

茯苓酸通过 Smads 调控 MMP/TIMP 平衡抑制肾癌细胞侵袭转移的机制

罗园园, 冯心怡, 褚泽文, 朱虹, 刘延庆, 王海波*

(扬州大学医学院, 国家中医药管理局胃癌毒邪论治重点研究室, 扬州大学-扬州市肿瘤研究所, 江苏扬州 225001)

[摘要] 目的:探讨茯苓中的三萜类化合物茯苓酸(PA),对肾癌侵袭转移的作用及机制。方法:采用细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒检测PA(0、20、40、80、160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞存活率的影响,并筛选PA浓度用于后续实验。采用克隆形成实验评估PA(0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞增殖的作用。细胞黏附实验用来观察PA(0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞黏附能力的效果。划痕实验和Transwell侵袭实验用来检测PA(0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞侵袭转移的影响。高内涵成像技术进一步动态观察和验证PA(0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞运动的抑制作用。PA(0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对细胞中侵袭转移相关蛋白基质金属蛋白酶/基质金属蛋白酶组织抑制因子(MMP/TIMP)和相关通路关键蛋白Smads表达的影响通过蛋白免疫印迹法(Western blot)来检测。结果:CCK-8结果显示,与空白组比较,PA组细胞存活率显著降低($P<0.01$),24 h时PA对ACHN细胞的半数抑制浓度(IC_{50})为70.42 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。克隆形成实验显示,与空白组比较,PA组细胞克隆群数目显著减少($P<0.01$)。细胞黏附实验显示,与空白组比较,PA组细胞的黏附数量显著减少($P<0.01$)。划痕实验表明,与空白组比较,PA组细胞的划痕愈合率降低($P<0.05$, $P<0.01$)。Transwell侵袭实验显示,与空白组比较,PA组细胞的穿膜数量减少($P<0.01$)。高内涵成像技术表明,与空白组比较,PA组细胞累计迁移距离更短($P<0.01$)。Western blot结果表明,与空白组比较,PA组MMP-2、MMP-9蛋白的表达降低($P<0.01$),TIMP-1蛋白的表达升高($P<0.01$)。此外,与空白组比较,PA组Smad2、Smad3蛋白的表达降低($P<0.01$)。结论:PA可抑制肾癌细胞的增殖、侵袭转移,其机制可能是通过Smad2/3调控MMP/TIMP的稳态平衡。

[关键词] 茯苓酸; 肾癌; 基质金属蛋白酶/基质金属蛋白酶组织抑制因子(MMP/TIMP); Smad2/3; 侵袭和迁移

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)07-0076-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.202202127

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220909.1745.003.html>

[网络出版日期] 2022-09-13 10:51:55

Mechanism of Pachymic Acid in Inhibiting Invasion and Metastasis of Renal Carcinoma Cells via Regulating MMP/TIMP Balance by Smads

LUO Yuanyuan, FENG Xinyi, CHU Zewen, ZHU Hong, LIU Yanqing, WANG Haibo*

(Medical College, Key Laboratory of Syndrome Differentiation and Treatment of Gastric Cancer of State Administration of Traditional Chinese Medicine, Yangzhou University- Yangzhou Cancer Research Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect and mechanism of pachymic acid (PA) in Poria on the invasion and metastasis of renal carcinoma cells. **Method:** The effect of PA (0, 20, 40, 80, 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8), and the dose of PA was selected for subsequent experiments. The effect of PA (0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cell proliferation was evaluated by colony formation

[收稿日期] 2022-06-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82104946、81773944);江苏省自然科学基金项目(BK20210817);江苏省中医药科技发展计划项目(QN202008)

[第一作者] 罗园园,在读硕士,从事中西医结合抗肿瘤的临床与基础研究,E-mail:lyy528539840@163.com

[通信作者] *王海波,博士,讲师,从事中西医结合抗肿瘤的临床与基础研究,E-mail:whbosy@163.com

assay. The effect of PA (0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cell adhesion ability was observed by cell adhesion assay. The effect of PA (0, 20, 40, and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cell invasion and metastasis was investigated by Wound healing assay and Transwell invasion assay. The inhibitory effect of PA (0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cell motility was further observed and verified by high-content imaging technology. The effects of PA (0, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the expression of matrix metalloproteinase (MMP)/tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) related to invasion and metastasis and Smads were detected by Western blot. **Result:** CCK-8 results showed that compared with the blank group, the PA groups showed decreased cell viability ($P<0.01$), with the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of ACHN cells of 70.42 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ at 24 h. Colony formation assay showed that the number of cell clonal groups in the PA groups was reduced compared with that in the blank group ($P<0.01$). Cell adhesion assay showed that compared with the blank group, the PA groups displayed reduced cell adhesion ($P<0.01$). Wound healing assay showed that the wound healing rate of cells in the PA groups was lower than that in the blank group ($P<0.05, P<0.01$). Transwell invasion assay showed that compared with the blank group, the number of transmembrane cells in PA groups was reduced ($P<0.01$). High-content imaging showed that the cumulative migration distance of cells in the PA groups was shorter than that in the blank group ($P<0.01$). The results of Western blot showed that the protein expression of MMP-2 and MMP-9 in the PA groups decreased ($P<0.01$), and TIMP-1 protein expression increased ($P<0.01$) compared with those in the blank group. In addition, compared with the blank group, the PA groups showed decreased protein expression of Smad2 and Smad3 ($P<0.01$). **Conclusion:** PA can inhibit the invasion and metastasis of renal carcinoma cells presumably through regulating the homeostasis of MMP/TIMP by Smad2/3.

[Keywords] pachymic acid; renal carcinoma; matrix metalloproteinase/tissue inhibitor of metalloproteinases (MMP/TIMP); Smad2/3; invasion and metastasis

肾癌是泌尿系统中最致命的肿瘤,通常男性发病率高于女性发病率^[1]。肾癌易发生转移,且因临床症状不明显,约17%的肾癌患者在诊断时已经发生了远处转移,还有20%~50%的患者会逐渐发展为转移性肾癌^[2],另有20%~40%的患者也会在术后发生转移^[3-4]。转移性肾癌愈后较差,其生存率仅有12%^[5]。因此,抑制肾癌侵袭转移也成了提高患者生存率的重要手段。在肿瘤微环境中,过度活跃的Smad3可能促进基质金属蛋白酶-2(MMP-2)依赖性癌症的侵袭和转移,转化生长因子- β (TGF- β)能够通过Smad信号转导直接诱导MMP-2转录,同时抑制基质金属蛋白酶组织抑制因子-2(TIMP-2)的表达以促进MMP-2的蛋白水解活性,因此将Smad3确定为MMP-2和TIMP-2的转录调节剂,通过抑制Smad3介导的MMP-2转录,同时增加TIMP-2这一途径来抑制肿瘤的侵袭转移^[6]。因此假设在肾癌中可以通过Smads调控基质金属蛋白酶/基质金属蛋白酶组织抑制因子(MMP/TIMP)来抑制肿瘤的侵袭转移。

中医药因其作用广泛,安全性高等优势,逐渐进入肿瘤的实验研究和临床研究中^[7-10]。茯苓是多孔菌科植物茯苓的干燥菌核,主要产于云南、湖南、

湖北、安徽、贵州等地,其味甘、淡、平,归心、脾、肾经,具有利水渗湿、健脾、宁心之功效^[11]。现代药理研究发现茯苓作用广泛,具有利尿、保肝、提高免疫力等多种药理作用,不仅可以镇静抗炎,而且对泌尿系统和免疫系统疾病疗效明显^[12]。茯苓还有抗肿瘤作用,这让茯苓的研究范围更为广泛^[13]。茯苓在泌尿系统有较好疗效,且具有抗肿瘤作用,因此认为茯苓可能对肾癌有较好的治疗作用。茯苓的三萜类物质茯苓酸(PA),可能是茯苓抗肿瘤的主要活性成分,PA广受关注^[14-15]。本研究主要探讨茯苓的主要三萜类化合物PA对肾癌侵袭转移的影响,并从分子水平深入探讨PA对细胞侵袭转移相关蛋白MMP/TIMP和相关通路关键蛋白Smads表达的影响,为茯苓作为抗肿瘤药物的开发研究奠定实验基础,也为临床抗肾癌的治疗策略提供新的选择。

1 材料

1.1 细胞 人肾细胞腺癌细胞ACHN细胞株,购自武汉普诺赛生命科学有限公司(货号CL-0021),传至第6代。

1.2 药品与试剂 PA(分析对照品,纯度 $\geq 97\%$,中国上海源叶科技有限公司,批号B20400)。PA以10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 溶解于二甲基亚砜中,使用时用培养基

稀释至所需浓度。ACHN细胞专用培养基(中国武汉普赛诺生命科技有限公司,批号CM-0021);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒、结晶紫染色液(中国碧云天生物技术研究所,批号分别为C0038、C0121);Transwell小室、(Matrigel)基质胶(美国Coring公司,批号分别为3422、356234);MMP-2抗体、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为PA5-85197、PA5-16509、PA146296、A18865);基质金属蛋白酶组织抑制因子-1(TIMP-1)抗体(英国Abcam公司,批号ab211926);Smad2抗体、Smad3抗体(中国Bioss生物科技有限公司,批号分别为AD112059、RB41035)。

1.3 仪器 IX73型倒置荧光显微镜(日本Olympus公司);EnSpire型全自动酶标板分析仪、Operetta CLS型高内涵细胞成像系统(美国Perkin Elmer公司);mini X25型垂直电泳仪、Trans-blot SD型转膜仪、Universar Hood III型凝胶成像分析仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与分组 人肾癌细胞ACHN培养在ACHN细胞专用培养基中,置于37℃、5% CO₂培养箱中,待培养皿中的细胞覆盖率达到80%~90%时,用胰酶消化进行传代。分为空白组和PA组,根据PA组的半数抑制浓度(IC₅₀),PA组分别分为低、中、高浓度组(20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。

2.2 CCK-8法检测细胞活力 取对数增殖期的ACHN细胞,消化后重悬为单细胞悬液,调整细胞浓度以3 000个/孔接种于96孔板中,待细胞贴壁后加入终浓度0、20、40、80、160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA处理细胞。继续培养24 h后每孔加入CCK-8试剂10 μL ,避光孵育2 h,使用酶标仪在450 nm处读取吸光度A,计算细胞存活率。使用Graphpad Prism 8.0软件计算药物IC₅₀以便进行后续实验。细胞存活率 = $A_{\text{PA组}}/A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

2.3 克隆形成实验观察细胞增殖 将ACHN细胞重悬成单细胞悬液后以800个/孔接种于6孔板中,待细胞开始分裂时,加入终浓度为0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PA继续培养细胞2周,期间每3 d更换新鲜含药培养基。待培养皿中出现肉眼可见的克隆群时,终止培养。弃掉培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,甲醇固定30 min,结晶紫染色15 min,计数细胞克隆数目。

2.4 细胞黏附实验检测细胞黏附能力 将ACHN细胞接种于6孔板,加入不同浓度(0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)PA干预24 h以备用。用无血清培养基将Matrigel胶稀释8倍,稀释后以每孔300 μL 铺于24孔板,置于超净台过夜风干。PBS清洗多余的胶,用无血清培养基继续封闭90 min。吸掉液体,取PA处理后的ACHN细胞以 2×10^4 个/孔接种于24孔板,于培养箱放置60 min。培养结束后,甲醇固定,结晶紫染色,在倒置显微镜随机取5个视野拍照。

2.5 细胞划痕实验观察细胞迁移能力 将ACHN细胞以 3×10^5 个/孔接种于6孔板中。当细胞融合度>80%,用200 μL 的移液管尖端在融合细胞单层上划线。加入终浓度为0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PA,置于37℃、5% CO₂培养箱培养。在0、24 h将划痕区域置于倒置显微镜下拍照。划痕愈合率=(空白组-PA组划伤宽度)/空白组划伤宽度 $\times 100\%$ 。

2.6 细胞侵袭实验检测细胞侵袭能力 将Matrigel胶用无血清培养基稀释后取50 μL 加入Transwell小室,过夜使胶固化,PBS轻轻清洗多余的胶。取ACHN细胞重悬于无血清培养基中,以 2×10^4 个/孔加入上室,下室加入不同浓度含药培养基(0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),置于37℃、5% CO₂培养箱中培养24 h。甲醇固定后结晶紫染色,用棉签小心地擦掉小室内没有穿膜的细胞,置于倒置显微镜下,每孔随机取5个视野的膜下细胞数。

2.7 高内涵成像法分析细胞动态迁移能力 将ACHN细胞以 3×10^3 个/孔接种于96孔板,贴壁后用不同浓度(0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的PA培养12 h。将该板置于高内涵成像机器中继续孵育12 h,使用Harmony 4.1软件进行数据采集和分析。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白的表达 将ACHN细胞接种于6孔板,分别用0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PA处理24 h。提取各种细胞总蛋白进行BCA法测定蛋白浓度。经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上。5%脱脂奶粉溶液室温封闭2 h。加入一抗(MMP-2、TIMP-1、Smad2、Smad3 1:1 000, MMP-9 1:500)4℃孵育12 h。洗膜后加入二抗(1:20 000)室温孵育2 h。用凝胶成像分析系统检测蛋白条带。

2.9 统计学分析 各实验独立重复3次以上,采用GraphPad Prism 8.0软件对数据进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

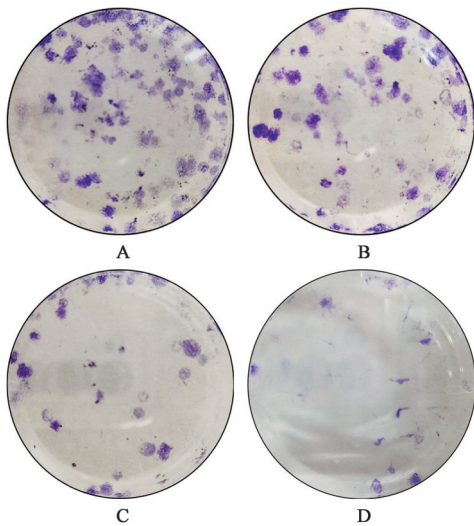
3.1 PA对ACHN细胞增殖的影响 与空白组比较,PA组细胞的存活率显著降低($P<0.01$),见表1。经GraphPad Prism 8.0软件计算,PA作用于ACHN细胞的 IC_{50} 为 $70.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,为避免PA的细胞毒性,后续实验选择低浓度的PA(0、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)观察其对肾癌细胞黏附、侵袭迁移的影响。克隆形成实验结果显示,与空白组比较,PA组细胞的克隆群数量显著减少($P<0.01$),见图1、表2。这提示PA对肾癌细胞的增殖有抑制作用。

表1 PA对ACHN细胞存活率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of PA on survival rate of ACHN cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞存活率/%
空白组		1.227±0.001	100.000±0.001
PA组	20	0.952±0.019 ¹⁾	73.214±0.047 ¹⁾
	40	0.677±0.005 ¹⁾	55.187±0.004 ¹⁾
	80	0.558±0.015 ¹⁾	45.491±0.012 ¹⁾
	160	0.526±0.020 ¹⁾	42.911±0.016 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ (表2、表3、表5-表7同)



注:A.空白组;B~D.PA组(20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)(图2-图5同)

图1 PA对ACHN细胞克隆形成的影响

Fig. 1 Effect of PA on formation of ACHN cell clones

表2 PA对ACHN细胞克隆形成的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of PA on ACHN cells colony formation ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	克隆形成数目/个
空白组		55.33±4.16
PA组	20	37.00±3.61 ¹⁾
	40	24.33±2.08 ¹⁾
	80	7.33±1.53 ¹⁾

3.2 PA对ACHN细胞黏附的影响 与空白组比较,PA组细胞的黏附数量显著降低($P<0.01$)。说明PA能在肾癌细胞迁移的开始降低与细胞基质的黏附能力。见图2、表3。

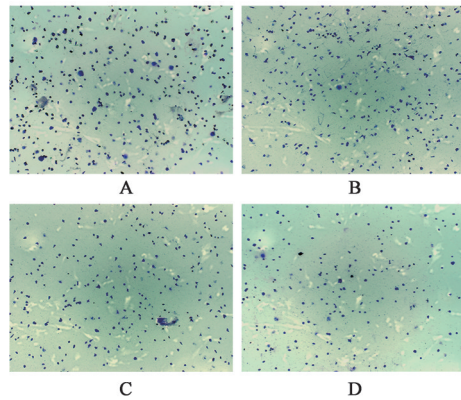


图2 PA对ACHN细胞的黏附能力的影响(倒置显微镜,×40)

Fig. 2 PA inhibited adhesion ability of ACHN cells (inverted microscope, ×40)

表3 PA对ACHN细胞黏附的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of PA on ACHN cells adhesion ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞黏附数目/个
空白组		362.67±9.45
PA组	20	305.67±6.03 ¹⁾
	40	265.67±6.66 ¹⁾
	80	182.30±6.51 ¹⁾

3.3 PA对ACHN细胞迁移的影响 与空白组比较,PA组细胞的划痕愈合率逐渐降低($P<0.05, P<0.01$)。这提示PA能抑制肾癌细胞的迁移。见图3、表4。

3.4 PA对ACHN细胞侵袭的影响 Transwell结果发现,与空白组比较,PA组细胞的穿膜数量显著减少($P<0.01$),这提示PA可以抑制肾癌细胞的侵袭迁移。见图4、表5。

3.5 PA对ACHN细胞动态迁移的影响 与空白组比较,PA组细胞的累计迁移距离显著缩短($P<0.01$)。这进一步说明PA能抑制肾癌细胞的转移。见表6。

3.6 PA对ACHN细胞中MMP/TIMP相关蛋白和Smads关键蛋白的影响 与空白组比较,PA组(40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)MMP-9和MMP-2蛋白表达降低,TIMP-1蛋白表达升高,且Smad2/3蛋白表达下调($P<0.01$)。这说明PA能够通过调控MMP/TIMP的稳态平衡和下调Smad2/3蛋白的表达来抑制肾癌的侵袭转移。见图5、表7。

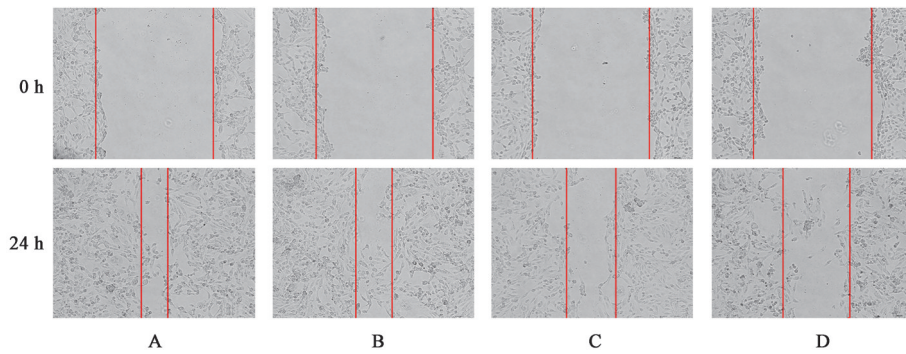


图3 PA抑制ACHN细胞的迁移(倒置显微镜,×100)

Fig. 3 PA inhibited migration of ACHN cells (inverted microscope, ×100)

表4 PA对ACHN细胞划痕愈合率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of PA on ACHN cells scratch healing rate ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	划痕愈合率/%
空白组		84.03±0.48
PA组	20	78.92±0.63 ¹⁾
	40	64.34±0.56 ²⁾
	80	51.50±0.69 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$

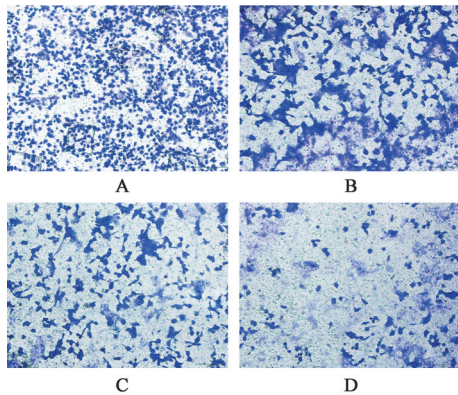


图4 PA对ACHN细胞侵袭的影响(倒置显微镜,×100)

Fig. 4 PA inhibited invasion of ACHN cells (inverted microscope, ×100)

表5 PA对ACHN细胞侵袭的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of PA on ACHN cells invasion ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	穿膜细胞数目/个
空白组		200.30±11.02
PA组	20	167.00±8.54 ¹⁾
	40	47.33±7.09 ¹⁾
	80	28.33±2.52 ¹⁾

4 讨论

侵袭转移是癌症相关死亡的主要原因^[16]。当肾癌发生转移时治愈的可能很小^[17]。西医虽然能在很大程度上提高恶性肿瘤的治疗效果,但其不良

表6 PA对ACHN细胞动态迁移的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of PA on dynamic cell migration ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	累计跟踪距离/ μm
空白组		27.78±6.06
PA组	20	25.05±4.68 ¹⁾
	40	19.46±4.34 ¹⁾
	80	13.18±2.94 ¹⁾

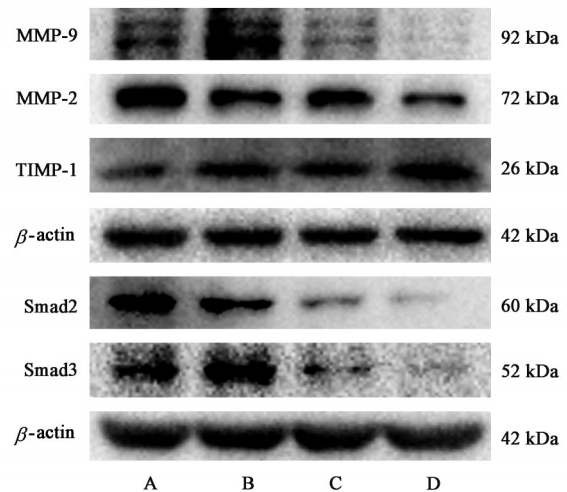


图5 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、Smad2、Smad3蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of protein expression of MMP-2, MMP-9, TIMP-1, Smad2, Smad3 protein

反应大、价格高,限制了其广泛应用,而中医药在防治肾癌侵袭转移方面具有明显优势^[18-20]。因此,有必要寻找更安全、更高效、低毒,减少对肝、肾、胃肠道不良反应的天然产物,从而提高患者的生活质量。茯苓作为一种抗肿瘤药物,对调节肠道腹泻、脾胃虚寒有较好的作用,对肝脏也有保护作用^[21]。在本研究中,首先通过CCK-8法发现PA可抑制肾癌细胞的活力,24 h时PA对ACHN细胞的 IC_{50} 为 $70.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。进一步研究发现PA可显著减少细胞的克隆群数目,抑制肾癌细胞的增殖,这表明PA有治疗肾癌的作用。肿瘤细胞黏附是肿瘤侵袭转

表7 PA对ACHN细胞MMP/TIMP相关蛋白和Smad2/3蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of PA on MMP/TIMP protein and Smad2/3 protein in ACHN cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	MMP-9/ β -actin	MMP-2/ β -actin	TIMP-1/ β -actin	Smad2/ β -actin	Smad3/ β -actin
空白组		0.66±0.02	1.04±0.02	0.26±0.01	0.99±0.05	0.86±0.04
PA组	20	0.88±0.04	0.85±0.03 ¹⁾	0.39±0.02 ¹⁾	0.79±0.03 ¹⁾	1.07±0.05
	40	0.42±0.06 ¹⁾	0.52±0.02 ¹⁾	0.37±0.01 ¹⁾	0.29±0.02 ¹⁾	0.54±0.06 ¹⁾
	80	0.17±0.04 ¹⁾	0.41±0.01 ¹⁾	0.51±0.02 ¹⁾	0.14±0.01 ¹⁾	0.29±0.02 ¹⁾

移的关键步骤,因此抑制肿瘤细胞的黏附可以抑制细胞侵袭转移的发生^[22]。通过细胞黏附实验发现PA可以显著抑制肾癌细胞的黏附能力,这表明PA能在肾癌细胞发生迁移的起始阶段抑制细胞的黏附。为了进一步验证PA对肾癌细胞的侵袭转移的抑制作用,进行了Transwell实验,结果发现,PA能有效减少肾癌细胞的跨膜细胞数量。有学者提出,抑制细胞运动可能是抑制肿瘤转移的有效途径^[23]。动态追踪PA对肾癌细胞动态迁移影响的结果再次证明,PA可以抑制肾癌细胞的迁移。

肿瘤侵袭转移的一个决定性标志是癌细胞跨越细胞外基质(ECM)和基底膜。为了穿透ECM,癌细胞分泌许多MMP家族的蛋白水解酶^[24]。其中MMP-2、MMP-9被认为是主要的ECM降解蛋白酶^[25]。实验结果显示,PA可以下调MMP-2、MMP-9的表达,这与MMP-2、MMP-9可以作为ECM重塑的关键效应物及抗肿瘤治疗的潜在靶点的结果相一致^[26-27]。研究还发现PA可以上调TIMP-1的表达。组织金属蛋白酶抑制剂家族成员(TIMPs)是促进癌症金属蛋白酶的天然抑制剂,其中早期发现TIMP-1因多功能性而成为了TIMPs的代表^[28]。MMPs的蛋白水解活性受到TIMPs典型的抗蛋白水解功能的严格调控,TIMPs的丢失导致基质蛋白水解的增强,TIMPs水平的增加导致ECM积累,即TIMPs表达的增加被认为是试图平衡ECM降解活性但未能成功地反映^[29-30]。在癌症中,蛋白酶抑制被认为可以防止恶性肿瘤的侵袭性特征^[31-35]。MMP/TIMP失衡可以促进肿瘤的增殖、侵袭和转移^[36],因此也可以通过调节MMP/TIMP失衡作为肿瘤侵袭转移的治疗靶点^[37]。PA抑制肾癌细胞的侵袭迁移的过程很可能是通过调节MMP/TIMP的稳态平衡来实现的。这为抗肾癌药物的研发提供了新的选择,也为茯苓作为抗肿瘤药物的研究奠定了基础。

Smad2与Smad3同属Smad族蛋白,是TGF- β_1 的下游信号转导因子,参与调控许多细胞外基质成

分的表达^[38]。Smad2/3异常表达,不仅促进ECM中胶原蛋白和纤维蛋白的过度沉积,还会抑制ECM的降解^[39-42]。在研究中发现PA可以降低Smad2、Smad3的表达,而通过Smads可参与MMP/TIMP平衡的调节过程,抑制Smad信号通路可以抑制肿瘤侵袭转移^[6,43]。因此推测PA可能是通过降低Smad2/3的表达影响MMP/TIMP稳态,抑制了ECM的降解进而抑制肾癌细胞侵袭转移的。这一结果的发现为深入研究PA抗肾癌的具体机制奠定了实验基础。

综上,本研究发现茯苓的主要三萜类化合物PA,具有抑制肾癌增殖、黏附及侵袭转移的作用,其机制可能与Smads调控MMP/TIMP稳态平衡有关。这些研究结果将为茯苓作为抗肾癌药物的进一步开发和临床运用提供实验基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R, MILLER K, JEMAL A. Cancer statistics, 2018[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] CAPITANIO U, MONTORSI F. Renal cancer [J]. Lancet, 2016, 387(10021): 894-906.
- [3] AMATO R. Renal cell carcinoma: Review of novel single-agent therapeutics and combination regimens [J]. Ann Oncol, 2005, 16(1): 7-15.
- [4] LANE B, RINI B, NOVICK A, et al. Targeted molecular therapy for renal cell carcinoma [J]. Urology, 2007, 69(1): 3-10.
- [5] PADALA S, BARSOUK A, THANDRA K, et al. Epidemiology of renal cell carcinoma [J]. World J Oncol, 2020, 11(3): 79-87.
- [6] LIAN G, WANG Q, MAK T, et al. Inhibition of tumor invasion and metastasis by targeting TGF- β -Smad-MMP2 pathway with asiatic acid and Naringenin [J]. Mol Ther Oncolytics, 2021, doi: 10.1016/j.omto.2021.01.006.
- [7] WANG S, LONG S, DENG Z, et al. Positive role of

- Chinese herbal medicine in cancer immune regulation [J]. *Am J Chin Med*, 2020, 48(7): 1577-1592.
- [8] LIU J, MAO J, WANG X, et al. Evaluation of traditional Chinese medicine herbs in oncology clinical trials[J]. *Cancer J*, 2019, 25(5): 367-371.
- [9] XU J, ZHANG J, WANG J. The application of traditional Chinese medicine against the tumor immune escape[J]. *J Transl Int Med*, 2020, 8(4): 203-204.
- [10] ZHAO H, XIE H, LI J, et al. Research progress on reversing multidrug resistance in tumors by using chinese medicine [J]. *Chin J Integr Med*, 2018, 24(6): 474-480.
- [11] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:251
- [12] 马艳春,范楚晨,冯天甜,等. 茯苓的化学成分和药理作用研究进展[J]. *中医学报*, 2021, 49(12): 108-111.
- [13] RÍOS J. Chemical constituents and pharmacological properties of *Poria cocos* [J]. *Planta Med*, 2011, 77(7): 681-691.
- [14] 邓桃妹,彭代银,俞年军,等. 茯苓化学成分和药理作用研究进展及质量标志物的预测分析[J]. *中草药*, 2020, 51(10):2703-2717.
- [15] 徐德宏,谭朝阳,郑慧,等. 茯苓功效成分茯苓酸的研究进展[J]. *食品科学*, 2022, 43(7):273-280.
- [16] VAN ZIJL F, KRUPITZA G, MIKULITS W. Initial steps of metastasis: Cell invasion and endothelial transmigration [J]. *Mutat Res*, 2011, 728(1/2): 23-34.
- [17] DABESTANI S, MARCONI L, BEX A. Metastasis therapies for renal cancer[J]. *Curr Opin Urol*, 2016, 26(6): 566-572.
- [18] WANG S, TANG S, LAM S, et al. Aqueous extract of *Paeonia suffruticosa* inhibits migration and metastasis of renal cell carcinoma cells via suppressing VEGFR-3 pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2012, 2012(18): 409823.
- [19] XIE J, LIN W, HUANG L, et al. Bufalin suppresses the proliferation and metastasis of renal cell carcinoma by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3867-3873.
- [20] 赵俊峰,李豪,肖耀军,等. 千金子对肾癌Renca细胞周期及侵袭能力的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(22):5599-5602.
- [21] 崔鹤蓉,王睿林,郭文博,等. 茯苓的化学成分、药理作用及临床应用研究进展[J]. *西北药学杂志*, 2019, 34(5): 694-700.
- [22] WEI S, YANG J. Forcing through tumor metastasis: The interplay between tissue rigidity and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(2): 111-120.
- [23] PALMER T, ASHBY W, LEWIS J, et al. Targeting tumor cell motility to prevent metastasis [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(8): 568-581.
- [24] BRASSART-PASCO S, BRÉZILLON S, BRASSART B, et al. Tumor microenvironment: Extracellular matrix alterations influence tumor progression [J]. *Front Oncol*, 2020, doi:10.3389/fonc.2020.00397.
- [25] CONLON G, MURRAY G. Recent advances in understanding the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis [J]. *J Pathol*, 2019, 247(5): 629-640.
- [26] JIANG H, LI H. Prognostic values of tumoral MMP2 and MMP9 overexpression in breast cancer: A systematic review and Meta-analysis [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21(1): 149.
- [27] LIU H, ZENG Z, WANG S, et al. Main components of pomegranate, ellagic acid and luteolin, inhibit metastasis of ovarian cancer by down-regulating MMP2 and MMP9 [J]. *Cancer Biol Ther*, 2017, 18(12): 990-999.
- [28] ECKFELD C, HÁUBLER D, SCHOEPS B, et al. Functional disparities within the TIMP family in cancer: Hints from molecular divergence [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38(3): 469-481.
- [29] ARPINO V, BROCK M, GILL S. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis [J]. *Matrix Biol*, 2015, doi: 10.1016/j.matbio.2015.03.005.
- [30] PEARSON J, ZURITA F, TOMÁS-GALLARDO L, et al. ECM-Regulator timp is required for stem cell niche organization and cyst production in the drosophila ovary [J]. *PLoS Genet*, 2016, 12(1): e1005763.
- [31] ALBINI A, MELCHIORI A, SANTI L, et al. Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2 [J]. *JNCI J Natl Cancer Inst*, 1991, 83(11): 775-779.
- [32] KHOKHA R. Suppression of the tumorigenic and metastatic abilities of murine B16-F10 melanoma cells *in vivo* by the overexpression of the tissue inhibitor of the metalloproteinases-1 [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1994, 86(4): 299-304.
- [33] RIGG A, LEMOINE N. Adenoviral delivery of TIMP1 or TIMP2 can modify the invasive behavior of pancreatic cancer and can have a significant antitumor effect *in vivo* [J]. *Cancer Gene Ther*, 2001, 8(11):

- 869-878.
- [34] JIANG Y, GOLDBERG I, SHI Y. Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer [J]. *Oncogene*, 2002, 21(14): 2245-2252.
- [35] BAKER A, GEORGE S, ZALTSMAN A, et al. Inhibition of invasion and induction of apoptotic cell death of cancer cell lines by overexpression of TIMP-3 [J]. *Br J Cancer*, 1999, 79(9): 1347-1355.
- [36] LIN S, GAO Z, LIN L, et al. *Treponema pallidum* enhances human monocyte migration and invasion by dysregulating the MMP/TIMP balance [J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, doi: 10.1016/j.intimp.2019.105744.
- [37] WANG Z, HUANG C, LI Z, et al. Chrysanthemum indicum ethanolic extract inhibits invasion of hepatocellular carcinoma via regulation of MMP/TIMP balance as therapeutic target[J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(2): 413-421.
- [38] KALININA N. Smad expression in human atherosclerotic lesions: Evidence for impaired TGF-beta/Smad signaling in smooth muscle cells of fibrofatty lesions[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(8):1391-1396.
- [39] LI X, GUO L, YANG X, et al. TGF- β_1 -induced connexin43 promotes scar formation via the ERK/MMP-1/collagen III pathway [J]. *J Oral Rehabil*, 2020, 47(Suppl 1): 99-106.
- [40] ZHANG L, ZHU Z, YAN H, et al. Creatine promotes cancer metastasis through activation of Smad2/3 [J]. *Cell Metab*, 2021, 33(6): 1111-1123. e4.
- [41] HORITANI S, FUKUI T, TANIMURA Y, et al. Specific Smad2/3 linker phosphorylation indicates esophageal non-neoplastic and neoplastic stem-like cells and neoplastic development [J]. *Dig Dis Sci*, 2021, 66(6): 1862-1874.
- [42] SUZUKI R, FUKUI T, KISHIMOTO M, et al. Smad2/3 linker phosphorylation is a possible marker of cancer stem cells and correlates with carcinogenesis in a mouse model of colitis-associated colorectal cancer [J]. *J Crohns Colitis*, 2015, 9(7): 565-574.
- [43] MO N, LI Z, LI J, et al. Curcumin inhibits TGF- β_1 -induced MMP-9 and invasion through ERK and Smad signaling in breast cancer MDA-MB-231 cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(11): 5709-5714.

[责任编辑 张丰丰]