

. 实验研究 .

苦参碱联合替莫唑胺对大鼠脑胶质瘤 MMP2、MMP9、VEGF 表达的影响

郝文炯 罗 卫 白晓斌 白茫茫 王茂德

【摘要】目的 探讨苦参碱联合替莫唑胺对大鼠脑胶质瘤基质金属蛋白酶(MMP)-2、MMP-9、血管内皮生长因子(VEGF)表达的影响。**方法** 建立大鼠 C6 脑胶质瘤模型,采用 MRI 扫描、HE 染色、免疫组织化学确定模型建立成功。将 C6 脑胶质瘤模型大鼠随机分成 4 组,每组各 20 只:①对照组,腹腔注射生理盐水(100 ml/kg);②苦参碱组,腹腔注射苦参碱(20 mg/kg);③替莫唑胺组,腹腔注射替莫唑胺(25 mg/kg);④联合组,腹腔注射苦参碱(20 mg/kg)和替莫唑胺(25 mg/kg);每天给药 1 次,连续 14 d。药物治疗后 14 d 处死大鼠,取胶质瘤组织,采用免疫印迹法和实时荧光定量 PCR 检测 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 蛋白和 mRNA 表达情况。**结果** 大鼠注射胶质瘤 C6 细胞后 7 d, MRI 扫描可见脑胶质瘤的存在, HE 染色发现组织表现出神经胶质瘤的侵袭性生长和细胞核分解,免疫组织化学结果显示也证明大鼠存在脑胶质瘤。与对照组相比,苦参碱组、替莫唑胺组与联合组 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白和 mRNA 表达水平均显著降低($P<0.05$);联合组 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白和 mRNA 表达水平均显著低于苦参碱组和替莫唑胺组($P<0.05$),而苦参碱组 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白和 mRNA 表达水平均显著低于替莫唑胺组($P<0.05$)。**结论** 苦参碱和替莫唑胺均可显著降低大鼠脑胶质瘤 MMP-2、MMP-9、VEGF 表达水平,而且,二者联用作用更强。

【关键词】 胶质瘤; C6 胶质瘤; 大鼠模型; 苦参碱; 替莫唑胺; 基质金属蛋白酶; 血管内皮生长因子
【文章编号】 1009-153X(2017)09-0642-04 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 739.41; Q 786

Effects of matrine combined with temozolomide on the expression of MMP2, MMP9 and VEGF in glioma tissues in rats with gliomas

HAO Wen-jiong¹, LUO Wei², BAI Xiao-bin³, BAI Mang-mang¹, WANG Mao-de³. 1. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital, Yan'an University, Yan'an 716000, China; 2. Department of Neurosurgery, The Affiliated Hospital, Shanxi Traditional Chinese Medicine University, Xianyang 712000, China; 3. Department of Neurosurgery, The First Affiliated Hospital, Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of matrine combined with temozolomide on the expressions of matrix metalloproteinases (MMP)2, MMP9 and vascular endothelial growth factor (VEGF) in glioma tissues in rats. **Methods** C6 glioma models were established in 80 rats. The glioma models were evaluated by MRI, HE staining and immunohistochemical technique. The rats with C6 gliomas were randomly divided into 4 groups of 20 animals each, i.e. control group in which the rats were treated only by physiological saline, matrine group in which the rats were treated only by matrine, temozolomide group in which the rats were treated only by temozolomide, and combination group in which the rats were treated by matrine and temozolomide. The solution of drug corresponding to each group was intraperitoneally injected once a day for 14 days. The expressions of MMP2, MMP9 and VEGF protein and mRNA in the glioma tissues were detected respectively by western blot and qRT-PCR in all the groups. **Results** The successful establishment of C6 cell glioma model was proved by MRI, HE staining and immunohistochemical technique. The levels of MMP2, MMP9, VEGF protein and mRNA expressions were significantly lower in the combination group than those in matrine group ($P<0.05$), which were significantly lower than those in temozolomide group ($P<0.05$), which significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusions** Matrine can enhance the chemotherapeutic effect of temozolomide on gliomas in the rats and matrine combined with temozolomide can significantly reduce the expressions of MMP2, MMP9, VEGF protein and mRNA in the glioma tissues in the rats.

【Key words】 C6 glioma; Model; Matrine; Temozolomide; Rats

脑胶质瘤占颅内恶性肿瘤的 40%~60%, 手术治疗
疗的生存期仅为 12~18 个月^[1]。目前, 术后常辅助放
疗和化疗, 其中替莫唑胺是广泛用于胶质瘤治疗的
新型化疗药物, 但是副作用多, 且肿瘤复发率高^[2], 因
此探索新型治疗方案迫在眉睫。近期研究发现, 苦
参碱可通过血脑屏障提高胶质瘤细胞 Fas 表达, 促
进胶质瘤细胞凋亡^[3]。本研究拟通过建立大鼠 C6 脑
胶质瘤模型, 应用苦参碱联合替莫唑胺治疗, 观察胶

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2017.09.011

作者单位: 716000 陕西延安, 延安大学附属医院神经外科(郝文炯、白茫茫); 712000 陕西咸阳, 陕西中医药大学附属医院神经外科(罗卫); 710061 西安, 西安交通大学第一附属医院神经外科(白晓斌、王茂德)

通讯作者: 王茂德, E-mail: maodewang@163.com

质瘤组织基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMP)-2、MMP-9 和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达变化。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 大鼠神经胶质瘤 C6 细胞购自中国科学院北京生命科学研究院,在含 10%胎牛血清的 PRMI 1640 培养基(美国 Thermo Fisher Scientific 公司)中单层培养。

1.2 大鼠 C6 脑胶质瘤模型 取 80 只 SPF 级 SD 成年雄性大鼠(9~10 周龄,体重 280~350 g;购自昆明动物研究所),根据文献[4]报道方法建立大鼠 C6 脑胶质瘤模型。大鼠腹腔注射 10%水合氯醛(3 ml/kg;美国 Sigma 公司)麻醉后,固定在立体定位仪中。切开头皮暴露颅骨,距前凶门 1.0 mm、矢状缝合线外侧 1.0 mm 处钻孔。将注射器插入大脑皮层 5 mm,并注射 10 μ l C6 胶质瘤细胞悬液(10^6 个细胞),持续 10 min,并在脑中停留 5 min。根据文献[5]报道,注射 C6 细胞后 7 d, MRI 监测大鼠脑中胶质瘤的存在,通过 MRI 扫描获得 T₁加权冠状位和轴位影像。

1.3 胶质纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)表达情况 根据文献[6,7]报道方法,通过组织学观察和免疫组织化学分析 GFAP 表达,进一步鉴定大鼠脑胶质瘤模型建立成功与否。

1.4 实验分组及给药 注射 C6 细胞后 14 d,将建模成功的大鼠随机分为 4 组,每组 20 只:①对照组,腹腔注射生理盐水(100 ml/kg);②苦参碱组,腹腔注射苦参碱(20 mg/kg);③替莫唑胺组,腹腔注射替莫唑胺(25 mg/kg);④联合组,腹腔注射苦参碱(20 mg/kg)和替莫唑胺(25 mg/kg);每天给药 1 次,连续 14 d。药物治疗后 14 d 处死大鼠,取胶质瘤组织迅速冻存于 -80 $^{\circ}$ C 以进行后续实验。

1.5 免疫印迹分析 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达 使用含 PMSF 的 RIPA 蛋白提取试剂裂解组织提取蛋白。4 $^{\circ}$ C、12 000 g 离心 10 min 后,通过 10% SDS-PAGE 电泳分离上清液,将分离的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。5%脱脂乳封闭 1 h,并用兔抗大鼠 MMP-2 多克隆抗体(1:750;英国 Abcom 公司)、兔抗大鼠 MMP-9 多克隆抗体(1:200;英国 Abcom 公司)、兔抗大鼠 VEGF 多克隆抗体(1:200;英国 Abcom 公司)和内部对照 GAPDH 多克隆抗体(1:200;英国 Abcom 公司)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。将膜用辣根过氧化物酶缀合的二抗在室温下孵育 1 h。使用 Quantity One 软件评估蛋白相对表达水平。

1.6 实时荧光定量 PCR 分析 MMP-2、MMP-9 和 VEGF mRNA 表达 使用 TRIzol 试剂从组织中提取总 RNA。使用 Reverse Transcription Kit(日本 Takara 公司)将 RNA 逆转录为 cDNA。使用 SYBR Green 进行实时 PCR 分析。以 β -actin 作为内参。利用 ABI7500 系统进行 PCR 反应。用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 mRNA 相对表达水平。PCR 反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 15 s, 共 40 个循环。

1.7 统计学分析 采用 SPSS 21.0 软件分析;计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 描述,行 t 检验; $P<0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 模型鉴定结果 MRI 扫描可见脑胶质瘤的存在(图 1A)。HE 染色发现组织表现出神经胶质瘤的侵袭性生长和细胞核分解,与正常组织相比,肿瘤周围组织显示较少的静脉湖,且癌细胞侵袭正常脑组织;红线表明肿瘤细胞与正常脑组织的边界(图 1B)。免疫组织化学染色结果显示,许多细胞表达呈棕褐色颗粒的 GFAP,表明大鼠存在脑胶质瘤(图 1C)。

2.2 MMP-2、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达变化 与对照组相比,苦参碱组、替莫唑胺组与联合组 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$)。联合组 MMP-2、MMP-9、VEGF 蛋白表达水平均显著低于苦参碱组和替莫唑胺组($P<0.05$),而苦参碱组 3 种蛋白表达水平均显著低于替莫唑胺组($P<0.05$)。见图 2。

2.3 MMP-2、MMP-9 和 VEGF mRNA 表达变化 与对照组相比,苦参碱组、替莫唑胺组与联合组 MMP-2、MMP-9、VEGF mRNA 表达水平均显著降低($P<0.05$)。联合组 MMP-2、MMP-9、VEGF mRNA 表达水平均显著低于苦参碱组和替莫唑胺组($P<0.05$),而苦参碱组 3 种 mRNA 表达水平均显著低于替莫唑胺组($P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

C6 胶质瘤大鼠模型成瘤率高,生长快,是筛选抗肿瘤药物最常用的理想动物模型。本研究建立大鼠 C6 脑胶质瘤模型,经 MRI 扫描、HE 染色、免疫组织化学染色证实模型建立成功。

恶性脑胶质瘤的特征是正常脑结构的弥漫性、浸润性侵袭,此特征是脑胶质瘤临床治疗难度大和疾病预后差的主要原因。肿瘤侵袭是复杂的现象,其涉及细胞外基质降解和肿瘤细胞转移到正常的相邻组织中^[8]。MMP 通过降解细胞外基质中多种蛋

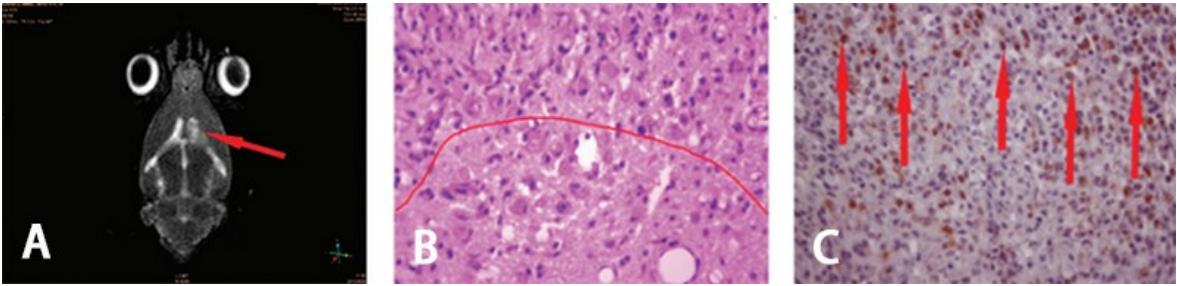


图 1 大鼠 C6 脑胶质瘤模型鉴定
A. 大鼠注射胶质瘤 C6 细胞后 7d, MRI 扫描结果; B. 组织 HE 染色; C. 胶质纤维酸性蛋白免疫组化染色

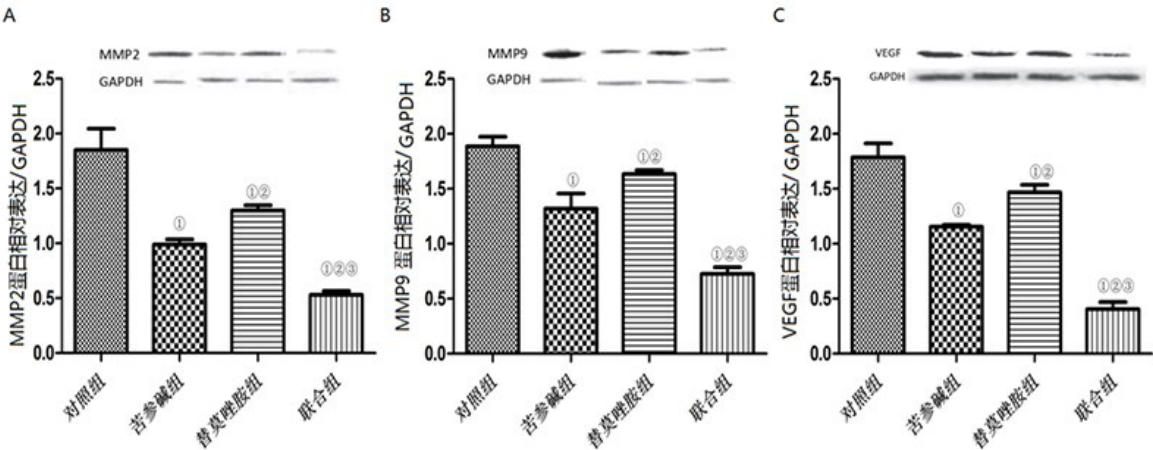


图 2 大鼠 C6 胶质瘤组织 MMP2、MMP9 和 VEGF 蛋白表达
①表示与对照组相比, $P<0.05$; ②表示与苦参碱组相比, $P<0.05$; ③表示与替莫唑胺组相比, $P<0.05$; MMP2: 基质金属蛋白酶 2; MMP9: 基质金属蛋白酶 9; VEGF: 血管内皮细胞生长因子; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

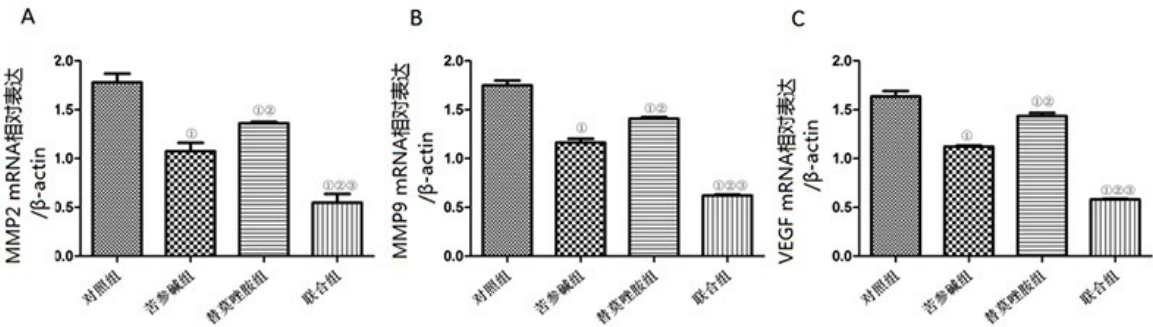


图 3 大鼠 C6 胶质瘤组织 MMP2、MMP9 和 VEGF mRNA 表达
①表示与对照组相比, $P<0.05$; ②表示与苦参碱组相比, $P<0.05$; ③表示与替莫唑胺组相比, $P<0.05$; MMP2: 基质金属蛋白酶 2; MMP9: 基质金属蛋白酶 9; VEGF: 血管内皮细胞生长因子; GAPDH: 甘油醛-3-磷酸脱氢酶

白,在肿瘤转移过程中起关键作用。神经胶质瘤 MMP 表达的增加直接或间接地降解血管细胞外基质和基底膜,导致胶质瘤的侵袭和肿瘤周围组织水肿。因此, MMP 被认为是脑胶质瘤进展的生物标志物^[9,10]。研究报道 MMP-9 和 MMP-2 在体外维持细胞外基质的刚性,并促进已建立的胶质瘤细胞系的结构刚性、运动和增殖^[11]。MMP 阻断剂抑制视神经外

植体中 C6 胶质瘤细胞的侵袭,且 BT5C 大鼠神经胶质瘤细胞分泌的 MMP-2 和 MMP-9 破坏培养的脑组织;体外研究表明,由胶质瘤细胞分泌的 MMP 可以使细胞外基质蛋白分解,促进肿瘤细胞向正常脑组织内侵袭,促使脑胶质瘤的浸润^[12]。

苦参碱具有广泛的药理作用,通过抑制 p38 MAPK 和 AKT 信号通路调节 EMT,从而抑制胶质瘤

细胞系在体外的迁移和侵袭能力^[13]。本研究发现,苦参碱组、替莫唑胺组及联合组 C6 脑胶质瘤大鼠 MMP-2、MMP-9 蛋白和 mRNA 表达水平均显著降低;联合治疗时,其表达水平显著低于单独使用苦参碱和替莫唑胺,且苦参碱治疗时,蛋白和 mRNA 表达水平均显著低于替莫唑胺治疗。这提示苦参碱和替莫唑胺均可通过降低胶质瘤细胞表达 MMP-2 和 MMP-9,抑制瘤细胞在正常脑组织中的浸润,且苦参碱的作用显著强于替莫唑胺,二者联合使用时,苦参碱可增强替莫唑胺的作用效果。

VEGF 是血管生成的关键调节因子,在胶质瘤的肿瘤形成、进展和复发中起重要作用。VEGF 表达上调,通过诱导血管生成而促进癌症进展,而增强的 VEGF 表达和 VEGF 受体活化诱导恶性肿瘤细胞的运动性。研究发现,VEGF 在脑胶质瘤体内高表达,且导致肿瘤微血管密度增加^[14]。因此,VEGF 的表达可作为脑胶质瘤评估的生物指标。研究发现,苦参碱可通过下调肿瘤细胞内 VEGF 的表达抑制肿瘤血管生成,从而发挥抗肝癌作用^[15]。近来研究表明,苦参碱能抑制胶质瘤 C6 细胞的增殖,并通过下调 VEGF 蛋白表达而起抗肿瘤作用^[16]。本研究苦参碱治疗可显著下调 C6 脑胶质瘤大鼠 VEGF 的表达水平,且作用效果显著高于替莫唑胺;二者联合治疗时,对 VEGF 表达水平的下调作用更显著。这提示苦参碱可增强替莫唑胺的作用效果。

综上所述,苦参碱和替莫唑胺均可显著降低胶质瘤大鼠 MMP-2、MMP-9、VEGF 表达水平,二者联用效果更好。

【参考文献】

[1] Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults [J]. *New Engl J Med*, 2008, 359(5): 492-507.

[2] 付锐,徐航,罗杰,等. 冷冻联合全反式维甲酸抑制大鼠 C6 脑胶质瘤增殖的实验研究[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2012(12): 746-749.

[3] 戚基萍,刘微,张淑君,等. 苦参碱对胶质瘤大鼠模型中 Fas 表达的调节作用的实验研究[J]. *中华神经医学杂志*, 2009, 8(4): 355-358.

[4] Zelenkov P, Baumgartner R, Bise K, *et al.* Acute morphological sequelae of photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the C6 spheroid model [J]. *J Neurooncol*, 2007, 82(1): 49-60.

[5] Ulmer S, Reeh M, Krause J, *et al.* Dynamic contrast-en-

hanced susceptibility-weighted perfusion MRI (DSC-MRI) in a glioma model of the rat brain using a conventional receive-only surface coil with a inner diameter of 47 mm at a clinical 1.5 T scanner [J]. *J Neurosci Methods*, 2008, 172(2): 168-172.

[6] Koderä T, Nakagawa T, Kubota T, *et al.* The expression and activation of matrix metalloproteinase-2 in rat brain after implantation of C6 rat glioma cells [J]. *J Neurooncol*, 2000, 46(2): 105-114.

[7] 杨萍,刘彦仿,刘健,等. 铁蛋白、胶质纤维酸性蛋白、S-100 蛋白在脑胶质瘤中的免疫组化及免疫电镜研究[J]. *肿瘤*, 1988, 8(s1): 107-108.

[8] Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic [J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1450-64.

[9] Hua H, Li M, Luo T, *et al.* Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2011, 68(23): 3853-68.

[10] Sathia B, Tran NL, Symons M, *et al.* Molecular pathways triggering glioma cell invasion [J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2006, 6(4): 613-626.

[11] Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, *et al.* Angiogenesis and invasion in glioma [J]. *Brain Tumor Pathol*, 2011, 28(1): 13-24.

[12] Ulrich R, Gerhäuser I, Seeliger F, *et al.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the developing mouse brain and spinal cord: a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction study [J]. *Dev Neurosci*, 2005, 27(6): 408-418.

[13] Wang Z, Wu Y, Wang Y, *et al.* Matrine inhibits the invasive properties of human glioma cells by regulating epithelial to mesenchymal transition [J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(5): 3682-3686.

[14] 项高波,邓勇,鲍风,等. IL-24 与 VEGF 在脑胶质瘤中的表达以及与肿瘤微血管密度的关系[J]. *安徽医科大学学报*, 2013, 48(7): 810-813.

[15] 赵海亮,黄桂柳,黄赞松,等. 苦参碱抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖及其对 VEGF、MMP-9 表达的影响[J]. *右江民族医学院学报*, 2016, 38(1): 1-5.

[16] 孔珊珊,张淑君,姚婕,等. 苦参碱对胶质瘤 C6 细胞血管生成相关因子的影响[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2016, 30(7): 646-649.

(2017-05-13 收稿, 2017-07-03 修回)