

· 中医药对胃癌的实验研究专题 ·

[编者按] 癌症是全世界最致命的疾病之一,胃癌则是当前恶性肿瘤中最常见的消化系统肿瘤之一,其发病率和死亡率居高不下。胃癌死亡患者多为进展期,失去根治性手术治疗机会,非手术治疗方法预后亦不佳。中医学是中国传统医学,其主要特点是整体观念和辨证论治。中医将恶性肿瘤总称为癌病,胃癌即属于中国医学的“反胃”“噎膈”“胃脘痛”“积聚”等病证范畴。中药在我国有着数千年的历史,各种中医药典籍十分丰富,中药具有作用时间久、多靶点、多途径且毒副作用低等优点,对于提高肿瘤患者的治疗成功率、改善肿瘤患者的生存质量以及延长生命方面具有显著效果。中医药作为抗肿瘤药物研究的热点,许多研究表明中医药在胃癌的治疗过程中有着独特的优势,它注重辨病和辨证相结合,在胃癌的综合治疗中发挥重要作用,特别是在减轻放化疗的毒副作用、防治胃癌的复发和转移等方面显示了广阔的应用前景。目前临床上也在放化疗的同时辅以中药或中成药,在抗肿瘤治疗的同时也能改善患者的生活质量,减少患者放化疗的不适反应。本实验室的成员通过研究不同种类中医药对胃癌的作用机制,发现中医药可以影响胃癌细胞的侵袭与迁移,能在胃癌治疗中发挥重要作用。

华蟾素通过调控基质金属蛋白酶抑制人胃腺癌 细胞 MGC-803 侵袭与迁移

倪腾洋¹, 李丹¹, 王海波¹, 陶丽¹, 金凤¹, 冯俊¹, 钱亚云¹,
陶立德², 砂川正隆³, 刘延庆^{1*}

1. 扬州大学 医药研究所, 扬州 225009;
2. 扬州大学 附属医院, 扬州市第一人民医院, 扬州 225000;
3. 昭和大学 医学部, 东京 142)

[摘要] 目的:探讨华蟾素对人胃腺癌 MGC-803 细胞的侵袭与迁移的影响及其分子机制。方法:噻唑蓝(MTT)比色法检测华蟾素(10,20,40,80,160,320 mg·L⁻¹)对人胃腺癌 MGC-803 细胞增殖的抑制影响;transwell 小室法检测华蟾素对 MGC-803 细胞侵袭与迁移能力的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测经华蟾素作用后的 MGC-803 细胞中基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2), 基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)和基质金属蛋白酶抑制因子-1(tissue inhibitors of metalloproteinases-1, TIMP-1), 基质金属蛋白酶抑制因子-2(tissue inhibitors of metalloproteinases-2, TIMP-2)的蛋白表达水平;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测经华蟾素处理后的 MGC-803 细胞中 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 的 mRNA 表达情况。结果:①MTT 比色法结果显示,与空白组比较,华蟾素(10,20,40,80,160,320 mg·L⁻¹)对胃腺癌 MGC-803 细胞的增殖具有显著抑制作用($P < 0.01$),并且华蟾素对 MGC-803 细胞的抑制作用呈浓度和时间依赖。②transwell 实验结果显示,与空白组比较,华蟾素(10,20,40 mg·L⁻¹)对胃腺癌 MGC-803 细胞的侵袭与迁移能力具有不同程度的抑制作用($P < 0.05$)③Real-time PCR 和 Western blot 实验结果显示,与空白组比较,华蟾素(10,20,40 mg·L⁻¹)能够下调 MMP-2, MMP-9 蛋白和 mRNA 的表达,上调 TIMP-1, TIMP-2 蛋白和 mRNA 的表达。结论:华蟾素能明显抑制胃腺癌 MGC-803 细胞的侵袭与迁移,其机制可能与上调 TIMP-1, TIMP-2 的转录水平,进而下调 MMP-2, MMP-9 蛋白水平有关。

[关键词] 华蟾素; 胃癌; 侵袭; 迁移; 基质金属蛋白酶; 金属基质蛋白酶抑制因子

[中图分类号] R22;R242;R273;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2018)19-0106-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181920

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180712.1050.015.html>

[网络出版时间] 2018-07-16 9:37

[收稿日期] 20180209(006)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81773944);江苏省自然科学基金项目(BK20141280)

[第一作者] 倪腾洋, 硕士, 中西医结合执业医师, 从事中西医结合临床肿瘤学研究, E-mail: yzunitengyang@sina.com

[通信作者] *刘延庆, 教授, 主任中医师, 博士生导师, 从事中西医结合临床肿瘤学研究, E-mail: liuyq@yzu.edu.cn

Effect of Cinobufacini on Invasion and Migration of Human Gastric Cancer MGC-803 Cells by Regulating Matrix Metalloproteinases

NI Teng-yang¹, LI Dan¹, WANG Hai-bo¹, TAO Li¹, JIN Feng¹, FENG Jun¹,
QIAN Ya-yun¹, TAO Li-de², MASATAKA Sunagawa³, LIU Yan-qing^{1*}

(1. Medical & Pharmaceutical Institute of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou First People's Hospital, Yangzhou 225000, China;

3. School of Medicine, Showa University, Tokyo 142, Japan)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of cinobufacini on the invasion and migration of human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells and its molecular mechanisms. **Method:** The inhibitory effect of cinobufacini on the proliferation of human gastric cancer MGC-803 cells was detected by methye thiazolye telrazlium (MTT) assay. The effect of cinobufacini on the invasion and migration of MGC-803 cells was determined by transwell assay. The protein expressions of matrix metalloproteinases-2 (MMP-2), matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and tissue inhibitors of metalloproteinases-2 (TIMP-2) were examined by Western blot. After treatment with different concentrations of cinobufacini, the mRNA expressions of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in MGC-803 cells were detected by Real-time PCR. **Result:** ① MTT assay showed that cinobufacini (10, 20, 40, 80, 160, 320 mg · L⁻¹) significantly inhibited the proliferation of gastric cancer MGC-803 cells ($P < 0.01$) in a dose and time-dependent manner. ② Transwell assay results showed that cinobufacini (10, 20, 40 mg · L⁻¹) inhibited the invasion and migration of gastric adenocarcinoma MGC-803 cells to varying degrees ($P < 0.05$). ③ Real-time PCR and Western blot results showed that cinobufacini (10, 20, 40 mg · L⁻¹) could down-regulate the protein and mRNA expressions of MMP-2, MMP-9 and up-regulate protein and mRNA expressions of TIMP-1, TIMP-2. **Conclusion:** Cinobufacini can obviously inhibit the invasion and migration of gastric cancer MGC-803 cells. The underlying mechanism may be related to the up-regulation of the transcription of TIMP-1 and TIMP-2 and the down-regulation of the protein levels of MMP-2 and MMP-9.

[Key words] cinobufacini; gastric cancer; invasion; migration; matrix metalloproteinase; matrix metalloproteinase inhibitor

胃癌是第 5 大常见肿瘤,并且在各种恶性肿瘤相关死亡率中居第 3 位。对于人类来说,胃癌与人们的生活习惯,遗传和环境等因素密切相关^[1]。目前,胃癌患者的存活率很低,5 年存活率仅有 24%,当患者被确诊胃癌时往往处于胃癌晚期,原发肿瘤已经发生转移^[2]。基于胃癌现状,防治胃癌的发生发展,侵袭转移以及开发抗肿瘤药物,延长胃癌患者生存期尤为重要。以基质金属蛋白酶(MMPs)的天然抑制剂——基质金属蛋白酶抑制剂(TIMPs)为研究核心的抗肿瘤机制研究和药物研究日益受到关注^[3]。前期研究已经表明,当 MMPs 和 TIMPs 之间的平衡被打破时,会导致细胞外基质的降解并诱发肿瘤细胞侵袭与转移^[4]。最新的研究结果显示,利用间充质干细胞疗法能够维持 MMPs 与 TIMPs 表达

水平之间的平衡,从而避免缺血性脑卒中引发的后遗症^[5],而在胃肠道肿瘤研究领域的最新研究结果表明,提高 MMPs 的活性会使胃癌细胞对自然杀伤细胞的敏感性降低^[6],提示 MMPs 能够影响抗肿瘤免疫功能。最新研制的一种基于 TIMP-2 的融合蛋白能以 MMP-14 为靶点发挥抗肿瘤活性^[7]。目前,许多中药提取物与中药复方已被研究证实能够影响 MMPs 与 TIMPs 的表达,从而起到抗肿瘤作用^[8-9]。中国传统中药干蟾皮提取物-华蟾素在抗肿瘤药物研究领域已发现对多种实体瘤及白血病等具有抗肿瘤作用^[10-11],然而华蟾素能否通过调控 MMPs 与 TIMPs 起到抑制胃癌的侵袭转移,国内外未见报道。本实验深入研究华蟾素通过调控 MMPs 和 TIMPs 抑制人胃癌 MGC-803 细胞侵袭、转移的作用机制,

为发现华蟾素治疗胃癌术后预防复发和转移的新机制提供依据,为开发华蟾素的抗肿瘤新方向奠定基础。

1 材料

1.1 药物与细胞株 华蟾素胶囊(陕西东泰制药有限公司,国药准字 z20050846),使用前用二甲基亚砜(DMSO) $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 助溶,并用无血清培养基配制成 $1.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,用 $0.22 \mu\text{m}$ 无菌微孔滤膜过滤,实验给药时用 RPMI 1640 培养基稀释至所需工作浓度,所有工作浓度的含药培养基中 DMSO 最大浓度均不超过 0.1%。人胃腺癌 MGC-803 细胞株,购自中国科学院上海细胞库,编号 TCHu 84。

1.2 试剂 RPMI 1640 细胞培养基,胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH30809.01, SH30042.01);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 10437028);人工重构基底膜胶,transwell 小室(美国 Corning 公司,批号分别为 356234, 3450);噻唑蓝(MTT)粉剂(美国 Sigma 公司,批号 M2003);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(增强型,中国碧云天公司,批号 P0010);MMP-2, MMP-9, TIMP-2, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 40994, 13667, 5738, 49709);TIMP-1 抗体(美国 Millipore 公司,批号 AB770);HRP 标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(杭州华安生物技术有限公司,批号 HA1001);Prime Script RT Master Mix, SYBR PremixEx TaqTM II(日本 Takara 公司,批号 RR036A)。

1.3 仪器 721BR08904 型蛋白电泳槽, 221BR57108 型半干转膜仪, Universal Hood II 型 SDS-PAGE 凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司);Enspire 型全自动酶标板分析仪(美国 Perkin Elmer 公司);8000 WJ 型 CO₂ 培养箱, CL30R 型高速台式冷冻离心机(美国 Thermo Fisher 公司);IX71 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);Lightcycler96 型荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人胃腺癌 MGC-803 细胞培养在含 10% 胎牛血清, 1% 青-链霉素混合液, pH 7.4 的 RPMI 1640 培养液中,于 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱内培养。隔天换液,以 0.25% 胰酶消化传代, 2~3 d 传代 1 次。

2.2 MTT 比色法检测华蟾素对细胞增殖能力的影响 取对数生长期的人胃癌 MGC-803 细胞消化,制成单细胞悬液(4×10^4 个/mL),均匀接种于 96 孔培

养板中,每孔 100 μL 。等待细胞贴壁后(24 h),每孔加入 100 μL 含华蟾素培养液(5, 10, 20, 40, 80, 160, 320 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)或 RPMI 1640 培养液(空白组),并设野生型细胞组。继续孵育培养 24, 48, 72 h 后,加入 5% MTT 20 μL 反应 4 h,弃上清,加 DMSO 150 μL /孔,震荡 10 min 使结晶物充分溶解,酶标仪检测波长 490 nm 测定每孔吸光度 A , 细胞增殖率 = $A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}}$ 。

2.3 细胞侵袭检测 transwell 小室膜底部用 matrigel 稀释胶覆盖,放于细胞培养箱 37 °C, 30 min 后凝固待用。将细胞培养在 6 孔板中,分别设立空白组、华蟾素(质量浓度分别为 5, 10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组,培养 24 h 后,消化各组细胞,用 RPMI 1640 空白培养液重悬成单细胞悬液,调整细胞密度至 5×10^5 个/mL, transwell 上室各组加入单细胞悬液 200 μL , 下室加入含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 500 μL 。各组细胞均设 5 个复孔。继续培养 24 h,取出 transwell 小室并用提前预冷的磷酸盐缓冲液(PBS)轻轻冲洗 3 遍,用棉签擦去上室膜表面的细胞。将小室置于甲醇溶液中固定 20 min,室温下 0.1% 结晶紫染色 20 min, PBS 清洗 3 遍使结晶紫完全洗净,于高倍镜下计数穿膜细胞数量,随机选取四周和中间共 5 个视野,计算平均值。

2.4 细胞迁移检测 transwell 小室膜底部不用 matrigel 稀释胶凝固覆盖,其余步骤同 2.3 项侵袭实验。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 蛋白 接种人胃腺癌 MGC-803 细胞于 6 孔板中,在细胞培养箱 37 °C 5% CO₂ 孵育至细胞贴壁后(24 h)。分别设立空白组,华蟾素(质量浓度分别为 5, 10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组,继续孵育 24 h 后提取每组细胞总蛋白,用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白浓度测定后进行聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳分离目标蛋白,电泳条件:60V 恒压 90 min, 120 V 恒压 15 min 后,将胶上分离的蛋白完全转移到 PVDF 膜上,转膜条件:300 mA 恒流 90 min。TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。5% 脱脂奶粉 TBST 溶液室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。将膜放置于一抗(1:1 000)中孵育 4 °C 过夜, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:2 000)室温下继续孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,采用凝胶成像分析系统检测 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 蛋白条带灰度值。

2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time

PCR) 检测 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 mRNA 表达 细胞分组及培养同 2.5 项, 提取每组细胞总 RNA, 引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 见表 1。PCR 反应条件: 预变性 95 °C 6 min; 解链 95 °C 10 s, 65 °C 60 s, 97 °C 1 s, 扩增 95 °C 10 s, 60 °C 10 s, 72 °C 10 s, 45 个循环, 反应结束后以 β -actin 为内参, MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 mRNA 表达量以标准化 C_t 进行计算, 采用相对定量方法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 对结果进行比较分析。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
MMP-2	上游 5'-TACAGGATCATTGGCTACACACC-3'	90
	下游 5'-GGTCACATCGCTCCAGACT-3'	
MMP-9	上游 5'-TGTACCCTATGGTTACACTCG-3'	97
	下游 5'-GGCAGGGACAGTTGCTTCT-3'	
TIMP-1	上游 5'-CTTCTGCAATTCCGACCTCGT-3'	79
	下游 5'-ACGCTGGTATAAGGTGGTCTG-3'	
TIMP-2	上游 5'-AAGCGGTCAGTGAGAAGGAAG-3'	136
	下游 5'-GGGGCCGTGTAGATAAACTCTAT-3'	
β -actin	上游 5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'	250
	下游 5'-CTCCTTAATGTACCGCAGCAT-3'	

2.7 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件处理, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较若方差齐则采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验; 若方差不齐则进行方差不齐的校正 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MGC-803 细胞增殖的影响 与空白组比较, 经 10 ~ 320 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 华蟾素分别处理 24, 48, 72 h 后, MGC-803 细胞增殖率显著下降 ($P < 0.01$), 呈时间和浓度依赖性。为排除华蟾素对 MGC-803 细胞本身毒性作用的影响, 后续实验选用较低质量浓度 (5, 10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 华蟾素作用 24 h 进行研究, 见表 2。

3.2 对 MGC-803 细胞侵袭和迁移能力的影响 与空白组比较, 经华蟾素 (5, 10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 24 h 后, MGC-803 细胞的穿膜数明显减少。其中在侵袭实验中, 华蟾素 (10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组胃癌细胞穿膜数显著减少 ($P < 0.01$); 迁移实验中, 华蟾素 (5, 10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组胃癌细胞穿膜数明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见表 3。

表 2 华蟾素对人胃腺癌 MGC-803 细胞增殖率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Table 2 Effect of cinobufacini on proliferation of human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白	-	100.48 \pm 3.07	100.33 \pm 0.29	100.67 \pm 3.59
华蟾素	10	64.11 \pm 1.87 ²⁾	48.59 \pm 2.55 ²⁾	40.05 \pm 4.11 ²⁾
	20	53.76 \pm 2.93 ²⁾	41.41 \pm 2.12 ²⁾	32.99 \pm 3.69 ²⁾
	40	46.99 \pm 2.07 ²⁾	32.72 \pm 2.97 ²⁾	22.89 \pm 4.38 ²⁾
	80	39.12 \pm 3.56 ²⁾	28.94 \pm 4.13 ²⁾	22.88 \pm 4.00 ²⁾
	160	36.95 \pm 3.01 ²⁾	25.56 \pm 2.87 ²⁾	17.00 \pm 2.29 ²⁾
	320	34.96 \pm 2.73 ²⁾	26.19 \pm 2.96 ²⁾	19.47 \pm 2.77 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

表 3 华蟾素对人胃腺癌 MGC-803 细胞侵袭与迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of cinobufacini on invasion and migration of human gastric adenocarcinoma MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

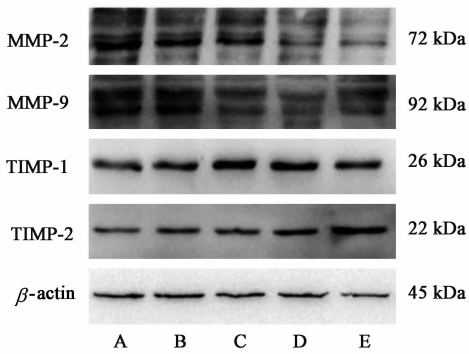
组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	侵袭数目	迁移数目
空白	-	214.50 \pm 13.03	396.00 \pm 47.51
华蟾素	5	221.25 \pm 16.62	312.00 \pm 17.58 ¹⁾
	10	143.25 \pm 5.06 ²⁾	220.67 \pm 10.07 ²⁾
	20	133.50 \pm 9.47 ²⁾	180.00 \pm 7.21 ²⁾
	40	40.00 \pm 2.94 ²⁾	181.33 \pm 11.59 ²⁾

3.3 对 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 蛋白表达的影响 与空白组比较, 随着华蟾素质量浓度的增加, MMP-2, MMP-9 蛋白表达水平平均下调, TIMP-1, TIMP-2 蛋白表达均上调。华蟾素 (10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 MMP-2 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.01$), 华蟾素 (10, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 MMP-9 蛋白表达明显下调 ($P < 0.05$); 华蟾素 (20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 TIMP-1, TIMP-2 蛋白表达水平明显上调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1, 表 4。

3.4 对 MMP-2, MMP-9, TIMP-1 和 TIMP-2 mRNA 表达水平的影响 与空白组比较, 华蟾素 (5, 10, 20, 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理 24 h 的人胃癌 MGC-803 细胞 MMP-2, MMP-9 mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$); TIMP-1, TIMP-2 mRNA 表达明显增高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 随华蟾素质量浓度增高, TIMP-1 mRNA 表达虽高于空白组, 但呈递减趋势。见表 5。

4 讨论

细胞外基质在不同的细胞和组织中起着非常重要的作用, 它能够支持并连接组织结构、调节组织的生长和细胞的生理活动^[12]。MMPs 是细胞外基质



A. 空白组; B~E. 华蟾素 (5, 10, 20, 40 mg·L⁻¹) 组

图 1 胃癌 MGC-803 细胞 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of protein expressions of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 in MGC-803 cells

蛋白酶体的重要组成成分,其能够极大地影响细胞外基质的重塑和降解^[13]。MMPs 的活性在前体酶原的转录和激活水平上被精确调控^[14]。其中尤以 MMP-2, MMP-9 与肿瘤细胞的侵袭转移关系最为密切,因此受到学者的广泛关注。中国传统中药华蟾素是从中华大蟾蜍的阴干蟾皮中提取的中成药制剂,其主要成分包含蟾毒灵、华蟾素毒基、脂蟾毒毒基等^[15-16],目前被广泛用于治疗心律失常、炎症、疼痛和肿瘤等。

TIMPs 是参与控制组织中局部活性的 MMPs 的特异性抑制剂。目前已经证实,细胞外基质的平衡在很大程度上取决于 MMPs 和 TIMPs 之间密切的相互作用。最近,临床研究表明,TIMP-1 的异常表达与胃癌等一系列肿瘤的预后不良有关^[17]。调节

表 4 华蟾素对 MGC-803 细胞 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of cinobufacini on expression levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 protein in MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	MMP-2/β-actin	MMP-9/β-actin	TIMP-1/β-actin	TIMP-2/β-actin
空白	-	1.23 ± 0.09	0.58 ± 0.06	0.78 ± 0.06	0.82 ± 0.05
华蟾素	5	0.91 ± 0.05	0.47 ± 0.06	1.34 ± 0.01 ²⁾	0.87 ± 0.02
	10	0.80 ± 0.05 ²⁾	0.37 ± 0.05	1.20 ± 0.07 ²⁾	1.05 ± 0.11
	20	0.68 ± 0.05 ²⁾	0.21 ± 0.02 ¹⁾	1.05 ± 0.11 ¹⁾	1.20 ± 0.07 ¹⁾
	40	0.45 ± 0.06 ²⁾	0.21 ± 0.01 ¹⁾	0.88 ± 0.02	1.34 ± 0.01 ²⁾

表 5 华蟾素对 MGC-803 细胞 MMP-2, MMP-9, TIMP-1, TIMP-2 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 5 Effect of cinobufacini on expression levels of MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 mRNA in MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	MMP-2/β-actin	MMP-9/β-actin	TIMP-1/β-actin	TIMP-2/β-actin
空白	-	1.00	1.00	1.00	1.00
华蟾素	5	0.91 ± 0.06	0.75 ± 0.09	1.55 ± 0.40	1.12 ± 0.22
	10	0.73 ± 0.02 ²⁾	0.48 ± 0.05 ²⁾	1.31 ± 0.01 ²⁾	1.21 ± 0.06 ¹⁾
	20	0.69 ± 0.02 ²⁾	0.39 ± 0.05 ²⁾	1.27 ± 0.02 ²⁾	1.27 ± 0.02 ²⁾
	40	0.63 ± 0.06 ¹⁾	0.38 ± 0.07 ²⁾	1.07 ± 0.01 ¹⁾	1.31 ± 0.00 ²⁾

MMP-9 活性的一个重要分子就是 TIMP-1,而调节 MMP-2 活性的重要分子是 TIMP-2, TIMP-1, TIMP-2, 能够分别结合 MMP-9, MMP-2, 从而抑制后两者的功能^[18-19]。

本实验中,经华蟾素处理的胃腺癌细胞 MGC-803 的 MMP-2, MMP-9 蛋白表达水平均下调,同时 MMP-2, MMP-9 的天然抑制因子 TIMP-1, TIMP-2 蛋白表达水平均上调,因此华蟾素可能是通过下调 MMP-2, MMP-9 蛋白表达来抑制胃癌细胞的侵袭和迁移能力,其机制很可能是通过上调 TIMP-1, TIMP-2 表达水平实现的。进一步研究表明,经华蟾

素处理的胃腺癌细胞 MGC-803 的 TIMP-1, TIMP-2 mRNA 均上调,说明华蟾素能够提高 TIMP-1, TIMP-2 的转录水平,进而提高两者的蛋白表达水平。值得关注的是,经各浓度华蟾素处理 MGC-803 的 TIMP-1 mRNA 表达水平虽然均高于空白组表达水平,但随着华蟾素浓度的提高, TIMP-1 mRNA 表达水平呈下降趋势,且 TIMP-1 蛋白表达与 mRNA 趋势一致,其中的机制有待进一步研究。

综上,本实验揭示了华蟾素抑制胃癌侵袭与转移的新机制,即华蟾素能够通过上调 TIMP-1, TIMP-2 的转录水平,进而上调两者的蛋白表达,

TIMP-1, TIMP-2 蛋白水平上调,又可抑制 MMP-2, MMP-9 蛋白表达,从而起到抑制胃癌侵袭转移的作用。但是华蟾素如何上调 TIMP-1, TIMP-2 mRNA 水平,并且其中有何信号途径参与,还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Fock K M. Review article: the epidemiology and prevention of gastric cancer [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2014, 40(3):250-260.

[2] D'Ugo D, Persiani R, Zoccali M, et al. Surgical issues after neoadjuvant treatment for gastric cancer [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2010, 14(4):315-319.

[3] 王海波, 顾昊, 赵雪煜, 等. 南蛇藤提取物通过调控基质金属蛋白酶组及其抑制因子抑制人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭转移的研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(8):1345-1350.

[4] Overall C M, López-Otín C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(9):657-672.

[5] Chelluboina B, Nalamolu K R, Mendez G G, et al. Mesenchymal stem cell treatment prevents post-stroke dysregulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(4):1360-1369.

[6] Shiraishi K, Mimura K, Kua L F, et al. Inhibition of MMP activity can restore NKG2D ligand expression in gastric cancer, leading to improved NK cell susceptibility [J]. *J Gastroenterol*, 2016, 51(12):1101-1111.

[7] XU J, LIU X J, LI L, et al. An engineered TIMP2-based and enediyne-integrated fusion protein for targeting MMP-14 shows potent antitumor efficacy [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28):26322-26334.

[8] 李启玉, 李芳, 徐丽, 等. 益气滋阴、活血通络方干预动脉粥样硬化相关炎症因子的表达 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(2):156-159.

[9] 李弯, 梁敏, 边俊梅, 等. 射干麻黄汤治疗儿童哮喘发作期临床疗效及对血清细胞因子、骨桥蛋白及 TIMP-1 水平的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017,

23(20):180-184.

[10] 任立新, 王亚红, 哈敏文. 华蟾素治疗晚期胃癌的临床疗效研究 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(12):1474-1475.

[11] 欧阳华强, 谢广茹, 潘战宇, 等. 华蟾素对人胰腺癌 CFPAC-1 移植瘤裸鼠血清 IL-6, IL-8 及 sVCAM-1 表达的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(19):2731-2733.

[12] Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry [J]. *Circ Res*, 2003, 92(8):827-839.

[13] LIU X, SU P, MENG S, et al. Role of matrix metalloproteinase-2/9 (MMP2/9) in lead-induced changes in an *in vitro* blood-brain barrier model [J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(11):1351-1360.

[14] Niño M E, Serrano S E, Niño D C, et al. TIMP1 and MMP9 are predictors of mortality in septic patients in the emergency department and intensive care unit unlike MMP9/TIMP1 ratio: multivariate model [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2):e0171191.

[15] 苏永华, 黄雪强, 张大志, 等. 华蟾素注射液中毒毒内酯类成分含量检测 [J]. *中成药*, 2003, 25(1):24-27.

[16] 高波, 魏晓露, 韩玲玉, 等. 华蟾素注射液中酯毒配基的分离及体内外抗肿瘤活性筛选 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(16):78-84.

[17] WANG Y Y, LI L, ZHAO Z S, et al. Clinical utility of measuring expression levels of KAP1, TIMP1 and STC2 in peripheral blood of patients with gastric cancer [J]. *World J Surg Oncol*, 2013, 11(1):81.

[18] Ethell I M, Ethell D W. Matrix metalloproteinases in brain development and remodeling: synaptic functions and targets [J]. *J Neurosci Res*, 2007, 85(13):2813-2823.

[19] Vafadari B, Salamian A, Kaczmarek L. MMP-9 in translation: from molecule to brain physiology, pathology, and therapy [J]. *J Neurochem*, 2016, 139(S2):91-114.

[责任编辑 张丰丰]