

# 黄芩苷对肺癌A549细胞自噬及上皮间质转化的影响

王林 吴翠芸 汪贤竹 黄琪峰 张菁\*

(浙江大学医学院邵逸夫医院药学部, 杭州 310018)

**摘要** 该文研究了黄芩苷(Baicalin)对肺癌A549细胞自噬、上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)及细胞侵袭的影响。将不同浓度的Baicalin(0、5、10、20、40、80、160、320、640  $\mu\text{mol/L}$ )作用于肺癌A549细胞后,采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测细胞活力;吖啶橙染色(AO)法在荧光显微镜下观察细胞自噬状态;采用倒置显微镜观察转化生长因子- $\beta$ 1(transforming growth factor- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1)作用肺癌A549细胞后其形态学的改变;Transwell小室实验检测Baicalin对由TGF- $\beta$ 1诱导的肺癌A549细胞侵袭的影响;Western blot法检测Baicalin以及TGF- $\beta$ 1处理前后对肺癌A549细胞中EMT相关蛋白表达和自噬相关蛋白LC3的影响。结果表明, Baicalin抑制肺癌A549细胞活力,并呈一定的剂量依赖关系( $P < 0.01$ ), Baicalin作用肺癌A549细胞24 h的 $\text{IC}_{50}$ 值为104.30  $\mu\text{mol/L}$ 。吖啶橙染色结果显示, Baicalin明显促进肺癌A549细胞中自噬溶酶体的生成。同时, Western blot结果显示Baicalin干预后,肺癌A549细胞中LC3-II蛋白表达水平明显上调( $P < 0.01$ )。经TGF- $\beta$ 1作用后的A549细胞形态由多边形转变成了长梭形;且EMT分子标志物E-cadherin蛋白表达水平显著下调,而Vimentin蛋白分子表达显著上调。Baicalin能显著抑制由TGF- $\beta$ 1诱导的肺癌A549细胞的侵袭( $P < 0.01$ )。此外, Baicalin可逆转由TGF- $\beta$ 1诱导的肺癌A549细胞EMT标志蛋白E-cadherin表达的下调和Vimentin表达的上调( $P < 0.01$ )。以上结果提示, Baicalin可诱导肺癌A549细胞自噬,同时, Baicalin抑制了TGF- $\beta$ 1诱导肺癌A549细胞的上皮间质转化,从而发挥了其抗细胞侵袭转移的作用。

**关键词** 黄芩苷; 转化生长因子- $\beta$ 1; 上皮间质转化; 肺癌

## Effects of Baicalin on Cell Autophagy and Epithelial-Mesenchymal Transformation in Lung Cancer A549 Cells

WANG Lin, WU Cuiyun, WANG Xianzhu, HUANG Qifeng, ZHANG Jing\*

(Department of Pharmacy, Sir Run Run Shaw Hospital Affiliated to School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract** This work was to investigate the effects of baicalin on cell autophagy, EMT (epithelial-mesenchymal transition) and cell invasion in lung cancer A549 cells. The effect of Baicalin (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640  $\mu\text{mol/L}$ ) on the viability of A549 cells was measured by MTT assay. Formation of autophagosome was observed by staining with acridine orange under fluorescence microscope. The morphological changes of A549 cells were observed under microscope. The cell invasion ability was analyzed by Transwell method. The protein expression of E-cadherin, Vimentin and LC3 in A549 cells was detected by Western blot. The activity of A549 cells was significantly inhibited by Baicalin in a dose dependent manner ( $P < 0.05$ ).  $\text{IC}_{50}$  of Baicalin (24 h) for A549 cells was 104.30  $\mu\text{mol/L}$ . Acridine orange fluorescent staining showed that the num-

收稿日期: 2020-04-30 接受日期: 2020-09-04

浙江省自然科学基金(批准号: LYY18H310004)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-87887161, E-mail: 3415340@zju.edu.cn

Received: April 30, 2020 Accepted: September 4, 2020

This work was supported by Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LYY18H310004)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-87887161, E-mail: 3415340@zju.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5381>

ber of intracellular acid dye follicular bright red fluorescence in the A549 cells was significantly increased after Baicalin treatment, while the autophagic lysosomes were rarely observed in control group. The protein level of LC3-II/GAPDH in A549 cells was significantly enhanced after Baicalin treatment ( $P < 0.01$ ). TGF- $\beta$ 1 could induce morphological alteration of the A549 cells from epithelial morphology to mesenchymal morphology. Meanwhile, the protein expression of E-cadherin was down-regulated and the protein expression of Vimentin was up-regulated in the presence of TGF- $\beta$ 1 (5 ng/mL) ( $P < 0.01$ ). Baicalin significantly inhibited TGF- $\beta$ 1-induced cell invasion. Moreover, Baicalin reversed TGF- $\beta$ 1-induced EMT, up-regulating the protein expression of E-cadherin and down-regulating the protein expression of Vimentin ( $P < 0.01$ ). In conclusion, Baicalin significantly inhibits the growth and induces autophagy in A549 cells, meanwhile reversing TGF- $\beta$ 1-induced EMT in lung cancer A549 cells.

**Keywords** Baicalin; TGF- $\beta$ 1; EMT; lung cancer

肺癌是我国常见的恶性肿瘤, 具有高侵袭性、易复发等生物学特点。近年来, 尽管在肺癌的诊断和治疗上有了较大进展, 但其发病率和晚期肺癌患者的死亡率依旧很高<sup>[1]</sup>。研究表明, 多种分子机制参与肺癌的侵袭转移过程, 其中上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)被认为是肿瘤转移或扩散的重要环节, 一直是肿瘤侵袭转移研究的热点<sup>[2]</sup>。因此, 寻找调控肺癌转移过程中的靶点基因及探索肺癌发生EMT及其侵袭转移的分子机制对治疗肺癌和提高患者的生存率具有重要意义。自噬在肿瘤进展中的角色随疾病病程发展而不断发生动态变化。自噬在肿瘤细胞中具有双重作用, 一方面, 它能起到保护细胞的作用; 另一方面, 它也能诱导细胞发生自噬性死亡<sup>[3-4]</sup>。黄芩苷(Baicalin)是从植物黄芩中提取分离的一种黄酮类化合物, 具有抗氧化、抗病毒、抗炎、抗菌、抗过敏反应、抗肿瘤等多种药理作用<sup>[5]</sup>。其中Baicalin对肺癌、乳腺癌、淋巴瘤等多种肿瘤具有抑制作用<sup>[6-7]</sup>。近年来研究显示, 天然药物不仅能诱导细胞自噬, 还能调节EMT, 在肿瘤的侵袭转移中起着重要作用<sup>[8]</sup>。但Baicalin是否能诱导细胞自噬, 同时抑制肺癌上皮间质转化, 尚无相关报道。本研究采用TGF- $\beta$ 1诱导肺癌A549细胞建立EMT模型, 拟使用Baicalin处理人肺癌A549细胞, 观察Baicalin对细胞增殖、细胞自噬、EMT及细胞侵袭转移能力的影响, 为Baicalin治疗肺癌提供进一步的实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人肺癌A549细胞购自中国科学院细胞库。

### 1.2 试剂及仪器

Baicalin购自Sigma公司; TGF- $\beta$ 1购自Pepro-tech公司; 四甲基偶氮唑盐[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-(diphenyltetrazolium) bromide, MTT]、BCA蛋白定量试剂盒购自上海碧云天生物有限公司; 吖啶橙(acridine orange, AO)购自Sigma-Aldrich公司; RPMI-1640培养液购自杭州吉诺生物医药技术有限公司; 胎牛血清购自Gibco公司; Vimentin、E-cadherin、LC3、GAPDH抗体购自Cell Signaling Technology公司。

仪器包括: 多功能酶标分析仪、凝胶成像系统、电泳仪(美国伯乐公司); 倒置相差显微镜(徕卡公司)。

### 1.3 细胞培养

A549细胞培养于RPMI-1640培养基中, 内含10%灭活新生小牛血清及100 U/mL青霉素和100  $\mu$ g/mL链霉素, 置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中培养。

### 1.4 MTT法检测细胞活力

取对数生长期A549细胞以 $5 \times 10^3$ 个/孔接种于96孔细胞培养板中, 然后置于37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度培养箱中培养过夜。实验设置以二甲基亚砜(DMSO)溶剂组为对照组、不同浓度的Baicalin(0、5、10、20、40、80、160、320、640  $\mu$ mol/L)为作用组, 每个浓度设平行重复6孔。干预24 h后, 弃培养板中的上清液, 每孔加入5 g/L的MTT溶液20  $\mu$ L和80  $\mu$ L无血清培养液, 继续孵育4 h后, 弃掉培养板中的上清液, 每孔中立刻加入150  $\mu$ L DMSO, 使蓝紫色结晶充分溶解后在490 nm波长处用酶标仪测定吸光度(D)值, 重复实验3次。

### 1.5 吖啶橙染色

取对数生长期的A549细胞接种于12孔板中,于37℃、5% CO<sub>2</sub>孵育培养24 h后分别加入终浓度为0、20、40、80 μmol/L的Baicalin。在Baicalin作用下继续培养24 h后,加入终浓度为1 μg/mL的吖啶橙溶液,避光染色15 min,在倒置荧光显微镜下观察细胞形态,实验独立重复3次。

### 1.6 细胞分组及干预

本研究中所用药物浓度依据参考文献及前期预实验结果确定。实验分组为(1) 对照组,细胞以含有DMSO溶剂的培养液培养;(2) TGF-β1组,细胞以含有5 ng/mL TGF-β1培养液培养;(3) Baicalin组,细胞以含有5 ng/mL TGF-β1和10 μmol/L的Baicalin培养液培养;(4) Baicalin组,细胞以含有5 ng/mL TGF-β1和20 μmol/L的Baicalin培养液培养。各作用组置于37℃、5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度培养箱中培养24 h后,在倒置显微镜下观察细胞形态的变化并用Western blot法检测相关蛋白水平。

### 1.7 Transwell小室实验

将Matrigel基质胶原液用无血清RPMI-1640培养液按1:8稀释后,加入到Transwell小室的上室中,把小室置于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱培养1 h,使基质胶凝固。用无血清培养液配制各组终浓度的药物,进行添加或不添加Baicalin处理。同时将TGF-β1诱导24 h的A549细胞用含有或不含Baicalin的无血清培养液重悬并调整细胞密度为8×10<sup>7</sup>个/L;吸取200 μL的细胞悬液加入至Transwell小室的上室,并将小室置于加有600 μL含10% FBS的RPMI-1640培养液的培养板下室中。每组设置3个复孔,置于37℃、5% CO<sub>2</sub>细胞培养条件下培养24 h。孵育结束后,取出小室,将上室液体弃去,用棉签头轻轻擦去上室未穿膜的细胞,用PBS漂洗后甲醇固定30 min,然后用0.1%结晶紫染色20 min, PBS清洗后在倒置显微镜下观察细胞,随机选取5个视野计数每孔穿膜细胞数并拍照,结果取平均值,实验重复3次。

### 1.8 Western blot实验

取对数生长期A549细胞接种于6孔细胞培养板中,采用5 ng/mL的TGF-β1诱导肺癌A549细胞24 h,然后加入不同浓度的Baicalin处理细胞24 h后提取总蛋白,用BCA蛋白定量法测定蛋白浓度。各作用组取15 μg等量蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。将膜用TBST清洗

后,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h后,加入鼠抗人E-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)和GAPDH(1:1 000)一抗,4℃孵育过夜,次日,TBST洗膜3次,5 min/次,加入辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠IgG抗体,室温孵育2 h后,TBST洗膜3次,5 min/次,在膜上滴加ECL显影液,凝胶成像系统拍照,并用Image J软件分析条带灰度值。

### 1.9 数据统计

实验数据均采用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据分析用SPSS 17.0统计软件进行,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较应用SNK-*q*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 黄芩苷对肺癌A549细胞活力的影响

采用不同浓度的Baicalin处理肺癌A549细胞24 h,MTT法检测Baicalin对细胞增殖的影响。结果如图1所示,与对照组相比,Baicalin对肺癌A549细胞的增殖具有明显的抑制作用,且随着Baicalin给药剂量的增加,Baicalin对A549细胞的生长抑制率显著增加。Baicalin作用肺癌A549细胞24 h的IC<sub>50</sub>值为104.30 μmol/L。

### 2.2 黄芩苷对肺癌A549细胞自噬溶酶体的影响

吖啶橙可将胞质内酸性自噬泡染成红色,肿瘤细胞在吖啶橙染色后,细胞中的自噬溶酶体则显示橘红色荧光,而细胞核则显示绿色荧光。Baicalin作用肺癌A549细胞后,由于酸性的差异,Baicalin增加肺癌A549细胞自噬溶酶体的产生。结果如图2所示,与对照组相比,Baicalin作用于肺癌A549细胞24 h后细胞内酸性滤泡染成亮红色荧光比例增多,提示自噬水平增加。说明Baicalin增加了肺癌A549细胞中酸性自噬溶酶体的数量。

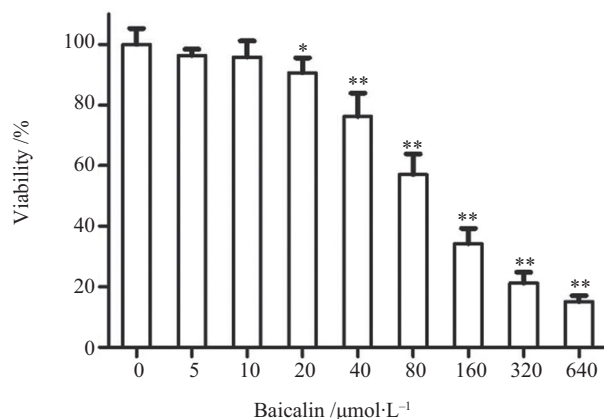
### 2.3 黄芩苷对肺癌A549细胞自噬相关蛋白的影响

为了进一步证明Baicalin对肺癌A549细胞自噬相关蛋白的影响,我们采用Western blot法检测了Baicalin对自噬的标志蛋白LC3的表达影响情况。结果如图3所示,Baicalin作用肺癌A549细胞24 h后,与对照组相比,细胞中自噬的标志蛋白LC3-II的表达水平显著升高( $P < 0.01$ ),说明Baicalin明显激活了肺癌A549细胞的自噬水平。

### 2.4 TGF-β1处理前后肺癌A549细胞形态的变化

采用5 ng/mL的TGF-β1处理肺癌A549细胞48 h



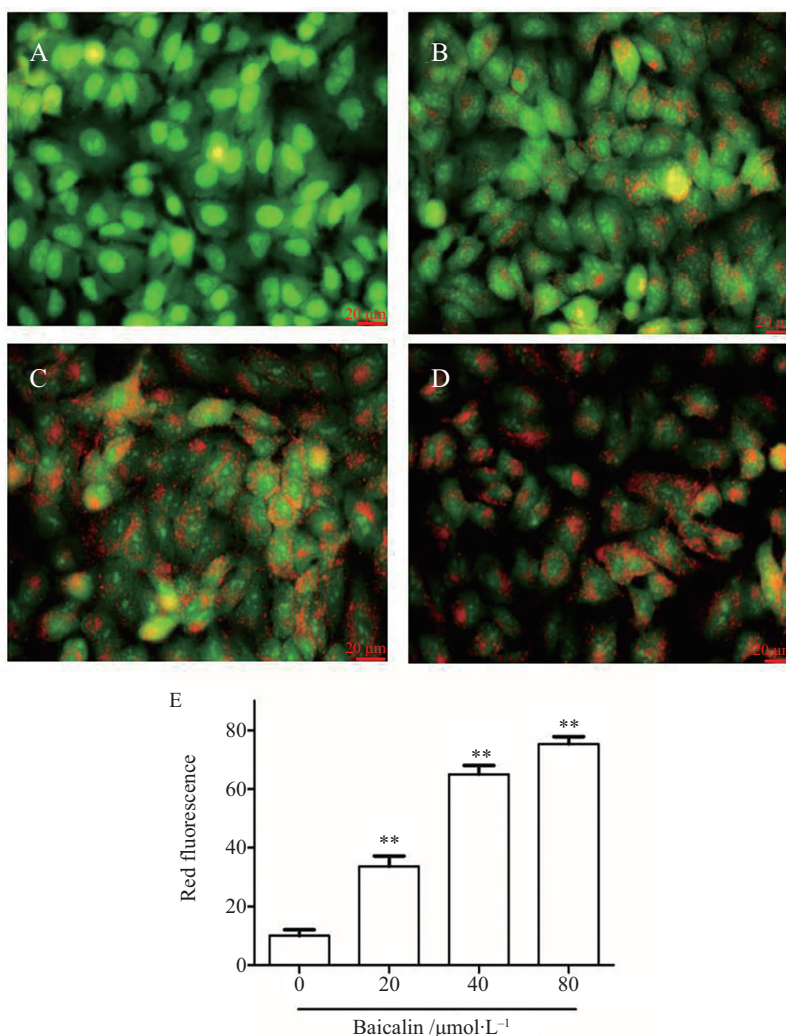


$n=3$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

$n=3$ , \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group.

图1 不同浓度的黄芩苷对肺癌A549细胞活力的影响

Fig.1 The effects of different concentrations of Baicalin on the viability of A549 cells

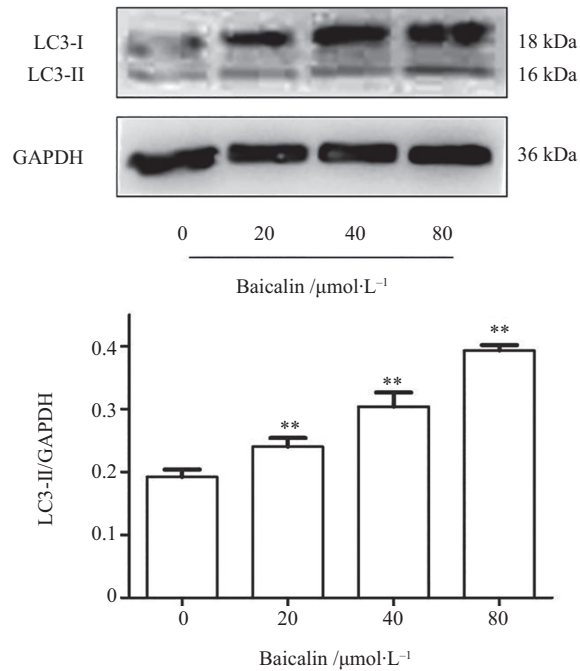


A: 0 μmol/L 黄芩苷; B: 20 μmol/L 黄芩苷; C: 40 μmol/L 黄芩苷; D: 80 μmol/L 黄芩苷; E: 红色荧光强度。  $n=3$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

A: 0 μmol/L Baicalin; B: 20 μmol/L Baicalin; C: 40 μmol/L Baicalin; D: 80 μmol/L Baicalin; E: red fluorescence intensity.  $n=3$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group.

图2 不同浓度的黄芩苷对肺癌A549细胞内自噬泡形成的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of Baicalin on autophagy vesicle formation in lung cancer A549 cells



$n=3$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

$n=3$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group.

图3 不同浓度的黄芩苷对肺癌A549细胞自噬相关蛋白LC3的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of Baicalin on autophagy-associated protein LC3 in lung cancer A549 cells

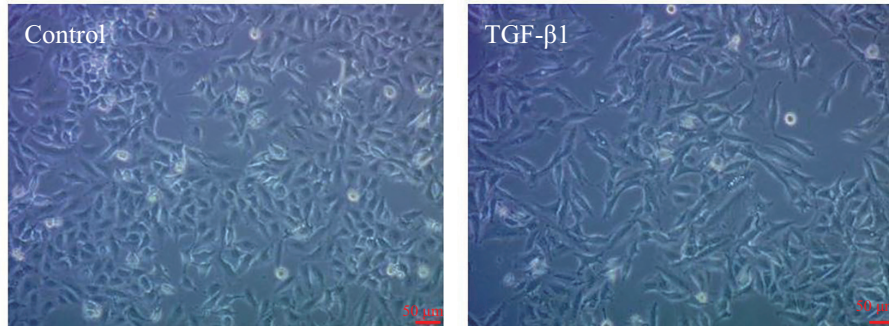


图4 TGF- $\beta$ 1处理前后肺癌A549细胞形态的变化

Fig.4 Changes of cell morphology of A549 before and after TGF- $\beta$ 1 treatment

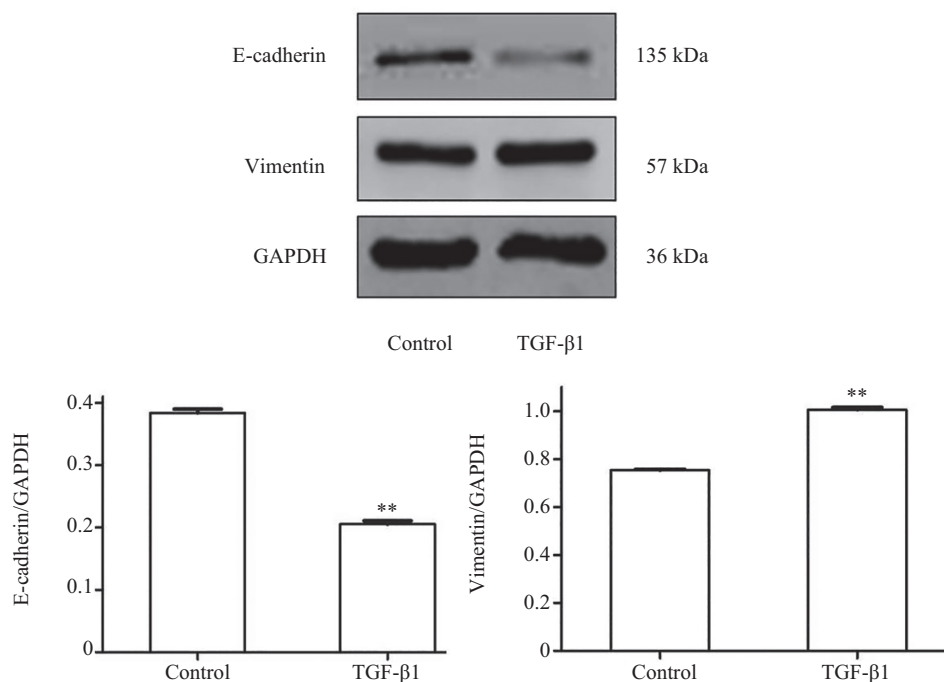
后,在倒置显微镜下观察细胞形态,结果如图4所示,与未经TGF- $\beta$ 1处理的对照组细胞比较,经TGF- $\beta$ 1诱导48 h后,肺癌A549细胞形态由多边形向成纤维样改变。

### 2.5 TGF- $\beta$ 1处理前后肺癌A549细胞EMT相关蛋白表达的变化

采用5 ng/mL的TGF- $\beta$ 1处理肺癌A549细胞48 h后,提取干预前后各组细胞的总蛋白,Western blot法检测EMT标志蛋白的表达。结果如图5所示,TGF- $\beta$ 1诱导肺癌A549细胞24 h后,EMT分子标志物E-cadherin蛋白表达水平显著下调,而Vimentin蛋白分子表达显著上调,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。

### 2.6 黄芩苷对TGF- $\beta$ 1诱导的肺癌A549细胞侵袭的影响

肿瘤之可怕之处在于肿瘤发展到一定阶段,会向四周扩散并侵袭到正常组织周围。而这种肿瘤细胞的扩散是肿瘤细胞恶性进展的一个重要环节。我们采用Transwell小室实验检测Baicalin对由TGF- $\beta$ 1诱导的肺癌A549细胞侵袭的影响,结果如图6所示,5 ng/mL的TGF- $\beta$ 1处理组中,穿越Transwell小室的细胞数与未经TGF- $\beta$ 1处理组相比显著增多,差异有统计学意义( $P<0.01$ ),说明TGF- $\beta$ 1促进了肺癌A549细胞的侵袭。不同浓度的Baicalin处理组穿越Tran-



$n=3$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组比较。

$n=3$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group.

图5 TGF-β1处理对肺癌A549细胞EMT相关蛋白表达的影响

Fig.5 The effect of TGF-β1 on the expression of EMT-related protein in lung cancer A549 cells

swell小室的细胞数均低于模型组, 差异有统计学意义( $P<0.01$ ), 说明Baicalin能有效抑制由TGF-β1诱导的肺癌A549细胞的侵袭。

## 2.7 黄芩苷抑制TGF-β1诱导的肺癌A549细胞上皮间质转化

为了探索 Baicalin抑制肺癌 A549细胞的侵袭是否与其阻断EMT进程有关, 我们采用不同浓度的Baicalin处理肺癌A549细胞48 h, 显微镜观察发现, 经TGF-β1处理的肺癌A549细胞由多边形向成纤维样细胞形态改变, 而加入Baicalin作用后, 其细胞形态又向多边形改变。同时, Western blot法检测Baicalin对EMT标志物E-cadherin和Vimentin的影响, 结果如图7所示, 与对照组相比, TGF-β1处理组显著下调肺癌A549细胞E-cadherin蛋白表达水平, 同时上调Vimentin蛋白表达水平; 然而, 加入不同浓度的Baicalin处理后, 与TGF-β1模型组相比, 肺癌A549细胞E-cadherin蛋白表达水平上调, 而Vimentin蛋白表达水平下调, Baicalin能抑制肺癌A549细胞上皮间质转化, 从而发挥抑制细胞侵袭的生物学效应。

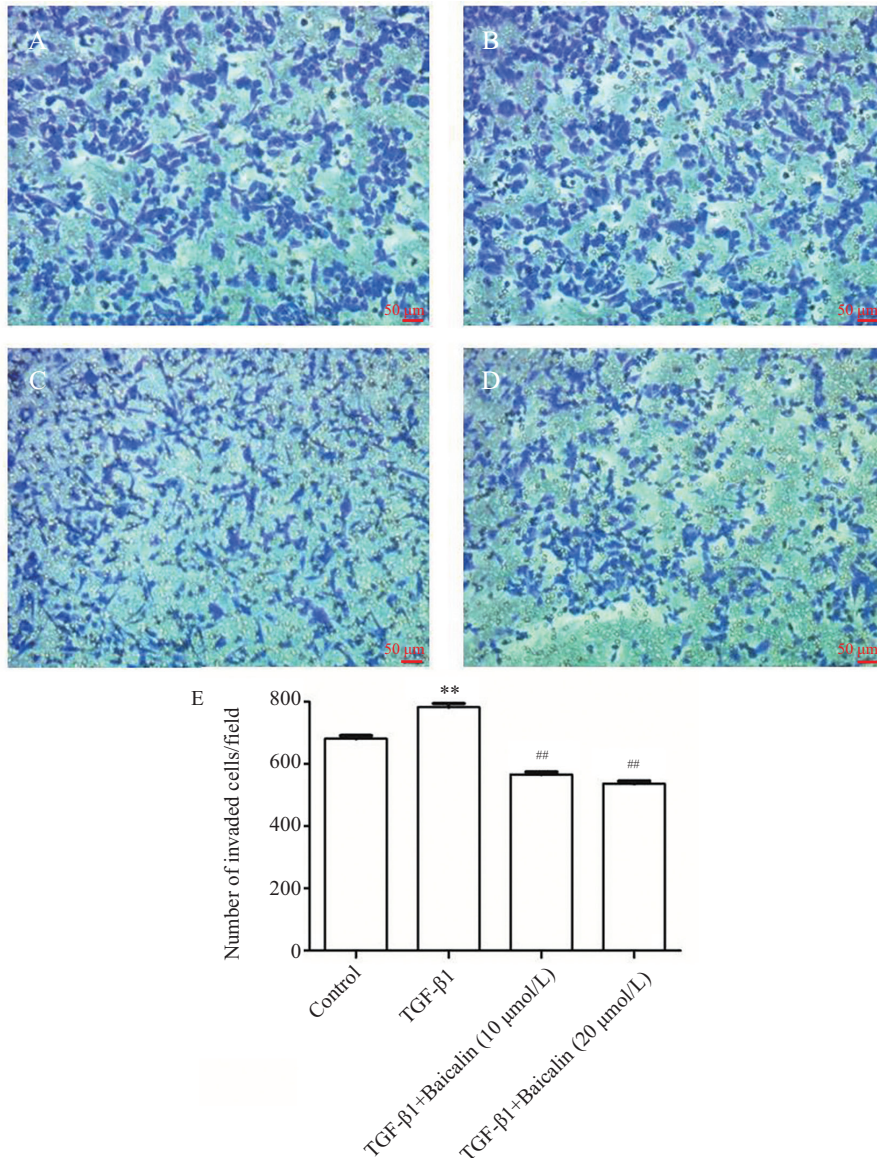
## 3 讨论

肺癌是我国常见的恶性肿瘤。目前, 我国肺癌

的发病率已跃居恶性肿瘤首位, 成为危害我国国民健康的重大疾病之一。肺癌具有侵袭性高、易转移和复发等特点, 因此, 在临床治疗上非常棘手<sup>[9]</sup>。肺癌的转移受多种因素的影响, 但其具体机制目前仍不清楚。近年来研究发现, EMT可促进肿瘤细胞的浸润以及肿瘤的转移, 与肿瘤的发生和发展密切相关, 而针对EMT抑制剂的研究已成为抗癌药物研究的重要方向<sup>[10]</sup>。

中草药是祖国传统医学的瑰宝、我国的宝贵财富, 且具有副作用小、应用广泛、多靶点等特点。黄芩苷作为传统中草药黄芩的有效成分之一, 具有抗肿瘤、抗氧化、抗病毒、抗炎、抗菌、抗过敏反应等多种药理作用<sup>[11-12]</sup>。在我们的前期研究过程中发现, Baicalin能显著抑制肺癌A549细胞增殖、迁移及侵袭。目前, 自噬作为II型程序性细胞死亡越来越受到人们的重视。自噬作为一种保护机制, 是由于在自噬发生的早期能使肿瘤细胞避免受到外界的刺激, 例如低营养、电离辐射和化疗药物等所致的损伤, 而持续存活; 但是, 在当外部环境较差, 肿瘤细胞过度自我吞噬效应时, 就会引起自噬性死亡, 从而抑制肿瘤的发生发展<sup>[13]</sup>。在我们的研究过程中发现, Baicalin能显著诱导肺癌A549细胞自噬。这是由





A: 对照组; B: TGF-β1(5 ng/mL); C: TGF-β1(5 ng/mL)+黄芩苷(10 μmol/L); D: TGFβ1(5 ng/mL)+黄芩苷(20 μmol/L); E: 侵袭的细胞数。n=3, \*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较; ## $P < 0.01$ , 与TGF-β1组比较。

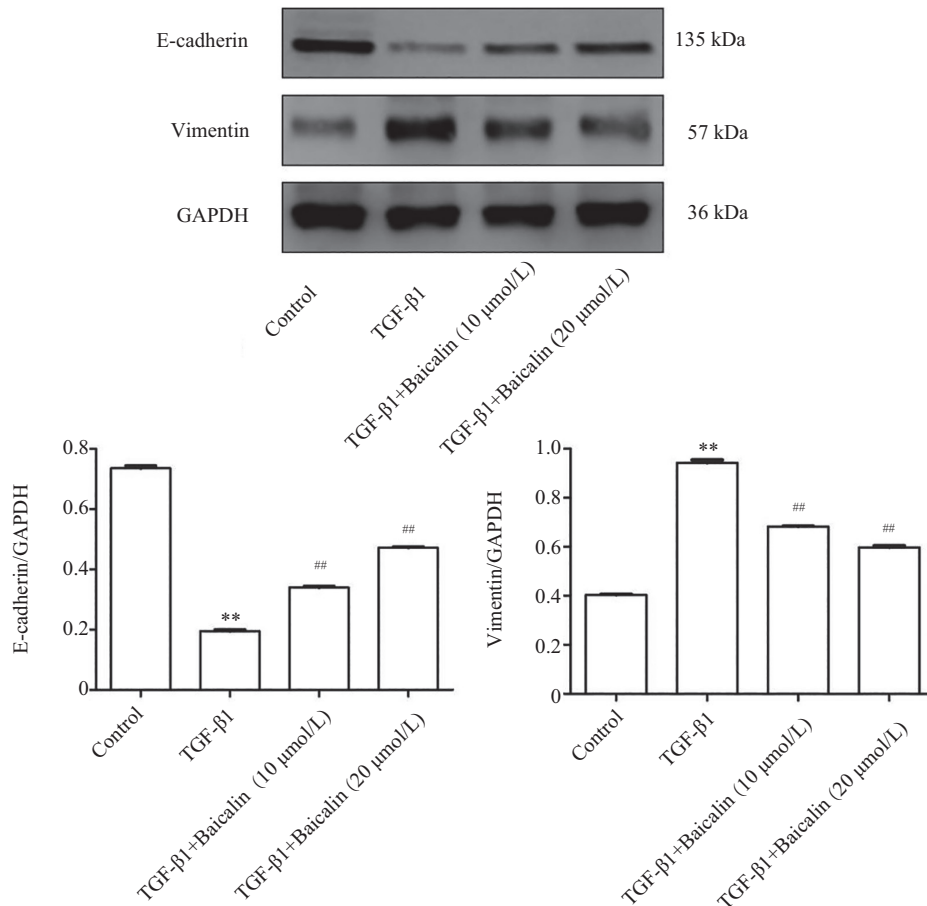
A: control; B: TGF-β1 (5 ng/mL); C: TGF-β1 (5 ng/mL)+Baicalin(10 μmol/L); D: TGFβ1 (5 ng/mL)+Baicalin (20 μmol/L); E: number of invaded cells. n=3, \*\* $P < 0.01$  compared with control group; ## $P < 0.01$  compared with TGF-β1 group.

图6 Transwell小室法检测检测黄芩苷对肺癌A549细胞侵袭能力的影响

Fig.6 The effect of Baicalin on the invasive ability of lung cancer cell line A549by transwell assay

于自噬激活过度时则会引起肿瘤细胞发生自噬性死亡, 从而对肿瘤的生长起到一定的抑制作用。越来越多的研究认为, EMT在肿瘤转移的分子机制中起着重要作用。因此, 我们推测Baicalin对肺癌A549细胞迁移和侵袭的抑制作用可能与抑制EMT有关。本研究首先通过TGF-β1诱导肺癌A549细胞建立EMT模型, 结果表明, 经过TGF-β1处理过的A549细胞侵袭能力增强, 细胞形态也由多边形向成纤维样改变, 同时, EMT相关标志蛋白上皮细胞标志物E-cadherin

蛋白表达水平降低, 而间质细胞标志物Vimentin蛋白表达水平明显升高。这与LI<sup>[14]</sup>和ZHANG等<sup>[15]</sup>研究的TGF-β1诱导肿瘤细胞上皮间充质转化的模型实验结果相一致。表明TGF-β1促进了肺癌A549细胞发生EMT, 进而提高肿瘤细胞的侵袭与迁移能力。其次, 我们采用Baicalin处理经TGF-β1诱导的肺癌A549细胞, 实验结果与我们的推测一致, Baicalin处理细胞后, 不仅从形态学上使其恢复上皮细胞的不规则多边形, 而且也改变了EMT分子标志物的表达,



A: 对照组; B: TGF-β1(5 ng/mL); C: TGFβ1(5 ng/mL)+黄芩苷(10 μmol/L); D: TGFβ1(5 ng/mL)+黄芩苷(20 μmol/L)。n=3, \*\*P<0.01, 与对照组比较; ##P<0.01, 与TGF-β1组比较。

A: control; B: TGF-β1 (5 ng/mL); C: TGFβ1 (5 ng/mL)+Baicalin (10 μmol/L); D: TGFβ1(5 ng/mL)+Baicalin (20 μmol/L)。n=3, \*\*P<0.01 compared with control group; ##P<0.01 compared with TGF-β1 group.

图7 黄芩苷对TGF-β1诱导的EMT相关蛋白E-cadherin及Vimentin表达水平的影响

Fig.7 The effect of baicalin on the expression of EMT-related proteins E-cadherin and Vimentin induced by TGF-β1

其上皮细胞标志物E-cadherin蛋白表达上调, 而间质细胞标志物Vimentin蛋白表达下调。这些结果与廖存静等<sup>[16]</sup>研究的木犀草素逆转由TGF-β1诱导的人肺癌细胞上皮间充质转化的实验结果相符。说明, Baicalin逆转TGF-β1诱导的肺癌A549细胞EMT的发生。研究表明, 经历EMT的细胞最重要的行为改变是细胞侵袭能力的增强。本论文Transwell小室实验结果显示, TGF-β1处理后的A549细胞侵袭能力增加, 但是再经Baicalin作用后其细胞的侵袭能力则显著降低, 表明Baicalin可抑制EMT引起的肺癌A549细胞侵袭能力。这可能与细胞中E-cadherin表达的增加有关, 细胞中E-cadherin表达的增加使细胞间相互黏附聚集, 不易向远处扩散。以上结果证实了, Baicalin能够通过抑制肺癌细胞的EMT来抑制肿瘤的迁移和转移能力。

综上所述, Baicalin可诱导肺癌A549细胞自噬, 其可能是通过促进肺癌A549细胞自噬性死亡, 从而发挥抗肿瘤作用。同时, 细胞形态的改变及EMT标志蛋白的变化初步表明, Baicalin作为一种天然存在的化合物可逆转由TGF-β1诱导的肺癌A549细胞的上皮间质转化, 为Baicalin在肺癌中的应用提供了参考。

### 参考文献 (References)

- [1] GONG S L, QU X H, YANG S Z, et al. RFC3 induces epithelial-mesenchymal transition in lung adenocarcinoma cells through the Wnt/β-catenin pathway and possesses prognostic value in lung adenocarcinoma [J]. Int J Mol Med, 2019, 44(6): 2276-88.
- [2] 沈东, 王维. 紫草素对HGF诱导的人肺癌细胞上皮-间充质转化的逆转作用[J]. 中国病理生理杂志(SHEN D, WANG W. Reverse effect of shikonin on epithelial-mesenchymal transition induced by HGF in lung cancer cells [J]. Chinese Journal of



- Pathophysiology), 2018, 34(9): 1622-6.
- [3] LI H N, CAO X R, CHEN X B, et al. Bufadienolides induce apoptosis and autophagy by inhibiting the AKT signaling pathway in melanoma A-375 cells [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 20(3): 2347-54.
- [4] GOZUACIK D, KIMCHI A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism [J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2891-906.
- [5] GAO C, ZHOU Y L, LI H T, et al. Antitumor effects of baicalin on ovarian cancer cells through induction of cell apoptosis and inhibition of cell migration *in vitro* [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 8729-34.
- [6] YOU J W, CHENG J, YU B, et al. Baicalin, a chinese herbal medicine, inhibits the proliferation and migration of human non-small cell lung carcinoma (NSCLC) cells, A549 and H1299, by activating the SIRT1/AMPK signaling pathway [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 2126-33.
- [7] 黄忠杨, 甘东辉, 陈英玉, 等. 黄芩苷衍生物02-036对Burkitt淋巴瘤CA46细胞株的作用及相关机制[J]. *中国实验血液学杂志*(HUANG Z Y, GAN D H, CHEN Y Y, et al. Effect of baicalin derivative 02-036 on burkitt lymphoma cell line CA46 and its related mechanisms [J]. *Journal of Experimental Hematology*), 2019, 27(5): 1497-503.
- [8] LORENA A C, PEDRO M, JOSÉ ANTONIO S T, et al. Natural plants compounds as modulators of epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 715.
- [9] QIAN B L, WANG X, MAO C, et al. Long non-coding RNA linc01433 promotes migration and invasion in non-small cell lung cancer [J]. *Thorac Cancer*, 2018, 9(5): 589-97.
- [10] 方瑞, 赵晶晶, 盛飞凤, 等. 薯蓣皂苷激活p38MAPK/FOXO3a信号抑制三阴性乳腺癌细胞上皮-间质转化及侵袭[J]. *中国细胞生物学学报*(FANG R, ZHAO J J, SHEN F F, et al. Dioscin activates p38MAPK/FOXO3a signaling to inhibit epithelial-mesenchymal transformation and invasion of triple negative breast cancer cells [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2018, 40(5): 640-7.
- [11] ZHENG L, ZHANG C, LI L, et al. Baicalin ameliorates renal fibrosis via inhibition of transforming growth factor  $\beta$ 1 production and downstream signal transduction [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(4): 1702-12.
- [12] WANG G, LIANG J X, GAO L R, et al. Baicalin administration attenuates hyperglycemia-induced malformation of cardiovascular system [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 234.
- [13] 汪宇, 周桃, 孙韩艳, 等. 姜黄素类似物EF24诱导A549细胞自噬及凋亡关系的研究[J]. *中国细胞生物学学报*(WANG Y, ZHOU T, SUN H Y, et al. Study on the relationship between autophagy and apoptosis in A549 cells induced by curcumin analogue EF24 [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2012, 34(6): 590-6.
- [14] LI L M, QI L S, LIANG Z J, et al. Transforming growth factor- $\beta$ 1 induces EMT by the transactivation of epidermal growth factor signaling through HA/CD44 in lung and breast cancer cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(1): 113-22.
- [15] ZHANG X P, LIU L, DENG X Z, et al. MicroRNA 483-3p targets Pard3 to potentiate TGF- $\beta$ 1-induced cell migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in anaplastic thyroid cancer cells [J]. *Oncogene*, 2019, 38(5): 699-715.
- [16] 缪存静, 陈俊杰, 历星, 等. 木犀草素逆转由TGF- $\beta$ 1诱导的人肺癌细胞上皮-间充质转化的实验研究[J]. *中国病理生理杂志*(MIU C J, CHEN J J, LI X, et al. Effect of luteolin on TGF- $\beta$ 1 induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer A549 cells [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*), 2019, 35(7): 1163-8.