论著

文章编号:1000-5404(2012)06-0522-04

新型斑蝥素类似物 LB1 协同阿霉素杀伤肝癌细胞的实验研究

王得春[1,2],谭 旭[1],张二龙[1],王曙光[2],史春梦[1] (400038 重庆,第三军医大学:军事预防医学院防原医学教研室,全军复合伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆市纳米工程研究中心[1],西南医院全军肝胆外科研究所[2])

[摘要] **目的** 通过水溶性化学小分子蛋白磷酸酶2A抑制剂LB1与阿霉素(doxorubicin, DOX)联合应用,研究其在肝癌化疗过程中的协同作用。**方法** 体外细胞活性分析检测不同剂量LB1对HepG2细胞活性影响及其与阿霉素(DOX)的协同杀伤效应;通过裸鼠体内荷瘤模型以及组织化学分析,进一步观察LB1对肿瘤生长影响以及在体与阿霉素的协同化疗作用。**结果** LB1对HepG2细胞生长与作用剂量相关,低剂量时可促进其生长,高剂量时则促进其凋亡,而且在联合阿霉素后,可显著提高对HepG2肿瘤细胞的杀伤作用;体内实验也发现,单纯给予阿霉素抑瘤率为57%,而LB1联合应用后,抑瘤率可达77%,显著提高了阿霉素对肿瘤的杀伤作用($P<0.05$),且无明显毒副作用。**结论** LB1联合应用可显著提高阿霉素(DOX)对肝癌细胞的化学杀伤作用。

[关键词] 斑蝥素衍生物;PP2A抑制剂;LB1;阿霉素;HepG2细胞
[中图法分类号] R730.53;R730.7;R979.1 [文献标志码] A

Synergistic effect of a novel cantharidin analog LB1 with doxorubicin in chemotherapy against hepatocellular carcinoma cells

Wang Dechun[1,2], Tan Xu[1], Zhang Erlong[1], Wang Shuguang[2], Shi Chunmeng[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Combined Injury, Chongqing Engineering Research Center for Nanomedicine, College of Preventive Medicine, [2]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the synergistic effect of cantharidin analog LB1, a novel inhibitor of protein phosphatase 2A, with doxorubicin (DOX) on human HepG2 hepatocellular carcinoma cells. **Methods** *In vitro* cell viability analysis was applied to detect the effect of different doses of LB1 and the synergistic effect of LB1 with DOX on HepG2 cells. The *in vivo* synergistic effect of LB1 with DOX was further examined in HepG2 tumor xenografts in athymic nude mice by immunohistochemical assay. Tumor growth and mouse weight were measured after the treatment. **Results** The effect of LB1 on the growth of HepG2 cells was associated with the doses of administration. Low doses of LB1 (<10 mol/L) promoted cell viability, while high doses of LB1 (>10 mol/L) induced the mitotic catastrophe and apoptosis of HepG2 cells. The *in vivo* experiment results showed that the growth inhibition rate of HepG2 cells was 57% for DOX alone, and increased significantly to 77% for LB1 and DOX combination. LB1 significantly enhanced the effect of DOX on tumor growth inhibition in both cultured HepG2 *in vitro* and mouse xenografts *in vivo* without apparent toxicity ($P<0.05$). **Conclusion** LB1 can enhance the effect of doxorubicin in the chemotherapy against hepatocellular carcinoma cells.

[**Key words**] cantharidin derivative; PP2A inhibitor; LB1; Doxorubicin; HepG2 cells

Corresponding author: Shi Chunmeng, Tel: 86-23-68752280, E-mail: shicm1010@yahoo.com.cn

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全世界范围内发病率和病死率都极高的恶性肿瘤之一[1]。目前肝切除术仍是治疗肝癌最行之有效的措施,然而只有少数肝癌患者符合手术条件,且术后转移复发率极高[2]。对于肝癌晚期失去手术机会的患者,化疗则成了其唯一的选择。目前阿霉素(doxorubicin, DOX)在肝癌化疗中应用广泛[3],然而高剂量阿霉素虽有显著疗效,但其对心脏和肝功能有明显的毒副作用,控制剂量后又很难达到根治肿瘤的效果[4]。

斑蝥素(Cantharidin)可以通过抑制蛋白磷酸酶

[通信作者] 史春梦,电话:(023)68752280,E-mail: shicm1010@yahoo.com.cn

2A(protein phosphatase 2A,PP2A)的活性,而使癌细胞异常分裂,引起有丝分裂灾难(mitotic catastrophe),最终导致细胞凋亡,从而起到抑瘤作用[5-6]。然后,严重的毒副作用限制了其临床应用。

近年来发现,一种斑蝥素的新型化学小分子衍生物 LB1 可以通过抑制 PP2A 活性,调控肿瘤细胞进入分裂期,从而增加化疗药物对肿瘤,如多形性胶质母细胞瘤以及神经母细胞瘤的化疗效果,而且无明显毒副作用,在肿瘤化学治疗中显示出良好的研究前景[7-8]。我们前期研究还表明,LB1 可显著抑制 PP2A 活性,并协同阿霉素显著杀伤皮肤干细胞来源恶性肿瘤,且无明显毒副作用,进一步支持其应用前景[9]。

本研究拟在上述研究基础上,研究 LB1 对阿霉素杀伤肝癌细胞的协同作用,以期为肝癌治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

LB1 斑蝥素类似物 LB1.2 的水溶性化合物,由美国 Lixte 生物科技集团提供[7]。阿霉素由深圳万乐有限公司提供。DMEM 培养基购自 HyClone 公司,胎牛血清购自 Gibco 公司,抗-PCNA 抗体购自博士德公司,Hoechst33342 购自碧云天公司,细胞计数试剂盒(CCK-8)购自日本 Dojindo 化学研究所。

1.2 细胞培养

以含有 10% 的胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 NMEM 培养基将人类肝癌细胞株 HepG2 细胞培养在 37 ℃、含有 5% CO_2 和 95% 空气的培养箱中。

1.3 体内抗瘤活性处理

20 只 5 ~ 6 周无胸腺裸鼠(athymic nude mice),以含有 1×10^7 的 200 μl PBS 混合液在每只裸鼠右侧腹部皮下荷瘤,并运用随机数字表法分为 4 组,分别为对照组、DOX 组、LB1 组以及联合组。单独给药组(LB1 组和 DOX 组)中,分别以 0.5、2.5 mg/kg通过腹腔在第 4、6、8、10、12 天给予 LB1 和 DOX。而联合组,与单独给药组剂量相同,但 2 种药物相隔 1 d 给药。每 3 天测量实验鼠体质量以及肿瘤大小。肿瘤体积计算公式为:肿瘤体积 = 肿瘤长度 × 肿瘤宽度 × (1/2)。所有实验鼠在第 22 天处死,测量肿瘤湿重,并以 4% 多聚甲醛固定将小鼠相关脏器(心、肝、脾、肺、肾等)以及肿瘤固定保存。

另外,抑瘤率(tumor inhibitory rate)计算公式为:抑瘤率 = (对照组平均瘤质量 - 处理组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量 ×100%。

1.4 组织学分析

将固定好的肿瘤组织进行包埋、切片,然后分别行 HE 染色以及 PCNA 染色。

1.5 体外细胞活性分析

将 HepG2 细胞按每孔 3×10^3 细胞混于 100 μl 含有 10% 的胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 NMEM 培养基中,然后接种到 96 孔板中,放入 37 ℃、含有 5% CO_2 和 95% 空气的培养箱中生长 24 h。然后分别加入一定浓度的 LB1 后继续孵育 48 h,然后每孔加入 10 μl 的 CCK-8 进行细胞毒性检测。

1.6 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 统计学软件进行 t 检验。

2 结果

2.1 LB1 体外对 HepG2 生长的影响及其与阿霉素的协同杀伤作用

通过体外研究发现,在 LB1 对 HepG2 细胞生长的影响与作用剂量密切相关(图 1),即当给予小剂量 LB1(< 10 μmol/L)时,HepG2 细胞随着 LB1 剂量的增加,其生长加快;然而,当给予 LB1 剂量大于 10 μmol/L 以后,HepG2 细胞活性随 LB1 的剂量增加而降低,开始出现细胞凋亡。这些表明 LB1 可诱导肿瘤细胞出现异常分裂,引起有丝分裂灾难,最终导致细胞凋亡。进而观察 LB1 与阿霉素的联合杀伤效应,发现较之对照组,单纯给予 DOX 药物组显著杀伤肿瘤细胞($P < 0.05$),同样,较之单纯给予 DOX 药物组,联合给药(LB1 10 μmol/L、DOX 0.4 μg/ml)肿瘤杀伤作用更加显著($P < 0.05$),表现出了显著的协同杀伤作用。这可能是由于 LB1 促进了 HepG2 细胞特别是静止期细胞的异常分裂,从而增强了阿霉素的杀伤作用。

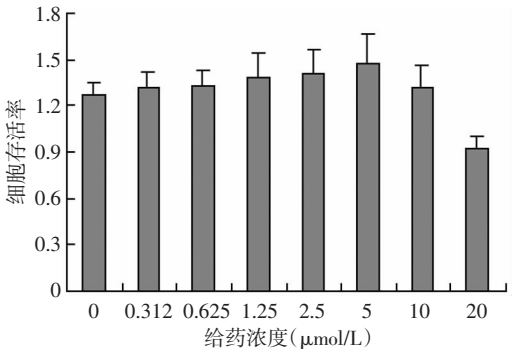
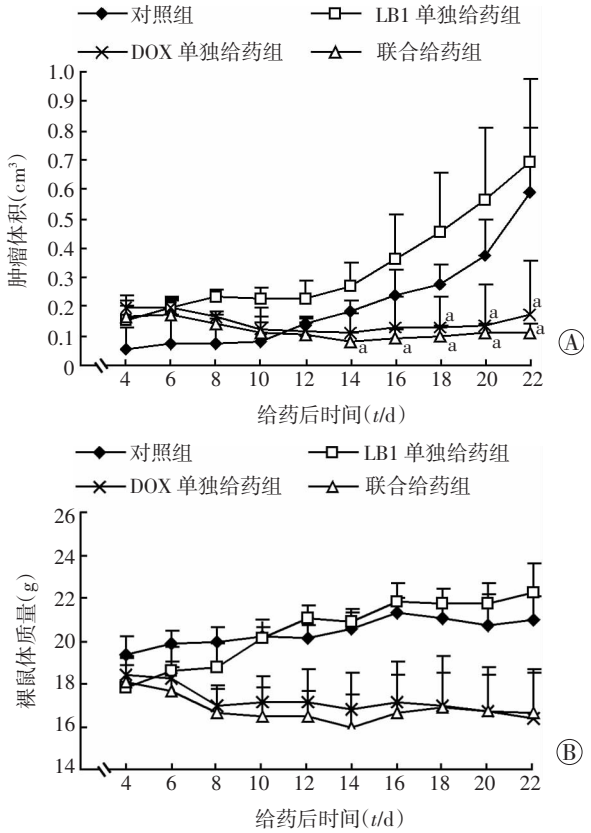


图 1 体外不同浓度 LB1 对 HepG2 细胞的作用

2.2 LB1 与阿霉素体内联合应用对 HepG2 细胞的协同杀伤作用

根据体外研究结果,进一步对无胸腺裸鼠进行体内抗瘤活性处理发现,与对照组比较,LB1 单独给药组未见对肿瘤生长具有明显杀伤作用,肿瘤体积增长甚至较对照有所加快;DOX 单纯给药组对肿瘤具有抑制作用;LB 联合 DOX 组对肿瘤生长的抑制作用更显著($P < 0.05$)(图 2A);给药 22 d 后取材,发现 LB1 联合组较之 DOX 组肿瘤体积更小,肿瘤湿重分析中也获得类似结果,较之对照组,DOX 单纯给药组肿瘤湿重降低(抑瘤率为 57%),联合给药组降低更加显著(抑瘤率 77%,$P < 0.05$),这些提示 LB1 可协同增强阿霉素对肿瘤的杀伤作用。此外,在对裸鼠体质量进行动态分析中发现,DOX 组以及联合组裸鼠体质量明显下降,而 LB1 组与对照组并无变化(图 2B),也表明 LB1 本身并不存在明显的毒副作用。



A:给予不同药物后肿瘤体积动态变化情况 a:$P<0.05$,与对照组比较; B:不同给药组裸鼠体质量动态变化情况

图2 体内抗瘤实验结果

HE染色发现,LB1组肿瘤细胞大部分呈现细胞核固缩,细胞体积缩小出现明显分裂形态,DOX组肿瘤细胞则呈现细胞肿胀、核固缩、出现空泡等坏死表现,并且组织可见明显坏死区。联合组见大量固缩核而无明显坏死区(图3)。

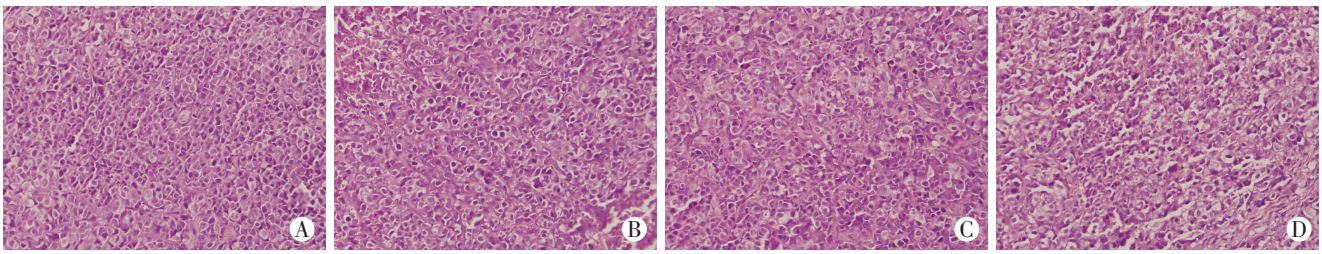
PCNA免疫组织化学染色后示,LB1组PCNA阳性细胞较之对照组显著增加,而DOX组PCNA阳性细胞减少,联合组显著减少(图4)。这些组织学结果进一步提示,LB1可以通过促进肿瘤细胞的异常分裂,增强阿霉素对肿瘤细胞的杀伤作用。

3 讨论

利用肿瘤细胞周期调节中存在的缺陷来选择性杀伤肿瘤细胞,是目前抗癌治疗的一种主要策略[10-11]。然而,由于肿瘤细胞的异质性,当暴露于化疗药物时,细胞可以通过细胞自身周期阻滞,由分裂期进入"休眠"期,从而逃避化疗药物对其杀伤作用[12-13],导致化疗失败。虽然高剂量的化疗药物仍可以起到较好的疗效,但其存在明显的毒副作用,对患者伤害极大。

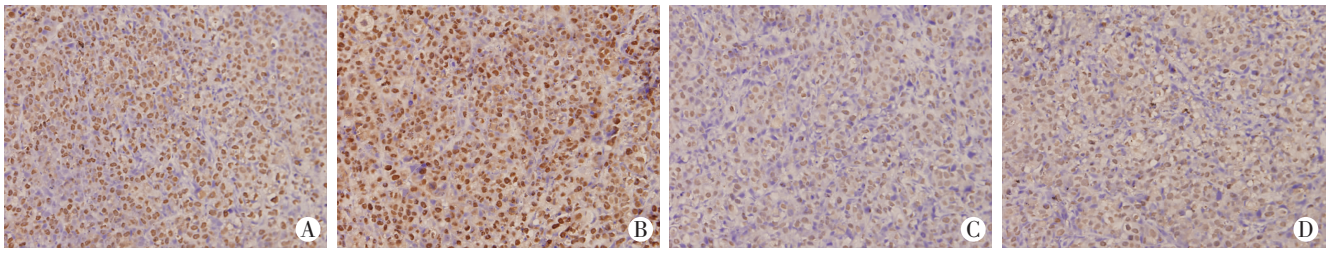
PP2A是一种广泛分布的具有调节细胞周期及凋亡作用的丝氨酸/苏氨酸磷酸酶[14]。我们前期研究发现,LB1在较低剂量下可通过抑制p53信号通路,使肿瘤细胞受到化疗药物作用后的主动防御机制发生障碍,导致肿瘤细胞发生异常分裂,增加对化疗药物的敏感性;在高剂量时还可通过诱发有丝分裂灾难而导致肿瘤细胞凋亡,我们前期和其他研究均表明,LB1可以显著增强化疗药物对多种肿瘤的杀伤作用[7-8,15],可望为增强肿瘤的化疗效果提供新的思路。

目前,阿霉素广泛应用于肝癌的化疗中,然而高剂量阿霉素对心脏和肝功能有明显的毒副作用。本研究通过体外和体内研究均发现,在LB1作用下,HepG2细胞可出现异常分裂,并可发生细胞凋亡,从而增强DOX对HepG2细胞的杀伤作用,表现为LB联合DOX可更显著地杀伤肿瘤细胞。上述研究表明,LB1可协同增强阿霉素对肝癌的化疗作用,从而可望减少阿霉素的用量,为肝癌化疗提供了可能的新途径。



A:对照组;B:LB1组;C:DOX组;D:联合组

图3 各组裸鼠肿瘤组织病理学改变 (HE ×400)



A:对照组;B:LB1组;C:DOX组;D:联合组

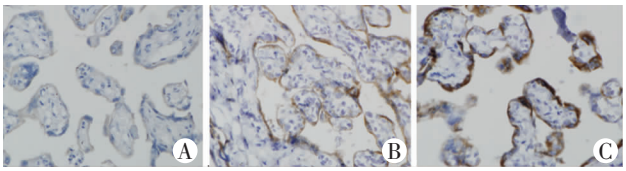
图4 免疫组织化学检测各组裸鼠肿瘤组织PCNA表达 (S-P ×400)

参考文献：

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, *et al*. Cancer statistics, 2010[J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5): 277 – 300.
[2] Coradini D, Speranza A. Histone deacetylase inhibitors for treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Acta Pharmacol Sin, 2005, 26(9): 1025 – 1033.
[3] Gewirtz D A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin[J]. Biochem Pharmacol, 1999, 57(7): 727 – 741.
[4] Puhlmann U, Ziemann C, Ruedell G, *et al*. Impact of the cyclooxygenase system on doxorubicin-induced functional multidrug resistance 1 overexpression and doxorubicin sensitivity in acute myeloid leukemic HL-60 cells[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312(1): 346 – 354.
[5] Hart M E, Chamberlin A R, Walkom C, *et al*. Modified norcantharidins; synthesis, protein phosphatases 1 and 2A inhibition, and anticancer activity[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2004, 14(8): 1969 – 1973.
[6] Liu D, Chen Z. The effects of cantharidin and cantharidin derivates on tumour cells[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2009, 9(4): 392 – 396.
[7] Lu J, Kovach J S, Johnson F, *et al*. Inhibition of serine/threonine phosphatase PP2A enhances cancer chemotherapy by blocking DNA damage induced defense mechanisms[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(28): 11697 – 11702.
[8] Martiniova L, Lu J, Chiang J, *et al*. Pharmacologic modulation of serine/threonine phosphorylation highly sensitizes PHEO in a MPC cell and mouse model to conventional chemotherapy[J]. PLoS One, 2011, 6(2): e14678.
[9] Zhang C, Peng Y, Wang F, *et al*. A synthetic cantharidin analog for the enhancement of doxorubicin suppression of stem cell-derived aggressive sarcoma[J]. Biomaterials, 2010, 31(36): 9535 – 9543.
[10] Liu N, Fang H, Li Y, *et al*. Recent research in selective cyclin-dependent kinase 4 inhibitors for anti-cancer treatment[J]. Curr Med Chem, 2009, 16(36): 4869 – 4888.
[11] Noteborn M H. Proteins selectively killing tumor cells[J]. Eur J Pharmacol, 2009, 625(1/3): 165 – 173.
[12] Gascoigne K E, Taylor S S. How do anti-mitotic drugs kill cancer cells?[J]. J Cell Sci, 2009, 122(Pt 15): 2579 – 2585.
[13] Aguirre-Ghiso J A. Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy[J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7(11): 834 – 846.
[14] Eichhorn P J, Creyghton M P, Bernards R. Protein phosphatase 2A regulatory subunits and cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2009, 1795(1): 1 – 15.
[15] Zhuang Z, Lu J, Lonser R, *et al*. Enhancement of cancer chemotherapy by simultaneously altering cell cycle progression and DNA-damage defenses through global modification of the serine/threonine phosphoproteome[J]. Cell Cycle, 2009, 8(20): 3303 – 3306.

（收稿：2011-11-09；修回：2011-12-20）
（编辑 邓强庭）

（上接 521 页）



A：对照组；B：试验组轻度子痫前期；C：试验组重度子痫前期

图 2 免疫组化检测各组胎盘组织中 COX-2 的表达 （S-P ×100）

2.2 胎盘组织 p38MAPK 与 COX-2 表达的相关性

试验组轻、重度子痫前期 p38MAPK 与 COX-2 表达强度均呈正相关（$r=0.838$，$P<0.05$；$r=0.728$，$P<0.05$）。

3 讨论

p38MAPK 主要表达于胎盘滋养层细胞、血管内皮细胞的细胞质，可由细胞外的多种应急反应活化。Fujita 等[1]发现，与细胞外信号相关的酶及级联反应在低氧诱导的子痫前期发病中起重要作用。Mata-Greenwood 等[2]发现，通过 p38MAPK 信号通路改变 VEGF 等因子的表达，使胎盘螺旋动脉发生重塑。本研究发现，子痫前期组胎盘 p38MAPK mRNA 较正常妊娠组明显增多，重度子痫前期组胎盘 p38MAPK 的表达强于轻度子痫前期组。提示子痫前期患者胎盘中 p38MAPK 基因转录、翻译增加，导致血管内皮细胞损伤及功能障碍；促进滋养细胞凋亡，使其浸润不足，发生子痫前期。

COX-2 为动脉粥样硬化的独立危险因子，可因细胞因子等炎症介质诱导产生。Burdon 等[3]通过研究大鼠胎盘发现，氧化应激可导致 COX-2 的表达增加及凋亡加速，与子痫前期发病密切相关。欧阳艳琼等[4]研究发现子痫前期患者子宫胎盘螺旋小动脉呈急性粥样硬化，其胎盘组织中 COX-2 阳性着色细胞数明显高于对照组。本研究结果显示，子痫前期患者胎盘 COX-2 表达高于正常孕妇，且重度子痫前期表达高于轻度子痫前期。表明 COX-2 参与子痫前期动脉粥样硬化病变的炎症过程。

Yamakawa 等[5]研究发现，注射脂多糖的大鼠血管平滑肌细胞 COX-2 和 PGs 的蛋白和 mRNA 表达增多，而使用 p38MAPK 抑制剂 SB203580 预注射的大鼠 COX-2 和 PGs 的表达明显受抑制。魏倩萍等[6]在糖尿病肾病的研究中发现 COX-2 表达增加是依赖于 p38MAPK 的激活。本研究发现子痫前期胎盘中 p38MAPK 与 COX-2 表达强度程正相关，提示 COX-2 表达受 p38MAPK 调控，p38MAPK 是 COX-2 的上游激酶之一。

参考文献：

[1] Fujita D, Tanabe A, Sekijima T, *et al*. Role of extracellular signal-regulated kinase and AKT cascades in regulating hypoxia-induced angiogenic factors produced by a trophoblast-derived cell line[J]. J Endocrinol, 2010, 206(1): 131 – 140.
[2] Mata-Greenwood E, Liao W X, Zheng J, *et al*. Differential activation of multiple signalling pathways dictates eNOS upregulation by FGF2 but not VEGF in placental artery endothelial cells[J]. Placenta, 2008, 29(8): 708 – 717.
[3] Burdon C, Mann C, Cindrova-Davies T, *et al*. Oxidative stress and the induction of cyclooxygenase enzymes and apoptosis in the murine placenta[J]. Placenta, 2007, 28(7): 724 – 733.
[4] 欧阳艳琼，陈汉平，沈红玲. 环氧合酶-2 在子痫前期患者胎盘组织中的表达[J]. 中国优生与遗传杂志，2007，15(4)：38 – 40.
[5] Yamakawa T, Ohnaka K, Tanaka S, *et al*. Cyclooxygenase-2 induction by lysophosphatidylcholine in cultured rat vascular smooth muscle cells: involvement of the p38MAPK pathway[J]. Biomed Res, 2008, 29(1): 1 – 8.
[6] 魏倩萍，邓华聪，赵劼. p38MAPK 对大鼠肾小球系膜细胞表达 COX-2 的影响[J]. 中国糖尿病杂志，2007，15(9)：558 – 561.

（收稿：2011-12-15；修回：2012-01-11）
（编辑 汪勤俭）