

· 实验研究 ·

汉黄芩素对食管癌 KYSE150 细胞 周期和凋亡的影响[※]

● 黄伟锋¹ 卢春敬² 许光辉³

摘要 目的:观察汉黄芩素对食管癌 KYSE150 细胞生长的影响及其机制,为汉黄芩素应用于临床抗肿瘤提供理论依据。方法:不同浓度的汉黄芩素作用于 KYSE150 细胞后,MTS 法检测细胞生长活性,流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡。结果:KYSE150 细胞的生长受汉黄芩素的抑制并且呈浓度依赖性,IC₅₀ = (68.59 ± 3.43) μM;细胞周期检测结果表明,汉黄芩素可阻滞 KYSE150 细胞周期进展,将细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期;细胞凋亡实验表明汉黄芩素可以诱导细胞凋亡。结论:汉黄芩素具有抗食管癌 KYSE150 细胞生长的作用,其机制为抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡。

关键词 汉黄芩素;食管癌;细胞增殖;细胞凋亡

食管癌主要有两种类型,即鳞状细胞癌和腺癌。在我国,90%以上为鳞状细胞癌,而国外腺癌占比较多,是消化系统常见的恶性实体瘤。它是我国癌症死亡的第四大原因,也是世界十大癌症之一^[1]。

目前肿瘤化疗存在的两个主要问题是化疗的副作用和多重耐药性的发展,因此,最小化副作用和最大化功效已成为开发新的抗肿瘤药物的主要目标。中药最近被认为是开发抗癌药物的新来源,并作为一种新的化疗佐剂来提高疗效或改善目前癌症化疗的副作用。近年来研究发现,许多中药的有效成分能在肿瘤细胞周期的某一阶段发生作用,从而阻滞细胞增殖,或(和)诱导细胞凋亡^[2],进而发挥良好的抗肿瘤作用,而对正常细胞无毒副作用。汉黄芩素(5,7-二羟基-8-甲氧基黄酮,wogonin)是一种黄酮类化合物,研究发现,其对多种肿瘤有抑制作用,包括多发性骨髓瘤^[3]、肺腺癌^[4]、胶质瘤^[5]、肝癌^[6]、胃癌^[7]、乳腺癌^[8]等。其抗肿瘤分子机制包括:上调细胞内 ROS 水平,下调 PI3K - AKT 信号通路,调节 MAPKs,上调

p53,抑制 NF - κB 信号通路,抑制 GSK - 3β 活化以及 ΔNp63 的表达等^[9]。本实验主要研究汉黄芩素抑制食管癌细胞生长的机制,为汉黄芩素应用于临床抗肿瘤提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞培养 人食管鳞状细胞癌细胞株 KYSE150,购自凯基生物(ATCC; Rockville, MD, USA),培养于含有 10% 热灭活胎牛血清(Gibco by Life Technologies, Carlsbad, CA, 美国)的 RPMI 1640 培养基中,培养箱条件控制为 37°C,95% 空气/5% CO₂,95% 湿度。

1.2 细胞增殖实验 收集处于对数期生长的 KYSE150 细胞,种植于 96 孔板中,每孔大约 5 × 10³ 细胞(为了减少液体蒸发,培养板周边的孔用 PBS 填充),培养箱培养 3h 使细胞贴壁。用不同浓度的汉黄芩素处理细胞(汉黄芩素溶解于 DMSO,DMSO 终浓度小于 0.1%),每个浓度的药物设 3 个复孔。培养 48h 后,每孔加入 20 μL Cell Titer 96 AQ One Solution Reagent(Promega, Madison, WI, USA),继续培养 2h。酶标仪(MD SpectraMax M3, CA, USA)测量各孔的 OD_{490nm} 和 OD_{650nm} 吸光值,实验至少重复三次。

1.3 细胞周期实验 收集不同浓度汉黄芩素处理的 KYSE150 细胞和空白对照组细胞,大约每组 1 × 10⁶

※基金项目 福建省科技厅自然科学基金面上项目(No. 2016D017)

• 作者单位 1. 厦门大学附属第一医院消化内科(福建 厦门 361003); 2. 厦门市妇幼保健院输血科(福建 厦门 361003); 3. 厦门市健康医疗大数据管理中心(厦门市医药研究所)(福建 厦门 361008)

个细胞。参考细胞周期检测试剂盒说明(Keygen Biotech, Nanjing, China), 将体积分数为 70% 冷乙醇 500 μ L 加入到细胞中, 固定细胞 2 小时至过夜, 放置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 染色前用 PBS 将固定液洗去, 加入 100 μ L RNase A 37 $^{\circ}$ C 水浴 30min。最后加入 400 μ L PI 染色混匀, 4 $^{\circ}$ C 避光 30 min, 上机检测, 流式细胞仪记录激发波长 488 nm 处红色荧光(BD Accuri C6, Ann Arbor, MI, USA)。用 FlowJo software 软件分析细胞周期。

1.4 细胞凋亡实验 收集不同浓度汉黄芩素处理的 KYSE150 细胞和空白对照组细胞, 大约每组 1×10^6 个细胞。参考细胞凋亡检测试剂盒(Keygen Biotech, Nanjing, China), 加入 5 μ L Annexin V - FITC 混合均匀后, 加入 5 μ L Propidium Iodide 混匀, 室温、避光、令其反应 5 ~ 15min, 流式细胞仪上机检测, 记录激发波长 488nm 处的 FL1 和 FL3。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 汉黄芩素对 KYSE150 细胞生长的影响 细胞增殖实验表明, 汉黄芩素处理 KYSE150 细胞 48h 后, 细胞的生长受到抑制, 且随着药物浓度的增大, 其抑制生长作用越大。汉黄芩素大于 25 μ M 的实验组与对照组相比均有统计学差异 ($P < 0.05$), 汉黄芩素 10 μ M 组的抑制作用与对照组相比无统计学差异 ($P > 0.05$) (表 1)。汉黄芩素作用 48h 的 $IC_{50} = (68.59 \pm 3.43) \mu$ M。

表 1 汉黄芩素对 KYSE150 细胞生长的抑制作用

浓度 (μ M)	OD 值	生长率%	P
Control	0.376 \pm 0.019	100	-
10	0.320 \pm 0.016	85.11	0.052
25	0.291 \pm 0.016	77.39	0.041
50	0.237 \pm 0.012	63.03	0.009
100	0.141 \pm 0.007	37.50	0.007
150	0.112 \pm 0.006	29.79	0.009
200	0.108 \pm 0.008	28.72	0.01

注: P 值为加药组与对照组 (Control) 相比

2.2 汉黄芩素对 KYSE150 细胞周期的影响 为了研究汉黄芩素抑制 KYSE150 细胞生长的作用机制,

笔者进行了细胞周期实验。实验结果表明汉黄芩素作用于 KYSE150 细胞 48h 后, 可以显著抑制 KYSE150 细胞增殖, 表现为细胞周期 G₀/G₁ 期所占的比例显著增加, 而 G₂ 期细胞数显著降低。另外, 高浓度的汉黄芩素 (100 μ M) 能够显著增加亚 G₁ 期 (凋亡细胞) 的细胞比例 (图 1、图 2)。

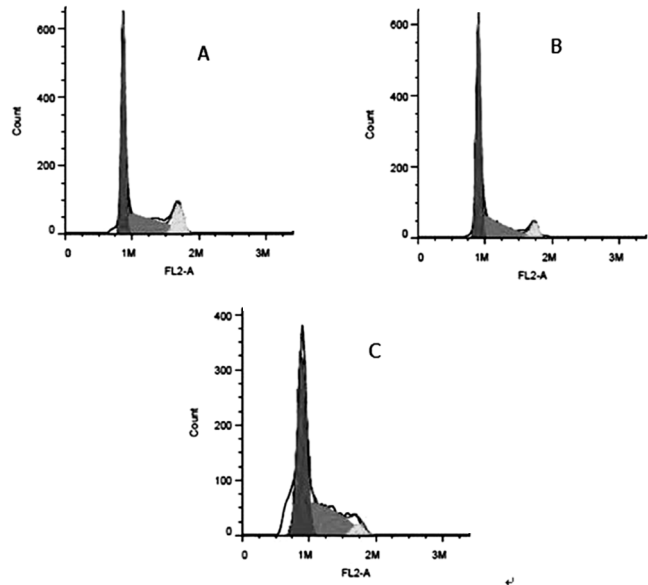


图 1 汉黄芩素作用 48h 后 KYSE150 细胞周期的变化
注: A: Control; B: 50 μ M Wogonin; C: 100 μ M Wogonin

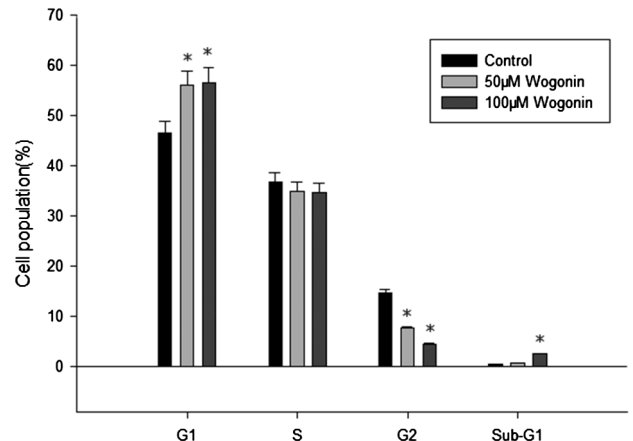


图 2 汉黄芩素作用 48h 后 KYSE150 细胞周期的变化柱状图
注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 汉黄芩素对 KYSE150 细胞凋亡的影响 在研究细胞周期实验中笔者发现高浓度的汉黄芩素可以增加亚 G₁ 期 (凋亡细胞) 的细胞比例, 为了进一步研究汉黄芩素对 KYSE150 细胞凋亡的影响, 笔者利用流式细胞技术进行了细胞凋亡实验。实验结果表明, 汉黄芩素干预 48h 后, 汉黄芩素 50、100 μ M 组的细胞早期凋亡率均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 且汉黄芩

素的浓度越高,细胞凋亡率也越高,有明显的剂量依赖关系(图 3,图 4)。

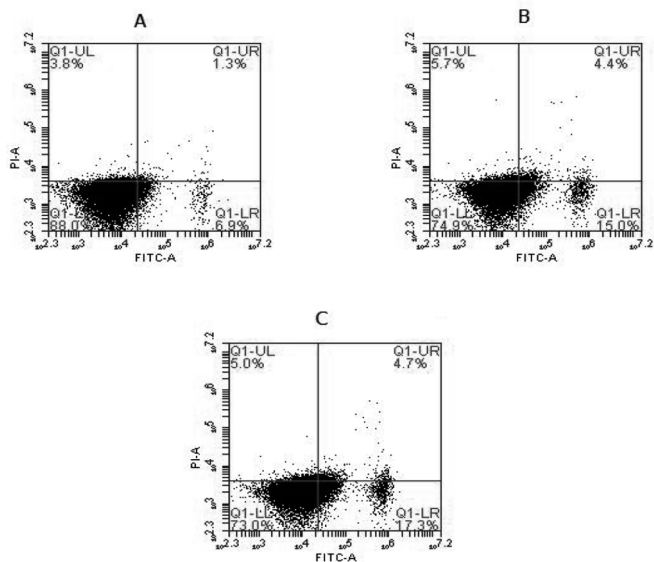


图 3 汉黄芩素作用 48h 后 KYSE150 细胞凋亡分析

注: X 轴代表 AV - FITC 染色, Y 轴代表 PI 染色。LR 和 UR 区域的百分比分别代表 AV 阳性/PI 阴性(早期凋亡)和 AV 阳性/PI 阳性细胞(晚期凋亡)。A: Control; B: 50µM Wogonin; C: 100µM Wogonin

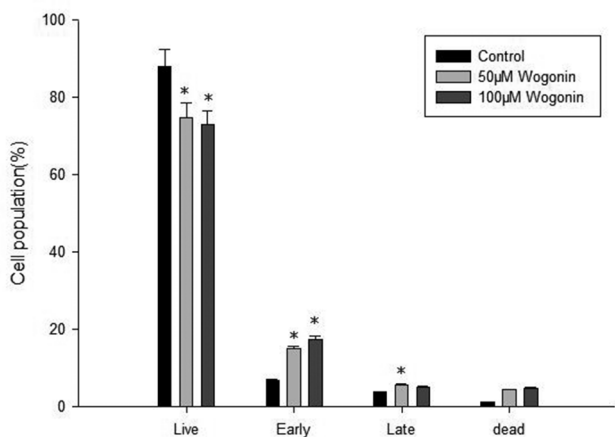


图 4 汉黄芩素作用 48h 后 KYSE150 细胞凋亡分析柱状图

注:与对照组比较, * P < 0.05

3 讨论

恶性肿瘤作为全球较大的疾病之一,严重危害人类的健康,是新世纪人类健康的第一杀手。当今世界,随着经济的发展、生活节奏的加快、不良的生活方式以及环境的污染等问题,恶性肿瘤的发病率呈上升趋势^[10]。中医学是我国医药事业的伟大传承之一,汉黄芩素(5,7-二羟基-8-甲氧基黄烷酮)是从黄芩(唇形科)中提取的天然黄酮类化合物,在体外和体内具有特别有效的抗肿瘤活性。有趣的是,汉黄芩素

对正常细胞或组织没有毒性或轻微毒性^[11,12]。由于其对肿瘤细胞系的选择性毒性,汉黄芩素成为一种有吸引力的候选药物,是一种潜在的新型抗肿瘤药物。

本次实验研究了中药单体汉黄芩素对食管癌 KYSE150 细胞生存的影响,并对其可能的机制进行初步探讨。汉黄芩素对 KYSE150 细胞的生长有明显的抑制作用,并有剂量依赖性,与杨莉^[13]对汉黄芩素抗肿瘤作用研究进展的报告中关于汉黄芩素能呈剂量、时间依赖性抑制细胞增殖的观点相符合。细胞周期检测表明,汉黄芩素能使 KYSE150 细胞发生 G1 期阻滞,从而表明干扰细胞周期进程是汉黄芩素影响肿瘤细胞增殖的机制之一。另外,流式细胞术检测细胞凋亡显示,随着汉黄芩素剂量的增大,凋亡细胞比例变大。芦曦^[7]等研究汉黄芩素对 SGC7901 细胞增殖和侵袭活性的影响,发现汉黄芩素对 SGC7901 细胞生长有明显抑制作用,其抑制细胞生长的 IC₅₀ 为 (74.26 ± 1.21) µM,与本实验得出的 IC₅₀ = (68.59 ± 3.43) µM 相近。本实验结果表明汉黄芩素作用 48h 后,影响肿瘤细胞周期分布,使 S 期、G₂/M 期细胞比例减少, G₀/G₁ 期细胞比例增大,表明汉黄芩素将肿瘤细胞的细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期,进而抑制细胞增殖。在个体发育过程中细胞的凋亡受基因调控,是一种细胞自杀活动。恶性肿瘤的生物学特征包括细胞增殖过度、细胞凋亡受阻,研究表明汉黄芩素的抗肿瘤作用与诱导肿瘤细胞凋亡有关^[9]。许多文献表明,汉黄芩素诱导肿瘤细胞凋亡的机制可能与调节细胞凋亡相关基因的表达有关,例如 Bcl-2、p53、survivin 等^[14]。

综上所述,汉黄芩素能够抑制食管癌 SGC7901 细胞的生长,其机制可能是通过阻滞细胞周期进程和诱导细胞凋亡。这为汉黄芩素将来用于治疗食管癌提供理论依据。

参考文献

- [1] Naveed M, Kubiliun N. Endoscopic Treatment of Early - Stage Esophageal Cancer[J]. Curr Oncol Rep, 2018, 20(9): 71.
- [2] 温少瑾, 郝敬全, 江劲波. 中药诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2013, 29(5): 125 - 127.
- [3] 张萌, 刘丽萍, 郭友逢, 等. 汉黄芩素对多发性骨髓瘤细胞周期及 P - Wee1 和 P - Akt 蛋白表达的影响[J]. 热带医学杂志, 2012, 12(11): 1301 - 1303.
- [4] 黄恺飞, 黄亦琦. 汉黄芩素对肺腺癌 A549 细胞粘附和迁移能力的影响及其可能机制[J]. 肿瘤, 2011, 31(1): 34 - 38.

(下转第 62 页)

正有利于临床辨证的就只有望诊和切诊,故其处方的书写常以脉诊为先。笔者近年来通过学习其相关书籍,并通过介绍他人赴连建伟处就诊,后根据处方中书写的脉象在患者身上仔细对照等方法,学习其运用平脉辨证法诊治各种疾病的方法。近年来笔者采用平脉辨证法为主,且以“切、望、闻、问”诊的顺序应用于各种杂病的临床辨证中,确实提高了治疗效果。然而正如国医大师任继学所说的“不到六十不懂中医”,笔者对平脉辨证法的领悟尚处于初级阶段,故临床上常有因诊脉错误而导致治疗失误的案例^[3-5]。

新近有学者发现,作为人体第二基因组的肠道菌群不仅直接参与人体的正常生理代谢活动,且可能与高血压病的发生有重要相关性^[8]。因此如果肠道菌群失

调,肠道内有害菌将成为优势菌,而有利菌将成为弱势菌,如此不仅可导致消化系统疾病,尚可导致高血压^[1]。同时近年来多位学者认为脾胃与肠道菌群稳态在生长发育、消化吸收、抗御外邪等方面有重要作用,且脾胃功能失调与肠道菌群失衡均可导致消化吸收功能紊乱、免疫力减退等病态,而经调理脾胃治疗后上述症状即可纠正^[1,9]。

笔者临床中发现,脾胃虚弱兼夹痰湿、湿热、寒热错杂型高血压病患者不在少数,而经调理脾胃为主治疗后,患者的血压水平即可随消化道症状的减轻而降低。

参考文献

[1] 金 华,金 钊,张蕾蕾,等. 高血压从脾

胃论治机理探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2014,20(3):290-292,318.

[2] 金 华. 肠道菌群是高血压干预的新靶点[J]. 基础医学与临床,2018,38(3):413-417.

[3] 李 航,蒋宁峙. 从误诊误治案例再谈平脉辨证[J]. 中医药通报,2017,16(5):61-63.

[4] 李 航. 从误诊挽救杂病案例再谈“平脉辨证”[J]. 中医药通报,2018,17(1):58-60.

[5] 李 航. 从误诊误治“慢性咳嗽”案谈“平脉辨证”法的临床价值[J]. 浙江中医杂志,2018,53(2):124-125.

[6] 连建伟. 连建伟中医传薪录[M]. 科学出版社,2008.

[7] 连建伟. 连建伟中医传薪录(第2版)[M]. 科学出版社,2016.

[8] Aguilar A. Hypertension. Microbiota under pressure[J]. Nature Reviews Nephrology, 2017,13(1):3.

[9] 高 旅,李 侠. 浅析中医脾运与肠道菌群的相关性[J]. 中医儿科杂志,2017,13(2):21-23.

(收稿日期:2018-05-21)

(本文编辑:蒋艺芬)

(上接第 65 页)

[5] 梁俊君,黄韶华,董征学,等. 汉黄芩素对胶质瘤 U251 细胞增殖、凋亡、Survivin 及 Caspase-3 表达的影响[J]. 基础研究,2013,51(15):5-7.

[6] 张琳黄,桂 华. 汉黄芩素对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响[J]. 中药材,2013,36(11):1842-1844.

[7] 芦 曦,吴小翎,李 艳,等. 汉黄芩素体外抗人胃癌 SGC7901 细胞的增殖、凋亡作用[J]. 中国药理学杂志,2011,46(7):512-517.

[8] 黄恺飞,庄 媛,黄亦琦,等. 汉黄芩素抑制乳腺癌细胞增殖及侵袭的实验研究[J]. 中国中药杂志,2014,39(8):1485-1489.

[9] PENG Miao-Xin, ZHANG Hai-Wei, CHEN Bao-An. Main signal pathways underlying the molecular mechanisms of the antitumor effects of wogonin[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2012, 10(6):401-

407.

[10] 吴 菲,林国桢,张晋昕. 我国恶性肿瘤发病现状及趋势[J]. 中国肿瘤,2012,21(2):81-85.

[11] Zhao L, Chen Z, Zhao Q, et al. Developmental toxicity and genotoxicity studies of wogonin[J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2011, 60(2):212-217.

[12] Qi Q, Peng J, Liu W, et al. Toxicological studies of wogonin in experimental animals[J]. Phytother Res, 2009, 23(3):417-422.

[13] 杨 莉,尤启冬,杨 勇,等. 汉黄芩素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 中国药科大学学报,2009,40(6):576-579.

[14] 温少瑾,郝敬全,江劲波. 中药诱导肿瘤细胞凋亡机制的研究进展[J]. 湖南中医杂志,2013,29(5):125-127.

(收稿日期:2018-08-17)

(本文编辑:金冠羽)