

· 实验研究 ·

# 北沙参抑制肺癌细胞迁移侵袭能力的研究<sup>※</sup>

● 王振飞<sup>1</sup> 刘丽<sup>2</sup> 梁琳<sup>3</sup> 张晋<sup>1</sup> 李佳晨<sup>1</sup> 郝钦<sup>3▲</sup>

**摘要** 目的:观察北沙参对肺癌细胞迁移和侵袭能力的影响并探究其机理。方法:体外培养人正常支气管细胞系 16HBE 和肺癌细胞系 H460,制备北沙参提取液作用于 16HBE 和 H460 细胞。CCK-8 法检测北沙参提取液对 16HBE 细胞增殖能力的影响,Transwell 法和 Matrigel 法分别检测北沙参提取液对 H460 细胞迁移能力和侵袭能力的影响,荧光定量 PCR 检测北沙参提取液对 H460 细胞中 TIMP2 表达水平的影响,ELISA 检测北沙参提取液对 H460 细胞分泌 TIMP2 蛋白水平的影响。结果:5mg/mL 到 15mg/mL 的北沙参提取液对 16HBE 细胞不产生毒性作用,5mg/mL 到 15mg/mL 的北沙参提取液显著抑制 H460 细胞的增殖能力和侵袭能力,上调 H460 细胞对 TIMP2 的表达与分泌。结论:北沙参可上调肺癌细胞对 TIMP2 的表达与分泌,从而抑制其迁移和侵袭活动,在肿瘤临床治疗中具有良好应用价值。

**关键词** 北沙参;肺癌;迁移;侵袭

肺癌是严重威胁人类健康与生命的一种疾病,其发病率与死亡率均居各种恶性肿瘤之首<sup>[1]</sup>。造成肺癌患者高死亡率的主要原因在于其高侵袭转移率。手术和放疗无法清除、杀灭转移的肿瘤细胞,已有的化疗药物大都毒副作用巨大,极大降低了患者的生活质量和治疗效果<sup>[2]</sup>,而且一些化疗药物还会加速肿瘤细胞的进化,促进肿瘤的浸润和转移<sup>[3]</sup>。急需以新的思路研发无毒、高效的抑制肺癌细胞侵袭转移的药物。

中国药理学博大精深,尤其在肿瘤治疗方面,更有其独特之处。它不是仅着眼于杀灭肿瘤细胞,而是提出了“扶正固本”“清热解毒”“软坚散结”等一系列治疗思路。许多低毒、无毒中药在肿瘤治疗中都发挥

了显著的功效<sup>[4]</sup>。北沙参是一味常用无毒中药,入肺、胃经,善治肺脏疾患,具有养阴清肺、生津润燥、祛痰止咳等作用,在许多抗肺癌方剂中都有广泛应用<sup>[5]</sup>。我课题组在研究中发现,北沙参可以有效抑制肺癌细胞的迁移和侵袭能力,并探讨了它的作用机理。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人正常支气管上皮细胞系 16HBE 购自南京凯基生物技术有限公司,人肺癌细胞系 H460 购自中科院上海生命科学院细胞库。

**1.2 药物** 北沙参生药饮片购自内蒙古中医院药房。将生药磨为细粉,过 200 目筛,75% 乙醇回流提取 2 次,每次 40min,过滤,合并滤液,回收乙醇,浓缩至稠膏,冷冻干燥,得到干粉。干粉用 PBS(磷酸盐缓冲液)溶解,配制成浓度为 100mg/mL(按生药计算)的提取液。

**1.3 试剂** 胎牛血清、RPMI-1640 培养液、PBS、胰蛋白酶消化液均购自 Gibco 公司,CCK-8 试剂盒(C16038)购自上海碧云天生物技术有限公司,Matrigel 基质胶购自 BD Biosciences,总 RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒购自 Takara 公司,荧光定量 PCR 试剂盒

※基金项目 国家自然科学基金(No. 81760552);内蒙古自治区高等学校青年科技英才支持计划(No. NJYT-17-B30)

\* 作者简介 王振飞,男,助理研究员。主要研究方向:抗肿瘤药物及肿瘤分子诊断。

▲通讯作者 郝钦,男,主治医师。主要研究方向:肿瘤学。E-mail:sdjb12@126.com

• 作者单位 1. 内蒙古医科大学附属人民医院(内蒙古 呼和浩特 010020); 2. 乌海市人民医院(内蒙古 乌海 016000); 3. 内蒙古医科大学附属第一医院(内蒙古 呼和浩特 010050)

购自上海翊圣生物, ELISA 试剂盒购自北京百智生物技术公司。

1.4 仪器 二氧化碳恒温培养箱(Thermo), 超净工作台(苏州金燕), 倒置相差显微镜(Nikon TE2000), 多功能酶标仪 SpectraMax® i3x(Molecular Devices), 7500 Real-Time PCR Systems(Applied Biosystem)。

## 2 方法

2.1 细胞培养 16HBE 和 H460 细胞培养于含 10% 胎牛血清、0.1% 双抗的 RPMI-1640 培养基(完全 RPMI-1640 培养基)中, 37°C、5% CO<sub>2</sub>、饱和湿度培养箱中常规培养, 取对数生长期细胞进行实验。

2.2 CCK-8 法检测细胞毒效应 将 16HBE 细胞悬于完全 RPMI-1640 培养基中, 调整浓度为  $2.5 \times 10^4$  个/mL, 接种于 96 孔板(0.2 mL/孔)。培养 12h 后, 药物组加入北沙参提取液(终浓度为 1 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、15 mg/mL), 对照组加入等体积的 PBS。继续培养 24h 后, 每孔加入 CCK-8 溶液 20  $\mu$ l, 培养箱内孵育 1h。以 450 nm 为检测波长、以 650 nm 为参考波长, 测定吸光度。

2.3 Transwell 法检测细胞迁移能力 将 H460 细胞以  $10^6$  个/mL 悬于无血清 RPMI1640 培养液。向 Transwell 小室的每个上室中加入 150  $\mu$ l 细胞悬液, 同时加入北沙参提取液, 使其终浓度为 5 mg/mL、10 mg/mL 和 15 mg/mL; 向每个下室中加入 650  $\mu$ l 含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液。培养 24h 后, 取出上室, 吸弃液体, PBS 漂洗, 棉签轻轻擦掉膜上面的细胞, 滤膜用甲醇固定 30 min, 苏木素染色 15 min, 显微镜下, 选取膜的上、下、左、右、中 5 个不同区域计迁移细胞数。

2.4 Matrigel 法检测细胞侵袭能力 将 H460 细胞以 106 个/mL 悬于无血清 RPMI 1640 培养液。用预冷的无血清 RPMI 1640 培养液稀释 Matrigel, 取 100  $\mu$ l 稀释液加入 Transwell 小室的上室, 小室置于 37°C 4h, 使胶凝固。向每个上室中加入 150  $\mu$ l 细胞悬液, 同时加入北沙参提取液, 使其终浓度为 5 mg/mL、10 mg/mL 和 15 mg/mL; 向每个下室中加入 650  $\mu$ l 含 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液。培养 24h 后, 取出上室, 吸弃液体, PBS 漂洗, 棉签轻轻擦掉膜上面的 Matrigel 及未穿过膜的细胞, 滤膜用甲醇固定 30 min, 苏木素染色 15 min, 显微镜下, 选取膜的上、下、左、右、中 5 个不同区域计侵袭细胞数。

2.5 荧光定量 PCR 法检测 TIMP2(组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2)表达水平 H460 细胞传代培养 24h 后, 药物组加入北沙参提取液, 使其终浓度为 5 mg/mL、10 mg/mL 和 15 mg/mL, 对照组加入等体积 PBS。作用 24h 后, 提取各组细胞的总 RNA, 经浓度和纯度检测后, 反转录为 cDNA, 实时荧光定量 PCR 检测。PCR 条件: 95°C 30s, (95°C 5s, 60°C 31s)  $\times$  40 个循环。所用引物: TIMP2 上游引物 5' - TCTGGATG-GACTGGGTCACA - 3', TIMP2 下游引物 5' - CTT-GATGCAGGC GAAGA ACTT - 3'; GAPDH 上游引物 5' - TGTCCCCACTGCCAACGTGTCA - 3', GAPDH 下游引物 5' - GCGTCAAAGGTGGAGGAGTGGGT - 3'。以 GAPDH 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算 TIMP2 的相对 mRNA 表达量。

2.6 ELISA 检测培养液中 TIMP2 的含量 取对数生长期的 H460 细胞, 药物组加入北沙参提取液, 使其终浓度为 5 mg/mL、10 mg/mL 和 15 mg/mL, 对照组加入等体积 PBS。作用 24h 后, 换为无血清培养基, 培养 24h 后, 收集培养上清, 按试剂盒说明书操作, 检测 TIMP2 浓度。

2.7 统计学方法 采用 SPSS17.0 统计软件对数据进行统计分析, 计量资料用均数  $\pm$  标准差表示, 采用单因素方差分析进行检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

3.1 北沙参提取液对 16HBE 细胞增殖能力的影响 CCK-8 检测结果显示, 在 5 mg/mL 到 15 mg/mL 浓度范围内, 北沙参提取液对正常支气管上皮细胞 16HBE 的增殖能力无影响, 说明其对正常支气管上皮细胞无毒性作用。见表 1。

表 1 北沙参提取液对 16HBE 细胞增殖能力的影响  
( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	OD 值
对照组	0.580 $\pm$ 0.006
5mg/mL 组	0.570 $\pm$ 0.008
10mg/mL 组	0.564 $\pm$ 0.015
15mg/mL 组	0.565 $\pm$ 0.014

### 3.2 北沙参提取液抑制 H460 细胞迁移能力的影响

Transwell 迁移实验显示, 5mg/mL、10mg/mL 和 15mg/mL 的北沙参提取液对 H460 细胞的迁移能力具有抑制作用, 且随药物浓度的提高, 抑制作用逐渐增强。见表 2。

### 3.3 北沙参提取液抑制 H460 细胞侵袭能力的影响

Matrigel 侵袭实验显示, 5mg/mL、10mg/mL 和 15mg/mL 的北沙参提取液对 H460 细胞的侵袭能力具有抑制作用, 且随药物浓度的提高, 抑制作用逐渐增强。见表 2。

表 2 北沙参提取液对 H460 细胞迁移和侵袭能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	迁移细胞数 (个)	侵袭细胞数 (个)
对照组	164 ± 14	103 ± 8
5mg/mL 组	131 ± 9**	85 ± 9*
10mg/mL 组	100 ± 11**	63 ± 11**
15mg/mL 组	62 ± 5**	31 ± 7**

注: 与对照组相比, \*P < 0.05, \*\*P < 0.01。

### 3.4 北沙参提取液对 H460 细胞中 TIMP2 的表达水平的影响

荧光定量 PCR 结果显示, 5mg/mL、10mg/mL 和 15mg/mL 的北沙参提取液上调了 H460 细胞中 TIMP2 的 mRNA 表达水平, 且随药物浓度提高, 上调幅度逐渐增大。见表 3。

表 3 北沙参提取液对 H460 细胞中 TIMP2 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	相对 mRNA 表达量
对照组	1.00 ± 0.00
5mg/mL 组	1.37 ± 0.09**
10mg/mL 组	1.65 ± 0.08**
15mg/mL 组	2.04 ± 0.19**

注: 与对照组相比, \*\*P < 0.01。

### 3.5 北沙参提取液对 H460 细胞 TIMP2 的分泌水平的影响

ELISA 结果显示, 5mg/mL、10mg/mL 和 15mg/mL 的北沙参提取液作用于 H460 细胞后, 其培养液中 TIMP2 的浓度升高, 且升高幅度随药物浓度提高而提高。说明北沙参提取液可以促进肺癌细胞对 TIMP2 蛋白的分泌。见表 4。

表 4 北沙参提取液对 H460 细胞 TIMP2 蛋白分泌水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TIMP2 浓度 (pg/mL)
对照组	70.6 ± 3.0
5mg/mL 组	95.9 ± 6.4**
10mg/mL 组	134.4 ± 5.1**
15mg/mL 组	170.1 ± 5.8**

注: 与对照组相比, \*\*P < 0.01。

## 4 讨论

已有的抑制肿瘤细胞迁移、侵袭的药物大多具有较强的毒副作用, 给患者的肝脏、肾脏和骨髓造成较大的伤害, 严重影响其临床整体疗效<sup>[6]</sup>。北沙参是一味常用中药。已有研究表明: 它具有增强巨噬细胞吞噬能力、抗氧化、逆转肺纤维化、抑制肺部感染等多种药理活性<sup>[7]</sup>。北沙参在很多抗肿瘤方剂中均有应用, 但是其确切的抗肿瘤作用机理还不很清楚。本实验证实, 北沙参对正常支气管上皮细胞不产生细胞毒作用, 同时能够有效抑制肺癌细胞的迁移和侵袭能力。

基质金属蛋白酶是一类胶原酶, 它们可以降解细胞外基质中的胶原成分, 破坏肿瘤细胞迁移侵袭的组织学屏障。许多肿瘤细胞都分泌大量的基质金属蛋白酶到细胞外空间, 以利于自身的迁移和侵袭活动。组织型基质金属蛋白酶抑制剂是一类内源性的基质金属蛋白酶抑制剂, 它们以 1:1 的比例与细胞外空间的基质金属蛋白酶结合, 并封闭其降解细胞外基质的活性位点, 使其无法发挥促进肿瘤细胞迁移、侵袭的作用<sup>[8]</sup>。TIMP2 是组织型基质金属蛋白酶抑制剂家族的重要成员, 是一种重要的抑癌因子。在肺癌细胞中, TIMP2 的合成和分泌水平显著降低。本研究中, 北沙参作用于肺癌细胞后, 有效增强了肺癌细胞对 TIMP2 的合成和分泌, 从而有力抑制了肺癌细胞的迁移和侵袭能力。

本研究从细胞和分子层面探究了北沙参的抗肿瘤作用机理, 为北沙参的抗肿瘤临床应用提供了理论依据。所得结果证明, 从中药, 特别是无毒中药中寻找新型抗肿瘤药物是一个极有前景的方向。

### 参考文献

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2016, 66(1): 7-30.  
 [2] 李 芳. 化疗致多器官损伤中细胞因子的作用及应对策略[J]. 大连医科大学学报, 2014, 36(3): 205-210. (下转第 72 页)

素<sup>[13]</sup>。中间普雷沃菌亦被认为是慢性牙周炎相关的致病微生物<sup>[14]</sup>。

从本研究结果可以看出,泽漆水煎剂对口腔常见细菌,具有广谱的抑菌效果,并确有可能通过抑制口腔常见感染菌群的生长来达到治疗效果。

泽漆水煎剂的抑菌机制目前尚不完全清楚,已有的研究发现大戟科药物尤其是泽漆中有效成分假白榄烷类具有抑菌作用<sup>[15]</sup>,也有研究报道 1-ethoxypentacosane, heptacosan-1-ol 和  $\beta$ -谷甾醇可能是抑菌的主要成分<sup>[16]</sup>。泽漆抑菌的确切药理作用有待进一步深入研究。

笔者在临床应用泽漆水煎剂治疗口腔疾病,的确取得了较好的疗效,但本实验中泽漆对细菌的敏感性不高,可能有以下原因:①本研究采用的纸片扩散法(K-B法)是体外抑菌试验中最常用的方法。泽漆水煎剂为悬浊液,成分较为复杂,其中的抑菌活性成分可能存在具挥发性、对热敏感,导致药物挥发等因素很可能影响到结果的准确性。②口腔微生物极为丰富,有研究者发现涵盖了 22 个细菌门的 318 个细菌属<sup>[17]</sup>,本研究仅选取了常见的 15 种常见口腔致病菌进行研究,可能与泽漆水煎剂实际的抑菌谱尚存在一定差异。下一步,笔者将对泽漆水煎剂进行稀释法定量测定,进一步阐明泽漆水煎剂的药效学数据,评估其抑菌性能,并深入探究泽漆的抑菌机制研究。

参考文献

[1] 雷载权. 中药学[M]. 上海:上海科技出版社,1995.  
 [2] 赵忆文,唐蕊蕊,吴昆仑. 泽漆含漱液治疗复发性口疮的临床观察与护理[J]. 上海护理,2010,10(6):62-64.  
 [3] 赵忆文,吴昆仑,都乐亦,等. 泽漆煎剂在口腔护理中的应用[J]. 上海护理,2011,11(3):54-56.  
 [4] 孟焕新. 临床牙周病学[M]. 第 2 版:北京大学医学出版社,2014.

[5] 王宇,范雅娟,范求实,等. 肿痛安胶囊联合替硝唑注射液治疗牙周炎临床观察[J]. 中医药通报,2015,14(2):48-50+53.  
 [6] 李时珍. 本草纲目[M]. 第 1 版. 北京:中国书店,2013.  
 [7] 彭倩,刘一平. 复发性口腔溃疡与幽门螺杆菌相关性的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志,2013,22(26):2962-2964.  
 [8] Olczak-Kowalczyk D, Pyr? ak B, D? bkowska M, et al. Candida spp. and gingivitis in children with nephrotic syndrome or type 1 diabetes[J]. BMC Oral Health,2015,15:57.  
 [9] Machado FC, de Souza IP, Portela MB, et al. Use of chlorhexidine gel (0.2%) to control gingivitis and candida species colonization in human immunodeficiency virus - infected children; a pilot study[J]. Pediatr Dent, 2011,33(2):153-157.  
 [10] Jobbins J, Bagg J, Parsons K, et al. Oral carriage of yeasts, coliforms and staphylococci in patients with advanced malignant disease[J]. J Oral Pathol Med,1992,21(7):305-308.  
 [11] Jacobson JJ, Patel B, Asher G, et al. Oral staphylococcus in older subjects with rheumatoid arthritis[J]. J Am Geriatr Soc,1997,45(5):590-593.  
 [12] Tanner AC, Sonis AL, Lif HP, et al. White - spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients[J]. J Dent Res,2012,91(9):853-858.  
 [13] Lockhart PB, Brennan MT, Thornhill M, et al. Poor oral hygiene as a risk factor for infective endocarditis - related bacteremia[J]. J Am Dent Assoc,2009,140(10):1238-1244.  
 [14] López R, Dahlén G, Retamales C, et al. Clustering of subgingival microbial species in adolescents with periodontitis[J]. Eur J Oral Sci,2011,119(2):141-150.  
 [15] Geng D, Yi LT, Shi Y, et al. Structure and antibacterial property of a new diterpenoid from Euphorbia helioscopia[J]. Chin J Nat Med,2015,13(9):704-706.  
 [16] Awaad AS, Alothman MR, Zain YM, et al. Comparative nutritional value and antimicrobial activities between three Euphorbia species growing in Saudi Arabia[J]. Saudi Pharm J,2017,25(8):1226-1230.  
 [17] 周学东,徐健,施文元. 人类口腔微生物组学研究:现状、挑战及机遇[J]. 微生物学报,2017,57(6):806-821+792.

(收稿日期:2018-04-10)

(本文编辑:蒋艺芬)

(上接第 64 页)

[3] Martins - Neves, SR, Paiva - Oliveira DI, Wijers - Koster PM, et al. Chemotherapy induces stemness in osteosarcoma cells through activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling[J]. Cancer Lett. 2016,370:286-295.  
 [4] 王振飞,李煜,戴宝贞,等. 大蓟对 5 种癌细胞抑制作用的研究[J]. 中华中医药学刊,2008,26(4):761-762.  
 [5] 耿增岩,乔逸,杨晓青,等. 北沙参的研究进展[J]. 现代中医药,2006,26(6):62-63.

[6] 罗安福,叶冬梅. 常用抗肿瘤药物致肝损害的研究概况[J]. 医学综述,2010,16(24):3725-3727.  
 [7] Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions, Eur. J. Cell Biol. 1997,74(2):111-122.  
 [8] 刘伟,李中燕,田艳,等. 北沙参的化学成分及药理作用研究进展[J]. 国际药学研究杂志,2013,40(3):291-294.

(收稿日期:2017-12-10)

(本文编辑:金冠羽)