

汉黄芩素对人髓母细胞瘤增殖和凋亡的影响

王新法,何俊平*,张 瑞,钱 静,王 静,王 刚

南京医科大学附属儿童医院神经外科,江苏 南京 210008

[摘要] 目的:探讨汉黄芩素对髓母细胞瘤增殖和凋亡的影响。方法:运用CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒,流式细胞仪检测不同浓度汉黄芩素及同一浓度不同作用时间对髓母细胞瘤细胞活性及凋亡的影响;通过比色法检测汉黄芩素对髓母细胞瘤细胞中Caspase-3蛋白活性的影响;通过体内试验,检测汉黄芩素在裸鼠成瘤实验中对髓母细胞瘤细胞活性的影响。结果:汉黄芩素可以抑制髓母细胞瘤细胞活性并诱导髓母细胞瘤细胞凋亡。汉黄芩素抑制髓母细胞瘤细胞活性具有浓度依赖性和时间依赖性。此外,汉黄芩素可增强髓母细胞瘤细胞中凋亡蛋白Caspase-3的活性,诱导髓母细胞瘤细胞凋亡。在裸鼠成瘤实验中,汉黄芩素可抑制髓母细胞瘤的体内增殖。结论:汉黄芩素在体外可抑制髓母细胞瘤细胞活性及诱导细胞凋亡。在裸鼠成瘤实验中,汉黄芩素可以抑制肿瘤增长。

[关键词] 髓母细胞瘤;汉黄芩素;增殖;凋亡

[中图分类号] R739.41

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)12-1688-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20181205

The effect of Wogonin on the proliferation and apoptosis of medulloblastoma cell line DAOY

Wang Xinfu, He Junping*, Zhang Rui, Qian Jing, Wang Jing, Wang Gang

Department of neurosurgery, Nanjing Children's Hospital, Affiliated to NMU, Nanjing 210008, China

[Abstract] **Objective:** To explore the impact of wogonin on the proliferation and apoptosis of medulloblastoma cell line DAOY. **Methods:** DAOY cells were divided into experimental groups (added with wogonin at difference concentrations) and control group. The proliferation of DAOY was detected using CCK-8 assay kit. The apoptosis was analyzed by Annexin V-FITC/PI double staining and the activity of caspase-3 was determined via colorimetry. Moreover, we also detected the tumor inhibiting function of wogonin in vivo using subcutaneous tumor model. **Results:** Wogonin remarkably inhibited the proliferation of medulloblastoma cell DAOY and induced the apoptosis in a dose and time dependent manner. The apoptosis was characterized by the increase of apoptosis protein caspase-3. **Conclusion:** Wogonin could inhibit medulloblastoma cell proliferation both in vitro and in vivo via inducing medulloblastoma cells apoptosis.

[Key words] medulloblastoma; wogonin; proliferation; apoptosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(12): 1688-1691]

髓母细胞瘤是儿童最常见的颅内原发性恶性肿瘤^[1]。随着现代诊疗技术水平的不断进步,髓母细胞瘤患儿的5年生存率有了很大提高,但仍有30%的患儿存活不过5年。存活的患儿也多因严重的治疗后遗症,生活质量较低。因此,迫切需要寻找新的治疗方法来降低髓母细胞瘤患儿的病死率

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金面上项目(2017NJMU066)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: junpinghe1118@sina.com

和致残率^[2]。

汉黄芩素是中药黄芩的提取物,属黄酮类化合物,具有较强的抗氧化和抗炎活性^[3-4]。近来国内外诸多研究表明,汉黄芩素不仅可以抑制炎症反应、调节免疫,还可抑制多种肿瘤细胞的增殖^[5-6]。但汉黄芩素在对人髓母细胞瘤的作用尚未见报道。本研究以人髓母细胞瘤细胞DAOY为模型,研究汉黄芩素对髓母细胞瘤细胞增殖和凋亡的影响,以期汉黄芩素在髓母细胞瘤治疗的研发应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

汉黄芩素(上海友思生物技术有限公司),纯度>99%,以DMSO助溶,4℃保存。DAOY细胞为本实验室自存。DMEM培养基和胎牛血清(Gibco公司,美国)。细胞培养瓶、96孔板等(Corning公司,美国)。CCK-8细胞增殖与毒性试剂盒、Caspase-3分光光度法检测试剂盒及Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(南京凯基生物技术股份有限公司)。酶标仪为Thermo光谱扫描多功能读数仪。流式细胞仪为BD Influx。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将DAOY细胞置于含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM培养液中,置于37℃、5%CO₂饱和湿度的恒温培养箱中培养;每2~3d换液1次、每4d左右传代1次。

1.2.2 CCK-8法检测细胞增殖

将细胞消化、计数、配制成浓度为 5×10^4 个/mL的单细胞悬液。96孔细胞培养板中每孔加入100 μL单细胞悬液;将培养板置于37℃、5%CO₂饱和湿度的恒温培养箱中培养24h;弃去培养基,PBS清洗2次,用培养基稀释汉黄芩素至所需浓度(12.5、25.0、50.0和100 μmol/L),每孔加入200 μL相应的含药培养基,同时设立阴性对照组;再将培养板置于37℃、5%CO₂培养箱中培养24h;向每孔中加入10 μL CCK-8,继续培养3h;摇床10 min轻轻混匀;酶标仪在波长450 nm读出每孔的吸光度(A)。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡

将对数生长期的细胞消化接种到6孔板中,次日,根据组别设置加入50 μmol/L汉黄芩素的完全培养基培养48h后,消化收集细胞;用PBS洗涤细胞2次(1 000 r/min离心5 min);加入500 μL Binding Buffer重悬细胞;然后再加入5 μL Annexin V-FITC混匀后,加入5 μL PI,混匀;室温、避光、反应15 min;用流式细胞术检测细胞的凋亡。

1.2.4 比色法检测Caspase-3活性

DAOY细胞接种于6孔板上,培养24h后进行不同浓度的汉黄芩素处理,处理后继续培养24h后收集并裂解细胞,离心取上清测定蛋白浓度。取含100~200 μg蛋白的裂解液至96孔培养板中,每孔加50 μL 2倍浓度的反应缓冲液/DTT和5 μL Caspase-3底物后,37℃孵育4h。每组设3个复孔。在酶标仪

上读取各孔吸光度值,确定每个样本中Caspase-3活性的倍增数。实验重复3次。Caspase-3活性倍增数=药物处理组吸光度值/阴性对照组吸光度值。

1.2.5 裸鼠皮下成瘤实验

收集对数期生长的DAOY细胞,用无血清DMEM培养基重悬后配成 2×10^8 个/mL单细胞悬液。用10%水合氯醛腹腔注射麻醉饲养在SPF条件下的4~5周龄雄性BALB/C备用的裸小鼠(0.3 mL/100 g)。麻醉成功后,取100 μL单细胞悬液接种于裸小鼠的右前肢腋下。待裸鼠注射部位形成肉眼可见肿瘤后,每隔1d用游标卡尺测量肿瘤长径(a)和短径(b),按公式 $V = ab^2/2$ 计算肿瘤体积。待肿瘤体积达50 mm³时将裸鼠随机分成两组,每组3只。将两组分别注射50 μmol/L汉黄芩素与DMSO(0.1%)160 μL瘤内注射。从第1次治疗开始,每隔1d治疗1次,共治疗5次。于最后一次观察测量结束后,断颈处死裸鼠,取出肿瘤标本。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 汉黄芩素抑制髓母细胞瘤细胞活性

CCK-8检测结果显示汉黄芩素在24h可以有效抑制髓母细胞瘤的细胞活性(图1A)。随着汉黄芩素浓度的增高,髓母细胞瘤细胞的活性逐渐降低。此外,进一步观察了50 μmol/L浓度的汉黄芩素不同作用时间对髓母细胞瘤细胞活性的影响(图1B)。这些结果表明,汉黄芩素可抑制髓母细胞瘤细胞增殖,且汉黄芩素对髓母细胞瘤细胞活性抑制程度具有浓度和时间依赖性。

2.2 汉黄芩素诱导髓母细胞瘤细胞凋亡

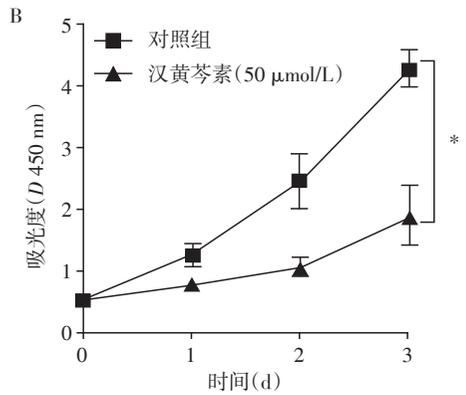
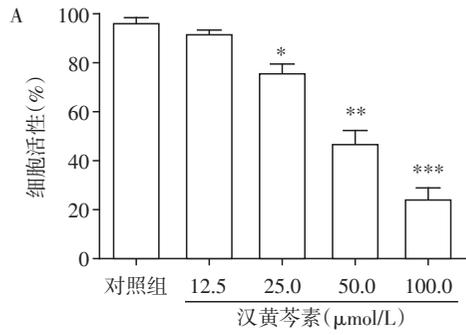
Annexin V-FITC/PI流式凋亡检测显示,与对照组相比,50 μmol/L汉黄芩素处理组细胞凋亡明显增多($P < 0.001$,图2)。

2.3 汉黄芩素增加细胞凋亡蛋白Caspase-3的表达

通过Caspase-3活性检测试剂盒,发现不同浓度汉黄芩素处理组细胞中Caspase-3活性不同,Caspase-3活性随汉黄芩素浓度的增高而增强(图3)。

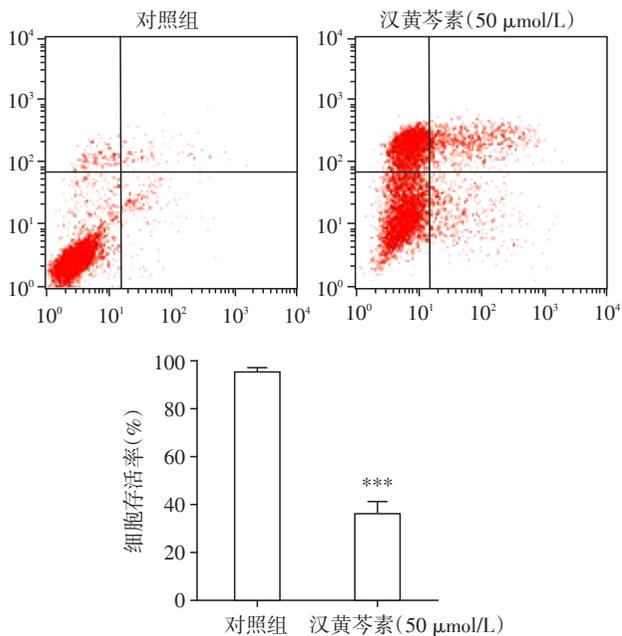
2.4 汉黄芩素体内抑制髓母细胞瘤增殖

为研究汉黄芩素对髓母细胞瘤细胞生长抑制作用,用汉黄芩素对皮下成瘤裸鼠进行瘤内治疗,与对照组相比,治疗组肿瘤的体积明显缩小(图4)。



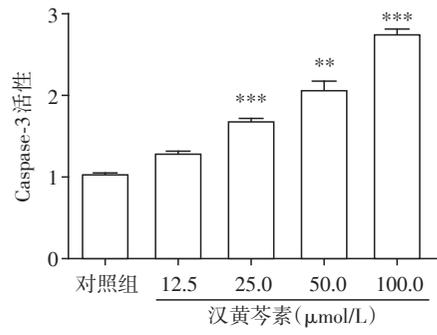
A: 24 h 不同浓度汉黄芩素对髓母细胞瘤细胞活性影响; B: 50 μmol/L 浓度汉黄芩素不同作用时间对髓母细胞瘤细胞活性影响。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图1 CCK-8检测汉黄芩素对髓母细胞瘤DAOY活性的影响
Figure 1 Analysis of wogonin on DAOY cell viability using CCK-8 kit



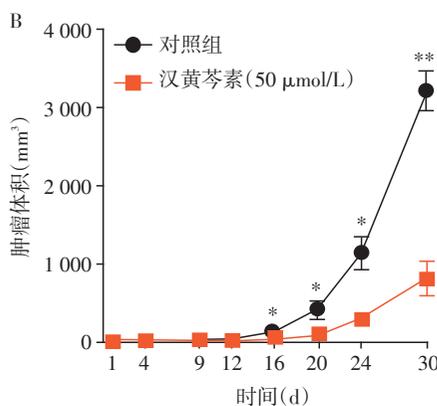
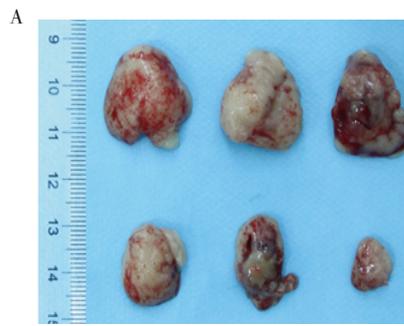
与对照组比较, *** $P < 0.001$ 。

图2 流式细胞仪检测 50 μmol/L 汉黄芩素对髓母细胞瘤细胞凋亡的影响
Figure 2 Analysis of wogonin on DAOY cell apoptosis using flow cytometry



与对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图3 Caspase-3活性检测试剂盒检测汉黄芩素对髓母细胞瘤细胞中Caspase-3活性的影响
Figure 3 Analysis of wogonin on caspase - 3 activity in DAOY cells by caspase-3 activity assay kit



A: 汉黄芩素明显抑制髓母细胞瘤细胞左裸鼠体内成瘤; B: 汉黄芩素对髓母细胞瘤细胞右裸鼠皮下生成肿瘤体积的影响。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图4 汉黄芩素抑制髓母细胞瘤的体内生长
Figure 4 Analysis of wogonin on medulloblastoma cells proliferation *in vivo*

3 讨论

髓母细胞瘤是一种胚胎源性肿瘤,多起源于小脑下蚓部,是儿童后颅窝内最常见的恶性肿瘤。目前的治疗策略是以手术切除为主,术后辅以脑及全脊髓放疗和化疗^[1-2]。该方法虽然可以显著提高患儿的生存率,但由于治疗的不良反应,存活下来的

患儿多留有智力下降、生长缓慢、内分泌功能失常和听力减退等严重的后遗症,这使得存活患儿生存质量较低^[7]。此外,目前国内外已研究的抗肿瘤药物众多,但多数不良反应较大,寻找新的高效低毒的肿瘤抑制剂已成为国内外研究的重点。中药抗癌成分以其高疗效低毒性日益受到研究人员的重视。汉黄芩素是传统中草药黄芩的有效成分之一,是一种植物单黄酮类化合物。近年来,越来越多的研究揭示汉黄芩素除了较强的抗氧化和抗病毒活性外,还有明显的抑癌作用^[8],例如汉黄芩素可诱导EB病毒阳性淋巴瘤细胞凋亡,还可通过抑制Nrf2增强耐药头颈部肿瘤对顺铂的敏感性^[9-10]。此外体外研究还发现,在乳腺癌、肝癌及胶质母细胞瘤细胞系中,汉黄芩素都发挥了抑癌作用^[11-13]。

本研究通过采用不同浓度汉黄芩素体外处理人髓母细胞瘤DAOY细胞发现,汉黄芩素对髓母细胞瘤细胞活性具有明显抑制作用,且汉黄芩素对髓母细胞瘤细胞活性抑制程度具有浓度和时间依赖性。随后,通过流式细胞凋亡检测还进一步发现汉黄芩素可以诱导髓母细胞瘤DAOY细胞凋亡。caspase-3活性的检测还发现汉黄芩素可以增强髓母细胞瘤细胞中caspase-3凋亡蛋白的活性。这一发现进一步证实,汉黄芩素能够诱导DAOY细胞凋亡。

因此,汉黄芩素有望用于髓母细胞瘤的治疗,相信其在髓母细胞瘤的预防和治疗方面有非常好的应用前景。汉黄芩素的抗癌作用与Caspase-3的关系,及其如何调控DAOY细胞进入凋亡的进程,有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] Packer RJ, Macdonald T, Vezina G, et al. Medulloblastoma and primitive neuroectodermal tumors [J]. *Handb Clin Neurol*, 2012, 105: 529-548
- [2] Saury JM, Emanuelson I. Cognitive consequences of the treatment of medulloblastoma among children [J]. *Pediatr Neurol*, 2011, 44(1): 21-30
- [3] Lucas CD, Dorward DA, Sharma S, et al. Wogonin induces eosinophil apoptosis and attenuates allergic airway inflammation [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2015, 191(6): 626-636
- [4] Khan S, Zhang D, Zhang Y, et al. Wogonin attenuates diabetic cardiomyopathy through its anti-inflammatory and anti-oxidative properties [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 428: 101-108
- [5] Fu P, Du F, Liu Y, et al. Wogonin increases doxorubicin sensitivity by down-regulation of IGF-1R/AKT signaling pathway in human breast cancer [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2015, 61(7): 123-127
- [6] Hu C, Xu M, Qin R, et al. Wogonin induces apoptosis and endoplasmic reticulum stress in HL-60 leukemia cells through inhibition of the PI3K-AKT signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(6): 3146-3154
- [7] Gudrunardottir T, Lannering B, Remke M, et al. Treatment developments and the unfolding of the quality of life discussion in childhood medulloblastoma: a review [J]. *Childs Nerv Syst*, 2014, 30(6): 979-990
- [8] Yang L, Wang Q, Li D, et al. Wogonin enhances antitumor activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo through ROS-mediated downregulation of cFLIPL and IAP proteins [J]. *Apoptosis*, 2013, 18(5): 618-626
- [9] Wu X, Liu P, Zhang H, et al. Wogonin as a targeted therapeutic agent for EBV (+) lymphoma cells involved in LMP1/NF- κ B/miR-155/PU.1 pathway [J]. *BMC Cancer*, 2017, 17(1): 147
- [10] Kim EH, Jang H, Shin D, et al. Targeting Nrf2 with wogonin overcomes cisplatin resistance in head and neck cancer [J]. *Apoptosis*, 2016, 21(11): 1265-1278
- [11] Baek JS, Na YG, Cho CW. Sustained cytotoxicity of wogonin on breast cancer cells by encapsulation in solid lipid nanoparticles [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2018, 8(3): 159
- [12] 苏 飞, 赵 达, 庄亚飞, 等. 汉黄芩素对肝癌细胞SMMC-7721增殖、迁移及侵袭的影响 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2017, 31(8): 735-738
- [13] 陈望昊, 王慧博, 刘 宁. 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 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2013, 33(4): 456-461

[收稿日期] 2017-12-03