

β -榄香烯对人食管癌细胞 Eca-109 增殖、凋亡和迁移的影响

陈晓华¹, 蔡思娜², 张晓娜³, 李宝霞⁴, 曹小龙¹

(1. 广州市番禺区中心医院肿瘤科 番禺区肿瘤研究所, 广东 广州 511400;

2. 广州南方医科大学第三附属医院肿瘤科, 广东 广州 510500;

3. 中山大学附属第六医院, 广东 广州 510655;

4. 华南肿瘤研究所 中山大学附属肿瘤医院, 广东 广州 510600)

【摘要】 目的 检测 β -榄香烯对人食管鳞癌细胞 Eca-109 增殖、凋亡和迁移的影响, 初步探讨其对食管癌细胞的作用机制。方法 采用不同浓度的 β -榄香烯(终浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ 、20 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 、600 $\mu\text{g/mL}$) 作用于 Eca-109 细胞后, CCK-8 测定细胞增殖活力。同时采用 Annexin V/PI 双染法(β -榄香烯作用浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、10 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$) 检测细胞的凋亡率(流式细胞仪)。此外, 采用 β -榄香烯(0 $\mu\text{g/mL}$ 、100 $\mu\text{g/mL}$) 作用细胞后, 检测其对细胞迁移的影响(β -榄香烯浓度为 0 $\mu\text{g/mL}$ 组作为对照组)。结果 β -榄香烯孵育 48 h 后对食管癌细胞增殖抑制在不同浓度之间比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$), 同时, 随着浓度增加, β -榄香烯对细胞的增殖抑制进一步增强, 且其抑制作用存在剂量依赖性; 不同浓度 β -榄香烯对细胞的凋亡率间比较, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 相对于对照组, β -榄香烯显著降低迁移细胞数, 两者间差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。结论 β -榄香烯显著抑制了 Eca-109 细胞的增殖活力, 且其抑制存在剂量依赖性, 同时可诱导凋亡及抑制细胞迁移, 可能通过诱导细胞凋亡及抑制迁移发挥其抗肿瘤效应。

【关键词】 食管癌; β -榄香烯; 增殖抑制; 凋亡; 迁移**【中图分类号】** R735.1 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)08-1037-04

Effect of β -elemene on proliferation, apoptosis and migration in human esophageal carcinoma cell Eca-109.

CHEN Xiao-hua¹, CAI Si-na², ZHANG Xiao-na³, LI Bao-xia⁴, CAO Xiao-long¹. 1. Department of Oncology, Guangzhou Panyu Central Hospital, Cancer Institute of Panyu, Guangzhou 511400, Guangdong 511400, CHINA; 2. Department of Oncology, the Third Affiliated Hospital of Southern Medical University, Guangzhou 510630, Guangdong, CHINA; 3. the Sixth Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510655, Guangdong, CHINA; 4. State Laboratory of Oncology in South China, Cancer Center of Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510060, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the effect of β -elemene on the proliferation, apoptosis and migration of human esophageal squamous carcinoma cell Eca-109, and to explore its mechanism of anti-tumor effect. **Methods** Eca-109 cells were incubated with different concentrations of β -elemene (final concentration to 0 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$, 400 $\mu\text{g/mL}$, 600 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h, then cholecystokinin octapeptide (CCK-8) assay was used to detect the cell proliferation activity. For the apoptosis detection, Annexin-V/PI assay was used and the cells were detected on the flow cytometry before incubation with different concentrations of β -elemene (final concentration to 0 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$). While for the migration activity detection, the concentration of 0 $\mu\text{g/mL}$ and 100 $\mu\text{g/mL}$ of β -elemene were set as the control and experimental group respectively. **Results** After the incubation of 48 h for β -elemene, the inhibition of cell proliferation were significant different among different concentrations of β -elemene ($P < 0.05$). Meantime, with the increase of concentration, the inhibition of cell proliferation was further enhanced by β -elemene, and its inhibitory effect was dose-dependent. The cell apoptosis were significant different among different concentrations of β -elemene ($P < 0.05$). Compared with the control group, β -elemene significantly reduced the number of migratory cells ($P < 0.05$). **Conclusion** The proliferation of cell line of Eca-109 can be inhibited by β -elemene and the inhibited rate is dose-dependent. β -elemene may make its anti-tumor effect through inducing the cell apoptosis and migration.

【Key words】 Esophageal carcinoma; β -elemene; Proliferation inhibition; Apoptosis; Migration

食管癌为全世界常见的消化道恶性肿瘤之一, 而我国是全球食管癌发病率最高的国家, 同时, 我国也是全世界死亡率最高的国家之一。这些患者中, 约

90% 的病理类型为鳞癌^[1-2]。 β -榄香烯(β -elemene)是一种抗癌提取物, 其有效成分主要从温郁金(温莪术)(属于姜科植物)的根茎中提取。研究表明, β -榄香烯

基金项目: 广东省中医药局基金项目(编号: 20161186); 广东省番禺区珠江科技新星专项资助项目(编号: 2013-专 15-6.10)

通讯作者: 陈晓华。E-mail: cxh0663@126.com

可通过诱导肿瘤细胞凋亡、分化、抗肿瘤转移、逆转肿瘤细胞耐药性、降低肿瘤微血管密度等方面发挥其抗肿瘤效应^[3-8]。目前榄香烯已广泛应用于临床,研究结果表明,榄香烯可抑制多种实体肿瘤细胞的生长及增殖,同时对抗肿瘤转移具备一定的作用,具有良好的应用前景。但在食管癌方面的报道较少。因此,本项目采用 β -榄香烯(不同浓度)作用于食管鳞癌细胞 Eca-109,通过 CCK-8、Annexin V/PI 双染等方法检测其对细胞增殖、凋亡、迁移的影响,以期初步探讨其抗肿瘤作用机制,并为下一步作用机制的深入研究提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 CO₂培养箱(购自美国赛默飞公司),1640 培养基、胎牛血清(南美)、0.25%胰蛋白酶(均购自美国英韦创津 Gibco 公司),培养瓶、细胞培养六孔板、Transwell 小孔(购自美国 Corning 公司),超净工作台(购自中国海尔公司),台式低温高速离心机(购自美国贝克曼库尔特公司),CCK-8 试剂盒(购自日本同仁),Annexin V/PI 凋亡试剂盒(购自四正柏公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养条件 Eca-109 细胞培养采用 1640 培养基并加入 10%胎牛血清培养,放置于 37℃ 恒温孵育箱(5% CO₂)。

1.2.2 细胞增殖抑制实验 Eca-109 细胞传代后,调整细胞浓度为(2~3)×10⁴/mL,并按 100 μ L/孔的密度接种于 96 孔板,培养 24 h 后去除培养液,加入不同浓度 β -榄香烯(使其终浓度分别为 0 μ g/mL、1 μ g/mL、20 μ g/mL、100 μ g/mL、200 μ g/mL、400 μ g/mL、600 μ g/mL),并继续于孵箱中培养 48 h 后,每孔加入 CCK-8 10 μ L,继续孵育 2 h 后在酶标仪上检测各孔的 OD 值(检测波长采用 450 nm),并计算细胞存活率。细胞存活率=(实验组 A₄₅₀ OD 值-本底组 A₄₅₀ OD 值)/(空白对照组 A₄₅₀ OD 值-本底组 A₄₅₀ OD 值)。

1.2.3 细胞凋亡实验 细胞传代后调整细胞浓度为 1×10⁴/mL,并按 1 mL/孔的密度接种于六孔板,继续培养 24 h 后去除培养液,同时加入 β -榄香烯,使其终浓度分别为 0 μ g/mL、10 μ g/mL、100 μ g/mL,继续孵育 48 h 后收集细胞约 5×10⁵个,冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次后用 100 μ L Binding buffer 重悬后分别加入 5 μ L AnnexinV-FITC 和 5 μ L PI 于室温避光培养 10 min,在流式细胞仪上检测细胞各时项的凋亡率(检测波长采用激发波长 488 nm,发射波长 530 nm)。

1.2.4 细胞迁移实验 Eca-109 细胞消化后调整细胞浓度为 1×10⁴/mL,并按 1 mL/孔的密度接种于六孔板,培养 24 h 后去除培养液,加入 β -elemene,调整其终浓度分别为(0 μ g/mL、100 μ g/mL)(浓度 0 μ g/mL 组作为对照组,100 μ g/mL 组作为实验组),孵育 48 h,进

行离心收集,重悬细胞(用含 1%小牛血清的培养基),并进行细胞计数,调整细胞的浓度(每孔种细胞约 1×10⁵个),将细胞均匀布满在细胞滤膜上。下室加入培养基(10%血清),继续培养 24 h 后,采用 1%的结晶紫进行细胞染色 2 min,PBS 液漂洗 2~3 遍。使用棉签轻轻擦去细胞滤膜上室表面的细胞。风干小室后,在光学显微镜下计数滤膜下细胞数并进行细胞成像,保证每个细胞小室的成像不低于 10 个细胞每个视野。

1.3 统计学方法 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据统计处理,计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,不同浓度的组间差异采用 One-way ANOVA 分析,其中两两比较采用 LSD(方差齐时)或 Dunnett's T3(方差不齐时)。两个不同组间的差异采用独立样本 *t* 检验进行分析。以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 β -榄香烯对食管癌细胞 Eca-109 的增殖抑制 不同浓度 β -榄香烯作用食管癌细胞 Eca-109 48 h 后,对细胞增殖抑制在不同作用浓度之间存在显著差异(*F*=22.282,*P*=0.000),差异有显著统计学意义,同时随着浓度增加, β -榄香烯对细胞增殖抑制作用增强,其作用呈剂量依赖性,见图 1。

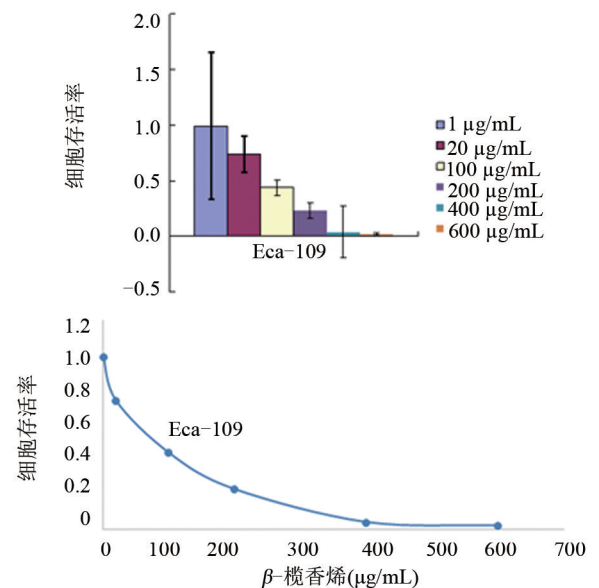


图 1 不同浓度 β -榄香烯作用于食管癌细胞 Eca-109 的存活率

2.2 β -榄香烯对食管癌细胞 Eca-109 凋亡的影响 不同浓度 β -榄香烯作用于食管癌细胞 Eca-109 后,细胞凋亡率比较差异有统计学意义(*F*=10.058,*P*=0.012),并可见高浓度组(100 μ g/mL)以晚期凋亡为主。100 μ g/mL 组与对照组比较差异具有统计学意义(*P*<0.05),见图 2。

2.3 β -榄香烯对食管癌细胞 Eca-109 迁移的影响 β -榄香烯可显著抑制食管癌细胞 Eca-109 的迁移,差异有统计学意义(*P*<0.05),见图 3。

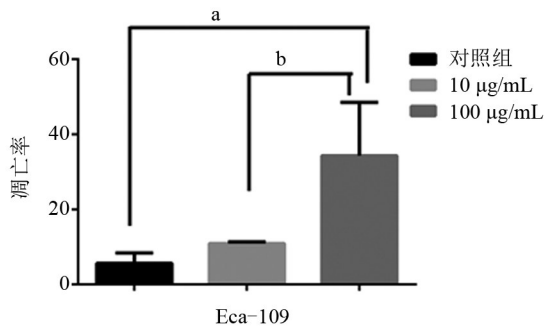


图2 不同浓度 β -榄香烯作用于食管癌细胞Eca-109的凋亡率

注:a,浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 组与对照组凋亡率比较差异有统计学意义($P < 0.05$);b,浓度10 $\mu\text{g/mL}$ 与浓度100 $\mu\text{g/mL}$ 凋亡率比较差异亦有统计学意义($P < 0.05$)。

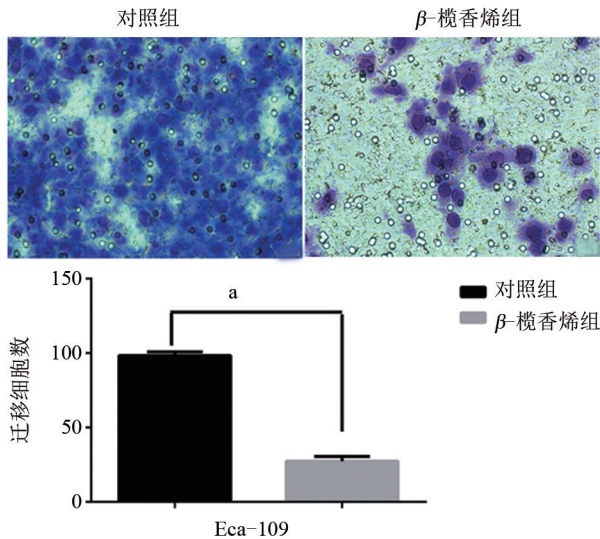


图3 β -榄香烯对食管癌细胞Eca-109迁移的影响($\times 200$)

注:a,对照组比较, β -榄香烯组细胞迁移数显著减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

β -榄香烯是一种抗癌的提纯物,其有效成分主要从温郁金(温莪术)(姜科植物)的根茎中提取,其提取物是一种混合物,含有 β -、 δ -和 γ -榄香烯,而在3种亚型中 β -榄香烯占60%~72%。既往研究表明, β -榄香烯可通过诱导肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤细胞分化,抗肿瘤转移,降低肿瘤的微血管密度以及逆转肿瘤细胞耐药性等方面发挥其抗肿瘤效应^[9-13],在多种实体瘤如肝癌、乳腺癌、胰腺癌、食管癌中显示了一定的抗肿瘤效应^[14-16]。

研究表明, β -榄香烯对多种实体瘤存在抗肿瘤效应,可通过抑制肿瘤细胞的生长及增殖、抗肿瘤转移等发挥效应,具有良好的应用前景。而 β -榄香烯的抗肿瘤效应可通过影响凋亡及相关信号分子、转移相关信号分子等而调控凋亡、转移。研究发现, β -榄香烯作用于Panc-1细胞后可通过抑制细胞增殖及诱导细胞凋亡,通过激活死亡受体途径及线粒体凋亡途径发挥抗肿瘤作用^[15]。宋颖等^[5]研究则发现, β -榄香烯通过阻滞内皮细胞从G1期进入S期从而抑制细胞增殖,同时可降低细胞形成血管腔的能力。李悦^[4]则发现, β -榄香烯作用于血管内皮细胞后,也可抑制细胞的增殖

和凋亡以及形成血管的能力,同时可抑制MMP-2和MMP-9的活性。Zhao等^[17]则发现, β -榄香烯可抑制RAS通路上的Hsp90/Raf-1复合体而影响恶性胶质瘤的凋亡。Yu等^[18]发现, β -榄香烯可通过P53通路影响肝癌细胞的凋亡和细胞周期。

本研究结果亦显示,不同浓度 β -榄香烯作用细胞48 h后均对细胞Eca-109增殖存在抑制作用,不同浓度之间细胞存活率差异有统计学意义($P < 0.05$);同时,随着作用浓度增加, β -榄香烯对细胞增殖抑制作用增强,且呈剂量依赖性。 β -榄香烯作用于食管癌细胞Eca-109后可诱导细胞凋亡,且不同浓度之间凋亡率差异有统计学意义($P < 0.05$)。同时,迁移实验结果显示, β -榄香烯可显著抑制Eca-109的迁移,与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。从上述实验结果中可以推测, β -榄香烯对食管癌细胞的抗肿瘤机制可能是通过影响细胞凋亡及迁移来发挥作用的。

综上所述, β -榄香烯可显著抑制Eca-109细胞的增殖,并可影响细胞凋亡及迁移。本实验为明确 β -榄香烯对食管癌细胞的抗肿瘤作用提供了一定的依据,并后续作用机制的深入研究提供了一定的基础。

参考文献

- [1] Kim JY, Nelson RA, Kim J, et al. How well does pathologic stage predict survival for esophageal adenocarcinoma after neoadjuvant therapy? [J]. J Thorac Dis, 2015, 7(4): 734-739.
- [2] Wang CC, Cheng JC, Tsai CL, et al. Pathological stage after neoadjuvant chemoradiation and esophagectomy superiorly predicts survival in patients with esophageal squamous cell carcinoma [J]. Radiother Oncol, 2015, 115(1): 9-15.
- [3] 孟晓. β -榄香烯对大鼠骨髓来源内皮祖细胞分化及分化过程中Notch信号通路的影响(学位论文)[D]. 中国医科大学, 2010: 4.
- [4] 李悦. β -榄香烯对血管内皮细胞增殖、凋亡、成血管能力及MMP-2、MMP-9活性的影响(学位论文)[D]. 中国医科大学, 2010: 5.
- [5] 宋颖, 孟晓, 杨向红, 等. β -榄香烯对肿瘤细胞上清液诱导的大鼠骨髓来源的内皮祖细胞增殖管腔形成能力及细胞周期的影响[J]. 重庆医学, 2012, 41(6): 537-539.
- [6] Jiang S, Ling C, Li W, et al. Molecular mechanisms of anti-cancer activities of β -elemene: Targeting Hallmarks of Cancer [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2016, 16(11): 1426-1434.
- [7] Lu JJ, Dang YY, Huang M, et al. Anti-cancer properties of terpenoids isolated from Rhizoma Curcumae—a review [J]. J Ethnopharmacol, 2012, 143(2): 406-411.
- [8] Tan W, Lu J, Huang M, et al. Anti-cancer natural products isolated from Chinese medicinal herbs [J]. Chin Med, 2011, 6(1): 27.
- [9] 郭建忠, 魏尧, 谷如雷, 等. β -榄香烯诱导血管内皮细胞凋亡的研究[J]. 中国医药与临床, 2016, 16(8): 1127-1129.
- [10] Shi H, Liu L, Liu L, et al. β -Elemene inhibits the metastasis of B16F10 melanoma cells by downregulation of the expression of uPA, uPAR, MMP-2, and MMP-9 [J]. Melanoma Res, 2014, 24(2): 99-107.
- [11] Zhang X, Zhang Y, Li Y. β -elemene decreases cell invasion by upregulating E-cadherin expression in MCF-7 human breast cancer cells [J]. Oncol Rep, 2013, 30(2): 745-750.
- [12] Zhang X, Li Y, Zhang Y, et al. Beta-elemene blocks epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cell line MCF-7 through Smad3-mediated down-regulation of nuclear transcription factors [J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58719.

趋化素上调 p38 MAPK 磷酸化水平 促进 ApoE^{-/-}小鼠主动脉粥样硬化

熊玮¹, 骆瑜², 陈婷婷¹, 曹园芝¹, 高原¹, 刘华东¹, 董少红¹

(深圳市人民医院/暨南大学第二临床医学院心内科¹、老年病科², 广东 深圳 518020)

【摘要】 目的 观察趋化素在 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化发生过程中的作用及机制。方法 在 ApoE^{-/-}小鼠中通过高脂高胆固醇饲料构建动脉粥样硬化模型。构建趋化素低表达和过表达腺病毒, 转染到 ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织, 观察下调或上调趋化素表达后主动脉组织斑块形态, ELISA 法检测血清白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平, Real time PCR 和蛋白印迹法检测趋化素、磷酸化丝裂原活化蛋白激酶(p-p38 MAPK)的 mRNA 和蛋白水平的变化。结果 在高脂高胆固醇饲养 16 周后 ApoE^{-/-}小鼠主动脉组织出现显著的动脉粥样硬化, 血清 IL-1 β 、TNF- α 水平增加($P < 0.01$), 趋化素、p-p38 MAPK 的 mRNA 和蛋白水平增加($P < 0.05$); 在降低主动脉组织中趋化素表达后动脉粥样硬化程度减轻, 血清 IL-1 β 、TNF- α 水平降低($P < 0.01$), 趋化素、p-p38 MAPK 等的 mRNA 和蛋白表达下降($P < 0.01$); 而在上调主动脉组织中趋化素表达后动脉粥样硬化更加明显, 血清 IL-1 β 、TNF- α 水平增加($P < 0.01$), 趋化素、p-p38 MAPK 等的 mRNA 和蛋白表达增加($P < 0.05$)。结论 趋化素通过增加促炎细胞因子生成和上调 p38 MAPK 磷酸化水平促进了 ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化的发生。

【关键词】 趋化素; 动脉粥样硬化; 炎症; 丝裂原活化蛋白激酶

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1003-6350(2018)08-1040-04

Chemerin stimulates the progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice by upregulating p38 MAPK signaling.
XIONG Wei¹, LUO Yu², CHEN Ting-ting¹, CAO Yuan-zhi¹, GAO Yuan¹, LIU Hua-dong¹, DONG Shao-hong¹.
Department of Cardiology¹, Department of Gerontology², Shenzhen People's Hospital/the Second Medical College of Jinan University, Shenzhen 518020, Guangdong, CHINA

【Abstract】 Objective To investigate the relationship of chemerin with atherosclerosis development in ApoE^{-/-} mouse and its mechanism. **Methods** The 7-week old ApoE^{-/-} mice were employed to induce atherosclerosis by feeding high lipid and high cholesterol food. Adenoviruses were transfected to downregulate or upregulate chemerin gene in aorta. Serums and aortic tissues of ApoE^{-/-} mice were obtained at 16 weeks after high lipid food intake. Haematoxylin eosin (HE) and oil red O staining were performed to evaluate aortic plaque. ELISA was performed to explore serum level of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Real time PCR and Western blot were carried out to investigate chemerin, phosphorylated p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK). **Results** Significant aortic plaque, elevated serum level of IL-1 β , TNF- α ($P < 0.01$) as well as mRNA and protein levels of chemerin, p-p38 MAPK ($P < 0.05$) occurred in ApoE^{-/-} mice at 16 weeks after high lipid food intake. After aortic chemerin gene were downregulated, aortic atherosclerosis was significantly meliorated, and serum level of IL-1 β , TNF- α as well as mRNA and protein levels of chemerin, p-p38 MAPK ($P < 0.01$) were significantly decreased. After aortic chemerin gene were upregulated, aortic atherosclerosis was significantly aggravated, and serum level of IL-1 β , TNF- α ($P < 0.01$) as well as mRNA and protein levels of chemerin, p-p38 MAPK ($P < 0.05$) were significantly increased. **Conclusion** Chemerin stimulated the progression of atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice by increasing proinflammatory cytokine and upregulating p38 MAPK signaling.

【Key words】 Chemerin; Atherosclerosis; Inflammation; Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81770496); 广东省医学科研基金(编号: A2017145); 广东省深圳市卫计委项目(编号: 201606012)

通讯作者: 董少红。E-mail: dsh266@medmail.com.cn.

[13] Zhu T, Li X, Luo L, et al. Reversion of malignant phenotypes of human glioblastoma cells by β -elemene through β -catenin-mediated regulation of stemness-, differentiation-and epithelial-to-mesenchymal-transition-related molecules [J]. J Transl Med, 2015, 13: 356.

[14] 任凌燕, 徐磊, 赵青, 等. β -榄香烯对人食管癌细胞 EC9706 增殖、凋亡及 caspase-3 的影响[J]. 实用癌症杂志, 2016, 31(2): 202-206

[15] 王秉钧, 王先坤, 晏波, β -榄香烯对人胰腺癌 Panc-1 细胞凋亡的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2016, 23(10): 78-81.

[16] 赵婉君, 赵振安, 王青云, 等. β -榄香烯对兔 VX2 喉癌生长及肿瘤相关因子的影响[J]. 中华耳鼻喉头颈外科杂志, 2016, 51(8): 606-610.

[17] Zhao YS, Zhu TZ, Chen YW, et al. β -elemene inhibits Hsp90/Raf-1 molecular complex inducing apoptosis of glioblastoma cells [J]. J Neurooncol, 2012, 107(2): 307-314

[18] Yu ZY, Wu FL, Chen L, et al. ETME, a novel β -elemene derivative, synergizes with arsenic trioxide in inducing apoptosis and cell cycle arrest in hepatocarcinoma cells via a p53-dependent pathway [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2014, 4(6): 424-429.

(收稿日期: 2017-09-04)