

汉黄芩素抑制鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的研究

林彩星¹, 陈 罡², 杨振东¹, 蒋伟哲³, 言柯柯¹, 伍小薇¹, 韦祝新¹

(1.广西医科大学第一附属医院放疗科, 广西 南宁 530021;

2.广西医科大学第一附属医院病理科, 广西 南宁 530021;

3.广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 探究汉黄芩素对鼻咽癌细胞 C666-1、HK-1 增殖、迁移和侵袭能力的影响。方法 采用 CCK8 实验明确汉黄芩素对鼻咽癌细胞 C666-1、HK-1 的活性抑制作用, 并计算 IC₅₀; 采用平板集落形成实验明确汉黄芩素对鼻咽癌细胞 C666-1 增殖和独立生存能力的影响; 采用划痕实验和 Transwell 迁移实验研究汉黄芩素对鼻咽癌细胞迁移能力的影响; 最后采用 Transwell 侵袭实验研究汉黄芩素对鼻咽癌细胞侵袭能力的影响。结果 CCK8 实验结果显示, 汉黄芩素对 C666-1 和 HK-1 细胞的活力均表现出明显的抑制作用, 随药物浓度增加, 抑制效果明显增强; 同一药物浓度下, 药物作用 48 h 的抑制效果高于 24 h, 抑制效果表现为剂量时间依赖性; 汉黄芩素作用于 C666-1 细胞 24 h 的 IC₅₀ 值为 37.15 μmol/L、48 h 为 20.75 μmol/L; 汉黄芩素作用于 HK-1 细胞 24 h 的 IC₅₀ 值为 29.09 μmol/L、48 h 为 20.46 μmol/L。平板集落实验结果显示, 汉黄芩素干预后, 鼻咽癌细胞 C666-1 细胞形成肉眼可见集落的数目更少, 体积更小。划痕实验和 Transwell 迁移实验显示, C666-1 及 HK-1 细胞的迁移能力明显受到抑制, 且药物浓度越高, 抑制作用越强。Transwell 侵袭实验显示, 汉黄芩素干预后, 穿过基质胶后迁移至下室的细胞数目明显减少。结论 汉黄芩素能抑制鼻咽癌细胞的活性、增殖、迁移以及侵袭的能力。

关键词:鼻咽癌; 汉黄芩素; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285; R739.63

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1006-1959.2023.10.017

文章编号: 1006-1959(2023)10-0071-06

Effects of Wogonin on Proliferation, Migration and Invasion of Nasopharyngeal Carcinoma Cells

LIN Cai-xing¹, CHEN Gang², YANG Zhen-dong¹, JIANG Wei-zhe³, YAN Ke-ke¹, WU Xiao-wei¹, WEI Zhu-xin¹

(1.Department of Radiation Oncology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China;

2.Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China;

3.School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning 530021, Guangxi, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of wogonin on the proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells C666-1 and HK-1. **Methods** CCK8 assay was used to determine the inhibitory effect of wogonin on the activity of nasopharyngeal carcinoma cells C666-1 and HK-1, and IC₅₀ was calculated. The effect of wogonin on the proliferation and independent viability of nasopharyngeal carcinoma cell C666-1 was determined by plate colony formation assay. The effect of wogonin on the migration ability of nasopharyngeal carcinoma cells was studied by scratch test and Transwell migration test. Finally, Transwell invasion assay was used to study the effect of wogonin on the invasion ability of nasopharyngeal carcinoma cells. **Results** The results of CCK8 assay showed that wogonin significantly inhibited the viability of C666-1 and HK-1 cells, and the inhibitory effect was significantly enhanced with the increase of drug concentration. At the same drug concentration, the inhibitory effect of 48 h was higher than that of 24 h, and the inhibitory effect was dose-time dependent. The IC₅₀ of wogonin on C666-1 cells was 37.15 μmol/L at 24 h and 20.75 μmol/L at 48 h. The IC₅₀ value of wogonin on HK-1 cells was 29.09 μmol/L at 24 h and 20.46 μmol/L at 48 h. The results of plate colony assay showed that after wogonin intervention, the number of visible colonies formed by nasopharyngeal carcinoma cells C666-1 cells was less and the volume was smaller. Scratch test and Transwell migration assay showed that the migration ability of C666-1 and HK-1 cells was significantly inhibited, and the higher the drug concentration, the stronger the inhibition. Transwell invasion assay showed that after wogonin intervention, the number of cells migrating to the lower chamber after passing through matrigel was significantly reduced. **Conclusion** Wogonin can inhibit the activity, proliferation, migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cells.

Key words: Nasopharyngeal carcinoma; Wogonin; Migration; Invasion

作者简介: 林彩星(1996.1-), 女, 广西贵港人, 硕士研究生, 主要从事鼻咽癌的基础和临床研究

通讯作者: 韦祝新(1968.10-), 女, 广西河池人, 硕士, 主任医师, 主要从事鼻咽癌的基础和临床研究

鼻咽癌(nasopharyngeal carcinoma)是来源于鼻咽部被覆上皮的恶性肿瘤,其发病具有明显的地区聚集性,在我国以广东、广西、香港等为鼻咽癌高发地区^[1]。据最新发布的全球癌症统计报告,鼻咽癌2020年新发病例约为13.3万,占全部新诊断肿瘤的0.7%,其中死亡病例约为8万(占0.8%)^[2]。目前认为,鼻咽癌的发生与遗传易感性、EB病毒感染、环境因素等相关^[3]。随着放疗技术和综合治疗的不断发展,I期鼻咽癌5年生存率可达95%以上,但是鼻咽癌的复发和转移仍然是患者治疗失败的主要原因。放疗是鼻咽癌患者最主要的治疗方式,但是对于一些晚期患者需行联合治疗方可提高治疗疗效。中药治疗配合放化疗可减轻放化疗所引起的副作用,但中药对肿瘤的直接杀灭作用尚未得到充分验证。汉黄芩素是传统中草药黄芩的有效成分之一,具有消炎、抗病毒、抗氧化、抗癌和神经保护等多种药理作用^[4-7],且在多种肿瘤中显示出强大的抗肿瘤作用,如胰腺癌^[8-10]、结肠癌^[11]、乳腺癌^[12]、胃癌^[13]、肺癌^[14]以及卵巢癌^[15]等。有报道称^[16],汉黄芩素可抑制鼻咽癌CNE2细胞增殖并诱导其凋亡,但其对鼻咽癌细胞迁移和侵袭作用尚未明确。基于此,本研究拟在2株鼻咽癌细胞株C666-1、HK-1中研究汉黄芩素对鼻咽癌细胞增殖、迁移和侵袭能力的作用,进一步了解汉黄芩素对鼻咽癌细胞的影响,以期期为开发新型抗肿瘤药物提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人C666-1、HK-1均来源于广西医科大学耳鼻喉实验室。RPMI-1640、0.25%胰酶购于美国Gibco公司,胎牛血清购于依科赛生物公司,CCK8试剂盒购于中国白鲨公司,Transwell细胞小室购于康宁公司,Matrigel基质胶购于美国BD公司,汉黄芩素购于成都曼斯特生物科技有限公司。

1.2 细胞培养和药物处理 用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养细胞,细胞融合率达到85%~95%时使用胰酶进行消化传代,细胞培养于37℃、5%CO₂的培养箱中。称取20mg汉黄芩素粉末,汉黄芩素分子质量为284.27,溶于0.70356ml DMSO溶液中配置成浓度为100mmol/L母液,置于-20℃中贮存,使用时再用培养基稀释成不同浓度的汉黄芩素工作液。

1.3 CCK8实验测定汉黄芩素对鼻咽癌细胞的抑制作用 取处于对数生长期的鼻咽癌细胞,胰酶消化

后制备单细胞悬液,每孔100μl细胞悬液种植4000个细胞于96孔板中,每组设置5个重复孔。在细胞周围放入100μl PBS以防止挥发。在培养箱分别培养24h后,以换液的形式加入含有不同浓度药液的培养基,分别设置5个组:0、10、20、40、80μmol/L。随后置于培养箱中继续分别培养24、48h后取出细胞,使用PBS缓冲液冲洗细胞2遍,随后以换液的形式加入100μl CCK8工作液(CCK8试剂:基础培养基=1:9)。再将细胞避光孵育于培养箱中1.5h左右,随后使用酶标仪检测450nm波长处的吸光度(OD值)。细胞相对活性=[OD(加药)-OD(空白)]/[OD(未加药)-OD(空白)]×100%。实验结果重复3次,结果使用GraphPad Prism 8.0软件分析。

1.4 平板克隆实验测定汉黄芩素对鼻咽癌细胞独立生存能力的影响 使用胰酶消化细胞,6孔板每孔大约种植500个细胞,于培养箱中培养24h后,按照0、10、20、40μmol/L的浓度配置相应浓度的汉黄芩素工作液,分别加入细胞中,48h后更换完全培养基,继续培养,每天于显微镜下观察细胞集落形成情况,大约1周后,可形成肉眼可见的细胞克隆随后终止培养。使用4%多聚甲醛进行固定20min,PBS缓冲液清洗后用结晶紫染液进行染色,使用PBS缓冲液清洗多余的染液,最后在显微镜下计算>50细胞的克隆数。

1.5 细胞划痕实验测定汉黄芩素对鼻咽癌细胞迁移能力的影响 用马克笔在6孔板每孔背面用直尺画直线,每间隔约0.5cm画上1条直线,每孔画5条直线,以便于后期拍照。用胰酶消化细胞,6孔板每孔大约种植50万个细胞,于37℃、5%CO₂的培养箱中培养24h。待细胞铺满6孔板底部时,将直尺垂直于画的直线放在6孔板上,用1000μl的枪头紧贴直尺边缘,在每个孔的底部划出3条划痕。制好划痕后用PBS清洗每孔5次,并加入含有不同浓度汉黄芩素的无血清培养基,分别在0、24h用倒置显微镜在相同的位置点观察拍照,记录划痕愈合的距离。用Image J软件测量计算各组细胞在不同时间点向划痕愈合的相对面积。

1.6 Transwell迁移实验测定汉黄芩素对鼻咽癌细胞迁移能力的影响 用胰酶消化细胞并用不同浓度药物溶液制备单细胞悬液。Transwell小室的下室中加入400μl含20%血清的完全培养基,在上室中加入

200 μl 细胞悬液, 每个小室内含有 10×10^4 个细胞。将细胞放入 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的培养箱中培养。培养 24 h 后用 PBS 缓冲液清洗 Transwell 小室 3 次。用 400 μl 4% 多聚甲醛固定小室 20 min 后用 PBS 缓冲液清洗 Transwell 小室 3 次, 然后用结晶紫染液染色 20 min。染色后用 PBS 缓冲液清洗每个小室 3 次, 随后用医用棉签将上室未穿过聚碳酸酯膜的细胞擦去, 注意手法要轻柔, 并在室温下晾干小室。倒置显微镜下对 Transwell 小室进行拍照, 用 Image J 软件计数各组细胞穿过小室的数量。

1.7 Transwell 侵袭实验测定汉黄芩素对鼻咽癌细胞侵袭能力的影响 使用 RPMI-1640 培养基将基质胶按 1:8 的比例在冰上稀释。然后将 100 μl 稀释后的基质胶放入 Transwell 上室, 置于 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中过夜, 直至基质胶凝固。下室放入 400 μl 含 10% 血清的 RPMI-1640 培养基, 上室放入 200 μl 含 10 万个细胞的细胞悬液, 置于培养箱中孵育 36 h。随后的细胞染色和固定步骤与 Transwell 迁移实验相同。穿膜细胞数代表各组细胞的侵袭能力。

1.8 统计学方法 采用 SPSS 23.0 统计学软件对数据进行分析, 用 GraphPad Prism 8.0 进行绘图分析, 计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 采用 t 检验或 F 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 汉黄芩素对鼻咽癌细胞活性的影响 汉黄芩素

对 C666-1 和 HK-1 细胞的活力均表现出明显的抑制作用, 随药物浓度增加, 抑制效果明显增强; 同一药物浓度下, 药物作用 48 h 的抑制效果高于 24 h, 抑制效果表现为剂量时间依赖性 (图 1)。通过 GraphPad Prism 8.0 软件计算不同时间的 IC_{50} , 结果显示汉黄芩素作用于 C666-1 细胞 24 h 的 IC_{50} 值为 $37.15\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、48 h 为 $20.75\text{ }\mu\text{mol/L}$; 汉黄芩素作用于 HK-1 细胞 24 h 的 IC_{50} 值为 $29.09\text{ }\mu\text{mol/L}$ 、48 h 为 $20.46\text{ }\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 汉黄芩素对鼻咽癌细胞增殖的影响 汉黄芩素干预后, 鼻咽癌细胞 C666-1 细胞形成肉眼可见集落的数目更少, 体积更小, 见图 2。

2.3 汉黄芩素对鼻咽癌细胞迁移的影响 划痕实验结果显示, 汉黄芩素处理后, C666-1 及 HK-1 细胞的迁移能力明显受到抑制, 且药物浓度越高, 抑制作用越强 (图 3)。0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 的汉黄芩素处理 C666-1 及 HK-1 细胞干预 24 h 后细胞迁移面积的相对比率比较 [HK-1: $(67.72 \pm 2.43)\%$ 、 $(45.87 \pm 2.00)\%$ 、 $(38.48 \pm 2.66)\%$ 、 $(25.98 \pm 1.23)\%$; C666-1: $(73.07 \pm 2.30)\%$ 、 $(58.52 \pm 7.76)\%$ 、 $(43.98 \pm 2.10)\%$ 、 $(36.08 \pm 6.30)\%$], 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与划痕实验结果相一致, Transwell 细胞迁移实验也表明, 不同浓度汉黄芩素处理 C666-1 及 HK-1 细胞后, 从上室迁移至下室的细胞数目明显降低, 药物浓度越高, 抑制作用越明显 (图 4)。

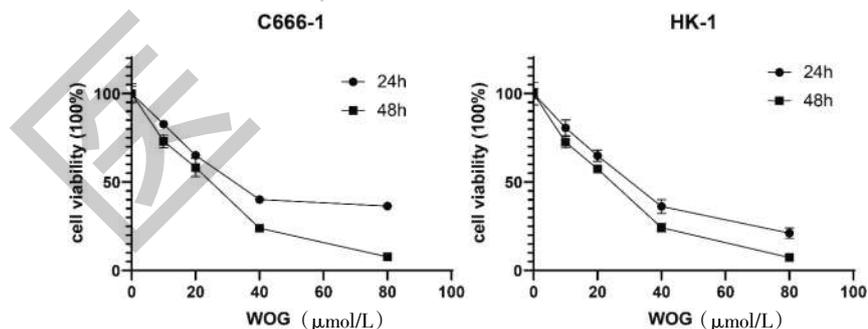


图 1 汉黄芩素对鼻咽癌细胞的抑制作用

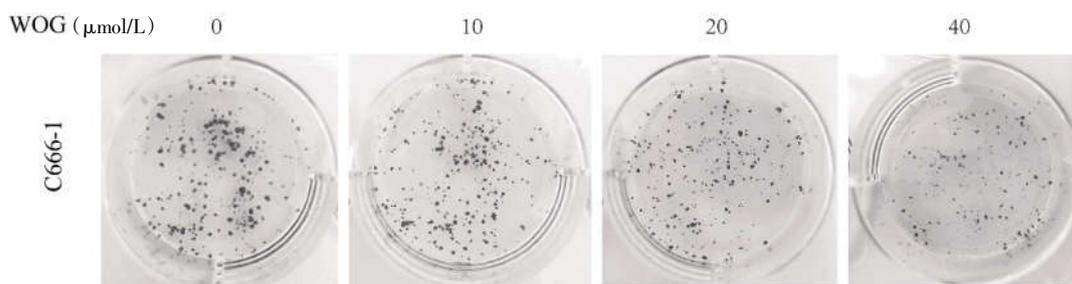
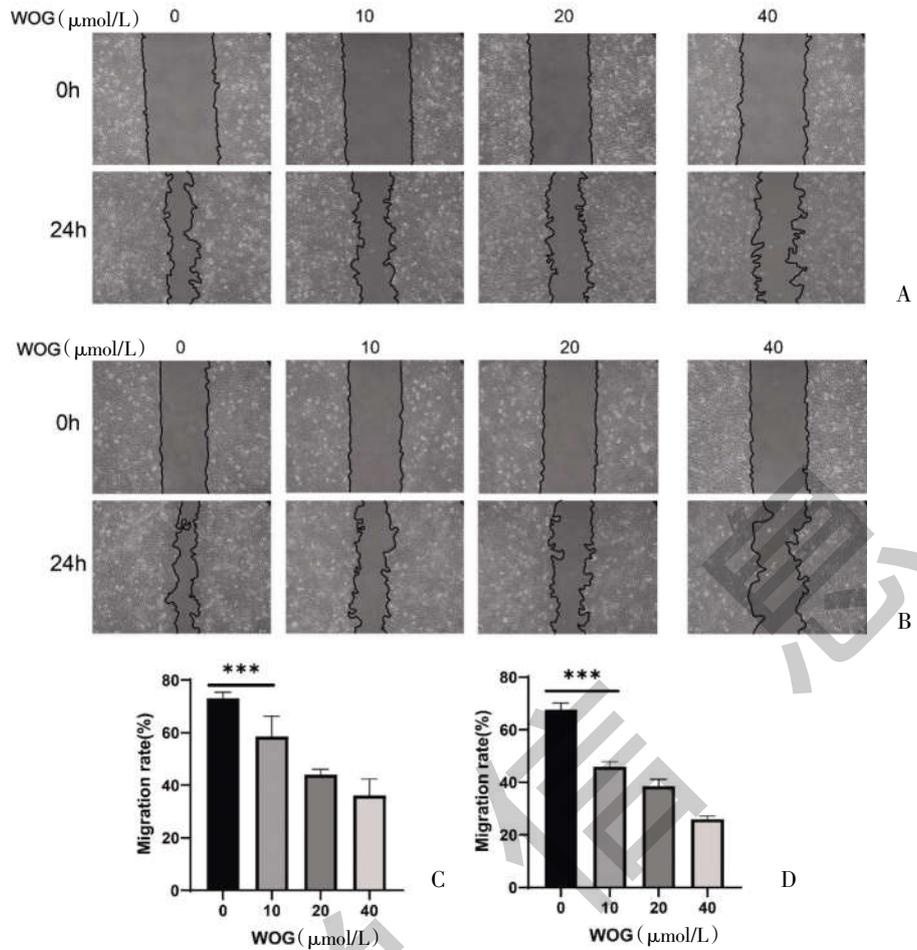
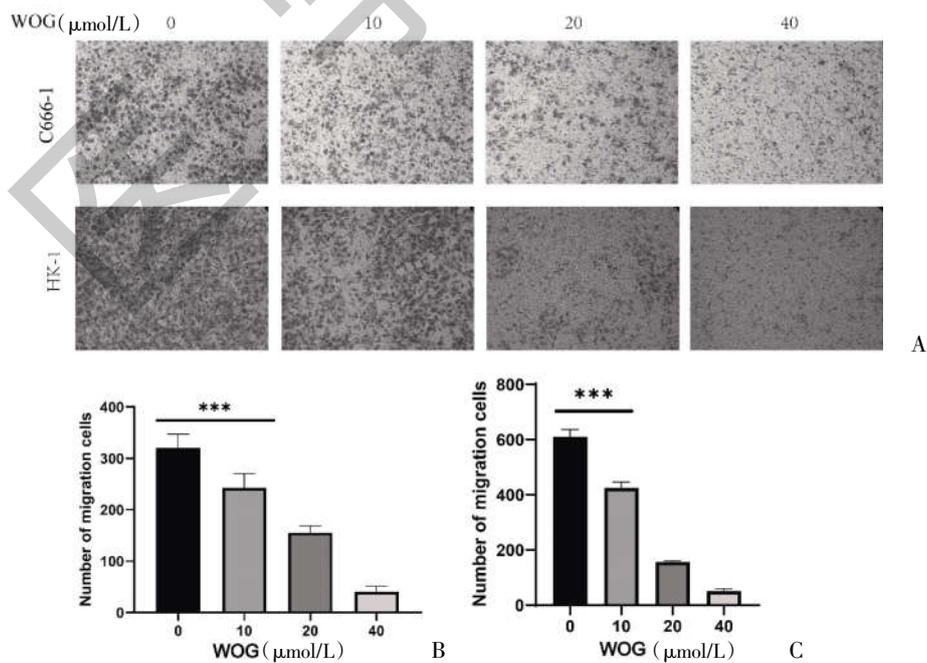


图 2 汉黄芩素对鼻咽癌细胞增殖的影响



注:A:C666-1 细胞;B:HK-1 细胞;C:不同浓度药物对 C666-1 细胞迁移率的比较;D:不同药物浓度对 HK-1 细胞迁移率的比较

图 3 划痕实验检测汉黄芩素对鼻咽癌细胞细胞划痕的影响

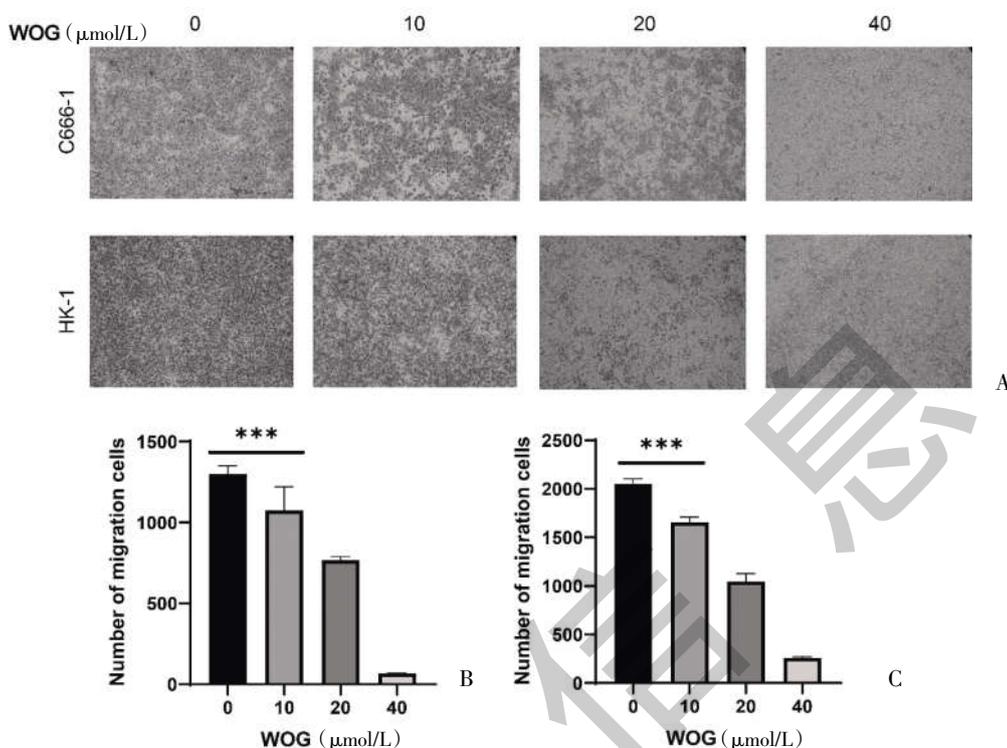


注:A:Transwell 迁移实验代表图;B:不同浓度药物对 C666-1 细胞迁移细胞数目的比较;C:不同药物浓度对 HK-1 细胞迁移细胞数目的比较;*** P<0.05

图 4 Transwell 细胞迁移实验检测汉黄芩素对鼻咽癌细胞迁移能力的影响

2.4 汉黄芩素对鼻咽癌细胞侵袭的影响 汉黄芩素干预后,穿过基质胶后迁移至下室的细胞数目明显

减少,见图 5。



注:A:Transwell 侵袭实验代表图;B:不同浓度药物对 C666-1 细胞穿过基质胶的细胞数目的比较;C:不同药物浓度对 HK-1 细胞穿过基质胶的细胞数目的比较;*** $P<0.05$

图 5 Transwell 侵袭实验检测汉黄芩素对鼻咽癌细胞侵袭能力的影响

3 讨论

尽管化疗和靶向药物的应用以及放疗技术的发展和进步,使得鼻咽癌患者的 5 年总体生存率有了很大的提高,其中 I 期鼻咽癌患者 5 年生存率可达 95%, II 期达 85%,然而对于就诊时已发生转移的鼻咽癌患者来说,预后仍然较差,IV 期鼻咽癌患者 5 年生存率仅有 50%。目前对于局部晚期鼻咽癌患者,在放疗基础上联合化疗是其主要的治疗模式,然而化疗所导致的耐药或者患者不能耐受化疗是化疗失败的主要原因,从而导致了肿瘤的进展。因此,迫切需要研发有效且毒副作用小的抗肿瘤药物。

汉黄芩素是来源于中草药植物中的一种纯天然化合物,因其所具备的多种药理作用而广泛地在多种炎症性和肿瘤性疾病中进行了研究。研究发现,汉黄芩素通过 IRF3 介导的 Hippo 信号通路抑制结肠癌细胞的致癌行为和 EMT 过程^[11];通过抑制

MMP1 表达和调控 PI3K/AKT 信号通路,从而抑制肺癌细胞的生长和转移潜能并促进细胞凋亡^[14];通过调控 miRNA-135b-3p 靶向 SIX4 抑制 A549 细胞的侵袭转移和 EMT 过程^[6]。除此之外,汉黄芩素还能通过阻滞肿瘤细胞的周期,从而发挥抑癌作用^[16,17],使细胞周期阻滞于 G₁/G₀ 期^[18]或 G₂/M 期^[9]。汉黄芩素还能通过增加恶性肿瘤的放化疗敏感性进一步增强其本身的抗肿瘤作用^[15,20]。本研究通过 CCK8 实验证明汉黄芩素能够有效抑制鼻咽癌细胞 C666-1 和 HK-1 的活性,并根据实验结果估算出药物的 IC₅₀,进而初步明确后续实验研究的药物浓度。细胞活性降低是细胞增殖受到抑制的重要原因之一,因此为进一步明确汉黄芩素对鼻咽癌细胞增殖能力的影响,通过平板克隆形成实验来评估鼻咽癌细胞的增殖和生存能力,结果表明汉黄芩素能有效抑制 C666-1 细胞的增殖和生存能力,与陈琳等^[21]研究结

果一致。鼻咽癌细胞的迁移以及侵袭能力的异常升高是鼻咽癌侵袭性强及易发生远处转移的重要原因,也是导致鼻咽癌患者预后变差的重要因素。本研究通过划痕实验以及 Transwell 实验发现,汉黄芩素能够抑制鼻咽癌细胞的迁移和侵袭能力。

综上所述,汉黄芩素能抑制鼻咽癌细胞 HK-1、C666-1 的活性、增殖、迁移还有侵袭能力,后续将进一步探究其在鼻咽癌细胞中的分子机制。

参考文献:

- [1]Chen YP,Chan ATC,Le QT,et al.Nasopharyngeal carcinoma [J].Lancet,2019,394(10192):64-80.
- [2]Sung H,Ferlay J,Siegel RL,et al.Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries [J].CA Cancer J Clin,2021,71(3):209-249.
- [3]李晔雄.肿瘤放射治疗学[M].5版.北京:中国协和医科大学出版社,2018:389-390.
- [4]Lu QY,Zhang L,Moro A,et al.Detection of baicalin metabolites baicalein and oroxylin-a in mouse pancreas and pancreatic xenografts[J].Pancreas,2012,41(4):571-576.
- [5]Dong P,Zhang Y,Gu J,et al.Wogonin, an active ingredient of Chinese herb medicine *Scutellaria baicalensis*, inhibits the mobility and invasion of human gallbladder carcinoma GBC-SD cells by inducing the expression of maspin [J].J Ethnopharmacol, 2011,137(3):1373-1380.
- [6]王凌,李艺炫,蒋宗胜,等.汉黄芩素调控 miRNA-135b-3p 靶向 SIX4 抑制 A549 细胞上皮间质转化的分子机制[J].中国现代应用药学,2022,39(24):3225-3233.
- [7]Feng Q,Wang H,Pang J,et al.Prevention of Wogonin on Colorectal Cancer Tumorigenesis by Regulating p53 Nuclear Translocation[J].Front Pharmacol,2018,9:1356.
- [8]Zhang T,Liu M,Liu Q,et al.Wogonin increases gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer by inhibiting Akt pathway [J].Front Pharmacol,2022,13:1068855.
- [9]Sun Y,Guo W,Guo Y,et al.Apoptosis induction in human prostate cancer cells related to the fatty acid metabolism by wogonin-mediated regulation of the AKT-SREBP1-FASN signaling network[J].Food Chem Toxicol,2022,169:113450.
- [10]Liu X,Peng X,Cen S,et al.Wogonin induces ferroptosis in pancreatic cancer cells by inhibiting the Nrf2/GPX4 axis [J].

Front Pharmacol,2023,14:1129662.

- [11]You W,Di A,Zhang L,et al.Effects of wogonin on the growth and metastasis of colon cancer through the Hippo signaling pathway[J].Bioengineered,2022,13(2):2586-2597.
 - [12]Yang D,Guo Q,Liang Y,et al.Wogonin induces cellular senescence in breast cancer via suppressing TXNRD2 expression [J].Arch Toxicol,2020,94(10):3433-3447.
 - [13]Hong ZP,Wang LG,Wang HJ,et al.Wogonin exacerbates the cytotoxic effect of oxaliplatin by inducing nitrosative stress and autophagy in human gastric cancer cells [J].Phytomedicine, 2018,39:168-175.
 - [14]Guo J,Jin G,Hu Y,et al.Wogonin Restrains the Malignant Progression of Lung Cancer Through Modulating MMP1 and PI3K/AKT Signaling Pathway [J].Protein Pept Lett,2023,30(1): 25-34.
 - [15]Xing F,Sun C,Luo N,et al.Wogonin Increases Cisplatin Sensitivity in Ovarian Cancer Cells Through Inhibition of the Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)/Akt Pathway [J].Med Sci Monit,2019,25:6007-6014.
 - [16]Wu K,Teng M,Zhou W,et al.Wogonin Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells by Activating Hippo Signaling [J].Anticancer Agents Med Chem, 2022,22(8):1551-1560.
 - [17]Hong M,Almutairi MM,Li S,et al.Wogonin inhibits cell cycle progression by activating the glycogen synthase kinase-3 beta in hepatocellular carcinoma [J].Phytomedicine,2020,68:153174.
 - [18]Zhao Q,Chang W,Chen R,et al.Anti-Proliferative Effect of Wogonin on Ovary Cancer Cells Involves Activation of Apoptosis and Cell Cycle Arrest [J].Med Sci Monit,2019,25:8465-8471.
 - [19]Tan H,Li X,Yang WH,et al.A flavone, Wogonin from *Scutellaria baicalensis* inhibits the proliferation of human colorectal cancer cells by inducing of autophagy, apoptosis and G2/M cell cycle arrest via modulating the PI3K/AKT and STAT3 signalling pathways[J].J BUON,2019,24(3):1143-1149.
 - [20]王松.汉黄芩素的乳腺癌放疗增敏作用及药动学研究[D].成都:电子科技大学,2020.
 - [21]陈琳,吕炎,何文龙,等.汉黄芩素对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖及凋亡的影响[J].中国癌症防治杂志,2020,12(1):39-43.
- 收稿日期:2023-04-02;修回日期:2023-04-18
编辑/杜帆