

# 华蟾素注射液联合放疗对食管癌细胞增殖与周期的影响

杨兴肖, 李幼梅, 宋姮, 刘志坤, 马鸣\*, 祝淑钗  
(河北医科大学第四医院, 石家庄 050011)

**[摘要]** 目的:观察华蟾素注射液对食管癌细胞 ECA109 增殖的抑制作用,分析华蟾素联合 X 射线照射对细胞周期的影响,探讨华蟾素注射液与放疗联合效应的机制。方法:实验分空白组、华蟾素组、放疗组、华蟾素 + 放疗组,作用食管癌 ECA109 细胞 48 h 后,应用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测华蟾素注射液对 ECA109 细胞增殖的影响;流式细胞术 (FCM) 检测细胞周期的变化,反转录-PCR (RT-PCR) 和免疫印迹法 (Western blot) 检测各组泛素连接酶 (RNF2), p16 和周期蛋白依赖性激酶 (CDK4) mRNA 和蛋白表达。结果:华蟾素可显著抑制食管癌 ECA109 细胞的增殖,且呈浓度和时间依赖性。与空白组比较,各药物组中 DNA 合成前期 ( $G_0/G_1$  期) 细胞比例明显升高 ( $P < 0.05$ ), S 期细胞比例明显下降 ( $P < 0.05$ )。与空白组比较,华蟾素 + 放疗组中 RNF2 mRNA 和蛋白明显降低 ( $P < 0.05$ ), 且各药物组均能促进 p16 mRNA 和蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 抑制 CDK4 mRNA 和蛋白水平 ( $P < 0.05$ )。结论:华蟾素注射液能有效抑制人食管癌 ECA109 细胞增殖,并将细胞阻滞于  $G_0/G_1$  期,机制可能与降低 RNF2, CDK4 水平,上调 p16 基因水平相关。

**[关键词]** 华蟾素; X 射线照射; 食管癌; 增殖; 细胞周期; 泛素连接酶; p16; 周期蛋白依赖性激酶

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)16-0128-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016160128

## Effect of Cinobufacini Injection Combined with Radiotherapy on Proliferation and Cell Cycle of Human Esophageal Carcinoma

YANG Xing-xiao, LI You-mei, SONG Heng, LIU Zhi-kun, MA Ming\*, ZHU Shu-chai  
(Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Cinobufacini (Cino) injection on the proliferation of human esophageal carcinoma cells ECA109, analyze the effect of Cino combined with irradiation on cell cycle, and explore the potential mechanisms of Cino injection combined with radiotherapy. **Method:** ECA109 cells were divided into blank group, Cino group, radiotherapy group, and combined group (Cino + radiotherapy). After the esophageal carcinoma cells ECA109 were treated for 48 h, methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the effects of Cino on proliferation of ECA109 cells, flow cytometry (FCM) was used to detect the changes in cell cycles, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot were used to respectively detect the mRNA expressions and protein expressions of ring finger protein 2 (RNF2), p16 and cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) in ECA109 cells. **Result:** Cinobufacini injection significantly inhibited ECA109 cells proliferation in doses and time dependent ways. As compared with the blank group, the proportion of cells in  $G_0/G_1$  phase were significant increased ( $P < 0.05$ ) and the proportion of cells in S phase were significant decreased ( $P < 0.05$ ) in various treatment groups. As compared with the blank group, the mRNA and protein expressions of RNF2 in the combined group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ), mRNA and

**[收稿日期]** 20151130(012)

**[基金项目]** 河北省中医药管理局科研计划项目(2015131);河北省医学科学研究重点课题计划项目(20160183,20150305)

**[第一作者]** 杨兴肖, 博士, 主治医师, 从事食管癌放射治疗基础研究和临床应用的研究, Tel: 15100117064, E-mail: yangxingxiao2007@sina.com

**[通讯作者]** \* 马鸣, 博士, 主管技师, 从事肿瘤免疫学研究, Tel: 0311-86095373, E-mail: maming19830419@163.com

protein expressions of p16 were higher in various treatment groups ( $P < 0.05$ ), while mRNA and protein expressions of CDK were lower in the various treatment groups ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Cino injection can effectively inhibit the proliferation of human esophageal carcinoma ECA109 cells and arrest cell cycle at  $G_0/G_1$  phase. The mechanism might be partly related to the down-regulation of RNF2, CDK4 levels, and the up-regulation of p16 mRNA expressions.

**[Key words]** Cinobufacini injection; X-ray irradiation; esophageal carcinoma; cell proliferation; cell cycle; RING finger protein 2; p16; cyclin-dependent kinase 4

食管癌是一种常见的具有高发病率和死亡率的消化道恶性肿瘤,据 2014 年世界癌症报告统计,在恶性肿瘤中食管癌发病率居第 8 位,在 2012 年约有 45.6 万新发病例,占全球新发恶性肿瘤病例的 3%;在世界癌症中食管癌死亡居第 6 位,全球约 5% 的癌症患者死于食管癌<sup>[1]</sup>。并且大部分食管癌患者就诊时处于中晚期,已失去手术治疗机会,需行放射治疗,但单纯放疗后 5 年生存率较低,仅为 10% ~ 20%,放疗后复发较高,达 60% ~ 80%。虽然目前因放疗新技术的开展使食管癌放疗后局部控制率有了较大改善,但总体来说仍不近人意,肿瘤细胞对放射线不敏感及放疗产生的严重毒副作用,如放射性食管炎、刺激性干咳等都是导致放疗失败的主要原因,相关研究认为中药联合放疗可以减轻放疗的副作用,增加放射线对肿瘤的杀伤作用,提高肿瘤细胞对放射线的敏感性<sup>[2]</sup>。华蟾素注射液是以中药蟾蜍为主要原料,经加工而制成水溶性制剂,已证实该药对多种肿瘤细胞具有明显的抑制作用,例如其作用于胰腺癌细胞、肝癌细胞后,可显著降低肿瘤细胞的增殖水平,此外,有研究报道华蟾素注射液对胃癌和肺癌患者也有很好的临床治疗效果<sup>[3-6]</sup>。然而,华蟾素联合放疗治疗食管癌的研究较少。本实验旨在探讨华蟾素注射液联合放疗对食管癌 ECA109 细胞增殖和周期的影响,并对其机制进行探讨。

## 1 材料

**1.1 细胞株及药品** 食管癌 ECA109 细胞株,由河北医科大学第四医院科研中心提供。华蟾素注射液(安徽金蟾生化股份有限公司,国药准字 Z34020273,5 mL/支)。

**1.2 试剂与仪器** 噻唑蓝(MTT,美国 Sigma 公司,批号 M2128),环指蛋白 2(RNF2),p16,周期蛋白依赖性激酶(CDK4)兔抗单克隆一抗(Abcam 公司,编号分别为 EPR12245, EPR1473, EPR4513-32-7),二抗(Millipore 公司,编号 2459496), $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体(上海拜力生物科技有限公司,批号 AP00060),细胞周期试剂盒(杭州联科生物技术股

份有限公司,批号 LK-CCS01)。Homo RNF2, p16, CDK4,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物由上海生工生物技术有限公司合成,RNF2(112 bp):上游 5'-AGCACAATAATCAGCAAGCACTC-3',下游 5'-GCTCCACTACCATTTTCAATCTG-3'。p16(126 bp):上游 5'-ACCAGAGGCAGTAACCATGC-3',p16 下游 5'-GTAGGACCTTCGGTGACTGA-3';CDK4(174 bp):上游 5'-CCCGAAGTTCTTCTGCAGTC-3',下游 5'-TCGAGGCCAGTCATCCTCTG-3'。GAPDH(172 bp):上游 5'-CGCTGAGTACGTCGGAGTC-3',下游 5'-GCTGATGATCTTGAGGCTGTTGTC-3'。反转录-PCR(RT-PCR)试剂盒(美国 Thermo 公司,批号 K1622),Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596-026)。TC2323 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Sheldon 公司),江南 XD-101 型倒置显微镜(南京向日葵光学仪器有限公司),DYCP-31DN 型电泳槽(北京六一仪器),GBOX EF2 型凝胶成像系统(英国 Syngene 公司),Odyssey 型扫描仪(美国 Licor 公司),FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 Beckman Gallios 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养和照射** 将食管癌细胞接种于含 10% 新生胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度的孵箱中培养,细胞达到对数生长期时,用 0.25% 的胰蛋白酶消化传代培养。应用 6-MV X 线直线加速器照射 ECA109 食管癌细胞株,取机架角 180°,源皮距 100 cm,照射面积 20 cm × 20 cm,培养瓶下置 0.5 cm 组织补偿膜,室温下照射,照射剂量为 6 Gy。

**2.2 MTT 法检测肿瘤细胞增殖** 用培养液调整细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL,接种于 96 孔培养板中,每孔 100  $\mu$ L。培养 24 h 后,弃原培养液,华蟾素组分别加入华蟾素注射液(0.062 5, 0.125, 0.25, 0.5 mg · L<sup>-1</sup>)200  $\mu$ L,另设空白组(不加药)。分别培养 24, 48, 72 h 后收集细胞。在各个时间点,每孔加 5 g · L<sup>-1</sup> MTT 液 20  $\mu$ L,37 °C 避光继续孵育 4 h,弃掉培

养液,每孔加入 DMSO 150  $\mu\text{L}$  震荡 10 min,使结晶完全溶解,于酶标仪 570 nm 波长处检测各孔吸光度  $A$ ,根据  $A$  计算不同浓度药物对肿瘤细胞生长的抑制率 (IR)。IR =  $(1 - A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。以药物浓度为横轴,细胞抑制率为纵轴绘制量效曲线,根据量效曲线计算半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。实验重复 3 次。

**2.3 流式细胞术检测细胞周期变化** 调整对数生长期食管癌细胞密度为  $8 \times 10^5$  个/mL,接种于 6 孔板中,培养 24 h,待细胞贴壁后,空白组加入新鲜培养液,华蟾素组和华蟾素 + 放疗组加入  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  华蟾素培养液,培养 4 h 后,放疗组和华蟾素 + 放疗组分别给予 6 Gy X 线照射,继续培养 48 h。收集各组细胞,洗涤后置于预冷的 70% 乙醇中,4  $^{\circ}\text{C}$  固定 2 h;离心,重悬细胞,300 目筛网过滤;加入碘化丙啶 (PI) 染液,室温反应 10 min,4  $^{\circ}\text{C}$  避光染色 30 min,用流式细胞仪测定各实验组食管癌细胞周期的变化。

**2.4 RT-PCR 法检测 RNF2 mRNA 表达水平** 细胞培养、加药、照射同 2.3 项,收集细胞,采用 Trizol 试剂提取 RNA,按照试剂盒说明书逆转录为 cDNA,进行 PCR 反应,反应条件:94  $^{\circ}\text{C}$  5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,56  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  45 s,30 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  5 min。2% 琼

脂糖凝胶电泳,紫外线下观察、拍照。以目的基因条带/GAPDH 条带表示 mRNA 相对表达量。

**2.5 免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达** 细胞培养、加药、照射同 2.3 项,收集细胞,根据蛋白提取试剂盒说明提取细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度,10% 的 SDS-PAGE 分离,转膜、封闭,加入一抗 RNF2 (1:10 000),p16 (1:1 000),CDK4 (1:1 000),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,加入碱性磷酸酶标记免疫球蛋白 (IgG) 二抗 (1:10 000) 于 37  $^{\circ}\text{C}$  摇床温育 1 h,洗膜,Odyssey 红外成像系统拍照。以目的蛋白条带/ $\beta$ -actin 条带表示蛋白相对表达量。

**2.6 统计学方法** 所有数据采用 SPSS 13.0 统计学软件,计量结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 华蟾素注射液对 ECA109 细胞增殖的影响** 随着药物质量浓度的升高和作用时间的延长,细胞生长变缓慢,且这种抑制作用有增强趋势,具有时间-剂量效应关系;药物作用 24,48,72 h 后,华蟾素注射液  $\text{IC}_{50}$  分别为  $(0.85 \pm 0.07)$ ,  $(0.27 \pm 0.04)$ ,  $(0.16 \pm 0.02) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,呈时间剂量依赖性。见表 1。

表 1 华蟾素在不同时间对 ECA109 细胞抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of cinobufacini on inhibition rate of esophageal carcinoma cells ECA109 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h	%
0.062 5	9.04 $\pm$ 0.81	21.42 $\pm$ 4.38	38.16 $\pm$ 6.79	
0.125	15.23 $\pm$ 1.19	34.55 $\pm$ 7.84	42.19 $\pm$ 8.77	
0.25	28.17 $\pm$ 4.97	49.28 $\pm$ 9.77	79.12 $\pm$ 13.21	
0.5	46.52 $\pm$ 8.06	81.48 $\pm$ 7.46	89.17 $\pm$ 11.14	
1.0	55.79 $\pm$ 9.55	88.49 $\pm$ 8.49	92.33 $\pm$ 12.26	

**3.2 华蟾素注射液对食管癌 ECA109 细胞周期的影响** 与空白组比较,华蟾素组、放疗组、华蟾素 + 放疗组细胞周期分布发生明显改变, $G_0/G_1$  期的细胞比例明显增加 ( $P < 0.05$ ),S 期比例明显减少

( $P < 0.05$ )。华蟾素 + 放疗组改变明显高于华蟾素组及放疗组 ( $P < 0.05$ ),华蟾素组与放疗组比较差异无统计学意义。各组细胞  $G_2/M$  期比较无显著差异。见表 2。

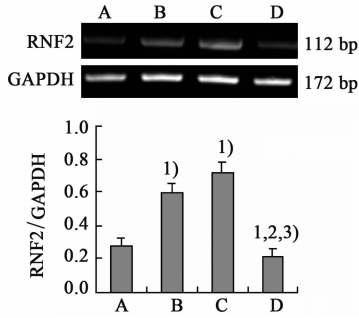
表 2 华蟾素对各组 ECA109 细胞周期分布的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of cinobufacini on cell cycle distribution in ECA109 cells of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$	%
空白	-	39.5 $\pm$ 0.48	47.7 $\pm$ 2.85	14.9 $\pm$ 2.17	
华蟾素	0.5	44.7 $\pm$ 1.85 <sup>1)</sup>	41.8 $\pm$ 0.84 <sup>1)</sup>	14.6 $\pm$ 1.89	
放疗	-	47.8 $\pm$ 0.54 <sup>1)</sup>	38.9 $\pm$ 1.90 <sup>1)</sup>	15.4 $\pm$ 2.90	
华蟾素 + 放疗	0.5	58.3 $\pm$ 0.79 <sup>1,2,3)</sup>	26.7 $\pm$ 0.81 <sup>1,2,3)</sup>	14.3 $\pm$ 1.18	

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与华蟾素组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与放疗组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

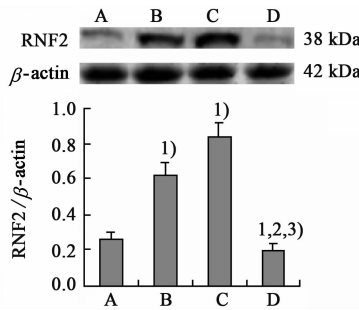
**3.3 华蟾素注射液对 RNF2 mRNA 和蛋白表达的影响** 与空白组比较,华蟾素组与放疗组 RNF2 mRNA 及蛋白相对表达明显增加 ( $P < 0.05$ ),华蟾素 + 放疗组 RNF2 mRNA 及蛋白相对表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。与华蟾素组和放疗组比较,华蟾素 + 放疗组中细胞 RNF2 mRNA 及蛋白相对表达水平明显降低 ( $P < 0.05$ )。见图 1,2。



A. 空白组;B. 华蟾素组;C. 放疗组;D. 华蟾素 + 放疗组。与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与华蟾素组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与放疗组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ (图 2~4 同)

**图 1 华蟾素对各组 ECA109 细胞 RNF2 mRNA 表达的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

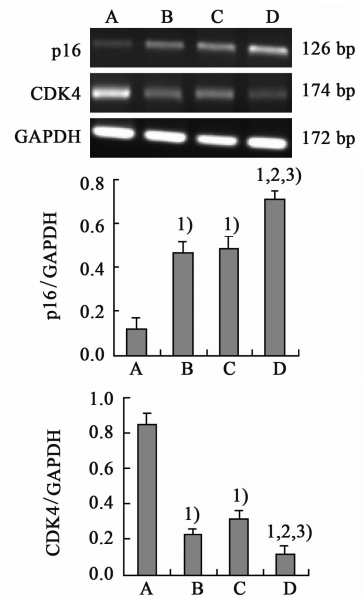
**Fig.1 Effect of cinobufacini on RNF2 mRNA expression in ECA109 cells of each group** ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



**图 2 华蟾素对各组 ECA109 细胞 RNF2 蛋白表达的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

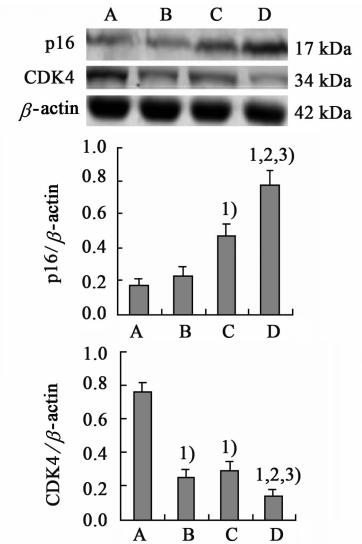
**Fig. 2 Effect of cinobufacini on RNF2 protein expression in ECA109 cells of each group** ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.4 华蟾素注射液对食管癌细胞中 CDK4 和 p16 mRNA 和蛋白表达的影响** 与空白组比较,华蟾素组、放疗组、华蟾素 + 放疗组 CDK4 mRNA 和蛋白表达量明显减少,p16 mRNA 表达量明显增加 ( $P < 0.05$ );放疗组、华蟾素 + 放疗组细胞中 p16 蛋白表达明显增加 ( $P < 0.05$ )。与华蟾素组和放疗组比较,华蟾素 + 放疗组 CDK4 mRNA 和蛋白表达下降的更明显,p16 mRNA 表达量增加的更明显 ( $P < 0.05$ )。华蟾素组和放疗组比较 CDK4,p16 mRNA 和蛋白表达变化不明显。见图 3,4。



**图 3 华蟾素对各组 ECA109 细胞 p16,CDK4 mRNA 表达的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Fig.3 Effect of Cinobufacini on p16 and CDK4 mRNA expressions in ECA109 cells of each group** ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



**图 4 华蟾素对各组 ECA109 细胞 p16,CDK4 蛋白表达的影响** ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**Fig.4 Effect of cinobufacini on p16 and CDK4 protein expressions in ECA109 cells of each group** ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

食管癌是消化系统最常见的恶性肿瘤,放疗是治疗食管癌的重要方法之一,随着放疗新技术的改进,局部控制率有所改善。但放疗后产生的副反应如吞咽困难、放射线食管炎等严重影响患者的生活,如何在提高临床疗效的同时,有效降低放疗后的毒副作用,成为临床医师思考的重要方面。有研究发现,中医药联合放疗可促进放射线对癌细胞的杀伤

活性,并降低放疗引起的不良反应<sup>[7]</sup>。华蟾素是从干蟾蜍皮中提取出的脂溶性成分,主要成分为吲哚生物碱,具有抗肿瘤、抗病毒和促进机体免疫力等功效。目前已有多篇文献报道华蟾素注射液联合放疗可有效提高肿瘤患者临床疗效<sup>[8-9]</sup>,但华蟾素对肿瘤所起的作用及其机制还不清楚。

为此,本实验将不同浓度华蟾素注射液作用于食管癌 ECA109 细胞,结果显示,肿瘤细胞的增殖水平受到不同程度抑制,细胞生长缓慢,且随着浓度和时间的延长,抑制率升高,其中  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  华蟾素 48 h 抑制率达 81.48%。有研究证明,细胞的增殖水平与细胞周期分布的关系密切,周期阻滞在照射后 DNA 损伤因素的影响下发挥重要作用,为照射后 DNA 损伤修复创造条件,有效的抑制了放射线对细胞的杀伤作用<sup>[10]</sup>。Huang 等<sup>[11]</sup>研究发现,用蟾蜍灵作用于膀胱癌 T24 细胞,可诱导细胞周期阻滞在  $G_0/G_1$  期,而 Hong 等<sup>[12]</sup>将蟾蜍灵作用于同种细胞株,发现细胞周期阻滞在  $G_2/M$  期。国内报道显示,华蟾素注射液作用于人肝癌 HepG-2 细胞和胃癌细胞 BGC-823 后,有效降低了肿瘤细胞的增殖水平,并将细胞阻滞在 S 期<sup>[13-14]</sup>。本实验研究表明,与空白组比较,华蟾素组和放疗组均将细胞周期阻滞在  $G_0/G_1$  期,且华蟾素 + 放疗组  $G_0/G_1$  期阻滞更加显著。不同实验室华蟾素诱导的细胞周期阻滞有差别,可能与采用的药物浓度、生产厂家及批号等因素不一致有关。有研究结果报道,人肝癌细胞经 6MV X 射线照射后  $G_0/G_1$  期比例升高,S 期细胞比例降低,细胞周期阻滞在  $G_0/G_1$  期<sup>[15]</sup>。细胞周期中 S 期对放射线抗拒, $G_2/M$  期对放射线敏感,表明细胞周期 4 个时相是影响放射敏感性的的重要因素。本实验研究结果与文献报道一致,华蟾素与放疗联合治疗对细胞周期  $G_0/G_1$  期的阻滞作用更加明显,S 期比例下降显著,提示华蟾素联合放疗增强了对肿瘤细胞的杀伤作用,其机制可能是华蟾素通过改变细胞周期分布,将肿瘤细胞阻滞于 DNA 合成前期,抑制了细胞周期从  $G_0/G_1$  期向 S 期过渡,降低了肿瘤细胞的增殖水平,从而提高了肿瘤细胞对放射线的敏感性。

为了进一步探讨华蟾素联合放疗对细胞增殖和周期调控机制,笔者检测了各实验组中 RNF2 mRNA 和蛋白的表达,结果发现与空白组比较,单纯华蟾素注射液或 X 射线作用后,肿瘤细胞 RNF2 mRNA 和蛋白表达均明显增多,华蟾素 + 放疗组 RNF2 mRNA 和蛋白表达却显著下降。RNF2 蛋白作为多梳基因

家族(PcG)成员之一,在 DNA 损伤修复、细胞周期调控、细胞增殖等方面发挥重要作用<sup>[16]</sup>。本研究中单纯华蟾素注射液或 X 射线作用后,不同程度地引起肿瘤细胞 DNA 双链断裂,细胞迅速启动一系列机制完成损伤后修复,泛素化连接酶 RNF2 首先使组蛋白 H2AX 发生泛素化,泛素化的 H2AX 易于被活化的 ATM 激酶磷酸化成 r-H2AX,从而促使下游基因聚集到 DNA 双链断裂处,感应和放大损伤信号,及时发挥损伤修复作用<sup>[17]</sup>。当华蟾素注射液与 X 射线联合作用时,可能对肿瘤细胞的杀伤作用增强,存活的肿瘤细胞数量明显减少,其表达 RNF2 基因水平显著降低,从而引起 DNA 损伤修复能力严重受损,有效地提高了肿瘤细胞对放射线的敏感性。这表明联合作用可通过抑制肿瘤细胞内 RNF2 基因表达,有效阻碍肿瘤细胞对 DNA 损伤修复能力,促进了放射线对肿瘤细胞的杀伤活性<sup>[18]</sup>。此外,本实验进一步检测了各组中 p16 和 CDK4 mRNA 和蛋白的表达,结果发现与空白组比较,放疗组细胞中 p16 mRNA 和蛋白的表达明显增加,华蟾素 + 放疗组增多更加明显;华蟾素组与放疗组细胞中 CDK mRNA 和蛋白的表达明显低于空白组,且华蟾素 + 放疗组降低地更明显。p16 基因是一种肿瘤抑制蛋白,能与 CDK4,6 结合,阻止了 Cyclin D<sub>1</sub> 与 CDK4,6 形成复合物,使 DNA 合成及基因转录受到抑制,细胞周期易阻滞在  $G_0/G_1$  期,从而有效抑制了细胞的生长<sup>[19]</sup>。有文献报道,蟾蜍灵和  $\gamma$  射线分别作用于胃癌细胞和垂体瘤细胞后,明显增加了 p16 基因的表达水平, $G_0/G_1$  期比例增加,显著抑制了细胞的增殖水平<sup>[20-21]</sup>。Koike 等<sup>[22]</sup>研究发现 RNF2 通过抑制 CDK 激酶抑制剂 Cdkn1 $\alpha$  和 Cdkn2 $\alpha$  来发挥对人肝细胞增殖的调控作用。本实验华蟾素 + 放疗组细胞中 p16 基因的表达升高,CDK4 表达降低,提示华蟾素与放疗的联合作用通过基因 RNF2 对细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂的调控来影响细胞周期分布,从而抑制细胞的增殖水平,有效地提高了肿瘤细胞对放射线的敏感性。

综上所述,华蟾素联合放疗具有抑制肿瘤生长的作用,其机制可能是通过下调 RNF2 的表达,抑制 CDK4 基因水平,并提高抑癌基因 p16 的表达,从而阻止 DNA 的合成和细胞生长,因此,本课题为食管癌华蟾素治疗和放疗提供理论依据。华蟾素与放疗的联合应用将有助于食管癌患者的长期生存,对食管癌的临床应用具有重大意义。

[参考文献]

- [1] Montgomery E A. World cancer report 2014 [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014;374-382.
- [2] 崔娟娟,江晓燕,谭程. 复方红豆杉胶囊联合调强放疗治疗老年中晚期食管癌的临床疗效分析[J]. 肿瘤基础与临床,2015,28(4):323-325.
- [3] 任立新,王亚红,哈敏文. 华蟾素治疗晚期胃癌的临床疗效研究[J]. 中国中药杂志,2008,33(12):14174-14175.
- [4] 张建. 华蟾素注射液联合化疗治疗中晚期肺癌 69 例疗效观察[J]. 中国医药指南,2013,11(24):285-286.
- [5] 欧阳华强,谢广茹,潘战宇,等. 华蟾素对人胰腺癌 CFPAC-1 移植瘤裸鼠血清 IL-6,IL-8 及 sVCAM-1 表达的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(19):2731-2733.
- [6] 牛凯,成宇晶. 华蟾素对人肝癌细胞 Bel-7402 细胞增殖及周期的影响[J]. 山西中医,2013,29(3):47-49.
- [7] 陆启轮,何伟岳,周海华,等. 中药合剂结合三乙醇胺防治乳腺癌术后放疗所致急性放射性皮炎临床观察[J]. 中国中医急症,2015,24(10):1810-1812.
- [8] 任民柱,王振华,高国伟. 放疗联合华蟾素注射液治疗老年骨转移瘤疗效观察[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2013,27(12):1219-1220.
- [9] 田素萍,史曙霞,杨保卫. 华蟾素联合放疗治疗老年食管癌临床疗效观察[J]. 中国现代药物应用,2013,7(16):126.
- [10] 桑春艳,杨霄鹏,张富婷,等. DPPC 抑制 A549 细胞增殖、阻滞细胞周期及诱导 DNA 损伤的初步探究[J]. 解放军医药杂志,2015,27(9):7-12.
- [11] Huang W W, Yang J S, Pai S J, et al. Bufalin induces G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase arrest through inhibiting the levels of cyclin D, cyclin E, CDK2 and CDK4, and triggers apoptosis via mitochondrial signaling pathway in T24 human bladder cancer cells[J]. Mutat Res, 2012, 732(1/2):26-33.
- [12] Hong S H, Choi Y H. Bufalin induces apoptosis through activation of both the intrinsic and extrinsic pathways in human bladder cancer cells[J]. Oncol Rep, 2012, 27(1):114-120.
- [13] 孙宇,卢辛辛,梁鑫森,等. 华蟾素注射液对人肝癌 HepG-2 细胞增殖及周期的影响[J]. 中国医药指南, 2011,9(28):206-208.
- [14] 韩鸿彬,陈嘉勇,袁勇,等. 联合应用华蟾素与氟尿嘧啶对胃癌细胞增殖抑制及诱导凋亡的作用[J]. 中国普通外科杂志,2006,15(9):654-658.
- [15] 陶振超,邱俊,钱立庭,等. 6MV-X 射线对肝癌细胞凋亡及周期分布的影响[J]. 现代肿瘤医学,2015,23(6):752-755.
- [16] Su W J, Fang J S, Cheng F, et al. RNF2/Ring1b negatively regulates p53 expression in selective cancer cell types to promote tumor development[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(5):1720-1725.
- [17] Pan M R, Peng G, Hung W C, et al. Monoubiquitination of H2AX protein regulates DNA damage response signaling[J]. J Biol Chem, 2011, 286(32):28599-28607.
- [18] 周春辉,杨帆,席文锦. 下调环指蛋白 2 的表达促进 U87 脑胶质瘤细胞凋亡并增强其放射敏感性[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2014,30(5):471-475.
- [19] Dickson M A. Molecular pathways: CDK4 inhibitors for cancer therapy[J]. Clin Cancer Res, 2014, 20(13):3379-3383.
- [20] 岳瑶,刘云鹏,侯科佐,等. 蟾蜍灵对胃癌组织 MGC-803 细胞周期作用机制的研究[J]. 肿瘤防治杂志, 2005,12(6):409-412.
- [21] 陈春美,杨卫忠,王锐,等. 伽玛射线对人垂体瘤细胞周期和抑癌基因 p16 表达的影响[J]. 中国医药导报,2011,8(10):32-36.
- [22] Koike H, Ueno Y, Naito T, et al. Ring1B promotes hepatic stem/progenitor cell expansion through simultaneous suppression of Cdkn1 $\alpha$  and Cdkn2 $\alpha$  in mice[J]. Hepatology, 2014, 60(1):323-333.

[责任编辑 张丰丰]