积雪草酸对人下咽癌细胞生物学行为的影响

陈　霞　欧阳坚　何　旺
萍乡卫生职业学院　江 西　萍 乡　337000

摘　要:目的 探究积雪草酸对人下咽癌 Fadu 细胞增殖、迁移、侵袭等生物学行为的影响。方法:分别用不同浓度 0μmol/L(CN 组)、10μmol/L(LN 组)、20μmol/L(MN1 组)、30μmol/L(MN2 组)和 40μmol/L(HN 组)的积雪草酸体外干预 Fadu 细胞,倒置显微镜观察细胞形态改变、MTT 法检测细胞增殖率,划痕实验检测细胞迁移能力,Transwell 实验检测细胞侵袭能力的改变。结果:与对照组比较,用药组可明显抑制 Fadu 细胞增殖,迁移和侵袭能力。结论:积雪草酸可体外抑制人下咽癌 Fadu 细胞的增殖、迁移和侵袭。
关键词:积雪草酸;人下咽癌 Fadu 细胞;细胞增殖;细胞迁移;细胞侵袭

Effects of asia on the biological behavior of human hypopharyngeal cancer cells

Xia Chen　Jian Ouyang　Wang He
Pingxiang Health Vocational College, Pingxiang, Jiangxi Pingxiang 337000

Abstract:Objective To investigate the effects of Asiatic acid(AA) on the proliferation, migration and invasion of human hypopharyngeal carcinoma Fadu cells. Methods: Fadu cells were treated with different concentrations (0 μmol/L for CN, 10 μmol/L for LN, 20 μmol/L for MN1,30 μmol/L for MN2 and 40 μmol/L for HN) in vitro. Cell morphology was observed by inverted microscope; cell proliferation was detected by MTT assay; cell migration was detected by scratch test; and cell invasion was detected by Transwell test. Results: Fadu cell proliferation, migration and invasion were significantly inhibited in the treatment group compared with the control group. Conclusion: AA can inhibit the proliferation, migration and invasion of human hypopharyngeal carcinoma Fadu cells in vitro.
Key Words:Asiatic acid; Fadu cells; Cell proliferation; Cell migration; Cell invasion

积雪草酸(Asiatic acid,AA)是一种从植物积雪草中提取出来的天然药物成分,近年来研究表明,它主要具有抗炎、抗阿茨海默病、护肝和抗肿瘤等作用,在心血管疾病中的保护作用也日渐报道。研究证实积雪草酸能够抑制结肠癌细胞增殖、诱导乳腺癌、肝癌等肿瘤细胞凋亡,目前积雪草酸已应用于大部分肿瘤研究,但头颈部肿瘤研究较少,对下咽癌的研究几乎没有。因此,本研究以人下咽癌 Fadu 细胞为研究对象,采用不同浓度的积雪草酸体外干预 Fadu 细胞,探讨 AA 在体外对下咽癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,拟为进一步研究人 AA 抗下咽癌发病机制及治疗方案提供实验室基础。

一、材料

人下咽癌 Fadu 细胞购自中科院生物化学与细胞生物学研究所;AA 购自南京景竹生物科技有限公司;胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司;DMEM 培养液购自赛默飞世尔(苏州)仪器有限公司;细胞增殖检测试剂盒(MTT)购于上海碧云天生物技术有限公司;Transwell 小室购自美国 Corning costar 公司,Matrigengel 胶购自美国 BD 公司。

二、方法

(一)细胞培养

Fadu 细胞用 10% 胎牛血清和 1x105U/L 青链霉素的 DMEM 培养液于 5%CO2、37℃饱和湿度的培养箱中培养,每 2 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行观察及下一步研究。

(二)形态学观察

取对数生长期 Fadu 细胞胰酶消化传代后,分成五组,计数 2x105 个 /mL 的密度接种到 6 孔培养板中,待细胞贴壁后,分别加入不同浓度 0μmol/L(CN 组)、10μmol/L(LN 组)、30μmol/L(MN1 组)、30μmol/L(MN2 组)和 40μmol/L(HN 组)的 AA 溶液进行干预共同培养,24 小时后,采用倒置显微镜观察细胞形态的改变。

(三)MTT 比色法检测细胞增殖率

取对数生长期 Fadu 细胞悬液 100ul,细胞密度 1x104 个接种到 96 孔板,每孔培养液为 100ul,孔板边缘用 PBS 缓冲液封闭,于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养至贴壁,加入不同浓度(0μmol/L、10μmol/L、20μmol/L、30μmol/L、40μmol/L)的 AA 溶液,设置 5 个复孔,边缘改用 DMEM 封闭,于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养 24h 后,每孔加入 20μl 的 MTT 溶液,37℃、5% CO2 培养箱中培养 4h,小心弃去 96 孔板中液体,加入 150ml 的 DMSO,振荡 10 分钟,用酶标仪在 490nm 波长下测定吸光度(A)值并记录。计算细胞增殖抑制率 =(1-A 给药组 /A 空白对照组)×100%。

（四）划痕实验检测细胞迁移能力

取对数生长期的 Fadu 细胞接种到 6 孔板中，每孔培养液为 3ml，细胞数量为 1.5x105 个细胞，于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养至贴壁，移液枪垂直在每孔细胞中间画线，PBS 液清洗 3 次，加入不同浓度（0μmol/L、10μmol/L、20μmol/L、30μmol/L、40μmol/L） 的 AA 溶液，设置 2 个复孔，培养箱中培养，按 0h，12h，24h，观察细胞并拍照记录。

（五）Transwell 实验检测细胞侵袭能力

4℃过夜融化 Matrigengel 胶，垂直加入使之均匀平铺于 Transwewll 上室中，放入培养箱（37℃，5%CO_2）中孵育 3h，每孔中加入 100 μL 无血清培养基后，于培养箱放置 30min，进行基底膜水化；孔板下室加入 500μL 含 10%FBS 培养基，取对数生长期 Fadu 细调至 2.5×10^5/mL，取 200μL 悬液加入 Transwell 上室中，培养箱培养 24h 后进行 4% 多聚甲醛固定和 0.1% 结晶紫染色，适当风干后，10 倍显微镜下选取 5 个视野观察细胞并计数。

三、结果

（一）形态学观察

与 CN 组比较，用药组细胞数量减少，细胞形态皱缩或变形，细胞膜内陷，并出现触角样改变，随着药物剂量浓度加大，细胞皱缩愈明显。

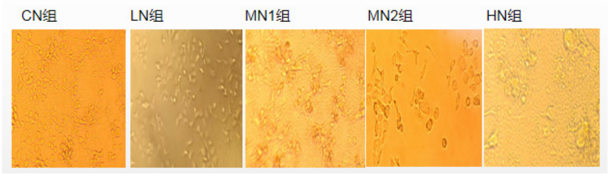

图 1：不同浓度 AA 溶液干预培养后 Fadu 细胞形态结果

（二）细胞增殖能力的影响

结果显示，与 CN 组比较用药组细胞增殖明显受抑制，抑制率差异明显（$P<0.05$）；不同浓度给药组（LN 组、MN1 组、MN2 组和 HN 组）组间相互比较，MN 组之间无明显差异，LN 组与 HN 组间比较，细胞增殖抑制率差异较显著（$P<0.05$）（见表 1），药物抑制程度呈现剂量和时间依赖性（见图 2）。

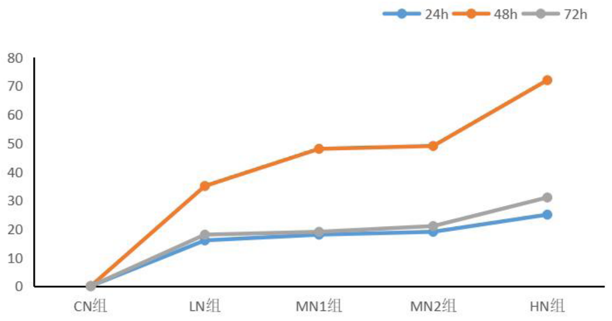

图 2：24、48 和 72 小时不同浓度 AA 对 Fadu 细胞的增殖抑制率的影响

（三）细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验结果显示，与 CN 组比较用药组细胞的迁移指数明显减少，能力减弱，差异有统计学意义（P<0.05）（见图 3）。

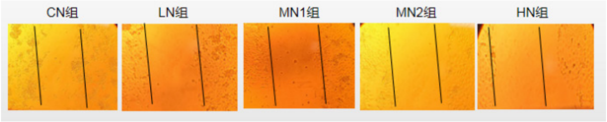

图 3：不同浓度 AA 溶液细胞划痕实验的镜下结果

（四）细胞侵袭能力的影响

Transwell 细胞侵袭实验结果显示，与 CN 组相比，HN 组侵入的细胞数量明显减少，差异有统计学意义（P<0.01）；MN 组间相比，差异无统计学意义（P>0.05，图 4）。

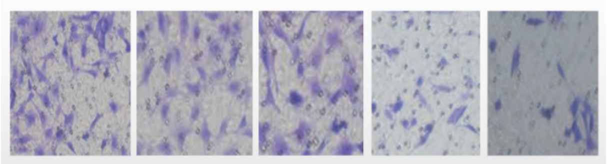

图 4：不同浓度 AA 溶液对 Fadu 细胞侵袭能力的影响

四、讨论

人下咽癌是一种头颈部恶性肿瘤，大部分患者在诊断时即已发生周围组织肿瘤浸润及淋巴结远处转移等，因此治疗效果欠佳、预后极差。下咽癌细胞的易侵袭性、易转移性严重影响了下咽癌的治愈率，让患者复

表 1：积雪草酸（AA）对 Fadu 细胞的增殖抑制率的影响（$\bar{x}\pm s$）

分组	浓度（μmol/L）	Fadu 细胞增殖抑制率（%）		
		24h	48h	72h
CN 组	0mol/L	0.587±0.041	0.801±0.005	0.364±0.039
LN 组	10mol/L	0.578±0.021	0.462±0.032*	0.336±0.047
MN1 组	20mol/L	0.514±0.002*	0.384±0.024*	0.305±0.027
MN2 组	30mol/L	0.506±0.035*	0.376±0.045*	0.300±0.085*
HN 组	40mol/L	0.496±0.070*	0.273±0.021*	0.249±0.038*

注：与空白对照组比较 *$P<0.05$。

发率及死亡率居高不下[1]。目前下咽癌主要使用顺铂等抗癌药物进行术后化学治疗，此类药物毒副作用较大，且费用昂贵，因此寻找一种更加有效、安全且经济的方法对于下咽癌患者具有十分重要的临床价值和意义。

AA 是一种从植物积雪草中提取出来的天然药物成分，近年来，国内研究发现积雪草酸具有许多生物活性，引起了人们极大的研究兴趣。研究显示：积雪草酸是促进肿瘤细胞凋亡且毒副作用小的天然产物，裸鼠成瘤模型上证实，积雪草酸可以抑制肺癌肿瘤的生长，而对正常细胞无明显影响[2]；另有研究表明积雪草酸可以抑制大鼠结肠癌模型中的癌前病变、炎症、细胞增殖和诱导细胞凋亡，而对结肠黏膜细胞无毒性作用[3]。以上研究结果说明，积雪草酸有可能作为低毒高效的抗肿瘤药物应用。

更多研究已经证实：积雪草酸在体内或体外对乳腺癌、卵巢癌、胃癌、胆管癌、淋巴瘤、黑色素瘤均有抗癌作用[4,5,6]。国外已发现积雪草酸可诱导人乳腺癌 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞株经历 S-G2/M 期阻滞和凋亡[7]；可通过降低 Bcl-2 和增加 bax、caspase-3 和 caspase-9 的表达在大鼠结肠癌模型中诱导细胞凋亡[8]；积雪草酸还可通过 p38 途径和 ERK 信号转导途径诱导顺铂耐药的人咽癌细胞凋亡，其抗癌作用呈现剂量依赖性和时间依赖性[9]。

总之，AA 可抑制人下咽癌 Fadu 细胞的增殖，抑制细胞的迁移和侵袭能力，但具体是通过什么信号途径或方式使细胞发生这些生物学行为的改变，仍需要进一步的研究。

参考文献：

[1] 肖麒祎，董频，陈歆维，等. 下咽鳞癌新辅助化疗和（或）手术＋放疗的疗效及预后分析 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志 .2023,(9):700-707.

[2] 邬月娇，杜姝贤，梅宇，等. 积雪草酸及其衍生物抗肿瘤活性研究进展 [J]. 当代化工 .2021,(5):1200-1204.

[3] 褚冬青. 积雪草酸通过诱导凋亡和调节 EMT 抑制舌鳞癌 Tca8113 细胞的生长和迁移 [D]. 锦州医科大学 ,2019。

[4] 金贝贝，刘馨. 羟基积雪草酸抑制人舌癌 Tca8113 细胞增殖的机制研究 [J]. 中国临床药理学杂志 .2020,(11):1528-1530.

[5] 董易，褚冬青，马春宇，等. 积雪草酸对人舌癌 TCA-8113 细胞增殖、凋亡的影响 [J]. 中国药理学通报 .2019,(11):1596-1601.

[6] 苏棋. 积雪草酸对人肝癌 SMMC-7721 细胞体内外增殖和凋亡的影响 [D]. 广西医科大学 ,2019.

[7] 杨兴旺. 积雪草酸对乳腺癌 4T1 细胞迁移、凋亡的影响及相关机制研究 [D]. 锦州医科大学 ,2022.

[8] 郝亚娟. 积雪草酸通过 PI3K/Akt/mTOR/p70S6K 信号通路调控 Pdcd4 诱导结肠癌 SW480/HCT 116 细胞凋亡的机制研究 [D]. 南方医科大学 ,2016.

[9] 郭冰洁. 积雪草酸诱导肝癌细胞凋亡及抑制其迁移侵袭的效应及机制研究 [D]. 中国人民解放军海军军医大学 ,2019.

课题项目：探究积雪草酸对人下咽癌细胞的生物学作用及作用机制；课题编号：202212213。

作者简介：陈霞（1980.10- ），女，汉族，江西省萍乡市，毕业于南昌医科大学，硕士学历，分子生物学专业，研究方向：肿瘤发生机制。