基础研究 文章编号:0253-3626(2011)04-0401-03

川芎嗪抑制 IL-8 诱导人卵巢癌 SKOV3 细胞的迁移作用

殷 娟[1],于 超[2],杨 竹[1]

(1.重庆医科大学附属第二医院妇产科,重庆 400010;2.重庆医科大学生命科学研究院,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察外源白介素-8(Interleukin-8,IL-8)对人卵巢癌 SKOV3 细胞迁移的影响,及川芎嗪(Tetramethylpyrazine,TMP)对它的干预作用,初步研究其可能机制。方法:TMP 处理 SKOV3 细胞后,MTT 法确定药物浓度;细胞划痕实验观察外源 IL-8对 SKOV3 细胞迁移能力的影响,采用 Transwell 法观察 TMP 对 IL-8 诱导 SKOV3 细胞迁移的干预作用;Western blot 分析 SKOV3 细胞中 E-cadherin 和基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9,MMP-9)的蛋白表达变化。结果:经 IL-8(100 ng/ml)处理后,SKOV3 细胞迁移力增加。TMP(50、100 μg/ml)具有抑制 IL-8 诱导的 SKOV3 细胞迁移作用。IL-8 使 SKOV3 细胞中 E-cadherin的表达显著降低(40.2±5.3)%,MMP-9的蛋白表达显著增加(34.6±4.4)%;而TMP可以上调 E-cadherin 的表达(74.9±6.4)%,同时使 MMP-9 的蛋白表达显著降低(86.5±5.8)%。结论:川芎嗪可以抑制 IL-8 诱导的 SKOV3 细胞迁移作用与细胞中 E-cadherin 和 MMP-9 蛋白表达变化有关。

【关键词】川芎嗪;卵巢癌;IL-8;细胞迁移

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-13

Mechanisms of TMP inhibiting cell migration in SKOV3 cells induced by extraneous IL-8

YIN Juan, et al

(*Department of Obstetries and Gynecology, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate whether tetramethylpyrazine (TMP) has the activity of inhibition on cell migration induced by extraneous Interleukin-8 (IL-8) in SKOV3 cell, and to understand its probable mechanisms. *Methods*: MTT was used to determine the concentrations of TMP. The wound healing assay and transwell assay were used to study the cell migration. The protein expression levels of E-cadherin and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) were detected by Western blot. *Results*: IL-8 (100 ng/ml) increased the ability of cell migration in SKOV3 cell, TMP (50, 100 μg/ml) inhibited this process. IL-8 down-regulated the protein expression of E-cadherin (40.2±5.3)%, and up-regulated the protein expression of MMP-9 (34.6±4.4)% respectively and significantly, and TMP (50, 100 μg/ml) increased the expression of E-cadherin (74.9±6.4)% and decreased the expression of MMP-9 (86.5±5.8)% in SKOV3 cells. *Conclusion*: TMP inhibits cell migration induced by extraneous IL-8, which correlates with variable protein expression changes of E-cadherin and MMP-9 in SKOV3 cells.

【Key words】tetramethylpyrazine (TMP); ovarian carcinoma; interleukin-8 (IL-8); cell migration

卵巢癌细胞的转移是多因素、多步骤的过程。白介素-8(Interleukin-8,IL-8) 或者 CXCL8 属于 CXC 家族炎症趋化因子,高水平的 IL-8 在肿瘤微环境中,具有促进肿瘤细胞迁移的作用[1]。因此,发现能够抑制 IL-8 诱导的肿瘤迁移的化合物,可以为新药开发提供一定的实验数据。

川芎(Ligustrazine)化学名为2,3,5,6-四甲基吡嗪(Tetramethylpyrazine,TMP),是最早从中药川芎根茎中提取而成的生物碱类化合物。主要用于心血管疾病的治疗,具有抗炎、抗氧化、抗凝和钙拮抗的作用。近年来,TMP 来在肿瘤中的研究也有新的发现,它既可直接抑制肿瘤细胞的生长,还具有抗肿瘤转移、增强化疗药物疗效、逆转多耐药、减毒和细胞保护等生物学效应[2,3]。然而,TMP 抑制肿瘤细胞转移的分子机制至今仍不清楚。本实验从 IL-8 可以诱导人卵巢癌细胞迁移为出发点,建立体外模型,通过 TMP 干预,初步探明其可能的抑制作用及相应的分子机制。

作者介绍:殷 娟(1984-),女,硕士,研究方向:妇科肿瘤。

通信作者:杨 竹,女,研究员,Email:cqyangz@vip.163.com。

基金项目:重庆市科委自然科学基金资助项目(编号:CSTC2009BA5083);重庆医科大学重点基金资助项目(编号:XBZD200806)。

1 材料与方法

1.1 材料

RPMI1640 培养基及胎牛血清(杭州四季青),胰蛋白

酶(美国 Gibco 公司)，卵巢癌细胞株(SKOV3 保存于重庆医科大学生命科学研究院)，TMP(美国 sigma 公司)，细胞裂解液(美国 CST 公司)，Transwell 小室(美国 Corning 公司)，羊抗兔 β-actin 及 E-cadherin(美国 CST 公司)，羊抗鼠 MMP-9(美国 santa 公司)，重组人 IL-8(上海欣百诺公司)。

1.2　MTT 法检测 TMP 对细胞的增殖情况

将细胞接种于 96 孔板中，24 h 后加入 DMSO (1‰) 或不同浓度 TMP(25、50、100、200、400 μg/ml)，各组设 5 个复孔。培养 24 h，加入 MTT 孵育 3 h，弃上清加入 DMSO，摇床上振荡 10 min，酶标仪比色(波长 490 nm)，测光密度值 D_{490}，并计算 TMP 对 SKOV3 细胞的抑制率。抑制率 =1-(药物组D_{490}-空白组 D_{490}) × 100%。

1.3　细胞划痕实验

将 SKOV3 细胞接种于 24 孔板中，待细胞长至 90%融合度时，各孔细胞用 10 μl 枪头划 3 条直线。PBS 清洗 3 次后，分别加入空白培养基及不同浓度的重组人 IL-8（50、100 ng/ml）。培养 24 h 后，每孔细胞随机选取 5 个视野倒置显微镜下采集图像，每组设 3 个复孔，各孔重复 2 次。

1.4　Transwell 小室实验

具体方法参照 Transwell 说明书进行。下室中加入 IL-8（100 ng/ml），将 SKOV3 细胞悬液接种于上室。孵育 12 h 后，下室中加入不同浓度的 TMP（50、100 μg/ml）与 IL-8 共孵育 24 h。取出上室，用棉签擦去微孔上层的细胞，PBS 洗涤 3 次，4%多聚甲醛中固定 10 min 后苏木晶染色 15 min，PBS 再洗涤 3 次。倒置显微镜 400 倍视野下计数上室微孔下层的细胞。每组设 3 个复孔，计数 5 个视野细胞的平均数，实验重复 3 次。

1.5　Western blot

SKOV3细胞经 IL-8（100 ng/ml）处理 12 h 后，加入 TMP（50、100 μg/ml）共孵育 24 h。收获细胞，用细胞裂解液提取蛋白；BSA 法测蛋白浓度，取等量蛋白样品（60 μg），SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳，将蛋白电转至 PVDF 膜上，5%脱脂奶粉封闭 1 h；一抗 4℃孵育过夜，二抗常温下孵育 2 h，DAB 显色照相。Quantity One 软件对得到的条带进行灰度分析。

1.6　统计学分析

每组实验至少重复 3 次，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SAS 8.0 进行统计分析，多组间比较若方差齐者采用单因素方差分析（SNK 法）；方差不齐者行多组间 Kruskal-Wallis 秩和检验，2 组间差异采用校正 t' 检验，以 $P<0.05$ 和 $P<0.008\ 3$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　MTT 法检测 TMP 对 SKOV3 细胞的生长抑制作用

TMP 处理 SKOV3 细胞 24 h 后，细胞增殖情况如图 1 所示。与对照组相比，低浓度的 TMP（25~100 μg/ml）对细胞增殖抑制作用，没有统计学意义（$P>0.05$）；而 200 μg/ml 的TMP 对细胞增殖有显著抑制作用（$P<0.05$）。因此，本文中使用 25~100 μg/ml 的 TMP 用于处理细胞。

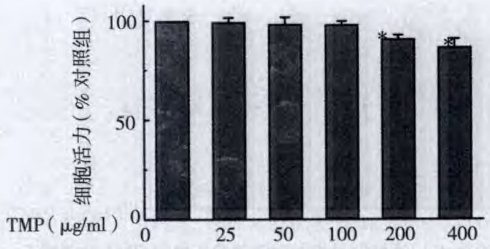


图 1　不同浓度 TMP 作用下各组细胞的生长抑制率（*$P<0.05$）

2.2　IL-8 对 SKOV3 细胞迁移作用的影响

划痕实验检测外源 IL-8 对 SKOV3 细胞迁移能力的影响。如表 1 和图 2 所示，与对照组相比，IL-8 组中细胞划痕的宽度较窄，以 IL-8（100 ng/ml）组效果最明显。以上结果表明外源 IL-8 有促进 SKOV3 细胞迁移的作用。

表 1　IL-8 促进 SKOV3 细胞的迁移作用（$\bar{x} \pm s$）

组别	例数(n)	划痕的宽度（mm）
对照组	6	1.3 ± 0.3
IL-8（50 ng/ml）	6	0.8 ± 0.2*
IL-8（100 ng/ml）	6	0.6 ± 0.2*

注：*$P<0.05$，与对照组相比

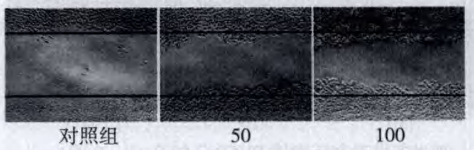


图 2　IL-8 对 SKOV3 细胞迁移作用的影响

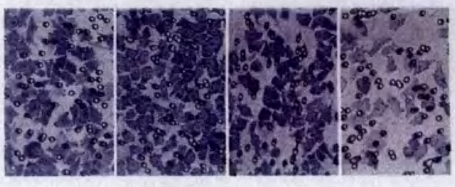
2.3　TMP 对 IL-8 促 SKOV3 细胞迁移作用的干预

Transwell 小室实验结果如表 2 和图 3 所示，与对照组（60.2 ± 8.5）相比，IL-8 组中迁移到小室滤膜下表面的细胞数明显增多（88.7 ± 10.9），其差异具有统计学意义（$P<0.008\ 3$）；在此模型中加入 TMP（50 μg/ml），迁移至小室滤膜下表面的细胞数为（58.4 ± 7.9），其差异无统计学意义；而高浓度 TMP（100 μg/ml）组中，迁移至小室滤膜下表面的细胞数明显减少（26.9 ± 5.9），与模型组比较其差异具有统计学意义（$P<0.008\ 3$）。这些结果证明 TMP 能抑制外源 IL-8 诱导的细胞迁移。

表 2　SKOV3 细胞在不同组中迁移至小室下室的细胞计数（$\bar{x} \pm s$）

组别	迁移至下室的细胞计数
对照组	60.2 ± 8.5
IL-8（100 ng/ml）	88.7 ± 10.9*
TMP（50 μg/ml）+IL-8（100 ng/ml）	58.4 ± 7.9
TMP（100 μg/ml）+ IL-8（100 ng/ml）	26.9 ± 5.9#

注：*$P<0.008\ 3$，与对照组相比；#$P<0.008\ 3$，与 IL-8 组相比



TMP（μg/ml）	0	0	50	100
IL-8（ng/ml）	0	100	100	100

图 3　TMP 抑制 IL-8 诱导的细胞迁移

2.4 TMP 对 E-cadherin 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示（表 3、图 4），与对照组相比，外源 IL-8使 E-cadherin 蛋白表达水平下调（40.2 ± 5.3）%，而TMP 可以上调 E-cadherin 的表达，以 TMP 100 μg/ml 组效果最明显（74.9 ± 6.4）%，半定量结果显示其差异具有统计学意义（P<0.008 3）。

表 3 SKOV3 细胞在不同组中 E-cadrerin 的蛋白表达（$\bar{x} \pm s$）

组别	E-cadherin	β-actin
对照组	80.1 ± 7.9	75.3 ± 7.6
IL-8（100 ng/ml）	49.5 ± 5.4*	78.7 ± 8.3
TMP（50 μg/ml）+IL-8（100 ng/ml）	51.6 ± 6.2	79.4 ± 8.9
TMP（100 μg/ml）+IL-8（100 ng/ml）	174.4 ± 10.4#	74.8 ± 7.5

注：*P<0.008 3，与对照组相比；#P<0.008 3，与 IL-8 组相比



IL-8（ng/ml）	0	100	100	100
TMP（μg/ml）	0	0	50	100

图 4 Western blot 检测 TMP 对 E-cadherin 表达的影响

2.5 TMP 对 MMP-9 蛋白表达的影响

如图 5 和表 4 所示，与对照组相比，外源 IL-8 可以使MMP-9 蛋白的表达水平增加（34.6 ± 4.4）%，而经过 TMP 处理后，细胞中 MMP-9 的表达显著降低，同样以 TMP 100 μg/ml 效果最明显（86.5 ± 5.8）%。

表 4 SKOV3 细胞在不同组中 MMP-9 的蛋白表达（$\bar{x} \pm s$）

组别	MMP-9	β-actin
对照组	50.1 ± 4.9	65.9 ± 5.6
IL-8（100 ng/ml）	76.6 ± 5.2*	64.5 ± 5.3
TMP（50 μg/ml）+IL-8（100 ng/ml）	31.6 ± 4.2	66.8 ± 5.9
TMP（100 μg/ml）+IL-8（100 ng/ml）	10.32 ± 4.0#	65.8 ± 5.5

注：*P<0.008 3，与对照组相比；#P<0.008 3，与 IL-8 组相比



IL-8（ng/ml）	-	100	100	100
TMP（μg/ml）	-	-	50	100

图 5 Western blot 检测 TMP 对 MMP-9 表达的影响

3 讨 论

卵巢癌是女性生殖器三大恶性肿瘤之一，其发病隐匿，早期缺乏特异性症状和体征，约 70%左右的病例在确诊时已属晚期并伴有远处转移[4]。临床上卵巢癌以手术治疗和化学疗法为主，但晚期伴有远处转移的卵巢癌已失去了最佳手术时机，即使能手术，术后亦易于复发和转移。由此可知，有效预防和（或）抑制卵巢癌的侵袭与转移将是临床治疗成败的关键所在。

包括卵巢癌在内的实体瘤主要由肿瘤细胞与间质细胞组成，在卵巢癌的发生发展过程中，间质细胞分泌大量细胞因子，比如 IL-8，具有促进肿瘤细胞迁移的作用，与癌症患者的不良预后密切相关[5]。本文通过细胞划痕实验也证实了IL-8 具有促进卵巢癌 SKOV3 细胞迁移的作用，因此，IL-8 不失为一个治疗卵巢癌的新靶点[6]。

近年来的研究表明 TMP 具有抗肿瘤的作用[7]，它可以对抗由 IL-8 引起的生物学行为改变[8]。为此，我们推测 TMP 具有抑制 IL-8 诱导的 SKOV3 细胞迁移的作用。本研究首先通过 MTT 法筛选出对 SKOV3 细胞毒性较小的 TMP 浓度，在此基础上，通过 Transwell 实验证实了外源 IL-8 促进 SKOV3 细胞迁移，与划痕实验结果相符；而当加入了 TMP 后，发生迁移的细胞数量明显减少，说明 TMP 具有抑制 SKOV3 细胞迁移的作用。

有文献报道，白介素类细胞因子可以使肿瘤细胞发生上皮间充质改变（Epithelial-mesenchymal transition，EMT），从而促进肿瘤细胞的迁移，此外，E-cadherin 的表达减少是发生 EMT 的标志性分子生物事件[9]。Yoshiko Kuwabara 等研究发现 E-cadherin 的下调与癌细胞转移有关[10]。为此，为了探明 TMP 是如何发挥抑制 IL-8 所诱导细胞迁移的作用，本文通过Western blot 发现，IL-8 使 E-cadherin 蛋白表达水平下调，而加入TMP 后，E-cadherin 表达水平有所恢复。说明 TMP 抑制 IL-8 诱导的 SKOV3 细胞迁移，部分归因于细胞中 E-cadherin 表达增加。另外，基质金属蛋白酶家族（Matrix metalloproteinases，MMPs）中的 MMP-9，可以通过水解胞外基质成分，破坏正常组织屏障，促进癌细胞的转移[11]。通过临床研究发现，在上皮性卵巢癌组织中，MMP-9 的表达上调，其在上皮性卵巢癌的生长和转移过程中发挥着重要作用[11]。另有临床研究证明 IL-8 不但可以上调 MMP-9 的表达而且还能增加 MMP-9 的活性，从而促进癌细胞的生长与转移[12]。在本文中，我们观察到 IL-8 上调人卵巢癌细胞 SKOV3 中 MMP-9 的蛋白表达水平，这与文献报道相符；而 TMP 可以抑制 IL-8 所致 MMP-9 的高表达。表明 TMP 干预 IL-8 诱导的卵巢癌细胞迁移可能与细胞中 MMP-9 蛋白表达水平受到抑制有关。

包括卵巢癌在内的恶性肿瘤的转移是多因素多步骤的过程，寻找 1 个合适的治疗靶点是目前卵巢癌治疗的研究重点，IL-8 有促进人卵巢癌 SKOV3 细胞迁移的生物学特性，引起肿瘤微环境中 IL-8 表达升高的因素均有望成为卵巢癌治疗的新靶点；通过本研究可见抗炎治疗在卵巢癌的综合治疗中起着重要作用。

参 考 文 献

[1] Singh R K, Gutman M, Radinsky R, et al. Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice[J].Cancer Res, 1994, 54(12): 3242-3247.

[2] Chen L, Lu Y, Wu J M, et al.Ligustrazine inhibits B16F10 melanoma metastasis and suppresses angiogenesis induced by vascular endothelial growth factor[J].Biochem Biophys Res Commun, 2009, 386(2): 374-379.

基础研究 文章编号：0253-3626（2011）04-0404-04

成纤维细胞生长因子受体 1 在小鼠肾发育中的表达

田 娟[1]，王 堃[2]，郭 敏[1]

（辽宁医学院 1. 组织学与胚胎学教研室；2. 附属第一医院党政办公室，锦州 121001）

【摘 要】目的：观察成纤维细胞生长因子受体 1（Fibroblast growth factor receptors 1，FGFR1）在小鼠肾发育中的时空性表达，探讨 FGFR1 与肾发育的关系。方法：应用免疫组织化学技术结合体视学方法和免疫印迹法，测定不同胚龄（E）11.5、13.5、15.5 d 和 17.5 d 及生后日龄（P）1、7、14、21 d 和 40 d 小鼠肾组织内 FGFR1 的表达及其含量变化。结果：免疫组织化学结果显示 FGFR1 在各期肾小体、远端小管及集合管内均有表达，但在各期远端小管和集合管表达较强，而在各期肾小体表达较弱。体视学测量和免疫印迹结果均显示随着胚日龄的增加，FGFR1 在各期肾小体、远端小管及集合管的表达量逐渐增加。结论：FGFR1 可能对肾各结构的发育以及成熟肾的形态维持起重要作用。

【关键词】成纤维细胞生长因子受体 1；肾；发育；小鼠

【中国图书分类法分类号】R329.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-10-29

Expression of fibroblast growth factor receptor 1 in the developing kidney of mouse

TIAN Juan, et al

(*Department of Histology and Embryology, Liaoning Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To observe the temporospatial expression of fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1) in the developing kidney of mouse, and investigate the relation between fibroblast growth factor receptor 1 and kidney development. *Methods*: The expression of FGFR1 was examined by immunohistochemistry, stereological method and Western blot in embryo and postnatal mouse kidneys, including embryos (E11.5, 13.5, 15.5, 17.5 d) and postnatal mice (P1, 7, 14, 21, 40 d). *Results*: Immunohistochemical analysis showed that FGFR1 was expressed in all stages of glomeruli, distal tubules and collecting ducts. The results of stereology and Western blot showed that during kidney development, the expression of FGFR1 was increased in all stages of glomeruli, distal tubules and collecting ducts. *Conclusion*: FGFR1 might play an important role in kidney development and maturation.

【Key words】fibroblast growth factor receptor 1; kidney; development; mouse

作者介绍：田 娟（1976-），女，讲师，博士，研究方向：肾脏发育生物学。

通信作者：郭 敏，女，教授，Email：mguo1118@yahoo.com.cn。

基金项目：辽宁省教育厅科学技术研究资助项目（编号：L2010274）；辽宁医学院青年科技启动基金资助项目（编号：Y2010Z005）。

[3] 符慧群，唐雪元，潘宇亮.川芎嗪和顺铂联合用对小鼠 Lewis 肺癌生长和转移的抑制作用[J].南华大学学报·医学版，2008，36(1)：46-49.

[4] 沈 锫，郎景和.卵巢上皮性癌诊断和治疗中应注意的问题[J].中华妇产科杂志，2003，38(2)：65-69.

[5] Xie K.Interleukin-8 and human cancer biology[J].Cytokine Growth Factor Rev，2001，12(4)：375-391.

[6] Merritt W M，Lin Y G，Spannuth W A，et al.Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth[J].J Natl Cancer Inst，2008，100(5)：359-372.

[7] Fu Y S，Lin Y Y，Chou S C，et al.Tetramethylpyrazine inhibits activities of glioma cells and glutamate neuro-excitotoxicity：Potential therapeutic application for treatment of gliomas[J].Neuro Oncol，2008，10(2)：139-152.

[8] Li X Y，He J L，Liu H T，et al.Tetramethylpyrazine suppresses interleukin-8 expression in LPS-stimulated human umbilical vein endothelial cell by blocking ERK，p38 and nulear factor-kappaB signaling pathways [J].J Ethnopharmacol，2009，125(1)：83-89.

[9] Sullivan N J，Sasser A K，Axel A E，et al.Interleukin-6 induces an epithelial-mesenchymal transition phenotype in human breast cancer cells [J].Oncogene，2009，28(33)：2940-2947.

[10] Kuwabara Y，Yamada T，Yamazaki K，et al.Establishment of an ovarian metastasis model and possible involvement of E-cadherin down-regulation in the metastasis[J].Cancer Sci，2008，99(10)：1933-1939.

[11] 李道成，梁立治，邓高丕.MMP-9 在上皮性卵巢癌组织中的表达及临床意义[J].实用癌症杂志，2008，23(1)：1-2.

[12] Inoue K，Slaton J W，Eve B Y，et al.Interleukin 8 expression regulates tumorigenicity and metastases in androgen-independent prostate cancer[J].Clin Cancer Res，2000，6(5)：2104-2119.

（责任编辑：冉明会）