

## 重楼总皂苷对 LiCl 诱导人胃癌 MKN-45 细胞迁移及侵袭的影响

洪星辉, 王 靓, 梁梦茹, 黄金玲\*

安徽中医药大学, 安徽 合肥 230038

**摘 要:** 目的 探讨重楼总皂苷 (*Rhizoma Paridis* total saponin, RPTS) 在体外对人胃癌 MKN-45 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响, 探讨其作用的可能机制。方法 体外培养 MKN-45 细胞, 取对数生长期细胞, 加入不同质量浓度 RPTS (2.5、5.0、10.0、20.0、40.0  $\mu\text{g/mL}$ ) 处理 24 h, 采用 MTT 法检测细胞增殖情况; 细胞划痕实验、Transwell 小室实验检测 RPTS 对 MKN-45 细胞迁移和侵袭的影响; 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测 RPTS 对 LiCl 诱导的 MKN-45 细胞上清液中基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 的上调表达的影响; 免疫印迹技术 (Western blotting) 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术分别检测 RPTS (10、20、40  $\mu\text{g/mL}$ ) 对 LiCl 诱导的 MKN-45 细胞中肿瘤侵袭转移相关分子血管内皮生长因子 (VEGF)、环加氧酶-2 (COX-2) 以及 LiCl 作用靶点糖原合酶激酶-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) 蛋白和基因表达水平的影响。结果 与对照组比较, RPTS 5.0、10.0、20.0、40.0  $\mu\text{g/mL}$  可明显下调 MKN-45 细胞的增殖活性 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ); RPTS 2.5、5.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$  可抑制 MKN-45 细胞的迁移和侵袭能力 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。与模型组比较, RPTS 能够显著下调 LiCl 诱导的 MKN-45 细胞上清液中 MMP-9 的表达水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ); 下调细胞中 VEGF、COX-2 mRNA 和蛋白表达水平; 上调 LiCl 作用位点 GSK-3 $\beta$  mRNA 和蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ )。结论 RPTS 具有体外抑制 MKN-45 细胞迁移和侵袭的能力, 其作用机制可能与调控 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关。

**关键词:** 重楼总皂苷; 人胃癌 MKN-45 细胞; 迁移; 侵袭; 基质金属蛋白酶-9; 血管内皮生长因子; 环加氧酶-2; 糖原合酶激酶-3 $\beta$

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253 - 2670(2019)13 - 3134 - 06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.13.020

## Effects and mechanism of *Rhizoma Paridis* total saponin on invasion and migration abilities of human gastric adenocarcinoma cell MKN-45 induced by LiCl

HONG Xing-hui, WANG Liang, LIANG Meng-ru, HUANG Jin-ling

Anhui University of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect and the possible mechanism of *Rhizoma Paridis* total saponin (RPTS) on human gastric cancer cell line MKN-45 proliferation, migration and invasion *in vitro*. **Methods** MKN-45 cells were cultured *in vitro* and treated respectively with indicated concentrations of RPTS (2.5, 5.0, 10.0, 20.0, and 40.0  $\mu\text{g/mL}$ ) for 24 h, and cell viability of cell proliferation was detected by MTT assay; The invasive and metastatic ability of MKN-45 treated with indicated concentrations of RPTS (2.5, 5.0, 10.0  $\mu\text{g/mL}$ ) was detected by Transwell migration assay and wound healing assay; Elisa assay was employed to detect the concentrations of MMP-9 induced by LiCl after RPTS administration (10, 20, and 40  $\mu\text{g/mL}$ ) in the cell supernatant; Western blotting and qRT-PCR were respectively performed to investigate the invasion and migration related protein and mRNA level of VEGF, COX-2, and GSK-3 $\beta$  in RPTS-treated MKN-45 after LiCl stimulation for 24 h. **Results** Compared with the control group, RPTS (10, 20, and 40  $\mu\text{g/mL}$ ) significantly inhibited the proliferation of MKN-45 cells ( $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ ); RPTS (2.5, 5.0, 10.0  $\mu\text{g/mL}$ ) suppressed the invasion and migration of MKN-45 cells ( $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ ); Compared with the model group, RPTS significantly downregulated the expression of MMP-9 in the cell supernatant of MKN-45 cells induced by LiCl ( $P < 0.05$  and  $P < 0.01$ ), and RPTS also decreased the protein and mRNA expression level of VEGF and COX-2, but it significantly upregulated the expression of GSK-3 $\beta$  at the protein and mRNA level ( $P < 0.05$  and  $P < 0.001$ ). **Conclusion** RPTS play a pivotal role in suppressing the invasion and migration of MKN-45 cells *in vitro*, and its mechanism may be related to the regulating effects of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in the human gastric adenocarcinoma cell.

**Key words:** *Rhizoma Paridis* total saponin (RPTS); MKN-45 cells; migration; invasion; MMP-9; VEGF; COX-2; GSK-3 $\beta$

收稿日期: 2019-04-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573864); 安徽中医药大学校级科研自然重点项目 (2019zrzd03); 安徽中医药大学校级科研自然面上项目 (2016zr004); 安徽中医药大学校级科研自然面上项目 (2016zr001)

作者简介: 洪星辉, 男, 安徽中医药大学讲师。Tel: 18297859690 E-mail: 317236287@qq.com

\*通信作者 黄金玲, 女, 安徽中医药大学教授, 博士生导师。Tel: (0551)65169390 E-mail: jinling681@sina.com

胃癌是最为常见的消化道恶性肿瘤之一，也是发病率和死亡率增长速度最快的恶性肿瘤之一<sup>[1]</sup>。全世界每年新发病例有 70% 在发展中国家，其中我国每年新增病例大约占全球的 40%<sup>[2]</sup>，且患者趋于年轻化。尽管近年来对于胃癌早期的诊疗技术、外科切除技术以及放化疗和免疫治疗等多种综合治疗技术有所提高，但是患者 5 年生存率仅为 25%~30%<sup>[3-4]</sup>，术后胃癌细胞的转移仍然是影响预后和 5 年生存率的主要因素。如何有效地改善进展期胃癌的浸润和转移仍然是临床上面临的一大难题。目前，众多研究证明中药在抑制肿瘤增殖和转移等方面展现出较高的研究价值。

重楼 *Rhizoma Paridis* 以蚤休之名首载于《神农本草经》。其具有清热解毒、消肿止痛的功效。现代植物化学和药理学研究证实从重楼中以醇提方式提取出来的化合物是天然的皂苷类成分，即重楼皂苷 (*Rhizoma Paridis* total saponin, RPTS)，也是抗肿瘤的主要活性成分<sup>[5-7]</sup>。近年来大量研究展示了 RPTS 在抑制肿瘤细胞增殖、阻滞癌细胞周期、诱导癌细胞凋亡等方面具有显著的作用<sup>[8-11]</sup>。本课题组前期研究发现 RPTS 具有明显的抑制胃癌细胞增殖的活性<sup>[12-13]</sup>。研究表明氯化锂 (LiCl) 能够抑制糖原合成酶激酶-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) 的表达和酶活性，激活 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路。该信号通路的激活调控下游靶基因基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、血管内皮生长因子 (VEGF)、环加氧酶-2 (COX-2) 等肿瘤侵袭转移相关分子的转录和表达<sup>[14-15]</sup>，参与了肿瘤细胞的上皮间质转化，血管生成以及远端转移<sup>[16]</sup>。基于以上研究背景，本实验研究 RPTS 对 LiCl 诱导的人胃癌 MKN-45 细胞迁移和侵袭能力的影响，并探讨可能的作用机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

MKN-45 细胞购自中国科学院上海细胞研究所细胞库。

### 1.2 药物与试剂

重楼饮片购自安徽济仁药业有限公司，产地为云南，批号 111012，经安徽中医药大学中药与资源教研室俞年军教授鉴定，确认为云南重楼 *Paris polyphylla* Smith var. *yunnanensis* (Franch) Hand.-Mazz. DMEM 高糖细胞培养基、胎牛血清购自美国 HyClone 公司；四甲基偶氮唑蓝 (MTT)、乙二胺四乙酸 (EDTA)、LiCl (质量分数 >99%) 购自

美国 Sigma 公司；Transwell 小室 (直径 8  $\mu$ m) 购自 Millipore 公司；MMP-9 ELISA 试剂盒购自上海生工生物工程有限公司；兔抗人 VEGF 多克隆抗体、COX-2 抗体、GSK-3 $\beta$  抗体购自美国 Cell Signaling 公司；TRIzol RNA 提取试剂购自美国 Invitrogen 公司；FastQuant cDNA 第一链合成试剂盒、TRIzol RNA 提取试剂、QuantiFast SYBR Green PCR 试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

### 1.3 仪器

Forma 370 细胞培养箱 (美国 Thermo 公司)；纯水-超纯水净化器 (美国 Millipore 公司)；7500 Real-Time PCR 仪 (美国 ABI 公司)；SPEC-TRAMax M2e 酶标仪 (美国 Molecular Devices 公司)；FCM 凝胶成像仪 (美国 Protein Simple 公司)；PowerPac 系列电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

### 2.1 RPTS 的制备

参考文献方法<sup>[17-20]</sup>提取制备得干浸膏。高氯酸比色法<sup>[21]</sup>测定重楼醇提物中 RPTS 质量分数为 62.6%。

### 2.2 细胞培养

MKN-45 细胞采用含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 DMEM 高糖培养液，置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下进行培养，待细胞长满至瓶壁 85% 左右后按照 1:5 进行传代，取对数生长期细胞进行各项实验。

### 2.3 MTT 法检测细胞增殖

将处于对数生长期的 MKN-45 细胞用胰酶常规消化，制成单细胞悬液并计数，使得细胞密度为  $5 \times 10^4$  个/mL，将细胞悬液以 200  $\mu$ L/孔接种于 96 孔培养板中，在 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱中培养，待细胞贴壁后，分别向各孔中加入终质量浓度分别为 0、2.5、5.0、10.0、20.0、40.0  $\mu$ g/mL RPTS，每组 6 个复孔，另设空白组，继续培养 24 h，培养结束后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20  $\mu$ L，37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h，吸出上清后加入 150  $\mu$ L DMSO，摇床避光震荡 15 min，用酶标仪测量各孔在 490 nm 处的吸光度 (*A*) 值，计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

### 2.4 细胞划痕实验检测细胞迁移率

取对数生长期的 MKN-45 细胞，制成单细胞悬液并计数，调整细胞密度至  $7 \times 10^5$  个/mL，接种于 6 孔板中。置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的饱和湿度培养箱

中,待细胞贴壁,用10  $\mu$ L枪头在孔板底部中央均匀划出一条横线,PBS清洗后,换无血清高糖DMEM培养,并在光学显微镜下观察0 h细胞划痕状态,拍照。之后向各孔中分别加入终质量浓度为0、2.5、5.0、10.0  $\mu$ g/mL的RPTS,继续培养24 h,培养结束后在光学显微镜下拍照,观察细胞迁移情况,并计算细胞24 h迁移率。

迁移率=(划痕宽度<sub>0 h</sub>-划痕宽度<sub>24 h</sub>)/划痕宽度<sub>0 h</sub>

## 2.5 Transwell小室实验检测细胞侵袭能力

将Matrigel基质胶置于4  $^{\circ}$ C冰箱中隔夜解冻,次日Matrigel基质胶和预冷的无血清DMEM培养液按1:3稀释混合均匀,在Transwell小室内加入100  $\mu$ L混合液并均匀铺展,放置在37  $^{\circ}$ C恒温培养箱中静置2 h,使基质胶凝固。将Transwell小室置于24孔板中,同时下室加入含10%胎牛血清的DMEM高糖完全培养液。用无血清培养基制得细胞密度为 $1.0 \times 10^6$ 个/mL的单细胞悬液,接种于Transwell上室100  $\mu$ L。在恒温细胞培养箱中孵育6 h待其贴壁后,加入不同质量浓度RPTS(0、2.5、5.0、10.0  $\mu$ g/mL)继续培养24 h,每组设置3个复孔。取出Transwell小室,用棉签小心擦去小室上层未迁移细胞,并用PBS缓慢清洗3次,用0.1%结晶紫在室温条件下染色20 min。在倒置光学显微镜下观察,并每组随机选取5个不同高倍( $\times 200$ )视野计细胞数。

## 2.6 ELISA法检测细胞上清中MMP-9的表达

取对数生长期的MKN-45细胞,制成单细胞悬液并计数,调整细胞密度至 $7 \times 10^5$ 个/mL,接种至6孔板中。待细胞贴壁后,除对照组外,其余各组细胞加LiCl(5 mmol/L)继续培养24 h,培养结束后换液,加入不同质量浓度RPTS(10、20、40  $\mu$ g/mL),各组设置3个复孔,继续培养24 h。吸出细胞上清液至1.5 mL EP管中,各组样品和缓冲液按1:5稀释依次加入MMP-9 Elisa试剂盒当中,每孔50  $\mu$ L,同时设置标准品组,置于37  $^{\circ}$ C恒温条件下孵育30 min,按说明书操作,酶标仪读取480 nm处A值,记录结果。

## 2.7 Western blotting法检测细胞中VEGF、COX-2、GSK-3 $\beta$ 蛋白表达

将处于对数生长期的MKN-45细胞,制成单细胞悬液并计数,调整细胞密度至 $7 \times 10^5$ 个/mL,接种至6孔板中。待细胞贴壁后,除对照组外,其余各组细胞加LiCl(5 mmol/L)继续培养24 h,换液,并加入不同质量浓度RPTS(10、20、40  $\mu$ g/mL)

放入培养箱继续培养24 h。培养结束,弃去上清培养液,PBS缓慢清洗2次,用细胞刮在冰上收集裂解提取细胞总蛋白。BCA试剂盒定量,加入溴酚蓝蛋白上样缓冲液,90  $^{\circ}$ C水浴变性5 min。10% SDS-PAGE电泳分离总蛋白。80 V湿法转膜2 h。用5%脱脂奶粉封闭PVDF膜,置于摇床上缓慢振摇2 h。振摇结束,用TBST洗涤2次,每次5 min。加入稀释的VEGF、COX-2、GSK-3 $\beta$ 一抗(1:1 000),4  $^{\circ}$ C孵育过夜。次日,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温下孵育2 h。避光配制ECL发光试剂,并均匀涂抹在PVDF膜上蛋白条带对应位置,于FCM凝胶成像仪中自动曝光。所得实验蛋白条带图像经凝胶图像处理系统加以分析。

## 2.8 qRT-PCR法检测细胞中VEGF、COX-2、GSK-3 $\beta$ mRNA表达

将已接种于6孔板中的MKN-45细胞经过LiCl(5 mmol/L)处理24 h后,加入RPTS(10、20、40  $\mu$ g/mL)继续处理24 h,收集细胞,TRIzol法提取细胞总RNA,取少量RNA进行定量,之后取总RNA 1  $\mu$ g/ $\mu$ L,用FastQuant cDNA第一链合成试剂盒将总RNA进行逆转录,生成cDNA。再根据QuantiFast SYBR Green PCR试剂盒说明书进行qRT-PCR反应。引物序列为 $\beta$ -actin:上游5'-GAGAAAATCTGGCACCACACC-3',下游5'-GGATAGCACAGCCTGGATAGCAA-3';GSK-3 $\beta$ :上游5'-GAACTGTCAAGTAATCCACCTCT-3',下游5'-CCACGGTCTCCAGTATTAGCATC-3';VEGF:上游5'-TCACCAAGGC-CAGCACATAG-3',下游5'-CGCTTTCGTTTTTGCC-CCTT-3';COX-2:上游5'-ACGCTTTATGCTGAAG-CCCT-3',下游5'-GCCGAGGCTTTTCTACCAGA-3'。

## 2.9 统计学分析

应用SPSS 19.0对数据进行统计学处理。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组指标采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间比较采用 $t$ 检验。

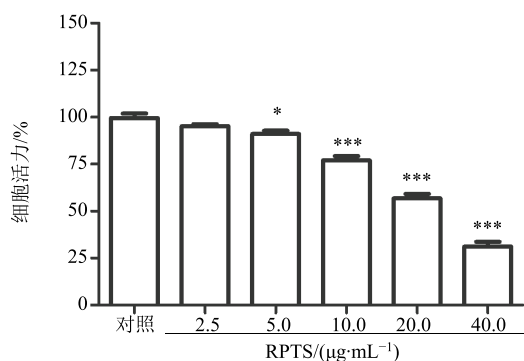
## 3 结果

### 3.1 RPTS对MKN-45细胞增殖的影响

MTT实验结果显示,与对照组比较,RPTS 2.5  $\mu$ g/mL组细胞活力受到影响较小。当RPTS质量浓度增加到5.0、10.0、20.0、40.0  $\mu$ g/mL时,细胞增殖受到明显的抑制( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ),并且随着质量浓度的升高,细胞活力降低。结果见图1。

### 3.2 RPTS对MKN-45细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示,与对照组比较,RPTS 2.5、



与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$ , 图 3 同  
\* $P < 0.05$  \*\*\* $P < 0.001$  vs control group, same as Fig. 3

图 1 RPTS 对 MKN-45 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 1 Effect of RPTS with various concentrates on cell viability of MKN-45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

5.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$  组细胞的划痕距离显著增加 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 结果提示 RPTS 可显著抑制 MNK-45 细胞的迁移, 而且迁移抑制作用呈质量浓度依赖关系, 结果见图 2。

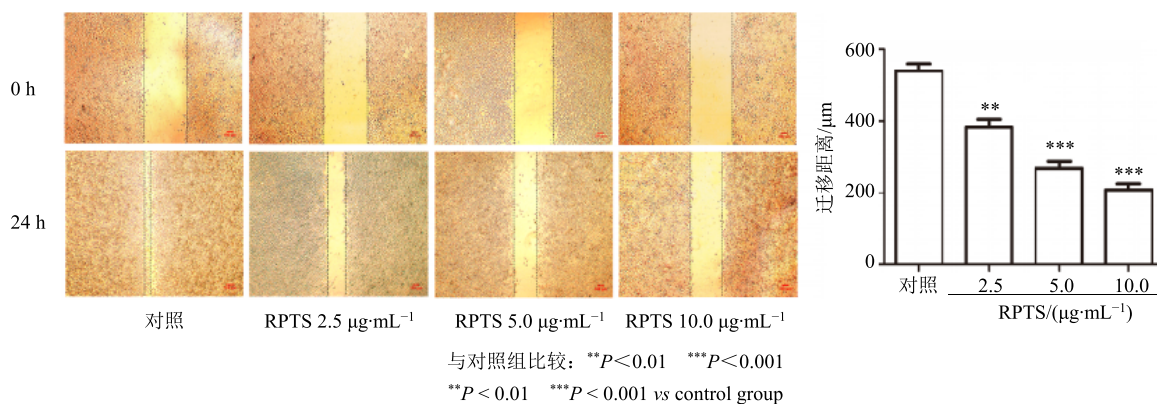


图 2 RPTS 对 MKN-45 细胞体外迁移能力的影响 ( $\times 200, \bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 2 Effects of RPTS on migration of MKN-45 cells *in vitro* ( $\times 200, \bar{x} \pm s, n = 3$ )

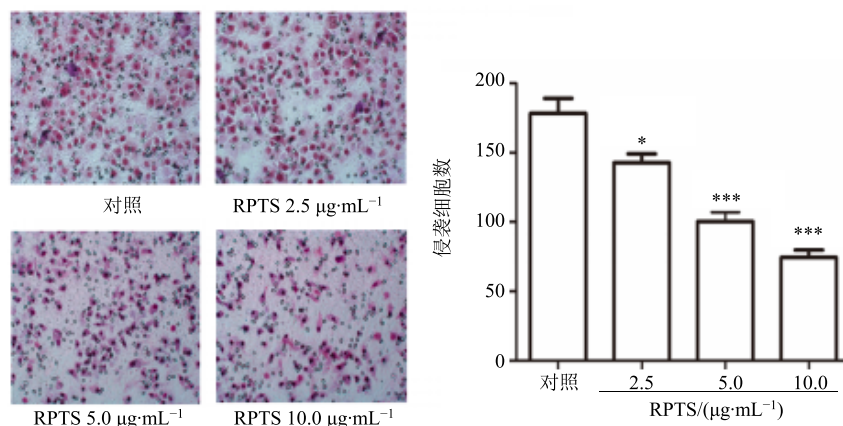


图 3 RPTS 对 MKN-45 细胞体外侵袭能力的影响 ( $\times 200, \bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 3 Effects of RPTS on invasion of MKN-45 cells *in vitro* ( $\times 200, \bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.3 RPTS 对 MKN-45 细胞侵袭能力的影响

Transwell 小室下室细胞经结晶紫染色, 通过对下室细胞数量的观察, 可以看出与对照组比较, RPTS 2.5、5.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$  组下室侵袭细胞数量明显减少 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ), 且表现出质量浓度依赖性, 结果提示 RPTS 能抑制 MKN-45 细胞的侵袭, 结果见图 3。

### 3.4 RPTS 对 LiCl 诱导的 MKN-45 细胞 MMP-9 蛋白表达的影响

结果显示 (表 1), 与对照组比较, LiCl 可显著提高 MKN-45 细胞中 MMP-9 蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ ), 提示 LiCl 造模成功。与模型组比较, RPTS 10、20、40  $\mu\text{g/mL}$  可显著抑制 MMP-9 蛋白的表达, 且呈现质量浓度依赖性。

### 3.5 RPTS 对 LiCl 诱导的 MKN-45 细胞 VEGF、COX-2、GSK-3 $\beta$ 蛋白表达的影响

Western blotting 结果 (图 4) 表明, 与模型组比较, RPTS 10、20、40  $\mu\text{g/mL}$  对 LiCl 诱导的 MKN-45

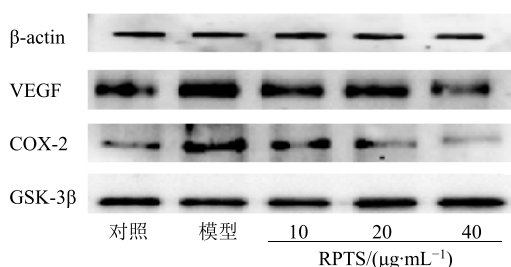
表 1 RPTS 对 LiCl 诱导的 MKN-45 细胞 MMP-9 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effects of RPTS on expression of LiCl-induced protein MMP-9 in MKN-45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 组别   | $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ | MMP-9/(ng·mL <sup>-1</sup> ) |
|------|-----------------------------------------|------------------------------|
| 对照   | —                                       | 165.62 ± 4.15                |
| 模型   | —                                       | 234.01 ± 10.58 <sup>#</sup>  |
| RPTS | 10                                      | 178.29 ± 6.07 <sup>**</sup>  |
|      | 20                                      | 112.57 ± 4.79 <sup>**</sup>  |
|      | 40                                      | 69.53 ± 5.61 <sup>**</sup>   |

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group



与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

图 4 RPTS 对 LiCl 诱导的 MKN-45 细胞 VEGF、COX-2、GSK-3β 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effects of RPTS on protein expression of LiCl-induced VEGF, COX-2, and GSK-3β in MKN-45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

细胞 GSK-3β 表达无明显差异, 提示 LiCl 可能仅在蛋白水平调控 GSK-3β 的表达。与模型组比较, RPTS 20、40 μg/mL 组细胞 GSK-3β mRNA 表达水平明显上调 ( $P < 0.01$ ), 结果见图 5。

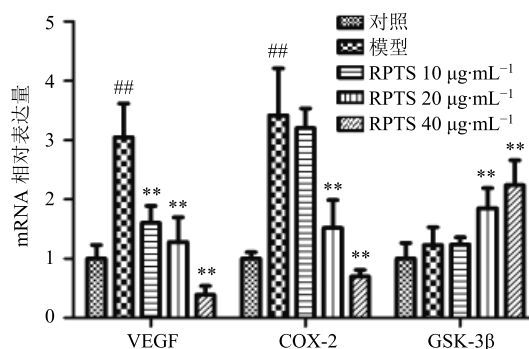
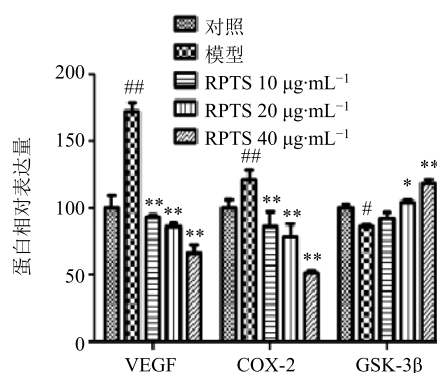
#### 4 讨论

胃癌是起源于胃黏膜上皮的恶性肿瘤, 在我国各种恶性肿瘤中发病率居首位。胃癌发病有明显的地域性差别, 在我国胃癌高发的地区主要集中在东部沿海和中西部的黄河中上游地区。此外, 男女发病率为 2:1, 并且随年龄的增加而显著升高。据我国肿瘤登记中心最新数据调查结果估计, 2015 年我国胃癌的新发病例约为 67.9 万例, 胃癌死亡病例约为 49.8 万例<sup>[22]</sup>, 因此胃癌已是威胁我国居民健康的主要疾病之一。控制进展期胃癌细胞的高侵袭和高转移性是改善患者预后、减少死亡率的有效途径。本研究发现, RPTS 可抑制 MKN-45 细胞增殖、迁移和侵袭。本研究选用 LiCl 作为对 MKN-45 细胞的外源性诱导物, 模拟 Wnt/β-catenin 信号通路被激活情况下对 MKN-45 细胞侵袭和转移

细胞 VEGF、COX-2 蛋白表达产生了显著的抑制作用 ( $P < 0.01$ )。RPTS 可上调 LiCl 抑制的 GSK-3β 蛋白表达水平 ( $P < 0.05$ 、0.01), 提示 RPTS 可能参与调控 MKN-45 细胞 Wnt/β-catenin 信号通路。

#### 3.6 RPTS 对 LiCl 诱导的 MKN-45 细胞 VEGF、COX-2、GSK-3β mRNA 表达的影响

qRT-PCR 结果显示, 与模型组比较, RPTS 10、20、40 μg/mL 对 LiCl 诱导的 MKN-45 细胞 VEGF、COX-2 mRNA 表达产生了显著的抑制作用, 与 Western blotting 结果一致。与对照组比较, 模型组



与对照组比较: <sup>##</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较: <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$

<sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model group

图 5 RPTS 对 LiCl 诱导的 MKN-45 细胞 VEGF、COX-2、GSK-3β mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 5 Effects of RPTS on mRNA expression of LiCl-induced VEGF, COX-2, and GSK-3β level in MKN-45 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

能力的影响。结果发现 LiCl 处理细胞 24 h 后, MKN-45 细胞中 MMP-9、VEGF、COX-2 蛋白的表达显著上调, 但 RPTS 能逆转以上作用, 并表现出质量浓度依赖关系。RPTS 对 LiCl 作用位点 GSK-3β

蛋白也表现出明显的调控作用。

综上所述, RPTS 可抑制 MKN-45 细胞的迁移和侵袭过程, 其机制可能与调控细胞 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路有关, 但具体调控机制还需要进一步探索和研究, 为更多的临床应用提供参考。

#### 参考文献

- [1] Piazuolo M B, Correa P. Gastric cancer: Overview [J]. *Colomb Med*, 2013, 44(3): 192-201.
- [2] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, *et al*. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. *Int J Cancer*, 2015, 136(5): 359-386.
- [3] Kim H S, Kim J H, Kim J W, *et al*. Chemotherapy in elderly patients with gastric cancer [J]. *J Cancer*, 2016, 7(1): 88-94.
- [4] Farran B, Müller S, Montenegro R C. Gastric cancer management: Kinases as a target therapy [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2017, 44(6): 613-622.
- [5] Sun J, Liu B R, Hu W J, *et al*. *In vitro* anticancer activity of aqueous extracts and ethanol extracts of fifteen traditional Chinese medicines on human digestive tumor cell lines [J]. *Phytother Res*, 2007, 21(11): 1102-1104.
- [6] 陈雪梅, 杨焕芝, 施敏, 等. 长柱重楼总皂苷的抗肿瘤活性及急性毒性作用研究 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(7): 904-910.
- [7] 金炜东, 陈孝平, 蔡红娇. 重楼提取物对 HepG2 细胞的毒性作用 [J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2006, 35(1): 103-106.
- [8] 吴夏慧, 薛娇, 胡文静, 等. 重楼总皂苷提取分离及其对人胃癌细胞 BGC823 的抑制作用 [J]. *江苏中医药*, 2011, 43(8): 84-86.
- [9] 朱丽丽, 李惠芬. 重楼皂苷对 SGC-7901 细胞增殖抑制及诱导凋亡的实验研究 [J]. *时珍国医国药*, 2009, 20(6): 1501-1502.
- [10] Cheng Z X, Liu B R, Qian X P, *et al*. Proteomic analysis of anti-tumor effects by *Rhizoma Paridistotal* saponin treatment in HepG2 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 122(2): 139-137.
- [11] 陈志红, 龚先玲, 刘义, 等. 重楼总皂苷对人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 周期及凋亡的影响 [J]. *中成药*, 2011, 33(1): 25-29.
- [12] 保永亮, 龚晓燕, 方海雁, 等. 重楼总皂苷对人胃癌 MNK-45 和 MGC80-3 细胞增殖的影响 [J]. *安徽中医学院学报*, 2012, 31(6): 51-55.
- [13] 方海雁, 龚晓燕, 洪星辉, 等. 重楼总皂苷对人胃癌 MKN-45 细胞凋亡及 Fas/FasL 信号通路的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(7): 1388-1391.
- [14] Li V S, Ng S S, Boersema P J, *et al*. Wnt signaling through inhibition of  $\beta$ -catenin degradation in an intact Axin1 complex [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1245-1256.
- [15] Holland J D, Klaus A, Garratt A N, *et al*. Wnt signaling in stem and cancer stem cells [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2013, 25(2): 254-264.
- [16] Ilyas M. Wnt signalling and the mechanistic basis of tumour development [J]. *J Pathol*, 2015, 205(2): 130-144.
- [17] 年四辉, 张赫名, 郑渝艳. 重楼水提工艺的初步研究 [J]. *云南中医学院学报*, 2006, 29(1): 13-16.
- [18] 张娟, 路金才. 皂苷的提取方法及含量测定研究进展 [J]. *中国现代中药*, 2006, 8(3): 25-28.
- [19] 孙治国, 张琳, 李凌军, 等. 重楼总皂苷提取工艺研究 [J]. *中药材*, 2006, 30(6): 726-729.
- [20] 孙治国, 张琳, 田景奎, 等. 重楼总皂苷的纯化工艺研究 [J]. *药学实践杂志*, 2009, 27(6): 455-469.
- [21] 杨骁, 张振秋. 重楼中总皂苷的含量测定 [J]. *中华中医药学刊*, 2007, 25(11): 2420-2422.
- [22] Chen W Q, Zheng R S, Baade P D, *et al*. Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.