

# 木犀草素通过上调 microRNA-34a-5p 诱导肺癌细胞株 H460 凋亡的研究

姜泽群, 李沐涵, 马艳霞, 覃月穆, 张旭, 吴勉华\*

南京中医药大学 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023

**摘要:** 探究木犀草素诱导人肺癌细胞株 H460 凋亡的分子机制, 为其治疗肺癌提供新的科学依据。选取处于对数生长期的 H460 细胞株, 并分为对照组和不同剂量的木犀草素组。采用 CCK-8 法检测木犀草素对 H460 细胞增殖的影响; 流式细胞术检测细胞凋亡率; PCR array 检测肺癌相关基因 mRNA 表达; Western-blot 检测 p53、p21、Bax、Bcl-2 表达量变化; qRT-PCR 法检测 microRNA-34a(miR-34a) 的表达水平; 本实验还检测了过表达 miR-34a-5p 后对 H460 细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响。结果显示, 木犀草素能有效抑制人肺癌 H460 细胞的增殖, 并促进其凋亡, 其机制可能是通过激活 p53 信号通路, 上调 miR-34a-5p, 最终影响凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 的表达来实现的。

**关键词:** 木犀草素; 肺癌; H460 细胞凋亡; miR-34a-5p; p53

中图分类号: R93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.2.001

## Luteolin Induces Apoptosis of Human Lung Cancer H460 Cells by Up-regulation of MicroRNA-34a-5p

JIANG Ze-qun, LI Mu-han, MA Yan-xia, QIN Yue-mu, ZHANG Xu, WU Mian-hua\*

*Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing 210023, China*

**Abstract:** To investigate the molecular mechanism for the induction of apoptosis by luteolin in human lung cancer H460 cells, and to provide a new scientific basis for its treatment of lung cancer. H460 cells in logarithm growth phase were selected and randomly divided into various groups: a blank control group and different concentrations of luteolin (LTL) groups. The cell viability was detected by CCK-8 assay, while the cell apoptosis was measured by flow cytometry analysis. The mRNA expression of lung cancer related genes in H460 cells were determined by PCR array. The protein levels of p53, p21, Bax and Bcl-2 were detected by Western blot. The expression levels of microRNA-34a (miR-34a) in H460 cells were assessed by qRT-PCR. Then, the miR-34a-5p was transfected into H460 cells, to observe its effects on cell apoptosis and related protein expression. The results showed that luteolin exhibited the anti-cancer effect in H460 cells through the induction of cell apoptosis and inhibition of cell proliferation, which may be mediated through the activation of the p53 signal pathway, up-regulation of miR-34a-5p, and subsequent regulation of apoptosis-related protein expression such as Bax/Bcl-2.

**Key words:** luteolin; lung cancer; H460 cell apoptosis; miR-34a-5p; p53

肺癌是目前全世界范围内发病率和死亡率增长最快, 对人群健康和生命威胁最大的恶性肿瘤之一。《2015 中国癌症统计数据》显示, 2015 年肺癌的发病率及死亡率在我国恶性肿瘤排名中均居首位<sup>[1]</sup>。尽管肺癌可以用化疗和放疗等方法来治疗, 但这些

疗法往往都有副作用。因此, 迫切需要研发出副作用更小的新药, 寻找天然低毒的药物治疗肺癌是一条有效途径。木犀草素又名 3', 4', 5, 7-四羟基黄酮 (luteolin, LTL), 是主要存在于金银花、菊花、荆芥、白毛夏枯草等传统中药中的一种重要的黄酮类化合物, 在自然界许多植物和食物如芹菜、甜椒、白菜、花椰菜、橄榄油、茶中也含有大量的木犀草素, 具有抗炎、降糖、抗氧化、抗肿瘤等多种药理活性<sup>[2-5]</sup>。有研究表明, 木犀草素能够抑制非小细胞肺癌细胞株

收稿日期: 2017-08-14 接受日期: 2017-09-20

基金项目: 国家自然科学基金 (81603584); 第 59 批中国博士后科学基金面上课题 (2016M590485)

\* 通信作者 E-mail: wmb7001@163.com

A549 的生长,并诱导其凋亡<sup>[6,7]</sup>,但对其他肺癌细胞的作用效果尚未见报道。

近年来我们认识到微小核糖核酸(microRNAs, miRNAs)家族在肺癌细胞的增殖、转移、凋亡等过程中扮演着重要角色这一事实,其中,有研究证实 miRNA-34a(miR-34a)在关键的 p53 肿瘤抑制通路中占据着重要地位,并与非小细胞肺癌的发生、发展密切相关<sup>[8]</sup>。miR-34a 是 p53 的直接转录靶标,miR-34a 的表达被 p53 激活后,具有调控细胞增殖和死亡的功能<sup>[8-10]</sup>。同时,miR-34a 可作为 p53 的调节子或修饰基因,抑制沉默信息调节因子 1(silent information regulator 1),诱导 p53 乙酰化,促进 p21 表达增加,从而促使细胞周期停滞和细胞凋亡的发生。p53 与 miR-34a 之间形成的正反馈调控网络对抑制肿瘤的发生发展起着重要作用<sup>[8-10]</sup>。课题组前期研究发现,木犀草素对人肺癌 H460 细胞的增殖有明显抑制作用,并可促进其凋亡,但具体作用机制是否以 miR-34a 为靶点目前尚不清楚,有待进一步研究。本实验以人肺癌细胞株 H460 作为研究对象,探讨木犀草素诱导 H460 细胞凋亡的作用机制及与 miR-34a 之间的关联,为其治疗肺癌的 microRNA 靶点研究提供理论和实验依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 药品与试剂

木犀草素(20 mg/支)购自上海源叶生物科技有限公司(纯度 98%)溶于 698.7  $\mu\text{L}$  DMSO 配制成 100 mmol/L 储存液,-20  $^{\circ}\text{C}$  保存,实验时用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基稀释成相应浓度。

DMSO、胰蛋白酶和 p53 抑制剂 Pifithrin- $\alpha$ (美国 Sigma 公司);RPMI 1640 培养基和胎牛血清购自美国 Hyclone 公司;CCK-8 细胞增殖与毒性检测试剂盒(上海碧云天公司);AnnexinV-FITC/PI 双染试剂盒和 Trizol(美国 Invitrogen 公司);AnnexinV-PE/7-AAD 双染试剂盒(美国 BD 公司);RNeasy Plus Mini 试剂盒,RT<sup>2</sup> First Strand 试剂盒,RT<sup>2</sup> qPCR SYBR Green/Fluor MasterMix-6 试剂盒,Human Lung Cancer RT<sup>2</sup> Profiler PCR array 试剂盒均购自德国 Qiagen 公司;p53、p21、Bax、Bcl-2、 $\beta$ -actin 以及  $\beta$ -tubulin 一抗和相应二抗均购自美国 Cell Signaling Technology 公司;化学发光(ECL)检测试剂盒(美国 Pierce 公司);SYBR Green qPCR 和逆转录试剂盒(立陶宛 Fermentas 公司);引物(上海捷瑞生物工程有限公

司);慢病毒载体 LV-hsa-mir-34a-5p 和阴性对照慢病毒载体由上海吉凯基因化学技术有限公司构建。

### 1.2 仪器

HERACELL 150i 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱(美国 Thermo Forma 公司);MCV-B161S(T)型超净工作台(日本 Sanyo);倒置显微镜(日本 Olympus CKX31);低温离心机(eppendorf 5702);680 型全自动酶联免疫检测仪、7500 型定量 PCR 仪、Mini Protean 3 Cell 小型垂直电泳仪、170-3935 型电转仪、170-8070 型凝胶成像分析系统均为美国 Bio-Rad 公司;FACScan 型流式细胞仪(美国 BD 公司);6 孔板和 96 孔板(美国 COSTOR 公司);Biospec-mini 型核酸蛋白测定仪(日本岛津公司)。

### 1.3 细胞及培养

人 NCI-H460 肺癌细胞购自中科院上海细胞库,接种于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基中,在含有 5% CO<sub>2</sub> 的 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温孵育箱中培养,用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,每 2~3 d 传代一次。

## 2 实验方法

### 2.1 CCK-8 法检测 H460 细胞活性

取处于生长对数期的 H460 细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^8/\text{L}$ ,以每孔 100  $\mu\text{L}$  的细胞悬液接种于 96 孔板,随机分为空白组、对照组和木犀草素各加药组(5~100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ),每组均设 3 个平行孔。空白组为含 10% 胎牛血清的 100  $\mu\text{L}$  完全培养基,对照组为含与实验组等量细胞的 100  $\mu\text{L}$  细胞悬液。细胞加药培养 24、48、72 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液培养 1~4 h 后,在酶联免疫检测仪上于波长 405 nm 处测定各孔的吸光度 A 值,计算细胞增殖抑制率=(对照组 A 值-加药组 A 值)/(对照组 A 值-空白组 A 值) $\times 100\%$ 。

### 2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

取处于生长对数期的 H460 细胞,调整细胞密度为  $1 \times 10^8/\text{L}$ ,以每孔 1 mL 的细胞悬液接种于 6 孔板,随机分为对照组和低、中、高剂量木犀草素加药组(分别为 10、20、40  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ),每组均设 3 个平行孔。细胞加药培养 24 h 后,将对照组和加药组的细胞用 PBS(pH7.4)洗涤 2 次,0.25% 胰酶消化,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液终止消化,1000 rpm,离心 10 min 后弃上清,用 PBS 洗涤 2 次,弃上清液,取细胞沉淀,检测按 AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒说明书操作:加入 500  $\mu\text{L}$  的 Bind-

ing Buffer 制成药约  $1 \times 10^8/L$  的细胞悬液;加入  $5 \mu L$  Annexin V-FITC 混匀后,再加入  $5 \mu L$  PI,混匀;室温避光反应 15 min,上流式细胞仪测定各组细胞凋亡率。

### 2.3 PCR array 检测肺癌相关基因 mRNA 表达

细胞处理方法同 2.2,将培养到 24 h 后的对照组和木犀草素高剂量组 ( $40 \mu mol/L$ ) 的细胞收集后,采用 RNeasy Plus Mini 试剂盒提取总 RNA,使用 RT<sup>2</sup> First Strand 试剂盒合成 cDNA,每个反应中加  $91 \mu L$  RNase-free 水并用加样枪上下混匀数次,把反应放在冰上继续实时 PCR 实验过程。通过简短离心 10 ~ 15 s,把 RT<sup>2</sup> qPCR SYBR Green/Fluor Master-Mix-6 试管中的试剂沉至管底,按说明书准备 PCR 反应混合物。小心地从密封的包装袋中取出 Human Lung Cancer RT<sup>2</sup>Profiler PCR array 板,加入准备好的 PCR 反应混合物,每孔  $25 \mu L$ ,透光黏性密封膜密封 96 孔板,在室温下离心去除气泡。设定 Applied Biosystems,把 PCR Array 板放在实时 PCR 仪中,开始 PCR 实验。

### 2.4 Western Blot 方法检测相关蛋白的表达

细胞处理方法同 2.2,将培养到 24 h 后的对照组和各加药组的细胞用刮法收集。冰上裂解细胞 1 h 后,12 000 rpm 离心 10 min,取上清即为总蛋白。以 Bradford 法测定蛋白浓度后,取  $30 \mu g$  蛋白加上样缓冲液,10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳结束后湿法转膜(硝酸纤维素膜),然后用封闭液  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  封闭过夜,洗膜后加入适当稀释比例的一抗抗体,孵育过夜,常规洗膜 3 次,继而与二抗抗体室温孵育 2 h。加 ECL 试剂显色,GelDoc XR System 凝胶成像仪(美国 Bio-rad,型号 170-8070)中采集图像,Image Lab 软件进行灰度分析。

### 2.5 Real-Time PCR 方法检测 miR-34a 的表达

取对数生长期的细胞悬液,调整细胞密度为  $1 \times 10^8/L$ ,将细胞接种于 6 孔板,每孔 1 mL,24 h 后换液,分对照组和低、中、高剂量木犀草素加药组(分别为 10、20、 $40 \mu mol/L$ ),以及 p53 抑制剂 Pifithrin- $\alpha$  (PFT $\alpha$ ) + 木犀草素高剂量处理组 ( $40 \mu mol/L$ )。将培养到 24 h 后的对照组和各加药组的细胞收集后,使用 TRIzol 法进行 microRNA 提取,并按照逆转录试剂盒说明书进行逆转录及荧光定量 PCR 实验,选取 U6 基因作为 PCR 的内参。miR-34a-5p 的上游引物为 5'-ACACTCCAGCTGGGTG-GCAGTGTCTTAG-3',下游引物为 5'-TGGTGTCGTG GAGTCG-3';miR-34a-3p 的上游引物为 5'-ACACTC-

CAGCTGGGCAATCAGCAAGTATA-3',下游引物为 5'-TGGTGTCGTG GAGTCG-3';U6 的上游引物为 5'-CTCGCTTCGGCAGCAC-3',下游引物为 5'-AACGCTTCACGAATTTGCGT-3'。扩增条件为:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  3 min;  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  7 s、 $57 \text{ }^\circ\text{C}$  10 s、 $72 \text{ }^\circ\text{C}$  15 s,45 个循环,检测结果以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算。

### 2.6 miR-34a-5p 过表达对 H460 细胞凋亡以及相关蛋白表达的影响

将细胞铺进 12 孔板中,每孔计数加入  $8 \times 10^4$  细胞,当细胞密度为 40% 时,加入 hsa-miR-34a-5p 及对照病毒侵染细胞。侵染 24 h 后收集细胞样品,进行细胞凋亡检测,检测按 Annexin V-PE/7-AAD 凋亡检测试剂盒说明书操作:用  $1 \times$  Binding Buffer 制成药约  $1 \times 10^8/L$  的细胞悬液,取  $100 \mu L$  重悬液依次加入  $5 \mu L$  PE-Annexin V 和  $5 \mu L$  7-AAD 染色液,轻轻混匀,室温避光反应 15 min,然后加入  $400 \mu L$  Binding Buffer 上流式细胞仪测定各组细胞的凋亡率。Western Blot 检测方法同 2.4,以  $\beta$ -tubulin 作为内参。

### 2.7 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件对所得数据进行统计处理,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验。

## 3 实验结果

### 3.1 木犀草素对 H460 细胞增殖的影响

与对照组相比,木犀草素加药组能有效抑制肺癌 H460 细胞的增殖,并呈时间和浓度的依赖性,见图 1。木犀草素作用 H460 细胞 48 h 的  $IC_{50}$  为  $40 \mu mol/L$ 。因此,选择  $40 \mu mol/L$  作为实验研究最大浓度,见图 1。

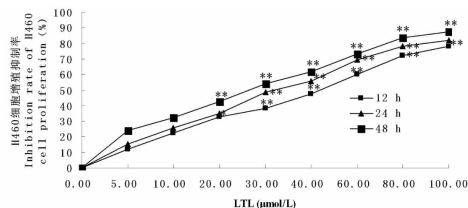


图 1 木犀草素对 H460 细胞的增殖抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of luteolin (LTL) on H460 cell proliferation

注:与对照组比较,\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$

Note: Compared with control group ( $0 \mu mol/L$ ),\*  $P < 0.05$ ,\*\*  $P < 0.01$

### 3.2 木犀草素对 H460 细胞凋亡的影响

各组细胞凋亡率用流式细胞仪检测结果如图 2 所示,空白对照组细胞主要集中于左下 LL 区域,表明细胞存活率高,其早期(UR 区域)和晚期(LR 区域)凋亡率极低,分别为 0.7% 和 5.5%。木犀草素 10、20、40  $\mu\text{mol/L}$  三个剂量组作用于 H460 细胞 24 h 后,随着加药浓度的升高,H460 细胞的凋亡率逐渐增加,分别增加至 9.8% (早期凋亡率 2.6% + 晚期凋亡率 7.2%),14.6% (早期凋亡率 1.9% + 晚期凋亡率 12.7%) 和 36.9% (早期凋亡率 2.3% + 晚期凋亡率 34.6%),其中木犀草素中、高剂量组与对照组比较,差异有统计学意义 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

### 3.3 木犀草素对肺癌相关基因 mRNA 表达的影响

芯片上包含 84 个与肺癌相关的基因,其中,木犀草素高剂量组 (40  $\mu\text{mol/L}$ ) 与对照组比较,发生上调  $\geq 3$  倍或下调  $\leq 0.3$  倍的基因共 19 个,其中上调的基因有 16 个,如 Tp53 基因的表达上调了 14.3772 倍;下调的基因有 3 个,如 Bcl-2 基因的表达下调了 5.2054 倍,见表 1。

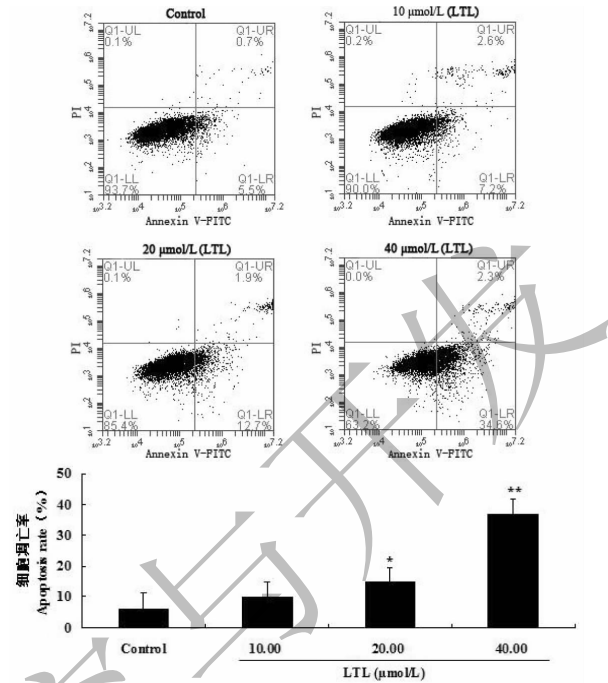


图 2 木犀草素对 H460 细胞凋亡的影响

Fig.2 The effect of luteolin (LTL) on H460 cell apoptosis

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

Note:Compared with control group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$

表 1 PCR array 发生差异性变化的基因及数值变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Differentially expressed genes and their relative expression by PCR Array ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

基因类别 Gene symbol	基因全名 Gene full name	木犀草素组/对照组 Luteolin group/Control group
启动子区差异甲基化基因: Differentially methylated promoters-related genes:		
APBA1	amyloid beta (A4) precursor protein-binding, family A, member 1	9.0005 $\uparrow$
CYP1B1	cytochrome P450, family 1, subfamily b, polypeptide 1	4.3469 $\uparrow$
FHIT	fragile histidine triad	5.3147 $\uparrow$
TCF21	transcription factor 21	3.8906 $\uparrow$
细胞凋亡和周期相关基因: Apoptosis and cell cycle regulation-related genes:		
Bcl-2	B-cell lymphoma-2	5.2054 $\downarrow$
CDKN1C	cyclin dependent kinase inhibitor 1C	13.4543 $\uparrow$
DLC1	deleted in liver cancer 1	8.7543 $\uparrow$
EGFR	epidermal growth factor receptor	4.0840 $\uparrow$
TOP2A	topoi-somerase II alpha, T	3.4343 $\downarrow$
Tp53	tumor protein p53	14.3772 $\uparrow$
肿瘤转移基因: Metastatic potential genes:		
DUSP6	dual Specificity Phosphatase 6	5.4642 $\uparrow$
HMMR	hyaluronan mediated motility receptor	4.723 $\downarrow$
NF1	neurofibromatosis type 1	3.387 $\uparrow$
肺癌差异表达基因: Differentially expressed genes in lung cancer:		
CLCA2	chloride channel accessory 2	8.0009 $\uparrow$
LGSN	lengsin	5.9794 $\uparrow$

续表 1 (Continued Tab. 1)

基因类别 Gene symbol	基因全名 Gene full name	木犀草素组/对照组 Luteolin group/Control group
免疫应答基因: Immune response genes:		
CSF3	colony stimulating factor 3	4.2281 ↑
IRF4	interferon regulatory factor 4	3.2490 ↓
细胞外基质与细胞粘附基因: Extracellular matrix & cell adhesion genes:		
CADM1	cell adhesion molecule 1	6.1475 ↑
CLDN18	claudin 18	4.7899 ↑

注:基因表达用 PCR array 实验方法评估,上调:↑;下调:↓。

Note:Gene expression is evaluated by PCR array method. Up-regulation: ↑;down-regulation: ↓.

### 3.4 木犀草素对 p53 信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较, H460 细胞经不同浓度的木犀草素作用后, 抑癌蛋白 p53、p21 和促凋亡蛋白 Bax 的表达水平逐渐升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平逐渐下降, 与对照组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

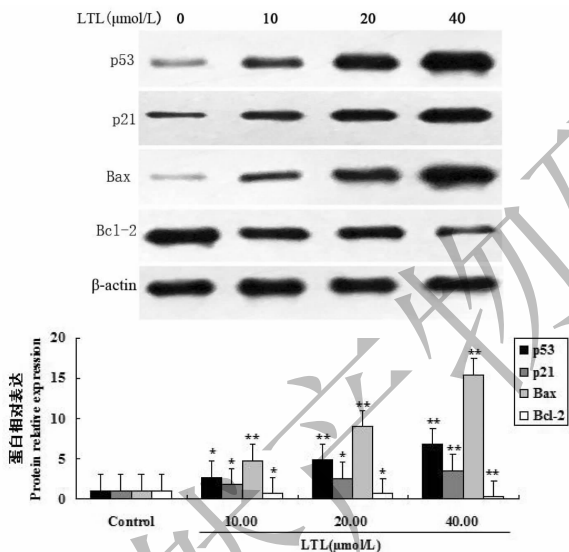


图 3 Western blot 检测 p53、p21、Bax 和 Bcl-2 蛋白的表达

Fig. 3 The expression level of p53, p21, Bax and Bcl-2 detected by Western blot

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Note:Compared with control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

### 3.5 木犀草素对 H460 细胞 miR-34a-5p 表达的影响

与对照组相比, 木犀草素给药后 miR-34a-5p 的表达水平显著升高, 呈一定的剂量依赖性。中剂量组和高剂量组的 miR-34a-5p 表达水平与对照组相比, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 木犀草素高剂量组给予 p53 抑制剂 PFTα 阻断 p53 基因激活后, miR-34a-5p 的基因表达量和木犀草素高剂

量单用组相比明显下降 ( $P < 0.01$ ), 见表 2、图 4 (miR-34a-3p 的表达在木犀草素处理前后没有显著性差异, 无统计学意义, 未在表 2 和图 4 中显示)。

表 2 木犀草素对 H460 细胞 miR-34a-5p 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Table 2 Effect of luteolin (LTL) on miR-34a-5p expression ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

组别 Group	miR-34a-5p
空白对照 Control	1.00 ± 0.00
木犀草素低剂量 LTL-10 μmol/L	1.11 ± 0.16
木犀草素中剂量 LTL-20 μmol/L	1.41 ± 0.09 *
木犀草素高剂量 LTL-40 μmol/L	1.81 ± 0.03 **
木犀草素高剂量 + p53 抑制剂 LTL-40 μmol/L + PFTα	1.18 ± 0.10 ##

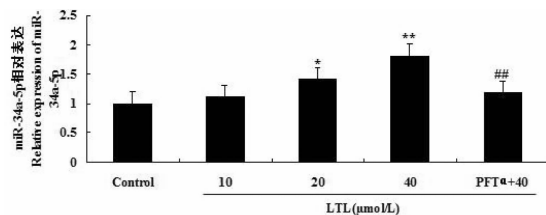


图 4 Real-Time PCR 方法检测 miR-34a-5p 的表达

Fig. 4 Real-time PCR analysis on miR-34a-5p expression

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; 与木犀草素高剂量处理组 (40 μmol/L) 比较, ##  $P < 0.01$

Note:Compared with control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with LTL group (40 μmol/L), ##  $P < 0.01$

### 3.6 miR-34a-5p 过表达对 H460 细胞凋亡的影响

转染 miR-34a-5p 过表达慢病毒 24 h 后, H460 细胞的凋亡率用流式细胞仪检测, 结果如图 5 所示, 与慢病毒阴性对照组相比, miR-34a-5p 过表达组细胞的凋亡率显著增加 ( $P < 0.01$ )。阴性对照组的细胞总凋亡率为 9.0%, 早期 (E2 区域) 和晚期 (E4 区域) 凋亡率分别只有 2.4% 和 6.0%, 而 miR-34a-5p

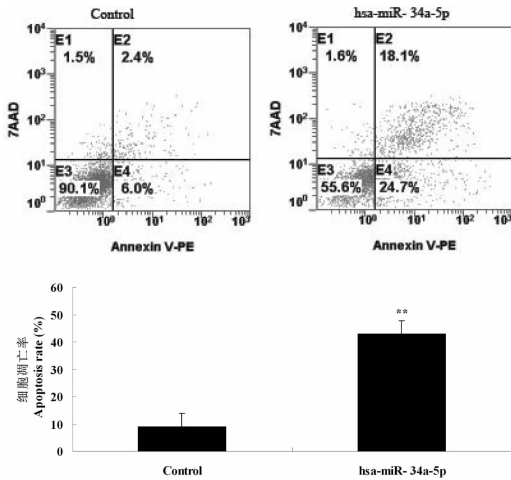


图5 miR-34a-5p 过表达对 H460 细胞凋亡的影响

Fig.5 The effect of miR-34a-5p overexpression on H460 cell apoptosis

注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$

Note:Compared with control group, \*\*  $P < 0.01$

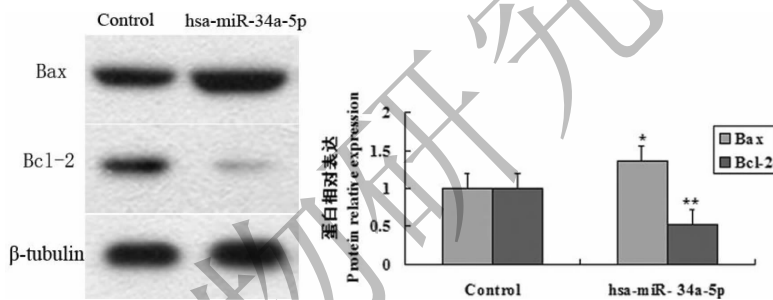


图6 miR-34a-5p 过表达对凋亡相关蛋白表达的影响

Fig.6 The effect of miR-34a-5p overexpression on apoptosis-related proteins

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

Note:Compared with control group, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

能和它清除自由基、抗氧化、抗炎、抗增殖的活性密切相关<sup>[14]</sup>。然而,木犀草素在肺癌细胞中是否对 miR-34a 具有调节作用,以及能否进一步通过 miR-34a 诱导肺癌细胞凋亡目前尚无报道。本实验研究结果显示,木犀草素能有效抑制人肺癌细胞 H460 的增殖,流式细胞术检测发现木犀草素作用 H460 细胞后,能有效促进其凋亡。

为了筛选木犀草素作用于 H460 细胞后发生差异表达的肺癌基因,本研究选用了 Human Lung Cancer RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array 芯片,该芯片包含了与肺癌相关的 84 个关键基因,主要涉及以下 4 个方面:肺癌样品中常规检测的基因,启动子发生甲基化变化的基因,细胞凋亡和细胞周期相关基因以及和肿瘤转移相关的基因。本实验通过 PCR Array 芯片

过表达组的细胞凋亡率上升到 42.8% (早期凋亡率 18.1% + 晚期凋亡率 24.7%),见图 5。

### 3.7 miR-34a-5p 过表达对凋亡相关蛋白表达的影响

与慢病毒阴性对照组相比,转染 miR-34a-5p 24 h 后,促凋亡蛋白 Bax 的表达水平显著增加 ( $P < 0.05$ ),抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平显著降低 ( $P < 0.01$ ),见图 6。

## 4 讨论与结论

近年来国内外学者研究证实,木犀草素能抑制多种肿瘤细胞的增殖和迁移<sup>[11-13]</sup>,抑制肺癌细胞增殖作用也有相关报道<sup>[6,7,14,15]</sup>。Meng 等研究表明,木犀草素可以通过激活 A549 肺癌细胞中 MEK/ERK 信号通路,促进肺癌细胞的凋亡,抑制肺癌细胞的迁移<sup>[6]</sup>;Kasala 等证实,木犀草素可以有效抑制苯并 a 芘引起的实验性肺癌发生和发展,其机制可

筛选技术发现,与对照组比较,木犀草素处理组差异表达基因 Tp53 的表达明显上调,Bcl-2 的表达明显下调,这表明木犀草素可能通过 p53 信号途径发挥促进肺癌细胞凋亡的作用。进一步的 Western blot 检测发现,木犀草素可使 H460 细胞中 p53、p21 和 Bax 蛋白的表达水平明显升高,而使 Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,且呈剂量依赖性,进一步证实了木犀草素对 p53 信号通路的调控作用。

众所周知,Tp53 作为重要的抑癌基因之一,在恶性肿瘤的发生和发展过程中起着关键性的作用。肺癌是恶性肿瘤中致死率最高的一种疾病,研究表明,Tp53 无论是在非小细胞肺癌还是在小细胞肺癌中的突变率均较高,导致 p53 信号通路出现异常<sup>[16,17]</sup>。诸多因素参与了肺癌中 p53 信号通路的

调控,如微小核糖核酸 miRNAs 就是其中重要的影响因素之一,并且可用于肺癌的早期诊断<sup>[18]</sup>。如作为 miRNA-34 家族主要成员之一的 miR-34a,就是 p53 的直接靶基因,它的第一外显子区域存在 p53 蛋白结合位点而受到 p53 的转录调控,可以和 p53 的其它靶标,如 p21 一起,促进恶性肿瘤细胞生长停滞和死亡的发生<sup>[9,10]</sup>。大量研究证实 miR-34a 可作为一种抑癌基因,抑制胶质瘤、骨肉瘤、肝癌、结肠癌等恶性肿瘤细胞的增殖、生长和迁移,在多种癌症的发生发展中发挥抑癌作用<sup>[19-22]</sup>。曾婷等<sup>[23]</sup>研究发现,非小细胞肺癌患者的癌组织中 miR-34a 的表达水平明显低于癌旁组织。Chakraborty 等<sup>[8]</sup>研究报告,miR-34a 除了受到 p53 的调控外,还可反过来调控 p53 本身及下游功能性靶基因如 Bcl-2 和 Bax 的表达,两者的互动可有效促进非小细胞肺癌 A549 和 H1299 细胞的凋亡。

本实验研究发现,木犀草素处理 H460 细胞后,miR-34a-5p 的表达水平明显增加,而给予 p53 抑制剂 PFT $\alpha$  阻断 p53 基因激活后,miR-34a-5p 的基因表达量明显下降,提示木犀草素有可能通过激活 p53 从而促进 miR-34a-5p 的基因表达。另外,将 miR-34a-5p 过表达后,肺癌 H460 细胞的凋亡水平明显升高,同时,可显著上调 Bax 的表达,抑制 Bcl-2 的表达。Bax 和 Bcl-2 分别是 Bcl-2 家族中最主要的促进凋亡和抑制凋亡蛋白<sup>[24]</sup>,以上结果提示对 miR-34a-5p 的表达调控是促进 H460 肺癌细胞凋亡的重要因素之一。

综上所述,木犀草素对人肺癌 H460 细胞有明显的抗肿瘤活性,其作用机制可能是通过激活 p53 信号通路,促进 miR-34a-5p 的上调,最终影响凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 的表达,从而诱导 H460 肺癌细胞凋亡。

#### 参考文献

- 1 Chen WQ, Zheng RS, Baade PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66:115-132.
- 2 Kim HJ, Lee W, Yun JM. Luteolin inhibits hyperglycemia-induced proinflammatory cytokine production and its epigenetic mechanism in human monocytes [J]. *Phytother Res*, 2014, 28:1383-1391.
- 3 Zhang T, Wu W, Li D, *et al.* Anti-oxidant and anti-apoptotic effects of luteolin on mice peritoneal macrophages stimulated by angiotensin II [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20:346-351.
- 4 Chen Y, Sun XB, Lu HE, *et al.* Effect of luteoin in delaying

- cataract in STZ-induced diabetic rats [J]. *Arch Pharm Res*, 2015, 40:88-95.
- 5 Naso LG, Badiola I, Marquez CJ, *et al.* Inhibition of the metastatic progression of breast and colorectal cancer *in vitro* and *in vivo* in murine model by the oxidovanadium (IV) complex with luteolin [J]. *Bioorg Med Chem*, 2016, 24:6004-6011.
- 6 Meng G, Chai K, Li X, *et al.* Luteolin exerts pro-apoptotic effect and anti-migration effects on A549 lung adenocarcinoma cells through the activation of MEK/ERK signaling pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2016, 257:26-34.
- 7 Hu CP (胡春萍), Cai XT (蔡雪婷), Hu TT (胡婷婷), *et al.* Mechanism of growth inhibition effect of 3', 4', 5, 7-tetrahydroxyflavone on A549 cells [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2012, 37:1259-1264.
- 8 Chakraborty S, Mazumdar M, Mukherjee S, *et al.* Restoration of p53/miR-34a regulatory axis decreases survival advantage and ensures Bax-dependent apoptosis of non-small cell lung carcinoma cells [J]. *FEBS Lett*, 2014, 588:549-559.
- 9 Song C, Lu P, Sun G, *et al.* miR-34a sensitizes lung cancer cells to cisplatin via p53/miR-34a/MYC axis [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 482:22-27.
- 10 Lou G, Liu Y, Wu S, *et al.* The p53/miR-34a/SIRT1 positive feedback loop in quercetin-induced apoptosis [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35:2192-2202.
- 11 Yuan L, Lang T, Jin B, *et al.* Luteolin inhibits colorectal cancer cell epithelial-to-mesenchymal transition by suppressing CREB1 expression revealed by comparative proteomics study [J]. *J Proteomics*, 2017, 161:1-10.
- 12 Tu DG, Lin WT, Yu CC, *et al.* Chemotherapeutic effects of luteolin on radio-sensitivity enhancement and interleukin-6/signal transducer and activator of transcription 3 signaling repression of oral cancer stem cells [J]. *J Formos Med Assoc*, 2016, 115:1032-1038.
- 13 Lin CW, Lai GM, Chen KC, *et al.* RPS12 increases the invasiveness in cervical cancer activated by c-Myc and inhibited by the dietary flavonoids luteolin and quercetin [J]. *J Funct Foods*, 2015, 19:236-247.
- 14 Kasala ER, Bodduluru LN, Barua CC, *et al.* Antioxidant and antitumor efficacy of Luteolin, a dietary flavone on benzo(a)pyrene-induced experimental lung carcinogenesis [J]. *Biomol Pharmacother*, 2016, 82:568-577.
- 15 Choi HJ, Choi HJ, Chung TW, *et al.* Luteolin inhibits recruitment of monocytes and migration of Lewis lung carcinoma cells by suppressing chemokine (C-C motif) ligand 2 expression in tumor-associated macrophage [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 470:101-106.