

毛茛总苷对人胃癌 MGC803 细胞血管生成拟态的影响及其机制

傅士龙², 朱峰妍¹, 曹志飞², 蒋小岗¹, 周泉生², 顾振纶^{1*}

1. 苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007

2. 苏州大学唐仲英血液学研究中心, 江苏 苏州 215123

摘要: **目的** 探讨毛茛总苷对人胃癌 MGC803 细胞血管生成拟态的影响及其机制。**方法** 采用细胞黏附实验观察毛茛总苷对 MGC803 细胞黏附作用的影响; 通过细胞划痕实验检测毛茛总苷对 MGC803 细胞迁移能力的影响; 通过 Matrigel 肿瘤细胞类血管生成模型实验观察毛茛总苷对 MGC803 细胞体外类血管生成的作用; 半定量 RT-PCR 方法检测毛茛总苷对 MGC803 细胞血管生成拟态相关基因表达的影响。**结果** 毛茛总苷有效抑制 MGC803 细胞黏附、细胞迁移以及 MGC803 细胞介导的体外类血管生成; 明显抑制 MGC803 细胞血管生成拟态相关基因 VE-cadherin、sema 4D 和 integrin $\beta 5$ 的表达。**结论** 毛茛总苷通过抑制血管生成拟态相关基因 VE-cadherin、sema 4D 和 integrin $\beta 5$ 的表达来抑制 MGC803 细胞黏附、细胞迁移和血管生成拟态。

关键词: 毛茛总苷; 人胃癌 MGC803 细胞; 血管生成拟态; 细胞迁移; 细胞黏附

中图分类号: R282.710.5; R979.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)16-2267-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.16.014

Effect of total glycosides from *Ranunculus japonicus* on vasculogenic mimicry of human gastric cancer MGC803 cell line and its mechanism

FU Shi-long², ZHU Feng-yan¹, CAO Zhi-fei², JIANG Xiao-gang¹, ZHOU Quan-sheng², GU Zhen-lun¹

1. Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Suzhou 215007, China

2. Cyrus Tang Hematology Center, Soochow University, Suzhou 215123, China

Abstract: Objective To investigate the effect of total glycosides from *Ranunculus japonicus* (TGRJ) on vasculogenic mimicry of human gastric cancer MGC803 cell line *in vitro* and its mechanisms. **Methods** The effect of TGRJ on the cell adhesion of MGC803 was observed by cell attachment assay. The effect of TGRJ on the cell migration of MGC803 was studied by cell wound healing assay. The function of TGRJ on the tube-like structures formation of MGC803 *in vitro* was verified by tube formation assay. The effect of TGRJ on the expression of vasculogenic mimicry related genes was assessed by semi-quantitative RT-PCR assay. **Results** TGRJ effectively inhibited the cell adhesion, cell migration of MGC803, and the MGC803-mediated vasculogenic mimicry *in vitro* in a dosage-dependent manner. Furthermore, the semi-quantitative RT-PCR showed that TGRJ markedly inhibited the expression of MGC803 vasculogenic mimicry-related genes VE-cadherin, sema 4D, and integrin $\beta 5$. **Conclusion** TGRJ could effectively inhibit the cell attachment and cell migration of MGC803, and the MGC803-mediated vasculogenic mimicry by down regulating vasculogenic mimicry-related genes VE-cadherin, sema 4D, and integrin $\beta 5$.

Key words: total glycosides of *Ranunculus japonicus*; human gastric cancer MGC803 cell line; vasculogenic mimicry; cell migration; cell attachment

自 1972 年 Folkman 首先提出新血管生成(angio-genesis)的概念以来^[1], 肿瘤新血管生成越来越受到生物学界和制药行业的广泛重视。目前众多抗新血管生成药物对恶性肿瘤虽有一定的疗效, 但疗效

有限并难以持久, 其基本原因是人们对恶性肿瘤新血管生成的机制所知甚少^[1-3]。有研究表明, 恶性肿瘤血管并非都由血管内皮细胞组成, 特别是有些肿瘤组织的微血管和小血管可由肿瘤细胞自身组成,

收稿日期: 2012-11-05

基金项目: 苏州市科技支撑计划项目 (SS201004)

作者简介: 傅士龙 (1988—), 男, 硕士研究生, 研究方向为抗肿瘤血管新生药物研发。Tel: (0512)65880899-516 E-mail: fushilonghao@126.com

*通信作者 顾振纶 Tel: (0512)65190599 E-mail: zhenlun.gu@163.com

这种现象被称为血管生成拟态^[4-5]。因此,研究恶性肿瘤新血管生成机制,发现肿瘤血管生成的特异性靶标,研发针对肿瘤新血管生成的药物已成为抗肿瘤研究的重要课题^[6]。前期实验发现毛茛等多种中药具有明显的抗肿瘤作用,经进一步分离、提取,发现毛茛总苷具有较好的抗癌作用,特别是对人胃癌 MGC803 细胞具有较高的敏感性。本实验研究毛茛总苷对人胃癌 MGC803 细胞血管生成拟态的影响及其机制,为将其开发为抗肿瘤药物提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞系

人胃癌 MGC803 细胞,本实验室保存,培养于 DMEM (高糖) 培养基。在 5% CO₂、37 °C 培养箱常规培养,2 d 换液 1 次,3~4 d 传代 1 次。

1.2 药品与试剂

毛茛,购自河北省安国市冷背药材有限公司,经朱峰妍助理研究员鉴定为毛茛科植物毛茛 *Ranunculus japonicus* Thunb. 全草。PAA 胎牛血清 (FBS),澳大利亚 PAA 公司;高糖 DMEM 培养基,HyClone 公司;胰蛋白酶, Biosharp 公司; RNase A, 美国 Biomiga 公司;瑞-姬氏染液,南京建成科技有限公司;二甲基亚砜 (DMSO),美国 Sigma 公司;GelRed 核酸凝胶染料,美国 Boitium 公司;Alamarblue 试剂、Trizol 试剂,美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒,美国 Fermentas;PCR 试剂盒,大连宝生物工程有限公司;引物,上海生工生物工程技术有限公司;基质胶, BD 公司。

1.3 仪器

CO₂ 培养箱、PCR 扩增仪、美国 Thermo 公司;多功能读板机,美谷分子仪器有限公司;智能图像导航仪,日本 Olympus 公司。

2 方法

2.1 毛茛总苷的提取

取干燥的毛茛全草剪碎,分别用 10、8、6 倍质量的 85%乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h,抽滤,合并提取液,减压浓缩回收溶剂至无醇味,分别用等体积的石油醚、氯仿、醋酸乙酯萃取若干次至有机溶剂层为浅绿色。回收溶剂得石油醚萃取物、氯仿萃取物、醋酸乙酯萃取物及下层 (水层)。水层用蒸馏水溶解,滤过,经 D-101 大孔树脂吸附、水洗,弃去水洗液,再用 95%乙醇洗脱,收集洗脱部位,蒸干乙醇得膏状物即毛茛总苷,主要含三萜皂苷类化合物约 8%。实验时用高糖 DMEM 培养基稀释成

所需质量浓度。

2.2 细胞黏附实验

用不同质量浓度 (100、200、400、600、800 μg/mL) 毛茛总苷处理 MGC803 细胞 24 h [对照组加入 1.6%磷酸盐缓冲液 (PBS)],用无血清培养基重悬后台盼蓝计数活细胞,调整细胞密度至 2.0×10^5 /mL,接种于 96 孔板中。接种细胞前先在 96 孔板中铺 0.1%明胶,37 °C 孵育 1 h,吸弃上层液体再铺细胞。待细胞贴壁后吸弃培养基,磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 3 次,加入新鲜培养基,加入 Alamarblue 试剂 10 μL/孔。2 h 后用酶标仪测 560/590 nm 处吸光度 (A) 值,计算细胞黏附率。实验重复 3 次。

2.3 细胞迁移实验

将处于对数生长期的 MGC803 细胞以合适密度接种于 6 孔板中,24 h 后用黄枪头进行划痕,吸弃培养基后用 PBS 洗 3 次,重新加入含 5% FBS 的新鲜培养基,分别加入不同质量浓度 (100、200、400 μg/mL) 的毛茛总苷,对照组加入含 0.6% DMSO 的培养基,分别于 0、12、24 h 拍照。实验重复 3 次。

2.4 血管生成拟态实验

用不同质量浓度 (100、200、400 μg/mL) 毛茛总苷处理 MGC803 细胞 24 h (对照组加入 0.8% PBS),培养基含 5% FBS。实验前 1 天将 Matrigel 置于冰上过夜,实验时取融化的 Matrigel,加置 48 孔板中,轻拍使之均匀分布,37 °C 孵育 0.5 h,使 Matrigel 聚合成胶。取合适数量 (4.0×10^4) 经台盼蓝计数的 MGC803 活细胞,接种在 Matrigel 上,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 4 h,瑞-姬氏染液染色,显微镜观察 (×40) 并拍照。

2.5 RT-PCR 法检测 MGC803 细胞血管生成拟态相关基因的表达

用不同质量浓度 (100~600 μg/mL) 毛茛总苷处理 MGC803 细胞 24 h (对照组加入 1.2% PBS)。采用 Trizol 提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA (由金唯智生物科技有限公司合成)。PCR 反应体系为 25 μL (双蒸水 18.3 μL, 10×PCR 缓冲液 2.5 μL, 2.5 mmol/L 三磷酸脱氧核糖核苷 (dNTP) 2 μL, 上游引物 0.5 μL, 下游引物 0.5 μL, cDNA 1 μL, rTaq 酶 0.2 μL)。PCR 条件: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 22~35 个循环, 72 °C 延伸 8 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像仪拍照,实验重复 3 次。引物序列见表 1。

表 1 基因引物序列及片段
Table 1 Gene primer sequences and fragments

基 因	引物序列 (5'-3')	产物片段 / bp
β -actin	正向引物: AAGAGCTACGAGCTGCCTGACG 反向引物: CGCCTAGAAGCATTGCGGTGG	420
VE-cadherin	正向引物: CTGTCTACTCCTTATCCCTTGTTT 反向引物: GTCAGTGTATCTACAATCCCTTGC	372
sema4D	正向引物: TGTCTGTGGAGTATGAGTTTGTGTT 反向引物: GGGTGTAGTTCACATCTTTCTTGAT	552
VEGFA	正向引物: AGAAGAGACACATTGTTGGAAGAAG 反向引物: CGGTACAAATAAGAGAGCAAGAGAG	439
plexinB1	正向引物: AGGATGGCCCAGGAGACAATGAGTG 反向引物: GGACCTTCGGATCCTGGTAGGCAAA	663
MYC	正向引物: TCGCAAGACTCCAGCGCCTTCT 反向引物: TGGGGCTGGTGCATTTTCGGT	409
intergrin α 5	正向引物: AGGCTAATACCAGCCAGCCA 反向引物: CACCTAAAACCACACGGCCA	423
CD105R	正向引物: CAGCAGAGCTTTGTGCAGGTCAGAG 反向引物: GTACTCACGCGTGTGCGAGTAGATG	450
hintergrin β 5	正向引物: TGCCATGCAGGTTACATCGG 反向引物: ATCATGACGCAGTCCTTGGC	353
EPHB4	正向引物: GTCAGTGCATTGAACGGGGT 反向引物: ATCCAGTTGGGTCTGGCTGT	372

2.6 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 16.0 统计软件中 Oneway ANOVA 进行统计学分析, 组间差异比较采用 LSD 检验。

3 结果

3.1 对 MGC803 细胞黏附的影响

毛茛总苷作用 MGC803 细胞 30 min 后, 细胞的黏附作用受到抑制, 并呈质量浓度相关性, 当毛茛总苷质量浓度达 800 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞黏附作用抑制率达 70%, 提示毛茛总苷可明显抑制 MGC803 细胞黏附。结果见图 1。

3.2 对 MGC803 细胞迁移的影响

与毛茛总苷处理前 (0 h) 相比, MGC803 细胞用毛茛总苷 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 处理 12、24 h 后, 能明显抑制 MGC803 细胞的迁移。结果见图 2。

3.3 对 MGC803 细胞血管生成拟态的影响

与对照组相比, 毛茛总苷使 MGC803 细胞管腔形成数明显减少, 管腔长度明显缩短; 其质量浓度分别为 100、200、400 $\mu\text{g/mL}$ 时, MGC803 细胞形

成完整管腔的能力逐渐减弱, 质量浓度为 200 $\mu\text{g/mL}$ 时, 几乎使 MGC803 细胞无法形成血管, 表明毛茛总苷可以抑制 MGC803 体外类血管结构的形成。结果见图 3。

3.4 对 MGC803 细胞血管生成拟态相关基因表达的影响

MGC803 细胞以毛茛总苷处理后, 血管生成拟

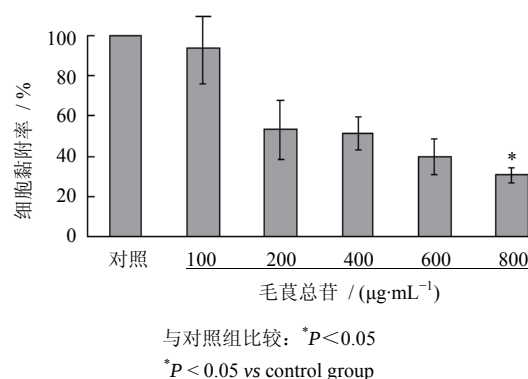


图 1 毛茛总苷对 MGC803 细胞黏附的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Effect of TGRJ on MGC803 cell adhesion ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

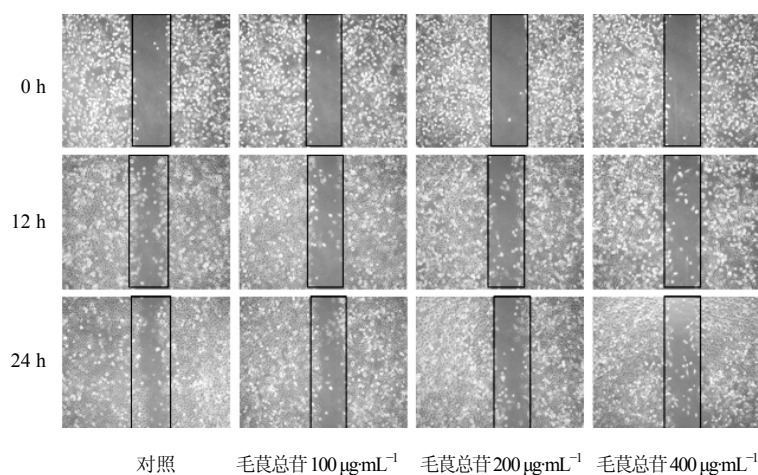


图2 毛茛总苷对 MGC803 细胞迁移的影响

Fig. 2 Effect of TGRJ on cell migration of MGC803 cell line

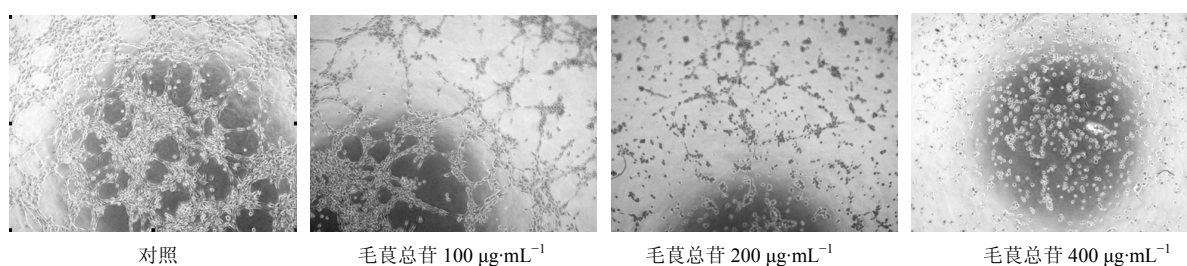


图3 毛茛总苷对 MGC803 细胞血管生成拟态的影响

Fig. 3 Effect of TGRJ on vasculogenic mimicry in MGC803 cell line

态相关基因 VE-cadherin、sema 4D、integrin $\beta 5$ 的表达受到不同程度地抑制，其他相关基因如 VEGFA、CD105R、EPHB4 则无明显变化，表明毛茛总苷的特异性靶点是 VE-cadherin、sema 4D、integrin $\beta 5$ 等。提示毛茛总苷通过选择性下调 MGC803 细胞血管生成拟态相关基因 VE-cadherin、sema 4D、integrin $\beta 5$ 的表达，抑制血管生成拟态。结果见图 4。

4 讨论

通常认为肿瘤血管是正常血管系在肿瘤组织中的延伸，正常血管内皮细胞向肿瘤组织迁移，在肿瘤组织中增殖并形成肿瘤血管^[7]。而近年有研究表明，有些类型的肿瘤细胞可相互连接，形成血管样管道，这种血管在形态和功能学上均不同于正常血管模式，被称为血管生成拟态。

全球每年新发胃癌 100 余万，中国占 42%，且发病率和死亡率均较高^[8-9]。因此研发合适的抗胃癌细胞药物具有重要的现实意义。毛茛总苷具有消炎镇痛等作用，体外明显抑制人胃癌细胞 MGC803 的增殖，且不良反应少^[10-12]。本实验结果显示，毛茛

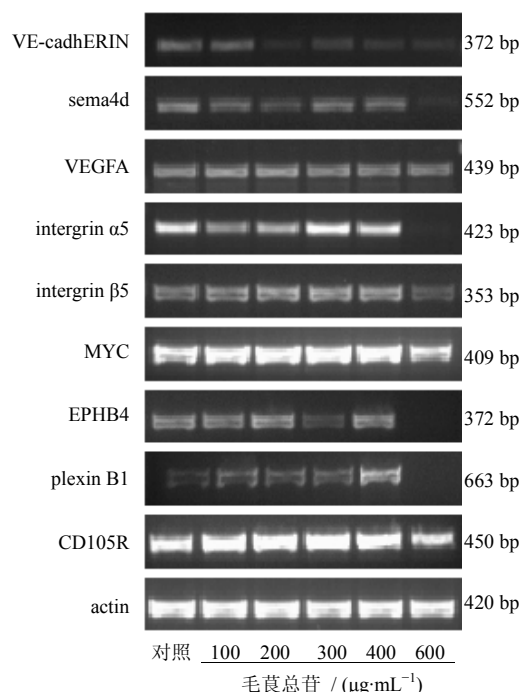


图4 毛茛总苷对 MGC803 细胞血管拟态相关基因表达的影响

Fig. 4 Effect of TGRJ on expression of MGC803 vasculogenic mimicry-related genes

总苷质量浓度分别为 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 时,可明显抑制 MGC803 细胞的迁移,并与质量浓度相关;还选择性下调 MGC803 细胞血管生成拟态相关基因 VE-cadherin、sema 4D 和 integrin $\beta 5$ 的表达,而这些基因介导相邻内皮细胞之间的黏附连接,在保持血管的完整性、调节内皮细胞之间的通透性和细胞内的信号传导中发挥重要作用^[4,13]。近年来有学者发现,在一些高度侵袭性肿瘤细胞中 VE-cadherin、sema 4D、integrin $\beta 5$ 高表达,这些基因参与肿瘤细胞的血管生成拟态^[3,5]。

综上,毛茛总苷通过抑制血管生成拟态相关基因 VE-cadherin、sema 4D 和 integrin $\beta 5$ 的表达来抑制人胃癌 MGC803 细胞迁移、细胞黏附和血管生成拟态。毛茛总苷在体内抑制 MGC803 细胞血管生成拟态的作用将在以后的研究中进一步深入探索。

参考文献

- [1] Carmeliet P, Jain R K. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis [J]. *Nature*, 2011, 473(7347): 298-307.
- [2] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis [J]. *Cell*, 2011, 146(6): 873-887.
- [3] Shang B, Cao Z, Zhou Q. Progress in tumor vascular normalization for anticancer therapy: challenges and perspectives [J]. *Front Med*, 2012, 6(1): 67-78.
- [4] Bao M, Cao Z, Yu D, et al. Columbamine suppresses the proliferation and neovascularization of metastatic osteosarcoma U2OS cells with low cytotoxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 215(3): 174-180.
- [5] Cao Z, Yu D, Fu S, et al. Lycorine hydrochloride selectively inhibits human ovarian cancer cell proliferation and tumor neovascularization with very low toxicity [J]. *Toxicol Lett*, 2013, 218(2): 174-185.
- [6] Bu Z, Pan Y, Shang B, et al. SZ-117, a monoclonal antibody against matrix metalloproteinase-2 inhibits tumor cell-mediated angiogenesis [J]. *Hybridoma*, 2012, 31(1): 63-67.
- [7] 王奇巍, 杨国红, 林梦感, 等. 植物来源抑制血管生成的活性成分研究进展 [J]. *中草药*, 2010, 41(5): 附 3-附 8.
- [8] De Vita F, Giuliani F, Silvestris N, et al. Current status of targeted therapies in advanced gastric cancer [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(suppl 2): S29-S34.
- [9] 张雯, 王金万. 胃癌的流行病学及其分型 [J]. *中国全科医学: 医生读者版*, 2010(11): 16-17.
- [10] 秦汝兰, 孟庆双. 毛茛总皂苷对小鼠耐缺氧及记忆能力的影响 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(22): 13404-13404.
- [11] 苏波. 毛茛皂苷的提取及其抑菌作用初步分析 [J]. *怀化学院学报*, 2011, 30(2): 53-56.
- [12] 王榕乐, 谭毓治, 罗绍宝. 毛茛总苷抗炎镇痛作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(2): 290-292.
- [13] Liu R, Cao Z, Tu J, et al. Lycorine hydrochloride inhibits metastatic melanoma cell-dominant vasculogenic mimicry [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2012, 25(5): 630-638.