

· 药理 ·

南蛇藤总萜对 MGC-803 细胞侵袭和迁移能力的影响

朱耀东¹, 钱亚云¹, 马慧¹, 郭试瑜², 久光正², 刘延庆^{1*}

(1. 扬州大学医学院中西医结合临床医学系肿瘤研究室, 江苏 扬州 225009;

2. 昭和大学医学部生理学教研室, 东京 142)

[摘要] **目的:**探讨南蛇藤总萜对人胃癌 MGC-803 细胞侵袭和迁移能力的影响,并对其进行初步探讨。**方法:**体外培养 MGC-803 细胞,分为南蛇藤总萜组(质量浓度分别为 20,40,80 mg·L⁻¹)、阴性对照组和阳性对照组,采用 MTT 法检测南蛇藤总萜对 MGC-803 细胞增殖的抑制作用;采用 Transwell 小室法检测南蛇藤总萜处理 MGC-803 细胞 24 h 后,细胞侵袭和迁移能力的改变;Western blotting 法检测处理 24 h 后基质金属蛋白酶(MMP)-2 和 MMP-9 的表达情况。**结果:**南蛇藤总萜能抑制 MGC-803 细胞的增殖,呈一定的浓度及时间依赖性;南蛇藤总萜 40,80 mg·L⁻¹能显著降低 MGC-803 细胞的穿膜细胞数($P < 0.01$),并呈浓度依赖性;南蛇藤总萜能降低 MGC-803 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平,并有浓度依赖性。**结论:**南蛇藤总萜能抑制人胃癌 MGC-803 细胞的侵袭和迁移能力,其机制可能与抑制 MMP-2, MMP-9 的表达有关。

[关键词] 南蛇藤提取物; 侵袭; 迁移; 基质金属蛋白酶-2; 基质金属蛋白酶-9

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0180-04

Effect of *Celastrus orbiculatus* Extract on the Invasion and Migration in Human Gastric Carcinoma MGC-803 Cells

ZHU Yao-dong¹, QIAN Ya-yun¹, MA Hui¹, GUO Shi-yu², Hisamits Tadashi², LIU Yan-qing^{1*}

(1. Cancer Research Institute, Medical College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

2. Department of Physiology, School of Medicine, Showa University, Tokyo 142, Japan)

[Abstract] **Objective:** To study the effect and mechanism of *Celastrus orbiculatus* Thunb. extract (COE) on invasion and migration of human gastric carcinoma MGC-803 cells. **Method:** The human gastric carcinoma MGC-803 cells were divided into negative and positive control group and COE groups (20, 40, 80 mg·L⁻¹, respectively). The cytotoxicity effect was measured by using the MTT assay. The invasion and migration ability of MGC-803 were assayed by transwell assay. The expression levels of matrix metalloproteinase (MMP) -2 and MMP-9 in MGC-803 were examined by western blot assay. **Result:** COE suppressed the proliferation of MGC-803 cells in a time and does-dependent manner. The concentrations of 40, 80 mg·L⁻¹ of COE significantly inhibited the invasion and migration activity of MGC-803 cells. In addition, the expression levels of MMP-2, MMP-9 were dramatically suppressed by COE in a concentration-dependent manner. **Conclusion:** COE could obviously inhibit the migration and invasion ability of MGC-803 cells. Its mechanism may be related to the down-regulated expression of MMP-2 and MMP-9.

[Key words] *Celastrus orbiculatus* extract; invasion; migration; MMP-2; MMP-9

[收稿日期] 20120409(011)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173603);江苏省自然科学基金项目(BK2012686);江苏省中医药科技项目(LZ11210)

[第一作者] 朱耀东,在读研究生,中医师,从事中西医结合临床肿瘤学研究,Tel:18762321144,E-mail: zhuyaodong2010@163.com

[通讯作者] *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,Tel:13905278844,E-mail: liuyq@yzu.edu.cn

肿瘤细胞的侵袭转移包括增殖、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其侵袭转移过程中的重要环节。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)能降解细胞外基质及基底膜,在肿瘤细胞侵袭和迁移的过程中发挥了重要作用^[1]。南蛇藤是卫矛科南蛇藤属落叶木质藤本植物,是中国重要的药用植物,其茎、根、叶和果均可入药,具有祛风活血、消肿止痛和解毒等功效^[2]。研究发现,南蛇藤活性成分具有抑制肿瘤细胞生长的作用^[3,4],但其对胃癌细胞侵袭和迁移能力的影响未见报道。本研究拟探讨南蛇藤总萜对人胃癌 MGC-803 细胞侵袭和迁移能力的影响。

1 材料

1.1 药物 南蛇藤购自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* Thunb.)。南蛇藤总萜类化合物的提取和鉴定由课题合作方中国药科大学王强教授课题组完成^[5]。药物提取的主要流程如下:将南蛇藤藤茎切断,粉碎成粉,烘干,95%乙醇回流提取 3 次,旋转蒸发仪回收溶剂得到浸膏,拌入硅藻土,真空低温抽干,再用乙酸乙酯热水浴加热回流,过滤,回收得到乙酸乙酯浸膏(总萜类化合物含量 68.3%),提取物得率约 2%。药物经二甲亚砜助溶,以无血清培养基配成实验所需要浓度工作液,常压过滤除菌。5-氟尿嘧啶注射液(5-Fu)购自上海旭东海普药业有限公司(批号 090724)。

1.2 细胞株和试剂 人胃癌细胞株 MGC-803(中国科学院上海细胞库)。RPMI 1640 细胞培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),胰蛋白酶、MTT 粉剂、Matrigel(Sigma 公司),Transwell 小室(Corning 公司),MMP-2 和 MMP-9 单克隆抗体(Millipore 公司), β -actin(Cell Signaling 公司),HRP 标记的羊抗兔 IgG(Bioworld 公司)。

1.3 仪器 全自动酶标板分析仪、蛋白电泳槽、电转移装置(美国 Bio-Rad 公司),正置荧光显微镜(日本, Nikon 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞活力 取对数生长期 MGC-803 细胞消化后,制成单细胞悬液(5×10^4 个/mL),接种于 96 孔培养板中,每孔 100 μ L。分别设南蛇藤总萜组(质量浓度分别为 20, 40, 80, 160, 320 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、阴性对照组(加入等量的 RPMI 1640 培养液)和阳性对照组(加入 5-Fu 32 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。细胞接种

24 h 后,每孔加入 100 μ L 含药培养液或相应对照液,继续孵育培养 24, 48 h 后,按常规方法进行 MTT 反应,酶标仪检测波长 490 nm 的吸光度(A_{490}),按下式计算:

$$\text{抑制率} = (1 - \text{药物组 } A_{490} / \text{对照组 } A_{490}) \times 100\%$$

2.2 细胞侵袭力检测 Transwell 小室底部膜用 Matrigel 稀释液包被、水化。用无血清培养液将细胞浓度调整到 5×10^5 个/mL,加 200 μ L 到 Transwell 上室,加 500 μ L 含 20% 胎牛血清的培养液到下室,分别设南蛇藤总萜组(质量浓度分别为 20, 40, 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、阴性对照组和阳性对照组。每种浓度设 5 个复孔,细胞继续培养 12 h,取出 Transwell 小室用 PBS 洗 2 遍,用棉签擦去上室表面细胞,甲醇固定 15 min,0.1% 结晶紫室温下染色 30 min,在高倍镜下计数小室膜下面侵袭的细胞数,计数中间和四周 5 个视野,取平均值。

2.3 细胞迁移力检测 迁移实验不铺 Matrigel,其余步骤同侵袭实验。

2.4 MMP-2, MMP-9 蛋白的表达检测 取对数期的 MGC-803 细胞等数目接种于 $\Phi 9$ cm 细胞培养皿,培养过夜待其贴壁后,加入含南蛇藤总萜(质量浓度分别为 20, 40, 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的细胞培养液,另设阴性对照组和阳性对照组,24 h 后提取细胞总蛋白,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,封闭液室温封闭 2 h,加入一抗(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,洗膜后加入二抗(1:5 000)孵育 2 h,采用化学发光法曝光胶片,冲洗显色检测相应蛋白条带。

2.5 统计学处理 应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 MGC-803 细胞增殖的影响 对照组 MGC-803 细胞体外生长活跃,经 20 ~ 320 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 南蛇藤总萜处理 24, 48 h 后,细胞生长呈现不同程度的抑制,并且呈一定的浓度及时间依赖性(表 1)。与阴性对照组相比,具有统计学意义($P < 0.01$)。根据南蛇藤总萜对 MGC-803 细胞增殖的抑制率,计算南蛇藤总萜的半数抑制浓度(50% concentration of inhibition, IC_{50})为 108.94 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。为排除药物的细胞毒作用对细胞侵袭和迁移能力的影响,后继实验选用的南蛇藤总萜质量浓度为 20, 40, 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

3.2 对 MGC-803 细胞侵袭力和迁移力的影

表 1 南蛇藤总萜对 MGC-803 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	A	
		24 h	48 h
阴性对照	-	1.23 ± 0.023	1.21 ± 0.025
南蛇藤总萜	20	1.01 ± 0.027 ¹⁾	0.92 ± 0.018 ¹⁾
	40	0.89 ± 0.019 ¹⁾	0.76 ± 0.016 ¹⁾
	80	0.78 ± 0.022 ¹⁾	0.66 ± 0.027 ¹⁾
	160	0.66 ± 0.017 ¹⁾	0.57 ± 0.015 ¹⁾
	320	0.55 ± 0.022 ¹⁾	0.47 ± 0.017 ¹⁾
5-Fu	32	0.65 ± 0.018 ¹⁾	0.61 ± 0.014 ¹⁾

注:与阴性对照组相比¹⁾P < 0.01。

响 40, 80 mg·L⁻¹ 的南蛇藤总萜作用 MGC-803 细胞 24 h 后, 透膜细胞数目较阴性对照组明显减少 (P < 0.01, 表 2)。

表 2 南蛇藤总萜对 MGC-803 细胞侵袭力和迁移力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	侵袭透膜	迁移透膜
		细胞数	细胞数
阴性对照	-	148.8 ± 7.76	146.4 ± 8.39
南蛇藤总萜	20	131.8 ± 8.41 ¹⁾	128.8 ± 7.09 ²⁾
	40	97.6 ± 9.21 ²⁾	87.2 ± 8.56 ²⁾
	80	65.4 ± 6.69 ²⁾	54.8 ± 7.12 ²⁾
	5-Fu	32	34.4 ± 7.31 ²⁾

注:与阴性对照组相比¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

3.3 对 MMP-2, MMP-9 蛋白表达的影响 MGC-803 细胞经过不同浓度的南蛇藤总萜作用 24 h 后, Western blotting 分析表明, 随着药物浓度的增加, MGC-803 细胞 MMP-2, MMP-9 蛋白表达水平显著降低, 见图 1。

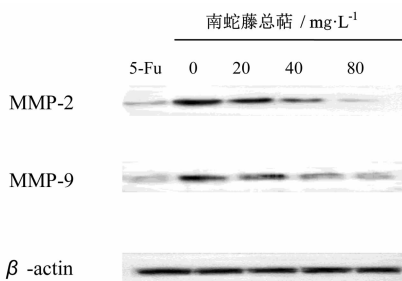


图 1 南蛇藤总萜对 MGC-803 细胞 MMP-2, MMP-9 表达的影响

4 讨论

近年来国内外研究表明, 从中药南蛇藤中提取的多种有效成分多为二萜类和三萜类化合物及生物碱类, 具有很好的抗肿瘤活性。它主要通过细胞毒作用、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞黏附和迁移、抑制肿瘤血管生成等多种机制发挥抗肿瘤作用。

侵袭转移是恶性肿瘤进展的关键步骤, 肿瘤细胞无限制的增殖是前提, 接着肿瘤细胞同质黏附降低, 异质黏附增强, 使得肿瘤细胞易脱落后, 降解基底膜和细胞外基质并且发生迁移。其中, MMPs 是降解细胞外基质最为重要的蛋白酶家族, 还能以非蛋白降解的形式调节肿瘤的微环境。家族之中尤以 MMP-2 和 MMP-9 与胃癌的侵袭转移关系最为密切, 不仅能降解基底膜和细胞外基质, 还参与肿瘤细胞的迁移和血管生成^[6]。Jeon 等在黑色素瘤上探讨南蛇藤提取物与 MMP-2 和 MMP-9 的关系时, 发现南蛇藤提取物降低黑色素瘤细胞侵袭和迁移能力的同时伴随着 MMP-2 和 MMP-9 的下调^[7]。由此可见, MMP-2 和 MMP-9 可作为南蛇藤提取物抑制肿瘤侵袭转移的下游靶向因子, 但需要在更多的肿瘤研究上得以证实。本实验结果显示, 南蛇藤总萜能抑制人胃癌 MGC-803 细胞的侵袭和迁移能力, 降低 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达, 提示南蛇藤总萜可能是通过下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达来抑制 MGC-803 细胞的侵袭和迁移。

MMPs 受到多种因子以及信号通路的调节。例如, 研究发现 JAK/STAT3 与 TGFβ₁/MAPKs 信号通路可以通过上调 MMP-2, MMP-9 的表达, 从而高效降解细胞外基质和基底膜, 促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[8]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路可以上调 MMP-2, MMP-9 的表达, 降解细胞外基质, 增强肿瘤细胞的转移^[9-10]。另外, 还有 NF-κB 信号通路可以调控 MMP-2, MMP-9 的表达, 参与肿瘤的转移进程^[11]。

本研究表明南蛇藤总萜通过降低 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达, 来抑制胃癌细胞的侵袭和迁移能力, 但是肿瘤细胞的侵袭和迁移所涉及的环节较为复杂, 而与 MMP-2, MMP-9 相关的信号通路又众多, 故还需进一步研究证实南蛇藤总萜抑制胃癌细胞侵袭和迁移的分子机制。

[参考文献]

- [1] 詹启敏. 分子肿瘤学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 509.
- [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] Xu J, Guo Y Q, Li X, et al. Cytoprotective sesquiterpenoids from the ethanol of fruits of *Celastrus orbiculatus* [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 117 (1): 175.
- [4] 员林, 刘延庆, 张华. 南蛇藤提取物含药血清对小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞的增殖能力和 VEGF-C 表达水平的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 17 (11): 157.

仙灵骨葆微波辅助提取物抗大鼠骨质疏松症

赵海平^{1,2}, 罗云¹, 张婧¹, 李敏¹, 廖正根^{1,*}, 杨明¹

(1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004;
2. 江西中医学院药学院, 南昌 330004)

[摘要] **目的:**探讨采用微波辅助提取技术(MAE)与传统提取工艺(TE)所得仙灵骨葆提取物的抗骨质疏松作用差异,为 MAE 的进一步推广及仙灵骨葆的临床应用提供资料。**方法:**健康 SD 大鼠,随机分为正常对照组、模型组、福善美组、仙灵骨葆传统提取物中剂量组(1.0 g·kg⁻¹),微波辅助提取物低、中、高剂量组(0.33,1.0,3.0 g·kg⁻¹)。上午除正常对照组外,各组采用维甲酸灌胃造模(80 mg·kg⁻¹),1 次/d,共 2 周,同时下午除正常对照组与模型组外,各给药组灌胃给药,1 次/d,共 4 周。给药结束后测定大鼠胫骨与股骨干骺端及腰椎的骨密度(BMD)。**结果:**模型组与正常对照组比较,大鼠胫骨与股骨干骺端及腰椎骨 BMD(0.267 5 ± 0.011 9), (0.228 9 ± 0.015 2), (0.247 1 ± 0.012 6) g·cm⁻²,水平显著下降($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组大鼠胫骨与股骨干骺端及腰椎骨 BMD 显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与仙灵骨葆 TE 中剂量组(0.272 7 ± 0.013 3) g·cm⁻²比较,仙灵骨葆 MAE 中剂量组大鼠胫骨干骺端 BMD(0.283 3 ± 0.020 0) g·cm⁻²水平明显升高($P < 0.05$);与福善美组比较,仅 MAE 高剂量组胫骨与股骨干骺端及腰椎骨 BMD(0.290 1 ± 0.014 3), (0.251 5 ± 0.006 7), (0.261 7 ± 0.007 9) g·cm⁻²水平与之未有明显差异。**结论:**采用 MAE 所得的仙灵骨葆提取物抗骨质疏松作用明确,且具剂量依赖性;较之同等剂量的传统提取物,MAE 提取物的抗骨质疏松作用呈增强趋势,今后应注重 MAE 在提升药物疗效与安全性等领域的研究。

[关键词] 仙灵骨葆;微波辅助提取;传统提取;骨质疏松

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)22-0183-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120921.1555.006.html>

[网络出版时间] 2012-09-26 15:55

[收稿日期] 20120415(003)

[基金项目] “863 计划”中药生产创新工艺及装备研发项目(2009AA043202)

[第一作者] 赵海平,博士,从事中药药理及药效学研究,Tel:0791-87118985,E-mail:cdzhp3690098@163.com

[通讯作者] *廖正根,教授,博士,从事药物新剂型与新技术研究,Tel:0791-87119011,E-mail:lyzlyg@163.com

[5] 管珂,陈筱清,王强,等. 南蛇藤茎的化学成分研究[J]. 中草药,2007,38(10):1455.

[6] Hua H, Li M J, Luo T, et al. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm [J]. Cell Mol Life Sci, 2011, 68(7):3853.

[7] Jeon Hoon. Anti-metastatic effects of *Celastrus orbiculatus* extract in B16F10 melanoma cells [J]. Natural Product Sciences, 2011, 17(2):135.

[8] 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.

[9] Bush S, Renaud S J, Schleussner E, et al. mTOR mediates human trophoblast invasion through regulation

of matrix-remodeling enzymes and is associated with serine phosphorylation of STAT3 [J]. Exp Cell Res, 2009, 315(10):1724.

[10] Lee C H, Hong C H, Yu H S, et al. Transforming growth factor- β enhances matrix metalloproteinase-2 expression and activity through AKT in fibroblasts derived from angiofibromas in patients with tuberous sclerosis from angiofibromas in patients with tuberous sclerosis complex [J]. Br J Dermatol, 2010, 163(6):1238.

[11] Kim D, Kim S, Koh H, et al. Akt/PKB promotes cancer cell invasion via increased motility and metalloproteinase production [J]. FASEB J, 2001, 15(11):1953.

[责任编辑 聂淑琴]