

*Helena Moreira, Tomasz Gębarowski, Anna Szyjka, Magda Flank,
Kazimierz Gąsiorowski*

WPLYW BAJKALEINY I WOGONINY NA LICZEBNOŚĆ POPULACJI BOCZNEJ W KOMÓRKACH RAKA PIERSI I RAKA JELITA GRUBEGO*

Katedra i Zakład Podstaw Nauk Medycznych, Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr hab. K. Gąsiorowski

W pracy zbadano wpływ flawonoidów tarczycy bajkalskiej: bajkaleiny i wogoniny na liczebność populacji bocznej (SP) w komórkach raka piersi (MCF7/WT i MCF7/DX) i gruczolakoraka jelita grubego (LOVO/WT i LOVO/DX). Populację SP zidentyfikowano i poddano ilościowej ocenie w cytometrii przepływowej, w teście usuwania z komórek barwnika Hoechst 33342. Wykazano istotne statystycznie obniżenie odsetka populacji SP w komórkach raka piersi. W gruczolakoraku jelita zanotowano słabszy efekt w zakresie wyższych stężeń (25-75µM).

Hasła kluczowe: nowotworowe komórki macierzyste, populacja boczna/SP, bajkaleina, wogonina.

Key words: cancer stem cell, side population/SP, baicalein, wogonin.

Nowotworowe komórki macierzyste (NKM) stanowią niewielką populację nie-różnicowanych i samoodnawiających się komórek, które odpowiedzialne są za wzrost nowotworu, jego rozprzestrzenianie się oraz wznowę. Komórki te charakteryzują się wysoką ekspresją transporterów błonowych typu ABC (*ATP-Binding Cassette Transporters*), odpowiedzialnych za usuwanie ksenobiotyków z komórki. W chemioterapii nowotworów stanowią aktualnie jeden z najistotniejszych celów terapeutycznych (1-3). NKM można zidentyfikować w cytometrii przepływowej na podstawie wyodrębniania tzw. populacji bocznej SP (ang. *Side Population*) (4).

Komórki guza nowotworowego tworzące populację SP wykazują skrajnie niski poziom fluorescencji barwnika Hoechst 33342, co związane jest z jego aktywnym usuwaniem przez transportery ABCB1 (P-gp) i ABCG2. Populacja SP nie jest homogenną grupą komórek nowotworowych, ale uważa się, że jest wzbogacona w nowotworowe komórki macierzyste (5, 6). Odsetek komórek wykazujących fenotyp SP różni się w różnych typach nowotworów i prawdopodobnie wiąże się ze stopniem złośliwości nowotworów (7).

Bajkaleina i wogonina są bioaktywnymi flawonoidami, izolowanymi z tarczycy bajkalskiej (*Scutellaria Baicalensis* Georgi), rośliny wywodzącej się z tradycyjnej medycyny chińskiej. Flawonoidy te wykazują szeroki zakres aktywności farmakologicznej, m.in. działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne, przeciwwolnorodnikowe

* Praca wykonana w ramach badań statutowych UM we Wrocławiu, Nr: ST-775

oraz silne właściwości przeciwnowotworowe (8). Mechanizm przeciwnowotworowego działania bajkaleiny i wogoniny związany jest z wpływem na zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych, na zatrzymanie cyklu komórkowego oraz na indukcję apoptozy (9, 10). Natomiast wpływ flawonoidów tarczycy bajkalskiej na komórki SP jest słabo poznany. W pojedynczych doniesieniach autorzy wykazali zmniejszenie frakcji komórek SP po inkubacji z etanolem ekstraktem tarczycy bajkalskiej (11) i izolowaną bajkaleiną (12), w linii nowotworowej wywodzącej się ze szpiczaka mnogiego (RPMI 8226). Celem prezentowanej pracy było zbadanie wpływu wybranych flawonoidów na liczebność komórek SP w hodowlach komórek raka piersi i raka jelita grubego.

MATERIAŁY I METODY

Badania przeprowadzono na ludzkich liniach nowotworowych raka piersi (MCF7/WT i MCF7/DX) i gruczolakoraka jelita grubego (LOVO/WT i LOVO/DX). Dla każdego typu nowotworu badania przeprowadzono na komórkach cechujących się przeciętną, standardową wrażliwością na cytostatyki (linie: MCF7/WT i LOVO/WT) oraz na komórkach wykazujących cechy zwiększonej oporności na doksorubicynę, standardowy cytostatyk (linie: MCF7/DX i LOVO/DX). Komórki hodowano w CO₂-inkubatorze (temp. 37°C, 5% CO₂, wilgotność 95%) w odpowiednich mediach hodowlanych: DMEM (Gibco, USA) dla linii MCF7/WT i MCF7/DX oraz DMEM-F12 (Lonza, Belgia) dla linii LOVO/WT i LOVO/DX. Media hodowlane były wzbogacone w 10% surowicę bydlęcą płodową (FBS), 2mM L-glutaminę i gentamycynę (Lonza, Belgia). Flawonoidy tarczycy bajkalskiej: bajkaleinę i wogoninę (Sigma, USA) rozpuszczano w czystym DMSO w stężeniu 50mM i przechowywano w temperaturze –20°C.

W celu ilościowej oceny populacji SP wykorzystano standardową metodę podaną w piśmiennictwie (5), z użyciem fluorochromu Hoechst 33342 (Ho.33342), który wiąże się do DNA komórek i emituje fluorescencję w zakresie światła czerwonego i niebieskiego, odczytywaną w cytometrycznym przepływowym za pomocą dwóch detektorów. Analiza uzyskanych wartości fluorescencji pozwala wyodrębnić, wśród komórek o wysokim stopniu wybarwienia, populację wykazującą bardzo niski poziom fluorescencji – populację SP.

Do hodowli komórek linii nowotworowych (5×10^5 kom./ml) dodawano roztwory badanych flawonoidów (1, 5, 10, 25, 50, 75 μ M) przygotowane bezpośrednio przed dodaniem do hodowli z roztworu macierzystego bajkaleiny i wogoniny w DMSO. Końcowe stężenie DMSO w hodowlach komórkowych wynosiło każdorazowo 1%. Jednocześnie dodawano fluorochrom Ho. 33342 (5 μ g/ml) i hodowle inkubowano 90 min w CO₂-inkubatorze, wstrząsając w odstępach 30-minutowych. Następnie komórki płukano w płynie Hanksa (Hanks' Balanced Salt Solution, HBSS), barwiono jodkiem propidyny (2 μ g/ml) i analizowano w cytometrycznym przepływowym CyFlow®Space (Partec-Sysmex). Emisja fluorescencji barwnika Ho. 33342 była mierzona za pomocą detektora FL6 (z filtrem optycznym 630 nm) i FL5 (z filtrem optycznym 455 nm), a uzyskane wyniki pomiarów były przedstawiane na wykresach dwuparametrowych (FL6 vs FL5) w programie FlowMax. Populację SP identyfiko-

wano i zaznaczano na wykresie w postaci bramki nazwanej: SP. Martwe komórki, wybarwione jodkiem propidyny, nie były analizowane.

Zdolność komórek poddanych działaniu bajkaleiny i wogoniny do redukcji soli tetrazoliowych zbadano testem MTT wg standardowej procedury (13). W tej metodzie ilość powstającego formazanu, oceniana spektrofotometrycznie, jest miarą aktywności oksydacyjnej mitochondriów i jest proporcjonalna do liczby żywych, proliferujących komórek. Test przeprowadzono w 96-dołkowych płytkach hodowlanych, nanosząc do każdego dołka po 100 μ l zawiesiny komórkowej (5×10^5 kom. linii LOVO/WT i DX oraz 1×10^5 kom. linii MCF-7/WT i DX). Hodowle komórkowe inkubowano przez 24 godz. z bajkaleiną i wogoniną w zakresie stężeń 1–75 μ M. Następnie usuwano medium hodowlane z komórek, dodawano po 50 μ l roztworu MTT (1 mg/ml) i inkubowano 2 godz. Wytrącone kryształy formazanu rozpuszczano w 100 μ l izopropanolu (POCH, Polska). Absorbancję mierzono w spektrofotometrze Wallac Victor 2 (Perkin Elmer, USA), $\lambda=550$ nm.

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono w programie Graph-Pad PRISM® Version 6.05 Software Inc. (San Diego CA.) testem t-studenta.

WYNIKI

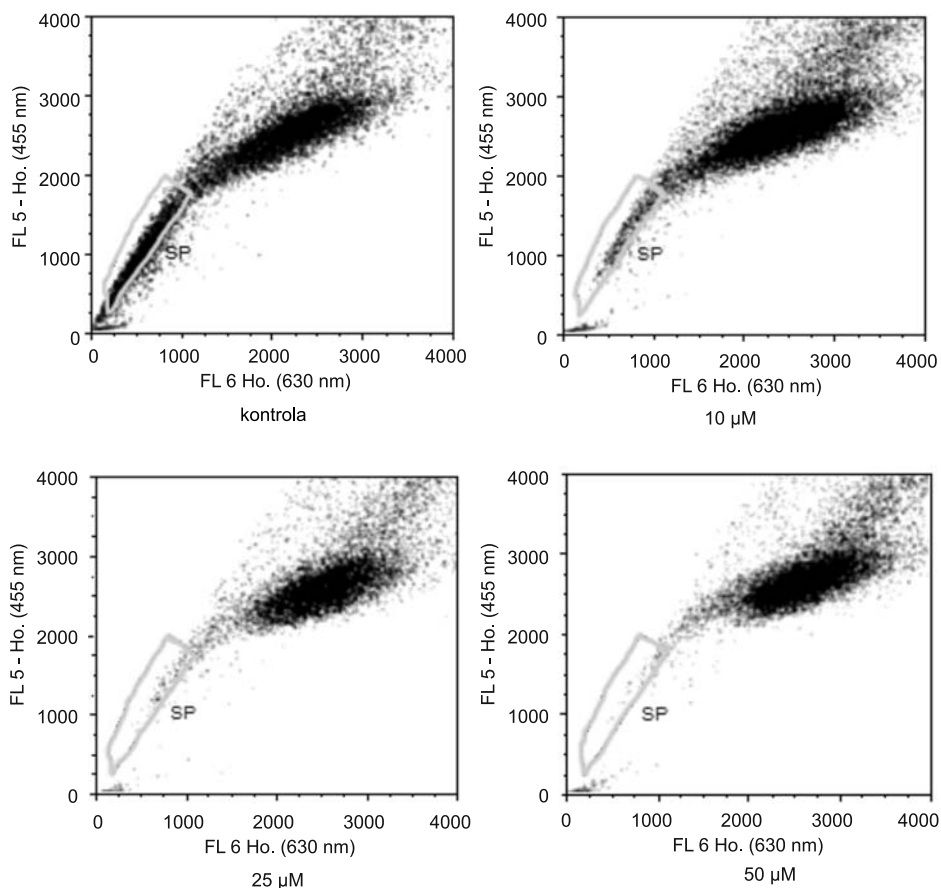
Zastosowane w pracy linie komórek nowotworowych różniły się wrażliwością na standardową terapię cytostatyczną; były to zarówno linie komórek wykazujących przeciętną/standardową wrażliwość na doksorubicynę (MCF7/WT i LOVO/WT) i linie komórek o zwiększonej oporności na ten cytostatyk (MCF7/DX i LOVO/DX). Badania własne pokazały, że linie te różniły się odsetkiem populacji SP, który był 1.7 razy wyższy w linii MCF7/DX i 7 razy w linii LOVO/DX w porównaniu do ich odpowiedników – linii wrażliwych na cytostatyk i odsetek ten ulegał obniżeniu po inkubacji hodowli z werapamillem (50 μ M) – standardowym inhibitorem glikoproteiny P.

W prezentowanej pracy oba flawonoidy tarczycy bajkalskiej znacząco zmniejszały liczebność SP w liniach komórek raka piersi. Przykładowe histogramy, uzyskane z analizy cytometrycznej, z zaznaczoną populacją SP w próbie kontrolnej i w próbach po inkubacji z różnymi stężeniami bajkaleiny, pokazano na rycinie 1.

Wyniki hodowli komórek nowotworowych z bajkaleiną i hodowli z wogoniną przedstawiono w histogramach na rycinie 2.

Inkubacja hodowli komórek z bajkaleiną prowadziła do istotnego statystycznie obniżenia odsetka populacji SP o 47–95% w komórkach MCF7/WT i MCF7/DX, w zakresie stężeń 10–75 μ M (Rycina 2A). Wogonina również indukowała obniżenie frakcji SP, nawet o 94% w najwyższym badanym stężeniu (75 μ M), aczkolwiek wykazywała słabsze działanie w porównaniu do bajkaleiny, szczególnie w zakresie niższych stężeń (5–25 μ M) (Rycina 2B). W pojedynczych doniesieniach piśmiennictwa na temat wpływu flawonoidów tarczycy bajkalskiej na odsetek komórek SP (11), również obserwowano, że wogonina wywierała słabsze niż bajkaleina działanie na populację SP w komórkach RPMI 8226. W komórkach raka jelita grubego (LOVO/WT i LOVO/DX), oba flawonoidy wykazywały znacznie słabsze działanie – bajkaleina i wogonina indukowały obniżenie odsetka SP jedynie w wyższych stężeniach (25–75 μ M). W tych stężeniach bajkaleina zmniejszała proporcję SP o 22–31% w li-

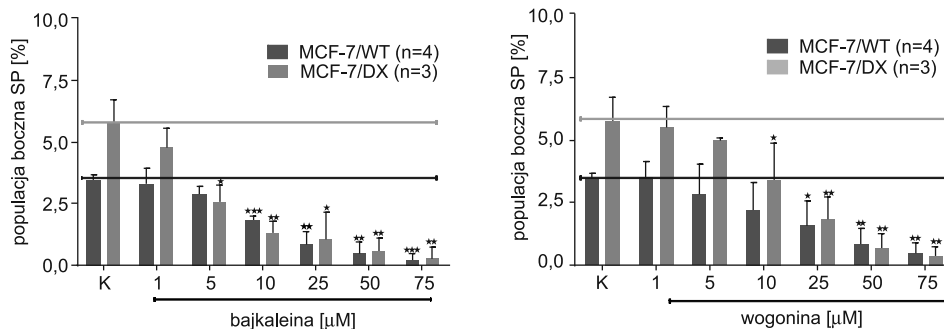
nii LOVO/WT i o 8–21% w linii LOVO/DX, natomiast wogonina o 12–32% (LOVO/WT) i 26–37% (LOVO/DX), chociaż w tych hodowlach nie wykazano istotności statystycznej wyników.



Ryc. 1. Przykładowe histogramy przedstawiające wpływ bajkaleiny na liczebność populacji bocznej (SP) w linii MCF7/DX. Komórki populacji SP oznaczono **bramką SP**. *Ho- Hoechst 33342*

Fig.1. Representative histograms showing the effect of baicalein on Side Population (SP) quantity in MCF7/DX cells. SP cells are shown in **SP gate**. *Ho- Hoechst 33342*

W teście redukcji soli tetrazoliowych (MTT), bajkaleina hamuje proliferację komórek linii ludzkiego szpiczaka mnogiego RPMI 8226 proporcjonalnie do badanych stężeń i w szerokim zakresie badanych stężeń (18.5-592 μM) (12). W badaniach własnych oba flawonoidy tarczycy bajkalskiej wykazywały istotne statystycznie zahamowanie redukcji barwnika MTT w komórkach linii raka piersi, szczególnie w zakresie stężeń: 25-75 μM . W najwyższym badanym stężeniu redukcja MTT zmniejszyła się o około 50% zarówno w hodowlach inkubowanych z bajkaleiną jak i w hodowlach z wogoniną. W liniach raka jelita grubego efekty te były słabiej zaznaczone i wyniki nie były istotne statystycznie.



Ryc. 2. Wpływ bajkaleiny (A) i wogoniny (B) na odsetek populacji bocznej (SP) w liniach komórkowych raka piersi (MCF-7/WT i MCF-7/DX) (średnia±SD). Komórki były inkubowane przez 90 minut w obecności różnych stężeń bajkaleiny/wogoniny i Hoechst 33342. Oceniano procentową zawartość komórek tworzących populację SP. Istotność statystyczną wyników oceniono testem t (*- $p < 0.05$; **- $p < 0.01$; ***- $p < 0.001$). *K* = hodowla kontrolna

Figure 2: Effect of baicalein (A) and wogonin (B) on Side Population (SP) quantity in breast cancer cells (MCF-7/WT and MCF7/DX) (mean±SD). Cells were incubated in the presence of different baicalein/wogonin concentrations and Hoechst 33342. Percentage of SP cells was estimated. Statistical significance was calculated with the t test (*- $p < 0.05$; **- $p < 0.01$; ***- $p < 0.001$). *K* = control cells

WNIOSKI

1. Flawonoidy tarczycy bajkalskiej, bajkaleina i wogonina hamują proliferację komórek badanych linii nowotworowych oraz zmniejszają liczebność frakcji populacji SP.
2. W raku piersi bajkaleina i wogonina mogą poprawiać skuteczność terapii cytotatycznej i zapobiegać nawrotom choroby poprzez obniżanie odsetka komórek populacji SP.
3. Wpływ badanych flawonoidów na komórki raka jelita grubego był słabszy i wyraźniej zaznaczony jedynie w wyższych stężeniach bajkaleiny i wogoniny.

H. Moreira, T. Gębarowski, A. Szyjka, M. Flank, K. Gąsiorowski

EFFECT OF BAICALEIN AND WOGONIN ON SIDE POPULATION QUANTITY IN HUMAN BREAST AND COLON CANCERS

Summary

Baicalein and wogonin, the main bioactive flavonoids of skullcap (*Scutellaria Baicalensis* Georgi), possess anticancer activities, including inhibition of cell proliferation, cell cycle arrest and induction of apoptosis in cancer cells. Very little is known about their effect on side population (SP) cells, i.e. cancer stem-like cells. Our results showed that baicalein and wogonin significantly inhibited SP in wild-type (MCF7/WT) and doxorubicin-resistant (MCF7/DX) breast cancer cells, in a dose-dependent manner. In the case of human colon cancer cells, we did not observe significant decrease in SP cells in the presence of tested flavonoids (neither in wild-type, LOVO/WT, nor in doxorubicin-resistant, LOVO/DX). Baicalein and wogonin inhibited breast cancer cells proliferation in a dose dependent manner (the MTT

reduction test) and only a weak effect was noted in colon cancer cells. The results suggest that baicalein and wogonin could improve efficiency of the standard cytostatic therapy in breast cancers, whereas their weak influence on colon cancer cells should be further evaluated.

PIŚMIENNICTWO

1. *Wieczorek K., Niewiarowska J.*: Nowotworowe komórki macierzyste. Post. Hig. Med. Dośw., 2012; 66: 629-636. – 2. *Szaryńska M., Kmieć Z.*: Rola nowotworowych komórek macierzystych w patogenezie i terapii chorób nowotworowych. Forum Med. Rodz., 2011; 5(1): 47–56. – 3. *Chen K., Huang Y., Chen J.*: Understanding and targeting cancer stem cells: therapeutic implications and challenges. Acta Pharm. Sinica, 2013; 34: 732–740. – 4. *Hadnagy A., Gaboury L., Beaulieu R., Balicki D.*: SP analysis may be used to identify cancer stem cell populations. Exp. Cell Res., 2006; 312(19): 3701–3710. – 5. *Goodell M.A.*: Stem cell identification and sorting using the Hoechst 33342 side population (SP). Curr. Protoc. Cytom., 2005; Chapter 9: Unit 9.18 – 6. *Greve B., Kelsch R., Spaniol K., Eich H.T., Götte M.*: Flow cytometry in cancer stem cell analysis and separation. Cytometry A, 2012; 81(4): 284-93. – 7. *Wu C., Alman B.A.*: Side population cells in human cancers. Cancer Lett., 2008; 268(1): 1–9. – 8. *Blach-Olszewska Z., Lamer-Zarawska E.*: Come Back to Root – Therapeutic activities of *Scutellaria baicalensis* Root in aspect of innate immunity regulation – Part I. Adv. Clin. Exp. Med., 2008; 17(3): 337–345. – 9. *Li-Weber M.*: New therapeutic aspects of flavones: The anticancer properties of *Scutellaria* and its main active constituents Wogonin, Baicalein and Baicalin. Cancer Treat. Rev., 2009; 35(1): 57–68. – 10. *Wilczańska-Barska A., Chmura B., Krauze-Baranowska M.*: Dotychczasowy stan badań nad aktywnością farmakologiczną flawonów z rodzaju *Scutellaria*. Post. Fitoter., 2012; 1: 28-34.
11. *Lin M.G., Liu L.P., Li C.Y., Zhang M., Chen Y., Qin J., Gu Y.Y., Li Z., Wu X.L., Mo S.L.*: *Scutellaria* extract decreases the proportion of side population cells in a myeloma cell line by down-regulating the expression of ABCG2 protein. Asian Pac. J. Cancer Prev., 2013; 14(12): 7179-86. – 12. *Gu Y.Y., Liu L.P., Qin J., Zhang M., Chen Y., Wang D., Li Z., Tang J.Z., Mo S.L.*: Baicalein decreases side population proportion via inhibition of ABCG2 in multiple myeloma cell line RPMI 8226 *in vitro*. Fitoterapia, 2014; 94: 21-8. – 13. Polski Komitet Normalizacyjny: Polska Norma. Biologiczna ocean wyrobów medycznych – Część 5: Badania cytotoksyczności *in vitro* (ISO 10993-5:2009), 2009: 24-28.

Adres: ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław