

黄芩素对人肺腺癌 A549 细胞的药效作用及机制探讨

曹慧娟^{1,2}, 李君³, 孙淑军⁴, 房军伟², 王洋², 张永煜^{2*}, 毛文伟^{5*}

(1. 华北理工大学 中医学院, 河北 唐山 063000; 2. 上海中医药大学 中医方证与系统生物学研究中心, 上海 201203; 3. 上海市东方肝胆外科医院, 上海 200438;
4. 上海通微分析技术有限公司, 上海 201203;
5. 上海交通大学 药学院, 上海 200240)

[摘要] 目的:研究黄芩素对 A549 细胞增殖、侵袭、迁移,对人脐静脉血管内皮细胞(HUVEC)血管形成的影响;观察其体内对裸鼠移植瘤的作用,通过代谢组学探讨其抑瘤机制。方法:体外实验,噻唑蓝(MTT)法检测黄芩素对 A549 细胞生长的影响;transwell 小室法观察黄芩素对 A549 细胞侵袭及迁移的影响;小管生成实验观察黄芩素对 HUVEC 新生血管形成的影响。体内实验,移植瘤裸鼠分为模型组、顺铂组、黄芩素(50,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组,观察黄芩素对移植瘤的干预作用;气相色谱/质谱法对黄芩素干预后裸鼠血清样本进行代谢组学分析,寻找差异性代谢物及代谢通路。结果:黄芩素能抑制 A549 细胞生长,24,48,72 h 的 IC_{50} 分别为 43.02,31.11,28.42 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。黄芩素(5,10,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能抑制 A549 细胞的侵袭及迁移。黄芩素(10,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能抑制 HUVEC 官腔样结构的形成($P < 0.05$)。黄芩素(50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)对移植瘤具有抑制作用;代谢组学方法检测到黄芩素组血清中差异性代谢物 14 种,代谢通路 7 条。结论:黄芩素可抑制 A549 细胞增殖、侵袭、迁移及 HUVEC 官腔样结构形成,体内对移植瘤生长具有抑制作用;黄芩素干预后,血清中氨基酸、碳水化合物、能量代谢等多条代谢通路发生变化,这些变化可能是其抗肿瘤的作用机制。

[关键词] 黄芩素; A549 细胞; 增殖; 侵袭; 迁移; 血管生成; 移植瘤; 代谢组学

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)02-0098-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017020098

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161107.1515.046.html>

[网络出版时间] 2016-11-07 15:15

Pharmacodynamic Effect and Mechanism of Baicalein on Lung Adenocarcinoma A549 Cells

CAO Hui-juan^{1,2}, LI Jun³, SUN Shu-jun⁴, FANG Jun-wei², WANG Yang²,
ZHANG Yong-yu^{2*}, MAO Wen-wei^{5*}

(1. *Traditional Chinese Medicine (TCM) College, North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China*; 2. *Center for TCM and Systems Biology, Shanghai University of TCM, Shanghai 201203, China*; 3. *Department of Hepatobiliary surgery, the East of Shanghai City Hospital, Shanghai 200438, China*;
4. *Unimicro Technologies Inc., Shanghai 201203, China*;
5. *School of Pharmacy, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China*)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of baicalein on the proliferation, invasion and migration of

[收稿日期] 20160310(018)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81373519);上海市科技创新行动计划项目(13401900306);华北理工大学博士科研课题启动基金项目(25758399)

[第一作者] 曹慧娟,博士,讲师,从事中医药防治肿瘤、认知障碍的基础研究工作,Tel:031-53725048,E-mail:116356449@qq.com

[通讯作者] *张永煜,博士,教授,博士生导师,从事中药活性物质、体内代谢研究,Tel:021-51322748,E-mail:dryyz@sina.com;

*毛文伟,博士,副教授,从事肿瘤治疗研究,Tel:13262242761,E-mail:wmmao@sytu.edu.cn

A549 cells, and investigate its effects on vascularization of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), as well as the antitumor effect of baicalein on A549 cell xenografts *in vivo*, and the antitumor mechanism of baicalein by the method of serum metabolomics. **Method:** *In vitro*, the thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the effect of baicalein on A549 cells proliferation. The effect of baicalein on invasion and migration of A549 cells were detected by transwell assay. The anti-angiogenic effect of baicalein on HUVEC was detected by tubule formation experiment. *In vivo*: anti-tumor efficacy of baicalein was evaluated in nude mice models of human lung cancer xenograft. The nude mice were divided into model group, cisplatin group, and baicalein groups (50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). The serum samples from nude mice were subjected to metabolomics analysis after baicalein treatment by using gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), looking for the differential metabolites and related metabolic pathways. **Result:** The growth of A549 cells was significantly inhibited by different concentrations of baicalein, and the 50% concentration of inhibition (IC_{50}) of baicalein were 43.02, 31.11, 28.42 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ respectively at 24 h, 48 h and 72 h. Different concentrations of baicalein (5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could inhibit the invasion and migration abilities of A549 cells. Baicalein (10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) could inhibit the tubule structure formation of HUVEC ($P < 0.05$). The growth of A549 cell xenograft was inhibited by baicalein (50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) *in vivo*. A total of 14 differential metabolites and 7 related metabolic pathways in the serum were found after intervention with baicalein. **Conclusion:** Baicalein could inhibit the proliferation, invasion and migration of A549 cells and the tubule formation of HUVEC *in vitro*, with inhibitory effect on the growth of A549 cell xenograft. The changed metabolic pathways in the baicalein group including amino acid metabolism, carbohydrate metabolism and energy metabolism in the serum were found, and the antitumor mechanism of baicalein maybe relevant to these metabolic pathways.

[**Key words**] baicalein; A549 cells; proliferation; invasion; migration; angiogenesis; xenograft; metabolomics

肺癌的发病率与死亡率均呈上升趋势^[1], 癌症的预防和治疗已成为临床迫切需要解决的问题之一^[2]。手术或放化疗虽然能够控制肿瘤进展, 但副作用较大, 寻找副作用小且具有确切疗效的药物尤为重要。黄芩素是中药黄芩的主要黄酮成分之一, 研究报道显示, 黄芩素在抗肿瘤作用方面具有一定的效果, 并逐渐成为研究热点^[3-4]。研究报道黄芩素对喉癌^[5], 食管癌^[6]具有生长抑制作用, 其机制主要为影响花生四烯酸系统代谢、抑制肿瘤细胞增殖、清除活性氧^[7], 逆转肿瘤细胞多耐药性、诱导肿瘤细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成及增强化疗敏感性等方面^[8]。大部分研究者主要从基因、蛋白水平阐述黄芩素抗肿瘤的作用机制。本文重点从黄芩素对 A549 细胞增殖、侵袭、迁移、血管生成及体内对 A549 细胞移植瘤的作用方面进行探讨, 并应用气相色谱/质谱法, 通过血清代谢组学方法对其进行药效评价, 以期从整体上研究黄芩素抗肺癌的作用机制, 为其应用于肺癌的实验研究及临床应用提供药理学依据。

1 材料

1.1 主要材料和试剂 人非小细胞肺 A549 细胞购自中科院细胞库; 人脐静脉血管内皮细胞 HUVEC

由上海中医药大学穆拉德实验中心惠赠; 黄芩素 (南京泽朗医药科技有限公司, 纯度 97.98%) ; 噻唑蓝 (MTT, Sigma 公司, 批号 MKB06849V) ; Matrigel 基质胶 (BD 公司, 批号 356234) ; *N-O*-双(三甲硅基)三氟乙酰胺 (BSTFA + 1% TMCS, Sigma-Aldrich 公司, 批号 LC00975) ; L-2-氯苯丙氨酸 (上海瀛正科技有限公司, 批号 060507)。黄芩素用二甲亚砜 (DMSO) 配制成 100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的贮存液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 临用时以 DMEM 培养基稀释。

1.2 动物 BALB/C (nu/nu) 无胸腺裸鼠 32 只, 雌性, SPF 级, 5~6 周龄, 体重 18~22 g, 购自中科院, 合格证号 SCXK (京) 2012-0002。由上海中医药大学实验动物中心提供无特殊病原体 (SPF) 饲养环境。

1.3 仪器 CKX41 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司), Powerwave XS 型酶标仪 (中国基因有限公司), 6890/5975B 型气相色谱/质谱联用仪 (美国 Agilent 科技有限公司), L-128 型氮吹浓缩仪 (北京来亨科贸有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 A549 细胞常规培养于 10% 小牛

血清中, $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素、链霉素的 DMEM 培养基, 取对数生长期细胞用于实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖 调整 A549 细胞密度为 1×10^4 个/mL, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 1 mL, 细胞贴壁后, 实验组加入不同浓度的黄芩素 ($10, 20, 40, 80, 160 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), 同时设空白组, 每个浓度设 5 个复孔。37 °C 5% CO_2 饱和湿度下分别培养 24, 48, 72 h, 加入 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL , 继续孵育 4 h, 弃上清, 加入 DMSO 200 μL , 振荡 10 min 后, 在酶标仪 490 nm 波长处测定吸收度 A , 计算生长抑制率 (IR)。计算半数抑制浓度 (IC_{50})。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (1 - A_{\text{药物组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.3 transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力 稀释后的 Matrigel 基质胶 30 μL 包被 transwell 小室, 37 °C 孵育 30 min, 调整细胞密度为 2×10^5 个/mL, 按分组情况上室加入 5, 10, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的黄芩素单细胞悬液, 下室加入含 10% 血清的 DMEM 培养液 600 μL , 37 °C 5% CO_2 培养 24 h。具体步骤按照说明书操作。

$$\text{侵袭抑制率} = (1 - \text{侵袭细胞数}_{\text{药物组}} / \text{侵袭细胞数}_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.4 transwell 迁移实验检测细胞迁移能力 迁移实验方法同 2.3 项, 但 transwell 小室底部膜的内表面上未铺 Matrigel 基质胶。

$$\text{迁移抑制率} = (1 - \text{迁移细胞数}_{\text{药物组}} / \text{迁移细胞数}_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.5 小管生成实验检测新生血管形成情况 预冷的 96 孔板中加入 Matrigel 基质原胶 50 μL , 放置 37 °C, 1 h 后聚合成胶, 将 HUVEC 细胞悬液调整细胞密度为 2×10^5 个/mL, 接种于铺有 Matrigel 胶的 96 孔板中, 100 μL /孔, 设立空白组和黄芩素组, 药物组加入含药培养液 100 μL , 空白组加入不含药的 100 μL 培养液。放置于 37 °C 5% CO_2 培养箱中培养 24 h, 倒置显微镜下观察 HUVEC 小管的形成情况, 每组设 3 个平行孔。

2.6 裸鼠移植瘤实验检测黄芩素对移植瘤生长的影响 A549 细胞悬液调细胞密度为 5×10^7 个/mL, 取 1 mL, 在裸鼠右腋窝皮下接种, 待移植瘤生长至一定体积时将裸鼠随机分为模型组、顺铂组、黄芩素高、低剂量组, 每组 8 只。模型组灌胃等量 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na), 顺铂组按照 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射给药, 每日 1 次, 连续 10 d。黄芩素高、低剂量组用 0.5% CMC-Na 溶解后分别按 100, 50 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 每日 1 次, 10 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 连续

21 d。每间隔 2 d 用电子游标卡尺测量肿瘤体积, 绘制移植瘤生长曲线。最后 1 次给药后 24 h 以脱颈椎方式处死并解剖裸鼠, 剥取肿瘤用于实验。

2.7 移植瘤裸鼠的血清代谢组学检测 所有裸鼠处死前眼眶取血, 血液离心取上清液存放于 -80 °C 保存。实验前 1 h 取出解冻, 摇匀后进行三甲基氯硅烷 (TMCS) 衍生化处理, 衍生化完成后待进样。取衍生化萃取样本 1 μL 进行气相质谱联用分析。气相色谱、质谱条件与本课题组其他研究一致^[9], 升温程序见表 1。

表 1 GC-MS 色谱柱温箱升温程序

Table 1 Temperature program of column incubator in GC-MS

升温速率/ $^{\circ}\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$	温度/ $^{\circ}\text{C}$	恒温/min
-	70	2
5	120	0
3	190	0
5	210	0
10	260	0
5	290	0

2.8 统计学分析 体外及体内移植瘤数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据两两比较采用 t 检验, 多组之间的比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

血清代谢组学原始数据经 Agilent MSD 工作站自带软件转化为 NetCDF 格式, 导入 R 软件, 采用 XCMS 工具箱处理。将处理得到的三维矩阵经过中心化、标准化后导入 SIMCA-P11.5 软件进行主成分分析 (PCA) 和偏最小二乘法判别分析法 (PLS-DA), 考察血液样本总体代谢谱图分布状况, 观察样品的聚集、离散及离群点。为了鉴别各组间对代谢轮廓贡献较大的差异变量, 采用正交偏最小二乘法判别分析法 (OPLS) 来寻找与肺癌最相关的差异变量, 权重系数 VIP 值越大, 表明对模型的贡献越大, 采用 $\text{VIP} > 1.5$ 为阈值选择多维统计上的差异变量。采用 Mann-Whitney U 检验对所得差异代谢物进行分析, 选择 $P < 0.05$ 的差异物, 同时满足 $\text{VIP} > 1.5$ 和单维统计 $P < 0.05$ 的代谢物, 认为是最终差异代谢物。通过 NIST 谱库和标准品的检索和确认, 即为差异性代谢物。通过 KEGG (<http://www.genome.jp/kegg>) 和 HMDB (<http://www.hmdb.ca>) 数据库检索代谢物代谢通路, 通过 Metabolites Biological Role (<http://csbg.cnbc.csic.es/mbrole/index.jsp>) 分析, 确定代谢通路。

3 结果

3.1 黄芩素体外抑制 A549 细胞的增殖 浓度为 10 ~ 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的黄芩素作用于 A549 细胞 24, 48, 72 h 后, 随着黄芩素浓度的增加, 细胞的生长抑制率逐渐升高, 黄芩素 24, 48, 72 h 的 IC_{50} 分别为 43.02, 31.11, 28.42 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果表明黄芩素可以抑制 A549 细胞的生长和增殖。见图 1。

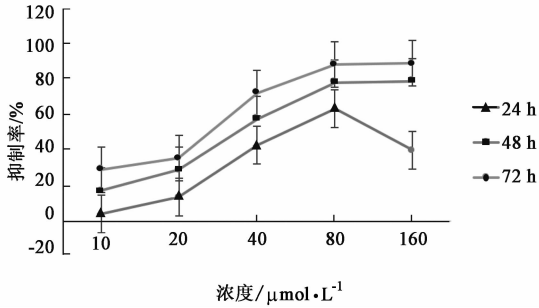


图 1 黄芩素对 A549 细胞增殖抑制的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Fig. 1 Proliferation inhibition curve of baicalein in A549 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 黄芩素对 A549 细胞侵袭及迁移能力的影响 侵袭实验表明, 与空白组比较, 黄芩素浓度为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 侵袭细胞数明显减少 ($P < 0.05$); 当剂量增至 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 侵袭细胞数目显著减少 ($P < 0.01$)。24 h 的侵袭抑制率分别为 32.9%, 51.1%, 57.8%。迁移实验表明, 与空白组比较, 黄芩素浓度为 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 迁移细胞数明显减少 ($P < 0.05$); 当浓度为 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 迁移细胞

数显著减少 ($P < 0.01$)。迁移抑制率分别为 48.9%, 52.5%, 69.0%。表明黄芩素可以抑制 A549 细胞的侵袭及迁移。小管生成实验中, 与空白组比较, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素组小管数显著减少 ($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 黄芩素对 A549 细胞侵袭、迁移细胞数及对 HUVEC 各组小管形成数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of baicalein on invasion and migration of A549 cells and tubular formation number of HUVEC ($\bar{x} \pm s, n = 3$) 个

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭细胞数	迁移细胞数	小管形成数
空白	-	58 ± 14	43 ± 4	39 ± 2
黄芩素	5	39 ± 5 ¹⁾	22 ± 7 ¹⁾	30 ± 3
	10	28 ± 2 ²⁾	21 ± 4 ¹⁾	25 ± 8 ²⁾
	20	25 ± 2 ²⁾	13 ± 3 ²⁾	13 ± 2 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 黄芩素对裸鼠移植瘤生长的作用 第 12 天时, 黄芩素高、低剂量组移植瘤体积开始减小, 但无统计学意义, 第 21 天时, 黄芩素高、低剂量组与模型组比较移植瘤体积显著减小 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 顺铂组移植瘤体积从第 12 天开始减小, 一直持续到 21 d ($P < 0.05, P < 0.01$)。黄芩素高、低剂量组裸鼠体重从开始用药到用药结束无明显变化。与模型组比较, 顺铂组在给药第 9, 12 天动物体重减轻 ($P < 0.05, P < 0.01$), 第 15 ~ 21 天动物体重逐渐恢复。见表 3。

表 3 黄芩素对 A549 移植瘤体积及体重的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of baicalein on the size and weight of A549 cell xenograft ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

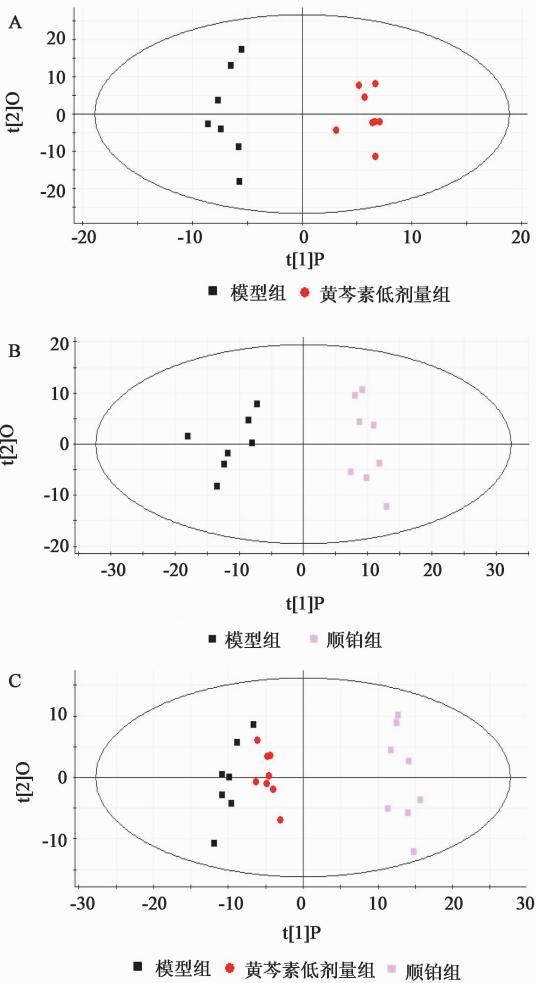
组别	剂量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	肿瘤体积/ mm^3			裸鼠体重/g			
		12 d	18 d	21 d	9 d	12 d	18 d	21 d
模型	-	878.19 ± 196.74	1 379.72 ± 342.18	1 944.77 ± 404.48	22.50 ± 1.31	22.00 ± 2.83	22.13 ± 2.95	22.00 ± 2.93
黄芩素	50	704.20 ± 201.68	1 059.76 ± 311.28	1 161.62 ± 354.17 ²⁾	22.13 ± 0.99	21.88 ± 1.25	21.88 ± 1.13	22.25 ± 1.04
	100	721.55 ± 208.79	1 272.23 ± 516.93	1 296.97 ± 562.22 ²⁾	22.50 ± 0.76	22.13 ± 1.25	22.25 ± 1.04	22.13 ± 1.13
顺铂	1	655.26 ± 300.04 ¹⁾	901.59 ± 374.55 ¹⁾	1 077.92 ± 332.42 ²⁾	20.25 ± 1.49 ¹⁾	20.00 ± 1.51 ²⁾	21.50 ± 1.41	21.25 ± 1.49

注: 与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.4 黄芩素对移植瘤裸鼠的血清代谢组学的影响 基于血清代谢图谱的 OPLS 分析, 可以最大化凸显模型内部不同组别之间的差异, 以便找出贡献于组间分离的主要差异性物质。图 2 (A, B) 中可以明显看出模型组与各用药组之间的分离趋势。图 2 (C) 中可以发现顺铂组离模型组最远, 其次是黄芩素低剂量组, 这与体内抑瘤实验中顺铂组效果最好, 而黄芩素低剂量组结果次之的实验结果相一致。

由于这两组的抑瘤效果较好, 本研究将这两组的差异性代谢物和相关代谢通路进行分析, 以探讨其抑瘤作用机制。

与模型组比较, 黄芩素低剂量组发现了 14 个差异性代谢物, 其中除乙二酸、巯基乙酸、油酸、丁酸、苯胺外, 大部分的差异性代谢物 (*L*-谷氨酰胺, 丁二酸, *L*-酪氨酸, 磷酸等) 水平表现为下调; 与模型组比较, 顺铂组发现了 16 个差异性代谢物, 包括磷酸,



A. 模型组与黄芩素低剂量组比较; B. 模型组与顺铂组比较; C. 模型组与各用药组比较

图 2 模型组与各用药组 OPLS 模型得分

Fig. 2 Score of OPLS in model group and the treatment groups

L-赖氨酸, L-天门冬氨酸, 鸟氨酸, L-酪氨酸, L-缬氨酸, L-苏氨酸等水平全部表现为下调。差异性代谢通路的结果中, 与模型组比较, 发现黄芩素低剂量组差异性代谢通路有 7 条, 主要涉及氨基酸代谢、碳水化合物、能量代谢等; 顺铂组差异性代谢通路有 14 条, 9 条为氨基酸代谢通路, 占了绝大部分, 其余的为能量代谢、维生素代谢、转录过程等。

4 讨论

我国肺癌死亡已居恶性肿瘤首位, 5 年生存率很低, 约为 10% ~ 15%^[10]。前期研究中发现黄芩苷对 A549 细胞增殖、侵袭、迁移等方面均有抑制作用。黄芩素的药理作用是否有别于黄芩苷, 两者发挥药理作用的有效浓度或有效剂量还有待进一步确定^[11]。本研究探讨了黄芩素体内外对肺癌的干预作用, 并通过血清代谢组学的方法对其药效进行评价, 分析其抗肿瘤的作用机制, 为治疗肺癌的药物

筛选提供实验依据。研究发现黄芩素在人乳腺癌细胞中具有抑制其增殖和侵袭转移的作用^[12]。结果表明, 黄芩素各浓度组对 A549 细胞生长和增殖具有抑制作用, 呈现剂量和时间依赖性。细胞侵袭及迁移实验发现, 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素可以抑制 A549 细胞的侵袭及迁移。黄芩素对 A549 细胞迁移的影响要强于对细胞侵袭的影响, 提示黄芩素具有抑制肿瘤细胞转移的作用。Miocinouic 等^[13] 的研究结果显示, 黄芩素通过降低细胞内活性氧 (ROS) 水平显著抑制前列腺癌 DU-145 瘤体的血管生成, 本研究小管生成实验表明, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的黄芩素对 HUVEC 管腔样结构形成具有抑制作用。体内裸鼠移植瘤实验表明, 黄芩素组肿瘤体积从第 12 天开始减小, 在第 21 天肿瘤体积显著减小。顺铂组对肿瘤体积的影响出现的较早, 在第 12 天开始出现。顺铂组可使动物体重减轻, 黄芩素组动物体重无明显下降, 证明了其应用的安全可靠性。与本课题组之前发表的黄芩苷体内抑瘤结果比较^[14], 从肿瘤体积上看, 相同剂量的黄芩素在给药 21 d 时, 肿瘤体积相对较小。

肿瘤的发生发展与体内代谢组的变化密切相关, 本研究发现黄芩素低剂量组和顺铂组均对氨基酸代谢、能量代谢、转录过程通路有影响, 其中氨基酸代谢通路是涉及最多的一条通路, 尤其是在顺铂组中。血清代谢通路中黄芩素对碳水化合物代谢有影响, 而顺铂组未见对此条代谢通路有影响。Cling 等^[15] 运用气液分配层析技术分析比较了数组不同情况下癌症患者血浆氨基酸水平, 指出早期患者的必需氨基酸包括支链氨基酸以及非必需氨基酸中的丙、丝、甘、脯氨酸基本维持正常, 而进行放射、化疗的患者则有严重的支链氨基酸以及丝、甘、脯、苏氨酸等多种氨基酸下降。本研究发现应用黄芩素干预后, 与模型组比较, L-酪氨酸, L-色氨酸的水平下调; 应用顺铂进行化疗后, L-赖氨酸, L-天门冬氨酸, L-色氨酸, L-酪氨酸, L-脯氨酸, L-缬氨酸, L-苏氨酸等水平下调, 这与 Cling 等^[15] 的研究结果一致, 说明移植瘤应用药物干预后多种氨基酸水平下降。临床试验表明, 化疗时给予肠外氨基酸营养支持治疗能明显提高老年 NSCLC 患者的躯体、情绪、社会等功能, 提高化疗收益等^[16]。本研究可以看出应用黄芩素干预后氨基酸种类下调的相对较少, 顺铂组氨基酸下调的种类较多, 说明化疗后主要通过影响氨基酸代谢而抑制肿瘤生长。黄芩素干预后血清中碳水化合物代谢通路出现变化, 表现为乙二酸、丁酸水平

上调,丁二酸水平下调。丁酸属于短链脂肪酸,短链脂肪酸能抑制肿瘤细胞的增殖、控制原癌基因的表达、促进肿瘤细胞的分化和凋亡,起到抗肿瘤的作用^[17]。傅红等^[18]以人结肠癌 Caco-2 细胞为模型,研究了3种短链脂肪酸对细胞增殖、分化和转移的影响。结果表明3种短链脂肪酸,尤其是丁酸盐,可影响人结肠癌细胞的表型,显著延长肿瘤细胞倍增时间,增强癌细胞分化标志物蛋白酶的表达,并明显抑制癌细胞的转移。本研究中应用黄芩素干预移植瘤裸鼠后,丁酸水平上调,丁酸本身具有抗肿瘤作用,可能是通过上调的丁酸影响碳水化合物代谢或直接抑制肿瘤细胞的生长而发挥抗肿瘤作用。乙二酸是生物体的一种代谢产物,广泛分布于植物、动物和真菌体中,作为一种天然的抗氧化剂应用于自然或加工食物的贮藏已受到关注^[19]。黄芩素干预后移植瘤裸鼠乙二酸水平上调,影响肿瘤的发生与发展,肿瘤与体内的氧化应激有关,黄芩素干预后通过刺激乙二酸的上调从而发挥抗肿瘤作用。

综上所述,黄芩素组血清内多种代谢物水平发生变化,这些代谢物水平的变化涉及到氨基酸代谢、碳水化合物代谢等通路,这些通路的变化可能是黄芩素作用的结果,初步揭示了其抗肿瘤的作用机制。本研究也证实了代谢组学技术能从整体上评价分析药物的作用机制,为药物的临床应用提供新思路。

【致谢】本研究得到上海交通大学药学院毛文伟教授的技术支持和无私帮助,在此表示衷心感谢!

【参考文献】

[1] 陈万青,张思维,邹小农. 中国肺癌发病死亡的估计和流行趋势研究[J]. 中国肺癌杂志,2010,13(5):488-493.

[2] 刘盛楠,邵淑丽,隋文静,等. 白藜芦醇诱导肺癌 A549 细胞凋亡[J]. 基因组学与应用生物学,2015,34(4):685-691.

[3] Marsh Z, YANG T, Nopo-Olazabal L, et al. Effect of light, methyl jasmonate and cyclodextrin on production of phenolic compounds in hairy root cultures of *Scutellaria lateriflora* [J]. *Phytochemistry*, 2014, 107:50-60.

[4] CHENG C Y, HU C C, YANG H J, et al. Inhibitory effects of *scutellarein* on proliferation of human lung cancer A549 cells through ERK and NF- κ B mediated by the EGFR pathway [J]. *Chin J Physiol*, 2014, 57(4):182-187.

[5] 李登辉,康健. 黄芩素在人喉癌 Hep-2 增殖抑制中的作用及机制 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2015, 21(5):526-529.

[6] 姚怀齐,郭光华. 黄芩素对食管癌 EC109 细胞株增殖

及细胞周期的影响 [J]. 广东医学, 2010, 31(2):153-155.

[7] 汤立建,赵良才,李庆林,等. 黄芩黄酮类成分抗肿瘤作用及机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2007, 32(1):21-26.

[8] Naveenkumar C, Raghunandhakumar S, Asokkumar S, et al. Baicalein abrogates reactive oxygen species(ROS)-mediated mitochondrial dysfunction during experimental pulmonary carcinogenesis *in vivo* [J]. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2013, 112(4):270-281.

[9] 戴建业,郑宁宇,孙淑军,等. 基于血清代谢组学的柴胡醋炙生物学效应研究 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(7):1717-1720.

[10] Stewart B W, Wild C P. World Cancer Report 2014 [M]. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014:632-644.

[11] 辛文好,宋俊科,何国荣,等. 黄芩素和黄芩苷的药理作用及机制研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 22(6):647-659.

[12] Wang L, Ling Y, Chen Y, et al. Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2010, 297(1):42-48.

[13] Miocinovic R, McCabe N P, Keck R W, et al. *In vivo* and *in vitro* effect of baicalein on human prostate cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2005, 26(1):241-246.

[14] 曹慧娟,鄢云彪,戴建业,等. 黄芩苷对人肺腺癌 A549 细胞的体内外研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(13):216-220.

[15] Cling N, Grossi C, Jham G, et al. Plasma amino acid and serum unesterified fatty acid deficits and the effect of nutritional support in chemotherapy treatment [J]. *Surgery*, 1984, 95(6):730-738.

[16] 刘美玲. 化疗时肠外氨基酸营养支持治疗对老年非小细胞肺癌患者生活质量影响的临床研究 [D]. 合肥:安徽医科大学, 2008.

[17] Piekarska J, Mista D, Houszka M, et al. *Trichinella spiralis*; the influence of short chain fatty acids on the proliferation of lymphocytes, the goblet cell count and apoptosis in the mouse intestine [J]. *Exp Parasitol*, 2011, 128(4):419-426.

[18] 傅红,师英强,莫善斌. 短链脂肪酸对人结肠癌 Caco-2 细胞增殖分化的影响与临床意义 [J]. 中华消化杂志, 2003, 23(8):473-475.

[19] Kayashima T, Katayama T. Oxalic acid is available as a natural antioxidant in some systems [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1573(1):1-3.

【责任编辑 张丰丰】