

## 3种活血化瘀中药复方含药血清对神经胶质瘤U251细胞JAK/STAT信号通路的影响<sup>△</sup>

刘建民\*, 黄良文, 朱旭红, 胡 鹏, 袁淮涛(广州中医药大学第一附属医院神经外科, 广州 510405)

中图分类号 R966;R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2176-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.04

**摘要** 目的:评价3种活血化瘀中药复方含药血清对神经胶质瘤U251细胞侵袭行为及Janus激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)通路的影响。方法:将大鼠随机分为生理盐水组(5 mL/kg)、桃红四物汤组(5.7 g/kg)、血府逐瘀汤组(8.5 g/kg)和抵挡汤组(2.8 g/kg),以生药计,每天ig给药1次,连续10 d,末次给药2 h后制备10%含药血清培养液。以10%含药血清培养液干预U251细胞1周后,采用Transwell法检测细胞侵袭率,Western blot法检测细胞中金属基质蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9、磷酸化JAK2(p-JAK2)、磷酸化STAT3(p-STAT3)蛋白表达,实时荧光定量聚合酶链式反应法检测细胞中MMP-2、MMP-9 mRNA表达。结果:与空白血清比较,血府逐瘀汤含药血清能降低细胞侵袭率( $P<0.05$ ),下调细胞中MMP-2、MMP-9 mRNA及其蛋白表达以及细胞中p-JAK2、p-STAT3蛋白表达( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ );而桃红四物汤含药血清和抵挡汤含药血清作用后上述指标差异无统计学意义( $P>0.05$ )。结论:在3种活血化瘀中药复方中,血府逐瘀汤具有显著抑制U251细胞侵袭的能力;其机制可能与抑制JAK2/STAT3信号通路激活,下调MMP-2、MMP-9基因及蛋白表达有关。

**关键词** 活血化瘀;侵袭;Janus激酶/信号转导及转录激活因子信号通路;金属基质蛋白酶;胶质瘤U251细胞

### Effects of 3 Kinds of Serum Containing Blood-activating and Stasis-eliminating TCM Compound Formulas on JAK/STAT Signal Pathway of Glioma U251 Cells

LIU Jianmin, HUANG Liangwen, ZHU Xuhong, HU Peng, YUAN Huaitao (Dept. of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To evaluate the effects of 3 kinds of serum containing blood-activating and stasis-eliminating TCM compound formulas on aggressive behavior, Janus kinase (JAK)/signal transduction and transcriptional activator (STAT) pathway of glioma U251 cells. **METHODS:** Rats were randomly divided into normal saline group (5 mL/kg), Taohong Siwu decoction group (5.7 g/kg), Xuefu Zhuyu decoction (8.5 g/kg) and Didang decoction (2.8 g/kg), calculated by crude drug, intragastrically administrated once a day, for 10 d. 10% drug-containing serum culture medium was prepared after 2 h of last administration. After 10% drug-containing serum culture medium intervening U251 cells for 1 week, Transwell method was conducted to detect the cell invasion rate, Western blot was adopted to detect the metal matrix protease 2 (MMP-2), MMP-9, phosphorylated JAK2 (p-JAK2), phosphorylated STAT3 (p-STAT3) protein expression; and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction method was used to detect MMP-2, MMP-9 mRNA expression. **RESULTS:** Compared with blank serum, Xuefu Zhuyu decoction drug-containing serum can reduce cell invasion rate ( $P<0.05$ ), decrease the MMP-2, MMP-9 mRNA and its protein expression, and p-JAK2, p-STAT3 protein expression in cells ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while there was no significant difference in above-mentioned indexes in Taohong Siwu decoction drug-containing serum group and Didang drug-containing serum group ( $P>0.05$ ). **CONCLUSIONS:** In the 3 kinds of blood-activating and stasis-eliminating TCM compound formulas, Xuefu Zhuyu decoction shows significant invasive effect on inhibiting U251 cells; the mechanism may be related to inhibiting the activation of JAK2/STAT3 signal pathway and decreasing MMP-2, MMP-9 gene and protein expressions.

**KEYWORDS** Blood-activating and stasis-eliminating; Invasion; Janus kinase/signal transduction and transcriptional activator pathway; Metal matrix protease; Glioma U251 cells

恶性胶质瘤(Malignant gliomas, MGs)是中枢神经系统最常见的原发性恶性肿瘤,因其高度侵袭性生长的

<sup>△</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81072907);广州市科技计划基金项目(No.201607010365);广州中医药大学“高水平大学建设”项目(No.A1-AFD018171Z11072)

\* 副教授,博士。研究方向:中西医结合神经肿瘤基础与临床研究。电话:020-36591396。E-mail:jml\_liu@163.com

特点而缺乏有效的治疗措施,患者预后较差,中位生存时间仅大约1年<sup>[1-3]</sup>。近年来研究表明,活血化瘀中药能够抑制肿瘤侵袭,这给MGs治疗带来了新的希望,但这些活血化瘀中药抗肿瘤侵袭的作用机制尚缺乏研究<sup>[4]</sup>。Janus激酶(JAK)/信号转导及转录激活因子(STAT)通路的过度活化与MGs细胞浸润、扩散密切相关<sup>[5]</sup>,然而活

血化瘀中药抗肿瘤侵袭作用是否与调控 JAK/STAT 信号通路活化有关尚不清楚。基于此,本研究选用桃红四物汤、血府逐瘀汤、抵挡汤 3 种不同的活血化瘀作用层次的经典中药复方,从 JAK/STAT 信号通路磷酸化方面探讨其抗神经胶质瘤 U251 细胞侵袭的可能机制,为寻求治疗 MGs 的临床有效药物提供实验基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Qwin550 图像分析软件系统(德国 Leica 公司);MK3 酶标仪(美国 Thermo Labsystems 公司);XSP-4C 生物显微镜(上海彼爱姆光学仪器制造有限公司);DYY-10C 电泳仪、DYCP-33A 水平电泳槽(中国北京六一仪器厂);3K15 离心机(美国 Sigma 公司);7300System 荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(美国 Agilent 公司)。

### 1.2 药材与试剂

方中所用药材桃仁、红花、川芎、白芍、当归、熟地、生地、赤芍、牛膝、桔梗、柴胡、枳壳、炙甘草、水蛭、虻虫、大黄等均购自广东康美药业股份有限公司,经笔者鉴定均为真品;10%小牛血清(广州瑞舒生物科技有限公司);PCR 引物(美国 Invitrogen 公司);兔源性磷酸化 JAK2(p-JAK2)、磷酸化 STAT3(p-STAT3)、 $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)抗体和辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G(IgG)二抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;抗金属基质蛋白酶 2(MMP-2)、MMP-9 抗体(美国 Santa Cruz 公司);基底膜基质(Matrigel,美国 Sigma 公司)。

### 1.3 细胞与动物

神经胶质瘤 U251 细胞株购自上海生物化学和细胞生物研究所;SD 大鼠 75 只,SPF 级, $\delta$ ,体质量为 180~220 g,购自广东省医学实验动物中心[许可证号:SCXK(粤)2014-0035]。

## 2 方法

### 2.1 含药血清的制备

各方药经生药鉴定后,分别取方中药材用水煎煮 2 次,过滤,制成 1 g/mL 的药液(以生药计)。将大鼠随机分为生理盐水组(5 mL/kg, 15 只)、桃红四物汤组(5.7 mL/kg, 20 只)、血府逐瘀汤组(8.5 mL/kg, 20 只)和抵挡汤组(2.8 mL/kg, 20 只),以生药药液 ig 给药,各给药组给药剂量均按体表面积折算的人临床等效剂量<sup>[6]</sup>,每天 1 次,连续 10 d。末次给药 2 h 后采血,以离心半径为 6.2 cm、3 000 r/min 离心 20 min,合并同组大鼠血清,0.22  $\mu$ m 微孔滤膜过滤除菌,用 1640 培养基配成 10% 含药血清培养液,4  $^{\circ}$ C 冰箱保存,备用。

### 2.2 细胞培养及含药血清干预

将 U251 细胞接种于含 10% 小牛血清、100 u/mL 青霉素和链霉素的 1640 培养基中培养,细胞密度为  $2 \times 10^4$  个/mL,在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养。取对数生长期细

胞,空白血清组加入生理盐水组大鼠血清培养液,桃红四物汤血清组、血府逐瘀汤血清组和抵挡汤血清组分别加入已制备的 10% 相应含药血清培养液,然后置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 孵箱中继续培养,持续干预 1 周收获细胞继续试验。

### 2.3 Transwell 法检测细胞侵袭能力

将冻存于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱的 Matrigel 取出于 4  $^{\circ}$ C 过夜,制备基质胶;取 300  $\mu$ L DMEM 培养基,按 50  $\mu$ g/室加入 Matrigel 混匀,加入上室(3 个室)各 200  $\mu$ L,放入 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 5 h。每室加入含  $5 \times 10^4$  个 U251 细胞的单细胞悬液,下腔室中加入 500  $\mu$ L 的 10% 含药血清培养液,于 37  $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 24 h。取出小室用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍,5% 戊二醛 4  $^{\circ}$ C 固定。取出小室放入苏木精中浸泡,染色 5 min,显微镜下观察穿过 Matrigel 基质胶至滤膜反面的细胞。于 200 倍显微镜下计数 5 个视野的细胞数,取平均值,计算细胞侵袭率:细胞侵袭率(%) = 含药血清组穿膜细胞数/空白血清组(无 Matrigel 胶)穿膜细胞数  $\times 100\%$ 。试验重复 6 次。

### 2.4 Western blot 法检测细胞中 MMP-2、MMP-9、p-JAK2、p-STAT3 蛋白表达

使用含抑肽酶的缓冲液对细胞进行匀浆处理,离心获取质膜碎片,随后用 1% Triton X-100 溶解匀浆,采用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。将 10  $\mu$ g 蛋白加入 Laemmli 样品缓冲液(1:1)混合,强力混匀,置 100  $^{\circ}$ C 的水浴箱中水浴加热 5 min,随后经 4%~20% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离。采用半干式电转印法将蛋白转入聚偏二氟乙烯膜,10% 脱脂奶室温封闭转印 2 h,放入杂交袋中,加入一抗稀释液(根据抗体敏感性稀释),封口,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,随后洗膜 3 次,每次 10 min;加入 HRP 标记的二抗,室温放置 1 h 后洗膜 3 次,每次 10 min,使用 HRP 法在 Kodak X-OmatAR 胶片上检测。用 Image-Pro Plus Version 6.0 软件进行分析,以目的蛋白灰度值与内参  $\beta$ -actin 灰度值的比值表示蛋白表达的水平。试验重复 6 次。

### 2.5 RT-PCR 法检测细胞中 MMP-2、MMP-9 mRNA 的表达

从细胞中提取总 RNA,取 80 ng 总 RNA 合成 cDNA。经过 95  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,循环内 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,58  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 30 s,PCR 反应 30 个循环后 72  $^{\circ}$ C 再延伸 10 min,然后 4  $^{\circ}$ C 保存,完成普通 PCR 反应。RT-PCR 检测反应体系:2  $\times$  Mix SYBR Green I 荧光反应液 10  $\mu$ L,上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.25  $\mu$ L,样品模板 1  $\mu$ L,用灭菌水补足体积至 20  $\mu$ L。反应条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 2 min;循环内 95  $^{\circ}$ C 变性 30 s,60  $^{\circ}$ C 退火 35 s,设置 40 个循环,并在每个循环延伸末端点收集荧光信号,绘制扩增曲线;40 个循环后设置(95  $^{\circ}$ C、15 s,60  $^{\circ}$ C、30

s, 95 °C、15 s)反应步骤,并对60~95 °C升温整个过程进行全程荧光信号收集,绘制融解曲线,使用 $\beta$ -actin作为内参基因,根据 $2^{-\Delta\Delta c_i}$ 公式计算目的基因相对表达量[其中, $\Delta c_i$ =目标基因 $c_i$ -内参基因 $c_i$ ],试验重复6次。引物序列及产物大小见表1。

表1 基因引物序列及产物大小

Tab 1 Primer sequences and sizes of genes

基因	引物序列	产物大小, bp
MMP-2	上游: 5'-CCACTGCCTTCGATACAC-3'	133
	下游: 5'-GAGCCACTCTCTGGAATCTTAAA-3'	
MMP-9	上游: 5'-GTTCCCGGAGTGAGTTGA-3'	109
	下游: 5'-TTTACATGGCACTGCAAAGC-3'	
$\beta$ -actin	上游: 5'-TCGACAACGGCTCCGGCAT-3'	241
	下游: 5'-AAGGTGTGGTGCCAGATTTTC-3'	

## 2.6 统计学方法

采用SPSS 18.0统计学软件进行统计学分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 活血化瘀中药复方含药血清对U251细胞侵袭的影响

桃红四物汤含药血清组、血府逐瘀汤含药血清组和抵挡汤含药血清组细胞侵袭率分别为 $(88.96 \pm 3.38)\%$ 、 $(29.61 \pm 2.56)\%$ 、 $(95.56 \pm 2.07)\%$  ( $n=6$ ),与空白血清组比较,血府逐瘀汤含药血清组细胞侵袭率显著降低( $P < 0.05$ )。细胞侵袭能力观察结果见图1。

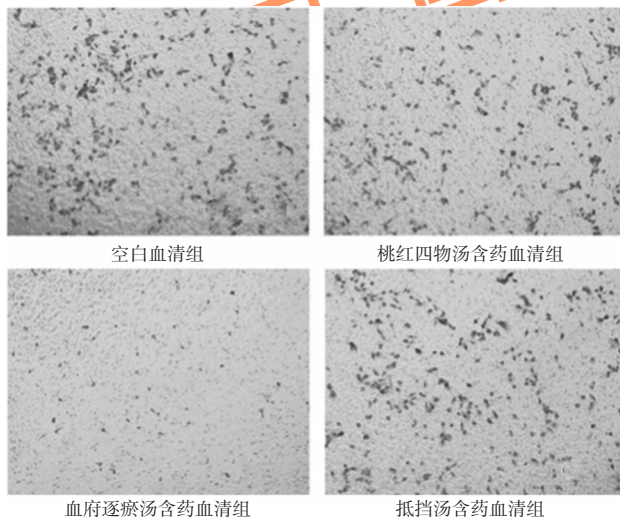


图1 各组细胞侵袭能力观察结果( $\times 200$ )

Fig 1 Results of cell invasive ability in each group ( $\times 200$ )

### 3.2 细胞中MMP-2、MMP-9、p-JAK2、p-STAT3蛋白表达测定结果

与空白血清组比较,血府逐瘀汤含药血清组细胞中MMP-2、MMP-9、p-JAK2、p-STAT3蛋白表达均显著减弱( $P < 0.05$ ),而桃红四物汤含药血清组和抵挡汤含药血清组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),蛋白表达电泳图见图2、测定结果见表2。

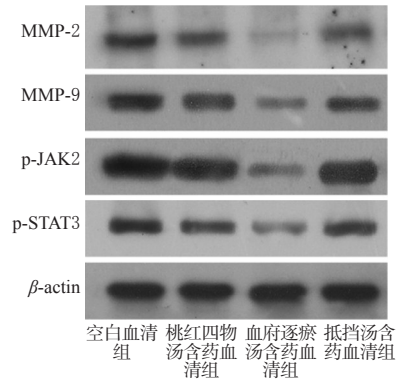


图2 各组细胞中MMP-2、MMP-9、p-JAK2、p-STAT3蛋白表达的电泳图

Fig 2 Electrophoretograms of MMP-2, MMP-9, p-JAK2, p-STAT3 protein expressions in cells of each group

表2 各组细胞中MMP-2、MMP-9、p-JAK2、p-STAT3蛋白表达测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 2 Results of MMP-2, MMP-9, p-JAK2, p-STAT3 protein expressions in cells of each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	MMP-2	MMP-9	p-JAK2	p-STAT3
空白血清组	0.685 ± 0.022	0.808 ± 0.020	1.513 ± 0.028	0.602 ± 0.019
桃红四物汤含药血清组	0.458 ± 0.016	0.613 ± 0.024	1.250 ± 0.019	0.412 ± 0.014
血府逐瘀汤含药血清组	0.022 ± 0.009*	0.193 ± 0.015*	0.265 ± 0.018*	0.127 ± 0.011*
抵挡汤含药血清组	0.405 ± 0.022	0.470 ± 0.024	0.943 ± 0.024	0.411 ± 0.015

注:与空白血清组比较, \* $P < 0.05$

Note: vs. blank serum group, \* $P < 0.05$

### 3.3 细胞中MMP-2、MMP-9 mRNA表达测定结果

与空白血清组比较,血府逐瘀汤含药血清组细胞中MMP-2、MMP-9 mRNA表达显著减弱( $P < 0.01$ ),桃红四物汤含药血清组和抵挡汤含药血清组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),结果见表3。

表3 各组细胞中MMP-2、MMP-9 mRNA表达测定结果( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Tab 3 Results of MMP-2, MMP-9 mRNA expressions in cells of each group ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	MMP-2	MMP-9
空白血清组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
桃红四物汤含药血清组	0.899 ± 0.066	0.719 ± 0.071
血府逐瘀汤含药血清组	0.545 ± 0.023**	0.544 ± 0.029**
抵挡汤含药血清组	0.924 ± 0.099	0.965 ± 0.094

注:与空白血清组比较, \*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank serum group, \*\* $P < 0.01$

## 4 讨论

中药血清药理学是利用含药血清代替中药复方而供实验研究使用的一种非单体药物药理研究的方法,使体外试验模拟了体内过程,达到了体外试验能够反映药物体内真实状态的目的,现此方法已被广泛用于抗肿瘤的研究中<sup>[7]</sup>。本研究选用3种不同的活血化瘀作用层次的经典中药复方,利用其含药血清从JAK/STAT信号通

# 丛枝菌根真菌对云木香根产量及其木香烯内酯和去氢木香烯内酯含量的影响<sup>Δ</sup>

张杰<sup>1,2\*</sup>, 潘兴娇<sup>2</sup>, 罗静<sup>3</sup>, 周浓<sup>1,2</sup>, 谢娥<sup>1</sup>, 杨敏<sup>2#</sup> (1.重庆三峡学院生命科学与工程学院, 重庆 404000; 2.大理大学药学与化学学院, 云南大理 671000; 3.重庆市食品药品检验检测研究院/重庆市药物过程与质量控制工程技术研究中心, 重庆 401121)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)16-2179-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.16.05

**摘要** 目的:研究丛枝菌根(AM)真菌在人工栽培条件下对云木香根产量及其有效成分含量的影响。方法:采用室温盆栽方法,设不接种AM真菌组为CK组,设接种阿密蕈菌根组为AM组,每组5个重复,每个重复1盆,共5盆,每盆栽种云木香3株。采用文献方法计算菌根感染率和感染强度,采用称重法测定云木香根产量,采用高效液相色谱法测定木香烯内酯、去氢木香烯内酯的含量。结果:AM组与CK组的感染率分别为(86.22±3.28)%、0( $P<0.05$ ),感染强度分别为(52.12±2.14)%、0( $P<0.05$ );两组间根增质量率和木香烯内酯、去氢木香烯内酯及总内酯的含量比较差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与CK组比较,AM组云木香根产量提高了(50.96±2.12)%,云木香根中木香烯内酯、去氢木香烯内酯及总内酯的含量分别增加了65.55%、97.42%、85.42%,内酯类成分间的结构比有所改变。结论:外源性AM真菌的加入能明显提高云木香根的品质。

**关键词** 云木香;丛枝菌根真菌;产量;木香烯内酯;去氢木香烯内酯

路磷酸化方面探讨了其抗神经胶质瘤细胞侵袭的可能机制。

STAT3通常以无活性的单体形式存在于细胞质中,当STAT被上游的JAK信号激活后,主要以活化的p-STAT形式进入细胞核内,刺激并导致某些与细胞侵袭密切相关的致癌基因异常表达,调节与癌细胞迁移和侵袭等相关的靶基因(MMP-2、MMP-9)转录活性<sup>[5]</sup>。MMP-2、MMP-9作为STAT3活化后引起迁移和侵袭的相关靶基因,是胶质瘤侵袭性预测的指标之一<sup>[8-9]</sup>。本研究结果显示,血府逐瘀汤含药血清干预U251细胞后,细胞侵袭能力显著降低,细胞中p-STAT3、p-JAK2蛋白以及MMP-2、MMP-9蛋白和mRNA表达均显著减弱,而桃红四物汤含药血清和抵挡汤含药血清作用不明显。可见,血府逐瘀汤抑制U251细胞侵袭可能是通过抑制JAK2/STAT3信号通路的激活及下游侵袭相关靶基因MMP-2、MMP-9的表达而起作用。

综上,血府逐瘀汤可以作为一种JAK2/STAT3磷酸化的有效抑制剂进一步用于抗胶质瘤的研究,同时本研究也为开发一种新的抗肿瘤药物或药物前体提供了一定的参考依据。

## 参考文献

Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81260622)

\* 硕士研究生。研究方向:药用植物栽培与生态环境调控。电话:023-58102522。E-mail:806202815@qq.com

# 通信作者:硕士,讲师。研究方向:中药材质量标准化研究。电话:0872-2219936。E-mail:yang\_min\_0302@163.com

- [1] Morgan LL. The epidemiology of glioma in adults: a "state of the science" review[J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17(4): 623-624.
- [2] Blacher E, Ben Baruch B, Levy A, et al. Inhibition of glioma progression by a newly discovered CD38 inhibitor[J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(6):1422-1433.
- [3] 李全国,胡永强.替莫唑胺联合放疗用于恶性脑胶质瘤患者的临床观察[J]. *中国药房*, 2015, 26(26):3690-3692.
- [4] 黄良文,刘建民,袁淮涛.活血化痰中药抗肿瘤转移作用的研究进展[J]. *中国医药科学*, 2014, 4(6):37-39, 67.
- [5] Chen F, Xu Y, Luo Y, et al. Down-regulation of STAT3 decreases invasion activity and induces apoptosis of human glioma cells[J]. *J Mol Neurosci*, 2010, 40(3): 353-359.
- [6] 陈赐慧,花宝金.关于中药血清药理学实验的几个问题和探讨[J]. *中华中医药学刊*, 2013, 31(1):46-48.
- [7] 陈健媚,郭姣.中药血清药理学研究进展[J]. *广东药学院学报*, 2016, 32(3):390-393.
- [8] Hagemann C, Anacker J, Ernestus RI, et al. A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas[J]. *World J Clin Oncol*, 2012, 13(5):67-79.
- [9] Shim KN, Jung SA, Joo YH, et al. Clinical significance of tissue levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gastric cancer[J]. *J Gastroenterol*, 2000, 42(2):120-128.

(收稿日期:2016-10-03 修回日期:2017-04-25)

(编辑:林静)