

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.008

· 基础研究 ·

青蒿琥酯对人肺癌 A549 细胞恶性生物学行为的影响及其可能机制

辛重阳¹, 孙肖², 王俊², 王宝成² (1. 山东中医药大学 2014 级硕士研究生班, 山东 济南 250355; 2. 济南军区总医院肿瘤科, 山东 济南 250031)

[摘要] **目的:** 探讨青蒿琥酯(artemisinin, ART)对人肺癌细胞株 A549 增殖、迁移和侵袭的影响及其可能机制。**方法:** 采用 CCK-8 法检测不同质量浓度的 ART 对 A549 细胞作用 24、48 h 后细胞的增殖水平, Transwell 小室试验检测 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 青蒿琥酯对 A549 细胞侵袭能力的影响, 划痕实验检测对 A549 细胞迁移能力的影响。Western blotting 检测 A549 细胞经 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的 ART 作用 48 h 后人抗原 R (human antigen R, HuR) 和 MMP-9 蛋白表达变化。**结果:** ART 能够抑制人肺癌 A549 细胞的增殖, 呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。与未处理组比较, ART (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理的 A549 细胞穿膜的细胞数目显著减少 [(47.11 ± 8.61) vs (131.00 ± 14.58) 个, $P < 0.01$]; A549 细胞迁移距离显著缩短 [(1.08 ± 0.13) vs (2.91 ± 0.24) mm, $P < 0.01$]; A549 细胞内 HuR 和 MMP-9 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。**结论:** ART 能够抑制肺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭, 其机制可能与抑制 HuR 的表达有关。

[关键词] 青蒿琥酯; 人肺癌 A549 细胞; 人抗原 R; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R392.12

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-385X(2017)04-0358-04

Effects and possible mechanisms of artesunate on the invasion and migratory ability of human lung cancer A549 cells

XIN Chongyang¹, SUN Xiao², WANG Jun², WANG Baocheng² (1. the Class of 2014 Master Graduate Student, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, Shandong, China; 2. Department of Oncology, General Hospital, Jinan Command of the PLA, Jinan 250031, Shandong, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of artesunate (ART) on the proliferation, invasion and migratory ability of human lung cancer A549 cells and its possible mechanisms. **Methods:** CCK-8 assay was used to analyze the proliferation level of A549 cells after treatment with different concentrations of ART for 24 and 48 h. Transwell assay and wound healing assay were adopted to evaluate the invasion and migration of A549 cells after the treatment of ART at concentration of 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, respectively. Western blotting was used to detect the change in protein expressions of human antigen R (HuR) and MMP-9 in A549 cells after the treatment with ART (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$). **Results:** ART inhibited the proliferation of human lung cancer A549 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with untreated group, number of A549 cells penetrating the membrane in ART group (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was significantly decreased ($[47.11 \pm 8.61]$ vs $[131.00 \pm 14.58]$, $P < 0.01$), and the migration distance was remarkably reduced ($[1.08 \pm 0.13]$ vs $[2.91 \pm 0.24]$ mm, $P < 0.01$). In addition, ART significantly inhibited the protein expression of HuR and MMP-9 in A549 cells ($P < 0.05$). **Conclusion:** ART can inhibit the proliferation, invasion and migration of A549 cells, and this effect may be related to inhibition of HuR expression.

[Key words] artesunate; non-small cell lung cancer (NSCLC); human antigen R (HuR); migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2017, 24(4): 359-363. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2017.04.008]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81572875, No. 81272619)。Project supported by the National Science Foundation of China (No. 81572875, No. 81272619)

[作者简介] 辛重阳 (1986 -), 男, 硕士生, 主要从事肺癌、乳腺癌耐药及转移机制的研究, E-mail: xinchongyang919@163.com

[通信作者] 王宝成 (WANG Baocheng, corresponding author), 博士, 主任医师, 博士生导师, 主要从事肺癌、乳腺癌耐药及转移机制的研究, E-mail: baochengwang@hotmail.com

青蒿琥酯(artemisinin, ART)隶属于青蒿素类衍生物,近年研究^[1-2]发现,青蒿素类药物具有明确的抗肿瘤活性。本课题组前期研究^[2-3]发现,青蒿素类药物对肿瘤细胞表达转移相关因子具有显著影响。人抗原 R (human antigen R, HuR) 是胚胎致死性视觉异常(embryonic lethal abnormal vision, ELAV)家族的 RNA 结合蛋白,可调节多种 mRNA 稳定性^[4]。HuR 可通过 RNA 识别基序(RNA recognition motif, RRM)与 mRNA 3' 末端翻译区(3'UTR)的富含 AU 碱基的序列(AU-rich elements, ARE)结合,使其免受核酸酶降解,从而增加其稳定性^[4]。最近研究^[5-6]发现,HuR 参与多种转移相关分子的转录后表达调控,人类多种肿瘤细胞高表达 HuR。鉴于青蒿素下调的多种肿瘤相关分子含有顺式作用元件 ARE,是 HuR 作用的靶基因,那么,青蒿素是否影响 HuR 的表达或生物学功能? 本课题通过研究 ART 对人肺癌细胞株 A549 增殖、迁移和侵袭及 HuR、MMP-9 蛋白表达水平的影响,旨在为进一步阐明 ART 类药物抗肺癌转移的机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株与主要试剂

人肺癌细胞株 A549 购买于中科院上海细胞库。ART 购于桂林南药股份有限公司,细胞增殖毒性检测试剂 CCK-8 购于日本同仁化学研究所,细胞侵袭试验相关 Matrigel 购于美国 BD 公司,Transwell 小室购于美国 Corning 公司,HuR、MMP-9、 β -actin 兔抗人多克隆抗体购于美国 Abcam 公司,辣根过氧化物酶标记的二抗购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 CCK-8 法检测 ART 对 A549 细胞增殖的影响

人肺癌 A549 细胞于 RPMI 1640 培养基中(含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 链霉素及 100 U/ml 青霉素)培养。取对数生长期的 A549 细胞,调整细胞密度为 5×10^4 个/ml,每孔 100 μ l 接种于 96 孔板。待细胞贴壁生长后,加入不同质量浓度(15、30、60、120 μ g/ml)的 ART 培养液中培养 24、48 h,每组设 3 个重复孔。在到相应时间后,向每孔中加入 10 μ l CCK-8 溶液(5 mg/ml),孵育 1~2 h,使用酶标仪在 450 nm 波长处读取各孔光密度(D)值。将对照孔的细胞增殖率视为 100%,其他各孔与之比较计算 ART 处理后细胞的增殖率,计算公式如下:细胞存活率(%) = (实验孔 D - 空白孔 D) / (对照孔 D - 空白孔 D) \times 100%。实验重复 3 次。

1.3 划痕实验检测 ART 对 A549 细胞迁移能力的

影响

取 1 000 μ l 密度 5×10^5 个/ml 的 A549 细胞接种于 6 孔板中,待到细胞平铺长满时,用一根无菌的 10 μ l 移液器吸头在各孔均匀划出细胞裂隙。用预热的 PBS 溶液冲洗去除飘浮细胞,后向孔内分别加入正常培养液和 ART(30 μ g/ml)培养液,观察各孔中细胞裂隙并拍照。培养 24 h,每组设 3 个重复孔,观察各孔底部的细胞裂隙并再次拍照,利用 Photo-shop 软件在照片上测量细胞裂隙宽度,计算细胞在有 ART 干预时细胞迁移距离的差异。实验重复 3 次。

1.4 Transwell 小室检测 ART 对 A549 细胞侵袭能力的影响

以 50 μ g/ml 的 Matrigel 加入聚碳酸酯膜孔径为 8.0 μ m 的 Transwell 上室中,保证底部液面平整,在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 5 h 等待 Matrigel 凝固。将 100 μ l 密度 5×10^5 个/ml A549 细胞悬液加入每个小室。向 Transwell 的下室中加入含有或不含有 ART(30 μ g/ml)培养液,于 37 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 24 h,每组设 3 个重复孔。吸去上、下室中的培养液,入 0.1% 的结晶紫溶液染色,擦除上室中基质胶,在显微镜下观察各孔中的 10 个视野,计数细胞个数及其 ART 干预时细胞数量的差异。实验重复 3 次。

1.5 Western blotting 检测 ART 对 A549 细胞 HuR、MMP-9 蛋白表达的影响

收集普通 A549 细胞和 ART(30 μ g/ml)处理 48 h 的 A549 细胞,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,各组取 20 μ g 蛋白上样,12% SDS-PAGE,半干转至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温下封闭 3 h,用抗 HuR、MMP-9 抗体(1: 1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,以 β -actin 为内参照,再用相应的二抗(1: 20 000)室温下孵育 2 h,TBST 洗膜 10 min \times 3 次,配置新鲜发光液,将膜孵育 3 min,暗室 X 线片曝光、显影、定影成像。用扫描仪获取条带图像,用 image Pro Plus 软件测定 HuR、MMP-9 条带灰度值,计算蛋白相对表达量。实验重复 3 次。

1.6 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计软件,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ART 抑制肺癌 A549 细胞的增殖

CCK-8 法检测结果(表 1)显示,ART 能够显著

抑制人肺癌 A549 细胞的增殖。在一个确定的作用时间点, ART 的质量浓度越大对 A549 细胞的抑制作用越强, 即 ART 作用具有质量浓度依赖性。

2.2 ART 抑制肺癌 A549 细胞的迁移

划痕实验结果(图 1)表明, 经 ART(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理 24 h 后, 肺癌 A549 细胞体外迁移距离显著低于未处理组[(2.91 \pm 0.24) vs (1.08 \pm 0.13) mm, $t = 20.30, P < 0.01$], 结果说明 ART(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 能够显著抑制 A549 细胞的迁移能力。

表 1 ART 对人肺癌 A549 细胞增殖的影响(%, $n = 3$)

Tab. 1 Effects of artesunate on the proliferation of human lung cancer A549 cells(%, $n = 3$)

Aartesunate [$\rho_B/(\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1})$]	Treatment time(t/h)	
	24 h	48 h
0	100	100
15	98.78 \pm 0.87 *	91.18 \pm 1.46 *
30	97.28 \pm 0.93 *	85.29 \pm 2.27 *
60	77.88 \pm 1.99 *	70.18 \pm 1.69 **
120	56.73 \pm 1.09 **	31.05 \pm 1.98 **

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ group

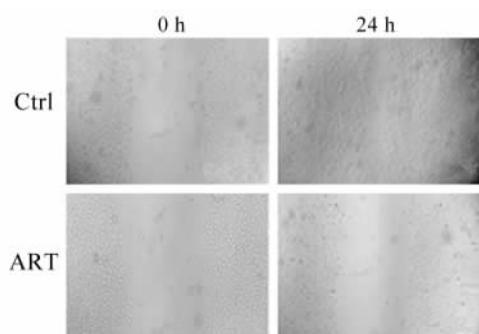


图 1 青蒿琥酯对人肺癌 A549 细胞迁移能力的影响
Fig. 1 Effect of artesunate on the migratory ability of human lung cancer A549 cells

2.3 ART 抑制肺癌 A549 细胞的侵袭

Transwell 小室试验结果(图 2)显示, 经 ART(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理的 A549 细胞穿膜数量明显低于未经处理的 A549 细胞[(47.11 \pm 8.61) vs (131.0 \pm 14.58) 个, $t = 14.87, P < 0.01$], 结果说明 ART(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 显著抑制 A549 细胞的侵袭能力。

2.4 ART 降低肺癌 A549 细胞 HuR、MMP-9 蛋白的表达水平

Western blotting 检测结果(图 3)显示, 经 ART

(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 处理 48 h 的肺癌 A549 细胞 HuR 蛋白表达水平显著低于未经处理的 A549 细胞[(0.15 \pm 0.01) vs (0.24 \pm 0.03), $t = 7.40, P < 0.01$], 同时发现 MMP-9 蛋白表达降低[(0.16 \pm 0.02) vs (0.25 \pm 0.03), $t = 4.2, P < 0.01$]。

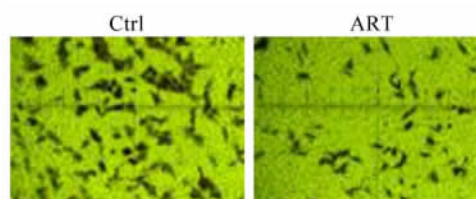


图 2 青蒿琥酯对人肺癌 A549 细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色, $\times 100$)

Fig. 2 Effect of artesunate on the invasion ability of human lung cancer A549 cells (Crystal violet staining, $\times 100$)

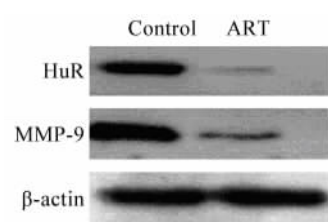


图 3 ART 影响 A549 细胞中 HuR、MMP-9 蛋白表达水平
Fig. 3 Artesunate affects the protein expressions of HuR and MMP-9 in A549 cells

3 讨论

肺癌是全球范围内最常见的肿瘤死亡原因, 初诊时多数已经发生局部扩散和远处转移。即使早期患者能接受外科根治性手术, 但仍有较高的复发率和转移率, 且患者 5 年生存率不足 10%; 化疗仍然是目前肺癌治疗的主要手段, 常规的细胞毒性药物对正常细胞损伤大, 易发生耐药。近年来研究发现, 从中草药中提取的有效成分具有抗肿瘤作用, 给肿瘤患者带来新的希望。ART 是在抗疟疾方面有突出疗效的青蒿素类药物。国内外科科研人员以及本课题组成员研究发现 ART 能够发挥抗肿瘤作用^[7-10]。本实验的研究目的在于证实 ART 抗肿瘤细胞侵袭转移并初步探讨其分子机制。本研究结果表明, ART 对 A549 细胞的增殖有明显抑制作用, 并且呈剂量依赖特征; 较低质量浓度的 ART(30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 能够抑制 A549 细胞迁移和侵袭能力。

HuR 作为一种 RNA 结合蛋白可以调节 mRNA

稳定性^[11-12], MMP-9 是一类降解细胞外基质的关键酶, 是 HuR 调控的下游分子, 与肿瘤转移有密切关系^[13-15]。笔者课题组一直致力于探索 HuR 分子在肿瘤中的生物学作用, 前期研究^[5-6]发现 HuR 与非小细胞肺癌临床分期、淋巴结转移密切相关, 是非小细胞肺癌患者不良预后的独立因素。本研究在明确 ART 能够抑制 A549 细胞增殖、迁移、侵袭的基础上, 进一步探讨 ART 对 HuR 和 MMP-9 蛋白表达的影响。结果表明, ART 能够同时抑制细胞中 HuR 和 MMP-9 蛋白表达, 说明 ART 可能通过调控 HuR、MMP-9 的表达进而抑制人肺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭。

总之, 本课题研究结果证明 ART 对体外培养的人肺癌 A549 细胞的增殖、迁移和侵袭有明显抑制作用, 同时能够降低 A549 细胞中 HuR 和 MMP-9 表达水平, 说明抑制 A549 细胞增殖、迁移、侵袭可能与降低细胞中 HuR 和 MMP-9 表达有关。研究结果将为深入研究 ART 抗肿瘤作用及 HuR 分子在肿瘤中的生物学行为提供参考。

[参 考 文 献]

- [1] WHITE N J, HIEN T T, NOSTEN F H. A brief history of Qinghaosu[J]. Trends Parasitol, 2015, 31(12): 607-610. DOI: 10.1016/j.pt.2015.10.010.
- [2] MILLER L H, SU X. Artemisinin: discovery from the Chinese herbal garden[J]. Cell, 2011, 146(6): 855-858. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.024.
- [3] CRESPO-ORTIZ M P, WEI M Q. Antitumor activity of artemisinin and its derivatives: from a well-known antimalarial agent to a potential anticancer drug[J/OL]. Biomed Biotechnol, 2012, 2012: 24757[2016-12-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3228295/>. DOI:10.1155/2012/247597.
- [4] SRIKANTAN S, GOROSPE M. HuR function in disease[J/OL]. Front Biosci, 2012, 17(1): 189-205[2016-12-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4540328/>.
- [5] WANG J, ZHAO W, GUO Y, et al. The expression of RNA-binding protein HuR in non-small cell lung cancer correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymph node metastasis[J]. Oncology, 2009, 76(6): 420-429. DOI: 10.1159/000216837.
- [6] WANG J, WANG B, BI J, et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with angiogenesis, lymphangiogenesis, and poor outcome in lung cancer[J]. Med Oncol, 2011, 28(Suppl 1): 577-585. DOI: 10.1007/s12032-010-9734-6.
- [7] MAGENTA D, SANGIOVANNI E, BASILICO N, et al. Inhibition of metalloproteinase-9 secretion and gene expression by artemisinin derivatives[J]. Acta Trop, 2014, 140(12): 77-83. DOI:10.1016/j.actatropica.2014.08.008. 2014.214.
- [8] 陈献珊 韩坤元 陈锋夏, 等. 青蒿琥酯对肺癌 A549 细胞侵袭能力及 ICAM-1、MMP-9 表达的影响[J]. 中国肺癌杂志, 2013, 16(11): 567-571. DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2013.11.01.
- [9] LIU W M, GRAVETT A M, DALGLEISH A G. The antimalarial agent artesunate possesses anticancer properties that can be enhanced by combination strategies[J]. Int J Cancer, 2011, 128(6): 1471-1480. DOI: 10.1002/ijc.25707.
- [10] MICHAELIS M, KLEINSCHMIDT M C, BARTH S, et al. Anticancer effects of artesunate in a panel of chemoresistant neuroblastoma cell lines[J]. Biochem Pharmacol, 2010, 79(2): 130-136. DOI: 10.1016/j.bcp.2009.08.013.
- [11] WANG J, GUO Y, CHU H, et al. Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(6): 10015-10041. DOI:10.3390/ijms140510015.
- [12] ABDELMOHSEN K, GOROSPE M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR[J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2010, 1(2): 214-229. DOI: 10.1002/wrna.4.
- [13] QIAO X, ZHAI X, WANG J, et al. Sequential measurements of serum matrix metalloproteinase 9 to monitor chemotherapy responses in patients with advanced non-small-cell lung cancer[J/OL]. Onco Targets Ther, 2016, 9: 3299-32305[2016-12-20]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4898419/>. DOI: 10.2147/OTT.S102351.
- [14] GONG L, WU D, ZOU J, et al. Prognostic impact of serum and tissue MMP-9 in non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2016, 7(14): 18458-18468. DOI: 10.18632/oncotarget.7607.
- [15] TANAKA T, IMAMURA T, YONEDA M, et al. Enhancement of active MMP release and invasive activity of lymph node metastatic tongue cancer cells by elevated signaling via the TNF- α -TNFR1-NF- κ B pathway and a possible involvement of angiopoietin-like 4 in lung metastasis[J]. Int J Oncol, 2016, 49(4): 1377-1384. DOI: 10.3892/ijo.2016.3653.

[收稿日期] 2016 - 12 - 18

[修回日期] 2017 - 02 - 15

[本文编辑] 党瑞山