

【药效学评价】

固公果根提取物促进结肠癌细胞凋亡的机制研究

杨 静^{1,2}, 高纳影², 赵艳敏^{1,2}, 李 覃², 刘岱琳^{2*}

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 中国人民武装警察部队后勤学院 卫生勤务系军事药学教研室, 天津 300309

摘要: 目的 探讨固公果根提取物促进结肠癌细胞凋亡及机制研究。方法 分别采用MTT法、DAPI染色及流式细胞术检测固公果根提取物对结肠癌细胞增殖活性及细胞凋亡的影响; 蛋白免疫印迹(Western-Blot)法检测凋亡相关蛋白的活性表达水平。结果 固公果根提取物能显著抑制结肠癌SW620和LOVO细胞增殖, 促进两种结肠癌细胞凋亡, 上调凋亡相关基因Keap-1、Bax的蛋白表达, 下调Nrf2、HO-1以及Bcl2蛋白的表达。结论 固公果根提取物能显著抑制人结肠癌细胞SW620和LOVO增殖、诱导细胞凋亡, 其作用机制可能涉及调控凋亡相关基因Bax、Bcl-2表达, 且与激活Nrf2氧化应激通路有关。

关键词: 结肠癌细胞; 固公果根提取物; 细胞凋亡; 凋亡蛋白; 氧化应激

中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)09-1757-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.09.008

Mechanisms of extracts of roots of *Rose odorata* sweet var. *gigantea* on colon cancer cells via promoting apoptosis

YANG Jing^{1,2}, GAO Naying², ZHAO Yanmin^{1,2}, LI Tan², LIU Dailin²

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Department of Military Pharmacy, Logistics University of People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

Abstract: Objective To investigate effects and mechanism of the extract of roots of *Rose odorata* sweet var. *gigantea* (ROE) on apoptosis of colon cancer cells. **Methods** MTT assay, DAPI staining, and flow cytometry were used to detect the effects of ROE extracts on proliferation and apoptosis of colon cancer cells. The protein expression was detected by Western Blotting. **Results** ROE extracts could significantly inhibit the growth of SW620 and LOVO cells and promote it apoptosis. ROE extracts could also up-regulate the expression of Keap-1 and Bax protein, and down-regulate the expression of Nrf2, HO-1 and Bcl2 protein. **Conclusion** ROE extracts can significantly inhibit the proliferation and induce apoptosis of human colon cancer cells SW620 and LOVO, which mechanisms might be involved in regulating the expression of apoptosis-related genes Bax and Bcl-2 and activating Nrf2 oxidative stress pathway.

Key words: colon cancer cells; extract of roots of *Rose odorata* sweet var. *gigantea* (ROE); apoptosis; apoptotic protein; oxidative stress

结肠癌(colorectal cancer, CRC)是常见的消化系统恶性肿瘤,其死亡率约8.5%,仅次于肝癌、肺癌和胃癌,全球每年约有50万患者因结肠癌而死亡^[1]。目前治疗结肠癌常用的药物有抗代谢药、植物类药、烷化剂、铂类、抗肿瘤抗生素类、表皮生长因子受体抑制剂和血管内皮生长因子抑制剂等^[2],通常情况下这些药物都有较大的毒副作用,且易出

现耐药性,因此寻求副作用小、价格低廉、治疗效果好的抗结肠癌药物是目前治疗结肠癌的重要任务。天然药物具有多成分、多靶点的优势,其抗肿瘤研究已成为临床抗肿瘤药物研究的热点^[3-4]。如人参中的人参皂苷Rh₂可以诱导结肠癌细胞SW480凋亡^[5],杜仲叶提取物中的绿原酸能够显著抑制结肠癌细胞HCT-116、LOVO的增殖,促进结肠癌细胞的

收稿日期: 2019-03-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81673693)

第一作者: 杨 静(1993—),女,硕士研究生。E-mail: m17320039636@163.com

*通信作者: 刘岱琳(1973—),女,教授,硕士生导师,研究方向为中药活性成分研究。E-mail: dailinlch@163.com

凋亡^[6]。固公果根是彝族民间常用药物,来源于蔷薇科蔷薇属植物大花香水月季 *Rose odorata sweet var. gigantea* (Coll. et Hemsl.) Rehd. et Wils, 为中成药“肠舒片”的主要原料之一,用于治疗大肠湿热蕴结所致的痢疾、肠炎等肠道疾病已有悠久历史^[7],但固公果根提取物对人结肠癌细胞的影响及作用机制尚未完全阐明。本实验选用结肠癌细胞 SW620 和 LOVO 研究固公果根提取物对结肠癌细胞的影响及其作用机制,为固公果根提取物用于预防和临床治疗提供相应的实验基础。

1 材料

1.1 实验细胞

人结肠癌细胞系 SW620、LOVO 购自天津百倍生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

固公果根提取物(ROE,批号 20150525),实验室自制(用高速万能粉碎机粉碎干燥的固公果根,粉碎后剪切成 2 cm 见方的小块。准确称取粉碎后的固公果根 5 kg,用 6 倍体积分数为 60% 的乙醇水溶液回流提取 2 h,提取 2 次。过滤后合并提取液即得固公果根提取物);五氟尿嘧啶(5-FU,质量分数 99.6%)购自上海紫一试剂厂。RPMI1640 培养基购自美国 Gibco 公司;胰蛋白酶购自北京索莱宝科技有限公司;胎牛血清(FBS)购自江苏恩莫阿赛生物技术有限公司;Bcl-2 抗体购自美国 Affinity 公司;Bax 抗体购自美国 Affinity 公司;Keap1 抗体购自美国 Cell signaling 公司;Nrf2 抗体购自美国 Cell signaling 公司;HO-1 抗体购自美国 Cell signaling 公司;FITC Annexin V 凋亡试剂盒购自美国 BD 公司。

1.3 仪器

FW100 高速万能粉碎机(中国天津泰斯特仪器有限公司);MYB 型调温电热套(中国天津中环实验电炉有限公司);SHB-111 循环水式多用真空泵(中国郑州长城科工贸有限公司);FA1204B 电子天平(中国上海精密科学仪器有限公司);22331 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司);Western-Blot 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Infinite F50 波长酶标仪(德国 Tecan 公司);TS100 倒置光学显微镜(日本 Nikon 公司)。

2 方法

2.1 MTT 法检测细胞活性

SW620、LOVO 细胞置于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中常规培养。将处于对数生长期的细胞以 1×10^4 /孔接种

于 96 孔板中培养 24 h。将细胞分为正常组,固公果根提取物 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL 组,以及 5-Fu 组。加药后继续培养 24 h 后,每孔加入 20 μ L MTT 溶液,置培养箱中继续培养 4 h 后,每孔加入 150 μ L DMSO 溶液,避光震荡 10 min,酶标仪在 490 nm 波长处检测吸光度。

2.2 DAPI 染色法观察细胞损伤

将 SW620、LOVO 细胞以 4×10^5 个/孔接种于 6 孔板培养 24 h,分组给药,药物处理 24 h,用甲醇固定,PBS 洗涤 3 次,每孔加入 1 mL DAPI 工作液避光反应 10 min,通过荧光显微镜观察细胞核形态变化。

2.3 流式细胞术检测细胞凋亡

将未处理及药物处理的两种结肠癌细胞收集到试管(细胞数 1×10^5 /mL),1 200 r/min 离心 10 min 弃上清,用 PBS 漂洗两遍,按 FITC Annexin-V 凋亡检测试剂盒说明书操作,依次加入 PI 和 FITC 试剂,室温避光放置 30 min,用流式细胞仪在激发波长 488 nm 下测定凋亡率(Apoptotic rate centage, AP),采用 Summit5.2 软件对结果进行分析。

2.4 Western-Blot 检测蛋白表达

收集各组细胞,用预冷 PBS 洗涤 2 次,加入蛋白裂解液 100 μ L,利用 BCA 蛋白定量试剂盒测定各组蛋白浓度。再按照体积比 1:4 加入上样缓冲液混匀,煮沸后置于 -20 °C 保存备用。采用 SDS-PAGE 凝胶电泳,转膜,用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液室温封闭 1.5 h,化学发光法检测,拍照,收集照片,利用 ImageJ 软件进行灰度分析。

2.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,各组数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

3 结果

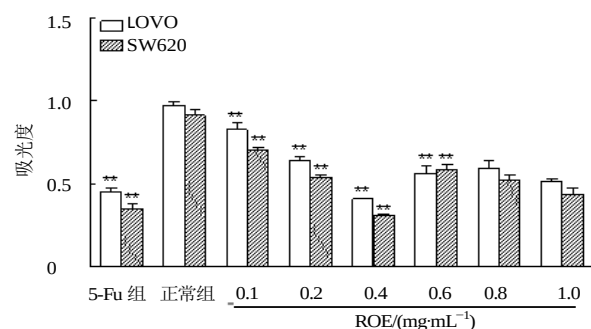
3.1 固公果根提取物对结肠癌细胞增殖活性的影响

固公果根提取物处理 SW620、LOVO 细胞 24 h 后,药物质量浓度在 0.1~0.4 mg/mL 均能显著抑制 SW620、LOVO 细胞的增殖,且随着给药浓度的增加,固公果根提取物对 SW620、LOVO 细胞增殖抑制作用明显增强($P < 0.01$),结果见图 1。

3.2 固公果根提取物对结肠癌细胞核损伤的影响

如图 2、3 所示,正常培养的 SW620、LOVO 细胞数量多且细胞核圆润、着色均匀,加药组的细胞损伤死亡较多,细胞中细胞核有裂解碎片出现;与正常培养的细胞比较,细胞死亡情况随着固公果根提

取物剂量的增加而升高($P < 0.01$)。



与正常组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group

图1 不同浓度固公果根提取物对LOVO、SW620细胞增殖活性的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig.1 Effects of different concentrations of extracts from ROE on the proliferation of LOVO and SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 固公果根提取物对结肠癌细胞凋亡的影响

结果如图4、5所示,通过流式细胞术测定固公果根提取物对结肠癌细胞凋亡的影响,结果表明,随着药物浓度的增加,LOVO、SW620细胞的细胞凋

亡率(含早期凋亡与晚期凋亡细胞)不断增加,且存在剂量相关性。说明固公果根提取物有促进结肠癌细胞凋亡的作用。

3.4 固公果根提取物对结肠癌细胞 Keap1、Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响

Bcl-2 蛋白家族的功能可分为抑制凋亡作用和促进凋亡作用两大类,Bax 蛋白属于促凋亡蛋白,Bcl-2 蛋白属于抑制凋亡蛋白。此外有研究表明,结肠癌细胞的凋亡过程伴随着氧化应激反应,因此测定了结肠癌细胞中氧化应激通路的相关蛋白和凋亡蛋白的表达,Western Blot 检测结果显示(图6、7),固公果根提取物干预后促凋亡蛋白 Bax 表达增加,抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达呈现显著性降低,同时氧化应激相关蛋白 Nrf2、HO-1 表达下降,Keap-1 的表达显著升高,说明固公果根提取物可以促进结肠癌细胞的凋亡,且伴随着氧化应激的改变。两种结肠癌细胞系 LOVO 与 SW620 的检测结果一致,都证实了同样的结果。

4 讨论

细胞凋亡是细胞的生物学行为。细胞凋亡信号通路是由多基因共同参与的复杂过程。普遍认

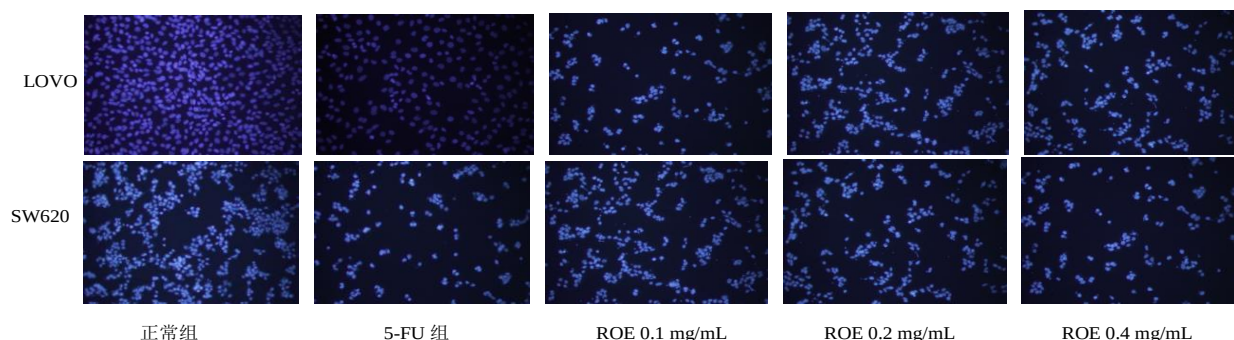
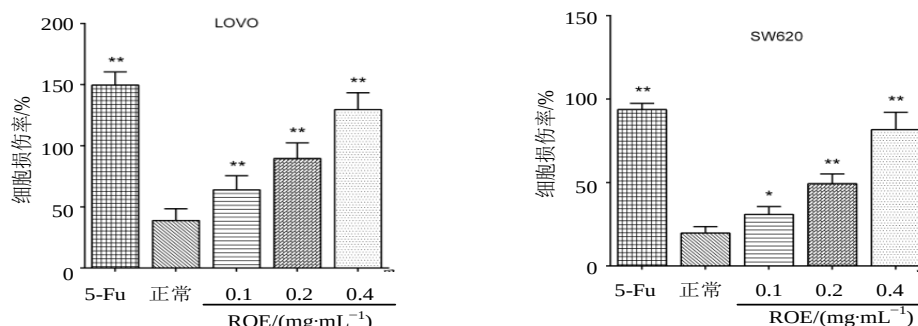


图2 LOVO和SW620结肠癌细胞的DAPI染色

Fig. 2 DAPI staining of LOVO and SW620 cells



与正常组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs normal group

图3 固公果根提取物对LOVO和SW620结肠癌细胞影响

Fig. 3 Effects of ROE on LOVO and SW620 colon cancer cells

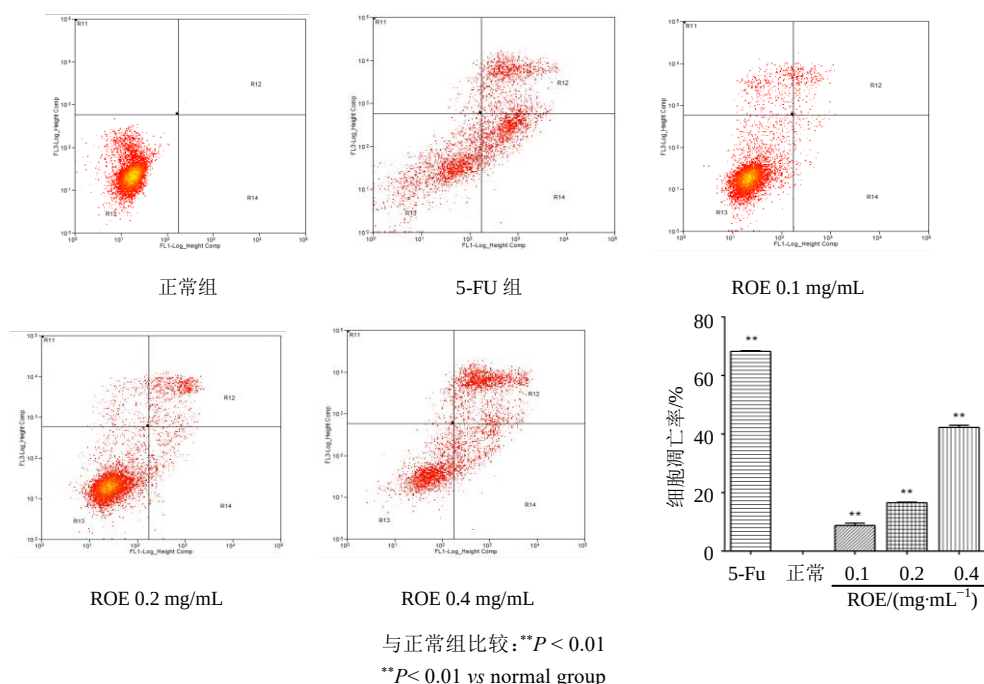


图4 固公果根提取物对LOVO结肠癌细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effects of ROE on the apoptosis of LOVO colon cancer cells

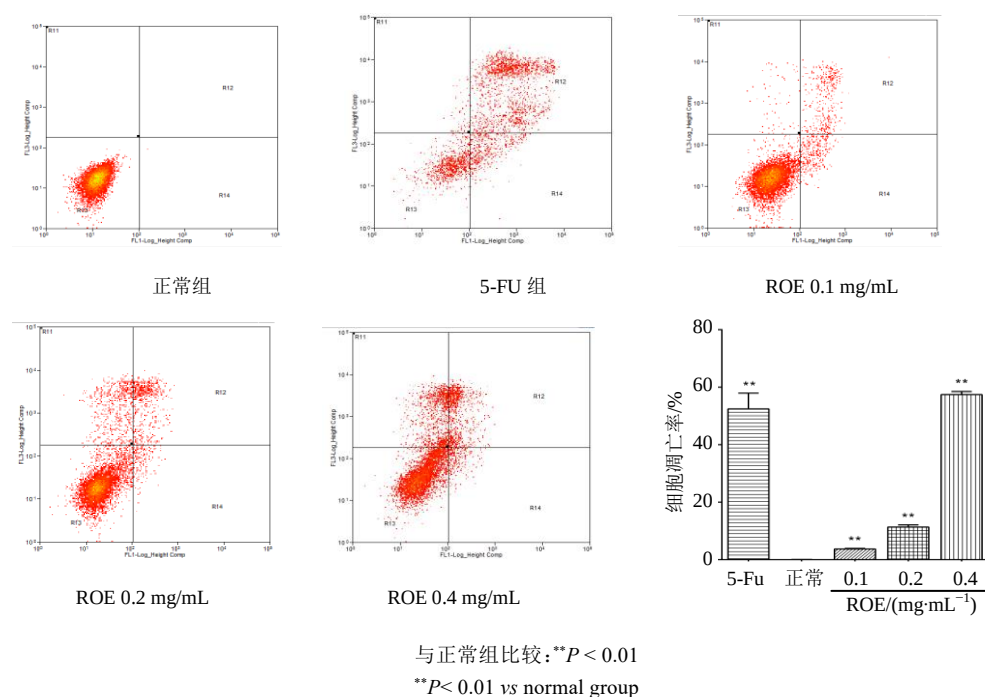


图5 固公果根提取物促进SW620结肠癌细胞凋亡

Fig. 5 Effects of ROE on apoptosis of SW620 colon cancer cells

为, Bcl-2/Bax 的比值对决定细胞是否进入凋亡状态有重要意义^[8]。Bax 在线粒体诱发凋亡中起着重要作用, 在胞浆中通常处于被抑制状态, 当细胞受到凋亡信号的刺激之后, Bax 的构象发生变化, 并转到线粒体表面发生聚合进而形成孔道, 使线粒体内的促凋亡因子和细胞色素 C 释放入细胞质引发凋

亡^[9]; 抑制凋亡蛋白 Bcl-2 能拮抗 Bax 基因的促凋亡作用, 抑制细胞色素 C 从线粒体释放至胞浆, 改变核内的氧化还原反应, 从而抑制细胞凋亡^[10]。

目前大多数化疗药物可通过激发肿瘤细胞自身的“自杀程序”杀死肿瘤细胞, 许多中药提取物也能通过凋亡途径抑制肿瘤细胞生长^[11]。本研究结

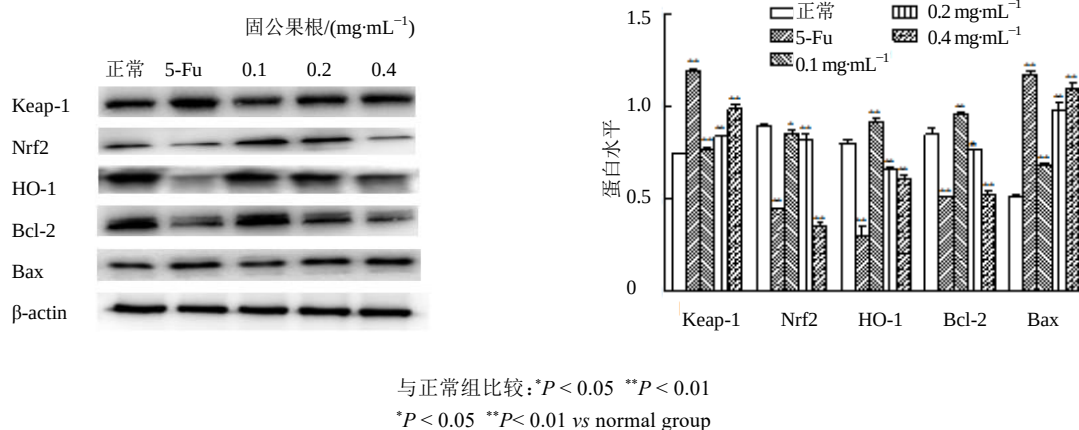


图6 固公果根提取物对 Keap1、Nrf2、HO-1、Bcl-2 和 Bax 蛋白在人结肠癌细胞 LOVO 中表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of ROE on Keap1, Nrf2, HO-1, Bcl-2, and Bax protein expression in LOVO cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

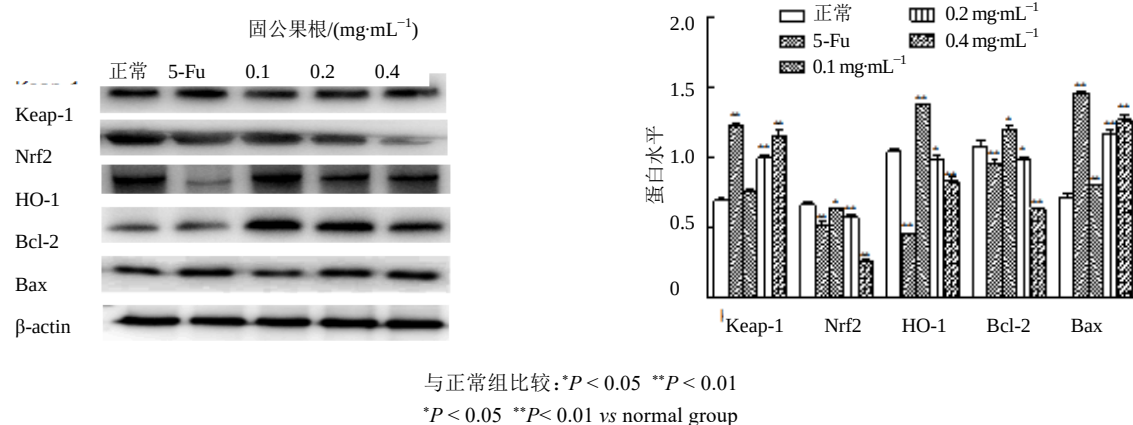


图7 固公果根提取物对 Keap1、Nrf2、HO-1、Bcl-2、Bax 蛋白在人结肠癌细胞 SW620 中表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of ROE on Keap1, Nrf2, HO-1, Bcl-2, and Bax protein expression in SW620 cell($\bar{x} \pm s, n=3$)

果显示,随着固公果根提取物给药组剂量的增加,促凋亡蛋白 Bax 表达增加,抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达呈现显著性降低的趋势,Bcl-2/Bax 的比值不断降低,说明固公果根提取物诱导结肠癌细胞凋亡与调节 Bcl-2 家族相关基因的表达相关。

此外,有研究表明,细胞凋亡可由多种机制引发,包括内源性信号通路,如氧化应激^[12]。结肠癌细胞的凋亡与氧化应激反应关系密切^[13],结肠癌的发生和转移与 Nrf2 的过表达有关^[14]。以往研究更多将 Nrf2 视为调节细胞氧化应激的关键因子,抑制炎症和损伤中的氧化应激反应。近年研究发现 Nrf2 基因的激活可能与促进癌变的发生有关^[15]。同时,Nrf2 参与着肿瘤的发生与发展,其在肿瘤细胞中的高表达同时也增强了癌细胞组织对放化疗的抵抗性^[14]。文献报道,叶黄素可通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路抑制人结肠癌 HT29 细胞的增殖^[16]。本研究结果显示,固公果根提取物能够通过抑制

Keap-1/Nrf2/HO-1 通路对 LOVO 和 SW620 细胞发挥促凋亡作用。

利用 HPLC 分析固公果根提取物中的主要成分,并与对照品对照可以确定其中的 9 个主要的酚酸类成分,主要是儿茶素及其衍生物和二聚体,包括没食子酸、原花青素 B3、EGC、儿茶素、表儿茶素、GCG、(-)-fisetinidol-(4 α , 8)-(-)-catechin、(4 β , 8)-(-)-fisetinidol-(-)-epicatechins、(+)-guibourtinidol-(4 β , 8)-epicatechins 等。儿茶素、原花青素等酚酸类成分都是公认的抗氧化活性物质,具有较强的清除体内自由基活性作用,而本文研究的 Nrf2 视为调节细胞氧化应激的关键因子,因此研究结果确定的固公果根提取物能够通过抑制 Keap-1/Nrf2/HO-1 通路对 LOVO 和 SW620 细胞发挥促凋亡作用,就有可能是由于固公果根提取物中含有的酚酸类成分发挥抗氧化作用,启动氧化应激通路从而发挥药效。不过,本研究主要采用体外实验,关

于固公果根提取物对结肠癌的影响和机制尚需体内实验进行更深入的研究。

综上所述,本研究结果表明,固公果根提取物能够明显抑制结肠癌细胞 LOVO 和 SW620 的增殖作用,并能有效诱导细胞凋亡,其作用机制涉及调节促凋亡蛋白 Bax 与抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达,以及调节细胞氧化应激通路。本研究结果为彝族药物固公果根用于临床治疗结肠癌提供理论和实验基础。

参考文献

- [1] 陈前昭, 曾于桦, 邵英, 等. 白藜芦醇抑制人结肠癌细胞增殖与 p38 MAPK 的关系研究 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(8): 1110-1114.
- [2] 张程程. 多不饱和脂肪酸影响结肠癌发生发展的生物学作用机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- [3] 代珍, 郑荣寿, 邹小农, 等. 中国结直肠癌发病趋势分析和预测 [J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(7): 598-603.
- [4] 赵琛, 苏光悦, 赵余庆. 人参皂苷及其衍生物抗结肠癌作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2015, 46(16): 2477-2483.
- [5] 石雪萍, 李静, 冉建华, 等. 人参皂苷 Rh2 调控 PI₃K/AKT/GSK-3 β 信号通路诱导人结肠癌细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2017, 33(1): 114-119.
- [6] 张胜, 李湘洲, 刘子雷, 等. 杜仲叶活性成分对结肠癌细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 中华中医药学刊, 2018, 36(2): 284-287.
- [7] 安瑛. 固公果根提取物对动物实验性肠炎的保护作用研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2015.
- [8] 杨连君. bcl-2, bax 与肿瘤细胞凋亡 [J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2003, 10(3): 232-234.
- [9] 娄诤, 陆仲夏, 俞雅蓉, 等. 迷迭香酸对人结肠癌 HCT-8 细胞增殖和凋亡的影响及分子机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(13): 3051-3055.
- [10] 巩秀珍, 刘炜. bcl-2 与 bax 基因在结肠癌发生中的作用 [J]. 齐鲁医学杂志, 2002, 17(4): 367-368, 370.
- [11] 马建秀, 汤小玲, 马艳庆, 等. 苦参碱联合奥沙利铂对人结肠癌 SW620 细胞增殖、凋亡及 p53 蛋白表达的影响 [J]. 保健医学研究与实践, 2018, 15(1): 49-54, 70.
- [12] Liang J, Cao R X, Wang X J, et al. Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2 [J]. Cell Res, 2017, 27(3): 329-351.
- [13] Gomez S L, O'Malley C D, Stroup A, et al. Longitudinal, population-based study of racial/ethnic differences in colorectal cancer survival: impact of neighborhood socioeconomic status, treatment and comorbidity [J]. BMC Cancer, 2007, 7: 193.
- [14] Evans J P, Winiarski B K, Sutton P A, et al. The Nrf2 inhibitor brusatol is a potent antitumour agent in an orthotopic mouse model of colorectal cancer [J]. Oncotarget, 2018, 9(43): 27104-27116.
- [15] 刘进生, 黄良祥, 李建党, 等. miR-140-5p 调控 Nrf2 影响结肠癌细胞 5-FU 耐药性 [J]. 中国癌症防治杂志, 2018, 10(3): 193-198.
- [16] 刘志方. 叶黄素基于 Nrf-2/ARE 信号途径对人结肠癌 HT29 细胞增殖抑制作用的研究 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016.