

冬凌草甲素抑制 HCT116 细胞增殖与 p38 MAPK 信号通路相关性研究

刘荣兴^{1,2}, 胡培³, 马妍^{1,2}, 任春美^{1,2}, 任文艳^{1,2}, 周林云^{1,2}, 廖云鹏^{1,2}, 朱茄慧^{1,2}, 王涵^{1,2}, 何百成^{1,2}, 孙文娟^{1,2*}

1. 重庆医科大学 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016
2. 重庆医科大学 药理学教研室, 重庆 400016
3. 贵州省遵义市妇幼保健院药剂科, 贵州 遵义 563000

摘要: 目的 研究冬凌草甲素 (ORI) 对人源结肠癌细胞 HCT116 的增殖抑制作用, 并探讨其可能的分子机制。方法 采用结晶紫染色研究 ORI (5、10、15、20、25 $\mu\text{mol/L}$) 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用; 采用 Western blotting 技术研究 ORI (10、15、20 $\mu\text{mol/L}$) 对 HCT116 细胞中增殖细胞核抗原 (PCNA)、凋亡相关指标 (Caspase-3 和 Cleaved-caspase-3)、p38 MAPK 信号通路相关指标 (Smad1/5/8、p-Smad1/5/8、p38、p-p38) 蛋白表达的影响; 采用 Western blotting、凝胶电泳技术分析 ORI 对 BMP7 蛋白、mRNA 表达的影响; 转染重组 BMP7 腺病毒 (AdBMP7) 实现 BMP7 的外源性过表达, 应用 BMP7 抗体 (anti-BMP7) 降低 BMP7 水平, 检测 ORI 是否通过调节 BMP7 表达影响 HCT116 细胞增殖凋亡、p38 MAPK 信号通路。结果 与对照组比较, ORI 明显抑制 HCT116 细胞增殖, 下调 PCNA 蛋白水平; 明显上调 Caspase-3、Cleaved caspase-3、p-p38 蛋白表达, 且呈浓度与时间相关性, 对 Smad1/5/8、P-Smad1/5/8 蛋白表达无明显影响; 明显上调 BMP7 蛋白及 RNA 表达; 外源性过表达 BMP7 加强了 ORI 对上述蛋白表达的调控, anti-BMP7 则部分抑制了 ORI 的作用。结论 ORI 抑制 HCT116 细胞的增殖, 其机制可能与上调 BMP7 蛋白表达进而激活 p38 MAPK 信号通路相关。

关键词: 冬凌草甲素; 结肠癌; HCT116 细胞; 增殖; 凋亡; p38 MAPK; BMP7

中图分类号: R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 02-0200-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.02.005

Relationship between anti-proliferation effect of Oridonin on HCT116 cells and p38 MAPK signal pathway

LIU Rongxing^{1,2}, HU Pei³, MA Yan^{1,2}, REN Chunmei^{1,2}, REN Wenyan^{1,2}, ZHOU Linyun^{1,2}, LIAO Yunpeng^{1,2}, ZHU Jiahui^{1,2}, WANG Han^{1,2}, HE Baicheng^{1,2}, SUN Wenjuan^{1,2}

1. Key Laboratory for Biochemistry and Molecular Pharmacology of Chongqing, Chongqing Medical University; Chongqing 400016, China
2. Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China
3. Department of Pharmacy, Maternal and Child Health Hospital of Zunyi city, Guizhou Province, Zunyi 563000, China

Abstract: Objective To investigate the proliferation inhibition effect and the possible mechanism of Oridonin (ORI) on human colon cancer HCT116 cells. **Methods** The inhibitory effects of ORI (5, 10, 15, 20, 25 $\mu\text{mol/L}$) on the proliferation of HCT116 cells were tested by crystal violet staining. The effects of ORI (15, 20, 25 $\mu\text{mol/L}$) on the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), apoptosis related index (Caspase-3 and Cleaved-caspase-3) and p38 MAPK signal pathway related protein (Smad1/5/8, p-Smad1/5/8, p38 and p-p38) in HCT116 cells were studied by Western blotting assay. The effect of ORI on the expression of BMP7 protein and mRNA was analyzed by Western blotting and gel electrophoresis. Next, the exogenous overexpression of BMP7 were realized by transfecting recombinant adenovirus (AdBMP7), and the BMP7 antibody (anti-BMP7), which could reduce the expression of BMP7, was used to detect the influence of ORI on proliferation and apoptosis of HCT116 cells and p38 MAPK signal pathway by regulating the expression of BMP7. **Results** Compared with control group, ORI could inhibit the proliferation of

收稿日期: 2017-10-22

基金项目: 重庆市渝中区科委课题 (No 20150120)

第一作者: 刘荣兴 (1992-), 男, 重庆人, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤与免疫药理学。E-mail: 1173942453@qq.com

*通信作者: 孙文娟, 女, 副教授, 研究方向为肿瘤与免疫药理学。E-mail: 1173942453@qq.com

HCT116 cells obviously, down-regulated the PCNA protein level; Western blotting results showed that ORI up-regulated the protein level of BMP7, Caspase-3, Cleaved caspase-3 and p-p38 in a time and concentration dependent manner, with no obvious effect on the expression of Smad1/5/8 and P-Smad1/5/8 protein and obvious up-regulative effect on the BMP7 protein and mRNA. Over expression of BMP7 strengthened the regulative level of above-mentioned proteins, while anti-BMP7 partly inhibited such effects of ORI. **Conclusion** ORI can inhibit the proliferation of HCT116 cells, which may be related to the up-regulation of BMP7 protein expression with view to activating of the p38 MAPK signal pathway.

Key words: Oridonin; colon cancer; HCT116 cells; proliferation inhibition; apoptosis; p38 MAPK; BMP7

结肠癌是一种严重的消化系统疾病,在全球范围内具有极高的死亡率和复发率,是危害人类生命健康的重大疾病之一。目前,结肠癌的临床治疗以化疗为主,同时依靠外科手术、放疗、以及较少的靶向治疗等^[1]。由于肿瘤的高侵袭转移特性,导致化疗与放疗仅对结肠癌早期有效,对于中晚期的患者治疗效果并不理想,随之造成的严重副作用也大大降低了病人的生活质量。故而,探索结肠癌的发生发展、寻找高效低毒的药物并明确其分子机制迫在眉睫。在中药现代化发展的带动下,越来越多的天然药物有效单体成分成为癌症治疗的研究热点。冬凌草甲素(Oridonin, ORI)是一种四环二萜类化合物,主要从传统中药植物冬凌草的根部提取^[2],具有去热解毒、镇痛消炎等功效,在咽喉肿痛、扁桃体炎等疾病的治疗中均有应用。现有研究指出,ORI能够控制结肠癌^[3]、乳腺癌、卵巢癌^[4]、白血病及骨肉瘤等癌症的发展,抑制癌细胞增殖并促使凋亡^[5-7]。但其抑癌的具体分子机制尚未被阐明。

现已发现 Wnt/ β -catenin 的异常活化、p53 突变以及 PTEN 表达异常等因素均可能与结肠癌的发生密切相关,但确切的发病机制仍不十分清楚^[8]。本研究通过分析 ORI 对结肠癌细胞的增殖抑制作用以及可能的分子机制,明确 ORI 的抑癌作用及机制,为将 ORI 进一步用于临床治疗和癌症预防提供坚实的实验基础。

1 材料

1.1 主要试剂

ORI (批号 DLCJS-110630, 98.2%纯度), 购自西安昊轩生物科技有限公司; 实验所用抗体 (GAPDH、PCNA、Caspase-3、Cleaved-caspase-3、BMP7、Smad1/5/8、P-Smad1/5/8、p38、p-p38), 均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司; 所用引物 (GAPDH、BMP7), 由武汉金开瑞生物工程有限公司构建。

1.2 细胞

人结肠癌细胞 HCT116, 购自 American Type

Culture Collection (ATCC)。细胞的培养条件: DMEM 培养基 (高糖, 含 10%胎牛血清、100 kU/L 青霉素和 0.1 g/L 链霉素), 孵箱温度为 37 °C, CO₂ 浓度为 5%。

1.3 主要仪器

细胞培养箱、低温离心机 (Thermo 公司); 超净操作台 (安泰技术有限公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Nikon); 湿式转膜仪、垂直电泳槽 (六一仪器厂); 凝胶成像仪 (Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 结晶紫染色检测细胞增殖

将生长状态良好的 HCT116 细胞消化, 并以 5×10^4 孔重铺于 24 孔板, 待细胞贴壁之后 (大约 6 h), 用不同浓度的 ORI (5、10、15、20、25 $\mu\text{mol/L}$) 处理, ORI 经 DMSO 溶解后给药, 对照组给予等体积的 DMSO。在处理后的 24、48、72 h, 弃去上层培养基, 磷酸缓冲液 (PBS) 轻轻清洗孔板 2 次。每孔加入 200 μL 的 0.25% 结晶紫溶液, 室温下孵育 20 min。弃去结晶紫溶液, 自来水小心清洗孔板 2 次, 在室温下晾干后扫描。实验重复 3 次。

2.2 RNA 提取及半定量 PCR

将 HCT116 细胞按 1×10^5 孔铺于 6 孔板中, 待细胞贴壁后 (大约 6 h), 加入低、中、高浓度的 ORI (10、15、20 $\mu\text{mol/L}$) 处理, 对照组给予等体积的 DMSO。48 h 后, 弃去上清液并用冷的 PBS 洗 2 次, Trizol 法提取 RNA, 用 DEPC 水定容到 20 μL 。取 5 μL 原液, 按逆转录试剂盒说明书操作, 制备 cDNA (逆转录条件: 37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s), 用于进行 PCR 检测目的基因的表达水平。具体操作为: 将 $10 \times$ Buffer (Mg^{2+})、dNTP、正向引物、反向引物、cDNA、Taq 酶、双蒸水按一定比例配制反应体系, 放入 PCR 仪, 经 95 °C 5 min (预变性)、94 °C 1 min (变性)、55 °C 30 s (退火)、72 °C 30 s (延伸)、72 °C 10 min (延伸结束) 完成扩增, 引物序列见表 1。加入 loading buffer 后进行凝胶电泳, 在凝胶成像仪中显影。

表 1 引物序列
Table 1 Primer Sequence

引物名称	引物序列
GAPDH	上游 5'-CAACGAATTTGGCTA CAGCA-3'
	下游 5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3'
BMP7	上游 5'-GGC AGGACTGGATCATCG-3'
	下游 5'-AAGTGGACCAGCGTCTGC-3'

2.3 Western blotting 实验

将处于指数生长期的细胞接种于 6 孔板中, 6 h 后加入低、中、高浓度 (10、15、20 μmol/L) 的 ORI 处理, 对照组给予等体积的 DMSO。并于 24、48 h 后冰浴裂解, 提取各组总蛋白。经 BCA 法进行蛋白定量, 10% 的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳。电泳后将蛋白转印至硝酸纤维素膜 (PVDF) 上, 采用 5% 的 BSA 封闭 1 h 后, 一抗封闭过夜, 再以辣根过氧化物酶标记的二抗封闭液封闭 1 h, 最后采用 ECL 试剂盒显影并成像。每组实验重复 3 次。

2.4 重组 BMP7 腺病毒

人源 BMP7 的编码序列 (CDS) 和绿色荧光蛋白 (GFP) 通过 EST 克隆扩增。将该片段分别克隆到穿梭载体 pAdTrace 中。穿梭载体线性化后转染 HEK293 细胞, 进行重组腺病毒的包装, 并命名为 AdBMP7。重组腺病毒表达绿色荧光蛋白 (GFP) 作为空白对照, 命名为 AdGFP。

用 AdBMP7 病毒感染 HCT116 细胞实现 BMP7 的外源性过表达, 并通过外源给予 BMP7 抗体 (anti-BMP7) 减少 BMP7 水平, 观察 ORI 是否通过 BMP7 调控细胞增殖凋亡。实验共设置 6 组: 对照 (DMSO + AdGFP) 组、ORI (10 μmol/L ORI + AdGFP) 组、BMP7 (DMSO + AdBMP7) 组、anti-BMP7 (DMSO + AdGFP + anti-BMP7) 组、ORI + BMP7 (10 μmol/L ORI + AdBMP7) 组、ORI +

anti-BMP7 (10 μmol/L ORI + AdGFP + anti-BMP7) 组。细胞接种及 Western blotting 实验操作均同 “2.4” 项。

3 结果

3.1 抑制 HCT116 细胞的增殖

结晶紫染色结果 (图 1A) 显示, ORI 抑制 HCT116 细胞增殖, 呈明显的浓度与时间相关性, 在浓度 ≥ 15 μmol/L 时明显抑制 HCT116 细胞增殖。Western blotting 结果 (图 1B) 显示, ORI 明显降低 HCT116 细胞中增殖细胞核抗原 (proliferation cell nuclear antigen, PCNA) 表达, 且呈浓度与时间相关性。

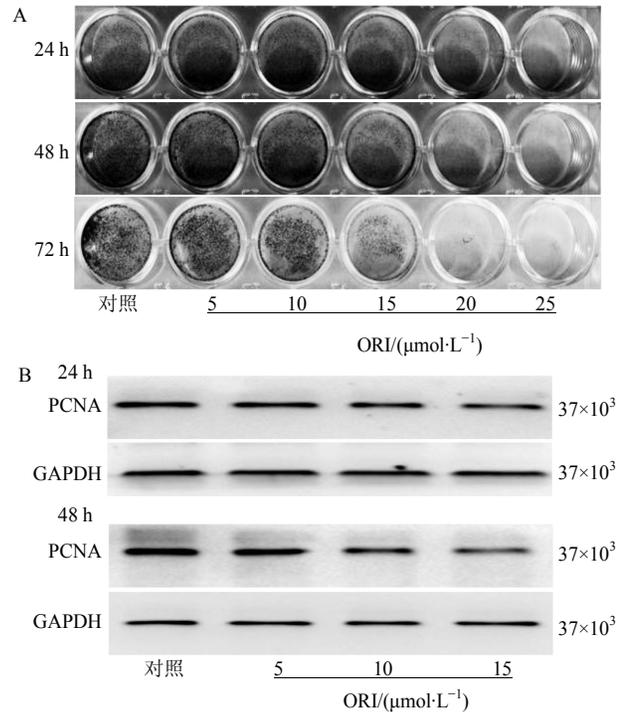


图 1 结晶紫染色 (A) 和 Western blotting 实验 (B) 检测 ORI 的抗增殖作用

Fig. 1 Anti-proliferation effect of ORI were detected by crystal violet dyeing (A) and Western blotting (B)

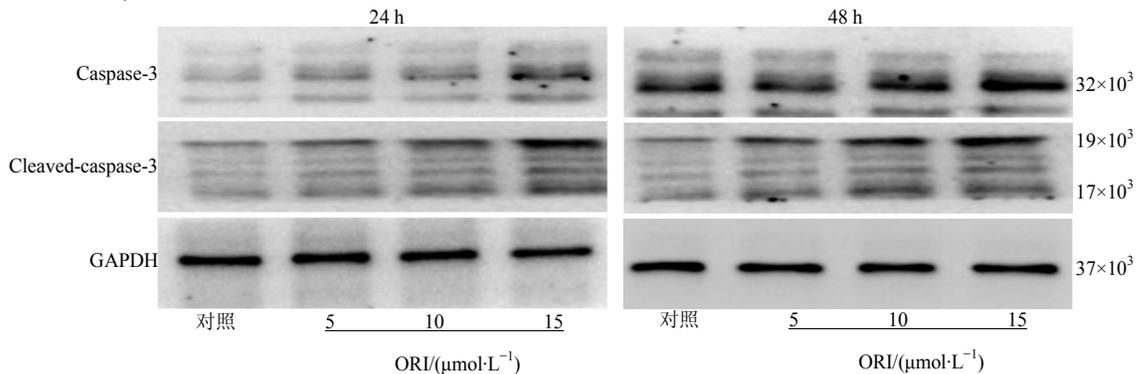


图 2 ORI 诱导凋亡作用

Fig. 2 Apoptosis effect of ORI

3.2 对 HCT116 细胞凋亡蛋白表达的影响

诱导细胞凋亡是大多数抗肿瘤药物的重要特点。Western blotting 结果 (图 2) 显示, ORI 显著增加促凋亡蛋白 Caspase-3 和 Cleaved-caspase-3 表达, 且呈浓度与时间相关性。

3.3 对 HCT116 细胞中 BMP7 表达的影响

Western blotting 和半定量 PCR 结果显示, ORI 明显上调 HCT116 细胞中 BMP7 表达, 且呈浓度与

时间相关性。结果见图 3。

3.4 对 HCT116 细胞中 p38 MAPK 的影响

MAPK 信号通路的异常与结肠癌的发生发展密切相关, 其中 p38 MAPK 对细胞增殖具有重要调控作用。Western blotting 结果 (图 4) 显示, ORI 对总的、磷酸化的 Smad1/5/8 蛋白水平无明显影响, 但能明显促进 p-p38 MAPK 的表达, 呈浓度与时间相关性。

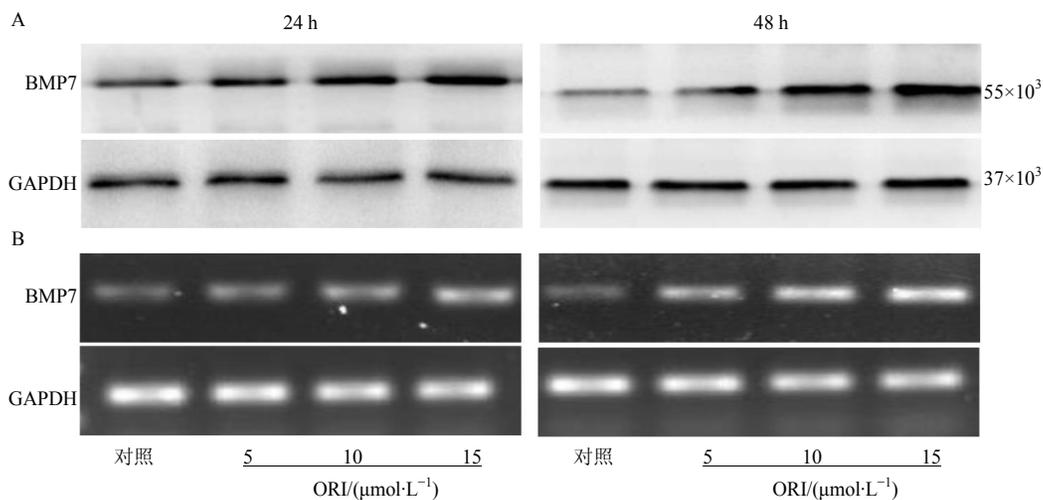


图 3 BMP7 蛋白 (A)、RNA (B) 水平的变化

Fig. 3 Level change of BMP7 protein (A) and RNA (B)

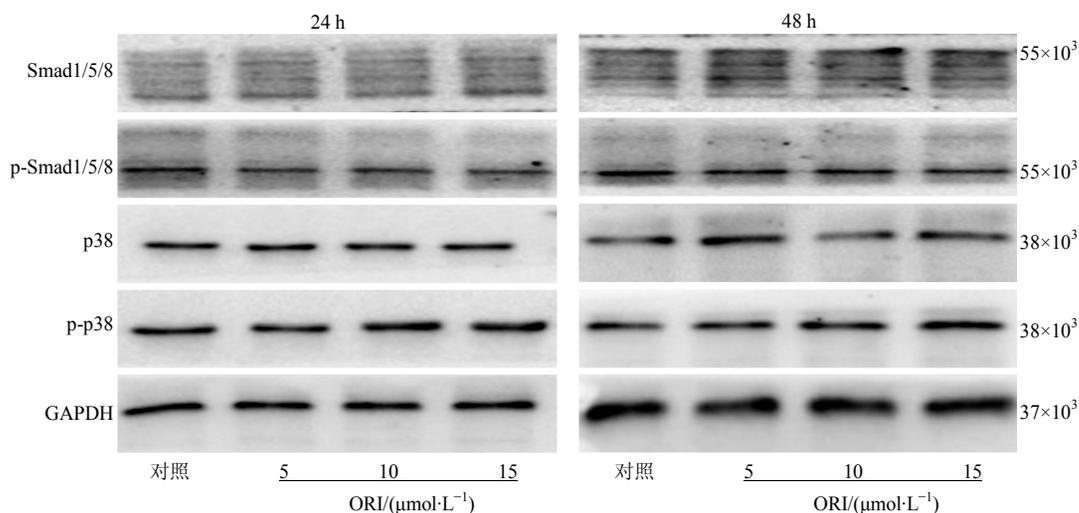


图 4 p38 MAPK 信号通路的变化

Fig. 4 p38 MAPK signal pathway

3.5 过表达 BMP7 与 BMP7 抗体对增殖凋亡、p38 MAPK 信号通路的影响

Western blotting 结果显示, 加入外源性 BMP7 腺病毒增强了 ORI 诱导的增殖抑制和促凋亡作用,

明显上调了 Caspase-3、Cleaved caspase-3 和 p-p38 表达, 下调了 PCNA 蛋白表达。加入 anti-BMP7, 明显翻转了 ORI 所诱导的上述作用。结果提示, ORI 可能是通过 BMP7 调控细胞的增殖凋亡。结果见图 5。

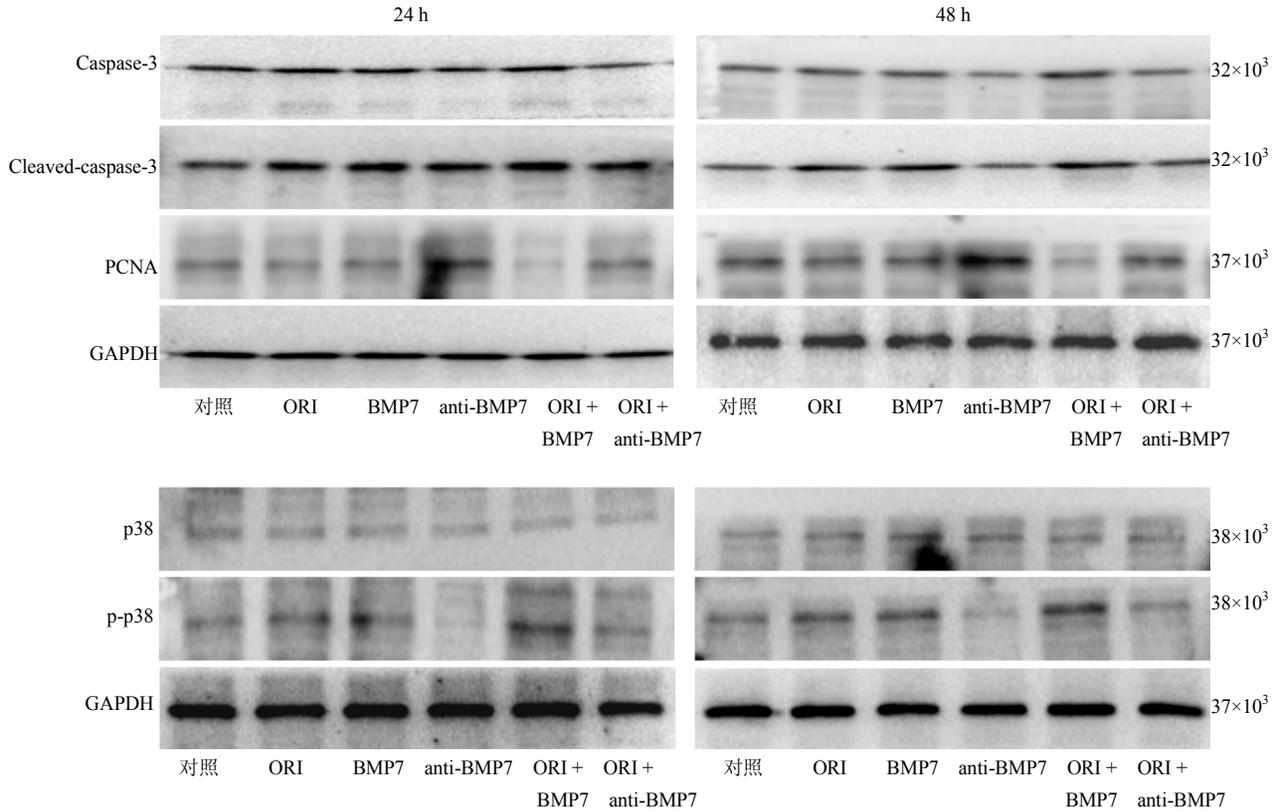


图 5 caspase-3、cleaved caspase-3、PCNA、p38 和 p-p38 蛋白水平变化
 Fig. 5 Level change of caspase-3, cleaved caspase-3, PCNA, p38 and p-p38 protein

4 讨论

结肠癌是临床上常见的一种消化系统恶性肿瘤，其发病率和死亡率仅次于肝癌、肺癌和胃癌，全球每年有近 50 万患者死于结肠癌^[9]。虽然医疗工作者已在结肠癌治疗方面取得了可观的成绩，但其不理想的预后效果以及化疗带来的不良反应仍是治疗的巨大阻碍，开发疗效佳且毒性低的抗肿瘤药物十分迫切。目前，天然药物在肿瘤治疗过程中逐渐受到重视，越来越多的天然药物中的单体化合物被证实具有较好的抗肿瘤活性（如紫杉醇等）^[10-11]。因此，医药研究者试图从天然药物中寻找抗肿瘤新靶点，明确信号转导机制，推动肿瘤治疗和天然药物的发展进程。从传统中药冬凌草的根、叶中提取的 ORI，已被证明具有较好的体外抗肿瘤活性^[12]。本研究发现，ORI 对人结肠癌 HCT116 细胞具有明显的增殖抑制和促凋亡作用，进一步探究发现，其机制可能与 p38 MAPK 活化相关。

虽然结肠癌的具体发病机制错综复杂，尚难明确，但研究表明，大部分结肠癌的发病与遗传因素无关^[13]。文献报道，结肠癌的发生发展可能与细胞内多种信号通路的异常或基因突变、缺失等有关。

如 Wnt/ β -catenin、BMP/Smad、TGF- β 信号通路异常传导，PTEN、RAF 的突变以及 p53 基因的缺失等^[14]。此外，MAPK 家族蛋白在细胞的生命进程中占据着重要地位，目前已鉴定出 4 条 MAPK 途径：p38 MAPK、细胞外信号调节激酶通路（ERK1）、细胞外信号调节激酶 5 通路（ERK5）和 c-Jun 氨基末端激酶通路（JNK）^[15]。其中主要的信号传导途径是 p38 MAPK。细胞内 p38 MAPK 可被多种外界因子激活，参与肿瘤细胞的生长、分化、凋亡和侵袭等过程^[16-17]。

BMPs, TGF- β 超家族成员之一，能够调节肿瘤的发生发展。BMP 信号通路异常参与结肠癌的发病。研究指出，BMP7 除具有显著的成骨活性，还通过 p38 MAPK 途径影响肿瘤细胞的增殖凋亡^[18]。

本研究通过结晶紫定量实验筛选出了药物作用的浓度，并选择其中 3 个浓度（10、15、20 μ mol/L）进行后续实验。采用 Western blotting 方法检测了增殖相关指标（PCNA）、凋亡相关指标（Caspase-3 和 Cleaved-caspase-3）的变化，结果显示，ORI 能够有效抑制肿瘤细胞的增殖并促进其凋亡。接下来，通过 Western blotting 与半定量 PCR 筛选出了 BMP7

这个有效靶点。但结果显示, ORI 并不是通过经典的 BMP/Smad 信号通路发挥作用, 而是通过 p38 MAPK 信号通路发挥作用的。为了证明这一作用通路, 我们通过 AdBMP7/anti-BMP7 联合 ORI 进行验证。结果显示, 加入 AdBMP7 能够增强 ORI 的作用, 上调 Caspase-3、Cleaved-caspase-3、BMP7 与 p-p38 表达; anti-BMP7 则部分减弱了 ORI 的作用。这说明细胞经过 ORI 处理后, p38 MAPK 信号通路激活, p38 磷酸化的水平上调, 进而抑制了结肠癌细胞 HCT116 增殖。

本研究表明, ORI 通过 BMP7 激活 p38 MAPK 信号通路, 进而调控肿瘤细胞的增殖凋亡, 发挥抑癌作用。本研究为结肠癌的预防以及临床治疗提供了新的研究方向和理论依据。

参考文献

- [1] Lambert R. Laterally spreading tumors in the colon and rectum [J]. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 24(10): 1123-1134.
- [2] Owona B A. Molecular insight in the multifunctional effects of oridonin [J]. *Drugs R D*, 2015, 15(3): 233-244.
- [3] 俞文英, 马建琦, 方杰, 等. 冬凌草甲素聚乙二醇功能化氧化石墨烯纳米粒的制备及抗结肠癌实验研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(19): 3954-3960.
- [4] 王汉楚, 沙丽晓, 陈小燕, 等. 冬凌草甲素对卵巢癌细胞紫杉醇耐药性的拮抗作用及其机制研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(3): 534-539.
- [5] Liu Y Q, Mu Z Q, You S, et al. Fas/FasL signaling allows extracellular - signal regulated kinase to regulate cytochrome c release in oridonin-induced apoptotic U937 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(9): 1873-1879.
- [6] Hsieh T C, Wijeratne E K, Liang J Y, et al. Differential control of growth, cell cycle progression, and expression of NF-kappa B in human breast cancer cells MCF-7, MCF-10A, and MDA-MB-231 by ponocidin and oridonin, diterpenoids from the Chinese herb *Rabdosia rubescens* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337(1): 224-231.
- [7] Zhu Y, Xie L, Chen G, et al. Effects of oridonin on proliferation of HT29 human colon carcinoma cell lines both *in vitro* and *in vivo* in mice [J]. *Pharmazie*, 2007, 62(6): 439-444.
- [8] Liu Y Z, Wu K, Huang J, et al. The PTEN/PI3K/Akt and Wnt/ β -catenin signaling pathways are involved in the inhibitory effect of resveratrol on human colon cancer cell proliferation [J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(1): 104-112.
- [9] Merika E, Saif M W, Katz A, et al. Review Colon cancer vaccines: an update [J]. *In Vivo*, 2010, 24(5): 607-628.
- [10] Wu K, Yang Q, Mu Y, et al. Berberine inhibits the proliferation of colon cancer cells by inactivating Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 292-298.
- [11] He B C, Gao J L, Luo X, et al. Ginsenoside Rg3 inhibits colorectal tumor growth through the down-regulation of Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Int J Oncol*, 2011, 38(2): 437-445.
- [12] Washington M K, Powell A E, Sullivan R, et al. Pathology of rodent models of intestinal cancer: progress report and recommendations [J]. *Gastroenterology*, 2013, 144(4): 705-717.
- [13] Watson A J. Colon cancer: a civilization disorder [J]. *Dig Dis*, 2011, 29(2): 222-228.
- [14] Yoon H H, Shi Q, Alberts S R, et al. Racial differences in BRAF/KRAS mutation rates and survival in stage III colon cancer patients [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 107(10). Doi: 10.1093/jnci/djv186. Print 2015 Oct.
- [15] Cowan K J. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress [J]. *J Exp Biol*, 2003, 206(7): 1107-1115.
- [16] 李爽, 刘丽丽, 夏天, 等. 益气消癥法方含药血清干预 EA. hy926 细胞 MAPK 信号转导通路 ERK1/2 表达的研究 [J]. *药物评价研究*, 2016, 39(5): 763-767.
- [17] 孙胜男, 邹翔, 高鹏, 等. 莱菔硫烷诱导人肝癌 HepG-2 细胞凋亡的 p38 MAPK 途径研究 [J]. *药物评价研究*, 2009, 32(1): 29-33.
- [18] Guan J, Li H, Lv T, et al. Bone morphogenic protein-7 contributes to cerebral ischemic preconditioning induced-ischemic tolerance by activating p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway [J]. *Inflammation*, 2014, 37(4): 1289-1296.