恶性肿瘤的分子诊断 文章编号：0253-3626（2011）07-0790-03

汉黄芩素对肺癌细胞株 A549 的体外作用研究

李现东
（河南大学淮河医院呼吸科，开封 475001）

【摘 要】目的：探讨体外汉黄芩素对肺癌细胞株 A549 增殖、侵袭及凋亡的影响。方法：应用 MTT（噻唑蓝）法检测汉黄芩素对于 A549 细胞增殖活性；用形态学方法观察汉黄芩素对 A549 细胞的促凋亡作用；应用 Transwell 法观察细胞侵袭能力。结果：汉黄芩素对 A549 细胞增殖和侵袭活性具有明显抑制作用，对肺癌细胞有明显促凋亡作用，镜下可见染色体聚集及细胞核碎裂。结论：汉黄芩素对肺癌 A549 细胞的增殖迁移均有明显抑制作用并可促进肿瘤细胞凋亡。

【关键词】汉黄芩素；凋亡
【中国图书分类法分类号】R694.13 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-01-25

Inhibitory effects of wogonin on lung cancer A549 cell line in vitro

LI Xian-dong
(*Department of Respiratory, Huaihe Hospital of Henan University*)

【Abstract】*Objective*: To study the inhibitory effect of wogonin on proliferation, invasion ability and pro-apoptotic activity in lung cancer A549 cell line. *Methods*: MTT chromatometry was employed to determine the influence of wogonin on proliferation of A549 cell. The apoptosis-promoting effect of wogonin on A549 cell was observed by morphological method. The changes of cell invasive ability in vitro were detected by Transwell assay. *Results*: Wogonin showed significant inhibitory effect on the proliferation and invasive activity of A549 cell line and the apoptosis-promoting effect on lung cancer cells. *Conclusion*: Wogonin can significantly inhibit proliferation and migration of lung cancer A549 cells and promote the apoptosis of A549 cell line.

【Key words】wogonin; apoptosis

汉黄芩素（Wogonin，分子式 $C_{16}H_{12}O_5$）是从黄芩中提取出的一种主要活性成分，是一种黄酮类化合物，已有研究表明其有抗氧化作用及较强的抗炎活性[1,2]，并对荷瘤动物的肿瘤生长有抑制作用[3,4]。但目前国内尚无汉黄芩素对肺癌作用的研究。本研究拟通过观察汉黄芩素对肺癌 A549 细胞增殖、侵袭及凋亡的影响，为汉黄芩素抗肺癌的临床应用及其作用机制的深入研究提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 肺癌 A549 细胞由河南大学医学院提供。

1.1.2 药物及试剂 汉黄芩素（南京中药研究所提供，汉黄芩素纯度为 98.95%）用 DMSO 配制为母液，-20℃冰箱冷冻保存；四甲基偶氮唑盐（MTT）、二甲亚砜（DMSO）及胰蛋白酶（美国 Sigma 公司）；RPMI 1640、胎牛血清（美国 Gibco 公司）；Hochest 33342/PI 染色液、AnnexinV-EGFP 细胞凋亡检测试剂盒（碧云天公司）。

作者介绍：李现东（1970-），男，副主任医师，研究方向：慢阻肺的诊断及治疗。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肺癌 A549 细胞常规培养于含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液，37℃、5% CO_2 孵箱内贴壁生长，每 2~3 d 用 0.25%胰蛋白酶消化传代，取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 法检测汉黄芩素对 A549 细胞增殖的抑制作用 用 0.25%胰蛋白酶消化 A549 细胞，用完全培养基配单细胞悬液，以每孔 0.4×10^4 个接种于 96 孔板中，每孔 200 μl。培养 24 h，待细胞贴壁并进入对数生长期后换液，并进行实验干预，实验分 6 组：空白组（100 μl 完全培养基 + 100 μl RPMI1640）；阴性对照组（100 μl完全培养基 + 100 μl RPMI1640 + 0.1%DMSO）；实验组（汉黄芩素终浓度分别为 0.1、1、10、100 μmol/L）。其中，每组设 5 个复孔，于 37℃、5% CO_2 饱和湿度培养箱中继续培养 48 h 后中止实验，取出 96 孔板，3 000 r/min 离心 10 min。去上清，加入 0.1 mol/L PBS 漂洗，重新在各孔中加入 100 μl 完全培养基和 100 μl RPMI1640，再加入 40 μl MTT，37℃继续培养 4 h 后小心吸弃上清。再加入150 μl DMSO，脱色摇床室温振荡 10 min。以上实验重复 3 次。测定 490 nm 处每孔的吸光度（A）值，计算各组细胞生长抑制率=（1-实验组平均 OD 值/阴性对照组平均 OD 值）× 100%。

表 1 汉黄芩素对于 A549 细胞增殖的影响（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	剂量(μmol/L)	吸光度	抑制率(%)	F 值	P值
空白对照组	0	0.204 6 ± 0.005 0			
阴性对照组	0	0.470 6 ± 0.016 3	0		
汉黄芩素组	0.1	0.450 8 ± 0.012 6	4.32 ± 0.04	4.581	0.064 726
	1.0	0.421 4 ± 0.015 5	19.02 ± 0.06*	23.756	0.001 234
	10.0	0.406 6 ± 0.019 5	34.93 ± 0.03*	31.694	0.000 493
	100.0	0.300 2 ± 0.010 3	80.67 ± 0.03*	389.454	4.52E-08

注：*，P<0.01，与阴性对照组及空白对照组相比

1.2.3 不同浓度汉黄芩素对肺癌细胞增殖曲线的影响 根据上个实验结果分为 5 组，分别设定为空白组、阴性对照组、汉黄芩素 15 μmol/L 组、30 μmol/L 组和 60 μmol/L 组，实验方法同前。随后每 1、2、3、4、5、6、7 d 各取 1 板，测定 490 nm 处每孔的吸光度(A)值，按上式求出生长抑制率(IR)。

1.2.4 Hoechst 33342 细胞核染色 同前实验分为 5 组。用 0.25%胰蛋白酶消化 A549 细胞，种于 6 孔板，分别处理 48 h，吸去孔内培养液，PBS 清洗 2 次，每次 3 min，吸尽液体，每孔加入 Hoechst 33342 荧光染料 200 μl，37℃、5%CO_2 孵育 15 min，于荧光显微镜下观察细胞核形态，根据说明书认定细胞核发生固缩变形的为凋亡细胞。在 100 倍镜下观察并随机选取 3 个视野，计数凋亡细胞数。取其平均值，并计算凋亡率。

1.2.5 Transwell 肺癌细胞体外侵袭实验 同前实验分为 5 组。用 0.25%胰蛋白酶消化 A549 细胞，用 RPMI1640 培养液制成单细胞悬液以 6×10^5 个/ml 的密度加入 Transwell 上层小室中，每孔 200 μl，在下层小室加入 600 μl 完全培养液，置于 37℃、5%CO_2 孵箱培养 24 h，24 h 后用湿棉签擦去上室内的细胞，无水乙醇固定 15 min，HE 染色，在 100 倍光镜下观察并随机选取 5 个视野，计数穿膜细胞数并取其平均值，穿膜细胞数目的多少代表肺癌细胞体外侵袭能力的高低。

1.3 统计学方法

用 SPSS 10.0 统计软件分析，P<0.05 表示有统计学意义，数据描述采用$\bar{x}\pm s$表示，同一指标的组间比较采用单因素方差分析检验。

2 结 果

2.1 汉黄芩素对肺癌 A549 细胞增殖的影响

采用单因素方差分析对各组抑制率进行比较，汉黄芩素浓度为 1、10、100 μmol/L 时，对 A549 细胞增殖有明显抑制作用，与阴性组相比差异均有统计学意义(P<0.01)(表 1)。汉黄芩素 0.1 μmol/L 组与阴性对照组比较差异无统计学意义(P>0.05)，表明其对于 A549 细胞增殖无明显抑制作用。

2.2 不同浓度汉黄芩素对肺癌细胞的生长抑制曲线

汉黄芩素 15 μmol/L 组、30 μmol/L 组、60 μmol/L 组对于肺癌细胞均有不同程度抑制作用，与阴性对照组差异均有统计学意义(P<0.01)。说明汉黄芩素在一定浓度范围内对A549 细胞的生长具有明显的抑制作用(图 1)。

2.3 Hoechst 33342 荧光染色

观察不同浓度汉黄芩素对 A549 凋亡的影响，处理 48 h 后，与阴性对照组相比，可见肺癌细胞数减少、胞体变圆、可见细胞坏死及碎片。荧光显微镜下观察如图所示(图 3)。各处理组细胞与阴性组相比染色质浓缩成斑块状，出现不同程度凋亡，应用单因素方差分析比较，各组之间差异有统计学意义(P< 0.01)，表明汉黄芩素有明显促进凋亡作用(表 2)。

表 2 汉黄芩素对 A549 侵袭能力的影响（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	剂量 (μmol/L)	侵袭细胞数	F值	P值
阴性对照组	0	245 ± 7		
汉黄芩素组	1	176 ± 8*	214.60	4.64E-07
汉黄芩素组	10	120 ± 3*	1 346.983	3.33E-10
汉黄芩素组	100	90 ± 4*	1 848.077	9.45E-11

注：*，P<0.01，与阴性对照组相比

2.4 Transwell 肺癌细胞体外侵袭实验

采用单因素方差分析比较各组穿膜的细胞数发现，汉黄芩素各浓度组与阴性组穿膜细胞数有明显差异(P<0.01)(图 2)；与阴性对照组相比，经汉黄芩素处理后 A549 的穿膜细胞数均有到不同程度的降低，且随着汉黄芩素浓度的增加，穿膜细胞数降低，不同浓度汉黄芩素之间穿膜细胞数差异有统计学意义(P<0.01)(表 3)。

表 3 汉黄芩素对 A549 细胞凋亡率的影响（n=5，$\bar{x}\pm s$）

组别	剂量 (μmol/L)	凋亡率(%)	F值	P值
阴性对照组	0	2.47 ± 0.57		
汉黄芩素组	1	6.67 ± 1.33*	36.526	0.000 308
汉黄芩素组	10	8.46 ± 0.47*	265.970	2.01E-07
汉黄芩素组	100	13.06 ± 1.02*	385.870	4.69E-08

注：*，P<0.01，与阴性对照组相比

3 讨 论

汉黄芩素作为黄芩的主要活性成分之一，具有较强的抗炎、抗氧化活性，近年来的研究发现，汉黄芩素也具有明显的抗病毒及抗肿瘤作用，如有报道指出汉黄芩素对乳腺癌细胞 MDA-MB-231 的增殖有抑制作用，IC_{50} 小于 100 μmol/L，并可导致其 pAKT 降低。在体内实验中也发现汉黄芩素对移植

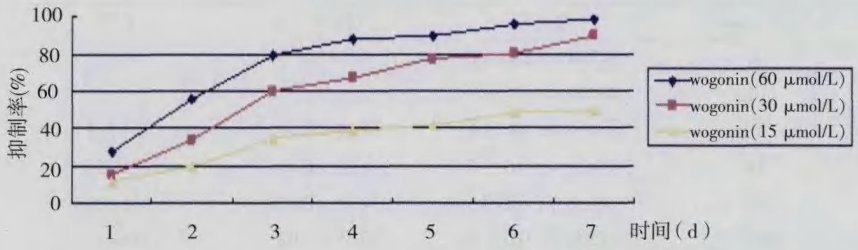
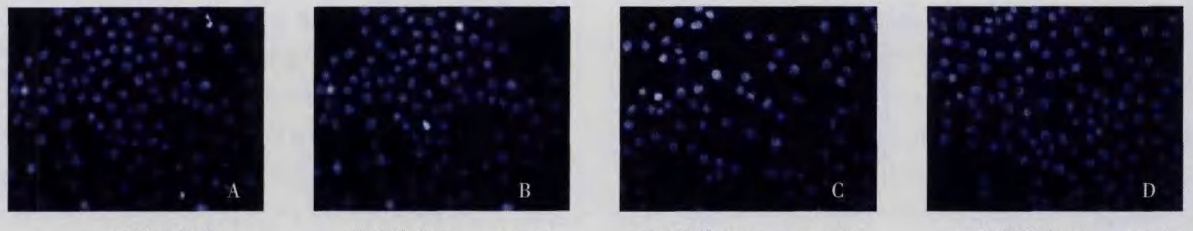
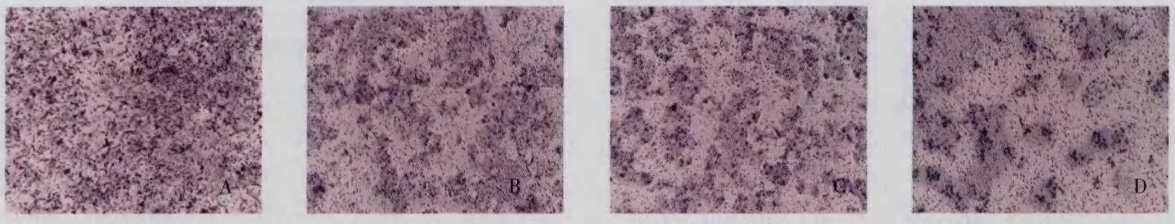


图 1　不同浓度汉黄芩素对肺癌细胞的生长抑制曲线



A. 阴性对照组　　B. 汉黄芩素 15 μmol/L 组　　C. 汉黄芩素 30 μmol/L 组　　D. 汉黄芩素 60 μmol/L 组

图 2　汉黄芩素对 A549 细胞凋亡率的影响（Hoechst33342 荧光染色）



A. 阴性对照组　　B. 汉黄芩素 1 μmol/L 组　　C. 汉黄芩素 10 μmol/L 组　　D. 汉黄芩素 100 μmol/L 组

图 3　Transwell 实验（HE 染色）

瘤有明显的抑制作用而对体内正常细胞几乎没有影响[5]。本实验采用 MTT 法就汉黄芩素对肺癌细胞的增殖进行研究后，结果表明，汉黄芩素可有效抑制肺癌细胞 A549 的增殖，IC_{50} 小于 100 μmol/L。且现有的研究表明汉黄芩素对于荷瘤动物的正常上皮、外周血和正常髓细胞几乎没有毒性[6-8]。因此提示汉黄芩素具有作为一种新的辅助化疗药物的前景。

Hoechst 33342 可以通过细胞膜，与 DNA 特异性的染色。荧光显微镜下可以看到凋亡细胞的核呈亮蓝色，或核呈分叶，碎片状，边集。本实验发现汉黄芩素可以明显诱导肺癌细胞的凋亡。由于细胞的增殖与细胞凋亡发生和周期分布紧密相关，因此我们推测：汉黄芩素对细胞凋亡的诱导作用是其抑制细胞增殖的部分机制。有研究认为汉黄岑素对细胞的凋亡作用可能通过其抑制 NF-κB 通路和对细胞周期的调控来实现[9,10]。

我们通过 Transwell 小室实验发现汉黄芩素对肺癌细胞株 A549 也具有明显的侵袭抑制作用，肿瘤细胞的侵袭多发生于转移之前，是肿瘤从非恶性变为恶性的关键特征。该结果提示汉黄芩素可有效抑制肿瘤细胞侵袭从而抑制肺癌细胞转移。

综上所述，我们的实验结果提示汉黄岑素可以抑制肺癌细胞 A549 的增殖迁移并诱导其凋亡，为汉黄岑素的抗肿瘤作用提供了实验依据，并拓展了肿瘤治疗的新思路。在下一步实验中我们将继续探讨它对肿瘤细胞抑制作用的可能分子机制，进一步研究汉黄岑素对肿瘤的作用。

参 考 文 献

[1] Kaiserova H, Simunek T, van der Vijgh W J, et al. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase[J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772(9): 1065-1074.

[2] Chi Y S, Lim H, Park H, et al. Effects of wogonin, a plant flavone from Scutellaria radix, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression[J]. Biochem Pharmacol, 2003, 66(7): 1271-1278.

[3] Yu J, Liu H, Lei J, et al. Antitumor activity of chloroform fraction of Scutellaria barbata and its active constituents[J]. Phytother Res, 2007, 21(9): 817-822.

[4] Wang W, Guo Q L, You Q D, et al. The anticancer activities of wogonin in murine sarcoma S180 both in vitro and in vivo[J]. Biol Pharm Bull, 2006, 29(6): 1132-1137.

[5] Chung H, Jung Y M, Shin D H, et al. Anticancer effects of Wogonin in both estrogen receptor-positive and -negative human breast cancer cell lines in vitro and in nude mice xenografts[J]. Int J Cancer, 2008, 122(4): 816-822.

基础研究 文章编号：0253-3626（2011）07-0793-04

丹参酮ⅡA磺酸钠预处理对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞fractalkine表达的影响

周 平，曾得康，李法琦，张 彬，殷 菱
（重庆医科大学附属第一医院老年病科，重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨丹参酮ⅡA磺酸钠（Sodium tanshinone ⅡA sulfonate，STS）预处理对高糖诱导的人脐静脉内皮细胞（Human umbilical vein endothelial cells，HUVECs）fractalkine（FKN）表达的影响及其可能机制。方法：对数生长期的HUVECs，分为正常组（N），高糖组（HG），STS组（STS），高糖加STS组（HG+STS），高糖加STS与氯化锂组（HG+STS+LiCl），5.5 mm的低糖DMEM培养的HUVECs种板10 h后按以上分组加入5 mg/L的STS和（或）10 mm的LiCl预处理2 h，再用33.3 mm的高糖干预48 h后，免疫组化SABC法检测β-catenin及p-GSK-3β（Ser^9）、免疫荧光FITC法检测FKN蛋白水平变化，RT-PCR检测GSK-3β和FKN mRNA水平变化。结果：与正常组比较，高糖组FKN蛋白及mRNA水平（$P<0.05$），GSK3β mRNA水平（$P<0.05$）明显增加，β-catenin及p-GSK-3β（Ser^9）蛋白表达（$P<0.05$）降低；与高糖组比较，STS组FKN蛋白及mRNA水平（$P<0.05$），GSK3β mRNA水平（$P<0.05$）明显降低，但仍高于正常组，β-catenin及p-GSK-3β（Ser^9）蛋白表达（$P<0.05$）增加，但仍低于正常组；STS与氯化锂共同预处理后以上改变更明显（$P<0.05$）。结论：STS抑制HUVEC FKN表达可能与Wnt信号通路有关。

【关键词】丹参酮ⅡA磺酸钠；高糖；fractalkine；人脐静脉内皮细胞；Wnt信号通路
【中国图书分类法分类号】R587.1 【文献标志码】A 【收稿日期】2011-04-09

The effects of sodium tanshinone ⅡA sulfonate pretreatment on high glucose-induced fractalkine expression in human umbilical vein endothelial cells

ZHOU Ping, ZENG De-kang, LI Fa-qi, ZHANG Bing, YIN Ling
(*Department of Gerontology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effects of sodium tanshinone ⅡA sulfonate (STS) pretreatment on high glucose-induced expression of fractalkine (FKN) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and its possible mechanisms. *Methods*: HUVECs in good condition were divided into 5 groups: normal group (N), high glucose group (HG), STS group (STS), high glucose with STS group (HG+STS) and high glucose with STS and lithium chloride group (HG+STS+LiCl). After planted HUVECs in DMEM/LG (5.5 mmol/L) for 10 h, 5 mg/L STS and/or 10mmol/L LiCl was added for 2 h as above and then 33.3 mmol/L high glucose was added for 48h. Harvested and the protein levels of intracellular β-catenin and p-GSK-3β (Ser^9) were measured by immunohistochemistry staining (SABC) and membrane fractalkine were detected by immunofluorescence (FITC), and the mRNA expression of GSK-3β and FKN were measured by RT-PCR. *Results*: Compare with N, the

作者介绍：周 平（1971-），女，主治医师，硕士，
研究方向：老年心血管基础与临床研究。

[6] Baumann S, Fas S C, Giaisi M, et al. Wogonin preferentially kills malignant lymphocytes and suppresses T-cell tumor growth by inducing PLC {gamma} 1-and Ca^{2+}-dependent apoptosis[J]. Am Soc Hematology, 2008, 111(4): 2354.

[7] Lee D H, Kim C, Zhang L, et al. Role of p53, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells[J]. Biochem Pharmacol, 2008, 75(10): 2020-2033.

[8] Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa H, et al. Difference of growth-inhibitory effect of Scutellaria baicalensis-producing flavonoid wogonin among human cancer cells and normal diploid cell[J]. Cancer Lett, 2007, 245(1): 269-274.

[9] Fas S C, Baumann S, Zhu J Y, et al. Wogonin sensitizes resistant malignant cells to TNF-alpha and TRAIL-induced apoptosis[J]. Blood, 2006, 108(12): 3700-3706.

[10] Himeji M, Ohtsuki T, Fukazawa, et al. Difference of growth-inhibitory effect of Scutellaria baicalensis-producing flavonoid Wogonin among human cancer cells and normal diploid cell[J]. Cancer Lett, 2007, 245(1-2): 269-274.

（责任编辑：冉明会）