

去甲斑蝥素诱导人直肠癌 Colo 320 细胞凋亡作用研究

李 猛, 王天阳, 石 铖, 张国建, 林 林, 赵 晶, 任鹏涛, 闫庆辉
(河北医科大学第二附属医院肛肠外科, 河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的** 探讨去甲斑蝥素对人直肠癌 Colo 320 细胞的诱导凋亡作用. **方法** 采用不同浓度的去甲斑蝥素 (noncantharidin, NCTD) 作用于人直肠癌 Colo 320 细胞 24 h, 应用光镜和透射电镜观察细胞形态学和细胞超微结构的变化, 流式细胞的方法检测细胞生长周期, Western blot 法检测细胞 Bag-1 和 Bcl-2 蛋白表达. **结果** 光镜及透射电镜观察可见人直肠癌 Colo 320 细胞出现典型的凋亡形态学和超微结构的改变. 流式细胞仪分析显示: 经 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度 NCTD 处理人直肠癌 Colo320 细胞 24 h 后, G_0/G_1 期和 S 期细胞逐渐减少, G_2/M 期细胞逐渐增多, 呈剂量依赖关系. Western blot 检测显示, Bcl-2、Bag-1 蛋白的表达均下降. **结论** NCTD 对人直肠癌 Colo 320 细胞具有促进凋亡、干扰细胞的有丝分裂、将细胞阻滞于 G_2/M 分裂期和抑制 Bag-1 及 Bcl-2 蛋白表达的作用.

[关键词] 去甲斑蝥素; 人直肠癌 Colo 320 细胞; Bag-1; Bcl-2

[中图分类号] R735.3⁺7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 09 - 0020 - 05

The Effect of Norcantharidin on Human Rectal Cancer Colo 320 Cells

LI Meng, WANG Tian-yang, SHI Cheng, ZHANG Guo-jian, LIN Lin, ZHAO Jin, REN Peng-tao, YAN Qing-hui
(Dept. of Anorectal Surgery, The Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang Hebei 050000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of norcantharidin on growth inhibition and induction of apoptosis of human rectal cancer Colo 320 cells. **Methods** Norcantharidin (NCTD) in different concentrations were added to rectal cancer Colo 320 cells. Morphological characteristics of apoptosis were observed using the light microscope and transmission electron microscope. The expressions of Bag-1 and Bcl-2 proteins were tested by Western blotting. The growth inhibition of Colo 320 cells on the cell cycle was observed by flow cytometry. **Results** The apoptosis morphological changes of Colo 320 cells were observed by the light microscope and transmission electron microscopy. Flow cytometry analysis showed that the cell count of G_2/M phase in experimental group was higher than that in control group ($P < 0.05$) but the cell counts of G_0/G_1 and S phases have decreased in experimental group after treatment with NCTD at the concentrations of 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, and presented dosage dependence relations. The expressions of Bag-1 and Bcl-2 proteins have decreased. **Conclusion** Norcantharidin has inhibitory effect on rectal cancer Colo 320 cells, and the effect may be related to the cell cycle arrest and apoptosis.

[Key words] NCTD; Rectal cancer; Bag-1; Bcl-2

直肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率较高, 在我国有些发达地区甚至超过

世界平均水平. 目前, 直肠癌的治疗多以手术和化疗为主, 但远期生存率并不理想并且复发率较高.

[基金项目] 河北省科学技术研究与发展攻关计划项目 (042761517)

[作者简介] 李猛 (1986~), 男, 河北保定人, 在读硕士研究生, 主要从事肛肠外科临床及研究工作.

[通讯作者] 闫庆辉. E-mail: YQH804@Yahoo.com.cn

因此. 研究直肠癌新的治疗策略和开发新的治疗药物已成为当前医药领域重点研究方向. 从传统中医药理论出发, 用中药或者其提取成分治疗肿瘤受到越来越多医学专家的重视. 斑蝥素 (cantharidin, CTD) 是从斑蝥的干燥虫体中提取的有效活性成分, 大量的体外研究也发现其对多种消化系统肿瘤有明显的抑制作用, 如肝癌、胆囊癌、食管癌^[1-3]等, 但对直肠癌体外研究的报道尚不多见. 本研究旨在探讨去甲斑蝥素 (noncantharidin, NCTD) 对人直肠癌 Colo 320 细胞的生长抑制和诱导凋亡作用, 为直肠癌的治疗提供新的治疗思路和实验基础.

1 材料与方法

1.1 材料

直肠癌 Colo320 细胞 (自中国科学院上海生命研究所), 去甲斑蝥素 (美国 Sigma 公司), RPMI1640 (武汉原生原代医药科技有限公司), 四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (碧云天生物技术有限公司), HE 染色试剂盒 (百浩生物科技有限公司), DMSO (美国 Sigma 公司), 胎牛血清 (杭州四季青公司), 兔抗人 bcl-2、bag-1 (bioworld 公司), 兔抗人 β -actin (美国 Abcam 公司), AnnexinV 凋亡检测试剂盒 (北京宝赛生物试剂有限公司).

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养于含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基中, 在温度为 37℃ 的含 5% CO₂ 培养箱中培养, 细胞生长方式为贴壁生长.

1.2.2 药物处理 去甲斑蝥素溶于 DMSO, 配成 100 mg/mL 储存浓度后冻存备用, 冻存温度为 -20℃, 采用 RPMI1640 液配制成工作浓度使用.

1.2.3 光学显微镜观察 HE 染色细胞形态变化 收集细胞, 用 PBS 洗涤 3 次后离心, 加入 1 mL 甲醛钙固定 2 min, 然后用蒸馏水洗涤 2 次, 每次 10 s, 用苏木素染液染色 2~3 min 后蒸馏水洗涤 2 遍, 浸入氨水中 2 min, 之后伊红染色 1 min, 最后在纯乙醇中脱水, 待乙醇自然风干后, 用中性树脂封片, 最后在光学显微镜下观察细胞凋亡形态变化并采集图像.

1.2.4 透射电镜观察细胞形态学变化 收集各组细胞, 用 PBS 洗涤 2 次, 将细胞放入青霉素小瓶中, 加 4℃ 预冷的 4% 戊二醛, 4℃ 固定 1 h, 然后吸出固定剂, 用 PBS 清洗 2 次, 每次 10 min, 再用 4℃ 预冷的 1% 锇酸, 4℃ 固定 1 h, 用 PBS 清洗 2 次, 先用乙醇梯度脱水每次 10 min, 再用丙酮脱

水 10 min, 然后分别用丙酮与树脂 3:1, 1:1, 1:3 的混合液各浸泡 15 min 后, 用 Epon 618 纯化树脂浸透包埋, 之后切成 50 nm 的超薄切片, 用醋酸铅和柠檬酸铅双重染色, 完成后在透射电镜下观察细胞超微结构变化.

1.2.5 Western blotting 法检测蛋白的表达 直肠癌 Colo320 细胞经不同浓度 NCTD 作用 24 h 后用细胞裂解液裂解细胞, 提取总蛋白, 紫外分光光度法进行蛋白定量. 50 μ g/孔上样, 加入 10% SDS-PAGE 分离胶中进行电泳, 之后将蛋白质通过干转移法转移到 PVDF 膜上, 然后将 PVDF 膜放入 1X TBST 中清洗 3 次, 每次 5 min, 摇床摇动, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 6 h, 加入一抗 (兔抗人 bag-1 和 Bcl-2) 37℃ 孵育 90 min, 摇床摇动, 将 PVDF 膜放入 TBST 中清洗 3 次, 每次 5 min, 接着加入荧光二抗 (抗兔 IgG) 37℃ 孵育 1 h, 摇床摇动, 然后 TBST 充分漂洗 (3 次, 每次 10 min), 最后应用 odyssey 成像仪显色.

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡率 收集各组细胞, 用 PBS 洗涤 2 次后加入冰预冷的 70% 的乙醇 4℃ 固定 2 h, 离心后弃去固定液, 3 mL PBS 重悬 5 min, 800 r/min 离心 5 min 后弃去 PBS, 然后用 1 mL PI 染色, 室温避光孵育 30 min 后混匀, 置流式管中, 然后上流式细胞仪检测 (PI 用氩离子激发荧光, 激光光波波长为 488 nm), 最后用 LYSIS 软件分析凋亡率.

1.3 统计学方法

采用 SPSS 软件进行统计分析, 计量数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 对各组数据均进行方差齐性检验, 方差齐时不同组间用单因素方差分析, 两两比较用 SNK q 检验; 方差不齐用 K-WH 检验, 两两比较用 Neminy 法, 检验水准为 $P < 0.05$.

2 结果

2.1 细胞凋亡的形态学观察

2.1.1 光学显微镜 光学显微镜下观察结果显示: 空白对照组人直肠癌 Colo320 细胞在经 HE 染色后细胞核被苏木精染成鲜明的蓝色, 胞浆被伊红染成深浅不同的粉红色, 胞浆丰富, 胞核饱满; 而 5 μ g/mL NCTD 处理后的细胞, 可见胞核固缩深染, 胞浆减少, 细胞体积缩小; 10 μ g/mL NCTD 处理后的细胞, 胞浆进一步减少, 胞核进一步深染, 并且出现裸核细胞, 胞浆完全溶解; 20 μ g/mL NCTD 处理后的细胞, 可见细胞已完全裂解, 凋亡, 胞核消失, 见图 1.

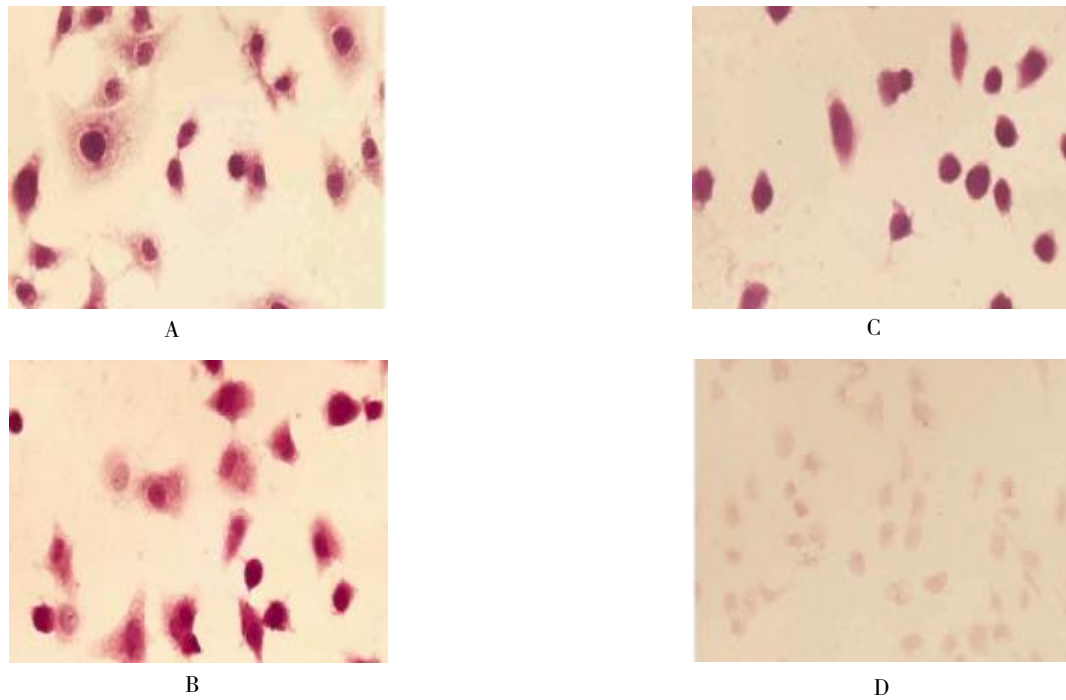


图 1 HE 染色直肠癌 Colo 320 细胞形态学的变化 (× 400)

Fig. 1 Morphology of human rectal cancer Colo 320 cells with HE staining (× 400)

A:空白对照; B: 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NCTD; C:10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NCTD; D:20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NCTD.

2.1.2 透射电镜 透射电镜下观察结果显示: 空白对照人直肠癌 Colo320 组细胞, 细胞核大、且有 4 个大而明显的核仁, 细胞表面有些细长突起; 经过浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NCTD 处理 24 h 后, 人直肠癌 Colo320 细胞出现皱缩, 胞浆空泡化明显, 胞浆及核膜形成锐角向外突起, 细胞器数量明显减少; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NCTD 处理细胞, 核染色质进一步浓缩, 体积缩小, 电子密度增加, 边集于核膜下, 形成了典型的半月体; 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ NCTD 处理细胞, 出现细胞核膜破裂, 染色质外排, 见图 2.

2.2 去甲斑蝥素对人直肠癌 colo320 细胞周期的作用

流式细胞仪分析结果显示: 经 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度 NCTD 处理人直肠癌 colo320 细胞 24 h 后, G_0/G_1 期和 S 期细胞逐渐减少, G_2/M 期细胞逐渐增多, 呈剂量依赖关系, 见表 1 和图 3.

2.3 去甲斑蝥素对人直肠癌 Colo 320 细胞 Bag-1 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

实验结果显示, NCTD 作用于人直肠癌 Colo320 细胞 24 h 后, 随着 NCTD 剂量增加, 人直肠癌 Colo320 细胞中 Bcl-2 及 Bag-1 蛋白的表达逐渐减少 ($P < 0.05$), 呈剂量依赖关系, 见表 2、图 4.

3 讨论

从传统中医药理论出发, 用中药及其提取成分治疗肿瘤受到越来越多医学专家的重视. 斑蝥素 (cantharidin, CTD) 是从斑蝥的干燥虫体中提取的有效活性成分, 曾被在临床上应用于各种肿瘤的治疗, 但对于泌尿系统的副作用较强, 而去甲斑蝥素 (NCTD) 为去除斑蝥素 1、2 位甲基的衍生物, 其毒副作用较小, 却保留了较强的抗癌作用, 并且由于其特殊的升高白细胞作用, 因而被广泛的应用于临床. 近年大量的体外研究发现 NCTD 对多种消化系统肿瘤如肝癌、胆囊癌、食管癌等有明显的抑制作用^[1-3], 但对直肠癌体外研究的报导尚不多见.

本研究发现人直肠癌 Colo 320 细胞经 NCTD 作用 24 h 后, 光学显微镜和透射电镜下细胞形态及超微结构均呈现出典型的凋亡形态改变, 提示 NCTD 具有促进人直肠癌 Colo 320 细胞凋亡作用. 流式细胞仪检测显示: 经过 NCTD 作用后的直肠癌 Colo 320 细胞中处于 G_2/M 期的细胞数明显增多, G_0/G_1 期和 S 期细胞明显减少, 表明 NCTD 能够干扰细胞的有丝分裂, 将细胞阻滞于 G_2/M 分裂期, 这可能与抑制人直肠癌 Colo 320 细胞增殖的作

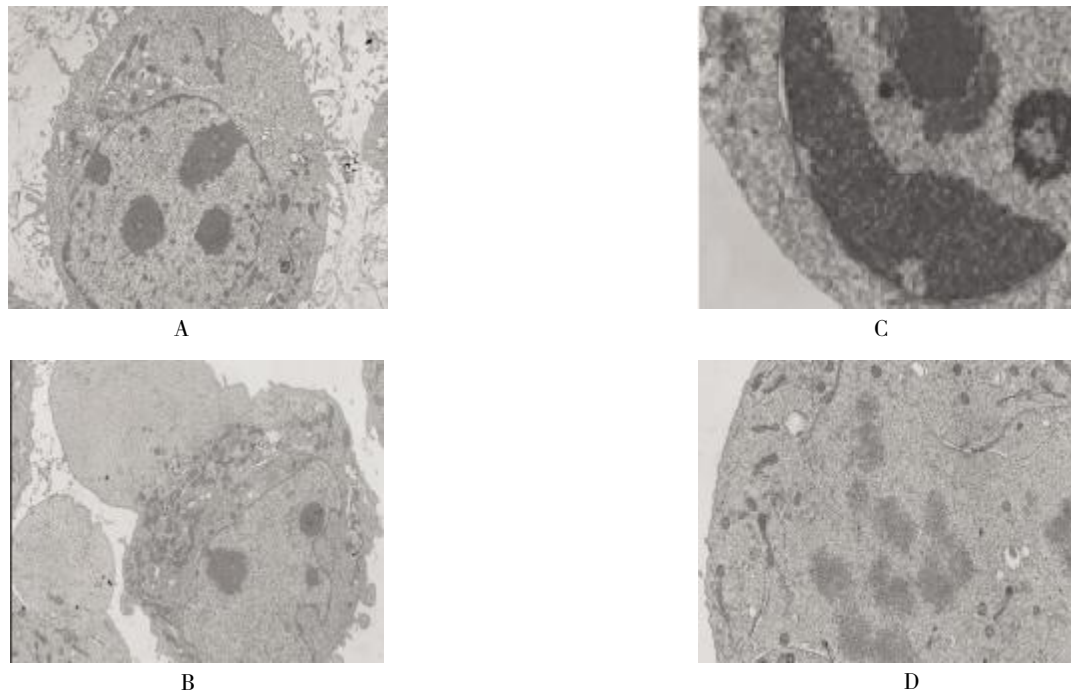


图 2 透射电子显微镜下观察去甲斑蝥素对直肠癌 Colo320 细胞凋亡的变化

Fig. 2 The apoptosis of human rectal cancer Colo 320 cells under electron microscopy treated with NCTD at different concentrations for 24 h

A:空白对照 (×4 000); B:5 μg/mL (×4 000); C:10 μg/mL (×10 000); D:20 μg/mL (×8 000) .

表 1 去甲斑蝥素对人直肠癌 Colo 320 细胞周期的作用 (x̄ ± s)

Tab. 1 The effect of NCTD on the cell cycle of Colo 320 cells for 24 h (x̄ ± s)

组 别	n	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
空白对照组	5	48.39 ± 1.48	28.47 ± 1.24	21.64 ± 1.37
5 μg/mL 组	5	38.42 ± 1.39 [▲]	27.86 ± 1.04 [▲]	32.25 ± 1.18 [▲]
10 μg/mL 组	5	32.31 ± 1.26 ^{▲*}	25.34 ± 0.85 ^{▲*}	40.36 ± 0.93 ^{▲*}
20 μg/mL 组	5	28.07 ± 1.19 ^{▲*Δ}	9.38 ± 0.96 ^{▲*Δ}	51.09 ± 1.13 ^{▲*Δ}

与空白对照组比较, [▲]P<0.05; 与 5 μg/mL 组比较, ^{*}P<0.05; 与 10 μg/mL 组比较, ^ΔP<0.05.

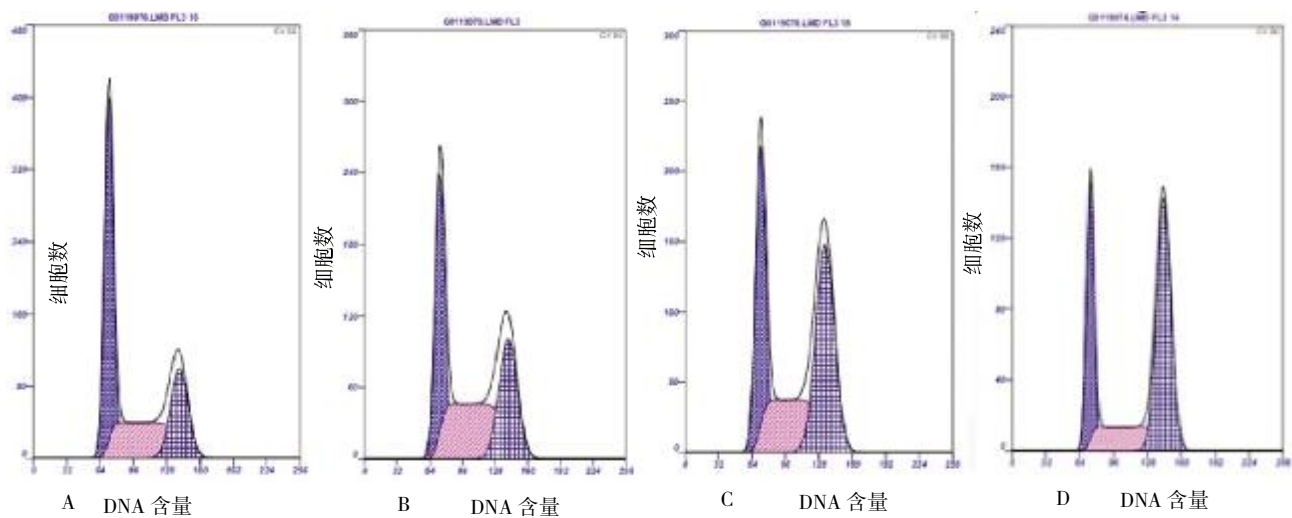


图 3 流式细胞术检测 NCTD 对直肠癌 Colo320 细胞周期的影响

Fig. 3 The effect of NCTD on the cell cycle of Colo 320 cells by flow cytometry

A: 空白对照; B: 5 μg/mL NCTD; C: 10 μg/mL NCTD; D: 20 μg/mL NCTD.

表 2 去甲斑蝥素对 bag-1 和 bcl-2 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Effects of NCTD on the expression of bag-1 and bcl-2 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Bag-1	Bcl-2
空白对照组	5	42.32 ± 1.28	54.87 ± 3.16
5 μg/mL 组	5	38.71 ± 2.84 [▲]	53.89 ± 2.54 [▲]
10 μg/mL 组	5	29.76 ± 1.23 ^{▲*}	37.68 ± 1.43 ^{▲*}
20 μg/mL 组	5	17.07 ± 1.13 ^{▲▲*}	22.45 ± 3.43 ^{▲▲*}

与空白对照组比较, [▲] $P < 0.05$; 与 5 μg/mL 组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与 10 μg/mL 组比较, [▲] $P < 0.05$.

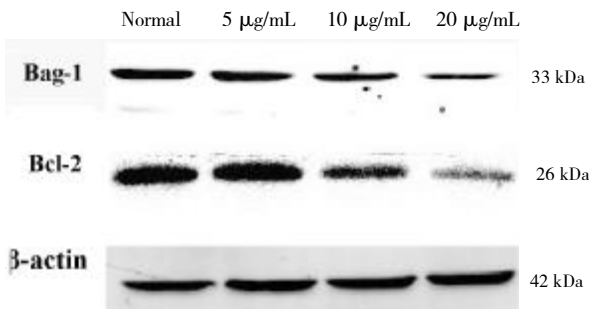


图 4 Western blotting 测定去甲斑蝥素对 Bag-1 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

Fig. 4 The effects of NCTD on Bag-1 and Bcl-2 proteins expression in Colo 320 cells by western blotting

用机理有关。

Bag-1 是 BAG 家族的主要成员之一, 它能显著促进 Bcl-2 的抗凋亡作用, 与 Bcl-2 形成复合物, 共同抑制细胞凋亡^[4]。相反, 当 Bag-1 与 Bcl-2 蛋白处于高表达状态时, 细胞增殖活跃^[5]。有研究发现: Bcl-2、Bag-1 蛋白高表达在结直肠癌的发病过程中均发挥十分重要作用; Bag-1 表达水平与结直肠癌的恶性程度有关, 可作为预测结直肠癌浸润转移潜能的新的生物学指标^[6,7]。本研究用 Western blotting 方法分析结果发现, 经 NCTD

作用 24 h 后人直肠癌 Colo 320 细胞 Bag-1 及 Bcl-2 蛋白的表达均随 NCTD 剂量浓度的增加而下降, 提示 NCTD 诱导直肠癌细胞凋亡与抑制 Bag-1 及 Bcl-2 蛋白的表达有关。

综上所述, NCTD 具有促进人直肠癌 Colo 320 细胞凋亡, 干扰细胞的有丝分裂, 将细胞阻滞于 G₂/M 分裂期和抑制 Bag-1 及 Bcl-2 蛋白的表达的作用, 为其在临床上应用于直肠癌的治疗提供了理论和实验依据。

[参考文献]

- [1] SHUIJUN ZHANG, GONGQUAN L I, XIUXIAN M A, et al. Norcantharidin enhances ABT-737-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by transcriptional repression of Mcl-1 [J]. *Cellular Signalling*, 2012, 24: 1 803 - 1 809.
- [2] JING - TAO ZHANG, YUE - ZU FAN, CHUN - QIU CHEN, et al. Norcantharidin: a potential antiangiogenic agent for gallbladder cancers in vitro and in vivo [J]. *International Journal of Oncology*, 2012, 40: 1 501 - 1 514.
- [3] 许昕, 彭林涛. 去甲斑蝥素诱导人食管癌 Eca-109 细胞凋亡及其作用机制 [J]. *肿瘤*, 2010, 30(8): 666 - 670.
- [4] NIANFENG SUN, PH.D, QINGYI MENG, et al. Expressions of the anti-apoptotic genes Bag-1 and Bcl-2 in colon cancer and their relationship [J]. *The American Journal of Surgery*, 2010, 200: 341 - 345.
- [5] PAUL A, TOWNSEND, ANASTASIS STEPHANOU, et al. BAG-1: a multi-functional pro-survival molecule [J]. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, 37: 251 - 259.
- [6] 杨光华, 赵晶, 李磊, 等. AG-1 在大肠癌中的表达及意义 [J]. *肿瘤防治研究*, 2012, 39(1): 71 - 74.
- [7] SUN N F, MENG Q Y, HU S Y, et al. Correlation between the expression of the BAG-1 gene and clinicopathologic factors in colorectal cancer [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2011, 137(10): 1 419 - 1 424.

(2013-06-14 收稿)