

槲皮素对人胃癌细胞侵袭和MMP-2表达的影响

王晓燕, 张尤历, 张 恒, 祁卫东, 范 钰

王晓燕, 张尤历, 江苏大学附属医院消化内科 江苏省镇江市 212001

张恒, 祁卫东, 范钰, 江苏大学附属人民医院肿瘤研究所 江苏省镇江市 212002

王晓燕, 医学硕士, 副主任医师, 主要从事消化系统肿瘤防治的研究。江苏大学临床医学科技发展基金资助项目, No. JLY20080002 镇江市社会发展基金资助项目, No. SH2009014

作者贡献分布: 王晓燕与范钰此文所作贡献均等; 此课题由张尤历设计; 实验过程由王晓燕与张恒操作完成; 数据分析由祁卫东完成; 本论文写作由王晓燕完成。

通讯作者: 范钰, 主任医师, 212002, 江苏省镇江市电力路8号, 江苏大学附属人民医院肿瘤研究所. yuf36@sina.com

电话: 0511-88915233

收稿日期: 2011-12-19 修回日期: 2012-01-05

接受日期: 2012-01-19 在线出版日期: 2012-01-28

Quercetin reduces cell invasion and down-regulates matrix metalloproteinase 2 expression in human gastric cancer cell line BGC-823

Xiao-Yan Wang, You-Li Zhang, Heng Zhang, Wei-Dong Qi, Yu Fan

Xiao-Yan Wang, You-Li Zhang, Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001, Jiangsu Province, China

Heng Zhang, Wei-Dong Qi, Yu Fan, Cancer Institute, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China

Supported by: the Clinical Medical Science and Technology Development Foundation of Jiangsu University, No. JLY20080002; the Social Development Project Foundation of Zhenjiang City, No. SH2009014

Correspondence to: Yu Fan, Associate Chief Physician, Cancer Institute, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, No.8 Dianli Road, Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China. yuf36@sina.com

Received: 2011-12-19 Revised: 2012-01-05

Accepted: 2012-01-19 Published online: 2012-01-28

Abstract

AIM: To investigate the effect of quercetin on the migration of human gastric cancer BGC-823 cells and to explore possible mechanisms involved.

METHODS: After BGC-823 cells were treated with different doses of quercetin, the anchorage-independent growth of cells was evaluated by colony formation assay, cell invasion ability was determined by Boyden chamber assay, and the mRNA and protein expression of matrix metal-

loproteinase-2 (MMP-2) was detected by real-time RT-PCR and Western blot, respectively.

RESULTS: Quercetin reduced the invasion ability and anchorage-independent growth of BGC-823 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.005$, $P < 0.005$). Treatment with quercetin down-regulated MMP-2 mRNA and protein expression in a time- and dose-dependent manner ($P < 0.001$, $P < 0.001$).

CONCLUSION: Quercetin inhibits the invasion of human gastric carcinoma cell line BGC-823 possibly by down-regulating MMP-2 expression.

Key Words: Gastric carcinoma; Quercetin; Invasion; Matrix metalloproteinase 2

Wang XY, Zhang YL, Zhang H, Qi WD, Fan Y. Quercetin reduces cell invasion and down-regulates matrix metalloproteinase 2 expression in human gastric cancer cell line BGC-823. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(3): 215-218

摘要

目的: 观察槲皮素(Quercetin, Que)对人胃癌细胞侵袭的影响, 并探讨其可能机制。

方法: 采用不同浓度的槲皮素处理胃癌BGC-823细胞后, 以软琼脂集落培养试验检测癌细胞锚着不依赖性增殖, 以Boyden小室模型方法检测癌细胞侵袭能力, 采用荧光实时定量PCR检测癌细胞基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)基因mRNA水平, 以Western blot方法检测癌细胞MMP-2基因蛋白水平变化。

结果: 不同浓度的胃癌BGC-823细胞经槲皮素处理后, 恶性增殖和侵袭能力均明显下降, 且呈剂量依赖性($P < 0.005$, $P < 0.005$)。槲皮素处理组MMP-2基因mRNA和蛋白水平均明显下调, 且呈时间和浓度依赖性, 即随着作用时间的延长和槲皮素作用浓度的增加, MMP-2的mRNA和蛋白水平逐渐下降, 差异均有统计学意义($P < 0.001$, $P < 0.001$)。

■背景资料

胃癌发病率和死亡率很高, 严重威胁着人们的健康, 寻找有效且不良反应小的抗癌药物具有重要意义。槲皮素(quercetin, Que)是颇具应用前景的抗癌药物之一, 但该药物对消化系统肿瘤细胞侵袭的研究甚少。

■同行评议者

沈克平, 主任医师, 上海中医药大学附属龙华医院

■相关报道

槲皮素可抑制多种恶性癌细胞如白血病、肺癌、肝癌、卵巢癌、膀胱癌、大肠癌等恶性增殖,抑制黑色素瘤、前列腺癌等癌细胞的恶性侵袭,但该药物对消化系统肿瘤细胞侵袭的研究甚少。

结论: 槲皮素可明显抑制胃癌BGC-823细胞侵袭能力,其机制可能与下调MMP-2基因表达有关。

关键词: 胃肿瘤; 槲皮素; 侵袭; 基质金属蛋白酶-2

王晓燕, 张允历, 张恒, 祁卫东, 范钰. 槲皮素对人胃癌细胞侵袭和MMP-2表达的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(3): 215-218

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/215.asp>

0 引言

胃癌是最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率很高,严重威胁着人们的健康,寻找有效且不良反应小的抗癌药物具有重要意义。作为一种天然的黄酮类化合物,槲皮素(quercetin, Que)广泛分布于水果、蔬菜及常见中草药之中。许多研究结果显示,槲皮素可抑制多种恶性癌细胞如白血病、肺癌、肝癌、卵巢癌、膀胱癌、大肠癌等恶性增殖^[1-5],抑制黑色素瘤、前列腺癌等癌细胞的恶性侵袭^[6-10],说明该药是颇具应用前景的抗癌药物之一,但该药物对消化系统肿瘤细胞侵袭的研究甚少。本研究采用槲皮素处理人胃癌BGC-823细胞,观察其对癌细胞侵袭和基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)基因表达的影响,以了解其可能的分子机制。

1 材料和方法

1.1 材料 槲皮素购自美国Sigma公司,用二甲基亚砜(DMSO)配成储液, -20 °C冰箱保存; 实验时用RPMI 1640培养基稀释, DMSO的最终浓度小于0.9%; 人胃癌细胞株BGC-823购自中科院上海细胞所细胞库, 江苏大学附属人民医院肿瘤组织血液生物标本库冻存; TRIzol试剂购自美国Invitrogen公司; BCA蛋白分析试剂盒购自Pierce公司; 基底膜胶(Matrigel)购自BD公司; RPMI 1640、新生小牛血清均购自Gibco公司。

1.2 方法

1.2.1 癌细胞培养及处理: 人胃癌BGC-823细胞置含100 mL/L胎牛血清的RPMI-1640液中, 于37 °C、CO₂培养箱中培养。每日观察,待细胞至对数生长期,采用不同浓度(5、10、20 μmol/L)的槲皮素处理后,以RPMI-1640代替槲皮素处理细胞作为空白对照组, 备测。

1.2.2 软琼脂集落培养试验: 根据文献[11]方法进行。倒置显微镜下随机计数每组样品10个视野

中的集落个数,取其平均数作比较,以此代表胃癌细胞增殖力。结果采用 t 检验分析。

1.2.3 体外侵袭抑制试验: 根据文献[12]方法进行。Boyden小室的上、下室之间隔以孔径为8 μm的聚碳酸酯膜,膜上铺匀1:4稀释的基底膜胶(Matrigel)。下室加预先制备的NIH 3T3细胞培养上清液600 μL作为趋化因子,上室加入100 μL待测的癌细胞悬液。置于37 °C、50 mL/L CO₂培养箱中温育24 h,弃去上室液体,取出聚碳酸酯膜,用棉签仔细擦尽膜上Matrigel及未穿过的细胞,甲醛固定5 min, HE染色。200倍光镜下计数穿过聚碳酸酯膜的细胞数,以侵袭细胞的相对数目表示肿瘤细胞侵袭能力。随机计数5个视野内的细胞数,取平均值进行统计处理。

1.2.4 MMP-2基因mRNA水平检测: 分别用不同浓度(5、10、20 μmol/L)的槲皮素处理胃癌BGC823细胞24、48、72 h后,收集细胞,用TRIzol提取总mRNA,并进行cDNA合成,根据文献[13]方法及条件,采用荧光实时定量PCR检测MMP-2基因mRNA水平并进行数据分析。MMP-2: 上游引物5'-CCGCCTTTAACTG-GAGCAAA-3', 下游引物5'-TTTGGTTCTC-CAGCTTCAGG-3'; 内参基因GAPDH: 上游引物5'-TTGGTATCGTGAAGGACTCA-3', 下游引物5'-TGTCATCATATTTGGCAGGTTT-3'。PCR反应条件为: 95 °C, 预变性3 min, 95 °C, 30 s; 52 °C, 45 s; 72 °C, 45 s; 35 个循环后, 72 °C再延伸7 min。

1.2.5 MMP-2基因蛋白水平检测: 提取各组癌细胞总蛋白,对蛋白定量后进行常规Western-blot方法检测各组蛋白水平。利用Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software (Eastman Kodak Company, USA)测定各条带净灰度值,并与内参β-actin的测定结果相比较,计算其比值。

统计学处理 采用SPSS11.5统计软件包进行统计学处理,所得到的数值均以mean±SD表示。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 槲皮素对胃癌细胞软琼脂集落形成的影响 胃癌BGC-823细胞在体外半固体培养体系中可自发形成集落,但经槲皮素处理后,所形成的集落数明显减少。统计学分析提示,集落生长数呈浓度依赖性减少($P<0.005$, 图1)。

2.2 槲皮素对胃癌细胞侵袭的影响 收集经槲皮素处理的细胞,采用Boyden小室检测癌细胞侵

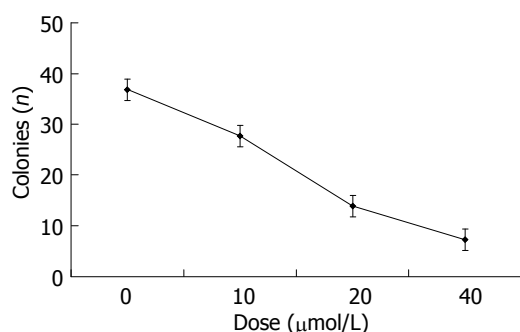


图1 槲皮素对胃癌细胞软琼脂集落形成的影响。

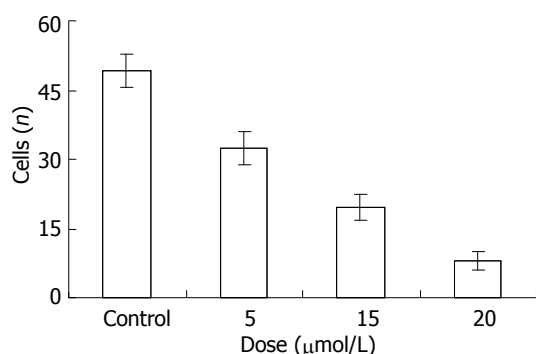


图2 槲皮素对胃癌细胞侵袭的影响。

侵袭情况。经统计学分析发现, 槲皮素对胃癌细胞侵袭抑制与浓度相关($P<0.005$, 图2)。

2.3 槲皮素对胃癌细胞MMP-2基因表达的影响
胃癌BGC-823细胞经槲皮素处理后, 分别于不同时间(24、48和72 h)收集细胞, 提取RNA和蛋白后, 进行相关检测。结果显示, 随着作用时间的延长和药物浓度的增加, 经槲皮素处理各组细胞的MMP-2 mRNA和蛋白水平均明显降低($P<0.005$, $P<0.005$, 图3, 4)。

3 讨论

肿瘤细胞在软琼脂形成集落的多少可反映肿瘤细胞锚着不依赖性增殖的特性, 且与其恶性程度呈正相关。癌细胞侵袭能力强, 则在软琼脂上形成的集落数目多。本研究发现, 胃癌BGC823细胞经不同浓度槲皮素处理后, 软琼脂集落数明显减少, 且呈浓度依赖性($P<0.005$)。癌细胞侵袭、转移是一个复杂的过程。一旦肿瘤细胞从原发肿瘤上脱落, 将侵入宿主的细胞外基质, 然后穿透淋巴管和血管, 进行远处转移。在此过程中, 肿瘤细胞侵袭细胞外基质是重要的步骤。在体外侵袭实验中, 我们发现BGC-823细胞具有较强的侵袭能力, 而经槲皮素处理后, 其穿过聚碳酸酯膜的细胞数量减少, 且呈浓度依赖性($P<0.005$)。由此说明, 槲皮素可抑制胃癌

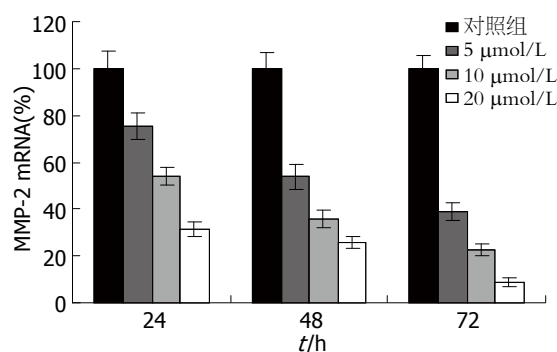


图3 槲皮素对胃癌细胞mRNA水平的影响。

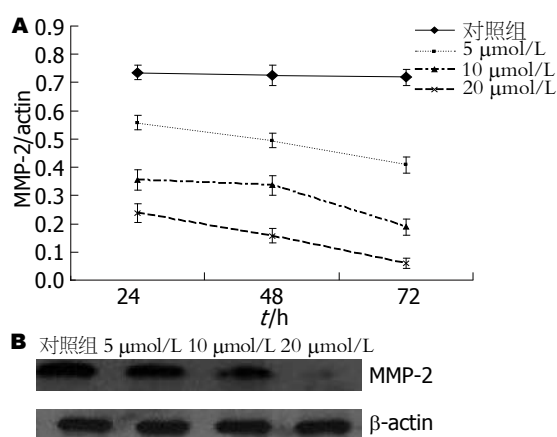


图4 槲皮素对胃癌细胞蛋白水平的影响。A: 不同作用时间和不同作用浓度的槲皮素对MMP-2蛋白表达的影响; B: 不同浓度槲皮素作用48 h后MMP-2蛋白的表达差异。

BGC823细胞的恶性侵袭能力。

MMP是一组锌离子依赖性肽链内切酶, 主要由肿瘤细胞和肿瘤周边间质细胞产生, 几乎能降解细胞外基质的所有成分, 通过对细胞外基质的重塑促进肿瘤新生血管的生成, 从而实现肿瘤的侵袭和转移。MMP-2是该家族中重要成员之一, 能特异性降解细胞外基质和基底膜中的主要成分-IV型胶原, 使基底膜丧失完整性。研究发现, 胃癌组织中MMP-2表达与淋巴结转移和浸润深度密切相关, 且MMP-2的表达情况可以作为评估患者预后的参考指标^[14-16]。本研究发现, 槲皮素组MMP-2基因mRNA和蛋白水平均受到抑制, 且与时间和浓度相关($P<0.005$; $P<0.005$)。

总之, 槲皮素可抑制胃癌细胞体外恶性增殖和侵袭能力, 其机制可能与下调MMP-2基因表达有关, 但其具体的内在作用机制值得进一步深入研究。

4 参考文献

- Hollman PC, Katan MB. Dietary flavonoids: intake,

■创新盘点
以槲皮素为工具, 从基质金属蛋白酶角度了解其抑制癌细胞侵袭的分子机制。

■同行评价

本研究初步探讨了槲皮素对胃癌细胞侵袭及MMP2表达的作用, 有一定科学意义。

- 2 Lamson DW, Brignall MS. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern Med Rev* 2000; 5: 196-208
- 3 Culig Z, Klocker H, Bartsch G, Hobisch A. Androgen receptors in prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2002; 9: 155-170
- 4 Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: 284S-291S
- 5 Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, Lee MT. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo* 2003; 19: 895-909
- 6 Zhang X, Xu Q, Saiki I. Quercetin inhibits the invasion and mobility of murine melanoma B16-BL6 cells through inducing apoptosis via decreasing Bcl-2 expression. *Clin Exp Metastasis* 2000; 18: 415-421
- 7 Zhang XM, Huang SP, Xu Q. Quercetin inhibits the invasion of murine melanoma B16-BL6 cells by decreasing pro-MMP-9 via the PKC pathway. *Cancer Chemother Pharmacol* 2004; 53: 82-88
- 8 Zhang W, Zhang F. Effects of quercetin on proliferation, apoptosis, adhesion and migration, and invasion of HeLa cells. *Eur J Gynaecol Oncol* 2009; 30: 60-64
- 9 Tang SN, Singh C, Nall D, Meeker D, Shankar S, Srivastava RK. The dietary bioflavonoid quercetin synergizes with epigallocatechin gallate (EGCG) to inhibit prostate cancer stem cell characteristics, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Mol Signal* 2010; 5: 14
- 10 Priyadarsini RV, Vinothini G, Murugan RS, Manikandan P, Nagini S. The flavonoid quercetin modulates the hallmark capabilities of hamster buccal pouch tumors. *Nutr Cancer* 2011; 63: 218-226
- 11 Birkenkamp-Demtroder K, Olesen SH, Sørensen FB, Laurberg S, Laiho P, Aaltonen LA, Orntoft TF. Differential gene expression in colon cancer of the caecum versus the sigmoid and rectosigmoid. *Gut* 2005; 54: 374-384
- 12 范钰, 郑树, 赵刚. 青蒿琥酯对乳腺癌MCF-7细胞抗失巢凋亡的影响. *中国病理生理杂志* 2006; 22: 748-751
- 13 范钰, 郑树, 丁佳逸. 脂质体介导的cripto反义寡核苷酸抑制结肠癌细胞端粒酶活性. *中国病理生理杂志* 2006; 22: 761-765
- 14 He Q, Chen J, Lin HL, Hu PJ, Chen MH. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, E-cadherin and matrix metalloproteinases-2 in gastric carcinoma and lymph node metastases. *Chin Med J (Engl)* 2007; 120: 1498-1504
- 15 Mrena J, Wiksten JP, Nordling S, Kokkola A, Ristimäki A, Haglund C. MMP-2 but not MMP-9 associated with COX-2 and survival in gastric cancer. *J Clin Pathol* 2006; 59: 618-623
- 16 Wu CY, Wu MS, Chen YJ, Chen CJ, Chen HP, Shun CT, Chen GH, Huang SP, Lin JT. Clinicopathological significance of MMP-2 and TIMP-2 genotypes in gastric cancer. *Eur J Cancer* 2007; 43: 799-808

编辑 张姗姗 电编 闫晋利

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) CN 14-1260/R 2012年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), 国内统一刊号CN 14-1260/R, Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology], 是一本由来自国内23个省、市、自治区、特别行政区的470位胃肠病学和肝病专家支持的开放存取的同行评议的旬刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括背景资料、研发前沿、相关报道、创新盘点、应用要点、名词解释、同行评价。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。