# 大黄素联合甲磺酸阿帕替尼通过上调 ACE2-Ang(1-7)-Mas 受体轴抑制胰腺癌细胞增殖的研究Δ

王　婧*,马　晓,尚　昆,林海珊,曹邦伟#(首都医科大学附属北京友谊医院肿瘤科,北京　100050)

中图分类号　R979.1　　文献标志码　A　　文章编号　1672-2124(2021)03-0269-04
DOI　10.14009/j.issn.1672-2124.2021.03.003

**摘　要**　目的:验证大黄素联合甲磺酸阿帕替尼通过上调血管紧张素转换酶 2(ACE2)-血管紧张素(1-7)[Ang(1-7)]-Mas 受体轴抑制胰腺癌细胞增殖的作用及机制。方法:采用四甲基偶氮唑盐(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)比色法检测大黄素、甲磺酸阿帕替尼以及联合用药(大黄素+甲磺酸阿帕替尼)对胰腺癌 PANC-1 细胞增殖能力的影响,以空白处理作为对照。采用酶联免疫吸附试验测定细胞上清液白细胞介素 6(IL-6)、Ang(1-7)水平。采用 Western blot 法和免疫荧光方法检测各实验组细胞 ACE2、Mas 受体蛋白表达情况。结果:加药干预细胞后,大黄素组细胞抑制率为 11.72%,甲磺酸阿帕替尼组的抑制率为 15.94%,联合用药组的抑制率为 28.84%,联合用药组显著高于单药组,差异均有统计学意义($P<0.05$)。甲磺酸阿帕替尼组 IL-6 水平明显低于大黄素组,联合用药组明显低于大黄素组及甲磺酸阿帕替尼组;与 IL-6 相反,大黄素组、甲磺酸阿帕替尼组及联合用药组的 Ang(1-7)水平明显高于对照组,其中联合用药组最高,上述差异均有统计学意义($P<0.01$)。Western blot 法及免疫荧光方法检测结果表明,大黄素组及甲磺酸阿帕替尼组 ACE2 及 Mas 受体蛋白表达水平高于对照组,联合用药组表达最高。结论:大黄素及甲磺酸阿帕替尼单药通过上调 ACE2-Ang(1-7)-Mas 受体轴抑制胰腺癌细胞增殖,两药联合应用具有协同效应。

**关键词**　大黄素;甲磺酸阿帕替尼;胰腺癌;血管紧张素转换酶 2;血管紧张素(1-7)

## Inhibition of Emodin Combined with Apatinib Mesylate on Proliferation of Pancreatic Cancer Cells by Up-Regulating the ACE2-Ang(1-7)-Mas Receptor AxisΔ

WANG Jing, Ma Xiao, SHANG Kun, LIN Haishan, CAO Bangwei (Dept. of Oncology, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT**　OBJECTIVE: To verify the effect and mechanism of emodin combined with apatinib mesylate in inhibiting the proliferation of pancreatic cancer cells by up-regulating the angiotensin converting enzyme 2 (ACE2)-Angiotensin(1-7)[Ang(1-7)]-Mas receptor. METHODS: Methyl Thiazolyl Tetrazolium (MTT) was used to detect the effects of emodin, apatinib mesylate and drug combination (emodin + apatinib mesylate) on the proliferation of PANC-1 cells. Without medicine were took as the control. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to determine the levels of interleukin 6 (IL-6) and Ang(1-7) in the cell supernatant. Western blot method and immunofluorescence method were used to detect the expression of ACE2 and Mas receptor protein in each experimental group. RESULTS: After intervention, the cell inhibition rate of the emodin group, apatinib mesylate group and drug combination group was respectively 11.72%, 15.94% and 28.84%, the drug combination group was significantly higher than the single drug group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The level of IL-6 in the apatinib mesylate group was significantly lower than that in the emodin group, and that in the drug combination group was significantly lower than that in the emodin group and the apatinib mesylate group. In contrast to the level of IL-6, Ang(1-7) in the emodin group, apatinib mesylate group and combination group was significantly higher than that in the control group, and the drug combination group had the highest Ang(1-7), with statistically significant difference ($P<0.01$). The results of Western blot and immunofluorescence showed that the expression levels of ACE2 and Mas receptor protein in the emodin group and apatinib mesylate group were higher than those in the control group, and the expression levels of ACE2 and Mas receptor protein in the drug combination group were the highest. CONCLUSIONS: The monotherapy of emodin and apatinib mesylate inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells by up-regulating the ACE2-Ang(1-7)-Mas receptor axis, and the combination of two drugs has a synergistic effect.

**KEYWORDS**　Emodin; Apatinib mesylate; Pancreatic cancer; Angiotensin converting enzyme 2; Angiotensin(1-7)

Δ 基金项目:北京市临床重点专科(2018-2020);北京市医院管理中心消化内科学科协同发展中心专项经费资助(No. XXT01);首都卫生发展科研专项基金资助(No. 2018-2-2022);首都医科大学科研培育基金(No. PYZ20148)

* 副主任医师,博士。研究方向:消化系统肿瘤的临床及基础研究。Email:wangjing@bfh.com.cn
# 通信作者:主任医师,博士。研究方向:恶性肿瘤的综合诊治。E-mail:oncology@ccmu.edu.cn

胰腺癌是恶性度较高的恶性肿瘤之一，2018 年全球范围内报告了 458 918 例胰腺癌新病例，预计至 2040 年将出现 355 317 例新病例[1]。尽管在胰腺癌的检测和治疗方面取得了进展，但患者 5 年生存率仍然只有 9%。甲磺酸阿帕替尼是我国独立研发的抑制肿瘤新生血管形成的靶向治疗药物，其不仅具有抑制肿瘤新生血管形成的作用，还有抑制肿瘤细胞增殖的作用[2]。本研究拟通过观察大黄素、甲磺酸阿帕替尼以及上述 2 种药物联合应用对胰腺癌细胞增殖能力的影响，探讨其作用机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞株

胰腺癌 PANC-1 细胞株购自江苏凯基生物技术股份有限公司，于含 10%胎牛血清的 1640 培养基传代培养，当细胞处于对数生长期时开始进行实验。

### 1.2 药物与试剂

实验所用大黄素购于美国 Sigma 公司；甲磺酸阿帕替尼购自江苏恒瑞公司；胎牛血清购自 ExCell 公司；1640 培养基购自 Hyclone 公司。

### 1.3 仪器

XD-101 型 $CO_2$ 培养箱（日本 SANYO 公司）；IX51 型生物倒置显微镜（日本 OLYMPUS 公司）；80-2 型台式低速离心机（上海医疗器械股份有限公司医疗设备厂）；WH-2 型振荡器（上海沪西分析仪器厂）；UV-2450 型紫外光度仪（日本 SHIMADZU 公司）；ELx800 型酶标仪（美国 BioTek 公司）。

## 2 方法

### 2.1 分组

本研究共分为对照组、甲磺酸阿帕替尼组、大黄素组及联合用药组（大黄素+甲磺酸阿帕替尼）。实验药物按照特定浓度分别溶于含 10%胎牛血清的 1640 培养基，对照组为不含药物的培养基。

### 2.2 四甲基偶氮唑盐（methyl thiazolyl tetrazolium，MTT）法检测细胞活力

将胰腺癌 PANC-1 细胞铺于 96 孔板内，每孔注入细胞悬液 50 μl（约含 $1\times10^4$ 个细胞），加入 1640 培养液 50 μl。待细胞充分贴壁后进行分组实验。作用 72 h 后，每孔加入 MTT 20 μl，37 ℃孵育 4 h 后吸出上清液，每孔加入二甲基亚砜 150 μl 震荡约 10 min，测量波长为 490 nm 处的吸光度（OD），计算细胞增殖率[3]。

### 2.3 酶联免疫吸附（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）方法测定白细胞介素 6（IL-6）、血管紧张素（1-7）[Ang（1-7）]的表达

分别收集四组细胞的上清液进行检测，选取美国 Rapid Bio 公司 ELISA 试剂盒，按照试剂盒使用说明书检测 IL-6、Ang（1-7）水平[4]。

### 2.4 Western blot 法检测胰腺癌细胞内血管紧张素转换酶 2（ACE2）、Mas 受体蛋白表达水平

将细胞接种于 6 孔板，待细胞贴壁后，按照不同干预组给药处理，置于 37 ℃温箱孵育 24 h。按照经典 Western blot 检测方法，提取细胞总蛋白，测定蛋白浓度，每样品上样 30 g，进行蛋白电泳，电转移到 PVDF 膜上，封闭后顺序加 ACE2、Mas、GAPDH 一抗（1∶1 000）及二抗（1∶5 000），到达反应时间后，检测杂交信号，计算蛋白含量[5]。

### 2.5 免疫荧光细胞化学法测定 ACE2、Mas 受体蛋白表达情况

将胰腺癌细胞接种至 6 孔板中，待其生长融合度达 85%时，更换为无血清培养基继续培养 24 h，然后进行免疫荧光细胞化学染色，观察 ACE2、Mas 受体蛋白表达情况，用激光共聚焦显微镜观察并摄取荧光图像[5]。

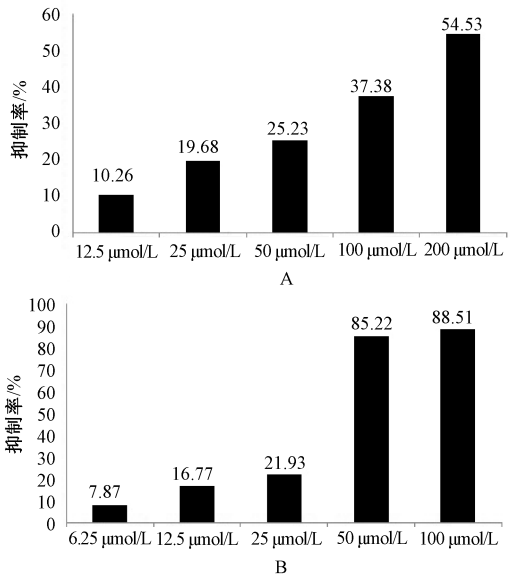
### 2.6 统计学方法

数据均采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析，正态分布者通过两独立样本 $t$ 检验，偏态分布者采用秩和检验；各测定值结果以均数±标准差表示，$P<0.05$ 认为有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 大黄素、甲磺酸阿帕替尼以及联合用药对 PANC-1 细胞增殖能力的影响

分别用不同浓度的大黄素（12.5、25、50、100 及 200 μmol/L）对 PANC-1 细胞进行处理，检测结果显示，大黄素及甲磺酸阿帕替尼单药刺激 PANC-1 细胞，其抑制增殖能力均呈现剂量依赖性，见图 1。根据半数抑制浓度（$IC_{50}$），选择大黄素实验浓度为 100 μmol/L，甲磺酸阿帕替尼实验浓度为 40 μmol/L。加药干预细胞后，大黄素组细胞抑制率为 11.72%，甲磺酸阿帕替尼组的抑制率为 15.94%，联合用药组的抑制率为 28.84%，联合用药组显著高于单药组，差异有统计学意义（$P<0.05$），见图 2。




A. 大黄素；B. 甲磺酸阿帕替尼

A. emodin；B. apatinib mesylate

**图 1 不同浓度大黄素、甲磺酸阿帕替尼对 PANC-1 细胞的增殖抑制作用**

**Fig 1 Inhibition proliferation effect of emodin combined with apatinib mesylate on PANC-1 cell at different concentrations**

### 3.2 大黄素、甲磺酸阿帕替尼以及联合用药组细胞上清液中 IL-6、Ang（1-7）水平的差异

取各组细胞上清液进行检测 IL-6、Ang（1-7）水平，对照

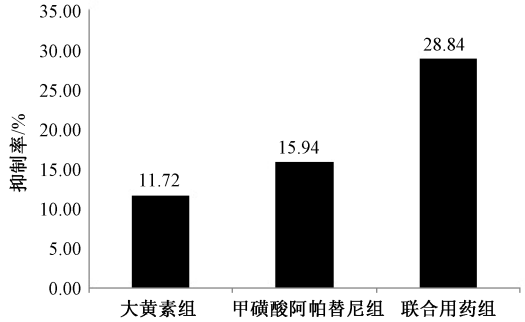



**图 2　不同药物干预对 PANC-1 细胞的增殖抑制作用**

**Fig 2　Inhibition proliferation effect of different drug interventions on PANC-1 cell**

组、大黄素组、甲磺酸阿帕替尼组及联合用药组的 IL-6 水平明显低于对照组，差异均有统计学意义（$P<0.01$），甲磺酸阿帕替尼组显著低于大黄素组，联合用药组显著低于大黄素组及甲磺酸阿帕替尼组；与 IL-6 相反，大黄素组、甲磺酸阿帕替尼组及联合用药组的 Ang(1-7)水平高于对照组，其中联合用药组最高，与对照组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$），见表 1。

**表 1　四组 PANC-1 细胞上清液中 IL-6、Ang(1-7)水平比较（$\bar{x}\pm s$）**

**Tab 1　Comparison of levels of IL-6, Ang(1-7) in the cell supernatant of PANC-1 cell among four groups（$\bar{x}\pm s$）**

| 组别 | IL-6/(pg/ml) | Ang(1-7)/(pg/ml) | $P_{\text{vs. 对照组}}$ |
|---|---|---|---|
| 对照组 | 10.33±0.98 | 29.70±0.26 | |
| 大黄素组 | 8.60±0.25 | 42.07±0.09 | <0.01 |
| 甲磺酸阿帕替尼组 | 4.30±0.17 | 33.43±0.12 | <0.01 |
| 联合用药组 | 2.07±0.64 | 46.79±0.09 | <0.01 |

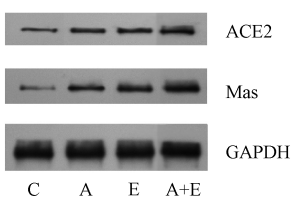
### 3.3　Western blot 方法检测 ACE2、Mas 受体蛋白水平

用大黄素、甲磺酸阿帕替尼等药物干预 PANC-1 细胞后提取细胞蛋白，测定不同组别 ACE2、Mas 受体蛋白水平。检测结果显示，大黄素组及甲磺酸阿帕替尼组 ACE2、Mas 受体蛋白表达水平高于对照组，联合用药组表达最高，结果见表 2、图 3。

**表 2　四组 PANC-1 细胞 ACE2、Mas 受体蛋白水平比较（$\bar{x}\pm s$）**

**Tab 2　Comparison of levels of ACE2 and Mas receptors protein in the cell supernatant of PANC-1 cell among four groups（$\bar{x}\pm s$）**

| 项目 | 对照组 | 甲磺酸阿帕替尼组 | 大黄素组 | 甲磺酸阿帕替尼+大黄素组 |
|---|---|---|---|---|
| ACE2/GAPDH | 0.12 | 0.23 | 0.22 | 0.39 |
| MasI/GAPDH | 0.10 | 0.29 | 0.31 | 0.51 |




C. 对照组；A. 甲磺酸阿帕替尼组；E. 大黄素组；A+E. 甲磺酸阿帕替尼+大黄素组

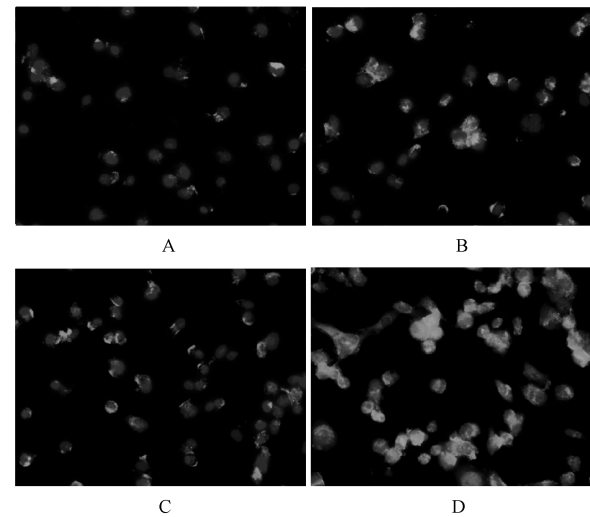
C. control group; A. apatinib mesylate group; E. emodin group; A+E. apatinib mesylate+emodin group

**图 3　四组细胞 ACE2、Mas 受体蛋白表达情况**

**Fig 3　Expression of ACE2 and Mas receptor protein in four groups**

### 3.4　免疫荧光检测 ACE2、Mas 受体蛋白表达水平

Mas 受体阳性表达呈绿色荧光，细胞核呈蓝色荧光；ACE2 表达部位在胰腺癌细胞的胞浆中；Mas 表达部位在胰腺癌细胞膜。大黄素组及甲磺酸阿帕替尼单药组 ACE2 及 Mas 受体表达高于对照组，联合用药组表达明显最高，见图 4—5。

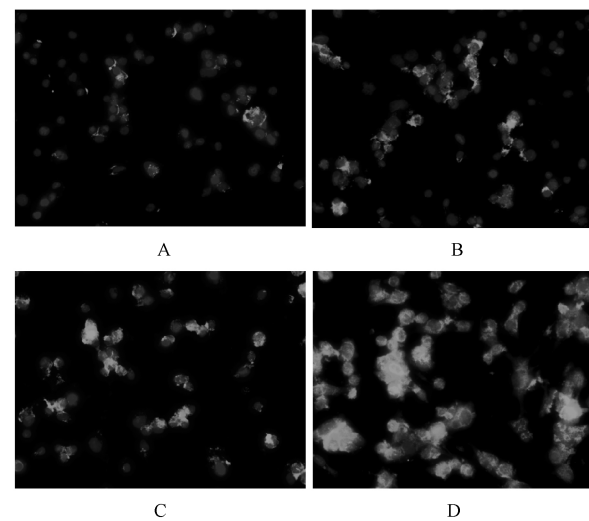



A. 对照组；B. 甲磺酸阿帕替尼组；C. 大黄素组；D. 甲磺酸阿帕替尼+大黄素组

A. control group; B. apatinib mesylate group; C. emodin group; D. apatinib mesylate+emodin group

**图 4　四组细胞 ACE2 蛋白表达情况**

**Fig 4　Expression of ACE2 protein in four groups**




A. 对照组；B. 甲磺酸阿帕替尼组；C. 大黄素组；D. 甲磺酸阿帕替尼+大黄素组

A. control group; B. apatinib mesylate group; C. emodin group; D. apatinib mesylate+emodin group

**图 5　四组 Mas 受体蛋白表达情况**

**Fig 5　Expression of Mas receptor protein in four groups**

## 4　讨论

大多数胰腺癌患者就诊时已是晚期，无法进行手术，目前的治疗以化疗为主，靶向治疗尚未有大的突破[6]。诸多研究结果发现，大黄素能够抑制肿瘤细胞的增殖[7]。其机制包括启动线粒体诱导和内质网应激诱导细胞凋亡[8]；靶向转录调

节因子 NCOR2 和 SerRS 抑制血管内皮生长因子 A 转录和肿瘤血管生成促进肿瘤细胞凋亡[9]；通过灭活 PI3K/Akt 信号通路在体内外逆转耐药[10]；可能通过激活 RIP1/RIP3 轴来诱导肿瘤细胞坏死[11]。因此，大黄素在胰腺癌的治疗中起到重要作用[12]。

甲磺酸阿帕替尼片是我国自主研发的全球首个胃癌靶向药物，其作用机制为高度选择性竞争细胞内血管内皮生长因子受体 2 的 ATP 结合位点，进而阻断下游信号转导通路，抑制肿瘤新生血管生成。课题组前期研究结果发现，甲磺酸阿帕替尼本身对肿瘤细胞有一定的抑制能力[2]。已有研究结果证实，多种中药的提取物对胰腺癌细胞可起到抑制其增殖的作用[13-14]。大黄素是传统中药大黄的主要有效成分之一，能够抑制胰腺癌 PANC-1 细胞增殖，具有促细胞凋亡的作用[15]。本研究观察了大黄素、甲磺酸阿帕替尼单药及二者联合使用对胰腺癌细胞的抑制作用；关于各组 IL-6 水平的比较，甲磺酸阿帕替尼组明显低于大黄素组，联合用药组明显低于大黄素组及甲磺酸阿帕替尼组。IL-6 是核因子 κB 信号传导通路的下游炎症介质，通过激活转录信号转导子和激活子 3，阻断炎症过程中的细胞凋亡，促进肿瘤细胞持续增殖。各用药组 IL-6 水平的下调有助于抑制肿瘤细胞的增殖。

血管紧张素Ⅰ(Ang Ⅰ)、血管紧张素Ⅱ(Ang Ⅱ)均为血管紧张素转换酶 2(ACE2)的作用底物[16]。ACE2 的主要生物学作用是水解 Ang Ⅱ生成 Ang(1-7)[17]。Ang(1-7)通过其特异性受体(为 Mas 原癌基因编码的 G 蛋白耦联受体，Mas 受体)，即 ACE2-Ang(1-7)-Mas 受体轴，在人体多个系统中发挥舒张血管、抗炎、抗凝以及保护血管内皮等作用[5]。既往研究结果证实了 ACE2 在胰腺中的表达及其对胰腺的保护作用[17]。ACE2 可抑制胰腺癌细胞增殖、血管生成和转移[18]。有研究结果认为，在肿瘤组织中存在 ACE2 表达下调甚至缺失，且 ACE2 可抑制肿瘤细胞增殖，可作为一个抑癌基因发挥作用[19]。稳定高表达 ACE2 基因可抑制获得性铂类耐药的非小细胞肺癌细胞增殖[20]。Ye 等[17]亦发现 ACE2 高水平的肝癌患者的生存期相对更长，而低水平的 ACE2 可作用预后差的指标之一。本研究结果显示，大黄素和甲磺酸阿帕替尼均可提高 ACE2、Mas 受体水平，降低 Ang(1-7)水平，实现通过上调 ACE2-Ang(1-7)-Mas 受体轴而发挥抑制胰腺肿瘤的作用。

综上所述，大黄素、甲磺酸阿帕替尼能够通过上调 ACE2-Ang(1-7)-Mas 受体轴，下调 IL-6 水平，抑制胰腺癌细胞增殖，两药联合应用的抑制作用更为明显，可起到协同效应，从而为大黄素和甲磺酸阿帕替尼在临床上的应用提供实验基础。

## 参考文献


[1] Rawla P, Sunkara T, Gaduputi V. Epidemiology of Pancreatic Cancer: Global Trends, Etiology and Risk Factors[J]. World J Oncol, 2019, 10(1): 10-27.

[2] Wu J, Yu J, Wang J, et al. Astragalus polysaccharide enhanced antitumor effects of Apatinib in gastric cancer AGS cells by inhibiting AKT signalling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 100: 176-183.

[3] Pintor AVB, Queiroz LD, Barcelos R, et al. MTT versus other cell viability assays to evaluate the biocompatibility of root canal filling materials: a systematic review[J]. Int Endod J, 2020, 53: 1348-1373.

[4] Dang Z, Su S, Jin G, et al. Tsantan Sumtang attenuated chronic hypoxia-induced right ventricular structure remodeling and fibrosis by equilibrating local ACE-AngII-AT1R/ACE2-Ang1-7-Mas axis in rat[J]. J Ethnopharmacol, 2020, 250: 112470.

[5] Wang J, Liu R, Qi H, et al. The ACE2-Angiotensin-(1-7)-Mas Axis Protects Against Pancreatic Cell Damage in Cell Culture[J]. Pancreas, 2015, 44(2): 266-272.

[6] 尚昆，化怡纯，王婧. 胰腺癌靶向治疗药物的研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析，2017，17(7)：869-871.

[7] 王婧 赵磊，车娟娟，等. 大黄素联合吉西他滨抑制胰腺癌细胞系 PANC-1 细胞增殖能力的研究[J]. 肿瘤预防与治疗，2016，29(3)：139-143.

[8] Ying J, Xu H, Wu D, et al. Emodin induces apoptosis of human osteosarcoma cells via mitochondria- and endoplasmic reticulum stress-related pathways[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(10): 12837-12844.

[9] Zou G, Zhang X, Wang L, et al. Herb-sourced emodin inhibits angiogenesis of breast cancer by targeting VEGFA transcription[J]. Theranostics, 2020, 10(15): 6839-6853.

[10] Li T, Si W, Zhu J, et al. Emodin reverses 5-Fu resistance in human colorectal cancer via downregulation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. Am J Transl Res, 2020, 12(5): 1851-1861.

[11] Zhou J, Li G, Han G, et al. Emodin induced necroptosis in the glioma cell line U251 via the TNF-alpha/RIP1/RIP3 pathway[J]. Invest New Drugs, 2020, 38(1): 50-59.

[12] 张涛. 中药单体及有效成分治疗胰腺癌的实验研究进展[J]. 国际中医中药杂志，2019(11)：1270-1273.

[13] 杨向，张华茂. 复方苦参注射液联合化疗对人胰腺癌的抑制作用[J]. 中国医院用药评价与分析，2012，12(1)：50-52.

[14] 庞慧芳，范学科，满泉，等. 姜黄素对胰腺癌细胞增殖与凋亡的影响及其机制研究[J]. 中国医院用药评价与分析，2019，19(7)：775-778，781.

[15] 石娜娜，何若琳，陈旭义，等. 大黄素抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 环球中医药，2019，12(4)：641-644.

[16] Iwai M, Horiuchi M. Devil and angel in the renin-angiotensin system: ACE-angiotensin II-AT1 receptor axis vs. ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas receptor axis[J]. Hypertens Res, 2009, 32(7): 533-536.

[17] Ye G, Qin Y, Lu X, et al. The association of renin-angiotensin system genes with the progression of hepatocellular carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 459(1): 18-23.

[18] Lau ST, Leung PS. Role of the RAS in pancreatic cancer[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2011, 11(4): 412-420.

[19] Yu C, Tang W, Wang Y, et al. Downregulation of ACE2/Ang-(1-7)/Mas axis promotes breast cancer metastasis by enhancing store-operated calcium entry[J]. Cancer Lett, 2016, 376(2): 268-277.

[20] Cheng Q, Zhou L, Zhou J, et al. ACE2 overexpression inhibits acquired platinum resistance-induced tumor angiogenesis in NSCLC[J]. Oncol Rep, 2016, 36(3): 1403-1410.


（收稿日期：2020-09-11）