

冬凌草甲素对人黑色素瘤 A375 细胞侵袭和转移的影响及机制研究

李春雨^{1*}, 王 琪², 申 坤¹, 李国霞¹

1. 天津医科大学国际医学院, 天津 300070

2. 同济大学附属上海市肺科医院 肿瘤科, 上海 200433

摘要: 目的 研究冬凌草甲素对人黑色素瘤 A375 细胞侵袭和转移的抑制作用及其作用机制。方法 采用细胞培养技术体外培养 A375 细胞, 用不同浓度冬凌草甲素处理细胞, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖率; 划痕实验分析细胞的迁移能力; Transwell 小室实验研究细胞的侵袭能力; 黏附实验评价细胞的黏附能力; Western blotting 法检测转录因子 Snail、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和 MMP-9 蛋白的表达。结果 冬凌草甲素对 A375 细胞 48 h 半数抑制浓度(IC₅₀)为 47.94 μmol/L; 与对照组比较, 5、10、20 μmol/L 冬凌草甲素可明显降低 A375 细胞的体外迁移、侵袭及黏附能力($P < 0.05$), 且具有量效关系。冬凌草甲素作用于细胞后, E-cadherin 蛋白表达水平明显上调($P < 0.05$), Snail、N-cadherin、vimentin、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平明显下调($P < 0.05$)。结论 冬凌草甲素具有体外抑制 A375 细胞侵袭和转移的作用, 其机制可能与调控上皮-间质转化(EMT)及 MMPs 有关。

关键词: 冬凌草甲素; 人黑色素瘤细胞 A375; 迁移; 侵袭; 上皮-间质转化; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0658-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.022

Effects and mechanism of oridonin on invasion and migration abilities of human melanoma A375 cells

LI Chun-yu¹, WANG Qi², SHEN Shen¹, LI Guo-xia¹

1. International Medical School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

2. Oncology Department, Shanghai Pulmonary Hospital Affiliated to Tongji University, Shanghai 200433, China

Abstract: Objective To study the effects and the mechanism of oridonin on inhibiting the invasion and migration abilities of human melanoma A375 cells. **Methods** Human melanoma A375 cells were cultured and treated respectively with indicated concentrations of oridonin by cell culture technique. The proliferation rate was detected by CCK-8 method. The migration ability was measured by wound healing assay. The invasion ability was examined by Transwell assay. The adhesion capabilities were evaluated by adhesion assay. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) and matrix metalloproteinases (MMPs) related protein expression levels were determined by Western blotting. **Results** CCK-8 assay showed the median inhibition concentration (IC₅₀) of 48 h was 47.94 μmol/L. Oridonin (5, 10, and 20 μmol/L) inhibited the migration, invasion and adhesion abilities of human melanoma A375 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). After oridonin treatment, the protein expression levels of E-cadherin increased significantly ($P < 0.05$) and the protein levels of Snail, N-cadherin, vimentin, MMP-2, and MMP-9 decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Oridonin inhibits the migration, invasion and adhesion abilities of human melanoma A375 cells. The mechanism may be related with the regulating effects of oridonin on EMT and MMPs.

Key words: oridonin; human melanoma A375 cells; migration; invasion; EMT; MMPs

恶性黑色素瘤是一种侵袭性强的皮肤黏膜和色素膜恶性肿瘤, 也是发病率增长最快的恶性肿瘤之一, 进展迅速且极易转移, 临床预后差, 严重危害了人类的健康^[1-2]。早期黑色素瘤主要通过手术切除

治疗, 但是对于晚期转移性黑色素瘤, 常规治疗手段收效甚微^[3]。因此, 寻找有效的防治黑色素瘤侵袭和转移的药物迫在眉睫, 特别是高效低毒的天然产物更具应用价值。冬凌草甲素为唇形科香茶菜属植

收稿日期: 2017-08-02

基金项目: 中国博士后科学基金面上项目(2016M591398); 天津医科大学科学基金青年项目(2015KYZZQ13); 天津市教委科研计划项目(2016YD07)

*通信作者 李春雨(1985—), 男, 博士, 研究方向为肿瘤的综合治疗。Tel: (022)83336911 E-mail: lichunyu@tmu.edu.cn

物冬凌草 *Rabdosia rubescens* (Hemsl.) Hara 中的二萜类成分^[4-5]。研究发现,冬凌草甲素具有广谱抗肿瘤活性,对胃癌、卵巢癌、肝癌等多种肿瘤细胞增殖均具有显著的抑制作用^[6-8],但未见冬凌草甲素抑制黑色素瘤细胞侵袭和转移的报道。本研究以体外人恶性黑色素瘤 A375 细胞株为研究对象,观察冬凌草甲素对 A375 细胞增殖、侵袭、转移及黏附的作用,并探讨其作用机制,以期为新药开发和临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞

A375 细胞来源于美国模式细胞培养物集存库(ATCC),由本实验室保存。

1.2 药品与试剂

冬凌草甲素(批号 E1526003,质量分数≥98%)购于上海阿拉丁生化科技股份有限公司。Cell Counting Kit-8 细胞增殖检测试剂盒购自东仁化学科技(上海)有限公司;Matrigel 基质胶购自 BD 公司;Transwell 小室购自 Corning 公司;转录因子 Snail、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(vimentin)抗体购自 Abcam 公司;基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和 MMP-9 抗体购自 Santa Cruz 公司;β-actin 抗体购自 Affinity Biosciences 公司;全蛋白抽提试剂盒、SDS-PAGE 凝胶电泳试剂盒、Western blotting 检测试剂盒、ECL 化学发光底物试剂盒均购自南京凯基生物科技发展有限公司。

1.3 仪器

CO₂ 培养箱(Sanyo 公司);IX71 荧光倒置显微镜(Olympus 公司);全波长多功能酶标仪(Thermo Varioskan Flash 公司);G:BOX 全能型凝胶成像分析系统(美国 Syngene 公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞增殖

取对数生长期 A375 细胞消化,调整细胞浓度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$,接种于 96 孔板,每孔 100 μL ,设空白组、对照组和药物不同浓度(5、10、20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$)组,每组均设 5 个复孔。待细胞贴壁后药物组分别加入不同浓度冬凌草甲素处理,空白组不接种细胞只加入完全培养基,对照组接种细胞并加入等体积溶媒(0.5%的 DMSO)。培养 48 h 后加入 CCK-8 试剂 20 μL ,孵育 2 h 后,酶标仪 450 nm 测定吸光度(A)值。计算细胞增殖抑制率,采用直线回归方程计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

$$\text{细胞增殖抑制率} = 1 - A_{\text{药物}}/A_{\text{对照}}$$

2.2 划痕实验检测细胞迁移

取对数生长期 A375 细胞消化,调整细胞浓度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$,铺于 35 mm 培养皿培养 24 h,设冬凌草甲素低、中、高浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)及对照组,加入不同浓度的冬凌草甲素及溶媒进行干预,24 h 后用 10 μL 枪头在培养皿底部中央划出均匀划痕,换液后继续培养 24 h,于不同时间(0、3、6、9、12、24 h)在倒置显微镜下拍照,记录划痕宽度变化,分析 A375 细胞迁移能力。

2.3 Transwell 小室实验检测细胞侵袭

基底胶 Matrigel 用 PBS 稀释成 1 mg/mL,以 50 $\mu\text{L}/\text{孔}$ 铺于 Transwell 小室聚碳酸酯膜。Transwell 下室每孔加入含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基 600 μL ,上室加入 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的 A375 细胞,每孔 50 μL 。设冬凌草甲素低、中、高浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)组及对照组,分组后加入不同浓度的冬凌草甲素及溶媒对上室细胞进行干预,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后,弃上室液体,棉签擦去上膜未穿过膜的细胞,苏木精染色,倒置显微镜观察穿过膜的细胞,每张膜随机选取 3 个视野,计数穿过微孔的细胞数,分析细胞侵袭能力。

2.4 黏附实验检测细胞黏附

盖玻片用 10 $\mu\text{g/mL}$ 纤连蛋白(Fibronectin)包被,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,风干后置于 35 mm 培养皿中;取对数生长期 A375 细胞,消化,计数,调整细胞浓度至 $3 \times 10^5/\text{mL}$,加入 35 mm 培养皿中,每皿 1.5 mL,设冬凌草甲素低、中、高浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)及对照组,加入不同浓度的冬凌草甲素及溶媒进行干预,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 24 h 后,加入表皮细胞生长因子(EGF, 10 ng/mL,每皿 200 μL)或无血清培养基后,分别在 5、15、30 min 时,冰 PBS 终止反应,4%多聚甲醛固定,倒置显微镜观察每个培养皿的细胞黏附数,计算 5 个随机视野数目总和,分析细胞黏附能力。

2.5 Western blotting 检测细胞蛋白表达

胰酶消化经不同浓度的冬凌草甲素(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)干预 48 h 后的细胞,SDS 细胞裂解液提取总蛋白,BCA 法蛋白定量,SDS-PAGE 电泳分离,转膜,封闭 1 h,加入鼠抗人 Snail、E-cadherin、N-cadherin、vimentin、MMP-2、MMP-9 及 β-actin 抗体,室温孵育 2 h,洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠 IgG 抗体,室温孵育 1 h,ECL 化学发光试剂盒曝光,凝胶成像系统分析拍照并对凝胶条

带信号强度进行半定量分析。

2.6 数据分析

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并用单因素方差分析法 (ANOVA) 进行组间比较。

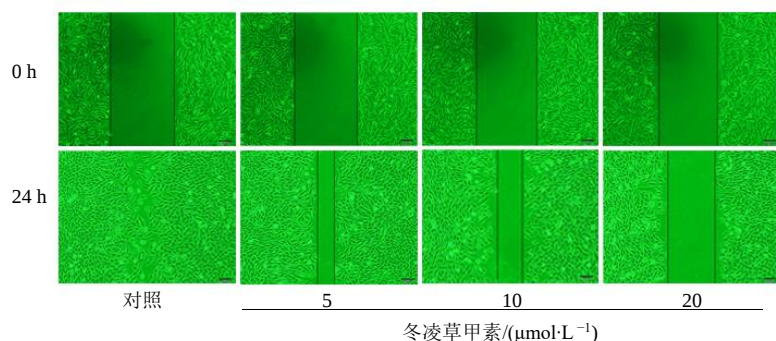
3 结果

3.1 冬凌草甲素对 A375 细胞增殖的影响

冬凌草甲素处理 A375 细胞 48 h 后, CCK-8 法检测冬凌草甲素对细胞增殖的影响。经 5~80 $\mu\text{mol/L}$ 冬凌草甲素处理 48 h 后, 细胞生长呈现出不同程度的生长抑制, 且呈明显的浓度依赖性, 结果见图 1。冬凌草甲素作用 48 h 的 IC_{50} 为 47.94 $\mu\text{mol/L}$ 。为排除冬凌草甲素对细胞毒性作用的影响, 采用 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素进行后续实验。

3.2 冬凌草甲素对 A375 细胞迁移能力的影响

癌细胞的迁移能力与肿瘤的侵袭和转移呈正相



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 下同
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; same as below

图 2 冬凌草甲素对 A375 细胞迁移的影响 ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effects of oridonin on migration of A375 cells ($\times 100$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

可抑制 A375 细胞的迁移能力, 该作用呈量效关系。

3.3 冬凌草甲素对 A375 细胞侵袭能力的影响

参照文献报道方法^[10], 本研究采用 Matrigel 基质胶模拟肿瘤细胞在机体内侵袭环境中的细胞外基质, 考察冬凌草甲素对 A375 细胞侵袭能力的影响。Transwell 实验结果 (图 3) 显示, 与对照组比较, 经不同浓度的冬凌草甲素处理的 A375 细胞体外侵袭能力明显下降 ($P < 0.01$), 且呈浓度依赖性。提示冬凌草甲素可明显抑制 A375 细胞的侵袭能力, 该作用呈量效关系。

3.4 冬凌草甲素对 A375 细胞黏附能力的影响

癌细胞在机体内侵袭和转移的过程中, 与宿主组织成分发生多次黏附。癌细胞的黏附能力与肿瘤侵袭转移密切相关^[11]。黏附实验结果 (图 4) 显示, 与对照组比较, 经不同浓度的冬凌草甲素处理的

关^[9]。划痕实验结果 (图 2) 显示, 细胞划痕 24 h 后, 与对照组比较, 经不同浓度的冬凌草甲素处理的 A375 细胞迁移能力明显下降, 划痕距离明显大于对照组 ($P < 0.05$, 0.01), 且呈浓度依赖性。提示冬凌草甲素

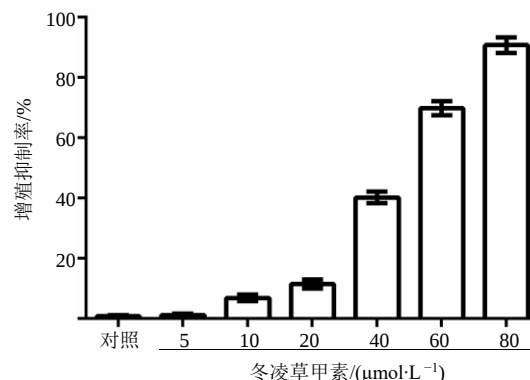
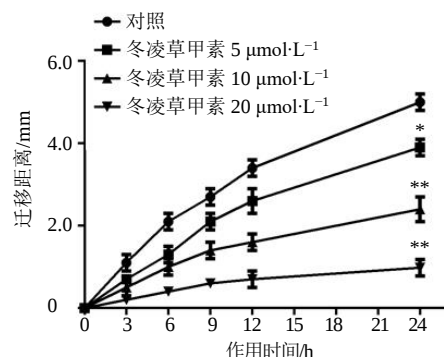


图 1 冬凌草甲素对 A375 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effects of oridonin on proliferation of A375 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



A375 细胞体外黏附能力明显下降 ($P < 0.05$, 0.01), 且呈浓度依赖性。提示冬凌草甲素可明显降低癌细胞的黏附能力, 该作用呈量效关系。

3.5 冬凌草甲素对 A375 细胞上皮-间质转化 (EMT) 和 MMPs 相关蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果 (图 5) 显示, 与对照组比较, 经不同浓度冬凌草甲素干预处理 A375 细胞后, EMT 调控的关键因子 Snail 蛋白表达量明显下调 ($P < 0.05$); 上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 表达量明显上调 ($P < 0.05$, 0.01); 间质细胞标志蛋白 N-cadherin 和 vimentin 表达量明显下调 ($P < 0.05$, 0.01); MMP-2、MMP-9 表达量明显下调 ($P < 0.05$, 0.01), 且呈一定的浓度依赖性。

4 讨论

黑色素瘤是由异常黑素细胞过度增生引发的高

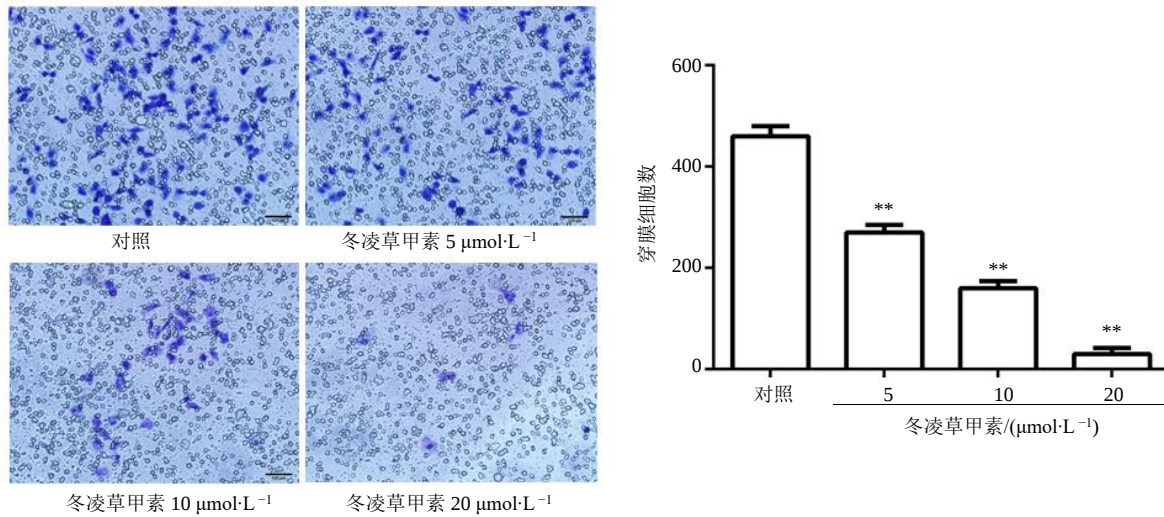


图 3 冬凌草甲素对 A375 细胞侵袭的影响 ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effects of oridonin on invasion of A375 cells ($\times 200$, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

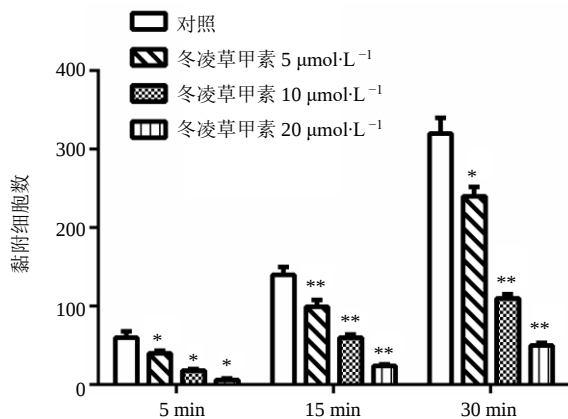


图 4 冬凌草甲素对 A375 细胞黏附的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 Effect of oridonin on adhesion on A375 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

度恶性肿瘤，占皮肤肿瘤死亡病例的极大部分。预后差、死亡率高、易发生侵袭及转移是黑色素瘤的主要特征。控制其侵袭与转移已成为彻底治愈黑色素瘤的关键。目前虽有一些防治肿瘤侵袭转移的药物在临床使用，但疗效并不理想。因此开发防治肿瘤侵袭转移的药物已成为转化医学的一项重要任务。

冬凌草甲素为清热解毒类中药冬凌草的单体成分，研究表明，冬凌草甲素对多种恶性肿瘤具有良好的抗肿瘤活性，如食管癌、结肠癌、肺癌、肝癌、宫颈癌等。其主要抗肿瘤机制可归纳为阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡、抑制端粒酶活性、诱导细胞发生自噬等^[12-13]。但由于其作用广泛，更多的抗肿瘤机制尚未阐明，值得深入研究。本研究发现，冬凌草甲素体外

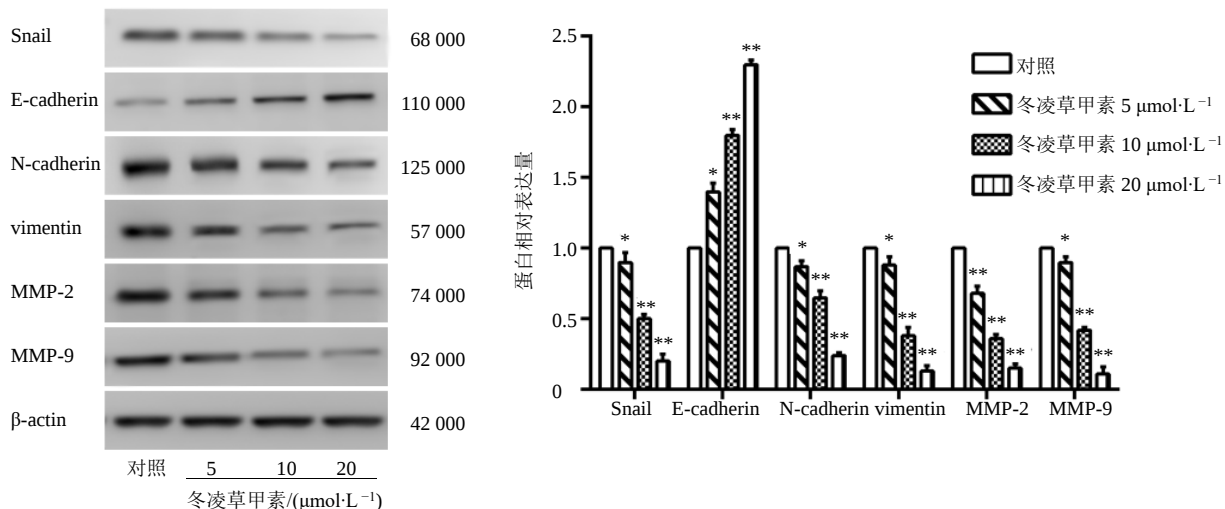


图 5 冬凌草甲素对 A375 细胞 EMT 和 MMPs 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 Effects of oridonin on expression of EMT and MMPs related proteins of A375 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

可明显抑制 A375 细胞的迁移、侵袭及黏附能力,提示其对皮肤黑色素瘤的侵袭与转移具有抑制作用。

侵袭与转移是影响恶性肿瘤预后的主要原因。多项研究证实,EMT 是肿瘤侵袭和转移的始动步骤。随着 EMT 的发生,上皮来源的肿瘤细胞发生形态学、细胞表型等方面的改变,使细胞由较为稳定的上皮型细胞向具有更强迁移和侵袭能力的间质型细胞的转化^[14]。EMT 的发生主要表现在细胞上皮、间质分化分子标志的改变。发生 EMT 后上皮表型标记蛋白 E-cadherin、紧密连接蛋白-1(ZO-1)和泡膜蛋白 1(VMP1)等表达下调,而间质表型标志物如 N-cadherin、vimentin 和 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)等表达上调^[15]。许多转录因子促进了 EMT 的发生,如转录因子 Snail、Slug、Twist 和锌指增强子结合蛋白(ZEB)均可通过抑制 E-cadherin 表达,促进 N-cadherin 表达,参与 EMT 发生^[16]。其中 Snail 是首个发现能诱导 EMT 的转录因子,高表达于肺癌、宫颈癌等细胞癌,与肿瘤组织学分级和转移密切相关。过表达 Snail 可促进 N-cadherin 和 vimentin 的表达,促进肿瘤的侵袭和转移^[17-18]。细胞外基质及基底膜的降解是肿瘤细胞发生侵袭和转移的关键环节。MMPs 在细胞外基质及基底膜的降解过程中发挥关键作用。MMPs 不仅与肿瘤细胞 EMT 的发生密切相关,其作为间质细胞表型的特有蛋白之一,即为 EMT 发生的重要标志物,又可诱发 EMT 的发生^[19]。因此,靶向 MMPs 已成为临床防治肿瘤侵袭转移的一个重要策略。本研究发现,经不同浓度冬凌草甲素处理 A375 细胞后,E-cadherin 蛋白表达量明显上调,N-cadherin 和 vimentin 蛋白表达明显下调,MMP-2、MMP-9 表达明显下调,EMT 调控的关键因子 Snail 明显下调,与本研究体外实验结果一致。提示其作用机制与调控 EMT 和 MMPs 有关。

综上,在一定浓度范围内,冬凌草甲素体外可明显抑制 A375 细胞的迁移、侵袭和黏附能力,其机制可能与调控 EMT 和 MMPs 有关。

参考文献

- [1] Muhsin-Sharafaldine M R, Saunderson S C, Dunn A C, et al. Melanoma growth and lymph node metastasis is independent of host CD169 expression [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2017, 486(4): 965-970.
- [2] Youland R S, Packard A T, Blanchard M J, et al. 18F-FDG PET response and clinical outcomes after stereotactic body radiation therapy for metastatic melanoma [J]. *Adv Rad Oncol*, 2017, 2(2): 204-210.
- [3] Gu Z, Wang X, Qi R, et al. Oridonin induces apoptosis in uveal melanoma cells by upregulation of Bim and downregulation of fatty acid synthase [J]. *Biochem Bioph Res Co*, 2015, 457(2): 187-193.
- [4] Farma J M, Kulkarni N, Hsu C, et al. Surgical management of primary and recurrent melanoma [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2015, 24(2): 239-247.
- [5] 郭萍, 李玉山, 郭远强. 冬凌草化学成分和药理活性研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2010, 33(2): 144-147.
- [6] 王汉楚, 沙丽晓, 陈小燕, 等. 冬凌草甲素对卵巢癌细胞紫杉醇耐药性的拮抗作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(3): 534-539.
- [7] 季宇彬, 江剑, 高世勇. 冬凌草甲素注射剂诱导人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡及其机制研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(10): 2051-2055.
- [8] 王天晓, 刘迎滑, 时小燕. 冬凌草甲素下调 STAT3-HKII 通路诱导 HepG2 细胞凋亡的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(3): 397-402.
- [9] Kim K M, Im A R, Kim S H, et al. Timosaponin AIII inhibits melanoma cell migration by suppressing COX-2 and *in vivo* tumor metastasis [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(2): 181-188.
- [10] Liang G, Ding M, Lu H, et al. Metformin upregulates E-cadherin and inhibits B16F10 cell motility, invasion and migration [J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(3): 1527-1532.
- [11] Fukai F. New type of antitumor agent targeting the cell adhesion molecule, integrin [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2017, 137(2): 137-139.
- [12] 冯耀荣, 陈红淑. 冬凌草甲素抗肿瘤活性研究进展 [J]. *中国中医药科技*, 2016, 23(1): 125-127.
- [13] 齐琦, 张配, 李其响, 等. 冬凌草甲素诱导三阴乳腺癌 MDA-MB-231 细胞凋亡及对细胞内活性氧水平的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(12): 2361-2365.
- [14] 陈璐, 陈子华. 上皮间质转化与恶性肿瘤的转移和侵袭 [J]. *中国普通外科杂志*, 2012, 21(7): 886-892.
- [15] 陈文浩, 杨明, 张艳桥. 上皮-间质转化在恶性肿瘤中发生机制的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2016, 25(1): 51-57.
- [16] 惠起源, 魏晓萍. 上皮间质转化在肿瘤发生发展中的作用 [J]. *中国肿瘤*, 2013, 22(3): 219-222.
- [17] 龚晓萌, 陶仪声, 周蕾, 等. 宫颈癌中 Snail、Slug 和 KAI1 的表达及临床意义 [J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(12): 1733-1738.
- [18] 孙菊杰, 魏玲, 张德贤, 等. 非小细胞肺癌中 Snail、HIF-1 α 和 E-cadherin 表达的临床意义及相关性 [J]. *肿瘤防治研究*, 2015, 42(1): 37-40.
- [19] 王海波, 顾昊, 赵雪煜, 等. 南蛇藤提取物通过调控基质金属蛋白酶组及其抑制因子抑制人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭转移的研究 [J]. *中草药*, 2016, 47(8): 1345-1350.