

引文格式:李超,钱新华,千新来,李航,冯思佳. 黄芪多糖对视网膜母细胞瘤细胞侵袭能力的影响[J]. 眼科新进展,2014,34(6):530-532. doi:10.13389/j.cnki.rao.2014.0145

【实验研究】

# 黄芪多糖对视网膜母细胞瘤细胞侵袭能力的影响<sup>△</sup>

李超 钱新华 千新来 李航 冯思佳

作者简介:李超,男,1979 出生,河南汝州人,在读博士研究生。研究方向:血液与遗传。E-mail:lichao@xxmu.edu.cn

About LI Chao: Male, born in 1979. Medical doctor. E-mail: lichao@xxmu.edu.cn

收稿日期:2014-04-15  
修回日期:2014-05-20

本文编辑:方红玲

△基金项目:河南省基础与前沿技术  
研究计划(编号:122300410121)

作者单位:510515 广东省广州市,南方医科大学南方医院新生儿科(李超,钱新华);453003 河南省新乡市,新乡医学院病理学教研室(李超,千新来,李航,冯思佳)

通讯作者:钱新华, E-mail: qxh\_nfyf@163.com

Received date: Apr 15, 2014  
Accepted date: May 20, 2014

Foundation item: Henan Province Basic and Frontier Technology Research Program(No:122300410121)

From the Department of Neonatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University(LI Chao, QIAN Xin-Hua), Guangzhou 510515, Guangdong Province, China; Department of Pathology, Xinxiang Medical University(LI Chao, QIAN Xin-Lai, LI Hang, FENG Si-Jia), Xinxiang 453003, Henan Province, China

Responsible author: QIAN Xin-Hua, E-mail: qxh\_nfyf@163.com

与对照组每高倍视野(54.667±4.041)个和(26.000±2.646)个细胞相比,APS组RB44细胞穿过Transwell小室基膜的细胞数量显著减少,分别为每高倍视野(26.667±4.041)个和(8.667±2.082)个细胞(均为 $P<0.01$ )。Western blotting结果显示:与对照组(0.128±0.019)相比,APS组RB44细胞中E-cadherin的表达(0.117±0.019)差异无统计学意义( $P=0.486$ ),而MMP-9和MMP-2的表达(0.134±0.008、0.085±0.006)与对照组(0.269±0.187、0.223±0.013)相比均显著降低,差异均有显著统计学意义(均为 $P<0.01$ )。结论 APS可显著抑制视网膜母细胞瘤RB44细胞的侵袭能力,其机制可能与抑制MMP-9和MMP-2的表达有关。

【眼科新进展,2014,34(6):530-532】

视网膜母细胞瘤是婴幼儿眼内最常见的原发性恶性肿瘤,严重威胁患儿的生命,其发病率约为1/20 000,且呈逐年上升趋势<sup>[1-2]</sup>。视网膜母细胞瘤的治疗以手术为主,但其严重影响患儿的生存质量。因此,以保存患儿眼球并尽可能保存一定程度视力的包括中药治疗在内的综合治疗手段正日益受到重

## Effects of astragalus polysaccharide on the invasive ability of retinoblastoma cells

LI Chao, QIAN Xin-Hua, QIAN Xin-Lai, LI Hang, FENG Si-Jia

【Key words】 astragalus polysaccharide; retinoblastoma; invasion; matrix metalloproteinase; E-cadherin

【Abstract】 Objective To explore the effects of astragalus polysaccharide (APS) on the invasive potential of retinoblastoma cells and its mechanisms. Methods Taken RB44 cells untreated with APS as the control group, RB44 cells treated with 200 mg · L<sup>-1</sup> APS for 48 hours as the APS group. The influence of APS on the migration and invasion potential of RB44 cells was determined via transwell migration test and transwell invasion test. The changes of invasion related genes before and after treated with APS were detected by Western blotting assay. Results The results of transwell migration test and transwell invasion test revealed that, compared with control group (54.667 ± 4.041) cell/HPF and (26.000 ± 2.646) cell/HPF number of RB44 cells through basement membrane of chamber in APS group (26.667 ± 4.041) cell/HPF and (8.667 ± 2.082) cell/HPF were significantly decreased (both  $P<0.01$ ). The results from Western blotting demonstrated that, compared with expression of E-cadherin in control group (0.128 ± 0.019), the expression of E-cadherin in APS group (0.117 ± 0.019) was no significant difference ( $P>0.05$ ), while the expressions of MMP-9 and MMP-2 in APS group (0.134 ± 0.008, 0.085 ± 0.006) were significantly increased compared with control group (0.269 ± 0.187, 0.223 ± 0.013) (both  $P<0.01$ ). Conclusion APS could remarkably inhibit the invasive ability of retinoblastoma RB44 cells, which the mechanisms may be related to the inhibition of APS on the expressions of MMP-9 and MMP-2. [Rec Adv Ophthalmol, 2014, 34(6): 530-532]

【关键词】 黄芪多糖;视网膜母细胞瘤;细胞侵袭;基质金属蛋白酶;钙黏附蛋白

【摘要】 目的 探讨黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)对视网膜母细胞瘤RB44细胞侵袭能力的影响及机制。方法 以200 mg · L<sup>-1</sup> APS诱导48 h的RB44细胞为实验组(预实验结果),以不加药的RB44细胞为对照组。通过Transwell迁移和侵袭实验观察APS对RB44细胞迁移和侵袭能力的影响,通过Western blotting方法检测APS处理前后RB44细胞中侵袭相关基因蛋白表达的变化。结果 Transwell迁移和侵袭实验结果显示:与对照组每高倍视野(54.667±4.041)个和(26.000±2.646)个细胞相比,APS组RB44细胞穿过Transwell小室基膜的细胞数量显著减少,分别为每高倍视野(26.667±4.041)个和(8.667±2.082)个细胞(均为 $P<0.01$ )。Western blotting结果显示:与对照组(0.128±0.019)相比,APS组RB44细胞中E-cadherin的表达(0.117±0.019)差异无统计学意义( $P=0.486$ ),而MMP-9和MMP-2的表达(0.134±0.008、0.085±0.006)与对照组(0.269±0.187、0.223±0.013)相比均显著降低,差异均有显著统计学意义(均为 $P<0.01$ )。结论 APS可显著抑制视网膜母细胞瘤RB44细胞的侵袭能力,其机制可能与抑制MMP-9和MMP-2的表达有关。

视<sup>[3-6]</sup>。侵袭、转移是恶性肿瘤显著的生物学特性,是恶性肿瘤顽固性、难治性和患者死亡的根本原因。因此,防治肿瘤侵袭、转移对于控制肿瘤、提高治愈率及延长患者生存具有重要意义。黄芪多糖(astragalus polysaccharide, APS)是黄芪的主要活性成分之一,其抗肿瘤作用已经被越来越多的研究证实<sup>[7-9]</sup>。

但 APS 对视网膜母细胞瘤细胞侵袭能力是否具有抑制作用及相关机制尚不清楚。本研究拟以 200 mg · L<sup>-1</sup> APS 诱导 48 h 的 RB44 细胞为实验组(预实验结果),以不加药的 RB44 细胞为对照组,探讨 APS 对视网膜母细胞瘤 RB44 细胞侵袭能力的影响及其机制,以期为 APS 用于治疗视网膜母细胞瘤的可行性提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系及培养条件 人视网膜母细胞瘤 RB44 细胞购于中南大学湘雅中心实验室细胞中心。培养条件:含体积分数 10% 胎牛血清、100 × 10<sup>3</sup> U · L<sup>-1</sup>青霉素、100 mg · L<sup>-1</sup>链霉素的 RPMI-1640 培养基,于 37 ℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 孵箱中培养。

1.1.2 主要试剂和材料 β-actin 鼠抗人单克隆抗体(IgG)、羊抗人基质金属蛋白酶-9(matrix metallo-proteinase 9, MMP-9)多克隆抗体(IgG)、羊抗人基质金属蛋白酶-2(matrix metallo-proteinase 2, MMP-2)多克隆抗体(IgG)、兔抗人钙黏附蛋白 E(E-cadherin)多克隆抗体(IgG)和辣根酶标记的抗鼠、抗羊、抗兔(IgG)二抗及增强化学发光试剂盒均为美国 Santa Cruz 公司产品;APS 为本实验室提取并定量(提取的 APS 浓度为 51.514 g · L<sup>-1</sup>,稀释至 10 g · L<sup>-1</sup>,过滤除菌并分装后 -80 ℃ 冻存),胎牛血清为杭州四季青公司产品。

1.2 方法

1.2.1 Transwell 迁移实验 APS 组 RB44 细胞用含 200 mg · L<sup>-1</sup> APS 的 RPMI-1640 培养基培养,对照组 RB44 细胞用正常 RPMI-1640 培养基培养,48 h 后消化并计数,用无血清 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度为 10<sup>5</sup> mL<sup>-1</sup>。加含体积分数 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基于 24 孔板(每孔 600 μL),将 Transwell 小室放入 24 孔板中,静置 5 min。各小室接种细胞数量为 40 × 10<sup>3</sup> mL<sup>-1</sup>,补无血清培养基至 200 μL。常规培养 16 h,取出小室,用棉签完全擦去小室基膜上面的细胞。体积分数 95% 酒精室温固定 15 min,2 g · L<sup>-1</sup>结晶紫染色 10 min。倒置显微镜下观察小室基膜下面细胞数量。实验重复 3 次。

1.2.2 Transwell 侵袭实验 在小室基膜上面预铺设基质胶。接种细胞后培养时间为 24 h,余同 1.2.1 方法。

1.2.3 Western blotting 检测 APS 对 RB44 细胞中侵袭相关基因蛋白表达的影响 提取对照组和 APS 组 RB44 细胞总蛋白并定量。通过 Western blotting 检测侵袭相关基因蛋白表达的变化。以 β-actin 为内参照,蛋白上样量为 75 μg。β-actin 鼠抗人单克隆抗体(IgG)、羊抗人 MMP-9 多克隆抗体(IgG)、羊抗人 MMP-2 多克隆抗体(IgG)、兔抗人 E-cadherin 多克隆抗体(IgG)和辣根酶标记的抗

鼠、抗羊、抗兔(IgG)二抗稀释倍数分别为:1 : 2500、1 : 150、1 : 300、1 : 150、1 : 7500、1 : 5000 和 1 : 5000。

1.3 统计学分析 采用 SPSS 11.5 统计软件进行分析,通过 Bandscan 5.0 软件分析 Western blotting 条带灰度与内参照条带灰度比值,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两样本均数比较采用 *t* 检验。检验水准为  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 APS 对视网膜母细胞瘤 RB44 细胞侵袭能力的影响

2.1.1 Transwell 迁移实验结果 Transwell 迁移实验结果见表 1,由表 1 可见:APS 组 RB44 细胞迁移穿过基膜的数显著少于对照组,差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ )。

2.1.2 Transwell 侵袭实验结果 Transwell 侵袭实验结果见表 1,由表 1 可见看出:与对照组相比,APS 组 RB44 细胞侵袭并穿过基膜的细胞数显著减少,差异有显著统计学意义( $P < 0.01$ )。

表 1 Transwell 迁移和侵袭实验结果

Table 1 Results of transwell migration and invasion test		
( $\bar{x} \pm s$ , cell/HPF)		
Group	Transwell migration test	Transwell invasion test
Control	54.667 ± 4.041	26.000 ± 2.646
APS	26.667 ± 4.041	8.667 ± 2.082
<i>t</i>	8.485	8.918
<i>P</i>	0.001	0.001

2.2 APS 对视网膜母细胞瘤 RB44 细胞中侵袭相关基因蛋白表达的影响 Western blotting 检测 APS 对视网膜母细胞瘤 RB44 细胞中侵袭相关基因表达的影响,结果见图 1、表 2:与对照组相比,APS 组 RB44 细胞中 E-cadherin 的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),而 MMP-9 和 MMP-2 的表达显著降低,差异均有显著统计学意义(均为  $P < 0.01$ )。

Figure 1 Effects of APS on the expression of invasion related genes in RB44 cells. A: Control group; B: APS group APS 对 RB44 细胞中侵袭相关基因蛋白表达的影响。A:对照组;B:APS 组

表2 APS对RB44细胞中侵袭相关基因蛋白表达的影响

Table 2 Effects of APS on the expression of invasion related genes in RB44 cells ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	E-cadherin/ $\beta$ -actin	MMP-9/ $\beta$ -actin	MMP-2/ $\beta$ -actin
Control	0.128 $\pm$ 0.019	0.269 $\pm$ 0.187	0.223 $\pm$ 0.013
APS	0.117 $\pm$ 0.019	0.134 $\pm$ 0.008	0.085 $\pm$ 0.006
<i>t</i>	0.766	11.530	17.149
<i>P</i>	0.486	0.000	0.000

3 讨论

随着医疗技术的发展和医疗水平的提高,视网膜母细胞瘤的治疗目标正由保存患儿的生命向提高患儿生存质量转变,即以保存患儿眼球并尽可能保存一定程度视力的包括中药治疗在内的综合治疗手段正日益受到重视<sup>[3-6]</sup>。APS具有增强机体免疫功能、抗肿瘤、抗病毒、抗应激、抗氧化等多种药理功效<sup>[10-12]</sup>。

肿瘤的迁移和侵袭是一个由瘤细胞与细胞外基质(extracellular matrix, ECM)、细胞相互作用的过程<sup>[13-14]</sup>,包括肿瘤细胞去黏附从瘤体脱落、瘤细胞的运动能力、瘤细胞与基底膜的黏附、瘤细胞产生分泌蛋白水解酶、蛋白水解酶降解ECM等,是恶性肿瘤细胞转移的前提和基础<sup>[13-14]</sup>。Transwell迁移实验和侵袭实验是体外检测肿瘤细胞迁移和侵袭能力的良好指标。本研究结果显示,与对照组相比,APS组RB44细胞穿过transwell小室基膜的细胞数显著减少( $P < 0.01$ )。提示APS能显著抑制RB44细胞的迁移和侵袭能力。

MMP-2是一种相对分子质量为72 000的Ⅳ型胶原酶,MMP-9是MMPs家族中分子量最大的胶原酶,能够降解明胶、胶原等多种ECM成分,有利于肿瘤的迁移、侵袭和转移<sup>[15-16]</sup>。研究显示,当MMP-9和MMP-2表达或活性降低时,高转移特性的细胞的侵袭性会明显减弱<sup>[17-18]</sup>;MMP-9和MMP-2与视网膜母细胞瘤的恶性表型和预后有关<sup>[19]</sup>。本研究通过Western blotting检测了APS处理前后RB44细胞中MMP-9和MMP-2表达的变化,结果表明,APS组RB44细胞中MMP-9和MMP-2的表达均显著低于对照组(均为 $P < 0.01$ )。提示APS对视网膜母细胞瘤RB44细胞迁移侵袭能力的抑制作用可能与其抑制MMP-9和MMP-2的表达有关。

瘤细胞之间的黏附主要由上皮钙黏连素介导,当E-cadherin表达降低时可导致瘤细胞间黏附力下降,有利于瘤细胞脱落,进而发生侵袭和转移。因此,E-cadherin是肿瘤侵袭、转移的一种重要抑制因子<sup>[20]</sup>。本研究通过Western blotting检测了APS处

理前后RB44细胞中E-cadherin表达的变化,结果表明,APS组和对照组RB44细胞中E-cadherin的表达差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。提示在APS抑制视网膜母细胞瘤RB44细胞迁移侵袭能力中E-cadherin可能不起重要作用。

综上所述,本研究证明了APS可显著抑制视网膜母细胞瘤RB44细胞的迁移和侵袭能力,其该作用可能与其抑制MMP-9和MMP-2的表达有关。本研究为APS治疗视网膜母细胞瘤可行性提供了一定的理论依据。

参考文献

- 1 Broadus E, Topham A, Singh AD. Incidence of retinoblastoma in the USA; 1975-2004 [J]. *Br J Ophthalmol*, 2009, 93(1): 21-23.
- 2 Yun J, Li Y, Xu CT, Pan BR. Epidemiology and Rb1 gene of retinoblastoma [J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4(1): 103-109.
- 3 郁想想, 陈长征, 赵军阳, 郑红梅, 叶美红, 李璐, 等. 视网膜母细胞瘤综合治疗疗效分析 [J]. 武汉大学学报(医学版), 2012, 33(2): 247-250.
- 4 刘瑾, 朱豫. 视网膜母细胞瘤的治疗进展 [J]. 眼科新进展, 2013, 33(1): 91-94.
- 5 唐松, 陆晓和, 张国明. 视网膜母细胞瘤综合治疗的临床分析 [J]. 实用肿瘤杂志, 2013, 28(2): 167-169.
- 6 冯亦颖, 王巨存, 潘振华, 李正翔, 李燕. 小巢胺对视网膜母细胞瘤HXO-RB44细胞增殖的抑制作用 [J]. 天津医药, 2012, 40(4): 356-358.
- 7 Cho WC, Leung KN. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor effects of Astragalus membranaceus [J]. *Cancer Lett*, 2007, 252(1): 43-46.
- 8 刘爱平, 曾峰. 黄芪多糖对A549细胞增殖的作用及其机制的实验研究 [J]. 肿瘤药学, 2011, 1(6): 499-501.
- 9 邹品文, 赵春景, 李攀, 尹小燕, 黄红. 黄芪多糖抗S180肉瘤作用及其免疫调节的影响 [J]. 遵义医学院学报, 2012, 35(1): 17-20.
- 10 杨志霞, 王琦. 黄芪多糖免疫作用的基础与临床研究进展 [J]. 世界中医药, 2013, 8(7): 833-836.
- 11 黄家林, 张勇. 黄芪多糖抗炎免疫作用机制研究进展 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2013, 11(11): 1374-1376.
- 12 张小鸿, 徐先祥, 汪宁卿. 黄芪保护血管内皮细胞作用机制研究进展 [J]. 中国药理学杂志, 2013, 48(18): 1526-1530.
- 13 Hubert S, Abastado JP. The early steps of the metastatic process [J]. *Med Sci (Paris)*, 2014, 30(4): 378-384.
- 14 Wan L, Pantel K, Kang Y. Tumor metastasis: moving new biological insights into the clinic [J]. *Nat Med*, 2013, 19(11): 1450-1464.
- 15 Velinov N, Poptodorov G, Gabrovski N, Gabrovski S. The role of matrix metalloproteinases in the tumor growth and metastasis [J]. *Khirurgiia (Sofia)*, 2010, (1): 44-49.
- 16 蔡维艳, 李爱敏, 初清, 周广玉, 柳雪梅, 李春香. 血栓调节蛋白、血管性假血友病因子、基质金属蛋白酶-9在过敏性紫癜肾损害早期诊断中的价值 [J]. 实用儿科临床杂志, 2012, 27(17): 1340-1342.
- 17 王洪兴, 张洁, 朱会芳, 李娜. KISS-1和基质金属蛋白酶-9蛋白在胃癌中的表达及意义 [J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(12): 733-735.
- 18 王永霞, 王金祥. 人脑胶质瘤中核转录因子- $\kappa$ B p65和基质金属蛋白酶-9的表达及临床意义 [J]. 新乡医学院学报, 2012, 29(6): 425-427.
- 19 Long H, Zhou B, Jiang FG. Expression of MMP-2 and MMP-9 in retinoblastoma and their significance [J]. *Int J Ophthalmol*, 2011, 4(5): 489-491.
- 20 Canel M, Serrels A, Frame MC. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(2): 393-401.