

绿原酸抑制结肠癌 HCT116 细胞的机制研究

向 舒¹, 唐宏伟¹, 周 军¹, 张 胜¹, 李湘洲^{1,2*}, 黄 丹^{1,3}

1. 中南林业科技大学材料科学与工程学院, 湖南 长沙 410004

2. 南方林业生态应用技术国家工程实验室, 湖南 长沙 410004

3. 湖南中医药大学 中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地, 湖南 长沙 410208

摘 要: **目的** 探讨绿原酸对结肠癌 HCT116 细胞抑制作用的机制。**方法** 以绿原酸处理 HCT116 细胞, 未处理组为对照组, 通过基因表达谱芯片筛选出处理前后的差异表达基因, 应用 Real-time PCR 技术对胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP3)、肺腺癌转移相关转录本 1 (MALAT1)、雄性性别决定基因相关高迁移率族盒基因 (SOX4)、N-myc 下游调节基因 1 (NDRG1) 4 个基因进行验证, Western blotting 法检测上调基因中 NDRG1 的蛋白表达水平。**结果** 基因表达谱芯片检测表明, 经绿原酸处理后的结肠癌细胞中表达上调的基因为 161 个 (差异倍数大于 2), 表达下调的基因为 64 个 (差异倍数小于 0.5)。这些基因主要涉及细胞信号转导、生物过程、细胞组分等功能。Real-time PCR 检测证实 IGFBP3、NDRG1 基因经绿原酸处理后表达明显上调 ($P < 0.05$)。Western blotting 检测表明, 经绿原酸处理后 NDRG1 基因的蛋白表达水平上调。**结论** 基因表达谱芯片结合 Real-time PCR 技术筛选出绿原酸处理后的差异表达基因, 为揭示绿原酸抑制结肠癌细胞的作用机制提供依据。

关键词: 绿原酸; 结肠癌; HCT116 细胞; 基因表达谱芯片; N-myc 下游调节基因 1

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2017)23-4952-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.23.021

Research on inhibition mechanism of chlorogenic acid for colorectal cancer cell line HCT116

XIANG Shu¹, TANG Hong-wei¹, ZHOU Jun¹, ZHANG Sheng¹, LI Xiang-zhou^{1,2}, HUANG Dan^{1,3}

1. College of Materials Science and Engineering, Central South University of Forestry & Technology, Changsha 410004, China

2. State Key Laboratory of Ecological Applied Technology in Forest Area of South China, Changsha 410004, China

3. State Key Laboratory of Chinese Medicine Powder and Medicine Innovation in Hunan, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

Abstract: **Objective** To discuss the inhibition mechanism of chlorogenic acid for colorectal cancer cell line HCT116. **Methods** Colorectal cancer cell line HCT116 were treated with chlorogenic acid, and the untreated group was blank control. Then, the gene expression chip was used to screen the differential expression gene before and after processing, the Real-time PCR technique was used to identify IGFBP3, MALAT1, SOX4, and NDRG1, and the Western blotting detected the level of protein expression of NDRG1, which belongs to up-regulated gene. **Results** The gene expression spectra chip test showed that there were 161 up-regulated expression gene of colorectal cancer (the fold change was larger than 2), and 64 down-regulated expression genes (the fold change was less than 0.5) after chlorogenic acid treatment. Also, these genes were mainly related to the function of cell signal transduction, biological process and cellular component. The results of Real time PCR showed that the mRNA expression of IGFBP3 and NDRG1 were up-regulated significantly ($P < 0.05$) after chlorogenic acid treatment. Western Blotting results showed that the NDRG1 gene protein expression was up-regulated significantly ($P < 0.05$) after chlorogenic acid treatment. **Conclusion** The gene expression spectrum chip combined the Real-time PCR technology, which were used to screen the differential expression gene before and after the chlorogenic acid treatment, in order to reveal the inhibition mechanism of chlorogenic acid for colorectal cancer cells.

Key words: chlorogenic acid; colorectal cancer; HCT116 cell; gene expression spectrum chip; NDRG1

收稿日期: 2017-05-04

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划项目资助 (2012BAD21B05)

作者简介: 向 舒 (1994—), 女, 硕士研究生, 主要从事天然产物化学与利用研究。E-mail: 465896279@qq.com

*通信作者 李湘洲 (1965—), 女, 教授、博士生导师, 主要从事天然产物化工、化学工程研究。E-mail: rlxz@163.com

结肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是一种严重威胁人类健康的恶性肿瘤^[1], 随着人们饮食结构和生活习惯的改变, 我国结肠癌的发病率逐年上升^[2]。结肠癌的主要治疗方法是手术治疗, 然而手术并不能根治, 常使用化学药物进行辅助治疗。临床常用的多数化疗药物毒性较大、安全系数较低, 在抑制和杀伤结肠癌细胞的同时也会损伤身体的正常组织。如 5-氟尿嘧啶作为大肠癌的有效化疗药物, 在使用过程中可能会引发腹痛、腹泻, 甚至便血^[3]。贝伐单抗可能引起心肌梗死、一过性缺血发作和静脉血栓等不良反应^[4]。除了传统的手术、化疗与放疗外, 多成分、多靶点、多环节、多途径效应的植物源化合物的抗肿瘤研究已逐渐成为热点^[5]。植物中提取的天然产物在治疗肿瘤方面具有独特的优势, 能够对肿瘤细胞产生抑制作用。于思等^[6]发现重楼皂苷 I 能够明显抑制结肠癌 HCT116 细胞的增殖。吕盈盈等^[7]发现大黄素能够通过抑制血管内皮生长因子受体酪氨酸酶活性从而抑制结肠癌细胞生长。

绿原酸是植物体中重要的多酚类物质, 存在于杜仲、金银花等多种植物中^[8-9], 具有广泛的生物学效应, 如清除自由基、调节酶活性、改变信号转导通路等^[10]。研究表明绿原酸在抗癌、抗肿瘤方面具有一定的作用^[11]。本课题组已采用 MTT 法研究了绿原酸对 HCT116 细胞的抑制作用, 证明了绿原酸具有抑制 HCT116 细胞体外增殖并诱导其凋亡的作用^[12], 因此, 本实验进一步研究绿原酸抑制 HCT116 细胞的作用机制。

基因芯片又称 DNA 芯片, 是专门用于核酸检测的生物芯片, 其有助于识别药物相应的靶序列, 分析基因组药物作用, 监视药物治疗反应中的基因表达改变, 并观察药效^[13]。本实验通过观察绿原酸对体外 HCT116 细胞基因表达谱的影响, 利用 Real-time PCR 和 Western blotting 技术从基因水平探讨绿原酸抑制结肠癌细胞的作用机制, 为绿原酸在临床抗癌方面的应用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞

HCT116 细胞株 (第 4~5 代), 来源于中国科学院细胞库细胞平台 (上海)。

1.2 药品与试剂

绿原酸 (批号 10081445, 经 HPLC 测定质量分数 $\geq 98\%$, 天津一方科技有限公司); Trizol 试剂、DS2000 marker、SYBR Green qPCR Mix 购自东盛

生物科技有限公司; 焦炭酸二乙酯 (DEPC, 美国 Sigma 公司); mRNA 逆转录试剂盒 (美国 Thermo 公司); 三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇均为分析纯 (湖南化虹试剂有限公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、电泳缓冲液、转移缓冲液、彩色预染蛋白相对分子质量标准 (10 000~170 000)、AuraECL 化学发光检测试剂盒、显影定影试剂盒、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 $\times$)、蛋白标准溶液 (BSA)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒、丽春红染色液、蛋白印迹膜再生液、PMSF (100 mmol/L)、蛋白酶抑制剂混合物 (100 $\times$)、羊抗兔二抗、羊抗鼠二抗、磷酸酯酶抑制剂 (100 mmol/L) 均购自湖南艾佳生物科技股份有限公司; N-myc 下游调节基因 1 (NDRG1) 抗体 (Abcam 公司)。

1.3 仪器

NanoDrop Lite 核酸定量仪、Forma702 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱、酶标仪 (美国 Thermo 公司); 16K-R 低温台式离心机 (长沙鑫奥仪器仪表有限公司); SE-CJ-2D 医用净化工作台 (苏州净化设备有限公司); 0.2 mL BS-02-P PCR 管 (Biosharp 白鲨生物科技公司); DYY-6C 电泳仪 (北京六一仪器厂); 5 000 Plus 凝胶成像系统 (北京赛智创业科技有限公司); Real-time PCR 仪 (美国 ABI 公司); THERM-1000 PCR 仪 (美国 Axygen 公司); 电泳仪、迷你双垂直电泳仪、迷你转印电泳仪 (北京六一仪器厂); 水平脱色摇床 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司); 台式冷冻高速离心机 (长沙市鑫奥仪器仪表有限公司); Fluka 电动组织匀浆器 (北京南方晨阳生物科技有限公司); 96 孔细胞培养板 (美国 Costar 公司)。

2 方法

2.1 实验分组与处理

将对数生长期的 HCT116 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔细胞培养板, 每孔 2 mL, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱培养 24 h, 换液, 待细胞融合至 80% 时开始加药。实验分为对照组和绿原酸组, 绿原酸组加入浓度为 4.5 mmol/L 的绿原酸 (根据前期细胞侵袭实验选择有效的药物浓度)。加药后继续培养 24 h, 收集细胞。

2.2 总 RNA 抽提与质量控制

使用 Trizol 试剂提取总 RNA: 每 1×10^6 个细胞加入 1 mL Trizol 试剂, 用移液枪将细胞团轻轻吹打均匀; 按 Trizol-氯仿 5:1 加入氯仿, 剧烈震荡 15 s, 室温静置 3 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min, 离心 15 min;

吸取上清至另一新的 1.5 mL EP 管, 加入等体积异丙醇, 混匀后室温静置 20 min; 4℃、12 000 r/min 离心 10 min, 去上清; 加入至少 1 mL 4℃预冷的 75%乙醇, 洗涤沉淀; 4℃、10 000 r/min 离心 5 min, 弃上清; 4℃、10 000 r/min 离心 5 min, 吸去残液, 室温干燥; 加入 20 μ L RNase-free 水, 至完全溶解, 取 1 μ L 进行电泳检测, 用微量分光光度计测定不同波长下的吸光度 (A) 值, 并计算 A_{260}/A_{280} 、 A_{260}/A_{230} , 以检测 RNA 的浓度及纯度, 琼脂糖凝胶电泳检测其完整度。

2.3 探针标记和芯片杂交

以总 RNA 为模板, 含有 T7 启动子序列的 T7 Oligo(dT)Primer 为引物, 使用 First Strand Enzyme Mix 合成 First strand cDNA。用 Second Strand Enzyme Mix 将 DNA-RNA 杂合体中的 RNA 链转化为 Second Strand cDNA, 合成双链 DNA。以 Second Strand cDNA 为模板, 利用 T7 Enzyme Mix 合成 cRNA, 掺入生物素。使用磁珠纯化 cRNA, 除去盐、酶等杂质, 并对 cRNA 进行定量。将 cRNA 片段化成适宜杂交的大小。将标记后的芯片平衡放置于杂交炉中, 45℃、60 r/min 旋转杂交 16 h。

2.4 芯片扫描及数据分析

使用 AGCC 软件 (Affymetrix® GeneChip® Command Console® Software) 进行芯片清洗染色, 扫描基因芯片, 将芯片的荧光扫描图像保存成 DAT 文件以待分析。对芯片原始数据进行归一化处理, 根据倍数差异 Fold change 和 t 检验筛选差异表达基因, 对差异基因进行 Pathway 和 GO 的统计分析。

2.5 Real-time PCR 检测差异表达基因

选择 4 条差异表达基因进行 PCR 验证。所有样本总 RNA 各取 2 μ g, 将其逆转录为 cDNA。引物设计序列见表 1。qRT-PCR 反应体系 20 μ L: 2 $\times$ SYBR Green qPCR Mix 10 μ L, 上游引物和下游引物各 1 μ L, cDNA 1 μ L, 水 7 μ L, 反应条件为 95℃预变性 3 min; 之后每一步变性 95℃, 10 s, 胰岛素样生长因子结合蛋白 3 (IGFBP3)、肺腺癌转移相关转录本 1 (MALAT1)、雄性性别决定基因相关高迁移率族盒基因 (SOX4)、NDRG1、 β -actin 引物 60℃退火延伸 30 s, 共进行 40 个循环, 每次在延伸阶段读取荧光值。

2.6 Western blotting 检测 NDRG1 蛋白的表达

裂解细胞后提取总蛋白, 10%分离胶, 5%浓缩胶, 恒压 100 V 电泳, 通过预染蛋白 marker 来确定电泳时间, 湿转法转膜 90 min (90 V 恒压), 转膜

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'→3')
IGFBP3	正向引物 TGCCGCAAGGTTAATGTG
	反向引物 GCTGACTACTGGAAAGTGAAA
MALAT1	正向引物 GACCCTTCACCCCTCACC
	反向引物 TTATGGATCATGCCACAAG
SOX4	正向引物 GACGAATTTGGCCGATGG
	反向引物 GGGCAAGGGGAAAAGAGG
NDRG1	正向引物 TCATCAATGCCTACAACAGCC
	反向引物 GCCACAGTCCGCCATCTT
β -actin	正向引物 AGGGGCCGGACTCGTCATACT
	反向引物 GGCGGCACCACCATGTACCCT

完成后丽春红染色试剂对膜进行染色, 观察转膜效果, 将膜完全浸没于 3% BSA-TBST 中室温轻摇封闭 60 min, 加入 3% BSA-TBST 稀释的 NDRG1 (1:2 000)、 β -actin (1:2 300) 一抗, 室温孵育 10 min, 4℃过夜, TBST 洗膜 5 次, 每次 3 min。TBST 稀释二抗 (1:15 000), 室温孵育 40 min, TBST 洗膜 5 次, 每次 3 min。ECL 加到膜上后反应 3~5 min, 胶片曝光 10 s~3 min (曝光时间随不同光强度而调整), 显影 2 min, 定影。

将胶片进行扫描, 用图像分析软件 IPP 6.0 对图像进行灰度分析, 以目的条带与 β -actin 的灰度值的比值作为比较目的蛋白表达强弱的指标。

2.7 统计学方法

数据采用 SPSS V 17.0 软件进行统计分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 t 检验进行统计分析。

3 结果与分析

3.1 总 RNA 提取

提取 6 个样本的总 RNA, 将抽提的 RNA 用分光光度计检测 A 值。参照 Affymetrix 真核生物基因表达谱实验过程说明文件及样品质检报告单, A_{260}/A_{280} 均在 1.8~2.1, A_{260}/A_{230} 均 >1.8 , 说明 RNA 纯度良好; RNA 总量 $\geq 10 \mu$ g, 满足表达谱芯片实验要求; HCT116 细胞样本在加绿原酸前后的 RNA 提取电泳图见图 1, 经甲醛变性胶电泳检测其完整性, RNA 样品电泳条带清晰, 28 S:18 S rRNA 条带亮度大于或接近 2:1。检测结果显示样品纯度、总量及完整性均符合表达谱芯片实验要求^[14]。

3.2 差异表达基因分析

根据 Affymetrix PrimeView 表达谱芯片数据分析说明和基因芯片结果, 筛选两组间差异倍数 Fold

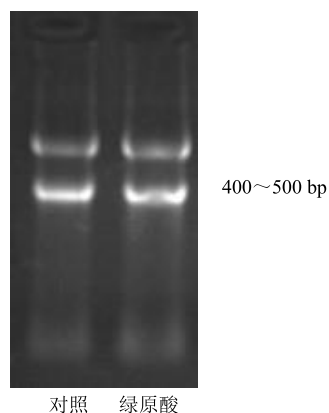


图 1 RNA 样品电泳图 (400~500 bp)

Fig. 1 Electrophoresis diagram of cell sample RNA extracts (400—500 bp)

change (经 $\log_2$ 转换) 2 倍以上的基因为差异表达基因。表达谱芯片火山图见图 2, 图中红色表示基因上调, 绿色表示基因下调, 黑色表示没有显著变化。火山图可以直观反映差异基因的数量、显著性和可靠性, 图中各点越靠近左上角和右上角, 则其差异越显著, 而差异 (即红绿标记) 的筛选标准为 $\text{Fold change} \geq 2$ 和 $q \text{ 值} \leq 0.05$ ^[15]。绿原酸组与对照组间共筛选出 225 个差异基因, 其中上调 161 个 (差异倍数大于 2), 下调 64 个 (差异倍数小于 0.5), 部分上调基因见表 2、3。

利用 KOBAS 系统将 Molecule Annotation System 中筛选出来的差异表达基因进行 GO 功能分析^[16], 得到 enrichment-GO 表, 部分结果见表 4。表中涉及生物过程 (biological process) 3 449 个、细胞组分 (cellular component) 343 个、分子功能 (molecular function) 502 个。GO 富集分析中, P 值小于 0.05 的 GO 为显著性 GO。GO 分析结果显示,

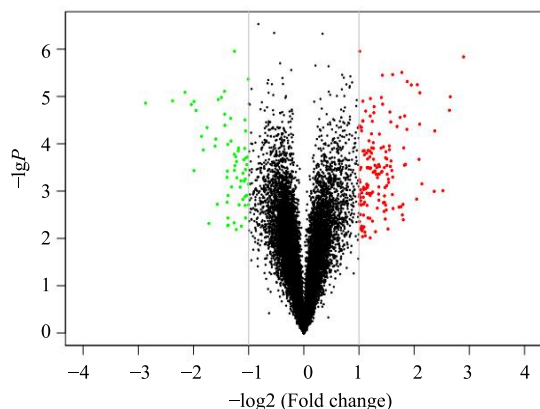


图 2 表达谱芯片火山图

Fig. 2 Volcano Plot of expression spectrum chip

表 2 绿原酸处理后基因表达上调 2 倍以上的部分基因

Table 2 Part of genes whose expression is upregulated more than 2-fold after chlorogenic acid treatment

基因	序号	上调倍数
ANGPTL4	NM_139314.1	7.438 2
TFRC	NM_003234.2	6.293 9
ARRDC3	NM_020801.2	5.185 3
ADM	BF589790	4.297 9
STC2	BC000658.2	4.286 1
WFDC3	NM_080614.1	4.252 9
ADM	NM_001124.1	4.161 3
IGFBP3	BC064987.1	4.126 2
DDIT4	AW169241	3.859 2
NDRG1	AK296794.1	3.393 1

表 3 绿原酸处理后基因表达下调 0.5 倍以下的部分基因

Table 3 Part of gene whose expression is downregulated less than 0.5-fold after chlorogenic acid treatment

基因	序号	下调倍数
GJA1	NM_000165.3	0.136 9
ID2	NM_002166.4	0.192 3
ID3	NM_002167.3	0.224 8
ID3	BT006791.1	0.243 4
BST2	NM_004335.2	0.251 5
MALAT1	EF177381.1	0.303 5
CYP24A1	NM_000782.4	0.381 2
CRISPLD2	NM_031476.3	0.382 7
RHOU	NM_021205.4	0.384 4
SOX4	NM_153757.2	0.479 5

部分基因涉及细胞凋亡过程 (GO:0008283、GO:0006915、GO:0012501)、细胞增殖过程 (GO:0008283) 等多细胞生物过程 (GO:0051704; GO:0032501), 此研究结果从基因水平验证了绿原酸抑制 HCT116 细胞增殖和诱导其凋亡的作用^[12]。

同时利用 KOBAS 系统对差异基因进行了 Pathway 分析^[16], 得到 enrichment-Pathway 表, 部分结果见表 5。Pathway 分析结果显示差异基因主要涉及 HIF-1 信号通道 (hsa04066)、病毒感染 (hsa05416、hsa05169)、新陈代谢 (hsa01200)、免疫应答 (hsa04672、hsa05323、hsa05320)、炎症反应 (hsa05321)、细胞凋亡 (hsa04210) 和细胞增殖 (100154、100209) 等方面, 此结果再次从基因水平解释了绿原酸抑制 HCT116 细胞增殖和诱导其凋亡作用的机制。

表 4 生物过程中部分 GO 功能分析结果

Table 4 Part of GO results of biological process

GO 功能注释	输入量	输入频率	P 值
GO:0008150 (biological-process)	136	0.951 0	0.004 0
GO:0009987 (cellular process)	132	0.923 1	0.000 1
GO:0032501 (multicellular organismal process)	82	0.573 4	0.000 0
GO:0051704 (multi-organism process)	42	0.293 7	0.000 0
GO:0008283 (cell proliferation)	39	0.272 7	0.000 0
GO:0006915 (apoptotic process)	37	0.258 7	0.000 0
GO:0012501 (programmed cell death)	37	0.258 7	0.000 0
GO:0042127 (regulation of cell proliferation)	31	0.216 8	0.000 0
GO:0042981 (regulation of apoptotic process)	29	0.202 8	0.000 0
GO:0022414 (reproductive process)	26	0.181 8	0.000 0

表 5 部分 pathway 功能分析的结果

Table 5 Part of results of pathway functional analysis

通道名称	输入量	输入频率	P 值
hsa04066: HIF-1 signaling pathway	13	0.031 25	0.000 0
hsa05323: rheumatoid arthritis	9	0.021 63	0.000 1
hsa04672: intestinal immune network for IgA production	8	0.019 23	0.000 0
hsa05321: inflammatory bowel disease (IBD)	8	0.019 23	0.000 0
hsa05416: viral myocarditis	7	0.016 83	0.000 1
hsa05320: autoimmune thyroid disease	7	0.016 83	0.000 1
hsa05169: Epstein-Barr virus infection	6	0.014 42	0.142 5
hsa01200: carbon metabolism	6	0.014 42	0.011 1
hsa04630: Jak-STAT signaling pathway	4	0.009 62	0.286 8
hsa04210: apoptosis	1	0.002 40	0.774 1
100154: inhibition of cellular proliferation by gleevec	1	0.011 49	0.358 6
100209: cadmium induces dna synthesis and proliferation in macrophages	1	0.011 49	0.293 5

3.3 Real-time PCR 对部分差异表达基因的验证

从筛选出的差异表达基因中选出差异倍数变化较明显的 4 条基因进行验证。芯片结果显示, IGFBP3 和 NDRG1 基因表达上调; SOX4 和 MALAT1 基因则表达下调。Real-time PCR 结果显示 (表 6)。SOX4、IGFBP3、MALAT1 和 NDRG1 基因在绿原酸组的相对表达量均高于对照组 ($P < 0.05$), 与芯片筛选结果有差异, 芯片筛选是初步预

测变化趋势, Real-time PCR 是对其结果进行验证, 最终结果以 Real-time PCR 检测结果为准, 也就是 4 种基因表达均上调。

3.4 Western blotting 对部分差异表达基因的验证

NDRG1 基因表达的蛋白相对分子质量为 48 000, Western blotting 检测结果如图 3 所示, 表明经绿原酸处理后, NDRG1 蛋白表达水平显著上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 6 绿原酸对 HCT116 细胞中 SOX4、IGFBP3、MALAT1、NDRG1 基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Table 6 Effects of chlorogenic acid on expression of SOX4, IGFBP3, MALAT1, and NDRG1 in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	相对表达量			
	SOX4	IGFBP3	MALAT1	NDRG1
对照	1.009 8 $\pm$ 0.164 6	1.002 3 $\pm$ 0.021	1.004 5 $\pm$ 0.141 8	1.000 8 $\pm$ 0.043 1
绿原酸	15.957 7 $\pm$ 0.263 6*	3.664 5 $\pm$ 0.463 5*	5.776 3 $\pm$ 0.481 4*	2.611 4 $\pm$ 0.546 2*

与对照组比较: * $P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$ vs control group, same as below

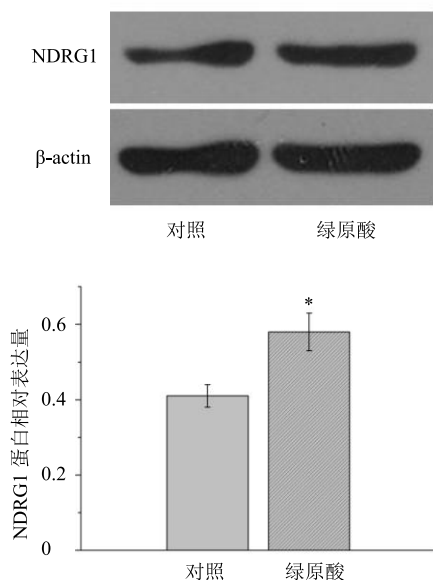


图3 绿原酸对 HCT116 细胞中 NDRG1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effect of chlorogenic acid on expression of NDRG1 protein in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

4 讨论

以绿原酸处理结肠癌 HCT116 细胞株, 未处理组为对照组, 通过基因表达谱芯片筛选出处理前后的差异表达基因, 经绿原酸处理后表达上调的基因 161 个(差异倍数大于 2), 表达下调的基因 64 个(差异倍数小于 0.5), 这些基因主要涉及细胞信号转导、生物过程、细胞组分等功能, 并主要与 HIF-1 信号通道、病毒感染、细胞代谢、免疫应答、炎症反应、细胞凋亡和细胞增殖等通道有关。

采用 Real-time PCR 技术对 IGFBP3、MALAT1、SOX4、NDRG1 基因的表达进行验证, 结果表明, 经绿原酸处理后 4 种基因的表达均上调。

采用 Western blotting 技术对上调基因 NDRG1 的蛋白表达水平进行检测, 结果表明经绿原酸处理后 NDRG1 蛋白表达水平显著上调 ($P<0.05$)。进一步验证经绿原酸处理后相关基因的表达上调。

本研究结果表明, 绿原酸对结肠癌 HCT116 细胞株的抑制作用可能与 IGFBP3、MALAT1、SOX4、NDRG1 等基因表达量上调有关, 绿原酸通过影响细胞信号转导, 调节免疫应答、炎症反应、细胞凋亡和细胞增殖, 从而起到抗结肠癌的作用。但绿原酸使 NDRG1 等基因表达上调的机制亟待研究。另外, 根据基因芯片提示的相关生物过程和通道目前

只能作为参考, 绿原酸是否通过其发挥抑制作用还需要进一步验证。

参考文献

- [1] 梅宁卓, 韩宇, 白玉贤. 结肠癌术后辅助治疗的研究进展 [J]. 临床肿瘤学杂志, 2016, 21(4): 376-380.
- [2] 郭欣, 裴毅. 老年结肠癌患者 D-二聚体与肿瘤进展的相关性研究 [J]. 中国药物与临床, 2016, 16(6): 878-879.
- [3] 许健, 陈君坤, 曹建民, 等. 大肠癌动脉插管化疗中 5-氟尿嘧啶的副作用 [J]. 东南国防医药, 1995(1): 115-116.
- [4] 栗英, 罗聪. 贝伐单抗治疗结直肠癌的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2012, 21(24): 2903-2906.
- [5] 汪晶, 杨蕾, 金鑫, 等. 黄芪甲苷对人参皂苷 CK 肿瘤细胞摄取及抗肿瘤作用的影响 [J]. 中草药, 2016, 47(13): 2308-2312.
- [6] 于思, 曹治兴, 杨雨婷, 等. 重楼皂苷 I 诱导 G₂/M 期阻滞及干扰微管结构抗结肠癌 HCT116 细胞作用机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(6): 149-154.
- [7] 吕盈盈, 钱家鸣, 邱辉忠. 大黄素对结肠癌血管内皮生长因子受体的影响及对结肠癌抑制作用的研究 [J]. 中国中西医结合消化杂志, 2005, 13(5): 310-313.
- [8] 周英, 李敏, 杨付梅, 等. 绿原酸、咖啡酸、阿魏酸对微血管内皮细胞的损伤作用 [J]. 中国药理学通报, 2016, 32(10): 1474-1475.
- [9] Zhang B, Yang R, Zhao Y, et al. Separation of chlorogenic acid from honeysuckle crude extracts by macroporous resins [J]. J Chromatogr B, 2008, 867(2): 253-258.
- [10] Manach C, Scalbert A, Morand C, et al. Polyphenols: Food source and bioavailability [J]. Am J Clin Nutr, 2004, 79(5): 727-747.
- [11] 张珏. 忍冬茎叶中绿原酸的提取纯化工艺研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2011.
- [12] 栾芳菲, 李湘洲, 黄丹, 等. 杜仲叶提取物对人结肠癌细胞 HCT116 及抗血管生成活性的影响 [J]. 林产化学与工业, 2016, 36(3): 95-100.
- [13] 朱华, 吴耀生. 基因芯片技术在药用植物研究中的应用 [J]. 中草药, 2005, 36(10): 1441-1444.
- [14] 肖笑. 定量 PCR 和 Western blot 结合检测转基因大豆植物组织和商业化大豆相关食品中 CP4-EPSPS 成分 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- [15] Yong L, Song G, Yan J, et al. Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish [J]. BMC Genomics, 2013, 14(1): 612.
- [16] Xie C, Mao X, Huang J, et al. KOBAS 2.0: A web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases [J]. Nucleic Acids Res, 2011, 39: 316-322.