

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.23.011

冬凌草甲素对人结肠癌细胞株 HCT116 生长的影响及其机制研究 *

金星镜 丁文评 张 莲 田 玮 陈思宇[△]

(上海交通大学医学院附属新华医院肿瘤科 上海 200092)

摘要 目的:研究冬凌草甲素(ORI)对人结肠癌细胞株 HCT116 生长的影响及其可能机制。**方法:**以体外培养的 HCT116 细胞为研究对象,给予不同浓度(0、2.5、5、10、20 μ M)ORI 处理 HCT116 细胞不同时间(0、24、48、72 h),通过 MTT 法检测其对 HCT116 细胞增殖的影响,DAPI 染色观察其对细胞核的形态的影响,western blot 检测细胞内 β -catenin、c-myc 蛋白表达的变化。**结果:**① ORI 可显著抑制 HCT116 细胞的增殖,且此作用随着浓度和作用时间的增加或延长而增强($P < 0.05$)。② ORI 处理 HCT116 细胞 24 小时后,细胞核固缩的百分率随药物作用浓度的增加而增加。③ 5、10、20 μ M ORI 处理 HCT116 细胞 24 小时后,细胞内的 β -catenin、c-myc 蛋白水平均显著下调,且随着 ORI 浓度的增加逐渐减少。**结论:**ORI 能以浓度和时间依赖性的方式抑制 HCT116 细胞的增殖,其机制可能与 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

关键词:冬凌草甲素;结肠癌;HCT116 细胞; β -catenin;c-myc

中图分类号:R733 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)23-4444-03

Effects and Mechanisms of Oridonin on the Growth of HCT116 Cells*

KIM Sung-kyoung, DING Wen-ping, ZHANG Lian, TIAN Wei, CHEN Si-yu[△]

(Department of Oncology, Xinhua Hospital Affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200092, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect and mechanisms of oridonin on the growth of human colon cancer HCT116 cells.

Methods: HCT116 cells were cultured in vitro and treated with various concentrations (0, 2.5, 5, 10, 20 μ M) of ORI for different durations(0, 24, 48, 72 h). The cytotoxic effect of ORI on HCT116 cells was observed by MTT assay. The morphological nuclear changes following treatment with ORI (0, 10, 20 μ M) for 24 h were observed under the fluorescence microscope. Western Blot was used to investigate the expression levels of β -catenin, c-myc in HCT116 cells. **Results:** ① HCT116 proliferation was inhibited in a time and concentration dependent manner after treatment of ORI ($P < 0.05$). ② With the increase of ORI concentration, the percentage of nuclear condensation increased. ③ The expression of β -catenin and c-myc both significantly down-regulated with the ORI concentration increased. **Conclusion:** ORI could inhibit the HCT116 cells proliferation in a time and concentration dependent manner, and the mechanism may be associated with the Wnt/ β -catenin signal pathway.

Key words: Oridonin; Colon cancer; HCT 116; β -catenin; c-myc

Chinese Library Classification: R733 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)23-4444-03

前言

结直肠癌的发生、发展是多步骤、多基因畸变的结果,在此过程中可能涉及到多个途径的分子改变,如 Wnt 通路中的 β -catenin 和 c-myc 等^[1,2]。冬凌草甲素(Oridonin, ORI)是从唇形科香茶菜属植物冬凌草的叶子中提取的一种四环二萜类活性天然有机化合物,具有广泛的生物活性,包括抗炎、抗菌、降压等多种药理作用^[3]。近年来的研究发现,ORI 对多种肿瘤细胞有明显的抑制或杀伤作用,但其机制尚未完全阐明^[4]。本研究旨在观察不同剂量 ORI 处理不同时间对结肠癌细胞株 HCT116 的增殖及 Wnt 信号的影响,以期 ORI 应用于抗结肠癌的治疗提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人结肠癌细胞株 HCT116 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库 / 中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。ORI 购自西安旭煌生物公司,用 DMSO 溶解。胎牛血清、DMEM 培养液、胰酶等购自美国 Gibco 公司;MTT 购自美国 Sigma 公司;DAPI 染色液、SDS-聚丙烯酰胺凝胶(polyacrylamide gelelectrophoresis, PAGE)配制试剂盒、5 $\times$ 蛋白上样缓冲液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、HRP 标记的山羊抗兔抗体和 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体均购自碧云天公司;抗 β -catenin

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81274142, 30300139);上海市科委自然科学基金项目(11ZR1423400);上海市教委重点项目(07ZZ43)

作者简介:金星镜(1985-),女,硕士研究生,主要研究方向:冬凌草甲素抗肿瘤机制研究,

电话:021-2507-7642, E-mail: 13818233815@163.com

[△] 通讯作者:陈思宇,电话:021-2507-7642/7653, E-mail: siyu.chen@shsmu.edu.cn

(收稿日期:2014-03-11 接受日期:2014-04-09)

抗体和抗 c-myc 抗体均来自 Cell Signaling 公司; 抗 β -actin 抗体购自 Proteintech 公司; Western Blot 相关试剂盒购自碧云天公司。PVDF 膜和 ECL 超敏发光液购自 Millipore 公司。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 细胞培养 HCT116 细胞常规培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 在 37℃, 5%CO₂ 的饱和湿度孵育箱中培养, 细胞按 1:5 传代, 2 天一次, 以含 0.25% EDTA 的胰酶常规消化。

1.2.2 MTT 法检测 ORI 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用取对数生长期细胞, 按 1×10^5 个 / mL 孔接种于 96 孔板, 每孔细胞悬液体积为 90 μ L。待细胞贴壁后, 实验组加入不同浓度的 ORI (0、2.5、5、10、20 μ M), ORI 由 DMEM 培养液进行稀释, 每孔所加药物溶液体积均为 10 μ L, 每组设 3 个复孔, 分别培养 24、48 和 72 小时后, 加 0.5% MTT 溶液 10 μ L, 反应 4 小时后, 加 150 μ L 的 10% SDS 溶液过夜溶解, 用酶标仪在 562 nm 波长下测定吸光度(A)值, 并计算各组细胞的生存率。细胞生存率(%)=(实验组吸光度值 - 空白组吸光度值)/(对照组吸光度值 - 空白组吸光度值) $\times$ 100%。

1.2.3 细胞形态学观察 按 10^6 个 / 孔的细胞密度分别接种 HCT116 细胞于 12 孔培养板中, 每个组设 3 个平行孔。用 10 μ M/L 和 20 μ M/L ORI 处理 HCT116 细胞 24 小时后, 进行 DAPI 荧光染色, 于倒置荧光显微镜下观察细胞的形态学变化。

1.2.4 细胞总蛋白的提取及 Western Blot 实验 不同浓度 ORI(0、5、10、20 μ M)处理 HCT116 细胞 24 h, 收集细胞, 加入

RIPA 裂解液后置于冰上静止 30 分钟(min), 离心 15 min(4℃, 14000 rpm)。吸取上清, 检测蛋白浓度及定量, 加上样缓冲液置于 100℃ 水浴中煮沸 10 min 使蛋白变性, 吸取等量蛋白上样于 SDS-PAGE 电泳、转膜, 用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。抗 β -catenn 抗体和抗 c-myc 抗体按 1:1000 比例稀释, 抗 β -actin 抗体按 1:2000 比例稀释, 孵育过夜, 二抗按 1:1000 比例稀释后孵育 1 h, 用 ECL 试剂曝光显色。

1.3 统计学分析

运用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 各组所得计量数据采用均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示, 两组间均数比较用配对样本 t 检验, 以 P<0.05 为差异有统计学意义的标准。

2 结果

2.1 ORI 对 HCT116 细胞的增殖的影响

以不同浓度 ORI(2.5、5、10、20 μ M)处理 HCT116 细胞 24 小时, 细胞生长抑制率分别为(5.04 $\pm$ 0.22)%、(11.15 $\pm$ 0.59)%、(19.78 $\pm$ 2.33)%、(58.86 $\pm$ 0.49)%, 均较对照组显著升高, 差异均有统计学意义(P<0.05)。随着 ORI 作用浓度的增加, HCT116 细胞的存活率逐渐下降, 以 20 μ M ORI 作用时, HCT116 细胞的存活率最低。进一步采用 20 μ M ORI 分别处理 HCT116 细胞 24、48、72 h, 其细胞生长抑制率分别为 (58.86 $\pm$ 0.48)%、(88.74 $\pm$ 0.50)%、(93.34 $\pm$ 0.90)%, 均较对照组显著升高, 差异均有统计学意义(P<0.01)。随着 ORI 作用时间的延长, HCT116 细胞的存活率逐渐下降。见图 1。

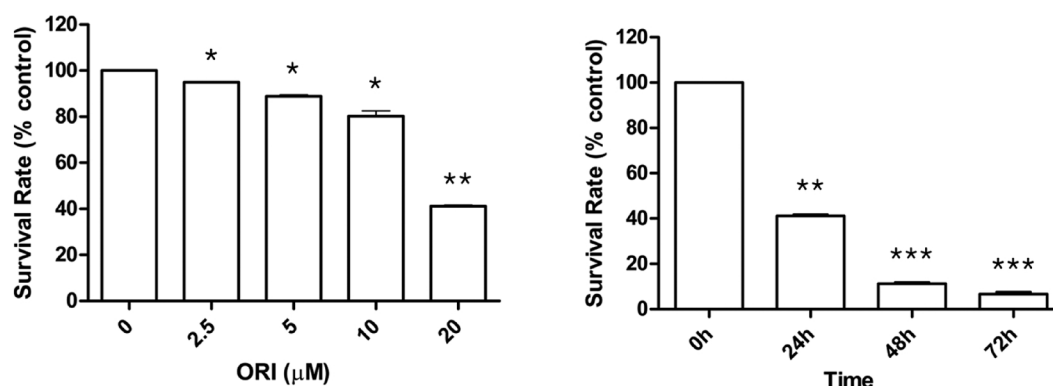


图 1 不同浓度 ORI(左图)作用不同时间(右图)对 HCT116 细胞的增殖的影响

注:(左图)以不同浓度(2.5、5、10、20 μ M/L)的 ORI 处理 HCT116 细胞 24 h, 细胞存活率由 MTT 测得;(右图)20 μ M ORI 处理 HCT116 细胞 0、24、48、72 h, 细胞存活率由 MTT 测得; *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001。

Fig. 1 The Effect of different concentrations of ORI on proliferation of in HCT116 cells treated for different time

Note: (Left)HCT116 cells were treated with different concentrations of ORI for 24h. Cell survival rate was measured by MTT assay; (Right)HCT116 cells were treated by 20 μ M of ORI for 0, 24, 48, 72 h, respectively. Cell survival rate was measured by MTT assay; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

2.2 ORI 对 HCT116 细胞形态学的影响

在荧光显微镜下(200 $\times$)观察, 空白对照组细胞生长良好, 呈均匀微弱的荧光, 细胞核固缩少见(图 2A)。10 μ M ORI 作用 24 小时后, 细胞数目比对照组减少, 出现细胞核固缩、紧密的蓝色荧光(图 2B)。20 μ M ORI 作用 24 小时后, 细胞数目明显减少, 核固缩多见, 细胞膜与细胞核呈浓缩致密的强蓝色荧光(图 2C)。经定量分析, 10 μ M 和 20 μ M ORI 处理 HCT116 细胞 24 小时后, 核固缩的百分率分别为 (19.40 $\pm$ 0.67)%、(36.18 $\pm$

0.48)%, 均显著高于对照组, 差异有统计学意义(P<0.05)。

2.3 ORI 对 HCT116 细胞 β -catenin 和 c-myc 蛋白表达的影响

不同浓度的 ORI(5、10、20 μ M/L)处理 HCT116 细胞 24 小时后, 随着 ORI 作用浓度增加, 细胞 β -catenin、c-myc 的蛋白表达逐渐下调, 与对照组相比均显著下降, 差异均有统计学意义(p<0.05)。见图 3。

3 讨论

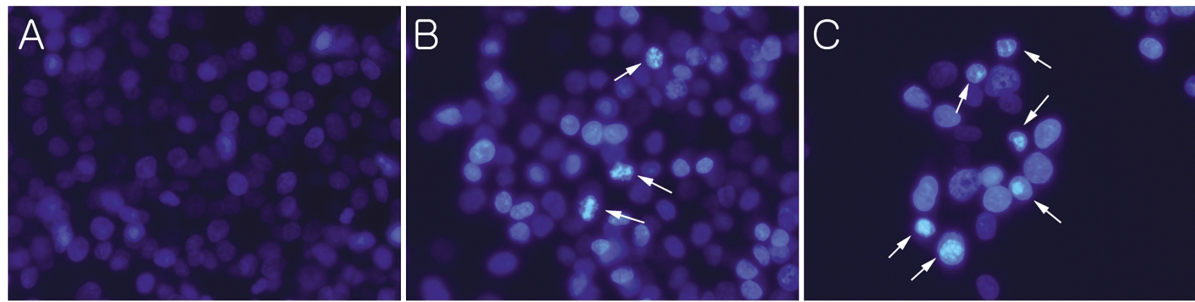


图 2 ORI 对 HCT116 细胞形态学的影响(200×)

Fig.2 Effect of ORI on the morphology of HCT116 cells(200×)

注: A: 对照组; B: 10 μM/L ORI 处理组; C: 20 μM/L ORI 处理组。

Note: A: Control group; B: Experimental group(treated with 10 μM/L ORI); C: Experimental group(treated with 20 μM/L ORI).

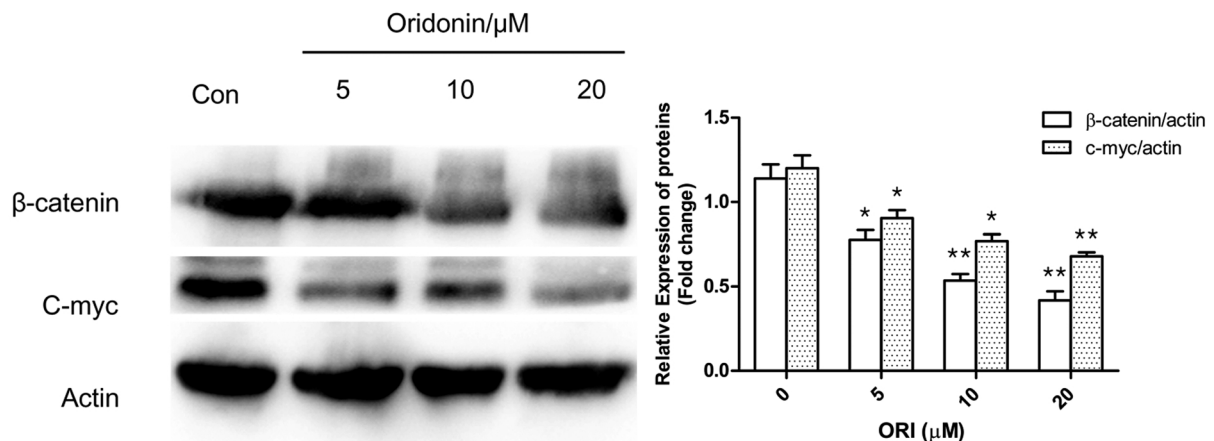


图 3 不同浓度 ORI(5、10、20 μM/L)处理 24 h 对 HCT116 细胞内 β-catenin 及 c-myc 蛋白表达的影响

注:与对照组比较, *P<0.05, **P<0.01。

Fig.3 Effect of different concentrations of ORI (5, 10, 20 μM/L) on the expression of β-catenin and c-myc in HCT116 cells for 24h

Note: Compared with control group, *P<0.05; **P<0.01.

冬凌草甲素(ORI)是贝壳杉烯二萜类天然有机化合物,具有较强的抗肿瘤活性,临床上常用于食管癌、胃癌等治疗^[45],对膀胱癌、卵巢癌、肺腺癌、肝癌、骨肉瘤、白血病等恶性肿瘤也有一定的作用^[67]。近年来,许多研究发现 ORI 可诱导肿瘤细胞凋亡,但其具体的分子机制尚不完全清楚。受 ORI 影响而发生磷酸化变化的蛋白,显著富集在与控制细胞增殖、激酶结合功能、癌症相关的重要通路中^[8]。ORI 可能通过 PI3K/Akt、NF-κ B 等通路抑制乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和急性淋巴细胞白血病 Molt-4 细胞的生长,诱导细胞凋亡^[37];通过调节 Caspase-3 活性诱导胆管癌 GBC-SD 细胞和白血病 Molt-4 细胞的凋亡^[9,10]。邓志成等研究表明,ORI 能通过降低 Survivin、Bcl-2 表达和上调 Bax 表达抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞的生长及诱导细胞凋亡^[11]。本研究观察了 ORI 对 HCT116 细胞增殖的影响,结果表明 ORI 可明显抑制 HCT116 细胞的增殖,且作用呈时间和浓度依赖性。20 μM/L ORI 作用于 HCT116 细胞 72 h 后,细胞形态发生明显改变,且细胞生存率下降了 90 % 以上。

Wnt/β-catenin 信号转导途径是一类传导生长刺激信号的通路,在动物胚胎发育和肿瘤形成中起着重要作用,其中涉及 β-catenin 及 c-myc,这些基因突变引起转导途径失调从而导致多种肿瘤形成^[12]。β-catenin 与 c-myc 蛋白表达与结肠癌细胞的

增殖关系密切。β-catenin 作为 Wnt 通路中的关键环节,与其他信号通道可能相互影响,形成复杂的网络效应,提示 β-catenin 异常表达在肿瘤发展过程中有多重效应^[13,14]。C-myc 作为 Wnt 通路下游的一个靶基因,在大肠腺瘤、腺瘤恶变、大肠癌中呈过表达^[15,16]。当 Wnt 信号存在时,Wnt 蛋白结合于卷曲蛋白(Frizzled)受体和低密度脂蛋白受体相关蛋白 5 或 6(LRP5/6),Wnt 蛋白和 Frizzled 受体的富半胱氨酸富集区、LRP5/6 氨基端形成复合体,导致复合体的出现^[17]。Wnt 复合体的 LRP 5/6 的所极端与 Axin 结合,从蛋白复合体中释放 β-catenin,在细胞质中堆积,从而转入至细胞核。在细胞核,β-catenin 与 TCF/LEF 蛋白结合,激活靶基因 c-myc、VEGF、cyclinD1 等转录^[18]。本研究结果表明不同浓度 ORI 均可明显下调 HCT116 细胞 β-catenin 和 c-myc 的蛋白表达水平,且随着 ORI 浓度的增加,其表达也逐渐减少。因此,我们推测 ORI 可能通过 Wnt/β-catenin 信号通路,下调 c-myc 表达,从而抑制 HCT116 细胞的增殖。

综上所述,ORI 能显著抑制人结肠癌 HCT116 细胞的增殖,其机制可能与抑制 Wnt/β-catenin 信号通道有关。ORI 作为一种中药制剂,具有临床应用及开发价值,本研究为进一步深入研究 ORI 抗结肠癌的分子机制提供了实验基础。

- cerebral ischemia/reperfusion injury through its antioxidant activity [J]. *Eur J Pharmacol*, 2010, 643(2-3): 211-217
- [10] Sahota P, Savitz SI. Investigational therapies for ischemic stroke: neuroprotection and neurorecovery[J]. *Neurotherapeutics*, 2011, 8(3): 434-451
- [11] He Y, Wan H, Du Y, et al. Protective effect of Danhong injection on cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(2): 387-394
- [12] Jia JH, Chen KP, Chen SX, et al. Breviscapine, a traditional Chinese medicine, alleviates myocardial ischaemia reperfusion injury in diabetic rats[J]. *Acta Cardiol*, 2008, 63(6): 757-762
- [13] Tu Q, Wang R, Ding B, et al. Protective and antioxidant effect of Danshen polysaccharides on cerebral ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Int J Biol Macromol*, 2013, 60: 268-271
- [14] Chang BB, Zhang L, Cao WW, et al. Pharmacokinetic interactions induced by content variation of major water-soluble components of Danshen preparation in rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2010, 31(5): 638-646
- [15] LeMay DR, Gehua L, Zelenock GB, et al. Insulin administration protects neurologic function in cerebral ischemia in rats [J]. *Stroke*, 1988, 19(11): 1411-1419
- [16] Annapurna A, Ansari MA, Manjunath PM. Partial role of multiple pathways in infarct size limiting effect of quercetin and rutin against cerebral ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2013, 17(4): 491-500
- [17] Dhote V, Balaraman R. Anti-oxidant activity mediated neuroprotective potential of trimetazidine on focal cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2008, 35(5-6): 630-637
- [18] Wei Q, Yin Y, Xi M, et al. Antioxidant properties of magnesium lithospermate B contribute to the cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in vivo and in vitro[J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33 (1): 85-91
- [19] Ho JH, Hong CY. Salvianolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection[J]. *J Biomed Sci*, 2011, 18: 30
- [20] Lin LL, Liu AJ, Liu JG, et al. Protective effects of scutellarin and breviscapine on brain and heart ischemia in rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50 (3): 327-332

(上接第 4446 页)

参考文献(References)

- [1] Xiao X, Chen WC, Lin M, et al. Study on expressions and clinical significance of β -catenin /c-myc by immunohistochemical staining to tissue microarray in human colon cancer[J]. *MMJC*, 2007, 9(1): 1-4
- [2] Wong NA, Pignatelli M. Beta-catenin - a linchpin in colorectal carcinogenesis[J]. *Am J Pathol*, 2002, 260: 389-401
- [3] Liu Q, Li BM, Bie J, et al. NK- κ B in oridonin- induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia Molt- 4 cells[J]. *Laser J*, 2013, 43(3): 81-82
- [4] Tang XQ, Zhu BY, Wang WC, et al. Molecular mechanism of oridonin in inhibiting proliferation and inducing apoptosis of osteosarcoma cell MG-63[J]. *Traditional Chin Drug Res Clin Pharm*, 2013, 24(1): 43-47
- [5] Shen W, Xu J, Sun J, et al. Study on cyclin D/Rh/p16 signal pathway of BxPC-3 cell line treated with oridonin [J]. *Chin Academic J*, 2013, 37(5): 595-600
- [6] Zhao D, Liu HY, Zhao H. Inhibiting effect of oridonin on proliferation of bladder cancer T24 cells[J]. *Chin Modern Med*, 2013, 20(14): 4-6
- [7] Wang M, Zhang Y, Xie XR, et al. Oridonin induces MDA-MB-231 cells apoptosis through PI3K/Akt pathway in vitro [J]. *Chin J Clin Pharm*, 2013, 18(2): 161-165
- [8] Tun LL, Li Z, Sun H, et al. The protein phosphorylation profile in oridonin-treated kasumi-1 cells [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2013, 29 (7): 506-514
- [9] Ding XX, Luo WD, Zhang J, et al. Oridonin-induced GBC-SD cell apoptosis through mitochondrial pathway[J]. *J Med Res*, 2013, 42(3): 111-113
- [10] Liu Q, Wu G, Ye CY, et al. Effects of oridonin on the progress of apoptosis in acute lymphoblastic leukemia Molt-4 cells and its mechanism[J]. *West Chin Med J*, 2013, 28(6): 834-836
- [11] Deng ZC, Chen S, Liu SH. Oridonin inhibits cell growth on human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells by induction of apoptosis [J]. *Chin J Sur Oncol*, 2013, 5(1): 50-54
- [12] Zhang LJ, Li M, Chen Y, et al. Expression of β -catenin and c-myc in human colorectal adenocarcinoma[J]. *J Colorectal Anal Sur* 2007, 13 (5): 275-278
- [13] Yao ZQ, Ou C, Zhu B, Cao J, et al. Expression of beta-catenin, cyclinD1 and c-myc genes in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res on Prevention and Treatment*, 2006, 33(12): 849-852
- [14] He YJ, Liu ZX, Qiao C, et al. Expression and significance of Wnt signaling components and their target genes in breast carcinoma[J]. *Molecular medicine reports*, 2014, 9(1): 137-143
- [15] Dai WB, Ren ZP, Chen WL, et al. Expression and Significance of APC, β -catenin, C-myc, and Cyclin D1 Proteins in Colorectal Carcinoma[J]. *Chin J Cancer*, 2007, 26(9): 963-966
- [16] Giles RH, Van Es JH, Clevers H, et al. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1653(1): 12-241
- [17] Liu X, Wang Y, Yin PH, et al. Wnt / β -catenin signal pathway regulates VEGF expression in human colorectal cancer cells [J]. *Chin Oncol*, 2012, 22(12): 881-885
- [18] Lv ZL, Chuan W, Yuan TX, et al. Bone morphogenetic protein 9 regulates tumor growth of osteosarcoma cells through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Oncology reports*, 2014, 31(2): 989-994