

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2020.13.014

黄芪配伍莪术对小鼠结肠癌细胞 CT26 黏附和迁移能力的影响

吴幸冬, 唐德才*

南京中医药大学, 江苏省南京市栖霞区仙林大道 138 号, 210000

摘要 目的 探讨黄芪配伍莪术在体外对小鼠结肠癌细胞 CT26 黏附和迁移能力的影响及作用机制。方法 体外培养 CT26 细胞, 设对照组, 分别以 0.00625、0.0125、0.025、0.05、0.1、0.2 g/ml 的黄芪、莪术药物浓度处理 24 h 和 48 h 后, 采用 CCK-8 法检测黄芪配伍莪术对 CT26 细胞存活率的影响以选择合适的给药浓度。采用划痕实验检测黄芪配伍莪术对 CT26 细胞迁移能力的影响, 采用细胞黏附实验检测黄芪配伍莪术对 CT26 细胞与细胞及与细胞外基质间黏附能力的影响。药物处理 24 h 后采用 Western blot 法和 RT-PCR 法检测 CT26 细胞中黏附相关因子 E-钙黏蛋白 (E-cadherin)、抗癌 1 号蛋白 (KAI1)、抑癌基因张力蛋白同源 10 号染色体缺失的磷酸酶基因 (PTEN)、基质蛋白酶诱导因子 (CD147)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 的蛋白和 mRNA 表达。结果 选择 0.0125、0.025、0.05 g/ml 浓度进行后续实验。与对照组比较, 24 h 时黄芪配伍莪术组 0.025、0.05 g/ml 浓度及 48 h 时 0.0125、0.025、0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞的迁移率均明显降低; 与黄芪配伍莪术组 0.0125 g/ml 浓度比较, 24、48 h 0.025、0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞迁移率均明显降低; 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, 24、48 h 0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞迁移率均明显降低; 除黄芪配伍莪术组 0.05 g/ml 浓度外, 各组 48 h CT26 细胞迁移率较本组 24 h 均明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组比较, 黄芪配伍莪术组 0.0125、0.025、0.05 g/ml 浓度与细胞外基质黏附率均明显下降; 与黄芪配伍莪术组 0.0125 g/ml 浓度比较, 0.025、0.05 g/ml 浓度与细胞黏附率明显升高, 0.05 g/ml 浓度与细胞外基质黏附率明显下降; 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, 0.05 g/ml 浓度与细胞黏附率明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与对照组比较, 黄芪配伍莪术组 0.025、0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞的 E-cadherin、KAI1、PTEN 蛋白及 mRNA 表达水平显著升高, CD147 蛋白表达显著降低; 与黄芪配伍莪术组 0.0125 g/ml 浓度比较, 0.025 g/ml 浓度 E-cadherin 蛋白及 mRNA 表达明显升高, 0.05 g/ml 浓度 E-cadherin、KAI1、PTEN 蛋白及 mRNA 表达显著升高, CD147 蛋白及 mRNA 表达下降; 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, 0.05 g/ml 浓度的 KAI1、PTEN 蛋白及 mRNA 表达明显升高, CD147 蛋白及 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 黄芪配伍莪术可以增强 CT26 细胞间黏附, 减弱与细胞外基质黏附能力, 并抑制其迁移能力, 其作用机制可能与促进同源性黏附相关因子 E-cadherin、PTEN、KAI1 表达, 抑制异源性黏附相关因子 CD147、MMP-9、HIF-1 α 表达有关。

关键词 结肠癌; 黄芪; 莪术; CT26 细胞; 细胞黏附; 细胞迁移

肿瘤转移是导致癌症患者死亡的主要原因之一, 被认为是一个具有高度复杂性的多步骤过程, 这一过程中最突出的特点之一是肿瘤细胞黏附性能的改变^[1]。细胞间黏附和细胞-细胞外基质黏附在肿瘤的发展过程中起着重要的作用, 两者中的任何一种变化都直接影响到肿瘤的整体侵袭模式^[2]。

益气活血法是中医治疗肿瘤的重要方法, 而黄芪与莪术作为补气药与活血药的代表药物, 临床常配伍应用于肿瘤的治疗^[3]。近年来研究表明, 黄芪、莪术中的有效成分对肿瘤细胞的黏附具有显著调节作用^[4-7], 两药配伍还可通过促进肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖分化等多表型干预模式产生抗肿瘤活性^[8]。本研究使用黄芪、莪术水煎液进行体外实验, 观察两药配伍对 CT26 细胞间黏附、

基金项目: 国家自然科学基金 (81873021)

* 通讯作者: talknow@163.com

细胞与细胞外基质黏附及迁移能力的影响,以进一步探究其抗肿瘤机制。

1 材料

1.1 细胞株

小鼠结肠癌细胞株 CT26,购于北京市肿瘤防治研究所。

1.2 药物与试剂

黄芪采用豆科植物蒙古黄芪 [*Radix Astragali* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge) Hsiao] 的干燥根,莪术采用温郁金 (*Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling) 的干燥根茎。黄芪、莪术饮片购自江苏省中医院中药房,经南京中医药大学药学院刘训红教授鉴定。黄芪配伍莪术药液制备:根据我们临床用药经验和本课题组前期实验^[8]结果,黄芪、莪术不同配伍比例的抑制作用存在差异,最佳配伍比例为 2:1。取黄芪 400 g、莪术 200 g,加水浸泡 0.5 h,加 5 倍量水提取 2 次,每次 1 h,合并滤液,浓缩至 600 ml,得到浓度为 1 g/ml 的黄芪、莪术配伍药液。将浓缩液于低温高速离心机 4℃、5000 r/min 离心(离心半径 8.6 cm) 10 min 后取上清液,用孔径 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,分装保存于 -20℃。实验时用培养液稀释使用。

RPMI-1640 培养基(货号 SH30809.01)、PBS 缓冲液(货号 SH30256.01),均为 Hyclone 公司产品;胎牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司,货号 1012-8611);增强型 CCK-8 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,货号 C0042);matri-gel 基质胶(BD 公司,货号 356234);E-钙黏蛋白(E-cadherin,货号 ab11512)、抗癌 1 号蛋白(KAI1,货号 ab170941)、抑癌基因张力蛋白同源 10 号染色体缺失的磷酸酶基因(PTEN,货号 ab66400)、基质蛋白酶诱导因子(CD147,货号 ab188190)、缺氧诱导因子 1α(HIF-1α,货号 ab179483)、基质金属蛋白酶 9(MMP-9,货号 ab38898) 抗体,均为 Abcam 公司产品;0.25% 胰蛋白酶(货号 T1320)、放射免疫沉淀法(RIPA)组织细胞快速裂解液(货号 R0020)、Tris-HCl 电泳缓冲液(pH=8.8,货号 T1010)、Tris-HCl 电泳缓冲液(pH=6.8,货号 T1020)、10% 十二烷基硫酸钠(SDS,货号 S1010)、10% 过硫酸铵(货号 A1030)、四甲基乙二胺(TEMED,货号 T8090)、蛋白上样缓冲液(货号 P1015)、脱脂奶粉(货号 D8340)、吐温-20(货号 T8220),均为

北京索莱宝科技有限公司产品;BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo 公司,货号 PICPI23223);蛋白预染 Marker(Fermentas 公司,货号 SM1811);NC 膜(货号 HATF00010)、发光液(货号 WBKLS0100),均为 Millipore 公司产品;SYBR Green PCR 试剂盒(Thermo 公司,货号 K0223);逆转录试剂盒(Fermentas 公司,货号 K1622);无水乙醇(货号 100092680)、氯仿(货号 10023419)、异丙醇(货号 80109218),均为国药集团产品;Trizol(Invitrogen 公司,货号 1596-026)。

1.3 仪器

CO₂ 培养箱(Panasonic 公司,型号 MCO-20AIC);超净工作台(苏州净化设备有限公司,型号 SW-CJ-4F);倒置显微镜(Nikon 公司,型号 TS100);酶标仪(芬兰雷勃公司,型号 MK3);电泳仪(Bio-Rad 公司,型号 mini protean 3 cell);电转仪(HOEFER 公司,型号 TE77XP);水浴锅(Leica 公司,型号 HI1210);成像系统(上海天能科技有限公司,型号 Tanon-5200);Real-time 检测仪(ABI 公司,型号 ABI-7300);低温冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司,型号 TG-16M);旋涡振荡器(青浦沪西仪器厂,型号 K30)。

2 方法

2.1 细胞培养

复苏 CT26 细胞,置于含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。次日换液,第 3 天细胞进入对数生长期,传代 1 次。

2.2 CCK-8 法检测黄芪配伍莪术对 CT26 细胞存活率的影响

将处于生长对数期的 CT26 细胞用胰酶消化,制成细胞悬液后,利用血球计数板进行计数并调整细胞浓度,将稀释后的细胞悬液接种到 96 孔板中,每孔 100 μl 细胞悬液,每孔细胞数量控制在 2000~5000 个,四周孔中不加细胞,加入 100 μl PBS 缓冲液以减少液体挥发,于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。第 2 天待细胞贴壁后,弃去旧培养基,加入含有黄芪、莪术药物的培养基,设黄芪、莪术不同浓度(0.2、0.1、0.05、0.025、0.0125、0.00625 g/ml)组(黄芪配伍莪术),对照组(不含药物,只含细胞和培养基),空白组(只含培养基,不含细胞和药物),每组设 6 个复孔(24 h 和 48 h 各用 3 个)。

置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 和 48 h 后, 取出 96 孔板, 各孔分别加入 10 μl 增强型 CCK-8 试剂, 放入培养箱中培养 45 min 后取出, 使用酶标仪在 450 nm 波长处检测吸光度, 计算 CT26 细胞存活率。细胞存活率 = (给药组吸光度 - 空白组吸光度) / (对照组吸光度 - 空白组吸光度) × 100%

2.3 划痕实验检测黄芪配伍莪术对 CT26 细胞迁移能力的影响

取处于对数生长期的 CT26 细胞用胰酶消化, 制成细胞悬液后接种于 6 孔板, 每孔控制细胞数量 1.0×10^5 个, 使用完全培养基, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 掌握为过夜能铺满板底。第 2 天用 200 μl 枪头垂直于细胞表面由孔一端划向另一端, 弃去旧培养基, 用 PBS 缓冲液洗细胞表面 2 次, 去除划下细胞。加入 2 ml 含有低浓度胎牛血清的培养基为对照组, 根据 2.2 细胞存活结果选取合适的药物浓度, 分别设置含不同浓度药物胎牛血清培养基为不同浓度黄芪配伍莪术组, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。分别取 3 个划痕观察点, 在 0、24、48 h 后观察不同处理组的划痕横道宽度, 并用显微镜拍照记录, 计算迁移率。迁移率 = (0 h 划痕面积 - 24 h 或 48 h 划痕面积) / 0 h 划痕面积 × 100%。

2.4 细胞-细胞间黏附实验观察细胞同源性黏附率

先将 CT26 细胞于 6 孔板培养, 使用含 10% 胎牛血清的培养基, 于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养过夜。待细胞长满单层, 以板底不留空隙为标准, 作为靶细胞, 这样可以避免待测细胞与板底的黏附。将空白对照细胞和含有根据 2.2 细胞存活结果选取的合适的黄芪、莪术浓度处理 24 h 后的细胞 (在培养瓶中培养) 制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 1.0×10^5 个/ml, 作为待测细胞。然后将 1 ml 待测细胞悬液加入到靶细胞上, 每组设 3 个复孔, 在水平摇床上缓慢摇动 10 min, 放入培养箱中培养 30 min, 使靶细胞与待测细胞充分接触、黏附, 吸出上清液 (含有未黏附的细胞), 用 1 ml PBS 缓冲液轻轻洗涤 2 次, 去除附着而未真正黏附的细胞, 然后计算上清液及洗涤液中细胞数量, 即为未黏附细胞数。黏附率 = (待测细胞总数 - 未黏附细胞数) / 待测细胞总数 × 100%。

2.5 细胞-细胞外基质黏附实验观察细胞与细胞外基质的黏附率

先用 Matrigel 包被 96 孔板, 在 37℃ 培养箱中

温育 1~2 h, 待成胶后弃上清, 加入 2% BSA 封板 1 h, 避免非特异性黏附, 以无钙镁 PBS 缓冲液洗涤 2 次备用。将空白对照细胞和含有根据 2.2 细胞存活结果选取的合适的黄芪、莪术浓度处理 24 h 后的细胞制成细胞悬液, 调整细胞浓度为 5.0×10^5 个/ml, 作为待测细胞。然后将待测细胞悬液 100 μl 加入到靶基质上, 每组设 3 个复孔, 在水平摇床上缓慢摇动 10 min, 放入培养箱中培养 1 h, 使靶基质与待测细胞充分接触、黏附, 吸出上清液 (含有未黏附的细胞), 用 20 μl PBS 缓冲液轻轻洗涤 2 次, 去除附着而未真正黏附的细胞, 每孔加入含有 10% CCK-8 试剂的培养基 100 μl, 用酶标仪检测各孔吸光度。黏附率 = 给药组吸光度 / 对照组吸光度 × 100%。

2.6 Western blot 法检测细胞 E-cadherin、KAI1、PTEN、CD147、HIF-1α、MMP-9 蛋白表达

用 6 孔板于 37℃ 培养箱中培养 CT26 细胞, 在对数生长期时弃去旧培养基, 分别使用正常培养基和根据 2.2 细胞存活结果选取的合适的黄芪、莪术浓度含药培养基进行培养, 每组设 3 个复孔。置于培养箱 24 h 后, 用胰酶蛋白消化并于离心机中常温、5000 r/min (离心半径 13.5 cm) 离心 5 min, 得到细胞沉淀, 提取各组细胞总蛋白后, 用 BCA 法测定蛋白浓度。每孔上样 15 μg 蛋白后, 将配制好的 PAGE 胶放入电泳槽中, 加入适量电泳缓冲液。电泳浓缩胶 80 V 20 min, 分离胶 120 V 60 min 后进行半干式转膜, 半干式的电转缓冲液为: 48 mmol/L Tris, 39 mmol/L glycine, 0.04% SDS, 20% 甲醇。25 V 转膜 30 min 后将蛋白转移至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h 后, 加入一抗 4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 再按照 1 : 1000 稀释 HRP 标记的二抗, 与膜 37℃ 孵育 1 h, 用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。利用 ECL 化学发光检测法显影拍照。以 β-actin 作为内参, 分别计算 E-cadherin、KAI1、PTEN、CD147、HIF-1α、MMP-9 与内参的比值, 并进行半定量分析, 实验重复 3 次。

2.7 RT-PCR 法检测细胞 E-cadherin、KAI1、PTEN、CD147、HIF-1α、MMP-9 mRNA 表达

细胞分组同 2.6, 收集给药 24 h 后的各组细胞, 按照 SYBR Green PCR 试剂盒说明书提取细胞总 RNA、逆转录和 Real-time PCR 扩增。引物由南京巴斯菲生物科技有限公司合成, 引物序列见表 1。扩增反应程序: 95℃, 10 min 预变性; 95℃, 15 s 变性; 55℃, 45 s 复性和延伸, 40 个循环;

95 ℃, 15 s; 60 ℃, 1 min; 95 ℃, 15 s; 60 ℃, 15 s; 每个样本设 3 个复孔。数据采用仪器自带软件 ABI Prism 7300 SDS Software 1.4 分析。

表 1 E-cadherin、KAI1、CD147、PTEN、HIF-1 α 、MMP-9 引物序列

引物	序列	长度 (bp)
E-cadherin	上游 5' GTGAAGGCTTGAGCACAAC 3'	101
	下游 5' AGGCACTTGACCCTGATAC 3'	
KAI1	上游 5' ATCGCACAGGTGACCGTAG 3'	111
	下游 5' GGTGGCATTGGCAGTGTAG 3'	
CD147	上游 5' CCCAACCCAAGTGAAGAC 3'	178
	下游 5' CAGGGCTGTACTGACAAC 3'	
PTEN	上游 5' GTCTGAAGATAGCCCTAACC 3'	120
	下游 5' ACAAGTCCCGATGAAACC 3'	
HIF-1 α	上游 5' TCCAAGCCCTCCAAGTATG 3'	219
	下游 5' GTGCCACTGTATGCTGATG 3'	
MMP-9	上游 5' AGGGAGATGCCATTTCG 3'	203
	下游 5' GCCGTCCTTATCGTAGTCAG 3'	
β -actin (内参照)	上游 5' TGAGAGGGAAATCGTCGTGAC 3'	154
	下游 5' GAACCGCTCGTTGCCAATAGTG 3'	

注: E-cadherin, E-钙黏蛋白; KAI1, 抗癌 1 号蛋白; CD147, 基质蛋白酶诱导因子; PTEN, 抑癌基因张力蛋白同源 10 号染色体缺失的磷酸酶基因; HIF-1 α , 缺氧诱导因子-1 α ; MMP-9, 基质金属蛋白酶 9

2.8 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析, 划痕面积采用 Image J 1.58 软件计算, 所有数据均采用($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 SNK- q 法, 24 h 与 48 h 的同组间比较采用重复测量方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组 CT26 细胞不同时间存活率比较

表 2 示, 24 h 时, 与对照组比较, 黄芪配伍莪术组 0.05、0.1、0.2 g/ml 浓度细胞存活率明显降低 ($P < 0.01$)。48 h 时, 与对照组比较, 黄芪配伍莪术组各浓度细胞存活率均显著降低 ($P < 0.01$)。与本组 24 h 比较, 48 h 时黄芪配伍莪术组各浓度 CT26 细胞存活率均明显降低 ($P < 0.01$)。考虑到黄芪配伍莪术组 0.00625 g/ml 药物浓度过低, 黄芪配伍莪术组 0.05 g/ml 浓度细胞存活率较高, 黄芪配伍莪术组 0.1、0.2 g/ml 浓度药物对细胞的杀伤程度过大, 故选择 0.0125、0.025、0.05 g/ml 3 个浓度进行后续实验, 以降低黄芪配伍莪术对 CT26 细胞增殖的影响。考虑到给药 48 h 后, 药物对细胞的杀伤作用过大, 对黏附实验的结果影响较大, 故后续黏附实验只选择给药 24 h。

表 2 各组 CT26 细胞不同时间存活率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (g/ml)	孔数	24 h	48 h
对照组	—	3	100	100
黄芪配伍莪术组	0.00625	3	92.81 $\pm$ 7.87	62.35 $\pm$ 3.70 ^{*Δ}
	0.0125	3	92.63 $\pm$ 7.91	58.30 $\pm$ 2.80 ^{*Δ}
	0.025	3	93.06 $\pm$ 3.12	40.72 $\pm$ 0.58 ^{*Δ}
	0.05	3	61.82 $\pm$ 4.08 [*]	35.52 $\pm$ 5.96 ^{*Δ}
	0.1	3	22.02 $\pm$ 2.11 [*]	25.08 $\pm$ 1.65 ^{*Δ}
	0.2	3	25.04 $\pm$ 1.69 [*]	21.41 $\pm$ 1.30 ^{*Δ}

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, $\Delta P < 0.01$

3.2 各组 CT26 细胞不同时间迁移率比较

表 3 示, 与对照组比较, 黄芪配伍莪术组 24 h 时 0.025、0.05 g/ml 浓度及 48 h 时 0.0125、0.025、0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞的迁移率均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与黄芪配伍莪术组 0.0125 g/ml 浓度比较, 24 h 和 48 h 0.025、0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞迁移率均明显降低 ($P < 0.01$); 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, 24 h 和 48 h 0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞迁移率均明显降低 ($P < 0.01$)。除 0.05 g/ml 浓度外, 各组 48 h CT26 细胞迁移率较本组 24 h 均明显增加 ($P < 0.01$)。

表 3 各组 CT26 细胞不同时间迁移率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (g/ml)	孔数	24 h	48 h
对照组	—	3	41.21 $\pm$ 7.57	53.53 $\pm$ 8.15 [#]
黄芪配伍莪术组	0.0125	3	35.05 $\pm$ 4.90	43.15 $\pm$ 2.48 ^{*$\#$}
	0.025	3	19.29 $\pm$ 4.87 ^{**Δ}	26.12 $\pm$ 0.97 ^{**Δ}
	0.05	3	5.93 $\pm$ 2.55 ^{**Δ}	5.54 $\pm$ 1.79 ^{**Δ}

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与黄芪配伍莪术组 0.0125 g/ml 浓度比较, $\Delta P < 0.01$; 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, $\Delta P < 0.01$; 与本组 24 h 比较, $\# P < 0.01$

3.3 各组 CT26 细胞与细胞及细胞外基质黏附能力比较

表 4 示, 与对照组比较, 黄芪配伍莪术组 0.0125、0.025、0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞与细胞黏附率明显升高, 与细胞外基质黏附率均明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与黄芪配伍莪术组

表 4 各组 CT26 细胞与细胞及细胞外基质黏附率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (g/ml)	孔数	与细胞黏附率	与细胞外基质黏附率
对照组	—	3	75.21 $\pm$ 4.05	100
黄芪配伍莪术组	0.0125	3	81.31 $\pm$ 1.68 [*]	58.50 $\pm$ 13.44 ^{**}
	0.025	3	86.18 $\pm$ 2.72 ^{**Δ}	45.04 $\pm$ 10.73 ^{**}
	0.05	3	91.50 $\pm$ 3.12 ^{**Δ}	27.40 $\pm$ 6.25 ^{**Δ}

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与黄芪配伍莪术组 0.0125 g/ml 浓度比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$; 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, $\Delta P < 0.05$

0.0125 g/ml 浓度比较, 0.025、0.05 g/ml 浓度细胞与细胞黏附率明显升高, 0.05 g/ml 浓度细胞与细胞外基质黏附率明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, 0.05 g/ml 浓度细胞与细胞黏附率明显升高 ($P < 0.05$)。

3.4 各组 CT26 细胞 E-cadherin、KAI1、PTEN、CD147、HIF-1 α 、MMP-9 蛋白表达比较

表 5 示, 与对照组比较, 黄芪配伍莪术组 0.0125、0.025、0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞的 E-cadherin、KAI1、PTEN 蛋白表达水平显著升高, 0.025、0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞 CD147 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与黄芪配伍莪术组 0.0125 g/ml 浓度比较, 0.025 g/ml 浓度 E-cadherin 蛋白表达明显升高, 0.05 g/ml 浓度 E-cadherin、KAI1、PTEN 蛋白表达显著升高, CD147 蛋白表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, 0.05 g/ml 浓度 E-cadherin、KAI1、PTEN 蛋白表达明显升高, CD147 蛋白表达下降 ($P < 0.05$)。

3.5 各组 CT26 细胞 E-cadherin、KAI1、PTEN、CD147、HIF-1 α 、MMP-9 mRNA 表达比较

表 6 示, 与对照组比较, 黄芪配伍莪术组

0.0125、0.025、0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞的 E-cadherin、KAI1 的 mRNA 表达均明显升高, CD147、MMP-9 的 mRNA 表达均明显降低, 0.025、0.05 g/ml 浓度 CT26 细胞的 PTEN 的 mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与黄芪配伍莪术组 0.0125 g/ml 浓度比较, 0.025 g/ml 浓度 E-cadherin、KAI1、PTEN 的 mRNA 表达均明显上升, CD147、HIF-1 α 的 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 0.05 g/ml 浓度 E-cadherin、KAI1、PTEN 的 mRNA 表达上升, CD147、HIF-1 α 、MMP-9 的 mRNA 表达下降 ($P < 0.01$); 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, 0.05 g/ml 浓度 E-cadherin、KAI1、PTEN 的 mRNA 表达明显上升, CD147、HIF-1 α 、MMP-9 的 mRNA 表达明显下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

4 讨论

肿瘤细胞从原发灶脱落后游离是肿瘤侵袭、转移的第一步, 同质性黏附能力的缺失则是肿瘤细胞从母体脱落的主要原因; 肿瘤细胞对细胞外基质黏附并对其侵袭是肿瘤细胞迁移与转移的关键, 肿瘤细胞间的黏附能力下降, 与细胞外基质的黏附能力上升, 则会促使肿瘤细胞离开原发部位^[4]。

表 5 各组 CT26 细胞 E-cadherin、KAI1、PTEN、CD147、HIF-1 α 、MMP-9 蛋白表达比较 (/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (g/ml)	孔数	E-cadherin	KAI1	PTEN	CD147	HIF-1 α	MMP-9
对照组	—	3	0.47 $\pm$ 0.05	0.25 $\pm$ 0.01	0.19 $\pm$ 0.02	0.67 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0.31	0.81 $\pm$ 0.19
黄芪配伍莪术组	0.0125	3	0.63 $\pm$ 0.05**	0.39 $\pm$ 0.06*	0.34 $\pm$ 0.03**	0.58 $\pm$ 0.07	0.81 $\pm$ 0.24	0.74 $\pm$ 0.17
	0.025	3	0.79 $\pm$ 0.05** $\Delta\Delta$	0.46 $\pm$ 0.02**	0.41 $\pm$ 0.03**	0.50 $\pm$ 0.07*	0.71 $\pm$ 0.18	0.68 $\pm$ 0.09
	0.05	3	0.89 $\pm$ 0.04** $\Delta\Delta\Delta$	0.57 $\pm$ 0.09** $\Delta\Delta\Delta$	0.50 $\pm$ 0.08** $\Delta\Delta\Delta$	0.35 $\pm$ 0.03** $\Delta\Delta\Delta$	0.45 $\pm$ 0.08	0.51 $\pm$ 0.13

注: E-cadherin, E-钙黏蛋白; KAI1, 抗癌 1 号蛋白; PTEN, 抑癌基因张力蛋白同源 10 号染色体缺失的磷酸酶基因; CD147, 基质金属蛋白酶诱导因子; HIF-1 α , 缺氧诱导因子 1 α ; MMP-9, 基质金属蛋白酶 9; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与黄芪配伍莪术组 0.0125 g/ml 浓度比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, $\Delta\Delta P < 0.05$ 。

表 6 各组 CT26 细胞 E-cadherin、KAI1、PTEN、CD147、HIF-1 α 、MMP-9 mRNA 表达比较 (/ β -actin, $\bar{x} \pm s$)

组别	浓度 (g/ml)	孔数	E-cadherin	KAI1	PTEN
对照组	—	3	0.018 $\pm$ 0.002	0.070 $\pm$ 0.010	0.094 $\pm$ 0.015
黄芪配伍莪术组	0.0125	3	0.028 $\pm$ 0.004*	0.136 $\pm$ 0.013**	0.148 $\pm$ 0.028
	0.025	3	0.036 $\pm$ 0.004** Δ	0.180 $\pm$ 0.023** Δ	0.275 $\pm$ 0.036** $\Delta\Delta$
	0.05	3	0.042 $\pm$ 0.006** $\Delta\Delta\Delta$	0.268 $\pm$ 0.022** $\Delta\Delta\Delta$	0.385 $\pm$ 0.051** $\Delta\Delta\Delta$
组别	浓度 (g/ml)	孔数	CD147	HIF-1 α	MMP-9
对照组	—	3	0.329 $\pm$ 0.026	0.102 $\pm$ 0.015	0.086 $\pm$ 0.006
黄芪配伍莪术组	0.0125	3	0.252 $\pm$ 0.024**	0.076 $\pm$ 0.012**	0.064 $\pm$ 0.007**
	0.025	3	0.173 $\pm$ 0.022** $\Delta\Delta$	0.053 $\pm$ 0.009** Δ	0.051 $\pm$ 0.008**
	0.05	3	0.113 $\pm$ 0.009** $\Delta\Delta\Delta$	0.032 $\pm$ 0.007** $\Delta\Delta\Delta$	0.031 $\pm$ 0.005** $\Delta\Delta\Delta$

注: E-cadherin, E-钙黏蛋白; KAI1, 抗癌 1 号蛋白; PTEN, 抑癌基因张力蛋白同源 10 号染色体缺失的磷酸酶基因; CD147, 基质金属蛋白酶诱导因子; HIF-1 α , 缺氧诱导因子 1 α ; MMP-9, 基质金属蛋白酶 9; 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与黄芪配伍莪术组 0.0125 g/ml 浓度比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$; 与黄芪配伍莪术组 0.025 g/ml 浓度比较, $\Delta\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.01$ 。

从划痕实验结果可以看出, 黄芪配伍莪术组 CT26 细胞迁移率较对照组明显减弱, 且随着浓度的递增迁移率也呈现降低趋势, 提示黄芪配伍莪术能够降低 CT26 细胞的迁移能力, 且存在浓度依赖性。在黏附实验中, 各给药组的细胞间黏附能力较对照组有所增加, 与细胞外基质的黏附能力均减弱, 且随着药物浓度的增加, 相应的细胞间的黏附率也显著上升, 提示该药对于细胞黏附功能的影响可能存在浓度依赖性。

E-cadherin 是一种 Ca^{2+} 依赖性黏附分子, Ca^{2+} 作为细胞与细胞表面负电荷连接的媒介, 其降低可减弱细胞间的黏附能力^[1]。研究发现, KAI1 能够增强结肠癌细胞非 Ca^{2+} 依赖的聚集性^[2]。PTEN 能够以 E-cadherin 依赖性方式诱导肿瘤细胞聚集, 促进细胞间的黏附^[3]。HIF-1 α 可降低肿瘤细胞与细胞间的黏附能力^[4]。本实验结果显示, E-cadherin、KAI1、PTEN 的表达随着给药浓度的增加而上升, HIF-1 α 的表达随着给药浓度的增加而下降, 提示黄芪配伍莪术可增强 CT26 细胞 Ca^{2+} 及非 Ca^{2+} 依赖性的同质性黏附能力, 与细胞-细胞间黏附实验结果相符。另有研究发现, KAI1 可抑制整合素和细胞外基质分子的识别和黏附, 并抑制整合素介导的细胞外基质黏附^[5]; PTEN 可抑制局部粘着斑激酶磷酸化, 从而抑制整合素介导的细胞外基质黏附^[6]; CD147 还可与整合素形成复合物, 进而促进肿瘤细胞与基质的黏附^[7]。本研究结果显示, 随着药物浓度的上升, KAI1、PTEN 表达上升, CD147 表达下降, 提示黄芪配伍莪术可能影响整合素介导的黏附功能, 从而降低细胞与细胞外基质的黏附能力。研究证实, PTEN 还可在多种水平上调调控基质金属蛋白酶 (MMPs)^[8], 从而减弱细胞与细胞外基质黏附; 黏附分子 CD147 可诱导产生 MMPs 的释放, 进而降解细胞外基质和基底膜^[9]; MMP-9 是分子量最大的 MMPs, 能够降解和破坏肿瘤表面的细胞外基质和基底膜^[10]; HIF-1 α 导致的缺氧条件下, 细胞外基质也会发生降解, 增强细胞外基质的黏附与浸润^[11]。本实验结果显示, 随着药物浓度的升高, PTEN 表达上调, CD147、MMP-9、HIF-1 α 表达下降, 说明黄芪配伍莪术能够调控 MMPs, 抑制细胞外基质的降解, 从而降低 CT26 细胞与细胞外基质的黏附能力, 与细胞-细胞外基质黏附实验结果相符。

综上, 黄芪配伍莪术能够抑制 CT26 细胞的迁移能力, 增强 CT26 细胞的细胞间黏附能力, 降低

与细胞外基质的黏附能力, 其潜在机制可能与调控黏附相关因子 E-cadherin、KAI1、PTEN、CD147、HIF-1 α 、MMP-9 的表达有关, 其更深层次的机理还有待更深入的研究挖掘。

本实验中存在部分不足, 如在 CCK-8 法和细胞-细胞外基质的黏附实验中, 向 96 孔板中加入试剂时未使用多通道移液器, 这样会增加平行孔间的误差; 在划痕实验中, 由于 48 h 时给药组的细胞存活率进一步下降, 故对迁移实验的结果存在一定的影响, 由此不能确定该药对于 CT26 细胞的迁移能力影响是否存在时间依赖性; 在细胞-细胞间黏附实验中, 靶细胞与待测细胞 30 min 的接触时间还有待调整, 有些细胞可能由于黏附不够充分, 在 PBS 洗涤时被冲掉, 增加了实验误差。

参考文献

- [1] MAKRIKILIA N, KOLLIAS A, MANOLOPOULOS L, et al. Cell adhesion molecules: role and clinical significance in cancer [J]. Cancer Invest, 2009, 27(10): 1023-1037.
- [2] SHUTTLEWORTH R, TRUCU D. Multiscale modelling of fibres dynamics and cell adhesion within moving boundary cancer invasion [J]. B Math Biol, 2019, 81(7): 2176-2219.
- [3] 许成勇. 窦永起教授治疗肿瘤学术思想总结及黄芪: 莪术配伍抗肿瘤血管生成机制研究 [D]. 北京: 中国人民解放军医学院, 2018.
- [4] 庞歆桥, 王婧, 姚婷, 等. 黄芪甲苷通过调节细胞自噬增强贝伐单抗在肺癌细胞系 A549 中抗肿瘤作用机制的研究 [J]. 临床与病理杂志, 2016, 36(3): 220-225.
- [5] 曾普华, 郜文辉, 潘敏求, 等. 益气化痰解毒方及拆方对人肝癌 HepG2 裸鼠移植瘤和 HIF1 α 、E-cad 表达的影响 [J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(9): 2004-2006.
- [6] 孙学然, 杨克, 吕玲玲, 等. 莪术二酮对乳腺癌 HCC1937 细胞迁移和侵袭的影响及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(3): 66-73.
- [7] 钱祥, 甄宏德, 李永峰, 等. 莪术石油醚提取物对三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 转移相关基因影响的体外研究 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2017, 27(6): 463-466.
- [8] 刘夫艳, 唐德才, 谭喜莹. 黄芪-莪术药对基于网络药理学的抗大肠癌分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(13): 176-185.
- [9] 谭喜莹. 基于趋化因子受体相关途径的黄芪-莪术配伍抗结肠癌肝转移机制研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [10] 廖子君, 雷光焰. 肿瘤转移学 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2007: 39-44.
- [11] BATCHULUUN K, AZUMA M, YASHIRO T, et al.

- Notch signaling-mediated cell-to-cell interaction is dependent on E-cadherin adhesion in adult rat anterior pituitary [J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 368(1): 125–133.
- [2] 邵晓冬, 郭晓钟. 转移抑制基因 KAI1 与恶性肿瘤的关系 [J]. *国外医学(肿瘤学分册)*, 2001, 28(3): 167–170.
- [3] STEWART AL, MHASHILKAR AM, YANG XH, et al. PI3K blockade by Ad-PTEN inhibits invasion and induces apoptosis in radial growth phase and metastatic melanoma cells [J]. *Mol Med*, 2002, 8(8): 451–461.
- [4] 秦承东, 任正刚, 汤钊猷. 缺氧微环境在肿瘤进展中的作用 [J]. *肿瘤*, 2016, 36(1): 96–102.
- [5] ODINTSOVA E, VAN NIEL G, CONJEAUD H, et al. Metastasis suppressor tetraspanin CD82/KAI1 regulates ubiquitylation of epidermal growth factor receptor [J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(36): 26323–26334.
- [6] 邹荣, 方向明. PTEN 在消化系统恶性肿瘤中的研究进展 [J]. *疑难病杂志*, 2017, 16(3): 107–110.
- [7] 琚玲丽, 刘惠宁. CD147 与肿瘤侵袭转移关系的研究进展 [J]. *西南国防医药*, 2011, 21(4): 450–453.
- [8] 卢家美, 刘丹, 张苏梅, 等. PPAR- γ 通过活化 PTEN 抑制肾间质成纤维细胞 MMP2 的活化 [J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2018, 39(3): 386–391.
- [9] 买赛虎, 王浩. CD147 与 E-cadherin 在胆囊癌组织中的表达及其意义 [J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(2): 247–250.
- [10] 雒洪志, 黄宗海, 余元龙, 等. MMP-9 在结肠癌中的表达及其临床意义 [J]. *肿瘤学杂志*, 2009, 15(6): 552–555.

Effects of Compatibility of *Radix Astragali seu Hedysa* and *Rhizoma Curcumae* on Adhesion and Migration Ability of Colon Cancer Cell CT26 in Mice

WU Xingdong, TANG Decai

Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210000

ABSTRACT Objective To explore the effects and mechanism of *Radix Astragali seu Hedysa* and *Rhizoma Curcumae* synergy on the adhesion and migration ability of mouse colon cancer cells CT26 in vitro. **Methods** CT26 cells were cultured in vitro, and a blank control group was set up. After treatment with the concentrations of 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 g/ml of *Radix Astragali seu Hedysa* and *Rhizoma Curcumae* respectively for 24 hours and 48 hours, the CCK-8 method was used to detect the effects of *Radix Astragali seu Hedysa* and *Rhizoma Curcumae* on the survival rate of CT26 cells in order to select a suitable concentration for administration. The scratch test was used to detect the effects of the compatibility of *Radix Astragali seu Hedysa* and *Rhizoma Curcumae* synergy on CT26 cell migration, and the cell adhesion test was used to detect the effects of the compatibility of *Radix Astragali seu Hedysa* and *Rhizoma Curcumae* synergy on the adhesion between CT26 cells and cells and extracellular matrix. After 24 hours of drug treatment, Western blot and RT-PCR were used to detect the adhesion-related factors E-cadherin, anti-cancer protein NO. 1 (KAI1), tumor suppressor gene tension protein homologous NO. 10 chromosome-deleted phosphatase gene (PTEN), matrix proteinase-inducible factor (CD147), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) protein and mRNA expression in CT26 cells. **Results** The concentrations of 0.0125, 0.025 and 0.05 g/ml were selected for subsequent experiments. Compared with the blank control group, the migration rates of CT26 cells at 0.025, 0.05 g/ml concentration of *Radix Astragali seu Hedysa* and *Rhizoma Curcumae* group at 24 h and 0.0125, 0.025, 0.05 g/ml concentration at 48 hour were significantly reduced. The migration rate of CT26 cells at 0.025 and 0.05 g/ml concentrations at 24 hours and 48 hours was significantly reduced; the migration rate of CT26 cells at 0.05 g/ml concentration at 24 hours and 48 hours was significantly reduced compared to the concentration at 0.025 g/ml. Except for the 0.05 g/ml concentration, the migration rate of CT26 cells in all groups at 48 hour was significantly higher than that at 24 hour within group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the blank control group, at the concentration of 0.0125, 0.025, 0.05 g/ml, the adhesion rate of CT26 cell with extracellular matrix in the *Radix Astragali seu Hedysa* and *Rhizoma Curcumae* groups were significantly decreased; compared with the concentration of 0.0125 g/ml, the concentration of 0.025, 0.05 g/ml, the adhesion rate of CT26 cell with cells increased significantly, and the 0.05 g/ml concentration the extracellular matrix adhesion rate decreased significantly; compared with the 0.025 g/ml concentration, the 0.05 g/ml concentration cell adhesion rate

increased significantly ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared with the blank control group, the expression levels of E-cadherin, KAI1, PTEN protein and mRNA in CT26 cells of 0.025 and 0.05 g/ml concentration in *Radix Astragali seu Hedysa* and *Rhizoma Curcumae* group were significantly increased, and the expression of CD147 protein was significantly reduced; compared with the concentration of 0.0125 g/ml, under 0.025 g/ml concentration E-cadherin protein and mRNA expression increased significantly, under 0.05 g/ml concentration E-cadherin, KAI1, PTEN protein and mRNA expression increased significantly, CD147 protein and mRNA expression decreased; compared with 0.025 g/ml concentration, under 0.05 g/ml concentration KAI1, PTEN protein and mRNA expression increased significantly, CD147 protein and mRNA expression decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** The synergy of *Radix Astragali seu Hedysa* and *Rhizoma Curcumae* can enhance the adhesion between CT26 cells, weaken the adhesion ability with extracellular matrix, and inhibit its migration ability. The mechanism may be related to the promotion of the expression of homologous adhesion-related factors E-cadherin, PTEN, KAI1, and inhibition of heterologous adhesion-related factors CD147, MMP-9, and HIF-1 α .

Keywords colon cancer; *Radix Astragali seu Hedysa* ; *Rhizoma Curcumae*; CT26 cells; adhesion; migration

(收稿日期: 2019 - 09 - 15; 修回日期: 2020 - 03 - 02)

编辑: 王利芬