

- cells[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(7): 1445-1453.
- [15] Hsu CL, Lo WH, Yen GC. Gallic acid induces apoptosis in 3T3-L1 pre-adipocytes via a Fas-and mitochondrial-mediated pathway[J]. J Agric Food Chem, 2007, 55(18): 7359-7365.
- [16] Du C, Fang M, Li Y, et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition[J]. Cell, 2000, 102(1): 33-42.
- [17] Altieri DC. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in cancer[J]. Oncogene, 2003, 22(53): 8581-8589.
- [18] Pisarev V, Yu B, Salup R, et al. Full-length dominant-negative survivin for cancer immunotherapy[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(17): 6523-6533.

(编辑: 梁进权)

黄芩素对子宫颈癌 Hela 细胞表皮生长因子受体表达的影响

邹颖^{1,2}, 迟宏罡¹, 李涛³, 杨敏⁴ (1. 广东医学院第二临床医学院中医学教研室, 广东 东莞 523808; 2. 广东医学院中美肿瘤研究所, 广东 东莞 523808; 3. 广东省高州市人民医院化疗科, 广东 高州 525200; 4. 广州中医药大学第三附属医院妇科, 广东 广州 510360)

摘要: 目的 研究黄芩素对子宫颈癌 Hela 细胞表皮生长因子受体(EGFR)表达的影响, 探讨黄芩素抗肿瘤的分子机制。方法 采用 CCK-8 法检测黄芩素对 Hela 细胞增殖的抑制作用, real-time PCR 法和 Western blot 法检测黄芩素对 Hela 细胞 EGFR 表达的影响。结果 黄芩素可在体外抑制 Hela 细胞的增殖, 并对 EGFR 的表达有显著的抑制作用, 呈剂量依赖性。结论 黄芩素可能是通过 EGFR 通路抑制子宫颈癌 Hela 细胞的增殖。

关键词: 黄芩素; 子宫颈癌; Hela 细胞; 表皮生长因子受体

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2014)02-0121-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.002

Effect of Baicalein on Human Cervix Cancer Hela Cells Epidermal Growth Factor Receptor Expression

ZOU Ying^{1,2}, CHI Honggang¹, LI Tao³, YANG Min⁴ (1. Department of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Medical College, Dongguan 523808 Guangdong, China; 2. China-America Cancer Research Institute of Guangdong Medical College, Dongguan 523808 Guangdong, China; 3. Department of Chemotherapy of Gaozhou People's Hospital, Gaozhou 525200 Guangdong, China; 4. Department of Gynaecology of the Third Affiliated Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510360 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of baicalein on the expression of human cervix cancer Hela cells epidermal growth factor receptor (EGFR), thus to explore its anti-tumor molecular mechanism. **Methods** Anti-proliferative effects of baicalein on the proliferation of human cervix cancer Hela cells were assessed by using CCK-8 assay. The effects of baicalein on the regulation of EGCG mRNA and protein expression were examined by using real-time PCR and Western blotting analysis. **Results** The results of CCK-8 assay indicated that baicalein markedly decreased the viability of Hela cells compared to control groups. Furthermore, the levels of EGCG mRNA and protein expression were suppressed significantly by baicalein treatment in dose-dependent manner. **Conclusion** These findings demonstrate that the ability of baicalein in inhibiting the proliferation of human cervix cancer Hela cells may be associated with EGFR pathway.

Keywords: Baicalein; Cervical Cancer; Hela cells; Epidermal growth factor receptor

收稿日期: 2013-09-10

作者简介: 邹颖, 博士, 助理研究员, 研究方向: 中西医结合临床与科研工作。Email: cz98@163.com。通讯作者: 杨敏, 副主任医师, 研究方向: 中医妇科。Email: minyang86@sina.com。

黄芩素(baicalein)是黄芩中含量最高的黄酮类化合物之一,化学名称为5,6,7-三羟基黄酮,药理研究证实黄芩素不仅具有抗炎和抗菌作用,还具有较好的抗肿瘤作用,能够抑制肝癌、乳腺癌、卵巢癌和子宫颈癌等多种癌细胞的生长^[1-6],具有较好的抗肿瘤效果。表皮生长因子受体(EGFR)是具有酪氨酸蛋白激酶活性的多功能跨膜糖蛋白,在多种肿瘤中呈高表达,在细胞生长、增殖和分化中起着重要的作用。研究发现阻断EGFR后,肿瘤的生长速度受到明显抑制,为EGFR的靶向治疗提供了依据^[7]。同时,也有学者^[8]证实EGFR在宫颈腺癌的发生过程中起着重要的作用,而黄芩素能有效的抑制人子宫颈癌细胞的增殖,但其机制尚未完全明确。本研究旨在探讨黄芩素是否通过对EGFR调控以抑制肿瘤细胞的增殖,为黄芩素抗肿瘤的分子机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器 RPMI-1640培养基、胎牛血清,美国Gibco公司;子宫颈癌细胞(Hela细胞),中科院上海生化细胞研究所;98%黄芩素,美国Sigma公司,批号:465119;EGFR,美国CST公司,批号:3197s;β-actin鼠单克隆抗体,美国Santa Cruz公司,批号:sc-8432;总RNA抽提试剂盒,北京天根生化科技有限公司,批号:DP421;PCR试剂盒,大连Takara公司,批号:RR420A;7500实时定量PCR仪,美国Applied Biosystems公司;Odyssey近红外双色激光成像系统,美国LI-COR公司;NUAIR-NU-5510E细胞培养箱,美国Nuair公司。

1.2 细胞培养方法 采用RPMI 1640培养液(含10%胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素,100 mg·mL⁻¹链霉素),置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

1.3 药物配制 用DMSO溶解黄芩素,配制成50,100,200 mmol·L⁻¹的原液,最终稀释为25,50,100,200 μmol·L⁻¹。对照组加入等量的DMSO。当细胞生长至铺满瓶底约40%~50%时即加入药物进行干预。

1.4 Hela细胞增殖测定 取对数生长期的Hela细胞,调整细胞数为5×10⁴ mL⁻¹,按每孔200 μL接种于96孔板,培养24 h后,吸去培养液,按1.3项下设计的浓度分别给药,每组设4个平行孔。培养24,48,72 h后,每孔分别加入CCK-8试剂10 μL,37℃孵育1 h,多功能酶标仪于450 nm波长处测定光密度(OD)值。细胞增殖抑制率=(对照组OD平均值-实验组OD平均值)/对照组OD平均值×100%。

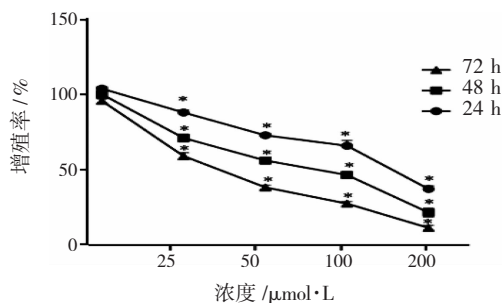
1.5 Real-time PCR法测定EGFR mRNA表达水平 取对数生长期Hela细胞,调整细胞数为5×10⁴ mL⁻¹,用不同浓度的黄芩素处理48 h后,提取总RNA,按照逆转录试剂盒说明书操作合成cDNA第一链,再以cDNA为模板,用7500实时定量PCR仪进行Real-time PCR反应。引物序列如下:EGFR,上游引物为5'-GGCCGACAGCTATGAGATGGA-3',下游引物为5'-ACCGGCAGGATGTGGAGATC-3',扩增片段长度为186 bp;β-actin,上游引物为5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3',下游引物为5'-TTTAATGT CACGCACGATTTC-3',扩增片段长度为150 bp。

1.6 Western blot法检测EGFR蛋白表达水平 用不同浓度的黄芩素处理细胞48 h后,提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,SDS-PAGE凝胶电泳后转至PVDF膜上,用含5%脱脂牛奶的TBST封闭1 h后加入EGFR一抗和β-actin,4℃孵育过夜,TBST洗膜3次,每次10 min,加入荧光标记的二抗,4℃孵育1 h,TBST洗膜3次,每次10 min。Odyssey近红外双色激光成像系统扫描成像,Quantity one软件进行条带灰度分析。

1.7 统计学处理方法 采用SPSS17.0软件,各组数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析法(one-way ANOVA)进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩素对Hela细胞增殖的抑制作用 结果见图1。随着黄芩素浓度的增加和时间的延长,Hela细胞的增殖率逐渐降低,黄芩素对Hela细胞的增殖抑制作用呈浓度依赖和时间依赖关系,与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。



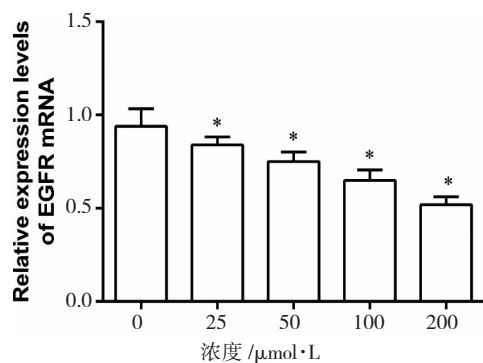
注:与对照组比较,* $P < 0.05$ 。

图1 黄芩素对Hela细胞的增殖抑制作用($n=4$)

Figure 1 Baicalein inhibited the proliferation in Hela cells

2.2 黄芩素对Hela细胞EGFR mRNA表达水平的影

响 结果见图 2。随着黄芩素浓度的增加, Hela 细胞中 EGFR mRNA 表达的水平逐渐降低, 呈浓度依赖性, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。



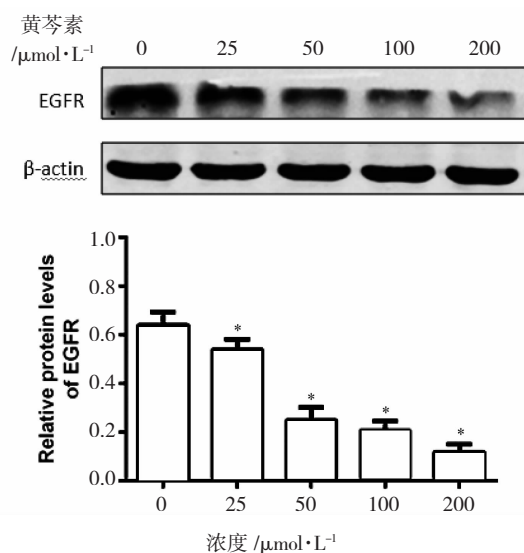
注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 黄芩素对 Hela 细胞 EGFR mRNA 表达的影响($n=4$)

Figure 2 Expression of EGFR mRNA in Hela cells treated with baicalein

2.3 黄芩素对 Hela 细胞 EGFR 蛋白表达水平的影响

结果见图 3。黄芩素能有效的抑制 Hela 细胞 EGFR 蛋白的表达, 随着黄芩素浓度的增加, Hela 细胞中 EGFR 蛋白表达水平逐渐降低, 呈浓度依赖性, 与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 3 黄芩素对 Hela 细胞 EGFR 蛋白表达的影响($n=4$)

Figure 3 Expression of EGFR protein in Hela cells treated with baicalein

3 讨论

子宫颈癌是全球妇女恶性肿瘤中仅次于乳腺癌的最常见的恶性肿瘤, 常规的化疗和放疗有严重的不良反应。大量的研究证实许多天然药物具有较好的抗肿瘤作用, 且副作用小。黄芩的黄酮类化合物

黄芩素能有效抑制 Hela 细胞的增殖^[5], 但其抑制肿瘤细胞增殖的具体机制尚未完全明确。

EGFR 是一种跨细胞膜的蛋白受体, 是具有酪氨酸激酶活性的原癌基因 c-erbB-1 的表达产物, 由胞外区、跨膜区及胞内区 3 部分组成。活化的蛋白酪氨酸激酶对调节细胞增殖、分化具有重要的作用。EGF 与其配体结合后形成二聚体, 可激活 PI3K/Akt、MAPK、JAK/STAT 等与细胞增殖、分化密切相关的重要通路^[9-10]。近年研究发现, EGFR 与子宫颈癌的发生、发展、预后及治疗密切相关, EGFR 参与并促进宫颈癌的发生及进展, 并可作为判断预后的一个指标, 被认为是肿瘤治疗的靶点, 目前已经有一些针对 EGFR 的药物被批准应用于临床肿瘤的治疗。因此, 以 EGFR 为靶点治疗宫颈癌药物的基础和临床研究备受关注。

本研究以 Hela 细胞为研究对象, 探讨黄芩素对 Hela 细胞的作用及其机制, 结果表明, 不同浓度的黄芩素分别作用 Hela 细胞 24, 48, 72 h 后, 均可以抑制 Hela 细胞的增殖, 且随着时间的延长和浓度的增加, 其抑制增殖作用逐渐加强, 呈现时间和浓度依赖关系, 说明黄芩素对 Hela 细胞具有较好的抑制作用。为了进一步研究黄芩素的作用靶点, 我们从基因和蛋白两个水平研究了黄芩素对 EGFR 表达的调控作用, 不同浓度的黄芩素作用 Hela 细胞 48 h 后, EGFR 的 mRNA 和蛋白水平均降低, 与对照组比较差异有显著意义, 且呈剂量依赖关系, 提示黄芩素对 Hela 细胞的增殖抑制作用可能与调控 EGFR 的表达有关。

参考文献:

- [1] 毛捷, 徐善水, 盛莉莉, 等. 黄芩素的抗肿瘤作用及机制的研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2009, 14(10): 1178-1182.
- [2] 宋超, 刘霞, 邵启祥, 等. 黄芩素对肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响及 miR-34a 在其机制中的作用[J]. 江苏大学学报(医学版), 2011, 21(6): 470.
- [3] 王秀峰, 周钱梅, 苏式兵. 黄芩素抑制人乳腺癌细胞侵袭和迁移的实验研究[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(6): 745-750.
- [4] 黎丹戎, 张汉英, 张玮, 等. 汉黄芩素对人卵巢癌细胞株 SKOV3 裸鼠移植瘤生长及端粒酶活性的抑制作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(4): 534-538.
- [5] 童旭辉, 董淑英, 陶亮. 黄芩素对人子宫颈癌 HeLa 细胞生长的抑制作用[J]. 蚌埠医学院学报, 2009, 34(6): 468-470.
- [6] Chen J, Li Z, Chen AY, et al. Inhibitory effect of baicalin and baicalein on ovarian cancer cells[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2013, 14(3): 6012-6025.

- [7] Damodaran S, Olson E. Targeting the human epidermal growth factor receptor 2 pathway in breast cancer[J]. Hospital Practice, 2012, 40 (4): 7-15.
- [8] 周铁军, 向丽, 李霞斌, 等. NF- κ Bp65, EGFR, P16 在宫颈腺癌中的表达及临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(6): 1007-1010.
- [9] 冯望德, 伍晶晶, 沈国栋. 表皮生长因子受体与宫颈癌的研究进展[J]. 中国临床保健杂志, 2013, 16(2): 219-222.
- [10] 易福梅, 王俊杰. EGFR 拮抗剂在结直肠癌治疗中的应用[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(1): 188-191.

(编辑: 梁进权)

小叶榕叶对 LPS 诱导的 RAW264.7 巨噬细胞 NO 和 TNF- α 的影响

黄 洋, 李 康, 邵慧凯, 刘盛权(广东药学院药科学院, 广东 广州 510006)

摘要: **目的** 采用体外炎症模型观察小叶榕叶水提物及其不同极性萃取部位对炎症介质一氧化氮(NO)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 的影响。**方法** 采用脂多糖(LPS)刺激 RAW264.7 巨噬细胞, 建立体外炎症模型。采用噻唑蓝(MTT)法检测小叶榕叶水提物及其不同萃取部位对 RAW264.7 巨噬细胞的毒性作用; Griess 法检测培养液中 NO 含量; 采用酶联免疫试验(ELISA)法检测培养液中 TNF- α 的含量。**结果** LPS 刺激 RAW264.7 巨噬细胞后, 培养液中 NO 和 TNF- α 含量显著增加($P < 0.01$); 小叶榕叶水提物及其不同萃取部位对 NO 和 TNF- α 的释放有不同程度的抑制作用, 其中水提物高、中、低浓度组对 NO 的抑制率分别为 17.0 %, 30.0 %, 33.0 %; 乙酸乙酯部位中、低浓度组对 NO 的抑制率分别为 40.0 %、27.0 %; 水相部分低浓度组对 NO 的抑制率为 37.0 %; 水提物中浓度组和乙酸乙酯部位高浓度组对 TNF- α 的抑制率分别为 58.0 %, 43.5 %, 与 LPS 组比较, 差异均有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 小叶榕叶可能通过抑制 NO 和 TNF- α 释放而发挥抗炎作用, 其中乙酸乙酯部位、水相部分是小叶榕叶的主要抗炎活性成分。

关键词: 小叶榕叶; 脂多糖; RAW264.7 巨噬细胞; 一氧化氮; 肿瘤坏死因子- α

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2014)02-0124-04

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2014.02.003

Effects of Water Extract of *Ficus microcarpa* Leaves and Polar Solvent Extract of Different Parts on Expression of NO and TNF- α in Peritoneal Macrophages RAW264.7 Induced by LPS

HUANG Yang, LI Kang, SHAO Huikai, LIU Shengquan (School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, 510006, Guangdong China)

Abstract: Objective To evaluate the effects of water extract of *Ficus microcarpa* leaves and the polar solvent extract of different parts on the release of inflammatory mediators of nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) by using *in vitro* inflammatory model. **Methods** Lipopolysaccharide (LPS) was used to stimulate the RAW264.7 macrophage line for the establishment of inflammatory model. MTT assay was performed to determine the toxic effects of water extract of *Ficus microcarpa* leaves and the polar solvent extract of different parts on the viability of RAW264.7. Griess reaction was used for assaying the concentration of NO, and ELISA was performed to measure the expression of TNF- α in the cultured solution. **Results** NO and TNF- α contents in the cultured solution of macrophages were significantly increased after the stimulation of LPS ($P < 0.01$). Water extract of *Ficus microcarpa* leaves and the polar solvent extract of different parts could remarkably ameliorate the inflammation factors release at various degrees. The inhibition of NO was 17.0 %, 30.0 %, 33.0 % in the high-, middle- and low-concentration water extract groups, respectively. The inhibition of NO was 40.0 %, 27.0 % in the middle- and low-concentration

收稿日期: 2013-09-17

作者简介: 黄洋, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药效物质基础及其质量评价方法研究。Email: hy1987615@163.com。通讯作者: 李康, 教授, 研究方向: 中药药效物质基础及其质量评价方法研究。Email: likang229@aliyun.com。

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金([2011]1139); 国家自然科学基金青年基金资助项目(30801515)。