

伊维菌素对人胃癌细胞BGC-823、MGC-803迁移和侵袭的影响及机制研究^Δ

谢燕娇^{1*}, 邝少轶², 邓慧鸣³, 虞道锐², 樊好飞², 贾皓², 刘 嫱^{2#}(1.海南省人民医院药剂科,海口 570311;2.海南医学院药理学教研室,海口 571199;3.海南医学院第一附属医院胃肠肿瘤外科,海口 570102)

中图分类号 R735.2;R361[†].3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0621-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.09

摘要 目的:研究伊维菌素对人胃癌细胞BGC-823、MGC-803迁移和侵袭能力的影响及其作用机制。方法:0、2.5、5、10、20、40 μmol/L伊维菌素分别作用于BGC-823、MGC-803细胞24 h后用MTT法检测细胞抑制率,再采用Transwell小室侵袭实验观察5 μmol/L伊维菌素和含0.67%二甲亚砜的磷酸盐缓冲液(对照组)作用24 h对BGC-823、MGC-803细胞迁移和侵袭的影响,Western blot法分别检测5、10 μmol/L伊维菌素和含0.67%二甲亚砜的磷酸盐缓冲液(对照组)作用于BGC-823、MGC-803细胞24 h后上皮-间质转化(EMT)标记物E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail和EMT转导通路转化生长因子β(TGF-β)/Smad中TGF-β₁、TGF-βR、Smad2、Smad3蛋白的表达水平。结果:伊维菌素对BGC-823、MGC-803细胞生长均有抑制作用,其细胞抑制率与其浓度呈正相关。与对照组比较,5 μmol/L伊维菌素作用后BGC-823、MGC-803细胞的迁移数和侵袭数均明显减少($P<0.01$ 或 $P<0.001$);5、10 μmol/L伊维菌素作用后BGC-823、MGC-803细胞中E-cadherin蛋白表达明显增强($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$),N-cadherin、Vimentin、Snail、TGF-βR、Smad2、Smad3蛋白表达均明显减弱($P<0.05$ 或 $P<0.01$ 或 $P<0.001$),TGF-β₁蛋白仅在10 μmol/L伊维菌素作用后明显减弱($P<0.05$)。结论:伊维菌素能显著抑制BGC-823、MGC-803细胞的迁移和侵袭,其可能与抑制TGF-β/Smad活性从而影响EMT过程有关。

关键词 伊维菌素;人胃癌细胞BGC-823;人胃癌细胞MGC-803;转化生长因子β/Smad;细胞迁移;细胞侵袭

Effects of Ivermectin on Migration and Invasion of Human Gastric Cancer Cells BGC-823 and MGC-803 and Its Mechanism

XIE Yanjiao¹, KUANG Shaoyi², DENG Huiming³, YU Daorui², FAN Haofei², JIA Hao², LIU Qiang² (1.Dept. of Pharmacy, Hainan Provincial People's Hospital, Haikou 570311, China; 2.Dept. of Pharmacology, Hainan Medical College, Haikou 571199, China; 3.Dept. of Gastrointestinal Tumor Surgery, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical College, Haikou 570102, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the effects of ivermectin on the migration and invasion of human gastric cancer cell lines BGC-823 and MGC-803 and its mechanism. METHODS: After treated with 0, 2.5, 5, 10, 20, 40 μmol/L ivermectin for 24 h, inhibitory rate of human gastric cancer cell lines BGC-823 and MGC-803 were detected by MTT assay. Effects of 5 μmol/L ivermectin and phosphate buffercontaining 0.67% dimethyl sulfoxide (control group) for 24 h on the migration and invasion of gastric cancer cells BGC-823 and MGC-803 were observed by Transwell chamber invasion assay. Western blot assay was used to detect the protein expression of TGF-β₁, TGF-βR, Smad2 and Smad3 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Snail and EMT transduction pathway TGF-β/smud of BGC-823 and MGC-803 cells after treated with 5, 10 μmol/L ivermectin and phosphate buffercontaining 0.67% dimethyl sulfoxide (control group) for 24 h. RESULTS: Ivermectin could inhibit the growth of BGC-823 and MGC-803, inhibitory rate of it was positively correlated with its concentration. Compared with control group, the number of migration and invasion BGC-823 and MGC-803 cells were decreased significantly after treated with 5 μmol/L ivermectin ($P<0.01$ or $P<0.001$); the expression of E-cadherin protein was enhanced significantly in BGC-823 and MGC-803 cells after treated with 5 and 10 μmol/L ivermectin ($P<0.05$ or $P<0.01$ or $P<0.001$); the protein expression of N-cadherin, Vimentin, Snail, TGF-βR, Smad2 and Smad3 were decreased significantly ($P<0.05$, $P<0.01$ or $P<0.001$); protein expression of TGF-β₁ was decreased significantly after treated with 10 μmol/L ivermectin ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Ivermectin can significantly inhibit the migration and invasion of gastric cancer cells BGC-823 and MGC-803,

^Δ 基金项目:海南省自然科学基金(No.817132);大学生国家创新课题(No.201611810061)

* 主管药师。研究方向:肿瘤药理学。E-mail:xie089801@163.com

通信作者:教授,博士。研究方向:肿瘤药理学。E-mail:Liu-qiang200709@126.com

and inhibiting the biological activity of EMT by reducing the expression of TGF-β/smud pathway is one of the mechanisms that inhibit the migration and invasion of gastric cancer cells.

KEYWORDS Ivermectin; Human gastric cancer cell BGC-823; Human gastric cancer cell MGC-803; TGF-β/Smad; Cell migration; Cell invasion

胃癌是全球最常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率和病死率在恶性肿瘤疾病中位居前列^[1]。Lancet发布的2000—2014年全球癌症生存率变化趋势监测研究报告显示,我国胃癌的5年生存率仅为35.9%,明显低于韩国(68.9%)、日本(60.3%)等发达国家^[2]。由于胃癌的早期临床症状不明显,当确诊时多数已为中、晚期并伴有远处转移^[3]。虽然有研究表明,腹腔镜微创切除术结合亚叶酸钙、奥沙利铂、氟尿嘧啶新辅助化疗方案用于进展期胃癌具有显著疗效,但患者的远期存活率仍然很低,而胃癌细胞向邻近器官侵袭和远处转移是影响胃癌患者生存期的主要因素之一^[4-5]。目前转移性胃癌的治疗方式主要是以手术和放化疗为主,但手术清除率低、放化疗副作用大一直影响着转移性胃癌的治疗效果^[6]。因此,寻找新的转移性胃癌的治疗方式已成为亟待解决的医学问题。

伊维菌素(Ivermectin)是在日本Kitasato研究所发现由放线菌阿维链霉菌发酵产生的16元大环内酯化合物,属于阿维菌素类,是新型抗寄生虫药,还广泛用于农业、兽医和水产养殖等行业,具有高效、广谱、低毒等特点^[7-9]。有研究表明,伊维菌素可作为线粒体功能障碍和氧化损伤的诱导物从而具有抑制肾癌细胞生长的作用^[10],也能够诱导乳腺癌细胞自噬增加进而抑制细胞的生长^[11],还可以作为肿瘤细胞多药耐药的抑制剂^[12]。由此可见,伊维菌素不仅有望作为抗肿瘤药物在临床上推广应用,还可作为“老药新用”节约抗肿瘤新药的研发成本。上皮-间质转化(Epithelial mesenchymal transitions, EMT)是肿瘤细胞向周围浸润和远处转移的重要机制,当肿瘤发生EMT后,肿瘤细胞间黏附能力下降,浸润和转移能力增强,从而突破基底膜侵入肿瘤周围组织或进入血液循环向远处转移^[13]。已有多项研究表明,EMT与结肠癌、胃癌、肺癌细胞的转移和侵袭密切相关^[14-16]。因此,本文结合国内外的研究现状,探讨伊维菌素是否能够抑制人胃癌细胞BGC-823、MGC-803的迁移和侵袭及其作用机制,以期为伊维菌素的合理应用提供参考。

1 材料

1.1 仪器

3111二氧化碳培养箱(美国Thermo公司);BX43正置荧光显微镜(日本Olympus公司);SW-CJ-2D超净工作台(苏州净化设备有限公司);SpectraMax plus384全波长酶标仪(美国MD公司);TGL-16M台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);TDZ6B-W5台式低速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司);ChemiDoc XRS+System凝胶成像仪和Mini-Protein Tetra System电泳转印系统(美国Bio-Rad公司)。

1.2 药品与试剂

伊维菌素对照品(上海麦克林生化科技有限公司,批号:1854556,纯度:≥98%);RPMI-1640培养基、0.25%胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(Trypsin-EDTA)、青链双抗、胎牛血清(FBS)均购于美国Gibco公司;MTT试剂盒(批号:022817170401)、二辛可宁酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(批号:112416170410)均购于上海碧云天生物技术有限公司;Transwell小室和基质胶均购自美国Corning公司;兔抗E-钙黏蛋白(E-cadherin)、神经钙黏附蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、编码锌指蛋白转录因子(Snail)、1型转化生长因子β(TGF-β₁)、转化生长因子β受体(TGF-βR)、Smad2、Smad3、β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体和山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)抗体均购自美国Abcam公司。

1.3 细胞

人胃癌细胞BGC-823、MGC-803均购自中国科学院上海细胞库。

2 方法

2.1 MTT法检测胃癌细胞抑制率

选取处于对数生长期的BGC-823、MGC-803细胞,0.25%胰蛋白酶消化后,用含10% FBS的RPMI-1640完全培养基悬浮制成单细胞悬液,计数后调整细胞密度,按每孔 5×10^3 个/100 μL接种于96孔板,待细胞贴壁后,加入伊维菌素浓度分别为2.5、5、10、20、40 μmol/L的含0.67%二甲亚砜(DMSO)的磷酸盐缓冲液(PBS)(后文均称为伊维菌素溶液),同时设置对照组加入含0.67% DMSO的PBS(由于DMSO含量极少,后文均称为PBS),每组设5个复孔,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h,于终止培养前4 h加入10 μL MTT(5 mg/mL),继续37℃孵育4 h,弃去培养液,每孔加入150 μL DMSO,用全波长酶标仪在570 nm下测定吸光度(A值),计算细胞抑制率(%)=1-给药组A值/对照组A值×100%。

2.2 Transwell小室试验检测细胞的迁移和侵袭

2.2.1 迁移 选取处于对数生长期的BGC-823、MGC-803细胞,0.25%胰蛋白酶消化细胞,用PBS洗2遍,无血清的RPMI-1640培养基重悬,调整细胞密度至 5×10^5 mL⁻¹。上室均匀加入200 μL细胞悬液,试验组再加入伊维菌素溶液5 μmol/L,对照组加入相应体积的PBS;下室加入含10% FBS的RPMI-1640培养基600 μL,每组设5个复孔,置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h,取出上室,用棉签擦去上室细胞,PBS漂洗后用多聚甲醛固定15 min,弃固定液,0.1%结晶紫染液染色10 min,PBS洗3遍,每次10 min,显微镜下摄片并计数结晶紫染色的细胞迁移数。

2.2.2 侵袭 将Transwell小室置于24孔板内,每孔铺

基质胶 50 μL ,再按“2.2.1”项下条件加入细胞和药液,每组设5个复孔,置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养24 h后,刮除上室中的基质胶和细胞,按“2.2.1”项下方法固定、染色,显微镜下摄片并计数结晶紫染色的细胞侵袭数。

2.3 Western blot法检测细胞中E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail、TGF- β_1 、TGF- βR 、Smad2、Smad3蛋白的表达

选取处于对数生长期的BGC-823、MGC-803细胞,按 1×10^5 个/孔接种于6孔板,待细胞贴壁后分别给予伊维菌素5、10 $\mu\text{mol/L}$ (伊维菌素低、高浓度组)以及PBS(对照组),置于37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养24 h后,提取总蛋白,BCA蛋白定量试剂盒定量分析蛋白浓度,加入5 \times 十二烷基硫酸钠(SDS)加样缓冲液混合,95%变性10 min,SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)凝胶电泳,转膜,5%脱脂奶粉封闭2 h,分别加入EMT标志蛋白抗体[兔抗E-cadherin(1:1 000)、N-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)、Snail(1:1 000)单克隆抗体]、TGF- β /Smad通路蛋白抗体[TGF- β_1 (1:1 000)、TGF- βR (1:1 000)、Smad2(1:1 000)、Smad3(1:1 000)单克隆抗体]和内参抗体[β -actin(1:1 000)单克隆抗体],4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后按1:2 000加山羊抗兔IgG抗体,室温孵育2 h,洗膜,采用增强化学发光试剂盒曝光,Quantity one图像分析软件分析目的条带和内参条带的A值,计算相对表达量。试验重复3次。

2.4 统计学方法

细胞迁移和侵袭数量用ImagePro Plus软件进行计数,蛋白表达的灰度值用Image J软件测定,统计图用GraphPad Prism 6软件制作,数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用SPSS 21.0软件进行统计分析,组间差异采用单因素方差分析和Student's *t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞抑制率

与对照组比较,2.5、5、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的伊维菌素对BGC-823细胞的抑制率分别为 0.12 ± 0.04 、 0.25 ± 0.03 、 0.34 ± 0.06 、 0.43 ± 0.03 、 0.55 ± 0.04 ,差异均有统计学意义($P < 0.05$);对MGC-803细胞的抑制率分别为 0.09 ± 0.03 、 0.24 ± 0.04 、 0.43 ± 0.07 、 0.62 ± 0.04 、 0.79 ± 0.03 ,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结果表明,伊维菌素对BGC-823、MGC-803细胞的生长均有明显的抑制作用,且伊维菌素浓度越高、抑制作用越强,呈明显的量效关系。伊维菌素对BGC-823、MGC-803细胞抑制率的影响见图1。

3.2 迁移和侵袭

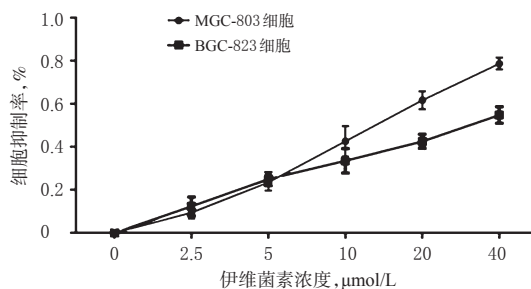


图1 伊维菌素对BGC-823、MGC-803细胞抑制率的影响($n=5$)

Fig 1 Effects of ivermectin on inhibitory rates of BGC-823 and MGC-803 cells($n=5$)

3.2.1 迁移 试验组BGC-823、MGC-803细胞的迁移数分别为 (49.8 ± 17.0) 、 (37.0 ± 8.1) 个($n=5$),均明显少于对照组的 (125.2 ± 12.5) 、 (83.4 ± 13.2) 个($n=5$),差异均有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。2组BGC-823、MGC-803细胞迁移的显微镜图见图2,测定结果见图3。

3.2.2 侵袭 试验组BGC-823、MGC-803细胞的侵袭数分别为 (51.4 ± 15.6) 、 (34.0 ± 6.5) 个($n=5$),明显少于对照组的 (130.0 ± 18.0) 、 (67.0 ± 8.5) 个($n=5$),差异均有统计学意义($P < 0.001$)。2组BGC-823、MGC-803细胞侵袭的显微镜图见图4,测定结果见图5。

3.3 EMT标志蛋白表达

与对照组比较,伊维菌素低、高浓度组BGC-823、MGC-803细胞中E-cadherin蛋白的表达明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),N-cadherin、Vimentin、Snail蛋白表达明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。表明伊维菌素可能是通过影响胃癌细胞EMT过程从而抑制细胞的迁移和侵袭。3组BGC-823、MGC-803细胞中E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail蛋白表达的电泳图见图6,测定结果见图7。

3.4 TGF- β /smad信号通路蛋白表达

与对照组比较,除伊维菌素低浓度组BGC-823细胞中TGF- β_1 和MGC-803细胞中Smad3外,伊维菌素低、高浓度组BGC-823、MGC-803细胞中TGF- β_1 、TGF- βR 、Smad2、Smad3蛋白的表达均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。表明伊维菌素可能通过明显抑制TGF- β /smad信号通路活性,从而抑制EMT过程,进而减弱胃癌细胞的迁移和侵袭能力。3组BGC-823、MGC-803细胞中TGF- β_1 、TGF- βR 、Smad2、Smad3蛋白表达的电泳图见图8,测定结果见图9。

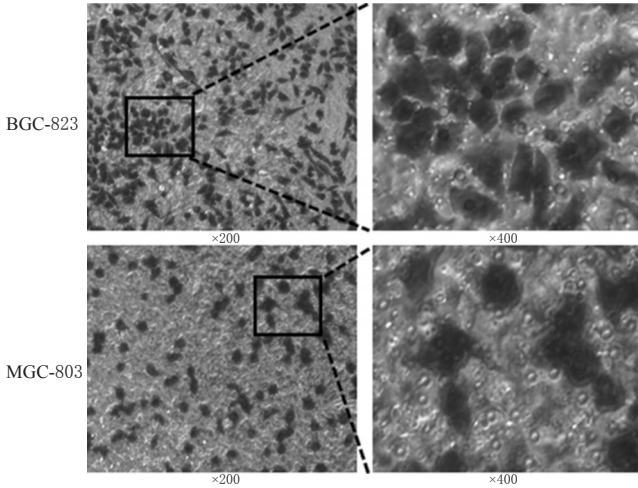
4 讨论

近年来多项研究报告表明,“老药新用”也是发展药物抗肿瘤治疗的新途径之一,例如阿司匹林和二甲双胍能明显提高结直肠癌患者的生存率^[17-18]。因老药具有众

所周知的药动学和药效学概况,所以与新研发的抗肿瘤药物相比,老药具有研究成本低、风险小、成功率高等优势。本研究结果发现,抗寄生虫药伊维菌素也可明显抑

制BGC-823、MGC-803细胞的生长,明显减弱其迁移和侵袭能力,这与国外Nambara S等^[19]学者报道一致,提示伊维菌素具有发展为抗肿瘤药物的潜力。

对照组:



试验组:

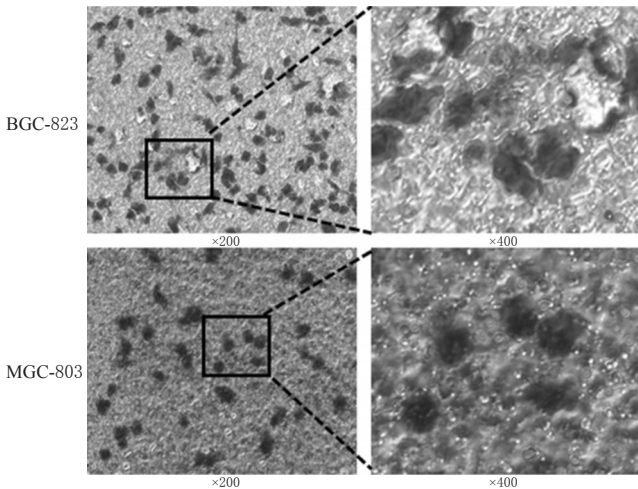
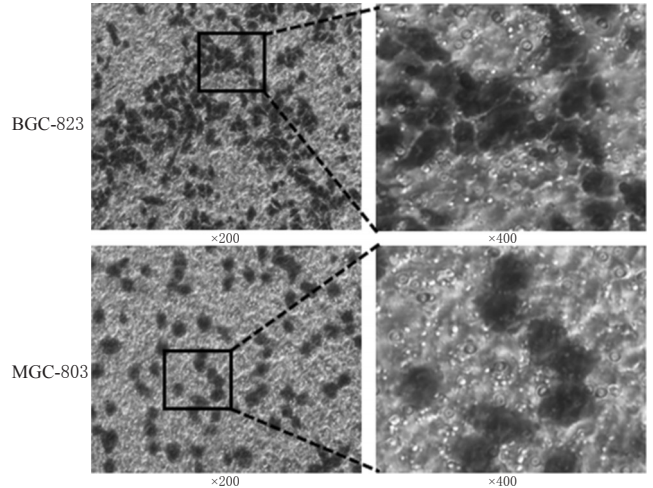


图2 2组BGC-823、MGC-803细胞迁移的显微镜图
Fig 2 Microscogram of the migration of BGC-823 and MGC-803 cells in 2 groups

对照组:



试验组:

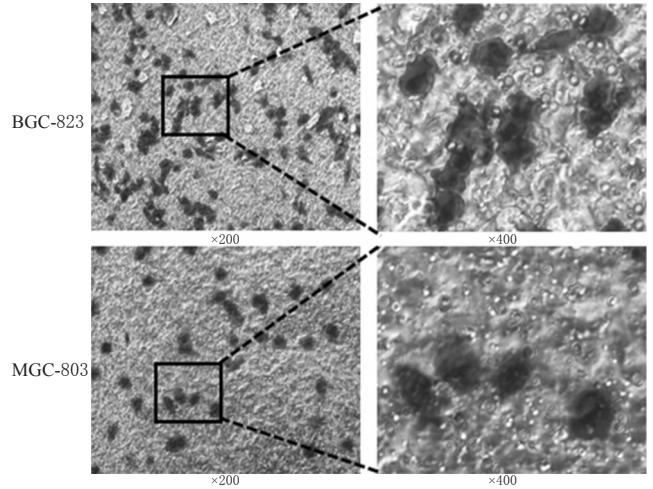
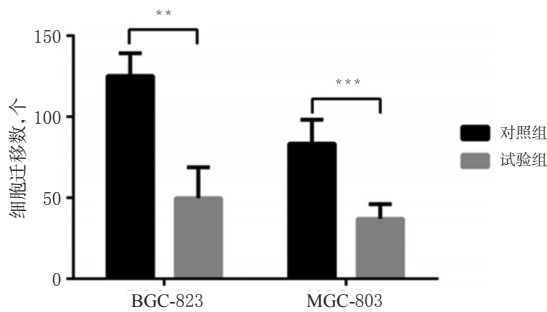


图4 2组BGC-823、MGC-803细胞侵袭的显微镜图
Fig 4 Microscogram of the invasion of BGC-823 and MGC-803 cells in 2 groups

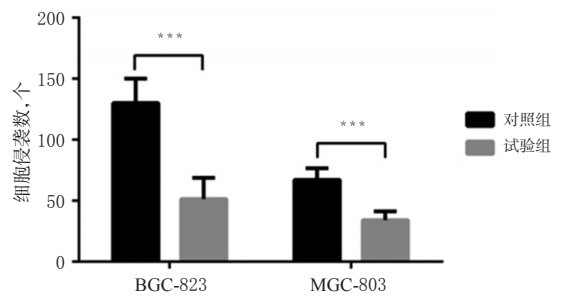


注:与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Note: vs. control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图3 2组BGC-823、MGC-803细胞迁移的测定结果 ($n=5$)

Fig 3 Migration of BGC-823 and MGC-803 cells in 2 groups ($n=5$)



注:与对照组比较, *** $P < 0.001$

Note: vs. control group, *** $P < 0.001$

图5 2组BGC-823、MGC-803细胞侵袭的测定结果 ($n=5$)

Fig 5 Invasion of BGC-823 and MGC-803 cells in 2 groups ($n=5$)

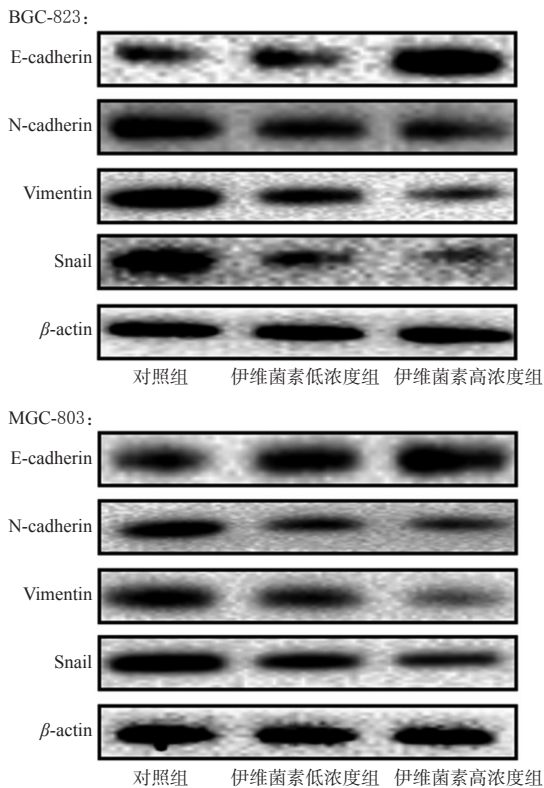
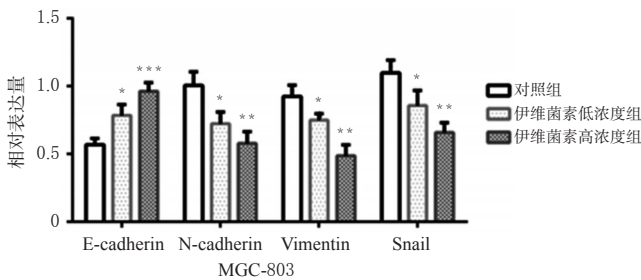
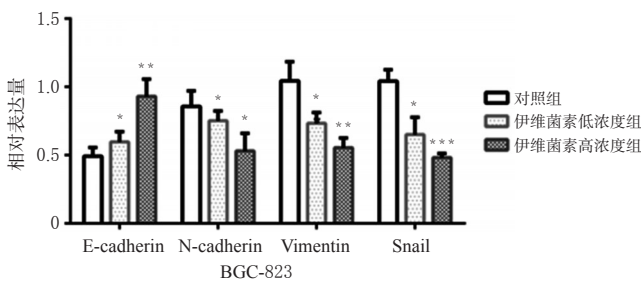


图 6 3组 BGC-823、MGC-803 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达的电泳图

Fig 6 Electrophoregram of protein expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Snail in BGC-823 and MGC-803 cells of 3 groups



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

Note: vs. control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,*** $P < 0.001$

图 7 3组 BGC-823、MGC-803 细胞中 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail 蛋白表达的测定结果($n=3$)

Fig 7 Protein expression of E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Snail in BGC-823 and MGC-803 cells of 3 groups($n=3$)

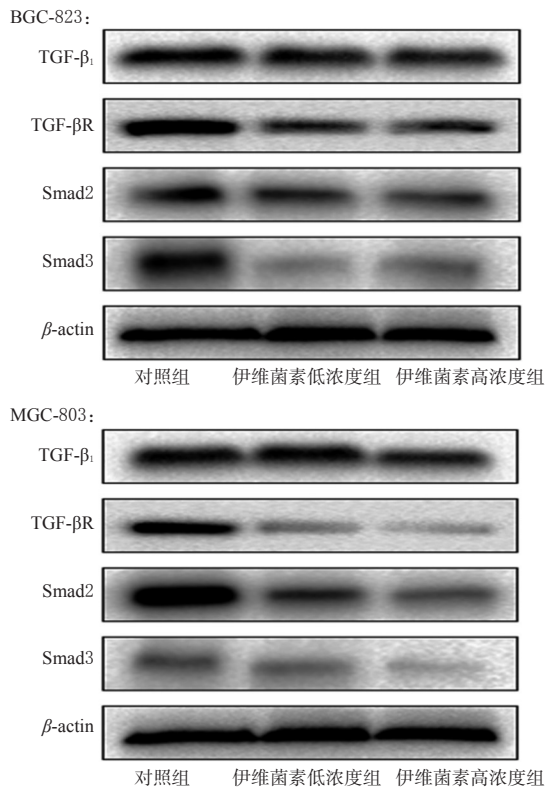
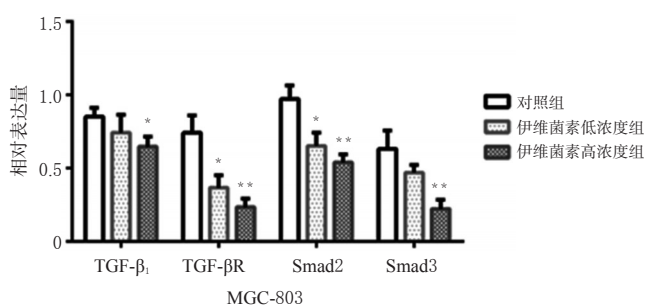
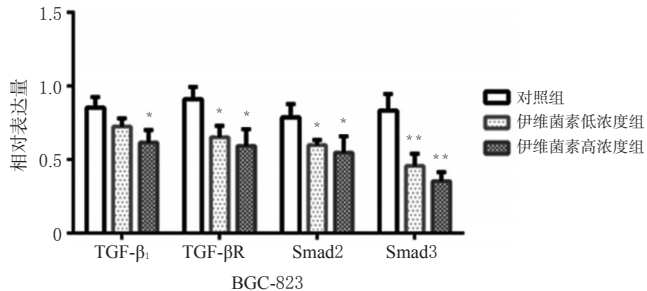


图 8 3组 BGC-823、MGC-803 细胞中 TGF- β_1 、TGF- β R、Smad2、Smad3 蛋白表达的电泳图

Fig 8 Electrophoregrams of protein expression of TGF- β_1 , TGF- β R, Smad2 and Smad3 in BGC-823 and MGC-803 cells of 3 groups



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

图 9 3组 BGC-823、MGC-803 细胞中 TGF- β_1 、TGF- β R、Smad2、Smad3 蛋白表达的测定结果($n=3$)

Fig 9 Protein expression of TGF- β_1 , TGF- β R, Smad2 and Smad3 in BGC-823 and MGC-803 cells of 3 groups($n=3$)

EMT对肿瘤的迁移和侵袭起着重要的调节作用,在EMT过程中皮标志物E-cadherin的表达会降低,而间充质标志物N-cadherin、Vimentin、Snail蛋白的表达通常会增强^[20-21]。当由上皮组织衍生出来的肿瘤组织中E-cadherin的表达降低或者是缺失时(被认为是EMT的关键步骤),E-cadherin向N-cadherin转化并促进其表达,形态上由上皮细胞转化为具有间充质特征,这时具有间质细胞表型的上皮细胞活动性更强且具有较低的极性,进而增强肿瘤细胞的能动性和侵袭性^[22-23]。因此当靶向EMT抗肿瘤药物干预后,肿瘤细胞内常伴随着E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Snail蛋白的表达异常。本研究结果发现,伊维菌素可升高E-cadherin蛋白的表达,降低N-cadherin、Vimentin、Snail蛋白的表达,提示伊维菌素可通过调节EMT过程从而抑制BGC-823、MGC-803细胞的迁移和侵袭能力。

TGF- β 对肿瘤细胞有着双重调节作用,在肿瘤发生早期,TGF- β 可以促进肿瘤细胞凋亡抑制其生长,但在晚期TGF- β 可以促进肿瘤细胞转移,因此TGF- β 也是调节EMT过程的重要细胞因子^[24-25]。Smads蛋白是TGF- β 细胞内信号传导的重要蛋白,是将信号由胞浆传导至细胞核的承接者。转录因子Smads家族中Smad2、Smad3是TGF- β 转导通路下游关键的蛋白分子,属受体激活型,活化的TGF- β_1 与TGF- β R结合后活化Smad2、Smad3的磷酸化,与Smad4结合形成聚合物进入细胞核调节靶基因转录^[26]。有研究表明,TGF- β /Smad信号通路可通过调控EMT过程,对胰腺癌细胞和肝癌细胞的转移和侵袭发挥正性作用^[27-28]。因此笔者也推测伊维菌素可以影响TGF- β /Smad信号通路的表达。本研究结果表明,伊维菌素作用胃癌细胞24 h后,TGF- β_1 、TGF- β R表达明显降低,转录因子Smad2、Smad3的表达也降低,提示伊维菌素是通过抑制TGF- β /Smad的活性影响EMT过程,从而抑制BGC-823、MGC-803细胞的迁移和侵袭作用。

综上所述,伊维菌素具有抑制BGC-823、MGC-803细胞的迁移和侵袭作用,其作用机制可能为抑制TGF- β /Smad的活性从而影响EMT过程。但是其如何影响TGF- β /Smad信号通路调控EMT的作用机制尚需进一步研究。

参考文献

[1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):7-30.
 [2] ALLEMANNI C, MATSUDA T, DI CV, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): analysis of individual records for 37513025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 popula-

tion-based registries in 71 countries[J]. *Lancet*, 2018, 391(10125):1023-1075.

[3] GAMBARDELLA V, CERVANTES A. Precision medicine in the adjuvant treatment of gastric cancer[J]. *Lancet Oncol*, 2018, 19(5):583-584.
 [4] SHIDA A, MITSUMORI N, NIMURA H, et al. Prediction of lymph node metastasis and sentinel node navigation surgery for patients with early-stage gastric cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(33):7431-7439.
 [5] 杨立平, 李晓峰, 耿兴隆, 等. 进展期胃癌患者腹腔镜微创切除术前应用新辅助化疗的效果分析[J]. *中国药房*, 2017, 28(27):3797-3800.
 [6] LIAO X, CHAUDHARY P, QIU G, et al. The role of propranolol as a radiosensitizer in gastric cancer treatment[J]. *Drug Des Dev Ther*, 2018. DOI: 10.2147/DDDT.S160865.
 [7] OTTESEN EA, CAMPBELL W. Ivermectin in human medicine[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1994, 34(2):195-203.
 [8] CRUMP A. Ivermectin: enigmatic multifaceted 'wonder' drug continues to surprise and exceed expectations[J]. *J Antibiot*, 2017, 70(5):495-505.
 [9] BAI SH, OGBOME S. Eco-toxicological effects of the avermectin family with a focus on abamectin and ivermectin[J]. *Chemosphere*, 2016. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.03.113.
 [10] ZHU M, LI Y, ZHOU Z. Antibiotic ivermectin preferentially targets renal cancer through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative damage[J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2017, 492(3):373-378.
 [11] DOU Q, CHEN HN, WANG K, et al. Ivermectin induces cytosolic autophagy by blocking the PAK1/Akt axis in breast cancer[J]. *Cancer Res*, 2016, 76(15):4457-4469.
 [12] JUAREZ M, SCHCOLNIK-CABRERA A, DUENASGONZALEZ A. The multitargeted drug ivermectin: from an antiparasitic agent to a repositioned cancer drug[J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(2):317-331.
 [13] SAITOH M. Involvement of partial EMT in cancer progression[J]. *J Biochem*, 2018, 164(4):257-264.
 [14] NING Y, ZHANG W, HANNA DL, et al. Clinical relevance of EMT and stem-like gene expression in circulating tumor cells of metastatic colorectal cancer patients[J]. *Pharmacogenomics J*, 2018, 18(1):29-34.
 [15] ZHOU Q, ZHENG X, CHEN L, et al. Smad2/3/4 pathway contributes to TGF- β -induced mirna-181b expression to promote gastric cancer metastasis by targeting Timp3[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 39(2):453-466.
 [16] DING NH, ZHANG L, XIAO Z, et al. NEK4 kinase regulates EMT to promote lung cancer metastasis[J]. *Journal*

HPLC加校正因子的主成分自身对照法测定盐酸特拉唑嗪片中有关物质的含量^Δ

周燕丽^{1*}, 余永华^{2#}, 马佳丽³, 顾超群³, 谢明华¹(1. 杭州市余杭区第一人民医院药剂科, 杭州 311100; 2. 杭州新诺华医药有限公司, 杭州 310015; 3. 浙江中医药大学药学院, 杭州 310403)

中图分类号 R927.2; O657.72 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)05-0627-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.05.10

摘要 目的: 建立测定盐酸特拉唑嗪片中有关物质含量的方法。方法: 采用高效液相色谱加校正因子的主成分自身对照法。色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB C₁₈, 流动相为乙腈-高氯酸溶液(20:80, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 246 nm, 进样量为 20 μL, 柱温为 50 ℃; 绘制盐酸特拉唑嗪和杂质 A、B、C 的线性方程, 以斜率计算各杂质相对于盐酸特拉唑嗪的校正因子, 用相对保留时间确定各杂质位置, 测定 3 批盐酸特拉唑嗪片中杂质 A、B、C 的含量, 并与杂质对照品法测得的结果进行比较。结果: 盐酸特拉唑嗪杂质 A、B、C 的相对保留时间分别为 0.39、0.74、2.77, 检测质量浓度线性范围均为 0.25~3.0 μg/mL, 校正因子分别为 0.75、1.09、0.84, 检测限分别为 0.35、0.51、0.43 ng, 定量限分别为 0.70、1.02、0.86 ng。3 批盐酸特拉唑嗪片中杂质 A、B、C 的含量分别为 0.11%~0.13%、0.03%、0.09%~0.12%, 杂质 B 未检出; 与杂质对照品法测定结果一致。结论: 该方法简便快速, 可准确测定盐酸特拉唑嗪片中有关物质的含量。

关键词 盐酸特拉唑嗪片; 有关物质; 高效液相色谱法; 校正因子

- of Cellular and Molecular Medicine, 2018, 22 (12) : 5877-5887.
- [17] GARCIA-ALBENIZ X, CHAN AT. Aspirin for the prevention of colorectal cancer[J]. *Progress in Chemistry*, 2013, 25(4):461-472.
- [18] XIAO Y, ZHENG L, MEI Z, et al. The impact of metformin use on survival in prostate cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8 (59) : 100449-100458.
- [19] NAMBARA S, MASUDA T, NISHIO M, et al. Antitumor effects of the antiparasitic agent ivermectin via inhibition of yes-associated protein 1 expression in gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(64):107666-107677.
- [20] PRADELLA D, NARO C, SETTE C, et al. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression[J]. *Molecular Cancer*, 2017.DOI:10.1186/s12943-016-0579-2.
- [21] BANYARD J, BIELENBERG DR. The role of EMT and MET in cancer dissemination[J]. *Connective Tissue Research*, 2014, 56(5):403-413.
- [22] KUPHAL S, BOSSERHOFF AK. Influence of the cytoplasmic domain of E-cadherin on endogenous N-cadherin expression in malignant melanoma[J]. *Oncogene*, 2005, 25 (2):248-259.
- [23] ONDER TT, GUPTA PB, MANI SA, et al. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways[J]. *Cancer Research*, 2008, 68(10):3645-3654.
- [24] NEUZILLET C, TIJERAS-RABALLAND A, COHEN R, et al. Targeting the TGF-β pathway for cancer therapy[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2015.DOI:10.1016/j.pharmthera.2014.11.001.
- [25] LOVICU FJ, SHIN EH, MCAVOY JW. Fibrosis in the lens. Sprouty regulation of TGF-β signaling prevents lens EMT leading to cataract[J]. *Experimental Eye Research*, 2016.DOI:10.1016/j.exer.2015.02.004.
- [26] 倪鑫. PCGEM1 通过 TGF-β/smad 通路调节胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭[D]. 南京: 江苏大学, 2016.
- [27] THAKUR AK, NIGRI J, LAC S, et al. TAp73 loss favors Smad-independent TGF-β signaling that drives EMT in pancreatic ductal adenocarcinoma[J]. *Cell Death & Differentiation*, 2016, 23(8):1358-1370.
- [28] YI EY, PARK SY, JUNG SY, et al. Mitochondrial dysfunction induces EMT through the TGF-β/Smad/Snail signaling pathway in Hep3B hepatocellular carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5):1845-1853.

(收稿日期:2018-09-16 修回日期:2019-01-14)

(编辑:邹丽娟)

Δ 基金项目:浙江省中医药科技计划项目(No.2016ZA007)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0571-88369284。E-mail:154321525@qq.com

通信作者:工程师。研究方向:药品研发。电话:0571-88073919。E-mail:yhua85@sina.com