

·基础研究·

## 黄芩素增强 Cx32 组成的细胞缝隙连接提高顺铂的细胞毒性

王宜文<sup>1</sup>, 王 琴<sup>2</sup>, 李国成<sup>1</sup>, 伍俊妍<sup>1</sup>, 陶 亮<sup>\*2</sup>

(中山大学 1. 孙逸仙纪念医院药学部, 广东 广州 510120; 2. 中山医学院, 广东 广州 510080)

**摘 要:**【目的】黄芩素在转染并稳定表达 Cx32 的 HeLa 细胞上,对顺铂细胞毒性的影响及其与 GJ 的关系。【方法】SRB 检测黄芩素对 HeLa32 细胞增殖性的影响,Parachute assay 检测黄芩素对 Cx32 组成的 GJ 功能的影响。细胞集落实验用于检测黄芩素对顺铂细胞毒性的影响及其与 Cx32 组成的 GJ 的关系。Western blotting 检测对 Cx32 蛋白的影响。【结果】黄芩素 24 h, 100  $\mu\text{mol/L}$  浓度以下不影响 HeLa32 细胞增殖。黄芩素 (0.0125 ~ 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 能浓度依赖性地增强 HeLa32 细胞间的荧光传递。黄芩素 (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 分别作用 4 h, 12 h, 和 24 h, 细胞间荧光传递最强的作用时间是 4 h。在生长融合细胞组(有 GJ 形成),黄芩素可以提高顺铂对 HeLa32 细胞的细胞毒性。在生长未融合细胞(无 GJ 形成),或用 GJ 抑制剂 oleamide 阻断 GJ 功能,黄芩素不改变顺铂对细胞的杀伤作用。多西环素调控 HeLa32 细胞 Cx32 的表达与 GJ 的形成。在生长融合细胞,不表达 Cx32(无 GJ 形成),可以降低黄芩素增强顺铂细胞毒性的作用。在生长未融合细胞(无论 Cx 表达与否,均无 GJ 形成),改变 Cx 表达无此效应。黄芩素 0.0125 ~ 0.1  $\mu\text{mol/L}$  作用细胞 4 h,对 Cx32 蛋白表达没有影响。黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ,作用细胞 4 h, 12 h, 和 24 h,对 Cx32 蛋白表达没有影响。【结论】黄芩素可增强 HeLa32 细胞 GJ 功能,提高顺铂的细胞毒性。黄芩素影响 Cx32 组成的 GJ 功能不伴有 Cx32 蛋白表达的增加。

**关键词:**细胞缝隙连接;黄芩素;肿瘤化疗;缝隙连接蛋白 32;顺铂;化疗增敏

**中图分类号:** R730.53; R730.52; R453

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1672-3554(2014)05-0641-09

## Baicalein Enhances Cisplatin Cytotoxicity via Increasing Gap Junction Intercellular Communication in Cx32 Transfected HeLa cells

WANG Yi-wen<sup>1</sup>, WANG Qin<sup>2</sup>, LI Guo-cheng<sup>1</sup>, WU Jun-yan<sup>1</sup>, TAO Liang<sup>\*2</sup>

(1. Pharmacy of Sun Yat-sen Memorial Hospital, Guangzhou 510120, China; 2. Zhongshan School of Medicine, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510080, China)

**Abstract:** 【Objective】 This study investigated the effect of Baicalein on cisplatin cytotoxicity and the relationship between this effect and the modulation of gap junction (GJ) function in Cx32 transfected HeLa cell line. 【Methods】 SRB assay was used to examine the effect of baicalein on cell viability. Parachute assay was used to investigate the effect of baicalein on GJ function. The effect of baicalein on cisplatin cytotoxicity and the relationship of this effect and GJ function were assayed by standard colony-forming assay. The expression of Cx32 was monitored by Western blotting. 【Results】 Baicalein 24 h had no effect on cell viability below 100  $\mu\text{mol/L}$ . Baicalein 0.0125 ~ 0.1  $\mu\text{mol/L}$  4 h dose dependently increased dye spread through gap junction. Baicalein 0.1  $\mu\text{M}$  increased GJ function mostly at 4 h. Baicalein decreased clonogenic survival fraction at high cell density (GJ formed) induced by cisplatin. Baicalein had no effect on cisplatin cytotoxicity at low-density cell cultures (no GJ formed) or using GJ inhibitor oleamide. Doxycycline could induct connexin expression and GJ formation. At high cell density, non-Cx32 expression (no GJ formed) could reduce the enhancement of cisplatin cytotoxicity induced by baicalein compared with Cx32 expression cells (GJ formed). In contrast, at low cell density (no GJ formed no matter Cx expression or not), Cx expression change did not have this effect. Western blotting results showed different concentration (0.0125-0.1)  $\mu\text{mol/L}$  of baicalein 4 h had no effect on Cx32 expression. Cx32 expression did not change when treated with baicalein 0.1  $\mu\text{mol/L}$  from 4 h to 24 h. 【Conclusion】 Baicalein improved cisplatin cytotoxicity in HeLa32 cells by improving GJ function in HeLa32 cells. The improvement of GJ function in HeLa32 cells by baicalein did not accompany Cx32 expression change.

**Key words:** gap junction; baicalein; cancer chemotherapy; connexin 32; cisplatin; chemotherapeutic sensitization

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2014, 35(5): 641-649]

收稿日期: 2014-03-28

基金项目: 国家自然科学基金(U1303221), 新疆维吾尔自治区科技计划项目(201233150)

作者简介: 王宜文, 博士生, 主管药师, 研究方向: 肿瘤药理, E-mail: yiwang@163.com; \* 通信作者: 陶亮, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 细胞缝隙连接与疾病, E-mail: taol@mail.sysu.edu.cn

化疗增敏是目前肿瘤化疗研究的热点。其所用浓度或剂量没有抗肿瘤作用或抗肿瘤作用很小,但能提高已知肿瘤化疗药物的细胞毒作用,对于减少肿瘤化疗药物的用量,提高其疗效,扩大其临床应用具有非常重要的意义。最近的研究发现缝隙连接通道(gap junction, GJ)可以提高很多化疗药物的细胞毒性<sup>[1-2]</sup>。我们前期工作也证实 GJ 可以影响顺铂与依托泊苷的细胞毒性<sup>[3]</sup>,由 Cx32 组成的 GJ 可以影响化疗药物的细胞毒性<sup>[4]</sup>。GJ 是提高化疗敏感性的一个重要机制。很多植物来源的黄酮类化合物可以提高肿瘤细胞的 GJ 功能<sup>[5-6]</sup>。黄芩素属于黄酮类化合物,并已经被证实具有抗肿瘤作用<sup>[7-11]</sup>。但其对 Cx32 组成的 GJ 的影响及其对化疗药物细胞毒性的影响尚未见报道。本课题拟在转染 Cx32 的 HeLa 细胞上观察其对顺铂细胞毒性的影响及其与 GJ 功能的关系,以探讨 GJ 在黄芩素化疗增敏中的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

顺铂(cisplatin, Sigma-Aldrich); 油酸酰胺(oleamide, Sigma-Aldrich); 潮霉素(Hygromycin, Calbiochem); 多西环素(doxycycline, Calbiochem); 黄芩素(baicalein, 中国药品生物制品检定所标准品); DMEM 低糖干粉(Gibco); 新生牛血清(NBCS, Gibco); 青-链霉素(penicillin-streptomycin, Gibco); 胰酶(trypsin, Gibco); 二甲基亚砷(DMSO, Sigma-Aldrich); 丽丝胺罗丹明 B (sulforhodamine B, SRB, Sigma-Aldrich); 三氯醋酸(trichloroacetic acid, TCA, Sigma-Aldrich); Tris (Sigma-Aldrich); Calcein-AM 和 CM-DiI (Invitrogen); BSA 蛋白定量试剂盒(Bio-rad); 抗 HA 抗体 (Sigma-Aldrich); HRP 标记的羊抗小鼠二抗 (Amersham); ECL-plus 化学发光剂 (Bio-rad); 丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺 (Bio-rad), 硝酸纤维素膜 (NC 膜, Amersham), 其它常用试剂均为国产分析纯级。

### 1.2 实验细胞

转染,并稳定表达 Cx32 的 HeLa 细胞,由美国新泽西医学牙医学大学药理学/生理学系 Andrew L. Harris 教授惠赠。

### 1.3 功能性 GJ 的表达

本实验选用转染含有 Cx32 cDNA 的载体质粒

PBI。PBI 含有 LacZ 基因用于鉴定转染的细胞。在一个多克隆位点的上游插入一段编码串联在 Cx32 C-末端的流感血凝素抗原表位(influenza hemagglutinin (HA) epitope)的纯化(检测)标记物的基因序列。该 PBI 质粒可以通过多西环素而控制 Cx 表达。在培养基中加入多西环素时能诱导 Cx 表达并形成有效的 GJIC。构建好的含 Cx32 的质粒转染已经建立好的 Tet-On HeLa 细胞,筛选稳定表达 Cx32 的 HeLa 细胞株进行培养、扩增、留种。Western blotting 和“细胞接种荧光示踪法”(Parachute Assay)已经证实,用 doxycycline 诱导上述转染 Cx32 的 HeLa 细胞,均能稳定表达 Cx32,并能形成功能性的 GJ<sup>[12]</sup>。

### 1.4 稳定表达 Cx32 的 HeLa 细胞的培养传代

将转染并稳定表达 Cx32 的 HeLa 细胞培养于含 10% 新生牛血清和 1% 青-链霉素的 DMEM 低糖培养液中, 37 °C、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的细胞培养箱中培养。常规培养瓶中培养细胞, 2 ~ 3 天传代一次, 2.5 g/L 的胰蛋白酶消化, 传代 2-3 次/周, 传代比例约为 1:3 ~ 1:4。

### 1.5 SRB 法

测定不同浓度黄芩素对 HeLa 细胞增殖的影响, 以确定用于研究 GJ 功能作用的黄芩素浓度<sup>[13-14]</sup>。取生长良好的细胞, 以  $4 \times 10^5$  cells/mL 的种板密度, 200  $\mu$ L/孔将细胞接种到 96 孔板上, 空白组只含培养液, 每组 5 个平行孔用细胞诱导培养基培养(含 doxycycline), 体积分数 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C 培养箱中培养。48 h 后, 实验组加入黄芩素(终浓度 0.01、0.1、1、10、100  $\mu$ mol/L), 对照组加入 DMSO, 药物作用 24 h 后更换新鲜培养液, 继续培养 24 h。小心弃培养液, 每孔加入 50  $\mu$ L 冰冷的 50% TCA(终浓度为 10%), 4 °C 冰箱静置 1 h 固定。倒掉固定液, 用超纯水洗 3 遍, 每次 1 min, 甩干后空气干燥。每孔加入 200  $\mu$ L 0.4% SRB, 室温 30 min, 然后 1 % 醋酸洗去游离染料。甩干后空气干燥。每孔精确加入 150  $\mu$ L 10 mmol/L Tris 放摇床 5 ~ 10 min 溶解至染料全部溶解。酶标仪在 564nm 波长处测定 OD 值, 测时减掉空白 OD 值。每个试验均重复 3 次。

$$\text{细胞存活率(surviving fraction)} = \frac{\text{OD}_{\text{黄芩素处理组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}}}$$

### 1.6 细胞接种荧光示踪法测定缝隙连接功能

按  $8 \times 10^5$  cells/mL, 1 mL/孔的密度用细胞诱导筛选培养液将细胞接种到 12 孔板, 体积分数

5%CO<sub>2</sub>, 37℃培养箱中培养 48 h 后,至细胞融合。供体细胞用 5 μmol/L 的 CM-DiI 和 5 μmol/L 的 calcein-AM 共孵育 30 min。供体细胞用胰酶消化,无血清培养基稀释至 500 cells/mL,接种到“接受细胞”。加入不同浓度的黄芩素、Oleamide 50 μmol/L (终浓度),置于体积分数 5%CO<sub>2</sub>, 37℃培养箱中培养 4 h。CM-DiI 是亲脂性的膜荧光染料,不能通过细胞膜传至相邻细胞,标记供体细胞。Calcein-AM 进入细胞后,其上所带的乙酰甲酯(acetoxymethyl ester, AM) 被胞内脂酶水解而形成发绿色荧光的 calcein,不能透过细胞膜,但能经 GJ 传递至邻近细胞,标记接受细胞。计数一个供体细胞周围发绿色荧光的受体细胞数,作为评价 GJ 功能的指标<sup>[15-16]</sup>。每次实验重复至少 5 次。

### 1.7 标准细胞集落形成分析法 (standard colony-forming assay)

以  $8 \times 10^5$  cells/mL (高密度) 接种,细胞之间可紧密接触,有条件形成 GJ。48 h 后换为无血清培养基培养,予以黄芩素, GJ 抑制剂 (Oleamide) 相应处理后,加入顺铂作用 1 h, 0.25% 胰酶 100 μL 消化,细胞诱导筛选培养液 500 μL 中止消化,吹匀,细胞计数。吸取适量细胞悬液,用细胞诱导筛选培养液稀释成 500 cells/mL 细胞悬液, 2 mL/孔接种到 6 孔培养板, 5%CO<sub>2</sub>, 37℃培养箱中培养。7~9 天后计数细胞集落数。500 cells/mL (低密度) 的种板密度,细胞之间无接触,无形成 GJ 的条件。2 mL/孔将实验细胞用细胞诱导筛选培养液接种到 6 孔板,置于 5%CO<sub>2</sub>, 37℃培养箱中培养。6~8 h 细胞贴壁后,同样予以黄芩素, GJ 抑制剂 (oleamide) 相应处理后,加入顺铂作用 1h (具体步骤同高密度接种细胞)。后吸去药液,换为细胞诱导筛选培养液培养。7 d 后计数细胞集落数。测定细胞集落形成率; 比较生长融合细胞与生长未融合细胞的顺铂毒性大小<sup>[2]</sup>。

细胞集落形成率 (surviving fraction) =  $\frac{\text{顺铂处理组的细胞集落}}{\text{未用顺铂处理组的细胞集落}}$

### 1.8 Western Blotting 检测 Cx32 蛋白表达

不同浓度 (0.0125 ~ 0.1 μmol/L) 的黄芩素作用于 HeLa 32 细胞 4 h 后,用冰冷的 PBS 洗细胞 3 次,加适量细胞裂解液裂解细胞,用细胞刮匙将细胞刮下,超声破碎细胞。细胞液 4℃ 12 000 ×g,离心 30 min,取上清,标准蛋白定量 (Bio-rad DC assay)。抽取 20 μg 蛋白加样至 10% SDS-PAGE 凝

胶中进行电泳分离,后转膜至 NC 膜上。常规剪膜, 5% 脱脂奶粉/TBST, 室温封闭 30 min。抗 HA 抗体为一抗,浓度为 1:1 000, 4℃,摇床振摇过夜。TBST 洗膜, 5 min × 3 次。二抗为羊抗鼠抗体,浓度为 1:2 000, 室温孵育 30 min, TBST 洗膜, 10 min × 3 次。Bio Imaging system (Gene Genius) 对胶片进行灰度扫描分析。

### 1.9 统计学处理方法

实验结果使用 SPSS 13.0 软件进行分析。两组之间计量资料比较进行 *t* 检验, 多组之间计量资料比较进行 ANOVA 分析, 组间比较采用 LSD 法,  $P < 0.05$  认为有统计学意义, 统计图表采用 Sigma Plot 10.0 绘制。

## 2 结 果

### 2.1 黄芩素对 HeLa32 细胞增殖的影响

SRB 法检测不同浓度黄芩素 (0.01、0.1、1、10、100 μmol/L, 终浓度) 24 h 对 HeLa32 细胞增殖的影响。黄芩素处理组与对照组的比值作为细胞生存率, 以细胞生存率 (cell viability) 作为衡量黄芩素细胞毒性大小的指标。结果显示: 与对照组相比, 0.01 ~ 100 μmol/L 黄芩素作用细胞 24 h, 黄芩素 < 100 μmol/L, 对细胞无毒性 (图 1)。

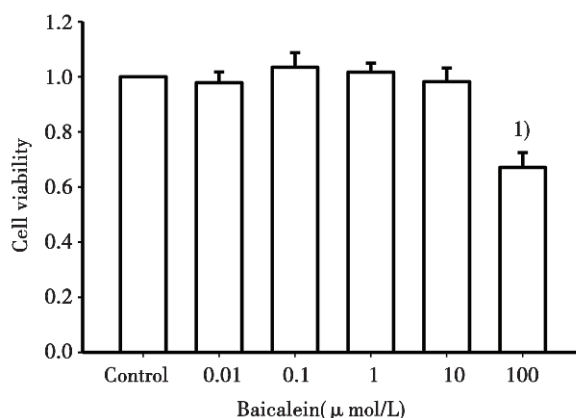


图1 黄芩素 0.01~100 μmol/L (终浓度) 24 h 对 HeLa 32 细胞增殖的影响

Fig.1 The effect of baicalein 0.01 ~ 100 μmol/L (final concentration) 24 h on the cell viability in HeLa32 cell

The surviving fraction of HeLa 32 cell after treated with baicalein 0.01 ~ 100 μmol/L (final concentration) for 24 h. Columns, means ± S.D from 3 independent experiments. 1) significantly different from control,  $P < 0.05$ .

## 2.2 黄芩素对 HeLa32 细胞 GJ 功能的影响

“细胞接种荧光示踪法”(Parachute Assay), 分别测定了不同浓度的黄芩素(0.0125、0.025、0.05、0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 终浓度)4 h 对细胞 GJ 功能的影响。结果显示:黄芩素能浓度依赖性地增强 HeLa32 细胞间缝隙连接功能。作用时间 4 h, 黄芩素在浓度为 0.1  $\mu\text{mol/L}$  时, GJ 功能提高  $0.42 \pm 0.08$ (图 2)。为了确定黄芩素(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )对 GJ 影响的最佳时间, 我们测定黄芩素(0.1  $\mu\text{mol/L}$ )不同作用时间点对细胞 GJ 功能的影响。结果显示: 黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 4 ~ 24 h 内, 随着时间延长, 荧光传递功能逐渐减弱, 最强的作用时间是 4 h,  $P < 0.05$ (图 3)。

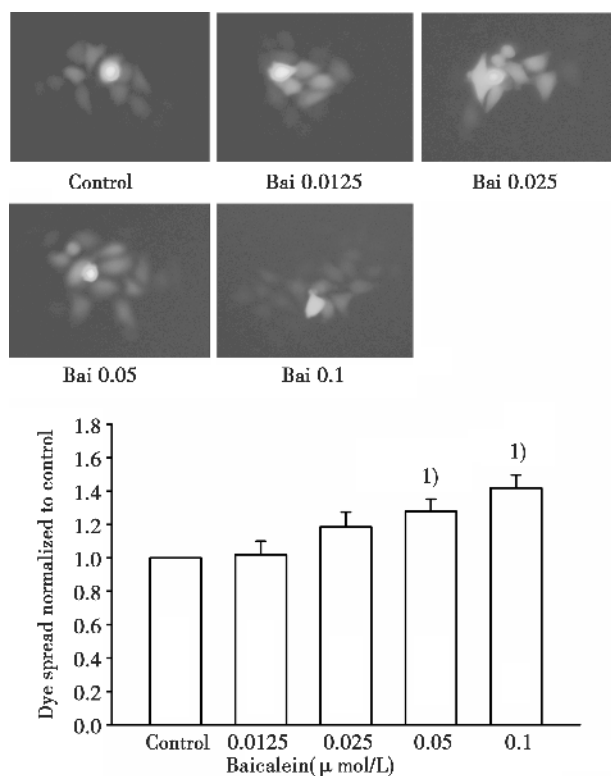


图 2 黄芩素 0.0125 ~ 0.1  $\mu\text{mol/L}$  4 h 对 HeLa 32 细胞 GJ 功能的影响

Fig.2 Effect of baicalein 0.0125 ~ 0.1  $\mu\text{mol/L}$  4h on dye coupling through gap junction in HeLa 32 cell

The normalized enhancement of dye coupling through GJ by baicalein 4 h (0.0125  $\mu\text{mol/L}$  ~ 0.1  $\mu\text{mol/L}$  final concentration). Columns, means  $\pm$  S.D from nine experiments. 1)  $P < 0.05$ , significantly different from control. magnification  $\times 400$

以上结果提示: 黄芩素可提高转染并稳定表达 Cx32 HeLa 细胞荧光传递功能。

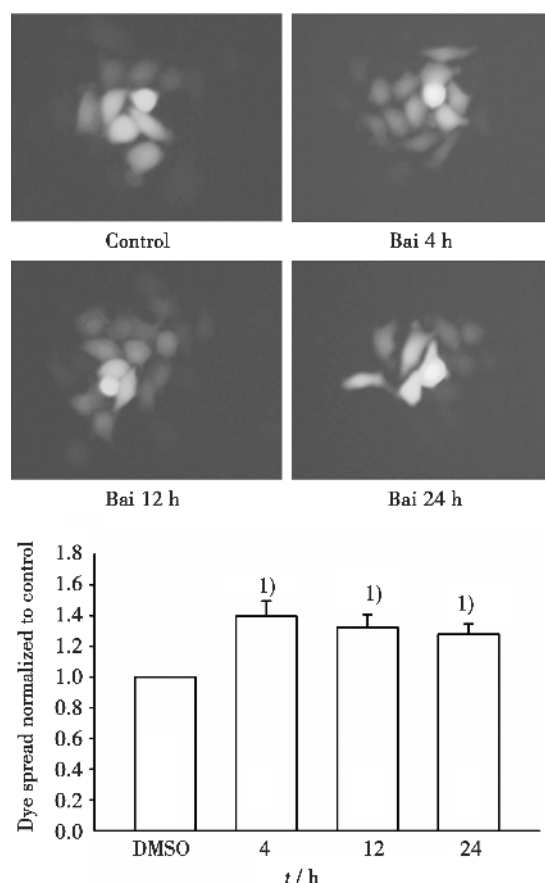


图 3 黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$  4 ~ 24 h 对 HeLa 32 细胞 GJ 的影响

Fig.3 The effect of baicalein 0.1  $\mu\text{mol/L}$  4 ~ 24 h on dye coupling through gap junction in HeLa 32 cell

The normalized enhancement of dye coupling through GJ by baicalein 0.1  $\mu\text{mol/L}$  during the course of 4 ~ 24 h. Columns, means  $\pm$  S.D from five experiments. 1)  $P < 0.05$ , significantly different from control. magnification  $\times 400$

## 2.3 黄芩素对顺铂细胞毒性的影响及与 GJ 的关系

2.3.1 抑制剂 oleamide 对黄芩素提高 HeLa32 GJ 功能的影响 HeLa 细胞分别给予 oleamide 50  $\mu\text{mol/L}$ , 4 h, 黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 4 h, 和 oleamide 50  $\mu\text{mol/L}$ 、黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$  共同孵育 4 h, 荧光显微镜观察经 GJ 介导的细胞间荧光传递的变化。结果如图 4 所示: GJ 抑制剂 oleamide 50  $\mu\text{mol/L}$  4 h 抑制 HeLa32 GJ 功能, 降低至 control 组的  $0.45 \pm 0.1$ 。GJ 抑制剂 oleamide 50  $\mu\text{mol/L}$  4 h 拮抗黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 4 h 对 HeLa32 GJ 的增强作用, 使 GJ 功能由  $1.36 \pm 0.13$ , 降低至 control 组的  $0.67 \pm 0.19$ 。结果提示: oleamide 50  $\mu\text{mol/L}$  4 h 可抑制

HeLa32 GJ 功能,可抑制黄芩素对 HeLa32 GJ 功能的增强作用。

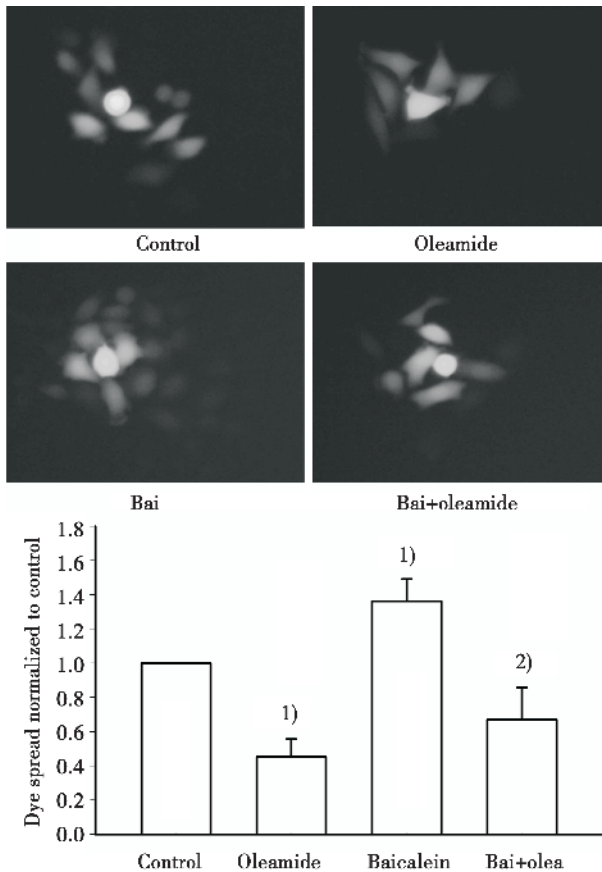


图 4 Oleamide 拮抗黄芩素对 HeLa32 细胞 GJ 功能的增强作用

Fig.4 Oleamide counteracted the enhancement of the dye coupling through gap junction in HeLa 32 cell induced by baicalein

Oleamide 50  $\mu\text{mol/L}$ , 4 h counteract the enhancement of baicalein 0.1  $\mu\text{M}$  4h on the dye coupling through GJ in HeLa 32 cell. Columns, means  $\pm$  S.D for three experiments. 1)  $P < 0.05$ , significantly different from control; 2)  $P < 0.05$ , significantly different from baicalein group. magnification  $\times 400$

2.3.2 黄芩素对顺铂细胞毒性的影响及与 GJ 的关系 用不同密度接种细胞,获得生长融合的细胞( $8 \times 10^5$  cells/mL 接种,培养 48 h,细胞之间形成紧密接触,有条件形成 GJ)和生长未融合的细胞(500 cells/mL 接种,培养 48 h,细胞之间未接触,无形成 GJ 的条件)。在上述细胞中加入黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$  或黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ,oleamide 50  $\mu\text{mol/L}$  共同孵育 3 h,后加入 0.5  $\mu\text{mol/L}$  顺铂(终

浓度),作用 1h;测定细胞集落形成率;比较生长融合细胞与生长未融合细胞黄芩素对顺铂毒性的影响,探讨其与 GJ 的关系。由图 5 所示:在高密度组,黄芩素降低细胞集落形成率由  $0.62 \pm 0.02$  至  $0.36 \pm 0.07$ 。而在低密度组,黄芩素对顺铂的细胞毒性没有影响,两组无显著性差异。结果提示:黄芩素提高顺铂细胞毒性与细胞融合度有关。在高密度组,oleamide 降低黄芩素预处理组顺铂的细胞毒性,细胞集落形成率由  $0.36 \pm 0.07$  升高至  $0.64 \pm 0.06$ ,与顺铂组无显著性差异。在低密度组,各组间无显著性差异。结果提示:GJ 抑制剂 oleamide 可以拮抗黄芩素对顺铂细胞毒性的增强作用。

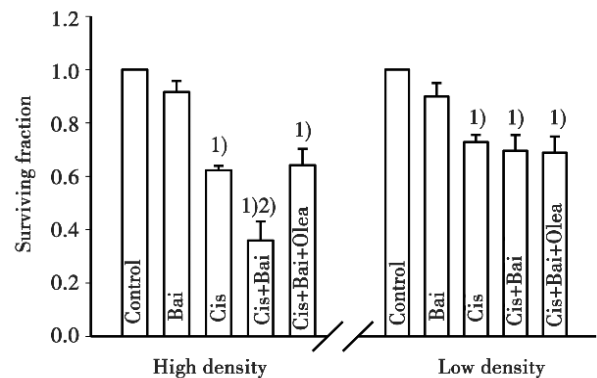


图 5 黄芩素对顺铂细胞毒性的影响及其与 GJ 的关系

Fig.5 The effect of baicalein on cisplatin cytotoxicity and the relationship of this effect and GJ function in HeLa 32 cell

At high cell density (GJ formed), the cells were more sensitive to cisplatin when preincubated with baicalein 0.1  $\mu\text{mol/L}$  4h. At low cell density (no GJ formed), baicalein did not influence cisplatin cytotoxicity. At high cell density (GJ formed), oleamide 50  $\mu\text{mol/L}$  4h counteracted the improvement of cisplatin cytotoxicity induced by baicalein, while at low cell density (no GJ formed), oleamide did not have this effect. Columns, means  $\pm$  S.D from 5 experiments. 1)  $P < 0.05$ , comparing with control, 2)  $P < 0.05$  compared with cisplatin preincubated cells.

2.3.3 改变 Cx32 表达对黄芩素增强顺铂细胞毒性的影响 ① HeLa 32 细胞 Cx32 表达受 doxycycline 调控;HeLa 细胞是来源于人宫颈癌的永生型细胞,自身无内源性 Cx 表达,经转染后可以稳定表达 Cx。在“实验材料与方法”中已经介绍,我们使用的是表达 Cx32 的 PBI 质粒。这种质粒在启动子的控制下表达 Cx32。一般情况下,

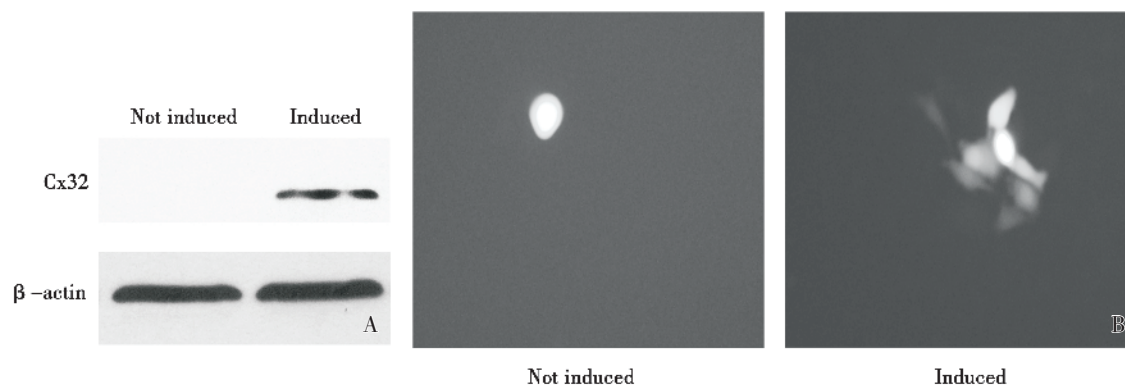


图 6 多西环素调控 HeLa32 细胞 Cx32 的表达及 GJ 的形成

Fig.6 Doxycycline induction of connexin expression and GJ formation

Doxycycline (1  $\mu\text{g/mL}$ ) induces Cx32 expression, as shown by Western blotting (A). Dye coupling through Cx32-derived gap junctions, as shown by parachute dye coupling assay (B). Magnification  $\times 400$ .

Cx32 不表达;需要表达时,可在培养基中加入 doxycycline 诱导 Cx32 表达。本研究在转染 Cx32 的 HeLa 细胞,用 doxycycline (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 诱导 48 h 后,用 Western blotting 和 parachute assay 测定 HeLa 细胞的 Cx32 的蛋白表达情况及其 GJ 功能(图 6)。Western blot 结果表明,未加 doxycycline 的细胞无 Cx32 蛋白表达,加入 doxycycline (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 诱导 48 h 后,检测到 HeLa 细胞内的 Cx32 蛋白表达显著增加。同时,parachute assay 结果显示,未加 doxycycline 的 HeLa 细胞未见有通过 GJ 产生的荧光传递,而加入 doxycycline (1  $\mu\text{g/mL}$ ) 诱导 48 h 后,HeLa 细胞通过 GJ 产生的荧光传递出现。以上结果表明,doxycycline 不仅可诱导转染的 HeLa 细胞的 Cx32 表达,而且能够形成功能性的 GJ。②改变 Cx32 表达对黄芩素增强顺铂细胞毒性的影响:仍然采用高低密度接种细胞,分别采用 doxycycline 诱导与非诱导,获得生长融合的细胞(dox 诱导,有 Cx 表达,有条件形成 GJ;无 dox 诱导,无 Cx 表达,无条件形成 GJ)和生长未融合的细胞(无论 dox 诱导与否,均无形成 GJ 的条件)。在上述细胞中加入黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$  作用 3 h,后加入 0.5  $\mu\text{mol/L}$  顺铂(终浓度),作用 1 h;测定细胞集落形成率。比较生长融合细胞与生长未融合细胞 Cx 蛋白表达对黄芩素增强顺铂毒性的影响,进一步探讨其与 GJ 的关系。如图 7 所示:在高密度组,Cx 蛋白不表达(无 GJ 形成),可以降低黄芩素增强顺铂细胞毒性的作用,细胞集落形成率由  $0.36 \pm 0.07$  升高至  $0.63 \pm 0.06$ 。而在低密度组,Cx

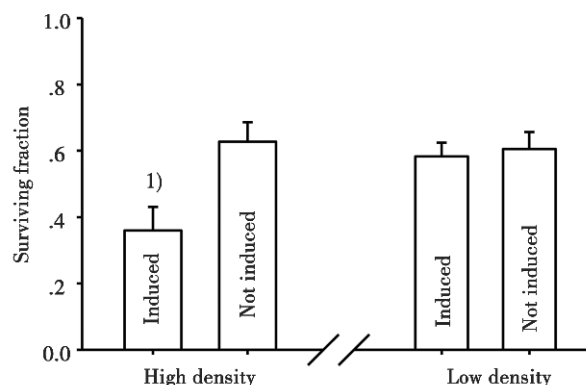


图 7 改变 Cx 的表达影响黄芩素增强顺铂对 HeLa32 细胞毒性的作用

Fig.7 Cx expression influenced the enhancement of cisplatin cytotoxicity in HeLa cells transfected with Cx32 by baicalein

At high cell density (permissive for GJ formed), the cells treated with doxycycline (GJ formed) were much more sensitive to cisplatin 0.5  $\mu\text{mol/L}$  compared with doxycycline-untreated cells (no GJ formed). In contrast, at low cell density (not permissive for GJ formed), doxycycline did not have this effect. Columns, means  $\pm$  S.D from 5 independent experiments. 1)  $P < 0.05$ , comparing with doxycycline-noninduced cells.

蛋白表达与否不影响黄芩素对顺铂的细胞毒性,两组无显著性差异。结果提示:黄芩素提高顺铂细胞毒性与 GJ 形成有关。

## 2.4 黄芩素对 connexin 32 蛋白表达的影响

### 2.4.1 不同浓度黄芩素 4 h 对 Cx32 蛋白表达的影响

细胞以  $8 \times 10^5$  cells/mL 种板密度, 2 mL/孔

接种于 6 孔板, 分别予以不同浓度 (0.0125 ~ 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 的黄芩素孵育 4 h, Western blotting 法测定黄芩素对细胞 connexin32 蛋白表达的影响。统计结果如图 8 所示, 黄芩素 0.0125 ~ 0.1  $\mu\text{mol/L}$  4 h, 对 HeLa32 细胞的 Cx32 蛋白表达没有影响 ( $P > 0.05$ )。

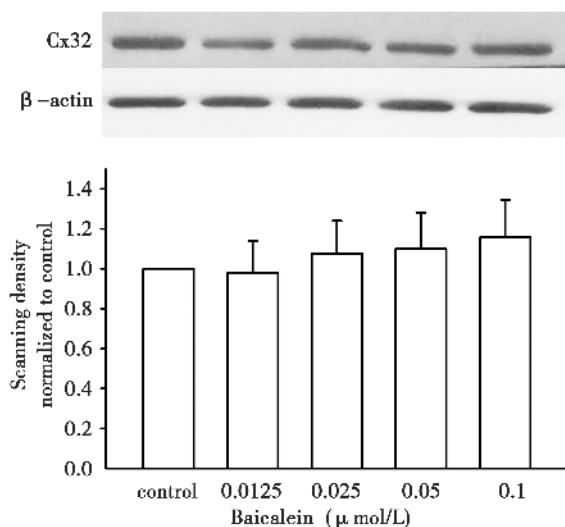


图 8 黄芩素 (0.0125 ~ 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 4 h 对 HeLa32 细胞 Cx32 蛋白表达的影响

Fig.8 The effect of baicalein (0.0125 ~ 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 4 h on Cx32 expression in HeLa32 cells

The figure showed the scanning density normalized to control induced by baicalein (0.0125 ~ 0.1)  $\mu\text{mol/L}$  4 h in HeLa32 cell as shown by western blotting assay. Datas, means  $\pm$  S.D from three independent experiments.  $P < 0.05$  comparing with control were considered significant.

2.4.2 黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$  不同作用时间对 HeLa32 细胞 Cx32 蛋白表达的影响 细胞以  $8 \times 10^5$  cells/mL 种板密度, 2 mL/孔接种于 6 孔板, 予以黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$  孵育 4 h, 12 h, 24 h, Western blotting 法测定黄芩素对细胞 connexin32 蛋白表达的时效关系。统计结果如图 9 所示, 黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$ , 作用时间 4 ~ 24 h, 对 HeLa32 细胞的 Cx32 蛋白表达没有影响 ( $P > 0.05$ )

以上结果提示: 黄芩素  $\leq 0.1 \mu\text{mol/L}$ , 4 h 增强 HeLa32 细胞 GJ 功能不是通过增加 Cx32 表达产生的。

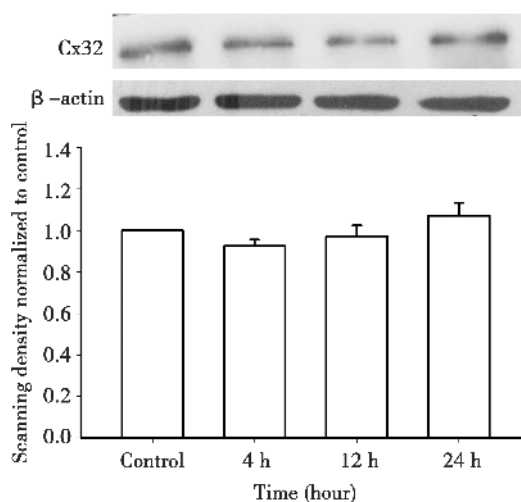


图 9 黄芩素 0.1  $\mu\text{mol/L}$  4 ~ 24 h 对 HeLa32 细胞 Cx32 蛋白表达的影响

Fig.9 The effect of baicalein (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) 4 h, 12 h, and 24 h on Cx32 expression in HeLa32 cells

The figure showed the scanning density normalized to control induced by baicalein 0.1  $\mu\text{M}$  for 4 h, 12 h, 24 h respectively as shown by western blotting assay. Datas, means  $\pm$  S.D from four independent experiments.  $P < 0.05$  comparing with control were considered significant.

### 3 讨 论

黄芩素与化疗药物联合应用的研究提示, 黄芩素可协同提高化疗效果。其机制可能包括: 1 抑制耐药细胞中 MDR1、MRP1、MRP2、MRP6、AHR、COMT、FGF2 等耐药相关基因以及 Bcl-2、BFL1、NAIP、p63 等凋亡抑制基因的表达, 增加 Apa-f1、ASC、ATM、Bad、Bak、Bax、BimL 等凋亡促进基因的表达, 具有显著的耐药逆转作用<sup>[17]</sup>。2 抑制多药耐药基因产物 P-糖蛋白 170 (P-gp 170) 表达, 增强化疗敏感性<sup>[18]</sup>。3 降低耐药基因产物 P-gp 药物外排功能、增加细胞内药物浓度<sup>[19]</sup>。

GJ 是提高化疗效果的另外一条途径, 其增强化疗药物细胞毒性的机理与“旁观者效应” (Bystander effect, BE) 有关<sup>[1-2]</sup>。旁观者效应发现: 肿瘤细胞转染目的基因, 未被转染的细胞也会被杀灭。旁观者效应是提高化疗药物敏感性的一个重要机制。由 Cx 组成的 GJ 与 BE 关系密切。GJ 在旁观者效应中起到传递细胞死亡时产生的“死亡信号”, 引起毗邻细胞死亡而加强化疗药物细胞毒

性的作用<sup>[1,20]</sup>。研究发现:GJ 提高了 HSV-TK/GCV 基因治疗的旁观者效应<sup>[21-22]</sup>。我们的研究也证明:提高 GJ 功能可提高化疗药物的杀伤作用<sup>[4]</sup>。Cx32 及其组成的 GJ 在化疗增敏中的研究证实: Cx32 及其组成的 GJ 是增强化疗效果的一个靶点,提高 GJ 功能可以提高“死亡信号”在肿瘤细胞间的传递,增强化疗药物对整体细胞的杀伤作用。

本研究结果表明:在转染并稳定表达 Cx32 的 Hela 细胞上,无细胞毒作用的黄芩素可增强 GJ 功能,提高顺铂的细胞毒性作用。集落实验结果显示:在生长融合细胞组(有 GJ 形成),顺铂与黄芩素预处理组细胞集落形成率显著低于单用顺铂组,阻断 GJ 可以拮抗黄芩素增强顺铂细胞毒性作用。在生长未融合细胞组,黄芩素或阻断 GJ 均不影响顺铂的细胞毒性。以上结果提示:黄芩素提高顺铂的细胞毒性与其提高 Cx32 组成的 GJ 功能有关。一方面证实我们之前的研究结果:提高 Cx32 的 GJ 功能,可以提高顺铂的细胞毒性<sup>[4]</sup>。另一方面也验证了我们的推测:黄芩素可通过提高 Cx32 组成的 GJ 功能,提高了顺铂的细胞毒性。

我们的结果还提示:黄芩素提高 GJ 功能的机制,不伴有 Cx32 蛋白表达的改变。GJ 通道功能的改变受诸多因素的影响,包括:胞内的 pH 值、Ca<sup>2+</sup>浓度、磷酸化状态、跨 GJ 电压、某些神经体液因子、蛋白质调节因子以及外源性化学物质等<sup>[23-25]</sup>。黄酮类药物对 GJ 的影响可通过增强 Cx 蛋白表达,改变 Cx43 磷酸化,改变 GJ 功能。如山奈酚提高结肠癌细胞株 KNC 中 Cx43 蛋白的表达,Cx43 磷酸化,提高 GJIC<sup>[26]</sup>。木黄酮与槲皮素提高乳腺癌细胞 MDA-MB-231 中 Cx43 的表达<sup>[6]</sup>。黄酮类药物芹菜素、橘皮素 1 h 对 Cx43 蛋白表达无影响,对磷酸化状态无影响,而抑制促癌因子 TPA, BHT 对 GJIC 的抑制作用<sup>[5]</sup>,具体机制不明。这与我们的实验结果类似。黄芩素可否直接作用于 GJ,影响其功能,其他机制如 Cx 蛋白磷酸化在这一过程中起到什么作用,尚需进一步的证实。尽管我们没有揭示出黄芩素提高 GJ 功能的机制,但是我们的结果首次证实无细胞毒性的黄芩素,有 GJ 时,显著增强顺铂的细胞毒性。GJ 是黄芩素协同提高化疗效果的新机制。这提示我们,当黄芩素与顺铂合用于肿瘤化疗时,可降低顺铂的剂量而能达到相同的治疗作用,从而减少顺铂的使用剂量,减少其毒副反应。这为

黄芩素用于化疗增敏、减少耐药性研究提供了新的思路。

#### 参考文献

- [1] Kalvelyte A, Imbrasaitė A, Bukauskienė A, et al. Connexins and apoptotic transformation [J]. *Biochem Pharmacol*, 2003, 66(8): 1661-1672.
- [2] Jensen R, Glazer PM. Cell-interdependent cisplatin killing by Ku/DNA-dependent protein kinase signaling transduced through gap junctions[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(16): 6134-6139.
- [3] Wang Q, You T, Yuan D, et al. Cisplatin and oxaliplatin inhibit gap junctional communication by direct action and by reduction of connexin expression, thereby counteracting cytotoxic efficacy[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010, 333(3): 903-911.
- [4] He B, Tong X, Wang L, et al. Tramadol and flurbiprofen depress the cytotoxicity of cisplatin via their effects on gap junctions[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(18): 5803-5810.
- [5] Chaumontet C, Bex V, Gaillard-Sanchez I, et al. Apigenin and tangeretin enhance gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells [J]. *Carcinogenesis*, 1994, 15(10): 2325-2330.
- [6] Conklin CM, Bechberger JF, MacFabe D, et al. Genistein and quercetin increase connexin43 and suppress growth of breast cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(1): 93-100.
- [7] Wang L, Ling Y, Chen Y, et al. Flavonoid baicalein suppresses adhesion, migration and invasion of MDA-MB-231 human breast cancer cells [J]. *Cancer Lett*, 2010, 297(1): 42-48.
- [8] Cheng YH, Li LA, Lin P, et al. Baicalein induces G1 arrest in oral cancer cells by enhancing the degradation of cyclin D1 and activating AhR to decrease Rb phosphorylation [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, 263(3): 360-367.
- [9] Takahashi H, Chen MC, Pham H, et al. Baicalein, a component of *Scutellaria baicalensis*, induces apoptosis by Mcl-1 down-regulation in human pancreatic cancer cells [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1813(8): 1465-1474.
- [10] Chen CH, Huang TS, Wong CH, et al. Synergistic anti-cancer effect of baicalein and silymarin on human hepatoma HepG2 Cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(3): 638-644.
- [11] Zhang Y, Song L, Cai L, et al. Effects of baicalein on

- apoptosis, cell cycle arrest, migration and invasion of osteosarcoma cells[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 53(9): 325–333.
- [12] Koren IV, Elsayed WA, Liu YJ, et al. Tetracycline-regulated expression enables purification and functional analysis of recombinant connexin channels from mammalian cells[J]. Biochem J, 2004, 383(9): 111–119.
- [13] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1787.
- Xu SY, Bian RL, Chen X. Experimental Methodology Pharmacology[M]. Beijing, People's Medical Publishing House, 2005: 1787.
- [14] Skehan P, Storeng R, Scudiero D, et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening [J]. J Natl Cancer Inst, 1990, 82(13): 1107–1112.
- [15] Willecke K, Eiberger J, Degen J, et al. Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome[J]. Biol Chem, 2002, 383(5): 725–737.
- [16] Goldberg GS, Bechberger JF, Naus CC. A pre-loading method of evaluating gap junctional communication by fluorescent dye transfer[J]. Biotechniques, 1995, 18(3): 490–497.
- [17] 徐珊, 罗莉, 朱利群, 等. 4'-甲醚-黄芩素对绒癌耐药细胞株多药耐药性的逆转作用研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2006, 33(11): 1061–1073.
- XU S, Luo L, Zhu LQ, et al. Reversal Effect of 4'-Methylether-scutellarein on Multidrug Resistance of Human Choriocarcinoma JAR/VP16 Cell Line[J]. Prog Biochem Biophys, 2006, 33(11): 1061–1073.
- [18] Lee Y, Yeo H, Liu SH, et al. Increased anti-P-glycoprotein activity of baicalein by alkylation on the A ring[J]. J Med Chem, 2004, 47(22): 5555–5566.
- [19] 黎丹戎, 张玮, 唐东平. 黄芩素对卵巢癌耐药细胞株 A2780/ADM 逆转作用实验研究[J]. 肿瘤, 2004, 24(2): 111–113.
- Li DR, Zhang W, Tang DP. A study of the reverse effect of scutellarein on multidrug-resistant human ovarian carcinoma cell line A2780/ADM[J]. Tumor, 2004, 24(2): 111–113.
- [20] Tanaka M, Grossman HB. Connexin 26 gene therapy of human bladder cancer: induction of growth suppression, apoptosis, and synergy with Cisplatin [J]. Hum Gene Ther, 2001, 12(18): 2225–2236.
- [21] Marconi P, Tamura M, Moriuchi S, et al. Connexin 43-enhanced suicide gene therapy using herpesviral vectors [J]. Mol Ther, 2000, 1(1): 71–81.
- [22] Tanaka M, Fraizer GC, De La Cerda J, et al. Connexin 26 enhances the bystander effect in HSVtk/GCV gene therapy for human bladder cancer by adenovirus/PLL/DNA gene delivery[J]. Gene Ther, 2001, 8(2): 139–148.
- [23] Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, et al. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia[J]. Circ Res, 2000, 87(8): 656–662.
- [24] Sáez JC, Contreras JE, Bukauskas FF, et al. Gap junction hemichannels in astrocytes of the CNS[J]. Acta Physiol Scand, 2003, 179(1): 9–22.
- [25] De Maio A, Vega VL, Contreras JE, et al. Gap junctions, homeostasis, and injury[J]. J Cell Physiol, 2002, 191(3): 269–282.
- [26] Nakamura Y, Chang CC, Mori T, et al. Augmentation of differentiation and gap junction function by kaempferol in partially differentiated colon cancer cells [J]. Carcinogenesis, 2005, 26(3): 665–671.

(编辑 孙慧兰)