

美登木素对人乳头状甲状腺癌 B-CPAP 细胞增殖和凋亡的作用及机制

刘翠翠¹, 顾娜², 王璐瑶², 谭程², 李锡晶², 沈洪昇², 李新燕¹, 王梅¹, 李文畅², 李冬冬², 赵秀梅^{2*}

1. 沧州医学高等专科学校, 河北 沧州 061000

2. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

摘要: 目的 探讨美登木素对人乳头状甲状腺癌 B-CPAP 细胞增殖、凋亡的影响及作用机制。方法 用不同浓度 (0.19、0.76、3.05、12.21、48.83、195.31、781.25、3 125 nmol/L) 的美登木素溶液处理 B-CPAP 细胞, SRB 法检测 B-CPAP 细胞增殖情况。将 B-CPAP 细胞分为对照组及美登木素 (0.1、1、10 nmol/L) 组, 光学显微镜观察 B-CPAP 细胞形态变化; 流式细胞术检测 B-CPAP 细胞凋亡情况; Western blotting 法测定 B-CPAP 细胞中 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 前体 (Procaspase-3) 的蛋白表达量。结果 与对照组比较, 美登木素能有效抑制 B-CPAP 细胞增殖, 且呈浓度及时间相关性; 随美登木素浓度增加 B-CPAP 细胞凋亡率逐渐升高, Bcl-2 和 Procaspase-3 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$), 呈明确的浓度相关性。结论 美登木素具有抑制 B-CPAP 细胞增殖及诱导凋亡的作用, 其机制可能与调控 Bcl-2 和 Procaspase-3 蛋白有关。

关键词: 美登木素; 人乳头状甲状腺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡; B 淋巴细胞瘤-2

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)11-2655-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.11.002

Effect and mechanism of maytansine on the proliferation and apoptosis of human papillary thyroid cancer B-CPAP cells

LIU Cui-cui¹, GU Na², WANG Lu-yao², TAN Cheng², LI Xi-jing², SHEN Hong-sheng², LI Xin-yan¹, WANG Mei¹, LI Wen-chang², LI Dong-dong², ZHAO Xiu-mei²

1. Cangzhou Medical College, Cangzhou 061000, China

2. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

Abstract: Objective To investigate the effects of maytansine on the proliferation and apoptosis of B-CPAP cells and its mechanism.

Methods B-CPAP cells were treated with different concentrations (0.19, 0.76, 3.05, 12.21, 48.83, 195.31, 781.25, and 3 125 nmol/L) of maytansine solution. The proliferation of B-CPAP cells was detected by SRB. B-CPAP cells were divided into control group and maytansine (0.1, 1, and 10 nmol/L) group. The change of cellular morphology was observed by invert microscope, and the flow cytometry was used to detect the cell apoptosis rate and the expression of Bcl-2 and Procaspase-3 protein was assayed by Western blotting. **Results** Compared with the control group, maytansine could proliferation inhibited B-CPAP cell in concentration and time-dependent manner. The apoptosis rate of B-CPAP cells gradually increased, and the expression levels of Bcl-2 and Procaspase-3 proteins decreased ($P < 0.05$) with concentration dependent. **Conclusion** Maytansine could inhibit the proliferation and induce apoptosis of B-CPAP cells, and its mechanism may be related to the regulation of Bcl-2 and Procaspase-3 proteins.

Key words: maytansine; human papillary thyroid cancer; cell proliferation; cell apoptosis; Bcl-2

甲状腺癌属于内分泌恶性肿瘤, 在我国已成为发病率增长最快的恶性肿瘤之一^[1]。甲状腺乳头状癌是甲状腺癌最常见的类型, 可通过手术、放射性

碘、促甲状腺激素抑制进行治疗^[2-5]。虽然能获得较长时间的无疾病生存期, 但是仍有部分患者在治疗过程中进展为碘难治性甲状腺癌, 生存期大大缩

收稿日期: 2023-08-16

基金项目: 沧州市重点研发计划项目 (204106038); 天津市第二批卫生健康行业高层次人才选拔培养工程 (TJSJMYXC-D2-034); 天津市卫生健康委天津市中医药管理局中医中西医结合科研课题 (2021072)

作者简介: 刘翠翠, 女, 讲师, 主治医师, 研究方向为基础药理学。E-mail: 65549465@qq.com

*通信作者: 赵秀梅, 女, 研究员, 研究方向为中药药理、肿瘤药理。E-mail: zxmmlg@163.com

短,严重危害患者生命。因此,临床上仍需寻找安全有效的治疗药物,来提高甲状腺癌患者生存率,降低死亡率,改善患者的生活质量。

微管靶向剂(MTAs)是癌症化疗中最成功的抗癌药物。通过干扰微管蛋白聚合和解聚动力学,影响细胞内运输和细胞信号通路,抑制细胞有丝分裂和细胞增殖,诱导细胞凋亡和死亡^[6-7]。美登木素作为一种高效的 MTAs,可在较低浓度下杀死肿瘤细胞。1972年,由美国植物学家 Kupchan 及其同事在埃塞俄比亚和肯尼亚产的卵叶美登木中分离得到,并发现其对小鼠白血病 P388 细胞、黑色素瘤 B16 细胞、Lewis 肺癌等有效^[8]。随后,我国科研人员在一种国产云南美登木中也成功提取到美登木素^[9]。近年来的研究表明,美登木素对体外培养的人肺癌 A549、鼻咽癌细胞也具有明确地抑制作用^[10-11],但其对甲状腺癌的作用研究较少。为此,本研究以人甲状腺乳头状癌 B-CPAP 细胞为研究对象,探讨了美登木素对甲状腺癌的作用及机制,为其临床上治疗甲状腺癌提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞来源

人源 B-CPAP 细胞购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.2 药品与试剂

美登木素(质量分数≥99.80%,美国 MCE 公司,批号 95688);SRB(美国 Sigma 公司,批号 S1402);三氯乙酸(TCA,天津市科密欧化学试剂有限公司,批号 20190304);Annexin-FITC 凋亡试剂盒(美国 Immunoway 公司,货号 KC0001);Procaspase-3(美国 Proteintech 公司,货号 19677-I-AP);Bcl-2 抗体(美国 Abcam 公司,货号 ab32124);山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗(美国 Immunoway 公司,货号 RS0002)。

1.3 仪器

FACSCanto II 流式细胞仪(美国 BD 公司);Infinite M200 酶联免疫检测仪(瑞士 Tecan 公司);HERA Cell 150iCO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);IM 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);垂直凝胶电泳仪及配套设备(美国 BIO-RAD 公司);LAS500 凝胶成像一体机(美国 GE 公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 B-CPAP 细胞用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液置于 37℃、5%CO₂ 培养箱中

培养,3~4 d 胰酶消化传代 1 次。

1.4.2 美登木素溶液的配制 称取美登木素 2 mg,加入二甲基亚砜 2.7 mL,于超声震荡仪中超声 2 min 使充分溶解,配制成 1 mmol/L 的储备溶液。用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 液稀释成不同浓度的待测溶液。

1.4.3 SRB 法测定美登木素对 B-CPAP 细胞增殖抑制率^[12] 取对数生长期的 B-CPAP 细胞,胰酶消化后调整密度为 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 100 μ L。37℃含 5%CO₂ 的培养箱中培养 24 h,加入不同质量浓度的美登木素溶液,使其最终浓度分别为 0.19、0.76、3.05、12.21、48.83、195.31、781.25、3 125 nmol/L。同时设对照组,每孔 100 μ L。继续培养 24~72 h 后,每孔加入 50 μ L 预冷的 50% TCA 溶液固定,4℃放置 1 h 后,用蒸馏水反复洗涤,空气中自然干燥。干燥后每孔加入由冰醋酸配制的 SRB 溶液 100 μ L,室温中染色 10 min。弃去上清液,用 1%醋酸反复洗涤,空气中自干。最后每孔加入 Tris 溶液 150 μ L,于 515 nm 处测定各孔吸光度(A)值,计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{药物}} / A_{\text{对照}}$$

1.4.4 光学显微镜观察美登木素对 B-CPAP 细胞形态的影响 取对数生长期的 B-CPAP 细胞,调整密度为 1×10^5 个/mL,接种于 6 孔板中,每孔 2.5 mL。贴壁 24 h 后,分为对照组,低、中、高浓度美登木素组。对照组用含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液培养,而低、中、高浓度美登木素组剂量分别采用 48 h 半数抑制浓度(IC₅₀)的 0.05、0.5、5 倍,即终浓度为 0.1、1、10 nmol/L 的美登木素溶液培养。培养箱中培养 48 h 后,倒置显微镜下观察各组细胞的形态学变化。

1.4.5 流式细胞仪检测美登木素对 B-CPAP 细胞凋亡的促进作用 参照 1.4.4 项下,设置美登木素终浓度为 0.1、1、10 nmol/L 组和对照组。于药物作用后 48 h,用不含 EDTA 的胰酶消化后,2 000 r/min,离心收集细胞。用冷 PBS 洗涤细胞,2 000 r/min 离心。弃去上清,取细胞沉淀重悬于 $1 \times$ binding buffer 缓冲液中,加入 Annexin V-FITC 和 PI 溶液各 5 μ L 并混匀。在避光情况下室温孵育 15 min。上流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.4.6 Western blotting 法测定美登木素对 B-CPAP 细胞中 Bcl-2、Procaspase-3 蛋白水平表达变化 参照 1.4.4 项下,设置美登木素 0.1、1、10 nmol/L 组和

对照组。于药物作用后 48 h, 弃去培养液, 加 4 °C 预冷的 PBS, 平放轻轻摇动 1 min 洗涤细胞。加含 PMSF 的裂解液, 于冰上裂解。裂解完后, 用移液器将细胞碎片和裂解液移至 1.5 mL 离心管中。于 4 °C 下 12 000 r/min 离心。将离心后的上清转移至 1.5 mL 的离心管中。BCA 法检测蛋白浓度后, 每孔蛋白上样量 20 μ g, SDS-PAGE 电泳后湿转法转膜。以脱脂牛奶封闭 PVDF 膜, TBST 缓冲液清洗后, 加一抗冰箱 4 °C 孵育过夜。次日用 TBST 缓冲液洗膜, 加二抗室温孵育后洗膜。最后, 将 PVDF 膜置于凝胶成像一体机中, 滴加发光液后, 测定目的蛋白条带。

1.5 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计和分析, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析行组间比较。

2 结果

2.1 美登木素对 B-CPAP 细胞增殖抑制作用

由图 1 可见, 不同浓度的美登木素对 B-CPAP 细胞的增殖均具有不同程度的抑制作用, 且随着药物浓度的增加, 抑制程度递增, 具有剂量相关性。随着美登木素作用时间延长, 抑制程度也随之增加。24、48、72 h 的 IC_{50} 分别为 46.191、1.827、1.072 nmol/L, 呈明显的时间相关性。

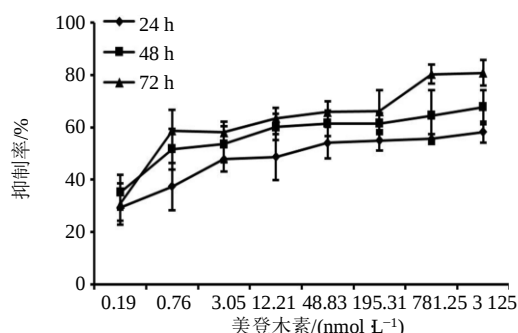


图 1 美登木素对 B-CPAP 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of maytansine on the growth of B-CPAP cells

2.2 美登木素对 B-CPAP 细胞形态的影响

倒置显微镜下观察发现, 对照组 B-CPAP 细胞胞质饱满, 呈圆形或长梭形, 相邻细胞生长融合成片。经美登木素处理后 48 h, 随着美登木素浓度增加, 细胞数逐渐减少、间隙增大、细胞碎片增多、折光性变差, 几无片状细胞生长区, 见图 2。

2.3 美登木素对 B-CPAP 细胞凋亡的影响

通过流式细胞术检测发现, 与对照组相比, 美登木素处理 B-CPAP 细胞 48 h 后, 随药物浓度递

增, 细胞凋亡比例也随之增加 ($P < 0.05$), 见图 3、表 1。

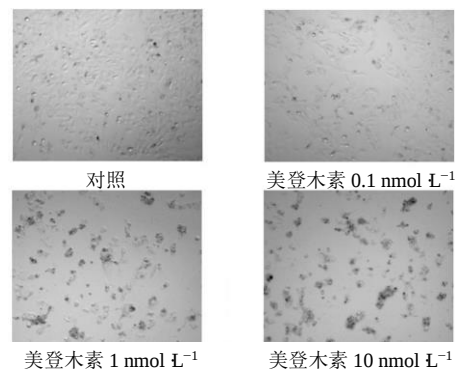


图 2 美登木素对 B-CPAP 细胞形态学的影响 ($\times 200$)

Fig. 2 Effect of maytansine on morphology of B-CPAP cells ($\times 200$)

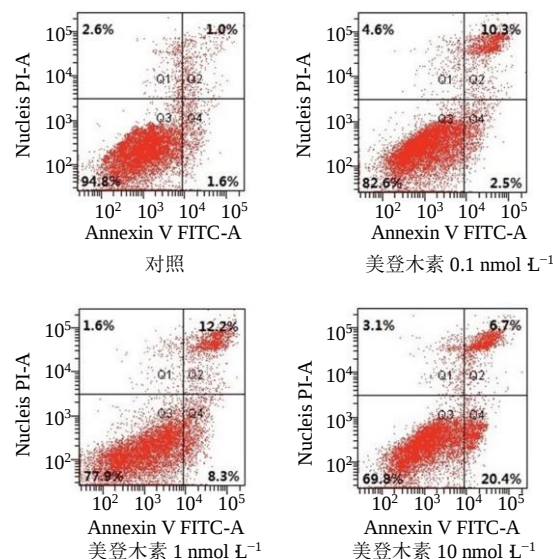


图 3 美登木素对 B-CPAP 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of maytansine on apoptosis of B-CPAP cells

表 1 不同浓度美登木素对 B-CPAP 细胞凋亡的对比 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Comparison of different concentrations of maytansine on apoptosis of B-CPAP cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(nmol L^{-1})	凋亡率/%
对照	—	2.33 $\pm$ 0.38
美登木素	0.1	13.43 $\pm$ 0.78*
	1	22.63 $\pm$ 2.87*
	10	31.87 $\pm$ 6.84*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

2.4 美登木素对 B-CPAP 细胞中 Bcl-2、Procaspase-3 蛋白表达的影响

与对照组相比, 经 0.1、1、10 nmol/L 美登木素

处理后的 B-CPAP 细胞, Bcl-2 和 Procaspase-3 蛋白的表达水平随药物浓度的升高逐渐降低 ($P < 0.05$), 见图 4。

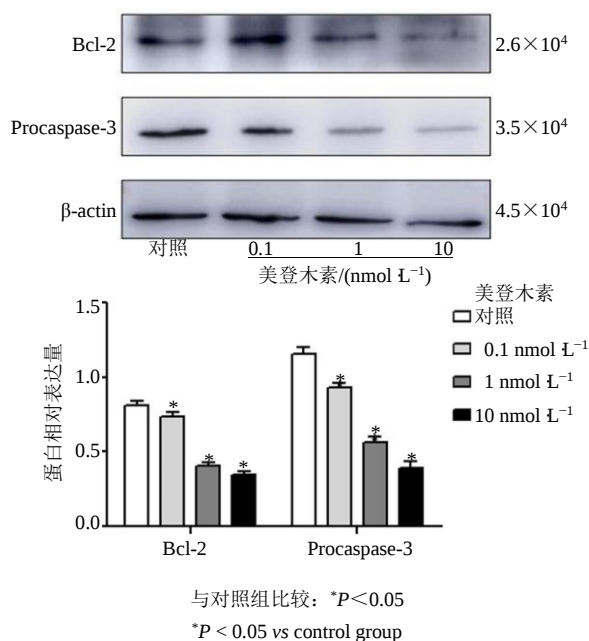


图 4 美登木素对 Bcl-2、Procaspase-3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of maytansine on the levels of Bcl-2 and Procaspase-3 protein ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3 讨论

从天然活性成分中寻找低毒、高效的药物, 一直是抗肿瘤研究的热点。近代药理学研究表明, 盐酸石蒜碱、姜黄素、白藜芦醇、小檗碱、毛蕊异黄酮、小白菊内酯等单体成分可通过调控相关通路和蛋白在体内外抑制甲状腺乳头状癌细胞增殖^[13-18]。而自发现美登木素以来, 科研人员对美登木属植物的化学成分及其生物活性进行了大量研究。近年来其抗肿瘤方面的研究主要集中在肺癌和鼻咽癌, 但对甲状腺癌的研究鲜有报道。作为 MTAs 中的微管聚合抑制剂即微管失稳剂, 美登木素可通过与微管蛋白的不可逆结合, 使得微管自身的结构发生改变, 抑制微管的聚合生长, 让微管自身的动力学性质发生转变, 从而妨碍细胞有丝分裂时纺锤体的形成, 阻滞细胞有丝分裂, 达到抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡的目的^[19]。本研究采用 SRB 法观察了不同浓度的美登木素对体外培养的人乳头状甲状腺癌 B-CPAP 细胞的生长影响。结果表明, 美登木素能明显抑制该细胞增殖, 并呈剂量和时间相关性。此外, 美登木素对 B-CPAP 细胞有显著的凋亡诱导作用。且随作用浓度的增加, 细胞凋亡率显著增加

($P < 0.05$)。

细胞凋亡指生理或病理状态下, 机体为维持内环境稳定而出现的细胞程序性死亡。细胞凋亡水平的下调与肿瘤发生发展密切相关。近年来, 细胞凋亡相关分子途径已成为肿瘤诊治策略制定及相关药物研发的关注目标^[20]。其中 Bcl-2 和 Caspase-3 是抗肿瘤的有效靶点^[21-22]。Caspase-3 是细胞凋亡过程中最关键的执行分子之一, 正常情况下, Caspase-3 以 Procaspase-3 的形式存在, 当 Procaspase-3 接收到凋亡信号后, 被催化裂解成为 Caspase-3, 进而诱导细胞凋亡。由于肿瘤细胞中的 Caspase-3 被抑制, 无法进行正常细胞凋亡, 导致酶原 Procaspase-3 呈现高表达状态。因此, 直接激活 Procaspase-3 成为 Caspase-3, 可诱导肿瘤细胞凋亡, 达到抗肿瘤的目的^[23-25]。为了探讨美登木素诱导 B-CPAP 细胞凋亡的可能机制, 本研究采用 Western blotting 法检测了细胞中 Bcl-2 和 Procaspase-3 蛋白表达的情况。结果发现, 美登木素培养 48 h 后, B-CPAP 细胞中 Bcl-2 和 Procaspase-3 蛋白表达较细胞对照组明显降低。

综上所述, 本研究通过体外实验发现美登木素对人乳头状甲状腺癌 B-CPAP 细胞具有抑制增殖、诱导凋亡的活性, 其作用机制可能与调控 Bcl-2、Procaspase-3 蛋白表达有关, 为其临床应用的可行性提供了充分的依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 樊丽, 许景伟, 王晓鑫, 等. 去甲斑蝥素对人未分化甲状腺癌 FRO 细胞增殖和凋亡的影响及机制 [J]. 广西医学, 2020, 42(10): 1257-1260.
- [2] 伍洁, 魏莹, 赵朕龙, 等. 超声引导下微波消融治疗侵犯被膜的甲状腺乳头状癌 [J]. 中国介入影像与治疗学, 2023, 20(2): 70-73.
- [3] 刘祥祥. 比较 7/8 版本甲状腺乳头状癌 TNM 分期患者的生存并探究放射性碘治疗对不同分层的患者的生存影响 [D]. 天津: 天津医科大学, 2021.
- [4] 张波涛, 张卫星, 贺志强, 等. 中高危甲状腺乳头状癌患者 ¹³¹I 治疗后临床转归的影响因素 [J]. 实用癌症杂志, 2022, 37(9): 1541-1543.
- [5] 陈承坤, 陶玄斌, 张颖超, 等. 智能化辅助调药系统在甲状腺乳头状癌患者术后内分泌抑制治疗中的应用 [J]. 中国普通外科杂志, 2022, 31(5): 597-607.
- [6] Cao S, Dong Y H, Wang D F, et al. Tubulin maytansine site binding ligands and their applications as MTAs and ADCs for cancer therapy [J]. Curr Med Chem, 2020,

- 27(27): 4567-4576.
- [7] Wordeman L, Vicente J J. Microtubule targeting agents in disease: Classic drugs, novel roles [J]. *Cancers*, 2021, 13(22): 5650.
- [8] Douros J, 曹玉泉. 美国抗癌研究所对美登木素的研究 [J]. 国外药学: 植物药分册, 1981(5): 9-14.
- [9] 周韵丽, 黄丽瑛, 周倩如, 等. 云南美登木活性成分的研究 I. 抗癌成分美登素和美登普林的分离和鉴定 [J]. 化学学报, 1981(5): 427-432.
- [10] Yu X L, Wu H C, Hu H Y, *et al.* Zein nanoparticles as nontoxic delivery system for maytansine in the treatment of non-small cell lung cancer [J]. *Drug Deliv*, 2020, 27(1): 100-109.
- [11] 韩伟. 美登木素抑制鼻咽癌细胞上皮间充质转化及其机理研究 [D]. 广州: 南方医科大学, 2018.
- [12] Vajrabhaya L O, Korsuwannawong S. Cytotoxicity evaluation of a Thai herb using tetrazolium (MTT) and sulforhodamine B (SRB) assays [J]. *J Anal Sci Technol*, 2018, 9(1): 1-6.
- [13] 黄霜. 盐酸石蒜碱对甲状腺乳头状癌的抑制作用及机制 [D]. 镇江: 江苏大学, 2023.
- [14] 罗剑波. 姜黄素治疗甲状腺乳头状癌的药理学作用机制研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- [15] 刘卫国, 张情, 侯俊杰, 等. 白藜芦醇对人甲状腺乳头状癌细胞 IHH4 细胞恶性生物学特征及 PI3K/Akt 信号通路影响 [J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(9): 1647-1653.
- [16] 朱梓依. 小檗碱在甲状腺乳头状癌中的作用及机制 [D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2021.
- [17] 封海岗, 程飏, 王佑权, 等. 毛蕊异黄酮抑制甲状腺癌 TPC-1 细胞增殖的机制 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2021, 28(9): 644-649.
- [18] 张文婧, 王佳贺. 小白菊内酯对甲状腺癌 TPC-1 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及机制 [J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(2): 185-189.
- [19] Tangutur A D, Kumar D, Krishna K V, *et al.* Microtubule targeting agents as cancer chemotherapeutics: An overview of molecular hybrids as stabilizing and destabilizing agents [J]. *Curr Top Med Chem*, 2017, 17(22): 2523-2537.
- [20] 陈骢, 郝健淇, 彭皓宁, 等. BCL-2 家族凋亡调控作用及其介导的抗肿瘤药物治疗后耐药的研究进展 [J]. 中国胸心血管外科临床杂志, 2023, 30(1): 140-148.
- [21] Basu A. The interplay between apoptosis and cellular senescence: Bcl-2 family proteins as targets for cancer therapy [J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 230: 107943.
- [22] 吴庭艳, 戴景芳, 张强, 等. 丹参酮 II_A 通过抑制 PI3K/Akt 通路逆转人喉癌细胞顺铂耐药的机制研究 [J]. 现代药物与临床, 2022, 37(9): 1938-1944.
- [23] 倪欣, 黄坤, 马俊杰. Procaspase-3 小分子激活剂的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(3): 368-371.
- [24] 任刚, 李福昌, 程德刚. 瓜蒂醇提取物通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对肝癌细胞 Hep3B 恶性生物学行为的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2022, 44(11): 2088-2097.
- [25] 李靖荣, 李凌宇, 赵晨旭, 等. 毛大丁草内酯 J 对乳腺癌细胞周期和凋亡的影响及机制研究 [J]. 药学学报, 2023, 58(4): 938-945.

责任编辑 高源]