维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0301-03

XIAP 小分子抑制剂 Embelin 对胃癌细胞株 SGC7901 的作用研究

张 红[1], 高 青[1],汤为学[2]

(1.重庆医科大学附属第一医院消化内科;2.重庆医科大学病理生理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察 XIAP 小分子抑制剂 Embelin 对肿瘤细胞株 SGC7901 的作用。方法:实验分 SGC7901,SGC7901+Embelin 两组, 采用 RT-PCR,Western blot 分别测定 XIAP mRNA 和蛋白水平;MTT 法检测 SGC7901 对 VCR,Embelin,VCR+Embelin 的敏感性,并计算合用指数 CI;体内观察抑瘤情况。结果:体外实验显示 Embelin 诱导后 SGC790 的 XIAP mRNA 基因和蛋白水平均明显高于 SGC7901+Embelin 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。MTT 显示 VCR IC_{50}=0.045 8 μmol;Embelin IC_{50}=6.369 1 μmol;联合用药 IC_{50}=0.039 9 μmol。合用指数 CI 在抑制率为 90%时的抑制率开始大于 1。体内实验:VCR 组,Embelin 组及联合用组分别为重量抑瘤率分别是 90.719 2,93.514 4,96.592 3。结论:XIAP 小分子抑制剂 Embelin 对 SGC7901 有效, 联合常规化疗药物 VCR 作用表现为小剂量协同,大剂量拮抗。

【关键词】XIAP;Embelin;胃癌

【中国图书分类法分类号】R730 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-26

The effect of small molecule anatagonists of XIAP(Embelin)on the multidrug resistance cells SGC7901

ZHANG Hong,et al

(*Department of Gastroenterology,the First Affiliated Hospital,Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*:To oberserve the effect of small molecule anatagonists of XIAP (Embelin)on the multidrug resistance cells SGC7901 in vitro and in vivo. *Methods*:in vitro two groups of cultured SGC7901 cells were used:SG7901 (group A),the SGC7901 cells treated with Embelin (group B),XIAP mRNA and protein levels of the cells of both groups were determined by TR-PCR,Western blot. MTT assay was performed to examine the IC_{50} and CI. In vivo nude mice were divided into four groups:control group,VCR group,Embelin group,VCR assistance with Embelin group, the weight of tumor growth in the nude mice were measured. *Results*:Between group A and group B there was a significant difference in the expression of XIPA ($P<0.05$),VCR IC_{50}=0.045 8 μmole;Embelin IC_{50}=6.369 1 μmol;Combination IC_{50}=0.039 9 μmol,CI>1 at the high inhibition ratio>90% by MTT assay. in vivo experiment tumor weight inhibition rates were93.514 4,90.719 2,96.592 3respectivly. *Conclusion*:Embelin was good for cells SGC7901,especial for a low dose combination with VCR.

【Key words】XIAP;Embelin;Gastric cancer

凋亡抑制蛋白(IAP 家族)在抑制细胞凋亡中起着非常重要的作用,目前认为 X 染色体连锁的凋亡抑制基因(X-linked inhibitor of apoptosis protein gene, XIAP)是 IAP 家族中最有潜在抑制活性的一种蛋白质,它可以与 caspase-3、caspase-7、caspase-9 直接结合,抑制其活性,从而抑制细胞凋亡的发生。并且由于 XIAP 在多种人类肿瘤细胞中存在过量表达,因而认为其在肿瘤化疗中起着重要作用。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

1.1.1 细胞株和动物 SGC7901 为胃癌细胞系,由重庆医科大学基础研究所提供;12 只裸鼠(BABL/C,4~5 周龄,雌性,20g),购于中国科学院上海动物实验中心,裸鼠在 SPF(特殊的无病原体的条件下)饲养,并用灭菌食物和水喂养。

1.1.2 药品及主要试剂 羊抗人 XIAP 一抗:RD 公司,货号 AF8221。Embelin、二甲基亚砜(DMSO)、硝酸纤维素滤膜、噻

作者介绍:张 红(1981-),女,硕士,
研究方向:消化道肿瘤与多药耐药。

通讯作者:高 青,男,教授,E-mail:gaoqing27@yahoo.com.cn。

维普资讯 http://www.cqvip.com

唑蓝(MTT)为美国 Sigma 公司产品,RPMI1640 培养基购自 GIBCO 公司;小牛血清购自 TBD 公司,总 RNA 提取试剂盒购自上海华舜生物有限公司,RT-PCR 试剂盒为 Takara 产品。

1.2 试验方法

1.2.1 细胞培养 SGC7901 常规培养于含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液。

1.2.2 引物设计与合成 应用 Premier Primer5.0 软件设计引物,由上海生物工程技术服务有限公司合成,目的基因 XIAP 上游引物: 5'-TGGCACGAGCAGGGTTCTTTT-3'。下游引物 5'-TGGCACGAGCAGGGTTTCTTT-3'。内参 GAPDH 上游引物 5'-GGAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'。下游引物 5'-GACCACCTGGTGCTCAGTGT-3'。

1.2.3 细胞总 RNA 的提取及 RT-PCR 收集 SGC7901 细胞,提取总 RNA。紫外分光光度计测定所获 RNA 样品的含量和纯度,同时行电泳检测 RNA 完整性。逆转录 RNA,扩增 cDNA 产物,PCR 产物经 15%琼脂糖凝胶电泳后,用凝胶图像分析系统进行分析。

1.2.4 Western blot 制备 SGC7901 总蛋白质,并用 BCA 法测定蛋白浓度,上样,电泳,电转,封闭,结合一抗,二抗,显色,用密度扫描仪全自动扫描图像分析仪,数据分析测定条带的面积和灰度值,得出积分灰度值以代表蛋白表达量。

1.2.5 MTT 法体外药物敏感性实验 测定 SGC7901 对化疗药物的敏感性。收获、计数对数生长期的胃癌细胞,按每孔 1×10^4 个 /L 铺入 96 孔板。培养过夜后,将 VCR 分别加入细胞中,每组设 3 复孔。继续培养 72h,按照常规方法依次加入 MTT、DMSO,并于酶联免疫仪上测定各孔的吸光度 A570。根据 $fa/fu = (D/D_m)^m$ 计算各种药物的中效浓度(IC_{50})值。计算各不同抑制率时的合用指数,并绘制图表。

1.2.6 动物实验 实验随机分为 4 组,对照组、VCR 组、Embelin 组、Embelin+VCR 组,细胞悬液(3×10^6 个 /ml)皮下接种建模,于模型建立 24h 后开始给药。隔日给药,以上 VCR 采用腹腔注射,Embelin 采用臀部皮下注射,每次每只裸鼠注射 0.2ml,共给药 2 周。4 周后将所有裸鼠脱臼处死。取出肿瘤、脾脏,称量。

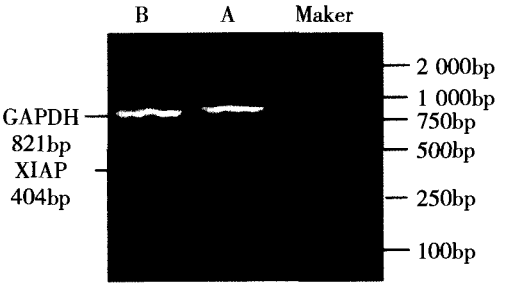
1.3 统计分析

统计学处理实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用卡方检验和方差分析。

2 结 果

2.1 2 组细胞 XIAP mRNA 的表达

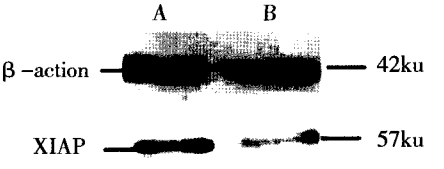
2 组细胞均扩增出内参 GAPDH 的片断(821bp),且每组均扩增出 404bp 的 XIAP 基因片断。经 3 次重复实验,结果显示 SGC7901+Embelin 的 XIAP mRNA 明显减弱,与 SGC7901 的 XIAP mRNA 比较差异有统计学意义($P<0.05$)。



A. SGC7901;B. SGC7901 +Embelin

图 1 细胞株 SGC7901 加药前后的 RT-PCR 结果

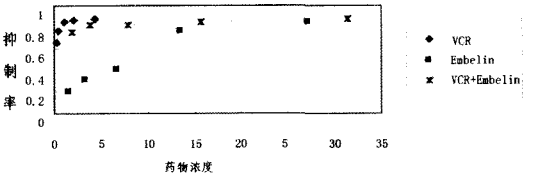
2.1.2 2 组细胞 XIAP 的蛋白表达 2 组细胞均扩增出内参 β-action,且每组均转出 57ku 的 XIAP 的蛋白,经 3 次重复实验,结果显示 SGC7901+Embelin 的蛋白水平明显减弱,与 SGC790 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。



A. SGC7901; B. SGC7901+Embelin

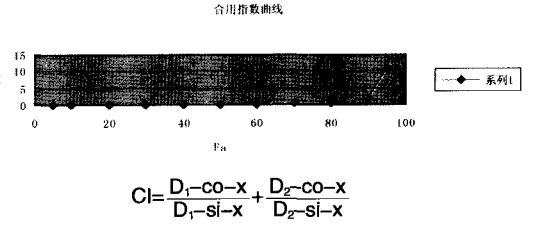
图 2 细胞株 SGC7901 加药前后的 Western 结果

2.1.3 MTT 法测定胃癌细胞对化疗药物的敏感性 测出不同浓度下的抑制率进而得出各自的中效浓度,计算不同浓度下的合用指数 CI,体外显示 Embelin 与 VCR 联合用药时 SGC7901 表现为小剂量时协同(CI<1),大剂量时拮抗(CI>1)见图 3,图 4。



浓度单位:μmol/L VCR IC_{50}=0.045 8 μmol;
Embelin IC_{50}=6.369 1 μmol; 联合用药 IC_{50}=0.039 9 μmol

图 3 不同药物浓度下的抑制率曲线图



$$CI=\frac{D_1\text{-}co\text{-}x}{D_1\text{-}si\text{-}x}+\frac{D_2\text{-}co\text{-}x}{D_2\text{-}si\text{-}x}$$

图 4 VCR+Embelin 联合用药的合用指数曲线图

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 各组平均瘤体,脾脏重量和抑瘤率

分组(B 组)	数量	重量(g)肿瘤	脾脏	抑瘤率
对照组	3	0.636 8 ± 0.007	0.154 1 ± 0.010	—
VCR	3	0.059 1 ± 0.009	0.090 1 ± 0.006	90.719 2
Embelin	3	0.041 3 ± 0.010	0.082 3 ± 0.008	93.514 4
联合用药	3	0.021 7 ± 0.010	0.010 1 ± 0.007	96.592 3

合用指数 CI 和抑制率的曲线图,CI 在抑制率为 90 时开始大于 1,小剂量时联合用药表现为协同,大剂量时表现为拮抗。

2.1.4 裸鼠经不同给药方式化疗后的抑瘤变化

见表 1。

3 讨 论

化疗药物诱导细胞凋亡,首先是药物作用于细胞的特异性靶点,导致靶细胞的损伤和功能障碍,通过一系列途径将信号传递到凋亡调控点,触发细胞凋亡。凋亡启动后,经过一系列酶的级连反应,最后均导致凋亡效应分子 caspase-3、caspase-7 的活化,切割 DNA。因此,凡是能抑制细胞凋亡的因子均可能使化疗药物诱导的肿瘤细胞的死亡下降。IAP 家族是近来新发现的具有强烈凋亡抑制作用的蛋白质家族,而 XIAP 被认为是 IAP 家族中作用最强的一种,XIAP 的主要结构包括 3 个 BIR 结构域,即杆状病毒 IAP 重复序列区(Baculoviral Inhibitor of apoptosis Repeat,BIR)它是 IAP 家族蛋白的特征性结构,位于 XIAP 蛋白的 N 端;一个功能不明的两性分子结构区,羟基端一个富含半胱氨酸的锌指结构以及以上结构的连接区域(linker)。通过竞争性和非竞争性机制,XIAP 的 BIR 结构域及 linker 区域能够分别抑制 caspase-3、caspase-7、caspase-9,从而起到抑制细胞凋亡,促进细胞生存的作用[1~9]。

Embelin 是从中药矮地茶中提取信筒子素,已有的实验证实,其具有 SMAC(Second mitochondria-derived activator of caspases)同样的粘性,并能与 BIR3 结构域结合,继而阻止其与 caspase-9 结合;在前列腺癌细胞系中研究发现,在微克级信筒子素的作用下,可以直接诱导前列腺癌细胞凋亡[10]。

研究通过体内体外实验观察 Embelin 对胃癌细胞株 SGC7901 的作用。体内 Embelin 短期单独、合同 VCR 作用于 SGC7901 时,均能很好的抑制肿瘤的生长(肿瘤重量抑制率分别为 93.514 4,96.592 3);体外 Embelin 与 VCR 联合作用于 SGC7901 时(联合用药浓度范围为 1.969 2 ~ 31.511 5 μmol),表现为小剂量时协同(CI<1),大剂量时拮抗(CI>1),这为临床选取最佳用药剂量及是否选择联合用药提供了实验室依据。至于 Embelin 的长期作用及疗效,正在进一步的研究之中。

对 Embelin 作用后的裸鼠进行骨髓及外周血涂片未见骨髓抑制和外周血形态改变(外周血的细胞数目不减少,骨髓象中粒,红系及巨核细胞未明显减少且形态大致正常),做卵巢病理切片发现细胞形态的改变(细胞体积明显变大,胞核无明显改变),这与 Johri RK 等[11]的结果一致:在动物研究中发现,信筒子素是安全的,仅会引起可逆性的雄激素降低和暂时性的生育障碍,目前,信筒子素是最有望进入临床实验的 BIR3 抑制剂。

同时通过 RT-PCR,Western blot 测定基因及蛋白的表达水平,发现胃癌细胞株 SGC7901 经 Embelin 诱导后 XIAPmRNA 和蛋白水平明显下降($P<0.01$),其抗凋亡作用明显减弱,导致肿瘤发生凋亡,打断肿瘤异常凋亡途径是有效抑制肿瘤发生发展的重要手段。

参 考 文 献

[1] 罗华友,杨家印,刘自明,等.多药耐药基因反义寡核苷酸逆转肝癌细胞耐药的研究[J]. 中华肝脏病杂志,2004;12(2):85-87.

[2] Deveraux QL, Roy N,Stennicke HR,et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases[J]. EMBO J,1998;17(8):2215-2223.

[3] Suzuki Y,Nakabayashi Y,Nakata K,et al. X-linked Inhibitor of apoptosis protein(XIAP) inhibits caspase-3 and-7 in distinct modes [J]. J Biol Chem,2001;276(29):27058-27063.

[4] Shiozaki EN,Chai J,Rigotti DJ,et al. Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9[J]. Mol Cell,2003;11(2):519-527.

[5] Silke J,Ekert PG,Day CL,et al. Direct inhibition of caspase-3 is dispensable for the anti-apoptotic activity of XIAP[J]. EMBO J. 2001;20(12):3114-3123.

(下转第 363 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

膜及粘膜下组织缝合，形成一再造的声带，术后发音良好，对晚期声门型喉癌，在肿瘤切除后，患侧半喉组织缺损范围较大时，将甲状软骨膜与胸骨舌骨肌肌膜缝合后平展开，可扩大整复的面积，让术腔光滑。即使肿瘤向声门上侵犯室带，由于复合肌瓣面积大，仍可覆盖梨状窝内侧及杓区粘膜，由于保留了喉上神经、咽缩肌及甲状软骨后缘，支撑了梨状窝形态，术后吞咽功能恢复快，发生呛咳机会少。在 T_2、T_3 声门上型喉癌中，当肿瘤累及会厌前间隙、会厌谷或部分舌根受侵时，在彻底切除会厌前间隙，部分舌根后，可用该带蒂复合肌瓣向后上翻转与舌根断缘缝合以修复延长舌根，再将残喉悬吊于胸骨舌骨肌及其筋膜上，从而可恢复较好的喉功能。但在声门上型喉癌修复时，肌瓣游离不宜过长，过宽，以免术后组织臃肿，影响呼吸与发音。

3.3 应用复合肌瓣的注意事项

在制作该肌瓣时，应熟悉胸骨舌骨肌的解剖。胸骨舌骨肌起于胸锁关节囊后方，止于舌骨体后方。支配该肌的运动神经为舌下神经降支，供应动脉为甲状腺上动脉的分支，入肌点位于该肌外缘，距环状软骨上 51mm 左右[11]。根据经验并结合相关文献[12]提出应用该肌瓣的注意事项：

(1)游离肌瓣时应沿肌纤维间隙进行，注意保护好表面的肌筋膜，保证再造声带表面光滑，防止术后声带粘连。

(2)游离肌瓣时，在甲状软骨中部尽量保护该肌的供应动脉和支配神经，以保证术后肌瓣的成活和营养。

(3)制作肌瓣的厚薄和体积要适度，缝合时宜以正常声带体积大小为度，过宽、过厚或过小的肌瓣均影响发声。

(4)带状肌瓣与肿瘤切除后遗留创缘及声带突的缝合要牢固，缝合缘要尽量平整，以保证肌瓣良好的形态与术腔光滑，有利于恢复发声。

参 考 文 献

[1] 王天铎.喉癌喉部分切除术的现状[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，2000;14(12):531-532.

[2] 张立强，栾信庸，潘新良，等.喉癌的手术治疗与喉功能的保护[J]. 中华医学杂志，2002;82(21):1461-1463.

[3] 潘子民. 功能性喉癌外科的进展及有关问题的探讨[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志，1999;34(5):279.

[4] 屠规益，祁永发，唐平章.喉癌 T_3 及 T_4 病变功能保全性手术后的喉修复及其生存率[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，1994;8(5):280-282.

[5] 范文汉，贺玉梅.喉癌部分切除术后修复材料的应用[J]. 第三军医大学学报，1999;21(6):449-450.

[6] 方 平，叶 进，张琨龄，等.胸舌骨肌瓣或舌骨—胸舌骨肌瓣用于垂直喉部分切除术后声带重建[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，2003;17(3):138-140.

[7] 张立强，栾信庸，潘新良，等.单蒂胸骨舌骨肌肌筋膜瓣在喉部分切除术中的应用[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，2003;17(3):132-134.

[8] 王 超，金德均，鲁建光.声门水平切除胸骨舌骨肌喉功能重建术治疗 T_2 期声门癌[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志，2003;38(1):10-11.

[9] 孙亚男，金德均，姚鸿超，等.带蒂舌骨在额侧部分喉切除术中的应用[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，2004;18(6):371.

[10] 胡国华，魏莲枝，朱 江.喉黏膜瓣和胸大肌肌皮瓣修复晚期梨状窝癌术后缺损[J]. 中国修复重建外科杂志，2004;18(4):295-297.

[11] 陈合新，钟世镇.胸骨舌骨肌瓣修复声带的应用解剖[J]. 中国耳鼻咽喉颅底外科杂志，2000;6(1):1-3.

[12] 张发岐，黄金中.颈部带状肌瓣重建喉癌术后声带缺如 31 例报告[J]. 临床耳鼻咽喉科杂志，2003;17(8):488-489.

(责任编辑：关蕴良)

(上接第 303 页)

[6] Datta R,Oki E,Endo K,et al. XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage[J]. J Biol Chem,2000;275(41):31733-31738.

[7] Huang Y,Park YC, Rich RL,et al. Structural basis of caspase inhibition by XIAP: differential roles of the linker versus the BIR domain[J]. Cell,2001;104(5):781-790.

[8] Sun C,Cai M,Meadows RP,et al. NMR structure and mutagenesis of the third Bir domain of the inhibitor of apoptosis protein XIAP[J]. J Biol Chem,2000;275(43):33777-33781.

[9] 黄谟婉，马 英.细胞凋亡抑制蛋白 IAP 家族与卵巢癌关系研究进展[J]. 重庆医科大学学报，2007;32(6):670-672.

[10] Nikolovska-Coleska Z,Xu L,Hu Z,et al. Discovery of embelin as a cell-permeable,small-molecular weight inhibitor of XIAP through structure-based computational screening of a traditional herbal medicine three-dimensional structure database[J]. J Med Chem,2004;47(10):2430-2440.

[11] Johri RK,Dhar SK,Pahwa GS,et al.Toxicity studies with potassium embelate,a new analgesic compound[J]. Indian J Exp Biol,1990;28(3):213-217.

(责任编辑：谭乐勤)