

扁桃酸对肺腺癌 H1299 细胞增殖、凋亡和迁移能力的影响及其机制

陆海青¹,李艳丽²,华兹涵¹,肖佳欣²,凌博¹,叶广彬²

摘要 目的 探索扁桃酸对肺腺癌 H1299 细胞增殖、凋亡和迁移的作用及相关的分子机制。方法 CCK-8 检测 H1299 细胞增殖能力变化;Hoechst 33258/PI 双染分析 H1299 细胞凋亡水平;划痕和 Transwell 实验分析 H1299 细胞侵袭迁移能力变化;Western blot 检测细胞增殖、凋亡和迁移相关通路蛋白的表达。结果 不同浓度扁桃酸均可抑制 H1299 细胞增殖活力和侵袭迁移能力($P < 0.05$)。扁桃酸可诱导细胞增殖、凋亡通路蛋白 bax、cl-caspase-3 高表达, p-stat3 低表达($P < 0.05$)。此外,抑制侵袭迁移相关蛋白 MMP-9 和 Vimentin 蛋白表达($P < 0.01$)。结论 扁桃酸抑制肺腺癌细胞 H1299 的增殖,提升细胞凋亡水平,其分子生物学机制可能与 stat3 活化降低及激活 bax/caspase-3 信号轴密切相关;抑制 H1299 细胞侵袭迁移能力,与 MMP-9 和 Vimentin 蛋白表达降低相关。

关键词 肺腺癌;扁桃酸;增殖;凋亡;迁移

中图分类号 R 932

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)05-0742-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.007

中医药防治肺癌广泛应用于临床,且在疗效和预后中具有其独特的优势^[1-2]。以苦杏仁为核心组方药物的薯蓣丸、清气化痰丸和益肺清化膏,均可明显改善肺癌患者的临床疗效,尤其在增强患者放疗的疗效、缓解咳嗽等临床症状和提升生活质量方面优势明显^[3-4]。研究^[5-7]表明,苦杏仁苷是苦杏仁抗肿瘤的核心有效成分,苦杏仁苷抗肿瘤的部分作用是由其催化产物所实现的,如肿瘤细胞无法代谢氢氰酸(苦杏仁苷催化产物),故诱导肿瘤细胞凋

亡。但是,同为苦杏仁苷催化产物的扁桃酸,在肺腺癌中的作用及机制尚不清楚。该研究以不同浓度扁桃酸干预肺腺癌 H1299 细胞,分析肺腺癌细胞增殖、凋亡和迁移能力的变化,聚焦相关通路蛋白的检测,从而整体分析扁桃酸抗肺腺癌细胞的作用和机制,继而为苦杏仁及苦杏仁苷对肿瘤治疗的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人肺腺癌 H1299 细胞购于中国科学院细胞库。基础培养基 DMEM、10% 胎牛血清(美国 Gibco 公司)制备完全培养基,0.25% 胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)用于细胞消化。扁桃酸购于美国 Sigma 公司,用 DMSO 溶解,制备成母液(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$),进行滤膜过滤除菌除杂质,再用培养基稀释成不同浓度备用。CCK-8 试剂购于中国 Biosharp 公司;Hoechst 33258 和 PI 试剂购于北京索莱宝科技有限公司;Matrigel 基质胶和 Transwell 小室购于美国 BD 公司;Western blot 实验基础试剂:SDS-PAGE 凝胶试剂盒、BCA 检测试剂盒和 ECL 超敏显影试剂盒购于上海碧云天生物技术有限公司;stat3、p-stat3、bax、bcl-2、caspase-3、cl-caspase-3、MMP-9、Vimentin 和 β -tubulin 单克隆抗体均购于艾博抗(上海)贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 检测 取对数期生长的 H1299 细胞制成细胞悬液,计数并接种于 96 孔板,每孔接种 100 μl (6×10^4 个/孔),设置 6 个复孔。待细胞长满后,更换含不同浓度扁桃酸(0、5、7.5、10 和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的完全培养基,分别培养 24 h 和 48 h。弃培养基,再分别滴加 CCK-8 溶液(10 $\mu\text{l}/\text{孔}$),培养箱中孵育 4 h 后,用酶标仪在 450 nm 波长下检测各孔的吸光度值,计算细胞增殖抑制率并绘制曲线。

1.2.2 Hoechst 33258/PI 双染 取对数期生长的 H1299 细胞制成细胞悬液,调整细胞密度并接种到 6 孔板中(2×10^5 个/孔)培养。实验组给予 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 扁桃酸,对照组给予 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 扁桃酸

2022-12-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82060540);广西高校中青年骨干教师基础能力提升项目(编号:2022KY0541、2022KY0533);广西壮族自治区级大学生创新创业训练计划项目(编号:S202210599069、S202110599069、S202110599095)

作者单位:右江民族医学院¹药学院、²基础医学院,百色 533000

作者简介:陆海青,女,本科;

叶广彬,男,实验师,责任作者,E-mail:ygb9064@126.com;

凌博,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:lingbo268

@163.com

干预 24 h。收集细胞,加入 4% 多聚甲醛固定 4 ℃ 10 min,1 000 r/min 离心 3 min 弃上清液,加入 1 ml 预冷 PBS 重悬细胞沉淀,1 000 r/min 离心 3 min 弃上清液,滴加 100 μ l Hoechst 33258 和 PI 混合工作液重悬细胞沉淀,室温避光染色 10 min,加入 1 ml 预冷 PBS 洗涤,1 000 r/min 离心 3 min 弃上清液,残留上清液 50 μ l 重悬细胞,加入 10 μ l 抗荧光淬灭剂。取 10 μ l 细胞悬液滴至载玻片,置于倒置荧光显微镜下拍照。凋亡细胞的判定标准为细胞呈高蓝光低红光。

1.2.3 划痕实验 取对数期生长的 H1299 细胞制成细胞悬液,调整细胞密度并接种到 6 孔板中(2×10^5 个/孔)培养。待细胞长满后,用 10 μ l 枪头在孔内竖线划痕,并添加含不同浓度扁桃酸(0.5、7.5 和 10 μ g/ml)的无血清培养基进行干预。培养 24 h 后,用显微镜进行观察孔内细胞的愈合情况,拍照。

1.2.4 Transwell 迁移实验 将孔径 0.8 μ m 小室放入 24 孔板中,0.25% 胰酶消化处理后的 H1299 细胞,离心去上清液,PBS 洗涤 2 遍,用无血清培养基重悬细胞,计数并调整细胞密度为 2×10^5 个/ml。取 100 μ l 细胞悬液加入小室,同时在 Transwell 下室分别加入 600 μ l 含不同浓度扁桃酸(0.5、7.5 和 10 μ g/ml)的完全培养基,培养 24 h 后,用 4% 多聚甲醛固定和 1% 结晶紫染色,PBS 洗涤 3 次,棉签轻轻擦去上层未迁移的细胞,显微镜下随机选取 3 个视野,利用 Image J 进行细胞计数。

1.2.5 Transwell 侵袭实验 0.25% 胰酶消化对数生长期 H1299 细胞,用无血清培养基重悬细胞,调整细胞密度至 2×10^5 个/ml。Transwell 下室分别加入 600 μ l 含不同浓度扁桃酸(0.5、7.5 和 10 μ g/ml)的完全培养基,上室先铺水化的 BD 胶基底膜,再加 100 μ l 细胞悬液。培养 24 h 后,用 4% 多聚甲醛固定和 1% 结晶紫染色,PBS 洗涤 3 次,棉签轻轻擦去上层未迁移的细胞,显微镜下随机选取 3 个视野,利用 Image J 进行细胞计数。

1.2.6 Western blot 检测 不同浓度扁桃酸(0.5、10 和 20 μ g/ml)干预 H1299 细胞后,取细胞总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳,转膜。PVDF 膜用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,TBST 洗涤 3 遍,添加一抗(一抗稀释液 1:2 000 稀释)后 4 ℃ 静置过夜。TBST 洗涤 3 遍,二抗(5% 脱脂奶粉 1:1 000 稀释)室温孵育 2 h。取出 PVDF 膜滴加 ECL 显影液,在凝胶成像系统下显影成像,用 Image J 分析蛋白条带灰度值。

1.3 统计学处理 实验数据采用 SPSS 23.0 和

Graphpad Prism 5.0 软件进行统计学分析和作图。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布和方差齐性的多组间比较采用单因素方差分析(one way ANOVA),两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 扁桃酸抑制肺腺癌 H1299 细胞增殖 为研究不同浓度扁桃酸对肺腺癌细胞 H1299 增殖的影响,用不同浓度扁桃酸分别作用于 H1299 细胞 24 h 和 48 h,从而确定扁桃酸的时效和量效。结果表明,不同浓度扁桃酸对 H1299 细胞的增殖活力均有抑制作用(24 h: $F = 51.6, P < 0.001$; 48 h: $F = 253.7, P < 0.001$),提示扁桃酸可以抑制肺腺癌 H1299 细胞增殖(图 1)。

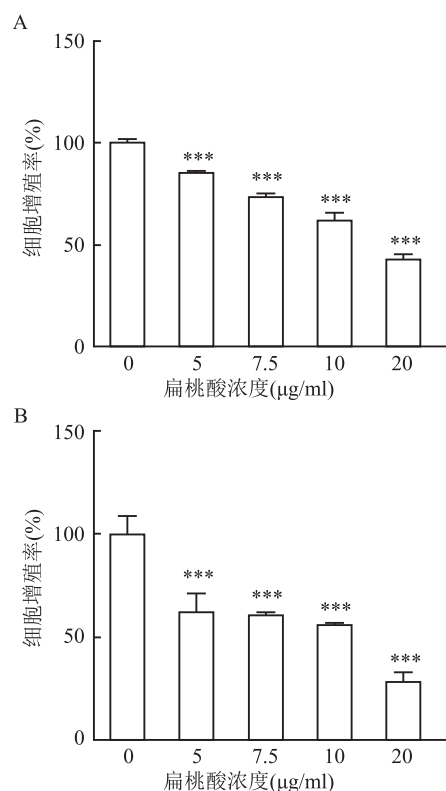


图 1 扁桃酸对 H1299 细胞增殖能力的影响
A:24 h;B:48 h;与 0 μ g/ml 比较:*** $P < 0.001$

2.2 扁桃酸诱导肺腺癌 H1299 细胞凋亡 采用 Hoechst 33258 联合 PI 双染可以较好区分活细胞和细胞的凋亡、坏死。结果表明,不同浓度扁桃酸处理肺腺癌 H1299 细胞 24 h 后,实验组(10 μ g/ml 和 20 μ g/ml)细胞凋亡(细胞呈高蓝光低红光)数量均明显高于对照组(0 μ g/ml),提示扁桃酸可诱导肺腺

癌 H1299 细胞凋亡(图 2)。

2.3 扁桃酸降低肺腺癌 H1299 细胞的侵袭迁移

划痕实验结果显示,不同浓度扁桃酸处理 H1299 细胞 24 h 后,实验组的细胞迁移率均明显低于对照组 ($F = 332.7, P < 0.001$)。Transwell 迁移实验结果显示,不同浓度扁桃酸处理 H1299 细胞 24 h 后,实验组的细胞迁移数 [$5 \mu\text{g/ml}$: ($1\ 552.33 \pm 48.13$) 个/视野; $7.5 \mu\text{g/ml}$: (611.67 ± 124.71) 个/视野; $10 \mu\text{g/ml}$: (266.33 ± 23.07) 个/视野] 均明显低于对照组的细胞迁移数 [$0 \mu\text{g/ml}$: ($2\ 044.67 \pm 41.86$) 个/视野], 差异有统计学意义 ($F = 532.6, P < 0.001$)。以上结果提示扁桃酸可以抑制肺腺癌 H1299 细胞迁移。见图 3。

Transwell 侵袭实验结果显示,不同浓度扁桃酸处理 H1299 细胞 24 h 后,实验组的细胞穿透数 [$5 \mu\text{g/ml}$: (464.00 ± 69.42) 个/视野; $7.5 \mu\text{g/ml}$: (65.67 ± 26.31) 个/视野; $10 \mu\text{g/ml}$: (28.00 ± 14.73) 个/视野] 均明显低于对照组的细胞穿透数 [$0 \mu\text{g/ml}$: (657.67 ± 101.12) 个/视野], 差异有统计学意义 ($F = 65.94, P < 0.001$), 这提示扁桃酸可以抑制肺腺癌 H1299 细胞侵袭。见图 3。

2.4 扁桃酸对相关通路 bax/caspase-3、MMP-9 和 Vimentin 的蛋白表达影响

不同浓度扁桃酸处理 H1299 细胞 24 h 后结果如图 4 所示。与对照组 (0

$\mu\text{g/ml}$) 比较,实验组 (5 、 10 和 $20 \mu\text{g/ml}$) 中的细胞凋亡相关蛋白 cl-caspase-3/caspase-3 明显表达上升 ($F = 1816, P < 0.001$), bcl-2/bax 明显表达降低 ($F = 1855, P < 0.001$); 而细胞侵袭迁移相关蛋白 MMP-9 ($F = 336.2, P < 0.001$) 和 Vimentin ($F = 358.9, P < 0.001$) 明显表达降低。这提示扁桃酸可以诱导肺腺癌细胞 H1299 凋亡,并抑制 H1299 细胞上皮间质转化,从而达到抑制细胞侵袭迁移的作用。

2.5 扁桃酸对 stat3 信号通路的影响

不同浓度扁桃酸处理 H1299 细胞 24 h 后结果如图 5 所示。与对照组 ($0 \mu\text{g/ml}$) 比较,不同浓度扁桃酸均能降低 p-stat3/stat3 的表达 ($F = 236.4, P < 0.001$), 抑制 stat3 磷酸化水平,从而导致 stat3 信号通路失活,这提示扁桃酸可以抑制 stat3 信号通路的激活。

3 讨论

扁桃酸是苦杏仁苷催化产物中非常重要的类型。目前扁桃酸的临床应用和研究主要集中在抗炎、镇痛和抗菌,与肿瘤的相关性研究不明确^[8]。为分析扁桃酸与抗肿瘤活性的相关性,本研究用不同浓度扁桃酸对肺腺癌 H1299 细胞进行干预,发现扁桃酸可抑制肺腺癌 H1299 细胞的增殖活性。肺癌研究^[9-10]显示,stat3 被活化后形成 p-stat3 蛋白,继而提升其促进肿瘤细胞增殖的作用。本研究证实

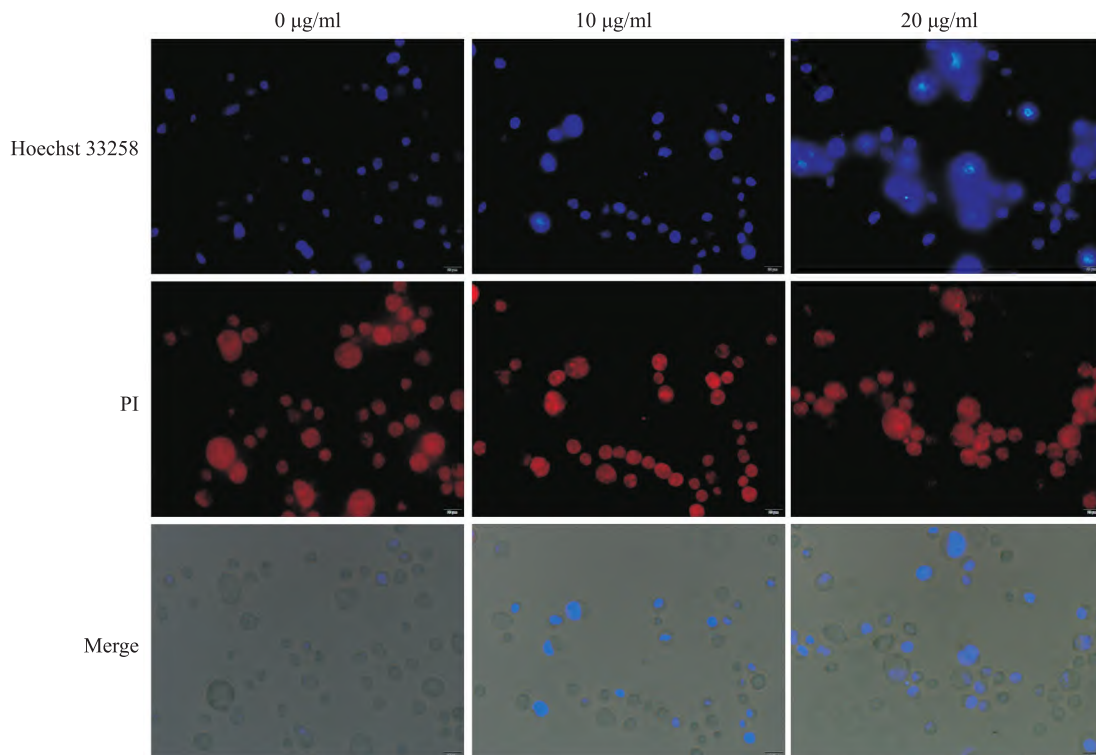


图 2 扁桃酸对 H1299 细胞凋亡的影响 $\times 400$

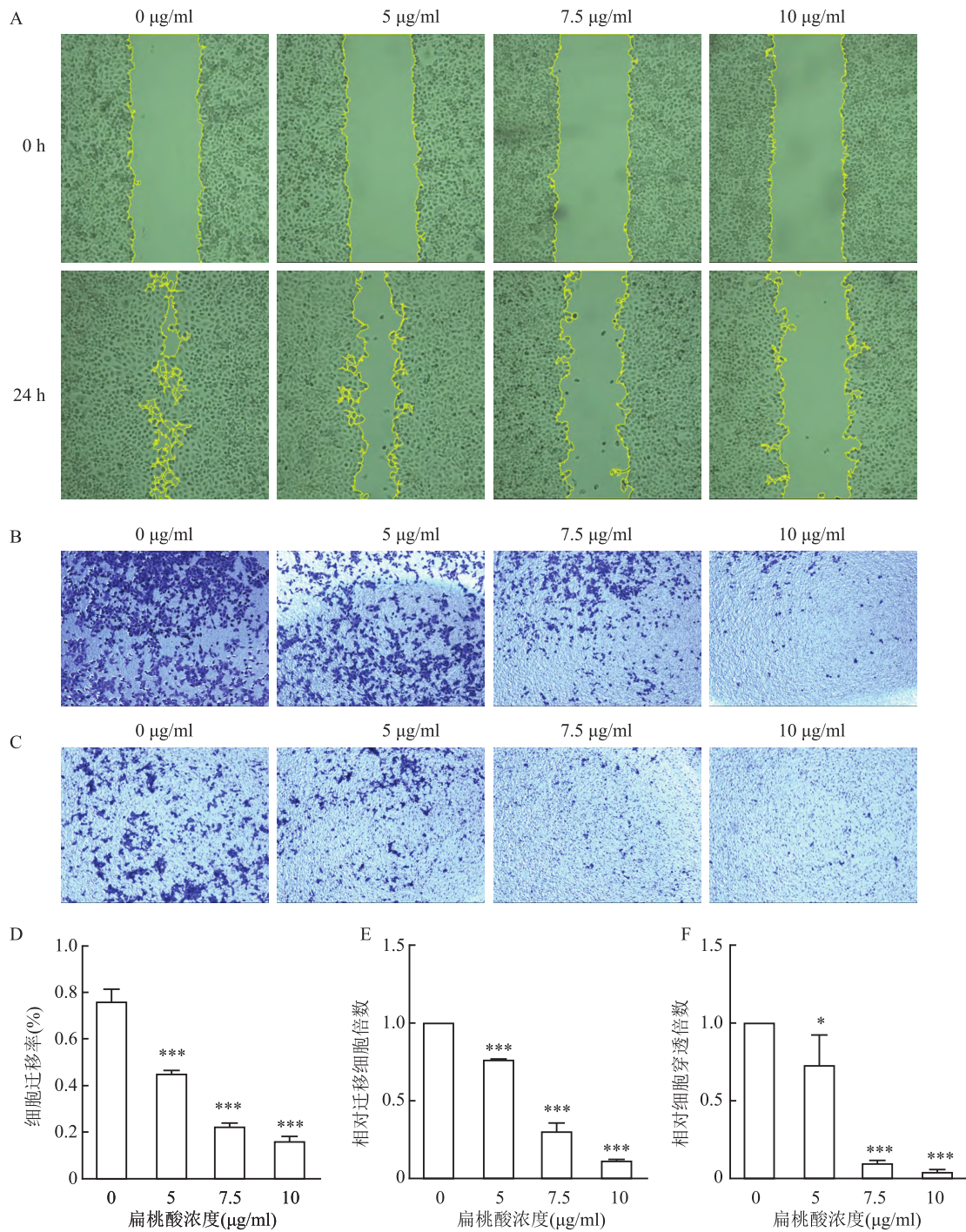


图3 扁桃酸对 H1299 细胞侵袭迁移能力的影响 ×40

A:划痕实验;B:Transwell 迁移实验;C:Transwell 侵袭实验;D:划痕实验的定量统计图;E:Transwell 迁移实验的定量统计图;F:Transwell 侵袭实验的定量统计图;与 0 µg/ml 比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

扁桃酸可抑制肺腺癌 H1299 细胞中 p-stat3 的表达,继而抑制 stat3 的活化。鉴于 stat3 活化是肺癌细胞增殖的核心调控通路,扁桃酸抑制 stat3 的活化是其降低 H1299 细胞增殖的有效机制之一。同时,分析了扁桃酸对肺腺癌 H1299 细胞凋亡水平的影响,结果表明扁桃酸可显著提升 H1299 细胞的凋亡水平。

在肺腺癌细胞的凋亡途径中, bax 是经典的促凋亡蛋白,接受凋亡信号后进入线粒体膜,破坏线粒体膜的完整性,继而促进线粒体释放细胞色素 C,继而发挥 caspase 的破坏细胞结构和诱导细胞凋亡的作用^[11]。本研究结果表明扁桃酸显著提升 H1299 细胞中 bax 的表达。证实了扁桃酸促凋亡的机制与

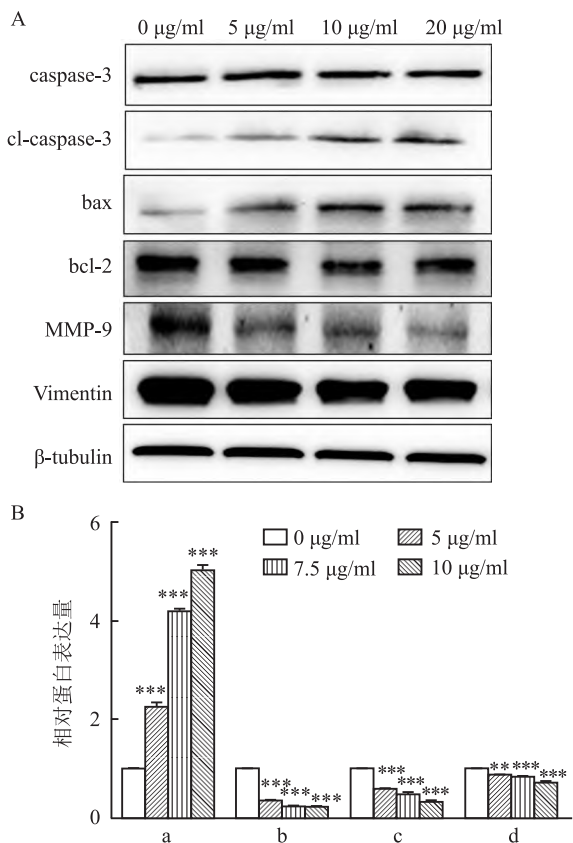


图4 扁桃酸对细胞凋亡和侵袭迁移相关蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 H1299 细胞中凋亡和侵袭迁移相关蛋白的表达结果; B: 相关的蛋白表达比值; a: cl-caspase-3/caspase3; b: bcl-2/bax; c: MMP-9/ β -tubulin; d: Vimentin/ β -tubulin; 与 0 $\mu\text{g/ml}$ 比较; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

bax 信号轴关系密切。bax 促进线粒体释放细胞色素 C 中, caspase-3 起到关键作用, 也是其经典的下游通路蛋白, 然而 caspase-3 行使其功能, 需要在细胞内活化成 cl-caspase-3^[12]。因而采用 Western blot 检测了 cl-caspase-3 的表达量, 发现扁桃酸显著提升 H1299 细胞中 cl-caspase-3 的表达。由此可以得出, 扁桃酸促 bax 信号轴的下游效应蛋白为 caspase-3, 即可促进 bax 下游 caspase-3 的活化。提示 bax/caspase-3 信号轴是潜在的扁桃酸诱导 H1299 细胞凋亡的作用通路之一。

肿瘤细胞侵袭迁移能力变化也是评价潜在抗癌药物的核心指标之一^[13]。本研究用划痕和 Transwell 实验证实扁桃酸显著降低肺腺癌 H1299 细胞的侵袭迁移能力。研究^[14]表明, MMP-9 发挥着降解细胞外基质和降低细胞黏附力的功能, 故被认为是肿瘤细胞获得侵袭转移能力的起始因素之一。Vimentin 蛋白是肿瘤细胞运动过程中的关键骨架蛋白, 通过促进肿瘤细胞伪足形成, 来提升肿瘤细胞的上

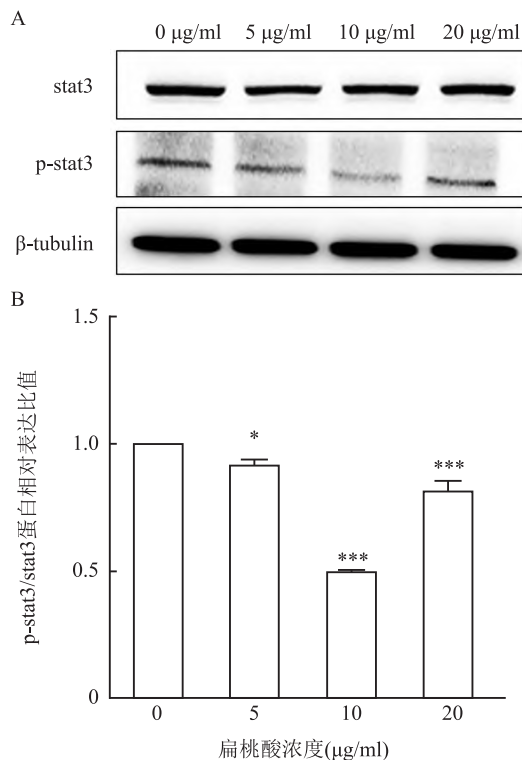


图5 扁桃酸对 stat3 蛋白表达的影响

A: Western blot 检测 H1299 细胞中磷酸化 stat3 和总 stat3 蛋白的表达结果; B: 磷酸化 stat3 与总 stat3 的蛋白表达比值; 与 0 $\mu\text{g/ml}$ 比较; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

皮-间质转化, 继而提升其侵袭运动能力^[15]。本研究的结果证实扁桃酸降低肺腺癌 H1299 细胞中 MMP-9 和 Vimentin 蛋白的表达。鉴于 MMP-9 和 Vimentin 蛋白的功能, 可以得出扁桃酸通过降低 MMP-9 和 Vimentin 蛋白的表达, 抑制肿瘤细胞外基质的降解和上皮间质转化, 从而抑制 H1299 细胞的侵袭迁移能力。

综上所述, 扁桃酸抑制 stat3 的活化是其降低 H1299 细胞增殖的有效机制之一; 扁桃酸诱导 H1299 细胞凋亡与 bax/caspase-3 信号轴的活化关系密切; 扁桃酸通过降低 MMP-9 和 Vimentin 蛋白的表达, 与其抑制 H1299 细胞的侵袭转移能力密切相关。

参考文献

[1] Wan L Q, Tan Y, Jiang M, et al. The prognostic impact of traditional Chinese medicine monomers on tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer[J]. Chin J Nat Med, 2019, 17(10): 729-37.

[2] 李庭树, 黄锁义. 鸡骨草提取物体内抗肿瘤活性研究[J]. 右江民族医学院学报, 2020, 42(6): 690-7.

[3] 许炜茹, 韩冬, 樊庆胜, 等. 清气化痰丸治疗痰热壅肺型肺癌

- 合并阻塞性肺炎疗效观察[J]. 吉林中医药, 2020, 40(11): 1473-6.
- [4] 韩甜甜. 薯蓣丸加减方治疗气血两虚型肺癌化疗癌因性疲乏的随机对照试验[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2020.
- [5] Qian L Y, Xie B, Wang Y G, et al. Amygdalin-mediated inhibition of non-small cell lung cancer cell invasion *in vitro* [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(5): 5363-70.
- [6] 杨玉妃, 谢冰晶, 黄瑞林. 大鼠口服苦杏仁苷组织分布和血浆药物代谢动力学研究[J]. 按摩与康复医学, 2021, 12(4): 91-3, 90.
- [7] Makarević J, Rutz J, Juengel E, et al. Amygdalin blocks bladder cancer cell growth *in vitro* by diminishing cyclin A and cdk2 [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105590.
- [8] 苟玉虹, 何泾正, 李超, 等. 扁桃酸对金黄色葡萄球菌分选酶A活性的抑制机制[J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 2020, 35(4): 622-8.
- [9] Yang Y, Wang Y Z, Che X F, et al. Integrin $\alpha 5$ promotes migration and invasion through the FAK/STAT3/AKT signaling pathway in icotinib-resistant non-small cell lung cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2021, 22(1): 556.
- [10] Harada D, Takigawa N, Kiura K. The role of STAT3 in non-small cell lung cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(2): 708-22.
- [11] Zhang S L, Liu N, Ma M X, et al. Methionine enkephalin (MENK) suppresses lung cancer by regulating the Bel-2/Bax/caspase-3 signaling pathway and enhancing natural killer cell-driven tumor immunity [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 98: 107837.
- [12] Xu C Y, Wang Y G, Feng J, et al. Effect of optimal combination of Huangqi (Radix Astragali Mongolici) and Ezhu (Rhizoma Curcumae Phaeocaulis) on proliferation and apoptosis of A549 lung cancer cells [J]. *J Tradit Chin Med*, 2018, 38(3): 351-8.
- [13] 叶广彬, 罗世官, 张忠伟, 等. 血清 miR-22 检测在非小细胞肺癌预后中的临床价值研究[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(3): 488-92.
- [14] Sławińska-Brych A, Mizerska-Kowalska M, Król S K, et al. Xanthohumol impairs the PMA-driven invasive behaviour of lung cancer cell line A549 and exerts anti-EMT action [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1484.
- [15] Na H H, Ryu J M, Kim K C. Knockout of FosB gene changes drug sensitivity and invasion activity *via* the regulation of Bel-2, E-cadherin, β -catenin, and vimentin expression [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 567: 131-7.

Effect of mandelic acid on the proliferation, apoptosis and migration ability of lung adenocarcinoma H1299 cells and its mechanism

Lu Haiqing¹, Li Yanli², Hua Zihan¹, Xiao Jiaxin², Ling Bo¹, Ye Guangbin²

(¹School of Pharmacy, ²School of Basic Medical Sciences,

Yuejiang Medical University for Nationalities, Baise 533000)

Abstract Objective The research was aimed at exploring the effects of mandelic acid on the proliferation, apoptosis and migration of H1299 lung adenocarcinoma (LUAD) cells and the related molecular mechanisms. **Methods** CCK-8 was used to detect changes in the proliferation ability of H1299 cells; Hoechst 33258/PI double-staining assay was used to analyze the apoptosis of H1299 cells; Transwell and migration assays were used to analyze changes in the invasive and migration ability of H1299 cells; Western blot was used to detect the expression of proliferation, apoptosis and migration-related pathway proteins. **Results** Different concentrations of mandelic acid inhibited the proliferation viability and invasion and migration ability of H1299 cells ($P < 0.05$). Mandelic acid induced high expression of bax and cl-caspase-3 and low expression of p-stat3 in proliferation and apoptosis pathways ($P < 0.05$). In addition, it inhibited the expression of MMP-9 and Vimentin proteins, which were related to invasion and migration ($P < 0.01$). **Conclusion** Mandelic acid inhibited the proliferation of H1299 LUAD cells and elevated the level of apoptosis, and molecular biological mechanism might be closely related to the decreased activation of stat3 and activation of bax/caspase-3 signaling axis. The inhibition of invasive and migrational ability of H1299 cells induced by mandelic acid was associated with the decreased expression of MMP-9 and Vimentin proteins.

Key words lung adenocarcinoma; mandelic acid; proliferation; apoptosis; migration