

亮菌多糖对 GES-1 细胞发生 EMT 的影响及机制研究

赵莉莉 朱耀东 李 平 张 梅

摘要 目的 探讨亮菌多糖(ATPS)对人胃黏膜上皮细胞(GES-1)发生上皮-间质转化(EMT)的影响及相关机制。方法 利用IL-8诱导GES-1细胞建立EMT模型,实验设空白对照组、模型组(IL-8诱导组)、实验组[ATPS低剂量组(IL-8诱导1h后加入ATPS 30 mg/L)、ATPS中剂量组(IL-8诱导1h后加入ATPS 60 mg/L)、ATPS高剂量组(IL-8诱导1h后加入ATPS 120 mg/L)]。应用光学显微镜观察GES-1细胞形态学变化,Western blot法检测EMT相关蛋白及PD-CD4蛋白表达水平,MTT法检测不同浓度ATPS对GES-1细胞存活率影响,细胞划痕实验检测各组GES-1细胞侵袭能力变化。结果 光学显微镜观察到IL-8作用24h后GES-1细胞形态由不规则多边形向梭形转化,细胞排列紊乱,侵袭能力增强,不同剂量亮菌多糖作用后细胞形态可部分恢复,侵袭能力降低。Western blot结果提示:与模型组相比,实验组上皮标志物E-钙黏蛋白增多($P < 0.05$),间质标志物N-钙黏蛋白、波形蛋白减少($P < 0.05$),PD-CD4表达增多($P < 0.05$)。细胞划痕实验观察到模型组GES-1细胞与空白组相比侵袭扩散能力明显增强,实验组与模型组相比侵袭扩散能力明显减弱。结论 ATPS可通过抑制GES-1细胞EMT的发生逆转胃癌前病变,其机制可能与促进抑癌基因PD-CD4表达有关。

关键词 亮菌多糖;胃黏膜上皮细胞;EMT

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)06-0868-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.06.009

上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是指上皮细胞转化为具有间质表型细胞的生物学过程,在胚胎发育、伤口愈合、组织再生、器官纤维化和肿瘤进展中起重要作用^[1]。研究^[2]表明,EMT与胃癌的发生发展息息相关,广泛存在于

胃癌前病变过程中,与多种信号通路及基因表达失调有关,其主要表现为细胞形态学变化及相关蛋白异常表达,胃黏膜上皮细胞由不规则多边形向梭形转变,细胞之间黏连减少,排列紊乱;其标记上皮细胞的E-钙黏蛋白(E-Cadherin)表达减少,标记间质细胞的N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)表达增多。亮菌多糖(*Armillariella tabescens* polysaccharides, ATPS)是亮菌生长代谢过程中的有效产物,是亮菌口服液的有效成分,ATPS有明显的增强机体免疫力、抗肿瘤及保护胃黏膜的作用^[3]。亮菌口服液临床广泛用于治疗慢性浅表性、萎缩性胃炎,并取得了较好的疗效,有效的逆转胃癌前病变,控制了疾病的进展。关于亮菌多糖对人胃黏膜细胞(human gastric epithelial cell line, GES-1)发生EMT的影响及相关机制研究,相关报道较少。该研究利用白介素-8(interleukin-8, IL-8)诱导GES-1细胞建立EMT模型;不同剂量亮菌多糖作用后细胞形态可部分恢复,侵袭力降低。

1 材料与方法

1.1 实验仪器 细胞培养箱购自美国Thermo公司;安全生物柜购自北京Aertai公司;DMEM培养基、胰酶购自美国Gibco公司;胎牛血清购自以色列Biological Industries公司;ATPS购自合肥诚志生物制药有限公司(纯度>90%);IL-8及IL-8溶解套装购自美国Peprotech公司,溶解稀释成25 mg/L,分装后-20℃保存;兔抗人E-Cadherin、N-cadherin、Vimentin、PD-CD4抗体购自美国Cell Signaling Technology生物公司;鼠抗人GAPDH抗体购自上海BBI life sciences公司;二抗购自美国Promega公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国Sigma公司;四甲基偶氮唑盐(MTT)、细胞裂解液购自合肥biosharp公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人胃黏膜上皮细胞GES-1株购自南京科佰生物科技有限公司,在细胞培养室的超净工作台上,将GES-1细胞置于DMEM培养液中(含10%胎牛血清,1%双抗),将培养皿置于培养箱中37℃、5% CO₂培养。当培养皿中细胞生长近

2018-03-14 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81603439);安徽省中医药科技项目(编号:2016zy86)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院中西医结合肿瘤科,合肥 230022

作者简介:赵莉莉,女,硕士研究生;

张 梅,女,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者,E-mail: 2239824941@qq.com

80% 细胞基本融合时,用浓度为 0.25% 胰蛋白酶 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内消化 2~3 min,显微镜下观察到细胞变圆、散开时,1:1 加入 DMEM 培养液终止消化,800 r/min 离心 3 min,重悬后分装至 3 小皿继续培养。

1.2.2 建立 EMT 模型 生长至对数期的 GES-1 细胞,加入含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基在 37 ℃、5% CO₂ 的条件下培养 12 h,待细胞完全贴壁,更换培养基为 1% FBS 的 DMEM,分别加入浓度为 25、50、100、200、300 μg/L 的 IL-8 作为实验组;对照组更换正常培养基,继续培养 24 h。

1.2.3 MTT 法检测不同浓度亮菌多糖对 GES-1 细胞增殖的影响 取对数生长的 GES-1 细胞消化计数后接种于 96 孔细胞培养板中,8.0 × 10³ 个每孔,37 ℃、5% CO₂ 温室培养 12 h 细胞长成单层,将 ATPS 用 DMEM 稀释成 15、30、60、120、240 mg/L 分别加入各孔中,每孔 0.1 ml,每一稀释度设置 5 个复孔,同时设立空白对照组、DMSO 处理组及仅加 DMSO 组。37 ℃、5% CO₂ 温育 24 h 后每孔加入 MTT(5 g/L) 10 μl 后继续孵育 4 h,小心吸净各孔内培养液,然后每孔内加入 150 μl DMSO,震荡 10 min,酶标仪测其波长 490 nm 吸光度,各组均取平均值,计算各组细胞的相对存活率并绘制柱状图。以空白组为零,抑制率(%) = 1 - (给药组 OD 值 - DMSO 组 OD 值) / (空白组 OD 值 - DMSO 组 OD 值) × 100%,实验重复 3 遍。

1.2.4 亮菌多糖对 IL-8 诱导的 GES-1 细胞发生 EMT 的影响 GES-1 细胞随机分为 5 组,每组至少 3 复孔。分别设空白对照组、模型组、实验组 [ATPS (高、中、低剂量) 组]。待细胞贴壁后除空白对照组外,其余各组预先更换为 1% FBS 的 DMEM 并给予 IL-8 200 μg/L 孵育 1 h 后,实验组给予不同浓度 (30、60、120 mg/L) 的亮菌多糖继续孵育 24 h。

1.2.5 光学显微镜观察细胞形态变化 取不同浓度 IL-8 诱导 24 h 后的 GES-1 细胞显微镜下拍照,每孔取 4 个视野;同样的方法对亮菌多糖处理后的各组细胞在光学显微镜下拍照。

1.2.6 细胞划痕实验 先用记号笔在 6 孔板背后用直尺均匀划横线,每孔至少穿过 5 条线,将对数期生长的 GES-1 细胞胰蛋白酶消化、10% DMEM 重悬,每孔内加入约 8 × 10⁵ 个细胞,以过夜能铺满孔底为最好,37 ℃、5% CO₂ 的条件下培养待细胞至细胞融合达到 90% 以上,用 100 μl 移液枪头在孔板内平行划痕,PBS 液洗涤 3 次后,空白对照组加入 1%

FBS 的 DMEM 培养基 1.5 ml,模型组加入 IL-8 200 μg/L 含 1% FBS 的 DMEM 培养基 1.5 ml,实验组加入 IL-8 200 μg/L 含 1% FBS 的 DMEM 培养基 1.5 ml 培养 1 h 后加入 ATPS 120 mg/L,在倒置显微镜 100 倍下观察、划痕两侧细胞的迁移情况,放入 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养,分别于 0、6、12、18、24 h 镜下拍照测量划痕宽度,比较各组间划痕愈合的差异,实验重复 3 次。

1.2.7 Western blot 法检测 EMT 相关蛋白及 PD-CD4 蛋白的表达 将处理后细胞弃上清液,加入细胞裂解液 (80~100 μl),充分搔刮孔底后收集样本,沸水煮样 10 min, -20 ℃ 冻存储备。5% 浓缩胶,10% 分离胶,每孔上样 10 μl,90 V 恒压电泳 20 min,调整电压 150 V 电泳 60 min;恒流 350 mA 转膜 150 min,将蛋白转至 NC 膜上;用 50 mg/L 的脱脂奶粉封闭 1 h,加入一抗 4 ℃ 孵化过夜,E-Cadherin (1:300)、N-cadherin (1:500)、Vimentin (1:500)、PD-CD4 (1:500)、GAPDH (1:1000),TBST 洗去一抗 (共洗 5 次,每次 7 min),加二抗 (1:10000) 室温孵化 1 h,TBST 洗去二抗 (共洗 5 次,每次 7 min),ECL 发光试剂 A 液:B 液 1:1 混合后均匀滴在条带上,使用 ImageQuant LAS 4000 系统显影,Image-Pro-Plus 软件进行 Western blot 条带灰度值分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析 (one-way ANOVA),组内两两比较用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察 EMT 模型细胞形态变化 IL-8 诱导 24 h 后,GES-1 细胞形态由不规则多边形、易聚集成片向梭形转变,细胞排列疏松紊乱,细胞间粘力度减小,随 IL-8 浓度越大,细胞形态变化越明显,见图 1。

2.2 Western blot 法检测 IL-8 诱导的 GES-1 细胞 EMT 相关蛋白表达变化 结果显示,其标记上皮细胞的 E-Cadherin 表达减少,标记间质细胞的 N-cadherin、Vimentin 表达增多,综合 3 种蛋白表达量变化情况并结合形态学变化,选择 IL-8 200 μg/L 诱导建立 EMT 模型,见图 2。

2.3 MTT 检测 ATPS 对 GES-1 细胞存活率的影响 不同浓度 ATPS 处理 GES-1 细胞 24、48 h 后,相同作用时间不同浓度之间用 χ^2 检验,相同浓度不同作用时间组间行 t 检验。MTT 结果提示:同一浓度下,随着药物作用时间增加,对细胞的抑制作用增

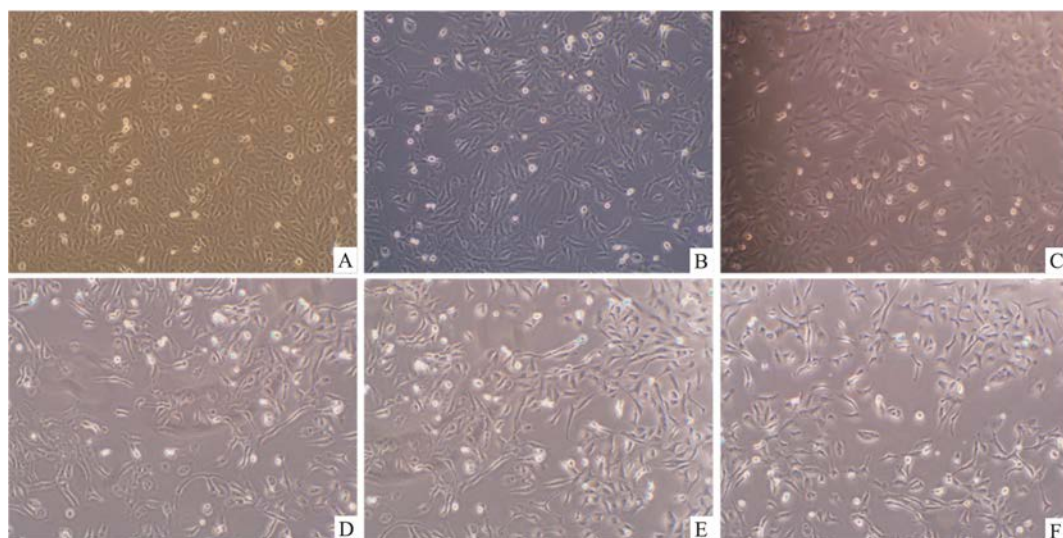


图1 IL-8 诱导 GES-1 发生 EMT 转变细胞形态的变化 ×100

A: 空白对照组; B: IL-8 25 μg/L; C: IL-8 50 μg/L; D: IL-8 100 μg/L; E: IL-8 200 μg/L; F: IL-8 300 μg/L

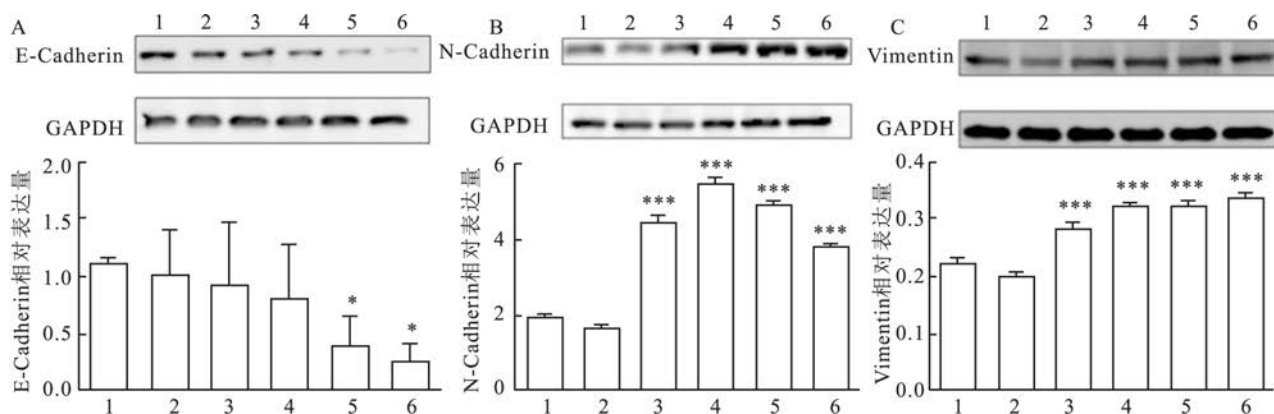


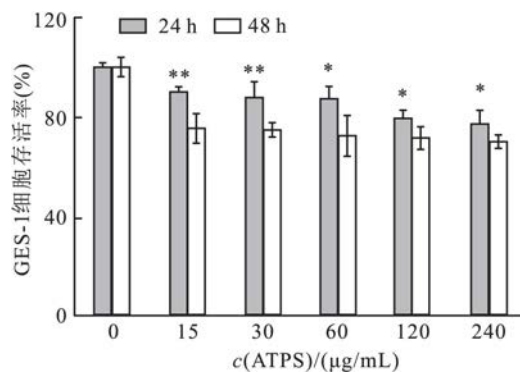
图2 Western blot 法检测各组细胞中 E-Cadherin、N-Cadherin、Vimentin 的表达

1: 空白对照组; 2: IL-8 25 μg/L; 3: IL-8 50 μg/L; 4: IL-8 100 μg/L; 5: IL-8 200 μg/L; 6: IL-8 300 μg/L; 与空白对照组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

强 差别有统计学意义; 同一时间点, ATPS 浓度的增加对 GES-1 细胞增殖的抑制作用的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 3。

2.4 观察 ATPS 逆转 GES-1 细胞 EMT 后细胞形态的变化 和空白对照组相比, 模型组 GES-1 细胞形态明显由多边形向梭形转变, 细胞排列疏松紊乱, 细胞间粘附力降低, 实验组和模型组比较, 细胞形态向多边形转变, 细胞之间出现片状粘连, 生长状态好转, 见图 4。

2.5 ATPS 逆转 GES-1 细胞发生 EMT 相关蛋白表达变化 Western blot 结果显示实验组与模型组相比上皮细胞的 E-Cadherin 表达增加, 标记间质细胞的 N-cadherin、Vimentin 表达减少, 见图 5。

图3 不同浓度 ATPS 用于 GES-1 细胞的存活率 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)与处理 48 h 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.6 ATPS 逆转 GES-1 细胞发生 EMT 的机制探讨

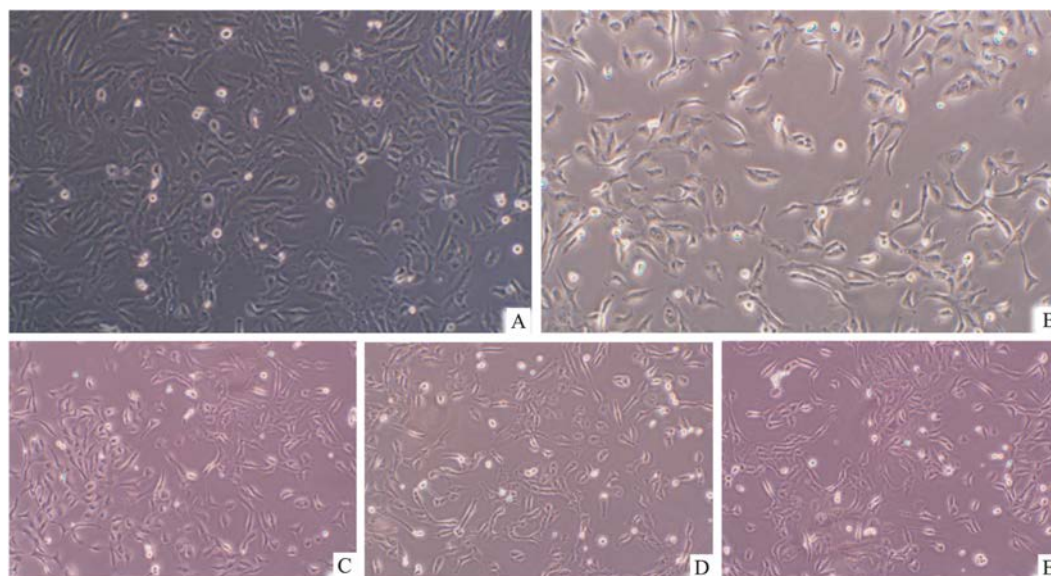


图4 不同浓度 ATPS 逆转 IL-8 诱导的 GES-1 细胞发生 EMT 的细胞形态变化 ×100

A: 空白对照组; B: IL-8 200 µg/L; C: IL-8 200 µg/L + ATPS 30 mg/L; D: IL-8 200 µg/L + ATPS 60 mg/L; E: IL-8 200 µg/L + ATPS 120 mg/L

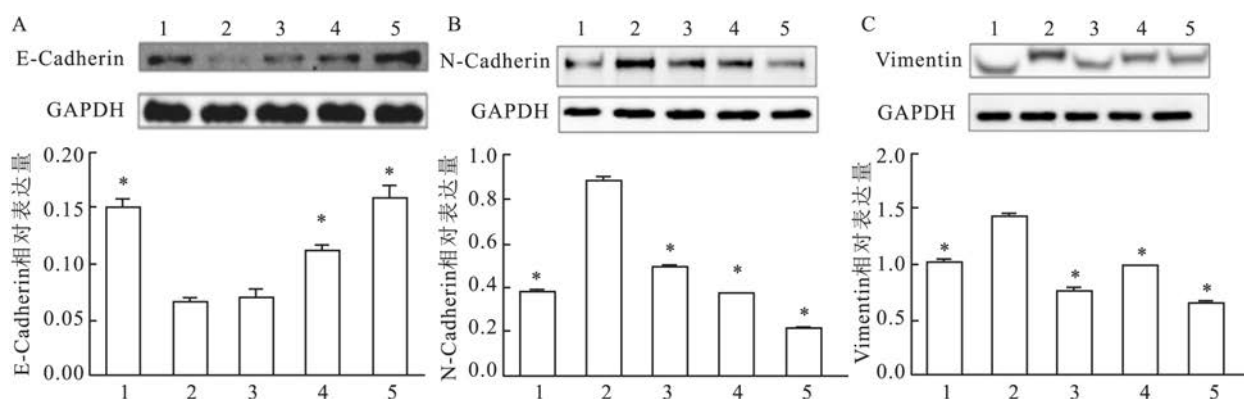


图5 Western blot 法检测 ATPS 作用前后 EMT 相关蛋白变化

1: 空白对照组; 2: IL-8 200 µg/L; 3: IL-8 200 µg/L + ATPS 30 mg/L; 4: IL-8 200 µg/L + ATPS 60 mg/L; 5: IL-8 200 µg/L + ATPS 120 mg/L; 与 IL-8 200 µg/L 比较: * $P < 0.05$

为进一步探讨可能机制, Western blot 检测程序性细胞死亡因子 PDCD4 蛋白表达量, 结果显示, 模型组 PDCD4 表达明显减少, 加入亮菌多糖后, PDCD4 表达量增高, 说明亮菌多糖逆转 EMT 可能与调节 PD-CD4 表达量有关, 见图 6。

2.7 细胞划痕实验结果 细胞划痕实验显示 IL-8 使 GES-1 细胞侵袭扩散能力增强, 而 ATPS 可以显著抑制 GES-1 细胞向周围扩散, 抑制其侵袭和转移能力, 见图 7。

3 讨论

亮菌又叫假蜜环菌, 是一种兼食用与药用价值于一体的名贵真菌, 从 2002 年开始亮菌口服液应用

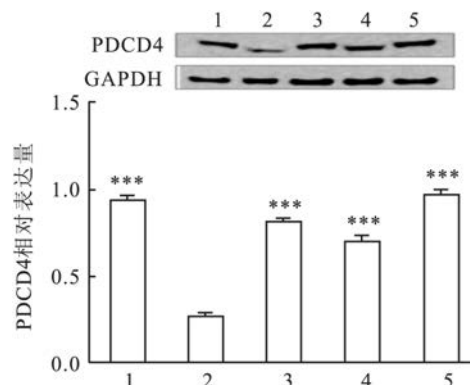


图6 Western blot 法检测程序性细胞死亡因子 PDCD4 蛋白表达量

1: 空白对照组; 2: IL-8 200 µg/L; 3: IL-8 200 µg/L + ATPS 30 mg/L; 4: IL-8 200 µg/L + ATPS 60 mg/L; 5: IL-8 200 µg/L + ATPS 120 mg/L; 与 IL-8 200 µg/L 比较: *** $P < 0.001$



图7 细胞划痕实验不同时间各组细胞向周围扩散的程度

A: 空白对照组; B: IL-8 200 $\mu\text{g/L}$ 诱导组; C: IL-8 200 $\mu\text{g/L}$ + ATPS 120 mg/L ; 1: 0 h; 2: 6 h; 3: 12 h; 4: 18 h; 5: 24 h

于临床,主要用于慢性肝炎、迁延性肝炎、慢性胆管炎和胆囊炎以及慢性、浅表性、萎缩性胃炎及放疗、化疗引起的白细胞减少的辅助治疗,取得显著的疗效。亮菌可降低化疗后大鼠胃肠道组织 5-HT 的释放,可有效抑制顺铂化疗所诱发的胃节律性运动紊乱^[4]。以亮菌发酵产物为主要成分的亮菌口服液临床上长期应用于慢性胃炎的治疗,取得显著的疗效,可以有效逆转慢性萎缩性胃炎,研究^[5]表明,亮

菌口服液对反流液造成的胃黏膜损失有保护作用,其机制可能与降低了胃黏膜 COX-2 含量相关,并且亮菌口服液可以通过修复受损胃黏膜的超微结构来起到保护作用^[6]。大量临床案例及实验室研究表明慢性萎缩性胃炎属胃癌前病变,亮菌口服液可有效逆转胃癌前病变,降低胃癌的发生。其中亮菌口服液的主要有效成分 ATPS 起到重要的作用,亮菌多糖是由亮菌发酵产生的分子量145 000的杂多糖,

由 L-木糖、L-岩藻糖、D-半乳糖、D-葡萄糖和 D-甘露糖 5 种单糖组成。研究^[7]表明,亮菌多糖可通过提高小鼠肠黏膜组织中表皮生长因子 EGF 含量降低前列腺素 2 含量,从而对顺铂所致小鼠小肠黏膜损伤起到保护作用。亮菌多糖作为一种天然药物对人类的多种疾病疗效明显,多年以来,由于其分离纯化困难,分子结构不明确等各种因素限制了其发展和应用,本课题组与合肥诚志生物制药有限公司合作,提取了纯度较为可观的亮菌多糖,用于亮菌多糖在逆转胃癌前病变的过程作用的研究。

既往研究认为胃癌的发病与家族史、不良生活习惯、*H. pylori* 感染、相关药物使用不当以及人体免疫功能下降等因素密切相关。且胃癌的发生是一个慢性演变的过程,胃黏膜在各种因素的刺激下,从正常胃黏膜-浅表性胃炎-慢性萎缩性胃炎-肠上皮化生-异性增生逐步发展成胃癌,因此如何将胃癌抑制在发展阶段,如何有效逆转胃癌前病变成为亟待解决且意义重大的事情。随着分子生物学的不断发展,研究者开始从分子水平上进一步探寻胃癌前病变的发病及癌变机制。研究表明,在胃癌前病变的形成过程中,DNA 甲基化、微卫星不稳定性、端粒酶激活、EMT 的发生等占有重要的地位^[8],其中 EMT 与胃癌前病变的形成过程密切相关,在胃癌发生、发展过程中发挥关键性作用^[2]。

本研究表明,亮菌多糖可逆转 IL-8 诱导的 GES-1 细胞 EMT 的发生,不仅从形态学上使其恢复上皮细胞的不规则多边形,其 EMT 相关蛋白 E-Cadherin、N-cadherin、Vimentin 表达均得到逆转,细胞划痕实验证明,亮菌多糖可有效抑制 GES-1 细胞的扩散侵袭能力,这可能与上皮细胞因子 E-Cadherin 表达增多有关,E-Cadherin 使细胞间相互粘附聚集,不易向远处扩散,连续观察 24 h,实验组较模型组细胞扩散程度明显减低,本研究表明亮菌多糖可通过逆转 EMT 对胃癌前病变起治疗作用,且可以抑制 GES-1 细胞的扩散侵袭,阻止癌变进程。PDCD4 作为一种新近发现的抑癌基因在多种肿瘤的发生发展中发挥重要的作用,Yu et al^[9]在胃癌细胞株 GSC-7901 和 BGC-823 中转染入过表达 PDCD4 的质粒,使 PDCD4 mRNA 及蛋白均高表达,然后检测 EMT 特异性标志物 TWIST1、Vimentin、E-Cadherin,结果显示间质细胞标志物 TWIST1、Vimentin 蛋白及相应 mRNA 均降低,而上皮细胞标志物 E-Cadherin 明显升高,表明 PDCD4 可逆转 EMT,本研究为了进一步研究亮菌多糖逆转 EMT 可能机制,Western blot 检测 PDCD4 蛋

白的表达变化,结果显示 IL-8 诱导的模型组较空白对照组明显降低,而亮菌多糖处理后 PDCD4 基本恢复到处理前水平,说明亮菌多糖逆转 EMT 可能与使 PDCD4 高表达有关,PDCD4 的表达受各种因素的调节。DNA 甲基化可明显抑制 PDCD4 的表达,Gao et al^[10]使用 DNA 甲基转移酶抑制剂 5-氮杂-2-脱氧胞苷阻断神经胶质瘤细胞中的甲基化,PDCD4 基因表达明显提高。研究^[11]表明,多种微小 RNA (miRNA) 与 PDCD4 的表达相关,其中 miR-21 与 PDCD4 表达呈明显负相关,Wen et al^[12]在食管鳞状细胞癌细胞株 (TE-13) 中转染反义 miR-21 使其表达明显减少,结果显示与对照组相比转染反义 miR-21 的 TE-13 细胞中 PDCD4 表达明显升高,且 miR-21、miR-23a 和 miR-27a 可协同抑制 PDCD4、抗增殖基因 2 (BTG2) 等抑癌基因的表达来促进胰腺导管腺癌进展,增强其侵袭力,可作为生存期较短的可靠标志^[13-14]。miR-183 过表达亦可使 PDCD4 蛋白表达降低,促进细胞增殖和转移,在食管癌细胞中可通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 通路来降低 miR-183 表达,进而上调 PDCD4^[15]。本研究表明 ATPS 逆转 EMT 可能与调高 PDCD4 表达有关,但 ATPS 到底是通过何种机制上调 PDCD4 表达仍未清楚,下一步拟在基因水平进一步探讨相关机制及可能的信号表达通路。

参考文献

- [1] Hou J, Wang T, Xie Q, et al. N-Myc-interacting protein (NMI) negatively regulates epithelial-mesenchymal transition by inhibiting the acetylation of NF- κ B/p65 [J]. *Cancer Lett* 2016, 376(1): 22-33.
- [2] Huang L, Wu R L. Epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer [J]. *Am J Transl Res* 2015, 7(11): 2141-58.
- [3] 杨丽红, 叶选怡, 凌庆枝, 等. 亮菌的临床应用与研究进展 [J]. *北方药学* 2013, 10(3): 66-7.
- [4] 杜静, 李平, 孙鑫, 等. 亮菌对顺铂化疗所诱发胃肠道反应的防治效果 [J]. *中华肿瘤杂志* 2011, 33(8): 579-82.
- [5] 王冬青, 丁西平, 殷实. 实验性胆汁反流性胃炎大鼠胃黏膜改变及亮菌口服液的干预作用 [J]. *世界华人消化杂志* 2014, 22(20): 2875-80.
- [6] 虞文永, 丁西平, 胡闻, 等. 亮菌口服液对反流液致胃黏膜损伤模型大鼠胃黏膜 SOD 及 IL-8 的影响和超微结构的变化 [J]. *安徽医科大学学报* 2014, 49(12): 1751-4.
- [7] 尤伟, 张梅, 李平, 等. 亮菌多糖对顺铂致小鼠肠黏膜损伤的保护作用 [J]. *中国新药杂志* 2013, 22(22): 2683-7.
- [8] Wu Y, Fan Y, Jiang Y, et al. Analysis of risk factors associated with precancerous lesion of gastric cancer in patients from eastern China: a comparative study [J]. *J Cancer Res Ther* 2013, 9(2):

- 205–9.
- [9] Yu H ,Zeng J ,Liang X ,et al. *Helicobacter pylori* promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer by downregulating programmed cell death protein 4 (PDCD4) [J]. *PLoS One* 2014 ,9 (8) : e105306.
- [10] Gao F ,Wang X ,Zhu F ,et al. PDCD4 gene silencing in gliomas is associated with 5 CpG island methylation and unfavourable prognosis[J]. *J Cell Mol Med* 2009 ,13(10) :4257–67.
- [11] 赵莉莉,张梅,朱耀东. 程序性细胞死亡因子4在肿瘤中的研究进展[J]. *国际肿瘤学杂志* 2017 ,44(7) :512–5.
- [12] Wen S W ,Zhang Y F ,Li Y ,et al. Characterization and effects of miR-21 expression in esophageal cancer [J]. *Genet Mol Res* , 2015 ,14(3) :8810–8.
- [13] Frampton A E ,Castellano L ,Colombo T ,et al. Integrated molecular analysis to investigate the role of microRNAs in pancreatic tumour growth and progression [J]. *Lancet* 2015 ,385 Suppl 1: S37.
- [14] Frampton A E ,Castellano L ,Colombo T ,et al. MicroRNAs cooperatively inhibit a network of tumor suppressor genes to promote pancreatic tumor growth and progression [J]. *Gastroenterology* 2014 ,146(1) :268–77. e18.
- [15] Ren L H ,Chen W X ,Li S ,et al. MicroRNA-183 promotes proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by targeting programmed cell death 4 [J]. *Br J Cancer* 2014 ,111(10) :2003–13.

Armillariella polysaccharide effect on EMT in GES-1 cells and its mechanisms

Zhao Lili ,Zhu Yaodong ,Li Ping ,et al

(*Dept of Integrated Chinese and Western Oncology ,*

The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University ,Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the influence of *Armillariella* polysaccharide (ATPS) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gastric epithelial cells (GES-1) and its mechanism. **Methods** Construction of EMT model with GES-1 cells induced by IL-8. The blank control group , model group (IL-8 group induced group) , experimental group [low dose group (IL-8 induced 1 h ,ATPS 30 mg/L) , middle dose of ATPS group (IL-8 induced 1h ,ATPS 60 mg/L) ,high dose group (IL-8 induced 1h ,ATPS 120 mg/L)]. Morphological changes of GES-1 cells were observed by optical microscope ,Western blot was used to detect the expression levels of EMT-related protein and PDCD4 protein ,MTT assay was used to detect the effect of different concentrations of ATPS on the survival rate of GES-1 cells ,and cell scratch test was used to detect the invasion ability of GES-1 cells in each group. **Results** After treatment with IL-8 for 24 hours ,the morphological changes of GES-1 cells were observed from irregular polygons to spindle ,cell arrangement disorder ,invasive ability increased ,the morphology of the cells could be partially restored and invasive ability weakened after the action of different doses of ATPS. Western blot results showed that the experimental group the E-cadherin and PDCD4 were increased($P < 0.05$) as well as the N-cadherin and Vimentin were reduced ($P < 0.05$) compared with the model group. Cell scratch assay showed that the model group of GES-1 cells compared with the blank group significantly increased the ability of invasion and proliferation , experimental group compared with the model group significantly reduced the ability of invasion and proliferation. **Conclusion** ATPS can reverse the precancerous lesion by inhibiting the occurrence of EMT in GES-1 cells , and its mechanism may be related to ATPS promoting the expression of PDCD4.

Key words ATPS; GES-1; EMT