虫草素对人胃癌细胞系 HGC-27 的影响及分子机制

田爽，于洪丹(锦州医科大学基础医学院细胞生物学教研室，辽宁 锦州 121000)

摘要：目的 探讨虫草素对 HGC-27 细胞增殖、运动性和凋亡的影响及相关机制。**方法** 用不同浓度虫草素处理人胃癌细胞系 HGC-27、AGS 和 MGC-803，利用 CCK-8 法检测细胞活力，集落形成试验检测细胞增殖能力，流式细胞术检测细胞凋亡情况，体外划痕试验检测细胞运动性。Western blot 检测 Bcl-2、Bax、ERK、磷酸化 ERK (p-ERK)和糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)蛋白表达水平。**结果** 与对照组相比，虫草素处理组明显抑制细胞增殖、集落形成率、细胞运动性并诱导细胞凋亡，下调 Bcl-2、GSK-3β 和 p-ERK 蛋白表达水平，且呈浓度和时间依赖性，但对 Bax 蛋白表达水平没有影响。**结论** 虫草素通过调节 ERK/GSK-3β 信号通路起到抗肿瘤作用，有望成为临床干预和治疗胃癌的潜在药物。

关键词：虫草素；HGC-27；增殖；凋亡；运动性

中图分类号：R284.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2019)12-1468-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2019.12.004

引用本文：田爽，于洪丹. 虫草素对人胃癌细胞系 HGC-27 的影响及分子机制[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(12): 1468-1472.

Effects of Cordycepin on Human Gastric Cancer Cell Lines HGC-27 and It's Molecular Mechanisms

TIAN Shuang, YU Hongdan(*Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Jinzhou Medical University, Jinzhou 121000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects and the related molecular mechanisms of cordycepin on cell proliferation, motility and apoptosis of human gastric carcinoma cell lines HGC-27. **METHODS** Human gastric carcinoma cell lines HGC-27, AGS and MGC-803 were treated with different doses of cordycepin. Cell counting kit-8 assay was used to determine relative cell vitality. Cell proliferation ability was assessed by colony formation assay. Cell apoptosis was analyzed by flow cytometry and cell motility was detected by healing wound assay. Western blot was used to test the expression levels of Bcl-2, Bax, ERK, p-ERK and GSK-3β. **RESULTS** Compared with the control group, cordycepin treatment groups could significantly inhibit cell proliferation, the rate of colony formation and cell motility, induce cell apoptosis and down-regulate the expression levels of Bcl-2, GSK-3β and p-ERK in a dose and time-dependent manner, but it could not affect the expression level of Bax. **CONCLUSION** Cordycepin exert significant anticancer effects by modulating ERK/GSK-3β signaling pathway, which may be potential drug for cancer prevention and therapy of gastric carcinoma in the clinic.

KEYWORDS: cordycepin; HGC-27; proliferation; apoptosis; motility

胃癌是最常见的消化系统恶性肿瘤，每年新发病例达 100 多万，尤其以东亚居多[1]。近十年中，随着诊断水平的提高和治疗方法的进步，胃癌的发病率和死亡率都大幅下降，但它仍是世界范围内公共卫生事业的沉重负担[2]。因此，寻找新型癌症治疗剂是解决这一问题的当务之急。

近年来，中药由于高天然生物活性，被认为是发现新型癌症治疗药物的沃土。虫草素最早是从蛹虫草中分离出来的，具有抗炎、抗病毒、失活 mRNA 多聚腺苷酸化、免疫调节和抗肿瘤等多种临床作用[3]。目前，虫草素在多种类型的肿瘤中被广泛研究其抗肿瘤作用及机制。研究发现[4]，虫草素通过诱导 DNA 损伤和上调 P53 蛋白的表达导致白血病细胞周期阻滞和细胞凋亡；此外，虫草素可通过抑制肺癌[5]、肝癌[6]、乳腺癌[7]和前列腺癌[8]细胞的生长、转移和诱导细胞凋亡起到抗肿瘤作用。据报道，虫草素通过 PI3K/Akt 信号通路产生 ROS 诱导 SGC-7901 细胞凋亡[9]，但其在人类胃癌中的抗肿瘤作用机制尚不清楚。因此，本研究选用 HGC-27 细胞，从细胞增殖、凋亡和运动性等方面着手，进一步探讨虫草素的抗胃癌作用和分子机制，为临床干预和治疗提供有效的基础。

1　仪器与试剂

1.1　仪器

CO_2 细胞培养箱(美国 Thermo Fisher)；HBS-1096A 酶标分析仪(南京德铁)；FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD)；CKX41 型倒置显微镜(日本奥林巴斯)。

作者简介：田爽，女，硕士，实验师　Tel: 18841697150　E-mail: tianshuangsj@163.com

1.2 细胞和试剂

人胃癌细胞系 HGC-27、AGS 和 MGC-803(中科院上海细胞库)；虫草素(成都曼思特生物科技有限公司，批号：MUST-16121312)；RPMI-1640 完全培养基(武汉博士德生物工程有限公司，批号：PYG0049)；Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(南京凯基生物科技有限公司，批号：20170728)；CCK-8 试剂盒、Bcl-2、Bax、ERK 和 p-ERK 抗体(上海碧云天生物技术有限公司，批号：111116170503，020717170518，010317170602，032017170610，122716170512)；GSK-3β 抗体(沈阳万类生物科技有限公司，批号：H08231456)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 HGC-27、AGS 和 MGC-803 细胞置于添加 10%胎牛血清、100 U·mL^{-1} 青霉素和 100 μg·mL^{-1} 链霉素的 RPMI-1640 完全培养基中，并在 37 ℃孵箱中培养。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

将处于对数生长期的 HGC-27、AGS 和 MGC-803 细胞接种于 96 孔板，接种密度为每孔 3×10^3 个细胞，细胞置于 37 ℃孵箱中孵育过夜。第 2 天用 0，12.5，25，50，100 μmol·L^{-1} 的虫草素处理细胞，并于处理后 24，48 h 分别测定细胞活力。10 μL CCK-8 溶液加入到每孔中，37 ℃继续孵化 1 h。最后，酶标仪测量 450 nm 处吸光度值(A_{450})。

2.3 集落形成试验检测细胞增殖能力

将 HGC-27 细胞消化成单个细胞，接种于 24 孔板，每孔 200 个细胞。用 0，25，50，100 μmol·L^{-1} 的虫草素处理细胞，并培养 7 d，直到细胞生长成足够大的集落。然后，用甲醇固定 15 min，0.1%的结晶紫染色 10 min，PBS 洗涤 3 次，在倒置显微镜下观察拍照并计数。

2.4 Annexin V-FITC/PI 染色结合流式细胞术检测细胞凋亡

将 HGC-27 细胞接种于 6 孔板，接种密度为每孔 2×10^5 个细胞，并置于 37 ℃孵箱中孵育过夜。第 2 天用 0，25，50，100 μmol·L^{-1} 的虫草素处理细胞，48 h 后收集细胞，用预冷的 PBS 洗涤 3 次，加入 500 μL 结合液重悬细胞，加入 5 μL Annexin V-FITC 和 5 μL PI 试剂混匀后避光室温下孵育 10 min，然后在 1 h 内用流式细胞仪上机检测细胞凋亡情况。

2.5 体外划痕试验检测细胞运动性

在 24 孔板中培养 HGC-27 细胞，直到细胞长成致密单层后，用无菌枪头垂直划出一无细胞的细痕，制作细胞划痕模型。之后，弃去培养基，加入含有 0，12.5 和 25 μmol·L^{-1} 虫草素的新鲜培养基。相差显微镜下拍照，并测量伤口宽度，此时作为划痕后 0 h，继续 37 ℃孵育培养 12，24 h，测定划痕的宽度，计算二者之间的差值，即为细胞 12，24 h 内移动的距离，虫草素处理组和对照组之间移动距离的平均值比值即为 2 组细胞移动速度的相对比值。

2.6 Western blot 检测蛋白表达

收集各组细胞加入裂解缓冲液，提取总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳，将蛋白转移至 PVDF 膜上，然后，在含 40 g·L^{-1} BSA 的 TBST 中室温封闭 1 h，分别加入 Bcl-2、Bax、GSK-3β 多克隆一抗、ERK、p-ERK 和 GAPDH 单克隆一抗，4 ℃过夜。次日，加入二抗室温孵育 1 h，ECL 试剂发光成像，软件分析目的条带灰度，并用 GAPDH 灰度值进行标化。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析，所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Duncan 检验和单因素方差分析，P<0.05 表示差异有统计学意义，P<0.01 表示差异具有显著性。

3 结果

3.1 虫草素抑制胃癌细胞活力

用 0，12.5，25，50，100 μmol·L^{-1} 的虫草素处理 HGC-27、AGS 和 MGC-803 细胞 24，48 h 后，CCK-8 法检测结果显示，与对照组(0 μmol·L^{-1})相比，虫草素处理组细胞存活率显著降低，差异具有统计学意义，且呈浓度和时间依赖性(P<0.05 或 P<0.01)。说明虫草素对 3 种细胞系的活力有明显的抑制作用，其中 HGC-27 细胞对虫草素最敏感。因此，选择 HGC-27 细胞进行下一步研究。结果见图 1。

3.2 虫草素降低 HGC-27 细胞集落形成率

集落形成试验结果显示，与对照组(0 μmol·L^{-1})相比，随着虫草素浓度的增加，HGC-27 细胞的集落形成率明显降低，差异具有统计学意义(P<0.01)。结果见图 2。

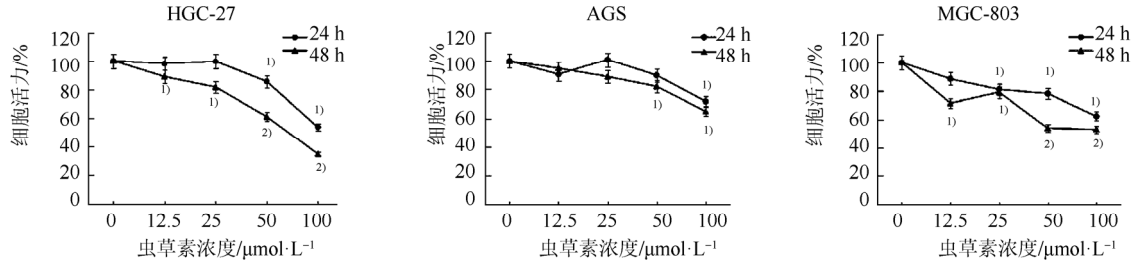

图 1　虫草素抑制胃癌细胞 HGC-27、AGS 和 MGC-803 的增殖活力

与对照组(0 μmol·L^{-1})相比，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01。

Fig. 1　Cordycepin inhibited cell viability of gastric cancer cells HGC-27, AGS and MGC-803

Compared with control group(0 μmol·L^{-1}), $^{1)}P$<0.05, $^{2)}P$<0.01.

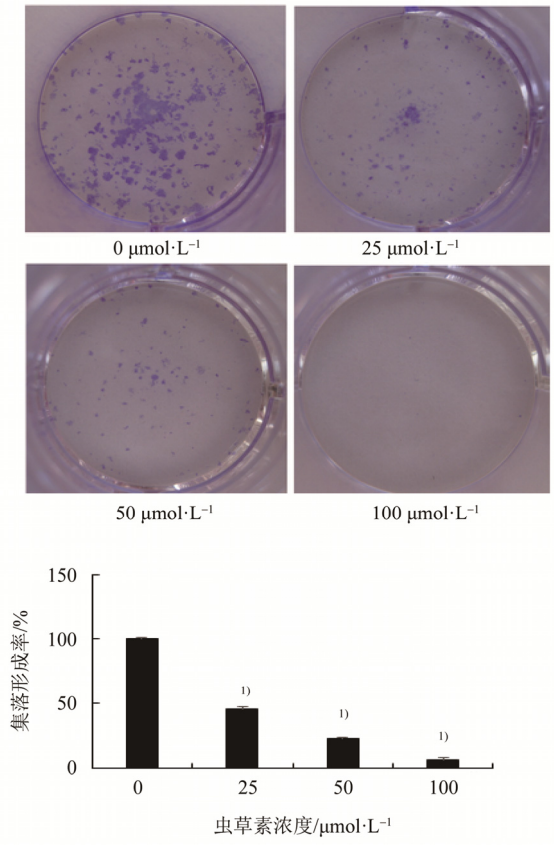

图 2　虫草素降低 HGC-27 细胞集落形成率

与对照组(0 μmol·L^{-1})相比，$^{1)}P$<0.01。

Fig. 2　Cordycepin reduced the colony formation rate of HGC-27 cells

Compared with control group(0 μmol·L^{-1}), $^{1)}P$<0.01.

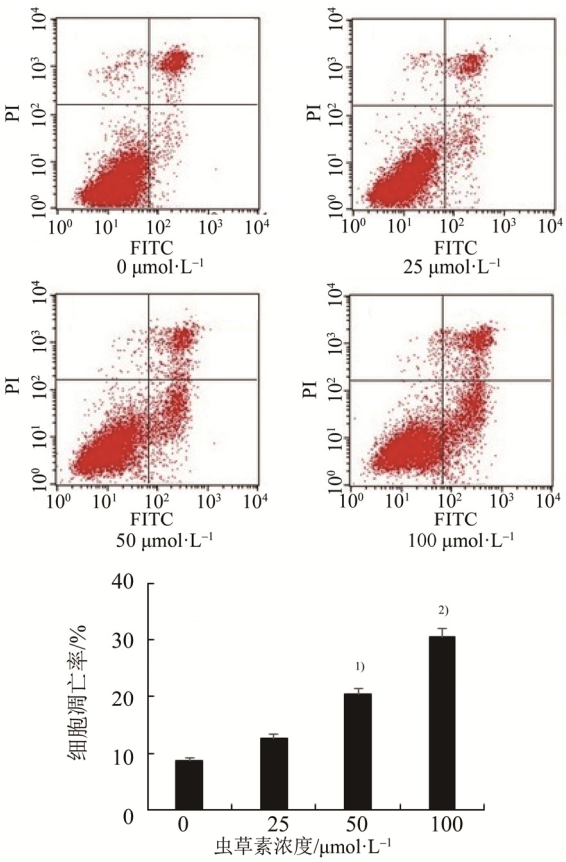

图 3　虫草素促进 HGC-27 细胞凋亡

与对照组(0 μmol·L^{-1})相比，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01。

Fig. 3　Cordycepin promoted HGC-27 cell apoptosis

Compared with control group(0 μmol·L^{-1}), $^{1)}P$<0.05, $^{2)}P$<0.01.

3.3　虫草素促进 HGC-27 细胞凋亡

流式细胞术检测结果显示，当用 25 μmol·L^{-1} 虫草素处理细胞时，细胞凋亡率与对照组(0 μmol·L^{-1})没有差别。然而，随着虫草素浓度的升高，细胞凋亡率明显升高，差异具有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)，说明细胞凋亡率与虫草素浓度呈正相关。结果见图 3。

3.4　虫草素抑制 HGC-27 细胞运动性

根据图 1 所示，当用低于 25 μmol·L^{-1} 虫草素处理 HGC-27 细胞 24 h 时，其细胞活力没有受到影响。为了确定虫草素是否影响细胞迁移，采用 0，12.5，25 μmol·L^{-1} 虫草素处理 HGC-27 细胞 0，12，24 h，检测细胞相对迁移距离。研究结果表明，对照组(0 μmol·L^{-1})和虫草素处理组细胞迁移能力存在显著差异，虫草素处理组的细胞迁移速度较慢，

随着时间和浓度的增加，3 组间迁移距离的差异逐渐明显，差异具有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)。结果见图 4。

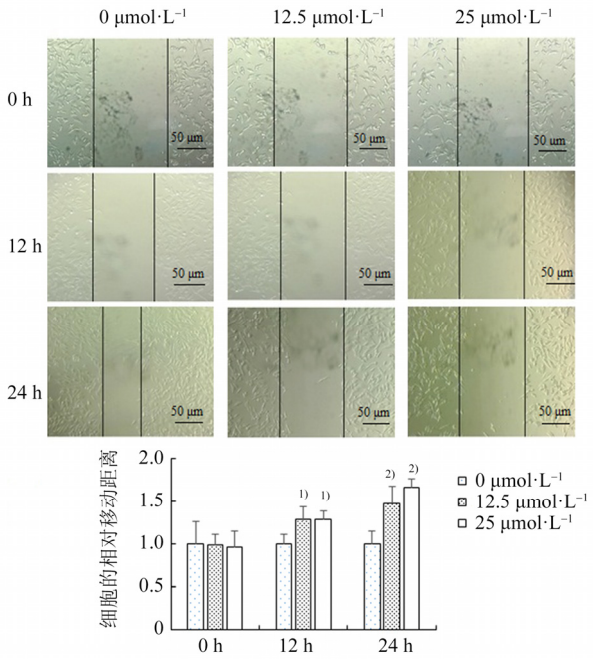

图 4　虫草素抑制 HGC-27 细胞运动性

与对照组(0 μmol·L^{-1})相比，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01。

Fig. 4　Cordycepin repressed HGC-27 cell motility

Compared with control group(0 μmol·L^{-1}), $^{1)}P$<0.05, $^{2)}P$<0.01.

3.5　虫草素下调 Bcl-2、p-ERK 和 GSK-3β 蛋白

Western blot 分析结果表明，不同浓度虫草素处理 HGC-27 细胞 48 h 后，与对照组(0 μmol·L^{-1})相比，p-ERK 和 GSK-3β 表达水平明显下降，并伴随 Bcl-2 蛋白的减少和 Bax/Bcl-2 比值的增高，差异具有统计学意义(P<0.05 或 P<0.01)，而 Bax 蛋白表达水平差异没有统计学意义。结果提示，虫草素可以抑制 ERK/GSK-3β 信号通路。结果见图 5。

4　讨论

虫草素作为从蛹虫草和冬虫夏草中提取的一种重要的天然生物活性成分，通过靶向作用多种分子和途径，抑制细胞生长、诱导细胞凋亡、阻滞细胞周期和抵抗细胞转移，在预防和干预多种类型的肿瘤细胞进展方面发挥着重要作用[3]。

细胞凋亡被认为是抗肿瘤作用的重要机制，与抑制肿瘤生长有关，而线粒体损伤所介导的细胞凋亡信号转导通路是细胞凋亡的主要途径。Bcl-2 家族在线粒体介导的细胞凋亡过程中起着关键作用。Bax 是最重要的促凋亡蛋白，加速程序性细胞死亡，促进细胞色素 C 的释放，参与形成凋

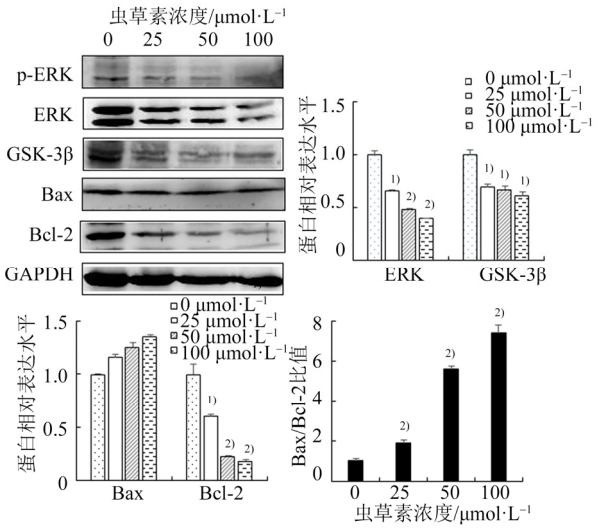

图 5　虫草素对 HGC-27 细胞内蛋白相对表达水平的影响

与对照组相比，$^{1)}P$<0.05，$^{2)}P$<0.01。

Fig. 5　Cordycepin affected the protein expression levels of HGC-27 cells

Compared with control group, $^{1)}P$<0.05, $^{2)}P$<0.01.

亡启动复合体，激活 caspase 的级联反应，导致细胞凋亡。Bcl-2 是最重要的抗凋亡蛋白，调节线粒体外膜的通透性，阻止细胞色素 C 向细胞浆中释放，抑制下游凋亡级联反应[10-11]。此外，Bax 与 Bcl-2 的比值对细胞凋亡的发生也起着至关重要的作用[12]。本研究发现用虫草素处理 HGC-27、AGS、MGC-803 细胞 24，48 h 后，细胞活力明显下降，HGC-27 细胞的集落形成率明显降低，细胞凋亡率明显升高，与虫草素浓度呈正相关，同时与凋亡相关蛋白表达水平的变化也相一致。Western blot 结果显示，虫草素以浓度依赖性的方式下调 Bcl-2 蛋白的表达水平，上调 Bax/Bcl-2 的比值。

肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的主要原因，细胞运动能力在恶性肿瘤侵袭的进展中起着至关重要的作用。一种能够抑制肿瘤细胞迁移的药物可能对抑制癌症进展和转移以及降低死亡率有重要作用[13]。本研究结果显示虫草素能够抑制 HGC-27 细胞的运动性，呈浓度和时间依赖性，这表明虫草素可能限制胃癌细胞的转移。

ERK 信号通路在许多癌症中被不断激活，它参与调控各种癌细胞的生存、凋亡和迁移，通过磷酸化激活并发挥其功能[14-16]。GSK-3β 是糖原代谢的重要调节器，参与调节多个信号通路，研究发现[17-18]，抑制 GSK-3β 的活性可以抑制细胞生长和诱导凋亡。本实验数据表明，虫草素处理导致 p-ERK 和 GSK-3β 表达水平的减少，并伴随着 Bcl-2

的下降和 Bax/Bcl-2 比例的增高。

综上所述，虫草素能抑制细胞生长、集落形成率和细胞运动性，诱导细胞凋亡，其作用机制可能与抑制 ERK/GSK-3β 信号通路有关。因此，虫草菌素有望成为治疗胃癌的新型药物，本研究也可以为下一步临床用药奠定理论基础。

REFERENCES

[1] CATALANO V, LABIANCA R, BERETTA G D, et al. Gastric cancer [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 71(2): 127-164.

[2] ASHTARI S, VAHEDI M. Economic burden of gastrointestinal cancer: estimation and importance [J]. Int J Gastrointest Cancer, 2014, 3(4): 178-181.

[3] TULI H S, SHARMA A K, SANDHU S S, et al. Cordycepin: a bioactive metabolite with therapeutic potential [J]. Life Sci, 2013, 93(23): 863-869.

[4] LIAO Y H, LING J Y, ZHANG G Y, et al. Cordycepin induces cell cycle arrest and apoptosis by inducing DNA damage and up-regulation of p53 in Leukemia cells [J]. Cell Cycle, 2015, 14(5): 761-771.

[5] TAO X D, NING Y, ZHAO X W, et al. The effects of cordycepin on the cell proliferation, migration and apoptosis in human lung cancer cell lines A549 and NCI-H460 [J]. J Pharm Pharmacol, 2016, 68(7): 901-911.

[6] ZHOU Y L, GUO Z H, MENG Q F, et al. Cordycepin affects multiple apoptotic pathways to mediate hepatocellular carcinoma cell death [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2017, 17(1): 143-149.

[7] WANG D, ZHANG Y F, LU J H, et al. Cordycepin, a natural antineoplastic agent, induces apoptosis of breast cancer cells via caspase-dependent pathways [J]. Nat Prod Commun, 2016, 11(1): 63-68.

[8] LEE H H, PARK C, JEONG J W, et al. Apoptosis induction of human prostate carcinoma cells by cordycepin through reactive oxygen species-mediated mitochondrial death pathway [J]. Int J Oncol, 2013, 42(3): 1036-1044.

[9] NASSER M I, MASOOD M, WEI W, et al. Cordycepin induces apoptosis in SGC-7901 cells through mitochondrial extrinsic phosphorylation of PI3K/Akt by generating ROS [J]. Int J Oncol, 2017, 50(3): 911-919.

[10] TODT F, CAKIR Z, REICHENBACH F, et al. Differential retrotranslocation of mitochondrial Bax and Bak [J]. Embo J, 2015, 34(1): 67-80.

[11] REN L P, LI X J, JIN S J. Influence of sophoridine on proliferation and caspase-3/Bcl-2/Bax signaling pathway of human pancreatic cancer cell line capan-1 cells [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(3): 325-328.

[12] KHODAPASAND E, JAFARZADEH N, FARROKHI F, et al. Is Bax/Bcl-2 ratio considered as a prognostic marker with age and tumor location in colorectal cancer? [J]. Iran Biomed J, 2015, 19(2): 69-75.

[13] YE Y, CHOU G X, WANG H, et al. Effects of sesquiterpenes isolated from largehead Atractylodes Rhizome on growth, migration, and differentiation of B16 melanoma cells [J]. Integr Cancer Ther, 2011, 10(1): 92-100.

[14] ZHU Y, TAO M, WU J, et al. Adenovirus-directed expression of TIPE2 suppresses gastric cancer growth via induction of apoptosis and inhibition of AKT and ERK1/2 signaling [J]. Cancer Gene Ther, 2016, 23(4): 98-106.

[15] WANG Y, MO H M, GU J, et al. Cordycepin induces apoptosis of human acute monocytic leukemia cells via downregulation of the ERK/Akt signaling pathway [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(4): 3067-3073.

[16] WANG J H, PARK S J, KO W G, et al. Cordycepin induces human lung cancer cell apoptosis by inhibiting nitric oxide mediated ERK/Slug signaling pathway [J]. Am J Cancer Res, 2017, 7(3): 417-432.

[17] WU J, ZHANG H T, XU C, et al. TIPE2 functions as a metastasis suppressor via negatively regulating β-catenin through activating GSK3β in gastric cancer [J]. Int J Oncol, 2016, 48(1): 199-206.

[18] YE Y, CHAO X J, WU J F, et al. ERK/GSK3β signaling is involved in atractylenolide I-induced apoptosis and cell cycle arrest in melanoma cells [J]. Oncol Rep, 2015, 34(3): 1543-1548.

收稿日期：2018-09-12

(本文责编：李艳芳)

http://www.chinjmap.com