

鸦胆子素D联合紫杉醇对胰腺癌Capan-2细胞增殖的抑制作用及机制研究[△]

黄玉玉^{1,2*}, 饶明君^{1,2}, 谭笔琴^{1,3}, 王慧铭², 林能明^{1,2,3#} (1. 浙江中医药大学第四临床医学院, 杭州 310006; 2. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310053; 3. 浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院临床药学科, 杭州 310006)

中图分类号 R965;R735.9 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)06-0789-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.06.14

摘要 目的:探讨鸦胆子素D(BD)联合紫杉醇(Taxol)对人胰腺癌Capan-2细胞增殖的抑制作用及可能机制。方法:以Capan-2细胞为对象,采用磺酰罗丹明B法检测不同剂量BD(5、10、15、20 μmol/L)、Taxol(10、20、30、40 nmol/L)、BD+Taxol(5 μmol/L+10 nmol/L、10 μmol/L+20 nmol/L、15 μmol/L+30 nmol/L、20 μmol/L+40 nmol/L)作用48 h后的细胞增殖情况,并计算细胞存活率和药物合用指数(CI)。采用克隆形成试验检测BD(20 μmol/L,下同)、Taxol(40 nmol/L,下同)、BD+Taxol(20 μmol/L+40 nmol/L,下同)作用24 h后的细胞克隆集落形成情况,并计算克隆形成率;采用DAPI染色法观察BD、Taxol、BD+Taxol作用24 h后的细胞凋亡情况,采用Western blotting法检测的BD、Taxol、BD+Taxol作用后凋亡相关蛋白[Bcl-2、多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)、胱天蛋白酶3(Caspase-3)、切割胱天蛋白酶3(Cleaved-caspase-3);药物作用48 h]以及c-Jun氨基末端激酶(JNK)、磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)蛋白(药物作用4、6、12 h)的表达情况。结果:经10、15、20 μmol/L BD、20、30、40 nmol/L Taxol以及两药上述剂量联合作用48 h后,细胞的存活率均显著降低,且联用组显著低于BD、Taxol同剂量单药组($P < 0.05$),各联用组(BD 5 μmol/L+Taxol 10 nmol/L、BD 10 μmol/L+Taxol 20 nmol/L、BD 15 μmol/L+Taxol 30 nmol/L、BD 20 μmol/L+Taxol 40 nmol/L)的CI值分别为 0.63 ± 0.04 、 0.68 ± 0.08 、 0.89 ± 0.12 、 0.84 ± 0.05 。经20 μmol/L BD、40 nmol/L Taxol以及两药上述剂量联合作用后,细胞的克隆集落形成有所减少,并伴有不同程度的染色质浓聚和细胞核皱缩,细胞的克隆形成率(24 h)以及Bcl-2(48 h)、RAPR(48 h)、Caspase-3(48 h)、JNK(4、6 h, Taxol单药组除外)的相对表达量均显著降低, Cleaved-caspase-3(48 h)、p-JNK(4、6、12 h)的相对表达量均显著升高,且BD+Taxol联用组均显著优于同时间点BD、Taxol同剂量单药组[JNK(4、6、12 h)、p-JNK(4 h)除外]($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:BD、Taxol均可抑制人胰腺癌Capan-2细胞的增殖并促进其凋亡,且两者联合具有一定的协同作用,效果优于任一药物单用。上述作用可能与激活Caspase通路以及JNK磷酸化等途径有关。

关键词 鸦胆子素D;紫杉醇;人胰腺癌;Capan-2细胞;增殖;凋亡;胱天蛋白酶;c-Jun氨基末端激酶

Study on Inhibitory Effects and Mechanism of Bruceanine D Combined with Taxol on the Proliferation of Human Pancreatic Cancer Capan-2 Cells

HUANG Yuyu^{1,2}, RAO Mingjun^{1,2}, TAN Biqin^{1,3}, WANG Huiming², LIN Nengming^{1,2,3} (1. No. 4 Clinical Medical School, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310006, China; 2. College of Pharmacology, Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310053, China; 3. Dept. of Clinical Pharmacology, the Affiliated Hangzhou First People's Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effect and potential mechanism of Bruceine D (BD) combined with Taxol on the proliferation of human pancreatic cancer Capan-2 cells. METHODS: Using Capan-2 cells as object, the proliferations after treated with BD (5, 10, 15, 20 μmol/L), Taxol (10, 20, 30, 40 nmol/L) and BD+Taxol (5 μmol/L+10 nmol/L, 10 μmol/L+20 nmol/L, 15 μmol/L+30 nmol/L, 20 μmol/L+40 nmol/L) for 48 h were determined by sulfonyl rhodamine B method. Survival rate of cells and combination index (CI) were calculated. The clone formation assay was performed to detect the formation of clonal colonies after treated with BD (20 μmol/L, hereinafter), Taxol (40 nmol/L, hereinafter), BD+Taxol (20 μmol/L+40 nmol/L, hereinafter) for 24 h. The rate of clone formation was calculated. DAPI method was used to observe the apoptosis of cells after treated with BD, Taxol and BD+Taxol for 24 h. Western blotting was used to detect the expression of apoptosis-related protein (Bcl-2, PARP, Caspase-3, Cleaved-caspase-3) after treated by BD, Taxol, BD+Taxol for 48 h and the expression of JNK and p-JNK after treated by BD, Taxol, BD+Taxol for 4, 6, 12 h. RESULTS: After treated with 10, 15 and 20 μmol/L BD, 20, 30 and 40 nmol/L Taxol or two-drug combination for 48 h, survival rates of cells were decreased significantly; the survival rate of drug combination group was significantly lower than the same dose of BD group and Taxol group ($P < 0.05$). CI values of drug combination groups (BD 5 μmol/L+

[△] 基金项目:杭州市省市共建医学重点学科建设计划(No.浙卫办[2018]2号);杭州市医学重点学科建设补助资金资助项目(No.杭卫计发[2017]68号、杭财社会[2017]20号)

* 硕士研究生。研究方向:肿瘤药理学。电话:0571-56007664。E-mail:1617237062@qq.com

通信作者:主任药师,教授,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

Taxol 10 nmol/L, BD 10 μ mol/L+Taxol 20 nmol/L, BD 15 μ mol/L+Taxol 30 nmol/L, BD 20 μ mol/L+Taxol 40 nmol/L) were 0.63 \pm 0.04, 0.68 \pm 0.08, 0.89 \pm 0.12 and 0.84 \pm 0.05. After treated with 20 μ mol/L BD, 40 nmol/L Taxol and two-drug combination, the formation of clonal colonies was decreased with different degrees of chromatin concentration and nuclear shrinkage; the rate of clone formation (24 h), the expression of Bcl-2 (48 h), PARP (48 h), Caspase-3 (48 h) and JNK (4, 6 h, except for Taxol group) were decreased significantly, while the relative expression of Cleaved-caspase-3 (48 h) and p-JNK (4, 6, 12 h) were increased significantly. Those of BD+Taxol group were significantly better than those of BD group and Taxol group [except for JNK (4, 6, 12 h), p-JNK (4 h)] ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). CONCLUSIONS: Both BD and Taxol can inhibit the proliferation and promote apoptosis of human pancreatic cancer Capan-2 cells, and the combination have a certain synergistic effect, which is better than any single drug. It may be associated with activating Caspase pathway and JNK phosphorylation.

KEYWORDS Brucerin D; Taxol; Human pancreatic cancer; Capan-2 cells; Proliferation; Apoptosis; Caspase; JNK

胰腺癌为常见恶性肿瘤,是所有实体瘤中患者生存率较低的类型之一^[1]。胰腺癌前期起病隐匿,不易察觉,约80%的患者在确诊时已经失去了手术机会,故放疗是胰腺癌治疗不可替代的重要手段之一,但预后不良、易复发等缺点严重影响了治疗的效果^[2-3]。目前,临床多以白蛋白结合型紫杉醇(Albuminbound taxol)联合吉西他滨作为一线方案来治疗胰腺癌,但疗效不佳,且备选药物有限^[4]。紫杉醇(Taxol)作为治疗胰腺癌的一线用药,具有较强的肿瘤细胞生长抑制作用,但因其具有较大的肝毒性及免疫抑制作用,该药的临床应用受到了一定的限制^[5-6]。有研究表明,Taxol与中药的联合应用可通过多种途径增强抗肿瘤效果,并有助于减轻毒副作用^[7-8]。Newman DJ等^[9]研究指出,全世界经批准上市的抗肿瘤药物中有73%不是化学合成药物,且大部分都是从天然产物中获得或直接从天然化合物衍生而成的。我国中药资源丰富,多种中药活性成分正处于开发阶段,因此联合应用中药活性成分对于提高化疗药物抗肿瘤活性具有重要的意义。

鸦胆子别名老鸦胆、苦参子,为苦木科植物鸦胆子[Brucea javanica (L.) Merr.]的干燥成熟果实。鸦胆子素D(BD)是从鸦胆子果实中提取的一种水溶性三环四萜类化合物,研究表明其可以诱导多种肿瘤细胞发生凋亡,具有一定的抗肿瘤活性^[10]。虽然BD单体对胰腺癌细胞具有一定的抑制活性^[11-12],但尚未见其与一线药物联合应用及其机制研究的相关报道。为此,本研究观察了BD联合Taxol对人胰腺癌细胞株Capan-2的抑制作用,并初步探讨了其可能机制,以期胰腺癌的临床治疗提供新的思路。

1 材料

1.1 仪器

SpectraMax i3x型全波长多功能酶标仪(美国Molecular Devices公司);FACSCanto II型流式细胞仪(美国BD公司);5418R型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);IX71型倒置相差显微镜(日本Olympus公司);Friendensplatz 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);QB-8001型摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);

DHG-9053A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);3111型细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 药品与试剂

BD对照品(上海盛中医药化工有限公司,批号:PRF9041122,纯度: $\geq 98\%$);紫杉醇注射液(Hospira Australia Pty Ltd.,批号:E036853AA,规格:5 mL:30 mg);胎牛血清(批号:10270-106)、青霉素链霉素双抗(批号:1953098)、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)消化液(批号:25200-056)、RPMI 1640培养基(批号:AD17321266)均购自美国Gibco公司;磷酸盐缓冲液(PBS,pH为7.3~7.5,美国Hyclone公司,批号:ABC212871);4',6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI)染色液(批号:061518181024)、乙基苯基聚乙二醇(NP-40)裂解液(批号:070918181105)、超敏ECL化学发光试剂盒(Be-yoECL Plus)(批号:111717171122)、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(批号:070618181008)均购自碧云天生物技术研究;0.4%磺酰罗丹明B(SRB)染色液(美国Sigma-Aldrich公司,批号:1002459715);三羟甲基氨基甲烷(Tris)[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号:E802BA0003;使用前用水稀释,得pH为10.5的10 mmol/L Tris碱性缓冲溶液];兔c-Jun氨基末端激酶(JNK)单克隆抗体(批号:ab179461)、兔磷酸化c-Jun氨基末端激酶(p-JNK)单克隆抗体(批号:ab76572)、兔Bcl-2单克隆抗体(批号:ab32124)、鼠 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(内参,批号:ab8226)均购自美国Abcam公司;兔多聚二磷酸腺苷核糖聚合酶(PARP)单克隆抗体(批号:9532S)、兔胱天蛋白酶3(Caspase-3)单克隆抗体(批号:9662S)、兔切割胱天蛋白酶3(Cleaved-caspase-3)单克隆抗体(批号:9664S)均购自美国CTS公司;山羊抗大鼠辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(批号:9300003001)、山羊抗兔HRP标记二抗(批号:9300014001)均购自武汉艾博泰克生物科技有限公司;三氯乙酸(TCA)、乙酸等试剂均为分析纯,水为纯化水。

1.3 细胞

人胰腺癌细胞株Capan-2由上海富衡生物科技有限公司提供。

2 方法

2.1 细胞培养

将Capan-2细胞置于含10%胎牛血清、1%青霉素链霉素双抗的RPMI 1640培养基中,置于37℃、5%CO₂(下同)培养箱中进行培养,每2~3天更换1次培养基,用胰蛋白酶-EDTA消化液消化传代。

2.2 SRB法检测BD和Taxol联用对Capan-2细胞增殖的影响

取对数生长期Capan-2细胞,经胰蛋白酶-EDTA消化液消化后计数,按 2×10^3 个/孔接种至96孔板中(每孔100 μL),培养至细胞贴壁后,将其随机分为空白组(不含细胞和药物)、对照组(含细胞但不含药物)以及BD单药组(5、10、15、20 μmol/L,剂量设置参考本课题组前期试验结果)、Taxol单药组(10、20、30、40 nmol/L,剂量设置参考本课题组前期试验结果)、BD+Taxol联用组(BD 5 μmol/L+Taxol 10 nmol/L、BD 10 μmol/L+Taxol 20 nmol/L、BD 15 μmol/L+Taxol 30 nmol/L、BD 20 μmol/L+Taxol 40 nmol/L,剂量设置参考本课题组前期试验结果),每组设置3个复孔。空白组和对照组均加入RPMI 1640培养基100 μL,各给药组加入含相应药物的RPMI 1640培养基100 μL,培养48 h后,加入10% TCA溶液,于4℃固定1 h,弃去上清液,用水清洗,置于干燥箱中烘干;随后加入0.4% SRB染色液染色30 min,用1%乙酸溶液清洗后,置于干燥箱中烘干;随后加入10 mmol/L Tris碱性缓冲溶液,用全波长多功能酶标仪于570 nm波长处检测各孔的光密度(OD)值,并计算细胞存活率[细胞存活率=(各试验组平均OD值-空白组平均OD值)/(对照组平均OD值-空白组平均OD值)×100%],并使用CompuSyn 1.0.1软件计算药物合用指数(CI)[$CI = D_A / (D_{XA} + D_B / D_{XB})$ 。式中, D_A 、 D_B 分别为两药联用产生某(X)效应时所需的浓度, D_{XA} 、 D_{XB} 分别为两药单用产生某(X)效应时所需的浓度]。当 $CI < 1$ 时,表示两药联合有协同作用;当 $CI = 1$ 时,表示两药联合有相加作用;当 $CI > 1$ 时,表示两药联合有拮抗作用^[13-14]。上述试验重复3次(下同)。

2.3 克隆形成试验检测BD和Taxol联用对Capan-2细胞克隆形成能力的影响

取对数生长期Capan-2细胞,经胰蛋白酶-EDTA消化液消化后计数,按1 500个/孔接种于6孔板中(每孔2 mL),培养24 h后,将细胞随机分为空白对照组以及BD单药组(20 μmol/L,剂量设置参考“2.2”项下试验结果)、Taxol单药组(40 nmol/L,剂量设置参考“2.2”项下试验结果)、BD+Taxol联用组(20 μmol/L+40 nmol/L,剂量设置参考“2.2”项下试验结果),每组设置3个复孔。空白对照组加入RPMI 1640培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的RPMI 1640培养基2 mL,培养24 h后,弃去培养基,加入含10%胎牛血清和1%青霉素链霉素双抗的

RPMI 1640培养基适量,按上述条件继续培养,每3~4天更换1次培养基。2周后,弃去培养基,用PBS清洗后,加入0.1%结晶紫染色液染色1 h,用水清洗,置于干燥箱中烘干,使用倒置相差显微镜观察细胞克隆集落形成情况,并计算克隆形成率[克隆形成率=(克隆集落形成数/细胞接种总数)×100%]。

2.4 DAPI染色法检测BD和Taxol联用对Capan-2细胞凋亡的影响

取对数生长期Capan-2细胞,经胰蛋白酶-EDTA消化液消化后计数,按 8×10^4 个/孔接种于6孔板中(每孔2 mL),培养24 h后,按“2.3”项下方法分组,每组设置3个复孔。空白对照组加入RPMI 1640培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的RPMI 1640培养基2 mL,培养24 h后,弃去培养基,用PBS清洗,每孔加入4%多聚甲醛1 mL,避光固定20 min,再用PBS清洗,随后每孔加入DAPI染色液500 μL,避光染色30 min,培养20 min,弃去染色液,加入PBS 1 mL,置于摇床中以100 r/min振摇5 min,弃去上清液,使用荧光显微镜观察细胞核形态并拍照(凋亡细胞经DAPI染色呈现蓝白色荧光:其中,早期凋亡细胞呈现核浓缩,染色加深,或核染色质呈现新月牙形;晚期凋亡细胞核破碎成大小不等的圆形小体,并被细胞膜包围)。

2.5 Western blotting法检测BD和Taxol联用对Capan-2细胞凋亡相关蛋白以及JNK、p-JNK表达的影响

取对数生长期Capan-2细胞,经胰蛋白酶-EDTA消化液消化后计数,按 8×10^4 个/孔接种于6孔板中(每孔2 mL),培养24 h后,按“2.3”项下方法分组,每组设置3个复孔。空白对照组加入RPMI 1640培养基2 mL,各给药组加入含相应药物的RPMI 1640培养基2 mL,并于不同时间点[凋亡相关蛋白(48 h),JNK、p-JNK(4、6、12 h)]收集细胞。所得细胞经胰蛋白酶-EDTA消化液消化后,加入含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基适量,终止消化,以1 200 r/min离心5 min,弃去上清液,沉淀经NP-40裂解液裂解后,采用BCA法测定其总蛋白的含量。以β-actin为内参进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳(电压:330 V,时间:65 min),并于电泳结束后转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)膜上,用5%全脂奶粉室温封闭1 h,分别加入相应一抗[Bcl-2(1:5 000)、PARP(1:1 000)、Caspase-3(1:1 000)、Cleaved-caspase-3(1:500)、JNK(1:5 000)、p-JNK(1:5 000)、β-actin(1:1 000)],于4℃孵育过夜;用TBST溶液清洗3次,每次10 min;加入相应二抗(内参:山羊抗大鼠HRP标记二抗,其余蛋白:山羊抗兔HRP标记二抗;加入量均为1:5 000),于室温孵育2 h,再用TBST溶液清洗3次,每次10 min。以BeyoECL Plus显色后,置于凝胶成像系统上成像,并采用Image J 1.46r软件进行分析。以目标蛋白条带灰度值与内参β-actin条带灰度

值的比值表示目标蛋白的相对表达量。

2.6 统计学方法

采用SPSS 22.0软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析或 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 BD和Taxol联用对Capan-2细胞增殖的影响

药物作用48 h后,BD、Taxol以及两者联用对Capan-2细胞的增殖均有不同程度的抑制作用:与对照组比较,BD 10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 组,Taxol 20、30、40 nmol/L 组以及两药上述剂量联用组细胞的存活率均显著降低,且联用组显著低于BD、Taxol同剂量单药组,差异均有统计学意义($P < 0.05$),详见表1。

表1 BD和Taxol联用对Capan-2细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Effects of BD combined with Taxol on survival rate of Capan-2 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	细胞存活率, %	组别	细胞存活率, %
对照组	100.00 ± 0.01	Taxol 30 nmol/L组	71.25 ± 0.05*
BD 5 $\mu\text{mol/L}$ 组	97.40 ± 0.11	Taxol 40 nmol/L组	49.97 ± 0.01*
BD 10 $\mu\text{mol/L}$ 组	89.31 ± 0.02*	BD 5 $\mu\text{mol/L}$ +Taxol 10 nmol/L组	72.70 ± 0.01
BD 15 $\mu\text{mol/L}$ 组	77.80 ± 0.08*	BD 10 $\mu\text{mol/L}$ +Taxol 20 nmol/L组	41.94 ± 0.03** ^Δ
BD 20 $\mu\text{mol/L}$ 组	76.05 ± 0.05*	BD 15 $\mu\text{mol/L}$ +Taxol 30 nmol/L组	35.08 ± 0.04** ^Δ
Taxol 10 nmol/L组	96.51 ± 0.07	BD 20 $\mu\text{mol/L}$ +Taxol 40 nmol/L组	20.81 ± 0.02** ^Δ
Taxol 20 nmol/L组	80.48 ± 0.04*		

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与BD同剂量单药组比较,[#] $P < 0.05$;与Taxol同剂量单药组比较,^Δ $P < 0.05$

Note: vs. control group, * $P < 0.05$; vs. the same dose of BD single drug group, [#] $P < 0.05$; vs. the same dose of Taxol single drug group, ^Δ $P < 0.05$

各联用组(BD 5 $\mu\text{mol/L}$ +Taxol 10 nmol/L 、BD 10 $\mu\text{mol/L}$ +Taxol 20 nmol/L 、BD 15 $\mu\text{mol/L}$ +Taxol 30 nmol/L 、BD 20 $\mu\text{mol/L}$ +Taxol 40 nmol/L)的CI值分别为0.63 ± 0.04、0.68 ± 0.08、0.89 ± 0.12、0.84 ± 0.05。

3.2 BD和Taxol联用对Capan-2细胞克隆形成能力的影响

与空白对照组比较,BD单药组、Taxol单药组以及BD+Taxol联用组细胞的克隆集落形成均有不同程度地减少,其克隆形成率均显著降低,且BD+Taxol联用组显著低于BD、Taxol同剂量单药组,差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),详见图1、表2。

3.3 BD和Taxol联用对Capan-2细胞凋亡的影响

空白对照组细胞形态饱满,细胞膜和细胞核形态均较为完整,染色质均匀;BD单药组细胞形态完整,染色质基本均匀;Taxol单药组细胞可见细胞核染色质浓聚,部分细胞核皱缩呈月牙型;BD+Taxol联用组细胞核皱缩愈明显,染色质固缩,且凋亡的细胞数量也增加,详见

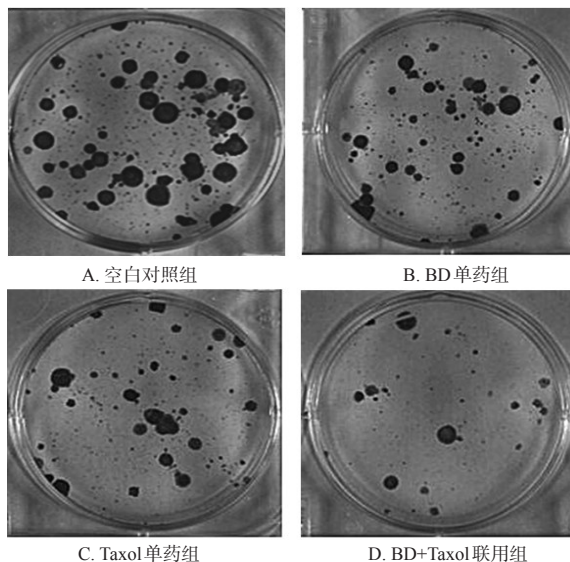


图1 BD和Taxol联用对Capan-2细胞克隆形成的影响
Fig 1 Effects of BD combined with Taxol on the clone formation of Capan-2 cells

表2 BD和Taxol联用对Capan-2细胞克隆形成率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 2 Effects of BD combined with Taxol on the rate of clone formation of Capan-2 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	克隆形成率, %	组别	克隆形成率, %
空白对照组	100.00 ± 0.05	Taxol单药组	57.64 ± 2.52*
BD单药组	67.36 ± 2.52*	BD+Taxol联用组	31.35 ± 2.01** ^Δ

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$;与BD单药组比较,[#] $P < 0.01$;与Taxol单药组比较,^Δ $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, * $P < 0.05$; vs. BD single drug group, [#] $P < 0.01$; vs. Taxol single drug group, ^Δ $P < 0.01$

图2(图2C、2D中,“箭头”表示皱缩的细胞核)。

3.4 BD和Taxol联用对Capan-2细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与空白对照组比较,BD单药组、Taxol单药组以及BD+Taxol联用组细胞Bcl-2、PARP、Caspase-3蛋白的相对表达量均显著降低,且BD+Taxol联用组显著低于BD、Taxol同剂量单药组;Cleaved-caspase-3蛋白的相对表达量均显著升高,且BD+Taxol联用组显著高于BD、Taxol同剂量单药组,差异均有统计学意义($P < 0.01$),详见图3、表3。

3.5 BD和Taxol联用对Capan-2细胞JNK、p-JNK蛋白表达的影响

与空白对照组比较,BD单药组(4、6 h)以及BD+Taxol联用组(4 h)细胞JNK蛋白的相对表达量均显著降低,且BD+Taxol联用组(4 h)显著低于同时时间点Taxol同剂量单药组;BD单药组、Taxol单药组以及BD+Taxol联用组(4、6、12 h)细胞p-JNK蛋白的相对表达量均显著升高,且BD+Taxol联用组(6、12 h)显著高于同时时间点BD、

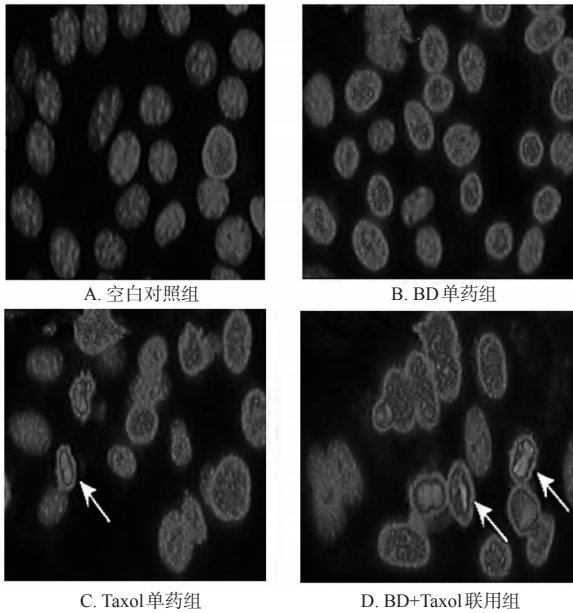


图2 BD和Taxol联用对Capan-2细胞凋亡影响的显微图(DAPI染色, ×20)

Fig 2 Micrographs of effects of BD combined with Taxol on the apoptosis of Capan-2 cells (DAPI staining, ×20)

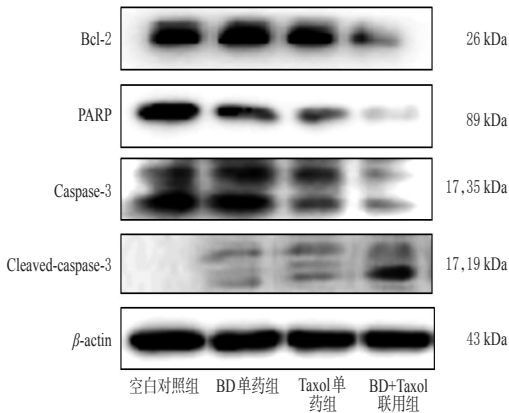


图3 BD和Taxol联用对Capan-2细胞凋亡蛋白表达影响的电泳图

Fig 3 Electrophoregrams of effects of BD combined with Taxol on the expression of apoptosis protein in Capan-2 cells

Taxol 同剂量单药组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 详见图4、表4。

4 讨论

鸦胆子首载于清代医学家赵学敏的《本草纲目拾遗》, 其果实已被广泛应用于治疗阿米巴痢疾、疟疾和各种寄生虫感染等疾病, 并被用作中药抗癌剂, 用以治疗食管癌、小细胞肺癌、胃癌等症^[15-17]。BD是从鸦胆子果实中提取的天然化合物, 是鸦胆子发挥抗肿瘤活性的主要成分, 虽然其对胰腺癌细胞株的抑制作用已有报道^[17-18], 但关于其与一线抗癌药物的协同抗肿瘤作用研究尚较为鲜见。为此, 本研究初步考察了BD和Taxol联

表3 BD和Taxol联用对Capan-2细胞凋亡蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Effects of BD combined with Taxol on the expression of apoptosis protein in Capan-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Bcl-2	PARP	Caspase-3	Cleaved-caspase-3
空白对照组	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.26
BD单药组	0.26 ± 0.01 [*]	0.52 ± 0.02 [*]	0.61 ± 0.03 [*]	32.25 ± 2.37 [*]
Taxol单药组	0.29 ± 0.02 [*]	0.34 ± 0.03 [*]	0.31 ± 0.00 [*]	70.99 ± 1.89 [*]
BD+Taxol联用组	0.04 ± 0.00 ^{**Δ}	0.18 ± 0.03 ^{**Δ}	0.14 ± 0.02 ^{**Δ}	213.27 ± 9.38 ^{**Δ}

注: 与空白对照组比较, $*P < 0.01$; 与BD单药组比较, $^{\#}P < 0.01$; 与Taxol单药组比较, $^{\Delta}P < 0.01$

Note: vs. blank control group, $*P < 0.01$; vs. BD single drug group, $^{\#}P < 0.01$; vs. Taxol single drug group, $^{\Delta}P < 0.01$

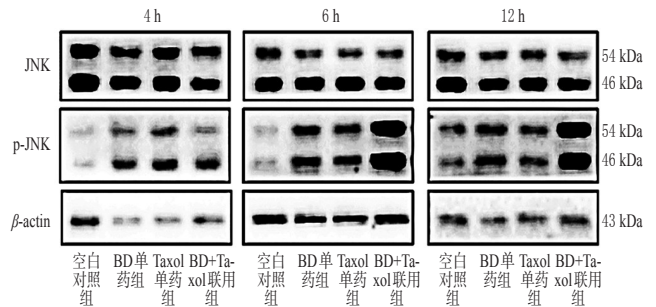


图4 BD和Taxol联用对Capan-2细胞JNK、p-JNK蛋白表达影响的电泳图

Fig 4 Electrophoregrams of BD combined with Taxol on the expression of JNK and p-JNK in Capan-2 cells

表4 BD和Taxol联用对Capan-2细胞JNK、p-JNK蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 4 Effects of BD combined with Taxol on the expression of JNK and p-JNK in Capan-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	JNK			p-JNK		
	4 h	6 h	12 h	4 h	6 h	12 h
空白对照组	1.00 ± 0.03	1.00 ± 0.07	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.28	1.00 ± 0.32	1.00 ± 0.16
BD单药组	0.74 ± 0.06 [*]	0.78 ± 0.03 [*]	1.03 ± 0.02	11.06 ± 1.35 [*]	11.60 ± 0.07 [*]	4.22 ± 0.24 [*]
Taxol单药组	0.91 ± 0.07	0.94 ± 0.05	1.01 ± 0.02	18.79 ± 0.81 [*]	9.12 ± 0.09 [*]	2.64 ± 0.09 [*]
BD+Taxol联用组	0.52 ± 0.02 ^{**Δ}	0.95 ± 0.05	0.90 ± 0.02	14.63 ± 0.86 [*]	48.58 ± 0.27 ^{**ΔΔ}	11.58 ± 0.65 ^{**ΔΔ}

注: 与空白对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; 与BD单药组比较, $^{\#}P < 0.01$; 与Taxol单药组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

Note: vs. blank control group, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$; vs. BD single drug group, $^{\#}P < 0.01$; vs. Taxol single drug group, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

用对人胰腺癌Capan-2细胞的体外抑制作用及其可能机制。

本研究采用SRB法评价了BD和Taxol联用对Capan-2细胞增殖的影响。在前期预试验中, 本课题组设计了一系列剂量梯度(BD: 0、5、10、15、20、25、30、35 μmol/L, Taxol: 0、10、20、30、40、50、60、70 nmol/L), 同时结合两药的半数抑制浓度[IC₅₀; BD: (24.56 ± 0.07) μmol/L,

Taxol: (39.98 ± 0.14) nmol/L], 最终将BD单用剂量确定为5、10、15、20 μmol/L, Taxol单用剂量确定为10、20、30、40 nmol/L, BD+Taxol联用剂量确定为5 μmol/L+10 nmol/L、10 μmol/L+20 nmol/L、15 μmol/L+30 nmol/L、20 μmol/L+40 nmol/L。SRB试验结果显示, 与对照组比较, BD 10、15、20 μmol/L组, Taxol 20、30、40 nmol/L组以及两药上述剂量联用组细胞的存活率均显著降低, 且BD+Taxol联用组显著低于BD、Taxol同剂量单药组, 差异均有统计学意义; 此外, BD 5 μmol/L+Taxol 10 nmol/L、BD 10 μmol/L+Taxol 20 nmol/L、BD 15 μmol/L+Taxol 30 nmol/L、BD 20 μmol/L+Taxol 40 nmol/L组的CI值分别为0.63 ± 0.04、0.68 ± 0.08、0.89 ± 0.12、0.84 ± 0.05。这提示BD、Taxol对Capan-2细胞的增殖均具有一定的抑制作用, 且两者联用的抑制作用强于任一药物单用, 表明两药联合具有一定的协同作用。

参考上述结果, 本课题组分别考察了BD单药(20 μmol/L)、Taxol单药(40 nmol/L)、BD+Taxol联用(20 μmol/L+40 nmol/L)对Capan-2细胞克隆形成和凋亡的影响。结果显示, 空白对照组细胞形态饱满, 细胞膜和细胞核形态均较为完整; 与空白对照组比较, BD单药组、Taxol单药组以及BD+Taxol联用组细胞均发生了不同程度的染色质浓聚、细胞核皱缩等形态学改变, 各给药组细胞克隆集落形成均有所减少, 克隆形成率均显著降低, 且BD+Taxol联用组显著低于BD、Taxol同剂量单药组, 差异均有统计学意义。这提示BD、Taxol、BD+Taxol均可不同程度地促进Capan-2细胞凋亡, 抑制其克隆形成, 且两药联用的效果明显优于任一药物单用。

有关研究发现, BD可通过诱导多种肿瘤细胞的凋亡来发挥抗肿瘤的作用^[10-12]。细胞凋亡是细胞在一定的生理或病理条件下, 受多种基因精确调控的主动的、程序化的死亡过程, 是机体重要的自稳调节机制^[19]。Bcl家族是线粒体凋亡通路的重要调节因子, 其中Bak、Bax等蛋白可促进细胞凋亡, 而Bcl-2、Mcl-1等蛋白则可抑制细胞凋亡^[20]。Caspase家族是凋亡调控系统中备受关注的蛋白家族之一, 在细胞凋亡的过程中发挥着极其关键作用, 其引发的级联反应是细胞凋亡的中心环节^[21-22]。Caspase-3是Caspase家族的核心成员, 位于级联反应的下游, 是诱导细胞凋亡的真正实施者; Cleaved-caspase-3是其活性形式, 两者均可作为衡量细胞凋亡的指标; PARP是Caspase-3的主要切割底物, 其裂解片段的出现被认为是细胞凋亡的重要信号^[23]。本研究结果显示, 与空白对照组比较, BD单药组、Taxol单药组以及BD+Taxol联用组细胞Bcl-2、PARP、Caspase-3蛋白的相对表达量均显著降低, 且BD+Taxol联用组显著低于BD、Taxol同剂量单药组; Cleaved-caspase-3蛋白的相对表达量均显著升高, 且BD+Taxol联用组显著高于BD、Taxol同剂

量单药组, 差异均有统计学意义。这提示BD联合Taxol可通过激活Caspase通路来诱导Capan-2细胞的凋亡。

除上述蛋白外, 细胞凋亡还受多种因素的调节。近年来有学者发现, JNK信号通路介导了多种胞外刺激诱导的细胞凋亡, 同时也参与了肿瘤细胞凋亡的发生过程^[24]。JNK属于促分裂原活化蛋白激酶(MAPKs)家族成员, 当细胞受到外界刺激后, JNK通路会被激活, 一部分活化的JNK会转位至细胞核中, 通过磷酸化修饰后形成p-JNK, 后者可作用于Bcl家族中的促凋亡蛋白(Bax、Bak等), 诱导细胞色素释放至细胞质内, 从而启动细胞凋亡程序^[25-27]。有研究指出, BD作用于人结肠癌HT29细胞后, 细胞中JNK蛋白的表达会有所降低, 而p-JNK的表达则会明显升高^[28]。本研究结果显示, 与空白对照组比较, BD单药组(4、6 h)以及BD+Taxol联用组(4 h)细胞JNK蛋白的相对表达量均显著降低, 且BD+Taxol联用组(4 h)显著低于同时间点Taxol同剂量单药组; BD单药组、Taxol单药组以及BD+Taxol联用组(4、6、12 h)细胞p-JNK蛋白的相对表达量均显著升高, 且BD+Taxol联用组(6、12 h)显著高于同时间点BD、Taxol同剂量单药组, 差异均有统计学意义, 与上述研究^[28]的结果基本一致。这提示BD联合Taxol可通过激活JNK磷酸化来诱导Capan-2细胞的凋亡。

综上所述, BD、Taxol均可抑制人胰腺癌Capan-2细胞的增殖并促进其凋亡, 且两者联合具有一定的协同作用, 效果优于任一药物单用。上述作用可能与激活Caspase通路以及JNK磷酸化等途径有关。但由于试验条件的限制, 本研究只初步探讨了BD和Taxol联用体外抗肿瘤的部分可能机制, 后续还有待进一步明确JNK参与细胞凋亡的具体机制, 并完善相应的在体研究。

参考文献

- [1] YOUNG K, HUGHES DJ, CUNNINGHAM D, et al. Immunotherapy and pancreatic cancer: unique challenges and potential opportunities[J]. *The Adv Med Oncol*, 2018. DOI: 10.1177/1758835918816281.
- [2] DIAZ KE, LUCAS AL. Familial pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *AM J Pathol*, 2019, 189(1): 36-43.
- [3] 曹蓉, 李燕雏. 晚期不可手术切除胰腺癌治疗新进展[J]. *华西医学*, 2015, 30(8): 1577-1580.
- [4] 朱斌, 刘腾, 余克富, 等. 吉西他滨联合白蛋白结合型紫杉醇化疗方案在胰腺癌治疗中的应用研究[J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(15): 1309-1312.
- [5] 陈卓, 蒋常春, 唐小川. 紫杉醇不良反应及合理用药探析[J]. *肿瘤药学*, 2012, 2(1): 73-74、80.
- [6] MAHALINGAM D, GOEL S, APARO S, et al. A phase II study of pelareorep (REOLYSIN®) in combination with gemcitabine for patients with advanced pancreatic adenocarcinoma[J]. *Cancers: Basel*, 2018. DOI: 10.3390/can-

- cers10060160.
- [7] GUO H, LIU JX, XU L, et al. Traditional Chinese medicine herbal treatment may have a relevant impact on the prognosis of patients with stage IV adenocarcinoma of the lung treated with platinum-based chemotherapy or combined targeted therapy and chemotherapy[J]. *Integr Cancer Ther*, 2011, 10(2): 127-137.
- [8] YANG L, SONG Z, WANG X, et al. Huaier extract enhances the treatment efficacy of paclitaxel in breast cancer cells via the NF- κ B/I κ B α pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(6): 3455-3464.
- [9] NEWMAN DJ, CRAGG GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years[J]. *J Nat Prod*, 2007, 70(3): 461-477.
- [10] PAN L, CHIN YW, CHAI HB, et al. Bioactivity-guided isolation of cytotoxic constituents of *Brucea javanica* collected in Vietnam[J]. *Bioorg Med Chem*, 2009, 17(6): 2219-2224.
- [11] LAU ST, LIN ZX, LIAO Y, et al. Bruceine D induces apoptosis in pancreatic adenocarcinoma cell line PANC-1 through the activation of p38-mitogen activated protein kinase[J]. *Cancer lett*, 2009, 281(1): 42-52.
- [12] LAU ST, LIN ZX, LEUNG PS. Role of reactive oxygen species in brucein D-mediated p38-mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signalling pathways in human pancreatic adenocarcinoma cells[J]. *Br J Cancer*, 2010, 102(3): 583-593.
- [13] CHOU TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(2): 440-446.
- [14] CHOU TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies[J]. *Pharmacol Rev*, 2006, 58(3): 621-681.
- [15] LIU L, LIN ZX, LEUNG PS, et al. Involvement of the mitochondrial pathway in bruceine D-induced apoptosis in Capan-2 human pancreatic adenocarcinoma cells[J]. *Int J Mol Med*, 2012, 30(1): 93-99.
- [16] MAN F, CHOO CY. Safety assessment of standardized aqueous *Brucea javanica* extract in rats[J]. *J Ethnopharmacol*, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2017-12-040.
- [17] XIAO Z, CHING CHOW S, HAN LI C, et al. Role of microRNA-95 in the anticancer activity of brucein D in hepatocellular carcinoma[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014. DOI: 10.1016/ejphar.2014.02.002.
- [18] ZHAO M, LAU ST, LEUNG PS, et al. Seven quassinoids from *Fructus Bruceae* with cytotoxic effects on pancreatic adenocarcinoma cell lines[J]. *Phytother Res*, 2011, 25(12): 1796-1800.
- [19] JEFFREY KL, CAMPS M, ROMMEL C, et al. Targeting dual-specificity phosphatases: manipulating MAP kinase signalling and immune responses[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2007, 6(5): 391-403.
- [20] 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.
- [21] LANGFORD MP, MCGEE DJ, TA KH, et al. Multiple caspases mediate acute renal cell apoptosis induced by bacterial cell wall components[J]. *Ren Fail*, 2011, 33(2): 192-206.
- [22] 朱赴东, 周霞, 陶雪芬, 等. 告达庭激活 Caspase-3 诱导人胃癌细胞 SGC-7901 凋亡[J]. *中国肿瘤*, 2014, 23(6): 523-527.
- [23] HORBAY R, BILYY R. Mitochondrial dynamics during cell cycling[J]. *Apoptosis*, 2016, 21(12): 1327-1335.
- [24] 魏娜, 贺海波, 张长城, 等. JNK 信号通路与细胞凋亡关系的研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2013, 18(7): 807-812.
- [25] YEOM M, KIM JH, MIN JH, et al. Xanthii fructus inhibits inflammatory responses in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages through suppressing NF- κ B and JNK/p38 MAPK[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015. DOI: 10.1016/j.jep.2015.11.020.
- [26] DHANASEKARAN DN, REDDY EP. JNK-signaling: a multiplexing hub in programmed cell death[J]. *Genes Cancer*, 2017, 8(9/10): 682-694.
- [27] XU L, YU J, ZHAI D, et al. Role of JNK activation and mitochondrial Bax translocation in allicin-induced apoptosis in human ovarian cancer SKOV3 cells[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2014. DOI: 10.1155/2014/378684.
- [28] 郑艳艳, 陈晶晶, 王兆洪. 鸦胆子素 D 对结肠癌 HT29 细胞株增殖的抑制及诱导其凋亡的机制[J]. *医学研究杂志*, 2017, 46(12): 85-89.
- (收稿日期: 2018-08-23 修回日期: 2019-01-14)
(编辑: 张元媛)