

大黄素联合雷替曲塞抑制胰腺癌细胞增殖及对血管紧张素转换酶 2、血管紧张素 II 的影响[△]

马 晓*, 尚 昆, 林海珊, 王 婧* (首都医科大学附属北京友谊医院肿瘤科, 北京 100050)

中图分类号 R96;R979.1

文献标志码 A

文章编号 1672-2124(2022)05-0527-06

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.05.003

摘 要 目的:探讨大黄素联合雷替曲塞抑制胰腺癌 PANC-1 细胞系增殖的作用及对血管紧张素转换酶 2 (ACE2)、血管紧张素 II (Ang II) 的影响。方法:将 PANC-1 细胞分为对照组 (0.1% DMSO)、雷替曲塞组 (雷替曲塞)、大黄素组 (大黄素) 和联合用药组 (大黄素+雷替曲塞)。使用四甲基偶氮唑盐比色法 (MTT) 检测大黄素、雷替曲塞和联合用药对 PANC-1 细胞增殖能力的影响;使用酶联免疫吸附试验测定细胞上清液白细胞介素 (IL) 6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 水平;使用 Annexin-V FITC/PI 双染法检测大黄素组、雷替曲塞组以及联合用药组的细胞凋亡情况;使用蛋白质印迹法、免疫荧光法检测各组细胞 ACE2、Ang II 蛋白表达情况。结果:MTT 检测结果显示,大黄素组 (100 μ mol/L)、雷替曲塞组 (40 μ mol/L) 和联合用药组 PANC-1 细胞抑制率分别为 46.73%、42.39% 和 68.71%,与对照组相比,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。大黄素组、雷替曲塞组和联合用药组 PANC-1 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平显著低于对照组,而雷替曲塞组显著低于大黄素组,联合用药组显著低于大黄素组、雷替曲塞组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。大黄素组、雷替曲塞组及联合用药组 PANC-1 细胞凋亡率均显著高于对照组,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。蛋白质印迹法、免疫荧光法结果证实,大黄素组、雷替曲塞组和联合用药组 PANC-1 细胞 ACE2 的表达高于对照组,Ang II 的表达低于对照组,差异均有统计学意义 ($P < 0.001$);且联合用药组 ACE2 的表达最高、Ang II 的表达最低。结论:大黄素、雷替曲塞单药能够有效抑制胰腺癌 PANC-1 细胞增殖,提高 ACE2 水平、降低 Ang II 水平,具有促进肿瘤细胞凋亡的作用,而 2 种药物联合应用具有协同效应。

关键词 大黄素;雷替曲塞;胰腺癌;血管紧张素转换酶 2;血管紧张素 II

Inhibition of Emodin Combined with Raltitrexed on the Proliferation of Pancreatic Cancer Cells and Its Effect on Angiotensin Converting Enzyme 2 and Angiotensin II[△]

MA Xiao, SHANG Kun, LIN Haishan, WANG Jing (Dept. of Oncology, Beijing Friendship Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100050, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To probe into the inhibitory effect of emodin combined with raltitrexed on the proliferation of pancreatic cancer PANC-1 cell line and its effect on angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and angiotensin II (Ang II). **METHODS:** The PANC-1 cells were divided into control group (treated with 0.1% DMSO), raltitrexed group (treated with raltitrexed), emodin group (treated with emodin) and combination group (treated with emodin combined with raltitrexed). The methyl thiazolyl tetrazolium method (MTT) was used to detect the effect of emodin, raltitrexed and drug combination on the proliferative capacity of PANC-1 cells; the enzyme linked immunosorbent assay was used to measure the interleukin (IL) 6, IL-1 β and tumor necrosis factor α (TNF- α) levels in cell supernate; the Annexin-V FITC/PI double-staining method method was used to detect the cell apoptosis in the emodin group, raltitrexed group and combination group; the Western blotting and immunofluorescence methods was used to detect the expression of ACE2 and Ang II protein in each group. **RESULTS:** The MTT result showed that the inhibition rates of emodin group (100 μ mol/L), raltitrexed group (40 μ mol/L) and combination group on PANC-1 cells were respectively 46.73%, 42.39% and 68.71%, the differences were statistically significant compared with the control group ($P < 0.05$). The IL-6, IL-1 β and TNF- α levels in the supernate of PANC-1 cells were significantly lower in the emodin group, raltitrexed group and combined group than those in the control group, while those of raltitrexed group were significantly lower than the emodin group, and those of the combination group were significantly lower than the emodin group and raltitrexed group, with statistically significant differences ($P < 0.05$). The PANC-1 cell

[△] 基金项目:北京市临床重点专科项目 (2018-2020);北京市医院管理中心消化内科学科协同发展中心专项经费资助项目 (No. XXT01);首都医科大学科研培育基金项目 (No. PYZ20148)

* 硕士研究生。研究方向:恶性肿瘤基础及临床研究。E-mail:448804251@qq.com

通信作者:主任医师。研究方向:恶性肿瘤基础及临床研究。E-mail:18911188803@163.com

apoptosis rates of the emodin group, raltitrexed group and combination group were significantly higher than that of the control group, with statistically significant difference ($P < 0.01$). The Western blotting and immunofluorescence method confirmed that the expression of ACE2 in PANC-1 cells was higher and the expression of Ang II in PANC-1 cells was lower in the emodin group, raltitrexed group and combination group than those in the control group, with statistically significant differences ($P < 0.001$), the expression of ACE2 was the highest and the expression of Ang II was the lowest in the combination group. CONCLUSIONS: Single use of emodin or raltitrexed can effectively inhibit the proliferation of pancreatic cancer PANC-1 cells, increase ACE2 level and decrease Ang II level, which has the effect of promoting apoptosis of tumor cells, while the combination of two drugs has a synergistic effect.

KEYWORDS Emodin; Raltitrexed; Pancreatic cancer; Angiotensin converting enzyme 2; Angiotensin II

胰腺癌是发病率高、致死率高的消化道恶性肿瘤之一,具有起病隐匿、发展迅速和治疗效果欠佳的特点。即使目前肿瘤的靶向治疗及免疫治疗发展迅速,厄洛替尼、奥拉帕利和程序性细胞死亡蛋白-1 抑制剂相继被纳入指南,但患者的生存期并未出现显著延长,治疗尚无明显突破。胰腺癌患者腹部胀满不适常见,大黄类药物有一定疗效,既往研究结果也发现大黄素具有保护胰腺、抑制胰腺癌细胞增殖的作用^[1]。雷替曲塞为抗代谢类叶酸类似物,能够经过还原叶酸载体摄入肿瘤细胞,进而被叶酰聚谷氨酸合成酶转化成聚谷氨酸盐,并贮存于肿瘤细胞中,从而发挥更强的抑制胸苷酸合成酶作用,并能够延长抑制时间,有效提高抗瘤活性^[2]。对于老年患者或者心脏风险大的患者,接受雷替曲塞治疗的安全性良好,因此,雷替曲塞在临床中应用广泛。本研究拟通过大黄素与雷替曲塞联合应用,观察其对胰腺癌细胞增殖能力的影响及对血管紧张素转换酶 2 (ACE2)、血管紧张素 II (Ang II) 的作用效果,为临床用药提供更多理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

PANC-1 胰腺癌细胞系购自江苏凯基生物技术股份有限公司,于含 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养传代。

1.2 仪器

ELx800 型酶标仪(美国 BioTek 公司);NovoCyte 1040 型流式细胞仪[艾森生物(杭州)有限公司];UV-2450 紫外光度仪(日本 Shimadzu 公司)。

1.3 药品与试剂

青霉素/链霉素溶液(批号:KGY002)、0.25% 胰蛋白酶-EDTA 细胞消化液(Trypsin-EDTA)(批号:KGY001)、磷酸盐缓冲液(PBS)(批号:KGB500)、Bradford 蛋白含量检测试剂盒(批号:KGA801)和全蛋白抽提试剂盒(批号:KGP250)均购自江苏凯基生物技术股份有限公司;胎牛血清(FBS)(美国 ExCell Biology 公司,批号:FSS500);DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号:12800-082);(上海 ExCell 公司);1640 培养基(美国 Hyclone 公司);大黄素(美国 Sigma 公司);雷替曲塞(南京正大天晴制药有限公司,国药准字:H20090325;规格:2 mg/支;酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(美国 Rapid Bio 公司)。

1.4 实验分组

本研究共分为 4 组,对照组[给予 0.1% 二甲基亚砜(DMSO)]、雷替曲塞组(给予雷替曲塞)、大黄素组(给予大黄素)和联合用药组(给予大黄素+雷替曲塞)。

1.5 四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞活力

将 PANC-1 细胞铺于 96 孔板内,每孔加入 50 μ L 细胞悬液(约 1×10^4 个细胞),另加入 1640 培养液 50 μ L。待细胞充分贴壁后进行实验,按照不同组别分别给予雷替曲塞、大黄素以及两药联合处理,干预 72 h 后实验终止。96 孔板每孔加入 MTT 溶液 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 孵育 4 h,吸出上清液,每孔加入 DMSO 150 μ L,震荡混匀后,使用酶标仪测量波长为 490 nm 处的吸光度(OD)值,计算细胞增殖率。细胞增殖率=用药组平均 OD 值/对照组平均 OD 值 $\times 100\%$ 。

1.6 ELISA 法测定白细胞介素(IL)6、IL-1 β 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平

分别收集对照组、雷替曲塞组、大黄素组和联合用药组细胞上清液,按照 ELISA 试剂盒的说明书进行检测。取出 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 抗体包被板,将不同浓度的标准品及实验样本加入反应孔中,并用封板胶纸封闭,37 $^{\circ}$ C 孵育 90 min;舍弃反应孔中液体,每孔加入洗涤液 350 μ L,反复洗板共 5 次;除空白孔之外,其余反应孔中加入生物素化抗体工作液 100 μ L/孔,用封板胶纸封闭,37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min 并反复洗板;除空白孔外,各反应孔中加入酶结合物工作液 100 μ L/孔,用封板胶纸封闭,37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后反复洗板;加入显色剂,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 15 min。加入终止液 100 μ L/孔,混匀后测量波长为 450 nm 处的 OD 值。

1.7 Annexin-V FITC/PI 双染法检测 PANC-1 细胞凋亡情况

(1)将 PANC-1 细胞消化后,接种至六孔板,待 PANC-1 细胞贴壁后,根据不同组别加入相应的含药培养基,同时设立阴性对照组;(2)待各组药物作用 48 h 后用 0.25% 胰酶消化,收集细胞;(3)用 PBS 洗涤 PANC-1 细胞 2 次,收集 5×10^5 细胞;(4)每孔加入 Binding Buffer 悬浮细胞 500 μ L,并加入 Annexin V-FITC 5 μ L 及 Propidium Iodide 5 μ L 混匀;(5)避光反应 10 min;用流式细胞仪进行检测细胞凋亡情况(参数:Ex = 488 nm;Em = 530 nm)。

1.8 蛋白质印迹法检测胰腺癌细胞内 ACE2、Ang II 表达水平

PANC-1 细胞按照不同干预组,加入相应药物处理后提取细胞总蛋白,并测定蛋白浓度,每个样品上样 30 g,进行蛋白电泳,电转移到 PVDF 膜,牛奶封闭后顺序加入 ACE2、Ang II、GAPDH 一抗(1:1 000)及二抗(1:5 000),到达反应时间后,使用 ECL 试剂盒检测杂交信号,并计算 ACE2、Ang II 蛋白含量。

1.9 免疫荧光法测定 ACE2、Ang II 蛋白表达情况

将不同干预组的 PANC-1 细胞进行免疫荧光细胞化学染色,观察各组 ACE2、Ang II 蛋白表达情况。具体流程:(1)PBS

反复洗涤 3 次,每次 5 min;(2)弃去 PBS,加入 4%多聚甲醛,在 37 ℃条件下固定 40 min;(3)37 ℃条件下 PBS 再次洗涤 3 次,每次 5 min;(4)使用 0.1% Triton X-100 在细胞膜打孔,室温(25 ℃)下反应 20 min;(5)加入 3% H₂O₂ 浸泡,抑制内源性过氧化物酶,室温下反应 20 min;(6)37 ℃条件下 PBS 反复洗涤 3 次,每次 5 min;(7)加入正常血清封闭液,每孔 50 μL,37 ℃,反应 30 min;(8)去除血清封闭液,直接加入相对应的 ACE2、Ang II 一抗;(9)滴加 1%BSA 按 1 : 500 稀释的浓缩型 FITC 和 Cy5 标记二抗,每孔 50 μL,37 ℃避光孵育 40 min;(10)37 ℃,PBS 反复洗涤 3 次,每次 5 min;(11)滴加 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI,稀释浓度 1 : 100),37 ℃避光孵育 5 min;(12)冲洗,室温下 PBS 洗涤 4 次,每次 2 min;用激光共聚焦显微镜观察并摄取荧光图像。

1.10 统计学方法

对检测数据进行汇总,采用 SPSS 17.0 软件进行统计处理,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,通过两独立样本 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素、雷替曲塞以及联合用药对 PANC-1 细胞增殖能力的影响

应用不同浓度大黄素(200、100、50、25、12.5、6.25、3.125、1.562 5、0.781 25、0.390 625 和 0.195 312 5 μmol/L)对 PANC-1 细胞进行刺激,MTT 方法检测结果显示,单用大黄素刺激胰腺癌细胞,随着大黄素浓度的降低,胰腺癌细胞的抑制率逐渐降低,抑制率由 54.53%逐渐降至 3.31%,提示大黄素对胰腺癌细胞增殖能力的抑制作用呈剂量依赖性,见表 1。应用不同浓度雷替曲塞(40、20、10、5、2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25、0.078 125、0.039 062 5 μg/mL),MTT 方法检测结果显示,单用雷替曲塞刺激胰腺癌细胞,其对胰腺癌细胞增殖能力的抑制作用亦呈剂量依赖性,随着雷替曲塞浓度的降低,胰腺癌细胞的抑制率由 54%逐渐降至 8.29%,见表 2。根据 *IC*₅₀,后续选择大黄素 100 μmol/L、雷替曲塞 40 μg/mL 进行实验。PANC-1 细胞加药处理 24、48 及 72 h,大黄素组的 PANC-1 细胞抑制率分别为 11.72%、21.26%及 46.73%,雷替曲塞组的

表 1 不同浓度大黄素对 PANC-1 细胞的增殖抑制作用($\bar{x}\pm s$)
Tab 1 Inhibitory effect of different concentration of emodin on the proliferation of PANC-1 cells($\bar{x}\pm s$)

组别	OD 值	抑制率/%
对照组	0.688±0.061	
大黄素组		
200 μmol/L	0.313±0.088	54.507±14.527
100 μmol/L	0.431±0.067	37.370±10.453
50 μmol/L	0.514±0.013	25.191±2.151
25 μmol/L	0.553±0.056	19.678±5.168
12.5 μmol/L	0.617±0.068	10.232±1.295
6.25 μmol/L	0.627±0.097	8.838±1.976
3.125 μmol/L	0.628±0.100	8.657±1.753
1.562 5 μmol/L	0.629±0.138	8.580±2.118
0.781 25 μmol/L	0.646±0.083	6.072±9.791
0.390 625 μmol/L	0.649±0.086	5.628±1.200
0.195 312 5 μmol/L	0.665±0.134	3.618±2.545
<i>F</i>	132.108	94.114
<i>P</i>	<0.001	<0.001

表 2 不同浓度雷替曲塞对 PANC-1 细胞的增殖抑制作用($\bar{x}\pm s$)
Tab 2 Inhibitory effect of different concentration of Raltetrexed on the proliferation of PANC-1 cells($\bar{x}\pm s$)

组别	OD 值	抑制率/%
对照组	0.673±0.075	
雷替曲塞组		
40 μg/mL	0.310±0.096	53.967±1.674
20 μg/mL	0.425±0.012	36.855±1.770
10 μg/mL	0.525±0.076	21.974±1.818
5 μg/mL	0.536±0.079	20.305±1.895
2.5 μg/mL	0.544±0.115	19.102±1.873
1.25 μg/mL	0.546±0.009	18.838±9.594
0.625 μg/mL	0.560±0.137	16.680±2.573
0.312 5 μg/mL	0.570±0.006	15.212±1.584
0.156 25 μg/mL	0.572±0.012	15.029±2.240
0.078 125 μg/mL	0.592±0.009	11.991±1.150
0.039 062 5 μg/mL	0.617±0.014	8.286±2.240
<i>F</i>	80.478	48.766
<i>P</i>	<0.001	<0.001

抑制率分别为 8.40%、19.59%及 42.39%,联合用药组的抑制率分别为 22.85%、47.75%及 68.71%,联合用药组的抑制率高于大黄素组和雷替曲塞组。

2.2 大黄素、雷替曲塞以及联合用药对 PANC-1 细胞上清液中 IL-6、IL-1β、IL-10 和 TNF-α 水平的影响

使用不同药物处理 72 h 时取细胞上清液,分别测定 IL-6 水平,结果发现,各用药组 PANC-1 细胞上清液中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平均显著低于对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.001);雷替曲塞组 PANC-1 细胞上清液中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平显著低于大黄素组,联合用药组上述指标水平显著低于大黄素组和雷替曲塞组,差异均有统计学意义(*P*<0.05),见表 3。

表 3 四组 PANC-1 细胞上清液中 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 水平比较($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

Tab 3 Comparison of IL-6, IL-1β and TNF-α levels in the supernate of PANC-1 cells among four groups($\bar{x}\pm s$,pg/mL)

组别	IL-6	IL-1β	TNF-α
对照组	10.33±0.06	19.14±0.36	39.20±0.35
大黄素组	8.60±1.46 *	14.83±0.84 **	32.96±0.77 **
雷替曲塞组	6.33±0.06 *#	7.83±0.18 *##	24.69±0.45 *##
联合用药组	2.43±0.02 *#&	3.81±0.17 *#&	10.42±0.47 *#&
<i>F</i>	1638.144	210.247	548.403
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组相比,**P*<0.001,***P*<0.05;与大黄素组相比,#*P*<0.001,##*P*<0.05;与雷替曲塞组相比,&*P*<0.001

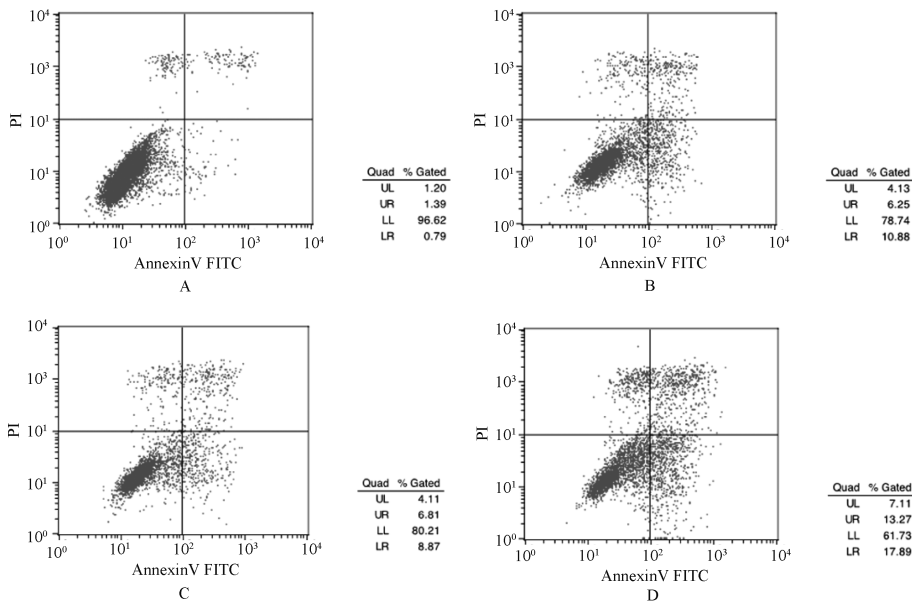
Note:rs. the control group, **P*<0.001, ***P*<0.05; rs. the emodin group, #*P*<0.001, ##*P*<0.05; rs. the raltitrexed group, &*P*<0.001

2.3 Annexin-V FITC/PI 双染法检测大黄素、雷替曲塞以及联合用药对 PANC-1 细胞凋亡的影响

用药物干预 PANC-1 细胞 72 h 后,各用药组 PANC-1 细胞凋亡率均显著高于对照组,差异均有统计学意义(*P*<0.01);联合用药组 PANC-1 细胞凋亡率显著高于大黄素组和雷替曲塞组,差异均有统计学意义(*P*<0.01),见图 1、表 4。

2.4 蛋白质印迹法检测大黄素、雷替曲塞以及联合用药对 PANC-1 细胞 ACE2、Ang II 表达的影响

用药物干预 PANC-1 细胞 72 h 后,提取细胞蛋白,测定 ACE2、Ang II 蛋白水平。结果显示,大黄素组、雷替曲塞组 ACE2 表达高于对照组,而联合用药组表达最高;大黄素组、雷



A. 对照组; B. 大黄素组; C. 雷替曲塞组; D. 联合用药组

A. control group; B. emodin group; C. raltitrexed group; D. combination group

图 1 四组 PANC-1 细胞凋亡情况

Fig 1 Apoptosis of PANC-1 cells in four groups

表 4 四组 PANC-1 细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$, %)

Tab 4 Comparison of apoptosis rate of PANC-1 cells among four groups ($\bar{x} \pm s$, %)

组别	凋亡率
对照组	2.207±0.145
大黄素组	16.723±0.256 [*]
雷替曲塞组	15.743±0.145 ^{*##}
联合用药组	31.203±0.098 ^{*##¥}
F	4 790.285
P	<0.001

注:与对照组相比, ^{*} $P<0.001$;与大黄素组相比, [#] $P<0.001$, ^{##} $P<0.05$;与雷替曲塞组比, [¥] $P<0.001$

Note: vs. the control group, ^{*} $P<0.001$; vs. the emodin group, [#] $P<0.001$, ^{##} $P<0.05$; vs. the raltitrexed group, [¥] $P<0.001$

替曲塞组 ACE II 的表达低于对照组,而联合用药组表达最低,见图 2、表 5。

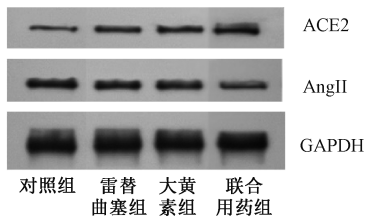


图 2 四组 PANC-1 细胞 ACE2、Ang II 蛋白表达情况

Fig 2 Expression of ACE2 and Ang II protein in PANC-1 cells of four groups

2.5 免疫荧光法检测大黄素、雷替曲塞以及联合用药对 PANC-1 细胞 ACE2、Ang II 表达的影响

从激光共聚焦显微镜的观察结果可见,ACE2 蛋白阳性表达呈绿色荧光,细胞核呈蓝色荧光;ACE2 表达部位在胰腺癌细胞的胞浆中,胰腺癌细胞的细胞核中无 ACE2 表达;大黄素

表 5 四组 PANC-1 细胞 ACE2、Ang II 蛋白水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Tab 5 Comparison of ACE2 and Ang II protein levels in PANC-1 cells among four groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	ACE2/GAPDH	Ang II/GAPDH
对照组	0.120±0.001	0.412±0.002
大黄素组	0.229±0.002 ^a	0.304±0.005 ^a
雷替曲塞组	0.202±0.001 ^{ab}	0.351±0.001 ^{ab}
联合用药组	0.351±0.002 ^{abc}	0.205±0.004 ^{abc}
F	10 909.955	1 510.047
P	<0.001	<0.001

注:与对照组相比, ^a $P<0.001$;与大黄素组相比, ^b $P<0.001$;与雷替曲塞组比, ^c $P<0.001$

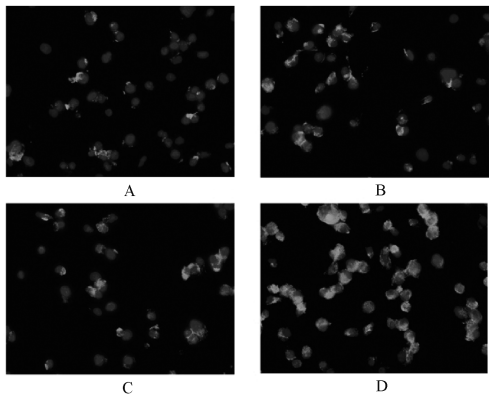
Note: vs. the control group, ^a $P<0.001$; vs. the emodin group, ^b $P<0.001$; vs. the raltitrexed group, ^c $P<0.001$

及雷替曲塞单药组 PANC-1 细胞 ACE2 表达高于对照组,联合用药组 PANC-1 细胞 ACE2 表达较对照组明显升高,见图 3。Ang II 蛋白阳性表达呈绿色荧光,细胞核呈蓝色荧光;Ang II 表达部位在胰腺癌细胞的胞浆和细胞核中;大黄素组、雷替曲塞组 PANC-1 细胞 Ang II 表达低于对照组,联合用药组 PANC-1 细胞 Ang II 表达较对照组明显降低,见图 4。

3 讨论

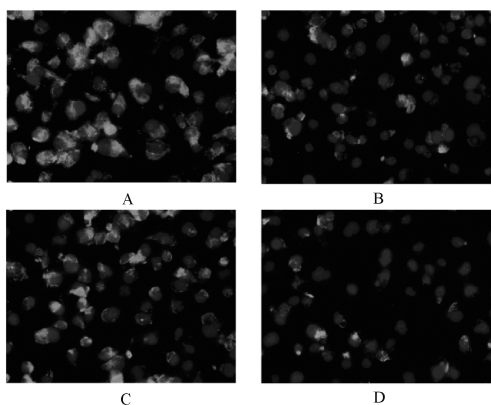
胰腺癌是恶性度较高的肿瘤,具有病程短、进展快速和死亡率高的特点。胰腺癌的治疗方案仍值得进一步探索,亟需更为有效的药物延长患者生存期,提高患者生活质量^[3]。

雷替曲塞为喹啉类尿酸盐类似物,最初由英国 Zeneca 公司与 Royal Marsden 医院合作开发,属于抗代谢类抗肿瘤药。雷替曲塞经还原叶酸载体摄入细胞被叶酰聚谷氨酸合成酶转化为聚谷氨酸盐形式贮存细胞中,发挥更强胸苷酸酶抑制作用。雷替曲塞聚谷氨酸盐通过增强 TS 抑制能力、延长抑制时间而提高其抗肿瘤活性。由于其多聚谷氨酸盐代谢物的半衰期相对较长,约为 198 h,而常用的化疗药 5-氟尿嘧啶



A. 对照组;B. 大黄素组;C. 雷替曲塞组;D. 联合用药组
A. control group; B. emodin group; C. raltitrexed group;
D. combination group

图3 四组 PANC-1 细胞 ACE2 蛋白表达情况
Fig 3 Expression of ACE2 protein in PANC-1 cells of four groups



A. 对照组;B. 大黄素组;C. 雷替曲塞组;D. 联合用药组
A. control group; B. emodin group; C. raltitrexed group;
D. combination group

图4 四组 PANC-1 细胞 Ang II 蛋白表达情况
Fig 4 Expression of Ang II protein in PANC-1 cells of four groups

(5-FU)的半衰期仅为 20 min,因此,雷替曲塞能够维持较长时间发挥抗肿瘤作用。雷替曲塞与 5-FU 的作用靶酶虽然相同,但由于两者作用部位不同,代谢途径有差异,不易产生交叉耐药性,故雷替曲塞可作为胰腺癌 5-FU 耐药后的优化选择^[4]。研究结果发现,大黄素可抑制肿瘤细胞的增殖,其机制包括抗胰腺纤维化^[5],抑制 Stat3 信号通路,增强表皮生长因子受体抑制剂对胰腺癌细胞的抑制作用^[6],激活凋亡和自噬途径^[7],抑制上皮间质转化^[8],下调缺氧诱导因子 1 α ^[9],增强 5-Aza-CdR 对胰腺癌细胞肿瘤抑制基因 P16 的去甲基化作用等^[10]。

本研究系统观察了大黄素、雷替曲塞单药及两者联合应用对胰腺癌 PANC-1 细胞的抑制作用。各用药组 PANC-1 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均显著低于对照组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。IL-6 为核因子 κ B 信号通路的下游炎症介质,能通过激活 STAT3 传递信号,阻断炎症过程中出现的细胞凋亡,促进微小体形成,促进胰腺癌细胞持续增殖和远处转移^[11-12]。一项 Meta 分析研究结果指出,循环中 IL-6 水平

有可能是一个独立的预后生物标志物,高 IL-6 水平与短总生存期相关^[13]。下调 IL-6 的表达水平,可有助于实现抑制肿瘤的作用。IL-1 由肿瘤细胞表达和分泌,可通过小 G 蛋白 Ras 诱导转录因子的激活,可诱导激活蛋白 1 的激活。高 IL-6 水平和高 IL-1 水平的患者表现出整体和无进展生存期缩短,肿瘤控制率降低^[13]。本研究结果显示,大黄素和雷替曲塞单药均可有效降低 PANC-1 细胞上清液中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平,上述 2 药联合应用可使其进一步降低,对肿瘤的抑制作用显著增加。

近年来,临床肿瘤学的一个主要目标是促进细胞凋亡,有效杀灭肿瘤细胞。这一程序性细胞死亡过程由多种因素介导,凋亡通路与其他信号机制的相互作用也会影响细胞死亡^[14]。本研究结果发现,联合用药组的 PANC-1 细胞凋亡率显著高于大黄素组及雷替曲塞组,提示上述两药联合应用可以产生协同作用,通过促进肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖。

既往研究结果证实,ACE2 在胰腺中的表达具有保护胰腺作用^[15-16];可抑制胰腺癌细胞增殖、血管生成和转移^[17-18]。ACE2 高表达的肿瘤患者生存期相对更长,而 ACE2 低表达可作为预后差的指标之一^[16]。下调 ACE2-Ang(1-7)-Mas 受体轴会促进肿瘤细胞的增殖及转移^[19]。本研究在蛋白水平观察 PANC-1 细胞 ACE2、Ang II 表达的变化,结果证实,各用药组 PANC-1 细胞 ACE2 蛋白水平升高,且联合用药组最高;各用药组 PANC-1 细胞 Ang II 蛋白水平降低,且联合用药组最低,与既往研究结果一致。

中医学中虽无“胰腺癌”的病名,但就其临床表现,该病属于中医学“积聚”“结胸”和“黄疸”等范畴。中医古籍对其病因病机亦有不少论述,如《证治汇补》中记载,“积之始生,因起居不时,忧虑过度,饮食失节,脾胃亏损,邪正相搏,结于腹中”。“辨证论治”是中医治疗学的基本原则。胰腺癌晚期,热毒血瘀证型较为常见。利用中医辨证论治的观点,针对热毒血瘀证的胰腺癌患者,特别是对于便秘为主的患者,加大大黄通腑,有利于胃肠功能的恢复,提高疗效。

综上所述,本研究通过细胞实验证实了大黄素、雷替曲塞能够下调 IL-6、IL-1 β 及 TNF- α 水平,促进胰腺癌细胞凋亡,实现对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖的抑制作用;两者联合应用可起到协同效应,抑制肿瘤细胞增殖的作用更为明显,其机制可能与上调 ACE2 蛋白表达、下调 Ang II 蛋白表达有关,可为中西医结合治疗胰腺癌提供理论依据。

参考文献

- [1] 王婧,马晓,尚昆,等. 大黄素联合甲磺酸阿帕替尼通过上调 ACE2-Ang(1-7)-Mas 受体轴抑制胰腺癌细胞增殖的研究[J]. 中国医院用药评价与分析, 2021, 21(3): 269-272.
- [2] VAN CUTSEM E, CUNNINGHAM D, MAROUN J, et al. Raltitrexed: current clinical status and future directions[J]. Ann Oncol, 2002, 13(4): 513-522.
- [3] KLOTZ R, DOERR-HARIM C, AHMED A, et al. Top ten research priorities for pancreatic cancer therapy[J]. Lancet Oncol, 2020, 21(6): e295-e296.
- [4] 王会忠,王震,阎凤霞. 雷替曲塞联合伊立替康治疗一线方案失败或术后复发转移胰腺癌的疗效[J]. 中国肿瘤临床与康复, 2015(9):3.

(下转第 538 页)