

斑蝥素对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响及其可能机制

封艳艳, 马齐襄, 隋彤彤, 孙笑, 邵好珍, 金琳, 胡晓炜, 邓恺文, 范潇婷,
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:**探讨不同浓度斑蝥素(cantharidin,CTD)对肝癌细胞 HepG2 细胞增殖、凋亡以及其可能机制。**方法:**应用长时间细胞观察及功能分析系统(IncuCyte™ ZOOM)以及克隆形成实验,分析药物处理后肝癌细胞 HepG2 细胞增殖的影响。应用流式细胞术检测 CTD 对肝癌细胞 HepG2 凋亡的影响。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测技术,检测 CTD 处理后, HepG2 细胞 pro 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)及聚二磷酸腺苷核糖多聚酶(PARP)蛋白表达的变化以及细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2),蛋白激酶 B(Akt)磷酸化水平的变化。采用长时间细胞观察及功能分析系统检测 ERK1/2 抑制剂(PD98059),磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)抑制剂(Wortmannin)与 CTD 共处理对 HepG2 细胞抑制作用的变化。**结果:**CTD 在 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时就能够明显抑制 HepG2 细胞的生长,但不出现明显凋亡。CTD 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时 HepG2 的生长几乎完全受到抑制,流式细胞术结果显示, HepG2 细胞凋亡率达 40.4%。同时 Western blot 结果显示 CTD 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞 pro Caspase-3 蛋白表达明显降低, Cleaved PARP 蛋白表达明显上升,说明 CTD 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组会出现细胞凋亡,与流式结果相符。CTD 能够促进 ERK 磷酸化,但不能促进 Akt 磷酸化。**结论:**CTD 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 具有抑制 HepG2 细胞生长的作用,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时能够促进 HepG2 细胞凋亡,提示 CTD 既具有抑制细胞生长作用,也具有一定的细胞毒作用。CTD 能够促进 ERK 磷酸化,但不能促进 Akt 磷酸化。

[关键词] 斑蝥素; HepG2; 增殖; 凋亡; 生长抑制; 细胞毒作用

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)15-0112-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017150112

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170511.0943.060.html>

[网络出版时间] 2017-05-11 9:43

Effect of Cantharidin on Growth, Survival and Mechanism in HepG2 Cells

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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of cantharidin on proliferation, apoptosis and MAPK signaling in hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Method:** IncuCyte™ ZOOM-based proliferation assay and clonogenic assay were used to assess the inhibitory effect of cantharidin (CTD) on HepG2 cells. Flow cytometry was used to define the effect of CTD on apoptosis. Western blot was used to monitor the changes in Caspase-3, poly adeno-sine diphosphate ribose polymerase (PARP), extracellular-signalregulated kinase (ERK1/2) and protein kinase B (Akt) phosphorylation after CTD treatment. Finally, ERK1/2 inhibitor (PD98059), and Akt inhibitor (Wortmannin) were used to assess the potential effect of ERK1/2 and Akt on the inhibitory and/or proapoptotic effect of CTD. **Result:** CTD at 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ significantly inhibited the growth of HepG2, but did not significantly affect cell survival. However, CTD at 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ resulted in not only most a complete inhibitory effect

[收稿日期] 20170320(021)

[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] 封艳艳, 硕士, 在读硕士, 从事肿瘤转化医学研究, Tel:15210946631, E-mail:yanyandai@163.com

[通讯作者] * 罗广彬, 博士, 教授, 从事肿瘤转化医学研究, Tel:01064286526, 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:18911079152, E-mail:414475133@163.com

on growth, but also a significant apoptosis rate (40.4%). Western blot result showed that $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of CTD decreased pro Caspase-3 expression and increased cleaved PARP expression in HepG2. Besides, CTD promoted the phosphorylation of ERK, but not Akt. **Conclusion:** CTD exhibited a potent growth inhibitory (cytostatic) effect at $2.5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, but could show a strong pro-apoptotic (cytotoxic) effect at $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for HepG2 cells. Therefore, the study reveals a potent cytostatic effect of CTD and a certain cytotoxic potency, suggesting that the cytostatic effect is an important anticancer mechanism.

[Key words] cantharidin; HepG2; proliferation; apoptosis; cytostatic; cytotoxic

原发性肝癌是中国最常见的恶性肿瘤之一,目前发病率位居全球第 5 位。目前临床常用的化疗药物包括蒽环类抗肿瘤药、氟尿嘧啶类、铂类、喜树碱等,但多年来临床观察发现,这些化疗药物疗效并不理想,晚期肝癌患者仍然只有 4~5 月的生存期^[1]。因此急需找到一种能够有效治疗晚期肝癌的药物。中医药在肝癌治疗过程中具有非常重要的作用,斑蝥是芫青科昆虫南方大斑蝥或黄黑小斑蝥的干燥体,斑蝥作为一种中药被使用已经有 2 000 多年的历史,其中斑蝥抗肿瘤药物有效成分即为斑蝥素 (cantharidin, CTD)^[2]。据报道,CTD 能够抑制多种肿瘤细胞系的增生以及凋亡,如肺癌细胞 A549^[3],白血病 K562 细胞^[4]等。CTD 能抑制肿瘤的侵袭、转移以及血管生成,同时,CTD 能够刺激骨髓白细胞生成,并且增加外周淋巴细胞的数量^[1]。CTD 作为一种抗肿瘤药物已经被广泛研究。但其抗肿瘤作用机制并不十分清楚。近些年有学者提出,CTD 作为一种 PP2A 抑制剂^[5],其抗肿瘤作用极有可能是通过促进多种激酶磷酸化来实现的^[6]。基于以上理论,本研究旨在验证斑蝥素对肝癌细胞 HepG2 的抑制效果,并且通过探讨斑蝥素对细胞外信号调节激酶 (extracellular regulated protein kinase, ERK),蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 磷酸化的影响,以及联合激酶抑制剂使用对 CTD 抗肿瘤效果的影响,揭示斑蝥素的抗肿瘤机制,为进一步深入研究斑蝥素的抗肿瘤机制提供实验依据及思路。

1 材料

1.1 细胞与试剂 HepG2 细胞由中国科学院动物研究所周光标老师课题组提供;Annexin V:FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (美国 BD Pharmingen 公司,批号 556547);胎牛血清 (美国 PAN Biotech 公司,批号 P150104);96 孔板,6 孔板,RPMI 1640 培养基 (美国 Corning 公司,批号分别为 3599, 3736, 18916003);CTD,去甲斑蝥素 (norcantharidin, NCTD) (中国曼斯特公司,批号分别为 a0167, a1068);蛋白裂解液 (RIPA,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号

wb-0071);胰蛋白酶,结晶紫,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, c0120, de0220);RNA 酶 (碧云天生物技术有限公司,批号 ST578);二甲基亚砜 (DMSO,美国 Sigma 公司,批号 34869);ERK1/2 抑制剂 (PD98059),磷脂酰肌醇 3 激酶 (PI3K) 抑制剂 (Wortmannin) (美国 Selleck 公司,批号分别为 S1177, S2758);pro 半胱氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体 (美国 Epitomics 公司,批号 YH0926);聚二磷酸腺苷核糖多聚酶 (Cleaved PARP),ERK,磷酸化-ERK (p-ERK),Akt,磷酸化-Akt (p-Akt), β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (美国 CST 公司,批号分别为 9541S, 9102S, 4370L, 4691S, 13038S, 4967S)。

1.2 仪器 IncuCyte™ ZOOM 型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);165-8001 型垂直电泳槽,170-3940 型半干转电转印仪,PowerPac™ Basic 型电泳仪 (美国伯乐公司);BD FACSCanto II 型流式细胞仪 (美国 BD Pharmingen 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 长时间细胞观察及功能分析系统 (IncuCyte™ ZOOM) 观察 HepG2 细胞增殖变化 取对数生长期的肝癌细胞 HepG2,以 3×10^4 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板中,每孔 100 μL ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱内培养 12 h,加入不同浓度的 CTD (0, 0.312 5, 0.625, 1.25, 2.5, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),每个组设 3 个平行孔。加药后立即放入 IncuCyte™ ZOOM 中拍照观察 96 h 内细胞增殖变化。CTD 与 PD98059, Wortmannin 共处理组,细胞提前用 PD98059 或 Wortmannin 预处理 30 min,然后加入 CTD 共处理,再用 IncuCyte™ ZOOM 分析 HepG2 细胞增殖变化。

2.2 克隆形成 取对数生长期的肝癌细胞 HepG2,以 75 个/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 培养箱内培养 12 h,加入不同浓度 CTD

处理,同 2.1 项。10 d 后待细胞长成克隆,用 0.5% 结晶紫染液对克隆进行染色,然后对形成的克隆进行计数。

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 将处于对数生长期的肝癌细胞 HepG2,以 6×10^4 个/mL 接种于 6 孔板中,细胞长至 50% 后,弃 6 孔板中液体。CTD 组加入不同浓度 CTD ($0, 2.5, 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。在 37°C 5% CO_2 培养箱中培养 72 h 后收集细胞。用不含 EDTA 0.25% 的胰酶消化后, $400 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清液。具体操作参照 BD Annexin V: FITC 细胞凋亡检测试剂盒操作说明,分别加入 RNA 酶,PI,FITC 孵育 15 min 后,流式分析仪分析细胞凋亡。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 技术检测 pro Caspase, PARP, p-ERK1/2, p-Akt 蛋白表达 NCTD 是 CTD 的一类衍生物, NCTD 能够促进细胞凋亡^[7], 本实验增加 NCTD 作为阳性对照。pro Caspase, PARP 蛋白检测, NCTD ($20, 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), CTD ($2.5, 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 HepG2 细胞 72 h, 加入蛋白裂解液 4°C 裂解 10 min, 收集裂解液, 离心 $15\ 000 \times g, 10 \text{ min}$ 取上清。蛋白变性 10 min, BCA 法进行蛋白定量。配制 12% 的聚丙烯酰胺凝胶后上样,电泳,转膜 (PVDF), 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 直接加入一抗 ($1:1\ 000$) 4°C 过夜。次日洗膜,二抗孵育 1 h, ECL 显色、显影,用 Image J 软件进行灰度值分析。

p-ERK1/2, p-Akt 蛋白检测,待 HepG2 细胞处于对数生长期时,消化重悬细胞,以 4×10^4 个/mL 接种于 6 孔板。待 6 孔板细胞长到 50% ~ 60% 后,去掉培养基,加入 1640 基础培养基饥饿处理 24 h 后加药,CTD 浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。其中药物用 1640 基础培养基配制,30 h 后收集蛋白,余操作同上。

2.5 统计学方法 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,组间比较采用单因素方差分析法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CTD 对 HepG2 细胞增殖的影响 IncuCyte™ ZOOM 结果显示,与空白组比较,CTD 在 $1.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, HepG2 增殖率降低 ($P < 0.05$), 在 $2.5, 5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 HepG2 增殖率下降 ($P < 0.01$)。见图 1。

3.2 CTD 对 HepG2 细胞克隆形成的影响 与空白组比较,CTD $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, HepG2 克隆形成显著

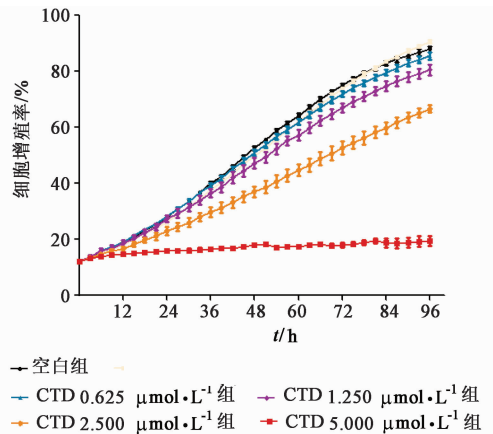


图 1 CTD 对 HepG2 细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Growth inhibitory effect of CTD on HepG2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

下降 ($P < 0.01$)。CTD $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, HepG2 克隆形成几乎完全受到抑制 ($P < 0.01$)。与 IncuCyte™ ZOOM 结果基本一致,提示 CTD 能够起到很好的抑制肝癌细胞 HepG2 生长的作用。见图 2。

3.3 CTD 对肝癌细胞 HepG2 凋亡的影响 与空白组比较, $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ CTD 对 HepG2 细胞凋亡没有明显增加,说明 CTD 在 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,主要体现对 HepG2 细胞增殖抑制作用。CTD $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, HepG2 细胞凋亡率升高显著 ($P < 0.01$)。说明高浓度 CTD 不仅能抑制 HepG2 细胞的增殖,且能在一定程度上促进 HepG2 细胞凋亡。见表 1。

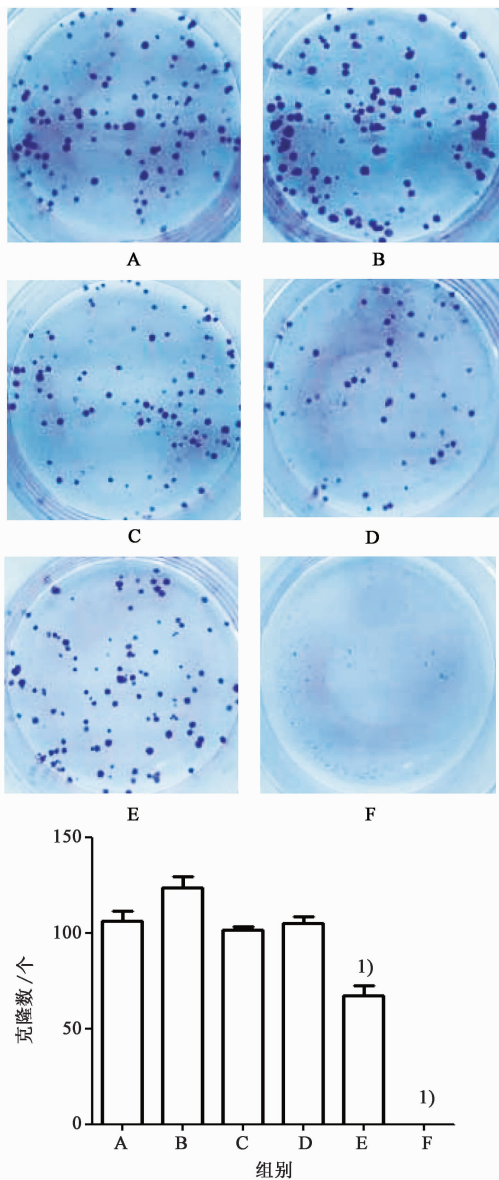
表 1 CTD 处理后 HepG2 细胞凋亡率变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Change in apoptosis rate of HepG2 after CTD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	早期凋亡	晚期凋亡
空白	-	1.5 ± 0.08	1.23 ± 0.20
CTD	2.5	5.23 ± 0.73	1.67 ± 0.34
	5	$32.7 \pm 1.69^{1)}$	$9.47 \pm 0.41^{1)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同)。

3.4 NCTD 和 CTD 对 pro Caspase-3, cleaved PARP 蛋白表达的影响 与空白组比较, NCTD ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, CTD ($2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 pro Caspase-3, cleaved PARP 蛋白表达没有明显变化。说明该浓度下 HepG2 细胞凋亡不明显,主要以抑制细胞增殖为主,与流式细胞术检测凋亡结果基本一致。NCTD ($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, CTD ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 pro Caspase-3 蛋白表达下降 ($P < 0.01$), PARP 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)。说明该浓度下 CTD 能够明显促进 HepG2 细胞的凋亡。见图 3, 表 2。

3.5 NCTD 和 CTD 对 ERK1/2, Akt 磷酸化蛋白表达的影响 与空白组比较, CTD ($5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组



A. 空白组; B ~ F. CTD (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$

图 2 CTD 对 HepG2 细胞克隆形成的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of CTD on clonogenicity of HepG2 after CTD treatment ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

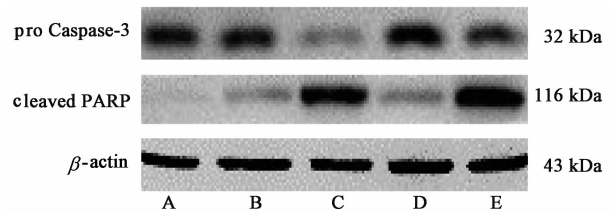
表 3 CTD 处理后, HepG2 细胞 ERK1/2, Akt 磷酸化蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of CTD on ERK, Akt phosphorylation expressions in HepG2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p-ERK1/2/ERK	p-Akt/Akt	p-ERK1/2/ β -actin	p-Akt/ β -actin
空白	-	0.09 \pm 0.01	0.02 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
CTD	5	1.14 \pm 0.04 ¹⁾	0.02 \pm 0.01	1.31 \pm 0.04 ¹⁾	0.03 \pm 0.01

3.6 PB98059, Wortmannin 与 CTD 共处理对 HepG2 细胞增殖的影响 与 CTD 单独用药比较, CTD 与 PB98059 联合使用, HepG2 细胞增殖率升高 ($P < 0.05$)。说明 CTD 引起的 HepG2 生长抑制作用可能与激活 ERK 有一定联系。CTD 与 Wortmannin 联

p-ERK1/2 表达水平升高 ($P < 0.01$)。p-Akt 表达水平则没有变化。说明 CTD 能够促进 ERK 磷酸化, 但不能够激活 Akt 磷酸化。见图 4, 表 3。



A. 空白组; B, C. NCTD (20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组; D, E. CTD (2.5, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组

图 3 NCTD 和 CTD 处理 HepG2 细胞后 pro Caspase-3, cleaved PARP 蛋白表达

Fig. 3 Pro Caspase-3, cleaved PARP expression after NCTD and CTD treatment on HepG2

表 2 NCTD 和 CTD 处理 HepG2 细胞后 pro Caspase-3, cleaved PARP 蛋白相对表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of NCTD and CTD on pro Caspase-3, cleaved PARP expression in HepG2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	pro Caspase-3/ β -actin	cleaved PARP/ β -actin
空白	-	1.46 \pm 0.11	0.61 \pm 0.01
NCTD	20	1.27 \pm 0.09	0.67 \pm 0.03
	40	0.87 \pm 0.03 ¹⁾	1.38 \pm 0.14 ¹⁾
CTD	2.5	1.18 \pm 0.08	0.66 \pm 0.03
	5	0.96 \pm 0.07 ¹⁾	1.43 \pm 0.14 ¹⁾



A. 空白组; B. CTD (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组

图 4 CTD 处理后, HepG2 细胞 ERK1/2, Akt 磷酸化蛋白表达

Fig. 4 ERK1/2, Akt phosphorylation expressions after CTD treatment on HepG2

合使用完全没能抑制 CTD 导致的 HepG2 生长抑制作用, 与空白组比较, CTD 1.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 Wortmannin 联合使用反而导致 HepG2 增殖率下降 ($P < 0.01$)。说明 CTD 对 HepG2 的抑制生长作用可能与 PI3K/Akt 通路有关, 可能通过 CTD 与 PI3K

抑制剂联合作用来加强 CTD 的抗肿瘤效果。见图 5。

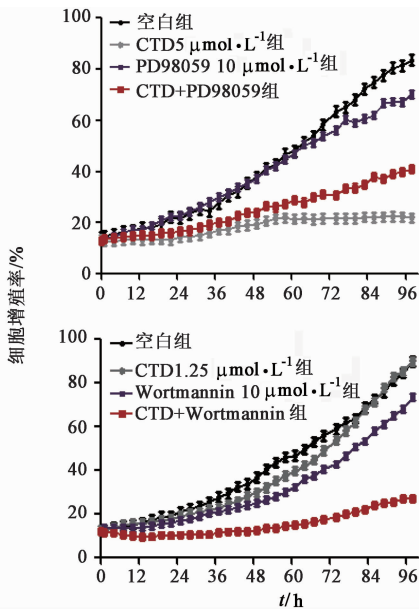


图 5 ERK1/2,PI3K 抑制剂与 CTD 共处理对 HepG2 细胞增殖的变化 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of ERK1/2, PI3K inhibitor and CTD on proliferation of HepG2 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

中国是肝癌高发地区,其发病和死亡位于世界较高水平^[8]。古代将肿瘤称为“石瘤”、“肉瘤”、“血瘤”、“积聚”等,古人在治疗这些疾病时,常常都会用到斑蝥。《神农本草经》中谓其:“主寒热、鬼疰蛊毒、鼠瘻、恶疮疽,蚀死肌,破石癥。”1970 年代就已经有临床研究,将 CTD 用来治疗原发性肝癌,能够缓解患者病情。但其剧毒以及对泌尿系统的严重刺激限制了其临床应用^[9]。西医学对 CTD 及其衍生物 NCTD 的抗肿瘤机制的研究并不透彻^[10-11]。本研究结果显示,CTD 在较低浓度下即能够明显地抑制肝癌细胞 HepG2 的生长,并且在 CTD 5 μmol·L⁻¹ 浓度下, HepG2 细胞的增殖几乎完全受到抑制。CTD 引起的 HepG2 细胞增殖抑制作用是不可逆的,即所谓的细胞生长抑制。现在大部分经典的抗肿瘤药物都是通过细胞毒作用实现^[12-13],能够杀死快速分裂的细胞,如肿瘤细胞、免疫细胞、胃肠道、毛囊等,因此会对正常分生细胞引起严重的副作用,包括骨髓抑制、胃肠道毒性、脱发等^[14]。而细胞生长抑制,作为抗肿瘤机制之一,由于减轻了药物细胞毒效应引起的严重副作用,已经受到越来越多学者的关注^[15]。因此,CTD 作为一种抑制细胞增殖的药物,可以作为细胞生长抑制的抗肿瘤药物而得到应用,

但还需要接下来对 CTD 的抗肿瘤机制进行更加深入的研究。

从上述实验结果可以看出,CTD 具有明显的促进 ERK 磷酸化的作用,加上 ERK 抑制剂之后,CTD 引起的 HepG2 生长抑制作用也得到抑制。说明 CTD 引起的 HepG2 生长抑制与促进 ERK 磷酸化有一定的关系。而加入 PI3K 抑制剂后,CTD 引起的 HepG2 生长抑制作用非但没有受到抑制, HepG2 细胞的生长反而受到更加明显的抑制。出现这种情况有两种可能性:一种是 CTD 引起的 HepG2 生长抑制与 PI3K 通路有关,与 PI3K 抑制剂共处理细胞可以起到联合共效的作用。另一种可能性是 CTD 引起的 HepG2 生长抑制与 PI3K 通路无关,但两者通过不同的途径共同作用,也能起到很好的抗肿瘤联合作用,而且 PI3K/Akt 通路作为一条主要的细胞抗凋亡通路^[16-17],当这条抗凋亡通路被抑制后, HepG2 细胞会对 CTD 变得更加敏感。其具体机制有待进一步明确,这一发现足以提示临床上可以 CTD 与 PI3K 抑制联合使用来达到进一步提高抗肿瘤疗效目的。

[参考文献]

- [1] 张良清,高海鸿. 原发性肝癌的治疗现状[J]. 中国实用医药,2011,6(12):235-237.
- [2] WANG G S. Medical uses of mylabris in ancient China and reagent studys[J]. J Ethnopharmacology, 1989, 26 (2):147-162.
- [3] 张卫东,赵惠儒,阎影,等. 斑蝥素诱导人肺癌 A549 细胞凋亡及其分子机制的研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2005,27(6):330-334.
- [4] 孙震晓,魏育林,赵天德,等. 斑蝥素及去甲斑蝥素诱导人红白血病 K562 细胞凋亡的细胞学研究[J]. 解剖学报,2000,31(1):56-60.
- [5] Hill T A, Stewart S G, Gordon C P, et al. Norcantharidin analogues: synthesis, anticancer activity and protein phosphatase 1 and 2A inhibition[J]. Chem Med Chem, 2008,3(12):1878-1892.
- [6] LI W, CHEN Z, ZONG Y. PP2A inhibitors induce apoptosis in pancreatic cancer cell line PANC-1 through persistent phosphorylation of IKKα and sustained activation of NF-κB pathway [J]. Cancer Lett, 2011,304(2):117-127.
- [7] ZHENG L C, YANG M D, KUO C L, et al. Norcantharidin-induced apoptosis of AGS human gastric cancer cells through reactive oxygen species production, and Caspase- and mitochondria-dependent signaling pathways [J]. Anticancer Res, 2016, 36 (11):

- 6031-6042.
- [8] 魏矿荣,彭侠彪. 全球肝癌流行概况[J]. 中国肿瘤, 2015,24(8):612-630.
- [9] 张鹏,林晨. 去甲斑蝥素抑制胃癌细胞 MGC-803 生长并诱导其凋亡[J]. 暨南大学学报,2013,34(4):385-390.
- [10] PENG C, LIU X, LIU E, et al. Norcantharidin induces HT-29 colon cancer cell apoptosis through the alpha beta6-extracellular signal-related kinase signaling pathway[J]. Cancer Sci,2009,100(12):2302-2308.
- [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 P hamaco,2003,140(3):461-470.
- [12] Awada A. New cytotoxic agents and molecular-targeted therapies in the treatment of metastatic breast cancer [J]. Forum: Genova,2002,12(1):4-15.
- [13] Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med,2009,360(6):563-572.
- [14] Serkova N J, Eckhardt S G. Metabolic imaging to assess treatment response to cytotoxic and cytostatic agents[J]. Front Oncol,2016,6(3):1-9.
- [15] Tol J, Koopman M, Cats A, et al. Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer[J]. N Engl J Med,2009,360(6):563-572.
- [16] Kawiak A, Lojkowska E. Ramentaceone, a naphthoquinone derived from drosera induces apoptosis by suppressing PI3K/Akt signaling in breast cancer cells [J]. PLoS One,2016,11(2):e0147718.
- [17] LU X X, CAO L Y, CHEN X, et al. PTEN inhibits cell proliferation, promotes cell apoptosis, and induces cell cycle arrest *via* down regulating the PI3K/Akt/hTERT pathway in lung adenocarcinoma A549 cells [J]. Biomed Res Int,2016,24(7):68-75.

[责任编辑 张丰丰]