

- 诱导小鼠迟发型变态反应的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2006, 30(6): 617.
- [13] 王 辉, 林 琳, 陈民利, 等. 盐酸奥芬米洛对小鼠细胞免疫功能的影响[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(3): 177.
- [14] Fu F, Hu S, Li S, *et al.* FTY720, a novel immunosuppressive agent with insulinotropic activity, prolongs graft survival in a mouse islet transplantation mode [J]. *Transplan Proc.*, 2001, 33(1-2): 672.
- [15] Maki T, Gottschalk R, Monaco A P. Prevention of autoimmune diabetes by FTY720 in nonobese diabetic mice [J]. *Transplantation*, 2002, 74(12): 1684.
- [16] El-Amine M, Melo M, Kung Y H, *et al.* Mechanisms of tolerance induction by a gene-transferred peptide-IgG fusion protein expressed in B lineage cells [J]. *Immunology*, 2000, 165: 5631-5636.

去甲斑蝥素干扰 HL-60 肿瘤细胞周期及其机制研究

李金龙^{1,3}, 蔡于琛^{1,2}, 胡志明³, 高基民³, 冼励坚^{1,2*}

(1 华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060; 2 中山大学肿瘤防治中心, 广东 广州 510060;

3 南方医科大学生物技术学院 生物治疗研究所, 广东 广州 510515)

摘要:目的 明确去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 对肿瘤细胞周期的影响, 进一步阐明 NCTD 的抗肿瘤作用机制。方法 体外培养 HL-60 细胞, NCTD 作用后采用³H-TdR 掺入实验检测 DNA 复制; 流式细胞术检测细胞周期进程; Western blotting 检测细胞周期调控蛋白 Cdk1、Cyclin B1、Cdc 25c 表达变化。结果 不同浓度 (16~128 μmol/L) NCTD 作用于 HL-60 细胞 12 h 后, DNA 复制受到抑制, 细胞周期出现明显的 S 期累积, 并呈剂量依赖性趋势; 同时观察到 G₂/M 的阻滞, 且调控 G₂/M 周期进程的调节蛋白 Cdk1、Cyclin B1 及 Cdc 25C 蛋白表达下调。结论 NCTD 可抑制 HL-60 细胞 DNA 复制、下调周期调控蛋白从而干扰肿瘤细胞的周期进程。

关键词: 去甲斑蝥素; DNA 复制; HL-60; 细胞周期

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2010)08-1315-04

Norcantharidin disturbed cell cycle progress in cancer HL-60 cells and its mechanism

LI Jin-long^{1,3}, CAI Yu-cheng^{1,2}, HU Zhi-ming³, GAO Ji-min³, XIAN Li-jian^{1,2}

(1 State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Guangzhou 510060, China; 2. Cancer Center,

Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 3. Institute of Biotherapy, School

of Biotechnology, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To confirm the influence of norcantharidin (NCTD) on cancer cell cycle, and to further explore the anti-cancer mechanism of NCTD. **Methods** HL-60 Cells were cultured and treated with NCTD, ³H-TdR incorporation assay was performed to reflect DNA replication, flow cytometry was used to detect cell cycle progress, and the cell-cycle-regulation proteins were detected by Western blotting.

Results After treatment with NCTD for 12 h, DNA replication was significantly inhibited and the cell cycle was arrested mainly at S phase in a dose-dependent manner. G₂/M Phase accumulation was also observed and G₂/M regulation proteins Cdk1, Cyclin B1, and Cdc25c were down-regulated. **Conclusion** NCTD could interfere with cancer cell cycle through inhibiting DNA replication and deregulating cell cycle-regulation protein.

Key words: norcantharidin (NCTD); DNA replication; HL-60; cell cycle

去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 是斑蝥素的衍生物, 与斑蝥素构型相似, 唯 1、2 位无甲基。去除两个甲基后, NCTD 的泌尿系刺激作用基本消失, 而且保留了抗癌活性^[1]。研究表明, NCTD 可

以有效抑制肿瘤细胞的增殖、诱导肿瘤细胞凋亡^[2-4]。NCTD 目前临床主要用于治疗原发性肝癌、食道癌和胃癌等, 但是 NCTD 的抗肿瘤作用机制尚不明确^[5]。

* 收稿日期: 2009-11-03

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (30901822)

作者简介: 李金龙 (1975—), 男, 山东人, 博士, 讲师, 研究方向为肿瘤药理。Tel: (020) 62789135 E-mail: lijnlong75@sina.com

细胞周期调控异常是肿瘤细胞恶性增殖的重要环节,目前关于 NCTD 的抗肿瘤机制的研究认为主要是诱导肿瘤细胞 G₂/M 期阻滞,使肿瘤细胞分裂增殖受阻并诱发凋亡。如 NCTD 作用于人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 48 h 后^[6]、作用于肝癌 HepG2 细胞 48 h 后^[7]、作用于人胃癌 SGC-7901 细胞 48 h 后^[8]、作用于人白血病 K562 细胞 24 h 后^[9],均出现 G₂/M 期细胞累积和细胞凋亡。上述研究认为 NCTD 主要通过诱导凋亡产生抗肿瘤作用,且凋亡与 G₂/M 期阻滞相关。这些研究所观察到的细胞周期的变化皆为 NCTD 作用时间较长的结果,细胞已经出现凋亡改变,不能全面反应 NCTD 对细胞周期的影响。

前期研究发现 NCTD 可以降解 DNA 复制起始蛋白 Cdc6,且此降解作用在 NCTD 作用早期就可出现(12 h)^[10]。Cdc6 是起始真核细胞 DNA 复制的重要调节因子,抑制 Cdc6 功能将有效抑制细胞的 DNA 复制。因此 NCTD 通过降解 Cdc6、抑制 DNA 复制,必将首先对反映 DNA 复制的 S 细胞周期产生影响,本研究旨在明确 NCTD 在作用早期对体外培养的 HL-60 细胞周期的影响,并初步研究其作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料:去甲斑蝥素由北京双鹤高科药业惠赠,质量分数 99.5%,生理盐水溶解;RPMI 1640 培养基及小牛血清均为 Gibco 公司产品;鼠抗人 GAPDH、CDK1、CyclinB1、Cdc25c 单抗及相应羊抗鼠二抗均为 Santa Cruz 产品;CO₂培养箱系 HERA cell 产品;流式细胞仪为 Beckman coulter 产品。

1.2 细胞培养:人急性早幼粒细胞白血病细胞 HL-60 (本实验室保存),在含 10% 小牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养液中,37 ℃、5% CO₂条件下培养。

1.3 ³H-TdR 掺入实验:取对数生长期的 HL-60 细胞接种于 96 孔培养板(2×10⁵个/孔),根据前期实验结果 NCTD 对 HL-60 的 IC₅₀ 值为 50 μmol/L^[9],选取不同浓度的 NCTD (0~128 μmol/L) 作用于 HL-60 细胞,结束前 4 h 加入 ³H-TdR (1 kBq/孔)。自动细胞收集器收集细胞于滤膜上,80 ℃烤干滤膜,液闪仪(Beckman, Fullerton, CA, 美国)计数。实验结果以每分钟计数次数(cpm)表示,重复 3 次。

1.4 流式细胞术检测:选取不同浓度的 NCTD (0、8、16、32、64、128 μmol/L) 作用 12 h 后,测定 HL-

60 细胞周期的变化。收集细胞, PBS 洗涤两次, 70% 乙醇固定过夜, 2 000 r/min, 离心 10 min, 弃去乙醇,再次悬浮于 PBS, 细胞经碘化丙啶(PI, 10 μg/mL)染色 5 min, 4 ℃避光 30 min 后,在流式细胞仪上用 488 nm 激发光激发,吸收波长 610 nm, 检测细胞 DNA 水平。

1.5 Western blotting 检测:32 μmol/L NCTD 作用 HL-60 细胞 12、24、48 h 后,收集细胞,加入预冷的 PBS 洗涤两遍。以 1×10⁷个/mL 加入细胞裂解液[50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5), 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1 mmol/L PMSF, 10 U/mL 抑肽酶]置冰上 20 min。13 000 r/min, 4 ℃离心 10 min,取上清。蛋白样品行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜,含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭后,加入鼠抗人 GAPDH (1:1 000)、鼠抗人 CDK1 (1:400)、鼠抗人 Cyclin B1 (1:400) 或鼠抗人 Cdc25C (1:400) 单抗,37 ℃孵育 2 h, TBST 清洗后加入兔抗鼠二抗,37 ℃孵育 2 h, TBST 清洗后显影曝光。结果采用 Gelpro 4.0 图像分析软件进行分析,得出每个蛋白条带累积吸光度值,并与加样对照 GAPDH 条带累积吸光度(A)值进行比较,得出比值。

1.6 统计学处理:采用 SPSS 10.0 版软件包进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计检验采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 NCTD 对 HL-60 细胞 DNA 复制的影响:根据 NCTD 对 HL-60 的 IC₅₀ 值为 50 μmol/L^[9],选取不同浓度的 NCTD (0、16、32、64、128 μmol/L) 作用于 HL-60 细胞后,³H-TdR 掺入实验检测其 DNA 复制。结果显示不同浓度的 NCTD 作用于 HL-60 细胞后,其³H-TdR 掺入量明显降低(图1)。

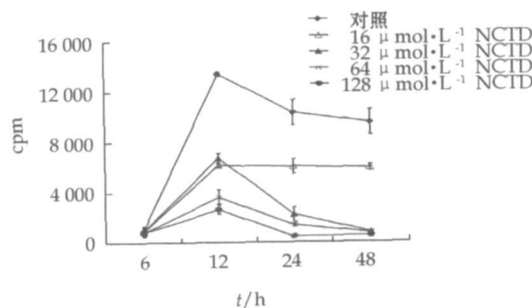


图1 NCTD 对 HL-60 细胞 DNA 复制的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Inhibition of NCTD on DNA replication in HL-60 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

在 12 h 时未加药对照组 cpm 值最高, 为 $13\,402.00 \pm 194.21$, 随着作用时间的延长掺入量有所降低; 加药组的 cpm 值在 NCTD 作用 12 h 后明显下降, 且随作用时间的延长而逐渐下降。结果表明 NCTD 可明显抑制 HL-60 细胞 DNA 的合成, 并呈现时间、剂量依赖性。

2.2 NCTD 对 HL-60 细胞周期的影响: 根据 ^3H -TdR 掺入实验结果, 选取不同浓度 NCTD (0、8、16、32、64、128 $\mu\text{mol/L}$) 作用后, 测定 HL-60 细胞

周期的变化。结果显示, NCTD 作用 12 h 后 HL-60 细胞出现 S 期的阻滞, 并呈现剂量依赖性趋势。128 $\mu\text{mol/L}$ NCTD 可使约 80% 细胞阻滞于 S 期, 同时观察到 G₂/M 期细胞的累积, 但缺乏剂量依赖趋势, 在 32 $\mu\text{mol/L}$ (低于 IC₅₀) 下 G₂/M 期阻滞最为明显 (图 2、表 1), 药物浓度升高后 G₂/M 期细胞比例反而下降。说明 NCTD 作用于 HL-60 后, 细胞不能有效地进行 DNA 的复制以完成 S 期, 导致 S 期阻滞; 同时细胞的 G₂/M 进程也受到干扰。

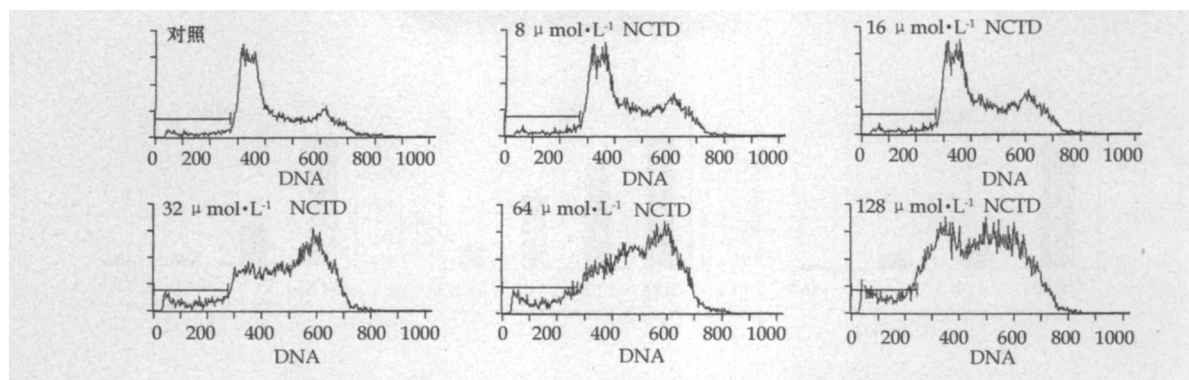


图 2 不同浓度 NCTD 作用 12 h 后 HL-60 细胞周期分布

Fig. 2 Distribution of cell cycle for HL-60 cells after treated with various concentrations of NCTD for 12 h

表 1 不同浓度 NCTD 作用 12 h 后 HL-60 细胞周期分布 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 1 Distribution of cell cycle for HL-60 cells after treated with various concentrations of NCTD for 12 h ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	C/ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	细胞周期/%		
		G ₁	S	G ₂ /M
对照	0	47.0 $\pm$ 2.3	44.0 $\pm$ 4.3	8.0 $\pm$ 0.5
NCTD	8	46.0 $\pm$ 1.9	43.0 $\pm$ 2.9	10.0 $\pm$ 0.7
	16	37.0 $\pm$ 3.2	49.0 $\pm$ 3.1	13.0 $\pm$ 1.1
	32	4.0 $\pm$ 0.2	61.0 $\pm$ 3.2	34.0 $\pm$ 2.3*
	64	3.0 $\pm$ 0.1	69.0 $\pm$ 4.3	26.0 $\pm$ 2.4
	128	11.0 $\pm$ 0.6	84.0 $\pm$ 4.8**	4.0 $\pm$ 0.9

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

2.3 NCTD 对肿瘤细胞周期调节蛋白的影响: 鉴于 NCTD (32 $\mu\text{mol/L}$) 作用后 HL-60 细胞出现 G₂/M 期阻滞的现象, 本实验检测了 32 $\mu\text{mol/L}$ NCTD 对 G₂/M 期调控蛋白表达的影响。Western blotting 结果显示, NCTD 可下调 G₂/M 期调控蛋白 Cdc25c、Cdk1 和 CyclinB1 的蛋白表达水平, 随着作用时间的延长下调作用更加明显 (图 3)。

3 讨论

本研究中, ^3H -TdR 实验结果证实, NCTD 可以抑制 HL-60 细胞 DNA 的复制。对照组在 12 h 时间点的 ^3H -TdR 掺入量最大, 说明此时细胞增殖状

态最佳, 随着培养时间延长细胞增殖活力下降, 其 ^3H -TdR 掺入量也下降。NCTD 作用后, 在各种剂量及各个时间点下, 其 ^3H -TdR 掺入量均明显下降, 表明 NCTD 可有效地抑制 HL-60 细胞 DNA 的复制, 并呈现时间、剂量依赖性。这一结果与前期研究结果相吻合^[10], 即 NCTD 确实因为对 DNA 复制起始蛋白 Cdc6 的降解而抑制了 DNA 的复制。与 ^3H -TdR 实验相符的是细胞周期结果, NCTD 作用 12 h 后, 细胞出现 S 期的阻滞, 且其阻滞效果呈现剂量依赖性, 最高药物浓度下可使 80% 以上的细胞阻滞于 S 期。综合上述两项实验结果可以认为, 在 NCTD 作用下 DNA 复制从起始阶段就受到抑制, 使细胞不能完成 DNA 的复制而停滞于 S 期。

实验中还观察到 NCTD 作用于 HL-60 后, 出现 G₂/M 期细胞累积的现象, Western blotting 结果显示 NCTD 可下调 Cdc25c、Cdk1 和 CyclinB1 的蛋白水平。Cdk1/cyclinB 复合物是调控细胞进入有丝分裂的关键激酶, Cdc25c 可去除 Cdk1 和 Thr14 和 Tyr15 的抑制性磷酸化, 从而激活 Cdk1。在本实验体系中 NCTD 一方面下调 Cdk1、CyclinB1 的蛋白水平, 另一方面又下调 Cdc25c 间接抑制 Cdk1 的活化, 从而从整体上抑制了 Cdk1/CyclinB1 复合物的激酶活性, 使细胞阻滞于有丝分裂前期。但 Chen 等^[7] 的研究发现 NCTD 作用于

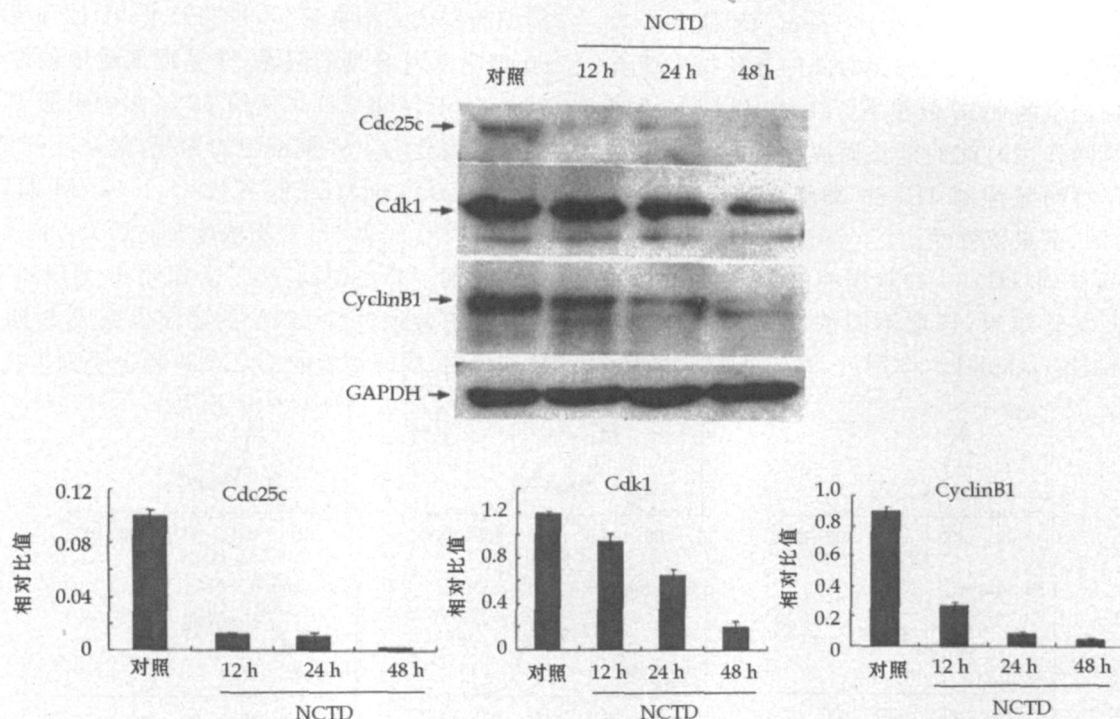


图 3 NCTD 对 HL-60 细胞 G₂/M 期调控蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 G₂/M Regulation proteins in HL-60 cell after treatment with NCTD ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

HepG₂、Hep3B 后, Cdk1 表达水平不受影响, Cdc25c 表达反而升高, 而且 Cdk1/CyclinB1 复合物的激酶活性也增强。之所以会出现这种差异, 首先与实验体系所采用的不同细胞有关, 其次也暗示了 Cdk1 和 Cdc25c 并不是 NCTD 的直接作用靶点。

总结上述结果, NCTD 作用于 HL-60 细胞后, DNA 的复制被有效抑制, 使细胞不能完成 DNA 复制阻滞于 S 期, 同时启动检测点机制使细胞阻滞于有丝分裂前期。但在药物高剂量作用下, NCTD 主要是表现为抑制肿瘤细胞 DNA 的复制, 使细胞的 S 周期进程受阻。

参考文献:

- [1] 李 柏, 凌昌全. 去甲斑蝥素基础及临床研究进展 [J]. 中草药, 2002, 33(2): 184-185
- [2] Liao H F, Su S L, Chen Y J, *et al.* Norcantharidin preferentially induces apoptosis in human leukemic Jurkat cells without affecting viability of normal blood mononuclear cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(9): 1678-1687.
- [3] Peng C, Liu X, Liu E, *et al.* Norcantharidin induces HT-29 colon cancer cell apoptosis through the alpha6 beta6 extracellular signal-related kinase signaling pathway [J]. *Cancer Sci*,

2009, 100(12): 2302-2308

- [4] Yang P Y, Chen M F, Tsai C H, *et al.* Involvement of caspase and MAPK activities in norcantharidin-induced colorectal cancer cell apoptosis [J]. *Toxicol In Vitro*, 2010, 24(3): 766-775
- [5] 原江亮. 去甲斑蝥素对不同肿瘤细胞系作用的研究现状 [J]. 长治医学院学报, 2008, 22(4): 305-307
- [6] Huang Y, Liu Q, Liu K, *et al.* Suppression of growth of highly-metastatic human breast cancer cells by norcantharidin and its mechanisms of action [J]. *Cytotechnology*, 2009, 59(3): 201-208
- [7] Chen Y N, Chen J C, Su Y N, *et al.* Effect or mechanisms of norcantharidin-induced mitotic arrest and apoptosis in human hepatoma cells [J]. *Int J Cancer*, 2002, 100: 158-165
- [8] 成 浩, 范跃祖. 去甲斑蝥素对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响及其机制探讨 [J]. 现代肿瘤医学, 2008, 16(4): 527-530
- [9] 陈家旭, 刘晓兰, 刘 燕, 等. 去甲斑蝥素诱导 K562 细胞凋亡的影响 [J]. 中国医药学报, 2000, 15(2): 21-23
- [10] Li J L, Cai Y C, Liu X H, *et al.* Norcantharidin inhibits DNA replication and induces apoptosis with the cleavage of initiation protein Cdc6 in HL-60 cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2006, 17(3): 307-314