

褪黑素对人胃癌细胞 SGC-7901 黏附和迁移的影响

陈宜刚¹,许蕊²,杨玲³,崔洁²,杜军^{2*}

(¹泰州职业技术学院医学技术学院,江苏 泰州 225300;²南京医科大学生理学系,江苏 南京 210029;³苏州大学附属第三医院心脏科,江苏 常州 213003)

[摘要] 目的:研究褪黑素对人胃癌细胞 SGC-7901 黏附和迁移能力的影响及探索可能的分子机制。方法:用不同浓度的褪黑素孵育人胃癌细胞 SGC-7901 24 h,通过免疫印迹方法检测 F-actin 和 G-actin 蛋白表达水平,通过免疫荧光法检测细胞骨架结构的改变,通过细胞黏附实验观察胃癌细胞对血管内皮细胞黏附能力的变化,通过划痕实验检测褪黑素对细胞迁移能力的影响。结果:褪黑素使人胃癌细胞 SGC-7901 F-actin 量明显降低,同时细胞骨架结构发生重组,应力纤维出现断裂;褪黑素可抑制胃癌细胞的迁移及对血管内皮细胞的黏附能力。结论:褪黑素可能通过破坏细胞内应力纤维结构的稳定,最终导致了胃癌细胞的黏附和迁移能力的降低。

[关键词] SGC-7901 人胃癌细胞;细胞骨架;褪黑素

[中图分类号] R735.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)12-1644-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20141204

Melatonin inhibits adhesion and migration of SGC-7901 gastric cancer cells

Chen Yigang¹, Xu Rui², Yang Ling³, Cui Jie², Du Jun^{2*}

(¹College of Medical Technology, Taizhou Polytechnic College, Taizhou 225300; ²Department of Physiology, NJMU, Nanjing 210029; ³Department of Cardiology, the Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213003, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of melatonin on adhesion and migration abilities of human SGC-7901 gastric cancer cells and its role in reorganization of actin cytoskeleton. **Methods:** SGC-7901 cells were treated with different concentrations of melatonin for 24h. The contents of G-actin (in cytosolic fraction) and F-actin (in cytoskeletal fraction) in cells were measured by Western blot. Cellular F-actin stained with FITC-phalloidin was examined by fluorescence microscopy. Adhesive assay was used to detect the adhesive ability of SGC-7901 cells to HUVECs. Migration rate was measured by wound healing assay. **Results:** After treated with melatonin for 24h, the cellular F-actin was depolymerized and actin cytoskeleton was rearranged. Consistently, the abilities of adhesion and migration in SGC-7901 cells were significantly reduced compared to the control cells. **Conclusion:** Melatonin inhibits the abilities of adhesion and migration in SGC-7901 cells, which may be via reorganization of cellular actin cytoskeleton.

[Key words] SGC-7901 gastric cancer cells; cytoskeleton; melatonin

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(12): 1644-1648]

临床研究表明,胃癌细胞的转移通常以直接迁移和淋巴转移为主,晚期病例的胃癌细胞也可发生血行转移。胃癌细胞转移的分子机制一直是国内外相关研究关注的重点。胃癌细胞迁移能力的增强是

其转移进而导致临床不良预后的重要原因。因此,对防止或降低胃癌细胞迁移能力的药物开发,对临床上胃癌转移的防治及抗胃癌新药的研发具有重要的意义。

褪黑素是一种胺类激素,除了可由松果体分泌外,在胃肠道、皮肤及视网膜也有所分泌。已有研究表明它在胃肠道的分泌量是松果体处的 400~500 倍,并能影响胃肠道的多种生理功能,包括腺体分

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目(81201614);
江苏省六大人才高峰(JY-020)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: dujun@njmu.edu.cn

泌、胃肠运动、营养物质的消化和吸收等^[1]。褪黑素还能够促进胃黏膜细胞中一氧化氮(NO)的产生及微循环血管的扩张,能减轻胃黏膜损伤,加速胃愈合^[2-5]。以往研究表明,褪黑素可以作为活性氧代谢物清除剂,抑制缺氧引起的 SGC-7901 人胃癌细胞上皮-间充质转化^[6]。有研究发现,褪黑素还具有抑制胃癌细胞增殖和转移的作用^[7],但其确切机制目前尚不清楚。肌动蛋白(actin)细胞骨架的重组在真核细胞结构和形态的稳定及众多细胞功能的实现中具有极其重要的作用,也是细胞黏附能力和运动能力改变得以实现的关键^[8-9]。本文推测褪黑素可能通过改变细胞骨架结构,从而影响胃癌细胞的黏附及迁移能力,进而参与胃癌细胞浸润和转移的调控。

1 材料和方法

1.1 材料

SGC-7901 人胃癌细胞、脐静脉血管内皮细胞(HUVECs)购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。褪黑素(Sigma 公司,美国);DMEM 培养基(Gibco 公司,美国);新生牛血清(PAA 细胞培养公司,奥地利);异硫氰酸荧光素-鬼笔环肽、actin 抗体(Sigma 公司,美国);HRP 标记的二抗(中杉金桥公司,北京);ECL 化学发光剂(Pierce 公司,美国);电泳仪和半干转膜仪(Bio-Rad 公司,美国);水溶性封片剂(Southern Biotech 公司,英国)。细胞培养箱(Thermo 公司,美国),倒置显微镜(Nikon 公司,日本),荧光显微镜(Olympus 公司,日本),成像系统(Bio-Rad 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

SGC-7901 人胃癌细胞使用添加 10%(V/V)胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,于 5% CO₂、饱和湿度的细胞培养箱中 37℃培养。

用乙醇溶解褪黑素,配制成 500 mmol/L 的储存液。实验分乙醇溶剂对照组和 10、100 μmol/L 和 1 mmol/L 浓度的褪黑素受试药物组。乙醇在各组培养液中的终浓度为 0.2%。

1.2.2 免疫印迹分析 actin 含量变化

细胞分组处理后,弃去残液,冷 PBS 洗 2 遍,加入 500 μl 预冷的细胞裂解液(0.5% Triton X-100,1% SDS,300 mmol/L 蔗糖,5 mmol/L Tris-HCl,2 mmol/L EDTA,1% cocktail,1 mmol/L Na₃VO₄,0.5 mmol/L PMSF pH7.4),刮刀刮取细胞至预冷的 EP 管,冰上振摇 20 min。4℃离心(8 000 r/min,20 min)后,将上清转入预冷的 EP 管即为胞浆组分(Triton 可溶组分),沉

淀加 150 μl 细胞裂解液,冰上吹打重悬均匀即为骨架组分(Triton 不溶组分)。BCA 法测定蛋白浓度,样品-70℃保存备用。将蛋白样品(40 μg)与加样缓冲液混合,100℃煮沸 3 min,微离心后用于 SDS-PAGE 凝胶电泳(10%)。电泳完毕后将胶上蛋白半干转至硝酸纤维素膜,膜于 5%脱脂奶粉中室温封闭 1 h,加 1:1 000 稀释的一抗(actin)4℃过夜,加 1:2 000 稀释的 HRP 标记的二抗室温孵育 1 h,加 ECL 反应 4 min,于暗房内压片,显影。

1.2.3 F-actin 染色及细胞免疫荧光染色

SGC-7901 人胃癌细胞在灭菌处理后的盖玻片上进行爬片,按实验要求经不同处理后用 4%多聚甲醛固定,0.2% Triton X-100 对细胞进行破膜处理,1% BSA 室温封闭 1 h,将盖玻片扣在终浓度为 2 μg/ml 的 FITC-鬼笔环肽液滴上,37℃避光孵育 1 h,PBS 溶液清洗 5 min×3 次,用含 DAPI 的水溶性封片剂封片,在荧光显微镜下观察并拍照记录。

1.2.4 细胞黏附能力测定

肿瘤细胞分组处理 24 h,0.1%胰蛋白酶消化后,以 0.1%BSA-DMEM 调节细胞密度为 1×10⁶ 个/ml,加入 CFDA 荧光探针(1:1 000)标记肿瘤细胞后,取 200 μl 细胞悬液于铺满 HUVECs 的 96 孔平板(每实验组设 6 个平行孔),于 CO₂ 培养箱孵育 1 h 后弃培养液,PBS 轻轻吹洗除去未黏附的肿瘤细胞,荧光显微镜下计算残留的肿瘤细胞数。细胞黏附率=(实验组细胞数/对照组细胞数)×100%。

1.2.5 细胞迁移能力测定

细胞以 2×10⁵ 个/孔的密度接种于 96 孔平板(每实验组设 6 个平行孔)。长成单层的细胞用无菌移液管尖在各培养板细胞生长单层的相同位置划平行直线,PBS 冲洗去除被移液管尖破坏而脱落的细胞,此时在倒置显微镜下拍照,记为 0 h。细胞分组处理 24 h 后,在倒置显微镜下可观察到细胞从划直线处向外爬出一定距离,每孔取与加药前相同视野进行拍摄,计算迁移至损伤区的细胞数,细胞迁移率=(实验组迁移平均细胞数/对照组迁移平均细胞数)×100%。

1.3 统计学方法

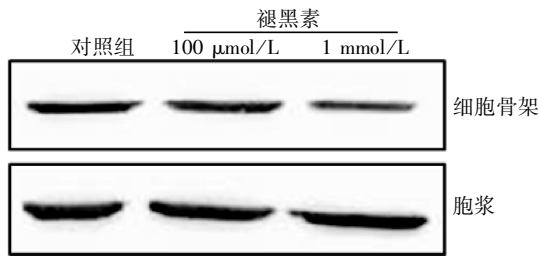
采用 SPSS11.0 软件进行统计学分析,多组比较采用 ANOVA 法分析,两两比较采用 *q* 检验,*P* ≤ 0.05 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 褪黑素诱导 SGC-7901 人胃癌细胞的细胞骨架

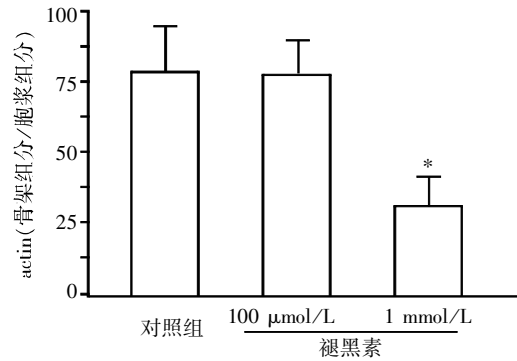
和胞浆组分中 actin 的分布变化

随着褪黑素处理浓度的增加,位于骨架组分中的 F-actin 减少,F-actin/G-actin(骨架组分/胞浆组分)比值随褪黑素处理而降低,和对照组相比有显著性差异($P < 0.05$,图 1)。



2.2 褪黑素诱导 SGC-7901 人胃癌细胞细胞骨架发生重构

为了确定褪黑素是否诱导细胞发生了细胞骨架重排,用 FITC 荧光标记的鬼笔环肽染色 F-actin,通过免疫荧光的方法检测了 F-actin 分布状态的改



与对照组比较, * $P < 0.05$, $n=3$ 。

图 1 褪黑素对 SGC-7901 细胞骨架和胞浆组分中 actin 分布的影响

Figure 1 The redistribution of actin during melatonin treatment in SGC-7901 cells

变。结果发现胃癌细胞中应力纤维结构呈丝状,在细胞浆内呈有规律的放射状排列。褪黑素处理后 F-actin 排列紊乱并逐渐减少,在细胞内弥散分布。以上结果清楚表明褪黑素能影响 SGC-7901 人胃癌细胞的 F-actin 细胞骨架结构(图 2)。

2.3 褪黑素抑制 SGC-7901 人胃癌细胞迁移

细胞划痕实验是研究细胞迁移能力的经典实验。结果表明,1 mmol/L 褪黑素处理可明显抑制迁移至损伤区的 SGC-7901 细胞数(图 3)。

2.4 褪黑素抑制 SGC-7901 人胃癌细胞黏附于血管

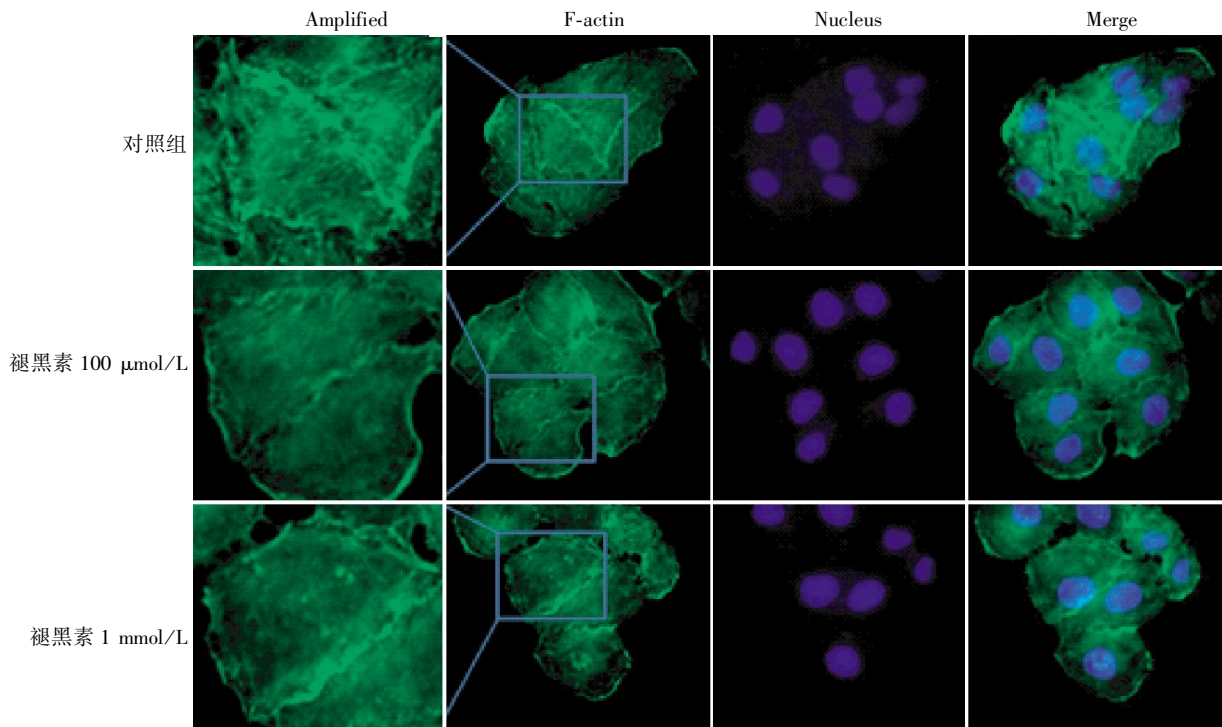


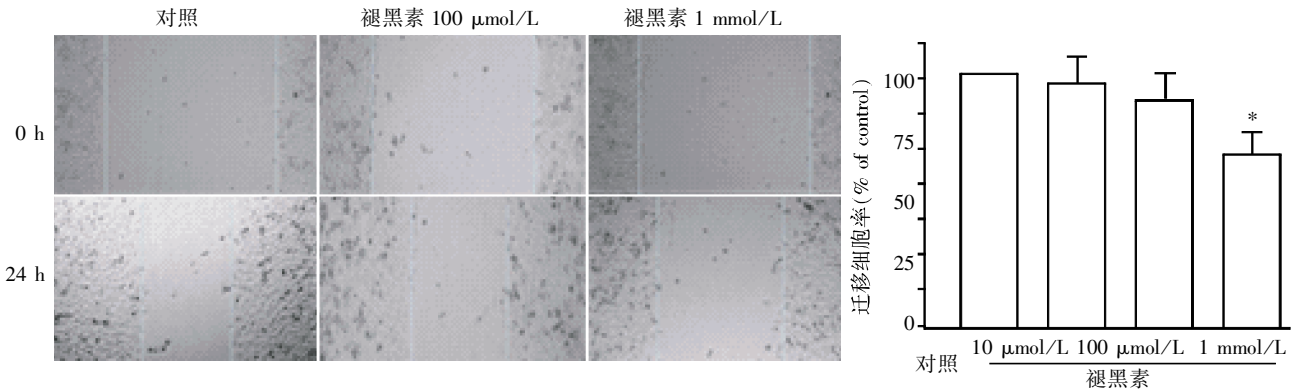
图 2 褪黑素诱导 SGC-7901 人胃癌细胞细胞骨架发生重构(荧光显微镜,×400)

Figure 2 Melatonin induced rearrangement of cytoskeleton in SGC-7901 human gastric cancer cells (fluorescence microscopy,×400)

内皮细胞

为进一步确定褪黑素对迁移的影响,观察了 SGC-7901 人胃癌细胞对血管内皮细胞 HUVECs 的黏附能力。由于在上述实验中确定了 1 mmol/L 褪黑素能明显抑制细胞迁移,因此在黏附实验中仅选择

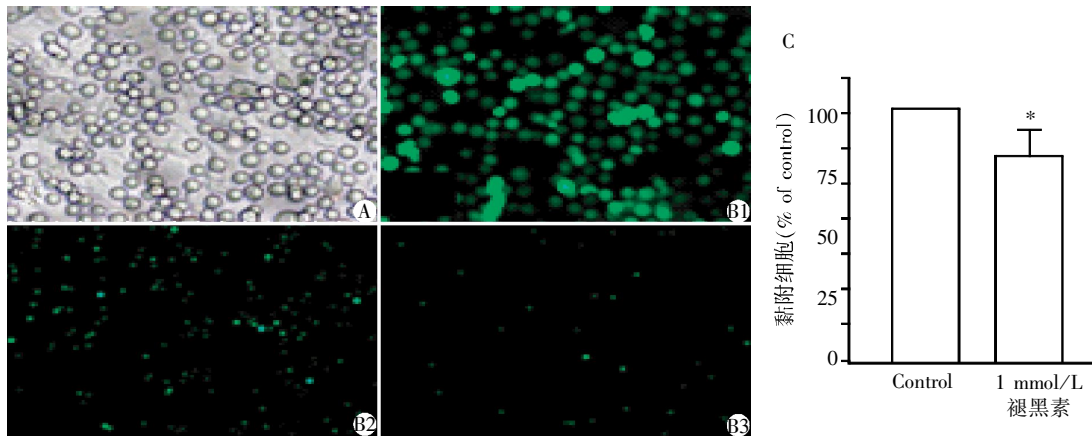
了该浓度的褪黑素进行观察。该浓度也是褪黑素处理肿瘤细胞时常用的浓度 [10-11]。结果表明,1 mmol/L 褪黑素处理组细胞的黏附率较对照组有显著降低 ($P < 0.05$),表明其可明显降低 SGC-7901 细胞和血管内皮细胞间的黏附(图 4)。



与对照组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。

图 3 褪黑素抑制 SGC-7901 人胃癌细胞的迁移能力

Figure 3 Melatonin suppressed migration of SGC-7901 human gastric cancer cells



A: 倒置显微镜图片($\times 200$); B: 荧光显微镜图片: B1: 0 h ($\times 200$), B2: 1 h 对照组 ($\times 100$), B3: 1 h 1 mmol/L 褪黑素处理组 ($\times 100$); C: 两组黏附率统计图,与对照组比较, * $P < 0.05$, $n = 6$ 。

图 4 褪黑素抑制 SGC-7901 人胃癌细胞的黏附能力

Figure 4 Melatonin suppressed adhesion of SGC-7901 human gastric cancer cells

3 讨论

恶性肿瘤细胞迁移能力的增强是导致恶性肿瘤细胞侵袭和转移的首要因素,而恶性肿瘤细胞的迁移能力改变与细胞内 actin 的动态重排密切相关。actin 是构成细胞骨架的主要成分之一,在细胞内 actin 以 actin 单体(G-actin)和 actin 多聚体(F-actin)两种形式存在。actin 单体和多聚体之间的动态平衡,能重排细胞骨架结构,并使细胞膜形态快速变化,形成与细胞运动相关结构如伪足和皱褶。F-actin 还参与了细胞与细胞外基质间的黏附。细胞外基质、整合素和 F-actin 共同聚集于细胞膜上形成特殊的黏着斑

结构,并由此介导细胞与细胞外基质的粘附。

近年来研究发现褪黑素可明显降低恶性肿瘤细胞的浸润和转移,但其作用的确切机制尚不十分清楚。荧光标记的鬼笔环肽能和细胞内 F-actin 特异性结合,使细胞内 F-actin 呈绿色荧光,因此用荧光显微镜可确定 SGC-7901 胃癌细胞内 F-actin 排列和分布的改变。本研究发现,对照组 F-actin 在细胞浆内呈有规律的放射状排列。经不同浓度褪黑素处理 24 h, F-actin 在细胞内呈弥散分布,应力纤维排列紊乱且数目逐渐减少,这些改变具有剂量依赖效应。免疫印迹实验也表明 SGC-7901 细胞在经褪黑素处理后, F-actin 含量减少,表明 actin 细胞骨架发生了

解聚。研究发现,在定向迁移的细胞伪足处存在 F-actin 的高度聚集,这是伪足形成及维持,以及促进胞体前移所必须的^[12]。本研究发现褪黑素能引起胃癌细胞中 actin 细胞骨架解聚,这可能是褪黑素抑制胃癌细胞迁移能力的关键环节。

已知细胞骨架不但参与细胞形态的维持,还与细胞外基质相连,进而影响细胞黏附。胃癌细胞也可发生血行转移,经门静脉转移到肝、肺、脑、骨等处。本实验选择血管内皮细胞作为黏附物,观察褪黑素对胃癌细胞黏附能力的影响,初步分析褪黑素对胃癌血行转移的作用。结果显示,褪黑素能明显降低 SGC-7901 细胞与血管内皮细胞间的黏附。由于 F-actin 是细胞与细胞外基质间形成正常黏附的基础,本研究发现褪黑素所致 SGC-7901 细胞中 F-actin 减少、应力纤维解体,这可能是褪黑素降低胃癌细胞黏附,进而影响胃癌血行转移能力的关键。

有报道指出,褪黑素能减弱 caspase-3 活性,阻止胃黏膜正常细胞的衰老过程^[13]。对于胃癌而言,褪黑素在体内外都能抑制胃癌细胞增殖活性,这与褪黑素能阻滞胃癌细胞周期、促细胞凋亡的作用有关^[14]。而胃癌患者血清中褪黑素水平较正常水平明显降低,且分泌节律出现紊乱^[15]。本研究发现,在胃癌细胞中,外源性给予褪黑素可能通过使 actin 细胞骨架解聚,进而使胃癌细胞的黏附及运动能力降低。本研究为褪黑素作为抗胃癌药物使用提供了有力的理论依据。

[参考文献]

- [1] Bubenik GA. Gastrointestinal melatonin: localization, function, and clinical relevance[J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47(10): 2336-2348
- [2] Brzozowska I, Ptak-Belowska A, Pawlik M, et al. Mucosal strengthening activity of central and peripheral melatonin in the mechanism of gastric defense [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 60 (Suppl 7): 47-56
- [3] Ganguly K, Swarnakar SO. Chronic gastric ulceration causes matrix metalloproteinases-9 and -3 augmentation: alleviation by melatonin [J]. *Biochimie*, 2012, 94(12): 2687-2698
- [4] Pradeepkumar SL, Vivek SA, Swarnakar S. Upregulation of collagenase-1 and -3 in indomethacin-induced gastric ulcer in diabetic rats; role of melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2011, 51(1): 61-74
- [5] Moezi L, Nasiripoor S, Mohajer V, et al. Gastric healing effect of melatonin against different gastroinvasive agents in cholestatic rats[J]. *Pathophysiology*, 2010, 17(1): 65-70
- [6] 陈宜刚, 许蕊. 褪黑素抑制缺氧引起的 SGC-7901 人胃癌细胞上皮-间充质转化[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2013, 33(11): 1508-1513
- [7] Zhang S, Qi Y, Zhang H, et al. Melatonin inhibits cell growth and migration, but promotes apoptosis in gastric cancer cell line, SGC7901[J]. *Biotech Histochem*, 2013, 88(6): 281-289
- [8] Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, et al. Cell migration: integrating signals from front to back[J]. *Science*, 2003, 302(5651): 1704-1709
- [9] Gumbiner BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis[J]. *Cell*, 1996, 84(3): 345-357
- [10] Zhang Y, Liu Q, Wang F, et al. Melatonin antagonizes hypoxia-mediated glioblastoma cell migration and invasion via inhibition of HIF-1alpha[J]. *J Pineal Res*, 2013, 55(2): 121-130
- [11] Martin V, Herrera F, Carrera-Gonzalez P, et al. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(2): 1081-1088
- [12] Zhang J, Fonovic M, Suyama K, et al. Rab35 controls actin bundling by recruiting fascin as an effector protein [J]. *Science*, 2009, 325(5945): 1250-1254
- [13] Akbulut KG, Akbulut H, Akgun N, et al. Melatonin decreases apoptosis in gastric mucosa during aging[J]. *Ageing Clin Exp Res*, 2012, 24(1): 15-20
- [14] 刘卉, 蒋继浩, 徐丽, 等. 褪黑素体内外对小鼠前胃癌细胞的增殖抑制与凋亡诱导作用[J]. *解剖学报*, 2011, 42(6): 792-796
- [15] Muc-Wierzgón M, Nowakowska-Zajdel E, Zubelewicz B, et al. Circadian fluctuations of melatonin, tumor necrosis factor-alpha and its soluble receptors in the circulation of patients with advanced gastrointestinal cancer[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2003, 22(2): 171-178

[收稿日期] 2014-06-19