

茵陈色原酮对结肠癌细胞增殖迁移的作用及其机制研究

张 慧¹, 崔 戈², 李 阳¹, 孙 倩¹, 蔡 倩¹, 张 婷^{1*}, 柳金娜¹, 冯馨园¹, 钱 乙¹

(¹湖州师范学院医学院病理学与病理生理学系, 浙江 湖州 313000; ²湖州师范学院附属第一医院病理科, 浙江 湖州 313000)

[摘要] 目的:探讨茵陈色原酮(capillarisin, Cap)对结肠癌细胞增殖及迁移能力的影响及其机制。方法:采用不同浓度的 Cap 体外干预结肠癌细胞 SW620 及正常结肠细胞 FHC, CCK-8 比色法检测细胞增殖活性, Transwell 迁移实验检测细胞迁移能力, 实时定量 PCR(qPCR)法检测癌基因(K-ras、c-Src、c-Myc)的 mRNA 表达, Western blot 检测细胞上皮-间质转化(EMT)标志蛋白(E-cadherin、Vimentin)表达。结果:与 DMSO 对照组相比, 各组 Cap 可显著抑制结肠癌细胞 SW620 增殖活性及迁移细胞数($P < 0.05$), 但对正常结肠细胞 FHC 增殖及迁移作用无显著差异($P > 0.05$); 与 5-FU 组相比, 各组 Cap 对于正常结肠细胞 FHC 的增殖及迁移活性抑制作用显著减小 ($P < 0.05$)。与 DMSO 对照组相比, 各组 Cap 可显著降低结肠癌细胞 K-ras、c-Src、c-Myc 的 mRNA 水平。与 DMSO 对照组相比, Cap 高剂量组可提高结肠癌细胞上皮标志物 E-cadherin 蛋白表达, 降低间质标志物 Vimentin 蛋白表达。结论:Cap 可能通过抑制癌基因(K-ras、c-Src、c-Myc)mRNA 表达抑制结肠癌细胞增殖, 通过逆转 EMT 过程抑制结肠癌细胞转移。与 5-FU 相比, Cap 可能具有更好的应用安全性, 具有开发为新一代天然抗肿瘤单体药物的前景。

[关键词] 茵陈色原酮; 结肠癌; 增殖; 转移; 上皮-间质转化

[中图分类号] R735.35

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2017)02-203-04

doi: 10.7655/NYDXBNS20170214

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一, 发病率呈逐年上升趋势, 全球每年约 120 万新发病例, 其病死率约为 20.51%^[1]。近年来我国结直肠癌的发病率和病死率增长迅速, 每年新发病例高达 17 万例, 患病率达 46.8/10 万^[2]。

近来研究发现, 茵陈蒿的活性成分之一茵陈色原酮(capillarisin, Cap)可抑制多发性骨髓瘤细胞抗凋亡基因、细胞迁移及血管生成相关基因表达^[3], 表明 Cap 具有一定的抗肿瘤应用前景。但 Cap 对于结肠癌等消化系肿瘤的作用及其机制尚未见报道。本研究将探讨 Cap 对结肠癌细胞体外增殖活性及迁移能力的影响及其机制。

1 材料和方法

1.1 材料

结直肠癌细胞株 SW620、人正常结肠黏膜细胞 FHC(ATCC CRL1831, 广州吉妮欧生物科技有限公司)以含 10%胎牛血清(Gibco 公司, 美国)、100 U/mL 青霉素、0.1 mg/mL 链霉素的低糖 DMEM

培养基(Hyclone 公司, 美国)复苏培养, 在 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件下孵育。细胞在对数生长期以 0.25%胰蛋白酶液(Sigma 公司, 美国)消化传代, 以培养基稀释至适当浓度备用。细胞分组:CaP 标准品(CAS:56365-38-9, Pureonebio, HPLC 检测纯度 > 98%)以 DMSO 溶解, 以培养基调整终浓度分别为 50 μmol/L (低剂量, Cap-L)、100 μmol/L (中剂量, Cap-M)、200 μmol/L (高剂量, Cap-H), 分别以 10 μL 加入相应 96 孔细胞培养板(Corning 公司, 美国)干预细胞。正常对照组每孔加入 10 μL 0.05% DMSO, 阳性对照组每孔加入 10 μL 50 μmol/L 5-氟尿嘧啶(5-FU, 上海旭东海普药业有限公司, 批准文号:国药准字 H31020593)。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 比色法检测各组细胞活性

上述各组细胞株以培养基分别稀释至浓度 5 × 10⁴ 个/mL, 分别取 100 μL 至 96 孔培养板, 上述每组细胞分别接种 3 个复孔。将培养板在培养箱分别孵育 0、6、12、24 h; 每孔加入 10 μL CCK8 溶液(同仁公司, 日本)继续孵育 2 h; 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。绘制细胞生长曲线, 计算细胞增殖抑制率 (%) = (1 - 实验组吸光度值均数 / 对照组吸光度值均数) × 100%。

1.2.2 Transwell 实验检测各组细胞迁移活性

[基金项目] 2016 年国家级大学生创新创业训练计划项目; 湖州市科技公益性技术应用研究(重点)项目(2015GZ14)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:grape_chang@163.com

收集上述对数生长期的各组细胞, 分别以 5×10^5 个/mL 浓度, 1 mL/孔接种于 12 孔 Transwell 插入式培养皿(Corning 公司, 美国)上室, 下室加入含 20%FBS 的细胞培养液, 每组设 2 个复孔。分别干预 24 h 后收集细胞, 计算各孔迁移至 Transwell 下室的细胞数, 计算平均值及标准误。上下室之间为聚碳酸酯微孔滤膜(孔径 8 μm)。培养 18 h 除去未黏附细胞, 固定染色, 200 倍光镜下计数。计算各组细胞迁移抑制率=(对照组迁移细胞数-实验组迁移细胞数)/对照组迁移细胞数 $\times 100\%$ 。

1.2.3 qPCR 法检测结肠癌细胞相关分子 mRNA 表达水平

收集各组结肠癌细胞 SW620, 提取细胞 RNA, 采用逆转录试剂盒 (Thermo 公司, 美国) 反转录合成 cDNA, β -actin 为内参。采用 real-time PCR 检测仪 (ABI-7300, 美国) 分别检测 K-ras、c-Src、c-Myc 的 mRNA 表达。RNA 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成: K-ras: 上游引物 5' -GGAAG-AAGGTGACTTAGGTT-3', 下游引物 5' -GAC-TGGCACTGAAGATGG-3'; c-Src: 上游引物 5' -CAG-GCTGAGGAGTGGTAT-3', 下游引物 5' -GCTTGGCG-ATCTTGAGT-3'; c-Myc: 上游引物 5' -CAGAGGCAG-AGAAGAGATG-3', 下游引物 5' -CACAGGAA-CACG-ATGACA-3'; β -actin: 上游引物 5' -TGACGTGGACAT-CCGCAAAG-3', 下游引物 5' -CTGGAAGGTGGACAG-CGAGG-3'。采用 SYBR Green PCR 试剂盒 (Thermo 公司, 美国) 进行 qPCR 反应, 绘制标准曲线, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸阶段采集荧光。采用 SDS 2.3 软件分析结果。采用比较 Ct 值法 ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$) 计算样本中目的基因 mRNA 相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测结肠癌细胞上述间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 蛋白表达

各组结肠癌细胞 SW620 以 1×10^6 个/mL 浓度接种于 2 mL/孔 DMEM 培养液的 6 孔板, 每组设 2

个复孔。收集细胞, 加入 RIPA 裂解液提取总蛋白, Bradford 法检测浓度。取 50 μg 总蛋白上样电泳、转膜、封闭, 分别加入 EMT 标志蛋白 E-cadherin (Cat. 3195, CST 公司, 美国)、Vimentin (Cat. 5741, CST 公司, 美国) 及内参基因 GAPDH 抗体 (Cat. 5174, CST 公司, 美国) (稀释度均为 1:1 000), 膜接触过夜; 洗膜, 加羊抗兔 HRP 标记二抗 (Cat. A0208, 稀释度 1:1 000, 杭州碧云天公司), 孵育, 洗膜, 加入 ECL 化学发光显示剂显影; 图像分析软件扫描分析条带灰度值。目的蛋白表达相对强度=目的条带灰度值/GAPDH 条带灰度值, 各扫取 3 个灰度值。

1.3 统计学方法

运用统计软件 SPSS19.0 进行数据分析; 计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 多组间计量资料比较用单因素方差分析; 两两比较采用 q 检验, 部分变量间的相互关系采用秩相关分析法; $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 比色法检测各组细胞活性

Cap 各剂量组对结肠癌细胞 SW620 的增殖抑制率呈剂量及时间依赖性递增, 在 24 h 达最大增殖抑制率 (Cap 高、中、低剂量分别为 16.99%、12.00%、7.32%); 与 DMSO 对照组相比, Cap 高、中、低剂量均可显著抑制结肠癌细胞 SW620 增殖活性 ($P < 0.01$, 图 1A); Cap 高、中、低剂量对于正常结肠细胞 FHC 的增殖抑制率在 24 h 达最大分别为 14.73%、9.84%、6.30% (图 1B), 与结肠癌细胞相比显著减小 ($P < 0.01$); 与 5-FU 相比, 各组 Cap 对于正常结肠细胞 FHC 的增殖抑制率显著减小 ($P < 0.01$, 图 1B)。

2.2 Transwell 实验检测各组细胞迁移能力

高、中、低剂量 Cap 及 5-FU 对 SW620 细胞的迁移抑制率分别为 44.47%、26.76%、10.65%、53.00%; 与 DMSO 对照组相比, 各剂量 Cap 干预后结肠癌细

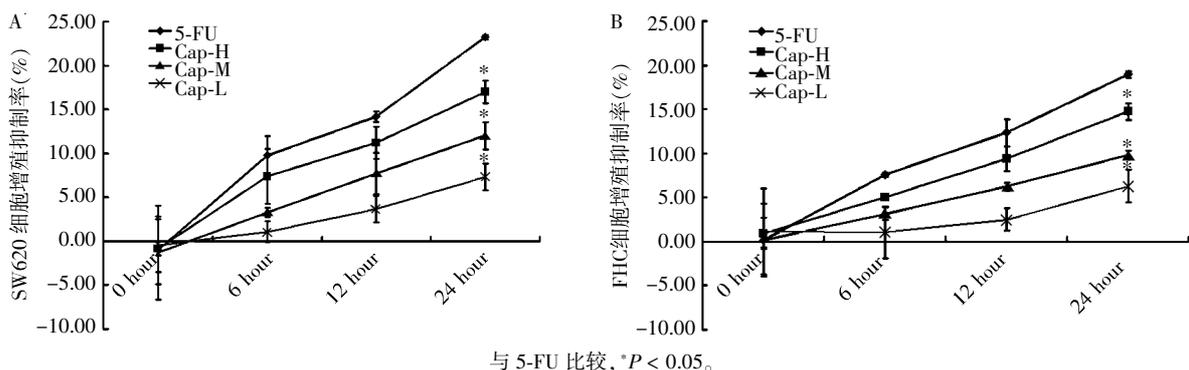


图 1 Cap 对结肠癌细胞(A)、正常结肠细胞(B)增殖活性的影响

胞 SW620 的迁移数显著减少($P < 0.01$, 图 2), 各剂量 Cap 及 5-FU 对 SW620 细胞迁移数的影响无明显差异($P > 0.05$)。

高、中、低剂量 Cap 及 5-FU 对正常结肠细胞 FHC 的迁移抑制率分别为 17.39%、11.01%、3.19%、64.35%; 与 DMSO 对照组相比, 各剂量 Cap 干预后结肠细胞 FHC 的迁移数无显著减少($P > 0.05$), 而 5-FU 干预显著减少结肠细胞 FHC 迁移数($P < 0.05$); 与 5-FU 相比, 高、中、低剂量 Cap 处理的 FHC 细胞迁移数具有显著差异($P < 0.01, P < 0.05$, 图 2)。

2.3 qPCR 法检测结肠癌细胞癌基因 mRNA 表达水平

与 DMSO 对照组相比, Cap 高剂量组可显著抑制结肠癌细胞 SW620 的 K-ras、c-Src、c-Myc mRNA

表达($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$, 图 3)。

2.4 Western blot 检测结肠癌细胞 EMT 蛋白表达

与 DMSO 对照组相比, 高剂量 Cap 可提高结肠癌细胞 SW620 的 E-cadherin 蛋白表达, 抑制 Vimentin 蛋白表达($P < 0.05$, 图 4); 但各剂量组 Cap 对于正常结肠细胞 FHC 的 E-cadherin 蛋白及 Vimentin 蛋白表达无显著影响($P > 0.05$, 图 5)。

3 讨论

本研究采用 Cap 体外干预结肠癌细胞后, 采用 CCK-8 比色法检测各组细胞活性, 结果发现, 与 DMSO 对照组相比, 各组 Cap 可呈剂量依赖性抑制结肠癌细胞 SW620 增殖活性; 与结肠癌细胞相比, 各组 Cap 对于正常结肠细胞 FHC 的抑制作用显著

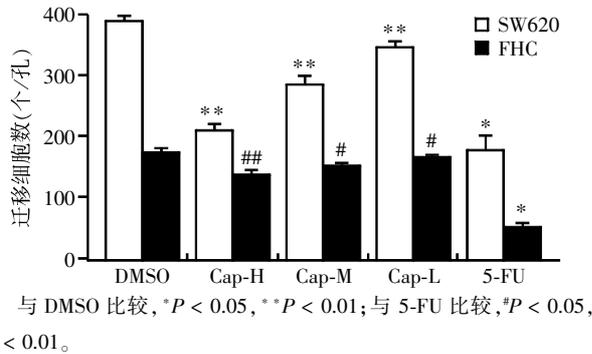


图 2 Cap 对结肠癌细胞、正常结肠细胞迁移能力的影响

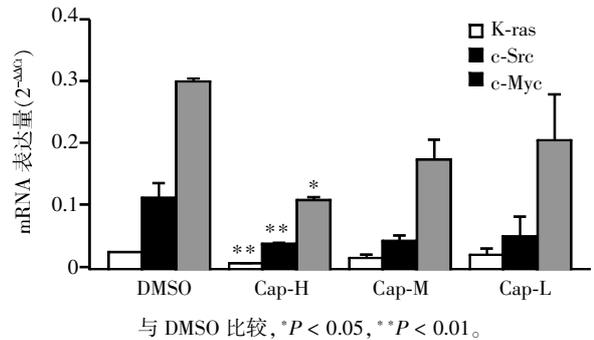


图 3 Cap 对结肠癌细胞癌基因 mRNA 表达的影响

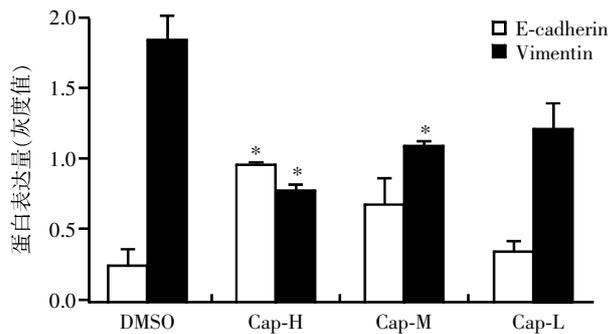
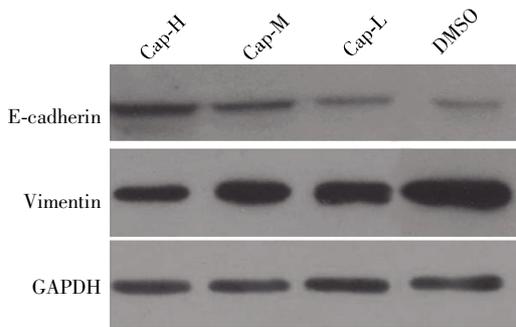


图 4 Cap 对结肠癌细胞 EMT 标志蛋白表达的影响

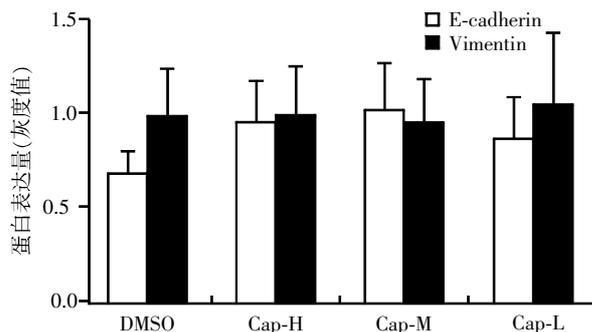
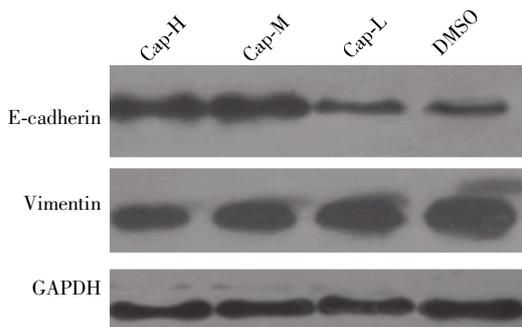


图 5 Cap 对正常结肠细胞 EMT 标志蛋白表达的影响

减小,且显著低于 5-FU,该结果显示 Cap 在具有较强的抗结肠癌细胞增殖活性的同时,对于正常结肠细胞增殖的抑制作用相对较小。

为探讨 Cap 对于结肠癌转移的抑制作用,本研究采用 Transwell 迁移实验观察经 Cap 干预后结肠癌细胞 SW620 的迁移能力,发现高、中、低剂量组 Cap 均可显著减少结肠癌细胞迁移数,表明 Cap 具有抑制结肠癌细胞迁移的作用;而高、中、低剂量组 Cap 干预结肠细胞 FHC 的迁移数无显著减少,但 5-FU 显著抑制 FHC 迁移,表明 Cap 对正常结肠细胞的迁移活性的影响相对于 5-FU 较小。

为验证 Cap 抗结肠癌细胞增殖活性是否与癌基因 K-ras^[4]、c-Src^[5]、c-Myc^[6]表达有关,本研究用 Cap 干预结肠癌细胞后,采用实时定量 PCR 法检测结肠癌细胞上述癌基因的 mRNA 表达,发现高剂量 Cap 可显著降低结肠癌细胞 K-ras、c-Src、c-Myc 的 mRNA 水平,表明 Cap 可能通过抑制癌基因 K-ras、c-Src、c-Myc 进而抑制结肠癌细胞增殖。

EMT 被认为是上皮来源肿瘤细胞获得侵袭和转移能力的重要生物学过程^[7]。为了证实 Cap 抑制结肠癌细胞迁移能力是否与抑制 EMT 过程有关,采用 Western blot 检测了 Cap 干预后的结肠癌细胞 EMT 上皮标志蛋白 E-cadherin 及间质标志蛋白 Vimentin 的表达,发现与 DMSO 对照组相比,Cap 高剂量组可增加结肠癌细胞 E-cadherin 蛋白表达而降低 Vimentin 蛋白表达,表明 Cap 可能通过逆转 EMT 过程抑制结肠癌细胞迁移。

综上所述, Cap 可能通过抑制癌基因(K-ras、c-Src、c-Myc)mRNA 表达从而抑制结肠癌细胞增殖,通过逆转 EMT 过程进而抑制结肠癌细胞转移。与 5-FU 相比, Cap 可能具有更好的应用安全性,具有开发为新一代天然抗肿瘤单体药物的前景。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Siegel R, Xu J. Cancer statistics, 2010 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2010, 60(5):277-300
- [2] 陈琼, 刘志才, 程兰平, 等. 2003-2007 年中国结直肠癌发病与死亡分析 [J]. *中国肿瘤*, 2012, 21(3):179-182
- [3] Lee JH, Chiang SY, Nam D, et al. Capillarasin inhibits constitutive and inducible STAT3 activation through induction of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases [J]. *Cancer Lett*, 2014, 345(1):140-148
- [4] Li Y, Fu XH, Yuan JQ, et al. Colorectal cancer; using blood samples and tumor tissue to detect K-ras mutations [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2015, 15(6):715-725
- [5] Gargalionis AN, Karamouzis MV, Papavassiliou AG. The molecular rationale of Src inhibition in colorectal carcinomas [J]. *Int J Cancer*, 2014, 134(9):2019-2029
- [6] Lee KS, Kwak Y, Nam KH, et al. c-MYC copy-number gain is an independent prognostic factor in patients with colorectal cancer [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10):e0139727
- [7] Cao H, Xu E, Liu H, et al. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review [J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(8):557-569

[收稿日期] 2016-03-11