

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research黄芩素联合 5 - 氟尿嘧啶调控小细胞肺癌
H446 细胞恶性生物学行为的研究Research on regulation of baicalein combined with 5 - fluorouracil in regulating
the malignant biological behavior of small cell lung cancer H446 cells

刘志广, 王学中, 杜亚龙

(新乡市中心医院 胸瘤一科, 河南 新乡 453600)

LIU Zhi - guang,

WANG Xue - zhong,

DU Ya - long

(Department of Thoracic Surgery,
Xinxiang Central Hospital, Xinxiang
453000, Henan Province, China)

摘要:目的 探索黄芩素联合 5 - 氟尿嘧啶(5 - FU)对肺癌 H466 细胞增殖、凋亡及迁移的影响。方法 将肺癌 H466 细胞分成空白组、对照组、实验组和联合组。空白组给予 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二甲基亚砜;对照组给予 $20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素;实验组给予 $20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 - FU;联合组给予 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素 + $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5 - FU。用细胞计数试剂盒 - 8(CCK - 8)实验法检测细胞存活率,用流式细胞仪检测细胞凋亡情况和活性氧(ROS)水平,用 Transwell 法检测细胞迁移情况,用蛋白质印迹法检测丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路蛋白表达水平变化情况。

结果 空白组、对照组、实验组和联合组 24 h 后存活率分别为 $(114.34 \pm 2.88)\%$ 、 $(79.87 \pm 3.48)\%$ 、 $(57.66 \pm 1.82)\%$ 和 $(40.31 \pm 2.73)\%$, 细胞凋亡率分别为 $(14.47 \pm 1.36)\%$ 、 $(33.94 \pm 4.33)\%$ 、 $(49.20 \pm 3.82)\%$ 和 $(49.17 \pm 2.13)\%$, 细胞迁移率分别为 $(8.43 \pm 1.94)\%$ 、 $(11.25 \pm 1.55)\%$ 、 $(26.74 \pm 3.13)\%$ 和 $(68.83 \pm 4.32)\%$, 试验组和联合组的上述指标与对照组比较均显著升高,且联合组的上述指标均显著高于试验组(均 $P < 0.01$)。在联合组中加入 ROS 清除剂 NAC 后,空白组、对照组、实验组、联合组和联合组 + NAC 的细胞凋亡率分别为 $(7.82 \pm 0.94)\%$ 、 $(12.31 \pm 2.13)\%$ 、 $(33.48 \pm 4.92)\%$ 、 $(52.42 \pm 3.17)\%$ 和 $(30.39 \pm 2.72)\%$;细胞迁移率分别为 $(4.36 \pm 0.54)\%$ 、 $(4.92 \pm 0.71)\%$ 、 $(31.43 \pm 3.14)\%$ 、 $(52.64 \pm 5.26)\%$ 和 $(27.61 \pm 3.52)\%$, 联合组 + NAC 的上述指标与联合组相比均显著降低(均 $P < 0.01$)。空白组、实验组、对照组、联合组和联合组 + NAC 的 p - JNK 蛋白相对表达水平分别为 0.78 ± 0.05 、 0.70 ± 0.04 、 0.73 ± 0.03 、 0.98 ± 0.02 和 0.73 ± 0.05 ;p - p38 相对表达水平分别为 0.56 ± 0.02 、 0.51 ± 0.03 、 0.60 ± 0.04 、 0.76 ± 0.06 和 0.54 ± 0.03 ;p - ERK 相对表达水平分别为 0.34 ± 0.03 、 0.30 ± 0.04 、 0.28 ± 0.04 、 0.18 ± 0.03 和 0.33 ± 0.05 。联合组的 p - JNK 和 p - p38 蛋白相对表达水平与对照组比较均显著升高,p - ERK 蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.01$);联合组 + NAC 的 p - JNK 和 p - p38 低蛋白相对表达水平均显著降低,p - ERK 蛋白相对表达水平显著升高(均 $P < 0.01$)。

结论 黄芩素联合 5 - FU 能够通过上调肺癌 H446 细胞中的 ROS 水平,激活 JNK 及 p38 信号通路,抑制 ERK 信号通路,进一步增强 5 - FU 对 H446 细胞的增殖抑制、诱导凋亡及抑制迁移作用。

关键词:黄芩素;5 - 氟尿嘧啶;小细胞肺癌 H446 细胞;活性氧;丝裂原活化蛋白激酶信号通路

DOI:10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.17.010

中图分类号:R28 **文献标志码:**A

文章编号:1001-6821(2025)17-2453-06

基金项目:河南省医学科技攻关计划基金资助项目(SB201901080)

作者简介:刘志广(1983 -),男,副主任医师,主要从事胸部肿瘤的相关工作和研究

通信作者:刘志广

MP:13598645497

E - mail: zzzgg8311@163.com

Abstract: Objective To investigate the effects of baicalein combined with 5 - fluorouracil (5 - FU) on the proliferation, apoptosis and migration of H446 cells, and to explore the sensitization mechanism.

Methods Lung cancer H466 cells were allocated into blank, control, experimental and combination groups. The blank group was treated with $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dimethyl sulfoxide, the control group with $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ baicalein, the experimental group with $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-FU, and the combination group with $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ baicalein plus $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-FU. Cell viability was determined using the cell counting kit-8 assay. Apoptosis and reactive oxygen species (ROS) levels were analyzed by flow cytometry. Cell migration was evaluated with Transwell assays, and alterations in mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway protein expression were examined by Western blotting. **Results** After 24 h of incubation, cell viability in blank, control, experimental and combination groups were $(114.34 \pm 2.88)\%$, $(79.87 \pm 3.48)\%$, $(57.66 \pm 1.82)\%$ and $(40.31 \pm 2.73)\%$, respectively; the corresponding apoptosis rates were $(14.47 \pm 1.36)\%$, $(33.94 \pm 4.33)\%$, $(49.20 \pm 3.82)\%$ and $(49.17 \pm 2.13)\%$; and cell migration rates were $(8.43 \pm 1.94)\%$, $(11.25 \pm 1.55)\%$, $(26.74 \pm 3.31)\%$ and $(68.83 \pm 4.32)\%$. Compared with control group, the above indexes of experimental group and combined group were significantly increased, and combined group were significantly higher than experimental group (all $P < 0.01$). After adding ROS scavenger NAC to combination group, the apoptosis rates of blank group, control group, experimental group, combination group and combination group + NAC were $(7.82 \pm 0.94)\%$, $(12.31 \pm 2.13)\%$, $(33.48 \pm 4.92)\%$, $(52.42 \pm 3.17)\%$ and $(30.39 \pm 2.72)\%$, respectively; the cell migration rates were $(4.36 \pm 0.54)\%$, $(4.92 \pm 0.71)\%$, $(31.43 \pm 3.14)\%$, $(52.64 \pm 5.26)\%$ and $(27.61 \pm 3.52)\%$, respectively. Compared with combined group, the above indexes of combined group + NAC were significantly decreased (all $P < 0.01$). The relative expression levels of p-JNK protein in blank, experimental, control, combination and combination group + NAC were 0.78 ± 0.05 , 0.70 ± 0.04 , 0.73 ± 0.03 , 0.98 ± 0.02 and 0.73 ± 0.05 , respectively; the relative expression levels of p-p38 were 0.56 ± 0.02 , 0.51 ± 0.03 , 0.60 ± 0.04 , 0.76 ± 0.06 and 0.54 ± 0.03 , respectively; the relative expression levels of p-ERK were 0.34 ± 0.03 , 0.30 ± 0.04 , 0.28 ± 0.04 , 0.18 ± 0.03 and 0.33 ± 0.05 , respectively. The relative expression levels of p-JNK and p-p38 protein in combination group were significantly higher than those in control group, and the relative expression levels of p-ERK protein were significantly lower (all $P < 0.01$); the relative expression levels of p-JNK and p-p38 low protein in combined group + NAC were significantly decreased, while the relative expression levels of p-ERK protein were significantly increased (all $P < 0.01$). **Conclusion** The combination of baicalein and 5-FU can enhance the inhibitory effect on proliferation, induce apoptosis, and suppress migration in H466 cells by upregulating ROS levels, activating the JNK and p38 pathways, and inhibiting the ERK pathway.

Key words: baicalein; 5-fluorouracil; small cell lung cancer H446 cell; reactive oxygen species; mitogen-activated protein kinase signaling pathway

肺癌是全世界范围内发病率和死亡率最高的癌症,肺癌患者的5年生存率不足10%^[1-2]。当前化疗药物大多都会抑制骨髓造血系统,主要是白细胞和血小板的下降,且存在耐药性的问题^[3]。化疗药物联合中药及免疫治疗效果比单独用药效果更好,且可能降低患者对药物的耐药性,已广泛作为化疗的辅助治疗手段^[4]。黄芩素是中药黄芩中提取出来的黄酮类化合物,可以降低脑血管阻力,在临床多用于脑血管病治疗^[5-6]。研究显示,黄芩素对胰腺导管癌、卵巢癌、黑色素瘤及宫颈癌等多种癌细胞均有较好的抑制作用,还能够增强顺铂、吉西他滨等化疗药物的抗癌活性^[7]。本研究旨在探索黄芩素联合5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)对H466细胞增殖及凋亡的影响。

材料与方法

1 材料

细胞株 人肺癌H446细胞系和人正常肺细胞IMR-90,均购自中国科学院细胞研究所。

试剂 黄芩素,规格:每管1 g,纯度:99%,批号:S25956,购自上海源叶生物科技有限公司;5-FU,规格:每管5 mg,纯度:99%,批号:F668385,购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;N-乙酰半胱氨酸酰胺(N-acetyl-L-cysteine, NAC)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)清除剂,规格:2 g,纯度:99.99%,批号:Ncl78547,购自上海西格玛奥德里奇贸

易有限公司;细胞计数试剂盒-8 (cell counting kit-8, CCK-8)、2,7-二氯二氢荧光素二乙酸酯(2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)和细胞凋亡检测试剂盒,均购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司;丝裂原活化蛋白激酶p38(mitogen activated protein kinase p38, p38)、磷酸化(phosphorylated, p-p38)、细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)、p-ERK、应激活化蛋白激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和p-JNK一抗,均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。

仪器 4300 酶标仪,美国 Awareness 公司产品;LSRFortessa 流式细胞仪,美国 BD 公司产品;YYJ-700 显微镜,北京金相公司产品;Mini-PROTEAN Tetra + Mini Trans-Blot WB 蛋白电泳仪电泳槽,上海艾研生物科技有限公司产品。

2 实验方法

2.1 溶液配制

黄芩素溶液配制 将黄芩素 1 g 溶解在二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 354 mL 中,得到 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储存液,置于室温中保存。临用时,用蒸馏水稀释为 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

5-FU 溶液配制 将 5-FU 5 mg 溶解在 DMSO 384 mL 中,得到 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的储存液,置于室温中保存。临用时,用蒸馏水稀释到 $20 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 细胞培养

将人肺癌 H446 细胞置于含 10% 胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素及 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素的 PRMI-1640 培养基中,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次,待细胞生长至 80%~90%,按 1:3 比例进行传代,取对数生长期细胞进行后续实验。

将 IMR-90 细胞置于含 10% 胎牛血清、 $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 青霉素及 $100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 链霉素的 DMEM 培养基中,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 饱和湿度的培养箱中培养,每 2 d 换液 1 次,待细胞生长至 80%~90%,按 1:3 比例进行传代,取对数生长期细胞进行后续实验。

2.3 细胞分组与处置方法

取对数生长期的 H446 细胞及 IMR-90 细胞分为空白组、对照组、实验组和联合组。空白组给予 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的二甲基亚砜;对照组给予 $20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素;实验组给予 $20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-FU;联合组给予 $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 黄芩素 + $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-FU。除了上述 4 组外设立联合组 + NAC,即在联合组用药基础上加

$20 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NAC,来针对性研究活性氧的存在意义。

2.4 CCK-8 实验法检测细胞存活率^[8]

将对数生长期的 H446 细胞及 IMR-90 细胞,按照每孔 1×10^4 个细胞的密度接种至 96 孔板,待细胞贴壁生长 24 h 后,按“2.3”的方法进行分组和处置,每组设 8 个复孔,在干预 0、3、6、12、24 h 后,每孔添加 CCK-8 $10 \text{ } \mu\text{L}$,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h。用酶标仪在 450 nm 处测量各孔的光密度(optical density, OD)值,并计算 H446 细胞及 IMR-90 细胞各个时间段的细胞存活率。

2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡^[9]

按“2.3”的方法进行分组与处理,于处理 3、6、12 和 24 h 后,收集细胞并经过磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)清洗后,依据细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

2.6 Transwell 法检测细胞迁移情况^[10]

将 H446 细胞消化离心重悬,调整密度为 $5 \times 10^6 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$,取 $200 \text{ } \mu\text{L}$ 加到 Transwell 小室的上层,下层加入含有 10% FBS 的 PRMI-1640 培养基 $500 \text{ } \mu\text{L}$,培养 24 h 后,吸弃培养液,使用棉签轻轻擦去上室膜表面未迁移的细胞,用 PBS 冲洗 2 次,4% 多聚甲醛固定 15 min,然后用 0.1% 结晶紫进行染色 0.5 h,随机选择 5 个视野,在显微镜($\times 400$)下计数迁移至小室微孔膜下层的细胞数。

2.7 流式细胞仪检测细胞 ROS 水平^[9]

按“2.3”的方法进行分组与处理,收集处理完细胞后,弃去上清后 PBS 洗涤 1 次。加 $10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DCFH-DA, $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴锅中避光孵育 30 min, PBS 洗涤 1 次,用 PBS $500 \text{ } \mu\text{L}$ 重悬细胞,转移至流式管后流式细胞仪检测细胞内活性氧水平。

2.8 蛋白质印迹法检测目的蛋白的表达水平^[11]

按“2.3”的方法进行分组与处理,收集细胞于离心管中,用蛋白试剂盒提取蛋白。每孔上样 $20 \text{ } \mu\text{g}$,用 10%~12% 十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,随后用湿转转膜仪将其转移至硝酸纤维膜上。5% 脱脂乳封闭 1.5 h 后,吐温-20 缓冲液(Tween-20-based saline-sodium citrate buffer, TBST)洗涤 5 次。加入与细胞凋亡及细胞周期阻滞相关的一抗(稀释比例为 1:2 000), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜。将对应一抗回收, TBST 洗涤 5 次,加入对应二抗(HRP 标记山羊抗兔及抗鼠免疫球蛋白 G),室温摇床孵育 1.5 h 后, TBST 洗涤 5 次,用 ECL 化学发光显色剂进行显色,再通过化学发光成像系统进行拍照。内参选择

α -tubulin,并用 ImageJ 1.42q 软件对所出条带进行灰度分析。

3 统计学处理

用 SPSS 21.0 软件进行统计分析。符合正态分布的计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用独立样本 t 检验。

结 果

1 黄芩素联合 5-FU 对 H446 和 IMR-90 细胞增殖的抑制作用

黄芩素、5-FU 及联合处理后,H446 细胞的存活率随着处理时间的延长而逐渐降低,且在相同处理时间下,联合组的细胞存活率均显著低于实验组和对照组,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。然而,黄芩素和 5-FU 及联合处理后,IMR-90 细胞并没有明显的大量死亡,实验组对 IMR-90 细胞的存活率有一定的影响;黄芩素和 5-FU 联合组处理后,相较于对照组细胞存活率,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),而相对于实验组细胞存活率显著升高(均 $P < 0.01$),结果表明,联合处理对 IMR-90 细胞无明显的增殖抑制作用。说明 2 药联合使用后不但增强了对细胞的增殖抑制作用还降低了 5-FU 单药大剂量使用造成的药物不良反应。结果见表 1。

2 黄芩素与 5-FU 联用对 H446 细胞的诱导凋亡作用

空白组、对照组、实验组和联合组的细胞凋亡率分别为 $(14.47 \pm 1.36)\%$ 、 $(33.94 \pm 4.33)\%$ 、 $(49.20 \pm 3.82)\%$ 和 $(49.17 \pm 2.13)\%$,联合组的细胞凋亡率与空白组和对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

3 黄芩素与 5-FU 联用对 H446 细胞迁移的影响

空白组、对照组、实验组和联合组的细胞迁移抑制率分别为 $(8.43 \pm 1.94)\%$ 、 $(11.25 \pm 1.55)\%$ 、

$(26.74 \pm 3.13)\%$ 和 $(68.83 \pm 4.32)\%$,实验组的细胞迁移抑制率与对照组相比显著升高,联合组的细胞迁移抑制率与实验组相比显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。

4 黄芩素与 5-FU 联用对 H446 细胞中 ROS 的影响

对照组、试验组、联合组和联合组 + NAC 的细胞凋亡率与空白组比较均显著升高,且联合组的细胞凋亡率较实验组显著更高,而联合组 + NAC 的细胞凋亡率较联合组显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。试验组、联合组和联合组 + NAC 的细胞移植抑制率均显著高于空白组,且联合组的细胞移植抑制率显著高于试验组,而联合组 + NAC 的细胞移植抑制率显著低于联合组,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$)。结果见表 2。

5 黄芩素与 5-FU 联用对 H446 细胞蛋白的影响

空白组、对照组、实验组和联合组中 Bcl-2 蛋白相对表达水平分别为 1.01 ± 0.09 、 0.88 ± 0.09 、 0.68 ± 0.12 和 0.41 ± 0.06 ;Bax 蛋白相对表达水平分别为 0.11 ± 0.01 、 0.12 ± 0.02 、 0.17 ± 0.04 和 0.38 ± 0.08 ;Caspase-3 蛋白相对表达水平分别为 0.01 ± 0.00 、 0.08 ± 0.01 、 0.78 ± 0.12 和 1.28 ± 0.21 ;PARP 蛋白相对表达水平分别为 0.21 ± 0.04 、 0.32 ± 0.13 、 0.64 ± 0.12 和 0.98 ± 0.07 ,其中,对照组的 Bax 和 Caspase-3 蛋白相对表达水平较空白组均显著升高,联合组的上述指标较对照组均显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$);对照组的 Bcl-2 蛋白相对表达水平较空白组显著降低,联合组的上述指标较对照组显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.01$),见图 2。

空白组、对照组、联合组和实验组的 N-cadherin 相对表达水平分别为 0.91 ± 0.15 、 0.61 ± 0.09 、 0.08 ± 0.01 和 0.27 ± 0.06 降低;E-cadherin 相对表达水平分别为 0.41 ± 0.10 、 0.53 ± 0.09 、 1.28 ± 0.13 和 1.08 ± 0.09 升高,其中,联合组和实验组的

表 1 黄芩素联合 5-氟尿嘧啶对 H446 和 IMR-90 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 The effect of baicalein combined with 5-FU on the survival rate of H446 and IMR-90 cells($\bar{x} \pm s$)

Time (h)	Viability rate of H446 cell(%)				Viability rate of IMR-90 cell(%)			
	Blank	Control	Experimental	Combination	Blank	Control	Experimental	Combination
3	102.84 $\pm$ 3.23	96.55 $\pm$ 3.11	92.32 $\pm$ 3.89 *	84.27 $\pm$ 2.14 * Δ	101.45 $\pm$ 3.42	98.56 $\pm$ 2.95	94.33 $\pm$ 3.82	95.43 $\pm$ 3.15
6	106.62 $\pm$ 5.44	90.46 $\pm$ 2.84	84.73 $\pm$ 3.24 *	70.94 $\pm$ 3.63 * Δ	103.74 $\pm$ 4.23	97.44 $\pm$ 4.17	83.41 $\pm$ 3.22 *	92.83 $\pm$ 1.95 Δ
12	110.72 $\pm$ 4.96	83.28 $\pm$ 4.26	72.14 $\pm$ 2.93 *	53.63 $\pm$ 2.54 * Δ	109.62 $\pm$ 3.85	94.22 $\pm$ 5.28	72.42 $\pm$ 2.94 *	89.72 $\pm$ 1.55 Δ
24	114.34 $\pm$ 2.88	79.87 $\pm$ 3.48	57.66 $\pm$ 1.82 *	40.31 $\pm$ 2.73 * Δ	115.51 $\pm$ 3.17	92.31 $\pm$ 4.76	59.22 $\pm$ 1.85 *	87.36 $\pm$ 3.74 Δ

Blank group: Treated with $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dimethyl sulfoxide (DMSO); Control group: Treated with $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ baicalein; Experimental group: Treated with $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-fluorouracil (5-FU); Combination group: Treated with $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ baicalein + $10 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-fluorouracil (5-FU); Compared with control group at the same time, * $P < 0.01$; Compared with experimental group at the same time, $\Delta P < 0.01$.

N-cadherin相对表达水平较空白组和对照组均显著降低,且联合组较试验组显著更低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);且联合组和实验组的E-cadherin相对表达水平较空白组和对照组均显著升高,且联合组较试验组显著更高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),见图2。

空白组、实验组、对照组、联合组和联合组+NAC的p-JNK蛋白相对表达水平分别为 0.78 ± 0.05 、 0.70 ± 0.04 、 0.73 ± 0.03 、 0.98 ± 0.02 和 0.73 ± 0.05 ;p-p38蛋白相对表达水平分别为 0.56 ± 0.02 、

0.51 ± 0.03 、 0.60 ± 0.04 、 0.76 ± 0.06 和 0.54 ± 0.03 ;p-ERK蛋白相对表达水平分别为 0.34 ± 0.03 、 0.30 ± 0.04 、 0.28 ± 0.04 、 0.18 ± 0.03 和 0.33 ± 0.05 。对照组的上述指标与空白组和实验组相比,在统计学上差异均无统计学意义(均 $P>0.05$);联合组的p-JNK和p-p38蛋白相对表达水平较对照组均显著升高,p-ERK蛋白相对表达水平较对照组均显著降低,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.01$);联合组+NAC的p-JNK和p-p38蛋白相对表达水平较联合组显著降低,p-ERK蛋白相对表达水平较联合组显著升高,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P<0.01$),见图3。

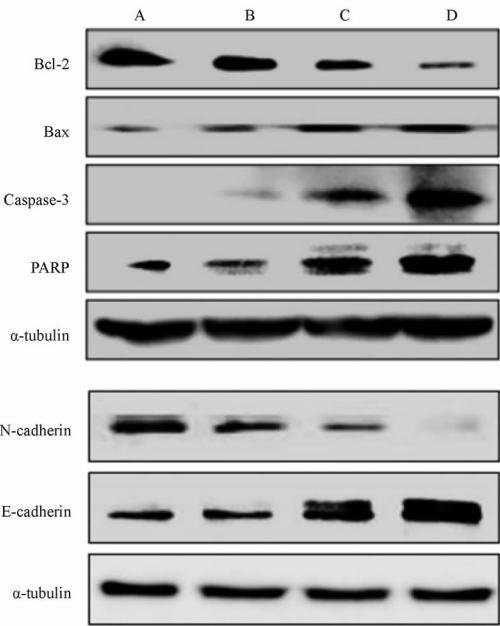


图2 用蛋白质印迹法检测各组 H446 细胞凋亡和细胞迁移相关蛋白的相对表达水平

Figure 2 The relative expression levels of apoptosis and migration related proteins in H446 cells detected by Western blot
A: Blank Group, B: Control Group, C: Experimental Group, D: Combination Group.

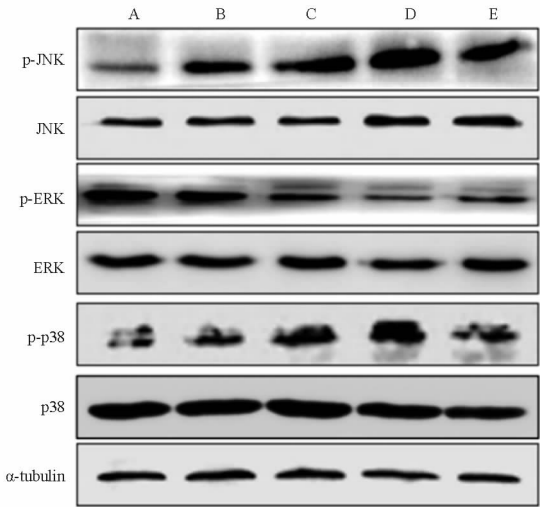


图3 用蛋白质印迹法检测各组 H446 细胞的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路相关蛋白

Figure 3 The relative expression levels of mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway related proteins in H446 cells detected by Western blot
A: Blank Group, B: Control Group, C: Experimental Group, D: Combination Group, E: Combination Group + NAC.

表2 各组细胞凋亡情况和细胞迁移情况

Table 2 Apoptosis and migration of cells in each group

Item	Blank	Control	Experimental	Combination	Combination + NAC
Cell apoptosis rate (%)	7.82 ± 0.94	12.31 ± 2.13 **△△	33.48 ± 4.92 **△△	52.42 ± 3.17 **	30.39 ± 2.72 **△△
Migration inhibition rate (%)	4.36 ± 0.54	4.92 ± 0.71 △△	31.43 ± 3.14 **△△	52.64 ± 5.26 **	27.61 ± 3.52 **△△

Combination group + NAC: $10\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ baicalein + $10\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5-FU + $20\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NAC; Compared with blank group, ** $P<0.01$; Compared with combination group, △△ $P<0.01$.

讨 论

5-FU 是嘧啶类化疗药物的代表,但是药物不良

反应也使 5-FU 不能以长时间和大剂量的方式用药^[12]。中药黄芩中所提取出来的黄芩素是黄酮类化合物的一种,可以辅助增强顺铂、吉西他滨等化疗药物的抗癌活性。本研究中黄芩素单独使用可小程度

抑制 H446 的增殖但效果不及同浓度 5-FU,然而当 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素和 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-FU 联合使用时,对 H446 细胞的抑制作用要远高于 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-FU;同时对正常肺细胞 IMR-90 细胞的药物不良反应验证中, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素和 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-FU 联合使用对正常细胞的增殖抑制效果要低于 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-FU 单药使用,说明黄芩素与 5-FU 联用能够在有效地降低药物不良反应的同时增强 5-FU 对细胞的抗癌效果。

5-FU 发挥抗癌作用是通过抑制胸苷酸的合成来将细胞周期阻滞在 S 期,最后引起细胞发生凋亡。细胞凋亡又受到多种因素的调控,其中最经典的线粒体依赖性凋亡过程受到 Bcl-2 家族及 Caspase 家族多个蛋白的调控,Bax 和 Bcl-2 蛋白之间的平衡影响着 Caspase-3 蛋白的活化,活化后的 Caspase-3 会进一步剪切下游蛋白,最终导致细胞凋亡^[13]。在本研究中,黄芩素对 H446 细胞没有明显的诱导凋亡作用, $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-FU 能够显著诱导 H446 细胞凋亡, $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素和 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-FU 联合使用后细胞凋亡比例进一步显著上升,证明了黄芩素与 5-FU 联用能够提高 5-FU 对 H446 细胞的诱导凋亡作用。单独黄芩素不能抑制 H466 细胞的迁移,单独 5-FU 对肺癌 H466 细胞的迁移有较低的抑制作用,2 药联合处理后对细胞迁移的抑制程度显著升高,证明了黄芩素与 5-FU 联用能够提高 5-FU 对 H446 细胞的诱导凋亡及迁移抑制作用。

当癌细胞中的 ROS 水平超过一定范围后会激活细胞中的多条信号通路从而改变多种生理进程^[14]。本实验显示,当黄芩素和 5-FU 单独处理 H446 细胞后,细胞中的 ROS 水平与对照组相比没有显著性差异,但是当二者一起联用处理后,细胞中的 ROS 水平明显上升;当在联合组中加入 ROS 清除剂 NAC 之后,凋亡细胞数目和迁移细胞数目均降低到和 5-FU 单独处理组相近的水平,因此可判断黄芩素与 5-FU 联合使用后能够上调 H446 细胞中的 ROS 水平进而增强 5-FU 的抗癌作用。有研究证明,MAPK 信号通路受体内 ROS 水平的调控,为了进一步探索 ROS 调控的下游分子机制,本研究进一步在分子水平上检测了 MAPK 相关蛋白的表达量变化情况,从实验结果中可以看出 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 黄芩素和 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 5-FU 联合使用后 p-JNK 及 p-p38 相对表达水平均显著升高,p-ERK 相对表达水平显著降低,但 ROS 清除剂 NAC 显著逆转了 MAPK 信号通路的变化。

本研究提示:黄芩素与 5-FU 联合使用能够通过

上调肺癌 H446 细胞中的 ROS 水平,激活 JNK 及 p38 信号通路,抑制 ERK 信号通路,进一步增强 5-FU 对 H446 细胞的增殖抑制、诱导凋亡及抑制迁移作用。

参考文献:

- [1] 沈美岷,蔺红静,李峰. 非小细胞肺癌基因突变与吸烟相关性的研究现状[J]. 现代肿瘤医学,2020,28(17):3078—3080.
- [2] 李玉潇,张孝刚,胡帅航,等. 中医药维持治疗晚期非小细胞肺癌的研究现状及展望[J]. 中医药信息,2020,37(4):126—129.
- [3] 蒋瑜. 茯苓的抗乳腺癌活性及作用机制的研究[D]. 江苏无锡:江南大学,2020.
- [4] 鲁孟丽,邱彤,詹斯文,等. 中药活性成分单用及联合化疗药物抗肿瘤研究进展[J]. 中国医院药学杂志,2023,43(4):450—457.
- [5] 徐由财. Nrf2 在黄芩素抑制氧化应激诱导心肌细胞凋亡中的作用研究[D]. 广东广州:广州医科大学,2022.
- [6] GUO L, YANG J, YUAN W, et al. Baicalein ameliorated obesity-induced cardiac dysfunction by regulating the mitochondrial unfolded protein response through Nrf2 signaling. *Phytomedicine*, 2024,126:155441. 2024-04-31 [2025-01-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38394729/>.
- [7] CHANDRASHEKAR N, PANDI A. Baicalein: A review on its anti-cancer effects and mechanisms in lung carcinoma. *J Food Biochem*, 2022,46(9):e14230. 2022-03-11 [2024-12-15]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35543192/>.
- [8] LEE J J, BEUMER J H, CHU E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016,78(3):447—464.
- [9] BAI H, JIN H, YANG F, et al. Apigenin induced MCF-7 cell apoptosis-associated reactive oxygen species. *Scanning*, 2014,36(6):622—631.
- [10] JUSTUS C R, MARIE M A, SANDERLIN E J, et al. Transwell in vitro cell migration and invasion assays. *Methods Mol Biol*, 2023,2644:349—359. 2023-03-05 [2025-01-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37142933/>.
- [11] MISHRA M, TIWARI S, GOMES A V. Protein purification and analysis: Next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*, 2017,14(11):1037—1053.
- [12] LEE J J, BEUMER J H, CHU E. Therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2016,78(3):447—464.
- [13] YANG C, SONG J, HWANG S, et al. Apigenin enhances apoptosis induction by 5-fluorouracil through regulation of thymidylate synthase in colorectal cancer cells. *Redox Biol*, 2021,47:102144. 2021-09-21 [2025-01-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34562873/>.
- [14] MOLONEY J N, COTTER T G. ROS signalling in the biology of cancer. *Semin Cell Dev Biol*, 2018,80:50—64. 2017-06-03 [2025-01-05]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28587975/>.

(收稿日期 2025-01-20)