

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.26.004  
文章编号: 1005-8982 (2018) 26-0022-08

## 氯硝柳胺联合顺铂抑制肾上腺皮质癌的实验研究\*

王敏捷<sup>1</sup>, 王尉<sup>2</sup>, 朱沂<sup>2</sup>, 赵旭<sup>2</sup>, 胡卫列<sup>2</sup>

(1. 解放军第 422 医院 泌尿外科, 广东 湛江 524009; 2. 广州军区广州总医院 泌尿外科, 广东 广州 510010)

**摘要: 目的** 研究氯硝柳胺和低剂量顺铂联合应用对人肾上腺皮质癌 SW-13 细胞株增殖、凋亡, 以及迁移力、侵袭力的影响, 并探讨其作用机制。**方法** 体外培养 SW-13 细胞, CCK-8 法检测氯硝柳胺和不同浓度顺铂对细胞增殖的影响。设对照组、氯硝柳胺组、顺铂组、联合用药组, 分别用 Annexin V/PI 和吖啶橙/溴化乙锭 (AO/EB) 染色检测细胞凋亡率的变化, Transwell 实验和细胞划痕实验检测细胞侵袭、迁移能力的变化, Western blot 检测 B 细胞淋巴瘤因子 2 (Bcl-2)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 3 (Caspase-3)、波形蛋白 (Vimentin)、E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 表达的变化。**结果** 氯硝柳胺增强顺铂对 SW-13 细胞增殖的抑制作用。Annexin V/PI 和 AO/EB 染色结果表明, 与联合用药组比较, 氯硝柳胺、顺铂促进细胞凋亡 ( $P < 0.05$ )。Transwell 和划痕实验结果表明, 与联合用药组比较, 氯硝柳胺、顺铂降低 SW-13 细胞的侵袭能力 ( $P < 0.05$ )。Western blot 检测结果表明, 与联合用药组比较, 氯硝柳胺、顺铂抑制 Bcl-2、Vimentin 的表达, 促进 Caspase-3、E-cadherin 的表达 ( $P < 0.05$ )。**结论** 氯硝柳胺能够增强低剂量顺铂对 SW-13 细胞增殖的抑制作用, 促进细胞凋亡, 抑制侵袭及迁移能力, 可能与其抑制 Bcl-2、Caspase-3、E-cadherin、Vimentin 的表达有关。

**关键词:** 氯硝柳胺; 顺铂; SW-13; 细胞增殖; 细胞凋亡

**中图分类号:** R736.6

**文献标识码:** A

## Study on inhibitory effect of Niclosamide combined with cisplatin on adrenocortical carcinoma\*

Min-jie Wang<sup>1</sup>, Wei Wang<sup>2</sup>, Yi Zhu<sup>2</sup>, Xu Zhao<sup>2</sup>, Wei-lie Hu<sup>2</sup>

(1. Department of Urology, No. 422 Hospital of PLA, Zhanjiang, Guangdong 524009, China;

2. Department of Urology, Guangzhou General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou, Guangdong 510010, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of Niclosamide combined with low-dosage cisplatin on the proliferation, apoptosis, migration and invasion of human adrenocortical carcinoma SW-13 cell line and its potential mechanism. **Methods** SW-13 cells were cultured *in vitro*. CCK-8 method was used to detect the influence of Niclosamide and different concentrations of cisplatin on cell proliferation. There were four groups: a control group, a Niclosamide (1  $\mu\text{mol/L}$ ) group, a cisplatin (16  $\text{mg/L}$ ) group, and a combined Niclosamide (1  $\mu\text{mol/L}$ ) plus cisplatin (16  $\text{mg/L}$ ) group. The change of cell apoptosis was detected with Annexin V/PI staining flow cytometry and AO/EB staining method respectively. The changes of cell invasion and migration abilities were detected by Transwell assay and cell scratch assay. Western blot was used to detect the changes of expressions of Bcl-2, caspase-3, E-cadherin and vimentin. **Results** Niclosamide enhanced the inhibitory effect of cisplatin on proliferation of SW-13 cells ( $P < 0.05$ ).

收稿日期: 2017-11-29

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81372744)

[通信作者] 胡卫列, E-mail: huwl-mr@vip.sina.com

The results of Annexin V/PI staining and AO/EB staining showed that the combined medicine group enhanced cell apoptosis rate more significantly than the Niclosamide group and the cisplatin group ( $P < 0.05$ ). Transwell assay showed that compared with the Niclosamide and cisplatin groups, the combined medicine group decreased the invasion ability of SW-13 cells ( $P < 0.05$ ), and cell scratch experiments showed that compared with the Niclosamide and cisplatin groups, the combined medicine group decreased the migration ability of SW-13 cells ( $P < 0.05$ ). Western blot showed that compared with the Niclosamide and cisplatin groups, the combined medicine group more efficiently inhibited the expressions of Bcl-2 and vimentin ( $P < 0.05$ ), promoted the expressions of caspase-3 and E-cadherin ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Niclosamide can enhance the inhibitory effect of low-dosage cisplatin on the proliferation of SW-13 cells, promote cell apoptosis, and inhibit cell invasion and migration abilities. This is probably related to its influence on expressions of Bcl-2, caspase-3, E-cadherin and vimentin.

**Keywords:** Niclosamide; cisplatin; SW-13; cell proliferation; cell apoptosis

顺铂是肾上腺皮质癌常用的化疗药物之一<sup>[1-2]</sup>, 大剂量应用易诱发骨髓抑制、肾功能损害, 并产生耐药性, 降低疗效<sup>[3]</sup>, 所以降低其剂量, 增强肾上腺皮质癌对其敏感性的研究有非常重要的临床应用价值。最新研究发现, 氯硝柳胺有抗肿瘤活性, 且能增强顺铂对三阴乳腺癌的毒性作用<sup>[4]</sup>。本实验联用氯硝柳胺和顺铂, 研究其对肾上腺皮质癌的疗效及作用机制, 为探索肾上腺皮质癌新的治疗方案提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

**1.1.1 细胞** 人肾上腺皮质癌 SW-13 细胞株 (上海中国科学院细胞库)。

**1.1.2 药物** 氯硝柳胺、顺铂购自美国 Sigma-Aldrich 公司。

**1.1.3 试剂** 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) (美国 MPBIO 公司), 胰酶、双抗购自美国 Gibco 公司, L-15 培养基、磷酸盐缓冲溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 购自上海 Genom 公司, 兔抗人  $\beta$ -actin 抗体、兔抗人 Bcl-2 抗体、Caspase-3 抗体、Vimentin 抗体、E-cadherin 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid, BCA) 蛋白检测试剂盒、二甲亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司, 结晶紫染液 (上海碧云天生物技术公司), 基质胶 (美国 Corning 公司), CCK-8 法细胞增殖检测试剂盒、吖啶橙 / 溴化乙锭 (acridine orange/ethidium bromide AO/EB) 细胞凋亡检测试剂盒、Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒购自日本 DOJINDO 公司。

### 1.2 仪器与设备

8  $\mu$ l 孔 Transwell 小室、流式细胞仪 LSR II 购自

美国 BD 公司, 培养瓶 / 皿、离心管购自美国 Corning 公司, 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), 37 $^{\circ}$ C 无二氧化碳 CO<sub>2</sub> 恒温孵箱 (美国 Thermo 公司)。

### 1.3 SW-13 细胞培育

SW-13 细胞接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 培养液为 L-15 培养基 (含 10% FBS 和 1% 双抗), 37 $^{\circ}$ C 无 CO<sub>2</sub> 恒温孵箱常规培养, 当细胞处于对数生长期时用于实验。

### 1.4 SW-13 细胞增殖检测

将处于对数生长期的 SW-13 细胞按  $2 \times 10^3$  个 / 孔, 接种于 96 孔培养板, 用不同浓度的氯硝柳胺 (4.00、2.00、1.00、0.50 和 0.25  $\mu$ mol/L) 和顺铂 (40、32、24、16、8 和 4 mg/L) 处理细胞, 每组设 3 个复孔。分别于药物处理 24 和 48 h 后加入 10  $\mu$ l CCK-8, 避光 37 $^{\circ}$ C 恒温无 CO<sub>2</sub> 孵箱培养 4 h, 用酶标仪测定 450 nm 处吸光值 (optical density, OD 值)。然后, 根据细胞对 2 种药物的反应, 选取 0.5 和 1.0  $\mu$ mol/L 氯硝柳胺与不同浓度顺铂联合处理细胞 48 h, CCK-8 法检测 OD 值。实验重复 3 次。根据 OD 值计算细胞生存率、半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>) 并绘制细胞生存率曲线。细胞生存率 (%) =  $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{阳性组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

### 1.5 SW-13 细胞凋亡检测

**1.5.1 Annexin V/PI 染色** 将 SW-13 细胞接种于 25 cm<sup>2</sup> 培养瓶, 设对照组、氯硝柳胺组 (1  $\mu$ mol/L 氯硝柳胺)、顺铂组 (16 mg/L 顺铂)、联合用药组 (1  $\mu$ mol/L 氯硝柳胺 + 16 mg/L 顺铂), 过夜培养后用药物处理。48 h 后按 Annexin V/PI 凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 用流式细胞仪检测细胞凋亡。实验重复 3 次。

**1.5.2 AO/EB 染色** 将 SW-13 细胞按  $5 \times 10^5$  个 / 孔接种于 6 孔板。分组同 1.5.1, 过夜培养后进行药物处

理。48 h 后按照 AO/EB 凋亡染色试剂盒说明书进行染色, 荧光显微镜下随机选取 5 个视野观察结果、拍照, 并且计数正常、早期、晚期凋亡细胞数, 取平均值, 根据结果计算凋亡率。实验重复 3 次。

### 1.6 Transwell 实验

将 SW-13 细胞按  $1 \times 10^4$  个 / 室接种于  $8 \mu\text{l}$  孔 Transwell 小室的上室, 分组同 1.5.1。下室加入  $500 \mu\text{l}$  含 30% FBS 的 L-15 培养基, 过夜培养后按分组药物处理, 24 h 后用 0.1% 结晶紫室温下染色 5 ~ 10 min, 显微镜下随机选取 5 个视野观察结果, 并拍照、计数, 计算细胞侵袭力。实验重复 3 次。

### 1.7 细胞划痕实验

将 SW-13 细胞接种于 6 孔板, 密度掌握为过夜培育后板底无空隙, 分组同 1.5.1。过夜培养后用  $100 \mu\text{l}$  枪头垂直于底壁, 力量均匀划痕 3 ~ 5 道。用 PBS 洗去脱落细胞和细胞碎片, 药物处理后 24 h 显微镜下拍照。实验重复 3 次。根据细胞间距计算迁移率, 细胞迁移率 =  $(1 - \text{愈合后间距} / \text{起始间距}) \times 100\%$ 。

### 1.8 Western blot 检测

将 SW-13 细胞接种于  $25 \text{ cm}^2$  培养瓶, 分组同 1.5.1。过夜培养后进行药物处理, 48 h 后按 BCA 蛋白检测试剂盒说明书进行操作, 结果条带用 Image-Pro 软件分析灰度值,  $\beta$ -actin 作为内参蛋白。实验重复 3 次。

### 1.9 统计学方法

数据分析采用 SPSS 15.0 统计软件和 Graphpad Prism 5.0 作图软件, 计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 两两比较用 Dunnett- $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 氯硝柳胺和顺铂抑制 SW-13 细胞的增殖

**2.1.1 氯硝柳胺** 氯硝柳胺各浓度处理组 24 和 48 h 细胞存活率比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞存活率有差别 ( $F = 114.614$ ,  $P = 0.000$ ); ②各浓度处理组细胞生存率有差别 ( $F = 293.883$ ,  $P = 0.000$ ), 随药物浓度的升高对 SW-13 细胞增殖的抑制作用越强; ③各浓度处理组的细胞生存率变化趋势有差别 ( $F = 4.841$ ,  $P = 0.02$ )。氯硝柳胺

24 和 48 h 的  $\text{IC}_{50}$  为 1.825 和  $1.250 \mu\text{mol/L}$ 。见图 1。

**2.1.2 顺铂** 顺铂各浓度处理组 24 和 48 h 细胞存活率比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点的细胞存活率有差别 ( $F = 2135.204$ ,  $P = 0.000$ ); ②各浓度处理组细胞生存率有差别 ( $F = 137.885$ ,  $P = 0.000$ ), 随药物浓度的升高对 SW-13 细胞增殖的抑制作用越强; ③各浓度处理组的细胞生存率变化趋势有差别 ( $F = 159.979$ ,  $P = 0.000$ )。顺铂 24 和 48 h 的  $\text{IC}_{50}$  为 43.94 和  $25.97 \text{ mg/L}$  见图 2。

### 2.2 氯硝柳胺增强顺铂对 SW-13 细胞增殖的抑制作用

顺铂组、顺铂 +  $0.5 \mu\text{mol/L}$  氯硝柳胺组、顺铂 +  $1.0 \mu\text{mol/L}$  氯硝柳胺组在 4、8、16、24、32 和  $40 \text{ mg/L}$  顺铂中 48 h 细胞存活率比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同浓度顺铂的细胞存活率有差别 ( $F = 1072.297$ ,  $P = 0.000$ ), ②各组细胞生存率有差别 ( $F = 201.336$ ,  $P = 0.000$ ), ③各组的细胞生存率变化趋势有差别 ( $F = 37.443$ ,  $P = 0.000$ )。氯硝柳胺可以增强顺铂对 SW-13 的毒性作用, 且随着氯硝柳胺浓度的升高毒性作用越强。见图 3。

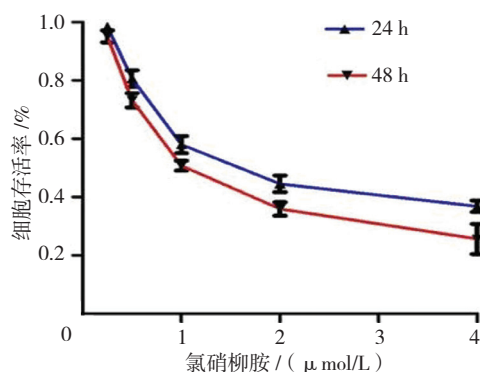


图 1 不同浓度氯硝柳胺对 SW-13 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

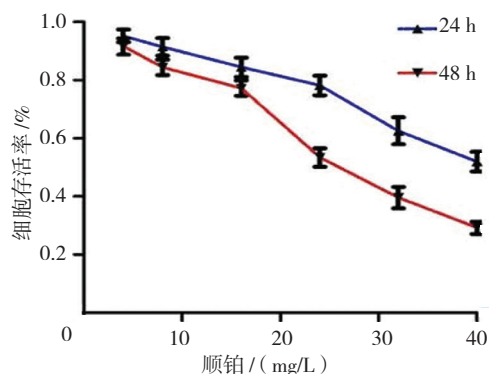


图 2 不同剂量顺铂对 SW-13 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

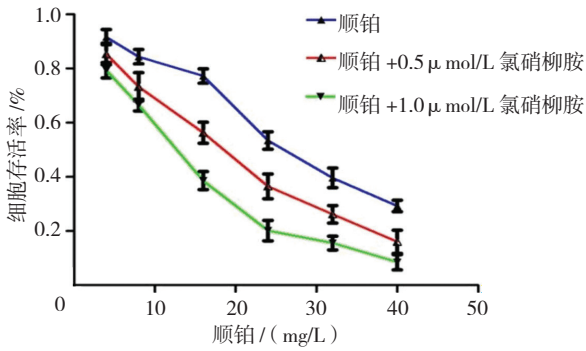


图 3 氯硝柳胺增强顺铂对 SW-13 细胞增殖的抑制作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.3 氯硝柳胺联合低剂量顺铂促进 SW13 细胞凋亡

Annexin V/PI 染色流式细胞仪检测早期凋亡细胞位于右下象限,晚期凋亡细胞位于右上象限(见图 4)。48 h 对照组、氯硝柳胺组、顺铂组、联合用药组细胞总凋亡率分别为 (5.1 ± 3.9) %、(28.5 ± 6.01) %、(26.89 ± 5.11) % 和 (50.53 ± 9.87) %, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=12.354, P=0.007$ )。进一步两两比较经 Dunnett- $t$  检验, 氯硝柳胺组、顺铂组与联合用药组的细胞总凋亡率比较, 差异有统计学

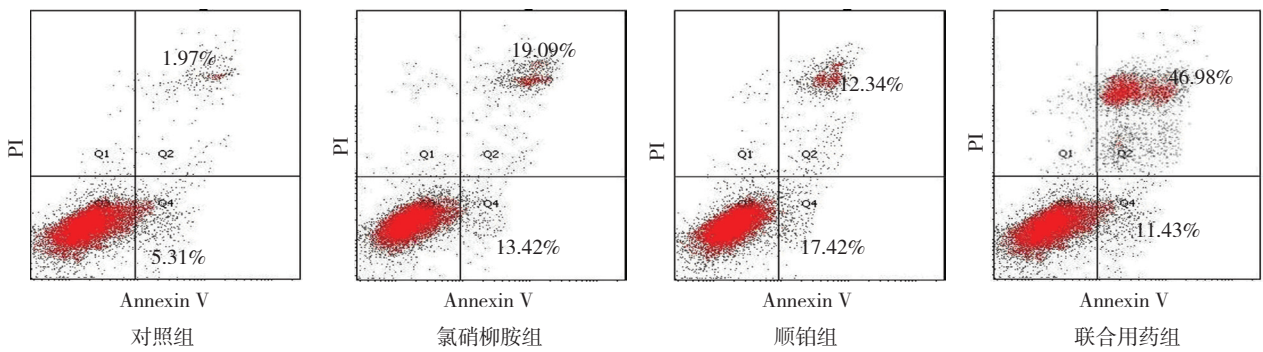
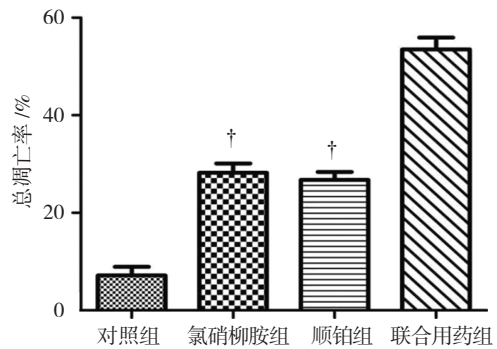


图 4 各组 SW-13 细胞的凋亡

意义 ( $t=3.797$  和  $6.031, P=0.019$  和  $0.004$ ), 氯硝柳胺组、顺铂组较联合用药组低(见图 5)。

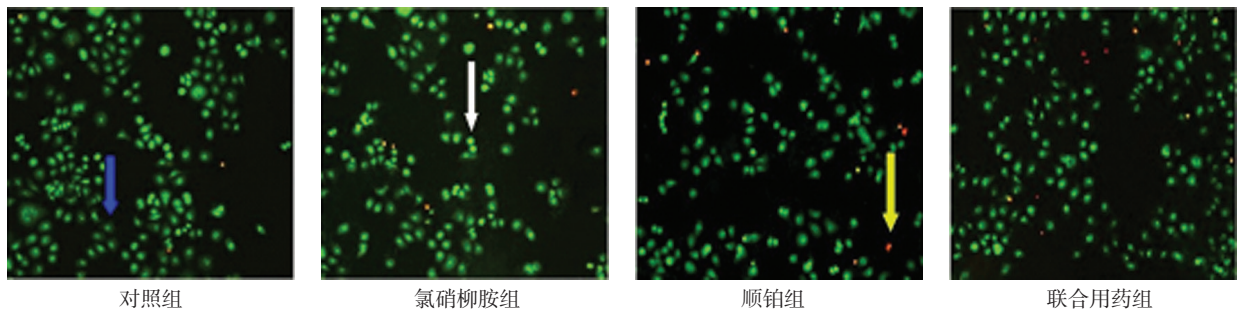
### 2.4 各组 SW-13 细胞凋亡的形态学特征

AO/EB 染色后荧光显微镜下正常 SW-13 细胞呈毛玻璃样, 均匀染绿色; 早期凋亡细胞胞质、胞核呈绿色, 但胞核固缩呈圆珠状; 晚期凋亡细胞呈桔红色, 胞核固缩呈圆珠状(见图 6)。48 h 对照组、氯硝柳胺组、顺铂组、联合用药组的细胞总凋亡率分别为 (5.8 ± 4.2) %、(28.1 ± 5.03) %、(27.1 ± 4.98) % 和 (54.5 ± 8.12) %, 经单因素方差分析, 差异有统计



† 与联合用药组比较,  $P < 0.05$

图 5 各组 SW-13 细胞总凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )



蓝色箭头示正常细胞; 白色箭头示早期凋亡细胞; 黄色箭头示晚期凋亡细胞

图 6 各组 SW-13 细胞凋亡的形态学特征 (AO/EB 染色 × 100)

学意义 ( $F = 22.602, P = 0.000$ )。进一步两两比较经 Dunnett- $t$  检验, 氯硝柳胺组、顺铂组与联合用药组的细胞总凋亡率比较, 差异有统计学意义 ( $t = 5.525$  和  $6.180, P = 0.001$  和  $0.000$ ), 氯硝柳胺组、顺铂组较联合用药组低 (见图 7)。

### 2.5 氯硝柳胺联合低剂量顺铂降低 SW-13 细胞侵袭能力

Transwell 实验结果显示, 药物处理 24 h 后, 对照组、氯硝柳胺组、顺铂组、联合用药组随机 5 个视野平均细胞数分别为 ( $63.5 \pm 9.1$ )、( $20.6 \pm 8.0$ )、( $22.2 \pm 7.8$ ) 和 ( $9.4 \pm 3.6$ ) 个, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 5.341, P = 0.022$ )。进一步两两比较经 Dunnett- $t$  检验, 氯硝柳胺组、顺铂组与

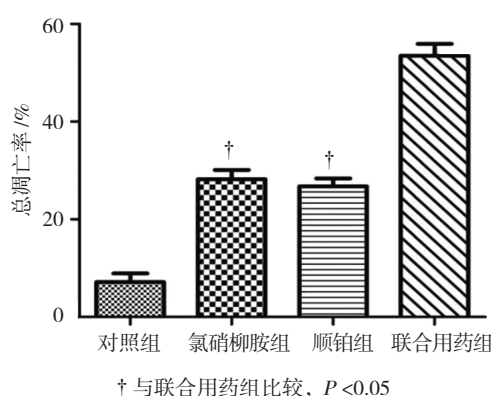


图 7 各组 SW-13 细胞总凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

联合用药组的平均细胞数比较, 差异有统计学意义 ( $t = 2.870$  和  $3.338, P = 0.021$  和  $0.010$ ), 氯硝柳胺组、顺铂组较联合用药组高。见图 8、9。

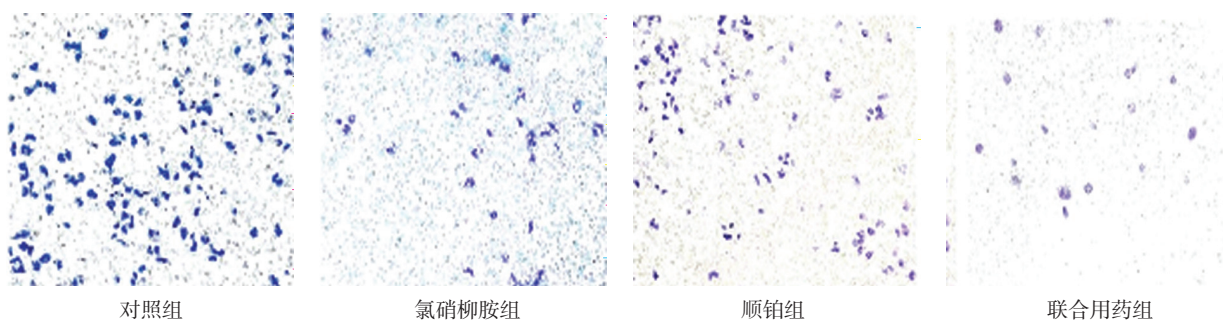


图 8 各组药物作用 24 h 后 SW-13 细胞的侵袭能力 (结晶紫染色  $\times 100$ )

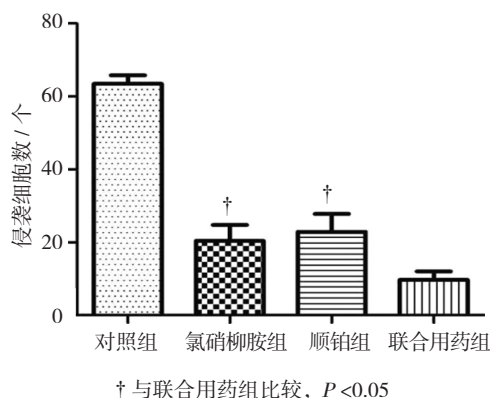


图 9 各组药物作用 24 h 后 SW-13 侵袭细胞数比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 2.6 氯硝柳胺联合低剂量顺铂降低 SW-13 细胞迁移能力

细胞划痕实验结果显示, 药物处理 24 h 后, 对照组、氯硝柳胺、顺铂组、联合用药组迁移率分别为 ( $43.25 \pm 5.48$ )%、( $16.65 \pm 3.26$ )%、( $17.74 \pm 3.13$ )% 和 ( $8.81 \pm 1.25$ )%, 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 9.715, P = 0.013$ )。进一步两两比较经 Dunnett- $t$  检验, 氯硝柳胺组、顺铂组与联合用药组的

迁移率比较, 差异有统计学意义 ( $t = 3.226$  和  $4.589, P = 0.031$  和  $0.010$ ), 氯硝柳胺组、顺铂组较联合用药组高。见图 10、11。

### 2.7 氯硝柳胺联合低剂量顺铂抑制 Bcl-2 的表达, 促进 Caspase-3 的表达

2.7.1 Bcl-2 Western blot 检测结果显示, 对照组、氯硝柳胺组、顺铂组、联合用药组的 Bcl-2 相对表达量分别为 ( $87.91 \pm 8.89$ )、( $75.98 \pm 9.26$ )、( $71.73 \pm 6.77$ ) 和 ( $24.82 \pm 9.13$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 33.716, P = 0.001$ )。进一步两两比较经 Dunnett- $t$  检验, 氯硝柳胺组、顺铂组与联合用药组的 Bcl-2 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $t = 6.811$  和  $7.143$ , 均  $P = 0.002$ ), 氯硝柳胺组、顺铂组较联合用药组高。见图 12、13。

2.7.2 Caspase-3 Western blot 检测结果显示, 对照组、氯硝柳胺组、顺铂组、联合用药组的 Caspase-3 相对表达量分别为 ( $15.48 \pm 5.14$ )、( $27.52 \pm 3.26$ )、( $35.74 \pm 5.08$ ) 和 ( $64.52 \pm 5.09$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 54.406, P = 0.000$ )。进一步两

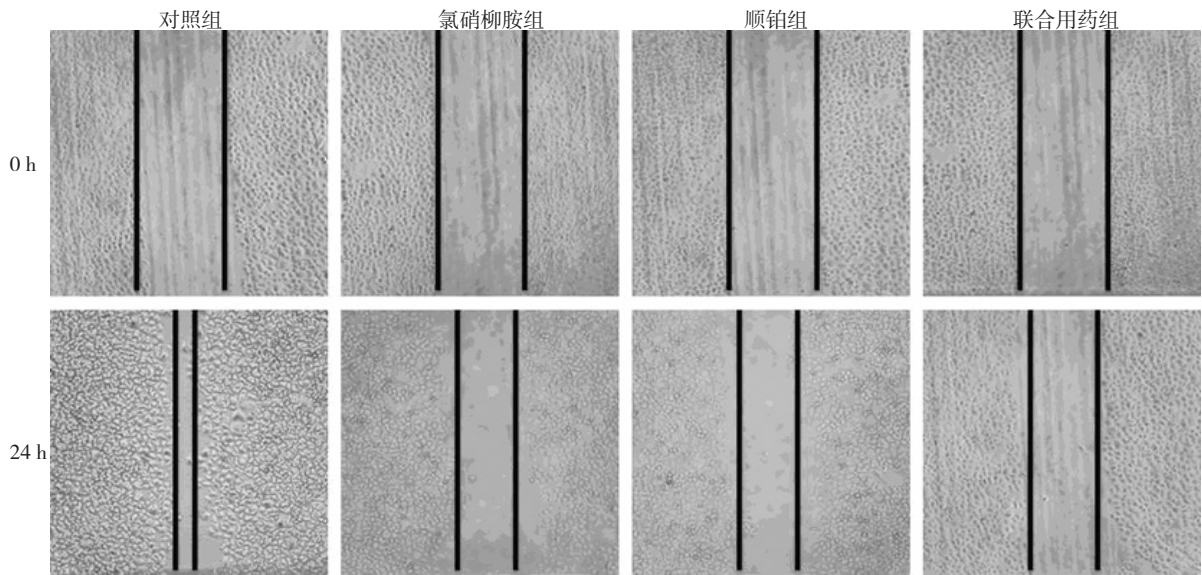


图 10 各组 SW-13 细胞的迁移能力 (×100)

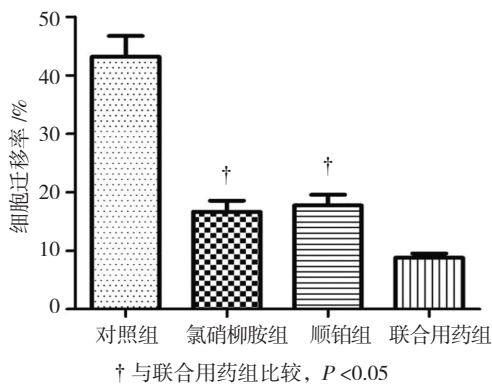


图 11 各组 SW-13 细胞迁移率比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

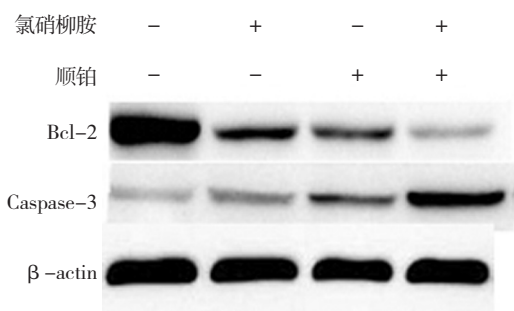


图 12 各组 Bcl-2、Caspase-3 蛋白的表达

组、氯硝柳胺、顺铂组、联合用药组的 E-cadherin 相对表达量分别为 ( $18.58 \pm 6.01$ )、( $9.32 \pm 2.15$ )、( $9.72 \pm 1.78$ ) 和 ( $3.84 \pm 0.513$ ), 经单因素方差分析, 差异有统计学意义 ( $F=12.131, P=0.008$ )。进一步两两比较经 Dunnett-*t* 检验, 氯硝柳胺组、顺铂组与联合用药组的 E-cadherin 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $t=4.846$  和  $5.387, P=0.008$  和  $0.006$ ), 氯硝

两比较经 Dunnett-*t* 检验, 氯硝柳胺组、顺铂组与联合用药组的 Caspase-3 相对表达量比较, 差异有统计学意义 ( $t=10.593$  和  $6.929, P=0.000$  和  $0.002$ ), 氯硝柳胺组、顺铂组较联合用药组低。见图 12、14。

## 2.8 氯硝柳胺联合低剂量顺铂促进 E-cadherin 的表达, 抑制 Vimentin 的表达

### 2.8.1 E-cadherin Western blot 检测结果显示, 对照

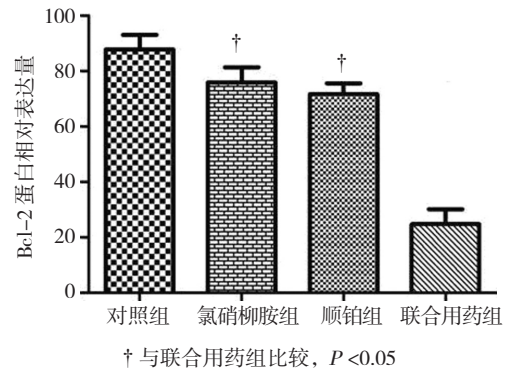


图 13 各组 Bcl-2 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

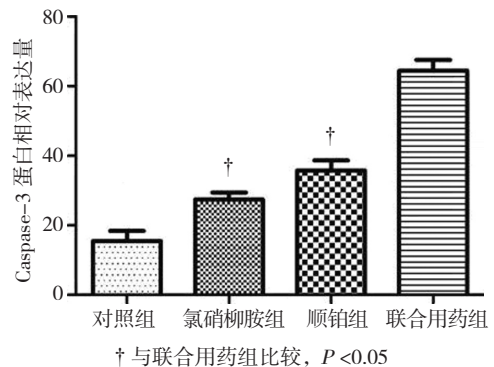


图 14 各组 Caspase-3 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

柳胺组、顺铂组较联合用药组高。见图 15、16。

**2.8.2 Vimentin** Western blot 检测结果显示,对照组、氯硝柳胺、顺铂组、联合用药组的 Vimentin 相对表达量分别为(13.48 ± 2.14)、(19.42 ± 5.27)、(26.64 ± 2.83)和(38.25 ± 8.08),经单因素方差分析,差异有统计学意义( $F=54.406, P=0.000$ )。进一步两两比较经 Dunnett- $t$  检验,氯硝柳胺组、顺铂组与联合用药组的 Vimentin 相对表达量比较,差异有统计学意义( $t=5.514$ 和 $4.304, P=0.005$ 和 $0.013$ ),氯硝柳胺组、顺铂组较联合用药组低。见图 15、17。

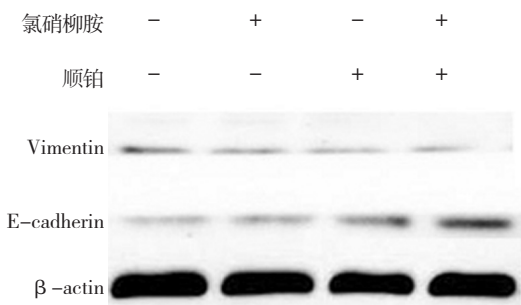


图 15 各组 E-cadherin、Vimentin 蛋白的表达

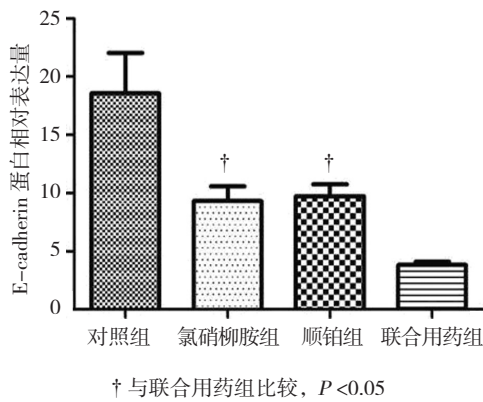


图 16 各组 E-cadherin 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

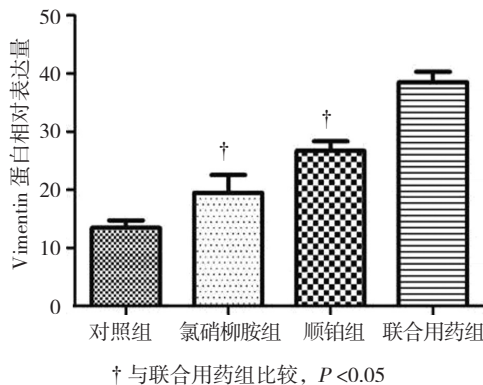


图 17 各组 Vimentin 蛋白表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

### 3 讨论

肾上腺皮质癌是一种起源于肾上腺皮质的恶性肿瘤,病程进展迅速。该病早期诊断困难,导致大多数患者确诊时已属晚期,治疗仍以根治手术为主<sup>[5]</sup>。由于缺乏有效的辅助治疗手段,使该病预后极差,病死率达 40%<sup>[6]</sup>。因此,为有效提高肾上腺皮质癌患者的生存率,手术联合药物治疗是一项重要的研究课题。

顺铂是临床治疗肾上腺皮质癌依托泊苷 + 顺铂 + 表柔比星 + 米托坦方案的重要成分,但大剂量顺铂诱发的骨髓抑制、肾功能损害等副作用严重影响其临床应用,而且随着顺铂剂量的增大,能够明显增加其耐药率<sup>[7]</sup>,所以降低顺铂的剂量,增强肾上腺皮质癌细胞对顺铂敏感性的研究有非常重要的临床应用价值。

在细胞增殖实验中发现,氯硝柳胺和不同浓度的顺铂联合作用于 SW-13 细胞后,可以提高顺铂对 SW-13 细胞的毒性作用,对低剂量顺铂的杀伤作用促进尤为明显。在凋亡实验中发现,氯硝柳胺增强低剂量顺铂抑制 SW-13 细胞的增殖作用与促进细胞凋亡相关,联合用药组细胞凋亡率达 50.53%,较氯硝柳胺和顺铂组的 28.5% 和 26.89% 提高。AO/EB 凋亡实验中不仅进一步证实该促凋亡作用,而且能直观地观察细胞凋亡的形态学变化。在细胞凋亡过程中, Bcl-2 家族成员起至关重要的作用。Bcl-2 是细胞凋亡的负调节因子,受到外界刺激时能保护细胞免于凋亡<sup>[8]</sup>,而活化的 Caspase-3 是启动细胞凋亡的标志。Western blot 检测结果显示,联合用药组的 Bcl-2 蛋白表达水平较氯硝柳胺组、顺铂组明显抑制,而 Caspase-3 表达较氯硝柳胺组、顺铂组升高。说明氯硝柳胺联合低剂量顺铂有可能是通过抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达和促进凋亡启动蛋白 Caspase-3 的表达,来发挥促进细胞凋亡的作用,并通过促进凋亡,抑制 SW-13 细胞的增殖。通过 Transwell 实验和细胞划痕实验证实,氯硝柳胺和顺铂联合应用可以降低 SW-13 细胞的侵袭和迁移能力,联合用药组较氯硝柳胺组、顺铂组对 SW-13 细胞侵袭和迁移能力的抑制作用更明显。研究发现,上皮间质转化参与多种肿瘤的浸润、转移,是肿瘤侵袭、转移的一个重要分子机制<sup>[9]</sup>。肿瘤细胞 E-cadherin 的缺失是促进肿瘤转移的重要表现<sup>[10]</sup>,随着 E-cadherin 表达减少, Vimentin 蛋白表达增加,肿瘤恶性程度增加<sup>[11]</sup>。通过 Western blot 检测发现,联合用药组较氯硝柳胺组、顺铂组可以明显抑制

Vimentin 的表达, 促进 E-cadherin 的表达, 表明氯硝柳胺和低剂量顺铂联合应用有可能是通过对上皮间质转化相关蛋白表达的影响, 降低 SW-13 细胞的侵袭和迁移能力。

细胞的增殖和凋亡都是多基因调控的复杂过程。研究发现, 氯硝柳胺可以通过抑制 Wnt/ $\beta$ -catenin、mTORC1、STAT3、NF- $\kappa$ B、Notch、HEDGEHOG 等信号通路, 发挥抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡的作用<sup>[12-14]</sup>。已知外在的死亡受体通路或内在的线粒体通路都可以促进顺铂诱导的细胞凋亡, 在此过程中有多种蛋白质参与, 如 JNK 信号通路蛋白、p53、抗凋亡蛋白及 Bcl-2 家族蛋白<sup>[15]</sup>。因此, 氯硝柳胺与顺铂联用的抗肿瘤机制是相当复杂的过程, 仍需进一步实验证明。

综上所述, 本研究在体外联合氯硝柳胺和低剂量顺铂作用于 SW-13 细胞, 通过对其细胞增殖、凋亡, 以及细胞侵袭力和迁移能力的多角度观察, 认为氯硝柳胺和低剂量顺铂联合应用可以抑制 SW-13 细胞增殖, 促进细胞凋亡, 降低其侵袭和迁移能力。并且这种抑制增殖和促进凋亡作用是通过抑制 Bcl-2 的表达, 促进 Caspase-3 的表达实现的, 同时氯硝柳胺和低剂量顺铂联合应用通过对 Vimentin 和 E-cadherin 的表达影响, 降低 SW-13 细胞的侵袭和迁移能力。希望通过本研究可以对肾上腺皮质癌的治疗提供理论支持, 在提高顺铂的抗肿瘤作用的同时, 降低由于大剂量应用顺铂而造成的副作用和细胞耐药。

#### 参 考 文 献:

- [1] RUTTER C E, PARK H S, CORSO C D, et al. Addition of radiotherapy to adjuvant chemotherapy is associated with improved overall survival in resected pancreatic adenocarcinoma: an analysis of the national cancer data base[J]. *Cancer*, 2015, 121(23): 4141-4149.
- [2] POSTLEWAIT L M, ETHUN C G, TRAN T B, et al. Outcomes of adjuvant mitotane after resection of adrenocortical carcinoma: a 13-institution study by the US adrenocortical carcinoma group[J]. *Journal of the American College of Surgeons*, 2016, 222(4): 480-490.
- [3] SHEN Z, QIN L, XU T, et al. Chloroquine enhances the efficacy of cisplatin by suppressing autophagy in human adrenocortical carcinoma treatment[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2016, 10(5): 1035-1045.
- [4] LIU J, CHEN X, WARD T, et al. Combined niclosamide with cisplatin inhibits epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in cisplatin-resistant triple-negative breast cancer[J]. *Tumor Biology*, 2016, 37(7): 9825-9835.
- [5] MARGONIS G A, KIM Y, TRAN T B, et al. Outcomes after resection of cortisol-secreting adrenocortical carcinoma[J]. *The American Journal of Surgery*, 2016, 211(6): 1106-1113.
- [6] GHORAYEB N E, RONDEAU G, LATOUR M, et al. Rapid and complete remission of metastatic adrenocortical carcinoma persisting 10 years after treatment with mitotane monotherapy[J]. *Medicine*, 2016, 95(13): e3180-e3181.
- [7] 吕雨虹, 陈庆, 赵娟, 等. 转染白细胞介素 18 基因通过下调多药耐药基因表达增强顺铂对 C6 胶质瘤细胞毒作用 [J]. *中国现代医学杂志*, 2016, 26(10): 20-24.
- [8] RISBERG K, REDALEN K R, SONSTEVOLD L, et al. Pro-survival responses to the dual inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 family proteins and mTOR-mediated signaling in hypoxic colorectal carcinoma cells[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16(1): 531-532.
- [9] AKHTAR K, ARA A, SIDDIQUI S A, et al. Transition of Immunohistochemical expression of E-cadherin and vimentin from premalignant to malignant lesions of oral cavity and oropharynx[J]. *Oman Med J*, 2016, 31(3): 165-169.
- [10] 张广伟, 朱朝阳, 李铁强, 等. 可溶性 E 钙蛋白与膀胱尿路上皮癌的相关性 [J]. *中国现代医学杂志*, 2013, 23(17): 21-24.
- [11] VARGAS D A, SUN M, SADYKOV K, et al. The Integrated role of Wnt/ $\beta$ -catenin, n-glycosylation, and e-cadherin-mediated adhesion in network dynamics[J]. *PLoS Computational Biology*, 2016, 12(7): e1005007-e1005008.
- [12] LIN C K, BAI M Y, HU T M, et al. Preclinical evaluation of a nanoformulated antihelminthic, niclosamide, in ovarian cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8993-9006.
- [13] CIRCU M L, DYKES S S, CARROLL J, et al. A novel high content imaging-based screen identifies the anti-helminthic niclosamide as an inhibitor of lysosome anterograde trafficking and prostate cancer cell invasion[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e146931-e146932.
- [14] TOMIZAWA M, SHINOZAKI F, MOTOYOSHI Y, et al. Niclosamide suppresses migration of hepatocellular carcinoma cells and downregulates matrix metalloproteinase-9 expression[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(6): 3515-3518.
- [15] 卞震炯, 杨冬花. 益气温阳活血方对慢性心力衰竭心室重塑患者外周血单个核细胞 Bax/Bcl-2 表达的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2015, 25(34): 6-9.

(童颖丹 编辑)