

血红素加氧酶-1 的表达对氟尿嘧啶诱导食管癌细胞凋亡的影响

张 健 马德华 陈保富 胡炳川 夏利龙 张 波 朱成楚

摘 要 **目的** 本研究探讨血红素加氧酶-1 与氟尿嘧啶诱导食管癌细胞凋亡的关系。**方法** 培养 ECa109 食管鳞癌细胞,实验组分别加入正常培养基,含 $20\mu\text{mol/L}$ 、 $80\mu\text{mol/L}$ 锌原卟啉(ZnppIX)的培养基培养 12h,后更换为含 $100\mu\text{g/ml}$ 5-FU 组培养;对照组予正常培养基培养;共培养 96h 后检测各组细胞凋亡情况。**结果** 在凋亡早期细胞中(Annexin V⁺/PI⁻), $20\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组($25.63\% \pm 6.52\%$)及 $80\mu\text{mol/L}$ ZnppIX($22.48\% \pm 5.59\%$)组显著高于 5-FU 组($12.89\% \pm 4.42\%$, P 均 <0.05)。在中晚期凋亡细胞(Annexin V⁺/PI⁺)中, $20\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组($25.17\% \pm 5.53\%$)显著低于 5-FU 组($39.89\% \pm 6.66\%$)及 $80\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组($41.95\% \pm 2.92\%$, P 均 <0.01)。 $80\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组 caspase-3 的活化率显著高于正常细胞($P < 0.05$)。**结论** ZnppIX 抑制 HO-1 表达后,可以显著增加 5-FU 诱导的 Eca109 食管癌细胞凋亡率,caspase-3 参与了其诱导细胞凋亡的过程。

关键词 食管癌 血红素加氧酶-1(HO-1) 细胞凋亡

中图分类号 R735

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.09.017

Influence of Heme Oxygenase-1 on Apoptosis Induced by Fluorouracil in ECa109 Cells. Zhang Jian, Ma Dehua, Chen Baofu, et al. Cardio-Thoracic Surgery Department, Tai Zhou Hospital Affiliated to Wenzhou Medical University, Zhejiang 317000, China

Abstract **Objective** To explore relationship between the expression of HO-1 and fluorouracil in esophageal carcinoma **Methods** ECa109 cells were trained 12 hours by normal medium, $20\mu\text{mol/L}$ and $80\mu\text{mol/L}$ concentrations of ZnppIX medium, then trained by $100\mu\text{g/ml}$ 5-FU to 96 hours totally. The apoptosis was detected in all experimental groups marked by Annexin V, PI and caspase-3. **Results** In early apoptosis, $20\mu\text{mol/L}$ ZnppIX group ($25.63\% \pm 6.52\%$) and $80\mu\text{mol/L}$ ZnppIX ($22.48\% \pm 5.59\%$) group was significantly higher than the 5-FU group ($12.89\% \pm 4.42\%$) ($P < 0.05$). In late apoptotic, $20\mu\text{mol/L}$ ZnppIX group ($25.17\% \pm 5.53\%$) was significantly lower than the 5-FU group ($39.89\% \pm 6.66\%$) and $80\mu\text{mol/L}$ ZnppIX group ($41.95\% \pm 2.92\%$) (P all < 0.01). The caspase-3 activation rate in $80\mu\text{mol/L}$ ZnppIX group was significantly higher than normal cells ($P < 0.05$). **Conclusion** ZnppIX significantly increased the apoptosis of ECa109 cells caused by 5-FU. Caspase-3 took a part in this apoptosis.

Key words Esophageal carcinoma; Heme oxygenase-1(HO-1); Apoptosis

食管癌是全世界高发肿瘤之一,尽管过去 20 多年来对食管癌的治疗手段不断改进,但食管癌患者的 5 年生存率仍只有 15% ~ 34%^[1]。血红素加氧酶(heme oxygenase,HO)是体内血红素分解代谢重要的限速酶,其可将血红素分解为一氧化碳(carbon monoxide,CO)、二价铁离子、胆绿素^[2]。近年来的研究发现,HO-1 在大多数恶性肿瘤中高表达,与肿瘤的增殖、凋亡、血管生成等生物学行为密切相关^[3]。本研究拟对 HO-1 与 5-FU 所诱导的食管癌细胞凋亡的

关系及其机制进行研究。

材料与方法

1. 材料:人食管癌 ECa109 细胞株购至中国科学院细胞库,RPMI1640 细胞培养液购至美国 GIBCO 公司,锌原卟啉(ZnppIX)购自美国 Sigma-Aldrich 公司,Annexin V 凋亡试剂盒购自美国 Invitrogen 公司,caspase-3 凋亡试剂盒购自美国 BioVision 公司。

2. 实验分组:ZnppIX 是 HO-1 的特异性抑制剂。接种 ECa109 细胞后正常培养 8h 后,待其细胞数达到 $10^6/\text{L}$ 时,实验组分别加入正常培养基,含 $20\mu\text{mol/L}$ 、 $80\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 的培养基培养 12h,后更换为含 $100\mu\text{g/ml}$ 5-FU 组培养;对照组予正常培养基培养;共培养 96h。

3. 流式 Annexin V 凋亡检测:以无处理正常细胞为阴性对照,第 4 天用流式细胞仪检测(Ex = 488nm; Em = 530nm)细胞凋亡的情况。取各组早期凋亡及晚期凋亡细胞所占的百分

基金项目:浙江省重大科技专项和优先主题项目(11C13039-2);台州市科技局项目(11KY11)

作者单位:317000 临海,温州医科大学附属台州医院心胸外科

通讯作者:朱成楚,硕士生导师,主任医师,教授,电子信箱:zhucc.

tzyy@gmail.com

比, 进行统计分析。

4. 流式 caspase-3 检测: 无处理正常细胞为阴性对照, 实验组为 80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组。予流式细胞仪分析 (FL-1)。取各组 caspase-3 活化细胞所占的百分比, 进行统计分析。

5. 细胞瑞氏染色: 同上实验分组于含玻片的 6 孔板中培养 96h, 予 PBS 洗涤, 涂片干燥后滴加瑞氏染料, 完全覆盖细胞。室温静置 1~2min 后镜下观察、分析。

6. 统计学方法: 所以结果均采用 SPSS 17.0 统计分析软件包进行统计学分析, 结果用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。流式检测结果采用单因素方差分析, 两两之间比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 流式细胞仪 Annexin V 细胞凋亡检测。在凋亡早期细胞中 (Annexin V⁺/PI⁻), 20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组 (25.63% $\pm$ 6.52%) 及 80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组 (22.48% $\pm$ 5.59%) 组显著高于 5-FU 组 (12.89% $\pm$ 4.42%, P 均 < 0.05), 但 20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组与 80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在中晚期凋亡细胞 (Annexin V⁺/PI⁺) 中, 20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组 (25.17% $\pm$ 5.53%) 显著低于 5-FU 组 (39.89% $\pm$ 6.66%) 及 80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组 (41.95% $\pm$ 2.92%, P 均 < 0.01), 5-FU 组与 80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1、表 1、表 2)。

2. 瑞氏染色结果: 各实验处理组均可见凋亡细胞, 其细胞体积缩小, 连接消失, 与周围的细胞脱离, 细胞质密度增加, 核质浓缩, 核膜核仁破碎, 胞膜有小泡状形成, 胞膜结构仍然完整。可见凋亡细胞遗骸分割包裹为几个凋亡小体 (图 2)。

3. caspase-3 流式检测结果: 正常培养细胞 caspase-3 活化比例较低, 80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组 caspase-3 活化比例显著增高, 两者差异有统计学意义 ($t = 8.351$, $P < 0.01$)。

讨 论

笔者在前期的研究中发现, HO-1 在食管癌中的阳性表达率显著高于癌旁组织和正常食管组织, 其表达水平与肿瘤分化、食管癌浸润程度、淋巴结转移密切相关^[4]。HO-1 siRNA 可以成功抑制食管鳞癌 ECa109 细胞 HO-1 的表达, 从而使细胞增殖能力明显减弱, 细胞死亡率显著增加^[5]。Petrache 等^[6]通过对鼠纤维母细胞的研究证实, 过表达 HO-1 可有效抑制 TNF- α 引起的细胞凋亡, 而这种效应在抑制 HO-1 表达后消失。说明 HO-1 具有有效的抗细胞

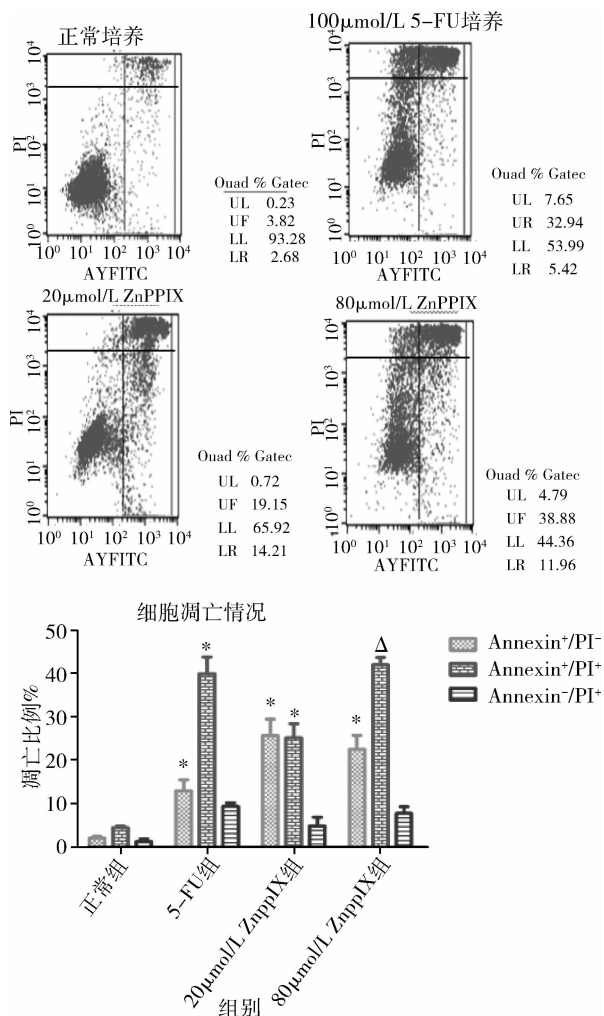


图 1 各实验组 Annexin V 流式检测结果

与 5-FU 组同凋亡情况相比, * $P < 0.05$; 与 20 $\mu\text{mol/L}$ ZnPPiX 组同凋亡情况相比, $\Delta P < 0.05$

表 1 不同组别早期凋亡情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LR
正常组	2.03 $\pm$ 0.72
5-FU 组	12.89 $\pm$ 4.42
20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组	25.63 $\pm$ 6.52
80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组	22.48 $\pm$ 5.59
F	14.478
P	0.001

表 2 不同组别中晚期凋亡情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	UF
正常组	4.39 $\pm$ 0.70
5-FU 组	39.89 $\pm$ 6.66
20 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组	25.17 $\pm$ 5.53
80 $\mu\text{mol/L}$ ZnppIX 组	41.95 $\pm$ 2.92
F	42.956
P	0.001

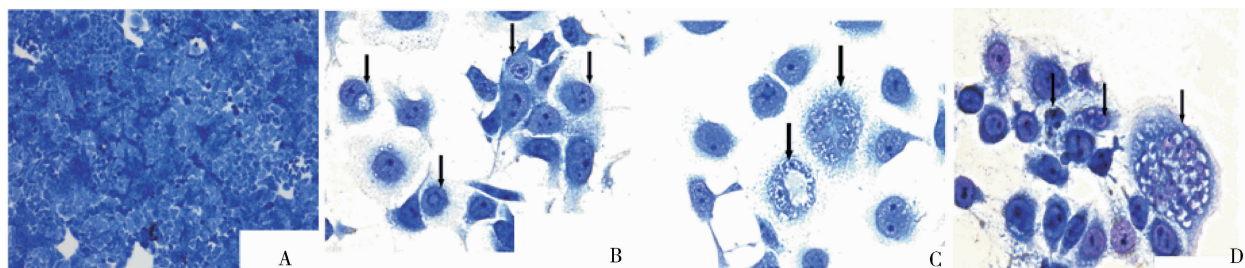


图 2 各实验组瑞氏染色细胞凋亡情况

A. 正常组 (×40); B. 20 μmol/L ZnppIX 组 (×400); C. 5-FU 组 (×400); D. 80 μmol/L ZnppIX 组 (×400)

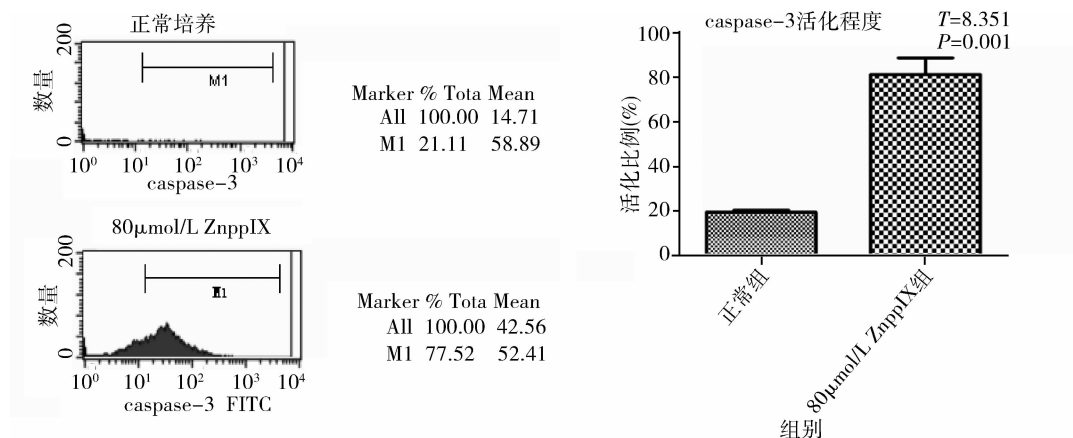


图 3 各实验组 caspase-3 流式检测结果

凋亡作用。本实验在凋亡早期细胞中 (Annexin V⁺/PI⁻), 20 μmol/L ZnppIX 组 (25.63% ± 6.52%) 及 80 μmol/L ZnppIX (22.48% ± 5.59%) 组显著高于 5-FU 组 (12.89% ± 4.42%, P 均 < 0.05), 但 20 μmol/L ZnppIX 组与 80 μmol/L ZnppIX 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在中晚期凋亡细胞 (Annexin V⁺/PI⁺) 中, 20 μmol/L ZnppIX 组 (25.17% ± 5.53%) 显著低于 5-FU 组 (39.89% ± 6.66%) 及 80 μmol/L ZnppIX 组 (41.95% ± 2.92%, P 均 < 0.05), 5-FU 组与 80 μmol/L ZnppIX 组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。提示 5-FU 作用于 ECa109 食管癌细胞, 主要以引起晚期凋亡为主。ZnppIX 抑制 HO-1 表达后, 可以显著增加 ECa109 食管癌细胞的凋亡率, 但低浓度的 ZnppIX (20 μmol/L), 以增加早期凋亡为主, 其凋亡率显著高于 5-FU 组及 80 μmol/L ZnppIX 组 (P 均 < 0.05); 在高浓度 (80 μmol/L ZnppIX), 其在增加 ECa109 食管癌细胞早期凋亡的同时, 也增加了中晚期细胞的凋亡率, 但与 5-FU 组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。低浓度 ZnppIX (20 μmol/L) 与 5-FU 组细胞生长情况差异无统计学意义, 但其凋亡结构发生了变化, 5-FU 组细胞以中

晚期凋亡为主, 而 20 μmol/L ZnppIX 组以早期凋亡为主; 高浓度 ZnppIX (80 μmol/L) 的细胞生长情况低于 5-FU 组, 以早期凋亡细胞增加为主, 但对照 5-FU 组, 不能减少细胞的晚期凋亡率。

Busserolles 等^[7] 在结肠癌中证实, Akt 途径的激活伴随 Bcl-2/Bax 的比例增高对 HO-1 的抗凋亡其促进作用。一氧化碳可能也参与 HO-1 凋亡抑制作用, 其通过激活 p38-MAPK 和水溶性鸟苷酸环化酶起作用^[8,9]。而且一氧化碳不仅阻碍了线粒体细胞色素 C 的释放, 而且也抑制了 p53 的表达^[10]。有丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 细胞信号转导通路在 HO-1 的活化上调中起到非常重要的作用。MAPKs 细胞信号转导通路包括 ERK1/2 (extracellular signal-regulated kin)、JNK/SPAK (c-Jun N-terminal kinase)、p38 及 ERK5/BMK1 (big mitogen activated protein kinase) 通路。在各种刺激因子的作用下, 细胞内 HO-1 及 MAPK 的表达量均有所增加, 且与酪氨酸磷酸化相关^[11]。Lu 等^[12] 研究表明, 应用激动剂激活 ERK 和 p38 信号通路可引起 HO-1 的表达增加。但其改变并不一定直接参与诱导 HO-1 的活化上调。应用人

转化生长因子-1(TGF- β 1)治疗肺癌细胞 A549,激活了 ERK1/2 及 p38 MAPKs 通路。但通过药物单纯抑制 p38 α 后,HO-1 mRNA 的表达量有所下降^[13]。本研究进一步表明在诱导细胞凋亡的过程中,有 caspase-3 的参与($P < 0.05$),提示与 Fas 诱导的细胞凋亡相关。研究显示,核因子 E2 相关因子 2(Nrf2)在大多数恶性肿瘤中表达升高,其主要的靶蛋白是 HO-1。Nrf2-HO-1 轴在肿瘤微环境中具有重要作用,其可以促进肿瘤的生长、转移、耐药等,是潜在的治疗靶点^[14]。在肿瘤细胞缺氧的环境下,Nrf2 和缺氧诱导因子 HIF-1 同时表达提高,shRNA 抑制 Nrf2 后,HIF-1 表达下降,揭示 HIF-1 α 可能是 Nrf2 的一个下游靶点,与食管癌细胞的转移相关。肿瘤细胞位于缺氧的环境中,Nrf2 表达的增加可以促进肿瘤的增殖和耐药。

正常组织细胞 HO-1 可起到维持细胞稳态、降低氧化损伤、削弱炎症反应的作用。而在肿瘤细胞中,HO-1 的表达却与肿瘤的扩散转移、抗凋亡作用有密切联系。由于 HO-1 具有在体内极易被快速诱导合成的特点,HO-1 可作为潜在的抗肿瘤治疗靶点,对与临床抗肿瘤治疗很有意义。表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)是茶叶的主要活性成分之一,具有抗增殖、抗氧化、抗诱变等作用。当癌细胞暴露于 EGCG,发现过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR α)表达增加,并呈剂量依赖性。当使用 PPAR α 激动剂安妥明可以抑制 HO-1 的表达,可以增加癌细胞对 EGCG 的敏感度。而安妥明也可以通过过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR α)引起 HO-1 基因表达的下降低, Nrf2 信号通路参与其中^[15]。虾青素(ATX)通过激活 ERK1/2 通路可以诱导 HO-1 的表达上调,并呈时间依赖性和剂量依赖性^[16]。这些研究都为进一步以 HO-1 作为治疗靶点的应用指明了方向。

参考文献

- Allum WH, Stenning SP, Bancewicz J, *et al.* Long-term results of a randomized trial of surgery with or without preoperative chemotherapy in esophageal cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(30): 5062-5067
- Muller RM, Taguchi H, Shibahara S. Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene[J]. Biol Chem, 1987, 262(14): 6795-6802
- Jozkowicz A, Was H, Dulak J, *et al.* Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? [J]. Antioxid Redox Signal, 2007, 9(12): 2099-2117
- 张健, 马德华, 朱成楚, 等. 血红素加氧酶-1 在食管癌中的表达及与微血管生成的关系[J]. 现代实用医学, 2012, 24(3): 250-253
- 夏利龙, 朱成楚, 陈保富, 等. 血红素加氧酶-1 对食管癌细胞株 Eca109 增殖及凋亡作用的影响[J]. 医学研究杂志, 2013, 42(8): 60-63
- Petrache I, Otterbein LE, Alam J, *et al.* Heme oxygenase-1 inhibits TNF- α induced apoptosis in cultured fibroblasts[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 278(2): L312-319
- Busserolles J, Megias J, Terencio MC, *et al.* Heme oxygenase-1 inhibits apoptosis in Caco-2 cells via activation of Akt pathway[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2006, 38(9): 1510-1517
- Kim HP, Wang X, Nakao A, *et al.* Caveolin-1 expression by means of p38 beta mitogen activated protein kinase mediates the antiproliferative effect of carbon monoxide[J]. Proc Natl Acad Sci, 2005, 102(32): 11319-11324
- Cherrington JM, Strawn LM, Shawver LK. New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents[J]. Adv Cancer Res, 2000, 79: 1-38
- Fang J, Sawa T, Akaike T, *et al.* Enhancement of chemotherapeutic response of tumor cells by a hemeoxygenase inhibitor, pegylated zinc protoporphyrin[J]. Int J Cancer, 2004, 109(1): 1-8
- Masuya Y, Hioki K, Tokunaga R, *et al.* Involvement of the tyrosine phosphorylation pathway in induction of human heme oxygenase-1 by hemin, sodium arsenite and cadmium chloride[J]. Biochem, 1998, 124(3): 628-633
- Lu TH, Lambrecht RW, Pepe J, *et al.* Molecular cloning, characterization, and expression of the chicken heme oxygenase-1 gene in transfected primary cultures of chick embryo liver cells[J]. Gene, 1998, 207(7): 177-186
- Ning W, Song R, Li C, *et al.* TGF- β 1 stimulates HO-1 via the p38 mitogen-activated protein kinase in A549 pulmonary epithelial cells[J]. Lung Cell Mol Physiol, 2002, 283(5): 1094-1102
- Ooi A, Dykema K, Ansari A, *et al.* CUL3 and NRF2 mutations confer an NRF2 activation phenotype in a sporadic form of papillary renal cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2013, 73(7): 2044-2051
- Shuai W, Bethany NH, Jundong Z, *et al.* Clofibrate induces heme oxygenase 1 expression through a PPAR α -independent mechanism in human cancer cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 32(5): 1255-1264
- 王洪权, 王玉敏, 赵伟丽, 等. 虾青素通过 ERK1/2 通路诱导血红素加氧酶-1 表达[J]. 中国老年学杂志, 2013, 12(33): 6210-6212 (收稿日期: 2015-01-04) (修回日期: 2015-01-23)