

# 蛇葡萄素对皮离蛋白过表达的大肠癌 LoVo 细胞迁移和侵袭能力的抑制作用研究<sup>△</sup>

刘丽芳<sup>1,2\*</sup>, 邱芳华<sup>2#</sup>, 杨泽填<sup>1,2</sup>, 李秋明<sup>2</sup>(1.广州中医药大学附属广州中医院, 广州 510405; 2.广州市中医医院, 广州 510130)

中图分类号 R735.3;R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)22-3053-06  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.22.07

**摘要** 目的:探讨蛇葡萄素(AMP)对皮离蛋白(DCD)过表达的大肠癌 LoVo 细胞迁移和侵袭能力的抑制作用。方法:通过质粒瞬时转染使 DCD 在 LoVo 细胞中过表达,并以蛋白免疫印迹法检测转染后 LoVo 细胞中 DCD 的蛋白表达水平。将细胞分为空载体组、正常对照组、阳性药物组(5-氟尿嘧啶, 0.25 μg/mL)和 AMP 组(300 μmol/L),除空载体组采用转染空载体的 LoVo 细胞外,其余组均采用转染 DCD 的 LoVo 细胞,以 Transwell 小室迁移实验和划痕实验考察 AMP 对相应 LoVo 细胞迁移能力的影响,以 Transwell 侵袭实验考察 AMP 对相应 LoVo 细胞侵袭能力的影响。结果:蛋白免疫印迹法检测结果显示,与空白对照组和空载体组比较,DCD 组细胞中 DCD 的蛋白表达水平均显著升高( $P < 0.01$ )。迁移实验和侵袭实验结果显示,与空载体组比较,正常对照组跨膜细胞数均显著增多,细胞迁移率均显著升高( $P < 0.01$ );与正常对照组比较,阳性药物组和 AMP 组跨膜细胞数均显著减少,细胞迁移率均显著降低( $P < 0.01$ ),且 AMP 对细胞迁移和侵袭能力的抑制作用均显著优于 5-氟尿嘧啶( $P < 0.01$ )。结论:DCD 过表达达能够促进肿瘤细胞迁移和侵袭;AMP 对 DCD 过表达的 LoVo 细胞的迁移和侵袭能力均具有明显的抑制作用。

**关键词** 蛇葡萄素;大肠癌;LoVo 细胞;皮离蛋白;迁移;侵袭

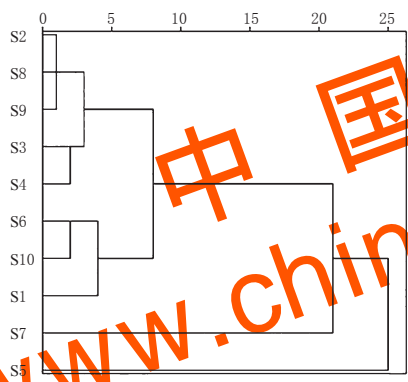


图3 聚类分析树状图  
Fig 3 Dendrogram of cluster analysis

乙腈 4 种体系作为流动相对结果的影响。最终发现,采用 0.1% 磷酸溶液-乙腈为流动相时其色谱峰峰形对称性好,基线平整,能够获得较好的分离效果。

本试验通过对 10 批白及药材样品的指纹图谱分析可知,其共有峰的相对保留时间差异较小,但相对峰面积差异较大。但采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统》(2004 A 版)对各批药材样品进行整体相似度评价的结果显示,10 批白及药材样品中有 9 批相似度均大于

△ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81503424);广州市科技计划项目——产学研协同创新重大专项(No.201704020171);广州市医药卫生科技项目(No.20171A010252)

\* 硕士研究生。研究方向:肿瘤分子生物学。电话:020-81226234。E-mail:llifang0406@163.com

# 通信作者:副教授,硕士。研究方向:肿瘤分子生物学。电话:020-81226234。E-mail:qiufanghua1976@163.com

0.90,说明不同来源白及药材样品在化学组成方面具有很好的相似性。

综上所述,本研究所建 HPLC 指纹图谱和聚类分析结果可为白及药材的质量控制提供参考。

### 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015 年版. 北京:中国医药科技出版社, 2015:103.
- [2] 董永喜,刘星星,董莉,等. 白及多糖对血热出血模型大鼠的止血作用及机制研究[J]. 中国药房, 2016, 27(31): 4347-4350.
- [3] 俞杭苏,代斌玲,钱朝东,等. 白及须根化学成分及其体外抗菌活性研究[J]. 中药材, 2016, 39(3):544-547.
- [4] 仰莲. 白及芪类化学成分及其抗人肺癌细胞 A549 活性研究[D]. 成都:成都中医药大学, 2016.
- [5] 张兵,史亚,周芳美,等. 白及提取物体外抗流感病毒药效及其机制研究[J]. 中药材, 2017, 40(12):2933-2938.
- [6] 仰莲,彭成,李小红,等. 白及的化学成分及生物活性研究进展[J]. 中药与临床, 2014, 5(6):59-64.
- [7] 梅朝叶,向文英,杨武,等. UPLC-MS/MS 同时测定白及中 6 个指标成分的含量[J]. 天然产物研究与开发, 2016, 28(8):1233-1237.
- [8] 张晓静,赵艳霞,邓雁如,等. HPLC 同时测定白及中 3 种成分的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 40-42.
- [9] 陈美君,李峰庆,吕蒙,等. 白及与其混伪品 ITS2 序列二级结构比较与鉴别[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15):46-52.

(收稿日期:2018-04-21 修回日期:2018-06-18)  
(编辑:张静)

# Study on Inhibitory Effect of Ampelopsin on Migration and Invasion Ability of Colorectal Cancer LoVo Cells with Dermcidin Over-expression

LIU Lifang<sup>1, 2</sup>, QIU Fanghua<sup>2</sup>, YANG Zetian<sup>1, 2</sup>, LI Qiuming<sup>2</sup> (1. The Affiliated Guangzhou TCM Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China; 2. Guangzhou Hospital of TCM, Guangzhou 510130, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To investigate the inhibitory effect of ampelopsin (AMP) on the migration and invasion ability of colorectal cancer LoVo cells with dermcidin (DCD) over-expression. METHODS: DCD in LoVo cells was up-regulated by plasmid transient transfection. Western blot method was used to detect the expression of DCD in transfected LoVo cells. Those cells were divided into empty vector group, normal control group, positive drug group (5-fluorouracil, 0.25  $\mu\text{g/mL}$ ) and AMP group (300  $\mu\text{mol/L}$ ). Except LoVo cells transfected with empty vector were adopted in empty vector group, LoVo cells transfected with DCD were adopted in other groups. The effects of AMP on migration ability of LoVo cells were studied by Transwell chamber migration and scratch experiments. The invasion ability of LoVo cells was studied by Transwell invasion experiment. RESULTS: Western blot analysis showed that compared with blank control group and empty vector group, the protein expression of DCD in DCD group were increased significantly ( $P < 0.01$ ). Results of migration and invasion experiments showed that compared with empty vector group, the number of transmembrane cells and the rate of cell migration were increased significantly in normal control group ( $P < 0.01$ ). Compared with normal control group, the number of transmembrane cells and the rate of cell migration were decreased significantly in positive drug group and AMP group ( $P < 0.01$ ); inhibitory effects on migration and invasion of AMP were better than 5-fluorouracil ( $P < 0.01$ ). CONCLUSIONS: Over-expressed DCD could promote the migration and invasion of tumor cells. AMP can significantly inhibit migration and invasion ability of LoVo cells with DCD over-expression.

**KEYWORDS** Ampelopsin; Colorectal cancer; LoVo cell; Dermcidin; Migration; Invasion

大肠癌是常见的恶性消化道肿瘤之一,在世界范围内其发病率位居女性恶性肿瘤第2位、男性恶性肿瘤第3位<sup>[1]</sup>。随着生活和饮食方式的改变,大肠癌的发病率和病死率呈逐年上升趋势<sup>[2]</sup>。目前大肠癌的治疗仍以手术治疗为主,辅以化疗、靶向治疗等,患者术后5年总生存率为50%左右<sup>[3]</sup>,其中发生复发、转移的患者5年生存率仅约为19%<sup>[4]</sup>。肿瘤的侵袭与转移是导致大肠癌患者术后复发、治疗失败和死亡的主要原因,而化疗和靶向治疗药物又有一定的毒副作用,因此寻找抗肿瘤侵袭和转移的药物,特别是高效低毒的抗肿瘤药物一直是临床研究热点。

蛇葡萄素 (Ampelopsin, AMP) 是中药材藤茶的主要活性成分,具有抗肿瘤、抗炎、抗病毒、改善循环、提高免疫力等多种药理作用,其抗肿瘤作用较强、毒性低、副作用小,且价廉易得,比靶向药物成本低<sup>[5]</sup>,作为一种天然来源的抗肿瘤药具有一定优势。近年来研究发现,AMP抗肿瘤机制主要包括:抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡,抑制新生血管形成,抑制肿瘤细胞的侵袭、运动和黏附等<sup>[6]</sup>。

已有研究证实,皮离蛋白 (Dermcidin, DCD) 在肝癌组织及细胞、肺癌组织及血清、大肠癌组织中的表达均明显升高<sup>[7-9]</sup>,提示其可能是上述肿瘤的治疗靶点之一。本课题组前期研究发现,DCD能促进肿瘤细胞的侵袭和转移<sup>[10-11]</sup>。本研究选择迁移性和侵袭性均较强的大肠癌 LoVo 细胞<sup>[12]</sup>为对象,通过质粒瞬时转染实现 DCD 在 LoVo 细胞中的过表达,并考察 AMP 对 DCD 过表达的 Lo-

Vo 细胞迁移和侵袭能力的抑制作用,为将 AMP 开发为有效的临床抗肿瘤药物提供实验基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

HF-90 型细胞恒温培养箱 (力康生物医疗科技控股有限公司); 细胞培养板 (无锡耐思生物科技有限公司); Transwell 细胞培养小室 (美国 Corning 公司); BDS200 型倒置光学显微镜 (北京奥特伟业光学仪器有限公司); TGL-16R 型高速冷冻离心机 (珠海黑马医学仪器有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

AMP 原料药 (成都曼思特生物科技有限公司, 批号: MUST-17031501, 纯度: 98%); 5-氟尿嘧啶注射液 (5-FU, 上海旭东海普药业有限公司, 批号: FA170507, 规格: 10 mL: 0.25 g); DCD 质粒 (广州吉赛生物科技股份有限公司, 批号: 170812L35); Lipofectamine 2000 试剂 (美国英杰生命技术有限公司); DMEM/F12 培养基 (美国 Gibco 公司); 兔抗人 DCD 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司); 鼠源 GAPDH 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG (二抗, 天津三箭生物技术有限公司); 多聚甲醛 (北京雷根生物技术有限公司); ECL 电化学发光液 [安迪福诺生物科技 (武汉) 有限公司]; Matrigel 胶 (美国 BD 公司, 批号: MA01730); 胎牛血清 [上海依科赛生物科技 (太仓) 有限公司]; 青霉素、链霉素、胰酶 (广州碧云天生物技术有限公司); 结晶紫 (北京索莱宝科技有限公司); 其他试剂均

为分析纯,磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.2)为实验室自制,水为双蒸水。

### 1.3 细胞

人大肠癌 LoVo 细胞(广州吉赛生物科技股份有限公司传代冻存)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养

用含 10% 胎牛血清、100 u/mL 青霉素和 100 u/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养基(以下简称“培养基”),于 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养,取对数生长期的 LoVo 细胞进行后续实验,调整细胞密度为 1×10<sup>6</sup> 个/mL。

### 2.2 DCD 瞬时转染 LoVo 细胞

取 LoVo 细胞接种于 6 孔板(5×10<sup>5</sup> 个/mL)中,待细胞融合至 80% 时进行转染。以无血清 DMEM/F12 培养基(以下简称“无血清培养基”)100 μL 稀释 DCD 质粒 2.5 μg;另以无血清培养基 100 μL 稀释 Lipofectamine 2000 试剂 4 μL,室温放置 5 min;将稀释好的 DCD 质粒和 Lipofectamine 2000 试剂混合,室温放置 20 min,以形成 DCD 质粒-Lipofectamine 2000 复合物。取该复合物 200 μL 加至每孔含无血清培养基 800 μL 的培养板中,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 5~6 h 后,完成 DCD 在大肠癌 LoVo 细胞中的瞬时转染;然后吸弃无血清培养基,更换新鲜培养基。另制备不含 DCD 的空载体转染 LoVo 细胞,除不加入 DCD 质粒外,其他操作同上。

### 2.3 转染后 LoVo 细胞中 DCD 蛋白表达水平检测

采用蛋白免疫印记法检测。将细胞分为空白对照组(LoVo 细胞)、空载体组(空载体转染 LoVo 细胞)、DCD 组(DCD 转染 LoVo 细胞)。取相应的对数生长期 LoVo 细胞,胰酶消化,以培养基制备细胞悬液(1×10<sup>6</sup> 个/mL),接种于 6 孔板中,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。然后加入蛋白裂解液冰上裂解细胞提取总蛋白,并以三嗪甲酸(BCA)法进行蛋白定量。取总蛋白依次经聚丙烯酰胺凝胶电泳、转膜、封闭等,再加入 DCD 单克隆抗体(1:1 000)和 GAPDH 抗体(1:5 000),4 ℃ 孵育过夜,然后加入二抗(1:5 000),室温孵育 40 min。采用化学发光法(ECL)显影,以 Quantity One 4.52 分析软件测定条带灰度值,对各组条带进行灰度分析。目的蛋白的相对表达量(IOD)=目的蛋白 DCD 灰度值/内参 GAPDH 灰度值。

### 2.4 细胞迁移实验

2.4.1 Transwell 小室迁移实验 将细胞分为空载体组、正常对照组、阳性药物组和 AMP 组(除空载体组采用转染空载体的 LoVo 细胞外,其余组均采用转染 DCD 的 LoVo 细胞进行实验)。取相应的对数生长期 LoVo 细胞,经胰酶消化后,以无血清培养基制备细胞悬液(1×10<sup>6</sup> 个/mL)。将 Transwell 细胞培养小室放置于 24 孔板底部,上室中加入细胞悬液 100 μL/孔,分别加入相应

药物(根据预实验,阳性药物 5-FU、AMP 终质量浓度分别设为 0.25 μg/mL、300 μmol/L;空载体组、正常对照组加入等容无血清培养基),下室中加入 600 μL 培养基,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。每组设置 3 个复孔。培养完毕后取出小室,用棉签擦去上室膜内表面残留细胞,以 4% 多聚甲醛固定 15 min,然后用 0.1% 结晶紫溶液染色 5 min。在倒置光学显微镜下随机选取 6 个视野,观察细胞形态并拍照,读取各个视野中的平均跨膜细胞数。

2.4.2 细胞划痕实验 按“2.4.1”项下方法分组。取相应的对数生长期 LoVo 细胞,经胰酶消化后,以无血清培养基制备细胞悬液(5×10<sup>5</sup> 个/mL),接种于 6 孔板中,分别加入相应药物,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h。待细胞贴壁密度至 80%~90% 时,用移液枪取细胞液垂直均匀划痕,以 PBS 清洗 1 次除去细胞碎片,加入培养基,在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 0、24、48 h 后,在倒置显微镜下观察细胞并拍照。每组设置 3 个复孔。采用 Photoshop 7.0 软件分析细胞的迁移距离,并计算细胞迁移率。细胞迁移率(%)=(0 h 划痕间距-不同时间点划痕间距)/0 h 划痕间距×100%。

### 2.5 Transwell 侵袭实验

按“2.4.1”项下方法分组。4 ℃ 下溶解 Matrigel 胶过夜后,加入 3 倍体积比的预冷无血清培养基稀释。取稀释后的 Matrigel 胶 100 μL 加入预冷的 Transwell 小室中,37 ℃ 孵育 1.5 h 使 Matrigel 胶凝固,吸弃多余的 Matrigel 胶。然后按“2.4.1”项下“上室中加入细胞悬液 100 μL/孔……”起同法操作,读取倒置光学显微镜下视野中的平均跨膜细胞数。

### 2.6 统计学方法

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析。各实验均独立重复 3 次。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验进行组间两两比较,并以 GraphPad Prism 6.0 软件作柱形图分析。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 LoVo 细胞中 DCD 的蛋白表达水平检测结果

与空白对照组、空载体组分别比较,DCD 组细胞中 DCD 的蛋白表达水平均显著升高,差异均有统计学意义(*P*<0.01),表明 DCD 成功转染到 LoVo 细胞中。各组细胞中 DCD 的蛋白表达电泳图见图 1,蛋白表达水平柱形图见图 2。

### 3.2 AMP 对过表达 DCD 的 LoVo 细胞迁移能力的影响

3.2.1 Transwell 小室迁移实验结果 空载体组、正常对照组、阳性药物组和 AMP 组跨膜细胞数均值分别为 101.35 ± 1.32、174.33 ± 5.13、74.67 ± 1.43、69.67 ± 2.08。与空载体组比较,正常对照组跨膜细胞数显著增多,差异有统计学意义(*P*<0.01),表明 DCD 转染后能促进 LoVo 细胞的迁移。与正常对照组比较,阳性药物组和 AMP 组跨膜细胞数均显著减少,差异均有统计学意义

( $P < 0.01$ ),提示AMP对过表达DCD的LoVo细胞的迁移能力均有明显抑制作用。各组细胞迁移实验显微图见图3,跨膜细胞数柱形图见图4。

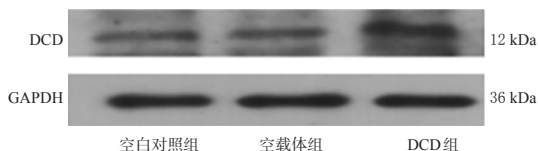
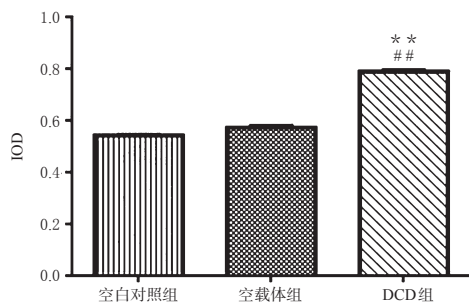


图1 各组细胞中DCD的蛋白表达电泳图

Fig 1 Electrophorograms of protein expression of DCD in each group



注:与空白对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与空载体组比较,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. empty vector group, \*\* $P < 0.01$

图2 各组细胞中DCD的蛋白表达水平柱形图

Fig 2 Column diagram of protein expression levels of DCD in each group

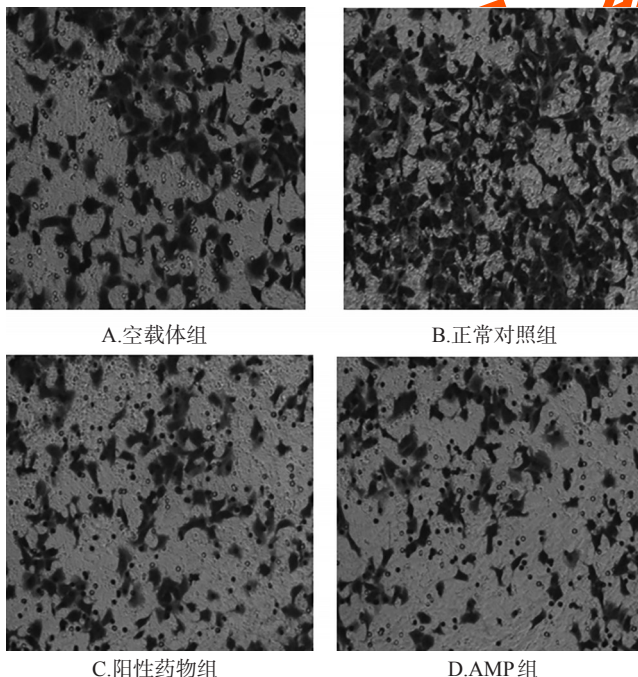
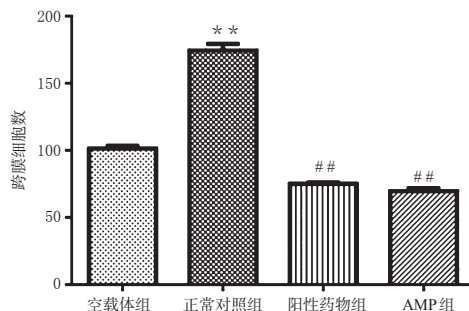


图3 各组细胞Transwell小室迁移实验显微图(结晶紫染色,  $\times 200$ )

Fig 3 Microscope diagrams of LoVo cells in Transwell chamber migration experiment in each group (crystal violet staining,  $\times 200$ )

3.2.2 细胞划痕实验结果 0 h时,空载体组、正常对照组、阳性药物组和AMP组细胞划痕间距基本相同;24、



注:与空载体组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与正常对照组比较,\*\* $P < 0.01$

Note: vs. empty vector group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. normal control group, \*\* $P < 0.01$

图4 各组跨膜细胞数柱形图(迁移实验)

Fig 4 Column diagram of transmembrane cells in each group (migration experiment)

48 h时,各组细胞划痕间距均变窄,正常对照组细胞在48 h时划痕甚至已消失,各组细胞迁移率分别为62%、75%、61%、50% (24 h时)与85%、100%、95%、88% (48 h时)。与空载体组比较,24、48 h时,正常对照组细胞迁移率均显著升高,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明DCD转染后能促进LoVo细胞的迁移。与正常对照组比较,24、48 h时,阳性药物组和AMP组细胞迁移率均显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与阳性药物组比较,24、48 h时,AMP组细胞迁移率均显著降低,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ )。这提示,AMP对过表达DCD的LoVo细胞的迁移能力有明显的抑制作用,且作用优于5-FU。各组细胞划痕实验显微图见图5,迁移率柱形图见图6。

### 3.3 AMP对过表达DCD的LoVo细胞侵袭能力的影响

空载体组、正常对照组、阳性药物组和AMP组跨膜细胞数均值分别为 $83.26 \pm 1.05$ 、 $125.67 \pm 5.13$ 、 $103.04 \pm 3.01$ 、 $60.67 \pm 2.08$ 。与空载体组比较,正常对照组跨膜细胞数显著增多,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明DCD转染后能促进LoVo细胞的侵袭。与正常对照组比较,阳性药物组和AMP组跨膜细胞数均显著减少,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );与阳性药物组比较,AMP组跨膜细胞数显著减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。这提示,AMP对过表达DCD的LoVo细胞的侵袭能力有明显抑制作用,且作用优于5-FU。各组细胞侵袭实验显微图见图7,跨膜细胞数柱形图见图8。

## 4 讨论

肿瘤细胞侵袭是肿瘤转移不可或缺的重要步骤,其发生是一个多因素、多环节参与的复杂生物学过程,涉及到肿瘤细胞黏附、迁移运动、基质降解、新生血管生成、肿瘤微环境变化、肿瘤细胞免疫逃逸等多方面的作用机制<sup>[10,13]</sup>。大量研究已证实,肿瘤细胞的侵袭和迁移速度越快,肿瘤转移能力越强。寻找肿瘤的侵袭、转移过程中能起到抑制作用的药物,避免肿瘤最终在机体内扩散,成为肿瘤治疗亟待解决的问题。

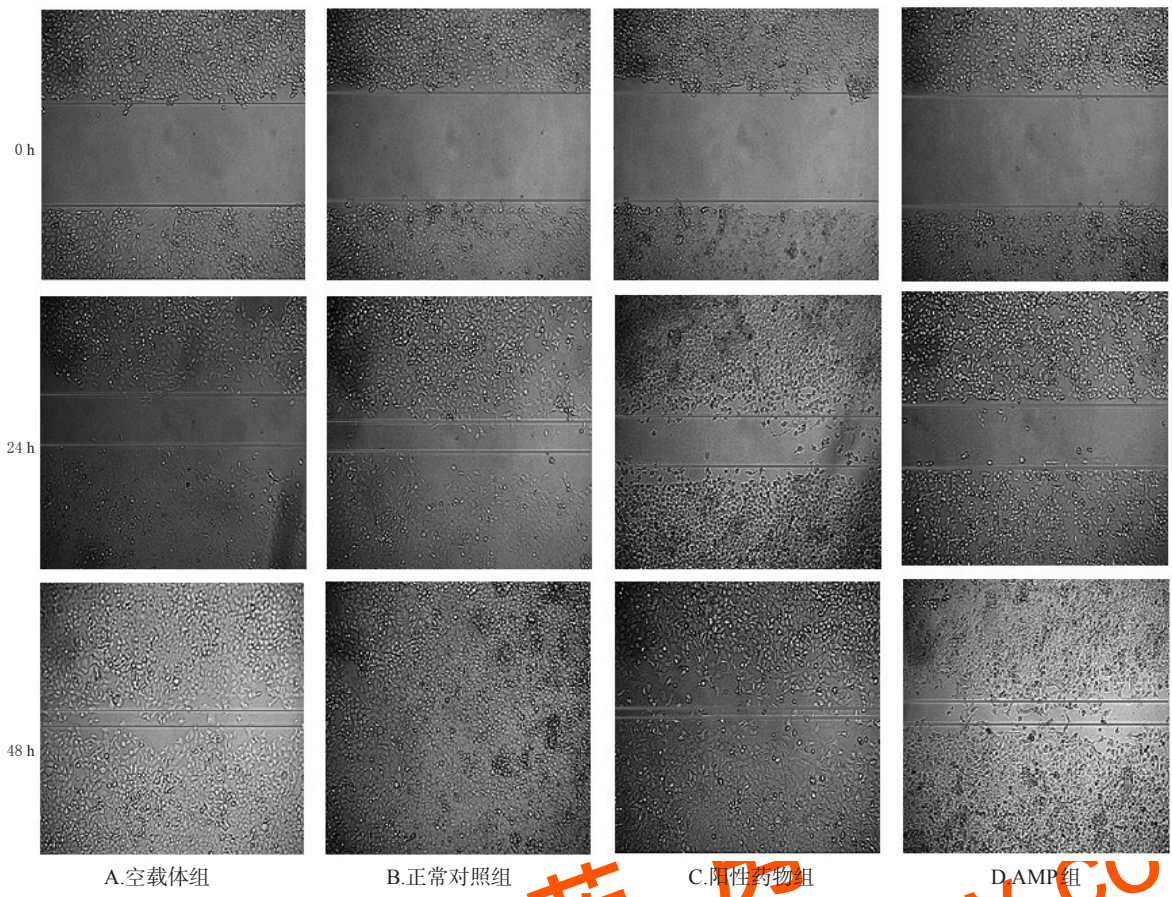
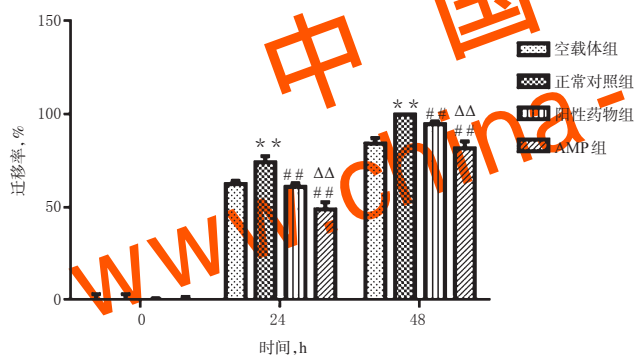


图5 各组细胞划痕实验显微图( $\times 100$ )

Fig 5 Microscope diagrams of LoVo cells in scratch experiment in each group( $\times 100$ )



注:与空载体组比较,  $**P < 0.01$ ;与正常对照组比较,  $**P < 0.01$ ;与阳性药物组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$

Note: vs. empty vector group,  $**P < 0.01$ ; vs. normal control group,  $**P < 0.01$ ; vs. positive control group,  $\Delta\Delta P < 0.01$

图6 各组细胞迁移率柱形图(划痕实验)

Fig 6 Column diagram of migration rate of LoVo cells (scratch experiment)

AMP作为一种源自中药材的天然活性物质,在抗肿瘤方面有明显的优势。已有研究发现,AMP能通过下调趋化因子基质细胞衍生因子1的特异受体(CXCR4),抑制前列腺癌细胞PC-3细胞的迁移和侵袭<sup>[14]</sup>;在体内外均能明显抑制黑色素瘤B16细胞的侵袭、运动和黏附<sup>[15]</sup>;能通过抑制上皮-间质转化(EMT)来减少卵巢癌细胞的迁移和侵袭<sup>[16]</sup>;能通过p38丝裂原活化蛋白激酶/基质金属

蛋白酶2(p38MAPK/MMP-2)信号通路抑制肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )诱导的骨肉瘤细胞的迁移和侵袭<sup>[17]</sup>。然而AMP对大肠癌细胞侵袭和迁移能力的影响的研究较少。

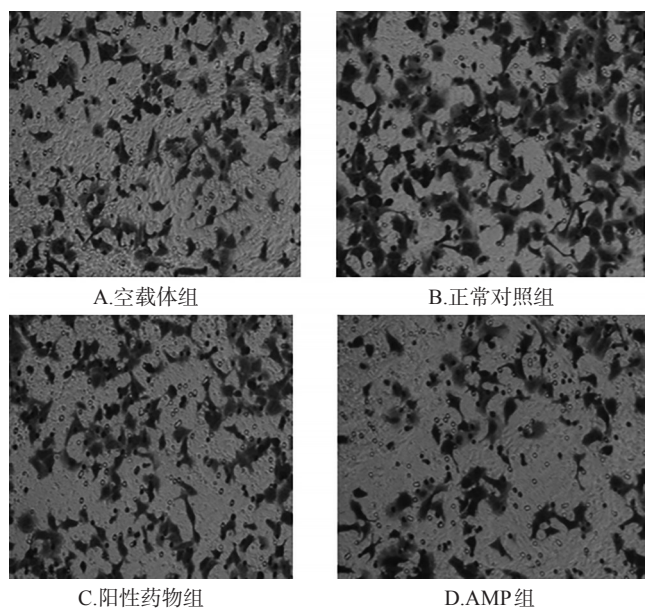
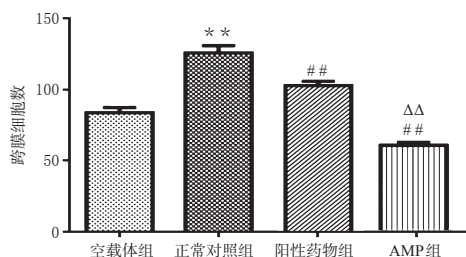


图7 各组细胞侵袭实验显微图(结晶紫染色, $\times 200$ )

Fig 7 Microscope diagrams of LoVo cell in invasion experiment in each group (crystal violet staining,  $\times 200$ )



注:与空载体组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与正常对照组比较, \*\* $P < 0.01$ ;与阳性药物组比较,  $\Delta\Delta P < 0.01$

Note: vs. empty vector group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. normal control group, \*\* $P < 0.01$ ; vs. positive drug group,  $\Delta\Delta P < 0.01$

图8 各组跨膜细胞数柱形图(侵袭实验)

Fig 8 Column diagram of transmembrane cells in each group (invasion experiment)

DCD是由一种新发现的由位于人类12号染色体上的调控基因所编码的多肽<sup>[18]</sup>。研究发现,DCD与肝癌、黑色素瘤等的转移密切相关,能明显促进癌细胞迁移<sup>[10,19]</sup>。本研究通过质粒瞬时转染法使DCD在大肠癌LoVo细胞中过表达。蛋白免疫印迹法检测结果显示,DCD转染后LoVo细胞中DCD的蛋白表达水平显著升高,表明DCD已成功转染到LoVo细胞中。通过迁移实验和侵袭实验发现,与空载体组比较,正常对照组跨膜细胞数和细胞迁移率均显著升高,表明DCD能够促进肿瘤细胞的迁移和侵袭。

5-FU是治疗胃肠道恶性肿瘤常用的药物。本研究以其作为阳性对照药物,通过迁移实验和侵袭实验发现,5-FU组和AMP组跨膜细胞数和细胞迁移率均显著减少或降低,提示两者均能够有效抑制LoVo细胞的迁移和侵袭;且与化疗药物5-FU比较,AMP对细胞迁移和侵袭能力的抑制作用更强。

综上所述,AMP对过表达DCD的大肠癌LoVo细胞的迁移和侵袭能力均有显著的抑制作用,提示其具有减缓大肠癌细胞转移的潜力,有望开发为有效的临床抗肿瘤药物。但本结论仅来自于体外研究,AMP在体内是否也有类似的效果,另外DCD在大肠癌中的具体作用及其机制仍需要进一步深入探索。

### 参考文献

[1] LUCCHETTI D, CALAPA F, PALMIERI V, et al. Differentiation affects the release of exosomes from colon cancer cells and their ability to modulate the behavior of recipient cells[J]. *Am J Pathol*, 2017, 187(7): 1633-1647.

[2] TORRE LA, BRAY F, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2): 87-108.

[3] 杨晓, 罗燕, 李勇敏, 等. 外泌体在大肠癌中的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(6): 182-188.

[4] BURGERS K, MOORE C, BEDNASH L. Cancer of the colorectal cancer survivor[J]. *Am Fam Physician*, 2018, 97(5): 331-336.

[5] 曹晓孚, 孟路华, 闫春章. 黄酮类化合物逆转肿瘤多药耐药的研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(5): 570-574.

[6] 郑雪晶, 张文婷, 谢黎雅, 等. 蛇葡萄属植物药理作用研究进展[J]. *福建医药杂志*, 2013, 35(3): 152-154.

[7] 邱芳华, 薛志锋, 李秋明, 等. Dermcidin在原发性肝癌诊断及病情评估中的意义[J]. *检验医学与临床*, 2016, 13(19): 2706-2708.

[8] 余琳, 肖洪广, 梁剑菲, 等. Dermcidin作为新的肺癌生物标志物的研究[J]. *中国热带医学*, 2017, 17(6): 550-552.

[9] 陈舒颖, 邱芳华, 李秋明, 等. 血清DCD、CA199、CA724和CEA联合检测对大肠癌的诊断价值[J]. *实用医学杂志*, 2017, 33(15): 2482-2485.

[10] SHEN SL, QIU FH, DAYARATHNA TK, et al. Identification of Dermcidin as a novel binding protein of Nck1 and characterization of its role in promoting cell migration[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812(6): 703-710.

[11] QIU F, HUANG D, XIAO H, et al. Detection of tyrosine-phosphorylated proteins in hepatocellular carcinoma tissues using a combination of GST-Nck1-SH2 pull-down and two-dimensional electrophoresis[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(4): 1209-1214.

[12] PENG HX, WU WQ, YANG DM, et al. Role of B7-H4 siRNA in proliferation, migration, and invasion of LoVo colorectal carcinoma cell line[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 326981.

[13] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314.

[14] NI F, GONG Y, LI L, et al. Flavonoid ampelopsin inhibits the growth and metastasis of prostate cancer in vitro and in mice[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e38802.

[15] 刘德育, 郑宏强, 罗高琴. 蛇葡萄素体内外对小鼠B16黑色素瘤侵袭和转移的抑制作用[J]. *中国中药杂志*, 2003, 28(10): 63-67.

[16] LIU T, LIU P, DING F, et al. Ampelopsin reduces the migration and invasion of ovarian cancer cells via inhibition of epithelial-to-mesenchymal transition[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(2): 861-867.

[17] LIU C, ZHAO P, YANG Y, et al. Ampelopsin suppresses TNF-alpha-induced migration and invasion of U2OS osteosarcoma cells[J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(6): 4729-4736.

[18] SCHITTEK B, HIPFEL R, SAUER B, et al. Dermcidin: a novel human antibiotic peptide secreted by sweat glands[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(12): 1133-1137.

[19] ORTEGA-MARTÍNEZ I, GARDEAZABAL J, ERRAMUZPE A, et al. Vitronectin and dermicidin serum levels predict the metastatic progression of AJCC I - II early-stage melanoma[J]. *Int J Cancer*, 2016, 139(7): 1598-1607.

(收稿日期: 2018-05-15 修回日期: 2018-09-28)

(编辑: 段思怡)