

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2020.14.001  
文章编号: 1005-8982(2020)14-0001-06

基础研究·论著

## 木犀草素对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞凋亡及自噬的影响\*

龚永媚<sup>1</sup>, 房子倩<sup>1</sup>, 徐昊<sup>1</sup>, 黄建华<sup>2</sup>, 黄克强<sup>1</sup>

(1. 锦州医科大学附属第二医院 正畸科, 辽宁 锦州 121004; 2. 锦州医科大学附属第一医院 外科学重点实验室, 辽宁 锦州 121000)

**摘要:** **目的** 探究木犀草素对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞体外凋亡和自噬作用的影响。**方法** 采用 MTT 法观察 12.5、25.0、50.0 及 100.0  $\mu\text{mol/L}$  的木犀草素作用 24 h 对细胞体外活性的影响; 运用 Hoechst33342 染色法和流式细胞术观察体外细胞凋亡情况; Western blotting 检测 Cleaved Caspase-3 蛋白、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤-2 相关 X 蛋白 (Bax) 和 Beclin1 蛋白、P62 蛋白及 LC3B 蛋白。**结果** MTT 法实验结果显示, 木犀草素抑制 Tca8113 细胞增殖, IC<sub>50</sub> 为 47  $\mu\text{mol/L}$ 。Hoechst33342 染色结果显示, 木犀草素使 Tca8113 细胞形态发生改变, 与时间呈正相关 ( $P < 0.05$ )。流式细胞术结果表明, 47  $\mu\text{mol/L}$  的木犀草素作用 Tca8113 细胞 12、24 h 后, 凋亡率高于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。Western blotting 检测结果表明, 木犀草素抑制 Bcl-2 以及增加 Bax 表达, 导致 Cleaved Caspase-3 表达增加, 促进 Tca8113 细胞凋亡 ( $P < 0.05$ ); 同时还升高 Beclin1、LC3B、P62 蛋白水平 ( $P < 0.05$ )。**结论** 木犀草素影响人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞凋亡和自噬的发生。

**关键词:** 舌癌 / 舌肿瘤; 木犀草素; 细胞增殖; 细胞凋亡; 自噬

**中图分类号:** R739.86

**文献标识码:** A

## Effects of luteolin on apoptosis and autophagy of human tongue squamous cell carcinoma Tca8113\*

Yong-mei Gong<sup>1</sup>, Zi-qian Fang<sup>1</sup>, Hao Xu<sup>1</sup>, Jian-hua Huang<sup>2</sup>, Ke-qiang Huang<sup>1</sup>

(1. Department of Orthodontics, The Second Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121004, China; 2. Key Laboratory of Surgery, The First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of luteolin (Luteolin, Lut) on apoptosis and autophagy in human tongue squamous cell carcinoma Tca8113 cells in vitro. **Methods** MTT assay was used to observe the effects of (12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ ) Lut on cell activity in vitro after 24 hours. Hoechst33342 and flow cytometry were used to observe cell apoptosis. Western blotting revealed changes in the protein expression of Cleaved Caspase-3, b-lymphocytoma-2 (Bcl-2), b-lymphocytoma-2-related X protein (Bax), and Beclin1, P62 and LC3B proteins. **Results** MTT assay results showed that Lut significantly inhibited the proliferation of Tca8113 cells with IC<sub>50</sub> of 47  $\mu\text{mol/L}$ . Hoechst33342 staining showed that Lut could change the morphology of Tca8113 cells, which was positively correlated with time. Annexin V/PI double staining results showed that the apoptosis rate of Tca8113 cells treated with 47  $\mu\text{mol/L}$  Lut for 12h and 24h was higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). Western Blotting

收稿日期: 2020-01-22

\* 基金项目: 辽宁省教育厅重点实验室建设项目 (No: LZ2015051, 2015020326)

[通信作者] 黄克强, E-mail: hkq9@163.com; Tel: 18604166399

showed that Lut inhibited Bcl-2 and increased Bax expression, leading to increasing Cleaved Caspase-3 expression and promoting Tca8113 cell apoptosis ( $P < 0.05$ ). Beclin1, LC3B and P62 protein levels were also increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Apoptosis and autophagy of tongue cancer cell line Tca8113 may be caused by Luteolin.

**Keywords:** tongue cancer/tongue neoplasms; Luteolin; apoptosis; autophagy

据相关文献报道, 尽管全球口腔癌的发病率呈下降趋势, 但舌癌的发病率却在增加, 其在口腔肿瘤中排名第 1 位<sup>[1]</sup>。目前, 手术为医治舌部肿瘤的关键方法, 并辅助其他治疗手段。但是患者声带被手术破坏, 可能使其遭受身体和心理双重的打击<sup>[2]</sup>。积极寻找安全、副作用小, 乃至无副作用的天然药物, 对舌癌的治疗显得十分必要。

木犀草素存于诸多类型的植物中, 是一种很重要的天然药物, 在体内外均有很有效的抗癌作用<sup>[3]</sup>。可作为抗各种类型人类恶性肿瘤的抗癌剂, 如肺癌<sup>[4]</sup>、乳腺癌<sup>[5]</sup>及黑色素瘤<sup>[6]</sup>。已有实验表明, 舌癌细胞系 Tca8113 的凋亡可由木犀草素的作用而发生, 但是如何发生凋亡, 内在的机理尚未完全研究明确<sup>[7]</sup>。本文探索木犀草素对 Tca8113 细胞凋亡和自噬的影响进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

木犀草素规格: 1G (药物浓度  $\geq 98\%$ ), 分子式: C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, 摩尔质量: 286.24, 识别码: 491-70-3。Tca8113 细胞株购于中国科学院上海细胞库, FBS (GIBCO) 购于美国 Invitrogen 公司, RPMI 1640 细胞培养基购于北京索莱宝生物科技有限公司, MTT 溶液购于美国 Sigma 公司, 兔抗人 Bcl-2/Bax/Cleaved Caspase-3 及  $\beta$ -actin 单抗, 以及 P62、Beclin1 购于沈阳万类生物科技有限公司, LC3B 购于美国 CST 公司, HRP-labeled Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) 抗体购于上海碧云天生物技术有限公司, Annexin V-FITC 凋亡试剂盒购于北京四正柏生物科技有限公司, 木犀草素购于南京景竹生物科技有限公司。

美国 BD 公司 (Verse) 流式细胞检测仪, 美国 Thermo 公司 Multiskan FC 酶标仪和 Proteinsimple 9 自动凝胶成像仪, 德国 BIO-RAD 公司电泳仪, 德国 LEICA 公司 DMILED 倒置显微镜。

### 1.2 方法

**1.2.1 舌癌细胞培养** RPMI 1640 培养基培养 Tca8113 细胞, 置于 37℃、5% 二氧化碳环境中。每天查看细胞生长情况, 培养基营养不足时及时更换,

待培养皿内细胞生长约 90%, 并且细胞状态良好, 即可传代。

**1.2.2 MTT 法检测细胞增殖** 取 Tca8113 细胞 ( $8 \times 10^4$  个/孔) 接种于 96 孔板中, 过夜。分别加入 12.5、25.0、50.0 及 100.0  $\mu\text{mol/L}$  木犀草素, 并设空白对照组。24 h 后, 现配 20  $\mu\text{l}$  MTT 溶液加入孔中, 4 h 后取针头抽上清, 将 150  $\mu\text{l}$  DMSO 加入其中, 轻轻用手敲板四侧, 使其混匀; 用酶标仪测 570 nm 波长处的光密度 (optical density, OD) 值。抑制率 (%) =  $(1 - \text{加药细胞组 OD 值} / \text{未加药细胞组 OD 值}) \times 100\%$ 。

**1.2.3 Hoechst33342 检测药物对细胞凋亡的影响** 取 Tca8113 细胞 ( $5 \times 10^5$  个/孔), 接种于直径为 20 mm 的 12 孔板中。细胞在培养皿底延伸开, 晃动培养基细胞不动时, 每孔加木犀草素 47  $\mu\text{mol/L}$ , 设 2 个复孔, 分别于 6、12 及 24 h 后, 加入染色液作用 30 min, PBS 轻轻清洗 3 次, 镜下观察实验的变化情况, 记录实时实验数据。

**1.2.4 流式细胞术检测细胞凋亡** 接种  $2 \times 10^5$  个/孔 Tca8113 细胞, 然后均匀铺在 3 个 100 mm 大培养皿中, 孵育 48 h, 每孔加入木犀草素 47  $\mu\text{mol/L}$ , 分别作用 12、24 h 后, 收集细胞在 10 ml 离心管中。加入 Annexin V/FITC 和 PI, 操作时按照说明书进行。为确保实验准确性, 流式细胞仪检测需要在 1 h 内进行。

**1.2.5 Western blotting 检测凋亡相关蛋白** 配制浓度为 47  $\mu\text{mol/L}$  的药液, 加入培养 Tca8113 细胞的大培养皿中, 按照 1、3、6、12 及 24 h 时间点收集细胞 (同时设定不加药组作为对照组)。按照说明书中操作方法提取细胞总蛋白, 并测定蛋白浓度后制样, 然后按序进行电泳、转膜, 2% 封闭液封闭 90 min; 孵上相应一抗。4℃ 冰箱, 摇床过夜。将制好的二抗完全覆盖住 PVDF 膜, 孵育 1 h。用高敏 ECL 化学发光试剂检测。

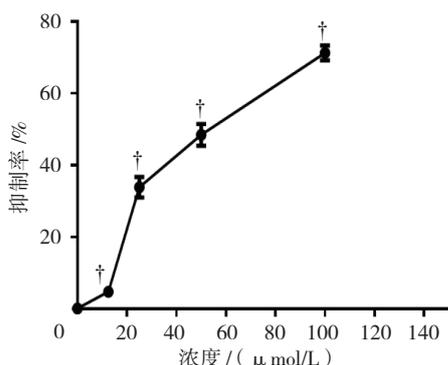
### 1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.00 统计软件。计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 比较用方差分析, 进一步两两比较用 LSD- $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 木犀草素抑制 Tca8113 细胞增殖

不同浓度木犀草素处理 Tca8113 细胞。24 h 后细胞增殖抑制率分别为  $(4.76 \pm 0.46)\%$ 、 $(33.91 \pm 2.88)\%$ 、 $(48.61 \pm 2.81)\%$  和  $(71.67 \pm 1.78)\%$ , 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 6.412, P = 0.000$ ), 进一步两两比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。细胞抑制率随着浓度的增大而增高。IC50 为  $47 \mu\text{mol/L}$ 。见图 1。



† 与  $0 \mu\text{mol/L}$  组 (空白对照组) 比较,  $P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度的木犀草素对 Tca8113 细胞增殖的影响

### 2.2 木犀草素对 Tca8113 细胞凋亡的影响

Hoechst33342 染色后, 在荧光显微镜下可见, 未加药组对照组细胞生长形状规则, 染色均匀, 经  $47 \mu\text{mol/L}$  的木犀草素作用 6、12 及 24 h 后, 随着时间的延长, 细胞核的荧光亮度越高。见图 2。

Annexin V/FITC 和 PI 双染结果见图 3。给药 0、12 及 24 h 后细胞凋亡率分别为  $(0.37 \pm 0.32)\%$ 、 $(9.51 \pm 0.56)\%$  和  $(14.75 \pm 0.76)\%$ , 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $F = 478.915, P = 0.005$ ), 与对照组比较, 12 和 24 h 细胞凋亡水平升高, 24 h 细胞凋亡水平高于 12 h ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 不同时间点 Bax、Bcl-2 及 Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量比较

Western blotting 结果显示, 木犀草素作用 Tca8113 细胞 1、3、6、12 及 24 h 后, Bax、Bcl-2 及 Cleaved Caspase-3 蛋白相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), Bax、Cleaved Caspase-3 的表达量随着时间的延长而增加; 而 Bcl-2 表达量随着时间的延长而呈降低趋势。见表 1 和图 4。

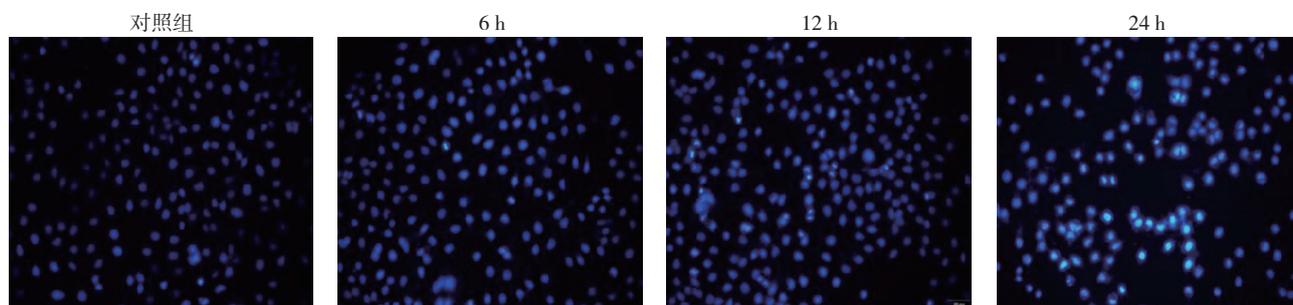


图 2 不同时间点木犀草素对 Tca8113 细胞凋亡的影响 (×200)

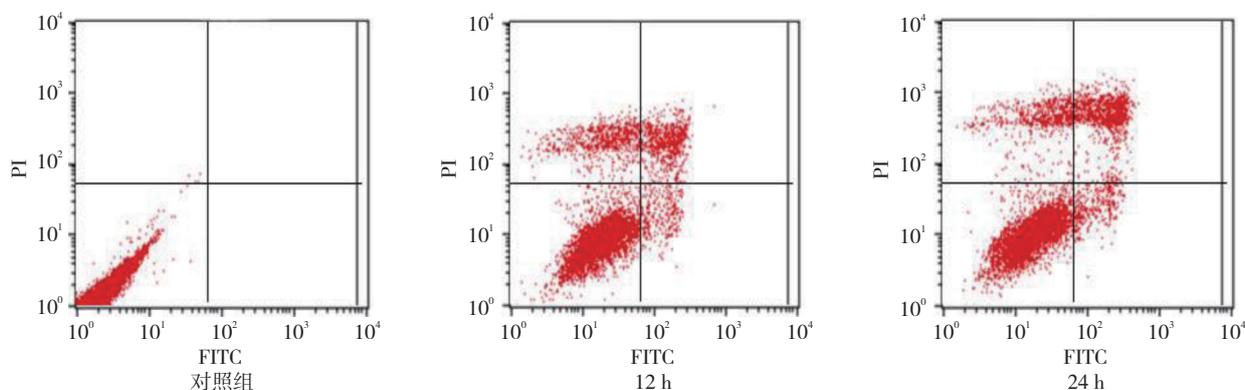


图 3 流式细胞术检测木犀草素对 Tca8113 细胞凋亡的影响

表 1 不同时间点 Bax、Bcl-2 及 Cleaved Caspase-3 蛋白的相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

蛋白	对照组	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	F 值	P 值
Bax	0.84 ± 0.08	1.02 ± 0.07	1.09 ± 0.05	1.35 ± 0.09	1.73 ± 0.02	2.06 ± 0.03	146.414	0.000
Bcl-2	2.11 ± 0.08	1.78 ± 0.03	1.54 ± 0.07	1.12 ± 0.14	1.21 ± 0.05	0.64 ± 0.01	118.182	0.000
Cleaved Caspase-3	0.15 ± 0.01	0.34 ± 0.05	0.57 ± 0.04	0.74 ± 0.05	1.2 ± 0.10	1.3 ± 0.04	215.157	0.000

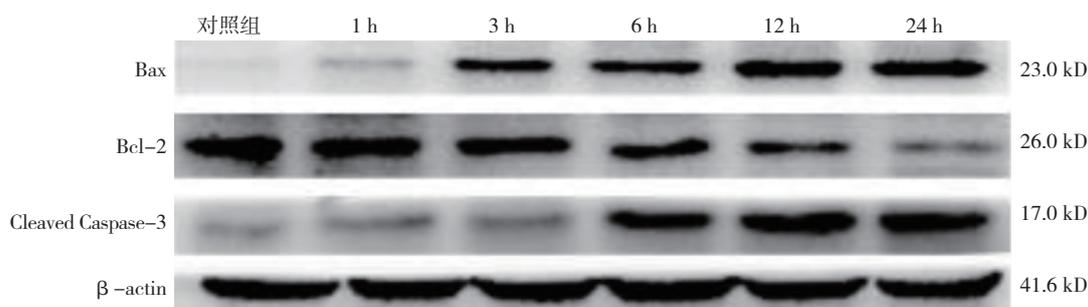


图 4 木犀草素对 Tca8113 细胞 Bax、Bcl-2 及 Cleaved Caspase-3 蛋白表达量的影响

## 2.4 自噬相关蛋白表达情况

Western blotting 检测结果显示,木犀草素作用 1、3、6、12 及 24 h 后, Tca8113 细胞自噬 P62、Beclin1 及

LC3B 蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), P62、Beclin1 及 LC3B 蛋白水平随着时间的延长而增加。见表 2 和图 5。

表 2 木犀草素作用 1、3、6、12 及 24 h 后 Tca8113 细胞自噬 P62、LC3B 及 Beclin1 蛋白相对表达量比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

自噬蛋白	对照组	1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	F 值	P 值
P62	0.16 ± 0.01	0.203 ± 0.01	0.26 ± 0.01	0.324 ± 0.03	0.44 ± 0.04	0.53 ± 0.07	48.713	0.000
Beclin1	0.72 ± 0.05	0.82 ± 0.06	1.13 ± 0.14	1.22 ± .017	1.34 ± 0.12	1.44 ± 0.31	20.833	0.000
LC3B	0.23 ± 0.01	0.45 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.50 ± 0.01	0.56 ± 0.01	0.60 ± 0.01	727.672	0.000

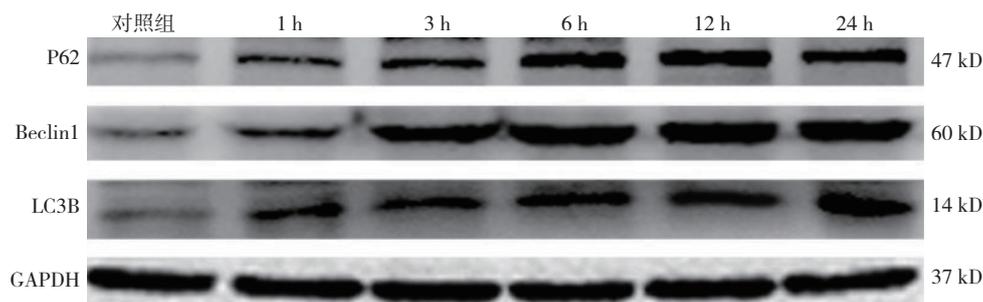


图 5 木犀草素对 Tca8113 细胞自噬 P62、LC3B 及 Beclin1 蛋白表达量的影响

## 3 讨论

通过纯化工工艺可以从多种植物中提取木犀草素。目前从植物中提纯的木犀草素应用于临床治疗各种疾病,例如炎症性疾病、高血压及各种肿瘤疾病。木犀草素可抑制肿瘤细胞的增殖,通过不同的信号传导途径

诱导细胞凋亡来阻断体外和体内的癌症发展<sup>[8-11]</sup>。有研究指出,木犀草素会影响舌癌细胞的活性,进而促进癌细胞的凋亡和转移等<sup>[7]</sup>,但木犀草素抑制癌细胞的具体机制尚不清楚。

细胞凋亡和自噬是细胞程序性死亡的两种形式。

癌症发生的标志正是凋亡细胞死亡机制的失控<sup>[12]</sup>。影响凋亡的关键蛋白酶家族为 Caspase。调节并控制凋亡最主要癌基因之一是 *Bcl-2*, 这是一条内在调节途径, 而 *Bcl-2* 基因正是门户开关, 癌细胞凋亡受到限制是因为蛋白出现过多; 内在途径程序开启后, 也使 Bax 蛋白启动, MOMP 受到破坏, 细胞色素 C 释放到细胞质中, 下游的 Caspase 被激活<sup>[13-14]</sup>。Caspase 对细胞凋亡机制有十分重要的影响, 其包括启动子和终止子, 其中最核心的是 Caspase-3 蛋白。Caspase 作为启动子通过自身蛋白水解自动启动, 切断终止子 Caspase, 终止子 Caspase 对特定细胞参与生物化学反应的物质进行临界裂解, 最终导致凋亡细胞死亡激活 Caspase-9<sup>[15]</sup>。本实验通过 Image J 软件得出蛋白量值, 结果显示木犀草素作用 Tca8113 细胞后, *Bcl-2* 蛋白水平下降, Cleaved Caspase-3 与 Bax 蛋白水平提高, 表明木犀草素对舌癌 Tca8113 细胞的凋亡作用可以通过 *Bcl-2*、Bax 及 Cleaved Caspase-3 的途径实现。

自噬是一种机制, 通过该机制将细胞物质递送至溶酶体进行降解, 从而允许细胞组分的基础更新并提供能量和大分子前体。然而在癌症中, 其作用相反, 并且依赖于环境, 与肿瘤的产生和恶化密切相关, 其自噬水平会升高, 当外界的情况发生变化时, 细胞提高自噬程度以更好地适应环境; 而细胞凋亡就是自噬水平过度变化导致<sup>[16-17]</sup>。本实验检测 LC3B、P62 及 Beclin1 蛋白的表达量, 探究其在细胞中是否发生了自噬<sup>[18-20]</sup>。LC3B 和 Beclin1 蛋白表达量随自噬水平的升高而升高<sup>[21]</sup>。自噬降解通路受损时, 提高 P62 蛋白水平<sup>[22]</sup>。本研究发现, 木犀草素增加 LC3B、Beclin1 及 P62 蛋白表达水平, 表明木犀草素可能激活细胞的自噬。

综上所述, 木犀草素作为自然界天然物质, 能够有效抑制舌癌 Tca8113 体外活性, 可通过提高 *Bcl-2*、Cleaved Caspase-3 蛋白水平, 降低 Bax 蛋白水平, 促进细胞的凋亡; 同时伴有细胞自噬性死亡, 表明木犀草素对舌癌有治疗作用。本实验为更深层次探索木犀草素对舌癌 Tca8113 细胞的影响打下很好的基础。

#### 参 考 文 献:

- [1] GHANTOUS Y, ELNAAJ I A. Global incidence and rise factors of oral cancer[J]. Harefuah, 2017, 156(10): 645-649.
- [2] FENG C J, SU X, YIN S C, et al. MicroRNA-532-3p suppresses malignant behaviors of tongue squamous cell carcinoma via regulating CCR7[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10: 940.
- [3] IMRAN M, RAUF A, ABU-IZNEID T, et al. A flavonoid, as an anticancer agent: A review[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 112: 108612.
- [4] YU Q, ZHANG M, YING Q, et al. Decrease of AIM2 mediated by luteolin contributes to non-small cell lung cancer treatment[J]. Cell Death Dis, 2019, 10(3): 218.
- [5] HUANG L, JIN K, LAN H. Luteolin inhibits cell cycle progression and induces apoptosis of breast cancer cells through downregulation of human telomerase reverse transcriptase[J]. Oncol Lett. 2019, 17(4): 3842-3850.
- [6] LI C, WANG Q, SHEN S, et al. HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling-mediated epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis is critically involved in anti-metastasis effect of luteolin in melanoma cells[J]. Phytother Res. 2019, 33(3): 798-807.
- [7] 张元. 木犀草素通过 PI3K-Akt-NF- $\kappa$ B 信号通路影响人舌鳞癌 Tca8113 细胞的增殖、凋亡和转移 [D]. 兰州: 兰州大学, 2017.
- [8] MANZOOR M F, AHMAD N, AHMED Z, et al. Novel extraction techniques and pharmaceutical activities of luteolin and its derivatives[J]. J Food Biochem. 2019, DOI: 10.1111/jfbc.12974.
- [9] ALEKHIA-SITA G J, GOWTHAMI M, SRIKANTH G, et al. Protective role of luteolin against bisphenol a-induced renal toxicity through suppressing oxidative stress, inflammation, and upregulating Nrf2/ARE/ HO-1 pathway[J]. IUBMB Life. 2019, 71(7): 1041-1047.
- [10] OYAGBEMI A A, OMOBOWALE T O, OLA-DAVIES O E, et al. Luteolin-mediated Kim-1/NF- $\kappa$ B/Nrf2 signaling pathways protects sodium fluoride-induced hypertension and cardiovascular complications[J]. Biofactors. 2018, 44(6): 518-531.
- [11] WANG Q, WANG H, JIA Y, et al. Luteolin induces apoptosis by ROS/ER stress and mitochondrial dysfunction in gliomablastoma[J]. Cancer Chemotherapy and Pharmacology, 2017, 79(5): 1031-1041.
- [12] 张建, 赵红伟, 胡义亭. 盐酸小檗碱对肝星状细胞自噬和凋亡的影响 [J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(5): 19-26.
- [13] DANIAL N N, KORSMEYER S J. Cell death: Critical Control Points[J]. Cell, 2004, 116(2): 205-219.
- [14] ZHANG D, WANG A, FENG J, et al. Ginsenoside Rg5 induces apoptosis in human esophageal cancer cells through the phosphoinositide-3 kinase/protein kinase B signaling pathway[J]. Mol Med Rep. 2019, 19(5): 4019-4026.
- [15] KIM J S, CHO I A, KANG K R, et al. Reversine induces caspase-dependent apoptosis of human osteosarcoma cells through extrinsic and intrinsic apoptotic signaling pathways[J]. Genes Genomics. 2019, 41(6): 657-665.
- [16] LI Y J, LEI Y H, YAO N, et al. Autophagy and multidrug

- resistance in cancer[J]. Chin J Cancer. 2017, 36(1): 52.
- [17] KIMMELMAN A C, WHITE E. Autophagy and tumor metabolism[J]. Cell Metab. 2017, 25(5): 1037-1043.
- [18] HECKMANN B L, GREEN D R. LC3-associated phagocytosis at a glance[J]. J Cell Sci. 2019, DOI: 10.1242/jcs.222984.
- [19] ISLAM M A, SOORO M A, ZHANG P H. Autophagic regulation of p62 is critical for cancer therapy[J]. Int J Mol Sci. 2018, DOI: 10.3390/ijms19051405.
- [20] MENON M B, DHAMIJA S. Beclin 1 phosphorylation-at the center of autophagy regulation[J]. Front Cell Dev Biol. 2018, 6: 137.
- [21] LI R, DU J H, YAO G M, et al. Autophagy: a new mechanism for regulating VEGF and PEDF expression in retinal pigment epithelium cells[J]. Int J Ophthalmol. 2019, 12(4): 557-562.
- [22] KATSURAGI Y, ICHIMURA Y, KOMATSU M. P62/SQSTM1 functions as a signaling hub and an autophagy adaptor[J]. FEBS J. 2015, 282(24): 4672-4678.

(唐勇 编辑)

本文引用格式：龚永媚，房子倩，徐昊，等．木犀草素对人舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞凋亡及自噬的影响 [J]．中国现代医学杂志，2020，30(14): 1-6.