文章编号:1000-5404(2012)04-0361-03

短篇论著

半边旗有效成分5F对人小细胞肺癌NCIH446细胞毒性、侵袭能力、运动能力及MMP-9、uPA表达的影响

陈 杰[1],庞江琳[2],覃燕梅[1],梁念慈[1](524023 广东 湛江,广东医学院:生物化学与分子生物学教研室[1],附属医院妇产科[2])

[摘要] **目的** 探讨半边旗有效成分5F对人小细胞肺癌NCIH446细胞毒性、侵袭能力、运动能力及MMP-9、uPA表达的影响。**方法** MTT法检测5F对NCIH446细胞的增殖作用;Transwell chamber法检测5F对NCIH446细胞侵袭能力和趋化性运动能力的影响。Western blot方法检测5F对NCIH446细胞侵袭转移相关基因MMP-9、uPA表达水平的影响。**结果** 5F对NCIH446细胞的增殖有显著抑制作用($P<0.05$)。在无明显细胞毒性情况下,5F能够明显抑制NCIH446细胞的侵袭能力、运动能力($P<0.05$)。5F作用于NCIH446细胞24 h,能明显下调MMP-9、uPA蛋白表达。**结论** 5F能抑制NCIH446细胞的增殖、侵袭、转移能力,下调MMP-9、uPA表达水平,5F具有潜在抗肺癌转移的作用。

[关键词] 半边旗;5F;细胞增殖;肿瘤侵润;细胞系,肿瘤;基质金属蛋白酶-9;尿激酶型纤维蛋白酶酶原激活剂
[中图法分类号] R966;R734.2;R730.23 [文献标志码] A

肺癌的治疗中,抑制肺癌的侵袭和转移是提高患者生存率的关键。肺癌细胞发生侵袭和转移与其自身分泌蛋白酶降解细胞外基质(extracellular matrix,ECM)和基底膜密切相关,而分泌的蛋白酶中,尿激酶型纤维蛋白酶酶原激活剂(urokinase-typeplasminogen activator,uPA)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9,MMP-9)在侵袭中起到极为重要的作用[1-2]。本实验以天然药物半边旗中有效成分5F为靶点药物,研究其对小细胞肺癌NCIH446细胞的生长增殖、侵袭、转移能力影响。

1 材料与方法

1.1 细胞及试剂

NCIH446细胞购自上海细胞所,半边旗有效成分5F(纯度为55%)由广东天然药物研究开发重点实验室提供,胎牛血清购自杭州四季青公司,RPMI1640培养基购自Gibco公司,Fibronectin购自Sigma公司,Matrigel购自BD公司,Transwell小室购自corning公司,MMP-9、uPA抗体购自Santa Cruz公司。

1.2 细胞培养

NCIH446细胞培养于含10%胎牛血清,25 mmol/L HEPES,100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI1640完全培养基中,37℃、5% CO_2饱和湿度培养箱培养。细胞经过传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.3 药物配制

半边旗有效成分5F使用时用DMSO配成原液,分装冻存,临用前用无血清培养基稀释成所需浓度。药物作用于细胞时,DMSO的终浓度≤0.1%(体积比),实验表明该浓度对细胞生长无影响。

[基金项目] 国家自然科学基金(39870900);香港创新科技署合作项目(GHP/022/06)

[通信作者] 陈 杰,E-mail:jackchan818@126.com

1.4 生长增殖实验

采用MTT法:选取对数期生长的NCIH446细胞,经胰酶消化调整细胞浓度以5×10^4/ml,接种于96孔培养板内,在37℃、5% CO_2饱和湿度条件下过夜后,加入等体积不同浓度药物,每组设5个平行孔,并设RPMI1640完全培养基调零孔,置培养板于孵箱中6、24 h后,每孔加入10 μl MTT(5 mg/ml),继续培养4 h。倾去培养液,每孔加入150 μl DMSO溶解,用微量振荡器摇振15 min,以测定波长为570 nm,参考波长为450 nm,测定其光密度值。实验重复3次。

据公式计算抑制率,并绘制浓度-抑制率曲线。细胞生长增殖抑制率=(1-给药组细胞光密度值/对照组细胞光密度值)×100%。

1.5 重组基底膜侵袭实验

在Transwell小室膜的外表面涂Fibronectin 4.5 μg(10 μl),置超净台内风干,膜内表面涂Matrigel 5 μg(10 μl),风干,形成人工重组基底膜;在24孔板内加入0.1% BSA-RPMI1640培养基,每孔700 μl,收集细胞,悬浮于0.1% BSA-RPMI1640培养基中,使终浓度为1×10^6/ml;将Transwell小室浸于24孔板的条件培养基,将细胞悬液加到Transwell小室中,每小室100 μl,并同时加入各浓度药物1 μl,对照组加入等量的PBS。37℃、5% CO_2温箱内孵育6 h。将Transwell小室取出,滤膜用甲醇固定1 min,Hematoxiline染色3 min,水洗,Eosin染色10 s,水洗,用生理盐水浸湿的棉签擦去滤膜内表细胞;用封片胶将滤膜封于载玻片上,于400×显微镜下计数穿过PVPF滤膜的细胞数。每膜计数上下左右中任意5个不重叠视野,每组平行设3个滤膜。

抑制率=(1-给药组侵袭细胞数/对照组侵袭细胞数)×100%。

1.6 细胞趋化性运动能力的测定

运动实验与侵袭实验相比,PVPF滤膜上不需铺Matrigel。抑制率=(1-给药组迁移细胞数/对照组迁移细胞数)×100%。

1.7 Western blot检测5F对uPA、MMP-9蛋白表达的影响

药物作用NCIH446细胞24 h,收集细胞,用裂解液裂解细

胞,检测蛋白浓度,SDS-PAGE,将蛋白从凝胶上转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭,一抗孵育,冲洗,HRP标记的二抗孵育,冲洗,最后用ECL法检测,拍照。图像用Bandscand软件进行光密度分析,以各蛋白与β-actin的灰度值之比代表各蛋白的相对表达量。

1.8 统计学分析

数据资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 12.0统计软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 5F对NCIH446细胞生长增殖抑制作用

NCIH446细胞加入不同浓度的5F,分别培养6、24 h,用MTT法测定药物对细胞生长的影响。结果可见药物对NCIH446细胞增殖具有明显的抑制作用,并且抑制率均随浓度(剂量)和时间的增加而增加。浓度为25、50、100 μmol/L的5F用药组作用24 h,对应的抑制率为(14.31±0.89)%、(32.10±0.35)%、(46.52±0.28)%($P<0.05$),表明5F能明显抑制NCIH446细胞的生长增殖。当作用6 h,药物对NCIH446的抑制率为(2.01±0.67)%、(4.35±0.56)%、(9.16±0.38)%($P>0.05$)。表明药物在6 h内对细胞无明显的毒性。据此采用50、100 μmol/L作为侵袭和趋化运动实验的工作浓度。

2.2 5F对NCIH446细胞侵袭能力的影响

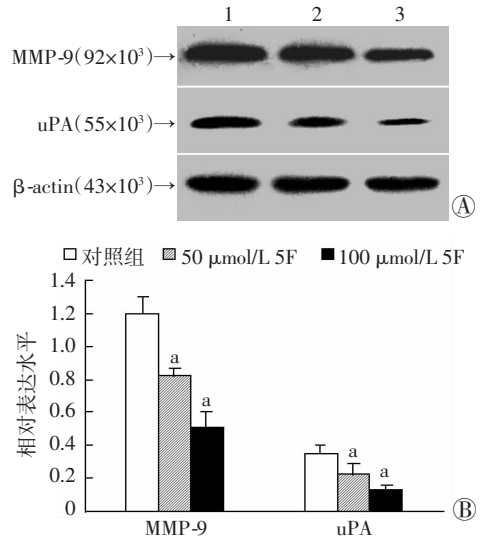
药物作用于NCIH446细胞6 h,50、100 μmol/L实验组对应的侵袭抑制率为(38.39±1.62)%、(54.65±2.18)%($P<0.05$),提示5F能明显降低细胞体外侵袭人工重组基底膜的能力。

2.3 5F对NCIH446细胞趋化运动能力的影响

5F作用NCIH446细胞6 h,5F使细胞体外趋化运动的能力明显降低,当实验组浓度为50、100 μmol/L时,对应的运动能力抑制率为(36.13±0.73)%、(50.18±1.53)%($P<0.05$)。

2.4 5F对NCIH446细胞蛋白表达的影响

结果显示,5F能明显下调uPA、MMP-9蛋白在NCIH446细胞中的表达($P<0.05$)。见图1。



A: Western blot结果 1:对照组; 2: 50 μmol/L 5F组; 3: 100 μmol/L 5F组; B:半定量分析结果 a: $P<0.05$,与对照组比较

图1 5F对NCIH446细胞uPA、MMP-9蛋白表达的影响

3 讨论

5F是从半边旗提取所得的有效成分,已有的研究结果表明,它对多种肿瘤具有抑制细胞增殖、诱导细胞凋和抑制细胞侵袭转移作用[3]。本实验结果表明,药物为100 μmol/L的实验组细胞的生长抑制率可达46.52%,表明5F可以明显抑制小细胞肺癌的细胞增殖。本实验采用小室实验证实了5F能明显抑制NCIH446细胞的侵袭转移。为了进一步探讨5F对肿瘤侵袭抑制的机制,本实验研究了与侵袭、转移密切相关的2个基因MMP-9、uPA的表达。

uPA属于丝氨酸蛋白水解酶类,它以无活性的酶原存在,在细胞表面与uPA受体(uPAR)结合后被纤溶酶、舒血管素激活[4]后,它从两方面进行细胞外基质的降解和基底酶的破坏,一方面能直接降解ECM的糖蛋白及蛋白多糖的蛋白核心部分。另一方面,它可以激活MMPs系统。uPA在很多肿瘤中均过表达,包括大肠癌、乳腺癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌等[5]。而在肺癌中,uPA的阳性表达率明显高于正常组织,而且进展性与临床特征相关,提示uPA在肺癌的进展中起到重要作用。

MMPs是一组锌离子依赖性内肽酶,而MMP-9是其中一个重要成员,相对分子质量为 92×10^3,它以酶原的形式分泌,被激活后形成Ⅳ型明胶酶,降解、破坏靠近肿瘤表面的ECM的 型胶原、层粘连蛋白和明胶,最终导致肿瘤的侵袭、转移。在肿瘤细胞中,MMP-9多呈现过表达,提示MMP-9与肿瘤的侵袭和转移密切相关[6]。uPA、MMP-9二者在肿瘤的侵袭和转移中联系密切。已有的研究表明,激活PTEN抑制PI3K信号通路,不仅可以明显减少MMP-9的表达,同时可使uPA的分泌受到抑制,从而抑制肿瘤的运动和浸润;uPA可以激活MMP-9、MMP-13等基质金属蛋白酶前体,活化的MMPS可以进一步降解细胞外基质,破坏基底膜成分,促进肿瘤细胞的侵袭和转移。Xu等[7]发现MMP-9可通过降低蛋白酶连接素1(NP-1)的表达从而增加uPA的活性。

本实验结果表明,5F抑制小细胞肺癌侵袭和转移效果明显,细胞中uPA和MMP-9的表达随药物浓度增加而下调,表明5F可能是通过上调PTEN或者是抑制FAK的表达,继而抑制PI3K途径或其他相关途径,使uPA和MMP-9的分泌减少,从而阻止或抑制肿瘤细胞侵袭和转移[8]。至于uPA与MMP-9的下调与NCIH446细胞的侵袭转移能力减弱是否存在直接关系,有待进一步研究。综上所述,5F作用小细胞肺癌NCIH446细胞,可抑制肿瘤的生长增殖,侵袭、转移能力,并下调uPA和MMP-9的表达,提示5F具有潜在的治疗肺癌作用。

参考文献：

[1] Yan L, Lin B, Gao L, *et al*. Lewis (y) Antigen Overexpression Increases the Expression of MMP-2 and MMP-9 and Invasion of Human Ovarian Cancer Cells[J]. Int J Mol Sci, 2010, 11(11): 4441 - 4452.

[2] Chen N H, Liu J W, Zhong J J. Ganoderic acid T inhibits tumor invasion *in vitro* and *in vivo* through inhibition of MMP expression[J]. Pharmacol Rep, 2010, 62(1): 150 - 163.

[3] Li M Y, Leung J, Kong A W, *et al*. Anticancer efficacy of 5F in NNK-induced lung cancer development of A/J mice and human lung cancer cells[J]. J Mol Med, 2010, 88(12): 1265 - 1276.

[4] Dass K, Ahmad A, Azmi A S, *et al*. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers[J]. Cancer Treat Rev, 2008, 34(2): 122 - 136.

[5] Ulisse S, Baldini E, Sorrenti S, *et al*. The urokinase plasminogen activator system: a target for anti-cancer therapy[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2009, 9(1): 32 - 71.

[6] 潘海邦, 王波, 杨爱军, 等. 胃癌组织中 CEACAM6、MMP-9 的表达及其与临床病理的关系[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(24): 2632 - 2635.

[7] Xu D, McKee C M, Cao Y, *et al*. Matrix metalloproteinase-9 regulates tumor cell invasion through cleavage of protease nexin-1[J]. Cancer Res, 2010, 70(17): 6988 - 6998.

[8] Huang G J, Yang C M, Chang Y S, *et al*. Hispolon suppresses SK-Hep1 human hepatoma cell metastasis by inhibiting matrix metalloproteinase-2/9 and urokinase-plasminogen activator through the PI3K/Akt and ERK signaling pathways[J]. J Agric Food Chem, 2010 58(17): 9468 - 9475.

（**收稿**：2011-09-14；**修回**：2011-10-14）
（编辑 张 维）

文章编号：1000-5404(2012)04-0363-04

短篇论著

不同强度经颅直流电刺激对帕金森大鼠旋转行为学的影响

李一言，田学隆，蒋巍巍，钱 龙，俞雪鸿 （400030 重庆，重庆大学生物工程学院生物医学信息检测实验室）

［**摘要**］ **目的** 研究不同强度阳极经颅直流电刺激(transcranial direct current stimulation, tDCS)对帕金森病(Parkinson's disease，PD)大鼠旋转行为学的影响。**方法** 根据完全随机原则，将成功造模的 32 例 PD 大鼠分成 3 个刺激组和 1 个假刺激组，每组 8 只。给予 3 个刺激组的左侧初级运动皮层(M1)区直流电刺激分别为 20、80、200 μA 的阳极刺激，刺激时间为 30 min；给予假刺激组 30 s 的假刺激。tDCS 后，对 PD 大鼠腹腔注射阿朴吗啡(apomorphine，APO)，记录 PD 大鼠旋转的潜伏期、持续时间和平均转速(30 min 内)。**结果** 刺激后，80 μA 刺激组、200 μA 刺激组均与假刺激组的平均转速组间存在显著差异（$P<0.05$）；80 μA 刺激组和 200 μA 刺激组的平均转速间差异无显著性（$P>0.05$）；各组潜伏期和持续时间组间差异无显著性（$P>0.05$）。**结论** 适当强度的 tDCS 对 PD 大鼠的旋转运动功能具有显著的改善作用。考虑到安全性，最佳的刺激强度为 80 μA。

［**关键词**］ 经颅直流电刺激；帕金森病；旋转行为；大鼠
［**中图法分类号**］ R-332；R742.5；R338.8 ［**文献标志码**］ A

帕金森病是一种常见的神经退行性疾病，主要病理改变是位于中脑的黑质多巴胺能神经元变性或缺失，使得合成的多巴胺减少，抑制乙酰胆碱的功能降低，乙酰胆碱的兴奋作用相对增强。两者失衡的结果便导致患者出现相应的症状。

经颅直流电刺激(transcranial direct current stimulation，tDCS)作为一种无创、无痛的皮层刺激方式，通过在左侧初级运动皮层施加一定强度的弱电流，从而极化局部大脑区域，刺激多巴胺的合成，引起皮层兴奋性可逆的改变，调节大脑皮层的兴奋性[1]；同时还调节皮层神经康复活动，缓解视觉病患者的疲劳和不适[2]；另外还有辅助治疗厌食症的功能[3]。尽管 tDCS 对帕金森病具有改善作用，但目前关于 tDCS 对帕金森病(Parkinson's disease，PD)大鼠行为学影响的研究甚少。本实验试图探究不同强度 tDCS 对 PD 大鼠旋转行为学的影响，以期为临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物及材料

健康雌性 Sprague-Dawley(SD)大鼠，体质量 180 ~ 260 g，鼠龄为 60 ~ 80 d，第三军医大学实验动物中心提供；6-羟基多巴胺(6-hydroxydopamine，6-OHDA)购自美国 Sigma 公司；阿朴吗啡(apomorphine，APO)购自美国 Sigma 公司；大鼠脑立体定位仪购自成都仪器厂；牙科钻购自南京立德磨具厂；抗坏血酸购自美国 Sigma 公司。

1.2 方法

实验采用单侧注射 6-OHDA 制备 PD 大鼠模型。术前给大鼠注射 APO 确认其无旋转行为，腹腔注射 APO 的目的是诱发 PD 大鼠的旋转行为。参照大鼠脑立体定向图谱[4]，采用黑质致密部(SNC)和腹侧被盖区(VTA)两点注射法[5]：对 PD 大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛(0.5 ml/100 g)麻醉。头颅水平位固定在大鼠脑立体定位仪上，保证前囟和后囟处于同一水平面。

［**基金项目**］ 第四届国家大学生创新性实验课题(101061138)
［**通信作者**］ 田学隆，E-mail：xltian@cqu.edu.cn