

通路来诱导胶质瘤干细胞的凋亡、抑制胶质瘤干细胞的生长、减弱胶质瘤干细胞的多能性^[7]。

中药传统用药方法是用其水煎剂,即丹参的水溶性成分,所以研究丹参的水溶性成分抗肿瘤细胞生长的机制更有意义。本研究采用丹参中最重要的水溶性活性成分丹参多酚酸盐,首次证实了丹参多酚酸盐可使胶质瘤细胞周期停滞于G₀/G₁期,促进胶质瘤细胞的凋亡,抑制胶质瘤细胞的增殖。作为自我毁灭的过程,凋亡及自噬在神经系统疾病的发生发展中扮演了重要的角色。Wirawan E 及 Luo S 等研究团队均发现 Beclin 1 基因的清除不仅能减弱其介导的促细胞自噬功能,并且 Beclin 1 基因降解产生的 C 末端片段能跨膜进入线粒体敏感型细胞使其释放促凋亡因子细胞色素而促进细胞的凋亡^[8-9]。本研究也发现,丹参多酚酸盐能上调胶质瘤 U251 细胞自噬相关基因 Beclin 1 表达,Beclin 1 基因降解产生的 C 末端片段的增多是否介导了丹参多酚酸盐促细胞凋亡的作用,有待进一步研究。

REFERENCES

- [1] LU C, SHERVINGTON A. Chemoresistance in gliomas [J]. Mol Cell Biochem, 2008, 312(1/2): 71-80.
- [2] YUAN S L, WANG Y J, WEI Y Q. Anticancer effect of tanshinone and its mechanisms [J]. Chin J Cancer(癌症), 2003, 22(12): 1363-1366.
- [3] LI G, SHAN C, LIU L, et al. Tanshinone II A inhibits HIF-1 α and VEGF expression in breast cancer cells via mTOR/p70S6K/RPS6/4E-BP1 signaling pathway [J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117440.
- [4] LIN L L, HSIA C R, HSU C L, et al. Integrating transcriptomics and proteomics to show that tanshinone II A suppresses cell growth by blocking glucose metabolism in gastric cancer cells [J]. BMC Genomics, 2015, 2(5): 16-41.
- [5] MUNAGALA R, AQIL F, JEYABALAN J, et al. Tanshinone II A inhibits viral oncogene expression leading to apoptosis and inhibition of cervical cancer [J]. Cancer Lett, 2015, 356(2 Pt B): 536-546.
- [6] TANG C, XUE H L, HUANG H B, et al. Tanshinone II A inhibits constitutive STAT3 activation, suppresses proliferation, and induces apoptosis in rat C6 glioma cells [J]. Neurosci Lett, 2010, 470(2): 126-129.
- [7] YANG L, GUO H, DONG L, et al. Tanshinone II A inhibits the growth, attenuates the stemness and induces the apoptosis of humanglioma stem cells [J]. Oncol Rep, 2014, 32(3): 1303-1311.
- [8] WIRAWAN E, VANDE WAALLE L, KERSSE K, et al. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhance apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria [J]. Cell Death Dis, 1(1): e18. doi: 10.1038/cddis.2009.16.
- [9] LUO S, RUBINSZTEIN D C. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-XL [J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 268-277.

收稿日期: 2015-11-02

蛇床子素对 TRAIL 抗乳腺癌活性的影响及其作用机制

王倩, 郑海雅, 周颖, 钟益芳(丽水市人民医院, 浙江 丽水 323000)

摘要:目的 探讨中药活性成分蛇床子素对抗肿瘤药物 TRAIL 抗乳腺癌活性的影响并研究其机制。方法 用蛇床子素联合 TRAIL 体外治疗乳腺癌细胞系 BT-20, MTT 法检测肿瘤细胞的细胞活力, Annexin V/PI 染色检测肿瘤细胞的凋亡, 免疫共沉淀法检测 RIP1-FADD-caspase-8 复合物的形成。Western blot 法检测 BT-20 细胞 caspase-8 的活化及蛇床子素对 BT-20 细胞 cIAP2 蛋白表达的影响。结果 联用蛇床子素显著提高 TRAIL 对 BT-20 细胞活力的抑制率和凋亡诱导活性。免疫共沉淀及 Western blot 结果发现联合蛇床子素后, TRAIL 治疗的 BT-20 细胞内的 RIP1-FADD-caspase-8 复合物水平及 caspase-8 的活化程度显著提高。Western blot 结果发现蛇床子素对 BT-20 细胞内的 cIAP2 蛋白表达有抑制作用。在 BT-20 细胞中转染 cIAP2 表达质粒后, 蛇床子素对 TRAIL 抗肿瘤活性的促进作用受到抑制。结论 蛇床子素通过促进死亡受体复合物的形成增强 TRAIL 对乳腺癌细胞的凋亡诱导效应。

关键词:蛇床子素; TRAIL; 乳腺癌; caspase-8; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)09-1141-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.09.012

作者简介: 王倩, 女, 硕士, 主管技师

Tel: 18957092550

E-mail: lishuiwangqian@163.com

Effect of Osthole on the Anti-breast Cancer Activity of TRAIL and Its Mechanism

WANG Qian, ZHENG Haiya, ZHOU Ying, ZHONG Yifang(People's Hospital of Lishui, Lishui 323000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of osthole on the anti-breast cancer activity of TRAIL and study its mechanism. **METHODS** After the BT-20 cells were treated with TRAIL combined with osthole, the cell viability, cell apoptosis, and the formation of RIP1-FADD-caspase-8 complex were detected by MTT assay, Annexin V/PI staining, and co-immunoprecipitation, respectively. The activation of caspase-8 and the expression of cIAP2 in BT-20 cells were evaluated by Western blot assay. **RESULTS** Addition of osthole significantly enhanced the cell viability inhibition rate and apoptosis inducing activity in BT-20 cells treated with TRAIL. The results of co-immunoprecipitation and Western blot indicated that the formation of RIP1-FADD-caspase-8 complex and the activation of caspase-8 in TRAIL-treated BT-20 cells were significantly increased due to the combination of osthole. The results of Western blot assay demonstrated that the expression of cIAP2 could be significantly inhibited due to the osthole treatment. Moreover, the transfection of cIAP2 vector abolished the promotion of osthole on TRAIL-induced cell death in BT-20 cells. **CONCLUSION** Osthole promotes TRAIL-induced apoptosis by the formation of RIP1-FADD-caspase-8 complex in breast cancer.

KEY WORDS: osthole; TRAIL; breast cancer; caspase-8; apoptosis

乳腺癌在女性群体中是发病率最高的恶性肿瘤,致死率非常高^[1]。目前乳腺癌的常规治疗手段包括手术治疗、放疗及化疗,尽管手术治疗往往能显著延长患者的生存时间,然而对于那些不宜进行手术的晚期乳腺癌患者,化疗是治疗患者的重要手段^[2-3]。肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL)是TNF家族的成员,能与死亡受体4(death receptor 4, DR4)或死亡受体5(death receptor 5, DR5)结合,从而激活 caspase-8 并诱导肿瘤细胞发生凋亡^[4]。研究发现,TRAIL 能选择性诱导肿瘤细胞发生凋亡,却不影响正常组织细胞的功能,因此 TRAIL 被认为是 1 种有很好前景的低毒抗肿瘤药物^[5-6]。尽管如此,研究也发现很多肿瘤细胞对 TRAIL 的抗肿瘤作用不敏感,并能抵抗 TRAIL 依赖的凋亡效应^[7-8]。因此研究如何提高肿瘤细胞对 TRAIL 的敏感性是目前研究工作的重点。蛇床子素是从蛇床子中提取的活性物质,在中医上用于治疗湿疹、皮肤瘙痒、阴道毛滴虫感染、性功能障碍^[9]。近年来研究发现蛇床子素还具有一定的抗肿瘤作用^[10],然而其对乳腺癌的辅助治疗作用却很少报道。本实验研究蛇床子素与乳腺癌细胞对 TRAIL 治疗敏感性的关系。

1 仪器与材料

1.1 仪器与试剂

CKX31 型倒置相差显微镜(Olympus 公司); 3111 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo Forma 公司); AE2000 型酶标仪(德国 Thermo Fisher); FACS Aria II 流式细胞仪(美国 BD); BIO-RAD 电泳仪

(美国伯乐)。

噻唑蓝(MTT, 批号: M2128)、蛇床子素(批号: O9265)、z-IETD-fmk(批号: C1230)、Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒(批号: APOAF)均购于美国 Sigma-Aldrich; TRAIL(美国 R&D Systems); DMEM 培养基、胎牛血清购于美国 Gibco; 细胞蛋白提取液、RIP1、FADD、caspase-8、cIAP2 和 β -actin 抗体购于美国 Cell Signaling; 蛋白 G 免疫共沉淀琼脂糖珠(美国 Santa Cruz); Western blot 上样缓冲液(日本 TaKaRa); RIP1 siRNA(上海吉玛生物)序列为正向: 5'-GGGCGAUUUU GCAAUAAUU-3', 反向: 5'-UUAUUUGCAA AUAUCGCCCCU-3'; Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen); ECL 试剂盒(美国 Pierce, 批号: 32109)。

1.2 细胞培养

人乳腺癌细胞系 BT-20(美国 ATCC)。细胞系培养在含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,在 37 °C 恒温培养箱中培养,通入 5% CO₂。

2 方法

2.1 质粒构建及转染

将 cIAP2 基因的开放阅读框架全序列(Gene ID: NM_001165.4)以分子克隆的方法与 pcDNA3.1 连接后构建成 pc-cIAP2 重组真核表达质粒^[11]。质粒和 RIP1 siRNA 的转染使用 Lipofectamine 2000 按照试剂操作说明书步骤进行。

2.2 细胞活力检测

将 BT-20 细胞按每孔 5×10^3 接种在 96 孔板上,孵育过夜后将 pc-cIAP2(终浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和 RIP1 siRNA(终浓度为 $50 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1}$)用 $0.5 \mu\text{L}$

的 Lipofectamine 2000 进行转染并加入 100 μL 无血清培养基, 6 h 后将无血清培养基更换为 100 μL 有血清 DMEM 继续培养 24 h, 然后按照实验设计将 z-IETD-fmk (终浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 蛇床子素 (终浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 及 TRAIL (终浓度为 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 加入到培养体系中, 培养 48 h。之后加入 20 μL MTT (5 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 培养 4 h, 移除孔内培养基, 加入 100 μL 二甲亚砜, 570 nm 处测定 OD 值。相对细胞活力结果用实验组与对照组的 OD 值比值表示。实验分为对照组、蛇床子素单治疗组、TRAIL 单治疗组、蛇床子素联合 TRAIL 治疗组、蛇床子素+TRAIL+z-IETD-fmk 组、蛇床子素+TRAIL+RIP1 siRNA 组、蛇床子素+TRAIL+pc-cIAP2 组, 每组采用 3 个复孔。

2.3 免疫共沉淀

将 BT-20 细胞按每孔 5×10^5 接种在 6 孔板上, 孵育过夜后将 pc-cIAP2 (终浓度为 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 用 10 μL 的 Lipofectamine 2000 进行转染并加入 2 mL 无血清培养基, 6 h 后将无血清培养基更换为 2 mL 有血清 DMEM 继续培养 24 h, 将蛇床子素 (终浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 及 TRAIL (终浓度为 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 加入到培养体系中, 培养 48 h。将细胞用免疫沉淀缓冲液裂解, 缓冲液的成分如下: 50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl (pH 7.4)、1% NP-40 细胞裂解液、50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl、1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA 和 1% 混合蛋白酶抑制剂 (Sigma-Aldrich)。裂解后的细胞在 11 430 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 10 min, 收取上清液加入 RIP1 抗体孵育过夜, 之后加入蛋白 G 琼脂糖珠孵育 2 h。免疫沉淀反应后, 在 1 200 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 速度下离心 5 min, 将琼脂糖珠离心至管底, 之后将上清小心吸去, 琼脂糖珠用免疫沉淀缓冲液洗涤 2 次后加入 Western blot 上样缓冲液, 沸水浴煮 5 min。实验分为对照组、蛇床子素单治疗组、TRAIL 单治疗组、蛇床子素联合 TRAIL 治疗组和蛇床子素+TRAIL+pc-cIAP2 组, 每组采用 3 个复孔。

2.4 Western blotting 试验

将 BT-20 细胞按每孔 5×10^5 接种在 6 孔板上, 孵育过夜后将 pc-cIAP2 (终浓度为 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 用 10 μL 的 Lipofectamine 2000 进行转染并加入 2 mL 无血清培养基, 6 h 后将无血清培养基更换为 2 mL 有血清 DMEM 继续培养 24 h, 将蛇床子素 (终浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 及 TRAIL (终浓度为 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 加入到培养体系中, 培养 48 h。之后将细胞用生理

盐水洗涤 2 遍后提取总蛋白质。将蛋白提取液或免疫共沉淀处理样品用 12.5% SDS-PAGE 进行电泳分离。分离完毕后通过电转方法将蛋白质从分离胶上转到 PVDF 膜上, 用 RIP1、FADD、caspase-8、cIAP2、 β -actin 抗体孵育过夜, 之后再带辣根过氧化物酶的二抗孵育 2 h, 蛋白条带用 ECL 试剂盒显色发光。目的蛋白的相对表达用目标蛋白灰度值与 β -actin 灰度值的比值表示, 蛋白灰度值分析用 Image J 软件处理。对于免疫共沉淀结果, Input 表示在加入 RIP1 抗体和琼脂糖珠之前, 预先留取的相同含量的样品蛋白作为对照。IP: RIP1 表示加入 RIP1 抗体和琼脂糖珠之后的免疫共沉淀蛋白。实验分组同“2.3”项下, 每组采用 3 个复孔。

2.5 细胞凋亡实验

将 BT-20 细胞按每 5×10^5 接种在 6 孔板上, 孵育过夜后按照实验设计将蛇床子素 (终浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 及 TRAIL (终浓度为 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 加入到培养体系中, 培养 48 h。之后将细胞用生理盐水洗涤 2 次, 按照凋亡试剂盒说明书步骤将 PI (碘化丙啶) 和 Annexin-V 加入细胞中孵育 20 min, 采用流式细胞术检测肿瘤细胞的凋亡, 凋亡率用 Annexin-V 阳性、PI 阴性细胞数占总细胞数的百分比表示。实验分为对照组, 蛇床子素单治疗组, TRAIL 单治疗组, 蛇床子素联合 TRAIL 治疗组, 每组采用 3 个复孔。

2.6 统计学方法

实验重复 3 次, 数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 15.0 统计分析软件进行处理, P 值计算采用非配对双边 t 检验进行分析, $P<0.05$ 认为有显著性差异。

3 结果

3.1 蛇床子素促进 TRAIL 对乳腺癌细胞的凋亡诱导效应

通过 MTT 细胞活力实验发现 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 TRAIL 单独治疗仅能轻微抑制乳腺癌细胞系 BT-20 的细胞活力, 然而在培养体系中加入 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 蛇床子素后, TRAIL 对 BT-20 细胞的杀伤活性显著提高, 见图 1。类似地, Annexin V 染色实验表明蛇床子素可显著增强 TRAIL 对 BT-20 细胞的凋亡诱导效应, 见图 2, 这些结果提示蛇床子素提高 TRAIL 抗肿瘤活性的机制可能和凋亡途径有关。

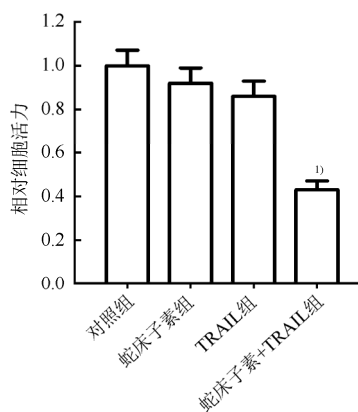


图1 MTT实验检测BT-20细胞的细胞活力($n=3$, $\bar{x} \pm s$)与TRAIL组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 1 The cell viability of BT-20 was performed by MTT assay($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with TRAIL group, $^{1)}P<0.05$.

3.2 蛇床子素促进 TRAIL 依赖的死亡受体复合物的形成

当 TRAIL 与其细胞表面的 DR4 和 DR5 受体结合后, 能募集 RIP1, 进而形成 RIP1-FADD-caspase-8 这一死亡受体复合物(death-inducing

signaling complex, DISC), 最后激活 caspase-8 依赖的凋亡途径^[12]。因此, 为了研究蛇床子素提高 BT-20 细胞对 TRAIL 敏感性的机制, 采用免疫共沉淀技术研究 DISC 的形成。联用蛇床子素后, TRAIL 对 RIP1-FADD-caspase-8 复合物的诱导能力较其单独治疗显著增强, 而进一步的研究发现由于 DISC 的形成显著增加, 蛇床子素联合 TRAIL 最终促使 BT-20 细胞中的 caspase-8 发生活化, 这可能是蛇床子素促进 TRAIL 依赖的凋亡途径的重要机制, 结果见图 3~4。为了证明 RIP1-FADD-caspase-8 复合物的重要作用, 在对 BT-20 细胞进行蛇床子素与 TRAIL 的联合治疗之前, 先将 BT-20 细胞用 $50 \text{ pmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ RIP1 siRNA 转染 24 h 或用 caspase-8 特异性抑制剂 z-IETD-fmk ($20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 进行预处理 2 h, 结果发现不论是 RIP1 siRNA 转染或 z-IETD-fmk 预处理均能显著抑制蛇床子素联合 TRAIL 对 BT-20 细胞的杀伤活性, 见图 5, 提示蛇床子素通过促进 TRAIL 依赖的死亡受体复合物的形成增强 TRAIL 的抗肿瘤活性。

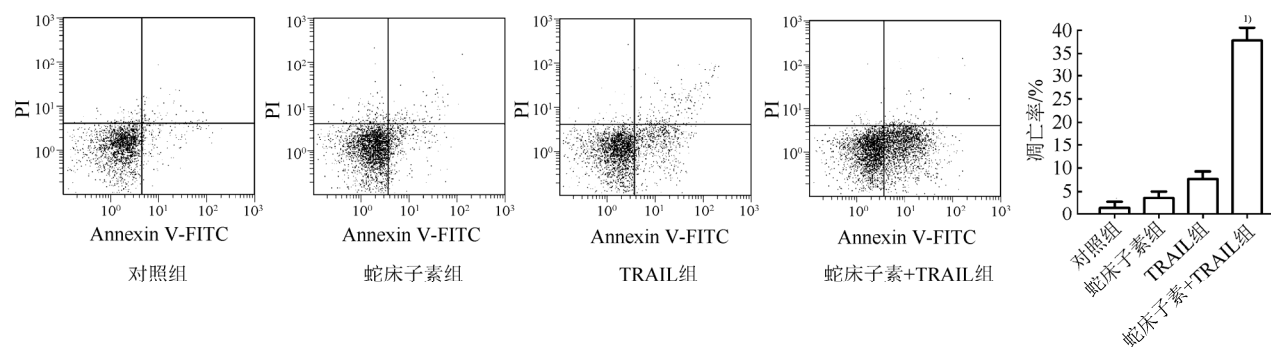


图2 Annexin V/PI 染色法检测 BT-20 细胞的凋亡($n=3$, $\bar{x} \pm s$)与 TRAIL 组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 2 The cell apoptosis of BT-20 was measured by Annexin/PI staining($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with TRAIL group, $^{1)}P<0.05$.

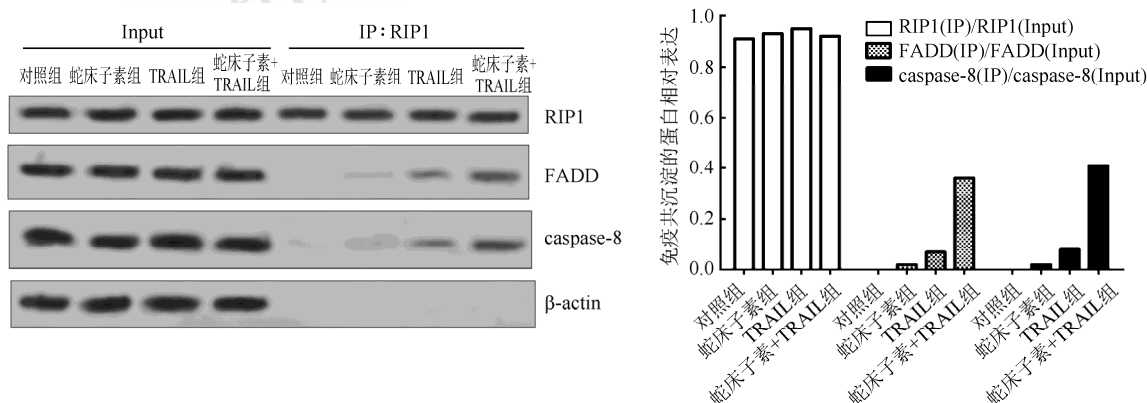


图3 免疫共沉淀及 Western blot 实验检测 BT-20 细胞 RIP1-FADD-caspase-8 复合物的形成

Fig. 3 Co-immunoprecipitation and Western blot assay were performed to detect the formation of RIP1-FADD-caspase-8 complex

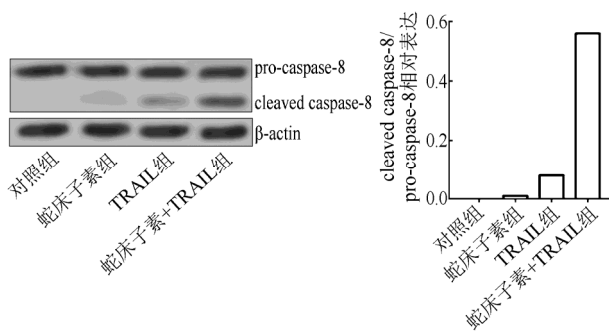


图4 Western blot 实验检测 BT-20 细胞 caspase-8 的活化水平

Fig. 4 Western blot assay was performed to detect the activation of caspase-8 in BT-20 cells

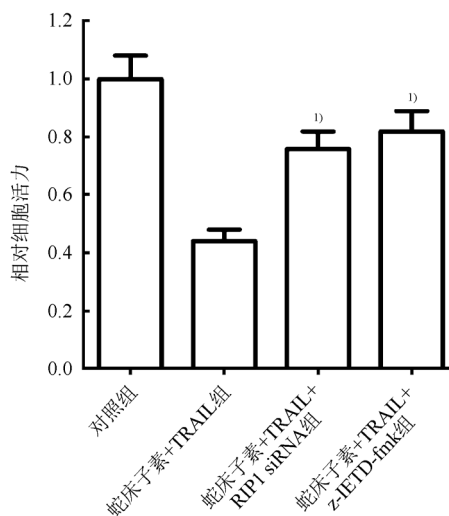


图5 MTT 实验检测 BT-20 细胞的细胞活力($n=3$, $\bar{x} \pm s$) 与蛇床子素+TRAIL 组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 5 The cell viability of BT-20 detected by MTT assay ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with osthole+TRAIL group, $^{1)}P<0.05$.

3.3 蛇床子素通过下调 cIAP2 的表达促进死亡受体复合物的形成

cIAP2 是细胞内重要的调节蛋白,能诱导 RIP1 蛋白发生范素化从而抑制该蛋白的功能,阻止 DISC 的形成^[13]。Western blot 实验发现蛇床子素能显著降低 BT-20 细胞中 cIAP2 的表达水平,见图 6。因此推测蛇床子素对 TRAIL 的协同效应依赖于 cIAP2 的下调。为了验证这一推测,本实验对 BT-20 细胞进行蛇床子素与 TRAIL 的联合治疗之前,先将 pc-cIAP2 质粒用脂质体转染入 BT-20 细胞并孵育 24 h,使细胞强制表达 cIAP2。发现 cIAP2 的过表达显著抑制了联合治疗下的 BT-20 细胞中的 RIP1-FADD-caspase-8 复合物的形成,从而使 caspase-8 的活化收到抑制,最终抑制了蛇床子素联合 TRAIL 对 BT-20 细胞的杀伤活性,结果见图 7~9。这些结果表明了蛇床子素促进 TRAIL

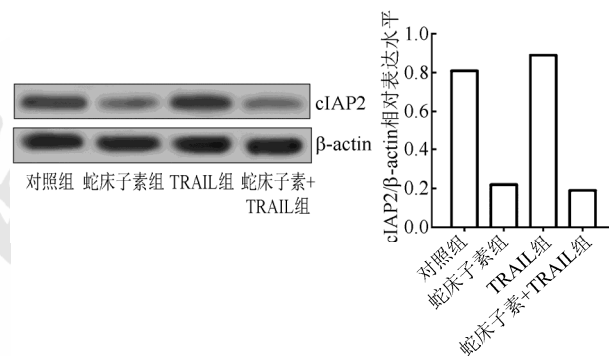


图6 Western blot 实验检测蛇床子素对 BT-20 细胞中 cIAP2 表达水平的影响

Fig. 6 Western blot assay was performed to evaluate the down-regulation of cIAP2 induced by osthole in BT-20 cells

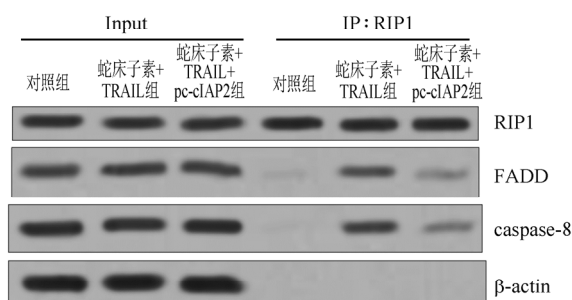
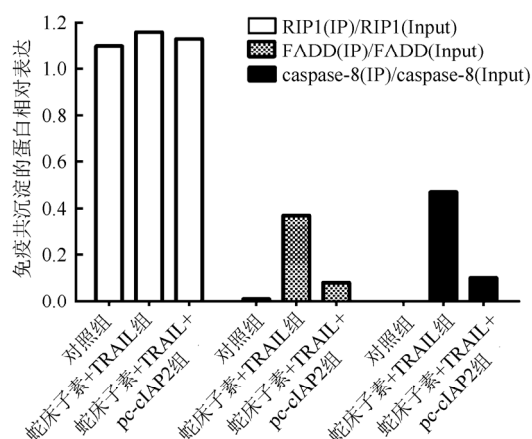


图7 转染 pc-cIAP2 质粒显著抑制蛇床子素与 TRAIL 联合治疗下的 BT-20 细胞中 RIP1-FADD-caspase-8 复合物的形成

Fig. 7 The formation of RIP1-FADD-caspase-8 complex was inhibited by the transfection of pc-cIAP2 in BT-20 cells treated with osthole plus TRAIL



依赖的死亡受体复合物形成的机制是其能下调乳腺癌细胞中 cIAP2 蛋白的表达水平。RIP1 siRNA 和 pc-cIAP2 vector 在 BT-20 细胞中的转染效率见图 10。

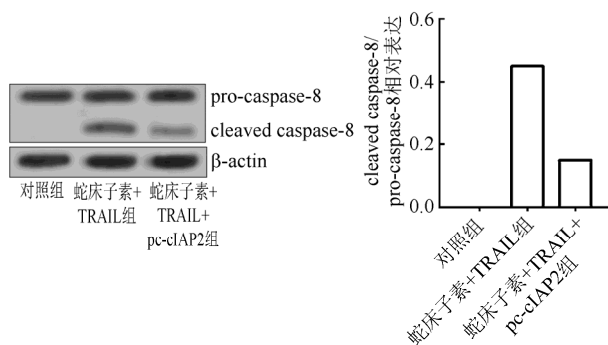


图 8 转染 pc-cIAP2 质粒显著抑制蛇床子素与 TRAIL 联合治疗下的 BT-20 细胞中 caspase-8 的活化

Fig. 8 The activation of caspase-8 was inhibited by the transfection of pc-cIAP2 in BT-20 cells treated with osthole plus TRAIL

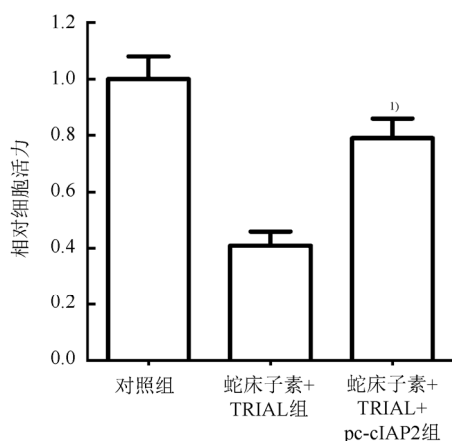


图 9 转染 pc-cIAP2 质粒显著抑制蛇床子素与 TRAIL 联合治疗对 BT-20 细胞的杀伤活性($n=3$, $\bar{x} \pm s$) 与 osthole+TRAIL 组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 9 Transfection of pc-cIAP2 significantly inhibited the cell death of BT-20 cells treated with osthole plus TRAIL($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

Compared with osthole+TRAIL group, $^{1)}P<0.05$.

4 讨论

TRAIL 对肿瘤细胞的杀伤作用依赖于 RIP1-FADD-caspase-8 复合物的形成, 该复合物能直接活化 caspase-8。活化的 caspase-8 能通过 2 条途径诱导细胞进入凋亡程序: 一是 caspase-8 能直接激活凋亡效应蛋白 caspase-3 使细胞发生凋亡; 二是 caspase-8 能使 Bid 蛋白发生活化, 而活化的 Bid 能转位到线粒体外膜上, 使线粒体外膜通透性发生改变, 释放线粒体内部的凋亡诱导物质, 引起

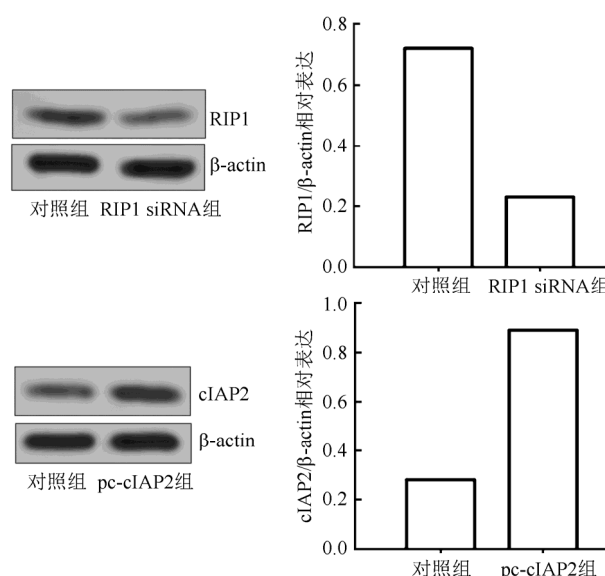


图 10 RIP1 siRNA 和 pc-cIAP2 vector 在 BT-20 细胞中的转染效率

Fig. 10 The transfection efficiency of RIP1 siRNA and pc-cIAP2 vector in BT-20 cells

线粒体途径的凋亡^[14-15]。本研究发现蛇床子素能显著提高 TRAIL 对乳腺癌细胞的凋亡诱导能力, 因此推测蛇床子素对 TRAIL 的协同效应可能与 RIP1-FADD-caspase-8 复合物的形成有关。通过 RIP1 特异性抗体依赖的免疫共沉淀实验发现, 蛇床子素能显著增加 FADD 蛋白、前体 caspase-8 蛋白与 RIP1 蛋白的结合, 并且蛇床子素也能促进 caspase-8 的活化。而当用 RIP1 siRNA 沉默 RIP1 的表达以减少 RIP1-FADD-caspase-8 复合物的水平, 或用 z-IETD-fmk 阻断 caspase-8 的活化后, 蛇床子素对 TRAIL 的协同作用丧失。根据这些实验结果, 可知蛇床子素是通过促进死亡受体复合物的形成增强 TRAIL 对乳腺癌细胞的凋亡诱导效应。

研究发现, 很多肿瘤细胞通过上调细胞凋亡抑制蛋白(cellular inhibitors of apoptosis proteins, cIAPs)的表达水平抵抗肿瘤微环境中的凋亡信号分子, 而高活性的 cIAP2 能使 RIP1 蛋白发生泛素化并使之失活^[16-17]。为了研究蛇床子素促进死亡受体复合物形成的机制, 本实验通过 Western blot 发现蛇床子素能显著下调乳腺癌细胞中 cIAP2 的表达水平, 减少 cIAP2 对 RIP1 蛋白的泛素化修饰, 从而使乳腺癌细胞在 TRAIL 的治疗下易于形成 DISC。进一步的研究发现在乳腺癌细胞中强制表达 cIAP2 废除了蛇床子素对 TRAIL 的协同作用, 因此证明了这一分子机制。

综上所述, 本研究表明蛇床子素能显著提高乳腺癌细胞对 TRAIL 的敏感性, 并通过 cIAP2/RIP1 途径使乳腺癌细胞在 TRAIL 的治疗下易于形成死亡受体复合物, 进而诱导肿瘤细胞进入凋亡程序。这些研究为如何提高 TRAIL 的抗肿瘤活性提供了新的思路 and 理论依据。

REFERENCES

- [1] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics, 2013 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2013, 63(1): 11-30.
- [2] HUANG X E, WANG L, LI L, et al. Safety of Lienal Polypeptide injection combined with chemotherapy in treating patients with advanced cancer [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(17): 7837-7841.
- [3] KIM B, STEPHEN S L, HUGHES T A, et al. Chemotherapy induces Notch1-dependent MRP1 up-regulation, inhibition of which sensitizes breast cancer cells to chemotherapy [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15(1): 634-645.
- [4] LAUSSMANN M A, PASSANTE E, REHM M, et al. Proteasome inhibition can impair caspase-8 activation upon submaximal stimulation of apoptotic tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) signaling [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(18): 14402-14411.
- [5] HARI Y, HARASHIMA N, HARADA M, et al. Bcl-xL inhibition by molecular-targeting drugs sensitizes human pancreatic cancer cells to TRAIL [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(39): 41902-41915.
- [6] AMARANTE-MENDES G P, GRIFFITH T S. Therapeutic applications of TRAIL receptor agonists in cancer and beyond [J]. *Pharmacol Ther*, 2015(155): 117-131.
- [7] TRIVEDI R, MISHRA D P. Trailing TRAIL resistance: Novel targets for TRAIL sensitization in cancer cells [J]. *Front Oncol*, 2015(5): 69-88. Doi: 10.3389/fonc.2015.00069.
- [8] FINLAY D, VAMOS M, VUORI K, et al. Small-molecule IAP antagonists sensitize cancer cells to TRAIL-induced apoptosis: roles of XIAP and cIAPs [J]. *Mol Cancer Ther*, 2014, 13(1): 5-15.
- [9] BALAYSSAC S, GILARD V, MALET-MARTINO M, et al. Analysis of herbal dietary supplements for sexual performance enhancement: first characterization of propoxyphenyl-thiohydroxyhomosildenafil and identification of sildenafil, thiosildenafil, phentolamine and tetrahydropalmatine as adulterants [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012(63): 135-150.
- [10] LIN K, GAO Z, FU Q, et al. Osteole suppresses the proliferation and accelerates the apoptosis of human glioma cells via the upregulation of microRNA-16 and downregulation of MMP-9 [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(3): 4592-4597.
- [11] SUN J G, XIANG J, LIU F Y, et al. Clitocine induces apoptosis and enhances the lethality of ABT-737 in human colon cancer cells by disrupting the interaction of Mcl-1 and Bak [J]. *Cancer Lett*, 2014, 355(2): 253-263.
- [12] SESSLER T, HEALY S, SZEGEZDI E, et al. Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signaling [J]. *Pharmacol Ther*, 2013, 140(2): 186-199.
- [13] BERTRAND M J, LIPPENS S, VANDENABEELE P, et al. cIAP1/2 are direct E3 ligases conjugating diverse types of ubiquitin chains to receptor interacting proteins kinases 1 to 4 (RIP1-4) [J]. *PloS One*, 2011, 6(9): e22356. Doi: 10.1371/journal.pone.0022356.
- [14] LI X H, DONG L, HOU X Y, et al. Apoptosis of human lung adenocarcinoma A549 cells induced by aloe polysaccharide through the mitochondrial pathway [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药理学), 2014, 31(3): 270-274.
- [15] KANTARI C, WALCZAK H. Caspase-8 and bid: caught in the act between death receptors and mitochondria [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(4): 558-563.
- [16] DE ALMAGRO M C, VUCIC D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy [J]. *Exp Oncol*, 2012, 34(3): 200-211.
- [17] SELMI T, ALECCI C, ZANOCCO-MARANI T, et al. ZFP36 stabilizes RIP1 via degradation of XIAP and cIAP2 thereby promoting ripoptosome assembly [J]. *BMC Cancer*, 2015(15): 357-363.

收稿日期: 2016-01-29

葛根素 PEG-PE 纳米胶束的制备及降低红细胞溶血的初步研究

方瑞华, 梁卫青, 张佳军(浙江中医药大学附属嘉兴中医院, 浙江 嘉兴 314001)

摘要: 目的 采集葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, G6PD)缺陷的动物模型血液, 评价葛根素 PEG-PE 纳米胶束降低红细胞溶血的作用。方法 1%乙酰苯胺皮下注射大鼠制备 G6PD 缺陷的动物模型, 取其红细胞制成混悬液, 比较评价葛根素和葛根素 PEG-PE 纳米胶束的溶血作用、红细胞脆性及红细胞膜流动性。结果 葛根素出现了明显的红细胞溶血, 且随着浓度变化和孵育时间延长具有增加的趋势, 溶血率高达 38%, 而葛根素 PEG-PE 纳米胶束未见明显溶血; 另外, 红细胞脆性实验结果表明, 葛根素 PEG-PE 纳米胶束对红细胞膜的作用非常轻微, $H_{50\%}$ 为 $(42.1 \pm 1.1)\%$, 显著小于葛根素的该数值 $(53.1 \pm 1.2)\%$, 红细胞膜流动性结果表明, 葛根素 PEG-PE 纳米胶束对红细胞膜的流动性影响非常轻微。结论 葛根素 PEG-PE 纳米胶束良好的血液相容性, 为该药物的体内研究和进一步新型药物制剂开发奠定基础。

作者简介: 方瑞华, 女, 副主任中医师 Tel: 13317495546 E-mail: 779229498@qq.com