

## · 实验研究 ·

## 西红花苷抑制 NFATc3 活性促进与肿瘤成纤维细胞共培养的结直肠癌细胞放射敏感性

如桂牙·阿不力孜, 薛青芳, 加依娜提·热马赞

新疆医科大学第一附属医院 药学部, 新疆 乌鲁木齐 830054

**摘要:** 目的 探究西红花苷对与肿瘤成纤维细胞 (CAFs) 共培养的结直肠癌细胞放射敏感性的影响, 并探究分子机制。方法 通过实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 和蛋白质免疫印记 (Western blotting) 比较人正常结肠上皮细胞 NCM460 和结直肠癌细胞系 SW480、SW620、HCT116、LOVO 中活化 T 细胞核因子 c3 (NFATc3) 表达差异。建立 CAFs 与 HCT116 细胞共培养体系, 西红花苷处理细胞后经不同剂量 (0、2、4、6、8 Gy) X 射线照射, 细胞克隆形成实验分析细胞存活分数 (SF)。再将 HCT116 细胞分为对照组、6 Gy 组、CAFs/HCT116+6 Gy 组、CAFs/HCT116+西红花苷+6 Gy 组, 进行对应处理后, MTT 法检测各处理组 HCT116 细胞活性, 流式细胞术检测各处理组 HCT116 细胞凋亡率, Hoechst 33258 染色观察各处理组 HCT116 细胞凋亡形态, qRT-PCR 和 Western blotting 测定各处理组 HCT116 细胞中 NFATc3 表达水平。结果 相较于人正常结肠上皮细胞 NCM460, 人结直肠癌细胞系 SW480、SW620、HCT116、LOVO 中的 NFATc3 mRNA 和蛋白相对表达量均显著上调 ( $P < 0.05$ )。与 HCT116 细胞比较, 与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞经辐射后的 SF 显著增高 ( $P < 0.05$ ); 与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞比较, 与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞经西红花苷处理再进行辐射的 SF 显著降低 ( $P < 0.05$ )。与 6 Gy 组比较, CAFs/HCT116+6 Gy 组 HCT116 细胞存活率显著升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率显著下降 ( $P < 0.05$ ), 细胞内染色也较为均匀, 未见致密浓染的凋亡状细胞, 细胞中 NFATc3 mRNA 和蛋白相对表达量均显著上调 ( $P < 0.05$ ); 而与 CAFs/HCT116+6 Gy 组比较, CAFs/HCT116+西红花苷+6 Gy 组 HCT116 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.05$ ), 细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ), 细胞中有较多致密浓染、碎裂荧光块, 同时, 细胞中 NFATc3 mRNA 和蛋白相对表达量显著下调 ( $P < 0.05$ )。结论 西红花苷能够明显提高与 CAFs 共培养的结直肠癌 HCT116 细胞的放射敏感性, 从而促进细胞发生凋亡, 该作用可能与抑制 NFATc3 有关。

**关键词:** 结直肠癌; 肿瘤成纤维细胞; 西红花苷; 放射敏感性; 活化 T 细胞核因子 c3

**中图分类号:** R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2023)10-2381-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.10.001

## Crocin inhibits NFATc3 activity and promotes radiosensitivity of colorectal cancer cells co-cultured with cancer associated fibroblasts

RUGUIYA Abulizi, XUE Qing-fang, JIAYINATI Remazan

Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

**Abstract: Objective** To investigate the effect of crocin on the radiosensitivity of colorectal cancer cells co-cultured with tumor fibroblasts (CAFs), and to explore the molecular mechanism. **Method** The expressions of activated T nuclear factor c3 (NFATc3) in human normal colon epithelial cells and colorectal cancer cell lines SW480, SW620, HCT116 and LOVO were compared by real-time quantitative PCR and Western blotting. The co-culture system of CAFs and HCT116 cells was established. Cells treated with crocin were irradiated with different doses (0, 2, 4, 6, 8 Gy), cell survival fraction (SF) was analyzed by cell cloning and formation experiment. Then HCT116 cells were divided into control group, 6 Gy group, CAFs/HCT116 + 6 Gy group, CAFs/HCT116 + crocin + 6 Gy group, after corresponding treatment, the activity of HCT116 cells in each treatment group was detected by MTT assay, the apoptosis rate of

收稿日期: 2023-08-11

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目 (2022D01C302)

作者简介: 如桂牙·阿不力孜, 女, 研究方向为代谢组学。E-mail: momaa66@163.com

HCT116 cells in each treatment group was detected by flow cytometry, the apoptotic morphology of HCT116 cells in each treatment group was observed by Hoechst 33258 staining, the expression level of NFATc3 in HCT116 cells of each treatment group was determined by qRT-PCR and Western blotting. **Results** Compared with human normal colon epithelial cells NCM460, the relative expression levels of *NFATc3* mRNA and NFATc3 protein in human colorectal cancer cell lines SW480, SW620, HCT116, and LOVO were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ). Compared with HCT116 cells, the SF of HCT116 cells co-cultured with CAFs was significantly increased after irradiation ( $P < 0.05$ ), compared with HCT116 cells co-cultured with CAFs, the SF of HCT116 cells co-cultured with CAFs and treated with crocin after radiation treatment was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). Compared with the 6 Gy group, the survival rate of HCT116 cells in CAFs/HCT116 + 6 Gy group was significantly increased ( $P < 0.05$ ), while the apoptosis rate was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), the intracellular staining was more uniform, and no dense and densely stained apoptotic cells were observed, the relative expression levels of *NFATc3* mRNA and NFATc3 protein were significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ). Compared with CAFs/HCT116 + 6 Gy group, the survival rate of HCT116 cells in CAFs/HCT116 + crocin + 6 Gy group was significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the apoptosis rate was significantly increased ( $P < 0.05$ ), there were more dense staining and fragmentation fluorescence blocks in the cells, the relative expression levels of *NFATc3* mRNA and NFATc3 protein in cells were significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Crocin can significantly improve the radiosensitivity of colorectal cancer HCT116 cells co-cultured with CAFs, thus promoting cell apoptosis, and the effect may be related to the inhibition of NFATc3.

**Key words:** colorectal cancer; cancer associated fibroblasts; crocin; radiosensitivity; activated T nuclear factor c3

结直肠癌已成为全球癌症相关死亡的第 2 大原因, 术前新辅助放化疗和放化疗后进行全直肠系膜切除术是晚期局部结直肠癌的标准治疗方法<sup>[1]</sup>。然而, 只有大约 20% 的患者达到肿瘤完全消退的效果, 其余患者仍有病理残留或对治疗无反应, 甚至在放疗后出现不良反应, 如放射诱发的继发性肿瘤和放射性肠炎<sup>[2]</sup>。因此, 阐明结直肠癌耐放射性的潜在机制并开发安全有效的放射增敏方案是临床上治疗结直肠癌的重要环节。

肿瘤微环境由细胞外基质和间充质细胞类型组成, 包括成纤维细胞、炎症细胞、周细胞和内皮细胞, 其中, 肿瘤相关成纤维细胞 (CAFs) 是肿瘤微环境中的主要基质细胞类型, 具有独特的致瘤特性, CAFs 以及原发灶周围的其他肿瘤基质细胞能够通过分泌各种细胞因子来促进肿瘤细胞的生长、侵袭和转移, 并增强肿瘤细胞耐药性<sup>[3-4]</sup>。已有研究表明, 从 CAFs 中分离的外泌体能够促进结直肠癌细胞的干性, 从而提高其抗放射性, 该机制可能与激活转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 信号通路有关<sup>[5]</sup>。

西红花苷是水溶性类胡萝卜素, 是西红花的主要成分和主要的暗红色色素。西红花具有多种用途, 包括排汗、助消化、镇静、祛痰以及治疗呕吐、心血管疾病和肿瘤等<sup>[6-7]</sup>。近年来, 西红花苷的抗肿瘤作用也被多项研究证实并报道, 其能够抑制胃癌、胰腺癌、前列腺癌、白血病等多种肿瘤发生与进展<sup>[8-10]</sup>。此外, 已有研究表明使用西红花苷可增加头颈部癌恶性肿瘤的放射敏感性, 促进肿瘤细胞凋亡<sup>[11]</sup>。但在与 CAFs 共培养下, 西红花苷能否发挥

增加肿瘤细胞放射敏感性, 目前尚未见报道。活化 T 细胞核因子 (NFAT) 是一种与人 T 细胞中白细胞介素-2 (IL-2) 启动子结合的转录因子, 目前已揭示 NFAT 的 5 种亚型, 包括 NFATc1、NFATc2、NFATc3、NFATc4、NFAT5, 肿瘤细胞的增殖、侵袭、转移、耐药性和肿瘤微环境均受到 NFAT 所调控<sup>[12-13]</sup>。基于此, 本研究通过将结直肠癌细胞与 CAFs 共培养下给予西红花苷处理, 检测结直肠癌细胞的放射敏感性变化, 探究其分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

CAFs 由本实验室前期从人结直肠癌组织中分离、鉴定并培养, 人正常结肠上皮细胞 NCM460 和人结直肠癌细胞系 SW480、SW620、HCT116、LOVO 均购于中科院细胞研究所, 添加含 1% 青 - 链霉素双抗和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内常规培养, 每 2 天传代 1 次。

西红花苷(质量分数 $\geq 98\%$ , 批号 111588-201704) 购于上海源叶生物科技有限公司, 总 RNA 抽提试剂盒 (批号 15596-026) 和 M-MLV 逆转录酶 (批号 C28025) 购于美国 Invitrogen 公司, SYBR Premix Ex Taq 荧光定量检测试剂盒 (批号 DRR041S) 购于日本 Takara 公司, 高效 RIPA 细胞裂解液 (批号 R0010) 购于北京索莱宝科技有限公司, BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 AC13858) 购于上海吉至生化科技有限公司, ECL 显影液 (批号 P0018M) 和 PVDF 膜 (批号 FFP20) 购于上海碧云天生物研究所, Transwell 小室 (批号 3422) 购于美国 Corning

公司, Giemsa 染液(批号 SH-1921) 购于北京凯诗源生物科技有限公司, MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒(批号 R20228) 购于上海源叶生物科技有限公司, Annexin V-FITC/PI 荧光双染细胞凋亡检测试剂盒(批号 E-CK-A211) 购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, Hoechst 33258 荧光染料(批号 A1371) 购于北京康瑞纳生物科技有限公司, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 ab205719) 与兔多抗 GAPDH 抗体(批号 ab181602) 购于英国 Abcam 公司, 兔多抗 NFATc3 抗体(批号 104857-T34) 购于美国 Abnova 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR)测定 NFATc3 mRNA 表达** Trizol 法提取细胞的总 RNA, 按照总 RNA 抽提试剂盒操作, 1% 凝胶电泳检测 RNA 完整性, 紫外分光光度计检测 RNA 浓度与纯度。取浓度、纯度符合要求的 RNA 样品, 通过 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。设计 NFATc3 的上、下游引物进行定量扩增, 以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 作为内参, 引物序列: NFATc3 正向 5' -TT CGCACATCTTCATTACCTCC-3'; 反向 5' -CCTCG GCTACCTTCAGTTTCAT-3'; GAPDH 正向 5' -GAC AAGCTTCCCGTTCTCAG-3', 反向 5' -GAGTCAA CGGATTTGGTCGT-3'。根据实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书配制反应体系, 在 ABI 7900 型荧光定量 PCR 系统上设置反应程序为:  $95^{\circ}\text{C}$  10 min 预变性, 循环 1 次;  $95^{\circ}\text{C}$  10 s,  $60^{\circ}\text{C}$  30 s, 循环 40 次。重复 3 次, 扩增结束后, 进行溶解曲线分析, 读取  $C_t$  值, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 NFATc3 mRNA 的相对表达量。

**1.2.2 蛋白质免疫印记(Western blotting)测定 NFATc3 蛋白表达** RIPA 裂解液提取细胞的总蛋白, BCA 法测量浓度。将等量上样缓冲液与蛋白混合,  $100^{\circ}\text{C}$  水浴加热变性。将 40  $\mu\text{g}$  变性后的蛋白上样至胶孔内, 通过 10% SDS-PAGE 凝胶分离, 并转至 PVDF 膜上。以 5% 脱脂奶粉作为封闭液, 将膜浸入封闭液后室温静置 1 h。再将膜与稀释后的特异性一抗(1:1000) 共置于  $4^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。次日, TBST 洗膜后, 再将膜与对应稀释后的二抗(1:5000) 在室温下共孵育 2 h, TBST 再次洗膜, 避光环境下利用 ECL 显影, 凝胶成像仪采集图像, Image J 软件分析各蛋白灰度值, 以 GAPDH 作为内参, 目的蛋白相对表达量以目的蛋白与内参蛋白的灰

度值比值来表示。

**1.2.3 细胞共培养体系建立与处理** 将培养的 CAFs 以每孔  $1 \times 10^4$  个的密度种植于 6 孔板 Transwell 上室, 将 HCT116 细胞以每孔  $3 \times 10^4$  个的密度种植于 6 孔板 Transwell 下室, 构建非接触共培养体系, 在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱静置共培养 48 h。此外, 以 Transwell 下室为 HCT116 细胞、上室为基础培养液作为对照, 记为 HCT116。收集与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞, 分为两部分, 一部分为单纯与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞, 记为 CAFs/HCT116; 另一部分与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞再采用 200  $\mu\text{mol/L}$  西红花苷处理 12 h, 记为 CAFs/HCT116+西红花苷, 其中西红花苷给药依据参考文献报道剂量<sup>[4]</sup>。

**1.2.4 细胞克隆形成实验分析细胞存活分数** 收集 1.2.3 项下处理后的 3 组 HCT116 细胞, 在  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱过夜培养后, 分别给予 0、2、4、6、8 Gy 剂量的 X 射线照射(剂量率为 2 Gy/min)。照射完毕后, 将各组细胞置于培养箱内培养, 14 d 左右出现肉眼可见菌落, 弃去培养基, PBS 洗涤, 加入细胞固定液固定, 再加入 Giemsa 染液染色 30 min, PBS 再冲洗, 自然晾干, 在光学显微镜下计数含 50 个细胞以上形成的集落数目, 统计集落形成率, 根据集落形成率计算细胞存活分数(SF)。

$$\text{SF} = \text{实验组集落形成率} / \text{对照组集落形成率}$$

**1.2.5 实验分组与处理** 将培养的 HCT116 细胞分为 4 组进行实验, 具体分组与处理如下: (1) 对照组, HCT116 细胞正常培养; (2) 6 Gy 组, HCT116 细胞经 6 Gy 剂量的 X 射线照射(剂量率为 2 Gy/min); (3) CAFs/HCT116+6 Gy 组, 与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞经 6 Gy 剂量的 X 射线照射(剂量率为 2 Gy/min); (4) CAFs/HCT116+西红花苷+6 Gy 组, 与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞采用 200  $\mu\text{mol/L}$  西红花苷处理 12 h, 再经 6 Gy 剂量的 X 射线照射(剂量率为 2 Gy/min)。处理结束后, 收集 4 组 HCT116 细胞。

**1.2.6 MTT 法检测细胞活性** 将 HCT116 细胞按照  $1 \times 10^5$  个/孔的密度接种于 96 孔培养板中, 置于  $37^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱培养 24 h。按照 1.2.5 项下进行分组处理后, 每孔加 20  $\mu\text{L}$  MTT, 处理 4 h 后, 终止培养。每孔再加入 150  $\mu\text{L}$  DMSO, 摇床振荡直至结晶物充分溶解, 采用全自动酶标仪测定每孔在 490 nm 处的吸光度(A) 值, 检测细胞存活率。

细胞存活率 = (A<sub>实验</sub> - A<sub>空白</sub>) / (A<sub>对照</sub> - A<sub>空白</sub>)

**1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡率** 收集处理后的 4 组 HCT116 细胞, 采用 0.25% 胰蛋白酶消化, 通过 4 000 r/min 离心 5 min, PBS 清洗沉淀, 加入 1 × binding buffer 重悬, 细胞密度为 1 × 10<sup>6</sup> 个/mL。在流式检测管中加入 100 μL 细胞悬液, 接着依次加 5 μL Annexin V-FITC、10 μL PI, 涡旋混匀, 立即上流式细胞仪检测各组 HCT116 细胞凋亡率。

细胞凋亡率 = Q2 象限百分率 + Q3 象限百分率

**1.2.8 Hoechst 33258 染色观察细胞凋亡形态** 将处理后的 4 组 HCT116 细胞进行爬片, 加入细胞固定液, 置于 4 °C 下固定过夜。次日, 弃原液, PBS 洗涤细胞, 吸除多余液体, 滴加 Hoechst 33258 工作液, 室温下染色 10 min, PBS 漂洗后, 用抗荧光淬灭封片液封片, 自然晾干, 在荧光显微镜观察各组 HCT116 细胞凋亡形态并摄取图像。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  来描述, 多组间比较采用方差分析, LSD-*t* 检验进行组间两两比较。统计图采用 GraphPad Prism 8.0 软件制作。

## 2 结果

### 2.1 NFATc3 人正常结肠上皮细胞与结直肠癌细胞系中的差异表达

qRT-PCR 与 Western blotting 测定结果显示, 相较于人正常结肠上皮细胞 NCM460, 人结直肠癌细胞系 SW480、SW620、HCT116、LOVO 中的 *NFATc3* mRNA 和蛋白相对表达量均显著上调 ( $P < 0.05$ ), 见图 1。且 HCT116 细胞中 *NFATc3* mRNA 和蛋白相对表达量上调水平较高, 因此, 后续选择该细胞系进行实验。

### 2.2 西红花苷对与 CAFs 共培养的结直肠癌细胞存活分数的影响

克隆形成实验检测并分析各组 HCT116 细胞 SF, 与 HCT116 细胞比较, 经过 4、6、8 Gy 剂量的 X 射线照射后, 与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞 SF 显著增高 ( $P < 0.05$ )。而与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞比较, 与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞经西红花苷处理、再通过 4、6、8 Gy 剂量的 X 射线照射后, 细胞 SF 显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

### 2.3 西红花苷对与 CAFs 共培养的结直肠癌细胞存活率的影响

MTT 检测结果显示, 与对照组比较, 6 Gy 组

HCT116 细胞存活率显著下降 ( $P < 0.05$ )。与 6 Gy 组比较, CAFs/HCT116+6 Gy 组 HCT116 细胞存活率显著升高 ( $P < 0.05$ )。与 CAFs/HCT116+6 Gy 组比较, CAFs/HCT116+西红花苷+6 Gy 组 HCT116 细胞存活率显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3。

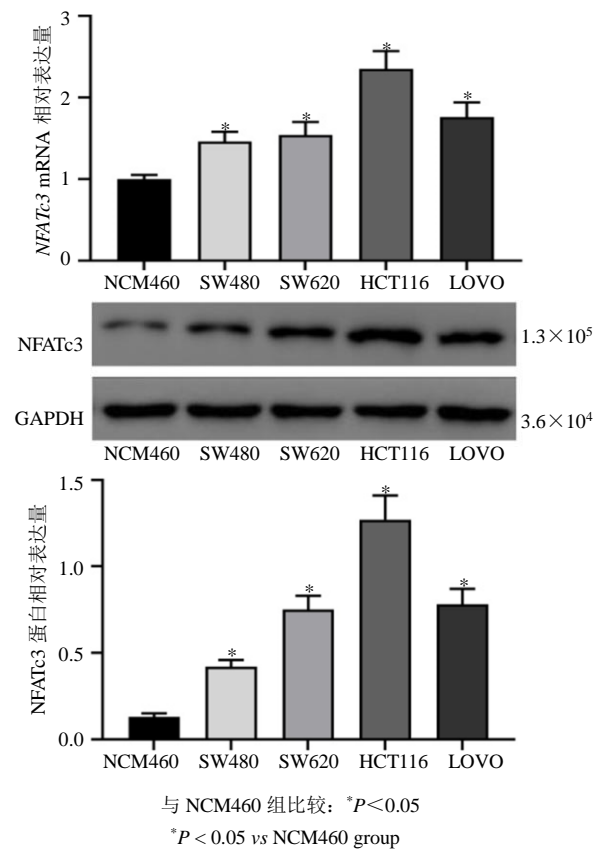
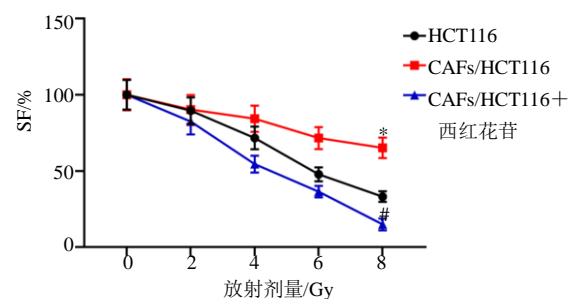


图 1 人正常结肠上皮细胞与结直肠癌细胞系中 NFATc3 表达比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

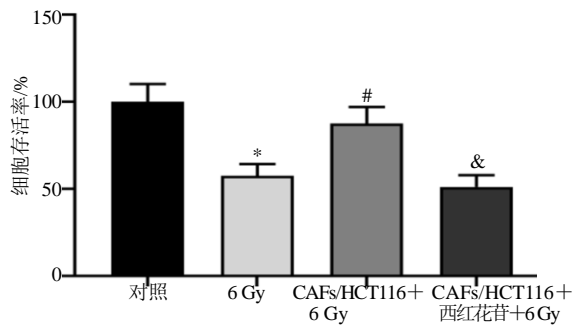
Fig. 1 Comparison of NFATc3 expression in human normal colon epithelial cells and colorectal cancer cell lines ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



与 HCT116 组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 CAFs/HCT116 组比较: # $P < 0.05$   
\* $P < 0.05$  vs HCT116 group; # $P < 0.05$  vs CAFs/HCT116 group

图 2 不同处理下 HCT116 细胞存活分数比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 2 Comparison of HCT116 cell survival fraction under different treatments ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 6 Gy 组比较: # $P < 0.05$ ; 与 CAFs/HCT116+6 Gy 组比较: & $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs 6 Gy group; & $P < 0.05$  vs CAFs/HCT116+6 Gy group

图 3 各组 HCT116 细胞存活率比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 3 Comparison of HCT116 cell survival rate among all groups ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

#### 2.4 西红花苷对与 CAFs 共培养的结直肠癌细胞凋亡率的影响

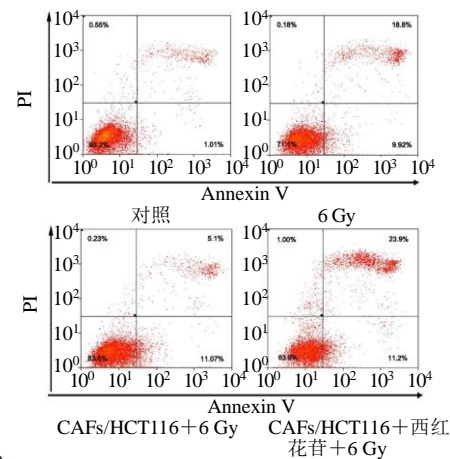
流式细胞术测定结果显示,与对照组比较,6 Gy 组 HCT116 细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ )。与 6 Gy 组比较,CAFs/HCT116+6 Gy 组 HCT116 细胞凋亡率显著下降 ( $P < 0.05$ )。与 CAFs/HCT116+6 Gy 组比较,CAFs/HCT116+西红花苷+6 Gy 组 HCT116 细胞凋亡率显著升高 ( $P < 0.05$ ),见图 4。

#### 2.5 西红花苷对与 CAFs 共培养的结直肠癌细胞凋亡形态的影响

Hoechst33258 染色结果如图 5 所示,对照组 HCT116 细胞内呈弥散均匀的染色,代表细胞未发生凋亡;6 Gy 组 HCT116 细胞可见致密浓染的颗粒块状荧光,代表细胞发生凋亡;CAFs/HCT116+6 Gy 组 HCT116 细胞内染色也较为均匀,未见致密浓染荧光;而 CAFs/HCT116+西红花苷+6 Gy 组 HCT116 细胞有较多致密浓染、碎裂荧光块,代表细胞发生凋亡。

#### 2.6 西红花苷对与 CAFs 共培养的结直肠癌细胞中 NFATc3 mRNA 和蛋白表达水平的影响

qRT-PCR 与 Western blotting 测定结果显示,与对照组比较,6 Gy 组 HCT116 细胞中 NFATc3 mRNA 和蛋白相对表达量均未发生统计学变化。而与 6 Gy 组比较,CAFs/HCT116+6 Gy 组 HCT116 细胞中 NFATc3 mRNA 和蛋白相对表达量均显著上调 ( $P < 0.05$ )。与 CAFs/HCT116+6 Gy 组比较,CAFs/HCT116+西红花苷+6 Gy 组 HCT116 细胞中 NFATc3 mRNA 和蛋白相对表达量显著下调 ( $P < 0.05$ ),见图 6。

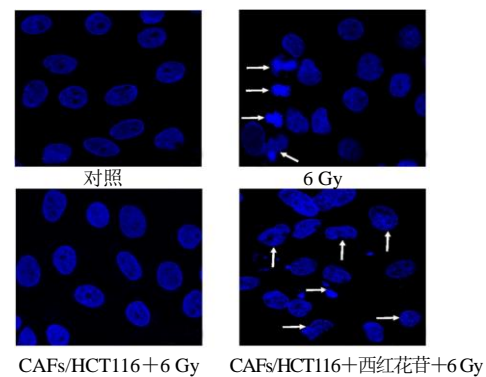


与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 6 Gy 组比较: # $P < 0.05$ ; 与 CAFs/HCT116+6 Gy 组比较: & $P < 0.05$

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs 6 Gy group; & $P < 0.05$  vs CAFs/HCT116+6 Gy group

图 4 各组 HCT116 细胞凋亡率比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Comparison of apoptosis rate of HCT116 cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



箭头所指为凋亡细胞形态

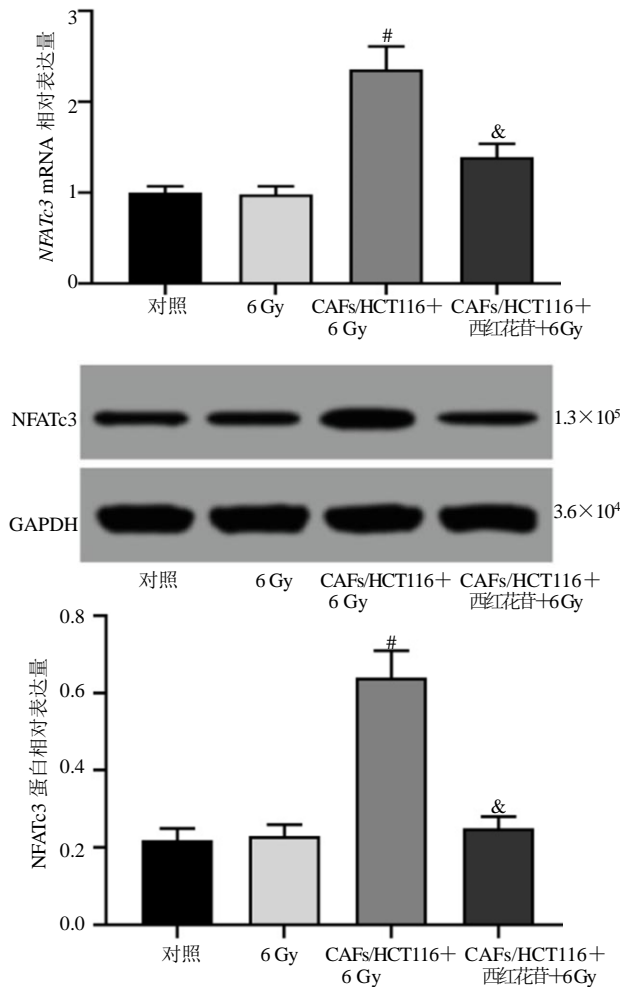
Arrows indicate apoptotic cell morphology

图 5 各组 HCT116 细胞凋亡形态观察 (Hoechst33258 染色,  $\times 200$ )

Fig. 5 Observation of apoptosis morphology of HCT116 cells in each group (Hoechst33258 staining,  $\times 200$ )

### 3 讨论

近年来,人们对中医药的兴趣日益浓厚,引发了在抗肿瘤领域的广泛研究。中药能减轻化疗不良



与 6 Gy 组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$ ; 与 CAFs/HCT116+6 Gy 组比较: <sup>&</sup> $P < 0.05$

<sup>#</sup> $P < 0.05$  vs 6 Gy group; <sup>&</sup> $P < 0.05$  vs CAFs/HCT116+6 Gy group

图 6 各组 HCT116 细胞中 NFATc3 表达水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

Fig. 6 Comparison of NFATc3 expression levels in HCT116 cells in each group ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 6$ )

反应, 调节免疫功能, 抑制肿瘤生长并预防复发, 不仅提高了患者的生活质量, 而且延长了患者的生存期。随着中药抗肿瘤作用研究的日益加深, 研究显示其还可以提高肿瘤细胞的放射敏感性, 这对于临床上提高肿瘤放射治疗效果来说意义重大。以往多项研究表明, 西红花苷可以抑制多种肿瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡, 说明西红花苷在肿瘤治疗中极具潜力。目前, 关于西红花苷在肿瘤放射治疗中的作用也已有报道, Vali 等<sup>[15]</sup>研究表明西红花苷对放射处理下的人乳腺癌 MCF-7 细胞具有协同作用, 能够促使细胞凋亡, 改善乳腺癌的治疗效果; Bakshi 等<sup>[16]</sup>研究发现西红花苷不仅能够降低放射下胰腺癌细胞的活力, 并对放射诱导的肝脏氧化损伤具有

显著的保护作用。由此可见, 西红花苷对于提高肿瘤细胞放射敏感性方面也具有积极作用。

作为实体瘤中主要的基质细胞亚型之一, CAFs 占肿瘤体积的 50%~70%, 相较于正常未激活的成纤维细胞, CAFs 有助于肿瘤细胞的多种恶性行为进展, 包括增殖、迁移、侵袭、血管生成、诱导化学抵抗和逃避免疫介导的杀伤。除此之外, CAFs 还与放疗治疗失败以及患者不良临床结局有关<sup>[17]</sup>。一方面, CAFs 通过分泌趋化因子、细胞因子、生长因子及调控相关信号途径, 保护肿瘤细胞免受放射造成的 DNA 损伤, 进而抑制细胞凋亡; 另一方面, 活化的 CAFs 可以重新编程肿瘤细胞代谢以维持肿瘤细胞存活并保护其免受药物或放射诱导的细胞凋亡<sup>[18]</sup>。Huang 等<sup>[19]</sup>研究发现 CAFs 诱导鼻咽癌细胞放射抗性的形成, 通过白细胞介素-8 (IL-8) /核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 途径在放射后促进鼻咽癌细胞存活, 以减少照射诱导的 DNA 损伤; Meng 等<sup>[20]</sup>研究表明 CAFs 通过蛋白酪氨酸激酶/信号传导子和转录激活子 (JAK/STAT) 途径促进非小细胞肺癌细胞增殖和放射抗性形成, 而靶向诱导 CAFs 凋亡显著提高了放射治疗效果, 并缓解了放射诱导的肺纤维化; Kitamura 等<sup>[21]</sup>研究报道指出 CAFs 分泌肝细胞生长因子 (HGF) 以激活 c-Met 信号通路, 诱导乳腺癌细胞的上皮到间充质转化, 促进乳腺癌细胞的放射抗性。在本研究中, 将结直肠癌 HCT116 细胞与 CAFs 共培养后, 再经过 4、6、8 Gy 剂量的 X 射线照射, HCT116 细胞的 SF 显著增高; 进一步的实验结果显示, 相较于单独经 6 Gy 剂量 X 射线照射的 HCT116 细胞, 与 CAFs 共培养后再经 6 Gy 剂量 X 射线照射的 HCT116 细胞存活率较高, 细胞凋亡率下降, 未见典型的细胞凋亡形态, 该结果同样表明, CAFs 能够降低 HCT116 细胞对放射的敏感性, 抑制细胞凋亡。而与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞经西红花苷处理再通过 4、6、8 Gy 剂量的 X 射线照射后, 细胞 SF 显著降低, 其中, 在 6 Gy 剂量的 X 射线照射下细胞 SF 接近于 50%, 因此后续选择该剂量进行研究。此外, 本研究还显示, HCT116 细胞与 CAFs 共培养后, 采用西红花苷处理 HCT116 细胞再经 6 Gy 剂量 X 射线照射, HCT116 细胞存活率下降, 细胞凋亡率升高, 出现较多致密浓染、碎裂的凋亡状细胞, 这说明西红花苷能够促进与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞放射敏感性, 从而提高结直肠癌的放疗效果。

NFATc3 作为 NFAT 的重要亚型之一, 研究表明, NFATc3 参与溃疡性结肠炎和溃疡性结肠炎相关结直肠癌的发生发展, 下调 NFATc3 可以抑制溃疡性结肠炎相关结直肠癌细胞的增殖和上皮间质转化, 降低促炎细胞因子的水平, 减少中性粒细胞和巨噬细胞的结肠浸润, 改善黏膜损伤, 并抑制肿瘤形成与生长<sup>[22]</sup>。此外, NFATc3 在替莫唑胺耐药胶质母细胞瘤 U87 细胞中的表达水平要显著高于替莫唑胺敏感胶质母细胞瘤 U87 细胞<sup>[23]</sup>。但关于 NFATc3 与放射敏感性之间的关系尚未报道。本研究检测结果显示, 相较于单独经 6 Gy 剂量 X 射线照射的 HCT116 细胞, 与 CAFs 共培养后再经 6 Gy 剂量 X 射线照射的 HCT116 细胞中 NFATc3 表达显著上调, 而 HCT116 细胞与 CAFs 共培养后, 经西红花苷处理再以 6 Gy 剂量 X 射线照射的 HCT116 细胞中 NFATc3 表达显著下调, 由此推测, 西红花苷提高与 CAFs 共培养的 HCT116 细胞放射敏感性的作用可能与抑制 NFATc3 表达有关。

综上所述, 西红花苷能够提高与 CAFs 共培养下的结直肠癌 HCT116 细胞的放射敏感性, 诱导细胞发生凋亡, 该作用可能与抑制 NFATc3 水平有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 尚小文, 吴东波, 宋学民, 等. 新辅助放化疗联合全直肠系膜切除术治疗局部进展期直肠癌的疗效及安全性分析 [J]. 临床普外科电子杂志, 2022, 10(1): 72-76.
- [2] Akiyoshi T, Wang Z, Kaneyasu T, et al. Transcriptomic analyses of pretreatment tumor biopsy samples, response to neoadjuvant chemoradiotherapy, and survival in patients with advanced rectal cancer [J]. *JAMA Netw Open*, 2023, 6(1): e2252140.
- [3] Luo H, Xia X, Huang L B, et al. Pan-cancer single-cell analysis reveals the heterogeneity and plasticity of cancer-associated fibroblasts in the tumor microenvironment [J]. *Nat Commun*, 2022, 13(1): 6619.
- [4] Glabman R A, Choyke P L, Sato N. Cancer-associated fibroblasts: Tumorigenicity and targeting for cancer therapy [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(16): 3906.
- [5] Liu L, Zhang Z, Zhou L, et al. Cancer associated fibroblasts-derived exosomes contribute to radioresistance through promoting colorectal cancer stem cells phenotype [J]. *Exp Cell Res*, 2020, 391(2): 111956.
- [6] Ali A, Yu L, Kousar S, et al. Crocin: functional characteristics, extraction, food applications and efficacy against brain related disorders [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 1009807.
- [7] 钟晴柔, 尤雅, 朱琳, 等. 西红花及其活性成分对肝脏疾病作用及其机制的研究进展 [J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4386-4397.
- [8] Shariat Razavi S M, Mahmoudzadeh Vaziri R, Karimi G, et al. Crocin increases gastric cancer cells' sensitivity to doxorubicin [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2020, 21(7): 1959-1967.
- [9] Veisi A, Akbari G, Mard S A, et al. Role of crocin in several cancer cell lines: An updated review [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2020, 23(1): 3-12.
- [10] Moradzadeh M, Kalani M R, Avan A. The antileukemic effects of saffron (*Crocus sativus* L.) and its related molecular targets: A mini review [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(4): 4732-4738.
- [11] Vazifedan V, Mousavi S H, Sargolzaei J, et al. Study of crocin & radiotherapy-induced cytotoxicity and apoptosis in the head and neck cancer (HN-5) cell line [J]. *Iran J Pharm Res*, 2017, 16(1): 230-237.
- [12] Wang B, Liu W, Liu C, et al. Cancer-associated fibroblasts promote radioresistance of breast cancer cells via the HGF/c-Met signaling pathway [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2023, 116(3): 640-654.
- [13] Cacheiro-Llaguno C, Hernández-Subirá E, Díaz-Muñoz M D, et al. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in human T cells by glucocorticoid receptor-mediated transrepression of nuclear factor of activated T cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(21): 13275.
- [14] 孙明月, 李洪霖, 冯保荣, 等. 西红花苷对成纤维细胞共培养的结直肠癌细胞生物学行为的影响及机制初步研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2021, 23(8): 2711-2718.
- [15] Vali F, Changizi V, Safa M. Synergistic apoptotic effect of crocin and paclitaxel or crocin and radiation on MCF-7 cells, a type of breast cancer cell line [J]. *Int J Breast Cancer*, 2015, 2015: 139349.
- [16] Bakshi H A, Zoubi M S A, Hakkim F L, et al. Dietary crocin is protective in pancreatic cancer while reducing radiation-induced hepatic oxidative damage [J]. *Nutrients*, 2020, 12(6): 1901.
- [17] Domogauer J D, de Toledo S M, Howell R W, et al. Acquired radioresistance in cancer associated fibroblasts is concomitant with enhanced antioxidant potential and DNA repair capacity [J]. *Cell Commun Signal*, 2021, 19(1): 30.
- [18] Zhang Z, Dong Y, Wu B, et al. Irradiation enhances the malignancy-promoting behaviors of cancer-associated fibroblasts [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 965660.
- [19] Huang W, Zhang L, Yang M, et al. Cancer-associated

- fibroblasts promote the survival of irradiated nasopharyngeal carcinoma cells via the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2021, 40(1): 87.
- [20] Meng J, Li Y, Wan C, *et al.* Targeting senescence-like fibroblasts radiosensitizes non-small cell lung cancer and reduces radiation-induced pulmonary fibrosis [J]. *JCI Insight*, 2021, 6(23): e146334.
- [21] Kitamura N, Shindo M, Ohtsuka J, *et al.* Identification of novel interacting regions involving calcineurin and nuclear factor of activated T cells [J]. *FASEB J*, 2020, 34(2): 3197-3208.
- [22] Lin Y, Koumba M H, Qu S, *et al.* Blocking NFATc3 ameliorates azoxymethane/dextran sulfate sodium induced colitis-associated colorectal cancer in mice via the inhibition of inflammatory responses and epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cell Signal*, 2020, 74: 109707.
- [23] Zou Y, Liu Z, Zhou Y, *et al.* TRPC5 mediates TMZ resistance in TMZ-resistant glioblastoma cells via NFATc3-P-gp pathway [J]. *Transl Oncol*, 2021, 14(12): 101214.

[责任编辑 高源]