

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.05.006

单宁酸通过内质网应激途径增强顺铂抗肝癌细胞 HepG2 的作用*

耿娜娜^{1,2}, 吴明松^{1,2,3}, 郑翔³, 杨蕾³, 王宏阳³, 李学英^{3△}

(1. 遵义医学院口腔学院, 贵州遵义 563000; 2. 贵州省高等学校口腔疾病研究特色重点实验室/遵义医学院医学与生物医学研究中心, 贵州遵义 563000; 3. 遵义医学院医学遗传学教研室, 贵州遵义 563000)

[摘要] 目的 探讨单宁酸(TA)与顺铂(CDDP)协同抗肝癌细胞 HepG2 的作用及其内质网应激(ERS)通路的激活情况。

方法 将人肝癌细胞 HepG2 分为对照组、TA 组、CDDP 组、TA+CDDP 组(联合组),并在体外培养 24 h。MTT 法测定药物对人肝癌细胞 HepG2 的生长抑制作用;药物联合作用指数、药物剂量降低指数和等效图解法分析两药物之间药力学的协同作用;4'6-二脒基-2-苯基咪唑(DAPI)染色观察细胞核变化;实时荧光定量 PCR(q-RT-PCR)和免疫印迹检测 ERS 标志分子葡萄糖调节蛋白(GRP)78、GRP94 的水平。结果 TA 和 CDDP 对 HepG2 细胞生长均呈剂量依赖性抑制作用,其半数有效浓度(IC₅₀)分别为 360.00 μmol/L 和 1.80 μg/mL;用 180.00 μmol/L TA 和 0.90 μg/mL CDDP 联合处理肝癌 HepG2 细胞后,能够加强对细胞生长的抑制作用;TA 和 CDDP 具有协同抑制肝癌细胞生长的作用。与 TA、CDDP 组比较,联合组细胞皱缩、变圆加剧且凋亡细胞增多,细胞核固缩、边缘不规则、致密浓染及核裂解碎片增多;细胞 GRP78、GRP94 的表达均上升。结论 TA 能够增强 CDDP 的抗肝癌 HepG2 细胞作用,该协同作用的机制可能与激活 ERS 通路有关。

[关键词] 单宁酸;顺铂;药物协同作用;肝肿瘤;细胞凋亡;内质网应激

[中图分类号] R979.1+9

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)05-0594-04

Tannic acid enhances cisplatin effect against hepatocellular carcinoma HepG2 by endoplasmic reticulum stress pathway*

GENG Nana^{1,2}, WU Mingsong^{1,2,3}, ZHENG Xiang³, YANG Lei³, WANG Hongyang³, LI Xueying^{3△}

(1. School of Stomatology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 2. Special Key

Laboratory of Oral Diseases Research, Higher Education Institutions of Guizhou Province/Research Center of Medicine and Biology, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China; 3. Teaching and Researching Section of Medical Genetics, Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou 563000, China)

[Abstract] Objective To investigate the synergistic effects of tannic acid(TA) and cis-dichlorodiamine platinum(CDDP) on hepatocellular carcinoma HepG2 cells and its activation situation of endoplasmic reticulum stress(ERS) pathway. Methods Human hepatocellular carcinoma HepG2 cells were divided into the control group, TA group, CDDP group and TA+CDDP group, and were cultured in vitro for 24 h. The growth inhibitory effect of medication on HepG2 cells was detected by MTT assay. The pharmacodynamics synergistic effect between the two drugs was analyzed by the drug interaction index, drug dose reduction index and equivalent graphical method. The nucleus changes were observed by DAPI staining. Real time fluorescent quantitative PCR(q-RT-PCR) and Western blot were used to detect the levels of ERS markers glucose regulated protein (GRP)78 and GRP94. Results TA and CDDP had dose-dependent growth inhibition effect on HepG2 cells, their median effective concentrations(IC₅₀) were 360.00 μmol/L and 1.80 μg/mL respectively. The combination treatment of 180.00 μmol/L TA and 0.90 μg/mL CDDP on HepG2 cells could enhance the inhibitory effect on cell growth. Ta and CDDP had synergistic effect for inhibiting hepatocellular carcinoma cells growth. Compared with the TA group and CDDP group, cell shrinkage and rounding were accelerated in the combined group, apoptotic cells were increased, nuclear had pyknosis, irregular edge and dense staining, nuclear fragmentations were increased and the expressions of GRP78 and GRP94 were up-regulated. Conclusion TA can enhance the effect of CDDP on anti-hepatic carcinoma HepG2 cells, and the synergy mechanism may be related to the activation of ERS pathway.

[Key words] tannic acid; cis-dichlorodiamine platinum; drug synergism; liver neoplasms; apoptosis; endoplasmic reticulum stress

有研究显示,2015 年中国肝癌男女新发病分别为 343 700 例和 122 300 例,其中男性死亡 310 600 例,女性死亡 111 500 例,占癌症相关死因的 17.2% 和 11.1%^[1]。原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)在我国发病率较高,其中肝细胞癌(hepatic carcinoma, HCC)占 PLC 的 90% 以上^[2-3]。顺铂(cis-dichlorodiamine platinum, CDDP)是治疗 HCC 的主要药物之一,但其单药有效率比较低^[3],毒副作用也较大。研究表明,单宁

酸(tannic acid, TA)可与其他药物协同发挥抗癌作用,如与丝裂霉素 C、5-氟尿嘧啶联用抗胆管癌^[4],与三氧化二砷(As₂O₃)联用抗人类白血病^[5],与 CDDP 联用抗卵巢癌^[6]等。此外,TA 能够抑制人肝癌 HepG2 细胞的生长增殖^[7-9],但其分子机制尚不清楚。有研究表明口服 TA 较为安全,并被作为食品添加剂^[6]。因此,TA 可能作为一种低毒的化疗药物增敏药物,参与癌症的预防和治疗。

* 基金项目:贵州省科技厅资助项目[黔科合 J 字(2013)2319 号、黔科合 LH 字(2014)7548 号];贵州省教育厅特色药用资源研发创新团队[黔科合人才团队字(2013)15 号];遵义医学院博士启动基金(F-655);遵义医学院遗传学扶持学科经费(2012-2016)。作者简介:耿娜娜(1989-),助理实验师,硕士研究生,主要从事药用资源的研究。△ 通信作者, E-mail: leexueying4722@163.com。

内质网主要负责蛋白质的合成、修饰与转运、信号转导等,当这些过程受到干扰时,会导致蛋白质的折叠、翻译后修饰、基因表达等发生紊乱,从而引起内质网应激(endoplasmic reticulum stress,ERS)^[10]。ERS 介导的细胞凋亡与众多癌症的发生、发展等有关联^[11-12]。研究表明,CDDP 能够通过激活 ERS 促进肝癌 HepG2 细胞的凋亡^[13]。TA 是否能够协同增强 CDDP 抗肝癌,并通过 ERS 途径诱导肝癌细胞凋亡,尚少见报道。本研究旨在探讨 TA 协同增强 CDDP 抗肝癌 HepG2 细胞的作用,并通过体外实验探索 ERS 凋亡通路在该协同效应中的作用。

1 材料与与方法

1.1 材料 人肝癌细胞株 HepG2,来源于中国科学院细胞库。TA(C₇₆H₅₂O₄₆,含量大于或等于 95%)购自 Sigma 公司,CDDP 注射液[Cl₂(NH₃)₂Pt]购自山东齐鲁制药公司,RPMI-1640 培养基购自 Gibco 公司,胎牛血清(FBS)购自浙江天杭生物科技有限公司,噻唑蓝(MTT)购自 BBI 公司,4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)购自 Biosharp 公司,M-MLV 逆转录酶购自 Promega 公司,dNTP Mix(10 mmol/L)购自上海生工生物公司,RNAiso TM Plus 购自 TaKaRa Biotechnology 公司,PCR 引物(表 1)由上海生工生物公司合成,Sso Fast Eva Green supermix 实时荧光定量 PCR(q-RT-PCR)试剂盒购自 Bio-Rad 公司,鼠抗人葡萄糖调节蛋白(glucose regulated protein,GRP)94 单抗、兔抗人 GRP78 多抗和兔抗人 β-actin 单抗、辣根过氧化物酶标记的多抗均购自 Protein-Tech Group 公司。酶标仪 Model 680、PCR 仪 CFX Connect TM Optics Module 均购自 Bio-Rad 公司,倒置荧光显微镜 IX73 购自 Olympus 公司,微量分光光度计 Nanodrop 2000 购自 Thermo Scientific 公司,GOLD-SIM 二氧化碳培养箱购自西盟国际公司。

表 1 PCR 引物序列及扩增长度

基因	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
β-actin	正向 CGGGAAATCGTGCCTGAC	186
	反向 CAGGAAGGAAGCTGGAAG	
GRP94	正向 CTGGGACTGGGAACCTATGAATG	217
	反向 TCCATATTCGTCAAACAGACCAC	
GRP78	正向 TCAAGTTCTTGCCGTTCAAGG	148
	反向 AAATAAGCCTCAGCGGTTTCTT	

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将人肝癌细胞系 HepG2 培养于含 10% FBS、2.0 g/L NaHCO₃、100 μg/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素的 RPMI-1640 培养基中,于 37 °C、5%CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养,每 2~3 天传代 1 次。

1.2.2 细胞的生长抑制作用 采用 MTT 法检测并计算细胞的存活率^[14]。取对数生长期 HepG2 细胞接种于 96 孔培养板中,每孔 1×10⁴ 个。静置培养 24 h 后,分别加 TA 0(对照组)、90.00、180.00、270.00、360.00、450.00、540.00 μmol/L 和 CDDP 0(对照组)、0.60、1.20、1.80、2.40、3.00、3.60 μg/mL,每组设 5 个复孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 10.00 μL 浓度为 5.00 mg/mL 的 MTT 溶液;再培养 4 h 后,弃上清液,每孔中加入 100.00 μL 二甲亚砜,轻轻振荡 10 min。用酶标仪测定 570 nm 波长下各样品的吸光度(A)值,各复孔的 A 取平均值,计算细胞的存活率,其中空白对照组细胞存活率记为 100%。用等效线图解法观察 TA 和 CDDP 的协同作用,其中等效线图

中的斜线为两种药物联合产生 100%最大抑制效应时的相加等效线,当二者的剂量比例点位于等效线上时,表现为相加作用;位于等效线下方,表现为协同作用;位于等效线上方,表现为拮抗作用。药物的协同作用还可通过药物联合作用指数(combination index,CI)和药物剂量降低指数(dose reduction index,DRI)来判断^[15]。以(D)1 和(D)2 表示两种药物联用达到某一特定生长抑制率时的使用浓度;(DX)1 和(DX)2 表示达到与联合用药相同的生长抑制率时,两种药物单独使用的浓度。CI<1 表明药物具有协同作用;CI=1 表明药物具有相加作用;CI>1 表明药物具有拮抗作用。DRI 表示在给定的抑制率下,与药物单独使用相比较,药物联合使用达到同一抑制率时,药物剂量所降低的倍数。计算公式如下:

$$\text{细胞存活率}(\%) = (\text{实验组 } A \text{ 值} - \text{阴性对照组 } A \text{ 值}) / (\text{空白对照组 } A \text{ 值} - \text{阴性对照组 } A \text{ 值}) \quad (1)$$

$$CI = (D)1 / (DX)1 + (D)2 / (DX)2 \quad (2)$$

$$(DRI)1 = (DX)1 / (D)1 \quad (3)$$

$$(DRI)2 = (DX)2 / (D)2 \quad (4)$$

1.2.3 细胞形态与细胞核变化的观察 DAPI 是一种能够穿透细胞膜与核 DNA 结合的荧光染料,可用于检测细胞核的形态变化和细胞凋亡,正常的细胞核较为完整,染色质均匀;而凋亡细胞的染色质发生固缩,边缘化,严重时发生细胞核裂解,产生核碎片等。取对数期 HepG2 细胞接种于 6 孔板,每孔 3×10⁵ 个(接种约 3.00 mL)。药物处理 24 h 后,经丙酮固定,DAPI 染色后,于显微镜下观察细胞和细胞核的形态,并照相。

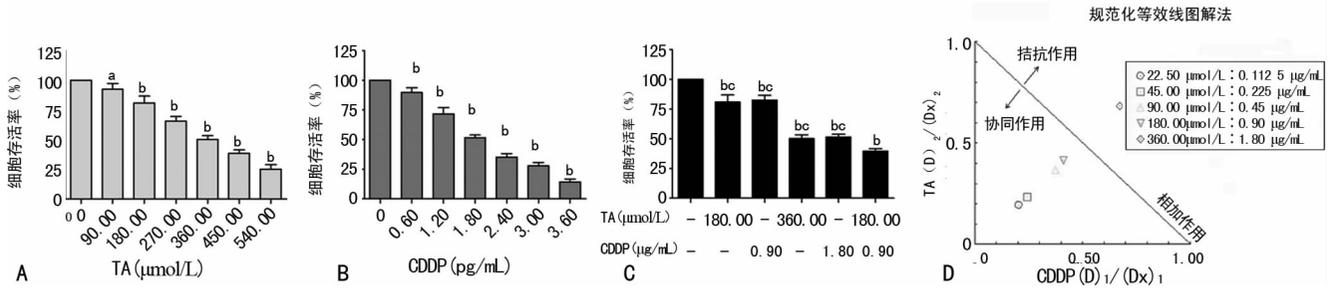
1.2.4 q-RT-PCR 检测 药物处理 24 h 后,收集细胞,提取细胞总 RNA,根据试剂盒方法,逆转录合成 cDNA。q-RT-PCR 反应体系体积为 10.00 μL,包括 cDNA 1.00 μL、Sso Fast Eva Green supermix 5.00 μL,上游引物 0.50 μL,下游引物 0.50 μL,无菌水 3.00 μL。PCR 反应程序:94 °C 预变性 60 s;95 °C 变性 20 s,56 °C (GRP78 和 β-actin)或 63.5 °C (GRP94)退火 30 s,40 个循环周期。每个样品设置 3 管重复。以 β-actin 作为内参,采用 2^{-ΔΔCT} 的方法,用 3 次重复的平均值计算基因相对表达量。

1.2.5 Western blot 检测 药物处理 24 h 后,提取细胞总蛋白质,采用 BCA 法测定蛋白质的浓度,取一定体积量蛋白样品,进行变性、电泳、转膜、封闭、孵育一抗 (GRP78 1 : 2 000; GRP94 1 : 2 000; β-actin 1 : 10 000)和二抗 (1 : 2 000)、曝光与显影,晾干。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 IPP 软件分析蛋白免疫印迹条带灰度值,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TA 与 CDDP 协同抑制肝癌细胞生长 TA 和 CDDP 均能明显抑制 HepG2 细胞的存活率,且均呈剂量性依赖(P<0.01),TA 和 CDDP 的半数抑制率(IC₅₀)浓度分别为 360.00 μmol/L(TA 组,图 1A)和 1.80 μg/mL(CDDP 组,图 1B)。采用两种药物 IC₅₀ 一半浓度的方法联合处理 HepG2 细胞,TA、CDDP 组对 HepG2 的抑制率分别为 (19.10±6.00)%、(17.50±4.00)%,而 TA 360.00 μmol/L+CDDP 1.80 μg/mL (联合组)抑制率为 (60.30±2.00)%,明显高于 TA、CDDP 组(P<0.01),见图 1C。等效线图中 TA 与 CDDP 的剂量比例点绝大多数位于等效线下方(图 1D)。不同剂量的 TA 与 CDDP 联用产生的抑制率为 9.00%~70.00%(IC₉~IC₇₀)时,其 CI 分别为 0.44、0.48、0.70、0.75、1.35,大多数均小于 1;不同比例的 TA 与 CDDP 联用的 DRI 分为 1.40~4.00 和 1.60~5.30,见表 2。



A: 单纯 TA; B: 单纯 CDDP; C: 二者联用; D: 规范化等效线图解法; ^a: $P < 0.05$, ^b: $P < 0.01$, 与对照组 (0) 比较; ^c: $P < 0.01$, 与联合组比较

图 1 不同剂量 TA 与 CDDP 对肝癌 HepG2 细胞生长的抑制作用

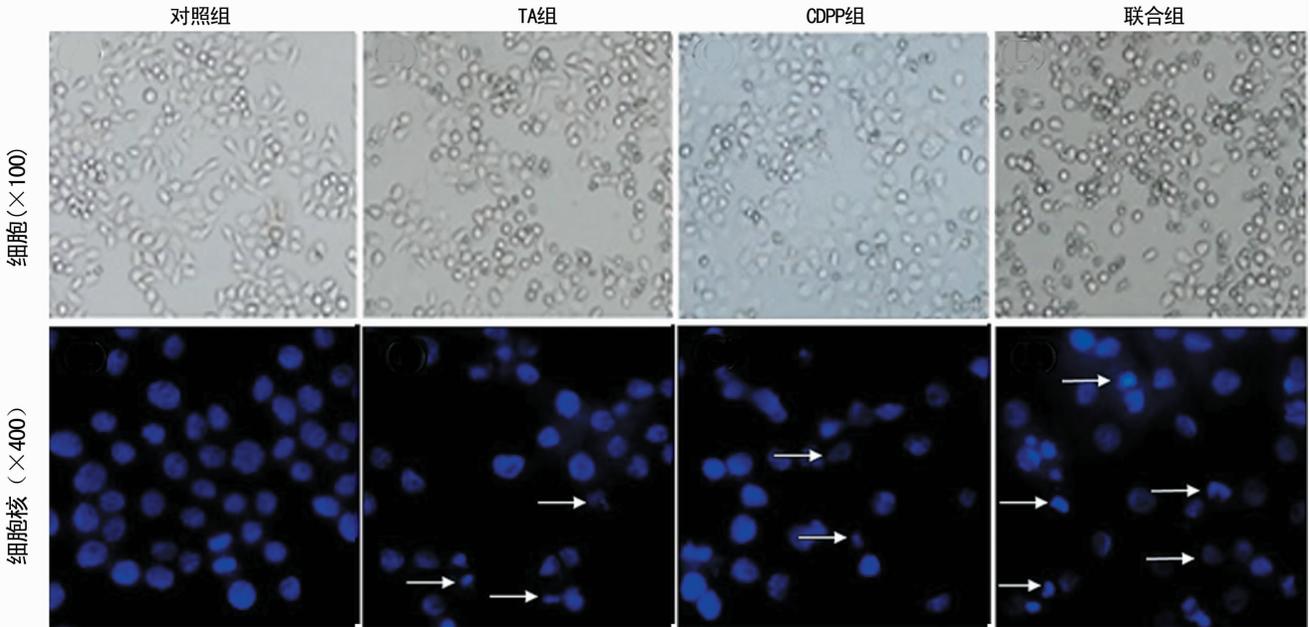


图 2 各组肝癌 HepG2 细胞的形态及细胞核变化

表 2 TA 与 CDDP 的 CI 与 DRI 情况

抑制率 (%)	CI	TA (μmol/L)			CDDP (μg/mL)		
		单用	联用	DRI	单用	联用	DRI
9.00	0.44	90.00	22.50	4.00	0.60	0.11	5.30
22.00	0.48	180.00	45.00	4.00	1.00	0.23	4.40
32.00	0.70	240.00	90.00	2.70	1.40	0.45	3.10
61.00	0.75	450.00	180.00	2.50	2.60	0.90	2.90
70.00	1.35	510.00	360.00	1.40	2.80	1.80	1.60

24 h 后, 联合组细胞 GRP78、GRP94 mRNA 及蛋白的表达量明显高于 TA、CDDP 组 ($P < 0.05$), 见表 3、图 3。

表 3 各组 GRP78、GRP94 mRNA 及蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	GRP78		GRP94	
	mRNA	蛋白	mRNA	蛋白
对照组	1.00 ± 1.00	0.80 ± 0.10	1.00 ± 1.00	0.70 ± 0.00
TA 组	9.80 ± 0.60 ^{ab}	1.20 ± 0.20 ^b	2.50 ± 0.20 ^{ab}	1.10 ± 0.10 ^{ab}
CDDP 组	3.00 ± 0.20 ^{ab}	0.70 ± 0.30 ^b	3.70 ± 0.50 ^{ac}	1.20 ± 0.10 ^{ab}
联合组	24.70 ± 4.10 ^a	2.20 ± 0.50 ^a	7.10 ± 0.70 ^a	1.50 ± 0.10 ^a

^a: $P < 0.01$, 与对照组比较; ^b: $P < 0.01$, ^c: $P < 0.05$, 与联合组比较

2.2 TA 增加 CDDP 的促肝癌细胞凋亡作用 凋亡细胞的基本形态变化主要有: 细胞体变小、变圆, 连接消失, 与周围的细胞脱离, 细胞质浓缩, 折光度降低等。药物处理 24 h 后, 对照组细胞贴壁良好, 呈梭形或多角形, 轮廓较为清晰, 折光度均一; TA、CDDP 组部分细胞开始脱壁, 细胞体积皱缩、变圆, 折光度降低; 联合组出现大量脱壁死亡细胞和细胞碎片, 折光度明显降低。药物处理 24 h 后 DAPI 染色显示, 对照组细胞核较为完整, 为椭圆形或圆形, 染色质较为均匀, 呈淡蓝色; TA 组、CP 组部分细胞核固缩, 出现大小不同的核裂解碎片 (凋亡小体); 而联合组多数细胞核固缩, 细胞染色质聚集, 部分细胞核边缘呈现不规则, 染色较深, 呈现蓝色荧光, 出现更多的凋亡小体, 表现出典型的细胞凋亡形态学变化, 见图 2。

2.3 TA 与 CDDP 协同上调肝癌细胞 ERS 水平 药物处理

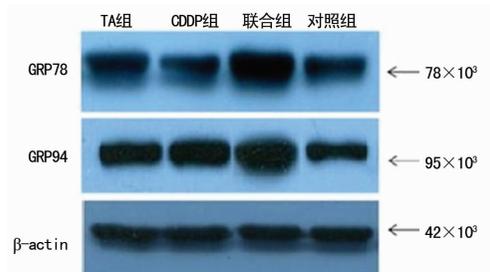


图 3 各组肝癌 HepG2 细胞 GRP78 和 GRP94 蛋白表达

3 讨论

本研究发现 TA 与 CDDP 单独用药均能够抑制 HepG2 细胞的生长增殖, 且均呈剂量性依赖; 当使用二者 IC_{50} 的一半浓

度进行联合用药后,上述效应加剧,抑制率明显高于各单药组,表明 TA 与 CDDP 具有协同抗 HepG2 的作用。等效线图解法、CI、DRI、细胞及细胞核的形态学观察结果进一步证明了二者的协同作用。已有研究表明,药物产生的毒副作用主要与用药剂量密切相关,因此通过降低药物使用剂量能够降低其毒副作用^[16],TA 与 CDDP 的协同抑制 HepG2 细胞的作用,能够降低 CDDP 的使用剂量,减少其毒副作用,并且 TA 本身毒性较低,可作为 CDDP 的增敏药物,参与癌症的预防和治疗,作者认为 TA 具有潜在的临床应用价值。

当环境因素极大地扰乱内质网动态平衡的过程时,内质网将进行应激,并激活各种 ERS 反应。一方面,内质网会启动各种调节机制以减轻这些损伤,使细胞适应环境的胁迫,以促进细胞的存活;另一方面,如果细胞无法适应环境的胁迫,长时间的 ERS 将会引起细胞凋亡的发生^[17-18]。GRP78 和 GRP94 是内质网蛋白的分子伴侣,被认为是 ERS 的标志分子。GRP78,即相对分子质量为 78×10^3 调节血糖的蛋白,也被称为 ERS 传感器结合免疫球蛋白(the immunoglobulin heavy chain binding protein, BiP)。GRP94 是另一种主要的 GRP,相对分子质量为 94×10^3 。在非 ERS 状态下,GRP78 与蛋白激酶 RNA 样内质网激酶(PERK)、肌醇酶 1α (IRE1 α)、激活转录因子 6(ATF6)形成稳定的配合物,并保持无活性状态^[19]。GRP78 通过阻止 PERK 和 IRE1 α 二聚体的形成,来抑制其活性^[19];与 ATF6 结合阻断高尔基体定位信号,使 ATF6 稳定结合在内质网膜,阻止 ATF6 的进一步激活^[20]。在 ERS 状态下,内质网中积累的错误折叠蛋白与 GRP78 蛋白竞争,使 GRP78 从 PERK、IRE1 α 和 ATF6 上解离,从而失去其抑制作用,引起下游相关信号转导^[20]。

ERS 介导的细胞凋亡与众多癌症的发生、发展等有关。癌细胞自身创造的低氧、低 pH 值和低营养等不利的微环境都有助于引起 ERS。但癌细胞能够通过多种方式去适应这种环境应激,以阻止 ERS 诱导的细胞凋亡相关信号途径^[18]。当癌细胞无法适应环境的胁迫,持续的 ERS 将会诱导癌细胞凋亡的发生,如 MESE 等^[21]研究发现 GRP78 表达上调能够使人表皮细胞癌 A431 细胞株对 CDDP 的敏感性增强。王涛等^[22]研究发现 GRP94 表达上调能够增加肺癌细胞株 NCI-H460 对 CDDP 的敏感性。本研究显示,用药 24 h 后,TA、CDDP 组与联合组 GRP78 和 GRP94 表达均有所上调,且联合组上调最高,表明 ERS 是 TA 和 CDDP 协同促进 HepG2 细胞凋亡的靶点之一。其机制可能是 TA 通过阻断蛋白质从内质网到高尔基体之间的运输,诱导 HepG2 细胞的 ERS 水平升高,高水平的 ERS 通过激活 PERK-ATF4、IRE1 α -XBP1 和 ATF6 信号通路来抑制细胞 DNA 修复酶的活性,从而协同性增加 CDDP 对癌细胞的 DNA 损伤作用^[23-25],最后激活 Caspase 蛋白家族级联反应^[26],诱导细胞凋亡的发生。然而,关于 ERS 的 PERK-ATF4、IRE1 α -XBP1 和 ATF6 信号通路激活的具体分子机制有待进一步研究。

综上所述,TA 和 CDDP 能够协同增强肝癌 HepG2 细胞的凋亡,其协同作用与 ERS 途径的激活有关,为 TA 与 CDDP 应用于临床治疗肝癌提供了理论基础。

参考文献

[1] CHEN W Q,ZHENG R S,BAADE P D,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
[2] 中国抗癌协会肝癌专业委员会,中华医学会肝病学会分会肝癌学组,中国抗癌协会病理专业委员会,等. 原发性肝

癌规范化病理诊断指南(2015 年版)[J]. 解放军医学杂志,2015,40(11):865-872.

- [3] 中华人民共和国卫生部. 原发性肝癌诊疗规范(2011 年版)[J]. 临床肝胆病杂志,2011,27(11):1141-1159.
[4] NAUS P J,HENSON R,BLEEKER G,et al. Tannic acid synergizes the cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in human cholangiocarcinoma by modulating drug efflux pathways[J]. J Hepatol,2007,46(2):222-229.
[5] CHEN K S,HSIAO Y C,KUO D Y,et al. Tannic acid-induced apoptosis and -enhanced sensitivity to Arsenic trioxide in human leukemia HL-60 cells[J]. Leuk Res,2009,33(2):297-307.
[6] SUN Y Y,ZHANG T H,WANG B D,et al. Tannic acid, an inhibitor of poly(ADP-ribose) glycohydrolase, sensitizes ovarian carcinoma cells to cisplatin [J]. Anticancer Drugs,2012,23(9):979-990.
[7] 宛春雷,金哲雄. 仙鹤草鞣质成分的抗肿瘤作用研究[J]. 黑龙江医药,2011,24(1):29-31.
[8] 陈小会,周云凯,蒋福升,等. 棕榈子提取物抗肿瘤活性研究[J]. 海峡药学,2012,24(6):265-267.
[9] 杨琳,李善俊. MTT 法检测蕲艾鞣酸体外抗肿瘤的活性[J]. 中国民康医学,2013,25(8):1-3.
[10] STUTZMANN G E,MATTSON M P. Endoplasmic reticulum Ca^{2+} handling in excitable cells in health and disease[J]. Pharmacol Rev,2011,63(3):700-727.
[11] ZHAO Y C,ZHU C L,LI X F,et al. Asterosaponin 1 induces endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis in A549 human lung cancer cells[J]. Oncol Rep,2011,26(4):919-924.
[12] SHI Y H,DING Z B,ZHOU J,et al. Targeting autophagy enhances sorafenib lethality for hepatocellular carcinoma via ER stress-related apoptosis[J]. Autophagy,2011,7(10):1159-1172.
[13] PARK I J,KIM M J,PARK O J,et al. Cryptotanshinone induces ER stress-mediated apoptosis in HepG2 and MCF7 cells[J]. Apoptosis,2012,17(3):248-257.
[14] THAVAMANI B S,MATHEW M,DHANABAL S P. In vitro cytotoxic activity of menispermaceae plants against HeLa cell line[J]. Anc Sci Life,2013,33(2):81-84.
[15] LI C J,CHU C Y,HUANG L H,et al. Synergistic anticancer activity of triptolide combined with cisplatin enhances apoptosis in gastric cancer in vitro and in vivo[J]. Cancer Lett,2012,319(2):203-213.
[16] 李大魁,张石革,张继春. 药学综合知识与技能[M]. 北京:中国医药科技出版社,2011:301-309.
[17] MEIR O,DVASH E,WERMAN A,et al. C/EBP-beta Regulates Endoplasmic Reticulum Stress-Triggered Cell Death in Mouse and Human Models [J]. PLoS One,2010,5(3):e9516.
[18] MARTIONON F. Targeting endoplasmic reticulum signaling pathways in cancer[J]. Acta Oncol(Madr),2012,51(7):822-830.
[19] HETZ C. The unfolded protein response:controlling cell fate decisions under ER stress and beyond[J]. Nat Rev Mol Cell Biol,2012,13(2):89-102. (下转第 600 页)

过程中的抑制作用。

综上所述,应用 MIF 抗体后能明显抑制 ACF 数量及大肠癌瘤体体积,并抑制 MIF 在血清及组织中的表达,这可能是 MIF 抗体能阻断大肠癌癌变的作用机制,在今后的研究中,需要在分子水平等方面进一步深入研究 MIF 抗体的作用机制,MIF 可能会成为大肠癌早诊早治的新靶点。

参考文献

- [1] WARGOVICH M J, JIMENEZ A, MCKEE K, et al. Efficacy of potential chemopreventive agents on rat colon aberrant crypt formation and progression[J]. *Carcinogenesis*, 2000, (21): 1149-1155.
 - [2] SEIKE K, KODA K, ODA K, et al. Assessment of rectal aberrant crypt foci by standard chromoscopy and its predictive value for colonic advanced neoplasms[J]. *Am J Gastroenterol*, 2006, 101(6): 1362-1369.
 - [3] JUNG H, SEONG H A, HA H. Critical role of cysteine residue 81 of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in MIF-induced inhibition of P53 activity[J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(29): 20383-20396.
 - [4] XU X D, WANG B, YE C S, et al. Overexpression of macrophage migration inhibitory factor induces angiogenesis in human breast cancer[J]. *Cancer Lett*, 2008, 261(2): 147-157.
 - [5] 贾旭东, 王伟, 崔文明, 等. 饮茶对大鼠大肠变性隐窝病灶及大肠肿瘤的影响[J]. *卫生研究*, 2000, 29(1): 54-56.
 - [6] BIRD RP. Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogen: preliminary findings[J]. *Cancer Lett*, 1987, 37(2): 147-151.
 - [7] INAMINE M, SUZUI M, MORIOKA T, et al. Inhibitory effect of dietary monoglucosylceramide 1-O-beta-glucosyl-N-2'-hydroxyarachidoyl-4,8-sphingadienine on two different categories of colon preneoplastic lesions induced by 1, 2-dimethylhydrazine in F344 rats[J]. *Cancer Sci*, 2005, 96(12): 876-881.
 - [8] CADERNI G, PEWELLI M G, CECCHINI F, et al. Enhanced growth of colorectal aberrant crypt foci in fasted/refed rats involves changes in TGF21 and P21CIP expressions[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(2): 323-327.
 - [9] LUO L, SHEN G Q, STIFFLER K A, et al. Loss of heterozygosity in human aberrant crypt foci (ACF), a putative precursor of colon cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(6): 1153-1159.
 - [10] BLOOM B R, BENNETT B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity[J]. *Science*, 1966, 153(3731): 80-82.
 - [11] SUN B, NISHIHARA J, SUZUKI M, et al. Induction of macrophage migration inhibitory factor by lysophosphatidic acid: relevance to tumor growth and angiogenesis[J]. *Int J Moll Med*, 2003, 12(4): 633-641.
 - [12] BARON N, DEUSTER O, NOELKER C, et al. Role of macrophage migration inhibitory factor in primary glioblastoma multiforme cells[J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(5): 711-717.
 - [13] SHUN C T, LIN J T, HUANG S P, et al. Expression of macrophage migration inhibitory factor is associated with enhanced angiogenesis and advanced stage in gastric carcinomas[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(24): 3767-3771.
 - [14] 何兴祥, 李晓宇, 郝元涛, 等. 巨噬细胞移动抑制因子与大肠癌肝转移的关系[J]. *中华普通外科杂志*, 2007, 22(11): 855-858.
 - [15] 杨荣娇, 王丽京, 臧林泉, 等. 靶向巨噬细胞移动抑制因子的 Sirna 对小鼠大肠癌肝转移的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(9): 1495-1497.
 - [16] (收稿日期: 2017-07-05 修回日期: 2017-09-11)
-
- (上接第 597 页)
- [20] SHEN J, CHEN X I, HENDERSHOT L, et al. ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals[J]. *Dev Cell*, 2002, 3(1): 99-111.
 - [21] MESE H, SASAKI A, NAKAYAMA S, et al. Analysis of cellular sensitization with cisplatin-induced apoptosis by glucose-starved stress in cisplatin-sensitive and -resistant A431 cell line[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(2A): 1029-1033.
 - [22] 王涛, 王琪, 裴复阳. GRP94 表达在大细胞肺癌 NCI-H460 细胞对顺铂耐药中的作用[J]. *大连医科大学学报*, 2011, 33(6): 517-520.
 - [23] NAGELLERKE A, BUSSINK J, VAN DER KOGEL A J, et al. The PERK/ATF4/LAMP3-arm of the unfolded protein response affects radioresistance by interfering with the DNA damage response[J]. *Radiother Oncol*, 2013, 108(3): 415-421.
 - [24] STROME E D, WU X W, KIMMEL M, et al. Heterozygous screen in *Saccharomyces cerevisiae* identifies dosage-sensitive genes that affect chromosome stability[J]. *Genetics*, 2008, 178(3): 1193-1207.
 - [25] DUFÉY E, URRÁ H, HETZ C. ER proteostasis addiction in cancer biology: Novel concepts[J]. *Semin Cancer Biol*, 2015, 15(33): 40-47.
 - [26] 黄亨平, 吴明松. 内质网应激--肿瘤治疗的新靶点[J]. *现代医药卫生*, 2014, 30(17): 2600-2603.
 - [27] (收稿日期: 2017-07-03 修回日期: 2017-09-08)