

• 药理与临床 •

β 1 整合素在淋巴瘤中的表达及姜黄素对其的影响

吴秋玲, 陈 燕, 张 纯, 何 静

(华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 研究 β 1 整合素在淋巴瘤中的表达及姜黄素对其的影响。方法 免疫组化法检测 B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤和反应性增生淋巴结中 β 1 整合素表达的差异; 流式细胞术检测 Raji 细胞、Daudi 细胞和正常人外周血淋巴细胞 β 1 整合素表达的差异; 流式细胞术和 RT-PCR 方法检测姜黄素对 Raji 细胞 β 1 整合素 mRNA 和蛋白水平的影响。结果 β 1 整合素在 Raji 细胞中高表达, Daudi 细胞及正常 B 淋巴细胞中 β 1 整合素表达水平很低; T 细胞淋巴瘤淋巴结和反应性增生淋巴结 β 1 整合素表达显著低于 B 细胞淋巴瘤淋巴结; 低浓度姜黄素即能显著抑制 β 1 整合素的表达。结论 β 1 整合素在 Raji 细胞中高表达, 在正常人淋巴结和外周血淋巴细胞中低表达, 且 β 1 整合素在不同类型淋巴瘤中的作用不同, 姜黄素能显著抑制 β 1 整合素的表达, 有望成为抑制淋巴瘤侵袭、转移的新药。

关键词: β 1 整合素; 姜黄素; 淋巴瘤**中图分类号:** R285.5**文献标识码:** A**文章编号:** 0253-2670(2006)11-1678-04

β 1 Integrin expression in lymphoma and modulatory effect of curcumin on it

WU Qiu-ling, CHEN Yan, ZHANG Chun, HE Jing

(Institute of Hematology, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To investigate the expression of β 1 integrin in lymphoma and modulatory effect of curcumin on it. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the difference of β 1 integrin expression in B-lymphoma, T-lymphoma, and reactive hyperplasia lymph nodes. Flow cytometry was used to detect the difference of β 1 integrin expression in Raji cells, Daudi cells, and lymph cells in normal human peripheral blood. Flow cytometry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) methods were used to determine the effect of curcumin on β 1 integrin mRNA and protein level of Raji cells. **Results** β 1 Integrin was highly expressed in Raji cells but lowly expressed in Daudi cells and normal B lymphocyte. β 1 Integrin expression in lymph node of T lymphoma and reactive hyperplasia lymph node were significantly lower than that in lymph node of B lymphoma. Curcumin at low concentration can markedly inhibit the expression of β 1 integrin. **Conclusion** β 1 Integrin can be highly expressed in Raji cells but lowly expressed in normal human lymph nodes and lymphocyte of peripheral blood. The expression level of β 1 integrin in various types of lymphoma is different. Curcumin can markedly inhibit the expression of β 1 integrin and may be a new drug which can inhibit the invasion and metastasis of lymphoma.

Key words: β 1 integrin; curcumin; lymphoma

整合素是由 α 和 β 亚单位通过二硫键形成的异质性二聚体跨膜糖蛋白, 与细胞外基质成分及细胞骨架结合而形成配体-整合素-细胞骨架跨膜信息系统, 介导肿瘤细胞的黏附和转移, 阻抑细胞的凋亡, 具有重要的生理和病理意义。但目前对整合素在淋巴瘤中的作用及调控因素还不甚了解, 本实验对此进行研究。

1 材料与方法

1.1 细胞: 人 B 细胞淋巴瘤细胞系 Raji 细胞株、Daudi 细胞株 (由同济医科大学免疫教研室提供)。
1.2 药物及主要试剂: 姜黄素 (质量分数 99%), 购自 Sigma 公司, 溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中, 配成 8 mmol/L 溶液, 等量分装, 置于 -20°C 保存, 临用前解冻。PE anti-human β 1 整合素购自

收稿日期: 2006-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472267)

作者简介: 吴秋玲 (1975—), 女, 湖北武汉人, 华中科技大学同济医学院附属协和医院血液科主治医师, 博士, 主要从事恶性血液病研究。

Tel: (027) 85726387 E-mail: imaxy@x263.net

Biolegend 公司;鼠抗 $\beta 1$ 整合素购自 BD 公司; FITC anti-human CD19 单克隆抗体购自 BD 公司。

1.3 细胞培养及处理:Raji 细胞、Daudi 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,37℃、5% CO_2 及饱和湿度培养,每 3 天更换新培养基,取对数生长期细胞,细胞悬液终浓度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$,分别与不同浓度姜黄素作用 24 h,流式细胞术和 RT-PCR 方法检测 $\beta 1$ 整合素的蛋白和 mRNA 水平的变化。

1.4 免疫组化:收集本院 2002—2004 年资料完整的住院和门诊患者淋巴结标本 30 份,其中 T 细胞淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤和反应性增生淋巴结各 10 例,淋巴结以 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μm 厚连续切片备用。免疫组化采用 S-P 法, $\beta 1$ 整合素单克隆抗体 1:50 稀释,DAB 染色,苏木素复染。

1.5 RT-PCR 方法检测 $\beta 1$ 整合素 mRNA 的表达:引物由 Premier 5.0 软件自行设计,经上海生工工程技术有限公司鉴定后合成,引物序列为上游:5' ACCAGCTAAGCTCAGGAACC3', 下游:5' GCCAGGTGACATTGTCCATC3', 扩增产物为 315 bp。 β -actin 引物序列为上游:5' TGAGACCTTCAACACCCCAG3', 下游:5' GCCCATCTCTTGCTCGAAGTC3', 扩增产物为 815 bp。

1.5.1 细胞总 RNA 提取:按 TRIzol 试剂盒说明书操作步骤进行。取 2×10^6 活细胞加 TRIzol 1 mL,混匀,室温作用 5 min,加氯仿 0.2 mL 振荡,室温作用 5 min,取上层水相层,加等体积的异丙醇混匀,室温 10 min,4℃、12 000 $\times g$ 离心 10 min,沉淀物用 75% 乙醇溶液洗涤 1 次,空气干燥,加 20 μL DEPC 处理双蒸水溶解,所得 RNA 用紫外分光光度仪测定纯度 ($A_{260}/A_{280} > 1.8$),同时进行 RNA 定量。

1.5.2 cDNA 链合成:20 μL 反应体系中含 oligo (T)₁₈ 0.5 μg , 10 mmol/L dTNP 1 μL , RNA 1 μg , DEPC 水补足容积,65℃、5 min,加 5 $\times$ buffer 4 μL , RNase 抑制剂 50 U,37℃、2 min,加逆转录酶 200 U,37℃、50 min,70℃、15 min,终止反应。

1.5.3 PCR 扩增:总体系 25 μL 中含正义、反义链引物各 10 pmol, 10 mmol/L dNTP 0.5 μL , 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl_2 1.5 μL , Taq DNA 聚合酶 1 U 逆转录产物 1 μL , PCR 循环 94℃、60 s, 55℃、50 s, 72℃、100 s, 共 30 个循环。

1.5.4 扩增产物分析:取 10 μL 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (电压为 5 V/cm) 30 min 后,置凝胶成像仪 IS1000 中,进行 $\beta 1$ 整合素和 β -actin 条带

吸光度定量分析。

1.6 流式细胞术检测 $\beta 1$ 整合素蛋白的表达:调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{mL}$,吸取 100 μL 细胞悬液至流式管,PBS 洗 2 次,去上清液,分别加入单抗各 10 μL ,放入 4℃ 冰箱孵育 30 min,PBS 洗 2 次,500 μL PBS 重悬,上流式细胞仪 (美国 Becton Dickinson 公司) 检测。

1.7 统计学处理:所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验。

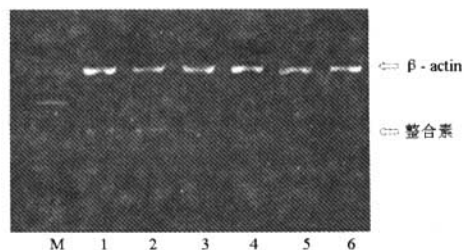
2 结果

2.1 免疫组化法检测 B 细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤和反应性增生淋巴结中 $\beta 1$ 整合素表达的差异:结果以不同淋巴结 $\beta 1$ 整合素阳性表达率表示。胞浆染成棕黄色为阳性表达,B 细胞淋巴瘤阳性表达率为 $[(90 \pm 4.68)\%, n=10]$,T 细胞淋巴瘤阳性表达率为 $[(15 \pm 1.23)\%, n=10]$,反应性增生淋巴结阳性表达率为 $[(20 \pm 1.56)\%, n=10]$,B 细胞淋巴瘤阳性表达率显著高于 T 细胞淋巴瘤和反应性增生淋巴结 ($P < 0.01$),T 细胞淋巴瘤和反应性增生淋巴结阳性表达率无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.2 流式细胞术检测 Raji 细胞、Daudi 细胞和正常人外周血淋巴细胞 $\beta 1$ 整合素表达的差异:PE-抗 $\beta 1$ 整合素抗体单标法测定 Raji 细胞和 Daudi 细胞 $\beta 1$ 整合素表达,结果显示 Raji 细胞 $\beta 1$ 整合素平均荧光强度为 87.38 ± 3.15 ($n=3$),显著高于阴性对照 2.83 ± 0.02 ($n=3, P < 0.01$) 和 Daudi 细胞 17.86 ± 1.24 ($n=3, P < 0.01$)。采用 PE-抗 $\beta 1$ 整合素抗体和 FITC-抗 CD19 抗体双标法测定 Raji 细胞和正常人外周血 CD19⁺ B 淋巴细胞 $\beta 1$ 整合素表达,Raji 细胞 $\beta 1$ 整合素平均荧光强度 ($219.20 \pm 23.38, n=3$) 显著高于正常人外周血 CD19⁺ B 淋巴细胞 $\beta 1$ 整合素平均荧光强度 ($126.28 \pm 14.52, n=3, P < 0.01$)。

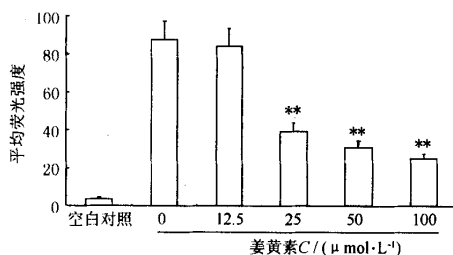
2.3 RT-PCR 方法检测姜黄素对 Raji 细胞 $\beta 1$ 整合素 mRNA 的影响:图 1 显示 6.25 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素作用组 $\beta 1$ 整合素 mRNA 略低于空白对照组,无显著性意义 ($P > 0.05$),12.5、25、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素处理组 $\beta 1$ 整合素/ β -actin 比值分别为 0.43 ± 0.03 、 0.38 ± 0.02 、 0.25 ± 0.01 、 0.19 ± 0.01 ,显著低于空白对照组 ($0.73 \pm 0.03, P < 0.01$),并且随着姜黄素浓度的升高, $\beta 1$ 整合素 mRNA 的表达逐渐降低。

2.4 流式细胞术检测姜黄素对 Raji 细胞 $\beta 1$ 整合素蛋白水平的影响:图 2 显示 0、12.5、25、50、100



M-Marker 1-对照组
2~6-姜黄素 (6.25, 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) 组
M-Marker 1-control group
2~6-curcumin (6.25, 12.5, 25, 50, and 100 $\mu\text{mol/L}$) groups
图 1 RT-PCR 法检测姜黄素对 Raji 细胞 $\beta 1$ 整合素 mRNA 表达的影响 ($n=3$)

Fig. 1 Effect of curcumin on $\beta 1$ integrin mRNA expression in Raji cells detected by RT-PCR ($n=3$)



与 0 $\mu\text{mol/L}$ 姜黄素组比较: ** $P<0.01$

** $P<0.01$ vs 0 $\mu\text{mol/L}$ curcumin group

图 2 流式细胞仪检测不同浓度姜黄素对 Raji 细胞 $\beta 1$ 整合素蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effect of curcumin at different concentrations on $\beta 1$ integrin protein expression in Raji cells analyzed by flow cytometer ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

$\mu\text{mol/L}$ 姜黄素加入 Raji 细胞中 $\beta 1$ 整合素表达的平均荧光强度分别为 87.38 ± 3.15 、 84.29 ± 2.98 、 39.60 ± 1.46 、 31.34 ± 1.38 、 25.25 ± 1.22 ，随着姜黄素浓度的升高， $\beta 1$ 整合素蛋白的表达显著降低。

3 讨论

整合素是 B 细胞上的主要黏附分子，在淋巴造血微环境中参与 B 细胞与基质细胞的相互作用，在正常和恶性 B 淋巴细胞生存过程中起关键作用。此外，整合素是淋巴细胞归巢的中心环节，对于淋巴瘤的扩散有极其重要的作用^[1]。Terol 等^[2]临床研究发现， $\alpha 4$ 、 $\alpha 5$ 和 $\beta 1$ 整合素中度或强表达与淋巴瘤患者的结外浸润相关，而 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 4$ 和 $\beta 1$ 整合素弱表达或阴性表达的淋巴瘤患者完全缓解率和无病生存率显著高于高表达患者。进一步研究淋巴瘤中 $\beta 1$ 整合

素的作用及调控机制必然具有重要意义。

本研究结果显示， $\beta 1$ 整合素在 B 细胞淋巴瘤细胞系 Raji 细胞中高表达，与 Mikawa 等^[3]研究结果一致，而另一 B 细胞淋巴瘤细胞系 Daudi 细胞 $\beta 1$ 整合素表达水平很低，免疫组化结果也提示 T 细胞淋巴瘤患者淋巴结 $\beta 1$ 整合素表达显著低于 B 细胞淋巴瘤患者淋巴结，提示 $\beta 1$ 整合素在不同类型淋巴瘤中的作用不同。此外，反应性增生淋巴结中 $\beta 1$ 整合素的表达显著低于 B 细胞淋巴瘤，提示 $\beta 1$ 整合素可能成为淋巴瘤的一项新的鉴别诊断指标。本实验结果显示 $\beta 1$ 整合素在正常人外周血淋巴细胞中表达水平极低，显著低于 Raji 细胞 ($P<0.01$)，提示以 $\beta 1$ 整合素为靶点筛选治疗淋巴瘤的药物具有良好的靶向性，具有重要的临床意义。

姜黄素 (curcumin) 系从中药姜黄中提取的酚性色素，有抗氧化、抗癌、抗突变、抗炎等广泛药理作用，进一步研究姜黄素对肿瘤的侵袭与转移方面的作用是近年来研究的热点。研究显示姜黄素能抑制多种肿瘤的侵袭，Menon 等^[4]报道，姜黄素可抑制 B16F10 黑色素瘤在小鼠体内的肺转移，使肺肿瘤结节明显减少，生存期延长。Lin 等^[5]报道，在表现出较高的 MMP-9 分泌的高侵袭性的人肝癌细胞系 Sk-Hep-1 中，姜黄素 10 mmol/L 可抑制 17.4% 和 70.6% 的细胞转移与侵袭。但姜黄素对于淋巴瘤细胞黏附、迁移方面的作用尚未见报道。本实验结果显示，低浓度姜黄素即能显著抑制 $\beta 1$ 整合素的表达，提示姜黄素能显著抑制淋巴瘤的侵袭。

恶性淋巴瘤中 B 细胞非霍奇金氏淋巴瘤占大多数，传统的化疗使患者长期存活率不到 50%，抗黏附治疗恶性肿瘤是近年来研究的热点^[6]，但是寻找淋巴瘤抗黏附治疗的靶点以及针对此靶点的药物尚未报道。本实验结果显示 $\beta 1$ 整合素在 Raji 细胞中高表达，是一个有前途的抗黏附治疗靶点。姜黄素来源广泛，价格低廉，研究发现姜黄素能显著抑制 Raji 细胞的增殖，并且对正常细胞无不良反应^[7]，本实验结果也显示姜黄素能显著抑制整合素的表达，提示姜黄素有望成为抑制淋巴瘤侵袭、转移的新药。

References:

- [1] Paul D, Steven T P. Cell adhesion receptors in lymphoma dissemination [J]. *Blood*, 2000, 95(6): 1900-1907.
- [2] Terol M J, Lopez-Guillermo A, Bosch F, et al. Expression of beta-integrin adhesion molecules in non-Hodgkin's lymphoma: correlation with clinical and evolutive features [J]. *J Clin Oncol*, 1999, 17(6): 1869-1875.
- [3] Mikawa M, Wang H, Guo L, et al. Novel peptide ligands for integrin alpha 4 beta 1 overexpressed in cancer cells [J].

- Mol Cancer Ther*, 2004, 3(10): 1329-1334.
- [4] Menon L G, Kuttan R, Cuttan G. Anti-metastatic activity of curcumin and catechin [J]. *Cancer Lett*, 1999, 141(1): 159-165.
- [5] Lin L I, Ke Y F, Ko Y C, *et al*. Curcumin inhibits SK-Hep-1 hepatocellular carcinoma cell invasion *in vitro* and suppresses matrix metalloproteinase-9 secretion [J]. *Oncology*, 1998, 55(4): 349-353.
- [6] Duan X, Jia S F, Zhou Z, *et al*. Association of alpha-beta 3 integrin expression with the metastatic potential and migratory and chemotactic ability of human osteosarcoma cells [J]. *Clin Exp Metastas*, 2004, 21(8): 747-753.
- [7] Liu H L, Chen Y, Cui G H, *et al*. Curcumin, a potent anti-tumor reagent, is a novel histone deacetylase inhibitor regulating B-NHL cell line Raji proliferation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(5): 603-609.

痛泻要方对肠易激综合征作用机制的实验研究

李佃贵¹, 赵玉斌^{1,2*}

(1. 河北医科大学, 河北 石家庄 050011; 2. 石家庄市第三医院, 河北 石家庄 050011)

摘要:目的 探讨痛泻要方对内脏高敏感性肠易激综合征 (IBS) 模型大鼠的疗效和作用机制。方法 采用结肠慢性刺激法制作内脏高敏感性的 IBS 大鼠模型。将实验动物分为正常组, 模型组, 阳性对照 (得舒特) 组, 痛泻要方低、高剂量组。观察各组大鼠肠道内扩张引起腹部抬起和背部拱起的容量阈值和大鼠肠道内不同容量下扩张期间腹壁收缩次数, 检测 5-羟色胺 (5-HT)、P 物质 (SP)、降钙素基因相关肽 (CGRP) 水平。结果 与模型组相比, 各治疗组大鼠行为学和电生理指标均有明显改善, 各治疗组模型大鼠 5-HT、SP 水平明显下降, CGRP 水平增加, 且有一定的量效关系。结论 痛泻要方能降低内脏高敏感性 IBS 模型大鼠血清 5-HT、血浆 SP 水平, 增加 CGRP 水平, 大剂量痛泻药方疗效优于得舒特。痛泻药方的作用机制可能是通过降低模型大鼠血清 5-HT、血浆 SP 水平, 减弱背角神经元兴奋性, 从而提高内脏痛阈、消除肠道过敏而达到治疗目的。

关键词: 痛泻要方; 肠易激综合征 (IBS); 5-羟色胺 (5-HT); P 物质 (SP); 降钙素基因相关肽

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2006)11-1681-05

Mechanism of Tongxieyaofang on irritable bowel syndrome

LI Dian-gui¹, ZHAO Yu-bin^{1,2}

(1. Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China; 2. The Third Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract: **Objective** To study the effect and the mechanism of Tongxieyaofang (TXYF) on rat model of irritable bowel syndrome (IBS). **Methods** Model rats of IBS which were prepared by chronic stimulation in colon were randomly divided into groups: the normal control group (Group A), the model control group (Group B), the positive control group (Group C), the low dosage of TXYF group (Group D), the high dosage of TXYF group (Group E). Different treatments were given to every groups by ig administration for one month. The capability limens of the sacculus that caused abdomen-uplifting and back-arching and the times of contract of abdomen muscle in rats under different dilatations were observed. The levels of 5-hydroxytryptamine (5-HT), substance P (SP), and calcitonin gene related peptide (CGRP) were evaluated. **Results** Compared with the Group B, the TXYF could effectively improve the index of the behavior and electrophysiology, it also could lower the levels of 5-HT and SP, and increase the levels of CGRP of rat model of IBS with certain dose-effect relationship. **Conclusion** TXYF could lower the levels of 5-HT in serum and SP in plasma, and increase CGRP level of model rats of IBS, especially in high dosage. The mechanism of TXYF may be increasing the pain threshold of bowel, eliminating hypersusceptibility of bowel, and decreasing excitability of nerve cells by decreasing the 5-HT and SP levels in IBS rats.

Key words: Tongxieyaofang (TXYF); irritable bowel syndrome (IBS); 5-hydroxytryptamine (5-HT); substance P (SP); calcitonin gene related peptide (CGRP)

收稿日期: 2006-02-25

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项计划 (04-05JP09); 河北省自然科学基金资助课题 (C2006000988)

作者简介: 李佃贵 (1950—), 男, 河北省蔚县人, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事胃肠道疾病的临床与实验研究工作。

Tel: (0311) 85990296 E-mail: drzhyubin@sina.com

* 通讯作者 赵玉斌