

# 香叶木素对人肺腺癌细胞系 H1299 和 A549 增殖能力影响的研究\*

宋长山<sup>1</sup> 沈柏儒<sup>1</sup> 朱珊<sup>2</sup> 苏珊<sup>1</sup> 陈家亿<sup>1</sup> 朱尚媚<sup>1</sup> 余敏<sup>1</sup>

**[摘要]** 目的:探究香叶木素(Dios)作用前后人肺腺癌细胞系 H1299 和 A549 细胞增殖活性的改变。方法:取 RPMI-1640 培养基培养的人肺腺癌细胞系 H1299 及 A549 用于实验。采用 CCK8 法检测 Dios 作用前后人肺腺癌细胞系 H1299 和 A549 细胞增殖活性的改变。结果:不同浓度(0.5、10、20  $\mu\text{mol/L}$ )Dios 作用 H1299 细胞 24 h 后,细胞的增殖抑制率分别为(10.9 $\pm$ 2.5)%、(32.7 $\pm$ 1.8)%、(41.2 $\pm$ 2.1)%、(51.7 $\pm$ 2.8)%,而 A549 细胞增殖抑制率为(18.9 $\pm$ 2.3)%、(30.8 $\pm$ 2.6)%、(42.2 $\pm$ 1.2)%、(50.7 $\pm$ 2.1)%。结论:Dios 对人肺腺癌细胞系 H1299 和 A549 的增殖有明显的抑制作用,提示 Dios 通过抑制肺腺癌细胞的增殖,进而起到良好的抗肿瘤作用。

**[关键词]** 香叶木素;肺腺癌;增殖

doi:10.13201/j.issn.1009-5918.2017.04.013

**[中图分类号]** R734.2 **[文献标志码]** A

## The effect of the diosmetin on growth and proliferation of human lung adenocarcinoma cell line H1299 and A549 in vitro

SONG Changshan<sup>1</sup> SHEN Bairu<sup>1</sup> ZHU Shan<sup>2</sup> SU Shan<sup>1</sup>  
CHEN Jiayi<sup>1</sup> ZHU Shangmei<sup>1</sup> YU Min<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Department of Thoracic Surgery, Chancheng District Central Hospital of Foshan City, Foshan 528000, China; <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology, Chancheng District Central Hospital of Foshan City)

Corresponding author: SHEN Bairu, E-mail: bairushen@yeah.net

**Abstract Objective:** To investigate the changes of proliferation activity in human lung adenocarcinoma cell lines H1299 and A549 before and after intervention with diosporine (Dios). **Method:** Human lung adenocarcinoma cell lines H1299 and A549 cultured in PRIM-1640 medium were used in the experiment. We used the CCK8 methods to detect the proliferation activity of human lung adenocarcinoma cell lines H1299 and A549 before and after intervention with Dios. **Result:** H1299 cells were treated with Dios at different concentrations (0.5, 10, 20  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 h, the cell proliferation inhibition rate was (10.9 $\pm$ 2.5)%, (32.7 $\pm$ 1.8)%, (41.2 $\pm$ 2.1)%, (51.7 $\pm$ 2.8)%, respectively; while the cell proliferation inhibition rate in A549 cells was (18.9 $\pm$ 2.3)%, (30.8 $\pm$ 2.6)%, (42.2 $\pm$ 1.2)%, (50.7 $\pm$ 2.1)%, respectively. **Conclusion:** Dios has an obvious inhibitory effect on the proliferation in human lung adenocarcinoma cell lines H1299 and A549, suggesting that Dios inhibits the proliferation of lung adenocarcinoma cells and thus plays a good anti-tumor effect.

**Key words** diosmetin; lung adenocarcinoma; proliferation

香叶木素(diosmetin, Dios)是一类常见的黄酮类化合物,其主要从我国南方常见草本植物蓬子菜和柑橘类中的提取,具有清除自由基、抗炎、抗氧化应激等多种药理学效应<sup>[1-4]</sup>。近年来在抑制肝癌、乳腺癌等肿瘤细胞增殖等方面做了大量工作,显示 Dios 可通过诱导抑制肿瘤增殖、肿瘤细胞凋亡及调控肿瘤细胞周期等多种作用机制发挥其抗肿瘤作用,如在乳腺癌细胞、肝癌细胞、结肠癌细胞和白血

病细胞等多种肿瘤中均具有明显的体外生长抑制活性,是一种很有前景的预防及治疗癌症的药物<sup>[5-7]</sup>。但其抗肿瘤的作用机制未得到明确阐述, Dios 在不同肿瘤中的作用机制不尽相同。Ninomiya 等<sup>[5]</sup>发现 Dios 能够抑制人类白血病 HL-60 细胞增殖,可能与其 B 环上的羟基和甲氧基活性有关。Androutsopoulos 等<sup>[6]</sup>研究发现 Dios 通过激活 CYP1A1 和 CYP1B1 的活性,抑制乳腺癌 MDA-MB468 细胞生长,细胞周期阻滞于 G1 期,而对正常乳腺细胞 MCF-10A 无细胞毒性。杨阳等<sup>[7]</sup>在人肝癌 HepG2 细胞的研究中发现 Dios 可以上调 Bax、cleaved-caspase-3、cleaved-caspase-8、cleaved-caspase-9 诱导细胞凋亡,上调 p21、p53 的

\* 基金项目:2016 年佛山市科技局科技攻关项目(No: 2016AB001691)

<sup>1</sup> 佛山市禅城区中心医院(广东医学院附属禅城医院)胸外科(广东佛山,528000)

<sup>2</sup> 佛山市禅城区中心医院(广东医学院附属禅城医院)妇产科

通信作者:沈柏儒, E-mail: bairushen@yeah.net

表达水平,下调 cyclinB、CDK1 的表达水平,诱导细胞 G2/M 周期阻滞。Dios 还能够抑制细胞色素 P450 酶活性,通过上调 p53 表达调控 TGF-β 信号途径,下调 Bcl-2、TGF-β、TβR-II、Smad3、p-Smad2/3 的蛋白表达,诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡<sup>[8]</sup>。但对肺癌细胞抑制作用的研究不多,本研究通过建立人肺腺癌 H1299 和 A549 细胞系,采用 CCK8 法检测不同浓度 Dios 作用前后人肺腺癌细胞系 H1299 和 A549 细胞增殖活性的改变,探究其对肺腺癌细胞的抑制增殖的作用效果,为解释其作用机制提供实验数据。

### 1 资料与方法

#### 1.1 实验材料

1.1.1 肺癌细胞系的获取 H1299 和 A549 由广东医科大学附属第一医院研究室提供。

1.1.2 实验试剂 Dios:美国 Sigma 公司;RPM I 1640 培养基:Gibco,USA;0.05%胰蛋白酶-EDTA (Trypsin-EDTA):Gibco USA;胎牛血清(FBS):Gibco,USA;CCK-8 试剂盒:Dojindo,Japan。

1.1.3 实验仪器 CO<sub>2</sub> 培养箱:Heraeus,Germany;GB-II 无菌工作台:北京新技术应用研究所;电子分析天平:BP-221s,Sartorius,Germany;Milli-Q 超纯水系统:Millipore,USA;立式压力蒸汽锅:北仑天恒自动化仪器厂;光学显微镜:日本 Olympus 公司;荧光成像系统:TCS SP5 II,Leica,Germany;细胞计数板:广东医学院临床研究中心;摇床:美国 SI 公司;HY-5A 型回旋式振荡器:金坛顺华仪器公司。

#### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 人肺腺癌细胞 H1299、A549 细胞系用 RPMI-1640 培养基培养,培养箱环境为 5% CO<sub>2</sub>、37℃ 恒温进行培养。每 1~2 天换液或用 0.25% 胰酶消化并传代,取生长对数期的细胞用于以下实验。

1.2.2 实验过程及观察指标 取对数期生长的 H1299 和 A549 细胞,PBS 洗涤 2 次,胰酶常规消化,用新鲜培养基重悬细胞,计数,调整细胞悬液浓度,每孔加入 100 μl,铺板使待测细胞调密度至 5000~10000 个/孔,(边缘孔用无菌 PBS 填充)。25% CO<sub>2</sub>,37℃ 孵育,待细胞单层铺满孔底(96 孔平底板)。Dios 组加入不同浓度梯度的 Dios,每孔 100 μl,设 5 个复孔。空白对照组加入等体积的生理盐水。2 组细胞于 35% CO<sub>2</sub>,37℃ 孵育 24 h,倒置显微镜下观察。

1.2.3 2 组细胞按 CCK-8 试剂盒说明书向每孔细胞加入 CCK-8 液 10 μl 和新鲜培养基 90 μl(总体积 100 μl),置 5% CO<sub>2</sub>,37℃ 温箱孵育 2 h。

2 组细胞在酶联免疫检测仪 OD450 nm 处测量各孔的吸光值,记录实验结果。以时间为横坐

标,吸光值为纵坐标,绘制细胞增殖曲线。

2 组细胞每孔加入 150 μl 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 OD490 nm 处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔(培养基、CCK8、二甲基亚砜),对照孔(细胞、培养液、CCK8、二甲基亚砜)。

#### 1.3 统计学处理

采用 SPSS 14.0 统计学软件进行数据分析,正态分布资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。多样本间均数比较先采用方差分析,2 样本间均数比较采用成组 *t* 检验。以 *P* < 0.05 差异有统计学意义。

### 2 结果

CCK8 结果表明,在同一时间点(24 h),随着 Dios 的浓度的增加,人肺腺癌细胞系 H1299、A549 细胞存活的数量随之减少,细胞增殖受到明显抑制;Dios(0、5、10、20 μmol/L)作用 H1299 细胞 24 h 后,细胞的增殖抑制率分别为(10.9 ± 2.5)%、(32.7 ± 1.8)%、(41.2 ± 2.1)%、(51.7 ± 2.8)%、而 A549 细胞增殖抑制率为(18.9 ± 2.3)%、(30.8 ± 2.6)%、(42.2 ± 1.2)%、(50.7 ± 2.1)% (见表 1、2)。

表 1 Dios 处理 H1299 细胞 24 h 后细胞增殖抑制率

组别	药物剂量	细胞抑制率 %, $\bar{x} \pm s$
空白对照组	—	10.9 ± 2.5
Dios 组	5 μmol/L	32.7 ± 1.8 <sup>1)</sup>
	10 μmol/L	41.2 ± 2.1 <sup>1) 2)</sup>
	20 μmol/L	51.7 ± 2.8 <sup>1) 2) 3)</sup>

与空白对照组比较,<sup>1)</sup> *P* < 0.05;与 Dios 5 μmol/L 组比较,<sup>2)</sup> *P* < 0.05;与 Dios 10 μmol/L 组比较,<sup>3)</sup> *P* < 0.05。

表 2 Dios 处理 A549 细胞 24 h 后细胞增殖抑制率

组别	药物剂量	细胞抑制率 %, $\bar{x} \pm s$
空白对照组	—	18.9 ± 2.3
Dios 组	5 μmol/L	30.8 ± 2.6 <sup>1)</sup>
	10 μmol/L	42.2 ± 1.2 <sup>1)</sup>
	20 μmol/L	50.7 ± 2.1 <sup>1) 2) 3)</sup>

与空白对照组比较,<sup>1)</sup> *P* < 0.05;与 Dios 5 μmol/L 组比较,<sup>2)</sup> *P* < 0.05;与 Dios 10 μmol/L 组比较,<sup>3)</sup> *P* < 0.05。

### 3 讨论

近年来,黄酮类物质的抗肿瘤作用研究是目前肿瘤学领域的热点研究方向。研究提示,部分黄酮类化合物对体内外肿瘤细胞的生长活性均具有良好的抑制作用,且对正常细胞毒性小,近年研究较多的黄酮类化合物的药理学机制有诱导恶性肿瘤细胞凋亡、抑制恶性肿瘤细胞增殖、影响细胞周期、

影响细胞信号转导、抑制新生血管形成等。黄酮类化合物是研究前景较好的抗肿瘤药物之一,其药物代谢活性也备受瞩目。Dios 是从我国南方药用草本植物蓬子菜和柑橘类中提取的一类黄酮类化合物,具有清除自由基、抗炎、抗氧化应激等多种药理学效应,在乳腺癌细胞、肝癌细胞、结肠癌细胞和白血病细胞等多种肿瘤中均具有明显的体外生长抑制活性。目前已有相关研究表明 Dios 可以抑制肿瘤细胞增殖、阻滞细胞周期进程<sup>[9]</sup>。Zhan 等<sup>[10]</sup>发现 Dios 的衍生物明显抑制 A549 细胞的增殖,且深入了解细胞凋亡率与 Dios 的浓度成正比,没有探讨细胞凋亡分子机制。Poór 等<sup>[11]</sup>研究表明 Dios 能够抑制肝癌 HepG2 细胞周期进程阻滞于 G2/M 期,与儿茶酚氧位甲基转移酶(catechol-O-methyltransferase, COMT)代谢活化有关。Barrajón-Catalán 等<sup>[12]</sup>研究 JIMT-1 细胞株表明 Dios 下调 ERK1/2 表达,细胞阻滞于 G1 期。Liu 等<sup>[13]</sup>研究 SK-HEP-1、MHcc97H 细胞株发现 Dios 通过抑制 PKC/MAPK/MMP 信号途径,下调 MMP-2、MMP-9,抑制肝癌细胞侵袭和转移。Liu 等<sup>[14]</sup>研究 HepG2 细胞株表明 Dios 能够下调 Bcl-2、TGF- $\beta$ 、T $\beta$ RII、Smad3 和 p-Smad2/3 的表达,上调 p53 的表达,抑制肝癌细胞增殖,诱导细胞凋亡。

本研究通过体外培养人肺腺癌 H1299 和 A549 细胞系,观察 Dios 对人肺腺癌细胞系 H1299 和 A549 的细胞增殖活性的抑制作用。实验结果显示,5~20  $\mu$ mol/L Dios 对人肺腺癌 H1299 和 A549 细胞系有明显的增殖抑制作用,随着 Dios 浓度的增加,抑制率呈剂量依赖关系。推测与其阻滞细胞周期转换、增强 T 淋巴细胞功能及促进细胞凋亡有关,尚有待进一步分子生物学研究证实。

#### 参考文献

- [1] Patel K, Gadewar M, Tahilyani V, et al. A review on pharmacological and analytical aspects of diosmetin: A concise report[J]. Chin J Integr Med, 2013, 19(10): 792-800.
- [2] Yu G, Wan R, Yin G, et al. Diosmetin ameliorates the severity of cerulein-induced acute pancreatitis in mice by inhibiting the activation of the nuclear factor- $\kappa$ B [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(5): 2133-2142.
- [3] Kanaze F I, Bounartzi M I, Niopas I. A validated HPLC determination of the flavone aglycone diosmetin in human plasma[J]. Biomed Chromatogr, 2004, 18(10): 800-804.
- [4] Mastuda H, Morikawa T, Ueda K, et al. Structural requirements of flavonoids for inhibition of antigen-induced degranulation, TNF-alpha and IL-4 production

from RBL-2H3 cells[J]. Bioorg Med Chem, 2002, 10(10): 3123-3128.

- [5] Ninomiya M, Nishida K, Tanaka K, et al. Structure-activity relationship studies of 5,7-dihydroxyflavones as naturally occurring inhibitors of cell proliferation in human leukemia HL-60 cells[J]. J Nat Med, 2013, 67(3): 460-467.
- [6] Androutsopoulos V P, Mahale S, Arroo R R, et al. Anticancer effects of the flavonoid diosmetin on cell cycle progression and proliferation of MDA-MB 468 breast cancer cells due to CYP1 activation[J]. Oncol Rep, 2009, 21(6): 1525-1528.
- [7] 杨阳, 林满洲, 黄艺文, 等. 香叶木素诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡及周期阻滞的机制研究[J]. 海南医学, 2016, 27(3): 354-357.
- [8] Quintieri L, Bortolozzo S, Stragliotto S, et al. Flavonoids diosmetin and hesperetin are potent inhibitors of cytochrome P450 2C9-mediated drug metabolism in vitro [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2010, 25(5): 466-476.
- [9] Androutsopoulos V P, Spandidos D A. The flavonoids diosmetin and luteolin exert synergistic cytostatic effects in human hepatoma HepG2 cells via CYP1A-catalyzed metabolism, activation of JNK and ERK and P53/P21 up-regulation[J]. J Nutr Biochem, 2013, 24(2): 496-504.
- [10] Zhan G, Pan L, Tu K, et al. Antitumor, Antioxidant, and Nitrite Scavenging Effects of Chinese Water Chestnut (*Eleocharis dulcis*) Peel Flavonoids [J]. J Food Sci, 2016, 81(10): H2578-H2586.
- [11] Poór M, Zrínyi Z, Kőszegi T. Structure related effects of flavonoid aglycones on cell cycle progression of HepG2 cells: Metabolic activation of fisetin and quercetin by catechol-O-methyltransferase (COMT) [J]. Biomed Pharmacother, 2016, 83: 998-1005.
- [12] Barrajón-Catalán E, Taamalli A, Quirantes-Piné R, et al. Differential metabolomic analysis of the potential antiproliferative mechanism of olive leaf extract on the JIMT-1 breast cancer cell line[J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 105: 156-162.
- [13] Liu J, Wen X, Liu B, et al. Diosmetin inhibits the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by downregulating the expression levels of MMP-2 and MMP-9 [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3): 2401-2408.
- [14] Liu B, Shi Y, Peng W, et al. Diosmetin induces apoptosis by upregulating p53 via the TGF- $\beta$  signal pathway in HepG2 hepatoma cells[J]. Mol Med Rep, 2016, 14(1): 159-164.

(收稿日期: 2017-02-06)