

# 地高辛对结直肠癌细胞株体外生长的影响

陈超<sup>1</sup> 王宇锋<sup>1</sup> 潘媛<sup>1</sup> 李海<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>宁夏医科大学临床医学院, 银川 750004; <sup>2</sup>宁夏医科大学总医院结直肠外科, 银川 750004)

**摘要** 该文研究了地高辛(digoxin)对结直肠癌HT29、SW480和SW620细胞株增殖、迁移和侵袭能力以及上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响。采用MTT检测不同浓度地高辛分别作用于HT29、SW480和SW620细胞株24、48、72 h后的细胞增殖。采用划痕实验测量细胞的迁移率。采用Transwell侵袭实验测定细胞侵袭能力。采用Western blot测定相关上皮-间质转换标志物E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、SNAIL、Slug和波形蛋白(vimentin)以及VEGF蛋白质水平。RT-PCR检测地高辛干预细胞后VEGF mRNA水平。结果发现, 地高辛能有效抑制HT29和SW480细胞的增殖, 且具有浓度和时间依赖性, 但对SW620细胞无显著抑制作用。地高辛能够抑制HT29和SW480细胞的迁移和侵袭能力, 但对SW620细胞无显著作用。EMT标志物检测结果发现, 与对照组相比, HT29和SW480细胞E-钙黏蛋白水平显著升高, N-钙黏蛋白、SNAIL、Slug、波形蛋白水平显著降低, SW620细胞E-钙黏蛋白水平显著升高, Slug蛋白质水平显著降低, 但VEGF水平在SW620细胞无明显改变而在HT29和SW480细胞中显著降低。与对照组相比, 地高辛干预HT29细胞后, 细胞中VEGF mRNA水平明显降低, 而SW620细胞无显著变化。结果提示, 地高辛能够抑制结直肠癌细胞的增殖, 抑制其EMT的发展, 对治疗结直肠未转移癌具有更好的潜力。

**关键词** 地高辛; 结直肠肿瘤; 上皮-间质转换

## The Effects of Digoxin on the Growth of Colorectal Cancer Cell Lines *In Vitro*

Chen Chao<sup>1</sup>, Wang Yufeng<sup>1</sup>, Pan Yuan<sup>1</sup>, Li Hai<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>Clinical Medical College of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

<sup>2</sup>Department of Colorectal Surgery, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**Abstract** This work was aimed to investigate the effect of digoxin on epithelial-mesenchymal transition, proliferation, migration and invasion of colorectal cancer cell HT29, SW480 and SW620 lines. Colorectal cancer cells were treated with the different concentrations of digoxin and growth inhibition was measured by MTT assay. Cell migration was observed by wound healing assay and cell invasion was measured by Transwell invasion assay. The relative levels of proteins were determined by Western blot. RT-PCR was used to detect the changes of VEGF mRNA level after digoxin treatment. The results showed that digoxin inhibited the proliferation of HT29 and SW480 cells in dose-and time-dependent manner but no significant inhibition of SW620 cells. Compared with the control group in EMT related protein markers, E-cadherin in cells was significantly increased and the levels of N-cadherin, SNAIL, Slug and vimentin were significantly decreased, and only the level of Slug protein in SW620 cells was significantly decreased by Western blot. The levels of VEGF protein in HT29 and SW480 cells were

收稿日期: 2017-09-05 接受日期: 2018-01-22

宁夏自然科学基金(批准号: NZ15279)和2017年宁夏“研究生教育创新计划”学位点建设项目(批准号: YXW2017014)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0951-6743376, E-mail: zhuoran1126@163.com

Received: September 5, 2017 Accepted: January 22, 2018

This work was supported by the Natural Science Foundation of Ningxia (Grant No. NZ15279) and the Plan of Postgraduate Education Innovation Discipline Construction Project of Ningxia (2017) (Grant No. YXW2017014)

\*Corresponding author. Tel: +86-951-6743376, E-mail: zhuoran1126@163.com

网络出版时间: 2018-04-08 17:00:22 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180408.1700.006.html>

significantly decreased but no change in SW620 cells. Compared with the control group, the levels of *VEGF* mRNA of HT29 and SW480 cells were significantly decreased after digoxin intervention, while SW620 cells no change significantly. Therefore, digoxin can inhibit the proliferation of colorectal cancer cells and inhibit the development of EMT, and has a better potential for the treatment of early colorectal cancer.

**Keywords** digoxin; colorectal cancer; epithelial-mesenchymal transition

结直肠癌是一种常见的恶性肿瘤,随着我国人民生活水平的提高和饮食结构的改变,发病率也逐年上升,现已位居恶性肿瘤发病率的第三位<sup>[1]</sup>,严重威胁人类的健康。目前,手术辅助放、化疗依然是治疗癌症的主要方法,这不仅使患者承担巨大的心理、经济负担,而且疗效因人而异,放、化疗副作用明显,给患者造成巨大痛苦。因而,根据癌症的发生、发展机制找出一种副作用小、价格低廉的药物来治疗结直肠癌显得尤为重要。

强心苷类药物在临床上是一种选择性作用于心脏、加强心肌收缩力的药物。近年来研究发现,强心苷类通过抑制 $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP酶发挥药理作用,促进心肌细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Na}^+$ 交换,升高细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 的浓度,从而使心肌收缩力增强<sup>[2]</sup>。研究发现,强心苷类药物在治疗肿瘤上,与多种细胞内的通路相关,可以抑制肿瘤上皮-间质转换的发展,在合适的浓度范围内强心苷类药物可以特异性地抑制肿瘤生长,又不会对人正常细胞产生影响<sup>[3]</sup>。地高辛是一种强心苷类药物和抗心律失常药物,其抑制人类肿瘤的增殖、促凋亡的作用很早就有研究<sup>[4]</sup>。我国古老中医就有利用华蟾素治疗癌症并一直沿用至今。华蟾素是一种强心苷类药物,有研究表明,它可以抑制肿瘤细胞的增殖<sup>[5]</sup>。国外也有相关报告,长期服用地高辛的人患乳腺癌、白血病、淋巴瘤以及肾脏或泌尿道肿瘤的风险低<sup>[6]</sup>。这些研究为地高辛治疗癌症的研究提供了大量依据,但地高辛抑制结直肠癌细胞生长的机制亟待解决。上皮-间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物过程<sup>[7]</sup>,而地高辛可以抑制肿瘤细胞获得迁移和侵袭的能力,在肿瘤治疗上具有潜在应用价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 HT29、SW480、SW620和NCM460细胞株购于ATCC。

1.1.2 药品与耗材 地高辛购于Sigma公司。胎牛血清(fetalbovine serum, FBS)、McCoy's 5A Medium、Leibovitz's和Advanced RPMI 1640购于Gibco公司。Matrigel基质胶购于BD公司。Transwell小室购于Corning公司。MTT试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司。抗体均为兔多克隆抗体(E-钙黏蛋白、N-钙黏蛋白、SNAIL、SLUG、波形蛋白和VEGF)购于Abcam公司。HRP标记山羊抗兔IgG购于Proteintech公司。逆转录试剂盒购于TaKaRa公司。Trizol试剂购于Invitrogen公司。

### 1.2 方法

1.2.1 地高辛溶液的配制 用DMSO溶解地高辛粉末。在超净台上用0.22  $\mu\text{m}$ 的滤器过滤除菌。用培养基分别配制出0.01、0.10、0.50、2.50、10.00 ng/mL 5种不同浓度的地高辛溶液,各配置的溶液充分混匀后,4  $^{\circ}\text{C}$ 冰箱密封保存备用。

1.2.2 细胞复苏 将HT29、SW480、SW620和NCM460细胞株从液氮罐中取出后立即放入37  $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中解冻2 min,细胞解冻后在超净台里分别移入离心管中做好标记。1 000 r/min离心5 min后,弃上清,分别转入含有相应培养液的培养皿中,HT29细胞培养于含有10% FBS的McCoy's 5A的培养基,SW480和SW620细胞培养于含有10% FBS的Leibovitz's培养基,NCM460(正常结直肠细胞)培养于Advanced RPMI 1640培养基。将细胞置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 的培养箱中培养。

1.2.3 MTT测定细胞存活率和药物 $\text{IC}_{50}$  将细胞接种于培养皿中,待培养皿中细胞汇合至80%时,消化处理对数生长期的两种细胞。用含10%胎牛血清(FBS)的相应培养液配成细胞悬液,使细胞浓度约为每孔 $1 \times 10^4$ 个,每孔接种100  $\mu\text{L}$ ,两种细胞分别接种在96孔板上,设有空白对照组、阴性对照组、地高辛药物干预组。空白对照组不含细胞,只加含10% FBS的培养液,作为调零值,阴性对照组为不用药物干预的细胞。地高辛药物干预组中5种浓度各设6个复孔。待细胞生长贴壁后,空白组和阴性对照组加

入100  $\mu\text{L}$ 新鲜的培养基, 干预组加入100  $\mu\text{L}$ 含有相应浓度地高辛药物的培养基, 放入培养箱中。24 h后各孔中分别加入1 $\times$ MTT 50  $\mu\text{L}$ , 放入培养箱中4 h后小心吸出每孔液体。然后加入150  $\mu\text{L}$ 的DMSO, 置37  $^{\circ}\text{C}$ 摇床振动10 min后在酶标仪上进行比色。在自动酶联免疫检测仪上选定490 nm波长处测定吸光度( $D$ )值, 参比波长620 nm。抑制率=(1-干预组平均 $D$ 值/阴性对照组平均 $D$ 值) $\times$ 100%。存活率=1-抑制率。 $\text{IC}_{50}$ 通过SPSS 22.0软件计算。

**1.2.4 细胞划痕实验** 取对数生长期的细胞, 每孔 $1\times 10^4$ 细胞接种于6孔板, 置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养。待细胞长到完全汇合贴到底壁时, 在超净台中用无菌的200  $\mu\text{L}$ 移液器枪头沿直尺在底部划直线, 弃掉原有培养基, 用PBS冲洗细胞2次, 每组细胞分别加入相应的培养基, 实验组加入地高辛溶液使浓度达到测出的 $\text{IC}_{50}$ 值, 对照组加入同体积的DMSO。置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 细胞培养箱中培养, 在0 h和48 h用倒置显微镜进行拍照, 用Image J软件测量划痕面积, 求出两次划痕面积比值。

**1.2.5 Transwell侵袭实验** 将培养基与Matrigel基质胶按9:1稀释, 取60  $\mu\text{L}$ 均匀铺到Transwell小室上室内, 37  $^{\circ}\text{C}$ 恒温孵育3 h使其成凝胶状。取对数生长期细胞, 细胞分实验组和对照组, 用配置好的各实验组培养基制备 $2.5\times 10^8/\text{L}$ 的细胞悬液。取200  $\mu\text{L}$ 细胞悬液加入上室内, 在24孔板中加入600  $\mu\text{L}$ 含10% FBS的培养基, 置于培养箱中培养24 h。经甲醇固定和姬萨姆染液染色后, 显微镜下取6个视野拍照计数, 取平均值, 每组设3复孔。

**1.2.6 Western blot检测相关蛋白质水平** 培养细胞, 待细胞达到对数生长期, 加入地高辛和对应培养基进行培养, 设立6个时间点(0、4、8、16、24、48 h)进行总蛋白质提取, 其中0 h组为对照组(control group)。在达到时间点的细胞用凯基总蛋白质提取试剂盒制备总蛋白质, BCA法定量后, 进行SDS-PAGE并低温下转移至PVDF膜。封闭液(TBST)封闭1 h, 加入I抗, 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST洗膜3次, 加入II抗室温下孵育1 h, TBST洗膜3次, ECL法显影。蛋白质条带灰度值用ImageJ分析。

**1.2.7 细胞VEGF mRNA表达检测** 按照Trizol试剂盒说明书提取细胞总RNA, 逆转录为cDNA, 分别以cDNA为模板扩增VEGF、 $\beta$ -actin。RT-PCR反应条件: 98  $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s; 98  $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s, 56  $^{\circ}\text{C}$ 退

火30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 s, 共40个循环; 4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。引物序列如下, VEGF正义链: 5'-TGC CCG CTG CTG TCT AAT-3', VEGF反义链: 5'-TCT CCG CTC TGA GCA AGG-3';  $\beta$ -actin正义链: 5'-CTC CAT CCT GGC CTC GCT GT-3',  $\beta$ -actin反义链: 5'-GCT GTC ACC TTC ACC GTT CC-3'。 $\beta$ -actin作为内参, 计算VEGF相对表达量(RQ值), 计算公式:  $\Delta\text{Ct}=\text{Ct}_{\text{目的基因}}-\text{Ct}_{\text{内参}}$ ,  $\Delta\Delta\text{Ct}=\Delta\text{Ct}_{\text{实验组}}-\Delta\text{Ct}_{\text{对照组}}$ ,  $\text{RQ}=2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , 将对照组目的基因mRNA相对水平作为1。

### 1.3 统计学方法

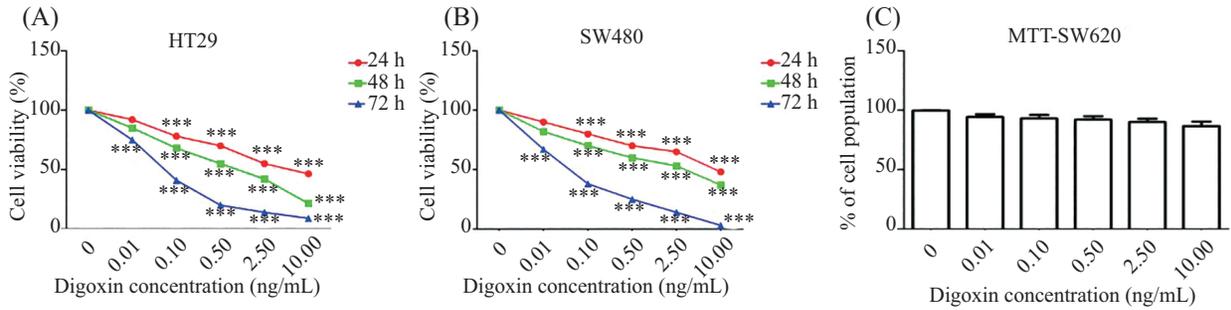
用SPSS 22.0统计软件进行分析。数据均采用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示, 多组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA), 并用 $t$ 检验进行组间两两比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 地高辛对HT29、SW480和SW620细胞存活率的影响

地高辛抑制结直肠癌HT29和SW480细胞的增殖具有时间和浓度依赖性。每组细胞都设有5组干预浓度(0、0.01、0.10、0.50、2.50、10.00 ng/mL), 结直肠癌HT29和SW480细胞以每种浓度地高辛干预24、48、72 h后, 求出细胞存活率(图1A和图1B), 随着时间延长及干预浓度的增加细胞抑制率逐渐增大。地高辛浓度为0.01 ng/mL时HT29细胞24、48、72 h抑制率分别为2.32%、11.78%和21.67%, SW480细胞24、48、72 h抑制率分别为7.77%、19.13%和33.62%。当浓度为10.00 ng/mL时HT29细胞抑制率分别为53.66%、79.51%和91.37%, SW480细胞抑制率分别为53.78%、66.74%和97.21%。HT29细胞干预24、48、72 h后地高辛的半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration,  $\text{IC}_{50}$ )分别为9.23、0.78 ng/mL和0.08 ng/mL; SW480细胞分别为7.81、0.55 ng/mL和0.07 ng/mL。但对SW620细胞进行MTT实验时发现, 地高辛并没有明显降低细胞的活力, 如图1C为干预48 h后细胞的存活率, 0.01 ng/mL和10.00 ng/mL其抑制率为2.11%和7.31%, 且以浓度大于10.00 ng/mL干预SW620细胞时其抑制率并没有发生显著的改变, 同样干预24 h和72 h后的MTT实验结果与48 h相同。

为了进一步研究地高辛是否对SW620细胞的增殖有影响以及探究抑制HT29细胞增殖的机制, 后续实验地高辛对SW620干预的浓度取HT29和

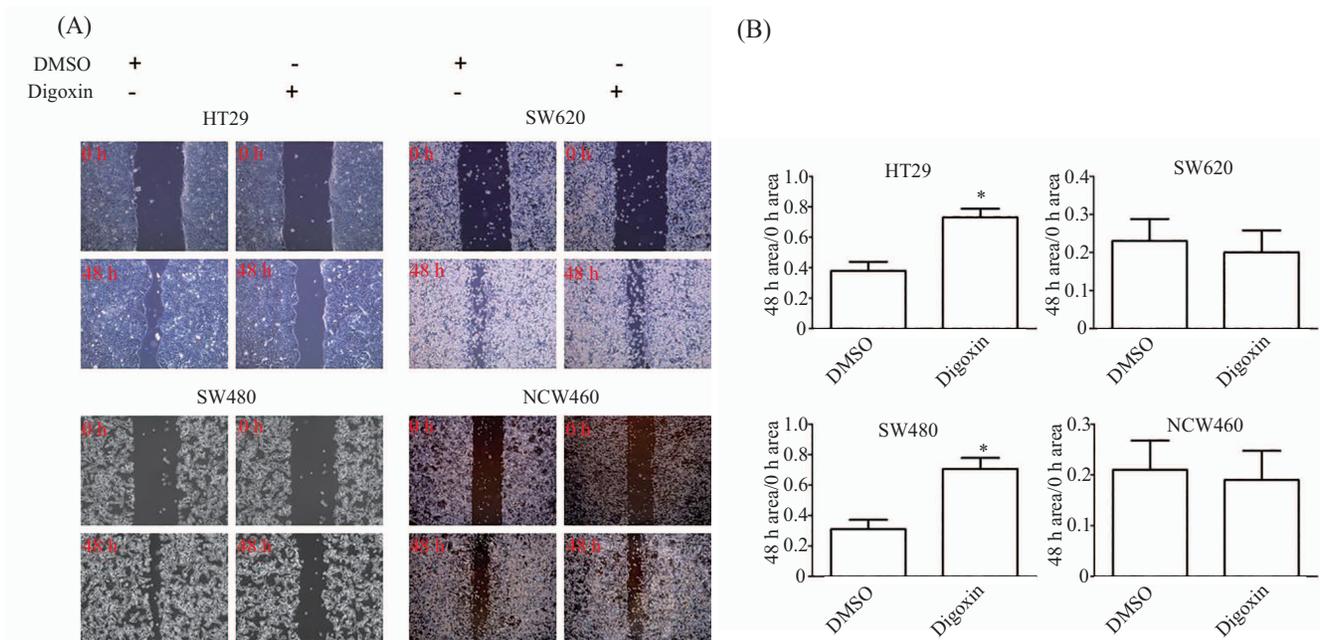


A: 不同浓度地高辛干预HT29细胞24、48、72 h后的细胞存活率; B: 不同浓度地高辛干预SW480细胞24、48、72 h后的细胞存活率; C: 不同浓度地高辛干预SW620细胞48 h的细胞存活率。\*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组比较。

A: HT29 cells was treated with different concentrations of digoxin at 24, 48, 72 h and cell survival rate was calculated; B: SW480 cells was treated with different concentrations of digoxin at 24, 48, 72 h and cell survival rate was calculated; C: SW620 cells treated with different concentrations of digoxin at 48 h and cell survival rate was calculated. \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图1 MTT检测HT29、SW480和SW620细胞的存活率

Fig.1 MTT detect the survival of HT29, SW480 and SW620 cells



A: HT29、SW480、SW620和NCM460细胞划痕实验(10 $\times$ ); B: HT29、SW480、SW620和NCM460细胞划痕实验定量分析, \* $P < 0.05$ , 与对照组比较。  
A: wound healing assay for HT29, SW480, SW620 and NCM460 cells (10 $\times$ ); B: quantitative analysis for HT29, SW480, SW620 and NCM460 cells. \* $P < 0.05$  vs control group.

图2 划痕实验检测地高辛对HT29、SW480、SW620和NCM460细胞的迁移能力的影响

Fig.2 The effect of digoxin on the migrations of HT29, SW480, SW620 and NCM460 cells detected by scratch test

SW480细胞IC<sub>50</sub>求出的48 h最大值0.78 ng/mL。

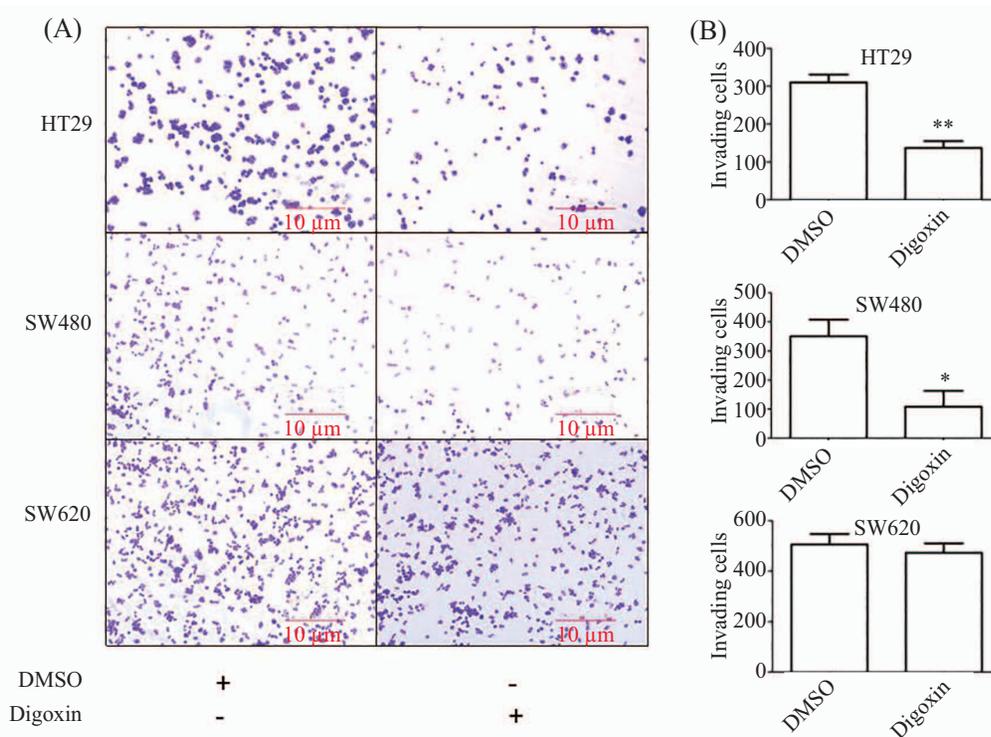
## 2.2 地高辛对结直肠癌细胞迁移能力的影响

在划痕实验中将细胞分为对照组(只加相同体积的DMSO)和实验组,其中NCM460细胞加入的药物浓度为0.78 ng/mL。结果显示,与对照组(0 h下同)相比,地高辛可以抑制HT29细胞( $t$ 值为4.28,  $P < 0.05$ )和SW480细胞的迁移( $t$ 值为4.16,  $P < 0.05$ )。地高辛干预不影响正常结直肠细胞(NCM460)的迁移( $t$ 值为0.24,  $P > 0.05$ ),且对SW620细胞的干预也无统计学意

义( $t$ 值为0.37,  $P > 0.05$ )(图2)。

## 2.3 地高辛对结直肠癌细胞侵袭能力的影响

在Transwell实验中将细胞分为对照组与实验组,每组3个复孔,每孔在显微镜下选择6个视野取平均值( $\bar{x} \pm s$ )。在HT29细胞中实验组的细胞数明显少于对照组( $t$ 值为10.13,  $P < 0.01$ ),SW480细胞实验组细胞数明显少于对照组( $t$ 值为3.05,  $P < 0.05$ ),由此表明,地高辛可以降低HT29和SW480细胞的侵袭能力。SW620细胞对照组与实验组的细胞数无明显差



A: Transwell侵袭实验; B: HT29、SW480和SW620细胞定量分析。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

A: Transwell invasion assay; B: quantitative analysis for HT29, SW480 and SW620 cells, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs the control group.

图3 地高辛对HT29、SW480和SW620细胞侵袭能力的影响

Fig.3 The effects of digoxin on the invasiveness of HT29, SW480 and SW620 cells

别( $t$ 值为0.53,  $P > 0.05$ ), 结果表明, 地高辛对SW620细胞侵袭能力无显著影响(图3)。

## 2.4 地高辛对结直肠癌细胞中EMT相关蛋白质水平的影响

EMT相关标志物的Western blot实验分析得出与对照组相比, HT29和SW480细胞在地高辛干预后, E-钙黏蛋白灰度值比随着作用时间延长(4、8、16、24、48 h, 下同)逐渐增大, N-钙黏蛋白、波形蛋白、Slug和SNAIL灰度值比随着作用时间延长逐渐减小; 结直肠癌细胞SW620在地高辛干预后, E-钙黏蛋白灰度值比随着作用时间延长逐渐增大, Slug灰度值比随着作用时间延长逐渐减小(图4)。

## 2.5 地高辛对结直肠癌细胞中VEGF蛋白质和mRNA水平的影响

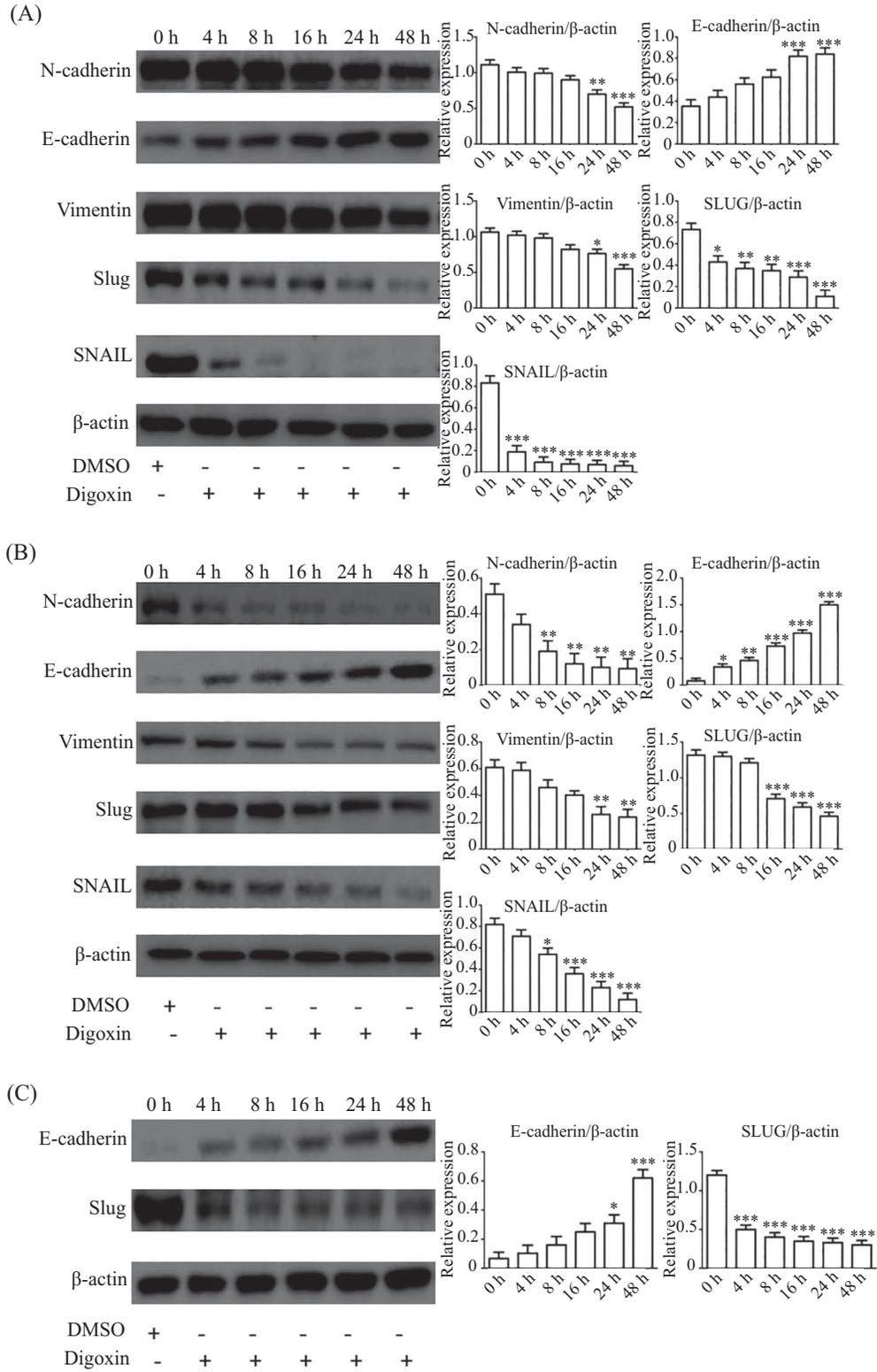
Western blot实验结果分析得出, 结直肠癌细胞HT29和SW480细胞在地高辛干预后, 与对照组相比, VEGF灰度值比随着作用时间延长逐渐降低, 但SW620细胞VEGF灰度值比没有发生显著改变。地高辛干预HT29、SW480和SW620细胞48 h后, 采用RT-PCR检测VEGF mRNA的表达水平。与对照组相比, HT29细胞中VEGF mRNA水平4 h组为 $0.67 \pm 0.30$ ,

8 h组为 $0.52 \pm 0.22$ , 16 h组为 $0.41 \pm 0.21$ , 24 h组为 $0.23 \pm 0.22$ , 48 h组为 $0.18 \pm 0.17$ ; SW480细胞中4 h组为 $0.52 \pm 0.40$ , 8 h组为 $0.46 \pm 0.33$ , 16 h组为 $0.35 \pm 0.29$ , 24 h组为 $0.29 \pm 0.22$ , 48 h组为 $0.21 \pm 0.19$ ; SW620细胞中4 h组为 $0.92 \pm 0.51$ , 8 h组为 $0.87 \pm 0.46$ , 16 h组为 $0.85 \pm 0.35$ , 24 h组为 $0.81 \pm 0.42$ , 48 h组为 $0.79 \pm 0.37$ (图5)。

## 3 讨论

本文选择SW620、SW480和HT29三种结直肠癌肿瘤细胞株为研究对象探究地高辛对治疗结直肠癌的作用及其机制。实验结果表明, 地高辛可以抑制结直肠癌肿瘤细胞的生长, 尤其对HT29和SW480细胞的抑制效果显著。迁移能力、侵袭能力和EMT的获得是癌症发生、发展不可或缺的生物特征<sup>[8]</sup>。本研究结果提示, 地高辛能够抑制结直肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭, 并可抑制EMT的发展。

在划痕实验中, 地高辛对HT29和SW480的抑制效果显著, 且用地高辛干预正常结直肠细胞NCM460时, 对NCM460细胞的生长无影响, 与文献报道相一致<sup>[5]</sup>。对SW620细胞的实验结果表明, 地高辛对其抑制作用不显著, 这也许与肿瘤的生长

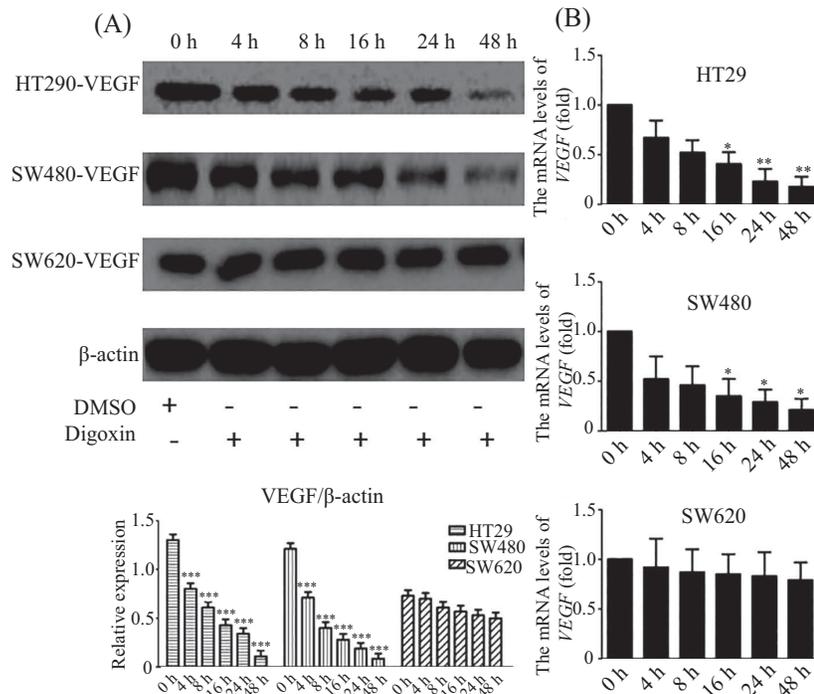


A: 免疫印迹检测地高辛干预HT29细胞不同时间后EMT相关蛋白质水平变化; B: 免疫印迹检测地高辛干预SW480细胞不同时间后EMT相关蛋白质水平变化; C: 免疫印迹检测地高辛干预SW620细胞不同时间后EMT相关蛋白质水平变化。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组(0 h)比较。

A: effect of digoxin on the levels of EMT related proteins in HT29 cells at different time by Western blot; B: effect of digoxin on the levels of EMT related proteins in SW480 cells at different time by Western blot; C: effect of digoxin on the levels of EMT related proteins in SW620 cells at different time by Western blot. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs control group.

图4 地高辛干预后对细胞EMT相关蛋白质水平的影响

Fig.4 The effect of digoxin on the levels of EMT related proteins in cells



A: 免疫印迹检测地高辛干预HT29、SW480和SW620细胞不同时间后VEGF蛋白质水平; B: RT-PCR检测地高辛干预HT29、SW480和SW620细胞不同时间后VEGF mRNA水平。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与对照组(0 h)比较。

A: effect of digoxin on the levels of VEGF protein in HT29, SW480 and SW620 cells at different time by Western blot; B: effect of digoxin on the levels of VEGF mRNA in HT29, SW480 and SW620 cells at different time by RT-PCR. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs the control group.

图5 地高辛对细胞VEGF蛋白质和mRNA水平的影响

Fig.5 The effects of digoxin on the levels of VEGF protein and mRNA in cells

状态有关。细胞的生长周期分为G<sub>1</sub>、S、G<sub>2</sub>和M四期。有研究表明,地高辛对肿瘤细胞的作用主要发生在肿瘤生长过程中的G<sub>2</sub>/M期<sup>[9]</sup>,细胞分裂周期基因2(cell division cycle gene 2, *cdc2*)在G<sub>1</sub>期和G<sub>2</sub>期两个重要调控点上起作用<sup>[10]</sup>,决定细胞分化在S期与M期,在细胞周期中原癌基因(如*c-myc*、*c-myb*、*c-ras*)也对细胞分裂周期产生影响<sup>[11]</sup>,晚期肿瘤中细胞周期调控因子变异,使地高辛不能有效抑制其生长。EMT是肿瘤获得迁移及侵袭能力的重要生物学特征,E-钙黏蛋白的减少是EMT发生的标志性变化<sup>[12-13]</sup>,N-钙黏蛋白、SNAIL、Slug和波形蛋白可以诱导EMT的发生或在EMT发生过程中表达增加<sup>[14-16]</sup>。地高辛在不同细胞对EMT相关蛋白质水平的影响差异与肿瘤细胞生长的必要因子VEGF有关。SW620细胞试验中,地高辛虽然使EMT相关因子E-钙黏蛋白升高以及降低Slug的表达,但本研究结果表明,地高辛并没有使SW620细胞中的VEGF表达显著减少。VEGF又是肿瘤生长过程中血管生成不可缺少的因子,通常情况下,肿瘤细胞的增殖需要充足的血供,而VEGF是血管生成的重要因子<sup>[17-18]</sup>,在肿瘤细胞生长的活跃

期,VEGF的表达也会上调。因而,抑制VEGF的表达,则对治疗肿瘤、抑制其增殖有着显著成效。VEGF的表达受缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )的影响<sup>[19]</sup>,在肿瘤增殖期间可以在低氧环境下调节下游VEGF在缺氧环境下的表达,促进肿瘤生长所需要的血管生成。地高辛可以在缺氧环境下抑制HIF-1 $\alpha$ 的表达,使得VEGF的表达得以下调,从而抑制了肿瘤的增殖<sup>[20-21]</sup>。地高辛可以对结直肠癌细胞HT29和SW480细胞有显著的抑制作用,而对SW620细胞抑制效果不明显。

综上所述,地高辛可以抑制结直肠肿瘤的生长且对未转移肿瘤的治疗效果显著,其有着较好的临床应用前景。地高辛能够通过抑制肿瘤EMT的发展使其降低远处转移能力,降低VEGF的表达切断营养供给从而起到对结直肠肿瘤的治疗作用。本文初步研究了地高辛对不同结直肠癌细胞株影响的差异,但是地高辛对癌症的调控靶点文献报告颇多,各个靶点之间是否有相关联系、长期服用地高辛是否对正常细胞产生影响还尚未知晓,这些都值得进行更深入的研究。

## 参考文献 (References)

- 1 Allemani C, Weir HK, Carreira H, Harewood R, Spika S, Wang XS, *et al.* Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). *Lancet* 2015; 385(9972): 977-1010.
- 2 Lee DH, Oh SC, Giles AJ, Jung J, Gibert MR, Park DM. Cardiac glycosides suppress the maintenance of stemness and malignancy via inhibiting HIF-1alpha in human glioma stem cells. *Oncotarget* 2017; 8(25): 40233-45.
- 3 Wei D, Peng JJ, Gao H, Li H, Li D, Tan Y, *et al.* Digoxin downregulates NDRG1 and VEGF through the inhibition of HIF-1alpha under hypoxic conditions in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Int J Mol Sci* 2013; 14(4): 7273-85.
- 4 Zhu Z, Li E, Liu Y, Gao Y, Sun H, Ma G, *et al.* Inhibition of Jak-STAT3 pathway enhances bufalin-induced apoptosis in colon cancer SW620 cells. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 228.
- 5 Eskiocak U, Ramesh V, Gill JG, Zhao Z, Yuan SW, Wang M, *et al.* Synergistic effects of ion transporter and MAP kinase pathway inhibitors in melanoma. *Nat Commun* 2016; 7: 13080.
- 6 Lee CH, Shih YL, Lee MH, Au MK, Chen YL, Lu HF, *et al.* Bufalin induces apoptosis of human Osteosarcoma U-2 OS cells through endoplasmic reticulum stress, Caspase- and mitochondria-dependent signaling pathways. *Molecules* 2017; 22(3): e437.
- 7 Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, *et al.* EMT and tumor metastasis. *Clin Transl Med* 2015; 4: 6.
- 8 Catalano M, D'Alessandro G, Lepore F, Corazzari M, Caldarola S, Valacca C, *et al.* Autophagy induction impairs migration and invasion by reversing EMT in glioblastoma cells. *Mol Oncol* 2015; 9(8): 1612-25.
- 9 Goodale D, Phay C, Postenka CO, Keeney M, Allan AL. Characterization of tumor cell dissemination patterns in preclinical models of cancer metastasis using flow cytometry and laser scanning cytometry. *Cytometry A* 2009; 75(4): 344-55.
- 10 Zhou B, Bu G, Zhou Y, Zhao Y, Li W, Li M. Knockdown of CDC2 expression inhibits proliferation, enhances apoptosis, and increases chemosensitivity to temozolomide in glioblastoma cells. *Med Oncol* 2015; 32(1): 378.
- 11 Dang CV. MYC on the path to cancer. *Cell* 2012; 149(1): 22-35.
- 12 Huang RY, Wong MK, Tan TZ, Kuay KT, Nq AH, Chung VY, *et al.* An EMT spectrum defines an anoikis-resistant and spheroidogenic intermediate mesenchymal state that is sensitive to e-cadherin restoration by a src-kinase inhibitor, saracatinib (AZD0530). *Cell Death Dis* 2013; 4: e915.
- 13 Qin Y, Tang B, Hu CJ, Xiao YF, Xie R, Yong X, *et al.* An hTERT/ZEB1 complex directly regulates E-cadherin to promote epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016; 7(1): 351-61.
- 14 Tanaka T, Goto K, Iino M. Sec8 modulates TGF-beta induced EMT by controlling N-cadherin via regulation of Smad3/4. *Cell Signal* 2017; 29: 115-26.
- 15 Yuan H, Kajiyama H, Ito S, Chen D, Shibata K, Hamauchi M, *et al.* HOXB13 and ALX4 induce SLUG expression for the promotion of EMT and cell invasion in ovarian cancer cells. *Oncotarget* 2015; 6(15): 13359-70.
- 16 Wettstein G, Bellaye PS, Kolb M, Hammann A, Crestani B, Soler P, *et al.* Inhibition of HSP27 blocks fibrosis development and EMT features by promoting Snail degradation. *FASEB J* 2013; 27(4): 1549-60.
- 17 Yang S, Gao Q, Jiang W. Relationship between tumour angiogenesis and expression of cyclo-oxygenase-2 and vascular endothelial growth factor-A in human renal cell carcinoma. *J Int Med Res* 2015; 43(1): 110-7.
- 18 Farkkila A, Pihlajoki M, Tauriala H, Butzow R, Leminen A, Unkila-kallio L, *et al.* Serum vascular endothelial growth factor A (VEGF) is elevated in patients with ovarian granulosa cell tumor (GCT), and VEGF inhibition by bevacizumab induces apoptosis in GCT *in vitro*. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(12): E1973-81.
- 19 Zhang M, Qiu Q, Li Z, Sachdeva M, Min H, Cardona DM, *et al.* HIF-1 alpha regulates the response of primary sarcomas to radiation therapy through a cell autonomous mechanism. *Radiat Res* 2015; 183(6): 594-609.
- 20 Guo LY, Zhu P, Jin XP. Association between the expression of HIF-1alpha and VEGF and prognostic implications in primary liver cancer. *Genet Mol Res* 2016; doi: 10.4238/gmr.15028107.
- 21 Dodd KM, Yang J, Shen MH. mTORC1 drives HIF-1alpha and VEGF-A signalling via multiple mechanisms involving 4E-BP1, S6K1 and STAT3. *Oncogene* 2015; 34(17): 2239-50.