肿瘤相关研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001219

α－倒捻子素对 MKN45 胃癌细胞增殖、迁移、侵袭和血管生成的影响及其作用机制

马林伟，徐红涛，戴小丽，韩中保
（盐城卫生职业技术学院临床医学教研室，盐城 224005）

【摘 要】**目的**：探讨 α-倒捻子素对人胃癌细胞 MKN45 增殖、迁移、侵袭和血管生成的影响及其作用机制。**方法**：MTS 法研究 α-倒捻子素对人胃癌细胞 MKN45 增殖的影响；伤口愈合实验及 Transwell 实验分别用于研究 α-倒捻子素对 MKN45 细胞体外迁移及侵袭的影响；采用大鼠动脉环实验检测 α-倒捻子素对 MKN45 胃癌细胞血管生成的影响；ELISA 实验检测 α-倒捻子素对 MKN45 细胞分泌的血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）及碱性成纤维细胞生长因子（basic fibroblast growth factor，bFGF）表达的影响等；Western blot 检测 α-倒捻子素对基质金属蛋白酶-2（matrix metalloproteinase-2，MMP-2）、基质金属蛋白酶-9（matrix metalloproteinase-9，MMP-9）、神经-钙黏素（N-cadherin）及上皮-钙黏素（E-cadherin）蛋白表达的影响。**结果**：α-倒捻子素能够明显抑制人胃癌细胞 MKN45 的增殖，且具有剂量依赖性；α-倒捻子素能够明显抑制 MKN45 细胞的迁移和侵袭；动脉环实验结果显示 α-倒捻子素能够抑制 MKN45 细胞诱导的血管生成。ELISA 结果显示，α-倒捻子素能够抑制 VEGF、TNF-α、TGF-β 及 bFGF 的蛋白表达；Western blot 结果显示 α-倒捻子素能够下调 MMP-2、MMP-9 及神经-钙黏素的表达，同时上调上皮-钙黏素的表达。**结论**：α-倒捻子素能够抑制 MKN45 人胃癌细胞的增殖、迁移、侵袭和血管生成，其发挥作用可能与以下两方面机制相关：①抑制调控肿瘤细胞迁移及血管生成相关蛋白的表达；②抑制 MKN45 细胞的上皮间质转化。

【关键词】α-倒捻子素；胃癌细胞；增殖；迁移与侵袭；血管生成；分子机制
【中图分类号】R735.2 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-11-18

Effect of α-mangostin on proliferation, migration, invasion and tumor angiogenesis of MKN45 gastric cancer cell and its mechanisms

Ma Linwei, Xu Hongtao, Dai Xiaoli, Han Zhongbao
(*Teaching and Research Section of Clinical Medicine, Yancheng Institute of Health Sciences*)

【Abstract】***Objective***: To explore the effect of α-mangostin on proliferation, migration, invasion and tumor angiogenesis of human gastric cancer cell MKN45 and its mechanisms. ***Methods***: MTS was used to study the effect of α-mangostin on proliferation of MKN45 cells. Wound healing and Transwell experiments were used to study the effect of α-mangostin on migration and invasion of MKN45 cells in vitro, respectively. Rat arterial ring experiment was used to examine the effect of α-mangostin on tumor angiogenesis. ELISA was used to examine the effect of α-mangostin on expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), tumor necrosis factor-α (TNF-α), transforming growth factor-β (TGF-β) and basic fibroblast growth factor (bFGF) to explore the potential mechanisms of α-mangostin on regulation of tumor angiogenesis. Western blot was used to detect the effect of α-mangostin on expression of MMP-2, MMP-9, N-cadherin and E-cadherin to explore the potential mechanisms of α-mangostin on regulation of tumor migration and invasion. ***Results***: The proliferation of MKN45 cells in vitro was significant inhibited by α-mangostin compared with the control group. α-mangostin significantly inhibited the migration and invasion of MKN45 cells, respectively. Rat arterial ring experiment showed that α-mangostin inhibited the tumor angiogenesis induced by tumor cell. The protein expressions of VEGF, TNF-α, TGF-β and bFGF were significant inhibited by α-mangostin. Moreover, the expression of MMP-2, MMP-9 and N-cadherin were significant downregulated while E-cadherin was significant upregulated. ***Conclusion***: α-mangostin has anti-proliferation, anti-migration, anti-invasion and anti-angiogenesis effects on MKN45 cell, and the potential mechanisms may due to: ①inhibits the tumor cell migration and tumor angiogenesis-related proteins expression; ②inhibits the process of epithelial-mesenchymal transition of MKN45 cells.

【Key words】α-mangostin; gastric cancer cell; proliferation; migration and invasion; tumor angiogensis; molecular mechanisms

作者介绍：马林伟，Email：malinwei2000@163.com，
研究方向：消化系统肿瘤治疗及分子机制研究。
通信作者：韩中宝，Email：ywzcnth@126.com。
基金项目：盐城市科技局资助项目（编号：YK2011119）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170313.1529.098.html（2017-03-13）

胃癌是常见的消化道恶性肿瘤之一[1]，在国内的发病率依然居高不下，且新发胃癌患者呈现年轻化趋势[2]。针对胃癌的治疗，目前仍以手术切除并辅以放化疗的常规模式为主[3]，这种治疗方法难以取得令人满意的效果[4]。因此，找寻天然来源的对胃癌有显著治疗作用且无明显毒副作用的药物显得迫在眉睫。山竹又称山竹子、倒捻子等，为藤黄科藤黄属植物。研究发现，山竹的果皮中含有种类丰富的化合物，其中最受关注且研究最多的当属 α-倒捻子素。研究表明，α-倒捻子素具有多种显著的生物学效应，如抗氧化、抗炎、抗过敏、抗菌及抗病毒等[5-6]。与此同时，近年来研究发现 α-倒捻子素对多种肿瘤的生长具有抑制作用，如乳腺癌[7]、前列腺癌[8]、结肠癌[9]等。纵观国内外研究发现，有关 α-倒捻子素抗胃癌的研究报道极少，考虑山竹果作为可食用的食物，其对胃癌的发生发展究竟有何影响尚未可知，因此值得深入研究。本研究以人胃癌细胞 MKN45 为研究对象，从增殖、迁移、侵袭及血管生成多个方面研究 α-倒捻子素对 MKN45 细胞的影响，并对其可能的作用机制进行探讨，为 α-倒捻子素的后续研究及临床应用提供重要实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

人源性胃癌细胞系 MKN45（购自中科院上海细胞库）；雄性大鼠，5 周龄，体质量 130 g 左右，购自南京医科大学动物实验中心。α-倒捻子素纯度为 98%，购自西安和霖生物工程有限公司，用 DMSO 溶解。10%小牛血清、1640 培养基及 0.25%胰蛋白酶购自 Gibco 公司。24 孔板（含 Transwell 小室）购自美国 Corning 公司，批号：07111036。相关 ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 MTS 法检测 α-倒捻子素对 MKN45 细胞增殖的影响 用含 10%小牛血清的 1640 培养基培养 MKN45 细胞，至细胞生长至对数生长期时，用胰蛋白酶将细胞消化并用细胞计数器计数，然后用 1640 完全培养基将细胞浓度调整为 5×10^5/mL，按每孔 1×10^4 个接种于 96 孔板，实验分为对照组和实验组，对照组加入等量的细胞及 1640 完全培养基，实验组分别加入用 1640 完全培养基稀释的 α-倒捻子素，使其终浓度分别为 1、2、4、8、16、32、64、128 μmol/L 梯度。使 96 孔板内每孔终体积为 200 μL，每组设 6 个复孔，置 37 ℃培养箱继续培养。孵育 24 h 后，向每孔加入 MTS 试剂 20 μL，并继续孵育 3 h。孵育结束，将 96 孔板置于紫外分光光度计内，并在 490 nm 处检测各孔的吸光度（absorbance，A）值，实验重复 3 次。细胞增殖抑制率计算方法：增殖抑制率（%）=（1-$A_{实验组}$值/$A_{阴性对照组}$值）×100%。

1.2.2 划痕实验检测 α-倒捻子素对 MKN45 细胞迁移的影响 将浓度为 3×10^5/mL 的 MKN45 细胞接种至 6 孔板中，每孔 2 mL 细胞悬液，置于培养箱中培养，待细胞长至 80%左右时，弃去上清液，用灭菌的 PBS 清洗细胞 2 遍，然后用白色的 10 μL 枪头沿每孔的中线垂直划痕。划痕结束后，用灭菌的 PBS 继续清洗 2 遍，然后向每孔加入含不同浓度对应药物的无血清培养基，该实验共设置 5 个组别：溶剂对照组（DMSO 组）、α-倒捻子素 0、1、2、4 μmol/L 组，0、24 h 分别在 100 倍镜下拍照。实验重复 3 次。

1.2.3 Transwell 实验检测 α-倒捻子素对 MKN45 细胞侵袭的影响 首先将含 Matrigel（去生长因子）的 DMEM 培养基稀释液（1∶4，v/v）均匀铺被在 Transwell 小室上室膜表面，置培养箱中使之凝固，备用。然后在上室接种 100 μL 处于对数生长期的 MKN45 细胞悬液，并在上室接种不同浓度的 α-倒捻子素（0~4 μmol/L），低血清培养（0.5%，v/v），并将 600 μL 含 20%小牛血清的 1640 培养基加入下室，置培养箱中处理 24 h，实验各组均设 3 个复孔。药物处理结束后，用棉签小心将上室中没有迁移的细胞拭去，并按下述操作处理：用 4%多聚甲醛固定 10 min→PBS 洗涤→0.1%结晶紫染色 30 min→PBS 漂洗 3 次→置于载玻片上→200 倍镜下随机选 5 个视野计数→将小室置于 400 μL/孔的甲醇中将结晶紫溶解→取 200 μL 溶解液置于 96 孔板中，于 370 nm 波长处检测 A 值，计算相对迁移率，实验重复 3 次。

1.2.4 大鼠动脉环实验检测 α-倒捻子素对 MKN45 细胞诱导血管生成的影响 ①首先将实验所需的 24 孔板及无菌的枪头置-20 ℃冰箱中预冷处理，同时将实验所需的器械用酒精灭菌，然后烘干备用。②配制包被胶质：将下述 3 种溶液置冰上充分混合备用，3 种溶液分别为：10×MEM 培养液、$NaHCO_3$ 溶液（浓度为 23.4 mg/mL）和Ⅰ型鼠尾胶原蛋白溶液（浓度为 2 mg/mL），其中 MEM 培养液与 $NaHCO_3$ 溶液的体积比为 1∶1。③用 5%水合氯醛麻醉大鼠，然后将大鼠置超净工作台上，剪开左侧背部到腹部，镊子夹住胸主动脉下端，沿胸主动脉剪开与胸椎相连部分，至主动脉弓处剪开。然后将手术分离出的主动脉置于已配制好的预冷 PBS 中。除去主动脉壁上的脂肪及结缔组织，分离出干净的血管条置于含有预冷 PBS 的培养皿中，然后用手术剪刀将培养皿中的血管条剪成 1 mm 左右宽的动脉环。④将经预冷处理的 24 孔板取出，向每个孔内加入 200 μL 包被胶质，再用镊子将动脉环小心放入每个孔内，每孔 1 条，使其平铺在孔的底部，然后将 24 孔板放入培养箱中，使其充分凝固。⑤除溶剂对照组外，每孔加入 200 μL MKN45 细胞培养上清液，显微镜每天观察动脉环的变化，每 2 天更换 1 次上清液。5 d 后，向每个孔内加入不同浓度的 α-倒捻子素（0~4 μmol/L），药物作用 3 d 后，显微镜下观察动脉环上管腔的形成情况并进照。动脉环周围血管生长的长度使用 Image J 软件进行分析，实验重复 3 次。

1.2.5 ELISA 检测 α-倒捻子素对 MKN45 细胞相关分泌因子的影响 采用 ELISA 试剂盒检测 α-倒捻子素对 MKN45 细胞中血管内皮生长因子（vascular endothelial growth factor，VEGF）、肿瘤坏死因子-α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）、转化生长因子-β（transforming growth factor-β，TGF-β）及碱

性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor,bFGF)蛋白表达的影响,相关的操作步骤严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行。实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 分析 将约 5×10^6 个细胞加至蛋白裂解液,冰上静置 30 min,低温离心 20 min(转速 9830 g),提取上清液。应用 BCA 定量法计算蛋白的浓度。取 60 μg 总蛋白跑胶(恒压 100 V)。电转膜 80 min。转膜结束后,用含 5%脱脂奶粉的 TBST 将膜封闭 1 h。封闭结束后,用 TBST 溶液清洗膜 5 次,每次 10 min,然后结一抗,置 4 ℃冰箱过夜。第 2 天回收一抗,用 TBST 溶液清洗膜 5 次,每次 10 min,然后结二抗,孵育 1.5 h 后显影。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)、神经-钙黏素(N-cadherin)及上皮-钙黏素(E-cadherin)以及 GAPDH 抗体购自美国 Cell Signaling 公司,所有实验重复 3 次。

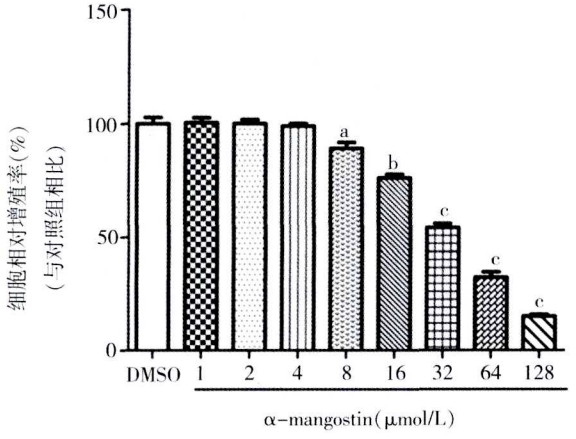
1.3 统计学处理

采用 SPSS 20.0 软件统计分析,每组实验均独立重复 3 次,结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)呈现,样本均数间的比较采用单因素方差分析。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 α-倒捻子素能够影响 MKN45 细胞的体外增殖

采用不同浓度的 α-倒捻子素(0~128 μmol/L)作用 24 h 后,α-倒捻子素在 8 μmol/L 时对 MKN45 细胞增殖表现出抑制效应(10.80 ± 2.61)%(表 1)。随着浓度的增加,α-倒捻子素抑制增殖的效应逐渐增强,呈剂量依赖性,但此时的抑制作用应该是由于药物的毒性所致,所对应的剂量系药物的毒性剂量(图 1,表 1)。重复测量方差分析各浓度 α-倒捻子素相对于对照组对 MKN45 的增殖抑制率有统计学意义(F=1 066.53,P=0.000)。



a:与对照组相比,P<0.05;b:与对照组相比,P<0.01;c:与对照组相比,P<0.001(n=3)

图 1 α- 倒捻子素对 MKN45 细胞体外增殖的影响

Fig.1 Effect of α-mangostin on proliferation of MKN45 cells *in vitro*

表 1 α- 倒捻子素对 MKN45 细胞的生长抑制作用($\bar{x}\pm s$,n=3)

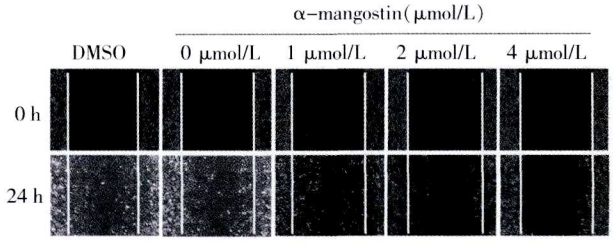
Tab.1 Effect of α-mangostin on proliferation of MKN45 cells *in vitro* ($\bar{x}\pm s$,n=3)

组别	生长抑制率(%,24 h)
对照组	0.00
1 μmol/L 组	0.00
2 μmol/L 组	0.00
4 μmol/L 组	0.00
8 μmol/L 组	10.80 ± 2.61[a]
16 μmol/L 组	23.76 ± 1.62[a]
32 μmol/L 组	45.75 ± 1.79[a]
64 μmol/L 组	67.63 ± 2.35[a]
128 μmol/L 组	84.90 ± 0.71[a]
F 值	1 066.530
P 值	0.000

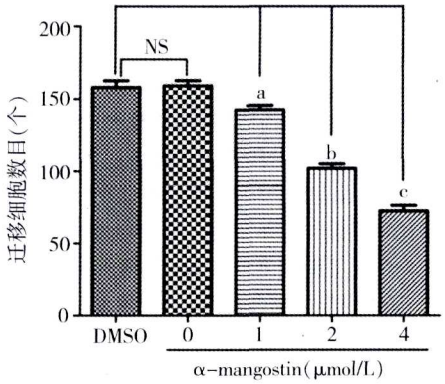
注:a,与对照组比较,差异有统计学意义,P<0.05

2.2 α-倒捻子素能抑制 MKN45 细胞的体外迁移

迁移实验中,选取对肿瘤细胞增殖无明显影响的药物浓度(0~4 μmol/L),实验结果显示,α-倒捻子素在 1 μmol/L 时即可抑制 MKN45 细胞的迁移(143.00 ± 3.11)(表 2)。随着浓度升高,其对 MKN45 细胞的迁移抑制作用具有能浓度依赖性(图 2,表 2)。重复测量方差分析各浓度 α-倒捻子素相对于对照组对 MKN45 的体外迁移抑制作用有统计学意义(F=1 445.50,P=0.000)。实验结果表明,α-倒捻子素能够抑制 MKN45 细胞的体外迁移。



A. α-倒捻子素对 MKN45 细胞体外迁移的影响



NS:与对照组相比,无明显影响;a:与对照组相比,P<0.05;b:与对照组相比,P<0.01;c:与对照组相比,P<0.001(n=3)

B. 迁移细胞数目定量

图 2 α- 倒捻子素对 MKN45 细胞体外迁移的影响

Fig.2 Effect of α-mangostin on migration of MKN45 cells *in vitro*

表 2 α- 倒捻子素对 MKN45 细胞体外迁移的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

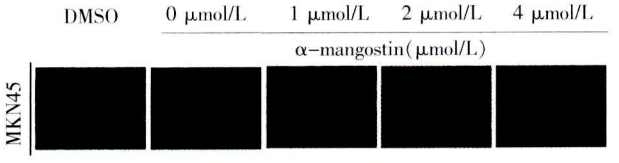
Tab.2 Effect of α-mangostin on migration of MKN45 cells *in vitro*（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	迁移细胞数（个）
对照组	158.00 ± 4.69
0 μmol/L 组	159.00 ± 3.59
1 μmol/L 组	143.00 ± 3.11[a]
2 μmol/L 组	102.00 ± 3.16[a]
4 μmol/L 组	73.00 ± 3.87[a]
F 值	1 445.500
P 值	0.000

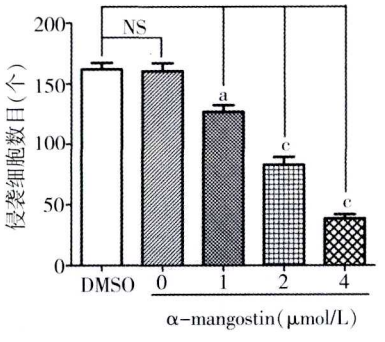
注：a，与对照组比较，差异有统计学意义，P<0.05

2.3 α-倒捻子素能抑制 MKN45 细胞的侵袭

在侵袭实验中，选取对 MKN45 细胞增殖无明显影响的浓度（0~4 μmol/L），如图 3 所示，实验结果显示，α-倒捻子素在 1 μmol/L 时即可抑制 MKN45 细胞的侵袭（127.00 ± 5.50）（表 3），随着药物剂量的增加，药物处理组肿瘤细胞的侵袭能力明显受到抑制，且与溶剂对照组之间呈现统计学差异（图 3，表 3）。重复测量方差分析各浓度 α-倒捻子素相对于对照组对 MKN45 的体外侵袭抑制作用有统计学意义（F=2742.2，P=0.000）。该实验研究表明，α-倒捻子素能够抑制 MKN45 细胞的侵袭。



A. α-倒捻子素对 MKN45 细胞体外侵袭的影响



B. 侵袭细胞数目定量

NS：与对照组相比，无明显影响；a：与对照组相比，P<0.05；b：与对照组相比，P<0.01；c：与对照组相比，P<0.001（n=3）

图 3 α- 倒捻子素对 MKN45 细胞侵袭的影响

Fig.3 Effect of α-mangostin on invasion of MKN45 cells

2.4 α-倒捻子素能抑制 MKN45 细胞诱导血管生成的能力

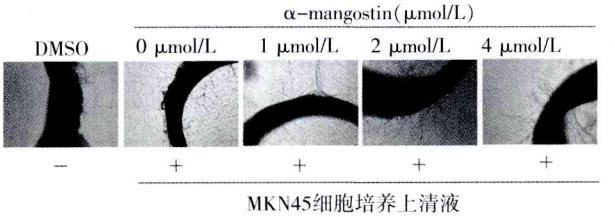
为了研究 α-倒捻子素对肿瘤血管生成的影响，本研究利用大鼠动脉环实验来开展研究。在开展 α-倒捻子素对 MKN45 细胞血管生成影响研究时所选择的药物浓度（4、8、16 μmol/L）与增殖、迁移及侵袭实验的药物浓度（1、2、4 μmol/L）是不同的，之所以选择高浓度，主要是考虑高浓度时对肿瘤细胞的抑制作用很明显，猜测这种高浓度的抑制作用很可能是由于肿瘤的血管生成受到影响，所以在血管生成的效应及机制研究中选取了高浓度开展研究。实验结果如图 4 所示，溶剂对照组在不给 MKN45 细胞培养上清液刺激的情况下，无明显血管生成，而给予细胞培养上清液刺激后血管生成明显增加。给予 α-倒捻子素处理后，与对照组相比，α-倒捻子素在 4 μmol/L 时即可对血管生成产生抑制（58.00 ± 4.24）（表 4）。随着药物浓度增加，其对血管生成的抑制作用逐渐增强，导致血管生成的数目显著减少（图 4，表 4）。重复测量方差分析各浓度 α-倒捻子素相对于对照组对 MKN45 细胞诱导的血管生成的抑制作用有统计学意义（F=502.27，P=0.000）。该实验研究结果表明，α-倒捻子素能够抑制 MKN45 细胞诱导血管生成的能力。

表 3 α- 倒捻子素对 MKN45 细胞侵袭的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

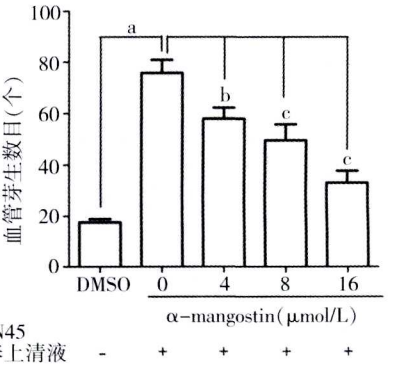
Tab.3 Effect of α-mangostin on invasion of MKN45 cells *in vitro*（$\bar{x}\pm s$，n=3）

α-倒捻子素（μmol/L）	迁移细胞数（个）
对照组	162.00 ± 5.35
0	161.00 ± 6.56
1	127.00 ± 5.50[a]
2	83.00 ± 6.40[a]
4	41.00 ± 5.79[a]
F 值	2 742.200
P 值	0.000

注：a，与对照组比较，差异有统计学意义，P<0.05



A. α-倒捻子素对 MKN45 细胞血管生成的影响



a：与对照组相比，P<0.001；b：与 0 μmol/L 组相比，P<0.01；c：与 0 μmol/L 组相比，P<0.001（n=3）

B. 血管芽生数目定量

图 4 α-倒捻子素对 MKN45 细胞诱导的血管生成的影响

Fig.4 Effect of α-mangostin on tumor angiogenesis induced by MKN45 cells

表 4 α-倒捻子素对 MKN45 细胞诱导的血管生成的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.4 Effect of α-mangostin on tumor angiogenesis induced by MKN45 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	血管芽生数目(个)
对照组	18.00 ± 1.29
0 μmol/L 组	76.00 ± 5.12
4 μmol/L 组	58.00 ± 4.24[a]
8 μmol/L 组	50.00 ± 6.24[a]
16 μmol/L 组	33.00 ± 4.69[a]
F 值	502.270
P 值	0.000

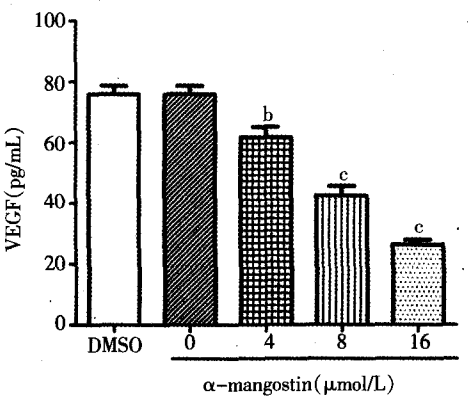
注：a，与对照组比较，差异有统计学意义，P<0.05

2.5 α-倒捻子素能够抑制 MKN45 细胞分泌的血管生成相关因子的表达

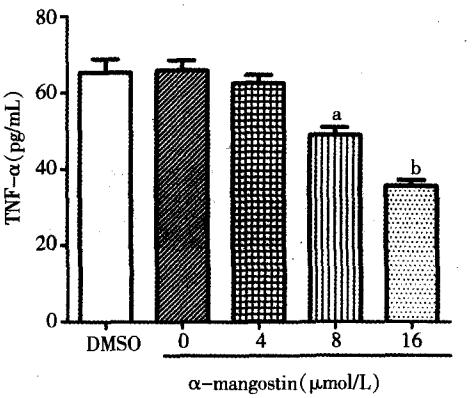
为了检测 α-倒捻子素对 MKN45 细胞分泌的血管生成相关因子表达的影响，采用 ELISA 方法开展研究。实验结果如图 5 所示，溶剂对照组（DMSO 组）与 0 μmol/L 组各血管生成相关因子的表达均很高，且因子水平基本一致，表明给予 DMSO 对于肿瘤细胞血管生成相关因子的表达无明显影响。而给予 α-倒捻子素处理后，α-倒捻子素能够抑制 VEGF、TNF-α、TGF-β 和 bFGF 的蛋白表达，且在一定浓度范围内，具有浓度依赖性。该研究结果表明，α-倒捻子素通过抑制 MKN45 细胞分泌的血管生成相关因子的表达，进而发挥对肿瘤血管生成的抑制作用（图 5，表 5）。

2.6 α-倒捻子素能够抑制调控肿瘤细胞迁移及侵袭相关蛋白的表达

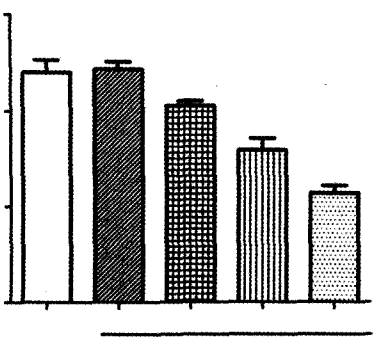
采用 Western blot 实验检测 α-倒捻子素对于调控肿瘤细胞迁移及侵袭相关蛋白表达的影响，选取了 4 种蛋白作为检测指标，分别为 MMP-2、MMP-9、E-cadherin 和 N-cadherin。实验结果显示，α-倒捻子素能够明显抑制 MMP-2、MMP-9 和 N-cadherin 的蛋白表达（图 6，表 6），同时发现 α-倒捻子素能够显著上调 E-cadherin 的蛋白表达。该实验结果表明，α-倒捻子素能够通过抑制基质金属蛋白酶的表达，并结合逆转上皮间质转化过程，共同发挥抑制肿瘤细胞迁移及侵袭的目的。



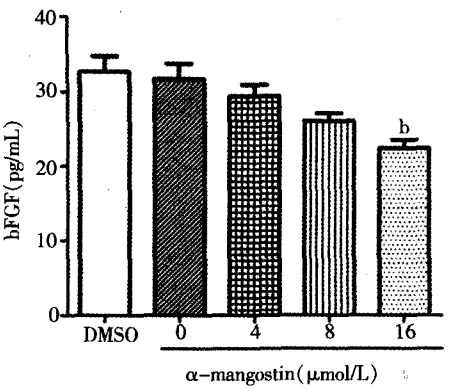
A. α-倒捻子素对 MKN45 细胞分泌的 VEGF 的影响



B. α-倒捻子素对 MKN45 细胞分泌的 TNF-α 的影响



C. α-倒捻子素对 MKN45 细胞分泌的 TGF-β 的影响



D. α-倒捻子素对 MKN45 细胞分泌的 bFGF 的影响

a：与对照组相比，P<0.05；b：与对照组组相比，P<0.01；c：与对照组组相比，P=0.000（n=3）

图 5 α-倒捻子素对 MKN45 细胞血管生成相关因子分泌的影响

Fig.5 Effect of α-mangostin on secretion of tumor angiogenesis-related factors in MKN45 cells

表 5 α-倒捻子素对 MKN45 细胞血管生成相关因子分泌的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Tab.5 Effect of α-mangostin on secretion of tumor angiogenesis-related factors in MKN45 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	VEGF(pg/mL)	TNF-α(pg/mL)	TGF-β(pg/mL)	bFGF(pg/mL)
对照组	76.37 ± 2.65	65.32 ± 3.59	48.19 ± 2.65	32.73 ± 2.08
0 μmol/L 组	76.81 ± 1.79	66.12 ± 2.66	48.34 ± 1.53	31.93 ± 1.85
4 μmol/L 组	61.62 ± 3.51[a]	61.71 ± 2.08	41.72 ± 2.09[a]	29.07 ± 1.26
8 μmol/L 组	42.17 ± 3.06[a]	49.34 ± 2.64[a]	31.68 ± 2.52[a]	27.66 ± 1.31
16 μmol/L 组	26.83 ± 1.53[a]	35.67 ± 1.53[a]	22.92 ± 1.63[a]	22.73 ± 1.15[a]
F 值	479.710	169.720	122.580	15.860
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

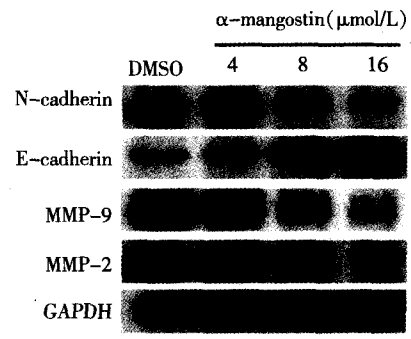
注：a，与对照组比较，差异有统计学意义，P<0.05

表 6 α-倒捻子素对 MKN45 细胞调控迁移及侵袭相关蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，n=3）

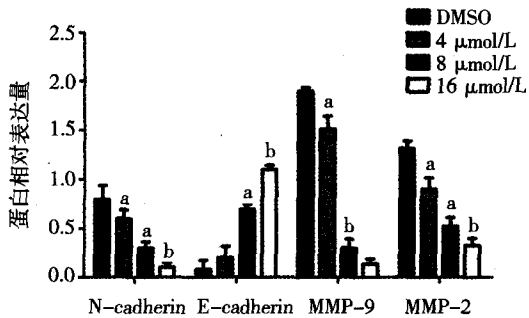
Tab.6 Effect of α-mangostin on expression of proteins involved migration and invasion in MKN45 cells（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	N-cadherin	E-cadherin	MMP-9	MMP-2
0 μmol/L 组	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
4 μmol/L 组	0.76 ± 0.03[a]	2.41 ± 0.17	0.79 ± 0.03[a]	0.69 ± 0.02[a]
8 μmol/L 组	0.42 ± 0.02[a]	8.39 ± 0.35[a]	0.16 ± 0.02[a]	0.36 ± 0.03[a]
16 μmol/L 组	0.12 ± 0.01[a]	12.66 ± 0.72[a]	0.12 ± 0.01[a]	0.21 ± 0.02[a]
F 值	43.620	291.330	51.690	78.630
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注：a，与对照组比较，差异有统计学意义，P<0.05



A. α-倒捻子素对 MKN45 细胞调控迁移及侵袭相关蛋白表达的影响



a：与对照组相比，P<0.05；b：与对照组组相比，P<0.01（n=3）

B. 蛋白表达定量

图 6 α-倒捻子素对 MKN45 细胞调控迁移及侵袭相关蛋白表达的影响

Fig.6 Effect of α-mangostin on expression of proteins involved migration and invasion in MKN45 cells

3 讨 论

本研究从增殖、迁移、侵袭及血管生成多个方面开展了 α-倒捻子素对人胃癌细胞 MKN45 的影响，研究显示 α-倒捻子素能够抑制 MKN45 细胞的增殖、迁移、侵袭及血管生成。机制研究方面，首先检测 α-倒捻子素对肿瘤血管生成相关因子表达的影响，选择 4 种调控肿瘤血管生成的关键因子，分别为 VEGF、TNF-α、TGF-β 和 bFGF。众所周知，VEGF 是参与血管生成调控最为关键的细胞因子[10]，同时也是最早被作为能提高血管通透性的细胞因子而被发现的，其他 3 种因子 TNF-α、TGF-β 和 bFGF[11-12] 也有诸多报道参与对血管生成的调控。本研究发现，α-倒捻子素能够不同程度地抑制几种血管生成细胞因子的表达，这可能是其发挥抗血管生成作用的机制之一。同时基质金属蛋白酶（MMPs）在肿瘤细胞迁移及侵袭中的关键调控作用已有很多报道[13]，其主要是通过降解细胞外基质，从而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭的目的。考察了 α-倒捻子素对相关 MMPs 蛋白表达的影响，本文选取了 MMP-2 和 MMP-9 作为研究对象，之所以选取这两种 MMPs，主要是因为它们属于Ⅳ型胶原酶，即所谓的明胶酶，研究证实，明胶酶是目前为止唯一能够降解Ⅳ型胶原的基质蛋白水解酶[14]，而细胞外基质的基本骨架恰恰是由Ⅳ型胶原组成的。研究发现，它们可以通过破坏基

质的降解平衡，进而促进肿瘤细胞突破基底膜的屏障，侵袭周围组织[15]。本研究结果显示，α-倒捻子素能够抑制 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达，这可能是其发挥抗迁移和侵袭作用的机制之一。需要特别强调的是，本文在开展 α-倒捻子素对 MKN45 细胞血管生成影响及机制研究时所选择的药物浓度与增殖、迁移及侵袭实验的药物浓度是不同的，众所周知，高浓度除了具有抑制细胞迁移及侵袭能力之外，会进一步抑制肿瘤细胞的增殖，之所以选择高浓度开展血管生成及机制研究，主要是考虑低浓度对肿瘤的增殖无明显影响，而浓度高的时候抑制作用就很明显，本文猜测这种高浓度的抑制作用很可能是由于肿瘤的血管生成受到影响，所以本文在血管生成的效应及机制研究中选取了高浓度开展研究。同时，本文还考察了 E-钙黏素和 N-钙黏素在 α-倒捻子素调控 MKN45 细胞中的蛋白表达情况。众所周知，E-钙黏素和 N-钙黏素是上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition，EMT)过程中 2 种关键的蛋白[16]，而上皮间质转化在在肿瘤细胞迁移和侵袭过程发挥重要作用。研究表明，肿瘤细胞中存在EMT现象，该过程会使细胞极性缺失，细胞间的紧密连接及粘附连接缺失，进而使得细胞的浸润性和游走能力大大增强[17]，促进了肿瘤细胞的迁移和侵袭。本研究结果显示 α-倒捻子素能够上调 E-钙黏素的表达，同时下调 N-钙黏素的表达，即 α-倒捻子素能够逆转 EMT 过程，而这也可能是其发挥抑制肿瘤细胞迁移和侵袭能力的另一机制。

综上所述，本文从多个方面研究了 α-倒捻子素对 MKN45 细胞相关生物学行为的影响，并从调控基质金属蛋白酶及上皮间质转化的角度探讨了其可能的分子机制。后续的研究将开展 α-倒捻子素对 MKN45 细胞裸小鼠异种移植瘤生长的影响，从体内实验继续深入研究 α-倒捻子素的作用效果。至此，本研究证实了 α-倒捻子素会是一个潜在的很有前景的治疗胃癌的化合物，值得进一步的研究和开发。

参 考 文 献

[1] Santos JC, Carrasco-Garcia E, García-Puga M, et al. SOX9 elevation acts with canonical WNT signaling to drive gastric cancer progression[J]. Cancer Res, 2016, 76(22): 6735-6746.

[2] Mita MT, Marchesi F, Cecchini S, et al. Prognostic assessment of gastric cancer: retrospective analysis of two decades[J]. Acta Biomed, 2016, 87(2): 205-211.

[3] Cananzi FC, Biondi A, Quagliuolo V, et al. Chemoradiotherapy in gastric cancer: a door ajar[J]. J Clin Oncol, 2016, 34(12): 1421-1422.

[4] Hess LM, Michael D, Mytelka DS, et al. Chemotherapy treatment patterns, costs, and outcomes of patients with gastric cancer in the United States: a retrospective analysis of electronic medical record (EMR) and administrative claims data[J]. Gastric Cancer, 2016, 19(2): 607-615.

[5] Hafeez BB, Mustafa A, Fischer JW, et al. Alpha-mangostin: a dietary antioxidant derived from the pericarp of Garcinia mangostana L. inhibits pancreatic tumor growth in xenograft mouse model[J]. Antioxid Redox Signal, 2014, 21(5): 682-699.

[6] Le TT, Pandey RP, Gurung RB, et al. Efficient enzymatic systems for synthesis of novel alpha-mangostin glycosides exhibiting antibacterial activity against Gram-positive bacteria[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(20): 8527-8538.

[7] Kritsanawong S, Innajak S, Imoto M, et al. Antiproliferative and apoptosis induction of alpha-mangostin in T47D breast cancer cells[J]. Int J Oncol, 2016, 48(5): 2155-2165.

[8] Li G, Petiwala SM, Nonn L, et al. Inhibition of CHOP accentuates the apoptotic effect of alpha-mangostin from the mangosteen fruit (Garcinia mangostana) in 22Rv1 prostate cancer cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2014, 453(1): 75-80.

[9] Watanapokasin R, Jarinthanan F, Nakamura Y, et al. Effects of alpha-mangostin on apoptosis induction of human colon cancer[J]. World J Gastroenterol, 2011, 17 (16): 2086-2095.

[10] Guru SK, Pathania AS, Kumar S, et al. Secalonic acid-D represses HIF1alpha/VEGF-mediated angiogenesis by regulating the Akt/mTOR/p70S6K signaling cascade[J]. 2015, 75(14): 2886-2896.

[11] Lai KC, Liu CJ, Lin TJ, et al. Blocking TNF-alpha inhibits angiogenesis and growth of IFIT2-depleted metastatic oral squamous cell carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2016, 370(2): 207-215.

[12] Krishnan S, Szabo E, Burghardt I, et al. Modulation of cerebral endothelial cell function by TGF-beta in glioblastoma: VEGF-dependent angiogenesis versus endothelial mesenchymal transition[J]. Oncotarget, 2015, 6(26): 22480-22495.

[13] Xian J, Shao H, Chen X, et al. Nucleophosmin mutants promote adhesion, migration and invasion of human leukemia THP-1 cells through MMPs up-regulation via Ras/ERK MAPK signaling[J]. Int J Biol Sci, 2016, 12(2): 144-155.

[14] Hui W, Rowan AD, Cawston T. Insulin-like growth factor 1 blocks collagen release and down regulates matrix metalloproteinase-1, -3, -8, and -13 mRNA expression in bovine nasal cartilage stimulated with oncostatin M in combination with interleukin 1alpha[J]. Ann Rheum Dis, 2001, 60(3): 254-261.

[15] Aroui S, Najlaoui F, Chtourou Y, et al. Naringin inhibits the invasion and migration of human glioblastoma cell via downregulation of MMP-2 and MMP-9 expression and inactivation of p38 signaling pathway[J]. Tumour Biol, 2016, 37(3): 3831-3839.

[16] Chen L, Muñoz-Antonia T, Cress WD, et al. Trim28 contributes to EMT via regulation of E-cadherin and N-cadherin in lung cancer cell lines[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e101040.

[17] Huang M, Wu S, Hu Q, et al. Agkihpin, a novel SVAE may inhibit the migration and invasion of liver cancer cells associated with the inversion of EMT induced by Wnt/beta-catenin signaling inhibition[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 479(2): 283-289.

（责任编辑：张辉洁）