

金龙胶囊对胃癌细胞 MGC-803 和 BGC-823 侵袭转移能力的影响

李丹¹, 金凤¹, 陶丽¹, 倪腾洋¹, 王海波¹, 冯俊¹, 朱光¹, 钱亚云¹,
丁岩冰², Masataka Sunagawa³, 刘延庆^{1,2*}

(1. 扬州大学医学院 中西医结合临床医学系肿瘤研究所, 国家中医药管理局胃癌毒邪论治
重点研究室, 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:探讨金龙胶囊对人胃癌 MGC-803, BGC-823 细胞侵袭和迁移能力的影响并对其具体机制进行探讨。方法:体外培养胃癌 MGC-803, BGC-823 细胞,分为金龙胶囊组(0.1, 0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹),空白组和 5-氟尿嘧啶(5-FU)组,采用噻唑蓝(MTT)比色法分别检测金龙胶囊对 MGC-803, BGC-823 细胞增殖的抑制作用,计算半数抑制率(IC₅₀);采用细胞侵袭(transwell)小室法和划痕实验检测金龙胶囊处理 MGC-803 和 BGC-823 细胞 24 h 后,细胞侵袭和迁移能力发生改变;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测金龙胶囊处理 MGC-803, BGC-823 细胞 24 h 后 E-钙黏素(E-cadherin),基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达情况。结果:金龙胶囊能明显抑制 MGC-803, BGC-823 细胞的增殖,呈一定的浓度及时间依赖性;与空白组比较,金龙胶囊能明显减少 MGC-803, BGC-823 细胞的穿膜细胞数目,可明显影响 2 种胃癌细胞的侵袭与迁移能力,并呈明显浓度依赖性($P < 0.05$);金龙胶囊组的划痕距离较空白组明显降低,影响 MGC-803, BGC-823 细胞迁移,并呈浓度依赖性($P < 0.05$);与空白组比较,金龙胶囊组能够提高 MGC-803 和 BGC-823 细胞中 E-cadherin 蛋白表达,降低 MMP-2, MMP-9 蛋白表达水平,且呈一定的量效关系($P < 0.05$)。结论:金龙胶囊能够抑制人胃癌 MGC-803, BGC-823 细胞的侵袭和迁移能力,其作用机制可能与上调 E-cadherin 表达,抑制 MMP-2, MMP-9 表达水平有关。本研究证实了金龙胶囊对胃癌 MGC-803, BGC-823 细胞抗侵袭转移的部分机制。

[关键词] 金龙胶囊; 侵袭; 迁移; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-9; 上皮细胞间质转化态

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R273; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)19-0117-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181922

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180712.1051.018.html>

[网络出版时间] 2018-07-16 10:41

Effect of Jinlong Capsule on Invasion and Migration of Human Gastric Carcinoma MGC-803 and BGC-823 Cells

LI Dan¹, JIN Feng¹, TAO Li¹, NI Teng-yang¹, WANG Hai-bo¹, FENG Jun¹, ZHU Guang¹,
QIAN Ya-yun¹, DING Yan-bing², Masataka Sunagawa³, LIU Yan-qing^{1,2*}

(1. Cancer Research Institute, Medical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Yangzhou University, Key Laboratory of Syndrome Differentiation and Treatment of Gastric Cancer of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Medical & Pharmaceutical Institute of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;
2. Yangzhou First People's Hospital, Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225000, China;
3. School of Medicine, Showa University, Tokyo 142, Japan)

[收稿日期] 20171228(005)

[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] 李丹, 硕士, 执业医师, 从事中西医结合临床肿瘤学研究, E-mail: lidanyu@163.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

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Jinlong capsule (JLC) on the invasion and migration of human gastric cancer MGC-803 and BGC-823 cells and its specific mechanism. **Method:** Gastric cancer MGC-803 and BGC-823 cells were cultured *in vitro* and divided into JLC group (with concentrations of 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 g·L⁻¹), negative control group and 5-fluorouracil (5FU) as positive control group. Methylthiazolyl tetrazolium (MTT) was used to detect the inhibitory effect of Jinlong capsule on the proliferation inhibition rate of MGC-803 and BGC-823 cells, in order to calculate the 50% inhibitory concentration (IC₅₀); transwell and wound healing assay were used to detect the invasion and migration abilities of BGC-823 cell and MGC-803 cells after treatment with JLC for 24 h; after 24 h, the migration of MGC-803 and BGC-823 cells changed; Western blot method was used to detect the expression levels of E-cadherin, matrix metalloproteinase (MMP) -2 and MMP-9 after Jinlong capsule treatment for 24 h. **Result:** JLC could obviously inhibit the proliferation of MGC-803 and BGC-823 cells in a time-dependent manner; compared with the control group, JLC could significantly affect the invasion and migration abilities of the two kinds of gastric cancer cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$); the scratch distance of Jinlong capsule group was significantly lower than that in control group in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$); compared with control group, JLC group could increase the expression of E-cadherin and reduce the expression levels of MMP-2, MMP-9 in MGC-803 and BGC-823 cells, with a dose-response relationship ($P < 0.05$). **Conclusion:** JLC can inhibit the invasion and migration of human gastric cancer MGC-803 and BGC-823 cells, and its mechanism may be related to the up-regulation of the expression of E-cadherin and the inhibition of the expression levels of MMP-2, MMP-9. This study has confirmed part of mechanisms of JLC on the invasion and metastasis of gastric cancer MGC-803 and BGC-823 cells.

[Key words] Jinlong capsule; invasion; migration; matrix metalloproteinase-2 (MMP-2); matrix metalloproteinase-9 (MMP-9); epithelial-mesenchymal transition (EMT)

胃癌是常见的消化系统肿瘤^[1],其临床发病率位于世界恶性肿瘤发病率的第 5 位,死亡率居于第 3 位^[2]。我国每年的新发病例约 40 万例,占世界总发病例数的 42%,是当前危害我国人民身体健康的重大疾病^[3-4]。随着科学技术的进步,手术和化疗技术手段不断改善,但胃癌的死亡率仍然居高不下,且 5 年生存率低于 30%^[5],而肿瘤细胞的转移是影响胃癌治疗成功的主要障碍因素之一。恶性肿瘤的主要生物学特征是侵袭和转移,主要是原发部位的肿瘤细胞脱离原发病灶,侵袭穿越基底膜并向周围间质呈浸润性生长,到达继发部位后不断增殖形成新的肿瘤细胞转移灶。因此,抑制胃癌的转移过程是胃癌治疗的一个重要环节。上皮细胞间质转化态 (EMT),是指上皮细胞向间充质细胞进行可逆性分化的过程^[6]。EMT 被看成导致肿瘤进展的病理过程,导致细胞骨架重组、细胞与细胞间的黏附损失和异常心尖基底极性,从而提高肿瘤细胞的侵袭和迁移能力。此外在 EMT 的过程中,细胞表型发生改变而丧失上皮表型,如 E-钙黏素 (E-cadherin),而获得间质表型,如波形蛋白 (Vimentin), N-钙黏素 (N-cadherin)。其中 E-cadherin 表达的丢失已经被认为是 EMT 最显著的特征^[7]。

鲜中药制剂金龙胶囊系国家正式批准的中成药,它由鲜守宫、鲜金钱白花蛇和鲜蕲蛇组成,鲜守宫味咸性寒,为君药,入血分透筋达络、破瘀解毒散结、通经活络而止痛,且能补肺肾益精血。鲜金钱白花蛇味咸性温,为臣药,具有搜风通络、破瘀散结、降痰解毒、活血止痛的作用,辅助君药可加强破瘀散结、解郁通络,同时能协同蕲蛇共同引药入肝经。鲜蕲蛇味甘咸性温,入肝经,为佐使药,其性善走窜,内走脏腑,外切皮毛,具有搜风定痛、通经达络的作用,既可加强君药滋阴破瘀散结功效,又可加强臣药的通络解郁散结力量。全方配伍精当、药性平和,用二蛇之温制守宫之寒而不滞,用守宫之寒制二蛇之温而不燥,用于治疗多种肿瘤实证。金龙胶囊在其鲜活的状态下经现代低温冷冻生化分离提取工艺制备,提取了所用原料的大部分有效成分,保持了各有效成分的最大生物活性和最佳天然配比,具有多成分、小分子、高含量、高活性等特点^[8]。鲍世铨等^[9]研究发现金龙胶囊中含有生理活性多肽,分子量为 10 以下者占 90% 以上^[10]。多项研究表明,金龙胶囊能抑制多种恶性肿瘤细胞生长并诱导其凋亡,如胰腺癌、肝癌、肺癌^[11-13]等,显示了金龙胶囊抗肿瘤广阔前景,但其对胃癌细胞侵袭和迁移能力的影

响未见报道。本研究拟从金龙胶囊对人胃癌细胞 MGC-803 和 BGC-823 在侵袭和迁移能力方面的影响对其机制进行探讨。

1 材料

1.1 药物 金龙胶囊(北京建生药业有限公司,国药准字 Z10980041,批号 170411),浅黄色粉剂,滤膜过滤除菌后备用,使用时以含 2% 血清的 RPMI 1640 培养基稀释至所需浓度。5-氟尿嘧啶(5-FU)注射液(上海旭东海普药业有限公司,国药准字 H31020593,批号 170724)。

1.2 细胞株 人胃癌细胞株 MGC-803, BGC-823 购自中国科学院上海细胞库,编号分别为 TCHu 84, TCHu 11。细胞株用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基,置于 37 °C 5% CO₂ 的环境中培养,取对数生长期的细胞进行后续的细胞实验。

1.3 试剂 RPMI 1640 细胞培养基,胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 8116341,1778586);胰蛋白酶(美国 Sigma 公司,批号 J170013);噻唑蓝(MTT)粉剂(美国 Biosharp 公司,批号 0793);transwell 小室,Matrigel(美国 Corning 公司,批号分别为 3422,6235005);E-cadherin,基质金属蛋白酶(MMP)-2, MMP-9 和 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 3195,2270,40994,4970S);HRP 标记的羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(杭州华安生物公司,批号 G170628)。

1.4 仪器 Heracell 150i 型 CO₂ 培养箱, MSC1.2 型生物安全柜(美国 Thermo 公司);AR224CN 型电子天平(美国 Ahaus 公司);EnSpire 多功能酶标板分析仪(美国 PerkinElmer 公司);Mini-protein Tetra System 型垂直电泳,ChemiDoc XRS+ 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);IX73 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 MTT 比色法检测细胞增殖 取对数生长期的 MGC-803, BGC-823 细胞胰酶消化制成单细胞悬液(5×10^4 个/mL)后,接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ L。分别设置金龙胶囊组(0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 $g \cdot L^{-1}$),空白组(等量 RPMI 1640 培养基)和 5-FU 组(32 $mg \cdot L^{-1}$)。细胞接种 24 h 后,每孔加入不同质量浓度的药物 100 μ L,继续孵育培养 24, 48 h,加入 MTT 溶液反应 4 h 后,弃上清液,加入二甲亚砜 150 μ L,低速震荡 10 min 使其充分溶解,酶标仪检测 490 nm 波长处的吸光度 A,抑制率 =

$(1 - A_{490} \text{ 药物组} / A_{490} \text{ 空白组}) \times 100\%$ 。

2.2 细胞侵袭和迁移力检测 细胞分组同 2.1 项,作用于 MGC-803, BGC-823 细胞 24 h,胰酶消化后用无血清培养基调整细胞密度为 5×10^5 个/mL。transwell 小室底部膜提前用 matrigel 稀释液包被、水化后,加细胞悬液 200 μ L 至 transwell 上室,加含 10% 胎牛血清的培养基 500 μ L 至下室。每种浓度设 5 个复孔,于培养箱中继续培养 12 h,取出 transwell 小室,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍,棉签轻轻擦去上室表面的细胞,滤膜用甲醇固定 20 min,结晶紫于室温下染色 15 min,在高倍光学显微镜下计数中间和四周 5 个视野侵袭的细胞数目。迁移实验不铺 matrigel,其余步骤同侵袭实验。

2.3 划痕实验检测细胞迁移 将胃癌细胞 MGC-803, BGC-823 培养至对数生长期,调整细胞数目为 2×10^5 个/mL,种至 6 孔板,待细胞贴壁后划一细痕。加入各组药物,加药情况同前,24 h 后测量伤口宽度并拍照。每组设置 3 个复孔,重复 3 次。

2.4 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 E-cadherin, MMP-2, MMP-9 蛋白表达 将 MGC-803, BGC-823 细胞接种于 6 孔板,培养其贴壁至合适数目后,加药同 2.1 项,24 h 后提取细胞总蛋白,采用 BCA 法定量后,进行 SDS-PAGE 电泳,将分离后的蛋白质电转移到 PVDF 膜上, TBST 洗膜 3 次,于室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入一抗(1:1 000),4 °C 孵育过夜, TBST 洗膜后加入 HRP 标记的二抗(1:2 000)孵育 2 h,洗膜 3 次后采用凝胶成像系统拍照观察结果,使用 Image J 软件进行条带灰度值的分析。

2.5 统计学处理 应用 SPSS 16.0 统计软件进行分析,最终计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组组间比较采用完全随机设计的单因素方差分析,组间两两比较用 LSD 进行分析, *P* < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MGC-803, BGC-823 细胞增殖的影响 MGC-803, BGC-823 细胞体外生长良好,与空白组比较,金龙胶囊 0.1 ~ 3.2 $g \cdot L^{-1}$ 处理 24, 48 h,细胞呈不同程度的生长抑制作用(*P* < 0.05, *P* < 0.01),并且有一定的浓度依赖性(表 1, 2)。根据金龙胶囊对 MGC-803 和 BGC-823 细胞增殖的抑制率,计算出金龙胶囊的半数抑制浓度(IC₅₀)为 1.6 $g \cdot L^{-1}$ 。为排除药物的细胞毒作用,在后继实验中金龙胶囊药物调整质量浓度为 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 $g \cdot L^{-1}$ 。

表 1 金龙胶囊对 MGC-803 细胞增殖抑制的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Inhibitory effect of Jinlong capsule (JLC) on proliferation of MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$) A

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白	-	0.72 ± 0.05	0.72 ± 0.01
金龙胶囊	0.1	0.66 ± 0.02	0.53 ± 0.02
	0.2	$0.61 \pm 0.02^{1)}$	$0.50 \pm 0.01^{2)}$
	0.4	$0.58 \pm 0.02^{2)}$	$0.48 \pm 0.02^{2)}$
	0.8	$0.43 \pm 0.02^{2)}$	$0.40 \pm 0.01^{2)}$
	1.6	$0.32 \pm 0.02^{2)}$	$0.20 \pm 0.02^{2)}$
	3.2	$0.24 \pm 0.01^{2)}$	$0.16 \pm 0.01^{2)}$
5-FU	0.032	$0.44 \pm 0.04^{2)}$	$0.28 \pm 0.04^{2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

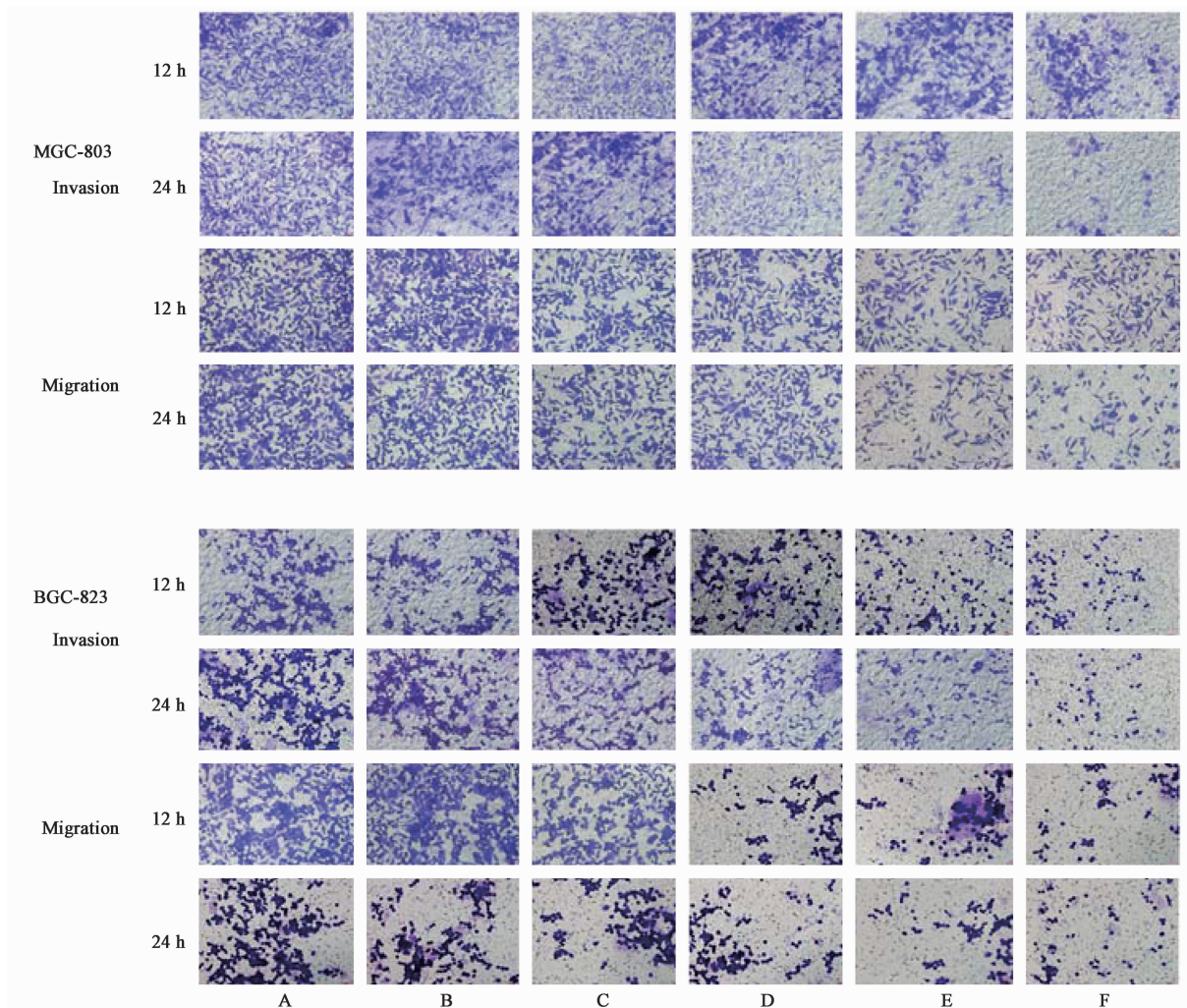
3.2 对 MGC-803, BGC-823 细胞侵袭力和迁移力的影响
与空白组比较,金龙胶囊 0.4, 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 干预 MGC-803, BGC-823 细胞 24 h 后,透膜的细胞数目

表 2 金龙胶囊对 BGC-823 细胞增殖抑制的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Inhibitory effect of JLC on proliferation of BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$) A

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白	-	0.73 ± 0.01	0.71 ± 0.01
金龙胶囊	0.1	$0.71 \pm 0.01^{2)}$	$0.64 \pm 0.02^{2)}$
	0.2	$0.69 \pm 0.01^{2)}$	$0.52 \pm 0.01^{2)}$
	0.4	$0.57 \pm 0.02^{2)}$	$0.49 \pm 0.01^{2)}$
	0.8	$0.54 \pm 0.02^{2)}$	$0.43 \pm 0.03^{2)}$
	1.6	$0.37 \pm 0.01^{2)}$	$0.36 \pm 0.01^{2)}$
	3.2	$0.30 \pm 0.03^{2)}$	$0.25 \pm 0.02^{2)}$
5-FU	0.032	$0.44 \pm 0.02^{2)}$	$0.35 \pm 0.03^{2)}$

明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见图 1, 表 3, 4。与空白组比较,金龙胶囊 0.4, 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组划痕距离明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 说明金龙胶囊抑制了 MGC-803, BGC-823 细胞的迁移能力, 见图 2, 表 5, 6。



A. 空白组; B~E. JLC 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; F. 5-FU 组 (图 2, 3 同)

图 1 金龙胶囊对 MGC-803 和 BGC-823 细胞侵袭和迁移能力的影响 (结晶紫, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of JLC on invasion and migration of MGC-803 and BGC-823 cells (crystal violet, $\times 200$)

表 3 金龙胶囊对 MGC-803 细胞侵袭力和迁移力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

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

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	侵袭细胞数目		迁移细胞数目	
		12 h	24 h	12 h	24 h
空白	-	412.00 ± 47.57	403.00 ± 46.89	447.33 ± 71.59	431.00 ± 62.50
金龙胶囊	0.1	409.67 ± 31.65	378.67 ± 48.88	435.33 ± 41.19	408.00 ± 37.74
	0.2	364.67 ± 20.23	328.00 ± 18.52	433.00 ± 31.32	403.00 ± 23.89
	0.4	328.00 ± 18.52 ¹⁾	252.67 ± 33.65 ¹⁾	367.00 ± 37.04	344.33 ± 36.89
	0.8	224.67 ± 39.80 ²⁾	208.37 ± 42.47 ²⁾	247.33 ± 13.79 ²⁾	234.66 ± 15.01 ²⁾
5-FU	0.032	24.33 ± 2.52 ²⁾	15.00 ± 5.00 ²⁾	197.00 ± 8.00 ²⁾	182.33 ± 14.50 ²⁾

表 4 金龙胶囊对 BGC-823 细胞侵袭力和迁移力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of JLC on invasion and migration of BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	侵袭细胞数目		迁移细胞数目	
		12 h	24 h	12 h	24 h
空白	-	425.67 ± 48.18	403.00 ± 46.89	240.33 ± 39.51	220.00 ± 33.51
金龙胶囊	0.1	403.67 ± 43.01	378.67 ± 48.88 ¹⁾	185.33 ± 7.767	171.33 ± 19.43
	0.2	359.67 ± 4.932 ²⁾	328.00 ± 18.52 ²⁾	165.33 ± 30.00 ¹⁾	151.66 ± 25.50 ²⁾
	0.4	270.37 ± 28.29 ²⁾	252.67 ± 33.65 ²⁾	157.66 ± 22.85 ²⁾	136.66 ± 25.57 ²⁾
	0.8	232.37 ± 36.35 ²⁾	208.37 ± 42.47 ²⁾	159.33 ± 17.61 ²⁾	140.00 ± 19.67 ²⁾
	5-FU	0.032	27.00 ± 8.18 ²⁾	15.00 ± 5.00 ²⁾	81.33 ± 5.51 ²⁾

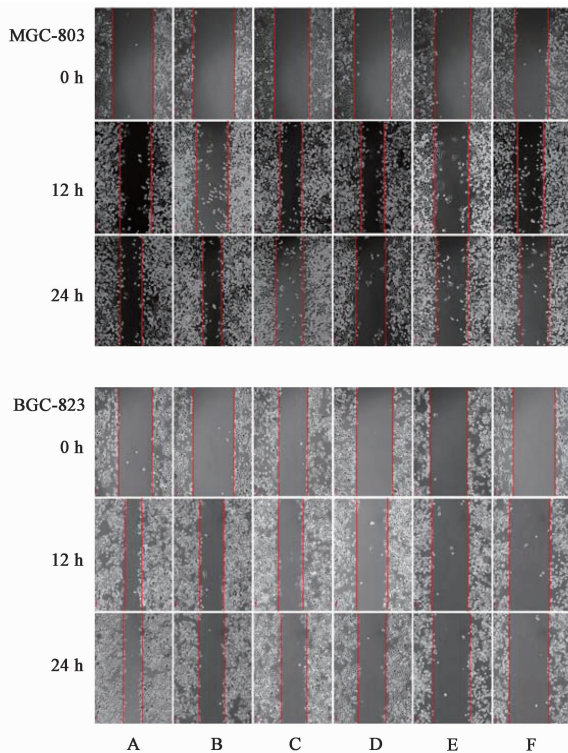


图 2 金龙胶囊对 MGC-803 和 BGC-823 细胞迁移能力的影响 (倒置显微镜, ×200)

Fig. 2 JLC effect on migration of MGC-803 and BGC-823 cells (inverted microscope, ×200)

表 5 金龙胶囊对 MGC-803 细胞划痕距离的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of JLC on scratching distance of MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	划痕距离/cm		
		0 h	12 h	24 h
空白	-	22.61 ± 0.26	9.93 ± 0.79	8.88 ± 0.90
金龙胶囊	0.1	22.38 ± 0.33	12.19 ± 0.83	10.06 ± 0.20
	0.2	20.18 ± 0.12	10.20 ± 1.04	11.44 ± 0.41
	0.4	21.02 ± 0.81 ²⁾	14.23 ± 0.98 ¹⁾	15.69 ± 0.80 ²⁾
	0.8	20.53 ± 0.32 ²⁾	17.13 ± 1.37 ²⁾	15.79 ± 0.79 ²⁾
5-FU	0.032	17.46 ± 0.53 ²⁾	16.60 ± 0.59 ²⁾	15.70 ± 0.32 ²⁾

3.3 对 E-cadherin, MMP-2, MMP-9 蛋白表达的影响 与空白组比较, MGC-803, BGC-823 细胞经过金龙胶囊 0.4, 0.8 g·L⁻¹ 作用 24 h 后, 随着药物质量浓度的增加, MGC-803 和 BGC-823 细胞中 E-cadherin 蛋白的表达水平增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), MMP-2, MMP-9 蛋白的表达水平降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见图 3, 表 7, 8。

4 讨论

胃癌作为全世界范围类癌症死亡的第二大原因, 且发病率和死亡率均较高。在肿瘤的微环境中,

表 6 金龙胶囊对 BGC-823 细胞划痕距离的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of JLC on scratching distance of BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$) cm

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	0 h	12 h	24 h
空白	-	7.93 ± 0.48	8.93 ± 0.42	18.31 ± 0.46
金龙胶囊	0.1	12.70 ± 0.17 ¹⁾	13.21 ± 0.51 ¹⁾	21.95 ± 0.48 ¹⁾
	0.2	13.87 ± 1.07 ¹⁾	15.16 ± 0.81 ¹⁾	20.56 ± 0.53 ¹⁾
	0.4	15.87 ± 0.69 ¹⁾	15.63 ± 1.06 ¹⁾	20.41 ± 0.52 ¹⁾
	0.8	18.84 ± 1.04 ²⁾	19.33 ± 1.29 ²⁾	22.51 ± 0.24 ²⁾
5-FU	0.032	20.91 ± 0.05 ²⁾	21.84 ± 0.46 ²⁾	23.42 ± 0.48 ²⁾

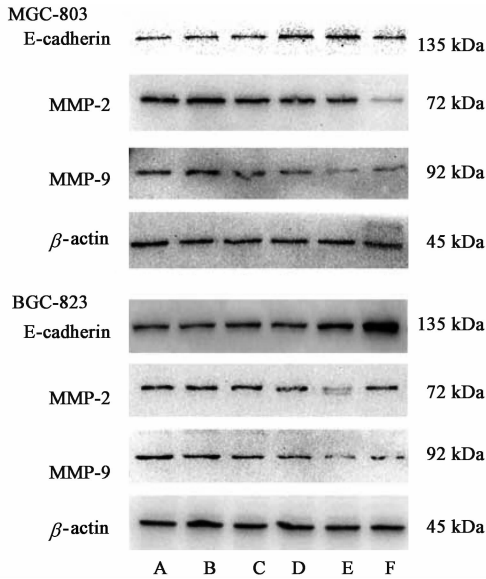


图 3 金龙胶囊作用 MGC-803, BGC-823 细胞 MMP-2, MMP-9 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of JLC effect on expression of MMP-2 and MMP-9 in MGC-803 and BGC-823 cells

通过 EMT 过程能使肿瘤细胞发生结构、细胞表型和生物学特性的改变,增加了肿瘤细胞的侵袭性,肿瘤细胞更易穿过细胞基底膜侵袭进入临近的宿主组织。钙黏蛋白(cadherin)是一类细胞表面的跨膜糖蛋白,影响细胞-细胞间的黏附功能^[14]。E-cadherin 是 EMT 中的关键分子,抑制 E-cadherin 的功能或表达水平将发生细胞形态向间质细胞样转化的现象,促进细胞的迁移、侵袭以及转移。在晚期肿瘤患者中,E-cadherin 表达或其细胞膜定位往往发生缺失,且这一变化与肿瘤复发和转移的高发生率密切相关^[15]。侵袭是恶性肿瘤细胞的重要生物学特征之一,是一个复杂的、多步骤的过程,也是肿瘤患者发生死亡的重要原因。肿瘤细胞的侵袭过程中必须破坏宿主原有的组织结构才能向周围浸润或者远处转

表 7 金龙胶囊对 MGC-803 细胞中 E-cadherin, MMP-2, MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of JLC on E-cadherin, MMP-2, MMP-9 protein expressions in MGC-803 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	E-cadherin /β-actin	MMP-2 /β-actin	MMP-9 /β-actin
空白	-	0.39 ± 0.07	1.98 ± 0.23	1.39 ± 0.22
金龙胶囊	0.1	0.48 ± 0.06 ¹⁾	1.87 ± 0.35	1.21 ± 0.24 ¹⁾
	0.2	0.76 ± 0.09 ¹⁾	1.79 ± 0.29	0.87 ± 0.17 ¹⁾
	0.4	0.89 ± 0.06 ²⁾	1.47 ± 0.20 ²⁾	0.71 ± 0.14 ²⁾
	0.8	1.21 ± 0.08 ²⁾	1.13 ± 0.12 ²⁾	0.31 ± 0.07 ²⁾
5-FU	0.032	1.39 ± 0.06 ²⁾	0.16 ± 0.05 ²⁾	0.39 ± 0.07 ²⁾

表 8 金龙胶囊对 BGC-823 细胞中 E-cadherin, MMP-2, MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of JLC on E-cadherin, MMP-2 and MMP-9 protein expressions in BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	E-cadherin /β-actin	MMP-2 /β-actin	MMP-9 /β-actin
空白	-	0.49 ± 0.07	0.61 ± 0.06	0.82 ± 0.07
金龙胶囊	0.1	0.68 ± 0.06	0.60 ± 0.06	0.80 ± 0.09
	0.2	0.86 ± 0.09	0.58 ± 0.09	0.70 ± 0.10
	0.4	1.09 ± 0.16 ¹⁾	0.47 ± 0.02 ¹⁾	0.65 ± 0.06 ¹⁾
	0.8	1.34 ± 0.12 ²⁾	0.28 ± 0.01 ²⁾	0.45 ± 0.04 ²⁾
5-FU	0.032	1.53 ± 0.08 ²⁾	0.53 ± 0.03 ²⁾	0.43 ± 0.03 ²⁾

移,包括增殖、黏附、侵袭、迁移 4 个基本步骤,其中肿瘤细胞侵袭和迁移能力的改变是重要环节之一。基质金属蛋白酶(MMPs)是属于高度保守的依赖于锌原子的内切蛋白水解酶家族,与肿瘤细胞的侵袭和迁移密切相关,能够降解由细胞间基质和基膜构成的细胞外基质和基底膜^[16-19],其中 MMP-2 和 MMP-9 与包括胃癌在内的肿瘤细胞的侵袭和迁移密切相关^[20]。中医学文献中没有胃癌这一病名,但有类似的症状、体征的记载,将其归属于“反胃”“噎膈”“胃脘痛”“积聚”等病证范畴。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^[21-23]。本实验发现,金龙胶囊能明显抑制 MGC-803 和 BGC-823 细胞的增殖,呈一定的浓度及时间依赖性,细胞划痕实验也发现,金龙胶囊对胃癌细胞有一定的抑制迁移作用。matrigel 胶中含有的层黏素是细

胞基膜和细胞外基质的主要成分,经不同浓度的金龙胶囊作用后,MGC-803和BGC-823细胞的穿膜细胞数目明显减少,有明显的浓度依赖性。因此transwell实验结果表明金龙胶囊能显著抑制胃癌MGC-803和BGC-823细胞的侵袭与迁移,并呈浓度依赖性,差异有统计学意义。Western blot结果说明金龙胶囊能够降低MGC-803和BGC-823细胞中MMP-2和MMP-9蛋白的表达水平,且呈一定的量效关系。本研究表明MMP-2和MMP-9在肿瘤侵袭转移过程中占有举足轻重的地位,正是由于MMP-2和MMP-9能够破坏胃癌MGC-803和BGC-823细胞侵袭的组织学屏障,因而在侵袭转移中起到关键性的作用,但是肿瘤细胞的侵袭和迁移所涉及的过程极其复杂,故金龙胶囊抑制胃癌细胞侵袭和迁移的其他分子机制等待进一步的探索。

[参考文献]

[1] QU Y, DANG S, HOU P. Gene methylation in gastric cancer[J]. Clin Chim Acta, 2013, 424:53-65.

[2] LIU X, Meltzer S J. Gastric cancer in the era of precision medicine[J]. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017, 3(3):348-358.

[3] 邹文斌,李兆申. 中国胃癌发病率及死亡率研究进展[J]. 中国实用内科杂志, 2014, 34(4):408-415.

[4] 郑朝旭,郑荣寿,张思维,等. 中国2010年胃癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2014, 23(10):795-800.

[5] MAO Z, ZHOU J, LUAN J, et al. Tamoxifen reduces P-gp-mediated multidrug resistance via inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway in ER-negative human gastric cancer cells[J]. Biomed Pharmacother, 2014, 68(2):179-183.

[6] Thierry J P, Acloque H, HUANG R Y J, et al. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease[J]. Cell, 2009, 139(5):871-890.

[7] Lamouille S, XU J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(3):178-196.

[8] 李玉衡. 多成分现代鲜药对肿瘤的影响—金龙胶囊能明显抑制肿瘤生长、复发、转移[J]. 首都医药, 2006, 13(2):39-40.

[9] 鲍世铨,曾耀辉,李建生. 鲜动物药“扶正荡邪制剂”的基础及工艺研究以及对治病机制的初步探讨及与质量有关的理化性质研究[J]. 中国肿瘤临床与康复, 1998, 5(增刊):25-28.

[10] 中国癌症研究基金会,《中国肿瘤临床年鉴》编辑委

员会. 中国肿瘤临床年鉴[M]. 北京:中国铁道出版社,2004:465-467.

[11] LI Y Y, HU J Q, HUANG H, et al. Effect of Jinlong capsule on proliferation and apoptosis of human pancreatic cancer cells BxPC-3[J]. J Tradit Chin Med, 2013, 33(2):205-210.

[12] WU G L, ZHANG L, LI T Y, et al. Short-term effect of combined therapy with Jinlong capsule and transcatheter arterial chemoembolization on patients with primary hepatic carcinoma and its influence on serum osteopontin expression[J]. Chin J Integr Med, 2010, 16(2):109-113.

[13] 鲁强,罗景斌,冯毅凡,等. 金龙胶囊联合放化疗治疗非小细胞肺癌的Meta分析[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(22):4491-4496.

[14] Bhatt T, Rizvi A, Batta S P, et al. Signaling and mechanical roles of E-cadherin[J]. Cell Commun Adhes, 2013, 20(6):189-99.

[15] 常琳琳,朱虹,郑琳,等. E-cadherin在肿瘤治疗中的研究进展[J]. 药学进展, 2015, 39(10):754-760.

[16] 詹启敏. 分子肿瘤学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2005:509.

[17] YANG H L, KUO Y H, Tsai C T, et al. Anti-metastatic activities of antrodia camphorata against human breast cancer cells mediated through suppression of the MAPK signaling pathway[J]. Food Chem Toxicol, 2011, 49(1):290-298.

[18] 奚胜艳,张前,刘朝阳,等. 羟基红花黄色素A对人胃癌移植瘤裸鼠瘤组织bFGF蛋白及MMP-9表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(21):2877-2881.

[19] 杨光明,张芳芳,王栋,等. 镰形棘豆对SMMC-7721肝癌细胞增殖及MMP-2表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2011, 36(9):1227-1230.

[20] 崔若凡,张宝刚,姬静,等. ARK5、MMP-2和MMP-9在胃癌中的表达及与侵袭转移的关系[J]. 实用医学杂志, 2012, 28(7):1073-1076.

[21] 王小兰,幸尚平,肖建勇,等. 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[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12):62-67.

[22] 杨明翰,骆骄阳,乔美玲,等. 多伞阿魏体外抗胃癌活性筛选、细胞凋亡及周期阻滞机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(10):112-122.

[23] 白小军. 中医辨证施治结合化疗对晚期胃癌的临床疗效分析[J]. 中国实用医药, 2012, 7(14):55-56.

[责任编辑 张丰丰]