沙棘总黄酮抑制肺癌 A549 增殖和迁移作用及机理

贾 丛[1],杜亚蓉[1,2*],孙 坤[1*]

[1]西北师范大学 生命科学学院;[2] 中国科学院 近代物理研究所,兰州 730000

摘 要:为探究三种沙棘总黄酮(TFH)对非小细胞肺癌 A549 细胞增殖及迁移的影响,并探讨其分子作用机制,选择不同浓度的西藏沙棘(*Hippophae tibetana* Schlecht)、中国沙棘(*H. rhamnoides* L. subsp. *sinensis* Rousi)、肋果沙棘(*H. neurocarpa*)总黄酮作用于 A549 细胞。通过 MTT 检测细胞相对活力,平板克隆形成实验及软琼脂克隆形成实验检测细胞克隆形成能力,流式细胞仪 AnnexinV/PI 双染法检测细胞凋亡比例。选择效果最佳的西藏沙棘总黄酮应用细胞划痕实验及 Transwell 实验分析该化合物对肺癌细胞迁移侵袭能力的影响。Western blot 检测 MMP9、E-cadherin 等侵袭迁移相关蛋白表达。敲低 E-cadherin 基因检测沙棘总黄酮对细胞迁移能力的影响。结果显示,三种沙棘总黄酮均对 A549 细胞系具有增殖抑制作用,抑制作用依次为:西藏沙棘 > 中国沙棘 > 肋果沙棘。西藏沙棘总黄酮可显著性抑制非小细胞肺癌 A549 细胞侵袭迁移能力($P < 0.05$)。实验组中 MMP9、MMP2、TGF-β、N-cadherin 表达水平显著降低,E-cadherin 表达水平上调。我们发现在 A549 细胞中敲低 E-cadherin,西藏沙棘总黄酮可逆转迁移增加。以上研究表明西藏沙棘总黄酮对肺癌 A549 增殖抑制作用具有明显的优势,且西藏沙棘总黄酮可明显抑制肺癌 A549 细胞的侵袭迁移能力,并可能与下调细胞中的 TGF-β 抑制 MMP9 表达并阻止肺癌 EMT 有关。

关键词:沙棘总黄酮;A549 细胞;增殖;迁移;EMT

中图分类号:Q946 **文献标识码**:A **文章编号**:1001-6880(2020)6-0937-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.6.005

Study on effect and mechanism of total flavonoids of *Hippophae* in inhibiting proliferation and migration of lung cancer A549 cells

JIA Cong[1], DU Ya-rong[1,2*], SUN Kun[1*]

[1]*College of Life Science, Northwest Normal University*;

[2]*Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China*

Abstract: To investigate the effect and molecular mechanism of total flavonoids of three species of *Hippophae* (TFH) on proliferation and migration of lung cancer cells A549, the cells were pretreated with different concentrations of total flavonoids of *Hippophae tibetana* (TFHt), *H. rhamnoides* subsp. *sinensis* (TFHr) and *H. neurocarpa* (TFHn). MTT assay was adopted to detect the effect of different concentrations of the TFH on the relative cell viability. The colony formation assay and soft agar assay was used to observe the colony formation ability. Annexin V-FITC / PI double stainings by flow-cytometry was performed to detect the apoptosis rate of A549 cells pretreated by the TFH. From the above results, it was found that the TFHt had the best anticancer effect. In order to preliminarily explore the effect of the TFHt on invasion and migration, the wound healing and transwell assay were used to analysis in A549 cells. Western blot was used to study the expression of MMP9, E-cadherin and other related proteins. The ability of cell invasion and migration were detected in knockdown of E-cadherin and then pretreated with the TFH. The results showed that the three species of TFH could inhibit the growth in A549 cells pretreated for 48 hours, which was ordered as TFHt, TFHr, TFHn. Compared with control group, the cell invasion and migration were both significantly decreased in experimental group pretreated by the TFHt ($P < 0.05$). The expressions of MMP9, MMP2, TGF-β and N-cadherin were significantly weakened, while the expression of E-cadherin was markedly enhanced in the experimental group. We found that knockdown of E-cadherin in A549 cells and the TFHt can reverse the expression of E-cadherin,

收稿日期:2020-01-13 接受日期:2020-05-21

基金项目:国家自然科学基金(31660060);国家自然科学基金青年项目(11705248);甘肃省重点研发计划(18YF1NA051)

*通信作者 E-mail:kunsun@nwnu.edu.cn

which increased the migration. The TFHt have obvious advantages in inhibiting the proliferation and reducing the invasion and migration ability of lung cancer A549 cells, which may be related to the down regulating the expression of MMP9 by TGF-β and inhibiting EMT of lung cancer.

Key words: TFH; A549 cells; proliferation; migration; EMT

沙棘隶属于胡颓子科(Elaeagnaceae)沙棘属(*Hippophae*),为小乔木或灌木。沙棘黄酮类化合物是沙棘最重要的活性成分之一,其单一黄酮类化合物以槲皮素、异鼠李素、山奈酚为主。具有抗肿瘤[1]、抗炎[2]、保护心脑血管[3]、提高机体免疫力[4]等方面的功效。肺癌是目前世界上最常见的癌症之一,具有发病率高、死亡率高等特点,其死亡率较高的主要原因是肺癌患者在首次诊断后经常发生转移和产生放化疗抗性[5]。近年来,沙棘在抗肿瘤方面的研究工作逐渐得到认可,且沙棘总黄酮的肠吸收特性明显优于单一黄酮类化合物异鼠李素[6]。已有研究证明,沙棘中黄酮类化合物对结肠癌 HT29 细胞[7],前列腺癌 PC-3 细胞[1],乳腺癌 Bcap-37 细胞[8]等多种肿瘤细胞都具有抑制作用。在非小细胞肺癌中,黄酮类化合物对顺铂等一些化疗药物有增敏作用[9]。本研究以沙棘属的3 种沙棘植物为材料,检测其总黄酮对 A549 增殖的抑制作用,进一步分析西藏沙棘总黄酮对肺癌细胞侵袭和迁移能力的影响,并初步探讨了相关分子机制,以期为高效开发利用沙棘资源提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

中国沙棘叶采自甘南藏族自治州阿万仓,西藏沙棘叶、肋果沙棘叶均采自青海省祁连县,经西北师范大学孙坤教授鉴定为西藏沙棘(*H. tibetana* Schlecht.)、中国沙棘(*H. rhamnoides* L. subsp. *sinensis* Rousi)、肋果沙棘(*H. neurocarpa* ssp. *neurocarpa*)。

1.1.2 实验试剂

甲醇及乙醇(国药集团);芦丁标准品(北京 Solarbio 公司 804D0218);槲皮素、异鼠李素、山奈酚标准品(上海源叶公司);RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司);胎牛血清(兰州荣晔公司);MTT(美国 Spectrum Chemical 公司);jetPRIME® 转染试剂(法国 PolyPlus-transfection 公司);DMSO(美国 Sigma 公司);RIPA 细胞裂解液(Biosharp 公司);AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒(Becton Dickinson 公司);MMP9、MMP2、TGF-β、E-cadherin、N-cadherin 等 5 种抗体(Proteintech 公司),山羊抗兔 IgG(中杉金桥公司)。

1.1.3 实验仪器

流式细胞仪(Backman moflo XDP,美国);倒置显微镜(Moticam 2306,中国);二氧化碳培养箱(Thermo Scientific 311,美国);凝胶成像系统(Tanon 4200,中国);酶标仪(Tecan Infinite M200Pro,瑞士);色谱柱(SunFire C_{18},美国);色谱仪(QuiksepP0050d-11,北京)。

1.2 实验方法

1.2.1 总黄酮提取

准确称取干燥粉碎后的三种沙棘叶片各 30 g,采用溶剂提取法,以固液比为 1∶10 的比例加入无水甲醇,40 ℃冷凝回流提取 1 h,过滤,重复以上操作 3 次,并收集总和 3 次提取液。

1.2.2 总黄酮纯化

用石油醚萃取叶绿素及脂溶性杂质后采用聚酰胺进行分离纯化。将萃取后的沙棘提取液置于旋转蒸发仪中进行浓缩至无醇后用蒸馏水溶解。过粒径为 100 目聚酰胺层析柱,先用蒸馏水洗去杂质,后用 70% ~100% 乙醇进行梯度洗脱,收集洗脱液。减压浓缩至干燥。

1.2.3 总黄酮含量测定

1.2.3.1 芦丁标准曲线绘制

用 25 mL 30% 乙醇定容溶解 5 mg 芦丁标准品,配置为 0.2 mg/mL 的标准母液备用。准确吸取标准液 0、1、2、3、4、5、6 mL 于 25 mL 容量瓶中,加 30% 乙醇至 10 mL,混合均匀后加 5% $NaNO_2$ 溶液 1 mL,充分摇匀后静置,吸取 10% $Al(NO_3)_3$ 1 mL 混匀,6 min 后再加入 10 mL 1 mol/L 的 NaOH 溶液,30% 乙醇的定容至标准线,置室温 15 min。510 nm 处测定三种沙棘醇提总黄酮吸光值。标准曲线以吸光度作为纵坐标 y,浓度为横坐标 x 进行分析绘制。

1.2.3.2 总黄酮含量测定

吸取 10 mL 已用 30% 乙醇溶解的沙棘总黄酮样品,置于 25 mL 容量瓶中,采用芦丁标曲方法测样品 510 nm 处吸光值,代入标曲方程,计算三种沙棘

总黄酮含量。

1.2.3.3　HPLC 法测定三种沙棘总黄酮样品中主要黄酮苷元含量比例关系

选用色谱柱(5 μm,4.6×250 mm)。流动相为甲醇、水(52∶48),设置柱温 30 ℃,检测波长 370 nm,流速 1 mL/min 洗脱 40 min。样品进样量为 10 μL。

1.2.4　细胞培养

选取人非小细胞肺癌 A549 细胞系,用 RPMI-1640 培养基进行细胞培养。细胞需置于饱和湿度含 5% CO_2 的 37 ℃培养箱中进行培养。待细胞增长至对数期时,用胰酶对细胞进行消化传代。

1.2.5　MTT 检测细胞相对活力

三种沙棘总黄酮用 DMSO 配成母液,实验时用 RPMI1640 培养基稀释至相应的浓度。消化对数生长期的细胞,稀释细胞密度至 5 000 个/孔接种于 96 孔培养板,置 37 ℃、5% CO_2 的培养箱培养。待细胞贴壁 12 h 后,分别加入含有不同浓度(20、40、60、80、100 μg/mL)的沙棘总黄酮,对照组加入与实验组同等质量浓度的 DMSO。干预培养 48 h 后,加入 20 μL MTT 溶液,置于培养箱中继续孵育 4 h,移除培养基,150 μL DMSO 加入各实验孔,避光震荡溶解。酶标仪 570 nm 处测定各孔吸光度值。

1.2.6　平板克隆形成实验检测克隆形成

将各组对数生长期的 A549 细胞消化,稀释细胞密度为 100 个/皿接种于 60 mm 培养皿中。实验组选择三种沙棘总黄酮的 IC_{50} 值(西藏沙棘 64.75 μg/mL、中国沙棘 76.85 μg/mL、肋果沙棘 95 μg/mL)处理 A549 细胞,阴性对照组加入含有与实验组相同浓度的 DMSO 的完全培养基,培养 48 h 后,更换新鲜完全培养基继续培养 10~14 天,定期更换培养基,待出现肉眼可见克隆时终止培养,固定,结晶紫染色后计数统计。

1.2.7　软琼脂克隆形成实验检测细胞克隆形成

配制 1% 及 0.7% 琼脂糖,高压灭菌后置于 38 ℃水浴锅中保持融化状态。配制 2 倍浓度 RPMI 培养基并加入 20% FBS,置于 38 ℃水浴锅中加热。以 1∶1的比例充分混合 1% 琼脂糖及培养基,吸取 3 mL 均匀铺于 60 mm 培养皿底部,冷却凝固。准备细胞,实验分组与“1.2.6”一致,培养 48 h 后,消化细胞,调整细胞密度 5 000 个/皿,等比例与 0.7% 琼脂糖混合,吸取 3 mL 铺于下层胶上。静置冷却凝固。加培养基继续培养,并隔天更换一次新鲜培养基,30 天后统计细胞克隆数。

1.2.8　流式检测细胞凋亡

实验分组与“1.2.6”一致,消化收集细胞。采用 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡,遵照 BD 凋亡检测试剂盒使用说明,进行染色,利用流式细胞仪上机检测 A549 细胞发生凋亡的比例。

1.2.9　细胞划痕实验检测细胞迁移能力

消化对数生长期的细胞,接种于细胞培养皿中,实验组加入含有 64.75 μg/mL 西藏沙棘总黄酮的 RPMI1640 培养基,对照组加入同等质量浓度的 DMSO。干预处理 48 h。消化细胞,稀释细胞数量为 10^6 个/孔接种于 6 孔板中。待细胞贴壁且铺满板底后,用 200 μL 移液器垂直板底划线。用 PBS 清洗至无漂浮细胞,再加入无血清培养基。培养 0、24、48 h 后,光学显微镜下进行观察拍照。

1.2.10　Transwell 实验检测细胞迁移能力

实验分组与“1.2.9”一致,干预培养 48 h 后消化细胞,置于离心管中离心,吸掉培养基,加无血清培养基将细胞稀释成 7 000/200 μL。取 200 μL 加入 Transwell 小室内,小室外加入含血清培养基 650 μL。放入培养箱培养 24 h。无水甲醇固定 40 min,吸除甲醇,结晶紫染色 60 min,用脱脂棉擦除小室内侧细胞。在光学显微镜下进行拍照,计数迁移细胞数,4 倍物镜下整体拍照小室内所有的细胞。

1.2.11　Transwell 实验检测细胞侵袭能力

将基质胶用无血清培养基按 1∶8的比例进行稀释。Transwell 小室中加 100 μL 稀释胶,培养箱放置至凝固。64.75 μg/mL 西藏沙棘总黄酮干预培养 48 h 消化细胞,吸取 1 mL 于 15 mL 离心管中离心,吸掉培养基,加无血清培养基将细胞稀释成 2 万/100 μL,吸取 100 μL 加入到小室中,放入培养箱培养 48 h。固定、染色、计数方法与“1.2.10”一致。

1.2.12　Western blot 检测蛋白表达

实验组加入含有 64.75 μg/mL 西藏沙棘总黄酮,对照组加入同等质量浓度的 DMSO,培养 48 h 后,培养皿中加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液收集各实验组蛋白,超声离心后收集上清为蛋白样品。采用 Bradford 法测定蛋白浓度。按照一定比例混匀收集的蛋白样品及 SDS-PAGE 上样缓冲液,煮沸 10 min。制备分离胶与浓缩胶,蛋白上样 30 mA 恒流电泳,130 mA 恒流转膜 180 min,用 5% 的牛血清白蛋白(BSA)室温封闭 1 h 后,置于一抗中 4 ℃过夜孵育,TBS 洗液漂洗 3 次,置于二抗中孵

天然产物研究与开发

育 1 h,再次漂洗 3 次,显影后,拍照记录相关条带。

1.2.13 RNA 干扰抑制 E-cadherin 基因的表达

采用 RNA 干扰手段抑制 A549 细胞系中 E-cadherin 的表达,将 A549 细胞消化计数,以 10 万/皿接种于 35 mm 培养皿中,待细胞达到转染密度,加入配置好 SiRNA 转染试剂复合物,培养 6 h 后换正常培养基,继续培养 48 h,Western blot 检测干扰抑制效率。

1.3 数据统计分析

各实验均进行三次独立重复实验。本研究数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用 SPSS 25 进行统计分析,多组均数间分析采用单因素 ANOVA 检验,事后多重比较采用最小显著性差异法(LSD)检验,两组独立样本均数间进行 t 检验,显著性水平设定为 $P<0.05$。

2 实验结果

2.1 三种沙棘总黄酮对 A549 细胞相对活力影响

MTT 检测结果如图 1 所示,将 20 ~ 100 μg/mL 的三种沙棘总黄酮(TFH)作用于 A549 细胞 48 h 后,其细胞存活率较对照组都有显著性降低($P<0.001$)。将三种沙棘总黄酮对 A549 细胞相对活力影响进行统计,发现其细胞活力抑制效果依次为:西藏沙棘 > 中国沙棘 > 肋果沙棘。经分析计算西藏沙棘、中国沙棘、肋果沙棘总黄酮其半数抑制浓度 IC_{50} 值分别为 64.75、76.85、95 μg/mL。上述结果表明,西藏沙棘总黄酮对 A549 细胞活力抑制作用明显优于中国沙棘及肋果沙棘。

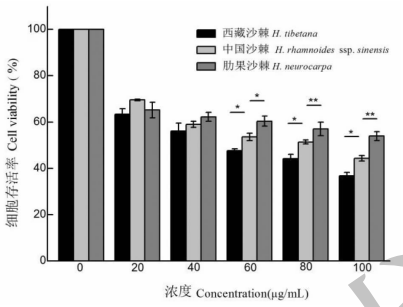

图 1 三种沙棘总黄酮对 A549 细胞存活率的影响

Fig. 1 The effects of three total flavonoids of *Hippophae* on the proliferation of A549 cells

注:$^{*}P<0.05$;$^{**}P<0.01$;$^{***}P<0.001$,下同。Note:$^{*}P<0.05$;$^{**}P<0.01$;$^{***}P<0.001$, the same below.

2.2 三种沙棘总黄酮对 A549 细胞平板克隆形成的影响

由图 2 可知,与对照组相比较,三种沙棘总黄酮均可显著性减少单个 A549 细胞克隆形成数($P<0.05$)。将三种沙棘总黄酮作用后的克隆形成数与对照组进行统计,西藏沙棘总黄酮可减少 62%,显著优于中国沙棘的 40% 及肋果沙棘的 16%($P<0.05$)。

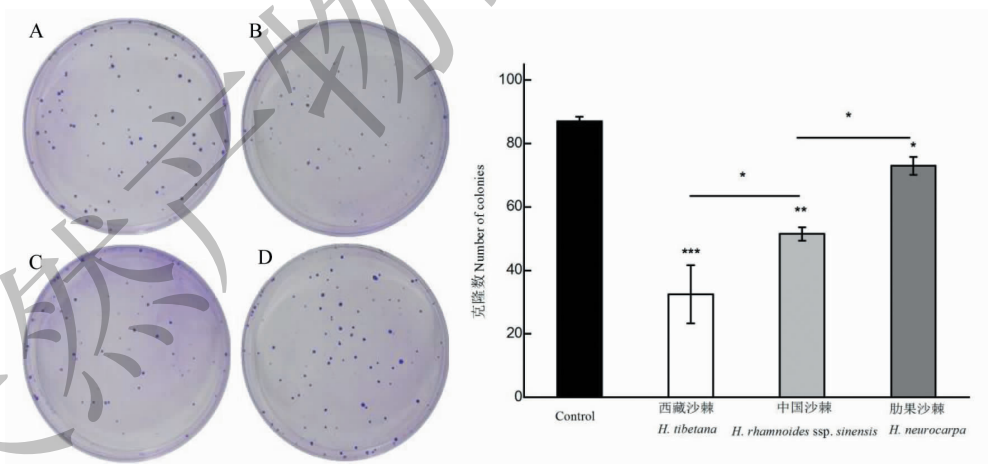

图 2 三种沙棘总黄酮对 A549 细胞平板克隆形成的影响

Fig. 2 The effects of three total flavonoids of *Hippophae* on the colony formation ability of A549 cells

注:A:对照组;B:西藏沙棘;C:中国沙棘;D:肋果沙棘,下同。Note:A:Control group;B: *H. tibetana*;C: *H. rhamnoides* ssp. *sinensis*;D:*H. neurocarpa*, the same below.

2.3 三种沙棘总黄酮对 A549 细胞软琼脂克隆形成的影响

软琼脂克隆形成结果如图 3 可知,经沙棘总黄酮处理的 A549 细胞克隆形成数显著减少($P<0.001$)。西藏沙棘、中国沙棘、肋果沙棘的克隆形成数依次减少 81%、56%、31%。基于以上分析,我们发现西藏沙棘提取的总黄酮抑制肺癌 A549 细胞肿瘤形成能力效果最显著。

2.4　三种沙棘总黄酮对 A549 细胞凋亡的影响

三种沙棘总黄酮对 A549 细胞凋亡作用结果见表 1,与对照组凋亡率 4.21% 相比,中国及肋果沙棘对 A549 细胞凋亡无显著差异,细胞凋亡率分别为

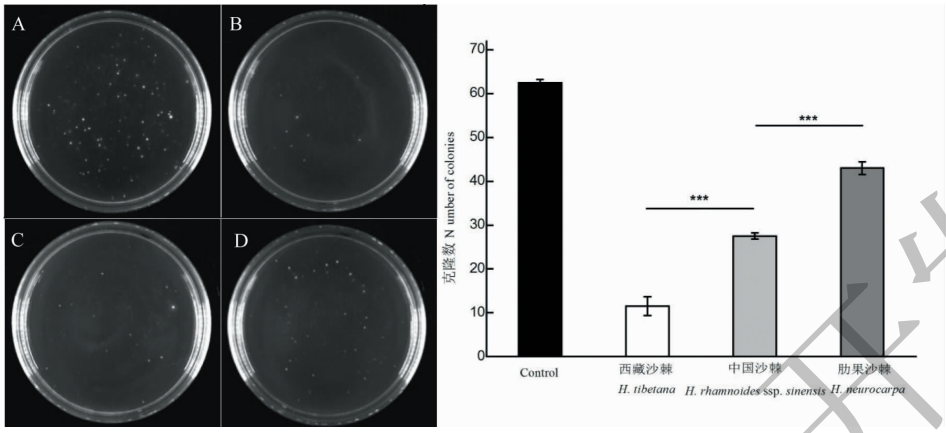

图 3　三种沙棘总黄酮对 A549 细胞软琼脂克隆形成的影响

Fig. 3　The effect of three total flavonoids of *Hippophae* on the colony formation ability of A549 cells by soft-agar assay

表 1　三种沙棘对三种沙棘总黄酮对 A549 细胞软琼脂细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1　The effect of three total flavonoids of *Hippophae* on cell apoptosis of A549($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	凋亡率 Apoptosis(%)	坏死率 Necrosis(%)
对照组 Control	4.21 ± 0.4	1.65 ± 0.96
中国沙棘 *H. rhamnoides* ssp. *sinensis*	4.99 ± 0.94	8.04 ± 1.11***
肋果沙棘 *H. neurocarpa*	4.94 ± 0.96	9.78 ± 0.78***
西藏沙棘 *H. tibetana*	18.46 ± 1.12***	12.63 ± 0.92***

注:与空白对照组比较, *** $P < 0.001$。Note:Compared with control, *** $P < 0.001$.

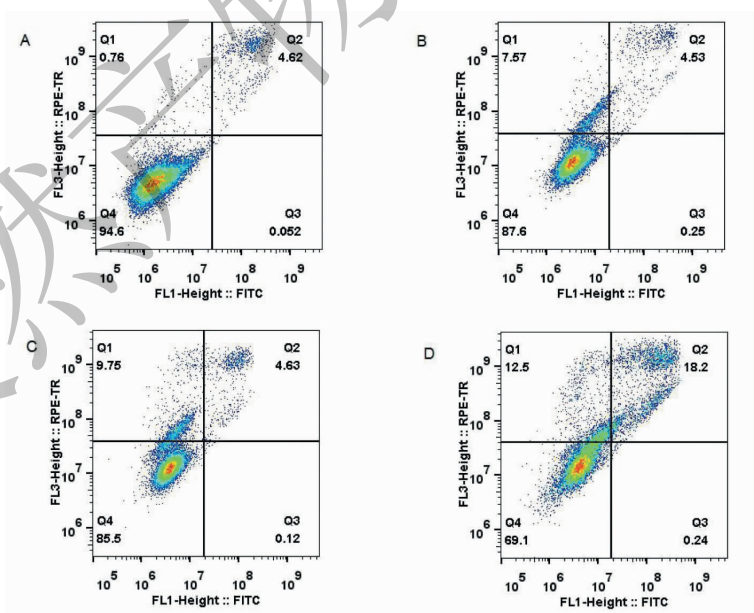

图 4　三种沙棘总黄酮对 A549 细胞凋亡的影响

Fig. 4　The effect of three total flavonoids of *Hippophae* on cell apoptosis of A549

注:A. 对照组;B. 中国沙棘;C. 肋果沙棘;D:西藏沙棘。Note:A. Control group;B. *H. rhamnoides* ssp. *sinensis*;C. *H. neurocarpa*;D. *H. tibetana*.

天然产物研究与开发

4.99%、4.94%。西藏沙棘总黄酮作用后,A549 细胞凋亡显著升高,凋亡率可达 18.46%。但三种沙棘均显著促进细胞坏死率,其促坏死率依次为:西藏沙棘(12.63%) > 肋果沙棘(9.78%) > 中国沙棘(8.04%)。

2.5 三种沙棘总黄酮样品中主要黄酮苷元含量比例关系

经 HPLC 检测分析结果见表 2,提取的三种沙棘总黄酮样品中,异鼠李素在三种苷元总量中占比均大于山奈酚及槲皮素。西藏沙棘中山奈酚:槲皮素、异鼠李素:槲皮素的比值均高于中国沙棘和肋果沙棘。肋果沙棘中山奈酚:槲皮素比值偏低。

2.6 西藏沙棘总黄酮对 A549 细胞侵袭迁移能力影响

2.6.1 西藏沙棘总黄酮对 A549 细胞迁移能力影响

首先,我们选用划痕实验检测西藏沙棘总黄酮处理后 A549 细胞迁移能力。划痕实验结果如图 5A 所示,与对照组相比,经西藏沙棘总黄酮处理 24 h 的 A549 细胞,划痕愈合度显著降低了 39%。处理 48 h 后,较对照组划痕愈合度降低 40.5%。上述结果表明,西藏沙棘总黄酮可显著性抑制肺癌 A549 细胞迁移能力。随后,Transwell 实验对划痕实验结果进行验证,由图 5B 可看出,经西藏沙棘总黄酮处理后,穿膜细胞明显减少。

表 2 三种沙棘总黄酮样品中主要黄酮苷元含量比例关系(与槲皮素相比)

Table 2 Proportional relationships of flavonoid aglycones in three total flavonoids of *Hippophae*

沙棘总黄酮 Total flavonoids of *Hippophae*	槲皮素 Quercetin	山奈酚 Kaempferol	异鼠李素 Lsorhamnetin
西藏沙棘 *H. tibetana*	1	1.77	4.02
中国沙棘 *H. rhamnoides* ssp. *sinensis*	1	0.71	1.39
肋果沙棘 *H. neurocarpa*	1	0.17	1.74

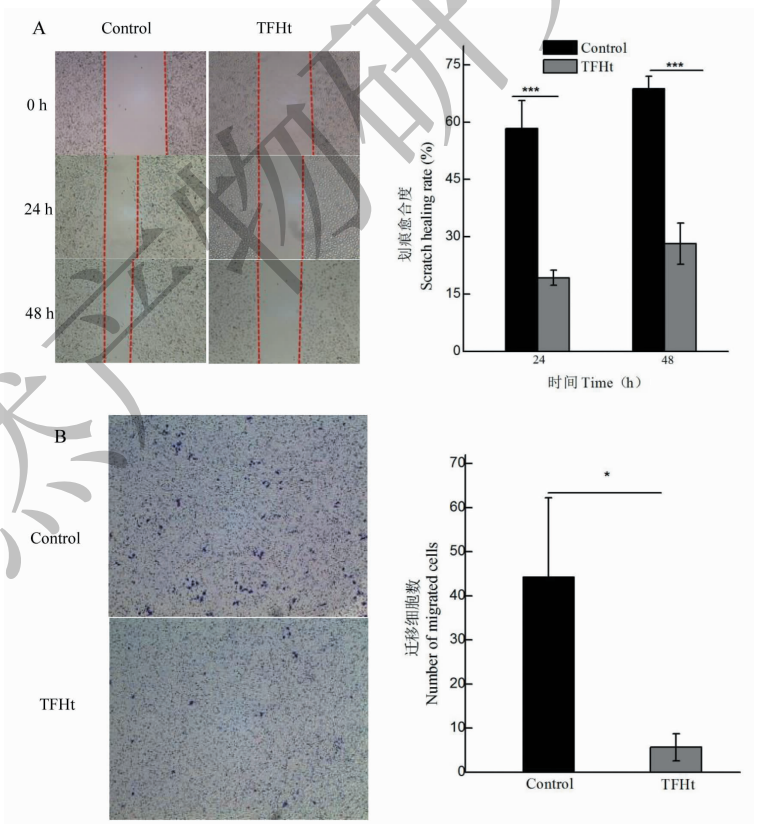

图 5 西藏沙棘总黄酮对 A549 细胞迁移能力影响

Fig. 5 The effect of TFHt on the migration of A549 cells

注:A:划痕实验检测沙棘总黄酮对 A549 细胞迁移能力影响;B:Transewell 实验检测沙棘总黄酮对 A549 细胞迁移能力影响。

Note:A:Migration of A549 cells after treatment with TFHt by wound healing assay;B:Migration of A549 cells after treatment with TFHt by Transwell assay.

天然产物研究与开发

2.6.2　西藏沙棘总黄酮对 A549 细胞侵袭能力影响

同样,通过 Transwell 实验对西藏沙棘总黄酮对 A549 细胞侵袭能力影响进行评价。由图 6 可知,西藏沙棘总黄酮可显著性减少 A549 穿膜数,其侵袭抑制率可达 81%。

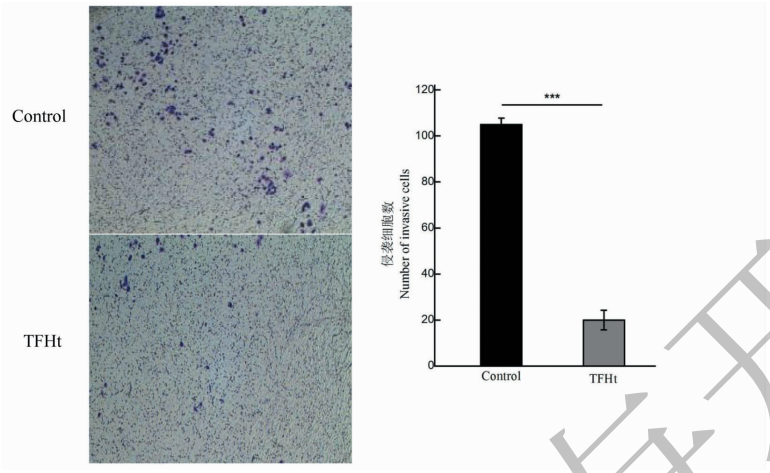

图 6　西藏沙棘总黄酮对 A549 细胞侵袭能力影响

Fig. 6　The effect of TFHt on invasion of A549 cells

2.7　西藏沙棘总黄酮对侵袭迁移相关蛋白表达水平的影响

Western blot 结果如图 7 显示,经西藏沙棘总黄酮处理的 A549 细胞,MMP9、MMP2、TGF-β 及 N-cadherin 表达水平显著性降低。而 E-cadherin 表达水平上调。

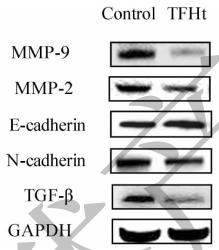

图 7　西藏沙棘总黄酮对 MMP9、E-cadherin 等蛋白表达水平的影响

Fig. 7　The effects of TFHt on the expression of MMP9, E-cadherin and other proteins

2.8　西藏沙棘总黄酮对 Si-E-cadherin 细胞迁移能力影响

SiRNA 敲低 A549 细胞系 E-cadherin 基因,如图 8 所示,经 Western blot 实验验证 A549 细胞系中 E-cadherin 蛋白显著降低,可用于后续实验。

选用 Si-E-cadherin 细胞再次进行划痕实验。结果如图 9A 所示,与 Si-NC 组相比,Si-E-cadherin control 组细胞划痕愈合度显著增加了 16.3% ($P < 0.01$),而经西藏沙棘总黄酮处理的 Si-E-cadherin 细胞逆转上述趋势,划痕愈合度较 Si-E-cadherin control 组显著降低了 17.5%。已经接近 Si-NC 组的细胞迁移能力。Transwell 实验结果如图 9B 所示,经西藏沙棘总黄酮处理的 Si-E-cadherin 细胞,细胞穿膜数显著减少($P < 0.01$)。我们得出结论,西藏沙棘总黄酮可逆转因敲低 E-cadherin 而引起迁移能力的增强。

Western blot 检测西藏沙棘总黄酮对 Si-E-cadherin A549 细胞系中 E-cadherin 表达水平影响,结果如图 10,经西藏沙棘总黄酮处理的 Si-E-cadherin A549 细胞中,E-cadherin 表达水平升高。

3　讨论

肺癌是我国近年来发病率和病死率均较高的恶性肿瘤之一[5],其死亡率较高的主要原因有容易复发转移。众所周知,肿瘤细胞的侵袭迁移能力是衡量肿瘤复发转移的关键。肿瘤的转移也是癌症治疗的难点之一。因此迫切需要寻找一种合适的辅助放化疗药物,以期降低转移的风险,显著提高肺癌患者

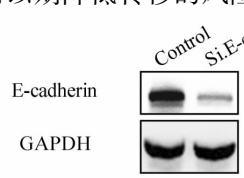

图 8　Western blot 检测 Si-E-cadherin 细胞系中 E-cadherin 表达水平

Fig. 8　Expression of E-cadherin in Si-E-cadherin cells

天然产物研究与开发

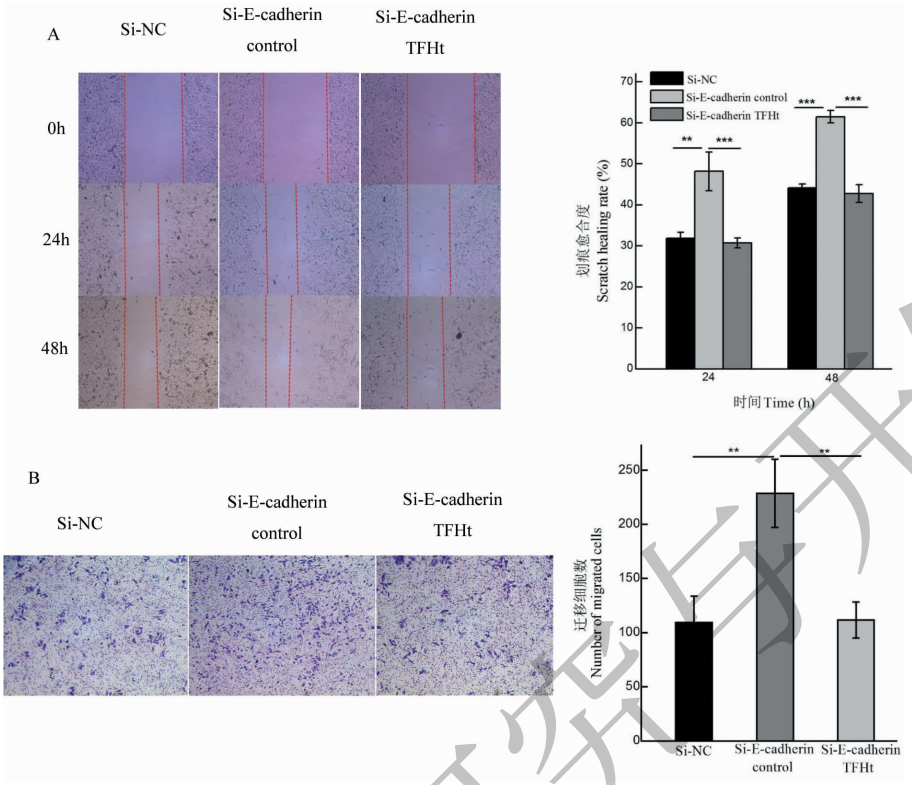

图 9 西藏沙棘总黄酮对 Si-E-cadherin A549 迁移能力影响

Fig. 9 The effect of TFHt on the migration of A549 cells by targeting E-cadherin

注:A:划痕实验检测沙棘总黄酮对 Si-E-cadherin A549 迁移能力影响;B:Transewell 实验检测沙棘总黄酮对 Si-E-cadherin A549 迁移能力影响。Note:A:The effect of migration in Si-E-cadherin A549 cells after treatment with TFHt by wound healing assay;B:The effect of migration in Si-E-cadherin A549 cells after treatment with TFHt by transwell assay.

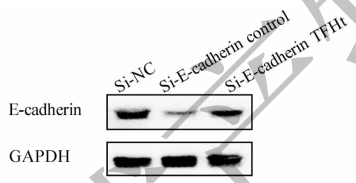

图 10 西藏沙棘总黄酮对 Si-E-cadherin A549 细胞系中 E-cadherin 表达水平影响

Fig. 10 The expression of E-cadherin were determined by western blot in A549 cells transfected by Si-E-cadherin and pretreat with the TFHt

的生存率。近年来,植物衍生化合物成为当今药物研究的热点,因此从药食同源植物或草药中寻找一种低毒副、高抗癌作用的化合物对癌症辅助治疗具有重要的意义。

本研究以沙棘属的 3 种沙棘植物叶为材料,发现三种沙棘总黄酮均对肺癌 A549 细胞具有增殖抑制以及促凋亡作用。三种沙棘总黄酮抑制作用依次为:西藏沙棘 > 中国沙棘 > 肋果沙棘。有文献报道,沙棘叶总黄酮的黄酮苷元成分以异鼠李素、槲皮素及山柰酚为主[10]。已有研究证实,三种苷元在肺癌 A549 中均可发挥细胞增殖抑制作用及促凋亡作用,三者可诱导由 Bcl-2/Bax 介导的线粒体依赖途径的细胞凋亡过程[11-13]。进一步研究发现,在该细胞凋亡过程中,异鼠李素作用机制是通过促进 CytoC 释放,致使 ATP 合成停止,从而引发膜电位异常[14]。且发现异鼠李素与槲皮素具有协同增效的作用,按比例混合两者的增殖抑制效果显著优于单一化合物[15]。

HPLC 分析检测三种沙棘总黄酮中均含有槲皮素、异鼠李素、山柰酚等黄酮类化合物,但其各黄酮苷元含量比例有明显差异。其中西藏沙棘中山柰酚:槲皮素、异鼠李素:槲皮素的比值均远高于中国沙棘和肋果沙棘。三种苷元的抗癌效果不尽相同,就肺癌 A549 而言,经 10 μmol/L 异鼠李素处理,其细胞的增殖率即可降至 50% 左右[16]。山柰酚半数致死浓度为 47 μmol/L[12],而槲皮素为 74 μmol/L[13]。本研究中发现西藏沙棘中山柰酚:槲皮素,异鼠李素:槲皮素的比值均高于中国沙棘和肋果沙棘,也更好

的解释了西藏沙棘总黄酮在抑制增殖作用和侵袭迁移能力具有明显的优势。这一研究结果可为高效开发利用沙棘资源提供实验依据。

进一步的研究中,我们选择西藏沙棘总黄酮研究沙棘总黄酮对 A549 细胞侵袭迁移作用。本研究表明西藏沙棘总黄酮可显著性抑制肺癌 A549 细胞迁移侵袭能力。本研究结果提示,沙棘总黄酮具有抑制肺癌细胞转移的潜力,可为晚期肺癌的治疗提供帮助。

肿瘤细胞的侵袭迁移是肿瘤细胞与宿主细胞及细胞外基质的多重作用的结果。E-cadherin 的缺失是上皮细胞间质转化的一个主要特征。其表达降低,致使细胞间的粘附能力减弱及细胞极性发生改变,从而导致肿瘤细胞的迁移[17]。在该研究中,沙棘总黄酮可上调 E-cadherin 表达,且可逆转 E-cadherin 缺失所导致的迁移增加。由此可证明,沙棘总黄酮通过抑制肺癌 EMT,从而抑制侵袭迁移。除此之外,该研究发现经沙棘总黄酮处理的 A549 细胞,其细胞中的 TGF-β、MMP9 表达量降低。MMP9 是降解细胞外基质的关键成分,通过对基膜中 IV 型胶原与层粘连蛋白等细胞外基质的降解,从而促进肿瘤对周围组织的浸润侵袭[18]。且已有研究表明,金属蛋白酶 MMPs 能切割位于细胞表面 E-cadherin 并将可溶性 E-cadherin 释放到培养基中,从而影响细胞的侵袭迁移[19]。MMP9 表达受不同细胞因子影响,其中包括 TGF-β 等。作为肿瘤微环境中的重要成分之一的 TGF-β,可通过介导 MMP9/MMP2,从而影响细胞侵袭迁移[20]。综上所述,本研究认为沙棘总黄酮通过降低细胞中的 TGF-β 抑制 MMP9 表达并阻止肺癌 EMT 来抑制 A549 侵袭迁移。

参考文献

1 Zhao B,Xiang XL,Wang W,et al. Preparation of flavonoids from sea buckthorn and its inhibitory effect on human prostate cancer PC-3 cells *in vitro*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:27-32.

2 Qi F,Sun JH,Yan JQ,et al. Anti-inflammatory effects of isorhamnetin on LPS-stimulated human gingival fibroblasts by activating Nrf2 signaling pathway[J]. Microb Pathog,2018,120:37-41.

3 Liu B,Yung B,Ning TY,et al. Protection effects of total flavones of *Hippophae rhamnoides* on human umbilical vein endothelial cell injured by H2O2[J]. Chin Arch Tradit Chin Med(中华中医药学刊),2017,35:2158-2160.

4 Liu BC,Qiu Y,Zhao RD,et al. Digital gene expression profiling of dendritic cells treated with seabuckthorn favones[J]. Chin J Microbiol Immunol(中华微生物学和免疫学杂志),2017,37:840-848.

5 Redig AJ,Mcallister SS. Breast cancer as a systemic disease:a view of metastasis[J]. J Intern Med,2013,274(2):113-126.

6 Xie Y,Duan JZ,Fu QX,et al. Comparison of isorhamnetin absorption properties in total flavones of *Hippophae rhamnoides* L. with its pure form in a Caco-2 cell model mediated by multidrug resistance-associated protein[J]. Eur J Pharm Sci,2015,73:1-8.

7 Jiao Y,Chang Y,Wang ZY. Inhibition and DNA damage of seabuckthorn residue flavonoids on colon HT29 cancer cells[J]. Sci Technol Food Ind(食品工业科技),2011(4):318-320.

8 Mao YC,Zhang P,Xu HJ,et al. Study on the inhibitory and apoptosis-inducing effects of flavonoids from *Hippophae rhamnoides* L. on human breast cancer cell line Bcap-37[J]. Curr Immunol(现代免疫学),2005,25(2):98-101.

9 Zhang BY,Wang YM,Gong H,et al. Isorhamnetin flavonoid synergistically enhances the anticancer activity and apoptosis induction by cis-platin and carboplatin in non-small cell lung carcinoma(NSCLC)[J]. Int J Clin Exp Pathol,2015,8(1):25-37.

10 Yu C,Zheng Y,Wu X,et al. Determination of flavonoid glycosides in extracts of flavonoid from the leaf of Fructus *Hippophae* by RP-HPLC[J]. Modern Med(中国当代医药),2012,19(11):51-52.

11 Li Q,Ren FQ,Yang CL,et al. Anti-proliferation effects of isorhamnetin on lung cancer cells in vitro and in vivo[J]. Asian Pac J Ccancer P,2015,16:3035-3042.

12 Han X,Liu CF,Gao N,et al. Kaempferol suppresses proliferation but increases apoptosis and autophagy by up-regulating microRNA-340 in human lung cancer cells[J]. Biomed Pharmacother. 2018,108:809-816.

13 Anna KW,Marta HW,Magdalena I,et al. Antiproliferative and antimetastatic action of quercetin on A549 non-small cell lung cancer cells through its effect on the cytoskeleton[J]. Acta Histochem. 2017,119(2):99-112.

14 Ruan YS. Autophagy inhibition enhances isorhamnetin-induced mitochondria-dependent apoptosis in non-small cell lung cancer cells[D]. Wuhan:Wuhan University(武汉大学),2016.

15 Zhao B. Preparation of flavonoids from Sea buckthorn and its inhibitory effect on human prostate cancer PC-3 cells in vitro[D]. Hangzhou:Zhejiang University(浙江大学),2018.

(下转第 952 页)

天然产物研究与开发