

大黄素对 HCT116 结肠癌细胞凋亡作用及机制研究

张昊悦¹, 赵蓓², 章阳¹

(1.南京中医药大学附属南京中医院,江苏 南京 210001;2.上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院,上海 200437)

摘要:目的 研究大黄素促进人结肠癌细胞 HCT116 细胞凋亡的作用及其分子机制。方法 通过 CCK8 法检测大黄素对细胞活力的影响,并计算出 IC₅₀。Annexin-V/PI 流式细胞术检测细胞凋亡,流式细胞术检测细胞周期和荧光探针 DCF-DA 细胞内活性氧(ROS)的水平,Western blot 法检测 Bax、Bcl-2、p-ERK1/2、ERK1/2 和 c-Myc 的表达。结果 不同浓度的大黄素抑制 HCT116 细胞的活力,并且具有浓度依赖性。大黄素将 HCT116 细胞周期阻滞在 G₀/G₁ 期($P < 0.05$),并且能够明显诱导 ROS 的产生($P < 0.01$),Western blot 结果显示大黄素能够引起 Bax/Bcl-2 表达的上调,p-ERK1/2 和 c-Myc 表达的降低($P < 0.05$)。结论 大黄素可以通过上调 Bax/Bcl-2,下调 c-Myc 和 p-ERK/ERK 的表达从而促进结肠癌细胞的凋亡,阻滞细胞周期和增加 ROS 的产生。

关键词:大黄素;凋亡;活性氧;HCT116 细胞;c-Myc

中图分类号:R285.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-0482(2020)04-0485-04

DOI:10.14148/j.issn.1672-0482.2020.0485

引文格式:张昊悦,赵蓓,章阳.大黄素对 HCT116 结肠癌细胞凋亡作用及机制研究[J].南京中医药大学学报,2020,36(4):485-488.

Effect and Mechanism of Emodin on Apoptosis and Cycle of HCT116 Cells

ZHANG Hao-yue¹, ZHAO Bei², ZHANG Yang¹

(1. Nanjing Hospital of Chinese Medicine Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210001, China; 2. Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 200437, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of emodin on human colon cancer cell line HCT116 and its molecular mechanism. **METHODS** The inhibitory effects of emodin on the viability of HCT116 cells were measured by CCK8 assay. Apoptosis rates of HCT116 cells were determined by flow cytometry. The cell cycle and the level of reactive oxygen species (ROS) in the fluorescent probe DCF-DA were detected by flow cytometry. The protein levels of Bax, Bcl-2, p-ERK1/2, ERK1/2 and c-Myc were determined by Western blot. **RESULTS** Treatment with emodin of 0, 25, 50, 100, 200, 300 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h significantly reduced the viability of HCT116 cells. Emodin promoted the apoptosis of HCT116 cells, blocked cell growth cycle in G₀/G₁ phase and induced the production of ROS, significantly. Western blot results showed that emodin promoted the up-regulation of Bax/Bcl-2 expression and inhibited the expression of c-Myc and p-ERK/ERK. **CONCLUSION** Emodin inhibits the proliferation of HCT116 cells, promotes cell apoptosis, induces cell cycle arrest in G₁/G₀ phase and ROS production, by promoting Bax/Bcl-2 expression and inhibiting c-Myc, p-ERK/ERK expression.

KEYWORDS: emodin; apoptosis; ROS; HCT116 cells; c-Myc

结肠癌是最常见的恶性肿瘤之一。结肠癌患者的常规治疗包括手术、介入治疗和化学疗法。尽管结肠癌在诊断和治疗水平取得了许多进展,但结肠癌的迁移和死亡率仍然很高^[1]。

大黄素是一种从许多植物中分离出的蒽醌衍生物,包括棕榈、大黄、虎杖、何首乌和决明子。近几年研究表明,大黄素可下调 ILK-PI3K/Akt^[2]、PI3K/Akt^[3] 信号通路、改变 Bcl-2 家族蛋白和细胞存活途

收稿日期: 2019-12-11

基金项目: “十三五”南京市卫生青年人才培养工程(NWQR-201703)

第一作者: 张昊悦,女,硕士研究生,E-mail:570724720@qq.com

通信作者: 章阳,男,副主任中医师,主要从事中医外科肛肠疾病研究,E-mail:2015676163@qq.com

径^[4],显著抑制结肠癌细胞株 Caco-2 增殖,影响细胞周期,促进其凋亡。体内研究也发现大黄素通过 Wnt/ β -Catenin 途径抑制上皮间质转化,从而抑制结肠癌细胞侵袭和迁移^[5]。蒽醌类衍生物也可通过抑制 ERK1/2 活性从而降低 ERCC1 表达,抑制 HCT116 结肠癌细胞的增殖和迁移^[6]。大黄素的抗肿瘤作用具有多靶点、多途径的特点,能联合多种抗肿瘤药物起协同作用^[7],还能增加肿瘤细胞对放疗的敏感性并减轻其副作用。大黄素能够诱导结肠癌细胞的凋亡,但是对于阻滞结肠癌细胞周期和诱导活性氧(ROS)的具体机制并未阐明,所以本研究将从这几个方面进行探讨。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 药物 大黄素(中国食品药品检定研究院,批号:110756-201913)。

1.1.2 细胞株 HCT116 细胞株购买于中国科学院上海科学研究所细胞库。用含有 10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素的 RPMI1640 培养基培养于 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养箱。

1.1.3 主要试剂 CCK8 试剂盒(同仁化学研究所,批号:NM598);细胞凋亡试剂盒(美国 Thermo Forma 公司,批号:2051233),PI 细胞周期检测试剂盒(美国 BD Biosciences 公司,批号:9228966),ROS 检测试剂盒(美国 Solarbio 公司,批号:R5901180);Bcl-2、Bax、ERK1/2、p-ERK1/2、c-Myc、 β -Actin 抗体(CST,货号:15071、14796、4370、4695、18583、4970),二抗(美国 Jackson ImmunoResearch Laboratories),超敏 ECL 化学反应发光试剂盒(新赛美生物科技有限公司,批号:19091716)。

1.1.4 主要仪器 CO₂ 培养箱,超净工作台,酶标仪(瑞士 Tecan 公司);Cytotflex 流式细胞仪(美国贝克曼库尔德公司)。

1.2 方法

1.2.1 CCK8 法测定大黄素对 HCT116 细胞活力的影响 取对数生长期细胞,接种于 96 孔板,每孔 5 000 个细胞,置培养箱(37 $^{\circ}$ C,5% CO₂)中孵育过夜。加入不同浓度的大黄素培养 24 h,浓度分别为 0、25、50、100、200、300 μ mol/L,设定 3 个平行组,24 h 后,每孔加入 10 μ L 的 CCK8,放置培养箱孵育 1.5 h,用酶标仪(450 nm)测吸光度值(OD)。根据下列公式计算:细胞存活率 = 实验孔 OD/对照孔 OD \times 100%。

1.2.2 Annexin-V/PI 流式细胞术检测大黄素对 HCT116 细胞凋亡的影响 取对数生长期细胞,接种于 6 孔板,每孔 3×10^5 个细胞,置培养箱中孵育过夜。加入不同浓度(30、60 μ mol/L)大黄素培养 24 h,每个剂量设定 3 个平行组。收集细胞,PBS 洗涤 2 次,Binding buffer 100 μ L 重悬,加入 5 μ L Alexa Fluor[®] 488 annexin V and 1 μ L 100 μ g/mL PI 室温避光孵育 15 min,流式上机检测。

1.2.3 流式细胞术检测大黄素对 HCT116 细胞周期的影响 按照 1.2.2 方法铺板,置培养箱中孵育过夜。加入不同浓度(30、60 μ mol/L)大黄素培养 24 h,每个剂量设定 3 个平行组。收集细胞,PBS 洗涤 2 次,用 70% 酒精放置 -20 $^{\circ}$ C 冰箱固定过夜。24 h 后取出,先用 PBS 洗涤 2 次,加入 PI 染色液,4 $^{\circ}$ C 避光染色 15 min,流式上机检测。

1.2.4 流式细胞术检测大黄素对 HCT116 细胞内 ROS 产生的影响 细胞培养和处理同 1.2.2,大黄素作用 24 h 后,收集细胞,用预冷的 PBS 冲洗 2 次,10 μ mol/L DCF-DA 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,用 PBS 清洗 2 遍,流式上机检测。

1.2.5 Western blot 检测大黄素对 HCT116 细胞相关蛋白表达 按照 1.2.2 方法铺板,药物作用 24 h 后,消化收集细胞,用预冷的 PBS 洗涤细胞,每孔加入 RIRA 裂解液 100 μ L,收集细胞于 1.5 mL 离心管中。冰上放置 30 min,然后 4 $^{\circ}$ C,12 000 \times g,离心 15 min,取上清液,蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。加入蛋白上样缓冲液,用金属浴变性 10 min。使用 10% SDS-PAGE 电泳分离,200 mA 恒流转膜 90 min,5% 脱脂奶粉,室温封闭 1 h;4 $^{\circ}$ C 过夜孵育一抗(1:1 000),TBTS 溶液洗 3 次,每次 10 min,室温孵育二抗(1:20 000)1 h;TBST 溶液洗 3 次,每次 10 min,然后使用 ECL 发光法检测蛋白。使用 Image J 软件对图像进行分析。

1.3 统计学方法

应用 GraphPad Prism 6 统计软件分析,独立样本采用 t 检验分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大黄素抑制 HCT116 细胞增殖

由表 1 可知,大黄素对 HCT116 细胞有明显的抑制作用($P < 0.01$),并呈浓度依赖性,通过计算得知 24 h 的 IC₅₀ 值为 60.13 μ mol/L。我们选用

30 μmol/L 和 60 μmol/L 作为接下来实验的浓度。

2.2 大黄素对 HCT116 细胞凋亡的影响

从图 1 和表 2 中可知,与对照组比较,大黄素在 30、60 μmol/L 早期凋亡率和晚期凋亡率均显著增加($P < 0.01$)。

表 1 大黄素对 HCT116 细胞活力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 细胞活力/% |
|--------------|-----------------|
| 对照组 | 1.00 ± 0.92 |
| 25 μmol/L 组 | 61.75 ± 0.11 ** |
| 50 μmol/L 组 | 56.54 ± 0.68 ** |
| 100 μmol/L 组 | 44.16 ± 0.29 ** |
| 200 μmol/L 组 | 31.86 ± 0.93 ** |
| 300 μmol/L 组 | 14.68 ± 0.66 ** |

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

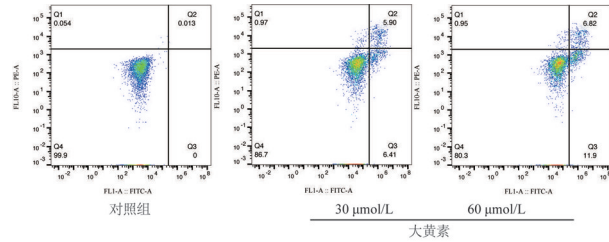


图 1 流式细胞术检测大黄素对 HCT116 细胞凋亡的影响

表 2 大黄素对 HCT116 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 早期凋亡/% | 晚期凋亡/% |
|-------------|-----------------|----------------|
| 对照组 | 0.16 ± 0.09 | 0.09 ± 0.07 |
| 30 μmol/L 组 | 6.61 ± 0.28 ** | 6.29 ± 0.20 ** |
| 60 μmol/L 组 | 12.26 ± 0.31 ** | 7.49 ± 0.38 ** |

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

2.3 大黄素对 HCT116 细胞周期的影响

如图 2 和表 3 显示,与对照组比较,加入浓度为 30、60 μmol/L 的大黄素能够显著将 HCT116 细胞阻滞在 G1/G0 期($P < 0.01$)。

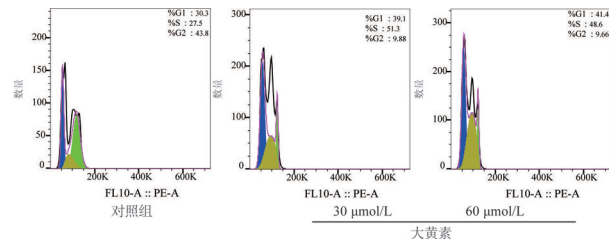


图 2 流式细胞术检测大黄素对 HCT116 细胞周期的影响

表 3 大黄素对 HCT116 细胞周期阻滞的影响

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | G1/G0 期 | S 期 | G2 期 |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 对照组 | 29.63 ± 0.41 | 26.33 ± 0.88 | 44.03 ± 1.01 |
| 30 μmol/L 组 | 38.10 ± 0.81 ** | 47.70 ± 0.20 ** | 14.20 ± 0.99 ** |
| 60 μmol/L 组 | 43.07 ± 0.38 ** | 51.37 ± 0.82 ** | 5.57 ± 0.22 ** |

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

2.4 大黄素对 HCT116 细胞内 ROS 水平的影响

由图 3 和表 4 结果显示,30、60 μmol/L 大黄素作用于细胞 24 h,与对照组比较,细胞内 ROS 水平显著升高($P < 0.01$)。

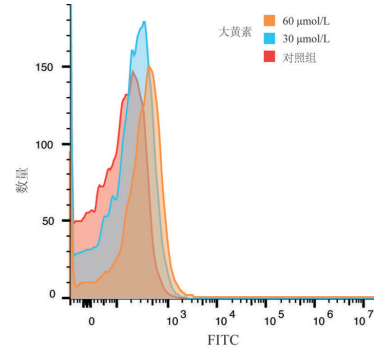


图 3 流式细胞术检测各组 HCT116 细胞内 ROS 水平的表达

表 4 大黄素对 HCT116 细胞内 ROS 水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | ROS 荧光强度 |
|-------------|------------------|
| 对照组 | 114.67 ± 0.53 |
| 30 μmol/L 组 | 306.33 ± 0.84 ** |
| 60 μmol/L 组 | 424.33 ± 0.65 ** |

注:与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

2.5 大黄素对 HCT116 细胞中 Bax/Bcl-2、c-Myc、p-ERK/ERK 蛋白表达的影响

从图 4 和表 5 中可以得出,30、60 μmol/L 大黄素作用于 HCT116 细胞 24 h 后,大黄素能够促进促凋亡蛋白 Bax 增加和抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 减少,抑制 p-ERK1/2、c-Myc 蛋白的表达,差异有统计学意义($P < 0.05 \sim 0.01$)。

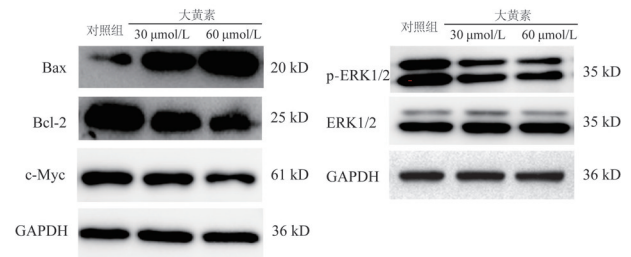


图 4 各组 HCT116 细胞中相关蛋白的表达

表 5 大黄素对 HCT116 细胞中相关蛋白的影响

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | Bax/Bcl-2 | p-ERK/ERK | c-Myc |
|-------------|----------------|----------------|----------------|
| 对照组 | 0.53 ± 0.08 | 1.77 ± 0.06 | 1.34 ± 0.02 |
| 30 μmol/L 组 | 0.92 ± 0.04 * | 0.87 ± 0.06 * | 1.05 ± 0.03 * |
| 60 μmol/L 组 | 1.53 ± 0.09 ** | 0.67 ± 0.01 ** | 0.86 ± 0.02 ** |

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

有研究表明大黄素能够通过损伤有丝分裂导致

癌细胞的死亡^[8],还能对 HepaRG 产生 ROS,阻滞 S 和 G2/M 期的细胞周期进程并诱导凋亡^[9]。大黄素能够通过以 ROS 依赖性方式自噬诱导结肠癌细胞的凋亡^[10],通过线粒体膜电位的丧失,Bcl-2 家族蛋白的调节以及人结肠癌 Caco-2 细胞和肝癌 HepaRG 细胞中 Caspase 的活化来诱导凋亡^[11]。本研究发现,大黄素可促进人结肠癌细胞 HCT116 的凋亡,阻滞细胞周期在 G0/G1 期,增加 ROS 的水平从而对细胞凋亡产生一定的影响。

许多蛋白在细胞凋亡中发挥了重要的作用。Bcl-2 和 Bax 是近年来 Bcl-2 家族研究中最具有代表性的抗凋亡因子及促凋亡因子^[12],都直接与细胞凋亡相关。Bax 蛋白表达升高能直接促进肿瘤细胞的凋亡;Bcl-2 水平升高则抑制肿瘤细胞的凋亡^[13]。随着 Bcl-2 减少和 Bax 增加,线粒体释放相关物质,对细胞凋亡产生影响。线粒体是 ROS 的主要来源,与 ROS 在活生物体中的作用有关,并参与 ROS 的调节以维持稳态细胞环境并防治细胞氧化损伤^[14]。大量文献表明,ROS 能够引起 DNA 的损伤导致肿瘤细胞的死亡^[15-16]。本研究中大黄素能够促进 HCT116 细胞的凋亡,并且能够增加 Bax,降低 Bcl-2 蛋白的表达从而破坏线粒体,诱导 ROS 的产生。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)途径在许多癌症中经常会发生突变,活化的 ERK 能磷酸化许多底物,包括激酶和转录因子,这些底物执行与细胞周期、增殖、代谢和逃避凋亡相关的各种细胞程序^[17]。c-Myc 位于许多调节细胞生长、增殖和代谢的信号通路下游。MAPK 可以刺激 c-Myc 的表达。c-Myc 控制着涉及细胞周期进程、生长和代谢基因的表达,包括数百个调控线粒体质量和生物发生的基因^[18]。致癌 c-Myc 增加了癌细胞支持快速增殖的生物合成、呼吸和代谢能力,与细胞增殖和细胞周期有关^[19-20]。大黄素通过降低 ERK 的磷酸化,从而降低 c-Myc 蛋白的表达,引起 HCT116 细胞的凋亡并且将细胞周期阻滞在 G1/G0。

本研究证实,大黄素能够抑制 p-ERK/ERK 和 c-Myc 通路从而促进 HCT116 细胞的凋亡,阻滞细胞周期,破坏线粒体,诱导细胞产生 ROS。提示大黄素诱导结肠癌细胞凋亡的新机制,具有多靶点的抗癌效应,为大肠素抗癌作用提供新证据。

参考文献

[1] MILLER KD, NOGUEIRA L, MARIOTTO AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019 [J]. CA Cancer J

Clin, 2019, 69(5): 363-385.

- [2] 李中辉,董旺,陈敏,等.大黄素下调 ILK/PI3K/Akt 信号通路抑制结肠癌 CACO-2 细胞增殖的机制研究[J].今日药学,2020,30(2):116-120.
- [3] MA QZ, DING YQ, WU ZQ, et al. Antitumor effects of emodin in CACO-2 human colon carcinoma cells are mediated via apoptosis, cell cycle arrest and downregulation of PI3K/AKT signaling pathway[J]. J BUON, 2018, 23(3): 587-591.
- [4] SAUNDERS IT, MIR H, KAPUR N, et al. Emodin inhibits colon cancer by altering BCL-2 family proteins and cell survival pathways[J]. Cancer Cell Int, 2019, 19: 98.
- [5] GU J, CUI CF, YANG L, et al. Emodin inhibits colon cancer cell invasion and migration by suppressing epithelial-mesenchymal transition via the wnt/ β -catenin pathway[J]. Oncol Res, 2019, 27(2): 193-202.
- [6] 郑婕. 萹蓄类衍生物 C3 通过 ERK1/2-ERCC1 信号通路对结肠癌细胞影响的研究[D]. 太原: 山西大学, 2019.
- [7] 林玩福,汪晨,凌昌全. 大黄素抗肿瘤作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(20): 3937-3940.
- [8] TRYBUS W, KRÓL T, TRYBUS E, et al. Emodin induces death in human cervical cancer cells through mitotic catastrophe[J]. Anticancer Res, 2019, 39(2): 679-686.
- [9] DONG X, NI BR, FU J, et al. Emodin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepaRG cells via the mitochondrial caspase-dependent pathway[J]. Oncol Rep, 2018, 40(4): 1985-1993.
- [10] WANG YY, LUO Q, HE XL, et al. Emodin induces apoptosis of colon cancer cells via induction of autophagy in a ROS-dependent manner[J]. Oncol Res, 2018, 26(6): 889-899.
- [11] DONG X, NI B, FU J, et al. Emodin induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepaRG cells via the mitochondrial caspase-dependent pathway[J]. Oncol Rep, 2018, 40: 1985-1993.
- [12] LUNA-VARGAS MPA, CHIPUK JE. Physiological and pharmacological control of BAK, BAX, and beyond[J]. Trends Cell Biol, 2016, 26(12): 906-917.
- [13] 龚张斌,徐品初,金国琴. 左归丸对大鼠胸腺细胞凋亡及 Bcl-2, Bax 表达的影响[J]. 中国老年学杂志, 2010, 30(22): 3290-3292.
- [14] GILL JG, PISKOUNOVA E, MORRISON SJ. Cancer, oxidative stress, and metastasis[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2016, 81(1): 163-175.
- [15] GAN XQ, HUANG SB, WU L, et al. Inhibition of ERK-DLP1 signaling and mitochondrial division alleviates mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease cybrid cell[J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1842(2): 220-231.
- [16] PYAKUREL A, SAVOIA C, HESS D, et al. Extracellular regulated kinase phosphorylates mitofusin 1 to control mitochondrial morphology and apoptosis[J]. Mol Cell, 2015, 58(2): 244-254.
- [17] WANG D, XU Y, FENG L, et al. RGS5 decreases the proliferation of human ovarian carcinoma-derived primary endothelial cells through the MAPK/ERK signaling pathway in hypoxia[J]. Oncol Rep, 2018, 41(1): 165-177.
- [18] PYAKUREL A, SAVOIA C, HESS D, et al. Extracellular regulated kinase phosphorylates mitofusin 1 to control mitochondrial morphology and apoptosis[J]. Mol Cell, 2015, 58(2): 244-254.
- [19] LEE WD, MUKHA D, AIZENSSTEIN E, et al. Spatial fluxomics provides a subcellular-compartmentalized view of reductive glutamine metabolism in cancer cells[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 1351.
- [20] ZHAO HX, LI T, WANG K, et al. AMPK-mediated activation of MCU stimulates mitochondrial Ca^{2+} entry to promote mitotic progression[J]. Nat Cell Biol, 2019, 21(4): 476-486.

(编辑:杨巍敏)