

# 鸦胆子油乳注射液对胶质瘤细胞侵袭性的影响及其可能机制\*

秦丽娟<sup>1</sup>, 贾永森<sup>2</sup>, 赵喜庆<sup>3</sup>, 张田<sup>1</sup>, 张伟<sup>1</sup>, 孙娜<sup>1</sup>

1. 华北理工大学基础医学院 生理教研室(唐山 063000); 2. 华北理工大学中医学院(唐山 063000);  
3. 华北理工大学附属医院 神经外科(唐山 063000)

**【摘要】** 目的 探讨鸦胆子油乳注射液降低胶质瘤细胞侵袭性的作用与 phosphatidylinositol 3 kinase / protein kinase B(PI3K/AKT)信号通路之间的关系。方法 采用鸦胆子油乳注射液处理培养的 C6 胶质瘤细胞, MTT 法检测胶质瘤细胞的抑制率, Western blot 法检测胶质瘤细胞内 PI3K、AKT 及核因子(NF)- $\kappa$ B 蛋白的表达水平, 结晶紫染色法观察透过 Transwell 下室面的胶质瘤细胞数。结果 鸦胆子油乳注射液可以抑制 PI3K、AKT 及 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平, 且分别于鸦胆子油乳注射液作用 30 min、60 min 和 120 min 时抑制程度最高。而鸦胆子油乳注射液作用 180 min 时对 C6 胶质瘤细胞增殖的抑制作用最强, 且此时 Transwell 下室面的胶质瘤细胞数最少。结论 鸦胆子油乳注射液可能是通过抑制 PI3K/AKT 信号传导通路抑制胶质瘤细胞的增殖, 进而降低胶质瘤细胞的侵袭性。

**【关键词】** 胶质瘤 鸦胆子油乳注射液 PI3K/AKT 信号传导通路 肿瘤侵袭性

**Effect of Brucea Javanica Oil Emulsion on the Invasiveness of Glioma Cells and Its Possible Mechanism** QIN Lijuan<sup>1</sup>, JIA Yong-sen<sup>2</sup>, ZHAO Xi-qing<sup>3</sup>, ZHANG Tian<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>1</sup>, SUN Na<sup>1</sup>. 1. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 2. College of Traditional Chinese Medicine, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 3. Department of Neurosurgery, North China University of Science and Technology Affiliated Hospital, Tangshan 063000, China

**【Abstract】** **Objective** To investigate the effect of brucea javanica oil emulsion on the invasiveness of glioma cells and phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B(PI3K/AKT) signaling pathway. **Methods** C6 glioma cells were treated by brucea javanica oil emulsion. The inhibition rate of glioma cells was detected by MTT, Western blot was used to detect protein expression levels of PI3K, AKT, and nuclear factor (NF)- $\kappa$ B in glioma cells. The number of the glioma cells migrated through polycarbonate membrane was detected by crystal violet staining method. **Results** Brucea javanica oil emulsion inhibited PI3K, AKT, and NF- $\kappa$ B protein expression which reached the highest inhibition at 30 min, 60 min, and 120 min after brucea javanica oil emulsion, respectively. Maximum suppression on the proliferation of C6 glioma cells reached at 180 min after brucea javanica oil emulsion, while the number of glioma cells migrated through polycarbonate membrane was the least. **Conclusion** Brucea javanica oil emulsion inhibit the proliferation and invasiveness of glioma cells, which may be related to the inhibition of PI3K/AKT signal pathway.

**【Key words】** Glioma Brucea javanica oil emulsion PI3K/AKT signal transduction pathway Tumor invasiveness

胶质瘤是中枢神经系统发病率最高的恶性肿瘤。临床上对于胶质瘤的治疗依然是以手术治疗为首选。但由于肿瘤组织和正常组织之间界限不清, 手术很难将其做到病理学上的彻底清除, 且胶质瘤

具有高侵袭性的特点, 故术后即使仅存留少量的肿瘤细胞, 也会在短时间内迅速增殖并侵袭到其他部位, 因此, 术后配合放、化疗已成为恶性脑肿瘤综合治疗的重要手段之一<sup>[1-2]</sup>。放化疗本身可以杀伤肿瘤, 但放化疗存在着“敌我不分”、有效剂量和中毒剂量非常接近、毒副作用多等严重不足, 胶质瘤患者往往因不良反应严重而难以接受放化疗或不能坚持完成整个疗程。中医的治疗原则从整体提高机体免疫力的角度, 调节全身机体的机能, 往往会达到事半功

\* 国家自然科学基金项目(No. 81101912)、河北省高等学校科学技术研究项(No. ZD20160082)、河北省中医药管理局中医药类科研项目(No. 2014195)、河北省卫生计生厅科学研究基金项目(No. 20150491)和河北省科技计划项目(No. 152777189)资助

倍的效果。鸦胆子油乳注射液是已经应用于临床的一种抗肿瘤中药,初步研究发现,其具有一定的抗胶质瘤作用,但其确切作用机制尚不十分明了<sup>[3]</sup>。本研究从鸦胆子油乳注射液对 phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B(PI3K/AKT)信号传导通路影响方面来探讨其抑制胶质瘤侵袭性的作用机制,以期为临床胶质瘤治疗制定更有效的治疗方案提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要试剂与仪器

鸦胆子油乳注射液(沈阳药大雷允上药业有限责任公司,国药准字 12290360Z),羊抗大鼠 PI3K、AKT 及核因子(NF)- $\kappa$ B 多克隆抗体(英国 Abcam 公司),小鼠抗大鼠  $\beta$ -actin 单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司),C6 细胞株和培养基(中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心),电泳仪(DYY-TB,北京六一仪器厂),半干式碳板转移电泳槽(DYY-III 40C,北京六一仪器厂),凝胶成像分析系统(Bio-Rad,美国),生物分子成像仪(Bio-Rad,美国)。

### 1.2 C6 细胞培养

用含有 0.025 g/mL 胎牛血清和 0.15 g/mL 马血清的 F-12 培养基培养 C6 胶质瘤细胞,37 °C 孵箱内孵育,并通以 5% 的 CO<sub>2</sub>。

### 1.3 细胞分组

将鸦胆子油乳注射液(2.5 g/L)加入处于对数生长期的 C6 细胞培养液内,C6 细胞随机分为鸦胆子油乳注射液处理 10 min 组、30 min 组、60 min 组、120 min 组、180 min 组和 240 min 组。

### 1.4 Western blot 法动态检测胶质瘤细胞内 PI3K、AKT 及 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平

培养的 C6 胶质瘤细胞给予鸦胆子油乳注射液后,收集不同时间点的细胞,采用 Western blot 法检测胶质瘤细胞内的 PI3K、AKT 及 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平。PVDF 膜置于曝光系统中曝光成像。以 GAPDH 为内参照。结果以蛋白表达强度表示,并通过分析各条带积分光密度(IOD)值与内参 IOD 值的比值来分析各组蛋白的相对表达量。

### 1.5 鸦胆子油注射液对肿瘤细胞增殖的影响

以每孔  $1 \times 10^4$  细胞的密度接种于 96 孔平面培养板,细胞贴壁生长 24 h 后,培养液内加入鸦胆子油注射液,对照组加入含 0.025 g/mL 胎牛血清和 0.15 g/mL 马血清的 F-12 培养基。各组细胞分别

于鸦胆子油注射液作用后的相应时间点,MTT 染色 4 h 后加入 DMSO,在酶标仪上以波长 570 nm / 630 nm 测定吸光度值,换算为各组 C6 细胞增殖的抑制率。

### 1.6 结晶紫染色法检测胶质瘤侵袭性

将 C6 胶质瘤细胞按照每膜  $5 \times 10^4$  细胞接种于 Transwell 膜上室,培养 24 h 后,再将 Transwell 膜置于 37 °C 培养箱内,分别于鸦胆子油注射液作用后 10 min、30 min、60 min、120 min、180 min 和 240 min 时用棉签擦去基质胶和上室内的细胞,用结晶紫染色法测定膜下室面贴壁细胞数来反映肿瘤侵袭性。

### 1.7 统计学方法

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间样本均数比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 C6 细胞内 PI3K 的表达水平

由图 1 可见,鸦胆子油注射液处理后,C6 细胞 PI3K 的表达水平开始降低,于鸦胆子油注射液处理后的 30 min 时达最低( $P < 0.01$ ),其后随时间推移而增加。

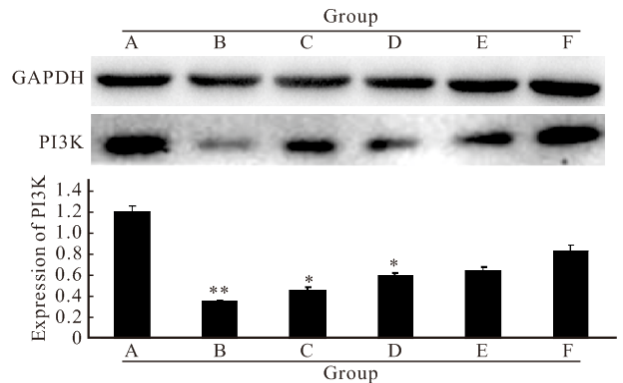


图 1 C6 细胞内 PI3K 的表达水平

Fig 1 Expression of PI3K in C6 cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. A group. A-F: 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min

### 2.2 C6 细胞内 AKT 的表达水平

由图 2 可见,鸦胆子油注射液处理后,C6 胶质瘤细胞内 AKT 的表达水平开始降低,于鸦胆子油注射液处理后的 60 min 时达最低值( $P < 0.01$ ),其后随时间推移而增加。

### 2.3 C6 细胞内 NF- $\kappa$ B 的表达水平

由图 3 可见,鸦胆子油注射液处理后,C6 细胞

内 NF-κB 的表达水平开始降低,于鸦胆子油注射液处理后 120 min 时最低( $P < 0.01$ ),其后随时间推移而增加。

### 2.5 鸦胆子油注射液对胶质瘤细胞侵袭性的影响

由图 4 可见,鸦胆子油注射液加入 Transwell 上室后,侵入 Transwell 下室的细胞数量减少,于治疗后 60 min 时低于对照组( $P < 0.05$ ),提示鸦胆子油注射液可降低胶质瘤侵袭性,并且于鸦胆子油注射液作用 180 min 时降到最低( $P < 0.01$ ),随后增加。

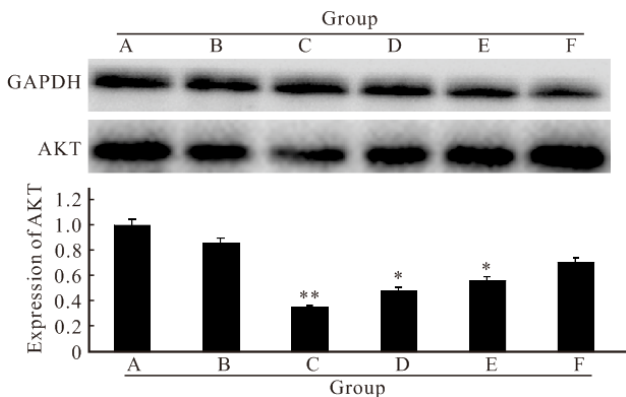


图 2 C6 细胞内 AKT 的表达水平  
Fig 2 Expression of AKT in C6 cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. A group. A-F: 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min

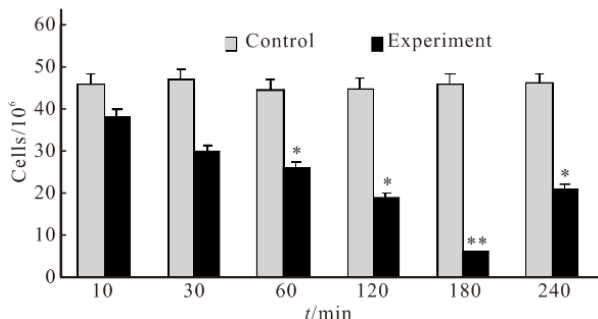


图 4 膜下面贴壁细胞数

Fig 4 Adherent cells on the membrane downside

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. control group

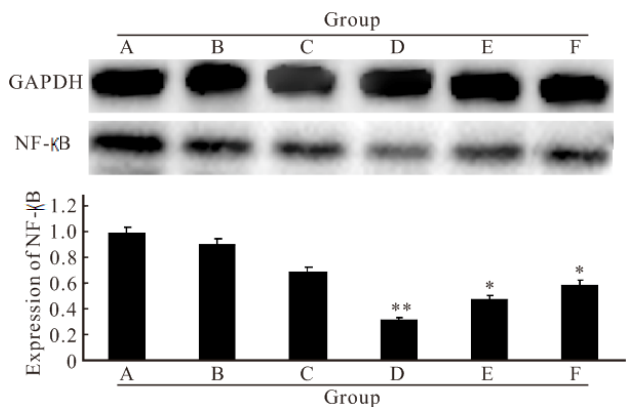


图 3 C6 细胞内 NF-κB 的表达水平  
Fig 3 Expression of NF-κB in C6 cells

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. A group. A-F: 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, 180 min, 240 min

### 2.4 鸦胆子油注射液对胶质瘤细胞增殖的影响

由附表可见,鸦胆子油注射液处理 C6 胶质瘤细胞后,细胞的抑制率开始增加,于 180 min 时抑制程度达最大( $P < 0.01$ ),随后减少。

附表 鸦胆子油注射液对 C6 细胞的抑制率( $\bar{x} \pm s$ )

Table The inhibition rate of C6 cells caused by brucea javanica oil injection ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	n	Inhibition rate
10 min	8	(5.6 ± 1.2)%
30 min	8	(16.3 ± 2.5)%
60 min	8	(48.2 ± 3.7)%
120 min	8	(64.1 ± 4.9)%*
180 min	8	(87.3 ± 5.4)**
240 min	8	(50.6 ± 3.7)%

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , vs. 10 min group

### 3 讨论

神经胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,其发病率近年来有所升高,且其发病群体呈现年轻化趋势。胶质瘤对机体最大的影响是其对脑组织的压迫症状。在临床胶质瘤的治疗中,手术是其首选的治疗方法。但手术并不能做到胶质瘤在病理学上的彻底清除,因胶质瘤本身增殖迅速,且侵袭性强,故术后依然会有部分侵袭到远处的胶质瘤细胞,这些胶质瘤细胞又会在短期内迅速增殖,形成新的胶质瘤团块而产生新的压迫症状<sup>[4]</sup>。因此,胶质瘤患者术后均要常规进行针对残留胶质瘤细胞的辅助治疗。目前临床常用的辅助治疗措施依然是放射治疗和化学治疗,但此两种治疗方法因为副作用大,患者往往不能耐受。随着中医药治疗脑瘤病研究的不断深入,中医药治疗脑瘤的报道日渐增多<sup>[5-7]</sup>。较多的临床与实验研究<sup>[8-9]</sup>显示,中医药可控制患者病情发展,缓解临床症状,减少放化疗不良反应,提高患者生活质量、改善预后。

对于脑胶质瘤的治疗,中医强调整体观念,通过调整机体阴阳、气血、脏腑功能的平衡,并根据各个患者不同的临床症状,标本兼治,扶正祛邪,从而达到有效减轻放化疗所引起的毒副作用,减少肿瘤的复发和转移以及改善生存预后与生活质量的的目的。

鹅胆子油注射液是近年较多用于临床脑肿瘤治疗的一种中药制剂,它是将鹅胆子仁石油醚提取物和精制大豆磷脂为原料制成的水包油型乳剂。目前的研究已经发现,鹅胆子油注射液既有抗肿瘤作用,又有免疫保护作用,可以降低放疗所伴随的毒性作用<sup>[10-12]</sup>,但有关其发挥作用的具体机制尚不十分明了。

我们通过研究鹅胆子油注射液对 C6 胶质瘤细胞侵袭性和细胞增殖情况的影响发现,鹅胆子油注射液可以降低胶质瘤细胞侵袭入 Transwell 下室的数目,即可以降低胶质瘤细胞的侵袭性,并于鹅胆子油注射液作用 180 min 时最强。而鹅胆子油注射液对抑制胶质瘤细胞增殖的抑制率亦于作用 180 min 时最高,说明鹅胆子油注射液对抑制胶质瘤细胞的增殖和侵袭有效,究其原因,可能是由于中成药鹅胆子油注射液能抑制拓扑异构酶活性,从而抑制了胶质瘤细胞 DNA 的合成,进而阻断了瘤细胞的增殖<sup>[13]</sup>,细胞的增殖被抑制也就直接导致细胞侵袭性的降低。

有研究发现,PI3K/AKT 信号通路在细胞代谢、细胞周期调控等方面发挥着重要的作用,通常可被多种肿瘤所激活<sup>[14]</sup>,与肿瘤的发生发展、转移及治疗耐药性等密切相关<sup>[15]</sup>。AKT 是 PI3K 的一个重要下游信号分子,可促进细胞恶性转化。AKT 的活化又可以进一步作用于其下游分子如 NF- $\kappa$ B 等,从而促进细胞的异常分化与增殖<sup>[16]</sup>。在本研究中我们发现,鹅胆子油注射液可以降低信号蛋白 PI3K 的表达,且于鹅胆子油注射液作用后 30 min 时达最低值,而 AKT 蛋白则在鹅胆子油注射液作用后 60 min 时达最低,NF- $\kappa$ B 蛋白表达在鹅胆子油注射液作用后 120 min 时达最低值。由此我们推测,鹅胆子油注射液作用于 C6 胶质瘤细胞后,可能是首先降低了 PI3K 的表达,PI3K 的表达激活了其下游信号分子 AKT,AKT 的激活又进一步降低了 NF- $\kappa$ B 的表达,最终使得 NF- $\kappa$ B 引起的 C6 胶质瘤细胞增殖受抑制而降低了胶质瘤的侵袭性。

本实验中所用到的鹅胆子油乳注射液是一中成药,药品中的其他成分也可能会影响到相关实验结果。因此,在今后的实验研究中,我们希望通过分别测定鹅胆子油乳注射液各种成分对本研究中各项指标的影响,以明确其发挥作用的确切成分。另外,有关鹅胆子油注射液降低胶质瘤侵袭性的作用,可能还有其他的信号通路或信号分子参与,这些尚待进一步探讨。而鹅胆子油注射液对 u87/u251 等人源

细胞系是否有影响,及其与 C6 细胞系之间有何异同,也是我们今后需要进一步研究的内容。

## 参 考 文 献

- [1] HARFORD-WRIGHT E, LEWIS KM, VINK R. Towards drug discovery for brain tumours: interaction of kinins and tumours at the blood brain barrier interface. *Recent Pat Cns Drug Discov*, 2011, 6(1): 31-40.
- [2] THOMPSON EM, FRENKEL EP, NEUWELT EA. The paradoxical effect of bevacizumab in the therapy of malignant gliomas. *Neurology*, 2011, 76(1): 87-93.
- [3] 张晓娇, 王雪莲, 赵峰, 等. 鹅胆子油乳抑制肺癌 NCI-H460 细胞的增殖及其机制. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2011, 18(5): 519-523.
- [4] FIVEASH JB, GILLESPIE GY, OLIVER PG, *et al.* Enhancement of glioma radiotherapy and chemotherapy response with targeted antibody therapy against death receptor 5. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008, 71(2): 507-516.
- [5] 石学魁, 阮殿清, 王亚贤, 等. 红花多糖抗肿瘤活性及对 T739 肺癌鼠 CTL, NK 细胞杀伤活性的影响. *中国中药杂志*, 2010, 35(2): 215-218.
- [6] 江龙, 林时辉, 高峰, 等. 黄芪多糖对脂多糖诱导的急性肺损伤大鼠的保护作用及肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、细胞间黏附分子-1、白细胞介素-6 表达的影响. *中国生物制品学杂志*, 2014, 27(11): 1416-1420.
- [7] 何彦丽, 应逸, 许艳丽, 等. 枸杞多糖对荷瘤小鼠肿瘤微环境 T 淋巴细胞亚群及树突状细胞的影响. *中西医结合学报*, 2005, 3(5): 374-377.
- [8] 苏勤勇, 李晓梅, 姚景春, 等. 牛蒡子苷元对大鼠脑胶质瘤的作用及初步作用机理探讨. *中国药理学通报*, 2015, 31(6): 805-809.
- [9] 柴昌, 韩双印, 宋来君. 白花丹素对胶质瘤细胞生长侵袭的影响及机制研究. *中华神经医学杂志*, 2014, 13(7): 1671-8925.
- [10] 赵楠, 李玉花, 吴效科, 等. 鹅胆子油乳及联合顺铂对卵巢癌 SKOV3 裸鼠移植瘤生长抑制的影响. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(1): 57-62.
- [11] 李滨萍, 林曦, 廖嘉仪, 等. 鹅胆子油乳治疗 H22 肝癌荷瘤小鼠的时辰药理学研究. *广州中医药大学学报*, 2015, 32(1): 111-120.
- [12] 罗琦, 杨静. 鹅胆子油乳制剂对宫颈癌 HeLa 细胞的抑制效果及作用机制研究. *现代中西医结合杂志*, 2015, 24(6): 574-576.
- [13] 张宏胜. 鹅胆子油乳注射液联合化疗对食管癌术后患者免疫功能的影响. *海军医学杂志*, 2007, 28(1): 31-33.
- [14] ZHANG G, ZHOU X, XUE L, *et al.* Accumulation of cytoplasmic  $\beta$ -catenin correlates with reduced expression of E-cadherin, but not with phosphorylated Akt in esophageal squamous cell carcinoma: immunohistochemical study. *Pathol Int*, 2005, 55(6): 310-317.
- [15] YAO TT, DAI YZ, LI SZ. Expression and clinical significance of phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B in cervical carcinoma. *Ai Zheng*, 2008, 27(5): 525-530.
- [16] 吴日平, 黄昌明. PI3K/Akt 信号传导通路与肿瘤关系的研究进展. *医学综述*, 2009, 15(10): 1501-1504.

(2015-07-30 收稿, 2016-01-03 修回)

编辑 吕熙