

# 土木香内酯对 C6 脑胶质瘤细胞迁移侵袭及凋亡的影响

王迅<sup>1,2</sup>, 王李桃<sup>1</sup>, 张波<sup>2\*</sup>

(1. 大连市第三人民医院神经外科, 辽宁省 大连 116033; 2. 大连医科大学附属第二临床学院神经外科, 辽宁省 大连 116027)

**【摘要】** 目的 观察土木香内酯对大鼠 C6 胶质瘤细胞迁移侵袭及凋亡的影响及探讨可能的作用机制。方法 体外培养大鼠 C6 胶质细胞瘤株, 采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测土木香内酯(AL)对 C6 细胞活力的影响; 通过划痕实验、Transwell 小室实验检测 AL 对 C6 细胞迁移侵袭的影响; 流式细胞仪检测 AL 对 C6 细胞诱导凋亡情况的影响, 以及 JC-1 荧光探针检测 AL 对 C6 细胞线粒体膜电位变化的影响; 采用免疫印迹(Western blot)方法检测经 AL 处理后, C6 细胞中各相关蛋白的表达情况。**结果** AL 显著抑制 C6 细胞的增殖, 且呈时间及剂量依赖性; AL 处理 24 h 后, C6 细胞的迁移侵袭能力明显受到抑制, N-cadherin 蛋白显著下降而 E-cadherin 蛋白明显上升; 凋亡细胞数明显上升而线粒体膜电位明显下降, 细胞色素 C/cleaved PARP/cleaved caspase-3/cleaved caspase-9 蛋白均显著上调。**结论** AL 抑制 C6 细胞的作用机制, 一方面可能是通过调节钙粘素(cadherin)蛋白抑制其迁移侵袭, 另一方面可能通过调节细胞色素 C/caspase 信号通路诱导其凋亡发生。

**【关键词】** 土木香内酯; 胶质细胞瘤; 迁移侵袭; 凋亡

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 03-0317-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2018.03.008

## Effect of alantolactone on migration, invasion and apoptosis in glioma C6 cells

WANG Xun<sup>1,2</sup>, WANG Litao<sup>1</sup>, ZHANG Bo<sup>2\*</sup>

(1. Department of Neurosurgery, the Third People's Hospital of Dalian City, Dalian 116033, China.

2. Department of Neurosurgery, the Second School of Clinical Medicine, Dalian Medical University, Dalian 116023)

Corresponding author: ZHANG Bo. Email: zhangbodyey@126.com

**【Abstract】** **Objective** To investigate the inhibitory effect of alantolactone on glioma C6 cells and its possible mechanism. **Methods** Rat glioma cell line C6 cells were cultured in vitro. The effect of AL on the viability of C6 cells was detected by MTT assay. The effect of AL on migration and invasion of C6 cells was assessed by scratch test and Transwell chamber assay. Flow cytometry was used to detect the effect of AL on the induction of apoptosis in C6 cells, and the effects of AL on mitochondrial membrane potential in C6 cells was detected using JC-1 fluorescent probe. Western blot was used to detect the expression of related proteins in C6 cells after AL treatment. **Results** AL significantly inhibited the proliferation of C6 cells in a time- and dose-dependent manner. After AL treatment for 24 hours, the migration and invasion of C6 cells were significantly inhibited, N-cadherin protein was significantly decreased and E-cadherin protein was significantly increased, the number of apoptotic cells increased obviously while the mitochondrial membrane potential decreased significantly. The protein expressions of PARP/cleaved caspase-3/cleaved caspase-9 were significantly up-regulated. **Conclusions** AL inhibits the proliferation of glioma C6 cells by inhibiting their migration and invasion through

**【基金项目】** 国家自然科学基金面上项目(No. 81672480); 大连市中医药科研计划项目(No. 17Z1007)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (No. 81672480); Traditional Chinese Medicine Foundation of Dalian (No. 17Z1007).

**【作者简介】** 王迅(1980—)男, 副主任医师, 研究方向: 神经外科基础与临床。Email: wangxun1980@126.com

**【通信作者】** 张波(1967—)男, 教授, 博士生导师。Email: zhangbodyey@126.com

regulating the protein expression of cadherin and inducing apoptosis in C6 cells by regulating the cytochrome C/caspase signaling pathway.

**【Key words】** alantolactone; glioma; migration and invasion; apoptosis

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

胶质瘤是最常见的神经系统肿瘤,约占原发性脑肿瘤的 60%。目前临床上仍采用手术结合放疗的方法,但效果欠佳,预后差,死亡率高<sup>[1]</sup>。而且近年来,胶质瘤患者对常规化疗药多耐性的问题日趋显著。若能探寻到多种作用途径的药物,必将使广大胶质瘤患者从中获益。

中药抗肿瘤历史悠久,因其毒副作用小,且具有多途径多靶点抗肿瘤作用的可能,因此长期致力于中药抗胶质瘤的筛选具有重要的战略意义。土木香内酯(Alantolactone, AL)是从土木香的根中分离出的半萜内酯类化合物,具有较好的抗炎、驱虫、抗菌、抗肿瘤等方面的作用<sup>[2]</sup>。AL 在抗肝癌、结肠癌及白血病等研究中已有报道<sup>[3-5]</sup>,而且 Khan 等<sup>[6]</sup>研究发现 AL 能透过血脑屏障,这使其在治疗中枢性系统疾病中的应用成为可能。本文旨在探讨 AL 对大鼠 C6 胶质细胞瘤的抑制作用及可能的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞株与试剂

大鼠 C6 脑胶质细胞株(购于 ATCC 美国);土木香内酯(纯度 > 98%,购于上海同田生物技术中国);DMEM 培养基、胎牛血清(购于 Hyclone 美国);N-cadherin、E-cadherin、cleaved PARP、cleaved caspase-3、cleaved caspase-9、Cyto c、GAPDH 等单克隆抗体(购于 Cell Signaling Technology 美国);AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(购于南京凯基生物科技中国);线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)(购于上海碧云天生物技术中国)。

#### 1.1.2 主要仪器与设备

多功能酶标仪(Perkin Elmer 美国);C6 流式细胞仪、蛋白/核酸凝胶成像仪(BD 美国);CKX41 型倒置相差显微镜(Olympus 日本);正置/倒置荧光显微镜(Leica 德国);Western Blot 仪器(北京六一中国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

C6 细胞培养于含 10% FBS 的 DMEM 培养基

中,于 5% CO<sub>2</sub>、95% 湿度、37℃ 恒温孵育箱中培养传代。

#### 1.2.2 药液储备及使用浓度

配制土木香内酯(AL)母液浓度为 100 mmol/L 溶解于二甲基亚砜(DMSO),-20℃ 保存备用。使用时采用含 1% FBS 的 DMEM 培养基稀释至终浓度为 5、10 μmol/L。

#### 1.2.3 细胞活力检测(MTT 法)

取对数期生长的 C6 细胞(密度为  $5 \times 10^3$  个/mL),接种于 96 孔细胞培养板中,每孔加入 100 μL 细胞悬液,每组设 6 个复孔;待细胞生长至 70% 以上汇合度时,依次施予不同浓度的 AL,共 6 个浓度梯度(0、1、5、10、20、40 μmol/L),给药后分别孵育观测至 12、24 h 及 48 h 终止,各加入 5 mg/mL 的 MTT 15 μL,孵育 4 h 后弃掉孔内液体,每孔加入 DMSO 150 μL,摇匀后,采用波长为 490 nm 的酶标仪测定每孔 OD 值。利用 OD 值计算出细胞增殖率(酶标仪所示 OD 值减去空白组 OD 值)。以细胞活性为纵坐标,以药物浓度为横坐标,绘制细胞活力的折线图。

#### 1.2.4 Transwell 小室实验

将 C6 细胞种植于表面有基质胶的 Transwell 小室上室中,下室用 600 μL 含有 10% FBS 的培养基填充。上、下室均含有不同浓度(0、5、10 μmol/L)的 AL 处理,经孵育 24 h 后,用棉签擦拭上层膜表面的非侵入性细胞。下层侵入细胞用甲醇固定,并用 0.1% 结晶紫染色溶液染色。显微镜下拍照,选取每个膜的五个独立区域中计数细胞。

#### 1.2.5 体外迁移实验

将 C6 细胞接种于 6 孔板,待细胞长满后,用 200 μL 移液枪枪头在各孔板上做垂直直线划痕,然后弃掉培养基,PBS 清洗后,分别施予含 0、5、10 μmol/L 浓度 AL 的新培养基(含 1% FBS)。在倒置显微镜下拍照( $\times 100$ ),先拍下药物处理 0 h 时划痕位置照片,并使用记号笔记录拍摄照片的位置。再培养 24 h 后,再根据之前记录的位置拍摄划痕后变化的照片。

#### 1.2.6 细胞凋亡检测

将 C6 细胞种植于 6 孔板中,采用不同浓度 AL

(0.5、10  $\mu\text{mol/L}$  处理 24 h 后;收集各组细胞, PBS 洗涤 2 次,加入 500  $\mu\text{L}$  的 binding buffer 悬浮细胞;加入 5  $\mu\text{L}$  annexin V-FITC 混匀后;加入 5  $\mu\text{L}$  propidium iodide 混匀后;在室温避光下反应 15 min;于流式细胞仪上进行荧光检测。

1.2.7 线粒体膜电位检测(采用 JC-1 荧光探针试剂盒)

将 C6 细胞种植于 6 孔板中,采用不同浓度 AL (0.5、10  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 24 h 后;吸除培养液,加入 1 mL JC-1 染色工作液,充分混匀。细胞培养箱中 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 20 min,吸除上清,用 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,加入 2 mL 细胞培养液,荧光显微镜下观察拍照。

1.2.8 Western blot 检测

收集经 0.5、10  $\mu\text{mol/L}$  浓度组 AL 处理 24 h 后的细胞,提取总蛋白及去线粒体的胞质蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度,经凝胶电泳分离,采用半干法将蛋白转至 PVDF 膜上,5% 脱脂奶粉封闭,分别孵育一抗、二抗后洗膜显影。

1.3 统计学方法

实验数据(所有实验均重复三次)采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,结果用( $\bar{x} \pm s$ )表示。采用方差齐性检验及单因素方差分析各组实验数据。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 AL 抑制 C6 胶质瘤细胞的增殖

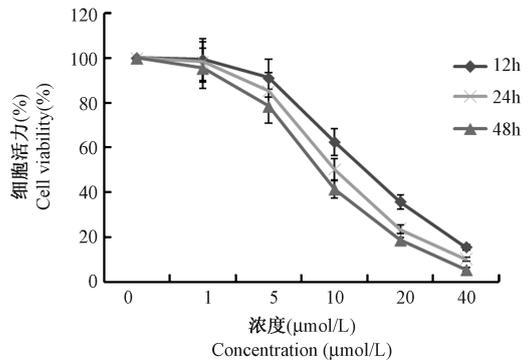
经 MTT 法检测发现(如图 1),AL 能显著抑制 C6 细胞的生长活力,且呈剂量及时间依赖性。计算 AL 作用后 12、24 h 及 48 h 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 14.27、10.01、8.35  $\mu\text{mol/L}$ 。

### 2.2 AL 通过调节钙粘素(cadherins)蛋白抑制 C6 胶质瘤细胞迁移侵袭

AL 能显著抑制 C6 细胞的穿透侵袭能力( $P < 0.05$ ),且呈剂量依赖性(图 2A)。AL 能显著抑制 C6 细胞的划痕愈合能力( $P < 0.05$ ),且呈剂量依赖性(图 2B)。Western blot 检测与胶质瘤侵袭转移密切相关的两种蛋白 N-cadherin 和 E-cadherin,AL 在降低 N-cadherin 蛋白表达的同时升高 E-cadherin 蛋白的表达,且呈剂量依赖性(图 2C)。

### 2.3 AL 通过调节细胞色素 C/Caspase 信号通路诱导 C6 胶质瘤细胞凋亡

AL 能明显上调 C6 细胞的凋亡数( $P < 0.05$ ),



注:不同浓度 AL(0、1、5、10、20、40  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别作用于 C6 细胞 12、24、48 h。

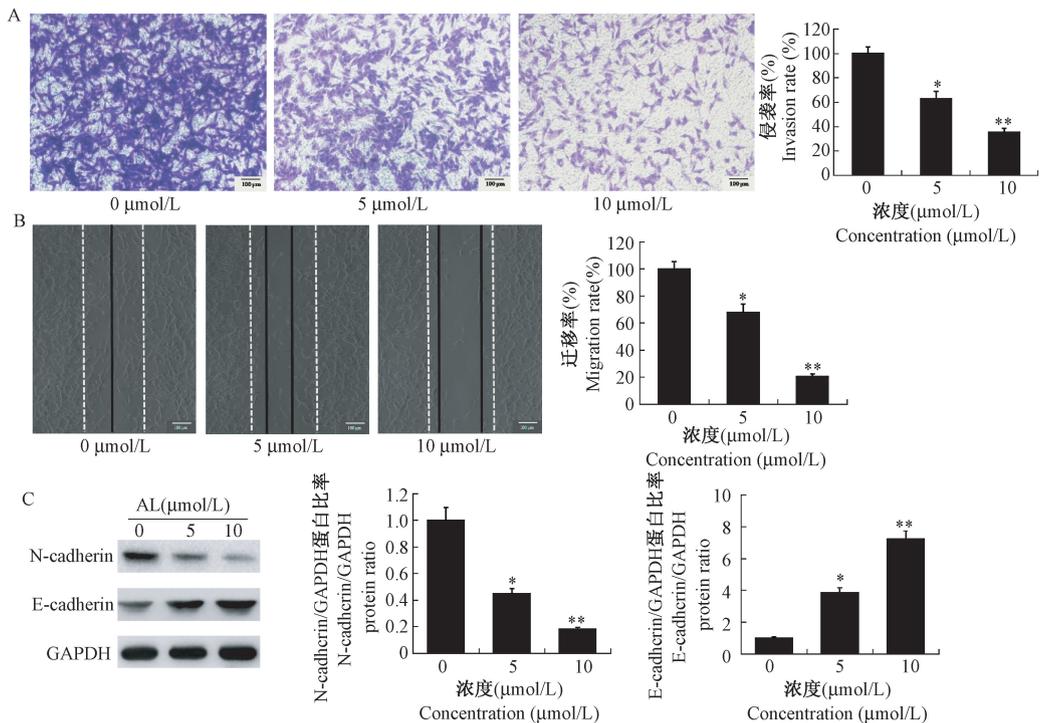
图 1 AL 抑制 C6 胶质瘤细胞活力的作用曲线  
Note. Different concentrations of AL (0, 1, 5, 10, 20, 40  $\mu\text{mol/L}$ ) were applied to C6 cells for 12, 24 h and 48 h.

Fig. 1 Inhibitory effect of AL on the activity of glioma C6 cells

且呈剂量依赖性。线粒体损伤线粒体膜电位下降是细胞凋亡的早期标志。JC-1 是一种检测线粒体膜电位的理想荧光探针。在线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体的基质中,形成聚合物,产生红色荧光;在线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体的基质中,此时 JC-1 为单体,产生绿色荧光(图 3A)。AL 能明显促使 JC-1 多聚体(红光)向单体(绿光)的转变。线粒体损伤后细胞色素 C 从线粒体向胞质释放,启动 caspase 级联通路诱导凋亡发生(图 3B)。经 western blot 检测发现,施予 AL 后,去除线粒体的胞质中细胞色素 C 蛋白表达显著上升( $P < 0.05$ )。如图 3C,对 caspase 级联通路中的关键蛋白 cleaved PARP/caspase-3/caspase-9 的检测发现,AL 均能上调以上三种蛋白的表达量,且呈剂量依赖性(图 3C)。

## 3 讨论

胶质瘤因高侵袭性、抗凋亡、化疗药多耐药等特性,严重危害病人的生命健康,在临床上治疗效果欠佳的背景下,探求新的治疗策略及多途径治疗机制的药物已日益受到广大学者的关注。中药在抗肿瘤作用中历来占有重要地位,天然化合物在肿瘤药物研发中发挥着重要的作用,尤其是植物化合物与化学合成药物相比,具有取材方便、价格低廉、毒副作用小的优势,尤其在抗耐药性和减毒增效方面更具显著优势,已受到国内外学者的广泛认可,成为研发新型抗癌药的重要来源。



注: (A) Transwell 小室实验观察 AL 对 C6 细胞侵袭的影响 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ); (B) 划痕实验观察 AL 对 C6 细胞迁移的影响 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ;  $\times 100$ ); (C) AL 对 N-cadherin 及 E-cadherin 蛋白表达的影响 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ )。

图 2 AL 抑制 C6 细胞迁移和侵袭

Note. (A) Effect of AL on C6 cell invasion in Transwell chamber experiment (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ). (B) Effect of AL on C6 cell migration in scratch test (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ;  $\times 100$ ). (C) Effect of AL on N-cadherin and E-cadherin protein expression (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ).

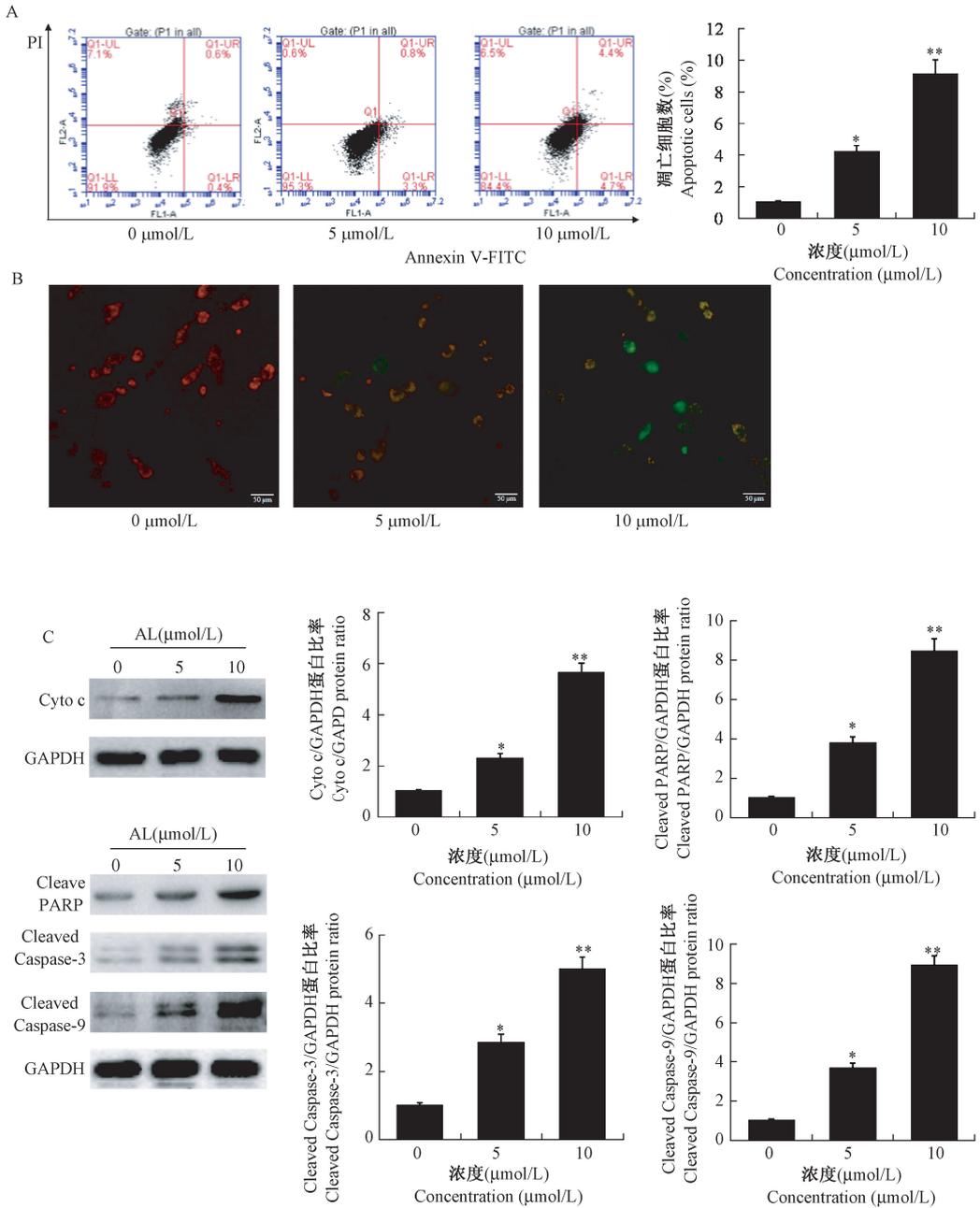
Fig. 2 AL inhibits the migration and invasion of C6 cells

土木香内酯(AL)是从土木香的干燥根中提取出来的活性物质,广泛分布于欧洲、北美洲以及中国新疆等地区,其采集及制备简便,价格低廉,在中、欧药典中均有记载。AL是土木香的精油成分,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤及保肝降糖等多种药理活性。AL对其他系统肿瘤的抑制作用已经陆续有相关报道,而对中枢神经系统肿瘤作用的研究罕有报道。故本实验选用C6脑胶质瘤细胞株作为研究对象,对AL在中枢神经系统恶性肿瘤抑制作用的活性进行阐述。

本实验首先通过细胞活力检测证实了AL能显著抑制C6细胞的增殖生长。随之通过划痕实验及Transwell小室实验发现AL能抑制C6细胞的迁移侵袭。而脑胶质瘤细胞粘附性的改变是肿瘤侵袭与转移的重要始动环节。钙粘素(cadherins)是一类结构和功能相似的钙依赖性单链跨膜糖蛋白。各类钙粘素蛋白分子中,以神经-钙粘素(N-cadherin)和上皮-钙粘素(E-cadherin)与肿瘤的侵

袭和转移关系最为密切<sup>[7]</sup>。研究发现N-cadherin的过度表达和E-cadherin的表达下调在胶质瘤的侵袭性生长及恶性进展中发挥着重要作用<sup>[7-8]</sup>。我们的实验发现AL能显著抑制N-cadherin蛋白的表达,而显著上调E-cadherin蛋白的表达。因此我们推测AL可能通过调节cadherin蛋白的表达抑制C6细胞的迁移侵袭。

凋亡是一种细胞程序化死亡,肿瘤细胞的无限生长是细胞凋亡受抑制的结果<sup>[9]</sup>。本实验通过AV-PI双染方法证实AL能显著诱导C6细胞的凋亡发生。而凋亡的发生主要分为内源性及外源性两种途径,其中内源性途径也称为线粒体-细胞色素C(Cyto c)途径<sup>[10-12]</sup>。本实验通过JC-1荧光探针发现AL能促使线粒体膜电位从高位向低位的转变,可能致线粒体通透性发生改变;随即通过蛋白印迹的方法发现去线粒体的胞质中Cyto c蛋白显著增加,从而证实Cyto c从线粒体向胞质的释放;进一步通过蛋白印迹的方法检测到天冬半胱氨酸蛋白水



注: (A) 流式细胞仪检测 AL 对 C6 细胞凋亡情况的影响 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ); (B) 荧光显微镜观察 AL 对 C6 细胞膜电位变化的影响 ( $\times 200$ ); (C) AL 对 Caspase 级联信号关键蛋白表达的影响 (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ )。

图 3 AL 诱导 C6 细胞的凋亡发生

Note. (A) The effect of AL on apoptosis in C6 cells detected by flow cytometry (\*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ ). (B) The effect of AL on the changes of membrane potential of C6 cells by fluorescence microscopy,  $\times 200$ . (C) The effect of AL on the expression of caspase cascade signaling. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.01$ .

Fig.3 AL induces the apoptosis in C6 cells

解酶 (caspase) 级联通路中的关键蛋白 (Cleaved PARP/caspase-3/caspase-9) 均有显著升高, 最终证实了 AL 通过激活 caspase 级联反应诱导凋亡发生。

综上所述, 经本实验发现 AL 能通过抑制迁移侵袭及诱导凋亡发生来发挥抗胶质细胞瘤的作用,

从而为 AL 在抗中枢神经系统肿瘤方面的应用提供了一定的实验依据。

参 考 文 献 (References)

[ 1 ] McNeill KA. Epidemiology of brain tumors [ J ]. Neuro Clin. 2016, 34 ( 4 ): 981 - 998.

- [ 2 ] Cantrell CL, Abate L, Fronczek FR, et al. Antimycobacterial eudesmanolides from *Inula helenium* and *Rudbeckia subtomentosa* [J]. *Planta Medica*, 1999, 65(4): 351 - 355.
- [ 3 ] Lei JC, Yu JQ, Yin Y, et al. Alantolactone induces activation of apoptosis in human hepatoma cells [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(9): 3313 - 3319.
- [ 4 ] Ding Y, Wang H, Niu J, et al. Induction of ROS overload by Alantolactone prompts oxidative DNA damage and apoptosis in colorectal cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 558.
- [ 5 ] 姚瑶, 孙月月, 夏丹丹, 等. 土木香内酯对 RPMI-8226 细胞的增殖抑制作用及其相关机制研究 [J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(05): 1336 - 1340.
- Yao Y, Sun YY, Xia DD, et al. Study on the inhibitory effect of Alantolactone on the proliferation of RPMI-8226 cells and its related mechanisms [J]. *J Exp Hematol*, 2015, 23(5): 1336 - 1340.
- [ 6 ] Khan M, Yi F, Rasul A, et al. Alantolactone induces apoptosis in glioblastoma cells via GSH depletion, ROS generation, and mitochondrial dysfunction [J]. *Iubmb Life*, 2012, 64(9): 783 - 794.
- [ 7 ] 李斐, 江普查, 袁先厚, 等. N-cadherin、E-cadherin 及  $\beta$ -catenin 在胶质瘤中的表达及意义 [J]. *中国临床神经外科杂志*, 2007, 12(9): 536 - 539.
- Li F, Jiang PC, Yuan XH, et al. Expression and significance of N-cadherin, E-cadherin and  $\beta$ -catenin in glioma [J]. *Chin J Clinl Neurosurg*, 2007, 12(09): 536 - 539.
- [ 8 ] 王鹏, 杨勇, 王景文, 等. LRIG1、EGFR、E-Cadherin 及 N-Cadherin 在胶质瘤中表达及其临床意义 [J]. *临床神经外科杂志*, 2016, 13(02): 118 - 121, 126.
- Wang P, Yang Y, Wang JW, et al. Expression of LRIG1, EGFR, E-Cadherin and N-Cadherin in glioma and its clinical significance [J]. *J Clin Neurosurg*, 2016, 13(2): 118 - 121, 126.
- [ 9 ] 杨绍杰, 孟金萍, 屈祎, 等. 细胞凋亡信号传导通路的研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2007, 17(5): 297 - 301.
- Yang SJ, Meng JP, Qu W, et al. The progress on the signal transduction pathway of apoptosis [J]. *Chin J Compa Med*, 2007(05): - 301.
- [ 10 ] 吴方, 余陈欢, 张欢欢, 等. 线粒体-细胞色素 C 途径在兔非酒精性脂肪肝肝细胞凋亡中的作用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(4): 7 - 13, 23.
- Wu F, Yu CH, Zhang HH, et al. The role of mitochondrial cytochrome C pathway in the apoptosis of non-alcoholic fatty liver cells in rabbits [J]. *Chin J Comp Med*, 2016, 26(04): 7 - 13, 23.
- [ 11 ] 庞文彪, 李莉红, 皇甫冰, 等. 中国地鼠口腔颊囊黏膜癌变过程凋亡相关基因 caspase-3、caspase-9、Bax、Bcl-2 的表达 [J]. *中国实验动物学报*, 2017, 25(03): 263 - 269.
- Pang WB, Li LH, Huang PB, et al. Expression of apoptosis related genes caspase-3, caspase-9, Bax and Bcl-2 in carcinogenesis of oral buccal pouch in Chinese hamsters [J]. *Acta Lab Anim Sci Sina*, 2017, 25(03): 263 - 269.
- [ 12 ] 张睿, 崔雨婷, 陈正礼, 等. 线粒体凋亡相关因子在大鼠自发性乳腺肿瘤中的 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(04): 375 - 381.
- Zhang R, Cui YT, Chen ZL, et al. The expression of mitochondrial apoptosis-related factors in spontaneous breast tumors in rats [J]. *Acta Lab Sci Sin*, 2015, 23(4): 375 - 381.

[ 收稿日期 ] 2017 - 12 - 17