

· 药理 ·

左金方及其主要成分小檗碱对人胃癌细胞 SGC7901 上皮间质转化的影响

王小兰¹, 幸尚平², 肖建勇¹, 杜海燕¹, 杜标炎¹, 谭宇蕙^{1*}

(1. 广州中医药大学基础医学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] **目的:**研究左金方及其主要成分小檗碱对人胃癌细胞 SGC7901 上皮间质转化的影响。**方法:**制备左金方冻干粉,采用高效液相色谱法(HPLC),对比小檗碱对照品,明确左金方冻干粉的纯度和小檗碱含量;采用噻唑蓝(MTT)比色法检测左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞生长影响,并确定后续实验给药浓度;划痕实验检测左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞迁移能力的影响;细胞侵袭实验(transwell 小室)检测左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞侵袭能力的影响;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测左金方及小檗碱作用 SGC7901 细胞 24 h 后对上皮间质转化(EMT)标志性蛋白上皮型钙黏蛋白(E-cadherin),神经型钙黏蛋白(N-cadherin)蛋白表达的影响。**结果:**制备的左金方冻干粉含 9.85% 的小檗碱;左金方、小檗碱对 SGC7901 细胞作用 24 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 165, 51.8 mg·L⁻¹, 选用 165 mg·L⁻¹左金方(含小檗碱 16.3 mg·L⁻¹)与 16.3 mg·L⁻¹小檗碱进行后续实验;左金方及小檗碱均能抑制 SGC7901 细胞划痕愈合及侵袭能力;Western blot 结果显示,与空白组比较,左金方及小檗碱能明显上调 E-cadherin 表达,下调 N-cadherin 表达($P < 0.05$)。**结论:**左金方及其主要成分小檗碱能抑制人胃癌细胞 SGC7901 的生长、侵袭及迁移,能抑制 SGC7901 细胞上皮间质转化,且小檗碱在复方中为其主要药效成分。

[关键词] 左金方; 小檗碱; 胃癌 SGC7901; 上皮间质转化(EMT); 转移

[中图分类号] R22; R273; R285.5; R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0062-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181022

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180309.1005.001.html>

[网络出版时间] 2018-03-09 10:52

Effect of Zuojinfang and Its Main Ingredient Berberine on Epithelial Mesenchymal Transition of Human Gastric Cancer Cell Line SGC7901

WANG Xiao-lan¹, XING Shang-ping², XIAO Jian-yong¹, DU Hai-yan¹, DU Biao-yan¹, TAN Yu-hui^{1*}

(1. School of Fundamental Basic Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. School of Pharmaceutical Science, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To study the inhibitory effect of Zuojinfang and its main ingredient berberine on epithelial-mesenchymal transition of human gastric cancer cell line SGC7901. **Method:** Zuojinfang freeze-dried powder was prepared. High-performance liquid chromatography (HPLC) was adopted to define the purity and content of freeze-dried powder. Berberine standards were compared, and single drug content of freeze-dried powder was detected. Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the effects of Zuojinfang and berberine on the growth of SGC7901 cells, and the concentration of the drug was determined. transwell chamber was used to detect the migration and invasion of cells. The expressions of E-cadherin, N-

[收稿日期] 20171014(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774028)

[第一作者] 王小兰,在读硕士,从事中西医结合防治肿瘤研究,E-mail:1085060131@qq.com

[通信作者] *谭宇蕙,博士,教授,从事中西医结合防治肿瘤研究,E-mail:tyuhui@gzucm.edu.cn

cadherin were detected by Western blot. **Result:** Prepared Zuojinfang freeze-dried powder contained 9.85% berberine. The median inhibitory concentration (IC_{50}) of Zuojinfang was $165 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. Zuojinfang ($165 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) and berberine ($16.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) were adopted for the subsequent experiment. Scratch and transwell experiments showed that Zuojinfang and berberine could significantly inhibit the migration and invasion of SGC7901 cells. Western blot analysis showed that Zuojinfang and berberine could significantly up-regulate the expression of E-cadherin in SGC7901 cells and down-regulate the expression of N-cadherin. The expressions of E-cadherin and N-cadherin were statistically significant different ($P < 0.05$). **Conclusion:** Zuojinfang and berberine could inhibit the growth, migration and invasion of SGC7901 cells and inhibit the epithelial mesenchymal transition. Berberine is the main effective component in compound prescription.

[**Key words**] Zuojinfang; berberine; gastric cancer SGC7901; epithelial-mesenchymal transition (EMT); tumor metastasis

胃癌是全球第 3 大癌症死亡原因,在中国每年影响 40 万例患者,是最常见的恶性肿瘤之一^[1]。胃癌在早期时即可发生癌细胞恶性转移,严重影响患者的预后及存活率,也是目前治疗胃癌的最大障碍之一。上皮间质转化(EMT)是一种上皮细胞向间质细胞转化的现象,在多种上皮细胞来源的恶性肿瘤的侵袭转移中发挥了重要推动作用^[2]。左金方出自《丹溪心法》,由黄连-吴茱萸 6:1 组成,方中黄连性味苦寒,能清泻肝胃之火,作为君药。现代临床上主要用来治疗胃炎、消化道溃疡、胃食管反流等疾病^[3]。小檗碱是黄连中的主要成分,具有抗炎、抗肿瘤等多样性药理作用^[4]。付晓伶等^[5]通过建立裸鼠人结肠癌皮下移植瘤耐药模型,证实了左金丸可以抑制人肠癌皮下移植瘤的生长;胡丽娟^[6]研究发现加味左金丸可以抑制人大肠癌裸鼠移植瘤的增殖,其机制之一可能是通过抑制胞外信号调节激酶/丝裂原活化蛋白激酶(ERK/MAPK)信号通路。钱平等^[7]从左金方 70% 乙醇提取物的正丁醇溶性部分分离鉴定了 15 个生物碱,采用噻唑蓝(MTT)比色法评价了其对人胃癌细胞系 NCI-N87 细胞和人结肠腺癌细胞系 Caco-2 细胞增殖的抑制活性,发现黄连生物碱活性最好。PENG 等^[8]发现了左金丸是通过激活线粒体凋亡途径抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的生长。然而,左金方对胃癌 SGC7901 细胞的 EMT 作用研究仍未见相关文献报道,同时本课题组前期研究发现,其主要成分小檗碱可以抑制小鼠黑色素瘤 B16 细胞的 EMT,抑制 B16 细胞转移^[9]。研究左金方对胃癌细胞的 EMT 的作用具有重大意义,其中逆转 EMT 的过程极有可能抑制胃癌的转移,甚至可以改善胃癌患者的预后。故本实验通过研究左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞的迁移侵袭能力及 EMT 标志物的影响,为治疗胃癌转移在临床上提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 细胞株 SGC7901 细胞购自 BNCC 公司,编号 100674,由本实验室保存。

1.2 仪器 SCIENTZ-10N 型冷冻干燥机(宁波新芝生物科技公司);SPD-M20A 型高效液相色谱仪(日本岛津公司);FORMA 371 型 CO_2 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher 公司);iMark 型酶标仪,Powerpac300 型电泳仪及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);Tanon-1600 型凝胶图像处理系统(上海天能科技有限公司);AE2000 型显微镜(中国 Motic 公司)。

1.3 药品与试剂 吴茱萸、黄连饮片,购自于广东省中医院中药房,经广州中医药大学中药学院魏刚研究员鉴定,吴茱萸为芸香科植物吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* 的干燥近成熟果实,黄连为毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* 的干燥根茎;小檗碱(纯度 > 99%,西安开来生物工程有限公司,批号 K140534);matrigel 胶(美国 Corning 公司,批号 6095006);胎牛血清(Biowest 公司,批号 S1335451580);高糖 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 8117028);上皮型钙黏蛋白(E-cadherin),神经型钙黏蛋白(N-cadherin), β -肌动蛋白(β -actin)一抗(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 0004,0013,0013);二抗标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,山羊抗鼠 IgG(Abcclonal 公司,批号分别为 9300014001,9300003001)。

2 方法

2.1 SGC7901 细胞的培养 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养。待细胞接近 85% ~ 90% 时,用含 0.05% EDTA-胰酶消化、传代培养,取第 3 ~ 8 代细胞进行实验。

2.2 左金方冻干粉的制备^[10] 取黄连 120 g,吴茱萸 20 g,去离子水浸泡 30 min,回流提取 3 次,

第 1 次 10 倍量水提取 1.5 h, 第 2 次 8 倍量水提取 1 h, 第 3 次 6 倍量水提取 0.5 h。合并药液, 旋转蒸发浓缩, 过滤, 置超低温冰箱冷冻, 用冷冻干燥机制成粉末, 制成左金方冻干粉 22 g。

2.3 高效液相色谱法检测左金方冻干粉的 药物含量 色谱条件: Shimadzu Inertsil ODS-SP 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm); 柱温 25 °C; 流动相 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液-乙腈 (75:25), 梯度洗脱 (0~35 min, 10%~45% A; 35~65 min, 45%~60% A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 335 nm, 进样体积 10 μL; 对照品溶液制备: 取小檗碱对照品适量, 加甲醇制成每 1 mL 含 90.5 μg 的溶液; 供试品溶液的制备: 取冻干粉 0.2 μg 加入甲醇-盐酸 (100:1) 混合溶液 50 mL, 精密称量, 超声处理 (功率 250 W, 频率 40 kHz), 滤过, 取滤液 2 mL 加入甲醇补足至 10 mL, 摇匀, 滤过, 即得。

2.4 药物试剂的配制 小檗碱, 称取适量的小檗碱粉末, 用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解配制成 20 g·L⁻¹ 的母液, 分装, -20 °C 保存。使用时用培养基稀释成所需浓度。左金方冻干粉, 称取适量的冻干粉, 用 DMSO 溶解配制成 200 g·L⁻¹ 的母液, 分装, -20 °C 保存。使用时用培养基稀释成所需的浓度。

2.5 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞生长抑制的作用 SGC7901 用 DMEM 完全培养基培养至对数生长期, 胰酶消化, 以 3 000 个/孔接种于 96 孔板, 每孔接种体积为 100 μL。置培养箱培养约 24 h 后, 依次分别加入不同浓度的左金方及小檗碱, 用完全培养基作为空白, 作用 24, 48 h 后, 采用 MTT 比色法检测细胞生长抑制作用, 酶标仪测定吸光度 A, 检测波长 490 nm。细胞抑制率按下列公式进行计算, 抑制率 = $[1 - (A_{\text{实验组}} - A_{\text{试剂组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{试剂组}})] \times 100\%$, 并根据改良寇氏法计算半数致死浓度 (IC₅₀)。

2.6 划痕修复实验检测细胞迁移能力 取对数生长期的 SGC7901 细胞, 经胰蛋白酶消化后制成细胞悬液, 按 2 × 10⁵ 个/孔接种于 6 孔板, 待细胞达 80% 左右后开始进行划痕实验。用 10 μL 规格枪头于 6 孔板正中及两侧均匀划 3 条直线使细胞脱落, PBS 缓冲液洗 2 遍, 洗去脱落细胞, 加入无药, 16.3 mg·L⁻¹ 小檗碱, 165 mg·L⁻¹ 左金方冻干粉的 DMEM 完全培养基 (2 mL/孔), 置于细胞培养箱内静置培养, 分别于划痕后 0, 24 h 后于倒置显微镜下观察细胞的迁移情况, 并进行图像采集。采用 Image Pro Plus 软件对结果进行处理得出数据。

2.7 transwell 小室检测细胞侵袭能力^[11] 在 transwell 小室膜的内表面涂 matrigel 5 μg, 置于细胞培养箱待凝固, 在 24 孔培养板孔中加入含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基 500 μL。收集对数生长期的细胞, 分别加无药, 16.3 mg·L⁻¹ 小檗碱, 165 mg·L⁻¹ 左金方冻干粉的 DMEM 无血清培养基重悬。将 transwell 小室浸于 24 孔板的培养基中, 每个小室加细胞悬液 100 μL, 置培养箱内培养 24 h 后将 transwell 小室取出, 用甲醇固定, 结晶紫染色, 棉签小心拭去未穿膜的细胞, 在显微镜下观察细胞的侵袭情况, 并进行图像采集, 随机计算 5 个视野的细胞数。24 孔板中加入 DMSO 700 μL, 将小室置于其中, 浸膜, 振荡 10 min, 充分溶解。将溶解有结晶紫的 DMSO 加入 96 孔板中, 每孔 200 μL, 3 个复孔, 96 孔板于酶标仪上 570 nm 检测 A。

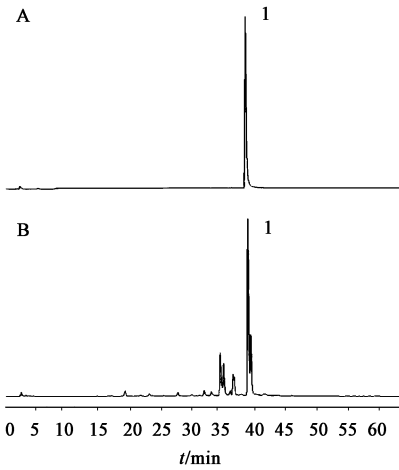
2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 EMT 蛋白表达情况 按 2 × 10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔板, 待细胞贴壁后, 加入无药, 16.3 mg·L⁻¹ 小檗碱, 165 mg·L⁻¹ 左金方冻干粉的 DMEM 完全培养基。收集各组细胞, PBS 漂洗 2 次, 裂解液冰上常规裂解 30 min, 1 万 r·min⁻¹, 离心 5 min, 加入蛋白质上样缓冲液, 100 °C 变性 10 min。Western blot 检测 EMT 蛋白表达^[12]。灌胶, 上样, 行 SDS-PAGE 电泳。转膜后, 5% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1 h。孵育一抗 (1:1 000), 4 °C 过夜。用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 4 次, 每次 5 min。二抗标记 (1:5 000), 室温下孵育 1 h 后用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 4 次, 每次 5 min, 化学发光、显影、定影。采用 Quantity one 对蛋白条带进行灰度值定量。

2.9 统计方法 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 应用方差分析法, 并用 *t* 检验 (least significant difference-*t*, LSD-*t*) 进行均数间的多重比较, *P* < 0.05 表示具有统计学差异。

3 结果

3.1 高效液相色谱法检测左金方冻干粉的 药物含量 根据高效液相 (图 1) 鉴定供试品即制备的左金方冻干粉杂峰少、纯度高, 同时包含单药成分种类较少, 对比小檗碱对照品, 左金方中小檗碱含量较高。根据小檗碱特征峰面积, 采用外标一点法计算, 测定得每 1 g 左金方冻干粉含有 0.098 5 g 小檗碱, 即约占 9.85%。同时根据相关文献水煎剂提取制备的左金方冻干粉几乎不含吴茱萸碱或含量极低^[13], 故左金方的药效作用基本可排除吴茱萸碱的作用。

3.2 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞生长的影响



A. 对照品; B. 供试品; 1. 小檗碱

图 1 左金方及小檗碱高效液相色谱

Fig. 1 HPLC of Zuojinfang and berberine

左金方对 SGC7901 的生长抑制有明显时效和量效关系, 50 ~ 400 mg·L⁻¹ 作用 SGC7901 对其生长有明显影响(表 1), 其中左金方对 SGC7901 细胞的 IC₅₀ 为 165 mg·L⁻¹。200 mg·L⁻¹ 组(含 19.7 mg·L⁻¹ 小檗碱)24 h 杀伤率达 59% 左右, 20 mg·L⁻¹ 小檗碱单药组的抑制率仅达 28.5% 左右, 说明左金方、小檗碱都有明显抑制该肿瘤细胞生长的作用, 但小檗碱作用明显低于含等量小檗碱的左金方, 由于吴茱萸碱含量很低^[13], 因此也说明除小檗碱吴茱萸碱外的其他成分也有协同抑制该肿瘤细胞的作用。文献[14-16]表明选取所研究药物的 IC₅₀ 作用肿瘤细胞, 可以抑制肿瘤细胞转移及 EMT, 故选用左金方对 SGC7901 细胞的 IC₅₀ 做后续实验, 并从 HPLC 法结果得出 165 mg·L⁻¹ 左金方中含小檗碱 16.3 mg·L⁻¹, 因而选用 16.3 mg·L⁻¹ 小檗碱做对比实验。

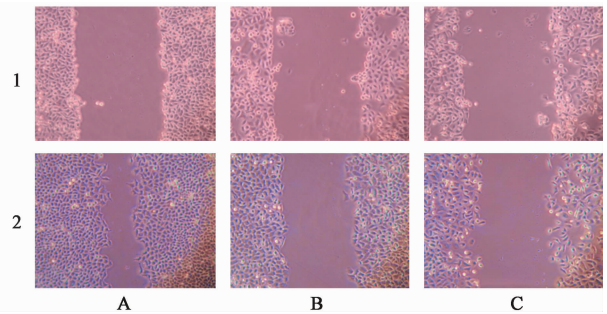
3.3 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞迁移能力的影响 在划痕 24 h 后空白组细胞划痕的缺口已逐渐缩小至接近愈合的状态, 而小檗碱加药组和左金方组比空白组细胞缺口较大, 缺口愈合情况差(图 2)。与空白组比较, 16.3 mg·L⁻¹ 小檗碱组的迁移率明显下降, 165 mg·L⁻¹ 左金方组的抑制率亦显著降低($P < 0.01$)。其中左金方组与小檗碱组的迁移率无明显差异。见表 2。这表明左金丸和小檗碱均可以显著抑制 SGC7901 细胞的迁移能力, 且在左金方发挥主要作用的可能为小檗碱。

3.4 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞侵袭能力的影响 与空白组比较, 左金方 165 mg·L⁻¹ 及小檗碱 16.3 mg·L⁻¹ 孵育 SGC7901 细胞 24 h 后, 穿膜细胞均明显减少, 细胞侵袭能力显著降低($P < 0.01$)。

表 1 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞生长抑制的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 1 Inhibitory effect of Zuojinfang and berberine on growth of SGC7901 cell($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率/%	
		24 h	48 h
空白	-	0.0 ± 2.3	0.0 ± 0.1
左金方	25	6.6 ± 4.7	45.5 ± 1.3 ²⁾
	50	23.9 ± 4.9 ¹⁾	68.9 ± 0.6 ²⁾
	100	35.5 ± 5.1 ¹⁾	72.6 ± 1.5 ²⁾
	200	59.0 ± 3.4 ²⁾	83.6 ± 0.3 ²⁾
	400	67.2 ± 3.9 ²⁾	89.1 ± 1.1 ²⁾
小檗碱	2.5	2.4 ± 6.1	16.9 ± 3.4 ¹⁾
	5.0	5.03 ± 2.4	28.2 ± 1.1 ¹⁾
	10.0	17.8 ± 2.3 ¹⁾	41.5 ± 4.6 ²⁾
	20.0	28.5 ± 3.7 ¹⁾	60.2 ± 2.5 ²⁾
	40.0	45.6 ± 2.9 ²⁾	72.8 ± 4.7 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。



A. 空白组; B. 小檗碱 16.3 mg·L⁻¹ 组; C. 左金方 165 mg·L⁻¹ 组(图 3, 4 同); 1. 起始时的划痕; 2. 划痕后 24 h

图 2 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞划痕的影响(倒置显微镜, × 100)

Fig. 2 Effect of Zuojinfang and berberine on migration of SGC7901 cell(inverted microscope, × 100)

表 2 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞迁移能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 2 Effect of Zuojinfang and berberine on migration of SGC7901 cell($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	0 h 痕距 /nm	24 h 痕距 /nm	24 h 迁移率 /%
空白	-	319.9 ± 6.2	128.4 ± 10.1	61.8 ± 2.3
小檗碱	16.3	329.3 ± 13.1	261.5 ± 7.3 ¹⁾	20.1 ± 0.9
左金方	165	331.7 ± 9.5	268.8 ± 12.2 ¹⁾	19.7 ± 1.5

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

165 mg·L⁻¹ 左金方组与 16.3 mg·L⁻¹ 小檗碱组比较, 侵袭抑制率无明显差异。药效和划痕实验一致, 这同样表明左金方和小檗碱均可以显著抑制 SGC7901 细胞的侵袭能力, 且在左金方中发挥主要作用的可能为小檗碱。见图 3, 表 3。

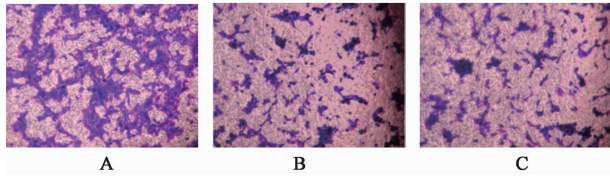


图 3 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞侵袭能力的影响 (transwell, $\times 100$)
Fig. 3 Effect of Zuojinfang and berberine on invasion ability of SGC7901 cell (transwell, $\times 100$)

表 3 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)
Table 3 Effect of Zuojinfang and berberine on invasion ability of SGC7901 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	穿膜细胞 /个	24 h 侵袭抑制率 /%
空白	0	456.8 \pm 11.4	-
小檗碱	16.3	123.2 \pm 3.6 ¹⁾	73.5 \pm 0.8
左金方	165	121.7 \pm 4.5 ¹⁾	73.1 \pm 0.5

3.5 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞 E-cadherin, N-cadherin 蛋白表达的影响 与空白组比较, 165 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左金方组与 16.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱组均能明显上调上皮标志物 E-cadherin, 明显降低间质标志物 N-cadherin ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。165 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 左金方组与 16.3 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱组两组间 E-cadherin, N-cadherin 的表达没有统计学差异。说明左金方及小檗碱均能明显抑制 SGC7901 细胞的 EMT, 且在左金方发挥主要作用的可能为小檗碱。见图 4, 表 4。

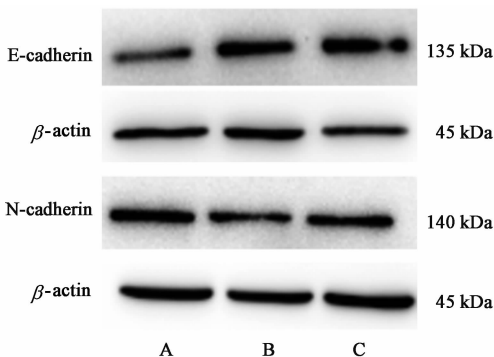


图 4 左金方和小檗碱作用 SGC7901 细胞 24 h 后 E-cadherin, N-cadherin 蛋白表达电泳
Fig. 4 Electrophoresis of Zuojinfang and berberine on expressions of E-cadherin and N-cadherin of SGC7901 cell

4 讨论

癌细胞转移是一个复杂的过程, 侵袭及转移是进展期胃癌的重要特征之一, 也是当前胃癌治疗所

表 4 左金方及小檗碱对 SGC7901 细胞 E-cadherin, N-cadherin 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 4 Effect of Zuojinfang and berberine on expressions of E-cadherin and N-cadherin of SGC7901 cell ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	E-cadherin / β -actin	N-cadherin / β -actin
空白	0	0.57 \pm 0.09	1.18 \pm 0.17
小檗碱	16.3	0.97 \pm 0.11 ²⁾	0.76 \pm 0.14 ²⁾
左金方	165	1.15 \pm 0.26 ²⁾	0.81 \pm 0.32 ¹⁾

面临的一大难题。当肿瘤细胞发生 EMT 时, 细胞间连接断裂, 细胞骨架重排, 并可以获得较强的迁移、侵袭和抗凋亡能力。故抑制 EMT 的发生, 对肿瘤浸润与转移有重要的意义。在上皮细胞转化的过程, 癌细胞获得间质标记, 包括 N-cadherin, 波形蛋白 Vimentin 等^[17]。此外, EMT 过程由转录因子 Snail1 等启动, 其可以调控 E-cadherin, N-cadherin 转录, 导致 E-cadherin, N-cadherin 表达的增加^[18]。左金方对消化系统具有明确而广泛的药理作用, 临床应用广泛。左金方药性偏寒, 主治肝郁化火、胁痛脘痞、胃失和降、呕吐吞酸、嘈杂似饥、脉弦数而口苦等肝火犯胃者^[19]。现代研究已有关于左金方在干预消化道肿瘤方面的研究报道, 本课题组前期的一系列研究亦发现左金方有明显抗肿瘤药效, 对人胃癌细胞活性有明显抑制作用, 小檗碱有部分药效, 而吴茱萸碱等成分亦发挥抗肿瘤作用^[20-23]。但左金方对胃癌转移的研究欠缺, 且意义重大。左金方化学成分众多, 主要包括小檗碱、表小檗碱、药根碱、黄连碱、巴马汀、吴茱萸碱和吴茱萸次碱等成分^[24]。其中小檗碱、吴茱萸碱是其主要的活性成分。本实验结果显示小檗碱是左金方主要的成分。据报道, 小檗碱能通过抑制 MMP 抑制 B16F-10 黑素瘤细胞的侵袭与迁移能力^[25]。此外, 小檗碱能有效抗肝癌细胞侵袭, 且对正常肝细胞无毒性作用^[26]。有研究发现小檗碱可抑制黑色素瘤细胞 EMT 转化^[9, 27], 且有报道小檗碱可抑制肺腺癌 A549 细胞的 EMT^[28]。小檗碱作为左金方最主要的成分在其中起到怎样的药效就成为本研究的重点。本实验结果表明, 左金方和小檗碱同样可以抑制胃癌细胞的生长、侵袭迁移及 EMT。左金方及小檗碱作用于胃癌细胞后, E-cadherin 表达增加, N-cadherin 蛋白表达下调, 证实了左金方及小檗碱在抑制胃癌细胞 EMT 方面的影响。左金方抑制胃癌细胞不只是小檗碱的作用, 其他成分也发挥明显作用, 但抑制侵袭迁移及 EMT 可能主要是小檗碱的作用。

左金方作为中国传统的经典方,其成分多样性,具有多种药效,本研究表明了左金方可以逆转SCG7901细胞EMT,在抑制胃癌转移方面发挥显著药效。但是,左金方在抑制胃癌转移的分子机制亦未明确,需进一步研究阐明。

[参考文献]

[1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.

[2] YANG J, Weinberg R A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis[J]. Dev Cell, 2008, 14(6): 818-829.

[3] 孔维军, 赵艳玲, 山丽梅, 等. 左金丸的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(5): 73-77.

[4] Bhadra K, Kumar G S. Therapeutic potential of nucleic acid-binding isoquinoline alkaloids: binding aspects and implications for drug design[J]. Med Res Rev, 2001, 31(6): 821-862.

[5] 付晓伶, 隋华, 潘树芳, 等. 左金丸通过 ABCB1/P-gp 途径对裸鼠人结肠癌多药耐药的抑制作用[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(2): 47-51.

[6] 胡丽娟. 加味左金丸对大肠癌裸鼠 ERK/MAPK 信号通路的干预作用[J]. 新中医, 2015, 47(2): 230-232.

[7] 钱平, 杨秀伟. 左金方的生物碱类成分及其对肿瘤细胞的细胞毒活性[J]. 中草药, 2014, 45(1): 8-15.

[8] PENG Q X, CAI H B, PENG J L, et al. Extract of Zuojin pill induces apoptosis of SGC-7901 cells via mitochondria-dependent pathway [J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(11): 837-845.

[9] KOU Y, LI L, LI H, et al. Berberine suppressed epithelial mesenchymal transition through cross-talk regulation of PI3K/Akt and RAR α /RAR β in melanoma cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 14(2): 290-296.

[10] 孔维军, 赵艳玲, 山丽梅, 等. 左金丸及类方 HPLC 指纹图谱与生物热活性的“谱-效”关系研究[J]. 化学学报, 2008, 66(22): 2533-2538.

[11] Albin A, Iwamoto Y, Kleinman H K, et al. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasiveness potential of tumour cells [J]. Cancer Res, 1987, 47(12): 3239-3245.

[12] Bartels T, Choi J G, Selkoe D J, et al. α -Synuclein occurs physiologically as a helically folded tetramer that resists aggregation [J]. Nature, 2011, 477(7362): 107-110.

[13] 黄艳萍, 刘德玲, 刘浩, 等. 左金丸不同提取液 HPLC 指纹图谱比较 [J]. 中国药房, 2011, 22(31): 2921-2923.

[14] 韩植芬, 季青, 朱惠蓉, 等. 健脾补肾解毒方醇提物对人大肠癌细胞转移及上皮-间质转化的影响[J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(2): 46-51.

[15] 李召卿, 王宇, 乔宇, 等. STAT3 小分子抑制剂 HJC0152 抑制人头颈部鳞癌细胞株侵袭迁移能力的研究[J]. 中国肿瘤临床, 2017, 44(17): 841-845.

[16] Bozok C V, Acikgoz E, Yigitturk G, et al. Effects of flavopiridol on critical regulation pathways of CD133^{high}/CD44^{high} lung cancer stem cells [J]. Medicine, 2016, 95(43): 5150-5159.

[17] de Herrerros A G, Peiro S, Nassour M, et al. Snail family regulation and epithelial mesenchymal transitions in breast cancer progression, J. Mammary Gland [J]. Biol Neoplasia, 2010, 15(2): 135-147.

[18] Yadav A, Kumar B, Datta J, et al. IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition *via* the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway [J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(12): 1658-1667.

[19] 石雪蓉, 顾健, 熊平, 等. 左金丸生物碱抗急性胃粘膜损伤作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2001, 17(4): 11-12.

[20] 周本杰, 陈蔚文, 王建华, 等. 加味左金丸对溃疡性胃癌的药效学研究 [J]. 中国医药学报, 1999, 14(4): 68-69.

[21] 孙丽群, 胡运莲, 谭大琦, 等. 加味左金丸治疗大鼠慢性萎缩性胃炎癌前病变的病理研究 [J]. 湖北中医杂志, 2005, 27(3): 11-13.

[22] 谭宇蕙, 陈冠林, 郭淑杰, 等. 小檗碱对人胃癌 MGC-803 细胞生长抑制及诱导凋亡的作用 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(1): 40-43.

[23] 谭宇蕙, 陈蔚文, 吴映雅, 等. 小檗碱、吴茱萸碱和靛玉红对人胃癌细胞的药理作用比较 [J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(4): 472-476.

[24] 丁世兰, 崔元璐, 张叶, 等. 切换波长 HPLC 同时测定左金丸乙醇提取物中 7 种生物碱的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(15): 66-70.

[25] Hamsa T P, Kuttan G. Berberine inhibits pulmonary metastasis through down-regulation of MMP in metastatic B16F-10 melanoma cells [J]. Phytother Res, 2012, 26(4): 568-578.

[26] LIU B, WANG G, YANG J, et al. Berberine inhibits human hepatoma cell invasion without cytotoxicity in healthy hepatocytes [J]. PLoS One, 2011, 6(6): 214-216.

[27] Kim H S, Kim M J, Kim E J, et al. Berberine induced AMPK activation inhibits the metastatic potential of melanoma cells via reduction of ERK activity and COX-2 protein expression [J]. Biochem Pharmacol, 2012, 83(3): 385-394.

[28] 辛灵艳, 范理宏. 黄连素对肺腺癌 A549 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 [J]. 现代肿瘤医学, 2014, 22(5): 998-1001.

[责任编辑 张丰丰]