

献指出无神经功能损害时监测 DjaS - 100 β 临床意义不大。

需要指出的是研究中仅纳入无脑功能损害危险因素患者,对高危患者应区别对待。综上所述,非体外循环下三支病变搭桥患者血管吻合时(尤其下壁和后壁)血流动力学波动明显,伴随脑氧合下降和 S - 100 β 释放增加,但短暂低灌注压不会造成神经功能损害。临床工作中需要加以重视。

参考文献

- 1 Chowdhury UK, Airan R, Malhotra P, *et al.* Relationship of internal jugular venous oxygen saturation and perfusion flow rate in children and adults during normothermic and hypothermic cardiopulmonary bypass[J]. *Hellenic J Cardiol*, 2010, 51(4): 310 - 322
- 2 Tamura A, Imamaki M, Shimura H, *et al.* Release of serum S - 100 β protein and neuron - specific enolase after off - pump coronary artery bypass grafting with and without intracranial and cervical artery stenosis[J]. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, 2011, 17(1): 33 - 38
- 3 Rohan D, Buggy DJ, Crowley S, *et al.* Increased incidence of postoperative cognitive dysfunction 24 hr after minor surgery in the elderly[J]. *Can J Anaesth*, 2005, 52(2): 137 - 142
- 4 Li YC, Xi CH, An YF, *et al.* Perioperative inflammatory response and protein S - 100 β concentrations - relationship with post - operative cognitive dysfunction in elderly patients[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2012, 56(5): 595 - 600
- 5 Couture P, Denault A, Limoges P, *et al.* Mechanisms of hemodynam-

- ic changes during off - pump coronary artery bypass surgery[J]. *Can J Anaesth*, 2008, 49(8): 835 - 849
- 6 Jeong H, Jeong S, Lim HJ, *et al.* Cerebral oxygen saturation measured by near - infrared spectroscopy and jugular venous bulb oxygen saturation during arthroscopic shoulder surgery in beach chair position under sevoflurane - nitrous oxide or propofol - remifentanyl anesthesia[J]. *Anesthesiology*, 2012, 116(5): 1047 - 1056
- 7 Kim JY, Kwak YL, Oh YJ, *et al.* Changes in jugular bulb oxygen saturation during off - pump coronary artery bypass graft surgery[J]. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2005, 49(7): 956 - 961
- 8 de Tournay - Jetté E, Dupuis G, Bherer L, *et al.* The relationship between cerebral oxygen saturation changes and postoperative cognitive dysfunction in elderly patients after coronary artery bypass graft surgery[J]. *J Cardiothorac Vasc Anesth*, 2011, 25(1): 95 - 104
- 9 Macmillan CS, Andrews PJ. Cerebrovenous oxygen saturation monitoring: practical considerations and clinical relevance[J]. *Intensive Care Med*, 2000, 26(8): 1028 - 1036
- 10 蒋宗明, 吴秀娟, 仲俊峰, 等. 每搏输量和脉搏压变异用于感染性休克患者容量治疗反应的评价[J]. *医学研究杂志*, 2012, 41(12): 153 - 155
- 11 Dong L, Crosby ND, Winkelstein BA. Gabapentin alleviates facet - mediated pain in the rat through reduced neuronal hyperexcitability and astrocytic activation in the spinal cord[J]. *J Pain*, 2013, 14(12): 1564 - 1572

(收稿日期: 2014 - 01 - 11)

(修回日期: 2014 - 01 - 28)

马兜铃酸 I 致人上尿路上皮细胞 MMP9、VEGF、E - cadherin、ERK 的活性变化

莫利才 翁志梁 金海勇 王 峰 李澄棣 陈必成

摘 要 目的 探讨马兜铃酸 I (aristolochic acid I, AA I) 诱导的可能癌变机制。分析 AA I 能否诱导人尿路上皮细胞(SV - HUC - 1) MMP9、VEGF、E - cadherin 的表达。**方法** SV - HUC - 1 细胞暴露于低浓度的 AA I (2.5、5.0、10 μ g/ml) 48h, 用蛋白免疫印迹 (Western blot) 法和荧光定量 PCR 分析 MMP9、VEGF、E - cadherin 的表达。此外用 Western blot 法比较马兜铃酸相关上尿路肿瘤 (upper urothelial carcinomas associated with aristolochic acid nephropathy, AA - UUC) 和非马兜铃酸相关上尿路肿瘤 (non - AA - UUC) MMP9、VEGF、E - cadherin、PERK1/2 蛋白表达变化。**结果** 随着 AA I 浓度的增加, MMP9、VEGF 逐渐表达增加, 而 E - cadherin 表达下降。然而, 当 SV - HUC - 1 细胞预先用 ERK1/2 信号通路抑制剂 (U0126) 作用 1h, MMP9、VEGF 蛋白的表达被抑制, 而 E - cadherin 蛋白的表达恢复。和 non - AA - UUC 相比, AA - UUC 的 MMP9、VEGF、PERK1/2 呈高表达, 而 E - cadherin 呈低表达。**结论** 低密度的 AA I 可能通过激活 SV - HUC - 1 细胞的 ERK1/2 信号通路使 MMP9、VEGF、E - cadherin 表达失调。马兜铃酸 (AA) 可能是上尿路肿瘤发生的原因之一。

作者单位: 325000 温州医科大学附属第一医院泌尿外科 (莫利才、翁志梁、金海勇、王峰、李澄棣), 外科实验室 (陈必成)

通讯作者: 翁志梁, 教授, 硕士生导师, 电子信箱: wengzli2001@163.com

关键词 马兜铃酸 I 基质金属蛋白酶 9 血管内皮生长因子 E-钙黏蛋白 人尿路上皮细胞

[中图分类号] R69

[文献标识码] A

Aristolochic Acid I Induced Abnormalities in Expressions of MMP9, VEGF, E-cadherin and ERK 1/2 Activation in Human Urothelium SV-HUC-1 Cells and in Upper Urothelial Carcinomas. Mo Licai, Weng Zhiliang, Jin Haiyong, et al. Department of Urology, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 325000, China

Abstract Objective To investigate the mechanism of Aristolochic acid I (AA I) - induced carcinogenesis and whether AA I induced the expressions of MMP9, VEGF, E-cadherin in human uroepithelial cells (SV-HUC-1). **Methods** After SV-HUC-1 cells were treated with low concentration of AA I (2.5, 5.0, 10.0 μg/ml) for 48h, Western blotting and qRT-PCR were used to detect the expression of MMP9, VEGF and E-cadherin. What's more, we also used Western blotting to compare the expression of MMP9, VEGF, E-cadherin, PERK1/2 between upper urothelial carcinomas associated with Aristolochic acid Nephropathy (AA-UUC) and common upper urothelial carcinomas (non-AA-UUC). **Results** When the concentration of AA I increased, the expression of MMP9, VEGF increased but the E-cadherin decreased. However, when cells were pretreated with ERK1/2 signaling pathway inhibitors U0126 for 1h prior to exposure to AA I, the effect of AA I on expression of MMP9, VEGF levels was suppressed but assisted the expression levels of E-cadherin. Moreover, compared to non-AA-UUC, the expression of MMP9, VEGF, PERK1/2 on AA-UUC showed high but the expression of E-cadherin was low. **Conclusion** These findings suggest that low concentration of AA I might induce MMP9, VEGF, E-cadherin dysregulation through ERK1/2 activation in SV-HUC-1 cells. AA might be associated with upper urinary tract urothelial carcinomas (UUC).

Key words AA I; MMP9; VEGF; E-cadherin; SV-HUC-1

马兜铃酸 (aristolochic acids, AAs) 广泛存在于马兜铃属中草药, 比如广防己和关木通。有两个重要的组成成分是马兜铃酸 I (AA I) 和马兜铃酸 II (AA II), 而 AA I 被认为引起马兜铃酸肾病 (aristolochic acid nephropathy, AAN) 的主要原因^[1,2]。此外 AAs 是人类强有力的致癌物, 和上尿路 (肾盂和输尿管) 上皮肿瘤的发生密切相关^[3]。最近越来越多的报道表明, AAs 也是引起巴尔干地区肾病 (balkan endemic nephropathy, BEN) 的重要原因, 这些地区的小麦被含有 AAs 的种子混入后制作成面粉及面包, 被以此为主食的巴尔干地区人民长期食用后, 导致 AAN 或 BEN 的发生率及进展为上尿路上皮肿瘤的可能性大大增加^[4]。在全球范围内, 所有泌尿道肿瘤中上尿路肿瘤仅占 5%, 而 BEN 病例中, 上尿路肿瘤占 50%, 而在中国台湾, 那些长期服用过含有 AAs 成分的中药病例中, 上尿路肿瘤占 33%^[5,6]。在中国特别是台湾、江浙地区, 上尿路肿瘤的发生率很高, 而服用含有 AAs 污染的中药可能促进该肿瘤的发生^[7]。然而 AAs 导致的上尿路肿瘤的发生的机制依然没有阐明。

E-钙黏蛋白 (E-cadherin) 是经典的钙依赖性跨膜糖蛋白的一员, 在细胞的黏附过程中起重要作用。最近有研究表明 E-cadherin 的缺失将导致上皮细胞的恶性转化, 以及促进肿瘤的侵袭和转移^[8,9]。血管内皮生长因子 (VEGF) 是高度特异性有丝分裂原, 被认为是各种恶性肿瘤血管生长的关键调节

器^[10]。研究人员发现 VEGF 通过 VEGFR-1 召集巨噬细胞来促进肿瘤生长^[11]。基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 是胞外蛋白酶的家族成员之一, 被认为是肿瘤侵袭、恶性转化、血管生成、凋亡的关键因素^[12,13]。

因此, 本次研究中, 笔者将探究 AA I 能否引起人尿路上皮细胞 (SV-HUC-1) E-cadherin、VEGF、MMP9 活性改变, 以及评估胞外信号调节激酶 1/2 (ERK1/2) 信号通路对 AA I 诱导的这些基因变化有无激活作用。此外笔者也选取了 3 例长期服用过含有马兜铃酸的中草药而导致上尿路肿瘤 (upper urothelial carcinomas associated with aristolochic acid nephropathy, AA-UUC) 的患者及未服用过该药的普通上尿路上皮肿瘤 (non-AA-UUC) 对照组来研究这些基因的变化。

材料与方法

1. 细胞: SV-HUC-1 细胞购自中国科学院上海细胞库 (编号 TCHu169), 最终来源于美国典型菌种保藏中心 (ATCC, 编号 CRL-9520)。细胞培养在含有 10% 小牛血清、100g/L 链霉素、100g/L 青霉素的 Ham's F-12K 培养液里, 在 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 隔天换液, 待细胞生长至对数期, 以 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 每隔 4~5 天按照 1:2 传代 1 次。

2. 主要试剂: AA I 和 MTT 为 Sigma 公司产品, Ham's F-12K 培养基、胰酶和小牛血清购自 Gibco 公司, Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司, 反转录试剂盒购自 Fermentas 公司, SYBR real-time PCR Master Mix 试剂盒为 TOYOBO 公司产品, ERK1/2 抑制剂 U0126 购自 Selleck 公司, 裂解液及 PMSF 为上海碧云

天产品,磷酸酶抑制剂为 Selleck 公司产品。荧光 PCR 所用引物由上海基康公司合成。E-cadherin、MMP9、PERK1/2 和 ERK1/2 兔抗人一抗购自美国 CST 公司,VEGF 兔抗人一抗购自美国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 二抗购自 Bioworld 公司。

3. 细胞活力检测:待细胞处于对数生长期时,用胰酶消化后,将细胞接种于 96 孔培养板,各孔 100 μ l,且设立空白对照组(无细胞仅加入等量 PBS),至细胞贴壁生长至亚汇合状态(达底面积 80%~90%)弃培养基,各加入 100 μ l 系列浓度的 AA I 溶液继续培养 24、48、72h。加入 100 μ l MTT(5mg/ml)溶液,继续培养 4h 后弃上清液,每孔加入 150 μ l DMSO(二甲基亚砷,用于溶解蓝紫色结晶甲臌),在摇床上震荡 15min,用酶标仪在波长为 570nm 处测定吸光度值(absorbance, A_{570nm})。在一定细胞数范围内,MTT 结晶形成的量与活的细胞数成正比。根据测定的吸光度值(absorbance, A_{570nm} , 参考波长 655nm),来表示活细胞数。

4. 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR):取 2.5、5.0、10.0 μ g/ml 的 AA I 处理细胞 48h,并设正常对照组,用 Trizol 一步法提取细胞总 RNA 2 μ g,按照反转录试剂盒相关说明,在 20 μ l 的体系中进行反转录反应。取 1 μ l 的反转录产物为模板,进行 PCR 扩增,PCR 扩增体系:5 μ l 2 $\times$ STBRGreen 荧光定量试剂、1 μ l cDNA、1 μ l plus、1 μ l 水、2 μ l 引物(上下游引物各 1 μ l,终浓度 100nmol/L)。反应条件:95 $^{\circ}$ C 3min,95 $^{\circ}$ C 15s,62 $^{\circ}$ C 1min,循环 40 次。得到的 Ct 值用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 的方法来表示 mRNA。目的基因的引物由上海基康公司设计合成。引物序列如下:MMP9:上游引物:5'-TCGAACCTTGACAGCGACAAGA-3',下游引物:5'-CAGGGCGAGGACCATAGAGG-3';E-cadherin:上游引物:5'-AGCCTCAGGTCATAAACATCATTG-3',下游引物:5'-GATAGATTCTTGCGTTGGGTCG-3';VEGF:上游引物:5'-GCCTTGCCTTGCTGCTCTAC-3';下游引物:5'-CCACTTCGTGATGATTCTGCCC-3';GAPDH:上游引物:5'-TCCCATCACCATCTTCCAGG-3',下游引物:5'-GATGAC-CCTTTTGGCTCCC-3'。

5. 蛋白免疫印迹法(Western blot):收集各染毒的 SV-HUC-1 细胞分 5 组:①对照组;②AA I (2.5 μ g/ml)作用组;③AA I (5 μ g/ml)作用组;④AA I (10 μ g/ml)作用组;⑤AA I (10 μ g/ml) + U0126(10 μ mol/L)预处理 1h 组。经含有 10% 磷酸酶抑制剂、1% PMSF 的裂解液裂解后行 SDS-PAGE 电泳,再转移到 PVDF 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(0.3% Tris,0.8% NaCl,0.02% KCl,0.1% Tween-20,pH 7.4)常温封闭 1.5h,分别加入兔抗人 MMP9、E-cadherin、VEGF、GAPDH 抗体(1:500)、兔抗人磷酸化 ERK1/2 抗体(1:500),兔抗人总 ERK1/2 抗体,4 $^{\circ}$ C 过夜。次日用 TBST 洗 PVDF 膜 4 次,每次 5min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1:1000)摇床上摇动 1h,最后 ECL 化学发光显色。用 Gelpro32 软件分析蛋白条带,以 GAPDH 为对照,目的蛋白的表达强度用目的蛋白与 GAPDH 的光密度比值来表示,用 P-ERK1/2 与 ERK1/2 的光

密度比值表示 ERK1/2 的磷酸化水平。独立实验重复 3 次。

6. 病例选择:温州医科大学附属第一医院 2012 年 3~6 月 6 例上尿路肿瘤组织,其中 3 例和马兜铃酸肾病(AAN)有关(1 例来自输尿管,2 例来自肾盂),另外 3 例为非马兜铃酸相关的普通上尿路肿瘤。诊断为马兜铃酸相关的上尿路肿瘤要符合以下筛选标准:大量摄入含有 AA 成分的药物;从外层到内层肾皮质低增生性纤维化逐渐减少,肾功能不全[eGFR < 60ml/(min $\cdot$ 1.73m 2)],以及排除其他肾脏疾病^[14]。所有患者签署知情同意书,所有组织的获取获得伦理委员会的批准。此外,由有经验的病理科医师审阅切片,以便评估组织性特征。

7. 统计学方法:采用 SPSS 17.0 进行数据的统计分析,实验数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. AA I 对 SV-HUC-1 细胞增殖的影响:MTT 结果显示,不同浓度的 AA I 作用于 SV-HUC-1 细胞 24h,与溶剂对照组(DMSO)相比,各浓度 AA I 的 A_{570nm} 值差别无统计学意义($P > 0.05$),这表明 AA I 对 SV-HUC-1 细胞增殖无明显作用。当作用时间增加至 48h 及 72h 时,随着浓度的增加,各浓度 AA I 的 A_{570nm} 值和对照组相比有统计学意义($P < 0.05$,图 1)。

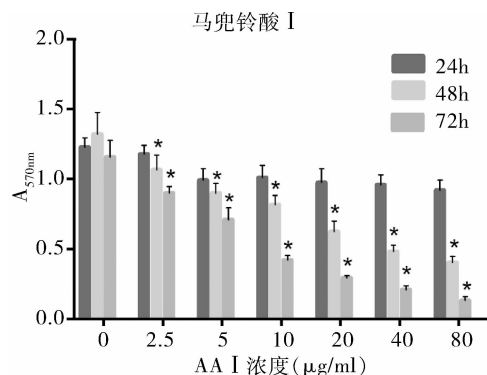


图 1 不同浓度 AA I 作用于 SV-HUC-1 细胞时 A_{570nm} 值
SV-HUC-1 细胞暴露于 AA I 时,活力呈现剂量反应性。当细胞达到 80% 融合,用不同浓度的 AA I 作用 24、48、72h。MTT 法测定细胞活力(存活的细胞数目和甲臌产物呈比例)。与对照组(0 μ g/ml)比较,* $P < 0.05$

2. AA I 诱导的 SV-HUC-1 细胞形态学改变:SV-HUC-1 细胞暴露于不同浓度 AA I 作用 48h,用相差显微镜观察拍摄细胞形态。溶剂对照组的 SV-HUC-1 细胞能保持正常细胞形态和细胞间隙(图 2A)。当细胞暴露于 2.5 μ g/ml AA I 48h 后,细胞保持正常的大小和形态(图 2B)。当细胞暴露于

5.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 AA I 48h 后,可以观察到细胞形态学改变。该浓度下 AA I 对细胞的毒性作用表现为细胞失去增殖能力,部分细胞失去典型的形态(图 2C)。当细胞暴露于 10.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 AA I 48h 后,SV-HUC-1 细胞开始变圆,表现出核固缩(图 2D)。继续增加 AA I 浓度至 20.0 $\mu\text{g/ml}$,SV-HUC-1 细胞的胞质开始出现空泡化(图 2E)。当细胞暴露于 40.0 $\mu\text{g/ml}$ 的 AA I 48h 后,部分细胞发生的胞质发生空泡化,细胞核固缩(图 2F)。

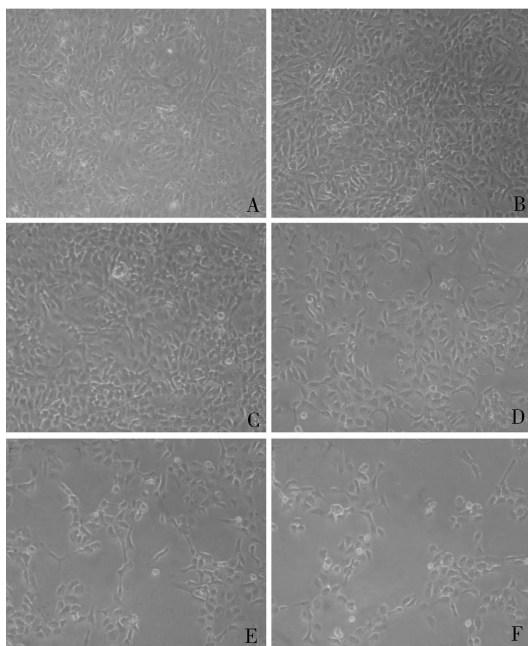


图 2 SV-HUC-1 细胞暴露于不同浓度 AA I 48h 用相差显微镜拍照($\times 200$)

A. 溶剂对照组, B~F 分别为 AA I 浓度 2.5、5.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{g/ml}$

3. 荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测 MMP9、VEGF、E-cadherin 基因表达:根据 MTT 结果及细胞培养结果,选择对 SV-HUC-1 细胞无明显损伤的作用 AA I 暴露浓度(2.5、5.0、10.0 $\mu\text{g/ml}$)作用 48h,用 qRT-PCR 检测 MMP9、VEGF、E-cadherin 基因表达(图 3)。图 3 中 A 和 B qRT-PCR 结果显示,与正常对照组相比,随着 AA I 暴露浓度的增加,基因 MMP9、VEGF 的 mRNA 的表达显著增加,在 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 AA I 浓度时,表达最多($P < 0.01$, $P < 0.05$)。而图 3C qRT-PCR 结果显示,与正常对照组相比,E-cadherin 的 mRNA 表达逐渐下降,在 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 AA I 浓度时,表达最少($P < 0.01$)。

4. Western blot 法检测 MMP9、VEGF、E-cadherin、ERK1/2 及其磷酸化形式 PERK1/2 蛋白的表达:结果显示,SV-HUC-1 细胞暴露于(AA I 浓度 2.5、

5.0、10.0 $\mu\text{g/ml}$)48h 后,和正常对照组相比,随着 AA I 的逐渐增加,MMP9、VEGF 蛋白的表达逐渐增加,在 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 AA I 时,蛋白表达最多;而在 E-cadherin 蛋白的表达逐渐下降,在 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 AA I 时,蛋白表达量最少。和对照组相比,随着浓度的增加,总的 ERK1/2 蛋白无明显变化,而其磷酸化形式 PERK1/2,表达逐渐增加,在 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 AA I 时,蛋白表达最多(图 3D)。

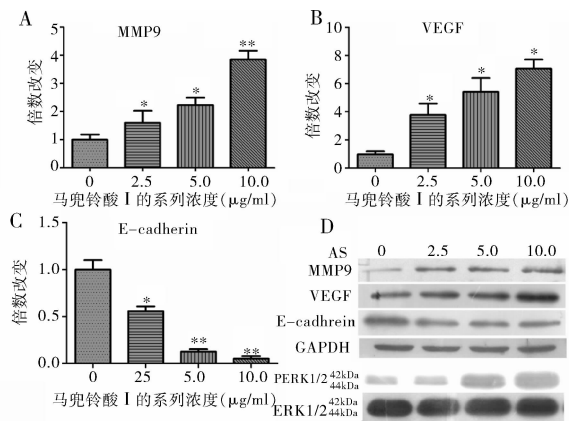


图 3 AA I 暴露 48h 后诱导 MMP9、VEGF、E-cadherin mRNA 的表达(用 GAPDH 的 mRNA 做内参)

用 Western blot 法检测 MMP9、VEGF、E-cadherin、ERK1/2、PERK1/2 蛋白的表达。与对照组(0 $\mu\text{g/ml}$)比较,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

5. ERK 信号通路抑制剂对 AA I 刺激 MMP9、VEGF、E-cadherin 蛋白表达的影响:笔者用 WB 检测 ERK 信号通路抑制剂 U0126 对 AA I 诱导 MMP9、VEGF、E-cadherin 蛋白表达的影响。用 U0126 预先处理 SV-HUC-1 细胞 1h,结果显示,与对照组(AA I 0 $\mu\text{g/ml}$)相比,抑制剂抑制 AA I 10 $\mu\text{g/ml}$ 组 MMP9、VEGF 的表达,但该组促进 E-cadherin 蛋白的表达(图 4)。

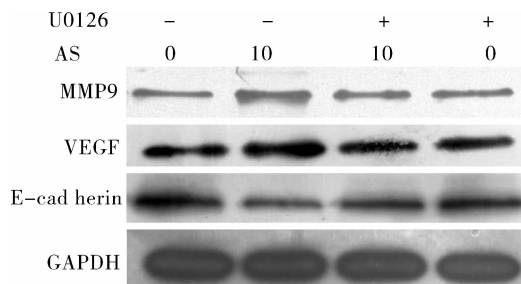


图 4 抑制剂 U0126 对 AA I 刺激 SV-HUC-1 细胞 MMP9、VEGF、E-cadherin 蛋白表达的作用

细胞预先用 10 $\mu\text{mol/L}$ U0126 作用 1h 后再暴露于 10 $\mu\text{g/ml}$ 的 AA I 作用 48h,MMP9、VEGF 蛋白的表达水平受到抑制,但促进 E-cadherin 蛋白的表达。用 GAPDH 调节蛋白上样量

6. 马兜铃酸相关上尿路肿瘤和非马兜铃酸相关上尿路肿瘤 MMP9、VEGF、E-cadherin、PERK 蛋白表达:如图 5 所示,笔者用 Western blot 法检测 6 例上尿路肿瘤 MMP9、VEGF、E-cadherin、PERK 蛋白的表达。结果显示,与 3 例普通的非马兜铃酸相关上尿路肿瘤相比,马兜铃酸相关的上尿路肿瘤 MMP9、VEGF、PERK 蛋白高表达,而 E-cadherin 蛋白低表达。

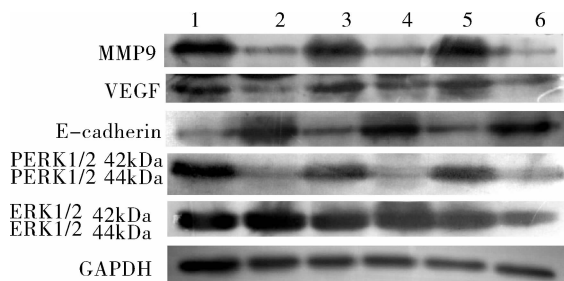


图 5 Western blot 法检测相关蛋白的表达

泳道 1、3、5. 马兜铃酸相关上尿路肿瘤 (AA-UUC); 泳道 2、4、6. 非马兜铃酸相关上尿路肿瘤 (non-AA-UUC)

讨 论

SV-HUC-1 细胞系来自转染 SV-40 病毒的人输尿管上皮细胞,形态和人上尿路上皮细胞(肾盂、输尿管)相似,可以无限传代,但被证实无致瘤性,在先前的毒理学实验中该细胞系被广泛运用^[15,16]。因此本次实验笔者采用该细胞系作为研究 AA 毒性的对象。现在人们发现 AA 通过形成 DNA 加合物造成对人体的肾毒性及致癌作用。先前有调查显示比利时的年轻女性患者误服含有 AA 的减肥中药,其肾间质表现为迅速进展的纤维化^[17]。2000 年 Nortier 等^[18]发现终末期马兜铃酸肾病的患者上尿路肿瘤的风险很高,占 46%,只有 5% 的患者尿路上皮正常。Yang 等^[19]报道了那些容易接触到含有 AA 药材的中医师发生尿路上皮肿瘤的风险大大增加。

MMPs 被定性为细胞增殖、血管生成、癌变、肿瘤侵袭的关键因素。有研究使用明胶酶谱法和酶联免疫吸附法分析发现,MMP9 在膀胱癌患者的表达活性和肿瘤的进展性密切相关。Huang 等^[20]发现有毒性和致癌作用的亚砷酸盐可以引起 SV-HUC-1 细胞 MMP9、MMP2、UPA 和 VEGF 蛋白的表达失调。然而 AA I 引起 SV-HUC-1 细胞 MMP9 表达失调的机制目前国内外鲜有报道。笔者的研究表明 AA I 可以增加 MMP9 蛋白、MMP9 mRNA 的表达(图 3)。此外,蛋白印迹结果表明,和 non-AA-UUC 相比,AA I 可

以增加 AA-UUC 的 MMP9 蛋白的表达(图 5)。然而,AA-UUC 病例太少,笔者需要收集更多的病例,并进一步用免疫组化方法分析 AA-UUC 和 non-AA-UUC 病例 MMP9 的表达。

VEGF 被认为可以促进细胞迁移,诱导内皮细胞的增殖,抑制细胞的凋亡。Crew 等报道 VEGF 和浅表性尿路上皮膀胱癌的复发和肿瘤的阶段进展密切相关。Kopparapu 等^[21]通过比较 212 例膀胱癌标本和 131 例癌旁正常膀胱黏膜标本的 VEGF、VEGFR1 的表达,发现和正常膀胱黏膜相比,膀胱癌的 VEGF ($P < 0.001$) 和 VEGFR1 ($P = 0.02$) mRNA 水平显著增加。笔者的研究结果表明 AA I 可以增加 SV-HUC-1 细胞 VEGF 蛋白及 mRNA 的表达(图 3)。此外,Western blot 法检测结果表明,和 non-AA-UUC 相比,AA 可以增加 AA-UUC 的 MMP9 蛋白的表达(图 5)。

E-cadherin 在细胞黏附过程中起关键作用,影响肿瘤细胞的侵袭、转移。一些研究显示 E-cadherin 表达缺失和肿瘤细胞(包括尿路上皮肿瘤)的侵袭性相关。也有研究表明 E-cadherin 表达缺失导致上皮细胞恶性转化,促进肿瘤的侵袭和迁移^[8,9]。但是 AA I 能否促进 SV-HUC-1 细胞 E-cadherin 的表达缺失目前还没有完全阐明。笔者的研究表明低浓度的 AA I (2.5、5.0、10.0 μg/ml) 暴露于 SV-HUC-1 细胞导致 E-cadherin 的表达下调(图 3)。此外,Western blot 法检测结果表明,和 non-AA-UUC 相比,AA 可以降低 AA-UUC 的 E-cadherin 蛋白的表达(图 5)。

ERK 信号转导通路在许多细胞过程中起重要作用,包括细胞增殖、分化、DNA 损伤、细胞恶性转化、凋亡和炎症等。此外 ERK 信号通路已经在许多类型的肿瘤包括膀胱癌中得到证实。先前有研究证实 ERK 信号通路在调节 MMP9、VEGF、E-cadherin 的表达和活性起着重要作用^[20]。也有研究表明 AA I 通过激活 ERK1/2 的磷酸化,诱导肾小管上皮细胞自噬,从而减轻细胞凋亡。然而,笔者的研究阐明了 AA I 促进 SV-HUC-1 细胞 ERK1/2 磷酸化水平。Western blot 法检测结果显示,当细胞预先用 ERK1/2 信号通路抑制剂 U0126 处理,MMP9、VEGF 蛋白的表达水平受到抑制,而 E-cadherin 蛋白的表达恢复。总之,这些结果表明 AA I 可能通过 ERK1/2 信号通路的激活来增加 MMP9、VEGF 蛋白的表达及降低 E-cadherin 蛋白的表达。这可能提供了 AA I 诱导的

细胞毒性、癌变及上尿路肿瘤发生的机制(图6)。

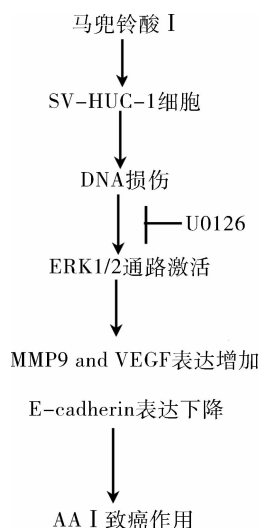


图6 AA I 诱导 SV-HUC-1 细胞 MMP9、VEGF、E-cadherin 表达的假设模型

AA I 可以显著增加 MMP9、VEGF 的 mRNA 和蛋白表达,降低 E-cadherin 相关水平的表达。当预先用 ERK1/2 抑制剂 U0126 时,这些标志物的表达受到抑制。这表明 AA I 促进上尿路肿瘤的发生可能机制是通过激活 ERK1/2 信号通路,导致 MMP9、VEGF、E-cadherin 表达异常

此外,笔者认为,需要做进一步研究来确定在体外用动物模型情况下 AA I 是否可以引起 MMP9、E-cadherin、VEGF 表达改变以及收集更多的上尿路肿瘤(马兜铃酸相关或不相关)来分析这些蛋白的表达和临床病理特征相关性。

参考文献

- Martinek V, Kubickova B, Arlt VM, *et al.* Comparison of activation of aristolochic acid I and II with NADPH: quinone oxidoreductase, sulphotransferases and N-acetyltransferases [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2011, 32 Suppl 1: 57-70
- Shibutani S, Dong H, Suzuki N, *et al.* Selective toxicity of aristolochic acids I and II [J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35(7): 1217-1222
- Jelakovic B, Karanovic S, Vukovic - Lela I, *et al.* Aristolactam - DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid [J]. *Kidney Int*, 2012, 81(6): 559-567
- Hranjec T, Kovac A, Kos J, *et al.* Endemic nephropathy: the case for chronic poisoning by aristolochia [J]. *Croat Med J*, 2005, 46(1): 116-125
- Gunay LM, Akdogan B, Koni A, *et al.* Upper urinary tract transitional cell carcinoma: is there a best [J]. *Clin Genitourin Cancer*, 2013, 11(1): 39-44
- Hsieh SC, Lin IH, Tseng WL, *et al.* Prescription profile of potentially aristolochic acid containing Chinese herbal products: an analysis of National Health Insurance data in Taiwan between 1997 and 2003 [J]. *Chin Med*, 2008, 3: 13
- Wu MJ, Lian JD, Yang CR, *et al.* High cumulative incidence of urinary tract transitional cell carcinoma after kidney transplantation in Taiwan [J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, 43(6): 1091-1097
- de Freitas Silva BS, Yamamoto - Silva FP, Pontes HA, *et al.* E-cadherin downregulation and Twist overexpression since early stages of oral carcinogenesis [J]. *J Oral Pathol Med*, 2014, 43(2): 125-131
- Kim DW, Walker RL, Meltzer PS, *et al.* Complex temporal changes in TGFbeta oncogenic signaling drive thyroid carcinogenesis in a mouse model [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(10): 2389-2400
- Wang YH, Yeh SD, Wu MM, *et al.* Comparing the joint effect of arsenic exposure, cigarette smoking and risk genotypes of vascular endothelial growth factor on upper urinary tract urothelial carcinoma and bladder cancer [J]. *J Hazard Mater*, 2013, 262: 1139-1146
- Johnson KE, Wilgus TA. Multiple roles for VEGF in non-melanoma skin cancer: angiogenesis and beyond [J]. *J Skin Cancer*, 2012, (12): 4834-4839
- Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations [J]. *Science*, 2002, 295(5564): 2387-2392
- Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(3): 178-193
- Gokmen MR, Cosyns JP, Arlt VM, *et al.* The epidemiology, diagnosis, and management of aristolochic acid nephropathy: a narrative review [J]. *Ann Intern Med*, 2013, 158(6): 469-477
- Chai CY, Huang YC, Hung WC, *et al.* Arsenic salt-induced DNA damage and expression of mutant p53 and COX-2 proteins in SV-40 immortalized human uroepithelial cells [J]. *Mutagenesis*, 2007, 22(6): 403-408
- Liu XP, Huang YC, Hung WC, *et al.* Sodium arsenite-induced abnormalities in expressions of Caveolin-1, eNOS, IKKbeta, and COX-2 in SV-40 immortalized human uroepithelial cells and in urothelial carcinomas [J]. *Toxicol in Vitro*, 2012, 26(7): 1098-1105
- Vanherweghem JL, Depierreux M, Tielemans C, *et al.* Rapidly progressive interstitial renal fibrosis in young women: association with slimming regimen including Chinese herbs [J]. *Lancet*, 1993, 341(8842): 387-391
- Nortier JL, Martinez MC, Schmeiser HH, *et al.* Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb (Aristolochia fangchi) [J]. *N Engl J Med*, 2000, 342(23): 1686-1692
- Yang HY, Wang JD, Lo TC, *et al.* Increased risks of upper tract urothelial carcinoma in male and female chinese herbalists [J]. *J Formos Med Assoc*, 2011, 110(3): 161-168
- Huang YC, Hung WC, Chen WT, *et al.* Effects of DNMT and MEK inhibitors on the expression of RECK, MMP-9, -2, uPA and VEGF in response to arsenite stimulation in human uroepithelial cells [J]. *Toxicol Lett*, 2011, 201(1): 62-71
- Kopparapu PK, Boorjian SA, Robinson BD, *et al.* Expression of VEGF and its receptors VEGFR1/VEGFR2 is associated with invasiveness of bladder cancer [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33(6): 2381-2390

(收稿日期:2014-01-23)

(修回日期:2014-03-03)