

重楼皂甙 I 对胃癌肿瘤相关成纤维细胞的作用

董锐增, 张则伟, 周一鸣, 郭剑民

(浙江省肿瘤医院, 浙江 杭州 310022)

摘要: [目的] 探讨重楼皂甙 I 对胃癌肿瘤相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs) 的作用。 [方法] 以体外原代培养的胃癌 CAFs 为研究对象, MTT 法检测重楼皂甙 I 对 CAFs 细胞的增殖抑制作用, Western Blot 法检测 CAFs 细胞 FAP、SPARC、SDF-1、TNC 和 HGF 蛋白表达改变。 [结果] 不同浓度重楼皂甙 I 能有效抑制 CAFs 细胞的增殖, 且呈浓度依赖性。 2 μ g/ml 重楼皂甙 I 作用 CAFs 细胞 24h 后, FAP、SDF-1 和 HGF 蛋白表达降低, 与对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。 SPARC 和 TNC 蛋白表达改变与对照组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。 [结论] 重楼皂甙 I 能抑制胃癌 CAFs 细胞的体外增殖, 通过下调 FAP、SDF-1 和 HGF 蛋白表达影响 CAFs 功能。

关键词: 胃肿瘤; 重楼皂甙 I; 肿瘤相关成纤维细胞

中图分类号: R735.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)04-0336-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.04.B009

The Effect of Polyphyllin I on Gastric Cancer-associated Fibroblasts

DONG Rui-zeng, ZHANG Ze-wei, ZHOU Yi-ming, et al.

(Zhejiang Cancer Hospital, Hangzhou 310022, China)

Abstract: [Objective] To explore the effect of polyphyllin I (PP I) on gastric cancer-associated fibroblasts. [Methods] The primary gastric CAFs were obtained by tissue culture. The effects of PP I on cell proliferation were detected by MTT method. The expressions of FAP, SPARC, SDF-1, TNC and HGF were detected by Western Blot. [Results] The growth of CAFs cells was inhibited by PP I in dose-dependent manner. Compared with control groups, the expressions of FAP, SDF-1 and HGF protein decreased significantly ($P < 0.05$) after treated with 2 μ g/ml PP I at 24h, while the expressions of SPARC and TNC protein were not statistically significant ($P > 0.05$). [Conclusion] PP I can inhibit the cell proliferation of gastric CAFs and affect the function of gastric CAFs by down-regulating the expression of FAP, SDF-1 and HGF protein.

Subject words: stomach neoplasms; polyphyllin I; cancer-associated fibroblasts

我国是胃癌高发国家, 胃癌仍然是第二位常见恶性肿瘤致死原因^[1]。由于诊断时多为进展期, 我国胃癌 5 年生存率低于 30%^[2]。肿瘤细胞的侵袭和转移不仅取决于肿瘤细胞本身的生物学行为, 还与间质微环境密切相关。肿瘤相关成纤维细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs) 是肿瘤间质的主要细胞成分, 能够分泌多种细胞因子, 促进肿瘤血管生成、

细胞外基质重塑以及肿瘤相关炎症等, 在肿瘤的增殖、侵袭、免疫逃逸及耐药等过程中发挥重要作用。这些细胞因子主要包括成纤维细胞活化蛋白 (fibroblast activation protein, FAP)、富含半胱氨酸的酸性蛋白 (secreted protein, acidic and rich incysteine, SPARC)、基质细胞衍生因子-1 (stromal cell derived factor-1, SDF-1)、肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 和结合腕蛋白 (tenascin-C, TNC) 等。CAF 基因组稳定不易产生耐药性, 近年作为抗癌治疗的新靶点受到广泛关注。国内外研究报道重楼皂甙 I (polyphyllin I, PP I) 能够直接抑制肿瘤细胞

基金项目: 浙江省中医药管理局基金资助项目 (2013ZA019)

通讯作者: 郭剑民, 腹部外科主任, 主任医师, 学士; 浙江省肿瘤医院腹部外科, 浙江省杭州市拱墅区半山山东路 1 号 (310022); E-mail: guojm@126.com

收稿日期: 2017-04-20; **修回日期:** 2017-11-20

增殖及促进凋亡,但PP I 能否通过调节间质微环境发挥抗肿瘤作用目前少有报道。本研究旨在探讨 PP I 对胃癌 CAFs 功能的调控作用及其潜在抗肿瘤机制。

1 材料与方法

1.1 药物和主要试剂

PP I (分子式为 C₄₄H₇₀O₁₆, 分子量为 855) 购自成都曼斯特生物科技有限公司, 纯度大于 98%, 用二甲基亚砜(DMSO)稀释成浓度为 10mg/ml 的贮存液, 以滤器过滤除菌, 等量分装, -20℃保存。使用时加入 RPMI-1640, 配成终浓度, 保持 DMSO 的终浓度小于 1%。PRMI-1640 和胎牛血清为杭州四季青生物有限公司产品, DMSO 和噻唑蓝 (MTT) 为 Sigma 公司产品, Annexin V-FITC 试剂盒为美国 BD 公司产品。FAP、SPARC、SDF-1、HGF 和 TNC 等抗体为 Cell Signaling 公司产品。

1.2 CAFs 的分离及培养

手术室取新鲜胃癌标本, 用 PBS+抗生素清洗临床标本, 剪成 1mm 大小的组织块, 加入适量合成培养基后放入培养箱培养, 每 2~3d 换液 1 次。待细胞铺满瓶底后, 用棉签蘸少许胰酶在标记区擦拭, 以刮除成团生长的上皮细胞。加入 0.25%胰蛋白酶消化 2min, 在相差显微镜下一旦发现胞质回缩、折光性增强即加入 2ml 含血清培养基终止消化。用吸管反复轻轻吹打制备细胞悬液, 计数后进行接种培养, 传代纯化。

1.3 CAFs 的鉴定

1.3.1 流式细胞仪检测细胞 FAP 表达

0.25%Trypsin 消化收集细胞, PBS 漂洗, 4%多聚甲醛室温固定 5min, 0.1%Triton X-100 室温处理 15min, PBS 漂洗, 10% BSA-PBS 重悬 (100μl), 加入 FAP 一抗 (1:50), 4℃孵育过夜, PBS 漂洗, 10% BSA-PBS 重悬 (100μl), 加入 Goat anti rabbit IgG-CFL 488 荧光二抗 (1:100), 4℃孵育 20min, PBS 漂洗, 500μl PBS 重悬, 流式细胞仪检测 FAP 阳性表达率。

1.3.2 免疫荧光法测定细胞内 FAP 表达

0.25%Trypsin 消化收集细胞, PBS 漂洗, 4%多聚甲醛室温固定 30min, PBS 洗 3 次×5min; 加入 0.1% Triton X-100 溶液室温破膜 10min, PBS 洗 3

次×5min。各孔滴加 1% BSA 溶液, 37℃封闭 90min, 不洗。滴加一抗(FAP 抗体工作浓度分别为 1:100), 4℃冰箱孵育过夜。次日取出湿盒, 放置室温平衡 30min, PBS 洗 3 次×5min, 滴加 Goat anti rabbit IgG-CFL 488 荧光二抗(抗体工作浓度为 1:800), 37℃避光孵育 1h, PBS 洗 3 次×5min。滴加 DAPI 室温染核 5min, PBS 洗 3 次×5min。封片, 荧光显微镜下观察 FAP 阳性表达率。

1.4 MTT 法检测 PP I 对 CAFs 增殖的影响

将浓度为 5×10⁴/ml 的 CAFs 细胞悬液 0.1ml 接种于 96 孔板, 孵育 24h 后, 加入 PP I 使其终浓度达到 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0μg/ml, 同时设阴性对照组, 每组 5 个平行孔。37℃、5%CO₂ 培养 24h 后, 弃去上清液, 每孔加入 MTT 液 20μl, 继续培养 4h, 弃去上清, 每孔加入 DMSO 150μl, 充分振荡 10min, 酶标仪 570nm 波长处测定各孔吸光度值。细胞存活率(%)=实验组 OD 值/不加药组 OD 值×100%。

1.5 Western-blot 法检测 FAP、SPARC、SDF-1、TNC 和 HGF 蛋白表达

CAF_s 细胞经胰酶消化、计数后以 1×10⁶/孔的浓度接种于培养瓶, 共设 2 组: 空白对照组、PP I 组, 各组设 3 个平行样本。各组 CAF_s 细胞贴壁后分别接受空白培养液、含 2μg/ml 浓度 PP I 培养液处理, 于 37℃培养箱内培养 24h 后胰酶消化离心、收集细胞。Trizol 法同时提取总蛋白, Western-blot 检测 FAP、SPARC、SDF-1、TNC 和 HGF 蛋白表达。照片以 TIF 格式导出后在 Image J 软件下分析各条带光密度。

1.6 统计学处理

采用 SPSS15.0 统计软件进行分析, 计量资料分析采用方差分析和 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

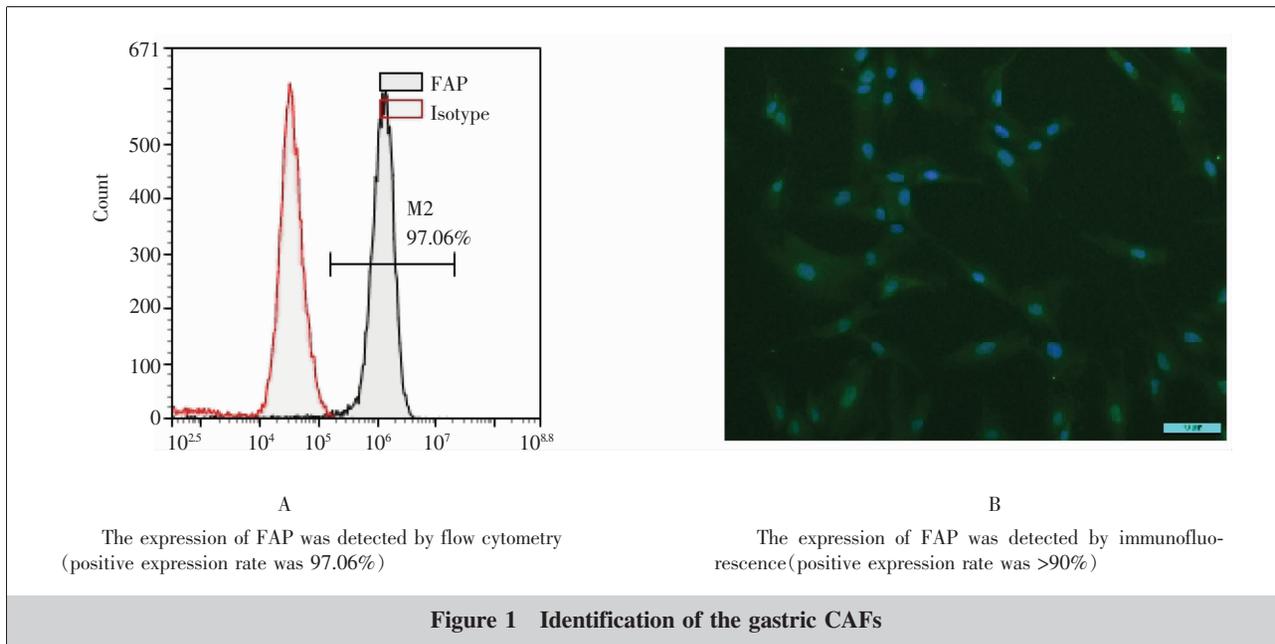
2 结果

2.1 CAFs 的鉴定

CAF_s 为梭形或星形, 胞突较多, 胞质丰富, FAP 呈强阳性表达。从流式细胞和免疫荧光结果分析 CAF_s 细胞 FAP 阳性表达均率达到 90%以上, 确定胃癌 CAF_s 分离培养成功(Figure 1)。

2.2 PP I 对 CAFs 细胞增殖的影响

不同浓度的 PP I 均能抑制胃癌 CAF_s 细胞的增



殖,随着浓度的增加,其抑制率亦随之增加,呈剂量依赖性,PP I 浓度为 0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 $\mu\text{g/ml}$ 组的胃癌 CAFs 细胞存活率分别为 $100.00\% \pm 1.96\%$ 、 $98.00\% \pm 2.77\%$ 、 $76.56\% \pm 1.60\%$ 、 $32.73\% \pm 2.86\%$ 、 $10.68\% \pm 0.52\%$ 和 $8.46\% \pm 1.20\%$ ($F=2244.25, P<0.001$)。

2.3 PP I 对 CAFs 细胞 FAP、SPARC、SDF-1、TNC 和 HGF 蛋白表达的影响

CAF_s 细胞经浓度 2 $\mu\text{g/ml}$ 的 PP I 作用 24h 后,FAP 蛋白相对表达水平为对照组的 69.6% ($t=-3.368, P=0.010$),SDF-1 相对表达水平为对照组的 50.4% ($t=-31.624, P<0.001$),HGF 相对表达水平为对照组的 41.2% ($t=-21.319, P<0.001$),TNC 相对表达水平为对照组的 100.6% ($t=0.183, P=0.859$),SPARC 相对表达水平为对照组 89.4% ($t=-1.638, P=0.140$)。见 Figure 2。

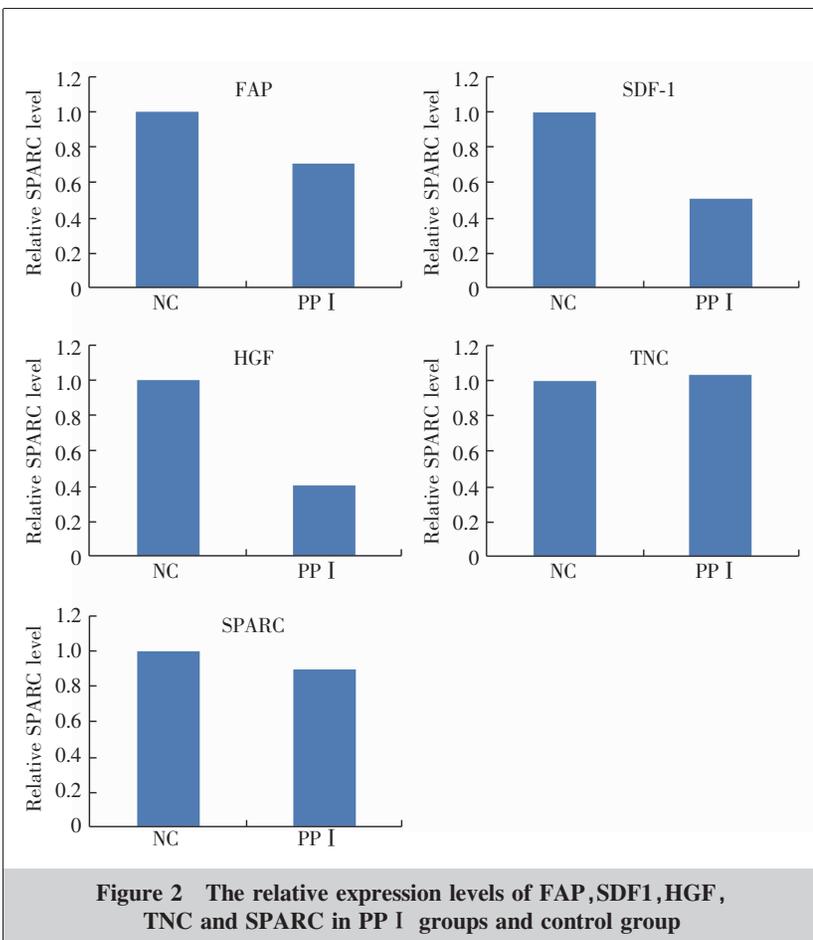


Figure 2 The relative expression levels of FAP,SDF1,HGF, TNC and SPARC in PP I groups and control group

3 讨论

中药的抗肿瘤作用已得到广泛肯定,中药通过对肿瘤细胞及机体内环境的多靶点、多环节作用,抑

制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡、重塑肿瘤微环境。中药重楼是百合科属植物重楼的根茎,性微寒,味苦,具有清热解毒,消肿止痛,凉肝定惊等功效。重楼

的主要有效成分是甾体皂苷,PP I 是其抗肿瘤主要成分之一,全称是 4-O-呋喃阿拉伯糖基-2-O-呋喃鼠李糖基-β-D-呋喃葡萄糖基薯蓣皂甙。研究发现重楼皂苷对肺癌、胃癌、肝癌、乳腺癌、胰腺癌、直肠癌、肾癌、前列腺癌和宫颈癌等多种肿瘤细胞均有一定的抑制作用^[3,4],其作用机制主要为抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生长、逆转肿瘤细胞多药耐药性等^[5]。关于 PP I 的抗肿瘤机制的研究已经取得一定成果,但多关注于对肿瘤细胞的直接作用,PP I 能否通过作用于肿瘤微环境发挥抗肿瘤效应目前少有报道,值得进一步深入探索。

肿瘤间质微环境在实体肿瘤的发生、演进中起重要作用。肿瘤间质微环境包括间质成纤维细胞,浸润的免疫细胞,内皮细胞以及细胞外基质等。CAFs 是肿瘤间质中的主要细胞成分。CAFs 通过其特殊的细胞表面标志物,并合成一系列细胞因子、生长因子、ECM 等,通过不同的信号通路,促进肿瘤细胞生长、侵袭、新生血管生成、免疫逃逸、转移等,这些重要分子主要包括 FAP、SPARC、SDF-1、HGF 和 TNC 等。本研究发现 PP I 能够抑制胃癌 CAFs 细胞的增殖,下调 CAFs 细胞 FAP、SDF-1 和 HGF 蛋白表达,提示 PP I 可以通过作用于肿瘤间质微环境中的 CAFs 间接发挥抗肿瘤效应,本研究结果有助于进一步探讨 PP I 的抗肿瘤机制。

FAP 是 CAFs 细胞特异性表达的一种表面抗原,具有二肽基肽酶和胶原酶活性,发挥促肿瘤细胞生长、侵袭,促新生血管生成及免疫抑制作用。FAP 的表达水平和胃癌不良临床病理特征相关,如 FAP 高表达病理多为弥漫型、分期晚、预后差等^[6]。PP I 可降低 CAFs 细胞的 FAP 表达水平,提示 PP I 可能通过此途径抑制胃癌细胞的恶性生物学行为,改善患者生存。FAP 在 CAFs 细胞表达具有特异性,提示其可能作为一个新的生物标记用于胃癌的个体化治疗。

CAFs 自身可分泌 SDF-1(或称为黏附分子 CX-CL12),SDF-1 可以吸引调节 T 细胞进入肿瘤微环境,阻断效应 T 细胞与肿瘤的相互作用,妨碍肿瘤清除。SDF-1 还能够作用于肿瘤细胞 CXCR4 受体,增加血管生成,促进肿瘤生长,从而在肿瘤的演进过程中发挥作用。SDF-1 的表达水平和胃癌肿瘤大小、浸润深度、淋巴管浸润及不良预后密切相关,阻断 SDF-1 信号通路能够抑制胃癌细胞的浸润能力^[7]。

乏氧细胞在实体瘤中普遍存在,在乏氧条件下,HIF-1α 可以上调 CAFs 细胞 SDF-1 表达,促进胃癌细胞迁移和浸润^[8]。在乏氧环境下,弥漫型胃癌细胞可将其驱动途径从 FGFR-2 信号途径转换至 SDF1/CXCR4 轴,促进肿瘤细胞增殖^[9]。PP I 可以显著下调 CAFs 细胞的 SDF-1 表达,提示 PP I 能够通过调节机体免疫系统,改变机体对肿瘤的免疫反应,发挥抗肿瘤作用。乏氧细胞化疗敏感性差,PP I 联合化疗或许能提高治疗效果。

HGF 是一种多功能细胞因子,HGF 本身并没有丝氨酸蛋白酶活性,只有在与 c-Met 受体结合以后,才能发挥其功能。CAFs 是 HGF 的主要来源,它与肿瘤细胞的高亲和性受体 c-Met 结合,激活 c-Met 信号促进肿瘤细胞增殖,增强肿瘤细胞的运动性,在肿瘤演进中有着重要作用。研究发现约 25%的胃癌患者 c-Met 异常表达^[10]。此外,c-Met 过表达还和 HER2 阳性胃癌对拉帕替尼耐药有关^[11]。C-Met 是极具潜力的胃癌治疗靶点,HGF/c-Met 信号通路抑制剂是治疗胃癌的潜在突破口。目前,部分作用于该信号通路的靶向药物正处于临床试验阶段,其中 onartuzumab、crizotinib 和 rilotumumab 等在治疗晚期胃癌的早期临床试验中取得一定疗效。胃癌 I 期临床试验中,1 例化疗抵抗的胃癌肝转移患者,在使用 onartuzumab 治疗后获得持续完全缓解^[12]。Onartuzumab 联合化疗的 III 期临床试验处于运行阶段,有望成为胃癌治疗新的有效手段。PP I 可以显著下调 CAFs 细胞的 HGF 表达,提示 PP I 可能通过抑制该信号通路抑制胃癌细胞增殖,并可能逆转肿瘤细胞对一些靶向药物的耐药性。

SPARC,又称骨连蛋白(Osteonectin)、基底膜 40 蛋白,也是激活的 CAFs 的标志之一。具有抗黏附,降解细胞外基质,促进肿瘤血管生成的作用。CAFs 还能合成 TNC 对肿瘤组织局部免疫起抑制作用,促进肿瘤的免疫逃逸和复发。此外,TNC 可通过加强干细胞信号分子 musashihomolog 1 (MSH1) 和 leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5(LGR5)的表达,促进肿瘤转移。但 PP I 在 2μg/ml 浓度不能显著改变 SPARC 和 TNC 的表达,更高的浓度能否显著改变 SPARC 或 TNC 表达还有待进一步研究。

综合上述,本研究通过细胞学研究发现 PPI 能

够抑制胃癌 CAFs 细胞的增殖,显著下调胃癌 CAFs 细胞 FAP、SDF-1 和 HGF 的表达,提示 PP I 能够通过调节 CAFs 功能,修饰肿瘤微环境,发挥间接抗肿瘤作用。PP I 在抗肿瘤方面有很大的潜力,其作用机制还有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Chen W,Zheng R,Baade PD,et al. Cancer Statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [2] Zuo TT,Zheng RS,Zeng HM,et al. Epidemiology of stomach cancer in China [J]. Chinese Journal of Clinical Oncology,2017,44(1):55-58.[左婷婷,郑荣寿,曾红梅,等.中国胃癌流行病学现状[J].中国肿瘤临床,2017,44(1):55-58.]
- [3] Wang YH,Liu HM,Li H,et al. Medicinal values and their chemical bases of Paris[J]. China Journal of Materia Medica,2015,40(5):833-839.[王跃虎,牛红梅,李恒,等.重楼属植物的药用价值及其化学物质基础[J].中国中药杂志,2015,40(5):833-839.]
- [4] Jiang H,Zhao PJ,Ma SL. The Effect of paris saponin I on apoptosis associating with PI3K/Akt pathway in pancreatic carcinoma cell line PANC-1[J]. Journal of Chinese Oncology,2014,20(2):127-130.[江皓,赵鹏军,马胜林.重楼皂苷 I 通过 PI3K/Akt 途径诱导胰腺癌 PANC-1 细胞凋亡的研究[J].肿瘤学杂志,2014,20(2):127-130.]
- [5] Lu W,Pan M,Yang GY,et al. Study advance in anti-tumor mechanisms of polyphyllin [J]. China Pharmacist,2016,19(12):2343-2345. [卢伟,潘梦,杨光义,等.重楼皂苷抗肿瘤作用机制研究进展 [J].中国药师,2016,19(12):2343-2345.]
- [6] Hu M,Qian C,Hu Z,et al. Biomarkers in tumor microenvironment? Upregulation of fibroblast activation protein- α correlates with gastric cancer progression and poor prognosis[J]. OMICS,2017,21(1):38-44.
- [7] Izumi D,Ishimoto T,Miyake K,et al. CXCL12/CXCR4 activation by cancer-associated fibroblasts promotes integrin β 1 clustering and invasiveness in gastric cancer[J]. Int J Cancer,2016,138(5):1207-1219.
- [8] Oh YS,Kim HY,Song IC,et al. Hypoxia induces CXCR4 expression and biological activity in gastric cancer cells through activation of hypoxia-inducible factor-1 α [J]. Oncol Rep,2012,28(6):2239-2246.
- [9] Kinoshita H,Yashiro M,Fukuoka T,et al. Diffuse-type gastric cancer cells switch their driver pathways from FGFR2 signaling to SDF1/CXCR4 axis in hypoxic tumor microenvironments[J].Carcinogenesis,2015,36(12):1511-1520.
- [10] Nagatsuma AK,Aizawa M,Kuwata T,et al. Expression profiles of HER2,EGFR,MET and FGFR2 in a large cohort of patients with gastric adenocarcinoma [J]. Gastric Cancer,2015,18(2):227-238.
- [11] Chen CT,Kim H,Liska D,et al. MET activation mediates resistance to lapatinib inhibition of HER2-amplified gastric cancer cells[J]. Mol Cancer Ther,2012,11(3):660-669.
- [12] Catenacci DV,Henderson L,Xiao SY,et al. Durable complete response of metastatic gastric cancer with anti-Met therapy followed by resistance at recurrence [J]. Cancer Discov,2011,1(7):573-579.