

· 斑蝥素药理、毒理及抗癌机制专题 ·

去甲斑蝥素对12类主要人类癌症细胞株生长状态的影响

邓恺文, 封艳艳, 金琳, 隋彤彤, 孙笑, 胡晓炜, 邵好珍, 范潇婷, 马齐襄,
罗广彬*, 马志涛*
(北京中医药大学 生命科学院, 北京 100029)

[摘要] **目的:** 确定去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) 对 12 类, 72 种人类癌症细胞的半数抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC_{50}), 并以此作为生长抑制效应的指标。**方法:** 采用长时间细胞观察及功能分析系统 (IncuCyte™ ZOOM), 用不同浓度 NCTD 分别与癌细胞株共同孵育 72 h, 实时监测和观察细胞增殖情况, 分析 NCTD 对 12 种人类癌症细胞的细胞毒性。此外, 长时间细胞观察及功能分析系统的成像系统在每个时点进行拍照存档, 展示了各细胞生长及存活的状态, 并且进行实时观察。**结果:** NCTD 对 72 株癌细胞系的生长抑制效应存在广泛的差异 [IC_{50} 2 ~ 66 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 平均 (24.63 ± 12.97) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$]。NCTD 对不同细胞生长抑制的影响差异明显, 体现在不同癌种之间以及同种癌种内不同个体之间。这充分反映了 NCTD 临床疗效个体化的特征, 并提示了未来个体化治疗的可能性。肝细胞癌、胃癌、前列腺癌、白血病、中枢神经系统癌、肾癌、胆管癌细胞的细胞系 IC_{50} 平均值均低于总平均值, 且前列腺癌、白血病、中枢神经系统癌、肾癌、胆管癌细胞 NCTD IC_{50} 平均值与肝癌细胞系和胃癌细胞系 IC_{50} 平均值相近。**结论:** NCTD 可能对前列腺癌、白血病、中枢神经系统癌、肾癌、胆管癌这几类癌症可产生显著疗效。

[关键词] 去甲斑蝥素; 半数抑制浓度; 人类肿瘤细胞系; 细胞生长状态; 个体化治疗

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0103-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017150103

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170511.0944.062.html>

[网络出版时间] 2017-05-11 9:44

Inhibitory Effect of Norcantharidin on Growth of Cell Lines Derived of 12 Main Human Cancers

DENG Kai-wen, FENG Yan-yan, JIN Lin, SUI Tong-tong, SUN Xiao, HU Xiao-wei, SHAO Hao-zhen,
FAN Xiao-ting, MA Qi-xiang, LUO Guang-bin*, MA Zhi-tao*
(School of Life Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To determine the inhibitory effect of norcantharidin (NCTD) on the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 72 cell lines of 12 major human cancers, in order to provide an index for growth inhibition effect. **Method:** The inhibitory effect of norcantharidin (NCTD) was determined by measuring and observing the half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) for individual cell lines using an IncuCyte™ ZOOM-based proliferation assay. Briefly, cells of individual lines at defined densities were treated with norcantharidin at various concentration, and their relative growth rates were assessed by measuring the relative cell densities once every 3 hours for 72 hours. In addition, digital images were captured at each time point and recorded. **Result:** The

[收稿日期] 20170321(017)

[基金项目] 北京中医药大学自主选题项目——特聘教授启动基金项目(1040053310002/002)

[第一作者] 邓恺文, 硕士在读, 从事肿瘤转化医学研究, Tel: 18511953595, E-mail: 2008jsdkw@163.com

[通讯作者] * 罗广彬, 博士, 教授, 从事肿瘤转化医学研究, Tel: 010-64286526, E-mail: luol35@hotmail.com;

* 马志涛, 博士, 助理研究员, 从事肿瘤转化医学研究, Tel: 010-64286526, E-mail: mzht@buem.edu.cn

IC₅₀ of NCTD for the 72 cancer cell lines varied considerably, ranging from 2 to 66 μmol · L⁻¹, with an overall median value of (24.63 ± 12.97) μmol · L⁻¹. Among the 12 cancer cell lines, the mean IC₅₀ of NCTD for two liver cancers (hepatocellular carcinoma cholangiocarcinoma), gastric cancer, prostate cancer, leukemia, central nervous system cancer, renal cancer were lower than the overall mean value. Also, significant differences among various cancer types and individuals with the same cancer were evident. **Conclusion:** There are remarkable differences in sensitivity towards NCTD among various cancer types and individuals with the same cancer, indicating the individualized sensitive nature of NCTD and the great future prospect for the development of individualized therapies with NCTD. Many cancers show a similar mean IC₅₀ of NCTD with hepatocellular carcinoma and gastric cancers, for which NCTD is effective clinically, suggesting that NCTD could also be effective for all of these cancers.

[**Key words**] norcantharidin; half maximal inhibitory concentration (IC₅₀); cancer cells line; cell growth status; individualized therapy

斑蝥是一种传统抗癌中药,在中国用于癌症治疗已有超过2 000年的历史^[1]。斑蝥素(cantharidin, CTD)是其活性成分,具有很强的抗肿瘤作用,广泛用于膀胱癌、结直肠癌、肝癌、胰腺癌、肾癌和乳腺癌等治疗^[2-7]。研究发现,CTD通过引起DNA双链损伤、肿瘤细胞细胞周期阻滞,p53基因依赖的细胞凋亡,抑制肿瘤的迁移和扩散发挥抗肿瘤作用^[1-4,7-8]。由于CTD发挥抗癌作用的同时,对人和实验动物泌尿系统产生严重副作用,限制了其临床应用^[9]。因此,科研人员研发各类CTD化学衍生物,其中去甲基斑蝥素(norcantharidin, NCTD)是CTD的去甲基化形式,合成更为容易,并且可引起较少的肾毒性和炎症性副作用^[10]。与CTD类似,NCTD可以影响细胞增殖的多种信号通路、引起癌细胞细胞凋亡、抑制血管生成和癌细胞转移^[11-14]。并且研究发现NCTD能够克服多药耐药性^[15]。NCTD于1996年被中国FDA批准用于肝癌,食管癌和胃癌的治疗^[14]。相关研究表明,NCTD主要是通过抑制蛋白磷酸酶2(PP2A)对细胞产生毒性,来体现其抗肿瘤效果。PP2A在多种肿瘤里异常表达并对生长存活具有重要的作用,因而抑制PP2A也可能对这些肿瘤有一定的疗效。但目前为止关于NCTD对各种肿瘤细胞的生长抑制及毒性方面系统的、全面性分析较少。为了探讨NCTD是否可能对肝癌、食管癌和胃癌以外的肿瘤类型有一定的疗效,本研究探讨NCTD对代表人类主要肿瘤类型的癌细胞株的生长抑制及细胞毒性进行系统性普查。以12种人类癌症的72株代表细胞株为实验材料,通过检测NCTD在各细胞系的半数抑制浓度(IC₅₀),全面分析比较NCTD在各癌细胞系的细胞毒性。目前国际上类似的研究主要有9类癌种的60个细胞株,也就是所谓的NCI-60系列

细胞株。考虑到NCTD已知的适应症及我国的特殊情况,本研究在NCI-60系列中选取58个细胞株的基础上,加入10个肝癌细胞株,包括7个肝细胞癌(hepatocellular carcinomas, HCCs)和3个胆管癌(cholangiocarcinomas, CCs)和4个胃癌细胞株,建成一个拥有72种细胞株,代表12类主要癌症的NCI-60+新体系。在此基础上,引入IncuCyte™ ZOOM系统对各个细胞株的IC₅₀进行系统性评估。IncuCyte™ ZOOM系统的引入不仅能在等同时间和实验条件下观察多个浓度NCTD对这72个细胞株的生长及存活状态进行评估,而且在必要时还能通过调看实时录像记录对处理后的动态变化进行回顾性分析。

1 材料

1.1 细胞与试剂 NCI-60由北京生命科学研究所陈良教授友情提供。胃癌细胞系SGC-7901, MGC-803, AGS, BGC 823, 肝癌细胞系HepG2, Hep3B, SNU-449, SNU-387, Huh7, LM9, SMMC7721, 胆管癌细胞系QBC939, HCC9810, RBE, 由北京肿瘤医院吕有勇教授友情提供。胎牛血清(德国PAN Biotech公司,批号P150104); RPMI 1640培养基, 96孔细胞培养板, 24孔细胞培养板(美国Corning公司,批号分别为18916003, 3995, 3524); 胰酶, 乙二胺四乙酸(EDTA), 磷酸盐缓冲液(PBS)(北京拜尔迪生物技术有限公司,批号分别为0458, 46-034-CI, de0220); NCTD(中国曼斯特公司,批号a1068); 4%台盼蓝染液(北京百诺威生物科技有限公司,批号60008-1); 二甲基亚砜(DMSO, 美国Sigma公司,批号34869)。

NCTD储备溶液配制,取NCTD粉末500 mg溶解于PBS 14.87 mL中,配置成终浓度为100 mmol · L⁻¹的NCTD储备溶液。

1.2 仪器 IncuCyte™ ZOOM 长时间细胞观察及功能分析系统(美国森西科技有限公司);IX81 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);1300SERIES A2-1384 型超净工作台,3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 用含有 10% 灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养细胞,细胞置于 37 °C 5% CO₂ 加湿细胞培养箱内培养。细胞贴壁生长,待培养瓶中细胞长至 80% ~ 90% 后,以 1:3 稀释比例传代,每 2 ~ 3 d 传代 1 次,取对数生长期的细胞铺板进行实验。

2.2 贴壁细胞生长状况分析 使用 IncuCyte™ ZOOM 测定 NCTD 对 57 株贴壁细胞生长的影响。将细胞按照 4 000 个/孔铺板于 96 孔板,置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱培养过夜。将 NCTD 用细胞培养液进行梯度稀释,浓度为 0,0.312 5,0.625,1.25,2.5,5,10,20,40,80,160 μmol·L⁻¹,更换 96 孔板内培养液为含药培养液,后将 96 孔板放置于 IncuCyte™ ZOOM,每 3 h 拍照 1 次,连续拍照 72 h。统计每个时间点的细胞密度。以胃癌细胞系 AGS 为例,从 IncuCyte™ ZOOM 中分析并导出每个时间点的细胞体积分数,用 GraphPad Prism 5 作图表示不同加药组的生长趋势。导出 0,24,48,60,72 h 空白组和 NCTD 20 μmol·L⁻¹ 组图片。

2.3 悬浮细胞生长状况分析 K562,CCRF-CEM,COLO-205,RPMI-8226,MOLT-4 细胞,调整细胞密度,以 5 × 10⁵ 个/孔接种于 24 孔板培养过夜。将 NCTD 用细胞培养液进行梯度稀释,浓度为 0,5,10,20,40 μmol·L⁻¹,细胞加入含药培养基,培养 72 h 后,吸取细胞悬液 20 μL 与 4% 台盼蓝染液 180 μL 混匀染色,取细胞悬液 10 μL,用细胞计数器进行计数。每组重复 3 次。统计每孔的活细胞数。

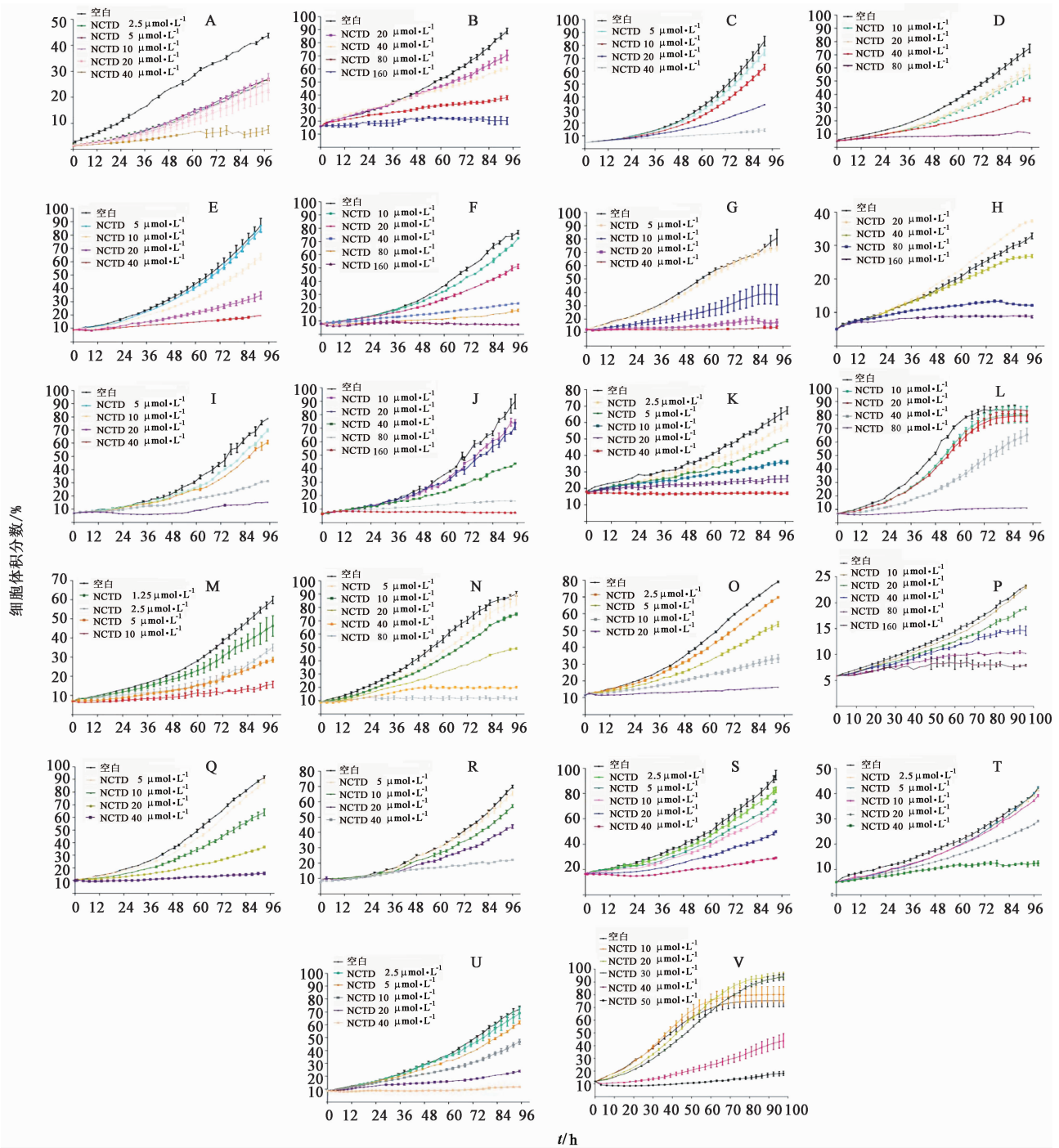
2.4 统计学分析 使用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 来表示。采用 probit 回归分析进行 IC₅₀ 计算, $P > 0.05$ 表明良好的曲线拟合, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 长时间观察评估 NCTD 对 11 类主要人类癌症细胞系细胞增殖的影响 选贴壁细胞 11 类贴壁生长的肿瘤细胞系,包括肺癌细胞系、结肠癌细胞系、中枢神经系统癌细胞系、黑色素癌细胞系、卵巢癌细胞系、肾癌细胞系、前列腺癌细胞系、乳腺癌细胞系、肝癌细胞系、胆管癌细胞系和胃癌细胞系,各筛选出

最敏感(IC₅₀ 最小)和最耐药(IC₅₀ 最大)的代表细胞株,分别是肺癌细胞系 NCI-H522 (7 μmol·L⁻¹) 和 NCI-H23 (66 μmol·L⁻¹);结肠癌细胞系 HT29 (19 μmol·L⁻¹) 和 SW-620 (35 μmol·L⁻¹);中枢神经系统癌细胞系 SF-268 (13 μmol·L⁻¹) 和 SF-295 (25 μmol·L⁻¹);黑色素癌细胞 SK-MEL-2 (9 μmol·L⁻¹) 和 MALME-3M (59 μmol·L⁻¹);卵巢癌细胞系 SK-OV-3 (19 μmol·L⁻¹) 和 OVCAR-8 (41 μmol·L⁻¹);肾癌细胞系 CAKI-1 或 RXF393 (6 μmol·L⁻¹) 和 UO-31 (40 μmol·L⁻¹);前列腺癌细胞系 PC-3 (2 μmol·L⁻¹) 和 DU-145 (21 μmol·L⁻¹);乳腺癌细胞系 BT-549 (8 μmol·L⁻¹) 和 MDA-MB-468 (56 μmol·L⁻¹);肝癌细胞系 SNU-449 (13 μmol·L⁻¹) 和 LM9 (30 μmol·L⁻¹);胆管癌细胞系 HCCC9810 (14 μmol·L⁻¹) 和 QBC939 (30 μmol·L⁻¹);胃癌细胞系 SGC7901 (13 μmol·L⁻¹) 和 MGC803 (38 μmol·L⁻¹)。分别从 IncuCyte™ ZOOM 中分析并导出每个时间点的细胞体积分数,用 GraphPad Prism 5 作图表示空白组和不同加药组细胞的生长趋势。见图 1。

与空白组比较,肺癌细胞系 NCI-H522,当 NCTD 浓度为 2.5 ~ 40 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖均得到了显著抑制 ($P < 0.01$); NCI-H23,当 NCTD 为 80 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到明显抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 160 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到完全抑制 ($P < 0.01$) (图 1A, B)。结肠癌细胞系 HT29,当 NCTD 为 10 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得抑制 ($P < 0.05$),当 NCTD 为 20 ~ 40 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到显著抑制 ($P < 0.01$); SW-620,当 NCTD 为 10 ~ 20 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到抑制 ($P < 0.05$),当 NCTD 为 40 ~ 80 μmol·L⁻¹ 时,细胞增长被显著抑制 ($P < 0.01$) (图 1C, D)。中枢神经系统癌细胞系 SF-268,当 NCTD 为 10 ~ 40 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到显著抑制 ($P < 0.01$); SF-295,当 NCTD 为 10 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到抑制 ($P < 0.05$),当 NCTD 为 20 ~ 40 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到显著抑制 ($P < 0.01$); 当 NCTD 为 80 ~ 160 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到完全抑制 ($P < 0.01$) (图 1E, F)。黑色素癌细胞 SK-MEL-2,当 NCTD 为 10 ~ 40 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到显著抑制 ($P < 0.01$); MALME-3M,当 NCTD 为 80 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 160 μmol·L⁻¹ 时,细胞增殖得到完全抑制 ($P < 0.01$) (图 1G, H)。卵巢癌细胞系 SK-OV-3,当



A, B. 肺癌细胞系 NCI-H522, NCI-H23; C, D. 结肠直肠癌细胞系 HT29, SW-620; E, F. 中枢神经细胞系 SF-268, SF-295; G, H. 黑色素瘤细胞系 SK-MEL-2, MALME-3M; I, J. 卵巢癌细胞系 SK-OV-3, OVCAR-8; K, L. 肾癌细胞系 RXF393, UO-31; M, N. 前列腺癌细胞系 PC-3, DU-145; O, P. 乳腺癌细胞系 BT-549, MDA-MB-468; Q, R. 肝癌细胞系 SNU-449, LM9; S, T. 胆管癌细胞系 HCCC9810, QBC939; U, V. 胃癌细胞系 SGC7901, MGC803

图 1 不同肿瘤细胞系的不同细胞株(部分)在 NCTD 持续加药刺激状态下的生长趋势($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 1 Growth tendency of different cells of different cancer cell lines in sustained stimulation with NCTD($\bar{x} \pm s, n=3$)

NCTD 为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞增殖得到抑制 ($P < 0.05$), 当 NCTD 为 $10 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞增长得到显著抑制 ($P < 0.01$), 当 NCTD 为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞增长得到完全抑制 ($P < 0.01$); OVCAR-8, 当 NCTD 为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞增殖得到抑制

($P < 0.05$), 当 NCTD 为 $80 \sim 160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞增殖得到完全抑制 ($P < 0.01$) (图 1I, J)。肾癌细胞系 RXF393, 当 NCTD 为 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞增殖得到抑制 ($P < 0.05$), 当 NCTD 为 $5 \sim 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 细胞增长得到显著抑制 ($P < 0.01$), 当 NCTD 为

40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长得到完全抑制 ($P < 0.01$);UO-31,当 NCTD 为 10 ~ 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到完全抑制 ($P < 0.01$) (图 1K, L)。前列腺癌细胞系 PC-3,当 NCTD 为 2.5 ~ 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到了显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到了完全抑制 ($P < 0.01$);DU-145,当 NCTD 为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到抑制 ($P < 0.05$),当 NCTD 为 10 ~ 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被完全抑制 ($P < 0.01$) (图 1M, N)。乳腺癌细胞系 BT-549,当 NCTD 为 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到了显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到了完全抑制 ($P < 0.01$);MDA-MB-468,当 NCTD 为 40 ~ 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到抑制 ($P < 0.05$),当 NCTD 为 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被完全抑制 ($P < 0.01$) (图 1O, P)。肝癌细胞系 SNU-449,当 NCTD 为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 ($P < 0.05$),细胞增殖得到抑制,当 NCTD 为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被完全抑制 ($P < 0.01$);LM9,当 NCTD 为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到抑制 ($P < 0.05$),当 NCTD 为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被完全抑制 ($P < 0.01$) (图 1Q, R)。胆管癌细胞系 HCCC9810,当 NCTD 为 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到抑制 ($P < 0.05$),当 NCTD 为 5 ~ 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被完全抑制 ($P < 0.01$);QBC939,当 NCTD 为 2.5 ~ 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到抑制 ($P < 0.05$),当 NCTD 为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被完全抑制 ($P < 0.01$) (图 1S, T)。胃癌细胞系 SGC7901,当 NCTD 为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增殖得到抑制 ($P < 0.05$),当 NCTD 为 10 ~ 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被完全抑制 ($P < 0.01$);MGC803,当 NCTD 为 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被显著抑制 ($P < 0.01$),当 NCTD 为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,细胞增长被完全抑制 ($P < 0.01$) (图 1U, V)。

由此可见,NCTD 对不同细胞生长抑制的影响差异明显,不仅体现在不同癌种之间,也体现在同种

癌种内不同个体之间。而这充分反映了 NCTD 临床疗效个体化的特征并提示了未来个体化治疗的可能性。

3.2 长时间观察评估 NCTD 对胃癌细胞系 AGS 细胞增殖的影响 胃癌细胞系 AGS 经过 NCTD 持续加药刺激至少 72 h 过程中,不同时间点空白组和各加药组的细胞增长的不同状态。空白组以及 NCTD 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞呈持续增长趋势, NCTD 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞增殖已经得到明显的抑制 ($P < 0.01$);NCTD 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞得到了完全抑制 ($P < 0.01$)。见图 2, 3。

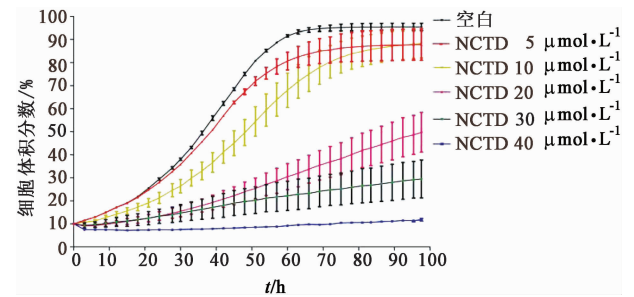


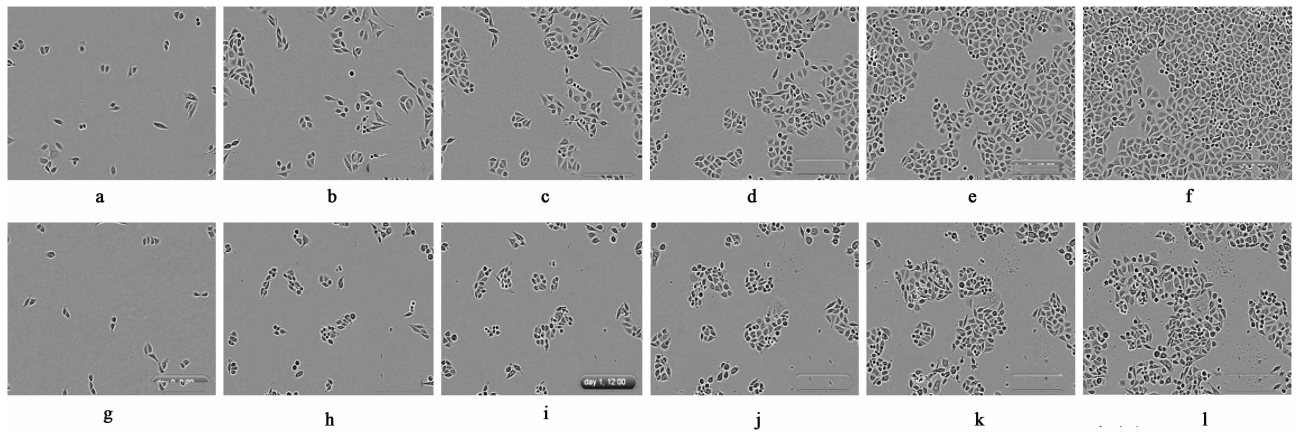
图 2 NCTD 对胃癌细胞系 AGS 细胞连续刺激至少 72 h 对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect on cell proliferation of gastric cancer cell line AGS after stimulated by NCTD for 72 hours ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 长时间观察评估 NCTD 对肝癌细胞系 Huh7 细胞增殖的影响 肝癌细胞系 Huh7 经过 NCTD 持续加药刺激 72 h 过程中,不同时间点空白组和各加药组的细胞增长的不同状态。空白组以及 NCTD 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞呈持续增长趋势,与空白组比较, NCTD 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞增殖已经得到显著抑制 ($P < 0.01$);NCTD 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞得到了完全抑制 ($P < 0.01$)。见图 4, 5。

3.4 72 株主要人类癌症细胞的 NCTD IC_{50} 比较 NCTD 在 72 株癌细胞系的 IC_{50} 为 2 ~ 66 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (前列腺癌细胞系 PC-3 最低,肺癌细胞系 NCI-H23 最高)。另外, IC_{50} 较低的还有肾癌细胞系 CAKI-1 和 RXF393 (均为 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 肺癌细胞系 NCI-H522 (7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 乳腺癌细胞系 BT-549 (8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 黑色素癌细胞系 SK-MEL-2 (9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 较低;较高的包括黑色素癌细胞系 MALME-3M (59 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 乳腺癌细胞系 MDA-MB-468 (56 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 肺癌细胞系 HOP-62 (49 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 乳腺癌细胞系 T-47D (46 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。见表 1。

同种癌症不同癌细胞系对 NCTD 的敏感性不同, IC_{50} 结果表明, NCTD 培养细胞后, 肺癌细胞系中



a ~ f. 空白组 0, 24, 36, 48, 60, 72 h 不同时间点细胞形态; g ~ l. NCTD (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组 0, 24, 36, 48, 60, 72 h 不同时间点的细胞形态 (图 5 同)
图 3 NCTD 对胃癌细胞系 AGS 细胞刺激 72 h 后对细胞增殖的影响 (倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 3 Effect on cell proliferation of gastric cancer cell line AGS after stimulated by NCTD for 72 hours (inverted microscope, $\times 100$)

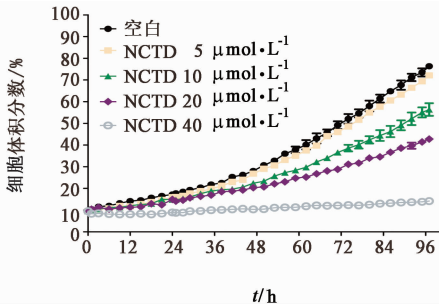


图 4 NCTD 对肝癌细胞系 Huh7 细胞连续刺激至少 72 h 对细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect on cell proliferation of Hepatocellular cancer cell line Huh7 after stimulated by NCTD for 72 hours ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

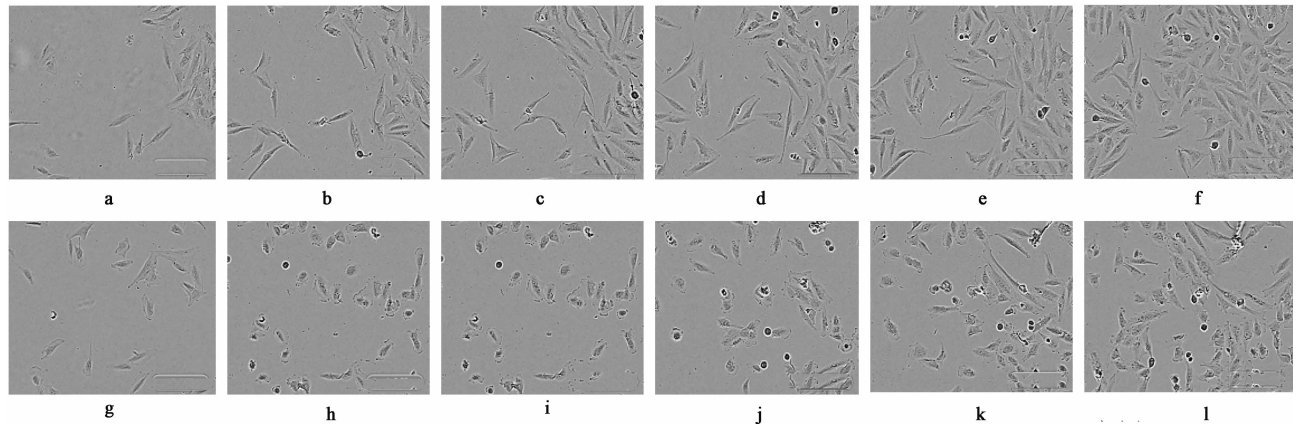


图 5 NCTD 对肝癌细胞系 Huh7 细胞刺激 72 h 后对细胞增殖的影响 (倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 5 Effect on cell proliferation of hepatocellular cancer cell line Huh7 after stimulated by NCTD for 72 hours (inverted microscope, $\times 100$)

为 2 ~ 21 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 10 ~ 13 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 13 ~ 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 6 ~ 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 14 ~ 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 13 ~ 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; 其 IC_{50} 均值分别为 (11.5 \pm 13.43), (12.25 \pm 1.5), (19.16 \pm 4.3), (19.25 \pm 12.45), (20 \pm 8.71), (20.57 \pm 5.31) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 均比总均值

NCI-H522 (7 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 远低于 NCI-H23 (66 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 黑色素瘤细胞系中 SK-MEL-2 (9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 远低于 MALME-3M (59 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 肾癌细胞系中 CAKI-1 (6 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 远低于 UO-31 (40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 前列腺癌细胞系中 PC-3 (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 远低于 DU-145 (21 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 乳腺癌细胞系中 BT-549 (8 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 远低于 T-47D (46 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 见表 1, 2。

在 12 种人类癌细胞系中, 前列腺癌细胞系、白血病癌细胞系、中枢神经系统癌细胞系、肾癌细胞系、胆管癌细胞系、肝癌细胞系的 NCTD IC_{50} 范围分别

(24.63 \pm 12.97) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 低。见表 3。

4 讨论

恶性肿瘤严重威胁着人类的健康, 多数患者需要面对癌症的威胁, 导致生活质量差、医疗费用高昂等问题, 所以人们迫切寻求一种高效、低毒、廉价的

表 1 NCTD 对 NCI-60 癌细胞系的细胞毒性

Table 1 Cytotoxicity of NCTD on human NCI-60 cell lines

癌症种类	细胞系	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	癌症种类	细胞系	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹	
leukemia	RPMI-8226	10		MDA-MB-435	22	
	CCRF-CEM	13		SK-MEL-5	26	
	K-562	13		UACC-62	38	
	MOLT-4	13		LOX IMVI	40	
non-small cell lung	NCI-H522	7		UACC-257	40	
	NCI-H226	11		MALME-3M	59	
	NCI-H460	21		ovarian	SK-OV-3	19
	NCI-H322M	27			OVCAR-4	21
	EKVX	32			IGR-OV1	25
	HOP-92	35			NCI/ADR-RES	26
	A549/ATCC	41		OVCAR-3	28	
	HOP-62	49		OVCAR-5	40	
	NCI-H23	66		OVCAR-8	41	
	colon	COLO 205		17	renal	CAKI-1
HT29		19	RXF 393	6		
HCT-116		26	SN12C	12		
KM12		27	TK-10	13		
HCC-2998		32	ACHN	20		
HCT-15		34	A498	24		
SW-620		35	786-0	33		
CNS	SF-268	13		UO-31	40	
	SNB-19	17		prostate	PC-3	2
	SNB-75	18			DU-145	21
	SF-539	19		breast	BT-549	8
	U251	23			MDA-MB-231/ATCC	18
melanoma	SF-295	25	HS 578T	27		
	SK-MEL-2	9	MCF7	39		
	SK-MEL-28	17	T-47D	46		
	M14	18	MDA-MB-468	56		

药物,旨在有效治疗癌症。传统中药作为一种纯天然药物。NCTD 是我国首次合成的新型抗肿瘤药物,由于它同时具有升高白细胞、保护肝细胞、调节免疫等作用,日益受到研究者的重视。近年来对 NCTD 以及其抗癌作用机制的研究比较多,各种具有靶向性的新型制剂和各种衍生物不断地发展使用。并且,NCTD 以及其类似物在临床的应用也较为广泛。

基于 NCTD 对肝癌,食管癌和胃癌的临床疗效

和对该药物的作用靶点及机制的认识的新进展,本研究探讨 NCTD 对代表人类主要肿瘤类型的癌细胞株的生长抑制及细胞毒性进行系统性的普查,结果显示,NCTD 在 72 株癌细胞系的生长抑制效应存在广泛的差异,肝癌和胃癌细胞系的 IC₅₀ 平均值均低于总平均值,与 NCTD 对这两类肿瘤有临床疗效的特性相符。同时,同种癌肿内不同细胞株之间在 NCTD IC₅₀ 上也存在很大的个体差异。以肝细胞肝癌(HCC)为例,该类癌细胞株中 HepG2(23 μmol·L⁻¹),

表 2 NCTD 对其他癌细胞系的细胞毒性

Table 2 Cytotoxicity of NCTD on additional lines

癌症种类	其他细胞系	IC ₅₀ /μmol·L ⁻¹
hepatocellular carcinoma	SNU-449	13
	Hep3B	17
	SNU-387	19
	SMMC7721	20
	Huh7	22
	HepG2	23
	LM9	30
cholangio carcinoma	HCCC9810	14
	RBE	16
	QBC939	30
gastric cancer	SGC7901	13
	AGS	17
	BGC823	19
	MGC803	38

表 3 NCTD 对 12 种癌细胞系 IC₅₀ 的影响

Table 3 Range, mean and standard deviation of IC₅₀ NCTD in 12 human cancer cell lines

细胞系	n	IC ₅₀ 范围	IC ₅₀ 均数 ($\bar{x} \pm s$)
			μmol·L ⁻¹
leukemia	4	10 ~ 13	12.25 ± 1.5
non-small cell lung cancer	9	11 ~ 66	32.11 ± 18.53
colon cancer	7	17 ~ 35	27.14 ± 7.1
CNS cancer	6	13 ~ 25	19.16 ± 4.3
melanoma cancer	9	9 ~ 59	29.88 ± 15.56
ovarian cancer	7	19 ~ 40	28.57 ± 8.69
renal cancer	8	6 ~ 40	19.25 ± 12.45
prostate cancer	2	2 ~ 21	11.50 ± 13.43
breast cancer	6	8 ~ 56	32.33 ± 17.98
hepatocellular carcinoma	7	13 ~ 30	20.57 ± 5.31
cholangio carcinoma	3	14 ~ 30	20.00 ± 8.71
gastric cancer	4	13 ~ 38	21.75 ± 11.11

Huh7(22 μmol·L⁻¹), LM9(30 μmol·L⁻¹) 高于肝细胞肝癌 IC₅₀ 总均值, Hep3B(17 μmol·L⁻¹), SNU-449(13 μmol·L⁻¹), SNU-387(19 μmol·L⁻¹), SMMC7721(20 μmol·L⁻¹) 低于肝细胞肝癌 IC₅₀ 总均值(表 2), 进一步说明同种癌症细胞系中不同癌症细胞也存在较大的个体差异。这一结果也与 NCTD 仅对部分 HCC 患者有疗效的临床结果一致。NCTD 对细胞生长抑制效应的差异体现在不同癌种之间和同种癌肿不同个体间, 这也充分反映了 NCTD 临床疗效个体化的特征, 提示未来个体化治疗的可能性。

此外, 在本研究普查的 12 种人类癌细胞中, 前列腺癌、白血病、中枢神经系统癌、肾癌、胆管癌细胞的 NCTD IC₅₀ 均值均低于总均值, 且与肝细胞癌和胃癌株系均值相近, 提示 NCTD 对这几类癌症的部分病例有同等疗效的可能性。

NCTD 诱导肿瘤细胞的凋亡是通过多点启动的, 这与 PP2A 抑制蛋白磷酸酯酶 2A 和 PP1 蛋白磷酸酯酶 1 的活性相关, 目前公认的 NCTD 的主要作用的靶点是 PP2A, 通过对 PP2A 的影响, 引起细胞发生不同形式的凋亡。而 NCTD 的抗肿瘤作用机制主要包括抑制肿瘤细胞的增殖, 诱导肿瘤细胞的凋亡^[16]; 抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[17]; 抑制 DNA 的复制, 从而增加放疗和化疗的敏感性^[18]; 能够克服多药耐药性^[19]; 可以有效干扰肿瘤细胞的生长周期^[20]等。其具体作用机制还有待进一步研究。

本研究在细胞水平证明 NCTD 在这 12 种人类主要肿瘤类型的细胞株的生长抑制效应差异性体现在不同癌种之间以及同种癌种内不同个体之间。反映了 NCTD 临床疗效个体化的特征, 并提示未来个体化治疗的可能性。且研究发现, NCTD 可能对前列腺癌、白血病、中枢神经系统癌、肾癌、胆管癌这几类癌症的部分病例会产生显著疗效。这一发现对后期开拓和深入研究 NCTD 的研究具有很好的参考意义, 从而达到进一步提高 NCTD 抗肿瘤疗效的目的。

本研究总结出影响 NCTD 抗肿瘤作用主要取决于药物吸收和外排的差异, 抗凋亡能力的差异性, 更值得关注的是不同细胞种类对 PP2A 依赖性的不同。如果可以通过蛋白质组学或者基因组学的方式找到一个能够预估标记物的方法, 从而进一步预测该药物对哪类患者更有效, 将会进一步提高 NCTD 抗肿瘤的疗效。

[参考文献]

[1] WANG, G S. Medical uses of mylabris in ancient China and recent studies [J]. J Ethnopharmacol, 1989, 26(2):147-162.
 [2] HUANG W W, Ko S W, Tsai H Y, et al. Cantharidin induces G₂/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways [J]. Int J Oncol, 2011, 38(4):1067-1073.
 [3] KUO J H, CHU Y L, YANG J S, et al. Cantharidin induces apoptosis in human bladder cancer TSGH 8301 cells through mitochondria-dependent signal pathways [J]. Int J Oncol, 2010, 37(5):1243-1250.
 [4] LI W, XIE L, CHEN Z, et al. Cantharidin, a potent and

- selective PP2A inhibitor, induces an oxidative stress-independent growth inhibition of pancreatic cancer cells through G₂/M cell-cycle arrest and apoptosis [J]. *Cancer Sci*, 2010, 101(5):1226-1233.
- [5] SHOU L, ZHANG Q, WEI L I, et al. Cantharidin and norcantharidin inhibit the ability of MCF-7 cells to adhere to platelets *via* protein kinase C pathway-dependent downregulation of α_2 integrin [J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(3):1059-1066.
- [6] 曾瑶波, 刘晓玲, 李创军, 等. 斑蝥化学成分及体外抗肿瘤活性研究 [J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(5):859-863.
- [7] REN Y, ZHANG S W, XIE Z H, et al. Cantharidin induces G₂/M arrest and triggers apoptosis in renal cell carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6):5614-5618.
- [8] HUANG Y P, NI C H, LU C C, et al. Suppressions of migration and invasion by cantharidin in TSGH-8301 human bladder carcinoma cells through the inhibitions of matrix metalloproteinase-2/-9 signaling [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/190281.
- [9] Cotovio P, Silva C, Marques M G, et al. Acute kidney injury by cantharidin poisoning following a silly bet on an ugly beetle [J]. *Clin Kidney J*, 2013, 6(2):201-203.
- [10] Hsieh C H, CHAO K S, LIAO H F, et al. Norcantharidin, derivative of cantharidin, for cancer stem cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2013, doi: 10.1155/2013/838651.
- [11] CHEN Y N, CHENG C C, CHEN J C, et al. Norcantharidin-induced apoptosis is *via* the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun-NH₂-terminal kinase signaling pathways in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140(3):461-470.
- [12] CHEN Y N, CHENG C C, CHEN J C, et al. Norcantharidin-induced apoptosis is *via* the extracellular signal-regulated kinase and c-Jun-NH₂-terminal kinase signaling pathways in human hepatoma HepG2 cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140(3):461-470.
- [13] HONG C Y, HUANG S C, LIN S K, et al. Norcantharidin-induced post-G₂/M apoptosis is dependent on wild-type p53 gene [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 276(1):278-285.
- [14] QIU P, WANG S, MING L, et al. Norcantharidin inhibits cell growth by suppressing the expression and phosphorylation of both EGFR and c-Met in human colon cancer cells [J]. *Bmc Cancer*, 2017, 17(1):55.
- [15] YI S, Wass J, Vincent P, et al. Inhibitory effect of norcantharidin on K562 human myeloid leukemia cells *in vitro* [J]. *Leuk Res*, 1991, 15(10):883-886.
- [16] 戎煜, 梁福佑, 陈莉, 等. 去甲斑蝥素对人乳腺癌细胞系的凋亡诱导作用及 Bcl-2 基因的表达 [J]. *癌症*, 2000, 19(12):1077-1081.
- [17] 黄松音, 姚燕丹, 陈丽莉, 等. 去甲斑蝥素抑制蛋白激酶 C 影响乳腺癌细胞侵袭转移的研究 [J]. *热带医学杂志*, 2010, 10(9):1034-1038.
- [18] 李金龙, 蔡于琛, 胡志明, 等. 去甲斑蝥素对肿瘤细胞 DNA 复制起始蛋白 Cdc6 的抑制作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2010, 30(8):1851-1853.
- [19] 彭宗根, 蒋建东, 武德柱, 等. 去甲斑蝥素体外抗 HIV-1 作用研究 [J]. *药学学报*, 2010, 45(2):224-227.
- [20] 范跃祖, 傅锦业, 赵泽明, 等. 去甲斑蝥素对人胆囊癌 GBC-SD 细胞系生长及侵袭的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2004, 24(S1):180-183.

[责任编辑 张丰丰]