

南蛇藤提取物对人胃癌 SGC-7901 细胞蛋白组学的影响

朱耀东¹, 刘延庆², 李平^{1*}

(1. 安徽医科大学 附属省立医院, 合肥 230000; 2. 扬州大学 医药研究所, 江苏 扬州 225000)

[摘要] 目的:探讨南蛇藤提取物(*Celastrus orbiculatus* extract, COE)在人胃癌细胞中的可能作用靶点。方法:采用细胞活力实验检测 COE 对细胞生长增殖的抑制作用,计算 COE 的半数抑制浓度(50% concentration of inhibition, IC₅₀)。蛋白质组学技术寻找 COE 作用前后的差异表达蛋白;并通过蛋白免疫印迹法(Western blot)对部分蛋白进行验证。结果:COE 能够抑制 SGC-7901 细胞的增殖,呈一定的浓度及时间依赖性;其 24 h 的 IC₅₀ 为 70.14 mg·L⁻¹。COE(70 mg·L⁻¹)作用 SGC-7901 细胞 24 h 后,与空白组比较有 9 个蛋白质点发生下调,4 个蛋白质点发生上调;这些蛋白可能是 COE 在胃癌细胞中的作用靶点。Western blot 验证了 COE 对热休克蛋白 27(heat shock protein 27, HSP27), 抗增殖蛋白(prohibitin), 丝切蛋白(cofilin-1), 膜联蛋白 A5(annexin A5)表达的影响,与蛋白质组学结果相一致。结论:COE 对胃癌细胞具有显著的抑制作用,筛选出的差异表达蛋白为 COE 的抗肿瘤机制研究提供新的依据。

[关键词] 南蛇藤; 胃癌; 蛋白质组学; 半数抑制浓度; 热休克蛋白 27; 抗增殖蛋白; 丝切蛋白; 膜联蛋白 A5

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0086-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020086

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161107.1519.052.html>

[网络出版时间] 2016-11-07 15:19

Effect of *Celastrus Orbiculatus* Extract on Proteomics of Human Gastric Cancer Cell Line SGC-7901

ZHU Yao-dong¹, LIU Yan-qing², LI Ping^{1*}

(1. Anhui Provincial Hospital Affiliated to Medical University of Anhui, Hefei 230000, China;

2. Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Yangzhou University, Yangzhou 225000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the possible effect targets of *Celastrus orbiculatus* extract (COE) in gastric cancer cells. **Method:** SGC-7901 cells were treated with different concentrations of COE for 24 and 48 h. The 50% concentration of inhibition (IC₅₀) of COE was measured by 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Differentially expressed proteins were detected before and after COE treatment by using proteomic techniques. Partial protein expression was verified by Western blot. **Result:** COE inhibited the proliferation of SGC-7901 cells in a dose-and time-dependent manner. The IC₅₀ in 24 h was 70.14 mg·L⁻¹. The protein expression profile showed 13 differentiated expression protein spots after COE (70 mg·L⁻¹) treatment on SGC-7901 cells for 24 h. Among the 13 proteins, 9 proteins were down-regulated and 4 proteins were up-regulated. These proteins may be the action targets of COE in gastric cancer cells. Its effects on expression of heat shock protein 27 (HSP27), prohibitin, cofilin-1, and annexin A5 were verified by Western blot, which were consistent with the proteomic results. **Conclusion:** COE has significant inhibitory effect on gastric cancer cells. The differentially expressed proteins provide new insights into the mechanisms involved in COE

[收稿日期] 20160327(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81603439);国家中医药管理局中医肿瘤学重点学科经费项目(国中医药发[2009]30号)

[第一作者] 朱耀东, 博士, 主治医师, 从事中西医结合临床肿瘤学研究, Tel:15855144709, E-mail: zhuyaodong2010@163.com

[通讯作者] * 李平, 博士, 教授, 主任医师, 从事中西医结合临床肿瘤学研究, Tel:13965112719, E-mail: liping64@sina.com

treatment for gastric cancer.

[Key words] *Celastrus orbiculatus*; gastric cancer; proteomic; 50% concentration of inhibition (IC_{50}); heat shock protein 27 (HSP27); prohibitin; cofilin-1; annexin A5

胃癌是严重危害我国人民健康的重大疾病之一。近年来胃癌的发病率有所下降,但其病死率呈上升趋势^[1]。因此,从中药中筛选并开发能够抑制胃癌的抗肿瘤新药,具有重要的医学价值和社会意义。南蛇藤是重要的药用植物,其药性辛温、有小毒,归肝、膀胱经,具有祛风活血、消肿止痛和解毒等功效^[2]。研究发现,南蛇藤提取物(*Celastrus orbiculatus* extract, COE)能抑制多种恶性肿瘤细胞生长并诱导凋亡,如肝癌、胃癌、大肠癌、宫颈癌等,还可抑制多重耐药的乳腺癌细胞增殖,显示了其抗肿瘤的广阔前景^[3]。课题组前期研究表明,COE 对人胃癌细胞增殖及其裸鼠移植瘤的生长具有明显的抑制作用,其机制可能与诱导胃癌细胞凋亡有关^[4-5],其具体分子机制有待进一步深入研究。近年来,利用蛋白质组学技术探索中药复杂成分的作用机制,寻找有效的药物靶点,已得到了国内外研究者的广泛认可^[6]。COE 的制备方法已获得国家发明专利^[7]。为进一步探讨 COE 在胃癌细胞中的可能作用靶点,本研究利用蛋白质组学技术筛查 COE 作用人胃癌细胞株 SGC-7901 前后的差异表达蛋白,为开发新型的抗肿瘤药物提供新的理论和实验依据。

1 材料

1.1 药物 南蛇藤茎中药饮片(广州致信药业有限公司,批号 070510),经中国药科大学中药资源研究室秦民坚教授鉴定为卫矛科南蛇藤属植物 *Celastrus orbiculatus* 的茎。COE 的制备方法主要流程:将南蛇藤茎饮片切断,粉碎成粉,95% 乙醇加热回流提取 3 次,回收溶剂至干,加水分散后,用石油醚和乙酸乙酯分别萃取 3 次,回收溶剂后减压浓缩并进行真空冻干,得到 COE^[8]。

1.2 细胞株 人胃癌细胞株 SGC-7901 购于中国科学院上海细胞库。

1.3 主要试剂 噻唑蓝(MTT),低熔点琼脂糖(美国 Sigma 公司,批号分别为 0222701,0507329);固相化梯度胶条,二硫苏糖醇,溴酚蓝(美国 Bio-Rad 公司,批号分别为 922804,028125,122701);考马斯亮蓝 G-250(美国 Amresco 公司,批号 131108);兔抗人热休克蛋白 27(heat shock protein 27, HSP27),兔抗人抗增殖蛋白(prohibitin),兔抗人丝切蛋白(cofilin-

1),兔抗人膜联蛋白 A5(annexin A5)单克隆抗体(美国 Epitomics 公司,批号分别为 79868,75766,131519,14196);兔抗人 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号 1025S)。

1.4 仪器 680 型全自动酶标板分析仪,Protein IEF Cell 型等电聚焦仪,Protein II XL Cell 型垂直电泳槽,GS-800 型扫描仪,Trans-blot 转印槽转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);AB 5800 MALDI TOF/TOF 型飞行时间质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 细胞活力实验 取对数生长期的 SGC-7901 细胞,经消化后制成单细胞悬液,调整密度为 5×10^4 个/mL,按每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板中。设空白组,COE 组,每组 5 个复孔。根据本课题组前期研究结果^[9],COE 组设药物的质量浓度为 10,20,40,80,160 $mg \cdot L^{-1}$,空白组加无血清培养基。继续孵育 24,48 h 后弃上清,按常规方法进行 MTT 反应,酶标仪读取吸光度 A,并计算细胞增殖抑制率。

2.2 细胞总蛋白样品制备 调整细胞密度为 1×10^5 个/孔,种植于 6 孔板,培养 24 h。待细胞贴壁后加入含 COE($70 mg \cdot L^{-1}$)的无血清培养基,另设空白组。24 h 后收集细胞,加入蛋白裂解液,冰浴 30 min 后,12 000 $r \cdot min^{-1}$ 离心 5 min 后吸取上清。BCA 法定量蛋白质浓度,分装后于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冻存。

2.3 蛋白质双向凝胶电泳 将制备好的细胞总蛋白样品与水化缓冲液充分混匀后,分散滴入聚焦盘内,并将固相化梯度胶条覆盖于不同泳道的样品溶液上,进行等电聚焦,后进行胶条平衡,将平衡好的胶条进行第二向电泳。结束后进行考马斯亮蓝染色,并用扫描仪收集图像。每组蛋白样品重复进行 3 次。利用 PDQuest 8.0.1 图像分析软件依次进行点检测、背景消减、标准化匹配、建立平均凝胶、比较差异等分析。依照 Bio-Rad 公司双向电泳实验指南,本课题组认为在 COE 组和空白组的比较中,如果蛋白质表达量的差异超过 2 倍(增加或者降低),并且在每组的 3 张凝胶图像中蛋白质表达量变化的趋势相一致,则认为该蛋白质表达差异的变化是由 COE 处理所引起,而不是由于样品材料和操作过程所带来的误差。根据这个原则,选择了 13 个点作为差异表达蛋白质点进行质谱分析。

2.4 蛋白质质谱鉴定 切下胶上的目标胶点,依次进行冲洗、脱色、脱水、酶解、萃取、干燥后,获得冻干样品。采用 AB 5800 MALDI TOF/TOF 型飞行时间质谱仪对样品进行分析;利用 Mascot Distiller 2.4 检索软件(英国 Matrix Science 公司)在线检索分析鉴定蛋白质。

2.5 免疫印迹法检测相关蛋白表达 将制备好的空白组和 COE 组的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,将分离后的蛋白质电转移到 PVDF 膜,封闭液室温封闭 2 h 后,加入一抗(1:1 000),4 ℃ 孵育过夜,洗膜后加入二抗(1:5 000)孵育 2 h,采用化学发光法检测并采集图像。结果用 Image Lab 3.0 成像系统软件对条带进行灰度值测定,以 β -actin 为内参,分析目的条带蛋白表达水平。

2.6 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多均数的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 COE 对 SGC-7901 细胞生长增殖的影响

SGC-7901 细胞经不同浓度的 COE 处理 24,48 h 后,与空白组比较,各组细胞的生长呈现不同程度的抑制($P < 0.05, P < 0.01$),且呈一定的浓度及时间依赖性。见表 1。根据 COE 对细胞增殖的抑制率,计算 COE 作用 SGC-7901 细胞 24 h 的半数抑制浓度(IC_{50})为 $70.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因此选择 $70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ COE 作用 SGC-7901 细胞 24 h 进行后续蛋白质组学研究。

表 1 COE 对 SGC-7901 细胞增殖 A 的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

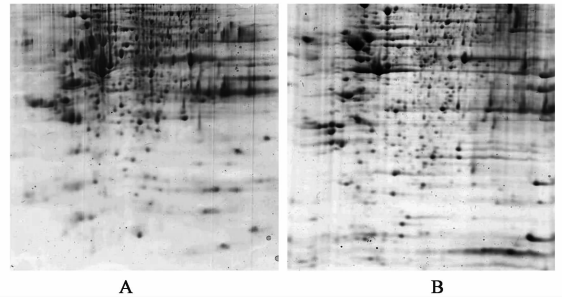
Table 1 Effect of COE on proliferation of SGC-7901 cells($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白	-	1.24 ± 0.021	1.22 ± 0.023
COE	10	$1.12 \pm 0.024^{1)}$	$1.02 \pm 0.019^{1)}$
	20	$1.04 \pm 0.018^{1)}$	$0.96 \pm 0.018^{2)}$
	40	$0.78 \pm 0.023^{2)}$	$0.69 \pm 0.026^{2)}$
	80	$0.58 \pm 0.018^{2)}$	$0.49 \pm 0.017^{2)}$
	160	$0.39 \pm 0.021^{2)}$	$0.31 \pm 0.016^{2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 双向电泳图谱分析 空白组和 COE ($70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组的平均蛋白质点数目分别为 (388 ± 17), (392 ± 20) 个。经消减背景后,进行图像间的蛋白质点匹配,各组平均匹配点数分别为 (338 ± 16), (341 ± 15) 个,匹配率为 87.11%, 86.99%。见图 1。由此认为每组 3 张双向电泳图谱的蛋白质点在位置上有较好的重复性。以 2 倍差异作

为标准,发现与空白组比较,在 COE 组中共有 13 个差异蛋白质点,其中下调的蛋白质点有 9 个,上调的蛋白质点有 4 个。进一步分析表明,下调表达量变化 2.5 倍以上的蛋白质点有 4 个(编号依次为 1,4,5,7 号)。

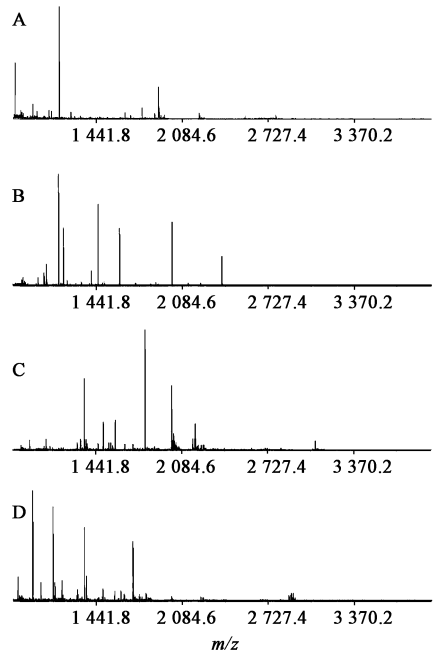


A. 空白组;B. COE($70 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组(图 3 同)

图 1 SGC-7901 细胞双向电泳谱

Fig. 1 Two-dimensional electrophoresis profiles of SGC-7901 cell samples

3.3 差异蛋白质点的质谱鉴定 对差异表达的蛋白质点进行鉴定,获得蛋白质点的肽质量指纹图谱(PMF),用 Mascot Distiller 软件识别单同位素信号峰,获得肽片段的质荷比。数值输入 Mascot 查询系统,检索美国国立生物技术信息中心(NCBI)蛋白质数据库,13 个蛋白质点全部得到鉴定。见表 2。以 1,4,5,7 号点为例,经分析获得 PMF。见图 2。



1,4,5,7 号点分析的肽质量指纹图谱;A,B,C,D 依次表示各点的特征峰

图 2 双向凝胶电泳上点 1,4,5,7 经 MALDI-TOF-TOF 分析的肽质量指纹谱

Fig. 2 Results of MALDI-TOF-TOF analysis of protein spot 1, 4, 5, 7 cut from 2-DE gels

表 2 差异蛋白质质谱鉴定

Table 2 Identification results of differential proteins by mass-spectrometric technique

编号	蛋白名称	基因序列号	相对分子质量/Da	等电点	变化情况
1	heat shock protein 27	gil662841	22 427	7. 83	下调
2	heat shock protein 60	gil306890	61 157	5. 70	下调
3	enolase1	gil4503571	47 139	7. 01	下调
4	prohibitin	gil4505773	29 843	5. 57	下调
5	cofilin-1	gil5031635	18 719	8. 22	下调
6	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	gil55958547	41 780	5. 03	下调
7	annexin A5	gil809185	35 840	4. 94	下调
8	tropomyosin 3 isoform 2	gil24119203	29 015	4. 75	下调
9	vimentin	gil340234	35 031	4. 70	下调
10	adenylate cyclase	gil55716047	56 530	5. 6	上调
11	ribosomal protein, large, P0	gil12654583	34 252	5. 42	上调
12	cytokeratin 18	gil30311	47 350	5. 27	上调
13	calreticulin precursor	gil62897681	47 060	5. 02	上调

3.4 COE 对 SGC-7901 细胞蛋白表达的影响 COE (70 mg·L⁻¹) 处理 SGC-7901 细胞 24 h 后, 与空白组比较, HSP27, prohibitin, cofilin-1, annexin A5 的表达均明显下调 ($P < 0.01$), 与蛋白质组学研究结果相一致。见图 3, 表 3。

4 讨论

近年来利用蛋白质组学研究技术探索中医学整体观念的基本内涵, 证候本质及中药或复方的作用机制, 为中医药现代化研究提供了崭新的思路和方法^[10]。在本研究中, 为进一步了解 COE 对胃癌细胞的作用机制, 探讨其治疗胃癌的潜在靶点, 实验采用了蛋白质组双向电泳图谱分析法。本课题组成功鉴定了 13 个差异蛋白质点, 包括与细胞代谢相关

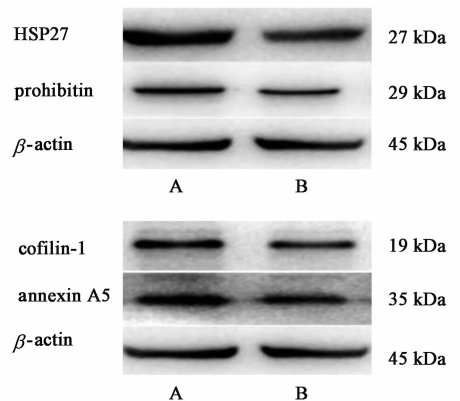


图 3 HSP27, Prohibitin, Cofilin-1, Annexin A5 蛋白表达电泳
Fig. 3 Validation of proteomic results by Western blot in SGC-7901 cells

表 3 COE 对 SGC-7901 细胞中 HSP27, prohibitin, cofilin-1, annexin A5 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effect of COE on protein expression of HSP27, prohibitin, cofilin-1, and annexin A5 in SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度/mg·L ⁻¹	HSP27/ β -actin	prohibitin/ β -actin	cofilin-1/ β -actin	annexin A5/ β -actin
空白	0	1.19 \pm 0.14	1.13 \pm 0.31	1.17 \pm 0.24	1.21 \pm 0.21
COE	70	0.49 \pm 0.15 ¹⁾	0.54 \pm 0.14 ¹⁾	0.52 \pm 0.11 ¹⁾	0.51 \pm 0.13 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

蛋白、与细胞骨架相关蛋白、与基因转录调控相关蛋白等。这些蛋白主要通过调控细胞内能量代谢、细胞骨架结构及形态, 以及基因的转录与翻译, 来影响肿瘤细胞的多种生物学过程^[11]。

1 号点 HSP27 是小热休克蛋白家族成员之一, 在生物体内普遍存在且功能强大, 可通过分子伴侣和调节细胞凋亡的作用, 发挥保护细胞的功能^[12]。现已证实 HSP27 和胃癌的发生、发展、侵袭、转移及

预后密切关系^[13]。4 号点 prohibitin 是一种序列高度保守的蛋白, 广泛参与细胞增殖凋亡、细胞能量代谢及细胞转录的调控等多种生物学过程^[14]。研究发现, prohibitin 在胃癌中的表达明显高于癌旁组织, 而且 prohibitin 的过度表达与胃癌的预后密切相关, 被认为是胃癌治疗的新靶点^[15]。5 号点 cofilin-1 是肌动蛋白结合蛋白, 可通过诱导片状伪足的形成, 设定细胞的运动方向, 从而增强细胞的运动和

迁移^[16]。研究表明,抑制胃癌细胞中 Cofilin-1 蛋白的表达,可有效抑制胃癌细胞的侵袭和迁移能力^[17]。7号点 annexin A5 是膜联蛋白家族中分布最广泛、含量最丰富的一种内源性蛋白质。在细胞信号转导、炎症反应、肿瘤细胞的增殖与分化、细胞骨架蛋白间的相互作用等方面具有重要功能^[18]。在本研究中,通过蛋白质组学及蛋白免疫印迹法均发现涉及肿瘤发生、发展、能量代谢和细胞骨架功能的4种蛋白质 HSP27, prohibitin, cofilin-1, annexin A5 的表达量均在 COE 组中明显下调。由此本研究认为 COE 可能通过对以上蛋白表达水平的综合调节,来发挥其抑制胃癌的作用。

本研究探讨了 COE 作用于胃癌细胞的蛋白质分子基础,为阐明 COE 的抗肿瘤机制提供了实验依据。深入研究 COE 的抗肿瘤作用及其分子机制将为早日开发生物利用度高的中药抗肿瘤新药奠定基础。

[参考文献]

[1] Park J I, Oh S H. Double common bile duct with an ectopic drainage into the stomach[J]. *Ann Surg Treat Res*, 2015, 88(4): 229-231.

[2] 黄泰康. 现代本草纲目[M]. 北京:中国医药科技出版社, 2001: 1859.

[3] 汪茂荣. 中药南蛇藤抗肿瘤作用的研究进展[J]. *中医学报*, 2011, 11(6): 1055-1057.

[4] 朱耀东, 钱亚云, 马慧, 等. 南蛇藤总萜对 MGC-803 细胞侵袭和迁移能力的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(22): 180-183.

[5] 朱耀东, 刘延庆, 钱亚云, 等. 南蛇藤提取物对人胃癌 SGC-7901 裸鼠移植瘤生长及凋亡相关蛋白表达的影响[J]. *中草药*, 2015, 46(5): 697-702.

[6] 赵霞, 岳庆喜, 谢正兰, 等. 蛋白质组学技术在中药复杂体系研究中的应用[J]. *生命科学*, 2013, 25(3): 334-341.

[7] 刘延庆. 南蛇藤茎总萜提取物及其制备方法及应用: 中国, ZL200710025343. 3[P]. 2012-02-08.

[8] LI J J, YANG J, LU F, et al. Chemical constituents from

the stems of *Celastrus orbiculatus*[J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(4): 279-283.

[9] 张舰, 许运明, 刘延庆. 南蛇藤提取物体外抑瘤作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2006, 22(3): 99-101.

[10] HU M, FAN L, ZHOU H H, et al. Theranostics meets traditional Chinese medicine: rational prediction of drug-herb interactions[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2012, 12(8): 815-830.

[11] LIN F, TAN H J, GUAN J S, et al. Divide and conquer: subproteomic approaches toward gastric cancer biomarker and drug target discovery[J]. *Expert Rev Proteomics*, 2014, 11(4): 515-530.

[12] Wettstein G, Bellaye P S, Micheau O, et al. Small heat shock proteins and the cytoskeleton: an essential interplay for cell integrity[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44(10): 1680-1686.

[13] Nagata Y, Kudo M, Nagai T, et al. Heat shock protein 27 expression is inversely correlated with atrophic gastritis and intraepithelial neoplasia[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(2): 381-388.

[14] ZHANG L, JI Q, NI Z H, et al. Prohibitin induces apoptosis in BGC823 gastric cancer cells through the mitochondrial pathway[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(8): 3803-3807.

[15] KANG X, ZHANG L, SUN J, et al. Prohibitin: a potential biomarker for tissue-based detection of gastric cancer[J]. *J Gastroenterol*, 2008, 43(8): 618-625.

[16] ZHOU J, WANG Y, FEI J, et al. Expression of cofilin 1 is positively correlated with the differentiation of human epithelial ovarian cancer[J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(6): 1187-1190.

[17] Gabrielsen M, Schuldt M, Munro J, et al. Cucurbitacin covalent bonding to cysteine thiols: the filamentous-actin severing protein Cofilin1 as an exemplary target[J]. *Cell Commun Signal*, 2013, 11(1): 1-11.

[18] ZHANG R, HUANG M, ZHOU M, et al. Annexin A5-functionalized nanoparticle for multimodal imaging of cell death[J]. *Mol Imaging*, 2013, 12(3): 182-190.

[责任编辑 张丰丰]