

· 药理 ·

汉黄芩素调控 Ywhaz 蛋白抑制结肠癌细胞增殖及侵袭转移

李瑶瑶^{1,2}, 王继军¹, 刘静², 郝臻凤², 张瑜¹, 侯亚颖¹,
李艳¹, 卜平¹, 孔桂美¹, 郁多男^{1*}

(1. 扬州大学医学院, 江苏省中西医结合老年病防治重点实验室, 江苏扬州 225009;
2. 泰兴市人民医院, 江苏泰兴 225400)

[摘要] 目的:探讨汉黄芩素对人结肠癌细胞 HCT116 和 HT29 细胞系的增殖、侵袭能力的影响,并研究汉黄芩素对酪氨酸 3/色氨酸 5-单加氧酶激活蛋白(Ywhaz)蛋白水平的影响。方法:体外培养 HCT116 和 HT29 细胞系,设空白组、汉黄芩素不同浓度组(浓度分别为 5,10,20,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用不同时间后,采用细胞计数试剂盒(CCK-8)法检测汉黄芩素对结肠癌细胞增殖的影响,并用 Annexin V-FITC/PI 双标后流式细胞仪检测结肠癌细胞的凋亡率;穿透小室(Transwell)小室法检测处理 24 h 后细胞侵袭和迁移力的变化;实时荧光定量-聚合酶链式反应(qPCR)检测不同浓度汉黄芩素作用 24 h 后 Ywhaz mRNA 的水平,并运用蛋白质免疫印迹(Western blot)检测该蛋白及其磷酸化水平。结果:与空白组比较,汉黄芩素可明显抑制结肠癌细胞系的增殖,具有浓度和时间依赖性,并促进结肠癌细胞系的凋亡率,其中 20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的汉黄芩素抑制细胞增殖作用显著($P < 0.01$),且不同浓度的汉黄芩素(10,20,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于结肠癌细胞后,明显降低肿瘤细胞的穿膜数($P < 0.05$, $P < 0.01$),汉黄芩素可下调 Ywhaz mRNA 水平和蛋白水平的表达,并降低 Ywhaz 的磷酸化水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:汉黄芩素可显著抑制 HCT116 和 HT29 细胞系的增殖、侵袭和迁移能力,并诱导细胞凋亡,其抗肿瘤机制可能与下调 Ywhaz 的蛋白水平及其蛋白的磷酸化水平有关。

[关键词] 汉黄芩素;结肠癌;增殖;侵袭;凋亡;迁移;酪氨酸 3/色氨酸 5-单加氧酶激活蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0097-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110097

Effect of Wogonin on Inhibiting Proliferation, Invasion and Migration of Colorectal Cancer Cells by Regulating Ywhaz Protein Expression

LI Yao-yao^{1,2}, WANG Ji-jun¹, LIU Jing², HAO Zhen-feng², ZHANG Yu¹,
HOU Ya-ying¹, LI Yan¹, BU Ping¹, KONG Gui-mei¹, YU Duo-nan^{1*}

(1. Medical College of Yangzhou University, Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Prevention and Treatment of Senile Diseases, Yangzhou 225009, China;
2. Taixing People's Hospital, Taixing 225400, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of wogonin on inhibiting the proliferation, migration and invasion of human colorectal cancer cells (HCT116 and HT29 cell lines), and investigate its effect on tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein (Ywhaz) expression levels. **Method:** HCT116 and HT29 cell lines were cultured *in vitro*, and then treated with wogonin of different concentrations (5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for various periods. Another blank group was also set up. Then the cell counting kit (CCK-8) was

[收稿日期] 20150709(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81272537);江苏省研究生创新工程项目(CXLX-1439);2014年泰兴市人民医院院级基金课题(try1401)

[第一作者] 李瑶瑶,在读博士,主治医师,从事中西医结合临床消化病学研究,Tel:15152488103,E-mail:lyy820708@126.com

[通讯作者] *郁多男,教授,博士生导师,从事肿瘤分子生物学与发育生物学研究,Tel:13222682112,E-mail:yzuyu@sina.com

used to detect the effect of wogonin on proliferation of colorectal cancer cells; Annexin V-FITC/PI double standard flow cytometry was used to detect the apoptosis of colorectal cancer cells; Transwell method was used to detect the cells migration and invasion capacities after 24 h treatment; Fluorescence real-time quantitative PCR method was used to detect mRNA expression levels of Ywhaz after 24 h treatment with different concentrations of wogonin, and their protein expression level and phosphorylation level were detected by Western blot assay. **Result:** As compared with blank group, wogonin significantly inhibited the proliferation of colorectal cancer cell lines in a dose-dependent manner, and promoted apoptosis of colorectal cancer cell lines; the inhibitory effect on cells proliferation was significant by 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ wogonin ($P < 0.01$). Moreover, different concentrations of wogonin (10, 20, 40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) could significantly reduce the number of transmembrane tumor cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$), down-regulate the protein and mRNA expression levels of Ywhaz and reduce the phosphorylation level of Ywhaz in HCT116 and HT29 cell lines ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Wogonin can significantly inhibit the proliferation, migration and invasion of HCT116 and HT29 cell lines and induce apoptosis. Its anti-tumor mechanism may be associated with down-regulating the protein expression of Ywhaz and its phosphorylation level.

[Key words] wogonin; colorectal cancer cells; proliferation; invasion; apoptosis; migration; tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein

越来越多的证据表明中药复方和中药单体有抗肿瘤活性,前期研究发现半枝莲黄酮类化合物有显著的抗肿瘤作用^[1]。汉黄芩素是半枝莲和黄芩的活性提取物,属于黄酮类化合物的一种。最近研究发现,汉黄芩素在胃癌、肺癌及神经细胞肿瘤等多种肿瘤中具有广泛的抗癌作用^[2-3],但对汉黄芩素抗肿瘤的分子机制及是否通过抑制酪氨酸 3/色氨酸 5-单加氧酶激活蛋白(Ywhaz)表达而发挥作用仍不清楚。本研究运用不同浓度的汉黄芩素作用于结肠癌细胞系 HCT116 和 HT29,探讨其对结肠癌细胞的增殖、凋亡、侵袭和转移能力的影响,检测汉黄芩素对 Ywhaz 蛋白及其磷酸化水平的影响,初步探讨汉黄芩素抑制结肠癌细胞的分子机制,为进一步开发抗肿瘤中药提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人结肠癌细胞系 HCT116 和 HT29 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药物及试剂 汉黄芩素(美国 Sigma 公司,批号 632-85-9);二甲基亚砜(DMSO,上海生工公司,批号 3496B599)溶解终质量浓度 $< 0.01 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存备用。DMEM 细胞培养基(美国 Gibco 公司,批号 NAD1367),胎牛血清(美国 Hyclone 公司,批号 113306),胰蛋白酶-乙二胺四乙酸(EDTA)混合液(美国 Gibco 批号,批号 1665739),细胞计数试剂盒(CCK-8)增殖检测试剂盒(美国 Biosharp 公司,批号 1213BS159),Annexin V-异硫氰酸荧光素(FITC,美国 BD 公司,批号 B148216),碘化丙啶(PI,美国 Sigma 公司,批号

MKBP1360V),人工基底膜(Matrigel)和穿透小室(Transwell)(美国 Corning 公司,批号分别为 356234,3422)。蛋白质免疫印迹(Western blot)抗体 Ywhaz 和 p-Ywhaz(Ser 58)(批号 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc-1019,sc-101623),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)二抗(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 3683,7074),Trizol 总 RNA 提取试剂(美国 Invitrogen 公司,批号 1382739),逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)及实时荧光定量 PCR 试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号 3101),所用的 PCR 引物 Ywhaz 和 GAPDH 由上海生工生物技术公司合成。

1.3 仪器 3111 型 CO_2 培养箱(美国 Thermo 公司),E6080 型全自动酶标分析仪(美国 Promage 公司),014BR96993 型垂直蛋白电泳装置(美国 Bio-Rad 公司),FACSCALTBUR 型流式细胞检测仪(美国 BD 公司),Fluorchemt 型蛋白化学发光成像系统(美国 AlphaView 公司),80i 型正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司),7500 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 实验用 HCT116 和 HT29 人结肠癌细胞系均培养于含 10% 胎牛血清, $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素和链霉素的 DMEM 培养液中, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱中培养,待细胞处于对数生长期时进行实验。

2.2 CCK-8 细胞增殖实验 取对数生长期 HCT116 和 HT29 细胞,细胞计数后稀释成密度为 6×10^4 个/mL 的细胞悬液,每孔 200 μL 接种于 96 孔板,培养

24 h 细胞贴壁后加入含不同浓度 (5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 汉黄芩素的溶液^[4]。并设空白组, 每组设 5 个复孔, 分别检测培养 24, 48, 72 h 后每孔加入 CCK-810 μL 试剂, 培养 4 h 后测定 450 nm 的吸光度 A_{450} , 根据回归方程求半抑制浓度 (IC_{50}), 并计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (1 - \text{药物组 } A_{490} / \text{对照组 } A_{490}) \times 100\%$$

2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡 HCT116 和 HT29 细胞系经不同浓度的汉黄芩溶液处理, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 培养箱培养 24 h, 按照试剂盒说明书方法, 胰酶消化收集 1×10^6 个细胞, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗后弃去上清, 100 μL 结合缓冲液重悬, 每管加入 Annexin V-FITC 4 μL , PI 染液 5 μL , 避光孵育 15 min 后流式细胞仪检测, 计算凋亡率。

$$\text{凋亡率} = \text{凋亡的细胞数} / \text{总细胞数} \times 100\%$$

2.4 Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移力 Matrigel 稀释液包被、水化 Transwell 小室底部膜。无血清培养液将细胞密度调整至 5×10^5 个/mL, 加 200 μL 到上室, 加含 20% 胎牛血清的培养液 500 μL 到下室。分别加入不同终浓度汉黄芩素 (5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理细胞, 每种浓度设 3 个复孔, 细胞培养 12 h 后, 取出 Transwell 小室, PBS 洗 2 遍, 棉签擦去上室表面细胞, 甲醇固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 30 min, 在高倍镜下计数小室膜下面侵袭的细胞数, 计数中间和四周 5 个视野, 取平均值。迁移实验不铺 Matrigel, 其余步骤同侵袭实验。

2.5 Western blot 检测 Ywhaz 蛋白和磷酸化水平 将 1.5×10^5 个 HCT116 和 HT29 细胞种植于 6 孔板, 细胞贴壁后加入不同终浓度汉黄芩素继续培养 24 h, 弃去培养液, 加入蛋白裂解液 (RIPA) 提取全细胞蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样品 20 μg 进行多聚丙酰胺凝胶 (PAGE) 电泳, 5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h 后加入一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 用洗膜缓冲液 (TBST) 洗涤 3 次, 二抗 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, TBST 缓冲液洗涤 3 次, 增强型化学发光试剂 (ECL) 发光, 采集图像和 ImageJ 分析数据。

2.6 实时荧光定量 PCR 检测 Ywhaz 的 mRNA 的表达 不同终浓度的汉黄芩素 (5, 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理结肠癌细胞 24 h 后, 收集细胞, Trizol 提取总 RNA 并进行 cDNA 合成。实时荧光定量 PCR 检测 Ywhaz 的 mRNA 水平。应用于 PCR 的 Ywhaz 引物上游为 5'-AGGAGCCCGTAGGTCATCTT-3', 引物下游为 5'-TGCTTGTGAAGCATTGGGA-3', 片段长度 184 bp; GAPDH 上游引物为 5'-

AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC-3', 下游引物为 5'-GGGGTCATTGATGGCAACAATA-3', 片段长度 101 bp。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 持续 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 40 个循环, 根据循环阈值 (C_t) 计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 用于分析基因的相对表达水平。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件数据分析, 数据统计以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 单因素两均数的比较采用 t 检验, 多均数的比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 汉黄芩素抑制结肠癌细胞系 HCT116 和 HT29 的增殖作用 与空白组比较, 随着汉黄芩素浓度的增高, 对细胞的增殖能力出现不同程度的抑制作用 ($P < 0.05, P < 0.01$), 抑制效应呈现时间和浓度依赖性。根据汉黄芩素对结肠癌细胞增殖的抑制率, 经回归方法计算出在 24, 48, 72 h 的 IC_{50} 分别为 38.78, 41.02, 39.03 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。见表 1, 2。

表 1 汉黄芩素抑制 HCT116 结肠癌细胞系的增殖作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of wogonin on proliferation of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A		
		24 h	48 h	72 h
空白	-	0.65 \pm 0.03	0.69 \pm 0.04	0.64 \pm 0.02
汉黄芩素	5	0.64 \pm 0.02	0.66 \pm 0.03	0.61 \pm 0.02
	10	0.58 \pm 0.01 ¹⁾	0.56 \pm 0.02 ¹⁾	0.53 \pm 0.02 ¹⁾
	20	0.41 \pm 0.02 ²⁾	0.43 \pm 0.02 ²⁾	0.44 \pm 0.01 ²⁾
	40	0.31 \pm 0.01 ²⁾	0.30 \pm 0.02 ²⁾	0.29 \pm 0.02 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4, 图 1~3 同)。

表 2 汉黄芩素抑制 HT29 结肠癌细胞系的增殖作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

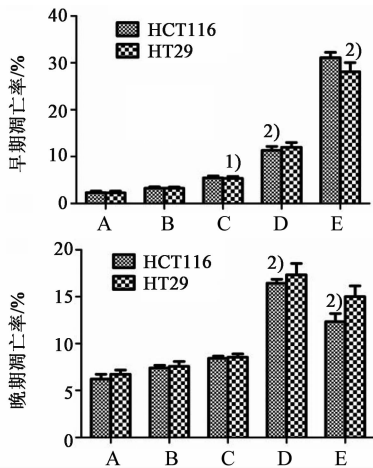
Table 2 Effects of wogonin on proliferation of HT29 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A		
		24 h	48 h	72 h
空白	-	0.66 \pm 0.02	0.67 \pm 0.03	0.69 \pm 0.02
汉黄芩素	5	0.65 \pm 0.01	0.64 \pm 0.02	0.62 \pm 0.02
	10	0.56 \pm 0.03 ¹⁾	0.58 \pm 0.02 ¹⁾	0.53 \pm 0.01 ¹⁾
	20	0.42 \pm 0.02 ²⁾	0.44 \pm 0.02 ²⁾	0.41 \pm 0.02 ²⁾
	40	0.28 \pm 0.02 ²⁾	0.30 \pm 0.03 ²⁾	0.32 \pm 0.02 ²⁾

3.2 不同浓度汉黄芩素促进结肠癌细胞凋亡的影响 与空白组比较, 汉黄芩素在浓度 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开始出现明显的促进凋亡作用 ($P < 0.05$), 浓度达到 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时作用更显著 ($P < 0.01$)。见图 1。

3.3 对结肠癌细胞系 HCT116 和 HT29 的侵袭和转移能力的影响 Transwell 小室检测发现不同药物浓度组的汉黄芩素透膜细胞数较空白组明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$), 随着汉黄芩素的浓度增加, 抑

制作用呈明显浓度依赖性。见表 3,4。



A. 空白组; B. 汉黄芩素 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. 汉黄芩素 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; D. 汉黄芩素 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. 汉黄芩素 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 (图 2,3 同)
图 1 汉黄芩素对 HCT116 和 HT29 细胞系 24 h 的早期和晚期凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig.1 Effects of wogonin on early and late apoptosis of HCT116 and HT29 cell lines ($\bar{x} \pm s, n=5$)

表 3 汉黄芩素对 HCT116 细胞系侵袭和转移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 3 Effects of wogonin on migration and invasion of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭透膜细胞数	迁移透膜细胞数
空白	-	68.50 ± 8.01	62.30 ± 9.45
汉黄芩素	5	$53.60 \pm 7.35^{1)}$	$50.45 \pm 7.37^{1)}$
	10	$39.50 \pm 5.23^{2)}$	$37.50 \pm 4.96^{2)}$
	20	$23.80 \pm 2.87^{2)}$	$27.50 \pm 3.87^{2)}$
	40	$15.63 \pm 3.84^{2)}$	$13.55 \pm 2.23^{2)}$

表 4 汉黄芩素对 HT29 细胞系侵袭和转移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effects of wogonin on migration and invasion of HT29 cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭透膜细胞数	迁移透膜细胞数
空白	-	70.42 ± 6.99	72.44 ± 5.43
汉黄芩素	5	68.45 ± 7.21	69.87 ± 5.76
	10	$52.32 \pm 4.19^{1)}$	$50.21 \pm 4.15^{1)}$
	20	$42.36 \pm 4.87^{2)}$	$38.43 \pm 5.26^{2)}$
	40	$30.56 \pm 3.27^{2)}$	$28.63 \pm 6.16^{2)}$

3.4 对结肠癌细胞系 Ywhaz mRNA 水平的表达的影响 与空白组比较,当汉黄芩素浓度 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,可明显下调 Ywhaz 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05$),随着作用浓度的升高, $20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 可显著下调 Ywhaz mRNA 表达水平 ($P < 0.01$)。见图 2。

3.5 对结肠癌细胞系 Ywhaz 蛋白水平的表达的影响 与空白组比较,在 HCT116 细胞系中汉黄芩素

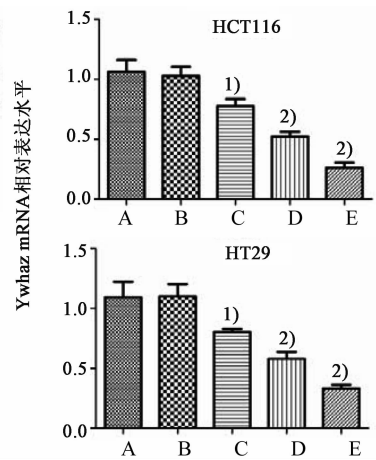


图 2 汉黄芩素对 HCT116 和 HT29 细胞系 Ywhaz 的 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig.2 Effects of wogonin on expression of Ywhaz mRNA level in HCT116 and HT29 cell lines ($\bar{x} \pm s, n=5$)

浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, Ywhaz 蛋白水平及其磷酸化表达水平均无明显变化,随着汉黄芩素浓度的升高,可明显下调 Ywhaz 及其磷酸化的蛋白表达水平 ($P < 0.05, P < 0.01$); 在 HT29 细胞系中汉黄芩素浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,即出现 Ywhaz 蛋白水平及其磷酸化表达水平下调,随着汉黄芩素浓度的升高,下调 Ywhaz 蛋白及其磷酸化表达水平程度更加显著 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3。

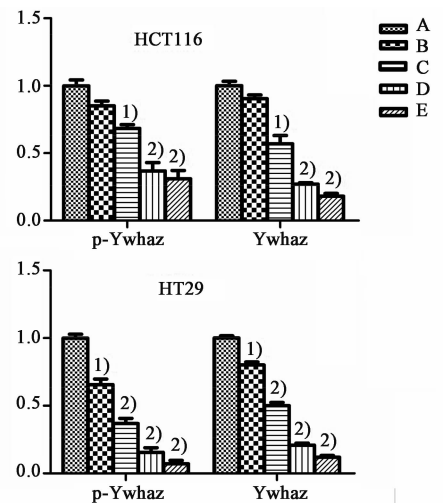


图 3 不同浓度汉黄芩素对 HCT116 和 HT29 细胞系 Ywhaz 及其磷酸化蛋白水平表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig.3 Effects of wogonin on expression of Ywhaz protein and phosphorylated protein level in HCT116 and HT29 cell lines ($\bar{x} \pm s, n=5$)

4 讨论

结肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤。最新统计发现在北美洲、欧洲以及亚洲等国家,结肠癌发病率仅次于肺癌、乳腺癌,位居前三位,且结肠癌的 5

年生存率仍较低^[5], 严重威胁人类健康。在我国由于不良饮食习惯的形成, 以及生活环境的恶化, 结肠癌的发病年龄呈现年轻化的趋势^[6]。如何提高结肠癌的生存率, 提高患者生存质量迫在眉睫^[7-9]。近年来, 传统中药已经成为抗肿瘤药物的研究热点, 已发现南蛇藤、苦参碱等多种中药的活性提取物在多种肿瘤的发生发展过程中起到重要的抑制作用^[10-11]。笔者前期研究已证实半枝莲提取物及含药血清可抑制肿瘤细胞的增殖和血管生成^[1,12], 汉黄芩素作为半枝莲和黄芩的活性提取物, 同样在胃癌、肺癌以及神经系统等多种肿瘤中发挥明确抗肿瘤作用, 可起到抑制肿瘤的血管生成、肿瘤细胞的增殖, 并促进细胞的凋亡^[4]。

本研究证实汉黄芩素可起到抑制结肠癌细胞系 HCT116 和 HT29 细胞的增殖、侵袭和转移能力, 且作用呈浓度和时间依赖性。同时, 汉黄芩素可促进该肿瘤细胞系的凋亡, 并有一定的剂量依赖性。由此笔者推测, 汉黄芩素在人类结肠癌的发生发展中发挥重要的抑制作用。Ywhaz 蛋白属于 14-3-3 蛋白家族, 是一种重要的抑制凋亡因子^[13], 主要分布在胞浆中, 具有重要的调节功能, 参与多种细胞信号通路的调节, 参与调控细胞增殖、黏附、信号转导和凋亡。研究表明 Ywha2 在胃癌、肺癌、乳腺癌、神经胶质瘤及宫颈癌等多种肿瘤组织中呈现高表达, 促进肿瘤的发生发展和转移, 抑制 Ywha2 的表达及其磷酸化水平后可提高肿瘤的放疗敏感性, 并促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤转移等^[14-16]。本研究发现, 不同浓度的汉黄芩素作用结肠癌 HCT116 和 HT29 细胞系 24 h 后, Ywhaz 蛋白和 mRNA 水平均明显下降, 且降低该蛋白的磷酸化水平, 其抑制作用呈浓度依赖性。由此笔者推测, 汉黄芩素可通过抑制 Ywhaz 蛋白的表达及其磷酸化, 起到抑制结肠癌细胞系增殖、侵袭和转移的作用, 这可能是汉黄芩素发挥抗肿瘤作用的作用机制之一。

本研究表明汉黄芩素具有明确的抑制结肠癌细胞系增殖、侵袭和转移的能力, 其可能的作用机制之一是通过抑制 Ywhaz 蛋白的表达及其磷酸化。但在结肠癌的发生发展过程中, 汉黄芩素是否可通过其他通路起到抗肿瘤作用, 目前尚不清楚, 需要更深入的研究。此外, 课题组前期研究已表明汉黄芩素在体内可以通过调节免疫系统从而发挥抑制胃癌荷瘤发生发展的活性^[4], 而在结肠癌荷瘤的发生发展中汉黄芩素是否能在体内发挥出同样的抗肿瘤活性, 仍需要进一步探讨。

[参考文献]

- [1] 徐敏, 卜平, 李瑶瑶. 半枝莲黄酮类化合物对体外肿瘤血管生成的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(20): 2215-2219.
- [2] 石文建, 赵喜庆, 杨利辉, 等. 中药对胶质瘤作用研究进展[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2011, 10(3): 287-288.
- [3] 孙健, 张扬, 温庆辉, 等. 汉黄芩素对人肺腺癌 SPC-A-1 细胞增殖和周期的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(18): 169-173.
- [4] Xiao W, Wu K, Yin M, et al. Wogonin inhibits tumor-derived regulatory molecules by suppressing STAT3 signaling to promote tumor immunity [J]. J Immunother, 2015, 38(5): 167-184.
- [5] May M. Statistics: Attacking an epidemic [J]. Nature, 2014, 509(7502): S50-S51.
- [6] 陆再英, 钟南山, 赵磊. 内科学[M]. 7 版. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 420-421.
- [7] Poste G. Bring on the biomarkers [J]. Nature, 2011, 469(7329): 156-157.
- [8] Poste G, Carbone D P, Parkinson D R, et al. Leveling the playing field: bringing development of biomarkers and molecular diagnostics up to the standards for drug development [J]. Clin Cancer Res, 2012, 18(6): 1515-1523.
- [9] Kerr D J, Shi Y. Biological markers: Tailoring treatment and trials to prognosis [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2013, 10(8): 429-430.
- [10] 朱耀东, 钱亚云, 马慧, 等. 南蛇藤总萜对 MGC-803 细胞侵袭和迁移能力的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(22): 180-183.
- [11] 员林, 张华, 钱亚云, 等. 南蛇藤提取物含药血清对小鼠肝癌 Hepal-6 细胞的增殖能力和 VEGF-c 表达水平的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(11): 157-161.
- [12] 张妮娜, 卜平, 朱海杭, 等. 半枝莲抑制肿瘤血管生成的作用及其机制研究 [J]. 癌症: 英文版, 2005, 24(12): 1459-1463.
- [13] Fu H, Subramanian R R, Masters S C. 14-3-3 proteins: structure, function, and regulation [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000, 40(1): 617-647.
- [14] Yang X, Cao W, Zhang L, et al. Targeting 14-3-3zeta in cancer therapy [J]. Cancer Gene Ther, 2012, 19(3): 153-159.
- [15] Matta A, Siu K W, Ralhan R. 14-3-3 zeta as novel molecular target for cancer therapy [J]. Expert Opin Ther Targets, 2012, 16(5): 515-523.
- [16] Matta A, DeSouza L V, Ralhan R, et al. Small interfering RNA targeting 14-3-3 ζ increases efficacy of chemotherapeutic agents in head and neck cancer cells [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9(10): 2676-2688.

[责任编辑 周冰冰]