

以往文献曾报道移植患者体内他克莫司血药浓度的测定方法^[8-9], 也有文献报道五酯胶囊或五味子木脂素成分在动物或健康志愿者体内的药动学研究^[3,10-11], 但未见报道同时测定移植患者体内他克莫司与五酯胶囊的血药浓度的文章, 临床中他克莫司与五酯胶囊联合应用非常普遍, 且两药的相互作用是近年来的研究热点^[4,12]。因此, 建立同时测定移植患者体内他克莫司、五味子甲素、五味子酯甲、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酚的血药浓度的方法, 对进一步深入研究五酯胶囊对他克莫司的影响具有重要意义。

REFERENCES

- [1] WALLEMACQ P E, REDING R. Tacrolimus, a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects [J]. Clin Chem, 1993, 39(11 Pt 1): 2219.
- [2] KUYPERS D R. Immunosuppressive drug monitoring-what to use in clinical practice today to improve renal graft outcome [J]. Transpl Int, 2005, 18(2): 140-150.
- [3] WEI H, MIAO H, YUN Y, et al. Validation of an LC-MS/MS method for quantitative analysis of the five bioactive components of Wuzhi capsule in human plasma samples [J]. Ther Drug Monit, 2014, 36(6): 781-788.
- [4] HUAWEN X, XIAOCHUN W, QING L, et al. Effects of *Schisandra sphenanthera* extract on the pharmacokinetics of tacrolimus in healthy volunteers [J]. Br J Clin Pharmacol, 2007(64): 469-475.
- [5] PAVAN M, CHAUDHARI A P, RANGANTH R. Altered bioavailability of tacrolimus following intravenous administration of tigecycline [J]. Am J Kidney Dis, 2011, 57(2): 354.
- [6] PAGE R L, MUELLER S W, LEVI M E, et al. Pharmacokinetic drug-drug interactions between calcineurin inhibitors and proliferation signal inhibitors with antimicrobial agents: implications for therapeutic drug monitoring [J]. J Heart Lung Transplant, 2011, 30(2): 124-135.
- [7] STAATZ C E, TETT S E. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation [J]. Clin Pharmacokinet, 2004, 43(10): 623-653.
- [8] XIA L F, XUE F, LIU L, et al. HPLC-MS/MS determination of blood tacrolimus concentrations in early liver transplant recipients [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(9): 1672-1675.
- [9] LIU X X, HU S S, CHEN Z J, et al. Determination of tacrolimus in whole tandem mass spectrometry and its study in liver transplant patients blood by liquid chromatographic-application in the pharmacokinetic [J]. Pharm Clin Res(药学与临床研究), 2013, 21(4): 329-333.
- [10] WANG Q, WANG Y, SONG X M, et al. Simulations determination of six lignans compounds in rat plasma and pharmacokinetics by UHPLC-MS/MS [J]. Chin Tradit Pat Med(中成药), 2014, 36(2): 266-271.
- [11] LI H L, JI D, MAO C Q, et al. Rapid determination of three lignans in the fruits of *Schisandra chinensis* by LC-MS methods and analysis of their pharmacokinetics in rat plasma [J]. Chin Pharm Bull(中国药理学通报), 2013, 29(9): 1313-1317.
- [12] WEI H, TAO X, DI P, et al. Effects of traditional Chinese medicine Wuzhi capsule on pharmacokinetics of tacrolimus in rats [J]. Drug Metab Dispos, 2013, 41(7): 1398-403.

收稿日期: 2015-11-20

迷迭香酸减少 RhoA 的表达抑制宫颈癌细胞的转移能力的研究

滕淑静^{1,2}, 宋旭日¹, 涂剑², 罗岚¹, 柳宁¹ (1. 岳阳职业技术学院药理教研室, 湖南 岳阳 414000; 2. 南华大学药物药理研究所, 湖南 衡阳 421000)

摘要: 目的 研究迷迭香酸对宫颈癌细胞转移能力的抑制作用及其可能机制。方法 用 1, 5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的迷迭香酸分别处理宫颈癌细胞, 通过 Transwell 小室法检测细胞的转移能力、半定量 RT-PCR 法检测细胞 RhoA mRNA 的表达、免疫荧光法检测 RhoA 蛋白的表达情况。结果 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的迷迭香酸可以抑制宫颈癌细胞的转移 ($P<0.01$), 而且 2 组细胞表达 RhoA 明显减少 ($P<0.05$)。结论 迷迭香酸可以抑制宫颈癌细胞的转移能力, 其作用机制可能与减少细胞 RhoA 的表达有关。

关键词: 迷迭香酸; 宫颈癌; 转移; RhoA

中图分类号: R285.4

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2016)07-0859-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.006

基金项目: 湖南省教育厅科研项目(13C980)

作者简介: 滕淑静, 女, 硕士, 讲师 Tel: 18974060199 E-mail: 1318048464@qq.com

Rosmarinic Acid Inhibiting Metastasis of Cervical Cancer by Reducing RhoA Expression

TENG Shujing^{1,2}, SONG Xuri¹, TU Jian², LUO Lan¹, LIU Ning¹ (1. Department of Pharmacology, Yueyang Vocational Technical College, Yueyang 414000, China; 2. Institute of Pharmacy and Pharmacology, University of South China, Hengyang 421000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the inhibiting effect of rosmarinic acid on metastasis of cervical cancer and the possible mechanism. **METHODS** Cervical cancer cells were treated by rosmarinic acid with concentration of 1, 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Transwell chamber was used to examine the metastasis of the cultured cells; semi-quantitative RT-PCR method was used to detect the expression of RhoA mRNA and immunofluorescence technique was used to detect the expression of RhoA protein. **RESULTS** The metastasis of cervical cancer was inhibited by rosmarinic acid with the concentration of 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P<0.01$), and the expression of RhoA decreased significantly in the two groups ($P<0.05$). **CONCLUSION** Rosmarinic acid can inhibit the metastasis of cervical cancer, and the mechanism may be related to reducing the expression of RhoA in cells. **KEY WORDS:** rosmarinic acid; cervical cancer; metastasis; RhoA

宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 严重威胁妇女的健康。虽然随着现代诊疗技术的进步和发展, 宫颈癌的死亡率明显下降, 但如果肿瘤细胞转移, 其预后并不乐观。有报道, 高表达 RhoA 与宫颈癌的预后有关^[1]。近年来很多的研究发现迷迭香酸具有抗肿瘤的作用^[2], 能抑制癌细胞的转移^[3]。本研究旨在探讨迷迭香酸可否抑制宫颈癌 Hela 细胞的转移能力及对 RhoA 表达的影响, 以说明迷迭香酸抑制癌细胞转移的可能机制。

1 材料与方法

1.1 细胞系、试剂和仪器

宫颈癌 Hela 细胞由中南大学肿瘤研究所惠赠。迷迭香酸(成都曼思特生物科技有限公司, 纯度 $\geq 98\%$, 批号: 12052513); 细胞培养液 DMEM(Gibco 公司, 批号: 1616015); 新生小牛血清(杭州四季青生物工程有限公司, 批号: 140918); Transwell 小室(批号: 3289699)、Matrigel 购自 BD 公司; Trizol(批号: 1382737)及 RT-PCR 试剂盒(批号: 00045336)购自 Fermentas; 鼠抗人 RhoA 单抗(批号: ABIN394821)、FITC 标记羊抗鼠二抗(批号: 40158DC)购自 Santa Cruz。PE2400 PCR 仪(美国 Perking 公司); AlphamagerTM2200 凝胶成像分析系统(Alpha innotech); IX71-A12FL/PH 荧光倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.2 细胞培养

HeLa 细胞培养在含 10% 新生小牛血清、 $1\times 10^5 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37°C 、5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养。

1.3 Transwell 小室法检测迷迭香酸对 Hela 细胞转移能力的影响

Transwell 小室上层铺 1:3 的 Matrigel。将 Hela 细胞制成 $1\times 10^6 \cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液, 加 200 μL 于 Transwell 小室的上层, 下室中加入 500 μL 含 10% 小牛血清的培养基。待细胞贴壁后, 实验组加迷迭香酸使终浓度分别为 1, 5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对照组加等量 DMEM, 于 37°C 孵育 24 h; 每组 6 孔重复。擦去小室上表面细胞, 甲醛固定、结晶紫染色, 于 400 倍显微镜下观察。随机数 10 个视野内的细胞数, 计算平均值进行统计学分析。

1.4 半定量 RT-PCR 法检测 Hela 细胞 RhoA mRNA 的表达

取对数生长期的细胞经接种贴壁生长后, 实验组更换含迷迭香酸的 DMEM 培养基, 使药物终浓度分别为 1, 5 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 对照组加等量 DMEM, 24 h 后收集细胞并提取细胞总 RNA, 取 2 μg 按 RT-PCR 试剂盒操作说明逆转录合成 cDNA 第一链, RhoA 特异性的引物上游: 5'TGGGACACAGCTGGGCAGGA3'; 下游: 5'AGCGCCAATCC TGT TTGCCA3'; 产物长度为 288 bp; 扩增 PCR: 94°C 变性 30 s、 62°C 退火 1 min、 72°C 延伸 1 min, 30 个循环后, 72°C 终延伸 7 min, 终止反应。1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 以 GAPDH 为内参照。

1.5 免疫荧光法检测 Hela 细胞 RhoA 蛋白的表达

细胞接种于 12 孔板, 分组处理同上。培养 24 h 后, 4% 甲醛固定(室温, 15 min), PBS 洗 3 次, 0.5% Triton 作用, RhoA 一抗(1:2000) 4°C 孵育过夜; 1% BSA 的 PBS 洗 3 次, FITC 标记羊抗鼠二抗(1:

1 000)室温孵育 1 h(避光); PBS 洗 3 次, 荧光显微镜下观察。IMAGE J 软件分析荧光强度, 并进行统计学分析。

1.6 统计学方法

实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析及 t 检验, 应用 SPSS 13.0 统计软件完成分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 迷迭香酸对 Hela 细胞转移能力的影响

与对照组相比, 5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 迷迭香酸组迁移细胞数明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见表 1。

2.2 迷迭香酸对 Hela 细胞 RhoA mRNA 和蛋白表达的影响

5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 迷迭香酸组 Hela 细胞 RhoA mRNA 的表达明显低于对照组, 具有统计学差异($P < 0.05$); 而 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 迷迭香酸组细胞 RhoA mRNA 的表达与对照组相比较, 无统计学差异。结果见表 1。

免疫荧光法检测 Hela 细胞 RhoA 蛋白表达, 通过荧光强度分析结果显示, 5, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 迷迭香酸组细胞 RhoA 蛋白的表达与对照组相比较明显减少, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 而 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 迷迭香酸组与对照组比较, RhoA 蛋白表达无明显差异。结果见图 1 和表 1。

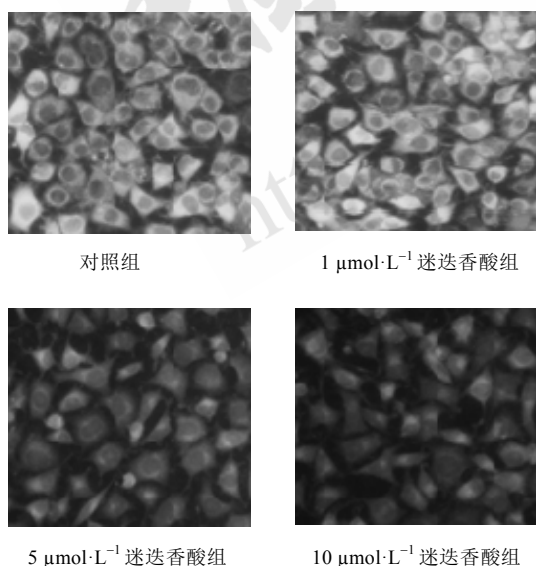


图 1 RhoA 蛋白的表达(400×)

Fig. 1 Expression of RhoA protein(400×)

表 1 迷迭香酸对宫颈癌细胞转移能力和 RhoA 表达的影响($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Influence of rosmarinic acid on metastasis and RhoA expressing of Hela cells($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	迁移细胞数	RhoA mRNA 条带灰度比值	RhoA 蛋白相对 荧光强度
对照组		85.7±3.5	0.584±0.057	34.563±2.323
迷迭香酸组	1	76.0±4.9	0.556±0.009	32.827±2.474
	5	44.0±3.8 ¹⁾	0.316±0.006 ²⁾	17.164±1.571 ²⁾
	10	37.0±4.4 ¹⁾	0.296±0.002 ²⁾	14.289±0.998 ²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.05$.

3 讨论

迷迭香酸是一种水溶性的多酚羟基化合物, 是丹参、牛至、紫苏、夏枯草等中药中的有效活性成分, 具有抗炎、抗氧化、抗菌、抗肿瘤等药理作用。近年研究报道显示, 迷迭香酸可以抑制乳腺癌、卵巢癌、肺癌、结肠癌等多种肿瘤细胞, 抗肿瘤机制包括抑制细胞增殖、诱导凋亡、抑制血管形成等^[2]。体外实验研究报道迷迭香酸可以抑制结肠癌细胞的转移^[3]。本研究以迷迭香酸处理宫颈癌 Hela 细胞, 通过 Transwell 小室体外模拟细胞转移实验显示一定浓度的迷迭香酸能明显减弱 Hela 细胞的转移能力, 说明迷迭香酸还具有抗宫颈癌的作用, 也可以通过抑制肿瘤细胞的转移发挥抗肿瘤作用。

肿瘤转移的一个关键性因素是细胞的运动, 而细胞骨架是实现细胞运动的结构基础。细胞骨架由微丝、微管和中间纤维构成, 肌动蛋白是微丝的主要成分。在肿瘤细胞转移的过程中, 伪足、黏着斑、应力纤维等的形成和细胞的收缩都离不开微丝。细胞骨架的重组在肿瘤的转移中起着非常重要的作用。而 RhoA 可以引起细胞骨架的重组。RhoA 是 Ras 超家族中的一种小 G 蛋白分子, 具有 GTP 酶活性, 在多种肿瘤细胞中异常表达^[4]。研究报道, 高表达 RhoA 可以诱使宫颈癌细胞的微丝重排并形成伪足、黏着斑等结构, 有利于细胞的运动、增强了宫颈癌细胞的转移潜能^[1]。相反, 干扰 RhoA 的表达可以抑制肿瘤细胞的转移^[5-8]。本研究显示, Hela 细胞经过一定浓度的迷迭香酸处理后 RhoA 表达明显减少。由此可见, 迷迭香酸可能通过减少细胞 RhoA 的表达影响肿瘤细胞的运动, 导致肿瘤细胞转移能力下降, 发挥抑制宫颈癌细胞转移的作用。

RhoA 是细胞内重要的信号分子,其表达受多种因子调节。研究报道,肿瘤细胞缺失哺乳动物雷帕霉素靶(mammalian target of rapamycin, mTOR)或 AKT/mTOR 被抑制,其表达 RhoA 减少^[6-7];激活 ERK 信号通路促使细胞表达 RhoA^[9];而迷迭香酸可以通过抑制 COX-2/PGE2/ERK 发挥抑制肿瘤细胞转移的作用^[10]。迷迭香酸如何减少宫颈癌细胞表达 RhoA 进而抑制其转移能力的具体机制还有待进一步的研究。

REFERENCES

- [1] LIU X, CHEN D, LIU G. Overexpression of RhoA promotes the proliferation and migration of cervical cancer cells [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2014, 78(11): 1895-901.
- [2] 牟宜双, 邓文龙, 周黎明. 迷迭香酸抗肿瘤作用研究进展[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(1): 266-269.
- [3] XU Y, XU G, LIU L, et al. Anti-invasion effect of rosmarinic acid via the extracellular signal-regulated kinase and oxidation-reduction pathway in Ls174-T cells [J]. J Cell Biochem, 2010, 111(2): 370-379.
- [4] 王雪, 王维莉, 任雨, 等. RhoA 介导的细胞骨架在肿瘤发生

- 发展中的作用[J]. 中国细胞生物学学报, 2014, 36(2): 1-7.
- [5] YANG X, ZHENG F, ZHANG S, et al. Loss of RhoA expression prevents proliferation and metastasis of SPCA1 lung cancer cells *in vitro* [J]. Biomed Pharmacother, 2015(69): 361-366.
- [6] MENG X G, YUE S W. Dexamethasone disrupts cytoskeleton organization and migration of T47D Human breast cancer cells by modulating the AKT/mTOR/RhoA pathway [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(23): 10245-10250.
- [7] CHEN X G, CHENG H Y, PAN T F, et al. mTOR regulate EMT through RhoA and Rac1 pathway in prostate cancer [J]. Mol Carcinog, 2015, 54(10): 1086-1095.
- [8] WANG S C, LIN X L, LI J, et al. MicroRNA-122 triggers mesenchymal-epithelial transition and suppresses hepatocellular carcinoma cell motility and invasion by targeting RhoA [J/OL]. PLoS One, 2014, 9(7): e101330. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0101330>.
- [9] XIAO G, WANG X, WANG J, et al. CXCL16/CXCR6 chemokine signaling mediates breast cancer progression by pERK1/2-dependent mechanisms [J]. Oncotarget, 2015, 6(16): 14165-14178.
- [10] TAO L, WANG S, ZHAO Y, et al. Phenolcarboxylic acids from medicinal herbs exert anticancer effects through disruption of COX-2 activity [J]. Phytomedicine, 2014, 21(11): 1473-1482.

收稿日期: 2015-10-12

尾加压素 II 诱导乳鼠心肌成纤维细胞增殖及胶原合成的信号转导机制研究

刘文媛^a, 韩清华^{a*}, 刘青华^b, 王瑾^b, 孙桂枝^a, 李建中^a(山西医科大学, a.第一医院肾内科; b.生理学教研室, 太原 030001)

摘要: 目的 探讨尾加压素 II (urotensin II, U II) 对乳鼠心肌成纤维细胞(cardiac myofibroblasts, CFs)增殖及胶原合成的影响。方法 体外培养 CFs 作为实验模型, 不同浓度 U II 处理细胞后, 通过 ELISA 法检测各组培养细胞上清中 TGF-β1 的含量变化, 分别利用 CKK-8 细胞增殖法及 Western blot 分析 U II 受体拮抗剂(SB-611812)及 PKA 特异性阻断剂(KT5720)对 U II 诱导的 CFs 增殖及胶原蛋白 col-I、col-III 表达的影响。结果 U II 10^{-10} , 10^{-9} , 10^{-8} mol·L⁻¹ 处理细胞后, CFs 培养上清中 TGF-β1 的含量及各组 CFs 的吸光度值与对照组相比明显增加($P < 0.05$), 而在 10^{-7} mol·L⁻¹ U II 处理细胞后, 上述参数与对照组比较无显著差异。 1 mol·L⁻¹ SB-611812+ 10^{-8} mol·L⁻¹ U II 组和 1 mol·L⁻¹ KT5720+ 10^{-8} mol·L⁻¹ U II 组的 TGF-β1 的含量及 CFs 的吸光度值均显著高于对照组($P < 0.05$), 但显著低于 10^{-8} mol·L⁻¹ U II 组($P < 0.05$), 且两组 col-I、col-III 型胶原蛋白表达均低于 10^{-8} mol·L⁻¹ U II 组。结论 U II 上调 TGF-β1 水平促进了 CFs 的增殖, 诱导细胞表达胶原蛋白 col-I、col-III, 这一过程可能涉及 cAMP-PKA 信号转导通路。

关键词: 尾加压素 II; 转化生长因子 1; 心肌成纤维细胞; 增殖

中图分类号: R994.11

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)07-0862-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.07.007

基金项目: 山西省自然科学基金(2012011036-1); 山西省回国留学人员科研资助项目(2012084)

作者简介: 刘文媛, 女, 博士 Tel: 15034066491 E-mail: liuwenyuan3057@sina.com *通信作者: 韩清华, 女, 博士, 教授, 博导 Tel: (0351)4639693 E-mail: hanqh2015@163.com