

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

王海波^{1,2,3,4}, 顾昊^{1,2,3,4}, 赵雪煜^{1,2,3,4}, 冯俊^{1,2,3,4}, 钱亚云^{1,2,3,4}, 杨林^{1,2,3,4}, 金凤^{1,2,3,4}, 史有阳^{1,2,3,4}, 陆松花^{1,2,3,4}, 刘延庆^{1,2,3,4*}

1. 国家中医药管理局胃癌毒邪论治重点研究室, 江苏 扬州 225001
2. 扬州大学-扬州市肿瘤研究所, 江苏 扬州 225001
3. 扬州大学 肿瘤防治重点实验室, 江苏 扬州 225001
4. 扬州大学医药研究所, 江苏 扬州 225001

摘要: 目的 探讨南蛇藤提取物(COE)对人胃癌 SGC-7901 细胞的侵袭和转移的影响及其分子机制。方法 MTT 法检测 COE 对人胃癌 SGC-7901 细胞增殖的影响; Transwell 小室实验检测 COE 对 SGC-7901 细胞侵袭和转移能力的影响。Western blotting 检测经 COE 作用后的 SGC-7901 细胞中金属基质蛋白酶(MMPs) MMP2、MMP9 和金属基质蛋白酶抑制因子(TIMPs) TIMP1、TIMP3 的蛋白水平。RT-PCR 检测经 COE 作用后的 SGC-7901 细胞中 MMP2、MMP9、TIMP1、TIMP3 的 mRNA 表达情况。结果 Transwell 实验显示, 经 20、40、80 mg/L COE 处理过的 SGC-7901 细胞穿膜数明显减少并呈一定的浓度依赖性。Western blotting 结果显示, 经 20、40、80 mg/L COE 处理过的 SGC-7901 细胞, MMP2、MMP9 蛋白的表达水平明显降低, 而 TIMP1、TIMP3 蛋白表达水平明显上调。RT-PCR 结果显示, 经 20、40、80 mg/L COE 处理过的 SGC-7901 细胞中 MMP2 和 MMP9 的 mRNA 水平有轻微升高趋势, 而 TIMP1 和 TIMP3 的 mRNA 水平明显大幅上调($P < 0.001$)。结论 COE 能明显抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的侵袭和转移, 其机制可能与下调 MMP2、MMP9 蛋白水平直接相关。而其作用的实现, 很可能是通过直接上调 TIMP1 和 TIMP3 的 mRNA 转录水平从而提高 TIMPs 蛋白表达水平实现的。

关键词: 南蛇藤; 胃癌; 金属基质蛋白酶; 金属基质蛋白酶抑制因子; 侵袭; 迁移

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2016)08-1345-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.08.016

Research on effect of *Celastrus orbiculatus* extract on inhibiting invasion and metastasis of human gastric cancer SGC-7901 cells by mediating matrix metalloproteinases group and their inhibitors

WANG Hai-bo^{1,2,3,4}, GU Hao^{1,2,3,4}, ZHAO Xue-yu^{1,2,3,4}, FENG Jun^{1,2,3,4}, QIAN Ya-yun^{1,2,3,4}, YANG Lin^{1,2,3,4}, JIN Feng^{1,2,3,4}, SHI You-yang^{1,2,3,4}, LU Song-hua^{1,2,3,4}, LIU Yan-qing^{1,2,3,4}

1. The Key Laboratory of Syndrome Differentiation and Treatment of Gastric Cancer of The State Administration of Traditional Chinese Medicine, Yangzhou 225001, China
2. Yangzhou Cancer Research Institute, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China
3. The Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China
4. Medical & Pharmaceutical Institute of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

Abstract: Objective To study the effect and the mechanism of *Celastrus orbiculatus* extract (COE) on inhibiting the invasion and metastasis of human gastric cancer SGC-7901 cells. **Methods** The groups of different cells were set up, such as negative control group, COE with different concentration groups, and positive control group. The effects of COE on the cytotoxicity and proliferation of human gastric cancer SGC-7901 cells were determined by MTT assay. The effect of COE on the metastatic ability of human gastric cancer SGC-7901 cells *in vitro* was observed by invasion assay and migration assay. The effects of COE on the expression of matrix

收稿日期: 2015-10-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81274141, 81450051, 81403232, 81573656); 江苏省自然科学基金(BK20141280); 江苏省中医药科技项目(LZ11210)

作者简介: 王海波(1989—), 男, 在读硕士, 主要从事中西医结合临床肿瘤学研究。Tel: 15366428858 E-mail: whbosy@163.com

*通信作者 刘延庆(1956—), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合临床肿瘤学研究。Tel: 13905278844 E-mail: liuyq@yzu.edu.cn

metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors in human gastric cancer SGC-7901 cells were examined by Western blotting. After the treatment in different groups, mRNAs of MMP2, MMP9, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), TIMP1, and TIMP3 in cells were detected by RT-PCR. **Results** Compared with the negative control group, human gastric cancer SGC-7901 cells treated with COE at different concentration exhibited a dose-dependent growth inhibition. COE obviously reduced the migration and invasion potential of human gastric cancer SGC-7901 cells. In addition, the expression levels of MMP2 and MMP9 were dramatically suppressed by COE in a concentration-dependent manner, while the expression levels of TIMP1 and TIMP3 were raised. RT-PCR showed that mRNAs of TIMP1 and TIMP3 were raised with the increase of drug concentration. **Conclusion** COE could significantly inhibit the invasion and metastasis of human gastric cancer SGC-7901 cells via an up-regulation of the expression levels of TIMP1 and TIMP3 and down-regulation of the expression levels of MMP-2 and MMP-9.

Key words: *Celastrus orbiculatus* Thunb.; human gastric cancer; matrix metalloproteinases; tissue inhibitors of metalloproteinases; invasion; metastasis

胃癌是世界上发病率最高的癌症之一,在我国胃癌发病率在各种恶性肿瘤中居首位,在所有恶性肿瘤中其肿瘤相关死亡率更高,居第 2 位。由于胃癌早期症状不明显,就诊时患者多处于进展期,大多数已发生淋巴道转移或者周围浸润^[1]。正因为胃癌的早期症状不明显,就诊时多发生转移,胃癌切除术后,复发和转移率较高。由于胃癌的高转移率,患者一般预后差、化疗敏感性低,严重制约着胃癌患者生存率的提高^[2],迫切需要寻找到或者开发出新型抗肿瘤转移的有效药物。以基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)天然抑制剂-金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)为切入点的新药研究日益受到关注。传统中药南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb. 为卫矛科(Celastraceae)南蛇藤属 *Celastrus* L. 植物,是中国重要的药用植物。前期实验研究发现,南蛇藤提取物(*Celastrus orbiculatus* extracts, COE)能显著抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[3-6],而 COE 抑制肿瘤细胞侵袭转移的生物学机制尚不完全清楚,前期研究也只揭开了 COE 抑制胃癌转移和侵袭部分通路和机制,而 COE 通过调控 MMPs 及 TIMPs 的研究,国内外未见文献报道。前期研究表明南蛇藤提取物对人胃癌 SGC-7901 裸鼠移植瘤生长具有抑制作用^[7],本实验在课题组前期研究成果基础上,深入研究 COE 通过调控 MMPs 和 TIMPs 抑制人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭、转移的作用机制,为研发治疗胃癌术后预防复发和转移的新药奠定基础,COE 有望成为新型的抗肿瘤转移中药。

1 材料

1.1 药物

南蛇藤购自广州致信药业有限公司(批号 070510),经中国药科大学中药资源研究室秦民坚

教授鉴定为卫矛科南蛇藤属植物南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb.。将南蛇藤藤茎切段,粉碎成粉,95%乙醇加热回流提取 3 次,回收溶剂至干,加水分散后,用石油醚和醋酸乙酯分别萃取 3 次,回收溶剂后减压浓缩并进行真空冻干,得到醋酸乙酯部位,即 COE,其中含总萜类化合物 68.3%^[8-9]。

1.2 细胞株和试剂

人胃癌细胞株 SGC-7901(中国科学院上海细胞库)。RPMI 1640 细胞培养基(Gibco 公司),胎牛血清(Hyclone 公司),胰蛋白酶、MTT 粉剂、Matrigel、Transwell 小室(BD 公司),MMP-2、MMP-9、TIMP1 和 TIMP3 单克隆抗体(Millipore 公司),姜黄素(Sigma 公司), β -actin(Cell Signaling 公司),HRP 标记的羊抗兔 IgG(Bioworld 公司)。

1.3 仪器

蛋白电泳槽、全自动酶标板分析仪、SDS-PAGE 凝胶成像分析仪(美国 Bio-Rad 公司);正置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);RT-PCR 仪(Roch 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞增殖

消化人胃癌 SGC-7901 细胞,重悬成单细胞悬液($3 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 个/mL),均匀接种 100 μ L 于 96 孔培养板中,使每孔细胞数在 3 000~4 000 个。细胞接种 12 h 后,设置对照组、COE(质量浓度分别为 10、20、40、80、160、320 mg/L)组和姜黄素(20 μ mol/L)阳性对照组,每孔加入 100 μ L 含药培养液,对照组加无药培养基(等量的 RPMI 1640 培养基)。分别孵育 24、48、72 h 后,每孔加入 5% MTT 20 μ L,继续孵育 4 h,弃上清,每孔加入 DMSO 150 μ L。全自动酶标仪中速振荡 10 min,充分溶解结晶物。490 nm 波长测定每孔的吸光度(A)值。计算细胞增殖率。

细胞增殖率=药物组 A 值/对照组 A 值

2.2 细胞侵袭实验

Transwell 小室膜底部用 Matrigel 稀释胶包被、水化。细胞在 6 孔板中培养, 分别设对照组、COE (质量浓度分别为 20、40、80 mg/L) 组、姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$) 组, 培养 24 h 后, 消化各组细胞, 用无血清 RPMI 1640 培养液重悬成单细胞悬液, 细胞浓度到 5×10^5 个/mL, Transwell 上室加入 200 μL 单细胞悬液, 下室加入含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养液 500 μL 。不同组细胞均设复孔 5 个, 继续培养 24 h, 取出 Transwell 小室用 PBS 轻轻洗 2 遍, 用棉签擦去上室膜表面的细胞。甲醇固定 30 min, 0.1% 结晶紫室温下染色 20 min, PBS 清洗 3 遍使结晶紫完全冲干净, 在高倍镜下计数穿膜下室细胞数量, 取四周和中间 5 个视野, 计算平均值。

2.3 细胞迁移实验

Transwell 小室膜底部不用 Matrigel 稀释胶包被, 其余步骤同“2.2”项实验。

2.4 MMP2、MMP9、TIMP1、TIMP3 蛋白的检测

接种人胃癌 SGC-7901 细胞于 6 孔板中, 孵育 12 h 后。分组及给药同“2.2”项, 继续孵育 24 h。提取每组细胞总蛋白, 用蛋白定量仪进行蛋白浓度测定后, 经 SDS-PAGE 凝胶分离, 60 V 恒压 30 min, 110 V 恒压电泳 30 min 后, 将胶上分离开的蛋白质电转移到 PVDF 膜上, TBST 洗膜 3 次 $\times$ 15 min。5% 脱脂奶粉 TBST 溶液室温封闭 2 h, TBST 洗膜 3 次 $\times$ 15 min。加一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜, TBST 洗膜 3 次 $\times$ 15 min。加入 HRP 标记的羊抗兔二抗室温下继续孵育 2 h, TBST 洗膜 3 次 $\times$ 15 min, 采用凝胶成像分析系统检测 MMP2、MMP9、TIMP1、TIMP3 蛋白条带。

2.5 RT-PCR 法检测 MMP2、MMP9、TIMP1 和 TIMP3 的 mRNA 水平

人胃癌 SGC-7901 细胞接种于 6 孔板, 孵育 12 h, 分组及给药同“2.2”项, 继续孵育 24 h, 提取总 RNA。MMP2、MMP9、TIMP1 和 TIMP3 及 β -actin 引物由上海生工生物工程有限公司合成。MMP2: F5'-TACAGGATCATTGGCTACACACC-3', R5'-GGTCACATCGCTCCAGACT-3', 扩增长度为 90 bp; MMP9: F5'-TGTACCGCTATGGTTACACTCG-3', R5'-GGCAGGGACAGTTGCTTCT-3', 扩增长度为 97 bp; TIMP1: F5'-CTTCTGCAATCCGACCTCGT-3', R5'-ACGCTGGTATAAGGTGGTCTG-3', 扩增长度为 79 bp; TIMP3: F5'-TGGGTTGTAAGTCAAG-3', R5'-GGTCCAGAGACACTCGTT-

CT-3', 扩增长度为 77 bp; β -actin: F5'-CATGTACGT-TGCTATCCAGGC-3', R5'-CTCCTTAATGTCACGC-ACGAT-3', 扩增长度为 250 bp。MMP2 反应条件: 预变性温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、6 min; 解链温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 97 $^{\circ}\text{C}$ 、1 s; 扩增温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s 进行 45 个循环。MMP9 反应条件: 预变性温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、6 min; 解链温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 97 $^{\circ}\text{C}$ 、1 s; 扩增温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s 进行 45 个循环。TIMP1 反应条件: 预变性温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、6 min; 解链温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 97 $^{\circ}\text{C}$ 、1 s; 扩增温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s 进行 45 个循环。TIMP3 反应条件: 预变性温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、6 min; 解链温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 97 $^{\circ}\text{C}$ 、1 s; 扩增温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s 进行 45 个循环。 β -actin 反应条件: 预变性温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、6 min; 解链温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 、60 s, 97 $^{\circ}\text{C}$ 、1 s; 扩增温度 95 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 、10 s 进行 45 个循环。

2.6 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件处理, 组间比较采用单因素方差分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 对 SGC-7901 细胞增殖的影响

对照组 SGC-7901 细胞生长良好, 经过 10~320 mg/L COE 分别处理 24、48、72 h 后, 细胞生长呈现出不同程度的生长抑制, 并且呈明显的浓度依赖性, 但时间依赖性不明显, 结果见表 1。根据 COE 对 SGC-7901 细胞生长抑制的情况, 为排除 COE 对细胞的毒性作用影响对细胞侵袭和迁移的研究, 后续实验选用 COE 质量浓度为 20、40、80 mg/L 的较低浓度作用 24 h 进一步研究。同时计算出 COE 的 24 h 半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 83.5 mg/L。

3.2 对 SGC-7901 细胞侵袭能力和迁移能力的影响

结果显示, COE (质量浓度分别为 20、40、80 mg/L) 和姜黄素 (20 $\mu\text{mol/L}$) 作用人胃癌 SGC-7901 细胞 24 h 后, 细胞穿膜数目较对照组明显减少, 结果见图 1 和表 2。结果直接证明 COE 能有效抑制 SGC-7901 细胞的侵袭和迁移。

3.3 对 MMP2、MMP9、TIMP1、TIMP3 蛋白表达的影响

人胃癌 SGC-7901 细胞经过不同浓度的 COE (20、40、80 mg/L) 和姜黄素 20 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h, Western blotting 结果分析表明, 与对照组比较, 随

表 1 COE 对 SGC-7901 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 1 Effect of COE on proliferation of SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞增殖率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	100.00 $\pm$ 11.12	100.00 $\pm$ 7.07	100.00 $\pm$ 5.02
COE	10	99.50 $\pm$ 10.87	97.78 $\pm$ 2.53	96.80 $\pm$ 5.96
	20	93.42 $\pm$ 9.50	88.67 $\pm$ 9.51**	85.24 $\pm$ 4.93***
	40	79.00 $\pm$ 6.00**	65.06 $\pm$ 3.94***	58.87 $\pm$ 7.02***
	80	59.18 $\pm$ 6.56***	45.56 $\pm$ 3.19***	38.95 $\pm$ 1.24***
	160	37.27 $\pm$ 5.37***	27.96 $\pm$ 3.19***	22.21 $\pm$ 2.50***
	320	19.27 $\pm$ 2.70***	14.98 $\pm$ 2.16***	13.21 $\pm$ 1.06***
姜黄素	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	35.33 $\pm$ 4.27***	24.67 $\pm$ 3.86***	16.56 $\pm$ 5.34***

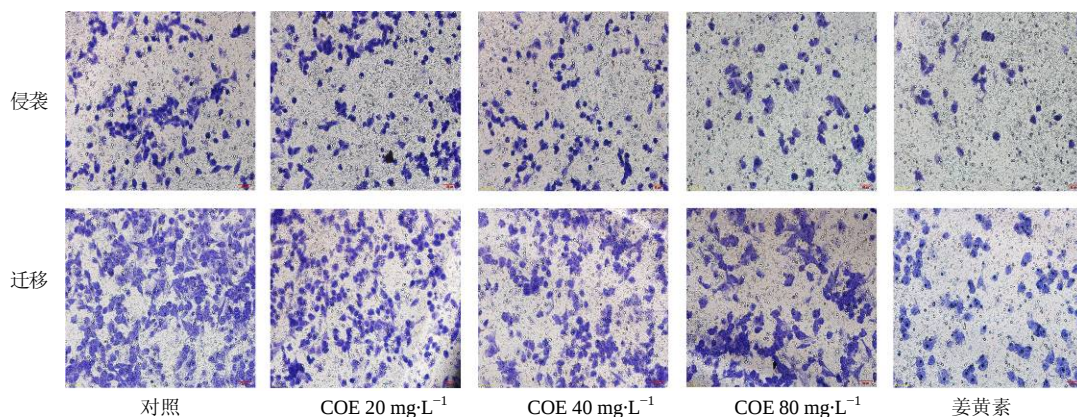
与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group, same as below

图 1 COE 对 SGC-7901 细胞侵袭与迁移的影响

Fig. 1 Effect of COE on invasion and metastasis of SGC-7901 cells

表 2 各组 Transwell 小室穿膜细胞数目 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 2 Numbers of transmembrane cells in Transwell of each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	侵袭数目	迁移数目
对照	—	148.60 $\pm$ 4.04	216.20 $\pm$ 14.55
COE	20	117.60 $\pm$ 9.29***	200.20 $\pm$ 8.35*
	40	109.40 $\pm$ 5.90***	137.80 $\pm$ 11.03***
	80	78.80 $\pm$ 6.38***	80.60 $\pm$ 3.51***
姜黄素	20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	40.80 $\pm$ 1.79***	45.20 $\pm$ 3.50***

着 COE 质量浓度的增加, TIMP1、TIMP3 蛋白的表达水平明显升高; MMP2、MMP9 蛋白的表达明显降低并呈明显的浓度依赖性, 见图 2。

3.4 对 MMP2、MMP9、TIMP1 和 TIMP3 的 mRNA 表达的影响

经不同质量浓度 COE (20、40、80 mg/L) 处理 24 h 的人胃癌 SGC-7901 细胞, MMP2 和 MMP9 的 mRNA 表达有轻微升高的趋势, 但是 TIMP1 和

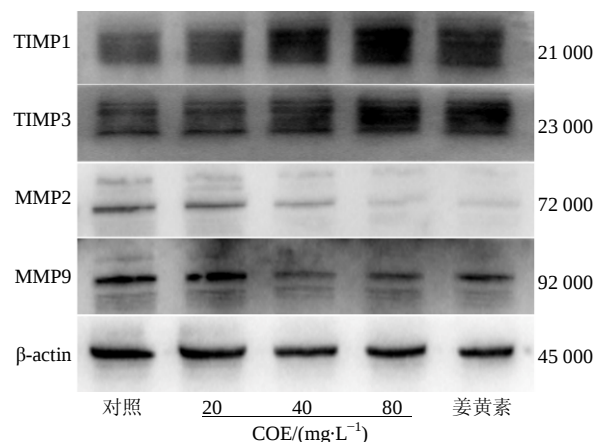


图 2 COE 对 SGC-7901 细胞 MMP2、MMP9、TIMP1 和 TIMP3 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of COE on protein expression of MMP2, MMP9, TIMP1, and TIMP3 in SGC-7901 cells

TIMP3 的 mRNA 表达显著增加, 并随 COE 质量浓度的递增呈现出一定的浓度依赖性, 见图 3。

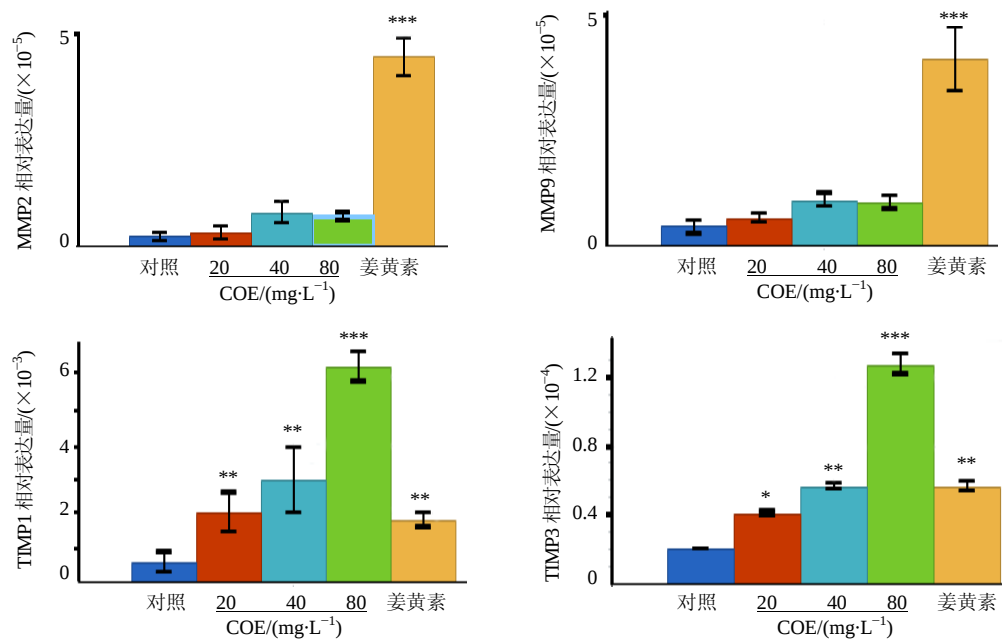


图 3 COE 对 SGC-7901 细胞 MMP2、MMP9、TIMP 1 和 TIMP 3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of COE on mRNA expression of MMP2, MMP9, TIMP1, and TIMP3 in SGC-7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

4 讨论

胃癌是我国消化道疾病中最主要的病症之一，无论是早期还是中期胃癌，手术是目前为止最为有效的治疗方法，配合放疗、化疗更能有效提高胃癌患者术后生存率。尤其是早期胃癌，手术治疗效果非常明显。然而胃癌的转移与复发却大大制约着胃癌中晚期手术治疗患者生存率的提高。侵袭和转移是恶性肿瘤细胞的重要生物学特征，其是一个动态的、复杂的、多步骤的过程，也是肿瘤患者死亡的主要原因^[10-12]。侵袭和转移不仅是胃癌手术治疗的最大障碍，也是其他恶性肿瘤治疗中的一大难题。近年来，如何抑制肿瘤的侵袭和转移以及抗肿瘤侵袭、转移药物的研发已经成为热点内容^[13-14]。恶性肿瘤细胞侵袭和转移的关键过程之一就是破坏肿瘤细胞侵袭和转移的组织学屏障，才能向周围组织浸润或远端转移^[15]。MMPs 作为肿瘤细胞降解外基质（ECM）的主要酶原家族，通过降解破坏 ECM 促进肿瘤细胞突破基底膜和细胞外基质构成的组织屏障，从而侵袭周围组织、血道和淋巴道。MMPs 可降解基底膜和细胞外基质的大多数组分，其中尤以 MMP2 和 MMP9 与胃癌的侵袭、转移关系最为密切^[16]。MMPs 受多条信号通路和细胞因子的调控，在肿瘤的发生和发展过程中 PI3K/Akt、NF- κ B 信号通路起了重要的调节作用，活化该信号通路能上调 MMP2 蛋白的表达水平，促进肿瘤细胞的侵袭

和转移^[17]。NF- κ Bp65 是 PI3K/Akt 信号通路的下游分子，也是 MMPs 的上游调节因子，活化 NF- κ B 也可以明显促进肿瘤细胞的侵袭和转移。另外，MMPs 又受 TIMPs 的调控。TIMPs 是 MMPs 活性的主要调节因子，大量研究证实，MMPs-TIMPs 平衡在肿瘤进展中具有重要作用，因此近年人们试图应用 TIMPs 治疗肿瘤^[18-19]，但相关实验并没有取得太大进展。通过 TIMPs 来抑制 MMPs 的水平已经成为研究热点内容之一。课题组前期研究结果显示，COE 可能是通过 PI3K/Akt、NF- κ B p65 信号通路来下调 MMP2 和 MMP9 蛋白的表达，从而抑制肿瘤细胞侵袭和转移的^[20-21]。然而并没有进行 COE 对 MMPs 天然的抑制因子 TIMPs 的影响及机制研究。本实验研究从 MMPs 的天然抑制因子着手，间接研究 COE 对人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭、转移的影响。结果显示，COE 能显著降低人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭和转移能力，下调 MMP2 和 MMP9 蛋白的表达水平，上调 TIMP1 和 TIMP3 蛋白的表达水平。而 MMP2 和 MMP9 蛋白是人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭、转移的重要因子，TIMPs 又可以直接抑制 MMP2 和 MMP9 的活性。结果说明，COE 很可能是通过下调 MMP2 和 MMP9 的水平来抑制肿瘤侵袭、转移的，但其作用机制很可能是通过上调 TIMP1 和 TIMP3 的表达水平来实现。进一步研究结果显示，COE 可以直接上调 TIMP1 和

TIMP3 mRNA 的水平。也就是说 COE 能提高 TIMP1 和 TIMP3 的转录水平, 进而上调 TIMP1 和 TIMP3 的蛋白表达水平。总之, COE 能够明显抑制人胃癌 SGC-7901 细胞的侵袭和转移, 其机制可能与上调 TIMP1 和 TIMP3 蛋白水平, 直接下调 MMP2 和 MMP9 蛋白水平有关。其作用机制很可能是 COE 直接作用于 TIMP1 和 TIMP3 的 mRNA, 直接上调 mRNA 的转录水平。本实验揭示了 COE 抗胃癌侵袭、转移的新作用机制, 找到了 COE 抗肿瘤侵袭转移的新的作用途径, 为开发新型抗胃癌转移新药提供了中药的理论依据。但是 COE 如何上调 TIMP1 和 TIMP3 的 mRNA 水平, 调节 MMP2 和 MMP9 蛋白的表达水平过程中是否还有其他信号通路的参与, 还有待继续研究。

参考文献

- [1] Ferlay J, Shin H R, Bray F, *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(12): 2893-2917.
- [2] Ebinger S M, Warschkow R, Tarantino I, *et al.* Modest overall survival improvements from 1998 to 2009 in metastatic gastric cancer patients: a population-based SEER analysis [J]. *Gastric Cancer*, 2015. doi:10.1007/s10120-015-0541-9.
- [3] Zhu Y D, Liu Y Q, Qian Y Y, *et al.* Research on the efficacy of *Celastrus orbiculatus* in suppressing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting HSP27 and TNF- α -induced NF- κ B/Snail signaling pathway in human gastric adenocarcinoma [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2014, 14(5): 433-445.
- [4] Qian Y Y, Zhang H, Hou Y, *et al.* *Celastrus orbiculatus* extract inhibits tumor angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor signaling pathway and shows potent antitumor activity in hepatocarcinomas *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(10): 752-760.
- [5] Zhang H, Qian Y, Liu Y, *et al.* *Celastrus orbiculatus* extract induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(4): 621-626.
- [6] 杨庆伟, 刘延庆, 刘 丽, 等. 南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞侵袭转移能力的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 434-437.
- [7] 朱耀东, 刘延庆, 钱亚云, 等. 南蛇藤提取物对人胃癌 SGC-7901 裸鼠移植瘤生长及凋亡相关蛋白表达的影响 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 697-702.
- [8] Li J J, Yang J, Lv F, *et al.* Chemical constituents from the stems of *Celastrus orbiculatus* [J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(4): 279-283.
- [9] 咎 珂, 陈筱清, 王 强, 等. 南蛇藤茎的化学成分研究 [J]. 中草药, 2007, 38(10): 1455-1457.
- [10] Valastyan S, Weinberg R A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 275-292.
- [11] Morra L, Moch H. Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update [J]. *Virchows Arch*, 2011, 459(5): 465-475.
- [12] Brooks S A, Lomax-Browne H J, Carter T M, *et al.* Molecular interactions in cancer cell metastasis [J]. *Acta Histochem*, 2010, 112(1): 3-25.
- [13] McNally L R, Rosenthal E L, Zhang W, *et al.* Therapy of head and neck squamous cell carcinoma with replicative adenovirus expressing tissue inhibitor of metalloproteinase-2 and chemorad-I action [J]. *Cancer Gene Ther*, 2009, 16(3): 246-255.
- [14] Lee S Y, Chung S M. Neovastat (AE 941) inhibits the airway inflammation via VEGF and HIF-2A suppression [J]. *Vascul Pharmacol*, 2007, 47(5/6): 313-318.
- [15] 沈培亮, 刘兆国, 王 旭, 等. 肿瘤 ECM 纤维生成与肿瘤转移研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(11): 1485-1488.
- [16] Chu D, Zhang Z X, Li Y M, *et al.* Matrix metalloproteinase-9 is associated with disease-free survival and overall survival in patients with gastric cancer [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(4): 887-895.
- [17] 田红艳, 陈萍萍, 李 笑, 等. Gab2 通过 PI3K/Akt/ARK5/MMP 途径影响乳腺癌的侵袭和转移 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(7): 1014-1018.
- [18] Clarke M R, Imhoff F M, Baird S K. Mesenchymal stem cells inhibit breast cancer cell migration and invasion through secretion of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 [J]. *Mol Carcinog*, 2015, 54(10): 1214-1219.
- [19] Donizy P, Rudno-Rudzinska J, Kaczorowski M, *et al.* Disrupted balance of MMPs/TIMPs in gastric carcinogenesis-paradoxical low MMP-2 expression in tumor and stromal compartments as a potential marker of unfavorable outcome [J]. *Cancer Invest*, 2015, 33(7): 286-293.
- [20] 季 雪, 钱亚云, 张 华, 等. 南蛇藤对人肝癌 HepG2 细胞侵袭能力的影响 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(6): 87-90.
- [21] 朱耀东, 钱亚云, 马 慧, 等. 南蛇藤总萜对 MGC-803 细胞侵袭和迁移能力的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 180-183.