

冬凌草甲素抑制SW620结肠癌细胞增殖与BMP7-p53通路的相关性研究

马妍^{1,2}, 刘荣兴^{1,2}, 朱茄慧^{1,2}, 王涵^{1,2}, 廖云鹏^{1,2}, 任文艳^{1,2}, 周林云^{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

摘要: 目的 研究冬凌草甲素(ORI)对人结肠癌细胞SW620的增殖抑制、诱导凋亡作用,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SW620细胞的增殖抑制作用;流式细胞术研究ORI(10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)诱导SW620细胞凋亡作用;采用Western blotting技术研究ORI对SW620细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)、凋亡相关指标(Caspase-3)、骨形态发生蛋白7(BMP7)、p53蛋白表达的影响;转染重组p53腺病毒实现p53的外源性过表达,p53抑制剂PFT α 降低BMP7水平,检测ORI是否通过调节p53表达影响细胞增殖凋亡、BMP7-p53信号通路。结果 与对照组比较,ORI可以时间和剂量依赖性抑制SW620细胞生长,上调PCNA蛋白水平;流式细胞术以及Western blotting检测结果显示,ORI明显增加细胞凋亡率,促进Caspase-3蛋白表达,并且上调BMP7和p53蛋白表达;外源性过表达p53加强了ORI对上述蛋白表达的调控,PFT α 则部分抑制了ORI的作用。结论 ORI可以通过激活BMP7-p53信号通路抑制SW620细胞增殖、诱导凋亡。

关键词: 冬凌草甲素;人结肠癌细胞;抑制增殖;凋亡;p53;BMP7

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2018)10-1770-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.10.004

Relationship between anti-proliferation effect of Oridonin on SW620 cells and BMP7-p53 pathway

MA Yan^{1,2}, LIU Rongxing^{1,2}, ZHU Jiahui^{1,2}, WANG Han^{1,2}, LIAO Yunpeng^{1,2}, REN Wenyan^{1,2}, ZHOU Linyun^{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

Abstract: Objective To investigate the proliferation inhibitory and apoptosis-inducing effects of oridonin (ORI) on human colon cancer SW620 cells and its possible mechanisms. **Methods** Crystal violet staining and flow cytometry assay were introduced to analyze the proliferation inhibition and induction apoptosis of ORI on SW620 cells. Western blotting assay were used to detect the effects of ORI on the expression of PCNA, Caspase-3, BMP7, and p53 of SW620 cells; The exogenous overexpression of p53 was achieved by transfecting recombinant adenovirus, and its inhibitor (PFT α) reduced the level of BMP7 with aim to detect the influence of ORI on the BMP7-p53 pathway. **Results** ORI (5, 10, 15, 20, and 25 $\mu\text{mol/L}$) could inhibit the proliferation of SW620 cells in a time and concentration dependent manner and upregulate the protein level of PCNA; Flow cytometry and Western blotting results showed that ORI induced apoptosis of SW620 cells significantly and upregulated the expression of BMP7, Caspase-3, and p53. The exogenous overexpression of p53 strengthened the expression regulation of above proteins, While p53 inhibitor (PFT α) reduced growth inhibition rate and apoptosis rate induced by ORI in SW620 cells and downregulated the level of BMP7 and p53. **Conclusion** ORI can induce apoptosis of SW620 cells via BMP7-p53 signal pathway.

Key words: oridonin; human colon cancer cells; anti-proliferation; apoptosis; p53; BMP7

收稿日期: 2018-03-04

基金项目: 重庆市渝中区科委课题(20150120)

第一作者: 马妍(1994—),女(回族),硕士生,研究方向为肿瘤与免疫药理学。Tel: 17723081448 E-mail: 986956760@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: 1115494605@qq.com

冬凌草甲素(Oridonin, ORI), 又名延命草宁, 是传统中药冬凌草全草中提取的主要有效成分, 属于四环二萜类化合物^[1-2]。近年来研究表明, 在体内和体外实验中, ORI均能够抑制多种肿瘤细胞的生长^[3-4], 延长患肿瘤动物的存活时间^[5], 并被认为是最有希望的治疗肿瘤的天然药物之一, 但是其具体的分子机制还不清楚。

结肠癌在胃肠道消化系统肿瘤中排第3位, 严重危害着人类健康。正常生理条件下, 肠道内的各种细胞系与微环境之间是一个相对平衡、不断更新的状态, 一旦这种相互作用被破坏, 就可能增加患癌几率^[6]。结肠癌的发病机制有很多, Wnt信号异常是最普遍的发病因素^[7-8], BMP7-p53信号通路异常也是结肠癌发生的重要原因之一。骨形态发生蛋白7(Bone morphogenetic protein 7, BMP7), 是转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族成员, 可以调节细胞的增殖、分化、迁移和凋亡, BMP7及其下游信号的异常涉及了结肠癌的发生发展。p53作为BMP7的下游信号蛋白, 在DNA损伤诱导细胞凋亡中发挥极其重要的作用^[9]。本研究选用人结肠癌SW620细胞为研究对象, 分析ORI对结肠癌的抑制作用, 探究其可能的作用机制, 筛选有效抑癌靶点, 为ORI的临床应用和开发提供更深一步的理论支持, 为结肠癌的药物治疗提供新思路。

1 材料

1.1 细胞培养

SW620细胞, 购自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC), 细胞用含10%胎牛血清、100 kU/L青霉素和0.1 g/L链霉素的高糖DMEM培养基, 在5% CO₂、37℃环境中培养。

1.2 药物及主要试剂

ORI购自西安昊轩生物科技有限公司, 批号DLCJS-110630, 质量分数98.2%, 用二甲基亚砜溶解并配成浓度为10 μ mol/L的储存液, 分装于1.5 mL的EP管中。

实验所用抗体均购自Santa Cruz Biotechnology公司; GFP-p53腺病毒由美国芝加哥大学何通川教授提供; p53抑制剂PFT α 购于赛力克公司。

1.3 主要仪器

二氧化碳培养箱、低温离心机(Thermo公司); 细胞培养超净台(安泰技术有限公司); 倒置荧光显微镜(Nikon公司); 湿式转膜仪、垂直电泳槽(六一仪器厂); 酶联免疫检测仪、凝胶成像系统(Bio-Rad

公司)。

2 方法

2.1 结晶紫染色

将处于指数生长期的SW620细胞消化、计数铺于24孔板中, 每孔约 5×10^4 个。待细胞贴壁之后, 分为ORI(5、10、15、20、25 μ mol/L)组与对照组, 对照组加入等量DMSO。分别于24、48、72 h后, 弃去上层培养基, 用冷的PBS轻轻洗2次, 每孔加入200 μ L 0.25%的结晶紫溶液, 室温孵育20 min后, 用自来水轻轻冲洗2次。室温放置, 晾干, 扫描。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡

将处于指数生长期的SW620细胞均匀铺于6孔板中, 每孔约 2×10^5 个。待其贴壁后, 加入不同浓度ORI(10、15、20 μ mol/L), 最高浓度多1个复孔, 对照组用相同体积的DMSO进行处理。48 h后分别收集细胞上清液, 先用PBS(4℃)清洗贴壁细胞, 然后用无EDTA的胰酶进行消化, PBS重悬并离心(800 r/min, 5 min $\times$ 3次), 按照试剂盒的操作说明用Annexin-V EGFP和PI处理, 流式细胞仪进行凋亡检测。

2.3 蛋白提取以及Western blotting实验

以每孔约 2×10^5 个细胞将SW620细胞均匀铺于6孔板中, 细胞贴壁后, 加入低、中、高浓度(10、15、20 μ mol/L)的ORI处理, 对照组给予等体积的DMSO。24 h后, 弃去上清液并用PBS洗2次, 每孔约加入200 μ L的裂解液、2 μ L的蛋白酶抑制剂和2 μ L的磷酸酶抑制剂, 冰上充分搅拌至细胞完全裂解, 置1.5 mL中的EP管保存。每孔按照200 μ L: 10 μ L: 50 μ L的比例加入 β -巯基乙醇与5 $\times$ Loading buffer混匀, 沸水煮10 min, -20℃保存。采用10%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 按照常规方法进行Western blotting试验。电泳后将蛋白转印至硝酸纤维素膜(PVDF)上, 采用5%的BSA封闭2 h, 一抗封闭过夜, 二抗封闭1 h, 最后采用ECL试剂盒显影并成像。

2.4 重组p53腺病毒

采用AdEasy质粒重组过表达p53腺病毒。具体步骤为: 用高保真Taq酶将目的基因编码序列以PCR进行扩增并克隆到穿梭质粒中。将穿梭质粒线性化, 与骨架质粒重组。重组完成后转染到HEK-293细胞中进行病毒包装, 得到p53的重组腺病毒, 并用绿色荧光标记, 命名为Adp53。同法构建AdGFP作为空白对照。

用Adp53病毒感染HCT116细胞实现p53的外

源性过表达,并通过外源给予p53抑制剂PFT α 减少p53水平,观察ORI是否通过BMP7-p53调控细胞凋亡。过表达P53实验分为4组:对照(DMSO + AdGFP)组、p53(DMSO + Adp53)组、ORI(20 $\mu\text{mol/L}$ ORI + AdGFP)组、ORI + p53(20 $\mu\text{mol/L}$ ORI + Adp53)组;抑制p53蛋白表达实验共分4组:对照(DMSO)组、PFT α (DMSO + 3 $\mu\text{g/mL}$ PFT α)组、ORI(20 $\mu\text{mol/L}$)组、ORI + PFT α (20 $\mu\text{mol/L}$ ORI + 3 $\mu\text{g/mL}$ PFT α)组。细胞接种及Western blotting实验操作均同“2.4”项,药物作用48 h。

3 结果

3.1 ORI对SW620细胞增殖的影响

结晶紫染色结果(图1A)显示,ORI抑制SW620细胞增殖,呈明显的浓度与时间相关性。Western blotting结果(图1B)显示,ORI明显升高SW620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。结果提示,ORI能够抑制SW620细胞的增殖。

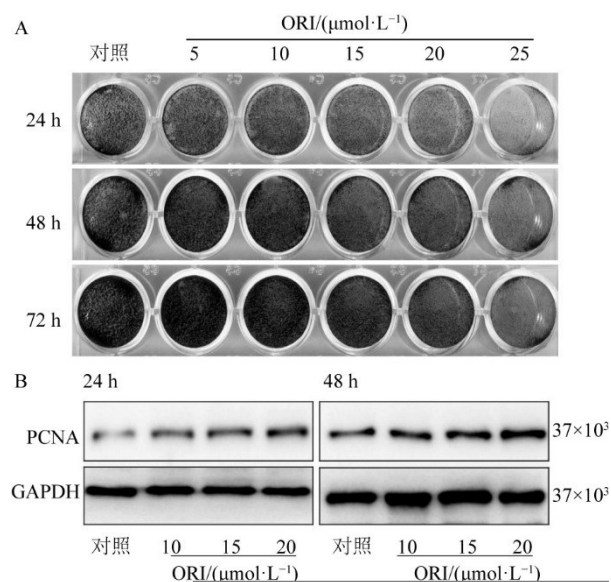
3.2 ORI对SW620细胞凋亡的影响

Western blotting结果显示,经ORI处理后,细胞中凋亡蛋白caspase-3的表达显著增加,且与药物浓度呈正相关,且随时间延长,48 h时caspase-3的增加水平比24 h有所提高,结果见图2A。流式细胞术凋亡检测显示,ORI组凋亡细胞比例明显较对照组上升,且随ORI浓度升高而升高(图2B)。结果提

示,ORI促进了SW620细胞的凋亡。

3.3 ORI上调BMP7与p53的表达

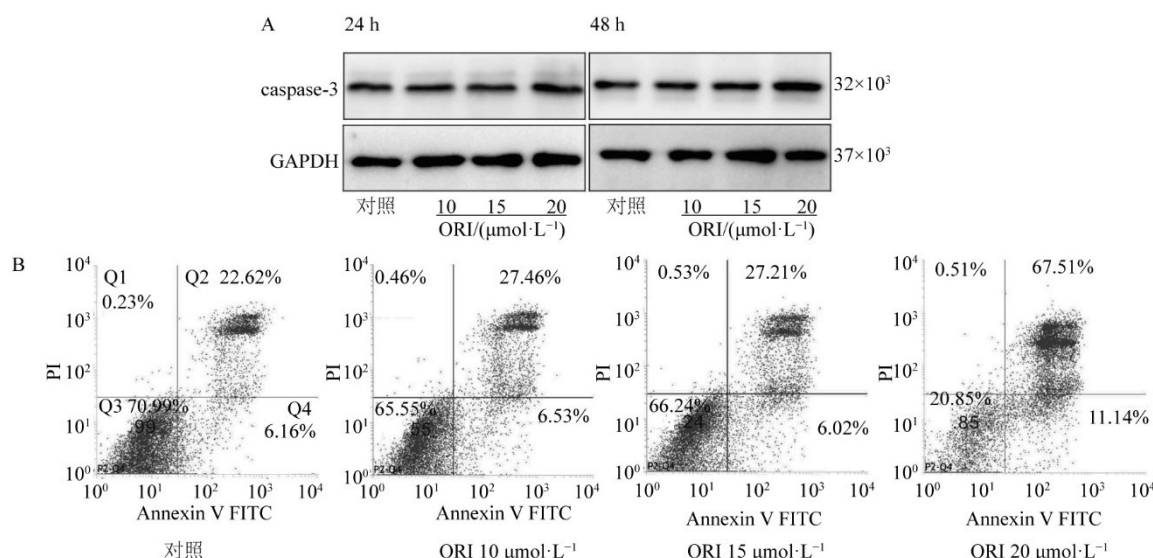
Western blotting结果显示,ORI明显上调SW620细胞中BMP7、p53蛋白表达,且呈浓度与时间相关性,见图3。结果提示,BMP7和p53能够调



A-结晶紫染色检测ORI对SW620细胞的增殖抑制作用;B-Western blot检测ORI对SW620细胞中PCNA蛋白表达水平的影响
A-crystal violet staining was used to detect inhibitory effect of ORI on proliferation of SW620 cells; B-Western blotting was used to detect the effect of ORI on expression of PCNA protein in SW620 cells.

图1 ORI对SW620细胞增殖的影响

Fig. 1 Effect of ORI on proliferation of SW620 cells



A-Western blotting 检测ORI对SW620细胞中caspase-3蛋白表达的影响;B-流式细胞术分析ORI对SW620细胞凋亡的影响;Q2与Q4象限代表凋亡细胞所占比例。

A- Western blotting was used to detect effect of ORI on expression of caspase-3 protein in SW620 cells; B- The effect of ORI on apoptosis of SW620 cells was analyzed by flow cytometry. Q2 and Q4 quadrants represented the proportion of apoptotic cells.

图2 ORI对SW620细胞凋亡的影响

Fig. 2 Effect of ORI on apoptosis of SW620 cells

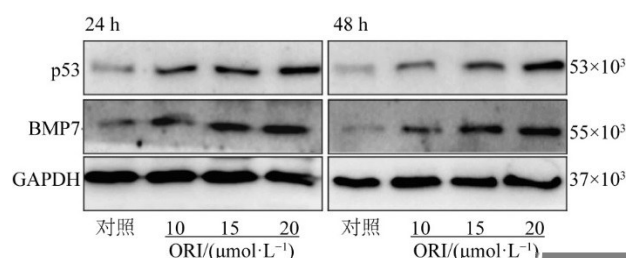


图3 ORI对SW620细胞中BMP7、p53蛋白表达水平的影响

Fig. 3 Effect of ORI on expression of BMP7 and p53 protein of SW620 cells

节ORI所诱导的增殖凋亡,BMP7与p53可能存在某种联系。

3.4 p53调节ORI诱导的细胞增殖抑制、凋亡

Western blotting 结果显示,ORI明显上调SW620细胞中caspase-3、PCNA蛋白表达,加入外源性的p53腺病毒,能够促进ORI诱导的caspase-3、PCNA表达上调;加入p53抑制剂PFT α ,能够逆转ORI诱导的caspase-3、PCNA表达上调,见图4。结果提示,ORI诱导凋亡与p53表达有关。

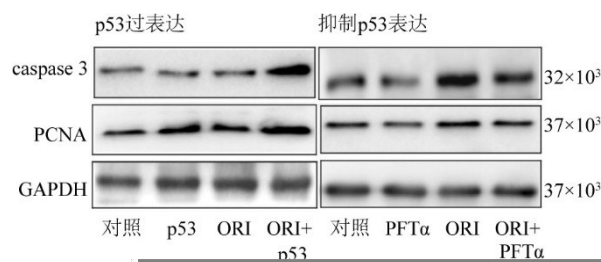


图4 ORI/p53/PFT α 对SW620细胞中Caspase-3及PCNA蛋白表达水平的影响

Fig. 4 Effect of ORI/p53/PFT α on expression of Caspase-3 and PCNA protein of SW620 cells

3.5 ORI影响BMP7-p53通路

对ORI诱导的细胞增殖抑制、凋亡进行初步机制分析,Western blotting结果显示,ORI明显上调SW620细胞中p53、BMP7蛋白表达,加入外源性的p53腺病毒,能够促进ORI诱导的p53、BMP7表达上调;加入p53抑制剂PFT α ,能够逆转ORI诱导的p53、BMP7表达上调,见图5。结果提示,ORI可能是通过上调BMP7、p53蛋白的表达,实现对SW620细胞中BMP7-p53通路的调控。p53是BMP7的下游信号蛋白,本结果发现p53能够反馈调节BMP7的表达,二者之间复杂的传导关系有待进一步研究。

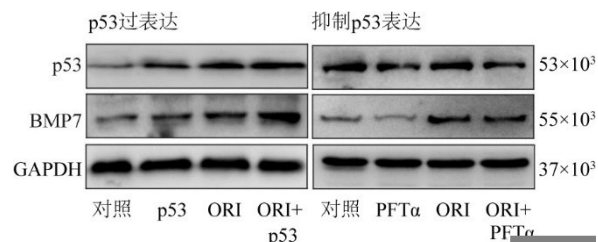


图5 ORI/p53/PFT α 对SW620细胞中p53及BMP7蛋白表达水平的影响

Fig. 5 Effect of ORI/p53/PFT α on expression of p53 and BMP7 protein of SW620 cells

4 讨论

结肠癌是世界上高发的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率逐年增加,尤其是在西方国家^[10]。尽管目前治疗结肠癌的方法有了很大的提高,但是其预后仍不乐观。因此,急需开发一些新的药物或者治疗方法来促进结肠癌的诊断或者治疗,减少结肠癌的复发。本研究发现,ORI能够明显抑制结肠癌细胞SW620的增殖、促进凋亡,上调p53的表达,通过激活BMP7-p53信号通路,抑制结肠癌的发生发展。

结肠癌的发病机制有很多,包括TGF- β 、Wnt/ β -catenin、PI3K/Akt的转导异常以及p53的缺失与PTEN的突变等^[11-12]。在人体正常细胞活动中,p53基因在多种生物功能中发挥作用,例如诱导细胞周期阻滞、促进细胞凋亡和DNA的修复等,调节细胞的分化与衰老、维持基因组的稳定^[13]。据报道,在p53基因信号通路中,被发现并且经过研究的基因已超过160种^[14]。经研究验证,p53相关靶基因主要包括:p21、MDM2、Bax、WT1、CD95/fas、HER2、p53AIP1、PCNA、cyclin G、PAG608等,这些基因受p53调控,参与p53的众多功能^[15]。p53作为肿瘤抑制因子,调节着肿瘤细胞的生长凋亡,但p53基因在大多数肿瘤细胞中易发生突变,突变率可超过50%。有报道称^[16],用5-氟尿嘧啶在体外处理结肠癌,可使细胞中p53表达逐渐上升,继而激活Bcl-2相关X蛋白(bcl2-associated x protein, Bax),致使细胞凋亡。BMP7属于TGF- β 超家族成员之一,是一类具有成骨活性的蛋白。BMP7不仅能够调节成骨分化,还与癌症的发生发展、侵袭转移有关^[17],BMP7能够介导多种癌症的发生,包括乳腺癌、淋巴瘤、宫颈癌、骨肉瘤等,但是具体的分子机制还不是很清楚。

本研究结果表明,ORI可以抑制结肠癌细胞SW620增殖,促进其凋亡,上调BMP7与p53的表达;外源性过表达p53加强了ORI抑制增殖、诱导凋

亡、上调 BMP7 表达的作用, PFT α 则部分抑制了 ORI 的作用, BMP7 与 p53 之间的相互调节是 ORI 抑制结肠癌生长的机制之一, 为 ORI 进一步应用于临床提供了参考。

参考文献

- [1] 李 菲, 王建筑, 毕研平, 等. 冬凌草甲素结肠定位栓塞型脉冲释药系统胶囊的制备 [J]. 中草药, 2016, 38(3): 543-546.
- [2] Wang J, Li F, Ding J, et al. Investigation of the anti-asthmatic activity of Oridonin on a mouse model of asthma [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(3): 2000-2006. DOI: 10.3892/mmr.2016.5485.
- [3] Chen J H, Wang S B, Chen D Y, et al. The inhibitory effect of oridonin on the growth of fifteen human cancer cell lines [J]. Chin Pharmacol Bull, 2007, 4(1): 403. DOI: 10.1007/s11805-007-0016-9.
- [4] 李春雨, 王 琪, 申 珅, 等. 冬凌草甲素对人黑色素瘤 A375 细胞侵袭和转移的影响及机制研究 [J]. 中草药, 2018, 49(3): 658-662.
- [5] 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. DOI: 10.1053/j.gastro.2013.01.067.
- [6] Medema J P. Microenvironmental regulation of stem cells in intestinal homeostasis and cancer [J]. Nature, 2011, 474 (7351): 318-326. DOI: 10.1038/nature10212.
- [7] Saif M W. Biology of colorectal cancer [J]. Cancer J, 2010, 16(3): 196-201. DOI: 10.1097/PPO.0b013e3181e076af.
- [8] 杨秋珺, 周龙洋, 刘映孜, 等. 小檗碱抑制 HCT116 细胞生长与 Wnt/ β -catenin 信号的关系研究 [J]. 中国药理学通报, 2012, 28(09): 1234-1238.
- [9] Balboni A L, Cherukuri P, Ung M, et al. p53 and Δ Np63 α coregulate the transcriptional and cellular response to tgfb β and bmp signals [J]. Mol Cancer Res, 2015, 13(4): 732-742. DOI: 10.1158/1541-7786.
- [10] Ouyang J, Pan X H, Hu Z C. The role of aplysia ras homolog I in colon cancer cell invasion and adhesion [J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5): 5193-5199. DOI: 10.3892/etm.2017.5122.
- [11] Reynolds A, Wharton N, Parris A, et al. Canonical Wnt signals combined with suppressed TGF β /BMP pathways promote renewal of the native human colonic epithelium [J]. Gut, 2014, 63(4): 610-621. DOI: 10.1136/gutjnl-2012-304067.
- [12] Markowitz S D. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer [J]. N Engl J Med, 2009, 361 (25): 2449-2460. DOI: 10.1056/NEJMra0804588.
- [13] Yu Q. Restoring p53-mediated apoptosis in cancer cells: new opportunities for cancer therapy [J]. Drug Resist Update, 2006, 9(1-2): 19-25. DOI: 10.1016 / j. drup. 2006.03.001.
- [14] Merkel O, Taylor N, Prutsch N, et al. When the guardian sleeps: Reactivation of the p53 pathway in cancer [J]. Mutat Res, 2017, 773: 1-13. DOI: 10.1016 / j. mrrrev. 2017.02.003.
- [15] Lane D, Cheok C, Lain S. p53-based cancer therapy [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2(9): 001222. DOI: 10.1101/cshperspect.a001222.
- [16] Lu J, Mochhala S, Kaur C, et al. Changes in apoptosis-related protein (p53, Bax, Bcl - 2 and Fos) expression with DNA fragmentation in the central nervous system in rats after closed head injury [J]. Neurosci Lett, 2000, 290 (2): 89-92. DOI: 10.1016/ S0304-3940(00)01307-0.
- [17] Kuzaka B, Janiak M, Wlodarski K H, et al. Expression of bone morphogenetic protein-2 and -7 in urinary bladder cancer predicts time to tumor recurrence [J]. Arch Med Sci, 2015, 11(2): 378-384. DOI: 10.5114/aoms.2014.46796.