

● 实验研究 ●

臭牡丹黄酮类化合物通过调控 CXCR4 对 A549 转移能力的影响

谭小宁,李勇敏,余娜,罗吉,罗燕,吕元,朱克俭

(湖南省中医药研究院附属医院,湖南长沙,410006)

[摘要] 目的:探讨臭牡丹黄酮类化合物通过调控 CXCR4 对 A549 转移能力的影响。方法:采用 siRNA 技术将 A549 细胞 CXCR4 基因沉默后,设立实验分组,为 A549 对照组、A549 + 臭牡丹黄酮组、A549 - CXCR4 沉默组、A549 - CXCR4 沉默 + 臭牡丹黄酮组。每组加入 100ng/ml 的 SDF-1 处理 48h 后,Transwell 检测各组 A549 细胞侵袭能力,Western Blot 法检测各组 CXCR4、MMP-9 蛋白表达情况。结果:与 A549 对照组相比,加入臭牡丹黄酮后 A549 其体外侵袭能力下降,沉默 CXCR4 后, A549 细胞侵袭能力显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$);与 A549 对照组相比, A549 + 臭牡丹黄酮组能降低 CXCR4 和 MMP-9 的表达, A549 - CXCR4 沉默组与 A549 - CXCR4 沉默 + 臭牡丹黄酮组 CXCR4 和 MMP-9 的表达明显降低。结论:臭牡丹黄酮类化合物通过下调 CXCR4 表达,降低 MMP-9 蛋白表达,进而降低 A549 侵袭能力可能是其治疗肺癌的作用机制之一。

[关键词] 肺癌;臭牡丹黄酮类化合物;CXCR4;A549

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.09.059

Flavonoids in Clerodendrum bungei affects the metastasis of A549 cells by regulating CXCR4

TAN Xiaoning, LI Yongmin, YU Na, LUO Ji, LUO Yan, LYU Yuan, ZHU Kejian

(The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha 410006, Hunan, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of flavonoids in *Clerodendrum bungei* on the metastasis of A549 cells via the regulation of CXCR4. Methods: A549 cells with the CXCR4 gene silenced by the siRNA technique were divided into A549 control group, A549 + *Clerodendrum bungei* flavonoids group, A549 - CXCR4 silencing group, and A549 - CXCR4 silencing + *Clerodendrum bungei* flavonoids group. After the treatment with SDF-1 100ng/ml for 48 hours, Transwell assay was used to evaluate the invasion ability of A549 cells, and Western blot was used to measure the protein expression of CXCR4 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). Results: Compared with the A549 control group, the A549 cells treated with *Clerodendrum bungei* flavonoids had a reduction in in vitro invasion ability, and after CXCR4 silencing, the A549 cells had a significant reduction in invasion ability ($P < 0.01$). Compared with the A549 control group, the A549 + *Clerodendrum bungei* flavonoids group had significant reductions in the expression of CXCR4 and MMP-9, and the A549 - CXCR4 silencing group and the A549 - CXCR4 silencing + *Clerodendrum bungei* flavonoids group also had significant reductions in the expression of CXCR4 and MMP-9. Conclusion: *Clerodendrum bungei* flavonoids can reduce the invasion ability of A549 cells by downregulating CXCR4 and reducing the protein expression of MMP-9 and thus exerts a therapeutic effect on lung cancer.

[Key words] lung cancer; *Clerodendrum bungei* flavonoid; CXCR4; A549

2018 年国家癌症中心发布了最新一期的全国癌症统计数据,数据显示,肺癌每年发病约 78.1 万,是我国发病率、死亡率第一的癌症。中医药能改善肺癌患者症状、长期稳定肿块、防治肺癌的复发与转移,延长生存期。臭牡丹是著名中医药学家欧阳琦研究员挖掘湖南民间治疗恶性肿瘤的验方,并经几十年的反复临床、实验筛选而确定

的一味中药。本课题组前期研究发现臭牡丹黄酮类化合物具有较好的抗肿瘤作用^[1]。有研究证实趋化因子受体 CXCR4 高表达与肺癌的分期及预后相关,高表达 CXCR4 的肺癌患者更容易发生转移^[2-3]。本研究旨在从 CXCR4 调控角度探讨臭牡丹黄酮类化合物对人肺癌细胞 A549 转移能力的影响。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81503452)

第一作者:谭小宁,女,助理研究员,研究方向:中医药抗肿瘤的研究

通讯作者:朱克俭,男,研究员,研究方向:中医药防治肿瘤, E-mail: zkj0731@263.net

1 实验材料

1.1 细胞 人肺癌细胞 A549 细胞株购自中国科学院细胞库,目录号为 TCHu 150。

1.2 药材 臭牡丹生药由湖南中医药研究院附属医院中药房提供,由湖南省中医药研究院药剂科鉴定为马鞭草科大青属植物。

1.3 主要试剂 DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号:8115225);0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司,批号:1766146);PBS(美国 Gibco 公司,批号:8117043);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号:1640958);ECL 发光液(Beyotime,批号:p0018);抗体 CXCR4(货号 11073-2-AP)、MMP-9(货号:10375-2-AP)、 β -actin(货号:60008-1-Ig)均购自 Proteintech 公司。

1.4 主要仪器 超净工作台(美国 Thermo Fisher,型号 Heraguard ECO);二氧化碳孵箱(美国 Thermo Fisher,型号 3141 型);高速离心机(卢湘仪,型号 TGL-18M);化学发光成像系统(GENE 公司,型号:G;BOX ChemiXRQ);微量核酸蛋白浓度分析仪(英国 BioDrop 公司,型号:BioDrop Duo);电泳仪(美国 Bio-rad,型号 powerpac);转膜仪(美国 Bio-rad 公司,型号 Mini Trans-Blot C);荧光正置显微镜(德国 Leica 公司,型号:DM4000)。

2 实验方法

2.1 臭牡丹黄酮类化合物的制备 取臭牡丹药材,加 7 倍量 95% 乙醇,回流提取 2h,再加 6 倍量 5% 乙醇,回流提取 1.5h。滤过,回收乙醇,浓缩至相对密度约 1.30,真空干燥。以芦丁为对照品,采用分光光度法测得干浸膏中黄酮类化合物量约为 40%。将初提干浸膏采用 95% 乙醇溶解,溶液上大孔吸附树脂柱,先用水洗脱,水洗液弃去,再用 50% 乙醇洗脱,收集洗脱液,回收乙醇,浓缩,蒸干后得纯化干浸膏。采用分光光度法检测纯化后干浸膏中黄酮类化合物的量约为 51%。

2.2 CXCR4-siRNA 转染 A549 胰酶消化 A549 细胞,制备细胞悬液,将细胞按 2×10^5 /孔接种于 6 孔板,培养过夜后,加入 2ml 无血清 DMEM 高糖培养基。SiRNA 靶片段母液配制: CXCR4-SiRNA-805 片段、CXCR4-SiRNA-604 片段、CXCR4-SiRNA-163 片段的 RNA oligo 加入 125 μ l 无菌 DEPC 水, Negative control 的 RNA oligo 加入 62.5 μ l 无菌 DEPC 水,配制成 20 μ M 的溶液。设置分组,空白组:不做转染,正常培养;Con 组:转染 Negative control 片段;805 组:转染 CXCR4-SiRNA-805 片段;604 组:转染 CXCR4-SiRNA-604 片段;163 组:转染 CXCR4-SiRNA-163 片段。(注: CXCR4-homo-163;Sense CCAUGAAGGAACCCUGUUUTT Antisense AAACAGGGUCCUUAUGGTT; CXCR4-homo-604;Sense CCGACUUAUCUUUGCCAATT Antisense UUGGCAAAGAUGAAGUCGTT; CXCR4-homo-805;Sense CCCUCAAGACCACAGUCAUUTT Antisense AUGACUGUGGUCUUGAGGGTT; Negative control;Sense UUCUCCGAACGUGUCACGUTT Antisense ACGUGA-

CACGUUCGGAGAATT。)

按上述分组进行转染处理:取 10 μ l RNA oligo 母液加入到 125 μ l 无血清 DMEM 高糖培养基中。取 5 μ l Lip2000 加入到 125 μ l 无血清 DMEM 高糖培养基中。两者混合成 250 μ l,室温放置 20min,加入到预先装入 2ml 的无血清 DMEM 高糖培养基的 6 孔板中,37 $^{\circ}$ C 孵育 6h 后,换成含血清的 DMEM 完全培养基,37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养 48h 后,收集细胞,用于 WB 检测。

2.3 实验分组及处理 实验分为 A549 对照组,A549+臭牡丹黄酮组,A549-CXCR4 沉默组,A549-CXCR4 沉默+臭牡丹黄酮组。A549 对照组为 A549 细胞不处理组;A549+臭牡丹黄酮组为 A549 细胞并加臭牡丹黄酮类化合物(1/500 浓度)处理组;A549-CXCR4 沉默组为转染了 CXCR4-siRNA 的 A549 细胞组;A549-CXCR4 沉默+臭牡丹黄酮组为转染了 CXCR4-siRNA 的 A549 细胞并加臭牡丹黄酮类化合物(1/500 浓度)处理组。每组加入 100ng/ml 的 SDF-1 处理 48h。

2.4 Transwell 检测细胞侵袭能力 吸取 Matrigel 胶加入无血清培养基按 1:2 稀释,每个小室铺胶 60 μ l,置 37 $^{\circ}$ C 培养箱内 60min 使胶凝固制备 Transwell 小室。每个小室加入 70 μ l 基础培养基,37 $^{\circ}$ C 30min 水化基底膜。用无血清基础培养基(含 5g/L 的 BSA)制成 A549 细胞悬液,调整细胞密度约为 1×10^5 /ml 吸取 100 μ l 加入到小室上室内,下室加入含 10% FBS 的完全培养基,培养 24h。弃去小室内培养液,用湿棉签擦尽上室面的 Matrigel 和细胞,甲醇固定 30min,用 0.5% 结晶紫染色 5min,倒置显微镜下观察拍照。

2.5 Western Blot 法检测 CXCR4、MMP-9 蛋白表达 收集各组 A549 细胞,加入 200 μ l RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,蛋白定量后上样 SDS-PAGE 电泳,PVDF 膜转移,5% 脱脂奶粉封闭 60min,剪取对应的蛋白条带分别加入 CXCR4、MMP-9、 β -actin 一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,TBS-T 洗 3 次后将稀释后的二抗(用封闭液稀释 HRP 标记的二抗,稀释比例 1:1000)与膜共同孵育 1~2h,TBS-T 洗 3 次,5~10min/次,ECL 显影。将各条带用 Image J 1.44 软件进行灰度扫描并以 β -actin 为内参计算各组平均值。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 A549 细胞 CXCR4 基因沉默结果 为明确 CXCR4 与其转移潜能的关系,我们先检测沉默 A549 细胞 CXCR4 的表达。空白组、con 组、805 组、604 组、163 组分别转染处理 48h 后,收集各组细胞,进行 Western Blot 检测,其结果见图 1。结果显示 CXCR4-SiRNA-805 的片段转染组 CXCR4 表达最低,因此最佳沉默片段为 CXCR4-SiRNA-805 的片段。

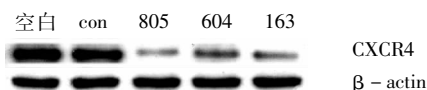


图1 CXCR4-siRNA 转染 A549 后 Western Blot 条带图

3.2 臭牡丹黄酮类化合物对 A549 细胞各组侵袭能力的影响 采用铺有人工基底膜 Matrigel 的 Transwell 小室,模拟肿瘤细胞穿过血管基底膜的过程,用穿膜细胞的多少反应肿瘤细胞的体外侵袭能力。结果见图 2,与 A549 细胞相比,加入臭牡丹黄酮后 A549 体外侵袭能力下降,沉默 CXCR4 后,A549 细胞侵袭能力显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。A549-CXCR4 沉默组与 A549-CXCR4 沉默组+臭牡丹黄酮组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果提示 CXCR4 在肺癌转移过程中,通过调控 CXCR4 表达可以影响肺癌细胞的体外侵袭能力。臭牡丹黄酮类化合物可能通过调控 CXCR4 表达影响肺癌细胞的侵袭力。

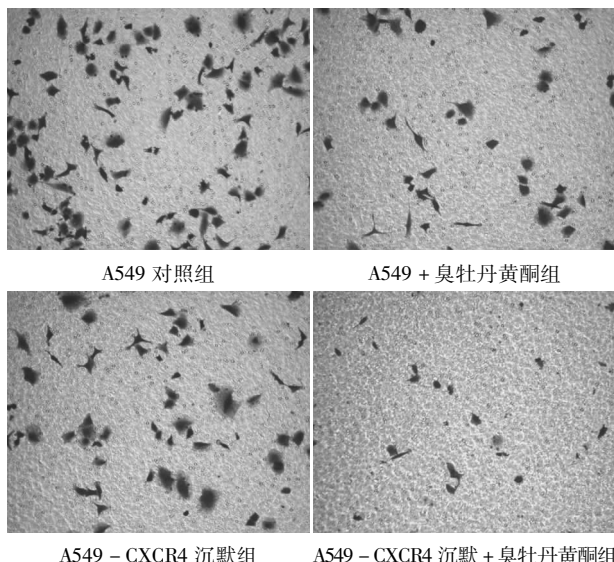
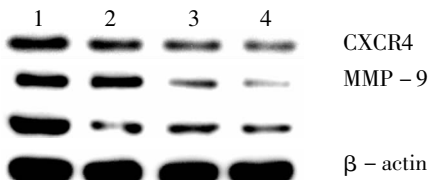


图2 臭牡丹黄酮类化合物对 A549 细胞各组侵袭能力的影响

3.3 臭牡丹黄酮类化合物对 CXCR4、MMP-9 蛋白表达的影响 根据臭牡丹黄酮类化合物能降低 A549 的侵袭力,通过对 CXCR4、MMP-9 蛋白表达的分析对其作用机制进一步探索。与 A549 对照组相比,549+臭牡丹黄酮组能一定程度上降低 CXCR4 和 MMP-9 的表达,A549-CXCR4 沉默组与 A549-CXCR4 沉默组+臭牡丹黄酮组的 CXCR4 和 MMP-9 的表达明显降低。(见图 3)



1—A549 对照组 2—A549 + 臭牡丹黄酮组
3—A549-CXCR4 沉默组 4—A549-CXCR4 沉默 + 臭牡丹黄酮组

图3 臭牡丹黄酮类化合物对 CXCR4、MMP-9 蛋白表达的影响

4 讨 论

肺癌属于中医学“肺积”“肺岩”等范畴,是由于邪毒侵

肺,导致肺气抑郁,宣降失司,血行受阻,津液失于输布,津聚为痰,痰凝气滞,瘀阻脉络,瘀毒胶结,因实致虚,最终形成肺部积块,治疗原则可概括为解毒化痰、行气化痰。臭牡丹性寒,《湖南药物志》《陕西中草药》等记载其具有祛风除湿、解毒散瘀、消肿止痛之功,符合肺癌“解毒、化痰、化痰”治疗原则的用药。现代药理研究发现其具有镇静催眠、局部麻醉、镇痛、抗感染、抑菌、抗肿瘤等作用^[4]。

SDF-1/CXCR4 具有增加肿瘤细胞与细胞外基质、基底膜等黏附的作用。Hartmann 等^[5]研究发现 SDF-1 能增加小细胞肺癌 NCI-592 黏附于纤维连接蛋白和胶原蛋白的能力,CXCR4 拮抗剂能显著降低黏附能力。Kryczek 等^[6]研究发现缺乏 CXCR4 基因的小鼠血管发育有缺陷,阻断 CXCR4 可以抑制小鼠体内肿瘤新生血管的形成和肿瘤的生长。本研究结果显示,沉默 CXCR4 后,A549 侵袭能力明显下降,而臭牡丹黄酮能够降低 CXCR4 的表达,因此臭牡丹黄酮类化合物能下调 CXCR4 表达而降低 A549 侵袭能力。

肿瘤细胞本身通过黏附和蛋白酶的水解功能等突破细胞间连接、基底膜和基质间隙等组织屏障,在迁移过程中又借助纤溶酶和众多基质金属蛋白酶(MMP)完成对周围组织的重塑,从而实现了侵袭和转移。本研究结果显示沉默 CXCR4 后,A549 表达 MMP-9 明显减少,表明臭牡丹黄酮也能在一定程度上降低 MMP-9 的表达,MMP-9 可能是 CXCR4 的下游靶点。

综上所述,臭牡丹黄酮类化合物能够通过降低 CXCR4 的表达而抑制肺癌转移,其作用机制可能是通过下调 CXCR4 而降低 MMP-9 的表达。而 CXCR4 有望作为肺癌转移的分子检测和分子靶向治疗的重要潜在靶点。关于臭牡丹黄酮类化合物如何通过 CXCR4 下调 MMP-9 表达需要进行下一步信号通路的深入研究。

参考文献

- [1] 余娜,朱克俭,马思静,等. 臭牡丹黄酮类化合物通过调控 Wnt/ β -catenin 通路影响 A549 细胞上皮间质转化研究[J]. 中草药,2018,49(3):663-669.
- [2] Yu T, Wu Y, Helman JI, et al. CXCR4 promotes oral squamous cell carcinoma migration and invasion through inducing expression of MMP-9 and MMP-13 via the ERK signaling pathway[J]. Mol Cancer Res, 2011, 9(2): 161-172.
- [3] Fukunaga S, Maeda K, Noda E, et al. Association between expression of vascular endothelial growth factor C, chemokine receptor CXCR4 and lymph node metastasis in colorectal cancer[J]. Oncology, 2006, 71(3): 204-211.
- [4] 陈思勤,朱克俭,程晓燕,等. 臭牡丹化学成分及其药理作用研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2012, 28(2): 141-142.
- [5] Hartmann TN, Burger JA, Glodek A, et al. CXCR4 chemokine receptor and integrin signaling cooperate in mediating adhesion and chemoresistance in small cell lung cancer (SCLC) cells[J]. Oncogene, 2005, 24(27): 4462-4471.
- [6] Kryczek I, Wei S, Keller E, et al. Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2007, 292(3): C987-995. (收稿日期:2019-02-05)