



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.08.012

http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.08.012

Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(8):1158-1162.

· 基础研究 ·

诱导型一氧化氮合酶抑制剂对胆管癌细胞生物学行为的影响

谢博文, 吕品, 聂盛丹, 曾杰宏, 刘铮凯, 彭思远, 张豹, 蒋波

(湖南师范大学第一附属医院 / 湖南省人民医院 肝胆外科, 湖南 长沙 410006)

摘要

目的: 探讨诱导型一氧化氮合酶抑制剂 (iNOS) 抑制剂对胆管癌细胞生物学行为的影响。

方法: 不同浓度 iNOS 抑制剂 1400W 孵育人胆管癌 QBC939 细胞 24 h 后, 分别用硝酸还原酶法、MTT 比色法检各组细胞中 NO 浓度与增殖情况, 并计算半抑制浓度 (IC_{50}); 根据 IC_{50} 值, 选择合适浓度的 1400W 处理 QBC939 细胞 24 h 后, 分别用划痕试验、Transwell 小室法检测细胞迁移及侵袭情况。以上实验均以未加 1400W 培养基处理的 QBC939 细胞为空白对照。

结果: 与空白对照组比较, 各 1400W 处理组 QBC939 细胞中 NO 含量及增殖率均呈浓度依赖性降低 (均 $P < 0.05$), IC_{50} 值为 $51.24 \mu\text{mol/L}$; 用 $50 \mu\text{mol/L}$ 的 1400 W 处理 QBC939 细胞 24 h 后, 实验组的细胞划痕愈合率 (61.7% vs. 92.3%) 和细胞侵袭数 (72.7 个 vs. 128.0 个) 均较对照组明显降低 (均 $P < 0.05$)。

结论: iNOS 抑制剂 1400W 能抑制胆管癌细胞增殖、迁移和侵袭, 其机制可能与 NO 下游的信号分子变化有关。

关键词

胆管肿瘤; 一氧化氮合酶; 酶抑制剂; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.8

Effect of inducible nitric oxide synthase inhibitor on the biological behaviors of cholangiocarcinoma cells

XIE Bowen, LU Pin, NIE Shengdan, ZENG Jiehong, LIU Zhengkai, PENG Siyuan, ZHANG Bao, JIANG Bo

(Department of Hepatobiliary Surgery, Hunan Provincial People's Hospital/the First Affiliated Hospital, Hunan Normal University, Changsha 410006, China)

Abstract

Objective: To investigate the effect of inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitor on the biological behaviors of cholangiocarcinoma cells.

Methods: Human cholangiocarcinoma QBC939 cells were cultured in different concentrations of iNOS inhibitor 1400W for 24 h, and then, the NO contents and proliferation status of each group of cells were determined by nitrate reductase assay and MTT assay respectively, and the half-inhibitory concentration (IC_{50}) was also calculated. After that, QBC939 cells were exposed to an appropriate concentration of 1400W, according to the IC_{50} value, for 24 h, and then, the cell migration and invasion were detected by wound healing assay and Transwell invasion assay, respectively. QBC939 cells cultured with the medium without 1400W were used as blank control

基金项目: 湖南省卫生厅医药卫生科研计划资助项目 (B2012-088); 湖南省教育厅重点基金资助项目 (15A114)。

收稿日期: 2016-05-04; **修订日期:** 2016-07-11。

作者简介: 谢博文, 湖南师范大学第一附属医院 / 湖南省人民医院硕士研究生, 主要从事肝胆胰外科方面的研究。

通信作者: 蒋波, Email: jiangbo@medmail.com.cn; 吕品, Email: lypinhn@163.com

for all experiments.

Results: Compared with blank control group, the NO content and proliferation in each 1400W treatment group were significantly reduced, with a concentration-dependent trend, and the IC_{50} was 51.24 $\mu\text{mol/L}$. In QBC939 after exposure to 50 $\mu\text{mol/L}$ 1400W, the healing rate of the scratch wound (61.7% vs. 92.3%) and number of invaded cells (72.7 vs. 128.0) were all significantly lower than those in blank control group (both $P < 0.05$).

Conclusion: iNOS inhibitor 1400W can suppress the growth, migration and invasion of cholangiocarcinoma cells, the mechanism may be associated with the changes in NO downstream signaling molecules.

Key words

Bile Duct Neoplasms; Nitric Oxide Synthase; Enzyme Inhibitors; Neoplasm Invasiveness

CLC number: R735.8

胆管癌(cholangiocarcinoma)系指胆管系统衬覆上皮发生的恶性肿瘤^[1],近年来胆管癌的发病率及死亡数正逐年上升^[2]。诱导型一氧化氮合酶(iNOS)在包括肝癌、乳腺癌、胆管癌在内的许多肿瘤发生发展中起着重要作用。1400W是高度选择性iNOS抑制剂。1400W是从双异硫脲改进而来的,是一种缓慢的、在体内与iNOS选择性紧密结合的药物。其对iNOS的抑制呈NADPH依赖性和时间依赖性,其对人iNOS的抑制能力比对人eNOS和nNOS的抑制能力分别高5000倍和200倍,是迄今为止最有选择性的iNOS抑制剂。有研究^[3]发现选择性iNOS抑制剂1400W可抑制人肝癌SMMC-7721细胞株iNOS表达,提示选择性抑制iNOS对肝癌新生血管的形成具有预防效果和潜在的治疗价值,从而对肝癌细胞的增殖与转移产生影响。因此,笔者推测iNOS抑制剂1400W对胆管癌细胞增殖与转移的影响可能与其对肝癌细胞的影响效果相似。笔者前期研究发现,iNOS高表达与胆管癌发展呈正相关,为探讨iNOS抑制剂1400W对胆管癌细胞增殖与转移的影响,本次研究观察iNOS抑制剂1400W对人胆管细胞癌QBC939细胞系转移与增殖的影响,以探讨1400W抑制iNOS表达用于治疗肿瘤的可能性,为临床肝内胆管细胞癌靶向治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料

人胆管癌细胞株(QBC939)购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司,由湖南省人民医院临床医学研究所保存,选择性iNOS抑制剂1400W购自美国Cayman公司,NO试剂盒购自南京建成生物制剂研究所。

1.2 研究方法

1.2.1 细胞培养及药物准备 用含10%胎牛血清的低糖DMEM培养基在37℃、5%CO₂饱和湿度的培养箱中培养,待其融合度达到80%以上进行传代,取对数期细胞进行实验。分别加入iNOS抑制剂1400W调节终浓度为1、10、25、50、100、200 $\mu\text{mol/L}$ 。

1.2.2 硝酸还原酶法检测 QBC939 细胞 NO 含量

NO检测试剂盒检测各组细胞上清液NO含量。检测试剂(从冰箱取出)与收集的各个样本置37℃水浴5 min后,按NO试剂盒说明书进行操作。待全部反应结束后蒸馏水调零,分光光度计550nm波长下测定吸光值(OD)。按下列公式计算NO含量, $NO(\mu\text{mol/L}) = [(测定管 OD 值 - 空白管 OD 值) / (标准管 OD 值 - 空白管 OD 值)] \times 标准品浓度(100 \mu\text{mol/L}) \times 样品测试前稀释倍数$ 。取5次相同实验的结果的平均值为NO含量。

1.2.3 MTT 比色法检测 QBC939 细胞增殖

取对数生长期胆管癌细胞, 1×10^4 /孔接种于96孔培养板中,24 h后弃细胞培养上清液。分别加入不同浓度1400W培养液180 μL ,每个浓度设7个复孔,对照组加入不含1400W的培养液180 μL ,培养24 h时倾去培养液,每孔加入MTT液20 μL ,继续培养4 h后弃上清液,加入150 μL 的DMSO。水平摇床摇荡10 min,全自动酶/标仪于490 nm波长处检测各孔吸光度(值)QBC939细胞增殖抑制率(IR) = $(1 - 实验组 A 值 / 对照组 A 值) \times 100\%$ 。从中选取半抑制浓度(IC_{50})的1400W用于后续实验。

1.2.4 划痕试验检测 QBC939 细胞迁移能力 对数期细胞接种于培养板中,待生长至90%融合后,无血清饥饿处理,用10 μL 移液头在中央区域划痕造成无细胞划痕区。PBS冲洗3次后加入含 IC_{50} 的

1400W浓度的培养基并培养24 h,再于24 h后进行观察。划痕愈合率=(划痕后即刻的划痕面积-划痕后24 h的划痕面积)/划痕后即刻的划痕面积×100%。

1.2.5 Transwell小室检测QBC939细胞侵袭能力 用培养基稀释Matrigel(2:1)均匀涂布Transwell小室上室膜中,待成固体后加入200 μL含IC₅₀(1400W)药物浓度无血清培养基重悬的细胞悬液(5×10⁴个细胞),下室加入500 μL含10%胎牛血清的培养基。在细胞培养箱中培养24 h,用棉签小心拭去上室未转移细胞,PBS洗涤下室细胞后用4%多聚甲醛固定,最后用瑞氏吉姆萨染液染色后计数,于400倍光镜下进行观察,计数透膜细胞总数,取5次相同实验的结果的平均值为细胞侵袭数,分析肿瘤细胞的侵袭能力。

1.3 统计学处理

应用SPSS 16.0统计软件对实验数据进行分析,数据均采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)示。组间差异采用单因素方差分析与LSD检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 1400w对QBC939细胞NO含量的影响

分别用1、10、25、50、100、200 μmol/L 1400W培养液孵育QBC939细胞24 h后检测上清液NO浓度,以上浓度1400W处理的QBC939细胞平均NO含量为68.55、51.32、43.10、24.63、13.18、3.10 μmol/L,而空白对照组平均NO含量为70.94 μmol/L,各组间差异有统计学意义($P < 0.05$) (图1)。

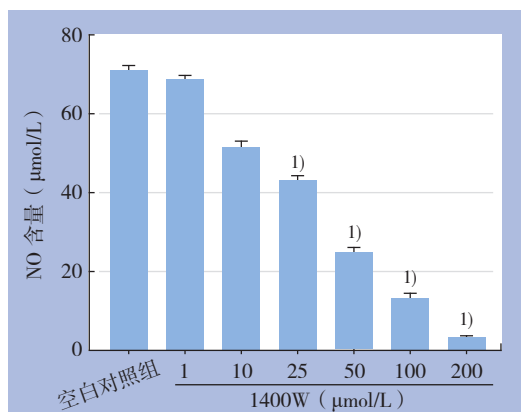


图1 各组QBC939细胞NO含量的比较 注:1)与空白对照组比较, $P < 0.05$

Figure 1 Comparison of the NO contents among groups of QBC939 cells Note: 1) $P < 0.05$ vs. blank control group

2.2 1400W对QBC939细胞增殖能力的影响

分别用1、10、25、50、100、200 μmol/L 1400W培养液孵育QBC939细胞24 h,与对照组比较,以上浓度1400W处理的QBC939细胞的平均细胞存活率分别为95.39%、90.28%、85.85%、47.48%、22.93%、6.33%,统计学分析显示,各组细胞存活率差异有统计学意义($P < 0.05$) (图2)。采用GraphPad Prism 5计算IC₅₀值为51.24 μmol/L,故采用50 μmol/L 1400W作为后续实验的处理药物浓度。

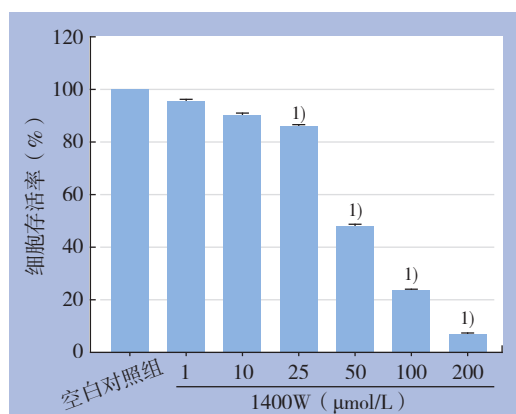


图2 各组QBC939细胞存活率比较 注:1)与空白对照组比较, $P < 0.05$

Figure 2 Comparison of the cell viabilities among groups of QBC939 cells Note: 1) $P < 0.05$ vs. blank control group

2.3 1400W对QBC939细胞迁移的影响

QBC939细胞制造划痕并PBS冲洗3次后,用50 μmol/L 1400W培养液180 μL培养24 h,再于24 h后进行观察。结果显示,实验组细胞划痕愈合率明显低于空白对照组[(61.7±3.1)% vs. (92.3±3.2)%, $P < 0.05$] (图3)。

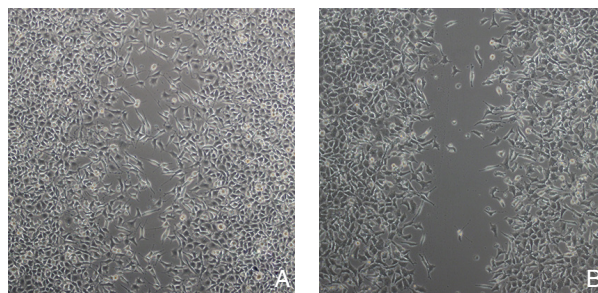


图3 细胞迁移能力检测(×20) A:空白对照组; B:1400W处理组

Figure 3 Determination of cell migration ability (×20) A: Blank control group; B: 1400W treatment group

2.4 1400W对QBC939细胞侵袭能力的影响

用50 $\mu\text{mol/L}$ 1400W培养液处理QBC939细胞24 h, Transwell小室侵袭实验结果显示, 实验

组的侵袭细胞数明显多于空白对照组[(72.7 \pm 3.5)个 vs. (128.0 \pm 6.2)个, $P < 0.05$] (图4)。

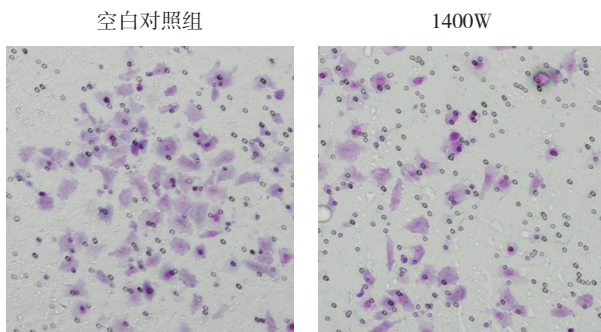
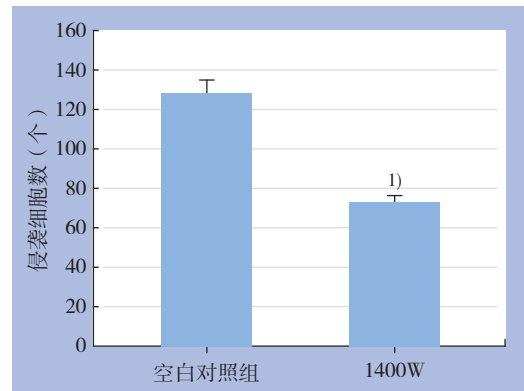


图4 细胞侵袭力检测($\times 20$)

Figure 4 Determination of cell invasion ability ($\times 20$)



注: 1) 与空白对照组比较, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. blank control group

3 讨论

胆管癌在癌症比例逐年上升, 在全部癌症死者中达到2.88%~4.65%^[4]。胆管癌有发病隐匿、易淋巴转移等特点, 手术 R_0 切除率低, 对放化疗不敏感, 胆管癌患者预后极差, 近端胆管癌的5年生存率仅为9%~18%, 远端胆管癌为20%~30%, 无法手术切除或有远处转移的患者预后差, 中位生存期 < 1 年^[5-9]。由于大多数能检查出的胆管癌的患者已到癌症晚期, 即使能手术治疗, 预后也比较差, 效果并不明显。更严重的是, 传统的化学疗法和放射治疗对晚期胆管癌的治疗作用有限, 无法有效延长患者生命。分子靶向治疗已成功运用恶性肿瘤治疗并取得较好疗效。因此, 寻找靶向治疗药物用于胆管癌治疗对于改善患者预后具有重要意义。

靶向治疗已成为恶性肿瘤综合治疗的新方向, 引起了越来越多医学研究者的重视^[10-11]。分子靶向治疗向相对其他治疗方法更具针对性, 在肿瘤治疗的临床实践中, 分子靶向治疗具有目标准确、适应证广、副作用少等特点^[12], 具有能高效的选择性杀伤肿瘤细胞, 减少治疗对正常组织的损伤。靶向治疗用于恶性肿瘤已有成功案例, 例如易瑞沙可以控制非小细胞肺癌^[13], 多吉美可以控制肝癌、肾癌晚期的靶向^[14], 但对与胆管癌, 目前还没有特异性的靶向药物控制病情。

有研究^[15-16]显示结肠癌、乳腺癌及黑色素瘤中eNOS表达增强, 且与肿瘤分级呈正相关, 因此推测eNOS过度表达对肿瘤的生长及转移有促进作用。研究^[17]证实: iNOS催化产生NO的能力较eNOS强, 且持续时间长, 主要参与机体的病理生理过程。因此, 本研究探讨iNOS抑制剂对人胆管细胞癌QBC939细胞抑制作用及与细胞内NO的关系, 为临床胆管癌分子靶向药物研究提供实验依据。研究结果显示, 在胆管癌QBC939细胞中, 使用iNOS抑制剂1400W后, 可显著抑制细胞增殖, 其机制可能涉及细胞内NO减少。同时, 考察了1400W对QBC939细胞迁移和侵袭能力的影响。结果证实, 实验组较对照组QBC939细胞增殖、迁移和侵袭能力均明显降低。

VEGF是已知的作用最强的血管生成因子, 在肿瘤血管形成中具有重要作用, 能强烈诱导血管形成及刺激肿瘤复发转移。大多数研究者认为调节VEGF表达可能是iNOS诱导肿瘤血管生成的一条重要途径。因此, 1400W可能通过抑制iNOS的表达, 从而阻断血管内皮因子VEGF表达, 降低细胞增殖侵袭迁移能力^[18]。且iNOS分子靶向治疗的针对性较强, 毒副作用相对较小^[19-20], 因此在胆管癌的治疗中, iNOS抑制剂如1400W等研究并开发临床分子靶向用药具有一定前景, 但具体药物及用药机制有待进一步探讨。

参考文献

- [1] Patel T. Cholangiocarcinoma-controversies and challenges[J]. *Nat Rev GastroenterolHepatol*, 2011, 8(4):189-200.
- [2] 孟令勤, 刘金钢. 肝外胆道癌分子流行病学研究的新进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2012, 20(5):1055-1059.
Meng LQ, Liu JG. An overview of molecular epidemiologic studies in biliary tract cancer[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2012, 20(5):1055-1059.
- [3] 邢宏松, 黄长文, 傅华群, 等. 选择性iNOS抑制剂1400W对缺氧培养人肝癌SMMC-7721细胞株iNOS和VEGF表达的影响[J]. *实用临床医学*, 2008, 9(9):3-6.
Xing HS, Huang CW, Fu HQ, et al. Effects of Selective iNOS Inhibitor 1400W in Hypoxic on the Expression of iNOS and VEGF in Hepatocarcinoma Cell Line SMMC-7721[J]. *Practical Clinical Medicine*, 2008, 9(9):3-6.
- [4] Patel T. Increasing incidence and mortality of primary intrahepatic cholangiocarcinoma in the United States[J]. *Hepatology*, 2014, 33(6):1353-1357.
- [5] Blechacz B, Komuta M, Roskams T, et al. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma[J]. *Nat Rev GastroenterolHepatol*, 2011, 8(9):512-522.
- [6] Li YG, Zhang N. Clinical significance of serum tumour M2-PK and CA19-9 detection in the diagnosis of cholangiocarcinoma[J]. *Dig Liver Dis*, 2015, 41(8):605-608.
- [7] Yalcin S. Diagnosis and management of cholangiocarcinomas: a comprehensive review[J]. *Hepatogastroenterology*, 2014, 51(55):43-50.
- [8] 毛志远, 郭晓川, 张婷婷, 等. 影响胆管癌预后的因素研究[J]. *华西医学*, 2014, 29(11):2046-2049.
Mao ZY, Guo XC, Zhang TT, et al. Research on Related Factors for Prognosis in Patients with Cholangiocarcinoma[J]. *West China Medical Journal*, 2014, 29(11):2046-2049.
- [9] Mavros MN, Economopoulos KP, Alexiou VG, et al. Treatment and prognosis for patients with intrahepatic cholangiocarcinoma: systematic review and meta-analysis[J]. *JAMA Surg*, 2014, 149(6):565-574.
- [10] Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 8(8):579-591.
- [11] Bukowski RM, Figlin RA, Motzer RJ. Targeted Therapy for Metastatic Renal Cell Carcinoma: Introduction[M]. Springer New York: Renal Cell Carcinoma, 2015:1-14.
- [12] 沈艺南, 卢军华. 肝细胞癌相关分子靶向治疗研究进展[J]. *临床肝胆病杂志*, 2015, 31(1):130-134.
Shen YN, Lu JH. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Clinical Hepatology*, 2015, 31(1):130-134.
- [13] 石远凯, 孙燕. 中国非小细胞肺癌分子靶向治疗十年[J]. *中华医学杂志*, 2015, 95(8):564-569.
Shi YK, Sun Y. Decade of molecular targeted therapy for Non-small cell lung cancer in China[J]. *National Medical Journal of China*, 2015, 95(8):564-569.
- [14] 傅炎炎, 时婷婷. 探究介入治疗联合多吉美对原发性肝癌的治疗效果[J]. *世界最新医学信息文摘:连续型电子期刊*, 2015, 15(92):79.
Fu YY, Shi TT. Efficacy exploration of the interventional therapy combined with nexavar for primary liver cancer [J]. *World Latest Medicine Information*, 2015, 15(92):79.
- [15] Day SD, Enos RT, McClellan JL, et al. Linking inflammation to tumorigenesis in a mouse model of high-fat-diet-enhanced colon cancer[J]. *Cytokine*, 2013, 64(1):454-462.
- [16] Yao L, Fang F, Zhong Y, et al. The association between two polymorphisms of eNOS and breast cancer risk: a meta-analysis[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2009, 122(1):221-227.
- [17] Heeba G H, El-Hanafy A A. Nebivolol regulates eNOS and iNOS expressions and alleviates oxidative stress in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Life Sci*, 2012, 90(11/12):388-395.
- [18] Tuby H, Maltz L, Oron U. Modulations of VEGF and iNOS in the rat heart by low level laser therapy are associated with cardioprotection and enhanced angiogenesis[J]. *Lasers Surg Med*, 2014, 38(7):682-688.
- [19] Granados-Principal S, Liu Y, Guevara ML, et al. Inhibition of iNOS as a novel effective targeted therapy against triple-negative breast cancer[J]. *Breast Cancer Res*, 2015, 17:25. doi: 10.1186/s13058-015-0527-x.
- [20] 李永盛, 江翰, 王子豪, 等. 叶酸靶向修饰纳米粒加载5-氟尿嘧啶治疗胆管癌的实验研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(8):976-981.
Li YS, Jiang H, Wang ZH, et al. 5-fluorouracil carrying nanoparticles with folate-targeted modification for cholangiocarcinoma: an experimental study[J]. *Chinese Journal of General Surgery*, 2013, 22(8):976-981.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 谢博文, 吕品, 聂盛丹, 等. 诱导型一氧化氮合酶抑制剂对胆管癌细胞生物学行为的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(8):1158-1162. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.08.012

Cite this article as: Xie BW, Lu P, Nie SD, et al. Effect of inducible nitric oxide synthase inhibitor on the biological behaviors of cholangiocarcinoma cells[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(8):1158-1162. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.08.012