

文章编号:1001-6880(2016)11-1691-08

# 海参皂苷 Des-echinoside A 通过 NF-κB 信号通路抑制人肺巨细胞癌 95D 细胞转移

赵 芹<sup>1\*</sup>,林 栋<sup>2</sup>,刘海梅<sup>1</sup>,邢少华<sup>1</sup><sup>1</sup>鲁东大学食品工程学院,烟台 264025;<sup>2</sup>滨州医学院药学院,烟台 264003

**摘要:**采用高速逆流色谱法从革皮氏海参中分离纯化得到皂苷单体 Des-echinoside A,研究了 Des-echinoside A 对高转移人肺巨细胞癌 95D 细胞增殖和转移的影响及其分子机制。结果显示:Des-echinoside A 能显著降低 95D 细胞增殖( $P < 0.01$ )、迁移( $P < 0.01$ )、侵袭( $P < 0.01$ )以及粘附能力( $P < 0.01$ );还能显著抑制鸡胚尿囊膜(chick embryo chorioallantoic membrane, CAM)上的血管新生。Des-echinoside A 能显著降低 uPA、MMP-2/-9、VEGF 和 NF-κB mRNA 的表达( $P < 0.05, P < 0.01$ ),显著上调 TIMP-1/-2 mRNA 的表达( $P < 0.01$ ),提示 Des-echinoside A 可能通过调控 NF-κB 信号通路抑制 95D 细胞转移。

**关键词:**皂苷;95D 细胞;转移;血管新生;信号通路

中图分类号:R285

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2016.11.002

## Triterpene Glycoside Des-echinoside A Inhibits Human Lung Cancer Cell Line 95D Metastasis via NF-κB Signaling Pathway

ZHAO Qin<sup>1\*</sup>, LIN Dong<sup>2</sup>, LIU Hai-mei<sup>1</sup>, XING Shao-hua<sup>1</sup><sup>1</sup>School of Food Engineering, Ludong University, Yantai 264025, China;<sup>2</sup>School of Pharmacy, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China

**Abstract:** A triterpene glycoside Des-echinoside A was separated by high speed counter current chromatography from sea cucumber *Pearsonothuria graeffei*. The effects and molecular mechanism of Des-echinoside A on tumor metastasis in high-metastatic (95D) human lung cancer cells were evaluated. The results showed that Des-echinoside A could inhibit 95D cell proliferation ( $P < 0.01$ ), migration ( $P < 0.01$ ), invasion ( $P < 0.01$ ), adhesion ( $P < 0.01$ ) and decrease the blood vessel growth on the chick embryo chorioallantoic membrane(CAM) remarkably. Des-echinoside A could also reduce the mRNA expression of uPA, MMP-2/-9, VEGF, NF-κB ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), and promote the mRNA expression of TIMP-1/-2 ( $P < 0.01$ ). It is suggested that Des-echinoside A could prevent the metastasis through specific inhibition of NF-κB signaling pathway.

**Key words:** triterpene glycoside; 95D cell; metastasis; angiogenesis; signaling pathway

革皮氏海参(*Pearsonothuria graeffei*)是一种主要分布于台湾和南沙群岛等海域的低值海参,其体内皂苷含量丰富,高达 3.51%,可作为海参皂苷的良好生物来源<sup>[1]</sup>。海参皂苷属于三萜类化合物<sup>[2]</sup>,作为海参中重要的生物活性成分之一,已被证实具有抗菌<sup>[3]</sup>、调节脂质代谢<sup>[4]</sup>和降血压<sup>[5]</sup>等生理活性,其显著的抗肿瘤细胞增殖活性更是引起广泛的关注<sup>[6,7]</sup>。

Des-echinoside A 最早由 Kitagawa 等<sup>[8]</sup>在 1980 年对海参皂苷 echinoside A 进行化学脱硫反应获

得,而它作为天然产物首次是从革皮氏海参中分离得到<sup>[1]</sup>。本课题组前期研究发现 Des-echinoside A 具有显著的体内体外抑制肿瘤生长的活性<sup>[9]</sup>,但对其抗肿瘤转移的作用及机制尚未深入探讨。本论文选用具有高转移潜能的 95D 细胞为研究对象,深入研究了 Des-echinoside A 对肿瘤迁移、侵袭、粘附以及血管新生等方面的影响,为挖掘海参皂苷的药理活性,促进低值海参的精深加工打下理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

皂苷单体 Des-echinoside A,以革皮氏海参(*P. graeffei*)为原料,通过高速逆流色谱法分离获得,其

收稿日期:2016-07-18 接受日期:2016-09-21

基金项目:山东省自然科学基金(ZR2015PC002;ZR2014BP016);

鲁东大学人才引进基金(LY2012011)

\*通讯作者 Tel:86-535-6913985;E-mail:candyffff@163.com

分子式为  $C_{54}H_{88}O_{23}$ , 相对分子量为 1104。化学结构式见图 1。

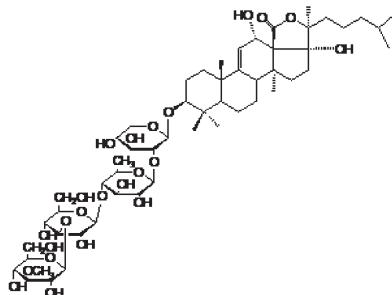


图 1 Des-echinoside A 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of Des-echinoside A

RPMI-1640、F-12K 培养基、胎牛血清和新生牛血清均购买于美国 Gibco 公司; MTT 购自美国 Amresco 公司; Matrigel 购自美国 BD 公司; TRIzol Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; DNA Marker DL2000 和 TaqDNA 聚合酶购自大连 TaKaRa 生物工程有限公司; M-MLV Reverse Transcriptase 购自美国 Promega 公司; 引物和 Random Primer 购自上海生工生物技术有限公司; 其它试剂为国产分析纯。

## 1.2 仪器与设备

CKX41 型倒置显微镜, 日本 Olympus 公司产品; 680 型酶标仪, 美国 BIO-RAD 公司产品; Transwell 小室, 美国 Corning 公司产品; BJ5060UV 型  $CO_2$  培养箱, 德国 Heraeus 公司产品; TC-96 Life Pro 基因扩增仪, 杭州博日科技有限公司产品; JS-780 全自动凝胶成像分析仪, 上海培清科技有限公司产品。

## 1.3 实验方法

### 1.3.1 细胞培养

人肺巨细胞瘤细胞株 95D 和人脐静脉内皮细胞株 HUVEC 均由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供。95D 细胞培养于含 10% 新生牛血清的 RPMI-1640 培养基中; HUVEC 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 F-12K 培养基中, 其中均含  $1 \times 10^5 U/L$  的青/链霉素。细胞均置于 37 °C、5%  $CO_2$  饱和湿度的培养箱中培养。细胞长成单层融合状态后, 以 0.25% 的胰蛋白酶消化传代。实验所用细胞均为对数生长期细胞。

### 1.3.2 MTT 法检测 Des-echinoside A 对 95D 细胞增殖活性的影响

95D 细胞以  $6 \times 10^4$  个/mL 的浓度接种于 96 孔板内, 100  $\mu L$ /孔。培养 24 h 后, 吸弃培养基, 分别

加入含不同浓度 Des-echinoside A (0、0.091、0.23、0.45 和 0.91  $\mu M$ ) 的完全培养基 200  $\mu L$ , 每组 4 个复孔, 继续培养 6、12 和 24 h。采用 MTT 法测定吸光度  $OD_{570}$  值, 以样品组  $OD_{570}$  值/对照组  $OD_{570}$  值表示细胞增殖活性, 并拟合曲线求出  $IC_{50}$ 。

### 1.3.3 Transwell 小室法检测 Des-echinoside A 对 95D 细胞迁移、侵袭的影响

95D 细胞以无血清 RPMI-1640 培养基调整细胞浓度至  $5 \times 10^5$  个/mL。迁移实验以 100  $\mu L$ /孔细胞悬液加入未经包被的 Transwell 小室上室中; 侵袭实验中 Transwell 小室预先加入 500  $\mu g/mL$  Matrigel 包被模拟基底膜, 再加入 100  $\mu L$ /孔细胞。各组分别加入含不同浓度 Des-echinoside A 无血清培养基 150  $\mu L$ , 使样品终浓度为 0、0.20 和 0.40  $\mu M$ 。下室加入 750  $\mu L$  含 20% 胎牛血清的完全培养基进行诱导。孵育 24 h 后, 取出 Transwell 小室, 用棉签擦去膜上层的细胞, 穿过基底膜的细胞粘附于膜下层, 以 2.5% 的戊二醛固定 0.5 h 后, 采用 0.1% 结晶紫染色 15 min。每孔随机取 5 个视野, 计数视野的细胞数并求平均值, 计算迁移率和侵袭率, 公式如下:

$$\text{迁移率(侵袭率)} = \frac{\text{样品组细胞平均数}}{\text{对照组细胞平均数}} \times 100\%$$

### 1.3.4 粘附实验检测 Des-echinoside A 对 95D 细胞粘附能力的影响

#### 1.3.4.1 同基质间粘附的影响

95D 细胞以  $1.5 \times 10^4$  个/mL 的浓度接种于 24 孔板, 1 mL/孔, 贴壁 24 h。吸弃培养基, 加入含不同浓度 Des-echinoside A (0、0.20 和 0.40  $\mu M$ ) 的完全培养基, 分别继续培养 12 h 和 24 h。收集细胞并以无血清培养基调整细胞浓度至  $2 \times 10^5$  个/mL, 以 100  $\mu L$ /孔加入预先经 Matrigel 包被的 96 孔板中, 每组 4 个复孔。置于培养箱孵育 1.5 h 后, 加入 PBS 洗去未粘着的细胞。采用 MTT 法测定吸光度  $OD_{570}$  值, 并计算肿瘤细胞与基质间粘附率:

$$\text{粘附率} = \frac{\text{样品组 } OD_{570}}{\text{对照组 } OD_{570}} \times 100\%$$

#### 1.3.4.2 同 HUVEC 细胞间粘附的影响

HUVEC 细胞以  $2 \times 10^5$  个/mL 接种于 96 孔板中, 100  $\mu L$ /孔, 贴壁 24 h。吸弃培养基, 加入 PBS 洗涤 2 次, 以  $2 \times 10^4$  个/孔加入预先经不同浓度 Des-echinoside A (0、0.20 和 0.40  $\mu M$ ) 预处理 12 h 和 24 h 的 95D 细胞。置于培养箱孵育 1.5 h 后, 用 PBS 洗去未粘着的细胞。采用 MTT 法测定  $OD_{570}$

值,计算粘附率。公式同 1.3.4.1。

### 1.3.5 鸡胚尿囊膜(chick embryo chorioallantoic membrane,CAM)法检测 Des-echinoside A 对血管生成的影响

参照文献<sup>[10]</sup>,挑选新鲜种蛋,置于 37 ℃ 孵箱中孵育。于第 9 d,在无菌条件下暴露出 CAM。将直径 1 cm 的圆滤纸片置于 CAM 上血管较稀疏的位置,然后加入 20 μL 不同浓度的 Des-echinoside A (0、11.32 和 22.64 μM)。继续孵育 24 h 后,以 2.5% 的戊二醛固定 0.5 h,以加样区为中心剪下尿囊膜,于解剖镜下观察并拍照。

### 1.3.6 RT-PCR 法检测 Des-echinoside A 对 95D 细胞转移相关基因表达的影响

95D 细胞以每孔  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板中,2 mL/孔,贴壁 24 h。吸弃培养基,加入含不同浓度

Des-echinoside A (0、0.20 和 0.40 μM) 的完全培养基,继续培养 24 h。收集细胞,以 PBS 洗涤后加入 TRIzol 提取总 RNA,进行 PCR 反应,检测各组细胞转移相关基因:尿激酶型纤溶酶原激活剂(urokinase plasminogen activator,uPA)、基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMP)-2、MMP-9、金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of matrix metalloproteinases,TIMP)-1、TIMP-2、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和核转录因子(nuclear transcription factor-κB,NF-κB)的表达。引物序列、退火温度、循环数和产物大小见表 1。PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 45 s;55 ℃ 退火 30 s;72 ℃ 延伸 45 s;最后 72 ℃ 延伸 10 min。扩增产物经电泳后,在凝胶成像系统内拍照,以目的基因与 β-actin 扩增条带的灰度比值代表基因相对表达水平。

表 1 引物序列、退火温度、循环数和产物大小

Table 1 Primer sequences, annealing temperature, cycles and length of products

基因 Gene		引物序列 Primer sequences	退火温度 Annealing temperature (℃)	循环数 Cycle (time)	产物大小 Product length (bp)
uPA	上游	ACTACTACGGCTCTGAAGTCACCA	63.5	29	200
	下游	GAAGTGTGAGACTCTCGTAGAC			
MMP-2	上游	TGGATGATGCCTTGCTCG	54	32	564
	下游	TCTTGTGCGCGTCGTAGTC			
MMP-9	上游	GAGAAGAGAGGGCCAGC	58.5	30	178
	下游	ACGTGACCTATGACATCCTGC			
TIMP-1	上游	TGTGGGACCTGTGAACTAT	54	32	267
	下游	TGTTGTTGCTGTGGCTGAT			
TIMP-2	上游	TGTTCGCTCCTGTATGGT	54	30	194
	下游	TCTGGCTCAAATGCTTCC			
VEGF	上游	GTGCAAGGCCAGGGCATGGG	57	30	167
	下游	GTCCTGAAGCTCCCCAACTCC			
NF-κB	上游	CTATGAGGTCTCTGGGGT	55	32	235
	下游	GGTAAAGCTGAGTTGCGG			
$\beta$ -actin	上游	GTTGCGTTACACCCTTCTTG	59.5	26	152
	下游	TGTCACCTTCACCGTTCCA			

## 1.4 统计学分析

采用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析,同时进行 LSD 和 SNK 组间比较,以  $P < 0.05$  为差异显著。实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 对 95D 细胞增殖活性的影响

如图 2 所示,Des-echinoside A 作用于 95D 细胞后显著抑制了细胞的增殖,且呈现显著的时效和量效关系。其中,Des-echinoside A 对 95D 细胞 12 h 和 24 h 的  $IC_{50}$  值分别为 0.64 μM 和 0.38 μM。刘治东<sup>[10]</sup>研究发现,革皮氏海参皂苷 Holothurin A1 和 24-Dehydroechinoside A 对 Hep G2、B16 和 S<sub>180</sub> 等 6 株肿瘤细胞 24 h 的  $IC_{50}$  为 2.49 ~ 19.67 μM。另外,有研究报道了黄疣海参皂苷 hillaside A 和 hillaside B 对受试的 10 株肿瘤细胞  $IC_{50}$  值为 0.15 ~ 3.20

如图 2 所示,Des-echinoside A 作用于 95D 细胞

mg/L<sup>[11]</sup>。棕环海参皂苷 fuscocineroside A 作用于人源性胶质母细胞瘤细胞 U251 48 h 的 IC<sub>50</sub> 值为 7.8 μM<sup>[12]</sup>。对比可见, Des-echinoside A 对肿瘤细胞的 IC<sub>50</sub> 值远小于其它海参皂苷, 其抑制肿瘤增殖的活

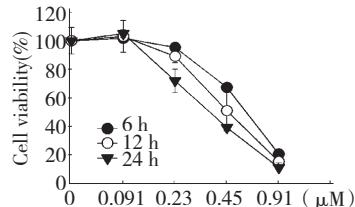


图 2 Des-echinoside A 对 95D 细胞增殖活性的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 2 Effects of Des-echinoside A on the proliferation activities of 95D ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

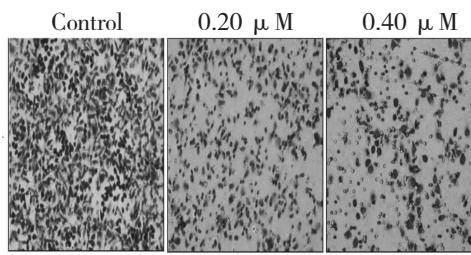


图 3 Des-echinoside A 对 95D 细胞侵袭率的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 3 Effects of Des-echinoside A on the invasion rate of 95D ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

注: 20 × 物镜, 与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$

Note: 20 × object, \*\*  $P < 0.01$  vs control

### 2.3 对 95D 细胞迁移能力的影响

迁移能力是恶性肿瘤的重要特征, 为肿瘤细胞脱离原位, 转移至其他部位创造了条件。由图 4 可见, 经 Des-echinoside A 处理后, 穿过 Transwell 小室膜的细胞数目显著减少, 95D 细胞的迁移能力显著受到抑制。同对照组相比, Des-echinoside A 低、高剂量组迁移率分别降低了 29.2% 和 59.8% ( $P <$

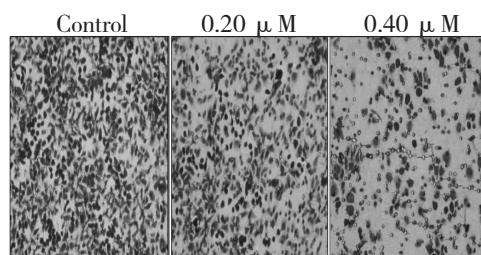


图 4 Des-echinoside A 对 95D 细胞迁移率的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 4 Effects of Des-echinoside A on the migration rate of 95D ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

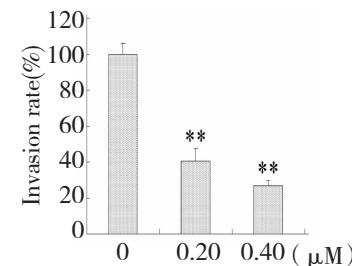
注: 20 × 物镜, 与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$

Note: 20 × object, \*\*  $P < 0.01$  vs control

性效果非常显著。

### 2.2 对 95D 细胞侵袭能力的影响

肿瘤细胞降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 是局部侵袭和转移的必需步骤, 也为其突破基底膜 (basement membrane, BM) 并进一步迁移打下了基础。本实验以穿过重组 Matrigel 的细胞数目表示其侵袭能力。由图 3 可见, 经高营养培养基诱导, 对照组 95D 细胞可显著降解重组 Matrigel。24 h 后, 穿过 Transwell 小室到达底部的细胞几乎铺满底面。经 Des-echinoside A 处理后, 穿越 Transwell 小室的细胞数目显著减少, 其中低、高剂量组 95D 细胞侵袭率分别下降了 59.5% 和 73.4% ( $P < 0.01$ ), 表明 Des-echinoside A 可显著降低 95D 细胞的侵袭能力。



0.01), 且量效关系显著, 表明 Des-echinoside A 可显著降低肿瘤细胞的迁移能力。

### 2.4 对 95D 细胞粘附能力的影响

通过侵袭和迁移进入血循环的肿瘤细胞, 必须要粘附到血管内壁上, 才能进一步穿过血管壁, 继续生长繁殖形成新的转移灶。肿瘤细胞的粘附作用既包括与血管内皮细胞粘附, 也包括与基底膜粘附, 因

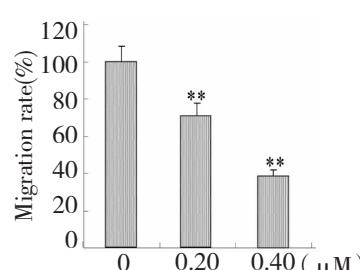


图 4 Des-echinoside A 对 95D 细胞迁移率的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 4 Effects of Des-echinoside A on the migration rate of 95D ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

此我们分别检测了 Des-echinoside A 对 95D 细胞同 HUVEC 和 Matrigel 的粘附能力的影响。

由图 5A 可见,经 Des-echinoside A 作用后,各组细胞同 HUVEC 的粘附率均显著降低,且呈现明显的时效和量效关系。其中,作用 24 h 后,Des-echinoside A 低、高剂量组 95D 细胞同 HUVEC 的粘附率分别下降了 15.72% 和 27.16% ( $P < 0.01$ )。Des-

echinoside A 对 95D 细胞同基质间的粘附能力的影响见图 5B。与对照组相比,Des-echinoside A 显著抑制了 95D 细胞同 Matrigel 之间的粘附作用。其中,作用 24 h 后,Des-echinoside A 低、高剂量组粘附率分别下降了 29.67% 和 56.46% ( $P < 0.01$ )。综上可见,Des-echinoside A 可同时显著抑制肿瘤细胞同血管内皮细胞和基质的粘附。

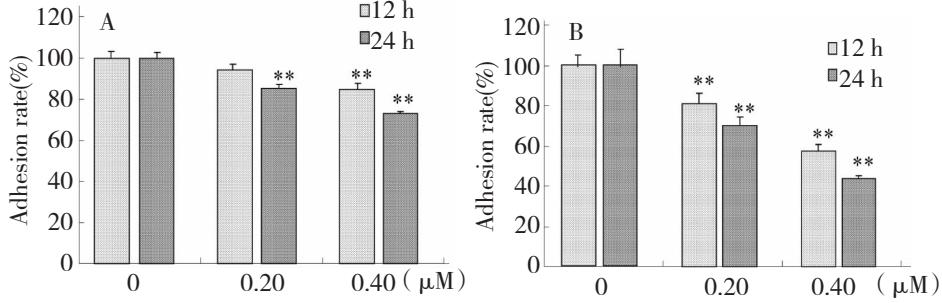


图 5 Des-echinoside A 对 95D 细胞粘附率的影响( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 5 Effects of Des-echinoside A on the adhesion rate of 95D ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ; A:95D 细胞同 HUVEC 粘附; B:95D 细胞同 Matrigel 粘附

Note: \*\*  $P < 0.01$  vs control; A:the adhesion of 95D cells and HUVEC, B:the adhesion of 95D cells and Matrigel

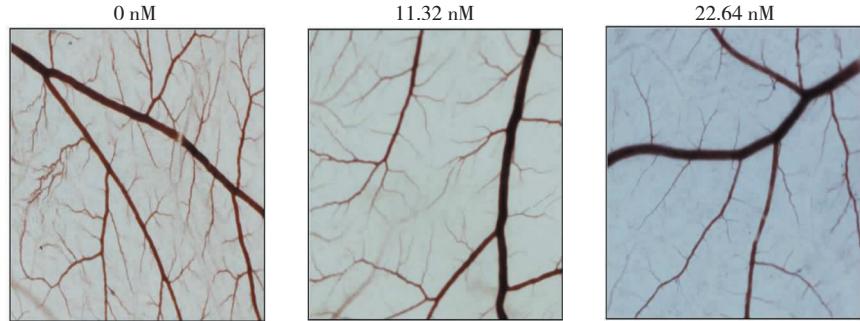


图 6 Des-echinoside A 对 CAM 血管生长情况的影响

Fig. 6 Effects of Des-echinoside A on the angiogenesis of CAM

## 2.5 对 CAM 上血管生长的影响

鸡胚绒毛尿囊膜实验是研究血管生成的理想体内模型。其中,在鸡胚发育的 5~10 d 内,尿囊膜上新生毛细血管不断出现,是用来观察血管形成的最佳时期。由图 6 可见,鸡胚发育的第 10 d,正常对照组的 CAM 上血管网络分支多且清晰可见,毛细血管分布丰富,长势旺盛。经 Des-echinoside A 处理后,各组 CAM 上毛细血管的数目均显著减少,且颜色变浅,结构模糊,由此可见 Des-echinoside A 具有抑制血管新生的活性。

## 2.6 对 95D 细胞转移相关基因 mRNA 表达的影响

研究发现高转移肺癌细胞 95D 中 uPA 呈高表达,且其 uPA 表达水平与侵袭转移能力呈正相

关<sup>[13]</sup>。我们首先检测了 Des-echinoside A 对 95D 细胞中 uPA 表达的影响,实验结果见图 7。与对照组相比,Des-echinoside A 显著下调了 95D 细胞中 uPA mRNA 的表达,其中高剂量组的表达量下降了 61.9% ( $P < 0.01$ )。

MMPs 是一组锌依赖性蛋白水解酶,可特异性降解 ECM 形成的物理屏障,与肿瘤生长和转移密切相关。TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制剂,能与 MMPs 1:1 结合,封闭其催化活性<sup>[14]</sup>。由图 8 可见,经 Des-echinoside A 作用后,95D 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 的表达水平显著降低,同时 TIMP-1 和 TIMP-2 的 mRNA 的表达水平显著上调。其中,与对照组相比,Des-echinoside A 高剂量组细胞

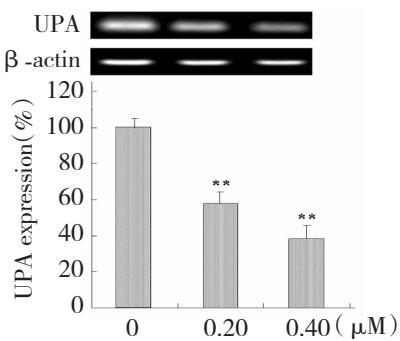


图 7 Des-echinoside A 对 95D 细胞 uPA mRNA 表达的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 7 Effects of Des-echinoside A on the uPA mRNA expression of 95D ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

注: 与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$

Note: \*\*  $P < 0.01$  vs control

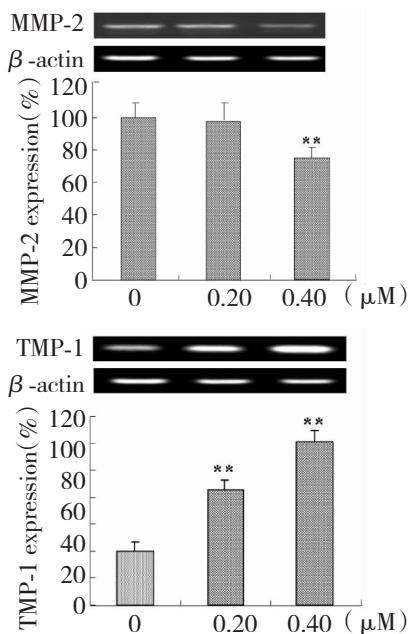


图 8 Des-echinoside A 对 95D 细胞 MMP-2/-9 和 TIMP-1/-2 mRNA 表达的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 8 Effects of Des-echinoside A on the MMP-2/-9 and TIMP-1/-2 mRNA expression of 95D ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

注: 与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$

Note: \*\*  $P < 0.01$  vs control

蛋白表达量分别降低了 9.95% ( $P < 0.05$ ) 和 25.9% ( $P < 0.01$ )。

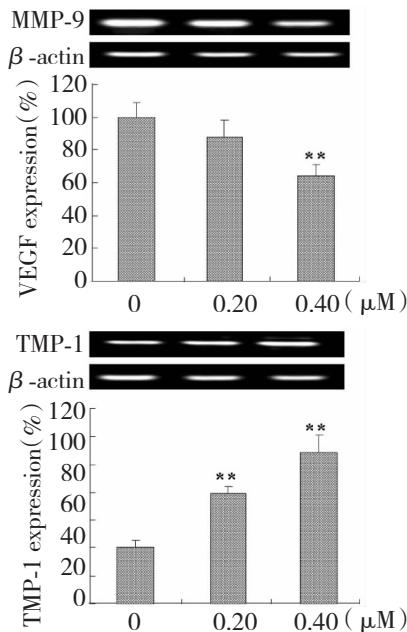
### 3 讨论与结论

肿瘤转移是恶性肿瘤最主要的生物学特征,包括局部浸润的产生、ECM 和 BM 的降解、肿瘤细胞与血管内皮细胞的粘附、随血行传播后形成新转移

MMP-2/TIMP-2 和 MMP-9/TIMP-1 比值分别下降到 25.0% 和 27.5% ( $P < 0.01$ )。

VEGF 是公认的调节血管生成最重要的细胞因子,它可以诱导内皮细胞分化及促进血管网络形成等,还可以诱导内皮细胞分泌蛋白酶类降解 ECM, 促进肿瘤细胞的侵袭和转移。由图 9 可见, 不同剂量的 Des-echinoside A 均能显著下调 95D 细胞 VEGF mRNA 的表达。与对照组细胞相比, Des-echinoside A 低、高剂量组 95D 细胞 VEGF mRNA 的表达量平均下降了 51.6% ( $P < 0.01$ )。

NF-κB 是一类与肿瘤的转移密切相关的核转录因子,其激活过程中伴有许多与浸润、转移相关的重要因子的活化,如 uPA、MMPs、和 VEGF 等<sup>[15]</sup>。由图 10 可见, Des-echinoside A 显著降低了 95D 细胞 NF-κB mRNA 的表达量,其中低、高剂量组 NF-κB



表达量分别降低了 9.95% ( $P < 0.05$ ) 和 25.9% ( $P < 0.01$ )。灶等过程。当肿瘤恶性增殖超过  $2 \text{ mm}^3$  之后,则必须依赖新生血管的生成才能继续生长。目前,抑制肿瘤细胞增殖、迁移、粘附和血管新生等仍是抗肿瘤转移研究的关键内容。本研究发现, Des-echinoside A 抑制高转移 95D 细胞增殖的活性显著优于其它海参皂苷,并且对肿瘤侵袭、迁移、粘附和血管新生等多个过程均具有显著的抑制作用,是一种非常有

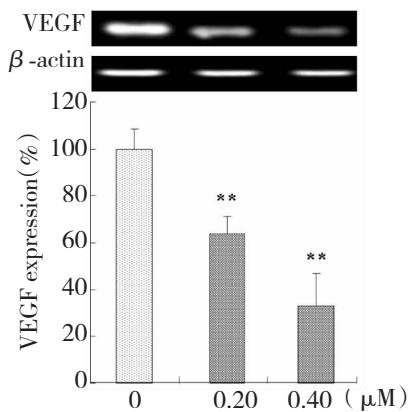


图 9 Des-echinoside A 对 95D 细胞 VEGF mRNA 表达的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 9 Effects of Des-echinoside A on the VEGF mRNA expression of 95D ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$

Note: \*\*  $P < 0.01$  vs control

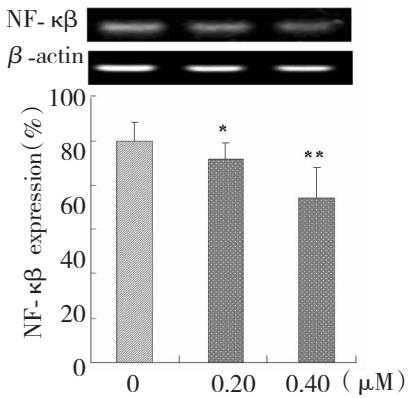


图 10 Des-echinoside A 对 95D 细胞 NF-κB mRNA 表达的影响 ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

Fig. 10 Effects of Des-echinoside A on the NF-κB mRNA expression of 95D cells ( $n = 4, \bar{x} \pm s$ )

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Note: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control

潜力的抗肿瘤转移活性成分。

肿瘤细胞离开原发部位发生浸润转移,首先要激活蛋白溶解酶,降解 ECM 和 BM。MMPs 可特异性降解 ECM,与肿瘤生长和转移密切相关<sup>[16]</sup>,TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制剂,其中,TIMP-1 则对 MMP-9 有较高的选择抑制作用,而 TIMP-2 可特异性抑制 MMP-2 的活性。本实验结果显示,Des-echinoside A 可显著降低 MMP-9/TIMP-1 和 MMP-2/TIMP-2 的比率,从而保护 ECM 的完整性,抑制肿瘤转移。

有研究发现,在肿瘤转移过程中,MMPs 既能促进 ECM 和 BM 中 VEGF 的释放,也可诱导内源性 VEGF 表达<sup>[17]</sup>。本研究结果显示,Des-echinoside A 可显著减少 CAM 上毛细血管的生成,并能显著降低肿瘤细胞中 VEGF 的表达。提示 Des-echinoside A 可能通过下调 MMPs 表达,进而影响 VEGF 及其下游的信号通路的表达,抑制肿瘤血管新生。

uPA 是尿激酶型纤溶系统的重要成员,它可以直接激活纤溶酶,降解 ECM,也可直接激活 MMPs 和 VEGF,参与肿瘤转移<sup>[18]</sup>,提示 Des-echinoside A 抑制 MMPs 和 VEGF 的表达可能与抑制上游因子 uPA 相关。

NF-κB 是一类重要的核转录因子,参与肿瘤的发生、转移以及血管生成等多个过程的基因调控。有研究发现,uPA 的启动子上有 NF-κB 的作用靶点,NF-κB 可通过增强 uPA 的表达促进肿瘤浸润转移的进展<sup>[19]</sup>。Helbig 等<sup>[20]</sup>研究发现 NF-κB 可以直接调控肿瘤细胞和基质中 uPA 和 MMPs 的表达,促进癌细胞的转移。此外,也有研究证实 VEGF 启动子上也存在 NF-κB 的特异性结合位点,抑制 NF-κB 的表达可下调 VEGF 的表达<sup>[21]</sup>。本研究结果显示,Des-echinoside A 能显著下调 95D 细胞中 NF-κB 的表达,提示 Des-echinoside A 对 MMP、VEGF 和 uPA 的抑制作用,依赖其上游转录因子 NF-κB 的调控。

综上所述 Des-echinoside A 抑制 95D 细胞转移的机制可能是通过抑制 NF-κB 信号通路,进而抑制 uPA 的活化,减少 MMPs 和 VEGF 激活和释放,保护 ECM 和 BM 结构的完整,最终抑制肿瘤细胞的转移和血管新生。

## 参考文献

- 1 Dong P(董平). Studies on the isolation, identification, structure-modification and bioactivities of triterpene glycosides in *Pearsonothuria graeffei*. Qingdao: Ocean University of China (中国海洋大学), PhD. 2008.
- 2 Han YQ(韩玉谦), Feng XM(冯晓梅), Guan HS(管华诗). The progress in research of sea cucumber glycosides. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2005, 17: 140-143.
- 3 Soltan M, Baharara J, Namvar F. Evaluation of cytotoxicity and anti-inflammatory effects of saponin isolated from *Holothuria leucospilota* sea cucumber. *J Cell Immun*, 2015, 1: 17-18.
- 4 Wang D(王丹), Ding L(丁琳), Dong P(董平), et al. Reg-

- ulation of cholesterol metabolism by sea cucumber saponins in rats with fatty liver. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2016, 38: 67-70.
- 5 Zhang LY(张铃玉), Song SS(宋姗姗), Xu J(徐杰), et al. Effects of sea cucumber saponin on blood pressure in obese mice. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2015, 31: 1169-1174.
- 6 Liu J(刘洁), Wang XY(王先友), Han H(韩华). Screening and isolation of antitumor saponins from the sea cucumber *Holothuria atra* Jaeger. *Chin J Mar Drugs* (中国海洋药物), 2014, 33:23-30.
- 7 Yu S, Ye XW, Lu C, et al. Cytotoxic and anti-colorectal tumor effects of sulfated saponins from sea cucumber *Holothuria moebii*. *Phytomedicine*, 2015, 22:1112-1119.
- 8 Kitagawa I, Inamoto T, Fuchida M, et al. Structures of Echinoside A and B, two antifungal oligoglycosides from the sea cucumber *Actinopyga echinata* (Jaeger). *Chem Pharm Bull*, 1980, 23:1651-1653.
- 9 Zhao Q, Xue Y, Wang JF, et al. In vitro and in vivo anti-tumor activities of echinoside A and ds-echinoside A from *Pearsonothuria graeffei*. *J Sci Food Agric*, 2012, 92:965-974.
- 10 Liu ZD(刘治东). The investigation of the anti-tumor effects and mechanisms of *Pearsonothuria graeffei* saponins. Qingdao: Ocean University of China(中国海洋大学), MSc. 2009.
- 11 Yin YH(尹一恒), Zhang X(章翔), Cheng G(程光), et al. Research on suppression of fuscocineroside A on proliferation of human glioblastoma U251 cell. *Chin J Neurosurg Dis Res*, 2009, 8:19-22.
- 12 Zhang JJ(张佳佳), Zhu KQ(朱可奇), Wu J(巫军), et al. Study on *in vitro* antifungal and antitumor activities of hillaside A and hillaside B from sea cucumber *Holothuria nobilis*. *China Pharm* (中国药业), 2014, 23:20-22.
- 13 He C, He P, Li P, et al. Analysis of expression of components in the plasminogen activator system in high-and low metastatic human lung cancer cells. *J Cancer Res Clin*, 2001, 127: 180-186.
- 14 Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, et al. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell B*, 2008, 40:1362-1378.
- 15 Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2:161-174.
- 16 Chen XF(陈晓锋), Gu ZL(顾振纶), Liang ZQ(梁中琴), et al. Progress in study of matrix metalloproteinases and tumour invasion and metastasis. *Chinese Pharm Bull* (中国药理学通报), 2001, 17:253-256.
- 17 Belotti D, Paganini P, Manenti L, et al. Matrix metalloproteinases (MMP9 and MMP2) induce the release of vascular endothelial growth factor (VEGF) by ovarian carcinoma cells. *Cancer Res*, 2003, 63:5224-5229.
- 18 Mekkawy AH, Pourgholami MH, Morris DL. Involvement of urokinase-type plasminogen activator system in cancer: an overview. *Med Res Rev*, 2014, 34:918-956.
- 19 Kuerer HM, Newman LA, Fornage BD, et al. Role of axillary lymph node dissection after tumor downstaging with induction chemotherapy for locally advanced breast cancer. *Ann Surg Oncol*, 1998, 5:673-680.
- 20 Helbig G, Christopherson KW, Bhat-Nakshatri P, et al. NF- $\kappa$ B promotes breast cancer cell migration and metastasis by inducing the expression of the chemokine receptor CXCR4. *J Biol Chem*, 2003, 278:21631-21638.
- 21 Factor V, Oliver AL, Panta GR, et al. Roles of Akt/PKB and IKK complex in constitutive induction of NF- $\kappa$ B in hepatocellular carcinomas of transforming growth factor  $\alpha$ /c-myc transgenic mice. *Hepatology*, 2001, 34:32-41.