

• 药理与临床 •

橙皮素抑制 P-选择素诱导的乳腺癌转移作用机制研究

毛晨梅, 郁丹红, 桂 环

苏州大学附属儿童医院, 江苏 苏州 215000

摘要: 目的 探究橙皮素对 P-选择素介导的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞转移的影响及其作用机制。方法 运用计算机虚拟对接技术体外评价橙皮素与 P-选择素的结合能力; 采用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞为模型, MTS 法观察不同浓度的橙皮素/P-选择素对 MDA-MB-231 生长能力的影响; ELISA 法检测橙皮素对活化的血小板表面 P-选择素分泌的影响; 黏附实验考察橙皮素对 P-选择素介导的 MDA-MB-231 与内皮细胞黏附的影响; Transwell 实验分析橙皮素对 P-选择素促进 MDA-MB-231 乳腺癌细胞迁移的影响; 采用 Western blotting 法考察橙皮素对 MDA-MB-231 细胞表面糖蛋白 (Mucin-1)、整合素 (Integrin $\beta 3$ 、 $\beta 1$) 及基质金属蛋白酶 (MMP-2、MMP-9) 蛋白表达的影响; 进一步分析橙皮素对 MDA-MB-231 细胞 Integrin-MMP 信号通路的影响, 阐明橙皮素抗肿瘤转移的作用机制。结果 计算机虚拟对接技术证实橙皮素与 P-选择素有较好的结合能力; 在体外橙皮素能剂量依赖性抑制 MDA-MB-231 增殖及其与内皮细胞的黏附; 橙皮素能降低活化的血小板表面 P-选择素的分泌; 迁移实验中橙皮素能显著抑制 P-选择素介导的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞迁移; 降低 P-选择素诱导的细胞表面糖蛋白 Mucin-1、Integrin $\beta 3$ 、Integrin $\beta 1$ 及 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达。结论 橙皮素具有抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞生长能力, 阻断 P-选择素诱导的乳腺癌 MDA-MB-231 肿瘤细胞迁移以及其与内皮细胞的黏附, 其机制为橙皮素通过竞争性结合 P-选择素, 阻断其与 Mucin-1 的结合, 抑制 PI3K-AKT-Paxillin-FAK-Src 信号通路, 下调 P-选择素调控的 Integrins 及 MMP-2、MMP-9 表达。

关键词: 橙皮素; P-选择素; 计算机虚拟对接; MDA-MB-231; 肿瘤转移; 基质金属蛋白酶; 整合素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)04-0714-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.04.017

Effect and mechanism of hesperetin on P-selectin mediated breast cancer MDA-MB-231 metastasis

MAO Chen-mei, YU Dan-hong, GUI Huan

Children's Hospital of Soochow University, Suzhou 215000, China

Abstract: Objective To study the effect of hesperetin on the migration of P-selectin mediated MDA-MB-231 breast cancer cells and its mechanism. **Methods** Using computer virtual docking to evaluate the capacity of hesperetin binding to P-selectin *in vitro*; MTS test was observed with different concentration of hesperetin or P-selectin on the growth capacity of MDA-MB-231; The effect of hesperetin on P-selectin secretion by activated platelet was detected by Elisa kit; Adhesion experiments examined hesperetin on P-selectin-mediated MDA-MB-231 and endothelial cell adhesion; Transwell experiment was performed to analyze the effect of P-selectin on MDA-MB-231 breast cancer cell migration affected by hesperetin; Western blotting investigated MDA-MB-231 cell surface glycoprotein Mucin-1, Integrin $\beta 3$, $\beta 1$ and matrix metalloproteinase expression of MMP-2 and MMP-9 protein expression influenced by hesperetin; impact of hesperetin on MDA-MB-231 cell integrin-matrix metalloproteinase signaling pathway was analyzed to clarify the anti-tumor metastasis mechanism of hesperetin. **Results** Hesperetin inhibited P-selectin-induced MDA-MB-231 cell migration and reduced HUVEC-breast cancer cell adhesion. Hesperetin down-regulated the expression of $\beta 1$ and $\beta 3$ integrins, and MMP-2 and MMP-9 at protein levels in MDA-MB-231 cells. **Conclusion** Hesperetin can inhibit the growth capacity of MDA-MB-231 breast cancer cells, block P-selectin-induced breast cancer MDA-MB-231 tumor cell migration and adhesion, and the mechanism for hesperetin is through competitive P-selectin binding to Mucin-1. Subsequently, hesperetin could block PI3K/AKT/Paxillin/FAK/Src signaling pathway and down-regulate P-selectin mediated Integrins, MMP-2, and MMP-9 expression.

Key words: hesperetin; P-selectin; computer virtual docking; MDA-MB-231; tumor metastasis; MMPs; integrin

收稿日期: 2016-08-07

基金项目: 江苏省高校自然科学基金资助项目 (15KJB310018)

作者简介: 毛晨梅, 女, 主任中药师。Tel: (0512)80692201 E-mail: maocm@163.com

血小板是恶性肿瘤发生血行转移的关键,一方面肿瘤细胞通过启动凝血系统,激活血小板,使得血浆中纤维蛋白原和血管性血友病因子(VWF)等重要黏附配体的水平上升,是血小板和癌细胞相互作用的重要桥梁^[1];另一方面,活化的血小板通过释放P-选择素(P-selectin)等生物活性刺激因子结合肿瘤细胞表面糖蛋白,介导侵袭转移信号级联反应,进一步促进肿瘤细胞的侵袭、浸润与转移^[2]。因此,抑制血小板以及血小板来源的细胞因子对肿瘤细胞的影响可以有效地抑制肿瘤转移。

肿瘤疾病发生时,凝血酶、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)及脂多糖(LPS)等激活血小板后,胞内Weible-palade小体膜与胞膜迅速融合,可通过细胞排粒作用,在数秒内由胞内颗粒易位至内皮细胞及血小板表面^[3]。黏蛋白是表达于大多数肿瘤细胞上的P-选择素配体,为二硫键连接而成的同源二聚体形式的唾液黏蛋白。P-选择素主要与肿瘤细胞表面的黏蛋白-1(Mucin-1)结合后向内信号传导活化磷脂酰肌醇-3激酶/蛋白激酶(PI3K/AKT)通路,上调整合蛋白超家族(intergrin supper family, Intergrins)的表达^[4]。Intergrins高表达后经Paxillin-FAK-Src通路上调基质金属蛋白酶(MMPs)的表达,促进肿瘤细胞的迁移、黏附能力^[5]。

相当多的研究已在探讨以P-选择素为靶点的抗肿瘤转移疗法的可能性^[6]。方向之一就是抑制P-选择素与其配体的相互作用,首先是抑制选择素配体在肿瘤细胞的表达,其次是使用选择素配体的类似物,再次是使用选择素配体的模拟物^[7]。近年来,一些P-选择素的拮抗剂如岩藻糖(fucose)、O型唾液酸(O-sialic acid)、P-选择素糖蛋白配体1(P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1)等已被开发,但由于这些P-选择素的拮抗剂存在不同的缺陷,比如交叉反应性能差、弱亲合力相对较低的选择、半衰期短等,这些不足之处大大限制了上述P-选择素拮抗剂的临床应用^[8]。

橙皮素(hesperetin)是柑桔属植物中普遍存在的一种类黄酮物质,具有抗氧化、抗炎、抗变态性反应、调血脂、保护心血管和抗肿瘤的药效作用。近年来,体内、外研究证实,橙皮素具有抑制甲状腺癌、前列腺癌、乳腺癌等肿瘤细胞生长,诱导凋亡效应^[9-10],但具体机制尚不明确。本研究证实橙皮素通过竞争性拮抗P-选择素与Mucin-1相结合,阻断P-选择素活化的Intergrin-MMPs蛋白信号通路

来影响肿瘤细胞的迁移黏附。在体外实验中选用MDA-MB-231人乳腺癌细胞考察橙皮素对P-选择素介导的细胞迁移以及黏附关键环节的影响。进一步采用酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹(Western blotting)等方法对橙皮素抗肿瘤作用机制进行深入研究,以期阐明橙皮素发挥抗肿瘤转移的确切分子机制,为临床上开发安全、有效的抗肿瘤候选药物提供实验依据。

1 材料

1.1 试剂与药品

橙皮素,上海源叶生物有限公司,批号B20184,质量分数99%;人血小板(购于江苏省血液中心),仅供本研究使用。DMEM(美国Gibco公司,批号758137);胎牛血清(Hyclone公司,批号KPF21390);3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTS, Promega公司,批号30502301);P-选择素(Prospec公司,批号610PSEL07);各种抗体如下:PI3K/AKT/Paxillin/FAK/Src购自SAB公司,Mucin-1购自南京伟沃生物科技有限公司,Integrin β 3、 β 1由Chemicon公司提供,MMP-2、MMP-9购自Calbiochem公司。重组人P选择素糖蛋白配体1(rhPSGL-1)购自上海嵘崑达实业有限公司,货号3345-PS-050。

1.2 细胞

人源乳腺癌细胞MDA-MB-231购于ATCC细胞库;人脐静脉内皮细胞株HUVECs,购于南京凯基生物科技有限公司。

1.3 仪器

SPECTRA MAX 190可见-紫外光微孔板检测仪(美国MD公司);DM1L莱卡倒置荧光显微镜(德国莱卡公司);P2精密移液器(法国吉尔森公司);MLS-3020全自动高压灭菌锅(日本SANYO公司);525BR027843电泳槽(美国Bio-Rad公司);SW-CJ-ZFD超净工作台(苏净集团安泰公司制造);Nu-6511超低温冰箱(美国纽艾尔公司);3111型CO₂培养箱(FORMA);S/N 020579纯水仪(美国Spring公司);BT323S电子天平(德国赛多利斯有限公司);KA-1000离心机(上海安亭科学仪器厂)。

2 方法

2.1 细胞培养

MDA-MB-231细胞,用含10%胎牛血清、青霉素(1×10^5 U/L)以及链霉素100 mg/L的DMEM培养基,于37℃、5% CO₂的培养箱中进行常规扩

增培养。HUVECs 用含 10%胎牛血清、100 mg/mL 链霉素和 100 U/mL 青霉素的 DMEM 培养基培养。

2.2 虚拟评价橙皮素与癌栓形成中关键蛋白的结合力

采用 Autodock 分子对接软件包 (版本 4.2) 进行分子对接, 将橙皮素与 P-选择素进行计算机虚拟结合, 在此基础上评价橙皮素与 P-选择素的结合参数。

2.2.1 准备橙皮素配体文件 运用 ACD/ChemSketch 化学作图软件画出橙皮素及极性分子苯胺分子结构, 并以 MOL2 文件格式导出保存。然后用 UCSF Chimera 分子图形软件制备分子 (prepping molecules), 将 MOL2 文件中橙皮素结构及苯胺分子进行加极性氢 (essential hydrogen)、加电子、合并非极性氢原子、计算 Gasteiger-Hückel 电荷等常规处理, 最后使用 MM2 算法对橙皮素及苯胺分子的三维结构进行能量最小化优化 [迭代次数 1 000 次, 最小的均方根 (RMS) 梯度为 0.10 nm]^[11]。将能量最优化的即最稳定的橙皮素及苯胺分子结构转化生成 PDB 格式文件, 以备使用。使用 AutoDockTools (ADT) 软件定义橙皮素分子及苯胺分子的柔性部分 (可旋转键), 以 PDBQT 格式存储, 已备 Autodock 使用。

2.2.2 P-选择素蛋白的准备和处理 从 BIDD (Bioinformatics and drug design group) 治疗性靶标数据库 (Therapeutic Target Database) 中寻找对接受体 P-选择素, 在 Protein Data Bank 搜索其晶体结构。Q-SiteFinder (<http://www.modelling.leeds.ac.uk/qsitefinder/>) 以及 metaPocket (<http://metapocket.eml.org/>) 提交该蛋白 PDB 文件格式, 在线预测出目的蛋白的活性位点^[12]。采用 AutodockTools 软件中 Select From String 功能模块将目的蛋白中水分子剔除, 利用 Hydrogens 模块对目的蛋白加极性氢原子及 Kollman 电荷, 然后将目的蛋白与橙皮素配体进行分子对接。

2.2.3 对接计算的参数设置 使用 Autodock 软件, 应用拉马克 (Lamarckian genetic algorithm, LGA) 遗传算法, 将局部能量搜索与遗传算法相结合, 以半经验势函数作为能量打分函数, 对小分子构象和位置进行全局搜索。对接选用的受体格点盒子大小为 2.25 nm×2.25 nm×2.25 nm (60 点×60 点×60 点), 格点间距 0.375 nm, 格点盒子中心位于各个蛋白活性位点的中心。为提高底物分子在对接过程中的柔性程度, 并使每次计算更为充分, 以便得到更精确的结果, 在对接过程中采用较大的运算参

数, 将该算法中的种群数 ga_pop_size 从默认值 100 调整为 150, 最大能量评估值 ga_num_evals 由默认值 2 500 000 调整为 10 000 000, 运算循环数从默认值 10 调整为 100, 其余参数使用默认数值。对接计算在 3.75 nm×3.75 nm×3.75 nm 的矩形框中进行^[13]。

2.3 细胞增殖活性的检测

人源乳腺癌细胞 MDA-MB-231 生长至 90%融合后, 用 37 °C 预热的 0.25%胰蛋白酶消化细胞, 用 DMEM 完全培养基重悬细胞进行计数, 调整细胞浓度为每孔 5×10^3 个细胞接种于 96 孔板中。待第 2 天细胞单层贴壁后加入橙皮素, 使给药组终浓度分别为 10、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.001 $\mu\text{mol/L}$ 。对照组加入 20 μL PBS, 每个药物浓度设 4 个复孔。在考察 P-选择素对 MDA-MB-231 生长的影响时, 每孔加入 P-选择素, 使其终质量浓度分别为 10、30、50、70、90、100、120、150、200 ng/mL。将培养板放回细胞培养箱, 24 h 后加入 20 μL MTS (终质量浓度 333 $\mu\text{g/mL}$) 溶液, 继续在培养箱中孵育 3 h。摇床避光震荡 15 min, 用全自动酶标仪在 490 nm 测定吸光度 (A) 值, 计算细胞增殖率 (给药组 A 值/对照组 A 值)。

2.4 橙皮素对活化的血小板表面 P-选择素分泌的影响

取 5 mL 血小板悬液, 800 r/min 常温离心 8 min 得血小板沉淀, 离心前加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 前列腺素 E_1 (PGE_1) 防止血小板激活。制备悬浮血小板到合适的浓度 (1×10^8 个/mL), 加入 10 μL 含橙皮素 0、0.01、0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 的药液, 孵育 30 min, 每组 3 个复孔。实验测定前用凝血酶 (0.05 U/mL) 激活^[14]。取上述血小板悬液, 3 000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 取上清。分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。按照说明书 (人 P-选择素 ELISA 试剂盒, 上海研谨生物科技有限公司, 货号 F00382) 标准品的稀释方法制备标准品的稀释液, 在酶标包被板上标准品孔中加入稀释好的标准品 50 μL , 在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液 40 μL , 然后再加待测样品 10 μL , 37 °C 反应 30 min。弃去液体, 每孔加满 30 倍稀释后洗涤液, 振荡 30 s, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干。每孔加入酶标试剂 50 μL , 空白孔除外。37 °C, 温育 30 min。弃去液体, 每孔加体积为 30 倍的洗涤液, 振荡 30 s 后甩去洗涤液, 用滤纸拍干洗涤液。每孔加 50 μL 显色剂 A, 再加 50 μL 显色剂 B, 轻微振荡使其混匀, 在避光条件下 37 °C 显色 10 min。依序每孔加 50 μL 终止溶液终止反应。

用空白孔调零,用酶联仪在 450 nm 波长依序测量各孔的 A 值。在加终止液后 15 min 以内进行检测^[15]。

2.5 橙皮素对 P-选择素诱导的 MDA-MB-231 细胞迁移能力的影响

实验前 24 h 对 MDA-MB-231 细胞进行撤血清饥饿。用 37 °C 预热的 0.25% 胰蛋白酶消化细胞,用无血清的 DMEM 培养基重悬细胞,调整细胞浓度为 2×10^6 /mL。在 24 孔板下室中加入 600 μ L DMEM 培养基,取 90 μ L 上述细胞悬液加入 Transwell 小室上室中,同时各孔中加入初始浓度分别为 0.1、1、10 μ mol/L 的橙皮素药液,体积 10 μ L,终浓度为 0.01、0.1、1 μ mol/L,对照组加入等体积的 PBS,阳性对照组加入 rhPSGL-1,终质量浓度为 70 ng/mL^[16],除对照组外,其余各组每孔加入 P-选择素使得终质量浓度为 70 ng/mL,同时设单独 P-选择素组,每组设置 3 个复孔。最后将 Transwell 小室浸于 24 孔板的培养液中,在培养箱中孵育 6 h 后,取出 Transwell 小室,用镊子取下滤膜,用 4% 多聚甲醛在冰上固定 10 min,取出用 0.1% 的结晶紫染液在水平摇床上染色 30 min,用 PBS 在水平摇床上漂洗 3 次,用棉签擦掉膜上层未迁移过的 MDA-MB-231 细胞,置于载玻片上,200 倍镜下观察细胞迁移情况并拍照。显微镜下随机选取 5 个视野,统计迁移细胞数目^[17]。

2.6 橙皮素对 P-选择素介导的 MDA-MB-231 细胞与 HUVECs 细胞黏附的影响

取对数生长期 MDA-MB-231 细胞,调整细胞密度为 1×10^5 个/mL,接种于 6 孔板中,待 MDA-MB-231 细胞生长至 80% 融合,除对照组外,每孔加入 P-选择素使得终质量浓度为 70 ng/mL,实验组再加入橙皮素终浓度为 0、0.01、0.1、1 μ mol/L,对照组加入等体积的 PBS,阳性对照组加入 rhPSGL-1,终质量浓度为 70 ng/mL。放于培养箱中培养 24 h。取对数生长期的 HUVECs,调整细胞密度至 1×10^5 个/L。每孔 1×10^4 个细胞数,接种于 96 孔板中,培养箱中静置 24 h。将 6 孔细胞培养板取出,弃培养基,PBS 洗涤 2 次,用 37 °C 预热的 0.25% 胰蛋白酶消化,完全培养基重悬 MDA-MB-231 细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,台盼蓝染色法检测 MDA-MB-231 细胞活力后,以每孔 100 μ L 体积加入到已弃培养基的包被有 HUVECs 的 96 孔板中,培养箱中继续静置 30 min。然后 PBS 洗掉未黏附细胞,每孔加入 200 μ L 0.1% 虎红染液,室温下孵育 30 min,弃染液,PBS

洗涤,每孔加入 95% 乙醇-PBS (1:1) 200 μ L,摇床上震荡 15 min,于 562 nm 酶标仪测定 A 值^[18],计算相对黏附率(给药组 A 值/对照组 A 值),每个给药剂量设 6 个复孔,实验重复 3 次。

2.7 对 P-选择素诱导的 MDA-MB-231 细胞 Integrin-MMP 与 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达的影响

取对数生长期 MDA-MB-231 细胞用预热 0.25% 胰蛋白酶消化并调整制成 1×10^9 个/mL 细胞悬液,接种于 75 mm² 培养皿中,每个培养皿加入 1 mL MDA-MB-231 细胞悬液,并加入 9 mL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液,共 10 mL 培养体系。细胞分组及给药方式同“2.6”项,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后裂解细胞提取总蛋白,采用 BCA 法测定总蛋白浓度。蛋白变性后取 30 μ g 上样,用 8% 分离胶、5% 浓缩胶电泳,电泳条件为 0.02 A 每块胶,电泳结束后将膜上蛋白转到 PVDF 膜上。PVDF 膜用一抗(稀释比例为 1:500),4 °C 孵育过夜后加辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG (1:10 000) 室温孵育 2 h。按 0.1 mL/cm² 加入化学发光试剂^[19]。用 Kodak 胶卷暗室进行发光曝光,以 GAPDH 作为蛋白条带内参,对蛋白条带进行灰度比值分析,实验共重复 3 次。

2.8 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间的比较采用单因素方差分析,样本均数间的比较采用 LSD- t 检验。

3 结果

3.1 对接结果与评价

在虚拟分子对接过程中,Autodock 软件将 10 个不同空间构象的橙皮素分别于目的蛋白 P-选择素在活性口袋进行计算机模拟拟合,之后软件对橙皮素与 P-选择素蛋白结合进行评分,其对接示意图见图 1,计算机虚拟对接情况见表 1。

在表 1 中,发现橙皮素与 P-选择素的对接能量接近对照物岩藻糖与 P-选择素的结合能力数值,表明橙皮素与 P-选择素有较好的亲和力。选用极性分子苯胺与 P-选择素进行分子对接^[20],以排除极性分子苯胺与 P-选择素的非特异性结合,根据结合能的差异进一步佐证橙皮素与 P-选择素的特异性结合。鉴于计算机虚拟对接橙皮素能较好地与 P-选择素结合,因此进一步开展实验考察橙皮素对 P-选择素下游调控信号通路的影响。

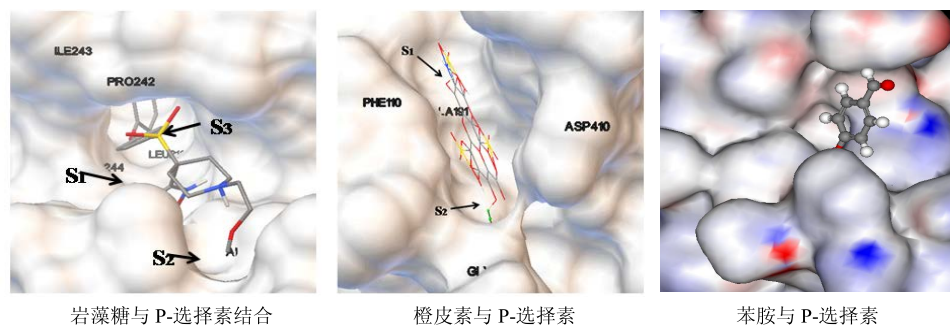


图 1 橙皮素与 P-选择素结合示意图

Fig. 1 Schematic views of hesperetin combined with P-selectin

表 1 计算机分子虚拟对接中结合能量参数

Table 1 Parameters of binding energy values by computer virtual docking

化合物	结合能/kJ	kI 值/(nmol·L ⁻¹)	分子间能/kJ	内能/kJ	扭转能/kJ	自由扩展能/kJ
岩藻糖	-15.11	87.46	-11.12	-0.48	1.49	-0.48
橙皮素	-14.08	65.15	-8.68	-3.56	0.34	-5.67
苯胺	-1.56	11.87	-0.39	1.45	0.06	1.73

3.2 橙皮素及 P-选择素对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

MTS 测定结果显示, 橙皮素在 5 $\mu\text{mol/L}$ 时对 MDA-MB-231 的生长有明显抑制作用, 抑制率为 26.98%, 而在 0.001~1 $\mu\text{mol/L}$ 对 MDA-MB-231 的生长无影响(图 2)。体外不同质量浓度的 P-选择素处理 MDA-MB-231 细胞 24 h, P-选择素对细胞增殖均无抑制作用。因此在考察橙皮素对 P-选择素诱导的 MDA-MB-231 细胞迁移及黏附生物学影响时, 选用 P-选择素对 MDA-MB-231 增殖无影响的质量浓度即 70 ng/mL (图 3)。

3.3 橙皮素对活化的血小板表面 P-选择素分泌的抑制作用

结果见表 2。与凝血酶激活对照组(橙皮素 0 $\mu\text{mol/L}$)相比, 橙皮素 0.01~1 $\mu\text{mol/L}$ 处理凝血酶

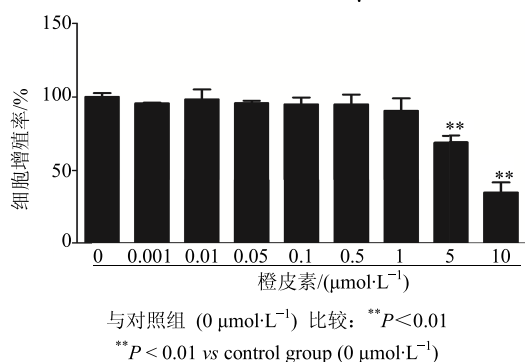
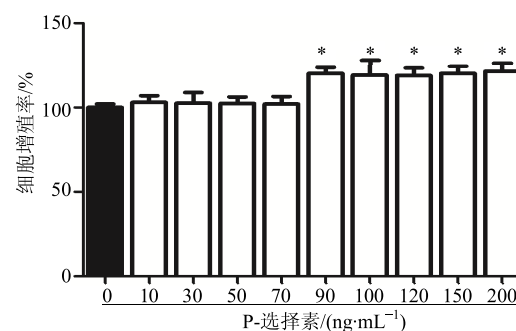


图 2 橙皮素对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 2 Effect of hesperetin on MDA-MB-231 proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 4$)



与对照组 (0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) 比较: * $P < 0.05$
* $P < 0.05$ vs control group (0 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)

图 3 P-选择素对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Fig. 3 Effect of P-selectin on MDA-MB-231 proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

表 2 橙皮素对凝血酶激活 P-选择素分泌的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effect of hesperetin on secretion of P-selectin in thrombin activated platelets ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	P-选择素/(pg·mL ⁻¹)
未激活对照	3 599.5 $\pm$ 118.5
激活对照	4 665.6 $\pm$ 518.4 ^{##}
凝血酶+橙皮素 0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	4 006.8 $\pm$ 328.5*
凝血酶+橙皮素 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	3 485.9 $\pm$ 119.5**
凝血酶+橙皮素 1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	2 745.9 $\pm$ 290.0**

与未激活对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与激活对照组比较: * $P < 0.05$
** $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs unactivated control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs activated control group

激活的血小板后, 上清中 P-选择素的量被显著降低。橙皮素 (0.01~1 $\mu\text{mol/L}$) 对凝血酶激活的血小板 P-选择素的释放具有抑制作用。

3.4 橙皮素抑制 P-选择素诱导的 MDA-MB-231 迁移

结果见图 4, 镜下观察可见 P-选择素诱导的 (橙皮素 0 $\mu\text{mol/L}$) 迁移过膜下的 MDA-MB-231

细胞数目较多, 有的地方成片, 橙皮素干预 6 h 后, 各给药组在相同倍数显微镜下观察, 肉眼可见细胞数目少于 P-选择素组。实验数据定量分析表明, 与 P-选择素组相比, 橙皮素明显抑制 P-选择素诱导的 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的迁移能力 ($P < 0.01$)。

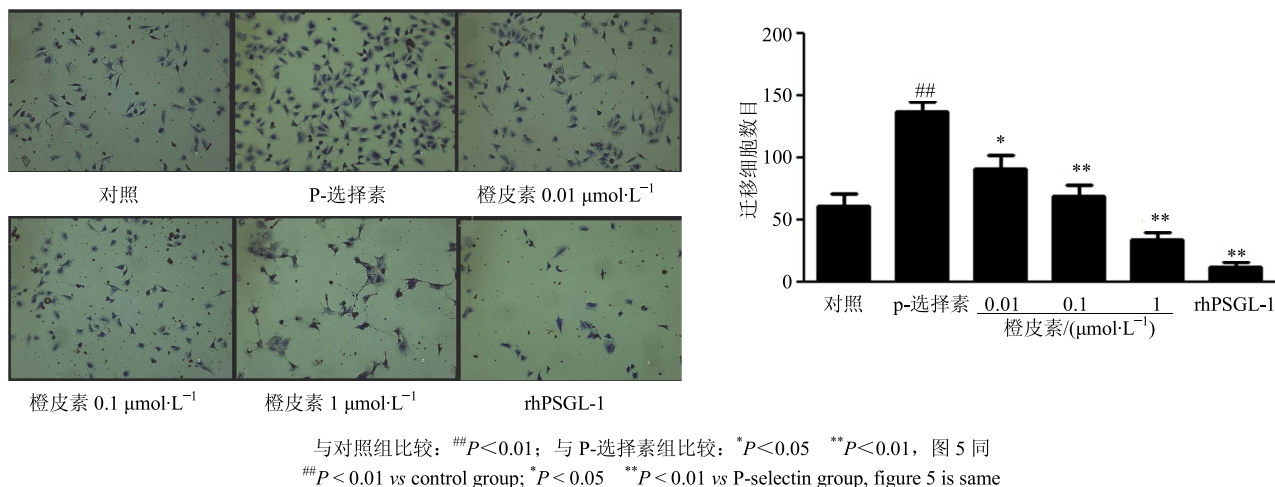


图 4 橙皮素对 P-选择素诱导的 MDA-MB-231 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of hesperetin on migration of MDA-MB-231 cells induced by P-selectin ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.5 橙皮素阻断 P-选择素介导的 MDA-MB-231 与内皮细胞黏附

肿瘤细胞穿越血管, 需要与血管内皮细胞黏附, P-选择素可以显著增强肿瘤细胞与内皮细胞黏附的能力, 图 5 显示橙皮素可以浓度依赖性地降低 P-选择素介导的 MDA-MB-231 细胞与内皮细胞的黏附率。

3.6 橙皮素抑制 P-选择素调控的 Integrin-MMPs 信号通路

如图 6 所示, 实验各组 GAPDH 的条带灰度相

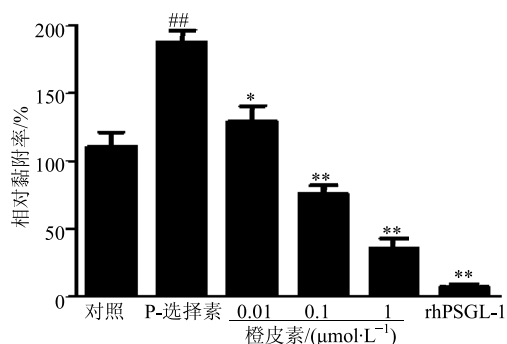


图 5 橙皮素对 MDA-MB-231 细胞与 HUVECs 黏附的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 5 Effect of hesperetin on MDA-MB-231 adhesion to HUVECs *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

近, 图 6 中 Integrin $\beta 3$ 、Integrin $\beta 1$ 、MMP-2、MMP-9 在橙皮素处理细胞后, 相比其亮度有明显差别, 可见有明显的减弱; 同时图 6 中相关信号通路蛋白的亮度和宽度可见有明显的减弱。实验结果证实橙皮素可以下调 P-选择素诱导的 MDA-MB-231 细胞表面整合素分子 Integrin $\beta 3$ 、Integrin $\beta 1$ 及基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达, 分子机制为抑制了 P-选择素介导的 PI3K-AKT-Paxillin-FAK-Src 信号通路。

4 讨论

血小板在肿瘤转移过程中发挥重要促进作用, 血小板可以与肿瘤细胞形成癌栓, 避免患者免疫系统杀死肿瘤细胞, 同时血小板会分泌一些生物活性因子调控肿瘤细胞的迁移、黏附等生物学行为。因此, 抑制血小板对肿瘤细胞的作用是近年来研究的热点和重点^[21]。大量的文献报道证实, 血小板分泌的 P-选择素是一类重要的促进肿瘤转移的生物活性因子, 在肿瘤转移过程中, 血小板来源的 P-选择素能激活肿瘤细胞表面的整合素蛋白, 调控 MMPs 的表达。虽然一些 P-选择素拮抗剂已被发现, 但由于半衰期短等原因限制了其在临床抗肿瘤治疗中的应用。如何从祖国传统中药中寻找出疗效好、不

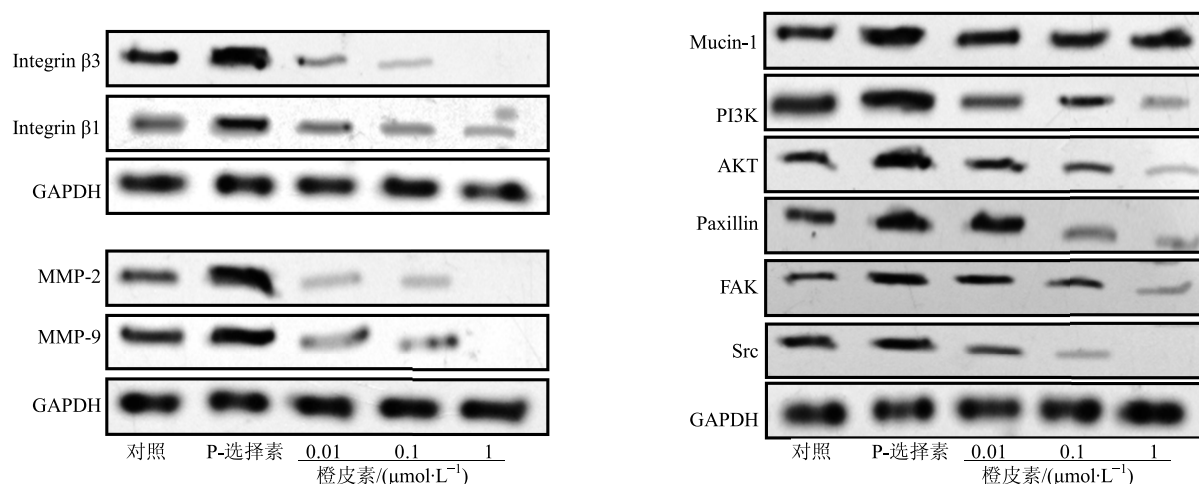


图 6 橙皮素对 P-选择素调控的 Integrin $\beta 3$ 、Integrin $\beta 1$ 、MMP-2、MMP-9 及介导的信号通路的影响

Fig. 6 Effects of hesperetin on protein expression of Integrin $\beta 3$, Integrin $\beta 1$, MMP-2, and MMP-9 and its signaling pathway stimulated by P-selectin in MDA-MB-231 cells

良反应小的抗肿瘤药物一直是科学研究者关注的重点。

计算机虚拟对接是发现先导化合物的重要手段之一，在本实验中采用计算机技术模拟橙皮素与 P-选择素的结合，考察两者之间的亲和力。与阳性对照岩藻糖相比，数据结果显示橙皮素能较好地与 P-选择素相结合。紧接着采用 ELISA 法考察橙皮素对活化的血小板分泌 P-选择素的影响。P-选择素是调节肿瘤细胞迁移黏附的关键分子，它可以介导肿瘤细胞与血小板以及内皮细胞之间的黏附。ELISA 检测法的结果发现橙皮素对活化的血小板 P-选择素释放有一定影响，但药物作用不是很显著。

P-选择素与 MDA-MB-231 细胞表面的 Mucin-1 结合后，向肿瘤细胞内信号传导活化 PI3K/AKT 信号通路，上调 Integrin $\beta 3$ 及 Integrin $\beta 1$ 的表达。Integrin 高表达后经 Paxillin/FAK/Src 通路上调 MMP-2/9 的表达，进一步促进肿瘤细胞的迁移、黏附能力^[22]。因为 P-选择素介导了肿瘤细胞的迁移及黏附过程，因此推测橙皮素一旦结合了血小板分泌的 P-选择素后，可能对 MDA-MB-231 细胞表面 Integrin 以及 MMPs 的表达有调控作用。在恶性乳腺癌中，激活的 Integrin $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 与 MMPs 相互协同控制了乳腺癌的转移。本研究采用 Western blotting 法检测了橙皮素对 P-选择素刺激的 MDA-MB-231 细胞表面 Integrin $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 表达的影响，发现橙皮素可以下调 Integrin $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 的蛋白表达；进一步对整合素调控的 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达进行了测

定，发现橙皮素同时下调 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达，初步说明了橙皮素具有下调 P-选择素诱导的整合素以及 MMPs 表达的功能。进一步分子机制研究发现橙皮素对 P-选择素调控的 PI3K-AKT-Paxillin-FAK-Src 信号通路同样具有抑制作用，这说明橙皮素可以作用于以上信号通路蛋白降低 Integrin $\beta 3$ 、 $\beta 1$ 以及 MMP-2、MMP-9 的蛋白表达。橙皮素正是通过对整合素的调控来抑制血行转移中血小板与 MDA-MB-231 细胞间的相互作用的。

本研究初步证实橙皮素能够通过竞争性与血小板分泌的 P-选择素相结合，阻断 P-选择素与 MDA-MB-231 细胞表面上 Mucin-1 结合，抑制 PI3K-AKT-Paxillin-FAK-Src 信号通路下调 Integrin $\beta 1$ 、 $\beta 3$ 以及 MMP-2、MMP-9 的表达，抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的迁移及黏附。

参考文献

- [1] Alshatwi A A, Ramesh E, Periasamy V S, *et al.* The apoptotic effect of hesperetin on human cervical cancer cells is mediated through cell cycle arrest, death receptor, and mitochondrial pathways [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2013, 27(6): 581-592.
- [2] Rahideh S T, Shidfar F, Nourbakhsh M, *et al.* The individual or combinational effects of Hesperetin and Letrozole on the activity and expression of aromatase in MCF-7 cells [J]. *Cell Mol Biol*, 2016, 62(6): 38-43.
- [3] Gong L, Mi H J, Zhu H, *et al.* P-selectin-mediated platelet activation promotes adhesion of non-small cell lung carcinoma cells on vascular endothelial cells under

- flow [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(4): 935-942.
- [4] Shen W Z, Zhou R F, Wang X F, *et al.* Antithrombotic mechanisms of holothurian glycosaminoglycan extracted from sea cucumber [J]. *Chin J Hematol*, 2006, 27(9): 579-583.
- [5] Wu D, Zhang J, Wang J, *et al.* Hesperetin induces apoptosis of esophageal cancer cells via mitochondrial pathway mediated by the increased intracellular reactive oxygen species [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(3): 3451-3459.
- [6] Chen S H, Dallas M R, Balzer E M, *et al.* Mucin 16 is a functional selectin ligand on pancreatic cancer cells [J]. *FASEB J*, 2012, 26(3): 1349-1359.
- [7] Azab A K, Quang P, Azab F, *et al.* P-selectin glycoprotein ligand regulates the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment [J]. *Blood*, 2012, 119(6): 1468-1478.
- [8] Sullivan C, Chen Y, Shan Y, *et al.* Functional ramifications for the loss of P-selectin expression on hematopoietic and leukemic stem cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10): e26246.
- [9] Trummer A, De Rop C, Stadler M, *et al.* P-selectin glycoprotein ligand-1 positive microparticles in allogeneic stem cell transplantation of hematologic malignancies [J]. *Exp Hematol*, 2011, 39(11): 1047-1055.
- [10] Cooney C A, Jousheghany F, Yao-Borengasser A, *et al.* Chondroitin sulfates play a major role in breast cancer metastasis: a role for CSPG4 and CHST11 gene expression in forming surface P-selectin ligands in aggressive breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res*, 2011, 13(3): R58.
- [11] Kozlowski E O, Pavao M S, Borsig L. Ascidian dermatan sulfates attenuate metastasis, inflammation and thrombosis by inhibition of P-selectin [J]. *J Thromb Haemost*, 2011, 9(9): 1807-1815.
- [12] Umeki S, Suzuki R, Shimojima M, Ema Y, *et al.* Characterization of monoclonal antibodies against canine P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2011, 142(1/2): 119-125.
- [13] Raman P S, Alves C S, Wirtz D, *et al.* Single-molecule binding of CD44 to fibrin versus P-selectin predicts their distinct shear-dependent interactions in cancer [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 11): 1903-1910.
- [14] Borsig L, Wong R, Feramisco J, *et al.* Heparin and cancer revisited: Mechanistic connections involving platelets, P-selectin, carcinoma mucins, and tumor metastasis [J]. *PNAS*, 2001, 98(6): 3352-3357.
- [15] Borsig L, Vlodavsky I, Ishai-Michaeli R, *et al.* Sulfated hexasaccharides attenuate metastasis by inhibition of P-selectin and heparanase [J]. *Neoplasia*, 2011, 13(5): 445-452.
- [16] Hoos A, Protsyuk D, Borsig L. Metastatic growth progression caused by PSGL-1-mediated recruitment of monocytes to metastatic sites [J]. *Cancer Res*, 2014, 74(3): 695-704.
- [17] Attilio P, Merritt C, Sims J, *et al.* The effect of ellagic acid on platelet activation as measured by the quantification of P-selectin using flow cytometry [J]. *AANA J*, 2010, 78(6): 453-459.
- [18] Li Y, Luo J Y, Cui H F, *et al.* Study on anti-metastasis of heparin derivatives as ligand antagonist of p-selectin [J]. *Biomed Pharmacother*, 2010, 64(10): 654-658.
- [19] Lu S X, Holland A M, Na I K, *et al.* Absence of P-selectin in recipients of allogeneic bone marrow transplantation ameliorates experimental graft-versus-host disease [J]. *J Immunol*, 2010, 185(3): 1912-1919.
- [20] Melavanki R M, Kusanur R A, Kadadevaramath J S, *et al.* Effect of solvent polarity on the fluorescence quenching of biologically active 5BAMC by aniline in binary solvent mixtures [J]. *J Fluoresc*, 2010, 20(6): 1175-1180.
- [21] Thomas G M, Panicot-Dubois L, Lacroix R, *et al.* Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation *in vivo* [J]. *J Exp Med*, 2009, 206(9): 1913-1927.
- [22] Simonis D, Schlesinger M, Seelandt C, *et al.* Analysis of SM4 sulfatide as a P-selectin ligand using model membranes [J]. *Biophys Chem*, 2010, 150(1/3): 98-104.