

不同浓度的异鼠李素对体外培养大鼠C6脑胶质瘤细胞的影响

杨金华¹,孙转妮¹,杨香丽¹,田瑞瑞¹,张熙²

摘要 目的:探讨不同浓度的异鼠李素对体外培养大鼠C6脑胶质瘤细胞的影响。方法:将大鼠C6胶质瘤细胞随机分为空白对照组、药物组(20、40、80 mg/L异鼠李素)处理细胞,观察细胞生长状况、异鼠李素对体外培养C6脑胶质瘤细胞影响、细胞抑制率和存活率、加入不同浓度异鼠李素与C6脑胶质瘤细胞凋亡率之间的关系。结果:应用异鼠李素后,肿瘤细胞出现明显的凋亡及坏死改变。MTT比色法显示,加入异鼠李素的浓度越高,脑胶质瘤细胞增殖率越差,抑制率越高,存活率越低。40 mg/L异鼠李素组的脑胶质瘤细胞凋亡率最高;80 mg/L异鼠李素组的脑胶质瘤细胞的存活率最低。Western blot检测细胞内总AKT蛋白和Ser473位点AKT蛋白密度随加入异鼠李素浓度的增高变化呈反比关系。高效液相色谱法测定大鼠血浆、脑组织,显示均有面积不等的异鼠李素峰,表明血浆和脑组织均有异鼠李素分布,其中异鼠李素主要存在于脑组织。结论:低浓度异鼠李素能促使C6脑胶质瘤细胞发生凋亡,高浓度异鼠李素可以导致体外培养C6脑胶质瘤细胞发生凋亡和坏死,具有明显的抑制脑胶质瘤细胞生长的作用,并且发生机制与PI3K/AKT途径有紧密的联系。

关键词 异鼠李素;脑胶质瘤细胞;细胞凋亡;PI3K/AKT

中图分类号 R741;R741.05 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssngcj.2018.05.010

近年有研究发现,异鼠李素对某些肿瘤细胞具有显著性影响^[1,2],同时发现异鼠李素对肿瘤具有选择性抑制^[3],如可抑制体外培养的A549、MCF-7细胞生长,诱导其凋亡,对肺癌和胃癌细胞分化有一定的影响^[4],对PC3、K562、AD293等细胞增殖、分化则基本无影响。熊学华等^[5]研究增强子结合蛋白同源蛋白(CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein, CHOP)在脑胶质瘤中的表达情况,发现CHOP在正常脑组织中低表达,在脑胶质瘤中高表达,在高分级脑胶质瘤中表达较低分级中的表达明显增强。雷宁等^[6]在实验中提到异鼠李素对鼠源性肿瘤细胞Lewis和C6两株细胞抑制作用明显,但体外作用较丝裂霉素弱,但至今仍未见报道关于异鼠李素对胶质瘤细胞作用的作用机理。本研究探讨不同浓度的异鼠李素对体外培养大鼠C6胶质瘤细胞的影响,报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验用细胞 C6鼠脑胶质瘤细胞购自中科院上海细胞研究所。

1.1.2 主要试剂及仪器 DMEM培养基(购于美国Gibco公司)、10%胎牛血清(购于四季清生物有限公司)、二甲基亚砜(购于重庆化学试剂厂)、异鼠李素(购于深圳同田生化技术有限公司)、0.25%胰蛋白酶(购于美国Hyclone公司)、细胞增殖及细胞毒性MTT检测试剂盒、Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒(购于上海炎彬公司),AKT和Ser473位点AKT蛋白的一抗(购于美国Cell

signaling公司),细胞培养皿(购于杭州生友生物技术有限公司),组织蛋白提取试剂盒(购于北京百泰克公司)。流式细胞仪(SL,购于德国Partec公司),高速冷冻离心机(universal 32R,购于德国Sigma公司),倒置显微镜(购于日本Olympus公司),紫外分光光度计(Auriud CE2401,购于英国Biochrom公司),凝胶图像分析系仪(购于天呈科技公司),电泳仪(FC101,购于大连竞迈生物科技有限公司),超低温冰箱(购于日本Sanyo公司),培养箱(购于美国NuAIRE公司),超纯水生产仪(购于美国密里博公司)。

1.2 方法

1.2.1 异鼠李素溶液的配制 异鼠李素用0.1% NaOH溶解配成母液,再用DMEM完全培养液稀释,使终浓度达到1 μmol/μL,过滤除菌后置4℃待用。

1.2.2 药物处理及细胞形态观察 将典型的大鼠C6胶质瘤细胞接种于六孔板内(每孔2 mL溶液),待六孔板内细胞密度达80%后,随机分为空白对照组、药物组(20、40、80 mg/L异鼠李素)处理细胞,细胞培养48 h后镜下观察。

1.2.3 MTT法测生长抑制率 设定空白0.1%NaOH对照。空白对照组加入等量0.1%NaOH和DMEM完全培养液,于37℃、5%CO₂培养箱培养。取对数生长期的C6胶质瘤细胞,调整细胞数为5×10⁴/L接种于96孔培养板,每孔100 μL,并设3个复孔。药物组分别给予终质量浓度为20、40、80 μg/mL的异鼠李素,不加细胞的10%DMEM完全培养液作为空白对照和溶剂对照,以完全培养基稀释MTT,终浓度为5 mg/mL,每孔加入10 μL,将细胞放回5%CO₂

作者单位

1. 西电集团医院神经外科

西安 710077

2. 西安交通大学第二附属医院神经外科

西安 710000

收稿日期

2016-09-01

通讯作者

孙转妮

1175299547@qq.com

com

培养箱中孵育4 h,再吸去含MTT的培养基,每孔加入150 μL 溶解液,以酶标仪在490 nm处测定每孔的吸收值。以未加药处理细胞的吸收值为100%对照,计算处理后细胞的抑制率。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 将各药物组细胞3次给药培养72 h后,吸出弃去培养液,PBS洗涤1次,后加入0.25%的胰酶消化1 min。吹打成悬液后吸入离心管中,6 000 rpm/min离心3 min。弃去上清液,加入2 mL PBS冲洗后6 000 rpm/min离心3 min,再重复一次。弃去离心后的上清液,加入细胞凋亡检测试剂盒中的结合液400 μL ,吹打均匀后每管加入试剂Annexin-v-FITC染色液5 μL 。4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育15 min后,加入10 μL 碘化丙啶(propidium iodide,PI)染色液(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$)10 μL 于4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育5 min。于流式细胞仪上检测凋亡情况。

1.2.5 Western blotting 法检测 C6 脑胶质瘤细胞总 AKT 蛋白和 Thr473 位点 AKT 蛋白表达 收集各组处理24 h后的细胞(2×10^5 个以上),用冷 PBS 洗2次,加入裂解液于冰浴上裂解30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 500 rpm离心5 min,收集上清并测定蛋白浓度。10% SDS-PAGE 分离蛋白,用电转仪半干法转至硝酸纤维素膜上。加入1:2 000稀释一抗反应2.5 h后,TBST洗2次,再加入1:1 000稀释的 AKT 和 Thr473 位点 AKT 二抗孵育1 h。最后 ECL 显影并曝光。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 13.0 统计软件分析数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,计数资料以率或百分比表示。组间比较采用样本均数 t 检验或 χ^2 检验,多组比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度处理的异鼠李素对细胞形态的影响

复苏、传代长势良好的 C6 脑胶质瘤细胞的生长情况:细胞活力强,6 h 后即可贴壁,贴壁后可见细胞变为三角形或长梭形,细胞生长迅速,48 h 后细胞即可长满瓶底,即进入平台期。在72 h 后可见部分肿瘤细胞堆积起来,出现无接触的抑制性生长,96 h 后培养液有大量死亡脱落细胞。在光学显微镜下,单层细胞的形态呈现为三角形、花纹状、多边形。爬片细胞经 HE 染色可见细胞呈长梭形、不规则多边形等。

2.2 MTT 比色法检测细胞存活率

随着异鼠李素浓度的增加,C6 脑胶质瘤细胞存活率逐步减少,生长抑制率 IC_{50} 逐步增加,见表1。以异鼠李素浓度为横坐标,C6 脑胶质瘤细胞抑制率为纵坐标作图,得异鼠李素作用于 C6 脑胶质瘤细胞48 h 的 IC_{50} 约为76.32 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ($n=3, P < 0.05$)。

2.3 细胞凋亡率比较

随着加入异鼠李素浓度的增高,大鼠 C6 脑胶质瘤细胞的凋亡率也增加($n=3, P < 0.05$),见表1。

2.4 Western 印迹分析

与对照组(1.00 ± 0.01)相比,随着加入异鼠李素浓度的升高,pAKT(Ser473)蛋白表达减弱($0.52 \pm 0.11, 0.49 \pm 0.09, 0.35 \pm 0.07$),差异有统计学意义($P < 0.05$),细胞内总 AKT 蛋白条带,基

本无表达差异,见图1。

表1 不同浓度的异鼠李素对 C6 胶质瘤细胞存活率及凋亡率的影响

剂量/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	平均OD值	细胞存活率/%	凋亡率(%)
空白对照组	0.517	100.00	5.83 \pm 0.18
20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.413	79.80 \pm 3.5	14.12 \pm 0.22
40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.339	65.57 \pm 2.7	16.77 \pm 0.45
80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.331	64.02 \pm 2.4	19.38 \pm 0.35

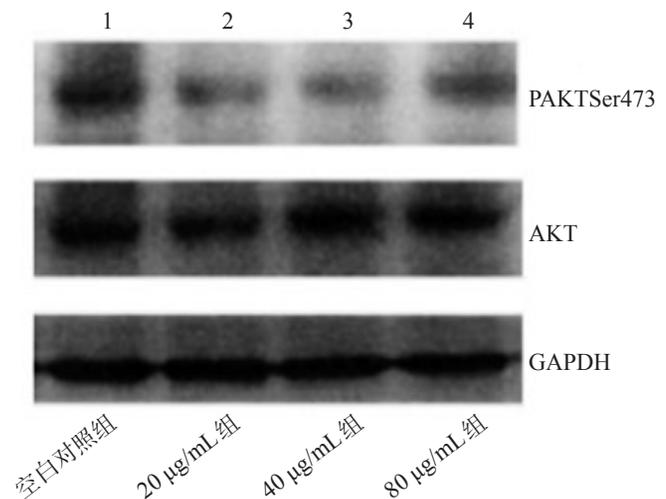


图1 不同浓度的异鼠李素对 C6 脑胶质瘤细胞 AKT 蛋白和 pAKT(Ser473)蛋白表达的影响

3 讨论

开发化疗药物,杀死肿瘤细胞,使肿瘤细胞凋亡和坏死,对肿瘤的治疗有很重要的意义,细胞凋亡是由基因控制的主动性、程序性的死亡。研究使细胞凋亡的药物与肿瘤之间的关系,深入探讨其机制,寻求靶向性药物对肿瘤的治疗有重要意义。实验结果显示,用不同实验方法同时得出一个结果:随着异鼠李素浓度的增加,体外培养的脑胶质瘤细胞的存活率下降,凋亡比例增加,而且呈一定剂量相关性。细胞增殖和凋亡的与 P13K/Akt 信号通路有着直接的关系,此信号通路的失调可以导致肿瘤的发生、转移、侵袭^[7]。众多文献报道异鼠李素对多种体外培养肿瘤细胞有抑制作用^[8,9],但对脑胶质瘤的作用影响尚未见报道。本文研究表明,异鼠李素对脑胶质瘤是有一定的靶向性,这为异鼠李素作为治疗药物提供了一个崭新的依据。当异鼠李素浓度高的时候,一般会引起凋亡和坏死共存^[10-12],原因在于,凋亡晚期,当巨噬细胞负荷足够大,无法迅速清除吞噬的细胞碎片,就不能再吞噬凋亡小体,此时细胞就会发生继发性坏死^[13-15]。

本文结论如下,低浓度异鼠李素能够促使 C6 脑胶质瘤细胞发生凋亡,高浓度异鼠李素可以导致体外培养 C6 脑胶质瘤细胞发生凋亡和坏死,具有明显的抑制脑胶质瘤细胞生长的作用,并且发生机制与 PI3K/AKT 途径有紧密的联系,在大鼠脑胶质瘤模型中,处理样品后,高效液相色谱法检测血浆和脑组织有一定的含量,说明异鼠李素有脑组织的靶向性,为异鼠李素在抗肿瘤的开发和利用提供了实验论据。

(下转第251页)

参考文献

- [1] 高一鹭, 王文志. 脑血管病流行病学研究进展[J]. 中华神经科杂志, 2015, 48: 337-340.
- [2] 鲁晓花. 颅内动脉瘤破裂患者显微外科手术 after 脑血管痉挛的危险因素分析[J]. 山东医药, 2015, 55: 40-41.
- [3] 詹绍萍, 刘辉, 郁鹏, 等. 经颅多普勒超声诊断自发性蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2015, 14: 175-176.
- [4] 杜宝顺, 亢志强, 孙来广. TCD 在分级不良颅内动脉瘤中的应用研究[J]. 肿瘤基础与临床, 2016, 29: 447-449.
- [5] 于莹, 许海洋, 李蕴潜, 等. 经颅多普勒超声对颅底肿瘤术后迟发性脑血管痉挛的检测及防治[J]. 中风与神经疾病, 2015, 32: 236-238.
- [6] 邵正凯, 刘爽, 王雪峰. 一氧化氮/环磷酸鸟苷信号与蛛网膜下腔出血后脑血管痉挛相关机制的研究进展[J]. 中国脑血管病杂志, 2016, 13: 165-168.
- [7] 杨洪宽, 赵亚军, 陈如东, 等. 蛛网膜下腔出血患者应用镁剂抗脑血管痉挛有效性 Meta 分析[J]. 中华实验外科杂志, 2015, 32: 2106-2109.
- [8] Chen L, Qian Z, Chao M, et al. Reproducibility of Middle Cerebral Artery Stenosis Measurements by DSA: Comparison of the NASCET and WASID Methods[J]. Plos One, 2015, 10: e0130991.
- [9] Washington CW, Derdeyn CP, Dhar R, et al. A Phase I proof-of-concept

- and safety trial of sildenafil to treat cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage[J]. J Neurosurg, 2016, 124: 318-327.
- [10] Hui PJ, Liu M, Wang Z, et al. Cerebrovascular hemodynamic changes of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. Chinese Journal of Cerebrovascular Diseases, 2011, 39: 893-898.
- [11] el Hendawy M, Wroński J, Juniewicz H, et al. Cerebral vasospasm detection by TCD after supratentorial brain tumours surgery[J]. Neurochir Pol, 2000, 34: 114-123.
- [12] Suarez JI, Martin RH, Calvillo E, et al. Effect of Human Albumin on TCD Vasospasm, DCI, and Cerebral Infarction in Subarachnoid Hemorrhage: The ALISAH Study[J]. Acta Neurochir Suppl, 2015, 120: 287-290.
- [13] 张茂, 陈健龙, 彭浩, 等. 经颅多普勒检测破裂脑动脉瘤栓塞术后脑血管痉挛的临床应用[J]. 临床神经外科杂志, 2017, 14: 174-177.
- [14] Eisenhut M. The evidence for a role of vasospasm in the pathogenesis of cerebral malaria[J]. Malar J, 2015, 14: 405.
- [15] Li G, Han K, Yang H, et al. Risk factors of intracranial hemorrhage after brain AVM interventional therapy and its effects on prognosis[J]. Int J Clin Exp Med, 2014, 8: 11014-11019.

(本文编辑:王晶)

(上接第248页)

参考文献

- [1] 崔尧元, 周逸鸣, 张煜, 等. 脑胶质瘤的凋亡和相关基因 Survivin 的表达[J]. 中华神经外科杂志, 2003, 19: 448-451.
- [2] 邵耐远, 黄强, 董军, 等. 神经节细胞胶质瘤恶变及其差异表达基因分析[J]. 中华神经外科杂志, 2004, 20: 191-195.
- [3] Wang ZR, Wang L, Yin HH, et al. Effect of total flavonoids of hippophae rhamnoides on contractile mechanics and calcium transfer in stretched myocyte[J]. Space Med Med Eng (Beijing), 2000, 13: 6-9.
- [4] 林卫红, 谢晓娜, 崔俐, 等. 胶素对 C6 脑胶质瘤细胞形态学影响的研究[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14: 1056-1058.
- [5] 熊学华, 邓健平, 吕明学, 等. CHOP 在不同级别胶质瘤中的表达和意义[J]. 神经损伤与功能重建, 2016, 11: 46-47, 59.
- [6] 雷宁, 沈富林. 异鼠李素对肿瘤细胞株的体外抑制作用观察[J]. 四川省卫生管理干部学院学报, 2006, 25: 161-163.
- [7] Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis[J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1784: 150-158.
- [8] Ward SG, Finan P. Isoform-specific phosphoinositide 3-kinase inhibitors as therapeutic agents[J]. Curr Opin Pharmacol, 2003, 3: 426-434.
- [9] Fan PS, Gu ZL, Sheng R, et al. Inhibitory effect of quercetin on

- proliferation of human neurovascular endothelial cells in vitro[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24: 1231-1234.
- [10] 周黎明, 朱玲, 王正荣. 异鼠李素体外抗肿瘤作用的研究[J]. 四川生理科学杂志, 2004, 26: 191-192.
- [11] 朱玲, 王正荣, 周黎明, 等. 异鼠李素对肺癌的作用及其抗肿瘤机制的初步探讨[J]. 航天医学与医学工程, 2005, 18: 381-383.
- [12] 吴秋歌, 蒋军广, 王静. PI3K/Akt 抑制剂对肺腺癌 A549 细胞增殖活性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 3: 45-52.
- [13] Boreddy SR, Pramanik KC, Srivastava SK. Pancreatic tumor suppression by benzyl isothiocyanate is associated with inhibition of PI3K/AKT/FOXO pathway[J]. Clin Cancer Res, 2011, 17: 1784-1795.
- [14] He X, Wang Y, Zhu J, et al. Resveratrol enhances the anti-tumor activity of the mTOR inhibitor rapamycin in multiple breast cancer cell lines mainly by suppressing rapamycin-induced AKT signaling[J]. Cancer Lett, 2011, 301: 168-176.
- [15] Junttila TT, Akita RW, Parsons K, et al. Ligand-independent HER2/HER3/PI3K complex is disrupted by trastuzumab and is effectively inhibited by the PI3K inhibitor GDC-0941[J]. Cancer Cell, 2009, 15: 429-440.

(本文编辑:王晶)