

去甲斑蝥素对胆管癌 RBE 细胞 α -Tubulin 骨架蛋白及细胞周期的影响

王天阳 王文斌 边伟 张小艳 刘建华 王凤安

【摘要】 目的 观察去甲斑蝥素对人胆管癌 RBE 细胞周期的影响及对微管蛋白 (α -Tubulin) 的作用。方法 体外培养胆管癌 RBE 细胞, 分别用不同剂量去甲斑蝥素处理, 流式细胞学检测细胞周期的影响, 免疫组化染色法观察 α -Tubulin 结构变化, Real-time PCR 检测 α -Tubulin mRNA 转录水平变化。结果 流式细胞学检测显示胆管癌 RBE 细胞随着药物浓度的增加, G2/M 期阻滞作用增强, 10、20、40 μ g/ml 组与对照组相比具有统计学意义 ($P=0.000, P<0.01$)。免疫组化染色法观察到去甲斑蝥素作用下, 胆管癌 RBE 细胞 α -Tubulin 骨架结构被破坏, Real-time PCR 证实去甲斑蝥素使胆管癌 RBE 细胞 α -Tubulin 转录水平减少, 差异具有统计学差异 ($P=0.002, P=0.000, P<0.01$)。结论 去甲斑蝥素可以通过破坏胆管癌 RBE 细胞 Tubulin 骨架、抑制 α -Tubulin mRNA 的表达, 阻止纺锤体的形成, 将细胞周期阻滞在 G2/M 期, 导致生长抑制, 是其抗肿瘤机制之一。

【关键词】 胆管肿瘤; 细胞骨架; 细胞周期; 微管蛋白; 去甲斑蝥素

Norcantharidin induces G2/M cell cycle arrest though disrupting α -Tubulin cytoskeleton WANG Tian-yang, WANG Wen-bin, BIAN Wei, ZHANG Xiao-yan, LIU Jian-hua, WANG Feng-an. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Hospital, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China
Corresponding author: LIU Jian-hua, Email: ljh@medmail.com.cn

【Abstract】 Objective To explore the mechanisms of Norcantharidin's anti-tumor effect by investigating cell cycle and α -Tubulin cytoskeleton changes in cholangiocarcinoma cell line RBE after treated by Norcantharidin. **Methods** The RBE cells were cultured *in vitro*, followed by treating with various concentration of norcantharidin for 24 h. Cell cycle changes were detected by flow cytometric analysis. We used immunohistochemical (IHC) to observe α -Tubulin cytoskeleton changes, and real-time PCR was used to detect α -Tubulin mRNA transcript levels. **Results** The result of flow cytometric analysis shown the cell cycle arrested at G2/M. The damages of α -Tubulin cytoskeleton under the treatment of Norcantharidin were observed by IHC, and real-time PCR determined that α -Tubulin was decreased at mRNA level. **Conclusions** Norcantharidin can prevent the formation of spindle to arrest the cell cycle in G2/M phase, by disrupting Tubulin cytoskeleton, inhibiting α -Tubulin mRNA expression, which is one of the mechanisms of Norcantharidin's anti-tumor effect.

【Key words】 Bile duct neoplasms; Cytoskeleton; Cell cycle; Tubulin; Norcantharidin

斑蝥素提取自传统中药斑蝥, 具有攻毒蚀疮, 逐瘀散结等功效, 在多种恶性肿瘤治疗中取得了一定的疗效。在斑蝥素基础上, 去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 缺少 1, 2 位 2 个甲基, 保留了抗肿瘤活性同时, 明显降低了毒性及不良反应^[1]。作为一种可升高白细胞的抗肿瘤药物, 去甲斑蝥素受到越来越多的关注。

在前期研究中, 去甲斑蝥素可以明显抑制胆管癌 RBE 细胞的增殖, 并通过线粒体途径诱导细胞凋亡。本研究通过观察去甲斑蝥素引起胆管癌 RBE 细胞株细胞周期变化, 细胞骨架的改变及其相关 mRNA 水平变化, 讨论去甲斑蝥素对胆管癌细胞诱导凋亡作用机制。

材料与方法

一、细胞系

胆管癌细胞系 RBE-TCHU179 购自中科院上海生命科学研究所, 使用含有 10% 胎牛血清 (杭州四季青公司)、100 U/ml 青霉素、0.1 mg/ml 链霉素 (Solarbio 公司) 的 RPMI-1640 (美国 Gibco 公司) 培养基, 在

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2013.21.044

基金项目: 河北省卫生厅医学科学研究重点课题计划 (20090095); 河北医科大学第二医院科学研究基金 (2h1201309)

作者单位: 050000 石家庄, 河北医科大学第二医院肝胆外科 (王天阳、王文斌、边伟、刘建华), 血液内科 (张小艳), 肛肠外科 (王凤安)

通讯作者, 刘建华, Email: ljh@medmail.com.cn

37℃、5% CO₂、饱和湿度环境下培养。

二、材料与试剂

注射用去甲斑蝥素购自 Sigma 公司, 使用前用不含血清的 RPMI-1640 稀释至目的浓度, 微管蛋白(α -Tubulin)小鼠多抗购自天津三箭生物公司, 即用型非生物素免疫组化 EliVision plus 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自福州迈新公司, TRIzol、M-MLV 反转录试剂盒、SYBR Green qPCR SuperMix 试剂盒购自 Invitrogen 公司。

三、方法

1. 流式细胞仪分析细胞周期分布: 对数期生长的 RBE 细胞应用 0、5、10、20、40 μ g/ml 的去甲斑蝥素干预 RBE 细胞 24 h, 胰酶消化后收集 1×10^6 个细胞, 用 4℃ 预冷的 PBS 溶液洗涤细胞, 1000 r/min 离心 5 min, 重复 3 遍, 固定于 4℃ 预冷的 70% 乙醇中, 4℃ 过夜。800 r/min 离心去除乙醇, PBS 洗涤 2 遍, 方法同前, 加入碘化丙啶至终浓度为 50 μ g/ml, 在 4℃ 避光染色 30 min, 488 nm 激发波长测定样品, 620 nm 带通滤片检测 PI 荧光, 每个样本收集 10 000 个荧光信号, 采用 modfit DNA 拟合软件分析细胞周期分布。

2. α -Tubulin 免疫组化染色: 同上分组及去甲斑蝥素处理, PBS 润洗 2 遍后, 滴加丙酮覆盖玻片固定 10 min, 滴加一抗: α -Tubulin 小鼠多抗 (1:100), 空白对照用 PBS 代替, 37℃ 湿盒内孵育 1 h。滴加二抗: PBS 冲洗后滴加 EliVision plus 试剂盒 A 液一滴, 室温孵育 30 min, PBS 冲洗后滴加 B 液一滴, 室温孵育 30 min, PBS 冲洗。DAB 显色: 滴加一滴新鲜配制的 DAB 溶液, 染色严格控制在 45 s, 立即在蒸馏水中终止反应, 梯度乙醇脱水干燥, 中性树胶封固。

3. Real-time PCR 检测 α -Tubulin mRNA 表达水平: 收集 10、40 μ g/ml 浓度去甲斑蝥素作用 24 h 后的细胞, 按 TRIzol 使用说明提取总 RNA, 紫外分光光度计测定其浓度和纯度, 按照反转录试剂盒说明书合成 cDNA, α -Tubulin 及内参 β -actin 均由北京赛百盛基因技术公司设计并合成。 α -Tubulin 上游引物: 5'-TTCTGGGTTCACCTCGCTGC-3'; 下游引物: 5'-GGTGAGGATGGAGTTGTAGGGC-3'; β -actin 上游引物: 5'-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3'; 下游引物: 5'-GGTAGTTTCGTGGATGCCACAG-3'; Real-time PCR 反应体系: 1 μ l cDNA 反转录产物, 上下游引物各 0.4 μ l, 10 μ l masterMIX, 无菌水补齐到 20 μ l, 设 2 个复孔。反应条件: 95℃ 预变性 10 min, 循环为 95℃ 20 s, 60℃ 30 s, 循环 40 次, 每个循环末检测荧光, 循环结束后测量溶解曲线。数据由 QIAGEN Rotor Gene Qene Q 软件分析, 实验重复 3 次。

四、统计学分析

数据应用均数士标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。应用 SPSS 13.0 进行数据统计分析, t 检验及单因素方差分析用于数据均数的比较, $P < 0.05$ 时为差异具有统计学意义。

结 果

1. 去甲斑蝥素影响 RBE 细胞细胞周期分布: 去甲斑蝥素作用 24 h 使 RBE 细胞周期发生改变 (图 1, 表 1), 其中 G2/M 期细胞增加 (图 2), 10、20、40 μ g/ml 组与对照组相比具有统计学意义 ($P=0.000$, $P=0.000$, $P=0.000$, $P < 0.01$)。随着药物浓度的增加, 阻滞作用增强。

表 1 去甲斑蝥素对 RBE 细胞细胞周期分布的影响 (% , $\bar{x} \pm s$)

周期	浓度				
	0 μ g/ml	5 μ g/ml	10 μ g/ml	20 μ g/ml	40 μ g/ml
G2/M	9.8 \pm 1.7	7.6 \pm 1.2	31.7 \pm 4.2	32.7 \pm 2.9	32.4 \pm 0.1
S	23.8 \pm 3.4	24.9 \pm 5.5	15.0 \pm 0.7	15.7 \pm 2.1	28.1 \pm 2.9
G0/G1	66.3 \pm 4.9	67.6 \pm 5.3	53.3 \pm 3.5	51.6 \pm 1.1	39.5 \pm 2.9

2. α -Tubulin 免疫组化染色观察去甲斑蝥素对 RBE 细胞微管的改变: 对照组胆管癌 RBE 细胞胞质内可见清晰的微管网络结构 (图 3A), 从胞核周围到细胞膜呈辐射状, 交织成网状, 其中, 分裂期的细胞 (图 3B) 可见明显的纺锤体形成。5~10 μ g/ml 去甲斑蝥素干预后 (图 3C, 3D), 细胞变圆, 细胞胞质减少, 纤维开始在核周围聚集, 染色加深。20~40 μ g/ml 组 (图 3E, 3F) 细胞呈圆形, 胞质进一步减少, Tubulin 蛋白聚集在核周围, 呈现无结构均一的环状。其中图 3E 为一处于分裂中期的细胞, 可见微管均匀存在于胞质中, 无纺锤体出现。

3. Real-time PCR 检测 (图 4): 与对照组相比, 无论低浓度或者是高浓度去甲斑蝥素作用胆管癌细胞后, α -Tubulin mRNA 表达水平均明显降低, 差异具有统计学差异 ($P=0.002$, $P=0.000$, $P < 0.01$)。

讨 论

前期试验已经证实去甲斑蝥素对胆管癌 RBE 细胞具有很强的抑制增殖和诱导凋亡的作用, 并通过线粒体途径激活 Caspase-3 级联反应, 诱导细胞凋亡。实验中发现, 细胞在凋亡前, 处于有丝分裂中期的细胞数目明显增多。为证实这个现象, 本次实验通过流式细胞学检测证实了胆管癌细胞被阻滞在 G2/M 期, 且随着剂量的升高, G2/M 期所占比例随之升高。这提示去甲斑蝥素可以通过诱导细胞周期阻滞的途径诱导胆管癌 RBE 细胞的凋亡。

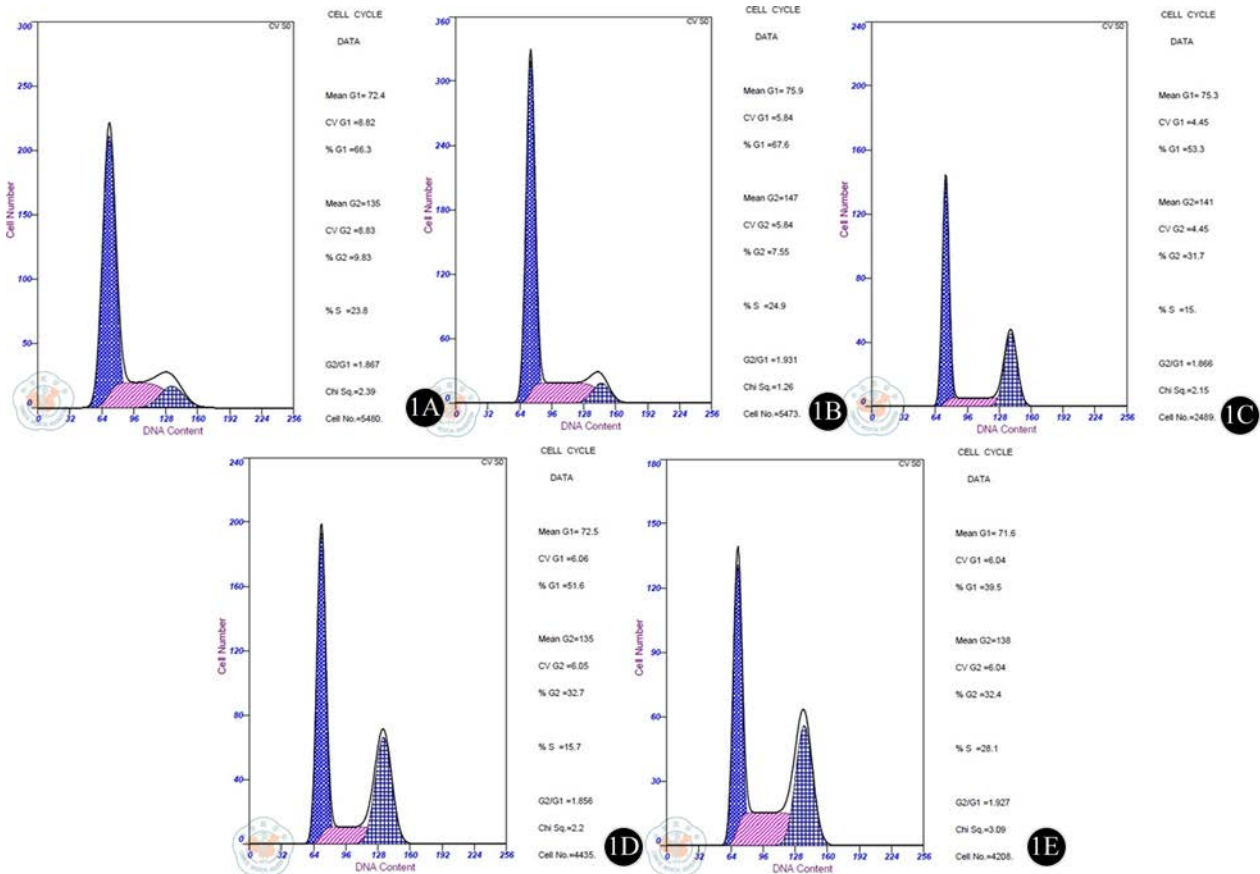


图1 去甲斑蝥素对胆管癌RBE细胞周期分布影响分析图。1A: 对照组; 1B~1E: 去甲斑蝥素组; 1B: 5 µg/ml; 1C: 10 µg/ml; 1D: 20 µg/ml; 1E: 40 µg/ml

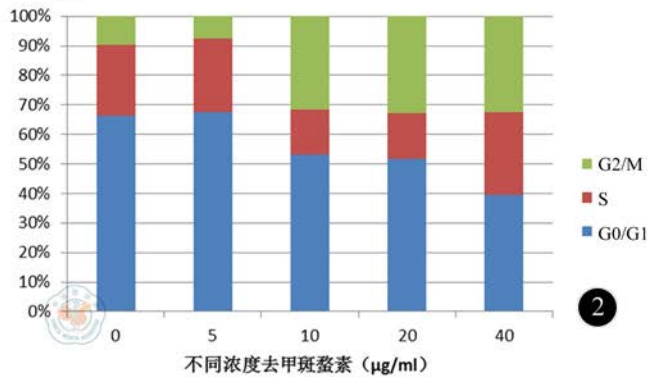


图2 去甲斑蝥素对胆管癌RBE细胞周期分布影响柱形图

研究显示去甲斑蝥素可通过诱导凋亡、抑制转移、阻滞细胞周期,抑制肿瘤血管生成等多个方面发挥抗癌作用^[2-3]。关于甲斑蝥素对细胞周期的影响,有研究表明其可通过促进 p21、Cdc25C 磷酸化;抑制 cyclin-D1 的表达发挥细胞周期阻滞作用^[4-5]。去甲斑蝥素也可以抑制 PP2A 的活性,影响细胞周期^[6]。此外,阻止染色质与 Cdc6, MCM2 和 MCM6 等复制复合物结合也是去甲斑蝥素对周期影响机制之一^[7]。研究表明,去甲斑蝥素可以在体外抑制 Tubulin 的聚合,并且干扰微管的组装和纺锤体的形成,诱导 SK-OV-3 细胞凋亡^[8-9]。

为探究甲斑蝥素是否通过破坏胆管癌 RBE 细胞微

管结构,从而影响细胞周期,本实验应用免疫组织化学染色技术对 Tubulin 染色。染色可以清晰观察到细胞的微管系统,对照组可以清晰地看到 α-Tubulin 所组装成的骨架网络,处于分裂期的细胞可见明显的纺锤体形成。而实验组随着去甲斑蝥素剂量的升高,可观察到网状 Tubulin 的部分解聚,在核周弥漫性累及,形成深染的环。处于分裂期的细胞未见纺锤体的形成。由此推测去甲斑蝥素可能通过解聚 α-Tubulin 骨架,阻止纺锤体的形成,阻滞细胞周期。

此外,本实验通过 Real-time PCR,检测到 α-Tubulin 在 RBE 细胞中的表达水平降低。推测去甲斑

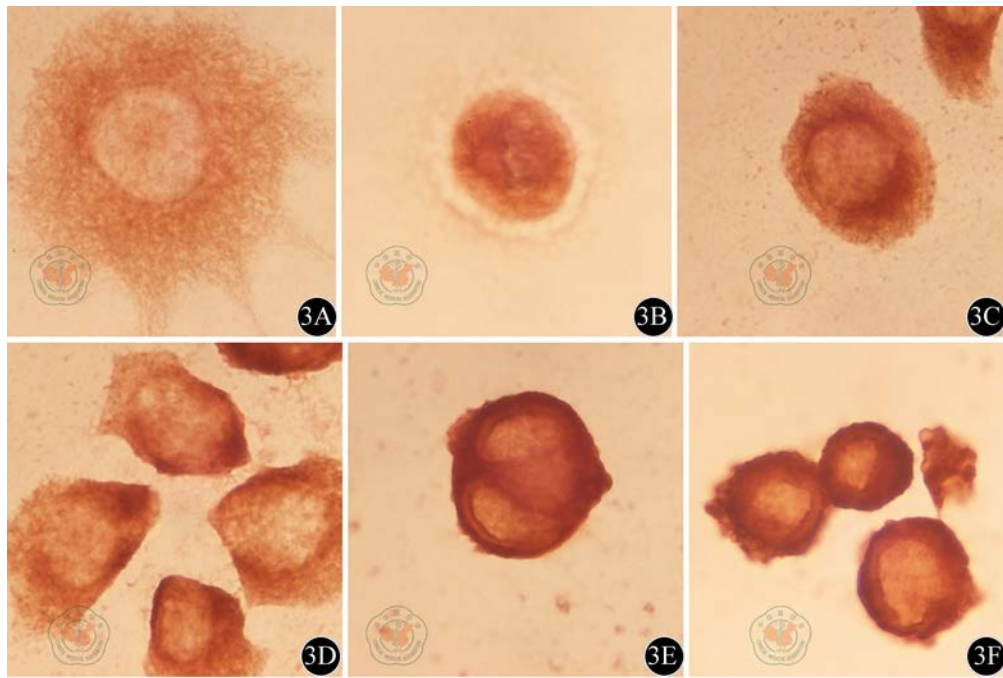


图3 去甲斑蝥素对RBE细胞 α -Tubulin微管蛋白的影响。3A, 3B: 对照组; 3C~3E: 去甲斑蝥素组; 3C: 5 μ g/ml; 3D: 10 μ g/ml; 3E: 20 μ g/ml; 3F: 40 μ g/ml

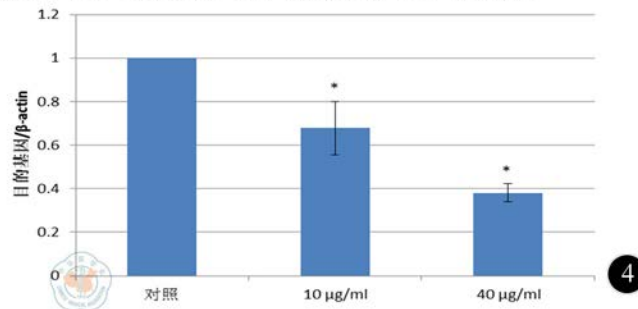


图4 去甲斑蝥素对RBE细胞 α -Tubulin微管蛋白mRNA的影响。* P <0.01

蝥素可能通过干扰 α -Tubulin mRNA 的表达, 进一步破坏 Tubulin 骨架。

有丝分裂灾难为化疗药抗肿瘤作用的重要机制之一^[10], 细胞长期停滞在细胞周期某一期是其产生因素^[11]。紫杉醇或多西他赛能抑制微管的解聚, 这类微管特异性药物可以导致微管功能的破坏, 使肿瘤细胞在 G2/M 期阻滞, 发生有丝分裂灾难, 导致细胞进入凋亡程序^[12-13]。本实验结果表明, 去甲斑蝥素对 Tubulin 骨架的直接抑制作用, 阻止分裂期细胞纺锤体形成, 导致分裂中期染色体不能正常分离。而这种细胞周期阻滞可以通过一系列通路诱导细胞凋亡。

综上所述, 去甲斑蝥素可以通过诱导胆管癌 RBE 细胞 Tubulin 骨架解聚, 抑制 α -Tubulin mRNA 的表达, 阻止纺锤体的形成, 将细胞周期阻滞在 G2/M 期, 导致细胞凋亡和生长抑制。本实验探索了去甲斑蝥素促使肿瘤细胞凋亡的机制, 为临床的联合用药提供了可靠的理论依据和实验基础。

参 考 文 献

- [1] Deng LP, Dong J, Cai H, et al. Cantharidin as an antitumor agent: a retrospective review. *Curr Med Chem*, 2013, 20: 159-166.
- [2] Dong X, Li JC, Jiang YY, et al. p38-NF-kappaB-promoted mitochondria-associated apoptosis and G2/M cell cycle arrest in norcantharidin-treated HeLa cells. *J Asian Nat Prod Res*, 2012, 14: 1008-1019.
- [3] 范跃祖, 经巍, 孙建军. 去甲斑蝥素和它的抗癌作用与机制. *外科研究与新技术*, 2012, 1: 13-18, 65.
- [4] Fan YZ, Zhao ZM, Fu JY, et al. Norcantharidin inhibits growth of human gallbladder carcinoma xenografted tumors in nude mice by inducing apoptosis and blocking the cell cycle *in vivo*. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2010, 9: 414-422.
- [5] Chen YN, Chen JC, Yin SC, et al. Effector mechanisms of norcantharidin-induced mitotic arrest and apoptosis in human hepatoma cells. *Int J Cancer*, 2002, 100: 158-165.
- [6] Hart ME, Chamberlin AR, Walkom C, et al. Modified norcantharidins; synthesis, protein phosphatases 1 and 2A inhibition, and anticancer activity. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004, 14: 1969-1973.
- [7] Chen S, Qu X, Wan P, et al. Norcantharidin Inhibits Pre-Replicative Complexes Assembly of HepG2 Cells. *Am J Chin Med*, 2013, 41: 665-682.
- [8] 洪兴福, 李宝赛, 孙震晓. 去甲斑蝥素对体外微管蛋白聚合的抑制作用. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26: 630-633.

- [9] 李瑞婧, 洪兴福, 季媛媛, 等. 去甲斑蝥素诱导人卵巢癌 SK-OV-3 细胞发生有丝分裂期阻滞与凋亡. 中国药理学与毒理学杂志, 2013(2): 180-186.
- [10] Vakifahmetoglu H, Olsson M, Zhivotovsky B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. Cell Death Differ, 2008, 15: 1153-1162.
- [11] Mansilla S, Bataller M, Portugal J. Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy. Anticancer Agents Med Chem, 2006, 6: 589-602.
- [12] Gajate C, Barasoain I, Andreu JM, et al. Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2', 3', 4'-trimethoxyphenyl)-2, 4, 6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-X(L) and cell cycle arrest. Cancer Res, 2000, 60: 2651-2659.
- [13] Abal M, Andreu JM, Barasoain I. Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of action. Curr Cancer Drug Targets, 2003, 3: 193-203.

(收稿日期: 2013-10-08)

(本文编辑: 戚红丹)

王天阳, 王文斌, 边伟, 等. 去甲斑蝥素对胆管癌 RBE 细胞 α -Tubulin 骨架蛋白及细胞周期的影响 [J/CD]. 中华临床医师杂志: 电子版, 2013, 7(21): 9581-9585.

