

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.14.003

川芎嗪联合 CIK 细胞对裸鼠肝癌 HepG2 细胞的影响*

黄芬¹, 王波², 卢彦达¹, 曾江正¹, 桑圣刚¹

(1. 海南医学院第一附属医院, 海南 海口 570102; 2. 海南省人民医院, 海南 海口 570102)

摘要:目的 探讨川芎嗪联合细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞对裸鼠肝癌 HepG2 细胞的影响。方法 取 HepG2 细胞接种于裸鼠皮下, 以建立裸鼠肝癌模型。建模成功后, 按随机数字表法分为川芎嗪 50 mg/L 联合 CIK 细胞组(A组)、川芎嗪 100 mg/L 联合 CIK 细胞组(B组)和川芎嗪 200 mg/L 联合 CIK 细胞组(C组), 各 12 只, 灌胃给药 1 次; 经尾静脉一次性输注 1.5×10^7 个 CIK 细胞。另将 10 只建模成功的裸鼠设为模型组(D组)。检测细胞侵袭和迁移能力, 检测基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶抑制剂-2(TIMP-2)蛋白水平, 检测细胞骨架蛋白-肌动蛋白微丝面积。结果 与 D 组比较, B 组和 C 组裸鼠迁移和侵袭细胞显著减少, 抑制率显著升高 ($P < 0.05$); A 组、B 组、C 组裸鼠细胞 MMP-2 蛋白表达水平显著降低, TIMP-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 细胞骨架蛋白-肌动蛋白微丝面积显著缩小 ($P < 0.05$)。结论 川芎嗪联合 CIK 细胞能抑制裸鼠肝癌 HepG2 细胞的迁移及侵袭, 作用机制可能与下调细胞 MMP-2 和上调 TIMP-2 蛋白表达, 以及抑制骨架微丝重排有关。

关键词: 川芎嗪; 细胞因子诱导的杀伤细胞; 肝癌 HepG2 细胞; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶抑制剂-2; 肌动蛋白微丝

中图分类号: R965.2; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)14-0008-03

Effect of Ligustrazine Combined with CIK Cells on Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2 in Nude Mice

HUANG Fen¹, WANG Bo², LU Yanda¹, ZENG Jiangzheng¹, SANG Shenggang¹

(1. The First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, China 570102; 2. Hainan General Hospital, Haikou, Hainan, China 570102)

Abstract: Objective To investigate the effect of ligustrazine combined with cytokine-induced killer(CIK) cells on hepatocellular carcinoma cell line HepG2 in nude mice. **Methods** HepG2 cells were inoculated subcutaneously in nude mice to establish models of hepatocellular carcinoma in nude mice. After the successful establishment of the models, the mice were divided into 50 mg/L ligustrazine combined with CIK cells group(group A), 100 mg/L ligustrazine combined with CIK cells group(group B) and 200 mg/L ligustrazine combined with CIK cells group(group C) by the random number table method, 12 mice in each group, all of them were given intragastric administration once, and 1.5×10^7 CIK cells were transfused via tail vein at one time. Another 10 successfully modeled nude mice were selected as the model group(group D). The activity of cells' invasion and migration, the levels of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), the tissue inhibitor of metalloproteinase-2(TIMP-2) protein and the area of cytoskeleton protein-actin microfilament were detected. **Results** Compared with group D, the migration cells and invasion cells of nude mice in group B and group C reduced significantly, while the inhibition rate in group B and group C increased significantly ($P < 0.05$), the expression levels of MMP-2 protein in nude mice in group A, group B and group C decreased significantly, while the expression levels of TIMP-2 protein in group A, group B and group C increased significantly ($P < 0.05$), the area of cytoskeleton protein-actin microfilament in group A, group B and group C reduced significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Ligustrazine combined with CIK cells can inhibit the migration and invasion of HepG2 cells in nude mice. The mechanism may be related to down-regulation of MMP-2 protein expression and up-regulation of TIMP-2 protein expression, as well as inhibition of skeletal microfilament rearrangement.

Key words: ligustrazine; cytokine-induced killer cells; hepatocellular carcinoma HepG2 cells; matrix metalloproteinase-2; tissue inhibitor of metalloproteinase-2; protein-actin microfilaments

川芎主要成分为川芎嗪, 具有活血行气、祛风止痛功效, 临床多用于治疗瘀血阻滞的各种病症, 称为“血中气药”^[1]。细胞因子诱导的杀伤(CIK)细胞是新型免疫活性细胞, 增殖能力强, 细胞毒作用强, 具有一定的免疫特性, 拟用于心血管、呼吸系统、消化系统及泌尿系统疾病的治疗^[2-3]。本研究中分析了川芎嗪联合 CIK 细胞对裸鼠肝癌 HepG2 细胞的影响。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物、细胞、仪器与试剂

动物: 裸鼠 46 只, 雄性, (5.5 ± 0.67) 周龄, 体质量 175 ~ 225 g, 由南华大学医学院动物实验中心提供, 实验动物生产许可证号为 SCXK(湘)2004-0009。在无特殊病原菌条件下分笼饲养, 自由进食、饮水, 适宜温度、湿度, 人工黑暗和光照交替。

细胞: HepG2 细胞(上海纪宁实业有限公司);

*基金项目: 海南省重点研发计划项目[ZDYF2016107]。

第一作者: 黄芬, 女, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为实体瘤的生物免疫治疗, (电子信箱)785864423@qq.com。

PB003F - C 单个核细胞(美国 Allcells 公司)。

仪器:HN - 25S 型 CO₂ 恒温培养箱(青岛聚创世纪环保科技有限公司);IN Cell Analyzer 2500HS 型高内涵细胞成像分析系统(美国 Molecular Devices 公司);xCELLigence RTCA SP 型实时无标记细胞功能分析仪(美国 ACEA Biosciences 公司);LWD300 - 38LT 型倒置生物显微镜(西安测维光电技术有限公司)。

试剂:盐酸川芎嗪氯化钠注射液(湖南康都制药有限公司,国药准字 H20041437,规格为每 100 mL 含盐酸川芎嗪 40 mg);细胞迁移分析试剂盒(美国 Biovision 公司,货号为 K906 - 100);DMEM 培养基、胰蛋白酶及胎牛血清(美国 Gibco 公司);4% 多聚甲醛(美国 Sigma 公司);注射用氨苄西林钠(湖南科伦制药有限公司,国药准字 H43022217,规格为每支 1.0 g);其余试剂均为分析纯。

1.2 方法

HepG2 细胞培养:将 HepG2 细胞接种于含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 条件下培养,壁贴,放置 2 ~ 3 d。

CIK 细胞培养:用完全培养液(100 mL/L 胎牛血清,50 mg/L 注射用氨苄西林钠,10 mmol/L Hepes 缓冲液,50 μmol/L 2 - 巯基乙醇)将外周血单个核细胞(PBMC)密度调至 1.5 × 10⁹/L,在 CO₂ 恒温培养箱中培养 24 h,即得 CIK 细胞。

模型建立及分组、给药:取对数生长期的 HepG2 细胞进行试验。将 HepG2 细胞经 0.25% 胰蛋白酶消化后接种于裸鼠皮下,其消化过程为将无血清的 DMEM 培养液重悬细胞并接种于事先预备的孔板上,再将培养板置其上作用 30 min 后注入裸鼠皮下。建模成功后,按随机数字表法分为川芎嗪 50 mg/L 联合 CIK 细胞组(A 组)、川芎嗪 100 mg/L 联合 CIK 细胞组(B 组)和川芎嗪 200 mg/L 联合 CIK 细胞组(C 组),各 12 只,灌胃给药 3 次,间隔 8 h;经尾静脉一次性输注 1.5 × 10⁷ 个 CIK 细胞。另将 10 只建模成功裸鼠设为模型组(D 组)。

1.3 观察指标

细胞侵袭和迁移能力:采用 DMEM 培养基调整细胞浓度后再次加入细胞悬液,培养 24 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,重复 2 次,加 4% 多聚甲醛固定 15 min,染色,显微镜下观察细胞迁移情况,并计算迁移抑制率。细胞迁移抑制率 = (D 组迁移或侵袭细胞数 - 用药组迁移或侵袭细胞数) / D 组迁移或侵袭细胞数 × 100%。

基质金属蛋白酶 - 2(MMP - 2)和基质金属蛋白酶抑制剂 - 2(TIM P - 2)蛋白水平:采用流式细胞仪检测,激发波长为 488 nm,采用 Expo 32 ADC 系统分析免疫荧光数据,结果均取平均值^[4]。

细胞骨架蛋白 - 肌动蛋白微丝:采用 IN Cell Ana-

lyzer 2500HS 高内涵细胞成像分析系统检测,取消毒后的钛板,置一次性培养皿中,接种细胞悬液 8 mL,培养后转至一次性培养皿中用 PBS 清洗,清洗 2 次后采用封闭液封闭 60 min 后染色,采用显微镜观察,采用 Leica TCS 软件测量视野中细胞的铺展面积。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行 *t* 检验;计数资料以率(%)表示,行 χ^2 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞侵袭和迁移能力

与 D 组比较,B 组和 C 组迁移和侵袭细胞显著减少,抑制率显著升高(*P* < 0.05)。详见表 1。随着时间的增加,A 组、B 组和 C 组细胞迁移数均明显低于 D 组,且 C 组 < B 组 < A 组,迁移率与时间及剂量呈正相关。详见图 1 和表 2。

表 1 各组细胞侵袭和迁移能力比较($\bar{X} \pm s$)

组别	质量浓度 (mg/L)	细胞黏附 率(%)	迁移细胞		侵袭细胞	
			个/视野	抑制率(%)	个/视野	抑制率(%)
A 组	50	59.19 ± 4.97	225.47 ± 9.77	4.29 ± 0.29	164.27 ± 10.25	1.79 ± 0.21
B 组	100	37.87 ± 4.95	197.59 ± 9.78 [#]	15.97 ± 0.31 [#]	146.14 ± 10.27 [#]	11.29 ± 0.23 [#]
C 组	200	21.94 ± 4.96 [#]	179.47 ± 9.79 [#]	22.29 ± 0.32 [#]	122.47 ± 10.26 [#]	26.12 ± 0.24 [#]
D 组		90.39 ± 4.94	235.59 ± 9.81		167.29 ± 10.25	

注:与 D 组比较,[#]*P* < 0.05。下表同。

表 2 各组细胞侵袭情况比较($\bar{X} \pm s$, 个/视野)

组别	质量浓度(mg/L)	24 h	48 h	72 h
A 组	50	0.47 ± 0.11	1.69 ± 0.15 [#]	2.39 ± 0.19 [#]
B 组	100	0.44 ± 0.09	1.69 ± 0.14 [#]	2.41 ± 0.20 [#]
C 组	200	0.45 ± 0.13	1.71 ± 0.16 [#]	2.40 ± 0.21 [#]
D 组		0.36 ± 0.13	1.24 ± 0.16	1.51 ± 0.20

2.2 MMP - 2 和 TIM P - 2 蛋白表达水平

与 D 组比较,A 组、B 组、C 组细胞 MMP - 2 蛋白表达显著降低,TIM P - 2 蛋白表达水平显著升高(*P* < 0.05)。详见表 3。

2.3 细胞骨架蛋白 - 肌动蛋白微丝

与 D 组比较,A 组、B 组、C 组细胞骨架蛋白 - 肌动蛋白微丝面积显著缩小(*P* < 0.05)。详见表 3。

3 讨论

侵袭与转移是恶性肿瘤发展过程中的危险阶段,一旦出现将对预后造成严重影响^[5]。细胞黏附性丧失及细胞骨架重建均会导致细胞运动和迁移^[6-7]。川芎为无色针状结晶,对心脏、血管(尤其是冠状动脉)及脑部等部位病变有一定改善作用^[8]。川芎嗪能抑制乳腺癌、肺癌细胞的体外增殖,作用机制为抑制肿瘤新生血管形成、抑制肿瘤细胞繁殖及逆转肿瘤细胞耐药性等^[9]。CIK 细胞是影

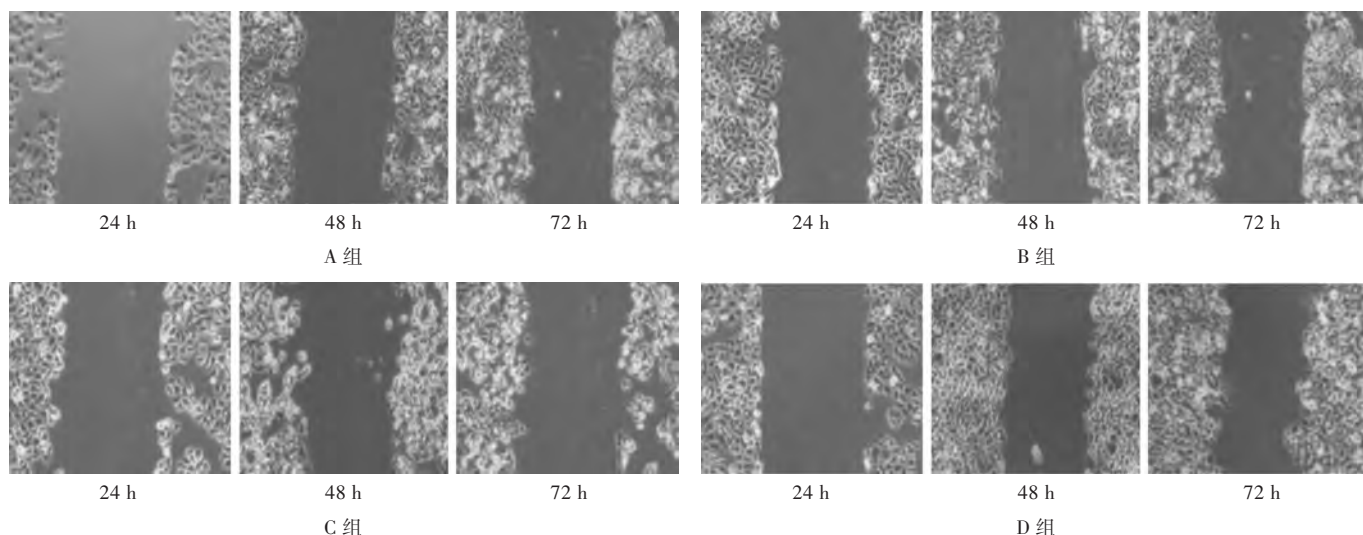


图1 细胞迁移情况($\times 100$)

表3 各组细胞 MMP-2 蛋白和 TIMP-2 蛋白表达水平及细胞骨架蛋白-肌动蛋白微丝面积比较($\bar{X} \pm s$)

组别	质量浓度 (mg/L)	MMP-2 蛋白 表达	TIMP-2 蛋白 表达	细胞骨架蛋白-肌 动蛋白微丝(mm^2)
A 组	50	401.39 \pm 22.49 [#]	329.39 \pm 12.49 [#]	2 601.81 \pm 270.01
B 组	100	359.09 \pm 22.51 [#]	349.09 \pm 12.51 [#]	2 000.79 \pm 269.84 [#]
C 组	200	307.89 \pm 22.48 [#]	375.49 \pm 12.52 [#]	1 687.49 \pm 269.91 [#]
D 组		529.14 \pm 22.49	285.49 \pm 12.54	3 479.61 \pm 269.94 [#]

响肿瘤的归巢能力及异常肿瘤微环境的重要因素^[10]。

本研究结果显示,随川芎嗪质量浓度的增加, HepG2 细胞侵袭和迁移能力逐渐降低,且川芎嗪联合 CIK 细胞作用 72 h 后抑制细胞侵袭能力明显强于 24 h 后,说明川芎嗪可抑制 HepG2 细胞的迁移及侵袭,进而具有抗肿瘤转移作用。A 组、B 组、C 组的 MMP-2 蛋白表达水平均明显低于 D 组,但 TIMP-2 蛋白表达水平均明显高于 D 组,显示 MMP-2 表达量降低时, TIMP-2 表达量会随之升高。细胞骨架是由蛋白纤维交织而成的立体网架结构,并充满整个细胞质,细胞骨架与细胞膜及核膜存在结构联系,能保持细胞形状,且细胞骨架与细胞运动具有一定联系;微管、微丝和纤维是组成细胞骨架主要结构,微丝在肿瘤细胞中被修饰,与肿瘤细胞生长特点相关,而肌动蛋白是构成微丝的主要成分,在细胞迁移及侵袭中起至关重要的作用^[11]。本研究中, A 组、B 组、C 组裸鼠的细胞骨架蛋白-肌动蛋白微丝面积明显小于 D 组,川芎嗪联合 CIK 细胞能降低肝癌 HepG2 细胞骨架面积,可通过调节细胞松弛素达到减少微丝形成的目的,但川芎嗪联合 CIK 细胞是否可以获得新的间质表型仍有待研究。

综上所述,川芎嗪联合 CIK 细胞能抑制裸鼠 HepG2 细胞迁移及侵袭,作用机制可能与下调细胞 MMP-2 和上调 TIMP2 蛋白表达,以及抑制骨架微丝重排有关。

参考文献:

- [1] 毕蕾, 颜晓静, 杨焱, 等. 川芎嗪对肝癌 HepG2 细胞迁移、侵袭和细胞骨架的影响[J]. 中国药理学通报, 2016, 25(2): 194-198.
- [2] 赵建夫, 赵凤芝, 陈文慧, 等. CIK 细胞联合贝伐单抗对肝癌 HepG2 细胞的体内外抗瘤活性[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2017, 24(4): 404-410.
- [3] 袁雅红, 郭兴荣, 于莉, 等. 酸性环境抑制 CIK 细胞对肝癌 HepG2 细胞的杀伤活性[J]. 肿瘤防治研究, 2016, 43(5): 331-334.
- [4] 赵新, 丛文铭, 谭璐, 等. MMP-2 和 TIMP-2 在肝癌中的表达及其意义[J]. 临床肿瘤学杂志, 2001, 6(1): 9-12.
- [5] 李克跃, 石承先, 汤可立, 等. 表柔比星联合川芎嗪对人肝癌细胞 TGF- β_1 /Smads 通路的影响[J]. 贵阳中医学院学报, 2017, 39(6): 17-22.
- [6] 韩林涛, 黄芳, 胡爱萍, 等. 牛黄参干预裸鼠肝癌 HepG2 细胞移植瘤模型的代谢组学研究[EB/OL]. (2017-04-17) [2018-08-16]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201704-176>.
- [7] 左新华, 高萍. DC-CIK 免疫疗法联合 TACE、RFA 治疗原发性肝癌的疗效评估[J]. 海南医学院学报, 2016, 22(4): 385-388.
- [8] 杨洋, 陈和平, 王占科, 等. 胰岛素和川芎嗪联合治疗对严重烫伤内毒素血症大鼠血浆 sTREM-1、sICAM-1、MDA 和 SOD 水平的影响[J]. 解放军医药杂志, 2017, 29(6): 10-14.
- [9] 张长洪, 李琛, 王布, 等. 川芎嗪联合顺铂对 Lewis 小鼠肺腺癌移植瘤与血管生成的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(6): 690-692.
- [10] 孙雯雯, 窦金霞, 张琳, 等. 山药提取物联合 DC-CIK 细胞疗法对结肠癌 HT29 干细胞荷瘤裸鼠的体内抗肿瘤研究[J]. 中草药, 2017, 48(7): 1362-1368.
- [11] 文彬, 孙海涛, 贺松其, 等. 鳖甲煎丸对 HepG2 裸鼠移植瘤的抑制作用及瘤体组织中 β -catenin、Tbx3 表达水平的影响[J]. 南方医科大学学报, 2016, 36(2): 210-214.

(收稿日期: 2018-09-28)