

不伤阴耗血。附子配白芍，回阳而益阴、祛寒而止痛。

本研究结果显示，附子、白芍提取物均有降低大鼠血清中炎性细胞因子 PGE₂、IL-1 β 和 TNF- α 含量的作用，减缓类风湿关节炎免疫介导炎症反应的作用，具有较好的抗炎作用，提示附子白芍提取物可能通过抑制 PGE₂、IL-1 β 和 TNF- α 的合成和释放来发挥抗炎的作用。本实验对附子与白芍配伍前后疗效进行比较，研究附子与白芍配伍的意义，结果附子与白芍配伍具有显著治疗作用，且配伍后作用优于单用附子或单用白芍，充分体现了中医配伍理论的显著意义，为临床运用中药治疗炎性疼痛提供了依据。

REFERENCES

- [1] 张林, 罗容, 鲁艺, 等. 中药镇痛新药开发的中西医结合研究进展[J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(6): 543-545.
- [2] CHEN X H, ZHANG L, WANG H M, et al. Effects of tanshinone on the changes of TNF- α , IL-1 β and IL-1Ra in rabbit model with spinal cord ischemia reperfusion injury [J]. Chin J Tradit Med Traumatol Orthop(中国中医骨伤科杂志), 2012, 20(4): 1-3.
- [3] PARK C K, LÜ N, XU Z Z, et al. Resolving TRPV1 and TNF- α -mediated spinal cord synaptic plasticity and

inflammatory pain with neuroprotectin D1 [J]. J Neurosci, 2011, 31(42): 15072-15085.

- [4] 张湘杰, 何永恒. 花椒、延胡索、没药、三七镇痛的药理学研究概述[J]. 海峡药学, 2009, 21(2): 62.
- [5] 高冲, 刘平. 中药镇痛作用机制及其发展概况[J]. 承德医学院学报, 2010, 27(3): 321-323.
- [6] 刘家骅. 药对[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 324.
- [7] 邵传森, 朱圣禾. 临床疾病与免疫[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 125.
- [8] 徐淑云, 卞如钪, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 915.
- [9] LU J, XING J H, LI J H. Prostaglandin E2 (PGE2) inhibits glutamatergic synaptic transmission in dorsolateral periaqueductal gray (dl-PAG) [J]. Brain Res, 2007(1162): 38-47.
- [10] ZHANG W H, JIANG J P. Roles and mechanisms of interleukin-1 β during inflammatory pain [J]. Chin Bull Life Sci(生命科学), 2010, 22(3): 291-295.
- [11] CHEN J, SONG Y, YANG J, et al. The contribution of TNF- α in the amygdala to anxiety in mice with persistent inflammatory pain [J]. Neuroscience Lett, 2013(541): 275-280.
- [12] HU C L, LIN B, ZHENG C J, et al. Advances in studies on natural medicines and their action mechanism for treatment of rheumatoid arthritis [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药), 2011, 42(7): 1435-1439.
- [13] ZHENG Y Q, WEI W. Total glucosides of paeony suppresses adjuvant arthritis in rats and intervenes cytokine-signaling between different types of synoviocytes [J]. Int Immunopharmacol, 2005, 5(10): 1560-1573.

收稿日期: 2014-07-12

异硫氰酸苄酯抑制人胶质瘤 U87MG 细胞体外侵袭和诱导凋亡的作用和机制

霍焱¹, 魏会宇¹, 马永建¹, 朱彧^{2*} (1.天津医科大学眼科医院药剂科, 天津医科大学眼视光学院, 天津医科大学眼科研究所, 天津 300384; 2.天津市环湖医院检验科, 天津 300060)

摘要: 目的 研究异硫氰酸苄酯对人胶质瘤 U87MG 细胞体外侵袭和凋亡的影响, 并初步探讨其作用机制。方法 采用 MTS 实验考察异硫氰酸苄酯对肿瘤细胞体外增殖的抑制作用; 2, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异硫氰酸苄酯作用 24 h 后, 采用 Transwell 实验、黏附实验和划痕实验观察异硫氰酸苄酯对人胶质瘤细胞侵袭、黏附和迁移能力的影响; 应用 Real-time-PCR 和 Western blot 法检测相应浓度异硫氰酸苄酯处理后人胶质瘤 U87MG 细胞中 MMP-2、MMP-9、CD44、Survivin、Bcl-2、Net1、RhoA、caspase-3、caspase-8 和 p-AKT 的表达变化; 应用报告基因技术检测 NF- κ B 转录活性的变化; 采用 ELISA 法测定胞内 8-OH-dG 含量; 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异硫氰酸苄酯作用 24 h 后, 采用流式细胞术观察其对细胞凋亡的作用。结果 异硫氰酸苄酯可显著抑制人胶质瘤 U87MG 细胞体外增殖; 与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, 2, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异硫氰酸苄酯对人胶质瘤细胞 U87MG 侵袭、黏附和迁移能力有明显的抑制作用; 不同浓度异硫氰酸苄酯处理后, 肿瘤细胞 MMP-2、MMP-9、CD44、Survivin、Bcl-2、NET1 和 RhoA 的 mRNA 和蛋白表达、AKT 磷酸化水平和 NF- κ B 转录活性明显下调, caspase-3 和 caspase-8 表达以及 8-OH-dG 含量显著上调; 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 异硫氰酸苄酯可显著诱导细胞凋亡。结论 异硫氰酸苄酯抑制人胶质瘤细胞 U87MG 的侵袭能力, 诱导细胞凋亡, 其机制可能与抑制 AKT/NF- κ B 信号转导途径, 进而调节侵袭和凋亡相关基

基金项目: 天津市卫生局科技基金(2013KY17); 天津市应用基础与前沿技术计划(14JCQNJC12000)

作者简介: 霍焱, 男, 药师 Tel: (022)58280827 E-mail: zhuyutj@126.com *通信作者: 朱彧, 男, 博士, 副主任技师 Tel: (022)60367853 E-mail: zhuyutj@126.com

因表达有关。

关键词: 异硫氰酸苄酯; 脑胶质瘤; U87MG 细胞; 侵袭

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2015)05-0542-07

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.05.006

Effect and Mechanism of Benzyl Isothiocyanate Inhibiting Invasion and Inducing Apoptosis of Human Glioma U87MG Cell Lines

HUO Yan¹, WEI Huiyu¹, MA Yongjian¹, ZHU Yu^{2*} (1. Department of Pharmacy, Tianjin Medical University Eye Hospital, the College of Optometry and Ophthalmology, Tianjin Medical University Eye Institute, Tianjin 300384, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Tianjin Huanhu Hospital, Tianjin 300060, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the effect and mechanism of benzyl isothiocyanate on the invasion inhibition and apoptosis induce of human glioma cancer U87MG cell lines. **METHODS** MTS assay was employed to determine the effect of benzyl isothiocyanate on the proliferation of tumor cells. After treatment with 2 and 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ benzyl isothiocyanate, Transwell assay, adhesion assay and scratch assay were employed to evaluate the potential of invasive, adhesion and migration in U87MG human glioma cells. Real-time-PCR and Western blot assay was employed to evaluate the mRNA and protein expression levels of MMP-2, MMP-9, CD44, Survivin, Bcl-2, caspase-3, caspase-8, Net1, RhoA and p-AKT. Report gene assay was employed to evaluate the transcriptional activity of NF- κ B, ELISA assay was employed to detect the level of 8-OH-dG, flow cytometry assay was employed to evaluate the apoptosis rate with 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ benzyl isothiocyanate treatment. **RESULTS** Benzyl isothiocyanate significantly inhibited the proliferation of U87MG. With 2 and 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ benzyl isothiocyanate, the invasion of U87MG cells was inhibited, the expression of MMP-2, MMP-9, CD44, Survivin, Bcl-2, NET1, RhoA, p-AKT and the transcriptional activity of NF- κ B was down regulated, as well as an increase in activity of caspase-3, caspase-8 and 8-OH-dG level. Apoptosis rate was improved with 10 and 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ benzyl isothiocyanate treatment compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group. **CONCLUSION** Benzyl isothiocyanate can significantly inhibit the invasion and induce the apoptosis of human glioma U87MG cell lines via regulation of metastasis and apoptosis-related genes, which may be related to AKT/NF- κ B pathways.

KEY WORDS: benzyl isothiocyanate; gliomas; U87MG cell lines; invasion

胶质瘤是中枢神经系统最常见的难治性肿瘤, 具有呈恶性生长、侵袭性强、预后不佳等特点。侵袭、转移行为是恶性肿瘤的本质特性, 也是肿瘤患者治疗失败和致死的主要原因, 对其分子机制的研究已经成为抗肿瘤研究的热点。异硫氰酸酯(benzyl isothiocyanate, BITC)是一种有机小分子, 普遍存在于蔬菜中^[1]。近年来, BITC 的抗肿瘤活性受到高度重视。多项研究表明, BITC 具有抗肿瘤作用, 能抑制肺癌、肝癌、乳腺癌等多种肿瘤的生成和转移^[2-4]。本研究将 BITC 作用于体外培养的人胶质瘤 U87MG 细胞, 旨在观察其对胶质瘤细胞侵袭转移和凋亡的影响, 并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 仪器和材料

人胶质瘤细胞 U87MG(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库), 培养于含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵育, 取对数生长期细胞进行实验。BITC(美国 Sigma 公司, 批号: 252492); Transwell(Corning 公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号: 556547)和

Matrigel 胶均购自 BD Biosciences 公司; DMEM 培养基、胎牛血清、实时荧光定量 PCR 试剂盒和反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司。青霉素-链霉素溶液(碧云天生物技术研究)。抗 MMP-2、MMP-9、CD44、神经上皮细胞转化基因 1(neuroepithelial cell transforming gene 1, NET1)和 RhoA 抗体购于 Santa Cruz 公司; Survivin、Bcl-2、caspase-3、caspase-8 和 p-Akt 抗体均购于 Cell Signaling Technology 公司; 抗 β -actin 抗体(美国 Sigma 公司); 抗鼠和抗兔二抗和增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂盒(批号: 34075)购自美国 Pierce Biotechnology 公司; NF- κ B 荧光素酶质粒(美国 Promega 公司); 8-羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-2'-deoxyguanine, 8-OH-dG)ELISA 检测试剂盒(北京艾然生物科技有限公司, 批号: ARB10033); 其他常用试剂为本实验室常规保存。BD CaliburTM 流式细胞仪(BD Biosciences 公司); Real-Time PCR 仪(美国 ABI 公司); 电泳和转膜系统为 Bio-Rad 公司产品; PVDF 膜(Millipore 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人胶质瘤细胞 U87MG 置于

DMEM 培养基中, 在含 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素、 $100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素培养液和 10%胎牛血清的条件下, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、饱和湿度下培养。待细胞长至 80%后, 常规更换培养液, 0.25%胰酶消化, 以 1:3 的比例传代继续培养。

1.2.2 细胞 MTS 实验 取对数生长期的细胞, 以 3×10^4 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种到 96 孔微孔板中, $100\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{孔}^{-1}$, 培养过夜使细胞贴壁。向对应试验孔加入 0, 1, 2, 5, 10, 20, 50 和 $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC, 继续培养 72 h, 吸去培养基, 按照试剂盒说明书加入 MTS 试剂, 最后用酶标仪测定 490 nm 处的 OD 值, 并计算药物对细胞的抑制率。抑制率=(1-实验组 OD 值/对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。以 BITC 浓度的对数为横坐标, 抑制率为纵坐标, 作图并拟合抑制曲线, 50%抑制率所对应的化合物浓度即为 IC_{50} 值。

1.2.3 细胞 Transwell 实验 Transwell 小室底部铺上 $60\text{ }\mu\text{L}$ Matrigel 基质胶, $200\text{ }\mu\text{L}$ 的含 5×10^5 细胞的 0.1% BSA 无血清培养基悬液加入上室, 加入 $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC, 下室加入 $600\text{ }\mu\text{L}$ 的含 10%胎牛血清的完全培养基, 置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 恒温孵箱培养 24 h。然后用棉签小心拭去基质胶及上室面细胞, 甲醇固定膜下层细胞, 结晶紫室温染色 25 min, PBS 洗 3 遍, 显微镜下随机选择 5 个视野, 计数细胞数。独立实验重复 3 次。

1.2.4 细胞黏附实验 取对数生长期的 U87MG 细胞, 接种于铺有 $20\text{ }\mu\text{L}$ Matrigel 基质胶的 96 孔板中, $2\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 的培养基, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱继续培养 6 h, PBS 洗 3 次, 通过 MTS 法检测细胞黏附率。细胞黏附率/%=OD 处理组/OD 对照组 $\times 100\%$ 。

1.2.5 细胞划痕实验 取对数生长期的 U87MG 细胞, 接种于 6 孔板内, 贴壁后划痕, 显微镜下分别观察 0, 2 和 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 处理 24 h 后划痕愈合情况, 考察肿瘤细胞迁移能力的变化。

1.2.6 流式细胞术实验 取对数生长期的 U87MG 细胞, 接种于 6 孔板内, 10 和 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 处理 24 h 后, 0.25%的胰酶消化, $2\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞, PBS 洗 2 次, $2\text{ }000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 收集细胞, 根据 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作, BD 流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。

1.2.7 Real-time 荧光定量 PCR 实验 收集 2 和 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 处理 24 h 的 U87MG 细胞, 采用

Trizol 一步法从细胞中提取总 RNA, 使用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 浓度及纯度。取总 RNA $2\text{ }\mu\text{g}$, 按反转录试剂盒操作说明合成 cDNA。以 cDNA 为模板进行 Real-time PCR 反应, GAPDH 作为内参照, ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上 SYBR Green I 染料检测各基因的表达情况。MMP-2 上游引物: 5'-TGATCTTGACCAGAATACCATCGA-3', 下游引物: 5'-GGCTTGCGAGGGAAGAAGTT-3'; MMP-9 上游引物: 5'-GACGCCGCTCACCTTCACTC-3', MMP-9 下游引物: 5'-CTTGCCCAGGGACCACAACCTC-3'; CD44 上游引物: 5'-TGGCACCCGCTATGTCCAG-3', CD44 下游引物: 5'-GTAGCAGGGATTCTGTCTG-3'; Survivin 上游引物: 5'-ACCAGGTGAGAAGTGAGGGA-3', Survivin 下游引物: 5'-AACAGTAGAGGAGCCAGGGA-3'; Bcl-2 上游引物: 5'-CTGCACCTGACGCCCTTCACC-3', Bcl-2 下游引物: 5'-CACATGACCACACCGAACTCAAAGA-3'; GAPDH 上游引物: 5'-AACGGGAAGCTTGTCAATGGAAA-3', GAPDH 下游引物: 5'-GCATCAGCAGAGGGGGCAGAG-3'。根据实时荧光定量扩增曲线获取目的基因和内参基因的 CT 值, 以 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析目的基因表达的相对定量值(RQ 值) 进行统计学分析。

1.2.8 蛋白质印迹法(Western blot)实验 收集 2 和 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (转移相关基因表达检测)或 10 和 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (凋亡相关基因表达检测)BITC 处理 24 h 的 U87MG 细胞沉淀, 用 RIPA 裂解法提取细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。 $40\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白样品经 10% SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜(150 mA, 1 h), 5%脱脂牛奶封闭 1 h 后, 再加入一抗(MMP-2 1:400, MMP-9 1:400, CD44 1:200, AKT 1:500, NF- κB p65 1:300, NET-1 1:400, RhoA 1:400, Survivin 1:1 000, Bcl-2 1:1 000, caspase-3 1:1000, caspase-8 1:1 000, p-AKT 1:1 000, p-NF- κB p65 1:1 000, 内参 β -actin 1:2 000) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用含 0.1% Tween-20 的 TBST 清洗 3 次后, 加入二抗室温孵育 1 h, 增强化学发光法(ECL)化学检测系统(美国 Pierce 公司)检测, X 光胶片适度曝光。

1.2.9 ELISA 实验 2 和 $5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 处理 U87MG 细胞 72 h 后, 更换无血清培养基继续培养 24 h, 收集细胞上清, 通过 8-OH-dG ELISA 试剂盒按照说明书要求检测培养基上清中 8-OH-dG 含量。

1.2.10 报告基因实验 取对数生长期的 U87MG 细胞, 接种于 6 孔板内, NF- κ B 荧光素酶质粒转染细胞后 6 h, 更换新鲜培养基, 加入 2, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 处理 24 h 后, 根据荧光素酶检测试剂盒说明书进行操作, 检测细胞的荧光强度变化。

1.2.11 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计软件包进行分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组之间的比较用重复测量的方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BITC 可显著抑制 U87MG 细胞体外增殖

用 MTS 法考察 BITC 作用 72 h 后对 U87MG 细胞体外增殖的抑制作用, 结果显示 BITC 可显著抑制 U87MG 细胞体外增殖, IC_{50} 为 $15.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果见图 1。2, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 作用肿瘤细胞 24 h 后, 抑制率为 3.8% 和 11.6%, 分别为无毒(抑制率 $< 5\%$)和低毒(抑制率 $< 15\%$)浓度。采用上述 2 种浓度进行细胞侵袭、黏附、迁移能力和基因表达研究, 以排除细胞增殖抑制对结果的影响。

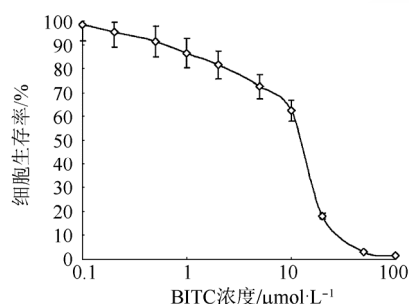


图 1 BITC 对胶质瘤 U87MG 细胞体外增殖的抑制作用

Fig. 1 Inhibition effect of BITC on proliferation of U87MG cells

2.2 BITC 抑制胶质瘤 U87MG 细胞的体外侵袭、黏附和迁移能力

Transwell 实验、黏附实验和划痕实验结果显

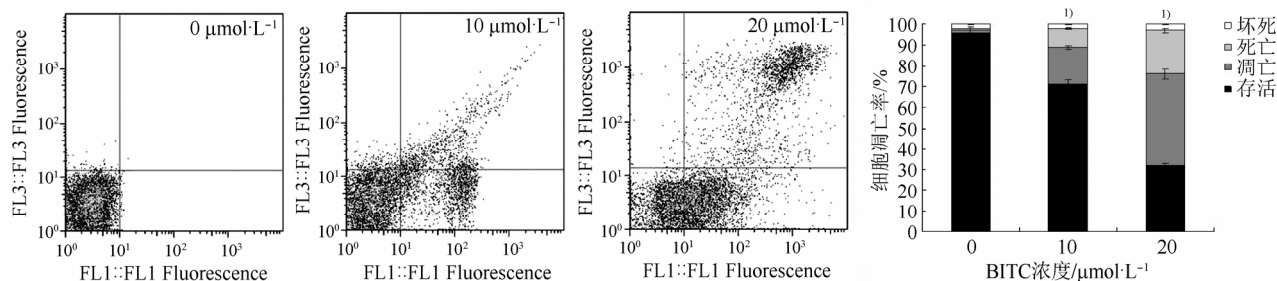


图 3 BITC 对胶质瘤 U87MG 细胞凋亡的诱导作用

与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, $^{1)}P < 0.05$ 。

Fig. 3 BITC induced apoptosis of U87MG cells

Compared with $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group, $^{1)}P < 0.05$.

示, BITC 处理组穿膜细胞数和细胞黏附率显著减少, 细胞迁移能力显著下降。结果见图 2。

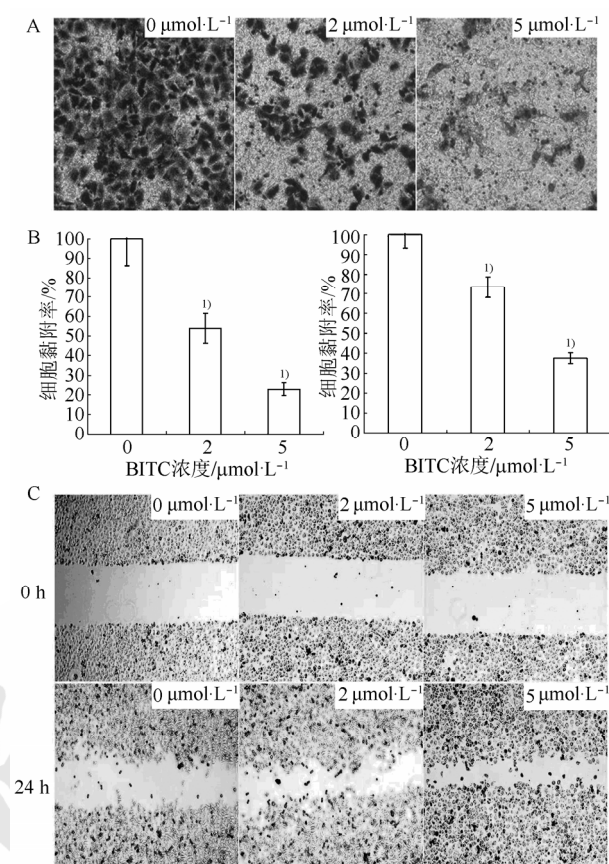


图 2 BITC 对胶质瘤 U87MG 细胞的体外侵袭(A)、黏附(B)和迁移能力(C)的抑制作用

与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, $^{1)}P < 0.05$ 。

Fig. 2 Inhibition effect of BITC on invasive(A), adhesion(B) and migration(C) of U87MG cells

Compared with $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group, $^{1)}P < 0.05$.

2.3 BITC 诱导 U87MG 细胞的凋亡

流式细胞术结果显示, 与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 处理组 U87MG 细胞凋亡率显著升高, 分别为 29.3% 和 68.6%, 结果见图 3。

2.4 BITC 促进 U87MG 细胞的 8-OH-dG 表达

氧化性 DNA 损伤在生物体细胞老化、死亡的发生过程中起重要作用, 自由基一直被认为是引起 DNA 损伤的主要因素之一。8-OH-dG 是活性氧基团引起的 DNA 氧化损伤修饰产物之一, 是目前 DNA 损伤中常用的生物标志物。2, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 作用 U87MG 细胞 72 h 后, 通过 ELISA 试剂盒检测细胞培养基上清中 8-OH-dG 含量。2, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 处理组 U87MG 细胞 8-OH-dG 含量显著上升, 说明 BITC 处理能引起 U87MG 细胞内 DNA 氧化损伤产生的 8-OH-dG 增加。结果见图 4。

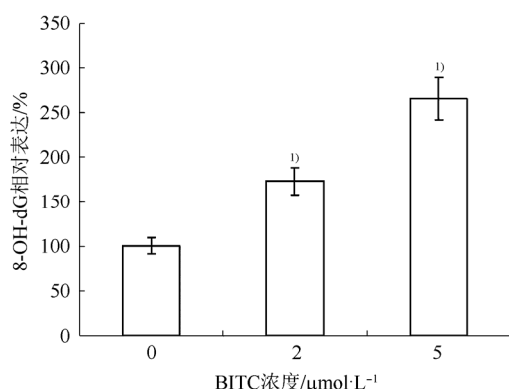


图 4 BITC 对胶质瘤 U87MG 细胞 8-OH-dG 表达的作用与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 4 Effect of BITC on expression of 8-OH-dG in U87MG cells

Compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group, $^{1)}P<0.05$.

2.5 BITC 对 U87MG 细胞侵袭和凋亡相关基因表达的作用

Real-time PCR 和 Western blot 分析结果显示, 与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, 2, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 作用 U87MG 细胞 24 h 后, 细胞内 MMP-2、MMP-9、CD44、Survivin、Bcl-2、NET1、RhoA 蛋白和 mRNA 表达显著降低, caspase-3 和 caspase-8 蛋白(激活形式)表达显著升高, 结果见图 5。

2.6 BITC 对 AKT/NF- κB 信号路径的影响

Akt 是信号传导通路中重要的蛋白激酶, 是 P13K 下游的靶蛋白^[5]。NF- κB 是 Akt 重要的下游分子之一, 其异常活化可促进肿瘤细胞的浸润和转移^[6]。Western blot 结果显示, 与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, 2, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BITC 作用 U87MG 细胞 24 h 后, BITC 能明显抑制 Akt 磷酸化, NF- κB 转录活性是 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的 36.7%和 18.5%。结果见图 6。

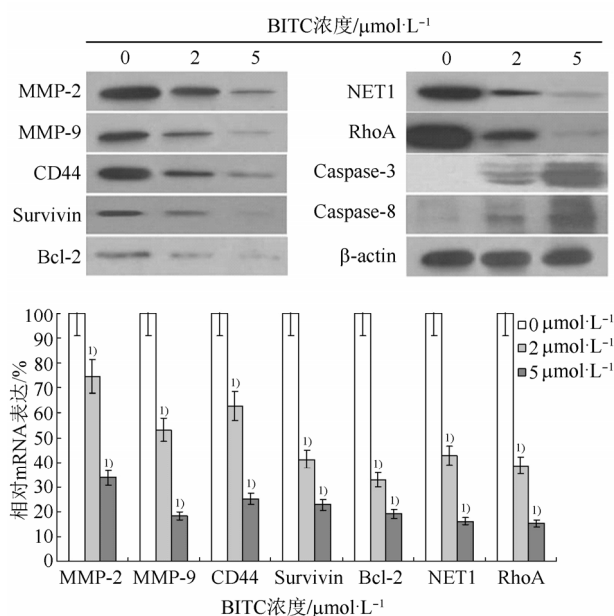


图 5 BITC 对胶质瘤 U87MG 细胞侵袭和凋亡相关基因表达的作用

与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比, $^{1)}P<0.05$ 。

Fig. 5 Effect of BITC on protein expression levels of U87MG cells

Compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ group, $^{1)}P<0.05$.

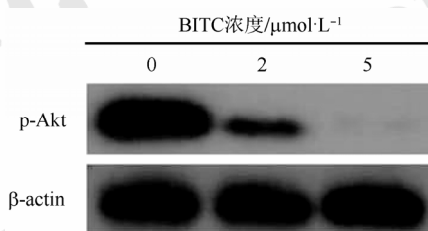


图 6 BITC 对胶质瘤 U87MG 细胞 Akt 磷酸化的作用

Fig. 6 Effect of BITC on phosphorylation of Akt in U87MG cells

3 讨论

脑胶质瘤是最常见的原发性颅内肿瘤, 恶性胶质瘤约占所有胶质瘤的 80%, 其复发、侵袭及转移是引起肿瘤患者治疗失败和死亡的主要原因之一^[7-8]。肿瘤侵袭和转移的过程是一个多步骤、多阶段、多因素的复杂过程。因此, 控制肿瘤的侵袭和转移是改善肿瘤患者预后, 提高患者生存率和生活质量的重要措施。然而目前尚无有效抑制肿瘤侵袭转移的药物。

BITC 是提取于十字花科植物的小分子化合物, 多项研究报道, BITC 在肿瘤的发生发展中发挥抑制作用, 并且由于其不良反应小, 被认为是一种比较理想的抗肿瘤物质^[2-4,9]。但其在抑制肿瘤侵袭转移特别是在恶性胶质瘤的研究报道较少。

肿瘤转移、侵袭与多种转移相关蛋白降解和破坏细胞外基质有关,以 MMP-2 和 MMP-9 基质为代表的金属蛋白酶(MMPs)家族成员是降解和破坏细胞外基质的主要蛋白水解酶类,其表达与胶质瘤的浸润及转移有着密切关系^[10-11]。CD44 是存在于细胞表面的跨膜糖蛋白,是介导转移的主要黏附分子,主要参与肿瘤细胞与宿主细胞和宿主基质的黏附^[12],其表达可能与胶质瘤的血管浸润潜能密切相关^[13-14]。本实验发现,BITC 对 MMP-2、MMP-9 和 CD44 的 mRNA 和蛋白表达均有较强抑制作用,同时对 U87MG 细胞的迁移侵袭能力也有较强对抗作用($P<0.05$),提示 BITC 有可能通过调节肿瘤组织侵袭与转移相关基因蛋白的表达而发挥抗黏附和抑制侵袭转移作用。

NET1 是新近发现的一个肿瘤侵袭转移相关蛋白,在肿瘤细胞的侵袭转移中起重要作用^[15]。由于 NET1 蛋白是 RhoA 蛋白特异性的鸟苷酸交换因子(GEFs),可通过 DH-PH 结构域调节 GTP 与 RhoA 蛋白的结合,从而调节 RhoA 蛋白的活性,参与调控细胞的运动迁移、细胞与细胞之间以及细胞与基质之间的黏附等^[16-17]。有研究表明,NET1 蛋白激活 RhoA 蛋白可以促进恶性胶质瘤细胞的侵袭转移能力^[18-19]。本实验发现,BITC 对 NET1 和 RhoA 的蛋白表达有较强抑制作用,提示异硫氰酸酯对 U87MG 细胞侵袭转移的抑制作用可能与 NET1 表达调控相关。

细胞凋亡是控制细胞生存和死亡的关键机制,在肿瘤发生、发展中起着重要的调节作用。Survivin 是新近发现的一种凋亡抑制基因,Survivin 基因过度表达抑制了细胞凋亡,有利于细胞的异常增殖和恶性转化^[20]。Survivin 通过抑制 caspase 级联反应下游的 caspase-3、caspase-7 发挥其抗凋亡作用^[21]。Bcl-2 基因是迄今研究得最深入、最广泛的凋亡调控基因之一,已被证实存在于多种肿瘤组织中。Bcl-2 抑制凋亡的机制可能与清除自由基,抑制钙离子释放,抑制凋亡基因的作用有关^[22-23]。有研究发现 Bcl-2 不改变内源性过氧化物产生的速度,但能完全阻止脂质过氧化,保护细胞免受 H_2O_2 和甲萘醌诱导的氧化损伤,因此说明 Bcl-2 与抗氧化有关。本实验发现,BITC 作用于人胶质瘤 U87MG 细胞后,细胞凋亡率和氧化损伤增强,而 Survivin 及 Bcl-2 表达水平有明显的下调趋势,且 caspase-3 和 caspase-8 活性有了明

显的提升,提示 BITC 可能通过抑制 Bcl-2,促进细胞的氧化损伤从而诱导细胞的凋亡,还可能抑制 Survivin 作用而激活 caspase-3 和 caspase-8 等 caspase 级联反应诱导细胞凋亡。

Akt 是信号传导通路中重要的蛋白激酶,通过其活性形式 p-Akt 参与肿瘤的发生发展^[7]。NF- κ B 是一种重要的核转录因子,是 Akt 重要的下游分子之一,其异常活化可调节与细胞增殖和凋亡有关的基因转录,溶解细胞外间质,促进肿瘤细胞的浸润和转移^[6,24-25]。多项研究表明,PI3K/Akt/NF- κ B 途径与肿瘤凋亡和侵袭转移有着密切的联系。本研究中发现,BITC 能明显抑制 p-Akt 和 NF- κ B 的活化,提示 BITC 对 U87MG 细胞侵袭转移的抑制作用和凋亡诱导可能涉及 Akt/NF- κ B 信号途径。

综上所述,本研究结果证实,BITC 对 U87MG 细胞侵袭有明显抑制作用,其可能机制为 BITC 抑制了肿瘤细胞内 MMP2、MMP9 和 NET1 等肿瘤侵袭相关蛋白的表达,而且还涉及 Akt/NF- κ B 信号途径。BITC 还能诱导细胞的凋亡,其机制可能是 BITC 抑制凋亡抑制基因 Survivin 和 Bcl-2 的作用,从而促进细胞的氧化损伤,促进细胞凋亡。但该过程是否有其他细胞因子的影响尚不明确。BITC 抑制侵袭的作用机制还有待进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] HECHT S S, UPADHYAYA P, WANG M, et al. Inhibition of lung tumorigenesis in A/J mice by *N*-acetyl-S-(*N*-2-phenethylthiocarbamoyl)-L-cysteine and myo-inositol, individually and in combination [J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(9): 1455-1461.
- [2] LIU B N, YAN H Q, WU X, et al. Apoptosis induced by benzyl isothiocyanate in gefitinib-resistant lung cancer cells is associated with Akt/MAPK pathways and generation of reactive oxygen species [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 66(1): 81-92.
- [3] HWANG E S, LEE H J. Benzyl isothiocyanate inhibits metalloproteinase-2/-9 expression by suppressing the mitogen-activated protein kinase in SK-Hep1 human hepatoma cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(7): 2358-2364.
- [4] KIM S H, SEHRAWAT A, SINGH S V. Notch2 activation by benzyl isothiocyanate impedes its inhibitory effect on breast cancer cell migration [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 134(3): 1067-1079.
- [5] GERSHTEIN E S, SCHERBAKOV A M, SHATSKAYA V A, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signalling pathway components in human breast cancer: clinicopathological correlations [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(4A): 1777-1782.
- [6] SUN Z J, CHEN G, HU X, et al. Activation of PI3K/Akt/IKK- α /NF- κ B signaling pathway is required for the apoptosis-evasion in human salivary adenoid cystic carcinoma: its inhibition by quercetin [J]. *Apoptosis*, 2010, 15(7):

- 850-863.
- [7] JOVCEVSKA I, KOCEVAR N, KOMEL R. Glioma and glioblastoma-how much do we (not) know? [J]. Mol Clin Oncol, 2013, 1(6): 935-941.
- [8] MAZLOOM A, ZANGENEH A H, PAULINO A C. Prognostic factors after extraneural metastasis of medulloblastoma [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2010, 78(1): 72-78.
- [9] ZHU Y, ZHUANG J X, WANG Q, et al. Inhibitory effect of benzyl isothiocyanate on proliferation *in vitro* of human glioma cells [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2013, 14(4): 2607-2610.
- [10] CHAUDHARY A K, PANDYA S, GHOSH K, et al. Matrix metalloproteinase and its drug targets therapy in solid and malignancies: an overview [J]. Mutat Res, 2013, 753(1): 7-23.
- [11] SHUMAN MOSS L A, JENSEN-TAUBMAN S, STETLER-STEVENSON W G. Matrix metalloproteinases: changing roles in tumor progression and metastasis [J]. Am J Pathol, 2012, 181(6): 1895-1899.
- [12] ICZKOWSKI K A. Cell adhesion molecule CD44: its functional roles in prostate cancer [J]. Am J Transl Res, 2011, 3(1): 1-7.
- [13] MERZAK A, KOOCHECKPOUR S, PILKINGTON G J. CD44 mediates human glioma cell adhesion and invasion *in vitro* [J]. Cancer Res, 1994, 54(15): 3988-3992.
- [14] YOSHIDA T, MATSUDA Y, NAITO Z, et al. CD44 in human glioma correlates with histopathological grade and cell migration [J]. Pathol Int, 2012, 62(7): 463-470.
- [15] CHAN A M, TAKAI S, YAMADA K, et al. Isolation of a novel oncogene, NET1, from neuroepithelioma cells by expression cDNA cloning [J]. Oncogene, 1996, 12(6): 1259-1266.
- [16] SYMONS M, RUSK N. Control of vesicular trafficking by Rho GTPases [J]. Curr Biol, 2003, 13(10): R409-418.
- [17] ROSSMAN K L, DER C J, SONDEK J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005, 6(2): 167-180.
- [18] MURRAY D, HORGAN G, MACMATHUNA P, et al. NET1-mediated RhoA activation facilitates lysophosphatidic acid-induced cell migration and invasion in gastric cancer [J]. Br J Cancer, 2008, 99(8): 1322-1329.
- [19] LEYDEN J, MURRAY D, MOSS A, et al. Net1 and Myeov: computationally identified mediators of gastric cancer [J]. Br J Cancer, 2006, 94(8): 1204-1212.
- [20] FANGUSARO J R, CALDAS H, JIANG Y, et al. Survivin: An inhibitor of apoptosis in pediatric cancer [J]. Pediatr Blood Cancer, 2006, 47(1): 4-13.
- [21] YANG J, SONG K, KREBS T L, et al. Rb/E2F4 and Smad2/3 link survivin to TGF-beta-induced apoptosis and tumor progression [J]. Oncogene, 2008, 27(40): 5326-5338.
- [22] ZIMMERMANN A K, LOUCKS F A, SCHROEDER E K, et al. Glutathione binding to the Bcl-2 homology-3 domain groove: a molecular basis for Bcl-2 antioxidant function at mitochondria [J]. J Biol Chem, 2007, 282(40): 29296-29304.
- [23] WANG L, CHANVORACHOTE P, TOLEDO D, et al. Peroxide is a key mediator of Bcl-2 down-regulation and apoptosis induction by cisplatin in human lung cancer cells [J]. Mol Pharmacol, 2008, 73(1): 119-127.
- [24] QIAO Q, JIANG Y, LI G. Inhibition of the PI3K/AKT-NF- κ B pathway with curcumin enhanced radiation-induced apoptosis in human Burkitt's lymphoma [J]. J Pharmacol Sci, 2013, 121(4): 247-256.
- [25] HUANG C Y, FONG Y C, LEE C Y, et al. CCL5 increases lung cancer migration via PI3K, Akt and NF-kappaB pathways [J]. Biochem Pharmacol, 2009, 77(5): 794-803.

收稿日期: 2014-07-24

蚕虫草不同提取物止咳化痰作用研究

李福明¹, 韦敏^{2*}, 吕晔², 蒋翠平³, 肖明富³ (1. 杭州市口腔医院, 杭州 310006; 2. 江苏省中国科学院植物研究所, 南京 210014; 3. 江苏富柏传媒有限公司, 南京 210008)

摘要: 目的 研究蚕虫草水提取物和 70%、95%乙醇提取物的止咳、祛痰作用。方法 采用氨水喷雾法造模, 记录小鼠咳嗽潜伏期以及 3 min 内的咳嗽次数; 采用枸橼酸喷雾法造模, 记录豚鼠咳嗽潜伏期以及 5 min 内的咳嗽次数; 采用酚红气管排泌法观察祛痰作用。结果 与对照组比较, 蚕虫草水提取物和 70%乙醇提取物高中剂量、95%乙醇提取物高剂量均可显著延长咳嗽潜伏期、减少咳嗽次数、增加酚红排泌量; 水提取物低剂量显著延长咳嗽潜伏期和咳嗽次数, 对酚红排泌量无显著影响; 70%乙醇提取物低剂量对上述指标均无明显影响; 95%乙醇提取物中低剂量对咳嗽潜伏期和咳嗽次数组均无明显影响, 但可明显增加酚红排泌量。结论 蚕虫草具有明显止咳祛痰作用, 水溶性成分作用强于醇溶性成分。

关键词: 蚕虫草; 止咳; 化痰

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1007-7693(2015)05-0548-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.05.007

作者简介: 李福明, 男, 硕士, 主治医师 Tel: 18857182436
Tel: (025)84347076 E-mail: wm96403@sina.com

E-mail: lfmmq@163.com

*通信作者: 韦敏, 女, 博士, 助理研究员,