连翘醇提物对肺癌NCI-H226细胞增殖、迁移及侵袭的影响Δ

黄玉龙[1*]，陈学武[2#]，王芳婷[1]，张　晶[1]，陈蔼莹[2]（1.海口市中医医院肺病科，海口　570216；2.海南省中医院肿瘤科，海口　570200）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）15-1821-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.15.06

摘　要　目的　探究连翘醇提物对肺癌NCI-H226细胞增殖、迁移、侵袭的影响。**方法**　以肺癌NCI-H226细胞为研究对象，将细胞分为对照组，连翘醇提物低、中、高浓度组（5、10、20 mg/mL），激活剂组[10 mg/mL连翘醇提物+0.5 μmol/L核因子κB（NF-κB）信号通路激活剂PMA]，抑制剂组（10 mg/mL连翘醇提物+10 μmol/L NF-κB信号通路抑制剂BAY 11-7082），阳性对照组（20 μg/mL顺铂），除对照组细胞不作干预外，其余各组细胞加入相应药物培养24 h。检测细胞增殖、迁移、侵袭情况，并计算增殖率、迁移率、侵袭细胞数；检测细胞中NF-κB p65、NF-κB抑制蛋白α（IκBα）、磷酸化NF-κB p65（p-NF-κB p65）、磷酸化IκBα（p-IκBα）蛋白表达水平。**结果**　与对照组比较，连翘醇提物各浓度组和阳性对照组细胞的增殖率、迁移率、侵袭细胞数以及细胞中p-IκBα、p-NF-κB p65蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$）；与连翘醇提物中浓度组比较，抑制剂组细胞增殖率、迁移率、侵袭细胞数及细胞中上述蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$），而激活剂组均显著升高（$P<0.05$）。**结论**　连翘醇提物可抑制肺癌NCI-H226细胞增殖、迁移和侵袭，其作用机制可能与抑制NF-κB信号通路有关。

关键词　连翘醇提物；肺癌；核因子κB；增殖；迁移；侵袭

Effects of *Forsythia suspensa* ethanol extract on the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells NCI-H226

HUANG Yulong[1], CHEN Xuewu[2], WANG Fangting[1], ZHANG Jing[1], CHEN Aiying[2] (1. Dept. of Pulmonary Disease, Haikou Hospital of TCM, Haikou 570216, China; 2. Dept. of Tumor, Hainan Hospital of TCM, Haikou 570200, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of *Forsythia suspensa* ethanol extract on the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells NCI-H226. **METHODS** As research objects, lung cancer cells NCI-H226 were divided into control group, *F. suspensa* ethanol extract low-, medium- and high-concentration groups (5, 10, 20 mg/mL), activator group [10 mg/mL *F. suspensa* ethanol extract+0.5 μmol/L nuclear factor kappa B (NF-κB) signaling pathway activator PMA], inhibitor group (10 mg/mL *F. suspensa* ethanol extract+10 μmol/L NF-κB signaling pathway inhibitor BAY 11-7082) and positive control group (20 μg/mL cisplatin). Except for the control group of cells without intervention, all other groups of cells were cultured with corresponding drugs for 24 hours; the proliferation, migration and invasion of cells were all detected, and the proliferation rate, migration rate, and the number of invading cells were also calculated; protein expressions of NF-κB p65, NF-κB inhibitory protein α (IκBα), phosphorylated NF-κB p65 (p-NF-κB p65) and phosphorylated IκBα (p-IκBα) were determined. **RESULTS** Compared with control group, the proliferation rate, migration rate, and the number of invading cells as well as the protein expressions of p-IκBα and p-NF-κB p65 were decreased significantly in *F. suspensa* ethanol extract groups and positive control group ($P<0.05$). Compared with *F. suspensa* ethanol extract medium-concentration group, the proliferation rate, migration rate, and the number of invading cells as well as above protein expressions were all decreased significantly in inhibitor group ($P<0.05$), while those of activator group were increased significantly ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** *F. suspensa* ethanol extract can inhibit the proliferation, migration and invasion of lung cancer cells NCI-H226, and the mechanism of which may be related to the inhibition of NF-κB signaling pathway.

KEYWORDS　*Forsythia suspensa* ethanol extract; lung cancer; NF-κB; proliferation; migration; invasion

肺癌是一种原发性的肺脏恶性肿瘤，病死率在肿瘤中居前列[1]。部分肺癌确诊时已是中晚期，临床常以免疫治疗、靶向治疗、放化疗等多种手段进行干预，但5年生存率仍较低，因此寻找能有效治疗肺癌的新型药物具

Δ **基金项目**　海南省自然科学基金高层次人才项目（No. 821RC719）

＊**第一作者**　副主任中医师，硕士。研究方向：中医内科学临床研究。电话：0898-36633580。E-mail：787974458@qq.com

＃**通信作者**　副主任中医师，硕士。研究方向：中西结合肿瘤治疗。电话：0898-66121058。E-mail：414831007@qq.com

有重要的意义[2]。近年来，中医药在肿瘤治疗中越来越受到重视，其在提高肿瘤患者生活质量、预防转移复发、防治多药耐药、减毒增效方面发挥了重要作用，充分体现了中医药在肿瘤治疗中的优势[3]。

中医学者认为肺癌之标实以热毒为甚，热毒当为肿瘤发生、发展的重要原因之一，故清热解毒之法治疗肺癌当行之有效[4]。连翘为木犀科植物连翘*Forsythia suspensa*（Thunb.）Vahl的干燥果实，为传统常用清热解毒药。相关文献报道，连翘醇提物具有广谱抗肿瘤活性，对肾癌细胞[5]、食管癌细胞[6]等多种癌细胞具有明显的抑制作用。核因子κB（nuclear factor kappa B，NF-κB）信号通路是一条与癌细胞发生、发展相关的经典通路[7]，可调控食管癌[8]、肺癌[9]、胰腺癌[10]等多种肿瘤细胞的恶性生物学进程。朱帅旗等[11]的研究也论述了靶向NF-κB疗法能够抑制非小细胞肺癌的生长和转移，并增强抗肿瘤免疫应答。基于此，本研究以肺癌NCI-H226细胞为研究对象，并基于NF-κB信号通路探讨连翘醇提物对该细胞增殖、迁移和侵袭的影响，以期为连翘醇提物治疗肺癌提供实验数据支撑。

1 材料

1.1 主要仪器

MCO18AIC型二氧化碳培养箱购自日本Sanyo公司；MF52-N型倒置荧光显微镜购自广州市明美光电技术有限公司；IMARK型酶标仪、Chemi Doc型凝胶成像系统购自美国Bio Rad公司。

1.2 主要药品与试剂

连翘醇提物（批号20190203，质量浓度为1 mg/L）购自天津美伦医药集团有限公司；顺铂、NF-κB信号通路抑制剂BAY 11-7082（纯度均大于98%，批号分别为N03GS166211、J07HS173399）购自上海源叶生物科技有限公司；NF-κB信号通路激活剂PMA（纯度≥98%，批号0000112801）购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；胎牛血清（批号2176404）购自美国Gibco公司；F-12K培养基、RIPA裂解液、CCK-8试剂盒购自武汉默沙克生物科技有限公司；5-乙炔基-2′脱氧尿嘧啶核苷（EdU）细胞增殖检测试剂盒（批号042621211123）购自上海碧云天生物技术有限公司；鼠抗人NF-κB抑制蛋白α（NF-κB inhibitor protein alpha，IκBα）、NF-κB p65、磷酸化IκBα（p-IκBα）、磷酸化NF-κB p65（p-NF-κB p65）、β-actin（一抗）和辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG（二抗）（批号分别为10021317、10021394、10021301、10021309、10021787、20000374）购自美国CST公司。

1.3 细胞株

本研究所用肺癌NCI-H226细胞购自中国科学院生物化学与细胞生物学研究所。

2 方法

2.1 NCI-H226细胞培养

取出冻存的NCI-H226细胞进行复苏后，加入F-12K培养基（含10%胎牛血清、1%青-链霉素）中，置于37 ℃、5% CO_2条件下培养，取对数生长期的NCI-H226细胞用于实验。

2.2 NCI-H226细胞增殖率的检测

取对数生长期细胞调整密度至2×10^5个/mL，再接种至96孔板中，然后分为对照组，连翘醇提物低、中、高浓度组（5、10、20 mg/mL，质量浓度根据前期预实验结果设置），激活剂组（10 mg/mL连翘醇提物+0.5 μmol/L NF-κB信号通路激活剂PMA[12]），抑制剂组（10 mg/mL连翘醇提物+10 μmol/L NF-κB信号通路抑制剂BAY 11-7082[13]），阳性对照组（20 μg/mL顺铂[14]）。除对照组细胞不作干预外，其余各组细胞加入相应药物，置于37 ℃、5% CO_2条件下培养24 h，每组设3个复孔。根据EdU细胞增殖检测试剂盒说明书方法处理，采用荧光显微镜拍照，再用Image J软件处理图片，以阳性染色细胞（红色）占总细胞（蓝色）的百分比表示细胞增殖率。

2.3 NCI-H226细胞迁移能力的检测

取对数生长期细胞调整密度至2×10^5个/mL，再接种至6孔板中，按“2.2”项下方法分组后，置于37 ℃、5% CO_2条件下培养；当细胞密度达90%时，用枪头于孔板底部进行划痕，然后加入相应药物培养24 h，每组设3个复孔。采用显微镜拍照记录各组细胞0、24 h时的划痕情况，并记录这两个时间点时的融合面积，分别记为S_0与S_{24}，再计算细胞迁移率，细胞迁移率（%）$=(S_0-S_{24})/S_0\times100\%$。

2.4 NCI-H226细胞侵袭能力的检测

采用Transwell小室法进行检测。取对数生长期细胞按“2.2”项下方法分组、给药、培养后，以胰酶消化，离心后用无血清培养基重悬细胞，调整细胞密度至3×10^5个/mL。将装有上述细胞的24孔板放入Transwell小室，上室加入无血清培养基200 μL，下室加入含10%血清的培养基500 μL，每组设3个复孔。培养24 h后弃上清液，擦去上室细胞，以4%甲醇固定下室细胞，以0.1%结晶紫染色10 min，清洗3次，将Transwell小室置于显微镜下，每孔随机选5个不同区域，采用显微镜观察拍照，并以Image J软件计算侵袭细胞数。

2.5 NCI-H226细胞中NF-κB信号通路相关蛋白表达水平的检测

取对数生长期细胞调整密度至2×10^5个/mL，再接种至96孔板中，按“2.2”项下方法分组、给药、培养后，加入裂解液提取总蛋白，采用BCA法测定蛋白含量，然后进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转膜，封闭2 h；加入IκBα、NF-κB p65、p-IκBα、p-NF-κB p65、β-actin一抗（稀释度分别为1∶500、1∶2 000、1∶500、1∶500、1∶25 000），4 ℃孵育过夜，洗涤后加入二抗孵育2 h；洗涤后加入显影液，使用凝胶成像系统拍照记录，实验重复3次。以目的蛋白与内参蛋白的灰度值比值表示其表达水平。

2.6 统计学方法

采用GraphPad Prism 8软件进行数据分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用Tukey检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 连翘醇提物对NCI-H226细胞增殖能力的影响

与对照组比较，连翘醇提物各浓度组和阳性对照组细胞增殖率均显著降低（$P<0.05$）。与连翘醇提物中浓度组比较，抑制剂组细胞增殖率显著降低（$P<0.05$），而激活剂组显著升高（$P<0.05$）。结果见图1（连翘醇提物低、高浓度组图略）、表1。

3.2 连翘醇提物对NCI-H226细胞迁移能力的影响

与对照组比较，连翘醇提物各浓度组与阳性对照组细胞迁移率均显著降低（$P<0.05$）。与连翘醇提物中浓度组比较，抑制剂组细胞迁移率显著降低（$P<0.05$），而激活剂组显著升高（$P<0.05$）。结果见图2（连翘醇提物低、高浓度组图略）、表1。

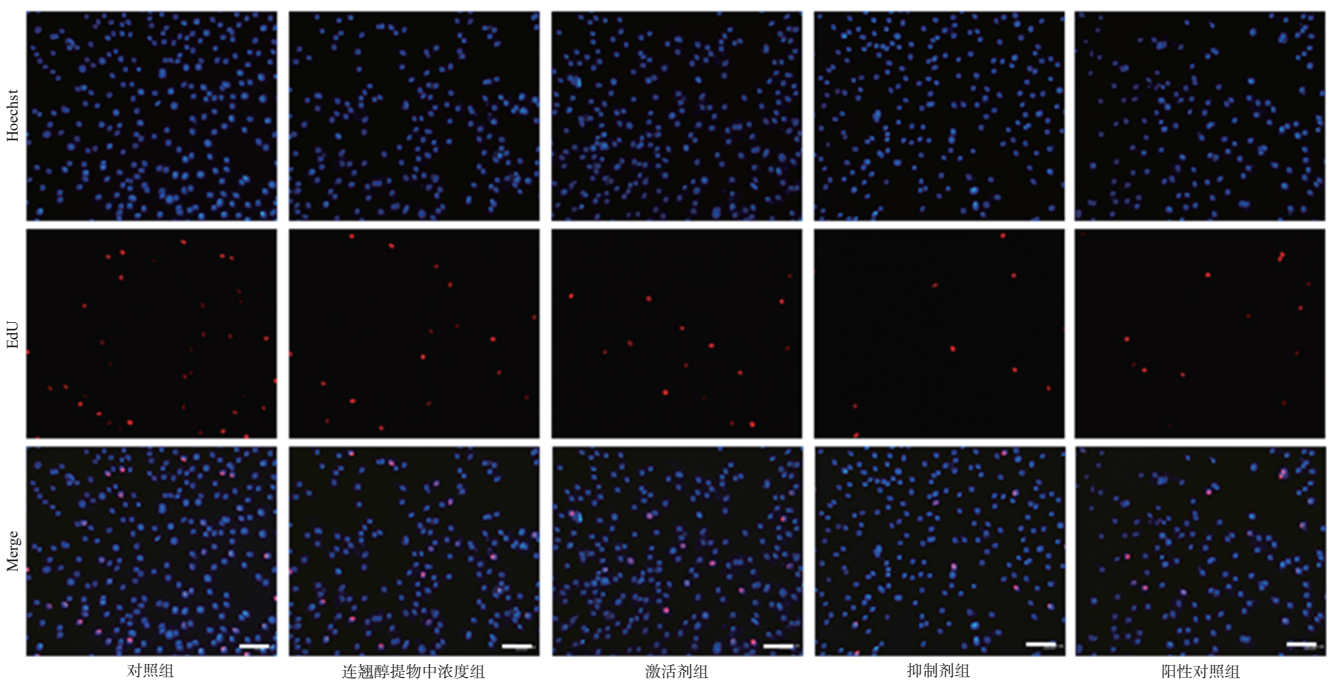


图1 连翘醇提物对NCI-H226细胞增殖影响的荧光显微图（比例尺=100 μm）

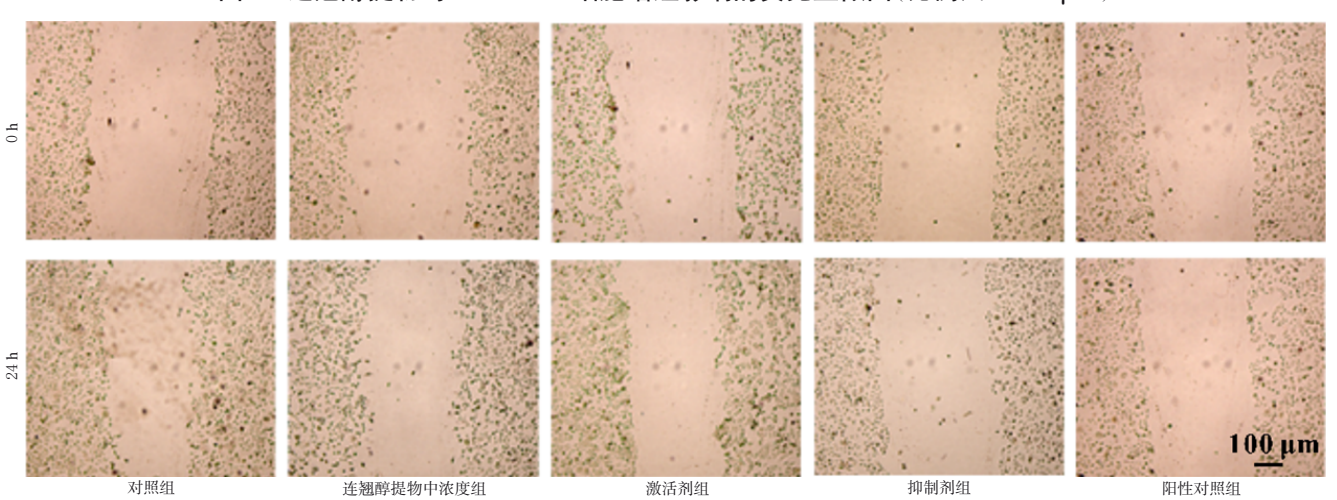


图2 连翘醇提物对NCI-H226细胞迁移影响的显微图

表1　各组细胞增殖率、迁移率和侵袭细胞数的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	增殖率/%	迁移率/%	侵袭细胞数/个
对照组	28.70±0.61	30.50±1.30	87.33±1.53
连翘醇提物低浓度组	20.17±1.53[a]	26.30±1.02[a]	70.67±2.08[a]
连翘醇提物中浓度组	10.67±0.40[a]	14.47±0.76[a]	44.33±2.08[a]
连翘醇提物高浓度组	4.80±0.62[a]	2.99±0.45[a]	15.00±1.00[a]
激活剂组	13.00±0.56[b]	18.85±0.89[b]	56.00±1.00[b]
抑制剂组	5.33±0.61[b]	5.93±0.38[b]	18.00±1.00[b]
阳性对照组	9.27±0.61[a]	3.36±0.39[a]	30.67±2.08[a]

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与连翘醇提物中浓度组比较，$P<0.05$。

3.3　连翘醇提物对NCI-H226细胞侵袭能力的影响

与对照组比较，连翘醇提物各浓度药物组与阳性对照组细胞侵袭细胞数均显著降低（$P<0.05$）。与连翘醇提物中浓度组比较，抑制剂组细胞侵袭细胞数均显著降低（$P<0.05$），而激活剂组显著升高（$P<0.05$）。结果见图3（连翘醇提物低、高浓度组图略）、表1。

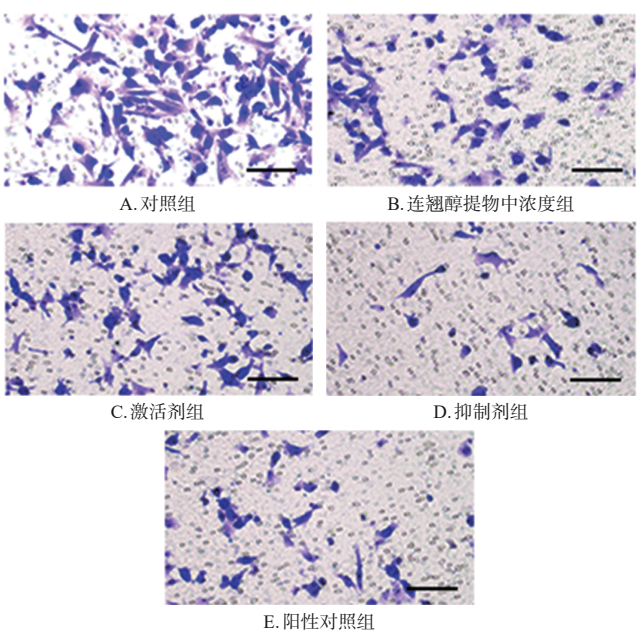
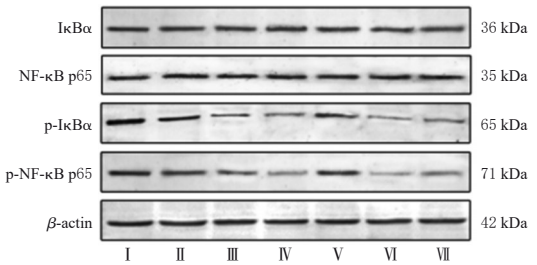


图3　连翘醇提物对NCI-H226细胞侵袭能力影响的显微图（比例尺＝100 μm）

3.4　连翘醇提物对NCI-H226细胞中NF-κB信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较，连翘醇提物各浓度组和阳性对照组细胞中p-IκBα、p-NF-κB p65蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$），而IκBα、NF-κB p65蛋白表达水平差异无统计学意义。与连翘醇提物中浓度组比较，抑制剂组细胞中p-IκBα、p-NF-κB p65蛋白表达水平显著降低（$P<0.05$），而激活剂组显著升高（$P<0.05$），但两组中IκBα、NF-κB p65蛋白表达水平差异均无统计学意义。结果见图4、表2。



Ⅰ：对照组；Ⅱ：连翘醇提物低浓度组；Ⅲ：连翘醇提物中浓度组；Ⅳ：连翘醇提物高浓度组；Ⅴ：激活剂组；Ⅵ：抑制剂组；Ⅶ阳性对照组。

图4　各组细胞中NF-κB信号通路相关蛋白表达的电泳图

表2　各组细胞中NF-κB信号通路相关蛋白表达水平的检测结果（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	p-IκBα	p-NF-κB p65	IκBα	NF-κB p65
对照组	1.10±0.07	0.95±0.04	0.86±0.03	0.91±0.02
连翘醇提物低浓度组	0.87±0.04[a]	0.84±0.03[a]	0.87±0.02	0.91±0.03
连翘醇提物中浓度组	0.63±0.04[a]	0.56±0.02[a]	0.87±0.05	0.91±0.04
连翘醇提物高浓度组	0.45±0.02[a]	0.37±0.01[a]	0.87±0.04	0.91±0.04
激活剂组	0.79±0.02[b]	0.64±0.02[b]	0.87±0.01	0.90±0.05
抑制剂组	0.43±0.02[b]	0.36±0.02[b]	0.87±0.03	0.91±0.03
阳性对照组	0.53±0.02[a]	0.29±0.02[a]	0.87±0.03	0.90±0.05

a：与对照组比较，$P<0.05$；b：与连翘醇提物中浓度组比较，$P<0.05$。

4　讨论

肺癌是临床上常见的恶性肿瘤之一，在近些年的发病率呈现逐年上升趋势。针对肺癌的诊疗方法多为靶向、免疫、化疗和手术治疗，近年诊疗方法虽有改进，但肺癌患者5年存活率仍低于20%[15]，且预后效果较差，患者负担较重。因此，寻找有效治疗肺癌的药物，并探究其治疗肺癌的作用机制至关重要。

中医将肺癌归为“肺积”“息贲”“劳嗽”等范畴[16]，治疗主要以化痰止咳、活血化瘀为主[17]。而连翘有消肿散结、清热解毒的功效。有研究表明，连翘醇提物具有阻滞肿瘤细胞周期、调控信号通路、逆转多药耐药等作用[18]。Kim等[19]研究认为，连翘醇提物能够阻断乳腺癌细胞的侵袭，并间接抑制乳腺癌对骨的破坏作用。曲欣等[20]研究发现，连翘醇提物可以抑制人宫颈癌HeLa细胞增殖并加速其凋亡，且具有剂量依赖性。本研究结果显示，与对照组比较，低、中、高浓度的连翘醇提物均可显著降低NCI-H226细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

NF-κB信号通路是一条与癌细胞发生、发展相关的经典信号通路，参与调控多种癌细胞生长和分化，在许多癌症中呈高表达状态，致使大量恶性肿瘤发生和进展[21]。NF-κB信号通路包含多个亚单位，如NF-κB p65，其表达改变与NF-κB信号通路激活程度成正比[22]。相关研究表明，肺癌细胞中NF-κB信号通路相关蛋白表达水平显著高于正常细胞[23]。基于此，本研究分别采用

NF-κB信号通路的抑制剂(BAY 11-7082)与激活剂(PMA),考察连翘醇提物是否通过该信号通路发挥抗肺癌作用。结果显示,与对照组比较,经连翘醇提物干预后,NCI-H226细胞中p-IκBα、p-NF-κB p65蛋白表达水平均显著降低($P<0.05$);与连翘醇提物中浓度组比较,经抑制剂干预后,NCI-H226细胞中上述蛋白表达水平均显著降低,而经激活剂干预后,上述蛋白表达水平反而显著升高。

综上所述,连翘醇提物可抑制肺癌NCI-H226细胞增殖、迁移和侵袭,其作用机制可能与抑制NF-κB信号通路有关。本研究为连翘醇提物应用于肺癌治疗提供了依据,但是仅从NF-κB信号通路探讨了作用机制,且仅在细胞水平进行了体外实验,后续将结合模型动物进行体内验证。

参考文献

[1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.

[2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[3] 谢雅革,沈克平,卢艳琳. 中医药治疗非小细胞肺癌研究进展[J]. 中华中医药杂志,2021,36(5):2846-2851.

[4] 侯超,林伟波,周岱翰. 清热解毒法历代演进与解毒治癌十法[J]. 中华中医药杂志,2016,31(11):4604-4606.

[5] 吴林斌,吴元肇,李晓丹,等. 连翘苷经PI3K/Akt信号通路干预肾细胞癌的机制研究[J]. 中草药,2019,50(10):2377-2382.

[6] ZHAO L M, YAN X, SHI J, et al. Ethanol extract of *Forsythia suspensa* root induces apoptosis of esophageal carcinoma cells via the mitochondrial apoptotic pathway[J]. Mol Med Rep, 2015, 11(2): 871-880.

[7] AHMAD A, AHSAN H. Ras-mediated activation of NF-κB and DNA damage response in carcinogenesis[J]. Cancer Invest, 2020, 38(4): 185-208.

[8] ZHANG B Z, ZHANG Z, LI L, et al. TSPAN15 interacts with BTRC to promote oesophageal squamous cell carcinoma metastasis via activating NF-κB signaling[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 1423.

[9] JUNG C H, HAN A R, CHUNG H J, et al. Linarin inhibits radiation-induced cancer invasion by downregulating MMP-9 expression via the suppression of NF-κB activation in human non-small-cell lung cancer A549[J]. Nat Prod Res, 2019, 33(24): 3582-3586.

[10] 陈伟毅,洪炼哲,彭靖,等. 青藤碱抑制胰腺癌细胞迁移和侵袭及其与NF-κB信号通路的关系[J]. 中国普通外科杂志,2022,31(3):359-368.

[11] 朱帅旗,段海潇,汪洋,等. NF-κB在非小细胞肺癌中的作用及治疗研究[J]. 生命科学,2022,34(4):409-419.

[12] 张洁,孙国欣,戴亮,等. 癌易感性候选基因2通过NF-κB信号通路对甲状腺乳头状癌细胞增殖及迁移的影响[J]. 医学研究生学报,2019,32(10):1043-1048.

[13] 周舫,任亚南,王娜,等. NOX1与NF-κB对TNF-α诱导A549细胞氧化损伤的影响[J]. 中国职业医学,2019,46(2):188-193.

[14] SHI X Y, LUO X P, CHEN T, et al. Naringenin inhibits migration, invasion, induces apoptosis in human lung cancer cells and arrests tumour progression *in vitro*[J]. J Cell Mol Med, 2021, 25(5): 2563-2571.

[15] ZHOU G B. Tobacco, air pollution, environmental carcinogenesis, and thoughts on conquering strategies of lung cancer[J]. Cancer Biol Med, 2019, 16(4): 700-713.

[16] 扈冰,龚亚斌. 30位名中医辨证治疗肺癌经验述要[J]. 中医药导报,2018,24(10):49-51.

[17] 于弘,胡倩,周光飚. 肺癌中医证型与用药规律的研究[J]. 中成药,2022,44(7):2273-2278.

[18] 齐丽娜,陈炫好,金华,等. 中药连翘化学成分及药理活性研究进展[J]. 天津中医药大学学报,2021,40(2):168-175.

[19] KIM Y L, LEE S K, PARK K K, et al. The inhibitory effects of *Forsythia koreana* extracts on the metastatic ability of breast cancer cells and bone resorption by osteoclasts[J]. J Cancer Prev, 2016, 21(2): 88-94.

[20] 曲欣,李鑫,蔡朋朋,等. 连翘抗肿瘤活性成分体外诱导HeLa细胞凋亡作用[J]. 中国公共卫生,2013,29(3):397-399.

[21] REN D, YANG Q, DAI Y H, et al. Oncogenic miR-210-3p promotes prostate cancer cell EMT and bone metastasis via NF-κB signaling pathway[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 117.

[22] MULERO M C, WANG V Y, HUXFORD T, et al. Genome reading by the NF-κB transcription factors[J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(19): 9967-9989.

[23] 李洪霖,董良,郗昱檀,等. 温阳散结汤含药血清通过NF-κB通路调控肿瘤相关巨噬细胞极化对Lewis肺癌的影响[J]. 现代肿瘤医学,2022,30(18):3257-3264.

(收稿日期:2023-03-30 修回日期:2023-07-02)

(编辑:唐晓莲)