DOI:10.16016/j.1000-5404.201510140

DIM 对胃癌细胞 SGC-7901 体外增殖与侵袭的抑制作用

黄 桃[1],万 东[1],何发明[1],张才全[2],赵 林[1] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院重症医学科[1],胃肠外科[2])

[摘要] **目的** 探讨3,3-二吲哚基甲烷(3, 3-Diindolylmethane, DIM)对胃癌细胞 SGC-7901 增殖和侵袭的抑制作用。**方法** 用 MTT 法检测不同浓度(0、10、20、40、80 μmol/L)DIM 对胃癌细胞 SGC-7901 生长抑制情况;Transwell 小室检测 40 μmol/L 的 DIM 对胃癌 SGC-7901 细胞侵袭力的影响,Western blot 检测胃癌细胞中血小板源性生长因子-D(PDGF-D)和 β-catenin 蛋白表达的变化,ELISA 法检测培养液上清中 MMP-2、MMP-9 的浓度。**结果** 不同浓度的 DIM 对胃癌细胞 SGC-7901 均有抑制作用($P<0.05$),随着药物浓度增加,抑制作用增强;但 40 μmol/L 和 80 μmol/L 差异无统计学意义($P>0.05$)。40 μmol/L 的 DIM 作用24 h 后胃癌细胞 SGC-7901 侵袭力下降 75.2%(125.4±10.8 *vs* 31.1±4.5,$P<0.05$),PDGF-D 和 β-catenin 的表达分别下降了 55.8% 和 52.5%($P<0.05$),培养液上清中的 MMP-2、MMP-9 的浓度明显下降(23.5±2.6 *vs* 13.2±1.9;30.4±2.4 *vs* 15.8±2.1,$P<0.05$)。**结论** DIM 对胃癌细胞的增殖和侵袭有抑制作用,其机制可能与 PDGF-D、β-catenin、MMP-2、MMP-9 的表达下降有关。

[关键词] 3,3-二吲哚基甲烷;增殖;侵袭;血小板源性生长因子-D;β-catenin;基质金属蛋白酶;胃癌
[中图法分类号] R73-37;R735.2;R979.11 [文献标志码] A

Effect of DIM on inhibiting proliferation and invasion in human gastric carcinoma SGC-7901 cells

Huang Tao[1], Wan Dong[1], He Faming[1], Zhang Caiquan[2], Zhao Lin[1] ([1]Department of Critical Care Medicine, [2]Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of 3,3-diindolylmethane (DIM) on inhibiting proliferation and invasion in gastric carcinoma SGC-7901 cells. **Methods** The proliferation of gastric cancer SGC-7901 cells treated with different concentrations (0, 10, 20, 40 and 80 μmol/L) of DIM was detected by MTT assay. The invasive ability of SGC-7901 cells treated with 40 μmol/L of DIM was detected with Transwell chamber assay. The expression of PDGF-D and β-catenin in SGC-7901 cells and the concentrations of MMP-2 and MMP-9 in culture supernatant were detected by Western blotting and ELISA, respectively. **Results** Different concentrations of DIM inhibited the proliferation of gastric cancer cells ($P<0.05$), and the inhibitory effect was associated with DIM concentration. There was no statistically significant difference between 40 and 80 μmol/L. The invasive ability of SGC-7901 cells was significantly reduced by 75.2% after treatment with 40 μmol/L of DIM for 24 h (125.4±10.8 *vs* 31.1±4.5, $P<0.05$). The expression of PDGF-D and β-catenin was decreased by 55.8% and 52.5%, respectively ($P<0.05$). The concentrations of MMP-2 and MMP-9 in culture supernatant were significantly decreased after DIM treatment (23.5±2.6 *vs* 13.2±1.9; 30.4±2.4 *vs* 15.8±2.1, $P<0.05$). **Conclusion** DIM inhibits gastric carcinoma cell proliferation and invasion through down-regulating the expression of PDGF-D, β-catenin, MMP-2 and MMP-9.

[**Key words**] 3,3-diindolylmethane; proliferation; invasion; PDGF-D; β-catenin; metal matrix proteins; gastric carcinoma

---

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81372102)
[通信作者] 赵 林, E-mail:zhaolin790826@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20160126.1536.024.html(2016-01-26)

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372102). Corresponding author: Zhao Lin, E-mail: zhaolin790826@163.com

近年来,植物来源的天然抗肿瘤成分3,3-二吲哚基甲烷(3,3-Diindolylmethane, DIM)越来越受到重视,是一个非常有前景的抗肿瘤药物[1];研究发现DIM可以抑制多种肿瘤的生长、侵袭和血管生成[1-2],增加前列腺癌对放射治疗的敏感性[3];DIM可以促进胃癌的凋亡[4],抑制胃癌生长[5-6],还可以增强胃癌细胞对5-Fu的敏感性[7],但是DIM对胃癌的侵袭是否有影响及其机制尚少见报道。我们研究发现胃癌组织和胃癌细胞中PDGF-D高表达与胃癌的侵袭密切相关,下调PDGF-D可以抑制胃癌细胞的生长和侵袭[8]。DIM可以抑制胃癌的生长,那么对胃癌的侵袭是否有影响,其机制是否与PDGF-D信号通路有关呢?因此,本研究探讨DIM对胃癌细胞生长、侵袭的影响及其与PDGF-D通路的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株SGC-7901及鼠胚胎成纤维细胞NIH-3T3购自中国科学院上海细胞库,由重医大附一院重庆市普通外科学重点实验室保存并提供;山羊抗人PDGF-D抗体、鼠抗人β-actin抗体、MMP-2和MMP-9 ELISA试剂盒购自美国R&D Systems公司,兔抗人β-catenin抗体购自美国Santa Cruz公司,DIM及MTT购自美国Sigma公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 细胞培养用含10%胎牛血清的RPMI 1640培养液,在37 ℃、常规湿度及含5% CO_2的孵箱中培养,定期观察细胞生长情况。在对数生长期,使用含0.25%的胰酶消化液消化细胞,用于扩增及后续实验研究。

1.2.2 MTT检测细胞的增殖 应用MTT法检测细胞生长,根据细胞生长情况绘制生长曲线,方法参照文献[8],消化好细胞后制成2.5×10^4/mL的单细胞悬液,加入96孔板中,每孔200 μL,即每孔中含有5×10^3个细胞,每组设3个复孔,分别用10、20、40、80 μmol/L的DIM作用胃癌SGC-7901细胞,培养24~72 h,消化细胞后,在96孔板中每孔加入MTT溶液20 μL,继续放入37 ℃温箱孵育4 h后终止培养,孔内培养液丢弃干净,然后每孔加入150 μL的DMSO,充分振荡10 min,使孔内结晶物完全溶解。使用酶标仪在波长570 nm下检测各孔的光密度值[$D(570)$],以$D(570)$值为纵轴,以时间为横轴绘制细胞生长曲线。

1.2.3 体外侵袭能力实验 操作方法参照文献[8-9],BioCoat Matrigel小室在使用前需水化基膜,用30 mL的RPMI 1640孵育并放入37 ℃的CO_2孵箱待用。用0.1%胰蛋白酶消化对数生长期的胃癌细胞SGC-7901,用含10% FBS的RPMI1640培养液配成终浓度为2×10^6个/mL的单个细胞悬液备用。取出经水化的BioCoat Matrigel侵袭小室,在其上室加入50 μL细胞悬液(含1×10^5个细胞),经40 μmol/L浓度的DIM处理,每组设3个复孔,然后加入完全培养基350 μL,在下室加入NIH-3T3细胞条件培养基600 μL,经40 μmol/L浓度的DIM处理,放入细胞培养箱培养24 h后取出小室,棉签小心擦除小室上层细胞,经95%酒精固定,HE染色剪裁后中性树胶封片,在显微镜下放大100倍,计算每视野下细胞数并采集图片,每孔计数5个视野,计算平均数,根据公式计算抑制率。

侵袭抑制率 =(1 -实验组侵袭细胞数/对照组侵袭细胞数)×100%

1.2.4 Western blot检测PDGF-D和β-catenin的表达

用40 μmol/L的DIM处理胃癌细胞48 h,收集细胞并裂解细胞,用蛋白提取试剂盒提取细胞的总蛋白,加入蛋白上样缓冲液,沸水5 min变性,12 mL/L的SDS-PAGE垂直电泳分离,电湿转,将蛋白转到PVDF膜上,封闭液封闭1.5 h,加入一抗(稀释浓度为1∶1 000)4 ℃过夜,加入HRP标记二抗(稀释浓度为1∶5 000),37 ℃下温育1.5 h后,经TBST漂洗,用ECL发光试剂滴加于PVDF膜上,Bio-Rad成像仪成像后分析,计算灰度值,计算抑制率,计算公式如下(A为检测蛋白相对于内参β-actin的相对表达量)。

表达抑制率 =(1 - A实验组/A对照组)×100%

1.2.5 ELISA法检测上清液中各因子的浓度

ELISA法检测培养液上清中MMP-2、MMP-9浓度,先将对数生长的胃癌细胞消化后调细胞浓度至5×10^4个/mL,使用6孔板,每孔加入2 mL,设3个复孔,经终浓度为40 μmol/L的DIM处理,48 h后收集培养液的上清,同时胰酶消化细胞并计数。按MMP-2、MMP-9的ELISA试剂盒说明书按步骤进行操作,Bio-Rad酶标仪测定波长450 nm下的光密度值[$D(450)$],将其作为纵坐标,标准品浓度为横坐标,绘制出标准曲线,求得标准曲线方程,通过标准曲线,计算标本对应的上清液中MMP-2、MMP-9蛋白浓度。

1.3 统计学处理

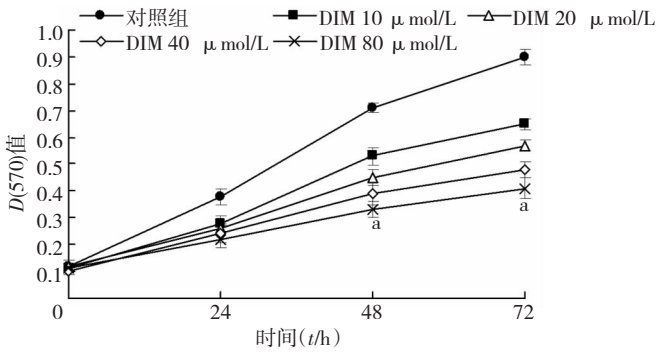
计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 16.0统计软件

进行单因素方差分析,两组间均数比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 DIM 对胃癌细胞 SGC-7901 细胞增殖的抑制作用

不同浓度的 DIM 对胃癌细胞 SGC-7901 的生长均有抑制作用,24 h 后各浓度 DIM 组较对照组均出现不同程度的抑制作用($P<0.05$),但各浓度组间差异无统计学意义($P>0.05$),培养 48 h 以后抑制更为明显,不同浓度组的 DIM 对胃癌细胞均表现出明显的抑制作用,呈现浓度依赖性,在 80 μmol/L 浓度组对细胞生长的抑制表现最明显,各浓度组间差异具有统计学意义($P<0.05$);72 h 时,不同浓度的 DIM 与对照组均有差异,但是 40、80 浓度组无差异($P>0.05$),其他各浓度组间均有差异($P<0.05$),各浓度 DIM 组在 24、48、72 h 时间点对胃癌细胞生长的抑制具有统计学意义($P<0.05$)。DIM 对胃癌细胞 SGC-7901 生长曲线见图 1。



a:$P<0.05$,与对照组相比较

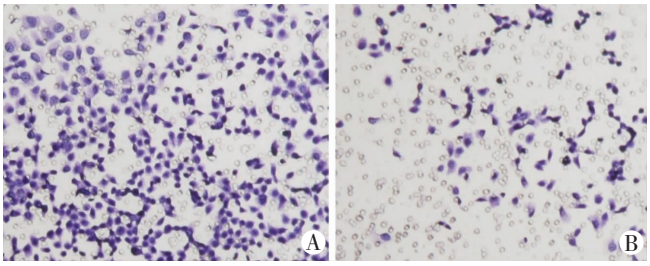
图 1 不同浓度 DIM 对胃癌 SGC-7901 细胞生长的影响 ($n=3$)

2.2 DIM 对 SGC-7901 细胞侵袭能力的影响

采用 Transwell 小室模型,经 40 μmol/L 的 DIM 处理胃癌细胞 24 h 后与对照组相比,DIM 明显抑制了 SGC-7901 细胞的侵袭(图 2)。两组膜下的每视野细胞数分别为(125.4±10.8)和(31.1±4.5),其抑制率为 75.2%,差异有统计学意义($P<0.05$)。

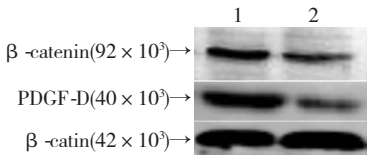
2.3 DIM 对胃癌 SGC-7901 细胞 PDGF-D、β-catenin 蛋白表达的影响

选择 40 μmol/L 浓度的 DIM 组对胃癌细胞处理 48 h,Western blot 检测(图 3)胃癌细胞 PDGF-D 表达相对表达量为(0.52±0.03;0.23±0.04,$P<0.05$),抑制率达到 55.8%;β-catenin 的相对表达量为(0.61±0.08;0.29±0.078,$P<0.05$),抑制率为 52.5%。



A:对照组;B:DIM 组

图 2 Transwell 实验观察两组细胞侵袭情况 (HE ×100)



1:对照组;2:DIM 组

图 3 Western blot 检测 DIM 对 PDGF-D 和 β-catenin 蛋白表达的影响

2.4 DIM 对胃癌 SGC-7901 细胞培养细胞上清液 MMP-2、MMP-9 浓度的影响

经 40 μmmol/L 浓度 DIM 处理的胃癌 SGC-7901 细胞培养液的上清液,DIM 处理组与对照组上清液中 MMP-2 的浓度分别为 13.2±1.9 和 23.5±2.6(ng/10^6细胞),DIM 处理组与对照组上清液中 MMP-9 的浓度分别为 15.8±2.1 和 30.4±2.4(ng/10^6细胞),差异具有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

对 DIM 研究较多的是集中在前列腺癌、乳腺癌、消化道肿瘤等恶性肿瘤,但是 DIM 对胃癌侵袭的影响和机制还少见报道,另外,很多研究发现 PDGF-D 与肿瘤的生长和侵袭密切相关,下调 PDGF-D 后肿瘤细胞的侵袭受到抑制,其机制和 Akt/NF-κB 等信号通路有关[5,10-12]。在胃癌标本和细胞系中 PDGF-D 的高表达,且与胃癌细胞的生长、侵袭和血管形成等生物学特性密切相关,抑制 PDGF-D 均对胃癌细胞生长和进展有抑制作用[5,13-16]。但 DIM 是否通过抑制 PDGF-D 来抑制胃癌的侵袭尚不明了。本实验发现经 DIM 处理的胃癌细胞 SGC-7901 生长和侵袭均受到抑制;MTT 研究发现 DIM 对 SGC-7901 的生长有明显的抑制作用,而且胃癌细胞的生长受抑制程度与 DIM 的浓度相关。进一步检测发现,DIM 处理后胃癌 SGC-7901 的 PDGF-D 蛋白表达下降,PDGF-D 与胃癌细胞 SGC-7901 的生长密切相关,因而 DIM 抑制胃癌细胞 SGC-7901 的生长与 PDGF-D 的表达下降有关。

进一步通过侵袭小室研究发现,经 DIM 处理的胃癌细胞 SGC-7901 穿透 Matrigel 小室的细胞数明显减

少,说明 DIM 对胃癌细胞 SGC-7901 的侵袭力具有明显的抑制作用,DIM 可以抑制胃癌 SGC-7901 中 PDGF-D 的表达,本实验还发现经 DIM 处理后胃癌细胞表达 β-catenin 蛋白下降,而 β-catenin 蛋白是 PDGF-D 的下游蛋白,胃癌侵袭力与 MMPs 相关,而 MMP-2、MMP-9 是 β-catenin 的下游蛋白[8]。本研究发现 DIM 处理的胃癌细胞培养液中 MMP-2、MMP-9 浓度较对照组明显下降,而上清液中游离的 MMP-2、MMP-9 与胃癌的侵袭力密切相关[5,17-18],因而 MMP-2、MMP-9 表达下降后胃癌细胞 SGC-7901 的侵袭力下降。其侵袭力的下降与胃癌细胞中 PDGF-D/β-catenin 信号通路被 DIM 抑制有关。DIM 对胃癌细胞 SGC-7901 的生长与侵袭有明显的抑制作用,其机制可能与 DIM 抑制胃癌细胞 PDGF-D/β-catenin 信号通路的表达,影响下游与胃癌侵袭相关的 MMP-2、MMP-9 的表达,抑制胃癌细胞侵袭力。

参考文献:

[1] Jin H, Park M H, Kim S M. 3,3′-Diindolylmethane potentiates paclitaxel-induced antitumor effects on gastric cancer cells through the Akt/FOXM1 signaling cascade[J]. Oncol Rep, 2015, 33(4): 2031 - 2036. DOI:10.3892/or.2015.3758

[2] Jin H, Li X J, Park M H, *et al*. FOXM1-mediated downregulation of uPA and MMP9 by 3,3′-diindolylmethane inhibits migration and invasion of human colorectal cancer cells[J]. Oncol Rep, 2015, 33(6): 3171 - 3177. DOI:10.3892/or.2015.3938

[3] Singh-Gupta V, Banerjee S, Yunker C K, *et al*. B-DIM impairs radiation-induced survival pathways independently of androgen receptor expression and augments radiation efficacy in prostate cancer[J]. Cancer Lett, 2012, 318(1): 86 - 92. DOI:10.1016/j.canlet.2011.12.006

[4] Ye Y, Miao S, Wang Y, *et al*. 3, 3′-diindolylmethane potentiates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of gastric cancer cells[J]. Oncol Lett, 2015, 9(5): 2393 - 2397. DOI:10.3892/ol.2015.3008

[5] Li X J, Park E S, Park M H, *et al*. 3, 3′-Diindolylmethane suppresses the growth of gastric cancer cells via activation of the Hippo signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2013, 30(5): 2419 - 2426. DOI:10.3892/or.2013.2717

[6] Yin X F, Chen J, Mao W, *et al*. A selective aryl hydrocarbon receptor modulator 3, 3′-Diindolylmethane inhibits gastric cancer cell growth[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 31: 46. DOI: 10.1186/1756-9966-31-46

[7] 苏明丽, 卢文华, 陈洁. 3,3′-二吲哚甲烷联合 5-氟尿嘧啶对胃癌细胞增殖的影响[J]. 热带医学杂志, 2014, 14(6): 697 - 700.

[8] Zhao L, Zhang C, Liao G, *et al*. RNAi-mediated inhibition of PDGF-D leads to decreased cell growth, invasion and angiogenesis in the SGC-7901 gastric cancer xenograft model[J]. Cancer Biol Ther, 2010, 9(1): 42 - 48. DOI:10.4161/cbt.9.1.10282

[9] Brown L, Waseem A, Cruz I N, *et al*. Desmoglein 3 promotes cancer cell migration and invasion by regulating activator protein 1 and protein kinase C-dependent-Ezrin activation[J]. Oncogene, 2014, 33(18): 2363 - 2374. DOI:10.1038/onc.2013.186

[10] Najy A J, Won J J, Movilla L S, *et al*. Differential tumorigenic potential and matriptase activation between PDGF B versus PDGF D in prostate cancer[J]. Mol Cancer Res, 2012, 10(8): 1087 - 1097. DOI:10.1158/1541-7786.MCR-12-0071

[11] Okada A, Yaguchi T, Kanno T, *et al*. PDGF-D/PDGF-ββ receptor-regulated chemotaxis of malignant mesothelioma cells[J]. Cell Physiol Biochem, 2012, 29(1/2): 241 - 250. DOI:10.1159/000337605

[12] Han Y, Guo X H, Zheng Q F, *et al*. Down-regulation of platelet-derived growth factor-D expression blockades NF-κB pathway to inhibit cell proliferation and invasion as well as induce apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(3): 2473 - 2483. DOI:10.1007/s11033-012-2328-y

[13] 赵林, 张才全, 何发明, 等. PDGF-D/PDGFR-β 在胃癌中的表达及与血管形成的关系[J]. 生命科学研究, 2012, 16(6): 516 - 520. DOI:10.3969/j.issn.1007-7847.2012.06.009

[14] 丁苏宁, 常树建, 李莉华, 等. PDGF-D 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(8): 1600 - 1603. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2010.08.50

[15] 赵林, 张才全, 廖刚, 等. PDGF-D 和 VEGF 在胃癌中的表达及其意义[J]. 基础医学与临床, 2009, 29(12): 1305 - 1309.

[16] Huang F, Wang M, Yang T, *et al*. Gastric cancer-derived MSC-secreted PDGF-DD promotes gastric cancer progression[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2014, 140(11): 1835 - 1848. DOI:10.1007/s00432-014-1723-2

[17] Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, *et al*. Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(9): 3581 - 3584.

[18] 钟华, 廖爱军, 刘迪群. MMP-2、MMP-9 与胃癌侵袭、转移的关系[J]. 实用临床医学, 2012, 13(2): 3 - 4. DOI:10.3969/j.issn.1009-8194.2012.02.002

(**收稿**:2015-10-25;**修回**:2015-12-22)

(编辑 汪勤俭)