

·实验研究·

本文引用:刘洁,史红健,熊雨,范婧莹,苏芮,王贤文,吴新正,江志超,何迎春. 黄芩苷通过 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖[J].湖南中医药大学学报,2021,41(8):1154-1159.

黄芩苷通过 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路抑制鼻咽癌细胞增殖

刘洁¹,史红健^{1,2,3},熊雨¹,范婧莹^{1,2,3},苏芮¹,王贤文^{2,3,4},吴新正^{2,3},江志超^{2,3,5},何迎春^{1,2,3*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.中医药防治眼耳鼻咽喉疾病湖南省重点实验室,湖南长沙 410208;

3.湖南省中医药防治眼耳鼻咽喉疾病与视功能保护工程技术研究中心,湖南长沙 410208;4.湖南中医药大学第一附属医院,湖南长沙 410007;5.湖南省脑科医院,湖南长沙 410005)

[摘要] 目的 探讨黄芩苷(baicalin)对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖及 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路的作用。方法 采用 CCK8 法检测不同浓度黄芩苷(2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、顺铂(4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)在 24、36、48 h 对 CNE2 细胞增殖的作用;细胞成像多功能检测系统(Cytation™ 5)实时监测黄芩苷对 CNE2 增殖数量的变化;Western blot 检测黄芩苷对 CNE2 细胞增殖相关蛋白 PCNA、Survivin 及 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路关键蛋白 TGF- β 1、p-ERK1/2 的影响。结果 CCK8 结果显示,黄芩苷可抑制 CNE2 增殖($P<0.05$ 或 $P<0.01$),且随着浓度升高,抑制作用增强;Cytation™ 5 监测结果显示,黄芩苷可抑制 CNE2 细胞数量增多($P<0.05$ 或 $P<0.01$);Western blot 结果表明,黄芩苷下调了增殖相关蛋白 PCNA($P<0.05$)、Survivin($P<0.05$)及 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路关键蛋白 TGF- β 1($P<0.05$)、p-ERK1/2($P<0.05$)的表达水平。加入 TGF- β 1(TGF- β 1/ERK1/2 信号通路激活剂)后,黄芩苷对 TGF- β 1、p-ERK1/2、PCNA、Survivin 的抑制作用降低($P<0.05$),同时降低了黄芩苷对 CNE2 细胞增殖的抑制作用。结论 黄芩苷能够抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖,并通过抑制 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路进一步降低下游蛋白 PCNA、Survivin 的表达发挥作用。

[关键词] 鼻咽癌;黄芩苷;细胞增殖;TGF- β 1/ERK1/2 信号通路

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.08.004

Baicalin Inhibits Nasopharyngeal Carcinoma Cell Proliferation Via TGF- β 1/ERK1/2 Signaling Pathway

LIU Jie¹, SHI Hongjian^{1,2,3}, XIONG Yu¹, FAN Jingying^{1,2,3}, SU Rui¹, WANG Xianwen^{2,3,4}, WU Xinzhen^{2,3},
JIANG Zhichao^{2,3,5}, HE Yingchun^{1,2,3*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Provincial Key Laboratory for the Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Traditional Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Hunan Provincial Ophthalmology and Otolaryngology Diseases Prevention and Treatment with Traditional Chinese Medicine and Visual Function Protection Engineering and Technological Research Center, Changsha, Hunan 410208, China; 4. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 5. Brain Hospital of Hunan Province, Changsha, Hunan 410005, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of baicalin on proliferation and TGF- β 1/ERK1/2 signaling pathway of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells. **Methods** CCK8 method was used to detect the effect of different concentrations (2.5, 5,

[收稿日期]2021-04-08

[基金项目]国家自然科学基金项目(81874408,81973914);湖南省自然科学基金项目(2018JJ2219,2019JJ4026);湖南省中医药管理局资助项目(2021014,2021184);湖南省研究生科研创新项目(CX20200794)。

[作者简介]刘洁,女,在读博士研究生,研究方向:中西医结合防治肿瘤。

[通信作者]*何迎春,女,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:yingchunhe@aliyun.com。

10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of baicalin and cisplatin (4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) on proliferation of CNE2 cells at 24, 36 and 48 hours. Cell imaging multifunctional detection system (Cytation™ 5) was used to monitor the changes of baicalin on proliferation of CNE2 cells. Western blot was used to detect the effect of baicalin on PCNA, Survivin and the key proteins of TGF- β 1/ERK1/2 signaling pathway TGF- β 1, p-ERK1/2 in CNE2 cells. **Results** CCK8 results showed that baicalin could inhibit proliferation of CNE2 ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the inhibition increased with the increasing of concentration. The monitoring results of Cytation™ 5 showed that baicalin could inhibit the quantity increasing of CNE2 cells ($P<0.05$ or $P<0.01$). Western blot results showed that baicalin down regulated the protein expression levels of PCNA ($P<0.05$), Survivin ($P<0.05$) and the key proteins of TGF- β 1/ERK1/2 signaling pathway TGF- β 1 ($P<0.05$) and p-ERK1/2 ($P<0.05$). After adding transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1, TGF- β 1/ERK1/2 signal pathway activator), the inhibitory effect of baicalin on TGF- β 1, p-ERK1/2, PCNA and Survivin was decreased ($P<0.05$), and the inhibitory effect of baicalin on CNE2 cell proliferation was also decreased. **Conclusion** Baicalin can inhibit the proliferation of nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells, and further reduce the expression of downstream proteins PCNA and Survivin by inhibiting TGF- β 1/ERK1/2 signaling pathway.

[**Keywords**] nasopharyngeal carcinoma; baicalin; cell proliferation; TGF- β 1/ERK1/2 signaling pathway

鼻咽癌发病地域特点明显, 主要在我国南部高发, 由于其发病部位特殊、放化疗敏感度较高, 目前临床依然采用放疗为主的联合治疗^[1]。近年来, 随着中医药的深入研究和挖掘, 中医药及其活性成分抗肿瘤研究亦取得了较大突破, 许多抗肿瘤单体的药效及作用机制有了实验验证, 为阐明中医药抗肿瘤机制提供了充分的理论依据^[2]。

黄芩苷(baicalin)是中药黄芩、半枝莲等的主要活性成分之一, 研究发现, 黄芩苷具有广泛的抗癌活性^[3-4], 在鼻咽癌的研究中, WANG C 等^[5]研究发现黄芩苷可抑制自噬、逆转鼻咽癌细胞放疗抵抗性, 李静等^[6]证实, 黄芩苷能够抑制鼻咽癌荷瘤鼠肿瘤发生发展, 但黄芩苷抑制鼻咽癌增殖的作用机制尚不明确。TGF- β 1 在大部分肿瘤中表达上调, 是肿瘤细胞免疫逃逸的主要调控因子之一^[7], 且刘婷等^[8]的研究证实, TGF- β 1 能够调控鼻咽癌细胞株的增殖和迁移等行为。因此, 探讨黄芩苷对鼻咽癌细胞的作用和对 TGF- β 1 信号通路的影响及两者的相关性, 可进一步明确黄芩苷抗鼻咽癌的效应及机制, 为开发抗鼻咽癌的中药单体丰富理论基础, 本实验拟研究黄芩苷对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响, 并检测其对增殖相关蛋白 PCNA、Survivin 及 TGF- β 1/ERK1/2 的调控作用, 以期后续研究提供实验参考。

1 实验材料

1.1 细胞株

人鼻咽癌 CNE2 细胞(批号: BNCC341794)购自北京北纳创联生物技术研究院, 由本实验室传代培养。

1.2 主要药物

黄芩苷(批号: P20A9F59353, 纯度 $\geq 98\%$)购于上海源叶生物科技有限公司; 顺铂(Cisplatin, Cis)(批号: MKCM2435)购于美国 Sigma 公司; TGF- β 1(批号: 1218209)购于美国 Pepro Tech 公司; LY3200882(批号: C24H29N5O3)购于美国 Target Mol 公司。

1.3 主要试剂

RPMI-1640 培养基(批号: AE24464298)购自 Hyclone 公司; 胎牛血清(批号: 42A0378K)购自 Gibco 公司; 胰蛋白酶消化液(批号: 20201113)购自北京索莱宝公司; PCNA 抗体(批号: AH08154078)购自 Bioss 公司; Survivin 抗体(批号: 15)、p-ERK1/2 抗体(批号: 24)、 β -actin 抗体(批号: 18)均购自 CST 公司; TGF- β 1 抗体(批号: GR3252552-1)购自 Abcam 公司。

1.4 主要仪器

双人单面净化工作台(型号: SW-CJ-2FD, 苏州净化设备有限公司); CO₂ 培养箱(型号: HERAcell 150i, 赛默飞世尔公司); 全自动酶标分析仪(型号: ELX800, BioTek 公司); 细胞成像多功能检测系统(型号: Cytation™ 5, BioTek 公司); 双色红外荧光成像系统(型号: Odyssey-CLX, Gene 有限公司)。

2 实验方法

2.1 CCK8 法检测细胞增殖

常规消化细胞后, 调整细胞悬液至 5 000 个/100 μL , 于 96 孔板中加入 100 μL 细胞悬液, 待细胞贴壁后弃上清液, 加入含不同浓度黄芩苷(2.5、5、10、20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Cis(4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的培养液。

分别于24、36、48 h后弃上清,加入100 μL CCK8溶液,孵育1.5 h后于450 nm波长测吸光度,并计算细胞相对增殖指数。

细胞相对增殖指数=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)

2.2 Cytation™ 5 监测细胞增殖

常规消化细胞后,调整细胞悬液至5 000个/100 μL ,于96孔板中加入100 μL 细胞悬液,待细胞贴壁后弃上清液,加入含不同浓度黄芩苷(5、10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、Cis(4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的培养液。将96孔板置于Cytation™ 5细胞成像多功能检测系统仪器内,设置6 h拍照1次,总时长48 h。待监测结束后,计算细胞数量,并计算细胞的相对增殖指数。

2.3 Western blot 法检测蛋白表达水平

根据Cytation™ 5监测结果,发现黄芩苷20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度抑制增殖效果较好,因此,设置对照组、黄芩苷20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、黄芩苷40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、Cis 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组干预细胞后进行蛋白测定。后续机制部分研究以TGF- β 1作为TGF- β 1/ERK1/2信号通路激活剂,LY3200882作为信号通路抑制剂,具体分组如下:对照组、TGF- β 1 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组、TGF- β 1+黄芩苷组、黄芩苷40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、LY3200882 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组。

药物处理CNE2细胞36 h后,提取总蛋白,按BCA试剂盒方法定量后,按照60 μg 上样量配置样品体系。配备10% SDS-PAGE分离胶,待分离胶凝固后加入5%浓缩胶,将样品加入相应的泳道,先按40 V恒压电泳,待样品浓缩好后,逐步增加至90 V

或120 V。电泳结束后按照转膜夹黑色面→海绵→4层滤纸→胶→PVDF膜→4层滤纸→海绵→转膜夹红色面的顺序放置好后,在转膜槽倒入转膜液,按照200 mA、2.5 h的条件在冰上湿转。转膜结束后将PVDF膜放入5%的脱脂奶粉室温下封闭1 h,然后加入稀释好的一抗溶液,放入4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。第2天先用TBST洗膜3遍,每次10 min,然后加入相应的荧光二抗室温避光孵育1.5 h。结束后洗膜3次,每次10 min,最后用双色红外荧光成像系统进行扫膜,并用Image Studio软件分析荧光强度。

2.4 统计学分析

采用SPSS 26.0进行分析,计量资料数据用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,服从正态分布且各组间方差齐时,采用单因素方差分析,LSD检验,方差不齐时,用Games-Howell(A)检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度黄芩苷抑制鼻咽癌细胞增殖

与对照组比较,24 h各浓度黄芩苷组,36 h和48 h的黄芩苷20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和Cis 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组CNE2细胞增殖指数降低,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与黄芩苷2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较,不同时间点黄芩苷(20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组细胞增殖指数降低,差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。采用Cytation™ 5进行实时动态监测进一步验证黄芩苷对CNE2细胞增殖的抑制作用,细胞在培养48 h后,黄芩苷各浓度组与对照组比较,CNE2细胞增殖明显被抑制。见表1和图1。

表1 不同浓度黄芩苷处理鼻咽癌细胞后的相对增殖指数($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	24 h	36 h	48 h
对照组	1.00±0.04	1.00±0.02	1.00±0.02
黄芩苷 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.88±0.08**	0.94±0.10	0.95±0.06
黄芩苷 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.89±0.04**	0.90±0.04	0.93±0.06
黄芩苷 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.88±0.05**	0.86±0.10	0.92±0.06
黄芩苷 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.82±0.06**	0.82±0.01**	0.76±0.05** $\Delta^{\#}$
黄芩苷 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.75±0.06** $\Delta^{\#}\nabla^{\diamond}$	0.70±0.92*	0.70±0.04** $\Delta^{\#}\nabla^{\diamond}$
黄芩苷 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组	0.67±0.05** $\Delta^{\#}\nabla^{\diamond}\square$	0.57±0.01** $\Delta^{\#}\nabla^{\diamond}$	0.49±0.05** $\Delta^{\#}\nabla^{\diamond}\square$
Cis 4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组	0.32±0.04** $\Delta^{\#}\nabla^{\diamond}\square\blacktriangle$	0.21±0.00** $\Delta^{\#}\nabla^{\diamond}\square\blacktriangle$	0.06±0.00** $\Delta^{\#}\nabla^{\diamond}\square\blacktriangle$

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与黄芩苷2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, $\Delta^{\#}P<0.05$, $\Delta^{\Delta}P<0.01$;与黄芩苷5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, $\nabla^{\#}P<0.05$, $\nabla^{\#}P<0.01$;与黄芩苷10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, $\nabla^{\nabla}P<0.05$, $\nabla^{\nabla}P<0.01$;与黄芩苷20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, $\diamond^{\#}P<0.05$, $\diamond^{\#}P<0.01$;与黄芩苷40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, $\square^{\#}P<0.05$, $\square^{\#}P<0.01$;与黄芩苷80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, $\blacktriangle^{\#}P<0.05$, $\blacktriangle^{\#}P<0.01$

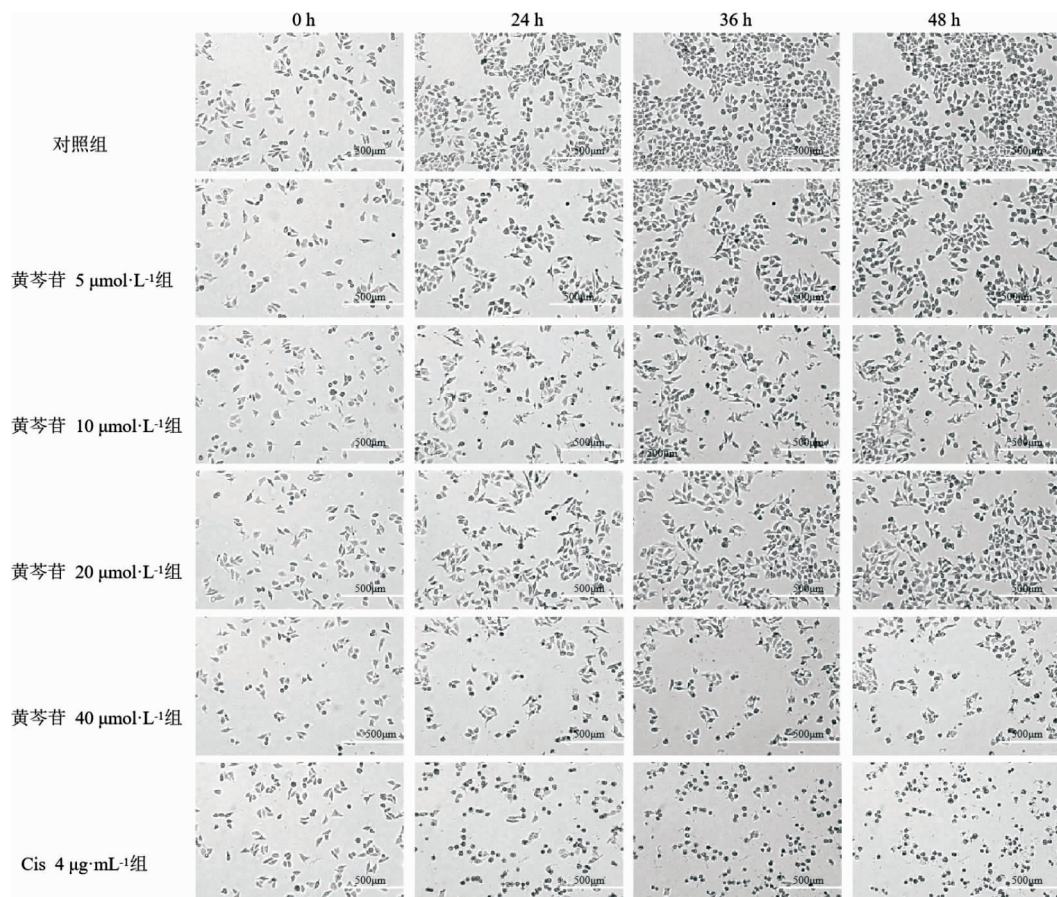


图1 黄芩苷对 CNE2 细胞增殖数量的影响(比例尺=500 μm , $\times 40$)

3.2 黄芩苷抑制鼻咽癌细胞 PCNA、Survivin 蛋白表达水平

与对照组相比,黄芩苷 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 PCNA 和 Survivin 表达水平下降,差异有统计学意义($P<0.05$);黄芩苷 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 PCNA 和 Survivin 表达水平下降不明显($P>0.05$)。黄芩苷 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和黄芩苷 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比,PCNA 和 Survivin 表达水平差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 2。

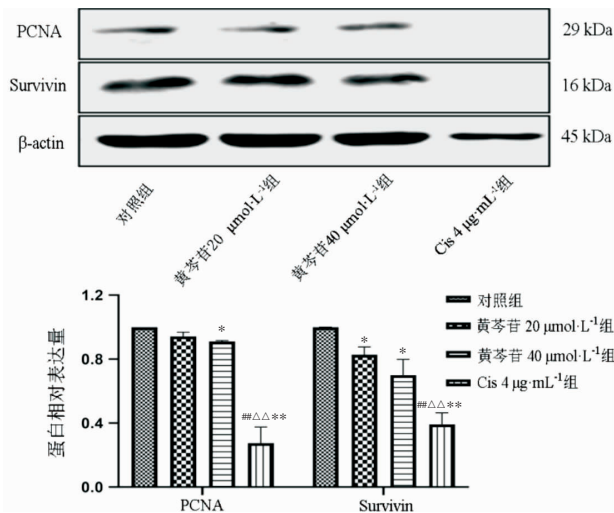
3.3 黄芩苷抑制鼻咽癌细胞 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路

与对照组比较,黄芩苷 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 TGF- β 1 和 p-ERK1/2 的表达水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);但黄芩苷 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组表达水平降低不明显($P>0.05$)。与黄芩苷 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组相比,黄芩苷 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 TGF- β 1 和 p-ERK1/2 表达水平降低,但差异无统计学意义($P>0.05$)。见图 3。

3.4 黄芩苷通过 TGF- β 1/ERK 信号通路抑制 CNE2 细胞增殖

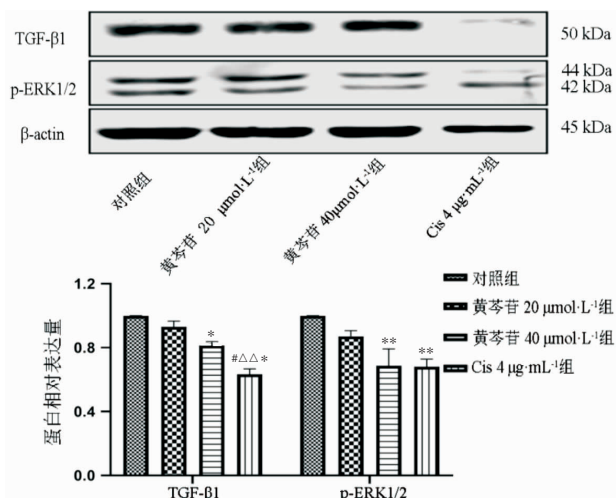
与对照组相比,TGF- β 1 $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 TGF- β 1、

p-ERK1/2、PCNA 和 Survivin 的表达水平上升,但差异无统计学意义($P>0.05$);TGF- β 1+黄芩苷组 TGF- β 1 和 p-ERK1/2 表达水平均下调,但差异无统计学意义($P>0.05$);PCNA 和 Survivin 的表达水平明显下降,差异有统计学意义($P<0.01$);黄芩苷 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组和 LY3200882 组 p-ERK、PCNA、Survivin 的表达水平下降,差异均有统计意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),黄芩苷组 TGF- β 1 下调($P<0.05$),但 LY3200882 组 TGF- β 1 下调不明显,差异无统计学意义($P>0.05$)。与 TGF- β 1+黄芩苷组比较,黄芩苷 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 TGF- β 1、p-ERK1/2、PCNA 表达降低不明显($P>0.05$),Survivin 表达水平降低且差异具有统计学意义($P<0.01$) (图 4A、4B)。Cytation™ 5 监测细胞增殖结果显示,TGF- β 1 $10 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组细胞增殖指数明显上升,但与对照组比较差异无统计意义($P>0.05$)。与 TGF- β 1+黄芩苷组相比,黄芩苷 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞增殖指数降低,但差异无统计学意义(图 4C)。



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与黄芩苷 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与黄芩苷 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, $\#\#\Delta P<0.01$

图 2 黄芩苷对 CNE2 细胞增殖相关蛋白的影响



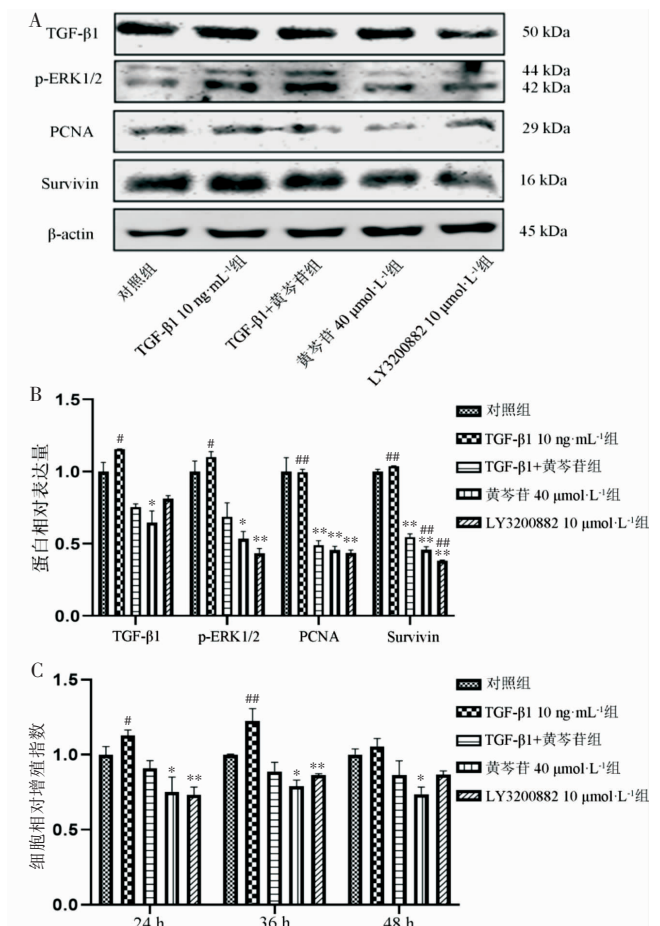
注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与黄芩苷 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$;与黄芩苷 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较, $\#P<0.05$

图 3 黄芩苷对 TGF-β1/ERK 信号通路关键蛋白的影响

4 讨论

鼻咽癌是头颈部常见的恶性肿瘤之一,治疗方案以放化疗为主,辅以手术治疗,但作用有限且黏膜糜烂、口干、神经损伤等不良反应明显^[9]。而我国传统医药在鼻咽癌临床应用中疗效显著,能够改善鼻咽癌患者的症状,提高生活质量^[10]。研究^[11-12]表明,黄芩苷具有抗肿瘤作用,能够抑制肺腺癌 A549 细胞上皮间质化、抑制 T 细胞淋巴瘤增殖并诱导凋亡。

本研究首先通过 CCK8 检测了黄芩苷对鼻咽癌细胞增殖活性的影响,结果表明,不同浓度黄芩苷均可抑制鼻咽癌细胞增殖,且随着浓度升高,抑制作用



注:A、B.TGF-β1/ERK 信号通路激活后黄芩苷对蛋白表达水平的影响。C.TGF-β1/ERK 信号通路激活后黄芩苷对 CNE2 细胞增殖的影响。与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与 TGF-β1+黄芩苷组比较, $\#P<0.05$, $\#\#\Delta P<0.01$

图 4 TGF-β1/ERK 信号通路在黄芩苷抑制 CNE2 细胞增殖中的作用

更加明显。同样,Cytation™ 5 实时监测细胞增殖结果显示,黄芩苷可抑制 CNE2 细胞数量的增长,进一步表明黄芩苷可抑制鼻咽癌细胞增殖。PCNA 与肿瘤的发生发展密切相关,课题组前期研究表明,PCNA 在鼻咽癌细胞中呈高表达状态^[13-14]。Survivin 是肿瘤标志物之一,与鼻咽癌的分化增殖有关^[15-16]。益气解毒方和三萜类化合物齐墩果酸、茯苓酸、熊果酸及黄芪甲苷均可降低 PCNA 和 Survivin 表达水平,抑制鼻咽癌细胞增殖^[17-18],表明药物通过抑制 PCNA 和 Survivin 的活性可以发挥抗鼻咽癌作用。本实验结果显示,黄芩苷能够下调鼻咽癌细胞中 PCNA 和 Survivin 的蛋白表达水平,提示黄芩苷抑制鼻咽癌细胞增殖可能是通过抑制 PCNA 和 Survivin 实现的。

TGF-β 主要参与细胞增殖、分化及免疫调节等

过程,既可以在正常细胞中参与细胞正常生理过程,当肿瘤发生时,又可以作为促肿瘤因子推动肿瘤细胞的恶化^[19]。TGF- β 1 是 TGF- β 超家族中研究得最多的,也是与肿瘤发生发展最密切的,因此,本研究通过 Western blot 检测了黄芩苷对 TGF- β 1 蛋白水平的影响,结果显示,黄芩苷组的表达水平与对照组比较明显下调($P < 0.05$),说明黄芩苷能够抑制 TGF- β 1 活性。TGF- β 1/ERK1/2 途径属于非 Smad 依赖性 TGF- β 信号通路中的一条,TGF- β 1 可以激活 MAPK/ERK 信号通路,其中以 ERK1/2 为主,引起一系列级联反应并产生相应的生物学行为^[20]。在本课题组的相关研究中,发现 ERK 的活化可促进 PCNA、Survivin 的蛋白表达水平^[11,21]。而黄芩苷能够降低 p-ERK1/2 蛋白表达水平,说明黄芩苷对鼻咽癌细胞 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路具有抑制作用。在 TGF- β 1/ERK 信号通路被激活后,黄芩苷对 TGF- β 1、p-ERK1/2、PCNA、Survivin 的抑制作用减弱了,同时黄芩苷抑制 CNE2 细胞增殖的能力被降低,而 LY3200882 组蛋白表达水平和增殖率均降低,与黄芩苷组作用趋势基本一致,说明黄芩苷可能作为 TGF- β 1 的抑制药物发挥抗鼻咽癌细胞增殖作用,提示黄芩苷抑制 CNE2 细胞增殖的作用可能是通过调控 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路实现的。

综上所述,本研究初步证实了黄芩苷能够抑制鼻咽癌细胞增殖,其部分作用机制是通过抑制 TGF- β 1/ERK1/2 信号通路,进而降低下游蛋白 PCNA、Survivin 的表达。

参考文献

[1] 邱前辉,高俊潇.鼻咽癌外科治疗的历史与现状及展望[J].中国耳鼻喉颅底外科杂志,2020,26(5):473-477.

[2] 王 姣,于 佳,胡万福,等.临床常用抗肿瘤中药的作用机制及抗肿瘤方剂分析[J].癌症进展,2020,18(9):884-886,900.

[3] 孔邦彦,魏立彬,郭青龙.黄芩苷的抗肿瘤作用研究进展[J].药理学报,2021,56(6):1537-1543.

[4] 刘梦珂,纪濛濛,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.

[5] WANG C, YANG Y L, SUN L N, et al. Baicalin reverses radioresistance in nasopharyngeal carcinoma by downregulating autophagy[J]. Cancer Cell International, 2020, 20(1): 1-8.

[6] 李 静,高 雪,李玉凤,等.黄芩苷对鼻咽癌荷瘤鼠抑瘤作用的实验研究[J].中医临床研究,2017,9(13):42-43.

[7] 陈兰玉,胡凯文.基于 TGF- β 信号通路探讨中医药改善肿瘤免疫微环境的研究进展[J].中国中医基础医学杂志,2020,26(11):1735-1738.

[8] 刘 婷.N-糖基化抑制通过调控 TGF β /smad 通路对鼻咽癌细胞恶性生物学行为的影响及其机制研究[D].广州:南方医科大学,2017.

[9] 沈 怡,强万敏.鼻咽癌病人同步放疗期间症状群的调查研究[J].护理研究,2017,31(31):3962-3966.

[10] 郭良芬,邱宝珊,黄 姿,等.中西医结合治疗对鼻咽癌患者生存质量的影响[J].新中医,2015,47(7):112-114.

[11] 王 林,吴翠芸,汪贤竹,等.黄芩苷对肺癌 A549 细胞自噬及上皮间质转化的影响[J].中国细胞生物学学报,2020,42(11):1960-1968.

[12] 肖 丹,钟 华,徐 岚,等.黄芩苷通过诱导 ROS 发生抑制人 T 细胞淋巴瘤的增殖并促进凋亡[J].肿瘤,2020,40(8):541-548.

[13] LIU J, HE L, HU J, et al. Isoimperatorin induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells via the MAPK/ERK1/2 signaling pathway[J]. Evidence Based Complementary and Alternative Medicine, 2020, 2020: 2138186.

[14] 周芳亮,胡 晶,蔺 婷,等.PI3K/Akt 信号通路在小檗碱联合人参皂苷 Rg3 诱导鼻咽癌细胞凋亡中的调控作用[J].中国药理学通报,2021,37(1):43-52.

[15] 明帮春,张书芳.鼻咽癌组织中 survivin 蛋白和 HIF-1 α 表达水平及临床意义[J].解放军医药杂志,2017,29(6):62-64,67.

[16] 徐茂林,陈晓华,孙 波.缺氧诱导因子-1 α 、生长素基因沉默对 CNE-2 鼻咽癌细胞放疗及凋亡敏感性的影响[J].中国免疫学杂志,2019,35(18):2249-2252,2257.

[17] 刘 洁,胡 晶,戴 娜,等.益气解毒方主要三萜类化合物抑制鼻咽癌 CNE2 细胞增殖效应的比较[J].湖南中医药大学学报,2019,39(11):1315-1320.

[18] 胡 晶,刘 洁,徐冰雁,等.益气解毒方对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖的影响[J].湖南中医药大学学报,2019,39(8):943-947.

[19] 胡 晶,刘 洁,徐冰雁,等.MAPK/ERK 信号通路在益气解毒方水提物诱导鼻咽癌细胞凋亡中的作用[J].中国药理学通报,2019,35(11):1613-1621.

[20] 陶 涛,汪国文,李其才,等.人参皂苷 Rg3 通过 TGF- β 1/ERK 信号通路调控原位荷瘤人肺癌裸鼠的淋巴管生成的机制[J].中国比较医学杂志,2019,29(11):34-40.

[21] ZHOU F L, HU J, DAI N, et al. Berberine and ginsenoside Rg3 act synergistically via the MAPK/ERK pathway in nasopharyngeal carcinoma cells[J]. Journal of Functional Foods, 2020, 66: 103802.