论著

文章编号:1000-5404(2008)04-0340-03

氨氯地平对人乳腺癌细胞株MDA-MB-231侵袭影响的体外实验

徐兴华[1],孙文娟[1],周岐新[1],马凤云[2] ([1]重庆医科大学药学院药理学教研室,重庆市分子药理重点实验室,重庆 400016;[2]吉林市职工医科大学药理教研室,吉林 吉林 132000)

摘 要:目的 探讨氨氯地平对人乳腺癌高转移细胞株MDA-MB-231体外侵袭的影响及其相关机制。**方法** 用8.34 μmol/L氨氯地平处理肿瘤细胞,以人工重组基底膜侵袭小室(Transwell)观察氨氯地平对MDA-MB-231细胞侵袭的影响;免疫细胞化学方法检测血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和基质金属蛋白酶-9(matrix metallo-proteinase,MMP-9)的表达。**结果** 8.34 μmol/L的氨氯地平可显著抑制MDA-MB-231细胞的侵袭能力,侵袭抑制率为36.27%;免疫细胞化学检测结果显示,MMP-9和VEGF蛋白的表达在MDA-MB-231细胞中亦明显降低。**结论** 氨氯地平对MDA-MB-231细胞体外侵袭具有明显的抑制作用,此作用与降低肿瘤细胞的MMP-9和VEGF的表达有关。

关键词: 氨氯地平;人乳腺癌细胞株MDA-MB-231;肿瘤侵袭;血管内皮生长因子;基质金属蛋白酶-9

中图法分类号: R73-361;R730.23;R737.9 **文献标识码:** A

Amlodipine inhibits *in vitro* invasion of human breast carcinoma cells MDA-MB-231

XU Xing-hua[1], SUN Wen-juan[1], ZHOU Qi-xin[1], MA Feng-yun[2] ([1]Pharmaceutical College, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology of Chongqing, Chongqing 400016; [2]Department of Pharmacology, Jilin Employee Medical University, Jilin 132000, Jilin, China)

Abstract: Objective To investigate the mechanism that Amlodipine inhibits the invasion of human breast cancer cell line MDA-MB-231. Methods MDA-MB-231 cells was treated by 8.34 μmol/L Amlodipine for 72 h. The invasion activity of MDA-MB-231 cells was evaluated by using Transwell chambers attached with polycarbonate filters and reconstituted basement membrane (Matrigel). The expressions of MMP-9 and VEGF in MDA-MB-231 cells were examined by immunohistochemistry. Results Amlodipine significantly inhibited the invasion activity of MDA-MB-231 cells, and the inhibitory rate was (36.27 ± 6.39)%. The expressions of MMP-9 and VEGF in MDA-MB-231 cells decreased obviously by Amlodipine. Conclusion Amlodipine exhibits the invasion activity of breast cancer cell line MDA-MB-231 and it is related to the reduction of MMP-9 and VEGF expressions.

Key words: Amlodipine; beast cancer cell line MDA-MB-231; tumor invasion; VEGF; MMP-9

氨氯地平(Amlodipine)又名洛活喜,属二氢吡啶类第3代长效钙通道阻滞剂(calcium channel blockers, CCBs),是美国辉瑞公司(Pfizer)于20世纪90年代开发的。目前临床上将氨氯地平用于治疗心血管疾病,如心绞痛、高血压和充血性心力衰竭,具有良好的疗效。

Yoshida等[1]研究发现氨氯地平具有广泛的降压外作用(非钙通道阻滞作用)。我们前期研究发现氨氯地平体外呈剂量依赖性和时间依赖性地抑制人乳腺癌细胞株MDA-MB-231的增殖及凋亡诱导作用[2]。为进一步研究氨氯地平对肿瘤细胞侵袭的作用,本研究以MDA-MB-231细胞为对象,对氨氯地平抗MDA-MB-231细胞侵袭的活性进行了体外实验,并对其抗侵袭转移的相关机制进行了初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株MDA-MB-231、成纤维细胞系NIH 3T3由本校病理生理学教研室汤为学教授惠赠,Transwell侵袭小室购自Costar公司,重组人工基底膜Matrigel购自BD公司,RPMI1640培养基购自美国HyClone公司,新生小牛血清购自

作者简介:徐兴华,女,山东省临沂市人,硕士研究生,主要从事肿瘤药理方面的研究。电话:(023)68486850

通信作者:孙文娟,电话:(023)68485075,E-mail:swenjuan6@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-08-30;修回日期:2007-09-15

杭州四季青生物工程材料有限公司,免疫组化试剂盒(S-P)、血管内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶(MMP-9)第一抗体、EDTA 抗原修复液均购自北京中杉生物技术公司,氨氯地平为重庆康尔威药业公司产品,由严燮和教授惠赠,氟尿嘧啶注射液购自南通精华制药有限公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购自上海华舜生物工程有限公司,酶标仪-550 型购自日本 Bio-Rad 公司。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　　MDA-MB-231 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中,用 0.25% 胰酶消化传代,37 ℃、5% CO_2 培养箱内常规传代培养,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2　实验分组　　实验分为对照组和氨氯地平组 2 组。前期实验得到氨氯地平对 MDA-MB-231 细胞作用的 IC_{50} 为 16.67 μmol/L,故选择 1/2 IC_{50}(8.34 μmol/L)的氨氯地平作为体外侵袭实验的浓度。对照组加等体积培养基。以上每组均设 3 个以上平行孔。

1.2.3　药物体外抗 MDA-MB-231 细胞侵袭实验　　用 8.34 μmol/L 的氨氯地平处理 MDA-MB-231 细胞 72 h 后进行实验。Transwell 聚碳酯膜上铺 Matrigel 40 μl,下室放入 NIH 3T3 上清液 0.6 ml。于上室内加入经氨氯地平处理的 5×10^{-5} ml^{-1} MDA-MB-231 细胞 0.4 ml,37 ℃培养箱中孵育 18 h。用棉签擦净膜上室细胞,HE 染色,200 倍光镜下记数 5 个视野的细胞数,取均值,结果以侵袭率表示。实验设 3 个平行小室,重复 2 次。

侵袭率(%) = (穿膜细胞数/细胞总数) × 100%

1.2.4　免疫细胞化学染色法检测 MMP-9 和 VEGF 的表达　　采用 S-P 法。6 孔培养板中放置 22 mm × 22 mm 的盖玻片,取对数生长期的 MDA-MB-231 细胞 1×10^5/孔接种培养,制备细胞爬片(加药组加入 8.34 μmol/L 的氨氯地平),加药培养 72 h 后取出。S-P 法染色:一抗为抗 MMP-9 和抗 VEGF 单克隆抗体(1∶100 稀释),DAB 显色,中性塑胶封片。每组设立 PBS 空白对照。MMP-9 和 VEGF 染色判断标准:以镜下细胞质着棕黄色颗粒为 MMP-9 和 VEGF 阳性细胞。10 × 20 倍镜下计数 5 个视野,每个视野计数 50 个细胞。结果判读分 3 级:(-):阳性细胞率 <5%;(+):阳性细胞率为 5% ~50%;(++):阳性细胞率 >50%。

1.3　统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件,药物体外抗 MDA-MB-231 细胞侵袭实验组间比较采用 t 检验,药物对 MDA-MB-231 细胞 MMP-9 和 VEGF 的表达结果比较进行 χ^2 检验。

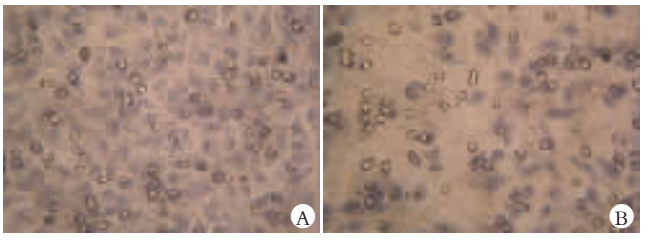
2　结果

2.1　氨氯地平对 MDA-MB-231 细胞侵袭重组人工基底膜的抑制作用

经氨氯地平处理的 MDA-MB-231 细胞侵袭能力明显降低。经氨氯地平处理 72 h,MDA-MB-231 细胞对 Matrigel 的迁移率为(36.27 ± 6.39),对照组为(70.24 ± 13.50),二者经 χ^2 检验,存在显著性差异(P <0.01),见图 1。

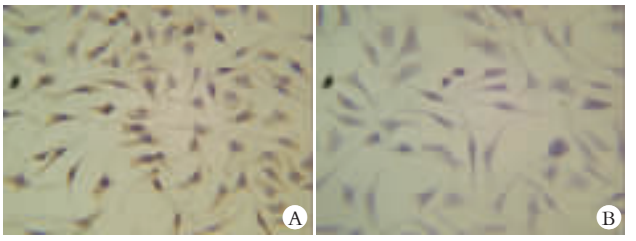
2.2　氨氯地平对 MDA-MB-231 细胞 MMP-9 表达的影响

MMP-9 在 MDA-MB-231 细胞的表达主要在细胞质内。对照组呈阳性表达,氨氯地平组的阳性表达率(41.18%)明显低于对照组(85.29%,P <0.01),见图 2。



A:对照组; B:氨氯地平组

图 1　MDA-MB-231 细胞侵袭重组基底膜　(HE × 200)

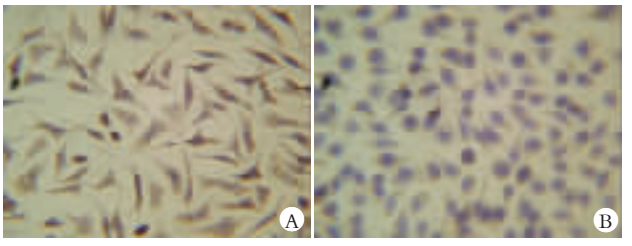


A:对照组; B:氨氯地平组

图 2　2 组中 MDA-MB-231 细胞 MMP-9 的表达　(ABC × 400)

2.3　氨氯地平对 MDA-MB-231 细胞 VEGF 表达的影响

VEGF 在 MDA-MB-231 细胞的表达主要在细胞质内。对照组呈阳性表达,氨氯地平组的阳性表达率(44.18%)明显低于对照组(83.12%,P <0.01),见图 3。



A:对照组; B:氨氯地平组

图 3　2 组中 MDA-MB-231 细胞 VEGF 的表达　(ABC × 400)

3　讨论

前期研究表明,氨氯地平对 MDA-MB-231 细胞的生长具有抑制作用,其作用强度与氟尿嘧啶相当,IC_{50} 为 16.67 μmol/L。同时进一步研究发现,氨氯地平对于 MDA-MB-231 细胞生长的抑制作用具有良好的时效关系。低浓度该药在短时间内即可产生生长抑制作用,于 72 h 达最强。流式细胞仪检测结果显示,经 8.34 μmol/L 的氨氯地平处理 2 h 后,肿瘤细胞的凋亡率达 6.82%[2]。

转移是恶性肿瘤的一个重要特征,又是癌症患者死亡的直接原因。目前对原发性肿瘤的治疗已获得可喜的进展,但转移仍是影响肿瘤患者预后的主要因素。有迹象表明氨氯地平可能具有抗肿瘤转移的潜能:Nadar 等[3]发现氨氯地平可使高血压患者血浆和血小板

中的 VEGF 和血管形成素-1（angiopoietin-1，Ang-1）水平降低，但与氨氯地平的降压机制无关。那么，氨氯地平对肿瘤细胞是否有相似的作用？值得进一步研究。Ang-1 是具有强大的促血管生成作用的活性蛋白，与内皮细胞的高亲和力受体结合，激活与细胞连接的蛋白酶，诱导内皮细胞的增殖、迁移和侵袭。VEGF 又称血管通透因子（vascular peame-ability factor，VPF），是一种多肽类细胞因子。其生物学作用一方面通过其与受体结合，刺激血管内皮细胞增殖，并诱导产生蛋白水解酶、间质胶原酶和组织因子来促进血管形成；另一方面，提高血管通透性，引起血浆蛋白、纤维蛋白原外渗，沉积在血管外基质中，从而为新生毛细血管网的建立、肿瘤侵润及转移提供合适的基础。Maehara 等[4]发现，VEGF 阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移直接相关。VEGF 可通过与表达于淋巴管内皮细胞的受体结合，引起淋巴管增殖，癌细胞由于其与淋巴管接触点的增多而易于侵犯淋巴管，并发生淋巴结转移[5]。任学群等[6]等研究发现 VEGF 的表达和微血管密度与肿瘤侵袭转移有关，可作为反映肿瘤生物学的指标。本实验以高转移的人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为研究对象，该细胞株的显著特征之一是分泌大量的基质金属蛋白酶，尤其是 MMP-2 和 MMP-9。

恶性肿瘤的侵袭和转移是多因素、多步骤、多阶段的病理过程。基底膜和细胞外基质是阻碍肿瘤细胞浸润和转移的天然屏障，它们的降解是恶性肿瘤细胞发生侵袭和转移的关键。而基底膜的降解需要一些蛋白水解酶的作用，MMPs 就是其中一组重要的细胞外基质降解酶，能降解 ECM 中的各种蛋白成分，其含量一般随肿瘤细胞恶性程度的加深而增加。在组织学上，基底膜完整性破坏，被认为是恶性肿瘤侵袭开始的一个标志。MMPs 的高表达与恶性肿瘤的侵袭、转移及血管生成密切相关。MMP-2 和 MMP-9 属于明胶酶，明胶酶在乳腺癌、胃癌、肠癌、肺癌、子宫内膜癌及膀胱癌等多处器官恶性肿瘤中的表达均显著增高，并与肿瘤细胞转移和病理分级相关[7]。李红梅等[8]发现 MMP-2 和 MMP-9 在肿瘤侵袭部位表达最为明显，而 Itoh 等[9]发现宿主来源的 MMP-9 在肿瘤转移中起重要作用。因此，目前肿瘤治疗新的热点之一就是开发 MMPs 的抑制剂。赵颖海等[10]研究发现乳腺癌中 VEGF 与 MMP-2、MMP-9 的表达可能协同作用刺激肿瘤血管形成，促进细胞外基质的降解和癌细胞的侵袭转移。Kurizaki 等[11]发现活化的 MMP-2 表达与 VEGF 间有明显相关性（$P<0.01$），VEGF 可上调乳腺癌组织中 MMP-2、MMP-9 的表达。

本实验结果表明，经氨氯地平处理的 MDA-MB-231 细胞侵袭能力有明显降低。同时，MMP-9 在 MDA-MB-231 细胞的表达亦低于对照组，说明氨氯地平对 MDA-MB-231 细胞的抗侵袭作用与抑制 MMP-9 有关。另外，我们还发现 VEGF 在 MDA-MB-231 细胞中呈阳性表达，这也是与该细胞株高侵袭性相关的另一个重要的生物学特征。氨氯地平组的 VEGF 阳性表达率明显低于对照组，这也与其抗侵袭作用有密切的关系。

综上，氨氯地平对 MDA-MB-231 细胞具有较强的抗增殖作用，此作用与抑制肿瘤细胞 MMP-9 和 VEGF 的表达有密切的关系。对氨氯地平抗肿瘤作用的深入研究有助于高效低毒的抗肿瘤药的开发。

参考文献：

[1] Yoshida J, Ishibashi T, Nishio M. Antiproliferative effect of Ca^{2+} channel blockers on human epidermoid carcinoma A431 cells [J]. Eur J Pharmacol 2003, 472(1-2): 23-31.

[2] Xu X H, Sun W J, Zhou Q X. Antiproliferative effect of amlodipine on human breast cancer MDA-MB-231 cells *in vitro*[J]. Chin J Pharmacol Toxicol, 2007, 21(4): 350.

[3] Nadar S K, Blann A D, Lip G Y. Plasma and platelet-derived vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 in hypertension: effects of antihypertensive therapy[J]. J Intern Med, 2004, 256(4): 331-337.

[4] Maehara Y, Kabashima A, Koga T, *et al*. Vascular invasion and potential for tumor angiogenesis and metastasis in gastric carcinoma [J]. Surgery, 2000, 128(3): 408-416.

[5] Yonemura Y, Fushida S, Bando E, *et al*. Lymphangiogenesis and the vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 in gastric cancer[J]. Eur J Cancer, 2001, 37(7): 918-923.

[6] 任学群，景 红，傅侃达. 血管内皮生长因子的表达和微血管密度与结直肠癌侵袭转移的关系[J]. 中国医师杂志，2004，6(5)：582-584.

[7] 段光杰，阎晓初，章 容，等. β-catenin 和 MMP-7 表达与大肠癌侵袭转移的关系研究[J]. 第三军医大学学报，2006，28(3)：227-230.

[8] 李红梅，方伟岗，时 峥，等. TIMP-2 基因转染对高转移性人巨细胞肺癌细胞系生物学行为的影响[J]. 中华医学杂志，1997，77(9)：652-656.

[9] Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, *et al*. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice[J]. Cancer Res, 1998, 58(5): 1048-1051.

[10] 赵颖海，苟新敏，陈小毅，等. VEGF、MMP-2、MMP-9 在乳腺癌组织中的表达及其对侵袭和转移的影响[J]. 广东医学院学报，2005，23(1)：1-5.

[11] Kurizaki T, Toi M, Tominaga T. Relationship between matrix metalloproteinase expression and tumor angiogenesis in human breast carcinoma [J]. Oncol Rep, 1998, 5(3): 673-677.

（编辑 龙 亮）