

臭牡丹总黄酮对 A549 细胞增殖迁移侵袭力及 Wnt 通路相关蛋白的影响

余娜¹ 朱克俭² 马思静² 谭小宁² 唐皓²

(1 湖南中医药大学,长沙,410208; 2 湖南省中医药研究院,长沙,410006)

摘要 目的:观察臭牡丹总黄酮对 β -catenin 过表达 A549 细胞增殖、迁移、侵袭力以及 Wnt 通路相关蛋白的影响。方法:选取构建 β -catenin 真核过表达载体并转染 A549 细胞,将其分为 6 组,分别为未转染细胞、未转染细胞 + 臭牡丹总黄酮、空载组、空载 + 臭牡丹总黄酮、 β -catenin 过表达组、 β -catenin 过表达 + 臭牡丹总黄酮。MTT 法检测各组细胞的相对存活率,划痕实验检测各组细胞迁移能力,Transwell 小室侵袭实验检测各组细胞的侵袭力。Western Blot 检测各组 Wnt 通路相关蛋白 β -catenin、GSK-3 β 、P-GSK-3 β 、c-myc、CyclinD1 的表达。结果:转染 β -catenin 过表达的 A549 细胞增殖能力、迁移能力、侵袭力均明显增强($P < 0.05$),并显著上调 wnt 通路相关因子 β -catenin、C-Myc、CyclinD 的蛋白表达,下调 P-GSK-3 β 的蛋白表达($P < 0.05$)。采用臭牡丹总黄酮干预后,能明显降低各组细胞的存活率,降低细胞向划痕区域迁移的能力,减少侵袭小室穿过基膜的细胞数($P < 0.05$)。并下调 β -catenin、C-Myc、CyclinD1 表达($P < 0.05$),上调 P-GSK-3 β 表达($P < 0.05$)。臭牡丹总黄酮的干预作用对转染 β -catenin 过表达细胞尤为明显。结论:转染 β -catenin 过表达的 A549 细胞其增殖、迁移、侵袭力均明显增强,能激活 Wnt/ β -catenin 通路。臭牡丹总黄酮可抑制 A549 细胞的增殖、迁移、侵袭力,其机制可能是通过抑制细胞中 β -catenin 的高表达从而调控下游的一系列因子而起到抑制 Wnt/ β -catenin 通路的作用。

关键词 臭牡丹总黄酮;上皮间质转化;Wnt 信号通路; β -catenin 过表达载体

Effect of Total Flavonoids Isolated from Clerodendrum Bungei on Proliferation, Migration, Invasion Ability and Wnt Pathway Associated Protein of A549 Cells

Yu Na¹, Zhu Kejian², Ma Sijing², Tan Xiaoning², Tang Hao²

(1 Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2 Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, China)

Abstract Objective: To observe the effect of total flavonoids isolated from clerodendrum bungei on proliferation, migration, invasion of human lung adenocarcinoma A549 cell and its effect on the proteins related to Wnt signal pathway. **Methods:** β -catenin over-expression plasmid was established and A549 cell was transfected. A549 cells were divided into 6 groups: normal A549 cells, normal A549 cells + total flavonoids isolated from clerodendrum bungei group, empty vector group, empty vector + total flavonoids isolated from clerodendrum bungei group, β -catenin over-expression group, β -catenin + total flavonoids isolated from clerodendrum bungei group. MTT assay detected relative survival rate of the cell, and scratch test observed cell migration. Transwell experiment detected the cell invasion. Western Blot was used to detect proteins of the factors that were related to Wnt pathway: β -catenin, GSK-3 β , P-GSK-3 β , c-myc, Cyclin D1. **Results:** The proliferation, migration and invasion of A549 cell was enhanced significantly after transfected with β -catenin over-expression plasmid ($P < 0.05$ or 0.01), along with the growth in number of β -catenin, C-Myc and CyclinD which were related to Wnt signal pathway and the decrease of P-GSK-3 β . After interfered with total flavonoids isolated from clerodendrum bungei, survival rate of A549 cell in each group declined significantly and the ability of migration and proliferation was decreased ($P < 0.05$). It down-regulated the expression of β -catenin, C-Myc and CyclinD1 ($P < 0.05$) and up-regulated the expression of P-GSK-3 β ($P < 0.05$). The effect on groups transfected with β -catenin over-expression plasmid were especially obvious. **Conclusion:** Overexpression of β -catenin could promote the invasion, migration and proliferation in the A549 cell line and activate Wnt/ β -catenin pathway, while total flavonoids isolated from clerodendrum bungei could inhibit the invasion, migration and proliferation in the A549 cell line, The pharmacological mechanism is probably inhibiting Wnt/ β -catenin pathway through prohibiting the overexpression of β -catenin by regulating its downstream factors.

基金项目:国家自然科学基金项目(81503452)

作者简介:余娜(1984.05—),女,博士,讲师,研究方向:恶性肿瘤的中医辨证, E-mail: yuna0525@163.com

通信作者:朱克俭(1955.12—),男,硕士研究生,研究员,研究方向:内科疑难病证辨治方法, E-mail: 0731zkjo@263.net

Key Words Total flavonoids isolated from *clerodendrum bungei*; Epithelial-Mesenchymal Transition; Wnt signal pathway; β -catenin over-expression plasmid

中图分类号:R284 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.04.046

原发性支气管肺癌(简称肺癌)是一种发生于支气管黏膜及腺体的恶性肿瘤,属于中医“肺积、肺岩、息贲、虚劳”等范畴。2014年全球癌症报告显示,全球引起死亡的最常见癌症,肺癌居于首位。在我国肺癌的发病率与死亡率均占肿瘤疾病的首位。肿瘤局部复发和远处转移是肿瘤病程发生发展的主要原因,80%以上的肺癌患者确诊时癌细胞已发生全身侵犯和转移,进入疾病晚期。臭牡丹是从湖南民间治疗恶性肿瘤的单方发掘,并经过反复临床与科研实践筛选出来的一味中药。臭牡丹性平,味辛、苦,历代本草记载其有“祛风除湿、解毒散瘀、消肿止痛”之功,对多种肿瘤具有临床治疗作用,尤以肺癌为佳。研究表明臭牡丹对多种肿瘤细胞具有抑制作用,并有一定预防肺癌发生及转移的作用^[1-2]。Wnt/ β -catenin 通路作为一条高度保守的信号通路在发育成熟动物个体中的异常激活,参与肿瘤发生的机制涉及信号传导、细胞周期、细胞增殖、凋亡以及细胞黏附等多方面^[3],并与肺癌的发生发展密切相关。本实验采用 β -catenin 过表达载体转染 A549 细胞,并予以臭牡丹总黄酮进行干预,观察 β -catenin 过表达载体以及臭牡丹总黄酮对 A549 细胞增殖、侵袭、侵袭力以及 Wnt/ β -catenin 通路的影响。

1 材料与方法

1.1.1 细胞 人肺腺癌 A549 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.1.2 试剂与仪器 β -catenin 质粒(pCDNA3.1 + 载体, AMP 抗性),空载体(pCDNA3.1 +, AMP 抗性),由上海交通大学金卫林教授馈赠。臭牡丹总黄酮由湖南中医药研究院附属医院中药房提供臭牡丹生药,经湖南省中医药研究院中药研究所提取,总黄酮含量 65%,1 g 相当于生药 30 g。批号:20130720。MTT 购自 Sigma 公司。Transwell 小室购自 Corning 公司。二甲基亚砜(DMSO)购自 VETEC 公司。RIPA 裂解液购自中国北京普利莱。 β -Catenin、GSK-3 β 、P-GSK-3 β (Ser9)兔单克隆抗体均购自 Cell Signaling Technology 公司;C-Myc、Cyclin D1 兔单克隆抗体均购自北京博奥森; β -Actin 鼠单克隆抗体购自 sigma aldrich 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 购自 Proteintech 公司。Endo-free Plasmid Mini Kit I 试剂盒购自广州飞扬生物工程有限公司。

Lip2000 助转染试剂购自美国 LIFE 公司。胎牛血清购自 Gibco 公司。DMEM 培养液,胰酶均购自 Hyclone 公司。金属浴 Grant-bi 公司生产,垂直凝胶电泳系统、转膜系统、化学发光仪 XRS + 由 BIO-RAD 公司生产超净工作台,细胞培养箱均由 Thermo Scientific 公司生产;离心机由 eppendorf 公司生产;倒置生物显微镜由北京中显恒业仪器公司生产;酶标仪由汇松公司生产。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将细胞分为 6 组:A 组(未转染细胞),B 组(未转染细胞 + 臭牡丹总黄酮),C 组(转染空载质粒),D 组(转染空载质粒 + 臭牡丹总黄酮),E 组(转染 β -Catenin 过表达质粒),F 组(转染 β -catenin 过表达质粒 + 臭牡丹总黄酮组)。

1.2.2 检测指标与方法

1)细胞培养与质粒转染:细胞培养:人肺腺癌细胞 A549 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 °C,5% CO₂ 恒温细胞培养箱中。每 2~3 天换液 1 次,待细胞长满约 80% 时,0.25% 含 EDTA 的胰酶消化后直接分瓶传代。A549 细胞呈梭形贴壁生长。

β -catenin 过表达和空载质粒的转化、扩增与抽提:常规制备 DH5 α 大肠杆菌感受态,制备感受态细胞,克隆母基因片段。将质粒 β -catenin 过表达、空载质粒分别剪下,放到 1.5 mL 离心管中,加入 20~50 μ L 灭菌水浸润备用。将制备好的感受态细胞加入准备好的 β -catenin 过表达和空载质粒溶液 50 μ L,摇匀后置于冰上 30 min。42 °C 水中热击 90 s,迅速冰浴冷却 3~5 min。另准备 EP 管 1 只,加入液体 LB 培养基 1 mL(不含 Amp),混匀,37 °C 下恒温振荡 1 h。取 200 μ L 菌液涂抹在有 Amp 的培养板上筛选,正面朝上 30 min,待菌液被培养基吸收后,将培养皿倒置,置于 37 °C 细菌培养箱中,培养 24 h。质粒的抽提按 E. Z. N. A. Endo-free Plasmid Mini Kit I 试剂盒操作,得到的质粒采用 nanodrop2000 超微量分光光度计检测浓度。

真核表达载体转染肺腺癌 A549 细胞:将 A549 细胞接种于 6 孔板中,待细胞生长至 80%~90% 时,弃原培养液,每孔加入 800 μ L 不含抗生素的含 10%

胎牛血清的 DMEM 完全培养基,待转染。取空载质粒 4 μg , β -catenin 过表达质粒 4 μg ,按 Lip2000 试剂盒步骤转染 A549 细胞。将转染后的细胞置于 CO_2 恒温培养箱中 5 h 后,去除原培养基,更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基,继续培养。

2) MTT 法检测臭牡丹总黄酮对 A549 细胞增殖活性的影响: MTT 法检测不同浓度臭牡丹总黄酮对 A549 细胞增殖活性的影响: 对数生长期的未转染质粒的 A549 细胞株,按 5 000 个/孔细胞铺于 96 孔板。培养 6~8 h 待细胞充分贴壁后待用。将臭牡丹总黄酮浸膏溶于无菌水中,母液浓度为 10 mg/mL。用含 4% FBS 的 DMEM 液稀释母液,配成不同浓度的药液。臭牡丹总黄酮浓度分别为 0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL,共 12 个浓度。用不同浓度的药液置换原培养液,每孔终体积 200 μL ,每组 6 个复孔,另设无细胞的培养基为空白对照孔。MTT 法测活细胞数,测定各孔各孔的吸光度(A 值),计算存活率。以上实验重复 3 次。将 IC_{50} 对应的臭牡丹总黄酮浓度作为后续实验的给药浓度。存活率 = 实验组平均 A 值/对照组平均 A 值 $\times 100\%$ 。

MTT 法检测臭牡丹总黄酮对各组细胞增殖活性的影响: 取对数生长期正常 A549 细胞、转染空载质粒细胞、转染 β -catenin 过表达质粒细胞,按 1.3 分组,5 000 个/孔细胞铺于 96 孔板。用无菌蒸馏水将臭牡丹总黄酮浸膏配成浓度为 10 mg/mL 的母液,再用含 10% 胎牛血清的完全 DMEM 培养基配成 2 mg/mL 的含药溶液。待 A549 细胞生长密度达 70%~80% 时,B、D、F 组分别加入含药的完全培养基,A、C、E 组加入不含药物的完全培养基,每组每孔终体积 200 μL ,继续培养 48 h,用 MTT 法测活细胞数。

3) 划痕试验检测臭牡丹总黄酮对 A549 细胞迁移能力的影响: 用无菌蒸馏水将臭牡丹总黄酮浸膏配成浓度为 10 mg/mL 的母液,再用含 10% 胎牛血清的完全 DMEM 培养基配成 2 mg/mL 的含药溶液。细胞按 1.3 分组。待细胞生长密度达 70%~80% 时,B、D、F 组分别加入含药的完全培养基,A、C、E 组加入不含药物的完全培养基,每孔终体积 1 mL,于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 环境下培养 48 h。待细胞长满后用 100 μL Tip 头沿培养板中轴均匀画一直线,用 DPBS 洗细胞 3 次,去除划下的细胞,加入 1% 低血清培养基,放入恒温 CO_2 培养箱继续培养。分别于 0、24、48 h 时间点,在倒置显微镜下观察划痕内的细胞,取样,拍照。结果以各组划痕培养后的划痕区域

闭合宽度占初始(0 h)划痕区域宽度的百分比来表示。重复 3 次实验,取平均值。

4) Transwell 小室侵袭检测臭牡丹总黄酮对 A549 细胞侵袭力的影响: 制备 Transwell 小室,吸取 Matrigel 胶 160 μL 加入 320 μL 无血清培养基中,按 1:2 稀释,即得 480 μL ,每个小室铺胶 60 μL ,共制作 8 个小室。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内 60 分钟使胶凝固。吸出小室内残余液体,每个小室加入 70 μL 无血清 DMEM 培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 水化基底膜。细胞按 1.3 分组,将各组细胞常规消化,调整细胞密度至 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 。吸取 200 μL 到小室上室内,下室加入含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM,继续培养 6 h。用无菌蒸馏水将臭牡丹总黄酮浸膏配成浓度为 10 mg/mL 的母液,再用含无血清培养基配成 2 mg/mL 的含药溶液。B、D、F 组分别加入含药的完全培养基,A、C、E 组加入不含药物的无血清培养基,每孔终体积 200 μL ,于 CO_2 恒温培养箱中培养 48 h。弃去小室内培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍。用湿棉签擦尽上室面的 Matrigel 胶和细胞,丙酮:甲醇 = 1:1,固定 20 min,PBS 洗 2 遍,用 0.5% 结晶紫染色 5 min,用清水洗 3 遍。倒置显微镜下观察,随机取个 5 视野计数细胞数,计算均值。以上实验重复 3 次。

5) Western blot 检测各组细胞 Wnt 通路相关蛋白的表达: 将细胞分为 4 组: pcDNA3.1 组(转染空载质粒), pcDNA3.1 + CMD 组(转染空载质粒 + 臭牡丹总黄酮), β -Catenin 组(转染 β -Catenin 过表达质粒), β -Catenin + CMD 组(转染 β -catenin 过表达质粒 + 臭牡丹总黄酮)。待 A549 细胞生长密度达 70%~80% 时,加入 2 mg/mL 的臭牡丹含药溶液,置于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 环境下培养 48 h 后进行 Western blot 检测。

用预冷的 PBS 洗涤 1 次,加入 100 μL RIPA 裂解液,反复吹打混匀,置于冰上,裂解 30 min; 将裂解完毕的细胞于 4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min 离心 15 min,将上清分装转移至 0.5 mL 的离心管中。按照 BCA 蛋白定量试剂盒绘制蛋白标准曲线,算出蛋白浓度。灌胶、上样,根据蛋白定量的结果,每孔上样 5 μL 已变性蛋白,电泳后转膜。按 β -catenin (92KD), GSK-3 β (46KD), P-GSK- β (46KD), C-Myc (49KD), Cyclin D1 (32KD), β -actin (42KD) 所在位置进行切胶。转移至 PVDF 膜, β -catenin 约 110 min, GSK-3 β 约 60 min, p-GSK- β 约 60 min, β -actin 约 60 min, c-myc 约 60 min, cyclin D1 约 40 min。载有蛋白质条带的膜

在含有5%脱脂奶粉的TBST溶液中室温封闭1h,然后加入含有稀释一抗(β -catenin 1:1 000、GSK-3 β 1:1 000、P-GSK-3 β 1:1 000、C-Myc 1:500、Cyclin D1 1:500、 β -actin 1:4 000),4℃下振荡孵育过夜。用1×TBST稀释HRP标记的二抗(Proteintech),稀释比例1:3 000,将PVDF膜放入杂交袋中与稀释完毕二抗共同孵育45~60min。洗涤后,采用ECL化学发光显示液曝光。

1.3 统计学方法 采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT法检测臭牡丹总黄酮对A549细胞增殖活性的影响

2.1.1 MTT法检测不同浓度臭牡丹总黄酮对A549细胞增殖活性的影响 臭牡丹总黄酮处理A549细胞48h后,MTT检测细胞活力显示,A549细胞活力受到明显抑制,随着给药浓度增加,细胞成活率下降,对细胞抑制作用增强,用SPSS 17.0计算其半数抑制率 IC_{50} 约2.0mg/mL,将该浓度作为后续实验的给药浓度。

2.1.2 MTT法检测臭牡丹总黄酮对各组细胞增殖活性的影响 转染空载质粒的细胞与正常细胞比较,增殖活性差异无统计学意义,但 β -Catenin过表达组细胞增殖活性明显提高($P < 0.05$);臭牡丹总黄酮可使各组细胞的增殖活性均明显降低($P < 0.05$),对 β -Catenin过表达组活性抑制尤为明显($P < 0.05$)。见图1、表1。

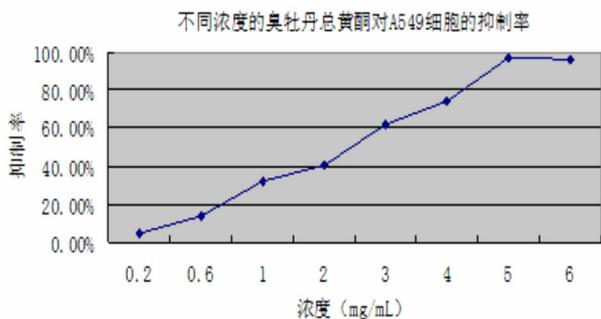


图1 不同浓度的臭牡丹总黄酮对A549细胞的抑制率

2.2 划痕试验检测臭牡丹总黄酮对A549细胞迁移能力的影响 给药48h后,与正常A549细胞比较,空载组的迁移率差异无统计学意义($P > 0.05$),但 β -Catenin过表达组较空载组迁移率上升($P < 0.05$)。采用臭牡丹总黄酮干预后,正常A549细胞、空载细胞、 β -catenin过表达细胞的迁移能力均明

显降低($P < 0.05$)。见图2、表2。

表1 MTT法检测臭牡丹总黄酮对各组细胞的增殖活性影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	A值
A组(未转染细胞)	0.38 ± 0.06
B组(未转染细胞+臭牡丹总黄酮)	0.27 ± 0.08*
C组(转染空载质粒)	0.36 ± 0.04
D组(转染空载质粒+臭牡丹总黄酮)	0.25 ± 0.07 Δ
E组(转染 β -Catenin过表达质粒)	0.46 ± 0.05 Δ
F组(转染 β -catenin过表达质粒+臭牡丹总黄酮组)	0.32 ± 0.08 Δ

注:和A组比较,* $P < 0.05$;与C组比较, $\Delta P < 0.05$;与E组比较, $\Delta P < 0.05$

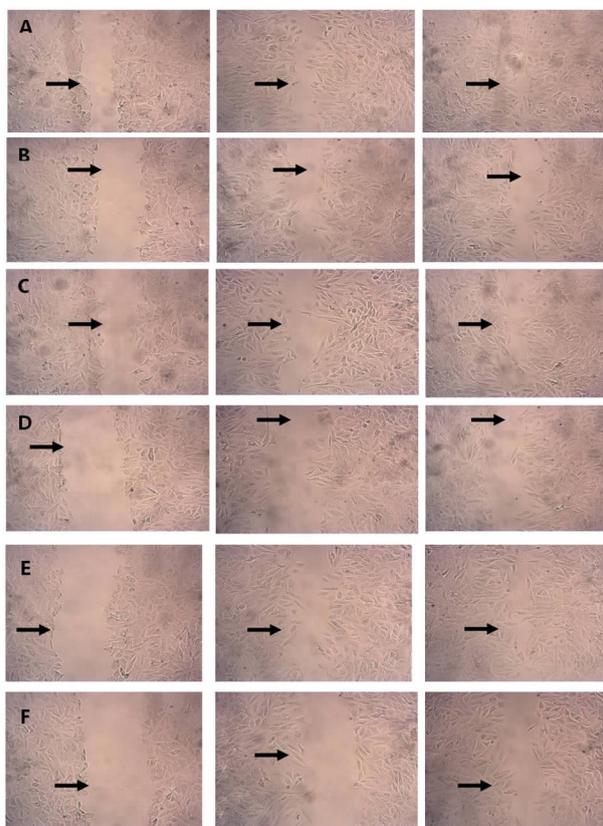


图2 给药0、24、48h镜下观察各组细胞的划痕迁移图像

注:A、B、C、D、E、F分别为未转染细胞、未转染细胞+臭牡丹总黄酮、转染空载质粒、转染空载质粒+臭牡丹总黄酮、转染 β -catenin过表达质粒、转染 β -catenin过表达质粒+臭牡丹总黄酮

表2 给药后48h各组细胞迁徙能力比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	愈合(%)
A组(未转染细胞)	0.70 ± 0.05
B组(未转染细胞+臭牡丹总黄酮)	0.48 ± 0.11*
C组(转染空载质粒)	0.69 ± 0.03
D组(转染空载质粒+臭牡丹总黄酮)	0.45 ± 0.13 Δ
E组(转染 β -Catenin过表达质粒)	0.91 ± 0.03 Δ
F组(转染 β -catenin过表达质粒+臭牡丹总黄酮组)	0.60 ± 0.02 Δ

注:与A组比较,* $P < 0.05$;与C组比较, $\Delta P < 0.05$;与E组比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 Transwell 检测臭牡丹总黄酮对 A549 细胞侵袭力的影响 转染空载质粒的细胞与正常细胞比较,侵袭活性无明显差异,而转染 β -catenin 过表达载体的细胞穿透人工基底膜的侵袭力明显增强 ($P < 0.05$)。臭牡丹总黄酮可使空白组,空转载体组, β -catenin 过表达组细胞的侵袭力均明显降低 ($P < 0.05$)。见图 3、表 3。

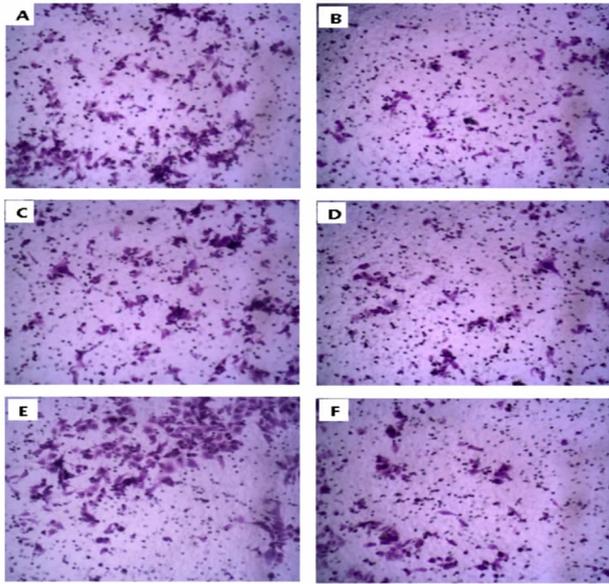


图 3 各组细胞镜下观察经染色的穿膜细胞

注:A、B、C、D、E、F 分别为未转染细胞、未转染细胞 + 臭牡丹总黄酮、转染空载质粒、转染空载质粒 + 臭牡丹总黄酮、转染 β -catenin 过表达质粒、转染 β -catenin 过表达质粒 + 臭牡丹总黄酮

表 3 给药 48 h 后各组细胞的穿膜细胞数 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	穿膜细胞数
A 组(未转染细胞)	138.00 \pm 21.00
B 组(未转染细胞 + 臭牡丹总黄酮)	93.33 \pm 14.29*
C 组(转染空载质粒)	138.00 \pm 8.00
D 组(转染空载质粒 + 臭牡丹总黄酮)	90.00 \pm 14.00 Δ
E 组(转染 β -Catenin 过表达质粒)	233.00 \pm 23.00 Δ
F 组(转染 β -catenin 过表达质粒 + 臭牡丹总黄酮组)	170.00 \pm 9.00 \blacktriangle

注:与 A 组比较,* $P < 0.05$;与 C 组比较, $\Delta P < 0.05$;与 E 组比较, $\blacktriangle P < 0.05$

2.4 Western blot 检测 Wnt 通路相关蛋白的表达

Western blot 分析结果显示:转染 β -catenin 过表达的 A549 细胞 β -catenin、C-Myc、CyclinD1 蛋白表达上调 ($P < 0.05$), P-GSK-3 β 蛋白表达下调 ($P < 0.05$)。采用臭牡丹总黄酮进行干预后,空载组的 β -catenin、C-Myc 蛋白表达下调 ($P < 0.05$),过表达组 β -catenin、C-Myc、CyclinD1 蛋白表达下调 ($P < 0.05$), P-GSK-3 β 的蛋白表达上调 ($P < 0.05$)。见图 4。

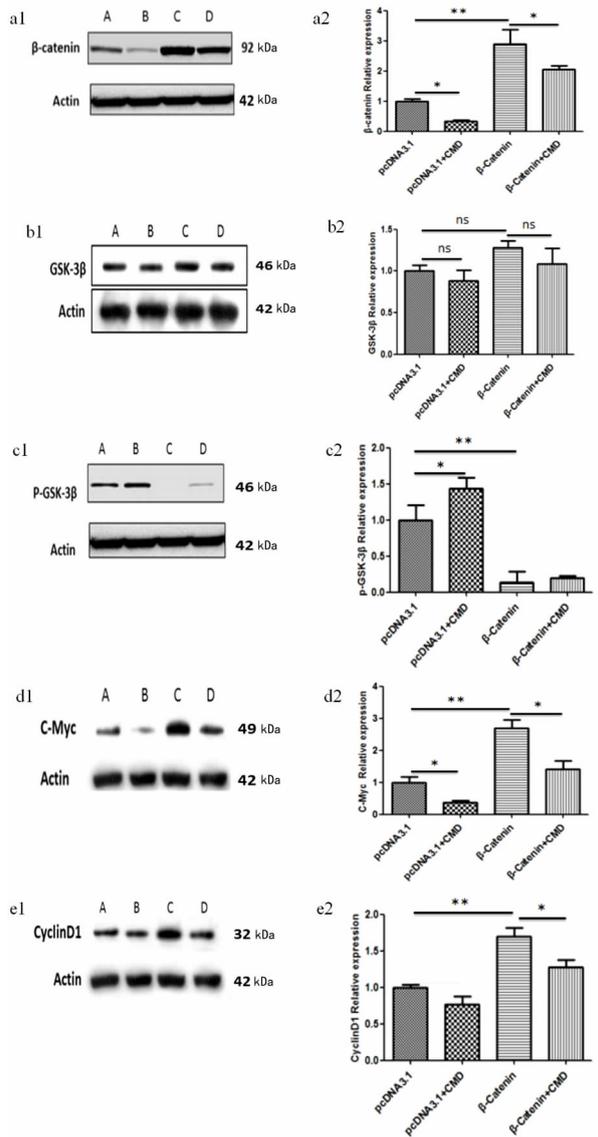


图 4 Western blot 检测各组 Wnt 通路相关蛋白的表达

注:a1 为各组 β -catenin 的蛋白条带;a2 为 β -catenin 蛋白灰度值的相对表达量比较;b1 为各组 GSK-3 β 的蛋白条带;b2 为 GSK-3 β 蛋白灰度值的相对表达量比较;c1 为各组 C-Myc 的蛋白条带;c2 为 C-Myc 蛋白灰度值的相对表达量比较;d1 为各组 P-GSK-3 β 的蛋白条带;d2 为 P-GSK-3 β 蛋白灰度值的相对表达量比较;e1 为各组 CyclinD1 的蛋白条带;e2 为 CyclinD1 蛋白灰度值的相对表达量比较(* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$);A(转染空载质粒组),B(转染空载质粒 + 臭牡丹总黄酮组),C(转染 β -Catenin 过表达质粒组),D(转染 β -catenin 过表达质粒 + 臭牡丹总黄酮组)

3 讨论

臭牡丹,性寒,具有“祛风除湿、解毒散瘀、消肿止痛之功”,正符合肺癌“化痰解毒”的中医治疗原则;另一方面臭牡丹具有一定的补益之力,重在补脾肺肾三脏,可治虚劳久咳,这与中医所认为的肺癌所致肺气虚不敛而致虚咳,肾气虚不纳气致虚喘,皆以补肺肾之气以定咳喘,并且补土生金补益脾气的治疗大法不谋而合,是符合中医药治疗肺癌用药原则

的中药之一。臭牡丹现代药理研究发现具有镇静催眠、局麻、镇痛、抗炎、抑菌、抗肿瘤等作用。本课题组曾采用淋巴瘤 Raji 细胞与人肺腺癌 A549 细胞对臭牡丹提取物的黄酮部分、生物碱部分、水提液去黄酮部分、水提醇溶部分 4 个不同样品进行抗肿瘤实验,发现 4 个样品均有不同程度的体外细胞毒作用,在综合考虑 4 个组分的抗肿瘤强度、提取工艺等情况后,最终确定臭牡丹总黄酮为抗肿瘤有效组分之一,并对其抗肿瘤作用机制进行研究。

Wnt/ β -catenin 通路参与肿瘤发生的机制涉及信号传导、细胞周期、细胞增殖、凋亡以及细胞黏附等多方面。Wnt 信号通路通过调控 β -catenin 而发挥作用,当无 Wnt/ β -catenin 信号时,胞质中的 Axin 复合体处于稳定状态, β -catenin 维持在较低水平。当细胞中存在 Wnt 信号时, β -catenin 即从 axin/APC/GSK-3 β 组成的降解复合物分离,在细胞内积聚并向细胞核内转移,与 TCF/LEF 结合,激活下游重要靶基因 C-myc、CyclinD1、slug 等的转录。经典的 Wnt 通路激活与肺癌的发生发展密切相关^[4]。如 Kras 转基因小鼠肺组织中的 Wnt 通路基因上调,可明显增加肿瘤发生的概率^[5]。在肺癌组织中,Wnt 通路的相关因子 Wnt-1 存在过表达^[6]。相反,如果下调 Wnt 信号通路,可促进肺癌细胞的凋亡、抑制肿瘤扩散和异种移植瘤生长,减少细胞活性和侵袭性,诱导表型分化,胞质 β -catenin 和存活素表达下降,TCF 依赖的转录活性降低^[7-8]。

β -catenin 为胞质中一个多功能蛋白,是 wnt/ β -catenin 信号通路途径中具有转录调控活性的关键成员,研究证实 β -catenin 蛋白的过表达、细胞定位变化及基因突变等是肺癌发生的重要原因。如曾凡军等^[9]认为阻止 β -catenin 蛋白异常表达以防止肺癌的发生、发展可能是治疗肺癌的新策略,为肺癌表观遗传干预治疗开辟一条新途径。Han 等^[10]研究表明,舒林酸抑制肺癌细胞增殖及诱导其凋亡的作用是通过抑制 β -catenin 的转录而实现的。

GSK-3 β 是哺乳类动物胞质内的一个 Ser/Thr 激酶,GSK3 β 对肿瘤细胞具有抑癌与促癌的双重调节作用^[11]。GSK-3 β 的抑癌作用主要表现在其作为 Wnt 信号通路的一个重要的负调控因子。GSK-3 β 的失活将在核内外启动 Wnt 信号途径,从而促进肿瘤的发生发展。相反,上调 GSK-3 β 的活性可以抑制 Wnt 信号从而减少肿瘤的发生^[12]。GSK-3 β 对肺癌主要表现为抑癌作用,表现为 GSK3 β 失活,而 GSK-3 β pSer9 过表达的情况。王革平和陈莉^[13]研究

发现磷酸化 pGSK-3 β 可促进肺癌的演进过程,与肺癌的分化、分期相关。曾静等^[14]采用免疫组化方法检测 pGSK-3 β 在 111 例非小细胞肺癌(NSCLC)患者肺癌组织中的表达,阳性表达 pGSK-3 β 的部分患者平均中位生存时间明显缩短,认为 pGSK-3 β 阳性表达可作为 NSCLC 独立预后的危险因素经证实 GSK3 β 在口腔癌、食管癌、鼻咽癌等多种肿瘤中均起到抑癌作用^[15]。C-myc 与 CyclinD 1 C-myc 是决定细胞从 G₀/G₁ 期进入 S 期的开关,是较早出现的细胞恶化的分子标志,与肺癌启动、恶性增生密切相关^[16]。正常情况下,c-myc 基因不显示转录活性或低水平表达,只有受某些因子激活时,c-myc 基因才大量表达,使细胞由静止期进入增殖期,促进癌细胞的增殖、浸润与转移^[17-18]。Cyclin D1 为原癌基因,其过表达和失调均可导致细胞,周期调控异常,而发生肿瘤。 β -catenin/Tcf 的复合物可直接刺激 CDKs 的活性,通过 cyclinD 1 上调促进细胞异常增生。本实验显示, β -catenin 可以成功转染 A549 细胞,转染后的细胞增殖、迁移、侵袭力均增强,并可通过调控 Wnt 通路相关因子 β -catenin、P-GSK-3 β 、c-myc、cyclinD1 的表达而激活 Wnt/ β -catenin 通路,可证实 β -catenin 在细胞内的稳定过表达是激活 Wnt 通路的起始因子。臭牡丹总黄酮可抑制 A549 细胞的增殖、迁移、侵袭力,并通过调节上述因子的表达,具有抑制 Wnt/ β -catenin 通路的倾向,其作用在 β -catenin 过表达组尤为明显。由此可推测臭牡丹总黄酮抗肿瘤的可能机制是通过抑制细胞内 β -catenin 的过表达从而调节下游多种因子,抑制 Wnt 通路而起作用。另外,由于 GSK-3 β 在具有促癌与抑癌的双向调节作用,在本实验中 GSK-3 β 的蛋白表达在各组差异无统计学意义,而 P-GSK-3 β 则在 β -catenin 过表达组表现为下调,在臭牡丹总黄酮组表现为表达上调,其内在机制还有待于进一步研究。

参考文献

- [1] 胡琦,朱克俭,谭小宁,等.臭牡丹总黄酮对人肝癌 HepG2 细胞增殖作用的实验研究[J].湖南中医杂志,2015,31(4):166-168.
- [2] 朱克俭,欧阳剑虹,卢铝沙,等.保肺饮预防肺癌的临床流行病学研究[J].中国中医药科技,1997,4(6):332-333.
- [3] Fodde R, Brabletz T. Wnt/ β -catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior[J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(2): 150-158.
- [4] Vaughan AE, Halbert CL, Wootton SK, et al. Lung cancer in mice induced by the jaagsiekte sheep retrovirus envelope protein is not maintained by rare cancer stem cells, but tumorigenicity does correlate with Wnt pathway activation[J]. Mol Cancer Res, 2012, 10(1): 86-95.

(下接第 987 页)

- [J]. 浙江中西医结合杂志,2009,19(9):571-572.
- [2]刘健,刘莉. 消银胶囊治疗玫瑰糠疹疗效观察[J]. 陕西中医, 2011,32(8):1026-1027.
- [3]乔爱莲. 窄谱中波紫外线照射联合复方甘草酸苷消银胶囊治疗寻常型银屑病疗效观察[J]. 当代医学,2012,18(16):92-93.
- [4]张晓宁. 消银胶囊治疗寻常型银屑病76例[J]. 陕西中医学院学报,2013,36(6):69-70.
- [5]段秀俊,裴妙荣,范书龙. HPLC法测定双参消银胶囊中芍药苷含量[J]. 世界中西医结合杂志,2009,4(3):173-174,178.
- [6]宁艳洁,孙虹,张贵华,等. 消银胶囊水提工艺研究[J]. 云南中医中药杂志,2012,20(11):62-63.
- [7]赵晓霞,高辉,于佳,等. 消银胶囊质量标准的研究[J]. 黑龙江中医药,2014,43(6):62-64.
- [8]邵晶,郭玫,余晓晖,等. 甘肃牛蒡不同部位总木脂素及牛蒡苷的含量测定[J]. 中国现代应用药学,2012,29(6):506-508.
- [9]田娟,王智民,王维皓. HPLC测定苦参药材中苦参碱和氧化苦参碱的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2006,12(2):23-24.
- [10]郭安. 苦参碱和氧化苦参碱提取纯化工艺研究[J]. 西南林学院学报,2006,26(2):37-39.
- [11]康凯,窦德强,康廷国,等. 牛蒡不同部位、牛蒡子不同产地中牛蒡苷和牛蒡苷元含量比较及指纹图谱分析[J]. 中国现代中药, 2009,11(4):23-26,37.
- [12]李明松,许青. 高效液相色谱法测定苦参中苦参碱的含量[J]. 中国民族民间医药,2013,22(5):19-20.
- [13]魏红,李春兰,刘梅. 透皮吸收制剂中苦参碱稳定性的胶束HPLC研究[J]. 药物分析杂志,2006,18(9):1317-1319.
- [14]陈黎,周晓萌,张秀华,等. 不同牛蒡子中牛蒡苷的鉴别及含量考察[J]. 中国药师,2011,14(1):63-65.
- [15]杨亮蕊,胡建勇,杞伶俐,等. 高效液相色谱法测定牛蒡子中牛蒡苷和牛蒡苷元的含量[J]. 中国医院用药评价与分析,2016,16(S1):53-54.
- [16]朱汀滢,丛海建,赵婷,等. 牛蒡子中牛蒡苷测定方法的优化[J]. 中成药,2016,38(4):846-850.
- [17]段秀俊,裴妙荣,范书龙. HPLC法测定双参消银胶囊中芍药苷含量[J]. 世界中西医结合杂志,2009,4(3):173-174,178.
- [18]赵晓霞,高辉,于佳,等. 消银胶囊质量标准的研究[J]. 黑龙江中医药,2014,43(6):62-64.

(2017-06-28 收稿 责任编辑:杨觉雄)

(上接第983页)

- [5] Pacheco-Pinedo, EC, Durham, AC, Stewart, KM, Wnt/ β -catenin signaling accelerates mouse lung tumorigenesis by imposing an embryonic distal progenitor phenotype on lung epithelium [J]. J Clin Invest, 2011,121(5):1935-1945.
- [6] Liang Y, Liu M, Wang P, et al. Analysis of 20 genes at chromosome band 12q13; RACGAP1 and MCERS1 overexpression in nonsmall-cell lung cancer [J]. Genes Chromosomes Cancer, 2013,52(3):305-315.
- [7] Lee JS1, Hur MW, Lee SK, et al. A novel sLRP6E1E2 inhibits canonical Wnt signaling, epithelial-to-mesenchymal transition, and induces mitochondria-dependent apoptosis in lung cancer [J]. PLoS One, 2012,7(5):e36520.
- [8] Nakashima, N, Liu, D, Huang, CL, et al. Wnt3 gene expression promotes tumor progression in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2012,76(2):228-234.
- [9] 曾凡军,周媛媛,宋新宇,等. β -连环蛋白与抑癌基因 ING1 蛋白在肺癌组织中的表达[J]. 疑难病杂志,2012,11(2):110-112,封3.
- [10] Han, A, Song, Z, Tong, C, et al. Sulindac suppresses beta-catenin expression in human cancer cells [J]. Eur J Pharmacol. 2008, 583(1):26-31.
- [11] 杨静,官成浓. GSK-3 β 对肿瘤细胞的双重调节[J]. 中国医疗前沿,2013,8(6):14-15.
- [12] 陶丽,盛晓波,刘玉萍,等. GSK-3 β 活性调节与肿瘤治疗[J]. 中国药理学通报,2014(6):741-743,744.
- [13] 王革平,陈莉. 非小细胞肺癌中 PGSK-3 β 、CEA、C-myc 表达与临床病理因素的相关性研究[J]. 华西医学,2009,24(9):2320-2323.
- [14] 曾静,邱志新,刘丹,等. pGSK-3 β 表达与非小细胞肺癌预后关系分析[J]. 中华肺部疾病杂志(连续型电子期刊),2011,4(6):462-466.
- [15] 郭扬,曲国蕃. GSK3 β 在恶性肿瘤中的作用及研究现状[J]. 现代生物医学进展,2012,12(22):4390-4392.
- [16] Nakashima T, Liu D, Nakano J, et al. Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients [J]. Oncol Rep, 2008,19(1):203-209.
- [17] 赖习华,王茂生,陈小萍,等. C-myc 与 PCNA 在肺癌组织中的表达及其意义[J]. 现代肿瘤医学,2011,19(8):1583-1585.
- [18] 王革平,陈莉. 非小细胞肺癌中 PGSK-3 β 、C-myc 表达及临床意义[J]. 现代肿瘤医学,2011,19(11):2224-2226.

(2018-01-01 收稿 责任编辑:杨觉雄)