

· 基础研究 ·

硒酸酯多糖对人食管鳞癌 Eca109 细胞增殖及凋亡的影响

岳黎敏¹, 杨以会¹, 赵克胜²

(1. 河北工程大学医学院, 河北邯郸 056029; 2. 河北省邯郸矿业集团总医院麻醉科 056003)

摘要:目的 研究硒酸酯多糖(KSC)对人食管鳞癌 Eca109 细胞增殖及凋亡的影响,并初步探讨其作用机制。方法 甲基噻唑基四唑(MTT)法检测不同浓度 KSC 对 Eca109 细胞增殖的影响;流式细胞术观察 KSC 对 Eca109 细胞凋亡的影响;Western blot 技术检测 KSC 对 Eca109 细胞核转录因子- κ B(NF- κ B)蛋白表达水平的影响。结果 KSC 可明显抑制 Eca109 的增殖($P < 0.05$),并呈时间及浓度依赖性;经 KSC 作用后,Eca109 细胞的凋亡率随 KSC 作用时间的延长(24、48、72 h)及 KSC 浓度的增加(30、60、120 μ g/mL)而明显升高($P < 0.01$);KSC(60、120 μ g/mL)显著下调 Eca109 细胞核中 NF- κ B 蛋白水平($P < 0.01$)。结论 KSC 对 Eca109 细胞具有抑制增殖、诱导凋亡作用,其作用机制可能与抑制 NF- κ B 信号通路有关。

关键词:食管肿瘤;细胞凋亡;NF- κ B;硒酸酯多糖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.16.019

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)16-1612-02

Effect of kappa-selenocarrageenan on proliferation and apoptosis in human

esophageal squamous carcinoma Eca109 cell line

Yue Liming¹, Yang Yihui¹, Zhao Kesheng²

(1. Medical College of Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056029, China;

2. General Hospital of Handan Coal Mineral Group, Handan, Hebei 056003, China.)

Abstract: Objective To study the effect of kappa-selenocarrageenan(KSC) on the proliferation and apoptosis of esophageal squamous carcinoma cell line Eca109 and its mechanism. **Methods** After treatment with KSC at different concentrations, the inhibitory effect on proliferation of Eca109 cells was measured by MTT and the apoptotic rates were analyzed with flow cytometry. Abundance of NF- κ B protein of Eca109 cells was detected by Western-blot. **Results** KSC could inhibit the growth of Eca109 cells in both dose and time dependent manners($P < 0.05$). The apoptotic rate of Eca109 cells was significantly increased by KSC in a time-dependent(24, 48 and 72 h) and concentration-dependent(30, 60, 120 μ g/mL) manners($P < 0.01$). Abundance of NF- κ B protein was down regulated in KSC(60, 120 μ g/mL) treated Eca109 cells($P < 0.01$). **Conclusion** KSC can inhibit the proliferation and induce apoptosis of Eca109 cells, which is correlated with down-regulation of the abundance of NF- κ B protein.

Key words: esophageal neoplasms; apoptosis; NF-kappa B; kappa-selenocarrageenan

硒酸酯多糖(kappa-selenocarrageenan, KSC)是一种新型的有机硒化合物,是微量元素硒与天然产物 κ -卡拉胶半合成的一种含硒的生物活性多糖,又称硒化卡拉胶。研究表明 KSC 对人肝癌、乳腺癌、骨肉瘤等多种肿瘤细胞具有抑制增殖及诱导凋亡的作用^[1-3],然而其对食管癌细胞株的增殖及凋亡的影响尚未见报道。本研究旨在探讨 KSC 对食管鳞癌 Eca109 细胞株增殖、凋亡的影响及其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药物与试剂 人食管鳞癌 Eca109 细胞株由本室保存。主要试剂包括硒酸酯多糖(上海天赐福生物工程有限公司,含硒量 1.68%)、RPMI1640 培养基(Gibco BRL)、碘化丙啶(propidium iodide, PI)(Sigma)、甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(Sigma)、细胞核与细胞质蛋白提取试剂盒(Pierce 公司)、兔抗人核因子(nuclear factor, NF)- κ B、 β -actin 单克隆抗体和羊抗兔第二抗体(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

1.1.2 细胞培养 人食管鳞癌 Eca109 细胞株在含 10% 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100 U/mL 青霉素和 100 U/mL 链霉素的 RPMI1640 培养液中,于 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂ 条件下培养。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测 KSC 对 Eca109 增殖的影响 取对数生

长期 Eca109 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液配成单细胞悬液(细胞密度为 1×10^5 / mL),加样每孔 100 μ L 于 96 孔培养板中。实验组加入等体积不同浓度 KSC(终浓度分别为 30、60、120 μ g/mL),阴性对照组加入等体积溶剂。各设 4 个复孔。置 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5% CO₂ 培养箱中培养 24、48、72 h 后,各孔加入 MTT(5 g/L) 20 μ L 孵育 4 h,弃上清液,每孔加入二甲苯亚砷 150 μ L,振荡 10 min,待结晶溶解后,用酶标仪于 570 nm 波长处测定光密度(optical density, OD)值。并按下式公式计算细胞生长抑制率(inhibition ratio, IR)。IR(%) = (1 - 实验组平均 OD 值 / 对照组平均 OD 值) \times 100%。

1.2.2 流式细胞术测定细胞凋亡率 收集阴性对照组和经 30、60、120 μ g/mL KSC 作用 24、48、72 h 后的 Eca109 细胞,磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline, PBS)洗涤 2 次。加入 70% 冷乙醇固定 12 h,离心去乙醇,37 $^{\circ}$ C RNA 酶处理 1 h,与 PI 室温反应 10 min,流式细胞术测定凋亡率。每个浓度重复 3 次。

1.2.3 Western blot 测定 NF- κ B 蛋白的表达 KSC 处理 48 h 后,收集对照组和实验组细胞,以 0.01 mol/L PBS 洗 2 次,悬浮在 0.4 mL 裂解液中,冰浴 10 min,14 800 g 离心 30 s,弃上清液,收集细胞核沉淀,悬浮在 100 μ L 冰冷核蛋白提取液中,冰浴 20 min,并不断震荡,14 800 g 离心 30 s,收集上清液,即为细胞核蛋白,用 Lowery 法进行定量。加等量蛋白于上样缓

冲液,煮沸,在十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,电转到硝酸纤维膜上。5%脱脂奶粉封闭 2 h 后,加兔抗人 NF-κB 单抗和 β-actin 一抗孵育,4 °C 过夜。加辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记的二抗,37 °C 孵育 1 h,3,3'-二氨基联苯胺显色。对免疫印迹条带进行分析扫描,结果以测定蛋白条带与 β-actin 的积分吸光度(integrated optical density,IOD)比值表示 NF-κB 蛋白的相对表达水平。每个浓度均重复 3 次。

1.3 统计学处理 应用统计软件 SPSS13.0 进行统计学分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KSC 对 Eca109 增殖的抑制作用 KSC 处理组 Eca109 细胞的增殖均受到不同程度的抑制,并呈明显时间和浓度依赖性(图 1),IR 最高达 87.3%,与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

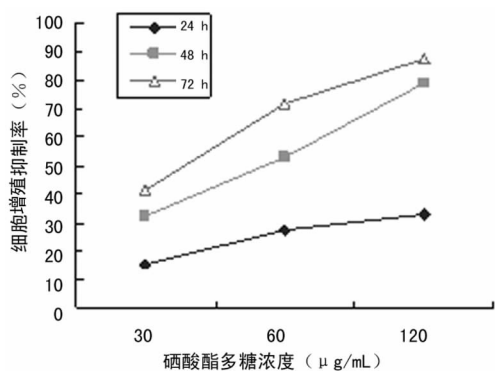


图 1 肿瘤细胞生长抑制率与硒酸酯多糖不同作用浓度及时间的关系(n=4)

2.2 KSC 对 Eca109 细胞凋亡的影响 KSC 处理组在作用 24、48、72 h 后,Eca109 细胞的凋亡率随药物作用时间的延长和药物浓度的增加而明显升高($P < 0.01$),见图 2。

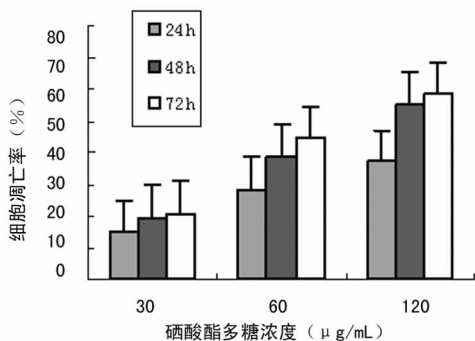
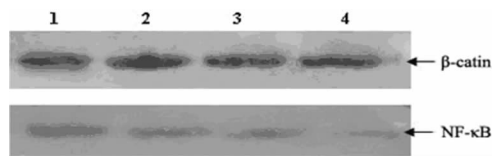


图 2 硒酸酯多糖对 Eca109 细胞凋亡的影响(n=3)



1:对照组;2~4:依次为 30、60、120 μg/mL KSC 作用 48 h 组。

图 3 硒酸酯多糖对细胞 NF-κB 蛋白表达的 Western blot 检测结果

2.3 KSC 对 Eca109 细胞 NF-κB 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示,经不同浓度(30、60、120 μg/mL) KSC 处理 48 h

后,Eca109 细胞 NF-κB 蛋白表达水平的校正值(NF-κB/β-actin)分别为 0.734 ± 0.190 、 0.323 ± 0.060 和 0.196 ± 0.070 。随 KSC 浓度增加,NF-κB 蛋白表达水平逐渐降低。60、120 μg/mL 处理组显著低于对照组(0.873 ± 0.040)($P < 0.01$),见图 3。

3 讨论

硒是人体一种必需微量元素,流行病学及临床资料显示微量元素硒与食管鳞癌的发生呈负相关性。高浓度的亚硒酸钠、硒蛋氨酸对食管癌细胞均具有抑制生长、诱导凋亡的作用^[4-5]。国内外相关研究显示,不同硒化合物对各类肿瘤细胞的影响不同^[6]。KSC 是一种新型的有机硒化合物,与无机硒相比,KSC 具有生物活性高、毒性小、生物利用度高等特点。已有研究显示,KSC 对肝癌、乳腺癌、卵巢癌及骨肉瘤等多种癌细胞具有抑制生长、诱导凋亡的作用^[7]。本研究显示药理剂量的 KSC 可显著抑制 Eca109 细胞增殖,且随药物浓度增加及作用时间延长,其抑制作用增强;药理剂量的 KSC 作用下,Eca109 细胞凋亡率显著增加,并也呈明显时间和浓度依赖性。

转录因子 NF-κB 最常见的形式是 P50/P65 异源二聚体。NF-κB 常与其抑制物 IκBs 蛋白结合,以非活性状态存在于细胞质中。多种活化因子可通过磷酸化 IκBs,释放 NF-κB,激活的 NF-κB 转位进入细胞核,从而调节其靶基因的转录。NF-κB 信号通路参与了感染、细胞凋亡和肿瘤等病理过程。NF-κB 可诱导许多抗凋亡基因,包括凋亡抑制因子、Bcl-2、肿瘤坏死因子受体结合因子 1 和 2 等^[8]。研究发现,多种肿瘤细胞内均存在着异常激活的 NF-κB,并且可能是肿瘤细胞抗凋亡的主要途径之一^[9-10]。已有研究发现,亚硒酸钠可通过抑制 NF-κB 信号通路影响前列腺癌细胞的生长及凋亡^[11],在食管鳞癌组织中存在 NF-κB 表达的显著升高^[12-13]。为探讨 KSC 的作用机制,本实验检测了 KSC 对 NF-κB 表达的影响,结果显示高浓度的 KSC 可显著减少进入细胞核内 NF-κB 蛋白含量,提示 KSC 对 Eca109 细胞的作用机制可能与抑制 NF-κB 信号通路有关。

NF-κB 信号通路作为肿瘤防治的新靶点日益受到关注,采用天然或人工合成的 NF-κB 抑制物,抑制该信号通路对多种肿瘤的临床防治具有重要意义^[14-15]。KSC 作为 NF-κB 信号通路的抑制物,在临床食管鳞癌防治中具有广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 凌娜,邓丹,季宇彬. 硒酸酯多糖诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的实验研究[J]. 亚太传统医药,2009,5(9):14-16.
- [2] 吴兴,陈峥嵘,陈中伟. 硒酸酯多糖诱导人骨肉瘤细胞凋亡作用的体外实验[J]. 肿瘤防治杂志,2004,11(9):927-930.
- [3] 何更生,程棕,陆瑞芳,等. 硒酸酯多糖对人乳腺癌细胞株(BcaP-37)生物学作用的研究[J]. 中华预防医学杂志,1997,31(2):105-105.
- [4] 肖慧娟,黄承钰,王华余,等. 硒、锌对人食管癌细胞株 Eca109 生长增殖的影响[J]. 南方医科大学学报,2008,28(12):2117-2120.
- [5] 陈滋华,吴清明,谢国建,等. 硒蛋氨酸对食管癌细胞株增生的影响[J]. 世界华人消化杂志,2004,12(5):1215-1217.
- [6] 王文娟,杨建一. 硒的抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. 微量元素与健康,2009,27(5):63-64.
- [7] 凌娜,邓丹,季宇彬. MTT 法检测多种肿瘤细胞对硒酸酯多糖敏感性的研究[J]. 亚太传统医药,(下转第 1616 页)

胞的增殖,然而 MTT 法显示 PMX 对 A549 细胞具有明显的抑制作用,本组推断虽然 PMX 处理后细胞 SKP2 表达升高,但是 SKP2 的升高引起的细胞增殖不足以抵抗 PMX 对肺腺癌细胞的抑制作用,所以总体表现为抑制。SKP2 表达的增加是 PMX 直接作用的结果还是对细胞周期调节后的表现,其具体机制还不清楚,需要作进一步研究。再者,SKP2 是癌基因,SKP2 蛋白表达上调是否与 PMX 治疗的疗效及预后有关目前尚不知晓,这必须引起重视并进行更深入的研究。

SKP2 也是一个重要的预后评价指标,SKP2 在卵巢癌、软组织肉瘤、口腔鳞癌、胃癌和直肠癌中的表达与预后相关都见诸报道。人们发现 SKP2 高表达患者预后差,SKP2 的表达就像 N 分期一样是总生存率的一个独立预测指标。Osoegawa 等^[11]通过多因素分析显示 SKP2 是 NSCLC 的一个独立预后因子,SKP2 高表达的 NSCLC 患者预后不良。SKP2 是否是 PMX 治疗肺腺癌的一个预后指标也有待进一步的研究。

总之,本实验再次肯定了 PMX 对肺腺癌细胞的抑制作用以及 S 期阻滞;本研究发现 PMX 处理后肺腺癌细胞 A549 细胞中 SKP2 蛋白表达升高,其具体机制目前尚不清楚,但 SKP2 是癌基因,其表达上调可能影响 PMX 的化疗疗效及预后。同时,进一步探讨 PMX 与特异性下调 SKP2 表达的药物联用后疗效是否会增加将为今后临床更好地使用 PMX 以及提高肺腺癌患者的化疗疗效提供重要的理论基础。

参考文献:

- [1] Ishii T, Matsuse T, Masuda M, et al. The effects of S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2) on cell cycle status, viability, and chemoresistance in A549 lung adenocarcinoma cells[J]. *Exp Lung Res*, 2004, 30(8): 687-703.
- [2] Ishii T, Fujishiro M, Masuda M, et al. Effects of p27Kip1 on cell cycle status and viability in A549 lung adenocarcinoma cells[J]. *Eur Respir J*, 2004, 23(5): 665-670.
- [3] Takanami I. The prognostic value of overexpression of Skp2 mRNA in non-small cell lung cancer [J]. *Oncol Rep*, 2005, 13(4): 727-731.
- [4] Wu W, Yao DF, Qiu LW, et al. Characteristics of hepatic nuclear-transcription factor-kappa B expression and quantitative analysis in rat hepatocarcinogenesis[J]. *Hepato-biliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(5): 504-509.
- [5] Gasparian AV, Yao YJ, Lü J, et al. Selenium compounds inhibit I kappa B kinase (IKK) and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in prostate cancer cells [J]. *Mol Cancer T-*

- [4] Wu MF, Hsiao YM, Huang CF, et al. Genetic determinants of pemetrexed responsiveness and nonresponsiveness in non-small cell lung cancer cell [J]. *J Thora Oncol*, 2010, 5(8): 1143-1151.
- [5] Bar-On O, Shapira M, Hershko DD. Differential effects of doxorubicin treatment on cell cycle arrest and skp2 expression in breast cancer cells [J]. *Anticancer Drugs*, 2007, 18(10): 1113-1121.
- [6] Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, et al. Small interfering RNA targeting of S phase kinase-interacting protein 2 inhibits cell growth of oral cancer cells by inhibiting p27 degradation [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(3): 471-476.
- [7] Lee SH, McCormick F. Downregulation of Skp2 and p27/Kip1 synergistically induces apoptosis in T98G glioblastoma cells [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2005, 83(4): 296-307.
- [8] Yokoi S, Yasui K, Iizasa T, et al. TERC identified as a probable target within the 3q26 amplicon that is detected frequently in non-small cell lung cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(13): 4705-4713.
- [9] Jiang F, Caraway NP, Li R, et al. RNA silencing of S-phase kinase-interacting protein 2 inhibits proliferation and centrosome amplification in lung cancer cells [J]. *Oncogene*, 2005, 24(21): 3409-3418.
- [10] Wouters A, Pauwels B, Lardon F, et al. In vitro study on the schedule-dependency of the interaction between pemetrexed, gemcitabine and irradiation in non-small cell lung cancer and head and neck cancer cells [J]. *BMC Cancer*, 2010, 10: 441.
- [11] Osoegawa A, Yoshino I, Tanaka S, et al. Regulation of p27 by S-phase kinase-associated protein 2 is associated with aggressiveness in non-small-cell lung cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2004, 22(20): 4165-4173.

(收稿日期: 2011-11-08 修回日期: 2011-12-22)

(上接第 1613 页)

2009, 5(10): 16-17.

- [8] Dolcet X, Llobet D, Pallares J, et al. NF- κ B in development and progression of human cancer [J]. *Virchows Arch*, 2005, 446(5): 475-482.
- [9] Kim H, Lim JW, Seo JY, et al. Oxidant-sensitive transcription factor and cyclooxygenase-2 by Helicobacter pylori stimulation in human gastric cancer cells [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2002, 21(2): 121-129.
- [10] Wu W, Yao DF, Qiu LW, et al. Characteristics of hepatic nuclear-transcription factor-kappa B expression and quantitative analysis in rat hepatocarcinogenesis [J]. *Hepato-biliary Pancreat Dis Int*, 2009, 8(5): 504-509.
- [11] Gasparian AV, Yao YJ, Lü J, et al. Selenium compounds inhibit I kappa B kinase (IKK) and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) in prostate cancer cells [J]. *Mol Cancer T-*

her, 2002, 1(12): 1079-1087.

- [12] 田芳, 徐培荣, 侯卫红, 等. NF- κ B 信号通路在食管鳞癌细胞系的激活 [J]. *肿瘤防治研究*, 2006, 33(1): 11-14.
- [13] Kang MR, Kim MS, Kim SS, et al. NF-kappaB signalling proteins p50/p105, p52/p100, RelA, and IKKepsilon are over-expressed in oesophageal squamous cell carcinomas [J]. *Pathology*, 2009, 41(7): 622-625.
- [14] Alwahaibi NY, Budin SB, Mohamed J, et al. Nuclear factor-kappa B as a promising target for selenium chemoprevention in rat hepatocarcinogenesis [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(4): 786-791.
- [15] Sarkar FH, Li Y. NF-kappaB: a potential target for cancer chemoprevention and therapy [J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 2950-2959.

(收稿日期: 2011-10-11 修回日期: 2011-12-26)