

DADS 下调 Cathepsin D 抑制人胃癌 MGC803 细胞侵袭转移

殷未兰¹, 陈琳¹, 苏菊¹, 姜浩¹, 苏琦², 黄卫国², 李跃华¹, 唐三元¹

(1. 湖南省胃癌研究中心 南华大学附属第一医院肿瘤内科, 湖南 衡阳 421001;

2. 南华大学医学院肿瘤研究所)

摘要: **目的** 研究二烯丙基二硫(DADS)是否通过下调组织蛋白酶 D(Cathepsin D)的表达抑制人胃癌 MGC803 细胞侵袭转移。**方法** RT-PCR 和 Western blot 检测 DADS 及干扰 Cath-D 对人胃癌 MGC803 细胞 Cath-D mRNA 与蛋白表达变化;细胞划痕实验和 Transwell 实验分别检测 DADS 及干扰 Cath-D 对人胃癌 MGC803 细胞侵袭转移能力的变化。**结果** DADS 作用人胃癌 MGC803 细胞 24 h 后, Cath-D mRNA 与蛋白表达水平明显下降($P < 0.05$), 划痕距离明显增宽($P < 0.05$), 穿膜细胞数明显减少($P < 0.05$); siRNA 干扰 Cath-D 后, Cath-D mRNA 与蛋白的表达水平明显下降($P < 0.05$), 划痕距离明显增宽($P < 0.05$), 穿膜细胞数明显减少($P < 0.05$)。**结论** DADS 能抑制人胃癌 MGC803 细胞的侵袭转移能力, 其机制可能与下调 Cath-D 的表达有关。

关键词: 胃癌; DADS; 组织蛋白酶 D; 转移; 侵袭

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A

Down-regulated Cathepsin D Inhibits Migration and Invasion in Human Gastric Cancer MGC803 Cells Induced by Diallyl Disulfide

YIN Leilan, CHEN Lin, SU Ju, et al

(Center for Gastric Cancer Research of Hunan Province, Department of Medical Oncology, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether diallyl disulfide (DADS) inhibits human gastric carcinoma MGC803 cells invasion and metastasis by down-regulating the expression of Cathepsin D. **Methods** The mRNA and protein expression level of Cath-D were detected by RT-PCR and Western blot respectively; Migration and invasion potentials were examined by Wound Healing assay and transwell assay. **Results** Human gastric carcinoma MGC803 cells exposed to DADS 30 mg/L for 24h, the mRNA and protein expression level of Cath-D were significantly decreased ($P < 0.05$), scar distance was widened ($P < 0.05$), the number of cancer cells which passed through the Matrigel coated membrane was reduced ($P < 0.05$); after Cath-D was interfered by siRNA, the mRNA and protein expression level of Cath-D were significantly decreased ($P < 0.05$), scar distance was widened ($P < 0.05$), the number of cancer cells which passed through the Matrigel coated membrane was reduced ($P < 0.05$). **Conclusions** DADS can significantly inhibit the ability of migration and invasion ability of human gastric carcinoma MGC803 cells and its mechanism may be related to the expression of down-regulating Cath-D.

Key words: gastric cancer; DADS; cathepsin D; migration; invasion

收稿日期:2013-11-26

基金项目:湖南省自然科学基金衡阳联合基金(10JJ9017)。

作者简介:殷未兰, 硕士, 研究方向:肿瘤的化学治疗, E-mail: yin-leilan1987@163.com. 通讯作者唐三元, 博士, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向:肿瘤的化学治疗, E-mail: tangsy09@126.com.

胃癌是全球第 4 位常见恶性肿瘤, 每年大约有 98.96 万新发病例, 73.8 万人死于胃癌^[1]。胃癌起病隐匿, 早期常无特殊的明显症状, 也无明显的体征, 故发现时多数已发生淋巴结或远处转移, 这是导致其预后差、死亡率高的主要原因。DADS 在体内

外抑制人胃癌 MGC803 细胞迁移和侵袭能力已有较多的实验依据,其机制可能与下调 MMP-9、MMP-2、uPAR,上调 TIMP-1、TIMP-2、TIMP-3, Rac1-Rock1/Pak1 通路介导 LIMK1 下调,抑制 cofilin1 磷酸化^[2-4]等有关。组织学研究发现组织蛋白酶 D 在胃癌组织中高表达,可能参与胃癌的侵袭转移^[5],但 DADS 是否通过下调 Cath-D 的表达抑制人胃癌 MGC803 细胞侵袭转移尚未见报道。本实验进一步探讨 DADS 抑制人胃癌 MGC803 细胞迁移和侵袭的可能分子机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料

人胃癌 MGC803 细胞株、DADS 由南华大学肿瘤研究所惠赠;胎牛血清购自杭州四季青生物工程有限公司;Lipofectamine™ 2000、Trizol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;siRNA 由美国 Invitrogen 公司设计合成(Cath-D siRNA 序列为:5'-GGATCCACCACAAG-TACAA-3',Control siRNA 序列为 5'-GGACCACAA-CAATGCTCAA-3');RT 试剂盒、PCR 试剂盒购自加拿大 Fermentas 公司;鼠抗人 Cath-D 蛋白单克隆抗体购自美国 Santa 公司。

1.2 细胞培养和转染

人胃癌 MGC803 细胞在含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基中贴壁生长,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期细胞进行转染,转染步骤按照说明书进行,siRNA 终浓度为 50 nmol/L。培养 6 h 后更换为含有 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基,转染后 24 h 收集细胞,作为后续检测。

1.3 RT-PCR 检测 Cathesin D mRNA 水平

设计并合成半定量 RT-PCR 引物。Cath-D 正义链 5'-CAA CAG CGA CAA GTC CAG C-3',反义链 5'-CTG AAT CAG CGG CAC GGC-3' (597 bp);β-actin 为内参照,5'-ATC TGG CAC CAC ACC T-3',反义链 5'-CGT CAT ACT CCT GCT T-3' (837 bp)。使用 Trizol 提取细胞中总 RNA, RNA 逆转录成 cDNA,再通过 PCR 扩增。PCR 条件为 94 ℃ 变性 5 min;36 个 PCR 循环(94 ℃ 30 s,52 ℃ 30 s,72 ℃ 50 s);72 ℃ 5 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像仪观察、拍照并分析。

1.4 Western blot 检测 Cath-D 蛋白水平

提取细胞总蛋白,蛋白定量,经电泳、转膜后,

5% 的脱脂奶粉室温封闭 PVDF 膜 1 h;加入 Cath-D、β-actin 一抗,室温下摇动反应 30 min 后,置 4 ℃ 冰箱过夜;TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次,每次 10 min;加入相应二抗,室温下孵育 60 min;TBST 洗涤 PVDF 膜 3 次,每次 10 min;加入 ECL 显影剂,置于凝胶成像仪内,结果用凝胶成像分析系统测量灰度值并分析。

1.5 划痕实验检测细胞迁移能力

细胞种于 6 孔板,转染 24 h 后,用 200 μL Tip 头在 6 孔板中沿着直尺划痕,PBS 冲洗 3 次,需 DADS 处理的 3 组加入含有 30 mg/L DADS 的新鲜无血清培养基,另外 3 组加入新鲜无血清培养基,各组继续培养 24 h,以各组划痕边缘细胞向划痕内部迁移的距离为观察指标,分别在 0 h 和 24 h 在倒置显微镜下拍照并记录,计算平均值与标准差,实验重复 3 次。

1.6 Transwell 实验检测细胞侵袭能力

将 Matrigel 用无血清 RPMI1640 培养基稀释,每个小室上层均匀铺 50 μL。制备单细胞悬液 2×10^5 /mL,下室加入 500 μl 含 10% 胎牛血清的 1640 培养基,取 100 μL 单细胞悬液接种到上室,需 DADS 处理的 3 组在上室加入 30 mg/L DADS,37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养 24 h,取出 Transwell 小室,4% 多聚甲醛固定,0.1% 结晶紫染色。显微镜观察,随机计数 10 个高倍视野侵袭至滤膜下表面的细胞数,计算平均值与标准差,实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

数据采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间区别用 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 RT-PCR 检测 DADS 及干扰 Cath-D 对人胃癌 MGC803 细胞 Cath-D mRNA 表达的影响

加 DADS 3 组的 Cath-D mRNA 表达水平均较未加 DADS 3 组明显下调($P < 0.05$);Cath-D siRNA 干扰组的 Cath-D mRNA 表达水平均明显低于阴性对照组和空白对照组($P < 0.05$,图 1);阴性对照组与未干扰组之间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 1)。表明 DADS 能明显下调 Cath-D mRNA 表达水平。

2.2 Western blot 检测 DADS 及干扰 Cath-D 对人胃癌 MGC803 细胞 Cath-D 蛋白表达的影响

加 DADS 3 组的 Cath-D 蛋白表达水平均较未加

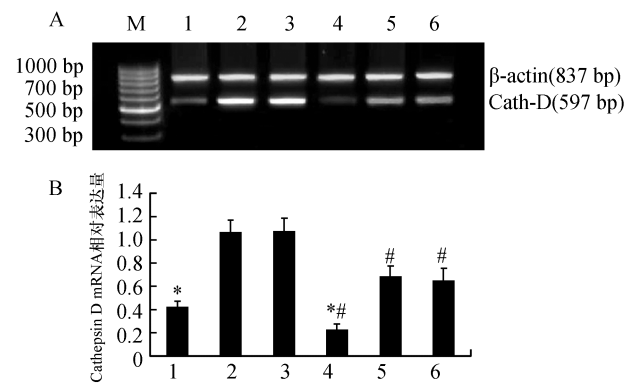


图1 DADS 及干扰 Cath-D 对 MGC803 细胞 Cath-D mRNA 表达的影响 A:RT-PCR 结果;B:相对灰度值. 与阴性对照组或未干扰组比较, *: $P < 0.05$; 与未加 DADS 组比较, #: $P < 0.05$. M; Marker; 1,4; Cath-D siRNA 干扰组; 2,5: 阴性对照组; 3,6: 未干扰组. 1,2,3: 未加 DADS; 4,5,6: 加 DADS

DADS 3 组明显下调 ($P < 0.5$); Cath-D siRNA 干扰组的 Cath-D 蛋白表达水平均明显低于阴性对照组和空白对照组 ($P < 0.05$, 图 2); 阴性对照组与未干扰组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 2)。表明 DADS 能明显下调 Cath-D 蛋白表达水平。

2.3 DADS 及干扰 Cath-D 对 MGC803 细胞迁移能力的影响

从图 3 可见, 各组在 0 h 时, 划痕距离大体相同 ($P > 0.05$, 表 1)。24 h 后, 加 DADS 3 组的划痕距离均较未加 DADS 3 组划痕距离明显增宽 ($P < 0.05$); Cath-D siRNA 干扰组较阴性对照组、未干扰组划痕距

离明显增宽 ($P < 0.05$, 表 1); 阴性对照组与未干扰组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$, 表 1)。

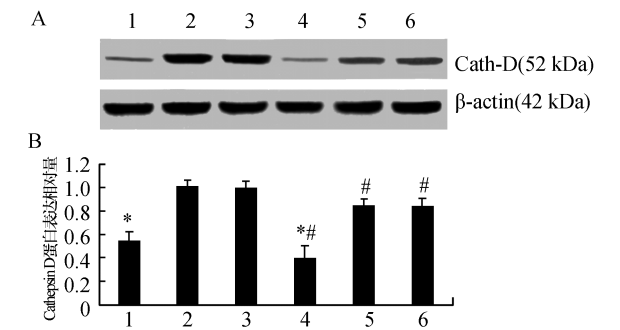


图2 DADS 及干扰 Cath-D 对 MGC803 细胞 Cath-D 蛋白表达表达的影响 A: Western Blot 结果; B: 相对表达量. 与阴性对照组或未干扰组比较, *: $P < 0.05$; 与未加 DADS 组比较, #: $P < 0.05$. M; Marker; 1,4; Cath-D siRNA 干扰组; 2,5: 阴性对照组; 3,6: 未干扰组. 1,2,3: 未加 DADS; 4,5,6: 加 DADS

表1 各组不同时点划痕距离的比较 (μm)

组别	DADS	0 h	24 h
阴性对照组	无	197.3 ± 0.4	71.1 ± 3.5
	有	197.8 ± 0.6	120.7 ± 4.8 ^b
未干扰组	无	197.4 ± 0.5	68.8 ± 3.3
	有	198.3 ± 0.7	118.3 ± 4.5 ^b
Cath-D siRNA 干扰组	无	198.2 ± 0.62	156.5 ± 8.1 ^a
	有	197.6 ± 0.5	168.5 ± 7.1 ^{ab}

与 24 h 阴性对照组或未干扰组比较, a: $P < 0.05$; 与 24 h 未加 DADS 组比较, b: $P < 0.05$

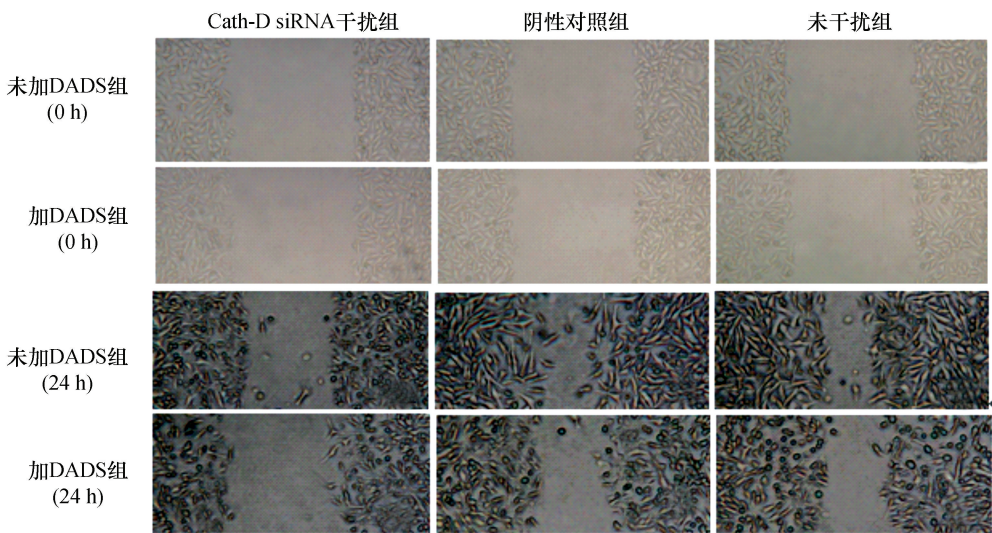


图3 DADS 及干扰 Cath-D 对 MGC803 细胞迁移的影响 (×100)

2.4 DADS 及干扰 Cath-D 对 MGC803 细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验显示,加 DADS 3 组侵袭细胞数目均较未加 DADS 3 组穿膜细胞数明显减少($P <$

0.05);Cath-D siRNA 干扰组较阴性对照组、未干扰组侵袭细胞数目明显减少($P < 0.05$,表 2);阴性对照组与未干扰组之间差异无统计学意义($P > 0.05$,图 4,表 2)。

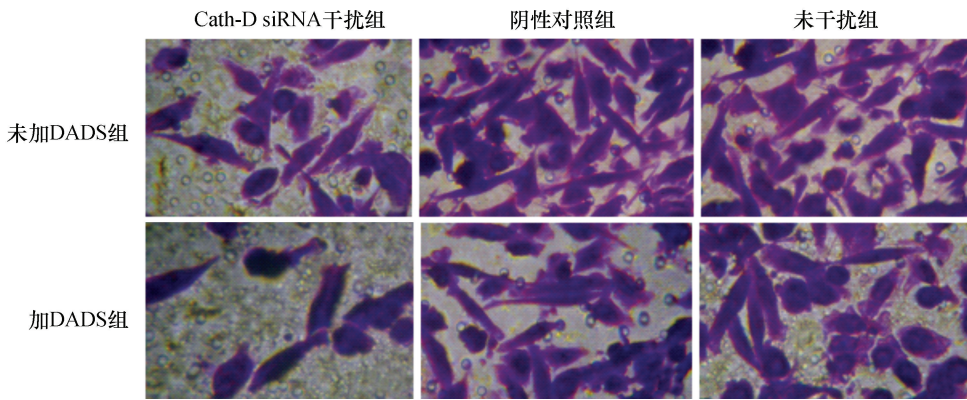


图 4 DADS 及干扰 Cath-D 对 MGC803 细胞侵袭的影响(24 h, ×200)

表 2 干扰 Cath-D 与 DADS 联合对 MGC803 细胞侵袭(穿膜细胞数,个)的影响(24 h)

组别	未加 DADS	加 DADS
阴性对照组	36.6 ± 6.5	29.2 ± 4.5 ^b
未干扰组	37.2 ± 6.3	29.5 ± 4.4 ^b
Cath-D siRNA 干扰组	18.4 ± 5.2 ^a	10.2 ± 3.5 ^{ab}

与阴性对照组或未干扰组比较,a: $P < 0.05$;与未加 DADS 组比较,b: $P < 0.05$

3 讨 论

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,全世界每年有超过 90 万的人罹患胃癌并且有大约 70 万的人死于胃癌^[6]。绝大部分胃癌患者就诊时已是晚期,5 年生存率只有 10%,这主要与胃癌侵袭和转移有关^[7],所以明确其机制已成为研究的热点。

DADS 是从大蒜中提取的一类脂溶性的有机硫化物,对多种肿瘤具有明显的抑制作用^[8],是一种很有开发潜力的抗肿瘤药物。DADS 可抑制胃癌细胞生长,诱导胃癌细胞凋亡,其机制与 G2/M 阻滞,调节 ATR/Chk1/Cdc25C/cyclin B1 通路,激活 p38、JNK 通路,抑制 ERK 通路,下调 Cdc25C 蛋白表达,上调 Caspase-3mRNA 表达等有关^[9-13]。DADS 可诱导胃癌细胞分化,其机制可能与 ERK1/2 通路抑制^[14],p21WAF1、pRb 表达增强,突变型 p53、p21ras、c-Myc 表达减弱,上调 RORα 蛋白等有关^[15]。本实验研究结果显示,DADS 作用人胃癌

MGC803 细胞 24 h 后,加 DADS 3 组较未加 DADS 3 组 Cath-D mRNA 与蛋白表达水平明显下降,划痕距离明显增宽,穿膜细胞数明显减少,表明 DADS 能抑制人胃癌 MGC803 细胞的侵袭转移能力,其机制可能与下调 Cath-D 的表达有关。

Cath-D 是存在于溶酶体内的一种可溶性的天门冬氨酸蛋白酶,在正常细胞中以低浓度存在,其功能是在溶酶体的酸性 pH 环境下分解蛋白质,参与细胞的生长调节^[16-17]。研究发现,Cath-D 过表达能促进肿瘤的恶性表型和转移能力,而在 Cath-D 基因敲除的裸鼠中发现,肿瘤的形成和肺转移瘤的发生和生长受到明显抑制,表明 Cath-D 与肿瘤的迁移和侵袭有一定的关系^[18-19]。Ohri 等^[20]证实组织蛋白酶 D 前体能够促进乳腺癌细胞增殖、侵袭、转移,这些效应的发挥主要与活性肽的 27 ~ 44 位氨基酸有关。Li 等^[5]证实胃癌组织中 Cath-D 的含量明显高于邻近的正常胃黏膜,并且 Cath-D 与胃癌淋巴结转移、分化程度以及预后密切相关。本实验利用 siRNA 干扰技术将 Cath-D siRNA 转染人胃癌 MGC803 细胞,研究结果显示,Cath-D siRNA 下调 Cath-D 的 mRNA 与蛋白表达水平后,Cath-D siRNA 干扰组较阴性对照组、未干扰组划痕距离明显增宽,侵袭细胞数目明显减少,表明 Cath-D 下调能明显抑制人胃癌 MGC803 细胞的侵袭转移能力,Cath-D 表达水平与胃癌的侵袭转移能力相关。加入 DADS 后,Cath-D siRNA 干扰组的 Cath-D mRNA 与蛋白表达水平下

降最为明显,划痕距离最宽,穿膜细胞数最少,表明 DADS 可能通过下调 Cath-D 的表达抑制人胃癌 MGC803 细胞的侵袭转移。

综上所述,DADS 能抑制人胃癌 MGC803 细胞的侵袭转移能力,其机制可能与下调 Cath-D 的表达有关。本研究为寻找抑制胃癌迁移和侵袭的作用靶点及药物提供了一定的实验依据。

参考文献:

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.
- [2] Park HS, Kim GY, Choi IW, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase activities and tightening of tight junctions by diallyl disulfide in AGS human gastric carcinoma cells [J]. J Food Sci, 2011, 76(4): T105-11.
- [3] 谷彬燕, 向姝霖, 庄英帜, 等. 二烯丙基二硫抑制人胃癌 SGC7901 细胞侵袭及相关机制 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(2): 213-217.
- [4] 马艳华, 苏波, 向姝霖, 等. 二烯丙基二硫下调 LIMK1 抑制人胃癌 MGC803 细胞迁移与侵袭 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(12): 1714-1718.
- [5] Li Y, Liu N, Huang D, et al. Proteomic analysis on N,N'-dinitrosopiperazine-mediated metastasis of nasopharyngeal carcinoma 6-10B cells [J]. BMC Biochem, 2012, 13: 25.
- [6] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [7] Catalano V, Labianca R, Beretta GD, et al. Gastric cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 71(2): 127-164.
- [8] Yi L, Su Q. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide [J]. Food and Chemical Toxicology, 2013, 57: 362-370.
- [9] Lee JE, Lee RA, Kim KH, et al. Induction of apoptosis with diallyl disulfide in AGS gastric cancer cell line [J]. J Korean Surg Soc, 2011, 81(2): 85-95.
- [10] Ling H, Wen L, Ji XX, et al. Growth inhibitory effect and Chk1-dependent signaling involved in G2/M arrest on human gastric cancer cells induced by diallyl disulfide [J]. Braz J Med Biol Res, 2010, 43(3): 271-278.
- [11] Yuan JP, Wang GH, Ling H, et al. Diallyl disulfide-in-

duced G2/M arrest of human gastric cancer MGC803 cells involves activation of p38 MAP kinase pathways [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(18): 2731-2734.

- [12] Wu XJ, Hu Y, Lamy E, et al. Apoptosis induction in human lung adenocarcinoma cells by oil-soluble allyl sulfides: triggers, pathways, and modulators [J]. Environ Mol Mutagen, 2009, 50(3): 266-275.
- [13] 王菊岩, 陈立军, 刘舒颖, 等. 大蒜素对人胃癌 MKN45 细胞株的影响及其作用机制的研究 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2006, 37(4): 650-652.
- [14] Ling H, Zhang LY, Su Q, et al. Erk is involved in the differentiation induced by diallyl disulfide in the human gastric cancer cell line MGC803 [J]. Cell Mol Biol Lett, 2006, 11(3): 408-423.
- [15] 石莺, 黄建军, 唐章文, 等. 二烯丙基二硫对人胃癌细胞 ROR α 蛋白表达的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2012, (22)4: 11-14.
- [16] Dian D, Vrekoussis T, Shabani N, et al. Expression of cathepsin-D in primary breast cancer and corresponding local recurrence or metastasis: an immunohistochemical study [J]. Anticancer Res, 2012, 32(3): 901-905.
- [17] Vashishta A, Ohri SS, Vetvicka V. Pleiotropic effects of cathepsin D [J]. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, 2009, 9(4): 385-391.
- [18] Kirana C, Shi H, Laing E, et al. Cathepsin D expression in colorectal cancer: from proteomic discovery through validation using western blotting, immunohistochemistry, and tissue microarrays [J]. Int J Proteomics, 2012, 2012: 245819.
- [19] Derocq D, Pr  bois C, Beaujouin M, et al. Cathepsin D is partly endocytosed by the LRP1 receptor and inhibits LRP1-regulated intramembrane proteolysis [J]. Oncogene, 2012, 31(26): 3202-3212.
- [20] Ohri SS, Vashishta A, Proctor M, et al. The propeptide of cathepsin D increases proliferation, invasion and metastasis of breast cancer cells [J]. Int J Oncol, 2008, 32(2): 491-498.

(此文编辑:朱雯霞)