

黄连素对人肺癌细胞增殖、凋亡、迁移、侵袭能力的影响

宋丹¹, 缪佰良², 高升², 赵玉婉^{2*} (1. 河南省滑县中医院心内科, 河南安阳 456400; 2. 广东医科大学附属医院泌尿外科, 广东湛江 524001)

摘要: **目的** 探讨黄连素对肺癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。**方法** 用0~100 μmol/L 黄连素处理人肺癌细胞株 24 h 后, 用MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡, 划痕实验检测细胞迁移, Transwell 实验检测细胞侵袭, 蛋白质印迹检测相关蛋白表达。**结果** 黄连素显著抑制肺癌细胞增殖、迁移、侵袭, 促进细胞凋亡($P<0.01$); 上调 Bad、Caspase-3、Caspase-9、TIMP-1 表达, 下调Bcl-2、MMP-2 表达。**结论** 黄连素可抑制增殖、迁移、侵袭能力, 促进肺癌细胞凋亡。

关键词: 肺癌; 黄连素; 凋亡; 侵袭

中图分类号: R 237

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2022) 04-0379-05

Effect of berberine on proliferation, apoptosis, migration, and invasion of lung cancer cells

SONG Dan¹, MIAO Bai-liang², GAO Sheng², ZHAO Yu-wan^{2*} (1. Department of Cardiology, Huaxian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Anyang 456400, China; 2. Department of Urinary Surgery, Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of berberine on proliferation, apoptosis, migration, and invasion of lung cancer cells. **Methods** After treated with 0-100 μmol/L berberine for 24 hours, proliferation, apoptosis, migration, invasion, and associated protein expression of human lung cancer cell lines were detected by MTT, flow cytometry, scratch, Transwell, and Western blot, respectively. **Results** Berberine significantly inhibited cell proliferation, migration and invasion, but enhanced apoptosis of lung cancer cells ($P<0.01$); and upregulated Bad, Caspase-3, Caspase-9, and TIMP-1 expression, but downregulated Bcl-2 and MMP-2 expression. **Conclusion** Berberine inhibites proliferation, migration and invasion, and promotes apoptosis of lung cancer cells.

Key words: lung cancer; berberine; apoptosis; invasion

肺癌占男性恶性肿瘤发病率和死亡率的第一位, 女性肺癌的发病率和病死率仅次于乳腺癌^[1]。大部分肺癌无法早期确诊, 肿瘤细胞的转移往往会给治疗带来巨大的困难, 其潜在机制也尚未完全明确^[2]。黄连素又名盐酸小檗碱(BBR), 是中药黄连中提取出的主要有效成分之一, 具抗炎、抗糖尿病、抗弯曲杆菌、护肝等多重药理作用^[3] 和抑制癌症细胞增殖、诱导癌症细胞凋亡、增强癌症细胞化疗治疗敏感性等作用^[4], 还可以诱导肿瘤细胞发生细胞周期停滞、衰老、细胞凋亡和自噬来抑制不同癌症的细胞增殖、侵袭和转移^[5], 是一种很有前景的抗肿瘤药物^[6]。此外, BBR 在相对高剂量下毒性

非常低, 没有明显的临床副作用^[7]。本研究探讨不同浓度BBR 对肺癌细胞的增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞培养

人肺癌细胞系(A549、H1299) 购买于中国科学院细胞库(中国上海), 均使用RPMI-1640 培养基(Waltham, MA, USA) 培养, 并加入 10% 胎牛血清(SeraPro)、1% 的青霉素 100 mg/L 和链霉素 100 g/L(碧云天, 中国上海)^[8]。

1.2 试剂和抗体

BBR 购买于生工生物工程有限公司(上海, 中国),

收稿日期: 2022-01-03

基金项目: 广东医科大学科研基金(GDMUM201823)

作者简介: 宋丹(1988-), 女, 硕士, 主治医师, E-mail: songdan2018@163.com

缪佰良(1996-), 男, 学士, 在读研究生

通信作者: 赵玉婉, 女, 硕士, 助理研究员, E-mail: zhaoyw201@126.com

将其溶解在 100% 二甲基亚砜 (DMSO) 中作为储备溶液 (BBR 100 mmol/L), -20°C 保存。Bcl-2、Bad、Caspase-9、Caspase-3、GAPDH、TIMP-1 和 MMP-2 抗体购买于 Cell Signaling Technology (CST), 山羊抗兔 IgG-HRP 二抗购于 EarthOx (美国)^[8]。

1.3 细胞增殖检测

使用 MTT 法检测人肺癌细胞 A549 和 H1299 细胞的增殖。肺癌细胞系 (A549: 4×10^3 细胞/孔, H1299: 5×10^3 细胞/孔) 接种在 96 孔板 (NEST) 中, 次日采用不同浓度 BBR (0、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 处理细胞 24、48 和 72 h。每孔用 0.5 g/L 的 MTT 孵育细胞 4 h, 随后用酶标仪 (EnSpire 2300 Multilabel Reader, PE) 在 492 nm 处检测吸光度值。评估药物对细胞生存力 (%) 的影响, 并与 BBR 0 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞进行比较, BBR 0 $\mu\text{mol/L}$ 组被指定为 100% 存活率^[8]。

1.4 蛋白质印迹分析

实验分为 BBR 0、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组。药物处理 24 h 的细胞使用裂解缓冲液 (RIPA, 碧云天) 裂解细胞获得细胞总蛋白, 整个过程均在冰上操作。BCA 蛋白质测定试剂盒 (碧云天, 中国) 检测蛋白浓度。样品蛋白通过 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离, 并电转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF, Millipore, USA) 膜上, 然后用 5% 脱脂奶粉 (1% Tween 20 和 Tris 缓冲盐水) 封闭, 将封闭后的 PVDF 膜放入一抗中 4°C 冰箱孵育过夜。次日, TBST 冲洗 PVDF 膜 3 次, 每次 5 min, 然后在室温将其与山羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶二抗 (EarthOx, USA) 孵育 1 h。

1.5 细胞凋亡检测

Annexin V 和 PI 染色检测细胞凋亡。实验分为 0、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ BBR 处理组。药物处理肺癌细胞 A549 和 H1299 细胞 24 h 后, 收集细胞, PBS 洗涤。使用 Annexin V 凋亡试剂盒 (BD Pharmingen, USA) 检测细胞凋亡, 在室温用 AV FITC 和 PI 避光染色 15 min 后, 流式细胞仪分析。

1.6 划痕实验

划痕实验检测细胞的迁移能力, 将 A549 细胞和 H1299 细胞以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的密度铺于 6 孔板内, 在 A549 细胞系和 H1299 细胞系中加入 RPMI-1640 培养基培养 48 h, 使之形成单层细胞。用 200 μL 移液枪枪头在单层细胞上纵横划痕^[9]。划痕操作后, 将其分为 4 组, 分别为 BBR 0 $\mu\text{mol/L}$ 、BBR 20 $\mu\text{mol/L}$ 、BBR 50 $\mu\text{mol/L}$ 和 BBR

100 $\mu\text{mol/L}$ 组, 分别于划痕之后的 0、24 h 在倒置荧光显微镜下观察 ($\times 100$ 倍) 并拍照。

1.7 Transwell 侵袭实验

将不同浓度 (0、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$) BBR 预处理 24 h 后的, 处于对数生长期的肺癌细胞 A549 和 H1299, 细胞放置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中 24 h 后, 用 0.05% 的胰蛋白酶消化, 收集细胞。将含有 2×10^5 个 60 μL 的细胞悬液置于 Transwell 小室内, 并在 24 孔板中加入含体积分数 10% FBS 的 RMP-1640 培养基 600 μL , 最后将 Transwell 小室放入 24 孔板中, 静置 5 min^[10]。常规培养 24 h, 取出小室用棉签擦去上室内面未穿膜的细胞, 并用 95% 的酒精固定 15 min, PBS 冲洗两次后晾干。随后用结晶紫染色 20 min, PBS 冲洗两次, 倒扣于滤纸上晾干。在显微镜下观察 (400 倍) 5 个随机视野中计数入侵细胞。

1.8 形态学实验

取对数生长的肺癌细胞 A549 和 H1299 铺板于 6 孔板中, 在细胞生长至约 70% 密度时, 对不同分组加入药物处理, 24 h 后在光镜下观察各组细胞形态的变化。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件, 选用单因素方差分析及 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBR 对肺癌细胞 A549 和 H1299 的增殖能力影响

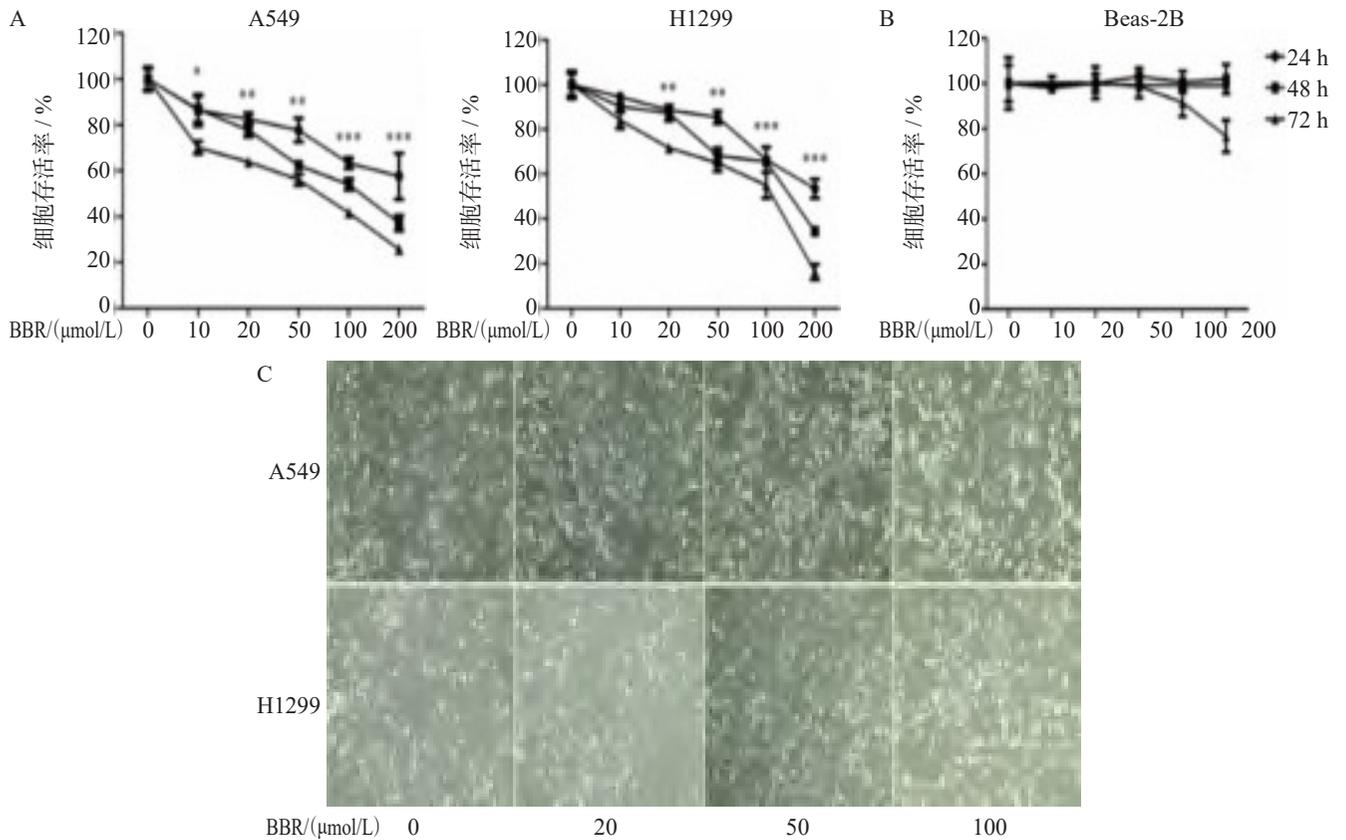
不同浓度 BBR (20、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 处理肺癌细胞 A549 和 H1299, 其存活率明显低于 BBR (0 $\mu\text{mol/L}$) 组 ($P < 0.05$), 且具有浓度和时间依赖性 (图 1A)。然而, 在相同浓度梯度的 BBR 处理下, 正常支气管上皮细胞 Beas-2B 细胞, 各 BBR 浓度组细胞存活率变化没有发生显著的变化 (图 1B)。随着 BBR 浓度增加, 肺癌细胞 A549 和 H1299 的细胞数目逐渐减少、细胞外形发生变化、细胞逐渐收缩, 失去正常形态, 变成圆形, 最终脱落培养基, 漂浮于培养基 (图 1C)。

2.2 BBR 对肺癌细胞凋亡的影响

随着 BBR 浓度增加, 肺癌细胞 A549 和 H1299 的早期凋亡率和晚期凋亡率明显增加 ($P < 0.05$) (图 2A、2B)。

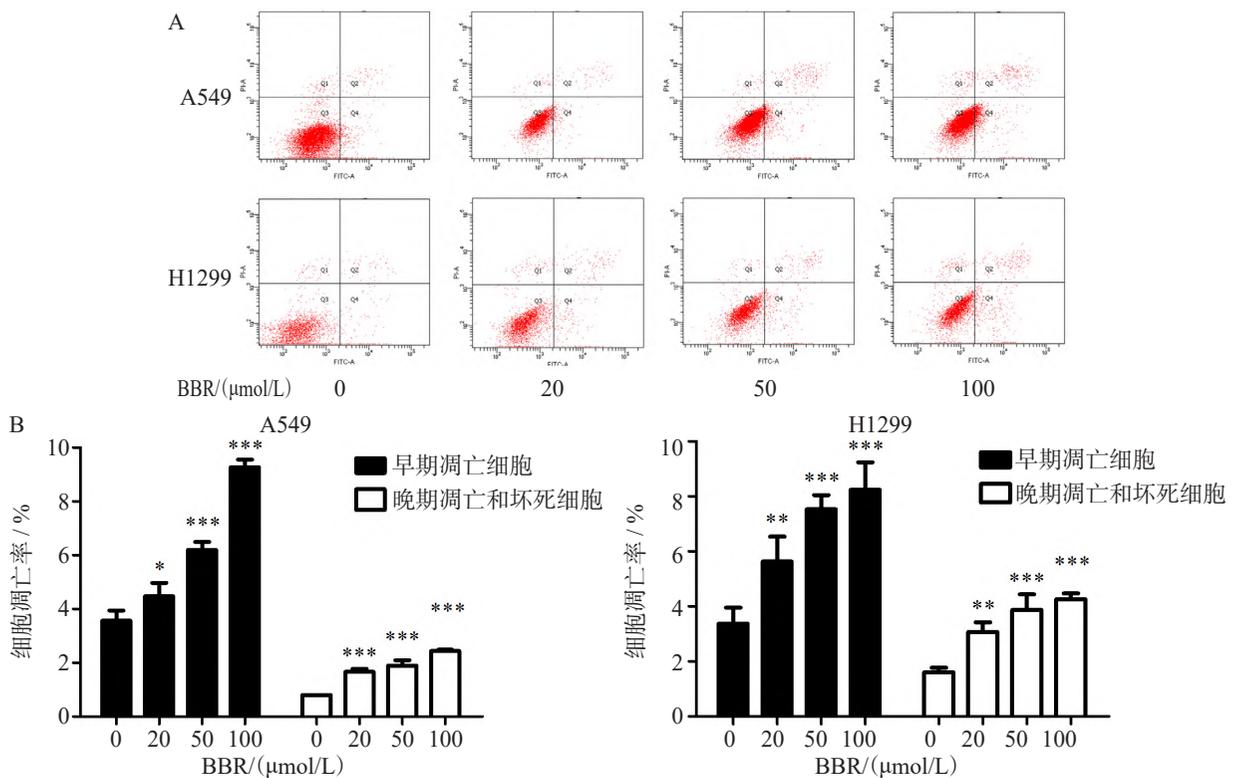
2.3 BBR 对肺癌细胞 A549 凋亡相关蛋白水平的影响

BBR (20、50、100 $\mu\text{mol/L}$) 与 BBR (0) 代替 BBR 处理组和对照组, 促凋亡相关蛋白 Bad、Civ-Caspase3 和 Civ-Caspase9 表达升高, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达水平减少 (图 3)。



A. MTT 法检测 A549 和 H1299 细胞的存活率; B. MTT 法检测正常支气管上皮细胞 Beas-2B 细胞的存活率; C. 倒置相差显微镜 (×100 倍) 对细胞拍照; BBR 组与 0 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 1 BBR 抑制肺癌细胞 A549 和 H1299 的增殖能力



A. 流式细胞术检测细胞的凋亡率; B. 对 A 图的量化; 不同浓度 BBR (20、50、100 μmol/L) 组与 BBR (0 μmol/L) 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图 2 BBR 对肺癌细胞 A549 和 H1299 凋亡的影响

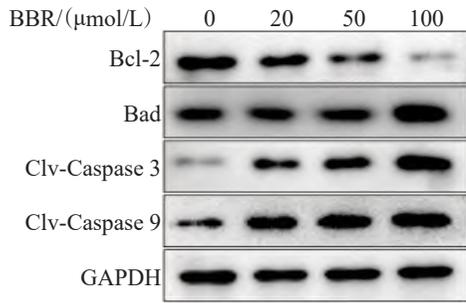


图3 BBR对A549肺癌细胞细胞凋亡相关蛋白水平的影响

2.4 BBR对肺癌细胞A549和H1299的迁移侵袭能力影响

与BBR (0 μmol/L)组相比,随着BBR 药物浓度的增加,细胞迁移的宽度显著减少(图 4A)。与对照组相比,不同浓度BBR (20、50、100 μmol/L)组的侵袭细胞数明显少于对照组,而且随着BBR 浓度增加,细胞的侵袭数目减少(图 4B 和 4C)。

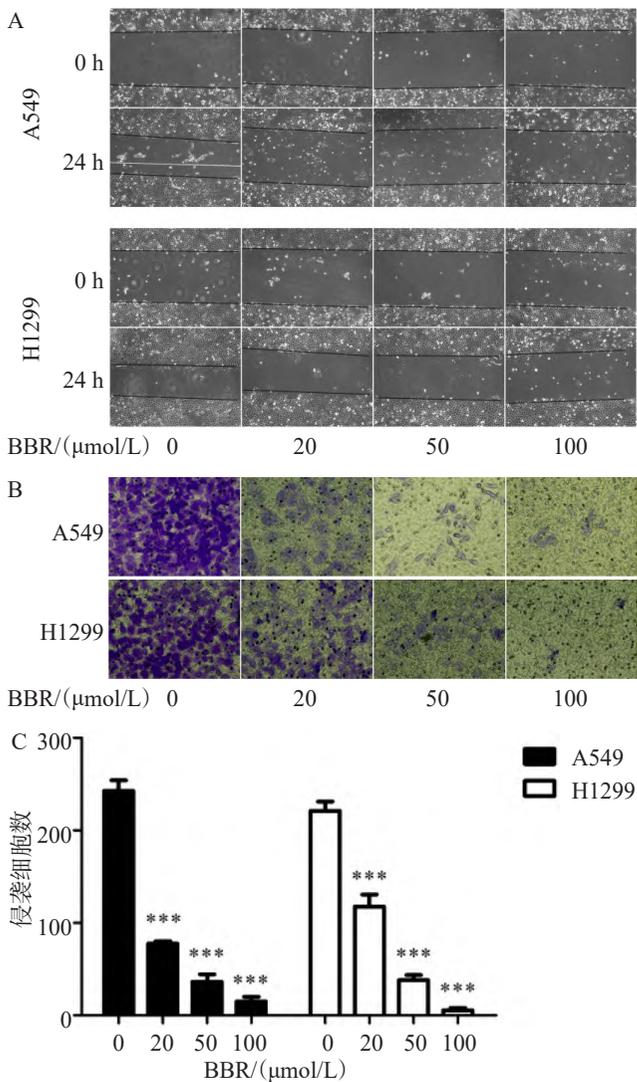


图4 BBR对A549和H1299肺癌细胞的迁移侵袭能力影响

2.5 BBR影响肺癌细胞迁移侵袭相关蛋白表达水平的影响

不同浓度BBR (20、50、100 μmol/L)组与BBR (0 μmol/L)组相比,随着BBR 的处理浓度增加,肺癌细胞A549中, MMP-2 的蛋白表达水平降低,但是TIMP-1蛋白表达水平上升,见图 5。

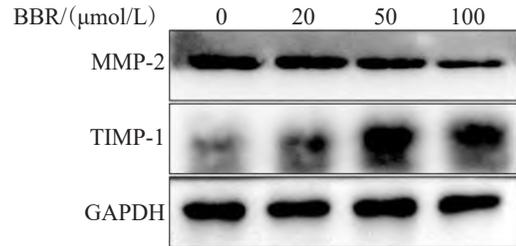


图5 BBR对肺癌细胞迁移侵袭相关蛋白表达水平的影响

3 讨论

肺癌是常见的呼吸系统肿瘤之一,目前全球发病率逐年递增已经严重危害人类的生命健康^[11]。有研究表明,肺癌的发生与某些致癌基因和抑癌基因密切相关,促癌基因过表达、抑癌基因的沉默、细胞凋亡率降低可能诱导支气管上皮细胞恶化成肺癌细胞的潜在机制^[12]。研究表明,许多基因参与肺癌细胞凋亡,其中Bcl-2与Bad和肺癌的凋亡密切相关,抗凋亡基因Bcl-2的过表达和凋亡促进基因Bad的低表达水平,可抑制细胞凋亡,延长细胞存活时间,是肺癌的潜在发病机制其中之一^[13]。在本研究中,MTT实验表明, BBR能抑制肺癌细胞的增殖效率和流式细胞术提示, BBR能提高肺癌细胞的凋亡率,免疫印迹技术发现BBR能提高蛋白Bcl-2、Clv Caspase-3、Clv Caspase-9和降低Bcl-2的表达。BBR抑制肺癌细胞存活率,其潜在机制可能是药物作用于肺癌细胞后,激活了细胞内凋亡相关通路的,影响了部分参与细胞凋亡的蛋白表达。

中药在肿瘤的治疗中不仅有直接的抗肿瘤作用,还能改善机体内环境,调节免疫,因此充分挖掘我国传统中药资源,积极筛选中药有效成分,将更好凸显中药重要的应用价值, BBR属于我国传统的中药中的一种^[14]。近年来有研究发现, BBR能通过抑SCAP/SREBP-1信号通路影响脂质的生成来抑制结肠癌细胞增殖^[15],还能通过MAPK/mTOR/p70S6K和Akt信号通路减少自噬从而体外和体内人胃癌细胞的生长^[16]。

MMP-2属于基质金属蛋白酶家族,基质金属蛋白酶通过降解细胞外基质(ECM)和基底膜,导致基底膜的丢失,然后使肿瘤细胞通过松散的胞基质外环境扩散并浸润到其他组织,最终形成肺癌的转移和侵

袭^[17]。也有研究表明, MMP-2 或MMP-9 可能通过增强VEGF 与VEGF 受体的结合来促进血管和淋巴管的生长,导致癌症细胞的远处迁移^[18]。基质金属蛋白酶组织抑制因子1 (TIMP1) 是基质金属蛋白酶的抑制酶,其功能与MMP 家族蛋白的功能相反,能抑制肿瘤细胞的浸润和转移^[19]。在上述实验肺癌细胞A549 和H1299 中, BBR 处理组与对照组相比,划痕实验的宽度变窄,迁移过Transwell 小室的细胞数减少和肺癌细胞A549 细胞中MMP-2 的表达水平明显降低, TIMP1 蛋白表达水平升高,这些实验结果表明BBR 能抑制肺癌细胞的侵袭和迁移能力,可能是BBR 影响了一些细胞内与迁移和侵袭相关的蛋白表达。

综上所述, BBR 能抑制肺癌细胞A549 和H1299 的增殖能力,促进肺癌细胞发生凋亡,抑制肺癌细胞的迁移侵袭能力。本次实验中,并未进行实验动物体内实验进行BBR 对肺癌细胞的探讨,以及在体外实验中BBR 发挥抑制肺癌的具体机制尚未明确,但本次实验为进一步深入探讨提供理论基础。

参考文献:

- [1] MILLER K D, FIDLER-BENAOUDIA M, KEEGAN T H, et al. Cancer statistics for adolescents and young adults, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(6): 443-459.
- [2] CHAFFER C L, WEINBERG R A. A perspective on cancer cell metastasis[J]. *Science*, 2011, 331(6024): 1559-1564.
- [3] IMENSHAHIDI M, HOSSEINZADEH H. Berberis vulgaris and berberine: An update review[J]. *Phytother Res*, 2016, 30(11): 1745-1764.
- [4] ZHANG C, SHENG J, LI G, et al. Effects of berberine and its derivatives on cancer: A systems pharmacology review[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10:1461.
- [5] WANG Y, LIU Y, DU X, et al. The anti-cancer mechanisms of berberine: A review[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 695-702.
- [6] LIU D, MENG X, WU D, et al. A natural isoquinoline alkaloid with antitumor activity: Studies of the biological activities of berberine[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 9.
- [7] KUMAR A, EKAVALI, CHOPRA K, et al. Current knowledge and pharmacological profile of berberine: An update[J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 761: 288-2897.
- [8] 李建昌, 林善鸿, 曾文锋, 等. 黄连素联合阿霉素对人前列腺癌细胞的作用[J]. *广东医科大学学报*, 2021, 39(5): 529-533.
- [9] 晁志祥, 秦西淳, 贾才力, 等. 色素上皮衍生因子及其多肽对非小细胞肺癌增殖、凋亡及迁移的影响[J]. *中国肺癌杂志*, 2021, 24(12): 829-837.
- [10] 李璐, 陈静静. G31P 对人肝癌细胞增殖黏附及侵袭作用的影响[J]. *安徽医学*, 2021, 42(12): 1341-1346.
- [11] BARTA J A, POWELL C A, WISNIVESKY J P. Global epidemiology of lung cancer[J]. *Ann Glob Health*, 2019, 85(1): 8.
- [12] SCHABATH M B, COTE M L. Cancer progress and priorities: Lung cancer global epidemiology of lung cancer[J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2019, 28(10): 1563-1579.
- [13] KENTEPOZIDIS N, KOTSAKIS A, SOULTATI A, et al. Docetaxel plus cisplatin and bevacizumab for untreated patients with advanced/metastatic non-squamous non-small-cell lung cancer: A multicenter phase II study of the Hellenic Oncology Research Group[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 71(3): 605-612.
- [14] KONG Y, LI L, ZHAO L G, et al. A patent review of berberine and its derivatives with various pharmacological activities (2016-2020)[J]. *Expert Opin Ther Pat*, 2022, 32(2): 211-223.
- [15] LIU Y, HUA W, LI Y, et al. Berberine suppresses colon cancer cell proliferation by inhibiting the SCAP/SREBP-1 signaling pathway-mediated lipogenesis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 174: 113776.
- [16] ZHANG Q, WANG X, CAO S, et al. Berberine represses human gastric cancer cell growth in vitro and in vivo by inducing cytosolic autophagy via inhibition of MAPK/mTOR/p70S6K and Akt signaling pathways[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 128: 110245.
- [17] WANG R, KE Z F, WANG F, et al. GOLPH3 overexpression is closely correlated with poor prognosis in human non-small cell lung cancer and mediates its metastasis through upregulating MMP-2 and MMP-9[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(3): 969-982.
- [18] CEPEDA M A, EVERED C L, PELLING J J H, et al. Inhibition of MT1-MMP proteolytic function and ERK1/2 signalling influences cell migration and invasion through changes in MMP-2 and MMP-9 levels[J]. *J Cell Commun Signal*, 2017, 11(2): 167-179.
- [19] KACZOROWSKA A, MIĘKUS N, STEFANOWICZ J, et al. Selected matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-7) and their inhibitor (TIMP-2) in adult and pediatric cancer[J]. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10(8): 547.