

龙葵碱对人胃癌 MGC-803 荷瘤小鼠癌细胞钙粘蛋白表达的影响

张卫东, 孙睿, 李莉, 张丽敏, 薛春梅, 罗志文* (佳木斯大学生命科学学院, 黑龙江佳木斯 154007)

摘要 [目的]研究龙葵碱对癌细胞钙粘蛋白表达的影响,探讨龙葵碱抗癌机制。[方法]制作人胃癌细胞荷瘤小鼠,以不同剂量龙葵碱干预,采用常规石蜡组织切片,E-cadherin 和 β -catenin 免疫组化染色,并通过医学图象分析软件统计胃癌细胞阳性表达的平均光密度,采用 t 检验分析测定结果。[结果]对照组和龙葵碱组的癌细胞中有部分阳性表达,E-cadherin 表达平均光密度值各组之间无明显差异($P > 0.05$)。龙葵碱各剂量组的 β -catenin 表达平均光密度值之间无统计学意义($P > 0.05$),但各龙葵碱组与对照组差异显著($P < 0.05$)。[结论]龙葵碱能够降低 β -catenin 表达,可能参与细胞凋亡的信号调控。

关键词 胃癌;龙葵(*Solanum nigrum*);体密度;数密度;淋巴管内皮;LYVE-1

中图分类号 S865.1⁺3 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)30-11965-02

Effect of *Solanum nigrum* on the Expression of E-cadherin in Human Gastric Carcinoma Cells of MGC-803 Tumor-Bearing Mice

ZHANG Wei-dong et al (College of Life Sciences, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract [Objective] To observe the effect of *Solanum nigrum* on the expressions of cadherin in MGC-803 cells and to explicate the anticancer mechanism by solanine. [Method] The mouse tumor models were built by injecting MGC-803 gastric cancer cells into mice, with different doses of solanine were injected into abdominal cavities of mice. The paraffin sections were stained by polyclonal antibody of E-cadherin and β -catenin. AO of E-cadherin and β -catenin expressions was stated by BI-2000 medical image; The results were analyzed by t-test. [Result] The partly positive expressions of cancer cells in control group and groups of solanine were observed. AO of E-cadherin among control group and groups of solanine was not significant different ($P > 0.05$). The AO of β -catenin expressions among groups of solanine was not statistically significant, but significant different between control group and groups of solanine ($P > 0.05$). [Conclusion] *Solanum nigrum* can lower the expressions of β -catenin, it is get involved in regulation of signaling in apoptosis.

Key words Gastric carcinoma; *Solanum nigrum*; Bulk density; Number density; Lymphatic endothelial; LYVE

龙葵(*Solanum nigrum*)是中医治疗肿瘤的一种药用植物,全草中含有多种化学成分,包括生多种维生素、矿物质、氨基酸、多糖、甾体皂苷、花青素及生物碱等成分。龙葵生物碱种类包括澳洲茄碱(solasonine)、澳洲茄明碱(茄达碱)(solasodamine)、澳洲茄边碱(solamargine)、 ϵ -龙葵碱(ϵ -solanigrine)、 δ -龙葵碱(δ -solanigrine)、龙葵定碱(solanigrine)等^[1-4],统称龙葵碱。研究表明,龙葵生物碱是抗癌主要成分之一。

胃癌早期资料显示,2007年我国胃癌发病率为第2位,死亡率为第3位^[5]。胃癌导致的死亡原因主要来自于癌细胞的转移,在胃癌的转移中,肿瘤的浸润转移是包含一系列复杂步骤的癌细胞与细胞外基质相互作用的结果。其中,癌细胞与原发灶失去粘附脱落是一个早期和必要的步骤^[6-9]。为了研究龙葵碱的抗癌机制,试验培养人胃癌 MGC-803 细胞,制作荷瘤小鼠模型,施加龙葵碱进行干预,观察细胞外基质 E 钙粘蛋白和 β 连环素在移植瘤中的表达变化,以期从细胞粘附角度探索龙葵碱抗癌可能机制。

1 材料与与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。龙葵碱(HPLC $\geq 95\%$),购自美国 Sigma 公司。

1.1.2 动物及瘤株。昆明种小鼠 40 只,体重(20 \pm 2) g,雌雄各半,由佳木斯大学动物中心提供。MGC-803 人胃癌细胞,购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.1.3 主要仪器。MCO-175 型 CO₂ 培养箱和全自动高压蒸汽消毒器,购自日本三洋公司;台式离心机,购自德国 Sigma 公司;SW-CJ-2G 超净工作台,购自上海博迅实业有限公司;CKX41 型倒置相差显微镜,购自日本 OLYMPUS 公司;OPTIMA L-80XP 低温高速离心机,购自美国 Beckman 公司;BI-2000 医学图像分析系统,购自成都泰盟科技有限公司。

1.1.4 主要试剂。E-cadherin 和 β -catenin,购自 Santa Cruz Biotechnologh, Inc.;免疫组化试剂盒,购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 方法

1.2.1 RPMI1640 培养基的制备。10%胎牛血清 25 ml、青霉素 100 μ g/ml 40 U、链霉素 100 g/ml 40 U。

1.2.2 细胞的培养。取胃癌 MGC-803 细胞,放在 RPMI1640 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、5%的 CO₂ 培养箱中培养;用浓度 0.25% 胰蛋白酶消化传代,2~3 d 传代 1 次。取培养的对数期胃癌 MGC-803 细胞,经浓度 0.25% 胰蛋白酶消化后,加入 RPMI1640 终止消化,充分吹打后,用 RPMI1640 液清洗 2 次,离心,用 RPMI1640 液重悬,采用细胞计数板计数,调整细胞浓度约为 1×10^7 个/ml。

1.2.3 移植瘤模型的建立。于小鼠背部皮下接种稀释后的癌细胞悬液 0.2 ml,24 h 后随机分为 4 组,即生理盐水组、低、中、高剂量组(9.37、18.75 和 37.50 mg/kg),每天用无菌龙葵碱药剂腹腔给药 1 次,连续给药 10 d。

1.2.4 取材与制片。接种与给药 15 d 后,将小鼠断颈处死,取出皮下肿瘤及周围组织,材料经甲醛固定,常规石蜡包埋,4 μ m 连续切片,常规 HE 染色和免疫组织化学染色。每个材料任选每张切片选 3 个视野,在 400 倍显微镜下观察,并用 BI-2000 医学图像分析软件分析平均光密度。

基金项目 黑龙江省教育厅科学技术项目(11541357)。

作者简介 张卫东(1967-),男,黑龙江佳木斯人,副教授,硕士,从事药用植物学研究。*通讯作者,副教授。

收稿日期 2013-09-23

1.2.5 统计学处理。采用 SPSS 11.0 统计学软件进行方差分析和 *LSD-t* 检验。

2 结果与分析

2.1 细胞的 E-cadherin 表达 观察可知,对照组和龙葵组中都有部分癌细胞表达,呈棕黄色,着色部位主要为细胞膜,也有细胞质部分着色。通过 BI-2000 医学图像分析软件分析平均光密度可知,对照组与龙葵组之间无统计学意义 ($P > 0.05$),低剂量组光密度与中剂量组差异不显著 ($P > 0.05$),

中剂量组与高剂量组也无明显差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

2.2 细胞的 β -catenin 表达 观察可知,人胃癌 MGC-803 形成的小鼠皮下原位肿瘤细胞中,大部分细胞无阳性表达,阳性表达细胞呈黄色,阳性表达主要为细胞膜。由表 1 可知,龙葵组与对照组之间平均光密度有明显差异 ($P < 0.05$),低剂量组光密度与中剂量组差异不显著 ($P > 0.05$),中剂量组与高剂量组也无明显差异 ($P > 0.05$);而低剂量组与高剂量组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

表 1 不同组别 E-cadherin β -catenin 平均光密度值

组别	<i>n</i>	E-cadherin	<i>P</i> 值	β -catenin	<i>P</i> 值
对照组	10	0.067 ± 0.019	$P_E^* > 0.05$	0.056 ± 0.018	$P_\beta^* < 0.05$
低剂量组	10	0.068 ± 0.023	$P_E^{**} > 0.05$	0.040 ± 0.013	$P_\beta^{**} > 0.05$
中剂量组	10	0.089 ± 0.049	$P_E^{***} > 0.05$	0.041 ± 0.016	$P_\beta^{***} > 0.05$
高剂量组	10	0.077 ± 0.035	$P_E^{****} > 0.05$	0.035 ± 0.019	$P_\beta^{****} > 0.05$

注: P_E^* 为对照组与处理组比较; P_E^{**} 为低剂量与中剂量组比较; P_E^{***} 为中剂量组与高剂量组比较; P_E^{****} 为低剂量组与高剂量组比较; P_β^* 为对照组与处理组比较; P_β^{**} 为低剂量与中剂量组比较; P_β^{***} 为中剂量组与高剂量组比较; P_β^{****} 为低剂量组与高剂量组比较。

3 结论与讨论

β -catenin 是一种多功能蛋白,可形成 E-cadherin- β -catenin 复合体,参与调节细胞-细胞粘附以及细胞-ECM 间的相互作用,是肿瘤细胞黏附的重要结构。在正常情况下 β -catenin 与跨膜蛋白 E-cadherin 的胞浆区连接而并与 γ -catenin 相互作用,构成复合结构定位表达于细胞膜,且使细胞膜和细胞骨架紧密连接。少数游离的 β -catenin 可被胞浆内的泛素蛋白酶系统降解,保持胞浆 β -catenin 的含量在较低水平。细胞浆 β -catenin 堆积入核,与 TCF4 结合,TCF 并做为转录因子活化靶基因。但在无 β -catenin 时,TCF4 则可作为 Wnt 信号响应基因的转录抑制因子,抑制基因转录。细胞浆内游离的 β -catenin 增至一定水平便易于细胞核内与 Tcf/Lef 作用形成 β -catenin-Tcf/Lef 复合体,从而活化转录,促进下游靶基因的过度表达。试验结果表明,龙葵碱组与对照组的 E-cadherin 表达的平均光密度值无统计学意义,表明龙葵碱对其作用还无法判断。尽管 β -catenin 表达的平均光密度在龙葵碱组之间无统计学意义,但与对照组之间存在明显差异,提示龙葵碱降低了 β -catenin 的表达。

龙葵碱通过减少 β -catenin 的表达,使 β -catenin 从细胞质和细胞核转位到细胞膜,干扰 β -Catenin/TCF 复合物的形成,从而抑制 β -catenin/TCF4 转录活性及下游基因 Survivin 的表达,阻断 Wnt/ β -Catenin 信号通路。同时,龙葵碱能下调癌细胞的 Bcl-2 蛋白及 Caspase-3 蛋白的表达,而保持 Bax 蛋白的表达不变,使 Bcl-2/Bax 的值下降。Bcl-2/Bax 值直接动态调控着 caspase 家族的基因表达;当 Bcl-2/Bax 值偏小时,能激活 caspase 家族基因表达。研究发现,伴随 β -catenin 的 mRNA 表达水平降低,Bcl-2 的 mRNA 表达下调,而 Caspase-

3、Caspase-8 的 mRNA 表达上调。龙葵碱既能降低 β -catenin 基因表达又能降低 Bcl-2/Bax 的值。高世勇等人提出 Bcl-2/Bax 值的下降,是其上游影响因素,推测龙葵碱诱导胃癌凋亡的 Wnt/ β -catenin 通路的可能调节机制:龙葵碱降低了 β -catenin 表达,缺少了 β -Catenin 的 TCF4 作为转录抑制因子,抑制 Wnt 信号通路的活性及功能,使原癌基因 Bcl-2 的转录下调,同时上调凋亡诱导因子作用,激活 caspase-8 进而激活其下游 Caspase-3 的活性,抑制细胞增生并诱导其凋亡,但具体的调控机理还有待进一步研究和验证。

参考文献

- [1] 杨辉,陈晓青,赵宇,等. 龙葵甙类生物碱的表征及其在该植物体内的形成、变化[J]. 精细化工,2006,23(4):358-361.
- [2] 陈万青,张思维,郑荣寿,等. 中国肿瘤登记地区 2007 年肿瘤发病和死亡分析[J]. 中国肿瘤,2011,20(3):162-169.
- [3] 张卫东,赵玲辉,张雅芳,等. 胃癌淋巴管 E 钙黏蛋白、 β 连环素的表达与癌转移的关系[J]. 解剖学杂志,2008,31(3):354-357.
- [4] ZHANG X H, DU J R, HAN L S, et al. Expression and clinical significance of E-cadherin and β -catenin in gastric carcinoma [J]. Journal of Haerbin Medical University, 2004, 5(38):435-438.
- [5] BARTH A L, NATHKE I S, NELSON W J, et al. Cadherins, catenins and APC Protein: Interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways[J]. Curr Opin Cell Biol, 1997, 9(5):683-690.
- [6] VAN DE WETERING M, CAVALLLO R, DOOIJES D, et al. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the Drosophila segment polarity gene dTCF[J]. Cell, 1997, 88:789-799.
- [7] TANG S J. The synaptic Wnt signaling hypothesis[J]. Synapse, 2007, 61(10):866-868.
- [8] 朱红霞,张果,王益华,等. 非甾体类抗炎药通过 β -Catenin/TCF4-survivin 通路诱导结肠癌细胞凋亡[J]. 癌症,2004,23(7):737-741.
- [9] KONTUREK P C, KONTUREK S J, SULEKOVA Z, et al. Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor alpha, apoptosis related proteins bax and bcl-2, and gastrin in human gastric cancer[J]. Aliment Pharm acol Ther, 2001, 15(5):989-999.