

• 实验研究 •

化痰通瘀解毒方水提取物对胃癌 SGC-7901 细胞划痕愈合及 E-cadherin 和 MMP-2 表达的影响*

刘 蕾¹, 彭 佳¹, 黄金玲^{2△}, 施 慧¹, 洪星辉², 方海雁³, 刘亚运¹

(1. 安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038; 2. 安徽中医药大学中西医结合研究所, 安徽 合肥 230038;

3. 安徽中医药大学科技处, 安徽 合肥 230012)

摘要:目的 观察化痰通瘀解毒方(Huatan Tongyu Jiedu Decoction, HTJD)水提取物对胃癌细胞 SGC-7901 E-钙黏蛋白(Epithelial cadherin, E-Cad)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase 2, MMP-2)表达及其侵袭转移能力的影响。方法 分别用含化痰通瘀解毒方水提取物 5、10、20、30、40 μg/mL 的培养基干预人胃癌 SGC-7901 细胞 24h 后, 采用划痕实验检测人胃癌细胞 SGC-7901 的侵袭迁移能力, 采用酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)检测 SGC-7901 细胞中和 E-Cad、MMP-2 的表达水平。结果 HTJD 10、20、30、40 μg/mL 浓度组与空白对照组相比, 划痕愈合距离(Δd)明显减小($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); HTJD 10、20、30、40 μg/mL 浓度组 SGC-7901 细胞上清液中 E-Cad 比空白对照组含量升高; 细胞上清液中 MMP-2 的含量与空白对照组相比明显减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 化痰解毒方可抑制人胃癌细胞 SGC-7901 侵袭和迁移能力, 其作用机制可能与下调 MMP-2 表达水平, 上调 E-Cad 的表达水平有关。

关键词:化痰通瘀解毒方; 胃癌细胞 SGC-7901; 侵袭转移; E-钙黏蛋白; 基质金属蛋白酶-2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2016)06-0001-04

DOI: 10.19288/j.cnki.issn.1000-2723.2016.06.001

侵袭转移是恶性肿瘤细胞的重要生物学特征, 也是胃癌患者肿瘤复发和死亡的重要原因之一^[1]。中医药研究在寻找抗侵袭转移、高效低毒的抗癌药物和治法上具有重要价值。研究表明^[2-5], 化痰、祛瘀、解毒、扶正等治法, 能有效地控制肿瘤细胞的侵袭转移、提高肿瘤模型的存活率和生存质量。前期研究发现^[6], 化痰通瘀解毒方能有效抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的增殖和移植瘤小鼠肿瘤微血管的生成, 抑制其瘤组织中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达水平, 抑制肿瘤生长^[7]。本实验在既往研究的基础上, 深入观察 HTJD 提取物对人胃癌细胞 SGC-7901 侵袭、转移能力的影响, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株

人胃癌细胞 SGC-7901 购自中国科学院上海生

命科学研究所。

1.2 药物

试验药物制备: 化痰通瘀解毒方(黄连、瓜蒌、半夏、白花蛇舌草、酒大黄、三七、壁虎等)中药均购自安徽济仁药业有限公司, 安徽中医药大学老年军教授鉴定符合《中国药典》(2015 版)规定; 按原方配伍比例精确称取药物, 采用正交试验优选化痰通瘀解毒方最佳水提工艺以加 10 倍量水、提取 3 次、每次提取 45min 为最佳(黄连小檗碱含量为 5.455mg/g); 以 75% 乙醇纯化, 旋转蒸发器低温蒸发得干燥粉末(每克含生药 3.58g); 实验药物由安徽中医药大学一附院制剂室按上述工艺及质控标准提取加工, 分装、蜡封, 4℃ 保存备用; 用时以 DMEM 培养液溶解, 0.22 μm 孔径滤膜过滤, 调整至所需浓度, 4℃ 保存备用; 测定药物干预最大浓度

* 基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81173171, 81573864)

收稿日期: 2016-09-28

作者简介: 刘蕾(1989-), 女, 安徽合肥人, 在读硕士研究生, 研究方向: 中药复方抗肿瘤分子机制。

△通信作者: 黄金玲, E-mail: jinling6181@126.com

40 μ g/mL 悬液渗透压为 304moSmol/kg。

1.3 试剂

E-Cad、MMP-2 ELISA 检测试剂盒 (上海谷研生物工程有限公司;201601、201512);DMEM 细胞培养液(美国 HyClone 公司;AAJ205976);胎牛血清(fetal bovineserum FBS 杭州四季青公司生物工程材料有限公司;20151116);双抗青霉素-链霉素(上海 Beyotime 碧云天生物技术有限公司;20160221);胰酶细胞消化液(上海 Beyotime 碧云天生物技术有限公司;C020120160106)。

1.4 仪器与材料

Olympus IX51 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司);Forma 370 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);ATOM 全自动酶联免疫分析系统 (意大利 Maroche 公司);SIGMA 3K15 低温高速离心机 (德国 Sigma 公司);微量移液器(德国 Eppendorf 公司);纯水-超纯水净化器 (美国 Millipore 公司);6 孔细胞培养板 (美国 Corning 公司)。

2 观察指标及检测方法

2.1 对肿瘤细胞侵袭迁移能力的影响

用划痕实验法检测^[8]。人胃癌 SGC-7901 细胞株用含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基于 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。在 6 孔板底外用记号笔画 3 条间隔为 0.5cm 的水平直线,将浓度为 5 $\times 10^5$ /mL 的细胞悬液接种于 6 孔板中,2mL/孔。常规培养至 90%融合状态。用 10 μ L 微量移液器枪尖在细胞板上划垂直于水平线的划痕后,弃去孔内完全培养基,PBS 洗 2 次,分别加入不同分组的含不同浓度的 HTJD 水提取物无血清培养基,放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。以划痕后时刻为 0h,在 0、12、24h 分别在各水平直线标记处跟踪拍摄各孔细胞划痕状态,各拍摄视野在不同位置用 Image J 2.1 图像分析软件测量细胞划痕宽度,取其平均值,将每孔各处划痕宽度取平均值代表该孔划痕宽度。计算划痕愈合距离(Δd)和抑制率,计算平均值、标准差以($\bar{x} \pm s$)表示。进行组间比较,实验重复 3 次。

抑制率=(1-加药组 Δd /对照组 Δd) $\times 100\%$

Δd =0h 划痕宽度-24h 划痕宽度

2.2 对人胃癌 SGC-7901 细胞 E-Cad、MMP-2 蛋

白表达量的影响

采用 ELISA 法检测^[9]。人胃癌 SGC-7901 细胞常规培养至对数生长期,调整细胞浓度至 5 $\times 10^5$ 个/mL,接种至 6 孔培养板,2mL/孔,培养 12h 待细胞贴壁后,将各组含有不同浓度药物的完全培养基分别加入各个孔中,空白孔加入完全培养基,继续培养 24h,取细胞上清液用 ELISA 法检测 E-Cad、MMP-2 蛋白表达量。实验步骤严格按照试剂盒说明书的描述,于全自动酶联免疫分析系统上进行。

2.3 统计学分析

应用 SPSS17.0 对数据进行统计学处理。实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示,各组指标采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较采用 LSD 检验。 $P < 0.05$ 表示组间差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对人胃癌细胞 SGC-7901 侵袭迁移能力的影响

HTJD 提取物干预人胃癌 SGC-7901 细胞 24h 后,HTJD 10、20、30、40 μ g/mL 组 SGC-7901 细胞与空白对照组比较,划痕愈合距离(Δd)明显减小($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);在浓度 20、30、40 μ g/mL 范围内,随着剂量的增加,划痕愈合距离(Δd)化逐渐变小,20、30、40 μ g/mL 组组间比较差异性显著($P < 0.05$),表明 HTJD 能够抑制人胃癌细胞 SGC-7901 迁移能力,并在 20、30、40 μ g/mL 浓度范围呈现剂量依赖的关系($P < 0.05$),结果见表 1、图 1。

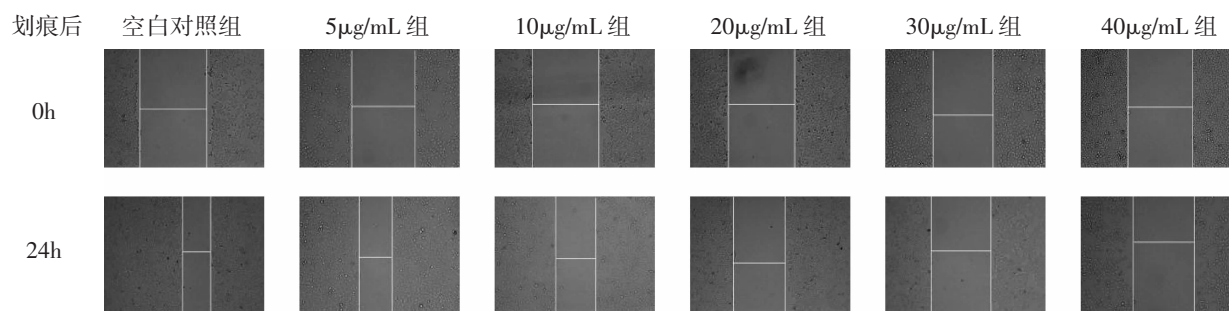
表 1 化痰通瘀解毒方水提取物对胃癌细胞 SGC-7901 侵袭迁移能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	给药剂量/ μ g $\cdot$ mL ⁻¹	侵袭迁移能力	
		划痕愈合距离/ μ m	抑制率/%
空白对照组	-	250.67 $\pm$ 16.29	-
HTJD 组	5	249.14 $\pm$ 8.32	0.47 $\pm$ 3.55
	10	223.67 $\pm$ 11.02*	6.67 $\pm$ 5.96
	20	180.00 $\pm$ 15.72**	19.45 $\pm$ 7.24
	30	139.00 $\pm$ 16.70***	38.74 $\pm$ 5.32
	40	95.67 $\pm$ 9.87** Δ	56.09 $\pm$ 6.87

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 HTJD 20 μ g/mL 组比较,* $P < 0.01$;与 30 μ g/mL 组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3.2 对胃癌 SGC-7901 细胞 E-Cad 表达的影响

胃癌 SGC-7901 细胞加药培养 24h 后,HTJD

图1 化痰通瘀解毒方对胃癌 SGC-7901 细胞划痕实验划痕愈合程度的影响($\times 200$)

10、20、30、40 $\mu\text{g/mL}$ 组上清液中 E-Cad 含量明显升高,与空白对照组比较具有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明 HTJD 提取物可上调其 E-Cad 的表达水平;各用药组组间差异有统计学意义($P<0.05$),即随着药物浓度的增加,上清液中 E-Cad 含量增加,呈现剂量依赖关系($P<0.05$)。结果见表 2。

3.3 对胃癌 SGC-7901 细胞 MMP-2 表达的影响

浓度为 10、20、30、40 $\mu\text{g/mL}$ 的 HTJD 水提取物干预胃癌细胞 SGC-7901 24h,细胞上清液中 MMP-2 含量明显降低,与空白组比较具有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$),表明化痰通瘀解毒方可降低其 MMP-2 的表达;各化痰通瘀解毒方水提取物给药组间差异有统计学意义($P<0.05$),即随着药物浓度增加,MMP-2 含量下降,呈现出剂量依赖的关系($P<0.05$)。结果见表 2。

表 2 化痰通瘀解毒方对胃癌细胞 SGC-7901 E-Cad 及 MMP-2 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	给药剂量 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	E-Cad ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	MMP-2 ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
空白对照组	0	3.22 ± 0.18	91.37 ± 1.51
HTJD 组	5	3.35 ± 0.20	90.52 ± 1.10
	10	$3.40 \pm 0.14^*$	$89.26 \pm 1.14^*$
	20	$3.80 \pm 0.25^{**}$	$86.55 \pm 0.96^{**}$
	30	$4.46 \pm 0.11^{***}$	$84.27 \pm 1.57^{***}$
	40	$4.68 \pm 0.12^{**\Delta}$	$72.43 \pm 2.58^{**\Delta}$

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 HTJD 20 $\mu\text{g/mL}$ 组比较,# $P<0.01$;与 30 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, $\Delta P<0.054$

4 讨论

化痰通瘀解毒方系张仲景《伤寒论》小陷胸汤合四君子汤化裁方,由黄连、半夏、瓜蒌、白花蛇舌

草、壁虎、红参等药物组成,针对瘀、痰、毒、虚等致病因素^[10]和痰瘀癌毒相互交阻前期病机^[11],功可除痰散结、活血化瘀,祛湿解毒,兼以扶正,该方临床用于中晚期胃癌患者,能改善其生存质量,预防复发转移,有较好的临床疗效。本实验中,划痕实验的结果表明随着用药剂量的增加,划痕愈合距离逐渐变小,提示 HTJD 提取物可抑制胃癌 SGC-7901 细胞的侵袭与转移,可能是此复方提取物抗肿瘤的机制之一。

侵袭转移是动态发展变化的复杂过程,多种蛋白水解酶类和黏附因子在此过程中参与调控。E-Cad 是介导细胞之间以及细胞与基质之间相互黏附的跨膜糖蛋白,其广泛存在于各类上皮细胞中,并与细胞内部 β -连环蛋白(beta catenin, β -catenin)形成 E-cadherin/ β -catenin 复合体后^[12],增加同型细胞间的黏附作用,从而稳定细胞形态和组织结构。在肿瘤细胞中,E-Cad 参与稳定细胞与细胞、细胞与基质之间的黏附力,防止肿瘤细胞从原发灶脱离,发生转移。E-Cad 表达下调或不表达将使细胞离散,则可能使癌细胞易于脱落,具有较强的侵袭能力^[13]。一些研究表明^[14],E-Cad 还参与肿瘤细胞淋巴转移以及远端播散。

MMP-2 能降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)和基底膜成分,使膜丧失连续性,从而破坏局部组织结构达到侵袭和转移,是基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)家族中重要成员,主要功能是降解 EMC 成分,是侵袭转移过程中主要的蛋白水解酶。其家族成员结构基本相似,可以分为分泌型和膜型,MMP-2 属分泌型蛋白^[15],可以降解细胞外基质中的 IV 型胶原。相关研究表明 MMP-2 蛋白的表达与肿瘤的远处转移相关^[16]。同

时,胃癌中的 MMP-2 的表达,可能是促使肿瘤发生、生长和浸润转移的重要因素,故可作为判断肿瘤恶性程度以及预后的重要指标。

实验结果显示,化痰通瘀解毒方提取物干预胃癌细胞 24h 后,SGC-7901 细胞 E-Cad 表达量上升,MMP-2 的表达量降低,提示 HTJD 提取物上调 E-Cad 表达,抑制 MMP-2 表达,可能是其抗肿瘤侵袭和转移的机制之一。

另外,E-Cadherin 介导同型细胞之间以及细胞与基质之间的黏附,与细胞分泌型蛋白 β -catenin 形成 E-cadherin/ β -catenin 复合体,稳固细胞膜结构,增加黏附作用。若 E-Cad 表达异常,该复合体上 β -catenin 将从中脱落,大量游离蓄积于胞质中,将会激活 Wnt/ β -catenin 通路下游部分通路, β -catenin 通过入核与 LEF 和 TCF 结合形成复合物,激活下游靶基因,又会影响包括 MMPs 原癌基因 c-myc、细胞周期蛋白、CD44 等与肿瘤侵袭转移密切相关的基因和蛋白分子的表达,使细胞迁移能力和侵袭性进一步增强^[17]。实验结果表明化痰通瘀解毒方可通过其上调 E-Cad 的表达从而抑制胃癌 SGC-7901 细胞侵袭迁移能力,可能与其稳固 E-cadherin/ β -catenin 复合体机构和功能,抑制 Wnt/ β -catenin 通路下游的激活从而抑制 MMP-2 的表达有关。为进一步探索化痰通瘀解毒方抗胃癌侵袭转移作用机制,后续深入研究正在进行。

参考文献:

- [1] 曾益新. 肿瘤学 [M]. 3 版. 北京: 北京人民卫生出版社, 2012:245-247.
- [2] 周丽华,付建华,蒋春灵. 扶正抑癌汤的免疫增强及体内抗肿瘤活性研究[J]. 江西医药,2016,51(3):192-194.
- [3] 刘文亚,顾媛媛,巩颖. 生半夏抗肿瘤作用初探[J]. 临床合理用药杂志,2016,9(7):93-94.
- [4] 李小江,贾英杰,于建春,等. 消岩汤剂拆方配伍对 A549 肺腺癌细胞体外生长抑制作用研究 [J]. 天津中医药, 2015,32(7):424-427.
- [5] 李玉云,翟玮玮,杨向荣,等. 三七总皂苷对 K562 细胞增殖、凋亡及周期的影响及机制 [J]. 南方医科大学学报, 2015,35(8):1103-1109.
- [6] 黄金领,蔡横,顾武军. 加味小陷胸汤抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国中医药科技,2007,14(4):251-252.
- [7] 黄金玲,王靓,王桐生,等. 化痰通瘀解毒方对 S180 小鼠移植瘤 MVD 及 VEGF 表达的影响 [J]. 中医药临床杂志, 2011,23(3):255-256.
- [8] 赵鹏,陈俊卯,曹文斌,等. TNF- α 在结肠癌细胞侵袭和迁移中的作用探讨[J]. 天津医药,2015,43(12):1368-1372.
- [9] 徐磊,杨静,吕茜,等. 健脾解毒汤对人大肠癌细胞 HT-29 基质裂解蛋白-9 基因表达及蛋白分泌影响的实验研究 [J]. 中国肿瘤外科杂志,2014,6(3):170-173.
- [10] 陈柯羽,张青. “癌毒”异变之思考[J]. 中医杂志,2015,56(22):1919-1922.
- [11] 郭仁清. 从痰毒瘀辨治胃癌 [J]. 南京中医药大学学报, 2011,27(1):87-88.
- [12] 王慧芳,田新瑞. E-钙黏蛋白/ β -连环蛋白复合体的研究进展[J]. 国际呼吸杂志,2013,33(5):377-380.
- [13] 薛松,陈映霞. E-cadherin 在胃癌浸润与转移中作用的研究进展[J]. 临床肿瘤学杂志,2015,20(6):555-558.
- [14] 冯智毅. 黏结蛋白聚糖 2 及 E-钙黏蛋白的表达及与结直肠癌淋巴结转移的关系 [J]. 中国现代医学杂志, 2016,26(2):72-75.
- [15] 侯晓丽,韩梅,王玉巧,等. 胃癌细胞基质金属蛋白酶-2、9 的表达及对细胞迁移的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2010,37(1):12-15.
- [16] 李巍,李培华,张艳秋. 基质金属蛋白酶 MMP-1、MMP-2 与下咽鳞状细胞癌侵袭转移的关系 [J]. 徐州医学院学报,2011,31(11):754-758.
- [17] Xi Y,Chen Y. Wnt signaling pathway:implications for therapy in lung cancer and bone metastasis[J]. Cancer Letters,2014,353(1):8-16.

(编辑:徐建平)

(英文摘要见第 9 页)

- [16] Cao X., Chen D. The BMP signaling and in vivo bone formation[J]. Gene, 2005, 357(1): 1-8.
- [17] K. Miyazono, Y. Kamiya, M. Morikawa. Bone morphogenetic protein receptors and signal transduction [J]. Journal of biochemistry, 2010, 147(1): 35-51.
- [18] Nohe A, Keating E, Knaus P, et al. Signal transduction of bone morphogenetic protein receptors [J]. Cell Signal, 2004, 16(3): 291-299.
- [19] Jeon EJ, Lee KY, Choi NS, et al. Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation [J]. J Biol Chem, 2006, 281(24): 16502-16511.
- [20] Canalis E. Update in new anabolic the rapides for osteoporosis [J]. J Clin Endocrinol metab, 2010, 95 (4): 1496-1504.

(编辑:徐建平)

Effects of YiGu Recipe on the Expression of BMP-2 Signaling Pathways in Rats with Osteoporosis

LI Wei, YAO Xinmiao, LI Xiaoya, YU Bin, DONG Zhengchao

(College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

ABSTRACT: Objective To study the effects of YiGu Recipe on the mRNA transcription and protein expression of BMP-2 (Bone morphogenetic protein-2), Smads, Runx2(Runt-related transcription factor 2), OSX(Osterix), Noggin on BMP-2 signaling pathways in rats with osteoporosis, analyze the mechanism of Yigu Recipe in the prevention and treatment of osteoporosis. **Methods** The osteoporosis rats model was built by the ovariectomy. All rats were divided into normal control, blank model, progynova, YiGu Recipe, anti-Noggin group. RT-PCR and WesternBlotting methods was applied to measure the mRNA and protein expression of BMP-2, Smads, Runx2, OSX, Noggin mRNA in bone homogenate. **Results** First, the BMD (Bone mineral density) of the model group significantly decreased compared with the blank group ($P < 0.01$), the BMD significantly increased compared with the model group ($P < 0.01$). Second, the expression of BMP-2, Smads, Runx2, OSX mRNA significantly increased compared with the model group ($P < 0.05$), the expression of Noggin mRNA significantly decreased compared with the model group ($P < 0.05$). At last, the expression of BMP-2, Smads, Runx2, OSX protein significantly increased compared with the model group, the expression of Noggin protein significantly decreased compared with the model group. **Conclusion** The mechanism of Yigu Recipe in the prevention and treatment of osteoporosis was increase the BMD, inhibiting the expression of Noggin and up-regulating the expression of the BMP-2, Smads, Runx2, OSX. Noggin as an inhibitor of MMPs may be a novel anti-osteoporosis target.

KEY WORDS: Yigu Recipe; Osteoporosis; BMP-2 signaling pathway; Noggin

(原文见第1页)

The Effects of the Aqueous Extracts of Huatan Tongyu Jiedu Decoction on Expression of E-cadherin and MMP-2 in Gastric Cancer Cell Line SGC-7901

LIU Lei¹, PENG Jia¹, HUANG Jinlin², SHI Hui¹, HONG Xinghui², FANG Haiyan³, LIU Yayun¹

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei 230038, China; 2. Research Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Academy of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China;

3. Department of Science and Technology, Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230012, China)

ABSTRACT: Objective To observe the effects of the aqueous extracts of Huatan Tongyu Jiedu Decoction on expression of E-cadherin and MMP-2 in gastric cancer cell line SGC-7901. **Methods** Gastric cancer cell SGC-7901 was intervened for 24h by the extract of different concentrations of 5、10、20μg/mL、30μg/mL and 40μg/mL, respectively. Wounding-healing assay test was adopted to detect gastric cancer cell SGC-7901's capacity of invasion and metastasis. Enzyme linked immunosorbent assay(ELISA) is operated to detect the protein expression of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and E-cadherin in cells. **Results** The difference of cells' healing width between the treatment concentration groups of 10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL and 40μg/mL and the blank group showed statistically significant($P < 0.05$, $P < 0.01$); the amount of E-cadherin of the treatment concentration groups of 10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL and 40μg/mL was higher than that of the blank group($P < 0.05$); the amount of MMP-2 in cell supernatant of the treatment concentration groups of 10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL and 40μg/mL was obviously lower than that of the blank group ($P < 0.05$). **Conclusion** HTJD repress the capacity of gastric cancer cell line SGC-7901 on invasion and metastasis. Its mechanism is likely related to down-regulating the expression level of MMP-2 and increasing the expression level of E-cadherin.

KEY WORDS: Huatan Tongyu Jiedu decoction; gastric cancer cell SGC-7901; invasion and metastasis; E-cadherin; MMP-2