

葱贝素体外抑制人胰腺癌细胞 Mia PaCa-2 细胞增殖和诱导凋亡的作用及其机制研究

顾建华, 赵欣, 郭仁德, 王毅

天津市第一中心医院 普通外科, 天津 300192

摘要: 目的 探讨 X 连锁凋亡抑制蛋白 (XIAP) 抑制剂葱贝素抑制人胰腺癌细胞 Mia PaCa-2 凋亡的作用及其可能机制。方法 MTT 法和流式细胞术检测不同剂量葱贝素对 Mia PaCa-2 细胞增殖和凋亡的影响; RT-PCR 法对葱贝素处理前后 Mia PaCa-2 细胞中 XIAP 基因的表达进行检测。Western blotting 方法检测葱贝素作用后细胞 XIAP、Caspase 3、促凋亡蛋白 Bax 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达的变化。结果 葱贝素对人胰腺癌细胞增殖具有显著抑制作用 ($P < 0.05$), 经不同剂量葱贝素处理后 Mia PaCa-2 细胞凋亡率明显增高, 与未处理组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$); RT-PCR 显示对照组细胞中 XIAP 的 $-\Delta\Delta CT$ 值是实验组的 11.31 倍; 经葱贝素作用 24 h 后, Mia PaCa-2 细胞出现 Caspase 3 裂解片段, 且 Bax/Bcl-2 比值增大。结论 葱贝素在体外可显著抑制 Mia PaCa-2 细胞增殖, 诱导细胞凋亡, 其机制可能是通过拮抗 XIAP 的作用, 激活 Caspase 相关性的细胞凋亡内源性途径而诱导人胰腺癌细胞发生凋亡。

关键词: 葱贝素; X-连锁凋亡抑制蛋白; 胰腺癌细胞; 凋亡; Caspase 3

中图分类号: R965.1; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1674 - 5515(2014)08 - 0843 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2014.08.003

In vitro inhibition of embelin on proliferation and apoptosis in pancreatic cancer Mia PaCa-2 cells and its mechanism

GU Jian-hua, ZHAO Xin, GUO Ren-de, WANG Yi

The First Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300192, China

Abstract: Objective To discuss the effect of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) inhibitor embelin on the apoptosis of pancreatic cancer Mia PaCa-2 cells and its possible mechanism. **Methods** The growth suppression and the apoptotic rate of embelin on Mia PaCa-2 cells were evaluated by MTT assay and flow cytometry. Real-time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to detect the expression of XIAP gene in Mia PaCa-2 cells with or without treatment of embelin. Western blotting analysis was performed to assess the expression of XIAP, Caspase 3, pro-apoptotic factor Bax as well as the pro-survival factor Bcl-2. **Results** Embelin inhibited the proliferation of the pancreatic cancer cells ($P < 0.05$). The apoptosis of Mia PaCa-2 cells were significantly increased after embelin treatment at different concentration as compared with that in the control group ($P < 0.01$). Furthermore, the $-\Delta\Delta CT$ value of XIAP in the control group was 11.31 times as much as that in the treatment group. The cleavage of Caspase 3 was observed after 24 h treated with embelin. Moreover, Bax expression was upregulated while Bcl-2 levels were decreased. **Conclusion** Embelin can significantly inhibit the proliferation of Mia PaCa-2 cells, induce the apoptosis of Mia PaCa-2 cells by antagonizing the endogenous XIAP pathway that activates caspase-dependent apoptosis in Mia PaCa-2 cells.

Key words: embelin; X-linked inhibitor of apoptosis; pancreatic cancer cell; apoptosis; Caspase 3

X 连锁凋亡抑制蛋白 (X-linked inhibitor of apoptosis protein gene, XIAP) 能够选择性地抑制癌细胞凋亡的上游启动分子 Caspase 9 和下游效应分子 Caspase 3、Caspase 7, 使癌细胞抵抗凋亡并对化

疗产生耐药。葱贝素又名信筒子素, 是从紫金牛科植物圆齿紫金牛 *Myrsinaceae ardisia Virens* 中提取的多酚类化合物, 是一种 XIAP 的小分子抑制剂, 能与 XIAP 蛋白分子中 BIR3 结构域结合, 阻止 XIAP

收稿日期: 2014-06-11

基金项目: 天津市卫生局重点课题资助项目 (2012KR06)

作者简介: 顾建华 (1975—), 男, 吉林省农安县人, 副教授, 主要从事甲状腺、乳腺、胰腺疾病临床及基础研究工作。

Tel: 13110056176 E-mail: gujianhua120@hotmail.com

分子与 Caspase 9 结合而诱导细胞凋亡, 增加化疗敏感性, 减少肿瘤细胞耐药^[1]。研究表明, XIAP 表达水平与胰腺癌 TNM 分期、术后生存期有关^[2], 即 XIAP 表达水平高的胰腺癌组织恶性程度更高, 发生血管浸润及淋巴结转移的机会更高, XIAP 蛋白表达水平可作为评价胰腺癌预后的有价值指标。因 Mia PaCa-2 细胞在人胰腺癌系中具有代表性, 且 XIAP 表达水平稳定, 故本研究通过给予不同剂量葱贝素处理 Mia PaCa-2 细胞, 探讨葱贝素对人胰腺癌增殖和凋亡的影响并分析其机制, 为胰腺癌的治疗寻找毒副作用较小的药物。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

葱贝素 (Sigma 公司提供, 溶解于 DMSO 中, 冰箱保存), 二甲基亚砜 (DMSO) 和噻唑蓝 (MTT) 试剂盒购于美国 Sigma 公司。AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (货号 40302ES20, 规格 20 rxn) 购于南京凯基科技发展有限公司。总 RNA 的提取 Trizol 试剂盒 (货号 15596-026, 规格 100 mL) 为 Invitrogen 公司产品, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供。XIAP、Caspase 3、 β -actin 单抗购于美国 Santa Cruz 公司。ECL 试剂盒购于美国 Amersham Bioscience 公司。人胰腺癌细胞 Mia PaCa-2 由美国得克萨斯州安德森癌症中心惠赠。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 检测肿瘤细胞的增殖抑制率 Mia PaCa-2 胰腺癌细胞在含 10% 新鲜小牛血清的 RPMI 1640 培养液中常规培养。制备单细胞悬液, 调整细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mL}$, 接种于 96 孔板, 每孔 100 μL , 过夜, 细胞贴壁后对照组加入 RPMI 1640 培养液, 实验组加入葱贝素 (葱贝素终浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 48 h^[3]。每组设 4 个复孔, 每孔加入 MTT 20 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 4 h。弃上清, 加 100 μL DMSO。用分光光度计 570 nm 下测定吸光度值。

1.2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡 取细胞数约 1×10^5 个。设 4 组, 每组 3 个复孔。8 h 后待细胞贴壁分别加入等量 RPMI 1640、葱贝素 (终浓度分别为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$), 继续抚育生长 48 h 后用胰酶消化离心, 500 μL Binding Buffer 悬浮细胞; 转入 EP 管内; 加入 AnnexinV-FITC 和碘化丙啶 (propidium iodide, PI) 各 5 μL , 室温避光染色 30 min

后上机检测。流式细胞仪检测经 Single Histogram Statistic 软件分析细胞凋亡率。每个浓度样本重复 3 次, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。凋亡分析以右下象限早期凋亡细胞判定为凋亡细胞。

1.2.3 Western blotting 免疫印迹检测 收集处理后的细胞, 加入蛋白裂解液, 采用 ECL 试剂盒进行检测。

1.2.4 RT-PCR 细胞总 RNA 提取按操作说明书执行。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。XIAP 引物: 上游: 5' GAA CTG GCC AGA CTA TGC TCA 3', 下游: 5' AAA GTG TCG CCT GTG TTC TGA 3'。 β -actin 上游: 5' GCA CCC AGC ACA ATG AAG ATC 3', 下游: 5' CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC 3'。PCR 反应体系 (20 μL): cDNA 模板 2 μL 、上下游引物 (25 mmol/L) 各 1 μL 、QuantiTect SYBR Green PCR MIX 10 μL 、ddH₂O 6 μL , 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 、20 s, 40 个循环。计算对照组 XIAP 表达量相对于实验组的变化^[4]。

$$\text{folds} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

$$\Delta\Delta\text{CT} = (\text{CT}_{\text{XIAP}} - \text{CT}_{\beta\text{-actin}})_{\text{对照}} - (\text{CT}_{\text{XIAP}} - \text{CT}_{\beta\text{-actin}})_{\text{实验}}$$

CT 值指 PCR 扩增过程中, 扩增产物的荧光信号达到设定阈值时所经过的扩增循环次数

1.2.5 统计学处理 统计分析由软件包 SPSS 15.0 完成, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间比较采用 *t* 检验, 每组内不同处理方式比较采用方差分析。

2 结果

2.1 葱贝素对 Mia PaCa-2 细胞增殖抑制作用

MTT 结果显示, 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 葱贝素对 Mia PaCa-2 细胞增殖活性均有抑制作用, 且随着时间和剂量的增加, 细胞存活率明显降低。见表 1。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

流式细胞仪分析结果显示, 与对照组比较, 肿瘤细胞凋亡率随药物浓度增加而明显增高, 各实验组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 提示葱贝素可诱导 Mia PaCa-2 细胞发生凋亡, 并呈明显的剂量相关性, 结果见图 1 和表 2。

2.3 RT-PCR 检测结果

与对照组比较, 各实验组经不同剂量葱贝素作用 24~48 h 后 Mia PaCa-2 细胞中 XIAP mRNA 表达均减低 ($P < 0.05$)。表明经葱贝素处理后的胰腺癌细胞中的表达量低于对照组, 在对照组 Mia PaCa-2 细胞中 XIAP mRNA 表达的 $-\Delta\Delta\text{CT}$ 值约为实验组的 11.31 倍, 结果见表 3。

表 1 葱贝素对胰腺癌细胞 Mia PaCa-2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Effects of embelin on proliferation of pancreatic Mia PaCa-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	存活率/%				
		0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
对照	—	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00	100.00±0.00
葱贝素	5	100.00±0.00	97.07±5.31	77.33±1.88*	66.90±2.23*	64.20±0.60*
	10	100.00±0.00	91.00±3.31	71.17±1.25*	54.03±0.80*	54.17±1.21*
	20	100.00±0.00	90.70±2.22	68.07±1.16*	51.33±1.48*	52.60±0.82*

与对照组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group

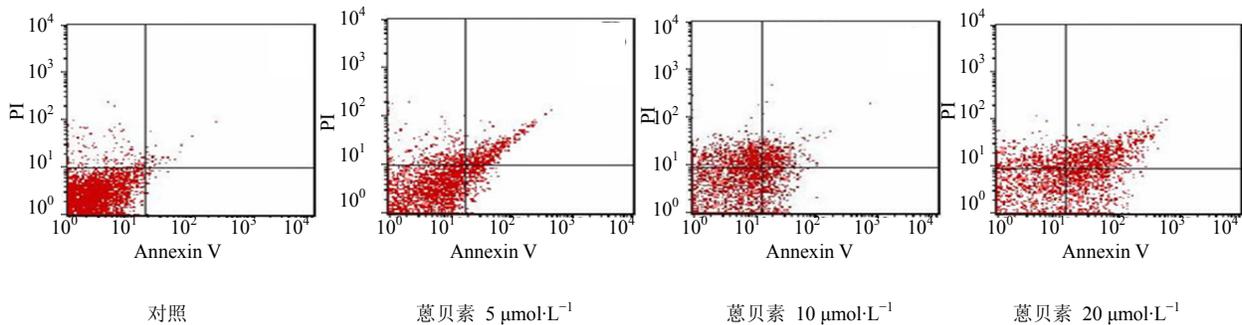


图 1 葱贝素 24 h 对人胰腺癌 Mia PaCa-2 细胞凋亡率的影响

Fig. 1 Effects of embelin on apoptosis rates of pancreatic Mia PaCa-2 cells during 24 h

表 2 不同剂量葱贝素处理 24 h 时对 Mia PaCa-2 细胞生长和凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Effects of embelin at different doses on growth and apoptosis of pancreatic Mia PaCa-2 cells treated for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	正常细胞率/%	细胞凋亡率/%
对照	—	99.50±10.76	0.50±0.13
葱贝素	5	93.43±13.87	6.57±0.65*
	10	86.51±9.97	13.49±1.04**
	20	76.11±10.63	23.89±1.51**

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

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

2.4 葱贝素对细胞 XIAP 及凋亡相关蛋白的影响

Western blot 显示 Mia PaCa-2 细胞的 XIAP 蛋白表达在 20 $\mu\text{mol/L}$ 葱贝素处理 24 h 后明显下调, 在 48 h 以后尤为显著; 此外, 葱贝素对 cleaved Caspase 3 蛋白有上调作用, 与对照组比较差异具有统计学意义 ($P<0.05$), 结果见表 4 和图 2。

另外, 促凋亡蛋白 Bax 的表达逐渐增强, 而抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达逐渐减弱, 与对照组比较差异

表 3 相同剂量葱贝素处理细胞 24、48 h 后对 Mia PaCa-2 XIAP mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of embelin in same dose on expression of XIAP mRNA of pancreatic Mia PaCa-2 cells treated for 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	XIAP mRNA 表达	
		24 h	48 h
对照	—	1.00±0.00	1.00±0.00
葱贝素	10	0.25±0.03*	0.12±0.03*
	20	0.39±0.09	0.07±0.02 [#]

与对照组比较: * $P<0.05$; 24 h 时与相同剂量处理组比较: [#] $P<0.05$

* $P<0.05$ vs control group; [#] $P<0.05$ vs same doses treatment group at 24 h

具有统计学意义 ($P<0.05$), 结果见表 5 和图 3。各组随着浓度增加和时间推移葱贝素的作用呈增强趋势。

3 讨论

XIAP 在大多数肿瘤细胞株中过表达, 其表达与肿瘤的进展、复发、预后以及肿瘤化疗耐药密切相关^[5]。在人类凋亡抑制基因家族 8 个成员中因 BIRC4 (XIAP) 对 caspases 凋亡途径的明显抑制作用而成为 IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) 家族

表 4 葱贝素处理 24 h 和 48 h 对 Mia PaCa-2 细胞 XIAP 和 Caspase 3 裂解片段蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of embelin on protein expression levels of XIAP and cleaved Caspase 3 of pancreatic Mia PaCa-2 cells treated for 24 and 48 h ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	XIAP 蛋白表达		Caspase 3 蛋白表达	
		24 h	48 h	24 h	48 h
对照	—	26.41 ± 1.32		18.63 ± 2.98	
葱贝素	10	25.51 ± 3.09	18.07 ± 1.28	18.49 ± 0.86*	20.72 ± 1.64
	20	17.29 ± 0.69 [#]	19.89 ± 2.39	12.31 ± 0.54 [#]	23.94 ± 3.12*

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 葱贝素比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs 10 $\mu\text{mol/L}$ embelin group

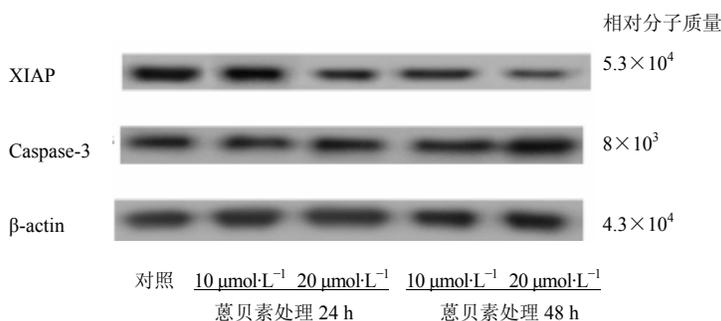


图 2 葱贝素处理 24 h 和 48 h 对 Mia PaCa-2 细胞 XIAP 和 Caspase 3 裂解片段蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of embelin on protein expression levels of XIAP and cleaved Caspase 3 of pancreatic Mia PaCa-2 cells treated for 24 and 48 h

表 5 葱贝素处理 24 h 和 48 h 对 Mia PaCa-2 细胞 Bax/Bcl-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 5 Effects of embelin on expression levels of apoptotic gene of Bax/Bcl-2 of pancreatic Mia PaCa-2 cells at 24 h and 48 h ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	Bcl-2 表达		Bax 表达	
		24 h	48 h	24 h	48 h
对照	—	34.62 ± 4.86		14.35 ± 2.63	
葱贝素	10	19.04 ± 2.09*	20.13 ± 6.59*	11.30 ± 2.53	25.93 ± 10.33*
	20	20.17 ± 1.48	6.04 ± 0.96 [#]	20.76 ± 6.23 [#]	23.41 ± 5.31

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 葱贝素比较: [#] $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs 10 $\mu\text{mol/L}$ embelin group

中的研究热点和目前抗凋亡治疗中最有潜力的治疗靶点。实验结果表明 XIAP mRNA 在 Mia PaCa-2 细胞中表达, 这为进一步选择 XIAP 为胰腺癌治疗靶点奠定了理论基础。

葱贝素是从植物圆齿紫金牛 *M. ardisia* Virens 中提取的具有抗肿瘤、抗炎、抗生育活性的化合物^[6], 可通过与 XIAP 蛋白 BIR3 功能域的结合阻止 XIAP 抑制 caspase 的活性。研究表明^[7-8], 通过阻止 XIAP 与 Caspase 9 结合, 葱贝素在低剂量就可以直接诱导多种肿瘤细胞凋亡, 具备化学合成类靶向抗肿瘤药物的基本特征。在本研究中, MTT 结果表明, 葱

贝素可抑制 Mia PaCa-2 细胞的增殖并表现为一定的剂量相关性, 在一定范围内随着剂量增加, 对胰腺癌细胞增殖的抑制作用越来越明显。流式细胞仪分析结果发现, 与对照组细胞相比, 葱贝素可明显诱导肿瘤细胞发生凋亡, 并且随着药物剂量增加细胞凋亡率也越来越高, 证明葱贝素有促进胰腺癌细胞凋亡作用。Western blotting 分析显示, 葱贝素作用 Mia PaCa-2 细胞 24 h 后, XIAP 蛋白表达明显下降, 表明作为 XIAP 小分子抑制剂的葱贝素是通过降低 XIAP 的表达诱导胰腺癌细胞的凋亡。

为研究葱贝素参与促进 Mia PaCa-2 细胞凋亡

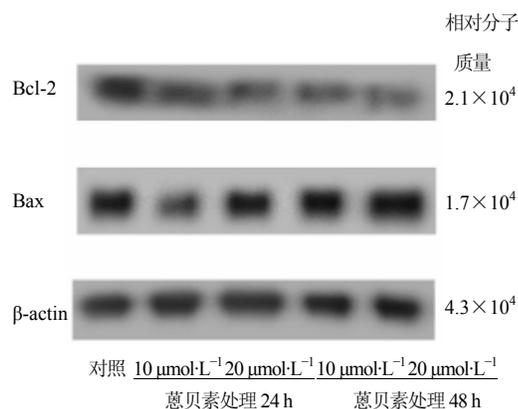


图3 葱贝素处理 24 h 和 48 h 对 Mia PaCa-2 细胞 Bax/Bcl-2 表达的影响

Fig. 3 Effects of embelin on gene expression levels of Bax/Bcl-2 of pancreatic Mia PaCa-2 cells treated for 24 and 48 h

的机制, 本实验进一步检测了凋亡下游通路相关蛋白的表达。发现伴随胰腺癌细胞中 XIAP 的表达降低, 导致 Mia PaCa-2 细胞中 Caspase 3 活性的显著提高, 且表现为随葱贝素剂量增加和时间延长, Caspase 3 裂解片段表达明显增加, 与文献报道的 XIAP 作用机制相符^[9]。Caspase 3 是细胞凋亡的参与者, 其活化在细胞凋亡信号中起核心作用, 激活后可特异性地切割 PARP, 达到阻止已损伤 DNA 修复的目的^[10]。本实验的 RT-PCR 结果也证实经葱贝素处理后的胰腺癌细胞中 XIAP 的表达量小于对照组, 进一步支持葱贝素是通过抑制 XIAP 的表达激活 caspases 级联凋亡途径诱导的胰腺癌细胞凋亡。

细胞发生凋亡的机制十分复杂, 受到严格的基因调控。bcl-2 是公认的凋亡调控基因, bax 是 bcl-2 基因家族成员之一, bax 和 bcl-2 通过形成同源或异源二聚体来调节细胞凋亡。研究表明^[11], miRNA-21 通过直接上调 Bcl-2 表达, 下调 Bax 的表达阻止胰腺癌 Mia PaCa-2 细胞凋亡, 增强对吉西他滨的耐药性并促进肿瘤细胞增殖。为进一步探究葱贝素对胰腺癌细胞凋亡的影响是否存在其他途径, 本实验同时对 Mia PaCa-2 细胞 Bax/Bcl-2 凋亡蛋白进行检测, 结果发现葱贝素可上调促凋亡蛋白 Bax, 下调抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 说明葱贝素可能还通过上调 Bax 和下调 Bcl-2 调节细胞线粒体的通透性, 从而影响下游促凋亡基因的功能而诱导细胞发生凋亡。

本研究结果显示, 在细胞水平上葱贝素抑制人

胰腺癌 Mia PaCa-2 细胞增殖, 明显诱导细胞凋亡, 主要通过激活半胱氨酸蛋白酶(caspases)级联反应。由于细胞水平与人体实体肿瘤在细胞生长、分化及迁移有一定差别, 尚不能完全模拟肿瘤的真正生长环境与转移特性, 故有必要进一步从动物体内研究葱贝素对胰腺癌的影响, 故本研究结果为进一步体内研究葱贝素的抗肿瘤效果提供实验依据。

参考文献

- [1] Lin Y F, Lai T C, Chang C K, *et al.* Targeting the XIAP/caspase-7 complex selectively kills caspase-3-deficient malignancies [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(9): 3861-3875.
- [2] 孙建建, 李胜棉, 赵松, 等. 胰腺癌组织 XIAP 蛋白表达预后价值的探讨 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 18(19): 1537-1540.
- [3] 朱秀丽, 江莲, 陈健, 等. XIAP 抑制剂 Embelin 对人 T 淋巴瘤细胞 Jurkat 增殖抑制作用 [J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(22): 1757-1760.
- [4] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9): e45.
- [5] Stadel D, Mohr A, Ref C, *et al.* TRAIL-induced apoptosis is preferentially mediated via TRAIL receptor 1 in pancreatic carcinoma cells and profoundly enhanced by XIAP inhibitors [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(23): 5734-5749.
- [6] 曾宪彪, 韦宝伟, 韦桂宁, 等. 葱贝素对雄性大鼠血浆性激素水平及附睾精子质量的影响 [J]. *药物评价研究*, 2013, 36(6): 414-417.
- [7] Li Y, Li D, Yuan S, *et al.* Embelin-induced MCF-7 breast cancer cell apoptosis and blockade of MCF-7 cells in the G2/M phase via the mitochondrial pathway [J]. *Oncol Lett*, 2013, 5: 1005-1009.
- [8] 田红, 贺星, 徐颂, 等. 化学合成类靶向抗肿瘤药物的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2009, 24(1): 8-14.
- [9] 郑丽端, 童强松, 汪良, 等. 下调 XIAP 表达增强化疗药物诱导胃癌细胞凋亡的作用 [J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(29): 3067-3073.
- [10] Irshad S, Ashworth A, Tutt A. Therapeutic potential of PARP inhibitors for metastatic breast cancer [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(8): 1243-1251.
- [11] Dong J, Zhao Y P, Zhou L, *et al.* Bcl-2 upregulation induced by miR-21 via a direct interaction is associated with apoptosis and chemoresistance in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells [J]. *Arch Med Res*, 2011, 42(1): 8-14.