

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.20.005

雷公藤多甙对 A375 黑色素瘤生长、侵袭和血管生成的影响及其机制

徐红涛, 韩中保, 张慧丽, 马林伟

(盐城卫生职业技术学院临床医学教研室, 江苏盐城 224005)

[摘要] **目的** 探讨雷公藤多甙对黑色素瘤生长、侵袭和血管生成的影响及其作用机制。**方法** 采用药物总评分(MTS)法考察雷公藤多甙对人黑色素瘤 A375 细胞增殖的影响;利用裸鼠皮下移植瘤模型考察雷公藤多甙对体内黑色素瘤生长的影响;Transwell 实验考察雷公藤多甙对人黑色素瘤 A375 细胞侵袭的影响;小管形成实验检测雷公藤多甙对人黑色素瘤血管生成的影响;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测雷公藤多甙对 A375 细胞分泌因子的影响,如血管内皮生长因子(VEGF)、碱性纤维母细胞生长因子(bFGF)、转化生长因子- β (TGF- β)及白细胞介素-8(IL-8)等。**结果** 雷公藤多甙处理 A375 细胞后,肿瘤细胞的体外增殖及体内生长较对照组明显受到抑制;肿瘤细胞的侵袭能力较对照组明显减弱;雷公藤多甙能通过下调 VEGF、bFGF 及 IL-8 蛋白从而抑制肿瘤细胞诱导的血管生成;但对 TGF- β 蛋白的表达没有明显影响。**结论** 雷公藤多甙具有抗黑色素瘤生长及侵袭的能力,其机制可能与抑制黑色素瘤的血管生成有关。

[关键词] 雷公藤多甙;黑色素瘤;生长;侵袭;血管生成;分子机制

[中图分类号] R758.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2016)20-2752-04

Effect of tripterygium on growth, invasion and angiogenesis of A375 melanoma and its action mechanisms

Xu Hongtao, Han Zhongbao, Zhang Huili, Ma Linwei

(Teaching and Researching Section of Clinical Medicine, Yancheng Institute of Health Vocational Technology, Yancheng, Jiangsu 224005, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of tripterygium on the growth, invasion and angiogenesis of melanoma A375 and its action mechanisms. **Methods** MTS was used to test the effect of tripterygium on proliferation of A375 melanoma; the nude mouse subcutaneous melanoma xenograft model was used to detect the effect of tripterygium on tumor growth; the Transwell experiment was used to determine the effect of tripterygium on invasion of A375 melanoma; the tubule formation experiment was used to determine the effect of tripterygium on tumor angiogenesis; ELISA was used to detect the influence of tripterygium on A375 cellular secretion factors, such as VEGF, bFGF, TGF- β and IL-8. **Results** The in vitro proliferation and in vivo growth of A375 melanoma cells after tripterygium treatment were significant inhibited, the invasion ability of A375 melanoma cells was significant weakened compared with the control group; tripterygium could inhibit tumor cell-induced vessel formation by down-regulating the expression of VEGF, bFGF and IL-8 proteins, but it had no influence on expression of TGF- β protein. **Conclusion** Tripterygium has anti-growth and anti-invasion effects on A375 melanoma, its potential mechanisms may associated with the inhibition of tumor angiogenesis of A375 melanoma.

[Key words] Tripterygium; melanoma; growth; invasion; tumor angiogenesis; molecular mechanism

雷公藤多甙是由卫矛科植物雷公藤根(去皮)经粉碎、提取,精制而成^[1]。研究发现雷公藤多甙具有多种药理学功能,如抗类风湿性关节炎^[2]、调节机体免疫功能^[3]、治疗妇科疾病^[4]、糖尿病^[5]及哮喘^[6]等。近年来,诸多研究表明雷公藤多甙具有较为广泛的抗肿瘤作用^[7-8]。本研究以 A375 黑色素瘤细胞为研究对象,考察雷公藤多甙对黑色素瘤生长、侵袭及血管生成的影响,并探讨其可能的作用机制,为雷公藤多甙的临床应用提供相关实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人源性黑色素瘤细胞系 A375 和原代人脐静脉内皮细胞 HUVEC 购自中国科学院上海细胞生物学研究所;BALB/c 裸鼠(雄性,6~8 周龄,18~20 g),SPF 级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2012-0001。雷公藤多甙片购自湖南省医药公司,用 DMSO(购自 Sigma 公司)溶解,并用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌后置

-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。临用前使用 DMEM(购自凯基公司)培养基进行稀释,整个体系中 DMSO 终浓度控制在 5% 以内。10% 胎牛血清及 0.25% 胰蛋白酶购自 Gibco 公司。BCA 蛋白定量试剂盒购自美国 Pierce 公司。I 型鼠尾胶原蛋白购自天津卫凯生物有限公司,包装规格:10 mg。MatrigelTM 基底膜基质购自美国 BD 公司,包装规格:5 mL。含 Transwell 小室的 24 孔板购自美国 Corning 公司。8 μm 聚碳酸酯膜购自美国 Corning 公司。相关酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购自 eBioscience 公司。

1.2 方法

1.2.1 采用药物总评分(MTS)法检测雷公藤多甙对 A375 黑色素瘤细胞增殖的影响 A375 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。取对数生长期的细胞,用胰酶消化后离心计数,用 DMEM 完全培养基调整细胞浓度为 5×10^5 /mL,接种于 96 孔板,每孔 200 μL 细胞

悬液,常规培养至细胞增长至 80%左右时,分别加入 0、0.625、1.25、2.50、5.00、10.00、20.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的雷公藤多甙和对照溶剂组(DMSO)孵育 24 h,之后每孔加入 MTS 试剂 20 μL ,继续培养 3 h。培养结束后,在 490 nm 波长下测定光密度值(OD 值)。细胞增殖抑制率(%)=(1-实验组 OD 值/阴性对照组 OD 值) \times 100%。每个浓度设置 6 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.2 A375 裸鼠皮下移植瘤模型的建立及检测雷公藤多甙对肿瘤体内生长的影响 (1)将购买的 BALB/c 裸鼠适应性饲养 1 周。然后根据体重质量分成 2 组,选择其中一组作为对照组(只接种肿瘤细胞,不接受任何药物处理);(2)常规培养 A375 黑色素瘤细胞,实验前 4~5 d,按 1:8 比例将细胞传代于 75 cm^2 细胞培养瓶中,以免细胞生长过度而出现不完全融合。每个培养瓶大约含(0.8~1.0) \times 10⁷ 个细胞,取对数生长期的细胞,弃去培养液,用 PBS 冲洗 2 遍。加入 1 mL 0.25%胰酶-0.02%乙二胺四乙酸(EDTA),37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1 min 后,轻敲培养瓶使细胞脱落,加血清终止消化。转移至 10 mL 离心管中,1 000 r/min,常温离心 3 min,弃上清液。加 PBS 吹打获得单细胞悬液。通过细胞计数将悬液浓度调节至 1 \times 10⁷/mL,放置冰上备用;(3)用浓度为 75%的乙醇消毒皮肤后,用 1 mL 注射器吸取 0.2 mL(2×10^6 个细胞)A375 细胞悬液接种至裸鼠右后肢的背部皮下,每注射 2 只裸鼠,充分混匀细胞悬液后,继续接种,接种完继续饲养,每天观察小鼠肿瘤的形成情况,接种 7 d 后,选择造模成功的 24 只裸鼠,测定平均瘤体体积和体质量进行分组,分为模型组、雷公藤多甙低剂量组(10 mg/kg)、雷公藤多甙高剂量组(40 mg/kg),每组 5 只,给药 21 d(药物用食用油溶解,灌胃给药;模型组给予不含药的食用油)。每隔 3 天测量每只裸鼠的体质量和瘤体体积;(4)给药 21 d 后将各组裸鼠颈椎脱臼处死,剪开皮肤后,小心地剥离整个瘤块,称质量、拍照后,用 4%多聚甲醛固定备用。

1.2.3 Transwell 实验检测雷公藤多甙对 A375 黑色素瘤细胞侵袭的影响 24 孔板的 Transwell 小室(含 8 μm 聚碳酸酯膜)上室膜表面均匀铺被含去生长因子 MatrigelTM 的 DMEM 培养基稀释液(1:4, v/v),于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱放置 30 min 使之凝固,备用。取含对数生长期的 A375 黑色素瘤细胞株 A375 细胞悬液 100 μL 接种于上室,并加入相应浓度的雷公藤多甙(0~2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$),低血清培养(0.5%, v/v),下室加入含 20% FBS 的 DMEM 培养基 600 μL 。每组均设 3 个复孔,作用 24 h。24 h 后取出小室,用棉拭子拭去上室中未迁移的细胞,用 4%多聚甲醛固定 10 min,PBS 洗涤后用 0.1%结晶紫染色 30 min,PBS 漂洗 3 次后置于载玻片上,在 200 倍镜下随机选 5 个视野计数,将小室置于 400 μL /孔的甲醇中将结晶紫溶解,取 200 μL 溶解液置于 96 孔板中,于 370 nm 波长处检测 OD 值,计算相对迁移率。

1.2.4 小管形成实验检测雷公藤多甙对 A375 黑色素瘤血管生成的影响 (1)将 96 孔板和无菌移液枪头置于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冷过夜;将保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中的 MatrigelTM 基底膜基质置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中,缓慢解冻过夜待用;(2)将预冷的 96 孔板置于冰板上,每孔加入 100 μL MatrigelTM 基底膜基质。将其先置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,再置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 /95%空气的细胞培养箱中 30 min;(3)取指数生长期的 HUVEC 细胞(100 mm 培养皿),弃培养液。加 10 mL PBS 洗涤 1 次,弃去 PBS 后,加入

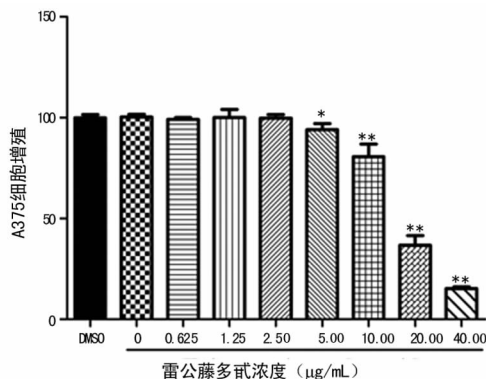
4 mL 0.25%胰蛋白酶-0.02%EDTA,37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 2 min 后,向其中加入 5 mL 完全培养基中和反应,吹打后将细胞转入 15 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 3 min。配制细胞悬液,用适量的基础培养基调整细胞浓度为 1.5 \times 10⁵/mL。96 孔板的每孔缓慢加入 100 μL 细胞混悬液;(4)除空白对照组(Control),每孔加入等体积的 A375 细胞培养上清液 0.2 mL 进行培养。与此同时,不同浓度的雷公藤多甙(0~2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)作用 24 h 后,分别于显微镜下观察管腔形成情况并进行拍照记录。运用 Image J 软件分析管腔生成的长度。

1.2.5 ELISA 检测雷公藤多甙对 A375 黑色素瘤相关分泌因子的影响 (1)配液:在 PBS 中加入 0.05%吐温-20,0.10% BSA 配制成稀释液;在 PBS 中加入 1%BSA 配制成封闭液;在 PBS 中加入 0.05%吐温-20 配制成洗涤液;将 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的捕获抗体原液用稀释液稀释 100 倍至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 配制成包被液。(2)板的制备:在 96 孔板中加入配制好的包被抗体溶液,每孔 100 μL ,用膜密封,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;倒出每孔液体,每孔加入 200 μL 洗涤缓冲液清洗,吸水纸上拍干,后续洗涤液同此,重复 4 次;每孔加入 300 μL 封闭液,在室温下孵育 1 h;重复第 2 步中的清洗步骤。(3)检测程序:将所有试剂放至室温;稀释标准品,每孔加入 100 μL 的样品或标准品,混合 1 min,轻轻拍打板框,覆盖胶条,室温孵育 2 h;重复洗涤;每孔加入 100 μL 检测抗体,盖上胶条,室温孵育 2 h;重复洗涤;每孔加入 100 μL 的链霉亲和素-HRP(原液按稀释倍数稀释),密封盖板,在室温下孵育 30 min,避免放置在直射光下;重复洗涤;每孔加入 100 μL 底物,在室温下孵育 20~30 min。避免放置在直射光下;每孔加入 50 μL 终止液,轻轻摇晃板,确保充分混合;15 min 后,设定酶标仪 450 nm 处和 570 nm 处,检测每孔的 OD 值。

1.3 统计学处理 采用 Graphpad 5.0 软件进行单因素方差分析,样本均数间的比较采用 LSD-*t* 检验。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 雷公藤多甙对 A375 细胞的增殖具有抑制作用 体外不同浓度的雷公藤多甙处理 A375 细胞 24 h,结果表明雷公藤多甙在 5.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对 A375 细胞的增殖出现抑制,10.00、20.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时可以明显抑制肿瘤细胞的增殖,并且呈现一定的量-效关系,见图 1。



*: $P<0.05$, **: $P<0.01$, 与 DMSO 组比较。

图 1 雷公藤多甙对 A375 黑色素瘤细胞增殖的影响

2.2 雷公藤多甙能够抑制 A375 黑色素瘤的体内生长 裸鼠体内移植瘤实验结果发现,与模型组相比,雷公藤多甙能够显

著抑制 A375 黑色素瘤的体内生长,且具有一定的剂量依赖性,见图 2。

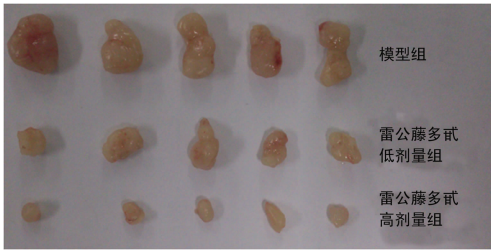
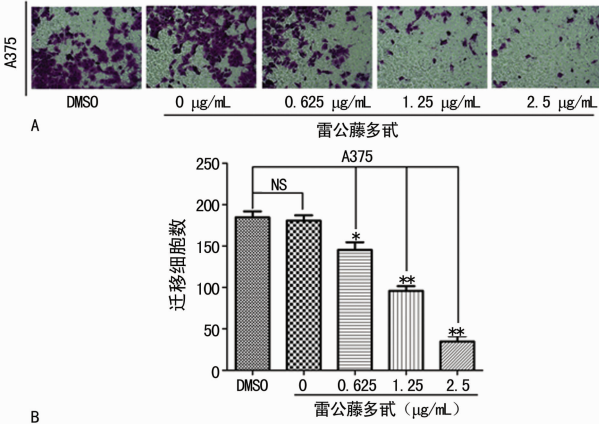


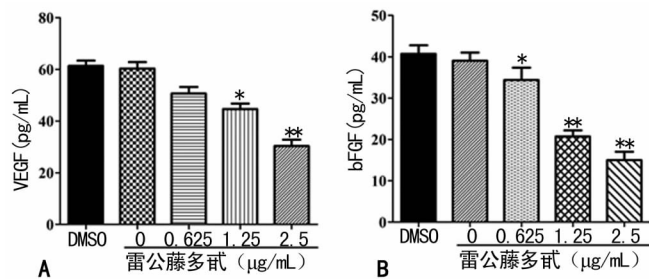
图 2 雷公藤多甙对裸鼠 A375 黑色素瘤皮下移植瘤体内生长的影响



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.001$, 与 DMSO 组比较。

图 3 雷公藤多甙对 A375 黑色素瘤细胞迁移的影响 (×200)

2.3 雷公藤多甙能抑制 A375 黑色素瘤细胞的侵袭 侵袭实验中,选取对肿瘤细胞增殖无明显抑制作用的浓度:0.625、1.25 μg/mL 和 2.5 μg/mL 处理 A375 细胞 24 h,结果表明雷公藤多甙在 0.625 μg/mL 时对 A375 细胞的侵袭出现抑制,1.25 μg/mL 和 2.5 μg/mL 浓度可以显著抑制肿瘤细胞的侵



*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, 与 DMSO 组比较。

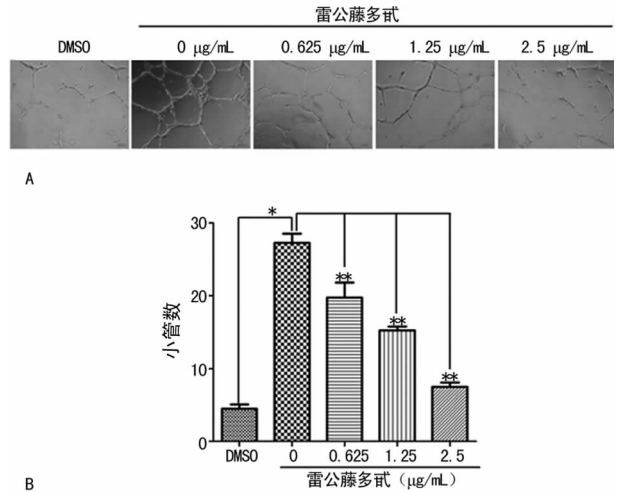
图 5 雷公藤多甙对 A375 黑色素瘤细胞血管生成相关因子分泌的影响

3 讨论

近年来黑色素瘤的发病率逐年升高,给人类的健康带来巨大威胁^[9]。目前,黑色素瘤的治疗主要以手术切除病灶为主,辅以放疗及化疗^[10]。该方法对于未发生转移的黑色素瘤治疗效果较为理想,但对于已经发生转移的黑色素瘤效果较差。因此找寻能够有效治疗黑色素瘤的药物显得尤为迫切。近年来,中药在肿瘤的治疗中受到了越来越多的重视,且大量临床前研究显示,多种中药具有广泛的抗肿瘤作用,如丹参^[11-13]、

并且具有一定的剂量依赖性,见图 3。

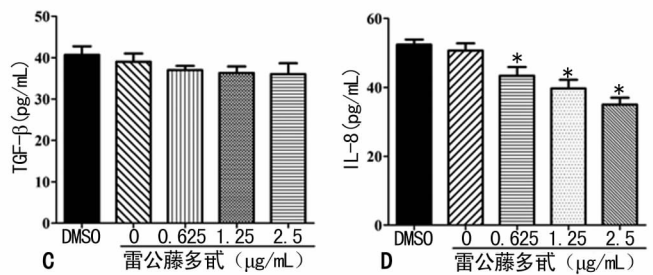
2.4 雷公藤多甙能抑制肿瘤细胞诱导的小管形成 小管形成实验中,选取 0、0.625、1.25、2.5 μg/mL 雷公藤多甙及 DMSO 处理 A375 细胞 24 h,结果表明,培养肿瘤细胞的上清液可以明显的刺激小管形成。雷公藤多甙在 0.625 μg/mL 时对 A375 黑色素瘤细胞诱导的小管形成具有抑制作用,1.25 μg/mL 和 2.5 μg/mL 浓度可以显著抑制肿瘤细胞诱导的小管形成,并且具有一定的剂量依赖性,见图 4。



*: $P < 0.01$, 与 DMSO 组比较; **: $P < 0.01$, 与 0 μg/mL 组比较。

图 4 雷公藤多甙对肿瘤细胞诱导的小管形成的影响

2.5 雷公藤多甙能够抑制 A375 黑色素瘤细胞血管生成相关因子的分泌 采用 ELISA 法对 A375 黑色素瘤细胞培养上清液进行检测,考察雷公藤多甙对肿瘤细胞血管生成相关因子分泌的影响。结果表明雷公藤多甙能显著抑制肿瘤血管生成相关因子的分泌,见图 5。



川芎^[14]等。

雷公藤多甙是从中药雷公藤根中提取而来,大量研究表明,雷公藤多甙对多种肿瘤细胞具有较为广泛的抗肿瘤作用,其主要通过抑制肿瘤细胞生长^[15]及诱导肿瘤细胞凋亡^[7]发挥作用。目前,尚无雷公藤多甙治疗黑色素瘤的相关研究报道,考虑到雷公藤多甙广泛的抗肿瘤作用,那么其对近些年来发病率逐渐升高的黑色素瘤有无治疗作用成为了研究的兴趣点所在。

本研究从体内、外考察了雷公藤多甙对 A375 黑色素瘤的影响,发现雷公藤多甙既能在体外抑制肿瘤细胞的增殖,同时对体内肿瘤的生长也具有抑制作用。同时,笔者也考察了雷公藤多甙对黑色素瘤细胞的体外迁移的影响,发现雷公藤多甙能够抑制肿瘤细胞的体外迁移。考虑到肿瘤细胞的生长及转移均依赖于肿瘤的血管生成^[16],因此笔者又考察了雷公藤多甙对肿瘤血管生成的影响,结果发现雷公藤多甙能显著抑制肿瘤细胞诱导的血管生成。在肿瘤的血管生成过程中,多种因子参与其中,包括 VEGF、bFGF、TGF- β 及 IL-8 等,因此笔者又考察了雷公藤多甙对参与调控血管生成过程的这些因子的表达有何影响。结果发现,雷公藤多甙能够显著抑制 VEGF、bFGF 及 IL-8 的蛋白表达,但却对 TGF- β 蛋白的表达没有明显影响,这表明雷公藤多甙对于黑色素瘤血管生成的调控不依赖于 TGF- β 。

综上所述,本文从体外肿瘤细胞增殖、迁移、体内肿瘤生长及肿瘤血管生成角度考察了雷公藤多甙对 A375 黑色素瘤的影响,研究结果显示,雷公藤多甙具有用于临床治疗黑色素瘤的潜能,这为雷公藤多甙后续的深入研究及药物开发提供了一定的实验依据。

参考文献

- [1] Song Q, Lu JZ, Li J. Effect of tripterygium glycosides on serum interleukin-1beta, interleukin-2, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma levels in patients with Behcet's disease[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2010, 30(6):598-600.
- [2] Bao J, Dai SM. A Chinese herb Tripterygium wilfordii Hook F in the treatment of rheumatoid arthritis: mechanism, efficacy, and safety [J]. Rheumatol Int, 2011, 31(9):1123-1129.
- [3] Li T, Xie J, Li Y, et al. Tripterygium wilfordii Hook F extract in cART-treated HIV patients with poor immune response: a pilot study to assess its immunomodulatory effects and safety[J]. HIV Clin Trials, 2015, 16(2):49-56.
- [4] 黄蕴. 雷公藤多甙治疗子宫内膜异位症 50 例[J]. 南通医学院学报, 1995, 15(1):70-71.
- [5] 吴艺捷, 王煜非, 杨虎天, 等. 雷公藤多甙用于 1 型糖尿病患者的免疫干预治疗[J]. 中华内分泌代谢杂志, 2006, 22(4):342-346.
- [6] Wang XH, Zhang ZY. Effect of tripterygium polyglucoside on T-lymphocyte subsets and serum interleukin-5

level in asthma patients[J]. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2001, 21(1):25-27.

- [7] Yang HS, Kim JY, Lee JH, et al. Celastrol isolated from Tripterygium regelii induces apoptosis through both caspase-dependent and -independent pathways in human breast cancer cells[J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(2):527-532.
- [8] Ushiro S, Ono M, Nakayama J, et al. New nortriterpenoid isolated from anti-rheumatoid arthritic plant, Tripterygium wilfordii, modulates tumor growth and neovascularization[J]. Int J Cancer, 1997, 72(4):657-663.
- [9] Ascierto ML, Melero I, Ascierto PA. Melanoma: from incurable beast to a curable bet. the success of immunotherapy[J]. Front Oncol, 2015(5):152.
- [10] Kyrgidis A, Valasidis A, Bourlidou E, et al. Better targeting melanoma: options beyond surgery and conventional chemotherapy[J]. Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov, 2011, 5(2):147-159.
- [11] Zhang W, Lu Y. Advances in studies on antitumor activities of compounds in Salvia miltiorrhiza [J]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi, 2010, 35(3):389-392.
- [12] Zhou J, Xu XZ, Hu YR, et al. Cryptotanshinone induces inhibition of breast tumor growth by cytotoxic CD4+ T cells through the JAK2/STAT4/perforin pathway[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15(6):2439-2445.
- [13] Liu F, Yu G, Wang G, et al. An NQO1-initiated and p53-independent apoptotic pathway determines the anti-tumor effect of tanshinone II A against non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(7):e42138.
- [14] Pan J, Shang JF, Jiang GQ, et al. Ligustrazine induces apoptosis of breast cancer cells in vitro and in vivo[J]. J Cancer Res Ther, 2015, 11(2):454-458.
- [15] 刘静, 胡维新, 叶茂, 等. 雷公藤多甙对人急性髓性白血病细胞株 HL-60 的生长抑制及调亡诱导作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2004, 29(4):382-385.
- [16] Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz WA, et al. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis[J]. Cancer Cell, 2009, 15(3):232-239.

(收稿日期:2015-12-15 修回日期:2016-03-01)

2016 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者,本刊一律接受网上投稿,不再接受纸质和电子邮箱投稿!请您直接登陆网站 <http://cqyx.journalserv.com/> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话:023-61965157。

来稿须将审稿费 100 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部,编辑部若未收到审稿费,稿件将不予处理。

感谢您对本刊工作的支持!