



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.011

http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.011

Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(9):1263-1268.

· 基础研究 ·

二氢杨梅素对肝癌细胞黏附、侵袭及迁移的抑制作用及机制

邱志东¹, 罗芳兰², 舒洋², 温小军², 张庆余³, 廖雅琳⁴, 黎然³, 缪辉来³

(1. 广东省深圳市第七人民医院 普通外科, 广东 深圳 518000; 2. 广东医学院研究生学院, 广东 湛江 524000;
3. 广东医学院附属医院 肝胆外科, 广东 湛江 524000; 4. 广东医学院第一临床学院, 广东 湛江 524000)

摘要

目的: 研究二氢杨梅素 (DHM) 对肝癌细胞黏附、侵袭和迁移能力的影响及其可能机制。

方法: 用不同浓度 DHM 处理肝癌 MHCC97L 细胞后, 分别检测细胞的黏附能力、迁移与侵袭能力, 以及 E-cadherin、MMP-2、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达。

结果: 与空白对照细胞比较, DHM 处理后的 MHCC97L 细胞黏附力明显降低、侵袭与迁移力明显减弱 (均 $P < 0.05$); E-cadherin 表达明显上调, 而 MMP-9、VEGF 蛋白表达明显下调的水平 (均 $P < 0.05$), 但 MMP-2 蛋白的表达无明显改变 (均 $P > 0.05$)。

结论: DHM 可能通过调控 E-cadherin、MMP-9 和 VEGF 蛋白的表达抑制肝癌细胞的黏附、迁移和侵袭。

关键词

癌, 肝细胞; 二氢杨梅素; 肿瘤浸润

中图分类号: R735.7

Inhibitory effect of dihydromyricetin on adhesion, invasion and migration in hepatocellular carcinoma cells and the mechanism

QIU Zhidong¹, LUO Fanglan², SHU Yang², WEN Xiaojun², ZHANG Qingyu³, LIAO Yalin⁴, LI Ran³, MIAO Huilai³

(1. Department of General Surgery, the Seventh People's Hospital of Shenzhen, Shenzhen 518000, China; 2. Graduate School, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524000, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524000, China; 4. The First Clinical College of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524000, China)

Abstract

Objective: To investigate the effect of dihydromyricetin (DHM) on adhesion, invasion and migration abilities of hepatocellular carcinoma (HCC) cells and the possible mechanisms.

Methods: HCC MHCC97L cells were exposed to different concentrations of DHM, and then, the adhesion, invasion and migration abilities of the cells were examined, and the protein expressions of E-cadherin, MMP-2, MMP-9 and VEGF were also determined.

Results: In MHCC97L cells treated with DHM compared with blank control cells, the abilities of adhesion, invasion and migration were all significantly decreased (all $P < 0.05$), the E-cadherin expression was upregulated, and the MMP-9 and VEGF expressions were downregulated significantly, but the MMP-2 expression showed no significant change ($P > 0.05$).

Conclusion: DHM can inhibit the adhesion, invasion and migration of HCC cells by regulation of E-cadherin, MMP-9 and VEGF expressions.

收稿日期: 2015-01-14; 修订日期: 2015-08-05。

作者简介: 邱志东, 广东省深圳市第七人民医院副主任医师, 主要从事肝胆胰疾病的基础与临床研究。

通信作者: 缪辉来, Email: gandanwaike2007@126.com

Key words Carcinoma, Hepatocellular; Dihydromyricetin; Neoplasm Invasiveness
CLC number: R735.7

二氢杨梅素(dihydromyricetin, DHM)是来源于葡萄科蛇葡萄属的一种野生木质藤本植物。具有解除醇中毒、预防酒精肝、脂肪肝、抑制肝细胞恶化、降低肝癌的发病率等作用^[1-2]。肝细胞癌是一种高侵袭性的实体肿瘤,肿瘤细胞可以通过原发部位脱落、黏附、降解、运动和血管形成等复杂步骤发生肿瘤远处转移^[3],目前缺乏有效治疗手段,本研究旨在观察DHM对肝癌细胞MHCC97L黏附、侵袭及迁移的抑制作用并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料

肝癌MHCC97L细胞株购自于上海中国科学院细胞库, DHM购自于Sigma公司,纯度超过99.90%,贮存浓度为100 mmol/L,最终浓度通过与相应的培养基稀释。MMP-2、MMP-9、E-cadherin, VEGF和 β -actin抗体购买于cell signaling公司,胎牛血清(FBS)及培养基DMEM购自GBICO公司, Transwell小室购于康宁公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞及细胞培养 人肝癌细胞株MHCC97L用含10%胎牛血清的DMEM培养液培养;0.25%胰蛋白酶消化传代培养,按实验所需细胞密度接种。

1.2.2 MTT法检测肝癌MHCC97L细胞黏附能力
制作含基质的培养板(用PBS将Matrigel原液(8 mg/mL)稀释160倍加入96孔板中,每孔加入5 μ L,置于超净台风干备用,用1%BSA封板,每孔加40 μ L,置于37 $^{\circ}$ C,孵育1 h, PBS冲洗3次将对数生长期的肝癌细胞,胰酶消化,以含有1%的BSA的DMEM混悬细胞,细胞计数后,调整细胞密度以 1×10^5 /mL接种于96孔板中,使每孔药物终浓度分别是0、10、25、50、100 μ mol/L,常规培养24 h,取出培养板后, PBS液冲洗3次,取出培养板后, PBS液冲洗3次,加入180 μ L PBS液和20 μ L MTT液(5 mg/mL)继续培养4 h,低速摇床10 min,在酶联免疫检测仪490 nm处测量各孔的吸光值。

1.2.3 划痕实验 取无菌六孔板,用封口膜将六孔板盖封好,倒置在超净台上,用标记笔沿着直尺均匀得划横线,每横线之间相隔0.5 cm。将对数生长期的细胞胰酶消化,稀释成适当的细胞密度接种于六孔板,贴壁培养24 h后,进行划痕。使用枪头垂直这5条横线进行划痕,枪头要垂直与六孔板,保证划痕的宽度一致。划痕完毕后,用枪缓慢吸出培养液,同时抽吸的力度要轻,避免引起细胞脱落。加入适量的PBS将细胞清洗3遍,除去细胞碎片。弃去PBS,每孔补充无血清培养液并给予(0、50、100 μ mol/L)浓度的DHM处理。观察时对十字交叉处的5点分别进行拍照,观察划痕愈合的程度。

1.2.4 Transwell检测细胞的迁移能力 复苏、培养肝癌细胞,取200 μ L无血清的培养基加入Transwell上室,且上室细胞数为 5×10^5 细胞/孔,待细胞贴壁后,再加入(0、50、100 μ mol/L)浓度的DHM处理, Transwell下室加入600 μ L含20%FBS的培养液,37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养24 h,将小室浸润甲醛中室温固定5 min,吸出固定液,加入素木精100 μ L,染色15 min,自来水轻轻冲洗1 min,再加伊红染色,染色5 min,自来水冲洗干净,用棉签擦去上室内的细胞,完整撕下Transwell小室基底膜,置于载玻片上,观察底模细胞数目,拍照,统计。

1.2.5 侵袭实验 准备Transwell小室将Matrigel放在冰上而后放入冰箱中隔夜使其解冻,在膜上表面铺上25 μ L Matrigel(1 mg/mL),置于超净台中风干,形成一个基质屏障膜。无血清DMEM培养基培养细胞过夜,使其饥饿,弃去培养液,用PBS洗净,胰酶消化,加入培养基终止消化制备细胞悬液,离心,以含0.1%BSA的DMEM培养基混悬细胞成密度 10^6 /100 μ L单细胞悬液,加入Transwell上室中100 μ L,待细胞贴壁后,再加入相应(0、50、100 μ mol/L)浓度的DHM处理。在24孔板中加入含20%胎牛血清的DMEM培养液,每孔600 μ L,将小室浸于24孔板的培养液中,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱培养24 h,后取出小室,撕下滤膜,用甲醇固定,HE染色,染色后用棉签

擦掉膜上层未穿过的细胞,用中性树脂封片。于100倍显微镜下计数侵袭细胞,并拍照,每膜计数上下左右5个不同视野透过细胞数,计算平均值。

1.2.6 Western blot 检测蛋白表达 0、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 DHM 处理肝癌细胞 24 h, 细胞收集后用 PBS 洗涤 2 次, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA buffer (1 \times PBS, 1% NP-40, 0.1% SDS, 5 mmol/L EDTA, 0.5% 脱氧胆酸钠和 1 mmol/L 正钒酸钠) 裂解细胞。蛋白样品定量后, 于 12% SDS-PAGE 上进行分离, 并电转至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂奶粉溶液进行封闭。加入稀释到合适浓度 E-cadherin、MMP-2、MMP-9 和 VEGF 一抗, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜进行免疫杂交。然后加入相应 HRP 标记的二抗, 最后加入化学发光检测底物 (PIERCE) 进行反应, 显影检测。

1.3 统计学处理

用 SPSS 17.0 统计软件分析数据, 采用方差分析及 *t* 检验进行检验。

2 结果

2.1 DHM 抑制肝癌细胞 MHCC97L 的细胞黏附

对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 不同浓度 (10、

25、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 的 DHM 作用 MHCC97L 细胞 24 h 后, MHCC97L 细胞的黏附力均有明显抑制 (均 $P < 0.05$), 且有一定的浓度依赖趋势, 但各浓度间差异不明显 (图 1)。

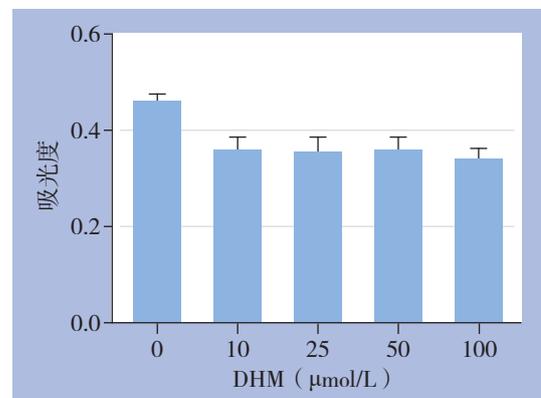


图 1 DHM 对 MHCC97L 黏附能力的影响

Figure 1 Effect of DHM on adhesion ability of MHCC97 cells

2.2 DHM 抑制肝癌细胞 MHCC97L 的侵袭能力

对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 不同浓度 (50、100 $\mu\text{mol/L}$) 的 DHM 作用 24 h, 与对照组比较, MHCC97L 细胞的侵袭力均明显降低 (均 $P < 0.05$) (图 2)。

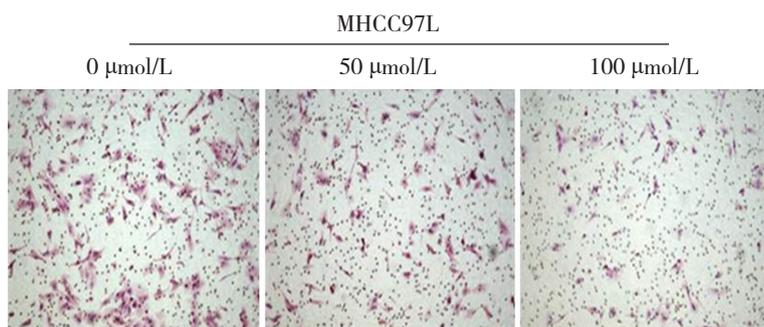
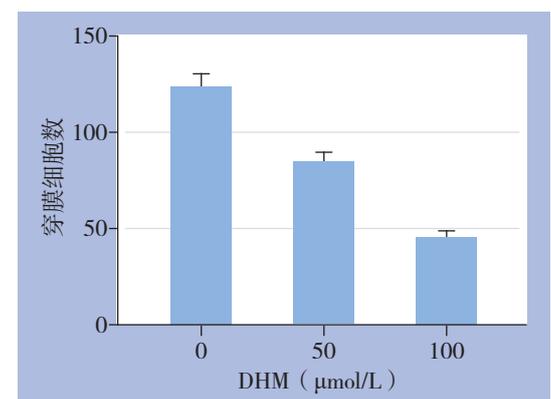


图 2 DHM 对 MHCC97L 细胞侵袭能力的影响

Figure 2 Effect of DHM on invasion ability of MHCC97 cells



2.3 DHM 抑制肝癌细胞 MHCC97L 的迁移与侵袭能力

DHM (50、100 $\mu\text{mol/L}$) 分别作用后, 与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, 在划痕实验中,

MHCC97L 的细胞迁移能力均明显降低 (均 $P < 0.05$) (图 3); 在 Transwell 小室迁移实验中, 穿过 Transwell 小室聚碳烯膜的细胞数明显减少 (均 $P < 0.05$) (图 4)。

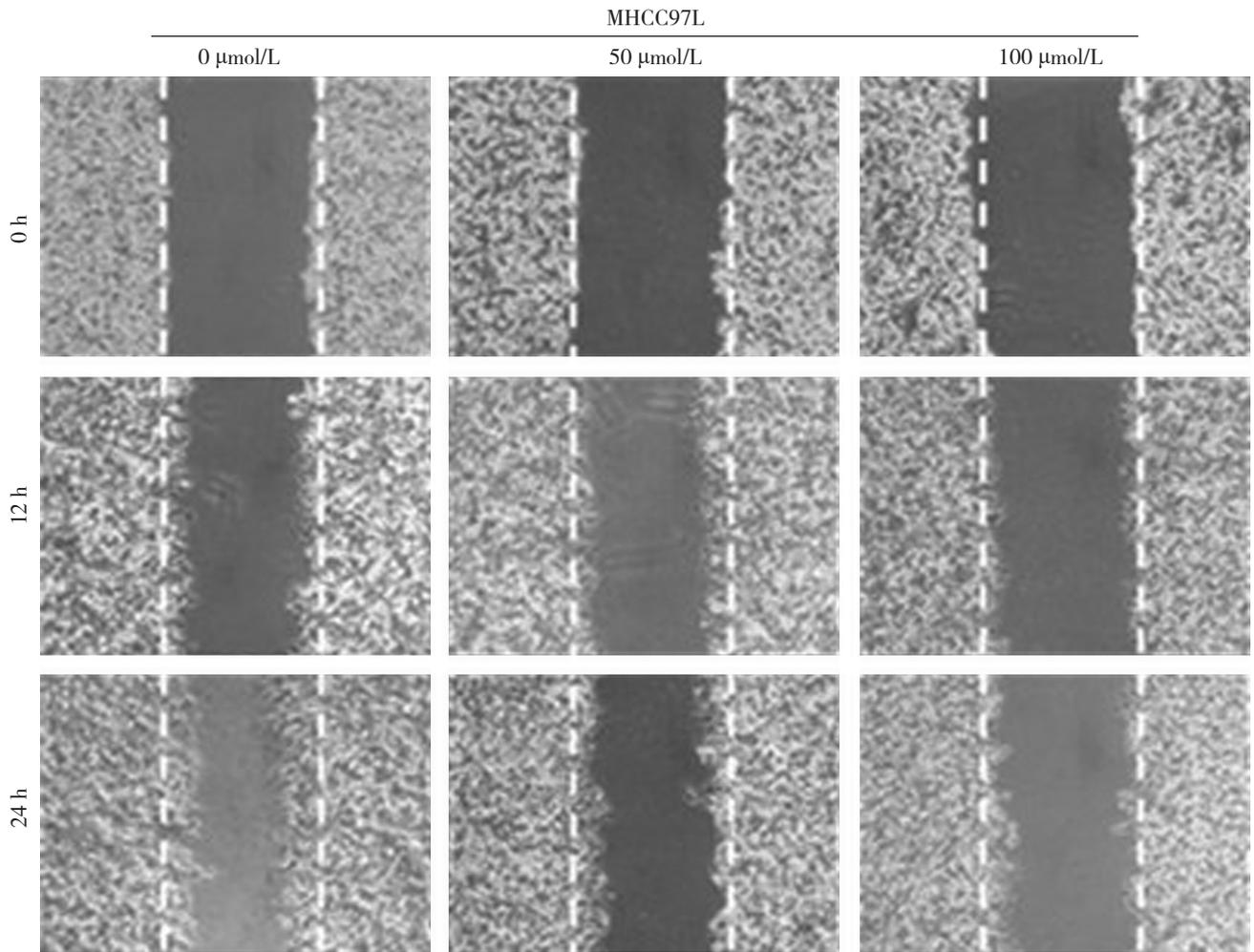


图 3 划痕实验

Figure 3 Scratch wound healing assay

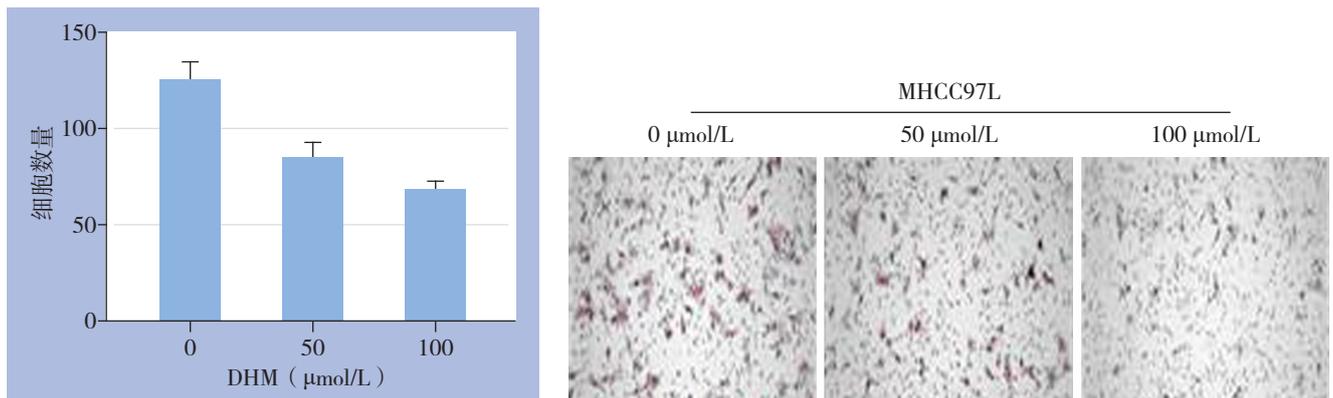


图 4 Transwell 小室迁移实验 (×100)

Figure 4 Transwell invasion assay (×100)

2.4 DHM 对 肝 癌 细 胞 MHCC97L MMP-9 与 MMP-2 的 蛋 白 影 响

DHM (0、10、50、100 μmol/L) 处理肝癌细胞24 h后, MMP-9蛋白相对表达量均随着药物浓度

增加而呈递减趋势, 各组间灰度值相比较呈明显差异 ($P < 0.001$); MMP-2蛋白相对表达量随着药物浓度增加而无明显变化 ($P > 0.05$) (图5)。

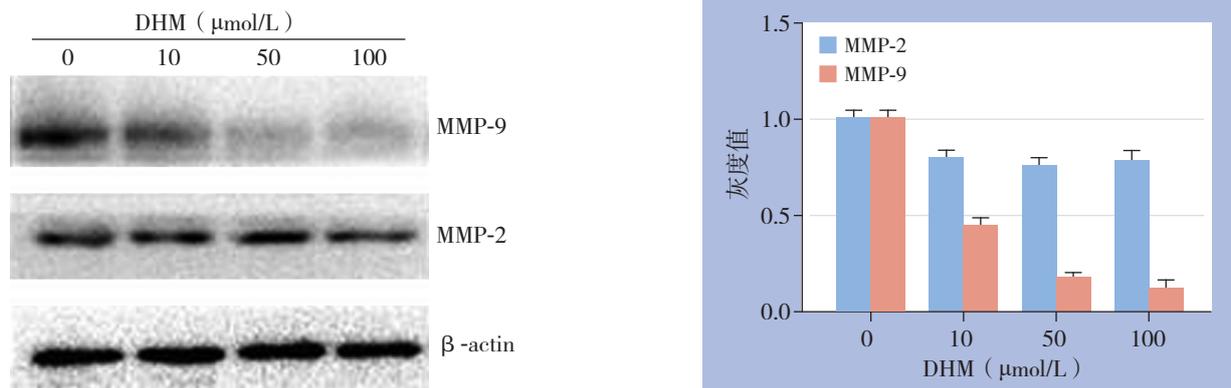


图5 MMP-2与MMP-9蛋白的表达

Figure 5 Protein expressions of MMP-2 and MMP-9

2.5 DHM对肝癌细胞MHCC97L的E-cadherin与VEGF的蛋白影响

DHM (0、10、50、100 μmol/L) 处理肝癌细胞24 h后, E-cadherin蛋白相对表达量均随着药物

浓度增加而呈递减趋势, 各组间灰度值相比较均有统计学差异 (均 $P<0.05$), VEGF蛋白相对表达量随着药物浓度增加而呈递减趋势, 各组间的灰度值相比较均有统计学差异 (均 $P<0.05$) (图6)。

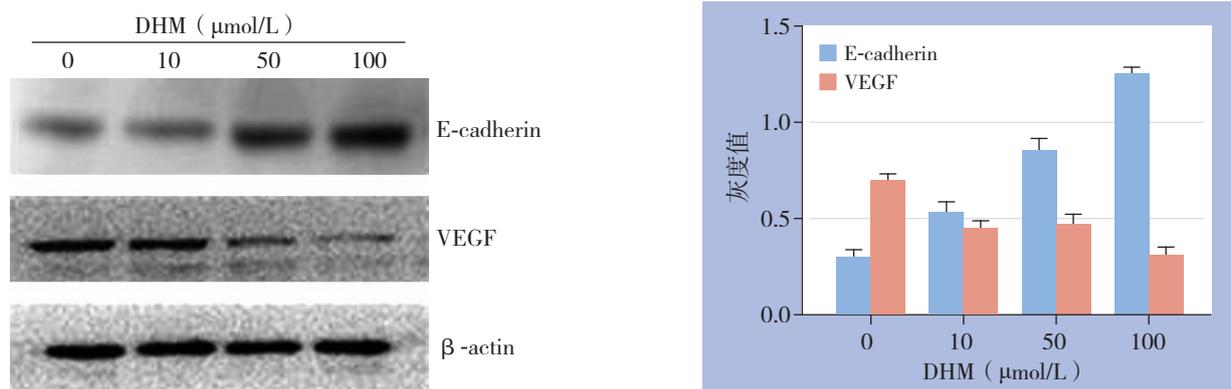


图6 E-cadherin与VEGF蛋白的表达

Figure 6 Protein expressions of E-cadherin and VEGF

3 讨论

研究^[4-6]证明, DHM能引起肝癌细胞周期阻滞、抑制膀胱癌增殖和抑制乳腺癌细胞侵袭, 还能抑制前列腺癌细胞在小鼠肺部转移^[7]。本研究发现DHM不仅能明显抑制肝癌细胞的迁移和侵袭, 还可以显著抑制MHCC97L细胞附着力, 说明DHM在一定的浓度范围内能够抑制肝癌细胞的转移。但是本研究所选取的肝癌MHCC97L细胞是一种转移潜能较低的肝癌细胞, 为了更好地探讨DHM对肝癌细胞转移的抑制作用, 需要选取多种细胞株进一步研究。

MMP-9是一个降解细胞外基质和基底膜重要

的蛋白酶, 其在肿瘤侵袭和血管生成中具有重要的作用^[8-9]。因此, 切断基质金属蛋白酶MMP-9的活动是抑制癌细胞侵袭的重要策略^[10-11]。在本研究中, DHM可以明显抑制MMP-9蛋白在MHCC97L细胞中的表达 (图5), 但对MMP-2的表达没有影响。

VEGF在肿瘤的生长, 浸润和转移过程中起到重要作用^[12-13]。目前VEGF是作用最强的促血管内皮生长因子^[14-15], 研究^[16]表明, 在肝癌组织中, VEGF表达上调可能与肝癌的侵袭性密切相关。它目前被认为调节血管生成的正调节因素, 它促使肿瘤周围微血管的生成, 并且增加内皮血管的通透性^[17]。同时, VEGF还能诱导多种蛋白酶包括基质金属蛋白酶 (MMPs) 表达, 从而导致细胞外基

质血管^[18]的解散。因此,抑制VEGF的表达能够抗肿瘤血管生成,而起到抗肿瘤的作用。本研究结果显示DHM能明显抑制VEGF的表达,说明DHM可能通过抑制VEGF的表达,从而抑制肿瘤的血管生成、限制肿瘤营养支持及抑制肿瘤的生长与转移。

E-cadherin是维持上皮细胞的完整性及细胞可塑性的重要因素^[19-21]。肿瘤发生远处转移时必须破坏细胞之间的完整性,而E-cadherin表达上调则可以维持肿瘤细胞的完整性。本研究发现DHM能明显上调肝癌细胞E-cadherin的表达,提示DHM可能通过上调E-cadherin表达,维持肿瘤细胞的完整性,从而抑制肝癌细胞的转移。

综上所述, DHM可能通过调节MMP-9、E-cadherin和VEFG蛋白的表达,从而抑制人类肝细胞癌的MHCC97L细胞迁移和侵袭,但其具体机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Yabe N, Matsui H. Ampelopsis brevipedunculata (Vitaceae) extract stimulates collagen synthesis through superoxide generation in the serum-free cultures of rat dermal fibroblasts and Ito cells[J]. *J Ethnopharmacol*, 1997, 56(1):67-76.
- [2] Hase K, Ohsugi M, Xiong Q, et al. Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB. on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide[J]. *Biol Pharm Bull*, 1997, 20(4):381-385.
- [3] Nicolson GL. Cancer metastasis: tumor cell and host organ properties important in metastasis to specific secondary sites[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1988, 948(2):175-224.
- [4] Huang H, Hu M, Zhao R, et al. Dihydropyridin suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells by inducing G2/M arrest through the Chk1/Chk2/Cdc25C pathway[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(5):2467-2475.
- [5] Zhang B, Dong S, Cen X, et al. Ampelopsin sodium exhibits antitumor effects against bladder carcinoma in orthotopic xenograft models[J]. *Anticancer Drugs*, 2012, 23(6): 590-596.
- [6] 周防震, 张晓元, 詹远京, 等. 二氢杨梅素抑制人乳腺癌细胞侵袭和下调MMP-2/-9蛋白表达研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2012, 39(4):352-358.
- [7] King JC, Lu QY, Li G, et al. Evidence for activation of mutated p53 by apigenin in human pancreatic cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1823(2):593-604.
- [8] Kang H, Jang SW, Ko J. Human leucine zipper protein sLZIP induces migration and invasion of cervical cancer cells via expression of matrix metalloproteinase-9[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(49):42072-42081.
- [9] Nyberg P, Heikkilä P, Sorsa T, et al. Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloproteinase-2,-9 and -13[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(25):22404-22411.
- [10] Zhang M, Altuwajri S, Yeh S. RRR- α -tocopheryl succinate inhibits human prostate cancer cell invasiveness[J]. *Oncogene*, 2004, 23(17):3080-3088.
- [11] Zhou X, Yang J, Wang Y, et al. Cucurbitacin B inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced invasion and migration of human hepatoma cells through inactivating mitogen-activated protein kinase and PI3K/Akt signal transduction pathways[J]. *Hepatol Res*, 2012, 42(4):401-411.
- [12] 欧阳德亮, 胡杨, 王又保, 等. 穿心莲内酯对胃癌AGS细胞增殖侵袭的影响[J]. *中南医学科学杂志*, 2014, 42(3):246-250.
- [13] 莫靓, 雷正文, 游咏, 等. 非小细胞肺癌中VEGF-C, VEGF-D及MMP-12的表达[J]. *中南医学科学杂志*, 2012, 40(5):472-476.
- [14] Yang JD, Nakamura I, Roberts LR. The tumor microenvironment in hepatocellular carcinoma: current status and therapeutic targets[J]. *Semin Cancer Biol*, 2011, 21(1):35-43.
- [15] Amaoka N, Saio M, Nonaka K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors is closely related to the histological grade of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Rep*, 2006, 16(1):3-10.
- [16] 万健, 唐才喜, 冯斌, 等. 原发性肝癌中Numb和VEGF的表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(1):39-44.
- [17] Dong F, Ha XQ. Effect of endothelial progenitor cells in neovascularization and their application in tumor therapy[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(17):2454-2460.
- [18] Potente M, Gerhardt H, Carmeliet P. Basic and therapeutic aspects of angiogenesis[J]. *Cell*, 2011, 146(6):873-887.
- [19] Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition[J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(6):1420-1428.
- [20] Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1198(1):11-26.
- [21] Gaggioli C, Hooper S, Hidalgo-Carcedo C, et al. Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells[J]. *Nat Cell Biol*, 2007, 9(12):1392-1400.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 邱志东, 罗芳兰, 舒洋, 等. 二氢杨梅素对肝癌细胞黏附、侵袭及迁移的抑制作用及机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(9):1263-1268. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.011
Cite this article as: QIU ZD, LUO FL, SHU Y, et al. Inhibitory effect of dihydropyridin on adhesion, invasion and migration in hepatocellular carcinoma cells and the mechanism[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(9):1263-1268. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.09.011