探索 • 发现

斑蝥酸钠与喜树碱联用抗肿瘤效果的实验研究

黄丹仪¹ 吴转斌² 黄 勤² 张梦杰¹ 杨 桦¹ 石嘉豪¹ 盛哲津¹ 费 俭^{1*} (¹同济大学生命科学与技术学院,上海 200092; ²上海南方模式生物研究中心,上海 201203)

摘要 斑蝥酸钠(sodium cantharidinate, SCA)和喜树碱(camptothecin, CPT)均已在临床 用于肿瘤的治疗。该文就SCA与CPT联合用药在体外和体内对肿瘤细胞的生长抑制作用进行 了研究。结果表明,两种药物的联合使用可增强对肺癌细胞系A549和肝癌细胞系Hep3B的体 外增殖的抑制作用,且不同浓度配比下联用组的CI值均小于1,表现出了协同效应。利用肿瘤 移植后的斑马鱼胚胎作为模型,研究结果证明,和单药作用相比,SCA和CPT联合应用可以显 著抑制斑马鱼胚胎中A549细胞的增殖和扩散,且在实验剂量下,两者的合用对斑马鱼的胚胎 发育没有明显的影响。另外,还发现CPT能够抑制斑马鱼胚胎的鳍发育,并对其血管生成产生 抑制作用。该文的研究结果对于临床上联合使用SCA和CPT治疗相关肿瘤提供了有用的实验 数据。

关键词 斑蝥酸钠; 喜树碱; 药物联用; 抗肿瘤药物

Experimental Study on the Anti-cancer Effect of Combined Usage of Sodium Cantharidinate and Camptothecin

Huang Danyi¹, Wu Zhuanbin², Huang Qin², Zhang Mengjie¹, Yang Hua¹, Shi Jiahao¹, Sheng Zhejin¹, Fei Jian^{1*} (¹School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China)

Abstract Both sodium cantharidinate (SCA) and camptothecin (CPT) have been used for clinical tumor therapy. We studied the inhibition on tumor cell growth when combined SCA with CPT both *in vitro* and *in vivo*. The results showed that the combination of SCA and CPT enhanced the inhibitory effect of proliferation of A549 lung cancer cell line and Hep3B hepatoma cell line *in vitro*. And the CI values of SCA in conjunction with CPT of different concentrations were less than 1, indicating a synergistic effect. Using xenograft model, our results showed that the joint application of SCA and CPT could significantly inhibit the proliferation and diffusion of A549 cells in zebrafish embryo compared with single drug treatment. The combination treatment had no obvious impact on the normal development of zebrafish in the experimental dosage. We also observed that CPT inhibited the fin development of zebrafish embryos, as well as the inhibitory effect on the angiogenesis. The results provided useful experimental data for the combination therapy for related tumors using SCA and CPT in clinic.

Key words sodium cantharidinate; camptothecin; drug combination; anti-tumor drug

收稿日期: 2014-05-06 接受日期: 2014-07-18

国家自然科学基金(批准号: 81261120568)和上海市科委项目经费(批准号: 12140902100)资助的课题

^{*}通讯作者。Tel: 021-65985591, E-mail: jfei@tongji.edu.cn

Received: May 6, 2014 Accepted: July 18, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81261120568) and the Project Funds of Shanghai Science and Technology Commission (Grant No.12140902100)

^{*}Corresponding author. Tel: +86-21-65985591, E-mail: jfei@tongji.edu.cn

网络出版时间: 2014-10-27 14:54 URL: http://www.enki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.11.0150.html

斑蝥素(cantharidin, CTD)也称斑蝥酸酐, 是存 在于南方大斑蝥(*Mylabris phalerata* Pallas)或黄黑小 斑蝥(*Mylabris cichorii* Linnaeus)等芫菁科昆虫体内 的一种防御性毒素, 也是昆虫类药物斑蝥中的主要 药用成分。李时珍《本草纲目》本经虫部记载, 斑 蝥经特殊处理后可用于"恶疮疽, 蚀死肌, 破石癃"。 现代医学研究发现, CTD在治疗恶性肿瘤的临床应 用中具有一定的价值, 但由于CTD本身对机体心血 管系统以及泌尿系统的毒副作用而未能得到广泛的 应用。斑蝥酸钠(sodium cantharidinate, SCA)是CTD 与氢氧化钠水解反应生成的钠盐, 其结构、作用与 CTD近似但产生的毒性较小, 是目前临床CTD应用 的主要形式之一(图1)。

我们前期的研究表明, SCA具有广谱的抗肿瘤 活性^[1], 在考虑制定多药物配伍治疗肿瘤的临床方 案中, SCA可以作为一个有潜力的选用药物。为此, 我们对SCA和其他抗肿瘤临床药物的联合使用效果 进行了初步筛选。本文就SCA与抗肿瘤药物喜树碱 (camptothecin, CPT)的联用使用效果进行报道, 希望 能够为SCA的临床应用和制定临床治疗策略提供实 验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

CPT购自美国Selleck公司,以二甲基亚砜(DMSO, Sigma公司)溶解并稀释至1 000 mg/mL备用。PTK787 购自美国Selleck公司。SCA注射液(50 µg/mL)由贵州 神奇集团贵州金桥药业有限公司出品。实验时,上 述药品都用PBS或斑马鱼(*Danio rerio*)培养用水(fish water)稀释至实验终浓度。MTT细胞增殖及细胞毒 性检测试剂盒购自碧云天生物技术研究所(Beyotime Institue of Biotechnology)。

1.2 细胞培养及斑马鱼饲养

人肺腺癌A549细胞以及肝癌Hep3B细胞均来 自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC),分别用含10%胎牛血清的F-12K Nutrient mixture培养基(Invitrogen公司)及1640培养 基(Hyclone公司)于37°C、5% CO₂条件下常规培养, 隔天更换培液,每2~3 d传代1次。不同时相的斑马 鱼胚胎^[2](AB或fli1a-EGFP/casper品系)由上海南方 模式生物科技发展有限公司提供,并在标准温度及 光照^[3]条件下培养,筛选发育正常的胚胎用于后续 实验。胚胎移植肿瘤后,在31°C温箱中饲养。

1.3 细胞活力的测定及联合效用的评价

取对数生长期细胞铺板,静置培养过夜后,用 不同浓度的不同药物处理细胞,实验设置溶剂对照 组、CPT单药组、SCA单药组以及不同配比的CPT 与SCA联用组共7个实验组。72 h后移除所有药液, 按照MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒说明书操 作,并检测每孔的D值。

不同药物处理下的抑制率用公式(1)计算:

%药物抑制率=(1-药物组平均吸光度/对照组 平均吸光度)×100 公式(1)

药物的半抑制率IC50按公式(2)计算:

其中, Xm为设计的最大浓度的对数值, i表示各浓度倍比的对数值, ∑P为各组生长抑制率之和, 0.5为经验常数。若CPT和SCA单用时对A549细胞的半抑制率分别为A和B, CPT和SCA联用时的半抑制率分别为a和b, 则药物的联合指数(combination index, CI)按公式(3)计算:

公式(3)

若CI值等于1, 认为该组两种药物加和; 若CI值 大于1, 认为该组两种药物拮抗; 若CI值小于1, 认为

CI=a/A+b/B





该组两种药物协同[4]。

1.4 药物对斑马鱼胚胎的急性毒性实验

在12孔板中,每孔加入20条受精后48 h(hours post fertilization, hpf)已破膜的斑马鱼胚胎,在fish water中加入0.1% DMSO作为溶剂对照组(vehicle control),不同浓度的药物作为实验组,处理72 h,并及时观察记录胚胎表型变化。分别合计用药过程中死亡的、出现表型变化的以及正常发育的斑马鱼胚胎,用SPSS软件拟合并计算出药物处理对斑马鱼胚胎的50%致死浓度(lethal concentration 50, LC₅₀)、10%致死浓度(LC₁₀)以及最大非致死浓度(most non-lethal concentration, MNLC)。

1.5 药物对斑马鱼体内移植肿瘤的作用

A549细胞培养至对数生长期,消化收集后用 终浓度为2 μg/mL的CM-Dil(Invitrogen公司)染料 标记,在48 hpf的fli1a-EGFP/casper品系斑马鱼胚 胎的卵黄囊部位显微注射约100个细胞。次日用不 同浓度的不同药物处理成功荷瘤的胚胎120 h,在 Nikon SMZ 1500荧光显微镜下观察并拍照,荧光 定量用NIS-Elements D3.1软件完成,GraphPad Prism 5.0软件用于计算并统计药物处理对胚胎内肿瘤的 抑制情况,肿瘤细胞抑制率按公式(4)计算:

%肿瘤细胞抑制率=(1-药物处理组相对荧光强度/溶剂对照组相对荧光强度)×100 公式(4)

1.6 CPT对斑马鱼胚胎发育的影响

在6孔板中,每孔加入30条48 hpf已破膜的野生型AB斑马鱼胚胎,在斑马鱼培养用水中加入0.1%DMSO作为溶剂对照组,0.5 μg/mL的CPT作为实验组,药物处理24 h后更换新鲜的斑马鱼培养用水终止药物作用,于Nikon SMZ 1500体视显微镜下拍摄斑马鱼胚胎的表型变化。在6孔板中,每孔加入30条24 hpf的fli1a-EGFP/casper斑马鱼胚胎,在斑马鱼培养用水中加入0.1%DMSO作为溶剂对照组,0.07 μg/mL的CPT作为实验组,5 μmol/L的PTK787作为阳性对照

组,药物处理8h后更换新鲜的斑马鱼培养用水终止 作用,于Nikon SMZ 1500体视显微镜下拍摄斑马鱼 胚胎的表型变化,统计每一条胚胎发育完全的节间 血管数量,并用GraphPad Prism 5.0软件进行统计检 验。血管生成抑制率用公式(5)计算:

%血管生成抑制率=(1-药物处理组胚胎体节间 血管平均数/溶剂对照组胚胎体节间血管平均数)×100 公式(5)

1.7 统计分析

实验结果用平均值±标准差表示,各组间显著 性差异用One-way ANOVA(Bonferroni多重比较法) 统计, P<0.05为差异具有显著性, P<0.01为差异极显 著。

2 结果

2.1 CPT与SCA联用对体外培养的人恶性肿瘤细 胞生长的影响

将终浓度分别为200 μg/mL的CPT与5 μg/mL 的SCA在保持相同用药体积(10 μL)的情况下,以不同 比例混合处理体外培养的人肺癌A549细胞及人肝癌 Hep3B细胞72 h, MTT结果表明,混合药物对两种肿瘤 细胞均表现出了良好的生长抑制作用。单独用药的 情况下, CPT对A549细胞的IC₅₀为(0.095±0.006) μg/mL, 对Hep3B细胞的IC₅₀为(0.477±0.038) μg/mL; SCA对 A549细胞的IC₅₀为(1.338±0.141) μg/mL,对Hep3B细 胞的IC₅₀为(0.801±0.116) μg/mL。不同浓度的药物 配比下,药物联用组的肿瘤细胞活力显著下降, CPT 与SCA不同浓度联用对两种肿瘤细胞的CI值均小 于1,在体外抑制中表现出了较好的协同作用,两种 药物联用的CI值见表1所示。

体外实验表明, SCA和CPT的联用显示出协同 抑制肿瘤细胞的效果, 为了进一步研究两者共同使 用在生物体内的药效和可能的副作用, 我们选用了 斑马鱼胚胎作为体内模型进行深入的实验。

Table 1 CI values of combined CPT and SCA for different cancer cell lines				
细胞系 Cell line	CPT+SCA浓度 Concentration of CPT+SCA			
	160 µg/mL+1 µg/mL	$120 \ \mu g/mL + 2 \ \mu g/mL$	$80 \ \mu g/mL + 3 \ \mu g/mL$	$40 \ \mu g/mL + 4 \ \mu g/mL$
A549	0.96	0.71	0.67	0.59
Нер3В	0.61	0.47	0.22	0.16

表1 联用CPT与SCA对不同肿瘤细胞的CI值







2.2 CPT与SCA对斑马鱼胚胎的急性毒性实验

CPT和SCA对斑马鱼胚胎的毒性作用呈明显 的浓度依赖性。CPT对野生型斑马鱼胚胎的LC₅₀为 0.072 μg/mL, LC₁₀为0.032 μg/mL, MNLC为0.016 μg/mL (图2B); SCA注射液的LC₅₀、LC₁₀和MNLC分别为 0.980 μg/mL、0.583 μg/mL和0.376 μg/mL(图2D)。 实验中,我们还观察到浓度高于0.5 μg/mL的CPT诱 导了斑马鱼胚胎的鳍抑制表型,阻滞了斑马鱼胚胎 血液流动,并且有较明显的发育延迟作用。而SCA 注射液对斑马鱼胚胎的器官发育表现出了较大的影 响(结果未显示)。

在获得了用药浓度与斑马鱼胚胎存活及表型 相关的数据后,接下来将以此为依据设计实验中的 给药浓度和处理时间,两种药物都取各自的MNLC: CPT为0.02 μg/mL, SCA为0.4 μg/mL,作为后续体内 联用实验的用药浓度。

2.3 CPT与SCA联用对斑马鱼体内移植肿瘤生长的影响

A549细胞由CM-Dil红色荧光标记后,显微注 射到48 hpf的fli1a-EGFP/casper品系斑马鱼胚胎的 卵黄囊部位。注射1 d后(1 day post injection, 1 dpi), 在荧光显微镜下观察,筛选出肿瘤细胞位置和大小 均一、适合用于下一步实验的肿瘤移植胚胎,并用 不同药物处理。

对5 dpi的肿瘤移植胚胎进行荧光显微镜下观察,并统计相对荧光强度(relative fluorescence intensity, RFI)。由结果可知,用药组胚胎的发育情况与 对照组没有显著差异,也没有出现器官毒性表型。 对照组胚胎体内的肿瘤细胞分布面积大且扩散广, 已经占据胰腺的部位并抵达鱼鳔下端,并有沿着



A:药物处理120h后斑马鱼胚胎体视图; B~E:不同药物处理120h后肿瘤细胞在斑马鱼胚胎体内的荧光成像; F:不同药物处理120h后肿瘤细胞的相对荧光定量及肿瘤抑制率柱状图。*P<0.05, ***P<0.001。

A: zebrafish embryonic body view after drug treatment for 120 h; B~E: fluorescence imaging of tumor cells in zebrafish embryos after different drug treatments for 120 h; F: histogram of relative fluorescence intensity and inhibit rate of tumor cells after different drug treatments for 120 h. *P<0.05, ***P<0.001.

图3 SCA与CPT处理对斑马鱼A549肿瘤移植模型的影响 Fig.3 Effect of SCA and CPT treatment in zebrafish A549 xenograft model



DF: 背鳍; CF: 尾鳍; VF: 臀鳍; PF: 腹鳍。 DF: dorsal fin; CF: caudal fin; VF: ventral fin; PF: pelvic fin.

图4 CPT诱导的斑马鱼胚胎鳍抑制 Fig.4 CPT induced fin-reduction phenotypes in zebrafish embryos

肠道向泄殖孔延伸的趋势。而用药组与对照组相比,肿瘤细胞的分布面积显著较小。RFI统计结果显示,0.02 μg/mL的CPT和0.4 μg/mL的SCA单独用药对斑马鱼体内的A549细胞有极显著的抑制作用(*P*<0.001),而0.02 μg/mL的CPT与0.4 μg/mL的SCA

联用后,对斑马鱼体内肿瘤细胞的抑制较两者单独 作用更加显著(P<0.05)(图3)。

2.4 CPT对斑马鱼胚胎发育的影响

之前,我们已经观察到高浓度的CPT(0.5 μg/mL) 能够在较短时间内显著诱导斑马鱼胚胎上皮细胞凋





图5 CPT对斑马鱼血管生成模型的作用 Fig.5 Effect of CPT in zebrafish angiogenesis model

亡,出现鳍抑制表型(图4)。

此外,由于观察到CPT用药造成斑马鱼胚胎血 流变缓,我们怀疑其可对斑马鱼胚胎血管发育产生 影响并对此追加实验,希望能够由此探索CPT对斑 马鱼胚胎可能的作用途径。结果显示,用药组胚胎 的尾部与溶剂对照组或阳性对照组相比呈现明显的 向上弯曲(图5A)。在荧光显微镜下观察,CPT组的体 节间血管(intersegmental vessels, ISV)和背部纵向血 管(dorsal longitudinal anastomotic vessels, DLAV)发 育受到阻碍(图5),对血管发育的抑制率达到67.54%, 这一结果与已知的VEGFR抑制剂PTK787的抑制效 果没有显著的统计学差异。

3 讨论

为了全面地对SCA与CPT联合用药的药效结果做出评价,我们分别在体外和体内对此开展了实验

研究。实验结果表明, SCA对人肺腺癌A549细胞具 有较好的生长抑制作用, 且能够增强CPT在抗肿瘤 方面的药效。

在体外实验中,我们用CI值评价SCA与CPT联 用的药物相互作用,得到了各浓度配比下两种药 物都能发挥协同作用的理想结果。CPT作为第I类 DNA拓补异构酶(Topo I)抑制剂,能够通过特异性抑 制Topo I阻断DNA复制与转录。许多重要通路的调 节被证明与CPT诱导的凋亡相关,包括caspase-3和 caspase-7^[5]、PARP^[5-6]、TNF^[7]、EGFR^[8]以及NF-кB^[9] 等。CTD及其衍生物能够抑制磷酸化丝氨酸/苏氨 酸蛋白磷酸酶(phosphoserine and phosphothreonine residues phosphatases, PPP)家族的活性^[10-11],并通过 线粒体通路活化caspase-3^[12]。也有报道证明,CTD 能够部分依赖p53的作用加速造成DNA损伤^[13]。 SCA与CPT分别通过不同途径诱导凋亡,可能是两 者联用能增强对肿瘤细胞抑制的重要原因。利用流 式细胞分析表明, SCA、CPT及两者合用均能够引 起细胞发生凋亡(结果未显示)。

体内实验我们采用移植了A549的斑马鱼胚胎 作为动物模型,这种基于斑马鱼胚胎肿瘤移植的药 物筛选模型及方法具有简单、快速和高通量的特有 优势,且实验结果已被认为是有效可信的[14-15]。我 们的结果证明了SCA与CPT对斑马鱼胚胎体内的肿 瘤细胞有良好的抑制作用,并且两种药物联合运用 时对肿瘤细胞的生长抑制作用更加显著。在研究中, 我们还发现高浓度的CPT能够抑制斑马鱼胚胎鳍的 发育和血管的生成。胚胎的鳍发育抑制可能是CPT 诱导调亡的表型, CPT能够在斑马鱼胚胎中通过下 调MLL5促进p53磷酸化[16],并调控下游的p21/Waf/ Cip-1^[17]开启凋亡通路。而CPT对血管发育的抑制表 型与PTK787^[18]相似,抑制肿瘤细胞中的VEGFR从而 阻止毛细血管萌发,可能是CPT体内抗肿瘤增殖和 扩散的另一个机制。但我们没有观察到SCA具有抗 斑马鱼鳍的发育及抗血管的作用, 而高浓度的SCA 处理可对斑马鱼胚胎产生一定的器官毒性(结果未 显示)。

CPT与CTD及其衍生物都被证明具有良好的抗 肿瘤效应,然而两者的应用前景都因为各自较强的 毒副作用而受到限制。在我们的实验中,我们证明 了两者的联用具有协同增加对肿瘤细胞杀伤的能 力,且联合用药在增加药物疗效的同时并没有对斑 马鱼胚胎的发育造成影响,因此,探索这两种药物的 临床联合用药,可能在降低用药浓度、减少药物副 反应、增强肿瘤治疗效果等方面提供一个新的思路。

参考文献 (References)

- 赵珍珍,李 俊,王维刚,马雨水,费 俭.不同癌细胞系对斑蝥 酸钠的药物敏感性检测.同济大学学报(医学版)(Zhao Zhenzhen, Li Jun, Wang Weigang, Ma Yushui, Fei Jian. Drugsusceptibility to sodium cantharidate of different cancer cell lines. Journal of Tongji University, Medical Science) 2013; 34(4): 10-5.
- 2 Kimmel CB, Ballard WW, Kimmel SR, Ullmann B, Schilling TF. Stages of embryonic development of the zebrafish. Dev Dyn 1995; 203(3): 253-310.
- 3 Matthews M, Trevarrow B, Matthews J. A virtual tour of the guide for zebrafish users. Lab Anim (NY) 2002; 31(3): 34-40.
- 4 Berenbaum MC. What is Synergy? Pharmacol Rev 1989; 41(2): 93-141.

- 5 Rodríguez-Hernández A, Brea-Calvo G, Fernández-Ayala DJ, Cordero M, Navas P, Sánchez-Alcázar JA. Nuclear caspase-3 and capase-7 activation, and poly(ADP-ribose) polymerase cleavage are early events in camptothecin-induced apoptosis. Apoptosis 2006; 11(1): 131-9.
- 6 Smith LM, Willmore E, Austin CA, Curtin NJ. The novel poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG14361, sensitizes cells to topoisomerase I poisons by increasing the persistence of DNA strand breaks. Clin Cancer Res 2005; 11(23): 8449-57.
- 7 Ciusani E, Croci D, Gelati M, Calatozzolo C, Sciacca F, Fumagalli L, *et al. In vitro* effects of topotecan and ionizing radiation on TRAIL/Apo2L-mediated apoptosis in malignant glioma. J Neurooncol 2005; 71(1): 19-25.
- 8 Mialon A, Sankinen M, Söderström H, Junttila TT, Holmström T, Koivusalo R, *et al.* DNA topoisomerase I is a cofactor for c-Jun in the regulation of epidermal growth factor receptor expression and cancer cell proliferation. Mol Cell Biol 2005; 25(12): 5040-51.
- 9 Zeng CW, Zhang XJ, Lin KY, Ye H, Feng SY, Zhang H, et al. Camptothecin induces apoptosis in cancer cells via microRNA-125b-mediated mitochondrial pathways. Mol Pharmacol 2012; 81(4): 578-86.
- 10 Shan HB, Cai YC, Liu Y, Zeng WN, Chen HX, Fan BT, et al. Cytotoxicity of cantharidin analogues targeting protein phosphatase 2A. Anticancer Drugs 2006; 17(8): 905-11.
- 11 McCluskey A, Ackland SP, Bowyer MC, Baldwin ML, Garner J, Walkom CC, *et al.* Cantharidin analogues: Synthesis and evaluation of growth inhibition in a panel of selected tumour cell lines. Bioorg Chem 2003; 31(1): 68-79.
- 12 Chen YN, Chen JC, Yin SC, Wang GS, Tsauer W, Hsu SF, et al. Effector mechanisms of norcantharidin-induced mitotic arrest and apoptosis in human hepatoma cells. Int J Cancer 2002; 100(2): 158-65.
- 13 Efferth T, Rauh R, Kahl S, Tomicic M, Böchzelt H, Tome ME, *et al.* Molecular modes of action of cantharidin in tumor cells. Biochem Pharmacol 2005; 69(5): 811-8.
- 14 Li Y, Huang W, Huang S, Du J, Huang C. Screening of anticancer agent using zebrafish: Comparison with the MTT assay. Biochem Biophys Res Commun 2012; 422(1): 85-90.
- 15 Le X, Pugach EK, Hettmer S, Storer NY, Liu J, Wills AA, *et al*. A novel chemical screening strategy in zebrafish identifies common pathways in embryogenesis and rhabdomyosarcoma development. Development 2013; 140(11): 2354-64.
- 16 Cheng F, Liu J, Teh C, Chong SW, Korzh V, Jiang YJ, et al. Camptothecin-induced downregulation of MLL5 contributes to the activation of tumor suppressor p53. Oncogene 2011; 30(33): 3599-611.
- 17 Langheinrich U, Hennen E, Stott G, Vacun G. Zebrafish as a model organism for the identification and characterization of drugs and genes affecting p53 signaling. Curr Biol 2002; 12(23): 2023-8.
- 18 Banerjee S, A'Hern R, Detre S, Littlewood-Evans AJ, Evans DB, Dowsett M, et al. Biological evidence for dual antiangiogenic-antiaromatase activity of the VEGFR inhibitor PTK787/ ZK222584 in vivo. Clin Cancer Res 2010; 16(16): 4178-87.