

双氢青蒿素抑制非小细胞肺癌细胞迁移侵袭和血管生成拟态的初步研究

胡冰琪,周 静,黄俊峰,陈礼文

摘要 **目的** 探讨双氢青蒿素(DHA)对非小细胞肺癌(NSCLC)细胞生长、迁移侵袭和血管生成拟态(VM)能力的影响。**方法** 将不同浓度的DHA加入NSCLC细胞株A549与H3255中,待24 h后,CKK8法检测细胞活力,Transwell实验检测NSCLC细胞的迁移侵袭能力。qRT-PCR和Western blot分别检测E-cadherin、N-cadherin、Vimentin mRNA和蛋白表达水平。三维细胞培养观察细胞的血管样形态生成情况。qRT-PCR和Western blot检测VM的标志物VE-cadherin mRNA和蛋白表达水平。**结果** DHA抑制A549和H3255的细胞生长,并呈现时间依赖性和浓度依赖性;DHA抑制A549和H3255转移和侵袭能力(均 $P < 0.001$);DHA在A549和H3255细胞中上调E-cadherin mRNA(均 $P < 0.001$)和蛋白($P < 0.001$; $P < 0.01$)的表达,下调N-cadherin mRNA(均 $P < 0.01$)和蛋白(均 $P < 0.001$)的表达以及Vimentin mRNA($P < 0.01$; $P < 0.001$)和蛋白(均 $P < 0.001$)的表达。三维细胞培养结果表明,DHA处理的A549细胞和H3255细胞12 h VM生成能力均降低,且下调VE-cadherin mRNA($P < 0.001$; $P < 0.01$)和蛋白(均 $P < 0.001$)表达。**结论** DHA可抑制NSCLC细胞的生长、迁移侵袭和VM能力。

关键词 双氢青蒿素;非小细胞肺癌;上皮-间质转化;血管生成拟态

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0766-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.011

肺癌是癌症相关死亡的主要原因之一,转移作为肺癌发展的关键阶段,与70%以上的死亡有关^[1]。上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞获得间质特征的过程。在癌症中,EMT与肿瘤起始、侵袭、转移和治疗耐药性相关^[2]。血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)是近年来在许多恶性肿瘤中发现的一种血管生成过程,涉及由肿瘤细胞组成的微血管通道的形成。

因此,VM被认为是侵袭性肿瘤血管形成的新模型,可以为肿瘤生长提供血液供应^[3]。

双氢青蒿素(dihydroartemisinin, DHA)是青蒿素的第一代衍生物,因其疗效好、毒性低等特点,被用于临床抗疟治疗^[4]。近年来,研究表明双氢青蒿素在肝癌^[5]、卵巢癌^[6]、胰腺癌^[7]等多种肿瘤中起抗癌作用。但在肺癌中,DHA是否发挥抗癌效应及其可能的抗癌机制还有待探究。该研究使用DHA处理非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)A549和H3255细胞来检测对EMT过程中E-cadherin、N-cadherin、Vimentin和VM的标志物VE-cadherin表达的影响,并采用一系列细胞功能实验探讨DHA对NSCLC细胞的转移侵袭和VM的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料 A549、H3255细胞采购于上海富恒生物技术有限公司;RPMI1640培养基和胎牛血清购于美国Gibco公司;0.25%胰酶消化液、1%青-链霉素、CKK8试剂和RIPA裂解液购于上海碧云天生物技术有限公司;总RNA提取试剂盒购于新贝(上海)生物科技有限公司;E-Cadherin抗体购于美国Affinity Biosciences公司;N-Cadherin抗体购于美国Cell Signaling Technology公司;Vimentin抗体、VE-Cadherin抗体购于英国Abcam公司;山羊抗兔(H+L)HRP和山羊抗小鼠(H+L)HRP购于美国Affinity Biosciences公司;Western blot显影仪购于上海天能科技有限公司;Matrigel Matrix基质胶和Transwell小室购于美国Corning公司。

1.2 实验药物 DHA(纯度>97%)购于美国Selleck公司、DMSO购于上海碧云天生物技术有限公司,DHA用DMSO充分溶解配成100 mmol/L的母液,水浴锅50℃水浴助溶,-20℃保存。在实验前用RPMI1640培养基稀释母液至所需使用的浓度(使DMSO终体积分数<0.1%)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 向RPMI1640培养基中加入

2022-12-11 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发计划项目(编号:202004J07020027)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院检验科,合肥 230601

作者简介:胡冰琪,女,硕士研究生;

陈礼文,男,主任技师,硕士生导师,责任作者,E-mail: chenliwen@ahmu.edu.cn

10%胎牛血清和1%的青-链霉素,配制成新鲜培养基,在5% CO₂、饱和湿度条件下的37℃培养箱里培养A549和H3255细胞。

1.3.2 CCK8 实验 将A549和H3255细胞以 5×10^3 个/孔的密度铺进96孔板中。待细胞过夜贴壁后,加入不同浓度的DHA(0、5、10、25、50、100 μmol/L)放置37℃培养箱培养。到待测时间后,以1:10的比例将CCK8试剂和RPMI1640培养基混合,将96孔板中的培养基吸出,加入配好的溶液,1 h后酶标仪检测450 nm处的吸光度值。

1.3.3 Transwell 实验 Matrigel Matrix 基质胶和无血清RPMI 1640培养基按1:3的比例配置。向小室内加入60 μl所配制的基质胶溶液,置于37℃培养箱烘干。其中,仅侵袭实验需使用含基质胶的无血清溶液,迁移实验无需基质胶。细胞数量为:迁移实验每小室 5×10^4 个,侵袭实验每小室 1×10^5 个。向小室的下室加入600 μl含30%胎牛血清的RPMI1640培养基,放置37℃培养箱中培养。加入4%多聚甲醛细胞固定液,0.1%结晶紫溶液染色。观察结果并拍照。

1.3.4 三维细胞培养 将Matrigel Matrix 基质胶和无血清培养基1:1配置,向96孔板每孔加入配置好的含基质胶培养基溶液50 μl,放置37℃培养箱烘干1 h。96孔细胞培养板中每孔加入 5×10^5 个/ml细胞,终体积为100 μl的细胞悬液。然后将96孔板放至37℃细胞培养箱培养6~12 h。最后将96孔板置于倒置显微镜观察高倍镜视野下,观察孔内外细胞的血管样形态生成情况并拍照记录。实验重复3次。

1.3.5 RNA 提取与 qRT-PCR 实验 总RNA按厂家说明书用TRIzol试剂提取,然后逆转录成cDNA,qRT-PCR检测E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、VE-cadherin和内参GAPDH的表达水平,引物序列见表1,反应条件为95℃预变性30 s,95℃变性10 s,60℃退火30 s,60℃延伸30 s。

1.3.6 Western blot 实验 加入RIPA裂解液收集细胞上清,进行SDS-PAGE蛋白电泳后,将蛋白质信息转移至PVDF膜(0.45 μm)上,切膜后,将条带放入5%脱脂牛奶中封闭2 h。一抗E-cadherin(兔源单抗1:2 000稀释)、N-cadherin(兔源单抗1:1 000稀释)、Vimentin(兔源单抗1:3 000稀释)和VE-cadherin(兔源单抗1:1 000稀释),GAPDH(兔源多抗1:5 000稀释),4℃冰箱里过夜;HRP二抗(1:5 000稀释)37℃孵育1.5 h,置于化学发光成

表1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
E-cadherin	F:CCCAATACATCTCCCTTCACAG R:CCACCTCTAAGGCCATCTTTG
N-cadherin	F:CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC R:GTAGGATCTCCGCCACTGATTC
Vimentin	F:AGGCAAAGCAGGAGTCCACTGA R:ATCTGGCGTTCCAGGGACTCAT
VE-cadherin	F:GAAGCCTCTGATTGGCACAGTG R:TTTGTGACTCGGAAGAAGTGGC
GAPDH	F:AAGGTGAAGGTCGGAGTCAAC R:GGGGTCATTGATGGCAACAATA

像仪内显影,用Image J图像分析软件对各组蛋白条带进行灰度值测定,实验重复3次。

1.4 统计学处理 Image J软件对实验结果图像进行量化分析,用Graph Pad Prism 9软件进行数据分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DHA 抑制 A549 和 H3255 细胞的生长 在96孔板中铺细胞后,加入不同浓度的DHA(0、5、10、25、50、100 μmol/L),分别处理24、48、72 h后,加入CCK8溶液进行检测。与对照组(DHA浓度为0 μmol/L)比较,DHA处理后的实验组细胞生存能力受到抑制,A549和H3255细胞存活率下降,并呈浓度和时间依赖性。A549和H3255的半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)分别为52.17 μmol/L和46.06 μmol/L。故后续实验均使用50 μmol/L的DHA。见图1。

2.2 DHA 抑制 A549 和 H3255 细胞的迁移与侵袭能力 Transwell实验检测DHA是否对肺癌细胞株的迁移和侵袭产生影响,用DHA处理A549和H3255细胞,24 h后观察迁移实验的结果,48 h后观察侵袭实验的结果,观察并拍照穿过基质胶的数量。24 h后,与对照组比较,DHA组A549和H3255细胞迁移数量减少,表明DHA抑制A549和H3255细胞迁移能力,差异有统计学意义(A549: $t = -19.190, P < 0.001$; H3255: $t = -24.678, P < 0.001$),见图2A、B。48 h后,与对照组比较,DHA组穿过基质胶的A549和H3255细胞侵袭数量减少,表明DHA抑制A549和H3255细胞的侵袭能力,差异有统计学意义(A549: $t = -33.080, P < 0.001$; H3255: $t = -51.824, P < 0.001$),见图2C、D。

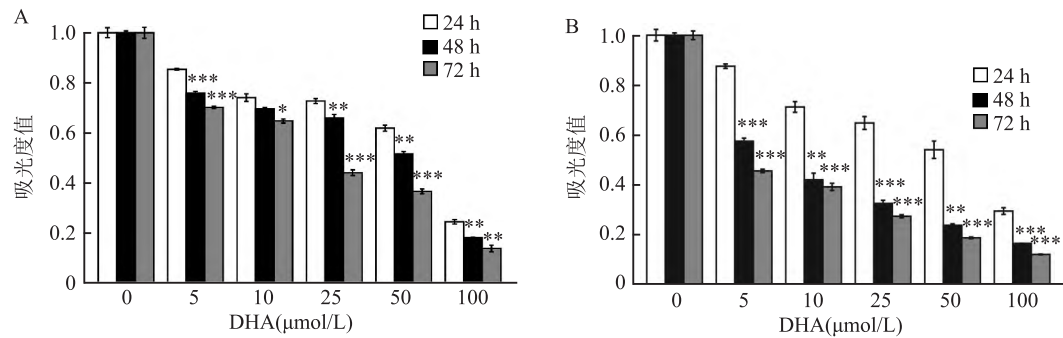


图1 不同浓度的DHA对A549和H3255的生长抑制程度

A:不同浓度DHA处理3 d的A549细胞生存情况;B:不同浓度DHA处理3 d的H3255细胞生存情况;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

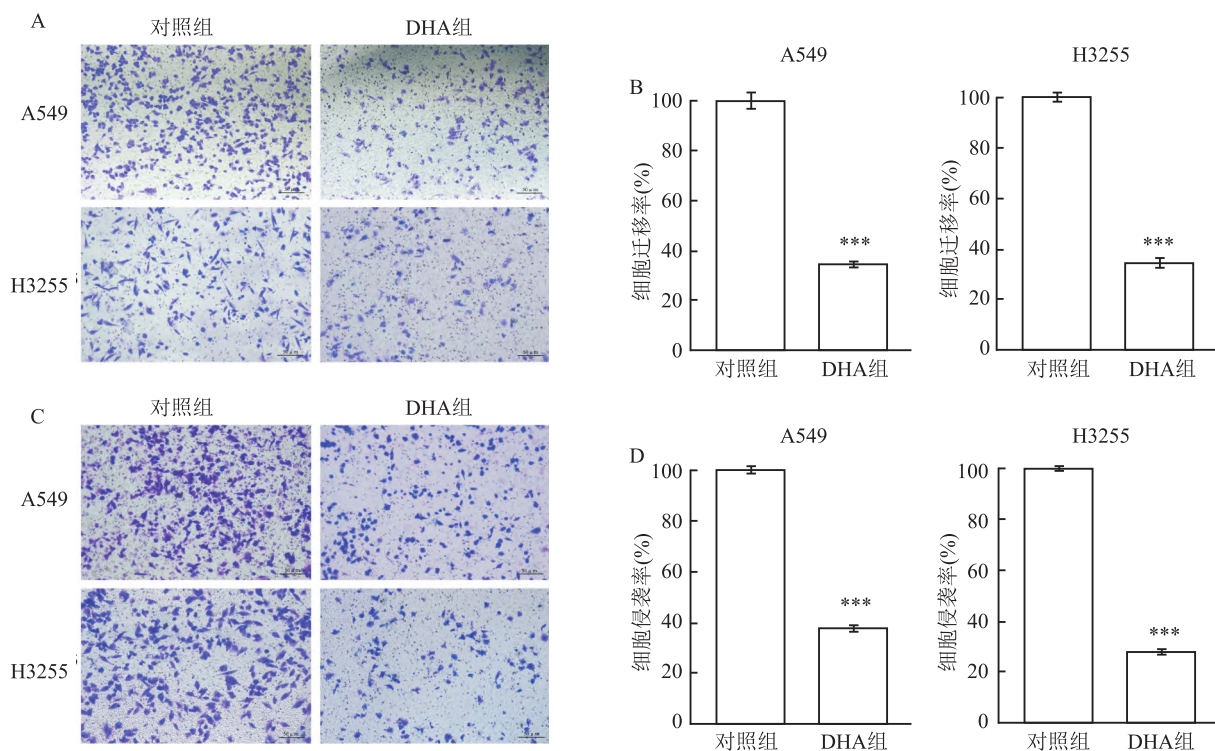


图2 DHA抑制A549和H3255细胞的迁移与侵袭

A:对照组、DHA组迁移结果 $\times 20$; B:对照组、DHA组的迁移的量化结果; C:对照组、DHA组的侵袭结果 $\times 20$; D:对照组、DHA组的侵袭的量化结果;与对照组比较: *** $P < 0.001$

2.3 DHA影响EMT进程相关分子mRNA和蛋白表达 qRT-PCR检测EMT标志物E-cadherin、N-cadherin和Vimentin的mRNA表达水平。结果显示:在A549和H3255细胞中,DHA组E-cadherin的mRNA表达上升(A549: $t = 11.445$, $P < 0.001$; H3255: $t = 20.068$, $P < 0.001$), N-cadherin的mRNA表达下降(A549: $t = -5.847$, $P = 0.004$; H3255: $t = -5.233$, $P = 0.006$), Vimentin的mRNA表达水平同样也下降(A549: $t = -8.333$, $P = 0.001$; H3255: $t = -13.629$, $P < 0.001$),见图3A。进一步用West-

ern blot技术验证E-cadherin、N-cadherin和Vimentin的蛋白表达水平。DHA作用于A549和H3255细胞24 h后,与对照组比较,DHA组除上皮样细胞标志物E-cadherin的蛋白表达水平上升(A549: $t = 24.571$, $P < 0.001$; H3255: $t = 6.062$, $P = 0.004$), N-cadherin(A549: $t = -52.589$, $P < 0.001$; H3255: $t = -50.409$, $P < 0.001$)及Vimentin(A549: $t = -25.730$, $P < 0.001$; H3255: $t = -34.694$, $P < 0.001$)蛋白表达水平均下降,见图3B、C。

2.4 DHA抑制VM形成及VE-cadherin表达 为

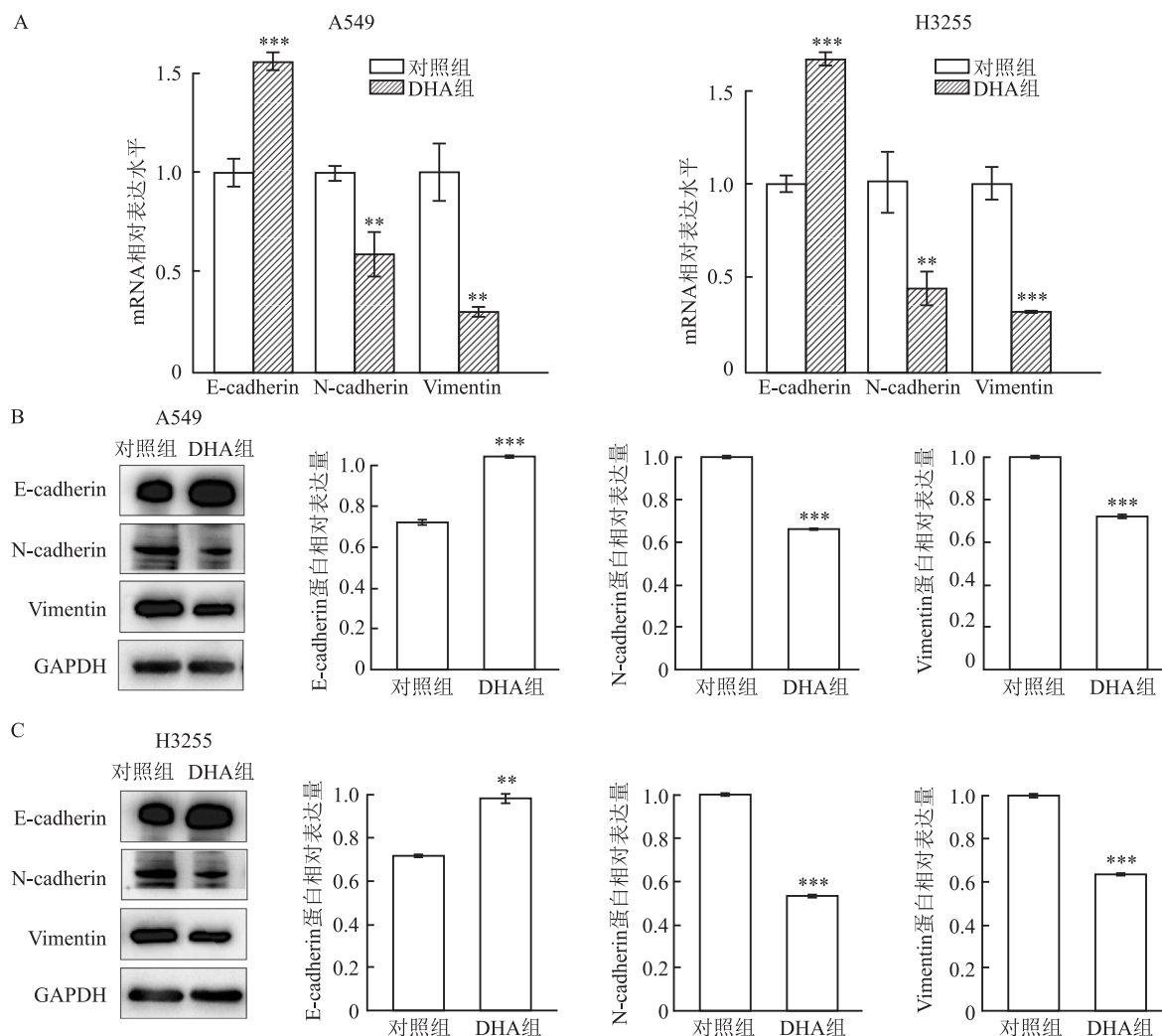


图3 DHA影响A549和H3255细胞EMT相关分子mRNA和蛋白表达

A: EMT相关分子mRNA相对表达量; B: A549细胞中EMT相关蛋白表达及量化结果; C: H3255细胞中EMT相关蛋白表达及量化结果; 与对照组比较: * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

了探究DHA对VM的影响,使用三维细胞培养技术检测对照组和DHA组的血管样结构生成情况。在37℃培养箱培养12h之后,DHA抑制肺癌细胞血管样结构生成,即抑制VM的形成,见图4A。qRT-PCR结果表明,DHA抑制了VM标志物VE-cadherin的mRNA水平表达(A549: $t = -10.846$, $P < 0.001$; H3255: $t = -6.443$, $P = 0.003$),见图4B。Western blot实验进一步验证,DHA也抑制了VE-cadherin的蛋白表达水平,差异有统计学意义(A549: $t = -37.691$, $P < 0.001$; H3255: $t = -11.006$, $P < 0.001$),见图4C。以上结果表明,DHA抑制VM的形成。

3 讨论

肺癌导致全球癌症相关死亡人数最多。目前,

这些病例中超过85%被归类为NSCLC,预计5年生存率仅为15.9%,在过去的几十年里,这个数据仅略有改善^[8]。小分子酪氨酸激酶抑制剂和免疫疗法极大的改善了NSCLC患者的生存益处。然而,NSCLC的总体治愈率和生存率仍然很低,特别是在转移性疾病中^[9]。因此,寻找一种抑制NSCLC转移和抑制其肿瘤进程的安全高效的药物显得尤为重要。青蒿素是一种被广泛认可及应用的抗疟疾药物,DHA是其第一代衍生物,具有水溶性好,毒性低等特点,其抗癌效应在近年来成为热点。如通过自噬来抑制肝癌细胞HepG2.2.15的增殖^[10],在食管鳞癌中以人端粒酶逆转录酶为靶点抑制增殖、转移和侵袭^[11]等。

转移是癌症相关死亡的主要原因,因此,抑制转移是改善临床结果中非常重要的一环。EMT是一

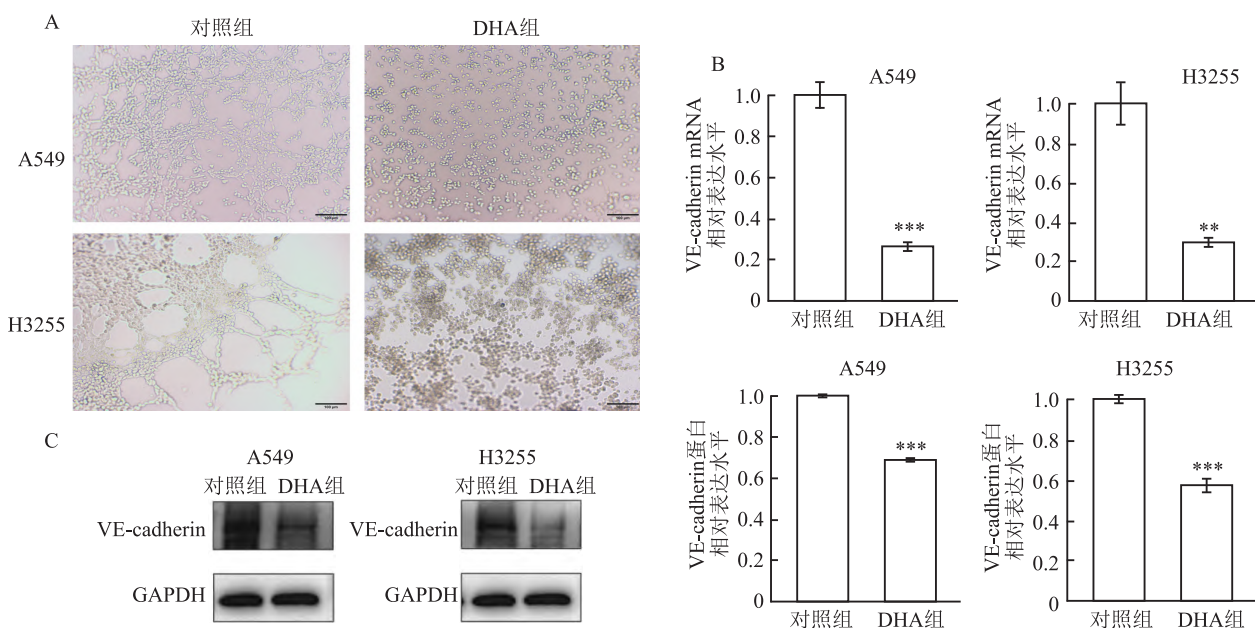


图4 DHA抑制NSCLC的VM形成

A: 三维细胞培养结果 $\times 10$; B: qRT-PCR 检测 VE-cadherin mRNA 相对表达水平; C: Western blot 检测 VE-cadherin 蛋白表达水平及量化结果; 与对照组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

种进化上保守的发育程序,它与致癌作用有关,并通过增强移动性、侵袭性赋予癌细胞转移特性。EMT的复杂生物学过程被认为是致癌的关键标志,而靶向EMT途径成为了一种有吸引力的癌症治疗策略^[12]。EMT的标志是失去上皮表面标志物,最显著的是E-cadherin,以及获得间充质标志物,包括Vimentin和N-cadherin。在功能上,E-cadherin作为一种肿瘤抑制基因,在调节细胞极性、分化、迁移和干细胞样特性方面发挥多种作用。在细胞极性的情况下,E-cadherin与相邻细胞结合,形成细胞间复合物,形成上皮屏障。EMT过程中丢失的关键上皮标志物包括E-cadherin、Mucin-1、细胞角蛋白。相反,在此过程中获得的标志物包括N-cadherin、平滑肌肌动蛋白、纤连蛋白和Vimentin,它们共同构成了关键的间充质标志物^[13]。本研究结果显示,用DHA处理A549和H3255细胞后,DHA明显抑制了NSCLC细胞的侵袭能力,并且E-cadherin的mRNA和蛋白水平表达增强,N-cadherin和Vimentin mRNA和蛋白表达水平受到明显抑制。因此,本研究证实,DHA可通过抑制EMT,进而抑制A549和H3255细胞的迁移和侵袭能力。

VM是最近在许多恶性肿瘤中发现的血管生成过程,不同于传统的涉及血管内皮的血管生成过程。肿瘤细胞沿着现有或新诱导的血管迁移,为肿瘤生长和转移提供能量。近年来,一些针对血管生成的

临床治疗并不令人满意,这可能是由于VM的激活所致。研究^[14]认为,EMT和VM息息相关,EMT导致了VM的发生,在EMT过程中,一些间充质细胞标记物被上调,包括VE-cadherin、纤连蛋白、钙黏蛋白2和Vimentin。而VE-cadherin是一个生物标志物,在VM的形成过程中起着至关重要的作用^[15]。本研究通过三维细胞培养技术观察对照组和DHA组VM的形成,发现DHA抑制了血管样结构的形成,并且DHA组VE-cadherin的mRNA和蛋白表达水平受到明显抑制,证实了DHA抑制VM,但是是否通过抑制EMT来抑制VM,尚未证实。

综上所述,本研究于体外证实了DHA抑制NSCLC的A549和H3255细胞的增殖、迁移、侵袭能力,诱导E-cadherin mRNA和蛋白表达及抑制N-cadherin和Vimentin mRNA和蛋白水平表达,抑制EMT效应;DHA还抑制VM的形成,下调VE-cadherin mRNA和蛋白水平表达。但DHA是否通过抑制EMT效应进而抑制VM还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Yin L, Liu X, Shao X, et al. The role of exosomes in lung cancer metastasis and clinical applications: an updated review [J]. J Transl Med, 2021, 19(1): 312.
- [2] Pastushenko I, Blanpain C. EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis [J]. Trends Cell Biol, 2019, 29(3): 212–26.

- [3] Wei X, Chen Y, Jiang X, et al. Mechanisms of vasculogenic mimicry in hypoxic tumor microenvironments[J]. *Mol Cancer*, 2021, 20(1):7.
- [4] Klayman D L. Qinghaosu (artemisinin): an antimalarial drug from China[J]. *Science*, 1985, 228(4703):1049–55.
- [5] Wu L, Cheng Y, Deng J, et al. Dihydroartemisinin inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell by upregulating tumor necrosis factor *via* JNK/NF-kappaB pathways[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019:9581327.
- [6] Liu Y, Gao S, Zhu J, et al. Dihydroartemisinin induces apoptosis and inhibits proliferation, migration, and invasion in epithelial ovarian cancer *via* inhibition of the hedgehog signaling pathway[J]. *Cancer Med*, 2018, 7(11):5704–15.
- [7] Chen H, Sun B, Wang S, et al. Growth inhibitory effects of dihydroartemisinin on pancreatic cancer cells: involvement of cell cycle arrest and inactivation of nuclear factor-kappaB[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2010, 136(6):897–903.
- [8] Chen Z, Fillmore C M, Hammerman P S, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases[J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(8):535–46.
- [9] Herbst R S, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer[J]. *Nature*, 2018, 553(7689):446–54.
- [10] Zou J, Ma Q, Sun R, et al. Dihydroartemisinin inhibits HepG2. 2. 15 proliferation by inducing cellular senescence and autophagy[J]. *BMB Rep*, 2019, 52(8):520–4.
- [11] Li Q, Ma Q, Xu L, et al. Human telomerase reverse transcriptase as a therapeutic target of dihydroartemisinin for esophageal squamous cancer[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:769787.
- [12] Mittal V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13:395–412.
- [13] Serrano-gomez S J, Maziveyi M, Alahari S K. Regulation of epithelial-mesenchymal transition through epigenetic and post-translational modifications[J]. *Mol Cancer*, 2016, 15:18.
- [14] Liu Q, Qiao L, Liang N, et al. The relationship between vasculogenic mimicry and epithelial-mesenchymal transitions[J]. *J Cell Mol Med*, 2016, 20(9):1761–9.
- [15] Luo Q, Wang J, Zhao W, et al. Vasculogenic mimicry in carcinogenesis and clinical applications[J]. *J Hematol Oncol*, 2020, 13(1):19.

A preliminary study of dihydroartemisinin inhibiting migration invasion and vasculogenic mimicry of non-small cell lung cancer cells

Hu Bingqi, Zhou Jing, Huang Junfeng, Chen Liwen

(Dept of Laboratory Medicine, the Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract **Objective** To investigate the effects of dihydroartemisinin (DHA) on cell growth, migration invasion and vasculogenic mimicry ability of non-small cell lung cancer (NSCLC). **Methods** Different concentrations of DHA were added to NSCLC cell lines A549 and H3255, and after 24 hours, the cell viability was detected by CCK8 method, and the migration and invasion ability of NSCLC cells was detected by Transwell experiment. qRT-PCR and Western blot detected E-cadherin, N-cadherin, and Vimentin mRNA and protein expression levels, respectively. Three-dimensional cell was cultured to observe the vascular-like morphological generation of cells. qRT-PCR and Western blot detected human vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) mRNA and protein expression levels as marker of vasculogenic mimicry. **Results** DHA inhibited cell growth of A549 and H3255 and showed time-dependent and concentration-dependent. DHA inhibits the invasion and metastasis (all $P < 0.001$) of A549 and H3255 cells; DHA upregulated the expression of E-Cadherin at mRNA (all $P < 0.001$) and protein ($P < 0.001$; $P < 0.01$) levels in A549 and H3255 cells, and downregulated the expression of N-cadherin at mRNA (all $P < 0.01$) and protein (all $P < 0.001$) levels as well as the expression of Vimentin at mRNA ($P < 0.01$; $P < 0.001$) and protein (all $P < 0.001$) levels. The results of three-dimensional cell culture showed that the 12-hour vasculogenic mimicry generation capacity of DHA-treated A549 cells and H3255 cells was reduced, and the expressions of VE-cadherin at mRNA ($P < 0.001$; $P < 0.01$) and protein (all $P < 0.001$) levels were downregulated. **Conclusion** Dihydroartemisinin inhibits the growth, migration invasion and vasculogenic mimicry ability of non-small cell lung cancer cells. **Key words** dihydroartemisinin; non-small cell lung cancer cells; epithelial-mesenchymal transition; vasculogenic mimicry