

连翘苷对胃癌细胞 AGS 增殖、迁移和侵袭的抑制作用

邓明¹, 邓芳¹, 陈志坚¹, 周福生^{2*}

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东广州 510405; 2. 广州中医药大学脾胃研究所, 广东广州 510405)

摘要: 目的 探讨连翘苷对胃癌细胞 AGS 增殖、迁移和侵袭的抑制作用。方法 5、10、20 μmol/L 连翘苷作用 AGS 细胞 24 h 后, CCK-8、Transwell 法检测细胞增殖、迁移和侵袭, Western blot 法检测 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达, RT-qPCR 法检测 lncRNA *EXOC7* mRNA 表达。转染 *EXOC7* 表达小干扰 RNA 至 AGS 细胞, 观察降低 *EXOC7* 表达对 AGS 细胞增殖、迁移和侵袭及 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响。结果 连翘苷作用于 AGS 细胞后, 细胞增殖活力、迁移和侵袭数, Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白, *EXOC7* mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$)。抑制 *EXOC7* 表达后, AGS 细胞增殖活力、迁移和侵袭数, Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$)。过表达 *EXOC7* 可以逆转连翘苷对 AGS 细胞增殖、迁移和侵袭及 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响。结论 连翘苷可能通过降低 *EXOC7* 表达抑制胃癌细胞 AGS 增殖、迁移和侵袭。

关键词: 连翘苷; 胃癌细胞 AGS; *EXOC7*; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)09-3009-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.09.049

胃癌的发病率和死亡率均较高, 严重威胁人类生命健康^[1]。胃癌复发、转移是导致死亡的主要原因, 减弱细胞迁移和侵袭对肿瘤复发、转移有抑制作用, 能够改善患者预后^[2]。近年来, 中草药或其活性成分具有作用靶点多、副作用小等优点, 其抗肿瘤作用也备受关注。连翘苷是中药连翘的主要活性成分之一, 具有抗氧化^[3]、抗炎^[4]、抗衰老^[5]等功效。研究显示, 连翘苷可通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B 信号通路降低肾癌细胞的生长、迁移和侵袭^[6]。但目前, 连翘苷对胃癌细胞机制研究还未知。长链非编码 RNA (lncRNA) 是一类与人类肿瘤发生发展密切相关的 RNA, 可作为肿瘤治疗和诊断的靶点^[7-9]。外泌体复合物 7 (*EXOC7*) 是一种 lncRNA, 其在胃癌患者的血清和癌组织中表达升高, 且其高表达与胃癌临床分期、浸润深度、分化程度、淋巴结转移等临床病理特征密切相关, 可能成为胃癌早期诊断及病情判断的潜在生物学指标^[10]。因此, 本研究主要探讨连翘苷可能通过调控 *EXOC7* 对胃癌细胞 AGS 增殖、迁移和侵袭的影响, 以期为其研究与应用提供依据。

1 材料

胃癌细胞 AGS 购自中国科学院上海细胞库。连翘苷 (纯度 ≥ 98%, 批号 20180619), 购自南京广润生物制品有限公司。胎牛血清 (FBS, 批号 20181225), 购自浙江天杭生物科技有限公司; TRIzol 试剂 (批号 55362985)、

Lipofectamine™ 2000 试剂盒 (批号 1464348), 购自美国 Invitrogen 公司; RPMI 1640 培养基 (批号 20180915)、细胞计数试剂盒-8 (CCK-8, 批号 20181123)、二喹啉甲酸 (BCA) 试剂盒 (批号 20181028), 购自北京索莱宝科技有限公司; 逆转录试剂盒 (批号 AK4856)、PCR 试剂盒 (批号 AK15028), 购自日本 TaKaRa 公司; PCR 引物、si-*EXOC7*、si-NC、pcDNA-*EXOC7*、pcDNA, 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 兔抗人 Ki67 (批号 45585995)、基质金属蛋白酶 2 (MMP-2, 批号 15265585)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9, 批号 25465855)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 多克隆抗体 (批号 36542115), 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养和转染 AGS 细胞用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养。AGS 细胞接种于 6 孔板, 按照 Lipofectamine™ 2000 试剂盒说明书操作, 分别转染 si-*EXOC7*、si-NC、pcDNA-*EXOC7*、pcDNA。

2.2 细胞分组 参考文献 [6] 报道, 将未转染细胞分为对照组, 5、10、20 μmol/L 连翘苷组。对照组细胞用常规培养基培养 24 h; 5、10、20 μmol/L 连翘苷组细胞分别用含 5、10、20 μmol/L 连翘苷的培养基培养 24 h。转染 si-*EXOC7*、si-NC 正常培养 24 h, 记为 si-*EXOC7* 组、si-NC 组。转染 pcDNA-*EXOC7*、pcDNA 用含 20 μmol/L 连翘苷的

收稿日期: 2020-12-19

基金项目: 广东省中医药局科研项目 (20202155)

作者简介: 邓明 (1979—), 男, 硕士, 主治医师, 从事中医药研究。Tel: 13925125863, E-mail: jdm725@163.com

* 通信作者: 周福生 (1950—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事脾胃虚实病证辨证论治规律及其病理本质研究。Tel: 13533988278, E-mail: lionten@hotmail.com

培养基培养 24 h, 记为 20 μmol/L 连翘苷+pcDNA-EXOC7 组、20 μmol/L 连翘苷+pcDNA 组。

2.3 CCK-8 法检测细胞增殖 将各组细胞接种于 96 孔板, 按“2.2”项下分组处理, 培养 24 h, 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 孵育 2 h, 于酶标仪 450 nm 波长处检测光密度 (OD) 值。以 OD 值表示细胞增殖活力。

2.4 Transwell 法检测细胞迁移和侵袭 取 100 μL 细胞悬液均匀铺于 Transwell 小室上室, 下室加入 500 μL 培养基。按“2.2”项下分组处理, 培养 24 h 后多聚甲醛固定 30 min, 结晶紫染色 15 min, 在显微镜 200 倍视野下观察并拍照, 计数并评价细胞迁移能力。侵袭实验以 Matrigel 基质胶铺于 Transwell 上室, 自然晾干, 其余步骤同迁移实验。

2.5 Western blot 法检测细胞中 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达 RIPA 试剂提取各组细胞中总蛋白, BCA 法进行蛋白定量, 10% SDS-PAGE 电泳, 湿转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂奶中封闭 1 h, 加 Ki67 (1:500)、MMP-2 (1:1000)、MMP-9 (1:1000)、GAPDH (1:1500) 一抗, 4℃ 孵育过夜, 加辣根过氧化物酶标记的 IgG, 37℃ 孵育 1 h, 通过化学发光试剂进行避光显影, 曝光拍照。Image J 软件对蛋白条带进行分析, 以 GAPDH 为内参, 计算目的蛋白相对表达。

2.6 RT-qPCR 检测细胞中 EXOC7 mRNA 表达 采用 TRIzol 试剂从细胞中提取总 RNA, 逆转录系统将 RNA 反转录为 cDNA, 进行 PCR 扩增。引物序列为 EXOC7 正向引物 5'-GATACTTGACTCATYAGAC-3', 反向引物 5'-ACTTCTACTCTCATGATC-3'; 内参 GAPDH 正向引物 5'-GATCGTGGC CATCAATGACC-3', 反向引物 5'-ACCTGCATCACCCCACTTA

A-3'。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 EXOC7 mRNA 相对表达。

2.7 统计学分析 通过 GraphPad Prism 7.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 2 组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 连翘苷对 AGS 细胞增殖的影响 与对照组比较, 各浓度连翘苷组 AGS 细胞增殖活力和 Ki67 蛋白表达均降低 (P<0.05), 且呈剂量依赖性, 见图 1、表 1。

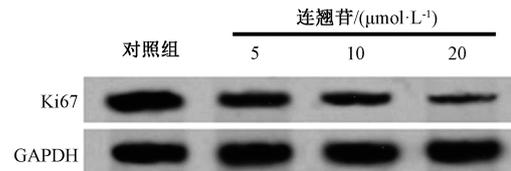


图 1 各组 AGS 细胞 Ki67 蛋白表达

表 1 连翘苷对 AGS 细胞增殖活力和 Ki67 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	增殖活力	Ki67
对照组	0.65±0.05	0.99±0.04
5 μmol/L 连翘苷组	0.58±0.04*	0.62±0.03*
10 μmol/L 连翘苷组	0.43±0.03*	0.46±0.03*
20 μmol/L 连翘苷组	0.32±0.03*	0.26±0.02*

注: 与对照组比较, *P<0.05。

3.2 连翘苷对 AGS 细胞迁移和侵袭的影响 与对照组比较, 各浓度连翘苷组 AGS 细胞迁移和侵袭数以及 MMP-2、MMP-9 蛋白表达均降低 (P<0.05), 且呈剂量依赖性, 见图 2、表 2。

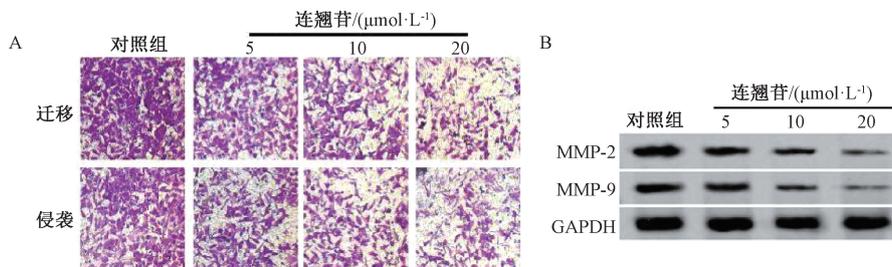


图 2 各组 AGS 细胞迁移、侵袭 (A) 及 MMP-2、MMP-9 蛋白表达 (B)

表 2 连翘苷对 AGS 细胞迁移、侵袭及 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	MMP-2	MMP-9
对照组	150.78±13.89	123.55±11.56	0.74±0.01	0.53±0.02
5 μmol/L 连翘苷组	123.03±11.43*	94.45±9.84*	0.48±0.02*	0.33±0.02*
10 μmol/L 连翘苷组	85.12±9.49*	64.20±5.87*	0.35±0.01*	0.25±0.01*
20 μmol/L 连翘苷组	41.54±4.31*	32.98±2.54*	0.21±0.01*	0.19±0.01*

注: 与对照组比较, *P<0.05。

3.3 连翘苷对 AGS 细胞中 EXOC7 mRNA 表达的影响 与对照组比较, 各浓度连翘苷组 AGS 细胞中 EXOC7 mRNA 表达降低 (P<0.05), 且呈剂量依赖性, 见表 3。

3.4 抑制 EXOC7 表达对 AGS 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 与 si-NC 组比较, si-EXOC7 组 AGS 细胞中 EXOC7

mRNA 表达降低, 增殖活力、迁移和侵袭数以及 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达降低 (P<0.05), 见图 3、表 4~5。

3.5 过表达 EXOC7 对 AGS 细胞增殖、迁移和侵袭的影响 转染 pcDNA、pcDNA-EXOC7 的细胞中 EXOC7 mRNA 表达分

别为 (1.01 ± 0.05) 、 (1.87 ± 0.13) ，2组比较差异显著 ($P < 0.05$)，表明 pcDNA-*EXOC7* 转染成功，细胞中 *EXOC7* mRNA 表达升高。与 20 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷+pcDNA 组比较，20 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷+pcDNA-*EXOC7* 组 AGS 细胞增殖活力、迁移和侵袭数及 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)，见图 4、表 6~7。

表 3 连翘苷对 AGS 细胞中 *EXOC7* mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	<i>EXOC7</i>
对照组	1.03±0.07
5 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷组	0.79±0.05*
10 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷组	0.56±0.04*
20 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷组	0.32±0.04*

注：与对照组比较，* $P < 0.05$ 。

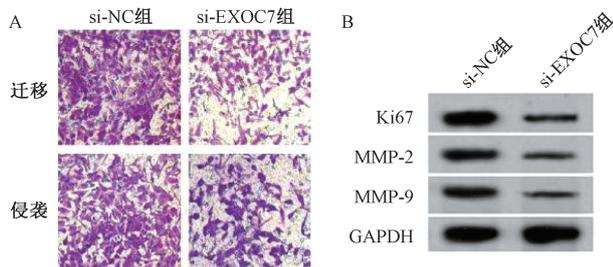


图 3 各组 AGS 细胞迁移和、侵袭 (A) 及 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达 (B)

表 6 过表达 *EXOC7* 对 AGS 细胞增殖活力及 Ki67 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	<i>EXOC7</i>	增殖活力	Ki67
20 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷+pcDNA 组	0.33±0.04	0.32±0.04	0.24±0.02
20 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷+pcDNA- <i>EXOC7</i> 组	0.83±0.03*	0.60±0.03*	0.93±0.06*

注：与 20 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷+pcDNA 组比较，* $P < 0.05$ 。

表 7 过表达 *EXOC7* 对 AGS 细胞迁移、侵袭及 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	MMP-2	MMP-9
20 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷+pcDNA 组	43.71±4.13	32.37±2.54	0.21±0.02	0.17±0.01
20 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷+pcDNA- <i>EXOC7</i> 组	138.75±10.92*	110.22±10.04*	0.67±0.01*	0.51±0.02*

注：与 20 $\mu\text{mol/L}$ 连翘苷+pcDNA 组比较，* $P < 0.05$ 。

4 讨论

连翘是我国传统中药，具有清热解毒、消肿散结等功效。连翘在我国地理分布范围广，可广泛种植，具有较好的开发价值。连翘苷作为连翘的主要活性成分之一，其药理活性有待深入探究。研究显示，连翘苷可通过降低 VEGF、升高 ET-1 抑制肺癌细胞发展^[11]。本研究采用不同浓度连翘苷干预体外培养的胃癌细胞 AGS，探究连翘苷对 AGS 细胞增殖、迁移和侵袭的影响及分子机制。

细胞增殖紊乱可导致肿瘤发生，抑制肿瘤细胞增殖可延缓肿瘤发展进程^[12]。Ki67 蛋白参与调控细胞周期，可以反映细胞增殖^[13]。本研究显示，不同浓度连翘苷作用胃癌细胞 AGS 后，细胞增殖活力和 Ki67 蛋白表达降低，表明连翘苷可抑制 AGS 细胞增殖。肿瘤细胞迁移和侵袭可影响肿瘤复发、转移，MMP-2、MMP-9 可以促进细胞外基质降解以及肿瘤细胞的迁移和侵袭^[14-15]。连翘苷可以降低 AGS 细胞迁移和侵袭数，降低 MMP-2、MMP-9 蛋白表达，表明连

表 4 抑制 *EXOC7* 表达对 AGS 细胞增殖活力和 Ki67 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	<i>EXOC7</i>	增殖活力	Ki67
si-NC 组	1.02±0.07	0.65±0.03	0.97±0.06
si- <i>EXOC7</i> 组	0.41±0.04*	0.36±0.03*	0.32±0.03*

注：与 si-NC 组比较，* $P < 0.05$ 。

表 5 抑制 *EXOC7* 表达对 AGS 细胞迁移、侵袭及 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	MMP-2	MMP-9
si-NC 组	149.66±11.04	122.75±10.69	0.72±0.01	0.55±0.01
si- <i>EXOC7</i> 组	52.05±4.93*	46.59±5.01*	0.26±0.01*	0.22±0.02*

注：与 si-NC 组比较，* $P < 0.05$ 。

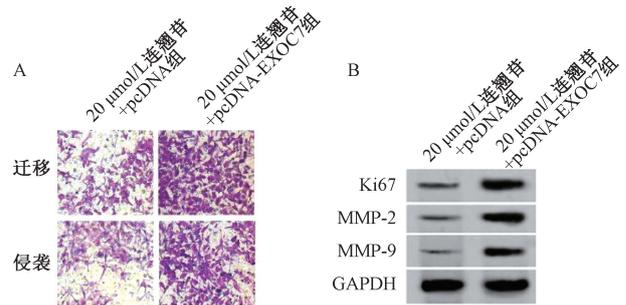


图 4 各组 AGS 细胞迁移、侵袭 (A) 及 Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达 (B)

翘苷可以抑制 AGS 细胞迁移和侵袭。

lncRNA 在真核生物体内广泛存在，与肿瘤的发生发展密切相关^[16]。作为一种 lncRNA，*EXOC7* 在宫颈鳞状细胞癌^[17]和肝细胞癌^[18]中表达升高，可作为肿瘤的分子标志物。本研究通过转染 *EXOC7* 干扰 RNA 降低 AGS 细胞中 *EXOC7* 表达后，细胞增殖活力、迁移和侵袭数降低，Ki67、MMP-2、MMP-9 蛋白表达降低，表明降低 *EXOC7* 可以抑制 AGS 细胞增殖、迁移和侵袭能力。进一步研究显示，过表达 *EXOC7* 逆转了连翘苷对 AGS 细胞增殖、迁移和侵袭的作用，提示连翘苷可能通过降低 *EXOC7* 表达发挥抗胃癌作用。

综上所述，连翘苷可抑制胃癌细胞增殖、迁移和侵袭，其作用机制与降低 *EXOC7* 表达有关。

参考文献：

[1] Qu Y J, Zhang H Y, Sun W, et al. MicroRNA-155 promotes

- gastric cancer growth and invasion by negatively regulating transforming growth factor- β receptor 2[J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(3): 618-628.
- [2] Ke B, Wang X N, Liu N, *et al.* Sonic hedgehog/Gli1 signaling pathway regulates cell migration and invasion via induction of epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer[J]. *J Cancer*, 2020, 11(13): 3932-3943.
- [3] 邱智军, 原江锋, 张国庆, 等. 连翘叶中连翘苷和连翘酯苷 A 对食用油脂的抗氧化活性[J]. *食品科学*, 2015, 36(17): 39-42.
- [4] 王佳贺, 万小旭, 刘丹. 连翘苷对金黄色葡萄球菌刺激的人单核巨噬细胞炎症反应的抑制作用[J]. *新乡医学院学报*, 2016, 33(6): 466-468.
- [5] 颜礼有, 刘明娟, 闫慧如, 等. 连翘苷抗小鼠衰老作用的研究[J]. *中国药房*, 2015, 26(1): 37-39.
- [6] 吴林斌, 吴元肇, 李晓丹, 等. 连翘苷经 PI3K/Akt 信号通路干预肾细胞癌的机制研究[J]. *中草药*, 2019, 50(10): 2377-2382.
- [7] Wang Y Q, Xu Z M, Wang X L, *et al.* LncRNA FOXC2-AS1 regulated proliferation and apoptosis of vascular smooth muscle cell through targeting miR-1253/FOXF1 axis in atherosclerosis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24 (6): 3302-3314.
- [8] Tao P P, Yang B L, Zhang H Y, *et al.* The overexpression of lncRNA MEG3 inhibits cell viability and invasion and promotes apoptosis in ovarian cancer by sponging miR-205-5p[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(5): 869-879.
- [9] Tian Q, Yan X D, Yang L, *et al.* lncRNA NORAD promotes hepatocellular carcinoma progression via regulating miR-144-3p/SEPT2[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5): 2257-2266.
- [10] 刘谦, 夏兴洲, 李金丽, 等. 胃癌患者癌组织及血清中 lncRNA EXOC7 的表达及其临床意义[J]. *胃肠病学和肝病学杂志*, 2019, 28(10): 1117-1121.
- [11] 郑末, 姜忠敏. 连翘苷对 Lewis 肺癌 VEGF 和内皮抑素表达的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32(1): 167-171; 178.
- [12] Liang L, Chen Y J, Yu Y Y, *et al.* SLC25A18 has prognostic value in colorectal cancer and represses Warburg effect and cell proliferation via Wnt signaling [J]. *Am J Cancer Res*, 2020, 10(5): 1548-1567.
- [13] Li T H, Si W J, Zhu J M, *et al.* Emodin reverses 5-FU resistance in human colorectal cancer via downregulation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2020, 12(5): 1851-1861.
- [14] Zhang L N, Zhao L, Yan X L, *et al.* Loss of G3BP1 suppresses proliferation, migration, and invasion of esophageal cancer cells via Wnt/ β -catenin and PI3K/AKT signaling pathways [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(11): 20469-20484.
- [15] Li H Q, Zhao J, Jia X M, *et al.* miR-21 promotes growth, invasion and migration of lung cancer cells by AKT/P-AKT/cleaved-caspase 3/MMP-2/MMP-9 signaling pathway[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2020, 13(4): 692-700.
- [16] Xu J H, Chen R Z, Liu L Y, *et al.* LncRNA ZEB2-AS1 promotes the proliferation, migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cell through miR-574-3p/HMGA2 axis [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24 (10): 5391-5403.
- [17] 潘海霞, 梁良, 任刚, 等. 宫颈鳞状细胞癌组织 lncRNA EXOC7 表达与预后相关性研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2017, 24(16): 1153-1156; 1161.
- [18] 方长英, 朱传卫, 张青松, 等. 原发性肝癌组织中长链非编码 RNA 外泌体复合物 7 的表达及临床意义[J]. *临床肝胆病杂志*, 2019, 35(1): 123-126.