

# 榄香烯乳联合更昔洛韦对C6脑肿瘤干细胞侵袭能力及TIMP-1 mRNA表达的影响

陈 强\*,段 青(德州市中医院神经外科,山东德州 253000)

中图分类号 R965;R361\*.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)34-4826-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.34.19

**摘要** 目的:研究榄香烯乳联合更昔洛韦对C6脑肿瘤干细胞(BTSCs)侵袭能力及组织金属蛋白酶抑制物1(TIMP-1)mRNA表达的影响。方法:从大鼠C6恶性胶质瘤细胞株中分离培养传代3次的细胞,采用免疫细胞化学法检测其中干细胞标志物CD133、Nestin蛋白表达情况。将20只大鼠随机分为空白对照组(生理盐水)、更昔洛韦组(ig,216 mg/kg)、榄香烯乳组(尾iv,36 mg/kg)和联用组(ig更昔洛韦216 mg/kg+尾iv榄香烯乳36 mg/kg),每组5只,每天给药1次,连续给药10 d。于末次给药后2 h采集各组大鼠血液并分离血清,分别与C6 BTSCs在体外培养基中共同培养24 h。采用Boyden侵袭试验检测C6 BTSCs的细胞侵袭能力,实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)法测定C6 BTSCs的TIMP-1 mRNA表达情况。结果:传代3次后的细胞中CD133、Nestin蛋白有明显表达,表明其为BTSCs。与空白对照组比较,更昔洛韦组、榄香烯乳组和联用组C6 BTSCs的细胞侵袭率均明显下降、TIMP-1 mRNA表达均明显增强,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与更昔洛韦组和榄香烯乳组比较,联用组C6 BTSCs的细胞侵袭率明显下降、TIMP-1 mRNA表达明显增强,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论:榄香烯乳联合更昔洛韦可明显抑制C6 BTSCs的细胞侵袭,其作用机制可能与促进TIMP-1的生成有关,且联用效果强于单用。

**关键词** C6恶性胶质瘤细胞株;脑肿瘤干细胞;榄香烯乳注射液;更昔洛韦分散片;细胞侵袭;组织金属蛋白酶抑制物1

## Effect of Elemene Emulsion Injection Combined with Ganciclovir on Invasive Ability and TIMP-1 mRNA Expression in C6 Brain Tumor Stem Cells

CHEN Qiang, DUAN Qing (Dept. of Neurosurgery, Dezhou City Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong Dezhou 253000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To study the effect of Elemene emulsion combined with ganciclovir on invasive ability and TIMP-1 mRNA expression in C6 brain tumor stem cells. METHODS: Cells with 3 generations were isolated and cultured from rats' C6 malignant glioma cell lines, and immunocytochemistry was adopted to detect the protein expressions of stem cell markers CD133, Nestin. 20 rats were randomly divided into blank control group (normal saline), ganciclovir group (intragastrically administrated, 216 mg/kg), Elemene emulsion injection group (intravenously injected in tail, 36 mg/kg) and combination group (intragastrically administrated 216 mg/kg of ganciclovir+intravenously injected 36 mg/kg of Elemene emulsion injection in tail), 5 in each group, once every day, for 10 d. After 2 h of last administration, the blood of rats in each group was collected, serum was isolated and co-cultured 24 h with C6 BTSCs in *in vitro* culture medium. Boyden invasion test was used to detect the invasive ability of C6 BTSCs, and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-PCR) method was used to determine the TIMP-1 mRNA expression of C6 BTSCs. RESULTS: Cells with 3 generations had obvious protein expressions in CD133 and Nestin, indicating they were BTSCs. Compared with blank control group, the cell invasion rates of C6 BTSCs in ganciclovir group, Elemene emulsion injection group and combination group were obviously decreased, TIMP-1 mRNA expression was obviously enhanced, with statistical significances ( $P<0.05$ ). Compared with ganciclovir group and Elemene emulsion injection group, the cell invasion rate of C6 BTSCs in combination group was obviously decreased, TIMP-1 mRNA expression was obviously enhanced, with statistical significances ( $P<0.05$ ). CONCLUSIONS: Elemene emulsion injection combined with ganciclovir can obviously inhibit the cell invasion of C6 BTSCs, the mechanism may be associated with promoting the TIMP-1 generation, and combination use shows better effect than single use.

**KEYWORDS** C6 malignant glioma cell lines; Brain tumor stem cells; Elemene emulsion injection; Ganciclovir dispersible tablets; Cell invasion; Tissue inhibitor of metalloproteinase 1

脑肿瘤干细胞(Brain tumor stem cells, BTSCs)是从脑肿瘤(尤其是恶性脑肿瘤)中分离的具有“干细胞”特

\* 副主任医师。研究方向:神经外科。电话:0534-2725036。E-mail: pansir@126.com

征的种子细胞<sup>[1]</sup>。不同于干细胞的是,BTSCs的增殖与自我更新能力更强,离体培养时传代次数也更多,因此被认为是引发脑肿瘤并维持其浸润性生长、复发及转移的主要细胞源<sup>[2]</sup>。目前,对于脑肿瘤的治疗主要依靠化

疗、放疗及手术等手段。有研究表明,含烷化剂的药物联合化疗方案治疗后患者2年内生存率低于30%,中位生存时间也不足15个月;放疗虽然可以提高治疗效果,但其受到放疗剂量的限制,且某些肿瘤细胞对放疗敏感性低;手术并无法对肿瘤进行彻底有效的根治,加上脑肿瘤复发率极高,因此众多疗法在脑肿瘤方面的临床疗效仍不能令人满意<sup>[3]</sup>。近年来,神经细胞学及电子显微技术的重大进步,极大地丰富了国内外学者对脑肿瘤发生、发展机制的认识,自2002年最早发现并成功分离BTSCs后,国内外学者便致力于对BTSCs进行研究。随着中医药在医学领域的发展,双氢青蒿素、喜树碱、山豆根等中药成分已被证实具有明显的抗癌作用<sup>[4]</sup>。榄香烯为中药温郁金中的主要活性成分,研究证实其细胞毒性小、不易产生耐药现象、无骨髓抑制,且由于榄香烯分子量较小,极易透过血脑屏障(Blood brain barrier, BBB)<sup>[5]</sup>,近年来已成为主治肿瘤的处方药物<sup>[6]</sup>。更昔洛韦为目前临床常用的广谱抗病毒药,可在多个靶点抑制病毒DNA进行复制,抗病毒活性极强,加之其分子量不大,同样也极易透过BBB<sup>[7]</sup>。有研究表明,莪术、白花蛇舌草等中药复方提取物与更昔洛韦联合应用对于肿瘤血管的生成抑制效果显著<sup>[8]</sup>。本研究将榄香烯乳与更昔洛韦联合应用,观察其对BTSCs侵袭能力以及组织金属蛋白酶抑制物1(TIMP-1)mRNA表达的影响,初步探讨榄香烯乳联合更昔洛韦是否可以抑制肿瘤细胞侵袭及其分子调控机制,以期为临床抗脑肿瘤治疗提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

G16型高速离心机(北京白洋医用离心机有限公司,离心半径:5.60 cm);Prism<sup>®</sup> 7000型实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(美国应用生物系统公司);CX23型荧光显微镜[奥林巴斯(中国)有限公司];4XC-TV型光倍显微镜(莱州莱华试验仪器厂);U-1810DS型紫外分光光度仪[屹谱仪器制造(上海)有限公司]。

### 1.2 药品与试剂

榄香烯乳注射液(大连华立金港药业有限公司,批号:H10960114,规格:20 mL:0.1 g);更昔洛韦分散片(湖北东信药业有限公司,批号:H20110082,规格:每片0.25 g);兔抗人干细胞标志物CD133一抗、兔抗大鼠肝细胞标志物Nestin一抗和Matrigel基质胶(美国BD公司);Alexa Fluor 488标记的羊抗人免疫球蛋白G(IgG)、Alexa Fluor 610标记的羊抗兔IgG二抗(美国Molecular Probes公司);多聚甲醛、结晶紫、Hoechst 33342染色液(上海远慕生物科技有限公司);Gibco<sup>®</sup>胎牛血清(FBS,美国Thermo Fisher公司);DMEM/F12培养基(上海博升生物科技有限公司);Transwell小室(美国Millipore公司);碱性成纤维生长因子、表皮生长因子(美国Sigma公司);B-27添加剂(美国Invitrogen公司);RT-PCR试剂

(威斯腾生物医药科技有限公司);Trizol试剂盒[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]。

### 1.3 细胞与动物

大鼠C6恶性胶质瘤细胞株(上海细胞所)。SD大鼠,♂,体质量240~260 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,生产合格证号:SCXK(京)2011-0011,使用许可证号:SYXK(鲁)2011-0034。本实验在我院实验动物伦理委员会审核并同意的情况下进行。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

先用普通培养基(含10%优质胎牛血清的DMEM/F12培养基)对C6恶性胶质瘤细胞在37℃、相对湿度95%、5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养。当细胞生长达到对数生长期时,按照3×10<sup>3</sup>个/cm<sup>2</sup>的密度在无血清培养基(质量浓度均为20 ng/mL的碱性成纤维生长因子与表皮生长因子、质量浓度为20 μg/mL的B-27添加剂)中再继续培养,2~3 d换液1次;6 d时消化制备成单细胞悬液,并以相同的密度接种在24孔板中。传代3次后作为C6 BTSCs进行下一步试验。

### 2.2 免疫细胞化学法检测细胞中CD133、Nestin蛋白的表达

为了证实“2.1”项下传代3次后的细胞已经是BTSCs,笔者将分离得到的细胞倒去培养基后用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗2次,多聚甲醛固定30 min,再用PBS洗涤3次。加封闭液进行封闭,1 h后加兔抗人CD133一抗于湿盒中,4℃条件下孵育过夜。然后继续加入Alexa Fluor 488标记的羊抗人IgG、Alexa Fluor 610标记的羊抗兔IgG二抗于37℃条件下孵育1 h。最后再加Hoechst 33342染色液,10 min后用PBS洗涤3次并用盖玻片进行封固,用荧光显微镜进行观察细胞中CD133、Nestin蛋白表达情况。

### 2.3 分组、给药及含药血清制备

将20只SD大鼠按随机数字表法分为空白对照组、更昔洛韦组、榄香烯乳组和联用组,每组5只。更昔洛韦组大鼠ig给予以生理盐水溶解稀释的更昔洛韦分散片,给药剂量为216 mg/kg;榄香烯乳组大鼠尾iv给予榄香烯乳注射液,给药剂量为36 mg/kg,药物剂量均参考《药理实验方法学》大鼠与人临床等效剂量表设定;联用组大鼠先ig给予更昔洛韦216 mg/kg进行抗病毒治疗,间隔0.5 h后,尾iv给予榄香烯乳36 mg/kg;空白对照组大鼠给予等量生理盐水。各组大鼠每天给药1次,连续给药10 d,于末次给药2 h后采集大鼠血液并分离血清。

### 2.4 C6 BTSCs与给药血清的体外培养

用无血清培养基对C6 BTSCs进行培养,当细胞生长达到对数生长期时分别加入10%的空白对照组、更昔洛韦组、榄香烯乳组和联用组大鼠的分离血清,继续培养24 h。

## 2.5 Boyden 侵袭试验检测细胞侵袭率

用 100  $\mu\text{L}$  Matrigel 基质胶将 Transwell 小室上室的底膜包被,分别在 2 个下室中添加 200  $\mu\text{L}$  的趋化液,将包被 Matrigel 基质胶底膜的上室套入其中一个下室,并以没有铺 Matrigel 基质胶的上室作为对照组。调整并配制细胞密度为  $2.5 \times 10^8$  个/L 的含药血清 C6 BTSCs 单细胞悬浮液,取 200  $\mu\text{L}$  分别加入 2 个上室中,37  $^\circ\text{C}$  条件下培养 20 h 后,取出上室,弃去残留细胞及 Matrigel 基质胶,并加入 300  $\mu\text{L}$  的 70% 甲醇进行固定,0.5 h 后用 PBS 洗涤 3 次。加 300  $\mu\text{L}$  的苏木精染液进行染色,10 min 后用双蒸水漂洗 3 次,盖玻片封膜,使用光倍显微镜放大 400 倍观察并计数,计算细胞侵袭率(%) [试验组穿膜细胞数/对照组(无 Matrigel 基质胶)穿膜细胞数  $\times 100\%$ ]。试验重复 5 次。

## 2.6 RT-PCR 法检测细胞中 TIMP-1 mRNA 表达

按照 Trizol 试剂盒说明书用氯仿提取细胞的总 RNA,反转录成 cDNA 并以此作为模板进行 PCR 扩增。反应参数:95  $^\circ\text{C}$  预变性 15 min;94  $^\circ\text{C}$  变性 1 min,58  $^\circ\text{C}$  退火 1 min,72  $^\circ\text{C}$  延伸 1 min,35 个循环;72  $^\circ\text{C}$  延伸 10 min 终止反应。用紫外分光光度计测定吸光度。以  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)为内参,以 TIMP-1 与内参吸光度的比值表示 TIMP-1 mRNA 相对表达量。PCR 反应扩增引物序列见表 1。

表 1 PCR 反应扩增引物序列

Tab 1 Primer sequence of PCR reaction amplification

基因	引物序列	片段大小, bp
TIMP-1	上游 5'-TCCCCAGAAATCATTTTAAG-3'	143
	下游 5'-ACGGCTGTCTAGCATAGGT-3'	
$\beta$ -actin	上游 5'-GAGCTATGAGCTGCTGTGAT-3'	125
	下游 5'-AGCACTTGCGGTCCGTGTTTC-3'	

## 2.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 细胞中 CD133 与 Nestin 蛋白表达

经免疫荧光染色后,CD133 表达呈强绿色荧光,Nestin 呈强红色荧光。传代 3 次后的细胞中 CD133、Nestin 蛋白有明显表达,表明细胞确为 C6 BTSCs。免疫荧光染色图见图 1。

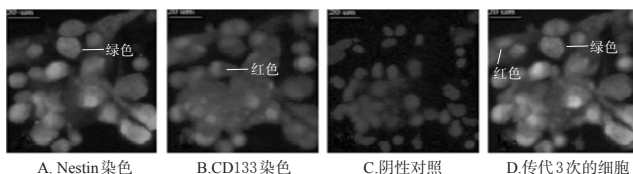


图 1 免疫荧光染色图( $\times 400$ )

Fig 1 Immunofluorescence staining( $\times 400$ )

### 3.2 细胞侵袭率

与空白对照组比较,更昔洛韦组、榄香烯乳组和联用组 C6 BTSCs 的细胞侵袭率均明显下降,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与更昔洛韦组和榄香烯乳组比较,联用组 C6 BTSCs 的细胞侵袭率明显下降,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组 C6 BTSCs 的细胞侵袭率结果见表 2。

表 2 各组 C6 BTSCs 的细胞侵袭率和 TIMP-1 mRNA 表达情况比较( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 2 Comparison of invasive rate of C6 BTSCs and TIMP-1 mRNA expression in each group( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

组别	细胞侵袭率, %	TIMP-1 mRNA
空白对照组	$0.96 \pm 0.12$	$0.684 \pm 0.121$
更昔洛韦组	$0.87 \pm 0.08^*$	$0.772 \pm 0.118^*$
榄香烯乳组	$0.81 \pm 0.05^*$	$0.836 \pm 0.153^*$
联用组	$0.76 \pm 0.07^{**}$	$0.876 \pm 0.079^{**}$

注:与空白对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与更昔洛韦组和榄香烯乳组比较,\*\* $P < 0.05$

Note: vs. blank control group, \* $P < 0.05$ ; vs. ganciclovir group and Elemene emulsion injection group, \*\* $P < 0.05$

### 3.3 细胞中 TIMP-1 mRNA 表达

与空白对照组比较,更昔洛韦组、榄香烯乳组和联用组 C6 BTSCs 中 TIMP-1 mRNA 表达均明显增强,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与更昔洛韦组和榄香烯乳组比较,联用组 C6 BTSCs 中 TIMP-1 mRNA 表达明显增强,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组 C6 BTSCs 中 TIMP-1 mRNA 表达结果见表 2。

## 4 讨论

脑肿瘤(尤其是恶性胶质瘤)是临床致死率比较高的肿瘤之一。目前常用的临床疗法包括手术、放疗、化疗、加压氧疗以及基因靶向疗法等,但由于恶性胶质瘤呈侵袭性生长,造成其与正常脑组织的界限并不能完全区分,因此给手术切除治疗造成极大的困难,即使凭借神经细胞学及影像学等高度发展的现代医学,手术治疗也无法彻底完整切除肿瘤组织;放疗、化疗等疗法对骨髓、消化道等的副作用大,某些肿瘤细胞对此也并不敏感,造成如今脑肿瘤临床效果均不佳,加之复发率较高,给患者的生理与心理造成极大的消极影响<sup>[9]</sup>。脑肿瘤的高复发率主要依赖于胶质瘤细胞可以迅速增殖,并且具有较强的浸润性及耐受性。研究发现,在肿瘤早期某些胶质瘤细胞已经沿血管外间隙、白质束及室管膜等进行浸润<sup>[10]</sup>。而有研究表明,BTSCs 具有类似“神经干细胞”的生物学特征,可以在体内分化成神经元,进而表达 CD133 与 Nestin 等表面标记物<sup>[11]</sup>。因此,成功分离获得 BTSCs 并以此为靶标找到有效治疗方法,对于胶质瘤的治疗与预后将有重要的临床意义。

温郁金是中药中行气活血化瘀的药物。中医认为,血瘀是肿瘤形成的重要原因之一,瘀血是肿瘤的病理产



物。榄香烯乳注射液是中药温郁金主要抗癌成分榄香烯的注射剂,榄香烯是一种小分子化合物,分子量为204.36。已有大量文献表明,榄香烯可以透过BBB,临床治疗脑恶性胶质瘤有效率可以达到70%以上;且其毒性甚微,对骨髓几乎无毒副作用,不易产生耐药,既可以杀伤肿瘤组织,又能保证正常器官不被伤害,因而是临床化疗的理想药物<sup>[5]</sup>。更昔洛韦作为一种广谱性抗病毒药,可通过病毒腺激酶对DNA聚合酶进行竞争性抑制,被病毒所诱生的蛋白酶磷酸化后可直接渗入病毒DNA链阻止其延长;由于更昔洛韦分子量也较小,因此极易透过BBB。目前,已有研究表明榄香烯乳注射液对恶性脑肿瘤患者疗效满意<sup>[6]</sup>,但联合更昔洛韦对C6 BTSCs的细胞侵袭能力及TIMP-1 mRNA的表达影响如何目前尚未见报道。本研究通过培养大鼠C6 BTSCs,观察榄香烯乳联合更昔洛韦对其侵袭能力以及TIMP-1 mRNA表达的影响,初步探讨联用后是否可抑制肿瘤细胞侵袭及分子调控机制,以期为榄香烯乳临床抗脑肿瘤治疗提供实验基础。

CD133与Nestin是具有增殖及多向分化能力的神经干细胞的特异性标记物<sup>[10]</sup>。在本实验中,首先从原代肿瘤组织中成功分离并纯化出BTSCs,并用免疫细胞化学法对CD133及Nestin进行了检测,以确定传代细胞的干细胞特征。

Boyden侵袭试验是模拟肿瘤细胞体外侵袭能力的可靠模型,多用于侵袭机制的研究,该模型中的Matrigel胶质胶与人类基底膜的基本成分相似,因而含有层黏蛋白、IV型胶原等成分。在恶性肿瘤的侵袭与转移过程中,肿瘤细胞必须通过形态的改变及分泌蛋白酶使细胞外基质(Extracellular matrix, ECM)降解从而穿透基底膜,方可进入血管、淋巴进行转移<sup>[12]</sup>。本研究采用Boyden侵袭小室技术,测定了C6 BTSCs在空白对照、更昔洛韦、榄香烯乳、联用药4种血清干预下侵袭基底膜情况,结果表明榄香烯乳与更昔洛韦联用可以显著抑制C6 BTSCs的体外侵袭能力。

目前,国内外学者的研究表明,ECM纤维所生成的网状结构对肿瘤细胞的生成、浸润与转移具有阻碍作用<sup>[13]</sup>。基质金属蛋白酶家族中的基质金属蛋白酶9(Matrix metalloproteinase, MMP-9)则是调节ECM代谢的最主要限速酶,可以降解ECM及基底膜,增强肿瘤细胞的侵袭和转移能力。TIMP-1是MMP-9的高特异性抑制剂,通过与酶原MMP-9以非共价的方式结合,可延缓或阻碍后者向激活型MMP-9的转化,从而抑制MMP-9参与降解ECM,达到减缓肿瘤细胞的侵袭和转移的目的<sup>[14]</sup>。本研究发现,榄香烯乳注射液与更昔洛韦联用可以通过促

进TIMP-1 mRNA的表达,从而抑制MMP-9对ECM的降解,最终起到抑制C6 BTSCs侵袭和转移的作用,为榄香烯乳与更昔洛韦联用于抗BTSCs的侵袭转移提供了初步的实验依据。

## 参考文献

- [1] 刘昊,杨海城.脑肿瘤干细胞相关研究进展[J].医学综述,2014,20(19):3508-3509.
- [2] Mendoza FHD, Rodriguez EA. *Cancer stem cells in brain tumors*[M]. Berlin: Springer Netherlands, 2014:229-243.
- [3] 吴艳林,蔡政,张明智,等.双氢青蒿素抑制胶质瘤干细胞侵袭迁移的机制[J].中国组织工程研究,2016,20(6):765-770.
- [4] 刘建民,黄良文,胡鹏,等.活血化瘀中药对C6脑肿瘤干细胞侵袭能力及TIMP1 mRNA表达的影响[J].新中医,2013,45(8):192-194.
- [5] 徐雪香,庄志明.榄香烯乳的药理作用与临床应用进展[J].海峡药学,2001,13(2):7-8.
- [6] 陈俊,缪亦峰,钟皎,等.榄香烯乳注射液联合放疗治疗恶性脑胶质瘤的临床观察[J].临床肿瘤学杂志,2010,15(11):1017-1019.
- [7] 吕婷婷,高景云,鲁晓晴,等.中药联合更昔洛韦对HCMV阳性脑肿瘤干细胞移植瘤的作用[J].青岛大学医学院学报,2016,52(6):634-638.
- [8] 秦铁城,文海斌,陈珮,等.莪术提取物诱导人脑恶性胶质瘤CHG-5细胞凋亡的实验研究[J].现代中西医结合杂志,2013,22(27):2980-2983.
- [9] 许森林.高侵袭性肿瘤细胞的干性特征及临床意义研究[D].重庆:第三军医大学,2011.
- [10] 仇波,杜江,张东勇,等.人脑胶质瘤组织培养的干细胞样细胞具有体外高侵袭能力[J].中国肿瘤生物治疗杂志,2012,19(2):128-132.
- [11] 齐玲,金宏,丁丽娟,等. CD133免疫磁珠分选脑肿瘤干细胞及其生物学特性[J].吉林大学学报(医学版),2011,37(3):441-444.
- [12] 沈培亮,刘兆国,王旭,等.肿瘤ECM纤维生成与肿瘤转移研究进展[J].中国药理学通报,2015,31(11):1485-1488.
- [13] 胡梅艳,孙晓红.细胞外基质、基质金属蛋白酶与恶性肿瘤关系的研究进展[J].肿瘤药学,2016,6(1):26-30.
- [14] Okada R, Naito M, Hattori Y, et al. Matrix metalloproteinase 9 gene polymorphisms are associated with a multiple family history of gastric cancer[J]. *Gastric Cancer*, 2017,20(2):246-253.

(收稿日期:2017-04-21 修回日期:2017-07-20)

(编辑:邹丽娟)