

[文章编号] 1000-4718(2009)06-1076-05

小檗碱对人高转移肺癌细胞与脐静脉内皮细胞黏附的影响*

胡剑江¹, 方 蕾², 邢 军³, 闫 寒¹, 郝 钰⁴, 邱全璞⁴, 黄启福⁴, 王 毅^{1△}

(¹ 中国中医科学院医学实验中心,北京 100700; ²中国医科大学 90K 11B,辽宁 沈阳 110041;

³长春职业病医院,吉林 长春 130021; ⁴北京中医药大学基础医学院,北京 100029)

[摘要] 目的: 探讨小檗碱对人高转移肺癌细胞株 PG 细胞与人脐静脉内皮细胞(HUVECs)黏附的影响及其机制。方法:用 MTT 法检测不同浓度(2.5-40 mg/L)的小檗碱对 HUVECs 增殖的影响,用 2.5、5 和 10 mg/L 小檗碱分别处理人高转移肺癌细胞株 PG 细胞 6、12 和 24 h,用虎红染色法测定小檗碱对 PG 细胞与 HUVECs 黏附能力的影响,用荧光抗体染色法测定小檗碱对 PG 细胞表面黏附分子 CD44s 表达的影响,用双光子各向异性度成像系统观察小檗碱对 PG 细胞膜流动性的影响。结果:(1)2.5、5 和 10 mg/L 小檗碱作用 HUVECs 6、12 和 24 h 后对其生长无影响。(2)用不同浓度小檗碱处理 PG 细胞 6、12 和 24 h 后,与 TNF- α 刺激后的 HUVECs 相互作用后,能够显著抑制其黏附率,且呈浓度依赖性($P < 0.05$, $P < 0.01$)。(3)各剂量组的小檗碱均能使 PG 细胞表面的 CD44s 分子表达增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。(4)小檗碱作用 PG 细胞 24 h 后能够抑制 PG 细胞膜的流动性,且随药物浓度的升高这种抑制作用增强。结论:小檗碱对 PG 细胞与 HUVECs 的黏附具有抑制作用,可能与小檗碱增加 PG 细胞表面黏附分子表达、降低其细胞膜流动性有关。

[关键词] 小檗碱; PG 细胞; 血管内皮细胞; 黏附; 细胞膜流动性

[中图分类号] R285; R73

[文献标识码] A

Effect of berberine on the adhesion between human umbilical vein endothelial cells and human pulmonary carcinoma cells

HU Jian-jiang¹, FANG Qiang², XING Jun³, YAN Han¹, HAO Yu⁴, QIU Quan-ying⁴, HUANG Qi-fu⁴, WANG Yi¹

(¹Experimental Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; ²90K 11B, China Medical University, Shenyang 110041, China; ³Changchun Occupational Disease Hospital, Changchun 130021, China; ⁴The School of Basic Medical Science, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China. E-mail: wangyi02@tsinghua.org.cn)

[ABSTRACT] AIM: To study the mechanism of berberine on the adhesion between human pulmonary carcinoma cells (PG cells) and HUVECs. METHODS: The effect of berberine (2.5-40 mg/L) on the proliferation of HUVECs was detected by MTT method. Further, PG cells were treated with berberine at doses of 2.5, 5, 10 mg/L for 6, 12, 24 h. The adhesion between PG cells and HUVECs was determined by rose bengal staining. The expression of CD44s on PG cells were determined by fluorescence antibody staining. Fluorescence anisotropy imaging system was used to assay the fluidity of PG cell membrane. RESULTS: Berberine at concentrations of 2.5, 5, 10 mg/L were the safety doses to the proliferation of HUVECs treated for 6, 12, 24 h. Berberine inhibited the adhesion between PG cells and HUVECs significantly in a dose-dependent manner ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Meanwhile, berberine increased the expression of CD44s on PG cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Berberine decreased the fluidity of PG cell membrane in a dose-dependent manner after 24 h incubation. CONCLUSION: Berberine inhibits the adhesion between PG cells and HUVECs by regulating the expression of adhesion molecules and the fluidity of cell membrane on PG cells.

[KEY WORDS] Berberine; PG cells; Vascular endothelial cells; Adhesion; Cell membrane fluidity

[收稿日期] 2008-06-17 [修回日期] 2008-11-12

* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30600842)

△通讯作者 E-mail: wangyi02@tsinghua.org.cn

小檗碱是清热解毒中药黄连、黄柏等植物中的主要活性成分,属异喹啉生物碱,是消化系统感染的常用药。目前,关于小檗碱新的药效不断被发现,尤其是它具有较好的抗肿瘤^[1]、降血糖和改善心脑血管功能的药效^[2-4],越来越受到人们的重视。

我们以前的研究表明^[5],小檗碱对人高转移肺癌细胞株(PG细胞)增殖具有抑制作用,与调节细胞内活性氧自由基产生从而影响细胞周期进程有关。为了进一步探讨其抗肿瘤作用的机制,本研究以人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cell, HUVECs)与PG细胞间的黏附过程模拟肿瘤转移的起始阶段,探讨小檗碱抑制肿瘤转移的机制。

材 料 和 方 法

1 材料

1.1 主要试剂 小檗碱购自北京生物制品检定所;M199培养基、RPMI-1640培养基、胎牛血清为Gibco产品;内皮细胞生长因子(endothelial cell growth factor, ECGF)为BM产品;明胶、I型胶原酶、肝素、重组人TNF- α 、虎红为Sigma产品;FITC标记的单克隆抗体荧光探针:FITC-CD44sAb为Bio legend产品;Hepes、丙酮酸钠、谷氨酰胺、胰蛋白酶均购自Sigma;青霉素、链霉素由华北制药厂生产;碳酸氢钠、无水乙醇由北京益利精细化学品有限公司生产;EDTA购自北京欣经科生物技术有限公司;6孔细胞培养板、96孔细胞培养板及荧光板均购自Costar。

1.2 实验仪器 激光共聚焦显微镜为Bio-Rad产品(MRC 1024ES);高效能荧光读板机(CytoFluor)为BMG产品。

2 方法

2.1 HUVECs的分离与培养^[6] 取健康产妇正常分娩的胎儿脐带(海淀妇幼保健院产科提供),除去残血,用0.01 mol/L PBS灌入反复冲洗至洗液无色,灌入0.1% I型胶原酶5-8 mL,置于37℃水浴中消化15 min;用PBS冲洗静脉将消化液与冲洗液一同收集入离心管,1500 r·min⁻¹ 4℃离心10 min;去上清,加入5 mL完全M199重悬细胞后,移入50 mL细胞培养瓶(预先用1%明胶包被)。置于5% CO₂、37℃培养箱中培养,约2-3 d融合成单层细胞后,即可进行传代。实验用第2-5代细胞。

2.2 小檗碱对HUVECs增殖的影响 用PBS将小檗碱配成终浓度分别为2.5、5、10、20和40 mg/L的溶液,过滤除菌,4℃保存。96孔板内HUVECs生长至适宜密度时,加入不同浓度小檗碱,置于5% CO₂、

37℃培养箱中培养6、12和24 h后,加入MTT 100 μ L/well,4 h后,弃上清,加入二甲基亚砷(200 μ L/well),于酶标仪上检测570 nm吸光度值(A),以表示细胞增殖水平。

2.3 PG与HUVECs的黏附实验 PG细胞由北京市广安门医院肿瘤科惠赠。当传代培养的HUVECs融合生长成单层时,加入TNF- α (1 \times 10⁶ U/L)继续培养6、12和24 h后,弃上清,用PBS洗2次后加入用不同浓度小檗碱培养6、12和24 h的PG细胞(5 \times 10⁵ cells/well),5% CO₂、37℃培养箱中继续培养1 h;之后用PBS轻洗去未黏附细胞,加入0.25%虎红(100 μ L/well),室温作用10 min后洗去游离虎红,每孔加PBS-无水乙醇(1:1)200 μ L,室温作用1 h后用酶标仪570 nm处测A值。

为动态了解药物在分别作用于PG或TNF- α 激活状态下的HUVECs 6、12和24 h后,对细胞黏附的影响趋势,不同组间采用细胞黏附抑制率的方法^[6]进行比较:细胞黏附抑制百分率=1-(实验孔A值均值/对照孔A值均值) \times 100%。

2.4 PG细胞表面黏附分子CD44s的表达 PG细胞与不同浓度小檗碱共同作用6、12和24 h后,弃上清,分别加入FITC-antiCD44sAb,37℃标记20 min, PBS洗2遍后,用荧光读板仪(激发光波长为488 nm)测量荧光强度。

2.5 小檗碱对PG细胞膜流动性的影响 用DPH标记PG细胞(37℃ 20 min),按照我们以前建立的方法^[7],用双光子荧光各向异性度成像测定系统测定荧光的各向异性度(FA),以此反映PG细胞膜流动性变化(即FA值高,细胞膜流动性低)。

3 统计学处理

数据均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间显著性差异用*t*检验方法进行比较。

结 果

1 小檗碱对HUVECs增殖的影响

如表1所示,小檗碱(2.5、5和10 mg/L)与HUVECs作用(6、12和24 h)后,在各时点均没有明显诱导HUVECs死亡的迹象;而当浓度增加到20 mg/L和40 mg/L时,作用HUVECs 6 h后就可导致其死亡,且与对照组相比有显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。由于HUVECs是机体的正常组织,所选择的小檗碱浓度不应对其具有毒性,因此我们在以下的实验中选择对HUVECs无毒性作用的浓度(2.5、5、10 mg/L)进行实验观察。

表1 小檗碱对 HUVECs 增殖的影响

Tab 1 Effect of berberine on the proliferation of HUVECs ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Time(h)	Berberine(mg/L)	A value
6	Control	0.275 ± 0.013
	2.5	0.268 ± 0.008
	5	0.271 ± 0.009
	10	0.253 ± 0.015
	20	0.239 ± 0.012 **
12	Control	0.222 ± 0.013
	2.5	0.226 ± 0.010
	5	0.226 ± 0.009
	10	0.217 ± 0.019
	20	0.203 ± 0.013 *
24	Control	0.227 ± 0.009
	2.5	0.232 ± 0.019
	5	0.226 ± 0.025
	10	0.215 ± 0.014
	20	0.182 ± 0.010 **
	40	0.173 ± 0.007 **

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

2 小檗碱对 PG 与 HUVECs 黏附的影响

如表 2 所示,用小檗碱作用 PG 细胞 6 h 和 12 h 后,高浓度能抑制其对 HUVECs 的黏附,且与对照组相比具有显著差异($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);药物作用

表2 小檗碱作用 PG 后对 PG - HUVECs 黏附的影响

Tab 2 Effect of berberine on the adhesion between PG and HUVECs (PG pretreated with berberine) ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Time(h)	Berberine (mg/L)	A value	Inhibition rate (%)
6	Control	0.322 ± 0.014	
	2.5	0.321 ± 0.011	0.31
	5	0.323 ± 0.023	0
	10	0.291 ± 0.010 **	9.63
12	Control	0.423 ± 0.015	
	2.5	0.413 ± 0.008	2.00
	5	0.400 ± 0.031	5.44
	10	0.390 ± 0.020 *	7.80
24	Control	0.269 ± 0.019	
	2.5	0.223 ± 0.001 *	17.10
	5	0.209 ± 0.021 **	22.30
	10	0.195 ± 0.006 **	27.51

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

24 h 后,小檗碱各剂量组均能显著抑制 PG - HUVECs 的黏附($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且随浓度升高抑制作用增强。

3 小檗碱对 PG 细胞表面 CD44s 表达的影响

如表 3 所示,小檗碱作用于 PG 细胞 6、12 和 24 h 后,低、中、高浓度的小檗碱均能使 PG 细胞表面的 CD44s 分子表达增高,且与对照组相比均显著差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表3 小檗碱对 PG 细胞表面 CD44s 表达的影响

Tab 3 Effect of berberine on the expression of CD44s on PG cells ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Time(h)	Berberine(mg/L)	Fluorescence intensity
6	Control	32 235 ± 509
	2.5	33 804 ± 106 *
	5	34 133 ± 420 *
	10	33 301 ± 336 **
12	Control	34 620 ± 591
	2.5	34 531 ± 1 274 *
	5	36 284 ± 537 *
	10	33 855 ± 468 *
24	Control	36 428 ± 746
	2.5	35 142 ± 720 *
	5	32 136 ± 621 *
	10	39 657 ± 852 **

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

4 小檗碱对 PG 细胞膜流动性的影响

如图 1 及表 4 所示,用 2.5、5 和 10 mg/L 小檗碱分别作用 PG 细胞 24 h 后加入 DPH,结果表明,与对照组(A)的 FA 值相比,随着小檗碱浓度的增加,PG 细胞的 FA 值变大,且呈浓度依赖性。

表4 小檗碱对 PG 细胞膜流动性的影响(24 h)

Tab 4 Effect of berberine on the fluidity of cell membrane of PG cell for 24 h ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Time(h)	Berberine(mg/L)	Fluorescence anisotropy value
24	Control	0.60 ± 0.01
	2.5	0.96 ± 0.05 *
	5	0.99 ± 0.12 *
	10	1.12 ± 0.04 **

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

讨 论

近年来,许多传统中药在其原有的药效基础上又发现了新的抗肿瘤作用,其低毒低成本的优势作

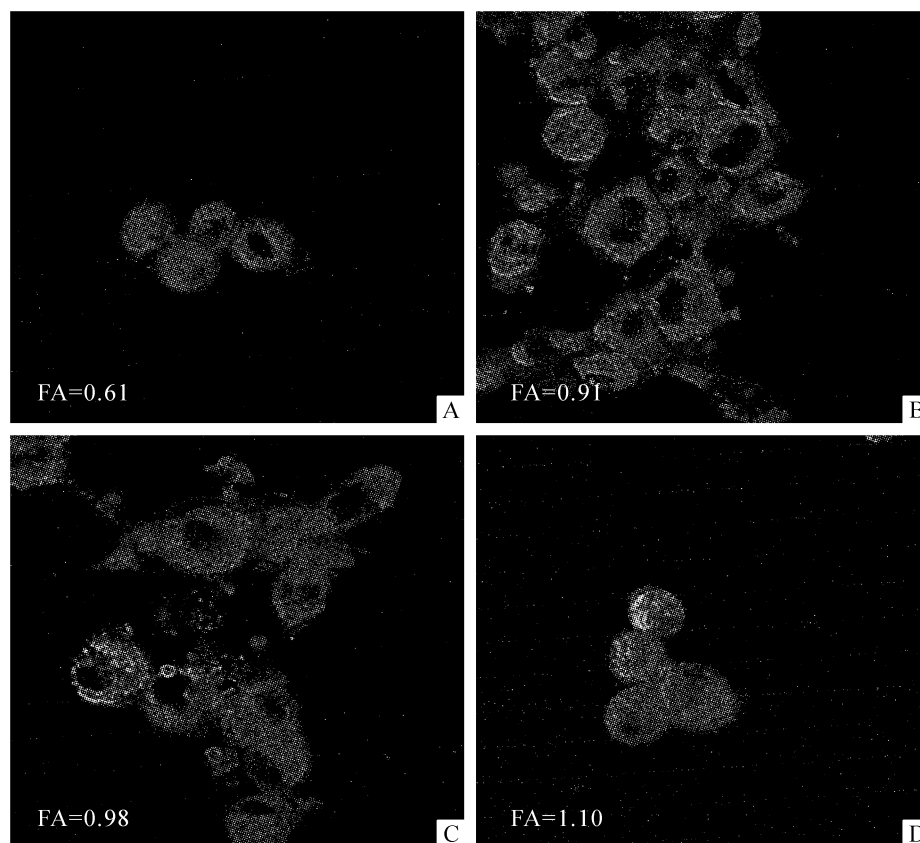


Fig 1 Effect of berberine on the fluidity of cell membrane of PG cell for 24 h. A: without berberine; B: berberine 2.5 mg/L; C: berberine 5 mg/L; D: berberine 10 mg/L; FA: fluorescence anisotropy.

图1 小檗碱对PG细胞膜流动性的影响(24 h)

为治疗肿瘤的替代疗法日益得到人们的重视,在美国已将含有小檗碱的7种中药作为癌症治疗的辅助药,取得良好的效果。研究发现,小檗碱可通过促进PG细胞间的同质黏附及抑制其对细胞外基质的黏附和侵袭能力等方式来达到抗肿瘤转移的目的^[8,9]。文献报道小檗碱具有抑制多种肿瘤细胞生长的作用^[10-12]。

患肿瘤时,机体发生免疫应答反应产生一系列的细胞因子,这些因子使血管内皮细胞发生病理性改变,导致肿瘤细胞与内皮细胞发生黏附。据报道,试验动物在接种肿瘤之前注射炎性细胞因子(IL-1)或TNF- α ^[13],能促使瘤细胞停留在靶器官上并引起肿瘤转移增多。肿瘤细胞与特定脏器血管内皮细胞的锚定黏附被认为是器官特异性转移关键性的第一步^[14]。在本研究中,为模拟体内过程,故将HUVECs用TNF- α 进行预处理后再与PG细胞进行相互作用。

我们通过一系列实验探讨了小檗碱对PG细胞与HUVECs细胞黏附的影响。一方面,我们用小檗碱处理PG细胞后与未受药物影响的HUVECs黏附,并测定同等条件下小檗碱对PG细胞表面黏附分子

表达的影响。另一方面,我们用小檗碱处理TNF- α 诱导的HUVECs细胞后与未受药物影响的PG细胞黏附,并测定相同条件下小檗碱对TNF- α 诱导的HUVECs表面黏附分子的影响(结果待发表)。从小檗碱两条作用途径分析出小檗碱对PG细胞与HUVECs细胞黏附的影响,并推断小檗碱对肿瘤转移的作用及机制。

从小檗碱作用PG细胞后影响PG-HUVECs黏附的实验中可以看出:小檗碱作用PG6和12 h后,高浓度(10 mg/L)能抑制其对HUVECs的黏附;药物作用24 h后,小檗碱各剂量组均能显著抑制PG-HUVECs的黏附,且随浓度升高抑制作用增强。

在肿瘤侵袭转移中,癌细胞与癌细胞、血管内皮细胞及胞外基质之间的黏附与解离在转移扩散中起决定性作用。这种黏附与解离是通过细胞黏附分子(cellular adhesion molecules, CAMs)的介导来实现的。CD44是一种跨膜透明质酸(hyaluronan/hyaluronic acid, HA)受体,在淋巴细胞成熟和归巢过程起重要作用的细胞表面黏附分子。可介导细胞与透明质酸黏附,并调节细胞的移动能力,CD44蛋白在肿瘤生长和转移中起重要作用。CD44具有不同的变

异异构体(CD44s及CD44v),有报道CD44s的下调可促进肿瘤的转移^[15]。

我们在实验中观察了PG细胞表面CD44s分子表达的情况,发现经小檗碱作用后CD44s在PG细胞表面的表达增高,说明小檗碱可通过促进PG表达CD44s分子抑制肿瘤细胞的转移。

生物膜流动性是生物膜结构的基本特征之一,适宜的流动性是膜蛋白行使正常功能如物质转运、能量转换和细胞免疫等的必要条件。一些研究表明^[11],肿瘤细胞膜的流动性高于正常细胞,与膜中胆固醇含量减少有关。有实验表明^[12],三苯氧胺可通过降低膜的流动性,恢复肿瘤细胞间的接触抑制,从而起到防止乳腺恶性肿瘤细胞转移的作用。因此推测,小檗碱可能能够通过抑制PG细胞膜的流动性而抑制PG与HUVECs间的黏附。此外,我们以前的工作还证明^[7],小檗碱可降低PG细胞表面CD44s分子的流动性,由于CD44s分子的跨膜结构特点,本实验结果进一步证明了小檗碱抑制PG与HUVECs间的黏附,可能通过抑制PG细胞膜及镶嵌于其表面的CD44s分子的流动性有关。

[参 考 文 献]

- [1] Katiyar SK, Meeran SM, Katiyar N, et al. p53 cooperates berberine - induced growth inhibition and apoptosis of non - small cell human lung cancer cells *in vitro* and tumor xenograft growth *in vivo* [J]. *Mol Carcinog*, 2009, 48(1): 24 - 37.
- [2] 余园媛,王伯初,彭亮,等. 黄连的药理研究进展 [J]. *重庆大学学报(自然科学版)*, 2006, 29(2): 107 - 111.
- [3] 庞玉生. 四氢小檗碱对心血管系统的药理作用 [J]. *广西医学*, 2001, 23(3): 533 - 535.
- [4] 吕俊华,张世平,潘竞锵. 小檗碱对D - 半乳糖诱导糖基化模型大鼠血糖、血脂和肝肾功能的影响 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2007, 13(1): 47 - 49.
- [5] 蒋艳,王毅,郝钰,等. 小檗碱对人高转移肺癌系(PG)细胞增殖的影响及机制研究 [J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(11): 2170 - 2173.
- [6] Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, et al. Culture of human endothelial cell derived from umbilical veins identification by morphologic and immunologic criteria [J]. *J Clin Invest*, 1973, 52(11): 2745 - 2756.
- [7] 汪雪峰,王毅,蒋艳,等. 双光子激发荧光各向异性度的成像 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2005, 32(2): 161 - 167.
- [8] 郝钰,徐伯文,王谦,等. 小檗碱对高转移性人巨细胞肺癌PG细胞黏附特性的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2006, 22(11): 1025 - 1031.
- [9] Hao Y, Xu BW, Zheng H, et al. Effect of berberine on invasion and migration of PG cells from a high metastatic human giant lung carcinoma cell line [J]. *中国病理生理杂志*, 2007, 23(3): 474 - 478.
- [10] Iizuka N, Miyamoto K, Okita K, et al. Inhibitory effect of coptidis rhizoma and berberine on the proliferation of human esophageal cancer cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2000, 148(1): 19 - 25.
- [11] Thirupurasundari CJ, Padmini R, Devaraj SN. Effect of berberine on the antioxidant status, ultrastructural modifications and protein bound carbohydrates in azoxymethane - induced colon cancer in rats [J]. *Chem Biol Interact*, 2009, 177(3): 190 - 195.
- [12] Rosenkranz V, Wink M. Alkaloids induce programmed cell death in bloodstream forms of trypanosomes (*Trypanosoma b. brucei*) [J]. *Molecules*, 2008, 13(10): 2462 - 2473.
- [13] Orosz P, Kruger A, Hubbem, et al. Promotion of experiment liver metastasis by tumor necrosis factor [J]. *Int J Cancer*, 1995, 60(6): 867 - 871.
- [14] Kieda C. How endothelial cell organo - specificity mediates circulating cell homing [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2003, 51(2): 81 - 89.
- [15] Takahashi K, Takahashi F, Hiramama M, et al. Restoration of CD44s in non - small cell lung cells enhanced their susceptibility to the macrophage cytotoxicity [J]. *Lung Cancer*, 2003, 41(2): 145 - 153.