

[DOI]10.12016/j.issn.2096-1456.2018.07.005

· 基础研究 ·

木犀草素对人舌鳞癌细胞侵袭和迁移的影响

王晓瑾¹, 游昕超², 陈凯¹, 黄坤宋¹, 潘宣¹

1. 广东药科大学附属第一医院口腔科, 广东 广州 (510080); 2. 广东药科大学附属第一医院中心试验室, 广东 广州 (510080)

【摘要】 目的 探讨木犀草素(Luteolin)对人舌鳞状细胞癌细胞SCC15侵袭和迁移能力的影响。方法 采用浓度梯度的木犀草素药物(5、10、15、20、40、60 μg/mL), 分别处理SCC15细胞24 h、48 h、72 h, 通过MTT实验检测木犀草素对SCC15细胞增殖能力的影响; 采用浓度梯度的木犀草素药物(1、5、10 μg/mL)分别处理SCC15细胞, 通过划痕实验检测木犀草素对SCC15细胞迁移能力的影响; 采用浓度梯度的木犀草素药物(5、10 μg/mL)分别处理SCC15细胞24 h, 通过Transwell实验检测木犀草素对SCC15细胞侵袭和迁移能力的影响; 采用浓度梯度的木犀草素药物(10、20、40 μg/mL)分别处理SCC15细胞24 h, 通过明胶酶谱法检测木犀草素对SCC15细胞上清液中基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)活性的变化。**结果** MTT实验表明木犀草素对SCC15细胞增殖具有明显的抑制作用($P < 0.01$), 并呈现明显的剂量-一效应和时间-一效应关系; 划痕实验、Transwell小室迁移及侵袭实验表明实验组细胞的迁移和侵袭能力均明显低于对照组, 迁移实验3组穿膜细胞数分别为(340.00 ± 22.94)个、(52.67 ± 6.94)个和(6.57 ± 0.80)个; 侵袭实验3组穿膜细胞数分别为(85.67 ± 5.18)个、(39.67 ± 4.63)个和(2.67 ± 0.29)个($P < 0.01$); 明胶酶谱显示木犀草素能明显降低MMP-2、MMP-9的酶活性, 呈剂量依赖性($P < 0.01$)。**结论** 木犀草素可通过抑制明胶酶MMP-2、MMP-9的分泌从而抑制SCC15细胞的侵袭和迁移。

【关键词】 木犀草素; 口腔癌; 鳞状细胞; 细胞增殖; 细胞侵袭; 细胞迁移

【中图分类号】 R738.9 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2018)07-0434-06

【引用著录格式】 王晓瑾, 游昕超, 陈凯, 等. 木犀草素对人舌鳞癌细胞侵袭和迁移的影响[J]. 口腔疾病防治, 2018, 26(7): 434-439.

Influence of luteolin on the invasion and migration of an human tongue squamous carcinoma cell line

WANG Xiaojin¹, YOU Xinchao², CHEN Kai¹, HUANG Kunsong¹, PAN Xuan¹. 1. Department of Stomatology, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China; 2. Central Laboratory, The First Affiliated Hospital of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China

Corresponding author: PAN Xuan, Email: 603200275@qq.com, Tel: 0086-20-61325457

【Abstract】 Objective To investigate the effects of luteolin on the invasion and migration of the human tongue squamous carcinoma cell line SCC15. **Methods** SCC15 cells were treated with various concentrations of luteolin (5, 10, 15, 20, 40 and 60 μg/mL) for 24, 48 and 72 h. The MTT assay was then carried out to estimate the proliferation of SCC15 cells treated with various concentrations of luteolin. SCC15 cells were treated with various concentrations of luteolin (1, 5 and 10 μg/mL), and the migration of SCC15 cells was examined in wound healing assays. SCC15 cells were treated with various concentrations of luteolin (5 and 10 μg/mL) for 24 h, and the migration and invasion of the cells were examined in Transwell migration/invasion assays. SCC15 cells were treated with various concentrations of luteolin (10, 20 and 40 μg/mL) for 24 h, and the conditioned medium was collected. The levels of the gelatinases matrix metalloproteinases-2 and -9 (MMP-2, MMP-9) in the conditional medium were detected by gelatin zymography assays. **Results** The

【收稿日期】 2018-04-24; **【修回日期】** 2018-05-02

【基金项目】 广东省科技计划项目(2016A020215154); 广东省省级科技计划项目(2016ZC0177)

【作者简介】 王晓瑾, 硕士研究生在读, Email: 2415632382@qq.com

【通信作者】 潘宣, 主任医师, 硕士, E-mail: 603200275@qq.com

MTT assay showed that luteolin had a substantial inhibitory effect on the proliferation of SCC15 cells in a concentration- and time-dependent manner ($P < 0.01$). The migration, invasion and proliferation of the SCC15 cell lines were significantly lower after treatment with luteolin than in the control. The numbers of migrating and invading SCC15 cells were 340.00 ± 22.94 , 52.67 ± 6.94 and 6.57 ± 0.80 versus 85.67 ± 5.18 , 39.67 ± 4.63 and 2.67 ± 0.29 , respectively ($P < 0.01$). The enzyme activities of MMP-2 and MMP-9 decreased significantly in response to luteolin treatment in a concentration-dependent manner ($P < 0.01$). **Conclusion** Luteolin inhibited the invasion and migration of SCC15 cells by reducing the activities of MMP-2 and MMP-9.

【Key words】 Luteolin; Oral Carcinoma; Squamous cell; Cell proliferation; Cell invasion; Cell migration

目前,舌鳞癌的治疗主要采用以手术为主、辅以放疗化疗的综合疗法。但术后复发及转移率较高,放疗化疗存在副作用大、易耐受等缺点,综合治疗后5年生存率仅为50%~60%左右^[1]。因此,寻找高效、低毒的药物来防治舌鳞癌,对改善患者生活质量和提高患者生存率具有十分重要的意义。木犀草素是一种很具有代表性的天然黄酮类化合物,主要存在于金银花、菊花等植物以及百里香、芽甘蓝等蔬果中。木犀草素具有抑菌、消炎、抗病毒、抗氧化等多种生物学功能^[2]。除此之外,木犀草素还具有良好的抗肿瘤活性。有研究已证实木犀草素对多种恶性肿瘤有效^[3-5],有助于阻止乳腺癌、肺癌、胰腺癌等的浸润和转移^[6-8]。但关于木犀草素对舌鳞癌细胞侵袭、迁移的作用研究较少,本文就此开展研究,探讨木犀草素对舌鳞癌细胞侵袭、迁移的作用及机制,以期为新药开发提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人舌鳞状细胞癌细胞株 SCC15(暨南大学医学院生物化学实验室惠赠);0.25%胰蛋白酶(Trypsin)、胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)(Gibco公司,美国);DMEM/F12培养基(Hyclone公司,美国);木犀草素(Sigma公司,美国);MTT(Amresco公司,美国);DAPI细胞核染色剂购自中国碧云天生物技术有限公司;Matrigel基质胶、8 μm 24孔 Transwell小室(Corning公司,美国)。

1.2 细胞培养

人舌鳞状细胞癌细胞株 SCC15 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 体积分数 5% CO_2 条件下,用质量分数 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养,0.25% 胰蛋白酶消化传代细胞,取对数生长期的细胞用于以下试验。

1.3 细胞增殖活性实验

取对数生长期 SCC15 细胞消化离心,调整细胞

悬液浓度为 1×10^5 个/mL,每孔 80 μL 接种于 96 孔板,每个样品设置 5 个复孔,边缘孔用无菌 PBS 填充。待细胞完全贴壁后,各组分别加入浓度为 0、5、10、15、20、40、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木犀草素,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为对照组,置体积分数 5% CO_2 、37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱内孵育,分别于 24、48、72 h 后终止培养,每孔加入 5 g/L 的 MTT 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 继续温育 4 h。吸除上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解,在酶联免疫检测仪 OD 490 nm 处测量各孔的吸光值。

1.4 划痕实验

取对数生长期 SCC15 细胞消化离心,调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个/mL,每孔 0.5 mL 接种于 6 孔板,等细胞 100% 长满,用含 0.2% FBS 的培养基饥饿处理 12 h,用 10 μL 枪头垂直于孔板画线,制造细胞划痕。吸掉旧培养基,用 PBS 冲洗细胞 3 次,去除划下的细胞,拍 0 h 照片。各组分别加入浓度为 0、1、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木犀草素,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为对照组,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱继续培养。于不同时间(0、6、12、18、24 h)在倒置显微镜下拍照,计算细胞迁移率。细胞迁移率 = $(S_0 - S_T) / S_0 \times 100\%$ (S_0 , 0 小时划痕形成的面积; S_T , 划痕后培养 T h 划痕形成的面积)。实验重复 3 次。

1.5 Transwell 迁移实验

取对数生长期 SCC15 细胞消化离心,调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个/mL,每孔 0.6 mL 接种于 100 mm^2 皿,培养 24 h 后,换含 0.2% FBS 的培养基,各组分别加入浓度分别为 0、5、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木犀草素,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为对照组,放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 培养箱继续培养 24 h 后,消化离心,调整细胞浓度为 5×10^5 个/mL,取 200 μL 细胞悬液接种到 Transwell 小室上室,下室加入 600 μL 含 10% FBS 的培养基,继续培养 24 h 后用棉签头擦掉小室内细胞,4% 多聚甲醛室温固定下室膜上细胞 20 min,

PBS洗3次。DAPI室温染色2 min, PBS洗3次。洗净风干后于荧光倒置显微镜200倍视野下拍照, 每组显微镜下取9个随机视野计数穿膜细胞。实验重复3次。

1.6 Transwell侵袭实验

取Corning公司普通Matrigel胶(8~12 mg/mL), 稀释成200~300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的工作浓度, 然后取50 μL 铺Transwell小室的上室, 铺胶后置于恒温培养箱过夜, 待Matrigel胶凝固。将药物预先处理24 h的SCC15细胞消化离心, 调整细胞悬液浓度为 5×10^5 个/mL, 取200 μL 接种到Transwell小室上室, 其余步骤与上述Transwell迁移实验相同, 分组同上。实验重复3次。

1.7 明胶酶谱实验

取对数生长期SCC15细胞消化离心, 调整细胞悬液浓度为 1×10^6 个/mL, 每孔0.5 mL接种于6孔板, 培养24 h后, 换含质量分数0.2% FBS的培养基, 各组分别加入浓度为0、10、20、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的木犀草素, 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组为对照组, 培养24 h后离心收集各组上清液, 进行凝胶电泳, 电泳完毕取整块胶置于洗脱液中震荡洗涤4次, 每次15 min, 转移到漂洗液中洗涤2次, 每次5 min, 置于孵育液中, 恒温箱中37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜(48 h左右)。将充分孵育后的胶以双蒸水漂洗2次, 每次5 min, 然后置于0.25%的考马斯亮蓝R250染液中平缓摇动、染色3 h。随后置于脱色液中脱色, 每30 min更新1次脱色液, 至背景上显出无色清晰酶谱条带停止。然后以双蒸水漂洗残留染料。将胶以ImageScanner(Amersham)扫描成像, Image J软件分析各酶谱条带灰度值, 比较各组样本基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)活性的差别。

1.8 统计学方法

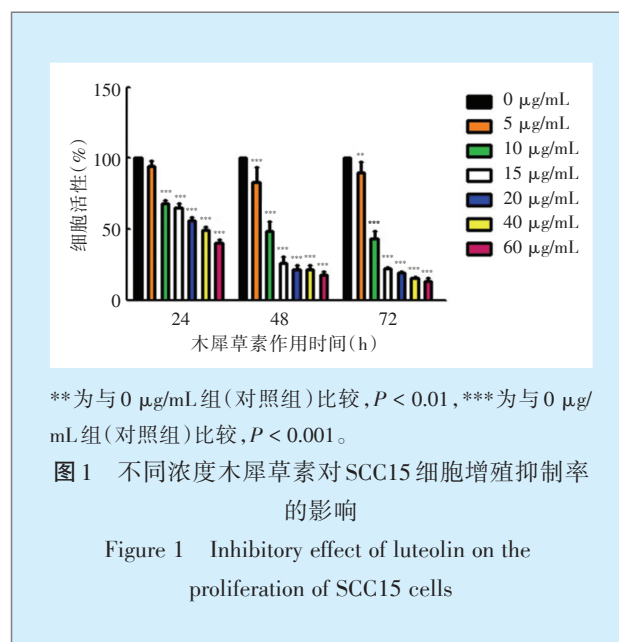
采用SPSS 17.0统计软件进行数据分析, 数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, MTT实验的细胞活性、划痕实验的迁移率、Transwell的迁移/侵袭细胞数、明胶酶谱的MMPs活性在各组间的比较均采用方差分析, GraphpadPrism 6.0绘图。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 木犀草素对SCC15细胞增殖的抑制作用

细胞增殖活性实验结果显示, 与对照组相比, 木犀草素对SCC15细胞增殖呈现明显的抑制作

用, 细胞活力随着木犀草素浓度和作用时间增加而降低, 见图1。木犀草素对SCC15细胞24、48、72 h的 IC_{50} 值分别为31.2、10.2、10.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。



2.2 木犀草素抑制SCC15细胞体外迁移的能力

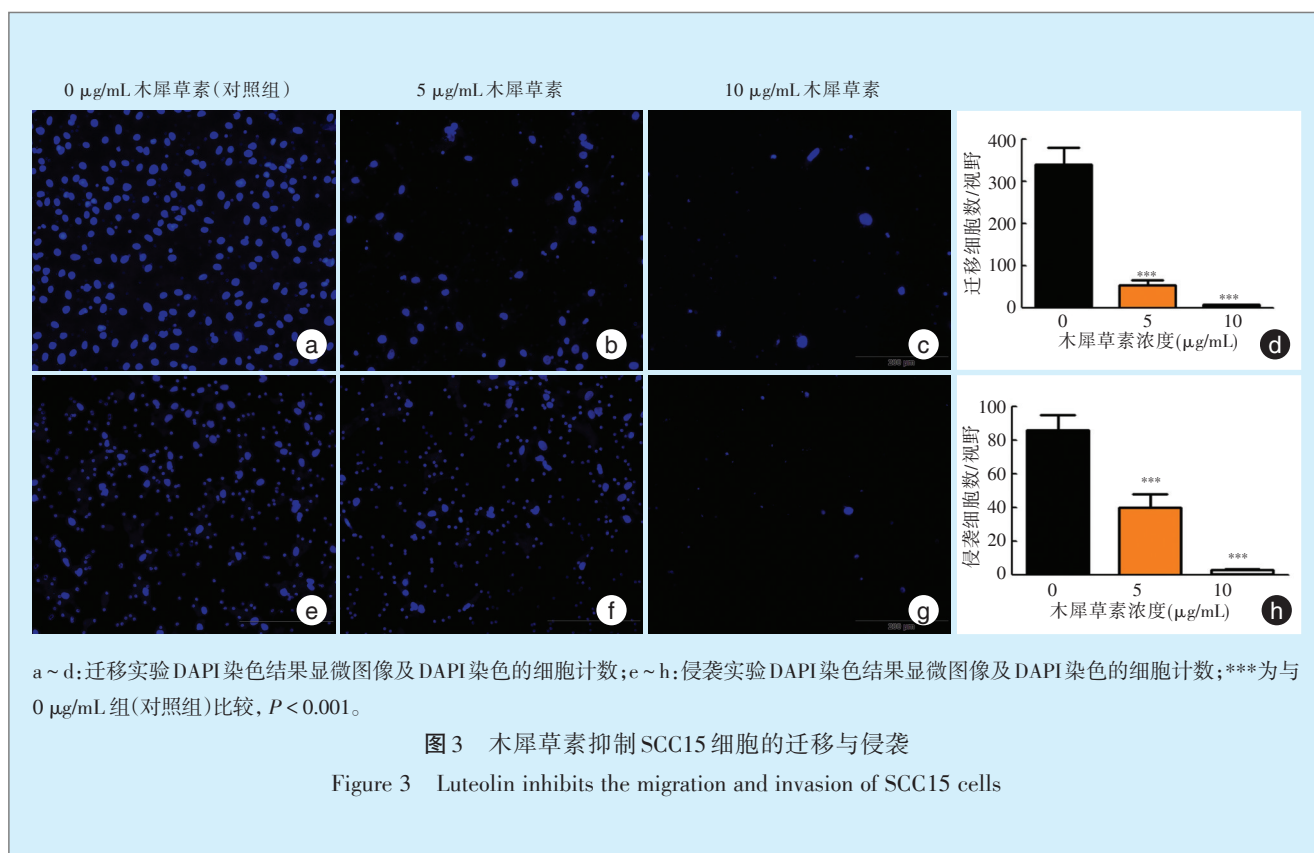
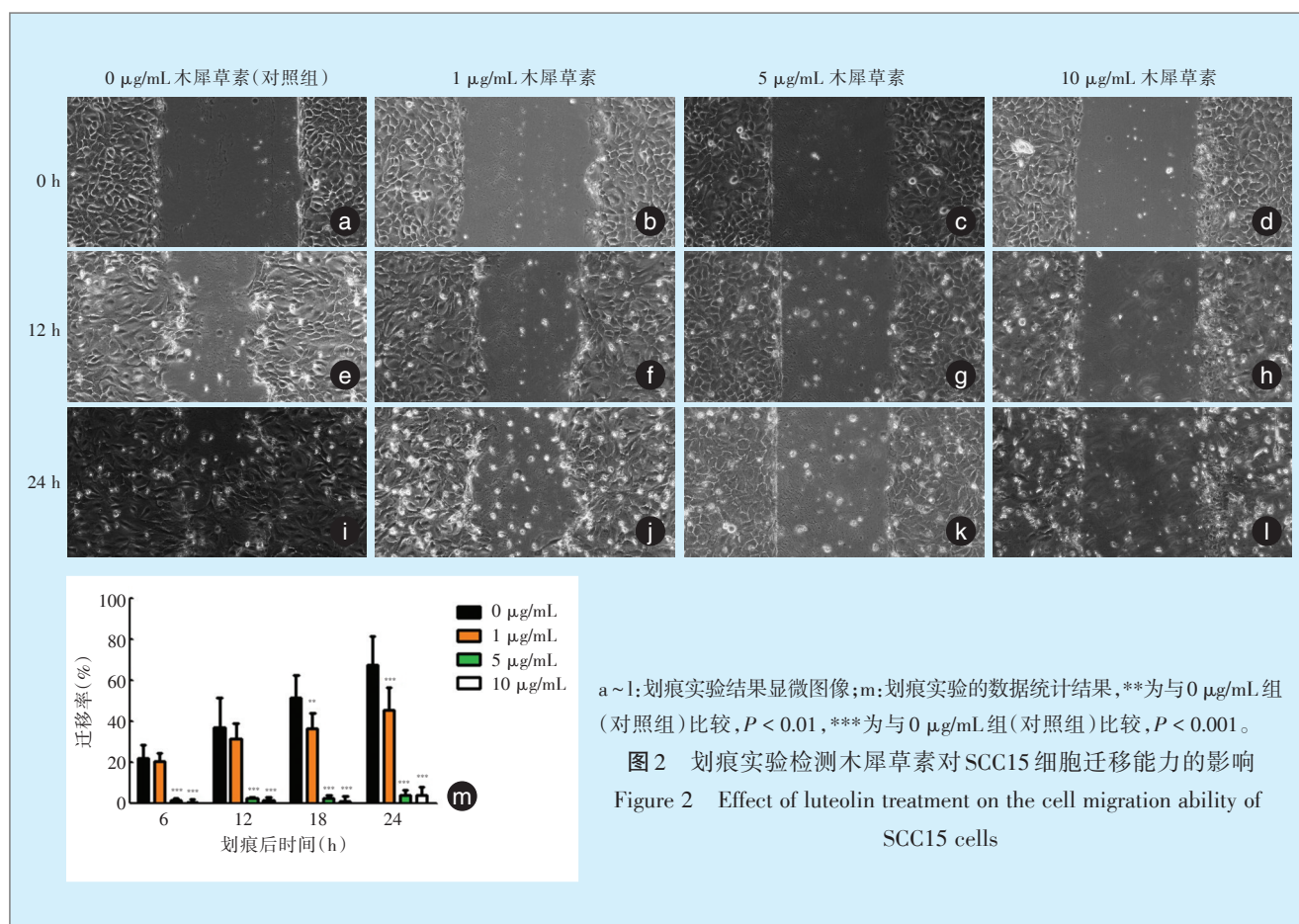
划痕实验结果显示, 与对照组相比, 木犀草素对SCC15细胞迁移呈现明显的抑制作用, 仅1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药物浓度时便可引起明显的抑制作用, 且随着药物浓度和时间的增加, 细胞迁移率越低, 说明木犀草素对细胞的迁移抑制越强(图2)。

2.3 木犀草素抑制SCC15细胞体外迁移与侵袭的能力

Transwell迁移与侵袭结果显示, 随着木犀草素药物浓度的递增, 迁移到下室的细胞数越少, 说明木犀草素浓度越高对SCC15细胞的迁移(图3a~图3d)、侵袭(图3e~图3h)能力抑制越强, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的药物浓度时穿膜细胞已经极少, 见图3。迁移实验3组穿膜细胞分别为(340.00 ± 22.94)个、(52.67 ± 6.94)个和(6.57 ± 0.80)个; 侵袭实验3组穿膜细胞分别为(85.67 ± 5.18)个、(39.67 ± 4.63)个和(2.67 ± 0.29)个($P < 0.001$)。

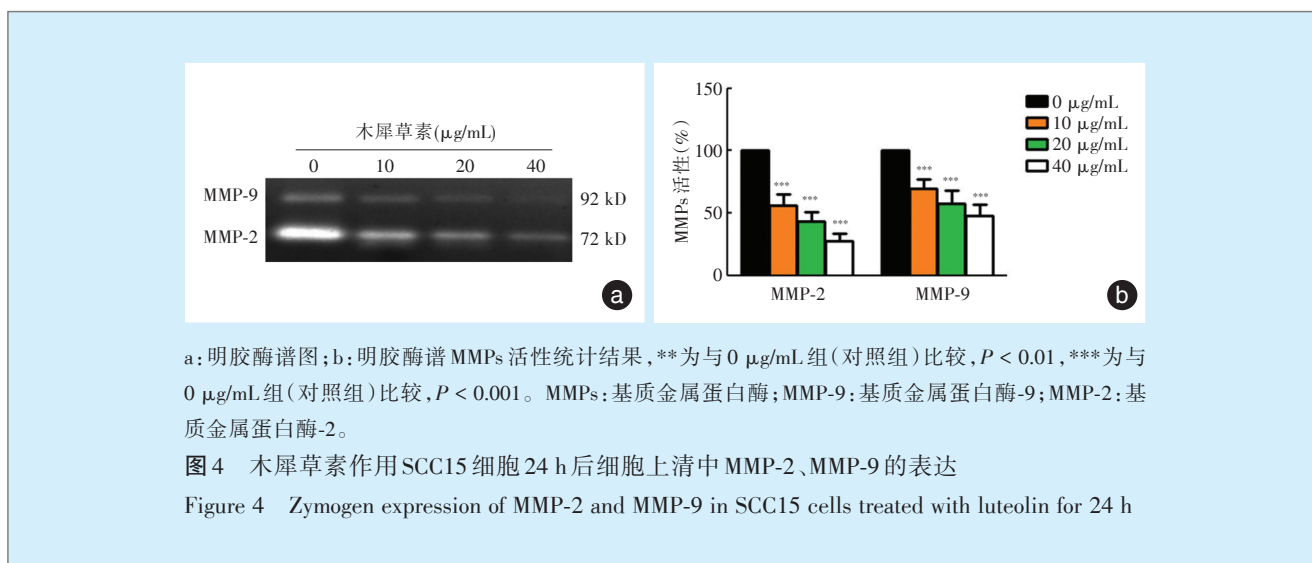
2.4 木犀草素降低MMPs的活性

明胶酶谱结果显示, 如图4a所示, 2条分子量为72kD、92kD的透明溶解带, 分别是酶原形式的MMP-2(Pro-MMP-2, 72 kD)及酶原形式的MMP-9(Pro-MMP-9, 92 kD)。后经ImageJ灰度扫描并统计分析, 不同浓度的木犀草素干预后, SCC15细胞的MMP-2、MMP-9活性均有一定程度的降低且差



异具有统计学意义(图4b),表明木犀草素能有效降

低 MMP-2、MMP-9 活性,且呈剂量依赖性($P < 0.01$)。



3 讨论

癌细胞的异常生长和转移是癌症重要的生物学特征。转移是肿瘤使数以万计的癌症患者致死的主要原因^[9]。舌鳞状细胞癌作为一种具有高度的局部侵袭性和颈淋巴结高转移率的疾病,降低其侵袭和转移的方法,可能有助于开发有效的辅助治疗。本研究验证了木犀草素能够抑制舌鳞癌细胞的迁移和侵袭,并且阐明其机制与抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性有关。肿瘤细胞的侵袭是一个复杂的、多阶段的连续过程,涉及到细胞粘附、侵袭和运动^[10]。因此,干扰其中一个或多个步骤是抗转移治疗的一种方法。本研究通过划痕实验、Transwell 迁移和侵袭实验,证实了木犀草素对舌鳞癌细胞的迁移、侵袭具有明显的抑制作用。

肿瘤细胞侵袭的起始步骤是基底膜的破坏,这个过程依赖 IV 型胶原降解酶,主要是 MMP-2 和 MMP-9。基质金属蛋白酶 MMPs 的表达,特别是 MMP-2 和 MMP-9 的表达,与包括口腔癌在内的多种人类肿瘤的高转移潜能相关^[11-13]。因此,通过一定方法抑制肿瘤细胞明胶酶的分泌,可在一定程度上达到抑制肿瘤细胞侵袭和转移的目的。本研究用明胶酶谱法研究木犀草素作用 SCC15 细胞 24 h 后, MMP-2 和 MMP-9 的活性变化。结果表明,木犀草素能明显抑制 MMP-2 和 MMP-9 的活性,并呈剂量依赖性。而关于木犀草素抑制 MMP-2 和 MMP-9 活性进一步的机制有待探讨。

调节 MMP-2 和 MMP-9 的合成涉及多种信号级联。Wang 等^[14]研究发现,可通过抑制 p-IGF-1R/

PI3K/AKT/mTOR 信号通路,进而降低 MMP-2 和 MMP-9 表达水平、增加 TIMP1 和 TIMP2 表达水平,从而改变 MMP/TIMP 平衡,最终达到抑制人胶质母细胞瘤细胞系侵袭转移的目的。而 MAPK 信号通路调节 MMP2/9 表达的确切作用尚存在争议^[15-17]。因此,在今后的研究中,可从 MAPK 信号通路着手,进一步探究其作用机制,为肿瘤的治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012[J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-E386.
- [2] Chen P, Zhang JY, Sha BB, et al. Luteolin inhibits cell proliferation and induces cell apoptosis via down-regulation of mitochondrial membrane potential in esophageal carcinoma cells EC1 and KYSE450[J]. Oncotarget, 2017, 8(16): 27471-27480.
- [3] Kwon K, Kwon YS, Kim SW, et al. Luteolin-induced apoptosis through activation of endoplasmic reticulum stress sensors in pheochromocytoma cells[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(1): 380-386.
- [4] Cao Z, Zhang H, Cai X, et al. Luteolin promotes cell apoptosis by inducing autophagy in hepatocellular carcinoma[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 43(5): 1803-1812.
- [5] Lu X, Li Y, Li X, et al. Luteolin induces apoptosis in vitro through suppressing the MAPK and PI3K signaling pathways in gastric cancer[J]. Oncol Lett, 2017, 14(2): 1993-2000.
- [6] Lin D, Kuang G, Wan J, et al. Luteolin suppresses the metastasis of triple-negative breast cancer by reversing epithelial-to-mesenchymal transition via downregulation of β -catenin expression[J]. Oncol Rep, 2017, 37(2): 895-902.
- [7] Parka SH, Parkb HS, Leec JH, et al. Induction of endoplasmic re-

- ticulum stress-mediated apoptosis and non-canonical autophagy by luteolin in NCI-H460 lung carcinoma cells[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 56: 100-109.
- [8] Huang X, Dai S, Dai J, et al. Luteolin decreases invasiveness, deactivates STAT3 signaling, and reverses interleukin-6 induced epithelial-mesenchymal transition and matrix metalloproteinase secretion of pancreatic cancer cells[J]. Onco Targets Ther, 2015, 8: 2989-3001.
- [9] Wang S, Liu Q, Zhang YS, et al. Suppression of growth, migration and invasion of highly-metastatic human breast cancer cells by berberine and its molecular mechanisms of action [J]. Mol Cancer, 2009, 8: 81-89.
- [10] Maluccio M, Covey A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(6): 394-399.
- [11] Lee JC, Chung LC, Chen YJ, et al. N-myc downstream-regulated gene 1 downregulates cell proliferation, invasiveness, and tumorigenesis in human oral squamous cell carcinoma[J]. Cancer Lett, 2014, 355(2): 242-252.
- [12] Fan H, Li H, Liu G, et al. Doxorubicin combined with low intensity ultrasound suppresses the growth of oral squamous cell carcinoma in culture and in xenografts [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2017, 36(1): 163-175.
- [13] Zhang CX, Ye LW, Liu Y, et al. Antineoplastic activity of Newcastle disease virus strain D90 in oral squamous cell carcinoma [J]. Tumor Biol, 2015, 36(9): 7121-7131.
- [14] Wang Q, Wang H, Jia Y, et al. Luteolin reduces migration of human glioblastoma cell lines via inhibition of the p-IGF-1R/PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. Oncol Lett, 2017, 14(3): 3545-3551.
- [15] Wang L, Ling Y, Chen Y, et al. Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells[J]. Cancer Lett, 2010, 297(1): 42-48.
- [16] Huang Q, Lan F, Wang X, et al. IL-1 β -induced activation of p38 promotes metastasis in gastric adenocarcinoma via upregulation of AP-1/c-fos, MMP2 and MMP9[J]. Mol Cancer, 2014, 13(1): 18-32.
- [17] Chen CM, Hsieh SC, Lin CL, et al. Alpha-Mangostin suppresses the metastasis of human renal carcinoma cells by targeting mek/erk expression and mmp-9 transcription activity[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 44(4): 1460-1470.

(编辑 张琳,曾曙光)

· 短讯 ·

《北京口腔医学》杂志2018年第26卷征订启事

《北京口腔医学》杂志是由首都医科大学口腔医学院主办、国内外公开发行的口腔医学专业学术性期刊,现为双月刊,双月28日出版。主编为白玉兴教授,编委会由全国各大口腔医学院校各学科专家组成。本刊为中国科技核心期刊,中国科技论文统计源期刊。宗旨是紧密跟踪口腔医学科技发展,加强口腔专业有关新理论、新技术、新工艺等方面信息的报道和交流,促进口腔医学事业的发展。主要栏目有论著、临床报道、病例讨论、文献综述、国内外动态等。本刊读者主要是各级口腔医疗、教学、科研等方面人员以及研究生、大学生等。读者遍布全国31个省、自治区、直辖市。本刊采用彩色印刷,欢迎投稿、订阅。

《北京口腔医学》杂志邮发代号82—708,每期定价10元/期,全年6期共计60元。欢迎广大读者到当地邮局订阅。如错过邮局征订时间,可向本刊编辑部联系邮购,编辑部地址:北京市东城区天坛西里4号,邮编100050,联系电话010-67013675,57099045。E-mail:bjkqyx@126.com。