

# 异甘草素对人肺癌细胞株 H460 增殖、 凋亡及 NF- $\kappa$ B 信号通路的影响

覃月穆<sup>1,2</sup>, 姜泽群<sup>1,2</sup>, 马艳霞<sup>2</sup>, 张旭<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>南京中医药大学 医学与生命科学学院; <sup>2</sup>江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023

**摘要:** 研究异甘草素对人肺癌 NCI-H460 细胞增殖、周期及凋亡的影响, 并探讨其相关分子机制为其治疗肺癌提供新的科学依据。取对数生长期人肺癌 NCI-H460 细胞, 用不同浓度异甘草素处理, 采用 CGK-8 法检测细胞增殖能力; 流式细胞术检测细胞周期、凋亡的变化; PCR array 检测肺癌相关基因 mRNA 表达; Western-blot 检测 p-p65, I $\kappa$ B  $\alpha$ 、I $\kappa$ B  $\beta$ 、Bax、Bcl-2 表达量变化; 细胞免疫荧光实验观察异甘草素对 NF- $\kappa$ B p65 分布的影响; 结果显示, 异甘草素能有效抑制人肺癌 H460 细胞的增殖和诱导细胞周期阻滞, 并促进其凋亡, 其机制可能是通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化, 抑制 NF- $\kappa$ B p65 入核使其不能发挥转录活性, 最终影响其下游凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 的表达来实现的。

**关键词:** 异甘草素; 肺癌; NCI-H460; 细胞凋亡; NF- $\kappa$ B

中图分类号: R93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.5.019

## Effects of Isoliquiritigenin on Proliferation, Apoptosis and NF- $\kappa$ B Signaling Pathway in Human Lung Cancer H460 Cells

QIN Yue-mu<sup>1,2</sup>, JIANG Ze-qun<sup>1,2</sup>, MA Yan-xia<sup>2</sup>, ZHANG Xu<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>School of Medicine and Life Sciences, Nanjing University of Chinese Medicine; <sup>2</sup>Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine (TCM) Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, P. R. China

**Abstract:** To study the effect of Isoliquiritigenin (ISL) on the proliferation, cell cycle and apoptosis of human lung cancer cell line NCI-H460, and to explore its relevant molecular mechanism to provide a new scientific basis for lung cancer treatment. NCI-H460 cells in logarithm growth phase were selected and cultured with different concentration of ISL. The cell viability was detected by CCK-8 assay, while cell cycle and cell apoptosis were measured by cytometry assay. The mRNA expression of lung cancer related genes in NCI-H460 cells were determined by PCR array. The protein levels of p-p65, I $\kappa$ B  $\alpha$ , I $\kappa$ B  $\beta$ , Bax and Bcl-2 were detected by Western blot analysis. Then, the effect of ISL on the expression of NF- $\kappa$ B p65 was observed by immunofluorescence assay. The results showed that ISL could inhibit proliferation and induce cell cycle block, as well as cell apoptosis in NCI-H460 cells. The mechanism may be related with the inhibition of the NF- $\kappa$ B signaling pathway, by inhibiting the entry of NF- $\kappa$ B p65 into the nucleus, it failing to exert its transcriptional activity and ultimately affecting the expression of downstream apoptotic proteins Bax and Bcl-2.

**Key words:** isoliquiritigenin; lung cancer; NCI-H460; cell apoptosis; NF- $\kappa$ B

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, 且是男性癌症死亡的首要原因。《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>, 非小细胞肺癌是肺癌中最为多见的病理类型, 约占肺癌总量的近 85%, 根据恶性非小细胞肺上皮性肿瘤的分类, 非小细胞肺癌可分为: 大细胞癌、鳞状细胞癌、腺癌<sup>[1]</sup>。目前临床上常用的治疗手段有手术和放疗等, 但治疗效果都不容乐观<sup>[2,3]</sup>。因此, 采取多靶点联合治疗, 将化疗和化学生物学疗法相结合或发掘新的靶点药物是肺癌治疗新的选择<sup>[4]</sup>。中药本身具有多靶点作用, 使之必然成为挖掘新的肿瘤治疗方法

收稿日期: 2017-11-27 接受日期: 2018-04-20

基金项目: 江苏省 2016 年度普通高校研究生科研创新计划 (NKYZZ16\_0412); IRSES Marie Curie project on China and Europe taking care in health care solutions-CHEATCH (PIESSES-GA-2013-612589); 国家自然科学基金 (81603584)

\* 通信作者 E-mail: zhangxu@njucm.edu.cn

的源泉。异甘草素又名 4, 2', 4'-三羟基查耳酮 (Isoliquiritigenin, ISL), 是一种具有简单查尔酮结构的黄酮类化合物, 为黄色针状结晶, 难溶于水, 溶于极性小的溶剂, 如乙醚、氯仿等, 而黄酮类化合物是大家所熟知的一类抗癌化合物<sup>[5]</sup>, 如黄酮类化合物木犀草素通过抑制 PTEN PI3K-AKT 信号通路以及对免疫功能的调节作用从而抑制肺癌的增殖和转移<sup>[6]</sup>。异甘草素主要存在石竹科植物石竹 *D. chinensis* L. 干燥地上部分, 细胞实验结果显示异甘草素具有抗炎, 抗微生物, 抗氧化, 抗癌活性, 免疫调节, 保肝和心脏保护作用等诸多药理活性<sup>[7-10]</sup>。近几年关于异甘草素抗肿瘤作用的研究取得了很大的进展, 报道显示异甘草素可抑制非小细胞肺癌的肺鳞癌细胞株 NCI-H157<sup>[11]</sup>、肺腺癌细胞株 A549<sup>[12]</sup> 的增殖, 并诱导其凋亡, 但目前尚未见异甘草素对大细胞肺癌细胞株 NCI-H460 细胞的研究报道。本文拟探讨异甘草素对 NCI-H460 细胞的增殖、凋亡及对 NF- $\kappa$ B 通路相关基因表达的影响, 为其临床应用提供理论和实验依据。

## 1 材料与仪器

### 1.1 药品与试剂

异甘草素 (Isoliquiritigenin), 分子量 256. 25 g/mol, 购自上海源叶生物科技有限公司 (纯度  $\geq$  98%), 用 DMSO 配制成 10 mmol/L 母液, -20  $^{\circ}$ 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。

青链霉素混合液 (100  $\times$ ) 购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司; DMSO (南京化学试剂股份有限公司); RPMI 1640 培养基、磷酸盐缓冲液 (PBS PH 7.4)、胰蛋白酶购自上海源培生物科技股份有限公司; 胎牛血清购自美国 GIBICO 公司; CCK-8 细胞增殖与毒性检测试剂盒、免疫荧光试剂盒均购自上海碧云天公司; AnnexinV-PE/7-AAD 双染试剂盒 (美国 BD 公司); AnnexinV-FITC/PI 双染试剂盒和 Trizol (美国 Invitrogen 公司); DAPI 染色液 (江苏凯基生物技术股份有限公司); 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; 荧光兔二抗 (美国 ImmunoReagents); ECL 化学发光检测试剂盒 (美国 Millipore 公司); SYBR Green qPCR 和逆转录试剂盒 (立陶宛 Fermentas 公司)。

### 1.2 仪器

CO<sub>2</sub> 培养箱 (美国 Thermo HERACELL 150i); 生物安全柜 (美国 Thermo 1300 SERIES A2); 酶标仪 (美国 Thermo MULTISKAN GO); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus BX43); 普通倒置显微镜 (德国 LEICA DMi8); 自动细胞计数仪 (美国 life Countess II); 高速冷冻离心机 (美国 Beckman Allegra X-30R); 微量离心机 (美国 Thermo MICROCL 17R); FACScan 型流式细胞仪 (美国 BD 公司); 电泳仪、7500 型定量 PCR 仪、凝胶成像分析仪 (美国 Bio-Rad); 恒温水浴锅 (上海精宏实验设备有限公司 DK-420S); 制冰机 (意大利 Scotsman AF103); 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)。其他: 微孔板、培养皿、培养瓶、EP 管、枪头等 (中国 Nest); PVDF 膜 (美国 Millipore)。

### 1.3 细胞及培养

人 NCI-H460 肺癌细胞株购自江苏凯基生物技术股份有限公司, 用含 100  $\mu$ g/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素以及 10% FBS 的 RPMI-1640 培养基常规培养于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>/95% 空气的细胞培养箱中, 用 0. 25% 胰蛋白酶消化传代, 每 1 ~ 3 天传代一次。

## 2 实验方法

### 2.1 CCK-8 法检测异甘草素对肺癌细胞 NCI-H460 增殖的影响

将 NCI-H460 细胞以  $1 \times 10^6$ /孔接种于 96 孔板中, 每孔 100  $\mu$ L, 随机分为空白组、对照组和异甘草素各加药组 (5 ~ 100  $\mu$ mol/L), 每组均设 3 个平行孔。空白组为含 10% 胎牛血清的 100  $\mu$ L 完全培养基, 对照组为含与实验组等量细胞的 100  $\mu$ L 细胞悬液。细胞加药培养 12、24、48 h 后, 每孔加入 10  $\mu$ 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 异甘草素对 NCI-H460 细胞周期的影响

为了检测异甘草素是否影响 NCI-H460 细胞的细胞周期, 取处于生长对数期的 H460 细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /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、高剂量异甘草素加药组 (分别为 15、30、60  $\mu$ mol/L), 每组均设 3 个平行孔。细胞加药培养 24 h 后, 对照组和实验组

细胞经胰酶消化, PBS 洗 2 遍, 70% 乙醇, 4  $^{\circ}$ C 固定过夜。PBS 清洗固定细胞, 然后加入 1 mL 含 50 mg/L PI 和 1g/L DNA 的 PBS, 37  $^{\circ}$ C 避光温育 30 min, 使用流式细胞仪测定 DNA 含量和细胞周期分布。

### 2.3 流式细胞仪 AnnexinV-FITC/PI 双染色法检测细胞凋亡率

细胞加药培养 24 h 后, 将对照组和加药组的细胞用 PBS 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  $\mu$ L 的 Binding Buffer 制成约  $1 \times 10^8$ /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。

### 2.4 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 后的对照组和异甘草素高剂量组 (60  $\mu$ 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。

### 2.5 Western Blot 方法检测相关蛋白的表达

细胞处理方法同 2.2, 取出药物处理 24 h 后的细胞, 预冷的 PBS 洗涤三遍后弃去 PBS 液, 加入 400  $\mu$ L/dish 含 100 mM 蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上刮取细胞, 收集细胞裂解液, 置于 -80  $^{\circ}$ C 过夜。次日取出样品, 置 4  $^{\circ}$ C 冻融后经 12000 rpm, 15 min 4  $^{\circ}$ C 离心沉降细胞碎片, 收集上清。每管样品取 200  $\mu$ L 加入 50  $\mu$ L 的 5  $\times$  Loading buffer, 置于沸水浴变性处理 10 min。以 Bradford 法测定蛋白浓度后, 取 30  $\mu$ g 蛋白加上样缓冲液, 配制 10% 分离胶与 4% 浓缩胶。电泳结束后湿法转膜 (硝酸纤维素膜), 然后用封闭液 4  $^{\circ}$ 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, 每次 5 min 继而与二抗抗体室温孵育 2 h。加 ECL 试剂显色, 凝胶成像仪中采集图像, Image Lab 软件进行灰度分析。

### 2.6 免疫荧光检测 NF- $\kappa$ B p65 的入核

取处于生长对数期的 NCI-H460 细胞, 调整细胞密度为  $1 \times 10^6$ /L, 以每孔 1 mL 的细胞悬液接种于 6 孔板, 随机分为 control、TNF- $\alpha$  和异甘草素 (ISL 30  $\mu$ mol/L) + TNF- $\alpha$  组, 细胞培养 24 h 后, 弃去上清, 用预冷的 PBS 洗涤细胞两遍; 4% 多聚甲醛 (in PBS) 4  $^{\circ}$ C 冰上缓慢振荡固定 30 min; 预冷的 PBS 摇床上洗涤三遍, 每次 10 min; 0.2% Triton X-100 (in PBS) 透化细胞 10 min; 1% BSA/PBS 室温封闭 30 min; 重复 PBS 洗涤操作, 每次 10 min; 1% BSA/PBS 稀释 p65 一抗 (1:200 稀释), 4  $^{\circ}$ C 冰箱过夜; 重复 PBS 洗涤操作, 每次 10 min; 1% BSA/PBS 稀释荧光二抗 (1:250 稀释), 室温避光孵育 2 h (后续操作均避光进行); 重复 PBS 洗涤操作; DAPI 复染细胞核, 室温孵育 5 min; 重复 PBS 洗涤操作后于倒置荧光显微镜下拍照观察。

### 2.7 统计学分析

应用 SPSS15.0 软件对实验数据进行单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示有显著性差异, 结果以  $\bar{x} \pm SD$  表示。数据作图采用 GraphPad Prism 5 软件。

## 3 实验结果

### 3.1 异甘草素对 NCI-H460 细胞增殖的影响

与对照组相比, NCI-H460 细胞的增殖能被一定浓度的异甘草素显著抑制, 随着异甘草素的浓度增加及作用时间延长, 异甘草素抑制细胞增殖的效果越强, 呈时间和浓度的依赖性, 异甘草素作用 NCI-H460 细胞 48 h 的 IC<sub>50</sub> 为 60  $\mu$ mol/L。因此, 选择 60  $\mu$ mol/L 作为实验研究最大浓度 (见图 1)。

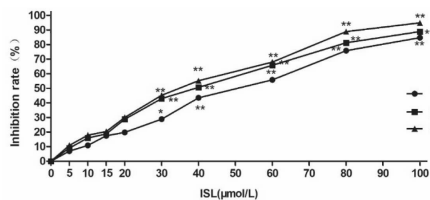


图 1 异甘草素对 H460 细胞的增殖抑制作用

Fig. 1 Inhibitory effect of Isoliquiritigenin on NCI-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 异甘草素对 NCI-H460 细胞周期的影响

为了检测异甘草素是否影响 NCI-H460 细胞的细胞周期,细胞经过不同浓度异甘草素处理 24 h 后经过 PI 染色,使用流式细胞仪检测细胞周期变化,

根据周期分布图做各个周期百分比变化柱状图,可清楚的发现异甘草素可将细胞周期阻滞在 G2/M 期(见图 2)。

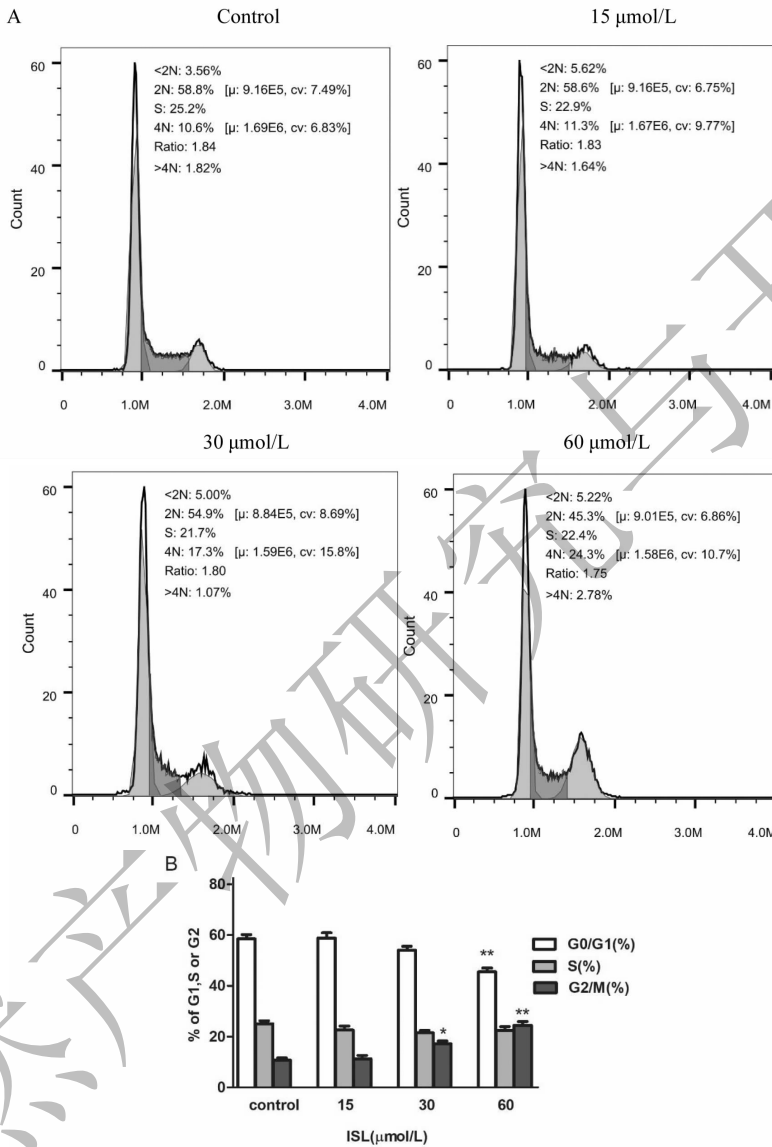


图2 异甘草素对 NCI-H460 细胞周期的影响

Fig. 2 The effect of Isoliquiritigenin on NCI-H460 cell cycle

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

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

### 3.3 异甘草素对 NCI-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(LR 区域)和晚期(UR 区域)凋亡率极低,分别为 1.3% 和 6.4%。异甘草素 15、30、60 μmol/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 11.1% (早期凋亡率 9.4% + 晚期凋亡率 1.7%), 14.2% (早期凋亡率 12.1% + 晚期凋亡率 2.1%) 和 20.3% (早期凋亡率 17.3% + 晚期凋亡率 3.0%),随着药物浓度的增加,凋亡率逐渐增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

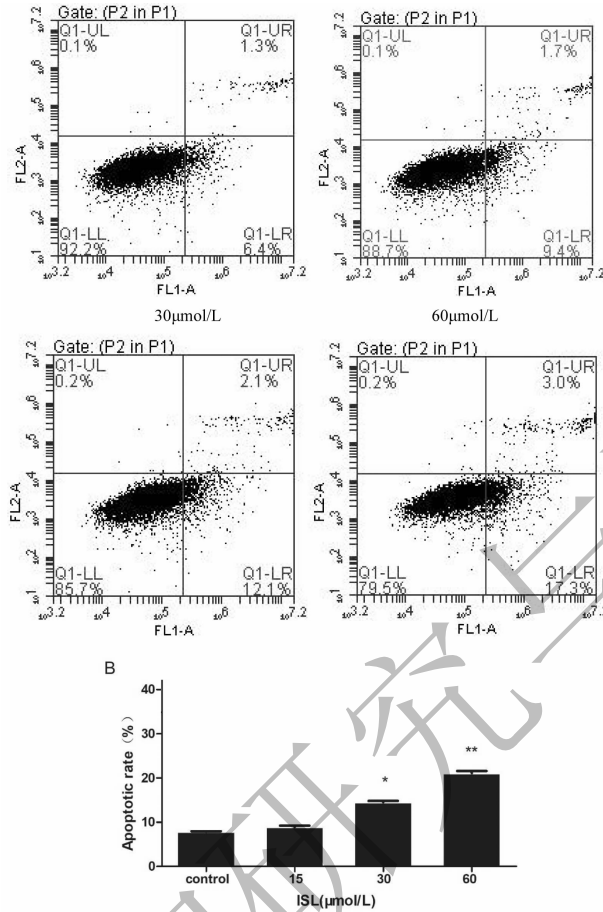


图3 异甘草素对 NCI-H460 细胞凋亡的影响

Fig. 3 The effect of Isoliquiritigenin on H460 cell apoptosis

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

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

### 3.4 异甘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,异甘草素高剂量组(60 μmol/L)与对照组比较,发生上调  $\geq 2$  倍或下调  $\leq 0.2$  倍的基因共 12 个,其中

上调的基因有 7 个,如 NF-κB IE 基因的表达上调了 4.9416 倍;下调的基因有 5 个,如 Bcl-2 基因的表达下调了 3 倍(见表 1)。

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 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

缩写 Abbreviation	基因全名 Gene full name	异甘草素组/对照组 Isoliquiritigenin group/Control group
BRCA2 乳腺癌 2 号基因	Breast cancer 2, early onset	3.063 ↑
CDKN2D 细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 2D	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	3.3988 ↓
CYP2C8 细胞色素 P450, 家族 2, 亚家族 C, 多肽 8	Cytochrome P450, family 2, subfamily C, polypeptide 8	3.668 ↑
HIF1A 缺氧诱导因子 1, α 亚基	Hypoxia inducible factor 1, alpha subunit (basic helix-loop-helix transcription factor)	4.6428 ↑
MVP 主要的穹窿蛋白	Major vault protein	4.3318 ↑

续表 I Continued table 1

缩写 Abbreviation	基因全名 Gene full name	异甘草素组/对照组 Isoliquiritigenin group/Control group
NFKBIB 细胞抑制剂中 $\kappa$ 轻链多肽基因增强子的核因子, $\beta$	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	4.7404 ↓
NFKBIE $\kappa$ B 轻链多肽基因增强子在 B 细胞抑制剂中的核因子, $\epsilon$	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon	4.9416 ↓
PPARG 过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma	3.668 ↑
RARG 视黄酸受体, $\gamma$	NR1B3/RARC (Retinoic acid receptor, gamma)	4.2426 ↑
BCL-2 B 淋巴瘤-2 基因	B-cell lymphoma-2	3.0 ↓
RELB vrel 禽网状内皮细胞过多症病毒基因同源物 B	V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B	3.042 ↓
TOP2B 拓扑异构酶 (DNA) II $\beta$	Topoisomerase (DNA) II beta 180kDa	3.171 ↑

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: ↓

### 3.5 异甘草素对 NF- $\kappa$ B 信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较, NCI-H460 细胞经不同浓度的异甘草素作用后, p-p65, I $\kappa$ B  $\alpha$  和 I $\kappa$ B  $\beta$  的表达水平逐

渐下降, 见图 4; NF- $\kappa$ B 信号通路下游促凋亡蛋白 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(见图 5), 与对照组相比差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

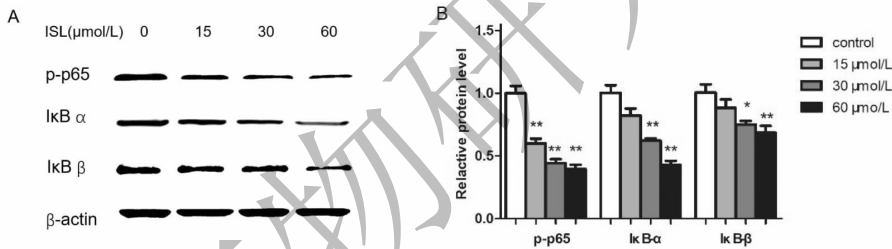


图 4 Western blot 检测 p-p65, I $\kappa$ B  $\alpha$  and I $\kappa$ B  $\beta$  的表达

Fig. 4 The expression level of p-p65, I $\kappa$ B  $\alpha$  and I $\kappa$ B  $\beta$  detected by Western blot

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

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

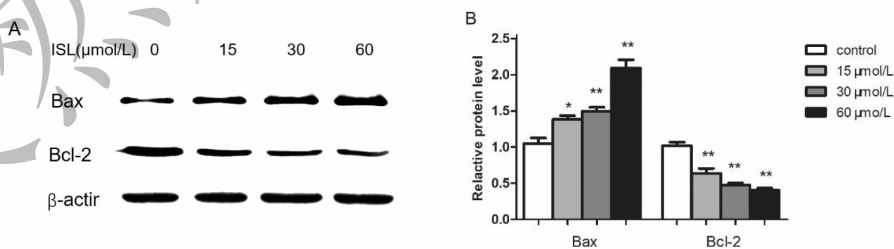


图 5 Western blot 检测 Bcl-2 及 Bax 的表达

Fig. 5 The expression level of Bcl-2 and Bax detected by Western blot

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

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

### 3.6 异甘草素抑制 TNF- $\alpha$ 诱导的 p65 入核

为研究异甘草素是否对 p65 的入核运动有影

响, 实验分为 control、TNF- $\alpha$  和 ISL + TNF- $\alpha$  组, 经过免疫荧光检测发现, 与 TNF- $\alpha$  组相比, 经过异甘草

素作用 NCI-H460 细胞后,再用 TNF-α 刺激,NF-κB (p65) 的入核运动受到明显的抑制作用,表明异甘

草素可以明显抑制 TNF-α 诱导的 p65 入核,见图 6。

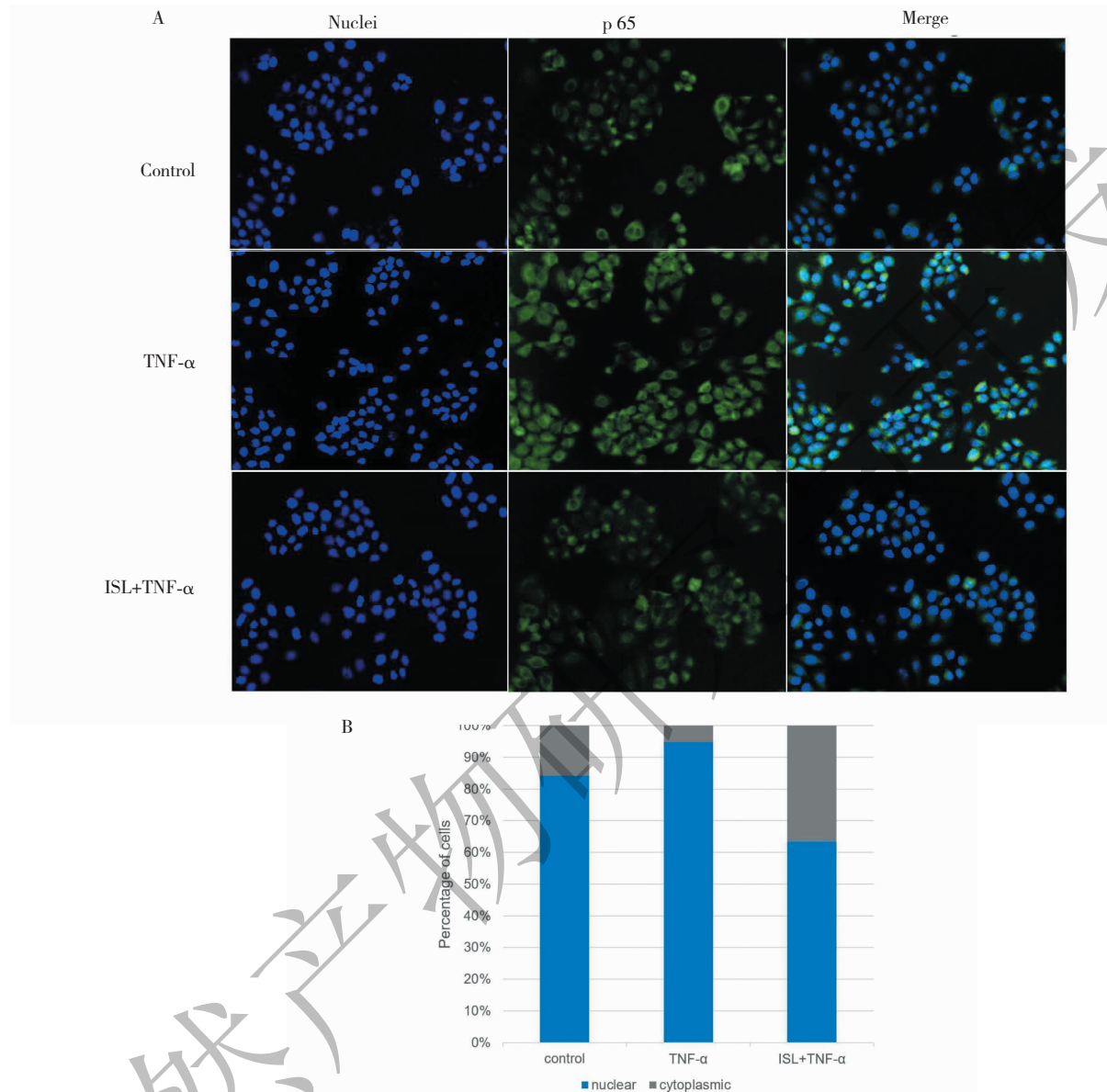


图 6 异甘草素抑制 NF-κB p65 转录 (200 ×)

Fig. 6 ISL inhibited NF-κB p65 translocation (200 ×)

注:与对照组比较,\* P < 0.05,\*\* P < 0.01

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

### 4 结论

在我国,肺癌占恶性肿瘤发病、死亡的首位<sup>[1]</sup>,大部分患者就诊时已处于中晚期阶段,目前临床上常用的治疗手段有手术和放疗化疗等,但治疗效果都不容乐观,每年仍有许多患者死于肺癌。中药是天然化合物的宝库,中药本身多靶点作用的特性,从多

靶点综合考虑治疗肺癌已成为我国中医药治疗肺癌的特色之一,中医药治疗肺癌不仅单用有效,而且可与手术、放疗、化疗联合运用提高临床疗效和减少毒副作用<sup>[13]</sup>,应用廉价的中药治疗肺癌在临床实践中日益显示出优势,而具有调和诸药之功的甘草就是常用中药之一,甘草中含有多种有生理活性的化合物,异甘草素就是其中一种,众多研究表明异甘草素

具有抗肿瘤活性等诸多药理活性,但尚无异甘草素关于 NCI-H460 细胞的研究报道。本实验研究用 CCK-8 法进行细胞活性检测时发现,异甘草素能有效抑制人肺癌细胞 NCI-H460 的增殖。流式细胞术检测发现异甘草素作用 NCI-H460 细胞后,能有效促进其凋亡,并且可以将 NCI-H460 细胞阻滞在 G<sub>2</sub>/M 期。

为了筛选异甘草素作用于 NCI-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,其中包括细胞凋亡和细胞周期相关基因。本实验通过 PCR Array 芯片筛选技术发现,与对照组比较,异甘草素处理组差异表达基因 NF- $\kappa$ B IB (I $\kappa$ B  $\beta$ )、Bcl-2 的表达明显下调,这表明异甘草素可能通过 NF- $\kappa$ B 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,异甘草素可使 NCI-H460 细胞中 I $\kappa$ B  $\beta$ 、Bcl-2 蛋白表达水平明显降低,且呈剂量依赖性,进一步证实了异甘草素对 NF- $\kappa$ B 信号通路的调控作用。

众多研究已经证实 NF- $\kappa$ B 信号通路在肿瘤进程中扮演重要角色,并发现 NF- $\kappa$ B 与细胞凋亡关系密切,其可以参与多种凋亡相关基因的转录调控,同时具有促进细胞凋亡和抑制胞凋亡的双向作用<sup>[14]</sup>。NF- $\kappa$ B 激活的调节包括了正、负反馈调节<sup>[15]</sup>。细胞外信号刺激引起 NF- $\kappa$ B 的激活可以增加细胞内激活因子的表达增加,如细胞因子 TNF- $\alpha$  的表达增加,而 TNF- $\alpha$  的表达增加又反过来激活 NF- $\kappa$ B<sup>[16]</sup>。实验采用 TNF- $\alpha$  作为诱导剂,进行 p65 的入核研究,结果发现,用异甘草素处理 H460 细胞后,p65 的入核比例明显减少,表明异甘草素能够显著抑制 TNF- $\alpha$  诱导的 p65 的入核,使其不能发挥转录活性,最终诱导 NCI-H460 细胞凋亡。Bcl-2 和 Bax 是最主要的抑制细胞凋亡和促进细胞凋亡的基因<sup>[17]</sup>,细胞凋亡时各种因素调控 Bcl-2 蛋白的表达减少,Bax 蛋白的表达增多,因而 Bcl-2/Bax 比例下降,Bax 和 Bcl-2 的异源二聚体减少,Bax 的同源二聚体增多,从而促进细胞凋亡。研究发现 Bcl-2 的启动子上存在 NF- $\kappa$ B 的特异结合位点,NF- $\kappa$ B 可以通过转录途径直接上调 Bcl-2 的表达<sup>[18]</sup>,而抑制 NF- $\kappa$ B 的活性则可以抑制 Bcl-2 的表达,进而诱导细胞细胞凋亡<sup>[19]</sup>。Western blot 检测发现异甘草素使 NCI-H460 细胞中 Bax 蛋白的表达水平明显升

高,而使 p-p65, I $\kappa$ B  $\alpha$  蛋白的表达水平明显降低,以上结果提示对 NF- $\kappa$ B 信号通路的表达调控是促进 NCI-H460 肺癌细胞凋亡的重要因素之一。

综上所述,异甘草素对人肺癌 NCI-H460 细胞有明显的抗肿瘤活性,其作用机制可能是通过抑制 NF- $\kappa$ B 信号通路的活化,抑制 NF- $\kappa$ B p65 入核使其不能发挥转录活性,并影响其下游凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 的表达,从而诱导 NCI-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 Busser B, Coll JL, Hurbini A. The increasing role of amphiregulin in non-small cell lung cancer [J]. *Pathol Biol*, 2009, 57: 511-512.
- 3 Sharma SV, Bell DW, Settleman J, *et al.* Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 169-181.
- 4 Gorzalczany Y, Gilad Y, Amihai D. Combining an EGFR directed tyrosine kinase inhibitor with autophagy-inducing drugs: A beneficial strategy to combat non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Letters*, 2011, 310: 207-215.
- 5 Moon Y J, Wang X, Morris M E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism [J]. *Toxicol In Vitro*, 2006, 20: 187.
- 6 Zhou L (周亮), Qiao YL (乔印玲), Wang L (王莉), *et al.* Effects of Luteolin on Expression of PTEN PI3K-AKT Signaling Pathway and Immune Function in Lung Cancer Model Rats [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2017, 29: 2128-2133.
- 7 Chen H, Zhang B, Yuan X, *et al.* Isoliquiritigenin-induced effects on Nrf2 mediated antioxidant defence in the HL-60 cell monocytic differentiation [J]. *Cell Boil Int*, 2013, 37: 1215-1224.
- 8 Zheng H, Li Y, Wang Y, *et al.* Downregulation of COX-2 and CYP 4A signaling by isoliquiritigenin inhibits human breast cancer metastasis through preventing anoikis resistance, migration and invasion [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2014, 280 (1): 10-20.
- 9 Yang Y, Bai L, Li X, *et al.* Transport of active flavonoids, base on cytotoxicity and lipophilicity: an evaluation using the blood brain barrier cell and Caco-2 cell models [J]. *Toxicol In Vitro*, 2014, 28: 388-396.
- 10 Gaur R, Gupta VK, Singh P, *et al.* Drug resistance reversal potential of isoliquiritigenin and liquiritigenin isolated from gly-



- cyrrhiza glabra against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) [J]. *Phytother Res*, 2016, 30:1708-1715.
- 11 Zhou Y, Ho WS. Combination of liquiritigenin, Isoliquiritin and isoliquiritigenin induce apoptotic cell death through upregulation P53 and P21 in the A 549 non-small lung cancers [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31:298-304.
  - 12 Liu L(刘丽), Shen H(沈洪), Jiang PJ(姜鹏君), *et al.* Effects of isoliquiritigenin on induction of apoptosis and expression of ERS related genes in NCI-H157 cells [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med*(南京中医药大学学报), 2016, 32:264-268.
  - 13 Xu ZY(徐振晔), Gong YB(龚亚斌). Prospect on diagnosis and treatment of lung cancer of Chinese and western medicine in the next decade [J]. *J Shanghai Univ Tradit Chin Med*(上海中医药大学学报), 2011, 25:10-14.
  - 14 Dutta J, Fan Y, Gupta N, *et al.* Curren sights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB [J]. *Oncogene*, 2006, 25:6800-6826.
  - 15 Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB [J]. *Genes Dev*, 2004, 18:2195-2224.
  - 16 Kulms D, Schwarz T. NF-kappaB and cytokines [J]. *Vitam Horm*, 2006, 74:283-300.
  - 17 Sukhotnik I, Voskoboinik K, Lurie M, *et al.* Involvement of the bax and bcl-2 system in the induction of germ cell apoptosis is correlated with the time of reperfusion after testicular ischemia in a rat model [J]. *Fertil Steril*, 2009, 92:1466-1469.
  - 18 Xie CY, Yang W, Ying J, *et al.* B-cell lymphoma-2 over-expression protects  $\delta$ -elemene-induced apoptosis in human lung carcinoma mucocypidermoid cells via a nuclear factor kappa B-related pathway [J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, 34:1279-1286.
  - 19 Fahy BN, Schlieman MG, Mortenson MM, *et al.* Targeting Bcl-2 overexpression in various human malignancies through NF- $\kappa$ B inhibition by the proteasome inhibitor bortezomib [J]. *Cancer Chemoth Pharm*, 2005, 56(1):46-54.
- 
- (上接第 776 页)
- 5 Liu YJ(刘益均), Zheng J(郑军), Xiao WB(肖文波), *et al.* Influence of oxymatrine on cell proliferation and VEGF expression in human gastric cancer cell line SGC-7901 [J]. *China Oncol*(中国癌症杂志), 2010, 20:22-26.
  - 6 Chen D(陈丹), Wang KB(王凯冰), Li JZ(李加桩), *et al.* Present status and challenges of targeted drugs on anti-angiogenesis in primary hepatic carcinoma [J]. *China Cancer*(中国肿瘤), 2017, 26:203-209.
  - 7 Hou ZC(侯卓成), Bai LG(白鲁根), Li WQ(李卫强). Influence of rat containing serum of Ningxia Eremia multiocellata on human gastric cancer BCG-823 cell proliferation and apoptosis [J]. *World Chin J Digestol*(世界华人消化杂志), 2017, 25:43-48.
  - 8 Wu Q(吴琴), Gao Y(高云). Role of sphingosine-1-phosphate receptor 1 in pain modulation [J]. *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2015, 31:759-762.
  - 9 Zhang DM(张东梅), Qing C(卿晨). Vascular endothelial growth factor family and tumor angiogenesis [J]. *Med Recapitul*(分子生物医学), 2017, 23:417-427.
  - 10 Li N(李娜), Gao JY(高俊岩), Liu M(刘敏). Advances in the relationship between apoptosis and tumor [J]. *Contempor Med*(当代医学), 2009, 15:13-14.
  - 11 Yang ZJ(杨志杰), Li XL(李秀丽). Research progress of traditional Chinese medicine inducing apoptosis and treating malignant tumor [J]. *China J Chin Med*(中医学报), 2013, 28:18-20.