

诺帝对人恶性胶质瘤细胞 U87 甲酰化肽受体功能的影响

陈剑鸿^{1*}, 卞修武¹, 姚小红¹, 杨世昕¹, 徐长荣², 周向东², 平轶芳¹

(第三军医大学 1. 西南医院 病理研究所, 2. 基础部 药学教研室, 重庆 400038)

摘要: 探讨手性化合物诺帝对人恶性胶质瘤细胞甲酰化肽受体 (fomylpeptide receptor, FPR) 功能的影响及其意义。以培养的人恶性胶质瘤细胞 U87 为研究对象, 用 FPR 激动剂 fMLF (N-fomyl-methionyl-leucyl-phenylalanine) 刺激细胞, 以双室跨膜迁移模型检测细胞的迁移能力, 计数法测定细胞的增殖能力, 分光光度法测定细胞内钙流, RT-PCR 方法测定血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA 表达, 以 ELISA 方法检测 VEGF 蛋白水平, 并测定诺帝 (25 ~ 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理瘤细胞后上述功能指标的变化。50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诺帝能有效抑制 fMLF 诱导的细胞增殖、迁移 ($P < 0.05$) 和细胞内钙流, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诺帝能抑制 VEGF mRNA 表达, 降低 VEGF 水平 ($P < 0.05$)。诺帝能抑制 FPR 介导的人恶性胶质瘤细胞增殖、迁移和 VEGF 产生, 提示其具有抗肿瘤活性。

关键词: 诺帝; 神经胶质瘤; 甲酰化肽受体; 血管内皮生长因子

中图分类号: R963; R979.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2007)03 - 0257 - 06

Effect of nordy on FPR function of malignant human glioma cell line U87

CHEN Jian-hong^{1*}, BIAN Xiu-wu¹, YAO Xiao-hong¹, YANG Shi-xin¹, XU Chang-rong²,
ZHOU Xiang-dong², PING Yi-fang¹

(1. Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China;
2. Department of Pharmacy, Division of Basic Medical Science, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Nordy is a synthesized chiral compound. To investigate the effects of nordy (25 - 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) on the function of fomylpeptide receptor (FPR) of malignant human glioma cells, human glioblastoma cell line U87 was used to detect its proliferation, migration, calcium mobilization, vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA and protein levels after activation of FPR by its agonist N-fomyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLF). Cell proliferation, migration ability, VEGF mRNA, VEGF protein and calcium mobilization were evaluated by cell counting, chemotaxis assay, RT-PCR, ELISA and spectrometry. Nordy (50 - 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) potently inhibited the proliferation, migration and calcium mobilization of U87 cells induced by fMLF ($P < 0.05$). Moreover, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ nordy showed a significantly impaired VEGF mRNA expression and protein secretion induced by fMLF ($P < 0.05$). Nordy could inhibit FPR functioning in glioma cell proliferation, migration and angiogenesis, which might be a possible mechanism of its anti-cancer effects.

Key words: nordy; glioma; fomylpeptide receptor; vascular endothelial growth factor

近年研究发现, 高度恶性的人胶质瘤细胞可以表达 G 蛋白偶联受体——甲酰化肽受体 (fomylpep-

tide receptor, FPR), 并可以被一种细菌趋化肽 N-甲酰化-亮氨酸-苯丙氨酸 (N-fomyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, fMLF) 激活。在肿瘤生长的微环境中, 恶性胶质瘤细胞自分泌一种 FPR 样活性因子, 在肿瘤的发生和演进过程中可能起至关重要的作用^[1]。因此, 抑制 FPR 表达和 (或) 功能可能是恶性

收稿日期: 2006-07-07.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30370552); 国家高技术
研究发展计划 (863 计划) 引导项目 (2002AA001010).

* 通讯作者 Tel: 86 - 23 - 68765991, Fax: 86 - 23 - 65461719,
E-mail: chenjh - 110@263.net

胶质瘤治疗的途径之一,寻找具有抗肿瘤活性的新型合成化合物尤为重要^[2]。

大量研究表明,脂氧化酶参与了肿瘤的发生和演进过程。脂氧化酶抑制剂具有不同程度的抗癌活性。例如脂氧化酶抑制剂去甲二氢愈创木酸(nordihydroguaiaric acid, NDGA)在体内和体外对多种肿瘤均具有抑制作用^[3,4]。作者既往的研究结果表明,基于天然 NDGA的化学结构而人工合成的其手性化合物诺帝(nordy)可以抑制胶质瘤细胞FPR的表达^[5],并且具有体内抗癌作用^[6]。本研究以人恶性胶质瘤细胞系U87为研究对象,探讨诺帝对FPR介导的细胞增殖、迁移、细胞内钙流以及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的mRNA表达和蛋白水平的影响及其意义。

材料与方法

材料 诺帝由本室合成并纯化(纯度为99.86%),为淡黄色结晶,以最高浓度溶解于DMSO并经细菌内毒素检测合格。准确称取诺帝适量,溶解于DMSO中(初浓度为 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$),经适当稀释后以 $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,于试验前用新鲜培养液将其稀释到所需浓度。试验采用的DMSO终浓度不超过0.005%,并严格设立溶剂对照。N-甲硫酰氨亮氨酸苯丙氨酸(fMLF)购自Sigma-Aldrich公司(美国);人三磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)引物购自Stratagene公司(美国); $10\ \mu\text{m}$ 孔径多聚碳酸酯滤膜购自GE Osmonics Labstore公司(美国);48孔趋化板和细胞刮片均购自NeuroProbe公司(美国);细胞固定及Diff-Quick染色试剂盒购自Biochemical Sciences, Swedesboro, NJ公司(美国);I型胶原购自Biosciences公司(美国);快速RNA提取试剂盒购自QIAGEN公司(美国);高保真单管RT-PCR反应体系(high fidelity ProSTARTM HF single-tube RT-PCR system)购自Stratagene公司(美国);ELISA试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。

细胞培养 人恶性胶质瘤细胞系U87来源于美国典型培养物中心(American Type Culture Collection, ATCC)。U87细胞培养于含滤膜的可透气培养瓶中,培养基为DMEM,添加10%胎牛血清、非必需氨基酸、 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 丙酮酸钠、 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺、 $100\text{ u}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素和 $0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素。培养于 $37\ ^\circ\text{C}$, 5% CO_2 和95%湿度的孵箱

内。细胞换液时间2~3 d, 3~5 d代,代前以0.25%胰蛋白酶消化2~5 min。

细胞处理方法和试验分组 诺帝于临用时用新鲜培养液稀释为25, 50和 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。不同分组的细胞以PBS悬浮、计数并调整细胞数以满足不同试验的要求。试验分为(1)对照组:除不进行诺帝处理外,其余同诺帝组;(2) fMLF刺激组:分别以 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ fMLF刺激瘤细胞,按试验要求进行每个指标的检测;(3)诺帝处理组:在上述 fMLF刺激前分别以含25, 50和 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诺帝的新鲜培养液处理细胞。其中,增殖试验的具体分组和处理时间见下述;迁移试验和细胞内钙流试验中,诺帝的处理时间均为4 h;VEGF mRNA表达检测的处理时间为12 h。VEGF蛋白水平检测于诺帝处理后的12, 24, 36和48 h进行。所有试验均至少重复3次。

台盼蓝拒染计数法检测细胞增殖 取对数生长期细胞加入0.25%胰蛋白酶消化,用含10%小牛血清的完全DMEM培养基漂洗细胞1次,并稀释至细胞数约 $1\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将细胞悬液转到96孔板中培养,200 μL 孔。 $37\ ^\circ\text{C}$, 5% CO_2 孵箱中培养过夜。去除培养基,每孔加入含不同浓度诺帝的完全培养基200 μL ,对照组加入等体积的完全培养基,继续培养处理细胞。细胞计数于不同分组处理后的d 4进行,每组试验至少重复3次。

细胞迁移试验 采用48孔趋化板进行。 $10\ \mu\text{m}$ 孔径的多聚碳酸酯滤膜先用 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ I型胶原于 $4\ ^\circ\text{C}$ 包被过夜。依试验设计于趋化板下室孔中加入不含以及含有 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ fMLF趋化诱导剂的BM液(binding medium)27 μL 。按分组需要,在趋化板上室孔中加入细胞数为 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$ 的诺帝处理组及对照组的U87细胞50 μL 。上下室之间以多聚碳酸酯滤膜隔开。趋化板在湿盒中于 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵箱孵育4.5 h后,以Diff-Quick染色试剂将迁移至滤膜下方的细胞固定并染色,于光学显微镜的3个高倍视野下($400\times$)计数迁移过滤膜的细胞。

分光光度法检测 Ca^{2+} 流 诺帝预处理细胞4 h,再调整细胞数为 $2\times 10^7\cdot\text{mL}^{-1}$,与 $5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fura-2 AM荧光探针室温孵育45 min,染色并负载荧光的细胞用生理缓冲液洗涤并调整细胞数为 $1\times 10^7\cdot\text{mL}^{-1}$,以分光光度计检测钙流时,加入负载了Fura-2 AM荧光探针的细胞悬液2 mL于石英杯中,待测定基线稳定后,按分组加入 $1\times 10^{-10}\sim 1\times 10^{-6}\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ fMLF 20 μL 刺激细胞,或对不同浓度诺帝处理后的U87细胞加入 $100\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

fMLF 20 μL 进行刺激,立即可看到 Ca^{2+} 流峰, Ca^{2+} 流值的计算基于检测 340 nm 和 380 nm 波长处的荧光光密度比率,采用 FL-W inLab program 软件进行处理。

RT-PCR 法检测 VEGF mRNA U87 细胞经不同浓度的诺帝处理 12 h 后,再以 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ fMLF 刺激细胞 8 h。然后按一步法以快速 RNA 提取试剂盒抽提细胞总 RNA,取总 RNA 0.5 μg 进行扩增。人 VEGF mRNA 的引物序列为: 5'-ATGAACTTCTGCTGTCTTGGG-3', 5'-CTGTATCAGTCTTTCCTGGTGAG-3', 用于扩增 4 个等位序列的 VEGF 基因,扩增片段的长度分别为 514 bp (VEGF121), 646 bp (VEGF165), 718 bp (VEGF189), 769 bp (VEGF206)。以人 GAPDH 作为内参, GAPDH mRNA 的引物序列为: 5'-GGTGAAG2GTCGGTGTGAACGGA-3', 5'-TGT TAGTGGTCTCGCTCCTG-3', 扩增片段大小为 223 bp, 退火温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。RT-PCR 反应以高保真单管反应体系进行,反应参数为: 42 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录 30 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 逆转录酶灭活 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min (40 个循环)。再于 68 $^{\circ}\text{C}$ 加时延伸 30 min。PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳并以溴乙啶染色观察。溴乙啶染色各条带检测用凝胶成像系统 Image/J program (NIH Image) 扫描进行灰度分析,记录各条带光密度。为消除系统及定量误差,基因表达水平以各个检测基因与自身 GAPDH 条带光密度平衡比率来计算。为便于比较,将各组细胞 VEGF mRNA 的 4 个条带测定值合并计算,并求平均积分光密度强度。

ELISA 法检测 VEGF 蛋白水平 单独诺帝处理组 (含 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诺帝的常规培养液)。于 12, 24, 36 和 48 h 收集各组细胞上清液,离心去杂质,按照人 VEGF ELISA 试剂盒说明进行操作。酶标仪 490 nm 波长读取吸收度值,绘制标准曲线并计算出相应 VEGF 浓度。

统计学分析 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。细胞数及 VEGF 蛋白的差异比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA); 两组间均数比较时,未配对样本采用 *t* 检验。采用 SPSS10.0 统计软件进行处理。

结果

1 诺帝对 U87 细胞增殖的影响

25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诺帝对 U87 细胞经 fMLF 诱导的增殖与对照组相比无显著统计学意义 ($P > 0.05$), 而诺帝 (50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 对 fMLF 诱

导的细胞增殖具有显著抑制效应,其 IC_{50} 值为 56.78 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$), 见图 1。

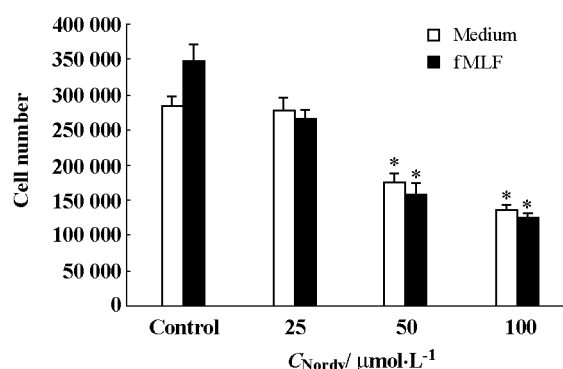


Figure 1 Effect of nordenin on the proliferation of U87 cells induced by fMLF. U87 cells were cultured in the presence or absence of nordenin in addition to fMLF. The cell number was calculated on the 4th day. Nordenin (50 - 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) inhibited ($P < 0.05$) the cell proliferation induced by 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ fMLF. * $P < 0.05$ vs control

2 诺帝对 U87 细胞迁移情况的影响

U87 细胞对不同剂量 fMLF 诱导的迁移运动呈剂量依赖效应,达到峰值后,更高浓度的 fMLF 不再增强 U87 细胞的迁移运动能力。fMLF 诱导的 U87 细胞迁移效应可被诺帝抑制,25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 诺帝的抑制效应与对照组相比没有显著的统计学意义 ($P > 0.05$), 而诺帝 (50 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 呈现显著的抑制效应 ($P < 0.05$), 见图 2。

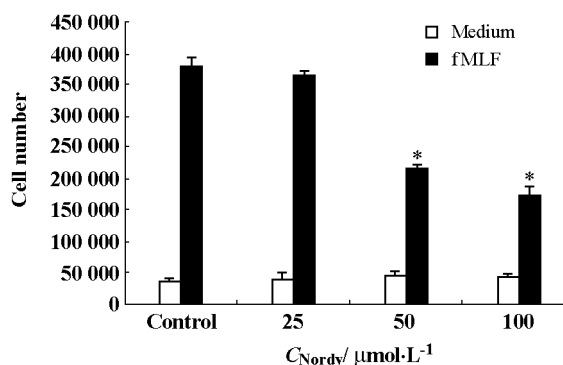


Figure 2 Effect of nordenin on migration of U87 cells induced by fMLF. U87 cells treated with different concentrations of nordenin for 4 h were stimulated by fMLF (100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$). The number of U87 cells which migrated across the membrane was counted to represent the migration ability. The results were expressed as $\bar{x} \pm s$ of migrated cells in 3 HPF. * $P < 0.05$ vs control

3 诺帝对 U87细胞 Ca²⁺流的影响

fMLF可诱导胶质瘤细胞产生短暂而强烈的细胞内 Ca²⁺流, Ca²⁺流信号包括一个逐渐上升的过程和一个持续的平台期,此诱导效应随 fMLF浓度变化呈剂量依赖性改变(图 3A)。诺帝处理 U87细胞 4 h后经上述刺激, Ca²⁺流的变化呈现为双相,即低浓度(25 μmol·L⁻¹)处理后细胞内 Ca²⁺流增强,而高浓度(50和 100 μmol·L⁻¹)处理后 Ca²⁺流被抑制。结果提示,高浓度的诺帝对 FPR介导的胶质瘤细胞 Ca²⁺流动具有抑制作用(图 3B)。

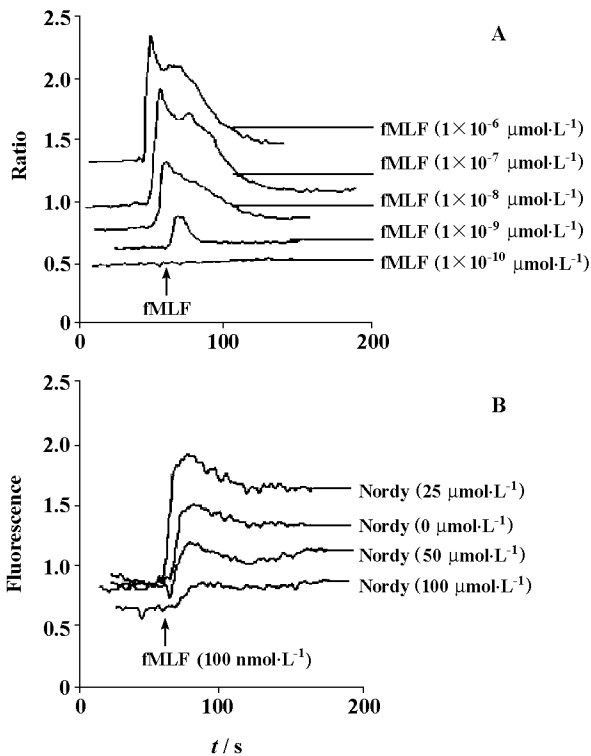


Figure 3 Calcium mobilization and effect of norty on the mobilization induced by fMLF in U87 cells. U87 cells treated with different concentrations of norty for 4 h were loaded with Fura-2 before stimulation with fMLF (100 nmol·L⁻¹). Calcium mobilization in response to fMLF was detected with a luminescence spectrometer. A: Dose response of calcium mobilization induced by different concentrations of fMLF; B: Effect of norty on calcium mobilization induced by 100 nmol·L⁻¹ fMLF

4 诺帝对 U87细胞 VEGF mRNA和蛋白水平的影响

经 fMLF刺激后, U87细胞的 VEGF mRNA表达明显增高。100 μmol·L⁻¹诺帝处理 12 h后的 U87细胞, fMLF的激动效应被抑制。诺帝能抑制由 fMLF引起的 VEGF mRNA表达的增高,并呈剂量依

赖性,低浓度(25和 50 μmol·L⁻¹)的抑制效应不明显,而高浓度(100 μmol·L⁻¹)的抑制效应较明显(图 4)。

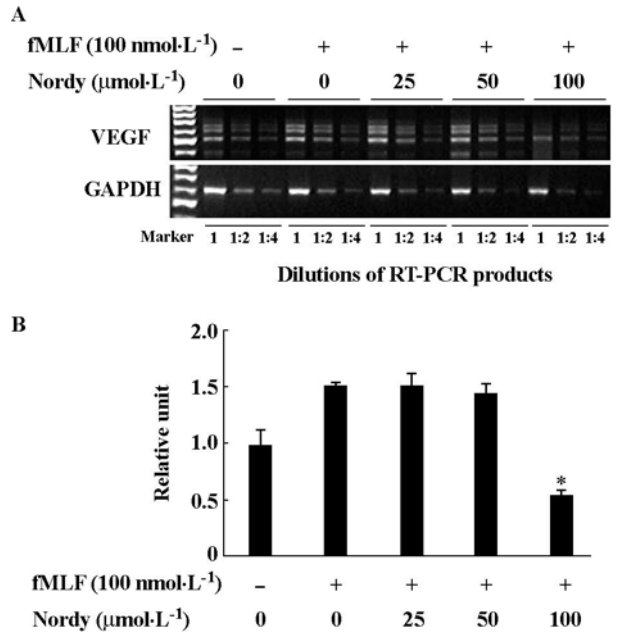


Figure 4 Effect of norty on VEGF mRNA expression induced by fMLF in U87 cells. U87 cells were preincubated with norty for 12 h, followed by stimulation with fMLF (100 nmol·L⁻¹) for 8 h. Total RNA was extracted and examined for VEGF mRNA by RT-PCR. The RT-PCR product was analyzed by electrophoresis and visualized with ethidium bromide staining. A: Electrophoresis of RT-PCR VEGF mRNA product in U87 cells treated with or without norty; B: Density analysis of electrophoresis bands (the density of 4 VEGF mRNA transcripts was combined for comparison between cells with fMLF alone and plus norty). * *P* < 0.05 vs control (without fMLF stimulation)

ELISA检测结果显示,以 100 nmol·L⁻¹ fMLF刺激 U87细胞,在 12, 24, 36和 48 h等各时间点,细胞培养上清液中 VEGF蛋白水平均显著增加,与对照组相比,具有显著统计学意义(*P* < 0.05)。而诺帝在各时间点均可显著削弱 fMLF的刺激效应。以处理 24 h观察时间点为例,未以 fMLF刺激对照组的 U87细胞培养上清液中的 VEGF含量为(29.95 ± 4.23) ng·mL⁻¹;以 100 nmol·L⁻¹ fMLF刺激 U87细胞,培养上清液中的 VEGF含量为(42.32 ± 2.48) ng·mL⁻¹;而以 100 μmol·L⁻¹诺帝和 100 nmol·L⁻¹ fMLF共同处理 U87细胞,培养上清液中的 VEGF含量为(24.65 ± 2.26) ng·mL⁻¹,见图 5。

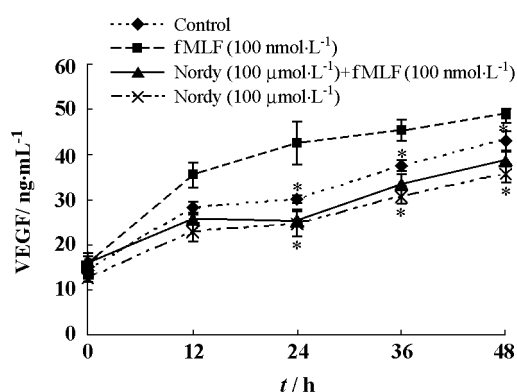


Figure 5 Effect of nurdy on secretion of VEGF in cultured U87 cells supernatant stimulated by fMLF. VEGF in the supernatant in different treatment groups was detected with ELISA kit. VEGF level was quantified by spectrophotometric measurements at 490 nm wavelength. * $P < 0.05$ vs control

讨论

甲酰化肽受体 (FPR) 属 7 次跨膜 G 蛋白偶联受体超家族成员。它们一般在受到配体的刺激数分钟后启动多级信号途径通路,最后引发细胞的趋化反应^[7,8]。趋化过程从趋化剂与其受体结合开始,以一些介质和因子的释放而终止。FPR 的跨膜区对配体结合区的形成具有调节作用。另外, FPR 的跨膜区还能形成有利于与配体结合的特殊结构。FPR 受到 fMLF 激活后,也干扰了细胞对其他不相关趋化剂的反应,因为此结合影响了异源受体的脱敏。在 U87 细胞, fMLF 首先作用于 FPR, FPR 将信号传导至细胞内,激活细胞的增殖、迁移和分泌功能。作者前期的研究表明,恶性胶质瘤细胞表达 FPR, 诺帝可抑制其表达水平^[1,5]。本研究通过用 FPR 的配体 fMLF 进行刺激,观察 FPR 是否具有参与细胞增殖、迁移、细胞内 Ca^{2+} 流和 VEGF 产生等功能。结果显示, fMLF 可以显著激活 FPR,进而介导胶质瘤细胞增殖、迁移、 Ca^{2+} 流以及 VEGF 的 mRNA 表达和蛋白分泌等功能。VEGF 是一种最为重要的血管生成因子,其经过 fMLF/FPR 途径诱导产生后可直接促进内皮细胞的生长和血管的新生。本研究结果进一步提示,功能性 FPR 在胶质瘤细胞的表达也参与了 VEGF 相关的肿瘤血管生成过程。

基于 NDGA 的化学结构而合成的手性化合物诺帝,通过动物实验模型,作者先后报道了诺帝可以抑制人胶质母细胞瘤细胞的体内移植瘤的生长^[6]。据此,作者推测诺帝对 FPR 生长信号的干扰可能是

此抑制效应的机制之一。但诺帝的作用靶点究竟位于 FPR 信号传导的上游还是下游,尚需深入研究。

肿瘤细胞的侵袭性生长机制与炎症时白细胞的趋化和浸润机制有一定的相似性。作者前期研究结果也发现, FPR 选择性地表达于高度恶性的人胶质瘤组织中,表明 FPR 可能涉及与肿瘤浸润和侵袭性生长有关的病理生理过程。本研究结果表明,低剂量诺帝 ($25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 对 fMLF 诱导的细胞的迁移反应没有表现出明显的抑制效应,而高剂量诺帝 (50 和 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 抑制了 FPR 介导的胶质瘤细胞迁移功能。诺帝抑制 U87 细胞对 fMLF 的反应性还表现在诺帝可能通过抑制 FPR 活化后的 Ca^{2+} 流动而影响胶质瘤细胞的多种生物效应。在检测胶质瘤细胞在 Ca^{2+} 流动方面对 FPR 激动剂的反应试验中还发现, FPR 激动剂 fMLF 可引起短暂而强烈的 Ca^{2+} 流动,而此效应可被诺帝显著抑制。当用适当浓度的 FPR 激动剂 fMLF ($100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 刺激 U87 细胞时, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诺帝对 Ca^{2+} 流动的抑制效应更为明显。

实体瘤的生长必须有血管维持足够的血供,提供其生长所需的养分,抗血管生成治疗与其他治疗联合对恶性肿瘤治疗有重要价值^[2,9]。在血管生成过程中,多种血管生成因子参与了血管新生过程。其中最为重要的强效血管形成因子便是 VEGF。多种人肿瘤细胞中均表达高丰度的 VEGF mRNA,如肾脏、结肠、卵巢以及颅内的肿瘤细胞^[10]。许多肿瘤细胞表达 VEGF 和一些与 VEGF 结构相似的蛋白质。在小鼠结肠癌肝脏转移的模型中, VEGF 在体内肿瘤病理生理过程中的重要作用得以证明,用抗 VEGF 抗体可以明显缩小肿瘤的体积。另外, VEGF 不仅可以诱导内皮细胞增殖、迁移以及小管样结构形成,还可以增加微血管通透性,后者可以易化恶性肿瘤细胞的扩散^[10]。采用 VEGF 抗体、降低 VEGF 表达和耗竭已表达的 VEGF 均可以引起内皮细胞凋亡并抑制肿瘤的生长^[11]。

快速增殖、高度侵袭和活跃的血管生成是人脑恶性胶质瘤的重要生物学特性,尽管近二十年来的恶性胶质瘤手术、化疗、放疗甚至基因治疗等多种治疗措施已有明显进步,也未能很好地延长患者的生存期。因此,如同其他肿瘤一样,探寻恶性胶质瘤新的治疗靶点和治疗方法十分必要和重要。对胶质瘤的研究结果表明, VEGF 介导胶质瘤形成丰富的新生血管^[12],若能干扰胶质瘤细胞 VEGF 的基因表达和蛋白水平,对于该病的抗血管生成治疗将具有重

要意义。

本研究中,诺帝对 FPR 活化后瘤细胞 VEGF mRNA 表达影响的检测结果显示,尽管在无 FPR 激动剂 fMLF 刺激情况下 U87 细胞就表达 VEGF mRNA,分泌一定量的 VEGF,但以 FPR 激动剂 fMLF 激活胶质母细胞瘤的该受体后,VEGF 在 U87 细胞 mRNA 的表达水平和细胞培养上清液中分泌的蛋白水平均显著增加。而 U87 细胞经 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诺帝处理 12 h 后, fMLF 对 VEGF mRNA 表达的激动效应被抑制。另外, $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 诺帝还对 fMLF 诱导的胶质瘤细胞上清液中 VEGF 的蛋白水平在不同时间点均有抑制作用。诺帝抑制 FPR 刺激因子 fMLF 上调的 VEGF 基因转录水平和蛋白水平的激活作用的结果提示,诺帝在抗肿瘤血管生成治疗中起到了重要的作用。

References

- [1] Zhou Y, Bian XW, Le YY, et al. Fomylpeptide receptor FPR and the rapid growth of malignant human gliomas [J]. J Natl Cancer Inst, 2005, 97: 823 - 835.
- [2] Zhai FM, You QD, Wang H, et al. Synthesis and *in vitro* antitumor activity of multi-methoxyl carbazole analogues [J]. Acta Pham Sin (药理学报), 2004, 39: 808 - 812.
- [3] Ito H, Ueda H, Iwamoto I, et al. Nordihydroguaiaretic acid (NDGA) blocks the differentiation of C-C12 myoblast cells [J]. J Cell Physiol, 2005, 202: 874 - 879.
- [4] Tong WG, Ding XZ, Witt RC, et al. Lipoxigenase inhibitors attenuate growth of human pancreatic cancer xenografts and induce apoptosis through the mitochondrial pathway [J]. Mol Cancer Ther, 2002, 1: 929 - 935.
- [5] Chen JH, Bian XW, Yao XH, et al. Nordy, a synthetic lipoxigenase inhibitor, inhibits the expression of fomylpeptide receptor and induces differentiation of malignant glioma cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 342: 1368 - 1374.
- [6] Chen FL, Zhang HR, Bian XW, et al. Treatment of C6 orthotopic implantation in rat brain's with nordy and its effects on the expression of STAT3 and p-STAT3 [J]. Chin J Neurosurg (中华神经外科杂志), 2005, 21: 359 - 362.
- [7] Yang SX, Chen JH, Jiang XF, et al. Activation of chemokine receptor CXCR4 in malignant glioma cells promotes the production of vascular endothelial growth factor [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 335: 523 - 528.
- [8] Sun RH, Iribarren P, Zhang N, et al. Identification of neutrophil granule protein cathepsin G as a novel chemotactic agonist for the G protein-coupled fomyl peptide receptor [J]. J Immunol, 2004, 173: 428 - 436.
- [9] Zhu XF, Liu ZC, Zeng YX. Tyrosine kinase receptor mediated signal transduction and cancer treatment [J]. Acta Pham Sin (药理学报), 2002, 37: 229 - 234.
- [10] Wood PA, Bove K, You S, et al. Cancer growth and spread are salutatory and phase-locked to the reproductive cycle through mediators of angiogenesis [J]. Mol Cancer Ther, 2005, 4: 1065 - 1075.
- [11] Schichor C, Bimbaum T, Etmann N, et al. Vascular endothelial growth factor A contributes to glioma-induced migration of human marrow stromal cells (hMSC) [J]. Exp Neurol, 2006, 199: 301 - 310.
- [12] Bian XW, Chen JH, Jiang XF, et al. Angiogenesis as an immunopharmacologic target in inflammation and cancer [J]. Int Immunopharmacol, 2004, 4: 1537 - 1547.