

· 论著 ·

红霉素对钾离子通道 HERG 高表达癌细胞的增殖抑制及其与化疗药物的协同作用

陈淑珍 张胜华 弓建华 甄永苏

【摘要】 目的 研究红霉素对钾离子通道 HERG 高表达癌细胞的增殖抑制及其与化疗药物的协同作用。**方法** 采用 Western 印迹、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法、流式细胞术、细胞黏附实验以及明胶酶谱法观察红霉素对肿瘤细胞的作用。**结果** HERG 钾通道在人结肠癌 HT-29 细胞和小鼠结肠癌 C26 细胞中均有表达,和 HERG 钾通道高表达对照神经母细胞瘤 SH-SY5Y 相比,在 HT-29 细胞中表达量较高。红霉素对 HT-29 细胞和 C26 细胞的增殖具有不同程度的抑制作用,呈浓度依赖性。红霉素能将 HT-29 细胞阻滞于 G₂/M 期,并引起明显的 Sub G₁ 峰。红霉素对 HT-29 细胞黏附于 I 型胶原具有明显的抑制作用,存在明显的剂量-效应关系。红霉素能抑制肿瘤细胞释放明胶酶 MMP-2。红霉素与长春新碱协同抑制小鼠 C26 细胞的增殖。长春新碱单用以及长春新碱与红霉素 (50 μmol/L) 联用的 IC₅₀ 分别为 62.65 nmol/L 和 4.68 nmol/L。红霉素与紫杉醇、羟基喜树碱联用亦显示协同作用。**结论** 红霉素在能抑制钾离子通道 HERG 高表达癌细胞 HT-29 的增殖,并能诱导肿瘤细胞凋亡。红霉素与长春新碱等化疗药物显示协同作用。

【关键词】 红霉素; 肿瘤浸润; 凋亡; 钾离子通道

Erythromycin inhibits the proliferation of HERG K⁺ channel highly expressing cancer cells and shows synergy with anticancer drugs CHEN Shu-zhen, ZHANG Sheng-hua, GONG Jian-hua, ZHEN Yong-su. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing, 100050, China

Corresponding author: ZHEN Yong-su, Email: zhenys@public.bta.net.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effects of erythromycin on the proliferation of the human ether-a-go-go related gene (HERG) K⁺ channel highly expressing cancer cells and its synergy with antitumor chemotherapeutic agents. **Methods** Human fibrosarcoma cell of the line HT-1080, murine colon carcinoma cells of the line C26, human colon carcinoma cells of the line HT-29, human pulmonary epithelial cells of the line A549, and human neuroblastoma cells of the line SH-SY5Y were cultured. Western blotting was used to detect the protein expression of the HERG K⁺ channel protein. Erythromycin, taxol, and vincristine were added into the culture fluid to observe the proliferation of the cancer cells. Collagen I was used to coat 96-well plate, HT-29 cells were put into, and Erythromycin, taxol, and vincristine were added, MTT method was used to examine the cell adhesion. SDS-PAGE was used to detect the secretion of gelatinase. Flow cytometry was used to detect the cell cycle and apoptosis. The coefficient of drug interaction (CDI) was calculated. **Results** HERG K⁺ channel expression was found in both HT-29 human colon carcinoma cells and C26 murine colon carcinoma cells. The expression level in HT-29 cells was higher than that in the positive control SHSY5Y neuroblastoma cells. Erythromycin suppressed the proliferation of HT-29 and C26 cells in a dose-dependent manner. There existed a remarkable G₂/M arrest after the cells were exposed to erythromycin. Induction of apoptosis in HT-29 cells and inhibition of cell adhesion to collagen I were found. Erythromycin inhibited the secretion of MMP-2 from HT-29 cells in a dose-dependent manner. At sub-cytotoxic concentration, erythromycin potentiated the cytotoxicity of vincristine, taxol, and hydroxyl-camptothecin to C26 cells. The IC₅₀ values for vincristine and vincristine plus erythromycin (50 μmol/L) were 62.65 nmol/L and 4.68 nmol/L respectively. **Conclusion** Erythromycin inhibits the proliferation and induces the apoptosis of cancer cells with high HERG K⁺ channel expression. Synergy is found in the combination of erythromycin with other anticancer agents.

【Key words】 Erythromycin; Neoplasm invasiveness; Apoptosis; HERG

基金项目:国家基础研究“973”项目基金资助项目(2002CB513108);美国癌症研究基金会(NFCR)基金资助项目

作者单位:100050 北京,中国医学科学院医药生物技术研究所

通讯作者:甄永苏,Email:zhenys@public.bta.net.cn

红霉素作为大环内酯类抗生素临床应用 40 多年,其抗菌以外的作用日益受到重视。有研究表明,红霉素能延长携带艾氏腹水癌及 P388 白血病的小鼠的生存期,这种抗肿瘤作用产生的机制主要通过增加小白鼠体内白细胞介素-4(IL-4)的水平,从而提高巨噬细胞杀伤肿瘤细胞的活性^[1]。近来研究发现,HERG(the human ether a-gò-gò related genes)钾通道在不同组织源性的肿瘤细胞中均有表达,其表达水平的高低与肿瘤细胞的增殖、凋亡、肿瘤的侵袭和转移等相关^[2-5],也与抗肿瘤药物的化疗敏感性相关^[6]。红霉素具有 HERG 通道阻断作用^[7],许多钾通道阻断剂具有一定的抗肿瘤作用,红霉素作为 HERG 钾通道阻断剂,可能具有抗肿瘤作用,因此本研究探讨红霉素对 HERG 钾通道高表达肿瘤细胞的抗肿瘤作用及增强抑制作用。

材料与方法

一、材料

1. 试剂:琼脂糖为美国 Promega 公司产品;胰蛋白胨、酵母提取物为英国 OXIOD 公司产品;氨苄青霉素、MTT、盐酸为美国 Sigma 公司产品;抗 HERG 的抗体(sc-15968)购自美国 Santa Cruz 公司,二抗、ECL 发光试剂盒和 SABC 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司;RPMI1640 粉购自美国 GIBCO 公司。

2. 实验仪器:高速低温离心机为 Beckman 公司产品,酶标仪为 BIO-RAD 公司产品,二氧化碳培养箱为 Revco 公司产品,96 孔培养板购自 Costar 公司,显微镜为 COIC 公司产品,超净工作台购自北京昌平长城空气净化工程公司,低温高速离心机为 Eppendorf 公司产品,电转仪及垂直电泳仪为 Pharmacia 公司产品。

二、方法

1. 肿瘤细胞系的培养:人纤维肉瘤 HT-1080 细胞系、小鼠结肠癌 C26 为本室保存,人结肠癌 HT-29 细胞系、人肺上皮细胞癌 A549 细胞系、人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞系由中国医学科学院基础研究所细胞中心提供。所有细胞系均置于 37℃、5% CO₂ 和饱和湿度的培养箱中,以含 10% 的新生牛血清的 RPMI 1640 培养,用 0.25% 胰酶和 0.02% EDTA 每 3~4 d 传代一次,所有细胞均处于对数生长期时进行实验。

2. Western 印迹检测 HERG 通道蛋白表达:收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤两次,用细胞刮刀将细胞收集到 1.5 ml 的离心管中,离心弃上清,加入 400

μl 裂解液(10 μmol/L Tris-HCl pH7.4, 150 μmol/L NaCl, 1% Triton-X 100, 1 mmol/L EDTA, 1 mmol/L EGTA, 0.2 mmol/L Na₃VO₄, 0.2 mmol/L PMSF, 0.5% NP-40, 0.2 U/ml aprotinin) 4℃ 裂解 20 min, 收集细胞裂解液, 16 000 × g 离心 5 min, 收集上清液, 用 Bradford 法测定蛋白含量, 取 50 μg 蛋白用 7.5% 的分离胶进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳。用半干转膜仪将蛋白转移到 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉 TBS 缓冲液(含 0.05% Tween 20)封闭过夜, 用 TBST 洗膜 5 次, 每次 5 min, 加入一抗(抗 HERG 的羊抗体), 室温孵育 2 h, 按上述方法洗膜。加入二抗, 室温孵育 2 h, 洗膜后用 Western 印迹发光剂(ECL, 美国 Santa Cruz 公司)显色, 拍照。

3. 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测细胞增殖作用:取培养 4~5 d、处于对数生长期的 HT-29、C26 细胞各一瓶, 加入适量胰蛋白酶-EDTA 液, 使细胞脱落, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液配成细胞悬液, 经计数后接种于 96 孔板, 每种细胞的细胞数分别为 2500/孔, 3000/孔, 将培养板置于 37℃、5% CO₂ 的温箱中培养 24 h, 每孔加不同浓度药物, 将平板置 37℃、5% CO₂ 温箱中继续培养 48 h, MTT 用 PBS 配成 2 mg/ml 溶液, 每孔加入 50 μl, 于 37℃、5% CO₂ 的温箱中培养 4 h, 吸出上清液, 加入 150 μl DMSO 使甲瓚颗粒溶解, 用平板摇床摇匀 15 min, 于 570 nm 处测定吸光度(A)值。细胞数变化百分率以 A 值变化百分率表示^[8]。即 $T/C(\%) = (A_{\text{给药组}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100$ 。

4. 细胞黏附能力的测定:首先将胶原 I 溶于 0.1 mol/L 乙酸(1 mg/ml), 用 I 型胶原 6~10 μg/cm² 包被 96 孔培养板, 4℃ 孵育 16 h, PBS 冲洗 3 次, 3% 灭活的 BSA 37℃ 封闭非特异性结合 1 h, 收集对数生长期的 HT-29 细胞, 在悬浮液中置 37℃、5% CO₂ 2 h, 使细胞膜组分恢复, 以含 0.1% BSA 的 RPMI1640 10% 血清培养液悬浮细胞, 每孔加入 8×10^4 个细胞和不同浓度的药液, 孵箱内 37℃ 孵育 1 h, 弃去培养基, 加入 200 μl/孔 PBS, 抽吸吹打 10 次, 共冲洗 3 遍。以去除未黏附的细胞, 弃去 PBS, 加入 MTT 40 μg/孔, 孵箱孵育 4 h, 弃去 MTT, 纸巾吸尽痕量残留, 用酶标仪于 570 nm 测定吸光值。

5. 明胶酶分泌的检测:以胰蛋白酶-EDTA 消化对数生长期肿瘤细胞, 以 1×10^6 /瓶种于 6 孔培养板中, 过夜后, 加入不同浓度的药物作用 12 h, 以灭菌 PBS(pH 7.4)洗 3 次, 换以无血清 RPMI1640 培养液

培养 1 h, 以 PBS 洗 3 次, 再加入含有不同浓度药物的无血清培养液继续培养 24 h, 制备 10% 分离胶和 5% 浓缩胶, 分离胶中加入终浓度为 1 mg/ml 的明胶, 灌胶及以后电泳操作与普通的 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳相同。收集药物作用后细胞的无血清培养液, 200 × g 低速离心 5 min, 上清液立即使用或 -20℃ 贮存备用。同时对细胞培养板中的细胞计数, 按照细胞数取相应体积的上清 (约 80 ~ 100 μl) 与等体积的上样缓冲液混合 (5% SDS, 20% 蔗糖, 0.2% 溴酚蓝), 上样, 以下按文献方法^[8]进行。

6. 流式细胞术对细胞周期和凋亡的检测: 收集药物作用后的细胞, PBS 洗 2 次, 加入 -20℃ 预冷的 70% 乙醇 4℃ 固定过夜, 离心弃乙醇, PBS 洗 1 次, RNase A (50 μg/ml) 37℃ 消化 45 min, 碘化丙啶 (PI, 50 μg/ml) 4℃ 避光染色 30 min, 过 400 目尼龙网, 流式细胞仪 (Coulter EPICS XL) 检测凋亡及周期变化。

7. 药物联合作用评价^[6]: 两药相互作用指数 (coefficient of drug interaction, CDI) 的计算公式为: $CDI = AB / (A \times B)$ 。采用 MTT 法, AB 为两药联用组与对照组 570 nm 吸光值的比值; A 或 B 是各药物单独使用组与对照组 570 nm 吸光值的比值。当 $CDI < 1$ 时, 两药有协同作用; 当 $CDI < 0.7$ 时, 协同作用非常显著。并同时进行检测。

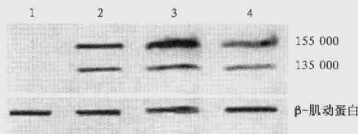
8. 统计学处理: 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Student's t 检验进行统计学检验, IC_{50} 由 Stat 统计软件进行计算。

结 果

1. HERG 钾通道在肿瘤细胞中的表达: 采用肺上皮细胞癌 A549 细胞作为阴性对照, 神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞作为阳性对照, 用针对 C-末端的 HERG 钾通道蛋白抗体作为一抗, 经 Western 印迹分析, 发现两条带, 一条带位于相对分子质量约为 155 000 左右, 另一条带位于相对分子质量为 135 000 附近 (图 1), 同时表明 HERG 通道蛋白在 A549 细胞中基本不表达, 在人结肠癌 HT-29 细胞和小鼠结肠癌 C26 细胞中均有表达, 在 HT-29 细胞中表达最高。

2. 红霉素体外抗肿瘤作用的研究: 不同浓度的红霉素分别与 HT-29 和 C26 细胞一同培养 48 h, 其对细胞生长的抑制程度依次为 HT-29 细胞和 C26 细胞, 其中对 HT-29 细胞的作用较强, 其 IC_{50} 为 106.61 μmol/L (图 2), 对 C26 的作用较弱, 其 IC_{50}

为 523.45 μmol/L。红霉素对肿瘤细胞的抑制作用存在浓度依赖性。



β-肌动蛋白作为内参照: 1: A549 细胞; 2: SH-SY5Y 细胞; 3: HT-29 细胞; 4: C26 细胞

图 1 Western 印迹分析 HERG 钾通道蛋白在肿瘤细胞中的表达情况

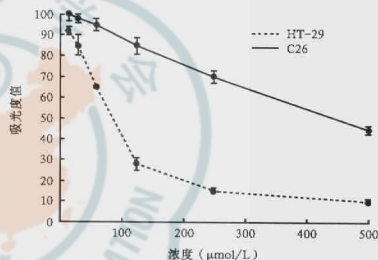


图 2 红霉素对 C26 细胞和 HT-29 细胞增殖的影响

3. 红霉素对 HT-29 细胞周期和凋亡的影响: 表 1 表明, 红霉素与细胞共同培养 12 h, 能将细胞阻滞于 G₂/M 期, 但随着作用时间的延长, 细胞周期时相逐渐恢复正常。表 2 说明红霉素对 HT-29 细胞凋亡的影响。红霉素与 HT-29 共同作用 12 h, 能引起面积为 5.51% 的 Sub G₁ 峰, 作用 24 h, Sub G₁ 期的峰面积为 23.8%, 作用 48 h, Sub G₁ 期的峰面积为 20.2%, 作用超过 24 h, 并不随着时间的延长而凋亡峰面积增加。

4. 红霉素对 HT-29 细胞黏附的影响: 红霉素对 HT-29 细胞黏附于 I 型胶原具有明显的抑制作用, 在浓度为 125 μmol/L, 250 μmol/L 和 500 μmol/L 的抑制率分别为 32%, 38% 和 45%, 随着浓度的增加, 抑制作用增强。

5. 红霉素对肿瘤细胞分泌明胶酶的影响: 如图 3 所示, HT-29 细胞分泌 MMP-9、MMP-2 明胶酶, 红霉素能抑制 MMP-2 的分泌。图 4 表明, 红霉素能浓度依赖性抑制 HT-1080 细胞分泌明胶酶 MMP-9。

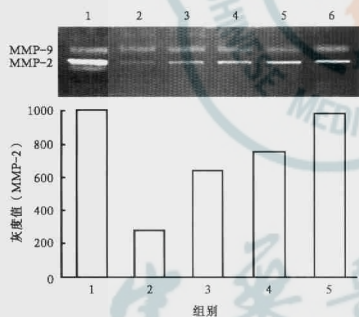
6. 红霉素与抗肿瘤药物的联合应用: 长春新碱单用以及不同浓度的红霉素 (50 和 100 μmol/L) 联用时对 C26 细胞生长的抑制作用的 IC_{50} 值分别为

表 1 红霉素对 HT-29 细胞周期时相分布的影响

时间(h)	组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞周期分布(%)		
			G ₁	S	G ₂ /M
12	对照组	-	53.1	36.3	10.5
	红霉素组	125	47.6	39.0	13.3
		250	60.4	30.9	8.7
		500	7.7	47.3	45.0
24	对照组	-	51.3	38.9	9.8
	红霉素组	125	55.4	36.2	8.4
		250	57.0	35.1	7.8
		500	24.8	37.1	38.0
48	对照组	-	52.9	39.2	5.3
	红霉素组	125	61.4	33.3	7.9
		250	68.0	24.9	7.1
		500	73.8	17.9	8.2

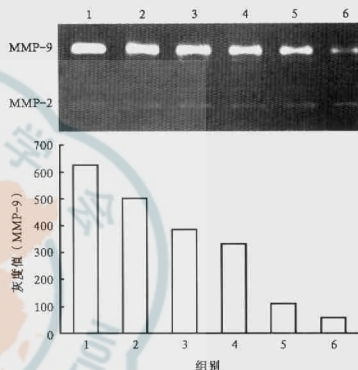
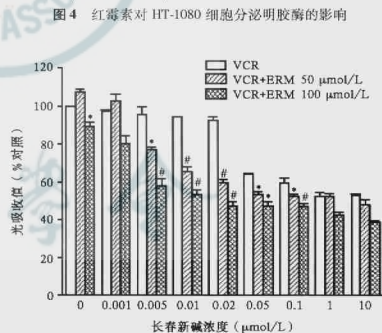
表 2 红霉素诱导 HT-29 细胞凋亡 SubG₁ 的变化

组别	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	SubG ₁ (%)		
		12 h	24 h	48 h
对照组	-	0.59	0.25	1.48
红霉素组	125	0.40	0.91	1.82
	250	0.93	0.25	0.58
	500	5.51	23.8	20.2

图 3 红霉素对 HT-29 细胞分泌膜脂酶的影响
1: HT-1080 细胞, 阳性对照; 2: 600 $\mu\text{mol/L}$; 3: 400 $\mu\text{mol/L}$; 4: 200 $\mu\text{mol/L}$; 5: 100 $\mu\text{mol/L}$; 6: HT-29 细胞

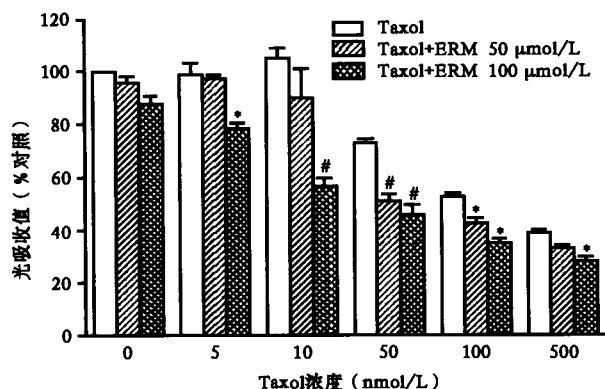
62.65 nmol/L $\pm$ 11.22 nmol/L、4.68 nmol/L $\pm$ 0.69 nmol/L 和 1.35 nmol/L $\pm$ 0.26 nmol/L。紫杉醇单用以及和不同浓度的红霉素(50 和 100 $\mu\text{mol/L}$)联用时对 C26 细胞生长的抑制作用的 IC₅₀ 值分别为 180.26 nmol/L $\pm$ 30.09 nmol/L、119.87 nmol/L $\pm$ 13.94 nmol/L 和 38.46 nmol/L $\pm$ 3.88 nmol/L。羟基喜树碱单用以及和不同浓度的红霉素(50 和 100 $\mu\text{mol/L}$)联用时对 C26 细胞生长的抑制作用的 IC₅₀

值分别为 4.66 $\mu\text{mol/L}$ $\pm$ 1.41 $\mu\text{mol/L}$ 、0.32 $\mu\text{mol/L}$ $\pm$ 0.06 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.07 $\mu\text{mol/L}$ $\pm$ 0.02 $\mu\text{mol/L}$ 。这三种药物与红霉素联用后,在不同浓度条件下 CDI 值均小于 1,有的小于 0.7。这些结果表明,红霉素与长春新碱、紫杉醇、羟基喜树碱联用能协同抑制 C26 细胞的增殖(图 5~7)。

图 4 红霉素对 HT-1080 细胞分泌膜脂酶的影响
1: 对照; 2: 25 $\mu\text{mol/L}$; 3: 50 $\mu\text{mol/L}$; 4: 100 $\mu\text{mol/L}$; 5: 200 $\mu\text{mol/L}$; 6: 400 $\mu\text{mol/L}$ 图 5 长春新碱与红霉素联用对 C26 细胞增殖的影响
VCR: 长春新碱; ERM: 红霉素。* CDI < 0.85, * CDI < 0.7

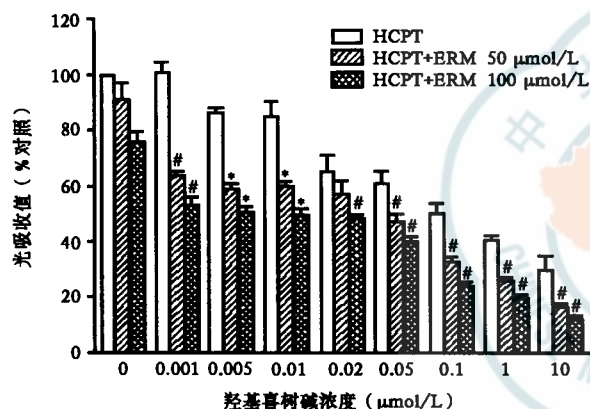
讨 论

红霉素是一种 14 元环的大环内酯类抗生素,主要用于革兰阳性细菌有效,它的作用机制是通过可逆地结合核糖体的大亚基(即 50S 亚基),从而阻断肽链延长过程中的转位反应,抑制细菌的 RNA 依赖的



Taxol: 紫杉醇; ERM: 红霉素。* CDI < 0.85, # CDI < 0.7

图6 紫杉醇与红霉素联用对 C26 细胞增殖的影响



HCPT: 羟基喜树碱; ERM: 红霉素。* CDI < 0.85, # CDI < 0.7

图7 羟基喜树碱与红霉素联用对 C26 细胞增殖的影响

蛋白质的合成。HERG 钾通道在 HT-29 细胞和 C26 细胞中均有表达, 本研究发现红霉素能剂量依赖性地抑制 HERG 钾通道高表达的 HT-29 细胞的增殖, 对 C26 细胞的生长也具有抑制作用。红霉素能将 HT-29 细胞的细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 并引起 HT-29 细胞凋亡。

已有研究发现, 许多抗生素如强力霉素能够影响明胶酶的分泌^[8]。红霉素是一种抗生素, 它能抑制白血病细胞 U937 分泌明胶酶 MMP-9^[9]。HERG 钾通道与肿瘤的侵袭转移相关, 具体机制仍然不清楚。红霉素作为一种 HERG 通道阻断剂, 可能可以影响肿瘤的侵袭和转移能力, 因此本研究探讨了红霉素对肿瘤细胞黏附和明胶酶释放的影响。研究结果表明, 红霉素能剂量依赖性的抑制 HT-29 细胞黏附于 I 型胶原, 同时对 HT-29 细胞释放明胶酶 MMP-2 具有明显的抑制作用。红霉素可能通过抑制肿瘤细胞的黏附和明胶酶的释放而影响肿瘤的侵

袭和转移。这说明, 红霉素通过对 HERG 通道的阻断作用, 影响到钾离子的通透性, 通过细胞内的调节机制, 影响到癌细胞的转移和侵袭的能力, 这与已有的文献^[5,9]报道 HERG 通道可能通过与细胞表面的整合素受体家族相互作用而调节下游信号通路, 影响到细胞的转移特性相一致。

已有研究表明, 红霉素分别与长春新碱、紫杉醇、羟基喜树碱、阿霉素联用对 HT-29 细胞的生长存在明显的协同抑制作用^[6,10], 长春新碱、紫杉醇、羟基喜树碱、阿霉素的化疗敏感性均与 HERG 钾通道的表达相关。本研究进一步发现, 红霉素具有体外抗肿瘤作用, 它与长春新碱、紫杉醇、羟基喜树碱联用对 C26 细胞的增殖抑制作用存在明显的协同作用。

总之, 红霉素在体外能抑制 HERG 钾通道高表达肿瘤细胞的生长, 对肿瘤细胞黏附和明胶酶释放具有抑制作用, 因而可能影响肿瘤的侵袭和转移。红霉素与抗肿瘤药物联用存在明显的协同作用, 可能作为生化调节剂应用于临床, 同时为研究新的生化调节剂提供了思路。

参 考 文 献

- 1 Hamada K, Kita E, Sawaki M, et al. Antitumor effect of erythromycin in mice. *Chemotherapy*, 1995, 41: 59-69.
- 2 Bianchi L, Wible B, Arcangeli A, et al. Herge encodes a K⁺ current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? *Cancer Res*, 1998, 58: 815-822.
- 3 Suzuki T, Takimoto K. Selective expression of HERG and Kv2 channels influences proliferation of uterine cancer cells. *Int J Oncol*, 2004, 25: 153-159.
- 4 Wang H, Zhang Y, Cao L, et al. HERG K⁺ channel, a regulator of tumor cell apoptosis and proliferation. *Cancer Res*, 2002, 62: 4843-4848.
- 5 Lastraioli E, Guasti L, Crociani O, et al. Herge1 gene and HERG1 protein are overexpressed in colorectal cancers and regulate cell invasion of tumor cells. *Cancer Res*, 2004, 64: 606-611.
- 6 Chen SZ, Jiang M, Zhen YS. HERG K⁺ channel expression-related chemosensitivity in cancer cells and its modulation by erythromycin. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, 56: 212-220.
- 7 Volberg WA, Koci BJ, Su W, et al. Blockade of human cardiac potassium channel human ether-a-go-go-related gene (HERG) by macrolide antibiotics. *J Pharmacol Exp Ther*, 2002, 302: 320-327.
- 8 黄云虹, 李毅, 商悦, 等. 强力霉素对实验性小鼠肺纤维化的抑制作用. *中华医学杂志*, 2006, 86: 182-186.
- 9 Hashimoto N, Kawabe T, Hara T, et al. Effect of erythromycin on matrix metalloproteinase-9 and cell migration. *J Lab Clin Med*, 2001, 137: 176-183.
- 10 陈淑珍, 江敏, 甄永苏. HERG 钾通道在肿瘤细胞的表达与阿霉素化疗敏感性的关系及红霉素的调节作用. *癌症*, 2005, 24: 924-929.

(收稿日期: 2006-03-31)

(本文编辑: 朱璠)