

• 药理与临床 •

木犀草苷对人食管鳞状癌 Eca109 细胞生长的抑制作用及其机制

王婷婷, 王少康, 黄桂玲, 孙桂菊*

东南大学公共卫生学院, 江苏 南京 210009

摘要: 目的 研究木犀草苷对人食管鳞状癌 Eca109 细胞生长的抑制作用及其机制。方法 Eca109 细胞经不同浓度木犀草苷处理后, MTT 法检测 Eca109 细胞增殖; 倒置显微镜观察 Eca109 细胞形态的变化; 流式细胞术检测 Eca109 细胞周期变化及细胞凋亡情况; RT-PCR 检测 Eca109 细胞 cyclin D1、survivin 和 c-myc 基因表达。结果 MTT 实验表明, 木犀草苷 80、120、160、200、240 $\mu\text{mol/L}$ 对 Eca109 细胞均有抑制作用, 且与浓度相关。木犀草苷可引起 Eca109 细胞形态改变、体积缩小, 并与周围细胞脱离, 浓度为 240 $\mu\text{mol/L}$ 时使细胞呈出芽状, 有的细胞伸出多个伪足样突起; 浓度为 160、240 $\mu\text{mol/L}$ 时, 可将细胞阻滞于 G₂/M 期, 诱导细胞凋亡; 浓度为 240 $\mu\text{mol/L}$ 并处理 Eca109 细胞 48 h 后, 使 Eca109 细胞 cyclin D1、survivin 和 c-myc 基因表达低于对照组 ($P < 0.05$)。结论 木犀草苷对食管鳞状癌 Eca109 细胞的生长有显著抑制作用, 其通过改变细胞周期、诱导细胞凋亡及抑制相关基因的表达发挥抗肿瘤作用。

关键词: 木犀草苷; 食管鳞状癌细胞 Eca109; 细胞生长; 细胞周期; 细胞凋亡; 基因表达

中图分类号: R979.19 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2013)12-1604-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.12.016

Inhibition of luteoloside on proliferation of human esophageal carcinoma cell line Eca109 and its mechanism

WANG Ting-ting, WANG Shao-kang, HUANG Gui-ling, SUN Gui-ju

School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China

Abstract: Objective To investigate the inhibition of luteoloside on the proliferation of human esophageal carcinoma cell line Eca109 and its mechanism. **Methods** MTT assay was used for detecting the influence of luteoloside at different concentration on the proliferation of Eca109. The morphological changes of cells were observed under inverted microscope. The cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. RT-PCR was used to detect the mRNA expression of cyclin D1, survivin, and c-myc genes. **Results** The results of MTT assay showed different doses (80, 120, 160, 200, and 240 $\mu\text{mol/L}$) of luteoloside could inhibit the cell proliferation of Eca109 cells in a dose-response manner. Luteoloside could also change the morphological characteristics of cells, reduce the cell size, and separate from peripheral cells. Treated with 240 $\mu\text{mol/L}$ luteoloside, the cells were sprouting and some of them developed multiple pseudopodia-like protrusions. Treated with luteoloside (160 and 240 $\mu\text{mol/L}$), the cell cycle of Eca109 cells was blocked in G₂/M phase and apoptosis was induced ($P < 0.05$). Compared with the control group, the gene expression of cyclin D1, survivin, and c-myc was decreased after treated with 240 $\mu\text{mol/L}$ luteoloside for 48 h ($P < 0.05$). **Conclusion** Luteoloside could significantly inhibit the proliferation of Eca109 cells by changing the cell cycle and inducing the apoptosis. Moreover, it could decrease the mRNA expression of relative genes.

Key words: luteoloside; esophageal cancer cell line Eca109; cell growth; cell cycle; cell apoptosis; gene expression

木犀草苷 (luteoloside), 又名木犀草素-7-O-葡萄糖苷, 属黄酮类化合物, 主要存在于芹菜、青辣椒、紫苏叶等植物中, 在金银花、菊花、金雀花和小苦苣菜中也有分布^[1-6], 其在紫苏子、荷兰芹中以

收稿日期: 2012-11-25

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (30800914); 江苏省研究生科研创新计划 (CXZZ_0179); 达能膳食营养研究与宣教基金 (DIC2011-05)

作者简介: 王婷婷 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为营养与肿瘤。E-mail: danyangwtt@gmail.com

*通信作者 孙桂菊 E-mail: gjsun@seu.edu.cn

木犀草素的形式存在。木犀草苷是重要的生物活性物质,具有抗氧化、消炎和抗病毒等多种活性^[7-9];还具有抗肿瘤作用,可抑制人胃癌 BGC-823 细胞增殖^[10],将肺癌 A549 细胞阻滞于 G₂ 期或诱导其凋亡^[11]。本实验研究木犀草苷体外对人食管鳞状癌 Eca109 细胞增殖的抑制作用,并从细胞周期、细胞凋亡及相关基因表达的变化初步探讨其作用机制,为研发新一代的预防食管癌药物提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

木犀草苷(批号 MUST-12041703),质量分数≥98%,5-氟尿嘧啶(5-Fu,批号 F20121224),南京奥多福尼生物公司;RPMI-1640 培养基、胎牛血清、Trizol, Gibco 公司;含 0.25% EDTA 的胰蛋白酶、二甲基亚砜(DMSO)、Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒、细胞周期检测试剂盒,南京凯基生物科技发展有限公司;第一链 cDNA 合成试剂盒、即用 PCR 扩增试剂盒、引物,上海生工生物工程技术服务有限公司;四甲基偶氮唑盐(MTT),Sigma 公司;磷酸盐缓冲液(PBS),武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 细胞

人食管鳞状癌 Eca109 细胞,中国科学院上海细胞库提供。

1.3 仪器

RT—600 酶标仪, Rayto 公司;IX51 倒置显微镜,日本 Olympus 公司;DSC—HX1 数码相机,日本 Sony 公司;MCO—15AC 型 CO₂ 培养箱,日本 Sanyo 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

Eca109 细胞株置于含 10%胎牛血清、80 U/mL 青霉素和 0.08 mg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,于 37 ℃、饱和湿度、5% CO₂ 的培养箱中培养,2~3 d 传代 1 次,取对数期细胞进行实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖和细胞形态观察

取对数生长期 Eca109 细胞,经胰酶消化后调整密度为 5×10⁴/mL,每孔 150 μL 接种于 96 孔板,培养 24 h 后弃去培养液,设立空白对照组、阴性对照组、5-Fu (240 μmol/L) 阳性对照组和不同浓度木犀草苷(20、40、80、120、160、200、240 μmol/L)组,每组 5 个复孔,各给药组细胞给予相应药物后(空白对照和阴性对照组给予培养液)置于 37 ℃、5% CO₂ 条件下分别培养 24、48、72 h,培养结束后

每孔轻轻弃去上清液,用 PBS 洗 1 遍,每孔加入 5 mg/mL MTT 20 μL 继续培养 4 h,吸去液体,每孔加入 DMSO 150 μL,振荡 10 min,用全自动酶标仪检测 490 nm 处吸光度(A)值,计算细胞生长抑制率。实验重复 3 次。

$$\text{细胞生长抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{对照}}$$

根据 MTT 实验结果,选取木犀草苷低(80 μmol/L)、中(160 μmol/L)、高(240 μmol/L)3 个浓度进行后续实验。

按相同密度将 Eca109 细胞接种于 6 孔板中,待 24 h 细胞贴壁后分别用含 0、80、160、240 μmol/L 木犀草苷的培养液作用 48 h,倒置显微镜下观察(×100)细胞形态,数码相机采集图像。

2.3 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡

取对数生长期细胞,用含 0、80、160、240 μmol/L 木犀草苷的培养液作用 48 h,胰酶消化,收集 1×10⁶ 个细胞,用预冷的 PBS 洗 1 次,2 000 r/min 离心 5 min,加入 70%乙醇 4 ℃固定过夜,离心弃乙醇,加 100 μL RNase A 在 37 ℃下水浴 30 min,加 400 μL PI 染色混匀,4 ℃避光 30 min,上机检测。记录激发波长 488 nm 处红色荧光,检测细胞周期。

取对数生长期细胞,用含 0、80、160、240 μmol/L 木犀草苷的培养液作用 48 h,用不含 EDTA 的胰酶消化悬浮细胞,2 000 r/min 离心 5 min,用 PBS 洗涤细胞 2 次,收集 5×10⁵ 个细胞,加入 Binding 缓冲液 500 μL 悬浮细胞,加入 Annexin V-FITC 5 μL 混匀后再加入 PI 5 μL 染色,混匀,室温避光、反应 10 min,在 1 h 内用流式细胞仪观察和检测细胞凋亡情况。

2.4 RT-PCR 法检测 Eca109 细胞相关基因表达

2.4.1 Eca109 细胞总 RNA 的提取 将 Eca109 细胞以 5×10⁴/孔接种于 6 孔板,于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h,弃尽培养液,分别加入含有 0、80、160、240 μmol/L 木犀草苷的培养基,相同条件下培养 48 h 后裂解细胞。Trizol 法提取总 RNA,按照 RT-PCR 试剂盒说明书进行 cDNA 第一链的合成。

2.4.2 RT-PCR 检测 以反转录产物为模板,引物序列见表 1。RT-PCR 反应体系 25 μL:上游引物 1 μL,下游引物 1 μL,模板(反转录产物)1 μL,ddH₂O 22 μL。循环参数: cyclin D1, 94 ℃、4 min, 94 ℃、30 s, 53 ℃、45 s, 72 ℃、30 s, 35 个循环; 72 ℃、10 min; survivin, 94 ℃、4 min, 94 ℃、30 s, 58 ℃、30 s, 72 ℃、30 s, 35 个循环, 72 ℃、10 min; c-myc,

表1 基因引物序列及片段
Table 1 Primer sequence and fragments of genes

基因	引物序列	片段长度 / bp
cyclin D1	正向: 5'-CTTCAAATGTGTGCAGAAGAG-3' 反向: 5'-GCATTTTGGAGAGGAAGTGTTTC-3'	374
survivin	正向: 5'-GGACCACCGCATCTCTACAT-3' 反向: 5'-TCTCCGCAGTTTCCTCAAAT-3'	344
c-myc	正向: 5'-GGCTCCTGGCAAAAGGTCA-3' 反向: 5'-AGTTGTGCTGATGTGTGGAGA-3'	113
β -actin	正向: 5'-GGCGGCACCAACCATGTACCCT-3' 反向: 5'-AGGGGCCGGAATCGTCATACT-3'	202

94 ℃、4 min, 94 ℃、30 s, 56 ℃、45 s, 72 ℃、30 s, 32 个循环, 72 ℃、10 min。PCR 产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果, 用 Quantity One 软件对电泳结果进行灰度值分析, 通过灰度值统计学分析结果间接推测各处理组相关基因的表达水平。

2.5 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计分析软件进行单因素方差分析, 各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Dunnett-*t* 检验。

3 结果

3.1 对 Eca109 细胞增殖和细胞形态的影响

木犀草苷在低浓度 (20、40 $\mu\text{mol/L}$) 时轻微促进 Eca109 细胞生长, 但随药物浓度的升高, 对 Eca109 细胞的抑制作用逐渐增强, 超过 80 $\mu\text{mol/L}$ 时, 随药物干预时间的延长, 对细胞的抑制率也提

高。木犀草苷浓度为 240 $\mu\text{mol/L}$ 且干预 Eca109 细胞 48 h 后, 细胞增殖抑制率超过 50%, 但仍弱于 5-Fu 组。结果见表 2。

在高倍显微镜下观察, 可见对照组 Eca109 细胞生长呈“铺路石”样, 细胞呈饱满的梭形或多角形, 细胞边界清晰, 细胞膜完整。与对照组相比, 木犀草苷 80 $\mu\text{mol/L}$ 处理 Eca109 细胞后, 细胞略皱缩, 与周围的细胞略脱离, 形态不规则, 内部结构不清楚, 随着木犀草苷浓度的升高, 细胞形态变化特征也愈加明显, 至 240 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞呈现芽状, 有的细胞伸出多个伪足样突起。结果见图 1。

3.2 对 Eca109 细胞周期的影响

木犀草苷可引起 Eca109 细胞周期的改变, 浓度为 160、240 $\mu\text{mol/L}$ 时, 将细胞周期阻滞于 G₂/M 期, 与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。结果见图 2、表 3。

表2 木犀草苷对 Eca109 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Effect of luteoloside on cell proliferation of Eca109 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	$C / (\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	抑制率 / %		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	—	—	—
木犀草苷	20	-7.59 ± 3.65	-5.40 ± 3.30	-8.40 ± 3.99
	40	-5.18 ± 1.06	-2.17 ± 3.10	-6.20 ± 3.78
	80	$9.91 \pm 5.56^*$	$9.33 \pm 4.80^*$	$10.79 \pm 4.10^*$
	120	$21.51 \pm 3.75^*$	$23.58 \pm 5.69^*$	$26.48 \pm 3.40^*$
	160	$28.65 \pm 5.63^*$	$32.82 \pm 4.67^*$	$37.10 \pm 3.57^*$
	200	$36.05 \pm 3.43^*$	$38.85 \pm 1.88^*$	$43.56 \pm 3.48^*$
	240	$46.09 \pm 4.10^*$	$54.09 \pm 3.74^*$	$56.42 \pm 3.42^*$
5-Fu	240	$53.24 \pm 3.16^*$	$84.29 \pm 0.88^*$	$84.30 \pm 2.74^*$

与对照组比较: $^*P < 0.05$, 下表同

$^*P < 0.05$ vs control group, same as below

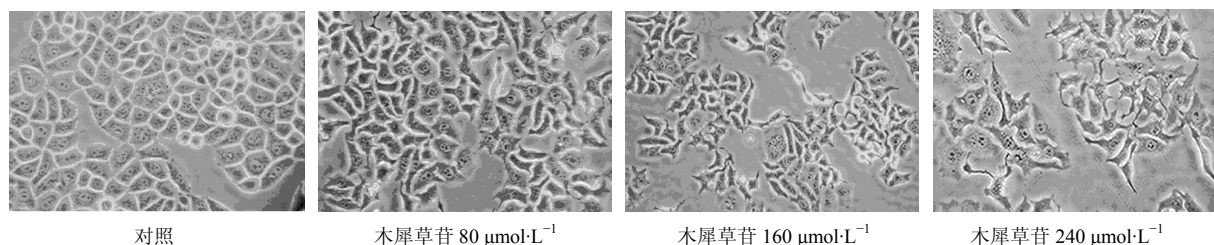


图 1 各组 Eca109 细胞形态观察

Fig. 1 Morphological observation of Eca109 cells in each group

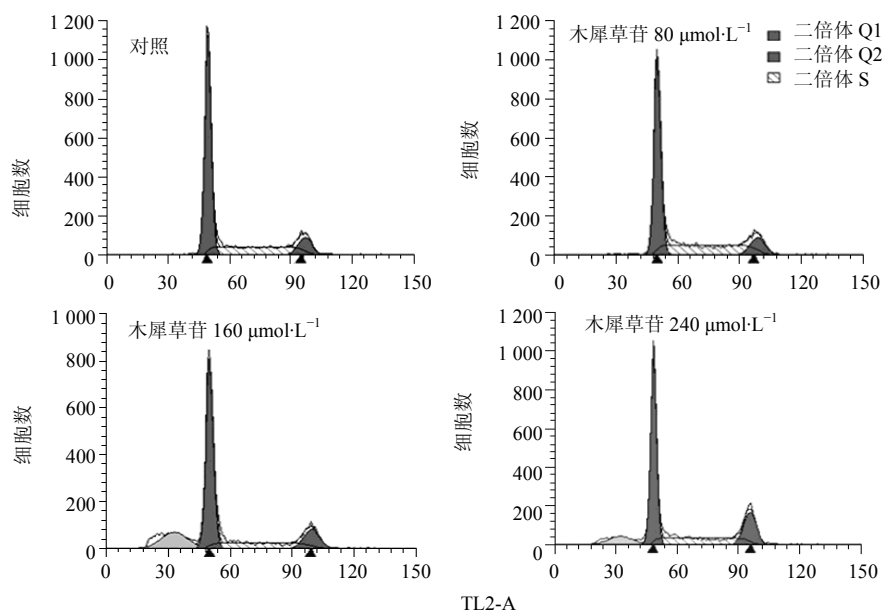


图 2 木犀草苷对 Eca109 细胞周期的影响

Fig. 2 Effect of luteoloside on cell cycle of Eca109 cells

表 3 木犀草苷对 Eca109 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of luteoloside on cell cycle of Eca109 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组 别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞分布 / %		
		G ₀ / G ₁ 期	S 期	G ₂ / M 期
对照	—	65.95 ± 2.85	26.31 ± 5.13	7.75 ± 2.28
木犀草苷	80	64.72 ± 1.38	21.83 ± 1.57	13.46 ± 2.95
	160	61.32 ± 3.67	23.71 ± 2.57	14.98 ± 1.10*
	240	59.05 ± 0.43	22.53 ± 1.22	18.43 ± 0.79*

3.3 对 Eca109 细胞凋亡的影响

用木犀草苷 80、160、240 $\mu\text{mol/L}$ 处理 Eca109 细胞 48 h 后, Eca109 细胞凋亡率均高于对照组, 且呈浓度相关性, 其中木犀草苷 160、240 $\mu\text{mol/L}$ 组 Eca109 细胞的凋亡率与对照组相比差异显著 ($P < 0.05$), 提示木犀草苷能够促进 Eca109 细胞凋亡。流式细胞图见图 3, 各组 Eca109 细胞凋亡率见图 4。

3.4 对 Eca109 细胞相关基因表达的影响

与对照组相比, 木犀草苷 240 $\mu\text{mol/L}$ 可使 Eca109 细胞 cyclin D1、survivin、c-myc 基因表达下调 ($P < 0.05$)。结果见图 5 和表 4。

4 讨论

我国食管癌患者以鳞状细胞癌为主, 因此本研究选用人食管鳞状癌 Eca109 细胞进行体外实验。MTT 法检测显示, 木犀草苷在低剂量时可促进 Eca109

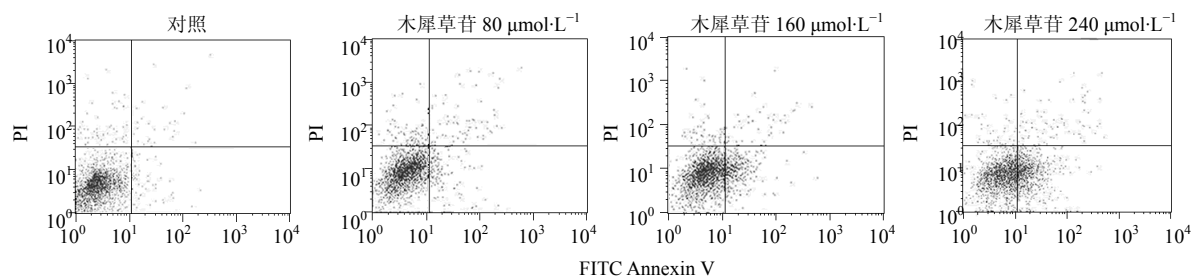


图3 木犀草苷对 Eca109 细胞凋亡的影响

Fig. 3 Effect of luteoloside on apoptosis of Eca109 cells

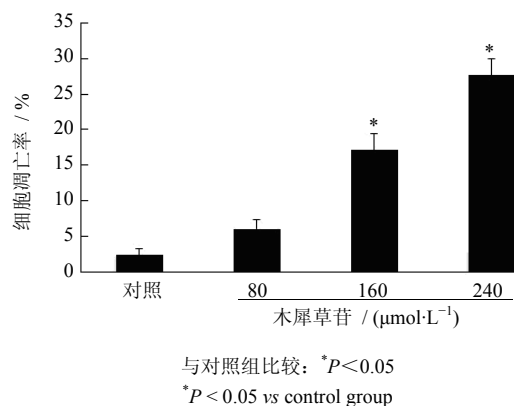
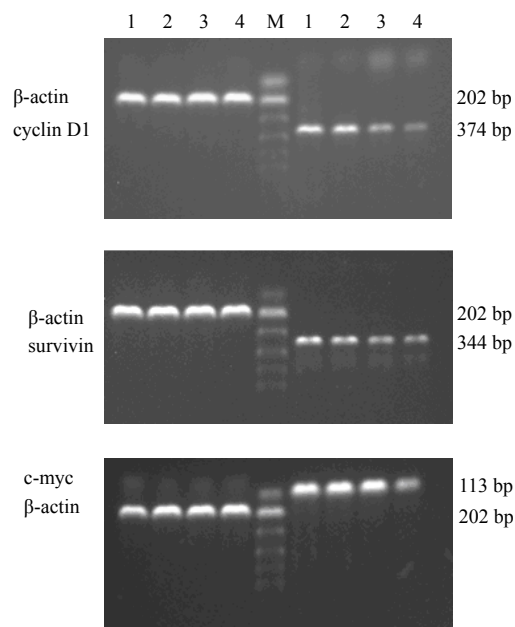


图4 木犀草苷对 Eca109 细胞凋亡率的影响

Fig. 4 Effect of luteoloside on Eca109 apoptosis rate

细胞生长,但随着药物浓度的升高抑制作用逐渐增强。肿瘤发生的主要分子机制是细胞周期紊乱导致细胞无限增殖和细胞凋亡受到抑制^[12]。本实验流式细胞术检测结果表明,木犀草苷可将 Eca109 细胞阻滞在 G₂/M 期。cyclin D1 是重要的细胞周期调控因子之一,在食管癌中过度表达较为常见,其不但与食管癌的发生、发展相关,还与肿瘤的转移、预后及放疗后肿瘤复发密切相关^[13]。survivin 是凋亡抑制蛋白家族的成员之一,具有抑制细胞凋亡和调节细胞增殖的双重作用,其表达具有细胞周期依赖性,在细胞周期的 G₂/M 期选择性地表达,在食管癌中的表达高于正常组织^[14-15]。c-myc 基因是 myc 基因

1-对照 2-木犀草苷 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 3-木犀草苷 160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4-木犀草苷 240 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Marker 自上而下依次为 100、200、300、400、500、600 bp

1-control 2-80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ luteoloside 3-160 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 4-240 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ luteoloside

Marker-top-down followed by 100, 200, 300, 400, 500, and 600 bp

图5 木犀草苷对 Eca109 细胞 cyclin D1、survivin 和 c-myc 基因 mRNA 表达的影响

Fig. 5 Effect of luteoloside on mRNA expression of cyclin D1, survivin, and c-myc in Eca109 cells

表4 木犀草苷对 Eca109 细胞 cyclin D1、survivin 和 c-myc 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)Table 4 Effect of luteoloside on gene expression of cyclin D1, survivin, and c-myc in Eca109 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	C / ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	cyclin D1 / β -actin	survivin / β -actin	c-myc / β -actin
对照	—	0.98 ± 0.21	0.66 ± 0.10	0.98 ± 0.11
木犀草苷	80	0.79 ± 0.12	0.65 ± 0.09	1.01 ± 0.09
	160	0.69 ± 0.19	0.51 ± 0.11	0.86 ± 0.17
	240	0.32 ± 0.05*	0.40 ± 0.04*	0.44 ± 0.16*

家族的重要成员之一,其高表达可刺激细胞增殖、分化,向恶性肿瘤细胞转化。另外,c-myc 基因与肿瘤细胞凋亡及侵袭和迁移有关联^[16]。本实验发现,木犀草苷浓度为 240 $\mu\text{mol/L}$ 时可下调 Eca109 细胞 cyclin D1、survivin 和 c-myc 基因表达,对食管癌的发生、发展有一定抑制作用。

综上所述,木犀草苷能抑制 Eca109 细胞的生长,可将细胞周期阻滞于 G₂/M 期并诱导细胞凋亡,下调 Eca109 细胞 cyclin D1、survivin 和 c-myc 基因表达。但木犀草苷抑制食管癌细胞生长的分子信号途径还需要深入探讨。

参考文献

- [1] Lee Y, Howard L R, Villalon B. Flavonoids and antioxidant activity of fresh pepper (*Capsicum annuum*) cultivars [J]. *J Food Sci*, 1995, 60(3): 476-483.
- [2] Sasaki N, Toda T, Kaneko T, *et al.* Protective effects of flavonoids on the cytotoxicity of linoleic acid hydroperoxide toward rat pheochromocytoma PC12 cells [J]. *Chem Biol Interact*, 2003, 145(1): 101-116.
- [3] Chen Q Z, Lin R C, Wang G L, *et al.* Studies on chemical constituents of the extract of *Lonicera japonica* [J]. *J Chin Med Mater*, 2010, 33(6): 920-922.
- [4] 沈 智, 张文婷, 黄琴伟, 等. RP-HPLC 法测定菊花中 3, 5-O-双咖啡酰基奎宁酸、木犀草苷和绿原酸 [J]. *中草药*, 2010, 41(2): 307-310.
- [5] Pereira O, Silva A M S, Domingues M R M, *et al.* Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus* [J]. *Food Chem*, 2012, 131(2): 652-659.
- [6] Yin R, Deng X X, Han F, *et al.* Determination of five components in *Ixeris sonchifolia* by high performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43(4): 1364-1369.
- [7] Frum Y, Viljoen A M, Van Heerden F R. Verbascoside and luteolin-5-O- β -D-glucoside isolated from *Halleria lucida* L. exhibit antagonistic anti-oxidant properties *in vitro* [J]. *South Afr J Bot*, 2007, 73(4): 583-587.
- [8] Jung H A, Jin S E, Min B S, *et al.* Anti-inflammatory activity of Korean thistle *Cirsium maackii* and its major flavonoid, luteolin 5-O-glucoside [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(6): 1271-1279.
- [9] Tian Y, Sun L M, Liu X Q, *et al.* Anti-HBV active flavone glucosides from *Euphorbia humifusa* Willd [J]. *Fitoterapia*, 2010, 81(7): 799-802.
- [10] 陆雪莹, 李艳红, 肖向文, 等. 木犀草素抑制人胃癌 BGC-823 细胞增殖作用的研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(3): 246-249.
- [11] Cai X T, Ye T M, Liu C, *et al.* Luteolin induced G₂ phase cell cycle arrest and apoptosis on non-small cell lung cancer cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(7): 1385-1391.
- [12] 王 威. 三氧化二砷联合 1, 25-二羟维生素 D₃ 对肺癌细胞增殖的影响 [D]. 沈阳: 中国医科大学, 2007.
- [13] Huang X P, Rong T H, Lin P, *et al.* Cyclin D1 over expression in esophageal cancer from southern China and its clinical significance [J]. *Cancer Lett*, 2006, 231(1): 94-101.
- [14] Shin S, Sung B J, Cho Y S, *et al.* An anti-apoptotic protein human survivin is a direct inhibitor of caspase-3 and caspase-7 [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(4): 1117-1123.
- [15] Kato J, Kuwabara Y, Mitani M, *et al.* Expression of Survivin in esophageal cancer: correlation with the prognosis and response to chemotherapy [J]. *Int J Cancer*, 2001, 95(2): 92-95.
- [16] 魏素菊, 张 凯. C-myc 蛋白结构、功能及对肿瘤细胞调控作用 [J]. *河北医药*, 2009, 31(21): 2965-2966.