

- impairing the mitochondria functions[J].Scanning, 2016, 38(6): 825-836.
- [13] SONAWANE VK, MAHAJIAN UB, SHINDE SD, et al. A chemosensitizer drug: disulfiram prevents doxorubicin-induced cardiac dysfunction and oxidative stress in rats[J]. Cardiovascular Toxicology, 2018, 18(11): 1-12.
- [14] TYLER R, MELODRY P, JEFF L, et al. High-throughput screen identifies disulfiram as a potential therapeutic for triple-negative breast cancer cells: interaction with IQ motif-containing factors[J]. Cell Cycle, 2013, 12(18): 3013-3024.
- [15] GUO X, XU B, PANDEY S, et al. Disulfiram/copper complex inhibiting NF- κ B activity and potentiating cytotoxic effect of gemcitabine on colon and breast cancer cell lines[J]. Cancer Letters, 2010, 290(1): 104-113.
- [16] YIP NC, FOMBON IS, LIU P, et al. Disulfiram modulated ROS-MAPK and NF κ B pathways and targeted breast cancer cells with cancer stem cell-like properties[J]. Br J Cancer, 2011, 104(10): 1564-74.
- [17] FOO JB, SAIFUL YL, TOR YS, et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by betulinic acid-rich fraction from Dillenia suffruticosa root in MCF-7 cells involved p53/p21 and mitochondrial signalling pathway[J]. J Ethnopharmacol, 2015, 166: 270-278.
- [18] YUAN Z, JIANG H, ZHU X, et al. Ginsenoside Rg3 promotes cytotoxicity of Paclitaxel through inhibiting NF- κ B signaling and regulating Bax/Bcl-2 expression on triple-negative breast cancer[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 89: 227-232.
- [19] 韩涛, 曹明. 乳腺癌组织 miR-20a 的表达及其对乳腺癌细胞自噬的影响[J]. 安徽医药, 2018, 22(10): 1936-1939.
- [20] ABDEL-MOHSEN MA, AHMED OA, EL-KERM YM, et al. BRCA1 Gene mutations and influence of chemotherapy on autophagy and apoptotic mechanisms in Egyptian breast cancer patients[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(3): 1285-1292.
- [21] ZHANG A, LI JC. Crocetin shifts autophagic cell survival to death of breast cancer cells in chemotherapy[J]. Tumor Biol, 2017, 39(3): 1010428317694536. DOI: 10.1177/1010428317694536.
- [22] 郑家芬, 谭超. 自噬相关基因 Beclin1 沉默对乳腺癌细胞阿霉素敏感性的影响研究[J]. 现代预防医学, 2017, 44(16): 2992-2996.
- [23] WU CL, LIU JF, LIU Y, et al. Beclin1 inhibition enhances paclitaxel-mediated cytotoxicity in breast cancer in vitro and in vivo[J]. Int J Mol Med, 2019, 43(4): 1866-1878.
- [24] 石瑛, 路璐, 王云凤, 等. 自噬对 MCF-7 细胞紫杉醇化疗敏感性的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2018, 53(3): 320-323.
- [25] WU X, XUE X, WANG LH, et al. Suppressing autophagy enhances disulfiram/copper-induced apoptosis in non-small cell lung cancer[J]. Eur J Pharmacol, 2018, 827: 1-12.
- [26] ZHANG X, HU P, DING SY, et al. Induction of autophagy-dependent apoptosis in cancer cells through activation of ER stress: an uncovered anti-cancer mechanism by anti-alcoholism drug disulfiram[J]. Am J Cancer Res, 2019, 9(6): 1266-1281.

(收稿日期: 2019-11-27, 修回日期: 2020-01-05)

引用本文: 刘磊. 白头翁皂苷 B4 调控去乙酰化酶 6 对胃癌细胞转移和放疗敏感性的影响[J]. 安徽医药, 2022, 26(12): 2389-2394. DOI: 10.3969/j.issn.1009-6469.2022.12.012.

◇ 药学研究 ◇



白头翁皂苷 B4 调控去乙酰化酶 6 对胃癌细胞转移和放疗敏感性的影响

刘磊

作者单位: 济南市中西医结合医院脾胃肝胆科, 山东 济南 271100

摘要: **目的** 探讨白头翁皂苷 B4(AB4)对胃癌细胞增殖、迁移、侵袭及放疗敏感性的影响及其分子机制。**方法** 该研究起止时间为 2018 年 4 月至 2019 年 10 月。体外培养人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 与胃癌细胞 HGC-27, 采用不同浓度(25、50、100 μ mol/L)的 AB4 处理 24 h, 通过 MTT 法检测细胞存活率并筛选 AB4 适宜浓度用于后续研究。Transwell 实验检测 HGC-27 细胞迁移及侵袭能力。细胞克隆形成实验检测 AB4 对 HGC-27 细胞放射敏感性的影响; 蛋白质印迹法检测 AB4 对 HGC-27 细胞中去乙酰化酶 6(SIRT6)蛋白表达的影响; 干扰 SIRT6 表达联合 AB4 处理后, 采用上述检测方法检测 HGC-27 细胞增殖、迁移、侵袭及放射敏感性; 蛋白质印迹法检测 DNA 激活蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)、DNA 双链修复蛋白 Rad51、DNA 修复酶 Ku80、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)蛋白表达水平。**结果** 与 NC 组相比, AB4 处理后 HGC-27 细胞存活率[(100.01 $\pm$ 9.57)%比(86.57 $\pm$ 6.58)%、(65.45 $\pm$ 8.45)%、(49.58 $\pm$ 7.96)%]显著降低($P<0.05$), 迁移细胞数[(98.47 $\pm$ 8.79)个比(43.57 $\pm$ 6.53)个]与侵袭细胞数[(88.42 $\pm$ 9.32)个比(45.56 $\pm$ 5.13)个]显著减少($P<0.05$), MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$), SIRT6 蛋白表达水平(0.42 $\pm$ 0.03 比 1.03 $\pm$ 0.15)显著升高($P<0.05$); 细胞克隆形成实验显示 AB4 可降低 HGC-27 细胞存活分数($P<0.05$), 增加增敏比, 降低 Rad51、DNA-PKcs、Ku80 的表达水平($P<0.05$); 干扰 SIRT6 表达联合 AB4 处理后, 迁移细胞数[(44.25 $\pm$ 5.52)个比(86.47 $\pm$ 11.16)个]与侵袭细胞数[(48.56 $\pm$ 6.29)个比(90.17 $\pm$ 12.13)个]显著增多($P<0.05$), MMP-2、MMP-9

蛋白相对表达量显著升高($P<0.05$),细胞存活分数显著升高($P<0.05$),Rad51、DNA-PKcs、Ku80蛋白表达水平明显升高($P<0.05$)。结论 白头翁皂苷 B4 能够通过促进 SIRT6 的表达进而发挥抑制胃癌细胞 HGC-27 增殖、迁移及侵袭的作用,并增加胃癌细胞的放射敏感性。

关键词: 白头翁属; 胃肿瘤; 辐射耐受性; 白头翁皂苷 B4; 基质金属蛋白酶 2; 基质金属蛋白酶 9; 去乙酰化酶 6; 迁移; 侵袭

Effect of Anemoside B4 regulating deacetylase 6 on metastasis and radiosensitivity of gastric cancer cells

LIU Lei

Author Affiliation: Department of Splenic, Gastric and Hepatobiliary Surgery, Jinan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Jinan, Shandong 271100, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of Anemoside B4 on the proliferation, migration, invasion and radiosensitivity of gastric cancer cells and its molecular mechanism. **Methods** The study started and ended from April 2018 to October 2019. GES-1 cells and HGC-27 cells were cultured *in vitro* for 24 h with different concentrations of AB4 (25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$). Cell viability was determined by MTT assay and the appropriate concentration of AB4 was screened for subsequent studies. The Transwell assay was used to detect the migration and invasion of HGC-27 cells. Cell clone formation assay was used to examine the effect of AB4 on radiosensitivity of HGC-27 cells. Western blotting was used to detect the effect of AB4 on the expression of SIRT6 protein in HGC-27 cells. After interfering with SIRT6 expression in combination with AB4 treatment, the above detection methods were used to detect proliferation, migration, invasion and radiosensitivity of HGC-27 cells. The expression levels of DNA-PKcs, Rad51, DNA repair enzymes Ku80, MMP-2 and MMP-9 were detected by Western blotting. **Results** Compared with the NC group, the survival rate of HGC-27 cells [(100.01 $\pm$ 9.57)% *vs.* (86.57 $\pm$ 6.58)%, (65.45 $\pm$ 8.45)%, (49.58 $\pm$ 7.96)%] was significantly decreased after AB4 treatment ($P<0.05$), the number of migrated cells (98.47 $\pm$ 8.79 *vs.* 43.57 $\pm$ 6.53) and the number of invasive cells (88.42 $\pm$ 9.32 *vs.* 45.56 $\pm$ 5.13) were significantly decreased ($P<0.05$), and the expression levels of MMP-2 and MMP-9 were significantly decreased ($P<0.05$), the expression level of SIRT6 protein (0.42 $\pm$ 0.03 *vs.* 1.03 $\pm$ 0.15) was significantly increased ($P<0.05$). Cell clone formation experiments showed that AB4 could decrease the survival fraction of HGC-27 cells ($P<0.05$), increase the sensitization ratio, and decrease the expression levels of Rad51, DNA-PKcs and Ku80 ($P<0.05$). After interference with SIRT6 expression and AB4 treatment, the number of migrated cells (44.25 $\pm$ 5.52 *vs.* 86.47 $\pm$ 11.16) and the number of invasive cells (48.56 $\pm$ 6.29 *vs.* 90.17 $\pm$ 12.13) increased significantly ($P<0.05$), the expression levels of MMP-2 and MMP-9 were increased significantly ($P<0.05$), and the cell survival fraction increased significantly ($P<0.05$), the expression levels of Rad51, DNA-PKcs and Ku80 protein were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** Anemoside B4 can inhibit the proliferation, migration and invasion of gastric cancer cells, and increase the radiosensitivity of gastric cancer cells by promoting the expression of SIRT6.

Key words: Pulsatilla; Stomach neoplasms; Radiation tolerance; Anemoside B4; Matrix metalloproteinase 2; Matrix metalloproteinase 9; Sirtuin 6; Migration; Invasion

胃癌是临床常见的一种恶性肿瘤,由于胃癌细胞的迁移及侵袭能力较强导致胃癌病人预后差,目前临床治疗胃癌主要以手术、放射治疗等手段为主,然而部分病人易产生放射耐受性导致其治疗效果有限^[1]。因而如何提高胃癌放射敏感性成为亟待解决的问题。近年来,研究发现部分中药可能成为放射增敏剂,但关于其具体作用机制尚未完全阐明^[2]。相关报道指出胃癌细胞放射敏感性涉及多种基因异常表达^[3]。因此积极探寻中药药物对胃癌细胞放射敏感性的影响及其可能作用靶点有助于提高放射治疗效果及改善病人预后。白头翁皂苷 B4 (AB4)源于白头翁,白头翁是一种毛茛科植物并具有清热解毒的功效,研究表明白头翁皂苷具有抗肿瘤

作用,但白头翁皂苷的主要活性成分 AB4 的抗癌活性及其作用机制尚未阐明^[4-5]。研究表明去乙酰化酶 6(SIRT6)在胃癌等多种肿瘤中呈低表达并可发挥抑癌作用^[6-7]。但 AB4 是否可通过调控 SIRT6 从而发挥抗胃癌活性尚未可知。本研究于 2018 年 4 月至 2019 年 10 月观察了 AB4 对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的影响,分析其对 SIRT6 表达的调控作用,并进一步探究了其对胃癌细胞放射敏感性的影响,为临床治疗胃癌药物的研发提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1、人胃癌细胞 HGC-27 购自美国 ATCC 细胞库;AB4 购自上海钰博生物科技有限公司;杜氏改良培养基

(DMEM)购自美国 Hyclone 公司;Lipofectamine2000 转染试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司;RIPA 裂解液、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒购自陕西碧云天生物工程有限公司;SIRT6 小干扰 RNA(si-SIRT6)、乱序无意义阴性序列(si-NC)购自广州锐博生物科技有限公司;甲基噻唑基四唑(MTT)购自上海泽叶生物科技有限公司;Transwell 小室购自北京优尼康生物科技有限公司;兔抗人 SIRT6 抗体购自美国 Abcam 公司;小鼠抗人 DNA 激活蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs)、DNA 双链修复蛋白 Rad51 与山羊抗人 DNA 修复酶 Ku80 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;兔抗人基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)抗体购自上海科敏生物科技有限公司;驴抗山羊、山羊抗鼠以及山羊抗兔 IgG 二抗购自碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 药物处理 取 GES-1 细胞与 HGC-27 细胞进行常规培养,待细胞长至对数生长期,分别用不同浓度(25、50、100 $\mu\text{mol/L}$)的 AB4 处理 24 h^[8],分别命名为 AB4 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、AB4 50 $\mu\text{mol/L}$ 组、AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组。同时将未进行药物处理的细胞记作 NC 组。通过 MTT 实验检测细胞存活率,选取白头翁皂苷 B4 适宜浓度进行后续研究。

1.2.2 细胞转染与分组 取对数生长期 HGC-27 细胞接种于 24 孔板,AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 处理 24 h 后经 0, 2, 4, 6, 8 Gy 照射剂量(Co60 医疗装置)进行处理 12 h,记作 IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组,同时将单独照射组作为 IR 组。参照 Lipofectamine2000 说明书分别将 si-NC、si-SIRT6 转染至 HGC-27 细胞 48 h,使用含有 100 $\mu\text{mol/L}$ 的 AB4 处理 24 h,分别记作 AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组、AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组。采用不同照射剂量处理 AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组、AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组细胞 12 h,分别记作 IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组、IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组。

1.2.3 MTT 检测细胞增殖 收集各组细胞以 3×10^3 个/孔接种至 96 孔板,每组设置 3 个复孔。于干预 48 h 后每孔加入 20 μL 5 g/L 的 MTT 溶液,室温条件下孵育 4 h,弃上清液,加入 150 μL 二甲基亚砷/孔,振荡 10 min,上多功能酶标仪检测 490 nm 波长处各孔吸光度值,计算细胞存活率。

1.2.4 Transwell 实验检测细胞迁移与侵袭 取 NC 组、AB4 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组、AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组对数期 HGC-27 细胞分别接种至不含胎牛血清的 DMEM 培养基,制成 5×10^4 个/升的细胞悬液,按照每孔 200 μL 接种至预先

用 Matrigel 基质胶包被的 Transwell 小室上室中,另取 600 μL 完全培养基加至小室下室,常规培养 24 h,弃去小室上室内培养液,并用棉签擦去上室内未穿膜细胞,加入多聚甲醛处理细胞 20 min,加磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤后用 0.1% 结晶紫染液染色 10 min,光学显微镜下观察侵袭细胞数。迁移实验中 Transwell 小室上室内不铺 Matrigel 基质胶,其余步骤同侵袭实验。

1.2.5 细胞克隆形成实验检测细胞放射敏感性 收集 IR 组、IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组、IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组、IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组对数期 HGC-27 细胞,按照 3×10^4 个/mL 的密度接种于 24 孔培养皿,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 二氧化碳体积分数、饱和湿度的细胞培养箱内常规培养 10~14 d,用 PBS 充分洗涤后,加入预冷的甲醇固定 15 min,滴加吉姆萨染液染色 30 min,于显微镜下观察并计数大于 50 个细胞的细胞集落数,克隆形成率(PE)=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$,细胞存活分数(SF)=照射剂量组的集落数/(照射剂量组细胞接种数 $\times$ 未照射组 PE),同时采用多靶单击模型模拟合细胞存活曲线,观察细胞放射增敏比。

1.2.6 蛋白质印迹法检测 SIRT6、Rad51、DNA-PKcs、Ku80、MMP-2、MMP-9 蛋白表达 分别收集各组 HGC-27 细胞,加入 RIPA 裂解液于冰上裂解 30 min,通过蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,BCA 法进行蛋白定量。每 50 μg 蛋白样液中加入 5 $\times$ 上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min 使蛋白变性。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶电泳,转膜至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶内封闭 1 h, TBST 洗涤,将 PVDF 膜置于一抗稀释液(SIRT6 稀释比 1:1 000、Rad51 稀释比 1:2 000、DNA-PKcs 稀释比 1:2 000、Ku80 稀释比 1:2 000、MMP-2 稀释比 1:1 000、MMP-9 稀释比 1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,加 TBST 充分洗涤,加入二抗稀释液(稀释比 1:5 000),室温孵育 1 h,曝光、显影,采用 GIS-2020 系统扫描并分析各蛋白条带灰度值,以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参计算目的蛋白蛋白相对表达量,上述所有操作均重复实验 3 次。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据符合正态分布及方差齐性,以独立样本 *t* 检验进行两组间比较;单因素方差分析进行多组间比较,采用 LSD-*t* 检验进行多组间两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白头翁皂苷 B4 对人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 与人胃癌细胞 HGC-27 存活率的影响 用不

同浓度的白头翁皂苷 B4 处理 GES-1 细胞与 HGC-27 细胞,结果显示,与 NC 组相比,AB4 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、AB4 50 $\mu\text{mol/L}$ 组、AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组 HGC-27 细胞存活率显著降低($P<0.05$),白头翁皂苷 B4 不同剂量组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),选取细胞存活率为 50% 左右时的白头翁皂苷 B4 浓度(100 $\mu\text{mol/L}$)进行后续研究,NC 组与 AB4 25 $\mu\text{mol/L}$ 组、AB4 50 $\mu\text{mol/L}$ 组、AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组间 GES-1 细胞存活率相比差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 白头翁皂苷 B4(AB4)对人正常胃黏膜上皮细胞 GES-1 与人胃癌细胞 HGC-27 存活率的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	GES-1 细胞存活率	HGC-27 细胞存活率
NC 组	3	100.00 $\pm$ 6.59	100.01 $\pm$ 9.57
AB4 25 $\mu\text{mol/L}$ 组	3	98.68 $\pm$ 12.03	86.57 $\pm$ 6.58 ^①
AB4 50 $\mu\text{mol/L}$ 组	3	99.48 $\pm$ 10.31	65.45 $\pm$ 8.45 ^{①②}
AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	3	99.74 $\pm$ 9.57	49.58 $\pm$ 7.96 ^{①②③}
<i>F</i> 值		0.03	66.58
<i>P</i> 值		0.993	<0.001

注:①与 NC 组相比, $P<0.05$ 。②与 AB4 25 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $P<0.05$ 。③与 AB4 50 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $P<0.05$ 。

2.2 白头翁皂苷 B4 对 HGC-27 细胞迁移及侵袭的影响 相较于 NC 组,AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组迁移及侵袭细胞数均显著减少($P<0.05$),MMP-2、MMP-9 蛋白相对表达量显著降低($P<0.05$),见表 2。

表 2 白头翁皂苷 B4(AB4)对人胃癌细胞 HGC-27 迁移及侵袭的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	迁移细胞数	侵袭细胞数	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
NC 组	3	98.47 $\pm$ 8.79	88.42 $\pm$ 9.32	0.86 $\pm$ 0.13	0.90 $\pm$ 0.16
AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	3	43.57 $\pm$ 6.53	45.56 $\pm$ 5.13	0.43 $\pm$ 0.08	0.45 $\pm$ 0.03
<i>t</i> 值		15.04	12.09	8.45	8.29
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:MMP-2 为基质金属蛋白酶-2,MMP-9 为基质金属蛋白酶-9。

2.3 白头翁皂苷 B4 对不同剂量照射下 HGC-27 细胞放射敏感性的影响 实验结果显示,与 IR 组相比,IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组 HGC-27 细胞在照射剂量为 2、4、6 Gy 时存活分数显著降低($P<0.05$),增敏比为 1.958,照射剂量为 4 Gy 时作用效果好,因而选用 4 Gy 用于后续研究,见表 3、4。与 IR 组相比,IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组 HGC-27 细胞中 DNA 修复蛋白 Rad51、DNA-PKcs、Ku80 的相对表达量显著降低($P<0.05$),见图 1,表 5。

2.4 白头翁皂苷 B4 对 HGC-27 细胞中 SIRT6 表达量的影响 蛋白质印迹法检测结果显示,与 NC 组相比,AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组 HGC-27 细胞中 SIRT6 蛋白

表 3 两组不同照射剂量下人胃癌细胞 HGC-27 存活分数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	重复次数	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
IR 组	3	100.00 $\pm$ 3.12	79.95 $\pm$ 9.16	46.44 $\pm$ 5.38	13.97 $\pm$ 2.05
IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	3	100.00 $\pm$ 2.56	41.62 $\pm$ 6.59	9.16 $\pm$ 1.20	2.37 $\pm$ 0.24
<i>t</i> 值		0.00	5.88	11.71	9.73
<i>P</i> 值		1.000	0.004	<0.001	0.001

表 4 白头翁皂苷 B4(AB4)联合照射 HGC-27 细胞单击多靶模型的参数值

组别	D_0/Gy	D_q/Gy	N	SF2	k	增敏比
IR 组	2.487	2.245	2.466	0.768	0.402	
IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	1.27	1.052	2.289	0.412	0.787	1.958

注: D_0 为平均致死量, D_q 为准阈剂量,N 为靶数,SF2 为照射后细胞存活分数,k 为直线部分斜率。



注:1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH);2—DNA 修复酶(Ku80);3—DNA 激活蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs);4—DNA 双链修复蛋白(Rad51);5—IR 组;6—IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组。

图 1 HGC-27 细胞 DNA 修复蛋白免疫印迹图

表 5 两组 HGC-27 细胞 DNA 修复蛋白相对表达量比较($\bar{x} \pm s$)

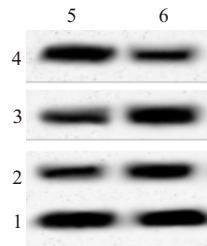
组别	重复次数	Rad51 蛋白	DNA-PKcs 蛋白	Ku80 蛋白
IR 组	3	0.98 $\pm$ 0.13	1.01 $\pm$ 0.16	0.96 $\pm$ 0.15
IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ 组	3	0.46 $\pm$ 0.08	0.50 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.03
<i>t</i> 值		10.22	8.33	10.79
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:Rad51 为 DNA 双链修复蛋白,DNA-PKcs 为 DNA 激活蛋白激酶催化亚基,Ku80 为 DNA 修复酶。

相对表达量显著升高(0.42 $\pm$ 0.03 比 1.03 $\pm$ 0.15, $t=11.96$; $P<0.001$)。

2.5 干扰 SIRT6 表达可逆转白头翁皂苷 B4 对 HGC-27 细胞增殖、迁移及侵袭的影响 蛋白质印迹法检测结果显示,与 AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组相比,AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组 HGC-27 细胞中 SIRT6 蛋白相对表达量显著降低($P<0.05$),见图 5、表 6。提示成功降低 HGC-27 细胞中 SIRT6 蛋白表达。进一步检测结果显示,相较于 AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组,AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组 HGC-27 细胞存活率显著升高($P<0.05$),迁移及侵袭细胞数显著

增多($P<0.05$), MMP-2、MMP-9蛋白相对表达量显著升高($P<0.05$), 见图2, 表6。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—基质金属蛋白酶-9(MMP-9); 3—基质金属蛋白酶-2(MMP-2); 4—去乙酰化酶6(SIRT6); 5—AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组; 6—AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组。

图2 去乙酰化酶6(SIRT6)蛋白与细胞迁移及侵袭相关蛋白质印迹图

2.6 干扰 SIRT6 表达可逆转白头翁皂苷 B4 对 HGC-27 细胞放射敏感性的影响 实验结果显示, 与 IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组相比, IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组 HGC-27 细胞在照射剂量为 2、4、6 Gy 时存活分数显著升高($P<0.05$), 增敏比为 0.37, 见表 7, 8。进一步检测结果显示, 与 IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组相比, IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组 HGC-27 细胞中 Rad51、DNA-PKcs、Ku80 蛋白相对表达量显著升高($P<0.05$), 见图 3, 表 9。

3 讨论

由于胃癌早期症状比较隐匿, 大多数病人确诊时已为中晚期, 因此错过了最佳手术根治机会。随着医疗水平的发展, 放射治疗成为治疗胃癌的重要手段, 但治疗效果受到放射损伤及放射敏感性的影响, 因而如何减少发生损伤并增强胃癌放射敏感性成为重点研究问题^[9]。近年来放射增敏实验研究主要集中于分子靶向治疗, 研究表明中草药具有抗胃癌作用并可能通过调控作用靶点而增强胃癌细胞放射敏感性^[10-11]。因此本研究积极探寻新型中草药物并分析其可能作用靶点从而为探索新的放射增敏剂奠定理论基础。

AB4 可能通过上调细胞凋亡蛋白表达而诱导结肠癌细胞凋亡从而发挥抗癌作用^[12]。研究表明白头翁皂苷能够通过调控相关基因表

表7 HGC-27 细胞存活分数/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	0 Gy	2 Gy	4 Gy	6 Gy
IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组	3	100.00 $\pm$ 2.24	44.62 $\pm$ 5.20	7.94 $\pm$ 1.13	1.55 $\pm$ 0.12
IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组	3	100.00 $\pm$ 2.81	82.05 $\pm$ 8.49	51.83 $\pm$ 6.11	11.67 $\pm$ 1.86
t 值		<0.001	6.51	12.23	9.40
P 值		1.000	0.003	<0.001	0.001

表8 干扰 SIRT6 表达与白头翁皂苷 B4 联合照射 HGC-27 细胞单击多靶模型的参数值

组别	D_0/Gy	D_q/Gy	N	SF2	k	增敏比
IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组	1.057	1.246	3.251	0.412	0.946	
IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组	2.859	2.045	2.045	0.754	0.350	0.37

注: SIRT6 为去乙酰化酶 6, D_0 为平均致死量, D_q 为准阈剂量, N 为靶数, SF2 为照射后细胞存活分数, k 为直线部分斜率。



注: 1—甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH); 2—DNA 修复酶(Ku80); 3—DNA 激活蛋白激酶催化亚基(DNA-PKcs); 4—DNA 双链修复蛋白(Rad51); 5—IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组; 6—IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组。

图3 HGC-27 细胞 DNA 修复蛋白免疫印迹图

达抑制口腔鳞癌等多种恶性肿瘤细胞增殖、迁移及侵袭, 从而发挥抗癌作用^[13-14]。相关报道指出 AB4 可减轻顺铂的肾毒性, 但不会降低顺铂的抗肿瘤活性^[15]。本研究结果显示, 经不同浓度的 AB4 处理后的胃癌细胞存活率显著降低, 提示 AB4 具有抑制胃癌细胞增殖的作用。研究表明上调 MMP-2、MMP-9 的表达可促进胃癌细胞的迁移侵袭^[16]。本研究结果显示, 经不同浓度的 AB4 处理后胃癌细胞的迁移及侵袭能力以及 MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平显著降低, 提示 AB4 可能是通过下调 MMP-2、MMP-9 的表达抑制胃癌细胞的迁移及侵袭。且本

表6 干扰 SIRT6 表达可逆转 AB4 对 HGC-27 细胞增殖、迁移及侵袭的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	SIRT6 蛋白	细胞存活率/%	迁移细胞数/个	侵袭细胞数/个	MMP-2 蛋白	MMP-9 蛋白
AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组	3	0.96 $\pm$ 0.18	50.12 $\pm$ 9.13	44.25 $\pm$ 5.52	48.56 $\pm$ 6.29	0.44 $\pm$ 0.09	0.46 $\pm$ 0.05
AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组	3	0.45 $\pm$ 0.05	98.15 $\pm$ 10.47	86.47 $\pm$ 11.16	90.17 $\pm$ 12.31	0.90 $\pm$ 0.16	0.88 $\pm$ 0.17
t 值		8.19	10.37	10.17	9.03	7.52	7.11
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: SIRT6 为去乙酰化酶 6, AB4 为白头翁皂苷 B4, MMP-2 为基质金属蛋白酶-2, MMP-9 为基质金属蛋白酶-9。

表9 各组 HGC-27 细胞 DNA 修复蛋白相对表达量比较/ $\bar{x} \pm s$

组别	重复次数	Rad51 蛋白	DNA-PKcs 蛋白	Ku80 蛋白
IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-NC 组	3	0.48 $\pm$ 0.06	0.47 $\pm$ 0.08	0.40 $\pm$ 0.02
IR+AB4 100 $\mu\text{mol/L}$ +si-SIRT6 组	3	0.71 $\pm$ 0.10	0.73 $\pm$ 0.14	0.68 $\pm$ 0.11
<i>t</i> 值		5.92	4.84	7.51
<i>P</i> 值		<0.001	<0.001	<0.001

注:Rad51 为 DNA 双链修复蛋白,DNA-PKcs 为 DNA 激活蛋白激酶催化亚基,Ku80 为 DNA 修复酶。

研究结果表明 AB4 联合放射处理可降低胃癌细胞存活分数,提高增敏比,提示 AB4 可增强胃癌细胞放射敏感性。研究表明 DNA 损伤修复能力是造成细胞放射敏感性的重要原因,放射治疗后 DNA 修复蛋白 Rad51、DNA-PKcs、Ku80 表达水平升高可降低放射敏感性,降低 Rad51、DNA-PKcs、Ku80 表达水平可增强放射敏感性^[17]。本研究结果显示 AB4 联合放射处理后胃癌细胞 HGC-27 中 Rad51、DNA-PKcs、Ku80 的表达水平明显降低,提示 AB4 可通过破坏 DNA 损伤修复过程从而提高胃癌细胞放射敏感性。

SIRT6 在卵巢癌组织中呈低表达,其低表达量与肿瘤组织浸润及转移密切相关^[18]。研究表明 SIRT6 通过抑制 JAK 激酶 2/信号转导及转录活化因子 3 途径而抑制胃癌的生长^[19]。相关报道指出 SIRT6 可抑制胰腺癌发生及发展^[20]。本研究结果显示 AB4 可明显提高胃癌细胞中 SIRT6 的表达水平,进一步研究结果显示干扰 SIRT6 的表达可明显降低 AB4 对胃癌细胞增殖、迁移及侵袭的抑制作用。提示 AB4 可能是通过上调 SIRT6 的表达发挥抑制胃癌细胞增殖、迁移及侵袭作用的。同时本研究结果显示,干扰 SIRT6 的表达联合 AB4 处理后经不同剂量射线照射后,胃癌细胞 HGC-27 存活分数明显增多,增敏比明显降低,Rad51、DNA-PKcs、Ku80 的表达水平明显升高,提示 AB4 可通过上调 SIRT6 的表达而增强胃癌细胞放射敏感性。

综上所述,AB4 能够抑制胃癌细胞 HGC-27 增殖、迁移及侵袭并可增强胃癌细胞 HGC-27 的放射敏感性,其作用机制可能与上调 SIRT6 表达有关,并可能通过抑制 DNA 损伤修复相关蛋白表达从而发挥作用,可为 AB4 应用胃癌的增敏治疗提供理论依据,并可为 AB4 在临床中的应用奠定理论基础。

参考文献

- [1] GENG W, TIAN D, WANG Q, et al. DNA-PKcs inhibitor increases the sensitivity of gastric cancer cells to radiotherapy[J]. *Oncol Rep*, 2019, 42(2): 561-570.
- [2] YANG G, QIU J, WANG D, et al. Traditional chinese medicine

curcumin sensitizes human colon cancer to radiation by altering the expression of DNA repair-related genes[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(1):131-136.

- [3] 崔勇霞, 吴广银, 罗执芬, 等. ZEB1 通过上调 ATM 表达调控胃癌细胞 AGS 的放射敏感性[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2018, 38(12):894-898.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2015 年版 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:104.
- [5] XUE S, ZHOU Y, ZHANG J, et al. Anemoside B4 exerts anti-cancer effect by inducing apoptosis and autophagy through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(4): 2580-2589.
- [6] LIU W, WU M, DU H, et al. SIRT6 inhibits colorectal cancer stem cell proliferation by targeting CDC25A [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5368-5374.
- [7] 朱秀敏. SIRT6 通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路抑制胃癌生长[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(11): 5215-5220.
- [8] 薛淑一, 李明春, 苗青, 等. 白头翁皂苷 B4 对肝癌细胞 Huh-7 及其荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用及机制研究[J]. *中国药房*, 2019, 30(5): 601-607.
- [9] 廖新华, 车向明, 仇广林, 等. 普奈洛尔对胃癌放疗敏感性影响及其机制的实验研究[J]. *现代肿瘤医学*, 2018, 26(21): 3369-3373.
- [10] 刘嘉, 赵庆年, 乔鑫, 等. 抗胃癌中成药的研究进展[J]. *肿瘤药学*, 2015, 5(6): 410-413.
- [11] 孙兆, 严玉月. 祛邪消积汤联合放化疗治疗胃癌根治术后腹腔淋巴结转移癌临床观察及对免疫指标的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2019, 37(7):1737-1740.
- [12] 李敏, 方明治. 白头翁皂苷 B4 粉防己碱对奥沙利铂耐药的结肠癌细胞的耐药逆转作用及其机制[J]. *中国癌症杂志*, 2015(1): 38-44.
- [13] 潘炜娟, 丁玲. 不同浓度白头翁皂苷对口腔鳞癌细胞增殖、迁移和钙蛋白酶 1、E-cadherin、N-cadherin 蛋白的影响[J]. *中国药师*, 2018, 21(6): 984-988.
- [14] 王冠玲, 何文. 白头翁皂苷抗肿瘤作用的研究进展[J]. *中国药师*, 2019, 22(4): 740-742.
- [15] HE L, ZHANG Y, KANG N, et al. Anemoside B4 attenuates nephrotoxicity of cisplatin without reducing anti-tumor activity of cisplatin[J]. *Phytomedicine*, 2019, 56(1): 136-146.
- [16] 张萌, 张向东, 夏永欣, 等. 钙周期素结合蛋白促进胃癌细胞迁移侵袭和 MMP-2、MMP-9、p-ERK1/2、p-AKT 水平上调[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2019, 28(2): 134-141.
- [17] 冯辉, 郭宝瑞, 孔祥梅, 等. 吴茱萸碱增强 Eca-109 食管鳞癌细胞的放射敏感性[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(7): 940-944.
- [18] 陈芳, 章建梅, 陆美英. Sirt6 在卵巢癌患者卵巢组织中表达的意义[J]. *中国预防医学杂志*, 2019, 20(3): 200-202.
- [19] ZHOU J, WU A, YU X, et al. SIRT6 inhibits growth of gastric cancer by inhibiting JAK2/STAT3 pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(2): 1059-1066.
- [20] DEMIR IE, CEYHAN GO, FRIESS H. Epigenomic therapies: the potential of targeting SIRT6 for the treatment of pancreatic cancer[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2017, 21(1): 1-3.

(收稿日期:2019-11-22,修回日期:2020-02-14)