

冰片对血肿瘤屏障通透性的影响及机制

邢燕梅 闫晓宁 郭军洽 张 荣

摘要 目的 观察天然冰片对体外血肿瘤屏障(blood tumor barrier, BTB)模型通透性和丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)信号转导通路相关激酶表达与激活的影响。**方法** 大鼠 C6 脑胶质瘤细胞与人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)共培养建立 BTB 模型后,设空白组,冰片低、中、高剂量组(25、50、100 $\mu\text{g/mL}$),每组 7 个时点(0、10、30、60、120、180、240 min),每个时点 3 个样本。空白组在冰片组给药同时更换空白培养基,冰片组给不同剂量冰片,给药后不同时间点收集细胞。辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)流量测定 BTB 通透性,Western blot 检测细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK),磷酸化 ERK(phosphorylation extracellular signal regulated protein kinase, P-ERK),P38MAPK,磷酸化 P38MAPK(phosphor-P38, P-P38MAPK),氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和磷酸化 JNK(phosphorylation c-Jun N-terminal kinase, P-JNK)的表达。**结果** 与本组 0 min 比较,低、中、高剂量组各时间点通透率升高($P < 0.01$), P-ERK 表达先升高,在 30 min 达极高值,逐渐恢复初始水平($P > 0.05$)。与空白组比较,低剂量组 10~240 min HRP 通透率升高($P < 0.01$),30、60 min P-ERK 蛋白表达升高($P < 0.05$),低、中、高剂量组 180 min P-JNK 表达升高($P < 0.05$),240 min P-JNK 表达降低($P < 0.05$)。与低剂量组比较,中剂量组 10~180 min P-ERK 表达升高($P < 0.05$),30~180 min 通透率升高($P < 0.05$),180 min 和 240 min P-JNK 表达降低($P < 0.05$)。与中剂量组比较,高剂量组 10~180 min 通透率升高($P < 0.05$),10~180 min P-ERK 表达升高($P < 0.05$),180 min 和 240 min P-JNK 表达降低($P < 0.05$)。**结论** 冰片通过激活 MAPKs 信号通路的 ERK 磷酸化进而可逆性下调相关蛋白的表达,达到调节可逆性 BTB 开放的效果。

关键词 天然冰片;丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路;血肿瘤屏障

Effect of Borneol on the Permeability of Blood Tumor Barrier Model and Its Mechanism Study
XING Yan-mei, YAN Xiao-ning, GUO Jun-qia, and ZHANG Rong *Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong (510405)*

ABSTRACT Objective To observe the effect of natural borneol on the permeability of blood tumor barrier (BTB) model and the expression and activation of mitogen-activated protein kinase (MAPKs) signal transduction pathway related protein kinase *in vitro*. **Methods** C6 rat glioma cells and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were co-cultured to establish BTB model. Then 4 groups were set up, the blank control group, low, middle, and high dose borneol groups (25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$), 3 samples collected at 7 time points (0, 10, 30, 60, 120, 180, 240 min, respectively). Blank culture medium was exchanged in the blank control group while medication. Different doses of natural borneol were administered to the 3 borneol groups. Cells were collected at different time points. BTB permeability was determined using horseradish peroxidase (HRP). Expression levels of extracellular signal regulated protein kinase (ERK), phosphorylation extracellular signal regulated protein kinase (P-ERK), P38MAPK, phosphor-P38MAPK, c-Jun N-terminal kinase (JNK), and phosphorylation c-Jun N-terminal kinase (P-JNK) were detected using Western blot. **Results** Compared with the same group at min 0, the permeation rate obviously increased ($P < 0.01$) in the 3 borneol groups at the rest time points. P-ERK expression was elevated first, reached the

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81173379);广州中医药大学“薪火计划”资助项目(No. A1-AFD015141Z0233)

作者单位:广州中医药大学临床药理研究所(广州 510405)

通讯作者:张 荣, Tel: 020-36855408, E-mail: zhangrong@gzucm.edu.cn

DOI: 10.7661/CJIM.2016.06.0696

peak at 30 min, and gradually recovered to the initial level ($P > 0.05$). Compared with the blank control group, HRP permeation rate increased from 10 min to 240 min ($P < 0.01$), and expression of P-ERK protein increased at 30 min and 60 min ($P < 0.05$) in the low dose borneol group; expression of P-JNK protein decreased in the 3 borneol groups at 180 min and 240 min ($P < 0.05$). Compared with the low dose borneol group, expression of P-ERK protein increased from 10 min to 180 min ($P < 0.05$), HRP permeation rate increased from 30 min to 180 min ($P < 0.05$), expression of P-JNK protein decreased at 180 and 240 min ($P < 0.05$) in the middle dose borneol group. Compared with the middle dose borneol group, HRP permeation rate increased from 10 min to 180 min ($P < 0.05$), expression of P-ERK protein increased from 10 min to 180 min ($P < 0.05$), expression of P-JNK protein increased at 180 min and decreased at 240 min (both $P < 0.05$) in the high dose borneol group. Conclusion Natural borneol arrived at the effect of regulating reversible BTB patency possibly through activating phosphorylation of ERK in MAPKs signal transduction pathway, and further reversibly down-regulating expression of associated proteins.

KEYWORDS natural borneol; mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway; blood tumor barrier

脑胶质瘤作为神经系统最常见的恶性肿瘤,占全部颅内肿瘤的 40%~50%^[1],对家庭和社会的危害极大,已成为导致死亡的主要肿瘤之一。除毛细胞型星形细胞瘤及少数位于非功能区、体积较小的胶质瘤可以通过手术根治外,大部分脑胶质瘤需术后辅以放化疗为主的综合性治疗。

课题组前期体内研究显示,天然冰片能选择性开放血脑屏障(blood tumor barrier, BTB),增强抗肿瘤药物顺铂、甲氨蝶呤的 BTB 通透率,提高其脑内生物利用度。体内实验结果均显示,其选择性开放 BTB 的机制与可逆性下调紧密连接相关蛋白及附着蛋白(zonula occludens-1, ZO-1)、F-肌动蛋白(filamentous-actin, F-actin)有关^[2,3],但冰片如何调控紧密连接相关蛋白表达的分子机制还需进一步阐释。因此,本实验拟在前期成功建立 BTB 体外模型的基础上,通过检测丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)信号通路细胞外信号调节激酶(extracellular signal regulated protein kinase, ERK),磷酸化细胞外信号调节激酶(phosphorylation extracellular signal regulated protein kinase, P-ERK),P38MAPK,磷酸化 P38MAPK(P-P38MAPK),氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和磷酸化的氨基末端激酶(phosphorylation c-Jun N-terminal kinase, P-JNK)的表达,探讨天然冰片调控通透性的分子机制,为冰片进一步应用于临床,改善脑胶质瘤化疗效果提供理论依据。

材料与方法

1 细胞系 人脐静脉内皮细胞株(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs),购自中国

科学院上海细胞生物研究所细胞库,目录号 30-2001,10%胎牛血清 DMEM-f12 培养基常规培养;大鼠脑胶质瘤细胞株(C6),购自中国科学院上海细胞生物研究所细胞库,目录号 TCR1,含有 2.5%胎牛血清与 15%马血清的 F12k 培养基行常规培养。

2 药物 天然冰片,气相色谱检测其右旋龙脑的含量为 97.983%,符合 2010 版《中华人民共和国药典》规定,吉安市林科天然冰片厂,批号:080922。

3 试剂及仪器 胎牛血清(批号:16050-122)、马血清(批号:10099-141),美国 Gibco 公司;F12k 培养基(批号:21127-022),美国 Gibco 公司;DMEM-F12 培养基(批号:SME001),美国 Hyclone 公司;ERK 兔多克隆抗体(批号:9102),P-ERK 兔单克隆抗体(批号:4377),P38 兔单克隆抗体(批号:8690),JNK 兔单克隆抗体(批号:ab179461),P-p38(批号:9216),P-JNK 小鼠单克隆抗体(批号:9255), β -actin 兔多克隆抗体(批号:AP0060),均购自广州铎洋生物科技有限公司;HRP 标记的山羊抗兔二抗(批号:IH-0011),HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(批号:IF-0031),北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;六孔 Transwell(批号:3450),广州吉泰生物技术有限责任公司;BCA 试剂盒(批号:PW0104),莱德尔公司;Western blot 缓冲液套装(批号:WP001),广州联科生物技术有限公司;凝胶套装(批号:WP002),广州联科生物技术有限公司;预染 Marker(批号:PM0033),北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;裂解液(批号:PC901),广州莱德尔公司。多功能酶标仪,美国 PerkinElmer 公司;化学发光凝胶成像系统,美国 BIO-RAD 公司;垂直电泳仪,美国 BIO-RAD 公司。

4 C6 细胞和 HUVECs 共培养建立 BTB 模型 参照参考文献[4,5], 24 孔 Transwell 板,按照说明书要求添加培养基后,置于 37 ℃ 培养箱中预先孵育至少 4 h 备用。2.5%胎牛血清和 15%马血清 F12K 培养基重悬 C6 细胞,调整细胞密度 $1 \times 10^5/\text{mL}$,取 50 μL 接种于 Transwell 小室膜的底面,置于培养皿中倒扣培养 4 h,然后翻转小室放于 24 孔板中继续培养^[6]。24 孔培养板内加入 0.6 mL 完全培养基,培养池内加入 0.1 mL 完全培养基,置于 37 ℃、5%CO₂ 的培养箱内继续培养,每天换液 1 次;待 C6 细胞融合至 80%时,取传代的 HUVECs,用含 10%FBS 的 DMEM/F12 完全培养基重悬,调整细胞密度 $3 \times 10^5/\text{mL}$,取 0.1 mL 种植于 Transwell 膜内侧,每天换液 1 次,共培养 3 天,待两种细胞分别在 Transwell 膜两侧形成单层,渗漏实验阳性组(造模成功)可进行下一步实验。实验设置共培养 3 天样品组(作为实验组)及无细胞接种的空白组,每组 3 个复孔。向 Transwell 孔内室、外室均添加培养基使内室液面高度大于外室液面高度 0.5 cm,放置于培养箱中 4 h 后取出观察液面是否能够维持 0.5 cm,以液面无明显改变者为阳性实验^[7]。

5 细胞分组及干预方法 选择渗漏实验阳性孔进行下一步实验,设空白组,冰片低、中、高剂量组(低、中、高剂量组,冰片 25、50、100 $\mu\text{g/mL}$,0.3% DMSO 培养基溶解),空白组在冰片组给药同时更换空白培养基,冰片组给不同剂量冰片,每组 7 个时点(0、10、30、60、120、180、240 min),每个时点 3 个样本。

6 检测指标及方法

6.1 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)流量测定 BTB 通透性 供池中加入含有 500 ng/mL HRP 无酚红 DMEM/F12(1:1)培养基 0.1 mL,同时在受池培养板孔中加入 0.6 mL 不含 HRP 的培养基,保持内外液面相平。分别于 0、10、30、60、120、240 min 从受池中均匀取样 50 μL ,每次取样完毕向受池中补充 50 μL 无酚红培养基。待所有取样完毕后,每个样品中分别加入 100 μL TMB 显

色工作液,避光反应 30 min,然后每孔加 50 μL 0.5 mol/L H₂SO₄ 终止显色,450 nm 波长处测定其 OD 值。根据标准曲线计算 HRP 浓度,HRP 通透率(%) = $(C_{\text{下室}} \times V_{\text{下室}} / C_{\text{上室}} \times V_{\text{上室}}) \times 100\%$ 。

6.2 Western blotting 检测 ERK、P-ERK、P38MAPK、P-P38MAPK、JNK、P-JNK 蛋白表达 BTB 模型上室中分别加入 100、50、25 $\mu\text{g/mL}$ 冰片,于加药后不同时间点(0、10、30、60、120、180、240 min)取出含药培养基,用 4 ℃ PBS 洗 2 次,加 50 μL 裂解液(RIPA:蛋白酶抑制剂:蛋白磷酸酶抑制剂 = 98:1:1)作用 30 min,4 ℃、14 000 r/min 离心 5 min^[8]。沉淀蛋白用 BCA 试剂盒(酶标仪 562 nm)进行定量。

取等量蛋白样品(40 μg)经 SDS-PAGE 电泳分离后,电转移至硝酸纤维素膜上,5% BSA 封闭 4 h,一抗(ERK、JNK、P38MAPK 1:2 000;P-ERK、P-JNK、P-P38MAPK 1:1 000)4 ℃ 孵育过夜(12 ~ 14 h)。TBST 洗膜 4 次,每次 10 min。HRP 标记的二抗(ERK、JNK、P38MAPK、P-ERK 山羊抗兔 IgG 1:30 000;P-JNK、P-P38MAPK 山羊抗小鼠 IgM 1:30 000)室温孵育 1 h,TBST 洗 4 次,每次 10 min;滴加 ECL 发光液 10 $\mu\text{L}/\text{cm}^2$,化学凝胶成像仪检测成像。

7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐性者采用 LSD 检验,方差不齐者采用 Dunnett's 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组 HRP 通透率比较(表 1) 与本组 0 min 比较,低、中、高剂量组各时间点通透率升高($P < 0.01$)。与空白组比较,低、中、高剂量组 10 ~ 240 min HRP 通透率升高($P < 0.01$);与低剂量组比较,中剂量组 30 ~ 180 min 通透率升高($P < 0.05$)。与中剂量组比较,高剂量组 10 ~ 180 min 通透率升高($P < 0.05$)。

表 1 各组 HRP 通透率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	n	时间点					
		0 min	10 min	30 min	60 min	120 min	240 min
空白	3	1.05 ± 0.09	1.67 ± 0.09	2.23 ± 0.07	2.91 ± 0.15	3.34 ± 0.32	3.44 ± 0.22
低剂量	3	1.33 ± 0.09	3.69 ± 0.11 **△	6.04 ± 0.12 **△	10.20 ± 0.31 **△	13.57 ± 0.56 **△	14.55 ± 0.45 **△
中剂量	3	1.67 ± 0.07	3.95 ± 0.12 **△	6.57 ± 0.22 **△	12.00 ± 0.56 **△	15.07 ± 0.39 *△	15.23 ± 0.34 **△
高剂量	3	1.89 ± 0.01	4.47 ± 0.14 **△	7.34 ± 0.18 **△	13.76 ± 0.44 **△	15.72 ± 0.49 **△	15.94 ± 0.51 **△

注:与本组 0 min 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与空白组比较, △ $P < 0.01$;与低剂量组比较, ▲ $P < 0.05$;与中剂量组比较, ○ $P < 0.05$

2 各组各时点 ERK、P-ERK、P38MAPK、P-P38MAPK、JNK、P-JNK 表达比较(表 2,图 1) 各剂量组间、各组时间点 ERK、P38MAPK、P-P38-MAPK、JNK 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$)。与本组 0 min 比较,低、中、高剂量组 P-ERK 表达先升高,在 30 min 达极高值,后逐渐恢复初始水平($P>0.05$)。与空白组比较,低剂量组 30、60 min P-ERK 蛋白表达升高($P<0.05$),低、中、高剂量组 180 min 和 240 min P-JNK 表达降低($P<0.05$)。与低剂量组比较,中剂量组 10~180 min P-ERK 表达升高($P<0.05$),180 min P-JNK 表达升高($P<0.05$),240 min P-JNK 表达降低($P<0.05$)。与中剂量组比较,高剂量组 10~180 min P-ERK 表达升高($P<0.05$),180 min 和 240 min P-JNK 表达降低($P<0.05$)。

讨 论

脑胶质瘤是一种最常见的颅内恶性肿瘤,它起源于脑组织中神经胶质细胞,占颅内肿瘤的 46% 左右。在

三大早亡的实体性恶性肿瘤中,脑胶质瘤的生存期之短仅次于肝癌。单纯的手术切除反而会刺激并加速肿瘤的增殖速度和恶变程度。因此,在全球范围内,脑胶质瘤至今缺乏疗效很好的治疗方法。在脑胶质瘤中,由于 BTB 存在,限制了抗肿瘤进入肿瘤组织,从而导致肿瘤部位不能达到有效的治疗浓度,这也是目前化疗效果不甚理想的主要原因之一^[9]。冰片在促进药物透过血脑屏障方面具有重要的应用价值。冰片常作为脑部病变的引经药,当与其他治疗颅脑疾病的药物共用时,能够增加药物的脑部靶向性,提高合用药物的脑组织分布,同时可以使药物更易于透过血脑屏障,增加脑内的药物浓度,提高其脑组织内生物利用度,从而增强药物的治疗效果^[10]。冰片对大鼠脑毛细管内皮细胞之间的紧密连接影响显著,可使细胞间紧密连接缝隙变宽、断续、结构减少^[11]。本课题组前期体内实验研究表明冰片可以促进抗肿瘤药物在脑组织内的蓄积,也可以可逆性调节紧密连接相关蛋白的表达。但对其相关的 MAPK 信号转导通路分子机制尚不明确。

表 2 各组各时点 ERK、P-ERK、P38MAPK、P-P38MAPK、JNK、P-JNK 表达比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	时间(min)	ERK	P-ERK	P38MAPK	P-P38MAPK	JNK	P-JNK
空白	3	0	0.50±0.02	0.36±0.02	0.54±0.02	0.42±0.01	0.85±0.01	0.95±0.03
		10	0.49±0.01	0.35±0.02	0.52±0.04	0.47±0.03	0.95±0.15	0.81±0.07
		30	0.48±0.01	0.34±0.01	0.54±0.03	0.44±0.02	0.85±0.04	0.98±0.06
		60	0.47±0.01	0.33±0.01	0.54±0.04	0.47±0.07	0.86±0.07	0.90±0.05
		120	0.56±0.02	0.35±0.03	0.52±0.03	0.44±0.06	0.85±0.07	0.87±0.11
		180	0.49±0.02	0.36±0.03	0.55±0.03	0.47±0.08	0.86±0.07	0.84±0.07
		240	0.51±0.03	0.35±0.02	0.56±0.04	0.39±0.05	0.82±0.09	0.88±0.04
低剂量	3	0	0.47±0.06	0.33±0.01	0.46±0.02	0.42±0.02	1.02±0.06	0.95±0.01
		10	0.49±0.05	0.44±0.01	0.48±0.01	0.46±0.01	0.91±0.05	1.01±0.08
		30	0.54±0.02	0.48±0.01 ^{*△}	0.40±0.05	0.46±0.06	1.08±0.04	0.84±0.07
		60	0.38±0.04	0.48±0.05 ^{*△}	0.44±0.02	0.45±0.02	0.81±0.05	0.77±0.06
		120	0.42±0.04	0.47±0.05	0.43±0.01	0.52±0.02	0.98±0.04	0.67±0.05
		180	0.38±0.04	0.29±0.01	0.47±0.01	0.49±0.01	0.95±0.13	0.50±0.05 ^{**△}
		240	0.40±0.02	0.28±0.02	0.42±0.02	0.52±0.03	0.99±0.09	0.45±0.04 ^{**△}
中剂量	3	0	0.47±0.06	0.42±0.03	0.50±0.01	0.41±0.03	0.81±0.07	0.96±0.03
		10	0.54±0.02	0.60±0.01 ^{**▲}	0.43±0.02	0.52±0.04	0.86±0.07	1.03±0.06
		30	0.64±0.02	0.78±0.02 ^{**▲}	0.52±0.05	0.43±0.04	0.92±0.14	0.83±0.05
		60	0.46±0.04	0.50±0.01 ^{*▲}	0.38±0.01	0.51±0.04	0.76±0.09	0.80±0.04
		120	0.44±0.01	0.52±0.00 ^{*▲}	0.45±0.01	0.44±0.03	0.63±0.06	0.83±0.04
		180	0.43±0.02	0.48±0.02 [▲]	0.43±0.02	0.55±0.07	0.75±0.03	0.63±0.03 ^{*△▲}
		240	0.45±0.02	0.38±0.03	0.41±0.02	0.58±0.09	0.69±0.08	0.40±0.00 ^{**△▲}
高剂量	3	0	0.58±0.01	0.42±0.04	0.53±0.07	0.41±0.03	0.83±0.07	1.00±0.09
		10	0.65±0.02	0.76±0.02 ^{**○}	0.47±0.04	0.46±0.03	0.92±0.15	0.88±0.08
		30	0.72±0.06	0.95±0.02 ^{**○}	0.55±0.03	0.46±0.01	0.92±0.07	0.85±0.08
		60	0.55±0.04	0.73±0.02 ^{**○}	0.44±0.06	0.41±0.03	0.67±0.05	0.89±0.02
		120	0.59±0.03	0.62±0.01 ^{*○}	0.52±0.06	0.46±0.02	0.90±0.02	0.79±0.07
		180	0.52±0.03	0.39±0.01 [○]	0.45±0.09	0.53±0.19	0.77±0.09	0.58±0.05 ^{**△○}
		240	0.55±0.07	0.36±0.02	0.54±0.11	0.42±0.03	0.78±0.12	0.54±0.05 ^{**△○}

注:与本组 0 min 比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与空白组同期比较, $^{\Delta}P<0.05$;与低剂量组同期比较, $^{\Delta}P<0.05$;与中剂量组同期比较, $^{\Delta}P<0.05$

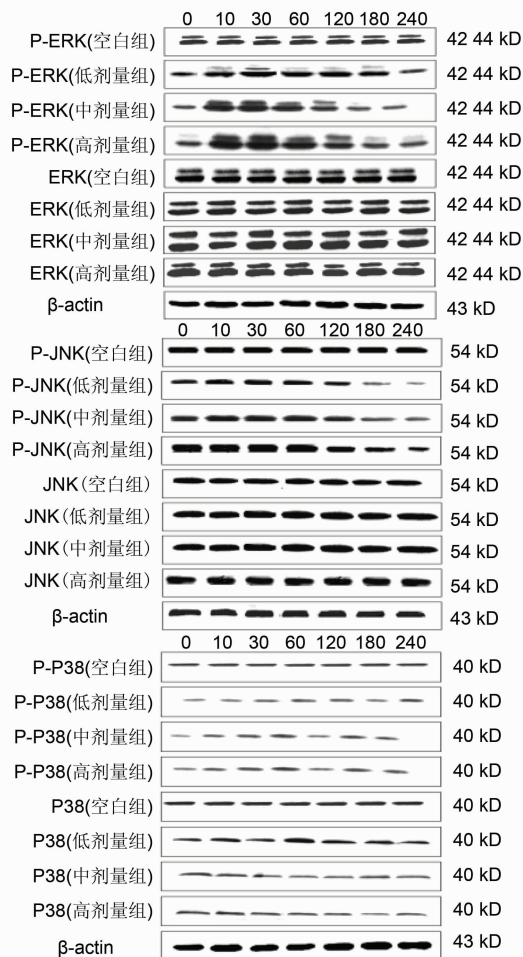


图1 各组 ERK、P-ERK、JNK、P-JNK、P38MAPK 和 P-P38MAPK 蛋白表达图谱

增殖、分化、侵袭和血管生成是肿瘤细胞生命活动中的重要内容,这四方面共同反映了肿瘤细胞的恶性程度,也是考察药物对肿瘤细胞的抑制效果的重要参考指标。VEGF 是目前已知的众多血管活性因子中活性功能最强、特异性最高的血管生成因子,在肿瘤血管生成的过程中起到了重要的作用。一方面 VEGF 与特异性受体(尤其是 VEGFR-2/KDR)相结合,激活 MAPK 信号传导通路促进内皮细胞的增殖,同时激活基质金属蛋白酶和纤维蛋白溶解酶原激活物,促进肿瘤组织的“出芽”式血管生成;另一方面大量分泌的 VEGF 能直接促进骨髓中的内皮细胞前体细胞释放,实现肿瘤血管“从无到有”的直接生成^[12,13]。VEGF 是肿瘤血管生成过程中的重要调节因子,它作用于血管内皮细胞,刺激血管内皮细胞增殖、迁移,诱导血管形成,在实体瘤生长、转移过程中起重要作用。近年来国内外研究显示,多种肿瘤细胞中存在 VEGF 的过度表达,VEGF 作用于细胞膜相应受体,受体将信号传递到胞内,通过激活 ERK-

MAPK 信号通路,促进血管增生和肿瘤的发生发展^[14]。另有临床研究发现,JNK 的激活(磷酸化)可能促进脑胶质瘤的发生^[15]。P38MAPK 通路的激活与人类脑胶质瘤的发生密切相关^[16]。

目前建立体外 BTB 模型的方法主要有: HUVECs 加 C6 胶质瘤细胞、大鼠脑微血管内皮细胞(rat brain microvascular endothelial cells, rBMECs) + C6 胶质瘤细胞、人脑微血管内皮细胞(human brain microvascular endothelial cells, hBMECs) + 脑周细胞(PC)加 U251 胶质瘤细胞(U251)。由于每一种模型都有其优缺点,研究者应根据个人研究需要选择和建立合适的 BTB 细胞模型^[17-19]。本实验采取 HUVECs 加 C6 胶质瘤细胞建立体外 BTB 模型。多种肿瘤的生成、转移、复发以及预后均与肿瘤血管的生成密切相关^[20-22],因此,选择合适的内皮细胞对建立体外 BTB 模型尤为重要。HUVECs 是一种干细胞,能无限次传代(理论上),易于实验操作和节约成本,且其体外培养时可以实现内皮细胞所有的在体功能。C6 脑胶质瘤细胞是经 N₂ 亚硝基甲脒诱变而形成的大鼠脑胶质瘤细胞,具有胶质源性,遗传背景稳定,且可以无限增殖,易于培养。利用该两种细胞非接触双室共培养,建立了一种简便可行、与在体血肿瘤结构类似的体外 BTB 模型^[23]。

液面渗漏实验常用于初步判断及筛选 BTB 成功模型,该实验方法简单,易操作。HRP 分子量为 40 kD,是一种大分子示踪剂,与特异底物显色后,用酶标仪即可检测其吸光度,其透过率一定范围内与血脑屏障/BTB 的通透性具有良好的线性关系,通过测定其流量可以更精确地反映体外血脑屏障/BTB 模型的通透性,常用作研究药物对屏障通透性的影响^[24]。本研究中采用 HRP 流量实验,测定 BTB 的通透性及天然冰片对其的影响,结果显示体外 BTB 模型具有在体血肿瘤屏障的限制物质通透能力。从相邻时间点的透过率差值分析,低、中、高剂量组均在 10 ~ 30 min、30 ~ 60 min 时, HRP 透过率提升最为显著,60 ~ 120 min 时提升率逐渐降低,120 ~ 240 min 时,提升率虽有增加但不明显。以上结果表明:天然冰片剂量在 25 ~ 100 μg/mL 剂量范围内,作用 30 ~ 60 min 时,能明显增加 BTB 细胞模型的通透性,增加 HRP 的 BTB 透过率。

脑质瘤的发生与 MAPKs 信号通路的激活密切相关,并且各 MAPKs 信号通路活性分子的改变因肿瘤类型、作用药物的不同而存在差异。各种药物对 MAPKs 通路的作用机制并非单一不变,不同药物可

以通过激活不同的 MAPKs 通路发挥作用,同一 MAPKs 通路对不同药物的反应性也存在差异^[25]。有研究认为,脑胶质瘤组织中不仅存在 ERK 信号通路的活化,而且 P38MAPK 和 JNK 信号通路也被激活,后两者是在肿瘤发生后反馈到机体而产生的保护性激活,抑或是其激活与 ERK 共同促进了脑胶质瘤的发生,具体的机制尚有待进一步研究^[26]。MAPKs 信号转导通路采用高度保守的三级激酶级联传递信号,即 MAPK 激酶激酶 (MAPK kinase kinase, MKKK)—MAPK 激酶 (MAP kinase kinase, MKK or MEK)—MAPK。细胞受到刺激后通过某种中间环节使 MKKK 激活,转而激活 MKK;MKK 激活后再通过双位点磷酸化调控 MAPK 的活性^[27-29]。在未受刺激的细胞中,未磷酸化的 MAPK 处于无活性状态,主要位于胞质中。在受到刺激后,MAPK 被磷酸化并迅速移位入核,导致相应基因的表达改变^[30,31]。可见,磷酸化的 MAPK 是转入细胞核内引发下游效应的活性形式。因此,若 MAPK 信号通路参与某个生理或病理生理过程,P-MAPK 表达量必定发生变化^[32]。

Western blotting 测定结果显示:天然冰片在 25~100 $\mu\text{g/mL}$ 剂量范围内,作用于 BTB 细胞模型 4 h,ERK 蛋白在不同时间点间,及不同组别间无显著性的变化。P-ERK 蛋白的表达量随作用时间的延长先升高,然后又逐渐恢复至药前水平,30 min 时表达量最高,且存在剂量依赖关系:高剂量组_{30 min} < 中剂量组_{30 min} < 低剂量组_{30 min} < 空白组_{30 min}。2010 版《中国药典》规定天然冰片成人用量为 0.3~0.9 g,细胞给药按照《中国药典》中成人最大剂量/人血浆容积 (4 000 mL) 换算,即天然冰片 225 $\mu\text{g/mL}$ 。按参考文献^[46,47]冰片吸收系数为 0.25,故血药浓度为 56.25 $\mu\text{g/mL}$ 。因此,结合 HRP 结果笔者认为天然冰片在 BTB 体外模型激活 ERK 信号通路的最佳作用剂量与时间点为 50 $\mu\text{g/mL}$,30 min。P38MAPK、P-P38MAPK 在不同时间点间及不同组别间表达无显著性的变化,说明在本研究中天然冰片对 P38MAPK 通路无明显的影响,至于冰片开放 BTB 过程中 P38MAPK 通路参与与否以及如何参与有待进一步研究;JNK 蛋白在不同时间点间及不同组别间无显著性的变化,P-JNK 蛋白表达在 120 min 内无明显变化。与 BTB 通透性从 10 min 开始逐渐升高的趋势明显不同。此结果说明在天然冰片作用 BTB 体外模型 4 h 这个时间段内,JNK 通路不是本研究的目标通路。本研究说明天然冰片开放 BTB,增加屏障通透性的重

要机制之一为增强 MAPK/ERK 通路上的 ERK 蛋白磷酸化。但是本研究未对 RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK 信号转导通路上的其他激酶进行检测,确认冰片作用的具体位点。也没有结合通路抑制剂对 ERK、P-ERK 的表达进行检测,反向证明本论文的结果。这是本课题组在未来的科研过程中应该跟进的方向。

参 考 文 献

- [1] Ueno M. Mechanisms of the penetration of blood-borne substances into the brain[J]. *Curr Neuroparmacol*, 2009, 7(2): 142-149.
- [2] 郭军治,张荣,段美美,等.天然冰片对甲氨蝶呤透过血脑屏障的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2015, 26(1): 73-77.
- [3] 段美美,曾武,陈浩,等.天然冰片对顺铂在 C6 脑胶质瘤模型大鼠体内的药动学及脑组织分布的影响[J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(5): 24-27.
- [4] Ma T, Xue Y. RhoA-mediated potential regulation of blood-tumor barrier permeability by bradykinin[J]. *J Mol Neurosci*, 2010, 42(1): 67-73.
- [5] Gu YT, Xue YX, Wang YF, et al. Role of ROS/RhoA/PI3K/PKB signaling in NS1619-mediated blood-tumor barrier permeability increase[J]. *J Mol Neurosci*, 2012, 48(1): 302-312.
- [6] 刘启德,梁美蓉,陈芝喜,等.冰片对庆大霉素透血脑屏障的影响[J]. *广州中医学院学报*, 1994, 11(1): 37-40.
- [7] Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Benito R, et al. The activation of ERK1/2 MAP kinases in glioblastoma pathobiology and its relationship with EGFR amplification[J]. *Neuropathology*, 2008, 28(5): 507-515.
- [8] Antonyak MA, Kenyon LC, Godwin AK, et al. Elevated JNK activation contributes to the pathogenesis of human brain tumors[J]. *Oncogene*, 2002, 21(33): 5038-5046.
- [9] Perry J, Laperriere N, Zuraw L, et al. Adjuvant chemotherapy for adults with malignant glioma: a systematic review[J]. *Can J Neurol Sci*, 2007, 34(4): 402-410.
- [10] Demuth T, Reavie LB, Rennert JL, et al. MAP-kinase glioma invasion: mitogen-activated protein kinase 3 and p38 drive glioma invasion and progression and predict patient survival[J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(4): 1212-1222.
- [11] 藤毅,杨海玲.冰片在药代动力学方面的研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2015, 20(4): 469-475.
- [12] 黄纯海,李学军,袁贤瑞.胶质瘤血管新生及其调控机制[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2009, 29(5):

- 386-391.
- [13] Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions [J]. Clin Sci (Lond), 2005, 109(3): 227-241.
- [14] 胡野荣, 邓又华, 姜志斌, 等. 人脐静脉内皮细胞体外分离培养的改进及其鉴定[J]. 临床医学研究, 2005, 22(5): 587-589.
- [15] 谢英, 叶丽亚, 张小滨, 等. 血脑屏障体外实验模型的建立[J]. 北京大学学报(医学版), 2004, 36(4): 435-438.
- [16] 马腾, 刘啸白, 薛一雪. RhoA 在缓激肽选择性开放血肿瘤屏障中的作用[J]. 中国药理学通报, 2011, 27(2): 187-190.
- [17] 曹友林. 冰片开放血肿瘤屏障的分子机制研究[D]. 昆明: 昆明医学院, 2008.
- [18] 刘恺鸣, 迟路湘, 鲁向辉, 等. 大鼠脑微血管内皮细胞的原代培养[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(20): 2011-2013. 15.
- [19] 李强, 李文龚, 李博, 等. 大鼠脑周细胞的培养与鉴定[J]. 中华病理学杂志, 2013, 42(8): 551-553.
- [20] 李明焕, 田铎, 刘执玉, 等. ECV304 细胞用于三维血管新生的研究[J]. 中国现代普通外科学进展, 2004, 7(3): 165-167.
- [21] Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis[J]. N Engl J Med, 1995, 333(26): 1757-1763.
- [22] Maruyama Y. The human endothelial cell in tissue culture[J]. Zellforsch Mikrosk Anat, 1963, 60(1): 69-79.
- [23] 李志满, 毕晓颖, 张春霞, 等. 大鼠 C6 脑胶质瘤动物实验模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 12, 13(6): 827-830.
- [24] 朱海燕, 迟蕾, 徐冰, 等. 清开灵注射液对血脑屏障模型通透性的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2011, 18(9): 35-37.
- [25] 朱廷准, 徐英辉. 丝裂原活化蛋白激酶信号转导通路与脑胶质瘤[J]. 肿瘤, 2011, 31(9): 871-874.
- [26] 刘启, 赵志英. ERK 和 JNK 信号转导通路与疾病关系的研究进展[J]. 医学综述, 2011, 17(11): 1637-1639.
- [27] Akbarian S, Davis RJ. Keep the 'phospho' on MAPK, be happy[J]. Nat Med, 2010, 16(11): 1187-1188.
- [28] 龚小卫, 姜勇. MAPK 的细胞内定位与激活后移位机制[J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(4): 509-512.
- [29] Lui WY, Lee WM, Cheng CY. TGF-betas: their role in testicular function and Sertoli cell tight junction dynamics[J]. Int J Androl, 2003, 26(3): 147-160.
- [30] Kiec-Wilk B, Grzybowska-Galuska J, Polus A, et al. The MAPK-dependent regulation of the Jagged/Notch gene expression by VEGF, bFGF or PPAR gamma mediated angiogenesis in HUVECs[J]. J Physiol Pharmacol, 2010, 61(2): 217-225.
- [31] Idris I, Gray S, Donnelly R, et al. Rosiglitazone and pulmonary oedema: acute dose-dependent effect on human endothelial cells permeability[J]. Diabetology, 2003, 46(2): 288-290.
- [32] 张静, 杨波, 常可亮, 等. 人脑胶质瘤组织中 MAPK 和磷酸化 MAPK 的表达[J]. 郑州大学学报, 2009, 44(2): 315-317.

(收稿: 2015-09-25 修回: 2016-02-29)

欢 迎 投 稿 欢 迎 订 阅