

网络出版时间: 2022-06-27 17:15 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220624.1732.001.html>

◇基础医学研究◇

芹菜素对人肺鳞癌细胞 NCI-H520 增殖、转移、凋亡及自噬的影响

刘萍¹ 耿亚迪² 刘云霄¹ 谢彦博² 张欣格¹ 张蕾^{1,2} 魏伟¹

摘要 目的 研究芹菜素对人肺鳞癌细胞 NCI-H520 增殖、转移、凋亡及自噬的影响。方法 体外培养人肺鳞癌细胞 NCI-H520, 采用 CCK-8 法检测不同浓度芹菜素(2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 或顺铂(2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 对细胞活力的影响; 采用细胞增殖示踪荧光探针(CFDA SE) 检测芹菜素或顺铂对细胞分裂能力的影响; 采用划痕实验和 Transwell 实验检测芹菜素对细胞迁移和侵袭能力的影响; 采用 Annexin V/PI 双染法、Hoechst 33258 核染色法检测芹菜素对细胞凋亡的影响; 透射电镜观察细胞内自噬囊泡的产生情况; 吖啶橙(AO) 染色观察细胞内酸性细胞器的变化; Western blot 检测微管相关蛋白 1 轻链 3B-II(LC3B-II) 和 p62 蛋白表达情况。结果 与对照组相比, CCK-8 法和 CFDA SE 结果显示芹菜素或顺铂使 NCI-H520 细胞的增殖水平下降($P < 0.05$); 划痕实验和 Transwell 实验表明芹菜素使细胞的迁移和侵袭水平下降($P < 0.01$); Annexin V/PI 双染结果显示芹菜素可使细胞凋亡率增加($P < 0.05$); Hoechst 33258 核染色显示芹菜素可促进细胞出现细胞核聚缩和浓染; AO 染色荧光值增大、电镜下细胞出现自噬双分子结构、Western blot 中 LC3B-II 和 p62 蛋白表达水平上升的结果表明芹菜素增加了细胞 NCI-H520 的自噬水平($P < 0.05$); 加入氯喹(CQ) 后, 未能增加芹菜素作用细胞中 LC3B-II 和 p62 的蛋白水平。结论 不同浓度芹菜素能抑制人肺鳞癌细胞 NCI-H520 增殖、迁移、侵袭, 其抑制细胞的生长转移可能与诱导细胞凋亡和自噬有关, 且自噬水平的升高可能是阻断自噬体的降解所致。

关键词 芹菜素; NCI-H520; 增殖; 转移; 凋亡; 自噬**中图分类号** R 734.2**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2022)07-1009-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.07.001

肺癌是全球发病率和病死率均居高位的一类癌症, 其中, 非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC) 是最常见的形式, 肺鳞状细胞癌(lung squamous cell carcinoma, LUSC) 是非小细胞肺癌的一种亚型, 目前尚无特效的治疗方法^[1]。芹菜素是一种天然的生物活性黄酮类分子, 在乳腺癌、结肠癌、胃癌等人类癌症细胞系中被证明能抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡^[2], 目前尚无关于芹菜素对人肺鳞癌细胞株 NCI-H520 作用的相关报道。

凋亡和自噬是细胞死亡的两种主要方式, 许多化疗药物可以诱导细胞凋亡, 当细胞受到外界刺激时, 发生以目标细胞的形态变化为特征等的凋亡反应^[3]。自噬是一个连续的过程, 能够清除细胞内变性的蛋白质和受损的细胞器, 产生大分子或者能量供细胞进一步重复使用^[4]。该研究旨在观察芹菜素对人肺鳞癌细胞株 NCI-H520 增殖、转移的影响, 并初步探讨芹菜素对 NCI-H520 细胞凋亡和自噬的作用。

1 材料与方法

1.1 药品与主要试剂 芹菜素(Apigenin, APG)、顺铂(cis-diamminedichloro-platinum, CDDP) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司(货号: A106676、D109812); 细胞增殖及毒性检测试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8) 购自大连美仑生物技术有限公司(批号: MA0218-2-Oct-11F); Hoechst 33258 活细胞染色液(100 $\times$)、细胞增殖示踪荧光探针(carboxy-fluorescein diacetate, succinimidyl ester, CFDA SE)、BCA 蛋白质测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司(货号: C1018、C0051、P0010); Annexin V-

2022-05-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(编号: 81803774); 安徽省重点研究与开发计划项目(编号: 201904a07020092); 安徽省自然科学基金(编号: 2108085MH311)

作者单位: ¹ 安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、安徽医科大学类风湿关节炎研究中心, 合肥 230032

² 中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院) 药剂科, 合肥 230001

作者简介: 刘萍, 女, 硕士研究生;

张蕾, 女, 博士, 副主任药师, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 76zhanglei@163.com;

魏伟, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

FITC 凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司(货号: 556547); 血清、胰酶和 RPMI 1640 培养基购自以色列 BI 公司(货号: 04-001-1ACS、03-050-1ACS、01-100-1ACS); 结晶紫购自天津市大茂化学试剂厂(CAS NO: 548-62-9); p62 多克隆抗体、GAPDH 单克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司(货号: 18420-1-AP、60004-1-Ig); 微管相关蛋白 1 轻链 3B-II (microtubule-associated protein 1 light chain 3B-II, LC3B-II)、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔/鼠二抗购自美国 Cell Signaling Technology (货号: 3868T、7074P2、7056S); 磷酸氯喹(chloroquine phosphate, CQ) 购自美国 MCE 公司(货号: HY-17589); AO 染色液购自上海麦克林生化科技有限公司(货号: A6009); Transwell 小室购自美国 Corning 公司; 24 孔板购自美国 NEST 公司。

1.2 细胞培养 NCI-H520 细胞由中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)检验科提供, 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 的青霉素和链霉素的 RPMI 1640 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。细胞密度长至 80% ~ 90% 时消化传代, 用于后续实验。

1.3 药物配制 用 DMSO 作为溶剂, 将芹菜素溶于其中并配制成药物母液, 实验中各组 DMSO 溶剂浓度不超过 0.1%。在 1 mg/ml 的溶解度范围内, 用超纯水配制成 1 mmol/L 的顺铂母液。药物分装后均于 -20 °C 冰箱中避光保存。

1.4 细胞增殖水平测定

1.4.1 CCK-8 法检测芹菜素或顺铂对细胞活力的影响 将处在对数生长期的 NCI-H520 细胞以 5×10^3 个/孔细胞量接种至 96 孔板中, 待细胞密度长至 60% ~ 70% 时加入不同浓度的芹菜素(2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 或顺铂(2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 作为药物组分别作用 24 h 或 48 h, 同时设空白对照组, 最后吸净培养基, 加入 100 μl 配制好的 10% CCK-8 溶液, 在细胞培养箱中孵育 1 ~ 2 h 后, 使用酶标仪在 450 nm 波长处读取吸光度值。

1.4.2 CFDA SE 荧光探针检测芹菜素对细胞分裂能力的影响 荧光标记($1 \sim 5$) $\times 10^6$ 个 NCI-H520 细胞, 均匀种至 6 孔板中 3×10^5 个/孔, 随后可按细胞的正常培养方法进行培养, 细胞长至 60% ~ 70% 时依序加入不同浓度芹菜素(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 或顺铂(2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) 培养 48 h, 用流式细胞仪检测荧光值大小。

1.5 细胞迁移、侵袭水平测定

1.5.1 划痕实验检测芹菜素对细胞迁移能力的影响 用尺子和记号笔在 6 孔板的底部 0.5 ~ 1 cm 处均匀地画出水平线, 然后将细胞以 3×10^5 个/孔的密度接种到 6 孔板中, 在含有 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中培养, 待细胞密度长至 80% ~ 90% 时用 200 μl 无菌移液管尖端制造垂直于水平线的划痕, 加入不同浓度的药液, 分别于 0、24、48 h 间隔时间在倒置显微镜下采集图像, 观察各组细胞迁移情况。

1.5.2 Transwell 实验检测芹菜素对细胞迁移、侵袭能力的影响 Transwell 迁移实验中, 在 10 cm 培养皿中培养细胞, 待细胞长至 60% ~ 70% 时, 加入不同浓度芹菜素(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$), 12 h 后将含有 200 μl 无血清 RPMI 1640 培养基的 10^6 个细胞接种到 Transwell 小室的上室中, 并在下室中加入 800 μl 含有 20% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。72 h 后, 上室未迁移的细胞用棉签清洁, Transwell 小室用多聚甲醛 1 ml 固定 15 min, PBS 漂洗 3 次, 0.1% 结晶紫 1 ml 染色 20 min, 染色结束后, PBS 漂洗 3 次, 在显微镜下对迁移的细胞进行拍照记录。细胞侵袭实验中, 于聚碳酸酯膜的上侧涂有 Matrigel 胶, Matrigel 胶加药前一晚与无血清 RPMI 1640 培养基 1 : 7 比例混合涂至上室, 在 24 孔板中放置于 37 °C 培养箱中, 接种细胞前先用无血清培养基水化基底膜 30 min 后, 吸净无血清 RPMI 1640 培养基再接种细胞。后续步骤同迁移实验。

1.6 细胞凋亡测定

1.6.1 Annexin V/PI 双染法检测芹菜素对细胞膜磷脂酰丝氨酸外翻的影响 将对数生长期细胞以 3×10^5 个/孔细胞接种到 6 孔板中, 用不同浓度的芹菜素(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 作用 48 h 后收集细胞, 同时设空白对照组, 用冷 PBS 洗涤 2 次, 1 500 r/min, 离心 5 min, 用 1 ml 的 1 $\times$ Annexin V 结合液对细胞进行重悬, 吸取 100 μl 悬液(约 1×10^5 个细胞) 转移到 1.5 ml 的离心管中, 分别加入 5 μl Annexin V 和 5 μl PI 染液, 室温避光孵育 15 min, 用流式细胞仪进行检测。

1.6.2 Hoechst 33258 染色实验检测芹菜素对细胞核的影响 将对数生长期的 NCI-H520 细胞以 3×10^5 个/孔细胞接种至 6 孔板中, 加入不同浓度的芹菜素(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) 作用 48 h, 同时设空白对照组。48 h 后弃除药液, PBS 清洗后用多聚甲醛固定, 每孔加入 1 ml Hoechst 33258 染色液于培养箱中孵育 15 min, PBS 清洗 2 次, 用荧光显微镜进行观察并

拍照。

1.7 细胞自噬水平测定

1.7.1 AO 染色检测芹菜素对细胞内酸性细胞器的影响 不同浓度芹菜素(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)处理 NCI-H520 细胞 48 h 后,在胰酶中将细胞进行消化,用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次。细胞中加入含 1 $\mu\text{g/ml}$ AO 染液的 PBS 溶液,在培养箱中孵育 15 min, PBS 洗涤细胞 3 次,用流式细胞仪对荧光强度进行统计分析。

1.7.2 电镜检测芹菜素对细胞内自噬双分子层的影响 分组处理完毕的 NCI-H520 细胞制成细胞悬液并离心,加入预冷的 2.5% 戊二醛固定液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h,经 0.05% mol/L pH7.2 的二甲酸钠-盐酸缓冲溶液漂洗后每管加入 1 滴 1% 锇酸固定液后固定 1 h,将标本分别浸入 30%、50% 乙醇脱水各 10 min,每管加入 70% 乙醇醋酸铀染色液放置 3 h 或过夜进行包埋前染色。将标本分别浸入 80%、95%、100% 乙醇和环氧丙烷各脱水 10 min、15 min,两次 50 min、30 min。浸透时,环氧丙烷:环氧树脂 = 1:1,1~2 h;纯环氧树脂 2~3 h。45 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱 12 h,再放入 72 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱 24 h;取出包埋块修块后超薄切片、铜网捞片、电子染色(铅染色),最后用透射电镜观察及拍片。

1.7.3 Western blot 检测芹菜素对自噬相关蛋白的影响 分组处理完毕的 NCI-H520 细胞在蛋白质裂解缓冲液中裂解 30 min,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下以 11 510 r/min ,离心 15 min,蛋白质浓度用 BCA 蛋白质测定试剂盒定量,电泳、转膜结束后,用新鲜的 5% 脱脂牛奶在室温下封闭 2 h。将膜与特异性一抗(p62、LC3B、GAPDH 抗体稀释比例均为 1:1 000)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,用 TBST 洗涤后,将膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗(山羊抗兔、鼠二抗,比例为 1:10 000)于室温缓慢孵育 1 h,将漂洗后的 PVDF 膜置于曝光仪中,滴加化学发光液,曝光并保存结果。

1.8 统计学处理 采用 Image J 和 Graphpad 软件对数据进行统计并分析,所有实验均重复 3 次以上。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组资料间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芹菜素对 NCI-H520 细胞增殖能力的影响

芹菜素(2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)或顺铂(2.5、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)作用细胞 48 h,图 1A 中的结果表明,相对于对照组细胞,芹菜素($F = 7.256, 24 \text{ h}; F =$

30.39, 48 h; $P < 0.05$)或顺铂($F = 2.507, 24 \text{ h}; F = 80.28, 48 \text{ h}; P < 0.01$)抑制 NCI-H520 细胞活力并呈时间和浓度依赖性。在倒置显微镜下观察发现,空白对照组细胞贴壁生长、形态完整且边界清晰;随着芹菜素或顺铂作用浓度的增加,细胞皱缩,体积缩小,数目减少,见图 1B。图 1C 显示,与空白对照组相比,荧光强度随着药物浓度的增加依次升高($F = 4.799, F = 76.24; P < 0.05$)。

2.2 芹菜素对 NCI-H520 细胞迁移、侵袭能力的影响 图 2A 结果显示,芹菜素加药组划痕愈合率较对照组下降,且 48 h 时更为明显,加药组的水平迁移能力受到了一定的抑制。Transwell 实验(图 2B、C)结果表明,与对照组相比,芹菜素加药组穿过小室的细胞数目有所减少,说明芹菜素对细胞的迁移能力($F = 48.91, P < 0.01$)及侵袭能力($F = 241.0, P < 0.01$)具有一定的抑制作用。

2.3 芹菜素诱导 NCI-H520 细胞凋亡作用 图 3A 结果表明,与对照组相比,芹菜素加药组的细胞凋亡率增加,且呈现浓度依赖性($F = 139.3, P < 0.05$)。在荧光显微镜下观察核染色情况,图 3B 显微镜观察结果显示,芹菜素加药组细胞核浓染并缩小,而空白对照组细胞无此现象。

2.4 芹菜素对 NCI-H520 细胞自噬作用的影响 流式结果表明(图 4A),芹菜素处理后,NCI-H520 细胞中酸性细胞器的数量增加,差异有统计学意义($F = 4.616, P < 0.05$)。电镜下观察(图 4B),对照组细胞形态正常,胞体饱满,核膜、质膜完整,芹菜素加药组细胞肿胀,线粒体、内质网等细胞器出现碎片迹象,细胞内出现自噬双分子层样结构。Western blot 检测结果显示(图 4C),随着芹菜素浓度的增加,LC3B-II 蛋白表达水平升高,说明芹菜素诱导细胞内自噬体的增加($F = 41.50, P < 0.05$)。p62 蛋白水平随着芹菜素浓度的增加而升高($F = 27.39, P < 0.01$)。加入自噬抑制剂 CQ(5 $\mu\text{mol/L}$)后,芹菜素(20 $\mu\text{mol/L}$)组与芹菜素(20 $\mu\text{mol/L}$)联合自噬抑制剂 CQ(5 $\mu\text{mol/L}$)组 LC3B-II、p62 蛋白表达差异无统计学意义($F = 38.4, \text{NS}; F = 17.90, \text{NS}$)。

3 讨论

作为一种天然黄酮类化合物,芹菜素具有低毒性和潜在的抗肿瘤药理作用,无论是单独使用还是与其他化疗药物联合使用,都在多种肿瘤中显示出潜在的抗癌作用^[5],如:肝癌^[6]、卵巢癌^[7]、胶质瘤^[8]等,同时在肿瘤耐药方面也有一定的作用^[9]。

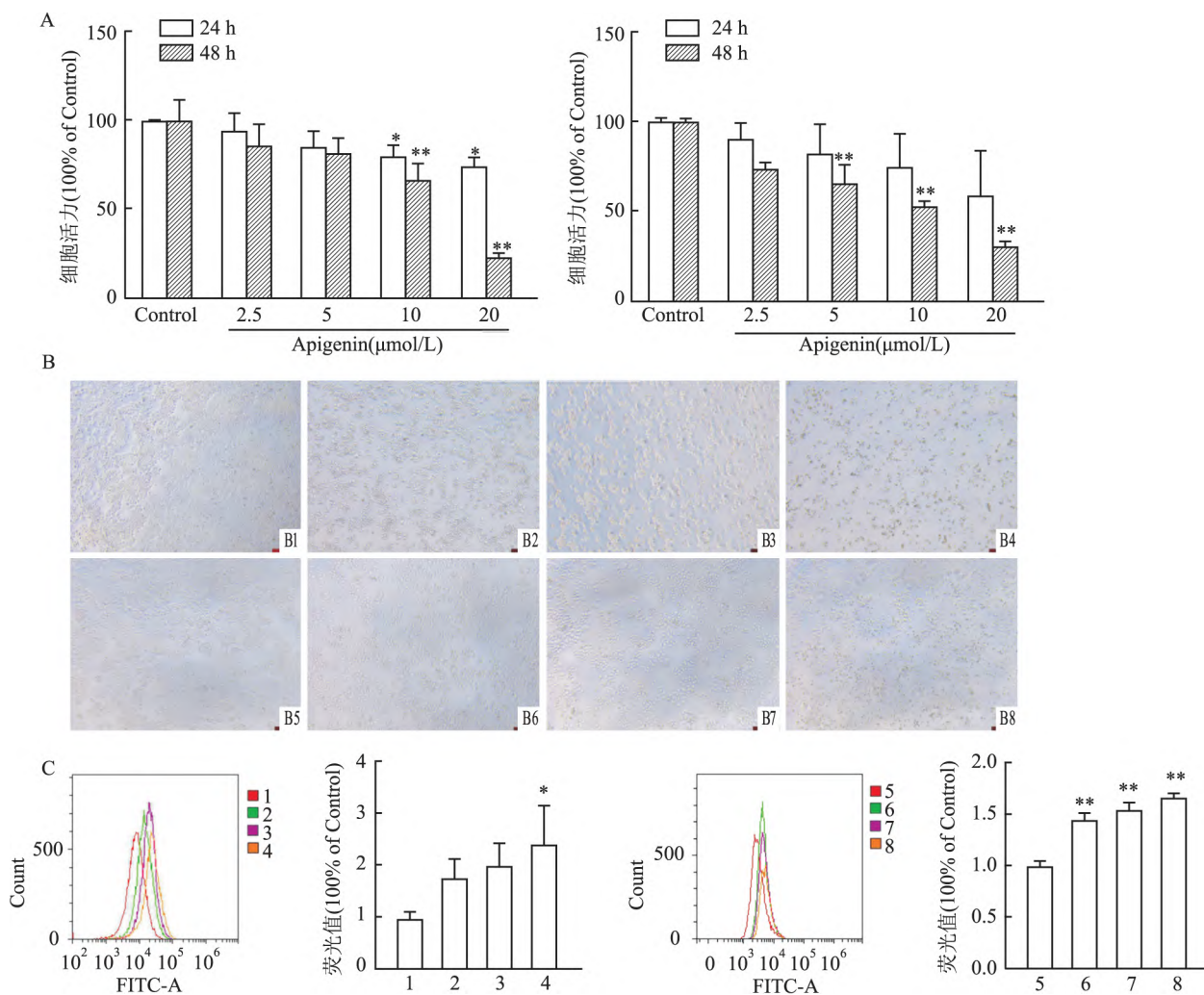


图1 芹菜素或顺铂对 NCI-H520 细胞增殖的影响

A: CCK-8 检测细胞活力; B: 芹菜素或顺铂处理细胞 48 h 后细胞形态 $\times 50$; C: CFDA SE 检测细胞分裂能力; 1: Control 组; 2: Apigenin 5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3: Apigenin 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4: Apigenin 20 $\mu\text{mol/L}$ 组; 5: Control 组; 6: Cisplatin 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 7: Cisplatin 5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 8: Cisplatin 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

文献^[10]表明,芹菜素可以诱导癌细胞凋亡。凋亡被称为 I 型程序性细胞死亡,细胞受到外界凋亡刺激后,通过细胞内发生信号级联反应,表现出如细胞变圆,体积缩小,结构更加紧密,脱离周围的细胞;胞浆浓缩,核染色质密度增高,核膜核仁破碎,膜内侧磷脂酰丝氨酸外翻到膜表面,胞膜出芽、脱落,包裹着细胞形成凋亡小体等一系列凋亡特征^[11]。该研究表明芹菜素可以诱导细胞磷脂酰丝氨酸膜外翻,凋亡率增加,并促进细胞核固缩及染色质凝集,提示芹菜素可以诱导 NCI-H520 细胞凋亡。

自噬在肿瘤中所发挥的作用在近年来逐渐受到广泛的关注。自噬可以促进肿瘤的发生发展,同时也可以诱导肿瘤细胞死亡,因此也被称为 II 型程序性细胞死亡。自噬过程中会形成自噬双分子层结

构,该实验在电镜下观察,结果显示芹菜素可诱导细胞内自噬双分子层结构的形成。同时,在自噬的发生过程中,LC3B-I 会转变成膜型 LC3B-II。该研究表明细胞内 LC3B-II 蛋白水平升高。以上结果表明芹菜素可以诱导细胞内自噬体的生成。自噬的过程需要酸性细胞器溶酶体参与降解过程,AO 是一种特异性染料,它能透过胞膜完整的细胞,嵌入细胞核 DNA,使之发出明亮的绿色荧光,也可以渗透进入酸性细胞器如自噬溶酶体^[12]。AO 流式结果表明,芹菜素可以引起细胞内酸性细胞器的增加,说明其促进了自噬的产生。

自噬是一个动态的过程,该实验检测 p62 蛋白的表达,以进一步验证自噬体增加的原因。自噬相关蛋白 p62 是一种支架蛋白和经典的接头蛋白,是

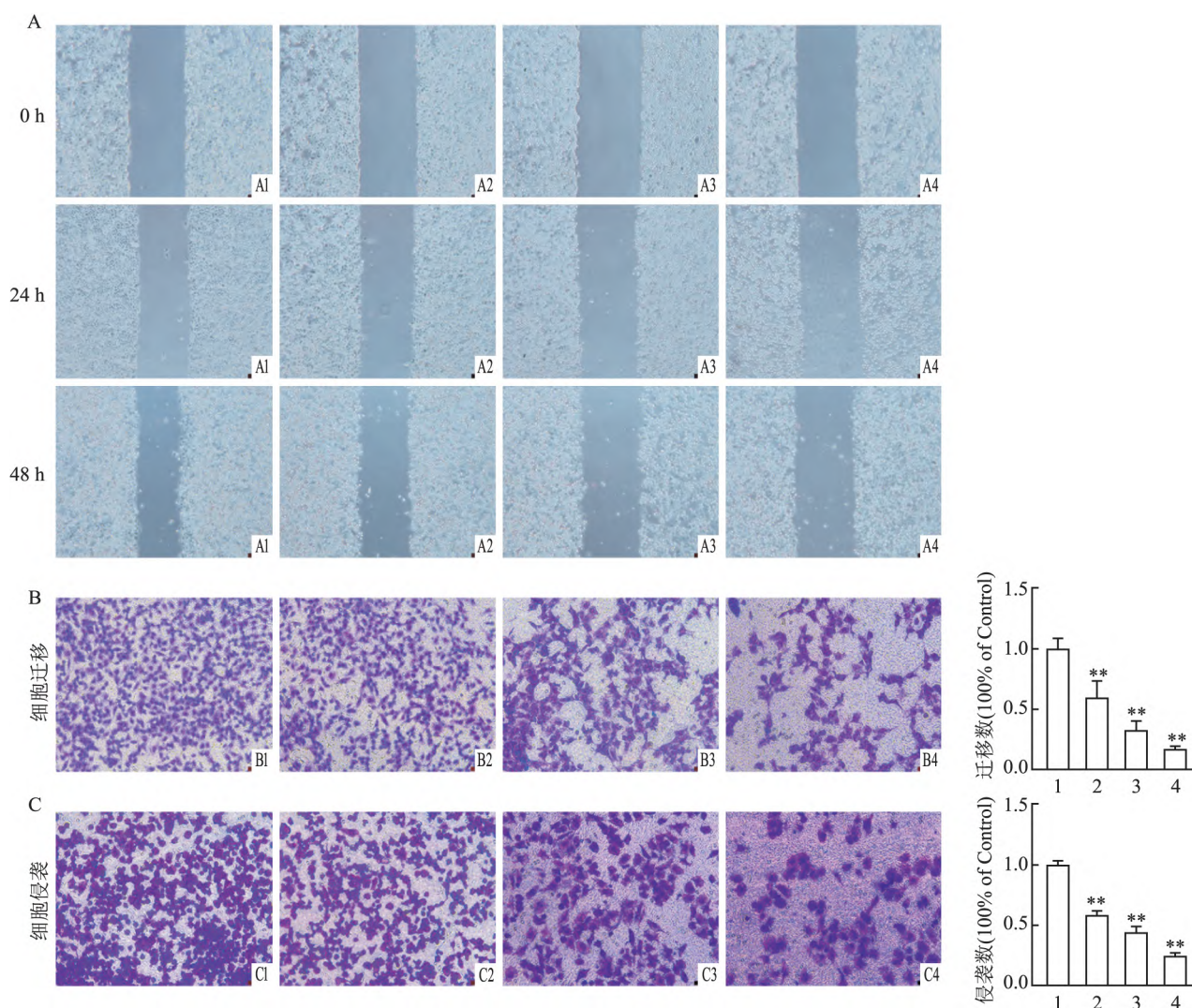


图2 芹菜素对 NCI-H520 细胞转移的影响

A: 划痕实验检测细胞划痕愈合率 $\times 50$; B: Transwell 检测细胞迁移数 $\times 200$; C: Transwell 检测细胞侵袭数 $\times 200$; 1: Control 组; 2: Apigenin 5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3: Apigenin 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4: Apigenin 20 $\mu\text{mol/L}$ 组; 与 Control 组比较: ** $P < 0.01$

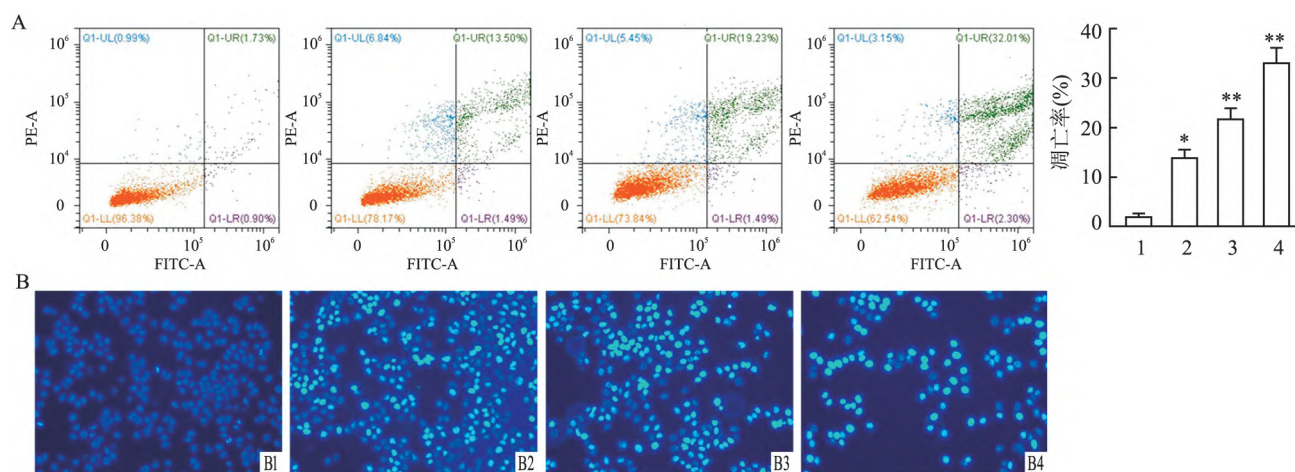


图3 芹菜素对 NCI-H520 细胞凋亡的影响

A: Annexin V/PI 双染检测细胞凋亡率; B: Hoechst 33258 核染色实验测定细胞凋亡 $\times 200$; 1: Control 组; 2: Apigenin 5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3: Apigenin 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4: Apigenin 20 $\mu\text{mol/L}$ 组; 与 Control 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

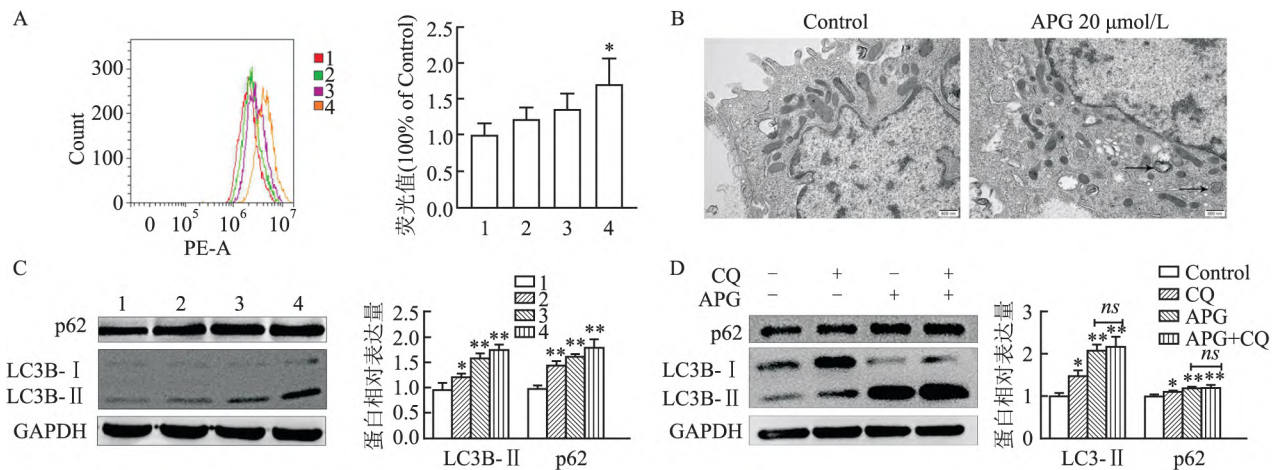


图4 芹菜素对NCI-H520细胞自噬水平的影响

A: AO染色观察细胞内酸性细胞器变化; B: 透射电镜观察细胞内自噬囊泡产生情况 $\times 25\ 000$; C: Western blot检测LC3B-II、p62蛋白表达情况; D: 加入CQ后, Western blot检测LC3B-II、p62蛋白表达情况; 1: Control组; 2: Apigenin 5 $\mu\text{mol/L}$ 组; 3: Apigenin 10 $\mu\text{mol/L}$ 组; 4: Apigenin 20 $\mu\text{mol/L}$ 组; 与Control组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

自噬选择性底物,参与自噬体的降解^[13]。该研究显示芹菜素可以诱导细胞内p62蛋白水平的升高,表明自噬体降解减少。在酸性溶酶体中,CQ会使溶酶体pH值升高,使溶酶体中酸性水解酶失活,从而抑制细胞内自噬溶酶体的融合与降解。CQ处理细胞会导致LC3B-II的聚集,在CQ的存在下,细胞中LC3B-II水平未能增加,表明芹菜素与CQ类似地可以阻断晚期自噬通量,而不是促进自噬启动。因此芹菜素诱导细胞自噬体的增加可能是由于抑制了自噬体的降解。

该研究用不同浓度的芹菜素处理人肺鳞癌细胞NCI-H520,初步探讨其对于细胞增殖、转移的影响以及可能的作用机制。该研究结果中,芹菜素作用于NCI-H520细胞后,细胞活力下降,分裂能力减弱,形态发生明显变化,迁移和侵袭的数量明显减少,表明芹菜素能够抑制人肺鳞癌细胞的增殖、迁移、侵袭能力,其抑制细胞的生长转移可能与诱导其凋亡和自噬有关。由于细胞及化合物的不同,自噬发挥不同的作用,因此自噬产生的具体机制有待进一步研究,以实现肿瘤的靶向治疗^[14]。

参考文献

- [1] Li Y, Gu J, Xu F K, et al. Transcriptomic and functional network features of lung squamous cell carcinoma through integrative analysis of GEO and TCGA data[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 15834.
- [2] Imran M, Aslam G T, Atif M, et al. Apigenin as an anticancer agent[J]. Phytother Res, 2020, 34(8): 1812–28.
- [3] Mortezaee K, Salehi E, Mirtavoos-Mahyari H, et al. Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy[J]. J Cell Physiol, 2019, 234(8): 12537–50.
- [4] Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1): 12.
- [5] Salehi B, Venditti A, Sharifi-Rad M, et al. The therapeutic potential of apigenin[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(6): 1305.
- [6] Papachristou F, Anninou N, Koukoulis G, et al. Differential effects of cisplatin combined with the flavonoid apigenin on HepG2, Hep3B, and Huh7 liver cancer cell lines[J]. Mutat Res, 2021, 866: 503352.
- [7] Xie Z F, Guo Z Y, Lei J C, et al. Scutellarin synergistically enhances cisplatin effect against ovarian cancer cells through enhancing the ability of cisplatin binding to DNA[J]. Eur J Pharmacol, 2019, 844: 9–16.
- [8] Wang D, Wang Z J, Dai X D, et al. Apigenin and temozolomide synergistically inhibit glioma growth through the PI3K/AKT pathway[J]. Cancer Biother Radiopharm, 2021, doi: 10.1089/cbr.2020.4283.
- [9] Li K, Li M H, Luo Z, et al. Overcoming the hypoxia-induced drug resistance in liver tumor by the concurrent use of apigenin and paclitaxel[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(2): 321–7.
- [10] Yang J L, Pi C C, Wang G H. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells[J]. Biomed Pharmacother, 2018, 103: 699–707.
- [11] Hseu Y C, Thiagarajan V, Ou T T, et al. CoQ0-induced mitochondrial PTP opening triggers apoptosis via ROS-mediated VDAC1 upregulation in HL-60 leukemia cells and suppresses tumor growth in athymic nude mice/xenografted nude mice[J]. Arch Toxicol, 2018, 92(1): 301–22.
- [12] Kim K Y, Park K I, Kim S H, et al. Inhibition of autophagy pro-

motes salinomycin-induced apoptosis via reactive oxygen species-mediated PI3K/AKT/mTOR and ERK/p38 MAPK-dependent signaling in human prostate cancer cells[J]. *Int J Mol Sci* ,2017 ,18 (5) : 1088.

[13] 王华斌,干晓琴,丁勇利,等. 靛茜素抑制 PI3K 通路的磷酸化

对宫颈癌 CaSki 细胞凋亡和自噬的影响[J]. *安徽医科大学学报* ,2020 ,55(12) : 1893 – 900.

[14] Onorati A V , Dyczynski M , Ojha R , et al. Targeting autophagy in cancer[J]. *Cancer* ,2018 ,124(16) : 3307 – 18.

Effect of apigenin on proliferation , metastasis , apoptosis and autophagy of human lung squamous cell carcinoma NCI-H520 cells

Liu Ping¹ , Geng Yadi² , Liu Yunxiao¹ , Xie Yanbo² , Zhang Xinge¹ , Zhang Lei^{1 2} , Wei Wei¹

(¹*Institute of Clinical Pharmacology , Anhui Medical University , Key Laboratory of Anti-Inflammatory and Immune Medicine , Ministry of Education , Ministry of Education Rheumatoid Arthritis Research Center , Anhui Medical University , Hefei 230032;* ²*Dept of Pharmacy , The First Affiliated Hospital of University of Science and Technology of China , Anhui Provincial Hospital , Hefei 230001)*

Abstract *Objective* To investigate the effect of apigenin on the proliferation , migration , invasion , apoptosis and autophagy of human lung squamous carcinoma NCI-H520 cells. *Methods* Human lung squamous carcinoma NCI-H520 cells were cultured *in vitro* , and the CCK-8 method was used to detect the effects of different concentrations of apigenin (2.5 , 5 , 10 , 20 $\mu\text{mol/L}$) or cisplatin (2.5 , 5 , 10 , 20 $\mu\text{mol/L}$) on cell viability. Carboxyfluorescein diacetate , succinimidyl ester (CFDA SE) was used to detect the effect of apigenin or cisplatin on cell division. Scratch test and Transwell test were used to detect the effect of apigenin on cell migration and invasion. Annexin V/PI double staining method and Hoechst 33258 nuclear staining method were used to detect the effect of apigenin on cell apoptosis. Transmission electron microscopy was used to observe the generation of autophagic vesicles in cells. Acridine orange (AO) staining was used to observe the changes of acidic organelles in cells. Western blot was used to detect microtubule-associated protein 1 light chain 3B-II (LC3B-II) and p62 protein expression. *Results* Compared with the control group , CCK-8 assay and CFDA SE showed that apigenin or cisplatin reduced proliferation of NCI-H520 cells ($P < 0.05$) . Scratch test and Transwell test showed that apigenin reduced the migration and invasion levels of cells ($P < 0.01$) . Annexin V/PI double staining showed that apigenin increased apoptosis rate ($P < 0.05$) . Hoechst 33258 nuclear staining showed that apigenin promoted nuclear condensation and hyperchromatism of cells. AO staining fluorescence value enhanced , the autophagy bimolecular structure appeared under transmission electron microscopy , and the results of LC3B-II and p62 protein expression levels in Western blot showed that apigenin increased the autophagy level of cell NCI-H520 ($P < 0.05$) . Chloroquine(CQ) failed to increase the protein levels of LC3B-II and p62 in apigenin treated cells. *Conclusion* Apigenin at different concentrations can inhibit the proliferation , migration and invasion of human lung squamous cell carcinoma NCI-H520 , and its inhibition of cell growth and metastasis may be related to the induction of apoptosis and autophagy , and the increase of autophagy may be caused by blocking autophagosome degradation.

Key words apigenin; NCI-H520; proliferation; metastasis; apoptosis; autophagy