

汉黄芩素调节恶性胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡并影响 miR-128 的表达

陈望昊,王慧博,刘 宁*

(南京医科大学第一附属医院神经外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:观察汉黄芩素(wogonin)对人胶质瘤细胞株 U87 增殖和凋亡的影响,并初步研究 miR-128 在汉黄芩素影响 U87 细胞系中的作用机制。方法:汉黄芩素(浓度分别为 25、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$)作用于 U87 细胞 24 h 和 48 h 后,分别用荧光显微镜观察 U87 细胞形态,MTT 法检测细胞增殖活性,流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡。并采用 qRT-PCR 检测 U87 细胞中 miR-128 的表达。结果:汉黄芩素处理 24 h 和 48 h 后,U87 细胞数量明显减少,细胞核固缩或裂解;MTT 检测结果显示 U87 细胞的增殖受到汉黄芩素的抑制并且与药物的作用时间和剂量有关;流式细胞术检测显示汉黄芩素处理后的细胞其大量停留在 S 期,汉黄芩素作用胶质瘤细胞 24 h 后活细胞比率下降,细胞死亡率增加。汉黄芩素处理后的 U87 细胞中 miR-128 的表达量较对照组明显增高。结论:汉黄芩素能抑制 U87 细胞的增殖,促进其凋亡,其机制与 miR-128 的上调可能有密切的相关性。

[关键词] 环氧合酶;汉黄芩素;细胞增殖;细胞凋亡;miR-128

[中图分类号] R739.41

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)04-456-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20130407

Wogonin regulated cell proliferation and apoptosis, and repressed miR-128 expression in human glioblastoma cell line U87

Chen Wanghao, Wang Huibo, Liu Ning*

(Department of Neurosurgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of wogonin on human glioblastoma cell lines U87, and the role of miR-128 in the mechanism of wogonin effect on U87 cells. **Methods:** U87 cells were treated by wogonin within three different concentrations (25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, 48 h, respectively. The morphological change of U87 cells were observed by using fluorescence microscope. The MTT was used on cell proliferation test. Flow cytometry (FCM) was performed to analyze the cell cycle and cell apoptosis. The qRT-PCR of miR-128 was detected from U87 cells after treated with or without wogonin. **Results:** Obvious appearances of cell apoptosis were observed under fluorescence microscope, including chromatin condensation and nuclear fragmentation. The analysis of MTT assay showed that the cell proliferation of U87 was inhibited by wogonin and associated with dose- and time-dependent manner. The FCM showed that the U87 cells treated by wogonin were arrest in S phase and the apoptosis ratio of U87 treated by wogonin was significantly increased after 24 h. The expression of miR-128 increased after being treated with wogonin. **Conclusion:** Wogonin induces glioblastoma cell U87 apoptosis and may restrain cell proliferation through miR-128.

[Key words] COX; wogonin; cell proliferation; cell apoptosis; miR-128

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(4): 456-461]

汉黄芩素是从唇形科植物黄芩根分离出的一种单体药物,其相对分子质量为 284.26,分子式为 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$ 。汉黄芩素是一类黄酮类化合物,在临床上主要用于抗炎和抗菌。目前的研究表明汉黄芩素还

具有明显的抗肿瘤和保护正常细胞的能力。

小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类内源性非编码的小分子 RNA,长 19~22 个核苷酸。miRNA 通过对靶基因转录后水平的负性调控作用,从而降低靶基因的表达水平。近年研究证实,miRNA 在许多肿瘤细胞的增殖、分化和凋亡等生物学过程中发挥了重要作用。Ciafre 等^[1]于 2005 年首次用 miRNA 芯片技术筛查了 245 个常见的 miRNAs 在恶性胶质瘤中的

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81172389)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: liuningnj2013@126.com

表达,发现与正常脑组织相比,某些 miRNA(如 miR-128 和 miR-21 等)在胶质瘤中异常表达。另外有文献报道,miR-128 与胶质瘤细胞的增殖相关,并且调低 miR-10b 的表达,能引起细胞的凋亡。在本实验中,采用在中枢神经细胞中高表达,但在恶性胶质瘤中低表达的 miR-128 做为研究对象。miR-128 是 P53 的直接作用靶标,能与细胞周期蛋白 CDK6、BCL-2 和 E2F3 等形成复合物,抑制靶基因的翻译或降解靶基因的 miRNA,诱导细胞周期停滞在 S 期,从而导致细胞凋亡和衰老。

胶质瘤是中枢神经系统中最常见的恶性肿瘤之一,胶质瘤的中位生存期一般为 15 个月左右,低于其他类型的脑肿瘤。胶质瘤的化学药物治疗是其手术治疗后的必要补充和高恶性胶质瘤晚期的主要治疗手段。然而,目前大多数化疗药物的细胞毒性很强,在杀灭胶质瘤细胞的同时也将大量正常细胞杀死,而且化疗药物价格一般比较昂贵,因此寻找一种有效、低毒、价格低廉的药物非常重要。近年来研究发现,环氧合酶(COX)在肿瘤的发生发展过程中有着重要作用,其在胶质瘤发生发展中的作用逐渐受到重视。本实验主要观察了 COX 抑制剂——汉黄芩素对人胶质瘤 U87 细胞增殖和凋亡的影响并探讨其初步机制,为汉黄芩素治疗胶质瘤提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

人胶质瘤 U87 细胞株购自中科院肿瘤细胞库,汉黄芩素为中国药科大学郭青龙教授惠赠(纯度>99%),顺铂为中国药科大学尤启东教授惠赠(10 mg/支,纯度>99.9%);DMEM、新生胎牛血清购自杭州四季青公司,青霉素购自美国 Sigma 公司,MTT 试剂盒和碘化丙啶(PI)购自美国 Sigma 公司,RT-PCR 试剂盒购自 Roche 公司(美国)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养

U87 细胞在 37℃、5%CO₂ 条件下培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。

1.2.2 试剂配制

使用 PBS 溶解汉黄芩素,配制成 25、50 和 100 mmol/L 的贮存液,使用时按 1:1 000 的比例加入培养液中,终浓度为 25、50 和 100 μmol/L。阴性对照组加入等量的 PBS(pH7.4),阳性对照组加入等量的顺铂(20 mg/L)。将碘化丙啶溶于 PBS 中,加入 1%枸橼酸钠和 0.1% TritonX-100,PI 终浓度为 50 mg/L,

用棕色瓶 4℃避光保存。

1.2.3 荧光显微镜下观察细胞形态

在 6 孔板内放置盖玻片,将 U87 细胞接种于 6 孔板中,当细胞生长至汇合度 70%左右时,加入浓度分别为 25、50 和 100 μmol/L 的汉黄芩素。另设不加汉黄芩素的空白对照组、阴性对照组(青霉素组)、阳性对照组(顺铂处理组,加入等量的浓度为 20 mg/L 顺铂)。各组作用 24 和 48 h 后,加入新鲜配置 1:3 混合的冰醋酸/甲醇固定液,干燥;用新鲜荧光染料溶液 PI 染色 30 min,滴加 pH5.5 柠檬酸缓冲液封片,使用荧光显微镜进行观察。

1.2.4 MTT 比色法检测细胞增殖活性

将对数生长期的 U87 细胞制成单细胞悬液,按 1×10⁴ 个/孔接种于 96 孔培养板,37℃、5%CO₂ 培养过夜,使细胞贴壁。弃上清,加入终浓度为 25、50 和 100 μmol/L 汉黄芩素溶液,以不含汉黄芩素的培养细胞为空白对照,以含 PBS 的培养细胞为阴性对照,以含有顺铂的培养基培养的细胞为阳性对照,每组设 7 个复孔,同时设不含细胞和不做任何处理的培养基 3 孔消除背景干扰。于培养结束前 4 h 加入 MTT,10 μl/孔,使总体积为 100 μl/孔,用酶标仪检测吸光度(检测波长 450~490 nm)分析检测结果。按以下公式计算细胞存活率,细胞存活率=[(实验孔吸光度-空白孔吸光度)/(对照孔吸光度-空白孔吸光度)]×100%。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡率

将 U87 细胞以浓度为 5×10⁵ 个/L 接种于 6 孔培养板,置于 37℃、5%CO₂ 培养箱内培养 24 h 后,加入终浓度为 25、50 和 100 μmol/L 的汉黄芩素处理细胞 24、48 h。消化收集细胞,1 000 r/min 离心 5 min, PBS 液洗涤 1 次,离心去 PBS,加入冰预冷的 70%的乙醇,4℃条件下固定 2 h。离心弃去固定液,用 1 ml PI 染液染色,4℃避光 30 min,400 目的筛网过滤 1 次,流式细胞仪(BD 公司)检测细胞周期和凋亡率。

1.2.6 引物设计与合成

所有引物由上海生物工程公司合成,在基因库查找基因序列,其中包含有 44 bp 的茎环结构和 3' 端的 6 个 miRNA-128 碱基序列,然后按照逆转录产物序列设计 PCR 引物(表 1)。

1.2.7 提取总 RNA 并进行 RT-PCR

用 DEPC 水调整浓度至 100 ng/μl,取 2 ng,加逆转录引物 1 μl、DEPC 水 12 μl 混匀,置 65℃ 5 min,冰上 2 min,然后依次加入 5×反应缓冲液 4 μl, RNA 酶抑制剂(20 U/μl)1 μl,10 mmol/L dNTPs 混

表 1 miR-128 和 U6 的引物序列
Table 1 The primer sequences of miR-128 and U6

引物	序列(5'→3')
miR-128 反转录引物	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGAITACGACAAAAGAG-3'
miR-128 real-time PCR 上游引物	5'-CGCGCTCACAGTGAACCG-3'
U6 real-time PCR 上游引物	5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAAAATATG-3'
real-time PCR 下游共同引物	5'-GCGCGTCGTGAAGCGTTC-3';5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'

合物 2 μl , Revertaidm-mulv 逆转录酶 (200 U/ μl) 1 μl , 混匀, PCR 仪上经 42 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 70 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 完成逆转录。PCR 中每个标本均设立 U6 对照管与检测管, 温度设置为 94 $^{\circ}\text{C}$ (2 min), 94 $^{\circ}\text{C}$ (15 s), 60 $^{\circ}\text{C}$ (1 min), 共进行 30 次循环, 最后采用 40 g/L 琼脂糖凝胶电泳观察结果。

1.3 统计学方法

运用 SPSS18.0 统计学软件包进行统计学分析, 数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数比较采用 t 检验, 组间百分率的比较采用 χ^2 检验, 相关性采用 Spearman 等级相关分析。 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 汉黄芩素诱导胶质瘤 U87 细胞形态学改变

空白组与阴性对照组的细胞排列紧密, 形态规则; 阳性对照(顺铂)组的细胞数量减少, 形态不规则, 核断裂, 细胞裂解成碎片; 汉黄芩素组随着药物

浓度增大和作用时间延长, 细胞数量和形态变化明显, 细胞数量减少, 细胞萎缩, 可见核染色质边集, 核固缩或断裂, 细胞裂解成碎片(图 1)。

2.2 汉黄芩素抑制 U87 细胞增殖并诱导 U87 细胞凋亡

流式细胞仪检测结果显示汉黄芩素对 U87 细胞具有诱导凋亡的作用(图 2), 该作用在实验浓度和作用时间范围内呈时间和浓度依赖性, 且检测结果显示汉黄芩素可阻滞 U87 细胞的周期于 S 期(表 2)。另外 MTT 法检测结果也证实, 汉黄芩素在实验浓度和作用时间范围内对 U87 细胞具有抑制增殖作用(图 3)。

2.3 miR-128 在胶质瘤 U87 细胞中的表达

普通 PCR 电泳结果显示, 汉黄芩素处理组和未处理组均有 miR-128 和 U6 的特异性条带(图 4)。经定量 RT-PCR 检测, miR-128 与 U6 均显示出可靠的 Ct 值, 汉黄芩素处理组 miR-128 的表达明显升高, 是未处理组的 7.73 倍。

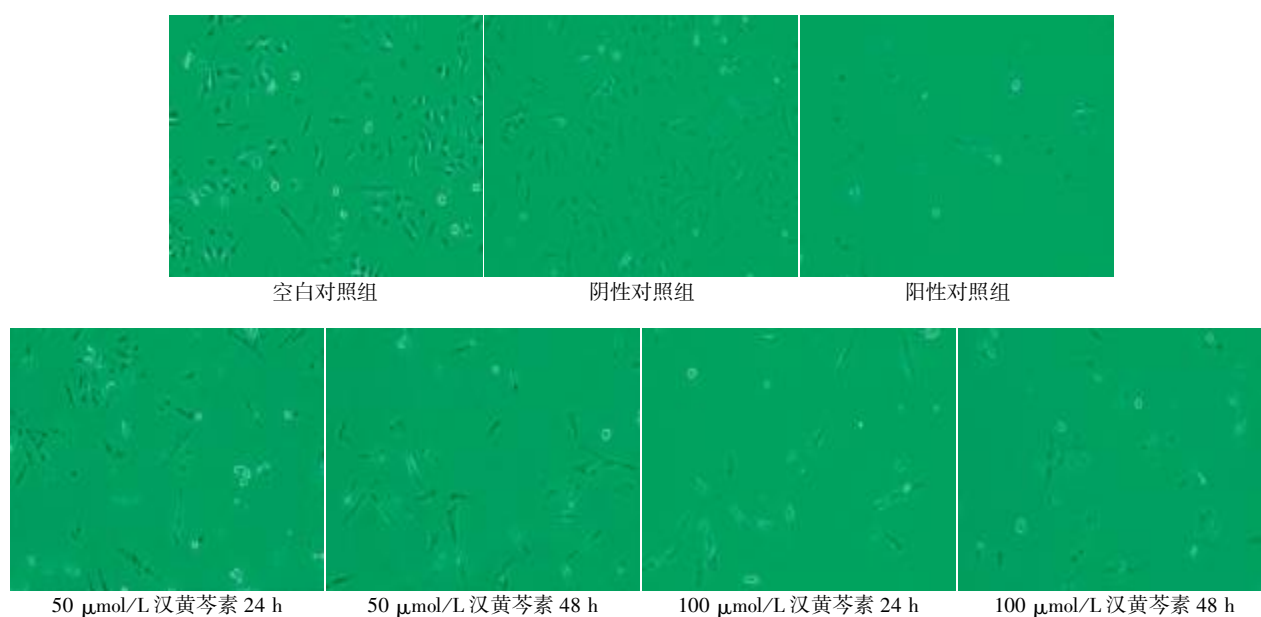


图 1 荧光染色法显微镜下胶质瘤 U87 细胞形态的变化($\times 200$)

Figure 1 The morphological changes of glioma cell line U87 under microscope by fluorescent staining ($\times 200$)

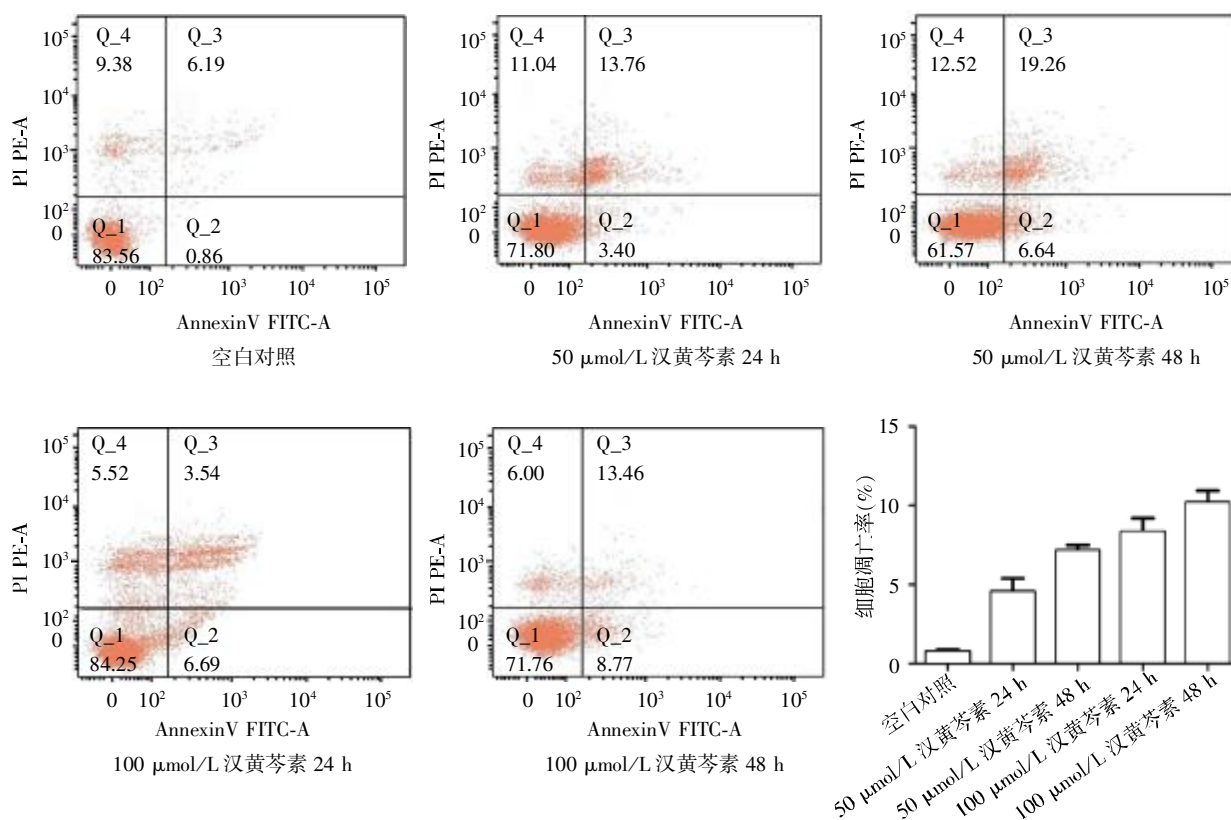


图 2 流式细胞仪检测经不同浓度汉黄芩素处理 24 h 和 48 h 后细胞凋亡情况的变化

Figure 2 Apoptosis analyses in U87 cells treated with different concentration wogonin for 24 or 48 hours by FCM

表 2 流式细胞仪检测经不同浓度汉黄芩素处理 24,48 h 后细胞周期的变化

表 2 Cell cycle analysis in U87 cells treated with different concentration of wogonin for 24 or 48 hours by FCM (%)

分组	24 h			48 h		
	G1	G2	S	G1	G2	S
空白对照	84.37 ± 2.98	6.32 ± 1.46	8.76 ± .12	85.88 ± 0.90	6.40 ± 1.50	7.73 ± 1.17
25 μmol/L 汉黄芩素	64.49 ± 2.64	17.28 ± 4.56	22.14 ± 0.83	55.68 ± 1.98	18.28 ± 2.95	26.04 ± 1.77
50 μmol/L 汉黄芩素	55.91 ± 2.12	17.50 ± 2.92	25.3 ± 12.06	46.44 ± 3.58	14.65 ± 6.64	38.93 ± 2.97
100 μmol/L 汉黄芩素	43.74 ± 2.98	16.58 ± 3.57	39.67 ± 6.55	40.51 ± 5.58	14.29 ± 7.81	45.52 ± 2.30

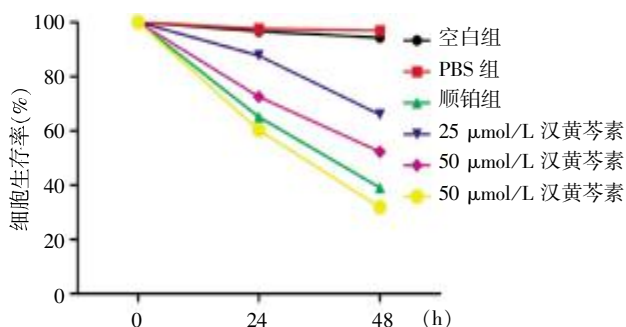
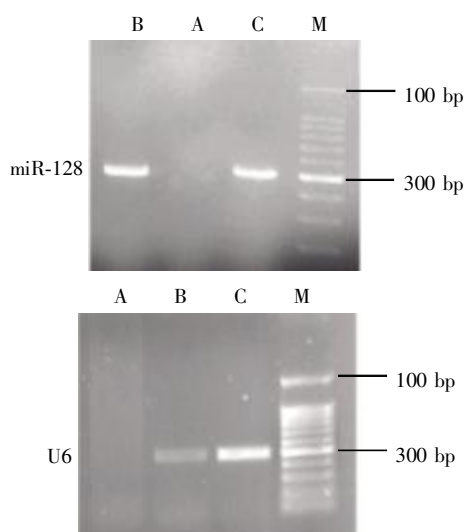


图 3 MTT 计算汉黄芩素对于胶质瘤 U87 细胞的杀伤作用与时间和剂量成正比

Figure 3 The effect of wogonin treated U87 cell is proportion to the effective time and dose size

3 讨论

胶质细胞瘤被认为中枢系统最常见的恶性肿瘤^[2]。之前的研究发现脂氧合酶途径和环氧合酶途径是花生四烯酸代谢的重要代谢途径,其代谢产物通过多种信号途径对胶质细胞瘤产生多种生物学效应,如抑制细胞凋亡、促进肿瘤增长等^[3]。花生四烯酸的代谢途径由如下 3 条途径构成:脂氧合酶、环氧合酶和细胞色素^[4]。COX 代谢途径在胶质瘤发生发展中的作用日益受到重视。目前研究发现的 COX 同工酶有 3 个:COX-1、COX-2 和 COX-3。COX-2 是一种诱导酶,功能有活化巨噬细胞或其他细胞,充斥于



A: 未处理组; B: 汉黄芩素处理组; C: 空白对照; M: Marker。

图 4 常规 PCR 检测 miR-128 和 U6

Figure 4 The PCR detection for miR-128 and U6

炎症组织。最新的研究表明 COX-2 在大多数正常组织都未能找到^[4]。最近,它已被证明可在许多癌症患者中测验出来,因此,COX-2 过度表达可能是诱导某些肿瘤发生发展的原因之一。抑制 COX-2 表达被认为可以对肿瘤起到预防或抑制其生长的作用。动物实验证实选择性 COX-2 抑制剂塞来昔布可以增强伊立替康对小鼠胶质瘤肿瘤模型的抗肿瘤作用^[5]。临床资料亦提示胶质瘤组织 COX-2 表达与术后放化疗后肿瘤复发相关,推测其原因可能与过表达 COX-2 的肿瘤组织对凋亡信号不敏感以及 COX-2 促进肿瘤血管生成有关。

最近,越来越多的证据表明 COX-2 抑制剂汉黄芩素,一种提取出的^[6]传统中药黄芩根混合物的单体,可诱导肾癌、非小细胞肺癌、胃癌、结肠癌、肝癌和前列腺癌等肿瘤细胞的凋亡。而且汉黄芩素还可以有效诱导胶质瘤细胞凋亡和保护正常脑细胞。有研究发现,非小细胞肺癌 H460 细胞用汉黄芩素处理 48 h 后,多数细胞凋亡,Bcl-2 表达减少,而 COX、caspase-9 的蛋白表达增加。之前的研究发现,汉黄芩素可破坏人肝癌细胞膜的完整性,导致肝癌细胞自身的 Bcl-2 蛋白合成降低,肝癌细胞的生长在 S 期停滞,从而引起肝癌细胞的凋亡^[7]。因此研究汉黄芩素等 COX 抑制剂有助于全面认识其具有的潜在抗肿瘤作用的机制。流式细胞术检测结果显示本实验中 U87 细胞经不同浓度的汉黄芩素处理 24 和 48 h 后,出现细胞明显的细胞凋亡现象。流式细胞术检测结果也显示,汉黄芩素能抑制 U87 细胞的增殖,且具有时间和剂量依赖关系。上述结果说明

汉黄芩素可以诱导 U87 细胞死亡,可能主要以凋亡形式为主。

近年来的研究发现,多个 miRNA 在脑内出现特异性的表达。某些在正常脑组织中高表达的 miRNA (如 miR-9、miR-125 和 miR-128) 在胶质瘤中却被抑制,而某些 miRNA (如 miR-21、miR-26 和 miR-10b) 在胶质瘤细胞中的表达远远高于正常脑细胞。另外,miRNA 在肿瘤的增殖、分化和凋亡等生物过程中发挥了重要作用。Corsten 等^[8]研究发现,miR-21 能抑制胶质瘤细胞的活性并引起 caspase-3 和 caspase-7 水平明显升高且明显加速了胶质瘤的凋亡。还有研究表明,miR-181a 和 miR-181b 可以抑制胶质瘤细胞的增殖,诱导胶质瘤细胞的凋亡和减弱恶性胶质瘤细胞的侵袭性。在这些 miRNA 中,miR-128 对于胶质瘤的凋亡发挥了重要作用。miR-128 可以通过调节 IRF4 而发挥其在延长急性淋巴细胞白血病患者生存期中的作用^[9]。另外,在恶性淋巴瘤启动细胞中降低的 miR-128 可调节 Bmi-1 的表达并诱导肿瘤对化疗药物的耐药性,miR-128 可以通过调节 IRF4 而发挥其延长急性淋巴细胞白血病患者生存期的作用,miR-128 还可以通过抑制 Bcl-2 来促进肿瘤的细胞凋亡^[10]。研究还发现将 miR-128 转入骨肉瘤 U-2OS 细胞后,相对于对照组,导入 miR-128 组的 U-2OS 细胞停滞在 S 期的细胞数目明显增多,说明 miR-128 对肿瘤细胞的增殖有抑制作用。同时研究还发现 p53 是 miR-128 发挥作用的始动基因^[11]。之前的研究发现,miR-128 缺失的胶质瘤患者中,p53 的抗肿瘤作用将受到影响,端粒酶的氧化应激和癌基因的活化等因素导致 DNA 损伤,激活 p53,p53 又激活 miR-128,miR-128 与 E2F3、Bcl-2、CDK4、CDK6、细胞周期蛋白 E2 以及 E2F3 形成复合物,抑制或降解下游基因的 mRNA 发挥功能^[12]。

因此,本文推测 miR-128 在汉黄芩素诱导的 U87 细胞凋亡中发挥作用。qRT-PCR 显示 miR-128 在汉黄芩素处理过的 U87 细胞中的表达较未处理过的 U87 细胞升高了 7.73 倍。因此汉黄芩素有可能通过上调 miR-128 的表达诱导细胞凋亡,但 miR-128 如何影响下游靶基因和如何导致胶质瘤细胞凋亡和抑制胶质瘤细胞增殖的机制仍不清楚,这将是今后研究的目标。

[参考文献]

- [1] Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334 (4): 1351 -

- 1358
- [2] Shi L,Zhang S,Feng K,et al. MicroRNA-125b-2 confers human glioblastoma stem cells resistance to temozolomide through the mitochondrial pathway of apoptosis [J]. Int J Oncol,2012,40(1):119-129
- [3] Roller A,Bahr OR,Streffer J,et al. Selective potentiation of drug cytotoxicity by NSAID in human glioma cells;the role of COX-1 and MRP[J]. Biochem Biophys Res Commun,1999,259(3):600-605
- [4] Chen L,Wang X,Wang H,et al. miR-137 is frequently down-regulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2[J]. Eur J Cancer,2012,48(16):3104-3111
- [5] Goel A,Aggarwal BB. Curcumin,the golden spice from Indian saffron,is a chemosensitizer and radiosensitizer for tumors and chemoprotector and radioprotector for normal organs[J]. Nutr Cancer,2010,62(7):919-930
- [6] Huang KF,Zhang GD,Huang YQ,et al. Wogonin induces apoptosis and down-regulates survivin in human breast cancer MCF-7 cells by modulating PI3K-AKT pathway [J]. Int Immunopharmacol,2012,12(2):334-341
- [7] Hu Y,Yang Y,You QD,et al. Oroxylin A induced apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 was involved in its antitumor activity [J]. Biochem Biophys Res Commun,2006,351(2):521-527
- [8] Corsten MF,Dennert R,Jochems S,et al. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease [J]. Circ Cardiovasc Genet,2010,3(6):499-506
- [9] Havelange V,Stauffer N,Heaphy CC,et al. Functional implications of microRNAs in acute myeloid leukemia by integrating microRNA and messenger RNA expression profiling[J]. Cancer,2011,117(20):4696-4706
- [10] Zhu Y,Yu F,Jiao Y,et al. Reduced miR-128 in breast tumor-initiating cells induces chemotherapeutic resistance via Bmi-1 and ABCG5 [J]. Clin Cancer Res,2011,17(22):7105-7115
- [11] Donzelli S,Fontemaggi G,Fazi F,et al. MicroRNA-128-2 targets the transcriptional repressor E2F5 enhancing mutant p53 gain of function [J]. Cell Death Differ,2011,19(6):1038-1048
- [12] Zhang Y,Chao T,Li R,et al. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a[J]. J Mol Med (Berl),2009,87(1):43-51
- [收稿日期] 2012-12-10

科技出版物中数字的用法

1. 凡是可以用阿拉伯数字且很得体的地方,均应使用阿拉伯数字。
2. 日期和时刻的表示。需注意年份不能简写,如 1997 年不能写成 97 年。
3. 计量或计数单位前的数字应采用阿拉伯数字;多位阿拉伯数字不能拆开转行;小数点前或后超过 4 位数(含 4 位)的应从小数点起向左或向右每 3 位空出适当间隙,不用千分撇“,”;数值的有效数字应全部写出,如“1.50、1.75、2.00”,不能写成“1.5、1.75、2”。
4. 参数与偏差范围的表示:
 - (1) 数值范围:5~10;注意 $3 \times 10^3 \sim 8 \times 10^3$,不能写成 $3 \sim 8 \times 10^3$;
 - (2) 百分数范围:20%~30%,不能写成 20~30%;
 - (3) 具有相同单位的量值范围:1.5~3.6 mA 不必写成 1.5 mA~3.6 mA;
 - (4) 偏差范围:(25±1)°C 不写成 25±1°C,(85±2)% 不能写成 85±2%;
5. 附带尺寸单位的量值相乘写为:50 cm×80 cm×100 cm,不能写成 50×80×100 cm,或 50×80×100 cm³。

(本刊编辑:接雅俐)