

# NK-1R 拮抗剂 L-732,138 抑制胃癌细胞增殖的作用研究

徐峰, 潘淑波, 史肖华

苏州科技城医院, 江苏 苏州 215000

**摘要:** **目的** 探讨 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 对胃癌细胞增殖及凋亡的影响。 **方法** 采用 MTT 比色法测定 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 对胃癌细胞的增殖影响, Hoechst 33342 染色实验检测 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 对胃癌细胞凋亡的影响。 **结果** NK-1R 拮抗剂 L-732,138 以浓度依赖性的方式阻断胃癌细胞系 23132-87 的增殖, 半数抑制浓度 IC<sub>50</sub> 为 67.85  $\mu$ M。此外, 染色实验结果表明, 在胃癌细胞系中发现凋亡细胞, 呈现染色质浓缩和核碎裂形态。 **结论** NK-1R 参与胃癌细胞的增殖和凋亡过程, 是一种新兴的胃癌药物治疗靶点, NK-1R 拮抗剂有望成为新的抗胃癌药物。

**关键词:** 胃癌; 细胞增殖抑制; NK-1 受体; 细胞凋亡

**中图分类号:** R735.2 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)12-1525-03 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.12.034

胃肠道癌症 (gastrointestinal cancer, GIC) 是全球范围内最常见的恶性消化道肿瘤, 每年约有 738 000 人死亡<sup>[1]</sup>, 在我国恶性肿瘤发病率和死亡率中居首位<sup>[2]</sup>, 且具有明显的地域区别。对于早期胃癌, 局部切除手术是一种首选治疗策略, 5 年生存率高达 90%, 但大多数胃癌患者发现时已是晚期阶段, 总体 5 年生存率不高于 30%<sup>[3]</sup>。据了解, 约 90% 的癌症患者死亡是由于转移发展而不是原发性肿瘤<sup>[4]</sup>。物质 P (substance P, SP), 是一种多肽, 由 11 个氨基酸残基组成, 广泛分布于神经纤维内的一种神经肽, 具有多种生理功能, 通过神经激肽-1 受体 (NK-1R) 控制了许多与癌症有关的病理生理作用, 例如癌症细胞的增殖和迁移<sup>[5]</sup>。然而, NK-1R 拮抗剂能阻断 SP 的作用并抑制这些功能。SP 在人体中广泛分布, 并且在癌细胞中发现 NK-1R 过表达, 人类胃肠道癌细胞和组织表达 NK-1R。在 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍诱发的胃癌模型中, 给予高剂量的 SP 可促进胃癌的发展<sup>[6]</sup>。此外, SP 促进人胃癌细胞系 MKN-45 的增殖, 粘附, 迁移和侵袭。在胃癌中, 已经观察到含有 SP 和 NK-1 受体 (NK-1R) 的神经, 并且 SP 阳性神经的数目似乎与胃癌的进展有关<sup>[7]</sup>。已有研究证明 SP 具有抗细胞凋亡的作用, 其以浓度依赖性方式促进人结肠癌细胞的增殖, 并且 NK-1R 拮抗剂 (L-733,060 和阿瑞吡坦) 与 NK-1R 结合后阻断 SP 的作用并抑制人结肠癌细胞系的增殖 (两种拮抗剂均诱导癌细胞凋亡和死

亡)<sup>[8]</sup>。然而, 目前尚不清楚 NK-1R 拮抗剂 (例如 L-732,138) 是否有抗胃癌细胞增殖的作用。因此, 为了更多地了解 NK-1R 拮抗剂的增殖抑制作用, 本研究通过观察 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 对人类胃癌细胞系 23132-87 的抗肿瘤作用, 证明 NK-1R 参与胃癌细胞的增殖和凋亡过程, 拮抗剂 L-732138 能够抑制人胃癌细胞增殖, 并诱导细胞凋亡。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 人胃癌细胞系 23132-87 购自美国模式培养物集存库 (American Tissue Culture Collection, ATCC), NK-1R 抑制剂 L-732,138 购自 Tocris Bioscience, 物质 P (SP), Hoechst 33342 染色液, MTT 试剂盒, DMSO 以及其他实验试剂均购自上海碧云天生物技术有限公司。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 人胃癌细胞系 23132-87 置于含 10% FBS 的培养基中, 在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> (体积分数) 的饱和湿度孵育箱中培养, 加入青霉素、链霉素, 防止污染。当细胞生长处于对数期时, 用胰酶处理细胞, 制成单细胞悬液, 显微镜下观察, 计数, 用于下一步实验。

**1.2.2 MTT 实验** MTT 是一种苯基四氮唑盐, 在活细胞线粒体中琥珀酸脱氢酶的作用下, MTT 通过还原反应, 生成蓝紫色不溶于水的甲臜, 蓝紫色结晶溶于 DMSO, 在酶标仪 490 nm 波长处测吸光度值。蓝紫色结晶的量反映细胞的活性。本实验用 MTT 法来检测神经激肽受体拮抗剂对胃癌细胞细胞活力的影响。收集对数生长期的胃癌细胞, 制成单细胞悬液, 计数, 稀释后按  $5 \times 10^4$  个/ml 接种在 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ l。

**作者简介:** 徐峰 (1977-), 男, 本科, 江苏苏州人, 副主任医师, 研究方向: 消化内科。

**通信作者:** 史肖华, E-mail: heerxiangw6@126.com。

在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,细胞生长状态良好时,分别加入浓度为 6.25、12.5、25、50、100 μM 的 NK-1R 拮抗剂,设置空白孔,每个实验组有三个复孔,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度环境下培养。在培养 48 h 后,检测 NK-1R 抑制剂对胃癌细胞的增殖毒性。为了测定 NK-1R 抑制剂对 SP 促进细胞增殖作用的影响,在加入抑制剂前,用 SP 孵育细胞 4 h,同时设置空白孔,SP 单独作用孔,培养 24 h 后,MTT 实验检测细胞的增殖能力。实验均重复 3 次。

1.2.3 Hoechst 33342 荧光染色 实验分为空白组和抑制剂处理组,L-732,138 孵育细胞 24 h 后,用胰酶消化成单细胞悬液,PBS 洗涤并在 Hoechst 33342 染液(0.1 mg/ml)孵育染色 15 min 后,在荧光显微镜下察胃癌细胞的细胞核形态,观察细胞是否发生凋亡(显示核碎裂和染色质浓缩)。

1.3 数据分析 实验结果使用 SPSS 统计软件进行统计学分析。数据以均数±标准差表示,通过单因素方差分析(One Way ANOVA)进行多重比较,LSD-*t* 检验进行组间均数的比较,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 抗胃癌细胞增殖的作用 在人胃癌细胞系中不同浓度的拮抗剂 L-732,138 都有抑制细胞生长的作用(图 1),且呈浓度依赖性抑制。表 1 显示了不同浓度的拮抗剂 48 h 后对胃癌细胞的抑制率,并计算出 IC<sub>50</sub> 值为 67.85 μM。在给与低浓度的 NK-1R 拮抗剂(20~40 μM)时,发现较低的肿瘤细胞生长抑制率,当浓度增加至 100 μM 时也没有发现最大抑制作用,且观察到随浓度的增加,抑制率继续增大的趋势(*F*=106.88,*P*<0.05)。

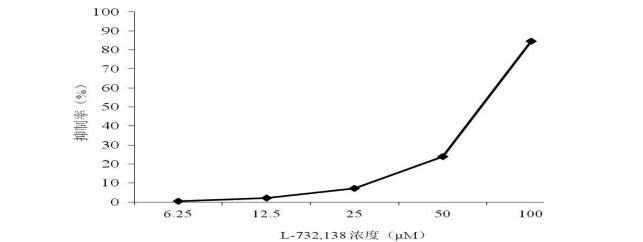


图 1 不同浓度的 L-732,138 对细胞生长抑制的作用  
表 1 不同浓度的 L-732,138 对胃癌细胞的抑制率(*n*=3)

L-732,138 浓度(μM)	抑制率(% , $\bar{x}\pm s$ )
6.25	0.42±0.08
12.5	2.09±0.62
25	7.10±1.24
50	23.89±3.98
100	84.44±12.52

2.2 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 对 SP 诱导胃癌细胞

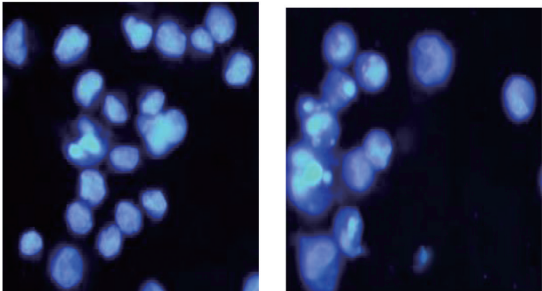
增殖作用的影响 L-732,138 可抑制 SP 诱导的促有丝分裂信号,而 SP 可促进人结肠癌细胞系和胃癌细胞系的生长<sup>[7]</sup>。为了研究 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 对 SP 诱导胃癌细胞增殖作用的影响,实验分别设置了四组:空白组,50 μM SP 单独作用组,70 μM 抑制剂 L-732,138 单独作用组(抑制剂 L-732,138 的 IC<sub>50</sub> 值为 67.85 μM,故本试验采用 70 μM 的浓度研究 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 对 SP 诱导胃癌细胞增殖作用的影响),SP+L-732,138 处理组。结果发现,在 SP 和 L-732,138 联合作用组的细胞浓度低于 SP 单独处理组的细胞浓度(*P*<0.01),表明 NK-1R 拮抗剂抑制神经肽 SP 介导的促有丝分裂作用。关于胃癌细胞的生长,实验数据显示了神经肽 SP 对 NK-1R 活化的特异性,联合作用组与单独施用 L-732,138 相比,联用组的细胞浓度明显增加(*P*<0.01)(表 3),结果提示 L-732,138 可通过 NK-1R 阻断人类胃癌细胞系的增殖。

表 3 70 μM NK-1R 拮抗剂 L-732,138 作用 24 h 对 SP 诱导胃癌细胞增殖作用的影响(*n*=3)

组别	细胞相对浓度比值(% , $\bar{x}\pm s$ )
空白组	100.00±0.00
SP 单独作用组	135.58±21.46
L-732,138 单独作用组	48.79±7.13
SP + L-732,138 组	83.52±9.78
<i>F</i> 值	25.71
<i>P</i> 值	<0.001

注:以空白组细胞浓度为 1 进行对比,各组均除以空白组细胞浓度(个数)。

2.3 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 对胃癌细胞凋亡的影响 Hoechst 33342 荧光染色实验表明,当给予胃癌细胞 70 μM L-732,138 处理 24 h 时,观察到许多凋亡细胞(图 2),在荧光显微镜下显示核碎裂和染色质浓缩。



A 未经处理的胃癌细胞 B L-732,138 处理过的胃癌细胞  
图 2 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 对胃癌细胞影响

3 讨论

本研究表明了色氨酸衍生物 NK-1R 拮抗剂 L-732,138 针对人胃癌细胞系(23132-87)的抗肿瘤作

用(凋亡引起肿瘤细胞死亡)。L-732,138 的抗肿瘤作用呈浓度依赖性,通过 NK-1R 发生作用。NK-1R 在胃癌和结肠癌细胞系中均有表达,SP 在这些肿瘤细胞中发挥了促有丝分裂作用,并且表现出对 NK-1R 的高亲和力<sup>[8-9]</sup>。本研究结果与以前报道的 L-732,138 对人类癌细胞系的抗肿瘤作用一致<sup>[10]</sup>,在这些研究中,L-732,138 诱导细胞凋亡,抵消 SP 引起的有丝分裂,以浓度依赖性方式引发肿瘤细胞生长抑制并且通过 NK-1R 发挥抗肿瘤作用<sup>[12]</sup>。提示 L-732,138 是用于治疗癌症的有希望的抗肿瘤药物。

SP 是表达 NK-1R 的肿瘤细胞类型中普遍存在的有丝分裂原,这种速激肽受体在肿瘤细胞中过表达<sup>[11]</sup>。NK-1R 的过度表达意味着可以使用 NK-1R 拮抗剂作为针对肿瘤细胞的特异性抗肿瘤策略,治疗引起的副作用可以显著降低。在患有晚期肿瘤的患者中发现更高水平的 NK-1R<sup>[12]</sup>,已经有报道证明 NK-1R 参与癌细胞的表达<sup>[13]</sup>。因此,过表达 NK-1R 的癌细胞抵消了导致细胞死亡的信号传导途径<sup>[14]</sup>。SP 增加 Akt(一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶)的磷酸化,Akt 的活化抑制了凋亡机制<sup>[15]</sup>。NK-1R 拮抗剂引起细胞凋亡,因为阻断了由 SP 引起的 Akt 磷酸化增加。在癌细胞中,NK-1R 拮抗剂增加聚合酶的水解和 caspase-3 的活化,引起细胞凋亡,并抑制 DNA 的合成<sup>[16]</sup>。

胃癌细胞中表达神经激肽-1 受体(NK-1R)和神经肽 P 物质(SP),P 物质与神经激肽-1 受体结合后引起肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤生长,促进血管生成和肿瘤的转移(迁移和侵袭),并具有抗细胞凋亡的作用。SP 通过 NK-1R 促进胃癌细胞的迁移和侵袭<sup>[11]</sup>,NK-1R 拮抗剂阻断上述机制。SP/NK-1R 系统能够调节新血管生成<sup>[17]</sup>,并且 SP 参与内皮细胞的增殖和毛细血管的生长。通过存在于血管中的高密度 NK-1Rs,增加肿瘤血流量和促进基质发育,SP 可强烈影响肿瘤内和肿瘤周围的血管结构和功能。然而,新血管生成可被 NK-1R 拮抗剂抑制,阻断 SP 的生物效应<sup>[18]</sup>。因此使用 NK-1R 拮抗剂作为新的候选抗肿瘤药物很可能是一种有前景的应用。已经证明 L-732,138 激活凋亡机制并通过细胞凋亡诱导胃癌细胞死亡。因此,诱导细胞凋亡或许是治疗癌症的策略,并为临床研究提供了新的可能性。本文研究结果证实了 NK-1R 拮抗剂引起癌细胞的凋亡。在癌症细胞中,SP/NK-1R 系统无处不在,是一种通用的生存方式,因此,NK-1R 是治疗胃癌的新兴药物靶点,NK-1R 拮抗剂是未来临床试验中检测抗肿瘤活性的良好候选

药物。

## 参考文献

- [1] Siegel R, Desantis C, Jemal A. Colorectal cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(2):104-117.
- [2] 袁平,郑奎城. 胃癌流行病学研究进展[J]. 慢性病杂志,2018, 19(12):1671-1675.
- [3] 秦叔逵,龚新雷. 晚期胃癌化疗的现状和新进展[J]. 临床肿瘤学杂志, 2006, 11(9):641-652.
- [4] Tang HB, Li YS, Arihiro K, et al. Activation of the neurokinin-1 receptor by substance P triggers the release of substance P from cultured adult rat dorsal root ganglion neurons[J]. Mol Pain, 2007, 3(1):42.
- [5] Huang WQ, Wang JG, Lei C, et al. SR140333 counteracts NK-1 mediated cell proliferation in human breast cancer cell line T47D[J]. J Exp Clin Oncol, 2010, 29(1):55.
- [6] Rosso M, Roblesfrías MJ, Coveñas R, et al. The NK-1 receptor is expressed in human primary gastric and colon adenocarcinomas and is involved in the antitumor action of L-733,060 and the mitogenic action of substance P on human gastrointestinal cancer cell lines[J]. Tumor Biol, 2008, 29(4):245-254.
- [7] 张洪伟,王为忠,宋俊峰,等. P 物质对胃癌细胞增殖的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(6):694-696.
- [8] Garcíarecio S, Gascón P. Biological and pharmacological aspects of the NK1-receptor[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015(1):495704.
- [9] Muñoz M, Gonzálezortega A, Rosso M, et al. The substance P/neurokinin-1 receptor system in lung cancer: focus on the antitumor action of neurokinin-1 receptor antagonists[J]. Peptides, 2012, 38(2):318-325.
- [10] González-Ortega A, Sánchez-Vaderrábanos E, Ramiro-Fuentes S, et al. Uveal melanoma expresses NK-1 receptors and cyclosporin A induces apoptosis in human melanoma cell lines overexpressing the NK-1 receptor[J]. Peptides, 2014, 55(5):1-12.
- [11] Muñoz M, Rosso M, González-Ortega A, et al. The NK-1 receptor antagonist L-732,138 induces apoptosis and counteract substance P-related mitogenesis in human melanoma cell lines[J]. Cancers, 2010,2(2):611-623.
- [12] Muñoz M, Rosso M, Coveñas R. A new frontier in the treatment of cancer: NK-1 receptor antagonists[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(6):504-516.
- [13] 卢燕. 神经激肽受体的两种拮抗剂对结肠癌细胞增殖的作用及其机制研究[D]. 杭州:浙江理工大学, 2015.
- [14] Miguel M, Rafael C. Neurokinin-1 receptor antagonists as antitumor drugs in gastrointestinal cancer: a new approach[J]. Saudi J Gastroenterol, 2016, 22(4):26-268.
- [15] Li J, Zeng Q, Zhang Y, et al. Neurokinin-1 receptor mediated breast cancer cell migration by increased expression of MMP-2 and MMP-14[J]. Eur J Cell Biol, 2016, 95(10):368-377.
- [16] Rojas C, Raje M, Tsukamoto T, et al. Molecular mechanisms of 5-HT<sub>3</sub> and NK<sub>1</sub> receptor antagonists in prevention of emesis[J]. Eur J Pharmacol, 2014, 722(1):26-37.
- [17] Ptak K, Burnet H, Blanchi B, et al. The murine neurokinin NK1 receptor gene contributes to the adult hypoxic facilitation of ventilation[J]. Eur J Neurosci, 2015, 16(12):2245-2252.
- [18] Huang SC, Korlipara VL. Neurokinin-1 receptor antagonists: a comprehensive patent survey[J]. Expert Opin Ther Pat, 2010, 20(8):1019-1045.

收稿日期:2019-08-08