

Notch1 下调对三叶青黄酮抑制食管癌 EC9706 细胞迁移和侵袭的影响

张胜强, 张洪艳, 黄建伟, 刘贵廷, 高克峰, 齐宝林, 李扬*
(牡丹江医学院 红旗医院, 黑龙江 牡丹江 157011)

[摘要] **目的:**观察三叶青黄酮(Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone, THRF)对食管癌(esophagus cancer, EC) EC9706 细胞增殖、迁移、侵袭能力及 Notch1 的影响,探讨其抗食管癌的可能作用机制。**方法:**体外培养 EC9706 细胞,以不同终质量浓度(0.5 ~ 20 g·L⁻¹)三叶青黄酮进行处理,未加三叶青黄酮为空白组,以 MW 167 处理为 MW167 组。采用细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8),检测三叶青黄酮对 EC9706 细胞增殖的抑制作用,计算半数抑制浓度(50% inhibitory concentration, IC₅₀);采用细胞黏附实验,划痕修复实验,transwell 小室体外侵袭实验观察 EC9706 细胞黏附力、迁移、侵袭能力,同时采用免疫细胞化学和实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 Notch1 蛋白和 mRNA 表达的变化。**结果:**与空白组比较,三叶青黄酮可明显升高 EC9706 细胞抑制率($P < 0.05$, $P < 0.01$),三叶青黄酮可明显降低 EC9706 细胞黏附率、迁移率、侵袭细胞数,Notch1 阳性细胞率和 mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**三叶青黄酮能明显抑制 EC9706 细胞增殖,降低细胞迁移和侵袭能力,与其下调 Notch1 有关,可能是其抗食管癌的机制之一。

[关键词] 三叶青黄酮; 食管癌; 迁移; 侵袭; Notch1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0162-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050162

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1423.062.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 14:23

Inhibitory Effect of Down-Regulation of Notch1 on Tetrastigma Hemsleyani Radix Flavone on Migration and Invasion of Esophageal Cancer EC9706 Cells

ZHANG Sheng-qiang, ZHANG Hong-yan, HUANG Jian-wei,
LIU Gui-ting, GAO Ke-feng, QI Bao-lin, LI Yang*

(Hongqi Hospital, Mudanjiang Medical University, Mudanjiang 157011, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone (THRF) on proliferation, migration, invasion and Notch1 in esophageal cancer (EC) 9706 cells, and discuss its possible anti-esophageal cancer mechanism. **Method:** The EC9706 cells were cultured *in vitro* and treated with THRF with different concentrations (0.5 ~ 20 g·L⁻¹), with no THRF in blank group, and with MW 167 in positive control group. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) was measured by cell counting kit-8 (CCK-8). The effect of THRF on adhesion rate was detected by the cell adhesion assay. The cell migration ability were evaluated by the wound healing assay. The cell invasion ability were evaluated by the transwell chamber assay. The expression of Notch1 and Notch1 mRNA expressions were detected by immunocytochemical analysis and Real-time PCR assay. **Result:** THRF can significantly increase the inhibition rate of EC9706 cells, with statistically significant difference compared with blank group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). THRF can significantly inhibit the adhesion rate, the

[收稿日期] 20160625(002)

[基金项目] 黑龙江省中医药科研项目(2015HC316)

[第一作者] 张胜强, 硕士, 主治医师, 从事肺癌和食管癌的诊断与治疗工作, Tel:0453-6586457, E-mail:shengqiangzh83@sina.com

[通讯作者] *李扬, 硕士, 主治医师, 从事骨科相关肿瘤的诊断与治疗工作, Tel:0453-6586450, E-mail:liyanyang1973@163.com

migration ability, the invasion cells, Notch1 positive cell rate and Notch1 mRNA expressions, with statistically significant difference compared with blank group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** THRF can inhibit the EC9706 cells viability, migration and invasion ability, its mechanism for anti-esophageal cancer may be correlated with down-regulation of Notch1.

[**Key words**] Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone; esophagus cancer; migration; invasion; Notch1

食管癌(esophagus cancer, EC)发病隐匿,发展迅速,一经发现往往处于中晚期,中国是食管癌大国,死亡人数超过全世界食管癌总死亡人数的 50%^[1]。流行病学调查报告显示,2003~2007 年食管癌发病率为 19.24/10 万(男性 25.85/10 万,女性 12.67/10 万),同期食管癌死亡率为 15.39/10 万(男性 20.71/10 万,女性 9.94/10 万),在癌症死亡原因中列居第 4 位,男女发病率和死亡率均居全球第 1 位^[2]。目前临床上食管癌的主要治疗方法为手术治疗,同时辅以放疗和(或)化疗,虽然取得了一定的效果,但是患者的死亡率依然没有得到有效的控制,最主要原因之一是其容易迅速转移和侵袭^[3]。药物治疗仍是目前治疗晚期食管癌的重要手段之一,但因化疗药物有较大的毒副作用致使部分患者难以耐受,总的疗效并不令人满意。因此积极寻找高效、低毒的抗食管癌药物仍是当前亟需解决的问题和研究热点。近年来发现,中草药在抗肿瘤治疗中可发挥显著作用。

三叶青属葡萄科崖爬藤属植物,具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒、调节免疫等活性,并广泛用于多种中成药或保健品^[4]。迄今从该植物中分离得到化合物主要有黄酮类,如三叶青黄酮(Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone, THRF)。现代药理研究表明,三叶青黄酮具有多种抗肿瘤作用,如抗肝癌、胃癌等^[5-6],提示其在临床上是非常有应用价值和前景的抗肿瘤药物,但是关于三叶青黄酮对食管癌的影响及机制鲜见报道,本研究旨在探讨三叶青黄酮对人食管鳞癌 EC9706 细胞的增殖、黏附力、迁移和侵袭的影响及其机制,探索将三叶青黄酮作为食管癌治疗药物的可能性。

1 材料

1.1 细胞株 食管鳞状细胞癌细胞系 EC9706 细胞购自中国科学院上海细胞研究所细胞库。

1.2 药物及试剂 三叶青饮片购自牡丹江医学院红旗医院中药房(杭州华东中药饮片有限公司,批号 160110);药材由牡丹江医学院红旗医院任公平副教授鉴定为葡萄科崖爬藤属 *Tetrastigma hemsleyanum* 三叶青的干燥块根。Notch1 抑制剂 MW 167(美国

Calbiochem 公司,批号 1001-MG0005);细胞计数(cell counting kit-8, CCK-8)试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 20150813);Matrigel 基质胶(美国 BD 公司,批号 354234);RPMI 1640 培养液(美国 Gibco 公司,批号 1517016);transwell 小室(美国 Corning 公司,批号 3260702);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 15596026);兔抗人 Notch1 抗体和过氧化物酶标记的免疫球蛋白(Ig)G 二抗(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 ZS-7281, SP-9026);ECL 化学发光试剂盒(北京中杉金桥公司,批号 ZLI-8926);BCA 蛋白定量试剂盒(北京原平皓生物生物技术有限公司,批号 150227);实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)试剂盒(上海生物科技公司,批号 160127)。

1.3 仪器 MCO-175 型 CO₂ 细胞培养恒温培养箱(日本 Sanyo 公司);RT-6100 型酶标仪(美国 Rayto 公司);TU-1901 型紫外分光光度计(北京普析通用公司);DSX100 型光学显微镜,IX51 型荧光倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Arktik 型 PCR 仪(美国 Thermofisher Scientific 公司);PowerPac HV 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 三叶青黄酮的提取与鉴定 三叶青黄酮由牡丹江医学院红旗医院制剂室提取并鉴定。4℃ 保存,临用时以 RPMI 1640 培养液稀释至所需浓度。

2.2 细胞培养 复苏 EC9706 细胞,培养在 RPMI 1640 培养基(含 10% 胎牛血清,100 mg·L⁻¹ 硫酸链霉素,100 U·mL⁻¹ 青霉素钠)中,37℃ 5% CO₂ 饱和湿度培养箱中培养 3~4 d,待细胞达 80% 汇合度时,传代。收集对数生长期细胞,制成单细胞悬液用于进一步实验。

2.3 CCK-8 检测 EC9706 细胞增殖反应 检测过程参照 CCK-8 试剂盒操作说明书进行。参照文献[7]及预实验结果,每孔分别加入 0.5, 1, 5, 10, 20 g·L⁻¹ 三叶青黄酮,设置空白组。37℃ 5% CO₂ 饱和湿度下分别培养 24, 48, 72 h 后,每孔加入无胎牛血清的新鲜 RPMI 1640 培养液(含 10% CCK-8 试剂)100 μL,37℃ 5% CO₂ 及饱和湿度下继续培养 2 h,酶标仪检测各孔在 450 nm 处吸光度 A。

Graphpad 5.0 计算细胞增殖抑制率和半数抑制浓度 (IC_{50})。细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$, 每个剂量组设 6 个平行孔, 取 6 孔平均值。

2.4 细胞黏附实验检测 EC9706 细胞黏附能力
参照 CCK-8 实验结果, EC9706 细胞随机分为 4 组, 低质量浓度组加入 $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 三叶青黄酮; 高质量浓度组加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 三叶青黄酮; 参照文献 [8] 和预实验结果, 选择 MW 167 作为 Notch1 抑制剂^[9-10], MW 167 组加入 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MW 167, 另设以同样条件下加入等体积 RPMI 1640 营养培养基作为空白组, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 及饱和湿度下培养 24 h, 接种于涂有 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IV 型胶原 $500 \mu\text{L}$ 的 24 孔板中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 及饱和湿度培养 30 min。PBS 洗涤, 乙醇固定, 0.1% 结晶紫染色, 0.2% Triton X-100 固定, 分光光度计检测各孔在 550 nm 处 A, 计算细胞黏附率。细胞黏附率 = $A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。实验重复 3 次, 取其平均值。

2.5 划痕修复实验检测细胞迁移能力 EC9706 细胞按照细胞密度 1×10^5 个/mL, 取 $100 \mu\text{L}$ 接种于 6 孔板中, 待细胞单层生长铺满板底时, 用移液枪头沿培养板底部划“—”字型划痕。各组给药同 2.4 项, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 及饱和湿度培养 24 h。显微镜下检测细胞向致伤区迁移的相对距离并拍照, 计算细胞迁移率。细胞迁移率 = 药物组细胞迁移面积/空白组细胞迁移面积 $\times 100\%$ 。实验重复 3 次, 取其平均值。

2.6 transwell 小室实验检测细胞体外侵袭
transwell 小室用前铺上 0.5% Matrigel 膜基质 $50 \mu\text{L}$, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。EC9706 细胞各组给药同 2.4 项, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 及饱和湿度培养 24 h。分别取细胞悬液 $200 \mu\text{L}$ 接种于 transwell 小室上室, 并在 transwell 小室下室加入含有 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 $600 \mu\text{L}$ 。 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 及饱和湿度孵育 24 h 后, 取出 transwell 小室, 甲醇固定、吉姆萨染色。光学显微镜计数穿过 transwell 小室聚碳酸酯膜的细胞。每组细胞随机选取 10 个视野计数, 取其平均值。实验重复 3 次。

2.7 免疫细胞化学检测 Notch1 蛋白表达 待 EC9706 细胞爬满爬片, 取出爬片。EC9706 细胞各组给药同 2.4 项, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 及饱和湿度培养 24 h。4% 多聚甲醛固定, 滴加兔抗人 Notch1 抗体 (1:500) 一抗, 室温培养 3 h, 滴加过氧化物酶标记的 IgG 二抗 (1:1000), 室温培养 15 min, Hoechst33258 核染色确定细胞总数, 荧光倒置显微

镜下分别观察 EC9706 细胞 Notch1 蛋白染色的表达, 随机计数 3 个不重叠高倍视野, 计算 Notch1 阳性细胞占视野中总数细胞的比率。

2.8 Real-time PCR 检测 Notch1 mRNA 表达
EC9706 细胞各组给药同 2.4 项, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 及饱和湿度培养 24 h。Trizol 试剂提取细胞总 RNA, 检测 RNA 纯度, 按照反转录试剂盒说明进行 cDNA 逆转录。利用 Pubmed 查找相关基因序列, 并利用引物合成软件 Primer Premier 5.0 设计引物。Notch1 (133 bp): 上游 $5' \text{-TGCGAGGTCAACACAGACGAG-3'}$, 下游 $5' \text{-TGTAAGTGTGGGTCCGTCCAG-3'}$; GADPH (232 bp): 上游 $5' \text{-ATGGGGAAGGTGAA GGTCC-3'}$, 下游 $5' \text{-GGGGTCATTGATGGCAAC AATA-3'}$ 。反应体系为 PCR 酶混合物 $2.0 \mu\text{L}$ 。反应条件: 预变性 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 2 min, 变性 $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 s, 退火 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s, 延伸 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 45 s, 共 40 个循环。通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 mRNA 相对表达量, 实验重复 3 次。

2.9 统计学方法 采用 Graphpad prism 5.0 软件进行描述性统计。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。首先对数据的正态分布和方差齐性进行检验, 经检验所有数据符合正态分布, 继之多组间均数比较, 采用 one-way-ANOVA 分析, 组间两两比较采用 Bonferroni 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 三叶青黄酮对 EC9706 细胞增殖的影响 与空白组比较, EC9706 细胞经不同终质量浓度 ($0 \sim 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 的三叶青黄酮处理 24, 48, 72 h 后, 随着终质量浓度的增大和作用时间的延长, 其对细胞的抑制也明显增强, 呈浓度和时间依赖性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。三叶青黄酮 24, 48 和 72 h 的 IC_{50} 分别为 $(5.22 \pm 0.48) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $(3.15 \pm 0.29) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $(2.31 \pm 0.27) \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1。

3.2 三叶青黄酮对 EC9706 细胞黏附力的影响 与空白组比较, 三叶青黄酮可显著降低 EC9706 细胞黏附率, 且呈浓度依赖性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 三叶青黄酮组与 MW167 组比较差异无统计学意义。见表 2。

3.3 三叶青黄酮对 EC9706 细胞迁移能力的影响 与空白组比较, 三叶青黄酮可显著降低 EC9706 细胞迁移率, 且呈浓度依赖性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 三叶青黄酮组与 MW167 组比较差异无统计学意义。见图 1, 表 3。

3.4 三叶青黄酮对 EC9706 细胞侵袭能力的影响 与空白组比较, 三叶青黄酮可显著降低

表 1 三叶青黄酮对 EC9706 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone on proliferations of EC9706 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	终质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	24 h		48 h		72 h	
		A	抑制率/%	A	抑制率/%	A	抑制率/%
空白	-	0.688 ± 0.065	0	0.723 ± 0.089	0	0.781 ± 0.153	0
三叶青黄酮	0.5	0.555 ± 0.053	19.33 ± 1.48	0.593 ± 0.051	17.98 ± 1.76	0.567 ± 0.127	27.40 ± 2.15
	1	0.422 ± 0.047 ¹⁾	38.62 ± 3.26	0.391 ± 0.070 ¹⁾	45.92 ± 3.51	0.406 ± 0.095 ¹⁾	48.02 ± 3.56
	5	0.405 ± 0.036 ¹⁾	41.14 ± 4.95	0.323 ± 0.046 ¹⁾	55.13 ± 5.75	0.320 ± 0.056 ¹⁾	59.03 ± 3.88
	10	0.317 ± 0.024 ²⁾	53.87 ± 5.33	0.283 ± 0.038 ²⁾	60.86 ± 6.41	0.297 ± 0.048 ²⁾	61.97 ± 4.16
	20	0.161 ± 0.019 ²⁾	76.59 ± 6.67	0.149 ± 0.013 ²⁾	79.39 ± 8.94	0.125 ± 0.023 ²⁾	83.99 ± 5.84

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

表 2 三叶青黄酮对 EC9706 细胞黏附力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone on adhesion of different concentrations of EC9706 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	终质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	黏附率/%
空白	-	100.00 ± 0.00
MW167 ³⁾	100	39.00 ± 5.77 ²⁾
三叶青黄酮	1	62.59 ± 6.95 ¹⁾
	5	49.67 ± 6.06 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; ³⁾ MW167 组单位为 $\mu mol \cdot L^{-1}$ (表 3~6 同)。

表 3 三叶青黄酮对 EC9706 细胞迁移率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone on migration rate of EC9706 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	终质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	迁移率/%
空白	-	100.00 ± 0.00
MW167 ³⁾	100	29.82 ± 4.56 ²⁾
三叶青黄酮	1	63.29 ± 11.55 ¹⁾
	5	35.42 ± 8.63 ²⁾

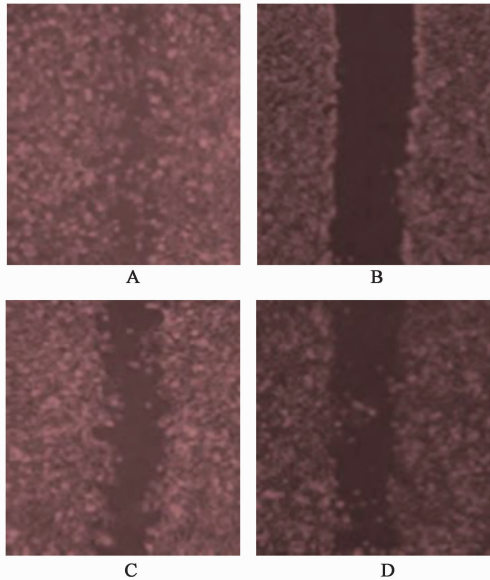


图 1 三叶青黄酮对 EC9706 细胞划痕修复的影响 (倒置显微镜, $\times 100$)

Fig.1 Effect of Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone on wound healing of EC9706 cells (inverted microscope, $\times 100$)

图 2 三叶青黄酮对 EC9706 细胞体外侵袭的影响 (吉姆萨染色, $\times 100$)

EC9706 细胞侵袭细胞数,且呈浓度依赖性 ($P < 0.01$),三叶青黄酮组与 MW167 组比较差异无统计学意义。见图 2,表 4。

3.5 三叶青黄酮对 EC9706 细胞 Notch1 表达的影响 与空白组比较,三叶青黄酮显著降低 EC9706

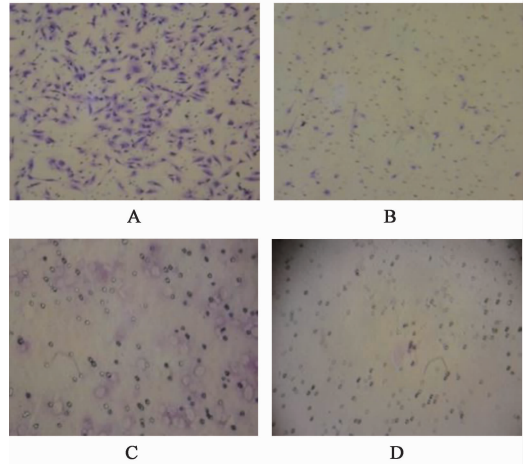


图 2 三叶青黄酮对 EC9706 细胞体外侵袭的影响 (吉姆萨染色, $\times 100$)

Fig.2 Effect of Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone on invasion in vitro of EC9706 cells (Giemsa, $\times 100$)

表 4 三叶青黄酮对 EC9706 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone on invasion of EC9706 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	终质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	侵袭细胞数/个
空白	-	157 ± 16
MW167 ³⁾	100	37 ± 6 ²⁾
三叶青黄酮	1	49 ± 4 ²⁾
	5	40 ± 7 ²⁾

细胞 Notch1 阳性细胞率,且呈浓度依赖性 ($P < 0.05, P < 0.01$),三叶青黄酮组与 MW167 组比较差异无统计学意义。见图 3,表 5。

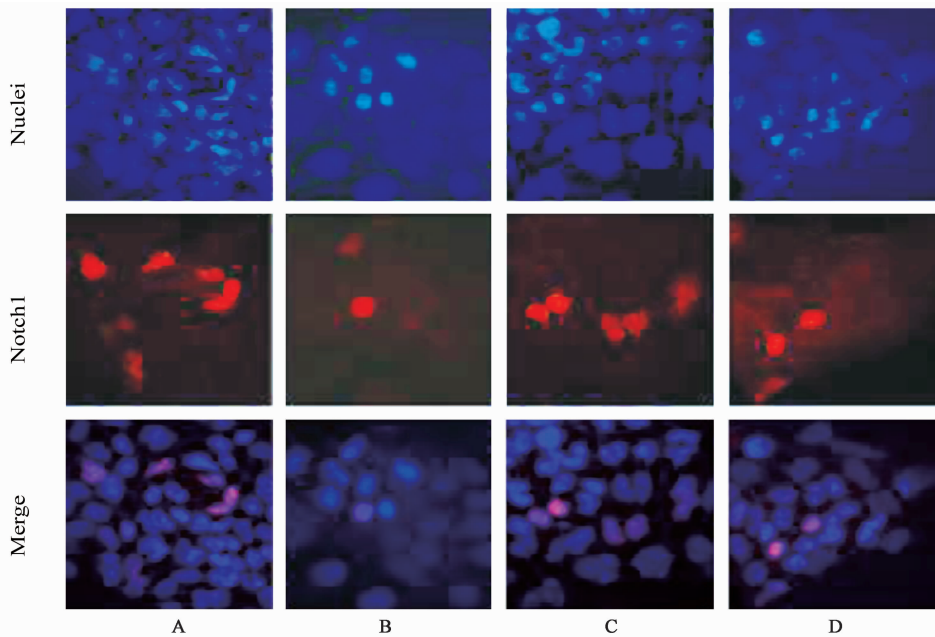


图 3 三叶青黄酮对 EC9706 细胞 Notch1 蛋白表达的影响(免疫荧光, ×400)

Fig.3 Effect of Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone on Notch1 mRNA expression of EC9706 cells(Immunocytochemistry, ×400)

表 5 三叶青黄酮对 EC9706 细胞阳性细胞率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Tetrastigma Hemsleyani Radix flavone on positive cell ratio of EC9706 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	终质量浓度/g·L ⁻¹	阳性细胞率/%
空白	-	41.01 ± 7.26
MW167 ³⁾	100	15.00 ± 2.89 ²⁾
三叶青黄酮	1	34.98 ± 5.25 ¹⁾
	5	21.67 ± 3.17 ²⁾

3.6 三叶青黄酮对 EC9706 细胞 Notch1 mRNA 表达的影响 与空白组比较,三叶青黄酮可显著降低 EC9706 细胞 Notch1 mRNA 表达水平,且呈浓度依赖性($P < 0.05, P < 0.01$),三叶青黄酮组与 MW167 组比较差异无统计学意义。见表 6。

表 6 三叶青黄酮对 EC9706 细胞 Notch1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of Radix Tetrastigma Hemsleyani flavone on Notch1 mRNA expression of EC9706 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	终质量浓度/g·L ⁻¹	Notch1/GADPH
空白	-	0.76 ± 0.08
MW167 ³⁾	100	0.41 ± 0.04 ²⁾
三叶青黄酮	1	0.51 ± 10.05 ¹⁾
	5	0.44 ± 0.04 ²⁾

4 讨论

食管癌在临床上是一种预后很差的肿瘤,近年来,随着肿瘤基础研究的发展,一些抗肿瘤的新药

陆续问世并应用于治疗食管癌,这其中也括了中草药的研发。中草药较西药的抗癌作用优势明显,其本身多为植物提取物,不良反应较小,三叶青黄酮抗肿瘤作用受到广泛关注。倪克锋等^[11]研究结果表明,三叶青黄酮可上调肿瘤细胞 TIMP-2 基因的表达而显著抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤细胞增殖。钟良瑞等^[7]研究结果表明,三叶青黄酮通过激活 p38MAPK 途径促进人非小细胞肺癌 A549 细胞凋亡作用。但是有关于其对食管癌的作用研究鲜见报道。本研究 CCK-8 结果证实,不同终质量浓度的三叶青黄酮对 EC9706 细胞的增殖具有显著的抑制作用,且随着给药浓度增加和时间的延长,其抑制作用也愈明显。以上结果提示,三叶青黄酮可能作为抗食管癌的潜在临床应用药物。

食管癌的组织学类型主要包括腺癌和鳞状细胞癌(鳞癌),其中鳞癌占 90% 以上,而迁移和(或)侵袭是其导致患者死亡和预后不良的主要因素^[12-13]。肿瘤细胞的迁移和侵袭与 Notch 信号通路有关^[14]。Notch 信号通路是由遗传学家 Mohr 小组在 20 世纪初期从果蝇体内发现,广泛存在于各种组织器官中,不但调控正常组织细胞的增生、分化和发育方向,而且更重要的是与肿瘤的发生、发展密切相关^[15]。Notch 由受体、配体和细胞内效应分子组成,受体家族成员包括 Notch1, Notch2, Notch3 和 Notch4,特别 Notch1 信号通路是调控细胞分化的关键信号通路之一,与肿瘤关系最为密切^[16]。研究表明,Notch1

高表达可促进肿瘤细胞的迁移和侵袭,如乳腺癌 MCF-7 细胞、胃癌 SGC-7901 细胞、黑色素细胞瘤 B16 细胞等^[17-19]。另有研究表明,Notch1 在食管癌中呈高表达^[20-22]。本研究证实,三叶青黄酮可显著降低 EC9706 细胞黏附率、迁移率和侵袭细胞数。以上结果提示,三叶青黄酮可明显抑制 EC9706 细胞的迁移和侵袭能力。本研究免疫细胞化学分析也证实,EC9706 细胞 Notch1 呈高表达,与以往研究相一致,而三叶青黄酮可显著降低 Notch1 表达。进一步分析还证实,三叶青黄酮可显著降低 Notch1 mRNA 的表达,与免疫细胞化学结果相一致。以上结果提示,三叶青黄酮可能通过下调 Notch1 的表达,从而抑制 EC9706 细胞的迁移和侵袭能力。

综上所述,三叶青黄酮可显著抑制 EC9706 细胞增殖,并抑制其迁移和侵袭能力,其机制可能是与下调 Notch1 的表达有关,为三叶青黄酮在临床上治疗食管癌提供了新的思路和理论依据。至于是否存在其他机制,如对 Notch 信号通路的下游基因 Hes1 的影响,本研究将继续进行探讨。

[参考文献]

[1] 纪昕,李伟皓,王崇,等. 淫羊藿苷对食管癌细胞 EC9706 增殖与凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(3):143-147.

[2] 张思维,张敏,李光琳,等. 2003~2007 年中国食管癌发病与死亡分析[J]. 中国肿瘤,2012,21(4):241-246.

[3] 何磊,郭传勇. CD151 与消化系统肿瘤侵袭转移相关性的研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志,2013,20(3):237-240.

[4] 林婧,纪明妹,黄泽豪,等. 三叶青的化学成分及其体外抗肿瘤活性研究[J]. 中国药学杂志,2015,50(8):657-662.

[5] 冯正权,倪克锋,何煜,等. 三叶青黄酮诱导 SGC-7901 胃癌细胞凋亡的实验研究[J]. 中国临床药理学与治疗学,2006,11(6):669-672.

[6] 张立明,樊瑞军,杨凤琴. 三叶青黄酮诱导 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡的实验研究[J]. 时珍国医国药,2010,21(11):2850-2851.

[7] 钟良瑞,魏克民. 三叶青黄酮对肺癌 A549 细胞生长抑制与 MAPKs 通路关系的研究[J]. 中国药理学通报,2014,30(1):101-104.

[8] 张衣北,陈安民,郭风劲,等. 激活的 Notch1 信号系统抑制前软骨干细胞凋亡及其机制研究[J]. 中华小儿外科杂志,2006,27(11):592-592.

[9] 史红飞,李焯佳,姚军. Notch1 信号通路与肿瘤的发

生发展[J]. 检验医学与临床,2010,7(11):1136-1137.

[10] 李大卫,彭志海,吴晴,等. Notch1 参与调节胃癌顺铂耐药的机制[J]. 中华实验外科杂志,2009,26(1):28-30.

[11] 倪克锋,金波,蒋福升,等. 三叶青黄酮对 H22 荷瘤小鼠 TIMP-2 mRNA 表达的影响[J]. 中国中医药科技,2009,16(3):195-196.

[12] TANG S,GAO L,BI Q, et al. SDR9C7 promotes lymph node metastases in patients with esophageal squamous cell carcinoma[J]. PLoS One,2013,8(1):e52184.

[13] 梁凤,仓艳红,杨炳银,等. 二甲双胍对 ECa109 人食管癌细胞转移潜能影响及其机制探讨[J]. 中华肿瘤防治杂志,2014,21(16):1232-1238.

[14] Massimiani M,Vecchione L,Piccirilli D, et al. Epidermal growth factor-like domain 7 promotes migration and invasion of human trophoblast cells through activation of MAPK,PI3K and NOTCH signaling pathways[J]. Mol Hum Reprod,2015,21(5):435-451.

[15] Ozasa Y, Akazawa H, QIN Y, et al. Notch activation mediates angiotensin II-induced vascular remodeling by promoting the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells[J]. Hypertens Res,2013,36(10):859-865.

[16] 王旭辉,花盛浩,王慧,等. DAPT 对食管鳞癌细胞株增殖与凋亡影响机制探讨[J]. 现代生物医学进展,2013,20(19):1455-1460.

[17] SHAO S,ZHAO X,ZHANG X, et al. Notch1 signaling regulates the epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer in a Slug-dependent manner[J]. Mol Cancer,2015,14(1):28.

[18] WEI G,CHANG Y,ZHENG J, et al. Notch1 silencing inhibits proliferation and invasion in SGC 7901 gastric cancer cells[J]. Mol Med Rep,2014,9(4):1153-1158.

[19] SHAO H,KONG R,Ferrari M L, et al. Notch1 pathway activity determines the regulatory role of cancer-associated fibroblasts in melanoma growth and invasion[J]. PLoS One,2015,10(11):e0142815.

[20] 叶福林,冯英备,张玉景,等. 水飞蓟宾通过抑制 Notch1 信号通路发挥抗食管癌 EC109 细胞的作用[J]. 现代生物医学进展,2015,15(24):4620-4624.

[21] 鲁照明,刘红涛,许培荣,等. Notch1 信号途径在食管鳞癌细胞株 EC9706 的作用研究[J]. 中国肿瘤临床,2007,34(13):740-743.

[22] 马瑞东,诸葛雪朋,刘伦旭,等. Notch-1 在人食管鳞癌和癌旁正常组织中的表达及其意义[J]. 中国肿瘤临床,2010,37(12):673-676.