

穿心莲内酯对胃癌 AGS 细胞增殖侵袭的影响

欧阳德亮¹, 胡 杨², 王又保¹, 黄明明¹, 谢荣兵¹

(1. 南华大学附属第三医院普外科, 湖南 衡阳 421900; 2. 南华大学附属南华医院消化内科)

摘要: **目的** 观察穿心莲内酯(AD)对胃癌细胞增殖侵袭以及 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的影响。 **方法** 体外培养胃癌细胞系 AGS, 分别用 1.0、3.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯作用 24~72 h, 无机磷法检测 AGS 细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性改变情况; MTT 和 ELISA 分析 AGS 细胞的增殖与断裂 DNA 含量; 同时采用 ELISA 检测血管内皮生长因子(VEGF)和转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 的水平; 荧光共振能量转移法检测基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的活性; 小室侵袭实验检测细胞侵袭。 **结果** 1.0~5.0 $\mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯能显著降低 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性, 并能在此浓度下抑制 AGS 细胞生长增殖以及增加断裂 DNA 水平。同时, 穿心莲内酯也能减少 VEGF 和 TGF- $\beta 1$ 的水平 ($P < 0.05$), 降低 MMP-9 酶的活性, 并能有效减少癌细胞的侵袭 ($P < 0.05$)。 **结论** 穿心莲内酯是一种有效的抗胃癌药物, 它可能具有阻碍胃癌细胞侵袭的能力。

关键词: 穿心莲内酯; 胃癌细胞; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶; 增殖; 侵袭

中图分类号: R735.2 文献标识码: A

Effect of Andrographolide on Human AGS Gastric Cancer Cells Proliferation and Invasion

OUYANG Deliang, HU Yang, WANG Youbao, et al

(Department of General Surgery, the Third Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: **Objective** To observe the effect of Andrographolide on the proliferation and invasion of human gastric cancer cells and explore its potential molecular mechanism. **Methods** Human gastric cancer cell line AGS was cultured in vitro, and was incubated with 1.0, 3.0 and 5.0 $\mu\text{mol/L}$ andrographolide. After treatment, enzymic activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ was determined by inorganic phosphorus assay. Proliferation of AGS cells and the DNA fragments were detected by MTT assay and ELISA, respectively. Production of vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor- $\beta 1$ (TGF- β) were detected by ELISA. Activity of Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) was analyzed by a fluorescence resonance energy transfer kits. Chamber invasion assay was used to study the cell invasion. **Results** 1.0~5.0 $\mu\text{mol/L}$ of andrographolide significantly reduced the enzymic activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, suppressed the AGS cells growth and induced the formation of DNA fragment, as demonstrated by MTT and ELISA. Results also showed that andrographolide could also decrease the VEGF and TGF- $\beta 1$ level, and decrease the enzymic activity of MMP-9. In addition, andrographolide could also reduce AGS cells invasion. **Conclusion** Andrographolide is a potential anti-cancer drug, and it could inhibit gastric cancer cells proliferation and invasion.

Key words: Andrographolide; gastric cancer cells; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$; proliferation; invasion

胃癌是我国最常见的消化系统恶性肿瘤之一。

跟其他肿瘤类似, 也是一个多因素、多步骤、多阶段的复杂过程, 涉及到宿主体内的基因型以及表型的变化。虽然早期手术治疗可挽救部分患者的生命, 但对于晚期患者而言, 化疗依然是主要治疗手段。尽管目前用于胃癌化疗的药物众多, 但因副作用等

因素限制了其使用。穿心莲内酯(Andrographolide, AD)是一类具有消炎解毒功能的二萜类化合物,以往多用于临床上各种感染性疾病的治疗^[1-2]。但近年有研究显示,这种化合物对人类多种肿瘤细胞生长具有一定的抑制效应^[3]。近年研究显示,在肿瘤的发生发展过程中,Na⁺-K⁺-ATP 酶可能参与肿瘤细胞的增殖^[4]。此外,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)以及基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)等也广泛参与癌细胞的黏附、侵袭及迁移。本研究旨在观察穿心莲内酯对胃癌细胞生长增殖的影响,并初步探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

穿心莲内酯(纯度 98%)购自 Sigma-Aldrich 化学制品公司,用 DMSO 溶解使其成为浓度为 15 mmol/L 的贮存液。细胞培养基为 Invitrogen 产品,培养板购自 Corning 公司。其他试剂均购于上海生工。Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司。RT-PCR 试剂盒购自大连宝生物公司。The Sensolyte MMP-9 活性检测试剂盒购自 AnaSpec 公司。

1.2 细胞培养

人胃癌细胞系 AGS 用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中在 37 °C 含有 5% CO₂ 的环境下培养,其中包含了 100 单位/mL 的青霉素和 100 单位/mL 的链霉素(pH 7.4)。每 3 天更换培养基或进行细胞传代培养。用于各种实验和分析的细胞密度约为 10⁵/mL。

1.3 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性分析

根据酶促反应释放的无机磷(Pi)的含量反应 ATP 酶的活性。反应体系中含有 20 mmol/L KCl、100 mmol/L NaCl、30 mmol/L Tris 缓冲液(pH 7.4)以及新鲜细胞线粒体分离物。当反应体系加入 2 mmol/L ATP 后,30 °C 孵育 15 min,接着加入 15% 三氯乙酸终止反应。通过测量 640 nm 处的吸光度分析释放的无机磷的含量。ATP 酶活性的定义:1 mg 蛋白质 1 h 内催化 ATP 生成 1 μ mol/L 无机磷的量为 1 个单位 ATP 酶活性,并计算其相对活性,公式为:相对活性 = 处理组酶活性/对照组酶活性 \times 100%。

1.4 细胞增殖分析

为了检测细胞的生存能力,进行 MTT 分析。利用 0.25 mg MTT/mL 在 37 °C 下孵育实验细胞。利用全自动定量绘图酶标仪通过测量 570 nm(630 作为参考)下的吸光度。细胞抑制率 = (空白组 OD 值 - 处理组 OD 值)/空白组 OD 值 \times 100%。

1.5 DNA 断裂的测量

采用 ELISA 测量 DNA 断裂情况。细胞经不同浓度的穿心莲内酯孵育之后,室温下裂解癌细胞 30 min,接着 200 g 下离心 10 min。然后将 20 μ L 上清液转移至抗生蛋白链菌素包被的培养板中,并且每孔加入 80 μ L 新配制的免疫试剂,在室温下孵育 2 h。利用 PBS 冲洗之后,加入底物溶液,并孵育 15 min。利用全自动定量绘图酶标仪测量 405 nm 处的吸光度(参考 490 nm 的波长)。计算断裂 DNA 的相对含量 = 样本吸光度/对照组吸光度 \times 100% (样本:穿心莲内酯处理的细胞;对照组:未用穿心莲内酯处理的细胞)。

1.6 VEGF 和 TGF- β 1 水平的测定

利用不同浓度的穿心莲内酯预处理细胞 48 h。利用 PBS 冲洗之后,接着用 10 ng/mL 的 TNF- α 孵育样本 18 h。利用 ELISA 工具测定 VEGF 和 TGF- β 1 在细胞培养上清液中的水平。

1.7 MMP-9 活性测定

细胞处理结束后,获取上清,采用间接法测定 MMP-9 的酶活性。其步骤根据 AnaSpec 公司的 Sensolyte[®] 490 MMP-9 Assay Kit 提供的步骤进行。本试剂盒含有 EDANS/DabcylPlus[™] 荧光共振能量转移肽,在这条完整的肽当中,DabcylPlus 将 EDANS 荧光淬灭,而此肽被 MMP-9 特异性降解后,EDANS 重新获得荧光,在荧光酶标仪上测定其强度(与 MMP-9 的活性成正比,激发/发射波长分别为 340 nm 和 490 nm),并计算各组与对照组的比值(相对活性)。

1.8 侵袭力分析

制备 AGS 细胞悬液(3 \times 10⁶/mL),同时将 Matrigel 铺在 Transwell 滤膜上(40 μ L/孔),紫外照射 12 h。Transwell 的上室加入细胞悬液 100 μ L,下室加入 500 μ L 完全培养基。5% CO₂ 条件下培养 24 h。取出小室,甲醇 4 °C 固定 10 min,并加入结晶紫染色 5 min,PBS 洗涤后擦去上表面细胞,并随机选择 5 个视野,计算穿膜细胞数目。

1.9 统计学分析

数据用均数 ± 标准差表示,用 SPSS 17.0 统计软件处理数据并进行方差分析(ANOVA),组间比较采用 LSD 分析。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结 果

2.1 不同浓度穿心莲内酯对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的影响

不同浓度的穿心莲内酯作用 AGS 细胞 24 h 后,能在一定程度上抑制细胞内 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性。其中 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯能使酶活性降低至 86%, $3.0 \mu\text{mol/L}$ 时其活性为 59%,而 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯能使 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性降低至 48%,见图 1 所示。

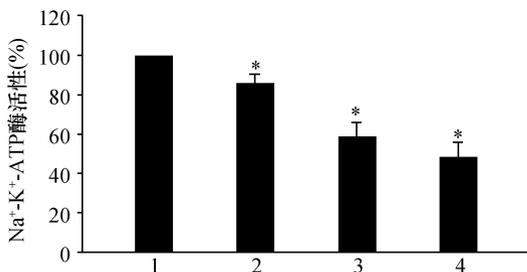


图 1 不同浓度穿心莲内酯对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性的影响

1: 对照组;2: $1.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯;3: $3.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯;4: $5.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯。与对照组($0 \mu\text{mol/L}$)比较, * : $P < 0.05$

2.2 穿心莲内酯对 AGS 细胞生长增殖的影响

MTT 结果显示,在同一时间点,不同浓度的穿心莲内酯能有效抑制 AGS 细胞生长增殖,且随着浓度的增高抑制作用增强。在相同浓度作用下,随作用时间的延长,对 AGS 细胞的抑制作用越明显(表 1)。

表 1 穿心莲内酯在不同浓度及不同时间作用下对 AGS 细胞抑制率的影响(%)

穿心莲内酯浓度(μmol/L)	24 h	48 h	72 h
0	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
1.0	19.08 ± 1.43 ^a	27.49 ± 0.97 ^{ab}	35.34 ± 1.22 ^{abc}
3.0	34.75 ± 1.92 ^{ac}	45.71 ± 1.95 ^{abc}	53.08 ± 1.72 ^{abc}
5.0	48.38 ± 1.46 ^{ad}	57.08 ± 1.57 ^{abd}	65.81 ± 1.14 ^{abde}

与对照组比较, a: $P < 0.05$; 与 24 h 比较, b: $P < 0.05$; 与 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 组比较, c: $P < 0.05$; 与 $3.0 \mu\text{mol/L}$ 组比较, d: $P < 0.05$; 与 48 h 比较, e: $P < 0.05$

2.3 穿心莲内酯对断裂 DNA 含量的影响

如图 2 所示, $1.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯孵育 48 h 后能轻微增加断裂 DNA 的含量。随着浓度的增高,其断裂 DNA 含量随之增多。

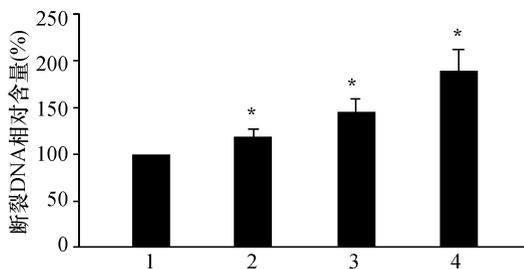


图 2 不同浓度穿心莲内酯对断裂 DNA 含量的影响 1: 对照组;2: $1.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯;3: $3.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯;4: $5.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯。与对照组($0 \mu\text{mol/L}$)比较, * : $P < 0.05$

2.4 穿心莲内酯对 AGS 细胞中 VEGF 及 TGF-β1 含量的影响

ELISA 结果显示,随着穿心莲内酯浓度的增高,VEGF 和 TGF-β1 的水平逐渐降低($P < 0.05$,表 2)。

表 2 不同浓度穿心莲内酯对 AGS 细胞中 VEGF 及 TGF-β1 水平的影响

穿心莲内酯浓度(μmol/L)	VEGF (pg/mg 蛋白)	TGF-β1 (ng/mg 蛋白)
0	169.34 ± 14.57	237.17 ± 17.51
1.0	154.17 ± 8.41 ^a	204.74 ± 9.75 ^a
3.0	131.95 ± 6.84 ^{ab}	182.87 ± 7.58 ^{ab}
5.0	87.08 ± 8.47 ^{ac}	119.38 ± 11.36 ^{ac}

与对照组($0 \mu\text{mol/L}$)比较, a: $P < 0.05$; 与 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 组比较, b: $P < 0.05$; 与 $3.0 \mu\text{mol/L}$ 组比较, c: $P < 0.05$

2.5 穿心莲内酯对 AGS 细胞 MMP-9 酶活性的影响

MMP-9 间接酶活性结果显示, 1.0 、 3.0 、 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯处理后,与对照组相比, MMP-9 活性明显降低。其中 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯能将 MMP-9 的酶活性降低 47.5%,见图 3。

2.6 穿心莲内酯对 AGS 细胞侵袭的影响

不同浓度穿心莲内酯作用 AGS 细胞 6 h 后,对细胞侵袭力的影响见图 4 和表 3 所示, $1.0 \sim 5.0 \mu\text{mol/L}$ 穿心莲内酯均能不同程度降低 AGS 细胞的侵袭力($P < 0.05$)。

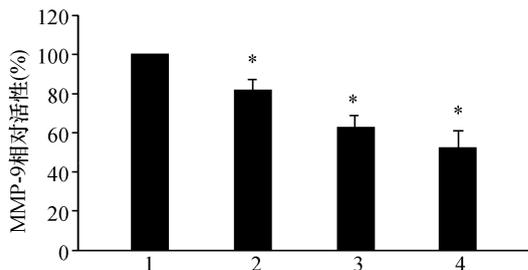


图3 不同浓度穿心莲内酯对 MMP-9 活性的影响 1:对照组;2:1.0 μmol/L 穿心莲内酯;3:3.0 μmol/L 穿心莲内酯;4:5.0 μmol/L 穿心莲内酯. 与对照组(0 μmol/L)比较, *:P < 0.05

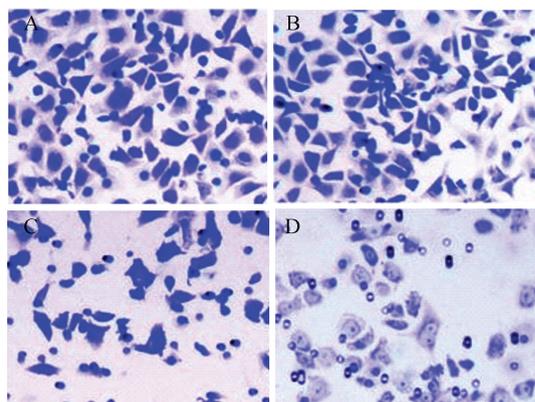


图4 穿心莲内酯对 AGS 细胞侵袭力的影响(×20)

A:0 μmol/L 穿心莲内酯;B:1.0 μmol/L 穿心莲内酯;C:3.0 μmol/L 穿心莲内酯;D:5.0 μmol/L 穿心莲内酯

表3 穿心莲内酯对 AGS 细胞侵袭力的影响

穿心莲内酯浓度(μmol/L)	AGS 细胞的穿膜细胞比例(%)
0.0	72.18 ± 2.32
1.0	56.63 ± 2.97 ^a
3.0	39.71 ± 3.17 ^{ab}
5.0	24.28 ± 3.28 ^{ac}

与对照组(0 μmol/L)比较,a:P < 0.05;与 1.0 μmol/L 组比较,b:P < 0.05;与 3.0 μmol/L 组比较,c:P < 0.05

3 讨 论

诱导细胞凋亡是癌症治疗的目标,而 DNA 断裂是细胞凋亡的重要指标。本研究发现 1.0 ~ 5.0 μmol/L 的穿心莲内酯处理后可显著增加胃癌细胞断裂 DNA 的含量,可能是由于穿心莲内酯渗入胃癌细胞后破坏了质膜的完整性,最终引起细胞凋亡。Na⁺-K⁺-ATP 酶为三羧酸循环的关键酶,是由一个 α-亚单位和一个 β-亚单位组成的异二聚体。而 α-亚单位是一种跨膜蛋白,可用于细胞内 Na⁺ 和细胞

外 K⁺ 的交换。因此,Na⁺-K⁺-ATP 酶对于维持离子动态平衡很关键^[5]。若外源性诱导该酶功能异常,则可触发线粒体膜的瓦解而促进细胞凋亡的发生。有研究发现抑制 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性,能有效抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移,其机制可能通过改变 α-亚单位的稳定性而影响线粒体功能,最终导致凋亡的发生^[6]。VEGF 和 TGF-β1 是肿瘤发生发展过程中的血管生成因子。TGF-β1 是包括胃癌在内的一种重要肿瘤生长调节物质^[7-8]。研究表明,TGF-β1 通过它的免疫抑制效应从而增强胃癌细胞的转移^[9]。本研究显示经穿心莲内酯处理后,VEGF 和 TGF-β1 在胃癌细胞中含量明显降低,这表明穿心莲内酯可能在一定程度上减弱胃癌细胞中血管生成和纤维发生。癌细胞的侵袭和迁移是癌症复发及迁移的关键进程。此转移过程与 MMP-9 的活性密切相关。MMP-9 是一种内肽酶,可降解细胞外基质成分,使得癌细胞进入脉管和淋巴系统^[10],因此其在肿瘤中的作用已经日益受到重视^[11]。本研究证实,穿心莲内酯能显著抑制 MMP-9 的活性,最终减弱胃癌细胞的侵袭和迁移。

总之,浓度为 1.0 ~ 5.0 μmol/L 的穿心莲内酯能抑制 Na⁺-K⁺-ATP 酶的活性,从而可能诱导细胞凋亡的发生。此外,这种二萜化合物也能抑制 VEGF 和 TGF-β1 的产生并抑制 MMP-9 的活性,从而可能抑制血管的发生以及减少胃癌细胞的侵袭。尽管这些结果说明穿心莲内酯可引起细胞凋亡或延缓胃癌的迁移,但是该药物对于缓和胃癌进展的效应、作用方式以及适当的剂量,还需要进行进一步的体内研究。

参考文献:

[1] Zhu YY, Yu G, Zhang Y, et al. A novel andrographolide derivative AL-1 exerts its cytotoxicity on K562 cells through a ROS-dependent mechanism [J]. Proteomics, 2013,13(1):169-178.

[2] Hai-Mei L, Song-Yin H, Run-Mei L, et al. Andrographolide protects against lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity by suppressing the expression of inducible nitric oxide in periaortic adipose [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2013,62(2):154-159.

[3] Zhang ZR, Al ZM, Wong MM, et al. Taxifolin enhances andrographolide-induced mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer cells via spindle assembly checkpoint activation [J]. PLoS One, 2013,8(1):e54577.

- [4] 王柏琦,程爱兰. 穿心莲内酯对人鼻咽癌细胞增殖以及 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性的影响[J]. 当代医学, 2012,18(26):27-28.
- [5] Wang HY, O'Doherty GA. Modulators of Na/K-ATPase: a patent review[J]. Expert Opin Ther Pat, 2012, 22(6): 587-605.
- [6] Rajasekaran SA, Huynh TP, Wolle DG, et al. Na, K-ATPase subunits as markers for epithelial-mesenchymal transition in cancer and fibrosis[J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(6):1515-1524.
- [7] Peng J, Tsang JY, Li D, et al. Inhibition of TGF-beta signaling in combination with TLR7 ligation re-programs a tumoricidal phenotype in tumor-associated macrophages [J]. Cancer Lett, 2013, 331(2):239-249.
- [8] Mimeault M, Batra SK. Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer-and metastasis-initiating cells [J]. J Cell Mol Med, 2013, 17(1):30-54.
- [9] Gulubova M, Ananiev J, Yovchev Y, et al. The density of macrophages in colorectal cancer is inversely correlated to TGF-beta1 expression and patients' survival [J]. J Mol Histol, 2013, 44(6):679-692.
- [10] 贺军,丁成明,贺更生,等. ESM-1 和 MMP-3 表达与肝癌侵袭转移的关系[J]. 中南医学科学杂志, 2012, 40(4):368-372.
- [11] Zhao M, Gao Y, Wang L, et al. Overexpression of Integrin-linked kinase promotes lung cancer cell migration and invasion via NF-kappaB-mediated upregulation of matrix metalloproteinase-9 [J]. Int J Med Sci, 2013, 10(8):995-1002.

(此文编辑:蒋湘莲)