doi:10.11659/jjssx.04E025002

·基础研究·

黄芩苷抑制胃癌细胞HGC-27的机制研究

王邓超[1,2],江 桃[1],刘津杉[3],雷跃华[1],魏 健[1],胡 强[1] (1.自贡市第四人民医院普外科,四川 自贡 643000;2.重庆医科大学附属第一临床学院胃肠外科,重庆 400016;3.江苏省人民医院重庆医院胃肠外科,重庆 401420)

[摘 要] **目的** 探讨中药黄芩苷对胃癌细胞HGC-27的作用及机制。**方法** CCK-8检测不同浓度黄芩苷对HGC-27细胞增殖的影响,并计算半数抑制浓度(IC50);流式细胞术检测黄芩苷对细胞凋亡的影响;细胞划痕实验评估黄芩苷对细胞迁移能力的影响;Western blot检测Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白的表达变化。**结果** 黄芩苷对HGC-27细胞的增殖具有显著的抑制作用,其IC50为104.1 μmol/L。75 μmol/L、100 μmol/L黄芩苷处理后细胞凋亡率高于0 μmol/L黄芩苷处理,差异有统计学意义(P<0.05);75 μmol/L、100 μmol/L黄芩苷处理48 h细胞划痕愈合率低于0 μmol/L黄芩苷处理,差异有统计学意义(P<0.05)。Western blot结果显示,75 μmol/L、100 μmol/L黄芩苷处理后细胞Wnt5a和β-catenin蛋白表达水平均显著下降(P<0.05),而GSK3β蛋白表达水平明显升高(P<0.05)。**结论** 黄芩苷能够抑制胃癌细胞HGC-27的增殖、促进凋亡以及限制细胞迁移,可能通过调控Wnt/β-catenin信号通路实现其抗癌效应。

[关键词] 黄芩苷;胃癌;Wnt/β-catenin信号通路;细胞凋亡;细胞迁移
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [收稿日期] 2025-04-01

Mechanism of baicalin inhibiting gastric cancer cells HGC-27

WANG Deng-chao[1,2], JIANG Tao[1], LIU Jin-shan[3], LEI Yue-hua[1], WEI Jian[1], HU Qiang[1] (1. Department of General Surgery, Zigong Fourth People's Hospital,Zigong Sichuan 643000,China;2. Department of Gastrointestinal Surgery,First Clinical College of Chongqing Medical University, Chongqing 400016,China;3. Department of Gastrointestinal Surgery, Chongqing Hospital of Jiangsu People's Hospital, Chongqing 401420,China)

Abstract: Objective To investigate the effect of the traditional Chinese medicine baicalin on gastric cancer cells HGC-27 and its underlying mechanism. **Methods** The effects of various concentrations of baicalin on the proliferation of HGC-27 cells were detected by CCK-8 assay, and the half-maximal inhibitory concentration (IC50)was calculated. The effect of baicalin on cell apoptosis was determined by flow cytometry. The effect of baicalin on cell migration was evaluated by wound healing assay. The expression changes of proteins related to the Wnt/β-catenin signaling pathway were detected by Western blot. **Results** Baicalin significantly inhibited the proliferation of HGC-27 cells, exhibiting an IC50 of 104.1 μmol/L. Treatment with 75 or 100 μmol/L of baicalin increased the apoptosis rate of HGC-27 cells compared to treatment with 0 μmol/L of baicalin, with statistically significant differences(P<0.05); the wound healing rate of HGC-27 cells treated with 75 μmol/L or 100 μmol/L of baicalin for 48 hours decreased compared to that treated with 0 μmol/L of baicalin, with statistically significant differences (P<0.05). Western blot results showed that treatment with 75 μmol/L or 100 μmol/L of baicalin significantly downregulated the protein expression of Wnt5a and β-catenin in HGC-27 cells (P<0.05), while upregulated the protein expression of GSK3β compared to treatment with 0 μmol/L of baicalin(P<0.05). **Conclusion** Baicalin inhibits proliferation, promotes apoptosis, and suppresses migration of gastric cancer cells HGC-27. These anticancer effects are likely mediated through the regulation of Wnt/β-catenin signaling pathway.

Keywords: baicalin;gastric cancer;Wnt/β-catenin signaling pathway;cell apoptosis;cell migration

胃癌是全球范围内致死率较高的恶性肿瘤之一,据报道每年新发病例约100万例,死亡病例达73万例[1-2]。尽管目前胃癌的早期诊断和临床治疗取得了一定进步,但晚期胃癌患者的5年生存率仍不足30%[3],开发新型高效治疗药物与策略已成为临床亟待解决的关键问题。中药因独特的治疗效果和相对低的副作用,在抗肿瘤领域中的应用逐渐受到关注[4]。黄芩苷作为从传统中药黄芩中提取的主要活性成分,已被研究证实对多种癌细胞具有抑制作用[5]。黄芩苷的抗炎、抗病毒和抗氧化的特性使其在肿瘤治疗中具有较高的应用价值[6]。然而,关于黄芩苷对胃癌细胞

[基金项目] 四川省医学会医学科研青年创新项目(Q22071);重庆市自然科学基金面上项目(CSTB2024NSCQ-MSX0098)

[通信作者] 王邓超,E-mail:wangdengchaopwk@163.com

的具体作用机制,尤其是其是否通过调节特定信号通路发挥作用,目前尚不明确[7]。Wnt/β-catenin信号通路在调节细胞增殖、分化以及凋亡等关键生物学过程中发挥重要作用,其异常激活已被证实与多种肿瘤的发生发展密切相关[8]。因此,本研究旨在探讨黄芩苷对胃癌细胞HGC-27的抑制作用是否通过调节Wnt/β-catenin信号通路实现,以期为胃癌的治疗提供新的治疗策略。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株HGC-27(中国科学院上海生科院细胞库);黄芩苷(成都植标化纯生物技术有限公司,纯度>99.90%);RPMI-1640培养基、胰蛋白酶、胎牛血清、青霉素-链霉素双抗溶液(美国Gibco公司);CCK-8试剂盒(上海碧云天生物技术研究所);DMSO(美国Sigma-Aldrich公司);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(日本TaKaRa公司);β-catenin抗体(英国Abcam公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司);Wnt5a抗体(常州Affinity,中国);GSK3β抗体(英国Abcam)。

1.2 细胞培养

将复苏后的HGC-27细胞接种于添加10%灭活胎牛血清的RPMI-1640培养基中,随后将培养瓶放入37 ℃、5% CO_2及饱和湿度的恒温培养箱中孵育。通过倒置显微镜定期观察培养基中细胞生长的状态,并及时更换新鲜的培养液以维持细胞生长。当细胞覆盖培养瓶底面积的90%时,使用0.25%胰蛋白酶-EDTA消化HGC-27细胞,并严格按照1∶3的比例进行传代培养。后续的实验选用处于对数生长期的HGC-27细胞。

1.3 药物处理

基于预实验数据,将黄芩苷的浓度梯度分为0、25、50、75、100和150 μmol/L。实验前,黄芩苷先在DMSO中溶解以制备75 mmol/L的母液。使用黄芩苷前,将母液用RPMI-1640培养基稀释至目标浓度,并控制DMSO终浓度低于0.1%,以减少溶剂对细胞生长的可能干扰。

1.4 细胞增殖检测

将HGC-27细胞以3 000个/孔的密度接种至96孔板,随后分别加入浓度为0、25、50、75、100和150 μmol/L的黄芩苷溶液。为防止污染,所有步骤均在超净工作台内完成。对照组(0 μmol/L黄芩苷)仅使用培养基进行处理。细胞培养48 h后,在每孔中加入100 μL CCK-8试剂继续孵育1.5 h。随后,使用多功能酶标仪检测450 nm波长处吸光度值,并计算不同浓度下的细胞活力。

1.5 细胞凋亡检测

通过Annexin V-FITC和PI双染色结合流式细胞术,检测黄芩苷对HGC-27细胞凋亡的诱导作用。将HGC-27细胞分别用0、75、100 μmol/L黄芩苷处理48 h,随后加入5 μL Annexin V-FITC,轻轻混匀后于室温避光孵育10 min。接着加入5 μL PI,混匀后立即进行流式细胞术检测,以测定黄芩苷诱导的细胞凋亡率。

1.6 细胞迁移能力变化

将0、75、100 μmol/L黄芩苷处理的HGC-27细胞接种于6孔板中,待融合度达到80%~90%时,使用10 μL的移液器枪头在细胞单层中央划1条直线,移除划痕区域的细胞,随后更换为无血清培养基继续培养细胞。分别在0、12、24、36和48 h观察并记录细胞迁移及划痕修复情况。

1.7 蛋白表达分析

以0、75、100 μmol/L黄芩苷处理HGC-27细胞,并收集蛋白,行电泳分离后转移至PVDF膜,加入1∶1 000稀释的β-actin一抗,并在室温下孵育1.5 h进行内参蛋白检测。随后分别加入1∶1 000稀释的Wnt5a、β-catenin和GSK3β一抗4 ℃过夜孵育,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗后进行检测。通过Tanon图像分析系统对蛋白条带密度进行定量,以评估各组细胞中Wnt/β-catenin信号通路的活化程度。

1.8 统计学分析

所有统计图均使用GraphPad Prism 8.0软件和R语言(版本4.5.0)完成。实验数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,2组间比较采用t检验,单因素方差分析(*ANOVA*)比较多组数据,进一步两两比较采用*Tukey*检验。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

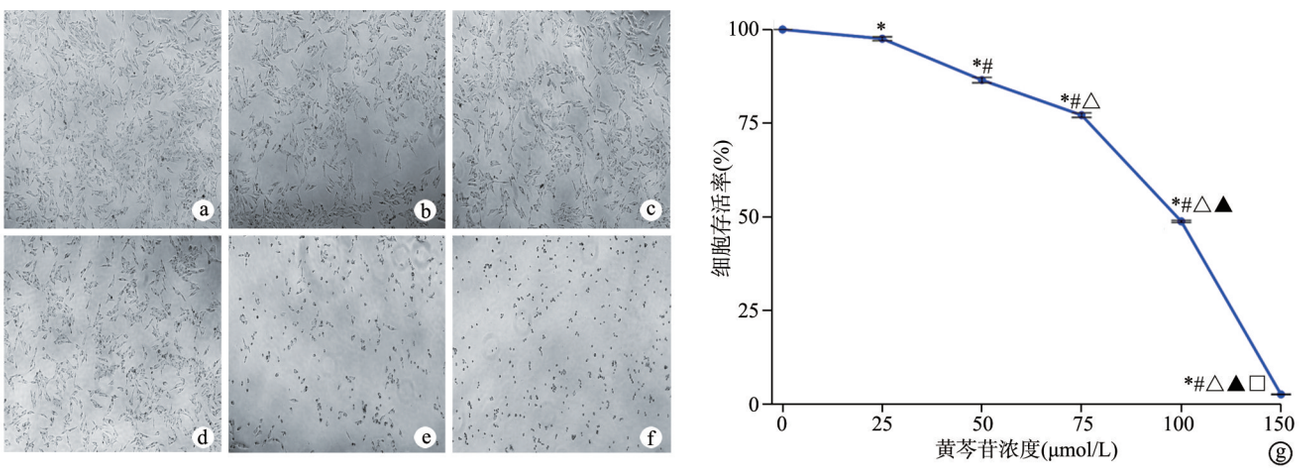
2.1 黄芩苷对HGC-27细胞增殖的影响

CCK-8实验结果显示,黄芩苷对HGC-27细胞的增殖具有明显的抑制作用,其半数抑制浓度(IC50)为104.1 μmol/L。随着黄芩苷浓度的升高,细胞存活率显著降低,尤其黄芩苷的浓度在50 μmol/L及以上时,抑制作用更加显著,见图1。定量分析结果显示,随着

黄芩苷浓度升高细胞活力显著下降,呈浓度依赖性变化,其中各浓度黄芩苷细胞存活率与0 μmol/L黄芩苷比较,差异具有统计学意义(P<0.05),见图1。

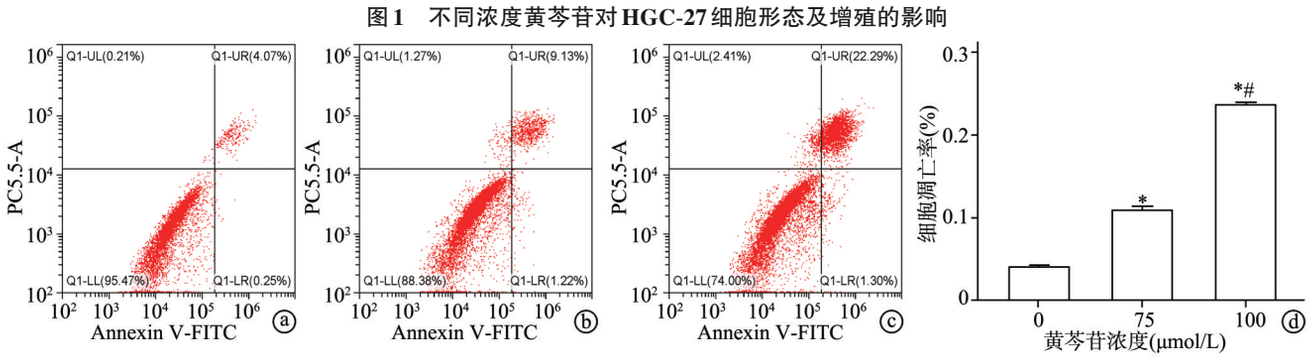
2.2　黄芩苷诱导细胞凋亡

75 μmol/L、100 μmol/L黄芩苷处理的细胞凋亡率[(10.99±0.65)% & (23.68±0.45)%]显著高于0 μmol/L黄芩苷处理[(4.04±0.25)%],且黄芩苷浓度越高,细胞凋亡率越高,差异均具有统计学意义(P<0.05),见图2。



a~f:0、25、50、75、100、150 μmol/L黄芩苷处理后细胞形态(×100);g:黄芩苷对HGC-27细胞增殖的影响　*:与0 μmol/L比较,P<0.05;#:与25 μmol/L比较,P<0.05;△:与50 μmol/L比较,P<0.05;▲:与75 μmol/L比较,P<0.05;□:与100 μmol/L比较,P<0.05

图1　不同浓度黄芩苷对HGC-27细胞形态及增殖的影响

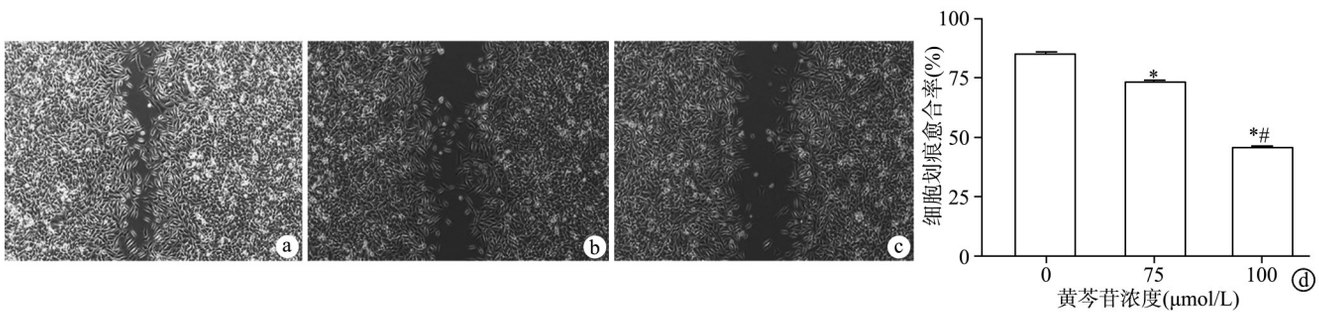


a~c:0、75、100 μmol/L黄芩苷处理后流式细胞图;d:细胞凋亡率定量分析　*:与0 μmol/L比较,P<0.05;#:与75 μmol/L比较,P<0.05

图2　黄芩苷诱导HGC-27细胞凋亡

2.3　黄芩苷对HGC-27细胞迁移能力的作用

75 μmol/L、100 μmol/L黄芩苷处理48 h细胞划痕愈合率[(73.20±0.94)% & (45.85±0.41)%]明显低于0 μmol/L黄芩苷处理[(85.72±0.34)%],且75 μmol/L和100 μmol/L黄芩苷处理后细胞划痕愈合率比较,差异有统计学意义(P<0.05),见图3。

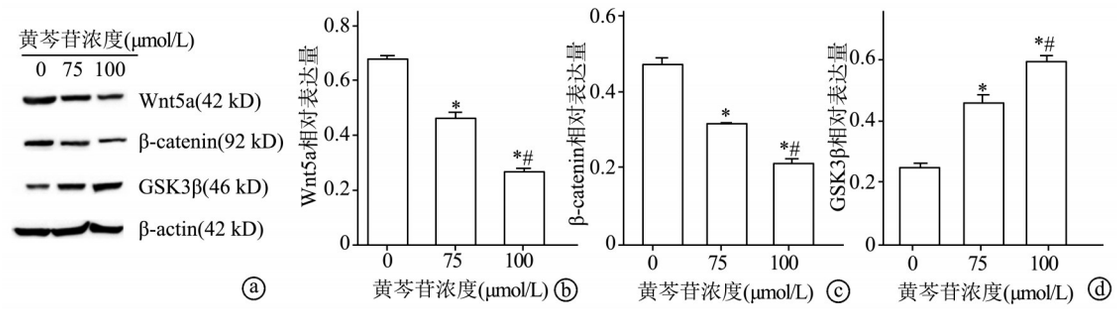


a~c:0、75、100 μmol/L黄芩苷处理对细胞迁移的影响(×100);d:细胞划痕愈合率的定量分析结果　*:与0 μmol/L比较,P<0.05;#:与75 μmol/L比较,P<0.05

图3　黄芩苷对HGC-27细胞迁移能力的影响

2.4 黄芩苷对Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白表达的作用

Western blot结果显示，与0 μmol/L黄芩苷处理比较，75 μmol/L、100 μmol/L黄芩苷处理后Wnt5a和β-catenin蛋白表达水平均下降，而GSK3β蛋白表达水平升高，差异均具有统计学意义（$P<0.05$），见图4。



a：Western blot检测蛋白灰度图；b：Wnt5a蛋白相对表达量；c：β-catenin蛋白相对表达量；d：GSK3β蛋白相对表达量 *：与0 μmol/L比较，$P<0.05$；#：与75 μmol/L比较，$P<0.05$

图4 黄芩苷对HGC-27细胞中Wnt/β-catenin信号通路相关蛋白表达的影响

3 讨论

胃癌致死率较高，已成为全球性重大健康问题。尽管手术切除、放射治疗及化学药物治疗等已广泛应用于胃癌的治疗，但晚期胃癌的疗效仍不佳，患者长期生存率持续处于较低水平[9-10]。因此，开发针对胃癌细胞增殖、迁移及凋亡调控机制的新型治疗策略，对改善患者预后具有重要意义。

本研究结果显示，黄芩苷对未分化胃癌细胞系HGC-27具有明显的抑制作用，CCK-8实验测得其IC50为104.1 μmol/L，表明黄芩苷对胃癌细胞具有较强的抑制活性，且其抑制作用呈浓度依赖性，显示出其抗肿瘤的潜力。Wnt/β-catenin信号通路在调控细胞增殖过程中发挥关键作用，特别是在癌细胞中，其过度激活会显著加速癌细胞增殖。本研究结果显示，黄芩苷可能通过下调Wnt5a和β-catenin蛋白的表达，抑制该信号通路的活性，减少了β-catenin在细胞核中的积累，进而阻碍其作为转录因子的功能。这一机制与此前的研究结果一致，即Wnt/β-catenin信号通路的抑制可显著减少胃癌细胞的增殖[11-12]。本研究结果显示，75 μmol/L、100 μmol/L黄芩苷处理后细胞凋亡率明显升高，表明黄芩苷处理可显著提升HGC-27细胞的凋亡率，且其促凋亡作用与Wnt/β-catenin信号通路的调节密切相关。已经有相关研究表明，Wnt/β-catenin信号通路的过度活化会抑制细胞凋亡，而阻断该信号通路则能够诱导肿瘤细胞凋亡[13]。黄芩苷可能通过下调β-catenin的表达恢复凋亡信号通路的正常功能，激活了线粒体依赖的凋亡机制[14]。凋亡是一种程序化的细胞死亡方式，对于肿瘤治疗具有重要意义，黄芩苷通过诱导凋亡来抑制胃癌细胞的生长，具有较大的应用潜力。

肿瘤细胞的迁移能力与Wnt/β-catenin信号通路的活化密切相关。研究发现，β-catenin的核转位可激活与细胞迁移相关的基因（如MMPs），从而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭[15]。本研究发现，黄芩苷处理能够显著抑制HGC-27细胞的迁移，这可能是通过抑制Wnt/β-catenin信号通路实现[16]。细胞划痕实验结果显示，黄芩苷能够显著抑制HGC-27细胞的迁移。在75 μmol/L和100 μmol/L的黄芩苷处理后，细胞划痕愈合率明显降低，尤其是在100 μmol/L浓度下，细胞迁移能力的抑制作用更为显著。黄芩苷可能通过影响细胞骨架和细胞外基质相互作用的关键蛋白，抑制肿瘤的扩散和侵袭，从而显著降低胃癌细胞的迁移能力[17]。

Wnt/β-catenin信号通路在多种肿瘤中异常活化，不仅与肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭能力密切相关，同时还在胃癌的发生与发展过程中发挥重要作用[18]。本研究Western blot结果显示，黄芩苷处理后，HGC-27细胞Wnt5a和β-catenin表达水平显著降低，同时GSK3β蛋白表达上升。GSK3β是Wnt/β-catenin信号通路的重要负调控因子，可通过促进β-catenin的磷酸化与降解，阻止其在细胞核内积聚，进而抑制该信号通路的活化[19]。黄芩苷还可能通过调控非经典Wnt信号通路的配体（如Wnt5a），进一步削弱肿瘤细胞的恶性表型[20]。

综上所述，本研究结果显示，黄芩苷可通过抑制Wnt/β-catenin信号通路，有效抑制胃癌细胞增殖，促进胃癌细胞凋亡，并显著降低胃癌细胞的迁移能力。此外，黄芩苷作为中药黄芩的主要活性成分，已在多种肿瘤模型中显示出抗肿瘤活性，其机制涉及细胞周期调控、凋亡激活及多个信号通路的调节，如PI3K/Akt

和MAPK等[21-24]。结合本研究发现,黄芩苷可通过调控Wnt/β-catenin信号通路抑制胃癌细胞的恶性表型,进一步支持其作为广谱抗癌候选药物的潜力,为胃癌临床治疗药物的开发提供了科学依据。

[参考文献]

[1] Ilic M, Ilic I. Epidemiology of stomach cancer[J]. World J Gastroenterol,2022,28(12):1187-1203. doi: 10.3748/wjg.v28.i12.1187.

[2] Compare D, Rocco A, Nardone G. Screening for and surveillance of gastric cancer[J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(38): 13681-13691. doi: 10.3748/wjg.v20.i38.13681.

[3] Kang W,Zeng H,Xiong J,et al. Survival of patients with gastric cancer surgically treated at the National Cancer Center of China from 2011 to 2018 according to stage at diagnosis[J]. J Natl Cancer Cent,2022,2(3):132-138. doi: 10.1016/j.jncc.2022.07.002.

[4] Wang S,Long S,Deng Z,et al. Positive role of Chinese herbal medicine in cancer immune regulation[J]. Am J Chin Med,2020,48(7):1577-1592. doi: 10.1142/S0192415X20500780.

[5] Wang L, Feng T, Su Z, et al. Latest research progress on anticancer effect of baicalin and its aglycone baicalein[J]. Arch Pharm Res, 2022,45(8):535-557. doi: 10.1007/s12272-022-01397-z.

[6] Hu Z, Guan Y, Hu W, et al. An overview of pharmacological activities of baicalin and its aglycone baicalein: new insights into molecular mechanisms and signaling pathways[J]. Iran J Basic Med Sci, 2022, 25(1):14-26. doi: 10.22038/IJBMS.2022.60380.13381.

[7] Singh S, Meena A, Luqman S. Baicalin mediated regulation of key signaling pathways in cancer[J]. Pharmacol Res,2021,164:105387. doi: 10.1016/j.phrs.2020.105387.

[8] Yu F, Yu C, Li F, et al. Wnt/β-catenin signaling in cancers and targeted therapies[J]. Signal Transduct Target Ther,2021,6(1):307. doi: 10.1038/s41392-021-00701-5.

[9] Morgan E, Arnold M, Camargo MC, et al. The current and future incidence and mortality of gastric cancer in 185 countries, 2020-40: a population-based modelling study[J]. EClinicalMedicine, 2022, 47: 101404. doi: 10.1016/j.eclinm.2022.101404.

[10] Wong MCS, Huang J, Chan PSF, et al. Global incidence and mortality of gastric cancer, 1980-2018[J]. JAMA Netw Open, 2021, 4(7): e2118457. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.18457.

[11] Xia X, Xia J, Yang H, et al. Baicalein blocked cervical carcinoma cell proliferation by targeting CCND1 via Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1): 2729-2736. doi: 10.1080/21691401.2019.1636055.

[12] Wu Q, Ma J, Wei J, et al. lncRNA SNHG11 promotes gastric cancer progression by activating the Wnt/β-catenin pathway and oncogenic autophagy[J]. Molr Ther, 2021,29(3):1258-1278. doi: 10.1016/j.ymthe.2020.10.011.

[13] Liu X, Liu S, Chen J, et al. Baicalein suppresses the proliferation of acute T-lymphoblastic leukemia Jurkat cells by inhibiting the Wnt/β-catenin signaling[J]. Ann Hematol, 2016, 95(11): 1787-1793. doi: 10.1007/s00277-016-2766-z.

[14] Ma X, Yan W, Dai Z, et al. Baicalein suppresses metastasis of breast cancer cells by inhibiting EMT via downregulation of SATB1 and Wnt/β-catenin pathway[J]. Drug Des Devel Ther, 2016, 10: 1419-1441. doi: 10.2147/DDDT.S102541.

[15] 许超平,蔡惠丽,何 莉,等. 黄芩素对多发性骨髓瘤细胞株RPMI8226和U266细胞增殖和迁移的影响[J]. 中华血液学杂志, 2012, 33(11): 938-943. doi: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2012.11.011.

[16] Örenlili Yaylagül E,Ülger C. The effect of baicalein on Wnt/β-catenin pathway and miR-25 expression in Saos-2 osteosarcoma cell line[J]. Turk J Med Sci, 2020, 50(44): 1168-1179. doi: 10.3906/sag-2001-161.

[17] Cheng Y, Lin G, Xie Y, et al. Baicalin ameliorates angiotensin Ⅱ-induced cardiac hypertrophy and mitogen-activated protein kinase signaling pathway activation: a target-based network pharmacology approach[J]. Eur J Pharmacol,2024,981:176876. doi: 10.1016/j.ejphar.2024.176876.

[18] Shi Y, Ge C, Fang D, et al. NCAPG facilitates colorectal cancer cell proliferation, migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition by activating the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Cancer Cell Int,2022,22(1):119. doi: 10.1186/s12935-022-02538-6.

[19] Qiu L, Chen J, Lin J, et al. Baicalin alleviates H_2O_2-induced injury of H9c2 cardiomyocytes through suppression of the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Mol Med Rep,2017,16(6):9251-9255. doi: 10.3892/mmr.2017.7748.

[20] Chen T, Yang P, Jia Y. Molecular mechanisms of astragaloside-Ⅳ in cancer therapy (review)[J]. Int J Mol Med, 2021, 47(3): 13. doi: 10.3892/ijmm.2021.4846.

[21] 郑勇凤,王佳婧,傅超美,等. 黄芩的化学成分与药理作用研究进展[J]. 中成药,2016,38(1):141-147. doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2016.01.032.

[22] 孔邦彦,魏立彬,郭青龙. 黄芩苷的抗肿瘤作用研究进展[J]. 药学学报,2021,56(6):1537-1543. doi:10.16438/j.0513-4870.2020-1642.

[23] 刘梦珂,纪漾激,程 林,等. 黄芩苷抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. 上海交通大学学报(医学版),2021,41(2):246-250. doi: 10.3969/j.issn.1674-8115.2021.02.019.

[24] Su X, Guo H, Zhou Y, et al. Astragaloside Ⅳ attenuates high glucose-induced NF-κB-mediated inflammation through activation of PI3K/AKT-ERK-dependent Nrf2/ARE signaling pathway in glomerular mesangial cells[J]. Phytother Res, 2023, 37(9): 4133-4148. doi: 10.1002/ptr.7875.

(编辑:刘 艺)