

粉防己碱对神经母细胞瘤细胞增殖和迁移、侵袭能力的影响及其机制研究

邓 香*(成都市第五人民医院儿科,成都 611130)

中图分类号 R730.264;R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)02-0211-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.02.14

摘 要 目的:探讨粉防己碱(TET)对神经母细胞瘤细胞增殖和迁移、侵袭能力的影响及其作用机制。方法:以人神经母细胞瘤细胞系IMR-32细胞、SH-SY5Y细胞为研究对象,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)方法检测浓度分别为0(空白对照)、2.5、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的TET对细胞增殖的影响;采用Transwell小室迁移实验和侵袭实验,考察正常对照组(TET浓度为0 $\mu\text{mol/L}$)和TET组(10 $\mu\text{mol/L}$,IMR-32细胞;15 $\mu\text{mol/L}$,SH-SY5Y细胞)的细胞跨膜情况;采用Western blotting法检测按上述浓度TET处理后的IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞中金属基质蛋白酶2(MMP-2)、MMP-9、 β -catenin、糖原合成激酶3 β (GSK3 β)、磷酸化GSK3 β (p-GSK3 β)的蛋白表达水平。结果:5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ 的TET可显著降低IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的存活率($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其半数抑制浓度分别为10.148、14.461 $\mu\text{mol/L}$ 。细胞迁移实验和侵袭实验结果显示,与正常对照组比较,TET组跨膜细胞数均显著减少($P<0.01$);Western blotting法检测结果显示,与正常对照组比较,TET组细胞中MMP-2、MMP-9、 β -catenin、p-GSK3 β 蛋白表达均显著降低($P<0.01$)。结论:TET对神经母细胞瘤细胞的增殖和迁移、侵袭能力具有明显的抑制作用,其机制与下调细胞中MMP-2、MMP-9蛋白表达及抑制Wnt/ β -catenin信号通路有关。

关键词 粉防己碱;神经母细胞瘤;IMR-32细胞;SH-SY5Y细胞;增殖;迁移;侵袭

Study on the Effects of Tetrandrine on Proliferation and Migration, Invasion Ability of Neuroblastoma Cells and Its Mechanism

DENG Xiang(Dept. of Pediatrics, Chengdu Fifth People's Hospital, Chengdu 611130, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the effects of tetrandrine (TET) on the proliferation and migration, invasion ability of neuroblastoma cells and its mechanism. METHODS: Human neuroblastoma cell lines IMR-32 and SH-SY5Y were chosen as objects. MTT assay was used to detect the effects of 0 (blank control), 2.5, 5, 10, 15, 20 $\mu\text{mol/L}$ TET on cell proliferation. The transmembrane number of normal control group (TET concentration of 0 $\mu\text{mol/L}$) and TET group (10 $\mu\text{mol/L}$ for IMR-32 cells, 15

as ABC: assessment of blood consumption? [J]. *J Trauma*, 2009, 66(2): 346-352.

[13] 刘劲.蒙脱石散在临床上的应用[J].医药与保健:下旬刊, 2009;72-73.

[14] 黎源,吴疆.肠道细菌移位的研究进展[J].世界华人消化杂志, 2015, 23(6): 938-943.

[15] RONCO C, KLEIN DJ. Polymyxin B hemoperfusion: a mechanistic perspective[J]. *Crit Care*, 2014. DOI: 10.1186/cc13912.

[16] AOKI H, KODAMA M, TANI T, et al. Treatment of sepsis by extracorporeal elimination of endotoxin using polymyxin B-immobilized fiber[J]. *Am J Surg*, 1994, 167(4): 412-417.

[17] 岳茂兴.偏二甲胍中毒损伤特点及其临床救治对策研究[J].总装备部医学学报, 2001, 3(3): 155-157.

[18] 刘海,赵剑秋,彭晓静,等.内毒素亲和吸附剂对失血性休克大鼠NO、SOD及MDA水平的影响[J].中国老年学杂志, 2016, 36(7): 1563-1565.

[19] WONG J, VILAR E, FARRINGTON K. Endotoxemia in

end-stage kidney disease[J]. *Semin Dial*, 2015, 28(1): 59-67.

[20] ALAMILI M, BENDTZEN K, LYKKESFELDT J, et al. Effect of melatonin on human nighttime endotoxaemia: randomized, double-blinded, cross-over study[J]. *In Vivo*, 2014, 28(6): 1057-1063.

[21] SCOTT LJ, FIGGITT DP. Mitoxantrone: a review of its use in multiple sclerosis[J]. *CNS Drugs*, 2004, 18(6): 379-396.

[22] ZHAO L, LUO L, JIA W, et al. Serum diamine oxidase as a hemorrhagic shock biomarker in a rabbit model[J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e102285.

[23] ZHANG L, FAN X, ZHONG Z, et al. Association of plasma diamine oxidase and intestinal fatty acid-binding protein with severity of disease in patient with heat stroke[J]. *Am J Emerg Med*, 2015, 33(7): 867-871.

[24] LIU W, SHAN LP, DONG XS, et al. Combined early fluid resuscitation and hydrogen inhalation attenuates lung and intestine injury[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(4): 492-502.

* 主治医师,硕士研究生。研究方向:新生儿疾病。电话:028-82723432。E-mail: deng521xiang@163.com

(收稿日期:2018-06-11 修回日期:2018-11-12)
(编辑:张元媛)

中国药房 2019年第30卷第2期

China Pharmacy 2019 Vol. 30 No. 2 • 211 •

μmol/L for SH-SY5Y cells) were investigated by Transwell cell migration and invasion experiments. The protein levels of MMP-2, MMP-9, β-catenin, GSK3β and p-GSK3β in IMR-32 cells and SH-SY5Y cells were tested by Western blotting assay after treated with TET of above concentrations. RESULTS: TET with 5, 10, 15, 20 μmol/L can reduce the survival rate of IMR-32 cells and SH-SY5Y cells significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). IC_{50} of which to IMR-32 cells and SH-SY5Y cells were 10.148 and 14.461 μmol/L, respectively. Results of migration and invasion experiments showed that compared with normal control group, the number of transmembrane cells was decreased significantly in TET group ($P<0.01$). Results of Western blotting assay showed that compared with normal control group, the protein expression levels of MMP-2, MMP-9, β-catenin and p-GSK3β were decreased significantly in TET group ($P<0.01$). CONCLUSIONS: TET shows significant inhibitory effects on the proliferation, migration and invasion ability of neuroblastoma cells, the mechanism of which may be associated with down-regulating the protein expression of MMP-2 and MMP-9 and inhibiting Wnt/β-catenin signaling pathway.

KEYWORDS Tetrandrine; Neuroblastoma; IMR-32 cell; SH-SY5Y cell; Proliferation; Migration; Invasion

神经母细胞瘤(Neuroblastoma, NB)是儿童常见的恶性实体肿瘤,其起源于交感神经神经嵴,属于神经内分泌性肿瘤;由于NB具有较高的异质性,且其存在恶性程度高、生长迅速、容易转移等特点,故患者治疗效果差、预后差^[1]。目前NB的治疗手段主要包括手术切除、化疗、放疗、骨髓/造血干细胞移植及生物治疗等,但一旦NB患者出现肿瘤转移,则其病死率极高^[2]。

粉防己碱(Tetrandrine, TET)属于双苄基异喹啉类生物碱,是从粉防己的根块中提取出的有效成分,在治疗高血压、心律不齐、关节炎、炎症甚至矽肺等方面发挥着重要作用^[3-4];此外,其在抗肿瘤如肝癌^[5]、胃癌^[6]、膀胱癌^[7]及肾癌^[8]等方面也具有一定功效。研究表明,TET主要通过直接的细胞毒性作用、抑制细胞增殖、诱导癌细胞凋亡、保护正常组织免受放射损伤以及抗转移、抗血管再生等途径发挥较好的抗肿瘤作用,其主要作用机制可能是激活线粒体死亡通路,进而诱导肿瘤细胞凋亡^[9]。但TET用于NB治疗的相关研究报道较少。

IMR-32和SH-SY5Y细胞系来源于人NB细胞系,其在细胞形态和功能上与正常人神经细胞有较多相似之处,因而成为颅内肿瘤研究的重要细胞模型之一^[10]。本研究以这类细胞系为研究对象,考察TET对NB细胞的增殖以及迁移、侵袭能力的影响,并通过检测信号通路相关蛋白水平的变化探讨TET抑制NB细胞的作用机制,以期为TET临床用于治疗NB以及探索新的NB治疗靶点提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

VIOS 160i型CO₂恒温培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司);Transwell小室(美国Corning公司);细胞培养板(上海晶安生物科技有限公司);JIDI-17R型微量高速冷冻离心机(广州吉迪仪器有限公司);BDS200型倒置光学显微镜(北京奥特伟业光学仪器有限公司);DG5031型酶联免疫检测仪(上海珂准仪器有限公司);HCB1502型电子天平(英国ADAM公司)。

1.2 药品与试剂

TET对照品(批号:T2695,纯度:≥98%)、青霉素、

链霉素(美国Sigma-Aldrich公司);1640培养基、DMEM/F12培养基、胎牛血清(美国Gibco公司);Matrigel基质胶(美国BD公司);金属基质蛋白酶2(MMP-2)兔单抗、MMP-9兔单抗(美国Santa Cruz公司);β-catenin兔单抗、糖原合成激酶3β(GSK3β)兔单抗、磷酸化GSK3β(p-GSK3β)兔单抗(美国CST公司);β-actin抗体(美国Abcam公司);辣根过氧化物酶标记抗体(二抗,北京博尔西科技有限公司);胰酶(广州碧云天有限公司);二甲基亚砜(DMSO)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)(美国Sigma公司);多聚甲醛(北京雷根生物技术有限公司);TBST缓冲液、结晶紫(北京索莱宝科技有限公司);化学发光(ECL)试剂、BCA试剂(美国Pierce公司);蛋白上样缓冲液(北京普利莱基因技术有限公司);其余试剂均为分析纯或实验室常用规格;pH 7.2磷酸缓冲盐溶液(PBS)为实验室自制;水为双蒸水。

1.3 细胞

人神经母细胞瘤细胞系IMR-32细胞、SH-SY5Y细胞(美国ATCC细胞库)。

2 方法

2.1 细胞培养

将IMR-32细胞、SH-SY5Y细胞分别培养于含10%胎牛血清、100 μg/mL青霉素、100 μg/mL链霉素的1640培养基或DMEM/F12培养基(以下各试/实验步骤相同),在37℃、5%CO₂培养箱中培养。细胞每隔2~3d进行换液,待细胞生长至80%~90%融合度时使用胰酶进行消化传代培养。

2.2 TET对NB细胞的毒性作用考察

采用MTT法进行检测。取对数生长期的IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞,按8 000个/孔接种于96孔板。待细胞贴壁生长后吸弃培养基,加入终浓度分别为0(空白对照)、2.5、5、10、15、20 μmol/L的TET甲醇溶液,每种浓度设置5个复孔。将细胞置于37℃、5%CO₂培养箱培养24 h;吸弃上清液,分别加入含1 mg/mL MTT的培养基200 μL,继续培养3 h;培养完毕后吸弃上清液,加入DMSO 150 μL,置于振荡器上振荡10 min。采用酶联免疫检测仪在490 nm波长处检测细胞光密度(OD)值,计

算细胞存活率。细胞存活率(%)=(OD_{试验组}/OD_{空白对照组})×100%。

2.3 TET对NB细胞迁移、侵袭能力的影响考察

2.3.1 NB细胞迁移实验 取对数生长期的IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞并分为正常对照组、TET组,经胰酶消化,无血清培养基重悬细胞并计数,调整细胞密度为1.0×10⁵个/mL。在Transwell上室加入细胞悬液200 μL,然后根据TET细胞毒性考察结果分别加入终浓度为0 μmol/L(正常对照组)、10 μmol/L(IMR-32细胞,TET组)或15 μmol/L(SH-SY5Y细胞,TET组)的TET甲醇溶液;下室加入含10%胎牛血清的细胞培养基800 μL。各组细胞置于37℃、5%CO₂培养箱培养24 h后,取出小室用棉签擦拭上室,以4%多聚甲醛固定15 min,再以0.1%结晶紫溶液染色20 min,取出用PBS清洗并使用棉签擦拭上室。在光学显微镜下随机挑选5个不同视野,拍照并计数跨膜细胞。

2.3.2 NB细胞侵袭实验 取Matrigel基质胶,以无血清培养基按照体积比8:1稀释,按50 μL/孔均匀铺在Transwell小室上室,置于37℃、5%CO₂培养箱放置4~6 h待凝固。取对数生长期的IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞,按照“2.3.1”项下方法分组,并按“经胰酶消化……0.1%结晶紫溶液染色20 min,取出用PBS清洗并使用棉签擦拭上室”等步骤同法操作。在光学显微镜下随机挑选5个不同视野,拍照并计数跨膜细胞。

2.4 TET对NB细胞相关蛋白表达水平的影响考察

采用Western blotting法检测。取对数生长期IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞,按照“2.3.1”项下方法分组,经胰酶消化,1 500 r/min离心15 min后以4.0×10⁵个/mL接种于6孔板内,待细胞贴壁后分别加入终浓度为0 μmol/L(正常对照组)、10 μmol/L(IMR-32细胞,TET组)或15 μmol/L(SH-SY5Y细胞,TET组)的TET甲醇溶液,置于37℃、5%CO₂培养箱培养24 h。使用RIPA裂解液裂解并提取总蛋白,以BCA法测定蛋白浓度以确定上样浓度。所获蛋白以上样缓冲液×6作变性处理后,使用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离,110 V电压转膜;使用5%脱脂奶粉封闭1 h,加MMP-2抗体(1:1 000)、MMP-9抗体(1:1 000)、β-catenin抗体(1:1 000)、GSK3β抗体(1:1 000)、p-GSK3β抗体(1:1 000)及β-actin抗体(1:2 000),在4℃下摇床孵育过夜;次日用TBST缓冲液漂洗10 min×3次,加入辣根过氧化物酶标记抗体(二抗,1:8 000),摇床上慢速常温孵育1 h;TBST缓冲液漂洗10 min×3次,加入ECL试剂显影。采用Quantity One 4.6.4分析软件测定条带灰度值,以目的蛋白与内参β-actin蛋白比较所得的相对灰度值表示目的蛋白表达水平。

2.5 统计学方法

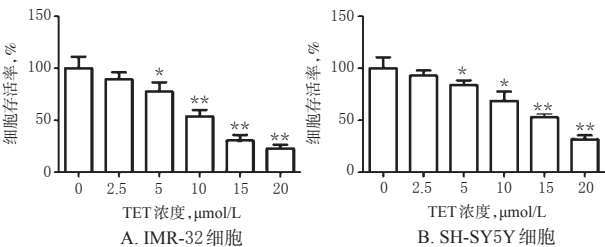
应用SPSS 18.0软件对数据进行统计分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两

比较采用LSD-*t*检验。*P*<0.05表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 TET对NB细胞的细胞毒性

结果显示,不同浓度的TET对IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的增殖均有抑制作用,并随TET浓度增加该抑制作用有增强趋势。与空白对照比较,当TET浓度为5~20 μmol/L时,细胞存活率随着药物浓度的增加而显著降低,差异有统计学意义(*P*<0.05或*P*<0.01);TET对IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为10.148、14.461 μmol/L。根据IC₅₀数据,并考虑到尽量减少药物自身对肿瘤细胞的毒性作用,故后续实验中TET对IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的处理浓度分别设为10、15 μmol/L。不同浓度TET作用后IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的存活率见图1。



注:与空白对照比较,**P*<0.05,***P*<0.01

Note: vs. blank control group, **P*<0.05, ***P*<0.01

图1 不同浓度TET作用后IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的存活率

Fig 1 Survival rates of IMR-32 cell and SH-SY5Y cell after treated with different doses of TET

3.2 TET对NB细胞迁移、侵袭能力的影响

3.2.1 细胞迁移实验结果 细胞计数结果显示,正常对照组IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的跨膜数分别为(163.02±6.24)个、(118.13±7.50)个,TET组IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的跨膜数分别为(68.32±3.51)个、(61.24±5.03)个。与正常对照组比较,TET组跨膜细胞数均显著减少,差异均有统计学意义(*P*<0.01)。各组NB细胞迁移实验显微图见图2,跨膜细胞数柱形图见图3。

3.2.2 细胞侵袭实验结果 细胞计数结果显示,正常对照组IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的跨膜数分别为(401.43±10.96)个、(182.28±5.56)个,TET组IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的跨膜数分别为(206.12±8.83)个、(83.35±3.60)个。与正常对照组比较,TET组跨膜细胞数均显著减少,差异均有统计学意义(*P*<0.01)。各组NB细胞侵袭实验显微图见图4,跨膜细胞数柱形图见图5。

3.3 TET对NB细胞中MMP-2、MMP-9的蛋白表达水平的影响

与正常对照组比较,TET组IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞中MMP-2、MMP-9蛋白表达水平均显著降低,差异均有统计学意义(*P*<0.01)。各组NB细胞中MMP-2、

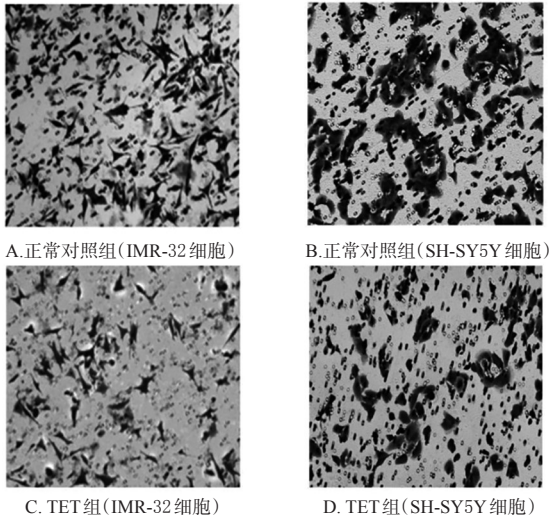
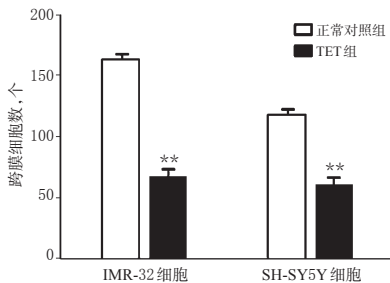


图2 各组NB细胞迁移实验显微图(结晶紫染色, ×200)

Fig 2 Micrographs of NB cell migration in each group (crystal violet staining, ×200)



注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$

图3 各组NB细胞迁移实验跨膜细胞数柱形图

Fig 3 Column diagram of the number of transmembrane cells in each group in NB cell migration experiment

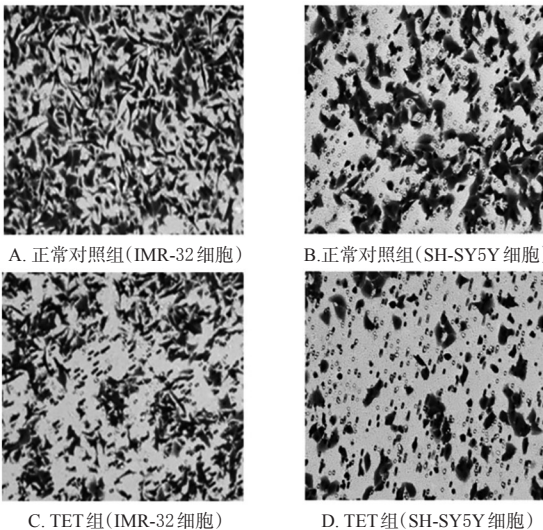
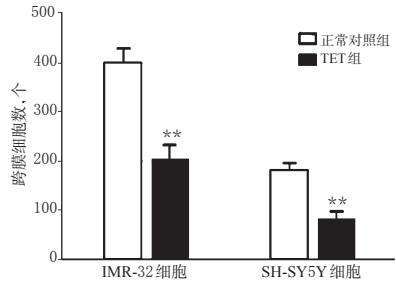


图4 各组NB细胞侵袭实验显微图(结晶紫染色, ×200)

Fig 4 Micrographs of NB cell invasion in each group (crystal violet staining, ×200)



注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$

图5 各组NB细胞侵袭实验跨膜细胞数柱形图

Fig 5 Column diagram of the number of transmembrane cells in each group in NB cell invasion experiment

MMP-9蛋白表达电泳图见图6,蛋白表达水平柱形图见图7。

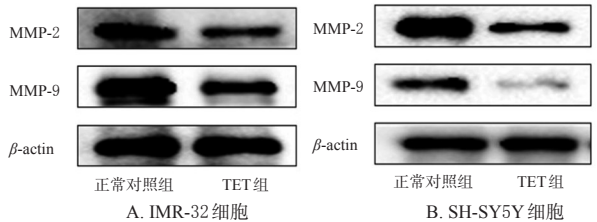
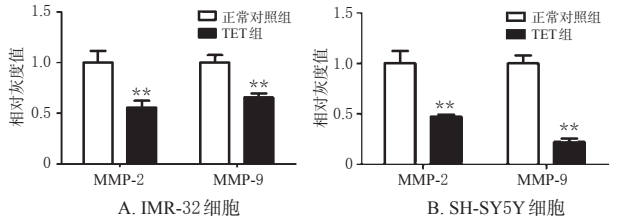


图6 各组NB细胞中MMP-2、MMP-9蛋白表达电泳图

Fig 6 Electrophoresis of MMP-2 and MMP-9 protein expression of NB cell in each group



注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$

图7 各组NB细胞中MMP-2、MMP-9蛋白表达水平柱形图

Fig 7 Column diagrams of protein expression levels of MMP-2 and MMP-9 in NB cells in each group

3.4 TET对NB细胞中 β -catenin、GSK3 β 、p-GSK3 β 的蛋白表达水平的影响

与正常对照组比较, TET组IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞中 β -catenin、p-GSK3 β 蛋白表达水平均显著降低, 差异均有统计学意义($P < 0.01$); 但各组间GSK3 β 的蛋白表达水平差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组NB细胞中 β -catenin、GSK3 β 、p-GSK3 β 蛋白表达电泳图见图8, 蛋白表达水平柱形图见图9。

4 讨论

NB是儿童常见的恶性肿瘤疾病, 严重威胁儿童生命健康。目前常用的手术、化疗、放疗、移植及生物治疗

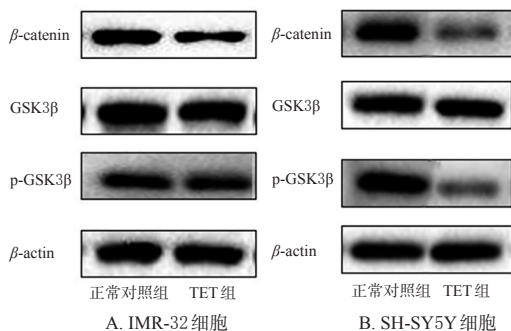
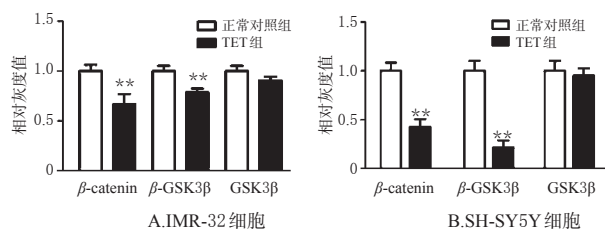


图8 各组NB细胞中 β -catenin、GSK3 β 、p-GSK3 β 蛋白表达电泳图

Fig 8 Electrophoresis of protein expression of β -catenin, GSK3 β and p-GSK3 β in NB cell in each group



注:与正常对照组比较, ** $P < 0.01$

Note: vs. normal control group, ** $P < 0.01$

图9 各组NB细胞中 β -catenin、GSK3 β 、p-GSK3 β 蛋白表达水平柱形图

Fig 9 Column diagrams of protein expression levels of β -catenin, GSK3 β and p-GSK3 β in NB cells in each group

等方法并不能有效控制疾病,因此积极寻找新的NB治疗方法对于提高患者生存率、改善预后具有重要意义。粉防己作为传统中药具有悠久的药用史,越来越多的研究发现,粉防己中的有效成分TET在体外和体内均具有抗多种肿瘤的活性^[11]。然而关于TET对NB的抗肿瘤作用却研究甚少。本研究结果显示,使用不同浓度的TET处理后,能明显抑制IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞的增殖,且随TET浓度增加该抑制作用呈增强趋势;Transwell小室迁移实验和侵袭实验结果显示,TET能显著抑制NB细胞的迁移和侵袭能力。

MMPs家族在NB侵袭转移过程中发挥着重要作用。据文献报道,MMPs是锌依赖性肽链内切酶家族,能降解细胞外基质中的蛋白成分,破坏肿瘤细胞侵袭的组织学屏障,在肿瘤侵袭转移中起关键作用^[12]。MMP-2和MMP-9是MMPs家族的重要成员,两者均属于明胶酶,能降解明胶和IV型胶原蛋白。在NB发生、发展过程中,MMP-2和MMP-9能促进NB的侵袭、迁移^[13]。本研究结果显示,TET处理能显著降低IMR-32细胞和SH-SY5Y细胞中MMP-2、MMP-9的蛋白表达水平。

Wnt/ β -catenin信号通路是生物体内广泛存在的信号传导途径,在NB发生、发展过程中发挥了重要作用,

其中 β -catenin和GSK3 β 是该信号通路的关键调节分子^[14]。当Wnt/ β -catenin信号通路被激活时,无法形成降解复合物,因此无法降解 β -catenin,从而使 β -catenin能转位进入细胞核,并与相应的转录因子结合形成复合物,进而调节下游靶基因表达,引发细胞增殖分化、细胞侵袭转移、组织形成等相应生理学改变;相反,当Wnt/ β -catenin信号通路失活时, β -catenin被降解而无法发挥生物学功能^[15-16]。研究发现,Wnt/ β -catenin信号通路与多种肿瘤的侵袭、转移密切相关,中药成分如姜黄素可通过抑制Wnt/ β -catenin信号通路来抑制小细胞肺癌的转移^[17]。本研究通过Western blotting检测发现,TET能抑制p-GSK3 β 和 β -catenin的蛋白表达,提示Wnt/ β -catenin信号通路在TET抑制NB的迁移和侵袭过程中可能起到关键作用;但TET对GSK3 β 的蛋白表达未见明显影响,这可能与GSK3 β 蛋白在不同状态下磷酸化位点不同有关^[18]。

综上所述,TET能抑制NB细胞增殖及迁移、侵袭能力,而下调MMP-2、MMP-9蛋白表达水平和抑制Wnt/ β -catenin信号通路是其可能的作用机制。

参考文献

- [1] CHEN X, ZHU Y, HAN L, et al. Chemokine receptor 4 gene silencing blocks neuroblastoma metastasis in vitro [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(10): 1063-1067.
- [2] 李雪.神经母细胞瘤多药耐药机制的研究[J]. *国际儿科学杂志*, 2016, 43(10): 748-753, 759.
- [3] 黄圆, 蒋东海, 范伟民. 粉防己碱抗乳腺癌细胞株多药耐药的作用及抗氧化机制研究[J]. *中国妇幼保健*, 2017, 32(11): 2469-2472.
- [4] LIU W, KOU B, MA ZK, et al. Tetrandrine suppresses proliferation, induces apoptosis, and inhibits migration and invasion in human prostate cancer cells[J]. *Asian J Androl*, 2015, 17(5): 850-853.
- [5] LAN J, WANG N, HUANG L, et al. Design and synthesis of novel tetrandrine derivatives as potential anti-tumor agents against human hepatocellular carcinoma[J]. *Eur J Med Chem*, 2017. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.01.008.
- [6] LEI RR, HU HF, BAI F, et al. Anti-proliferative and apoptotic effects of S1, a tetrandrine derivative, in human gastric cancer BGC-823 cells[J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(7): 527-533.
- [7] ZHANG Y, LIU W, HE W, et al. Tetrandrine reverses epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer by down-regulating Gli-1[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(5): 2035-2042.
- [8] CHEN S, LIU W, WANG K, et al. Tetrandrine inhibits migration and invasion of human renal cell carcinoma by regulating Akt/NF-kappaB/MMP-9 signaling[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e173725.
- [9] WAN J, LIU T, MEI L, et al. Synergistic antitumour activity of sorafenib in combination with tetrandrine is mediated

甘草水提物对雷公藤甲素致大鼠急性肝损伤的改善作用及其体内IL-10、TNF- α 水平的影响^Δ

朱胜楠^{1,2*}, 张靖¹, 谭亲友^{1,2,3#}, 胡 骞¹, 苏华珍¹, 黄少远¹, 刘 芳¹(1. 桂林医学院附属医院临床药学与临床药理学教研室, 广西 桂林 541001; 2. 桂林医学院附属医院肝胆胰外科实验室, 广西 桂林 541001; 3. 中美健康与疾病脂质研究中心, 广西 桂林 541001)

中图分类号 R969;R541 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)02-0216-05
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.02.15

摘要 目的: 观察甘草水提物对雷公藤甲素致大鼠急性肝损伤的改善作用及其体内IL-10、TNF- α 水平的影响。方法: 60只健康雄性SD大鼠随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组(异甘草酸镁)和甘草水提物低、中、高剂量组。空白对照组、模型组大鼠灌胃等容生理盐水, 阳性对照组大鼠灌胃异甘草酸镁药液(13.5 mg/kg), 甘草水提物低、中、高剂量组大鼠灌胃甘草水提物药液(120、240、480 mg/kg, 以提取物量计), 给药体积均为1 mL, 每天1次, 连续给药7 d。第8天时, 模型组、阳性对照组和甘草水提物各剂量组大鼠均一次性灌胃雷公藤甲素药液(0.6 mg/kg)以建立急性肝损伤模型。采用苏木精-伊红染色法检查大鼠肝组织病理学变化; 采用酶偶联反应法检测各组大鼠血清中丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的活性; 采用Western blotting法检测大鼠肝组织中白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)的蛋白表达水平。结果: 与空白对照组比较, 模型组大鼠肝组织出现明显病理学变化, 血清中ALT、AST活性均显著升高, 肝组织中TNF- α 蛋白表达水平显著升高, IL-10蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。与模型组比较, 甘草水提物各剂量组大鼠肝组织病理学变化程度明显减轻; 除甘草水提物低剂量组大鼠血清中AST活性外, 甘草水提物各剂量组大鼠血清中ALT、AST活性和肝组织中TNF- α 蛋白表达水平均显著降低, 肝组织中IL-10蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论: 甘草水提物能减轻雷公藤甲素所致大鼠急性肝损伤, 其机制可能与下调促炎因子TNF- α 的表达、上调抗炎因子IL-10的表达有关。

关键词 甘草水提物; 雷公藤甲素; 大鼠; 急性肝损伤; 白细胞介素10; 肿瘤坏死因子 α

- ed by reactive oxygen species(ROS)/Akt signaling[J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(2): 342-350.
- [10] XU W, DEBEB BG, LACERDA L, et al. Tetrandrine, a compound common in Chinese traditional medicine, preferentially kills breast cancer tumor initiating cells(TICs) in vitro[J]. *Cancers: Basel*, 2011, 3(2): 2274-2285.
- [11] BHAGYA N, CHANDRASHEKAR KR. Tetrandrine and cancer: an overview on the molecular approach[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97(116): 624-632.
- [12] HUANG H, DU T, XU G, et al. Matrine suppresses invasion of castration-resistant prostate cancer cells by down-regulating MMP-2/9 via NF-kappaB signaling pathway [J]. *Int J Oncol*, 2017, 50(2): 640-648.
- [13] ARUMUGAM P, SUBRAMANIAN R, Priyadharsini JV, et al. Thymoquinone inhibits the migration of mouse neuroblastoma (Neuro-2a) cells by down-regulating MMP-2 and MMP-9[J]. *Chin J Nat Med*, 2016, 14(12): 904-912.
- [14] ANGERS S, MOON RT. Proximal events in Wnt signal transduction[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(7): 468-477.
- [15] CLEVERS H, NUSSE R. Wnt/beta-catenin signaling and disease[J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192-1205.
- [16] MACDONALD BT, TAMAI K, HE X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases[J]. *Dev Cell*, 2009, 17(1): 9-26.
- [17] LU Y, WEI C, XI Z. Curcumin suppresses proliferation and invasion in non-small cell lung cancer by modulation of MTA1-mediated Wnt/beta-catenin pathway[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2014, 50(9): 840-850.
- [18] JAIN S, GHANGHAS P, RANA C, et al. Role of GSK-3 β in regulation of canonical Wnt/ β -catenin signaling and PI3-K/Akt oncogenic pathway in colon cancer[J]. *Cancer Invest*, 2017, 35(7): 473-483.

^Δ基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81360665、81760747); 广西自然科学基金资助项目(No.2013GXNSFBA019174、2015GXNSFAA139114、2017GXNSFBA198058); 广西壮族自治区卫生厅中医药科技专项(No.GZGG13-08)

* 药师, 硕士研究生。研究方向: 临床药学、体内药物分析、药动学。E-mail: 545409596@qq.com

通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 临床药学、中药药理学及毒理学。电话: 0773-2882506。E-mail: tqy1013@126.com

(收稿日期: 2018-06-26 修回日期: 2018-12-04)

(编辑: 段思怡)