

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.23.002

华蟾素对人胃癌 SGC7901 细胞增殖及 Rho GTPase 表达的影响*

李楠静¹, 黄娟², 张又³, 何菲¹

(1. 成都中医药大学临床医学院, 成都 610072; 2. 四川省人民医院血液科, 成都 610072;

3. 四川大学华西医院生物治疗国家重点实验室, 成都 610041)

[摘要] **目的** 研究华蟾素对人胃癌 SGC7901 细胞增殖及 Rho GTPase 表达的影响。**方法** 将人胃癌 SGC7901 细胞分为华蟾素组和对照组, 利用 Cell Counting Kit-8 检测(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL)华蟾素组和对照组的人胃癌 SGC7901 细胞的增殖抑制情况, 利用 Western blot 和 RT-PCR 分别检测不同浓度(0.5、1.0、2.0 ng/mL)华蟾素组和对照组的人胃癌 SGC7901 细胞内 Rho GTPase(RhoA、Cdc42、Rac1)蛋白和 mRNA 表达的水平。**结果** 与对照组相比, 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL 华蟾素组对 SGC7901 细胞均具有增殖抑制作用($P < 0.05$)。0.5、1.0、2.0 mg/mL 华蟾素组的 SGC7901 细胞内 Rho GTPase(RhoA、Cdc42、Rac1)蛋白和 mRNA 表达明显降低且呈剂量依赖性($P < 0.05$)。**结论** 华蟾素抑制胃癌 SGC7901 的增殖的机制可能与下调 Rho GTPase(RhoA、Cdc42、Rac1)信号通路的表达有关。

[关键词] 华蟾素; Rho GTPase; 胃肿瘤; SGC7901**[中图分类号]** R735.3**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)23-3010-03

Effect of cinobufacini on the proliferation and Rho GTPase expression of gastric cancer cell line SGC7901*

LI Nanjing¹, HUANG Juan², ZHANG You³, HE Fei¹

(1. School of Clinical Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu, Sichuan 610072, China;

2. Department of Hematology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu, Sichuan 610072, China;

3. Laboratory of State Key Laboratory of Biotherapy, West China Hospital,

Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of cinobufacini on the proliferation and Rho GTPase expression of gastric cancer cell line SGC7901. **Methods** SGC7901 cells were divided into the experimental group and the control group. Cell Counting kit-8 was used to detect the proliferation inhibition of SGC7901 cells in the experimental group (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL cinobufacini) and the control group. The expressions of Rho GTPase (RhoA, Cdc42, Rac1) protein and mRNA of SGC7901 cells in the experimental group (0.5, 1.0, 2.0 mg/mL) and the control group were detected by Western blot and RT-PCR respectively. **Results** Compared with the control group, the experimental group (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/mL) had significant inhibition effect on SGC7901 cell proliferation ($P < 0.05$). The expressions of SGC7901 cells Rho GTPase (RhoA, Cdc42, Rac1) protein and mRNA in the experimental group (0.5, 1.0, 2.0 mg/mL) decreased obviously and there was a dose-dependent relationship ($P < 0.05$). **Conclusion** The mechanism of cinobufacini inhibiting the proliferation of SGC7901 cells may be related to the down-regulation of Rho GTPase (RhoA, Cdc42, Rac1) signaling pathway.

[Key words] cinobufacini; Rho GTPase; stomach neoplasms; SGC7901

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一, 在我国发病率和病死率较高。目前除了化疗等传统治疗手段以外, 也在探索中西医结合的肿瘤综合治疗方案。华蟾素是从传统中药材蟾皮中提取的生物制剂, 具有清热解毒、消肿化瘀等功效, 多项研究发现其具有较强的抗肿瘤作用^[1-2]。Rho GTPases 是重要的细胞内信号分子, 参与调控许多细胞生理进程, Rho 家族在肿瘤细胞中通常呈高表达, 几乎参与了肿瘤发生、发展的每

一个重要环节, RhoA、Cdc42 和 Rac1 是其中最受关注的分子^[3-4]。本实验通过华蟾素对胃癌 SGC7901 细胞增殖能力和细胞内 Rho GTPases (RhoA、Cdc42、Rac1) 表达的影响, 为胃癌的综合治疗提供新的理论依据和选择方向。

1 材料与方

1.1 材料与试剂 胃癌细胞系 SGC7901 (四川大学信号转导及分子靶向治疗实验室提供); 华蟾素 (每支

5 mL,安徽华润金蟾药业股份有限公司);鼠抗人 RhoA、Cdc42、Rac1、β-actin 单克隆抗体(美国 BD 公司);RPMI1640 培养基、胎牛血清(美国 Gibco 公司);lipofectamine™ 2000、Trizol(美国 Invitrogen 公司);RT-PCR 试剂盒(日本 Takara 公司);CCK-8 试剂盒(日本 Dojindo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 胃癌细胞系 SGC7901 由 RPMI 1640 (含 10% 胎牛血清), 37 °C、5% CO₂ 敷箱常规培养。

1.2.2 CCK-8 法检测细胞增殖抑制率 培养胃癌细胞系 SGC7901 细胞至对数生长期,按照每孔 2 × 10³ 密度接种于 96 孔板,培养 24 h 细胞贴壁后加入华蟾素,使其最终浓度达到 0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL,每个实验组设 3 个复孔,并设对照组。分别于药物培养 24、48、72 h 进行检测。检测时更换为 100 μL 新鲜培养液与 10 μL CCK-8 试剂混合继续孵育 4 h,用酶标仪读取吸光度(A)值,选择 490 nm 和 630 nm 双波长,增殖抑制率(%) = (1 - 实验组 A 值/对照组 A 值) × 100%。

1.2.3 Western blot 检测 RhoA、Cdc42、Rac1 蛋白的表达 收集 3 种浓度(0.5、1.0、2.0 mg/mL)华蟾素培养 48 h 后的 SGC7901 细胞,制备细胞总蛋白,BCA 方法进行蛋白质定量。取等量的蛋白样品行 12% 聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,并将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,加入 RhoA、Cdc42、Rac1 抗体 4 °C 摇床孵育过夜,加入荧光二抗避光于室温振摇 2 h,将膜直接置于红外荧光扫描仪中扫描,与内参照 β-actin 进行比较。

1.2.4 RT-PCR 检测 RhoA、Cdc42、Rac1 mRNA 的表达 收集 3 种浓度(0.5、1.0、2.0 mg/mL)华蟾素培养 48 h 后的 SGC7901 细胞,以 Trizol 试剂提取总 RNA,按照 PCR 试剂盒说明书方法反转录获得 cDNA。按表 1 引物进行 RT-PCR 扩增,PCR 反应条件为 95 °C 预变性 5 min,94 °C 变性 30 s,57 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 30 s,共 36 个循环,最后 1 个循环 72 °C 延伸 5 min,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,凝胶图象分析仪进行条带分析。

表 1 RT-PCR 所用引物序列

基因	引物	扩增长度 片段(bp)
β-actin	上游 5'- TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3'	300
	下游 5'- CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'	
RhoA	上游 5'- CCC AAC ACT CCC ATC ATC CTA-3'	263
	下游 5'- GGG TTG TGA GGG TAG TAG GAT-3'	
Cdc42	上游 5'-AGT CTA GAG CCA CCG TCC AC-3'	183
	下游 5'- TCT GAC GCA CAC CTA TTG CAA-3'	
Rac1	上游 5'-TAC AGC ACC AAT CTC CTT A-3'	150
	下游 5'-CCC AAC ACT CCC ATC ATC C-3'	

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验或方差分析,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 华蟾素对 SGC7901 细胞增殖活性的影响 随着华蟾素浓度的增加和作用时间的延长,其对 SGC7901 细胞增殖抑制作用也在逐渐增强,呈剂量及时间效应关系,各浓度华蟾素组与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 华蟾素对 SGC7901 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	抑制率(%)		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0.00	0.00	0.00
0.5 mg/mL 华蟾素组	24.05 ± 2.32 ^a	40.73 ± 1.82 ^a	61.58 ± 1.63 ^a
1.0 mg/mL 华蟾素组	32.14 ± 0.96 ^a	49.65 ± 1.47 ^a	72.82 ± 1.54 ^a
1.5 mg/mL 华蟾素组	38.46 ± 2.08 ^a	61.39 ± 1.72 ^a	84.51 ± 1.67 ^a
2.0 mg/mL 华蟾素组	47.63 ± 1.84 ^a	76.25 ± 1.38 ^a	90.41 ± 0.87 ^a

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

2.2 华蟾素对 SGC7901 细胞 RhoA、Cdc42、Rac1 蛋白表达的影响 随着药物浓度的增加,RhoA、Cdc42、Rac1 蛋白表达水平逐渐降低,呈现剂量依赖性,当剂量达到 2.0 mg/mL 的时候蛋白表达量最低,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1。

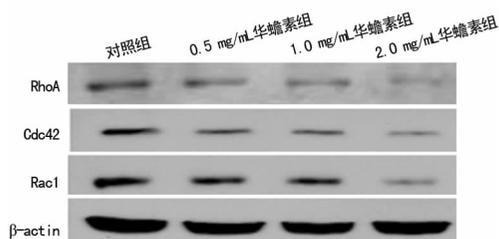


图 1 Western blot 检测各组 SGC7901 细胞中 RhoA、Cdc42、Rac1 蛋白表达

2.3 华蟾素对 SGC7901 细胞 RhoA、Cdc42、Rac1 mRNA 表达的影响 随着药物浓度的增加,RhoA、Cdc42、Rac1 mRNA 表达量逐渐降低,显示出剂量依赖性,各浓度华蟾素组与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 华蟾素对 SGC7901 细胞中 RhoA、Cdc42、Rac1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	RhoA mRNA	Cdc42 mRNA	Rac1 mRNA
对照组	0.956 ± 0.035	0.935 ± 0.018	0.961 ± 0.023
0.5 mg/mL 华蟾素组	0.664 ± 0.021 ^a	0.728 ± 0.033 ^a	0.792 ± 0.017 ^a
1.0 mg/mL 华蟾素组	0.341 ± 0.032 ^a	0.496 ± 0.028 ^a	0.547 ± 0.025 ^a
2.0 mg/mL 华蟾素组	0.169 ± 0.043 ^a	0.273 ± 0.031 ^a	0.386 ± 0.013 ^a

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

3 讨论

胃癌是最常见的恶性肿瘤,是世界上第 2 大癌症死因。我国是胃癌高发区,其发病率和病死率高居各

种恶性肿瘤之首,严重威胁着人们的健康和生命,胃癌目前临床上主要采用以 5-FU 为基础的化疗方案^[5],然而胃癌 5 年相对生存期仍然很低,探索新的有效抗肿瘤成分的药物和对相关的信号转导通路的影响成为近年来肿瘤研究的重点。华蟾素是以中华大蟾蜍皮为主要原料制成的一种水溶性制剂,具有清热解毒,消肿化瘀等作用。研究发现华蟾素对肝癌、胰腺癌、结肠癌、骨肉瘤、乳腺癌等多种肿瘤细胞的生长和增殖有较强的抑制作用,能够诱导肿瘤细胞的分化和促进凋亡,逆转多药耐药性^[6-9]。

Rho GTPases 家族均有与 GTP 结合的基因序列,与 GDP 和 GTP 有很高的亲和力,能够接收多种刺激信号。Rho 家族是细胞内重要的信号分子,可以参与调控细胞骨架重组、细胞黏附和移动、细胞周期、细胞凋亡、细胞分裂、基因转录等多种生理过程^[10]。作为 Rho 家族研究最多最具代表性的 3 个分子,大量的基础实验研究发现 RhoA、Cdc42、Rac1 与肿瘤的发生、发展有重要的联系,可以促进细胞分裂,加速细胞的生长、增殖;促进肿瘤血管壁的发育,加速肿瘤血管的生成;能够对抗和阻断细胞的凋亡信号转导途径从而抑制细胞的凋亡^[11-13]。目前多个研究发现 RhoA、Cdc42、Rac1 在胃癌细胞和组织中呈现高表达^[14-15],本实验希望通过研究不同浓度华蟾素对胃癌细胞中 RhoA、Cdc42、Rac1 基因表达的影响,探讨华蟾素通过 Rho GTPases 信号通路抗胃癌的作用机制。

本实验首先采用 CCK-8 法检测 4 种(0.5、1.0、1.5、2.0 mg/mL)不同浓度华蟾素作用于 SGC7901 细胞 24、48、72 h 后的增殖活性,显示各实验组与对照组相比增殖活性受到明显抑制,0.5 mg/mL 浓度的华蟾素对 SGC7901 细胞即有抑制作用,2.0 mg/mL 浓度的华蟾素在 72 h 时抑制率为最高,增殖抑制率呈现出剂量和时间依赖性关系。细胞增殖抑制实验得到的有效浓度范围中,选择 3 种(0.5、1.0、2.0 mg/mL)不同浓度华蟾素,用 Western blot 和 RT-PCR 分别检测其作用于 SGC7901 细胞 48 h 后 RhoA、Cdc42、Rac1 蛋白和基因表达,显示 RhoA、Cdc42、Rac1 蛋白和 mRNA 表达水平均较对照组降低,且随着华蟾素浓度的增加,3 种分子的蛋白和 mRNA 表达量逐渐降低,2.0 mg/mL 浓度的华蟾素抑制蛋白和 mRNA 表达作用最强,呈现剂量依赖性。表明华蟾素可以降低胃癌 SGC7901 细胞中 Rho GTPase 的表达,通过抑制 Rho 家族信号转导通路中相关分子的表达来降低细胞的增殖能力,从而起到抗肿瘤的作用。本实验为华蟾素抗胃癌的作用机制提供新的研究方向,为其临床应用提供理论依据。

参考文献

[1] 贾小晴,孙萍.华蟾素抗肿瘤成分及作用机制研究进展

[J]. 辽宁中医药大学学报,2017,19(3):215-217.

- [2] 袁梅美,惠起源.华蟾素抗肿瘤的研究进展[J].中国医药导报,2014,11(2):44-46.
- [3] ZAGO G,BIONDINI M,CAMONIS J,et al. A family affair: A Ral-exocyst-centered network links Ras, Rac, Rho signaling to control cell migration[J]. Small GTPases, 2017,12(5):1-8.
- [4] CARDAMA G A,GONZALEZ N,MAGGIO J,et al. Rho GTPases as therapeutic targets in cancer[J]. Int J Oncol, 2017,51(4):1025-1034.
- [5] DIGKLI A,WAGNER A D. Advanced gastric cancer: Current treatment landscape and future perspectives[J]. World J Gastroenterol,2016,22(8):2403-2414.
- [6] 荣震,陈羽娜,莫春梅,等.华蟾素注射液联合肝动脉栓塞化疗治疗原发性肝癌的 Meta 分析[J]. 广州中医药大学学报,2016,33(2):274-280.
- [7] LIU Y,BAN L Y,SU X,et al. Effects of cinobufacini injection on cell proliferation and the expression of topoisomerases in human HepG-2 hepatocellular carcinoma cells[J]. Mol Med Rep,2015,12(1):1598-1604.
- [8] HUANG T,GONG W H,LI X C,et al. Efficient killing effect of osteosarcoma cells by cinobufacini and cisplatin in combination[J]. Asian Pac J Cancer Prev,2012,13(6):2847-2851.
- [9] WEI X L,SI N,ZHANG Y F,et al. Evaluation of bufadienolides as the main antitumor components in cinobufacini injection for liver and gastric cancer therapy[J]. PLoS One,2017,12(1):e0169141.
- [10] PAJIC M,HERRMANN D,VENNIN C,et al. The dynamics of Rho GTPase signaling and implications for targeting cancer and the tumor microenvironment[J]. Small GTPases,2015,6(2):123-133.
- [11] QADIR M I,PARVEEN A,ALI M. Cdc42:role in cancer management[J]. Chem Biol Drug Des,2015,86(4):432-439.
- [12] RIDLEY A J. RhoA,RhoB and RhoC have different roles in cancer cell migration[J]. J Microsc,2013,251(3):242-249.
- [13] ZHAO Z,MANSER E. Myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinases(MRCK), the ROCK-like effectors of Cdc42 and Rac1[J]. Small GTPases,2015,6(2):81-88.
- [14] PAN Y L,BI F,LIU N,et al. Expression of seven main Rho family members in gastric carcinoma[J]. Biochem Biophys Res Commun,2004,315(3):686-691.
- [15] MATSUOKA T,YASHIRO M. Rho/ROCK signaling in motility and metastasis of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol,2014,20(38):13756-13766.

(收稿日期:2018-02-12 修回日期:2018-03-21)