

五龙消癥丸抑制人胃癌 BGC-823 细胞侵袭与迁移作用及机制研究

郭雪莹¹, 崔红霞^{1,2#}, 张雅丽¹, 袁星星¹, 曹 阳¹, 张树明¹, 王伟明^{1*}

1. 黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036

2. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006

摘要: **目的** 探究五龙消癥丸对胃癌 BGC-823 细胞侵袭与迁移能力的影响及其作用机制。**方法** 分别用五龙消癥丸、PI3K 激动剂胰岛素样生长因子 1 (IGF-1) 及 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 作用于 BGC-823 细胞, 采用 MTT 法检测不同质量浓度五龙消癥丸对 BGC-823 细胞增殖的影响; Transwell 小室模型研究五龙消癥丸对 BGC-823 细胞垂直侵袭和迁移能力的影响; 采用 ELISA 法检测五龙消癥丸对血管内皮生长因子 (VEGF)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 和 MMP-9 表达的影响; 采用 Western blotting 及 RT-PCR 法检测脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路中相关蛋白及 mRNA 的表达。**结果** 五龙消癥丸可显著抑制 BGC-823 细胞的增殖、黏附、侵袭和迁移能力, 显著抑制 BGC-823 细胞中 VEGF、MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达, 显著抑制 p-PI3K、p-Akt、磷酸化 IkB 激酶- α (p-IKK- α)、p-NF- κ B p65^{Ser 276} 蛋白及 PI3K、Akt、IKK α 、NF- κ B mRNA 的表达, 并且呈现一定的时效和量效关系。**结论** 五龙消癥丸通过抑制 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路相关蛋白及 mRNA 表达, 从而达到抑制 BGC-823 细胞的增殖、迁移、侵袭作用。

关键词: 五龙消癥丸; BGC-823 细胞; 侵袭; 迁移; PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)16-3788-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.16.010

Inhibition of Wulong Xiaozheng Pill on migration and invasion of gastric cancer BGC-823 cells and its mechanism

GUO Xue-ying¹, CUI Hong-xia^{1, 2}, ZHANG Ya-li¹, YUAN Xing-xing¹, CAO Yang¹, ZHANG Shu-ming¹, WANG Wei-ming¹

1. Heilongjiang Academy of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150036, China

2. Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Wulong Xiaozheng Pill (WXP) on the migration and invasion of human gastric cancer cell-line BGC-823 and its mechanism. **Methods** WXP, IGF-1, and LY294002 were added on BGC-823 cells. Then the inhibitory effect of WXP was detected by MTT assay. Transwell assay was performed to determine the migration and invasion capacity of on BGC-823 cells. Expressions of VEGF, MMP-2, and MMP-9 were detected by ELISA, while the expressions of related proteins and mRNA in PI3K/NF- κ B signaling pathway were detected by Western blotting and RT-PCR. **Results** WXP can inhibit the proliferation, adhesion, invasion, and migration of BGC-823 cells. In addition, WXP inhibited the expression of VEGF, MMP-2 and MMP-9 protein in BGC-823 cells. WXP significantly inhibited the expression of p-PI3K, p-Akt, p-IKK- α , and p-NF- κ B p65^{Ser 276} proteins, PI3K, Akt, IKK α , and NF- κ B mRNA, which showed a time-dependent and dose-dependent manner. **Conclusion** WXP inhibit the capacity, migration and invasion of BGC-823 cells by blocking PI3K/NF- κ B signaling pathway.

Key words: Wulong Xiaozheng Pill; BGC-823 cells; invasion; migration; PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway

胃癌是常见的消化道肿瘤之一, 据 2015 年世界癌症数据显示, 男性胃癌死亡率居癌症死亡率第 3 位, 女性胃癌死亡率居于第 5 位, 其中亚洲国家的

发病率明显高于欧美国家^[1]。细胞迁移是恶性肿瘤的基本生物学特征, 在胃癌的治疗过程中, 肿瘤细胞的转移是导致治疗失败、癌症复发和死亡的首要

收稿日期: 2018-01-15

基金项目: 国家中医药管理局中医药科学技术研究专项 (国中医药科 2016ZX05)

作者简介: 郭雪莹, 助理研究员, 主要从事中药研发。E-mail: guoxueying1987@163.com

*通信作者 王伟明, 研究员。Tel: (0451)55665478 E-mail: zyyjy@163.com

#并列第一作者 崔红霞, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为肿瘤分子生物学。E-mail: 236197163@qq.com

原因,因此改善肿瘤患者预后的关键在于防止恶性肿瘤转移^[2-3]。青龙衣是胡桃科(Juglandaceae)胡桃属 *Juglans* L. 植物胡桃 *Juglans regia* L. 和胡桃楸 *J. mandshurica* Maxim. 未成熟果实的干燥果皮,研究发现青龙衣具有良好的抗肿瘤活性,对于肝癌、胃癌、食管癌等消化道肿瘤及肺癌具有明显的治疗作用^[4]。五龙消癥丸(WXP)以青龙衣乙醇提取物为主要成分,具有抑瘤率高、镇痛效果好、提高免疫力、防肿瘤扩散的功效^[5-9]。本实验通过研究 WXP 对胃癌 BGC-823 细胞体外生物学特征及磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路相关蛋白及 mRNA 表达的影响,进一步阐释 WXP 抑制胃癌的作用机制。

1 材料

1.1 细胞

BGC-823 细胞购于北京协和细胞库。

1.2 药品与试剂

WXP 由黑龙江省中医药科学院制剂室提供(批号 20160511); Transwell 小室购于美国 Corning 公司; RPMI 1640 培养基、胎牛血清(FBS)、MTT 试剂盒、DMSO 购于美国 Sigma 公司; Marigel 胶购于美国 Becton Dickinson 公司; PI3K 特异性抑制剂 LY294002 购自上海碧云天公司; PI3K 激动剂胰岛素样生长因子 1(IGF-1)购自以色列 Prospec 公司; 一抗 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、磷酸化 IkB 激酶- α (p-IKK- α)、NF- κ B p65、p-NF- κ B p65^{Ser276} 和 GAPDH 购自美国 CST 公司; 二抗购自美国 Santa Cruz 公司。血管内皮生长因子(VEGF)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9 ELISA 定量试剂盒购自美国 Lifekey 生物医学技术公司。PI3K、Akt、IKK- α 、NF- κ B、GAPDH 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司设计并合成。

1.3 仪器

Infinite M200PRO 酶标仪(瑞士 Tecan 公司); 蛋白电泳槽、VersaDoc 凝胶成像仪(美国 Bio-rad 公司); 荧光倒置显微镜(德国 Leica 公司); 311 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司); RT-PCR 仪(德国 Roch 公司)。

2 方法

2.1 WXP 溶液的配制

取 0.2 g WXP, 用 5 mL 75%乙醇分多次溶解,直至完全溶解,作为母液,置于离心管中,封口膜封口,4℃冰箱中保存。使用前置于室温或超声使

析出的有效物质重新溶解后再用完全培养基稀释。取 68.25 μ L 母液加入 2 931.75 μ L 完全培养基,配制成 3 mL 质量浓度为 0.91 mg/mL 的 WXP 溶液; 取 1 800 μ L 质量浓度为 0.91 mg/mL 的 WXP 溶液加入 200 μ L 完全培养基,配制成 2 mL 质量浓度为 0.82 mg/mL 的 WXP 溶液; 取 900 μ L 质量浓度为 0.82 mg/mL 的 WXP 溶液加入 100 μ L 完全培养基,配制成 1 mL 质量浓度为 0.74 mg/mL 的 WXP 溶液。

2.2 细胞培养及分组

BGC-823 细胞培养于含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基中,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱内培养,48 h 传代 1 次,以维持细胞处于对数生长期。实验分 8 组,即对照组,IGF-1 组(0.10 μ mol/L),WXP 低、中、高质量浓度(0.74、0.82、0.91 mg/mL)组,LY294002 组(0.02 mmol/L),WXP+IGF-1 组(0.91 mg/mL+0.10 μ mol/L),WXP+LY294002 组(0.91 mg/mL+0.02 mmol/L)。

2.3 WXP 对 BGC-823 细胞增殖能力的影响

取对数生长期的 BGC-823 细胞稀释成 6×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种于 96 孔板,每孔接种 6 000 个细胞,每组设 6 个平行孔。待细胞贴壁后,按照分组情况加入相应药物处理,分别于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24、48、72 h 后,用 MTT 比色法测定吸光度(A)值,计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.4 WXP 对 BGC-823 细胞黏附能力的影响

将 4℃过夜融化的 Matrigel 胶在无菌条件下稀释,包被 96 孔板,2% BSA(100 μ L/孔)封板后,洗板 3 次,每组 6 个复孔,每孔接种相应药物处理 24 h 的细胞 1×10^5 个,培养箱中黏附 60 min,小心用 PBS 洗去未黏附细胞,换为无血清培养基 100 μ L,同时加入 10 μ L 0.5% MTT 继续作用 4 h,吸弃培养液,加入 DMSO 150 μ L,震荡溶解 10 s,用酶标仪测定 570 nm 处 A 值。

$$\text{细胞黏附抑制率} = 1 - A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

2.5 WXP 对 BGC-823 细胞侵袭能力的影响

Matrigel 胶 4℃过夜融化,备用。用镊子将 Transwell 放在 24 孔板内,Matrigel 胶(5 mg/mL)用无血清培养基以 1:9 稀释,在 Transwell 嵌套上层均匀铺 50 μ L 稀释的 Matrigel 胶,37℃放置过夜;此间经常观察,当出现“白色层”时,说明已经变为固态。消化细胞,无血清培养基洗 3 次,台盼蓝染色计数活细胞数在 95%以上,用含 1% FBS 的无

血清培养基配成 1.5×10^6 个/mL 细胞悬液, 上室每孔加入 100 μ L 无血清培养基, 洗 1 次; 下室中加入 600 μ L 含有 10% FBS 完全培养基; 在上室每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 加入不同质量浓度药物, 小心将细胞放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中, 孵育 24 h; 取出 Transwell 吸出上室液体, 甲醇室温固定 40 min, 移去 Transwells, 用棉签擦去上室表面多余细胞, 倒置, 风干; 加入 0.1% 的结晶紫染色 30 min, 自来水缓慢冲洗 (避免直接冲洗下室表面), 充分冲洗后倒置晾干, 显微镜下观察。以每个 200 倍显微镜下计数膜上下左右中 10 个随机不同视野的穿膜细胞数取平均值, 计算标准差。实验重复 3 次。

2.6 WXP 对 BGC-823 细胞迁移能力的影响

实验方法同“2.5”项下, 只是不用 Matrigel 胶包备 Transwell 小室。计数穿膜细胞数。实验重复 3 次。

2.7 WXP 对 BGC-823 细胞中迁移及侵袭相关蛋白分泌的影响

取对数生长期的 BGC-823 细胞, 按 1×10^8 个/L 接种于 24 孔板中, 每孔 500 μ L, 24 h 细胞贴壁后分别加入相应药物, 每组设 3 个复孔。于 48 h 后收集上层培养基, 离心后上清转入离心管中备用。按照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作, 根据标准品的测定值绘制标准曲线, 计算各组细胞上清液中 VEGF、MMP-2、MMP-9 的量。

2.8 WXP 对 BGC-823 细胞中 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响

取对数生长期的 BGC-823 细胞, 按 1×10^9 个/L 接种于 6 孔板中, 每孔 2.5 mL, 24 h 细胞贴壁后分别加入相应药物, 每组设 3 个复孔。加药后 48 h 收集细胞提取总蛋白。细胞用裂解液 50 μ L 冰上充分裂解 30 min。12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min, 收集上清液, 采用 BSA 法测定蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转膜后, PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭, 4 $^{\circ}$ C 过夜。加入一抗 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、p-IKK- α 、NF- κ B p65、p-NF- κ Bp65^{Ser276}、GAPDH (1:1 000), 室温孵育 2 h。TBST 洗膜 3 次。加入相应的二抗 (1:5 000), 室温孵育 1.5 h, 1 $\times$ TBST 洗膜 3 次。用 ECL 化学发光试剂盒显色检测, 以 GAPDH 为内参, 计算目的条带相对表达量。

2.9 WXP 对 BGC-823 细胞中 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路相关基因表达的影响

细胞处理同“2.8”项下, 采用 Trizol 法提取各

组细胞总 RNA, 取 5 μ L 总 RNA 进行反转录反映合成 cDNA。扩增条件: 94 $^{\circ}$ C、45 s; 54 $^{\circ}$ C、45 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s; PI3K 及 Akt 各 25 个循环, NF- κ B 及 GAPDH 共 40 个循环。IKK- α , 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C、10 min, 94 $^{\circ}$ C、15 s, 60 $^{\circ}$ C、45 s, 共 45 个循环。NF- κ B 复性的温度和时间 52 $^{\circ}$ C、50 s, 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 用 BandScan 4.0 软件进行灰度扫描, 计算目的条带与 GAPDH 的比值。PCR 反应所用引物序列为: PI3K: 上游 5'-GCACCTGAATAGGCAAGTC-3', 下游 5'-TCGCACCACCTCAATAAGT-3'; Akt: 上游 5'-GTGCTGGAGGACAATGACTACGG, 下游 5'-AGCAGCCCTGAAAGCAAGGA-3'; NF- κ B: 上游 5'-TCAATGGCTACACAGGACCA-3', 下游 5'-ATC-TTGAGCTCGGCAGTGTT-3'; IKK- α : 上游 5'-TGCC-TTGGCCATTAAAGCACTA-3', 下游 5'-GGGACAGT-GAACAAGTGACAACCTC-3'; GAPDH: 上游 5'-TG-CACCACCAACTGCTTAGC-3', 下游 5'-TCTTCTG-GGTGGCAGTGATG-3'。

2.10 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析, 各组计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析法 (one-way ANOVA), 组间两两比较采用 q 检验 (LSD 法)。

3 结果

3.1 WXP 对 BGC-823 细胞增殖能力的影响

MTT 实验结果显示 (表 1), 与对照组比较, IGF-1 干预后 BGC-823 细胞增殖显著增加 ($P < 0.01$)。WXP 及 LY294002 能显著抑制 BGC-823 细胞的增殖 ($P < 0.05$ 、0.01), 且抑制作用随着 WXP 的质量浓度、药物作用时间而增强, 呈现明显的量效和时效关系。与 IGF-1 组比较, WXP 高质量浓度与 IGF-1 共同作用下, IGF-1 对细胞的增殖促进作用被拮抗; WXP 高质量浓度与 LY294002 共同作用下, 抑制细胞增殖的作用进一步增强, 体现协同作用。

3.2 WXP 对 BGC-823 细胞黏附能力的影响

MTT 结果显示, 与对照组比较, IGF-1 干预后 BGC-823 细胞黏附率显著增加, 而随着 WXP 质量浓度增加, BGC-823 细胞黏附能力较对照组显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 呈现一定的剂量依赖性 (表 2)。

3.3 WXP 对 BGC-823 细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验结果显示, 与对照组比较, IGF-1 干预后 BGC-823 细胞侵袭能力显著增加, 而

WXP 各质量浓度及 LY294002 对 BGC-823 细胞侵袭均具有显著抑制作用 ($P < 0.01$), WXP + LY294002 组的抑制作用最强, 见表 3、图 1。

3.4 WXP 对 BGC-823 细胞迁移能力的影响

Transwell 小室迁移实验结果表明, 与对照组比较, IGF-1 干预后 BGC-823 细胞迁移能力显著增加,

表 1 WXP 对 BGC-823 细胞增殖能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effects of WXP on proliferation of BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度或浓度	存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	100.00	100.00	100.00
IGF-1	0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	137.28 $\pm$ 6.19**	155.50 $\pm$ 4.73**	172.32 $\pm$ 5.54**
WXP	0.74 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	91.28 $\pm$ 4.97*	86.30 $\pm$ 4.91**	73.77 $\pm$ 4.88**
	0.82 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	87.98 $\pm$ 6.21*	81.13 $\pm$ 3.53**	71.26 $\pm$ 3.86**
	0.91 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	79.50 $\pm$ 5.07**	74.06 $\pm$ 3.48**	62.75 $\pm$ 6.23**
LY294002	0.02 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	80.17 $\pm$ 7.86**	74.96 $\pm$ 4.80**	59.58 $\pm$ 9.13**
WXP+IGF-1	0.91 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	113.70 $\pm$ 4.86***	120.47 $\pm$ 4.71***	146.65 $\pm$ 6.69***
WXP+LY294002	0.91 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 0.02 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	62.59 $\pm$ 0.83*** Δ	53.02 $\pm$ 3.50*** Δ	40.39 $\pm$ 2.23*** Δ

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 IGF-1 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与 LY294002 组比较: $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$, 下同

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs IGF-1 group; $\Delta P < 0.05$ $\Delta\Delta P < 0.01$ vs LY294002 group, same as below

表 2 WXP 对 BGC-823 细胞黏附能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effects of WXP on adhesion of BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度或浓度	细胞黏附率/%
对照	—	100
IGF-1	0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	118.90 $\pm$ 3.33*
WXP	0.74 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	74.99 $\pm$ 4.78*
	0.82 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	70.99 $\pm$ 7.59*
	0.91 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	62.06 $\pm$ 3.09**
LY294002	0.02 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	51.64 $\pm$ 4.39**
WXP+IGF-1	0.91 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	83.01 $\pm$ 4.01***
WXP+LY294002	0.91 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 0.02 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	20.12 $\pm$ 1.04*** $\Delta\Delta$

表 3 WXP 对 BGC-823 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effects of WXP on migration of BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	质量浓度或浓度	穿膜细胞数
对照	—	234.60 $\pm$ 16.01
IGF-1	0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	391.20 $\pm$ 24.57**
WXP	0.74 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	184.60 $\pm$ 4.83**
	0.82 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	113.60 $\pm$ 6.47**
	0.91 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	90.20 $\pm$ 6.02**
LY294002	0.02 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	68.60 $\pm$ 5.37**
WXP+IGF-1	0.91 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 0.10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	196.40 $\pm$ 9.56***
WXP+LY294002	0.91 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ + 0.02 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	35.20 $\pm$ 4.44*** $\Delta\Delta$

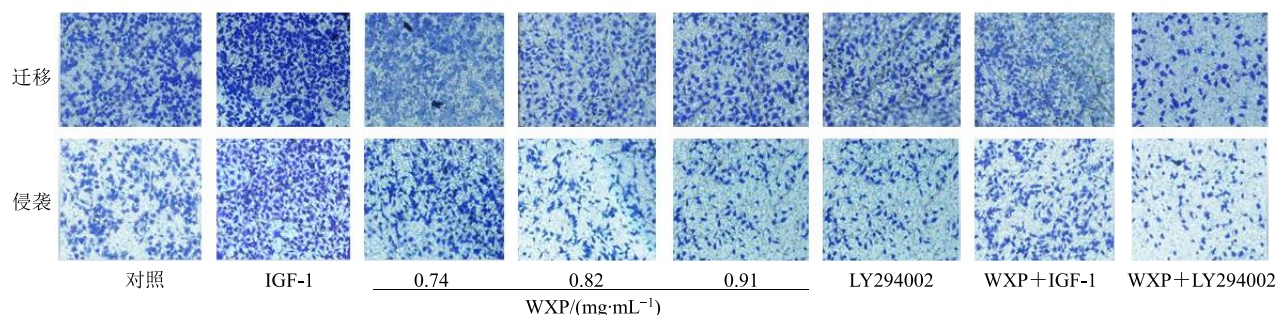


图 1 WXP 对 BGC-823 细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig. 1 Effects of WXP on migration and invasion of BGC-823 cells

而 WXP 各质量浓度及 LY294002 对 BGC-823 细胞侵袭均具有显著抑制作用 ($P < 0.01$), 且随着 WXP 质量浓度的增加, 细胞迁移能力呈递减趋势。WXP+LY294002 组的抑制作用最强(图 1 和表 4)。

表 4 WXP 对胃癌 BGC-823 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Effects of WXP on invasion of BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	质量浓度或浓度	细胞数
对照	—	408.80±23.45
IGF-1	0.10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	537.20±23.89**
WXP	0.74 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	366.20±17.36**
	0.82 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	312.60±13.69**
	0.91 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	233.80±20.54**
LY294002	0.02 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	215.80±13.83**
WXP+IGF-1	0.91 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 0.10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	400.20±28.32##
WXP+LY294002	0.91 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 0.02 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	125.80± 9.22**△△

3.5 WXP 对 BGC-823 细胞 VEGF、MMP-2、MMP-9 分泌的影响

药物作用 48 h 后, 与对照组比较, IGF-1 组 BGC-823 细胞上清液中 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平均显著升高, 而 WXP 各质量浓度组细胞 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), WLX+LY294002 干预后, VEGF、MMP-2、MMP-9 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01), 体现明显的协同作用(表 5)。

3.6 WXP 对 BGC-823 细胞 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路中相关蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示(表 6 和图 2), 与对

照组比较, IGF-1 干预后 BGC-823 细胞 p-PI3K、p-Akt、p-IKK α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01), 而 PI3K、Akt 蛋白表达水平基本不变; WXP 各质量浓度组及 LY294002、WXP+LY294002 组能够显著抑制 p-PI3K、p-Akt、p-IKK α 蛋白的表达, 其中以 WXP+LY294002 组的抑制作用最强 ($P < 0.05$ 、0.01)。

与对照组比较, IGF-1 干预后 BGC-823 细胞 p-NF- κ B p65^{Ser276} 蛋白的表达显著增加 ($P < 0.05$), 而 NF- κ B 的总蛋白表达基本不变; WXP 中、高质量浓度组及 LY294002、WXP+LY294002 组能够显著抑制 p-NF- κ B p65^{Ser276} 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 其中以 WXP+LY294002 组的抑制作用最强, 体现明显的协同作用(图 3 和表 7)。

3.7 WXP 对 BGC-823 细胞中 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路中相关 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, 与对照组比较, IGF-1 干预后 BGC-823 细胞中 PI3K、Akt、IKK- α 、NF- κ B mRNA 表达显著增加 ($P < 0.05$ 、0.01), WXP 中、高质量浓度、LY294002 及 WXP+LY294002 能够显著抑制细胞中 PI3K、Akt、IKK- α 、NF- κ B mRNA 的表达 ($P < 0.05$ 、0.01), 其中 WXP+LY294002 组抑制作用最强, 体现明显的协同作用(图 4 和表 8)。

4 讨论

胃癌是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一, 且死亡率一直居高不下。手术及放化疗是目前胃癌的主要治疗手段, 但对患者创伤较大, 并且有严重的副作用, 严重影响患者的生存质量, 同时胃癌的转移与复发也大大制约着胃癌中晚期手术治疗患者生

表 5 WXP 对 BGC-823 细胞上清液 VEGF、MMP-2、MMP-9 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

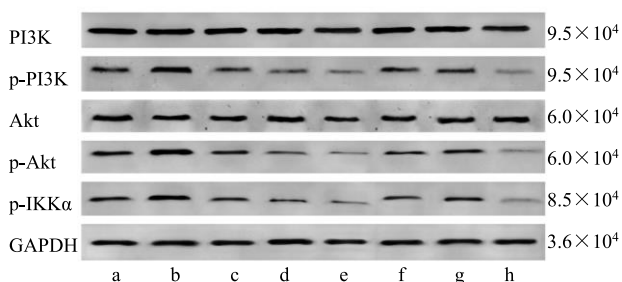
Table 5 Effects of WXP on expression of VEGF, MMP-2, and MMP-9 proteins in BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	质量浓度或浓度	VEGF/(ng·mL ⁻¹)	MMP-2/(ng·mL ⁻¹)	MMP-9/(ng·mL ⁻¹)
对照	—	1.29±0.16	4.22±0.23	4.98±0.30
IGF-1	0.10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.52±0.19**	6.83±0.56*	7.04±0.15*
WXP	0.74 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.99±0.08	3.81±0.24*	4.27±0.27
	0.82 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.82±0.28*	3.09±0.24**	3.45±0.44
	0.91 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	0.71±0.03*	2.33±0.09*	2.15±0.18**
LY294002	0.02 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.96±0.08*	2.83±0.13**	3.07±0.24*
WXP+IGF-1	0.91 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 0.10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.17±0.11	4.06±0.24*#	5.13±0.33#
WXP+LY294002	0.91 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ + 0.02 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.43±0.03*△	1.07±0.17**△△	0.97±0.28**△△

表 6 WXP 对 BGC-823 细胞 PI3K/Akt/NF-κB 信号通路中相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effects of WXP on expression of PI3K/Akt/NF-κB signal pathway associated protein in BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度或浓度	蛋白相对表达量				
		PI3K	p-PI3K	Akt	p-Akt	p-IKK-α
对照	—	1.92 ± 0.05	1.58 ± 0.2	1.84 ± 0.15	1.79 ± 0.12	1.34 ± 0.14
IGF-1	0.10 μmol·L ⁻¹	1.88 ± 0.09	2.47 ± 0.34*	1.82 ± 0.07	2.81 ± 0.15*	2.99 ± 0.14**
WXP	0.74 mg·mL ⁻¹	1.91 ± 0.08	1.04 ± 0.20	1.87 ± 0.07	1.25 ± 0.12*	0.72 ± 0.09**
	0.82 mg·mL ⁻¹	1.93 ± 0.06	0.74 ± 0.15*	1.83 ± 0.13	0.88 ± 0.11**	0.46 ± 0.11**
	0.91 mg·mL ⁻¹	1.90 ± 0.02	0.47 ± 0.04*	1.82 ± 0.03	0.42 ± 0.10**	0.23 ± 0.05**
LY294002	0.02 mmol·L ⁻¹	1.93 ± 0.04	0.71 ± 0.17**	1.89 ± 0.14	0.92 ± 0.17*	0.62 ± 0.06**
WXP+IGF-1	0.91 mg·mL ⁻¹ + 0.10 μmol·L ⁻¹	1.92 ± 0.02	1.23 ± 0.11 [#]	1.85 ± 0.09	1.54 ± 0.07 ^{##}	1.11 ± 0.17 ^{##}
WXP+LY294002	0.91 mg·mL ⁻¹ + 0.02 mmol·L ⁻¹	1.89 ± 0.05	0.11 ± 0.07* [△]	1.79 ± 0.05	0.21 ± 0.03** [△]	0.09 ± 0.01** ^{△△}



a-对照 b-IGF-1 c-WXP 0.74 mg·mL⁻¹ d-WXP 0.82 mg·mL⁻¹
e-WXP 0.91 mg·mL⁻¹ f-LY294002 g-WXP+IGF-1 h-WXP+LY294002, 下同
a-control b-IGF-1 c-WXP 0.74 mg·mL⁻¹ d-WXP 0.82 mg·mL⁻¹
e-WXP 0.91 mg·mL⁻¹ f-LY294002 g-WXP+IGF-1 h-WXP+LY294002, same as below

图 2 WXP 对 BGC-823 细胞 PI3K/Akt/NF-κB 信号通路中相关蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of WXP on expression of PI3K/Akt/NF-κB signal pathway associated protein in BGC-823 cells

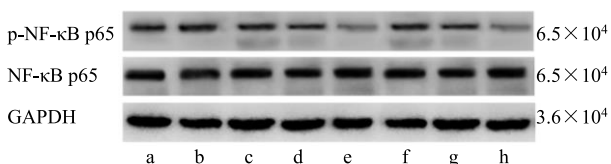


图 3 WXP 对 BGC-823 细胞中 NF-κB p65 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of WXP on expression of NF-κB p65 protein in BGC-823 cells

存率的提高。肿瘤细胞的侵袭与转移是一个动态的、复杂的、多步骤的过程，作为恶性肿瘤的重要生物学特征之一，也是肿瘤患者死亡的主要原因^[10-12]。故寻找及研发毒副作用较小，疗效好的抑制肿瘤转移药物尤为重要。

WXP 是黑龙江省中医药科学院自主研发的具有抗肿瘤活性的医院制剂，其主要成分为青龙衣及

表 7 WXP 对 NF-κB p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effects of WXP on expression of NF-κB p65 protein in BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度或浓度	蛋白相对表达量	
		p-NF-κB p65	NF-κB p65
对照	—	0.88 ± 0.05	1.08 ± 0.08
IGF-1	0.10 μmol·L ⁻¹	2.47 ± 0.29*	0.98 ± 0.08
WXP	0.74 mg·mL ⁻¹	0.67 ± 0.07	0.94 ± 0.03
	0.82 mg·mL ⁻¹	0.35 ± 0.04**	1.06 ± 0.06
	0.91 mg·mL ⁻¹	0.17 ± 0.01**	0.97 ± 0.04
LY294002	0.02 mmol·L ⁻¹	0.42 ± 0.04**	1.01 ± 0.10
WXP+IGF-1	0.91 mg·mL ⁻¹ + 0.10 μmol·L ⁻¹	1.35 ± 0.08** [#]	0.97 ± 0.06
WXP+LY294002	0.91 mg·mL ⁻¹ + 0.02 mmol·L ⁻¹	0.09 ± 0.01** ^{△△}	0.93 ± 0.07

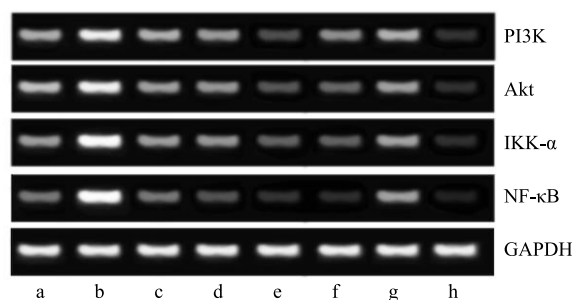


图 4 WXP 对 BGC-823 细胞 PI3K/Akt/NF-κB 信号通路中相关 mRNA 表达的影响

Fig. 4 Effects of WXP on expression of PI3K/Akt/NF-κB signal pathway associated mRNA in BGC-823 cells

刺五加乙醇提取物。多年来民间一直用青龙衣治疗癌症，经现代药理研究表明其对多种肿瘤细胞均有较好的抑制作用并能够诱导其凋亡^[6,13-14]。任生等^[15]

表 8 WXP 对 PI3K/AKT/NF-κB 信号通路中相关 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 8 Effects of WXP on expression of PI3K/Akt/NF-κB signal pathway associated protein mRNA in BGC-823 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度或浓度	mRNA 相对表达量			
		PI3K	Akt	IKK-α	NF-κB
对照	—	0.99±0.12	1.11±0.12	0.84±0.17	0.76±0.09
IGF-1	0.10 μmol·L ⁻¹	2.29±0.11**	2.94±0.28*	2.61±0.11**	2.20±0.27**
WXP	0.74 mg·mL ⁻¹	0.84±0.06	0.86±0.12	0.65±0.07	0.68±0.11
	0.82 mg·mL ⁻¹	0.52±0.04**	0.63±0.04*	0.48±0.06	0.47±0.07**
	0.91 mg·mL ⁻¹	0.22±0.02**	0.34±0.06*	0.28±0.05*	0.27±0.05**
LY294002	0.02 mmol·L ⁻¹	0.24±0.03**	0.31±0.03*	0.32±0.03*	0.20±0.03**
WXP+IGF-1	0.91 mg·mL ⁻¹ +0.10 μmol·L ⁻¹	1.62±0.18*#	2.09±0.23**#	1.74±0.15***#	1.76±0.16*#
WXP+LY294002	0.91 mg·mL ⁻¹ +0.02 mmol·L ⁻¹	0.11±0.02**△△	0.13±0.03**△△	0.21±0.04*△	0.09±0.01**△

研究发现青龙衣注射剂药效持续时间长, 对患者免疫系统有明显的保护作用, 这对抑制肿瘤复发和转移有重要意义。青龙衣糖膏可减少胃癌患者发作次数, 能够使疼痛及其他症状得到缓解或消失^[16]。唐惠兰等^[17]通过体外实验发现青龙衣粉针剂对人胃癌 SGC-7901 细胞有明显的抑制作用。本研究结果表明, WXP 可有效抑制 BGC-823 细胞的增殖, 且呈明显的剂量和时间依赖性, 但目前还未见青龙衣及其制剂抗肿瘤转移和侵袭作用的报道, 因此, 本研究在 WXP 对 BGC-823 细胞生长抑制作用基础上研究其抗侵袭、迁移的作用并探索其可能的作用机制。

侵袭和迁移是恶性肿瘤扩散、无限增生及转移的关键因素, 因此, 抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移对胃癌的治疗及预后具有重要意义^[18-19]。本研究采用经典的 Transwell 小室法研究 WXP 对胃癌细胞侵袭和迁移的影响。实验结果表明, 与对照组比较, IGF-1 干预后 BGC-823 细胞穿膜数量显著增多, 而 WXP 各剂量处理组及 LY2294002 组穿膜细胞数显著减少, 提示 WXP 能够抑制 BGC-823 细胞的侵袭、迁移能力, 其中以 WXP 0.91 mg/mL+LY294002 组的抑制作用最强, 表明 WXP 与 LY294002 具有一定的协同作用。此外, 与 IGF-1 组比较, WXP+IGF-1 组穿膜细胞数进一步减少, 说明 WXP 能够通过拮抗 IGF-1 达到抑制肿瘤细胞侵袭及迁移的作用。

在肿瘤转移的过程中, 肿瘤细胞与细胞外基质的黏附是肿瘤细胞侵袭转移的前提, 进而侵袭周围组织和侵入及穿出血管、淋巴管, 完成肿瘤转移的关键步骤。在此过程中, MMP-2 和 MMP-9 可有效分解基底膜的主要成分 IV 型胶原蛋白^[20], 使肿瘤

细胞顺利穿出血管、淋巴管, 定植到原发瘤以外的地方, 在 VEGF 的作用下, 形成血管, 汲取营养, 供肿瘤细胞生长。因此抑制 MMPs 和 VEGF 的表达能够抑制肿瘤的侵袭和转移。本研究中, 采用双抗体夹心 ELISA 法检测, 结果表明 WXP 作用 48 h 后, 可显著降低 BGC-823 细胞中 VEGF、MMP-2、MMP-9 的表达水平, 随着药物质量浓度的提高, 各蛋白表达水平显著降低; WXP 与 LY294002 共同作用下, 可进一步降低细胞中 VEGF、MMP-2、MMP-9 的分泌水平, 与侵袭迁移实验结果趋势一致, 提示 WXP 可通过影响 VEGF、MMP-2、MMP-9 的表达, 降低细胞对细胞外基质 (ECM) 和基底膜的降解能力, 导致细胞的侵袭能力降低, 抑制率胃癌细胞的侵袭和转移。

在肿瘤细胞中, MMP2/9 的表达受多种因子和多条信号传导通路的调节, NF-κB p65 是 MMPs 及 VEGF 的上游调节因子, 也是 PI3K/Akt 信号通路的下游分子。PI3K/Akt 信号通路是参与调控多种肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和转移的关键信号通路之一, 与肿瘤的发生、发展、预后密切相关^[21-22]。PI3K 是这一通路重要的信号蛋白, 它是一种具有催化活性的胞内磷脂酰肌醇激酶。Akt 是其下游最为关键的靶向调节分子, PI3K 的磷酸化产物一旦被激活, 就可以导致 Akt 发生质-膜的转移, 从而促使 Akt 得以激活, 活化后的 Akt 通过磷酸化作用在胞浆内传递生物学信号^[23]。NF-κB 信号通路在许多肿瘤 (淋巴瘤、白血病、乳腺癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌以及卵巢癌等) 中被激活, 与肿瘤复发、恶性增长、侵袭、转移和对抗化疗以及患者生存率低有

关^[24-26]。游离 NF- κ B 进入细胞核,促进靶基因转录。因此 IKK 激活(磷酸化)和 I κ B 磷酸化是 NF- κ B 活化的标志和重要过程^[27],这在决定肿瘤致命性的转移和侵袭方面也具有重要作用,通常静止细胞中 NF- κ B 和其抑制因子 I κ B 以无活性的形式存在于胞浆中, I κ B 与 NF- κ B 结合后遮盖了其核定位信号,使 NF- κ B 无法进入核内,从而抑制其转录活性。当细胞受活化刺激后, IKK- α 激活,使 I κ B 末端的丝氨酸残基发生磷酸化和泛素化, NF- κ B/I κ B 复合物解离,进而调节与肿瘤转移有关的 PI3K-Akt、MMPs (MMP-9) 等基因的表达^[28]。本研究采用 Western blotting 及 RT-PCR 技术检测了不同质量浓度 WXP 对 BGC-823 细胞 PI3K/Akt/NF- κ B 通路上关键蛋白表达的影响。研究结果显示,与对照组比较, IGF-1 干预后 BGC-823 细胞中 p-PI3K、p-Akt、p-IKK- α 、p-NF- κ B p65^{Ser276} 蛋白和 PI3K、Akt、IKK- α 、NF- κ B mRNA 的表达显著增加,而 WXP 各剂量处理组及 LY2294002 组能够显著抑制 BGC-823 细胞中 p-PI3K、p-Akt、p-IKK- α 、p-NF- κ B p65^{Ser276} 蛋白和 PI3K、Akt、IKK- α 、NF- κ B mRNA 的表达,其中以 WXP+LY294002 组的抑制作用最强。并且 WXP 能够拮抗 IGF-1 对 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通过及其下游相关因子的促进作用。

本研究发现, WXP 通过抑制 PI3K/Akt/NF- κ B 信号通路的活化,从而下调 MMP-2、MMP-9 及 VEGF 的表达,达到抑制 BGC-823 细胞侵袭和迁移的作用。

参考文献

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, *et al.* Global cancer statistics, 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.
- [2] Steeg P S. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges [J]. *Nat Med*, 2006, 12(8): 895-904.
- [3] Ruiz P, Gunthert U. The cellular basis of metastasis [J]. *World J Urol*, 1996, 14(3): 141-150.
- [4] 杜艳萍. 青龙衣抗癌作用研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2012, 40(4): 2024-2025.
- [5] 段玉敏, 张洪娟, 张志华, 等. 青龙衣胶囊在荷瘤小鼠体内抗肿瘤活性的研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(9): 125-127.
- [6] 许庆瑞, 张树明, 张俊威, 等. 复方青龙衣胶囊对胃癌细胞 SGC-7901 基因芯片表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(8): 180-183.
- [7] 张 强, 段玉敏, 王伟明, 等. 复方青龙衣胶囊对人胃癌 SGC-7901 细胞凋亡的形态学影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(16): 181-183.
- [8] 郭雪莹, 葛岳鑫, 王伟明. 青龙衣胶囊对环磷酰胺所致小鼠免疫功能低下实验研究 [J]. 黑龙江中医药, 2014(4): 56-57.
- [9] 段玉敏, 张志华, 王伟明. 青龙衣胶囊抗肿瘤活性研究 [J]. 科技致富向导, 2013(24): 20-21.
- [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] Gao X L, Lin H, Zhao W, *et al.* JA, a new type of polyunsaturated fatty acid isolated from *Juglans mandshurica* Maxim, limits the survival and induces apoptosis of hepatocarcinoma cells [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(3): 340-350.
- [14] Li Z, Wang J, Yang J, *et al.* Apoptosis of BGC823 cell line induced by p-hydroxymethoxybenzobijuglone, a novel compound from *Juglans mandshurica* [J]. *Phytother Res*, 2009, 23(4): 551-557.
- [15] 任 生, 孟 丽, 王桂花, 等. 中药青龙衣注射剂复合化疗药物介入治疗肺癌 3 例报告 [J]. 中国中医基础医学志, 2000, 6(7): 447-449.
- [16] 孙桂君, 苑淑莉. 青龙衣糖膏治疗浅表性胃炎疗效观察 [J]. 中医学, 2002, 30(3): 16.
- [17] 唐蕙兰, 杨志宏, 王伟明, 等. 青龙衣粉针剂对人胃癌 SGC-7901 细胞株的作用 [J]. 中国药理通讯, 2003, 20(1): 61.
- [18] Zhang W, Ha M W, Gong Y H, *et al.* Allicin induces apoptosis in gastric cancer cells through activation of both extrinsic and intrinsic pathways [J]. *Oncol Rep*, 2010, 24(6): 1585-1592.
- [19] Brown G T, Murray G I. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis [J]. *J Pathol*, 2015, 237(3): 273-281.
- [20] Blaser M J, Atherton J C. Helicobacter pylori ipersistence: Biology and disease [J]. *J Clin Invest*, 2004, 113(3): 321-333.
- [21] Rah Mani M, Aust M M, Attkisson E, *et al.* Dualinhibition of Bcl-2 and Bcl-xL strikingly enhances PI3K inhibition-induced apoptosis in human myeloid leukemia cells through a GSK3-and Bim-dependent mechanism [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(4): 1340-1351.

- [22] Chen L F, Monti S, Juszczynski P, *et al.* SYK inhibition modulates distinct PI3K/AKT-dependent survival pathways and cholesterol biosynthesis in diffuse large B cell lymphomas [J]. *Cancer Cell*, 2013, 23(6): 826-838.
- [23] Chot M, Kim W J, Moon S K. AKT signaling is involved in fucoidan-induced inhibition of growth and migration of human bladder cancer cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2014, 64(2): 344-352.
- [24] Arkan M C, Greten F R. IKK-and NF- κ B-mediated functions in carcinogenesis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2011, doi: 10.1007/82_2010_97.
- [25] Bassères D S, Baldwin A S. Nuclear factor-kappa B and inhibitor of kappa B kinase pathways in oncogenic initiation and progression [J]. *Oncogene*, 2006, 25(51): 6817-6830.
- [26] Prasad S, Ravindran J, Aggarwal B B. NF-kappaB and cancer: How intimate is this relationship [J]. *Mol Cell Biochem*, 2010, 336(1/2): 25-37.
- [27] 杜恒飞, 于路佳, 孟艳凤, 等. 去甲斑蝥素抗骨髓瘤作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(12): 2479-2483.
- [28] Peng Y, Li L, Huang M, *et al.* Angiogenin interacts with ribonuclease inhibitor regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in bladder cancer cells [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(12): 2782-2792.