

DOI:10.19403/j.cnki.1671-1521.2021.06.001

20(S)-原人参二醇抑制结直肠癌 SW620 细胞迁移和侵袭

卢泽原, 睢大寅, 于晓风, 付雯雯, 徐华丽*
(吉林大学药学院·吉林 长春·130021)

摘要:目的 研究 20(S)-原人参二醇(20(S)-PPD)对人结直肠癌 SW620 细胞迁移和侵袭的影响。方法 20(S)-PPD 处理 SW620 细胞 24h, MTT 检测 20(S)-PPD 对 SW620 细胞增殖的抑制情况, Transwell 小室检测细胞迁移和侵袭能力。结果 20(S)-PPD 在 $>40 \mu\text{M}$ 剂量时明显杀伤 SW620 细胞 ($P<0.05$), 但 20(S)-PPD 在 10、20、25 及 $30 \mu\text{M}$ 剂量时对 SW620 细胞无显著细胞杀伤作用; 20(S)-PPD (10、20 及 $30 \mu\text{M}$) 可明显抑制 SW620 细胞迁移和侵袭的能力 ($P<0.05$); 20(S)-PPD 可提高 E-cadherin 蛋白表达, 降低 Vimentin 蛋白表达。结论 20(S)-PPD 在低剂量时可以抑制人结直肠癌 SW620 细胞的侵袭能力。

关键词: 20(S)-原人参二醇; SW620 细胞; 侵袭

20 (S)-protopanaxadiol inhibits the invasion of colorectal cancer SW620 cells

LU Ze-yuan, SUI Da-yun, YU Xiao-feng, FU Wen-wen, XU Hua-li*
(College of pharmacy, Jilin University, Changchun, 130021)

Abstract: Objective To study the effect of 20 (S)-protopanaxadiol (20 (S)-PPD) on the invasion of human colorectal cancer SW620 cells. Methods SW620 cells were treated with 20 (s) - PPD for 24 hours. The inhibition of 20 (S)-PPD on the proliferation of SW620 cells was detected by MTT, and the ability of cell migration and invasion was detected by transwell chamber. Results When the concentration of 20 (S)-PPD more than $40 \mu\text{M}$, SW620 cells were significantly killed ($P<0.05$). When the concentration of 20 (S)-PPD less than $40 \mu\text{M}$, there was no significant cytotoxic effect on SW620 cells. 20 (S)-PPD (10, 20 and $30 \mu\text{M}$) could significantly inhibit the migration and invasion of SW620 cells ($P<0.05$); 20(S)-PPD could increase the expression of E-cadherin protein and reduce the expression of vimentin protein. Conclusion 20 (S)-PPD can inhibit the invasion of human colorectal cancer SW620 cells.

Keywords: 20 (S)-protopanaxadiol; SW620; invasion

结肠癌(Colon cancer, CRC)是最常见的恶性消化道肿瘤之一,也是全球第三大癌症^[1-3]。根据世界卫生组织统计,结肠癌是癌症相关死亡的第二大原因^[4]。全球每年报告有 120 万新增病例和 60 万死亡病例^[5]。其恶性程度高,发病率逐年加快,转移性强,治愈率较低且预后极差,死亡率高,并且呈现出越来越年轻化的趋势^[6]。20(S)-原人参二醇(20(S)-PPD)是从人参(西洋参)的根、茎、叶中提取得到的 20(S)-原人参二醇型皂苷(如 Rb1、Rb3、Rg3、Rh2)的苷元,本课题组经多年研究证实其具有良好的抗肿瘤作用^[6-10]。本课题组前期研究发现,20(S)-PPD 的抗肿瘤作用与其抑制 PI3K/Akt 通路的激活、诱导肿瘤细胞凋亡有关,但 PPD 对肿瘤的侵袭转移作用尚不明确^[7]。20(S)-PPD 是否可抑制结直肠 SW620 细胞迁移、转移,有待进一步研究。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

20(S)-PPD 由吉林大学化学学院天然药物化学研究室金永日教授提供;SW620 细胞购自上海美轩生物科技有限公司;Matrigel 购自 BD;E-cadherin, Vimentin 抗体购自 Cell Signaling Technology;高糖 DMEM 培养液购自 Invitrogen;其他试剂由长春鼎国昌盛生物技术有限公司提供。

1.2 实验仪器

酶标仪(Molecular Devices, USA);荧光倒置显微镜 TE2000-M (Nikon);Mini-Protean 垂直电泳系统 (Bio-Rad)。

2 实验方法

2.1 MTT 实验

基金项目: 吉林省教育厅项目,项目编号:JJKH20201121KJ。

作者简介: 卢泽原,男,博士,主要从事抗肿瘤药理研究。

*** 通信作者:** 徐华丽,男,副教授,硕士生导师,主要从事心脑血管与肿瘤药理研究。E-mail: xhl@jlu.edu.cn。

选取对数生长期细胞,0.25 %胰蛋白酶消化细胞,用培养液稀释,接种于 96 孔板,每孔 200 μ l。贴壁 24 h 后加入不同浓度 20(S)-PPD 作用 20 h,每孔加入 MTT 20 μ l,继续孵育 4 h,570 nm 测 OD 值,计算细胞生存率。

2.2 细胞迁移实验

选取对数生长期细胞,0.25 %胰蛋白酶消化细胞,用无血清培养液稀释细胞,接种于 Transwell 小室。加入 20(S)-PPD(10、20、30 μ M)作用 24 h,加入 1%结晶紫,染色,荧光倒置显微镜下拍照,ImageJ 软件计算图片中染色细胞数量。

2.3 细胞侵袭实验

以培养液:Matrigel=5:1 的比例将 Matrigel 胶稀释,每个 Transwell 小室中加入 60 μ l 稀释的 Matrigel 胶。选取对数生长期细胞,0.25 %胰蛋白酶消化细胞,用无血清培养液稀释细胞,接种于 Transwell 小室。加入 20(S)-PPD(10、20、30 μ M)作用 24 h,加入 1%结晶紫,染色,荧光倒置显微镜下拍照,ImageJ 软件计算图片中染色细胞数量。

2.4 Western Blot

选取对数生长期细胞,0.25 %胰蛋白酶消化细胞,用培养液稀释,接种于 6 孔板。贴壁 24 h 后加入不同浓度 20(S)-PPD 作用 24 h,通过 Western Blot 检测细胞中 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达。

2.5 统计学方法

数据统计后以平均数 \pm 标准差表示。应用软件 SPSS 分析数据,组间比较采用 Student's t-test 检验,* $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 PPD 对 SW620 细胞活力的影响

结果如图 1 所示,PPD 在 40、50 及 100 μ M 剂量时明显杀伤 SW620 细胞($P < 0.05$),但 PPD 在 10、20、25 及 30 μ M 剂量时对 SW620 细胞未发现显著细胞杀伤作用

($P > 0.05$),因此我们选用 10、20 和 30 μ M 用于后续实验。

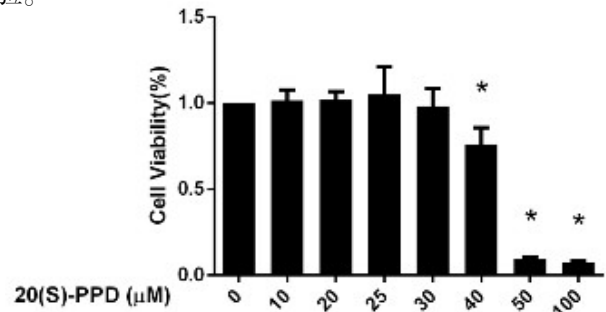


图 1. 20(S)-PPD 对 SW620 细胞生存率的影响与 20(S)-PPD 0 M 组比较,* $P < 0.05$ 。

3.2 20(S)-PPD 对 SW620 细胞迁移能力的影响

加入 10、20 及 30 μ M 20(S)-PPD 后,SW620 细胞在 Transwell 细胞迁移实验中显著降低了穿膜细胞数量($P < 0.05$),并且随 20(S)-PPD 剂量增加,抑制 SW620 细胞穿膜的作用逐渐增强,呈现一定剂量依赖性,结果见图 2。

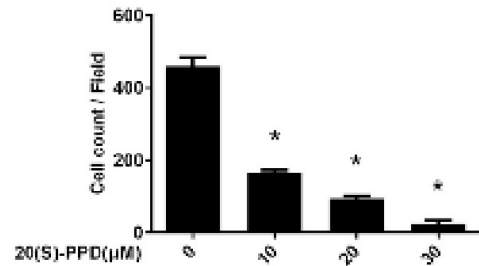


图 2. 20(S)-PPD 对 SW620 细胞迁移的影响与 20(S)-PPD 0 M 组比较,* $P < 0.05$ 。

3.3 20(S)-PPD 对 SW620 细胞侵袭能力的影响

从图 3 可见,加入 10、20 及 30 μ M 20(S)-PPD 后,SW620 细胞在侵袭实验中均显著降低了穿膜细胞数量($P < 0.05$),并且随 20(S)-PPD 剂量增加,抑制 SW620 细胞穿膜的作用逐渐增强,呈现一定剂量依赖性。

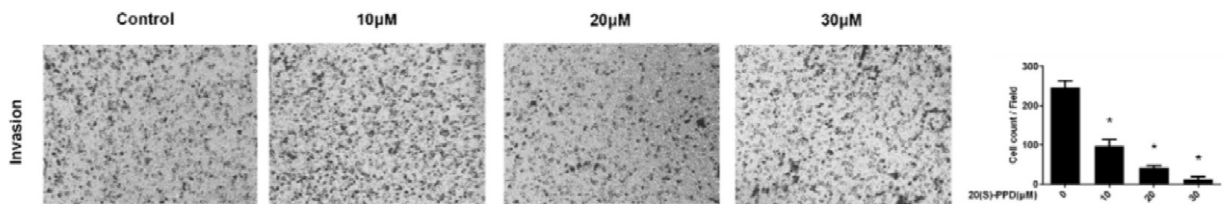


图 3. 20(S)-PPD 对 SW620 细胞侵袭的影响与 20(S)-PPD 0 M 组比较,* $P < 0.05$ 。

3.4 20 (S)-PPD 对 SW620 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达的影响

从图 4 可见,加入 20(S)-PPD 处理后 E-cadherin 蛋

白表达逐渐增加,vimentin 蛋白表达逐渐下降,呈剂量依赖性。

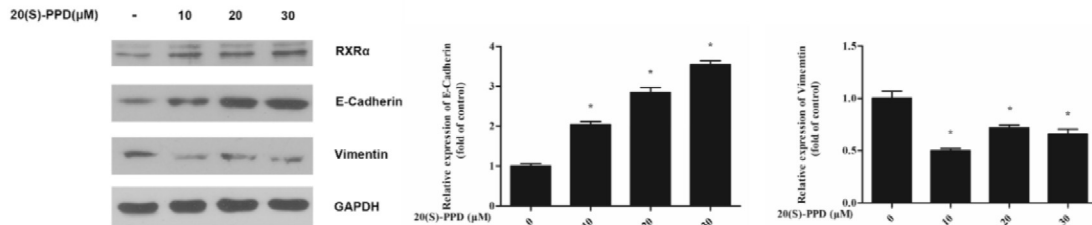


图 4. 20(S)-PPD 对 SW620 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达的影响与 20(S)-PPD 0 M 组比较, * $P<0.05$ 。

4 讨论

由于传统化疗药物具有较强的毒副作用,而且容易产生耐药性。近年来,越来越多研究表明天然产物能够产生良好的抗肿瘤作用^[1]。与传统化疗药物相比,天然产物具有更低的毒副作用,为抗肿瘤药物的开发提供了广阔的资源。天然产物已成为新的抗癌药物的丰富来源,目前使用的约 50% 的抗癌药物直接或间接来源于天然产物^[2]。在这些化合物中,包括生物碱、皂苷、多糖、多酚和不饱和脂肪酸。

人参皂苷是人参的主要生物活性成分之一,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗疲劳等多种生物活性。研究发现人参皂苷可以抑制肿瘤细胞的上皮间质转化,从而影响肿瘤细胞的迁移和侵袭。我们前期实验表明,20(S)-PPD 具有诱导多种肿瘤凋亡的作用,但 20(S)-PPD 能否抑制结直肠癌细胞迁移和侵袭尚不清楚。结果发现 20(S)-PPD 在 40 μM 以上时可以明显杀伤 SW620 细胞,但在 40 μM 以下对 SW620 细胞没有杀伤作用,因此我们选用 10、20 和 30 μM 用于后续的迁移和侵袭实验以排除由于药物杀伤细胞对迁移和侵袭实验的影响。图 2 和图 3 结果显示,20(S)-PPD 在 10、20 和 30 μM 的剂量下能明显的抑制 SW620 细胞的迁移和侵袭能力($P<0.05$),且呈现剂量依赖关系。

肿瘤细胞持续侵袭的能力,是肿瘤转变为恶性的标志之一,在该过程中上皮细胞表型蛋白 E-cadherin 表达异常降低,而间质细胞表型蛋白 Vimentin 表达异常增加,从而促进肿瘤细胞侵袭和转移,而抑制 Vimentin 或增加 E-cadherin 蛋白表达可抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[3,4]。在本研究中我们发现 20(S)-PPD 可以提高 E-cadherin 蛋白表达,降低 Vimentin 蛋白表达,从而抑制 SW620 细胞的迁移和侵袭能力。

肿瘤的侵袭和转移是一个复杂的生物学过程,有很多蛋白和生物因子参与其中。为了更明确的解释 20(S)-PPD 抑制 SW620 细胞侵袭的作用,更加深入的研究有待进一步开展。

参考文献

- [1] Xie J, Teng J, Fan Y, et al. The short-term effects of air pollutants on hospitalizations for respiratory disease in Hefei, China [J]. *Int J Biometeorol*, 2019, 63(3): 315–326.
- [2] Zanghi A, Piccolo G, Cavallaro A, et al. Apilot study about the oncologic safety of colonic self-expandable met-

al stents (SEMS) in obstructive colon cancer: is occlusion always better than "silent" perforation [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(24):5242–5248.

[3] Siegel R L, Fedewa S A, Anderson W F, et al. Colorectal Cancer Incidence Patterns in the United States, 1974–2013 [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2017, 109(8):djw322.

[4] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2018 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(1): 7–30.

[5] Labianca R, Beretta G D, Kildani B, et al. Colon cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2010, 74(2): 106–133.

[6] Zhang Hong, Xu Hua-li, Fu Wen-wen, et al. 20(S)-Protopanaxadiol induces human breast cancer MCF-7 apoptosis through a caspase-mediated pathway [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention Apjcp*, 2014, 15(18): 7919–7923.

[7] Zhang Yun-long, Zhang Rui, Xu Hua-li, et al. 20(S)-Protopanaxadiol Triggers Mitochondrial-Mediated Apoptosis in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cells via Inhibiting the PI3K/Akt Signaling Pathway [J]. *American Journal of Chinese Medicine*, 2013, 41(05): 1137–1152.

[8] 陈明侠, 徐华丽, 于小凤, 等. 20(s)-原人参二萜的抗肿瘤及免疫调节作用研究 [J]. *中国药师*, 2007, 10(12): 1165–1168.

[9] 张锐, 徐华丽, 曲绍春, 等. 20(S)-原人参二萜对肺癌 A549 细胞增殖和荷瘤裸小鼠肿瘤生长的抑制作用 [J]. *中草药*, 2008, 39(12): 1838–1841.

[10] 张锐, 徐华丽, 于小凤, 等. 20(S)-原人参二萜对荷瘤裸鼠化疗的增效减毒作用 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2009, 35(2): 195–200.

[11] Li F, Zhang W. Role of traditional Chinese medicine and its chemical components in anti-tumormetastasis [J]. *Cancer Res Ther*, 2014, 10(Suppl 1): 20–26.

[12] Newman D J, Cragg G M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 [J]. *J Nat Prod*, 2016, 79(3): 629–661.

[13] 孟小琴, 李云峰, 周毅, 等. 过表达 OTUD1 对结直肠癌细胞 HCT116 增殖和侵袭的影响及机制研究. *重庆医科大学学报*, 2018, 43(5): 687–691.

[14] 钱金锋, 杨其昌, 谢慧君, 等. 乳腺浸润性导管癌中上皮间质转化相关蛋白表达与临床病理特征和预后的关系. *中国普外基础与临床杂志*, 2015, 22(5): 591–596.