

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.07.019

黄药子配伍甘草对胃癌细胞增殖及侵袭的影响*

陆宝华, 陈翔[△]

(上海中医药大学附属曙光医院宝山分院·上海市宝山区中西医结合医院普外科, 上海 201900)

摘要:目的 探讨黄药子配伍甘草对胃癌细胞 SGC7901 增殖及侵袭的影响。方法 体外培养胃癌细胞 SGC7901, 以黄药子配伍甘草含药血清处理, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖, Transwell 试验检测细胞侵袭性, 实时荧光定量(qRT-PCR)检测上皮间质转化(EMT)相关基因的表达。结果 中药含药血清能抑制胃癌细胞 SGC 7901 增殖, 且抑制作用随着药物浓度的增加而加强($P < 0.05$); 中药组 Transwell 小室穿膜细胞数随着浓度的增加而减少($P < 0.05$); qRT-PCR 结果显示, 空白组 E 钙黏蛋白表达较其他组低, 不同浓度中药组 E 钙黏蛋白表达随着浓度的增加而增加; 中药组较空白组 N 钙黏蛋白和金属基质蛋白酶(MMP)-9 的表达均降低, 随着中药浓度的增加而显著下降($P < 0.05$)。结论 黄药子配伍甘草能抑制胃癌细胞 SGC 7901 的增殖, 并通过抑制 EMT 而降低癌细胞的侵袭性。

关键词: 胃癌; 黄药子; 甘草; 细胞增殖; 侵袭; 上皮间质转化

中图分类号: R932; R285.5; R273

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)07-0068-03

Effects of *Dioscorea Bulbifera* and *Glycyrrhiza Uralensis* on Proliferation and Invasion in Gastric Cancer Cell

LU Baohua, CHEN Xiang

(Department of General Surgery, Baoshan branch, Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine Shanghai · Baoshan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai, China 201900)

Abstract: Objective To investigate the synergistic effects of *Dioscorea bulbifera* and *Glycyrrhiza uralensis* on proliferation and invasion in gastric cancer cell line SGC7901. **Methods** The gastric cancer cells SGC7901 were used to treat with the drug-containing serum with the combination of *Dioscorea bulbifera* and *Glycyrrhiza uralensis*. The cell proliferation and invasion were detected by using the CCK-8 method and transwell. The expression of epithelial mesenchymal transition(EMT)-related genes were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction(qRT-PCR). **Results** The serum containing traditional Chinese medicine(TCM) could inhibit the proliferation of gastric cancer cell line SGC 7901, and with the increase of drug concentration, the inhibition effect was stronger($P < 0.05$). The numbers of transwell cells in TCM group were decreased with the increase of drug concentration($P < 0.05$). The results of PCR showed that the expression of E-cad in control group was lower than that in other groups. The expression of E-cad in different concentration groups increased with the increase of drug concentration. The expression of N-cad and MMP-9 in TCM group was lower than those in control group and decreased significantly with the increase of drug concentration($P < 0.05$). **Conclusion** *Dioscorea bulbifera* and *Glycyrrhiza uralensis* can inhibit the proliferation of gastric cancer cell line SGC 7901 and decrease the invasiveness of gastric cancer by inhibiting EMT.

Key words: gastric cancer; *Dioscorea bulbifera*; *Glycyrrhiza uralensis*; proliferation; invasion; epithelial mesenchymal transition

胃癌的治疗目前主要是以手术为基础的多学科治疗, 如辅助放化疗、分子靶向治疗等, 但由于效率低、易产生耐药性、毒副反应大、易复发等弊端常造成患者生活质量差、预后不佳^[1]。中医药治疗胃癌历史悠久, 具有一定疗效。前期研究显示, 黄药子醇提物有增加胃癌细胞氧化、抑制增殖和诱导凋亡的作用, 且能抑制胃癌动物移植瘤模型的瘤体生长^[2-5]。本试验中以胃癌细胞 SGC 7901 细胞株为研究对象, 予以中药黄药子配伍甘草含药血清处理, 观察中药对肿瘤细胞增殖和侵袭转移的影响, 以探讨其潜在的分子机制。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与材料

仪器: Transwell 小室(#ECM554, 美国 Chemicon 公

司); TRIzol(#15596018, 美国 Invitrogen 公司); 5810/5810R 型低温离心机(德国 Eppendorf 公司); Victor X 型酶标仪(美国 Perkinelmer 公司)。

瘤株: 人胃癌细胞 SGC 7901(上海市肿瘤研究所)。

药物与试剂: 黄药子及甘草均购自安徽省亳州市药材市场, 经上海中医药大学附属曙光医院宝山分院中药房苟小军教授鉴定为正品。DMEM 培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、磷酸缓冲盐溶液(PBS)等均购自美国 Gibco 公司; CCK-8 试剂盒(#AR1160, 武汉博士德生物科技有限公司)。

动物: 20 只 SD 大鼠, SPF 级, 雄性, 体质量(250 ± 20)g, 购自上海斯莱克动物有限公司, 许可证号为 SCXK(沪)2017-0005, 饲养于上海中医药大学实验动

*基金项目: 上海市宝山区青年医学人才项目[bswsyq-2015-A10]; 上海市宝山区中西医结合医院院级项目[院 201409]。

第一作者: 陆宝华, 男, 大学本科, 主治医师, 研究方向为普外科恶性肿瘤的基础与临床, (电子信箱)lubaohua777@sohu.com。

[△]通信作者: 陈翔, 男, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向为普外科恶性肿瘤的基础与临床, (电子信箱)adams1357@tom.com。

物中心,室温 22 ~ 25 ℃,相对湿度 45% ~ 70%。所有动物试验操作过程严格按试验动物管理与保护相关规定进行。

1.2 含药血清的制备及分组

将黄药子及甘草加 10 倍量蒸馏水浸泡 30 min 后武火煮沸,文火煎 30 min,过滤;再加 8 倍量蒸馏水复煎。取 2 次煎煮液进行浓缩后,放入 -80 ℃ 冰箱内制成冰,干燥获得浸膏粉,备用。

将 20 只 SD 大鼠随机分为 4 组,各 5 只,采用药物灌胃制备含药血清,分为高、中、低剂量组(20, 10, 5 mL/kg),空白组(生理盐水 5 mL),连续 7 d,最后 1 次灌胃 1 h 后,麻醉并剖腹于腹主动脉抽取血液,离心过滤后置 -80 ℃ 冰箱保存,备用,即得含药血清。

1.3 检测指标

细胞培养及 CCK-8 法检测细胞增殖:将细胞接种于培养器皿中,在环境条件 37 ℃ 及 5% CO₂ 的 DMEM 高糖培养基中培养,当细胞爬壁达 85% 时按 1:5 传代,取对数生长期细胞进行试验。制成单细胞悬液,并调整密度为 5×10^4 个/mL,在 96 孔培养板接种细胞悬液,每组 6 复孔,每孔接种量约 200 μ L,不同组分别加入各组含药血清 10 μ L,培养 24 h 和 48 h 后,各加入 CCK-8 试剂 10 μ L,37 ℃、5% CO₂ 孵育 2 h 后,利用酶标仪测定各组光密度值(OD 值),测定波长为 450 nm。

Transwell 侵袭试验:细胞消化后调整浓度为 2×10^5 个/mL,将各组含药血清与悬浮细胞混合培养,以每孔 200 μ L 细胞悬液加入上室,下室加入 DMEM 500 μ L,每组设 6 复孔。培养 24 h 后抽除上室中的培养基,并拭去未破膜的细胞;将小室浸渍于多聚甲醛中固定 30 min,0.1% 结晶紫在室温下染色 20 min,PBS 漂洗 2 次。倒置显微镜下检测,并计数破膜细胞数,各组随机挑选 3 个不同高倍($\times 200$)视野。

实时荧光定量(qRT-PCR)检测:参照 Trizol 使用说明提取细胞总 RNA,进行逆转录,生成 cDNA。依照 PCR 试剂盒使用步骤进行 qRT-PCR 反应。在线在 GenBank 中搜索相关基因序列,以 Primer Express 软件设计 PCR 引物,由上海生工公司合成。引物序列包括,

β -actin,上游 5'-GAGAAATCTGGCACCACAC C-3',下游 5'-GGATAGCACAGCCTGGATAGCAA-3';E 钙黏蛋白,上游 5'-CGAGAGCTACACGTTACCG G-3';下游 5'-GGGTGTCGAGGGAAAAATAGG-3';N 钙黏蛋白,上游 5'-TCAGGCGTCTGTAGAGGCTT-3';下游 5'-ATGCACATCCTTCGATAAGACTG-3';金属基质蛋白酶(MMP)-9,上游 5'-TGTACCGCTATG-GTTACACTCG-3',下游 5'-GGCAGGGACAGTTGCTT CT-3'。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件处理。计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{X} \pm s$)表示,多组间的均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对胃癌细胞 SGC 7901 增殖与侵袭的影响

结果见表 1。中药组 24,48 h 的 OD 值低于空白组,中、高剂量组下降更显著($P < 0.05$),表明中药含药血清作用能抑制胃癌细胞 SGC 7901 增殖,且随着药物浓度的增加,抑制作用更强。Transwell 试验结果表明,空白组的穿膜细胞数较中药组多,且不同浓度中药组穿膜细胞数随着浓度的增加而减少。

表 1 不同组别胃癌细胞 SGC 7901 增殖情况比较($\bar{X} \pm s, n=6$)

组别	增殖情况(OD 值)		穿膜细胞数 (个)
	24 h	48 h	
空白组	0.412 $\pm$ 0.017	0.428 $\pm$ 0.022	349 $\pm$ 16.01
低剂量组	0.401 $\pm$ 0.019	0.409 $\pm$ 0.024	298 $\pm$ 15.93*
中剂量组	0.370 $\pm$ 0.009*	0.351 $\pm$ 0.011*	224 $\pm$ 13.36*
高剂量组	0.357 $\pm$ 0.009* Δ	0.340 $\pm$ 0.008* Δ	191 $\pm$ 17.15* Δ

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与其他组比较, $\Delta P < 0.05$ 。下表同。

2.2 对胃癌细胞 SGC7901 EMT 相关基因表达的影响

qRT-PCR 结果显示,空白组 E 钙黏蛋白表达较其他组低,不同浓度中药组其表达随着浓度的增加而增加;中药组较空白组 N 钙黏蛋白和 MMP-9 的表达均降低,随着中药浓度的增加而下降显著($P < 0.05$)。详见表 2。

表 2 不同组 SGC7901 细胞中 E 钙黏蛋白、N 钙黏蛋白和 MMP-9 的变化比较($\bar{X} \pm s, n=6$)

组别	E 钙黏蛋白	N 钙黏蛋白	MMP-9
空白组	0.397 $\pm$ 0.103	0.873 $\pm$ 0.112	1.093 $\pm$ 0.184
低剂量组	0.550 $\pm$ 0.126	0.648 $\pm$ 0.174	0.850 $\pm$ 0.116
中剂量组	0.813 $\pm$ 0.165*	0.467 $\pm$ 0.123*	0.698 $\pm$ 0.105*
高剂量组	1.118 $\pm$ 0.155* Δ	0.382 $\pm$ 0.095* Δ	0.488 $\pm$ 0.108* Δ

3 讨论

中医药治疗胃癌历史悠久、应用普遍,疗效越来越被认可。但中药及组方包含多组分,具有多靶点作用的特点,作用机制复杂。现代医学研究发现,中药抗癌的分子机制包括抑制增殖、诱导凋亡、下调侵袭转移能力等。体外胃癌细胞株研究表明,中药化瘀解毒方可抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的增殖^[6]。体内试验还证实^[7],中药汤剂可抑制胃癌皮下移植瘤的生长。前期研究发现,黄药子能抑制胃癌细胞增殖和诱导凋亡,并能抑制动物模型的皮下移植瘤生长^[2-3]。甘草有中药国老之美名,有

调和、减毒等功效,还具有抗炎、抗病毒和抗癌等作用^[6-8]。体外试验证实^[9],甘草中的组分不但能抗肿瘤增殖,还可诱导细胞凋亡,甚至可通过间接下调 MMP-9 的表达降低肿瘤细胞的迁移/侵袭能力^[10]。本研究结果显示,黄药子配伍甘草能显著抑制体外培养的胃癌细胞的增殖,随着中药浓度的升高,抑制效果更明显。

肿瘤的侵袭与转移是临床预后不佳的重要因素。上皮间质转化(EMT)被认为是癌细胞侵袭和转移扩散的根源^[11-12]。其发生的显著标志为上皮细胞代表性蛋白 E 钙黏蛋白表达下降,以及间质细胞代表性蛋白 N 钙黏蛋白、波形蛋白和 MMP-9 表达增加^[13]。E 钙黏蛋白属钙黏蛋白家族成员,主要介导细胞连接与黏附,其表达缺失与多种上皮恶性肿瘤的侵袭和转移密切相关,且与不良预后密切相关^[14]。N 钙黏蛋白是反映间质细胞的重要标记蛋白,其高表达提示恶性肿瘤的预后较差^[15]。MMP 在降解细胞外基质和基底膜中有重要作用^[16]。其中 MMP-2 和 MMP-9 是目前常研究的基质金属蛋白酶,可降解细胞外基质(ECM),极大改变肿瘤的黏性、移动性,促进侵袭转移。体外研究发现,中药软坚散结,方能抑制胃癌细胞 SGC7901 的增殖及侵袭,其作用机制与增加 E 钙黏蛋白表达进而阻碍 EMT 进程有关^[17]。甘草中的成分 18 β -甘草酸对胃癌细胞 SGC7901 的侵袭转移有阻碍作用,相关机制可能通过调控 ROS/PKC/ERK 通路,抑制 MMP-2、MMP-9 表达和 EMT 的发生^[18]。本研究结果显示,与空白组相比,中药组细胞破膜数显著下降,且随着中药剂量的升高,细胞破膜数更趋减少,表明中药可抑制胃癌细胞的侵袭,在肿瘤的生长过程中有重要调节作用。为了初步探究中药抑制胃癌细胞侵袭的具体分子机制,检测了 EMT 过程中关键基因表达的变化。结果发现,与对照组相比,中药组细胞 E 钙黏蛋白的表达增加,N 钙黏蛋白和 MMP-9 的表达水平显著下调,提示中药黄药子配伍甘草可通过调控胃癌细胞的 EMT 进程,进而抑制肿瘤细胞的侵袭和转移。

综上所述,黄药子配伍甘草能抑制胃癌细胞的增殖,并可通过调节胃癌细胞 EMT 过程中的关键基因,从而降低其侵袭转移能力,但中药组分中是何种具体的分子活性物质参与调控 EMT 的具体分子机理尚待深入研究。

参考文献:

- [1] 郭康,周脉耕,潘晓平. 中国居民 2006-2012 年胃癌死亡趋势分析[J]. 中国公共卫生,2015,31(3):341-343.
- [2] CHEN X, WU SH, ZENG XB, et al. Antioxidant and SGC-7901 cell inhibition activities of Rhizoma Dioscoreae bulbiferae. ethanol extracts [J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2013, 10(5): 261-266.
- [3] 陈翔,吴曙辉,袁杰,等. 黄药子醇提取物对人胃癌裸鼠移植瘤的生长和血清 IL-8 及 sICAM-1 表达的影响[J]. 湖南中医杂志,2013,29(7):123-125.
- [4] 张俊萍,赵一,梁瑞峰,等. 化瘀解毒方对过表达 PDK1 和 Akt 人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2017,44(5):1036-1039.
- [5] 邓海霞,陈更新,周奥强,等. 养正散结汤对裸鼠胃癌移植瘤生长及 let-7a/c-Myc 表达的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志,2017,25(10):738-741.
- [6] YANG R, YUAN BC, MA YS, et al. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb[J]. Pharm Biol, 2017, 55(1):5-18.
- [7] 王永洪,兰婉莹,陈恬. 甘草酸体外抗人巨细胞病毒 AD169 的作用[J]. 中成药,2016,38(10):2121.
- [8] LIN SC, CHU PY, LIAO WT, et al. Glycyrrhizic acid induces human MDA-MB-231 breast cancer cell death and autophagy via the ROS-mitochondrial pathway[J]. Oncol Rep, 2018, 39(2): 703-710.
- [9] 彭洪,李鑫,李彦坤,等. 甘草提取物(GL-1)对胃癌 SGC-7901 细胞增殖抑制及促凋亡作用[J]. 中国公共卫生, 2016,32(7):931-934.
- [10] HSIEH MJ, LIN CW, YANG SF, et al. Glabridin inhibits migration and invasion by transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase 9 through modulation of NF- κ B and AP-1 activity in human liver cancer cells[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(12): 3037-3050.
- [11] ZHANG H, WU X, XIAO Y, et al. Coexpression of FOXK1 and vimentin promotes EMT, migration, and invasion in gastric cancer cells [J]. J Mol Med (Berl), 2019, 97(2):163-176.
- [12] LI G, SU Q, LIU H, et al. Frizzled7 Promotes Epithelial-to-mesenchymal Transition and Stemness Via Activating Canonical Wnt/ β -catenin Pathway in Gastric Cancer [J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(3):280-293.
- [13] LU W, KANG Y. Epithelial-Mesenchymal Plasticity in Cancer Progression and Metastasis[J]. Dev Cell, 2019, 49(3):361-374.
- [14] YAMASHITA N, TOKUNAGA E, IIMORI M, et al. Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With Regard to Invasion and Metastasis of Breast Cancer[J]. Clin Breast Cancer, 2018, 18(5):e1003-e1009.
- [15] OZAKI-HONDA Y, SEKI S, FUJIWARA M, et al. Prognostic Prediction of Oral Squamous Cell Carcinoma by E-Cadherin and N-Cadherin Expression in Overall Cells in Tumor Nests or Tumor Cells at the Invasive Front[J]. Cancer Microenviron, 2017, 10(1-3):87-94.
- [16] LV Y, ZHAO X, ZHU L, et al. Targeting intracellular MMPs efficiently inhibits tumor metastasis and angiogenesis[J]. Theranostics, 2018, 8(10):2830-2845.
- [17] 张贵彪,朱元章,朱国福. 软坚散结颗粒对人胃腺癌 SGC-7901 细胞 EMT 的抑制作用及相关机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(18):112.
- [18] CAI H, CHEN X, ZHANG J, et al. 18 β -glycyrrhetic acid inhibits migration and invasion of human gastric cancer cells via the ROS/PKC- α /ERK pathway[J]. J Nat Med, 2018, 72(1): 252-259.

(收稿日期:2019-08-12)