

二氢丹参酮抑制人胃癌 SGC7901 细胞侵袭迁移作用及机制研究

葛宇清¹, 程汝滨², 陈梦², 黄真², 张光霁^{2*}

1. 浙江中医药大学第一临床医学院, 浙江 杭州 310006

2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 310053

摘要: 目的 研究二氢丹参酮(DHT)对人胃癌 SGC7901 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响,并探讨其作用的分子机制。方法 利用不同浓度的 DHT 处理细胞后,MTT 法检测 DHT 对细胞生长活力的影响,划痕实验观察 DHT 对细胞运动能力的影响,Transwell 小室模型研究 DHT 对细胞迁移和侵袭的影响,qRT-PCR 和 Western blotting 检测基质金属蛋白酶 MMP2、MMP9 和 Hedgehog 通路调控基因 Gli1 和 HHIP 的 mRNA 和蛋白表达水平。结果 与对照组相比,DHT 可显著抑制 SGC7901 细胞的体外增殖及迁移能力,Transwell 实验表明药物处理后穿膜细胞数明显低于对照组,并且呈剂量依赖性。Western blotting 和 qRT-PCR 实验结果表明,DHT 可显著抑制 SGC7901 细胞中 MMP9 的表达,降低 Gli1 基因的 mRNA 和蛋白表达,并提高 HHIP 基因的表达水平。结论 DHT 能够抑制 SGC7901 细胞的迁移和侵袭能力,其机制可能与 MMP9 蛋白的表达降低和 Hedgehog 通路活性抑制有关。

关键词: 二氢丹参酮; 胃癌; 侵袭迁移; 基质金属蛋白酶; Hedgehog 通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2017)15-3138-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.15.020

Inhibition of dihydrotanshinone on migration and invasion of gastric cancer SGC7901 cells and its mechanism

GE Yu-qing¹, CHENG Ru-bin², CHEN Meng², HUANG Zhen², ZHANG Guang-ji²

1. The First Affiliated Hospital, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China

2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China

Abstract: **Objective** To study the effects of dihydrotanshinone (DHT) on the migration and invasion of human gastric cancer SGC7901 cells and to investigate its mechanism. **Methods** SGC7901 cells were treated with different concentration of DHT. Then, the inhibitory effect of DHT was detected by MTT assay. The scratch adhesion test and Transwell assay were performed to determine the migration and invasion capacity of the cells. Quantitative PCR and Western blotting were used to examine the expression of MMP2, MMP9, Gli1, and HHIP in SGC7901 cells. **Results** DHT could inhibit the proliferation of SGC7901 cells with obvious dose- and time- dependent effects. DHT significantly inhibited the migration and invasion ability in SGC7901 cells *in vitro*. The expression of MMP9 was obviously down-regulated after DHT treatment. Furthermore, DHT significantly inhibited the Gli1 mRNA and proteins expression levels, and evaluated the expression of HHIP in SGC7901 cells. **Conclusion** DHT could inhibit the capability of migration and invasion of human gastric cancer SGC7901 cells. The potential molecular mechanism may be related to the inhibition of MMP9, and down-regulation of Hedgehog signaling pathway.

Key words: dihydrotanshinone; gastric cancer; migration and invasion; matrix metalloproteinases; Hedgehog pathway

丹参为我国传统的常用中药,具有活血祛瘀、养血安神、凉血消肿等功效,药理作用和临床应用广泛,常用于心血管系统、消化系统、肾脏和血液系统疾病的治疗^[1]。近年来研究发现,丹参中的脂

溶性丹参酮类物质可显著抑制肿瘤细胞的生长,是一类极具药物研发前景的活性化合物^[2-3]。二氢丹参酮(DHT)是丹参中主要的菲醌类脂溶性化合物之一,可通过抑制细胞增殖、促进细胞凋亡和诱导分

收稿日期: 2017-03-22

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(LY17H290010); 国家自然科学基金资助项目(81673755, 81573962, 81303269); 浙江省中医药优秀青年人才基金计划项目(2012ZQ006)

作者简介: 葛宇清,女,博士,副研究员,主要从事中西医结合抗肿瘤研究。Tel: (0571)61768180 E-mail: geyuqing@hotmail.com

*通信作者 张光霁,男,教授,研究方向为中医药肿瘤防治技术开发研究。Tel: (0571)86633168 E-mail: zgj@zcmu.edu.cn

化等机制发挥抗肿瘤作用,但与丹参酮 II_A、隐丹参酮和丹参酮 I 等化合物相比,其抗肿瘤的功能研究尚处于起步阶段,对胃癌细胞的作用和相关机制仍不明确^[4-5]。本研究旨在明确 DHT 对人胃癌 SGC7901 细胞的体外增殖、迁移和侵袭能力的影响,并探讨其相关的分子机制,为其进一步的开发和应用提供基础实验数据。

1 材料与方法

1.1 细胞

中度分化的人胃癌 SGC7901 细胞,购自中国科学院上海细胞研究所。培养于 10%新生牛血清的 RPMI 1640 培养液中,在 37 °C、5% CO₂ 的恒湿培养箱中,2 d 传代 1 次。

1.2 药品与试剂

DHT 购自上海源叶生物科技有限公司(批号 YY90060,质量分数>98%),用 DMSO 配制成 10 mmol/L 工作母液,于-20 °C 保存备用,使用前以 RPMI 1640 培养液调至所需浓度;阳性对照药物 5-氟尿嘧啶(5-Fu)购买自阿拉丁试剂;RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司;胎牛血清购自杭州四季青公司;0.25%胰蛋白酶购自杭州科易生物技术有限公司;基质金属蛋白酶 2(MMP2)、基质金属蛋白酶 9(MMP9)的多克隆抗体购于武汉博士德公司,Gli1、 β -actin 抗体购自 Cell Signaling 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(goat anti-rabbit IgG-HRP)购自 Santa Cruz 公司;ECL 化学发光液购于 Millipore 公司;Matrigel 基质胶/基质膜购于美国 BD 公司;3422 型 Transwell 小室购自美国 Corning 公司;TRIzol 试剂为美国 Invitrogen 公司产品;逆转录试剂盒和 Real-time PCR 试剂盒购自 Takara 公司;RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天公司;引物由上海生工生物技术公司合成;实验所有其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器

IX71 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司);1300 SERIES A2 型生物安全操作柜(美国 Thermo 公司);ABI Prism 7900 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);ST 16R 型低速离心机(美国 Thermo 公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 SGC7901 细胞用含 10%胎牛血清和青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL 的 RPMI 1640 培养液于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培

养。细胞贴壁生长近 80%后,弃培养瓶中的培养液,用 PBS 清洗后加入适量的胰酶消化,待贴壁细胞变圆,加培养液中并离心,取单细胞悬液以适量比例传代培养。每次传代培养与实验用细胞皆为处于对数生长期的细胞。

1.4.2 MTT 法检测细胞增殖活性 收集对数生长期细胞,调整细胞密度至 1×10^5 /mL,每孔 100 μ L 接种于 96 孔板,培养过夜后加入相应药物处理。实验设对照组、不同浓度 DHT 组(0.3、0.625、1.25、2.5、5、10、15 μ mol/L)和阳性对照组(5-Fu 2 μ g/mL),每组设 5 个平行孔,培养液终体积为 200 μ L。置 37 °C 的培养箱中继续培养 24 h 和 48 h,加入 20 μ L 的 MTT(质量浓度为 5 mg/mL),培养 4 h,弃去培养液,加入 150 μ L DMSO 室温振荡 15 min 溶解结晶,用酶标仪于波长 570 nm 测吸光度(A)值。

1.4.3 细胞划痕实验检测细胞运动能力 取对数生长期的 SGC7901 细胞,按照每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板中,常规培养至细胞 90%融合状态时,利用无菌的 100 μ L 移液枪头在培养板底部中间划出一字型划痕,利用 PBS 清洗 2 次,加入含有不同浓度(2、3 μ mol/L)DHT 的无血清培养液,37 °C 恒温培养箱中培养 24 h,弃去培养液,PBS 清洗 1 次,在显微镜下观察并拍照。

1.4.4 Transwell 小室模型检测细胞迁移 采用孔径 8.0 μ m 的 24 孔板 Transwell 小室。消化对数生长期的 SGC7901 细胞,用 PBS 清洗离心,将细胞悬浮于含有 0.1%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,每孔接种细胞 5×10^4 个,体积为 100 μ L,设对照组和不同浓度(2、3 μ mol/L)DHT 组,下室加入体积分数为 10%血清的 RPMI 1640 新鲜培养液。置 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养 24 h,弃去培养液,PBS 清洗 2 次,5%戊二醛 4 °C 固定 15 min,0.1%的结晶紫室温染色 30 min,PBS 清洗 2 次后用棉棒将膜上层的细胞擦去,PBS 小心清洗 1 次,在显微镜下观察并拍照。

1.4.5 Transwell 小室模型检测细胞侵袭 预先将 Matrigel 用无菌无血清 RPMI 1640 培养液按 1:8 稀释,取 50 μ L 稀释液铺于 Transwell 小室膜上,37 °C 放置 2 h 后,加入 100 μ L 无血清 RPMI 1640 培养液置于培养箱水化 30 min。取对数生长期的 SGC7901 细胞,用 PBS 清洗离心,将细胞悬浮于含有 0.1%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中,每孔接种细胞 1×10^5 个,体积为 100 μ L,设对照组和不同

浓度 (2、3 $\mu\text{mol/L}$) DHT 组, 下室加入含 10% 血清的 RPMI 1640 培养液。继续培养 24 h, 弃去培养液, 细胞经戊二醛固定和结晶紫染色, 用棉棒将膜上的细胞及 Matrigel 擦去, PBS 小心清洗, 在显微镜下观察、拍照。

1.4.6 qRT-PCR 检测 MMP2、MMP9、Gli1、HHIP 基因的表达 取对数生长期的 SGC7901 细胞, 调整细胞密度至 $5 \times 10^5/\text{mL}$, 按每孔 2 mL 接种于 6 孔板中培养过夜, 加入含有不同浓度 (1、2、4 $\mu\text{mol/L}$) 的 DHT 培养液处理 24 h, 对照组加入新鲜培养液。收集各组细胞, 加入 Trizol 试剂提取各组细胞总

RNA, 用紫外分光光度仪测定 RNA 浓度及纯度, 利用 Takara 反转录试剂盒获得各组 cDNA。qRT-PCR 采用 SYBR Green I 荧光染料法, 测定 MMP2、MMP9、Gli1 和 HHIP 基因的表达水平, 以 GAPDH 基因为内参, 各个基因的引物序列如表 1 所示。反应体系体积为 25 μL , 包括 $2 \times \text{SYBR}$ Primer Ex Taq 12.5 μL 、上下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL 、cDNA 模板 2 μL 、无菌水 8.5 μL , 反应条件为 ABI 7900 定量 PCR 仪默认标准程序。获取熔解曲线以确认 PCR 反应的特异性, 根据实时荧光定量扩增曲线获取目的基因和内参基因的 C_t

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因名称	正向引物 (3'→5')	反向引物 (3'→5')
MMP2	TCTTCCCCTTCACTTTCCTG	ACTTGCGGTCATCATCGT
MMP9	CGGAGTGAGTTGAACACAG	GTCCCAGTGGGGATTAC
Gli1	GCCGTGCTAAAGCTCCAGTGAACACA	TCCCACTTTGAGAGGCCCATAGCAAG
HHIP	CCCACACTTCAACAGCACCA	GCACATCTGCCTGGATCGT
GAPDH	ATTGGTTCGTATTGGGCGCCTGGTCACC	GAAGATGGTGATGGGATTTC

值, 以目的基因表达的相对定量 (RQ) 值进行统计学分析。

1.4.7 Western blotting 法检测 MMP2、MMP9、Gli1 蛋白的表达 SGC7901 细胞经不同浓度 (1、2、4 $\mu\text{mol/L}$) 的 DHT 处理 24 h 后, 离心收集细胞, 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 取含有 50 μg 总蛋白的细胞裂解产物进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后转印至 PVDF 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 1 h, 一抗 (1:1 000) 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次, 加入辣根酶标记的二抗 (1:2 000), 室温作用 2 h, 用显色剂 ECL 试剂盒显色, 化学发光成像仪上显影, 利用 QuantityOne 软件分析各组的灰度值。以 β -actin 为内参, 检测目的蛋白 MMP2、MMP9 和 Gli1 的蛋白表达情况。

1.4.8 统计方法 采用 SPSS 13.0 统计软件处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验。

2 结果

2.1 DHT 对 SGC7901 细胞增殖活力的影响

梯度浓度的 DHT 作用 SGC7901 细胞不同时间后, MTT 法检测细胞的增殖能力。结果如图 1 所示, DHT 可显著抑制 SGC7901 细胞的体外增殖活力, 且呈现明显的剂量和时间依赖性。2 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-Fu

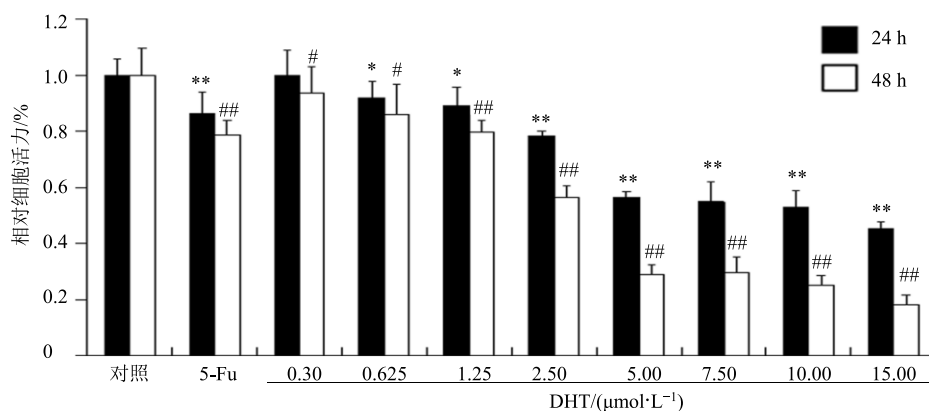
处理 24、48 h 的细胞增殖抑制率分别为 13.7%、21.6%, 提示 SGC7901 细胞对 5-Fu 具有一定的耐受性, 5-Fu 单独使用的抗胃癌细胞效果不佳。2.5 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHT 处理 24、48 h 时, 细胞的增殖抑制率分别为 21.8%、43.6%, 而当 DHT 的浓度增加到 5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞的抑制率分别为 43.5% 和 71.3%。说明 DHT 抑制 SGC7901 细胞增殖呈现明显的浓度和时间依赖性, 其作用 24、48 h 的 IC_{50} 值分别是 9.16、3.28 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 DHT 对 SGC7901 细胞运动能力的影响

细胞划痕实验观察 DHT 对 SGC7901 细胞运动能力的影响。如图 2 所示, 未经药物处理的细胞在 24 h 的划痕距离较 0 h 明显减少, 表明 SGC7901 细胞具有较强的迁移运动能力。而经 2、3 $\mu\text{mol/L}$ DHT 处理 24 h 后, 细胞的划痕距离要显著大于对照组, 说明 DHT 可有效抑制 SGC7901 的运动能力。

2.3 DHT 对 SGC7901 细胞迁移及侵袭能力的影响

Transwell 小室实验检测了加入 DHT 后细胞迁移能力的变化, 如图 3 所示, 加入 DHT 处理后, 膜上细胞数目明显减少, 且随着药物浓度的提高, 抑制作用增强。在 Transwell 小室铺上一层基质胶, 检测 DHT 对 SGC7901 细胞侵袭能力的影响, 结果如图 3 所示, DHT 显著降低了细胞的侵袭能力, 且呈现明显的浓度依赖性。



24 h 时与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 48 h 时与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group at 24 h; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group at 48 h

图 1 DHT 对 SGC7901 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of DHT on proliferation of SGC7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

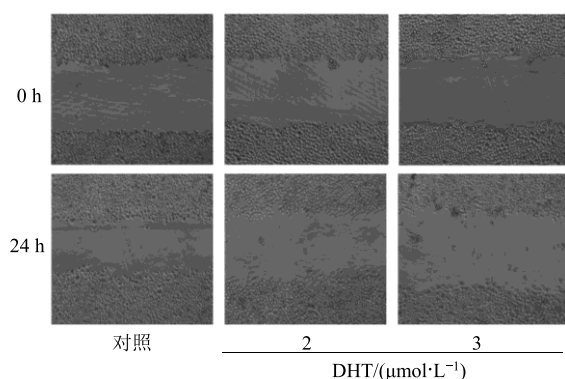


图 2 DHT 对 SGC7901 运动能力的影响

Fig. 2 Effect of DHT on mobility of SGC7901 cells

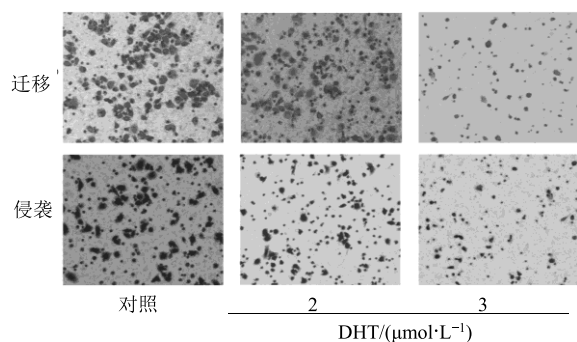
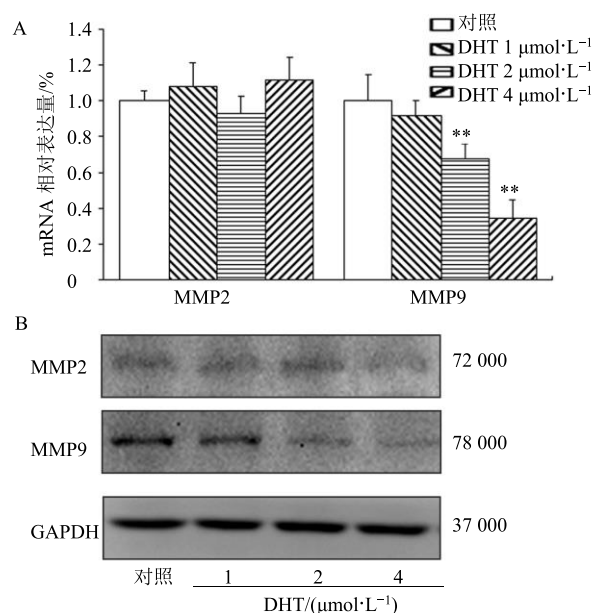


图 3 DHT 对 SGC7901 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig. 3 Effects of DHT on migration and invasion of SGC7901 cells

2.4 DHT 对 SGC7901 细胞中 MMP2 和 MMP9 表达的影响

Real-time PCR 和 Western blotting 检测 DHT 处理后 MMP2 和 MMP9 在 mRNA 和蛋白表达水平的变化。如图 4 所示, 2、4 $\mu\text{mol/L}$ DHT 处理细胞 24 h



与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

图 4 DHT 对 SGC7901 细胞 MMP2、MMP9 mRNA (A) 及蛋白 (B) 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of DHT on expression of MMP2 and MMP9 mRNA (A) and protein (B) in SGC7901 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

后对 MMP2 的 mRNA 表达水平无影响, 但是显著降低了 MMP9 基因 mRNA 的表达水平。Western blotting 结果显示, DHT 处理后, MMP9 的蛋白表达水平显著下调, 且呈现一定的剂量依赖性, 该结果提示 DHT 主要通过调控 MMP9 基因的表达抑制 SGC7901 细胞运动和迁移能力。此外, 高浓度 DHT 对 MMP2 的蛋白表达水平也有一定的抑制作用, 提

示 DHT 可在转录后水平调控胃癌 SGC7901 细胞中 MMP2 基因的表达。

2.5 DHT 对 SGC7901 细胞 Hedgehog 通路中 Gli1 和 HHIP 表达的影响

以往研究表明, Hedgehog 通路的活性与胃癌细胞的迁移和侵袭能力密切相关^[6], 本实验进一步检测了 DHT 对 Hedgehog 通路中 Gli1 和 HHIP 基因表达水平的影响。qRT-PCR 结果 (图 5) 表明, DHT 的加入抑制了 Gli1 在 mRNA 的表达水平, 同时显著提高了 Hedgehog 通路负反馈调节子 HHIP 的 mRNA 表达水平。与对照组相比, 2 $\mu\text{mol/L}$ 的 DHT 处理后, Gli1 的表达水平降低了 58%, HHIP 的表达水平提高了 2.2 倍。当 DHT 的浓度增加为 4 $\mu\text{mol/L}$ 时, Gli1 和 HHIP 的表达水平分别是对照组的 0.25 倍和 5.4 倍。Western blotting 结果进一步确认了 DHT 对 Gli1 蛋白表达的抑制功能, 且呈现显著的浓度依赖性。以上结果说明 DHT 可通过抑制 Hedgehog 通路的活性而发挥抗肿瘤作用。

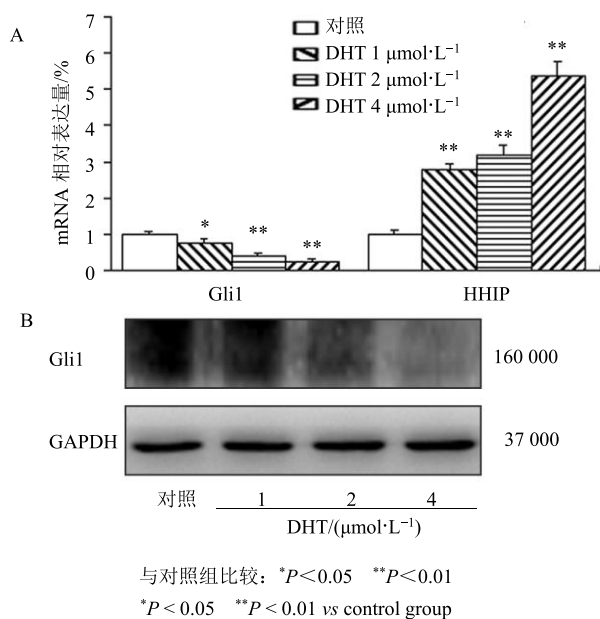


图 5 DHT 对 SGC7901 细胞中 Gli1 和 HHIP mRNA (A) 及蛋白 (B) 表达的影响

Fig. 5 Effects of DHT on expression of Gli1 and HHIP mRNA (A) and protein (B) in SGC7901 cells

3 讨论

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤, 全国胃癌平均死亡率高达万分之二, 其死亡率占恶性肿瘤的第一位。除了传统的手术和放化疗治疗措施外, 从传统的中药资源中寻找新的活性化合物, 防治胃癌的体内转移和恶化, 提高患者的化疗敏感性和生

存质量是当前的研究热点之一^[6]。DHT 是丹参中量最丰富的 4 种有效成分之一, 体外显示了一定的抗肿瘤效果。Wang 等^[7]发现 DHT 可通过激活活性氧 (ROS) 途径, 诱导结肠癌细胞的凋亡。Bian 等^[8]研究证明在人脐静脉内皮细胞中, DHT 可通过影响细胞的增殖、迁移和侵袭过程抑制血管的体内外形成。叶因涛等^[9]的研究结果表明, DHT 可抑制肝癌 H22 细胞的体内增殖, 且有一定的放射增敏效果。本实验结果表明, DHT 可有效抑制 SGC7901 细胞的增殖, 且呈明显的剂量和时间依赖性, 并通过降低 MMP9 的表达水平而抑制细胞的迁移和侵袭能力, 作用机制与 Hedgehog 信号通路的活性降低有关。

在胃癌的化疗过程中, 5-Fu 被广泛使用, 是多种胃癌联合化疗方案的基础^[10]。5-Fu 为抗代谢抗肿瘤药, 能抑制胸腺嘧啶核苷酸合成酶, 阻断脱氧胸腺核苷酸转换成胸腺嘧啶核苷核, 干扰 DNA 合成。但胃癌患者对 5-Fu 的耐药严重影响了其治疗的效果, 在本实验中采用 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 5-Fu 处理 SGC7901 细胞 48 h 后, MTT 检测结果表明, 5-Fu 的增殖的抑制率仅为 21.6%, 抗肿瘤效果不佳, 提示 SGC7901 细胞对 5-Fu 具有一定的耐受性。针对肿瘤的多药耐药现象, 从中药中寻找开发新的活性产物逆转其耐药, 提高化疗药物的敏感性是当前的研究热点之一。褚文希等^[11]研究发现, 徐长卿的提取物分离部位可显著逆转 SGC7901 细胞对 5-Fu 的耐药作用。课题组前期研究中也发现, 丹参酮类化合物隐丹参酮能有效逆转白血病细胞 K562-R 对伊马替尼的耐药现象, 两者联合可显著增加伊马替尼的抗白血病效果^[12]。本实验结果表明, DHT 可有效抑制胃癌细胞的增殖, 但其能否提高 5-Fu 的化疗效果, 逆转 SGC791 细胞对 5-Fu 的耐药现象仍需要深入研究。此外, 本实验中 DHT 处理 24 h 和 48 h 后, SGC7901 细胞的半数有效抑制浓度分别为 9.16 和 3.28 $\mu\text{mol/L}$, DHT 等药物由于溶解性低等原因, 在体内实验中将难以达到如此高的药物浓度, 其体内的抗肿瘤效果仍需要进一步的实验验证。针对 DHT 等丹参酮类药物的溶解性和生物利用度等问题, 可通过磺酸盐的化学结构修饰、配伍联合给药、脂微球和纳米粒包裹等相关的技术加以改进完善, 进一步提高 DHT 等药物的体内抗肿瘤效果。

侵袭和转移是恶性肿瘤的主要特征之一, 在肿瘤的病程发展过程中发挥了重要调控功能, 是导致肿瘤患者治疗失败的重要原因, 更是亟待阐明和解

决的重大基础和临床问题。控制肿瘤的侵袭和转移是当前抗肿瘤药物研发的一个重要方向,具有极大的临床应用前景^[13]。本研究利用多种细胞模型研究DHT对SGC7901细胞的侵袭能力的影响,结果表明2 $\mu\text{mol/L}$ 的药物即可有效地抑制细胞的侵袭,降低透过基质胶的细胞数目。此外,DHT还可抑制细胞的增殖和运动能力,说明其可通过多途径影响胃癌的侵袭和转移过程。

基质金属蛋白酶家族(MMPs)属于锌离子依赖的蛋白水解酶,它可以降解多种基质蛋白,破坏基质的降解平衡而促进肿瘤细胞突破基底膜(BM)和细胞外基质(ECM)构成的组织学屏障,从而侵袭周围的组织,在肿瘤的发生发展过程中发挥了重要的调控作用^[14]。其中MMP-2和MMP-9是MMPs家族中IV型胶原酶的2个亚型,激活后能将基底膜和ECM中的胶原蛋白降解,其表达水平可影响肿瘤的浸润、转移和血管生成过程,与胃癌的生长、侵袭和转移密切相关^[15]。大量研究表明,MMP2和MMP9在胃癌组织中的表达显著高于正常的胃黏膜组织^[16]。MMP2的表达水平与胃癌患者的生存率和预后不良等存在相关性,被认为是潜在的胃癌转移诊断标记物。阻断MMP2和MMP9在胃癌细胞中的过度表达,能够有效抑制肿瘤细胞对ECM和BM中IV型胶原蛋白的降解,从而阻滞肿瘤的发展、浸润和转移。Yang等^[17]发现苯乙基异硫氰酸酯可通过蛋白激酶C抑制MMP2和MMP9的表达,降低AGS细胞的迁移和侵袭能力。Lin等^[18]的研究表明小檗碱可通过激活胞内ROS,抑制胃癌SUN-5细胞中基质金属蛋白酶MMP1、MMP2和MMP9的表达。此外,丹参酮II_A、隐丹参酮等丹参中的活性化合物可通过抑制MMP2和MMP9的活性,抑制肿瘤细胞的侵袭黏附,从而在一定程度上阻碍肿瘤细胞侵袭和防止其向远处转移^[19-20]。本研究结果表明,DHT可有效的降低SGC7901中MMP9在表达,随着药物浓度的提高,其mRNA和蛋白的表达水平显著降低。高浓度的DHT可影响MMP2的蛋白水平的表达,而对其mRNA表达水平影响不大,说明高剂量DHT可在转录后水平调控SGC7901中MMP2基因的表达。本实验结果提示DHT可通过影响MMP9的活性,降低细胞对ECM和基底膜的降解能力,导致细胞的侵袭力降低,抑制了胃癌细胞的侵袭和转移。

在肿瘤细胞中,MMP2和MMP9的表达受多种

因子和多条信号传导通路的调节,其中Hedgehog(Hh)通路是重要的调控因子之一。研究发现,Hh通路可直接调节MMP2和MMP9的蛋白表达水平,提高肝癌细胞的侵袭和迁移能力^[21]。Fan等^[22]研究发现在鳞状细胞癌组织中,Hh通路Gli1基因和MMP9的表达水平与患者的淋巴结转移、复发和临床分期密切相关,且两者之间存在显著正相关,说明Hh通路可通过影响MMP9的表达,调控肿瘤的侵袭和转移过程。欧阳小波等^[23]研究发现,阻断胃癌细胞SGC7901中Hh信号通路能显著抑制细胞的侵袭和迁移能力,MMP2和MMP9的mRNA以及蛋白表达亦显著降低。本研究的结果表明,DHT可显著降低Gli1基因在mRNA和蛋白的表达水平,抑制SGC7901中Hh通路的活性,提示药物降低MMP9表达的分子机制可能是通过对Hh通路调控完成的。

HHIP作为1种新发现的Hedgehog通路结合蛋白,可竞争性抑制其他3种Hh蛋白与Ptc蛋白的结合,降低Hh通路下游的信号传导,发挥内源性抑制Hh信号通路活化作用,但该基因对肿瘤侵袭和迁移的作用仍有待深入研究。在胃癌等多种恶性肿瘤的组织中均发现HHIP处于低表达状态,且与其启动子区域CpG岛的超甲基化相关^[24]。在本研究中作者发现,DHT加入后显著提高了细胞中HHIP的表达水平,提示其可进一步抑制内源性Hh通路的活性,降低SGC7901细胞的迁移和迁移能力。本研究结果表明DHT可显著抑制SGC7901细胞的迁移与侵袭能力,从mRNA和蛋白水平下调基质金属蛋白酶MMP9的表达,并抑制Hh信号通路的活性。该研究证实了DHT对胃癌转移和侵袭的作用,对其作用机制进行了初步探讨,为胃癌的治疗提供了新的靶向分子,并为DHT的后续开发提供了一定的实验依据。

参考文献

- [1] 罗彩莲. 丹参的药理作用与临床应用 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(12): 11-12.
- [2] Yang L Q, Guo H J, Dong L H, *et al.* Tanshinone IIA inhibits the growth, attenuates the stemness and induces the apoptosis of human glioma stem cells [J]. *Oncol Rep*, 2014, 32(3): 1303-1311.
- [3] Ge Y Q, Cheng R B, Zhou Y H, *et al.* Cryptotanshinone induces cell cycle arrest and apoptosis of multidrug resistant human chronic myeloid leukemia cells by inhibiting the activity of eukaryotic initiation factor 4E

- [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 368(1/2): 17-25.
- [4] Lee W Y, Chiu L C, Yeung J H. Cytotoxicity of major tanshinones isolated from Danshen (*Salvia miltiorrhiza*) on HepG2 cells in relation to glutathione perturbation [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(1): 328-338.
- [5] 楼招欢, 杨波, 沈炜, 等. 丹参二萜醌部位高速逆流色谱制备工艺及体外抗肿瘤活性研究 [J]. 中草药, 2015, 46(5): 679-682.
- [6] Li X, Yang G, Li X, *et al.* Traditional Chinese medicine in cancer care: A review of controlled clinical studies published in chinese [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e60338.
- [7] Wang L, Yeung J H K, Hu T, *et al.* Dihydrotanshinone induces p53-independent but ROS-dependent apoptosis in colon cancer cells [J]. *Life Sci*, 2013, 93(8): 344-351.
- [8] Bian W P, Chen F, Bai L, *et al.* Dihydrotanshinone I inhibits angiogenesis both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Acta Biochim Biophys Sin*, 2008, 40(1): 1-6.
- [9] 叶因涛, 徐文清, 沈秀, 等. 二氢丹参酮 I 对 H22 肝癌荷瘤小鼠的放射增敏作用 [J]. 中国辐射卫生, 2009, 18(3): 284-285.
- [10] 卞俊杰, 田国防. 奥沙利铂与紫杉醇分别联合 5-Fu 在胃癌根治术后的应用效果比较 [J]. 中国临床新医学, 2017, 10(2): 130-133.
- [11] 褚文希, 刘小红, 刘坤, 等. 徐长卿逆转肿瘤多药耐药活性部位化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(18): 2674-2679.
- [12] Ge Y, Yang B, Xu X, *et al.* Cryptotanshinone acts synergistically with imatinib to induce apoptosis of human chronic myeloid leukemia cells [J]. *Leuk Lymphoma*, 2015, 56(3): 730-738.
- [13] 崔一鸣, 周斌, 李斐斐, 等. 益肺清化颗粒对人肺癌 PG 细胞增殖、迁移与侵袭能力的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014(11): 3592-3595.
- [14] Shuman Moss L A, Jensen-Taubman S, Stetler-Stevenson W G. Matrix metalloproteinases: Changing roles in tumor progression and metastasis [J]. *Am J Pathol*, 2012, 181(6): 1895-1899.
- [15] Zheng H, Takahashi H, Murai Y, *et al.* Expressions of MMP-2, MMP-9 and VEGF are closely linked to growth, invasion, metastasis and angiogenesis of gastric carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(5): 3579-3583.
- [16] Sampieri C L, de la Peña S, Ochoa-Lara M, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human gastric cancer and superficial gastritis [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16(12): 1500-1505.
- [17] Yang M D, Lai K C, Lai T Y, *et al.* Phenethyl isothiocyanate inhibits migration and invasion of human gastric cancer AGS cells through suppressing MAPK and NF-kappaB signal pathways [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(6): 2135-2143.
- [18] Lin J P, Yang J S, Wu C C, *et al.* Berberine induced down-regulation of matrix metalloproteinase-1, -2 and -9 in human gastric cancer cells (SNU-5) *in vitro* [J]. *In Vivo*, 2008, 22(2): 223-230.
- [19] Yu X X, Feng T, Ren L, *et al.* Tanshinone II-A inhibits invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Tumori*, 2009, 95(6): 789-795.
- [20] 叶欢, 阮君山, 王少明. 隐丹参酮抗肿瘤转移的研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2014, 30(7): 893-896.
- [21] Chen J S, Huang X H, Wang Q, *et al.* Sonic hedgehog signaling pathway induces cell migration and invasion through focal adhesion kinase/AKT signaling-mediated activation of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in liver cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 34(1): 10-19.
- [22] Fan H X, Wang S, Zhao H, *et al.* Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression [J]. *Med Oncol*, 2014, doi: 10.1007/s12032-014-0041-5.
- [23] 欧阳小波, 郝亚琴, 王立. Hedgehog 信号通路对人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭迁移作用及机制探讨 [J]. 重庆医科大学学报, 2011, 36(2): 159-162.
- [24] Taniguchi H, Yamamoto H, Akutsu N, *et al.* Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatic structure in human gastrointestinal cancer [J]. *J Pathol*, 2007, 213(2): 131-139.