

· 实验研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2019.22.004

紫花前胡素经 Nox1/Akt 信号通路对口腔鳞癌细胞增殖及侵袭的抑制作用

王慧¹, 邵义熊¹, 阮自琴¹, 毛敏^{2△}

(1. 湖北省十堰市妇幼保健院口腔科, 湖北 十堰 442000; 2. 湖北医药学院附属太和医院口腔科, 湖北 十堰 442000)

摘要:目的 探讨紫花前胡素通过 Nox1/Akt 信号通路抑制口腔鳞癌细胞增殖及侵袭的作用机制。方法 SCC-25 组(A 组)及紫花前胡素低、中、高剂量组(B₁组、B₂组、B₃组)均取 10 mL SCC-25 细胞(密度为 5 × 10⁶/mL), 置于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 分别加入紫花前胡素 0, 20.0, 40.0, 80.0 μg/mL, 置 CO₂ 培养箱(37 °C、5% CO₂、2% O₂、93% N₂)培养 72 h。采用四氮唑盐(MTT)比色法、结晶紫染色、MilliCell 室、流式细胞仪、逆转录-定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法、酶联免疫吸附(ELISA)法测定细胞增殖及凋亡水平、单克隆形成数、穿膜数、Nox1 mRNA 及 P-Akt mRNA 表达水平, 以及超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平。结果 B₁组、B₂组、B₃组吸光度(OD)值、存活率水平、克隆形成数、穿膜数、Nox1 mRNA 水平、P-Akt mRNA 水平、MDA 水平明显低于 A 组(P < 0.05), 且与剂量呈正相关; B₁组、B₂组、B₃组细胞凋亡率水平、SOD 及 GSH-Px 水平明显高于 A 组(P < 0.05), 且与剂量呈正相关。结论 紫花前胡素能抑制口腔鳞癌细胞增殖、侵袭, 并促进其凋亡, 其机制与紫花前胡素抑制 Nox1 活性降低 Akt 的磷酸化水平, 进而降低其氧化应激水平有关。

关键词:紫花前胡素; Nox1/Akt 信号通路; 口腔鳞癌; 增殖; 侵袭; 氧化应激; 作用机制

中图分类号: R932; R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)22-0010-04

Inhibition Effect of Decursin on Proliferation and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells via Nox1/Akt Signaling Pathway

WANG Hui¹, SHAO Yixiong¹, RUAN Ziqin¹, MAO Min²

(1. Department of Stomatology, Shiyuan Maternal and Child Health Hospital, Shiyuan, Hubei, China 442000; 2. Department of Stomatology, Taihe Hospital Affiliated to Hubei Medical College, Shiyuan, Hubei, China 442000)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of decursin in inhibiting the proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via Nox1/Akt signaling pathway. **Methods** In the SCC-25 cell group (group A) and low, medium and high dosage decursin groups (group B₁, group B₂ and group B₃), 10 mL SCC-25 cell (the density was 5 × 10⁶/mL) was put into DMEM medium with 10% fetal bovine serum, then 0, 20.0, 40.0, 80.0 μg/mL decursin was added into DMEM medium respectively, and the DMEM medium was cultured in CO₂ incubator (37 °C, 5% CO₂, 2% O₂, 93% N₂) for 72 h. The cell proliferation and apoptosis, the number of monoclonal formation, the number of membrane penetration, the expression levels of Nox1 mRNA and P-Akt mRNA, the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, crystal violet staining, MilliCell chamber, flow cytometry, reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) method and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** The levels of optical density (OD), survival rate, the number of clone formation and number of membrane penetration, the expression levels of Nox1 mRNA and P-Akt mRNA and the level of MDA in group B₁, group B₂ and group B₃ were lower than those in group A (P < 0.05), and those positively correlated with the dosage. The apoptosis rate, levels of SOD and GSH-Px in group B₁, group B₂ and group B₃ were higher than those in group A (P < 0.05), and those positively correlated with the dosage. **Conclusion** Decursin can inhibit the proliferation and invasion, and promote the apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells. Its mechanism is related to the inhibition of Nox1 activity by decursin, which reduces the phosphorylation level of Akt and then reduces the oxidative stress level.

Key words: decursin; Nox1/Akt signaling pathway; oral squamous cell carcinoma; proliferation; invasion; oxidative stress; mechanism of action

口腔鳞状细胞癌(简称口腔鳞癌)是常见的头颈部肿瘤,患者5年生生存率仅为53%^[1-2]。咀嚼槟榔、吸烟、饮酒等会持续产生氧化应激产物。过量的氧化应激产物产生会介导DNA损伤和/或脂质过氧化,这些均已被证实能加快口腔鳞癌的发展^[3-4]。研究表明,口腔鳞癌

患者唾液中的氧化应激标志物[如8-羟基-2'-脱氧鸟苷和丙二醛(MDA)]水平高于健康人群,而抗氧化剂维生素C和维生素E水平则较低^[5]。还原型辅酶II(NADPH)氧化酶(Nox/Duox)家族是产生氧化应激产物的酶家族,可在癌症的进程中发挥重要作用。上调Nox1

第一作者:王慧,女,大学本科,住院医师,研究方向为口腔错颌畸形的诊疗,(电子信箱)345687173@qq.com。

△通信作者:毛敏,硕士研究生,副主任医师,研究方向为口腔科学,(电话)0719-8801346。

表达和随后生成的氧化应激产物可促进癌细胞增殖^[6-7]。紫花前胡素为紫花前胡的醇提物,有祛痰解痉、抗血小板聚集和抗炎作用,并可抑制癌细胞的生长和代谢^[8-9]。本研究中探讨了紫花前胡素通过 Nox1/Akt 信号通路抑制口腔鳞癌细胞增殖及侵袭的作用,为口腔鳞癌的治疗提供参考。现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 仪器、试药与细胞

仪器:MilliCell 室(美国 Millipore 公司);SpectraMax M5 型分光光度计(美国 Molecular Devices 公司);IX73 型倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司);NanoDrop 2000 型分光光度计(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Applied Biosystems 7500 型实时荧光定量聚合酶链反应系统(qPCR, 美国 Applied Biosystems 公司)。

试药:10% 胎牛血清(FBS),DMEM 培养基,均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;四氮唑盐(MTT, 德国 Sigma-Aldrich 公司);4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI),0.5% 结晶紫,均购自美国 Sigma 公司;Matrigel 基质(美国 BD 公司);RNA 试剂盒、Ex Taq 酶,均购自日本 Takara 公司。

细胞:口腔鳞癌 SCC-25 细胞,源自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

1.2 方 法

细胞培养及分组:SCC-25 组(A 组)及紫花前胡素低、中、高剂量组(B₁ 组、B₂ 组、B₃ 组)取 10 mL SCC-25 细胞(密度为 5×10^6 /mL)置有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中,各组分别加入紫花前胡素 0, 20.0, 40.0, 80.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,置 CO₂ 培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO₂, 2% O₂, 93% N₂)。以上各组每孔设 6 个平行样,培养 72 h。

细胞增殖水平检测:采用四氮唑盐(MTT)比色法评估。取上述各组细胞,每孔中加入 MTT 溶液。孵育 4 h 后,加入裂解缓冲液(10% SDS 加入 0.01 mol/L HCl 中)并孵育过夜。最后,使用分光光度计测定 550 nm 波长处的吸光度(OD),计算存活率及凋亡率。

细胞单克隆形成数目检测:取上述各组细胞,用胰蛋白酶处理,计数,并在密度为 10^3 细胞/孔的 6 孔板中用完全培养基重新接种 8 d。每 3 d 更换培养基,以维持细胞生长。将菌落固定,并用 0.5% 结晶紫在室温下染色 30 min。培养 8 d 后,在倒置显微镜下计数菌落数。

细胞体外侵袭试验:在 MilliCell(直径 12 mm,孔径 8 μm)室上侧预涂 Matrigel。在补充有 0.1% 血清的培养基中将 1×10^5 个上述各组细胞加入上部隔室中,并将该室置含有 10% 胎牛血清的培养基的 24 孔板中。在

37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h 后,擦去膜上侧的细胞,将下膜表面上的侵入细胞固定,并用 DAPI 染色。通过计数每个室 10 个高功率毡的穿膜孔数来量化侵入活动。

细胞凋亡水平:使用基于 Annexin V(Axv) - FITC/PI 双染色的流式细胞(FACS)分析。室温下在 Axv - FITC 和 PI(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)中温育 15 min,使用流式细胞仪测定荧光强度。

细胞 Nox1 RNA 及 P - Akt RNA 表达水平:采用逆转录 - 定量聚合酶链反应(RT - qPCR)法测定。从上述各组细胞中提取总 RNA。以分光光度计测定 RNA 浓度。确保浓度比值水平为 2.60 ~ 2.80,PCR 系统上用 SYBR 预混物 Ex Taq 进行 qPCR。GAPDH mRNA 用于标准化 RNA 比对。引物序列如下, Nox1(5' - GCAACC - AATGGATCTCCTCCT - 3' 和 5' - GGGGAGAAAAACACC - CCGAA - 3'), P - Akt(5' - TGACACGCTTCCCTGGATT - G - 3' 和 5' - TCCGGGACAGCATCAAATC - 3'), GAPDH (5' - CTCTGCTCCTCCTGTTCGAC - 3' 和 5' - GCGCC - CAATACGACCAAATC - 3')。热循环条件,40 个循环,在 95 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 10 s,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 下退火 10 s,在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 15 s。数据用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法处理。平行测定 3 次。

细胞氧化应激水平:取上述各组细胞,5 000 r/min 离心收集细胞,加入磷酸盐缓冲液(PBS)制成细胞悬液后,以酶联免疫吸附(ELISA)法测定培养液中超氧化物歧化酶(SOD)、MDA、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px)蛋白水平。

1.3 统计 学 处 理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,多重比较采用 LSD - *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

结果见表 1 至表 4。

表 1 各组 SCC-25 细胞 OD 值、存活率及凋亡率水平比较($n=6$)

组别	质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	OD 值	存活率(%)	凋亡率(%)
A 组	0	1.00 \pm 0.07	100.00 \pm 0.01	1.52 \pm 0.89
B ₁ 组	20	0.86 \pm 0.01 ^a	76.76 \pm 9.75 ^a	7.94 \pm 2.12 ^a
B ₂ 组	40	0.64 \pm 0.02 ^{ab}	53.98 \pm 8.08 ^{ab}	11.70 \pm 2.54 ^{ab}
B ₃ 组	80	0.39 \pm 0.05 ^{abc}	26.98 \pm 9.54 ^{abc}	14.84 \pm 2.87 ^{abc}

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 B₁ 组比较,^b $P < 0.05$;与 B₂ 组比较,^c $P < 0.05$ 。下表同。

表 2 各组 SCC-25 细胞克隆形成数目及穿膜数比较($n=6$)

组别	质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	克隆形成数目($\bar{x} \pm s$)	穿膜数($\bar{x} \pm s$)
A 组	0	870.49 \pm 8.09	768 \pm 54
B ₁ 组	20	550.45 \pm 5.90 ^a	557 \pm 19 ^a
B ₂ 组	40	329.12 \pm 8.32 ^{ab}	423 \pm 43 ^{ab}
B ₃ 组	80	221.12 \pm 8.74 ^{abc}	234 \pm 25 ^{abc}

表3 各组 SCC-25 细胞 Nox1 及 P-Akt mRNA 表达水平比较 (n=6)

组别	质量浓度(μg/mL)	Nox1 ($\bar{X} \pm s$)	P-Akt ($\bar{X} \pm s$)
A 组	0	3.23 ± 0.15	5.12 ± 0.39
B ₁ 组	20	2.45 ± 0.27 ^a	3.99 ± 0.43 ^a
B ₂ 组	40	1.08 ± 0.23 ^{ab}	2.34 ± 0.36 ^{ab}
B ₃ 组	80	0.54 ± 0.17 ^{abc}	1.01 ± 0.24 ^{abc}

表4 各组 SCC-25 细胞氧化应激水平比较 (n=3)

组别	质量浓度(μg/mL)	SOD ($\bar{X} \pm s, U/mL$)	MDA ($\bar{X} \pm s, \mu mol/L$)	GSH-Px ($\bar{X} \pm s, \mu mol/L$)
A 组	0	254.23 ± 19.39	595.24 ± 19.35	148.59 ± 22.65
B ₁ 组	20	381.26 ± 23.21 ^a	421.36 ± 23.21 ^a	249.54 ± 19.69 ^a
B ₂ 组	40	589.65 ± 49.54 ^{ab}	254.36 ± 19.56 ^{ab}	408.54 ± 17.59 ^{ab}
B ₃ 组	60	604.35 ± 34.38 ^{abc}	158.69 ± 13.58 ^{abc}	635.49 ± 15.43 ^{abc}

3 讨论

口腔鳞癌为常见恶性肿瘤,对放射治疗和化学疗法反应较差。紫花前胡素是一种天然的异丙基甲酚,具有镇痛、抗菌、抗炎、抗氧化和抗血管生成的作用^[10]。肝癌细胞体外试验证实,紫花前胡素可通过一系列生物学途径抑制肝癌细胞的增殖,包括细胞周期调控、细胞凋亡、肿瘤发生、黏附和侵袭。此外,紫花前胡素对肺癌、乳腺癌和结肠癌细胞也具有一定抗增殖作用^[11]。本研究结果显示,B₁组、B₂组、B₃组的 OD 值、存活率、细胞克隆形成数目、穿膜数水平低于 A 组,凋亡率水平高于 A 组,这与上述文献结论相符合。同时提示,紫花前胡素能抑制口腔鳞癌细胞的增殖和侵袭,并促进其凋亡。

Nox/Duox 家族由 7 名成员组成,被认为是氧化应激产物生成的主要来源,其在癌症发生、发展中起重要作用^[12]。据报道,对 Nox1 活性的抑制可诱导许多癌细胞(包括胰腺癌、间皮瘤和肉瘤)凋亡。RT-PCR 分析显示,Nox1 mRNA 和 Nox4 mRNA 在肺癌细胞系的重要亚组中呈高度表达^[12]。基因敲除 Nox1,可显著抑制肺癌细胞活力。Nox1 还能抑制 p53(K382)的乙酰化,后者是 SiRT1 脱乙酰酶的靶标,并抑制了 p53 促凋亡转录活性^[13]。近期研究发现,在卵巢细胞癌中,Nox1 的敲低显著增强了顺铂诱导的细胞凋亡。这一新发现提示了 Nox1 可能是癌细胞治疗的一个重要潜在靶点^[14]。本研究结果显示,B₁组、B₂组、B₃组的 Nox1 mRNA 表达水平低于 A 组。说明紫花前胡素能抑制 Nox1 的表达,进而降低口腔鳞癌细胞的活性。

Akt 是细胞存活的调节因子,通过其磷酸化活化抑制凋亡,从而防止细胞死亡和延长细胞存活期^[15-16]。选择性抑制剂作用于磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K/Akt)对非小细胞肺癌、血液系统恶性肿瘤和头颈部鳞状细胞癌疗效较好^[17]。本研究中发现,B₁组、B₂组、B₃组的 Nox1 mRNA 和 P-Akt mRNA 表达水平低于 A 组,提示紫花前胡素可通过抑制 Nox1 活性,降低 Akt 的磷酸化水平,

进而加速口腔鳞癌细胞的凋亡。

由氧化应激产物水平分析结果可知,B₁组、B₂组、B₃组的 SOD 和 GSH-Px 水平高于 A 组,MDA 水平低于 A 组。提示紫花前胡素能明显降低氧化应激产物水平,进而抑制癌细胞的增殖及侵袭。这与上述文献的结果相符。

综上所述,紫花前胡素能抑制口腔鳞癌细胞增殖、侵袭,并促进其凋亡,其机制与紫花前胡素抑制 Nox1 活性并降低 Akt 的磷酸化水平,从而降低其氧化应激水平有关。但本研究中只探讨了紫花前胡素对 Nox1 mRNA 及 Akt mRNA 表达的影响,未探讨紫花前胡素对口腔鳞癌细胞 Nox1/Akt 信号通路上下游细胞因子表达的影响,这将在后续研究中进行。

参考文献:

- [1] RIVERA C, OLIVEIRA AK, COSTA RAP, et al. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review[J]. Oral Oncology, 2017, 72(8): 38-47.
- [2] ZHANG CZ. Long non-coding RNA FTH1P3 facilitates oral squamous cell carcinoma progression by acting as a molecular sponge of miR-224-5p to modulate fizzled 5 expression[J]. Gene, 2017, 607(4): 47-55.
- [3] LIANG S, ZHANG S, WANG P, et al. LncRNA, TUG1 regulates the oral squamous cell carcinoma progression possibly via interacting with Wnt/β-catenin signaling[J]. Gene, 2017, 608(12): 49-57.
- [4] WAN YM, TIAN J, QI L, et al. ANXA1 affects cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition of oral squamous cell carcinoma[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 5214-5218.
- [5] HE B, LIN X, TIAN F, et al. MiR-133a-3p Inhibits Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) Proliferation and Invasion by Suppressing COL1A1[J]. J Cell Biochem, 2018, 119(1): 338-346.
- [6] ITO K, OTA A, ONO T, et al. Inhibition of Nox1 induces apoptosis by attenuating the AKT signaling pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines[J]. Oncol Rep, 2016, 36(5): 2991-2998.
- [7] GAN YH, ZHANG S. PTEN/AKT pathway involved in histone deacetylases inhibitor induced cell growth inhibition and apoptosis of oral squamous cell carcinoma cells[J]. Oral Oncology, 2009, 45(10): e150-e154.
- [8] 李翠琼,李健春,樊均明,等.紫花前胡素能降低大鼠肾小管上皮细胞活性氧并抑制顺铂诱导的细胞凋亡[J].细胞与分子免疫学杂志,2017,33(10):1328-1334.
- [9] 柯昌康,刘毓英,张志培,等.紫花前胡素通过 JAK2/STAT3 抑制 EC109 细胞的机制[J].中华胸心血管外科杂志,2018,34(4):230-235.
- [10] LEISMAN L, HAYNES MP, JANOWIECKI S, et al. (Almost) Dark Galaxies in the ALFALFA Survey: Isolated H i-bearing Ultra-diffuse Galaxies[J]. The Astrophysical Journal, 2017, 842(2): 133-137.