doi:10.11659/jjssx.05E024103

·基础研究·

雷公藤甲素对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响及机制研究

杜艳明,崔丽伟,檀靖宇,马召雨,马丽丽 (唐山市人民医院消化科,河北 唐山 063000)

[摘 要] **目的** 探讨雷公藤甲素(TPL)对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭的影响及其作用机制。**方法** 体外培养人胃癌细胞系MKN45,给予不同浓度的TPL作用48 h,CCK-8法检测细胞增殖抑制率并选取最佳浓度进行后续实验,qRT-PCR检测经不同浓度TPL处理后的细胞miR-29b、KDM2A mRNA表达。取对数生长期MKN45细胞,随机分为对照组(不做任何处理)、TPL组(200 μg/mL TPL处理)、inhibitor-NC+TPL组(转染inhibitor-NC后用200 μg/mL TPL处理)、miR-29b inhibitor+TPL组(转染miR-29b inhibitor后用200 μg/mL TPL处理),qRT-PCR检测各组细胞miR-29b、KDM2A mRNA表达,Western blot检测各组细胞KDM2A蛋白表达,平板克隆形成实验检测各组细胞克隆形成能力,Transwell实验检测各组细胞迁移、侵袭能力。**结果** 25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL浓度的TPL均可明显抑制MKN45细胞增殖($P<0.05$),上调细胞中miR-29b表达($P<0.05$),下调KDM2A mRNA表达($P<0.05$),且TPL浓度为200 μg/mL时作用最明显,故选择200 μg/mL的TPL进行后续实验。与对照组比较,TPL组细胞miR-29b表达升高($P<0.05$),KDM2A mRNA和蛋白表达降低($P<0.05$),克隆形成数、迁移及侵袭细胞数减少($P<0.05$)。与inhibitor-NC+TPL组比较,miR-29b inhibitor+TPL组细胞miR-29b表达降低($P<0.05$),KDM2A mRNA和蛋白表达升高($P<0.05$),克隆形成数、迁移及侵袭细胞数增加($P<0.05$)。**结论** TPL能抑制胃癌细胞增殖、迁移及侵袭,其机制与调控miR-29b/KDM2A信号通路有关。

[关键词] 胃癌;雷公藤甲素;miR-29b;KDM2A;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭

[中图分类号] R735.2 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-05-22

Effect of triptolide on proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells and its mechanism

DU Yan-ming, CUI Li-wei, TAN Jing-yu, MA Zhao-yu, MA Li-li (Department of Gastroenterology, Tangshan People's Hospital, Tangshan Hebei 063000, China)

Abstract: Objective To explore the effects of triptolide (TPL) on the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells and its mechanism. **Methods** Human gastric cancer cell line MKN45 was cultured in vitro and treated with different concentrations of TPL for 48 hours. The cell proliferation inhibition rate was detected by CCK-8 method and the optimal concentration was selected for subsequent experiments. qRT-PCR was used to detect the expression of miR-29b and KDM2A mRNA in cells treated with different concentrations of TPL. MKN45 cells at logarithmic growth phase were randomly divided into the control group (without any treatment), the TPL group (treated with 200 μg/mL TPL), the inhibitor-NC+TPL group (transfected with inhibitor-NC and then treated with 200 μg/mL TPL), and the miR-29b inhibitor+TPL group (transfected with miR-29b inhibitor and then treated with 200 μg/mL TPL). qRT-PCR was used to detect the expression of miR-29b and KDM2A mRNA in each group of cells, and Western blot was used to detect the expression of KDM2A protein. The clone formation ability of each group of cells was detected by plate clone formation assay, and the migration and invasion abilities of each group of cells were detected by Transwell assay. **Results** TPL at concentrations of 25 μg/mL, 50 μg/mL, 100 μg/mL, and 200 μg/mL could significantly inhibit the proliferation of MKN45 cells ($P<0.05$), up-regulate the expression of miR-29b in cells ($P<0.05$), and down-regulate the expression of KDM2A mRNA ($P<0.05$). The effect was most obvious at the concentration of 200 μg/mL, so 200 μg/mL TPL was selected for the subsequent experiments. Compared with the control group, the expression of miR-29b in the TPL group increased ($P<0.05$), the expression of KDM2A mRNA and protein decreased ($P<0.05$), and the numbers of clone formation, migration and invasion cells reduced ($P<0.05$). Compared with the inhibitor-NC+TPL group, the expression of miR-29b in the miR-29b inhibitor+TPL group decreased ($P<0.05$), the expression of KDM2A mRNA and protein increased ($P<0.05$), and the numbers of clone formation, migration and invasion cells increased ($P<0.05$). **Conclusion** TPL can inhibit the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells, and its mechanism is related to the regulation of the miR-29b/KDM2A signaling pathway.

Keywords: gastric cancer; triptolide; miR-29b; KDM2A; cell proliferation; cell migration; cell invasion

[基金项目] 河北省医学科学研究重点课题计划项目(20221814)

[通信作者] 马丽丽,E-mail:mll061@126.com

胃癌是最常见的消化道肿瘤之一，近年来其发病呈年轻化的趋势，是全球第四大癌症，病死率排名第二[1]。手术切除是早期胃癌最有效的治疗策略，但当胃癌进展到晚期（不可切除或已转移）时，化疗则是主要的治疗方法。由于化疗药物普遍存在耐药性，并且毒副作用较大，临床效果不理想。因此，开发低毒、高效的抗肿瘤药物是当前研究的热点。植物源性药物因其潜在的安全性、有效性和较小的副作用在癌症治疗中引起了全世界的关注。雷公藤甲素（triptolide，TPL）是提取自雷公藤的一种天然二萜类活性成分，具有抗炎、抗氧化和抗类风湿等广泛的生物活性。不仅如此，研究表明TPL具有一定的抗肿瘤作用[2]。但TPL在胃癌中的作用研究较少，相关作用机制尚不清楚。目前研究发现，某些微小RNA（micro RNA, miRNA）可能与TPL的抗肿瘤作用有关[3-4]。miR-29b是miR-29家族成员之一，在许多肿瘤的生长转移中起着抑制作用。研究发现，miR-29b/KDM2A信号通路在中药提取物的抗肿瘤作用中发挥着重要作用，也是调控胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的重要信号通路[5-7]。但TPL在胃癌中能否通过miR-29b/KDM2A信号通路发挥抗肿瘤作用尚不明确。因此，本研究通过体外细胞实验探讨TPL能否通过miR-29b/KDM2A信号通路影响胃癌细胞的增殖、迁移及侵袭。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

人胃癌细胞系MKN45购自中国科学院上海细胞库。TPL（纯度>99.8%）购自美国Sigma公司，PCR引物、miR-29b抑制物（miR-29b inhibitor）、抑制物阴性对照（inhibitor-NC）购自上海吉玛制药公司；DMEM培养基购自美国Gibco公司；PrimeScript RT试剂盒、SYBR Premix Ex TaqⅡ试剂盒购自日本TaKaRa公司；CCK-8试剂盒购自日本Dojindo公司；Lipofectamine™3000转染试剂和TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司；Transwell小室购自美国Millipore公司；基质胶购自美国BD公司；KDM2A、GAPDH单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗IgG购自美国Santa Cruz公司。

1.2 CCK-8法检测细胞增殖抑制率

MKN45细胞在含10%胎牛血清的DMEM培养基中培养，取对数生长期的细胞以5×10^3个/孔接种于96孔板，置于37 ℃、5%CO_2、饱和湿度的培养箱中过夜培养，待细胞贴壁后，分别用含终浓度为0 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL的TPL药物培养基培养，每个浓度设4个复孔，以0 μg/mL作为对照，继续培养48 h后，按照CCK-8试剂盒说明书操作，每孔加入10 μL CCK-8反应液，继续孵育1 h，用酶标仪测定450 nm波长处的吸光度值，计算细胞增殖抑制率。

1.3 qRT-PCR检测细胞miR-29b、KDM2A mRNA表达

使用TRIzol试剂提取MKN45细胞总RNA，按PrimeScript RT试剂盒说明书反转录得到cDNA。以cDNA为模板，加入PCR引物，参照SYBR Premix Ex TaqⅡ试剂盒说明书配制PCR反应体系，上机进行检测。引物序列如下：miR-29b正向5′-TCAGGAAGCTGGTTTCATATGGT-3′，反向5′-CCCCCAAGAACACTGATTTCAA-3′；U6正向5′-CAGCACATATACTAAAATTGGAACG-3′，反向5′-ACGAATTTGCGTGTCATCC-3′；KDM2A正向5′-CCGATTGTGTCAGGAGCCAG-3′，反向5′-CACAGGACTGCTTCATGCGTC-3′；GAPDH正向5′-CCACCCATGGCAAATTCC-3′，反向5′-ACTCCACGACGTACTCAG-3′。反应条件：95 ℃预变性10 s；95 ℃变性5 s，60 ℃退火20 s，75 ℃延伸15 s，共40个循环。以U6作为miR-29b内参，以GAPDH作为KDM2A内参，采用$2^{-\triangle\triangle Ct}$法计算相对表达量。

1.4 细胞分组及转染

取对数生长期MKN45细胞接种于6孔板，随机分为对照组、TPL组、inhibitor-NC+TPL组、miR-29b inhibitor+TPL组。对照组细胞常规培养，不做任何处理；TPL组细胞用含终浓度为200 μg/mL的TPL药物培养基培养；inhibitor-NC+TPL组和miR-29b inhibitor+TPL组细胞应用Lipofectamine™3000转染试剂以脂质体转染法分别转染inhibitor-NC和miR-29b inhibitor，转染6 h后弃培养基，用含终浓度为200 μg/mL的TPL药物培养基继续培养48 h后进行后续实验。

1.5 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

收集各组MKN45细胞接种到细胞培养皿，每个细胞培养皿中添加培养液10 mL、细胞500个，细胞培养皿放入37 ℃、5%CO_2恒温培养箱中继续培养14 d，出现肉眼可见的成团细胞集落后终止培养，以4%多聚甲醛固定细胞，染色后在光学显微镜下进行细胞集落计数。

1.6 Transwell实验检测各组细胞迁移、侵袭能力

迁移实验：收集各组MKN45细胞，用无血清细胞培养基制备单细胞悬液（细胞浓度为1×10^5/mL），各组取200 μL接种于Transwell上室，取500 μL完全细胞培养基加入下室，继续培养24 h后取出，棉签拭除上室内膜表面细胞，以多聚甲醛固定细胞，染色、封片，显微镜下计数迁移细胞数。侵袭实验：先在小室上室

内膜均匀涂抹基质胶,其余方法同迁移实验。

1.7 Western blot检测细胞KDM2A蛋白的表达

收集各组MKN45细胞,RIPA裂解液冰上裂解提取细胞总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。取30 μg蛋白上样,采用10% SDS-PAGE行电泳分离,转至硝酸纤维素膜上,4 ℃下将膜与兔抗鼠KDM2A单克隆抗体(稀释比1∶2 000)及兔抗鼠GAPDH抗体(稀释比1∶5 000)孵育过夜,洗膜3次,加入山羊抗兔二抗IgG,ECL发光剂显影,Image J软件分析各条带灰度值。

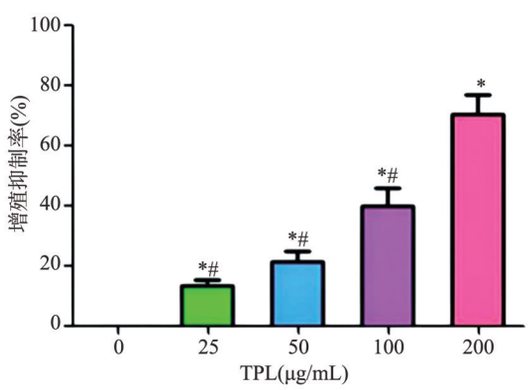
1.8 统计学处理

数据采用SPSS 22.0软件进行统计学分析,计量数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,使用单因素方差分析,进一步两两比较采用*LSD-t*检验。以$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度TPL对MKN45细胞增殖的影响

CCK-8检测结果显示,与0 μg/mL比较,25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL TPL对MKN45细胞均有明显增殖抑制作用($P<0.05$),且200 μg/mL TPL的增殖抑制率明显高于25 μg/mL、50 μg/mL和100 μg/mL($P<0.05$),见图1。因此,选择200 μg/mL的TPL进行后续实验。



*:与0 μg/mL比较,$P<0.05$;#:与200 μg/mL比较,$P<0.05$

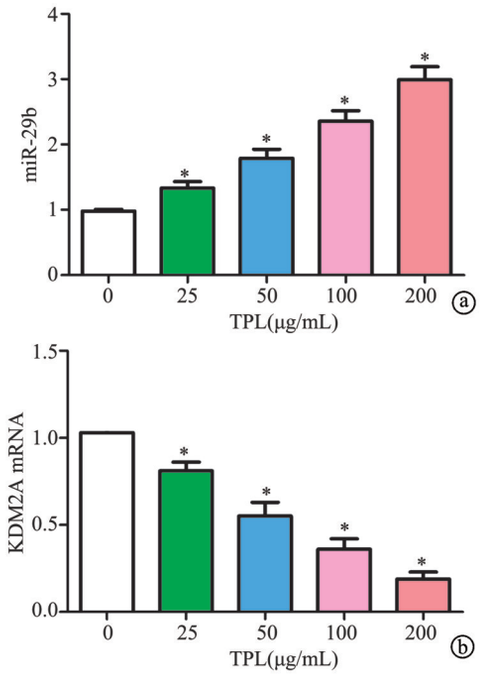
图1 不同浓度TPL对MKN45细胞增殖的影响

2.2 不同浓度TPL对MKN45细胞miR-29b、KDM2A mRNA表达的影响

qRT-PCR结果显示,与0 μg/mL比较,25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL TPL对MKN45细胞miR-29b表达均有明显促进作用($P<0.05$),对KDM2A mRNA表达均有明显抑制作用($P<0.05$),见图2。

2.3 各组MKN45细胞miR-29b、KDM2A mRNA和KDM2A蛋白比较

qRT-PCR及Western blot检测结果显示,与对照组比较,TPL组细胞miR-29b表达升高($P<0.05$),KDM2A mRNA和蛋白表达降低($P<0.05$),提示TPL能够明显上调MKN45细胞miR-29b表达,抑制KDM2A表达。与inhibitor-NC+TPL组比较,miR-29b inhibitor+TPL组细胞miR-29b表达降低($P<0.05$),KDM2A mRNA和蛋白表达升高($P<0.05$),提示转染miR-29b inhibitor能逆转TPL对MKN45细胞miR-29b表达的促进作用及对KDM2A表达的抑制作用,见图3。



a:MKN45细胞miR-29b表达;b:MKN45细胞KDM2A mRNA表达 *:与0 μg/mL比较,$P<0.05$

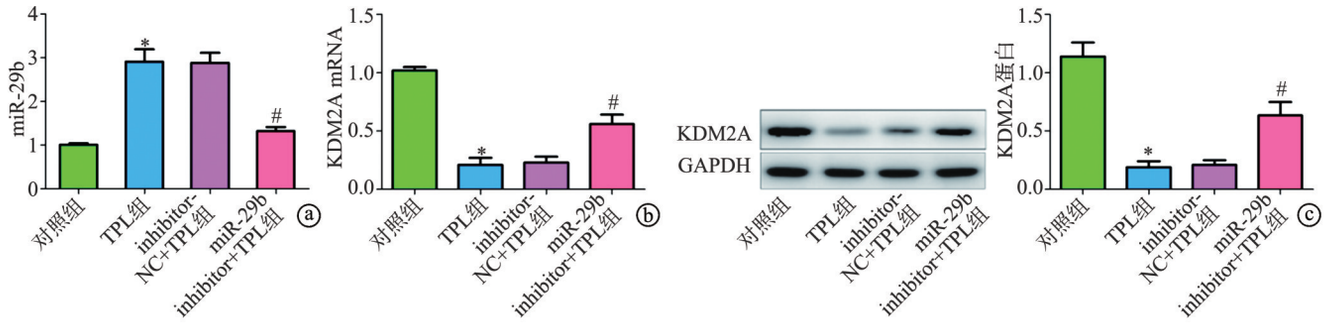
图2 不同浓度TPL对MKN45细胞miR-29b、KDM2A mRNA表达的影响

2.4 各组MKN45细胞克隆形成能力比较

平板克隆形成实验结果显示,与对照组比较,TPL组细胞克隆形成数减少($P<0.05$),提示TPL能够明显抑制MKN45细胞克隆形成能力。与inhibitor-NC+TPL组比较,miR-29b inhibitor+TPL组细胞克隆形成数增加($P<0.05$),提示转染miR-29b inhibitor能逆转TPL对MKN45细胞克隆形成能力的抑制作用,见图4。

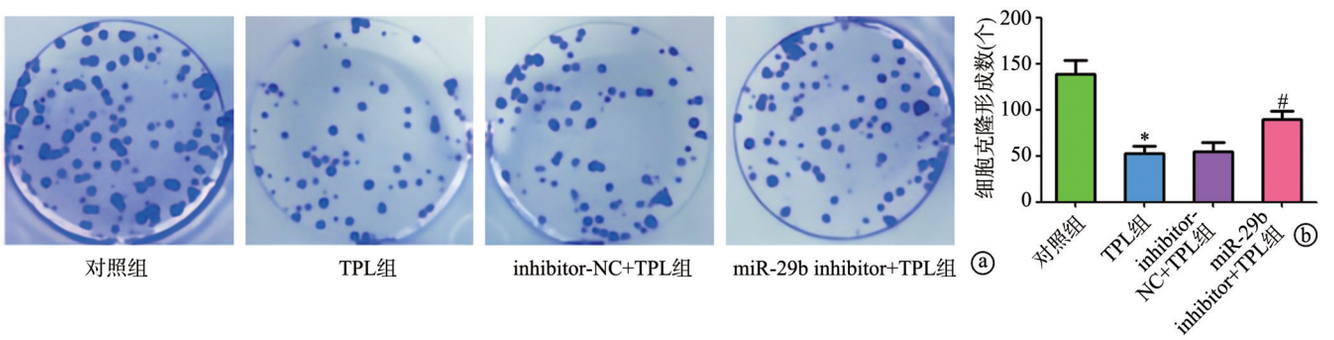
2.5 各组MKN45细胞迁移、侵袭能力比较

Transwell结果显示,与对照组比较,TPL组迁移及侵袭细胞数减少($P<0.05$),提示TPL能够明显抑制MKN45细胞迁移、侵袭能力。与inhibitor-NC+TPL组比较,miR-29b inhibitor+TPL组迁移及侵袭细胞数增加($P<0.05$),提示转染miR-29b inhibitor能逆转TPL对MKN45细胞迁移、侵袭的抑制作用,见图5。



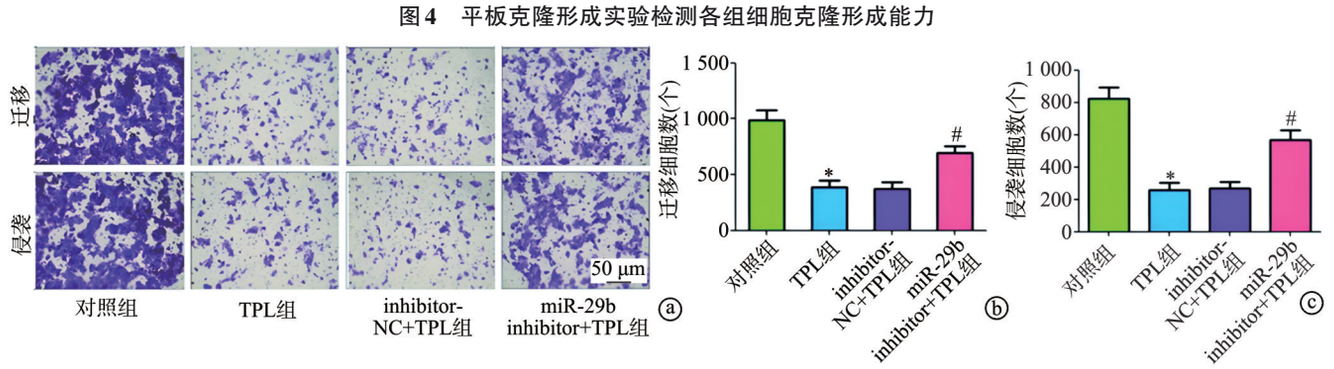
a:各组细胞miR-29b表达;b:各组细胞KDM2A mRNA表达;c:各组细胞KDM2A蛋白表达 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与inhibitor-NC+TPL组比较,$P<0.05$

图3 各组细胞miR-29b、KDM2A mRNA和蛋白比较



a:各组平板克隆形成实验结果;b:各组克隆形成数比较 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与inhibitor-NC+TPL组比较,$P<0.05$

图4 平板克隆形成实验检测各组细胞克隆形成能力



a:各组Transwell实验光镜图;b:各组迁移细胞数比较;c:各组侵袭细胞数比较 *:与对照组比较,$P<0.05$;#:与inhibitor-NC+TPL组比较,$P<0.05$

图5 Transwell实验检测各组细胞迁移、侵袭能力

3 讨论

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤,我国2020年胃癌死亡人数占所有癌症死亡人数的45%,国家癌症中心报告指出,我国胃癌的病死率是全球平均水平的2倍[8]。手术仍然是治疗胃癌最常用的策略,而化疗和放疗则被广泛用于不可切除的恶性胃癌治疗。目前常用的抗肿瘤药物,如铂类、5-氟尿嘧啶和阿霉素等,可缓解症状、控制肿瘤生长及延长患者生存期。然而,这些药物价格昂贵、毒性大,常可导致免疫功能低下、骨髓抑制和消化功能障碍等,且存在耐药性。有研究证实,中药治疗各种肿瘤具有成本低、毒性小、可增加免疫力并延长患者生存期等优势,为中药在肿瘤治疗中的应用提供了初步依据[9-10]。

TPL是从中药雷公藤中纯化得到的主要活性成分,已在多种肿瘤细胞中显示出抗肿瘤活性。研究表明,TPL是一种广谱肿瘤抑制剂,可治疗白血病、乳腺癌、胰腺癌、肺癌等,然而TPL抗肿瘤活性的机制仍有待进一步探索[2]。据报道,TPL可抑制神经母细胞瘤的细胞增殖和肿瘤生长,并且NF-κB信号通路参与TPL诱导的神经母细胞瘤细胞凋亡过程[4]。Chang等[11]的研究证明,TPL通过下调脂质脂肪酶信号通路来延缓

肝细胞癌的进展。TPL还被报道能通过ROCK/PTEN/Akt信号通路减弱细胞上皮间质转化,从而减少三阴性乳腺癌细胞的转移[12]。然而,TPL对胃癌的抗肿瘤作用尚未明确。因此,本研究采用CCK-8试验评估不同浓度的TPL对人胃癌细胞系MKN45的杀伤作用,以确定TPL对胃癌细胞的作用。结果显示,TPL降低了胃癌细胞的增殖能力,且高剂量的TPL对胃癌细胞的增殖抑制率更高。本研究显示,200 μg/mL TPL处理后的MKN45细胞克隆形成能力降低、迁移及侵袭能力下降,这说明TPL能抑制胃癌细胞的生长及转移,从而发挥抗肿瘤作用。

研究发现,miR-29b作为胃癌的抑癌基因之一,在胃癌细胞生长、转移中起着重要的调控作用[13-14],抑制miR-29b可抑制胃癌的转移和发展[15-16]。KDM2A是miR-29b调控肿瘤细胞生长及转移的靶基因之一,miR-29b/KDM2A信号通路是目前已被证明的调控胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的重要信号通路之一[6-7]。研究发现,姜黄素通过miR-29b/KDM2A信号通路抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移[5]。本研究通过qRT-PCR发现,不同浓度的TPL对MKN45细胞miR-29b表达均有明显促进作用,对KDM2A mRNA表达均有明显抑制作用。因此,我们推测TPL可能通过miR-29b/KDM2A信号通路抑制胃癌细胞的侵袭和迁移并进行了验证。本研究通过转染miR-29b抑制物的方法抑制胃癌细胞中miR-29b表达,结果发现抑制胃癌细胞miR-29b表达能够逆转TPL对胃癌细胞克隆形成、迁移及侵袭的抑制作用,并逆转TPL对胃癌细胞KDM2A mRNA和蛋白表达的促进作用。这说明TPL能够通过miR-29b/KDM2A信号通路抑制胃癌细胞的生长和转移,miR-29b/KDM2A信号通路可能介导TPL的抗胃癌生长、转移。

综上,TPL能够抑制胃癌细胞增殖、迁移及侵袭从而发挥抗肿瘤作用,其机制可能与调控miR-29b/KDM2A信号通路有关,为TPL的临床应用提供了新的依据。

[参考文献]

[1] Miller KD, Nogueira L, Devasia T, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2022[J]. CA Cancer J Clin, 2022, 72(5): 409-436. doi: 10.3322/caac.21731.

[2] 朱大诚,常 娜,吴慧婷. 雷公藤甲素抗肿瘤机制的研究[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(12): 8-12. doi: 10.13193/j.issn.1673-7717.2022.12.002.

[3] Liang H, Che W, Peng F, et al. Triptolide inhibits esophageal squamous cell carcinoma progression by regulating the circNOX4/miR-153-3p/SATB1 signaling pathway[J]. Thorac Cancer, 2024, 15(7): 538-549. doi: 10.1111/1759-7714.15215.

[4] Jiang J, Song X, Yang J, et al. Triptolide inhibits proliferation and migration of human neuroblastoma SH-SY5Y cells by upregulating microRNA-181a[J]. Oncol Res, 2018, 26(8): 1235-1243. doi: 10.3727/096504018X15179661552702.

[5] Guo X, Chen J, Gao R, et al. Curcumin inhibits cervical cancer cell proliferation, migration and invasion by suppressing the PI3K/AKT signaling pathway via the miR-29b/KDM2A axis[J]. J Chin Pharm Sci, 2020, 29(6): 398-410. doi: 10.5246/jcps.2020.06.038.

[6] Zhao Y, Chen X, Jiang J, et al. Epigallocatechin gallate reverses gastric cancer by regulating the long noncoding RNA LINC00511/miR-29b/KDM2A axis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(10): 165856. doi: 10.1016/j.bbadis.2020.165856.

[7] Kong Y, Zou S, Yang F, et al. RUNX3-mediated up-regulation of miR-29b suppresses the proliferation and migration of gastric cancer cells by targeting KDM2A[J]. Cancer Lett, 2016, 381(1): 138-148. doi: 10.1016/j.canlet.2016.07.038.

[8] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020[J]. Chin Med J (Engl), 2021, 134(7): 783-791. doi: 10.1097/CM9.0000000000001474.

[9] Zhang Y, Lou Y, Wang J, et al. Research status and molecular mechanism of the traditional Chinese medicine and antitumor therapy combined strategy based on tumor microenvironment[J]. Front Immunol, 2021, 11(1): 609705. doi: 10.3389/fimmu.2020.609705.

[10] Huang WJ, Ruan S, Wen F, et al. Multidrug resistance of gastric cancer: the mechanisms and Chinese medicine reversal agents[J]. Cancer Manag Res, 2020, 12(1): 12385-12394. doi: 10.2147/CMAR.S274599.

[11] Chang W, Wang J, You Y, et al. Triptolide reduces neoplastic progression in hepatocellular carcinoma by downregulating the lipid lipase signaling pathway[J]. Cancers (Basel), 2024, 16(3): 550. doi: 10.3390/cancers16030550.

[12] Wu Q, Leng X, Ma X, et al. Triptolide reduces MDA-MB-231 cell metastasis by attenuating epithelial-mesenchymal transition through the ROCK/PTEN/Akt axis[J]. Chem Biodivers, 2023, 20(12): e202300399. doi: 10.1002/cbdv.202300399.

[13] 施 莉,胡丽瑜,钟定福,等. 联合靶向阻断miR-29b/92b/106b抑制胃癌细胞生长及迁移[J]. 中国病理生理杂志, 2018, 34(11): 1997-2003. doi: 10.3969/j.issn.1000-4718.2018.11.012.

[14] Wang T, Hou J, Jian S, et al. miR-29b negatively regulates MMP2 to impact gastric cancer development by suppress gastric cancer cell migration and tumor growth[J]. J Cancer, 2018, 9(20): 3776-3786. doi: 10.7150/jca.26263.

[15] Kimura Y, Ohzawa H, Kaneko Y, et al. Intraperitoneal transfer of miR-29b containing exosome suppresses the development of peritoneal metastases from gastric cancer[J]. Gan To Kagaku Ryoho, 2023, 50(13): 1435-1437.

[16] Li H, Liu G, Pan K, et al. Methylation-induced downregulation and tumor suppressive role of microRNA-29b in gastric cancer through targeting LASP1[J]. Oncotarget, 2017, 8(56): 95880-95895. doi: 10.18632/oncotarget.21431.

(编辑:魏 源)