

黄芩素对 Ishikawa 子宫内膜癌细胞增殖及凋亡的影响

马兆霞¹ 熊茫茫¹ 姜雯雯¹ 荣小娟¹ 熊绍风^{2*}

(1. 江西科技学院 江西 南昌 330096)

(2. 南昌大学第一附属医院 江西 南昌 330006)

【摘要】目的：在细胞水平上探讨黄芩素对 Ishikawa 子宫内膜癌细胞的增殖、侵袭、迁移等生物学功能的影响。方法：采用 CCK-8 实验法、细胞克隆实验、细胞划痕实验、侵袭实验、凋亡实验等，探究黄芩素对 Ishikawa 子宫内膜癌细胞增殖的影响。结果：黄芩素能明显抑制 Ishikawa 子宫内膜癌细胞的增殖能力、克隆形成能力、迁移能力、侵袭能力，促进凋亡。结论：黄芩素能明显抑制 Ishikawa 子宫内膜癌细胞的增殖，促进 Ishikawa 子宫内膜癌细胞的凋亡。

【关键词】黄芩素；子宫内膜癌；细胞增殖；细胞凋亡

Effects of Baicalein on Proliferation and Apoptosis of the Endometrial Cancer Cells in Ishikawa

Zhaoxia Ma¹ Mangmang Xiong¹ Wenwen Jiang¹ Xiaojuan Rong¹ Shaofeng Xiong^{2*}

(1.School of Medicine,Jiangxi University of Technology, Nanchang,Jiangxi,330098)

(2. The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang,Jiangxi,330006)

[Abstract] Objective To investigate the effects of baicalein on the proliferation, invasion and migration of endometrial cancer cells in Ishikawa at cellular level. Methods CCK-8 assay, cell cloning assay, cell scratch assay and transwell assay were used to investigate the effect of baicalein on the proliferation of endometrial cancer cells in Ishikawa. Results baicalein could significantly inhibit the proliferation, cloning, migration and invasion of endometrial cancer cells in Ishikawa. Conclusion baicalein could significantly inhibit the proliferation of endometrial cancer cells and promote the apoptosis of Ishikawa endometrial cancer cells.

[Key words] Astragalus; Endometrial cancer; Cell proliferation; Cell apoptosis

子宫内膜癌又称为宫体癌，是发生于女性子宫内膜上皮的一种恶性肿瘤，多发生于绝经后的女性。子宫内膜癌是女性好发的生殖系统肿瘤之一，并且在导致死亡的妇科恶性肿瘤中居第三位，仅次于宫颈癌、卵巢癌^[1]。近年来我国子宫内膜癌的发病率和死亡率呈现上升趋势，严重影响我国女性的生命健康，因此研究发现新型的与子宫内膜癌细胞增殖和凋亡相关的药物，对子宫内膜癌的治疗具有重要的意义^[2]。

中药黄芩为唇形科植物黄芩的干燥根，主产于河北、山西、辽宁等省区，其中河北承德产质量最好，山西产量最大^[3]。黄芩味苦，性寒，具有清热燥湿、泻火解毒、止血、安胎等功效。现代药理学研究发现黄芩具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗过敏、对免疫系统的影响、抗肿瘤、保护肝脏、降血脂、抗动脉粥样硬化、中枢神经系统的保护等作用。黄芩素是黄芩的主要活性成分，近年来发现其在宫颈癌^[4]、卵巢癌^[5]、

肝癌^[6]的治疗中有积极作用，说明其有广谱抗肿瘤的作用，但是其在子宫内膜癌方面的治疗作用报道较少，本研究拟选用子宫内膜癌 Ishikawa 细胞，运用 CCK-8 实验法、克隆形成实验法、迁移实验法、侵袭实验法、凋亡检测实验法等，在细胞水平上探讨黄芩素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞的增殖、迁移、侵袭、凋亡的影响。

1 材料

1.1 细胞株、培养基、血清

实验用子宫内腺癌细胞株 Ishikawa 购于上海吉凯基因化学技术有限公司，培养基 DMEM/F12 (1:1)，购自加拿大 WISENT 公司，胎牛血清购自澳大利亚 CellMax 公司。

1.2 主要试剂

Cell Counting Kit (CCK 试剂盒) 购自北京全式金生物技术有限公司，Annexin-V-FITC、PI 双染凋亡试剂盒购于上海贝博生物公司，Transwell 小室购自

武汉 BOSTER 公司。

1.3 主要仪器

倒置显微镜(日本 NIKON 公司), 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司), 流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 Ishikawa 细胞培养

细胞培养参照刘浩月^[7]的细胞培养方法进行, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养, 至于 37℃、5% CO₂ 的恒温孵育箱中培养。

2.2 CCK-8 细胞的增殖能力检测

Ishikawa 细胞以每孔 5000 个接种于 96 孔板培养, 待细胞贴壁后, 每孔加 10 μ l CCK-8, 孵育 2h, 450nm 波长处测吸光度。

2.3 平板克隆实验单细胞克隆形成能力检测

Ishikawa 细胞以每孔 500 个接种于 6 孔板培养, 培养 10 d, 当细胞长到肉眼可见的克隆时, 停止培养, 甲醇固定, 0.1% 的结晶紫染色, 拍照, 数出不同组形成的克隆数。

2.4 划痕实验细胞迁移能力检测

Ishikawa 细胞以每孔 2×10^5 个接种于 6 孔板培养, 待细胞融合度达 80% 时, 200 μ l 的移液枪枪头 (tip 头) 划细胞, 每孔穿过 3 条分布均匀且互相平行的细胞划痕。弃去培养基, PBS (磷酸盐缓冲液) 洗 2-3 次, 加入完全培养基继续培养。划痕后细胞应在 0 h、24 h、48 h 换无血清培养基, 4 倍镜下拍照记录细胞迁移距离的变化。

2.5 侵袭实验细胞侵袭能力检测

Ishikawa 细胞以每室 200 μ l 3×10^5 个 /ml 接种于铺好 Matrigel 胶的小室中, 小室培养基无血清, 下室 6 孔板, 加入 500 μ l 含 20% 血清的 DMEM/F12 培养基, 轻轻摇匀细胞, 于孵箱中继续培养 48 h, 注意上下室之间一定不要产生气泡。48 h 后取出小室, 甲醇固定, 0.1% 的结晶紫染色, 倒置显微镜下, 随机选取 5 个视野进行拍照记录。

2.6 凋亡实验细胞凋亡水平检测

根据 Annexin-V-FITC/PI 双染凋亡试剂盒说明书, 按照步骤加入各试剂, 流式细胞仪检测。

2.7 实验分组

2.7.1 黄芩素对 Ishikawa 细胞增殖能力的影响
将 Ishikawa 细胞随机分成 5 组, 即加入的黄芩素浓度分别为 0、25、50、100、200 μ mol/L。

2.7.2 黄芩素对 Ishikawa 细胞克隆形成能力的影响
将 Ishikawa 细胞随机分成 4 组, 即加入的黄芩素浓度分别为 0、25、50、100 μ mol/L。

2.7.3 黄芩素对 Ishikawa 细胞迁移能力的影响
将 Ishikawa 细胞随机分成 4 组, 即加入的黄芩素浓度分别为 0、25、50、100 μ mol/L。

2.7.4 黄芩素对 Ishikawa 细胞侵袭能力的影响
将 Ishikawa 细胞随机分成 4 组, 即加入的黄芩素浓度分别为 0、50、100、150 μ mol/L。

2.7.5 黄芩素对 Ishikawa 细胞凋亡水平的影响
将 Ishikawa 细胞随机分成 4 组, 即加入的黄芩素浓度分别为 0、25、50、100 μ mol/L。

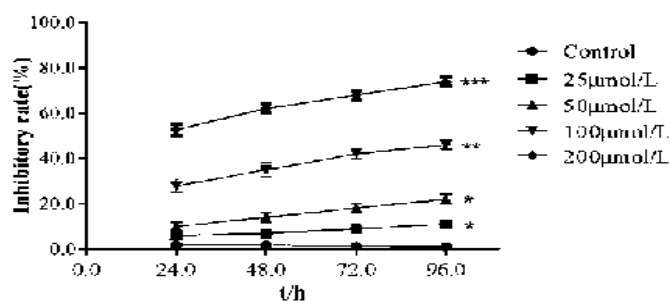
2.8 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism5.0 统计软件进行单因素方差分析 (One-way ANOVA), 组间比较采用 LSD test 检验, $P < 0.05$ 表示有统计学差异, 所有数据均表示为均数 $\pm$ 标准误 (means $\pm$ SEM)。

3 结果

3.1 黄芩素对 Ishikawa 细胞增殖能力的影响

图 1 结果显示: 相同的作用时间, 随着黄芩素浓度的增加, 其对 Ishikawa 细胞增殖能力的抑制作用也增强 ($P < 0.01$); 相同的黄芩素浓度, 随着作用时间的延长, 其对 Ishikawa 细胞增殖能力的抑制作用也增强 ($P < 0.01$)。



注: 与 Control 组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

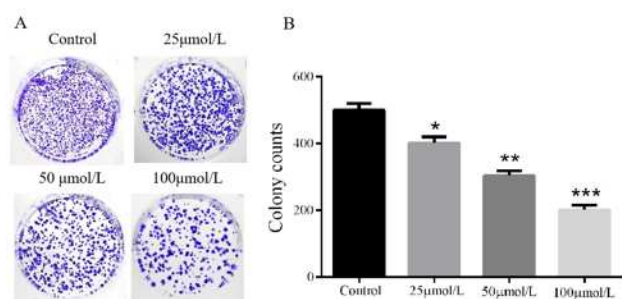
图 1 不同浓度黄芩素对 Ishikawa 细胞增殖能力的影响

3.2 黄芩素对 Ishikawa 细胞克隆形成能力的影响

图二结果显示: 相同的作用时间, 随着黄芩素浓度的增加, 其对 Ishikawa 细胞克隆形成能力的抑制作用也增强。

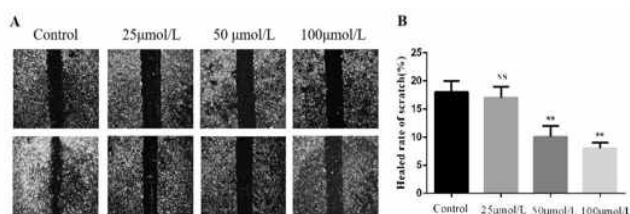
3.3 黄芩素对 Ishikawa 细胞迁移能力的影响

图三结果显示: 相同的作用时间, 当黄芩素的浓度大于 25 μ mol/L 时, 随着黄芩素浓度的增加, 其对 Ishikawa 细胞迁移能力的抑制作用也增强。



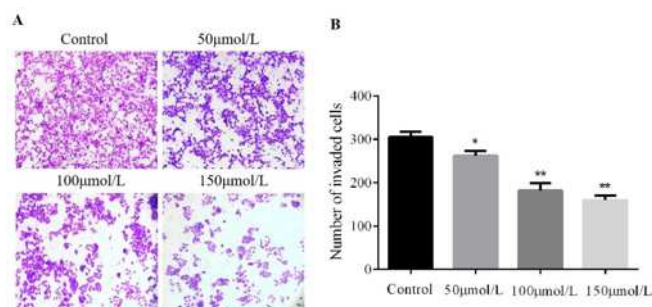
注：与 Control 组比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ 。
图2 不同浓度黄芩素对 Ishikawa 细胞克隆形成能力的影响

A. 细胞克隆形成图；B. 细胞形成克隆数



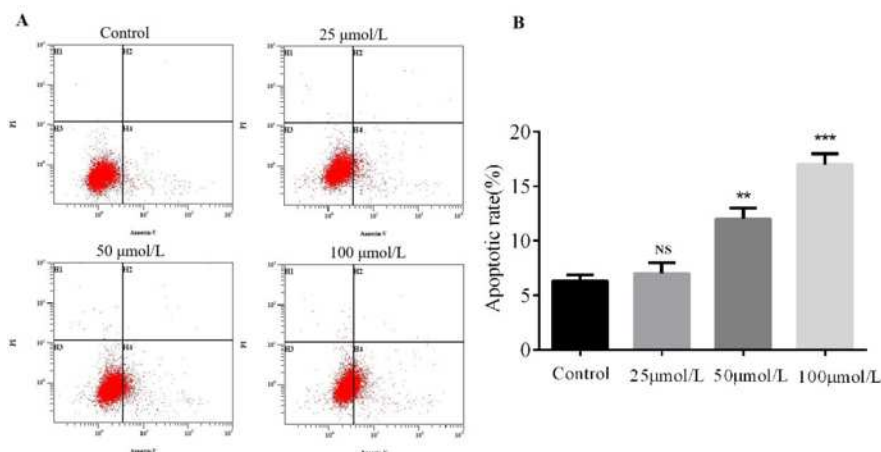
注：与 Control 组比，** $P<0.01$ ；NS: $P>0.05$ 。
图3 不同浓度黄芩素对 Ishikawa 细胞迁移能力的影响

A. 细胞划痕图；B. 细胞迁移率



注：与 Control 组比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。
图4 不同浓度黄芩素对 Ishikawa 细胞侵袭能力的影响

A. 细胞侵袭图；B. 细胞侵袭数



注：与 Control 组比，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ；NS: $P>0.05$ 。

图5 不同浓度黄芩素对 Ishikawa 细胞增殖能力的影响：

A. 细胞凋亡图；B. 细胞凋亡率

3.4 黄芩素对 Ishikawa 细胞侵袭能力的影响

图四结果显示：相同的作用时间，随着黄芩素浓度的增加，其对 Ishikawa 细胞侵袭能力的抑制作用也增强。

3.5 黄芩素对 Ishikawa 细胞凋亡水平的影响

图五结果显示：相同的作用时间，当黄芩素的浓度大于 25 $\mu\text{mol/L}$ 时，随着黄芩素浓度的增加，其对 Ishikawa 细胞凋亡水平的促进作用也增强。

4 讨论

子宫内膜癌作为威胁女性生命健康的生殖系统肿瘤之一的疾病，其发病率和死亡率近年来呈现上升趋势，对女性的生活和健康造成严重的威胁，使得该疾病越来越多的受到关注。子宫内膜癌的分型^[8]、发病机制^[9]、诊断方法^[10]、治疗手段^[11]，现在临床已经研究的很多，但是中药在子宫内膜癌的治疗中的作用研究较少。黄芩是一种清热燥湿类中药，其在泻火解毒，止血，安胎等方面具有积极的作用。黄芩素是黄芩的主要有效成分，其在改善治疗脑血管疾病方面有积极的作用，但是其在子宫内膜癌治疗方面的研究相对较少。本研究利用子宫内膜癌 Ishikawa 细胞，通过细胞增殖实验、克隆形成实验、迁移实验、侵袭实验、凋亡实验探究黄芩素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞增殖及凋亡的影响，为子宫内膜癌的治疗提供了新的治疗思路。然而，需要注意的是，中药作为辅助治疗的效果可能因人而异，还需要更多的临床研究来验证其疗效和安全性。在治疗子宫内膜癌时，应该综合考虑患者的个体情况，结合现有的治疗手段进行综合治疗，

以达到最佳的治疗效果。

中药在子宫内膜癌治疗中的作用研究相对较少,尤其是对黄芩素的研究。然而,一些研究表明中药可能具有一定的辅助治疗作用^[12]。但在实际治疗中,仍需综合考虑患者情况,采取综合治疗措施,以期获得最佳的治疗效果。尽管本研究已经为子宫内膜癌的治疗提供了新的治疗思路,但是对黄芩素对子宫内膜癌 Ishikawa 细胞作用的影响机制尚未得到充分研究。未来的研究将从机制上和动物水平展开,以期进一步探索黄芩素在治疗子宫内膜癌中的作用机制和疗效。

参考文献:

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2019[J]. CA Cancer J Clin, 2019,69(1):7-34.
- [2] 马兆霞.miR-128 通过 PTEN/PI3K/Akt 通路调控 DJ-1 表达对 Ishikawa 子宫内膜癌细胞生物学功能的影响[D]. 南昌:南昌大学,2020.
- [3] 中国药典[S]. 一部.2020.Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S].Volume I .2020
- [4] 曲长萍,田君,霍会蚕等.黄芩素通过 miR-410/JAK2/STAT3 轴对宫颈癌 SiHa 细胞增殖、侵袭及上皮间质转化的影响[J].实用医学杂志,2022,38(10):1208-1212.
- [5] 郑宁泽,陶亮,王琴.黄芩素对顺铂抑制卵巢癌 A2780 细胞增殖的影响[J].新医学,2020,51(05):348-353.
- [6] 刘振方,孙巧玉,孟祥彩等.黄芩素下调微小 RNA-130a 抑制肝癌细胞侵袭机制研究[J].陕西中医,2021,42(12):1667-1670.
- [7] 刘浩月.DJ-1 经 Cezanne/NF- κ B 非经典活化通路影响 Ishikawa 子宫内膜癌细胞生物学行为的分子机制研究[D]. 南昌:南昌大学,2021.
- [8] 金明珠,狄文.子宫内膜癌分型的研究进展[J].国际妇产科学杂志,2020,47(01):15-18.
- [9] 于岩君,尹香花.子宫内膜癌发病机制的研究进展[J].医学综述,2018,24(09):1719-1723.
- [10] 郑飞,王丹丹,杨清.子宫内膜癌早期诊断方法研究进展[J].现代妇产科进展,2022,31(10):792-794.
- [11] 罗丹,冯绣梅.子宫内膜癌治疗的研究进展[J].医学综述,2020,26(08):1542-1546.
- [12] 黄杰特,洪金妮,胡闽湘,王丹,陈捷.中药注射剂在子宫内膜癌辅助治疗中的临床应用[J].中国民间疗法,2022,30(16):113-115.

【基金项目】江西科技学院校级科研项目(ZR2001)

作者简介:

马兆霞(1991.04-),女,汉族,山东滕州人,硕士,讲师,研究方向:肿瘤药理学。

通信作者:熊绍凤,硕士,药师。研究方向:糖尿病。