

## 知母水提取物对人胃癌细胞 HGC-27 的抑制作用

朱建新, 颜娟, 赵虹秀, 姜爱雯, 张艺  
(河北北方学院附属第一医院, 河北 张家口 075000)

**摘要:** **目的** 探讨知母水提取物对人胃癌细胞 HGC-27 的抑制作用。**方法** 通过细胞粘附实验检测细胞黏附能力, MTT 法和细胞克隆形成实验检测细胞增殖能力, 细胞划痕实验检测细胞迁移能力, Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力, Western blot 法检测 HGC-27 细胞中 MMP-9、MMP-2、Slug、E-cadherin、E-Selectin 蛋白表达。**结果** 知母水提取物干预 24 h 后, HGC-27 细胞同质粘附能力增强 ( $P < 0.01$ ), 异质粘附能力、细胞增殖能力、迁移能力、侵袭能力及 MMP-9、MMP-2、Slug、E-Selectin 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ), E-cadherin 蛋白表达升高 ( $P < 0.05$ )。**结论** 知母水提取物具有抑制人胃癌细胞 HGC-27 粘附、增殖、迁移及侵袭能力的作用。

**关键词:** 知母水提取物; 胃癌; HGC-27 细胞; 粘附; 增殖; 迁移; 侵袭

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2022)07-2308-04

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.07.044

胃癌是最常见的消化道恶性肿瘤, 由于胃癌细胞具有增殖迅速, 侵袭能力强, 易发生早期转移和对化疗药物具有耐药性等原因, 使得其致死率高居第二位<sup>[1]</sup>。目前, 胃癌的治疗主要采取以手术为主化疗为辅的方案, 尽管治疗技术不断改进, 但仍有部分胃癌患者就诊时已经出现了恶性转移, 治疗效果不佳<sup>[2-3]</sup>。所以, 除了加强早期诊断之外, 探寻一种行之有效的天然抗肿瘤的药物具有重要的现实意义。

知母为百合科植物知母的干燥根茎, 性苦、甘、寒, 归胃、肺经, 是常用的清热泻火类药物, 具有降低血脂、抗血栓形成、预防老年痴呆、保护脑损伤及免疫调节等作用<sup>[4]</sup>。除此之外, 知母还具有抑制肿瘤增殖和侵袭的作用。研究发现, 知母皂苷 A III 可以通过抑制 COX-2 表达, 进而降低 NF- $\kappa$ B 信号通路蛋白表达来抑制黑色素瘤 B16-F10 细胞系与 WM-115 细胞系迁移能力及裸鼠成瘤能力<sup>[5]</sup>。测序分析及生物信息学技术指出知母水提取物可以通过调节胃癌细胞系 SGC7901 中 miR-26b-5p、miR-16-5p、miR-15b-5p、miR-20-5P 表达, 进而调控下游靶基因群来抑制胃癌细胞的增殖能力<sup>[6]</sup>。本实验选取胃癌细胞系 HGC-27 为对象, 深入研究知母对胃癌的作用机制, 为其临床应用提供基础实验依据。

### 1 材料

1.1 细胞 人胃癌细胞系 HGC-27 购自中国科学院上海细胞生物学研究所。

1.2 试剂与药物 知母颗粒剂 (批号 1602043) 购自江阴天江药业有限公司。RPMI1640、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; 青链霉素、胰蛋白酶购自上海碧云天生物技术有限

公司; 兔抗人 MMP-9 (货号 RLT1892)、鼠抗人  $\beta$ -actin (货号 RLM3028)、鼠抗人 MMP-2 (货号 RLM3667)、兔抗人 Slug (货号 RLM3371)、兔抗人 E-cadherin (货号 RLM3353)、兔抗人 E-Selectin (货号 RLT5745) 购自苏州睿瀛生物技术有限公司; Transwell 小室购自美国 CoStar 公司; 纤维粘连蛋白 (货号 356234) 购买自美国 BD 公司; 牛血清白蛋白封闭液 (货号 SW3015) 购自北京索莱宝科技有限公司。

### 2 方法

2.1 细胞培养 HGC-27 细胞于含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基中, 置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。待细胞融合率至 90%~95% 时进行传代。

2.2 知母水提取物制备与细胞分组 使用 RPMI1640 培养基溶解知母颗粒剂, 在无菌条件下制备成终质量浓度为 1、5、10、15 mg/mL 的药液, -20  $^{\circ}$ C 储存备用。将“2.1”项下细胞分为对照组, 知母水提取物 1、5、10 mg/mL 组。

2.3 MTT 法检测细胞增殖率 取处于对数生长期的 HGC-27 细胞, 经细胞计数后种于 96 孔板中, 每孔约  $1 \times 10^5$  个, 培养 12 h 后分别加入 1、5、10、15 mg/mL 知母水提取物, 继续培养 36 h, 每孔加入 15  $\mu$ L 1 mg/mL MTT 溶液, 37  $^{\circ}$ C 孵育 4 h, 离心, 倒去培养液并加入 100  $\mu$ L DMSO, 10 min 后使用酶标仪检测光密度 (OD) 值, 计算细胞增殖率。

2.4 克隆形成实验检测细胞存活情况 用知母水提取物将 HGC-27 细胞制成单细胞悬液, 经计数后, 按照每孔 500 个的密度接种于 6 孔板中, 加入含 10% FBS 的 RPMI1640 培养基 5 mL, 培养 7 d。至长出肉眼可见细胞团后, PBS 洗去培养液, 4% 多聚甲醛固定 10 min, 染色, 计算细胞团数

收稿日期: 2020-08-30

基金项目: 河北省医学科学研究重点课题计划项目 (20150474)

作者简介: 朱建新 (1992—), 女, 硕士, 初级中药师, 从事中药治疗胃癌肿瘤细胞研究。Tel: 18831317858, E-mail: 1587882210@qq.com

(细胞大于50)。

2.5 细胞同质粘附实验检测细胞粘附能力 用知母水提取物处理36 h后,将HGC-27细胞制成密度为 $1 \times 10^5$ /mL的细胞悬液,每孔200  $\mu$ L,接种于48孔板,孵育1 h后PBS洗去未粘附细胞,计算同质粘附细胞数,公式为同质粘附细胞数=每孔加入总细胞数-洗去未粘附细胞数。

2.6 细胞异质粘附实验检测细胞粘附能力 使用15 mg/L纤维粘连蛋白包被48孔板,置于无菌条件下吹干后,2%牛血清白蛋白封闭2 h,将各组细胞制成密度为 $1 \times 10^5$ /mL的细胞悬液,每孔200  $\mu$ L接种于48孔板,培养60 min后PBS洗去未粘附细胞,4%多聚甲醛固定10 min,计算异质粘附细胞数。

2.7 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 将HGC-27细胞制成密度为 $5 \times 10^5$ /mL的细胞悬液,每孔500  $\mu$ L、接种24孔板中,待到细胞融合率达到95%~100%时,用20  $\mu$ L枪头笔直在孔板中央进行划痕,PBS冲洗掉脱落细胞后,加入含1、5、10 mg/mL知母水提取物的无血清培养液培养24 h后,拍照观察。

2.8 Transwell小室法检测细胞侵袭能力 将各组HGC-27细胞用含0、1、5、10 mg/mL知母水提取物的无血清培养液制成密度为 $5 \times 10^6$ /mL的细胞悬液,将100  $\mu$ L细胞悬液加进提前用纤维粘连蛋白包被的Transwell小室上室,下室加入含10% FBS的RPMI1640培养基,培养24 h后擦去上室上面未侵袭的细胞,多聚甲醛固定15 min,吉姆萨染色,拍照观察。

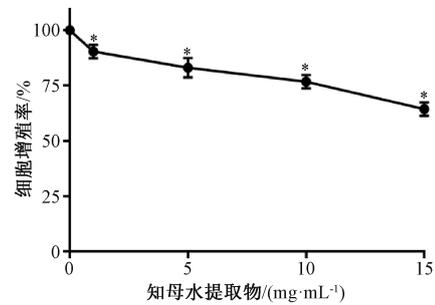
2.9 Western blot法检测细胞MMP-9、MMP-2、Slug、E-cadherin、E-Selectin蛋白表达 用知母水提取物处理HGC-27细胞48 h后,提取HGC-27细胞总蛋白,BCA法检测各

组蛋白浓度。每孔15  $\mu$ L蛋白上样,10% SDS-PAGE凝胶电泳分离,半干转至PVDF膜,室温封闭1 h,加入MMP9 (1:500)、MMP2 (1:150)、Slug (1:150)、E-cadherin (1:100)、E-Selectin (1:200)一抗,4  $^{\circ}$ C孵育过夜,PBS清洗后,加入二抗孵育1 h,ECL发光显色,通过成像仪自带的软件测量条带的灰度值,以 $\beta$ -actin为内参,计算目的蛋白的相对表达。

2.10 统计学分析 通过SPSS 20.0软件进行处理,数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

3.1 知母水提取物对HGC-27细胞增殖能力的影响 与对照组比较,知母水提取物各剂量组细胞增殖率均降低( $P < 0.05$ ),并呈剂量依赖性,见图1;知母水提取物各剂量组细胞克隆形成数均减少( $P < 0.05$ ),并呈剂量依赖性,见图2、表1,提示知母水提取物能抑制HGC-27细胞增殖。



注:与对照组(0 mg/mL)比较,\* $P < 0.05$ 。

图1 知母水提取物对HGC-27细胞增殖能力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

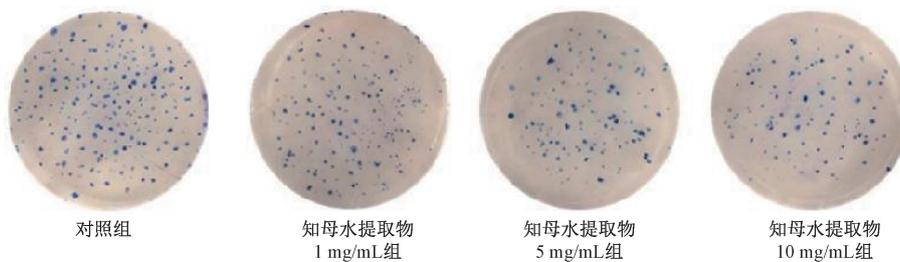


图2 各组细胞克隆形成数

表1 知母水提取物对HGC-27细胞克隆形成能力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

组别	克隆形成数/个
对照组	500 $\pm$ 12
知母水提取物 1 mg/mL 组	437 $\pm$ 17*
知母水提取物 5 mg/mL 组	318 $\pm$ 23*
知母水提取物 10 mg/mL 组	275 $\pm$ 19*

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。

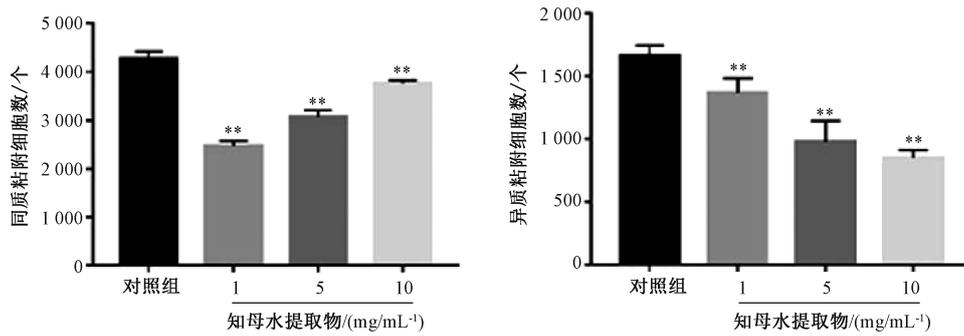
3.2 知母水提取物对HGC-27细胞粘附能力的影响 与对照组比较,知母水提取物各剂量组细胞同、异质粘附细胞数均降低( $P < 0.01$ ),并呈剂量依赖性,见图3。

3.3 知母水提取物对HGC-27细胞迁移能力的影响 与对

照组比较,知母水提取物各剂量组细胞划痕面积均增加,并呈剂量依赖性,见图4,提示知母水提取物能抑制HGC-27细胞迁移能力。

3.4 知母水提取物对HGC-27细胞侵袭能力的影响 与对照组比较,知母水提取物各剂量组HGC-27细胞侵袭能力均被抑制,见图5。

3.5 知母水提取物对HGC-27细胞中MMP-9、MMP-2、Slug、E-cadherin、E-Selectin蛋白表达影响 与对照组比较,知母水提取物各剂量组细胞中MMP-9、MMP-2、Slug、E-Selectin蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),E-cadherin蛋白表达升高( $P < 0.05$ ),并呈剂量依赖性,见图6、表2。



注：与对照组比较，\*\* $P < 0.01$ 。

图3 知母水提取物对HGC-27细胞粘附能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

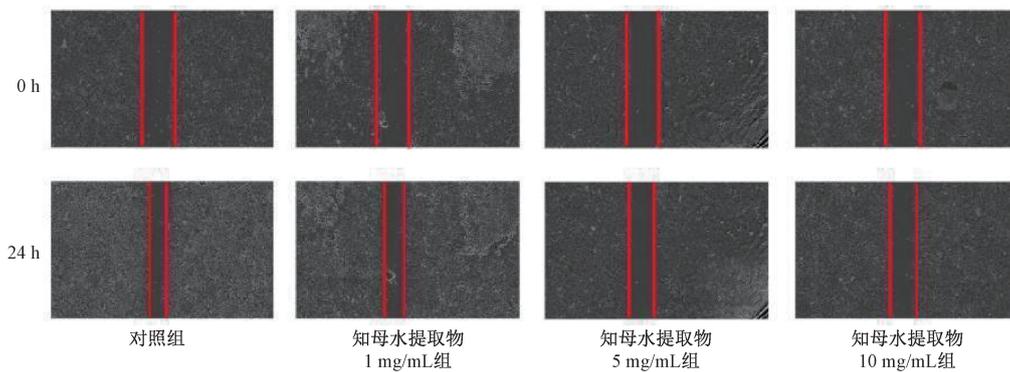


图4 知母水提取物对HGC-27细胞迁移能力的影响 ( $\times 100$ )

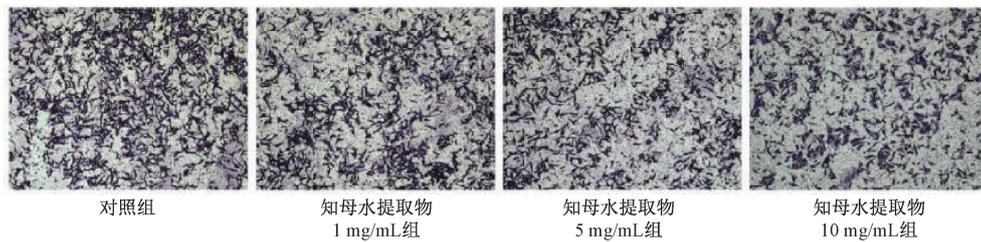
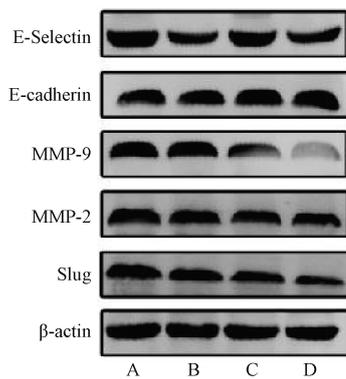


图5 知母水提取物对HGC-27细胞侵袭能力的影响 ( $\times 100$ )



注：A~D分别为对照组，知母水提取物1、5、10 mg/mL组。

图6 各组细胞MMP-9、MMP-2、Slug、E-cadherin、E-Selectin蛋白表达

#### 4 讨论

我国目前东西部医疗水平发展极不平衡，各级医院对于胃癌的诊治水平也不尽相同，许多患者在首诊时已经处

于胃癌的晚期阶段，即使进行手术切除或放化疗，胃癌复发率、致死率很高，5年生存率低<sup>[7]</sup>。知母作为抗肿瘤药物之一，近年来受到的关注也越来越多。

癌症出现转移的始动因素是癌细胞粘附能力的改变<sup>[8]</sup>。肿瘤细胞出现粘附能力改变后，原有的细胞连接被重新排列。本实验中同质细胞粘附能力是指胃癌HGC-27细胞之间粘附的能力，异质细胞粘附能力是指胃癌HGC-27细胞与正常基底细胞之间的粘附能力，结果发现，通过知母水提取物处理HGC-27细胞后，同质细胞粘附能力增强，提示知母水提取物可以使HGC-27细胞相互连接更加紧密不易出现向淋巴结转移、远处转移的现象；异质细胞粘附数减少，提示知母水提取物可以使HGC-27细胞与人正常基底面细胞结合能力下降，从而减低了胃癌HGC-27细胞转移后定植在局部的可能性。说明知母水提取物可以在癌症发生的第1个阶段就通过抑制粘附能力来降低胃癌HGC-27细胞转移的可能性。本实验还发现，知母水提取物可以抑制HGC-27细胞的生长。研究发现，对移植人脑胶质瘤U87MG细胞的裸鼠

表2 知母水提取物对 HGC-27 细胞 MMP-9、MMP-2、Slug、E-cadherin、E-Selectin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=5$ )

组别	Slug	MMP-2	MMP-9	E-cadherin	E-Selectin
对照组	0.97±0.02	0.98±0.04	0.97±0.01	0.61±0.03	0.99±0.01
知母水提取物 1 mg/mL 组	0.81±0.01*	0.86±0.01*	0.81±0.04*	0.75±0.01*	0.78±0.02*
知母水提取物 5 mg/mL 组	0.70±0.01*#	0.73±0.02*#	0.75±0.02*#	0.86±0.04*#	0.89±0.01*#
知母水提取物 10 mg/mL 组	0.53±0.05*#▲	0.69±0.01*#	0.58±0.04*#▲	0.94±0.01*#▲	0.80±0.04*#▲

注：与对照组比较，\* $P<0.05$ ；与知母水提取物 1 mg/mL 组比较，# $P<0.05$ ；与知母水提取物 5 mg/mL 组比较，▲ $P<0.05$ 。

接种知母皂苷 A III 后，瘤体生长处于抑制状态，并呈剂量依赖性；同时，在体外使用知母皂苷 A III 处理 U87MG 细胞后，作为粘附分子代表的  $\beta$ -catenin 表达降低，人脑胶质瘤 U87MG 细胞异质粘附能力降低<sup>[9]</sup>，与本实验结果一致。

肿瘤加强侵袭和迁移能力是癌症发生的又一重要阶段，通过释放 MMP-9、MMP-2 蛋白致使癌细胞穿过基底膜继而降解细胞外基质向远处组织或淋巴结进行转移<sup>[10]</sup>。本实验结果显示，HGC-27 细胞的迁移、侵袭能力可被知母水提取物抑制，并呈剂量依赖性，知母水提取物还可通过抑制 MMP-9、MMP-2 蛋白表达来调节 HGC-27 细胞的迁移、侵袭能力。本实验通过对在上皮间质转化进程中的 2 个关键因子进行检测，结果发现，知母水提取物可以抑制转录因子 Slug 及恢复 E-cadherin 蛋白表达，提示知母水提取物可能通过上皮间质转化进程中来抑制对 HGC-27 细胞的恶性进程<sup>[11]</sup>。另外，E-Selectin 是调节异质粘附能力的关键分子<sup>[12]</sup>，而知母水提取物可以促进 E-Selectin 蛋白表达，这与细胞异质粘附实验一致。

综上所述，知母水提取物可能通过调节上皮间质转化进程进而降低转录因子 Slug 与 MMP-9、MMP-2、E-Selectin 蛋白表达，升高 E-cadherin 蛋白表达，从而抑制 HGC-27 细胞的粘附、增殖、迁移和侵袭能力。

参考文献：

[ 1 ] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.  
[ 2 ] Riihimäki M, Hemminki A, Sundquist K, et al. Metastatic

spread in patients with gastric cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 52307-52316.  
[ 3 ] Shimizu D, Kanda M, Kodera Y. Review of recent molecular landscape knowledge of gastric cancer[J]. *Histol Histopathol*, 2018, 33(1): 11-26.  
[ 4 ] 赵春草, 吴飞, 张继全, 等. 知母的药理作用研究进展[J]. *中国新药与临床杂志*, 2015, 34(12): 898-902.  
[ 5 ] Kim K M, Im A R, Kim S H, et al. Timosaponin A III inhibits melanoma cell migration by suppressing COX-2 and *in vivo* tumor metastasis [J]. *Cancer Sci*, 2016, 107(2): 181-188.  
[ 6 ] 莫丽, 方晴霞, 余陈欢, 等. 基于 miRNAs 的知母水提取物体外抑制胃癌细胞 SGC7901 增殖作用机制[J]. *中国现代应用药学*, 2018, 35(5): 678-683.  
[ 7 ] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.  
[ 8 ] Zhang D Y, Zhou S R, Liu B R. Identification and validation of an individualized EMT-related prognostic risk score formula in gastric adenocarcinoma patients [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020(2): 7082408.  
[ 9 ] 姜爽, 任艳平, 魏琳, 等. 人参皂苷 CK 对 MCF-7 细胞增殖、凋亡、上皮间质转化、PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. *中成药*, 2018, 40(9): 1925-1929.  
[ 10 ] 郭锰, 魏艳霞, 任佳伟, 等. 青蒿素联合顺铂对胃癌细胞增殖、凋亡及上皮间质转化的影响[J]. *中成药*, 2016, 38(2): 431-434.  
[ 11 ] 张文静, 邓文彬, 秦鑫. 转录因子调控 EMT 参与肿瘤侵袭和转移[J]. *基础医学与临床*, 2016, 36(2): 272-276.  
[ 12 ] 左志超, 邓文娟, 金观桥, 等. ELAM-1 靶向肿瘤转移的研究进展[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(2): 143-146.