

· 药理 ·

## 斑蝥素诱导 HCT116 细胞形态改变及脱黏附机制

张鑫, 赵慧, 魏洁, 郭君, 胡刚, 林雅军\*

(北京医院 国家老年医学中心 卫生部老年医学重点实验室, 北京 100730)

**[摘要]** **目的:**探讨斑蝥素(cantharidin,CTD)引起人结肠癌 HCT116 细胞形态改变及脱黏附作用的分子机制与抑制肿瘤转移的相关性,为 CTD 的临床使用提供新依据。**方法:**将 HCT116 细胞接种于 6 孔板后,每孔加入不同浓度 CTD (0,2.5,5,10,15,20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )培养 7~10 d,使用结晶紫染色液染色,对形成的克隆进行计数及统计分析,确定 CTD 对 HCT116 细胞的抑制效果;使用鬼笔环肽(phalloidin)特异性染色检测 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CTD 对 HCT116 细胞聚合态微丝骨架(F-actin)的影响,间接免疫荧光染色法观察 CTD 作用后整合素蛋白含量的改变;蛋白免疫印迹法分析 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CTD 作用前后 Rho 家族 RhoA, RhoB, RhoC, Cdc42, Rac1/2/3 蛋白表达量变化,根据实验结果确定 RhoA 为研究目标蛋白;使用质粒瞬时转染方法构建过表达 RhoA 的 HCT116 结肠癌细胞,观察 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ CTD 对过表达细胞骨架形态及黏附的影响。**结果:**CTD 可引起 HCT116 结肠癌细胞微丝骨架重构及整合素含量减少;RhoA 蛋白是 CTD 作用后含量变化最大的 Rho 酶家族成员,构建的 RhoA 过表达细胞中带绿色荧光的转染细胞比例约为 60%,与野生型细胞相比,目标蛋白含量显著增高( $P < 0.01$ ),CTD 通过降低 RhoA 含量,逆转这一过表达效应( $P < 0.01$ ),对细胞的形态及黏附均产生影响。**结论:**CTD 可通过抑制 RhoA 蛋白的表达,引起 HCT116 结肠癌细胞形态改变及与基底的黏附减弱,游离的肿瘤细胞无法锚定于继发部位,从而抑制细胞迁移。

**[关键词]** 斑蝥素;人结肠癌 HCT116 细胞;细胞骨架;黏附;RhoA

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)10-0020-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.sjfx.20191024

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190211.2001.004.html>

**[网络出版时间]** 2019-02-12 17:29

### Mechanism of Cantharidin-induced Morphological Changes and Dissociation of HCT116 Cells

ZHANG Xin, ZHAO Hui, WEI Jie, GUO Jun, HU Gang, LIN Ya-jun\*

(Key Laboratory of Geriatrics Under Ministry of Health, National Center of Gerontology, Beijing Hospital, Beijing 100730, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the molecular mechanism of cantharidin (CTD) in inducing morphological changes and dissociation in human colon cancer HCT116 cells, in order to study the correlation with tumor metastasis and provide a new basis for clinical use of cantharidin. **Method:** Different concentrations of CTD (0, 2.5, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) were added to each hole to culture for 7 to 10 days, so as to determine the inhibitory effect of CTD on HCT116 cells; and changes of F-actin cytoskeleton and integrin in HCT116 cells were detected by immunofluorescence staining. Western blot analysis of protein expressions of RhoA, RhoB, RhoC, Cdc42 and Rac1/2/3 of Rho family were performed before and after cantharidin treatment. overexpression of RhoA was constructed by plasmid transient transfection, and effect of 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  cantharidin on the morphology and adhesion of overexpressing cells was also observed. **Result:** Cantharidin induced cytoskeletal remodeling and decreased integrin content in HCT116 colon cancer cells. RhoA protein was a member of Rho enzyme family with the greatest variation after cantharidin action. The proportion of transfected RhoA cells with green fluorescence was

**[收稿日期]** 20181203(005)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81671391)

**[第一作者]** 张鑫,博士,助理研究员,从事人体衰老与肿瘤研究,E-mail:303063231@qq.com

**[通信作者]** \*林雅军,博士,副研究员,从事人体衰老与肿瘤研究,E-mail:linyajun2000@126.com

about 60%, the expression of RhoA protein in constructed RhoA overexpression cells was significantly increased, compared with wild-type HCT116 cells ( $P < 0.01$ ). However, cantharidin can act on RhoA overexpressed HCT116 cells, reverse its overexpression ( $P < 0.01$ ), and affect its morphology. **Conclusion:** Cantharidin can inhibit the expression of RhoA protein, induce the morphological changes of HCT116 cells and weaken the adhesion to the basement, thereby inhibiting cell migration.

[ **Key words** ] cantharidin; HCT116 cell; cytoskeleton; cell adhesion; RhoA

结肠癌是目前发病率较高的恶性肿瘤,在常规的手术及化疗后仍然具有高转移性,而现有的治疗方法在癌症发生侵袭转移的情况下疗效有限,因此抑制细胞转移成为预防结肠癌复发的主要策略。肿瘤细胞的转移需要细胞的定向迁移能力,细胞骨架的动态组装以及与胞外基质的黏附力改变对细胞的运动有决定性的作用,影响了肿瘤细胞的骨架结构与黏附力,就能在一定程度上影响肿瘤细胞的转移。

斑蝥是我国最早发现的具有抗肿瘤作用的药材之一<sup>[1]</sup>。斑蝥素(CTD)是斑蝥中的主要有效成分,应用过程中不仅不会引起骨髓抑制,还可激活机体免疫反应<sup>[2]</sup>,对消化道肿瘤有特异性疗效<sup>[3]</sup>。在对人肝癌 HepG2 的作用中发现,CTD 既具有抑制细胞生长作用,也具有显著的细胞毒作用<sup>[4]</sup>,也因此影响了其在临床的使用。在 CTD 对小鼠的毒性研究中发现,半数致死量(LD<sub>50</sub>)慢性毒性剂量连续 2 周给药,其毒性主要体现在小肠和膀胱,可引起膀胱移行上皮水肿并整层脱落<sup>[5]</sup>;急性毒性剂量给药 3 h 后,小鼠心脏出现炎性细胞浸润,心肌细胞与基底层的黏附减弱,心肌结构出现明显分层及极化状态改变等现象<sup>[6]</sup>;CTD 引起的急性膀胱炎则主要表现为黏膜上皮剥脱及黏膜炎细胞浸润等组织炎症性病变<sup>[7]</sup>,说明 CTD 的作用特点体现在影响细胞与基底的黏附作用上。本课题组前期研究 CTD 抑制肿瘤效果时发现,CTD 在抑制 HCT116 细胞增殖的同时,还可引起细胞微丝骨架改变及与基底的黏附减弱,游离的肿瘤细胞无法锚定于继发部位,导致细胞无法完成侵袭过程,从而抑制了肿瘤细胞的迁移<sup>[8]</sup>。

在细胞迁移活动中,Rho 酶家族是调节细胞骨架变化与运动的主要成员,其通过网络化效应影响细胞骨架的重建、细胞黏附和定向运动,以及调控基因转录等过程,在肿瘤细胞的迁移和侵袭方面发挥重要的作用<sup>[9-10]</sup>。不同的成员以不同的方式影响细胞骨架的组装及运动,其中 Cdc42 活化后可以诱导细胞产生丝状伪足,决定细胞迁移的方向<sup>[11]</sup>;Rho 激活后可诱导细胞产生应力纤维和局部黏着斑<sup>[12]</sup>,而 Rac 的激活可以导致细胞产生板状伪足,为细胞

的迁移提供锚定力<sup>[13]</sup>。CTD 对胰腺癌<sup>[14]</sup>,乳腺癌<sup>[15]</sup>,舌癌<sup>[16]</sup>等多种肿瘤的迁移运动均有抑制作用,但 CTD 是否通过作用于 Rho 酶家族成员蛋白而影响了细胞迁移目前尚不明确,因此在本研究中,本实验通过研究 CTD 对 HCT116 细胞中 Rho 酶家族蛋白表达、细胞骨架及黏附的影响,阐明 CTD 抑制细胞迁移的新机制,为其临床使用提供新的依据。

## 1 材料

**1.1 实验细胞** 本实验所使用传至第 3 代人结肠癌 HCT116 细胞,由中国科学院动物研究所周光标老师课题组提供。

**1.2 药品与试剂** CTD, FITC-Phalloidin, 0.1% Triton X-100 (美国 Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 C7632-25MG, P5282-1MG, X100-5ML); RPMI 1640 培养基(美国 Corning 公司,批号 R10-040-CM);胎牛血清(美国 PAN Biotech 公司,批号 P150104);胰蛋白酶,乙二胺四乙酸(EDTA),磷酸盐缓冲液(PBS),4%多聚甲醛,卡那霉素(北京拜尔迪生物技术有限公司,批号分别为 0458, 46-034-CI, de0220, de0094, 1758-9316);结晶紫染色液(上海索莱宝生物科技有限公司,批号 C8470);DAPI(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号 P36931);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);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0012S);整合素一抗(美国 Santa 公司,批号 sc-7312), Rho-GTPase Antibody Sampler Kit(美国 CST 公司,批号 9968);罗丹明标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,羊抗兔二抗, $\beta$ -肌动蛋白一抗( $\beta$ -actin)(北京中杉生物技术有限公司,批号分别为 ZF-0316, ZB-2301, TA-09);RhoA 过表达质粒(上海吉凯基因化学技术有限公司,批号 NM\_001664);快速质粒中提试剂盒(美国 Biomiga 公司,批号 PD1468-01), FuGENE® HD 转染试剂(美国 Promega 公司,批号 04709713001)。

**1.3 仪器** 1300SERIES A2-1384 型超净工作台, 3111 型细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司); 165-8001 型垂直电泳槽, 170-3940 型半干电转仪(美

国 Bio-Rad 公司);Tanon 5200 型化学发光系统(上海天能科技有限公司);IX81 型倒置显微镜,OLS4500 型激光共聚焦显微镜(日本 Olympus 公司)。

## 2 方法

**2.1 平板克隆形成实验** 使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液常规培养 HCT116 细胞。待细胞长至对数生长期,将每孔 500 个细胞接种在 6 孔板,过夜贴壁后,加入不同浓度 CTD (0, 2.5, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 培养。7~10 d 后空白孔细胞长成肉眼可见细胞集落,结晶紫染色液染色,并对形成的克隆进行计数及统计分析。

**2.2 免疫荧光检测** 将细胞消化传代后,取  $1 \times 10^3$  个细胞于激光共聚焦培养皿中,孵育过夜后,加入 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CTD 培养 48 h,用预冷 PBS 轻轻冲洗小皿后加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定,使用 0.1% Triton X-100 室温作用透膜 10 min。随后加入整合素抗体(1:100),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。红色罗丹明标记二抗(1:100),室温孵育 2 h,加入 4  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  FITC-phalloidin,室温孵育 30 min。最后使用 3.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  DAPI 复染细胞核,避光孵育 3 min 后激光共聚焦显微镜扫描观察细胞骨架及整合素蛋白表达变化。

**2.3 蛋白免疫印迹法检测相关蛋白表达** 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CTD 药物干预 48 h,预冷 PBS 冲洗后加入裂解液 500  $\mu\text{L}$  低温裂解,4  $^{\circ}\text{C}$ , 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,分离上清液。BCA 法测定蛋白浓度,12% 分离胶电泳后采用半干电转法 10 V 恒压转膜 20 min,5% 脱脂牛奶室温封闭 60 min。分别使用 Rho-GTPase 试剂盒中抗体(1:1 000),4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,羊抗兔二抗(1:7 500)室温孵育 60 min 后,化学发光显影。使用软件 Image J 记录目的条带灰度值并计算与之相应的  $\beta$ -actin 比值。

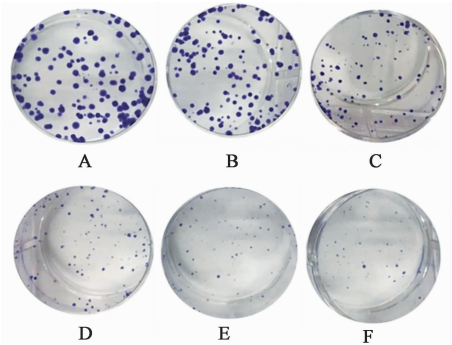
**2.4 RhoA 过表达载体构建** 先将带有过表达 RhoA 目的基因的质粒转化到感受态细菌中,在 LB 液体培养基中加入终浓度为 85.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  卡那霉素筛选含目的基因的质粒,扩大培养后提取纯化过表达质粒。取  $1 \times 10^5$  个对数生长期 HCT116 细胞接种于 6 孔板中,培养过夜后,将培养基换成既不含血清也不含抗生素的培养基中,将纯化好的质粒 DNA 4  $\mu\text{g}$  溶于无血清培养基 250  $\mu\text{L}$  中,再吸取转染试剂 12  $\mu\text{L}$  加入无血清培养基 250  $\mu\text{L}$  中,两者混合后室温放置 20 min,随后滴入细胞中孵育。4 h 后加入适量血清,继续培养,采用荧光显微镜观察带有绿色荧光蛋白的 RhoA 过表达细胞情况,使用绿色荧光细胞比例 > 60% 的过表达细胞进行后

续实验。

**2.5 统计学方法** 结果均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,数据分析使用 SPSS 22.0 软件,检验数据正态性,用 One-way ANOVA 及 LSD 检测进行组间比较,以判断组间差异,以  $P < 0.05$  判定差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 CTD 对 HCT116 肿瘤细胞增殖抑制的影响** 未加药处理的空白组细胞形成细胞集落体积大,数量多,与空白组比较,各加药组细胞集落数量减少同时体积也显著变小 ( $P < 0.01$ )。15, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CTD 组细胞团只剩针尖大小的染色,与 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CTD 细胞毒性差异无统计学意义,说明 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CTD 已经显著的抑制了细胞的分裂增殖。见图 1, 表 1。因此在以下实验中,选择 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CTD 作为后续浓度。见图 1。



A. 空白组; B~F. CTD 2.5, 5, 10, 15, 20  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组

图 1 CTD 对 HCT116 细胞克隆形成的影响(结晶紫)

Fig. 1 Effect of CTD on clonogenic survival of HCT116 cells (Crystal violet)

表 1 CTD 对 HCT116 细胞克隆形成的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of CTD on clonogenic survival of HCT116 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

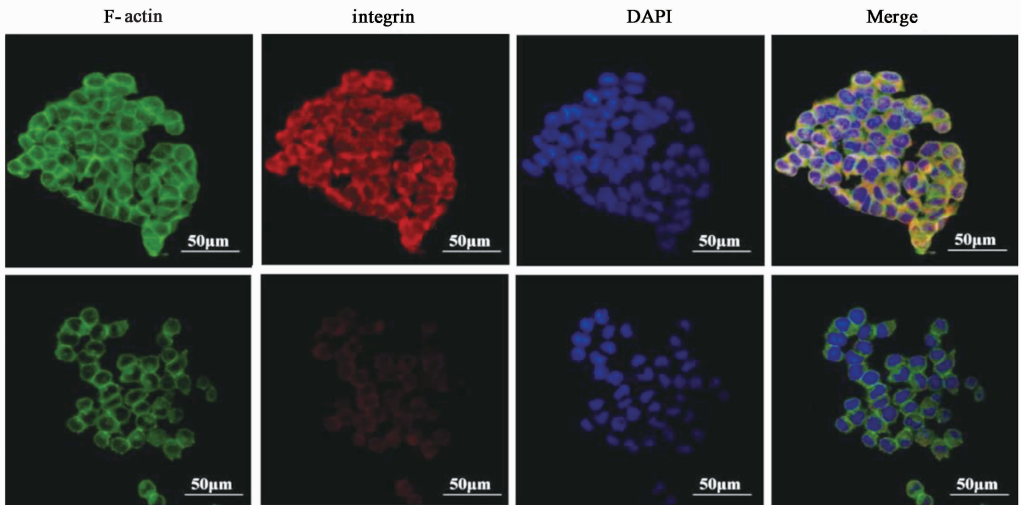
组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	克隆数/个
空白	-	136.33 $\pm$ 10.60
CTD	2.5	109.67 $\pm$ 1.53 <sup>1)</sup>
	5	81.00 $\pm$ 5.57 <sup>1)</sup>
	10	26.67 $\pm$ 3.06 <sup>1)</sup>
	15	20.00 $\pm$ 2.00 <sup>1)</sup>
	20	14.67 $\pm$ 1.53 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.2 CTD 对 HCT116 细胞中细胞骨架、整合素蛋白表达影响** 细胞骨架是真核细胞胞质中的纤维状网架,具有维持细胞形态及运动的功能,鬼笔环肽(phalloidin)可特异的与聚合态微丝(F-actin)结合,使用 FITC 标记鬼笔环肽即可显示微丝骨架在细胞中的分布。空白组 HCT116 细胞质内有较高浓度的

F-actin 存在;  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CTD 干预后胞质减少, F-actin 蛋白呈现环状聚集在胞膜处, 说明 CTD 引起细胞发生较显著的细胞骨架解聚-重构。整合素作为细胞表面受体的主要家族, 介导细胞与基质的黏

附。空白组细胞整合素含量较高,  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CTD 组荧光显著减弱, 仅剩胞膜周围淡淡的红色荧光, 与空白组差异显著, 意味着 CTD 通过降低整合素的表达, 使细胞与基质的黏附力减弱。见图 2。



A. 空白组; B. CTD  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组

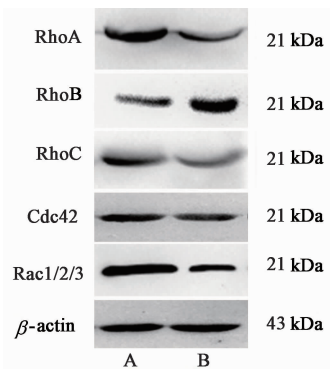
图 2 CTD 对 HCT116 细胞中微丝骨架及整合素表达的影响(免疫荧光,  $\times 600$ )

Fig. 2 Effect of CTD on expressions of F-actin and integrin in HCT116 cells (IF,  $\times 600$ )

**3.3 CTD 对 Rho 酶家族蛋白表达的影响** Rho 酶家族是细胞骨架的重要调节蛋白, Rho/ROCK 信号通路激活后可重塑细胞骨架, 调节细胞收缩、迁移、黏附和增殖等多种功能。本实验筛查了 5 种蛋白的表达变化, 寻找受 CTD 作用变化最大的 Rho 酶家族目标蛋白。以空白组蛋白相对表达为 1, CTD 组 RhoA, RhoB, RhoC, Cdc45, Rac1 蛋白相对表达为  $0.16 \pm 0.05$ ,  $1.70 \pm 0.07$ ,  $0.44 \pm 0.06$ ,  $0.81 \pm 0.10$ ,  $0.59 \pm 0.09$ 。与空白组比较, CTD 对 RhoA 蛋白表达的抑制作用显著 ( $P < 0.01$ ), 因此, 本实验通过过表达 RhoA 蛋白, 探索 CTD 作用的分子机制。见图 3。

**3.4 CTD 对细胞转染的影响** 转染 24 h 后可见大量绿色荧光, 说明重组基因已经开始高量表达; 转染 48 h 后, 绿色荧光的细胞比例约为 60%, 转染效率较高, 可以满足后续实验需求。见图 4。

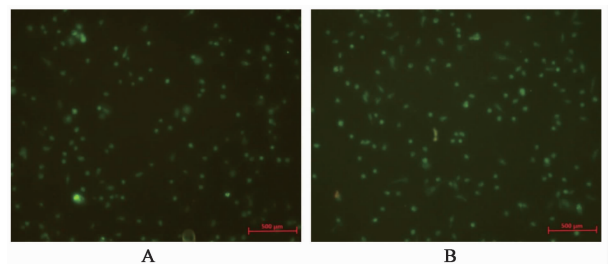
**3.5 CTD 对过表达 RhoA 蛋白的 HCT116 细胞骨架、整合素蛋白表达影响** 转染 RhoA 过表达质粒后, 细胞体积变大同时异形性细胞比例增多, F-actin 染色高亮说明排列致密, 反映出细胞运动能力的增强。  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  CTD 作用于过表达 RhoA 的 HCT116 细胞后细胞骨架回缩变圆, F-actin 结构重组, 恢复为环状聚集在胞膜处, 同时引起整合素含量明显降低, 说明活化的 RhoA 诱导肿瘤细胞发生有



A. 空白组; B. CTD  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  组

图 3 CTD 对 Rho 酶家族蛋白表达影响

Fig. 3 Effect of CTD on RHO-GTPase of HCT116 cells



A. 转染 24 h; B. 转染 48 h

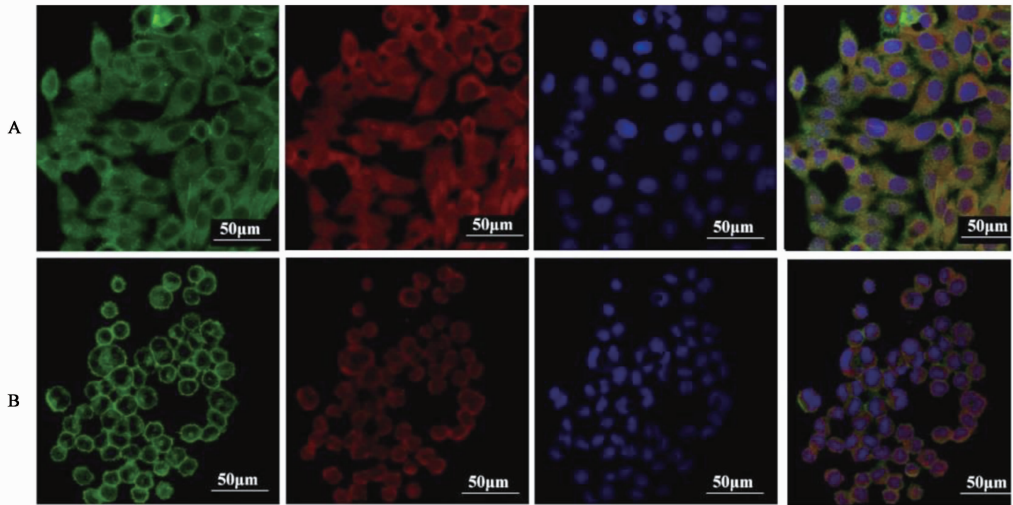
图 4 细胞转染效率(荧光显微镜,  $\times 100$ )

Fig. 4 Cell transfection efficiency (fluorescence microscope,  $\times 100$ )

利于迁移运动的形态变化, 而 CTD 有逆转这一变化的作用。见图 5。

**3.6 CTD 对 RhoA 蛋白表达的影响** CTD 显著抑制 HCT116 肿瘤细胞中 RhoA 蛋白的含量,为验证这一结果,观察 CTD 对过表达 RhoA 蛋白的作用效果。与野生型 HCT116 细胞比较,RhoA 过表达细胞中

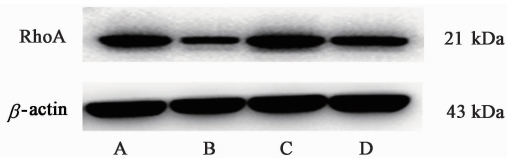
RhoA 蛋白含量显著增高 ( $P < 0.01$ );CTD 能够作用于过表达细胞,逆转这一过表达效应,甚至使过表达细胞中 RhoA 蛋白含量低于野生型 HCT116 细胞,证明了 CTD 抑制 RhoA 蛋白表达的作用。见图 6,表 2。



A. 过表达 RhoA 的 HCT116 细胞组; B. 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CTD 作用于过表达 RhoA 的 HCT116 细胞组

图 5 CTD 对过表达 RhoA 的 HCT116 细胞中微丝骨架及整合素表达的影响(免疫荧光,  $\times 600$ )

Fig. 5 Effect of CTD on expressions of F-actin and integrin in RhoA-overexpressed HCT116 cells( IF,  $\times 600$ )



A. 空白组; B. CTD 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组; C. 过表达 RhoA 的 HCT116 细胞组; D. 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  CTD + 过表达 RhoA 组

图 6 CTD 抑制 RhoA 蛋白表达电泳

Fig. 6 Effect of CTD in inhibiting RhoA protein expression

表 2 CTD 对 RhoA 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of CTD on RhoA protein expression ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	RhoA/ $\beta$ -actin
空白	-	1
CTD	10	$0.62 \pm 0.03^{1)}$
过表达 RhoA	-	$1.57 \pm 0.06^{1)}$
CTD + 过表达 RhoA	10	$0.83 \pm 0.05^{2)}$

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与过表达 RhoA 组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

#### 4 讨论

Rho 酶家族是调节细胞骨架变化与运动的主要成员,其通过网络化效应激活下游 ROCK,磷酸化 ROCK 下游底物影响细胞骨架的重建、细胞黏附和收缩运动<sup>[17]</sup>。因此本课题组设想,CTD 是否通过影响 Rho 酶家族而产生对 HCT116 细胞的调节功能。

本课题发现 RhoA 为受 CTD 作用影响最大的靶

蛋白,因此通过瞬时转染方法构建 RhoA 过表达的 HCT116 肿瘤细胞,来研究 CTD 与 RhoA 蛋白之间的关系。研究结果证实 CTD 不仅可抑制野生型 HCT116 细胞中 RhoA 蛋白的表达,还可以作用于过表达细胞,逆转这一过表达效应,甚至使过表达细胞中 RhoA 蛋白含量低于野生型 HCT116 细胞,充分证明了 CTD 抑制 RhoA 蛋白表达的作用。

恶性肿瘤细胞的转移与复发,是患者生存时间的关键所在。早期认为转移只发生在肿瘤进展的晚期,但近年来,有证据表明在肿瘤的早期形成过程中,肿瘤细胞或许已被释放到血液中,一旦在外周血中检测到肿瘤细胞,就可以预测肿瘤转移的可能性<sup>[18]</sup>。结肠癌的研究发现,外周血循环中肿瘤细胞的数量与结肠癌的预后呈负相关<sup>[19]</sup>,切断肿瘤的运动和黏附能力,抑制恶性肿瘤细胞转移和生存密切相关,是贯穿肿瘤治疗全过程的重要干预措施。肿瘤细胞的侵袭和转移涉及到细胞骨架结构改变、黏附性减弱后从原发病灶脱落,随循环系统流动并侵入到适宜组织,逐渐形成新的肿瘤病灶,细胞增殖后再次转移,成为复发转移的恶性循环<sup>[20]</sup>。以往研究普遍认为细胞的黏附能力和迁移能力呈负相关,但最近的研究发现黏附力的及时改变是肿瘤转移最微妙的环节之一,一方面瘤细胞从原发病灶脱落需要降低黏附力;另一方面侵入继发部位需增加其黏

附力,说明二者是可同时被促进或抑制的<sup>[21]</sup>。

斑蝥在我国有上千年的药用历史,其抗肿瘤疗效确切,但因其毒性较大,影响了临床使用。复方斑蝥胶囊将斑蝥与其他药物配伍,通过君臣佐使的配比起到了很好的增效减毒作用。在本课题组的前期研究中发现,CTD与培美曲塞联用具有良好的作用效果,能够通过诱发HCT116细胞凋亡及衰老来抑制细胞生长增殖,发挥抗肿瘤作用<sup>[22]</sup>。这是否揭示了CTD的使用应通过与其他化疗药的合理配伍,以较低毒副反应的剂量参与临床治疗,配合不同抗癌机制的药物组合使用,达到相辅相成的效果。

早期研究发现CTD是通过降低血管生长因子(VEGF),基质金属蛋白酶-9(MMP-9)等,从而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[23]</sup>。本篇研究中发现CTD通过影响RhoA蛋白的表达,使细胞骨架结构发生变化,最终影响了细胞与基底的黏附,使游离的肿瘤细胞无法锚定于继发部位,也就无法完成侵袭转移过程而发挥抗肿瘤效果。

#### [参考文献]

[1] 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, 2010:311-312.

[2] Maroufi Y, Ghaffarifar F, Dalimi A, et al. Interferon-gamma and interleukin-4 patterns in BALB/c mice suffering from cutaneous leishmaniasis treated with cantharidin[J]. Jundishapur J Microbiol, 2014, 7(6): 10907.

[3] CHEN R T, HUA Z, YANG J L, et al. Studies on antitumor actions of cantharidin[J]. China Med J, 1980, 93(3):183-187.

[4] 封艳艳, 马齐襄, 隋彤彤, 等. 斑蝥素对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响及其可能机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15):112-117.

[5] 范潇婷, 于睿鹏, 董瑞娟, 等. 斑蝥素及去甲斑蝥素对小鼠毒性靶器官的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15):118-123.

[6] 邵好珍, 马齐襄, 胡晓炜, 等. 斑蝥素引起小鼠急性中毒的器官损伤[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16):55-60.

[7] 孙笑, 盛鸿昊, 胡晓炜, 等. 斑蝥素引起小鼠急性膀胱炎的作用及相关机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16):49-54.

[8] 张鑫. 斑蝥素通过影响微丝骨架抑制 HCT116 结肠癌细胞增殖和迁移[D]. 北京:北京中医药大学, 2018.

[9] Aznar S, Lacal J C. Rho signals to cell growth and

apoptosis[J]. Cancer Lett, 2001, 165(1):1-10.

[10] Oxford G, Theodorescu D. Ras superfamily monomeric G proteins in carcinoma cell motility[J]. Cancer Lett, 2003, 189(2):117-128.

[11] Hoffman G R, Nassar N, Cerione R A. Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI[J]. Cell, 2000, 100(3):345-356.

[12] De Pascalis C, Etienne-Manneville S. Single and collective cell migration: the mechanics of adhesions[J]. Mol Biol Cell, 2017, 28(14):1833-1846.

[13] Huehn A, CAO W, Elam W A, et al. The actin filament twist changes abruptly at boundaries between bare and cofilin-decorated segments[J]. J Biol Chem, 2018, 293(15): 5377-5383.

[14] 宗洋, 李伟, 陈政, 等. 斑蝥素抑制胰腺癌细胞株生长、侵袭及其机制[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(2):177-179.

[15] 张琼妍. 斑蝥素抑制乳腺癌细胞与血小板粘附的机制研究[D]. 苏州:苏州大学, 2013.

[16] 郑乔丹, 李伟, 殷红. 斑蝥素抑制舌癌细胞生长及转移能力[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2014, 35(5):650-656.

[17] Amano M, Nakayama M, Kaibuchi K. Rho-Kinase/ROCK; a key regulator of the cytoskeleton and cell polarity[J]. Cytoskeleton, 2010, 67(9):545-554.

[18] Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients[J]. Cancer Cell, 2013, 23(5):573-581.

[19] Lieto E, Galizia G, Orditura M, et al. CD26-positive/CD326-negative circulating cancer cells as prognostic markers for colorectal cancer recurrence [J]. Oncol Lett, 2015, 9(2):542-550.

[20] Thompson E W, Newgreen D F, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? [J]. Cancer Res, 2005, 65(14):5991-5995.

[21] Fujihara K, Takahashi K, Koyama K, et al. Triterpenoid saponins from *Polaskia chichipe* Backbg. and their inhibitory or promotional effects on the melanogenesis of B16 melanoma cells[J]. J Nat Med, 2017, 71(4):606-616.

[22] 隋彤彤, 田丽春, 张鑫, 等. 斑蝥素与培美曲塞对结肠癌 HCT116 细胞的联合作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(16):43-48.

[23] CHEN X, QIU J, YANG D, et al. Cantharidin promotes invasion and metastasis in invasive ductal breast carcinoma by inducing matrix metalloproteinase-9 [J]. PLoS One, 2013, 8(11):e78794.

[责任编辑 张丰丰]