

褪黑素联合顺铂对人食管癌 Eca109 细胞的抑制作用及其机制

刘玲玲^{1,2}, 张梦晓², 张 配², 赵素容², 刘 浩²

[摘要] **目的:** 观察褪黑素 (Mel) 联合顺铂 (DDP) 对人食管癌 Eca109 细胞生长的抑制作用, 并探讨相关的分子机制。 **方法:** 通过 MTT 实验检测 Mel 与 DDP 不同浓度分别单用或两药联合处理后食管癌 Eca109 细胞增殖情况; 流式细胞仪检测用药后细胞凋亡情况; Western blot 法检测 Bax, Bcl-2 蛋白的表达。 **结果:** Mel 与 DDP 联用对食管癌 Eca109 细胞增殖的抑制率均高于单用 Mel 与 DDP 时对食管癌 Eca109 细胞的抑制率 ($P < 0.05$); Mel 单独诱导食管癌 Eca109 细胞凋亡作用不强, 但可增强 DDP 诱导的食管癌细胞凋亡 ($P < 0.01$); Mel 与 DDP 联用后食管癌 Eca109 细胞 Bcl-2 蛋白表达减弱, Bax 蛋白表达增强。 **结论:** Mel 可增强 DDP 对人食管癌 Eca109 细胞增殖的抑制作用, 并具有增强 DDP 诱导人食管癌 Eca109 细胞凋亡的作用, 其机制可能与上调 Bax 表达和下调 Bcl-2 的表达有关。

[关键词] 食管肿瘤; 褪黑素; 顺铂; Eca109 细胞

[中图分类号] R 735.1

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2016.03.001

Effect of Melatonin combined with cisplatin on proliferation and apoptosis of human esophageal carcinoma 109 cells

LIU Ling-ling^{1,2}, ZHANG Meng-xiao², ZHANG Pei², ZHAO Su-rong², LIU Hao²

(1. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004;

2. Faculty of Pharmacy, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of melatonin combined with cisplatin on the proliferation and apoptosis of Eca109 cell and study the molecular mechanism. **Methods:** Eca109 cells were con-cultured with different concentrations of melatonin with or without cisplatin for 24 h. The inhibitory rate of Eca109 cells were examined using MTT assay, and the cell apoptosis was analyzed using flow cytometry with propidium iodide staining. Western blot for apoptosis-related protein Bcl-2 and Bax were used to analyze possible mechanisms of the synergistic anti-proliferation effect of melatonin in combination with cisplatin. **Results:** Different concentrations of melatonin combined with cisplatin showed an obviously enhanced inhibitory effect on colony formation of Eca109 cells. When melatonin combined with cisplatin, the cell apoptosis rate increased to 29%, significantly higher than that in cells with cisplatin treatment alone (9.7%) ($P < 0.01$). The expression of Bcl-2 was high but Bax was low in Eca109 cells, after stimulating with melatonin and cisplatin, the expression of Bcl-2 decreased but expression of Bax increased. **Conclusions:** Melatonin can enhance the anti-proliferative effect of cisplatin on Eca109 cell and can enhance cisplatin-induced apoptosis. The possible mechanism may related to the downregulation of Bcl-2 and upregulation of Bax protein expression.

[Key words] esophageal neoplasms; melatonin; cisplatin; esophageal carcinoma 109 cells

全球每年新发食管癌 40 万例, 其中大约有 30 万例来自中国^[1], 可以看出我国的食管癌发病率居世界之首。目前, 对食管癌的研究已经取得一定的成果, 多种化学治疗药物已在临床广泛使用。顺铂 (DDP) 是这些化疗药物中应用最广范、作用最强的药物之一^[2], 但 DDP 对消化系统、骨髓、肾脏以及内

耳的毒性损伤及癌细胞对 DDP 的耐药性等问题严重影响着对食管癌的治疗效果。褪黑素 (Mel) 化学名 N-乙酰基-5-甲氧基色胺, 是松果体产生的一种天然的吲哚类激素, 应用于临床肿瘤治疗多年, 并且被证明是安全和可以耐受的药物^[3-5]; 其除了具有镇静催眠和调节睡眠觉醒周期的作用外^[6], 还与肿瘤的发生发展及治疗有着密切的关系^[7]。已有研究^[8-11]报道 Mel 能有效抑制多种肿瘤的增殖, 与抗肿瘤药物联用具有增强疗效和减轻毒性的作用。Mel 抗肿瘤的作用机制和路径复杂, 至今尚未完全清楚。本研究对 Mel 增强顺铂抗食管癌活性进行分析, 观察 Mel 与 DDP 联用对食管癌 Eca109 细胞株增殖和凋亡的影响, 探讨 Mel 增效作用的靶点。现作报道。

[收稿日期] 2015-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81372899); 安徽省自然科学基金项目 (1508085MH166); 蚌埠医学院校自然科学基金项目 (Byky1384)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院第二附属医院 药剂科, 安徽 蚌埠 233040;
2. 蚌埠医学院 药理学系, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 刘玲玲 (1985 -), 女, 硕士, 主管药师, 讲师。

[通信作者] 刘 浩, 教授, 硕士生导师。E-mail: liuhao_6886@foxmail.com

1 材料与方法

1.1 材料 人食管癌细胞株 Eca109, Mel、二甲基亚砜(DMSO)、SDS-PAGE 电泳试剂(sigma 公司), DDP(齐鲁制药有限公司), DMEM 培养基(Gibco 公司), 胎牛血清(Hyclone 公司), MTT 试剂(Amresco 公司), 倒置相差显微镜(Olympus 公司), 鼠抗人 β -actin(Santa Cruz 公司), Bcl-2/Bax 兔抗人多克隆抗体(Lab Vision 公司), WBKLS0500 底物显色试剂、聚偏二氯乙烯膜(Millipore 公司), Western 一抗稀释液、BCA 蛋白定量试剂盒、蛋白预染 MAKER(碧云天公司)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测人食管癌 Eca109 细胞增殖 取处于对数生长期的 Eca109 细胞, 调整细胞密度每毫升 1×10^5 个, 然后每孔 0.1 mL 铺于 96 孔培养板中, 每组设 5 个平行孔。24 h 后弃培养液, 再依次加入梯度浓度的 Mel 和 DDP 2.5 mg/L 联合梯度浓度的 Mel。继续孵育 20 h 后, 加入 20 μ L MTT, 再继续培养 4 h。后吸弃上清液, 每孔各加入 150 μ L DMSO, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育, 30 min 后取出, 放入酶标仪中设置振荡 10 min, 490 nm 波长测定吸光度值。

1.2.2 流式细胞术检测人食管癌 Eca109 凋亡 调节处于对数生长期的 Eca109 细胞浓度为每毫升 2×10^5 个, 6 孔板每孔铺 1 mL。移入温箱 24 h 后吸弃培养液, 设空白对照孔、Mel 1×10^{-5} mol/L 孔、DDP 2.5 mg/L 孔、DDP 2.5 mg/L + Mel 1×10^{-5} mol/L 孔, 继续培养 24 h 后, 分别收集各组细胞, 1 500 r/min 离心 8 min 后弃上清液, 加入 75% 乙醇 1 mL 固定, 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜保存。次日以 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后加 600 μ L 碘化丙啶行 DNA 染色, 避光放置 3~4 h 后上样流式细胞仪测定细胞凋亡率。

1.2.3 蛋白免疫印迹检测 取对数生长期的 Eca109 细胞, 接种于 6 孔培养板, 无血清培养基同步化 24 h 后, 设空白对照孔、Mel 1×10^{-5} mol/L 孔、DDP 2.5 mg/L 孔、DDP 2.5 mg/L + Mel 1×10^{-5} mol/L 孔, 24 h 后收集各组的 Eca109 细胞, 冰 PBS 洗 3 次, 加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液冰上处理 20 min, 离心后吸取上清液, 常规提取细胞蛋白, BCA 法定量蛋白后进行 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 并用电转法转印聚偏二氯乙烯膜。然后用含 5% 脱脂牛奶的缓冲液封闭, 分别加兔抗人 Bcl-2/Bax 和 β -actin 单克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 静置孵育过夜; 然

后加碱性磷酸酶标记的二抗辣根过氧化物酶-羊抗兔 IgG, 37 $^{\circ}$ C 摇床上孵育 1 h, 而后利用 Bio-Rad 凝胶成像系统获取图像。

1.3 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 Mel 增强 DDP 对人食管癌 Eca109 细胞增殖的抑制作用 Mel 单独处理细胞后, 低浓度抑制作用不明显, 直至浓度提升到 1×10^{-5} mol/L 方显示出抑制作用($P < 0.05$); 采用不同浓度的 Mel 联合半数抑制浓度的 DDP 后, 随着 Mel 浓度的逐渐提高, 抑制作用明显提高($P < 0.05$) (见表 1)。

表 1 DDP 和/或 Mel 对食管癌 Eca109 细胞增殖抑制情况

分组		n	吸光度	抑制率/%	F	P	MS _{组内}
DDP/(mg/L)	Mel/(mol/L)						
0	0	5	0.934 \pm 0.049	—			
2.5	0	5	0.513 \pm 0.016	45.07			
2.5	10^{-9}	5	0.501 \pm 0.016	46.36			
2.5	10^{-8}	5	0.479 \pm 0.044	48.72			
2.5	10^{-7}	5	0.436 \pm 0.071	53.32			
2.5	10^{-6}	5	0.327 \pm 0.056 *	64.99			
2.5	10^{-5}	5	0.329 \pm 0.041 *	64.78	88.02	<0.01	0.002
0	10^{-9}	5	0.824 \pm 0.032	11.8			
0	10^{-8}	5	0.719 \pm 0.060	23.09			
0	10^{-7}	5	0.668 \pm 0.034	28.51			
0	10^{-6}	5	0.646 \pm 0.054	30.85			
0	10^{-5}	5	0.533 \pm 0.024	43.02 Δ			

q 检验: 与单用同样浓度的 Mel 组比较 * $P < 0.05$; 与其他单用 Mel 组比较 $\Delta P < 0.05$

2.2 Mel 增强 DDP 诱导食管癌 Eca109 细胞凋亡的作用 Mel 处理后诱导食管癌 Eca109 细胞凋亡率明显高于空白对照组($P < 0.01$); 2.5 mg/L DDP 处理后细胞的凋亡率显著低于 Mel 联合 DDP 处理后的细胞凋亡率($P < 0.01$) (见表 2)。

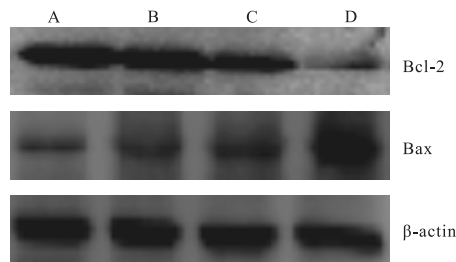
表 2 Mel 和/或 DDP 诱导食管癌 Eca109 细胞的凋亡率 (%) 比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	凋亡率	F	P	MS _{组内}
阴性对照组	3	1.6 \pm 0.1			
10^{-5} mol/L Mel 组	3	7.0 \pm 0.7 **			
2.5 mg/L DDP 组	3	9.7 \pm 0.5 **	379.34	<0.01	1.878
10^{-5} mol/L Mel 联合 2.5 mg/L DDP 组	3	29.0 \pm 2.6 ** $\Delta\Delta$			

q 检验: 与阴性对照组比较 ** $P < 0.01$; 与单用 DDP 组比较 $\Delta P < 0.01$

2.3 Mel 诱导后食管癌 Eca109 细胞 Bcl-2/Bax 蛋白表达的变化 检测结果显示, 与空白对照组比较, Mel 与 DDP 单用或联用后食管癌细胞 Eca109 的

Bcl-2 蛋白表达减弱,条带变淡,Bax 蛋白表达增强,条带加深,其中以两药联用组表现最为明显,可见 Bcl-2 蛋白表达随药物联用强度逐渐减弱,而 Bax 蛋白的表达随药物联用逐渐增强(见图 1)。



A: 对照组; B: Mel组; C: DDP组; D: Mel联合DDP组

图1 Mel联合DDP对人食管癌细胞Eca109中 Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

3 讨论

目前已知细胞凋亡存在内质网信号途径、死亡受体途径和线粒体途径 3 种^[12]。本实验是从线粒体途径来探讨 Mel 对 DDP 增效作用的可能作用靶点。Bcl-2 家族中的 Bcl-2 基因通过阻止细胞色素 C 从线粒体的释放来抑制凋亡;而 Bax 基因通过与线粒体上的膜通道结合促使细胞色素 C 的释放而促进凋亡^[13]。也就是说 Bcl-2 有抗凋亡作用,为凋亡抑制基因,Bax 有促凋亡作用,为凋亡诱导基因^[14]。Bax/Bcl-2 的比值与肿瘤细胞凋亡密切相关,决定了促凋亡因子 caspase-3 的激活程度^[15],并且 Bcl-2 的表达水平常常还与肿瘤的耐药性呈正相关^[16]。曾有研究发现食管正常上皮无 Bcl-2 表达,而癌旁上皮中 Bcl-2 与 Bax 均有少量表达,Bcl-2 基因表达则与肿瘤分化程度有关,肿瘤分化程度越低 Bcl-2 基因阳性表达率也越高^[17]。

本实验在得到 Mel 可以增强 DDP 对人食管癌 Eca109 细胞的增殖抑制和凋亡诱导作用的结果后,进一步尝试从 Bax 和 Bcl-2 的表达方面来了解这一作用背后可能存在的分子机制。

本研究将不同浓度的 Mel 和 DDP 分别单独处理人食管癌 Eca109 细胞后,随药物浓度加大,细胞内 Bcl-2 表达较空白对照组有所下降,而 Bax 表达较空白组有所增强。二药联用后,凋亡相关蛋白水平的改变也较单独用药更为明显,可能是由于 Mel 对 Bcl-2 表达的抑制作用,增加了细胞对 DDP 的敏感性,且由于联合用药后,Bax/Bcl-2 的比值明显上升,利于促凋亡因子 caspase-3 的激活,因此 Mel 对 DDP 的抗肿瘤活性起到增效的作用。

本研究证实 Mel 对 DDP 抗肿瘤活性有明显增效作用,其机制可能与下调 Bcl-2 的表达,上调 Bax

表达明有关。但是这些 Bcl-2 家族成员的上游蛋白表达情况如何,在接下来的研究中本课题组将围绕这一问题继续研究。

[参 考 文 献]

- [1] JEMAL A, SIEGEL R, XU J, *et al.* Cancer statistics, 2010 [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(5):277.
- [2] 周际昌. 实用肿瘤内科治疗 [M]. 北京:北京科学技术出版社, 2010:100.
- [3] REES S, HARDING R, WALKER D. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain [J]. Int J Dev Neurosci, 2011, 29(6):551.
- [4] KAUR C, SIVAKUMAR V, LING EA. Melatonin protects periventricular white matter from damage due to hypoxia [J]. J Pineal Res, 2010, 48(3):185.
- [5] JIMÉNEZ-RUBIO G, ORTÍZ-LÓPEZ L, BENÍTEZ-KING G. Melatonin modulates cytoskeletal organization in the rat brain hippocampus [J]. Neurosci Lett, 2012, 511(1):47.
- [6] HARDELAND R, POEGGELER B, SRINIVASAN V, *et al.* Melatonergic drugs in clinical practice [J]. Arzneimittelforschung, 2008, 58(1):1.
- [7] BOB P, FEDOR-FREYBERGH P. Melatonin, consciousness, and traumatic stress [J]. J Pineal Res, 2008, 44(4):341.
- [8] FAN LL, SUN GP, WEI W, *et al.* Melatonin and Doxorubicin synergistically induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(12):1473.
- [9] 王忠强, 郑启昌, 黄文广, 等. Mel、顺铂协同抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 的机制研究 [J]. 华中科技大学学报(医学版), 2004, 33(5):569.
- [10] BLOCK KI, KOCH AC, MEAD MN, *et al.* Impact of antioxidant supplementation on chemotherapeutic efficacy: A systematic review of the evidence from randomized controlled trials [J]. Cancer Treatment Reviews, 2007, 33(5):407.
- [11] LISSONI P. Biochemotherapy with standard chemotherapies plus the pineal hormone melatonin in the treatment of advanced solid neoplasms [J]. Pathologie Biologie, 2007, 55(3/4):201.
- [12] FERRINGTON DA, TRAN TN, LEW KL, *et al.* Different death stimuli evoke apoptosis via multiple pathways in retinal pigment epithelial cells [J]. Experimental Eye Research, 2006, 83(3):638.
- [13] 刘青松, 朱兴春, 蒋红, 等. 丹参诱导类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞 bcl-2、bax 基因表达研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2010, 19(21):2620.
- [14] LOOR G, KONDAPALLI J, IWASE H, *et al.* Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1813(7):1382.
- [15] CROKER BA, O' DONNELL JA, NOWELL CJ, *et al.* Fas-mediated neutrophil apoptosis is accelerated by Bid, Bak, and Bax and inhibited by Bcl-2 and Mcl-1 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(32):13135.
- [16] KRISHNA S, LOW IC, PERVAIZ S. Regulation of mitochondrial metabolism: yet another facet in the biology of the oncoprotein Bcl-2 [J]. Biochem J, 2011, 435(3):545.
- [17] 陈洁, 杨红梅, 裴瑞, 等. Survivin、Bcl-2 在食管鳞癌中的表达及其与细胞凋亡关系的研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(3):442.