

牛蒡子苷元对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞的增殖抑制作用及机制

刘若男¹ 刘文静¹ 邱建阁² 罗穗豫³

(1 郑州大学附属肿瘤医院, 郑州, 450008; 2 郑州大学医学科学院细胞信号转导和蛋白质组学研究中心, 郑州, 450001; 3 河南省人民医院妇科, 郑州, 450003)

摘要 目的:探讨牛蒡子苷元(ARG)对子宫内膜癌 HEC-1B 细胞的增殖抑制作用及机制。方法:HEC-1B 细胞分为观察组和对照组,观察组用终浓度为 10、20、30、40、60、100 $\mu\text{mol/L}$ 的 ARG 干预,对照组用 0.5% 二甲基亚砜(DMSO)干预。48 h 后,用四甲基偶氮唑盐微量酶反应比色法(MTT 法)检测细胞增殖情况;流式细胞仪检测细胞凋亡及细胞周期;蛋白免疫印迹法(WB)检测细胞 NF- κB 信号通路相关蛋白表达。结果:10、20、30、40、60、100 $\mu\text{mol/L}$ ARG 干预 48 h,HEC-1B 细胞的相对生存率分别为 $(92.36 \pm 0.52)\%$ 、 $(89.59 \pm 0.74)\%$ 、 $(78.49 \pm 0.68)\%$ 、 $(56.47 \pm 0.59)\%$ 、 $(40.12 \pm 0.69)\%$ 、 $(37.52 \pm 0.58)\%$,且随着 ARG 作用浓度的升高,HEC-1B 细胞的相对生存率呈逐渐降低趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$),干预 48 h HEC-1B 细胞 50% 抑制浓度(IC_{50})为 50 $\mu\text{mol/L}$ 。对照组和观察组(50 $\mu\text{mol/L}$ ARG)细胞凋亡率分别为 $(2.89 \pm 0.56)\%$ 、 $(26.58 \pm 3.26)\%$,观察组细胞凋亡率明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。但观察组细胞周期分布与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。观察组(50 $\mu\text{mol/L}$ ARG)细胞 p65、p-I κB - α 蛋白表达量明显低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),2 组间 I κB - α 蛋白表达量差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:ARG 可抑制 HEC-1B 细胞增殖,促进其凋亡,其作用机制可能与降低 NF- κB 通路相关蛋白表达水平,抑制 NF- κB 通路活化有关。

关键词 子宫内膜癌;牛蒡子苷元;HEC-1B 细胞;增殖;凋亡;NF- κB 通路

Proliferation Inhibition Effect of Arctigenin on Endometrial Carcinoma HEC-1B Cell and Its Mechanism

Li Ruonan¹, Liu Wenjing¹, Qiu Jiange², Luo Suiyu³

(1 Affiliated Cancer Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China; 2 Cell Signal Transduction and Proteomics Research Center, The Academy of Medical Science, China-Zhengzhou University, Zhengzhou 450008, China; 3 Department of Gynecology, Henan Province People's Hospital, Zhengzhou 450003, China)

Abstract **Objective:** To investigate the proliferation inhibition effect of Arctigenin (ARG) on endometrial carcinoma HEC-1B cell and its mechanism. **Methods:** HEC-1B cells were divided into test group and control group. The test group was intervened with ARG at the final concentration of 10, 20, 30, 40, 60, 100 $\mu\text{mol/L}$, and the control group was intervened with 0.5% dimethyl sulfoxide (DMSO). 48 h after incubation, the proliferation was detected by MTT assay. The cell apoptosis and cell cycle were detected by flow cytometry. The expression of NF- κB signaling pathway related proteins were detected by western blotting (WB). **Results:** The relative survival rates of HEC-1B cell intervened with 10, 20, 30, 40, 60 and 100 $\mu\text{mol/L}$ ARG after 48 h were $(92.36 \pm 0.52)\%$, $(89.59 \pm 0.74)\%$, $(78.49 \pm 0.68)\%$, $(56.47 \pm 0.59)\%$, $(40.12 \pm 0.69)\%$, $(37.52 \pm 0.58)\%$ respectively, with the increase of ARG concentration. The relative survival rates of HEC-1B cells decreased gradually ($P < 0.05$). 50% inhibitory concentration (ID_{50}) of HEC-1B cells intervened with ARG after 48 h was 50 $\mu\text{mol/L}$. The apoptosis rates of HEC-1B cells in the control group and the test group (50 $\mu\text{mol/L}$ ARG) were $(2.89 \pm 0.56)\%$, $(26.58 \pm 3.26)\%$ respectively. The apoptosis rate in the test group was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). However, there was no significant difference in cell cycle distribution between the test group and the control group ($P > 0.05$). The expression levels of p65 and p-I κB - α in the test group (50 $\mu\text{mol/L}$ ARG) were significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression levels of I κB - α between the test group and the control group ($P > 0.05$). **Conclusion:** ARG can inhibit the proliferation and promote apoptosis of HEC-1B cells, and its mechanism may be related to decreasing the expression level of NF- κB related protein and inhibiting the activation of NF- κB pathway.

Key Words Endometrial carcinoma; Arctigenin; HEC-1B cells; Proliferation; Apoptosis; NF- κB pathway

中图分类号: R285.5 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2018.08.046

子宫内膜癌又称子宫体癌,为子宫内膜腺体的恶性肿瘤,约占女性癌症总数的7%,其发病与遗传、患者长期使用激素以及高血压、肥胖、糖尿病、不孕不育、绝经等体质因素有关^[1-2]。近年来中西医结合抗肿瘤治疗取得了较为显著的临床效果,因此中药及其活性成分的抗肿瘤作用研究成为广大中医医务工作者关注的焦点,也成为临床研究的热点和方向。牛蒡子苷元(Arctigenin, ARG)为木质素类化合物,是中药牛蒡子的主要药理活性成分之一^[3]。最新研究^[4-5]证实,ARG不仅具有抗炎及免疫调节的功效,还具有较强的抗肿瘤作用,体外实验显示ARG能够增强肺癌细胞对化疗药物的敏感性,但是目前其对子宫内膜癌细胞抗肿瘤作用的研究仍较为罕见。本研究以子宫内膜癌 HEC-1B 细胞为研究模型,观察 ARG 对 HEC-1B 细胞的增殖抑制作用,分析其抗肿瘤作用机制,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 子宫内膜癌 HEC-1B 细胞,购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 药品 ARG;每支 20 mg,批号:115711,美国 Santacruz Biotechnology 公司;DMEM 培养基、二甲基亚砷(DMSO),美国 Sigma 公司;胎牛血清,美国 Gibco 公司;胰蛋白酶,杭州四季青生物试剂有限公司;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒,美国 Thermofisher 有限公司;p65 和 I κ B- α 抗体,美国 Santa Cruz 公司;磷酸化-I κ B- α (p-I κ B- α) 抗体,美国 Cell Signaling 公司等。

1.1.3 仪器 细胞培养板及细胞培养瓶,无锡耐思生物科技有限公司;DS-425P 电子天平,上海寺岗电子有限公司;Allegra 64R 高速冷冻离心机,美国 Beckman Coulter 有限公司;CKX-31 荧光倒置相差显微镜,日本 Olympus 公司;725 型紫外可见分光光度计,上海舜宇恒平科学仪器有限公司;Meta-Morph 图像分析系统,美国 Media Cybernetics 公司等。

1.2 方法

1.2.1 ARG 的配制 DMSO 溶解 ARG 制成 20 mmol/L 的溶液,除菌后 4 ℃ 避光暂存。

1.2.2 HEC-1B 细胞培养及 ARG 干预 将 HEC-1B 细胞以含有 10% 胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素及 100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养基,置于温度为 37 ℃,5% CO₂ 培养箱中培养,每 3 天以 0.25% 的胰蛋白酶消化传代 1 次。将生长至对数期 HEC-1B 细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化,PBS 洗涤后,以 DMEM 培

养液调整细胞密度为 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 个/mL 接种于培养瓶中,于 37 ℃ 5% CO₂ 条件下培养箱中培养过夜,待细胞贴壁后,观察组细胞分别加入终浓度为 10、20、30、40、60、100 μ mol/L 的 ARG 处理^[6],对照组则以 0.5% DMSO 处理,各组均继续培养 48 h。

1.3 观察指标

1.3.1 MTT 法检测 ARG 对 HEC-1B 细胞增殖抑制作用 取上述处理 48 h 后的 HEC-1B 细胞,用 0.25% 胰蛋白酶消化,以密度为 $4 \times 10^3 \sim 5 \times 10^3$ 个/mL 接种于 96 孔细胞培养板中,于 37 ℃ 5% CO₂ 条件下培养箱中培养。24 h 后待细胞贴壁生长后,按照 1.2.2 的方法处理细胞,于培养箱中继续培养 48 h 后进行细胞增殖活性的检测。将各组细胞上清吸弃后加 5 mg/mL 的 MTT,每孔 20 μ L,继续培养 4 h,弃上清,加 DMSO,轻轻震荡 10 min,以全自动酶标仪检测各孔于波长为 570 nm 的吸光光度值 (OD_{570 nm}),绘制生存曲线,细胞相对生存率 = (观察组 OD_{570 nm}/对照组 OD_{570 nm}) $\times$ 100%,计算 50% 抑制浓度(IC₅₀)。

1.3.2 流式细胞术检测 ARG 对 HEC-1B 细胞周期及凋亡率的影响 观察组和对照组 HEC-1B 细胞分别用 50 μ mol/L 的 ARG 及 0.5% DMSO 处理,干预 48 h 后,按照 Annexin V-FITC/PI 检测试剂盒的实验要求收集细胞并处理,于收集好的细胞沉淀中加入 $1 \times$ binding buffer 200 μ L 悬浮细胞,并加入 Annexin V-FITC 5 μ L,4 ℃ 避光孵育 15 min,加 5 μ L 碘化丙啶(PI)染液混匀,室温避光孵育 5 min,以流式细胞仪进行检测,以 Modfit LT2.0 细胞周期分析软件分析 HEC-1B 细胞周期分布及凋亡情况。

1.3.3 蛋白免疫印迹法(WB)检测 ARG 对 HEC-1B 细胞 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响 将 HEC-1B 细胞以密度为 $2 \times 10^4 \sim 3 \times 10^4$ 个/mL 接种于细胞培养瓶,至对数期弃培养液,观察组分别加终浓度为 50 μ mol/L 的 ARG 处理,对照组则以 0.5% DMSO 处理,48 h 后收集细胞。提取细胞总蛋白,以 β -actin 为参照,Meta-Morph 图像分析系统分析各组细胞 p65、I κ B- α 、p-I κ B- α 蛋白表达情况。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-q 检验法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ARG 对 HEC-1B 细胞的增殖抑制作用 经

MTT 实验检测, 10、20、30、40、60、100 $\mu\text{mol/L}$ ARG 处理 48 h, HEC-1B 细胞的相对生存率分别为 $(92.36 \pm 0.52)\%$ 、 $(89.59 \pm 0.74)\%$ 、 $(78.49 \pm 0.68)\%$ 、 $(56.47 \pm 0.59)\%$ 、 $(40.12 \pm 0.69)\%$ 、 $(37.52 \pm 0.58)\%$, 随着 ARG 作用浓度的升高, HEC-1B 细胞的相对生存率呈逐渐降低趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), ARG 处理 48 h HEC-1B 细胞的 ID₅₀ 为 50 $\mu\text{mol/L}$, 因此后续实验均采用 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 ARG 进行 HEC-1B 细胞的处理。

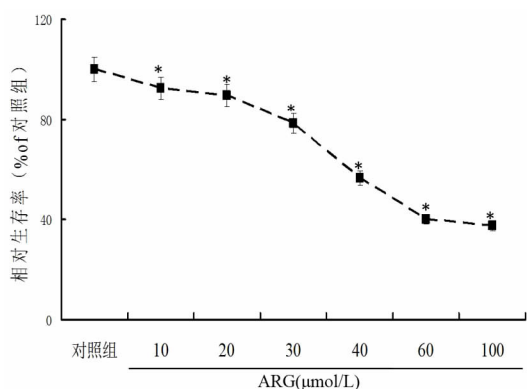


图 1 ARG 对 HEC-1B 细胞的增殖抑制作用

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

2.2 ARG 对 HEC-1B 细胞周期及凋亡率的影响 干预 48 h 后, 对照组和观察组 HEC-1B 细胞凋亡率分别为 $(2.89 \pm 0.56)\%$ 、 $(26.58 \pm 3.26)\%$, 观察组细胞凋亡率明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。但观察组细胞周期分布与对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见图 2、3。

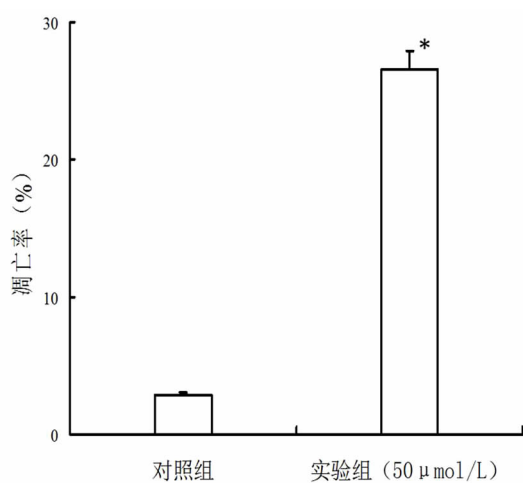


图 2 ARG 对 HEC-1B 细胞凋亡的影响

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

2.3 ARG 对 HEC-1B 细胞 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响 WB 检测结果显示, 观察组 HEC-1B 细胞 p65、p-I κ B- α 蛋白表达量明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 2 组 I κ B- α 蛋白表达量

比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 如图 4。

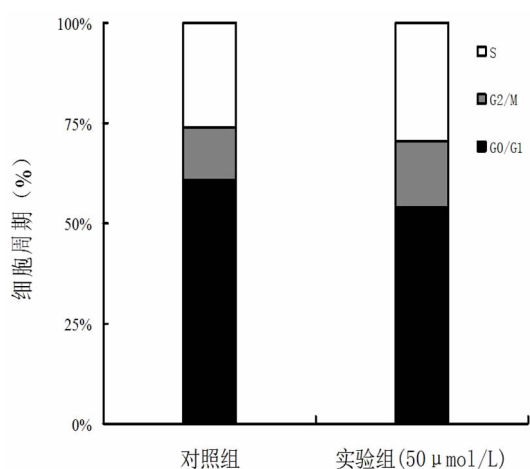


图 3 ARG 对 HEC-1B 细胞周期的影响

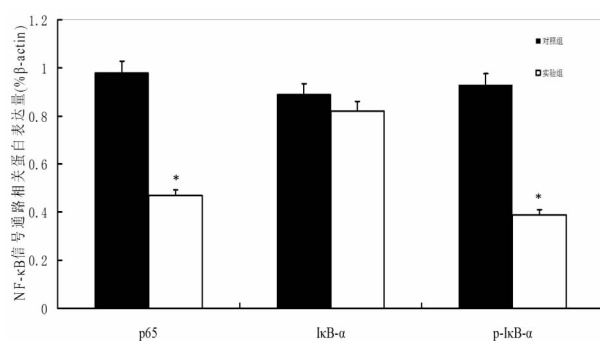


图 4 ARG 对 HEC-1B 细胞 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

子宫内膜癌是女性生殖道三大恶性肿瘤之一, 发病率居我国妇科肿瘤的第 2 位, 而近年来其发病有年轻化的趋势, 严重危害女性健康。常规放化疗虽可抑制癌细胞增殖, 但患者对于小剂量治疗易产生耐药性, 大剂量治疗则由于其细胞毒性, 患者易无法耐受而影响临床治疗, 因而更安全有效的低毒性治疗药物成为临床研究的热点和方向。中医学中并无子宫内膜腺癌的病名, 据其主要临床特点将其归属“崩漏”“痛经”“癥瘕”“五色带下”等范畴, 认为正气虚弱、血瘀、气滞、湿毒、热邪等为子宫内膜腺癌的主要病机, 属于本虚标实之症。患者疾病初期邪盛而正虚明显, 后期则随疾病病情进展出现气血阴阳虚弱, 表现为肝脾肾三脏具损, 而肾虚肾脏受损最甚^[7]。尚洪宇^[8]研究认为, 长期肝肾亏虚、冲任二脉失调导致了子宫内膜癌的形成, 同时也与脾虚生湿, 湿蕴化热, 湿热注于胞宫, 与瘀血互结化为邪毒所致有关。目前关于中医药抗肿瘤的的相关研究报道甚多, 充分反映出中药所具有的潜在抗肿瘤作用, 李柳

叶等^[9]研究发现,白花蛇舌草黄酮通过降低子宫内膜癌 Ishikawa 细胞炎性细胞因子的表达进而抑制细胞增殖。陈寒露等^[10]研究发现,姜黄素通过上调抑制基因 NKD2 的表达,抑制 Wnt 信号通路进而体外抑制结肠癌细胞 SW620 的生长。武超等^[11]研究表明,黄芪皂苷 II 可增加人肝癌细胞株 HepG2 对 5-FU 的敏感性,明显抑制细胞的增殖,其机制与抑制 p-ERK1/2 表达有关。

牛蒡子为牛蒡的果实,ARG 为牛蒡子的主要木脂素成分,具有不良反应小及较好的调控免疫等作用。近期报道^[12]显示,ARG 具有显著的抗肿瘤活性,其在体内外均可抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡。研究^[13]报道,ARG 可增加非小细胞肺癌 H460 细胞对顺铂的敏感性,抑制细胞增殖;王静泓等^[14]研究发现,ARG 可促进肝癌 HepG2、Hep3B 细胞的凋亡,与抑制 PI3K/Akt 信号通路下调抗凋亡蛋白表达有关。本研究结果显示,ARG 可抑制子宫内膜癌 HEC-1B 细胞增殖,并呈浓度依赖性的特点,同时 ARG 也具有促进 HEC-1B 细胞凋亡的作用,但对细胞周期并无明显的影响。因此可以认为 ARG 可能通过诱导 HEC-1B 细胞凋亡的方式实现其对子宫内膜癌细胞的杀伤作用。关于 ARG 的抗肿瘤作用机制研究报道不一,Huang 等^[15]发现,ARG 诱导卵巢癌细胞的凋亡与 i NOS/NO/STAT3/Survivin 信号通路相关;Yao 等^[16]研究证实,ARG 通过抑制 STAT3 信号增强多种肿瘤细胞体外对顺铂的化疗敏感性;Hsieh 等^[17]报道,ARG 诱导雌激素受体阴性的乳腺癌细胞凋亡与 ROS/p38 MAPK 通路有关。NF- κ B 信号通路为炎性细胞通路,通过抑制细胞凋亡、参与肿瘤侵袭性转移及诱导肿瘤耐药等多种途径参与肿瘤的形成的进展,p65 是 NF- κ B 通路上的主要位点蛋白,具有调控下游基因转录,激活细胞因子的级联放大作用,可反映 NF- κ B 的活化程度^[18]。本研究结果中,观察组 HEC-1B 细胞 p65、p-I κ B- α 蛋白表达量明显低于对照组,表明 ARG 可抑制上游信号分子 I κ B- α 的磷酸化,抑制 NF- κ B 信号通路,进而抑制子宫膜癌 HEC-1B 细胞的增殖,并促其凋亡。

综上所述,ARG 可抑制 HEC-1B 细胞增殖,促进凋亡,其作用机制与可能与降低 NF- κ B 通路相关蛋白表达水平,抑制 NF- κ B 通路活化有关,但是否具有其他作用机制尚需进一步研究确认。

参考文献

[1] Gibson W J, Hoivik E A, Halle M K, et al. The genomic landscape and

evolution of endometrial carcinoma progression and abdominopelvic metastasis[J]. *Nature Genetics*, 2016, 48(8):848-855.

[2] 张春苗, 丁海燕, 刘阳, 等. 胰岛素抵抗与血清胰岛素水平与子宫内膜癌发病的关系研究[J]. *贵州医药*, 2016, 40(7):697-698.

[3] 田兆兴, 杨倩. 中医药防治肿瘤放疗后骨髓抑制的应用及研究进展[J]. *中国医院药学杂志*, 2017, 37(2):190-193.

[4] 苏勤勇, 李晓梅, 姚景春, 等. 牛蒡子苷元对大鼠脑胶质瘤的作用及初步作用机制探讨[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(6):805-809.

[5] 郑国灿, 王兵, 黄聪华, 等. 牛蒡子苷元对肿瘤血管生成抑制作用的观察[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2013, 20(3):177-180.

[6] Yang S, Ma J, Xiao J, et al. Arctigenin anti-tumor activity in bladder cancer T24 cell line through induction of cell-cycle arrest and apoptosis[J]. *Anatomical Record*, 2012, 295(8):1260-1266.

[7] 黄彩梅, 夏亦冬, 胡国华. 紫草素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞雌激素信号通路表达的影响[J]. *世界中医药*, 2016, 11(9):1842-1845.

[8] 尚洪宇. 子宫内膜癌患者中医体质类型及其相关因素的临床观察[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2016.

[9] 李柳叶, 邢玉, 包晓霞, 等. 白花蛇舌草黄酮和多糖对与肿瘤相关巨噬细胞共培养的人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的影响[J]. *中国妇产科临床杂志*, 2015, 16(2):150-153.

[10] 陈寒露, 陈海滔, 徐超, 等. 姜黄素对结肠癌细胞株 NKD2 及 CXCR4 基因表达影响的研究[J]. *中国肿瘤*, 2016, 25(4):297-302.

[11] 武超, 许杜娟, 杨翠, 等. 黄芪皂苷 II 增加 5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞株 HepG2 增殖抑制作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(1):78-82.

[12] 黄栋栋, 蔡志毅. 牛蒡子苷元抗肿瘤分子机制研究进展[J]. *检验医学*, 2016, 31(6):546-548.

[13] 王焕勤, 王静. Survivin 基因在牛蒡子苷元增强人肺癌 H460 细胞化疗敏感性中的作用[J]. *国际呼吸杂志*, 2015, 35(6):401-405.

[14] 王静泓, 姜孝新, 曾乐平, 等. 牛蒡子苷元通过抑制 PI3-K/Akt 信号通路诱导肝癌细胞凋亡[J]. *肿瘤药学*, 2015, 5(6):430-435.

[15] Huang K, Li LA, Meng YG, et al. Arctigenin promotes apoptosis in ovarian cancer cells via the i NOS/NO/STAT3/survivin signaling[J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 115(6):507-511.

[16] Yao X, Zhu F, Zhao Z, et al. Arctigenin enhances chemo-sensitivity of cancer cells to cisplatin through inhibition of the STAT3 signaling pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(10):2837-2849.

[17] Hsieh CJ, Kuo PL, Hsu YC, et al. Arctigenin, a dietary phytoestrogen, induces apoptosis of estrogen receptor-negative breast cancer cells through the ROS/p38 MAPK pathway and epigenetic regulation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2014, 67(23):159-170.

[18] 任飞, 王婷婷, 王春雷. 布洛芬对 MyD88 基因沉默中性粒细胞中 NF- κ B 蛋白表达的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2016, 41(3):310-313.

(2018-04-16 收稿 责任编辑:张文婷)