

[DOI] 10.12016/j.issn.2096-1456.2019.04.004

· 基础研究 ·

黄芩苷对人舌鳞癌细胞 SCC15 的抑制作用

钟文德¹, 刘荣静², 管红兵³, 陈广盛¹

1. 广州医科大学附属第二医院口腔科, 广东 广州(510260); 2. 广州医科大学附属第二医院检验科, 广东 广州(510260); 3. 广州医科大学口腔医学重点实验室, 广东 广州(510140)

【摘要】 目的 探讨黄芩苷对人舌鳞癌细胞株 SCC15 细胞的抑制作用及可能机制, 为舌鳞癌的防治提供新的思路及实验基础。方法 单纯 DMEM 培养液培养的 SCC15 细胞为对照组, 加入 20 mg/mL 黄芩苷溶液培养的 SCC15 细胞为黄芩苷组。2 组细胞分别以划痕实验及 Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力的改变, 流式细胞术检测细胞周期的改变, Western blotting 检测细胞信号转导与转录激活子 3 (signal transduction and transcription activator 3, STAT3) 磷酸化水平的差异。结果 与对照组比较, 划痕实验及 Transwell 迁移实验结果显示黄芩苷组细胞迁移能力降低 ($t = 4.927, P = 0.008$); 流式细胞术结果显示黄芩苷组 G0/G1 期增高 ($t = 9.893, P = 0.001$), S 期降低 ($t = 8.528, P = 0.001$), G2/M 期降低 ($t = 3.550, P = 0.024$); Western blotting 结果显示黄芩苷组 SCC15 细胞 STAT3 蛋白磷酸化水平下降 ($t = 8.262, P = 0.001$)。结论 黄芩苷对人舌鳞癌细胞 SCC15 具有抑制作用, 其机制可能与降低 STAT3 通路磷酸化活性有关。

【关键词】 黄芩苷; 舌; 癌; 鳞状细胞; SCC15 细胞; 迁移; 细胞周期; 信号转导与转录激活子 3

【中图分类号】 R739.8 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 2096-1456(2019)04-0226-05

【引用著录格式】 钟文德, 刘荣静, 管红兵, 等. 黄芩苷对人舌鳞癌细胞 SCC15 的抑制作用[J]. 口腔疾病防治, 2019, 27(4): 226-230.

Research on the inhibitory effect of Baicalin on the human tongue squamous cell carcinoma cell line SCC15
ZHONG Wende¹, LIU Rongjing², GUAN Hongbing³, CHEN Guangsheng¹. 1. Department of Stomatology, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China; 2. Department of Clinical Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China; 3. Key Laboratory of Oral Medicine, Guangzhou Institute of Oral Diseases, Affiliated Stomatological Hospital to Guangzhou Medical University, Guangzhou 510140, China

Corresponding author: CHEN Guangsheng, Email:gschenys@qq.com, Tel: 0086-20-34152299

【Abstract】 Objective To explore the inhibitory effect and possible mechanism of Baicalin on the human tongue squamous cell carcinoma cell line SCC15 and to provide a new idea and experimental basis for the clinical prevention and treatment of tongue squamous cell carcinoma. **Methods** SCC15 cells cultured in DMEM alone were used as the control group, and SCC15 cells cultured in 20 mg/mL baicalin solution were used as the baicalin group. Scratch tests and Transwell migration tests were performed to detect changes in cell migration ability, and flow cytometry was used to detect changes in the cell cycle. Western blotting was used to detect differences in the phosphorylation levels of signal transduction and transcription activator 3 (STAT3). **Results** Compared with the control group, the scratch test and the Transwell migration test showed that the cell migration ability of cells in the baicalin group was significantly decreased ($t = 4.927, P = 0.008$); flow cytometry showed that the number of cells of the baicalin group increased in the G0/G1 phase ($t = 9.893, P = 0.001$), decreased in the S phase ($t = 8.528, P = 0.001$), and decreased in the G2/M phase ($t = 3.550, P = 0.024$); Western blotting results showed that the STAT3 protein of SCC15 cells in the baicalin group de-

【收稿日期】 2018-11-01; **【修回日期】** 2019-01-02

【基金项目】 广东省科技计划项目(2017A020215141)

【作者简介】 钟文德, 主治医师, 学士, Email: keki@163.com

【通信作者】 陈广盛, 教授, 硕士, Email: gschenys@qq.com, Tel: 0086-20-34152299

creased ($t = 3.550, P = 0.024$), and the phosphorylation level significantly decreased ($t = 8.262, P = 0.001$). **Conclusion** Baicalin inhibits the human tongue squamous cell carcinoma cell line SCC15, and its mechanism may be related to a decrease in STAT3 pathway phosphorylation activity.

【Key words】 Baicalin; Tongue; Carcinoma; Squamous cell; SCC15 cell; Migration; Cell cycle; Signal transduction and transcription activator 3(STAT3)

舌癌是头颈部常见的恶性肿瘤,其中大部分为鳞癌^[1],目前临床上口腔鳞癌放疗及化疗的疗效并不理想,而且会对人体造成严重的毒副作用^[2],抗癌天然药物毒副作用低,因此其使用越来越受青睐。黄芩苷(Baicalin)是从黄芩根中提取分离的一种黄酮类化合物^[3],具有抗炎、抗氧化等作用^[4],研究显示它对肝癌^[5]、结肠癌^[6]、血液肿瘤^[7]等恶性肿瘤均有抑制作用。SCC15是目前常用的人口腔鳞癌细胞株^[8-9],近年研究显示黄芩苷能抑制SCC15细胞的增殖^[10],但机制尚不清晰。因此本研究分析黄芩苷对SCC15细胞迁移及细胞周期的影响,并初步探讨其分子机制,从而为舌鳞癌的治疗提供新的方法。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

黄芩苷(南京替斯艾么中药研究所,中国),使用时以DMEM培养液稀释成浓度约为20 mg/mL的药物溶液。胎牛血清及DMEM(Gibco,美国);Western blotting蛋白浓度测定试剂(杰瑞生物,中国),显色试剂(博士德生物,中国),Annin-V-FITC/7-AAD Kit(贝克曼库尔特有限公司,美国),PI染液(Nexcelom Bioscience,美国),GAPDH、信号转导与转录激活子3(signal transduction and transcription activator 3, STAT3)、pSTAT3抗体(Cell Signal,美国)。

1.2 细胞处理及分组

人舌鳞状癌细胞株SCC15由中山大学肿瘤防治中心惠赠,用含有100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素、10%胎牛血清的DMEM培养液常规复苏。取对数生长期的细胞配制成约 1×10^6 个/mL的细胞悬液加入6孔板,上3孔加0.5 mL的DMEM培养液,为对照组;下3孔加0.5 mL的黄芩苷溶液,为黄芩苷组,置于37℃、体积分数为5%CO₂培养箱中孵育24 h。

1.3 细胞划痕实验

于6孔板中每孔接种约 1×10^6 个细胞,观察细

胞刚好铺满6孔板。10 μL枪头在每孔长满的单层细胞上迅速轻柔地划痕,洗去悬浮细胞。分别取0、24、48 h观察细胞划痕修复的速度。倒置显微镜下观察细胞划痕宽度,计算细胞迁移率。细胞迁移率=细胞迁移距离/细胞划痕宽度。

1.4 Transwell 迁移实验

于24孔板中加入500 μL含有10%胎牛血清的完全培养基,用镊子将Transwell小孔轻轻放在加有培养基的孔中。用培养基调整细胞悬液浓度至 1×10^5 个/mL,于Transwell小室中加入200 μL细胞悬液,24 h后PBS清洗Transwell小室。加入1 mL固定液(甲醇:冰乙酸=3:1)固定30 min, PBS清洗2次。结晶紫染色30 min,自来水清洗Transwell小室后晾干过夜,计数小室下面的细胞数。

1.5 流式细胞术检测细胞周期

收集消化的SCC15细胞至离心管中,以1000 rpm离心5 min,弃上清液, PBS洗涤沉淀3~4次,向沉淀中加入50 μL RNA酶和450 μL PI染液混匀,4℃避光放置30 min后上机分析。

1.6 免疫印迹法

以GAPDH为内参,分别检测对照组及黄芩苷组SCC15细胞的磷酸化STAT3(pSTAT3)及STAT3两种蛋白表达水平,用ImageJ 1.35V软件进行带型分析,结果以目标蛋白/GAPDH表示。

1.7 统计学处理

使用SPSS 17.0对资料行统计学分析,数据用均数±标准差表示。计量资料采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

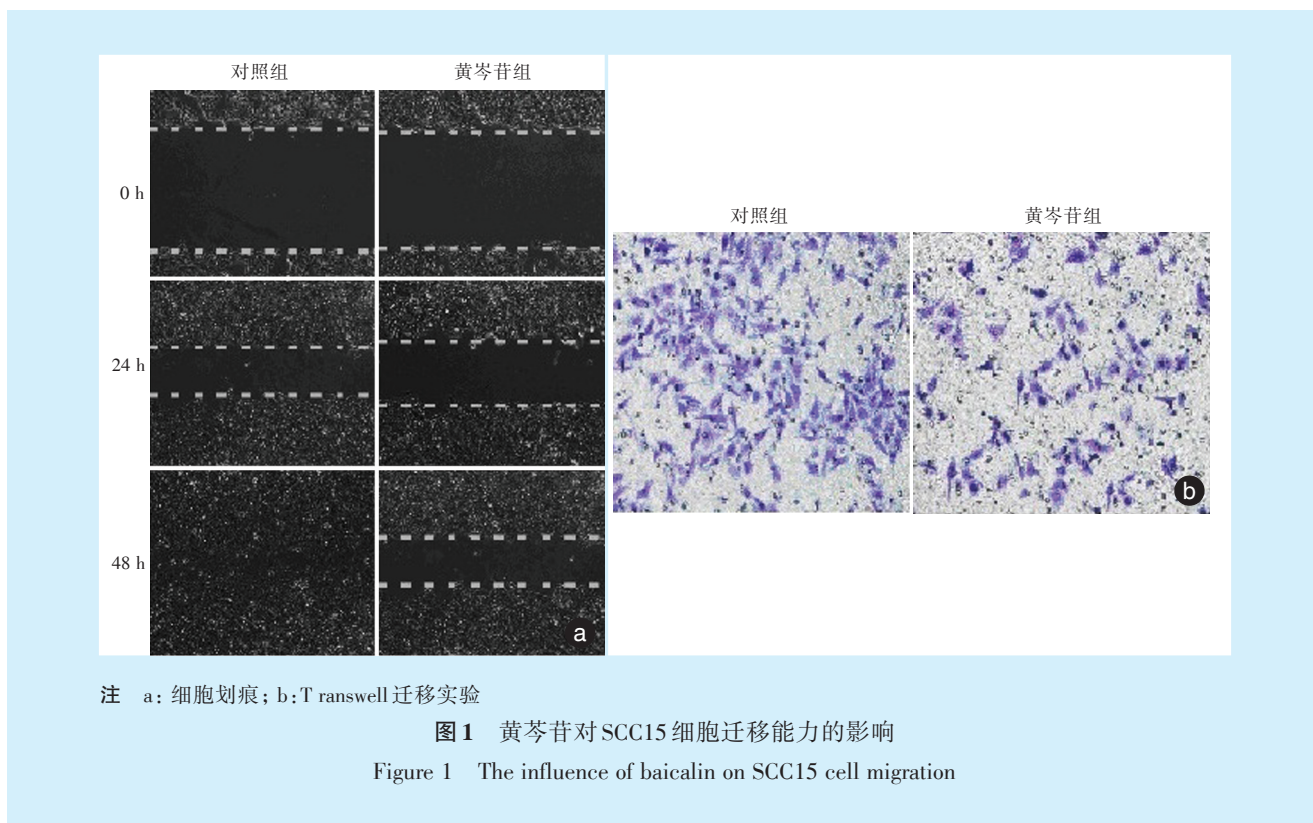
2 结果

2.1 黄芩苷对人舌鳞癌细胞株SCC15细胞迁移能力的影响

划痕实验结果(图1a)显示:24 h细胞迁移率,对照组为 63.0 ± 3.2 ,黄芩苷组为 50.0 ± 5.6 ,两组间差异有统计学意义($t = 3.497, P = 0.025$);48 h细胞迁移率,对照组为 90.7 ± 3.2 ,黄芩苷组为 72.2 ± 5.4 ,差异有统计学意义($t = 5.001, P = 0.008$),对照

组各个时段细胞迁移率均高于黄芩苷组。同时 Transwell 迁移实验 (图 1b) 显示: 对照组 SCC15 细

胞穿透小室细胞数约为 150 ± 22 ; 黄芩苷组为 94 ± 14 , 差异有统计学意义 ($t = 4.927, P = 0.008$)。



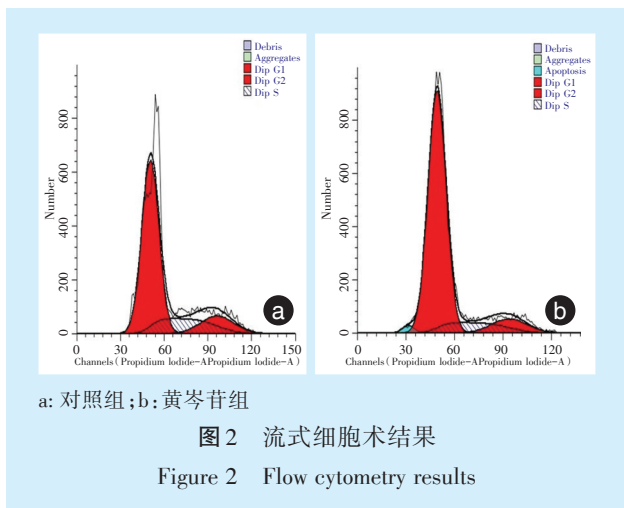
2.2 黄芩苷对 SCC15 细胞周期的影响

流式细胞术结果 (图 2, 表 1) 显示, 与对照组的 SCC15 细胞相比, 黄芩苷组 G0/G1 期比例增加 ($t = 9.893, P = 0.001$), S 期 ($t = 8.528, P = 0.001$) 和 G2/M 期 ($t = 3.550, P = 0.024$) 比例相应减少。

表 1 黄芩苷对 SCC15 细胞周期的影响

Table 1 The influence of baicalin on the cell cycle of SCC15

分组	cells		
	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
对照组	64.21 ± 1.82	20.07 ± 1.13	15.72 ± 2.30
黄芩苷组	77.75 ± 1.52	11.42 ± 1.35	10.83 ± 0.63
t 值	9.893	8.528	3.550
P 值	0.001	0.001	0.024



pSTAT3 蛋白水平为 0.28 ± 0.02 , 黄芩苷组为 0.13 ± 0.01 , 差异有统计学意义 ($t = 8.262, P = 0.001$); 对照组与黄芩苷组的 STAT3 蛋白水平分别为 0.49 ± 0.03 、 0.52 ± 0.02 , 差异无统计学意义 ($t = 1.373, P = 0.242$)。

2.3 黄芩苷对 SCC15 细胞 STAT3 蛋白磷酸化活性的影响

Western blotting 结果 (图 3) 显示: 对照组细胞

3 讨论

口腔癌是头颈肿瘤的主要类型, 全球每年至少有 275 000 个新确诊的病例, 其高转移率及死亡率成为了威胁人类的主要健康问题之一^[11]。鳞癌是口腔癌的主要类型^[1], 因此本研究以舌鳞癌细胞株 SCC15 为实验对象。

黄芩苷属黄酮类化合物, 是黄芩的主要有效

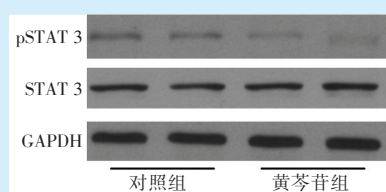


图3 黄芩苷对SCC15细胞STAT3蛋白磷酸化活性的影响

Figure 3 The effect of baicalin on the phosphorylation activity of STAT3 in SCC15 cells

成分之一,具有解热、降压、抗菌、抗病毒等药理作用^[3,12],近年学界发现黄芩苷对多种肿瘤均有抑制作用,而且随着研究的深入,逐步科学地揭示其作用的机制^[4-6]。目前研究显示黄芩苷对于口腔鳞癌同样具有抑制作用^[13],但具体机制仍未清晰。

本次划痕及Transwell实验结果显示,黄芩苷能降低人舌鳞癌细胞SCC15的迁移能力,提示黄芩苷对舌鳞癌细胞的转移有一定的抑制作用。另外,流式细胞术结果显示经黄芩苷处理的SCC15细胞与正常SCC15细胞相比,出现了G0/G1期的滞留,S期和G2/M期比例相对下降。肿瘤是多基因变化导致细胞周期紊乱,进而细胞失控性生长的疾病,细胞周期调控机制的失活在癌变过程中起着重要的作用^[9]。终末分化或静止的细胞主要停留在G1期,黄芩苷能使SCC15细胞出现G0/G1期的滞留,提示其可能具有抑制SCC15细胞失控性生长的能力。综合上述,可认为黄芩苷能一定程度上抑制SCC15细胞的活性,与近年部分研究结果一致^[13]。

STAT3是一种潜在的细胞质转录因子,最初STAT3的发现仅仅作为细胞表面传递信息到胞核的信号传感器,pSTAT3分子是其活性形式;由酪氨酸磷酸化激活后导致STAT3分子的二聚作用,进而发生核易位、DNA结合、激活基因转录等,一般在正常生理条件下,STAT3的激活受到严格的监控。然而大量研究证据表明STAT3在许多癌症中均持续激活,调节细胞增殖、入侵、迁移和肿瘤血管生成,活化的STAT3分子可负调节防御T细胞的免疫反应,成为肿瘤免疫逃逸的关键调节器^[14]。同时,STAT3作为多种致癌通路的交汇点,可通过直接调控致癌基因的表达而触发肿瘤进展。

越来越多的证据表明,靶向干预STAT3的活化

能增强机体的抗癌免疫反应,拯救肿瘤中被抑制的免疫微环境^[15]。近年研究指出黄芩苷能通过抑制STAT的激活和ROS生成而减少脂多糖诱导的炎症^[16],同时能下调小胶质细胞^[17]、神经干细胞^[18]等的STAT3通路活化。本研究结果显示,黄芩苷处理SCC15细胞后,细胞pSTAT3分子表达下降,提示SCC15细胞STAT3的磷酸活化性受到了黄芩苷的抑制。而STAT3的活化抑制可以有效降低口腔鳞癌细胞的迁移侵袭能力^[19],同时也能诱发细胞周期的阻滞^[20],因此黄芩苷对SCC15细胞的抑制作用可能与抑制STAT3活性有关。

综上所述,黄芩苷通过抑制STAT3能在一定程度上抑制舌鳞癌SCC15细胞的迁移,并具有使SCC15细胞滞留在终末细胞周期的能力,表明黄芩苷对舌鳞癌细胞具有一定的抑制作用。

参考文献

- [1] Kamata YU, Sumida T, Kobayashi Y, et al. Introduction of ID2 enhances invasiveness in ID2-null oral squamous cell carcinoma cells via the SNAIL axis[J]. *Cancer Genomics Proteomics*, 2016, 13(6): 493-498.
- [2] Hussain QA, Awan KH. Effect on quality of Life in oral cancer patients after radiation and chemotherapy[J]. *J Contemp Dent Pract*, 2016, 17(2): 97-98.
- [3] Noh K, Kang Y, Nepal MR, et al. Role of intestinal microbiota in baicalin-induced drug interaction and its pharmacokinetics[J]. *Molecules*, 2016, 21(3): 337.
- [4] Wu Y, Wang F, Fan L, et al. Baicalin alleviates atherosclerosis by relieving oxidative stress and inflammatory responses via inactivating the NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97: 1673-1679.
- [5] Wu XJ, Zhi FC, Lun WJ, et al. Baicalin inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell proliferation, apoptosis, invasion, migration and activation via the miR-3595/ACSL4 axis[J]. *Int J Mol Med*, 2018, 41(4): 1992-2002.
- [6] Wang CZ, Zhang CF, Chen LA, et al. Colon cancer chemopreventive effects of baicalein, an active enteric microbiome metabolite from baicalin[J]. *Int J Oncol*, 2015, 47(5): 1749-1758.
- [7] Chen HJ, Gao Y, Wu JL, et al. Exploring therapeutic potentials of baicalin and its aglycone baicalein for hematological malignancies[J]. *Cancer Lett*, 2014, 354(1): 5-11.
- [8] He BX, Lin XZ, Tian FQ, et al. MiR-133a-3p inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) proliferation and invasion by suppressing COL1A1[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(1): 338-346.
- [9] Fu XJ, Li HX, Yang K, et al. The important tumor suppressor role of PER1 in regulating the cyclin-CDK-CKI network in SCC15 human oral squamous cell carcinoma cells[J]. *Onco Targets Ther*, 2016, 9(1): 2237-2245.
- [10] 翟越, 赵海丰. 黄芩素对SCC15口腔癌细胞增殖和Caspase-3

- 活性的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015 (1): 139-141.
- [11] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.
- [12] Qian K, Kong ZR, Zhang J, et al. Baicalin is an inhibitor of subgroup J avian leukosis virus infection[J]. *Virus Res*, 2018, 248: 63-70.
- [13] Sato D, Kondo S, Yazawa K, et al. The potential anticancer activity of extracts derived from the roots of *Scutellaria baicalensis* on human oral squamous cell carcinoma cells[J]. *Mol Clin Oncol*, 2013, 1(1): 105-111.
- [14] Kamran MZ, Patil P, Gude RP. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances[J]. *Biomed Res Int*, 2013 (6): 421821.
- [15] Wang Y, Shen Y, Wang S, et al. The role of STAT3 in leading the crosstalk between human cancers and the immune system[J]. *Cancer Lett*, 2018, 415(9): 117-128.
- [16] Qi Z, Yin F, Lu L, et al. Baicalein reduces lipopolysaccharide-induced inflammation via suppressing JAK/STATs activation and ROS production[J]. *Inflammation Res*, 2013, 62(9): 845-855.
- [17] Xiong J, Wang C, Chen H, et al. A β -induced microglial cell activation is inhibited by baicalin through the JAK2/STAT3 signaling pathway[J]. *Int J Neurosci*, 2014, 124(8): 609-620.
- [18] Li Y, Zhuang P, Shen B, et al. Baicalin promotes neuronal differentiation of neural stem/progenitor cells through modulating p-stat3 and bHLH family protein expression[J]. *Brain Res*, 2012, 1429: 36-42.
- [19] Wang Y, Guo W, Li Z, et al. Role of the EZH2/miR-200 axis in STAT3-mediated OSCC invasion[J]. *Int J Oncol*, 2018, 52(4): 1149-1164.
- [20] Khalili MB, Yazdanparast R, Nowrouzi A, et al. Induction of transient cell cycle arrest by H_2O_2 via modulation of ultradian oscillations of hes1, Socs3, and p-Stat3 in fibroblast cells[J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(2): 1453-1462.

(编辑 罗燕鸿,曾曙光)

· 短讯 ·

《北京口腔医学》杂志2019年征订启事

《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。