

健脾消癌方对结肠癌 HCT116 细胞迁移、侵袭的影响研究*

简小兰^{1,2}, 曾普华^{1,2}, 杜佳³, 何凤姣^{1,2}, 李克雄³, 蒋益兰^{1,2}

1. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006; 2. 中医肿瘤学湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410006;
3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

摘要:目的:研究健脾消癌方含药血清对 HCT116 细胞迁移、侵袭的影响,并初步探讨其机制。方法:10%、15%、20% 的健脾消癌方含药血清处理 HCT116 细胞,划痕实验、Transwell 侵袭实验检测细胞迁移及侵袭能力,Western blot 检测细胞内基质金属蛋白酶 2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 的表达。结果:处理 24 h、48 h,与相同浓度鼠血清对照组相比,10%、15%、20% 的含药血清组划痕距离均增宽($P < 0.05$, $P < 0.01$);与相同浓度鼠血清对照组相比,10%、15%、20% 的含药血清组的迁移抑制率及侵袭抑制率均明显增大($P < 0.05$),均与浓度正相关。与 15% 的鼠血清对照组比较,15% 的含药血清组 MMP-2、MMP-9 蛋白表达显著下调($P < 0.01$)。结论:健脾消癌方抗复发转移机制可能是通过下调 MMP-2、MMP-9 蛋白表达,从而抑制 HCT116 细胞迁移、侵袭。

关键词:健脾消癌方;结肠直肠癌;细胞迁移;侵袭;基质金属蛋白酶 2;基质金属蛋白酶 9

DOI:10.16368/j.issn.1674-8999.2021.01.029

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-8999(2021)01-0132-06

Effect of Jianpi Xiaoi Prescription on Migration and Invasion of Colorectal Cancer HCT116 Cells

JIAN Xiaolan^{1,2}, ZENG Puhua^{1,2}, DU Jia³, HE Fengjiao^{1,2}, LI Kexiong³, JIANG Yilan^{1,2}

1. The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha Hunan China 410006; 2. Hunan Key Laboratory of Chinese Medicine Oncology, Changsha Hunan China 410006; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha Hunan China 410208

Abstract: Objective: To study the effect of Jianpi Xiaoi Prescription drug containing serum on the migration and invasion of HCT116 cells, and to explore its mechanism. Methods: HCT116 cells were treated with 10%, 15% and 20% Jianpi Xiaoi Prescription drug containing serum. Cell migration and invasion were detected by scratch test and Transwell invasion test. The expression of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) were detected by Western blot. Results: After 24 h and 48 h treatment, the scratch distance of 10%, 15%, 20% drug containing serum group was wider than that of the control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$); compared with the control group, the migration inhibition rate and invasion inhibition rate of 10%, 15%, 20% drug containing serum group were significantly increased ($P < 0.05$), and were positively correlated with the concentration; compared with the control group, the expression of MMP-2 and MMP-9 in the 15% drug containing serum group was significantly decreased ($P < 0.01$). Conclusion: The anti recurrence and metastasis mechanism of Jianpi Xiaoi Prescription may be through down regulating the expression of MMP-2 and MMP-9, thus inhibiting the migration and invasion of HCT116 cells.

Key words: Jianpi Xiaoi Prescription; Colorectal cancer; cell migration; invasion; matrix metalloproteinase-2 (MMP-2); matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81904109);中央引导地方科技发展专项资金项目——抗肿瘤中药创新平台建设项目(2018CT5005);湖南省自然科学基金项目(2019JJ50344);湖南省中医药研究院重点项目(201802)

结直肠癌(Colorectal cancer)在全球的发病率及死亡率均处于第3位。近年来随着医疗技术的发展,在早期诊断方面有所进展,仍有1/3的患者在确诊时已发现转移^[1-2],5年总体生存率低于50%^[3]。引起结直肠癌患者死亡的主要原因——侵袭及转移^[4-5],积极探索复发转移机制并进行阻断是提高结直肠癌患者生存率的关键。大量的临床研究均显示中医药在结直肠癌的综合治疗中发挥重要作用^[6-8]。中医药具有抗肿瘤、抗复发转移、调节免疫力、提高生活质量、延长生存期等作用。多年的临证研究证实,健脾消癌方抗结直肠癌术后复发转移具有良好疗效^[9-12],但其机制尚未完全阐明。本研究从癌细胞迁移、侵袭力方面,运用血清药理学方法研究健脾消癌方对结肠癌细胞迁移及侵袭作用的影响,进一步探讨健脾消癌方抗复发转移疗效机制,为临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 动物和细胞株 SD大鼠购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,体质量(200±20)g,雌雄各半,合格证号:SYXK(湘)2015-008。人结肠癌细胞株HCT116购买于中国科学院细胞库,编号TCHu 99。

1.2 药物 健脾消癌方主要药物是人参10g,薏苡仁30g,重楼10g,半枝莲30g,郁金15g,莪术10g,从湖南省中医药研究院附属医院中药房购买。取上述2倍量药物,用水浸泡1h,水量超出药物3~5cm,大火煮沸后转小火煎30min,过滤,药渣按前法再煎煮2次,将3次药液混匀、过滤,减压浓缩为相当于生药1.5g·mL⁻¹,4℃保存,1周内用完。

1.3 试剂与仪器 胎牛血清(以色列Biological industries公司,批号:1616316);DMEM培养基(美国Hyclone公司,批号:NZD1131);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0012);RIPA裂解液(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0013b);结晶紫(上海碧云天生物技术有限公司,批号:C0121);MMP-2(美国Abcam公司,货号:ab92536);MMP-9(美国Abcam公司,货号:ab228402);β-actin(美国Abcam公司,货号:ab6276);山羊抗兔IgG(康为世纪生物科技有限公司,货号:01325);山羊抗小鼠IgG(康为世纪生物科技有限公司,货号:50237)。

细胞培养箱(美国Thermo公司);Hofer电泳(美国Hofer公司);凝胶成像系统(美国Syngene公司);EIX808U型全自动酶标仪(美国BioTek公司)。

2 方法

2.1 含药血清的制备 SD大鼠20只,雌雄各半,随机分成2组,每组10只。实验组按10.8g·kg⁻¹(相当于70kg成年人120g·d⁻¹的等效量)灌胃;对照组以等容积的生理盐水灌胃。每天灌胃1次,连续7d,第7天灌胃1h后,10%水合氯醛(0.3mL·100g⁻¹)腹腔麻醉,腹主动脉采血,血液4℃保存,24h内离心,收集合并同组动物血清,微孔滤膜(0.22μm)过滤除菌,保存于-20℃冰箱。

2.2 细胞培养 HCT116细胞培养于含10%胎牛血清、1%青链霉素的DMEM高糖培养液中,置于37℃,5%的CO₂细胞培养箱中培养。细胞长满培养皿底约90%时,进行细胞传代,更换培养液,传代比率为1:2或1:3。需要进行实验处理时,取汇合率为80%的对数期细胞。

2.3 细胞划痕实验 取对数生长期HCT116细胞,调整细胞密度为5×10⁵mL⁻¹,按每孔2mL接种于6孔板中,待细胞长满后,吸弃培养液,将一张事先画有直线的纸放于6孔板下,各直线间隔适中,用100μL枪头沿直线划痕,每孔3条,PBS沿壁轻轻冲洗细胞3遍,吸弃PBS,分别加入浓度为10%、15%、20%的含药血清培养液2mL,10%、15%、20%的鼠对照血清培养液2mL,及10%胎牛血清为阴性对照组,每组设置3个复孔,培养24h、48h后取出培养板,有脱落细胞影响观察则予以更换培养液,倒置显微镜(×50)任意选取5个不同视野拍照,测量划痕的距离。

2.4 Transwell检测细胞迁移、侵袭能力 侵袭实验选用Transwell小室(孔径8μm),首先制备含Matrigel胶的Transwell小室。取对数期生长HCT116细胞,调整细胞密度为5×10⁵mL⁻¹,接种于6孔板,分别以10%、15%、20%含药血清和10%、15%、20%鼠对照血清,10%胎牛血清处理细胞。24h后收集细胞,用DMEM高糖培养基重悬细胞均调整密度为2×10⁶mL⁻¹,分别取100μL各组细胞悬液加入Transwell小室上室,24孔板下室加入600μL含15%的胎牛血清(FBS)培养液。培养24h后,取出小室清洗,4%的多聚甲醇固定15min,晾干10min,0.1%结晶紫染色20min,PBS清洗3遍,33%的醋酸将Transwell膜上细胞洗涤下来,酶标仪570nm波长读取OD值,计算细胞迁移抑制率。迁移实验除不在小室铺胶外,其余步骤同侵袭实验。

迁移抑制率 = [(胎牛血清对照组平均吸光

值 - 实验组平均吸光值) / 胎牛血清对照组平均吸光值] × 100%

2.5 Western Blot 法检测基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase - 2, MMP - 2)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase - 9, MMP - 9) 蛋白的表达 以 15% 的有效浓度处理细胞, 15% 鼠血清对照组、10% 的 FBS 为阴性对照组, 干预 48 h, 收集细胞, 预冷 PBS 洗细胞 3 次, 加入含有 4 μL 的含 PMSF 的 RIPA 缓冲液 400 μL, 冰上裂解 30 min, 4 °C、12 000 g 离心 15 min, 取上清, BCA 试剂盒进行蛋白定量, 按照比例加入 SDS - PAGE 蛋白缓冲液, 煮沸 5 min, 立即分装, 置 -80 °C 备用。取 50 μg 蛋白上样, SDS - PAGE 凝胶电泳后转膜至 PVDF 膜, 封闭, 一抗室温孵育 4 h、二抗室温孵育 2 h, ECL 发光, 分别检测 MMP - 2、MMP - 9 蛋白的表达水平, β - actin 为内参。以 Image J 软件分析结果。

2.6 数据统计 统计分析采用 SPSS 19.0 软件, 计

量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾消癌方对细胞划痕的影响 健脾消癌方含药血清处理 24 h、48 h 后, 含药血清划痕距离宽于相同浓度空白血清组。处理 24 h, 与相同浓度鼠血清对照组相比, 10%、15%、20% 的含药血清组划痕距离均较明显增宽 ($P < 0.05$); 处理 48 h, 与相同浓度鼠血清对照组相比, 10%、15%、20% 的含药血清组划痕距离均较显著增宽 ($P < 0.01$), 且浓度越大划痕距离越大。同浓度含药血清, 对细胞迁移抑制能力 48 h 优于 24 h。说明健脾消癌方能够抑制 HCT116 细胞的迁移, 其抑制作用与浓度和时间呈正相关。见图 1、图 2、图 3, 表 1。

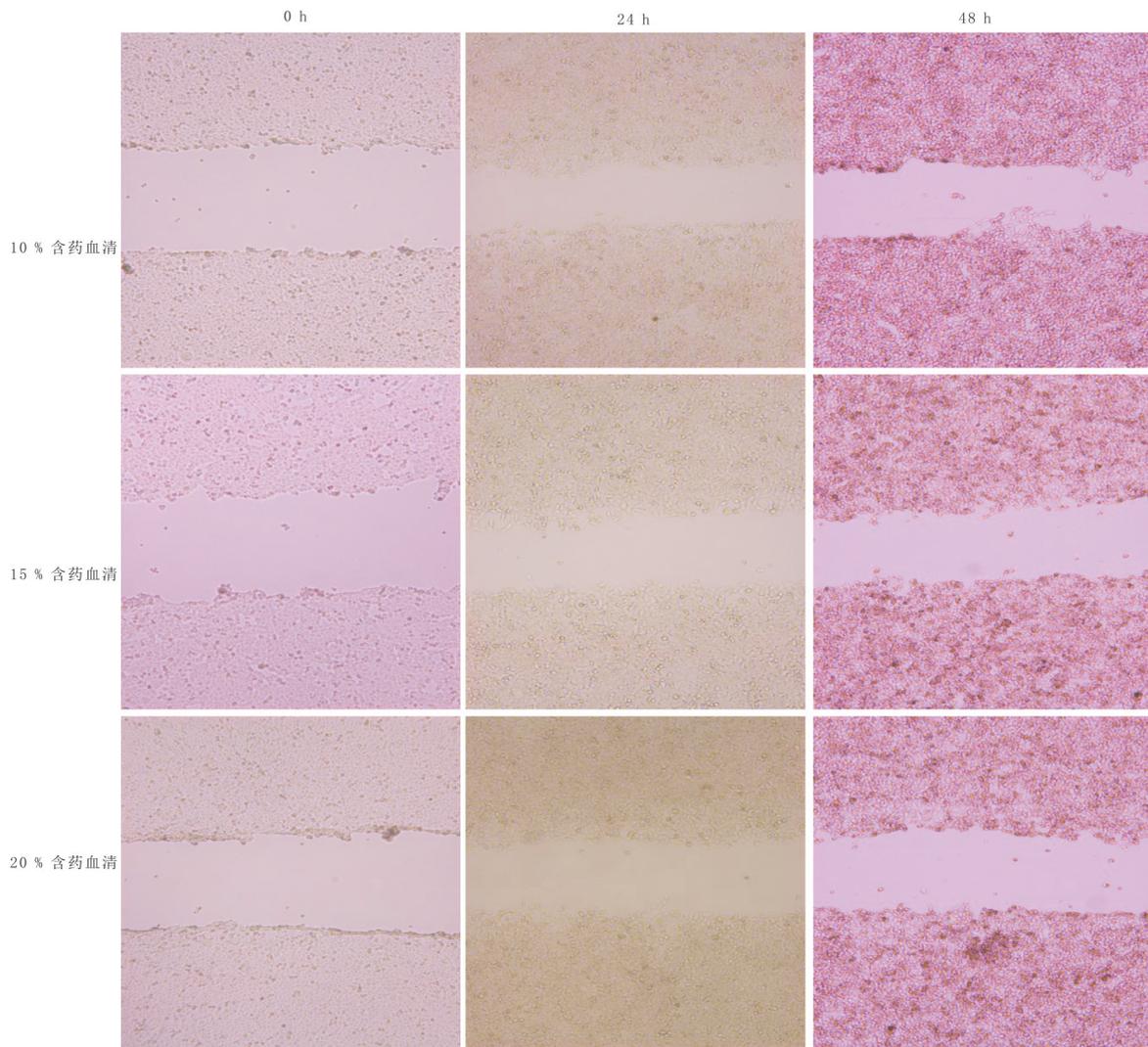


图 1 含药血清对 HCT116 细胞划痕距离的影响

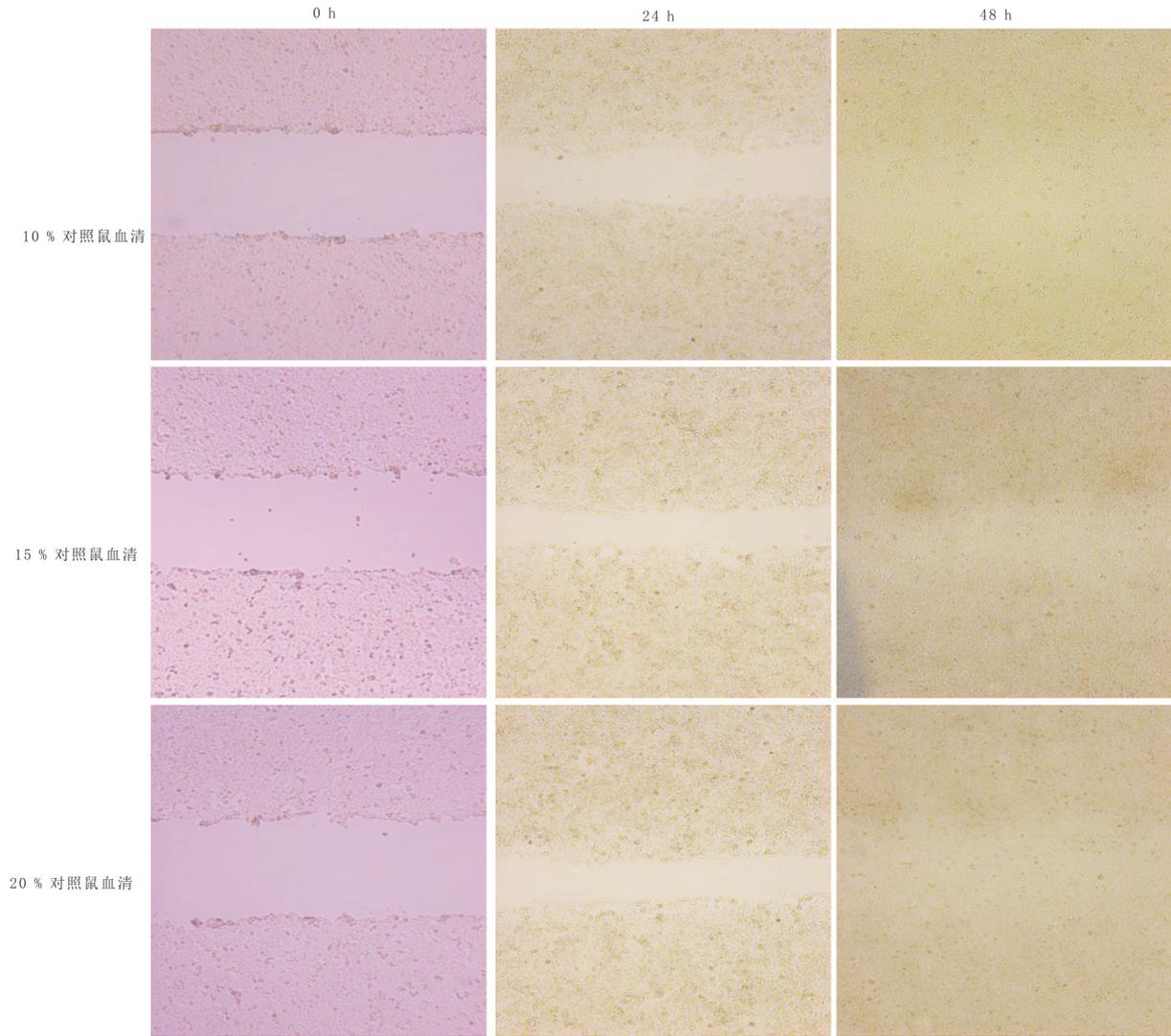


图2 对照鼠血清对 HCT116 细胞划痕距离的影响

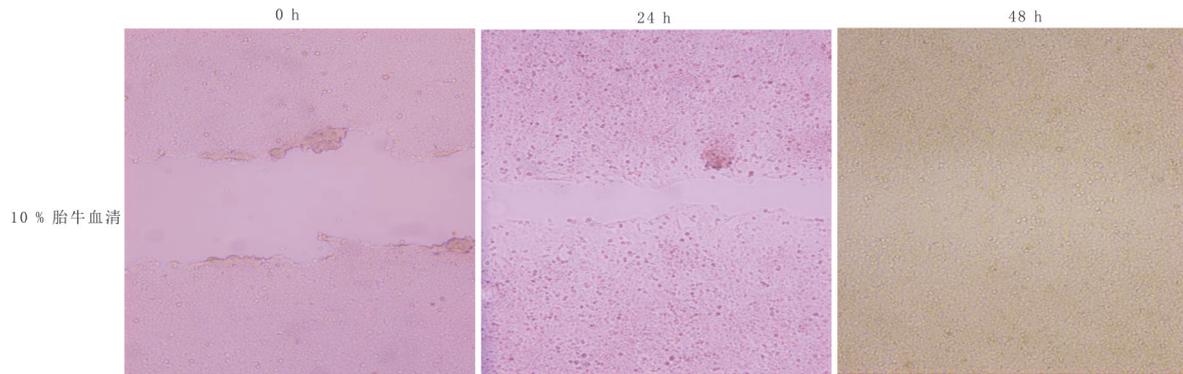


图3 胎牛血清对 HCT116 细胞划痕距离的影响

3.2 健脾消癌方对细胞迁移的影响 处理 24 h 后,与相同浓度鼠血清对照组相比,10%、15%、20% 的含药血清细胞迁移抑制率增大 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且随浓度增加迁移抑制率增大。说明健脾消癌方能够抑制 HCT116 细胞迁移,与浓度呈正相关。见表 2。

3.3 健脾消癌方对细胞侵袭的影响 处理 24 h 后,与相同浓度鼠血清对照组相比,10%、15%、20% 的含药血清细胞侵袭抑制率增加 ($P < 0.05$; $P < 0.01$),且随浓度增加侵袭抑制率增高。说明健脾消癌方能够抑制 HCT116 细胞侵袭,与浓度呈正相关。见表 3。

表1 含药血清对HCT116细胞迁移

组别	距离的影响 (n=3×5, $\bar{x} \pm s$)		
	0 h(L/cm)	24 h(L/cm)	48 h(L/cm)
10% 含药血清组	7.11 ± 0.24	4.47 ± 0.32 ^{*#}	5.10 ± 0.38 ^{△▲}
15% 含药血清组	6.98 ± 0.31	5.04 ± 0.45 ^{*#}	5.56 ± 0.51 ^{△▲}
20% 含药血清组	7.10 ± 0.25	5.12 ± 0.37 ^{*#}	6.03 ± 0.41 ^{△▲○}
10% 对照鼠血清组	7.22 ± 0.36	3.56 ± 0.39	0.55 ± 0.36 [*]
15% 对照鼠血清组	6.80 ± 0.34	3.20 ± 0.40	0.38 ± 0.30
20% 对照鼠血清组	6.86 ± 0.25	2.95 ± 0.31	0.15 ± 0.23
10% 胎牛血清组	7.04 ± 0.23	3.05 ± 0.34	0.10 ± 0.06

注:与胎牛血清组比较,*P<0.05,△P<0.01;与相同浓度对照组比较,#P<0.05,▲P<0.01;含药血清48 h与24 h比较,○P<0.05

表2 健脾消癌方含药血清对细胞

组别	迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	
	OD 值	迁移抑制率/%
10% 含药血清组	2.21 ± 0.15 [*]	21.9
15% 含药血清组	2.17 ± 0.23 ^{*#}	23.3
20% 含药血清组	1.39 ± 0.25 ^{△▲}	50.9
10% 对照鼠血清组	2.52 ± 0.26	10.9
15% 对照鼠血清组	2.60 ± 0.14	8.1
20% 对照鼠血清组	2.81 ± 0.20	0.7
10% 胎牛血清组	2.83 ± 0.18	/

注:与胎牛血清组比较,*P<0.05,△P<0.01;与相同浓度对照组比较,#P<0.05,▲P<0.01

表3 健脾消癌方含药血清对细胞

组别	侵袭的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	
	OD 值	侵袭抑制率/%
10% 含药血清组	0.79 ± 0.14 [*]	25.5
15% 含药血清组	0.66 ± 0.12 ^{△#}	37.7
20% 含药血清组	0.54 ± 0.15 ^{△▲}	49.1
10% 对照鼠血清组	0.94 ± 0.11	11.3
15% 对照鼠血清组	0.97 ± 0.13	8.5
20% 对照鼠血清组	1.02 ± 0.10	3.8
10% 胎牛血清组	1.06 ± 0.09	/

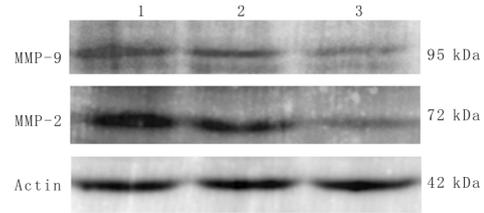
注:与胎牛血清组比较,*P<0.05,△P<0.01;与相同浓度对照组比较,#P<0.05,▲P<0.01

3.4 健脾消癌方对 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 与15%鼠血清对照组比较,15%的含药血清细胞的MMP-2、MMP-9蛋白表达显著下调(P<0.01)。说明健脾消癌方能够下调MMP-2、MMP-9蛋白表达。见表4,图4。

表4 MMP-2、MMP-9蛋白

组别	相对表达水平 ($\bar{x} \pm s, n=3$)	
	MMP-2/ β -actin	MMP-9/ β -actin
15% 含药血清组	0.58 ± 0.04 ^{△▲}	0.34 ± 0.02 ^{△▲}
15% 对照鼠血清组	1.06 ± 0.02	0.58 ± 0.03 [△]
10% 胎牛血清组	1.11 ± 0.03	0.72 ± 0.02

注:与胎牛血清组比较,△P<0.01;与相同浓度对照组比较,▲P<0.01



注:1:10%胎牛血清组,2:15%鼠血清对照组,3:15%含药血清组

图4 MMP-2、MMP-9蛋白表达水平

4 讨论

大肠癌属于中医学“肠覃”“肠癖”“脏毒”“癥瘕”“锁肛痔”等范畴。我院肿瘤中心长期从事中医药抗结直肠癌复发转移临床及基础研究,总结结肠癌基本病机为“脾虚、瘀积、癌毒”,当以健脾益气,化瘀解毒为治疗法则。拟定健脾消癌方,主要药物组成有人参、薏苡仁健脾益气,郁金、莪术活血化瘀,重楼、半枝莲清热解毒,全方配伍,寒温并用,标本兼顾,攻补兼施。

转移是引起肿瘤患者死亡的主要原因^[13]。肿瘤细胞的黏附、迁移能力与癌转移密切相关。单个肿瘤细胞从原发肿瘤脱落游离是肿瘤侵袭转移的第一步,肿瘤细胞与细胞之间黏附因子的损失是肿瘤细胞脱离的要素。脱落的肿瘤细胞即为循环肿瘤细胞,与脉管内皮细胞及细胞外基质细胞黏附,迁移到特定的组织器官,并发展成为继发癌灶的过程,即是转移。转移是肿瘤细胞转移过程中必不可缺的环节之一^[14]。故抑制肿瘤细胞转移的关键之一乃是抑制肿瘤细胞向外迁移。

MMPs是一类高度保守的锌原子依赖内肽酶家族,大部分成员具有降解细胞基膜及细胞外基质功能,是肿瘤细胞转移过程中的重要分子。MMPs在肿瘤转移的多个步骤均有参与,包括肿瘤的迁移、侵袭、免疫逃逸、血管的生成、肿瘤的生长^[13]。MMP-2和MMP-9是MMPs的明胶酶组成员,通过降解基底膜的胶原成分、细胞外基质和细胞黏附分子,促进血管生成和调节细胞黏附,从而导致癌细胞运动性增强,促进癌细胞侵袭和转移^[15-17]。端传友^[18]检测86例结肠癌组织及正常结肠组织中MMP-2、MMP-9的表达,发现结肠癌组织中MMP-2、MMP-9表达水平及阳性率均显著高于正常结肠组织,其中有淋巴结转移的结肠癌组织中MMP-2、MMP-9阳性表达率高于无淋巴结转移者,提示

MMP-2、MMP-9高表达与肿瘤转移密切相关。故通过降低MMP-2及MMP-9的表达,可以抑制肿瘤细胞的脱落、迁移,从而降低转移率。

本研究结果发现,健脾消癌方能够抑制细胞迁移及侵袭,并下调MMP-2、MMP-9蛋白表达水平,健脾消癌方抗复发转移机制可能是通过下调MMP-2、MMP-9蛋白表达,从而抑制HCT116细胞迁移、侵袭力。

参考文献:

[1] PARIZADEH S M, JAFARZADEH - ESFEHANI R, FAZILAT - PANAH D, et al. The potential therapeutic and prognostic impacts of the c - MET/HGF signaling pathway in colorectal cancer[J]. IUB - MB Life, 2019, 71(7): 802 - 811.

[2] 陈万青, 郑荣寿, 张思维, 等. 2013年中国恶性肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤, 2017, 26(1): 1 - 7.

[3] XIE Y H, CHEN Y X, FANG J Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer[J]. Sig Transduct Target Ther, 2020, 5: 22.

[4] 吴玉红. 血清CEA、CA724、CA199、MMP及TIMP在大肠癌复发转移中的诊断价值研究[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(20): 2695 - 2696.

[5] 胡云辉, 任统伟. 再次肝切除手术对结直肠癌肝转移复发患者的临床疗效和生存情况的影响因素[J]. 实用癌症杂志, 2017, 32(2): 242 - 244.

[6] 贺雪, 殷佩浩. 中医药治疗结直肠癌术后复发转移的研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(9): 2009 - 2012.

[7] 陈弦, 李杰. 中医综合治疗干预Ⅲ - IV期结直肠癌的临床研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2017, 23(3): 371 - 374, 383.

[8] 陶丽, 朱莹杰, 顾纛, 等. 中医药辨证治疗对结直肠癌肝转移根治性切除的预后影响[J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(5): 1051 - 1056.

[9] 蒋益兰, 潘敏求, 蔡美. 健脾消癌饮配合化疗拮抗大肠癌术后复发转移62例总结[J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 1 - 3.

[10] 蒋益兰, 潘博, 仇湘中. 健脾消癌饮配合化疗治疗大肠癌术后40例总结[J]. 湖南中医杂志, 2001, 17(5): 9 - 10.

[11] 王容容, 王其美, 蒋益兰, 等. 健脾消癌方联合化疗治疗晚期转移性结肠癌的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1732 - 1736.

[12] 蒋益兰, 俞天俊, 赵晔. 健脾消癌方治疗老年中晚期大肠癌临床观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(3): 94 - 96.

[13] 潘传芳, 梁未未, 顾贤, 等. 基于MMP-2、MMP-9探讨胃肠安方及其拆方抑制人胃癌裸鼠原位移植瘤生长及转移的部分配伍机制[J]. 上海中医药杂志, 2020, 54(9): 81 - 87.

[14] 赵晶晶, 谢梦洲, 曹建中, 等. 参山固体饮料对人结直肠癌细胞HT-29增殖和迁移的影响[J]. 中医学报, 2019, 34(11): 2398 - 2402.

[15] 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.

[16] PUZOVIC V, BRCIC I, RANOGAJEC I, et al. Prognostic values of ETS-1, MMP-2 and MMP-9 expression and co-expression in breast cancer patients[J]. Neoplasma, 2014, 61(4): 439 - 446.

[17] BAUVOIS B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: Outside-in signaling and relationship to tumor progression[J]. Biochim et Biophys Acta BBA - Rev Cancer, 2012, 1825(1): 29 - 36.

[18] 端传友. MMP-2、MMP-9及VEGF在结肠癌中的表达及其与肿瘤转移的相关性[J]. 中国医药导报, 2012, 9(21): 44 - 45, 48.

收稿日期: 2020-01-15

作者简介: 简小兰(1988-), 女, 四川内江人, 博士研究生, 研究方向: 肿瘤病的中西医结合防治方法和规律。

通信作者: 蒋益兰(1961-), 女, 湖南长沙人, 医学学士, 博士研究生导师, 主任医师, 研究方向: 肿瘤的中西医结合防治方法和规律。E-mail: tianshangren624@163.com

编辑: 李艳