维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0403-04

川芎嗪对白血病细胞 Jurkat 粘附、运动和侵袭的影响

张 伟,戴碧涛,汪明宇,徐酉华,于 洁,王世一,宪 莹,刘筱梅

(重庆医科大学附属儿童医院血液科,重庆 400014)

【摘 要】目的:研究川芎嗪(Ligustrazine)对人急性淋巴细胞白血病(Acute lymphoblastic leukemia,ALL)细胞株 Jurkat 粘附、运动和侵袭的抑制作用。方法:Jurkat 细胞体外培养,经 50 μg/ml、100 μg/ml、150 μg/ml 川芎嗪分别处理细胞,通过细胞粘附实验、细胞迁移实验和细胞侵袭实验全面观察川芎嗪对 Jurkat 细胞粘附力、运动力和侵袭力的影响。计量资料的多组比较采用方差分析(One-Way ANOVA)。结果:与对照组比较,50 μg/ml、100 μg/ml、150 μg/ml 川芎嗪可显著降低 Jurkat 细胞的运动力和降解基底膜的侵袭力($P<0.01$);100 μg/ml、150 μg/ml 川芎嗪能有效抑制 Jurkat 细胞与纤维粘连蛋白的粘附力($P<0.01$);50 μg/ml 川芎嗪抑制作用不明显($P>0.05$)。结论:川芎嗪能从细胞粘附、运动和侵袭等多环节全面抑制 Jurkat 细胞侵袭转移能力,是一种较好的白血病细胞侵袭转移的抑制剂,其抑制作用呈剂量依赖性。

【关键词】川芎嗪;白血病;细胞;粘附;运动;侵袭

【中国图书分类法分类号】R285.5;R730.52 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-17

Effects of ligustrazine on adhesion, migration and invasion of Jurkat cells

ZHANG Wei, et al

(*Department of Hematology, the Children's Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the inhibitory effects of ligustrazine on adhesion, migration and invasion of human acute lymphoblastic leukemia(ALL) cell line Jurkat. *Methods*: Jurkat cells were cultured in vitro and treated by 50 μg/ml, 100 μg/ml and 150 μg/ml ligustrazine respectively. Then the adhesion, migration and invasion of Jurkat cells were measured with cell adhesion test, cell migration test and cell invasion test. The measurement data was collected and the multi-samples were analyzed by analysis of variance(One-Way ANOVA). *Results*: Compared with control group, 50 μg/ml, 100 μg/ml and 150 μg/ml ligustrazine could significantly inhibit the migration of Jurkat cells and their invasion to basement membrane ($P<0.01$), and 100 μg/ml and 150 μg/ml ligustrazine could effectively inhibit adhesion of Jurkat cells to fibronectin ($P<0.01$) but the function of 50 μg/ml ligustrazine was not obvious ($P>0.05$). *Conclusion*: By roundly inhibiting adhesion, migration and invasion of Jurkat cells, ligustrazine is a good inhibitor to leukemia and the inhibitory effects are dose dependent.

【Key words】 Ligustrazine; Leukemia; Cell; Adhesion; Migration; Invasion

白血病是儿童最常见的恶性肿瘤,我国 <10 岁小儿白血病发生率为(3~4)/10^5,其中 90% 以上是急性白血病,以 ALL 最常见。近十年来由于化疗的不断改进,ALL 的缓解率显著提高,5 年无病生存率达 70%~80%。但是,在临床上白血病发生侵袭和转移是 ALL 复发和治疗失败的主要原因,也是临床医生治疗 ALL 最棘手的问题之一。白血病侵袭和转移是一个复杂的过程,细胞的粘附力、运动力、侵袭力是其侵袭转移的重要因素,本研究通过观察川芎嗪对 Jurkat 细胞粘附、运动和侵袭的影响,进一步探讨川芎嗪抗肿瘤的作用。

作者介绍:张 伟(1981-),男,硕士,
研究方向:儿童血液肿瘤的诊治。

通讯作者:戴碧涛,女,副教授,主任医师,E-mail:bitaodai@126.com。

基金项目:重庆市卫生局中医处科研基金(2004-B-70)。

1 材料和方法

1.1 细胞株和主要试剂

人 ALL 细胞株 Jurkat、小鼠胚胎成纤维细胞系 NIH3T3 由重庆医科大学儿科研究所外科/肿瘤实验室提供,盐酸川芎嗪注射液购自巴西英尔制药(西化)有限公司,RPMI1640 培养基购自美国 GIBCO 公司,优级胎牛血清、小牛血清白蛋白(BSA)购自天津 TBD 公司,四甲基偶氮唑盐(MTT)购自美国 Sigama 公司,二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Amresco 公司,人工重构基底膜胶(Matrigel)购自美国 BD 公司,纤维粘

维普资讯 http://www.cqvip.com

连蛋白(FN)购自美国 Roche 公司,聚碳酸酯微孔滤膜(Millicell 小室)购自美国 Millipore 公司。

1.2 细胞培养和分组

Jurkat 细胞培养在含 10%优级胎牛血清、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素、pH7.4 的 RPMI1640 培养液中,置 37℃、5%CO_2 培养箱内。细胞培养 2d 后换液,长满瓶底 80%后传代,取对数生长期的细胞用于实验,于实验前 1d 给细胞换液。处理组在培养液中加入川芎嗪,按不同浓度分为处理组 1、2、3,使其终浓度分别为 50μg/ml、100μg/ml、150μg/ml。对照组只加等量的培养液,不加川芎嗪。

1.3 细胞生长曲线测定

用含 10%优级胎牛血清的 RPMI1640 培养液调整 Jurkat 细胞密度为 1×10^5 个 /ml,分别将 200μl 细胞悬液接种于 96 孔培养板,每天每组各取 5 孔,细胞计数板计数,共做 7d,绘制细胞生长曲线。

1.4 细胞粘附实验[1]

用无血清 RPMI1640 培养液稀释 FN,终浓度为 0.1g/L,以 50μl/ 孔加入 96 孔培养板,4℃过夜,包被备用。吸出培养板中残余液体,每孔加入 50μl含 10g/L BSA 的无血清 RPMI1640 培养液,置 37℃孵育 30min。配制含 10g/L BSA 和体积分数为 1%优级胎牛血清的 RPMI1640 培养液,调整 Jurkat 细胞密度为 5×10^5 个 /ml,分别将 200μl 细胞悬液接种于包被 FN 的 96 孔培养板,另设空白组,只加等量的培养液而不加细胞悬液和川芎嗪,每组平行设 3 个复孔。置 37℃、5%CO_2 培养箱内常规培养 1h 后,分别弃去上清液,PBS 冲洗除去未粘附细胞,弃 PBS 后加 MTT 液(5mg/ml)20μl/ 孔,置 37℃培养箱内孵育 4h,平板离心机离心(1 000r/min)5min,弃上清,每孔加入 DMSO 150μl,振荡 2min 后,酶标仪测各孔细胞 490nm 处光吸收值(A 值),间接计数粘附细胞数。以对照组 A 值为参照,按以下公式计算细胞粘附率:

粘附率=[(实验组 A 值 - 空白组 A 值)/(对照组 A 值 - 空白组 A 值)]×100%

1.5 细胞迁移实验[1]

制备条件培养液:用含 10%优级胎牛血清 RPMI1640 培养液在 37℃、5%CO_2 培养箱内培养 NIH3T3,在细胞长势良好的情况下换无血清 RPMI1640 培养液继续培养 24h,然后收集培养上清液,过滤除菌,分装保存于 -20℃备用。用无血清 RPMI1640 培养液调整 Jurkat 细胞密度为 1×10^6 个 /ml,将 Millicell 小室放入 24 孔培养板,在上室加入 200μl 细胞悬液,在下室加入条件培养液和含 10%优级胎牛血清 RPMI1640 培养液各 200μl,另设空白组,只加等量的培养液而不加细胞悬液和川芎嗪,每组平行设 3 个复孔。置 37℃、5%CO_2 培养箱内常规培养 8h 后,取出 Millicell 小室,收集运动至下室的 Jurkat 细胞,MTT 法(同细胞粘附实验)测 A 值间接计数迁移细胞数。以对照组 A 值为参照,按以下公式计算细胞迁移率:

迁移率=[(实验组 A 值 - 空白组 A 值)/(对照组 A 值 - 空白组 A 值)]×100%

1.6 细胞侵袭实验[1]

用无血清 RPMI1640 培养液适当稀释 Matrigel(按试剂说明书操作),取 50μl Matrigel 稀释液均匀包被 Millicell 小室底部的正面,室温风干。取 50μl FN(0.1g/L)均匀包被 Millicell 小室底部的反面,室温风干。将包被 Matrigel 和 FN 的 Millicell 小室放入 24 孔培养板,上室培养液为含 10g/L BSA 和体积分数为 1%优级胎牛血清的 RPMI1640 培养液,调整 Jurkat 细胞密度为 1×10^5 个 /ml,将 200μl 细胞悬液接种到上室,下室加入条件培养液和含 20%优级胎牛血清 RPMI1640 培养液各 200μl,每组平行设 3 个复孔。置 37℃、5%CO_2 培养箱内常规培养 48h 后,取出 Millicell 小室,PBS 冲洗上室,用棉签擦去微孔滤膜上层的细胞,固定穿过微孔滤膜侵袭至下室的细胞,瑞士染色,在 400 倍光镜下计数穿膜细胞数,每张膜随机选 10 个视野。以对照组侵袭细胞数为参照,按以下公式计算细胞侵袭率:

侵袭率=(实验组侵袭细胞数 / 对照组侵袭细胞数)×100%

1.7 统计学分析

所得结果均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据分析采用 SPSS12.0,计量资料的多组比较采用方差分析(One-Way ANOVA),$P<0.05$ 有统计学意义,$P<0.01$ 有显著性差异。

2 结 果

2.1 川芎嗪对 Jurkat 细胞增殖和形态学的影响

细胞生长曲线测定显示,随着药物浓度的增加和作用时间的延长,川芎嗪对 Jurkat 细胞增殖抑制作用明显增强,呈剂量和时间依赖性。50μg/ml、100μg/ml、150μg/ml 川芎嗪分别作用 Jurkat 细胞 48h,细胞生长抑制率依次为 10.7%、18.5%、27.1%(图 1),光镜下观察,处理组细胞形状规则呈圆形,大小均匀,胞核圆形,核浆比例适当,细胞聚集呈团状生长,与对照组细胞相比无明显改变。表明 50μg/ml、100μg/ml、150μg/ml 川芎嗪在 48h 内抑制 Jurkat 细胞增殖的作用不明显,符合细胞粘附实验、细胞迁移实验、细胞侵袭实验的要求。

2.2 川芎嗪对 Jurkat 细胞粘附力的影响

由表 1 可以看出,3 个处理组粘附到 FN 上的细胞数受到不同程度的抑制,细胞粘附率随川芎嗪浓度的增加而逐渐降低,抑制作用呈剂量依赖性。经统计学分析,处理组 1 与对照组之间差别无统计学意义($P>0.05$),处理组 2、3 与对照组比较有显著性差异($P<0.01$),处理组 1、2 之间以及处理组 2、3 之间差别无统计学意义($P>0.05$),处理组 1、3 之间差别有统计学意义($P<0.05$)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

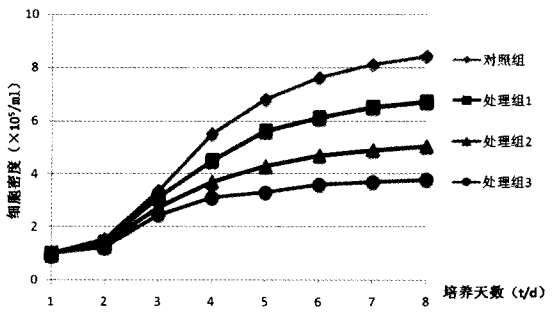


图 1 不同浓度川芎嗪作用于 Jurkat 细胞的生长曲线

2.3 川芎嗪对 Jurkat 细胞运动力的影响

由表 2 可以看出，3 个处理组运动穿膜至下室的细胞数受到不同程度的抑制，细胞迁移率随川芎嗪浓度的增加而逐渐降低，抑制作用呈剂量依赖性。经统计学分析，处理组 1、2、3 与对照组比较有显著性差异（$P<0.01$），3 个处理组之间两两比较差异均有显著性（$P<0.01$）。

2.4 川芎嗪对 Jurkat 细胞侵袭力的影响

由表 3 可以看出，3 个处理组降解 Matrigel 胶和侵袭穿膜至下室的细胞数受到不同程度的抑制，细胞侵袭率随川芎嗪浓度的增加而逐渐降低，抑制作用呈剂量依赖性。经统计学分析，处理组 1、2、3 与对照组比较有显著性差异（$P<0.01$），3 个处理组之间两两比较差异均有显著性（$P<0.01$）。

3 讨 论

恶性肿瘤侵袭和转移是其生物学特性之一，肿瘤侵袭转移最终成为大多数癌症患者死亡的原因。目前研究表明，肿瘤侵袭转移是一个多因素、多步骤参与的复杂过程，主要包括肿瘤细胞增殖，通过膜表面受体粘附于基底膜和细胞外基质，然后分泌或利用细胞膜上的多种蛋白酶降解基底膜和基质，最后定向运动穿过破损的基底膜和基质到达侵袭部位[2,3]。白血病是造血系统的恶性肿瘤，其侵袭和转移过程与实体肿瘤略有差别，但也包括细胞粘附、基质降解、细胞运动和侵袭以及转移灶形成等过程。因此，白血病细胞的粘附力、运动力、侵袭力

表 1 不同浓度川芎嗪对 Jurkat 细胞与 FN 粘附力的影响（$n=5$）

组别	吸光度 A 值	粘附率（%）
对照组	0.219 ± 0.021	100
处理组 1（50 μg/ml）	0.205 ± 0.018	86.8 ± 0.4
处理组 2（100 μg/ml）	0.196 ± 0.017	79.2 ± 1.9
处理组 3（150 μg/ml）	0.188 ± 0.014	71.7 ± 2.2
空白组	0.109 ± 0.008	

表 2 不同浓度川芎嗪对 Jurkat 细胞运动力的影响（$n=5$）

组别	吸光度 A 值	迁移率（%）
对照组	0.334 ± 0.014	100
处理组 1（50 μg/ml）	0.303 ± 0.010	87.5 ± 0.5
处理组 2（100 μg/ml）	0.271 ± 0.013	75.1 ± 0.8
处理组 3（150 μg/ml）	0.238 ± 0.012	61.9 ± 1.2
空白组	0.082 ± 0.003	

表 3 不同浓度川芎嗪对 Jurkat 细胞侵袭力的影响（$n=5$）

组别	侵袭细胞数（个）	侵袭率（%）
对照组	133 ± 9	100
处理组 1（50 μg/ml）	108 ± 10	81.4 ± 2.2
处理组 2（100 μg/ml）	87 ± 10	66.0 ± 3.6
处理组 3（150 μg/ml）	65 ± 9	50.0 ± 5.3

维普资讯 http://www.cqvip.com

是评价白血病细胞侵袭转移的主要指标。近年来，抗肿瘤侵袭转移的研究已受到越来越多的关注，我国传统中药在这方面有其独特的作用，寻找有效的抗肿瘤侵袭转移的药物也成为研究的热点。

川芎嗪是从中药伞形科植物川芎的根茎中提取的一种活性生物碱，现已能人工合成，主要成分为2,3,5,6-四甲基吡嗪(Tetramethylpyrazine,TMP)，分子式为 $C_8H_{12}N_2$，分子相对质量为 136.2。川芎嗪具有典型的钙离子拮抗剂的特性，有较强的扩张微血管、改善微循环、降低血粘度、改善血液流变学、降低毛细血管通透性、调节血小板功能和抗凝等作用，临床应用广泛。大量研究结果表明，川芎嗪在抗肿瘤方面具有抑制肿瘤细胞生长、逆转肿瘤细胞多药耐药、化疗增效与减毒、放射增敏与放射保护以及调节免疫等作用[4]。有关川芎嗪抑制肿瘤侵袭转移的报道少见，主要是研究川芎嗪对肿瘤细胞转移过程中血液循环的影响，且集中在实体肿瘤，本研究则通过细胞粘附实验、细胞迁移实验、细胞侵袭实验全面评价川芎嗪对白血病细胞 Jurkat 侵袭转移能力的抑制作用。

川芎嗪能抑制 Jurkat 细胞增殖，为了减少这种抑制作用在细胞粘附实验、细胞迁移实验、细胞侵袭实验中的影响，本研究选用的川芎嗪对 Jurkat 细胞 48h 增殖抑制率 <30%。实验结果显示，经 50μg/ml、100μg/ml、150μg/ml 川芎嗪处理后，Jurkat 细胞与 FN 的粘附率分别降至 86.8%、79.2%、71.7%，与对照组比较，100μg/ml、150μg/ml 川芎嗪组差异有显著性($P<0.01$)，50μg/ml 川芎嗪组无明显差异($P>0.05$)。在细胞迁移实验和细胞侵袭实验中，经 50μg/ml、100μg/ml、150μg/ml 川芎嗪处理后，无论是运动穿膜细胞数还是侵袭穿膜细胞数都明显少于对照组，差异有显著性($P<0.01$)，并且 3 个处理组之间也有显著性差异($P<0.01$)。结果表明，川芎嗪能有效抑制 Jurkat 细胞与 FN 的粘附力，并可显著降低 Jurkat 细胞的运动力和降解穿透基底膜的侵袭力，从而证实川芎嗪不是仅仅通过侵袭转移的某个环节，而是通过多个环节全面实现其抑制作用，并且呈剂量依赖性。

目前有关川芎嗪抑制肿瘤细胞侵袭转移的具体机制尚不十分清楚，大量研究表明，基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinase,MMPs)对肿瘤侵袭和转移起重要作用。在肿瘤细胞侵袭过程中，MMPs 结合肿瘤细胞后直接诱导宿主细胞产生更多 MMPs，主要通过以下几种机制促进肿瘤侵袭和转移：(1)MMPs 破坏肿瘤细胞周围的物理屏障；(2)MMPs 可重塑细胞粘附力以便肿瘤细胞向周围生长；(3)MMPs 作用于基质成分后激发潜在的生物活性参与肿瘤的免疫过程；(4)MMPs 通过降解细胞外基质促进肿瘤血管的形成[5,6]。有文献报道，MMP-2 和 MMP-9 在急性白血病细胞中高表达，并且在急性白血病的发生和髓外侵润中发挥重要作用[7,8]。因此，我们将在本研究的基础上进一步探讨川芎嗪抑制白血病细胞侵袭转移的具体机制，研究川芎嗪对白血病细胞 MMPs 表达的影响。

参 考 文 献

[1] 司徒镇强，吴军正.细胞培养[M]. 第 1 版.西安：世界图书出版公司，2004.216-228.

[2] Kohn EC,Liotta LA.Molecular insights into cancer invasion: strategies for prevention and intervention[J]. Cancer Res,1995;55(9): 1856-1862.

[3] Ludwig T.Local proteolytic activity in tumor cell invasion and metastasis[J]. Bioessays,2005;27(11):1181-1191.

[4] 王 昕，陈信义.川芎嗪对肿瘤细胞影响研究概况与展望[J].中国中药杂志，2003;28(4):295-298.

[5] Klein G,Vellenga E,Fraaije MW,et al. The possible role of matrix metalloproteinase(MMP)-2 and MMP-9 in cancer,e.g. acute leukemia[J]. Crit Rev Oncol Hematol,2004;50(2):87-100.

[6] Sun Y,Dong LJ.Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis and therapy of leukemia[J]. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi,2003;11(3):316-320.

[7] 赵莉敏，孙 慧，李晓文，等.MMP-2 和 MMP-9 在急性白血病骨髓细胞中的表达及与白血病髓外浸润的相关性[J]. 临床血液学杂志，2005;18(6):326-328.

[8] Kuittinen O,Savolainen ER,Koistinen P,et al. MMP-2 and MMP-9 expression in adult and childhood acute lymphatic leukemia (ALL)[J]. Leuk Res,2001;25(2):125-131.

(责任编辑：冉明会)