雷公藤甲素抑制子宫内膜癌细胞HEC-1B侵袭转移的初步研究

黄骁昊[1],周　雪[2]

([1]南京医科大学第一附属医院,江苏省妇幼保健院妇科,江苏　南京　210036;[2]南京医科大学附属南京市妇幼保健院妇产科,江苏　南京　210004)

[摘　要]　**目的**:探讨雷公藤甲素对人子宫内膜癌细胞株HEC-1B侵袭能力的影响。**方法**:雷公藤甲素干预HEC-1B细胞后,以明胶酶谱法检测细胞侵袭相关蛋白MMP-2/MMP-9的表达;Transwell法检测细胞侵袭能力的改变。**结果**:随着雷公藤甲素作用时间的延长,侵袭相关蛋白MMP-2/MMP-9的表达逐渐降低,HEC-1B细胞的侵袭能力亦逐渐下降,呈时间依赖性。**结论**:雷公藤甲素能通过下调侵袭相关蛋白MMP-2/MMP-9的表达,从而抑制HEC-1B细胞的侵袭能力。

[关键词]　雷公藤甲素;子宫内膜癌;transwell;细胞侵袭;明胶酶谱
[中图分类号]　R737.3　　[文献标志码]　A　　[文章编号]　1007-4368(2013)10-1392-04
doi:10.7655/NYDXBNS20131012

The effect of triptolide on the invasion in human endometrial carcinoma cell line (HEC-1B)

Huang Xiaohao[1],Zhou Xue[2]

([1]Department of Gynaecology,the First Affiliated Hospital of NJMU,Jiangsu Women and Children Health Hospital, Nanjing 210036;[2]Deparement of Gynaecology and Obstetrics,Nanjing Maternity and Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU,Nangjing 210004,China)

[Abstract]　**Objective**:To investigate the effect of triptolide on the invasion of human endometrial carcinoma cell line (HEC-1B). **Methods**:Gelatin zymography was performed to investigate the effects of triptolide on the activity of the invasion-related gelatinase proteins MMP-2 and MMP-9 in HEC-1B cells. Transwell was employed to assess the influence of triptolide on the invasion of HEC-1B cells. **Results**:The activity of the invasion-related gelatinase proteins MMP-2 and MMP-9 and the invasion of HEC-1B cells were decreased in a time-dependent manner,when exposed to triptolide. **Conclusion**:Triptolide could inhibit the invasion of HEC-1B by down-regulating the activity of the invasion-related gelatinase proteins MMP-2 and MMP-9.

[Key words]　triptolide;endometrial carcinoma;transwell;cell invasion;zymography

[Acta Univ Med Nanjing,2013,33(10):1392-1395]

雷公藤自古以来即被收入药典,广泛用于治疗类风湿关节炎、慢性肾炎、肝炎、血小板减少性紫癜等多种疾病。近十年来,雷公藤又逐渐成为肿瘤研究领域的新宠,且得到了医学界的广泛认可。雷公藤甲素(雷公藤内酯醇,triptolide,TP)是雷公藤的主要活性物质,已有多种文献报道其对多种肿瘤细胞有诱导凋亡、抵制癌性转化等作用。本课题在前期研究中发现,TP能显著抑制人子宫内膜癌细胞株(HEC-1B细胞)的增殖,且在较低浓度即可发挥其增殖抑制作用[1]。而子宫内膜癌细胞作为恶性肿瘤细胞,对外周组织具有较强的侵袭转移能力,同样直接影响到预后。肿瘤的侵袭和转移是一个多因素参与、多步骤、多阶段的复杂过程,肿瘤细胞突破基底膜是其进行浸润及远处转移的最初和最关键阶段。明胶酶又称Ⅳ型胶原酶,它包括基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase,MMP)-2和MMP-9,能够有效分解基底膜中的Ⅳ型胶原蛋白,从而介导肿瘤细胞的浸润和远处转移。本研究拟选择人子宫内膜癌细胞株HEC-1B作为观察对象,建立该肿瘤细胞的体外侵袭模型,以探讨TP对该细胞株侵袭能力的影响,并探讨可能的相关机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　细胞及药物来源

人子宫内膜腺癌细胞株 HEC-1B 购自中科院上海细胞库。TP 购自中国药品生物制品鉴定所,纯度≥98%,以二甲基亚砜(DMSO)配制成 1 g/L 储备液,0.22 μm 滤器过滤除菌,-20℃保存, 临用前用无血清培养液稀释至所需浓度。

1.1.2　试剂和设备

Transwell 小室(聚碳酸酯膜孔径 8.0 μm,Corning 公司,美国),ECM(Sigma 公司,美国),细胞培养基 DMEM(Gibco 公司,美国);胎牛血清(杭州四季青公司);明胶和考马斯亮蓝 R-250(Sigma 公司,美国),TritonX-100(Amresco 公司,美国)。

1.2　方法

1.2.1　细胞培养

HEC-1B 细胞培养于含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 DMEM 培养液中,在 37℃、5% CO_2 培养箱中培养, 每 48 h 换液 1 次,换液前观察细胞生长情况,0.25%胰蛋白酶消化传代。细胞呈单层贴壁生长,选用对数生长期细胞进行实验。实验前 1 d 将贴壁生长至 70%~80%融合的 HEC-1B 细胞培养液换成无血清的 DMEM 培养液,无血清饥饿 24 h。

1.2.2　明胶酶谱法测定子宫内膜癌细胞培养上清中 MMP-2/MMP-9 的活性

取上述培养细胞以 5×10^6 个/孔接种于 6 孔板中,根据前期实验结果[2],调整 TP 药物作用浓度为 40 ng/ml, 分别作用 HEC-1B 细胞 0、24、48 h 后,收集 3 组细胞上清与 4 倍上样缓冲液 (4%SDS、0.25 mmol/L Tris-HCl、40%甘油、0.1% 溴酚蓝) 混匀,并于 37℃孵育 30 min;进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,每上样孔加 50 g/L 蛋白样品,100 V 电泳。电泳完毕,用洗脱液 (2.5% Triton X-100、50 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L $CaCl_2$、1 μmol/L $ZnCl_2$,pH7.6) 洗胶 2 × 45 min。将胶放在孵育液(50 mmol/L Tris-HCl、5 mmol/L $CaCl_2$、1 μmol/L $ZnCl_2$、0.02% Brij-35,pH7.6) 中 37℃孵育18 h。孵育结束后经 2%考马斯亮蓝 R-250 染色45 min 并用 10%乙酸脱色,可见呈负染的酶原和活性形式的 MMP-2 和 MMP-9 活性分解带。用凝胶图像分析系统读取条带面积、宽度和灰度值,做统计分析。

1.2.3　Transwell 法测定子宫内膜癌细胞侵袭能力

将 matrigel 胶加至 Transwell 小室的上室聚碳酸酯膜上,36.5℃培养箱里孵育 8 h, 用加样枪吸除 matrigel 胶上层析出的液体;40 ng/ml TP 分别作用于 HEC-1B 细胞 0、24、48 h 后, 细胞以 4.0×10^5 个/ml 加入已铺好 matrigel 胶的 Transwell 小室的上室;下室按 600 μl/孔加入趋化液 (含 20%胎牛血清的 DMEM 培养基);将 Transwell 小室置于 37℃培养箱中,同时孵育 24 h 后取出上室,首先用加样枪吸除上室内液体, 然后用 PBS 溶液浸湿的棉签轻轻将 matrigel 胶和聚碳酸酯膜上表面的细胞擦去,用 4%的多聚甲醛固定聚碳酸酯膜下表面细胞 30 min 后,用 0.1%的结晶紫染色 45 min, 蒸馏水洗 3 遍以上。用高倍镜(×200)计数聚碳酸酯膜下表面的细胞数,分别对上、下、左、右和中间 5 个视野计数,取平均值,每组设 3 个平行样本,取均数。将穿过人工基底膜的细胞数确定为侵袭指标, 细胞侵袭指数=穿过基质胶板的细胞数/迁移穿过对照板的细胞数。

1.3　统计学方法

数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS17.0 统计学软件进行分析,行方差分析。$P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　TP 作用下子宫内膜癌 HEC-1B 细胞侵袭细胞数随着时间的变化情况

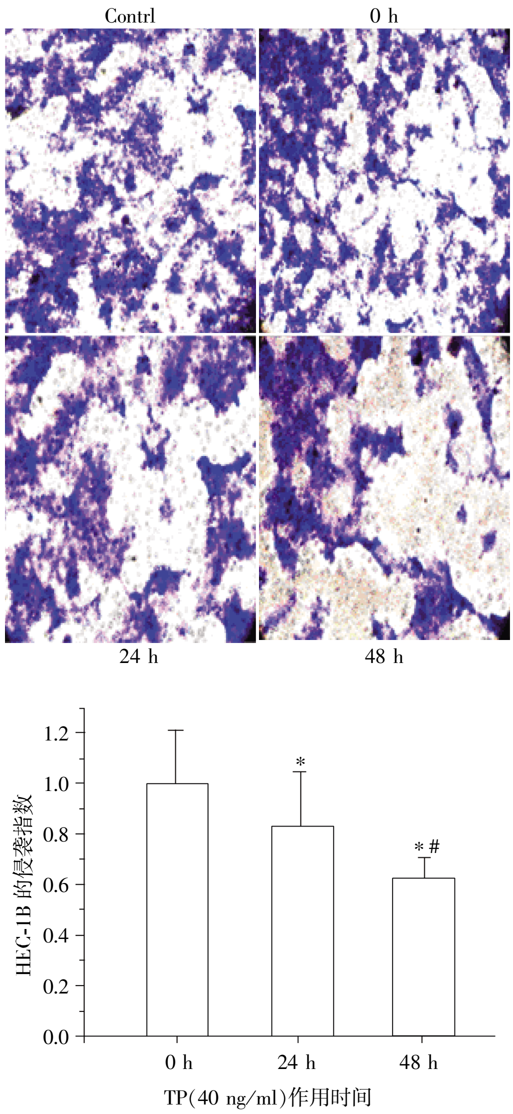
Transwell 实验用以分析 TP 对 HEC-1B 细胞侵袭能力的影响。以 40 ng/ml TP 分别干预 HEC-1B 细胞 0、24、48 h 后,HEC-1B 细胞的侵袭指数逐渐下降,具有时间依赖性(图 1)。

2.2　TP 作用不同时间后子宫内膜癌细胞上清中,MMP-2 和 MMP-9 活性分析

用明胶酶谱法检测细胞培养上清液中 MMP-2 和 MMP-9 活性, 凝胶背景上出现的白色条带即为 MMP-2 和 MMP-9 所在的部位, 其中 MMP-9 位于 92 000 位置,MMP-2 位于 72 000 位置。随着 TP 作用时间的延长,MMP-2 和 MMP-9 活性呈明显下降趋势,具有时间依赖性(图 2)。

3　讨　论

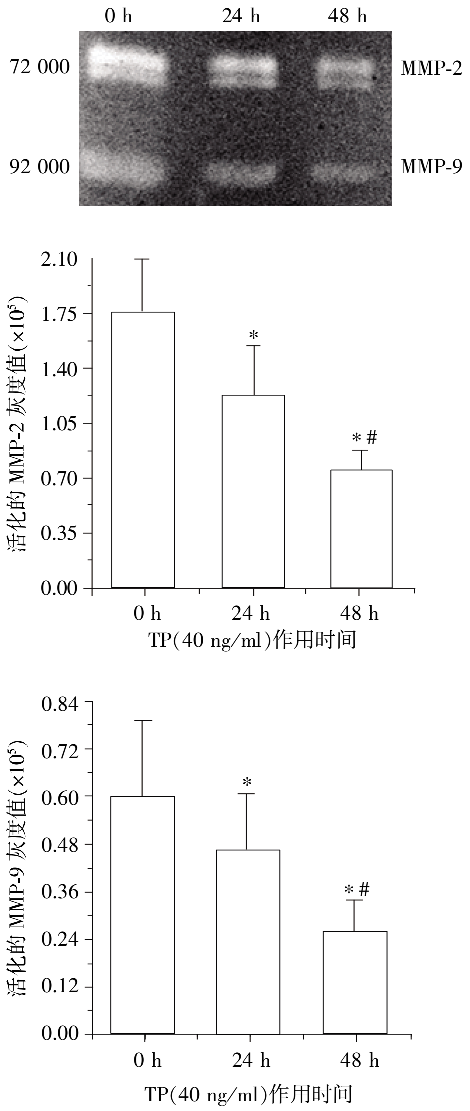
子宫内膜癌是女性生殖器官三大恶性肿瘤之一,其发病率在各国均呈上升趋势,发病亦愈来愈年轻化。如何尽早发现并控制肿瘤的发生和发展,一直是临床医生的研究重点。而中晚期患者依赖于传统的化疗, 其机制在于使恶性肿瘤细胞在抗肿瘤药物的作用下发生凋亡, 从而达到治疗的目的。而子宫内膜癌作为恶性肿瘤, 其具有潜在的细胞侵袭、转移能力,影响预后。近几年来雷公藤甲素在肿瘤治



与 0 h 比较, $^*P < 0.05$; 与 24 h 比较, $^\#P < 0.05$。

图 1　40 ng/ml TP 作用 0、24、48 h 后 HEC-1B 细胞侵袭能力的变化

Figure 1　Changes in the invasive ability of HEC-1B cells explored in TP (40 ng/ml) for 0,24,48 h



与 0 h 作用后比较, $^*P < 0.05$; 与 24 h 作用后比较 $^\#P < 0.05$。

图 2　TP 作用不同时间后 MMP-2 和 MMP-9 的活性改变

Figure 2　The activity of the invasion-related gelatinase proteins MMP-2 and MMP-9 in HEC-1B cells induced by TP

疗方面的应用日益受到人们的关注,前期研究中发现较低浓度的 TP 能显著抑制人子宫内膜癌细胞株 HEC-1B 细胞的增殖并发挥其增殖抑制作用[1-2]。

肿瘤的形成与发展除了与机体细胞自身基因突变所导致的原癌基因激活或抑癌基因失活有关外,还受到肿瘤细胞所处的微环境变化的影响。而正常情况下表达于细胞中的某些分子表达失调也参与了肿瘤细胞的浸润和转移。MMPs 是一类锌离子和钙离子依赖性的蛋白水解酶[3],它们在宫颈癌、子宫内膜癌等多种恶性肿瘤的转移和侵袭中发挥重要作用,常见的作用机制如下:①破坏局部组织结构促进肿瘤生长;②破坏基质膜屏障,利于肿瘤转移;③通过对细胞外基质的改建,促进肿瘤新生血管的形成。迄今为止, 已发现 20 余个基质金属蛋白酶家族成员, 其中分子量为 72 000 的 MMP-2 和 92 000 的 MMP-9 是降解Ⅳ型胶原蛋白最主要的酶, 它们在分解细胞外基质的同时, 也为血管内皮细胞的迁移创造条件[4],从而促使肿瘤新生血管形成[5],在肿瘤细胞的浸润和转移中起重要作用。目前研究显示, MMP-2 和 (或)MMP-9 在多种恶性肿瘤中存在过度表达, 而且这种过度表达与肿瘤的淋巴结及远处转移密切相关[6]。Iurlaro 等[7]研究发现,MMP-2 和 MMP-9 在子宫内膜癌组中的基因表达水平随着组织分化程度的降低和肌层浸润深度的增加而逐渐升

高,而在正常子宫内膜组织中 MMP-2 表达水平较低,MMP-9 则不表达。其他学者的研究也得出了相似的结论[8-9],并且进一步证实了 MMP-2 和 MMP-9 的表达水平与临床预后密切相关,MMP-2 和 MMP-9 高表达的子宫内膜癌患者临床预后较差。

中晚期子宫内膜癌患者易发生远处的淋巴、血运转移,甚至少数患者有骨转移表现[10]。同绝大多数恶性肿瘤一样,侵袭和转移是子宫内膜癌细胞重要的生物学特性,侵袭在肿瘤转移的整个过程中发挥核心作用,高转移的肿瘤细胞其侵袭力较强。癌细胞穿过基底膜、穿入与穿出血管都要依赖于肿瘤细胞的侵袭力。Transwell 小室体外侵袭模型是目前较为成熟的综合判断肿瘤侵袭转移能力的实验方法。因此建立一个 Transwell 小室体外侵袭模型对了解子宫内膜癌侵袭和转移能力具有重要意义。本实验将穿过人工基底膜的细胞数定为侵袭指标,用结晶紫将膜染色后,随机选取高倍镜下 5 个视野计数细胞,取均值。Transwell 与明胶酶实验小室侵袭试验相结合,能较准确地测定出癌细胞的体外侵袭力,具有敏感、准确、快速、简便、无放射污染等优点,有效提高了实验数据的可靠性及准确性。

TP 具有广谱抗肿瘤效应,可阻断多种不同器官和不同状态肿瘤的生长;能单独或与其他药物协同诱导多种肿瘤细胞凋亡,增强肿瘤细胞对化疗药物的敏感性。但在影响子宫内膜癌细胞侵袭性方面还鲜有研究。本实验结果显示,TP 作用 0、24、48 h,子宫内膜癌细胞的侵袭性明显减弱,与作用时间呈正比。明胶酶谱法亦证实,随着 TP 作用时间的延长,细胞培养上清液中 MMP-2 和 MMP-9 活性逐渐降低,均支持雷公藤甲素对子宫内膜癌细胞在细胞侵袭、转移方面有着抑制作用。这对认识 TP 治疗子宫内膜癌的机制提供了新的理论基础。但药物对细胞株的各种作用目前仍停留在离体实验中,仍需要进一步进行大量动物实体的研究,为更好地应用于临床而开拓新的思路。

[参考文献]

[1] 蔡 玉,孙志华,吴 强. 雷公藤甲素对人子宫内膜癌细胞株 HEC21B 的影响[J]. 现代妇产科进展,2009,18(4):282-285
[2] 黄骁昊,孙志华,吴 强. 雷公藤甲素对离体子宫内膜癌细胞株增殖及凋亡信号通路 PI3K/PKB 的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2010,30(7):910-912
[3] Yoshimoto A,Kasahara K,Nishio M,et al. Changes in angiogenic growth factor levels after gefitinib treatment in non-small cell lung cancer [J]. Jpn J Clin Oncol,2005,35(5):233-238
[4] 田 鲲,彭 敏,陈 宇,等. 免疫组化、明胶酶谱、Westen blot 检测涎腺肿瘤中基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 表达的比较与评价 [J]. 实用医院临床杂志,2010,7(5):17-21
[5] John A,Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis[J]. Pathol Oncol Res,2001,7(1):14-23
[6] Sakata K,Shigemasa K,Nagai N,et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2,MMP-9,MT1-MMP) and their inhibitors (TIMP-1,TIMP-2) in common epithelial tumors of the ovary [J]. Int J Oncol,2000,17 (4):673-681
[7] Iurlaro M,Loverro G,Vacca A,et al. Angiogenesis extent and expression of atrixmetalloproteinase-2 and -9 correlate with upgrading and myometrial invasion in endometrial carcinoma[J]. Eur J Clin Invest,1999,29(9):793-801
[8] Di Nezza LA,Misajon A,Zhang J,et al. Presence of active gelatinases in endometrial carcinoma and correlation of matrix metalloproteinase expression with increasing tumor grade and invasion[J]. Cancer,2002,94(5):1466-1475
[9] Aglund K,Rauvala M,Puistola U,et al. Gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9) in endometrial cancer-MMP-9 correlates to the grade and the stage [J]. Gynecol Oncol,2004,94(3):699-704
[10] 仲 剑,孙志华,吴 强. 雷公藤甲素对人子宫内膜癌抑制作用的裸鼠体内研究 [J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2009,29(6):775-778

[收稿日期] 2013-06-27