

常春藤皂苷元对胃癌细胞 MGC-803 增殖、黏附、侵袭和迁移能力的影响

刘包欣子¹, 王瑞平^{2*}, 邹玺², 周锦勇²

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210046; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨常春藤皂苷元对胃癌细胞 MGC-803 细胞的生长、黏附、侵袭和迁移能力的影响。方法:采用 MTT 法、细胞黏附实验、Transwell 小室侵袭实验、划痕实验检测对人胃癌细胞 MGC-803 的增殖、黏附、侵袭、迁移能力的影响。结果:①常春藤皂苷元有抑制人胃癌细胞 MGC-803 增殖的作用,与对照组比较,随着药物质量浓度的增大,其对细胞的抑制率也明显增大($P < 0.01$),呈现质量浓度依赖性。②常春藤皂苷元作用人胃癌细胞 MGC-803 后,细胞的黏附能力明显降低($P < 0.01$),随着质量浓度的增加和时间的推移,呈现抑制率递增的结果。③常春藤皂苷元作用人胃癌细胞 MGC-803 后,侵袭的细胞数较对照组明显减少($P < 0.01$),质量浓度越高,侵袭的数量越少。④常春藤皂苷元作用人胃癌细胞 MGC-803 后,细胞愈合的程度有明显的分组差别,质量浓度越高,愈合度越差,表明迁移能力受到很大影响。结论:常春藤皂苷元对人胃癌细胞 MGC-803 的增殖具有抑制作用;常春藤皂苷元能抑制人胃癌细胞 MGC-803 的黏附能力、侵袭能力和迁移能力。

[关键词] 常春藤皂苷元; 胃癌细胞 MGC-803; 增殖; 黏附; 侵袭; 迁移

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)04-0212-04

Effect of Hederagenin on Biological Behaviors Including Proliferation, Adhesion, Invasion and Migration Capabilities of Human Gastric Cancer Cell Line

LIUBAO Xin-zi¹, WANG Rui-ping^{2*}, ZOU Xi², ZHOU Jin-yong²

(1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210046, China;
2. Jiangsu Province Traditional Chinese Medicine Hospital, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** This study was designed to explore: the effect of hederagenin on the biological behaviors including proliferation, adhesion, invasion and migration capabilities of human gastric cancer cell line MGC-803 *in vitro*. **Method:** Using MTT, adhesion experiment, transwell room, wounding healing to observe the effect of hederagenin on the biological behaviors including proliferation, adhesion, invasion and migration

[收稿日期] 20120922(007)

[基金项目] 江苏省高校优势学科建设工程项目;江苏省中医药领军人才项目(LJ200908)

[第一作者] 刘包欣子, 硕士, 从事肿瘤内科的中西医结合临床医学研究, Tel:15952015453, E-mail:240136491@qq.com

[通讯作者] *王瑞平, 主任医师, 博士生导师, 从事肿瘤临床及相关科研工作, E-mail: wrp61@163.com

[2] 徐立, 范欣生, 何胜旭. 复方辛夷口服液对卵蛋白致敏豚鼠支气管哮喘的影响[J]. 南京中医药大学学报:自然科学版, 2004, 26(2):104.

[3] 张莉, 孙建宁, 周勇, 等. 芩苈止咳颗粒对豚鼠支气管平滑肌的影响及平喘作用[J]. 北京中医药大学学报, 1999, 22(6):43.

[4] 徐淑云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002:901.

[5] 陈光亮, 王艳, 王钦茂, 等. 金安咳喘颗粒镇咳平喘祛痰及抗炎作用[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(2):107.

[6] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京:人民卫生出版社, 2006:355.

[7] 罗诚浩, 宋旭艳, 魏敏, 等. 黄芩苷与木犀草素混合物镇咳祛痰平喘作用的实验研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(3):212.

[责任编辑 李玉洁]

capabilities. Result: ① Hederagnin significantly inhibited the proliferation of MGC-803 cells. ($P < 0.01$), the result showed that inhibition ratio increase with the increasing of the concentration of concentration and the passage of time. ② Hederagnin significantly decreased the adhesion capability of MGC-803 cells ($P < 0.01$), along with the increasing of the concentration and the passage of time, present the results of inhibition rate increasing. ③ Hederagnin roled in human gastinc cancer cells MGC-803 so that the cell invasion number is significantly reduced ($P < 0.01$), the higher concentration, the less the number of cell invasion. ④ After hederagnin roled in human gastric cancer cells MGC-803, cell healing degree have obvious group difference, the higher concentration, the worse of degree of healing, which showed that migration ability greatly affected. **Conclusion:** Hederagnin can inhibit the proliferation of human gastric cell line MGC-803 and supresse the adhesion, invasion and migration capability of MGC-803 cells.

[**Key words**] hederagnin; human gastric cell line MGC-803; proliferation; adhesion; invasion; migration

常春藤皂苷元来源于加科常春藤属植物中华常春藤,属于皂苷类,是齐墩果酸的衍生物,在威灵仙^[1]、藤梨根^[2]等植物中均含有。近年来对齐墩果酸的研究较多,实验发现齐墩果酸对肝癌、宫颈癌、白血病^[3-6]等有抗肿瘤效果,对常春藤皂苷元的研究较少。我们假设其具有抗肿瘤作用,故本实验旨在探讨常春藤皂苷元对人胃癌 MGC-803 的增殖抑制作用,观察对胃癌 MGC-803 细胞的增殖、黏附、侵袭和迁移能力的影响。

1 材料与方 法

1.1 材料 常春藤皂苷元购自中国药品生物制品检定所,含量 $\geq 98\%$ 。实验前用 RPMI 1640 培养液稀释后得 4 种终质量浓度 50, 25, 12.5, 6.25 mg·L⁻¹ 供实验用; RPMI 1640 培养液购自 Gibco 公司;小牛血清购自杭州四季青公司, MTT, DMSO 和胰蛋白酶购自 Biosharp 公司, 8 μm 微孔聚碳酸酯膜的 Transwell 细胞培养小室购自美国 Millipore 公司, Matrigel, FN 胶购自美国 BD 公司, 人胃癌细胞株 MGC-803 购自南京凯基生物公司。

1.2 方 法

1.2.1 细胞及细胞培养 人胃癌株 MGC-803 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液常规培养; 以 0.25% 胰蛋白酶消化, 按实验所需细胞密度接种。

1.2.2 MTT 法检测常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞增殖的影响 取对数生长期细胞接种于 96 孔板中, 细胞密度为 5×10^3 /孔, 培养 24 h 后, 实验组加入含不同质量浓度常春藤皂苷元(50, 25, 12.5, 6.25 mg·L⁻¹) 的 RPMI 1640 培养液, 共设 4 组, 每组 3 个附孔; 空白组加入无药物的含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液, 继续培养 24 h 后, 倾倒培养液, PBS 洗 2 次, 每孔加入 100 μL RPMI 1640 培养液 + 20 μL MTT 溶液, 继续培养 4 h, 倒掉上清, 每孔加入 150

μL DMSO, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物甲贍充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 波长测量各孔的吸光度(A), 实验重复 3 次。按下式计算常春藤皂苷元对胃癌细胞生长的抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - A_{\text{实验}} / A_{\text{空白}}) \times 100\%$$

1.2.3 MTT 法检测常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞黏附能力的影响 用 25 mg·L⁻¹ 的 FN 包被 96 孔板, 每孔 30 μL , 超净台风干, 4 $^{\circ}\text{C}$ 备用。将细胞种入直径 6 cm 小皿, 细胞数为 1×10^5 /皿, 贴壁后, 加入含不同质量浓度常春藤皂苷元(50, 25, 12.5 mg·L⁻¹) 的 RPMI 1640 培养液, 并设立对照组, 培养 24 h 后, 消化细胞, 离心重悬, 保留小皿内含药培养液, 用含药培养液将细胞数调至密度约为 1×10^6 个/mL, 接种于 96 孔板, 1×10^5 个/孔, 每种密度设 3 个附孔; 对照组加入无药物的 RPMI 1640 培养液, 常规培养 20, 40, 60, 80 min; 吸出培养液; 用灭菌 PBS 小心清洗每孔 2 次, 洗去未黏附细胞; 每孔加入 100 μL 10% 小牛血清 RPMI 1640 + 20 μL MTT, 继续培养 4 h, 弃去全部上清, 每孔加入 150 μL DMSO, 振荡器振荡 10 min, 使结晶完全溶解, 在酶联仪波长 490 nm 处测出各孔 A, 以 A 代表黏附细胞数。实验重复 3 次。计算同 1.2.2 项下。

1.2.4 常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞侵袭能力的影响 使用 Transwell 小室用于检测细胞的侵袭能力, 其杯孔直径为 6.5 mm, 杯底由聚碳酸酯微孔滤膜封闭(微孔孔径为 8 μm)。在滤膜上覆盖 Matrigel 胶(30 mg·L⁻¹) 50 μL , 超净台风干备用, 使用前加入少量无血清培养液水化 30 min。将细胞种入直径 10 cm 小皿, 细胞数为 1×10^6 /皿, 贴壁后, 加入含不同质量浓度常春藤皂苷元(50, 25, 12.5 mg·L⁻¹) 的 RPMI 1640 培养液, 并设立对照组, 培养 24 h 后, 吸出对照组的培养液离心 10 min, 取上清, 作为条件培

养液(趋化因子)。将细胞消化,调整细胞密度为 2×10^6 个/mL,按试验所需质量浓度(50, 25, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),每组 3 个小室,将细胞加入 Transwell 上室,每个小室 200 μL 。下室加入 300 μL 含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 + 300 μL 趋化因子。细胞培养 24 h 后,用 PBS 清洗,棉签轻轻去掉上室细胞及 Matrigel 胶。将附着于滤膜背面的细胞用 0.1% 结晶紫染色,风干后,取下微孔滤膜,封于载玻片上,并在光学显微镜($\times 400$ 倍)下计数细胞,随机计数 5 个视野的穿膜细胞,取平均数。实验重复 3 次。按以下公式计算常春藤皂苷元对胃癌细胞的侵袭抑制率。

$$\text{细胞侵袭抑制率} = (1 - \text{实验组平均侵袭细胞数} / \text{空白组平均侵袭细胞数}) \times 100\%$$

1.2.5 细胞划痕修复实验检测常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞迁移能力的影响 取对数生长期细胞,将细胞按照每个孔 1×10^6 个种于 24 孔板中,用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养基培养 24 h 后,用 100 μL 微量移液枪头在 24 孔板内直线划痕。然后更换培养液,去除脱落细胞,接着按照 50, 25, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度给药,并设立对照组,继续培养 24 h 后,PBS 洗 2 次,镜下观察细胞愈合的变化,以愈合程度反应细胞迁移能力。实验重复 3 次。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS 13.0 统计软件分析,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组之间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞增殖的影响 结果表明不同质量浓度(3.125 ~ 50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的常春藤皂苷元作用 MGC-803 细胞 24 h,与对照组比较,随着药物质量浓度的增大,其对细胞的抑制率也明显增大($P < 0.01$)。结果见表 1。

表 1 常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	A	24 h 抑制率/%
实验 1	50	0.353 ± 0.081	86.89 ¹⁾
实验 2	25	1.112 ± 0.213	58.83 ¹⁾
实验 3	12.5	1.721 ± 0.172	36.22 ¹⁾
实验 4	6.25	2.204 ± 0.134	18.32
实验 5	3.125	2.392 ± 0.146	11.34
对照	-	2.683 ± 0.245	0

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.01$ (表 3 同)。

2.2 常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞黏附的影响 结果表明:50, 25, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 常春藤皂苷元作用 MGC-803 细胞 20, 40, 60, 80 min 后,实验组各时间点的细胞黏附率均明显低于空白组,且作用时间越长,其对细胞黏附能力的抑制作用越强。结果见表 2。

2.3 常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞侵袭的影响 结果表明:50, 25, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 常春藤皂苷元作用胃癌 MGC-803 细胞 24 h 后各质量浓度侵袭细胞数均明显低于对照组($P < 0.01$),3 种质量浓度对 MGC-803 细胞的侵袭抑制率分别为 84%, 68%, 23%。结果见表 3。

表 2 MTT 法检测常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞黏附能力的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	80 min	60 min	40 min	20 min
常春藤皂苷元	50	0.397 ± 0.012	0.346 ± 0.008	0.324 ± 0.069	0.301 ± 0.017
	25	0.760 ± 0.125	0.729 ± 0.119	0.693 ± 0.012	0.634 ± 0.031
	12.5	1.131 ± 0.095	0.989 ± 0.133	0.825 ± 0.056	0.715 ± 0.027
对照	-	1.434 ± 0.151	1.237 ± 0.043	0.983 ± 0.061	0.815 ± 0.023

表 3 常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞侵袭的影响

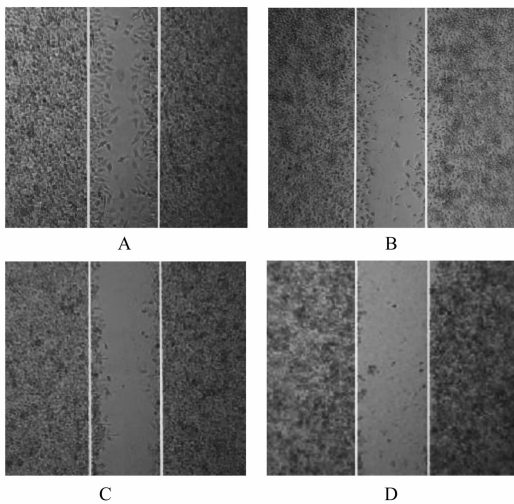
组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	视野 1/个	视野 2/个	视野 3/个	视野 4/个	视野 5/个	抑制率/%
常春藤皂苷元大剂量	100	187	263	258	171	177	84 ¹⁾
	50	523	447	361	381	436	68 ¹⁾
	25	1 087	1 104	993	923	1 013	23 ¹⁾
对照	-	1 436	1317	1 298	1 394	1 234	-

2.4 常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞迁移的影响 结果表明:50, 25, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度的常春藤皂苷元作用胃癌 MGC-803 细胞 24 h 后各质量浓度细胞愈合程度与对照组有明显差别,呈现质量浓度梯

度变化,表明常春藤皂苷元对 MGC-803 细胞迁移能力有显著的影响。结果见图 1。

3 结论

胃癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,居恶性肿



A. 对照组; B. 常春藤皂苷元 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
C. 常春藤皂苷元 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; D. 常春藤皂苷元 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

图1 常春藤皂苷元对胃癌 MGC-803 细胞迁移的影响

瘤死因的第2位^[7],可发生于任何年龄,但以40~60岁多见,能手术的仅为40%,切除后5年生存率仅为30%~40%^[8],复发转移率高达80%^[9],Ⅲ期胃癌5年生存率约30%^[10],晚期胃癌中生存期仅6~10个月。侵袭和转移是恶性肿瘤细胞最重要的生物行为,与预后密切相关,肿瘤细胞的转移是多因素、多基因综合作用的结果,其机制十分复杂,除了肿瘤细胞基因间的相互作用、肿瘤细胞与宿主细胞间的相互作用外,还包括细胞外基质在肿瘤细胞侵袭与转移过程中起到防御作用^[11]。肿瘤细胞转移是一个复杂、多步骤的级联过程,包括:①首先从原发肿瘤上脱落;②破坏并穿过自身基质;③穿入脉管(血管或淋巴管)进入血液循环或淋巴系统,并在其中存活;④形成瘤栓停滞于小脉管;⑤黏附于脉管内皮细胞,分泌蛋白酶水解内皮下基膜,迁移并穿出脉管;⑥在远处组织、器官中增殖,形成远处转移^[12]。实验发现齐墩果酸对肝癌、宫颈癌、白血病等有抗肿瘤作用,常春藤皂苷元是齐墩果酸的衍生物,故设计实验来观察其对肿瘤的作用。结果表明,常春藤皂苷元对胃癌细胞增殖有着明显的抑制作用,随着药物质量浓度的增大,其对细胞的抑制率也明显增大($P < 0.01$),对MGC-803的黏附能力也有影响,实验组各时间点的细胞黏附率均明显低于空白组,且

作用时间越长,其对细胞黏附能力的抑制作用越强($P < 0.01$),侵袭过的细胞细胞数与空白组比较显著减少,质量浓度越高侵袭能力越低($P < 0.01$),迁移图示MGC-803的迁移能力也有明显的抑制。常春藤皂苷元能抑制胃癌MGC-803增殖,对胃癌细胞侵袭、黏附、迁移能力有着明显的影响,是一种良好的抗肿瘤药物,但其具体作用机制待进一步研究。

[参考文献]

- [1] 赵燕强,杨立新,张宪民,等. 威灵仙的成分、药理活性和临床应用的研究进展[J]. 中药材,2008,31(3):465.
- [2] 邸学,王海波,翟延君,等. HPLC测定藤梨根中熊果酸、齐墩果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(1):66.
- [3] 黄志勤,李洪亮,孙立波,等. 齐墩果酸抗大鼠移植性肝癌作用的研究[J]. 安徽农业科学,2011,39(18):10807.
- [4] 王晶,张涛,商云飞. 齐墩果酸对宫颈癌Hela细胞凋亡的影响[J]. 黑龙江医药科学,2011,34(1):31,32.
- [5] 邱光清,张敏,杨燕军. 威灵仙总皂苷的抗肿瘤作用[J]. 中药材,1999,22(7):351.
- [6] 赵英,余春粉,张桂英,等. 威灵仙总皂苷抗肿瘤作用及其对癌细胞增殖周期的影响[J]. 时珍国医国药,2010,21(8):1908.
- [7] 冯丽丽,张爱平,董银平. 半夏泻心汤在胃癌防治中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(2):258.
- [8] Van Cutsem E. The treatment of advanced gastric cancer: new findings on the activity of the taxanes[J]. Oncologist, 2004,9(Suppl 2):9.
- [9] 金懋林,陈强,程风岐,等. 奥沙利铂联合亚叶酸钙和5-氟尿嘧啶治疗晚期胃癌的研究[J]. 中华肿瘤杂志,2003,25(2):172.
- [10] 吴蓉,吴小翎. 胃癌全身化疗进展[J]. 现代医药卫生,2005,21(5):546.
- [11] 阮叶萍,刘云霞,姚立. 益气补肾方对胃癌细胞侵袭转移能力的影响[J]. 中医杂志,2012,53(2):148.
- [12] 程兆明,周永静,张尤历,等. 吴茱萸碱对人胃癌SGC7901细胞增殖、侵袭和保罗样激酶-1基因表达的影响[J]. 江苏大学学报,2011,21(1):69.

[责任编辑 邹晓翠]