

臭牡丹总黄酮对 A549 细胞上皮间质转化相关蛋白的影响

余娜¹, 马思静², 朱克俭^{2*}

(1.湖南中医药大学, 湖南长沙 410208; 2.湖南省中医药研究院, 湖南长沙 410006)

[摘要] **目的** 观察臭牡丹总黄酮对 A549 肺腺癌细胞上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白的影响。**方法** 构建 β -catenin 真核过表达载体并转染 A549 细胞, 将细胞分为空载组、 β -catenin 过表达组、空载组+臭牡丹总黄酮组、 β -catenin 过表达+臭牡丹总黄酮组。MTT 法检测不同浓度的臭牡丹总黄酮对 A549 细胞体外增殖的抑制作用。实时定量 PCR 检测各组 β -catenin mRNA 的表达, Western Blot 检测各组 β -catenin、E-Cardherin、Vimentin 的蛋白水平。**结果** MTT 显示 A549 细胞活力随臭牡丹总黄酮浓度的增加受到明显抑制, IC_{50} 为 2.1 mg/mL。 β -catenin 过表达组较空载组的 β -catenin、Vimentin 表达均明显上调, E-cardherin 表达下调。臭牡丹总黄酮在空载组与 β -catenin 过表达组均能明显降低 β -catenin mRNA 与蛋白水平, 增加 E-cardherin 蛋白表达, 略微降低 Vimentin 蛋白表达。**结论** 臭牡丹总黄酮对 A549 肺癌细胞具有一定的体外抑制增殖作用, 其抗肿瘤作用的可能机制是通过调控 EMT 的相关蛋白从而逆转 β -catenin 诱导的 EMT 现象而起作用。

[关键词] 臭牡丹总黄酮; 上皮间质转化; β -catenin 过表达载体; A549 细胞

[中图分类号] R285.5

[文献标识码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2016.05.003

Effect of the Total Flavonoid of *Clerodendron bungei* Steud on the Epithelial Mesenchymal Transition Related Proteins in A549 Cells

YU Na¹, MA Sijing², ZHU Kejian^{2*}

(1. Hunan University of Chinese medicine, ChangSha, Hunan 410208, China;

2.Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effect of the total flavonoid of *Clerodendron bungei* Steud (CMD) on the epithelial mesenchymal transition related proteins in A549 cells. **Methods** Building the β -catenin overexpression vector and transfected A549 cells. The cells can be divided into empty vector group, β -catenin overexpression group, empty vector group + CMD group, β -catenin overexpression+CMD group. The proliferation inhibition of the total flavonoid of *Clerodendron bungei* Steud with different concentrations on A549 cells in vitro was detected by MTT method. The expression of β -catenin mRNA was determined with real-time PCR, and the protein expression of β -catenin, E-Cardherin, Vimentin was detected with Western Blot. **Results** MTT showed that the A549 cells vitality were significantly inhibited with the increasing concentrations of the CMD, the IC_{50} was 2.1mg/mL. Compared with the empty vector group, the expression of β -catenin and vimentin was significantly higher, the E-cardherin was lower in β -catenin overexpression group. The total flavonoid of *Clerodendron bungei* Steud can reduce the expression of β -catenin, increase the expression of E-cardherin, and slightly reduce the expression of Vimentin protein in empty vehicle and the β -catenin overexpression groups. **Conclusion** the total flavonoid of *Clerodendron bungei* Steud has a certain proliferation inhibition effect on A549 lung cancer cells in vitro. The possible mechanisms is that, it can regulate some related proteins to reverse the EMT phenomenon through β -catenin cell signaling.

[Keywords] the total flavonoid of *Clerodendron bungei* Steud; the epithelial mesenchymal transition; β -catenin expression vector; A549 cell

[收稿日期] 2016-01-25

[基金项目] 湖南省自然科学基金项目 (14JJ4066)。

[作者简介] 余娜, 女, 讲师, 在读博士研究生, 从事中药学教学与科研工作。

[通讯作者] *朱克俭, 男, 研究员, 博士研究生导师, E-mail: zkjo0731@263.net。

原发性支气管肺癌是一种发生于支气管黏膜及腺体的恶性肿瘤,属中医学“肺积”、“肺岩”、“息贲”等范畴,其发病率和死亡率在全球以及我国均居首位^[1-2]。其中,肿瘤局部复发和远处转移是肿瘤病程发生发展的主要原因,80%以上的肺癌患者确诊时癌细胞已发生全身侵犯和转移,进入疾病晚期。臭牡丹性平,味辛、苦,有“祛风除湿、解毒散瘀”之功,对多种肿瘤具有临床治疗作用,尤以肺癌为佳。臭牡丹对多种肿瘤细胞具有抑制作用,并有一定预防肺癌发生及转移的作用^[3-4]。

上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)现象是肿瘤发生及远处转移的重要因素,EMT现象受多条信号通路、转录因子以及生长因子的调控^[5]。研究显示 β -catenin在胞内稳定的高表达是诱发EMT现象的重要因素,参与肿瘤的侵袭与转移^[6]。本研究采用 β -catenin的真核过表达载体转染人肺癌A549细胞,诱导EMT现象的发生,研究臭牡丹总黄酮对EMT现象标志蛋白E-Cadherin、 β -catenin、Vimentin的影响。

1 材料

1.1 细胞

人肺腺癌细胞A549购于中南大学高等研究中心细胞库。 β -catenin质粒(pCDNA3.1+载体,AMP抗性),空载体pCDNA3.1+(AMP抗性),由上海交通大学金卫林教授馈赠。

1.2 药物及试剂

总RNA提取试剂RNAiso Plus,逆转录试剂RT Master Mix Kit均购自宝生物工程有限公司;SYBR Green荧光染料购自Bio- γ ad公司;DEPC水购自碧云天生物公司;RT-PCR引物购自Invitrogen公司。引物序列:Anti- β -Catenin(D10A8)、Anti-E-Cadherin(24E10) Rabbit mAb、Anti-Vimentin(D21H3)抗体均购自cell signaling technology。Anti- β -Actin抗体、Western Blot相关试剂均购自Sigma Aldrich。胎牛血清,DMEM培养液,胰酶均购自gibco公司。臭牡丹总黄酮由湖南省中医药研究院附属医院中药房提供臭牡丹生药,经湖南省中医药研究院中药研究所提取,总黄酮含量51%,1g相当于生药30g。批号:20110720。

1.3 仪器

金属浴Grant-bi公司生产;垂直凝胶电泳系统、转膜系统、化学发光仪XRS+由BIO-RAD公司生产;超净工作台,细胞培养箱均由Thermo Scien-

tific公司生产。

2 方法

2.1 细胞培养及传代

人肺癌细胞A549培养于含10%胎牛血清的DMEM培养基中,置于37℃,5%CO₂环境下培养。传代采用0.25%含EDTA的胰酶消化后直接分瓶法。

2.2 构建 β -catenin真核表达载体转染A549细胞

制备1DH5 α 大肠杆菌感受态,并克隆连接有 β -catenin目的基因片段的pcDNA3.1过表达载体,经Amp筛选后,选出有外源序列插入的克隆测序。将A549细胞按10⁶个密度接种于6孔板中,待细胞生长至80%~90%,使用Lipo2000 10 uL分别转染空载体pcDNA3.1(+)/EGFP和 β -catenin过表达载体,每孔质粒量4 μ g,与无血清DMEM混匀后加入6孔板,6h换有血清DMEM/F12,48h后用荧光显微镜观察转染效率。

2.3 细胞分组与给药

细胞共分为4组:转染空载体组(pcDNA3.1),转染空载体+臭牡丹总黄酮组(pcDNA3.1+CMD),转染 β -Catenin过表达组(β -Catenin),转染 β -catenin过表达+臭牡丹总黄酮组(β -Catenin+CMD)。用无菌蒸馏水将臭牡丹总黄酮浸膏配成浓度为10 mg/mL的母液,再用无血清培养基配制成2 mg/mL的含药溶液。待A549细胞生长密度达70%~80%时,加入含药溶液,置于37℃,5%CO₂环境下培养48h后进行后续实验。

2.4 MTT方法检测臭牡丹总黄酮对A549细胞增殖的影响

将臭牡丹总黄酮浸膏溶于无菌水中,母液浓度10 mg/mL。取对数生长期的未转染的人肺腺癌A549细胞株,按5 000个/孔细胞铺于96孔板。培养6~8h待细胞充分贴壁后,用含4%FBS的DMEM液配成的不同浓度的臭牡丹总黄酮溶液置换原培养液,每孔200 μ L,共0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0 mg/mL 12个浓度组,每组6个复孔。作用48h后,吸去上清,撤去药物,加入MTT溶液,37℃,5%CO₂环境下培养4h后,吸取板内溶液,加入二甲基亚砷,在OD490 nm处测量各孔的吸光值。

2.5 实时定量PCR检测臭牡丹总黄酮对 β -catenin mRNA的影响

按“2.3”分组与给药的4组A549细胞经PBS

清洗后,收集于总 RNA 提取试剂,经反复吹打破碎后,加入三氯甲烷溶液剧烈震荡混匀后,静置 5 min 后离心,15 min,4 ℃;小心吸取上层澄清的水相,加入等体积的异丙醇溶液,上下颠倒混匀 10 下,离心分离总 RNA,加入 75 %乙醇(DEPC 水配制)清洗后,用适量的 DEPC 水溶解。定量后取一定量 RNA,加入适量逆转录试剂,于 37 ℃转录 15 min。反应所得 cDNA 与上下游引物、SYBR Green 荧光染料混匀后进行实时定量 PCR 反应。反应程序为预变性 95 ℃ 10 min,扩增:95 ℃ 15 s,60 ℃ 60 s,最大循环数 40,引物序列:ACTIN-qPCR-F, CACCATTGGCAATGAGCGGTTCACTIN -qPCR -R, AGGTCTTTGCGGATGTCCACGT,CTNNB1 -qPCR -F, CACAAGCAGAGTGCTGAAGGTG,CTNNB1 -qPCR -R,GATTCCTGAGAGTCCAAAGACAG。结果采用达到固定荧光阈值的反应循环数表示,采用 β -actin 作为内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法对结果进行分析比较。

2.6 Western blot 检测 EMT 相关蛋白的表达

按 2.3 分组与给药的 4 组 A549 细胞经裂解液破碎后,收集总蛋白,蛋白样品与上样缓冲液混合后,煮沸变性 5~10 min。蛋白经 SDS-PAGE 凝胶分离,

120 V,70 min 后,转移至 NC 膜;载有蛋白质条带的膜在含有 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液中室温封闭 1 h,然后加入含有稀释一抗(Anti- β -catenin1:5 000、Anti-E-cadherin 1:1 500、vimentin 1:400,内参 Anti- β -actin1:5 000),4 ℃下振荡孵育过夜,TBST 溶液洗涤后加入含 1:2 000 稀释的辣根过氧化物酶(HRP)偶联抗体反应液(相应蛋白的 II 抗、5%脱脂奶粉稀释),室温中振荡孵育 1 h。洗涤后,采用 ECL 化学发光显示液曝光。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计学分析。计量数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较采用单因素方差分析,并用 Sidak 法进行多重比较。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 臭牡丹总黄酮对 A549 细胞增殖的影响

臭牡丹总黄酮处理 A549 细胞 48 h 后,MTT 检测细胞活力显示,A549 细胞活力受到明显抑制,随着给药浓度增加,细胞成活率下降,对细胞抑制作用增强。其半数抑制率 IC_{50} 为 2.1 mg/mL。见表 1。

表 1 臭牡丹总黄酮各浓度组吸光度 A 值与抑制率浓度 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

浓度 mg/mL	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
吸光度	1.56±0.25	1.46±0.15	1.43±0.09	1.35±0.12	1.24±0.16	1.05±0.19	0.92±0.23	0.59±0.23	0.40±0.07	0.33±0.03
生长抑制率(%)	0	6.21	8.01	13.46	20.28	32.3	40.62	61.83	73.77	78.34

3.2 臭牡丹总黄酮对 β -catenin mRNA 的影响

结果显示,转染 β -catenin 过表达载体的细胞的 β -catenin mRNA 水平明显增加,而臭牡丹总黄酮可显著降低 β -catenin 过表达 A549 细胞内 β -catenin 的 mRNA 水平,也可降低空载组的 β -catenin mRNA 水平,但差异无统计学意义。见图 1。

3.3 臭牡丹总黄酮对 EMT 相关蛋白表达的影响

β -catenin 过表达组较空载组的 β -catenin、Vimentin 表达明显上调,E-cadherin 表达略有下调,有诱导 EMT 现象的倾向。臭牡丹总黄酮在空载组与 β -catenin 过表达组均能明显降低 β -catenin 表达,增加 E-cadherin 表达,略微降低 Vimentin 蛋白表达,有逆转 EMT 现象的倾向。见图 2。

4 讨论

臭牡丹,性寒,具有“祛风除湿、解毒散瘀、消肿止痛之功”,符合肺癌“化瘀解毒”的中医治疗原则。

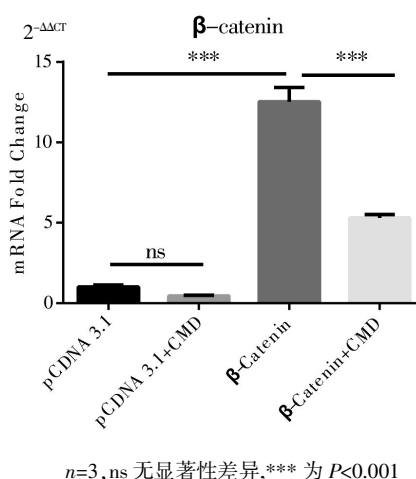
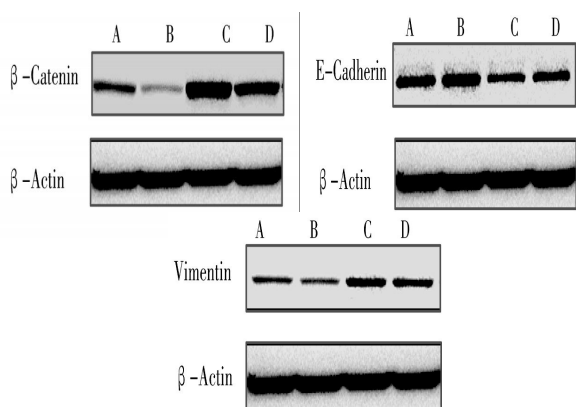


图 1 臭牡丹总黄酮对 β -catenin mRNA 的影响

并具有一定的补益脾肺肾之力,可治疗肺癌肺肾气虚所致的虚劳咳嗽。课题组曾采用淋巴瘤 Raji 细胞与人肺腺癌 A549 细胞对臭牡丹提取物的四个不同样品进行抗肿瘤实验,发现四个样品均有不同程



注:A.pCDNA3.1组;B.pCDNA3.1+CMD组;C.β-Catenin 过表达组;D.β-Catenin 过表达+CMD组

图2 臭牡丹总黄酮对 EMT 相关蛋白的调控电泳图

度的体外细胞毒作用,在综合考虑以上四个组分的抗肿瘤强度、提取工艺等因素后,最终确定臭牡丹总黄酮为抗肿瘤有效成分之一,并对其抗肿瘤作用机制进行研究。臭牡丹黄酮类化合物对 Lewis 肺癌小鼠皮下瘤及转移瘤、人肺癌细胞 A549、H460 具有一定的抑制增殖与诱导凋亡作用^[7-8]。

上皮间质转化(EMT)是指上皮细胞在特定的生理和病理情况下,向间质细胞表型转化,同时伴随有细胞形态与细胞功能的改变^[9-10]。EMT 现象中具有共同的细胞学机制,上皮属性蛋白如 E 钙黏蛋白(E-cadherin)、角蛋白(Keratin)表达下调,间质属性蛋白如波形蛋白(Vimentin)、纤维连接蛋白(Fibronectin)表达上升,β-catenin 入核,细胞骨架改变。其中 E-cadherin 维持着上皮细胞表型,是肿瘤侵袭转移的抑制因子。Vimentin 蛋白是 EMT 中由上皮属性转向间质属性的重要标志物,与肿瘤细胞的侵袭转移密切相关。β-catenin 一方面与 E-cadherin 结合,形成 β-catenin/E-cadherin 复合体,调节细胞间粘附,维持着上皮极性和完整性。另一方面 β-catenin 可作为转录激活因子,调控 EMT 相关基因的表达,促进肿瘤的进展与转移^[11]。在肿瘤细胞中,β-catenin 在细胞核内聚集,胞内稳定的高表达是发生 EMT 的重要条件。相反,抑制 β-catenin 的表达则可逆转细胞的 EMT 现象^[12]。

本研究中采用 β-catenin 过表达质粒转染 A549 细胞,通过对相关蛋白的检测,发现高表达的 β-

catenin 有诱导 EMT 现象的作用。臭牡丹总黄酮对 A549 细胞的体外增殖具有一定的抑制作用,随浓度的升高抑制率增大。臭牡丹总黄酮对 β-catenin 过表达组的 EMT 相关蛋白具有明显的调控作用,有逆转 EMT 现象的倾向,但在空载组无明显影响。显示其抗肿瘤的机制有可能是通过逆转 β-catenin 诱导的 EMT 现象而起作用。

参考文献:

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. CA, Cancer J Clin, 2011,61(2):69-90.
- [2] Ferlay J, Shin HR, Bray F, et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008 [J]. Int J Cancer, 2010,127(12):2 893-2 917.
- [3] 胡琦,朱克俭,谭小宇,等.臭牡丹总黄酮对人肝癌 HepG2 细胞增殖作用的实验研究. 湖南中医杂志,2014,31(4):166-168.
- [4] 朱克俭,张亚利,欧阳剑虹,等.保肺饮预防肺癌的临床流行病学研究[J].中国中医药科技.1997,4(6):332-333.
- [5] Riccardo F, Thomas B. Wnt/β-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior [J]. Curr Opin Cell Biol,2007,19(2):150-158.
- [6] Kwonseop K, Zifan L, Elizabeth D. Direct evidence for a role of β-catenin/lef-1 signaling pathway in induction of EMT[J]. Cell Bio Inter,2002,26(5):463-476.
- [7] Chen YS, Shen SC, Lin HY. Rutinoside at C7 attenuates the apoptosis-inducing activity of flavonoids [J]. Biochem Pharmacol, 2003,66(7):1 139-1 150.
- [8] HUNG Jenyu, HSU Yaling, KO Yingchin, et al. Didymin, a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas-mediated apoptotic pathway in human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo[J]. Lung Cancer, 2010, 68(3):366-374.
- [9] Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis[J]. Cancer Res,2006,66(17):8 319-8 326.
- [10] Klymkowsky MW, Savagner P. Epithelial-mesenchymal transition; a cancer researcher's conceptual friend and foe [J]. Am J Pathol,2009,174(5):1 588-1 593.
- [11] Valery, Lilia, Francesc. Targeting Wnt/β-catenin pathway in hepatocellular carcinoma treatment[J]. World Journal of Gastroenterology, 2016,22(2):823-832.
- [12] Zhao J H, Luo Y, Jiang Y G, et al. Knockdown of β-catenin through shRNA cause a reversal of EMT and metastatic phenotypes induced by HIF-1α [J]. Cancer Invest, 2011,29(6): 377-382.

(本文编辑 杨 瑛)