

威灵仙水提物对阿霉素耐药的人甲状腺未分化癌细胞株 HTh74Rdox 的作用机制

周临娜¹, 曹萌², 毛春芹¹, 陈国芳², 陈堃², 李敏超¹, 吴敏^{1,2*}

(1. 南京中医药大学, 南京 210029; 2. 江苏省中西医结合医院, 南京 210028)

[摘要] **目的:**探讨威灵仙水提物对阿霉素诱导耐药的人甲状腺未分化癌细胞株 HTh74Rdox 增殖的影响及机制。**方法:**用不同浓度威灵仙水提物处理 HTh74Rdox 后观察细胞形态;噻唑蓝(MTT)比色法检测威灵仙水提物对 HTh74Rdox 细胞的增殖抑制作用;流式细胞术检测 HTh74Rdox 细胞凋亡;蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测凋亡相关半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)及其活性片段(cleaved-Caspase-3),B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的表达。**结果:**威灵仙水提物对 HTh74Rdox 细胞的增殖有明显抑制作用,联合阿霉素后可减少阿霉素剂量;威灵仙水提物可显著诱导细胞凋亡($P < 0.01$);且能明显提高 cleaved-Caspase-3/Caspase-3, Bax/Bcl-2($P < 0.05$)。**结论:**威灵仙水提物可以抑制 HTh74Rdox 细胞的增殖,其机制可能与提高 cleaved-Caspase-3/Caspase-3, Bax/Bcl-2 有关;联合化疗药物使用具有减毒增效的作用。

[关键词] 威灵仙水提物; 甲状腺未分化癌; 生长抑制; 减毒增效; 半胱氨酸蛋白酶-3; B 淋巴细胞瘤-2; Bcl-2 相关 X 蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0091-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030091

Effect of Water Extract of Clematidis Radix et Rhizoma on Thyroid Anaplastic Carcinoma Doxorubicin Resistant Strains HTh74Rdox

ZHOU Lin-na¹, CAO Meng², MAO Chun-qin¹, CHEN Guo-fang², CHEN Kun², LI Min-chao¹, WU Min^{1,2*}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China; 2. Jiangsu Province Hospital on Integration Traditional Chinese and Western Medicine, Nanjing 210028, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of water extract of Clematidis Radix et Rhizoma on proliferation of HTh74Rdox cells and its mechanism. **Method:** HTh74Rdox cells were treated by different concentrations of water extract of Clematidis Radix et Rhizoma, in order to observe morphological changes and apoptosis of HTh74Rdox cells. methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) was used to test the inhibitory effect of water extract of Clematidis Radix et Rhizoma on proliferation of HTh74Rdox cells. The cell cycle change and the cell apoptosis rate were further detected by flow cytometry; Western blot was used to measure the expressions of cleaved-Caspase-3, Caspase-3, Bcl-2 and Bax. **Result:** Zedoary oil played a significant role in inhibiting the growth of HTh74Rdox cells. The combination of water extract of Clematidis Radix et Rhizoma and adriamycin could reduce the average dose of Adriamycin. Water extract of Clematidis Radix et Rhizoma significantly increased the percentage of cleaved-Caspase-3/Caspase-3 and Bax/Bcl-2. **Conclusion:** Water extract of Clematidis Radix et Rhizoma can inhibit the growth of HTh74Rdox cells. And its possible mechanism may be correlated with the increase of cleaved-Caspase-3/Caspase-3 and Bax/Bcl-2 ratio. Water extract of Clematidis Radix et Rhizoma combined with chemotherapy drug has the effect in reducing toxicity and increasing efficiency.

[收稿日期] 20160601(021)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473349);江苏省自然科学基金项目(BK20141037)

[第一作者] 周临娜,在读硕士,住院医师,从事内分泌代谢疾病研究, Tel:15195751582, E-mail:15195751582@163.com

[通讯作者] * 吴敏,教授,主任医师,从事内分泌代谢疾病研究, Tel:15365151208, E-mail:wumintem@126.com

[Key words] water extract of *Clematidis Radix et Rhizoma*; anaplastic thyroid carcinoma; growth inhibition; reducing toxicity and increasing efficiency; Caspase-3; Bcl-2; Bax

甲状腺未分化癌(anaplastic thyroid carcinoma, ATC)的发病率较低,约占甲状腺肿瘤的 2%~5%,但其病情凶险,中位生存期不到 6 个月,1 年生存率仅为 20%^[1]。临床上尽管予以积极的抗肿瘤治疗,预后仍然极差,确诊后平均存活期仅为 6~8 个月^[2]。阿霉素是甲状腺未分化癌常用的化疗药物,但其毒副作用如白细胞和血小板减少,心脏毒性等常常影响化疗效果。低剂量化疗药物的不良反应小,但不足以杀死肿瘤细胞,高剂量化疗效果明显,但其毒副作用对患者伤害大,常令患者常无法耐受^[3]。因此,确定一种可以与阿霉素联用,既可以降低阿霉素剂量,又不影响肿瘤杀伤作用的辅助用药显得极为重要。中药威灵仙^[4]来源于毛茛科植物威灵仙的干燥根和根茎,味辛、咸,性温,有小毒,归膀胱经,具有去风湿、通经络、消骨鲠等功效。现代药理证实威灵仙具有抗炎^[5]、抗氧化^[6]、抗肝纤维化^[7]等生物活性,其抗肿瘤活性也越来越得到关注,有报道威灵仙总皂苷对白血病腹水型(P338)肿瘤、小鼠移植性肉瘤(S180)、肝癌腹水型(HepA)均有明显的抑制作用^[8],威灵仙中的多糖则对胃癌 BGC-823 细胞^[9]、人乳腺癌 MCF-7 细胞^[10]及人舌鳞癌细胞(Tca-8113)^[11]具有显著生长抑制作用。此外, Lee 等^[12]研究发现,东北铁线莲 30% 乙醇提取物的正丁醇层可以抑制由癌基因抑活药诱导引起的大鼠软骨细胞的多种抗凋亡蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和 Bcl-2 家族 Bcl-xl 蛋白的下调以及促凋亡蛋白 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)的上调,同时也抑制癌基因抑活药诱导引起的大鼠软骨细胞线粒体前体抗凋亡蛋白 14-3-3 的下调,起到抑制由癌基因抑活药诱导引起的大鼠软骨细胞的凋亡的作用。国内外目前对威灵仙治疗甲状腺癌的研究鲜有报道,因此,本研究以人甲状腺未分化癌阿霉素耐药株 HTh74Rdox 细胞作为研究对象,探讨威灵仙水提物对 HTh74Rdox 细胞的增殖和凋亡的影响及作用机制,为进一步开发抗肿瘤中药提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人甲状腺未分化癌阿霉素耐药株 HTh74Rdox 由德国 Charite 医学院 Derwahl 教授赠予。

1.2 药物 阿霉素(浙江海正药业股份有限公司,国药准字 H33021980),使用去离子水溶解配制成

1 g·L⁻¹的溶液,储存于 -20 ℃。威灵仙水提物分析纯(AR)为 9.55% (中国药科大学天然药物活性组分与药效国家重点实验),由去离子水溶解配制成 50 g·L⁻¹的溶液,储存于 -20 ℃。

1.3 试剂 F12 培养基(美国 Gibco 公司,批号 1715892); 噻唑蓝(MTT, 美国 Sigma 公司,批号 M2128); BCA 蛋白定量试剂盒(南京凯基公司,批号 P0012-2); Bcl-2, Bax, 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)一抗,羊抗鼠-HRP 标记二抗,羊抗兔-HRP 标记二抗(美国 CST,批号分别 2870S, 2772S, 9662S, 7076S, 7074S); β -肌动蛋白(β -actin)一抗(美国 Santa Cruz 公司,批号 #G5110), 碘化丙啶(美国 BD Biosciences 公司,批号 51-66211E)。

1.4 仪器 CKX41SF 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司), SynergyH1 型酶标仪(美国 BioTek 公司), Guausoft 6L 型流式细胞仪(美国 Millipor 公司)。

2 方法

2.1 细胞形态观察 用不同质量浓度的威灵仙水提物(0, 1.6, 1.8, 2.0 g·L⁻¹)处理处于对数生长期 HTh74Rdox 细胞, 24 h 后观察其细胞形态变化,于倒置显微镜观察并拍照。

2.2 细胞活力实验 采用 MTT 检测细胞活力。预培养 HTh74Rdox 细胞 24 h 后,以不同质量浓度威灵仙水提物干预细胞 24, 48 h。干预结束前 4 h 加入 0.5 g·L⁻¹ MTT 20 μ L, 弃上清,二甲基亚砜(DMSO)溶解结晶,置于酶标仪 490 nm 处读取吸光度 A。

预培养 HTh74Rdox 细胞 24 h 后,以单味药威灵仙水提物、阿霉素及威灵仙水提物联合阿霉素干预细胞 24 h。干预结束前 4 h 加入 0.5 g·L⁻¹ MTT 20 μ L, 弃上清, DMSO 溶解结晶,置于酶标仪 490 nm 处读取 A。

2.3 细胞凋亡率检测 收集各组威灵仙水提物处理后的 HTh74Rdox 细胞, 4 ℃, 3 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 弃上清, PBS 清洗, 再离心弃上清, 加碘化丙啶室温避光孵育 15 min, 用流式细胞仪检测, 观察细胞凋亡情况并测定凋亡率。

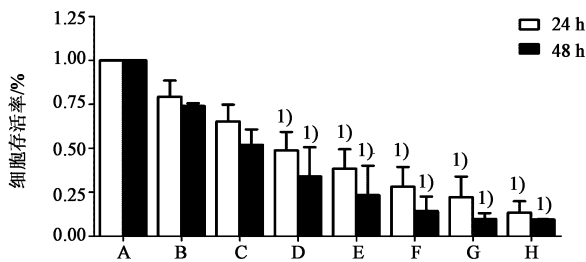
2.4 细胞蛋白检测 收集各组威灵仙水提物处理后的 HTh74Rdox 细胞, 4 ℃, 2 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 弃上清, 用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤, 再离心弃上清; 每孔加入裂解液 50 μ L 反应, 4 ℃, 14 000 r·min⁻¹ 离心 30 min, 吸上清进行 BCA 蛋白

定量。对蛋白进行电泳转膜,5% 脱脂牛奶封闭 2 h 后,一抗(1:5 000)4 ℃ 过夜,洗涤,二抗(1:5 000)室温反应 2 h,暗房曝光。用 Quantity one 软件对蛋白条带进行灰度分析。

2.5 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件,正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验比较两样本均数,采用单因素方差分析比较多组间均数, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 威灵仙水提取物对 HTh74Rdox 细胞增殖的抑制作用 与空白组比较,随着威灵仙水提取物浓度的升高,威灵仙水提取物(2.0,2.4,2.8,3.2,3.6 $g \cdot L^{-1}$)对细胞的增殖出现不同程度的抑制作用($P < 0.05$),抑制效应呈浓度依赖性,无时间依赖性。见图 1。24,48 h 的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 1.793,1.689 $g \cdot L^{-1}$ 。



A. 空白组; B ~ H. 威灵仙水提取物(1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6 $g \cdot L^{-1}$)组,与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$

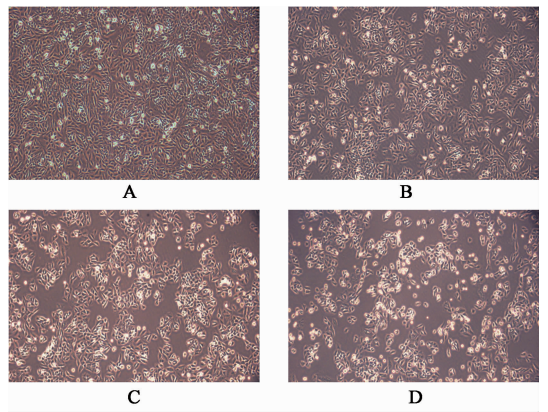
图 1 威灵仙水提取物对 HTh74Rdox 细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Inhibitory effect of water extract of Clematidis Radix et Rhizoma on cell proliferation in HTh74Rdox($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 威灵仙水提取物对 HTh74Rdox 细胞形态的影响

24 h 的 IC_{50} 为 1.793 $g \cdot L^{-1}$, 因此威灵仙水提取物的刺激浓度选 IC_{50} 的 1.8 $g \cdot L^{-1}$, $< IC_{50}$ 的 1.2 $g \cdot L^{-1}$, 及 $> IC_{50}$ 的 2.0 $g \cdot L^{-1}$ 。观察威灵仙水提取物处理 24 h 后细胞形态变化,与空白组比较,威灵仙水提取物质量浓度为 1.6 $g \cdot L^{-1}$ 时有部分细胞脱离培养皿;随着威灵仙水提取物处理浓度的增加,细胞密度系数降低,贴壁细胞数量减少,细胞形状由梭形变为碎片、颗粒。见图 2。

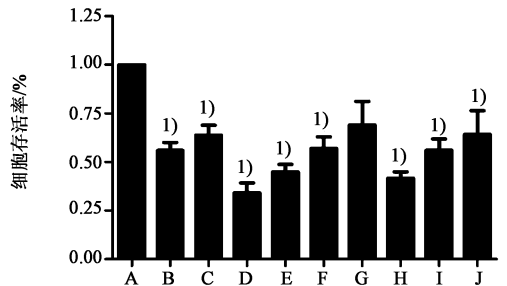
3.3 威灵仙水提取物对阿霉素的减毒增效作用 与空白组比较,当阿霉素质量浓度从 2.0 $mg \cdot L^{-1}$ 减少为 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ 时,加入 0.6 $g \cdot L^{-1}$ 威灵仙水提取物,仍可以有效抑制 HTh74Rdox 的细胞增殖($P < 0.05$),提示威灵仙水提取物可以减少阿霉素用量,提高其抗肿瘤作用。见图 3。



A. 空白组; B. 威灵仙水提取物 1.6 $g \cdot L^{-1}$ 组; C. 威灵仙水提取物 1.8 $g \cdot L^{-1}$ 组; D. 威灵仙水提取物 2.0 $g \cdot L^{-1}$ 组(图 4,5 同)

图 2 威灵仙水提取物对 HTh74Rdox 细胞形态的影响(倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of water extract of Clematidis Radix et Rhizoma on cell morphology in HTh74Rdox(inverted microscope, $\times 100$)



A. 空白组; B. 威灵仙水提取物 1.8 $g \cdot L^{-1}$ 组; C. 阿霉素 2.0 $mg \cdot L^{-1}$ 组; D. 威灵仙水提取物 1.8 $g \cdot L^{-1}$ + 阿霉素 2.0 $mg \cdot L^{-1}$ 组; E. 威灵仙水提取物 1.8 $g \cdot L^{-1}$ + 阿霉素 1.5 $mg \cdot L^{-1}$ 组; F. 威灵仙水提取物 1.2 $g \cdot L^{-1}$ + 阿霉素 1.5 $mg \cdot L^{-1}$ 组; G. 威灵仙水提取物 0.6 $g \cdot L^{-1}$ + 阿霉素 1.5 $mg \cdot L^{-1}$ 组; H. 威灵仙水提取物 1.8 $g \cdot L^{-1}$ + 阿霉素 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ 组; I. 威灵仙水提取物 1.2 $g \cdot L^{-1}$ + 阿霉素 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ 组; J. 威灵仙水提取物 0.6 $g \cdot L^{-1}$ + 阿霉素 1.0 $mg \cdot L^{-1}$ 组; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 3 威灵仙水提取物对阿霉素的减毒增效作用($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effect of water extract of Clematidis Radix et Rhizoma on reduction toxicity and increase efficiency of doxorubicin drug($\bar{x} \pm s, n = 3$)

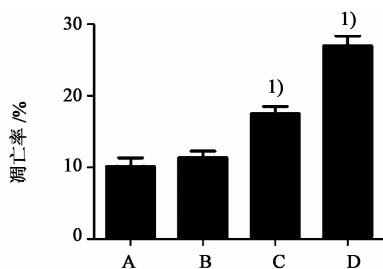
3.4 威灵仙水提取物对 HTh74Rdox 细胞凋亡的影响

与空白组比较,随威灵仙水提取物浓度的提高,威灵仙水提取物(1.8, 2.0 $g \cdot L^{-1}$)细胞凋亡率逐渐提高($P < 0.01$),且以早期凋亡为主。见图 4。

3.5 威灵仙水提取物对凋亡相关蛋白表达的影响 与空白组比较,威灵仙水提取物(1.8, 2.0 $g \cdot L^{-1}$), Bax, cleaved-Caspase-3 蛋白表达增强, Bcl-2 蛋白表达抑制, Bax/Bcl-2, cleaved-Caspase-3/Caspase-3 增加,且均呈浓度依赖性($P < 0.05$)。见图 5。

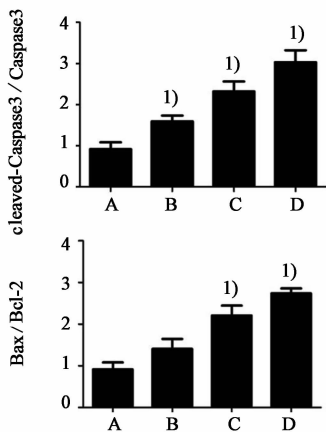
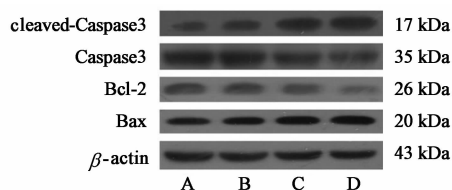
4 讨论

甲状腺癌按照肿瘤的病理类型可分为乳头状



与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$

图 4 威灵仙水提取物对 HTh74Rdox 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of water extract of Clematidis Radix et Rhizoma on cell apoptosis in HTh74Rdox ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$

图 5 威灵仙水提取物对凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Effect of water extract of Clematidis Radix et Rhizoma on expression of apoptosis related proteins ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

腺癌、滤泡状腺癌、髓样癌、未分化癌,其中未分化癌不易诊断,恶性程度高,易转移,预后差。因为发病时常已累及气管、食管等周围器官并且多发生颈部淋巴结和远处转移,因此,大部分患者确诊后已无手术机会;又因 ATC 缺乏分化不能聚碘,所以放射性碘治疗无法进行,只能选用外放射疗法,而外放射疗法对于全身转移的癌症具有局限性。因此,化学药物疗法仍然是 ATC 目前常用的治疗方法,但由于化疗药物的毒副作用,寻找高效、低毒的药物成为抗癌药物研发的重点。本研究发现威灵仙水提取物可以抑制 HTh74Rdox 细胞的增殖,抑制效应呈浓度依赖性;同时,威灵仙水提取物可以促进该肿瘤细胞的凋亡;与阿霉素联合用药后可降低阿霉素剂量,当阿霉素质量浓度从 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 减少为

$1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,加入 $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 威灵仙水提取物,其对肿瘤的增殖抑制作用仍然与阿霉素 ($2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组基本相同,提示威灵仙与阿霉素联用后可起到减毒增效作用。

细胞凋亡的调节中, Caspase-3 是关键的凋亡执行分子,其活化时首先被剪切产生活性片段 cleaved-Caspase-3,继而在细胞内发挥蛋白水解酶作用而促进细胞凋亡,因而可以通过 cleaved-Caspase-3 大致反映细胞凋亡情况^[13]。本研究发现,随着威灵仙水提取物处理浓度升高, cleaved-Caspase-3 表达增加, cleaved-Caspase-3/Caspase-3 逐渐升高,提示威灵仙水提取物可能通过促使 Caspase-3 转化为具有活性的 cleaved-Caspase-3 而促进 HTh74Rdox 细胞凋亡。Bcl-2 具有很强的抗凋亡作用,是目前已知的抗凋亡因子, Bax 可以促进凋亡,是凋亡蛋白的代表。Bcl-2 和 Bax 常以二聚体的形式出现在细胞中,具有相互拮抗作用。Bax 表达升高,形成同源二聚体,加速细胞凋亡; Bcl-2 表达升高,形成异源二聚体,抑制细胞凋亡^[14]。本研究发现,随着威灵仙水提取物浓度升高, Bcl-2 表达降低, Bax 表达增加, Bax/Bcl-2 逐渐升高,提示下调 Bcl-2,上调 Bax 表达可能是威灵仙水提取物诱导 HTh74Rdox 细胞凋亡的机制之一。

2010 版《中国药典》^[4] 推荐威灵仙临床用量为 $6 \sim 10 \text{ g}$,临床实际运用时常按照 $10 \text{ g}/50 \text{ kg}$ 体重给药, 50 kg 患者体液约为 5 L ,则威灵仙临床使用质量浓度为 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。本实验所用威灵仙水提取物 AR 为 9.55% ,药物刺激 24 h 的 IC_{50} ($1.793 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 换算成生药质量浓度为 $6.813 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,是临床推荐用量的 3 倍,浓度差在合理范围内,且临床根据病情也会将威灵仙浓度提高到 $6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,因此,本研究的实验结果基本与临床吻合,具有一定的参考价值。

综上, ATC 仍然是世界各国肿瘤中心所面临的巨大挑战,目前仍未找到标准、有效的治疗方法。中药威灵仙有着悠久的临床运用历史,具有临床实践基础,威灵仙水提取物作为中药威灵仙的主要有效成分,其安全性也是毋庸置疑的,这就大大缩短了科研到临床的距离。本研究结果显示,威灵仙水提取物可以明显抑制 HTh74Rdox 细胞增殖并诱导其凋亡,其机制可能与促使 Caspase-3 转化为具有活性的 cleaved-Caspase-3,抑制 Bcl-2 蛋白表达和促进 Bax 蛋白表达。但在 ATC 的发生发展过程中,是否可以通过其他的途径起到抗肿瘤作用,目前尚未清楚,有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Smallridge R C, Copland J A. Anaplastic thyroid carcinomaphathogenesis and emerging therapies[J]. Clin Oncol, 2010, 22(6):486-497.
- [2] Pasieka J L. Anaplastic thyroid cancer[J]. Curr Opin Oncol, 2003, 15(1):78-83.
- [3] HE Z, HU B, TANG L, et al. The over expression of MRP4 is related to multidrug resistance in osteosarcoma cells[J]. J Cancer Res Ther, 2015, 11(1):18-23.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2010:234-235.
- [5] 龙启才, 邱建波. 威灵仙、秦艽、桑寄生醇提取物体外对淋巴细胞和环氧化酶的影响[J]. 中药药理作用与临床, 2004, 20(4):26-27.
- [6] 陈彦, 孙玉军, 方伟. 威灵仙多糖的抗氧化活性研究[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(3):266-270.
- [7] 向虹, 琚坚. 威灵仙对实验性肝纤维化的干预作用[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2014, 22(7):377-380.
- [8] 赵英, 余东升, 周立群, 等. 威灵仙总皂苷抗肿瘤作用以及对癌细胞增殖周期的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8):1908-1909.
- [9] 张杰, 杨旭东, 王崴. Survivin 在威灵仙多糖诱导人胃癌 BGC-823 细胞凋亡中的基因表达[J]. 牡丹江医学院学报, 2014, 35(6):13-15.
- [10] 张杰, 杨旭东, 赵荣杰. 威灵仙多糖对人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及 Bcl-2, Fas 基因表达的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2011, 19(8):17-22.
- [11] 李俊妍, 钟辉, 李德超. 威灵仙多糖对舌鳞癌细胞生长抑制作用的研究[J]. 生物技术通讯, 2011, 22(2):255-257.
- [12] Lee S W, Choi S M, CHANG Y S, et al. A purified extract from Clematis mandshurica prevents staurosporin-induced downregulation of 14-3-3 and subsequent apoptosis an rat chondrocytes [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 111(2):213-218.
- [13] Cunha K S, Caruso A C, Faria P A, et al. Evaluation of bcl-2, bcl-x and cleaved caspase 3 in malignant peripheral nerve sheath tumors and neurofibromas [J]. An Acad Bras Cienc, 2013, 85(4):1497-1511.
- [14] Parikh N, Koshy C, Dhayabaran V, et al. The N-terminus and alpha-5, alpha-6 helices of the pro-apoptotic protein Bax, modulate functional interactions with the anti-apoptotic prote in Bel-xL [J]. Bmc Cell Biol, 2007, 23(8):1-16.

[责任编辑 张丰丰]