doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.10.008 ◇药学研究◇

半枝莲总黄酮对非小细胞肺癌细胞增殖及迁移的影响

任守雷[1],郭晓晓[2],陈翠翠[2],赵海燕[2],李来庆[2]

作者单位:[1]阳光融和医院肿瘤中心,山东 潍坊 261000;[2]广州优迪生物科技股份有限公司,广东 广州 510663

摘要:目的 观察半枝莲总黄酮对非小细胞肺癌细胞增殖、迁移及凋亡的影响并对其机制进行初步探索。**方法** 体外培养非小细胞肺癌A549细胞,分为阴性对照组、实验组、阳性对照组。阴性对照组用1640培养液200 μL处理细胞,实验组分别用1,5,10,20,40 μg/mL半枝莲总黄酮处理细胞24 h,阳性对照组用200 μL 40 μg/mL芦丁溶液处理细胞。采用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT)观察细胞增殖情况;通过流式细胞术检测细胞凋亡情况;蛋白质印迹法(Western Blot)检测凋亡抑制蛋白Survivin和促凋亡蛋白酶Caspase-3蛋白的表达;迁移划痕实验检测迁移的情况。**结果** MTT检测结果显示,阳性对照组的增殖抑制率为(57.234±0.533)%,实验组的增殖抑制率分别为(14.852±1.059)%、(23.486±1.366)%、(36.396±0.321)%、(46.179±1.334)%和(51.530±1.054)%,随浓度增加抑制率显著升高,呈浓度依赖($F=1\ 408.303,P<0.001$);流式细胞术检测细胞凋亡率,阴性对照组(9.09±0.50)%、阳性对照组(67.27±1.48)%、实验组分别为(24.62±0.70)%、(34.67±0.46)%、(46.92±0.29)%、(55.67±0.57)%和(59.29±0.73)%,实验组的细胞凋亡率均高于阴性对照组($F=1\ 467.681,P<0.001$);Western Blot结果显示,实验组Survivin蛋白表达均低于阴性对照组,Caspase-3蛋白表达均高于对照组($F=34.176,P<0.001$;$F=57.730,P<0.001$);迁移划痕实验结果显示,半枝莲总黄酮抑制肺腺癌A549细胞迁移并呈现剂量依赖性。**结论** 半枝莲总黄酮可抑制人肺腺癌A549细胞的增殖,可能与Survivin蛋白降低和Caspase-3蛋白表达量升高有关;另外,半枝莲总黄酮可抑制人肺腺癌A549细胞的迁移。

关键词:半枝莲; 癌,非小细胞肺; 凋亡抑制蛋白质类; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3; 细胞迁移分析; 细胞运动; 总黄酮

Effects of total flavonoids of *Scutellaria barbata D.Don* on proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells

REN Shoulei[1],GUO Xiaoxiao[2],CHEN Cuicui[2],ZHAO Haiyan[2],LI Laiqing[2]

Author Affiliations:[1]*Oncology Center of Sunshine Union Hospital*,*Weifang*,*Shandong* 261000,*China*;
[2]*Guangzhou Youdi Biotechnology Co.Ltd.*,*Guangzhou*,*Guangdong* 510663,*China*

Abstract:Objective To study the effects of total flavonoids of *Scutellaria barbata D.Don* on the proliferation,migration and apoptosis of non-small cell lung cancer cells and to explore the mechanism.**Methods** Non-small cell lung cancer A549 cells were cultured in vitro and assigned into negative control group,experimental group and positive control group.The negative control group was treated with 200 μL 1640 medium,the experimental group was treated with 1,5,10,20,40 μg/mL total flavonoids of *Scutellaria barbata D.Don* for 24 h,and the positive control group was treated with 200 μL 40 μg/mL rutin solution.Cell proliferation was observed by MTT assay.Cell apoptosis was detected by flow cytometry.The protein expression levels of Survivin and Caspase-3 were detected by Western blot.Transfer scratch test was adopted to detect the migration situation.**Results** MTT results showed that the inhibition rates were (57.234±0.533)% in the positive control group,and (14.852±1.059)%,(23.486±1.366)%,(36.396±0.321)%,(46.179±1.334)% and (51.530±1.054)%,respectively in the experimental group.The inhibition rate increased significantly with the increase of concentration,which was concentration-dependent ($F=1\ 408.303,P<0.001$).Cell apoptosis rates were (9.09±0.50)% in the negative control group,(67.27±1.48)% in the positive control group,and (24.62±0.70)%,(34.67±0.46)%,(46.92±0.29)%,(55.67±0.57)% and (59.29±0.73)% respectively in the experimental group.Cell apoptosis rates in the experimental group were all higher than that in the negative control group ($F=1\ 467.681,P<0.001$).The protein expression of Survivin in the experimental group was lower than that in the negative control group,and the protein expression of Caspase-3 was higher than that in the negative control group ($F=34.176,P<0.001$;$F=57.730,P<0.001$).Additonally,total flavonoids of *Scutellaria barbata D.Don* could inhibit the migration of A549 cells in a dose-dependent manner.**Conclusions** The proliferation of A549 cells can be inhibited by total flavonoids of *Scutellaria barbata D.Don*,which may be related to the decrease of Survivin protein and the increased expression of Caspase-3.In addition,total flavonoids of *Scutellaria barbata D.Don* could inhibit the migration of lung adenocarcinoma A549 cells.

Key words:*Scutellaria barbata*; Carcinoma,non-small-cell Lung; Inhibitor of apoptosis proteins; Caspase 3; Cell migration assays; Cell movement; Total flavonoids

半枝莲(*Scutellaria barbata D.Don*,SB)属于唇形科植物,性味辛、苦、寒,归肺、肝、肾经,是中医处方和成药中的常用中药,其主要有散瘀止痛、凉血解毒、清热利湿和消肿之功效;主要有效成分为黄酮类、生物碱、鞣质和甾体类等化合物,具有抗肿瘤作用,可诱导肿瘤细胞凋亡,抑制肿瘤细胞增殖及迁移,改善肿瘤细胞耐药性[1-3]。针对其作用机制的研究表明,半枝莲提取物可通过抑制PI3K和TGF-β信号通路抑制癌细胞迁移和侵袭[4-5];也可通过下调Treg细胞控制Th1/Th17型免疫反应,抑制肿瘤的生长[6]。

肺癌是常见恶性肿瘤之一,致死率较高,其中非小细胞肺癌是肺癌的主要发病类型,约占肺癌发病率的80%,非小细胞肺癌主要包括鳞状细胞癌、腺癌、大细胞癌3种类型[7-9]。人肺腺癌A549细胞常用于肺癌模型制备,本研究于2017年10月至2018年2月通过观察半枝莲总黄酮提取物对A549细胞增殖、凋亡及迁移的影响,探讨半枝莲总黄酮对于肺癌治疗方面的机制,为半枝莲总黄酮在肺癌方面的治疗提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 胎牛血清和DMEM培养基购自美国Gibco公司;半枝莲,购自太极集团四川绵阳制药有限公司;芦丁对照品,购自中国药品生物制品鉴定所;四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT法)检测试剂盒,购自上海碧云天生物技术公司;抗凋亡抑制蛋白Survivin抗体、抗促凋亡蛋白酶Caspase-3抗体购自英国Abcam公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)标记山羊抗兔IgG购自博士德公司;细胞培养6孔板购自美国Corning公司;磷脂结合蛋白-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexinv-FITC/PI)细胞凋亡检测试剂盒购自中国凯基公司;粤显1400602型倒置显微镜;二氧化碳恒温培养箱(MCO175,SANYO);多管架自动平衡离心机(卢湘仪,TDZ5-WS,上海);多功能酶标仪(PerkinElmer公司,EnSpire,美国);流式细胞检测仪(Millipore公司,Guava easyCyte™ 8HT ,美国)。

1.2 方法

1.2.1 *半枝莲总黄酮提取液制备* 称取适量半枝莲,甲醇溶解,制取总黄酮粗提液;取定量芦丁溶于甲醇,制备对照品。依次配置芦丁对照品,浓度分别为0.24 mg/mL、0.48 mg/mL、0.72 mg/mL、0.96 mg/mL、1.2 mg/mL,以甲醇为空白对照,测定500 nm下样品吸光度,测定半枝莲总黄酮粗提取液浓度[12]。

1.2.2 *半枝莲总黄酮处理A549细胞* 将A549细胞培养至对数生长期,计数,铺96孔板,每孔铺板$3×10^3$个/100 μL,5%二氧化碳,37℃恒温培养24 h。调整半枝莲总黄酮溶液浓度为1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、40 μg/mL,每孔加200 μL,作为实验组。阴性对照组加200 μL1640培养液,阳性对照组加入200 μL 40 μg/mL芦丁溶液。每组做5个复孔。

A549细胞铺板,5%二氧化碳,37 ℃恒温培养24 h后,每孔加入20 μL 5 mg/mL的MTT溶液,继续培养4 h,去除培养液,每孔加入150 μL二甲基亚砜,震荡溶解蓝色结晶物。酶标仪检测490 nm光吸收值(OD值),按照以下公式计算增殖抑制率(%)=(1-实验组OD值/阴性对照组OD值)×100%。

1.2.3 *流式细胞术* 将A549细胞培养至对数生长期,计数,调整细胞密度为$5×10^5$个/毫升,每孔2 mL,铺板6孔板,每个浓度做3个复孔,其他处理方式同1.2.2。5%二氧化碳,37 ℃恒温培养24 h。弃培养基,PBS缓冲液洗涤,胰酶消化,终止消化后,1 000 r/min离心5 min,弃上清,收集细胞,PBS缓冲液重悬计数;取$1×10^5$个细胞,1 000 r/min离心5 min收集细胞,弃上清,100 μL 1×Annexin V buffer重悬,加入5 μL Annexin V-FITC和5 μL PI染色液,混匀。室温避光孵育15 min。流式细胞仪上机检测(Annexin V-FITC绿色荧光,PI红色荧光)。

1.2.4 *蛋白质印迹法(Western Blot)检测Survivin,Caspase-3蛋白的表达* 将A549细胞培养至对数生长期,计数,调整细胞密度为$5×10^5$个/毫升,每孔2 mL,铺板6孔板,每个浓度做3个复孔,其他处理方式同1.2.2。5%二氧化碳,37 ℃恒温培养24 h。消化收集细胞,裂解,12 000 r/min离心5 min,取上清,BCA定量;加入5×十二烷基硫酸钠(SDS)上样缓冲液,100 ℃沸水浴5 min。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),上样量为20 μg。浓缩胶60 V,20 min;分离胶120 V,60 min电泳。100 V,60 min转膜;5%牛血清白蛋白(BSA)封闭60 min,一抗4 ℃孵育过夜,洗膜;二抗室温孵育1 h,洗膜;ECL发光液室温孵育5 min,于暗室医用X光底片曝光1 min后,依次显影、定影。

1.2.5 *细胞迁移* 将A549细胞培养至对数生长期,计数,调整细胞密度为$5×10^5$个/mL,每孔2 mL,铺板6孔板,每个浓度做3个复孔,37 ℃,5%二氧化碳恒温培养24 h至细胞基本铺满板孔。用枪头在板孔内做垂直划痕,PBS缓冲液洗涤,加入终浓度为1,5,10,20,40 μg/mL的半枝莲总黄酮1640培养液培养24 h,倒置相差显微镜观察。每个视野内,抽签法选择3个区域,并计算100×视野内迁移划痕空隙的像素。

1.3 统计学方法 实验数据采用$\bar{x} \pm s$表示,使用

SPSS 19.0软件进行分析,多组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用LSD-t检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT检测人肺腺癌A549细胞增殖情况 经不同处理后,阳性对照组增殖抑制率为(57.234±0.533)%,实验组1,5,10,20,40 μg/mL半枝莲总黄酮处理增殖抑制率分别为(14.852±1.059)%、(23.486±1.366)%、(36.396±0.321)%、(46.179±1.334)%和(51.530±1.054)%。半枝莲总黄酮抑制人肺腺癌A549细胞增殖,随浓度增加抑制率显著升高,呈浓度依赖($F=1\,408.303$,$P<0.001$)。推测半枝莲总黄酮可抑制肺癌细胞A549的增殖,且其抑制作用强弱与半枝莲总黄酮浓度有关。

2.2 流式细胞术检测人肺腺癌A549细胞凋亡情况 流式细胞术分析各组细胞凋亡情况,阴性对照组凋亡率为(9.09±0.50)%;实验组1,5,10,20,40 μg/mL半枝莲总黄酮处理凋亡率分别为(24.62±0.70)%、(34.67±0.46)%、(46.92±0.29)%、(55.67±0.57)%和(59.29±0.73)%;阳性对照组凋亡率为(67.27±1.48)%。与阴性对照组比较,实验组凋亡率增加($F=1\,467.681$,均$P<0.001$)。随半枝莲总黄酮浓度增加凋亡率显著增加,结果显示,半枝莲总黄酮诱导人肺腺癌A549细胞凋亡。见图1。

2.3 Western Blot检测Caspase-3、Survivin蛋白表达情况 与阴性对照组(0.44±0.05)和阳性对照组(1.56±0.24)相比,半枝莲总黄酮处理人肺腺癌A549细胞,Caspase-3凋亡蛋白表达逐渐升高[分别为(0.75±0.08,(0.87±0.03),(0.90±0.07),(0.98±0.06)和(1.23±0.07)]($F=34.176$,$P<0.001$)。与阴性对照组(1.46±0.06)和阳性对照组(0.45±0.06)相比,Survivin凋亡抑制蛋白表达逐渐下降[分别为(1.21±0.12),(0.86±0.06),(0.80±0.06),(0.71±0.09)和(0.54±0.10)]($F=57.730$,$P<0.001$)。半枝莲总黄酮通过上调Caspase-3表达和下调Survivin表达,诱导人肺腺癌A549细胞凋亡。见图2。

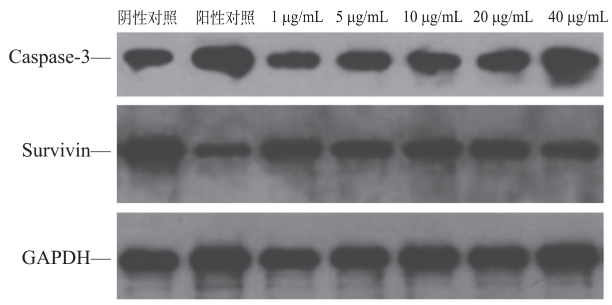

图2 半枝莲总黄酮处理人肺腺癌A549细胞凋亡蛋白的表达

2.4 划痕实验检测A549细胞迁移情况 细胞划痕实验中,与阴性对照组(707.6±92.6)像素和阳性对照组(209.6±41.7)像素相比,不同浓度半枝莲总黄酮处理组细胞迁移情况明显不同[分别为(594.0±26.7)像素,(410.0±44.0)像素,(359.3±38.8)像素,(307.0±54.3)像素和(285.3±44.0)像素]($F=34.612$,$P<0.001$)。半枝莲总黄酮浓度升高可导致细胞迁移速度降低,推测半枝莲总黄酮能够抑制人肺腺癌A549细胞迁移,并呈剂量依赖性。见图3。

3 讨论

半枝莲又称并头草、金挖耳、牙刷草、狭叶韩信草。最早记载于《外科正宗》一书,具化瘀、清热、解毒等功效,临床上应用具有抑菌、抗病毒、解热、保肝、抗肿瘤、抗癌等作用,被现代中药医师青睐。近年来,临床研究者对半枝莲药效、化学成分等的研究大幅度增多,为其在临床应用提供极大帮助。有研究证实,植物提取物中的某些黄酮类和生物碱类化合物具有明显的抗肿瘤作用,作用的机制是在一定程度上诱导肿瘤细胞凋亡、迁移以及侵袭[4]。本研究的MTT实验表明,不同浓度的半枝莲总黄酮对人肺腺癌A549细胞具有不同程度的抑制,且这种抑制作用随药物浓度的增加而增强,显示出一定的剂量依赖性。流式细胞仪检测结果表明,不同浓度的半枝莲提取物可诱导人肺腺癌A549细胞出现不同程度的凋亡,且细胞凋亡率随药物浓度的增加而提高,这提示半枝莲总黄酮抑制A549细胞增殖的机制在于诱导A549细胞凋亡。

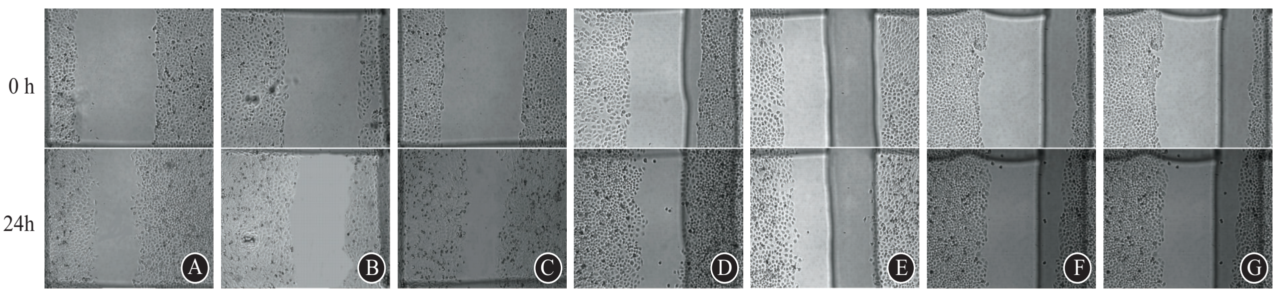

图3 半枝莲总黄酮对人肺腺癌A549细胞迁移的影响:A、B分别为阴性、阳性对照组;C、D、E、F、G分别为实验组1,5,10,20,40 μg/mL

Survivin是凋亡抑制蛋白家族(inhibitor of apoptosis protein,IAP)的新成员,参与促进细胞周期调控、细胞有丝分裂和血管生成等。Survivin具有肿瘤特异性,抵抗细胞凋亡在肿瘤发生、发展过程中发挥着重要作用[10]。Gu等[11]研究发现紫杉醇可下调Survivin的表达诱导细胞凋亡Hela细胞凋亡,同时减缓其增殖速率;Survivin的两个结构域BIR和C螺旋可精确调节细胞有丝分裂、细胞凋亡以及自噬,可作为肿瘤靶向药物研发对象,提高靶向药物的准确性及有效性[12];在83%的子宫内膜癌中,Survivin表达量上调,细胞耐药性增强[13];靶向干扰食管癌Eca-109细胞中Survivin基因表达,可曾庆人食管癌Eca-109细胞对氟尿嘧啶的化疗敏感性,利于提高化疗疗效[14];储进锦等通过紫外照射人胶质瘤U251细胞,发现经辐射可诱导胶质瘤细胞COX-2和Survivin蛋白表达量增加,这可能是胶质瘤存在放射抵抗的机制之一[15]。Caspase-3在细胞凋亡中起着不可替代的作用,可以被多种因素活化,既可被factor associated suicide/factor associated suicide ligand(Fas/FasL,自杀相关因子及其配体)途径活化,也可以通过颗粒酶B途径活化,活化后的Caspase-3可促进细胞凋亡。研究表明,Survivin表达量与Caspase-3表达量具有负相关性,推测Survivin通过抑制Caspase-3表达抑制细胞凋亡[2,16]。

本研究蛋白质印迹法检测结果表明半枝莲总黄酮可下调Survivin蛋白的表达水平和上调Caspase-3蛋白的表达水平,且其调控具有剂量依赖性。因而,半枝莲总黄酮通过下调A549细胞的Survivin蛋白表达,减弱Survivin对细胞凋亡因子Caspase-3活性抑制作用,诱导A549细胞凋亡,最终抑制A549细胞的增殖。

肿瘤细胞的侵袭转移是恶性肿瘤的主要生物学特性之一,是肿瘤病人死亡的主要原因,亦是肿瘤切除预后不良的原因[17]。据统计,临床肿瘤病人约有80%~90%死于肿瘤细胞的侵袭和转移[18]。本研究通过划痕实验结果提示,半枝莲总黄酮可抑制人肺腺癌A549细胞的迁移,且其作用随药物浓度增加而增强,呈一定的剂量依赖性。

综上所述,半枝莲总黄酮可抑制人肺腺癌A549细胞的增殖,可能与Survivin蛋白降低或caspase 3蛋白表达量升高有关;另外,半枝莲总黄酮可抑制人肺腺癌A549细胞的迁移。

(本文图1见插图10-2)

参考文献

[1] 吴晓龙,崔思远,王琰,等.中药半枝莲有效成分抗肿瘤作用机制研究进展[J].中华中医药杂志,2018,33(4):1459-1462.

[2] GUO F, YANG F, ZHU YH.Scutellarein from Scutellaria barbata induces apoptosis of human colon cancer HCT116 cells through the ROS-mediated mitochondria-dependent pathway[J].Nat Prod Rese,2019,33(16):2372-2375.

[3] 孙叙秋,鲁朔焱,张羽丰.半枝莲乙醇提取物对顺铂抗肝癌的增效作用研究[J].实用中西医结合临床,2017,17(10):160-161.

[4] JIN Y, CHEN W, YANG H, et al.Scutellaria barbata D.Don inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells via suppression of PI3K/AKT and TGF-beta/Smad signaling pathways[J].Exp Ther Med,2017,14(6):5527-5534.

[5] LIN J, FENG J, YANG H, et al.Scutellaria barbata D.Don inhibits 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by regulating PI3K/AKT pathway[J].Oncol Rep,2017,38(4):2293-2300.

[6] KAN X, ZHANG W, YOU R, et al.Scutellaria barbata D.Don extract inhibits the tumor growth through down-regulating of Treg cells and manipulating Th1/Th17 immune response in hepatoma H22-bearing mice[J].BMC Complement Altern Med,2017,17(1):41.

[7] HOFFMAN PC, MAUER AM, VOKES EE.Lung cancer[J].Lancet,2000,355(9202):479-485.

[8] RD PC, BURNETT RT, THUN MJ, et al.Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution[J].JAMA,2002,287(9):1132-1141.

[9] PAO W, MILLER VA, VENKATRAMAN E, et al.Predicting sensitivity of non-small-cell lung cancer to gefitinib: is there a role for P-Akt?[J].J Natl Cancer Inst,2004,96(15):1117-1119.

[10] 马建梅,陈承,黄伟.肺癌及其癌旁组织、良性病变survivin的表达意义[J].安徽医药,2014.18(2):264-266.

[11] GU F, LI L, YUAN QF, et al.Down-regulation of survivin enhances paclitaxel-induced Hela cell apoptosis[J].Eur Rev Med Pharmacol Sci,2017,21(15):3504-3509.

[12] HU F, PAN D, ZHENG W, et al.Elucidating respective functions of two domains BIR and C-helix of human IAP survivin for precise targeted regulating mitotic cycle, apoptosis and autophagy of cancer cells[J].Oncotarget,2017,8(69):113687-113700.

[13] KUMAR A, SIROHI VK, ANUM F, et al.Enhanced apoptosis, survivin down-regulation and assisted immunochemotherapy by curcumin loaded amphiphilic mixed micelles for subjugating endometrial cancer[J].Nanomedicine,2017,13(6):1953-1963.

[14] 牛朝霞,彭蕤蕤,陈洁,等.靶向survivin基因的小干扰RNA对食管癌细胞Eca-109化疗敏感性的影响[J].安徽医药,2016,20(4):683-686.

[15] 储进锦,张帆,王凡,辐射对人胶质瘤U251细胞COX-2和survivin表达的影响[J].安徽医药,2015,19(11):2115-2118.

[16] SAM MR, GHOREISHI S.Prodigiosin produced by Serratia marcescens inhibits expression of MMP-9 and survivin and promotes caspase-3 activation with induction of apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells[J].J Appl Microbiol,2018,125(4):1017-1029.

[17] FRIEDL P, ALEXANDER S.Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity[J].Cell,2011,147(5):992-1009.

[18] DUFFY MJ, MCGOWAN PM, GALLAGHER WM.Cancer invasion and metastasis: changing views[J].Journal of Pathology,2008,214(3):283-293.

(收稿日期:2018-03-14,修回日期:2018-07-09)