色试验观察细胞核形态变化

收集对数生长期的Capan-2细胞,以2×10⁴个细胞/孔的密度接种于24孔板中,置于培养箱中培养24 h后,加入0(空白对照)、2、4 μ g/mL的IHE,培养48 h。弃原培养液,用PBS洗2遍,然后每孔加入1 mL的4%多聚甲醛固定20 min。用PBS洗2遍后,再每孔加入300 μ L的Hoechst 33342荧光染色液,于细胞培养箱中培养20 min。取出后弃培养液,PBS洗2遍,用荧光显微镜观察细胞核变化,并拍照记录。试验重复3次。

2.5 Annexin V-FITC/PI双染法流式细胞术检测细胞的凋亡情况

收集对数生长期的Capan-2细胞,以2×10⁵个细胞/孔的密度接种于6孔板中,将细胞置于培养箱中培养24 h后,加入0(空白对照)、4、8、16 μ g/mL的IHE培养48 h,收集上清培养液,用胰酶消化细胞并收集。之后加入300 μ L的Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒中的缓冲液、5 μ L的Annexin V-FITC染液,轻轻混匀后,于2~8℃避光条件下培养15 min。再加入10 μ L的PI,轻轻混匀,于2~8℃避光条件下培养5 min后,流式细胞仪

检测,计算细胞凋亡率(%)。试验重复3次。

2.6 JC-1 染色法检测细胞内线粒体膜电位

收集对数生长期的Capan-2细胞,以 2×10^5 个细胞/孔的密度接种于6孔板中,将细胞置于培养箱中培养24 h后,加入0(空白对照)、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE培养24 h。收集上清培养液,用胰酶消化并收集细胞,然后用PBS洗2遍。每个样本加入500 μL 的JC-1工作液,于细胞培养箱中培养15 min后,用流式细胞仪检测膜电位下降细胞比例。试验重复3次。

2.7 Western blot 法检测细胞中凋亡相关蛋白的表达

收集对数生长期的Capan-2细胞,分别加入0(空白对照)、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE培养48 h后,采用细胞裂解液收集细胞。二喹啉甲酸(BCA)蛋白定量检测试剂盒测定总蛋白浓度,将样品调整至等浓度后分装, -80°C 保存。以 β -actin为内参进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),并转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。用50 g/L的脱脂奶粉溶液室温封闭1 h后,分别加入1:1 000稀释的一抗(Bcl-2、Bax、Mcl-1、PUMA、PARP、 β -actin), 4°C 孵育过夜,用缓冲液TBST洗膜3次,每次10 min。然后加入HRP标记的二抗(1:5 000),于室温条件下培养2 h,再用缓冲液TBST洗膜3次,每次10 min。用超敏化学发光试剂显影检测,应用化学发光成像仪进行图像采集,以目标蛋白条带的灰度值与内参 β -actin条带灰度值的比值表示目标蛋白的相对表达量。试验重复3次。

2.8 统计学方法

采用SPSS 13.0统计学软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 t 检验进行组间比较。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 IHE对Capan-2细胞体外增殖的影响

IHE对细胞的增殖抑制率呈明显的浓度依赖性增加。与0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,2、4、8 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用48 h后细胞的增殖抑制率均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中8 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE对Capan-2的抑制率超过了80%。1、2、4、8 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用48 h后,细胞的增殖抑制率分别为 $(7.01 \pm 1.84)\%$ 、 $(12.39 \pm 3.84)\%$ 、 $(38.23 \pm 3.30)\%$ 、 $(80.83 \pm 1.37)\%$ ($n=3$), IC_{50} 为6.6 $\mu\text{g/mL}$ 。

3.2 IHE对Capan-2细胞克隆形成的影响

克隆形成试验也表明,不同质量浓度IHE对Capan-2细胞的增殖有不同程度的抑制作用。经Giemsa染色后可看出,IHE作用于细胞1周后,随着其质量浓度的增加,细胞集落形成数逐渐减少。与0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,2 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用1周后细胞集落形成数明显减少($P < 0.01$)。0、1、2 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用1周后细胞集落形成数分别为 (362.67 ± 17.90) 、 (234.67 ± 17.79) 、 (74.33 ± 6.11) 个($n=3$)。

3.3 IHE对Capan-2细胞核的影响

以2、4 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用于细胞48 h后,细胞核固缩,荧光强度显著增加,且4 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用较2 $\mu\text{g/mL}$ 明显。这一结果也证实了IHE能抑制Capan-2细胞的增殖,染色后荧光显微图见图1。

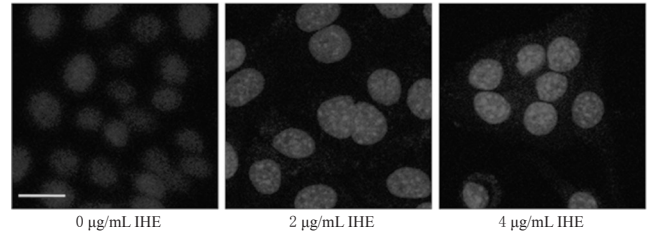


图1 不同质量浓度IHE作用48 h后细胞核的荧光显微图(Hoechst 33342染色, $\times 40$)

Fig 1 Fluorescence micrographs of nuclear morphology after 48 h with different mass concentrations of IHE (Hoechst 33342 staining, $\times 40$)

3.4 IHE对Capan-2细胞凋亡的影响

4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用于细胞48 h后,细胞凋亡率均不同程度升高,且呈明显的浓度依赖性。与0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,8、16 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用后细胞凋亡率均明显升高($P < 0.01$)。0、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用48 h后细胞的凋亡率依次为 $(8.43 \pm 2.47)\%$ 、 $(12.87 \pm 4.52)\%$ 、 $(23.97 \pm 3.24)\%$ 、 $(40.60 \pm 8.27)\%$ ($n=3$),流式图见图2。

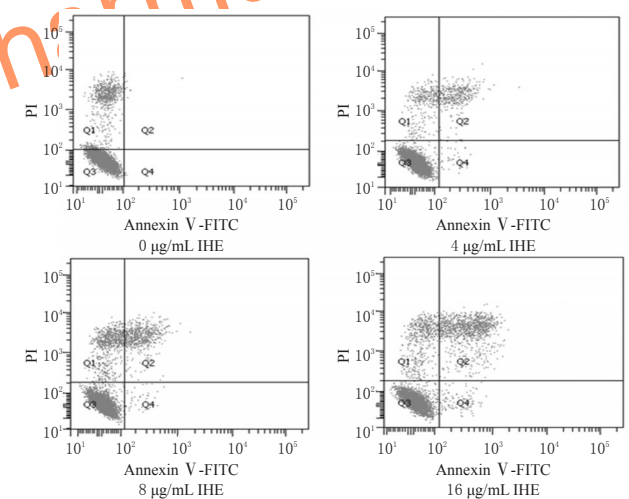


图2 不同质量浓度IHE作用48 h后细胞凋亡的流式图
Fig 2 Flow cytometry charts of cell apoptosis after 48 h with different mass concentrations of IHE

3.5 IHE对细胞线粒体膜电位的影响

4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用于细胞24 h后,均可不同程度地降低细胞线粒体膜电位,且呈明显的浓度依赖性。与0 $\mu\text{g/mL}$ 比较,16 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用后线粒体膜电位下降细胞比例为 $(82.47 \pm 1.25)\%$ ($P < 0.01$)。0、4、8、16 $\mu\text{g/mL}$ 的IHE作用24 h后线粒体膜电位下降的细胞比例依次为 $(3.8 \pm 0.61)\%$ 、 $(10.87 \pm 0.83)\%$ 、 $(19.2 \pm 1.01)\%$ 、 $(82.47 \pm 1.25)\%$,结果见图3。

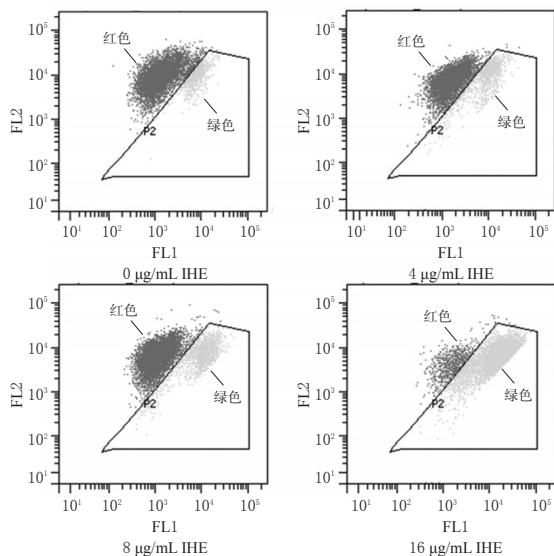


图3 不同质量浓度IHE作用24 h后细胞线粒体膜电位的流式图

Fig 3 Flow cytometry charts of mitochondria membrane potential after 24 h with different mass concentrations of IHE

3.6 IHE对细胞线粒体凋亡相关蛋白表达的影响

与0 μg/mL比较,8 μg/mL的IHE作用于细胞48 h后,细胞中Bcl-2、Mcl-1、PUMA、PARP蛋白表达明显减弱($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);16 μg/mL的IHE作用于细胞48 h后,细胞中PUMA、Mcl-1蛋白表达明显减弱($P < 0.01$)。蛋白表达电泳结果见图4、测定结果见表2。

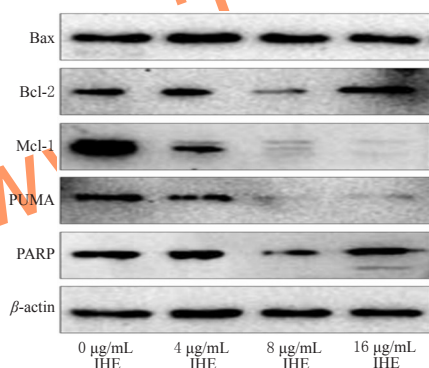


图4 不同质量浓度IHE作用48 h后细胞线粒体凋亡相关蛋白的电泳图

Fig 4 Electrophoresis charts of mitochondria apoptosis-related proteins after 48 h with different mass concentrations of IHE

4 讨论

在本研究中,笔者采用了不同方法来验证IHE对胰腺癌Capan-2细胞有增殖抑制作用,包括MTT试验、克隆形成试验和细胞核荧光染色试验。在进行克隆形成试验时,因作用时间较长,药物浓度应低于 IC_{50} ,故笔者采用了0、1、2 μg/mL的IHE进行试验。在MTT预试验中,笔者设置了0、0.5、1、2、4、8、16、32 μg/mL的等浓度

表2 不同质量浓度IHE作用48 h后细胞线粒体凋亡相关蛋白的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Determination results of mitochondrial apoptosis-related proteins after 48 h with different mass concentrations of IHE($\bar{x} \pm s, n=3$)

IHE质量浓度, μg/mL	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Mcl-1/ β -actin	PUMA/ β -actin	PARP/ β -actin
0	1.41 ± 0.02	0.82 ± 0.03	1.48 ± 0.08	1.01 ± 0.03	0.77 ± 0.01
4	1.27 ± 0.01	0.58 ± 0.01	0.51 ± 0.02	0.63 ± 0.01	0.66 ± 0.01
8	1.26 ± 0.02	0.41 ± 0.02*	0.17 ± 0.01**	0.23 ± 0.01**	0.31 ± 0.02*
16	1.28 ± 0.03	0.98 ± 0.03	0.08 ± 0.01**	0.28 ± 0.03**	0.78 ± 0.01

注:与0 μg/mL比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. 0 μg/mL,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

梯度,结果当IHE质量浓度为8 μg/mL时细胞的增殖抑制作用已经达到峰值,故正式试验时IHE的质量浓度设置为0、0.5、1、2、4、8 μg/mL。

JC-1是一种阳离子染料,可以检测细胞线粒体膜电位的变化。当细胞线粒体膜电位较高时,JC-1能聚集在线粒体基质中,形成聚合物,产生红色荧光;当线粒体膜电位较低时,JC-1不能聚集,以单体存在,此时产生绿色荧光^[7]。当JC-1从红色荧光到绿色荧光转变时可以反映出线粒体膜电位的下降,而线粒体膜电位下降则是细胞早期凋亡的一个重要标志。线粒体膜电位下降后可以促使线粒体释放细胞色素C^[8],细胞色素C与凋亡酶激活因子(Apaf-1)结合后能够催化半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶9(Caspase-9)的活化,最终使下游Caspase-3活化而诱导细胞凋亡^[9]。PARP作为细胞凋亡核心成员Caspase水解的切割底物,其在DNA损伤修复和细胞凋亡中发挥着重要作用。PARP在体内是Caspase-3的主要切割对象,被剪切后PARP的羧基端的催化结构域(89 kD)和氨基端的DNA结合结构域(24 kD)分离,使其失去酶活力,其裂解片段的出现被认为是细胞凋亡的重要信号^[7]。Bcl-2家族蛋白成员是线粒体凋亡通路的重要调节因子,如Bak、Bax等可以促进细胞凋亡,Bcl-2、Mcl-1等可以抑制细胞凋亡,另外还有一些BH3-only蛋白(如NOXA、PUMA等)也可促进细胞凋亡。

本研究结果显示,Capan-2细胞经IHE处理后,随着IHE质量浓度的增加细胞线粒体膜电位明显下降,细胞凋亡率明显升高。此外,从Western blot的结果也可以看到,抑凋亡蛋白Mcl-1的表达随着IHE质量浓度的增加而减弱;而Bcl-2的表达也随着IHE质量浓度的增加而减弱,但在高质量浓度(16 μg/mL)IHE的作用下则有反馈性的上调;而促凋亡蛋白Bax则无明显变化。BH3-only蛋白PUMA的表达也随着IHE质量浓度的增加而减弱。PARP在高质量浓度IHE处理后出现裂解片段。本研究结果表明,IHE可能是通过引起线粒体膜电位的下降,从而引起胰腺癌Capan-2细胞的凋亡。

综上所述,IHE对人胰腺癌Capan-2细胞具有较强的体外增殖抑制作用。其作用机制可能是通过引起线粒体膜电位的下降,下调细胞中Mcl-1、PUMA蛋白的表

人参皂苷CK联合5-氟尿嘧啶对人胰腺癌PANC-1细胞的增殖、凋亡及上皮间质转化的影响^Δ

崔江河^{1*}, 韩光宇^{2#}, 何光梅³, 尹媛媛¹, 马娜¹, 刘琳¹(1.牡丹江医学院附属红旗医院消化科, 黑龙江牡丹江 157011; 2.牡丹江医学院附属红旗医院普外科, 黑龙江牡丹江 157011; 3.牡丹江医学院附属红旗医院泌尿外科, 黑龙江牡丹江 157011)

中图分类号 R361⁺.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)31-4388-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.31.18

摘要 目的: 研究人参皂苷CK联合5-氟尿嘧啶(5-FU)对人胰腺癌PANC-1细胞的增殖、凋亡及上皮间质转化(EMT)的影响。方法: 将对数生长期的PANC-1细胞分为空白对照组、人参皂苷CK组(30 mg/L)、5-FU组(25 mg/L)和联用组(人参皂苷CK 30 mg/L+5-FU 25 mg/L)。采用MTT法检测各组细胞作用24、48、72 h后的细胞增殖抑制率, 流式细胞术检测作用48 h后的细胞凋亡率, 酶联免疫吸附法检测作用24、48、72、96 h后细胞中纤连蛋白表达, Western blot法检测作用48 h后细胞中波形蛋白、N-钙黏蛋白、E-钙黏蛋白、蛋白激酶(Akt)及磷酸化Akt(p-Akt)蛋白表达。结果: 人参皂苷CK、5-FU及其二者联用对细胞的增殖均有抑制作用; 与空白对照组比较, 人参皂苷CK组、5-FU组和联用组各作用时间点的早期和晚期凋亡率、E-钙黏蛋白表达水平均明显升高($P < 0.05$), 纤连蛋白、波形蛋白、N-钙黏蛋白表达水平和p-Akt/Akt水平均明显降低($P < 0.05$), 其中联用组上述指标效果均优于人参皂苷CK组和5-FU组($P < 0.05$)。结论: 人参皂苷CK和5-FU均可抑制PANC-1细胞增殖、诱导细胞凋亡、抑制EMT, 该作用可能与抑制磷脂酰肌醇3-激酶/Akt通路有关; 且二者联用效果更好。

关键词 人参皂苷CK; 5-氟尿嘧啶; 人胰腺癌PANC-1细胞; 联合给药; 增殖; 凋亡; 上皮间质转化

Effects of Ginsenoside CK Combined with 5-Fluorouracil on the Proliferation, Apoptosis and Epithelial Mesenchymal Transition of Human Pancreatic Cancer PANC-1 Cells

CUI Jianghe¹, HAN Guangyu², HE Guangmei³, YIN Yuanyuan¹, MA Na¹, LIU Lin¹(1. Dept. of Gastroenterology, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 2. Dept. of General Surgery, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China; 3. Dept. of Urology Surgery, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China)

达, 从而引起胰腺癌细胞的凋亡。

参考文献

- [1] Rahib L, Smith BD, Aizenberg R, et al. Matrisian projecting cancer incidence and deaths to 2030: the unexpected burden of thyroid, liver, and pancreas cancers in the United States[J]. *Cancer Res*, 2014, 74(14): 2913-2921.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics: 2016[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(1): 7-30.
- [3] 张乐, 方羽, 陆国红, 等. 土木香化学成分及药理研究概况[J]. *中成药*, 2015, 37(6): 1313-1316.
- [4] 小西天二. 土木香中抑制肿瘤细胞增殖的成分[J]. *国外医学: 中医中药分册*, 2003, 25(3): 174.
- [5] 赵永明, 张嫚丽, 霍长虹, 等. 土木香化学成分的研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(4): 616-618.
- [6] Ren Y, J Yu, Kinghorn AD. Development of anticancer agents from plant-derived sesquiterpene lactones[J]. *Curr Med Chem*, 2016, 23(23): 2397-2420.
- [7] Hamacher-Brady A, Brady NR. Bax/Bak-dependent, Drp1-independent targeting of X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) into inner mitochondrial compartments counteracts Smac/DIABLO-dependent effector Caspase activation[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(36): 22005-22018.
- [8] 赵秀梅, 周冰, 张桂贤, 等. 扶正解毒祛瘀方联合奥沙利铂对人结肠癌 HT-29 细胞增殖与凋亡的影响及机制研究[J]. *中国药房*, 2017, 28(19): 2613-2616.
- [9] Horbay R, Bilyy R. Mitochondrial dynamics during cell cycling[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(12): 1327-1335.

^Δ 基金项目: 牡丹江市科学技术计划项目(No.Z2015s0055)

* 主治医师。研究方向: 消化系统疾病的诊断及治疗。电话: 0453-6582800。E-mail: 18215039@qq.com

通信作者: 主治医师。研究方向: 普外科临床与科研。电话: 0453-6582800。E-mail: hanguangyu1981@163.com

(收稿日期: 2017-02-09 修回日期: 2017-08-10)

(编辑: 林静)