

DOI:10.3969/j.issn.1000-9760.2019.05.008

芹菜素对人食管癌 Eca109 细胞增殖 侵袭的影响*

于 森 袁 莉 蒋方剑

(菏泽医学专科学校药学与制药工程系, 菏泽 274000)

摘 要 **目的** 探究芹菜素对人食管癌 Eca-109 细胞增殖及侵袭的影响。**方法** 体外培养食管癌 Eca-109 细胞,随机分为芹菜素低、中、高组和空白对照组,MTT 法检测芹菜素对常规培养的食管癌 Eca-109 细胞的生长抑制情况;流式细胞仪 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡以及对细胞周期的影响;Transwell 侵袭实验观察芹菜素对 Eca-109 细胞侵袭、运动能力的影响。**结果** MTT 法结果显示,各芹菜素组对 Eca-109 细胞的生长抑制作用随剂量增加逐渐增强,呈现剂量依赖性,在 24、48、72h,低剂量组的抑制率分别为 11.28%、19.45%、37.78%,中剂量组的抑制率分别为 14.47%、29.49%、49.8%,高剂量组的抑制率分别为 15.78%、31.21%、67.21%,对照组在各时间段无抑制情况,实验组与对照组比较差别具有统计学意义($P < 0.001$)。Transwell 侵袭实验显示,48h 后芹菜素低、中、高剂量组和空白对照组细胞穿膜数分别为 (78.50 ± 3.48) 个、 (55.50 ± 4.41) 个、 (37.75 ± 3.36) 个和 (90.75 ± 5.32) 个,各芹菜素组与空白对照组比较差别具有统计学意义($P < 0.001$),不同浓度芹菜素组间两两比较具有统计学意义($P < 0.001$)。**结论** 芹菜素对人食管癌 109 细胞生长有抑制作用,能明显抑制其侵袭和运动能力。

关键词 芹菜素;食管癌;细胞增殖;Eca-109 细胞;侵袭转移

中图分类号:R734 文献标识码:A 文章编号:1000-9760(2019)10-341-04

Effect of apigenin on proliferation and invasion of human esophageal cancer eca109 cells

YU Miao, YUAN Li, JIANG Fangjian

(Department of Pharmacology, Heze Medical College, Heze 274000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of apigenin on proliferation and invasion of human esophageal cancer Eca-109 cells in vitro. **Methods** In vitro culture of Eca-109 cells from esophageal cancer, logarithmic cells were taken for experiments. The inhibitory effect of apigenin on the growth of Eca-109 cells cultured in vitro by MTT assay, Flowcytometry Annexin V/PI double staining for cell apoptosis and its effect on cell cycle, Transwell Invasion Test to Observe the Effect of Apigenin on Invasion and Motility of Eca-109 Cells. **Results** In MTT results, the experimental groups ($5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) were treated with apigenin, inhibitory effect on Eca-109 cell growth gradually increased in a dose-dependent manner. The inhibition rates of low dose group were 11.28%, 19.45% and 37.78% at 24, 48 and 72 hours respectively, the inhibition rates of middle dose group were 14.47%, 29.49% and 49.8% at 24, 48 and 72 hours respectively. The inhibition rates of high dose group were 15.78%, 31.21% and 67.21% at 24, 48 and 72 hours respectively in a time-dependent manner. There was no inhibition in the control group at all time intervals. The difference between the experimental group and the control group was statistically significant ($P < 0.001$). There was statistical significance between two groups of different concentration and different time ($P < 0.001$). Transwell Invasion Experiments showed that the number of cell membrane penetration in the control group was 90.75 ± 5.32 . The number of cell membrane penetration in low dose group was 78.50 ± 3.48 . The number of cell membrane penetration in the medium dose group was 55.50 ± 4.41 . The number of cell membrane penetration

* [基金项目] 山东省医药卫生科技发展项目 (2016WS0100)

in the high dose group was 37.75 ± 3.36 . The difference between the experimental group and the control group was statistically significant ($P < 0.001$). There was statistical significance between two groups with different concentrations ($P < 0.001$). **Conclusion** Apigenin can inhibit the growth of human esophageal cancer 109 cells and significantly inhibit its invasion and motor ability.

Keywords: Apigenin; Esophageal Cancer; Cell Proliferation; Eca-109 Cell; Invasion Transmissi

芹菜素 (apigenin) 是黄酮类化合物中的一种, 来源于伞形科植物旱芹叶, 又名芹黄素、洋芹素, 有“植物雌激素”之称, 广泛分布于温热带的蔬菜、水果、豆类、茶叶、小麦芽、百合科毛叶藜芦、蓼科虎杖、玄参科植物水蔓青中, 尤以芹菜中含量为高; 在一些药用植物如络石藤、车前子等中也有较高的含量, 在茶、酒以及一些调味品中也有分布^[1-3]。芹菜素具有多种药理活性, 可抗肿瘤、降血压、降血脂、舒张血管、抗动脉硬化、抗炎、清除自由基和抗焦虑等。与其它黄酮类化合物如大豆异黄酮、山奈黄酮等相比, 芹菜素具有低毒、无诱变等特点。目前, 芹菜素已成为抗肿瘤研究领域的热点之一^[4-6], 然而关于芹菜素抗食管癌的研究较少。本实验旨在探究芹菜素对人食管癌 Eca-109 细胞增殖与侵袭力的影响, 为其在食管癌临床治疗中的应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

低分化人食管癌细胞株 109 细胞 (Eca-109) 购于上海中科院细胞库。

芹菜素规格每瓶 20mg, 购于上海晶纯试剂公司; 1640 培养基和胎牛血清均购自美国 Thermo 公司; 胰蛋白酶 (Trypsin) 购自美国 Sibma 公司; 链霉素和青霉素均购自华北制药集团公司; 四甲基偶氮唑盐 (MTT) 购自美国 Amresco 公司; D-Hanks 液和 PBS 缓冲液 (磷酸盐缓冲液) 均购自百浩生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 双染试剂盒购于美国 Roche 公司; HE 染色液试剂盒购于上海亿欣生物科技有限公司; Matrigel 购于 Becton Dickinson 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 Eca-109 细胞培养于含有 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 以及 95% 空气和湿度的恒温培养箱中培养。取对数生长期的 Eca-109 细胞分为芹菜素低、中、高剂量组 (分别给予 $5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、

$20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的芹菜素) 和空白对照组。

1.2.2 MTT 法检测芹菜素对 Eca-109 细胞增殖的影响 取生长状态良好的常规培养的 Eca-109 细胞, 以 2.5g/L 的胰蛋白酶进行常规消化, 制成单个的细胞悬液; 培养基作调零孔为空白组, 不含药物孔为空白对照组, 以每孔 $10^3 \sim 10^4$ 个细胞接种于平底 96 孔培养板中心区域的 60 个孔中; 每组设 4 个重复, 分别于 24、48、72h 后向待测孔每孔加入 $20\mu\text{l}$ MTT (5mg/ml), 余孔 3 ~ 4d 更换培养基以维持药物浓度, 之后放置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中继续培养; 继续培养 4h 后, 取出 96 孔板, 最大程度地去除培养液, 每孔加入 DMSO $200\mu\text{l}$, 微量振荡器室温下充分震荡 15min, 促使紫色结晶充分溶解; 用空白孔进行调零, 使用酶联免疫测定仪选取 570nm 波长, 测定各孔吸光值, 记录结果, 实验重复 3 次。通过公式: 细胞增殖率抑制率 (%) = $(1 - \text{实验孔 A570} / \text{对照孔 A570}) \times 100\%$ ^[7]。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI 法检测芹菜素对 Eca-109 细胞凋亡的作用 按照试剂盒方法将细胞重悬于 $100\mu\text{l}$ 含 AnnexinV-FITC 的缓冲液中; 在 4℃ 的条件下避光孵育 30 min; 流式细胞仪检测, 激发波长为 488 nm, 通过散点图收集 10000 个细胞, 分析直方图上各细胞周期的变化和细胞的凋亡率; 实验重复 3 次, 取平均值。

1.2.4 Transwell 法检测芹菜素对 Eca-109 细胞侵袭、运动能力的影响 将已铺好 Matrigel 的 transwell 培养板置于 37℃ 保存备用; 常规培养 Eca-109 细胞, 于 transwell 小室上室加入 $200\mu\text{l}$ 无血清培养液调制的 $5 \times 10^5/\text{ml}$ 单细胞悬液, 按实验分组加药, 下室加入 $600\mu\text{l}$ 条件培养液; 向上室内加入前期配置好的芹菜素溶液, 浓度分别为 $5\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 设对照组, 每组平均 3 个复孔; 向下室内加入培养好的 Eca-109 细胞, 即趋化因子, 培养 48h; 取出 Transwell 膜, 用棉签头擦掉 Matrigel, 用 PBS 缓冲液反复洗涤 3 次, 后用 95% 乙醇固定, 常规 HE 染色, 揭下 Transwell 膜反贴在载玻片上; 在 200 倍光镜下计数穿膜细胞, 每膜计算

5 个随机不同视野中穿过膜的细胞的个数,取均值。肿瘤细胞侵袭的抑制率 = (对照组平均侵袭细胞数 - 药物组平均侵袭细胞数)/对照平均侵袭细胞数 × 100%。

1.3 统计学方法

应用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较采用单因素方差分

析,两组间比较采用 SNK-*q* 检验,率的资料用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 芹菜素对食管癌 Eca-109 细胞增殖的影响
随着药物浓度的加大,芹菜素对 Eca-109 细胞的生长抑制作用逐渐增强 ($P < 0.001$)。见表 1。

表 1 芹菜素对食管癌 Eca-109 细胞增殖的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	24h		48h		72h	
	A570	抑制率/%	A570	抑制率/%	A570	抑制率/%
空白对照组	0.967 ± 0.020	—	1.121 ± 0.022	—	1.146 ± 0.038	—
低剂量组	0.902 ± 0.032	11.28 *	0.936 ± 0.021	19.45 * [△]	0.798 ± 0.019	37.78 * [△]
中剂量组	0.886 ± 0.029	14.47 *	0.897 ± 0.188	29.49 * [△]	0.667 ± 0.234	49.8 * [△]
高剂量组	0.857 ± 0.016	15.78 *	0.834 ± 0.124	31.21 * [△]	0.532 ± 0.244	67.21 * [△]

注:与同时时间前一浓度相比: * $P < 0.001$;与同浓度前一时间相比: $\Delta P < 0.001$

2.2 芹菜素对食管癌 Eca-109 细胞周期的影响
细胞 Eca-109 经芹菜素作用 24 h 后,大部分细胞被阻滞在 S 期,与此同时 G2 期细胞减少,芹菜素高剂量组与空白对照组比较差别具有统计学意义 ($P < 0.001$)。S 期细胞由阴性对照组的 19.03% 分别提高至 26.30%、30.48% 和 33.88%,而 G2 期细胞则由阴性对照组的 13.07% 分别下降至 9.06%、7.94% 和 5.47%。见图 1。

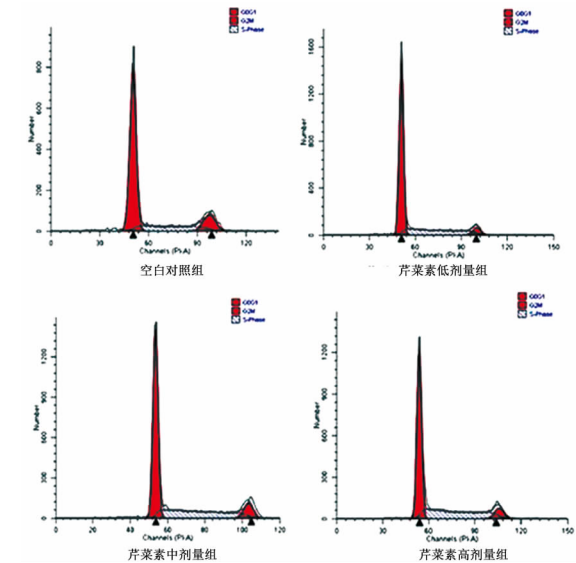


图 1 芹菜素作用 24h 后 Eca-109 细胞周期的变化

2.3 芹菜素对 Eca-109 细胞侵袭力的影响

与空白对照组相比,芹菜素作用 Eca-109 细胞 48h 后,Eca-109 细胞的体外侵袭基底膜能力明显

下降,差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。见表 2。

表 2 芹菜素对 Eca-109 细胞侵袭能力的影响

组别	穿膜细胞数	穿膜抑制率
空白对照组	90.75 ± 5.32	0
芹菜素低剂量组	78.50 ± 3.48 *	22.36 ± 3.56
芹菜素中剂量组	55.50 ± 4.41 [△]	45.85 ± 4.61
芹菜素高剂量组	37.75 ± 3.36 [#]	66.72 ± 3.45

注:与空白对照组相比, * $P < 0.001$;与芹菜素低剂量组相比, $\Delta P < 0.001$;与芹菜素中剂量组相比, $\#P < 0.001$

3 讨论

食管癌 (esophageal cancer, EC) 是我国最常见的消化道恶性肿瘤之一,早期症状隐匿,大多数患者被确诊时已属中晚期,失去了手术的最佳时机,因此化疗、放疗也就成为治疗食管癌的重要手段^[8-10]。化疗、放疗对机体的损伤十分明显,甚至诱发机体新的癌症出现。因此,从中药和其它天然产物中,寻求高效、低毒的新型抗食管癌物质,并深入探讨其抗肿瘤作用机制,是当前国内外研究的重要课题。

芹菜素可人工合成,是一种作用广泛、来源充足、具有广阔开发前景的天然药用植物。芹菜素对多种肿瘤细胞具有抑制癌细胞分裂、增殖,诱导凋亡作用,而对正常的细胞毒性较低,因此,芹菜素可以成为抗肿瘤的新药。已有实验证实,芹菜素可以

有效抑制非小细胞肺癌 HCC827 细胞的增殖^[11], 降低结肠癌 Caco 细胞的增殖^[12]。通过线粒体细胞通路诱导胶质瘤 SHG-44 细胞凋亡^[13]。本文结果显示, 芹菜素能有效抑制食管癌 Eca-109 细胞的生长和增殖, 并且该作用具有剂量依赖性; 另外, 给予不同剂量的芹菜素干预后, 大部分 Eca-109 细胞被阻滞在 S 期, 与此同时 G₂ 期细胞减少, 芹菜素也可控制 Eca-109 食管癌细胞周期的分布, 与对照组细胞相比, 实验组细胞的 G₂/M 期细胞的比例降低, S 期细胞所占比例增高, 这表明芹菜素可使 Eca-109 细胞周期阻滞于 S 期, 而 S 期是细胞 DNA 合成的关键时期, 阻断癌细胞由 S 期向 G₀/M 期的进程, 从而阻滞细胞的有丝分裂, 促使细胞发生凋亡。芹菜素作用食管癌 Eca-109 48h 后细胞的穿膜细胞数, 以及侵袭抑制率均有明显下降趋势, 与空白对照组的细胞相比, 芹菜素各组的细胞穿膜数以及细胞的侵袭能力均受到了不同程度的抑制, 差异具有统计学意义, 说明芹菜素能有效抑制人食管癌 Eca-109 细胞侵袭。

综上所述, 芹菜素能有效抑制人食管癌 Eca-109 细胞增殖, 明显降低人食管癌 Eca-109 细胞侵袭^[14], 在天然的抗肿瘤药物的研发方面, 芹菜素有广阔的发展前景。后续要对其抗食管癌机制进行更为深入的研究, 以期早日将其应用于食管癌这种疾病的临床治疗。

参考文献:

- [1] 刘欢, 杨周萍, 金桂芳, 等. 芹菜素对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖的影响及机制研究[J]. 广东药学院学报, 2016, 32 (6): 743-746. DOI: 10. 16809/j. cnki. 1006-8783. 2016082601.
- [2] BLOCK M J. Chemecyclopedia[M]. Washington, DC: American Chemical Society, 2001: 107.
- [3] 张连美, 仲纪祥, 孙苏安. EGFR、ALK 和 Ki-67 在非小细胞肺癌中的表达及相关性分析[J]. 临床肺科杂志, 2017, 22 (1): 4-7. DOI: 10. 3969/j. issn. 1009-6663. 2017. 01. 002.
- [4] Zhao G, Han X, Cheng W, et al. Apigenin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cells[J]. Oncol Rep, 2017, 37 (4): 2277-2285. DOI: 10. 3892/or. 2017. 5450.
- [5] Meng S, Zhu Y, Li JF, et al. Apigenin inhibits renal cell carcinoma cell proliferation[J]. Oncotarget, 2017, 8 (12): 19834-19842. DOI: 10. 18632/oncotarget. 15771.
- [6] Sun Q, Lu NN, Feng L. Apigenin inhibits gastric cancer progression through inducing apoptosis and regulating ROS-modulated STAT3/JAK2 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 498 (1): 164-170. DOI: 10. 1016/j. bbr. 2018. 02. 009.
- [7] Mei X, Wu YY, Mao X, et al. Antagonism of phenanthrene cytotoxicity for human embryo lung fibroblast cell line HFL-I by green tea polyphenols[J]. Environ Pollut, 2011, 159 (1): 164-168. DOI: 10. 1016/j. envpol. 2010. 09. 010.
- [8] 周鹏飞, 李娟. 丹参酮 II A 通过调控上皮间质转化抑制食管癌 EC9706 和 KYSE70 细胞的凋亡、侵袭和迁移[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2018, 25 (12): 1244-1250. DOI: 10. 3872/j. issn. 1007-385x. 2018. 12. 006.
- [9] 刘宏斌, 朱燕, 杨其昌, 等. siRNA 沉默 ADAM17 基因对食管癌 EC109 细胞增殖的影响[J]. 江苏医药, 2019, 45 (6): 599-601. DOI: 10. 19460/j. cnki. 0253-3685. 2019. 06. 018.
- [10] 王加茹, 徐宛婷, 朴仙姬, 等. 隐丹参酮诱导人食管癌 HCE-4 细胞凋亡的机制[J]. 肿瘤防治研究, 2018, 45 (8): 533-539. DOI: 10. 3971/j. issn. 1000-8578. 2018. 17. 1582.
- [11] 王林梅, 冯青青, 齐景宪, 等. 芹菜素对非小细胞肺癌细胞 HCC827 增殖、凋亡的影响及机制[J]. 中国老年学杂志, 2019, 39 (3): 640-642.
- [12] 郭闪, 田春鸿, 贺元, 等. 芹菜素在 Caco-2 细胞的摄取研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2018, 25 (2): 74-78. DOI: 10. 3969/j. issn. 1005-5304. 2018. 02. 017.
- [13] 徐旋旋, 石磊, 张曙光, 等. 芹菜素对人胶质瘤 SHG-44 细胞增殖抑制和诱导凋亡的作用[J]. 江苏医药, 2016, 42 (22): 2421-2424, 封 2.
- [14] Shin EJ, Sung MJ, Park JH, et al. Poly-γ-glutamic acid induces apoptosis via reduction of COX-2 expression in TPA-induced HT-29 human colorectal cancer cells[J]. Int J Mol Sci, 2015, 16 (4): 7577-7586. DOI: 10. 3390/ijms16047577.

(收稿日期 2019-08-15)

(本文编辑:石俊强)