

不同剂量川芎对 PG 干细胞样细胞低氧微环境改善的研究

王耀焯,张培彤,杨 栋,韩海英,郭秀伟,祁 鑫,张 芸
(中国中医科学院广安门医院,北京 100053)

摘要: [目的] 观察体内实验中不同剂量川芎对肿瘤干细胞样细胞低氧微环境的影响。 [方法] 通过无血清培养获得的干细胞样细胞并鉴定,将已鉴定的球细胞接种于裸鼠腋下,将裸鼠平均随机分为3组,即对照组、高剂量川芎组、低剂量川芎组,21d后检测抑瘤率,Western blot 检测瘤体 ABCG2、HIF-1 α 蛋白表达,RT-PCR 检测 HIF-1 α mRNA 表达。 [结果] 低剂量川芎对 PG-BE1 干细胞样细胞具有杀伤作用,可在蛋白水平上抑制 ABCG2 的表达($P<0.05$)。低剂量川芎同时还可于蛋白及 mRNA 的水平上抑制 HIF-1 α 的表达。 [结论] 低剂量川芎对肿瘤干细胞的杀伤作用可能与其抑制 HIF-1 α 蛋白表达,改善肿瘤乏氧微环境有关。

关键词: 川芎;肿瘤干细胞;乏氧

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0242(2016)07-0547-06

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2016.07.A010

Rhizoma Chuanxiong Improves Hypoxia Microenvironment of PG-BE1 Tumor Stem-like Cells

WANG Yao-han, ZHANG Pei-tong, YANG Dong, et al.

(Guang'anmen Hospital, Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

Abstract: [Purpose] To observe the effect of different doses of Rhizoma Chuanxiong on the hypoxia microenvironment of cancer stem-like cells. [Methods] Sphere PG-BE1 tumor stem-like cells were inoculated in nude mouse and the animals were randomly divided into 3 groups: control group, high-dose Rhizoma Chuanxiong group and low dose of Rhizoma Chuanxiong group. The tumor inhibition rate was detected after 21 days. Expression of ABCG2 and HIF-1 protein was detected by Western blot, and HIF mRNA was tested by RT-PCR. [Results] Low dose of Rhizoma Chuanxiong had a killing effect on PG-BE1 stem-like cells, and inhibited the expression of ABCG2 protein ($P<0.05$). In addition, low dose Rhizoma Chuanxiong also inhibited the expression of both HIF-1 α mRNA and protein. [Conclusion] Low dose Rhizoma Chuanxiong can inhibit cancer stem cells, which is associated with down-regulation of HIF-1 α expression and improvement of tumor hypoxic microenvironment.

Key words: Rhizome Chuanxiong; cancer stem cells; hypoxia microenvironment

肿瘤干细胞是目前肿瘤研究的热点之一,理论上认为肿瘤的复发、转移及耐药等问题的发生均与体内残留的极少数肿瘤干细胞有关。而肿瘤干细胞的发生主要与上皮间质转化(EMT)、肿瘤微环境等有关。肿瘤微环境为肿瘤干细胞的发生提供基础,其中缺氧为微环境中较为明确的影响因素之一,与肿瘤干细胞的发生存在着密切关系。

收稿日期:2015-11-05;修回日期:2016-04-02

基金项目:国家自然科学基金(81173450;81302963)

通讯作者:张培彤,E-mail:zhangpeitong@sohu.com

1 材料与方法

1.1 一般材料

高转移性人巨细胞肺癌细胞 PG-BE1,由中国中医科学院广安门医院肿瘤研究室提供。Human FGF-basic:美国 Pero Tech 公司,货号:AF-100-18B;Human EGF:美国 Pero Tech 公司,货号:AF-100-15;B27 Supplement(50 \times):美国 Gibco 公司,货号:7504-044;Trypsin inhibition from Glycine max(soybean):美

国 Sigma 公司,货号:T6522;CCK8 试剂盒:日本同仁,货号:CK04;ANNEXIN V:美国 BD 公司,货号:556547;Anti-BCRP/ABCG2 抗体:美国 Abcam 公司,货号:ab3380;Goat F(ab')₂ polyclonal Secondary Antibody to mouse IgG+IgM+IgA-H&L(HRP):货号:ab6006,美国 abcam 公司;顺铂注射液:齐鲁制药(海南)有限公司,批号:H20073652。

1.2 干细胞样细胞的分选与鉴定

1.2.1 干细胞样细胞的分选

常规复苏、培养 PG-BE1 细胞,待其生长至 70%~80%时,用胰酶消化成单个细胞,并用 PBS 反复清洗 2 次,重悬于含 0.02 μ g/ml EGF、0.02 μ g/ml bFGF、5 μ g/ml insulin、2% B27、4% BSA 的 DMEM/F-12 培养基中,调整细胞浓度 2 \times 10⁴/孔,接种于低黏附 6 孔板中,待细胞成球且折光率变低时收集 PG-BE1 球细胞,离心、胰酶消化、1mg/ml 大豆胰蛋白酶抑制剂终止消化,重悬于上述完全培养基 DMEM/F-12 中。使用传代至第三代的 PG-BE1 球细胞。

1.2.2 干细胞样细胞的鉴定

1.2.2.1 CCK-8 检测 PG-BE1 球细胞的增殖能力

分别收集 PG-BE1 贴壁细胞及第三代 PG-BE1 球细胞,接种于 96 孔板中,1000 个/孔,分为 3d、4d、5d、6d、7d 五组,每组 5 个复孔。分别于第 3、4、5、6、7d 时加入 Cell Counting Kit-8 细胞增殖检测试剂,10 μ l/100 μ l 培养基。酶标仪检测吸光值(OD)。

1.2.2.2 AV/PI 检测 PG-BE1 球细胞抗凋亡能力

分别收集 PG-BE1 贴壁细胞及第三代 PG-BE1 球细胞,用预冷的 PBS 清洗细胞 2 次,并重悬于 1 \times Binding Buffer,调整细胞浓度为 1 \times 10⁶/ml。取 100 μ l 的上述细胞悬液置于流式管中,加入 5 μ l FITC Annexin V 及 5 μ l PI。轻柔的震荡细胞并于室温(25 $^{\circ}$ C)下避光孵育 15min。每管中加入 400 μ l 1 \times Binding Buffer,上流式细胞仪检测。

1.2.2.3 免疫荧光检测 PG-BE1 球细胞 ABCG2 的表达

如前法收集 PG-BE1 贴壁细胞及第三代 PG-BE1 球细胞,调整细胞浓度为 1 \times 10⁵/ml,接种于 96 孔板中。24h 后,每孔依次加入 4%多聚甲醛固定,0.1%的 Triton X-100 透膜,免疫荧光封闭液,室温封闭 1h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,荧光二抗避光孵育 1h,滴加 DAPI 避光孵育 5min,最后加入适量抗荧光淬灭封片液。

1.2.2.4 Western blot 检测 PG-BE1 球细胞 ABCG2 的表达

分别收集 PG-BE1 贴壁细胞及球细胞,提取蛋白。用 BCA 法测定各组总蛋白浓度,分别制备浓缩胶与分离胶,加样后分别行蛋白电泳、电转移,5% 脱脂奶粉封闭后,一抗(稀释倍数为 1:1000)、二抗(稀释倍数为 2:1000)孵育各 1h,后于暗室中滴加超敏发光液,于凝胶成像系统拍照。

1.3 不同剂量川芎对裸鼠模型抑瘤率的影响

将 1 \times 10⁷/ml 浓度的 PG-BE1 球细胞接种于裸鼠腋下,0.2ml/只。接种 24h 后,将裸鼠随机平均分为 3 组:对照组、低剂量川芎组(0.75g/kg)、高剂量川芎组(3.0g/kg),每组 5 只。连续灌胃 21d 后将小鼠脱颈椎处死,称量瘤重,计算抑瘤率。

1.4 Western blot 检测不同剂量川芎对 ABCG2、HIF-1 α 蛋白表达的影响

分别收集各组瘤组织,提取蛋白。用 BCA 法测定各组总蛋白浓度,分别制备浓缩胶与分离胶,加样后分别行蛋白电泳、电转移,5% 脱脂奶粉封闭后,一抗(稀释倍数为 1:1000)、二抗(稀释倍数为 2:1000)孵育各 1h,后于暗室中滴加超敏发光液,于凝胶成像系统拍照,并用 Image J 软件分析各组蛋白表达量。

1.5 RT-PCR 检测不同剂量川芎对 HIF-1 α mRNA 表达的影响

分别收集各组瘤组织,提取 RNA,逆转为 cDNA,设定荧光定量 PCR 反应程序进行扩增,在 SDS 软件中分析数据。

1.6 统计学处理

采用统计软件 SPSS 18.0 进行数据统计分析。

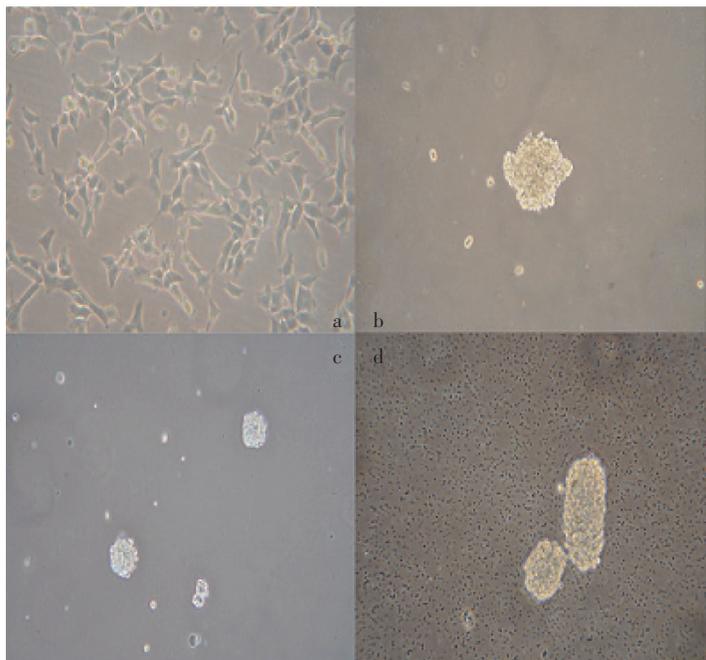
2 结果

2.1 干细胞样细胞分选

接种后第 3d 可见细胞球形成,随时间延长,生长至第 6d 时,球体积变大,折光率变低,收集传代至第三代的 PG-BE1 球细胞(Figure 1)。

2.2 干细胞样细胞增殖能力

分别计算 PG-BE1 贴壁细胞、PG-BE1 球细胞第 3、4、5、6、7d 的吸光值(OD 值),PG-BE1 球细胞组第 3、4、5、6、7d 的 OD 值明显高于 PG-BE1 贴壁细胞



(a:PG-BE1 cells;b:The first PG-BE1 sphere cells;c:The second PG-BE1 sphere cells;
d:The third PG-BE1 sphere cells)

Figure 1 The formation of PG-BE1 sphere cells

($P < 0.01$)。以 PG-BE1 贴壁细胞的 OD 值为基线,其 PG-BE1 球细胞第 3、4、5、6、7d 的相对 OD 值 [相对 OD 值=(实验组 OD 值-对照组 OD 值)/对照组 OD 值]分别为 0.10、0.17、0.21、0.24、0.32。证明通过无血清球培养筛选出的 PG-BE1 球细胞具有较强的增殖及自我更新能力,为肿瘤干细胞的主要特征之一(Figure 2)。

2.3 PG-BE1 球细胞抗凋亡能力

PG-BE1 球细胞与 PG-BE1 贴壁细胞早期凋亡

率分别为 0.638%、1.273% ($P < 0.05$);中晚期凋亡率分别为 2.53%、2.78%,PG-BE1 球细胞的中晚期凋亡低于 PG-BE1 贴壁细胞,但差异无统计学意义;两者总凋亡率差异有统计学差异 ($P < 0.05$)。证明球细胞与普通贴壁细胞相比,具有一定的抗凋亡能力(Figure 3)。

2.4 免疫荧光检测 PG-BE1 球细胞中 ABCG2 表达

PG-BE1 球细胞中 ABCG2 高表达,而 PG-BE1 贴壁细胞中 ABCG2 低表达甚至不表达,具有明显差异 ($P < 0.05$)(Figure 4)。

2.5 Western blot 检测 PG-BE1 球细胞中 ABCG2 的表达

PG-BE1 球细胞中 ABCG-2 蛋白的表达明显高于 PG-BE1 贴壁细胞,有显著性差异 ($P < 0.01$)(Figure 5)。

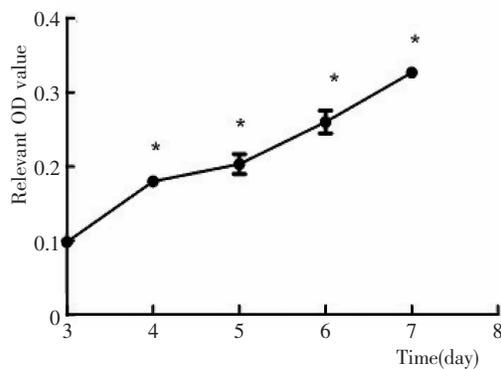
2.6 不同剂量川芎对裸鼠抑瘤率的影响

对照组、低剂量川芎组、高剂量川芎组的瘤重分别为 $0.38 \pm 0.16\text{g}$ 、 $0.20 \pm 0.03\text{g}$ 、

$0.19 \pm 0.10\text{g}$,低剂量川芎组、高剂量川芎组其抑瘤率分别为 47.4%、51.1%,与对照组相比,均有统计学差异 ($P < 0.05$);高剂量川芎组抑瘤率高于低剂量川芎组,但无统计学差异(Figure 6)。

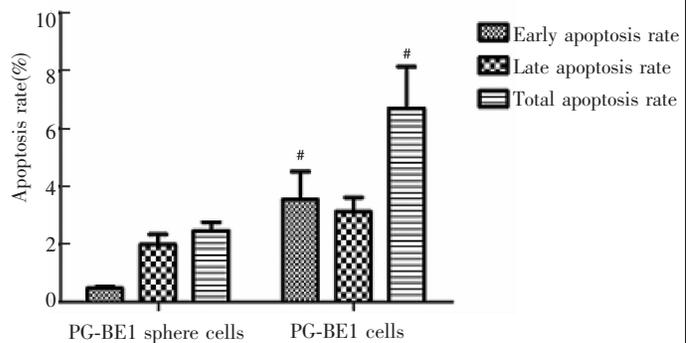
2.7 不同剂量川芎对 ABCG2 及 HIF-1 α 蛋白表达影响

低剂量川芎组与对照组相比,可抑制 ABCG2 耐药蛋白的表达 ($P < 0.05$)。而高剂量川芎组对



($P < 0.01$, PG-BE1 sphere cells vs PG-BE1 cells)

Figure 2 PG-BE1 sphere cells relevant OD value



(# $P < 0.05$, PG-BE1 sphere cells vs PG-BE1 cells)

Figure 3 The apoptosis rate of PG-BE1 cells and PG-BE1 cells

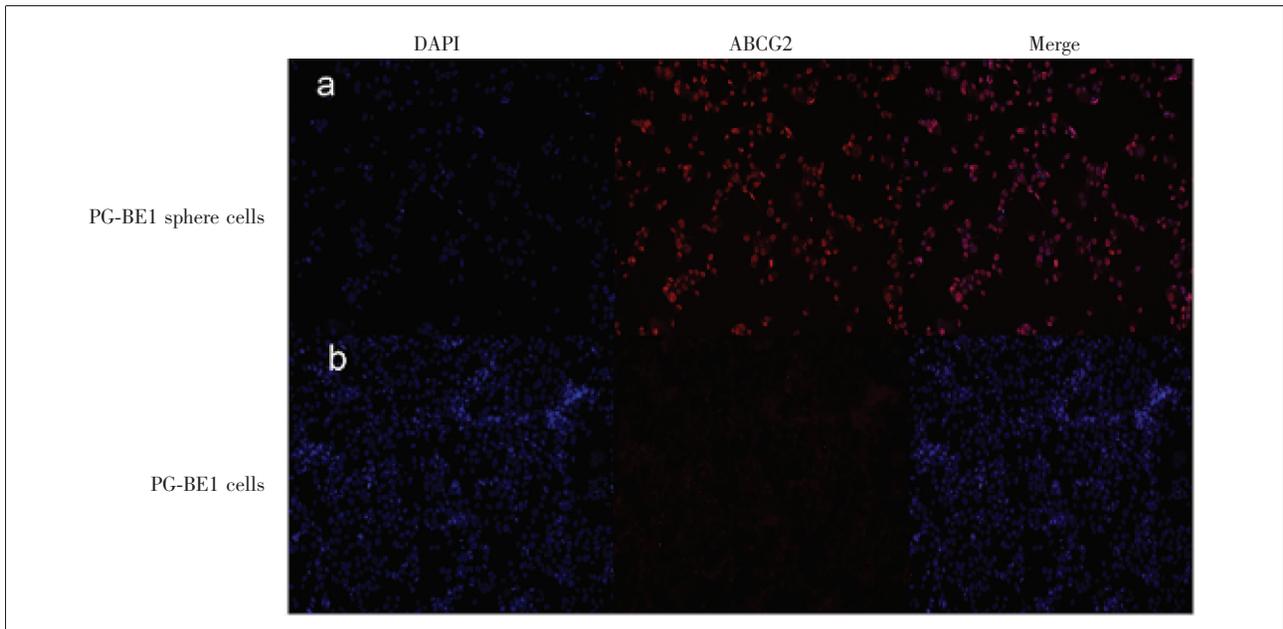


Figure 4 The expression of ABCG2 protein

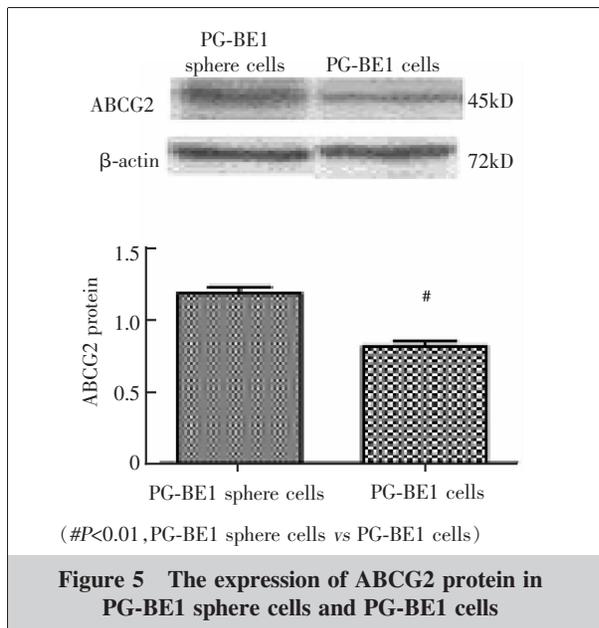


Figure 5 The expression of ABCG2 protein in PG-BE1 sphere cells and PG-BE1 cells

ABCG2 蛋白的表达无明显抑制作用,相反,高剂量川芎组 ABCG2 蛋白表达量略高于对照组,但无统计学差异。低剂量川芎可在体内实验有效杀伤干细胞样细胞(Figure 7)。

低剂量川芎组与对照组相比,可抑制 HIF-1 α 蛋白的表达($P<0.05$)。而高剂量川芎组对 HIF-1 α 耐药蛋白的表达无明显抑制作用(Figure 8)。

2.8 不同剂量川芎对 HIF-1 α mRNA 表达的影响

经 RT-PCR 检测,低剂量川芎组可抑制 HIF-1 α mRNA 表达,但与对照组比较无统计学差异($P>0.05$);而高剂量川芎组 HIF-1 α mRNA 明显高表达,与对照组及低剂量川芎组比较均有统计学差异($P<0.05$)(Figure 9)。

体内实验证实低剂量川芎可有效抑制肿瘤干细胞标志物 ABCG2 蛋白的表达,提示川芎在体内实验

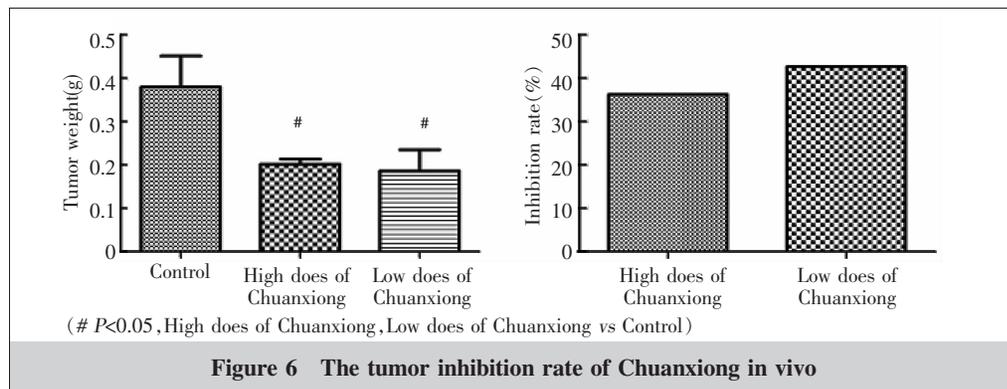


Figure 6 The tumor inhibition rate of Chuanxiong in vivo

中对肿瘤干细胞具有一定的杀伤作用;另外低剂量川芎在抑制 ABCG2 蛋白表达同时抑制 HIF-1 α 蛋白的表达,但并不影响 HIF-1 α 在 mRNA 水平上的表达,提示低剂量川芎对肿瘤干细胞的杀伤

作用可能与其抑制HIF-1 α 蛋白表达,改善肿瘤乏氧微环境有关。

3 讨论

肿瘤干细胞是肿瘤细胞中存在的极少数细胞,具有无限增殖、自我更新、抗凋亡等能力,与肿瘤的侵袭转移密切相关。侧群细胞(Side Population,SP)是目前较为公认的肿瘤干细胞标志物之一,其可将荧光染料 Hoechst 33342 泵出细胞外,而 ABCG2 蛋白的存在正是其可泵出 Hoechst 33342 的原因。ABCG2 属于 ABC 转运蛋白家族成员之一,它们结合并利用水解 ATP 提供的能量来转运药物,其过表达与 MDR 存在密切关系^[1],而在正常的人胚胎干细胞中,并不存在 SP 细胞及 BCRP/ABCG2 蛋白的表达^[2]。因此,ABCG2 被认为是肿瘤干细胞标记物之一。

1978 年,Schofield 提出了“微环境”假说,用来描述支持干细胞生长的生理性微环境。微环境包括间质细胞、细胞外基质及血管、炎症细胞。微环境的稳定是保持细胞正常增殖、分化、代谢和功能活动的重要条件,其成分的异常变化可使细胞发生病变。

肿瘤微环境对肿瘤细胞的生物学特性具有重要的调控作用,而缺氧是肿瘤微环境的显著特征。缺氧与肿瘤干细胞“干性”的维持密切相关,可能是调节 CSCs 干性的一个重要机制。将人胃癌细胞系 BGC823,SGC7901 培养在不同的氧浓度中,检测其增殖、侵袭能力及 EMT、CSCs 标志物。结果显示经过低氧预处理的细胞其细胞形态变化明显,细胞增殖、侵袭转移及克隆形成能力增强。进一步研究发现,经过低氧处理的细胞,其 N-cadherin、Vimentin、Snail、Sox2、Oct4、Bmi1 在 RNA 及蛋白水平上均明显增高。由此推断低氧微环境可诱导产生 EMT,增强胃癌细胞的干细胞功能,促进其侵袭转移的发生^[3]。其低氧诱导肿瘤干细胞“干性”增强的机制主要涉及以下几点:(1)缺氧是支持肿瘤干细胞微环境的基础条件^[4,5],研究证实抗血管生成导致肿瘤缺血缺氧,从而形成了有利于调控 CSCs 干性的缺氧微环境^[6];(2)缺氧可上调多种与 CSCs 相关的信号通路分子的表达,目前已证实的调控 CSCs 自我更新的信号通路主要包括 Notch、Wnt、Sonic hedgehog 等^[7,8];(3)缺氧可促进已分化的肿瘤细胞去分化,获得肿瘤干细胞功能^[9]。

缺氧诱导因子-1(HIF-1)作为低氧微环境中常

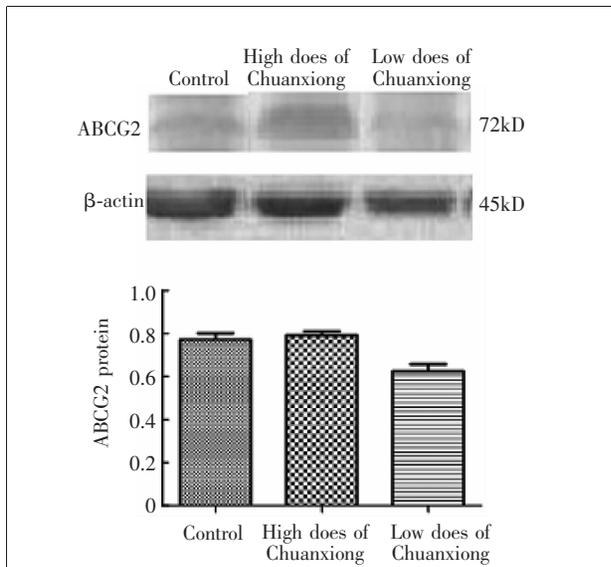


Figure 7 The expression of ABCG2 protein in vivo

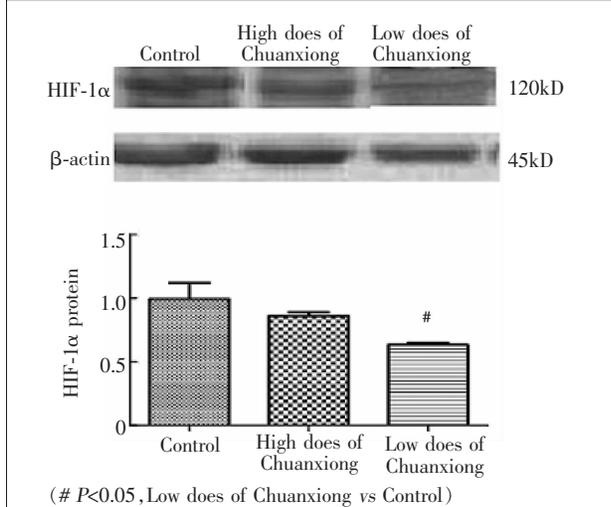


Figure 8 The expression of HIF-1 α protein in vivo

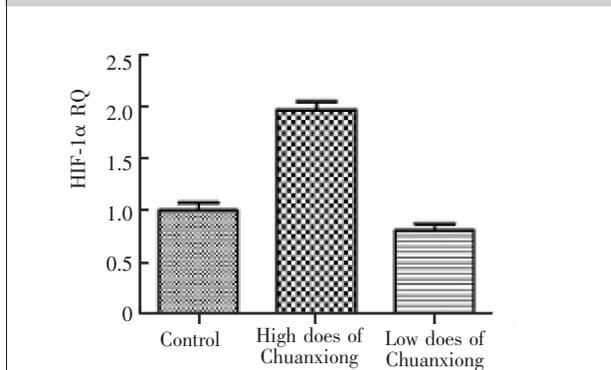


Figure 9 The expression of HIF-1 α mRNA in vivo

见的细胞因子,其高表达可促进肿瘤干细胞增殖。大量数据表明在低氧环境中抑制 HIF-1 α 、TAZ 及 SIAH1 的表达可明显减少乳腺癌干细胞的富集^[10],其作用机制主要与维持乳腺癌干细胞特性的转录激活剂 TAZ 的表达及活化有关。首先,HIF-1 直接抑制 WWTR1 基因表达并激活 TAZ mRNA 的转录;其次,HIF-1 可激活 SIAH1 转录基因,SIAH1 转录基因编码的泛素连接酶在降解 LAST2 的泛素蛋白酶体系中必不可少,而 LAST2 的表达可抑制 TAZ 的活性。实验证实具有明显的抗凋亡能力的前列腺癌球细胞高表达 Wnt/ β -catenin 及 HIF-1 α ^[11],在三阴性乳腺癌中,HIF 诱导谷氨酸转移酶及谷氨酸-半胱氨酸连接酶高表达,是乳腺癌肿瘤干细胞数目增多的原因之一^[12]。在持续低氧或间歇低氧的环境中,HIF-1 α 可以上调肿瘤细胞的自体吞噬能力、促进 EMT,增强肿瘤干细胞的侵袭转移能力^[13]。

本课题组前期体外实验研究证实川芎嗪可有效抑制肿瘤干细胞样细胞 HIF-1 α 蛋白的表达^[14]。在体内实验中,低剂量川芎可抑制肿瘤干细胞标志物 ABCG2 蛋白的表达,提示川芎对肿瘤干细胞具有一定的杀伤作用;另外低剂量川芎在抑制 ABCG2 蛋白表达的同时,HIF-1 α 蛋白也呈现低表达,与 ABCG2 蛋白表达趋势一致,进一步在 mRNA 水平上检测 HIF-1 α 表达发现,不同剂量川芎对 HIF-1 α mRNA 的表达与对照组相比,并没有明显的抑制作用,提示低剂量川芎对肿瘤干细胞的杀伤作用可能是通过抑制 HIF-1 α 蛋白表达起作用的。

参考文献:

[1] Britton KM, Kirby JA, Lennard TW, et al. Cancer stem cells and side population cells in breast cancer and metastasis [J]. *Cancers (Basel)*, 2011, 3(2):2106–2130.

[2] Zeng H, Park JW, Guo M, et al. Lack of ABCG2 expression and side population properties in human pluripotent stem cells [J]. *Stem Cells*, 2009, 27(10):2435–2445.

[3] Guo J, Wang B, Fu Z, et al. Hypoxic microenvironment induces emt and upgrades stem-like properties of gastric cancer cells [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2016, 15(1):60–68.

[4] Rehn M, Olsson A, Reckzeh K, et al. Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor regulates murine

hematopoietic stem cell function in the low-oxygenic nich [J]. *Blood*, 2011, 118(6):1534–1543.

[5] Inukai M, Hara A, Yasui Y, et al. Hypoxia-mediated cancer stem cells in pseudo-palisades with activation of hypoxia-inducible factor-1 α /Akt axis in glioblastoma [J]. *Hum Pathol*, 2015, 46(10):1496–1505.

[6] Conley SJ, Gheordunescu E, Kakarala P, et al. Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(8):2784–2789.

[7] Takebe N, Harris PJ, Warren RQ, et al. Targeting cancer stem cells by inhibiting Wnt, Notch, and Hedgehog pathways [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2011, 8(2):97–106.

[8] Santoyo-Ramos P, Likhatcheva M, García-Zepeda EA, et al. Hypoxia-inducible factors modulate the stemness and malignancy of colon cancer cells by playing opposite roles in canonical Wnt signaling [J]. *PLoS One*, 2014, 9(11):e112580.

[9] Mathieu J, Zhang Z, Zhou W, et al. HIF induces human embryonic stem cell markers in cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2011, 71(13):4640–4652.

[10] Xiang L, Gilkes DM, Hu H, et al. Hypoxia-inducible factor 1 mediates TAZ expression and nuclear localization to induce the breast cancer stem cell phenotype [J]. *Oncotarget*, 2014, 5 (24):12509–12527.

[11] Wang Y, Yin J, Qu X, et al. Prostate cancer Lncap stem-like cells demonstrate resistance to the hydros-induced apoptosis during the formation of spheres [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 74:1–8.

[12] Lu H, Samanta D, Xiang L, et al. Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(33):E4600–E4609.

[13] Zhu H, Wang D, Zhang L, et al. Upregulation of autophagy by hypoxia-inducible factor-1 α promotes EMT and metastatic ability of CD133+ pancreatic cancer stem-like cells during intermittent hypoxia [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32 (3):935–942.

[14] Yang D, Zhang PT, Wang YH, et al. Effect of TMP on expression of VEGF and HIF-1 α of PG CSC like cells [J]. *China Cancer*, 2015, 24(3):234–240. [杨栋, 张培彤, 王耀焯, 郭秀伟, 马雪曼. 川芎嗪对 PG 干细胞样细胞 HIF-1 α 、VEGF 蛋白表达的影响 [J]. *中国肿瘤*, 2015, 24(3):234–240.]