

## 蔓荆子总黄酮抑制 NCI-H446 细胞系肺癌干细胞自我更新

曹晓诚, 肖立红, 肖 荞, 盛习锋\*

湖南师范大学医学院 药物工程重点实验室, 湖南 长沙 410013

**摘要:** 目的 观察蔓荆子总黄酮 (*Vitidis Fructus* total flavonoids, VFTF) 抑制人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞系肺癌干细胞 (lung cancer stem cells, LCSCs) 自我更新能力的作用。方法 体外培养 NCI-H446 细胞系细胞, 免疫磁珠分选和干细胞条件培养基悬浮培养得到和扩增 LCSCs; 肿瘤球形成法检测自我更新能力, Western blotting 分析自我更新相关转录因子 Bmi1 和磷酸化 Akt (p-Akt) 蛋白表达。结果 VFTF 显著抑制 LCSCs 自我更新能力, 呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ); 与亲本细胞比较, LCSCs 细胞 Bmi1 和 p-Akt 蛋白表达水平增高; VFTF 能有效下调 LCSCs 细胞 Bmi1 和 p-Akt 蛋白表达; PI3K 特异性阻断剂 LY294002 增强 VFTF 抑制 LCSCs 自我更新能力的作用。结论 VFTF 抑制源自 NCI-H446 细胞系 LCSCs 自我更新能力的作用与其下调 p-Akt 蛋白表达和抑制细胞自我更新相关转录因子 Bmi1 有关。

**关键词:** 蔓荆子总黄酮; 肺癌; 肺癌干细胞; 自我更新; Akt

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)09-1284-04

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.09.016

## Inhibition of *Vitidis Fructus* total flavonoids on self-renewal of lung cancer stem cells derived from NCI-H446 cell line

CAO Xiao-cheng, XIAO Li-hong, XIAO Qiao, SHENG Xi-feng

Key Laboratory of Medicine Engineering, Medical College, Hunan Normal University, Changsha 410013, China

**Abstract: Objective** To examine whether and how *Vitidis Fructus* total flavonoids (VFTF) inhibit the capacity of self-renewal in lung cancer stem cells (LCSCs) derived from human small cell lung cancer NCI-H446 cell line. **Methods** NCI-H446 cell line was cultured *in vitro*. LCSCs were obtained and amplified by Magnetically activated cell sorting system (MACS) and suspended culture with serum-free conditioned medium. The capacity of self-renewal was detected by tumor sphere-forming assay. The protein expression levels of the self-renewal associated transcription factors, Bmi1 and p-Akt, were analyzed using Western blotting. **Results** VFTF significantly suppressed the capacity of self-renewal in LCSCs, in a concentration-dependent manner ( $P < 0.05$ ). The expression levels of Bmi1 and p-Akt were elevated in LCSCs, compared with parental cells. VFTF effectively down-regulated the expression levels of Bmi1 and p-Akt in LCSCs. In addition, LY294002, a PI3K specific inhibitor, enhanced the inhibition of VFTF on the capacity of self-renewal in LCSCs. **Conclusion** VFTF could inhibit the self-renewal capacity of LCSCs derived from NCI-H446 cell line, which is associated with down-regulation of the expression of p-Akt and self-renewal associated transcription factors Bmi1.

**Key words:** *Vitidis Fructus* total flavonoids; lung cancer; lung cancer stem cells; self-renewal; Akt

肿瘤组织中存在极少部分具有干细胞特性的肿瘤细胞, 称为肿瘤干细胞 (cancer stem cells, CSCs)。CSCs 决定肿瘤发生、转移与复发; 是临床肿瘤治疗中最重要的靶细胞; 抑制和杀灭 CSCs 是彻底治愈肿瘤的关键。蔓荆子为马鞭草科植物单叶蔓荆 *Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham. 或蔓荆 *Vitex trifolia* L. 的干燥成熟果实。研究表明蔓荆子有效活

性成分紫花牡荆素优先抑制胶质瘤干细胞样细胞增殖活性<sup>[1]</sup>。蔓荆子总黄酮 (*Vitidis Fructus* total flavonoids, VFTF) 是一种自主研发的抗肿瘤候选中药制剂 (专利申请号 201210591146.9)。本研究旨在检定 VFTF 是否以及如何抑制人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞系肺癌干细胞 (lung cancer stem cells, LCSCs) 自我更新能力。

收稿日期: 2013-09-22

基金项目: 湖南省研究生科研创新项目资助 (Cx2013B225); 湖南省科技厅科技计划项目 (2011FJ4144)

作者简介: 曹晓诚 (1989—), 男, 湖南师范大学生药学硕士研究生。Tel: (0731)88912434 E-mail: Caocheng268@163.com

\*通信作者 盛习锋, 女, 湖南师范大学天然药物化学副教授。E-mail: 1273939213@qq.com

## 1 材料与仪器

### 1.1 药品与试剂

VFTF 按照国家发明专利申请资料的方法制备, 本品为棕褐色粉末状固体, 含总黄酮量以芦丁计为 53%。鼠抗人 p-Akt (ser473)、Akt 和 Bmi1 单克隆抗体为美国 Cell Signaling 公司产品; 鼠抗人  $\beta$ -actin 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司。辣根过氧化酶偶联山羊抗鼠二抗购自 Santa Cruz 生物技术公司。增强化学发光检测试剂购于美国 Amersham Pharmacia Biotech 公司。PI3K 特异性阻断剂 LY294002 购于美国 Calbiochem 公司。藻红蛋白 (PE) 连接抗人 CD133/2 抗体购自 Miltenyi Biotec 公司; PE 标记抗鼠免疫球蛋白 IgG2b 抗体购自美国 Zymed Laboratories 公司。

### 1.2 细胞系与细胞培养

人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞系购自中国科学院上海细胞库。参照文献方法进行常规单层贴壁生长细胞培养和干细胞条件培养基悬浮培养<sup>[2]</sup>。

## 2 方法

### 2.1 NCI-H446 细胞 CD133 免疫磁珠分选和 PE 荧光标记 CD133 流式细胞术分析

分别取分选后的 CD133<sup>+</sup>和 CD133<sup>-</sup>细胞以及非分选细胞用 PBS 洗涤后, 调整细胞密度至  $1 \times 10^5/\text{mL}$ , 分装于 EP 管中, PE 标记的抗人 CD133 抗体和 PE 标记的抗 IgG2b 同型对照抗体避光 4 °C 孵育 30 min, 用流式细胞仪 Calibur (FACS 420, Becton Dickinson, 美国) 检测以及 Cell Quest 软件进行分析, 每管计数 10 000 个细胞。

### 2.2 肺癌球形成实验

取 NCI-H446 细胞系非分选细胞, 通过 0.25% 胰蛋白酶消化, 同时取从 NCI-H446 细胞系分选得到的 CD133<sup>+</sup>细胞, 制备单细胞悬液。细胞以 2 000 个/mL 密度接种于 6 孔超低黏附细胞培养板 (Corning Inc., Corning, NY, 美国), 用添加 VFTF (0.5、1.0、2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 或 LY294002 (5.0、10.0、20.0  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 或两者联用的干细胞条件培养基培养 6 d 后, 在 Olympus IX51 显微镜 (Olympus Inc.) 下计数肿瘤细胞球的个数, 并在 OLYMPUS BX41 倒置显微镜 (Olympus Inc.) 下获得照片。

### 2.3 有限稀释法

将分散得到的单个 CD133<sup>+</sup>肺癌球形成细胞悬液稀释至细胞密度 500 个/mL, 然后用每孔 2  $\mu\text{L}$  单细胞悬液接种超低黏附 96 孔细胞培养板 (Corning

Inc., Corning, NY, 美国), 再加入 150  $\mu\text{L}$  干细胞条件培养基。标记每孔只有 1 个细胞的孔, 并每天观察, 共计 8 d。

### 2.4 Western blotting 分析

参照文献报道的方法获得细胞总提取物<sup>[2]</sup>。以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离提取的蛋白质, 并转移至 PVDF 膜。该膜首先在 PBST 中以脱脂牛奶 5% 进行封闭, 为了进行探针检测, 随后以标示的一抗孵育, 轻微震动下, 4 °C 条件下过夜。冲洗膜 4 次后, 以适当的过氧化物酶标记的二抗孵育上述 PVDF 膜 1 h。以增强化学发光试剂盒对信号进行检测。

### 2.5 统计分析

实验数据录入 SPSS 16.0, 建立数据库, 各组实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用 One Way ANOVA 进行方差分析。当方差齐性时, 各组均数间的两两比较用 LSD 法; 方差不齐时, 对照组均数与实验组均数间比较用 Dunnett 法。

## 3 结果与分析

### 3.1 NCI-H446 细胞系 CD133<sup>+</sup>细胞、CD133<sup>-</sup>细胞和亲本细胞 CD133 表达状态

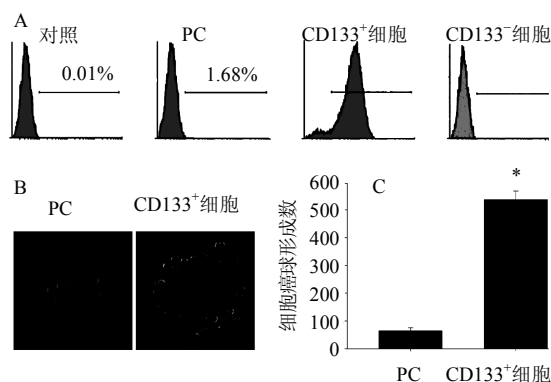
NCI-H446 细胞系 CD133<sup>+</sup>细胞群的 CD133 阳性细胞百分率是  $(89.52 \pm 2.17)\%$ ; CD133<sup>-</sup>细胞群的 CD133 阳性细胞百分率是  $(0.04 \pm 0.01)\%$ ; 亲本细胞 (PC) 的 CD133 阳性细胞百分率是  $(1.41 \pm 0.26)\%$  (图 1-A)。表明 CD133 抗体免疫磁珠分选能得到纯的 NCI-H446 细胞系 CD133<sup>+</sup>细胞群。在每孔接种 1 000 个细胞的情况下, 在相同的时间点 (第 6 天), CD133<sup>+</sup>细胞的肺癌球体积大于亲本细胞 (图 1-B); 并且 CD133<sup>+</sup>细胞的肺癌球形成数高于亲本细胞 (图 1-C)。

### 3.2 CD133<sup>+</sup>肺癌球形成细胞高表达磷酸化 Akt (p-Akt) 和自我更新相关转录因子 Bmi1 蛋白

来自 NCI-H446 细胞系的 CD133<sup>+</sup>肺癌球形成细胞的单个细胞能生长形成新的肺癌球 (图 2-A); 进一步证明 NCI-H446 细胞系的 CD133<sup>+</sup>肺癌球形成细胞具有体外自我更新能力。Western blotting 分析结果显示: 与亲本细胞相比, NCI-H446 细胞系 CD133<sup>+</sup>肺癌球形成细胞高表达 p-Akt 蛋白和自我更新相关转录因子 Bmi1 蛋白 (图 2-B)。

### 3.3 VFTF 抑制 LCSCs 自我更新能力

肿瘤球形成实验结果表明, VFTF 显著缩小肺癌球的体积 (图 3-A), 同时降低 NCI-H446 细胞系 CD133<sup>+</sup>肺癌球形成细胞的肺癌球形成数目 (图 3-B)。



与亲本细胞系比较: \* $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs parent cell group

图1 NCI-H446 细胞系 CD133<sup>+</sup> 细胞和亲本细胞 CD133 表达 (A) 和肺癌球形成能力 (B、C) 的比较

Fig. 1 Comparison on CD133 expression (A) and lung cancer sphere-forming capability (B and C) between NCI-H446 cell line CD133<sup>+</sup> cells and parental cells

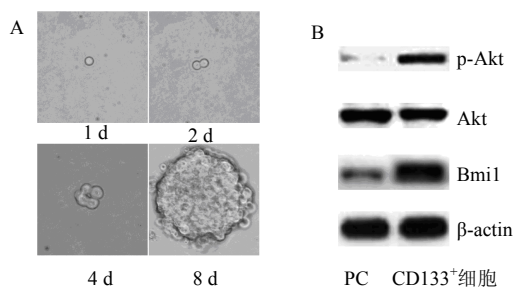
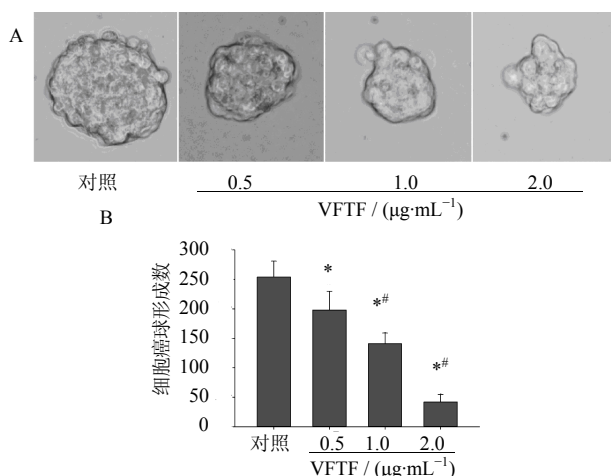


图2 具有自我更新特性的 LCSCs 组成性活化 Akt 和高表达 Bmi1 蛋白

Fig. 2 Constitutive activation of Akt and high expressed Bmi1 protein in LCSCs with capacity of self-renewal



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 VFTF 0.5 μg·mL<sup>-1</sup> 组比较: # $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs VFTF 0.5 μg·mL<sup>-1</sup> group

图3 VFTF 对 LCSCs 自我更新能力的影响

Fig. 3 Effect of VFTF on self-renewal ability of LCSCs

### 3.4 VFTF 下调 LCSCs p-Akt 蛋白和 Bmi1 蛋白表达水平

Western blotting 分析结果显示, VFTF (0.5、1.0、2.0 μg/mL) 以质量浓度依赖方式下调 NCI-H446 细胞系 CD133<sup>+</sup> 肺癌球形成细胞 p-Akt 和 Bmi1 蛋白表达水平 (图 4)。

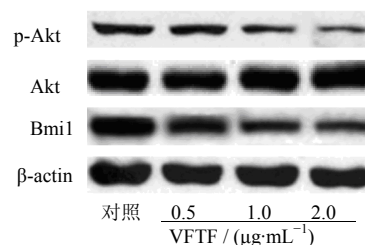


图4 VFTF 对 LCSCs 中 p-Akt 和 Bmi1 蛋白表达的影响

Fig. 4 Effects of VFTF on protein expression of p-Akt and Bmi1 in LCSCs

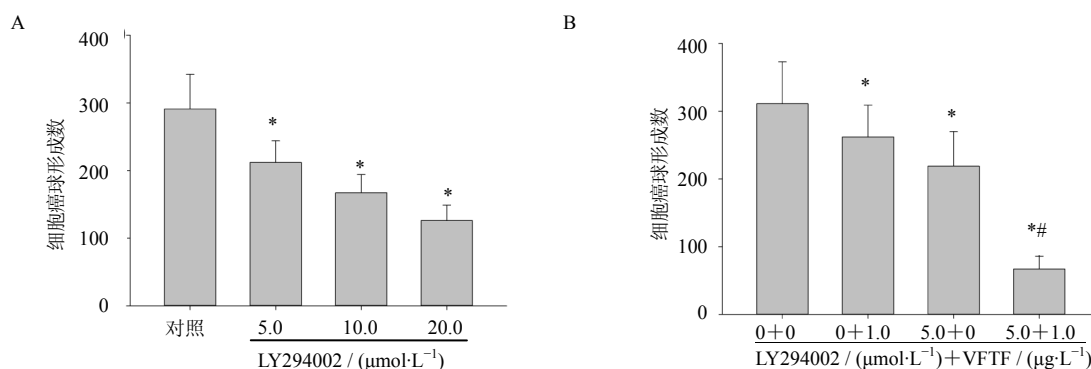
### 3.5 LY294002 增强 VFTF 抑制 LCSCs 自我更新作用

为了证明 VFTF 是否通过抑制 Akt 信号通路从而抑制肿瘤球的自我更新能力, 采用 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 处理或联合处理, 肿瘤球形成实验结果表明, 不同浓度 LY294002 (5.0、10.0 和 20.0 μmol/L) 抑制肺癌球形成, 呈浓度依赖性 (图 5-A); 此外, LY294002 (5.0 μmol/L) 预孵育 1 h 后, 与 VFTF (1.0 μg/mL) 联合处理导致 NCI-H446 细胞系 CD133<sup>+</sup> 肺癌球形成细胞肺癌球形成数目进一步降低 (图 5-B)。

## 4 讨论

2008 年, Eramo 等<sup>[3]</sup>首次在小细胞和非小细胞肺癌中发现一群稀少的未分化细胞表达干细胞表面标志物 CD133, 并发现其具有自我更新能力、多向分化潜能、高致瘤性和耐药性, 并把这种 CD133<sup>+</sup> 的肺癌细胞定义为肺癌干细胞 (lung cancer stem cells, LCSCs)。在本研究中, 使用免疫磁珠分选法和干细胞悬浮培养法从人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞系中分选并得到 CD133<sup>+</sup> 肺癌球形成细胞, 并证实其具有自我更新能力和高表达自我更新相关转录因子 Bmi1 蛋白。

蔓荆子是收载于《中国药典》2010 年版的一种中药, 具有消热解表、利湿解毒、止咳祛痰、缓解支气管痉挛等症状的作用。本实验通过肿瘤球形成实验发现 VFTF 可以显著降低 LCSCs 肺癌球形成数目并缩小肺癌球的体积, 表明 VFTF 能有效抑制



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与单用 VFTF ( $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 或 LY294002 ( $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组比较: # $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs treatment with VFTF ( $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) or LY294002 ( $5.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) alone group

图5 LY294002 (A)、VFTF 及两者联用 (B) 对 LCSCs 自我更新能力的影响

Fig. 5 Effects of LY294002 (A), VFTF, or LY294002 + VFTF (B) on self-renewal ability of LCSCs

LCSCs 自我更新能力。本研究还发现 PI3K 特异性阻断剂 LY294002 可以增强 VFTF 抑制 LCSCs 自我更新的能力, 反映 VFTF 可能以不同于 LY294002 的方式抑制 Akt 活性; 或者, VFTF 除抑制 Akt 活性外还存在其他的作用机制。总之本实验结果为两者联用靶向抑制 LCSCs 自我更新提供了可能性。

Bmi1 属于多梳基因家族 (polycomb of genes, PcG) 成员。有研究表明 Bmi1 是人类造血干细胞维持自我更新能力的关键因子<sup>[4]</sup>。Zhou 等<sup>[5]</sup>发现 Bmi1 通过沉默包括 p16<sup>INK4A</sup> 在内的靶基因调节肺癌干细胞的自我更新和致瘤性。Akt 是磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) /Akt 信号传导通路的核心。Liu 等<sup>[6]</sup>的研究发现 Akt 通过调节 Bmi1 等多梳家族蛋白维持造血干细胞自我更新能力。而本课题组的前期研究也表明 LY294002 降低源自人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞系肺癌球形成细胞 Akt 蛋白磷酸化水平, 并以剂量依赖方式抑制肺癌球形成能力<sup>[7]</sup>。本实验结果表明 VFTF 能同时下调 LCSCs 中磷酸化 Akt 和 Bmi1 蛋白表达, 并可以有效抑制 LCSCs 自我更新能力。结合上述文献报道, 推断 VFTF 可能通过降低 Akt 磷酸化水平, 从而下调 Bmi1 表达, 进而抑制 LCSCs 自我更新能力。

综上所述, VFTF 具有抑制源自人小细胞肺癌 NCI-H446 细胞系 LCSCs 自我更新能力的作用, 作用机制涉及下调磷酸化 Akt 和 Bmi1 蛋白表达, 最终抑制肿瘤干细胞自我更新能力。本实验的研究结

果突出了 VFTF 可能是治疗肺癌等恶性肿瘤的有效候选药物的价值。然而, VFTF 抑制肿瘤干细胞 Akt 磷酸化的作用机制以及是否具有在体根除肿瘤干细胞的作用仍需进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Feng X, Zhou Q, Liu C, *et al.* Drug screening study using glioma stem-like cells [J]. *Mol Med Rep*, 2012, 6(5): 1117-1120.
- [2] Ren K Q, Cao X Z, Liu Z H, *et al.* 8-bromo-5-hydroxy-7-methoxychrysin targeting for inhibition of the properties of liver cancer stem cells by modulation of Twist signaling [J]. *Int J Oncol*, 2013, 43(5): 1719-1729.
- [3] Eramo A, Lotti F, Sette G, *et al.* Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population [J]. *Cell Death Differ*, 2008, 15(3): 504-514.
- [4] Park I K, Qian D, Kiel M, *et al.* Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 302-305.
- [5] Zhou J, Xu Y, Hao P, *et al.* Inhibition of lung cancer stem cells self-renewal and tumorigenicity by lentivirus-delivered Bmi1 shRNA [J]. *Chin Germ J Clinl Oncol*, 2011, 10(11): 636-642.
- [6] Liu Y, Yu H, Nimer D. PI3K-Akt pathway regulates polycomb group protein and stem cell maintenance [J]. *Cell Cycle*, 2013, 12(2): 199-200.
- [7] 易恒仲, 龙灵芝, 周源, 等. LY294002 抑制小细胞肺癌干细胞样细胞自我更新 [J]. *湖南师范大学学报*, 2013, 3(1): 15-18.