doi:10.11659/jjssx.09E018015

·基础研究·

汉黄芩素对皮肤鳞状细胞癌 A431 细胞株增殖与侵袭的影响及其作用机制

李 博,陈志勇,刘太阳,李栋梁 (重庆涪陵中心医院烧伤整形科,重庆 408000)

[摘 要] **目的** 探讨汉黄芩素对皮肤鳞癌细胞的增殖和侵袭能力的影响及其潜在作用机制。**方法** 检测正常皮肤组织和皮肤鳞癌组织中 Notch1 mRNA 和蛋白表达水平。使用 0、5、10、和 20 μmol/L 浓度的汉黄芩素处理皮肤鳞癌 A431 细胞系 24、48、72 h,分别用 MTT 法检测各组细胞增殖能力;使用 0、5、10、和 20 μmol/L 浓度的汉黄芩素处理细胞 48 h,随后采用 Transwell 侵袭试验检测各组细胞侵袭能力,Real time PCR (RT-PCR)和 Western blot 法检测 Notch1 基因的 mRNA 及蛋白表达。使用 Notch1 激活剂多西环素处理后,进一步采用 MTT 法检测各组细胞增殖能力、Transwell 法检测各组细胞侵袭能力。**结果** 与正常皮肤组织相比,皮肤鳞癌组织中 Notch1 基因的 mRNA 及蛋白表达水平均显著升高,差异具有统计学意义($P<0.05$)。汉黄芩素能够抑制皮肤鳞癌细胞的增殖和侵袭,且呈剂量依赖性,差异具有统计学意义($P<0.05$)。汉黄芩素能够抑制 Notch1 基因的表达,而应用 Notch1 激活剂多西环素处理后,明显减弱了汉黄芩素对细胞增殖与侵袭能力的抑制作用,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 汉黄芩素能够抑制皮肤鳞癌细胞的增殖及侵袭进程,可能主要通过抑制 Notch1 基因来发挥作用。

[关键词] 皮肤鳞癌;汉黄芩素;Notch1;增殖;侵袭

[中图分类号] R739.5 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-09-07

Effects and mechanisms of wogonin on proliferation and invasion of skin squamous-cell carcinoma cell line A431

LI Bo, CHEN Zhi-yong, LIU Tai-yang, LI Dong-liang (Department of Burn and Plastic Surgery, Fuling Central Hospital, Chongqing 408000, China)

Abstract: Objective To investigate the role of wogonin on proliferation and invasion of skin squamous-cell carcinoma and to explore the potential mechanism. **Methods** The mRNA and protein expression levels of Notch1 were detected in normal skin tissues and skin squamous-cell carcinoma tissues. Skin squamous-cell carcinoma cell line A431 were treated with 0, 5, 10 and 20 μmol/L wogonin for 24, 48, 72 hours. Cell proliferation capacities were detected by MTT assay. Cell invasion abilities were monitored by Transwell invasion assay. The mRNA and protein expression of Notch1 gene were detected by Real time PCR (RT-PCR) and Western blot. After treatment with Notch1 activator doxycycline, cell proliferation ability and invasion ability of each group were further detected by MTT assay and Transwell assay. **Results** Compared with normal skin tissue, mRNA and protein expression levels of Notch1 gene in skin squamous cell carcinoma were significantly increased, with statistically significant differences ($P<0.05$). Wogonin inhibited the proliferation and invasion ability of skin squamous-cell carcinoma cells in a dose dependent manner, with statistically significant differences ($P<0.05$). Wogonin inhibited the expression of Notch1 gene, and the treatment with Notch1 activator doxycycline significantly reduced the inhibitory effect of Wogonin on cell proliferation and invasion, with statistically significant differences ($P<0.05$). **Conclusion** Wogonin can inhibite the proliferation and invasion of skin squamous-cell carcinoma primarily by inhibiting the Notch1 gene.

Keywords: skin squamous-cell carcinoma; Wogonin; Notch1; proliferation; invasion

皮肤癌是一种发病率较高的恶性上皮细胞来源的肿瘤,临床上以皮肤鳞状细胞癌(skin squamous cell carcinoma,SSCC)最多见,也称之为棘细胞癌[1-2]。皮肤鳞癌常见于易受紫外线辐射的体表皮肤,以面部和上肢居多,近年来其发病率有逐年增高趋势,在老年人中尤其明显[3-4]。皮肤鳞癌通常呈浸润性生长,局部病灶的异常增殖及侵袭转移是主要病理特征之一,晚期极易发生远处转移,预后较差[1,5]。手术治疗是目前皮肤癌的主流治疗方案,但对于失去手术时机以及术后预防复发的患者来说,研究开发有效的抗肿瘤药物十分重要[6-7]。汉黄芩素(5,7-二羟基-8-甲氧基黄酮)是从中药黄芪中提取的黄酮类化合物,具有特异性诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、侵袭及协同抗癌剂促进肿瘤细胞死亡等作用[8-10]。然而,汉黄芩素对皮肤鳞癌细胞的增殖和侵袭的调控作用目前尚未见报道。本研究通过研究汉黄芩素对皮肤鳞癌增殖及侵袭能力的调节及其可能的作用机制,为汉黄芩素治疗皮肤鳞癌提供实验基础。

[基金项目] 重庆市卫生计生委医学科研计划项目(20142148)

[通信作者] 李栋梁,E-mail:flzxmr@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

汉黄芩素(CAS:691-47-8; HPLC≥98%)购自上海中药标准化研究中心;DMEM 细胞培养基、双抗、胎牛血清和 Notch1 基因激活剂多西环素均购自天津洁洋盛生物科技公司;多克隆兔抗人 Notch1 抗体购自美国 Abcam 公司;β-Actin 内参抗体购自于美国 Cell Signaling Technology 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京艾伯泰科生物科技公司;Thermo26616 中分子量预染蛋白 Marker 购自美国 Thermo Fisher 公司;超敏 ECL 化学发光试剂盒(NCI4106)购自美国 Millipore 公司;组织及细胞 IP 裂解液(RIPA)及 BCA 蛋白浓度测定试剂盒均购自武汉碧云天生物技术有限公司;Trizol 试剂、逆转录试剂盒、SYBR Green 均购自日本 Takara 生物有限公司。

1.2 临床标本收集与细胞培养

正常皮肤组织标本(32 例)及皮肤鳞癌组织标本(32 例)来自于重庆市涪陵中心医院组织标本库,从 2016 年至 2017 年开始收集整理,并经过病理科严格鉴定。纳入本研究的所有临床标本取材均通过所在医院伦理委员会审批许可,仅用于实验研究。新鲜标本经液氮冻存用于组织 RNA 的提取。皮肤鳞癌细胞系 A431 培养于 DMEM 完全培养基中(含 10% 胎牛血清,100 mg/L青霉素,100 mg/L 链霉素),放置于 37 ℃,5% CO_2 恒温培养箱中,根据实验需要分为对照组、DMSO 处理组、汉黄芩素处理组、汉黄芩素与多西环素联合用药组。

1.3 逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)

RT-PCR 检测 Notch1 的表达,将经过处理的各组细胞用冰上预冷 PBS 洗涤 3 次,按照产品说明书操作步骤提取细胞总 RNA,并测定 A260/A280 比值。引物序列如下:β-actin 上游引物 5′-ATGGGGAAGGTGAAGGTCG-3′,下游引物 5′-GGGTCATTGATGGCAACAATATC-3′;Notch1 上游引物 5′-AAGTCCCGCCGTGAAGTG-3′,下游引物 5′-ACGCCAAGGTCTGAAGGTC-3′。反应条件均为:95 ℃,3 min 预变性;94 ℃,30 s;48 ℃,30 s;72 ℃,1 min,扩增 35 个循环;72 ℃延伸 10 min。

1.4 Western blot 检测

细胞处理完毕后将用预冷 PBS 洗涤贴壁细胞3 次后加入 RIPA 裂解液并将细胞裂解液收集至 1.5 mL EP 管中,冰上充分裂解 30 min。随后 13 000 r/min 离心 15 min,吸取蛋白液于 -20 ℃储存。先后用 80 V 和120 V电泳并 300 mA 转膜,再置于 BSA 中封闭孵育 1 h。随后用多克隆兔抗人的 Notch1(1∶1 000)及单克隆兔抗人的 β-actin(1∶1 000)孵育 16 h。次日 TBST 清洗 3 次后用 HRP 标记羊抗兔 IgG 孵育 1 h 后再次用 TBST 清洗 3 次。最后加入 ECL 化学发光显示剂进行曝光、分析结果。

1.5 MTT 法检测细胞增殖率

将使用不同浓度的汉黄芩素和多西环素处理后的皮肤鳞癌细胞消化、重悬为单细胞悬液,按照每孔 5×10^3 个的密度种于 96 孔板中,同时每组设置 4 个复孔以消除人为误差。培养 24、48、72 h 后每孔加入 0.5 mg/mL MTT 10 μL,避光置于 37 ℃继续孵育 4 h。随后弃去培养液,每孔加入 DMSO 溶液 150 μL 并置于脱色摇床中振摇 5 min,以充分溶解孔内结晶。随后使用酶标仪于 492 nm 波长测定 OD 值,并进行相关统计分析。

1.6 细胞侵袭实验

首先在 Transwell 小室中铺 matrigel 0.1 mL,在 37 ℃培养箱中孵育 1 h。将已用不同浓度汉黄芩素(0.5,10,20 μmol/L)处理 24 h 的皮肤鳞癌 A431 细胞消化,用无血清的 DMEM 培养基重悬,并稀释至每毫升 5×10^5 个细胞,将其加至上室中,而将含有 20% 胎牛血清的 DMEM 培养基加至下室中。置恒温 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养 24 h。未迁移的细胞留在 Transwell 小室的上表面,用棉签将其轻轻擦去。侵袭的细胞在 Transwell 小室的下表面,先用 100% 甲醇固定,后用苏木精 - 伊红染色。在显微镜下观察,并随机取 5 个视野,拍照计数取平均值。实验重复 3 次。

1.7 统计学方法

所有实验数据均采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,样本均数间的比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $\alpha=0.05$ 为检验水准,$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

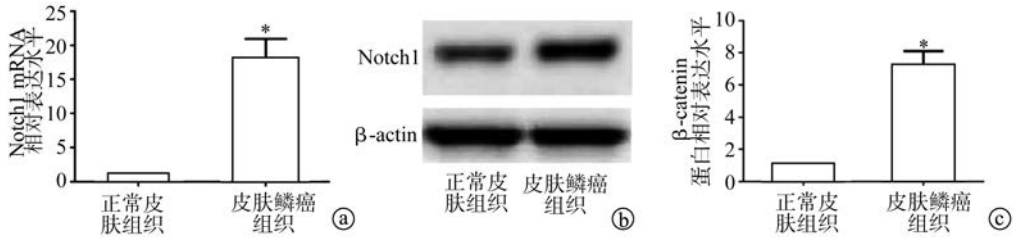
2 结果

2.1 Notch1 在正常皮肤组织和皮肤鳞癌组织的表达水平

RT-PCR 和 Western blot 结果显示,与正常皮肤组织相比,Notch1 mRNA 和蛋白表达水平在皮肤鳞癌组织中明显升高,差异具有统计学意义($P<0.05$),表明 Notch1 在皮肤鳞癌的发生和发展中具有一定的作用(图 1)。

2.2 汉黄芩素对皮肤鳞癌细胞增殖能力的影响

MTT 结果显示,与未经汉黄芩素处理的对照组(0 μmol/L)相比,使用不同浓度汉黄芩素(5、10、20 μmol/L)干预皮肤鳞癌 A431 细胞 24 h、48 h、72 h 后,细胞增殖能力明显受到抑制,且抑制作用随着药物浓度增加而增强,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 2。



a:正常皮肤组织与皮肤鳞癌组织中 Notch1 mRNA 表达;b:正常皮肤组织与皮肤鳞癌组织中 Notch1 蛋白表达;c:正常皮肤组织与皮肤鳞癌组织中 Notch1 蛋白表达 *:与正常皮肤组织比较,$P<0.05$

图 1 正常皮肤组织与皮肤鳞癌组织中 Notch1 mRNA 和蛋白表达水平

2.3 汉黄芩素对皮肤鳞癌细胞侵袭能力的影响

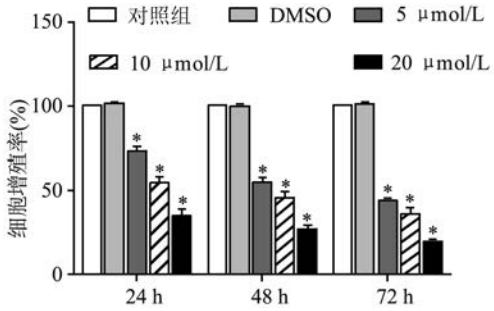
Transwell 侵袭实验结果显示,与对照组(0 μmol/L)相比,使用不同浓度汉黄芩素(5、10、20 μmol/L)干预后皮肤鳞癌 A431 细胞的侵袭能力明显受到抑制,且抑制作用随着药物浓度增加而增强,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 3。

2.4 汉黄芩素对皮肤鳞癌细胞 Notch1 表达的影响

RT-PCR 和 Western blot 结果显示,与对照组(0 μmol/L)相比,使用不同浓度汉黄芩素(5、10、20 μmol/L)干预后皮肤鳞癌 A431 细胞中 Notch1 基因的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,且随着药物浓度增加其表达水平下降更明显,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

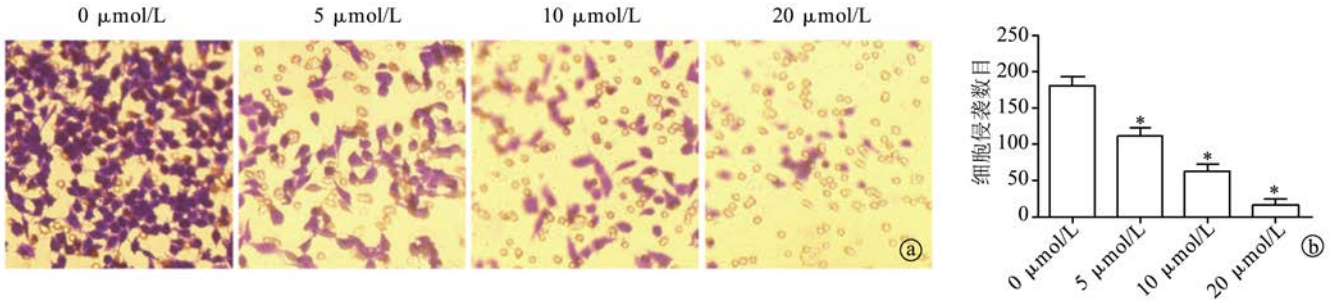
2.5 Notch1 基因在汉黄芩素调控皮肤鳞癌细胞增殖与侵袭中的作用

MTT 实验结果显示,与对照组相比,使用 Notch1 基因激活剂多西环素(20 ng/mL)后,汉黄芩素(20 μmol/L)对细胞增殖的抑制作用被削弱;Transwell 侵袭实验结果发现,使用 Notch1 基因激活剂多西环素(20 ng/mL)后,汉黄芩素对细胞侵袭的抑制作用也被削弱,差异均具有统计学意义($P<0.05$),见图 5。以上结果表明汉黄芩素主要通过抑制 Notch1 基因表达来调控皮肤鳞癌 A431 细胞的增殖及侵袭进程。



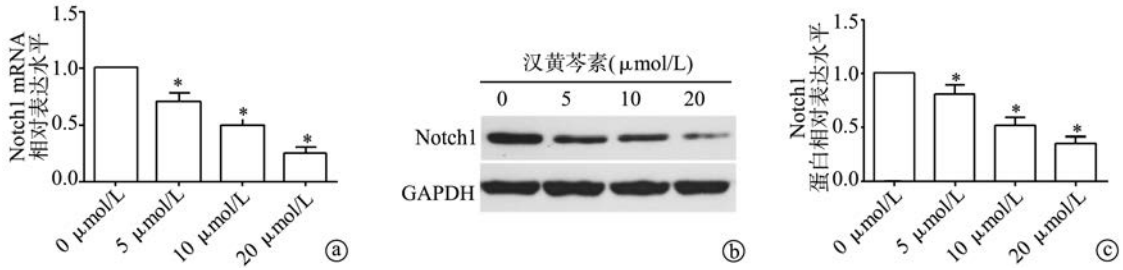
*:与对照组比较,$P<0.05$

图 2 汉黄芩素对皮肤鳞癌 A431 细胞增殖能力的影响



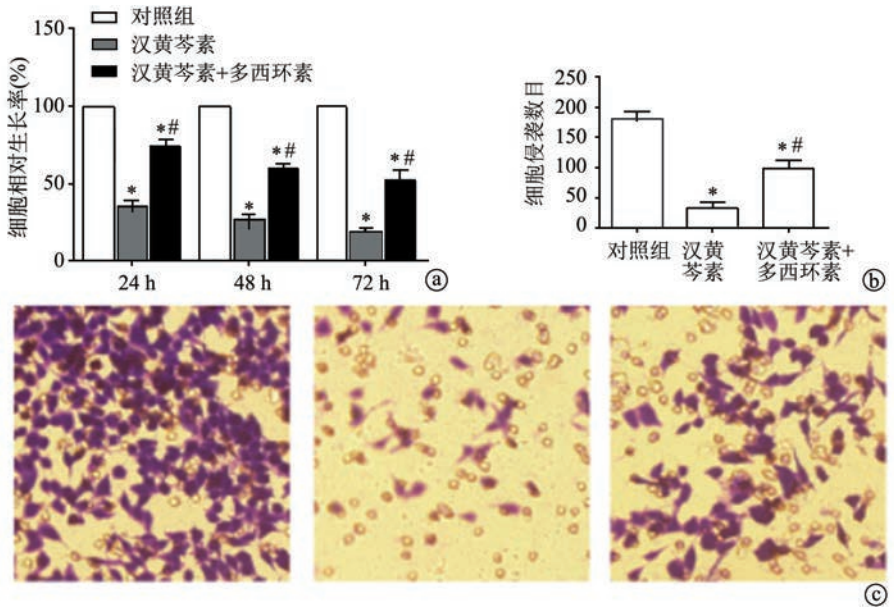
a:Tanswell 侵袭实验检测细胞侵袭能力(×200);b:侵袭细胞数量统计分析 *:与对照组(0 μmol/L)比较,$P<0.05$

图 3 汉黄芩素对皮肤鳞癌 A431 细胞侵袭能力的影响



a:RT-PCR 检测 Notch1 mRNA 表达;b:Western blot 检测 Notch1 蛋白表达;c:Western blot 结果定量分析 *:与对照组(0 μmol/L)比较,$P<0.05$

图 4 汉黄芩素对皮肤鳞癌 A431 细胞 Notch1 mRNA 和蛋白表达的影响



a:多西环素拮抗汉黄芩素介导的皮肤鳞癌 A431 细胞增殖抑制; b:侵袭细胞数量统计分析;c:Tanswell 侵袭实验检测细胞侵袭能力
*:与对照组比较,$P<0.05$;#:与汉黄芩素组比较,$P<0.05$

图 5 Notch1 基因在汉黄芩素调控皮肤鳞癌细胞增殖与侵袭中的作用

3 讨论

目前临床上针对皮肤鳞癌的治疗提倡制定个体化方案综合治疗,通常根据患病年龄、性别、发病部位、局部及远处转移状况,可选用常规手术切除病灶、化学药物治疗、放射治疗、激光显微切除、光动力学疗法等方法单用或联合应用[11-13]。然而临床上接受积极手术治疗的皮肤鳞癌患者仍有 12% 的复发率,5 年转移率达到 6%,且预后较差,5 年生存率仅有 18%[14-15]。针对皮肤鳞癌转移病灶的治疗目前多采用手术联合化疗药物,如长春新碱、博来霉素等综合治疗[16-18]。但是化疗药物的效果无法达到预期,且化疗药物带来的正常人体细胞的毒副作用较大,因此寻找新的治疗皮肤鳞癌的药物是临床与基础医学研究的迫切任务。

汉黄芩素是一种常见的天然黄酮类化合物,主要是从传统中药黄芩及半枝莲中提取出来的活性成分,具有来源广泛、价格低廉、无毒副作用等优点,近年来其抗肿瘤作用受到越来越多的关注[19-21]。在肝细胞癌中,汉黄芩素能够抑制基质金属蛋白酶-9 的表达并抑制肿瘤细胞的迁移与侵袭能力[22]。Liu 等[23]发现汉黄芩素能够通过调控 NF-κB、EGFR 以及 EGFR 下游 ERK/AKT 通路来诱导肝癌细胞凋亡,同时抑制肝癌细胞的增殖与侵袭。汉黄芩素还能够通过阻断 RAS 介导的信号通路来抑制恶性黑色素瘤 B16-F10 细胞的迁移与侵袭[24]。在宫颈癌细胞中汉黄芩素能够通过抑制 E6 和 E7 的表达从而促进肿瘤细胞凋亡,起到抗癌作用[25]。然而目前汉黄芩素在皮肤恶性肿瘤中的作用机制尚不明确。

Notch1 基因是高度保守的细胞跨膜糖蛋白,具有多种调控作用,参与了细胞的增殖、凋亡及侵袭转移等生物学事件[26]。Notch1 基因不仅参与了正常人体细胞组织的生长发育,且与多种恶性肿瘤的发展密切相关[27]。其调控的主要机制是 Notch1 基因受体与其配体结合后,被配体激活,其胞内活性功能片段从受体分子中释放出来,直接进入细胞核内,调控下游靶基因的表达,进一步抑制细胞周期相关调控蛋白的表达,抑制细胞增殖并使细胞周期静止[28-29]。有学者发现皮肤癌组织中存在 Notch1 基因的异常高表达,且 Notch1 能够通过抑制E-cadherin的表达从而促进肿瘤细胞的侵袭转移[30-31]。最近有学者发现汉黄芩素能够抑制 Notch1 基因表达从而诱导骨髓间充质干细胞的视网膜神经元样分化[32]。基于以上研究,我们推测汉黄芩素能通过抑制 Notch1 基因表达,从而抑制皮肤癌细胞的增殖与侵袭。

在本研究中,我们首先发现与正常皮肤组织相比,皮肤癌组织中 Notch1 基因表达显著升高。这结果表明 Notch1 信号通路的异常激活可能参与了皮肤癌的发生发展过程。本研究结果显示,随着汉黄芩素药物浓度的增高,其对皮肤癌细胞的增殖与侵袭的抑制作用逐渐增强,呈剂量依赖性。在研究汉黄芩素对皮肤癌细胞增殖与侵袭抑制作用的分子机制中发现,随着汉黄芩素药物浓度的增高,Notch1 基因的活性被显著

抑制,提示 Notch1 基因可能参与上述生物学事件。为了明确 Notch1 基因在汉黄芩素介导的皮肤癌细胞增殖与侵袭抑制中的确切作用机制,我们采用 Notch1 基因激活剂多西环素来检测其表达,并进一步检测其对细胞增殖和侵袭能力的影响。结果发现,在使用多西环素干预之后,汉黄芩素介导的细胞增殖和侵袭抑制现象被逆转,表明 Notch1 信号通路在这一过程中起着关键作用。通过以上实验我们初步证实了关于汉黄芩素能够调控皮肤癌细胞增殖与侵袭的推测,也证明 Notch1 基因参与了这一调控过程。

综上所述,汉黄芩素可抑制皮肤鳞癌细胞的异常增殖与体外侵袭能力,且主要是通过调控 Notch1 基因来实现,本研究为皮肤鳞癌防治提供了新的思路。但是,汉黄芩素调控 Notch1 基因的具体机制尚未明晰,还有待更深入的研究。

[参考文献]

[1] Gordon R. Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors [J]. Semin Oncol Nurs, 2013, 29(3): 160 - 169. doi:10.1016/j.soncn.2013.06.002.

[2] Goyal N, Thatai P, Sapra B. Skin cancer: symptoms, mechanistic pathways and treatment rationale for therapeutic delivery[J]. Ther Deliv, 2017, 8(5): 265 - 287. doi:10.4155/tde - 2016 - 0093.

[3] Fogel AL, Sarin KY, Teng JMC. Genetic diseases associated with an increased risk of skin cancer development in childhood[J]. Curr Opin Pediatr, 2017, 29(4): 426 - 433. doi: 10.1097/MOP.0000000000000514.

[4] Watson M, Holman DM, Maguire-Eisen M. Ultraviolet radiation exposure and its impact on skin cancer risk[J]. Semin Oncol Nurs, 2016, 32(3): 241 - 254. doi:10.1016/j.soncn.2016.05.005.

[5] Wernli KJ, Henrikson NB, Morrison CC, et al. Screening for skin cancer in adults: updated evidence report and systematic review for the US preventive services task force[J]. JAMA, 2016, 316(4): 436 - 447. doi:10.1001/jama.2016.5415.

[6] Behan JW, Sutton A, Wysong A. Management of skin cancer in the high-risk patient[J]. Curr Treat Options Oncol, 2016, 17(12): 60. doi:10.1007/s11864 - 016 - 0435 - z.

[7] Soleymani T, Abrouk M, Kelly KM. An analysis of laser therapy for the treatment of nonmelanoma skin cancer[J]. Dermatol Surg, 2017, 43(5): 615 - 624. doi:10.1097/DSS.0000000000001048.

[8] Tai MC, Tsang SY, Chang LY, et al. Therapeutic potential of wogonin: a naturally occurring flavonoid[J]. CNS Drug Rev, 2005, 11(2): 141 - 150. doi:10.1111/j.1527 - 3458.2005.tb00266.x.

[9] Chen B, Wu X, Zhang H, et al. Advances of wogonin, an extract from Scutellaria baicalensis, for the treatment of multiple tumors[J]. Onco Targets Ther, 2016,9:2935 - 2943. doi:10.2147/ott.s105586.

[10] Chirumbolo S. Anticancer properties of the flavone wogonin[J]. Toxicology, 2013, 314(1): 60 - 64. doi:10.1016/j.tox.2013.08.016.

[11] Winkelmann RR, Farberg AS, Glazer AM, et al. Integrating skin cancer-related technologies into clinical practice[J]. Dermatol Clin, 2017, 35(4): 565 - 576. doi:10.1016/j.det.2017.06.018.

[12] Soura E, Chasapi V, Stratigos AJ. Pharmacologic treatment options for advanced epithelial skin cancer[J]. Expert Opin Pharmacother, 2015, 16(10):1479 - 1493. doi:10.1517/14656566.2015.1052743.

[13] Perez HC, Benavides X, Perez JS, et al. Basic aspects of the pathogenesis and prevention of non-melanoma skin cancer in solid organ transplant recipients: a review[J]. Int J Dermatol, 2017, 56(4): 370 - 378. doi:10.1111/ijd.13409.

[14] Wollina U. Update of cetuximab for non-melanoma skin cancer[J]. Expert Opin Biol Ther, 2014, 14(2): 271 - 276. doi:10.1517/14712598.2013.876406.

[15] Asgari MM. Utility and limitations of large population-based data for skin cancer outcomes[J]. J Invest Dermatol, 2016, 136(11):2128 - 2130. doi:10.1016/j.jid.2016.07.031.

[16] Gracia-Cazaña T, Salazar N, Zamarrón A, et al. Resistance of nonmelanoma skin cancer to nonsurgical treatments. Part Ⅱ: photodynamic therapy, vismodegib, cetuximab, intralesional methotrexate, and radiotherapy[J]. Actas dermo-sifiliograficas, 2016, 107(9): 740 - 750. doi:10.1016/j.ad.2016.04.020.

[17] Rudnick EW, Thareja S, Cherpelis B. Oral therapy for nonmelanoma skin cancer in patients with advanced disease and large tumor burden: a review of the literature with focus on a new generation of targeted therapies[J]. Int J Dermatol, 2016, 55(3): 249 - 258. doi:10.1111/ijd.12961.

[18] Kirby JS, Miller CJ. Intralesional chemotherapy for nonmelanoma skin cancer: a practical review[J]. J Am Acad Dermatol, 2010, 63(4): 689 - 702. doi:10.1016/j.jaad.2009.09.048.

[19] Hayasaka S, Kodama T, Ohira A. Traditional Japanese herbal (kampo) medicines and treatment of ocular diseases: a review[J]. Am J Chin Med, 2012, 40(5): 887 - 904. doi: 10.1142/S0192415X12500668.

[20] Huynh DL, Sharma N, Kumar Singh A, et al. Anti-tumor activity of wogonin, an extract from Scutellaria baicalensis, through regulating different signaling pathways[J]. Chin J Nat Med, 2017, 15(1):15 - 40. doi:10.1016/S1875 - 5364(17)30005 - 5.

[21] Chen SS, Michael A, Butler-Manuel SA. Advances in the treatment of ovarian cancer: a potential role of antiinflammatory phytochemicals [J]. Discov Med, 2012, 13(68): 7 - 17.

[22] Hong M, Cheng H, Song L, et al. Wogonin suppresses the activity of matrix metalloproteinase-9 and inhibits migration and invasion in human hepatocellular carcinoma[J]. Molecules, 2018, 23(2): 384. doi:10.3390/molecules23020384.

[23] Liu X, Tian S, Liu M, et al. Wogonin inhibits the proliferation and invasion, and induces the apoptosis of HepG2 and Bel7402 HCC cells through NF-κB/Bcl-2, EGFR and EGFR downstream ERK/AKT signaling[J]. Int J Mol Med, 2016, 38(4): 1250 - 1256. doi:10.3892/ijmm.2016.2700.

[24] Zhao K, Wei L, Hui H, et al. Wogonin suppresses melanoma cell B16-F10 invasion and migration by inhibiting Ras-medicated pathways [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e106458. doi:10.1371/journal.pone.0106458.

doi:10.11659/jjssx.09E018065

·基础研究·

miR-195 靶向调控 CHEK1 对非小细胞肺癌细胞增殖、转移及侵袭的作用

罗 雷,杨彦辉,李 季,王 毅,李晓亮,谢晓阳 (内江市第一人民医院胸外科,四川 内江 641000)

[摘 要] **目的** 研究 miR-195 靶向调控细胞周期检测点激酶 1(CHEK1)对非小细胞肺癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移能力的影响。**方法** 选取非小细胞肺癌 A549、H1299、H197 细胞株为研究对象,分别转染 miR-195 及 RNA 阴性对照序列。采用实时荧光定量 PCR 法检测细胞中 miR-195 的表达水平;MTT 检测转染 miR-195 对肿瘤细胞分裂增殖能力的影响;Transwell 侵袭实验分析 miR-195 对细胞侵袭能力的作用;细胞划痕实验检测 miR-195 对细胞迁移能力的作用;流式细胞仪检测并评价转染 miR-195 对肿瘤细胞分裂周期的影响;Western blot 探究 miR-195 对肿瘤细胞 CHEK1 表达的调节;采用 Spearman 相关分析法分析 miR-195 及 CHEK1 表达的相关性。**结果** MTT 实验表明高表达 miR-195 可明显抑制肺癌 A549、H1299、H1975 细胞的体外增殖能力;Transwell 侵袭实验结果提示转染 miR-195 可导致肺癌 A549、H1299、H1975 细胞侵袭能力明显降低;流式细胞术结果表明,转染 miR-195 后 A549、H1299、H1975 细胞系的 G1 和 G2 期细胞增加,S 期细胞减少;划痕实验结果表明,转染 miR-195 可以抑制细胞的迁移能力;Western blot 结果显示,转染 miR-195 后 A549、H1299、H1975 细胞中 CHEK1 蛋白水平显著降低,上述差异均具有统计学意义($P<0.05$)。Spearman 相关分析显示细胞 miR-195 mRNA 水平与 CHEK1 蛋白含量呈负相关($r=-0.464\ 8$,$P=0.00$)。**结论** miR-195可靶向调控 CHEK1 抑制非小细胞肺癌细胞增殖、转移及侵袭。

[关键词] miR-195;CHEK1;非小细胞肺癌;转移;侵袭

[中图分类号] R734.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-09-21

Effects of miR-195 suppresses proliferation, metastasis and invasion on non-small cell lung cancer cells by targeting CHEK1

LUO Lei, YANG Yan-hui, LI Ji, WANG Yi, LI Xiao-liang, XIE Xiao-yang (Department of Thoracic Surgery, First People's Hospital of Neijiang, Neijiang Sichuan 641000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of miR-195 on the proliferation, apoptosis, invasion and metastasis on non-small cell lung cancer (NSCLC) by targetedly suppressed CHEK1. **Methods** Non-small cell lung cancer cell lines A549, H1299 and H197 were transfected with miR-195 and RNA-negative control sequences respectively. The expression of miR-195 in NSCLC cells was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. The effect of transfected miR-195 on the proliferation of tumor cells was detected by MTT assay. Cell invasion and metastasis were detected by transwell invasion test and cell scratch test. Cell apoptosis was detected by flow cytometry, the protein levels of CHEK1 were determined by Western blot, the correlation between the expressions of miR-195 and CHEK1 were analyzed by Spearman.

[基金项目] 四川省卫生和计划生育委员会科研课题(17PJ192)

[通信作者] 谢晓阳,E-mail:13990559066@163.com

[25] Kim MS, Bak Y, Park YS, et al. Wogonin induces apoptosis by suppressing E6 and E7 expressions and activating intrinsic signaling pathways in HPV-16 cervical cancer cells[J]. Cell Biol Toxicol, 2013, 29(4): 259-272. doi:10.1007/s10565-013-9251-4.

[26] Palomero T, Ferrando A. Therapeutic targeting of NOTCH1 signaling in T-cell acute lymphoblastic leukemia[J]. Clin Lymphoma Myeloma, 2009, 9(Suppl 3): S205-S210. doi:10.3816/CLM.2009.s.013.

[27] Afshar Y, Stanculescu A, Miele L, et al. The role of chorionic gonadotropin and Notch1 in implantation[J]. J Assist Reprod Genet, 2007, 24(7): 296-302. doi:10.1007/s10815-007-9149-2.

[28] Psyrri A, Seiwert TY, Jimeno A. Molecular pathways in head and neck cancer: EGFR, PI3K, and more[J]. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2013: 246-255. doi:10.1200/EdBook_AM.2013.33.246.

[29] Sakamoto K. Notch signaling in oral squamous neoplasia[J]. Pathol Int, 2016, 66(11): 609-617. doi:10.1111/pin.12461.

[30] Demehri S, Turkoz A, Kopan R. Epidermal Notch1 loss promotes skin tumorigenesis by impacting the stromal microenvironment[J]. Cancer Cell, 2009, 16(1): 55-66. doi:10.1016/j.ccr.2009.05.016.

[31] Wang Z, Liu L, Wang M, et al. NOTCH1 regulates migration and invasion of skin cancer cells by E-cadherin repression[J]. Mol Cell Biochem, 2012, 362(1-2): 35-41. doi:10.1007/s11010-011-1125-6.

[32] Shu Q, Zhuang H, Fan J, et al. Wogonin induces retinal neuron-like differentiation of bone marrow stem cells by inhibiting Notch-1 signaling[J]. Oncotarget, 2017, 8(17):28431-28441. doi:10.18632/oncotarget.16085.

(编辑:陈庆利)