

• 论 著 •

双氢青蒿素 DHA 诱导胆管癌细胞凋亡的分子机制研究*

朱建明¹, 邵志坚²

(1. 广州市海珠区瑞宝街社区卫生服务中心检验科, 广东广州 510288;

2. 广州市海珠区第一人民医院普外科, 广东广州 510220)

摘要:目的 探讨双氢青蒿素对 Mcl-1 表达的影响, 及其对胆管癌患者癌细胞凋亡的诱导作用。方法 随机抽选 2010 年 6 月至 2014 年 12 月保存的胆管癌细胞系 QBC939, 将其划分为对照组和观察组进行试验, 分别采用常规培养和双氢青蒿素培养, 并就两组癌细胞的 Mcl-1 表达情况及凋亡情况进行统计、比较和分析。结果 统计学对比显示, 观察组 MCL1-001、MCL1-201 在培养 12、24、48 h 的表达均明显高于对照组, 组间差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。MCL1-002 在 12、24 h 的表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但在 48 h 时明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。并且在培养 6、12、24、48、72 h 时的凋亡率均明显高于对照组, 差异存在统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 双氢青蒿素对 Mcl-1 的表达具有明显的上调作用, 且能够有效诱导胆管癌细胞凋亡。

关键词: 胆管癌; 双氢青蒿素; Mcl-1; 细胞凋亡

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.16.003

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2017)16-2183-03

Study on molecular mechanism of double hydrogen artemisinin inducing apoptosis of bile duct cancer cells*

ZHU Jianming¹, SHAO Zhijian²

(1. Department of Clinical Laboratory, Ruibao Street Community Health Service Center of Haizhu

District, Guangzhou, Guangdong 510288, China; 2. Department of General Surgery, Guangzhou

Municipal People's Hospital, Guangzhou, Guangdong 510220, China)

Abstract: Objective To study and discuss the effect of double hydrogen artesunate on Mcl-1 expression and its inducing effect on cancer cell apoptosis in the patients with cholangiocarcinoma. **Methods** Bile duct cancer cell lines QBC939 preserved in our hospital from June 2010 to December 2014 were randomly selected and divided into the control group and observation group for conducting experiments. The cells were cultured by using the conventional cultivation and double hydrogen artemisinin culture. Then the Mcl-1 expression and apoptosis of cancer cells were performed the statistical analysis and comparison. **Results** Statistical comparison showed that the expressions of MCL1-001 and MCL1 201 at 12, 24, 48 h in the observation group were significantly higher than those in the control group, the comparison between groups were statistically significant ($P < 0.05$). MCL1-002 expression had little difference between at 12 h and 24 h ($P > 0.05$), but which at 48 h in the observation was significantly higher than that in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). And the mortality rate at 6, 12, 24, 48, 72 h in the observation group was significantly higher than that in the control group, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** Double hydrogen artemisinin has obvious up-regulation effect on Mcl-1, moreover can effectively induces bile duct cancer cell apoptosis.

Key words: bile duct cancer; double hydrogen artemisinin; Mcl-1; cell apoptosis

胆管癌是胆管上皮细胞的发生瘤性转变而形成的恶性肿瘤, 发病率相比其他肿瘤少见, 但在东亚地区, 尤其是泰国呈高发趋势。胆管癌是肿瘤科临床上的一种危害严重的恶性肿瘤^[1]。目前, 临床上对胆管癌的发病原因尚不十分清楚, 其临床常见原因主要归结于胆管结石、胆管囊性扩张症、华支睾吸虫以及原发性硬化性胆管炎等。它的症状表现复杂, 主要有黄疸、胆道出血、胆囊肿大、二便异常、胆道感染、肝脏损伤等等^[2-3]。胆管癌在世界不同地区发病率有较大不同。胆管细胞癌在原发性肝癌类型中占第二位, 全世界范围来总体发病率约为 14.9%, 在日本为 5%, 在韩国釜山为 20%。虽然胆管癌生长缓慢, 且转移发生较晚, 但由于大多数患者明确诊断时已是晚期, 已无法行根治性手术, 化疗及放疗效果也不佳, 因此胆管癌的预后很差, 治疗效果不理想。目前全世界在胆管癌发病分子机制及治疗的研究方面尚无重要的进展。因此, 寻求新的分子

治疗靶点从而改善胆管癌的治疗效果是相关研究的首要任务。

青蒿素是由我国学者、诺贝尔奖获得者屠呦呦带领的科研团队从中草药植物青蒿中发现, 并作为特效药被应用于疟疾的治疗, 效果显著。近年来, 国内外研究发现, 青蒿素及其衍生物具有不少其他的药理活性, 比如抗细菌脓毒症、放疗增敏、抗菌增敏及抗肿瘤作用等, 其中它表现出的抗肿瘤作用已受到广泛关注。近年研究者们又合成出了许多青蒿素的衍生物, 双氢青蒿素(DHA)则是其中之一, 其拥有比青蒿素更好的活性。目前双氢青蒿素在抗肿瘤方面机制的研究还没有重大的突破, 主要观点集中在其抗肿瘤机制与 DHA 抗疟机制相似及其可促进肿瘤细胞凋亡从而起到抗肿瘤的作用^[4-7]。另外有研究表明, DHA 对癌症的抑制是通过铁传递蛋白受体 TfR1 而实现的^[8], 结合早前动物实验已经表明 TfR1 最终会引起 Mcl-1 的变化从而影响细胞凋亡^[9]。

* 基金项目: 广东省科技计划项目(20130319c)。

作者简介: 朱建明, 男, 主管技师, 主要从事细胞凋亡的分子机制及实验室检验。

已有的研究还表明在胆管癌细胞中,抗凋亡蛋白 Mcl-1 处于高表达量的状态,表明 Mcl-1 的表达失调与胆管癌的发生密切相关^[10]。这为临床在胆管癌的诊治研究上提供了新的思路。在胆管癌细胞中 Mcl-1 较正常细胞表达异常增高,胆管癌的发生与 Mcl-1 的表达失调密切相关。本研究则观察了 DHA 对人胆管癌细胞 QBC939 是否有确切的诱导凋亡作用,探讨 DHA 对 Mcl-1 表达的影响以及 DHA 诱导 QBC939 凋亡的可能机制。

本文随机选择 2010 年 6 月至 2014 年 6 月以来,广州市海珠区第一人民医院保存的胆管癌细胞系 QBC939 若干,将其进行平均分组,对照组采用常规方法进行培养试验,观察组采用双氢青蒿素进行培养试验,并对比、统计和分析两组细胞的 Mcl-1 表达情况及凋亡情况。现将具体结果进行汇报。

1 材料与方

1.1 材料 随机抽选 2010 年 6 月至 2014 年 6 月期间,广州市海珠区第一人民医院保存的若干胆管癌细胞系 QBC939。将其平均分成对照组和观察组,均采用 100 U/mL 青霉素+10%新生小牛血清+RPMI-1640 培养基进行细胞培养,并进行细胞换液和传代。

1.2 方法

1.2.1 Mcl-1 表达检测 采用实时荧光定量 PCR 法对两组 QBC939 细胞在培养 12、24、48 h 的 Mcl-1 表达情况进行检测。

1.2.2 癌细胞凋亡检测 采用台盼蓝染色法对两组 QBC939 细胞在培养 6、12、24、48 h 及 72 h 的凋亡情况进行细胞生物学观察。

1.3 统计学处理 通过 SPSS12.0 软件对两组 QBC939 细胞的 Mcl-1 表达及凋亡情况进行统计学分析,Mcl-1 表达水平的比较采用 *t* 检验,凋亡率的比较采用 χ^2 检验。 $P < 0.05$,则有统计学意义。

2 结 果

2.1 两组 Mcl-1 表达的情况分析 12 h 时,两组中的 MCL1-001 和 MCL1-201 表达均有明显升高,且观察组明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),MCL1-002 均略有降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$);24 h 时,两组中的 MCL1-001 和 MCL1-201 表达均持续升高,观察组仍明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),MCL1-002 均略有回升,但变化不大,差异无统计学意义($P > 0.05$);48 h 时,MCL1-001 和 MCL1-201 表达均下降,但观察组仍明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),MCL1-002 均明显升高,且观察组明显高于对照组($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组的 Mcl-1 表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

培养时间	检测项目	对照组	观察组	<i>t</i>	<i>P</i>
0 h	MCL1-001	1±0.1	1±0.1	0	>0.05
	MCL1-002	1±0.1	1±0.1	0	>0.05
	MCL1-201	1±0.1	1±0.1	0	>0.05
12 h	MCL1-001	1.5±0.2	2±0.1	5.477 2	<0.05
	MCL1-002	0.8±0.1	0.9±0.2	1.095 5	>0.05
	MCL1-201	1.6±0.1	2.0±0.1	6.928 2	<0.05
24 h	MCL1-001	2.2±0.2	3.5±0.2	11.258 3	<0.05
	MCL1-002	0.9±0.1	1.1±0.2	2.190 9	>0.05
	MCL1-201	3.6±0.3	4.6±0.3	5.773 5	<0.05
48 h	MCL1-001	2±0.2	3.1±0.1	12.049 9	<0.05
	MCL1-002	4±0.2	5.4±0.1	15.336 2	<0.05
	MCL1-201	3±0.1	4±0.2	17.320 5	<0.05

2.2 两组的癌细胞凋亡率比较 对照组在培养 6、12、24、48、72 h 时的 QBC939 细胞凋亡率较低,且无明显改变,前后比差异无统计学意义($P > 0.05$);观察组随着时间的延长 QBC939 细胞凋亡率持续上升,且明显高于对照组,组内及组间比较差异均存在统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 两组的癌细胞凋亡率比较(%)

培养时间	对照组	观察组				<i>P</i>
		10 μ mol	20 μ mol	40 μ mol	80 μ mol	
6 h	0	0	0	0	0	>0.05
12 h	5.0	10.0	19.0	33.0	57.0	<0.05
24 h	3.0	18.0	40.0	58.0	84.0	<0.05
48 h	1.0	37.0	50.0	71.0	90.0	<0.05
72 h	2.0	48.0	75.0	82.0	96.0	<0.05

3 讨 论

近年来,随着人们生活方式和社会环境的不断变化,胆管癌的发病率也越来越高,并呈现出逐年增长的趋势^[11]。由于胆管癌的确诊时间较晚,患者大多已经错过最佳治疗时机,无法进行根治性手术治疗,且放疗、化疗的效果不理想,使得临床上胆管癌治疗的预后效果较差^[12]。因此,如何采用新的分子治疗靶点提高胆管癌的治疗效果是临床治疗中的重要任务。青蒿素,是由我国的学者从青蒿中提取发现的一种药物,多用于治疗疟疾,并取得了理想的治疗效果。根据国内外多家医疗机构证实,青蒿素具有抗菌增敏、放疗增敏、抗细菌脓毒症、抗肿瘤等多种药理活性^[13]。而双氢青蒿素,是一种常见的青蒿素衍生物,它的活性较强,对红内期的疟原虫具有较强的灭杀功能,且能够对人体肿瘤的生长起到较为明显的抑制作用。近些年来,经过相关卫生医疗组织研究,双氢青蒿素对 Mcl-1 具有靶向调控作用,具有抗癌的功效^[14]。本研究显示,采用双氢青蒿素作用胆管癌细胞 QBC939 后,其 Mcl-1 基因转录产物中的 MCL1-001 和 MCL1-201 在 12~24 h 的 mRNA 表达呈明显上升趋势,24 h 后开始下降,但在全过程中均明显高于常规作用的细胞,组间比较存在明显差异($P < 0.05$)。MCL1-002 在 12~24 h 的 mRNA 表达无明显变化($P > 0.05$),但在 24 h 后激增,且明显高于常规作用细胞,组间差异存在统计学意义($P < 0.05$)。在 6、12、24、48、72 h 时,QBC939 细胞凋亡率呈持续上升趋势,最高到得了 96.0%,且各时间点的凋亡率均明显高于常规作用细胞,组内及组间比较差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。这就表明,双氢青蒿素能够有效上调 Mcl-1 的表达,从而促使 QBC939 细胞的凋亡,并且作用的时间越长,其对癌细胞的抑制及凋亡作用越大。通过已有研究,发现 Mcl-1 在胆管癌细胞中有着明显的表达异常,这为通过以 Mcl-1 为靶点的进一步研究打下了坚实的基础。诱导 Mcl-1 表达的细胞信号通路众多,从已有研究中发现 NF- κ B/miR-29b/Mcl-1 及 DNA damage/Mule/Mcl-1 这两个细胞信号途径与胆管癌凋亡发生有着密切的关系,这为胆管癌找出更有效的胆管癌治疗方案奠定了基础。

参考文献

[1] 刘玉翠,朱天信,韩玉坤,等. 双氢青蒿素抗肿瘤机制的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2014,5(3):216-218.
 [2] 陆佳燕,杨远勤,王毅刚,等. RAIL 耐药(下转第 2187 页)

畸形精子症的治疗一般先药物治疗,多次无效可考虑辅助生殖技术(ART)治疗^[9]。可见,精子体内体外完成受精功能的前提是有较好的正常精子形态和结构。本研究显示精浆锌水平与各项精子形态学参数均无相关性($P>0.05$),与有关报道一致^[16]。精浆锌主要来源于精液中的前列腺液,反映的是前列腺功能,其检测主要用于前列腺炎和男性不育的体外诊断^[7]。而前列腺炎中的白细胞可能对精子具有一定的损伤作用,对于精浆锌是否影响精子质量,目前结论不一,由于精子是睾丸中产生并在附睾储存,与前列腺并无直接关系,射精后,前列腺液与精子及其他附属腺分泌液一同排出体外,故前列腺液中的锌对精子的成熟和形态结构是否有影响尚未可知。总之,精子发生是一个复杂过程,其形态缺陷机制还有待进一步明确。

参考文献

- [1] 陆金春. 精子形态学分析的是与非[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(4): 291-295.
- [2] Jdrzejczak P, Taszarek-Hauke G, Hauke JA, et al. Prediction of spontaneous conception based on semen parameters[J]. Int J Androl, 2008, 31(5): 499-507.
- [3] Franken DR, Oehninger S. Semen analysis and sperm function testing[J]. Asian J Androl, 2012, 14(1, SI): 6-13.
- [4] 尹彪, 刘红杰, 赵明, 等. 精浆中锌、果糖和肉碱含量与精液参数的关系[J]. 中华男科学杂志, 2013, 19(11): 1051-1053.
- [5] 谷翊群, 陈振文, 卢文红, 等. 世界卫生组织人类精液检查与处理实验室手册[M]. 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 192-193.
- [6] Juyena NS, Stelletta C. Seminal plasma; an essential attribute to spermatozoa [J]. J Androl, 2012, 33(4): 536-551.
- [7] 陆金春, 黄宇烽, 张红焯. 临床检验报告速查手册[M]. 上

海: 第二军医大学出版社, 2009: 57-58.

- [8] Cavallini G. Male idiopathic oligoasthenoteratozoospermia [J]. Asian J Androl, 2006, 8(2): 143-157.
- [9] 陆金春, 黄宇烽. 特发性精液质量异常的诊断与治疗[J]. 中华男科学杂志, 2012, 18(1): 3-10.
- [10] Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, et al. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined infertility [J]. Hum Reprod, 2004, 19(1): 129-138.
- [11] Cayli S, Sakkas D, Vigue L, et al. Cellular maturity and apoptosis in human sperm; creatine kinase, capase-3 and Bcl-XL levels in mature and diminished maturity sperm [J]. Mol Hum Reprod, 2004, 10(5): 365-372.
- [12] 马晓萍, 高晓勤, 杨燕平, 等. 不育患者精浆中性 α -1, 4-糖苷酶活性与精液参数及精子透明质酸酶活性的关系[J]. 检验医学, 2014, 29(1): 53-56.
- [13] Dias AJ, Maia MS, Retamal CA, et al. Identification and partial characterization of alpha-1, 4-glucosidase activity in equine epididymal fluid [J]. Theriogenology, 2004, 61(7/8): 1545-1558.
- [14] 张红焯, 陆金春, 卢坤刚, 等. 精浆 α 葡糖苷酶全自动检测方法的建立及评价[J]. 中华男科学杂志, 2014, 20(10): 886-889.
- [15] Garrett C, Liu DY, Baker H. Selectivity of the human sperm-zona pellucida binding process to sperm head morphology [J]. Fertil Steril, 1997, 67(2): 362-371.
- [16] 李劲, 舒金辉, 李佳祥, 等. 男性不育患者精浆锌含量与精液主要参数相关性研究 [J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(15): 2408-2412.

(收稿日期: 2017-02-16 修回日期: 2017-04-16)

(上接第 2184 页)

- 产生的机制及逆转耐药的最新策略[J]. 中国细胞生物学学报, 2012, 8(11): 1175-1181.
- [3] 王婵, 章乐. Mcl-1 基因与巨噬细胞凋亡相关疾病的研究进展[J]. 中国人兽共患病学报, 2013, 11(11): 1105-1108.
- [4] Kong R, Jia G, Cheng ZX, et al. Dihydroartemisinin enhances Apo2L/TRAIL-Mediated apoptosis in pancreatic cancer cells via ROS-mediated up-regulation of death receptor 5 [J]. PLoS ONE, 2012, 7(5): e37222.
- [5] Liao K, Li J, Wang Z. Dihydroartemisinin inhibits cell proliferation via AKT/GSK 3β /cyclinD1 pathway and induces apoptosis in A549 lung cancer cells [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(12): 8684-8691.
- [6] Tilaoui M, Mouse HA, Jaafari A, et al. Differential effect of artemisinin against cancer cell lines [J]. Nat Prod Bioprospect, 2014, 4(2): 189.
- [7] Xie H, Chen LJ, Yao L, et al. Human Tumor Cells Apoptosis Induced by Dihydroartemisinin and Its Molecular Mechanism [J]. China Pharmacy, 2007, 18(24): 1850-1852.
- [8] Ba Q, Zhou NY, Duan J, et al. Dihydroartemisinin exerts its anticancer activity through depleting cellular iron via

transferrin receptor-1 [J]. PLoS ONE, 7(8): e42703.

- [9] Kerenyi MA, Grebien F, Gehart H, et al. Stat5 regulates cellular iron uptake of erythroid cells via IRP-2 and TfR-1 [J]. Blood, 2008, 112(29): 3878-3888.
- [10] Mott JL, Kobayashi S, Bronk SF. miR-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis [J]. Oncogene, 2007, 26(42): 6133-6140.
- [11] 王国丽, 宿文辉, 孙卢浩然, 等. 二氢青蒿素对结肠癌细胞 HCT116 凋亡基因表达图谱的影响 [J]. 中国医科大学学报, 2011, 10(3): 213-216.
- [12] 张莉莉, 张淑兰. 天然萜类化合物在宫颈癌抗癌机制中的研究 [J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2011, 12(2): 146-149.
- [13] 靳秋月, 呼文亮, 陈立军, 等. 基因芯片技术分析二氢青蒿素抑制 K562 细胞增殖的作用机制 [J]. 武警医学院学报, 2009, 12(1): 20-23, 27, 85.
- [14] 陈先国, 宋兴福, 崔向军, 等. 青蒿素及其衍生物诱导细胞凋亡研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2008, 12(10): 1278-1280.

(收稿日期: 2017-02-04 修回日期: 2017-04-04)