

◇ 药学研究 ◇

穿心莲内酯联合平阳霉素对人口腔鳞癌细胞 SCC-9 凋亡的影响

王露露, 吴萌萌, 董静, 徐家根

(南京市口腔医院、南京大学医学院附属口腔医院药学部, 江苏 南京 210008)

摘要:目的 探讨穿心莲内酯是否有增强平阳霉素抗人口腔鳞癌细胞的作用,并探讨其潜在作用机制。方法 MTT 法检测不同浓度的穿心莲内酯与平阳霉素联合应用对人口腔鳞癌细胞 SCC-9 细胞活力的影响,确定最佳的浓度组合;流式细胞术、划痕实验分别检测细胞凋亡率及迁徙能力;蛋白质免疫印迹(Western blot)法分析相应的凋亡机制。结果 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的穿心莲内酯和平阳霉素联合发挥最佳作用,流式细胞术及划痕实验结果显示穿心莲内酯联合平阳霉素的促凋亡作用、抗迁徙能力强于两者单独应用;Western blot 结果显示与单独应用穿心莲内酯和平阳霉素相比,两者联合显著提高了凋亡相关蛋白 BAX、天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、caspase-9 的表达。结论 穿心莲内酯对平阳霉素的促 SCC-9 细胞凋亡作用具有协同效应,并通过 caspase-9 通路发挥促凋亡作用。

关键词:穿心莲内酯;平阳霉素;SCC-9;凋亡;天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶-3

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2018.12.010

Effects of andrographolide and pingyangmycin on apoptosis of human oral squamous cell carcinoma cell line SCC-9

WANG Lulu, WU Mengmeng, DONG Jing, XU Jiagen

(Department of Pharmacy, Nanjing Stomatological Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu 210008, China)

Abstract: Objective To investigate the synergistic antitumor activity of andrographolide (ANDRO) in combination with pingyangmycin (PYM) in OSCC and the enhanced antitumor activity mechanisms. **Methods** The combinatorial effect of ANDRO and PYM on the proliferation of OSCC cell line SCC-9 was evaluated using MTT assays. Scratch wound test was carried out to examine cell migration and flow cytometry was conducted to analyze cell apoptosis. Western blot analysis was used to investigate Bcl-2, Bax and caspase proteins, as well as the expression of Stat3 proteins in SCC-9 cells. **Results** $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ANDRO combined with PYM exerted the best anti-proliferation effect. Flow cytometry and scratches experimental results showed that the pro-apoptotic effect, anti-migration ability of

基金项目:南京药学会-常州四药医院药学科研基金项目(2014YX005)

- [26] IGRESSA A, PECHLIVANIS I, WEBER F, et al. Endoscope-assisted keyhole surgery via an eyebrow incision for removal of large meningiomas of the anterior and middle cranial fossa [J]. Clinical Neurology and Neurosurgery, 2015, 129(4): 27-33.
- [27] YU LH, YAO PS, ZHENG SF, et al. Retractorless surgery for anterior circulation aneurysms via pterional keyhole approach [J]. World Neurosurgery, 2015, 84(6): 1779-1784.
- [28] 闫伟, 牟朝晖, 吴盛, 等. 经翼点小骨窗入路治疗前循环颅内动脉瘤患者临床疗效分析 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2015, 44(4): 366-370.
- [29] AHN JY, KIM ST, YI K C, et al. Superficial Temporal Artery-Sparing Mini-Pterional Approach for Cerebral Aneurysm Surgery [J]. Journal of Korean Neurosurgical Society, 2017, 60(1): 8-14.
- [30] LIU XG, AI-MIN LI, SUN Y, et al. Lateral orbital keyhole approach for microsurgical treatment of ruptured tiny anterior communicating aneurysms [J]. Journal of Brain & Nervous Diseases, 2016, 24(2): 70-75.
- [31] 孙勇, 李爱民, 刘希光, 等. 眶外侧锁孔入路夹闭破裂的微小动脉瘤临床分析 [J]. 中国综合临床, 2015, 31(10): 941-944.
- [32] 张洪伟, 孙勇, 李爱民等. 眶外侧锁孔入路治疗低分级前交通动脉瘤 [J]. 中国微创外科杂志, 2016, 16(4): 347-350.
- [33] MASUDA M, FUKUSHIMA J, FUJIMURA A, et al. Combined trans-cervical and orbitozygomatic approach for the removal of a nasopharyngeal adenocarcinoma [J]. Auris Nasus Larynx, 2016, 43(2): 192-196.
- [34] YOUSSEF AS, WILLARD L, DOWNES A, et al. The frontotemporal-orbitozygomatic approach: reconstructive technique and outcome [J]. Acta Neurochir, 2012, 154(7): 1275-1583.

(收稿日期: 2017-05-23, 修回日期: 2017-07-19)

ANDRO/PYM combination were stronger than the two groups alone. Western blot showed that ANDRO/PYM combination significantly increased the expression of Bax, caspase-3 and caspase-9 compared with either agent alone. **Conclusions** Our results indicated ANDRO enhances the antitumor effect of PYM through caspase-9-dependent mitochondrial pathways.

Key words: Andrographolide; Pingyangmycin; SCC-9; Apoptosis; Caspase

口腔鳞状细胞癌(OSCC)是口腔癌最常见的病理类型,预后较差。尽管治疗进展,OSCC患者的五年生存率在过去10年只有约50%^[1]。OSCC的主要治疗方法是手术切除、放疗和化疗,作为手术前后的辅助治疗,可以抑制OSCC的转移和复发^[2]。平阳霉素(PYM),从我国平阳县土壤中的微生物链霉菌产生的博来霉素的单一A5组分,临床上已用于治疗各种类型的癌症,如头颈部鳞状细胞癌,皮肤癌和肺癌^[3]。PYM的主要细胞毒作用为结合铁和直接损伤DNA的能力^[4]。然而,PYM的化学耐药性已经成为其治疗OSCC的主要障碍。因此,迫切需要为OSCC治疗找到新的更有效的用药方案。穿心莲内酯(ANDRO)是从草本穿心莲属分离得到的双环二萜内酯。最近的研究报道称ANDRO在多种人类癌细胞中发挥抗肿瘤作用^[5-9],并可增强常规化疗药的抗肿瘤作用。然而,ANDRO和PYM组合用于治疗OSCC尚未有报道。本研究旨在评估ANDRO联合PYM在体外对人类OSCC细胞凋亡的影响,并探讨相关的分子机制。

1 材料和方法

1.1 试剂和抗体 ANDRO购自Sigma-Aldrich公司;PYM购自哈尔滨博莱通制药有限公司;天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)、caspase-8及caspase-9一抗购自武汉Proteintech公司;Bcl-2, Bax购自Cell Signaling公司;山羊抗兔和兔抗小鼠IgG辣根过氧化物酶(HRP)二抗, GADPH一抗购自Santa Cruz公司。MTT试剂盒购自碧云天生物技术有限公司。本研究起止时间为2015年1月至2017年4月。

1.2 细胞培养 SCC-9人口腔鳞癌细胞株从美国菌种保藏中心(ATCC)获得,常规培养于含有10%胎牛血清(浙江四季青)的DMEM/F-12(Invitrogen公司)中,放置在保持37℃的含5%二氧化碳细胞培养箱中。

1.3 细胞活力测定 通过MTT法测定细胞活力。将细胞以每孔 10^4 个细胞的密度接种到96孔板中。细胞贴壁后,用含有 $0.5\text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT的200 mL新鲜DMEM/F-12培养基替换常规培养基,并在37℃环境下孵育4 h。弃去培养基后,将紫色甲臞结晶在37℃下溶于200 mL二甲亚砜(DMSO)中10 min。在酶标仪上用490 nm波长测量吸光度。

1.4 划痕试验 细胞以 5×10^5 个细胞/孔的密度

接种于6孔板中。使用200 μL 移液管做划痕,PBS冲洗3次去除刮除细胞。处理及培养24 h后在LEICA显微镜中对细胞进行拍照,用LEICA LASV4.2软件处理细胞图像。

1.5 流式细胞术分析 将SCC-9细胞接种在6孔板中,贴壁生长后药物处理24 h。收集悬浮细胞和贴壁细胞。将细胞重悬于500 μL 缓冲液中。随后加入5 μL Annexin V和5 μL PI,室温下黑暗处孵育15 min。最后,在1 h内通过流式细胞术分析细胞凋亡。

1.6 蛋白质免疫印迹(Western blot)分析 细胞用PBS冲洗2次,然后用含有PMSF的RIPA裂解物裂解30 min。将细胞裂解物在4℃下以12 000 g离心10 min,收集上清液并储存在-80℃冰箱里直至使用。在SDS-PAGE胶上加等量的蛋白质(50 μg),蛋白分离后转移到PVDF膜上。在室温下用含5%脱脂奶粉的TBST溶液将膜封闭2 h,4℃下与一抗孵育过夜。随后将膜与HRP缀合的抗兔或抗小鼠IgG抗体室温孵育2 h。ECL发光液显示条带,并由Kodak Molecular Imaging软件对条带定量分析。

1.7 统计学方法 实验数据表示为 $\bar{x} \pm s$,运用SPSS 21.0统计软件进行单因素方差分析和 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ANDRO增强PYM对人OSCC细胞的抗增殖作用 近年的研究已经证实ANDRO和PYM单独应用都表现出了一定的抗肿瘤活性。本次实验中,我们用MTT法检测了不同浓度的ANDRO和 $5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的PYM在不同时间点单独或联合应用对SCC-9细胞增殖的影响。结果显示在不同浓度的ANDRO和 $5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PYM作用下SCC-9细胞的生长受到了显著的抑制,并呈现出时间和剂量依赖性。此外,用不同剂量的ANDRO和PYM组合对人OSCC细胞的增殖的影响显著高于ANDRO或PYM单独应用。所有浓度组的ANDRO与PYM联合对SCC-9细胞均具有显著的协同抗增殖作用(图1),特别是 $50\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ANDRO和 $5\text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PYM的剂量组合,细胞增殖的抑制率为 $29.00\% \pm 4.32\%$,而相同剂量的PYM和ANDRO单独显示抑制率分别为 $14.66\% \pm 2.05\%$ 和 $18.33\% \pm 3.68\%$

(图2)。由于 ANDRO (50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 PYM (5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的组合具有最佳的抑制细胞增殖协同能力,随后所有的实验将选择这一剂量组合。

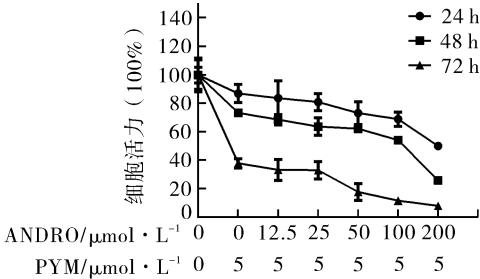


图1 穿心莲内脂联合平阳霉素对 SCC-9 细胞的抗增殖作用

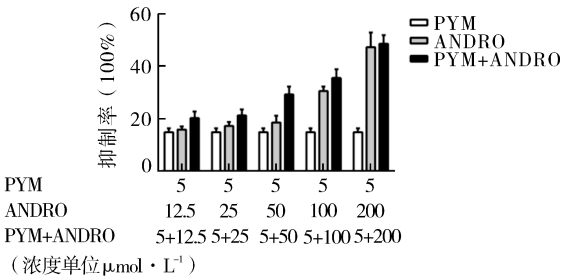


图2 穿心莲内脂联合平阳霉素对 SCC-9 细胞的生长抑制作用

划痕试验结果显示在 ANDRO、PYM 或两者联合作用 24 h 后,SCC-9 细胞的迁徙能力同样受到了显著抑制(表1)。这些与 MTT 结果一致的数据表明,ANDRO 对 PYM 的抗 SCC-9 细胞增殖、迁徙作用具有协同效应。

表1 各组细胞凋亡率及迁徙能力的测定结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	株数	凋亡率/%	划痕宽度/ μm
对照组	3	3.42 $\pm$ 0.41	36.73 $\pm$ 3.38
PYM	3	14.72 $\pm$ 0.85 ^a	63.30 $\pm$ 3.84 ^a
ANDRO	3	18.57 $\pm$ 0.86 ^a	79.00 $\pm$ 4.54 ^a
PYM + ANDRO	3	31.32 $\pm$ 0.62 ^b	91.33 $\pm$ 5.79 ^b

注:与对照组相比,^a $P < 0.01$;与 PYM 或 ANDRO 组相比,^b $P < 0.01$

2.2 ANDRO 增强 PYM 诱导的 SCC-9 细胞凋亡

为了确定 ANDRO 对 SCC-9 细胞凋亡的敏感性,并检测 ANDRO 是否可以增加 PYM 诱导的 SCC-9 细胞凋亡,我们通过 AnnexinV-FITC 和 PI 双染色的流式细胞术来定量凋亡细胞。结果表明用 PYM 或 ANDRO 处理 24 h 后,细胞凋亡率分别为 14.72% $\pm$

0.85%,18.57% $\pm$ 0.86%,PYM 和 ANDRO 均可诱导 SCC-9 细胞产生一定的凋亡,而 PYM 和 ANDRO 联合诱导的凋亡细胞率显著高于二者单独应用 (31.32% $\pm$ 0.62%),见表1。

2.3 ANDRO / PYM 联合改变了 BAX、Bcl-2 蛋白的表达 Western blot 用于检测凋亡相关蛋白 BAX、Bcl-2 的表达。结果表明在 PYM、ANDRO 或两者联合处理 24 h 后,Bcl-2 蛋白的表达均呈现了不同程度的降低,而 Bax 的表达则有不同程度的升高。与单一应用 ANDRO 或 PYM 相比,二者联合应用后细胞中 Bcl-2 蛋白表达显著降低,而 Bax 表达显著升高(图3,表2)。

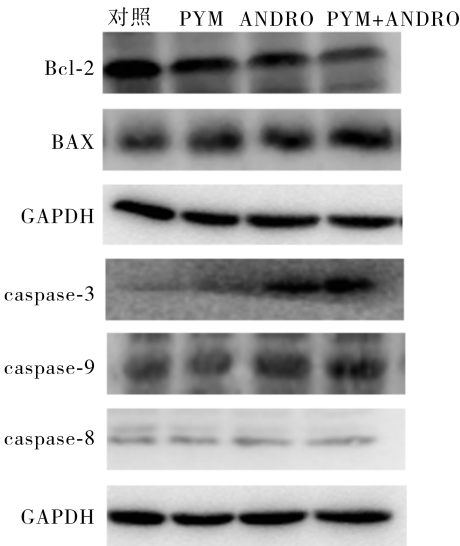


图3 各组细胞中凋亡相关蛋白的表达

2.4 ANDRO/PYM 联合激活了 caspase 凋亡途径中相关蛋白的活性 为了进一步确定诱导细胞凋亡的相关分子机制,我们检测了 caspase 相关蛋白的表达。如图3所示,与对照组相比,ANDRO/PYM 联合处理 24 h 后,SCC-9 细胞中 caspase-9、caspase-3 被激活。与单一应用 ANDRO 或 PYM 相比,caspase-9、caspase-3 的活性显著增强。然而,caspase-8 的表达在四组中几乎没有变化(表2)。以上结果表明,caspase-9 依赖的内源性线粒体途径参与了 ANDRO / PYM 诱导的 SCC-9 细胞凋亡。

表2 各组细胞中凋亡相关蛋白表达的测定结果/ $\bar{x} \pm s$

组别	株数	Bcl-2/GAPDH	BAX/GAPDH	caspase-3/GAPDH	caspase-9/GAPDH	caspase-8/GAPDH
对照组	3	1.01 $\pm$ 0.02	1.01 $\pm$ 0.01	0.99 $\pm$ 0.02	1.00 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.02
PYM	3	0.85 $\pm$ 0.05 ^b	1.15 $\pm$ 0.07 ^a	1.03 $\pm$ 0.10	1.23 $\pm$ 0.16 ^a	0.93 $\pm$ 0.11
ANDRO	3	0.68 $\pm$ 0.11 ^b	1.32 $\pm$ 0.13 ^b	1.66 $\pm$ 0.09 ^b	1.43 $\pm$ 0.09 ^b	1.00 $\pm$ 0.02
PYM + ANDRO	3	0.49 $\pm$ 0.09 ^d	1.81 $\pm$ 0.12 ^d	1.93 $\pm$ 0.07 ^c	1.78 $\pm$ 0.08 ^d	1.05 $\pm$ 0.03

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 PYM 或 ANDRO 组相比,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

3 讨论

与单药治疗癌症相比,联合用药具有延缓耐药性、降低毒副作用、提高治疗效果的优点。最近研究表明,ANDRO,一种二萜类内酯,具有抗炎、免疫调节和抗菌等多种生物活性^[10],已被用于治疗炎症、流感、腹泻等感染^[11]。同时,ANDRO 对多种人类癌细胞有显著的抑制增殖作用,ANDRO 联合常规化疗药物在人结肠癌细胞、卵巢癌^[12]、HeLa 和 HepG2 细胞^[13]中具有协同抗肿瘤作用。然而,关于 ANDRO 对 PYM 在人类 OSCC 细胞中的疗效的影响了解甚少。在本研究中,我们证实了 ANDRO 与 PYM 联合激活了 caspase-9 及下游的 caspase-3 活性,表明两者联合可以通过 caspase-9 依赖的内源性线粒体途径显著抑制人类 OSCC 细胞 SCC-9 的增殖,促进了细胞凋亡。我们的研究表明:(1) ANDRO 抑制 SCC-9 的生长,并增强了 PYM 对 SCC-9 细胞的毒性作用;(2) ANDRO / PYM 联合对诱导 SCC-9 细胞的凋亡具有协同效应;(3) ANDRO/PYM 可通过 caspase-9 依赖的线粒体途径诱导 SCC-9 细胞的凋亡。

迄今为止,已知存在两种主要的凋亡途径:一种是 caspase-8 激活的外源性途径,另一种是 caspase-9 激活的内在途径。内在的线粒体途径包括通过激活不同底物诱导细胞凋亡^[14]。外源信号通路涉及死亡受体介导的相互作用,衔接蛋白 FADD 的募集及与 caspase-8 相关联以形成死亡诱导信号传导复合物(DISC)。活化的 caspase-8 直接激活 caspase-3,随后激活 PARP 蛋白。内在的线粒体途径通常涉及线粒体跨膜电位的丧失和细胞色素 C 从膜间隙释放到胞质溶胶中。细胞色素 C 进而激活 Apaf-1 以及 caspase-9,形成凋亡抑制因子,导致 caspase-9 的活化,从而激活 caspase-3^[15]。在我们的研究中,我们用 MTT、划痕试验证实了 ANDRO 可增强 PYM 抑制 SCC-9 细胞增殖的能力。此外,我们的研究结果表明,ANDRO 与 PYM 的联合以协同方式诱导 SCC-9 细胞凋亡,与 Bax 的上调、Bcl-2 的下调及 caspase 9, caspase 3 和 PARP 的活化相关。然而,四组中 caspase-8 的表达没有显著差异。

总之,我们的研究数据表明,ANDRO 可通过 caspase-9 介导的内源性线粒体凋亡途径,增强 PYM 在体外抑制 OSCC 细胞的增殖,促进 OSCC 细胞的凋亡。因此,ANDRO 和 PYM 的联合治疗可能成为 OSCC 治疗的新方法。下一步需进行动物实验来验证体外实验的结果。

参考文献

- [1] POSNER M, VERMORKEN JB. Induction therapy in the modern era of combined-modality therapy for locally advanced head and neck cancer[J]. *Seminars in Oncology*, 2008, 35(3): 221-228.
- [2] SIEGEL R, NAISHADHAM D, JEMAL A. Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(5): 283-298.
- [3] GONG JH, LIU XJ, LI Y, et al. Pingyangmycin downregulates the expression of EGFR and enhances the effects of cetuximab on esophageal cancer cells and the xenograft in athymic mice[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2012, 69(5): 1323-1232.
- [4] CHEN J, STUBBE J. Bleomycins: towards better therapeutics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2005, 5(2): 102-112.
- [5] CHUN JY, TUMMALA R, NADIMINTY N, et al. Andrographolide, an herbal medicine, inhibits interleukin-6 expression and suppresses prostate cancer cell growth[J]. *Genes Cancer*, 2010, 1(8): 868-876.
- [6] LI J, ZHANG C, JIANG H, CHENG J, et al. Andrographolide inhibits hypoxia-inducible factor-1 through phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway and suppresses breast cancer growth[J]. *Onco Targets Ther*, 2015, 8: 427-435.
- [7] LIN HH, SHI MD, TSENG HC, et al. Andrographolide sensitizes the cytotoxicity of human colorectal carcinoma cells toward cisplatin via enhancing apoptosis pathways in vitro and in vivo[J]. *Toxicol Sci*, 2014, 139(1): 108-120.
- [8] PRATHEESHKUMAR P, SHEEJA K, KUTTAN G. Andrographolide induces apoptosis in B16F-10 melanoma cells by inhibiting NF-kappaB-mediated bcl-2 activation and modulating p53-induced caspase-3 gene expression[J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2012, 34(1): 143-151.
- [9] ZHANG QQ, DING Y, LEI Y, et al. Andrographolide suppress tumor growth by inhibiting TLR4/NF-kappaB signaling activation in insulinoma[J]. *Int J Biol Sci*, 2014, 10(4): 404-414.
- [10] IRURETAGOYENA MI, TOBAR JA, GONZALEZ PA, et al. Andrographolide interferes with T cell activation and reduces experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2005, 312(1): 366-372.
- [11] LIM JC, CHAN TK, NG DS, et al. Andrographolide and its analogues: versatile bioactive molecules for combating inflammation and cancer[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(3): 300-310.
- [12] YUNOS NM, MUTALIP SS, JAURI MH, et al. Anti-proliferative and pro-apoptotic effects from sequenced combinations of andrographolide and cisplatin on ovarian cancer cell lines[J]. *Anti-cancer Res*, 2013, 33(10): 4365-4371.
- [13] ZHOU J, ONG CN, HUR GM, et al. Inhibition of the JAK-STAT3 pathway by andrographolide enhances chemosensitivity of cancer cells to doxorubicin[J]. *Biochem Pharmacol*, 2010, 79(9): 1242-1250.
- [14] GHAVAMI S, HASHEMI M, ANDE SR, et al. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes[J]. *J Med Genet*, 2009, 46(8): 497-510.
- [15] HILL MM, ADRAIN C, DURIEZ PJ, et al. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes[J]. *EMBO J*, 2004, 23(10): 2134-2145.

(收稿日期: 2017-05-23, 修回日期: 2017-08-11)