

• 药理与临床 •

对羟基桂皮醛诱导食管癌 Kyse30 细胞分化及其作用机制研究

戴素丽¹, 吴昊², 赵日阳², 马鸣³, 张聪¹, 赵连梅¹, 单保恩^{1*}

1. 河北医科大学第四医院 河北省肿瘤基因诊断、预防和治疗重点实验室, 河北 石家庄 050011

2. 河北医科大学第四医院 科研中心, 河北 石家庄 050011

3. 河北医科大学第四医院 检验科, 河北 石家庄 050011

摘要: 目的 通过研究木鳖子中提取的对羟基桂皮醛 (*p*-hydroxycinnamaldehyde, CMSP) 对食管癌细胞株 Kyse30 细胞增殖、迁移、细胞周期及肿瘤标志蛋白表达水平等方面的影响, 探讨 CMSP 对食管癌细胞的诱导分化作用及其机制。方法 分别用 0、10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ CMSP 处理食管癌 Kyse30、Eca109、Kyse180 细胞 24、48、72 h, MTS 检测 CMSP 对 Kyse30、Eca109、Kyse180 细胞增殖的影响; 光学显微镜和电镜下观察 Kyse30 细胞形态变化; 流式细胞术检测 CMSP 对 Kyse30 细胞周期和凋亡的影响; ELISA 检测 CMSP 对 Kyse30 细胞表达肿瘤分化相关抗原癌胚抗原 (CEA)、鳞状细胞癌抗原 (SCC)、和肿瘤标志物白细胞介素-6 (IL-6) 和巨噬细胞抑制因子 1 (MIC-1) 的影响; Transwell、克隆形成和细胞划痕实验检测 CMSP 对 Kyse30 细胞迁移和侵袭能力的影响; 免疫印迹检测 CMSP 对食管癌细胞 C-myc、N-myc 肿瘤标志蛋白及 RhoA-MAPK 信号通路中相关蛋白水平的影响。结果 CMSP 可呈时间和剂量依赖性抑制食管癌细胞的增殖, 并将 Kyse30 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。CMSP 能够抑制 Kyse30 细胞的迁移和侵袭能力, 还可呈时间和剂量依赖性抑制肿瘤标志物的表达及 RhoA-MAPK 途径的活化。结论 CMSP 通过调控 RhoA-MAPK 信号通路的活性抑制食管癌 Kyse30 细胞的增殖, 诱导其分化, 为其抗肿瘤临床应用提供参考依据。

关键词: 木鳖子; 对羟基桂皮醛; 食管癌; 分化; RhoA-MAPK 途径

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0610-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.016

Study on mechanism of differentiation of esophageal carcinoma Kyse30 cells induced by *p*-hydroxycinnamaldehyde

DAI Su-li¹, WU Hao², ZHAO Ri-yang², MA Ming³, ZHANG Cong¹, ZHAO Lian-mei¹, SHAN Bao-en¹

1. Key Laboratory of Tumor Gene Diagnosis, Prevention and Treatment of Hebei Province, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

2. Research Center, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

3. Clinical Laboratory, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China

Abstract: Objective To investigate the effects of *p*-hydroxycinnamaldehyde (CMSP) on cell proliferation, migration, cell cycle and the expression level of malignant biomarkers, and to investigate the underlying mechanism of differentiation of esophageal carcinoma Kyse30 cells (ESCC cells). **Methods** The effect of different concentration of CMSP at 0, 10, 20, and 40 $\mu\text{g/mL}$ on viabilities of ESCC cell lines (Kyse30, Eca109, and Kyse180) for 24, 48, and 72 h was determined by MTS assay. Optical microscope and scanning electronic microscopy (SEM) were used to observe the morphologic changes of Kyse30 cells. The effect of CMSP at different concentration on cell cycle distribution and apoptosis of Kyse30 cells was assessed by flow cytometry analysis. ELISA was used to detect the effect of CMSP on expression of tumor related antigens (CEA and SCC) and malignant biomarkers (IL-6 and MIC-1) in Kyse30 cells at protein secretion level. Influence of different concentration of CMSP on migration and invasiveness of Kyse30 cells were determined by colony-formation, wound healing and Transwell assays. Western blotting was used to evaluate the effect of CMSP

收稿日期: 2017-08-02

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81502032); 河北省医学科学研究重点课题计划资助项目 (20120120)

作者简介: 戴素丽 (1989—), 女, 硕士, 研究方向为中药抗肿瘤研究。Tel: (0311)86095290 E-mail: dsfighting@163.com

*通信作者 单保恩, 男, 博士生导师, 教授, 研究方向为肿瘤免疫学、基因诊断、抗肿瘤中药研究和肿瘤生物治疗研究。E-mail: shanbaoen@163.com

on expression of protein biomarkers C-myc and N-myc of Kyse30 cells and the related proteins in RhoA-MAPK pathway. **Results** The proliferation of esophageal cancer cell lines (Kyse30, Eca109, and Kyse180) was significantly inhibited by CMSP in a dose- and time-dependent manner. The cell cycle Kyse30 was blocked in G₀/G₁ phase. After the treatment with CMSP, Kyse30 cells showed typical dendrite-like cellular protrusions, and the percentage of such elongated cells was significantly and progressively increased with the increase in CMSP concentration ($P < 0.01$). The results of flow cytometry revealed that the treatment with CMSP increased the number of Kyse30 cells in G₀/G₁ phase in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.01$), while the number of cells in S phase decreased ($P < 0.05$); However, the apoptosis rate showed no obvious change ($P > 0.05$). CMSP could decrease the expression of CEA, SCC, IL-6, and MIC-1 both in protein secretion levels significantly in a dose- and time-dependent manner ($P < 0.05, 0.01$). Western blotting analysis showed that C-myc and N-myc proteins were all decreased significantly in Kyse30 cells after treatment with CMSP ($P < 0.05$). CMSP significantly inhibited the proliferation and migration ability of Kyse30 cells ($P < 0.05$) and induced cell differentiation; The protein levels of p-P38 was significantly increased ($P < 0.01$), while protein levels of ERK1/2, SAPK/JNK, and GTP-RhoA were obviously decreased in Kyse30 cells after treatment with CMSP ($P < 0.01$). **Conclusion** CMSP suppressed the proliferation and induced the differentiation of Kyse30 cells through regulating the RhoA-MAPK signal pathway, which might provide new potential strategies for ESCC treatment.

Key words: *Momordica Semen*; *p*-hydroxycinnamaldehyde; esophageal carcinoma; differentiation; RhoA-MAPK pathway

目前,食管癌是严重危害人类健康的消化道恶性肿瘤之一。根据最新数据显示,2015年我国癌症发病率中食管癌的发病率居第3位,死亡率为第4位^[1]。食管癌以其高发性和高侵袭性严重威胁着人们的健康。常规放、化疗虽能暂时缓解病情,但较高的毒副作用严重影响了疗效。近年来,有关肿瘤细胞促分化作用方面的研究为食管癌的治疗带来了新希望。有报道显示,一些药物,如全反式维甲酸(ATRA)、组织型纤溶酶原激活剂(TPA)、福斯克林(Forskolin)、环磷酸腺苷(cAMP)等具有诱导包括食管癌细胞在内的多种肿瘤细胞分化的作用^[2-5]。然而有关中药有效成分作为分化诱导剂应用于食管癌治疗方面的研究仍较少。

木鳖子 *Momordica Semen* 为葫芦科植物木鳖 *Momordica cochinchinensis* (Lour.) Spreng. 的干燥成熟种子,蒙药中应用非常广泛,与其他药物配伍被用于治疗多种肿瘤。对羟基桂皮醛(*p*-hydroxycinnamaldehyde, CMSP)是木鳖子提取物中的重要成分。本课题组前期的实验研究发现,CMSP通过RhoA-MAPK信号通路能够抑制黑色素瘤细胞B16F1增殖,诱导其分化^[6-8]。本研究通过观察CMSP对食管癌细胞Kyse30分化诱导作用,探讨其抗肿瘤作用的潜在机制,为其抗肿瘤临床应用提供参考文献,并为中药有效成分应用于肿瘤治疗方面的研究提供新的思路。

1 材料

1.1 细胞系

人食管癌细胞株Kyse30、Eca109、Kyse180由中国医学科学院国家肿瘤分子生物学重点实验室赠送。

1.2 主要试剂及仪器

CMSP由华北制药集团新药研究中心从木鳖子(购自石家庄乐仁堂药店,经华北制药集团新药研究中心任凤芝教授鉴定为正品)中提取并鉴定,质量分数 $\geq 96\%$ 。RPMI 1640培养基、胎牛血清和PBS购自美国Gibco-BRL公司;ARTA购自美国Sigma公司;MTS购自美国Promega公司;S-3500n电镜为日本Hitachi公司;流式细胞仪为美国Beckman Coulter公司;倒置相差显微镜为日本Olympus公司;癌胚抗原(CEA)、鳞状细胞癌抗原(SCC)、白细胞介素-6(IL-6)和巨噬细胞抑制因子1(MIC-1)ELISA试剂盒购自中国联科生物技术股份有限公司;Annexin V fluorescein isothiocyanate (FITC)和PI购自美国BD Pharmingen公司;RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kits购自美国Promega公司;RhoA、ERK1/2、p-ERK1/2、SAPK/JNK、p-SAPK/JNK、p38、p-p38抗体均购自美国Cell Signaling Technology公司; β -actin抗体购自美国Abcam公司。

2 方法

2.1 MTS实验检测CMSP对3种食管癌细胞株活力的影响

3种细胞系于含10%胎牛血清和100 U/mL青霉素及100 μ g/mL链霉素的RPMI 1640培养基中常规培养,每1~2天换液,取对数生长期细胞用于实验。在96孔板中加入数量为 1×10^4 的细胞悬液,分别与不同质量浓度(0、10、20、40 μ g/mL)CMSP在37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中孵育24、48、72 h,培养体系均为200 μ L含10%胎牛血清的RPMI 1640培养基。培养结束

后, 每孔加入 20 μL MTS (1.90 mg/mL) 溶液并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2 h。用全自动定量酶标仪在波长 492 nm 处测定吸光度 (A) 值, 以 A 值表示细胞活力, 计算存活率 (存活率 = $A_{\text{药物}}/A_{\text{对照}}$), 实验均重复 3 次。

2.2 光镜和电镜观察 Kyse30 细胞的增殖和分化

CMSP (0、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 Kyse30 细胞 72 h 后, 4%多聚甲醛室温固定 15 min, 吉姆萨染色 30 min, 光镜下观察细胞的增殖与分化 (细胞分化率: 胞体纵轴长度大于 3 倍胞体横轴长度的细胞数与细胞总数的比值)。

扫描电镜下观察 CMSP 处理后 Kyse30 细胞形态的改变。将对数生长期 Kyse30 细胞接种于 6 孔板, 每孔 1×10^6 个细胞, CMSP (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 或 ARTA (10 nmol/L) 处理 48 h 后, 常规制片、干燥和涂金, 在 S-3500n SEM 电镜下观察 Kyse30 细胞形态。

2.3 流式细胞术检测 CMSP 对 Kyse30 细胞凋亡和细胞周期的影响

FITC 和 PI 双染检测细胞凋亡。Kyse30 细胞分别与不同质量浓度 CMSP (0、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 共培养 72 h 或与 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CMSP 分别培养 24、48、72 h, 经胰酶消化收集 5×10^5 个细胞重悬于 500 μL 1 \times 缓冲液中, 将细胞悬液与 Annexin-FITC 和 PI 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光共孵育 15 min 后, PBS 洗涤 1 遍, 上机检测细胞凋亡水平。

细胞周期分析用 PI 染色。Kyse30 单细胞悬液 100 μL (细胞数量为 1×10^6) 分别与 70%冰乙醇混合固定 1 h, 经核糖核酸酶 A 处理后, 与细胞打孔剂和 PI 共培养 15 min, 经 PBS 洗涤后重悬于 PBS, 流式细胞仪检测细胞周期分布状态。

2.4 ELISA 法检测 CMSP 对 Kyse30 细胞分泌肿瘤相关抗原 CEA、SCC 及肿瘤标志物 IL-6 和 MIC-1 蛋白水平的影响

将 Kyse30 细胞接种于 6 孔板 ($2 \times 10^5/\text{孔}$) 分别用 0、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CMSP 处理, 并分别于 24、48、72 h 收集上清, 根据 ELISA 说明书操作检测上述蛋白的表达水平。

2.5 Western blotting 技术检测 CMSP 对食管癌 Kyse30 细胞 C-myc、N-myc 及 RhoA-MAPK 通路相关蛋白表达的影响

Kyse30 细胞与 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CMSP 分别培养 0.5、1.0、2.0 h 后, 提取细胞总蛋白。BCA 法进行蛋白质定量。沸水浴 5 min 变性后取各组蛋白质 60 $\mu\text{g}/\text{孔}$ 在 10%的 SDS-PAGE 凝胶中进行电泳,

然后转印到 PVDF 膜上, 用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h。按 1:1 000 的比例稀释每个抗体, 以 β -actin 做内参。一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 荧光二抗室温孵育 1 h, TBST 洗涤后, 用 Odyssey 红外荧光成像扫描仪进行扫描。以目的蛋白条带的灰度值与相应内参 β -actin 条带的灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达水平。

2.6 克隆形成、划痕实验和 Transwell 小室检测 CMSP 对 Kyse30 细胞克隆形成、迁移和侵袭能力的影响

2.6.1 克隆形成 将对数生长期 Kyse30 细胞接种于 6 孔板, 每孔 2 000 个细胞, 实验组用 CMSP (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理, 对照组为完全培养基。培养箱中常规培养 10 d 后, 弃上清, 以 4%多聚甲醛溶液固定 30 min 后, 用 2%结晶紫染色 15 min, 观察并计算细胞克隆形成的数量。

2.6.2 划痕实验 将对数生长期 Kyse30 细胞接种于 6 孔板, 待细胞融合度达到 90%时, 用无菌微量移液器枪头比着直尺在细胞层表面轻轻划痕, 用 PBS 清洗细胞 3 次后, 对照组换为含 2%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基, 实验组为含 2%胎牛血清及 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ CMSP 的 RPMI 1640 培养基。置于培养箱中常规培养, 并分别于 0、48 h 拍照。以划痕愈合率 [划痕愈合率 = (0 h 划痕宽度 - 48 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度] 表示细胞迁移能力。

2.6.3 Transwell 小室实验 将 Transwell 小室置于无菌 24 孔板中。经不同质量浓度 CMSP (0、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理 24 h 后, 将 Kyse30 细胞重悬于无牛清的 RPMI 1640 培养基中, 调整细胞浓度。于每个小室中加入 200 μL 细胞悬液 (含 1×10^5 个细胞), 常规培养 24 h, 取出小室以 4%多聚甲醛固定 30 min 后用结晶紫染色, 擦掉位于小室内面的细胞, 自来水清洗后于倒置相差显微镜下观察拍照, 随机选取 5 个视野 ($\times 200$) 计数穿膜细胞数。

2.7 统计学方法

本研究中各项实验均独立重复 3 次, 所有数据使用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同指标在两组间的差异比较采用 t 检验, 不同指标在多组间的差异比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 SNK- q 检验; 计数资料采用 χ^2 检验。

3 结果

3.1 CMSP 抑制食管癌细胞株增殖活性并诱导 Kyse30 细胞分化

MTS 结果见图 1, 分别用不同质量浓度 (0、

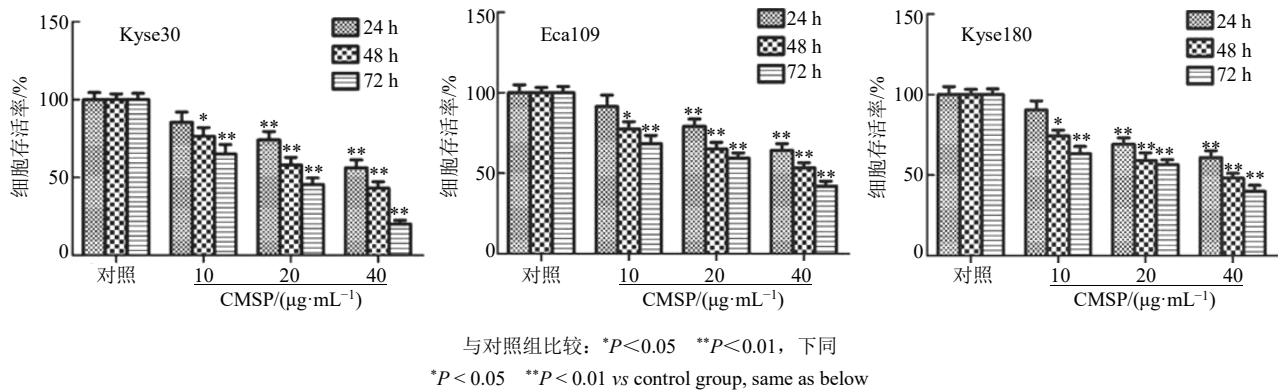


图 1 CMSP 对食管癌细胞 Kyse30、Eca109、Kyse180 增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Inhibition of CMSP on proliferation of esophageal cancer cells Kyse30, Eca109, and Kyse180 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

10、20、40 $\mu\text{g/mL}$ CMSP 处理不同时间后, 食管癌细胞株的增殖活性出现不同程度的降低, 表明 CMSP 可呈时间和剂量依赖性抑制食管癌细胞株的生长 ($P < 0.05, 0.01$)。CMSP 作用于 Kyse30、Eca109 和 Kyse180 细胞株 72 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 (15.13 ± 2.05)、(26.47 ± 3.27)、(25.40 ± 3.11) $\mu\text{g/mL}$ 。说明 CMSP 对 Kyse30 细胞增殖的抑制作用最强, 因此后续研究中选用 Kyse30 细胞作为研究对象。进一步通过光镜和电镜观察 CMSP 作用后 Kyse30 细胞的形态特征。如图 2 所示, 与不同质量浓度 CMSP 共培养的 Kyse30 细胞呈明显梭形变化, 且随着药物质量浓度的增加, 呈梭形变化的细胞比例明显增加 ($P < 0.01$)。这与 ATRA 作用后效果相

似。扫描电镜结果也证实 CMSP 处理后 Kyse30 细胞呈现明显的梭形改变, 结果见图 3。

3.2 CMSP 诱导 Kyse30 细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期

流式细胞术检测结果显示, 与 CMSP 共培养的 Kyse30 细胞阻滞于 G_0/G_1 期细胞的比例明显增加 ($P < 0.01$), 进入 S 期的细胞比例明显下降 ($P < 0.05, 0.01$), 且该作用呈明显剂量及时间依赖性 (图 4、5)。但 10~40 $\mu\text{g/mL}$ CMSP 作用 72 h 或 20 $\mu\text{g/mL}$ CMSP 分别培养 24、48、72 h 后, Kyse30 细胞凋亡水平并无明显变化 ($P > 0.05$), 见图 6。

3.3 CMSP 抑制 Kyse30 细胞肿瘤分化相关抗原及肿瘤标志物的表达

ELISA 结果显示, 与 CMSP 共培养后 Kyse30

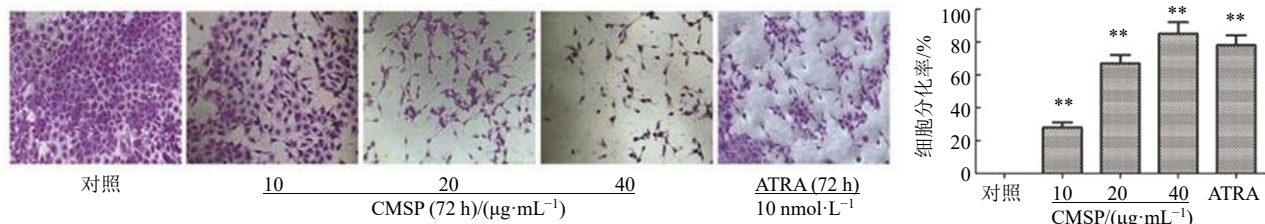


图 2 CMSP 对食管癌细胞 Kyse30 增殖和分化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of CMSP on proliferation and differentiation of esophageal cancer Kyse30 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



图 3 CMSP 对食管癌细胞 Kyse30 的诱导分化作用 (扫描电镜)
Fig. 3 Differentiation effect of esophageal cancer Kyse30 cells induced by CMSP (SEM)

细胞分泌肿瘤相关抗原 CEA、SCC 与肿瘤标志物 IL-6、MIC-1 蛋白的水平明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), 见图 7。

3.4 CMSP 对 Kyse30 细胞肿瘤标志蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示 CMSP 作用后 Kyse30 细胞表达肿瘤标志蛋白 C-myc 及 N-myc 的水平明显下降 ($P < 0.05, 0.01$), 见图 8。且上述 CMSP 作用均呈明显的时间及剂量依赖性。

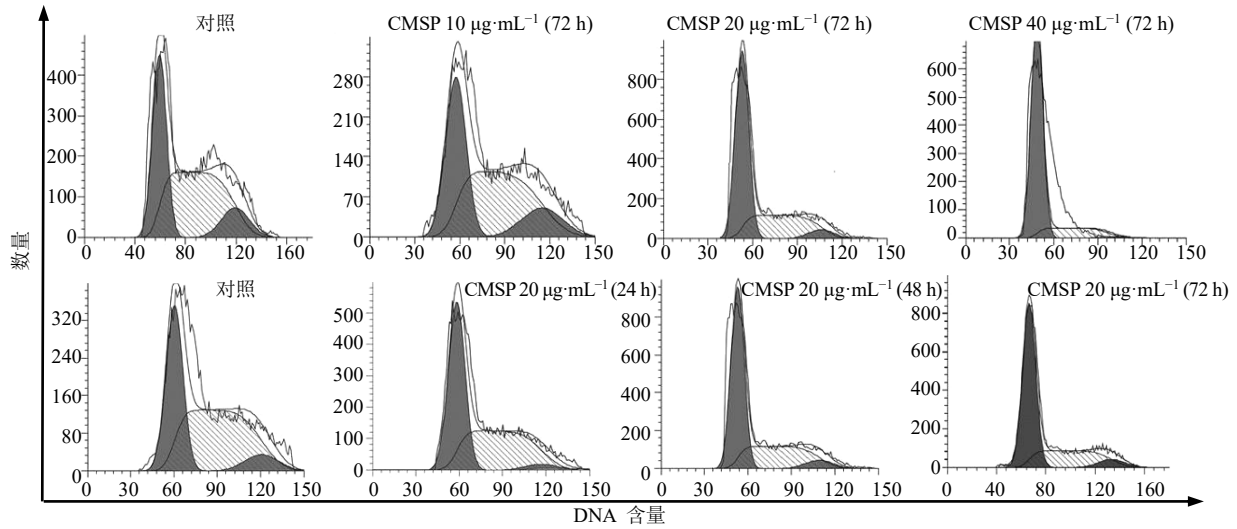


图 4 CMSP 对食管癌细胞 Kyse30 周期分布的影响

Fig. 4 Effects of CMSP on cell cycle distribution of Kyse30 cells

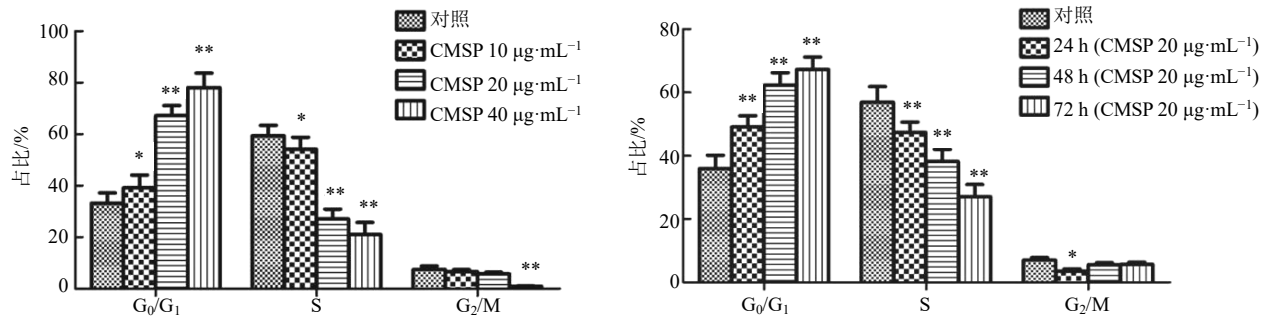


图 5 CMSP 不同质量浓度和不同作用时间对食管癌细胞 Kyse30 周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of CMSP at different concentration and different treatment time on cell cycle distribution of Kyse30 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

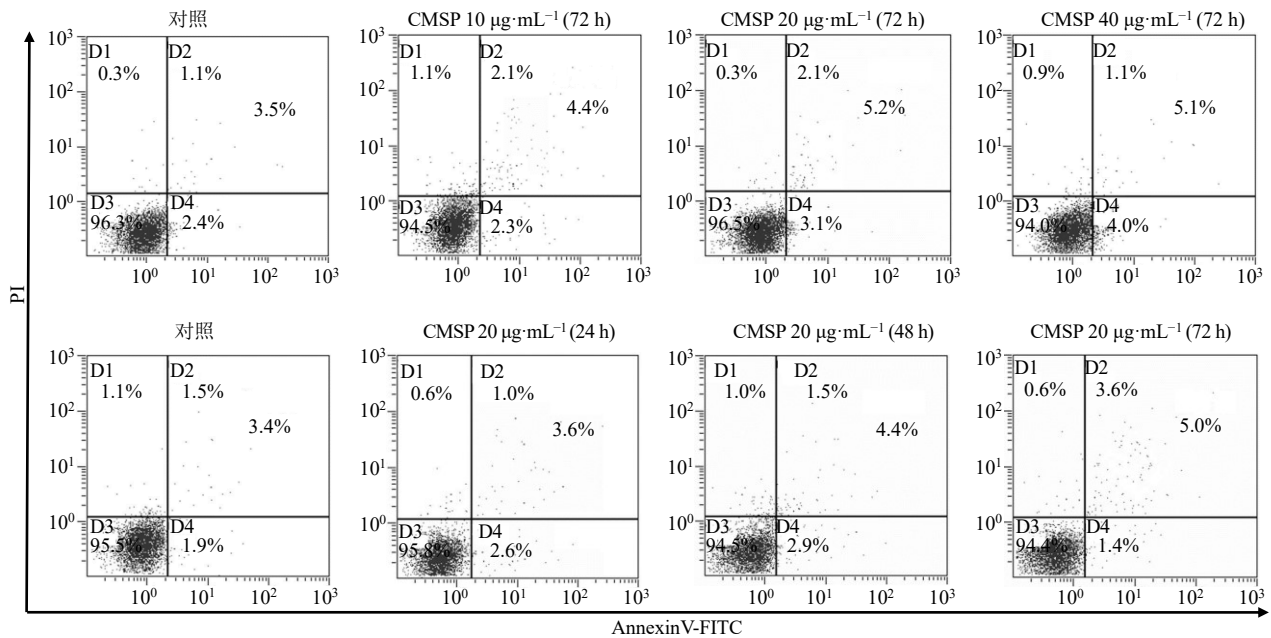


图 6 CMSP 对食管癌细胞 Kyse30 凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effects of CMSP on cell apoptosis of Kyse30 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

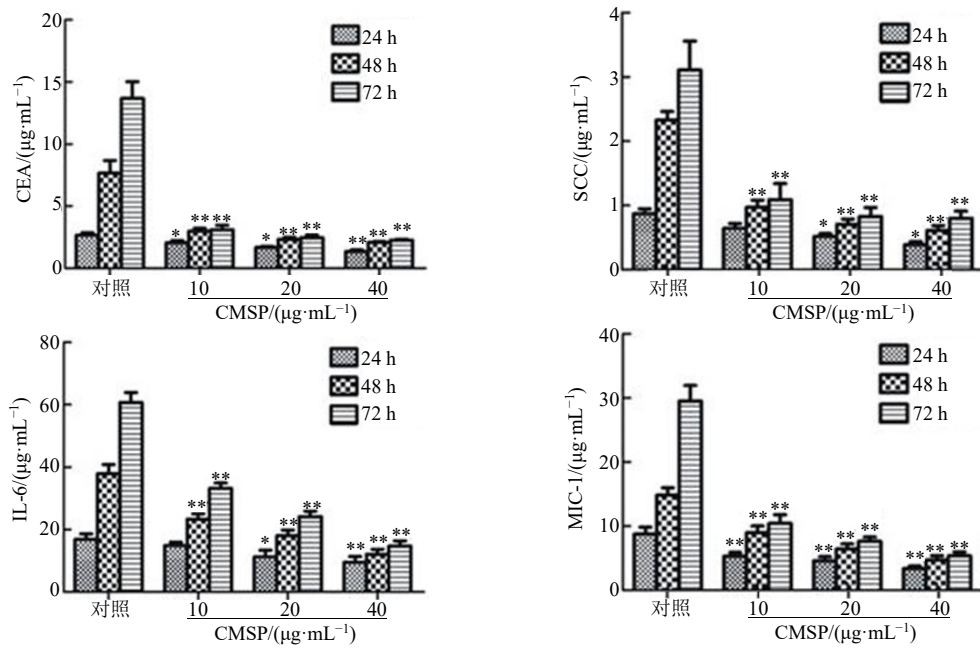


图 7 CMSP 对 Kyse30 细胞肿瘤相关抗原表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of CMSP on protein expression of tumor-related antigens in Kyse30 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

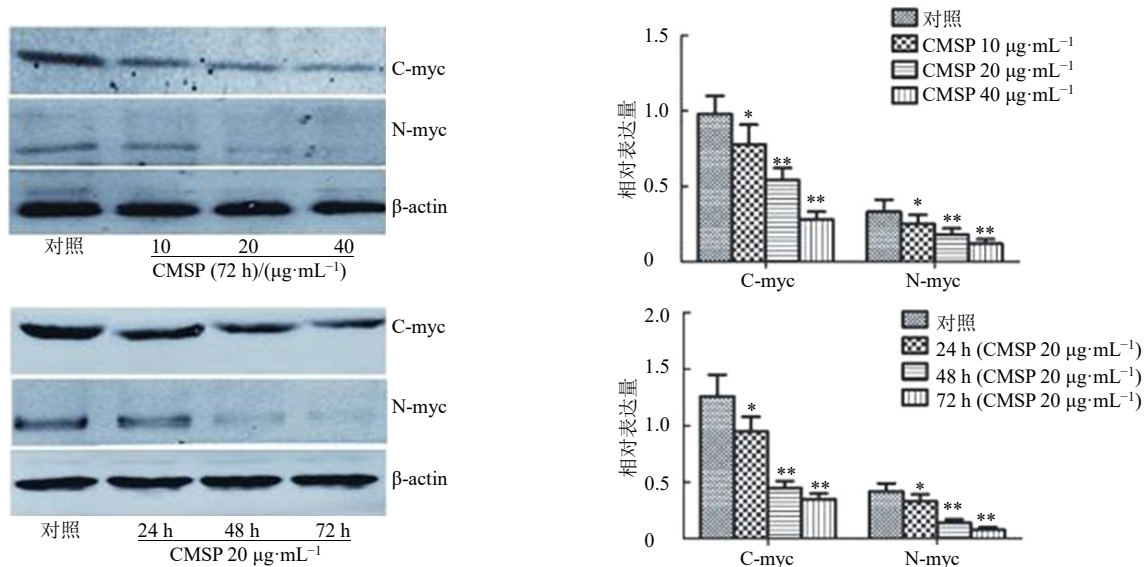


图 8 CMSP 对 Kyse30 细胞 C-myc 及 N-myc 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of CMSP on protein expression of C-myc and N-myc in Kyse30 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 RhoA-MAPK 途径参与 CMSP 诱导 Kyse30 细胞的分化

如图 9 所示, Western blotting 实验结果表明, 20 μg/mL 的 CMSP 处理 Kyse30 细胞, 随着作用时间的延长, RhoA、ERK1/2、SAPK/JNK 以及 P38 的表达水平均无明显变化 ($P > 0.05$), 而 GTP-RhoA、p-ERK1/2 及 p-SAPK/JNK 的表达水平均明显下

调 ($P < 0.05, 0.01$), 而 p-P38 表达水平明显上调 ($P < 0.01$)。说明 CMSP 能够活化 RhoA-MAPK 途径, 从而诱导食管癌 Kyse30 细胞分化。

3.6 CMSP 能够抑制 Kyse30 细胞的克隆形成及迁移、侵袭能力

如图 10 所示, 与 CMSP 共培养的 Kyse30 细胞克隆形成能力明显减弱 (229.80 ± 10.13 vs $76.60 \pm$

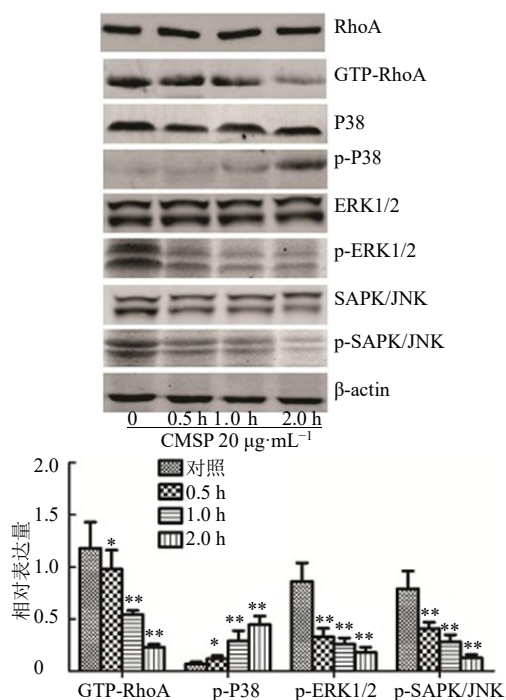


图 9 CMSP 对 Kyse30 细胞中 RhoA-MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effects of CMSP on expression of related proteins in RhoA-MAPK signaling pathway of Kyse30 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

5.50, $P < 0.01$)。划痕实验结果显示, 与 CMSP 共培养的 Kyse30 细胞迁移能力明显降低 ($P < 0.01$)。Transwell 小室实验结果显示, CMSP 处理后, Kyse30 细胞穿过基底膜的数量明显减少, 且随着 CMSP 质量浓度增加, Kyse30 细胞迁移及侵袭能力均逐渐下降 ($P < 0.01$)。

4 讨论

诱导分化是目前肿瘤防治中非常有前途的一种策略, 其不仅能够明显抑制肿瘤生长, 还能够显著纠正诱发细胞癌变的因素, 且具有较小的毒副作用, 因而是一种良好的肿瘤治疗手段^[9-10]。然而, 除 ATRA 已成熟应用于临床 AML-M3 的治疗外^[2], 包括食管癌在内的绝大多数实体肿瘤的分化诱导剂仍然仅处于初级研究阶段, 离应用于临床治疗尚有差距。中药以其较小的毒副作用和良好的疗效, 在临床肿瘤治疗中发挥越来越大的作用。本课题组一直致力于抗肿瘤中药单体的筛选。以往的研究发现, 连翘的根醇提物能够通过线粒体途径诱导食管癌细胞凋亡^[11], 香加皮的醇提物杠柳苷抑制胃癌细胞增殖, 并通过 ERK1/2-EGR1 途径诱导细胞凋亡^[12]。

前期研究发现^[6-8], CMSP 在体外和体内均能够

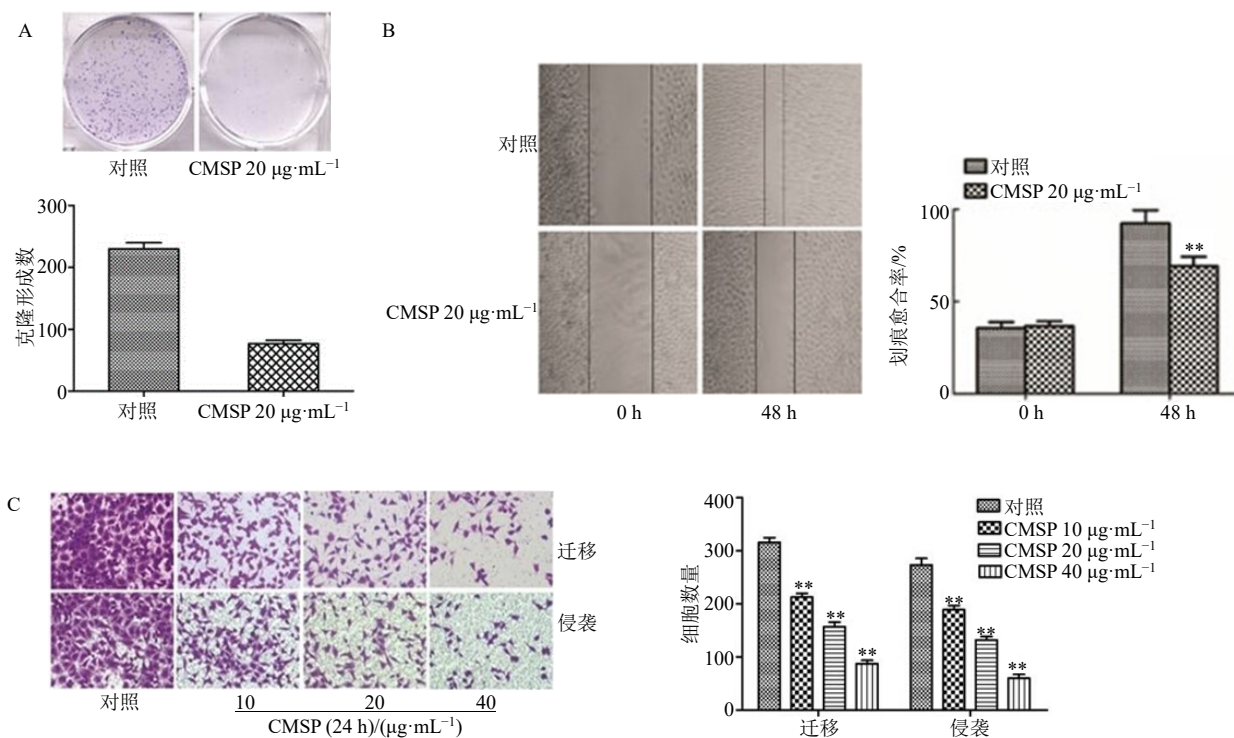


图 10 CMSP 对 Kyse30 细胞克隆形成 (A)、迁移 (B) 及侵袭 (C) 能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effects of CMSP on colony formation (A), migration (B), and invasion (C) ability of Kyse30 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

抑制黑色素瘤细胞 B16 的增殖并诱导其分化,减少肿瘤标志物的表达。本研究首先检测了 CMSP 对 Kyse30、Eca109 及 Kyse180 的作用,结果发现 10~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CMSP 均能够有效抑制 3 种食管癌细胞的增殖,且呈时间和剂量依赖性。

分化的生物学意义是指细胞通过表型改变逐渐获得更特异化功能的一个发展过程^[13]。本研究中发现,10~40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 CMSP 处理 Kyse30 细胞 72 h 后,吉姆萨染色结果显示细胞出现不同程度的梭形改变,这与 ATRA 作用效果类似。电镜下观察到的分枝状轮廓也证实了这一改变。流式细胞术的检测结果显示,CMSP 作用后,Kyse30 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期的比例明显增加,进入 S 期的细胞明显下降,但细胞凋亡水平并未明显变化。诱导凋亡和诱导分化是目前临床肿瘤化疗药物的主要作用机制。本研究中的形态学改变与流式细胞术结果提示,CMSP 可能是通过诱导分化作用抑制食管癌细胞的生物活性。

为了验证这一假设,检测了 CMSP 处理后 Kyse30 细胞肿瘤相关抗原 CEA 和 SCC 及肿瘤标志物 IL-6、MIC-1、C-myc 和 N-myc 的表达。CEA 和 SCC 是典型的肿瘤相关抗原,其表达与食管癌的分化程度呈明显的负相关。IL-6 及 MIC-1 是构成食管癌细胞肿瘤微环境的重要细胞因子,在食管癌的发生发展中发挥明显的促进作用^[14-16]。C-myc 与 N-myc 在包括食管癌在内的多种肿瘤细胞中均呈过表达状态,其涉及与细胞恶性转化、分化受阻及异常增殖密切相关的众多信号转导通路^[17-18]。ELISA 和 Western blotting 的结果表明,CMSP 作用后,上述指标均明显下调,提示食管癌细胞逐渐失去其恶性表型。迁移、侵袭能力是食管癌细胞恶性表型的重要方面。CMSP 处理后 Kyse30 细胞的克隆形成能力及迁移和侵袭能力均减弱,这同时证实了其诱导分化作用。

丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 途径在调控包括食管癌在内的多种肿瘤细胞的分化中发挥重要作用。已有研究报道表明^[19-20],ERK1/2、SAPK/JNK 等 MAPK 途径的异常过度表达是导致多种肿瘤细胞正常分化过程受阻的重要机制之一,而 MAPK 途径表达水平的下调可促进多种肿瘤细胞分化。RhoA 为 Ras GTP 酶超家族中的小 GTP 酶成员之一,是 MAPK 途径上游的重要调控因子,其活化形式 GTP-RhoA

可通过抑制 P38,促进 ERK、JNK 等蛋白发生磷酸化而直接活化 MAPK 途径^[21-23]。前期研究 CMSP 对黑色素瘤细胞株 B16F1 的促分化的结果也提示^[8],CMSP 能够抑制 RhoA 活化,进而抑制 MAPK 途径的活化,从而诱导分化作用。因此,本研究中分析了 CMSP 对食管癌细胞中 RhoA-MAPK 信号转导途径的影响。Western blotting 结果显示,CMSP 处理后 GTP-RhoA 的水平明显降低,导致 p-ERK1/2 及 p-SAPK/JNK 蛋白的表达水平随之减低,而 p-P38 蛋白的表达则明显升高。这提示 CMSP 作用后,食管癌细胞 RhoA-MAPK 途径的受抑可能是 CMSP 诱导 ESCC 细胞分化的重要机制。

综上所述,CMSP 可能通过抑制 RhoA-MAPK 途径,诱导分化,抑制食管癌细胞的生物活性。这提示 CMSP 在食管癌的分化诱导治疗中可能具有广泛的应用前景,值得深入探讨。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *Ca Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] Lu T, Li W, Chen R, *et al.* Inhibition effects of all trans-retinoic acid on the growth and angiogenesis of esophageal squamous cell carcinoma in nude mice [J]. *Chin Med J*, 2011, 124(17): 2708-2714.
- [3] Ozawa A, Lick A N, Lindberg I. Processing of proaurgurin is required to suppress proliferation of tumor cell lines [J]. *Mol Endocrinol*, 2011, 25(5): 776-784.
- [4] Zhang X, Xie J, Liao L, *et al.* 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate induces up-regulated transcription of variant 1 but not variant 2 of VIL2 in esophageal squamous cell carcinoma cells via ERK1/2/AP-1/Sp1 signaling [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0124680.
- [5] Hata K, Hori K, Takahashi S. Role of p38 MAPK in lupeol-induced B16 2F2 mouse melanoma cell differentiation [J]. *J Biochem*, 2003, 134(3): 441-445.
- [6] 耿艺曼, 赵连梅, 朱秀丽, 等. 木鳖子对羟基桂皮醛对黑色素瘤 B16 细胞分化的影响及其机制 [J]. *中草药*, 2013, 44(14): 1951-1956.
- [7] 于向艳, 崔雯萱, 孙士萍, 等. 木鳖子对羟基桂皮醛对小鼠黑色素移植瘤生长的抑制作用及机制研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(10): 1740-1745.
- [8] Zhao L, Sun G, Han L, *et al.* p-Hydroxycinnamaldehyde induces B16-F1 melanoma cell differentiation via the RhoA-MAPK signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(6): 2247-2260.
- [9] Leszczyniecka M, Roberts T, Dent P, *et al.* Differentiation therapy of human cancer: Basic science and clinical

- applications [J]. *Pharmacol Ther*, 2001, 90(2/3): 105-156.
- [10] Wang N, Wang L W, Gou B D, *et al.* Realgar-induced differentiation is associated with MAPK pathways in HL-60 cells [J]. *Cell Biol Int*, 2008, 32(12): 1497-1505.
- [11] Zhao L, Yan X, Shi J, *et al.* Ethanol extract of *forsythia suspensa* root induces apoptosis of esophageal carcinoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(2): 871-80.
- [12] Li L, Zhao L M, Dai S L, *et al.* Periplocin extracted from cortex periplocae induced apoptosis of gastric cancer cells via the ERK1/2-EGR1 pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(5): 1939-1951.
- [13] Jogi A, Vaapil M, Johansson M, *et al.* Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors [J]. *Ups J Med Sci*, 2012, 117(2): 217-224.
- [14] Wang X, Jiang X, Yu X, *et al.* Macrophage inhibitory factor 1 acts as a potential biomarker in patients with esophageal squamous cell carcinoma and is a target for antibody-based therapy [J]. *Cancer Sci*, 2014, 105(2): 176-185.
- [15] Cao X, Zhang L, Feng G R, *et al.* Preoperative Cyfra21-1 and SCC-Ag serum titers predict survival in patients with stage II esophageal squamous cell carcinoma [J]. *J Transl Med*, 2012, doi: 10.1186/1479-5876-10-197.
- [16] Dvorak K, Chavarria M, Payne C M, *et al.* Activation of the interleukin-6/STAT3 anti apoptotic pathway in esophageal cells by bileacids and low pH: Relevance to Barrett's Esophagus [J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13(18 Pt1): 5305-5313.
- [17] Zhou W, Feng X, Ren C, *et al.* Over-expression of BCAT1, a c-Myc target gene, induces cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Mol Cancer*, 2013, doi: 10.1186/1476-4598-12-53.
- [18] Wei W, Bracher-Manecke J, Zhao X, *et al.* Oncogenic but non-essential role of N-myc downstream regulated gene 1 in the progression of esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(2): 164-174.
- [19] Ding Q, Wang Q, Evers B. Alterations of MAPK activities associated with intestinal cell differentiation [J]. *BBRC*, 2001, 284(2): 282-288.
- [20] Rottmar M, Mhanna R, Guimond-Lischer S, *et al.* Interference with the contractile machinery of the fibroblastic chondrocyte cytoskeleton induces re-expression of the cartilage phenotype through involvement of PI3K, PKC and MAPKs [J]. *Exp Cell Res*, 2014, 320(2): 175-187.
- [21] Brumby A, Goulding K, Schlosser T, *et al.* Identification of novel Ras-cooperating oncogenes in *Drosophila melanogaster*: A Rho GEF/Rho-family/JNK pathway is a central driver of tumorigenesis [J]. *Genetics*, 2011, 188(1): 105-125.
- [22] Moon M, Kim H, Kim J, *et al.* Small GTPase Rap1 regulates cell migration through regulation of small GTPase RhoA activity in response to transforming growth factor- β 1 [J]. *J Cell Physiol*, 2013, 228(11): 2119-2126.
- [23] Sánchez-Mir L, Soto T, Franco A, *et al.* Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e88020.