

# 粉防己碱对人肺癌 A549 细胞血管生成拟态的影响

洪 荫<sup>1\*</sup>, 涂 健<sup>1</sup>, 傅士龙<sup>2</sup>, 曹志飞<sup>2</sup>, 商冰雪<sup>2</sup>, 周泉生<sup>2</sup>, 朱 旬<sup>1#</sup>(1.苏州大学附属第二医院, 江苏苏州 215004; 2.苏州大学唐仲英血液学研究中心, 江苏苏州 215123)

中图分类号 R285;R915 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2898-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.07

**摘要** 目的:研究粉防己碱对人肺癌 A549 细胞血管生成拟态的影响。方法:采用细胞黏附试验观察粉防己碱对 A549 细胞黏附作用的影响;通过细胞迁移试验检测粉防己碱对 A549 细胞迁移能力的影响;通过血管生成拟态试验观察粉防己碱对 A549 细胞体外类血管生成的作用;实时定量聚合酶链反应(RT-PCR)法检测粉防己碱对 A549 细胞血管生成拟态相关基因表达的影响。结果:5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  粉防己碱作用 A549 细胞 30 min 后,细胞的黏附作用受到抑制,并与浓度呈正相关;与对照比较,5、10、20  $\mu\text{mol/L}$  粉防己碱处理 A549 细胞 12、24 h 后,A549 细胞迁移数减少,A549 细胞管腔形成数明显减少,管腔长度明显缩短;A549 细胞以粉防己碱处理后,血管生成拟态相关基因 VE-cadherin、VEGF 的表达减弱。结论:粉防己碱可抑制 A549 细胞黏附、细胞迁移和血管生成拟态,其机制可能与抑制血管生成拟态相关基因 VE-cadherin、VEGF 的表达有关。

**关键词** 粉防己碱;人肺癌 A549 细胞;血管生成拟态;细胞迁移;细胞黏附

## Effects of Tetrandrine on Vasculogenic Mimicry of Human Lung Cancer A549 Cell Line

HONG Yin<sup>1</sup>, TU Jian<sup>1</sup>, FU Shi-long<sup>2</sup>, CAO Zhi-fei<sup>2</sup>, SHANG Bing-xue<sup>2</sup>, ZHOU Quan-sheng<sup>2</sup>, ZHU Xun<sup>1</sup>(1.The Second Affiliated Hospital of Soochow University, Jiangsu Suzhou 215004, China; 2.Tang Zhongying Hematology Research Center, Soochow University, Jiangsu Suzhou 215123, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effects of tetrandrin on vasculogenic mimicry of human lung cancer A549 cell line. METHODS: The effect of tetrandrin on the cell adhesion of A549 was observed by cell adhesion assay. The effect of tetrandrin on the cell migration of A549 was studied by cell scratch adhesion test. The effect of tetrandrin on the tube-like formation of A549 cell *in vitro* was observed by tube formation assay. The effect of tetrandrin on the expression of A549 vasculogenic mimicry related genes was assessed by semi-quantitative RT-PCR assay. RESULTS: 5, 10 and 20  $\mu\text{mol/L}$  tetrandrin effectively inhibited the cell adhesion of A549 cell 30 min later and was positively associated with concentration. Compared with control solution, 5, 10 and 20  $\mu\text{mol/L}$  tetrandrin strengthened the migration of A549 cell, increased the number of cell tube formulation significantly and shortened the length of cell tube 12 and 24 hours later. Tetrandrin markedly inhibited the expression of vasculogenic mimicry-related genes VE-cadherin and VEGF in A549 cell. CONCLUSIONS: Tetrandrin could effectively inhibit the cell adhesion and cell migration of A549, and the A549-mediated vasculogenic mimicry, which may be associated with inhibiting the expression of vasculogenic mimicry-related genes VE-cadherin and VEGF.

**KEYWORDS** Tetrandrin; Human lung cancer A549 cell line; Vasculogenic mimicry; Cell migration; Cell adhesion

自 1972 年 Folkman 首先提出新血管生成的概念以来<sup>[1]</sup>, 肿瘤新血管生成越来越受到生物学界和制药行业的广泛重视,但目前有关恶性肿瘤新血管生成的机制所知甚少<sup>[1-3]</sup>。有研究表明,恶性肿瘤血管并非都由血管内皮细胞组成,还存在一种与经典肿瘤血管生成途径不同的不依赖机体内皮细胞的全新肿瘤微循环模式,即血管生成拟态<sup>[4-5]</sup>。因此,关于肿瘤血管生成的机制及抗肿瘤血管生成药物的研究成为目前肿瘤研究的热点之一<sup>[6]</sup>。笔者研究粉防己碱对人肺癌 A549 细胞血管生成拟态的影响及其机制,为将其开发为抗肿瘤血管生成药物提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

\* 硕士研究生。研究方向:甲状腺及乳腺疾病。E-mail: dahongying8806330@163.com

# 通信作者:主任医师,博士。研究方向:甲状腺及乳腺疾病。E-mail: zhuxun1023@126.com

CO<sub>2</sub>培养箱、聚合酶链反应(PCR)仪(美国 Thermo 公司);多功能读板机[美谷分子仪器(上海)有限公司];智能图像导航仪(日本 Olympus 公司)。

### 1.2 药品与试剂

粉防己碱(苏州大学中药研究所);胎牛血清(FBS, 澳大利亚 PAA 公司);高糖 DMEM 培养基、Matrigel(美国 HyClone 公司);胰蛋白酶(美国 Biosharp 公司);RNaseA(美国 Biomiga 公司);瑞-姬氏染液(南京建成科技有限公司);二甲基亚砜(DMSO, 美国 Sigma 公司);GelRed 核酸凝胶染料(美国 Boitium 公司);Alamarblue 试剂、Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司);PCR 试剂盒(大连宝生物工程股份有限公司);引物(上海生工生物工程股份有限公司);基质胶(美国 BD 公司)。

### 1.3 细胞

人肺癌 A549 细胞株购自中国科学院上海细胞库,培养于 DMEM(高糖)培养基。在 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱常规培养,2 d

换液1次,3~4 d传代1次。

## 2 方法

### 2.1 细胞黏附试验

用不同浓度(5、10、20 μmol/L)粉防己碱(即为粉防己碱①、②、③组)处理A549细胞24 h(对照组加入PBS),用无血清培养基重悬后以台盼蓝染色,计数活细胞,调整细胞密度至 $2.0 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ ,接种于96孔板中。接种细胞前先在96孔板中铺0.1%明胶,37 °C孵育1 h,吸弃上层液体再铺细胞。待细胞贴壁后吸弃培养基,PBS洗3次,加入新鲜培养基,并加入Alamarblue试剂10 μL/孔。2 h后用酶标仪测560/590 nm波长处光密度(OD)值,计算细胞黏附率。试验重复3次。

### 2.2 细胞迁移试验

将处于对数生长期的A549细胞以合适密度接种于6孔板中,24 h后用黄枪头进行划痕,吸弃培养基后用PBS洗3次,重新加入含5%FBS的新鲜培养基,分别加入不同浓度(5、10、20 μmol/L)粉防己碱(即为粉防己碱①、②、③组),对照组加入含0.6% DMSO的培养基,分别于给药后0、12、24 h拍照。试验重复3次。

### 2.3 血管生成拟态试验

用不同浓度(5、10、20 μmol/L)粉防己碱(即为粉防己碱①、②、③组)处理A549细胞24 h(对照组加入PBS),培养基含5%FBS。试验前1 d将Matrigel置于冰上过夜,试验时取融化的Matrigel,加置48孔板中,轻拍使之均匀分布,37 °C孵育0.5 h,使Matrigel聚合成胶。取合适数量( $4.0 \times 10^4 \text{ ml}^{-1}$ )细胞经台盼蓝染色,计数活细胞,接种在Matrigel上,于37 °C、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养4 h,瑞-姬氏染液染色,显微镜观察(40×)并拍照。

### 2.4 实时荧光定量PCR法检测A549细胞血管生成拟态相关基因的表达

用不同浓度(5、10、20 μmol/L)粉防己碱处理A549细胞24 h(对照组加入PBS)。采用Trizol提取细胞总RNA,逆转录合成cDNA。PCR反应体系为25 μl[双蒸水18.3 μl,10×PCR缓冲液2.5 μl,2.5 mmol/L三磷酸脱氧核糖核苷(dNTP)2 μl,上游引物0.5 μl,下游引物0.5 μl,cDNA 1 μl,rTaq酶0.2 μl]。PCR条件:94 °C预变性3 min;94 °C变性30 s,55 °C退火30 s,72 °C延伸1 min,22~35个循环,72 °C延伸8 min。PCR产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪拍照,试验重复3次。引物序列见表1。

表1 引物序列

Tab 1 Primer sequence

基因	引物序列(5' -3')	产物片段, bp
β-actin	正向引物:AAGAGCTACGAGCTGCCTGACG	420
	反向引物:CGCCTAGAAGCATTTCGGGTGG	
VE-cadherin	正向引物:CTGTCTACTCCTTATCCCTTGGTTT	372
	反向引物:GTCAGTGTATCTACAATCCCTTGC	
Sema4D	正向引物:TGTCTGTGGAGTATGAGTTTGTGTT	552
	反向引物:GGGTGTAGTTCACATCTTTCTTGAT	
VEGFA	正向引物:AGAAGAGACACATTGTGGAAGAAG	439
	反向引物:CGGTACAATAAGAGGCAAGAGAG	
PlexinB1	正向引物:AGGATGCCCCAGGACAATGAGTG	663
	反向引物:GGACCTTCGGATCTCGTAGGCCAAA	

### 2.5 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS16.0软件处理分析试验数据。多组间单因素比较先用单因素分析其正态分布,后以

LSD法进行统计。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 粉防己碱对A549细胞黏附的影响

粉防己碱作用A549细胞30 min后,细胞的黏附作用受到抑制,并呈浓度相关性。当粉防己碱浓度达20 μmol/L时,细胞黏附作用抑制率达60%,提示粉防己碱可明显抑制A549细胞黏附。粉防己碱对A549细胞黏附的影响见图1。

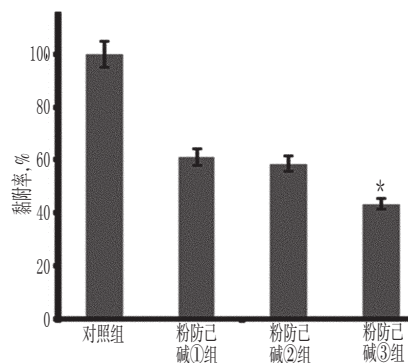


图1 粉防己碱对A549细胞黏附的影响  
与对照组比较: \* $P < 0.05$

Fig 1 Effects of tetrandrin on the adhesion of A549 cell  
vs. control group: \* $P < 0.05$

### 3.2 粉防己碱对A549细胞迁移的影响

与对照组比较,A549细胞用粉防己碱5、10、20 μmol/L处理12、24 h后,其浓度为5 μmol/L时在一定程度上抑制A549细胞的迁移,其浓度为10、20 μmol/L时明显抑制A549细胞的迁移。粉防己碱对A549细胞迁移的影响见图2。

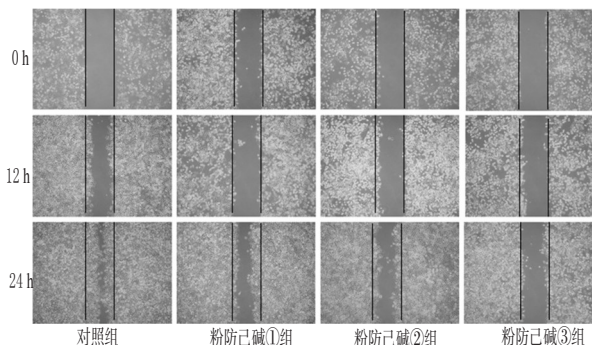


图2 粉防己碱对A549细胞迁移的影响

Fig 2 Effects of tetrandrin on the migration of A549 cell

### 3.3 粉防己碱对A549细胞血管生成拟态的影响

与对照组比较,粉防己碱各组A549细胞管腔形成数明显减少,管腔长度明显缩短;其浓度为5 μmol/L时,A549细胞形成完整管腔的能力逐渐减弱,浓度为10、20 μmol/L时,几乎无法形成血管,表明粉防己碱可以抑制A549细胞体外类血管结构的形成。粉防己碱对A549细胞血管生成拟态的影响见图3。

### 3.4 粉防己碱对A549细胞血管生成拟态相关基因表达的影响

A549细胞以粉防己碱处理后,血管生成拟态相关基因VE-cadherin、VEGF的表达受到不同程度的抑制,Sema4D、PlexinB1则无明显变化,表明粉防己碱的特异性靶点是VE-cadherin、VEGF。提示粉防己碱可能通过选择性下调A549细胞血管生成拟态相关基因VE-cadherin、VEGF的表达,

抑制血管生成拟态。粉防己碱对 A549 细胞血管生成拟态相关基因表达的影响见图 4。

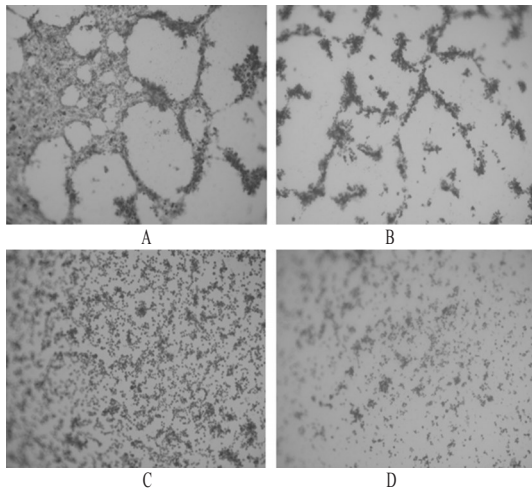


图 3 粉防己碱对 A549 细胞血管生成拟态的影响 (40×)

A. 对照组; B. 粉防己碱①组; C. 粉防己碱②组; D. 粉防己碱③组

Fig 3 Effects of tetrandrin on the vasculogenic mimicry of A549 cell (40×)

A. control group; B. tetrandrin ① group; C. tetrandrin ② group; D. tetrandrin ③ group

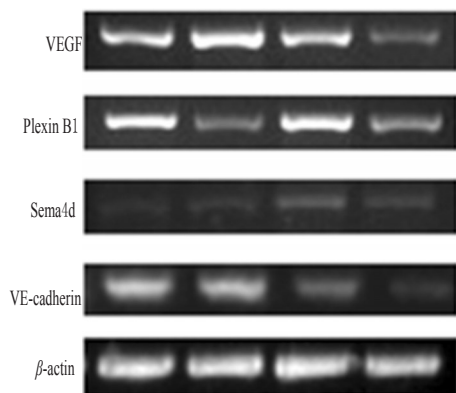


图 4 粉防己碱对 A549 细胞血管生成拟态相关基因表达的影响

Fig 4 Effects of tetrandrin on the expression of vasculogenic mimicry related gene in A549 cell

#### 4 讨论

血管生成是指源于已存在的毛细血管和毛细血管后微静脉的新的毛细血管性血管的生长<sup>[7]</sup>。肿瘤血管生成的机制和生理条件并不完全相同。血管生成拟态是近年研究热点,研究表明有些类型的肿瘤细胞可相互连接,形成不存在内皮细胞的血管样管道,这种全新的肿瘤微循环模式被称为血管生成拟态。

近年来,肺癌的发病率及病死率呈上升趋势,5年生存率约为15%<sup>[8]</sup>,在癌症相关疾病中肺癌病死率居首位<sup>[9]</sup>,严重影响人类健康。目前对于肺癌的治疗仍以手术及放化疗为主,而抗血管生成药物已经成为研究治疗肺癌药物的热点之一,但对于血管生成拟态形成的机制和对抗药物的研究目前并不多。粉防己碱是千金藤属防己科植物粉防己的主要活性成分,化学结构属双苄基异喹啉类化合物,具有广泛的生理活性

及抗炎、镇痛、降压等药理作用,临床上主要用于治疗高血压、肺纤维化等疾病<sup>[10]</sup>。近年来研究表明,粉防己碱可作为一种抗肿瘤物,对胶质细胞瘤、结肠癌、肺癌等肿瘤具有良好的抑制作用,但其作用机制并不明确。本研究结果表明,粉防己碱浓度分别为5、10、20 μmol/L时,可明显抑制 A549 细胞的黏附和迁移,并与浓度呈正相关;粉防己碱在浓度为5 μmol/L时可在一定程度上抑制血管生成拟态,在10、20 μmol/L时明显抑制血管生成拟态,表明其在体外可以抑制肺癌细胞株 A549 肿瘤类血管形成。血管生成对于肿瘤组织的生长、浸润和转移有重要意义,新近报道也证实粉防己碱在体外裸鼠模型中可以抑制肿瘤血管生成并抑制肿瘤转移<sup>[11]</sup>,表明粉防己碱具有抗肿瘤血管生成的作用。粉防己碱可选择性下调 A549 细胞血管生成拟态相关基因 VE-cadherin 和 VEGF 的表达。VE-cadherin 和 VEGF 均是经典的促血管生成因子,可作用于血管内皮细胞,介导内皮细胞黏附连接,使其分化形成新的血管,并保持血管通透性和完整性<sup>[12]</sup>。近年来有学者发现 VE-cadherin 和 VEGF 等基因参与肿瘤细胞的血管生成拟态<sup>[3,5]</sup>,并在一些高度侵袭性肿瘤细胞中高表达,VE-cadherin、VEGF 与肿瘤侵袭性以及恶性程度相关,并且是有关肺癌抗血管治疗的重要靶点。

综上所述,粉防己碱可能通过抑制血管生成拟态相关基因 VE-cadherin、VEGF 的表达来抑制人肺癌 A549 细胞迁移、细胞黏附和血管生成拟态,进而抑制肿瘤血管生成而发挥抗肿瘤作用。粉防己碱抑制 A549 细胞血管生成拟态的具体机制有待进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis[J]. *Nature*, 2011, 473(7 347): 298.
- [2] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis [J]. *Cell*, 2011, 146(6): 873.
- [3] Shang B, Cao Z, Zhou Q. Progress in tumor vascular normalization for anticancer therapy: challenges and perspectives [J]. *Front Med*, 2012, 6(1): 67.
- [4] Bao M, Cao Z, Yu D, et al. Columbamine suppresses the proliferation and neovascularization of metastatic osteosarcoma U2OS cells with low cytotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215(3): 174.
- [5] Cao Z, Yu D, Fu S, et al. Lycorine hydrochloride selectively inhibits human ovarian cancer cell proliferation and tumor neovascularization with very low toxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 218(2): 174.
- [6] Bu Z, Pan Y, Shang B, et al. SZ-117, a monoclonal antibody against matrix metalloproteinase-2 inhibits tumor cell-mediated angiogenesis[J]. *Hybridoma*, 2012, 31(1): 63.
- [7] 王奇巍,杨国红,林梦感,等.植物来源抑制血管生成的活性成分研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 附3.
- [8] Korpanty G, Smyth E, Sullivan LA, et al. Antinangiogenic therapy in lung cancer: focus on vascular endothelial growth factor pathway[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2010, 235(1): 3.
- [9] Blakely C, Jahan T. Emerging antiangiogenic therapies for

## 热熔挤出技术制备穿心莲提取物固体分散体<sup>Δ</sup>

刘 磐\*, 贺 倩, 邓丽红, 银杉杉, 潘伟增, 赖小平, 张 军<sup>#</sup>(广州中医药大学新药开发研究中心, 广州 510006)

中图分类号 R284;R943 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2901-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.08

**摘要** 目的:采用热熔挤出技术(HME)制备穿心莲提取物的固体分散体,并对其进行体外评价。方法:以穿心莲内酯和脱水穿心莲内酯含量为指标,采用单因素试验,分别对亲水性载体种类、穿心莲提取物与载体用量比例进行筛选,确定最优穿心莲提取物热熔挤出固体分散体的制备方法,并对形成的固体分散体进行体外溶出度试验和差式扫描量热分析、电镜扫描、X-射线衍射等物相鉴别。结果:穿心莲提取物热熔挤出固体分散体的最优制备工艺为:以Soluplus为载体,穿心莲提取物:Soluplus=1:2(m/m)混合,热熔挤出区段升温程序为130→135→140→130℃,螺杆转速为27 r/min,加料速度为15 g/min。物相鉴别试验显示穿心莲提取物在热熔挤出分散体中以无定形态分散。结论:HME能使穿心莲提取物以无定形态分散,提高穿心莲提取物的溶解度。

**关键词** 穿心莲内酯;脱水穿心莲内酯;Soluplus;热熔挤出技术;溶出度

### Preparation of *Andrographis paniculata* Extract Solid Dispersion by Hot-melt Extrusion Technology

LIU Pan, HE Qian, DENG Li-hong, YIN Shan-shan, PAN Wei-zeng, LAI Xiao-ping, ZHANG Jun (New Drug Development Research Centre, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To prepare *Andrographis paniculata* extract solid dispersion by using hot-melt extrusion (HME) technology, and to evaluate it *in vitro*. METHODS: The type of hydrophilic carrier and the proportion of *A. paniculata* extract to carrier were screened by single factor test using andrographolide and dehydroandrographolide as index. The preparation technology of *A. paniculata* extract solid dispersion was optimized. The dissolution rate *in vitro* was studied, and DSC, SEM, X-ray diffraction were used to analyze the solid dispersion. RESULTS: The optimal technology of *A. paniculata* extract solid dispersion by HME were as follows: choosing polyethylene caprolactam-polyvinyl acetate-soluplus as the carrier; the ratio of *A. paniculata* extract to soluplus was 1:2(m/m); the temperature-raising program of HME should be 130→135→140→130℃; the rotation rate of screw arbor was 27 r/min, feeding speed was 15 g/min. The results of physicochemical characterization experiment indicated that *A. paniculata* extract were in amorphous state in solid dispersion by HME. CONCLUSIONS: HME can disperse *A. paniculata* extract in amorphous state, and improve its solubility.

**KEYWORDS** Andrographolide; Dehydroandrographolide; Soluplus; Hot-melt extrusion method; Dissolution

热熔挤出技术(HME)又称熔融挤出技术(Melt extrusion technique),是近年来欧、美、日等国大力开发的一门新兴的固体分散技术。20世纪70年代从塑料工业应用中引入制药行业。HME具有分散效果好、药物损失少、不使用有机溶剂、安全无污染、可高效率地进行放大生产、工艺重现性高等优点<sup>[1-2]</sup>,已广泛用于提高难溶性药物的溶解度、溶出速率以及口

服生物利用度<sup>[3-5]</sup>。

目前,穿心莲制剂多为片剂和胶囊,但其主要指标成分穿心莲内酯、脱水穿心莲内酯等二萜内酯类成分疏水性强,因而大多存在体外溶出慢、生物利用度低的状况<sup>[6-9]</sup>。本研究采用HME制备穿心莲固体分散体,通过抑制药物结晶,改善其理化性质,使其以无定形态分散在亲水性载体中,以期提高指标成

non-samll-cell lung cancer[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2011, 11(10):1607.

[10] Garofalo C, Surmacz. Leptin and cancer[J]. *J Cell Physi-*

Δ 基金项目:“十二五”国家科技支撑计划课题(No.2011BAI01B01)

\* 硕士研究生。研究方向:中药新药药学。电话:020-39358519。

E-mail: gzliupan@163.com

# 通信作者:研究员。研究方向:中药新药药学。电话:020-39358103。E-mail: zhjxsh@aliyun.com

ol, 2006, 207(1):12.

[11] Gao JL, Ji X, He TC, et al. Tetrandrine suppresses cancer angiogenesis and metastasis in 4T1 tumor bearing mice [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2013, 55(10):115.

[12] Liu R, Cao Z, Tu J, et al. Lycorine hydrochloride inhibits metastatic melanoma cell-dominant vasculogenic mimicry [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2012, 25(5):630.

(收稿日期:2013-09-25 修回日期:2013-12-16)