

斑蝥酸钠联合多西紫杉醇诱导 A₅₄₉ 细胞凋亡及对 Caspase-8 表达的影响

许惠溢¹, 奚燕², 钟以胜³, 曾寰¹, 林碧英¹ (1. 厦门市第二医院, 福建 厦门 361021; 2. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200126; 3. 厦门市中医院, 福建 厦门 361009)

摘要: 目的 探讨斑蝥酸钠联合多西紫杉醇抑制人肺腺癌 A₅₄₉ 细胞增殖、诱导细胞凋亡的作用, 初步探讨其作用机制。方法 采用 MTT 法测定细胞增殖抑制率, Annexin V-FITC/PI 染色, 流式细胞仪测定细胞凋亡率; Western 印迹法测定 Caspase-8 活性。结果 斑蝥酸钠和多西紫杉醇均能抑制人肺腺癌 A₅₄₉ 细胞的增殖($P < 0.05$), 合用与单用相比抑制率明显提高, 诱导 12 h 时 CI 值为 0.88, 24 h 时为 0.96, 36 h 时为 1.02。Annexin V-FITC/PI 染色流式细胞仪检测提示斑蝥酸钠可增强多西紫杉醇的凋亡诱导作用。Western 印迹法显示多西紫杉醇、斑蝥酸钠及联合加药组均可见凋亡相关蛋白 Caspase-8 的裂解条带, 联合加药组的裂解条带最明显。结论 多西紫杉醇和斑蝥酸钠均可明显抑制人肺腺 A₅₄₉ 细胞增殖诱导细胞凋亡, 联合使用作用更强, 多西紫杉醇和斑蝥酸钠诱导细胞凋亡可能与促进 Caspases-8 表达有关。

关键词: 斑蝥酸钠; 多西紫杉醇; 人肺腺癌 A₅₄₉ 细胞; 细胞凋亡; Caspase8

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2012)07-0586-05

Research on the Combined Effect of Sodium Cantharidinate and Docetaxel on Adenocarcinoma Cell Apoptosis and the Activities of Caspase-8

XU Huiyi¹, XI Yan², ZHONG Yisheng³, ZENG Huan¹, LIN Biying¹ (1. Xiamen No.2 Hospital, Xiamen 361021, China; 2. Shanghai Longhua Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200126, China; 3. Xiamen Traditional Chinese Medicine Hospital, Xiamen 361009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibition effects of combination of Docetaxel and Sodium Cantharidinate on human pulmonary adenocarcinoma. **METHODS** Adenocarcinoma cell line A₅₄₉ was chosen and growth inhibition was measured both with MTT colorimetry and FCM assay. Caspase8 was detected by Western blot. **RESULTS** Either Docetaxel or

作者简介: 许惠溢, 女, 学士, 主管药师 Tel: (0592)6157185 E-mail: tiipi@sina.com

Sodium Cantharidinate can inhibit the proliferation of A₅₄₉ cell respectively, however, Sodium Cantharidinate can increase the sensitivity of A₅₄₉ cell to Docetaxel when using them at the same time. The difference between single use and combine two drugs is distinct ($P < 0.05$). High-level Caspase8 expression was detected with Docetaxel or Sodium Cantharidinate in A₅₄₉ cells by Western blot. **CONCLUSION** Sodium Cantharidinate can sensitize A₅₄₉ cell to Docetaxel's effects in vitro. The induction of apoptosis may be related to expression of Caspase8.

KEY WORDS: sodium cantharidinate; docetaxel; A₅₄₉ cell; apoptosis; caspase8

肺癌是发达国家最常见的非皮肤癌,在全世界范围内列第二位。肺癌中约 75%~80%为非小细胞肺癌(NSCLC)^[1]。多西紫杉醇是治疗 NSCLC 的常用方案^[2]。但是当前 NSCLC 化疗中位生存期仍很短,有必要寻找更优的治疗方案。近年来随着中药抗肿瘤优势的凸显,人们对斑蝥素及其衍生物的研究更加重视。斑蝥酸钠(Sodium Cantharidate, SCA)是斑蝥素的半合成衍生物^[3],临床研究表明其对多种恶性肿瘤总缓解率高,并可调节免疫^[4],改善患者一般状况^[5]。因此,笔者选择常见的人肺腺癌 A₅₄₉ 细胞,研究斑蝥酸钠及多西紫杉醇诱导肿瘤细胞的凋亡作用并初步探讨其机制,为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

多西紫杉醇(Docetaxel), 20 mg : 0.5 mL, 法国罗纳普郎克·乐安公司产品;斑蝥酸钠注射液, 0.1 mg : 2 mL, 贵州神奇制药有限公司产品; RPMI-1640 培养基, Gibco 公司;小牛血清(FCS), 华美上海公司;四甲基偶氮唑盐(MTT), 二甲亚砜(DMSO), 美国 Sigma 公司;PI 和 Annexin V-FITC, 美国 BD 公司;鼠抗人 Caspase8 单抗, Cell Signaling 公司;HRP 标记羊抗鼠二抗, 武汉博士德公司;BCA 法蛋白定量试剂盒及 ECL 发光检测试剂盒, Pierce 公司;硝酸纤维素转移膜(0.22 μm), Amersham 公司;其他试剂为国产试剂。

1.2 细胞培养

人肺腺癌 A₅₄₉ 细胞株购于武汉大学中国典型培养物保藏中心,用含 10% FCS 的 RPMI-1640 培养基培养,细胞密度约为 $3 \times 10^5 \sim 5 \times 10^5$ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 时进行实验。

1.3 主要仪器

酶标仪,日本岛津公司;荧光显微镜, Olympus 公司;流式细胞仪(FACSort), 美国 BD 公司。

1.4 药物浓度

斑蝥酸钠以成人给药剂量 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{d}^{-1}$, 按药物的血浆峰值浓度计算公式 $\text{PPC} (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}) = 50 \times \text{D} / 5000 \times 2 \times 10^3 [\text{D}(\text{mg} \cdot \text{d}^{-1}) \text{为每日用量}]$, 计算得

出血浆峰浓度为 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;多西紫杉醇的实验浓度参照临床常用剂量($100 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-2}$ 1 h 内静脉滴注)所对应的血浆峰值浓度,即 $3.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。斑蝥酸钠组含斑蝥酸钠 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;多西紫杉醇组含多西紫杉醇 $3.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$;联合加药组含斑蝥酸钠 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和多西紫杉醇 $3.7 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 半剂量联合加药组含斑蝥酸钠 $1.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和多西紫杉醇 $1.85 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。实验中所涉及浓度指标均为培养液中的药物终浓度。

1.5 MTT 法检测细胞增殖

将对数期细胞接种于 96 孔板,每孔 100 μL , 置于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度的 CO_2 培养箱中培养 24 h 后,加入多西紫杉醇和斑蝥酸钠 100 μL , 对照孔加入等量培养液,继续培养 12, 24, 36 h。终止培养前 4 h 每孔加入 MTT 10 μL , 4 h 后离心弃上清,沉淀加 DMSO 100 μL , 充分振荡至沉淀完全溶解,在 570 nm 波长处用酶标仪测定 OD 值。每组设复孔 5 个,实验重复两次。按以下公式计算抑制率:抑制率 = $(\text{OD}_{\text{空白}} - \text{OD}_{\text{样品}}) / \text{OD}_{\text{空白}} \times 100\%$

1.6 Annexin V-FITC/PI 双染法观察细胞形态, FCM 检测细胞凋亡

细胞于对数生长期时加药诱导 12, 24, 36 h 后收获细胞,离心($800 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min)弃上清,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤弃上清,80%冰乙醇固定, PBS 洗涤去固定液,加入 Annexin V-FITC 和 PI 染色液,荧光显微镜下观察细胞形态。采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,每组重复测定 3 次,取均值。

1.7 蛋白质印迹法检测凋亡相关蛋白 Caspase-8 的表达

RIPA 裂解液抽提细胞总蛋白,BCA 法行蛋白定量。每一样本取 20 μg 蛋白质,加适量上样缓冲液,行 9%变性十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳(SDS-PAGE)、转膜、5%脱脂牛奶封闭后,加入稀释 1 : 1 000 的凋亡相关蛋白 Caspase-8 抗体及 β -actin(内参照),室温摇床孵育 2 h 或 4°C 过夜。加入二抗,室温孵育 1 h, ECL 显影,凝胶成像系统拍照, LeicaQwin 图象分析软件进行吸光度积分值分析。实验重复 3 次。

1.8 统计学方法

数据分析采用 SPSS 13.0 统计分析软件, 样本均数比较采用成组 t 检验和方差分析。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

1.9 药物联合作用评价

采用药物合用指数 (coefficient of drug interaction, CI) 评价两药相互作用性质, CI 按下列公式计算: $CI=AB/(A \times B)$ 。根据 MTT 检测的吸光度值进行计算, AB 为两药联合组与对照组吸光度值的比值; A 或 B 是各药物单独使用组与对照组吸光度值的比值。当 $CI<0.95$ 时表示两种药物呈协同作用; 当 $CI>1.05$ 时呈拮抗作用; $0.96<CI<1.04$ 时呈相加作用。

2 结果

2.1 MTT 检测结果

斑蝥酸钠与多西紫杉醇对 A_{549} 细胞的增殖均有抑制作用(与对照组比较 P 均 <0.05); 两者联用抑制作用增强(与单药组比较 P 均 <0.05); 半剂量联用抑制作用与多西紫杉醇全剂量单药组相当, 差异无统计学意义($P>0.05$), 与斑蝥酸钠组的差异有统计学意义($P<0.05$)。两者联用 12 h 时合用指数 CI 为

0.88, 24 h 为 0.96, 36 h 时为 1.02, 提示多西紫杉醇与斑蝥酸钠合用早期表现为协同作用, 后期为相加作用。结果见图 1。

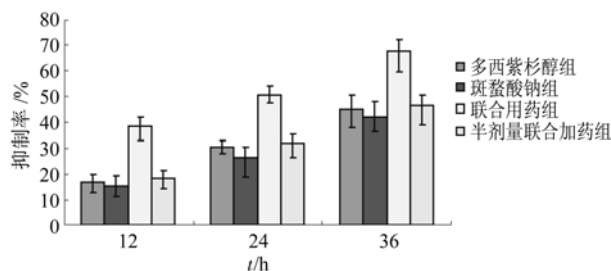


图 1 斑蝥酸钠及多西紫杉醇对人肺腺癌 A_{549} 细胞增殖的抑制

Fig 1 The inhibiting effects of Docetaxel and Sodium Cantharidinate on A_{549} cells

2.2 Annexin V-FITC/PI 双染法观察细胞凋亡情况

Annexin V-FITC/PI 染色荧光显微镜下观察, 加药组的部分细胞细胞膜被荧光染料着色呈黄绿色, 此为凋亡细胞形态。空白对照组几乎没有凋亡形态细胞, 多西紫杉醇组、斑蝥酸钠组、联合加药组、半剂量联合加药组的凋亡细胞显著增加, 联合加药组最明显。结果见图 2。

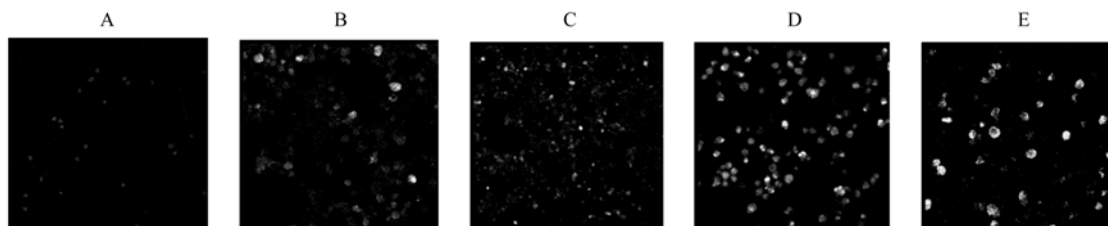


图 2 荧光显微镜观察 A_{549} 细胞形态改变

A-对照组; B-多西紫杉醇组; C-斑蝥酸钠组; D-联合加药组; E-半剂量联合加药组

Fig 2 Morphological changes on A_{549} cells

A-control group; B-Docetaxel group; C-Sodium Cantharidinate group; D-combine group; E-semi-dosage combine group

2.3 FCM 检测结果

在正常细胞中, 磷脂酰丝氨酸只分布在细胞膜脂质双层的内侧, 细胞发生凋亡早期, 膜磷脂酰丝氨酸(PS)由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V 是一种磷脂结合蛋白, 与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力, 可通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。在细胞发生凋亡时, 膜磷脂酰丝氨酸外翻的发生早于细胞核的变化, 而此阶段 Propidium Iodide(PI)不能通过细胞膜。细胞坏死时, 虽然也会发生磷脂酰丝氨酸外翻, 但此时细胞膜的通透性明显增加, PI 等核酸染料进入细胞与细胞核中的核酸结合, 发出红色荧光。所以 Annexin V-FITC 常与核酸染料(如 PI)合并使用, 应用流式细胞仪来区分凋

亡细胞与死亡细胞: Annexin V-FITC-/PI-细胞, 即正常活力细胞; Annexin V-FITC+/PI-细胞, 即凋亡细胞; Annexin V-FITC+/PI+细胞, 即已死亡细胞。

实验中各组细胞经 Annexin V-FITC/PI 染色后上流式细胞仪检测并由计算机进行 DNA 含量和细胞凋亡率分析。多西紫杉醇组、斑蝥酸钠组、联合加药组及半剂量联合加药组均检测到亚二倍体峰。结果见图 3。

各组细胞凋亡率的实验结果显示, 两者联用抑制诱导细胞凋亡作用增强(与单药组比较 P 均 <0.05); 剂量减半联用与多西紫杉醇单药全剂量效果相当($P>0.05$), 与斑蝥酸钠组差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 4。

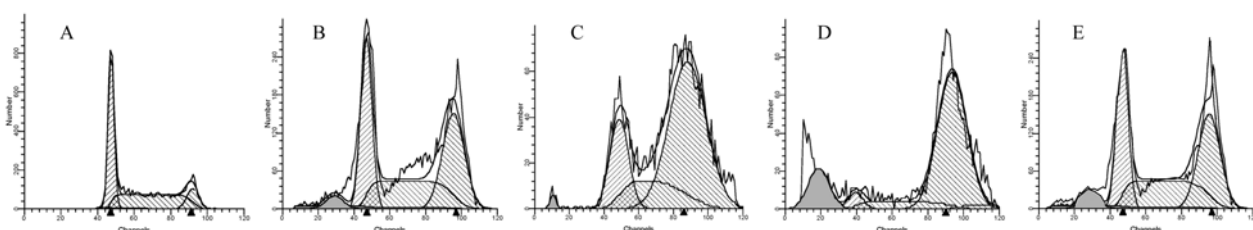


图3 多西紫杉醇联合斑蝥酸钠诱导 A₅₄₉ 细胞凋亡

A-对照组; B-多西紫杉醇组; C-斑蝥酸钠组; D-联合加药组; E-半剂量联合加药组

Fig 3 Apoptosis of A₅₄₉ cells induced by Docetaxel and Sodium Cantharidinate

A-control group; B-Docetaxel group; C-Sodium Cantharidinate group; D-combine group; E-semi-dosage combine group

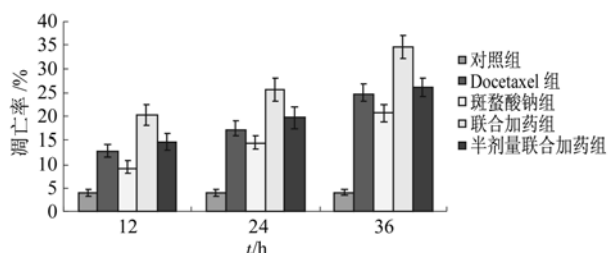


图4 FCM 检测各组细胞凋亡率

Fig 4 Apoptosis of A₅₄₉ cells induced by Docetaxel and Sodium Cantharidinate

2.4 凋亡相关蛋白表达

Western 印迹法检测表明, 诱导 12 h 的多西紫杉醇组、斑蝥酸钠组、联合加药组可见凋亡相关蛋白 Caspase-8 的裂解条带, 而对照组未见明显条带。图像分析发现, 全剂量联合加药组 Caspase-8 吸光度积分值最高, 其次为斑蝥酸钠组, 再为多西紫杉醇组、半剂量联合加药组, 各组间差异有统计学意义($P<0.05$)。结果见图 5 和图 6。

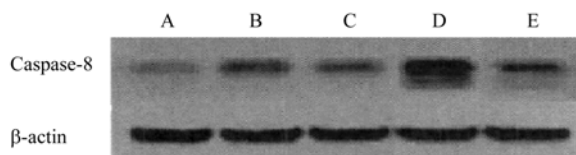


图5 各组凋亡相关蛋白表达(蛋白质印迹法)

A-空白对照组; B-多西紫杉醇组; C-斑蝥酸钠组; D-联合加药组; E-半剂量联合加药组

Fig 5 The effects of Docetaxel and Sodium Cantharidinate on expression of Caspase8

A-control group; B-Docetaxel group; C-Sodium Cantharidinate group; D-combine group; E-semi-dosage combining group

3 讨论

细胞的增殖、分化和凋亡, 保持着正常组织的生长平衡。如果细胞增殖过度或凋亡受抑、死亡不足, 细胞群体内存活与死亡的平衡破坏, 机体不能重新恢复调节, 则表现出生长优势最终形成肿瘤。因此设法诱导肿瘤细胞的凋亡已成为一种新的治疗方向。

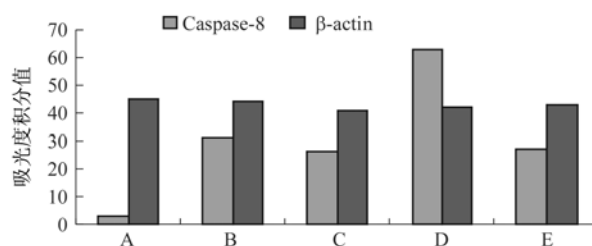


图6 多西紫杉醇及斑蝥酸钠对 A₅₄₉ 细胞 Caspase-8 表达影响

A-对照组; B-多西紫杉醇组; C-斑蝥酸钠组; D-联合加药组; E-半剂量联合加药组

Fig 6 The effects of Docetaxel and Sodium Cantharidinate on expression of Caspase8

A-control group; B-Docetaxel group; C-Sodium Cantharidinate group; D-combine group; E-semi-dosage combining group

细胞凋亡的发生和发展大致有 4 个阶段^[6]: 凋亡信号传导; 凋亡基因激活; 细胞凋亡的执行; 凋亡细胞清除, 细胞凋亡即是在前两个阶段的调控下引起细胞结构的改变而成。目前已知引起细胞凋亡的信号转导通路有: ①死亡因子介导的细胞凋亡; ②神经酰胺介导的细胞凋亡; ③p53 基因触发的细胞凋亡; ④线粒体损伤启动的细胞凋亡。各种通路在凋亡过程中又相互影响。在凋亡执行阶段, Caspases 在破坏细胞骨架结构方面起着关键性作用^[7]。其中 Caspase-8 发挥着极其重要的作用, 在死亡受体介导的细胞凋亡途径中, 他是 Caspase 级联反应关键的启动型 Caspase, 可启动 Caspase 级联反应, 引起细胞凋亡^[8]。还有研究提示, Caspase-8 还能通过细胞内途径影响 bcl-2 蛋白表达, 成为联系细胞内外凋亡途径的桥梁^[9]。

多西紫杉醇是治疗 NSCLC 的常用方案, 可延长 6 周中位生存期, 1 年生存率提高 10%, 研究显示初次治疗失败者应用多西紫杉醇仍能获益^[10]。斑蝥属昆虫纲, 鞘翅目, 为芫青科昆虫南方大斑蝥或黄黑小斑蝥的干燥全虫。斑蝥性味辛寒, 有毒, 具有攻毒蚀疮、破血散结等功效。斑蝥素是斑蝥体

内提取的一种倍半萜类衍生物,它通过减少癌细胞对氨基酸的摄取,抑制蛋白质合成,刺激巨噬细胞、淋巴细胞、多形核细胞产生白细胞介素,从而提高机体免疫力,增强机体对肿瘤细胞的杀伤作用达到治疗目的;对一些疑难杂症有特殊疗效,但是由于斑蝥素的剧烈毒性以及对泌尿系统严重刺激性,限制了其在临床的应用。斑蝥酸钠是斑蝥素与氢氧化钠共热时水解生成,与斑蝥素相比,其毒性、刺激性较小,尤其明显降低了泌尿系统的毒副作用。已有研究表明它能降低肿瘤细胞 cAMP 磷酸二酯酶活性,提高过氧化氢酶活力改善细胞能量代谢,同时降低癌毒素水平,直接抑制癌细胞内 DNA 和 RNA 合成及前体的渗入^[11],杀死肿瘤细胞。斑蝥酸钠可刺激机体内巨噬细胞、淋巴细胞和多核细胞产生白细胞介素,从而提高机体免疫力,增强机体对肿瘤细胞的杀伤作用。研究表明斑蝥酸钠注射液配合放化疗治疗中晚期恶性肿瘤(肺癌、鼻咽癌、乳腺癌、食管癌等),能提高治疗效果,降低放疗毒副作用,改善患者生活质量,具有抗肿瘤和免疫调节双重作用。

本实验表明,多西紫杉醇和斑蝥酸钠均能抑制人肺腺癌细胞 A₅₄₉ 增殖,诱导细胞凋亡,细胞呈现明显凋亡形态,细胞分裂阻滞于 G₂/M 期,流式细胞仪分析显示 G₁ 峰前出现低于二倍体的凋亡峰,两者联用凋亡更明显,表现为相加甚至协同作用。Western 印迹检测可见,多西紫杉醇及斑蝥酸钠作用 A₅₄₉ 细胞后均出现 Caspase-8 裂解带,联合用药组的裂解条带密度最高,提示多西紫杉醇及斑蝥酸钠可能通过 Caspases 途径诱导 A₅₄₉ 细胞凋亡。协同促进 Caspase-8 表达,通过 Caspases 途径诱导 A₅₄₉ 细胞凋亡可能是作用机制之一。已有研究表明,斑蝥酸钠和多西紫杉醇还能使 A₅₄₉ 细胞 Bcl-2 蛋白表达水平下降 Bax 蛋白表达水平升高 Bcl-2/Bax 表达比例下降^[4,12],并抑制凋亡抑制蛋白 Survivin 的表达^[13]。

实验还观察到,多西紫杉醇和斑蝥酸钠在药物浓度均减半联合使用的情况下,对 A₅₄₉ 细胞的增殖抑制率与诱导凋亡率高于或相当于多西紫杉醇单药全剂量。由于多西紫杉醇在临床应用中有骨髓抑制、神经毒性、心血管毒性、肝脏毒性、胃肠道反应、过敏反应、静脉炎等多种不良反应的出现,且不良反应发生率与用药浓度密切相关^[14]。同时因为过度表达 P-糖蛋白(Pgp)也有多药耐药(MDR)

出现。这也提示临床在采用多西紫杉醇单药化疗时,是否可以联合斑蝥酸钠并采用较低的治疗浓度,这样不仅可以大大降低多西紫杉醇不良反应的发生率,特别是严重毒性反应的发生率,还可以降低化疗费用,节省医疗资源。当然,以上推论仅是基于体外研究结果,实际的治疗情况还需要进行大量的更为深入的临床研究。

REFERENCES

- [1] PAN Y Q, YAN W H. Research development of drug-related genes on clinical oncology treatment [J]. Chin J Mod App Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(9): 785-791.
- [2] ZHAO S F, WANG L S. Progress of docetaxel combining with chemotherapy in treatment of non-small cell lung cancer [J]. Chin J Mod App Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(2): 117-121.
- [3] YU T, LIU D W, CHEN Z W. Mechanism and Clinical application of Cantharidin and its derivatives [J]. Life Science Instruments(生命科学仪器), 2009, 8(2): 15-17.
- [4] ZHANG W D, ZHAO H R. Inhibitory action of cantharidin to human lung cancer cell A₅₄₉ [D]. Shenyang: China Pharmaceutical University Surgery, 2005: 16-43.
- [5] LIU Z F, WU Y Y, ZHANG S Y. The Comparison on the Effect and the quality of life about NP chemotherapy with Cantharidin sodium or alone in NSCLC [J]. Int Med Hyg Guid(国际医药卫生导报), 2006, 12(23): 39-40.
- [6] BLANEY S M, BERNSTEIN M, NEVILLE K, et al. Phase I study of the Proteasome inhibitor bortezomib in Pediatric Patients with refractory solid tumors:a Children's Oncology Group study(Al)VL0015 [J]. J Clinoneol, 2004, 22(4): 4804-4809.
- [7] FRIEDLANDER R M. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases [J]. N Engl J Med, 2003, 348(14): 1365-1367.
- [8] PAN G, HUMKE F W, DIXIT V W, et al. Activation of caspases triggered by cytochrome C *in vitro* [J]. FERS Lett, 1998, 426(1): 151-153.
- [9] ASHKENAZI A, DIXIT V M. Death receptor: signaling and modulation [J]. Science, 1998, 281(5381): 1305-1308.
- [10] Sean C Sweetman. Martindale The complete Drug Reference(马丁代尔药物大典) [M]. Vol 35. Beijing: Pharmaceutical Press, 2009: 531.
- [11] AN Z Y, WANG Z, ZHAO Y. The anti-tumor research progress of cantharidin and its derivatives [J]. Asia-Pacific Traditional Medicine(亚太传统医药), 2009, 5(1): 128-130.
- [12] ZHANG Y X, DING W R, XIAO Z K. The Inhibitory effect of Docetaxel on the proliferation of human lung cancer cell A₅₄₉ cells *in vitro* [J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医学院学报), 2009, 21(1): 55-58.
- [13] SHU Y, BAI M, ZHOU Q, et al. Effects of Docetaxel on Apoptosis, Survivin Expression and Caspase-3 Activity of Lung Adenocarcinoma Cell A₅₄₉ [J]. J Med Mol Biol(医学分子生物学杂志), 2005, 2(4): 207-273.
- [14] ZHANG X Y, ZHANG K J, LAI Q, et al. Clinical Drug Reference(药物临床信息参考) [M]. Sichuan: Sichuan Science and Technology Press, 2007: 965-967.

收稿日期: 2011-02-28