

# 启膈散与顺铂对食管癌细胞 EC9706 低氧下生长抑制及其 miR-21, PDCD4 和 PTEN 表达的影响

杨联河, 赵雪艳, 郭彬, 牛春玲, 吴耀松, 陈玉龙\*, 尹素改, 任闪闪  
(河南中医药大学, 郑州 450036)

**[摘要]** 目的:观察低氧下启膈散和顺铂抑制食管癌细胞增殖的协同效应,从 miR-21 及其靶基因角度探讨其机制。方法:制备含药血清,噻唑蓝(MTT)比色法检测启膈散和顺铂单用或联合应用对食管癌细胞 EC9706 增殖的影响,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测启膈散和顺铂单用或两者联合应用对食管癌细胞 miR-21,程序死亡蛋白 4(PDCD4),磷酸酶和张力蛋白类似物(PTEN)mRNA 表达的影响,免疫印迹法(Western blot)检测 PDCD4,PTEN 蛋白表达。结果:启膈散在浓度为 8%,10%与 1 mg·L<sup>-1</sup>顺铂合用具有协同作用,其两药相互作用系数(CDI)分别为 0.90,0.94。顺铂高浓度组,联合高、低浓度组 miRNA-21 表达量明显低于空白组( $P < 0.05$ );联合高、低浓度组 miRNA-21 表达量显著低于同浓度顺铂组( $P < 0.01$ ),且联合高浓度组低于联合低浓度组( $P < 0.05$ )。顺铂高浓度、启膈散组 PDCD4 mRNA 表达量明显低于空白组( $P < 0.05$ ),而联合高、低浓度组 PDCD4,PTEN mRNA 表达量明显高于空白组( $P < 0.05$ );联合高、低浓度组 PDCD4,PTEN mRNA 明显高于同浓度顺铂组( $P < 0.01$ ),且联合高浓度组 PTEN mRNA 表达高于联合低浓度组( $P < 0.01$ )。与空白组比较,联合高、低浓度组 PTEN 蛋白表达明显升高( $P < 0.05$ ),且联合高、低浓度组 PTEN 蛋白显著高于同浓度顺铂组( $P < 0.01$ );顺铂高、低浓度组,联合高、低浓度组 PDCD4 明显高于空白组( $P < 0.05$ ),联合高浓度组明显高于同浓度顺铂组和联合低浓度组( $P < 0.05, P < 0.01$ )。结论:启膈散含药血清和顺铂在抑制食管癌细胞 EC9706 增殖方面具有协同作用,其机制可能与通过抑制 miR-21 表达从而升高 PDCD4 和 PTEN 基因表达相关。

**[关键词]** 低氧; 启膈散; 顺铂; 食管癌; miR-21; 程序死亡蛋白 4; 磷酸酶张力蛋白类似物

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0134-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016150134

## Inhibitive Effect of Qige San and Cisplatin on Growth of Esophageal Carcinoma Cells EC9706 and Its miR-21, PDCD4 and PTEN Expressions Under Hypoxia

YANG Lian-he, ZHAO Xue-yan, GUO Bin, NIU Chun-ling, WU Yao-song,  
CHEN Yu-long\*, YIN Su-gai, REN Shan-shan  
(Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450036, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the synergistic effect of Qige San and cisplatin in inhibiting proliferation of esophageal carcinoma cells in hypoxia, in order to explore the mechanism from the perspective of miR-21 and its target genes. **Method:** Drug-containing serum was prepared. The single or combined effects of Qige San and cisplatin on cells activation were tested by 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromid (MTT) assays. Apoptosis and cell cycle arrest induced by Qige San and cisplatin were detected by flow cytometry. MiR-21, programmed cell death 4 (PDCD4), phosphatase and tensin homolog (PTEN) mRNA expressions were detected by Real-time PCR, while PDCD4 and PTEN protein expression were detected by Western blot. **Result:** Qige San in concentrations of 8% and 10% combined with 1 mg·L<sup>-1</sup> cisplatin has a synergistic effect in inhibiting proliferation of esophageal carcinoma cells, with the coefficients of drug in interaction (CDI) of 0.90,

**[收稿日期]** 20151119(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81373535);河南省科技攻关计划项目(142102310038);河南省教育厅科学技术研究重点项目(14A360025)

**[第一作者]** 杨联河,副教授,博士,从事天然药物抗肿瘤机制研究,Tel:13598420711,E-mail:13598420711@139.com

**[通讯作者]** \*陈玉龙,教授,博士,从事肿瘤病机与防治研究,Tel:0371-65680206,E-mail:cyl72621@163.com

0.94, respectively. The expressions of miRNA-21 in cisplatin high concentration group, and combination high and low concentration group were significantly lower than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The expression of miRNA-21 in combination high and low concentration group was significantly lower than that of cisplatin groups with the same concentration ( $P < 0.01$ ), and the low concentration group ( $P < 0.05$ ). The expression of PDCD4 mRNA was significantly lower in the cisplatin high concentration group and the Qige San group than in control group ( $P < 0.05$ ), whereas the expression of PTEN and PDCD4 mRNA in combination high and low concentration group was significantly higher than that in control group ( $P < 0.05$ ), and PDCD4, PTEN mRNA expressions in combination high and low concentration group was significantly higher than that of cisplatin groups with the same concentration ( $P < 0.01$ ), and PTEN mRNA in high concentration combination group was higher than that in lower concentration combination group ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group, the expression of PTEN protein was significantly higher in combination high and low concentration group ( $P < 0.05$ ), and that in combination high and low concentration group was significantly higher than that in the same concentration of cisplatin group ( $P < 0.01$ ). PDCD4 was significantly higher in cisplatin high and low concentration group and combination high and low concentration group than in control group ( $P < 0.05$ ), and combination high concentration group was significantly higher than that in cisplatin group and combination low concentration group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Qige San and cisplatin have a synergistic effect in inhibiting proliferation of esophageal carcinoma cell line EC9706, and the mechanism may be related to increase the expression of PDCD4 and PTEN by inhibiting miRNA-21 expression.

**[Key words]** hypoxia; Qige San; cisplatin; esophageal carcinoma; miRNA-21; programmed cell death 4; phosphatase and tensin homolog

食管癌是常见的恶性肿瘤之一,我国每年约有 25 万新诊断的食管癌患者,占全世界食管癌病例数的 50%,5 年生存率不到 15%。手术和化疗是常用的治疗方法,但临床上对化疗的有效反应率只有 19%~40%,肿瘤耐药成为治疗食管癌的主要障碍<sup>[1-3]</sup>。低氧是实体瘤普遍的现象,影响肿瘤细胞多种生物行为,如生长、凋亡、自噬、迁移等,同时也是产生耐药的重要因素<sup>[4]</sup>。研究表明,低氧影响食管癌 EC9706 细胞的形态、生长及细胞周期,并可通过影响细胞凋亡和周期降低对顺铂的敏感性<sup>[5]</sup>。小分子 RNA-21 (microRNA-21, miR-21) 通过介导上下游分子信号使肿瘤微环境中各组分相互联系,参与了肿瘤的发生发展及耐药的形,也参与了低氧耐药<sup>[6-7]</sup>。启膈散是中医治疗食管癌的代表方剂,临床联合化疗应用显示其有很好的增效、减毒效应<sup>[8]</sup>,但机制未明。研究显示,启膈散能很好地抑制食管癌细胞生长,诱导细胞凋亡,抑制血管生成等<sup>[9-11]</sup>,但是否能在低氧条件下和常用抗癌药物顺铂有协同效应尚未见报道。本文观察在低氧情况下启膈散和顺铂对 EC9706 细胞增殖的影响及两者协同作用,并从 miR-21 角度探讨其可能机制。

## 1 材料

**1.1 药物** 启膈散由南沙参、丹参、川贝母、茯苓、

郁金、砂仁组成,生药均购于河南中医药大学第三附属医院,经河南中医学院苗艳艳副研究员鉴定,南沙参 *Adenophora stricta*, 丹参 *Salvia miltiorrhiza*, 川贝母 (去心) *Fritillaria praevalskii*, 茯苓 *Wolfiporia cocos*, 郁金 *Curcumae Radix*, 砂仁 *Amomum villosum*。

**1.2 动物** Wistar 大鼠共 80 只,雌雄各半,体重 0.2~0.25 kg,由山东省济宁市任城区鲁抗动物饲料经销中心提供,合格证号 SCXK(鲁)2013-0001。

**1.3 主要仪器** SG603 型超净工作台(美国 Barker 公司),371 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司),H35 型低氧工作站(英国 DWS 公司),CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),Spectrum 型全波长酶标仪(美国 Thermo 公司),StepOnePlus™ 型实时荧光定量 PCR 系统(美国 ABI 公司),Heraeus Multifuge X1R 型高速离心机(美国 Thermo 公司),Mini-PROTEAN 型凝胶电泳系统(美国 Bio-Rad 公司)。

**1.4 主要试剂** RPMI 1640 培养基,胰蛋白酶(北京索莱宝公司,批号分别为 20130416, T1320-100), 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司,批号 M8180), miRNA 试剂盒(北京天根公司,批号 FP205), 反转录试剂盒、荧光定量试剂盒(日本东洋纺公司,编号 261500,441900),鼠抗人磷酸酶和张力蛋白类似物 (PTEN),程序死亡蛋白 4 (PDCD4) 抗体(英国

Abcam 公司,批号分别为 GR106729-14,GR156078-1),内参(GAPDH)多克隆抗体,兔抗鼠二抗(北京康为世纪公司,批号分别为 CW0103,00041502)。引物序列由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,miRNA-21(67 bp):上游 5'-ACACTCCAGCTGGG TAGCTTATCAGACTGA-3',下游 5'-TGGTGTCGTG GAGTCG-3';U6(94 bp):上游 5'-CTCGCTTCGGCAG CACA-3',下游 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'; GAPDH(258 bp):上游 5'-AGAAGGCTGGGGCT CATTG-3',下游 5'-AGGG-GCCATCCATCCACA GTCTTC-3';PDCD4(185 bp):上游 5'-TCCTCAAGG GGCAGAAAGC-3',下游 5'-TGCCTTGACCCAAAA CAAGTG-3';PTEN(78 bp):上游 5'-TCCACAAA CAGAACAAGATG-3',下游 5'-CTGGTCCTGGTATG AAGAAT-3'。

## 2 方法

**2.1 含药血清的制备** 按照“南沙参-丹参-茯苓-川贝母-郁金-砂仁 9:9:3:4.5:1.5:1.2”(《医学心悟》)的比例称取药材,常规煎煮,药物终质量浓度为含生药  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , $4 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。按照随机数字表将大鼠分为空白组、启膈散组。启膈散组以  $1.41 \text{ mL} / 100 \text{ g ig}$ (按体重<sub>大鼠</sub>/体重<sub>人</sub> × 每副生药量 × 20 倍计算),空白组给予同体积生理盐水  $ig$ ,每天 2 次,间隔 12 h,共给药 7 次,末次  $ig$  前 12 h 禁食,末次  $ig$  2 h 后,10% 水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,静置 4 h 后,3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 取血清, $56 \text{ }^\circ\text{C}$  灭活 30 min, $0.22 \text{ } \mu\text{m}$  无菌过滤, $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  保存。

**2.2 细胞培养** 人食管癌细胞 EC9706 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,在 5%  $\text{CO}_2$   $37 \text{ }^\circ\text{C}$  条件下培养,2~3 d 换液、传代。检测指标前消化、计数后在低氧工作站(1%  $\text{O}_2$ ,5%  $\text{CO}_2$ ,94%  $\text{N}_2$ )中培养。

**2.3 MTT 检测细胞活性** 细胞以  $5 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板内,分为空白组、顺铂组、启膈散组、联合用药组,每组设 9 个复孔。培养过夜,空白组(加入 1%,2%,4%,8%,10% 正常血清),顺铂组(加入 1%,2%,4%,8%,10% 正常血清 +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  顺铂),启膈散组(1%,2%,4%,8%,10% 含药血清),联合用药组(1%,2%,4%,8%,10% 含药血清 +  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  顺铂)。48 h 后加入  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 20  $\mu\text{L}$ ,继续培养 4 h 后加入二甲亚砜(DMSO)150  $\mu\text{L}$ 。酶标仪 570 nm 处测吸光度  $A$ 。采用两药相互作用系数(CDI)评价两药相互作用性质,CDI < 1,表示两药作用性质为协同,CDI < 0.7 表示两药协同显

著,CDI = 1,为相加,CDI > 1,为拮抗<sup>[12-13]</sup>。

**2.4 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测食管癌细胞 miRNA-21 表达** 细胞处理同 2.3 项,空白组(8% 正常血清),顺铂组[8% 正常血清 + ( $1.0,0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )顺铂],启膈散组(8% 含药血清),联合用药组[8% 含药血清 + ( $1.0,0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )顺铂]。48 h 后按照提取试剂盒提取 miRNA,测定 RNA 纯度及浓度。逆转录 cDNA,按试剂盒说明书进行扩增,扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$  10 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$  1 min,40 个循环。根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  分析 miRNA-21 相对表达定量。

**2.5 Real-time PCR 检测 PDCD4,PTEN mRNA 的表达** 细胞处理及分组加药同 2.4 项,提取总 RNA,逆转录 cDNA,按试剂盒进行扩增,扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$  60 s, $95 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$  1 min,共 40 个循环。根据  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  分析 PDCD4,PTEN 表达。

**2.6 免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达** 细胞处理及分组加药同 2.4 项,提取细胞总蛋白,BCA 法检测样品蛋白浓度,蛋白变性,电泳,转膜,封闭,加入 PTEN(1:500),PDCD4(1:1 000)一抗孵育过夜,二抗(1:5 000)室温孵育 1 h。用化学发光法显色,曝片,凝胶成像系统分析。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白表达量/内参表达量。

**2.7 统计学方法** 使用 SPSS 18.0 统计软件,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,数据进行  $t$  检验和单因素方差分析,应用概率法计算半数抑制率, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对细胞增殖的影响** 启膈散在浓度为 8%,10% 与顺铂合用具有协同作用,其 CDI 分别为 0.90,0.94;同时,启膈散在 8%,10% 与顺铂合用, $A$  明显低于同浓度单独应用顺铂组( $P < 0.05$ )。见表 1。选择 8% 的启膈散含药血清进行下一步实验。

**3.2 对食管癌细胞 miRNA-21 表达的影响** 顺铂( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )组、联合组 miRNA-21 表达量显著低于空白组( $P < 0.01$ );联合组 miRNA-21 表达量明显低于同浓度顺铂组( $P < 0.05$ ),且联合高浓度低于联合低浓度组( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.3 对食管癌细胞 PDCD4,PTEN mRNA 表达的影响** 与空白组比较,顺铂( $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )组、启膈散组 PDCD4 mRNA 表达量明显降低( $P < 0.05$ ),而联合组 PDCD4,PTEN mRNA 表达量明显高于空白组( $P < 0.05$ )。联合组 PDCD4,PTEN mRNA 显著高于同浓度单独应用顺铂组( $P < 0.01$ ),且联合高浓度组 PTEN mRNA 表达显著高于低浓度组( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 1 启膈散含药血清与顺铂联合作用 48 h 对 EC9706 细胞活性的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	1% 血清	2% 血清	4% 血清	8% 血清	10% 血清
空白	1.74 ± 0.23	1.92 ± 0.11	1.95 ± 0.17	2.03 ± 0.17	2.17 ± 0.17
顺铂	1.34 ± 0.09 <sup>1)</sup>	1.20 ± 0.11 <sup>1)</sup>	1.10 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.28 ± 0.20 <sup>1)</sup>	1.37 ± 0.12 <sup>1)</sup>
启膈散	1.93 ± 0.14 <sup>2)</sup>	1.97 ± 0.14 <sup>2)</sup>	2.07 ± 0.13 <sup>2)</sup>	2.03 ± 0.07 <sup>2)</sup>	2.26 ± 0.08 <sup>2)</sup>
联合	1.22 ± 0.06 <sup>1)</sup>	1.16 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.14 ± 0.16 <sup>1)</sup>	1.15 ± 0.19 <sup>1,2)</sup>	1.24 ± 0.02 <sup>1,2)</sup>

注:空白组. 单用血清; 顺铂组. 正常血清 + 1 mg·L<sup>-1</sup> 顺铂; 启膈散组. 含药血清; 联合组. 含药血清 + 1 mg·L<sup>-1</sup> 顺铂。与空白组比较<sup>1)</sup> P < 0.01; 与顺铂组比较<sup>2)</sup> P < 0.05。

表 2 启膈散含药血清与顺铂联合 48 h 对食管癌细胞 miRNA-21 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 2 Effect of combined administration of Qige San-containing serum and cisplatin on miRNA-21 expression of esophageal cancer cells ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	浓度	miRNA-21
空白	8% 正常血清	1.00 ± 0.00
顺铂	8% 正常血清 + 0.5 mg·L <sup>-1</sup> 顺铂	0.94 ± 0.13
	8% 正常血清 + 1.0 mg·L <sup>-1</sup> 顺铂	0.83 ± 0.16 <sup>1)</sup>
启膈散	8% 含药血清	1.01 ± 0.05
	8% 含药血清 + 0.5 mg·L <sup>-1</sup> 顺铂	0.54 ± 0.15 <sup>1,2)</sup>
联合	8% 含药血清 + 1 mg·L <sup>-1</sup> 顺铂	0.29 ± 0.11 <sup>1,2,3)</sup>

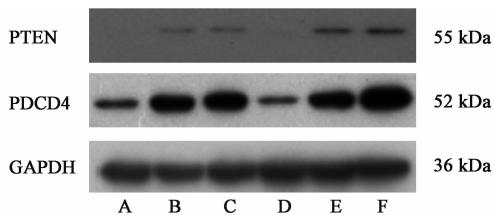
注:与空白组比较<sup>1)</sup> P < 0.01; 与同浓度顺铂组比较<sup>2)</sup> P < 0.05; 与联合低浓度组比较<sup>3)</sup> P < 0.05。

表 3 启膈散含药血清与顺铂联合 48 h 对食管癌细胞 PDCD4, PTEN mRNA 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

Table 3 Effect of combined administration of Qige San-containing serum and cisplatin on PDCD4, PTEN mRNA and protein expression of esophageal cancer cells ( $\bar{x} \pm s, n = 9$ )

组别	浓度	PDCD4 mRNA	PTEN mRNA	PDCD4 蛋白	PTEN 蛋白
空白	8% 正常血清	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.89 ± 0.15	0.59 ± 0.12
顺铂	8% 正常血清 + 0.5 mg·L <sup>-1</sup> 顺铂	1.02 ± 0.71	1.38 ± 0.89	2.94 ± 0.21 <sup>1)</sup>	0.72 ± 0.11
	8% 正常血清 + 1.0 mg·L <sup>-1</sup> 顺铂	0.75 ± 0.34 <sup>1)</sup>	1.15 ± 0.49	3.32 ± 0.12 <sup>1)</sup>	0.76 ± 0.13
启膈散	8% 含药血清	0.65 ± 0.31 <sup>1)</sup>	1.19 ± 0.56	1.55 ± 0.25	0.64 ± 0.10
	8% 含药血清 + 0.5 mg·L <sup>-1</sup> 顺铂	1.39 ± 0.58 <sup>1,2)</sup>	2.67 ± 0.99 <sup>1,2)</sup>	3.21 ± 0.28 <sup>1)</sup>	0.93 ± 0.11 <sup>1,2)</sup>
联合	8% 含药血清 + 1 mg·L <sup>-1</sup> 顺铂	3.27 ± 0.94 <sup>1,2,3)</sup>	3.34 ± 0.95 <sup>1,2)</sup>	4.80 ± 0.22 <sup>1,2,3)</sup>	1.07 ± 0.18 <sup>1,2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> P < 0.05; 与同浓度顺铂组比较<sup>2)</sup> P < 0.01; 与联合低浓度组比较<sup>3)</sup> P < 0.05。



A. 空白组; B ~ C. 顺铂 (0.5, 1.0 mg·L<sup>-1</sup>) 组; D. 启膈散组; E ~ F. 联合 (0.5, 1.0 mg·L<sup>-1</sup>) 组

图 1 启膈散含药血清与顺铂联合应用对食管癌细胞 PDCD4, PTEN 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of combined administration of Qige San-containing serum and cisplatin on PDCD4 and PTEN protein expression of esophageal cancer cells

具有抑制食管癌细胞增殖的作用<sup>[9-11]</sup>。本研究应用启膈散含药血清进行实验, 结果发现, 低氧条件下,

3.4 对食管癌细胞 PDCD4, PTEN 蛋白表达的影响  
与空白组比较, 联合高、低浓度组 PTEN 蛋白表达明显升高 (P < 0.05), 且联合高、低浓度组 PTEN 蛋白明显高于同浓度单独应用顺铂组 (P < 0.01)。顺铂组、联合组 PDCD4 明显高于空白组 (P < 0.05), 联合高浓度组显著高于同浓度顺铂组 (P < 0.01) 和联合低浓度组 (P < 0.05)。见图 1, 表 3。

#### 4 讨论

启膈散记载于《医学心悟》, 为治疗噎膈之名方。《中医内科学》等书记载本方为治疗食管癌 (噎膈) 首选方剂<sup>[13]</sup>。本方水、乙醇、乙酸乙酯提取物都

1% ~ 10% 的含药血清对食管癌细胞的增殖影响较小, 这与以上提取物直接给予细胞的体外实验结果报道有很大不同<sup>[9-11]</sup>, 可能因为含药血清中直接抑制细胞增殖的有效成分低于直接给药浓度。本实验结果提示 8%, 10% 的含药血清和 1 mg·L<sup>-1</sup> 顺铂联合用药, 两者具有很好的协同作用。

miRNAs 可通过调节靶基因的表达而在发育、分化、细胞增殖、凋亡、应激反应等生理和病理过程中发挥重要作用<sup>[14]</sup>。miR-21 是迄今发现的在所有恶性肿瘤类型中都高表达的一种 miRNA, 有望成为临床肿瘤诊断和判断预后的生物标记物, 它通过靶基因参与肿瘤细胞周期、浸润、凋亡、耐药等生物过程<sup>[15]</sup>。现已发现 miR-21 在食管癌组织中高表达, 它可以调节食管鳞癌细胞的增殖和浸润, 其中其靶

基因 PDCD4 和 PTEN 发挥重要作用<sup>[16]</sup>。本研究结果表明,顺铂高、低浓度有轻微抑制 miRNA-21 表达的作用,而启膈散含药血清作用微弱,两者联合应用后高、低浓度都能够明显降低 miR-21 表达,和单独应用顺铂差异显著,提示启膈散和顺铂的协同抑制食管癌细胞 EC9706 增殖效应与协同降低 miR-21 表达有关。

PDCD4 是肿瘤产生发展和浸润的重要抑制基因,在食管癌组织中低表达,表达高低和食管癌预后有关<sup>[17-21]</sup>。PTEN 是重要肿瘤抑制基因,调节着细胞增殖和生存,并和肿瘤微环境有关,在食管鳞癌组织低表达<sup>[21-22]</sup>。本研究结果显示,顺铂对 PDCD4 mRNA 表达影响较小,但可升高 PDCD4 蛋白和 PTEN mRNA 及蛋白表达,启膈散含药血清对 PDCD4 和 PTEN mRNA 及蛋白影响较小;两者联合应用后,可明显升高 PDCD4 和 PTEN mRNA 及蛋白表达,强于单独应用顺铂组,说明启膈散和顺铂的协同抑制食管癌细胞 EC9706 增殖效应与协同升高 PDCD4 和 PTEN 基因表达相关,其机制可能通过抑制 miR-21 发挥作用。

综上所述,启膈散含药血清和顺铂在抑制食管癌细胞 EC9706 增殖方面具有协同作用,其机制可能与抑制 miR-21 表达从而升高 PDCD4 和 PTEN 基因表达相关。

#### [参考文献]

[1] Rustgi A K, El-Serag H B. Esophageal carcinoma[J]. N Engl J Med, 2014, 371(26):2499-2509.

[2] 林东昕. 中国食管癌分子流行病学研究[J]. 中华流行病学杂志, 2003, 24(10):939-943.

[3] Ancona E, Ruol A, Santi S, et al. Only pathologic complete response to neoadjuvant chemotherapy improves significantly the long term survival of patients with resectable esophageal squamous cell carcinoma: final report of a randomized, controlled trial of preoperative chemotherapy versus surgery alone [J]. Cancer, 2001, 91(11):2165-2174.

[4] Wilson W R, Hay M P. Targeting hypoxia in cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(6):393-410.

[5] 杨联河, 赵雪艳, 牛春玲, 等. 低氧对食管癌 Eca9706 细胞生长及顺铂敏感性的影响[J]. 河南师范大学学报:自然科学版, 2015, 43(5):107-111.

[6] Wang X, Li C, Ju S, et al. Myeloma cell adhesion to bone marrow stromal cells confers drug resistance by microRNA-21 up-regulation [J]. Leuk Lymphoma, 2011, 52(10):1991-1998.

[7] Mace T A, Collins A L, Wojcik S E, et al. Hypoxia induces the overexpression of microRNA-21 in

pancreatic cancer cells [J]. J Surg Res, 2013, 184(2):855-860.

[8] 杨国武. 启膈散加减联合化疗治疗中晚期食管癌临床观察 [J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(3):77-78.

[9] 司富春, 陈玉龙. 启膈散及其拆方对食管癌细胞 Eca109 PLC gamma1 介导的细胞信号转导的影响 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(24):2583-2588.

[10] 周凌, 吴耀松, 尹素改, 等. 启膈散对食管癌 Eca-9706 细胞株诱导血管生成的影响 [J]. 中药材, 2015, 38(1):125-128.

[11] 尹素改, 王慧慧, 吴耀松, 等. 启膈散乙酸乙酯提取物对食管癌 Eca9706 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. 中国全科医学, 2015, 18(14):1663-1666.

[12] Cao S S, Zhen Y S. Potentiation of antimetabolite antitumor activity *in vivo* by dipyridamole and amphotericin B [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 1989, 24(3):181-186.

[13] Dai Y H, Xiong X P, Huang G, et al. Dichloroacetate enhances adriamycin-induced hepatoma cell toxicity *in vitro* and *in vivo* by increasing reactive oxygen species levels [J]. PLoS One, 2014, 9(4):e9296.

[14] 姜彤. 中药血清药理学方法初探 [J]. 黑龙江医药, 2004, 17(4):430-433.

[15] Bartel D P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions [J]. Cell, 2009, 136(2):215-233.

[16] Pan X, Wang Z X, Wang R. MicroRNA-21: a novel therapeutic target in human cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2010, 10(12):1224-1232.

[17] Hiyoshi Y, Kamohara H, Karashima R, et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and invasion in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(6):1915-1922.

[18] Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, et al. Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer, 2013, 119(6):1159-1167.

[19] Hilliard A, Hilliard B, Zheng S J, et al. Translational regulation of autoimmune inflammation and lymphoma genesis by programmed cell death 4 [J]. J Immunol, 2006, 177(11):8095-8102.

[20] Fassan M, Cagol M, Pennelli G, et al. Programmed cell death 4 protein in esophageal cancer [J]. Oncol Rep, 2010, 24(1):135-139.

[21] Milella M, Falcone I, Conciatori F, et al. PTEN: multiple functions in human malignant tumors [J]. Front Oncol, 2015, 16(5):24.

[22] Sun Z, Ji N, Bi M, et al. PTEN gene is infrequently hypermethylated in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Tumour Biol, 2015, 36(8):5849-5857.

[责任编辑 张丰丰]