

粉防己碱通过 NF- κ B 通路抑制肿瘤相关成纤维细胞分泌 IL-8 阻断肺腺癌细胞的侵袭转移

万海军, 邱水玮, 陈霖, 于进江, 吕定量
(衢州市人民医院, 浙江 衢州 324000)

摘要: [目的] 研究粉防己碱(tetrandrine, Tet)通过调控肿瘤相关成纤维细胞(CAF)旁分泌因子的表达抑制肺腺癌细胞侵袭转移的作用效应, 探讨 NF- κ B 通路在 Tet 抑制 CAF 分泌 IL-8 促进肺腺癌细胞侵袭转移中的重要作用。[方法] 采用条件培养基(CM)刺激胚肺成纤维细胞 MRC5 建立 CAF 模型, Western blot 实验分析 Tet 作用前后 NF- κ B 通路蛋白 IKK、I κ B 和 p65 表达和磷酸化水平, ELISA 实验检测 Tet 作用前后 CAF 分泌 IL-8 情况, 以及 Tet 对 CAF 诱导肺腺癌细胞 H1975 侵袭转移的影响。抗体封闭培养基中游离的 IL-8, 分析 CAF 诱导 H1975 细胞侵袭转移能力的变化, 验证 IL-8 是否 Tet 调控 CAF 旁分泌因子的表达抑制 H1975 细胞侵袭转移的关键因子。[结果] Tet 作用 24h, CAF 中 NF- κ B 通路蛋白 IKK、I κ B 和 p65 蛋白的磷酸化水平显著性下降; Tet 组培养基上清液中 IL-8 含量为 (151.7 $\pm$ 24.8) pg/ml, 显著性低于模型组的 (384.7 $\pm$ 39.5) pg/ml (P <0.001); 模型组诱导 H1975 细胞迁移的数量为 141.7 $\pm$ 21.5, Tet 组为 41.3 $\pm$ 11.9 (P <0.01); 模型组诱导 H1975 细胞侵袭的数量为 129.7 $\pm$ 25.1, Tet 组为 56.7 $\pm$ 14.5 (P <0.05)。模型组诱导 H1975 细胞迁移的数量为 152.3 $\pm$ 25.5, IL-8 封闭(aIL-8)组为 61.7 $\pm$ 15.5 (P <0.01); 模型组诱导 H1975 细胞侵袭的数量为 136.3 $\pm$ 14.5, aIL-8 组为 73.3 $\pm$ 12.7 (P <0.01)。[结论] Tet 具有抑制 CAF 诱导肺腺癌细胞侵袭转移的作用效应, 其机制与抑制 NF- κ B 通路的活性和 CAF 分泌 IL-8 有关。

关键词: 粉防己碱; NF- κ B 通路; 肿瘤相关成纤维细胞; 肺腺癌; 侵袭转移

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)05-0402-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.05.B007

Tetrandrine Inhibits Invasion and Metastasis of Lung Adenocarcinoma Cells by Inhibiting IL-8 Secretion in Tumor-Associated Fibroblasts via NF- κ B Pathway

WAN Hai-jun, QIU Shui-wei, CHEN Lin, YU Jin-jiang, LV Ding-liang
(People's Hospital of Quzhou, Quzhou 324000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the inhibitory effect of tetrandrine (Tet) on the invasion and metastasis of lung adenocarcinoma cells and its mechanisms. [Methods] The conditioned medium(CM) was used to stimulate embryonic lung fibroblasts MRC5 to establish a cancer-associated fibroblast (CAF) model. Western blot was used to analyze the expression and phosphorylation level of NF- κ B pathway proteins IKK, I κ B and p65 before and after Tet treatment. ELISA assay was used to assess the secretion of IL-8 in CAF, and the ability of CAF to induce the invasion and metastasis of human lung adenocarcinoma H1975 cells was analyzed with Transwell assay. The free IL-8 in the culture medium was blocked by antibody (aIL-8 group), and the change of CAF induced effect was evaluated in H1975 cells. [Results] After 24h of Tet treatment, the phosphorylation levels of NF- κ B pathway proteins IKK, I κ B, and p65 protein in CAF decreased significantly. The content of IL-8 in the supernatant of the Tet group was (151.7 $\pm$ 24.8) pg/ml, which was significantly lower than the model group (384.7 $\pm$ 39.5) pg/ml (P <0.001). The number of H1975 cell migration in the model group was 141.7 $\pm$ 21.5, and that in Tet group was 41.3 $\pm$ 11.9 (P <0.01). The number of H1975 cell invasion in the model group was 129.7 $\pm$ 25.1, and that in Tet group was 56.7 $\pm$ 14.5 (P <0.05). The number of H1975 cell migration induced by the model group was 152.3 $\pm$ 25.5, and that of the IL-8 blocked(aIL-8) group was 61.7 $\pm$ 15.5 (P <0.01). The number of H1975 cells in the model group was 136.3 $\pm$ 14.5, and It was 73.3 $\pm$ 12.7 in the aIL-8 group (P <0.01). [Conclusion] Tetrandrine can inhibit the CAF-induced invasion and metastasis of lung adenocarcinoma cells, which is associated with the inhibition of the activity of NF- κ B pathway and the secretion of IL-8 by CAF.

Subject words: tetrandrine; NF- κ B pathway; cancer associated fibroblasts; lung adenocarcinoma; invasion and metastasis

基金项目: 浙江省中医药科学研究基金(2015ZA216); 衢州市指导性科技项目(2016068); 衢州市指导性科技项目(2018071)

通信作者: 吕定量, 科主任, 主任医师, 本科; 衢州市人民医院心胸外科, 浙江省衢州市柯城区钟楼底 2 号(324000); E-mail: LVdingliang@126.com

收稿日期: 2019-11-18; **修回日期:** 2020-02-04

肿瘤微环境在促进肿瘤细胞侵袭转移中具有重要作用,肿瘤-宿主界面微环境的平衡在肿瘤侵袭转移中发挥着关键作用^[1]。肿瘤相关成纤维细胞(cancer associated fibroblast, CAF)是构成上述微环境最重要的宿主细胞,通过直接的细胞-细胞接触、可溶性因子的分泌和对细胞外基质的重塑维持微环境稳态^[2-3]。深入研究肺腺癌侵袭性生长的分子机制,从丰富的中药材资源中筛选具有调控 CAF 抑制肿瘤恶性进展的活性成分,以提高患者的预后是研发肺癌新型疗法的重要途径。粉防己碱(tetrandrine, Tet)是中药粉防己、头花千金藤、马兜铃的主要活性成分,具有抗炎、抗过敏及抗肿瘤的作用^[4]。通过抑制 ERK/NF- κ B 通路,下调炎性介质 NO 和 MMP-9 的合成, Tet 起到保护肾小球系膜细胞的作用^[5]。Tet 通过抑制 Cyclin D1 和 CDK4 表达诱导 G1/S 期阻滞,激活 Bcl-2/Caspase 3/PARP 通路诱导细胞凋亡,阻断结肠癌细胞 HT29 的增殖^[6]。本文研究 Tet 是否抑制 CAF 诱导的 H1975 细胞侵袭转移,分析 CAF 细胞中 NF- κ B 通路的活性和分泌 IL-8 变化,验证 IL-8 是否是 Tet 调控 CAF 旁分泌因子的表达抑制 H1975 细胞侵袭转移的关键因子,以期明确 Tet 抑制 CAF 诱导的肺腺癌侵袭转移的分子机制。

1 材料与方法

1.1 药物和细胞株

粉防己碱(C38H42N2O6,分子量 622.75)购自成都曼思特生物科技有限公司,DMSO 配成 50mM 母液,-80℃保存,以完全培养基稀释至目标浓度。人胚肺成纤维细胞 MRC5 和人肺腺癌细胞 H1975 购自中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂

胎牛血清、RPMI 1640 培养液、胰酶购自 Corning 公司,IL-8 ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司; α -SMA、Phospho-IKK α / β (Ser176/180)、IKK α 、IKK β 、Phospho-I κ B α (Ser32)、I κ B α 、Phospho-NF- κ B p65(Ser536)、NF- κ B p65、GAPDH 抗体和 HRP 标记的鼠抗兔 IgG 抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司;IL-8 抗体购自 R&D Systems 公司;ECL 化学发光试剂购自 Millipore 公司;Matrigel 购自 BD 公司;Transwell 小室购自 Falcon 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 条件培养基制备

H1975 细胞培养于 75cm² 培养瓶中,待细胞密度为 70%~80%时更换 7ml 完全培养基继续培养 24h,收集上清 3000rpm 离心 10min 去除细胞及碎屑,0.22 μ m 孔径的滤器过滤,与完全培养基以 1:1 的比例混匀即为条件培养基(conditioned medium, CM)。

1.3.2 CAF 建立及实验分组^[6]

以 3 $\times$ 10⁵/孔的密度将 MRC5 细胞培养于 6 孔板中,CM 培养 72h,隔天换液 1 次。Western blot 实验检测 α -SMA 蛋白表达,明确是否成功建立 CAF 模型。本研究设空白对照组、模型组、Tet 组(Tet 2.5 μ M 作用 CAF 细胞 24h)和 aIL-8 组(IL-8 抗体 5 μ g/ml 作用 CAF 细胞 24h)。

1.3.3 Western blot 检测 CAF 中 NF- κ B 通路蛋白的表达及磷酸化水平

提取空白对照组、模型组和 Tet 组 CAF 的总蛋白,DC 法测定蛋白浓度。蛋白样品行 PAGE-SDS 电泳,湿法电转移至 PVDF 膜。3% BSA 封闭 1h,一抗室温孵育 2h,TBST 洗膜 3 次,HRP 标记的二抗室温孵育 1h,TBST 洗膜 3 次。滴加 ECL 于凝胶成像系统内曝光,分析目的蛋白的表达。

NF- κ B 通路蛋白的检测指标为 Phospho-IKK α / β (Ser176/180)、IKK α 、IKK β 、Phospho-I κ B α (Ser32)、I κ B α 、Phospho-NF- κ B p65(Ser536)和 NF- κ B p65。Image J 软件分析目的蛋白条带灰度值,与内参 GAPDH 条带灰度值的比值计算相对表达量。实验重复 3 次。

1.3.4 ELISA 实验检测 CAF 上清液中 IL-8 含量

收集 CAF 上清液,3000rpm 离心 10min 去除细胞及碎屑,根据 IL-8 ELISA 试剂盒说明书检测空白对照组、模型组和 Tet 组 CAF 上清液中 IL-8 含量。实验重复 3 次。

1.3.5 迁移实验分析细胞的迁移能力

于 24 孔培养板中放入 Transwell 小室(孔径 8 μ m),小室内加入含有 2 $\times$ 10⁴/300 μ l 的 H1975 细胞悬液,下层培养模型组、Tet 或 aIL-8 处理的 CAF。培养 24h,取出 Transwell 小室,用棉签擦去小室内层的细胞,PBS 清洗 1 次,浸入 1%结晶紫液染色 15min。镜下随机计数 8 个视野,以确定迁移细胞数量。实验重复 3 次。

1.3.6 侵袭实验分析细胞的侵袭能力

无血清 RPMI 1640 按 1:8 比例稀释液态的 Matrigel, 40 μ l 稀释后的 Matrigel 均匀铺于 Transwell 上室底部中央, 孵育 3h 待其干成凝胶, 后续实验步骤同迁移实验的操作步骤。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 20.0 统计软件, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差检验, 两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立 CAF 模型

与常规培养的 MRC5 细胞相比, 条件培养基培养处理的 MRC5 细胞 α -SMA 的表达水平显著性上升 ($P < 0.001$), 提示成功建立 CAF 模型 (Figure 1)。

2.2 Tet 作用前后 CAF 中 NF- κ B 通路蛋白表达和磷酸化水平

与模型组相比, Tet 组 CAF 细胞中 Phospho-IKK α / β (Ser176/180)、IKK α 、IKK β 、Phospho-I κ B α (Ser32)、Phospho-NF- κ B p65 (Ser536)、NF- κ B p65 的表达显著性下降, 而 I κ B α 表达显著性上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (Figure 2)。

2.3 Tet 作用前后 CAF 分泌 IL-8 变化

与模型组 (384.7 ± 39.5 pg/ml) 相比, Tet 组上清液中 IL-8 的含量 (151.7 ± 24.8 pg/ml) 显著性下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$) (Figure 3)。

2.4 Tet 作用前后 CAF 诱导 H1975 细胞侵袭转移的能力

与模型组 (141.7 ± 21.5)

相比, Tet 组 CAF 诱导 H1975 细胞迁移的能力 (41.3 ± 11.9) 显著性下降 ($P < 0.01$) (Figure 4A)。与模型组 (129.7 ± 25.1) 相比, Tet 组 (56.7 ± 14.5) CAF 诱导 H1975 细胞侵袭的能力显著性下降 ($P < 0.05$) (Figure 4B)。

2.5 IL-8 介导 CAF 促进 H1975 细胞侵袭转移

与模型组 (152.3 ± 25.5) 相比, aIL-8 组 CAF 诱导

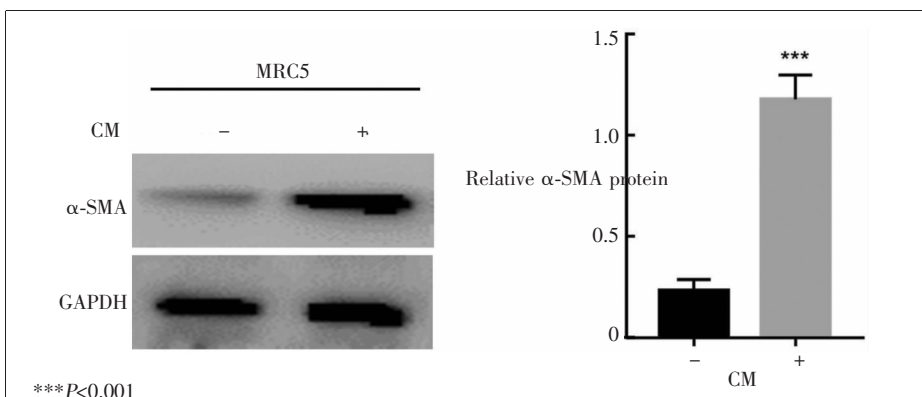
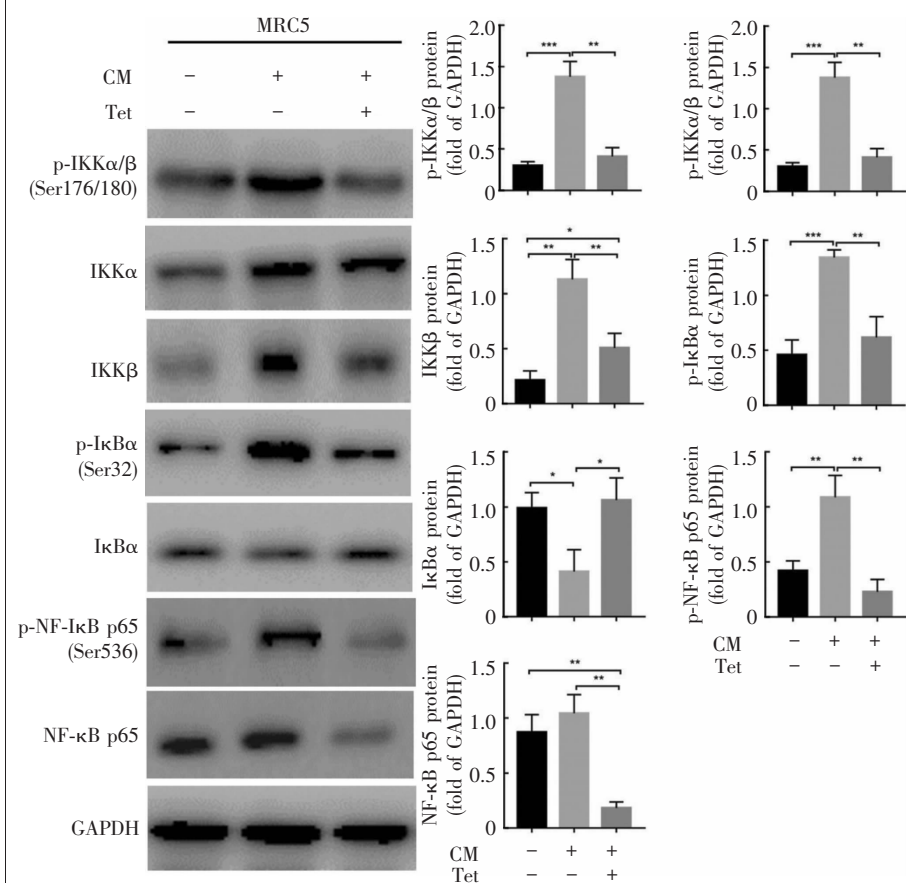


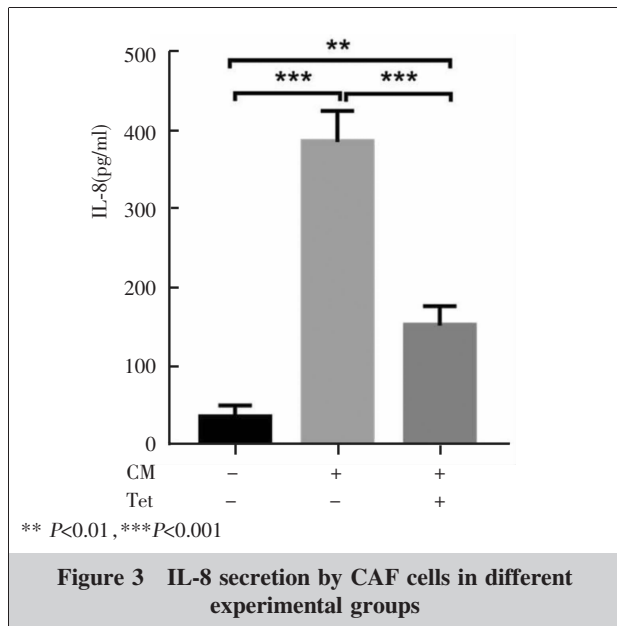
Figure 1 α -SMA expression levels in MRC5 cells in different experimental groups



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Figure 2 NF- κ B pathway protein expression and phosphorylation levels in CAF cells of different experimental groups

H1975 细胞迁移的能力(61.7 ± 15.5)显著性下降($P < 0.01$)(Figure 5A)。与模型组(136.3 ± 14.5)相比,aIL-8 组 CAF 诱导 H1975 细胞侵袭的能力(73.3 ± 12.7)显著性下降($P < 0.01$)(Figure 5B)。



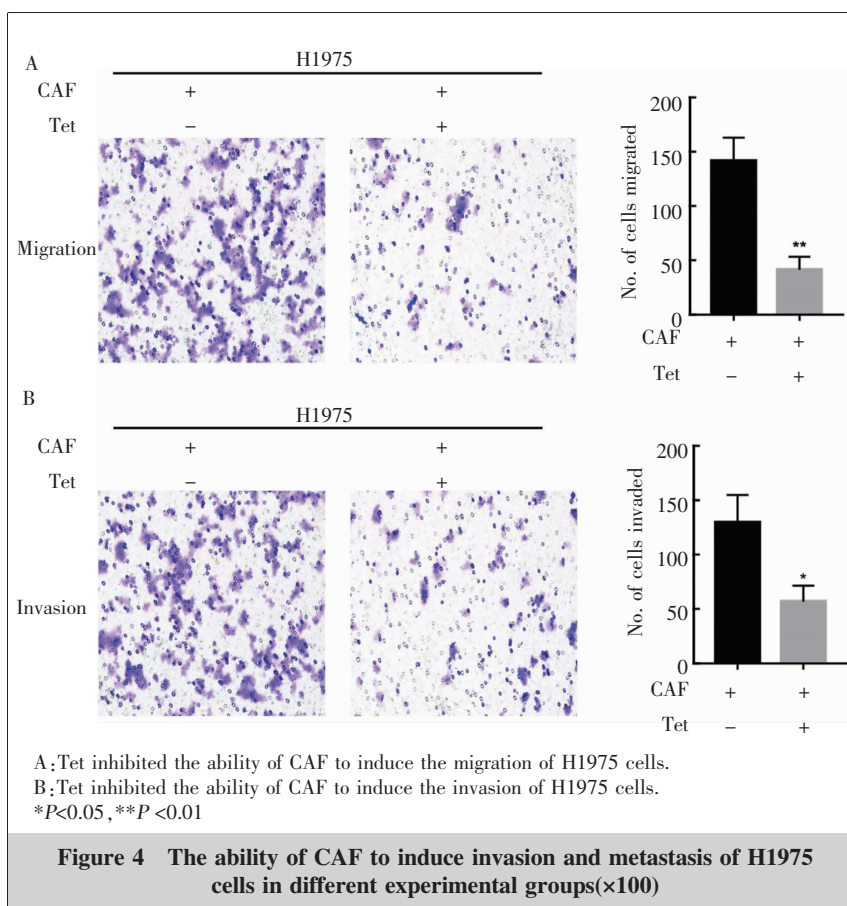
3 讨论

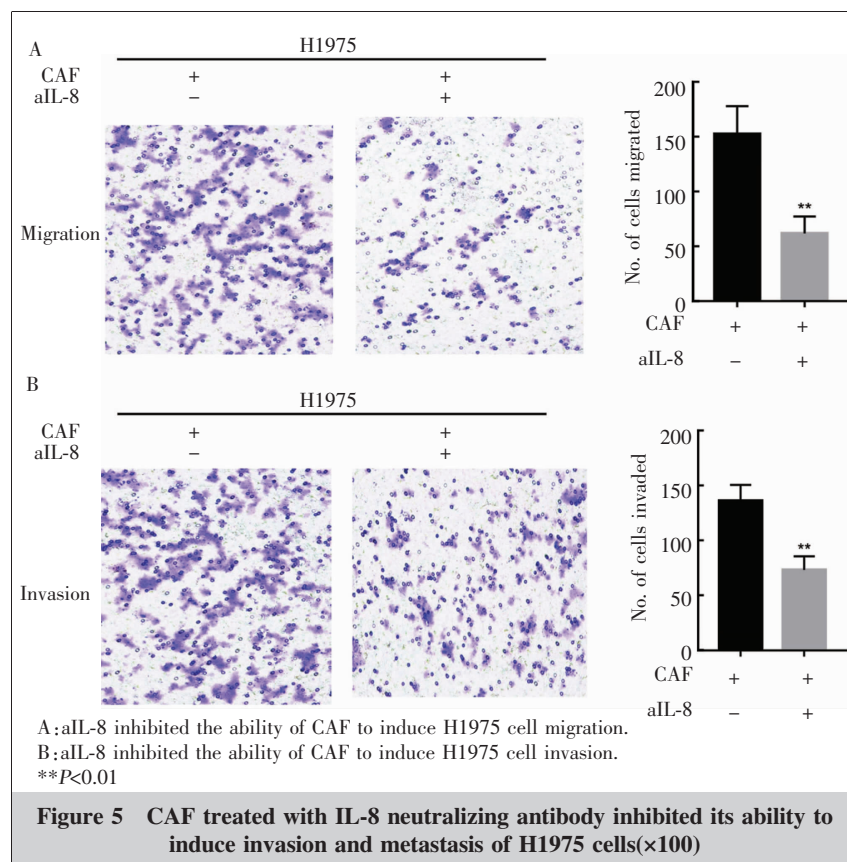
由肿瘤细胞、CAF 等宿主细胞、细胞外基质和分泌因子组成的肿瘤微环境在肺腺癌的侵袭转移过程中发挥关键作用。研究证实,细胞信号转导的复杂网络调控 CAF 表型转化及其塑造肿瘤微环境的作用,其中对 NF- κ B 通路调节 CAF 生物学行为的研究较为深入。CAF 通过分泌 IL-6 诱导头颈部肿瘤细胞表达骨桥蛋白(osteopontin, OPN)促进其侵袭转移^[7]。Erez 等^[8]等发现 NF- κ B 通路在乳腺癌、卵巢癌 CAF 中持续激活,促进靶基因 IL-6、COX-2 和 CXCL1 的表达形成炎性微环境导致肿瘤转移。本研究应用条件培养基刺激 MRC5 细胞成功地建立 CAF 模型, NF- κ B 通路在 CAF 中被激活。因此,具有阻断 CAF 中 NF- κ B 通路激活作用的中药活性成分是潜在的抑制肺腺癌侵袭转移的药物。

中药活性成分 Tet 具有通过抑制 NF- κ B 通路阻断炎症反应、肿瘤细胞增殖和转移的作用^[5,9-10]。Tet 通过抑制 ERK/NF- κ B 通路,下调肾小球系膜细胞合

成炎性介质 NO 和 MMP-9^[5]。Tet 抑制 Akt/NF- κ B/MMP-9 通路的活化阻断肾细胞癌的侵袭转移^[9]。Tet 通过抑制 NF- κ B 通路阻断脑胶质瘤细胞 GBM 8401 侵袭转移的潜能^[10]。本研究发现,Tet 组 CAF 中 NF- κ B 通路蛋白 IKK、I κ B 和 p65 蛋白的磷酸化水平显著性下降,证实 Tet 具有抑制 CAF 中 NF- κ B 通路活性的作用;与模型组相比,Tet 组诱导肺腺癌细胞 H1975 侵袭转移的作用显著性减弱。

CAF 促进肿瘤细胞增殖和转移能力的作用与其分泌 TNF α ^[11]、TGF- β ^[12]、IL-6^[13-14]、IL-8^[13-15]等细胞因子有关。天然产物 Conophylline 通过抑制 CAF 分泌促癌细胞因子 IL-8、IL-6、CCL2 和 CXCL12,阻断胰腺癌细胞的转移和在体内外的增殖能力^[13]。同时封闭 IL-6 和 IL-8 几乎可以完全抑制 CAF 诱导人黑色素瘤细胞侵袭转移的作用^[14]。转





录因子 Sohlh2 通过抑制 IL-8 的分泌阻断乳腺癌细胞 MDA-MB-231 和 MCF-7 发生上皮间质转化和侵袭转移^[15]。IL-8 亦是 NF- κ B 通路的下游靶基因^[16]。因此,本研究检测了 Tet 对 CAF 分泌 IL-8 的影响,发现 Tet 处理的 CAF 上清液中 IL-8 含量显著性下降;抗体中和 CAF 上清液中的 IL-8,CAF 诱导 H1975 细胞侵袭转移的能力显著性下降,提示 IL-8 在 Tet 阻断 CAF 介导的 H1975 细胞侵袭性生长中具有重要作用。

综上所述,Tet 具有抑制 CAF 诱导肺腺癌细胞侵袭转移的作用,其机制与抑制 NF- κ B 通路的活性和 CAF 分泌 IL-8 有关,但 Tet 调控 NF- κ B 通路活性的具体靶点;除 IL-8 外,Tet 是否通过调节 CAF 释放外泌体阻断肺腺癌的转移等有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface[J]. Nature, 2001, 411(6835): 375-379.
- [2] An Y, Liu F, Chen Y, et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in cancer[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(1): 13-24.
- [3] Kalluri R. The biology and function of fibroblasts in cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2016, 16(9): 582-598.
- [4] Bhagya N, Chandrashekar KR. Tetrandrine—a molecule of wide bioactivity[J]. Phytochemistry, 2016, 125: 5-13.
- [5] Wu CJ, Wang YH, Lin CJ, et al. Tetrandrine down-regulates ERK/NF- κ B signaling and inhibits activation of mesangial cells [J]. Toxicol in Vitro, 2011, 25(8): 1834-1840.
- [6] Li J, Wang Q, Wang Z, et al. Tetrandrine inhibits colon carcinoma HT-29 cells growth via the Bcl-2/Caspase 3/PARP pathway and G1/S phase [J]. Biosci Rep,

2019, 39(5): pii: BSR20182109.

- [7] Qin X, Yan M, Wang X, et al. Cancer-associated fibroblast-derived IL-6 promotes head and neck cancer progression via the osteopontin-NF- κ B signaling pathway[J]. Theranostics, 2018, 8(4): 921-940.
- [8] Erez N, Glanz S, Raz Y, et al. Cancer associated fibroblasts express pro-inflammatory factors in human breast and ovarian tumors [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 437(3): 397-402.
- [9] Chen S, Liu W, Wang K, et al. Tetrandrine inhibits migration and invasion of human renal cell carcinoma by regulating Akt/NF- κ B/MMP-9 signaling[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173725.
- [10] Jiang YW, Cheng HY, Kuo CL, et al. Tetrandrine inhibits human brain glioblastoma multiforme GBM 8401 cancer cell migration and invasion in vitro[J]. Environ Toxicol, 2019, 34(4): 364-374.
- [11] Mueller L, von Seggern L, Schumacher J, et al. TNF- α similarly induces IL-6 and MCP-1 in fibroblasts from colorectal liver metastases and normal liver fibroblasts [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 397(3): 586-591.
- [12] Yang J, Lu Y, Lin YY, et al. Vascular mimicry formation is promoted by paracrine TGF- β and SDF1 of cancer-associated fibroblasts and inhibited by miR-101 in hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Lett, 2016, 383(1): 18-27.
- [13] Ishii N, Araki K, Yokobori T, et al. Conophylline suppresses pancreatic cancer desmoplasia and cancer-promoting cytokines produced by cancer-associated fibroblasts [J]. Cancer Sci, 2019, 110(1): 334-344.
- [14] Li X, Fan Q, Li J, et al. MiR-124 down-regulation is critical for cancer associated fibroblasts-enhanced tumor growth of oral carcinoma[J]. Exp Cell Res, 2017, 351(1): 100-108.
- [15] Ji S, Zhang W, Zhang X, et al. Sohlh2 suppresses epithelial to mesenchymal transition in breast cancer via down-regulation of IL-8 [J]. Oncotarget, 2016, 7(31): 49411-49424.
- [16] Geng R, Tan X, Wu J, et al. RNF183 promotes proliferation and metastasis of colorectal cancer cells via activation of NF- κ B-IL-8 axis[J]. Cell Death Dis, 2017, 8(8): e2994.