

苦杏仁苷抑制人肺癌 NCI-H1299 细胞体外侵袭的机制

孙卓琳^{1*}, 刘京伟², 匡长春³¹天津市第五中心医院药剂科, 天津 300450; ²解放军总医院第一附属医院门诊药房, 北京 100037;³广州军区武汉总医院药剂科, 武昌 430070)

摘要 探讨天然产物苦杏仁苷对人非小细胞肺癌 NCI-H1299 细胞体外侵袭与转移的抑制作用及其机制。采用 MTS 法检测苦杏仁苷对肿瘤细胞生长的影响; 采用 Transwell 小室和划痕试验检测苦杏仁苷对细胞侵袭和迁移能力的影响; 采用 Western blot 和 RT-PCR 试验检测苦杏仁苷对 MMP-2/9、integrin β 1、integrin β 4、整合素连接激酶 (ILK)、黏附斑激酶 (FAK)、p-FAK 和 β -catenin 的表达水平, 以及 Akt 和 RICTOR 的磷酸化水平的影响。结果表明: 苦杏仁苷可显著抑制 H1299 细胞体外增殖, 0.5 和 1 mg/mL 苦杏仁苷作用 H1299 细胞 48 h 后, 肿瘤细胞侵袭、迁移能力显著下降, MMP-2/9、integrin β 1/4、ILK、FAK、 β -catenin 蛋白和 mRNA 表达, MMP-2/9 活性以及 FAK、Akt 和 RICTOR 磷酸化水平显著下调 (P 均 < 0.05)。

关键词 苦杏仁苷; 非小细胞肺癌; 肿瘤转移; NCI-H1299; 整合素连接激酶; 黏附斑激酶

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2016)04-0479-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160415

引用本文 孙卓琳, 刘京伟, 匡长春. 苦杏仁苷抑制人肺癌 NCI-H1299 细胞体外侵袭的机制[J]. 中国药科大学学报, 2016, 47(4): 479-482.

Cite this article as: SUN Zhuolin, LIU Jingwei, KUANG Changchun. Inhibitions and mechanisms of amygdalin in non-small cell lung cancer NCI-H1299 cell line invasion *in vitro*[J]. J China Pharm Univ, 2016, 47(4): 479-482.

Inhibitions and mechanisms of amygdalin in non-small cell lung cancer NCI-H1299 cell line invasion *in vitro*SUN Zhuolin^{1*}, LIU Jingwei², KUANG Changchun³¹ Department of Pharmacy, Tianjin 5th Central Hospital, Tianjin 300450;² Department of Outpatient Pharmacy, The First Affiliated Hospital of General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100037;³ Department of Pharmacy, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military, Wuchang 430070, China

Abstract The aim of this study was to investigate the effects and mechanisms of a nature product, amygdalin, in non-small cell lung cancer NCI-H1299 cell line invasion and migration *in vitro*. NCI-H1299 (H1299) cells were treated with amygdalin. MTS assay was employed to determine cell proliferation, transwell chamber and wound-healing assay were employed to determine invasion and migration *in vitro*, western blotting and RT-PCR assay were employed to determine the expression of integrin β 1, integrin β 4, integrin-linked kinase (ILK), focal adhesion kinase (FAK), p-FAK and β -catenin, and the phosphorylation of Akt and RICTOR. Results showed that *in vitro* proliferation of H1299 cells were inhibited significantly after treated with 0.5 and 1 mg/mL amygdalin for 48 h. The invasion and migration potential was decreased. The protein and mRNA expression of MMP-2/9, integrin β 1/4, ILK, FAK, β -catenin, the activity of MMP-2/9, the phosphorylation of FAK, Akt and RICTOR were all decreased significantly (all of $P < 0.05$).

Key words amygdalin; non-small cell lung cancer; metastasis; NCI-H1299; integrin-linked kinase; focal adhesion kinase

转移是肿瘤患者死亡的主要原因之一, 虽然已采用靶向治疗等多种治疗手段, 但肿瘤转移仍然是

肺癌治疗的难点, 因此寻找新型肺癌细胞转移抑制药物十分必要^[1]。

苦杏仁苷是一种糖苷类天然产物化学成分,已经发现对多种肿瘤具有抑制活性^[2-3],但其对肺癌转移的抑制作用和机制尚未报道。因此,本研究考察苦杏仁苷对肺癌转移的抑制作用,并对其分子机制做初步探讨。

1 材 料

1.1 药品和试剂

细胞侵袭检测试剂盒(美国 R&D Systems 公司);MTS 和 RT-PCR 试剂盒(美国 Promega 公司);苦杏仁苷(美国 Sigma-Aldrich 公司);体外侵袭试剂盒(美国 R&D Systems 公司);各种单克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);ECL 免疫印迹底物试剂盒(美国 Millipore 公司);细胞核蛋白质提取试剂盒(上海生工公司)。

1.2 仪 器

Scientific Multiskan FC 酶标仪,Scientific Arktik PCR 仪(美国 Thermo 公司)。

1.3 细 胞

人肺癌细胞系 NCI-H1299 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(上海)。

2 方 法

2.1 MTS 细胞增殖检测

取对数生长期的细胞,以每毫升 5×10^4 个细胞接种到 96 孔微孔板中,每孔 100 μ L,培养过夜使细胞贴壁。加入不同浓度的苦杏仁苷,继续培养 24、48 和 72 h,吸去培养基,按照试剂说明书的要求加入 MTS,继续培养 4 h。最后用酶标仪测定 490 nm 波长下的吸收值,以吸收值表示细胞的数量,计算药物对细胞的抑制率。

2.2 体外侵袭和迁移试验

收集经无血清饥饿 16 h 后的细胞,以每孔 25 000 个细胞接种 Transwell 的上室,同时加入苦杏仁苷,继续培养 48 h 后分析侵袭细胞数量,侵袭率(%)=(处理组侵袭细胞数/未处理组侵袭细胞数)×100,具体操作均依据试剂盒说明书进行。利用划痕试验评价肿瘤细胞的体外迁移能力,具体方法为培养细胞于 6 孔板中直至形成单层融合。无血清饥饿过夜,然后利用吸头在细胞层中形成划痕,加入苦杏仁苷继续培养 48 h,纤维观察并统计划痕的间隙变化,迁移率(%)=1-(48 h 划痕间

隙/0 h 划痕间隙)×100。

2.3 Western blot 试验

苦杏仁苷处理细胞 48 h 后,收集细胞裂解提取蛋白,细胞核蛋白提取采用细胞核蛋白质提取试剂盒以检测细胞核中 β -catenin 蛋白表达。以 12% SDS-PAGE 法分离蛋白质,然后转移至 PVDF 膜上,以不同的抗体(MMP-2/9,1:2 500;integrin β 1,1:2 500;integrin β 4,1:2 500;ILK,1:1 500;FAK,1:2 500;p-FAK,1:2 000; β -catenin,1:1 500;p-Akt,1:1 000;Akt,1:2 000;p-RICTOR,1:1 000;RICTOR,1:1 000)孵育 4 $^{\circ}$ C 过夜后,洗去一抗,以 HRP 连接的二抗温育 1 h,洗涤,以 ECL 试剂盒显示免疫反应条带。 β -actin(1:5 000)作为内参。

2.4 RT-PCR 试验

用 Trizol 法提取各组总 RNA,用 Real-Time PCR 试剂盒进行逆转录得到 cDNA,然后检测其中 MMP-2/9、integrin β 1、integrin β 4、ILK、FAK 和 β -catenin 的 mRNA 水平。

Table 1 Primer sequences forRT-PCR assay

Gene	Primer sequence
MMP-2	Forward 5'-GGATGATGCCTTTGCTCG-3'
	Reverse 5'-CAGTGGACATGGCGGTCT-3'
MMP-9	Forward 5'-TCCCTGGAGACCTGAGAACC-3'
	Reverse 5'-GGCAAGCTCTTCCAGTAGTIT-3'
Integrin β 1	Forward 5'-CAAGCAGGGCCAAATTGTGG-3'
	Reverse 5'-TGTCATCTGGAGGGCAACCC-3'
Integrin β 4	Forward 5'-GGCGTGCACACCCAGGCGGA-3'
	Reverse 5'-CTCTCCAGTGGCTCAAACACCT-3'
ILK	Forward 5'-TTTGCAGTGCTTCTGTGGAA-3'
	Reverse 5'-CTACTTGTCTGCATCTTCTC-3'
FAK	Forward 5'-TGCAAGTAAGGAAATACAGTTTGG-3'
	Reverse 5'-CCACATACACACCAAACATCATCCA-3'
β -catenin	Forward 5'-CCTATGCAGGGGTGGTCAAC-3'
	Reverse 5'-CGACCTGGAAAACGCCATCA-3'
GAPDH	Forward 5'-CTTAGATTTGTCGTATTGG-3'
	Reverse 5'-GAAGATGGTGATGGGATT-3'

2.5 明胶酶谱实验

苦杏仁苷处理细胞 48 h 后,吸取细胞培养上清液,3 000 r/min 离心 10 min,0.1% 明胶的 10% SDS-PAGE 电泳后在明胶酶孵育液中,37 $^{\circ}$ C 孵育 24 h,0.25% 考马斯亮蓝 R-250 染色 3 h,脱色后显示反白亮带。

2.6 数据统计

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,使用 SPSS 13.0 软件进

行分析。采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行比较,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结 果

3.1 苦杏仁苷对人肺癌 H1299 细胞的体外增殖的抑制作用

MTS 细胞增殖实验显示,苦杏仁苷可抑制 H1299 细胞的体外增殖,苦杏仁苷作用 H1299 细胞 24、48 和 72 h 后,细胞增殖收到显著抑制(图 1)。0.5 和 1 mg/mL 苦杏仁苷作用 H1299 细胞 48 h 后,对细胞增殖的抑制作用分别为 7.6% 和 12.1%,因此选择 0.5 和 1 mg/mL 两个质量浓度进行后续侵袭和迁移试验以排除细胞生长抑制所造成的干扰。

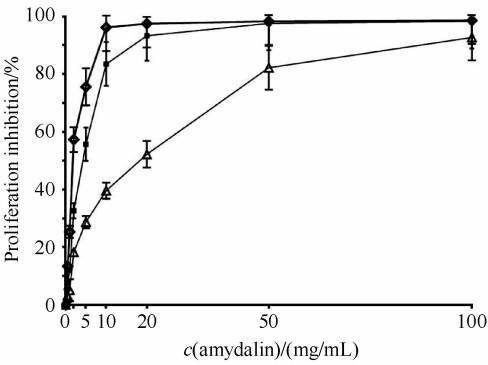


Figure 1 Effect of amygdalin on the proliferation of non-small cell lung cancer NCI-H1299 cell line *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.2 苦杏仁苷对人肺癌 H1299 细胞的体外侵袭和迁移的抑制作用

体外侵袭和迁移试验结果显示,分别以 0.5 和 1 mg/mL 苦杏仁苷作用肿瘤细胞 48 h 后,药物处

理组侵袭的细胞数量和划痕间隙变化显著低于未处理组,并呈药物剂量依赖性,显示苦杏仁苷可抑制人肺癌 H1299 细胞的体外侵袭和迁移能力(图 2)。

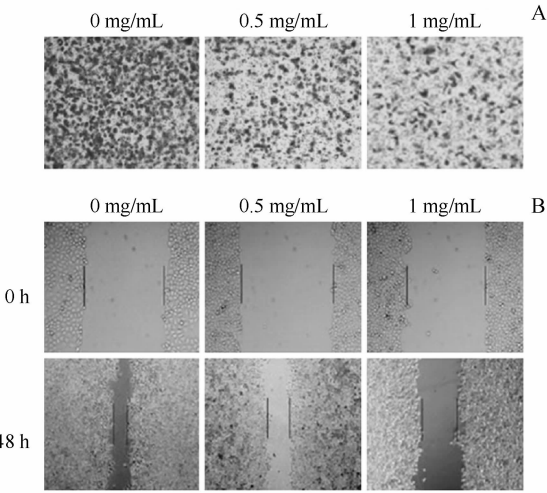


Figure 2 Effect of amygdalin on the invasion (A) and migration (B) of non-small cell lung cancer NCI-H1299 cell line *in vitro*

3.3 苦杏仁苷下调人肺癌 H1299 细胞 MMP-2/9、integrin $\beta 1$ 、integrin $\beta 4$ 、ILK、FAK、p-FAK 和 β -catenin 表达

以 0.5 和 1 mg/mL 苦杏仁苷作用肿瘤细胞 48 h 后,Western blot 结果显示,与对照组相比,肿瘤细胞中促进转移的 MMP-2/9、integrin $\beta 1$ 、integrin $\beta 4$ 、ILK、FAK、p-FAK 和细胞核中 β -catenin 蛋白表达水平显著下降,并呈药物剂量依赖性。RT-PCR 结果显示,MMP-2/9、integrin $\beta 1$ 、integrin $\beta 4$ 、ILK、FAK 和 β -catenin 的 mRNA 表达水平显著下降(图 3),并抑制 MMP-2/9 活性(图 4)。

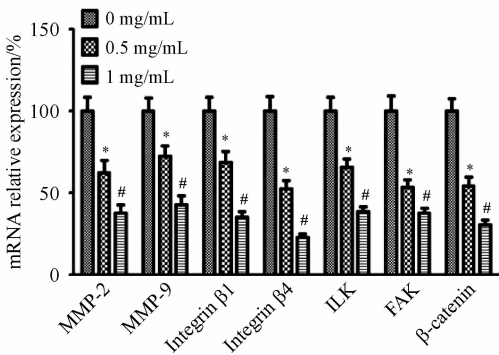
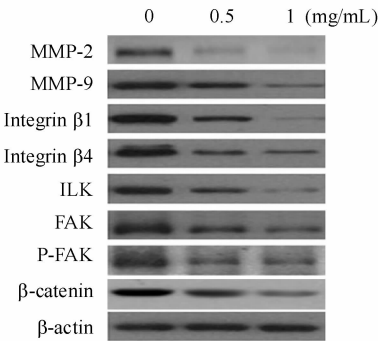


Figure 3 Effect of amygdalin on the expression of tumor related gene of non-small cell lung cancer NCI-H1299 cell line *in vitro* ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
* $P < 0.05$ vs 0 mg/mL group; # $P < 0.05$ vs 5 mg/mL group

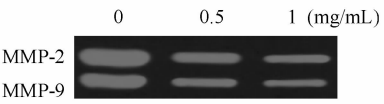


Figure 4 Effect of amygdalin on the activity of matrix metalloproteinases of non-small cell lung cancer NCI-H1299 cell line *in vitro*

3.4 苦杏仁苷对人肺癌 H1299 细胞的 Akt 和 RICTOR 磷酸化的抑制作用

Western blot 结果(图 5)显示:苦杏仁苷对 Akt 和 RICTOR 的表达无显著的影响,但可下调 Akt 和 RICTOR 的磷酸化水平,说明苦杏仁苷可对 Akt 和 RICTOR 信号通路的活性进行调控。

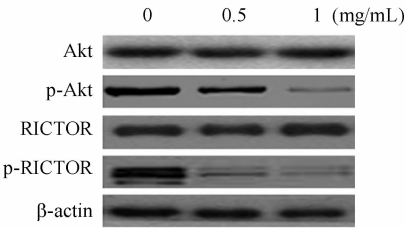


Figure 5 Effect of amygdalin on the phosphorylation of Akt and RICTOR of non-small cell lung cancer NCI-H1299 cell line *in vitro*

4 讨论

本研究首先通过非小细胞肺癌 H1299 细胞系考察苦杏仁苷对肿瘤细胞体外增殖的抑制作用,并选取无毒浓度 0.5 mg/mL(抑制率小于 10%)和低毒浓度 1 mg/mL(抑制率小于 15%)苦杏仁苷作用 H1299 细胞 48 h 后,进行后续侵袭和迁移试验以排除细胞生长抑制所造成的干扰。研究发现,经过上述浓度苦杏仁苷处理后,H1299 细胞体外增殖、迁移和侵袭能力均受到抑制。

Integrin 是一种多亚基蛋白,包括 α 和 β 两个亚基,其中 $\beta 1$ 和 $\beta 4$ 两种亚型与肿瘤的转移有关^[4-5],其高表达与肿瘤的进展和转移密切相关。细胞中的 integrin $\beta 1$ 和 $\beta 4$ 表达水平下调。FAK 可被 integrin $\beta 1$ 和 $\beta 4$ 活化,进一步释放 β -catenin,后者可迁移到细胞核中,介导与肿瘤生长和迁移相关蛋白的表达^[6-7],启动下游信号通路,如 Akt-

mTOR 通路,介导细胞增殖、黏附和转移功能^[8-10]。本研究显示,苦杏仁苷可抑制 integrin $\beta 1$ 和 $\beta 4$ 表达的下调,ILK,FAK、p-FAK 和 β -catenin 的水平均显著下降。进一步发现,虽然 Akt 和 RICTOR 的表达水平未受明显影响,但其磷酸化水平显著下降。这些结果进一步证实,苦杏仁苷可影响 Integrin 表达及其下游 Akt-mTOR 信号通路活性。

参考文献

[1] Reck M, Popat S, Reinmuth N, *et al.* Metastatic non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up [J]. *Ann Oncol*, 2014, **25** (Suppl 3) : iii27 - 39.

[2] Bolarinwa IF, Orfila C, Morgan MR. Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK [J]. *Food Chemistry*, 2014, **152**:133 - 139.

[3] Makarević J, Rutz J, Juengel E, *et al.* Amygdalin blocks bladder cancer cell growth *in vitro* by diminishing cyclin A and cdk2 [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(8) : e105590.

[4] Niu G, Ye T, Qin L, *et al.* Orphan nuclear receptor TR3/Nur77 improves wound healing by upregulating the expression of integrin $\beta 4$ [J]. *FASEB J*, 2015, **29**(1) : 131 - 140.

[5] Matsubara D, Kishaba Y, Yoshimoto T, *et al.* Immunohistochemical analysis of the expression of E-cadherin and ZEB1 in non-small cell lung cancer [J]. *Pathol Int*, 2014, **64** (11) : 560 - 568.

[6] Song JL, Nigam P, Tektas SS, *et al.* MicroRNA regulation of Wnt signaling pathways in development and disease [J]. *Cell Signal*, 2015, **27**(7) : 1380 - 1391.

[7] Sulzmaier FJ, Jean C, Schlaepfer DD. FAK in cancer; mechanistic findings and clinical applications [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, **14** (9) : 598 - 610.

[8] Fumarola C, Bonelli MA, Petronini PG, *et al.* Targeting PI3K/AKT/mTOR pathway in non small cell lung cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, **90** (3) : 197 - 207.

[9] Calderaro J, Rebouissou S, de Koning L, *et al.* PI3K/AKT pathway activation in bladder carcinogenesis [J]. *Int J Cancer*, 2014, **134**(8) : 1776 - 1784.

[10] Liu Y, Wang TT, Chen L. Synthesis and antitumor activity of isosteviol derivatives [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2016, **47**(1) : 48 - 53.