论著

文章编号:1000-5404(2007)05-0428-04

青蒿琥酯抗人食管癌作用与调控CDC25A表达的关系

王 静,刘 亮,李金梅,刘江惠,郭建文,左连富 (河北医科大学第四医院河北省肿瘤研究所流式分析室,石家庄 050011)

提 要:目的 观察青蒿琥酯(artesunate, Art)对人食管癌Eca109细胞株及裸鼠移植瘤的抑瘤作用,探讨Art诱导肿瘤细胞周期阻滞是否与CDC25A表达有关。**方法** MTT法测定Art对Eca109细胞及正常人外周血单个核细胞(hPBMC)增殖的影响;流式细胞术(FCM)测定肿瘤细胞的周期变化;观察Art对裸鼠人食管癌移植瘤的抑制情况;采用RT-PCR及Western blotting方法检测CDC25A mRNA和蛋白表达情况。**结果** Art能显著抑制Eca109细胞的增殖,IC_{50}为(68.80±0.76)μmol/L,而在刀豆蛋白A(concanavalin A, Con A)刺激下hPBMC的增殖则没有明显抑制作用。低浓度Art可将细胞阻滞于G_0/G_1期,S期细胞显著减少,当浓度达到100 μmol/L时,Art可将细胞阻滞于G_2/M期。Art对裸鼠肿瘤的体积抑瘤率最高可达76.4%,质量抑瘤率可达33.2%。Art可显著抑制Eca109细胞CDC25A mRNA及蛋白表达。**结论** Art可抑制食管癌细胞及裸鼠移植瘤的生长,且无明显毒副作用,通过下调CDC25A的表达而调控细胞周期,是Art发挥抑瘤作用的重要机制。

关键词:青蒿琥酯;肿瘤;细胞周期;裸鼠;CDC25A

中图法分类号:R730.23;R735.1;R979.1 **文献标识码**:A

Inhibitory effect of artesunate on human esophageal carcinoma is associated with CDC25A modulation

WANG Jing, LIU Liang, LI Jin-mei, LIU Jiang-hui, GUO Jian-wen, ZUO Lian-fu (Department of FCM Analysis, Hebei Provincial Tumor Institute, Fourth Hospital Affiliated to Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: Objective To observe the effect of artesunate (Art) on the proliferation of human esophageal carcinoma cell line Eca109 and the growth of transplantation tumors of nude mice, and explore the possible involvement of CDC25A expression in the cell cycle arrest induced by Art. **Methods** MTT method was employed to detect the proliferation of the Eca109 cells and normal human peripheral blood mononuclear cells (hPBMC) after Art treatment. Cell cycle of the tumor cells was assayed by flow cytometry. Inhibitory effects of Art on the transplanted tumor on nude mice were observed by mass weight, volume and morphological method. The expression of CDC25A in the Eca109 cells was examined by RT-PCR and Western blotting. **Results** Art significantly inhibited the proliferation of Eca109 with the IC_{50} of (68.80±0.76) μmol/L, while it had weaker effect on that of the hPBMC induced by Con A. At lower doses of Art, the number of Eca109 cells during G_0/G_1 was increased, and that at S phase was reduced dramatically. However, when the concentration was up to 100 μmol/L, most of cells were arrested at G_2/M phase. The volume and weight of transplanted tumor receiving Art treatment were smaller and lower than those of control group, with the maximal inhibitory rate of 76.4%. Art dramatically inhibited the mRNA as well as protein expressions of CDC25A in the Eca109 cells. **Conclusion** Art can inhibit the proliferation of tumor cells and transplanted tumor without apparent side effect, possibly by the mechanism of modulating cell cycle through CDC25A down-regulation.

Key words: artesunate; tumor; cell cycle; nude mice; CDC25A

基金项目:河北省普通高等学校强势特色学科肿瘤学建设经费资助(2006)

Supported by the Funds of Oncology Building from Powerful Featured Subjects of General High School of Hebei Province(2006)

作者简介:王 静(1977-),女,河北省丰润县人,博士研究生,主要从事消化道肿瘤方面的研究。电话:(0311)86095337

通讯作者:左连富,电话:(0311)86033947-337,E-mail:zuolianfu@sina.com

收稿日期:2006-05-18;**修回日期**:2006-08-28

青蒿琥酯（artesunate，Art）在临床上治疗恶性疟和脑型疟方面有显著疗效。近年来有研究表明 Art 在体外对人乳腺癌细胞、人鼻咽癌细胞以及小鼠移植性肝癌细胞等具有杀伤作用[1,2]，但其对食管癌的抑瘤作用报道较少。林芳等[3]的研究显示，Art 能明显改变人乳腺癌细胞 MCF-7 的细胞周期，将细胞阻滞于 G_0/G_1 期，但 Art 阻滞细胞周期的机制尚不清楚。细胞周期调控有多种因素参与，其中 CDC25 家族是双重特异性磷酸酶，其对细胞周期蛋白依赖性激酶（cyclin-dependent kinases，CDKs）的活化是周期调控的中心环节。近年来发现 CDC25 家族的重要成员——CDC25A 对于 G_1/S、G_2/M 期转换至关重要，并且在许多肿瘤中高表达，被认为是癌基因。调控 CDC25A 的表达已成为抗肿瘤研究的重要靶点[4]。本研究拟从体内、体外两方面探讨 Art 抗人食管癌的作用及其诱导细胞周期阻滞与 CDC25A 表达的关系。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要试剂　　RPMI1640 培养基（美国 Gibco BRL 公司）；胎牛血清（杭州四季青生物工程材料有限公司）；MTT、Con A、PI 荧光染料（美国 Sigma 公司）；淋巴细胞分离液（上海恒信化学试剂有限公司）；顺铂（南京制药厂有限公司）；DNA 标准（华美生物工程公司）；RT-PCR 试剂盒（Promega 公司）；兔抗人 CDC25A 抗体和兔抗人 β-actin 抗体（Santa Cruz 公司）。

1.1.2　细胞株　　人食管癌 Eca109 细胞株由本实验室传代培养，接种细胞于含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中（补充青霉素、链霉素各 100 U/L），培养器皿置于 37 ℃ 含有 5% CO_2 的细胞培养箱中。

1.1.3　实验动物　　BALB/c nu/nu 裸鼠 30 只购自中国医学科学院实验动物研究所（动物许可证编号：SCXK 京 2004-0001），4 周龄，雌雄各半，体质量 18 ~ 20 g，饲养于屏障系统的洁净层流架内（SPF 级）。室内定期进行紫外线照射，笼、垫料、饮水、饲料均经高压灭菌消毒。室温控制在（25 ± 1）℃，相对湿度 40% ~60%。

1.1.4　药物　　Art，桂林南药股份有限公司提供，批准文号：国药准字 H10930195，实验前配制，用 5% $NaHCO_3$ 溶解配成浓度为 60 mg/ml 的母液，再用生理盐水稀释至所需浓度。

1.2　方法

1.2.1　细胞增殖抑制试验（MTT 法）　　用 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养肿瘤细胞，用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液配成单个细胞悬液，常规分离健康成年人 hPBMC，以含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液配成单个细胞悬液，调整细胞浓度至 5×10^4/ml，分别接种于 96 孔细胞培养板，每孔180 μl。肿瘤细胞实验组分别加入不同浓度 Art 各 10 μl，另设空白对照组，加入等体积 5% 的 $NaHCO_3$ 培养液；hPBMC 实验组同时加入 Con A（10 μg/ml）以及不同浓度 Art 各 10 μl，另设空白对照组，加入 5% 的 $NaHCO_3$ 培养液和 Con A（10 μg/ml），反应总体积以培养液补至 200 μl/孔，阳性对照组加入 10 μg/ml 顺铂，每个药物剂量均设 3 复孔，置 37 ℃，5% CO_2 条件下分别孵育 24、48、72 h。每孔加入 MTT 溶液（5 mg/ml）20 μl，置 37 ℃，5% CO_2 条件下继续孵育 4 h，终止培养，倾去培养液。每孔加入 150 μl DMSO，振荡 10 min。选择 490 nm 波长，以空白孔调零，在酶标仪上测定各孔光吸收值［$D(490)$］，按下列公式计算抑瘤率：抑瘤率 =［对照孔 $D(490)$ - 用药孔 $D(490)$］/对照孔 $D(490)$ × 100%。

1.2.2　细胞周期分析（FCM）　　用 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养肿瘤细胞，用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液配成单个细胞悬液，以每孔 2×10^5 个细胞接种于 6 孔培养板中，每孔体积 4 ml，培养 24 h 后，加入各受试药物混匀。每个药物剂量设 3 复孔，对照组加等体积生理盐水。置 37 ℃，5% CO_2 条件下分别孵育 24、48、72 h，分别收获细胞，再以冷 PBS 离心洗涤 2 次，对收获的细胞用碘化丙啶（propidium iodide，PI）一步插入性 DNA 荧光染色方法进行染色。采用美国 Beckman-Coulter 公司生产的 Epics-XL Ⅱ 型流式细胞仪，激发光源为 15 mW 氩离子激发器，激发波长为 488 nm，应用 Expo3.2 ADC 分析软件进行免疫荧光数据分析，利用 Muticycle AV 软件对细胞周期进行分析。测定前以 flow-checkTMFluorpheres（10 μm）荧光微球作为标准样品调整仪器的 *CV* 值在 2% 以内。

1.2.3　荷瘤裸鼠的构建及实验治疗　　常规制备肿瘤细胞的单细胞悬液，再以生理盐水离心洗涤 2 次，调整细胞浓度为 3×10^7/ml，用一次性注射器吸取 0.2 ml 细胞悬液接种于 BALB/c nu/nu 裸小鼠的左前肢皮下。30 只裸鼠随机分为 3 个实验组和 2 个对照组（每组 6 只）。实验组分别给予 100、200、300 mg/kg Art，腹腔注射，连用 7 d，停药 1 周，再继续连用 7 d；阳性对照组给予 3 mg/kg 顺铂，腹腔注射，连用 7 d；空白对照组给予生理盐水代替 Art。实验过程中每隔 3 d 测量 1 次裸鼠的体质量及肿瘤的长、短径，Art 停药 1 d 后采用拉颈法统一处死裸鼠，取瘤块称质量、测量肿瘤体积后，将组织块在 4% 多聚甲醛中固定，梯度酒精脱水，最后用石蜡包埋，常规制备病理切片。

1.2.4　CDC25A mRNA 的表达　　Eca109 细胞分别暴露于浓度为 10 μmol/L 和 100 μmol/L 的 Art 72 h，Trizol 一步法提取总 RNA 用于 RT-PCR 反应。GAPDH 引物序列为：5′-ACCACAGTCCATGCCATC-3′（上游）和 5′-TCCACCACCCTGTTGCTG-3′（下游），扩增片段 452 bp。CDC25A 引物序列为：5′-CTGGAGGTGAAGAACAAC-3′（上游）和 5′-CTCATCAGACAAAGTGGC-3′（下游），扩增片段 456 bp。扩增条件为 94 ℃ 5 min，94 ℃ 30 s，57 ℃ 30 s，72 ℃ 1 min，共 30 个循环。对扩增产物进行 1.5% 琼脂糖电泳，溴化乙锭染色，在凝胶成像分析仪下成像，依据目标条带的灰度判断表达情况。

1.2.5　CDC25A 蛋白的表达　　Eca109 细胞分别暴露于浓度为 10 μmol/L 和 100 μmol/L 的 Art 72 h，按文献［5］的方法提取总蛋白，SDS-PAGE 电泳后，依次进行转膜、封闭、一抗和二抗杂交、DAB 显色。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 和百分率表示，采用 SPSS 11.0 统计软件，多组均数比较用单因素方差分析，其中两两比较用 LSD 检验；两

组均数比较用 t 检验。两组率的比较采用 χ^2 检验和四格表资料的 Fisher 确切概率法。

2 结果

2.1 Art 对 Eca109 细胞增殖的影响

MTT 法测定 Art 对 Eca109 细胞生长的影响，结果显示 1、10、100 μmol/L Art 均能显著抑制 Eca109 细胞的增殖（$P<0.01$），应用 IC_{50} 计算软件计算其 IC_{50} 为（68.80±0.76）μmol/L，最大抑制率可达（78.31±1.48）%，抑瘤水平与顺铂相当[（74.27±0.41）%]。结果显示，Eca109 细胞株生长活力随 Art 浓度的增加以及作用时间的延长而降低（$P<0.01$），Art 的抑制作用呈剂量、时间依赖性（表 1）。

表 1 Art 对人食管癌 Eca109 细胞株生长的抑制作用[$n=3$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	孵育时间(t/h)		
	24	48	72
空白对照组	0.22±0.12	0.20±0.11	0.21±0.10
Art 1 μmol/L 组	6.65±1.26[a]	10.81±0.14[a]	17.11±3.09[a]
Art 10 μmol/L 组	14.58±3.11[a]	20.22±0.76[a]	20.79±3.90[a]
Art 100 μmol/L 组	32.45±1.65[a]	42.84±4.31[a]	56.39±2.08[a]

a：$P<0.01$，与空白对照组比较

2.2 Art 对 hPBMC 增殖的影响

MTT 实验结果显示，各实验浓度 Art 对 Con A 刺激下 hPBMC 的增殖仅有轻微的抑制作用（$P<0.01$），抑制率为 2%～8%（表 2），表明各实验浓度的 Art 对正常免疫功能影响较小，顺铂对 hPBMC 的抑制率约为 15%。

表 2 Art 对 Con A 刺激下 hPBMC 增殖的抑制作用[$n=3$，($\bar{x}\pm s$)%]

组别	孵育时间(t/h)		
	24	48	72
空白对照组	0.14±0.09	0.18±0.07	0.15±0.04
Art 1 μmol/L 组	1.90±0.27[a]	2.48±0.35[a]	2.88±0.64[a]
Art 10 μmol/L 组	2.08±0.30[a]	2.71±0.36[a]	2.68±0.28[a]
Art 100 μmol/L 组	5.55±0.87[a]	6.45±0.72[a]	7.05±1.18[a]

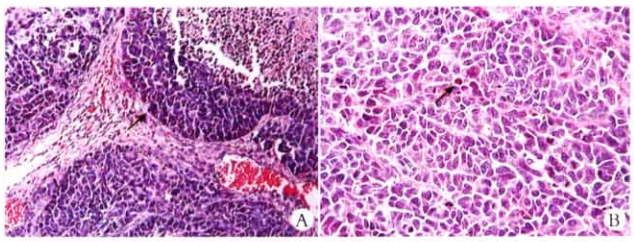
a：$P<0.01$，与空白对照组比较

2.3 Art 对 Eca109 细胞周期的影响

FCM 检测结果显示，不同浓度 Art 对 Eca109 细胞的细胞周期的影响亦不同。对照组处于 S 期的细胞多达 41.8%，体现了肿瘤细胞生长增殖旺盛的特点。1 μmol/L 和 10 μmol/L Art 可使 S 期细胞明显减少，细胞的生长被阻滞在 G_0/G_1 期，说明低浓度 Art 可有效阻止肿瘤细胞的基因组 DNA 的合成。100 μmol/L Art 亦可使 S 期细胞数目减少，但其作用主要表现为将细胞阻滞在 G_2/M 期，说明高浓度 Art 不仅阻止肿瘤细胞的基因组 DNA 的合成，还可显著抑制肿瘤细胞的分裂增殖。

2.4 Art 抑制裸鼠 Eca109 细胞移植瘤的生长

肿瘤细胞接种于裸鼠 1 周后，实验各组裸鼠均观察到有 Eca109 细胞移植瘤生长，瘤体呈椭圆形或圆形，经组织学检查可见明显角细胞、癌巢，证实均为食管鳞状细胞癌（图 1）。



A：癌巢（↑）；B：角细胞（↑）

图 1 裸鼠移植瘤的病理学特征 （HE×200）

实验结束时，各实验组肿瘤的体积及质量均明显小于空白对照组（$P<0.01$）（表 3）。

表 3 Art 对裸鼠 Eca109 皮下移植瘤生长的抑制作用（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

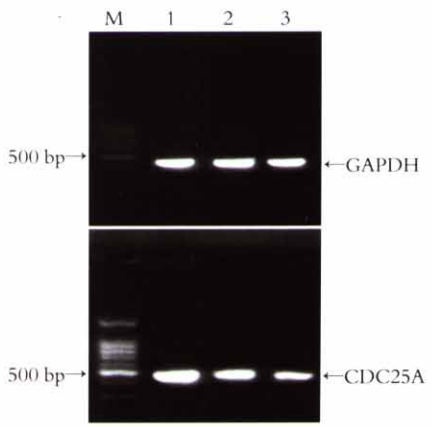
组别	瘤质量(m/g)	瘤体积(V/cm^3)
空白对照组		
0	0.73±0.37	0.89±0.45
Art 组(mg/kg)		
100	0.65±0.20[a]	0.60±0.24[a]
200	0.49±0.14[a]	0.21±0.08[a]
300	0.58±0.28[a]	0.73±0.33[a]
顺铂组(mg/kg)		
3	0.44±0.09[a]	0.46±0.20[a]

a：$P<0.01$，与空白对照组比较

实验结果显示，Art 的抑瘤作用并不随药物浓度的增大而增强，中浓度 Art 的抑瘤效果最佳，与顺铂的抑瘤作用相当。Art 各组用药前后生长、饮食、活动等情况良好，未观察到血尿和便血，体质量变化无显著性差异，顺铂组用药后体质量明显减轻，并出现进食减少，行动迟缓，皮肤干涩等现象。实验结果表明，各实验浓度 Art 对裸鼠的毒副作用较小，而顺铂的毒副作用较大。

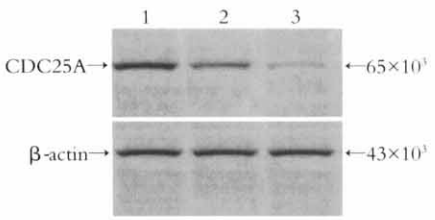
2.5 Art 对 CDC25A 基因及蛋白表达的影响

Eca109 细胞分别暴露于浓度为 10 μmol/L 和 100 μmol/L 的 Art 72 h 后，与空白对照组相比，CDC25A mRNA 及蛋白的表达呈浓度依赖性降低（图 2、3）。



M：标准；1：空白对照组；2：Art 10 μmol/L 组；3：Art 100 μmol/L 组

图 2 RT-PCR 法检测 Art 对 CDC25A mRNA 表达的影响



1：空白对照组；2：Art 10 μmol/L 组；3：Art 100 μmol/L 组

图 3　Western blotting 检测 Art 对 CDC25A 蛋白表达的影响

3　讨论

以往的体外实验表明青蒿素及其衍生物对肝癌、胃癌、乳腺癌、白血病等多种肿瘤细胞有确切的杀伤作用[6,7]，但其对食管癌细胞的作用研究尚少，与其相关的体内实验尚少见报道。本实验选择了临床上治疗疟疾最常用的青蒿素衍生物——Art，研究 Art 对人食管癌细胞株 Eca109 的抗肿瘤作用。已有研究表明 Art 对人宫颈癌细胞系 Hela 细胞、人涎腺样癌细胞系 SACC283 细胞以及人低分化鳞状上皮鼻咽癌 CNE2 细胞的 IC_{50} 分别为 37、30、101.6 μg/ml[7]。本研究的体外实验结果显示，Art 对 Eca109 有良好的抑瘤作用，对 Eca109 的 IC_{50} 仅为（26.45 ± 0.29）μg/ml，说明 Art 对 Eca109 细胞有选择性杀伤作用。为了进一步说明 Art 对人食管癌的抗肿瘤作用，本研究观察了 Art 对裸鼠 Eca109 细胞移植瘤生长的影响。结果显示各实验浓度 Art 均有抑瘤作用，但其抑瘤作用并不随浓度的增大而增强，中浓度的 Art 抑瘤效果最佳。临床上现有的治疗肿瘤的化疗药虽然抑瘤作用较好，但毒副反应大，往往治疗效果不佳，因此亟待开发高效、低毒的抗肿瘤药物。目前有关 Art 毒副作用的研究较少，为了说明 Art 的毒副反应，本实验从体外、体内两个方面进行了研究。结果表明实验浓度的 Art 对 Con A 诱导的 hPBMC 的增殖影响很小，抑制率仅为 2% ~8%，而顺铂的抑制率为 15%。此外，动物实验结果显示，低、中、高浓度的 Art 毒副作用均较小，实验过程中小鼠生长、饮食、活动等情况良好，用药前后裸鼠的体质量变化差异无显著性；而顺铂则表现出明显的毒副作用，裸鼠用药过程中出现生长缓慢、进食减少、行动迟缓、皮肤干涩、体质量明显减轻等表现。以上的实验结果均表明 Art 的毒副作用很小，有望用于临床抗肿瘤治疗。

Art 抗肿瘤的机制目前不十分清楚。有研究者认为，青蒿素衍生物抗增殖效应是由于将细胞阻滞于 G_1 期的结果[8,9]，本研究的部分结果与之相符，即低浓度 Art 可将肿瘤细胞阻滞于 G_0/G_1 期，从而阻止肿瘤细胞的基因组 DNA 的合成。与以往文献不同的是，本研究结果显示高浓度 Art 则是将细胞阻滞于 G_2/M 期，说明高浓度 Art 不仅可以阻止肿瘤细胞基因组 DNA 的合成，还可有效抑制肿瘤细胞的分裂增殖。

Efferth 等[7]研究显示青蒿素及其衍生物的抗瘤作用机制的关键是细胞周期调控，但其具体作用靶点和机制目前还不清楚。CDC25 是一个双重特异性磷酸酶，能消除 CDKs 的 ATP 锚定模序上 Thr-14 和 Tyr-15 的抑制性磷酸化，而这一过程则是细胞周期调控的中心环节。CDC25 家族有 CDC25A、CDC25B、CDC25C 3 个成员，其中 CDC25A 对 G_1/S 转换和进入 S 期是必需的，最近的研究显示 CDC25A 亦参与 G_2/M 期转换，是最为重要的细胞周期调控因素之一。已有研究显示许多肿瘤中都存在 CDC25A 高表达，并与肿瘤的生长增殖状态密切相关[10-12]。本实验通过 RT-PCR 及 Western blotting 检测结果显示，Art 作用后，CDC25A mRNA 及蛋白表达水平均降低，提示 Art 诱导肿瘤细胞阻滞于 G_0/G_1 及 G_2/M 期，与抑制 CDC25A 的表达有密切关系。关于 Art 如何抑制 CDC25A mRNA 的表达，CDC25A 蛋白表达降低是否直接源于 CDC25A mRNA 表达受抑尚需进一步探讨。

参考文献：

[1] 王　勤，吴理茂，李爱媛，等. 青蒿琥酯抗肝癌作用的实验研究[J]. 中国中药杂志，2001，26(10)：707-708，720.

[2] 肖柳英，林培英，张　丹，等. 青蒿琥酯对小鼠肝癌及 S_{180} 实体瘤的抑制作用[J]. 实用癌症杂志，2001，16(3)：245-247.

[3] 林　芳，钱之玉，薛红卫，等. 青蒿素和青蒿琥酯对人乳腺癌 MCF-7 细胞的体外抑制作用比较研究[J]. 中草药，2003，34(4)：347-349.

[4] Galaktionov K，Lee A K，Eckstein J，*et al*. CDC25 phosphatases as potential human oncogenes[J]. Science，1995，269(5230)：1575-1577.

[5] 奥斯伯 F，布伦特 R，金斯顿 R E，等. 精编分子生物学指南[M]. 颜子颖，王海林，译. 北京：科学出版社，1998：333-373.

[6] 孙炜辰，韩家娴，杨蔚怡，等. 四种青蒿酸及青蒿 B 衍生物的体外抗癌作用[J]. 中国药理学报，1992，13(6)：541-543.

[7] Efferth T，Dunstan H，Sauerbrey A，*et al*. The anti-malarial artesunate is also active against cancer[J]. Int J Oncol，2001，18(4)：767-773.

[8] Li Y，Shan F，Wu J M，*et al*. Novel antitumor artemisinin derivatives targeting G_1 phase of the cell cycle[J]. Bioorg Med Chem Lett，2001，11(1)：5-8.

[9] Wu J，Shan F，Wu G S，*et al*. Synthesis and cytotoxicity of artemisinin derivatives containing cyanoarylmethyl group[J]. Eur J Med Chem，2001，36(5)：467-479.

[10] Wu W Y，Fan H，Kemp B L，*et al*. Overexpression of CDC25A and CDC25B is frequent in primary non-small cell lung cancer but is not associated with overexpression of c-myc[J]. Cancer Res，1998，58(18)：4082-4085.

[11] Gasparotto D，Maestro R，Piccinin S，*et al*. Overexpression of CDC25A and CDC25B in head and neck cancers[J]. Cancer Res，1997，57(12)：2366-2368.

[12] Cangi M G，Cukor B，Soung P，*et al*. Role of the CDC25A phosphatase in human breast cancer[J]. J Clin Invest，2000，106(6)：753-761.

（编辑　薛国文）