

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.13.002

文章编号: 1005-8982(2020)13-0006-05

白藜芦醇抑制胃癌细胞株 MKN45 增殖的机制研究*

朱理辉¹, 罗勇², 邓萍萍¹, 陈宏辉¹, 陈汶¹, 李国庆¹, 王正根¹, 张琍¹
(南华大学附属第二医院 1. 消化内科, 2. 重症医学科, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 通过研究白藜芦醇抑制胃癌 MKN45 细胞增殖及对丝裂原活化蛋白激酶 (MEK)/ 细胞外信号调节激酶 (ERK) 信号通路的影响, 探讨白藜芦醇抗胃癌的作用机制。**方法** 体外常规培养胃癌 MKN45 细胞, 将细胞分为对照组、MEK/ERK 信号通路抑制剂 PD98059 组 (PD98059 组)、白藜芦醇低剂量组 (100 $\mu\text{mol/L}$)、白藜芦醇高剂量组 (400 $\mu\text{mol/L}$)。各组细胞处理 1、2 和 4 h 后, MTT 法检测细胞增殖抑制率, Western blotting 法检测 Ras、Raf、MEK、ERK1/2 蛋白的表达, 细胞免疫化学法检测 Ras、Raf、MEK、ERK1/2 蛋白荧光强度的变化。**结果** 与对照组比较, PD98059 组、白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组细胞在处理 1、2 和 4 h 后, 细胞增殖受到抑制 ($P < 0.05$), 且呈时间剂量依赖性; PD98059 组、白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组细胞 Ras、Raf、MEK 和 ERK1/2 表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且白藜芦醇的作用呈剂量依赖性 ($P < 0.05$); MEK 和 ERK1/2 蛋白主要定位于细胞质中, 且 PD98059 组、白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组细胞 ERK1/2 的荧光强度均减弱。**结论** 白藜芦醇呈剂量依赖性抑制胃癌细胞株 MKN45 的增殖, 可能与抑制 MEK/ERK 信号通路, 减弱 Ras、Raf、MEK 和 ERK1/2 的表达有关。

关键词: 胃肿瘤; 白藜芦醇; 增殖; 丝裂原活化蛋白激酶 / 细胞外信号调节激酶

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Resveratrol inhibits proliferation of gastric cancer MKN45 cells by regulating the MEK/ERK*

Li-hui Zhu¹, Yong Luo², Ping-ping Deng¹, Hong-hui Chen¹, Wen Chen¹,
Guo-qing Li¹, Zheng-gen Wang¹, Li Zhang¹

(1. Department of Gastroenterology, 2. Intensive Care Unit, The Second Affiliated Hospital,
University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibition effect and mechanism of resveratrol on proliferation of gastric cancer MKN45 cell and the involvement of MEK/ERK signaling pathway. **Methods** Gastric cancer MKN45 cells were cultured according to the conventional signaling pathway method. The experiment was divided into control group, MEK/ERK signaling pathway inhibitor PD98059 group (20 mg/L, 100 μl), resveratrol low-dose group (100 $\mu\text{mol/L}$), resveratrol high-dose group (400 $\mu\text{mol/L}$). Gastric cancer MKN45 cell was treated with 1 h, 2 h and 4 h for subsequent follow-up. MTT assay was used to detect the cell viability of the inhibition rate of cell proliferation. Western blotting was used to analyze the expression of proteins such as Ras, Raf, MEK, ERK1/2. Immunocytochemistry was used to analyze the fluorescence intensity of Ras, Raf, MEK and ERK1/2. **Results** Compared with control group, the proliferation of cells in PD98059 group, low dose resveratrol group and high dose

收稿日期: 2020-01-12

* 基金项目: 国家自然科学基金 (No: 81372378)

[通信作者] 罗勇, E-mail: fordluo@qq.com

resveratrol group was significantly inhibited after treatment for 1 h, 2 h and 4 h with a time-dependent and dose-dependent way ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expressions of Ras, Raf, MEK and ERK1/2 was significantly decreased ($P < 0.05$), and the difference was statistically significant. The effect of resveratrol has a dose-dependent effect ($P < 0.05$). MEK and ERK1/2 proteins were also found to be mainly localized with immunofluorescence chemistry in the cytoplasm. And the fluorescence intensity of ERK1/2 in PD98059 group, low dose resveratrol group and high dose resveratrol group were significantly decreased. **Conclusion** Resveratrol has obvious inhibitory effect on proliferation of gastric cancer MKN45 cell with a dose-dependent way, and its mechanism may be related to the inhibition of the expression of Ras, Raf, MEK and ERK1/2 by inhibiting the MEK/ERK signaling pathway.

Keywords: stomach neoplasms; resveratrol; proliferation; MEK/ERK signaling pathway

胃癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一, 大多数患者就诊时为中晚期, 无手术治疗机会, 目前中晚期胃癌的治疗主要采用以化疗为主的综合治疗^[1]。白藜芦醇又称为芪三酚属天然多酚类化合物, 是药食作物(如桑椹、虎杖、葡萄、花生等)的主要成分, 具有很强的抗氧化活性^[2], 属于植物源性药物, 具有毒副作用少和植物衍生成分广泛靶标的特点。其在抗肿瘤治疗中的作用已有许多研究, 包括结肠癌、皮肤恶性黑色素瘤、子宫内膜癌等^[3-5], 但其对胃癌细胞增殖的影响及相关作用机制尚不清楚。本研究通过观察不同浓度白藜芦醇对胃癌细胞株 MKN45 增殖及丝裂原活化蛋白激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路相关蛋白表达的影响, 为临床治疗及新药研发提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

胃癌细胞株 MKN45 (中国科学院上海细胞研究所), 白藜芦醇和 PD98059 (美国 Sigma Aldrich 公司), 四甲基偶氮唑蓝(MTT)检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 胎牛血清及 RPMI 1640 培养基(美国 Hyclone 公司), 二甲亚砜(DMSO)(中国医药集团有限公司), 胰蛋白酶(美国 Sigma Aldrich 公司), 兔抗 Ras 及 Raf 一抗(美国 Cell Signaling 公司), 兔抗 MEK 及 ERK1/2 一抗(美国 Santa Cruz 公司), 二氧化碳 CO₂ 恒温培养箱(上海新苗医疗器械制造有限公司), 超净工作台(江苏苏净集团有限公司), 荧光显微镜(德国莱卡公司), 低温高速离心机(美国贝克曼库尔特公司), 凝胶成像仪(美国 Bio Rad 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人胃癌 MKN45 细胞为贴壁生长细胞, 常规培养于含 10% 小牛血清、100 u/ml 青霉素的

RPMI 1640 培养基, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。每日光学显微镜下观察, 细胞呈单层生长, 铺满培养瓶时传代。传代时常规吸去培养液, PBS 洗 2 ~ 3 遍, 以 0.25% 胰酶消化适度, 吸去胰酶, 加适量培养液吹打成单细胞悬液, 分瓶继续培养, 取对数生长期细胞制成细胞悬液。

1.2.2 实验分组 实验分为对照组(DMSO, 100 μg/ml, 100 μl)、MEK/ERK 信号通路抑制剂 PD98059 组(20 mg/L, 100 μl)(PD98059 组)、白藜芦醇低剂量组(100 μmol/L)、白藜芦醇高剂量组(400 μmol/L)。将 228.2 mg 白藜芦醇加入 10 ml DMSO 溶解, 配置成浓度为 100 mmol/L 的储存液, 应用微孔滤膜滤过后将白藜芦醇母液 -20℃ 避光保存备用。参考杨洪秋^[6]的研究结果, 进行预试验, 最终设置白藜芦醇组的浓度为 100 和 400 μmol/L, 临用前取白藜芦醇母液用细胞培养基稀释成 100 和 400 μmol/L 的终浓度, 使 DMSO 的最终浓度低于 0.2%。

1.2.3 MTT 法检测细胞增殖抑制率 取对数生长期细胞用 0.25% 胰酶消化, 制成单细胞悬液, 吹打重悬细胞至浓度为 5×10^4 个/ml 的细胞悬液, 平行接种于 96 孔培养板中, 待细胞接近 70% 融合时, 将 MKN45 按照 1.2.2 分组方法随机分为 4 组: 对照组、PD98059 组、白藜芦醇低剂量组、白藜芦醇高剂量组。于 1、2 和 4 h 轻轻弃去各组细胞培养孔内的培养液, 加入 20 μl 的 MTT 继续于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。无菌 PBS 冲洗后在各组细胞中加入 150 μl DMSO, 震荡处理。用酶标仪检测培养后细胞培养板各个培养孔光密度(OD)值, 并计算抑制率。细胞的增殖抑制率 = (对照组 OD 值 - 实验组 OD 值) / 对照组 OD 值 × 100%。IC₅₀ 计算方法(寇式法): $IC_{50} = \lg^{-1} [X_m - I(P - 0.5)]$, 其中 X_m : 最大浓度对数值; I : 最大浓度 / 相邻浓度的对数值; P : 各组生长抑制率之和; 0.5 为

经验常数。每组重复 6 次。

1.2.4 Western blotting 法检测 Ras、Raf、MEK、ERK1/2 蛋白的表达 4 组细胞相应处理 4 h 后, PBS 洗涤细胞, 适量的裂解液冰上裂解 30 min, 收集细胞, 4℃、14 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液。BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 将蛋白样品与上样缓冲液充分混合, SDS-PAGE 电泳分离, 4℃转膜过夜。取出 PVDF 膜进行小冲洗。用纯化水配置 5% 胎牛血清进行封闭 (10 min)。在 20℃的室温条件下将 PVDF 膜分别与 Ras、Raf、MEK、ERK1/2 第一抗体 (稀释倍数为 200) 培养 60 min, 无菌 PBS 冲洗 (5 min/次, 共冲洗 3 次) 后, 与二抗 (稀释倍数为 500) 共培养 50 min。PBS 冲洗 3 次后 DAB 显色, 拍照。每组重复 6 次。

1.2.5 免疫细胞化学法检测 MEK、ERK1/2 蛋白荧光强度的变化 将在无菌盖玻片上生长良好并经相应处理后的 MKN45 用无菌 PBS 冲洗 3 次并用冰丙酮 (-20℃) 固定。并将其在无菌净化工作台上吹干, 用 1.0% 体积分数的 Triton-100 增加各组细胞通透性。用 5.0% 胎牛血清白蛋白溶液封闭。分别用相应浓度的 MEK、ERK1/2 第一抗体稀释液于 20℃条件下处理细胞 3 h, 无菌 PBS 漂洗 3 次。将漂洗后的细胞载玻片与 FITC 标记二抗避光 37℃孵育 2 h, 无菌 PBS 漂洗 3 次后用荧光显微镜拍照 (二抗孵育完毕至拍照时间控制在 90 min)。每组重复 6 次。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 21.0 统计软件, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇对 MKN45 细胞增殖的抑制作用

各组在 0、1、2 及 4 h 时 MKN45 细胞增殖抑制率的比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点 MKN45 细胞的增殖抑制率有差异 ($F = 449.928$, $P = 0.000$)。②组间 MKN45 细胞的增殖抑制率有差异 ($F = 242.550$, $P = 0.000$), 与对照组比较, PD98059 组、白藜芦醇低剂量组、白藜芦醇高剂量组对 MKN45 细胞的增殖抑制率升高 ($P < 0.05$), 以白藜芦醇高剂量组最高。③各组 MKN45 细胞的增殖抑制率的变化趋势有差异 ($F = 258.470$, $P = 0.000$)。见表 1。

2.2 白藜芦醇对癌细胞株 MEK/ERK 信号通路中 Ras、Raf、MEK 和 ERK1/2 蛋白表达的影响

细胞处理 4 h 后, 各组细胞 Ras、Raf、MEK 和 ERK1/2 蛋白的相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。PD98059 组、白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组均低于对照组, 且白藜芦醇高剂量组低于低剂量组。见表 2 和图 1。

同时, 免疫细胞化学法检测结果显示, MEK 及

表 1 白藜芦醇对 MKN45 细胞株增殖的抑制作用 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	0 h	1 h	2 h	4 h
对照组	0.010 ± 0.000	0.010 ± 0.000	0.010 ± 0.000	0.010 ± 0.000
PD98059 组	0.053 ± 0.010	0.193 ± 0.078	0.290 ± 0.033	0.398 ± 0.104
白藜芦醇低剂量组	0.042 ± 0.019	0.123 ± 0.025	0.188 ± 0.026	0.262 ± 0.035
白藜芦醇高剂量组	0.035 ± 0.019	0.255 ± 0.054	0.425 ± 0.040	0.540 ± 0.047

表 2 各组 MKN45 细胞 Ras、Raf、MEK 和 ERK1/2 蛋白的相对灰度值 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	Ras	Raf	MEK	ERK1/2
对照组	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000	1.000 ± 0.000
PD98059 组	0.725 ± 0.018 ^①	0.659 ± 0.025 ^①	0.783 ± 0.003 ^①	0.729 ± 0.015 ^①
白藜芦醇低剂量组	0.787 ± 0.015 ^①	0.774 ± 0.015 ^①	0.814 ± 0.005 ^①	0.800 ± 0.018 ^①
白藜芦醇高剂量组	0.532 ± 0.017 ^{①②}	0.651 ± 0.013 ^{①②}	0.750 ± 0.003 ^{①②}	0.698 ± 0.014 ^{①②}
<i>F</i> 值	178.583	103.148	1413.797	98.065
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与白藜芦醇低剂量组比较, $P < 0.05$ 。

ERK1/2 蛋白主要定位于细胞质, 且 PD98059 组、白藜芦醇低剂量组和白藜芦醇高剂量组细胞 MEK 及 ERK1/2 的荧光强度均减弱, 见图 2、3。

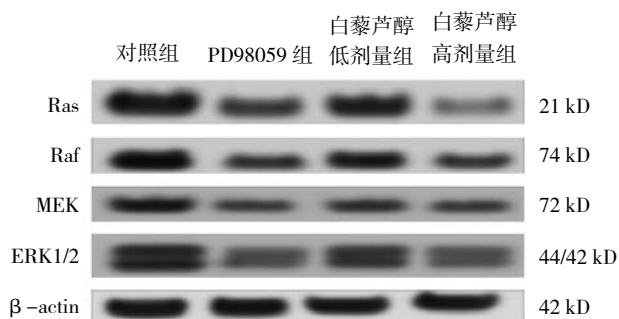


图 1 白藜芦醇对 MKN45 细胞株 Ras、Raf、MEK 和 ERK1/2 表达的影响

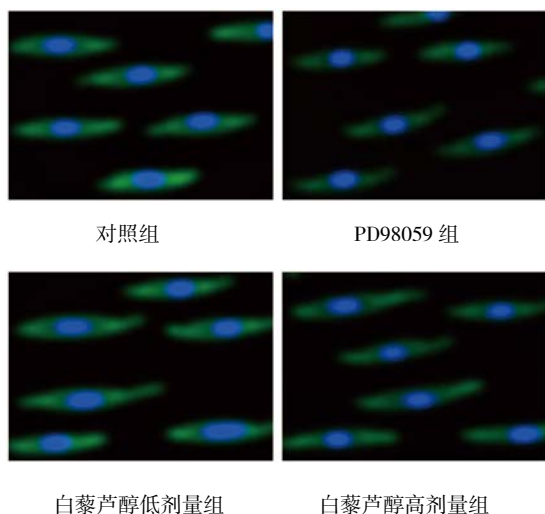


图 2 白藜芦醇对 MKN45 细胞株 MEK 蛋白表达的影响 (×400)

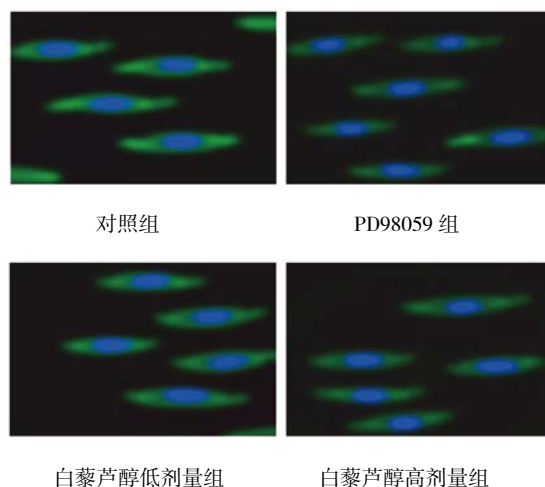


图 3 白藜芦醇对 MKN45 细胞株 ERK1/2 蛋白表达的影响 (×400)

3 讨论

白藜芦醇属于多酚类化合物, 是恶性肿瘤的化学预防物质, 对癌细胞有促凋亡、抗增殖作用, 以及抑制动物肿瘤生长的能力。已有研究发现, 白藜芦醇可能通过抑制 COX-2 的表达和活性诱导细胞凋亡^[7]、阻断 TNF- α /TNF- β 受体诱导的 NF- κ B 活化抑制肿瘤细胞的增殖^[8]、干扰葡萄糖发酵和促进呼吸来减缓肿瘤细胞的生长^[9]、抑制类花生酸合成、阻滞细胞周期进展等多种途径发挥抗肿瘤作用^[10]。白藜芦醇抗肿瘤的另一个作用可能是与化疗药物的相互作用, 降低顺铂肾毒性^[11]。本研究显示, MKN45 细胞在经 PD98059、100 μ mol/L 白藜芦醇和 400 μ mol/L 白藜芦醇处理后, 与对照组比较, 表现出不同程度的抑制作用, 且随着时间的延长和剂量增加, 细胞增殖抑制率升高, 呈时间剂量依赖性, PD98059 阻断 MEK/ERK 信号通路同样可抑制胃癌细胞增殖, 提示白藜芦醇对 MKN45 增殖的抑制作用, 可能与阻断 MEK/ERK 信号通路有关。

MEK/ERK 信号转导通路是细胞外信号刺激向细胞内转导进而诱发细胞发生生理或病理过程的主要途径, 其参与调控细胞的增殖、分化、凋亡、转移及癌变等多种生理或病理学过程^[12-13], 且已有证据显示其与恶性肿瘤的发生、发展有相关性^[14]。白藜芦醇可以通过下调 ERK1/2 和糖原合成酶激酶-3 信号级联作用抑制钒酸钠 (Na_3VO_4) 诱导的神经来源外泌体表达蛋白 p-S396-tau 的表达水平, 白藜芦醇减少长期暴露于 Na_3VO_4 或 FeCl_2 后细胞外活性氧产生和海马毒性的增加, 而此过程与其影响 ERK 信号转导通路有关^[15]。提示 MEK/ERK 信号通路可能是药物干预治疗的潜在靶点。本研究发现, 经白藜芦醇处理后胃癌细胞的 MEK/ERK 信号通路蛋白 Ras、Raf、MEK 和 ERK1/2 表达水平降低, 经 PD98059 阻断 MEK/ERK 信号通路后同样可使 Ras、Raf、MEK 和 ERK1/2 表达水平降低。CHEN 等^[3]研究证实, 白藜芦醇可能通过抑制 MEK/ERK 信号通路来促进人结肠癌 SW620 细胞凋亡。提示白藜芦醇可能是通过抑制 MEK/ERK 信号通路中 Ras、Raf、MEK 和 ERK1/2 蛋白表达发挥抑制胃癌细胞增殖的作用。

本研究虽然检测了白藜芦醇抑制胃癌细胞株 MKN45 的增殖效果, 且发现 MEK/ERK 信号通路蛋白参与其中。但尚未对 MEK/ERK 信号通路中关键蛋白磷酸化形式的表达变化进行检测。下一步将对此进行研究, 为更准确地阐明其相关抗肿瘤机制提供参考。

参 考 文 献:

- [1] AJANI J A, D'AMICO T A, ALMHANNA K, et al. Gastric cancer, version 3.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology[J]. *J Natl Compr Canc Netw*, 2016, 14(10): 1286-1312.
- [2] 高俊英, 季淑华, 郑兆娣, 等. 白藜芦醇抑制上皮肿瘤细胞侵袭和迁移的机制 [J]. *生命科学*, 2018, 30(7): 752-757.
- [3] CHEN H, JIN Z L, XU H. MEK/ERK signaling pathway in apoptosis of SW620 cell line and inhibition effect of resveratrol[J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2016, 9(1): 49-53.
- [4] HEO J R, KIM S M, HWANG K A, et al. Resveratrol induced reactive oxygen species and endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis, and cell cycle arrest in the A375SM malignant melanoma cell line[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 42(3): 1427-1435.
- [5] 李雪玲, 张凯敏, 李雯英, 等. 白藜芦醇联合 SB203580 对宫颈癌细胞凋亡迁移的影响及机制 [J]. *安徽医药*, 2019, 23(2): 240-245.
- [6] 杨洪秋. 白藜芦醇通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路诱导黑色素瘤 A375 细胞凋亡的研究 [D]. 西安: 西安医科大学, 2018.
- [7] CHENG T M, CHIN Y T, HO Y, et al. Resveratrol induces sumoylated COX-2-dependent anti-proliferation in human prostate cancer LNCaP cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 112: 67-75.
- [8] BUHRMANN C, YAZDI M, POPPER B, et al. Evidence that TNF-beta induces proliferation in colorectal cancer cells and resveratrol can down-modulate it[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2019, 244(1): 1-12.
- [9] FONSECA J, MORADI F, MADDALENA L A, et al. Resveratrol integrates metabolic and growth effects in PC3 prostate cancer cells-involvement of prolyl hydroxylase and hypoxia inducible factor-1[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 697-705.
- [10] STORNILOLO C E, MORENO J J. Resveratrol analogs with antioxidant activity inhibit intestinal epithelial cancer Caco-2 cell growth by modulating arachidonic acid cascade[J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(3): 819-828.
- [11] VALENTOVIC M A. Evaluation of resveratrol in cancer patients and experimental models[J]. *Adv Cancer Res*, 2018, 137: 171-188.
- [12] ZENG B, SHI W, TAN G. miR-199a/b-3p inhibits gastric cancer cell proliferation via down regulating PAK4//MEK/ERK signaling pathway[J]. *BMC Cancer*, 2018, 18(1): 34.
- [13] ZHANG J X, XU Y, GAO Y, et al. Decreased expression of miR-939 contributes to chemoresistance and metastasis of gastric cancer via dysregulation of SLC34A2 and Raf/MEK/ERK pathway[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 18.
- [14] MAIELLO M R, D'ALESSIO A, BEVILACQUA S, et al. Egr1 and mek blockade in triple negative breast cancer cells[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 116(12): 2778-2785.
- [15] JHANG K A, PARK J S, KIM H S, et al. Resveratrol ameliorates tau hyperphosphorylation at Ser396 site and oxidative damage in rat hippocampal slices exposed to vanadate: implication of ERK1/2 and GSK-3 beta signaling cascades[J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(44): 9626-9634.

(王荣兵 编辑)

本文引用格式: 朱理辉, 罗勇, 邓萍萍, 等. 白藜芦醇抑制胃癌细胞株 MKN45 增殖的机制研究 [J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(13): 6-10.