

槲皮素对食管癌细胞侵袭和中期生长因子基因表达的影响

钟锡明, 吴莺, 范钰

钟锡明, 吴莺, 范钰, 江苏大学附属人民医院肿瘤研究所化疗科 江苏省镇江市 212002

中国博士后基金资助项目, No. 2003033547

作者贡献分布: 钟锡明与范钰对此文所作贡献均等; 此课题由范钰设计; 研究过程由钟锡明及吴莺操作完成; 研究所用试剂及分析工具均由范钰及钟锡明提供; 数据分析由吴莺完成; 本论文写作由范钰完成。

通讯作者: 范钰, 212002, 江苏省镇江市, 江苏大学附属人民医院肿瘤研究所化疗科. yufanzh99@sina.com

电话: 0511-85797359 传真: 0511-85797359

收稿日期: 2008-04-22 修回日期: 2008-07-12

接受日期: 2008-07-14 在线出版日期: 2008-08-08

Effects of Quercetin on invasion and midkine expression of human esophageal cancer cell

Xi-Ming Zhong, Ying Wu, Yu Fan

Xi-Ming Zhong, Ying Wu, Yu Fan, Department of Chemotherapy, Cancer Institute, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China

Supported by: China Post-doctoral Foundation, No. 2003 033547

Correspondence to: Yu Fan, Cancer Institute, Department of Chemotherapy, Cancer Institute, the Affiliated People's Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212002, Jiangsu Province, China. yufanzh99@sina.com

Received: 2008-04-22 Revised: 2008-07-12

Accepted: 2008-07-14 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To observe the effects of Quercetin on the invasion of human esophageal cancer cells, and to investigate the possible mechanism.

METHODS: Human esophageal cancer cell line EC109 was treated with different concentrations of Quercetin, and then the anchorage independence growth of EC109 cells was studied by colony formation in soft agar; the invasion ability of EC109 cells was determined by Boyden chamber, and the expression levels of midkine mRNA and protein were detected by real time RT-PCR and Western blot assay, respectively.

RESULTS: After Quercetin treatment, the malignant proliferation and invasive ability of EC109

cells were obviously decreased, which showed a dose-dependent manner (all $P < 0.05$). Meanwhile, Quercetin down-regulated the expression of midkine mRNA and protein in a dose- and time-dependent manner (all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Quercetin can inhibit the invasion of EC109 cells by down-regulating midkine expression.

Key Words: Esophageal carcinoma; Quercetin; Invasion; Midkine; Western blot; Reverse transcription-polymerase chain reaction

Zhong XM, Wu Y, Fan Y. Effects of Quercetin on invasion and midkine expression of human esophageal cancer cell. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(22): 2503-2506

摘要

目的: 观察中药提取物槲皮素对食管癌细胞侵袭的影响, 并探讨其可能机制。

方法: 采用不同浓度的槲皮素处理食管癌 EC109 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 RT-PCR 检测癌细胞中期因子 (midkine, MK) 基因 mRNA 水平, 以 Western blot 方法检测癌细胞 MK 基因蛋白水平变化。

结果: 食管癌 EC109 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 (均 $P < 0.05$)。槲皮素处理组 MK 基因 mRNA 和蛋白水平均明显下调, 且呈时间和浓度依赖性 (均 $P < 0.05$)。

结论: 槲皮素可明显抑制食管癌 EC109 细胞侵袭能力, 其机制可能与下调 MK 基因表达有关。

关键词: 食管肿瘤; 槲皮素; 侵袭; 中期生长因子; 免疫印迹; 逆转录-聚合酶链反应

钟锡明, 吴莺, 范钰. 槲皮素对食管癌细胞侵袭和中期生长因子基因表达的影响. *世界华人消化杂志* 2008; 16(22): 2503-2506

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2503.asp>

■背景资料

槲皮素是一种天然黄酮类化合物, 广泛分布于蔬菜、水果及常见中草药之中。已有研究发现, 槲皮素可抑制多种肿瘤细胞的增殖, 和某些肿瘤细胞的侵袭能力, 是颇具应用前景的抗癌药物之一, 但内在机制尚不清楚。

■同行评议者

王健生, 副教授, 西安交通大学医学院第一附属医院肿瘤外科

■研发前沿

槲皮素(Que)可抑制多种肿瘤细胞的增殖及侵袭,是颇具应用前景的抗癌药物之一,但内在机制尚不清楚。

0 引言

槲皮素(quercetin, Que)是一种天然的黄酮类化合物,广泛分布于蔬菜、水果及常见中草药之中。已有研究发现,槲皮素可抑制多种肿瘤细胞的增殖^[1-2],和某些肿瘤细胞的侵袭能力^[3-6],是颇具应用前景的抗癌药物之一,但内在机制尚不清楚。为此,本研究采用Que处理食管癌EC109细胞,观察了Que对癌细胞锚着不依赖性增殖、侵袭和中期生长因子(midkine, MK)基因表达的影响,以探讨其抗癌机制。

1 材料和方法

1.1 材料 槲皮素,购自Sigma公司,用DMSO(二甲基亚砜)配成储液, -20℃冰箱保存。试验时用1640培养基稀释, DMSO的最终浓度小于0.9%。人食管癌细胞株EC109购自美国ATCC细胞库。TRIzol试剂购自Invitrogen公司。BCA蛋白分析试剂盒购自Pierce公司。MK和 β -actin mAb, 购自Santa Cruz公司。RPMI 1640、新生小牛血清, 购自Gibco公司。荧光实时定量PCR MK引物: 上游, 5'-GCGCGCTACAATGCTCAGT-3'; 下游, 5'-CCCTTCCCTTTCTTGGCTTT-3'。FAM探针引物5'-CTCCTTACTGTGCTGTATCCCCATGG-3'。以3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAPDH)为内参。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养: 人食管癌EC109细胞在含100 mL/L新生小牛血清的RPMI 1640液中培养, 置37℃, 50 mL/L CO₂培养箱中。每日观察, 待细胞至对数生长期, 采用不同浓度的槲皮素处理后, 然后准备进行以下试验。

1.2.2 软琼脂集落培养试验: 根据文献[7]进行。倒置显微镜下随机计数每组样品10个视野中的集落数, 取其平均数作比较。结果采用 t 检验分析。

1.2.3 体外侵袭抑制试验: 该试验在改良的Boyden小室中操作, 根据文献方法[7]进行。400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, 每组计数3份样本。

1.2.4 MK基因表达检测: 分别于槲皮素处理食管癌细胞24、48、72 h后, 收集各组细胞, 用TRIzol提取RNA, 并进行cDNA合成, 根据文献[8]方法, 采用荧光实时定量PCR检测MK基因mRNA表达水平。按照上述时间收集各组细胞, 提取细胞总蛋白, 蛋白定量后进行常规Western blot检测。利用Kodak Digital Science 1D Image Analysis

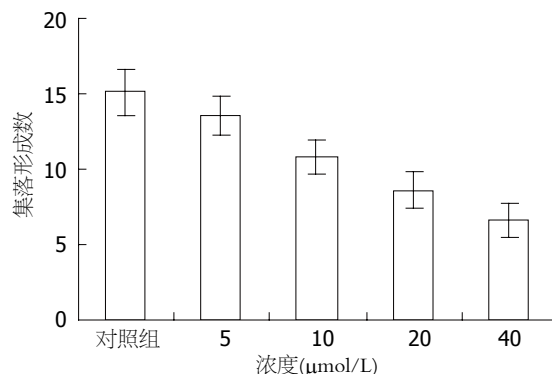


图1 槲皮素对食管癌EC109细胞软琼脂集落形成的影响。

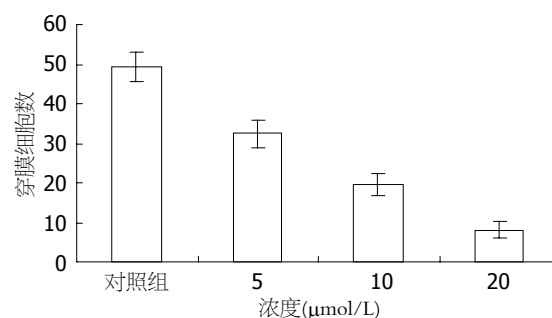


图2 槲皮素对食管癌EC109细胞侵袭的影响。

Software(Eastman Kodak公司, USA)测定Western blot条带净灰度值, 并与内参照 β -actin的测定结果相比较, 计算其比值。

统计学处理 采用SPSS10.0统计软件包进行统计学处理, 所得到的数值均以mean \pm SD表示。

2 结果

2.1 Que对食管癌细胞软琼脂集落形成的影响 食管癌EC109细胞在体外半固体培养体系中可以自发地形成集落。而癌细胞经槲皮素处理后, 所形成的集落数明显减少, 且呈剂量依赖性($P<0.05$, 图1)。

2.2 Que对食管癌细胞侵袭的影响 收集经Que处理的细胞, 采用Boyden小室检测癌细胞侵袭情况。结果发现, 与对照组比较, Que处理组癌细胞穿过滤膜的细胞数明显下降, 且呈浓度依赖性($P<0.05$, 图2)。

2.3 Que对食管癌细胞MK基因表达的影响 以槲皮素处理细胞后, 于不同时间收集细胞, 分别采用荧光实时定量PCR和Western blot检测。结果发现, 与对照组比较, 处理组MK基因mRNA和蛋白水平明显降低($P<0.05$, $P<0.05$, 图3-4)。

3 讨论

自1971年美国NCI组织首次发现槲皮素对P388白血病的抑制作用后, 许多学者发现, 槲皮素可

■相关报道

有学者发现, MK基因与某些癌细胞侵袭有关, 但是尚不了解MK基因与食管癌细胞侵袭的关系, 需要从细胞水平、基因水平进行研究, 以进一步深入了解槲皮素的抗癌机制。

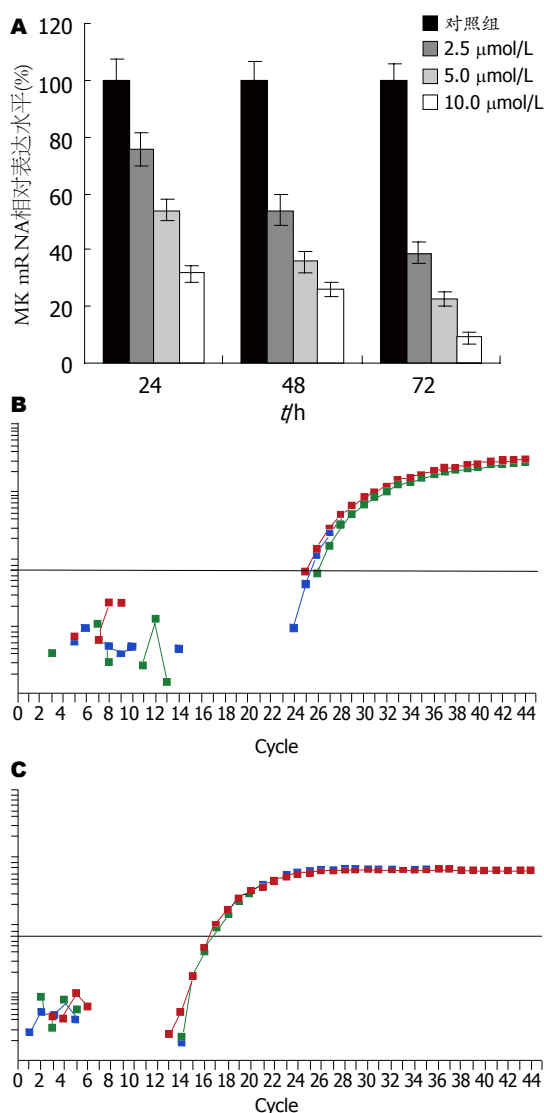


图 3 槲皮素对食管癌细胞MK基因mRNA水平的影响. B-C: 实时定量PCR图(48 h); B: MK; C: GAPDH.

抑制多种恶性肿瘤如白血病、肺癌、肝癌、卵巢癌、膀胱癌、结肠癌等多种癌细胞的恶性增殖. 最近研究发现, 槲皮素可抑制某些癌细胞侵袭转移^[5-6], 但其机制尚不完全清楚. 本研究采用槲皮素处理食管癌EC109细胞, 观察了其对照着不依赖性增殖和侵袭的影响, 并从MK基因角度方面初步探索了其可能的抗癌机制.

正常真核细胞, 除成熟血细胞外, 大多须黏附于特定的细胞外基质上存活, 称为锚着依赖性(anchorage dependence). 一般认为, 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, 食管癌细胞经不同浓度的槲皮素处理后, 软琼脂集落数明显减少, 且呈浓度依赖性($P<0.05$).

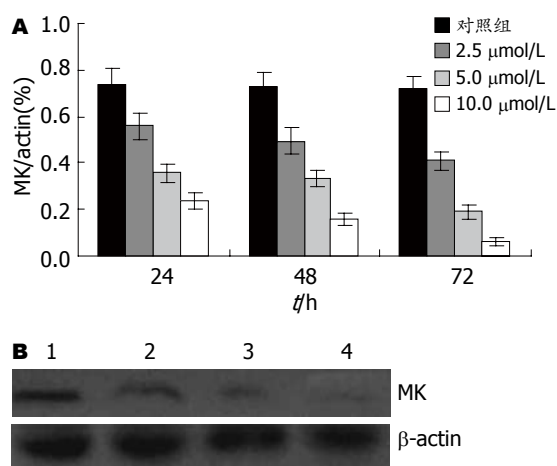


图 4 槲皮素对食管癌细胞MK蛋白水平的影响. B: Western blot检测(48 h); 1: 对照组; 2: 2.5 μmol/L; 3: 5.0 μmol/L; 4: 10.0 μmol/L.

肿瘤细胞侵袭转移是一个复杂的过程. 先从原发肿瘤上脱落, 侵入细胞外基质, 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. 本研究所用的基质胶(matrigel)含有IV型胶原、层黏蛋白、巢蛋白(entactin)、硫酸肝素蛋白多糖等成分, 与细胞外基质的成分非常相近. 因此, 能有效地在体外模拟肿瘤细胞的侵袭过程. 在体外侵袭实验中, 我们观察到EC109胞具有较强的侵袭能力, 而经过Que处理的癌细胞, 穿过聚碳酸酯膜的细胞数量减少, 且呈浓度依赖性($P<0.05$). 由此说明, 槲皮素可抑制食管癌细胞的侵袭能力.

MK基因是1988年Caltagirone *et al*^[9-10]在视黄酸诱导的小鼠胚胎肿瘤细胞系HM-1细胞cDNA文库中发现的一种新基因, 其后, 在多种动物和人类中均已发现了基因. MK蛋白和另一种相似的细胞因子-多效生长因子(pleiotrophin, PTN)一起归为一类新的肝素结合因子家族(heparin binding factor family)^[9]. 研究发现, MK在许多肿瘤如食管癌、胃癌、结肠癌、胰腺癌、肝细胞癌、肺癌等多种癌细胞和组织中过表达, 而在正常组织中表达很低或不表达^[10-18]. 近来有学者发现, MK基因表达与某些癌细胞侵袭有关^[9]. 因此, MK有可能作为肿瘤标志物在肿瘤的诊断、预后和治疗中发挥作用. 本研究以Que处理食管癌EC109细胞后, 分别以荧光实时定量PCR方法和Western blot检测cripto基因mRNA和蛋白水平, 结果发现, Que处理组MK蛋白和mRNA水平均明显下调, 且呈时间和浓度依赖性($P<0.05$, $P<0.05$). 因此, 我们推测, Que抑制食管癌细胞侵袭, 可能与下调MK基因表达有关.

■ 创新盘点

本研究首次从细胞水平观察了槲皮素对食管癌细胞侵袭的影响, 并从MK基因角度探讨了可能的机理, 具有重要的意义.

同行评价

本研究方法合理,对照可靠,统计方法运用恰当,结果明确,讨论部分能够结合国内外相关文献就研究内容展开重点突出的讨论,并得出相应的结论,具有一定的参考价值。

总之,本研究提示,Que可明显抑制食管癌细胞体外恶性增殖和侵袭能力,下调MK基因表达,可能是重要机制之一。

参考文献

- Hollman PC, Katan MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. *Food Chem Toxicol* 1999; 37: 937-942
- 魏金文, 范钰, 张尤历, 吴莺, 王晓燕, 陈萍. 槲皮素对胃癌细胞增殖的影响及机制探讨. *山东医药* 2007; 47: 14-16
- Devipriya S, Ganapathy V, Shyamaladevi CS. Suppression of tumor growth and invasion in 9,10 dimethyl benz(a) anthracene induced mammary carcinoma by the plant bioflavonoid quercetin. *Chem Biol Interact* 2006; 162: 106-113
- Vijayababu MR, Arunkumar A, Kanagaraj P, Venkataraman P, Krishnamoorthy G, Arunakaran J. Quercetin downregulates matrix metalloproteinases 2 and 9 proteins expression in prostate cancer cells (PC-3). *Mol Cell Biochem* 2006; 287: 109-116
- Caltagirone S, Rossi C, Poggi A, Ranelletti FO, Natali PG, Brunetti M, Aiello FB, Piantelli M. Flavonoids apigenin and quercetin inhibit melanoma growth and metastatic potential. *Int J Cancer* 2000; 87: 595-600
- 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
- Fan Y, Zhang YL, Wu Y, Zhang W, Wang YH, Cheng ZM, Li H. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses invasion through inducing anoikis in human colon cancer cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 428-434
- 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
- Takada T, Toriyama K, Muramatsu H, Song XJ, Torii S, Muramatsu T. Midkine, a retinoic acid-inducible heparin-binding cytokine in inflammatory responses: chemotactic activity to neutrophils and association with inflammatory synovitis. *J Biochem* 1997; 122: 453-458
- Shimada H, Nabeya Y, Tagawa M, Okazumi S, Matsubara H, Kadomatsu K, Muramatsu T, Ikematsu S, Sakuma S, Ochiai T. Preoperative serum midkine concentration is a prognostic marker for esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2003; 94: 628-632
- Wu X, Yao J, Li Q, Zheng H, Xin Y. Expression of midkine in benign, premalignant and malignant vulvar tumors. *Chin Med Sci J* 2002; 17: 148-152
- Barthlen W, Flaadt D, Girgert R, Conzelmann J, Schweizer P, Zugmaier G, Buck M, Knabbe C. Significance of heparin-binding growth factor expression on cells of solid pediatric tumors. *J Pediatr Surg* 2003; 38: 1296-1304
- Kadomatsu K, Muramatsu T. Midkine and pleiotrophin in neural development and cancer. *Cancer Lett* 2004; 204: 127-143
- Obata Y, Kikuchi S, Lin Y, Yagyu K, Muramatsu T, Kumai H. Serum midkine concentrations and gastric cancer. *Cancer Sci* 2005; 96: 54-56
- Maehara H, Kaname T, Yanagi K, Hanzawa H, Owan I, Kinjou T, Kadomatsu K, Ikematsu S, Iwamasa T, Kanaya F, Naritomi K. Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 358: 757-762
- Krzystek-Korpacz M, Matusiewicz M, Diakowska D, Grabowski K, Blachut K, Kustrzeba-Wojcicka I, Banas T. Serum midkine depends on lymph node involvement and correlates with circulating VEGF-C in oesophageal squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2007; 12: 403-413
- Maeda S, Shinchi H, Kurahara H, Mataka Y, Noma H, Maemura K, Aridome K, Yokomine T, Natsugoe S, Aikou T, Takao S. Clinical significance of midkine expression in pancreatic head carcinoma. *Br J Cancer* 2007; 97: 405-411
- Tanabe K, Matsumoto M, Ikematsu S, Nagase S, Hatakeyama A, Takano T, Niikura H, Ito K, Kadomatsu K, Hayashi S, Yaegashi N. Midkine and its clinical significance in endometrial carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 1125-1130
- Ren YJ, Zhang QY. Expression of midkine and its clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 2006-2010

编辑 李军亮 电编 郭海丽