

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.007

· 基础研究 ·

Sporamin 对人胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭以及 Notch4 蛋白表达的影响

陈依依^a, 曾菊萍^a, 陈晓英^a, 刘富强^a, 姚军^a, 钱翠娟^b(台州学院医学院 a. 医学检验教研室; b. 临床医学教研室, 浙江台州 318000)

[摘要] **目的:** 探讨胰蛋白酶抑制剂 sporamin 对人胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭及 Notch4 蛋白表达的影响。**方法:** 采用 MTT 法检测 sporamin 对人胰腺癌细胞株 PANC-1 和 MiaPaCa-2 增殖能力的影响, Transwell 法检测胰腺癌细胞体外迁移和侵袭能力, Western blotting 检测不同质量浓度的 sporamin (0、25、50、75、100 μg/ml) 对人胰腺癌细胞中 Notch4 蛋白表达水平的影响。**结果:** Sporamin 能显著抑制人胰腺癌 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞的增殖、迁移和侵袭能力, 三种作用均呈显著质量浓度依赖性 ($P < 0.05$), 但无显著时间依赖性 ($P > 0.05$); 随着 sporamin 质量浓度的增加, Notch4 蛋白水平的表达也逐渐下降。**结论:** 胰蛋白酶抑制剂 sporamin 能质量浓度依赖性抑制人胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力, 同时抑制人胰腺癌细胞中 Notch4 蛋白的表达。

[关键词] 胰蛋白酶抑制剂; sporamin; 胰腺癌

[中图分类号] R735.9

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2016)06-0779-04

Effect of sporamin on expression of Notch4 protein in human pancreatic cancer cells and proliferation, migration, invasion of the tumor cells

CHEN Yiyi^a, ZENG Juping^a, CHEN Xiaoying^a, LIU Fuqiang^a, YAO Jun^a, QIAN Cuijuan^b(a. Department of Medical Laboratory, b. Department of Clinical Medicine, Medical School of Taizhou College, Taizhou 318000, Zhejiang, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate effect of trypsin inhibitor, sporamin, on expression of Notch4 protein in human pancreatic cancer (PC) cells and proliferation, migration, invasion of the tumor cells. **Methods:** Effect of the sporamin on proliferation of the PANC-1 and MiaPaCa-2 PC line cells was detected by MTT assay; proliferation and invasion abilities *in vitro* of the pancreatic cancer cells detected by Transwell assay and effects of various concentrations of the sporamin (0, 25, 50, 75 and 100 μg/ml) on expression level of the Notch4 protein in the human pancreatic cancer cells detected by Western blotting assay. **Results:** Sporamin significantly inhibited proliferation, migration and invasion abilities of the PANC-1 and MiaPaCa-2 PC line cells, as a pattern of concentration-dependence ($P < 0.05$), but not a pattern of time-dependence ($P > 0.05$). With increase of the sporamin concentration, expression level of the Notch4 protein also decreased gradually. **Conclusion:** Trypsin inhibitor sporamin could inhibit proliferation, migration and invasion abilities of the PC cells with a concentration-dependence, and simultaneously inhibit expression of the Notch4 protein in the PC cells.

[Key words] trypsin inhibitor; sporamin; pancreatic cancer

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(6): 779-782. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.06.007]

胰腺癌是一种恶性程度很高的恶性消化系统肿瘤,其临床表现隐匿,缺乏敏感性高、特异性强的早期诊断手段,大多数患者就诊时已属中晚期,预后差,5年生存率 $< 5\%$ ^[1-2]。侵袭转移是影响胰腺癌患者生存的主要因素,可局部侵袭胰腺周围临近器官,通过血管、脂肪、神经丛、淋巴道进行浸润和转移^[3-4]。一般认为胰腺癌对放疗或化疗均不甚敏感,因此寻找更加安

[基金项目] 浙江省自然科学基金资助项目(No. LY16H160033);浙江省公益技术应用研究项目(No. 2016C33189)。Project supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. LY16H160033), and the Program of Application Research on Public Welfare Technology of Zhejiang Province (No. 2016C33189)

[作者简介] 陈依依(1994-),女,浙江台州人,检验技师,主要从事细胞信号转导的基础及临床研究, E-mail: lotus2007wh@sina.com; 曾菊萍(1994-),女,浙江湖州人,本科生,主要从事细胞信号转导的基础研究, E-mail: jj2001whu@sina.com

[通信作者] 钱翠娟(QIAN Cuijuan, corresponding author), E-mail: qiancuijuan2007@163.com

全有效的抗肿瘤药物对胰腺癌防治显得尤为重要。甘薯除含丰富的淀粉和糖类外,其块根中还含有一类蛋白质的干物质,而 sporamin 为其中主要的储藏蛋白^[5]。研究^[5]表明,sporamin 除了可消除 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)自由基和羟基自由基的活性外,还可作为一种 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor, TI),对舌癌、肠癌等恶性肿瘤细胞均有杀伤抑制作用^[6-7],但其作用机制不是非常明确,而且其抗胰腺癌作用迄今未有相关的研究报道。本实验采用 MTT 法、Transwell 法和 Western blotting 技术检测胰蛋白酶抑制剂 sporamin 对人胰腺癌细胞株 PANC-1 和 MiaPaCa-2 增殖、迁移和侵袭能力及 Notch4 蛋白表达水平的影响,为以后胰腺癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人胰腺癌 PANC-1(低分化)和 MiaPaCa-2(未分化)细胞株购自美国组织培养库(American Tissue Culture Collection, ATCC),由台州学院肿瘤研究所细胞培养实验室传代保存。DMSO 购自美国 Sigma 公司;RPMI 1640 培养基购自美国 Gibco 公司;小牛血清购自杭州四季青公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)购自上海华舜生物工程有限公司;人源 Notch4 和内参 GAPDH 一抗购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司;蛋白提取试剂盒及其相应二抗购自上海碧云天生物公司。

1.2 sporamin 的提取和纯化

甘薯 sporamin 蛋白的制备及纯化的具体方法参见文献^[8]。将洗净的甘薯块与一定量含有 0.1 mol/L NaCl 的 0.05 mol/L Tris-HCl(pH7.5)缓冲液一同匀质后,离心取上清液。在 0℃用 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对蛋白组分进行分级后离心,得到甘薯粗蛋白。将其用上述缓冲液过夜透析后离心,再过微孔滤膜抽滤,得到甘薯粗蛋白溶液。将一定量粗蛋白溶液用 SephadexG-75 凝胶过滤柱纯化,再将回收的组分作胰蛋白酶高效亲和层析。将收集的洗出液按峰值分别依照 Laemmli 法进行 SDS-PAGE 电泳,用考马斯亮兰 R-250 对蛋白染色,检验蛋白纯度。

1.3 细胞培养

胰腺癌细胞株 PANC-1 和 MiaPaCa-2 在含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液中,置于 37℃、5%

CO₂ 孵箱培养,每 3 d 换培养液 1 次,观察细胞至对数生长期进行下一步实验。

1.4 MTT 法检测胰蛋白酶抑制剂对胰腺癌细胞增殖的影响

用含 10% 小牛血清的培养液将贴壁细胞配成单细胞悬液(10 000 ~ 20 000 个/ml),接种到 96 孔板(200 μl 细胞/孔),细胞贴壁后与不同质量浓度的胰蛋白酶抑制剂 sporamin (0、25、50、75、100 μg/ml)分别共同培养 48、72 和 96 h,每种处理设 5 个复孔。用酶联免疫检测仪测定 570 nm 处各孔光密度(D)值,根据下列公式计算细胞增殖抑制率(inhibitory rate of proliferation)。细胞增殖抑制率(%) = (处理组 D 值 - 空白组 D 值) / 空白组 D 值 × 100%。

1.5 Transwell 实验检测胰蛋白酶抑制剂对胰腺癌细胞迁移和侵袭的影响

Transwell 细胞迁移实验:将 insert 放入 24 孔细胞培养板。收集与不同质量浓度的胰蛋白酶抑制剂 sporamin (0、25、50、75、100 μg/ml)分别共同培养 48 h 的对数生长期人胰腺癌 PANC-1 和 MiaPaCa-2 株细胞,调整细胞密度至 2×10^5 个/ml 左右;加入 Transwell 的 insert 小室(250 μl)。细胞培养 24 h 后,取出 insert 小室,DAPI 细胞核染液(1 μg/ml)染色后,荧光显微镜观察及拍照,随机选取 5 个视野计数细胞数,取平均数。

Transwell 细胞侵袭实验:收集各实验组细胞,调整细胞密度至 4×10^5 个/ml。取细胞悬液 250 μl 加入 Transwell 的 insert 小室,培养 24 h;加入 400 μl 细胞染料,再加入 200 μl 裂解试剂,使细胞充分裂解;取 100 μl 混悬液到 96 孔板,酶标仪检测 560 nm 波长的光密度(D_{560})。

1.6 Western blotting 检测 Notch4 蛋白表达水平

收集与不同浓度胰蛋白酶抑制剂 sporamin (0、25、50、75、100 μg/ml)分别共同培养 48 h 的对数生长期人胰腺癌 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞,提取总蛋白,进行 SDS-PAGE 电泳后,转移至硝酸纤维素膜,封闭,加入人源 Notch4 抗体和内参对照 GAPDH 抗体。4℃孵育过夜;加辣根过氧化物酶标记二抗室温摇晃 2 h,显色,放射自显影。

1.7 统计学处理

数据用 SPSS16.0 统计软件包处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料之间的比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 sporamin 抑制人胰腺癌 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞增殖

MTT 法检测结果(图 1)显示, sporamin 对 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞增殖均有浓度依赖性抑制作用($P < 0.05$);但无时间依赖性的抑制细胞增殖作用($P > 0.05$),即相同浓度的 sporamin 随着作用时间延长,其对 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞的增殖抑制率均无统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 sporamin 显著抑制胰腺癌细胞体外迁移和侵袭能力

Transwell 细胞迁移和侵袭试验结果(图 2A 和 2B)提示,与空白对照组(Blank Control)比较, sporamin 能显著抑制胰腺癌 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞的迁移和侵袭能力,并呈现明显的浓度依赖关系。

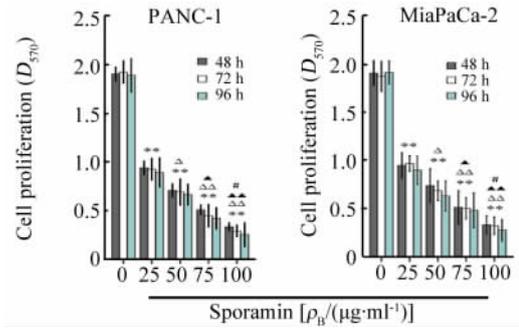


图 1 不同质量浓度 sporamin 处理不同时间对胰腺癌细胞株增殖的抑制程度

Fig. 1 Proliferation inhibition of the pancreatic cancer cells after treatments of sporamin in various concentrations for various times

** $P < 0.01$ vs 0 µg/ml group;
 $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 25 µg/ml group;
 $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs 50 µg/ml group;
 $\# P < 0.05$ vs 75 µg/ml group

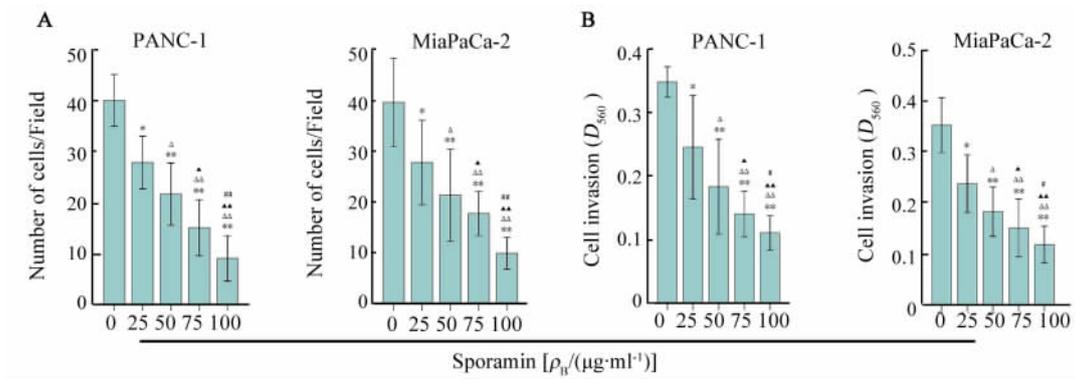


图 2 不同浓度 sporamin 对胰腺癌细胞体外迁移和侵袭能力的影响

Fig. 2 Effect of sporamin in various concentrations on abilities of migration and invasion *in vitro* of the pancreatic cancer cells

A: Migration *in vitro* of the pancreatic cancer cells detected by Transwell assay;

B: Invasion *in vitro* of the pancreatic cancer cells detected by Transwell (matrigel) assay
 $* P < 0.05$, $** P < 0.01$ vs 0 µg/ml group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs 25 µg/ml group;
 $\blacktriangle P < 0.05$, $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs 50 µg/ml group; $\# P < 0.05$, $\#\# P < 0.01$ vs 75 µg/ml group

2.3 sporamin 下调人胰腺癌细胞 Notch4 蛋白表达

Western blotting 检测结果(图 3)显示胰腺癌 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞 Notch4 蛋白的表达,随

sporamin 浓度的增加,Notch4 蛋白表达水平呈明显下降趋势。

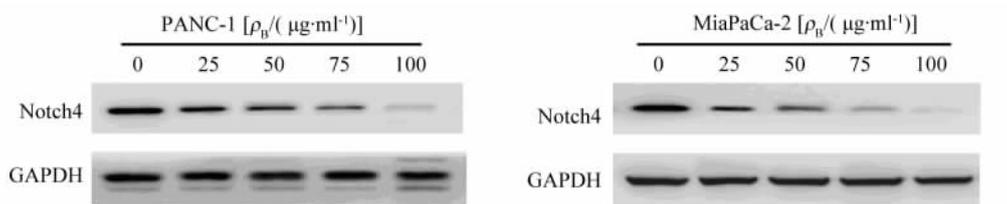


图 3 Western blotting 检测不同浓度 sporamin 处理后 Notch4 蛋白的表达

Fig. 3 Expressions of Notch4 protein after treatment with various concentrations of sporamin detected by Western blotting

3 讨论

人 Notch 信号通路家族包括 Notch1、Notch2、Notch3 和 Notch4 四个成员^[9-12]。在肿瘤中, Notch4 在各种肿瘤中的研究相对较少, 在胰腺癌中尚未见 Notch4 的研究报道^[13-15]。为了初步验证 Notch4 与肿瘤的相关性, 本课题组检测了不同分化程度胃癌细胞株中活化 Notch4 蛋白(Notch4 蛋白胞内段, ICN4)的表达, 发现与非肿瘤的胃黏膜细胞株 GES-1 相比较, 不同分化程度胃癌细胞中活化 Notch4 蛋白的表达呈现不同程度的增强; 而且, 通过特异性针对 Notch4 的 siRNA 下调 Notch4 通路活性后, 胃癌细胞株的细胞增殖、迁移及侵袭能力显著减弱^[13]。因此, Notch4 通路活化状态的改变可能会导致某些肿瘤细胞的增殖、侵袭及转移等恶性生物学行为的变化。

Sporamin 是一种从甘薯浆液中提取的胰蛋白酶抑制剂, 已证实胰蛋白酶抑制剂在肝癌、结直肠癌等肿瘤细胞中具有一定的抗肿瘤作用^[5], 而且前期研究也证实, sporamin 在舌癌、肠癌等肿瘤细胞中具有一定的抗肿瘤作用^[6-7]。

胰蛋白酶抑制剂对人胰腺癌细胞增殖及相关蛋白表达影响方面的研究鲜有报道。本实验以低分化和未分化人胰腺癌 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞株为实验对象, 与不同浓度的胰蛋白酶抑制剂 sporamin 分别共同培养 48、72 及 96 h。本实验结果显示, sporamin 对 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞均具有浓度依赖的增殖抑制作用。笔者又检测 sporamin 对胰腺癌细胞体外迁移和侵袭能力的影响, 发现 sporamin 能显著抑制人胰腺癌 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞的体外细胞迁移和侵袭能力, 且呈显著浓度依赖关系。笔者检测了 PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞与不同浓度的 sporamin 分别共同培养 48 h 后, Notch4 蛋白表达变化, 发现随着 sporamin 浓度的增加, PANC-1 和 MiaPaCa-2 细胞中的 Notch4 蛋白表达水平均明显降低。总之, 随着 sporamin 浓度的增加, 人胰腺癌细胞增殖、迁移和侵袭能力呈显著下降趋势, 同时 Notch4 蛋白表达也明显下降, 提示 sporamin 可能通过下调 Notch4 蛋白表达而抑制胰腺癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

本实验的结果为胰蛋白酶抑制剂 sporamin 应用于人胰腺癌的临床治疗提供了前期实验依据, 并为进一步探索 sporamin 抑制胰腺癌细胞增殖的具体机制提出方向。

[参考文献]

[1] TEAGUE A, LIM K H, WANG-GILLAM A. Advanced pancreatic

adenocarcinoma: a review of current treatment strategies and developing therapies [J]. *Ther Adv Med Oncol*, 2015, 7(2): 68-84. DOI: 10.1177/1758834014564775.

- [2] RYAN D P, HONG T S, BARDEESY N. Pancreatic adenocarcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(11): 1039-1049. DOI: 10.1056/NEJMr1404198.
- [3] KARANDISH F, MALLIK S. Biomarkers and targeted therapy in pancreatic cancer [J]. *Biomark Cancer*, 2016, 8(Suppl 1): 27-35. DOI: 10.4137/BiC.s34414.
- [4] MOHAMMED S, BUREN VAN II, FISHER W E. Pancreatic cancer: advances in treatment [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(28): 9354-9360. DOI: 10.3748/wjg.v20.i28.9354.
- [5] SENTHILKUMAR R, YE H K W. Multiple biological functions of sporamin related to stress tolerance in sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam) [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 30(6): 1309-1317. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2012.01.022.
- [6] YAO J, QIAN C. Sporamin induce apoptosis in human tongue carcinoma cells by down-regulating Akt/GSK-3 signaling [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2011, 25(2): 229-236. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2010.00830.x.
- [7] LI P G, MU T H, DENG L. Anticancer effects of sweet potato protein on human colorectal cancer cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(21): 3300-3308. DOI: 10.3748/wjg.v19.i21.3300.
- [8] 熊志冬, 李鹏高, 邓乐, 等. 甘薯 sporamin 蛋白对 3T3-L1 前脂肪细胞分化和增殖的影响 [J]. *中国农业科学*, 2009, 42(8): 2892-2898. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2009.08.030.
- [9] NTZIACHRISTOS P, LIM J S, SAGE J, et al. From fly wings to targeted cancer therapies: a centennial for notch signaling [J]. *Cancer Cell*, 2014, 25(3): 318-334. DOI: 10.1016/j.ccr.2014.02.018.
- [10] HORI K, SEN A, ARTAVANIS-TSAKONAS S. Notch signaling at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 10): 2135-2140. DOI: 10.1242/jcs.127308.
- [11] LOBRY C, OH P, MANSOUR M R, et al. Notch signaling: switching an oncogene to a tumor suppressor [J]. *Blood*, 2014, 123(16): 2451-2459. DOI: 10.1182/blood-2013-08-355818.
- [12] GIL-GARCÍA B, BALADRÓN V. The complex role of NOTCH receptors and their ligands in the development of hepatoblastoma, cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma [J]. *Biol Cell*, 2016, 108(2): 29-40. DOI: 10.1111/boc.201500029.
- [13] BONYADI R E, HAMMERLINDL H, WELS C, et al. Notch4 signaling induces a mesenchymal-epithelial-like transition in melanoma cells to suppress malignant behaviors [J]. *Cancer Res*, 2016, 76(7): 1690-1697. DOI: 10.1158/0008-5472.CCR-15-1722.
- [14] QIAN C, LIU F, YE B, et al. Notch4 promotes gastric cancer growth through activation of Wnt1/ β -catenin signaling [J]. *Mol Cell Biochem*, 2015, 401(1/2): 165-174. DOI: 10.1007/s11010-014-2304-z.
- [15] AVILA J L, KISSIL J L. Notch signaling in pancreatic cancer: oncogene or tumor suppressor? [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(5): 320-327. DOI: 10.1016/j.molmed.2013.03.003.

[收稿日期] 2016-07-20

[修回日期] 2016-10-28

[本文编辑] 宋关鸿