

南蛇藤总萜诱导自噬抑制结直肠癌细胞增殖的实验研究

杨林^{1,2} 王梅^{1,3} 钱亚云¹ 金凤¹ 王海波¹ 史有阳¹ 郭试瑜⁴ 久光正⁴ 刘延庆¹
(1.扬州大学医药研究所,江苏扬州 225009; 2.扬州大学医学院,江苏扬州 225009;
3.扬州市第一人民医院,江苏扬州 225001; 4.昭和大学医学院,日本东京 142)

摘要 目的:探讨南蛇藤总萜(COE)是否通过诱导自噬来抑制结直肠癌细胞增殖。方法:用不同浓度的 COE 处理体外培养的大肠癌 HT-29 细胞,噻唑蓝(MTT)法检查细胞存活率,透射电镜(TEM)观察细胞形态,免疫印迹法(Western blot)检测 COE 对细胞自噬相关蛋白表达的影响,并采用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA)联合 COE 干预 HT-29 细胞,用吖啶橙染色细胞、MTT 法检测 3-MA 对 COE 抑制 HT-29 细胞增殖的影响。结果:COE 抑制 HT-29 细胞的增殖,作用 24h 的 IC₅₀ 为 156 μg/mL;随着 COE 浓度的升高,TEM 示细胞中自噬体明显增多,和 COE 治疗组比较,COE 联合 3-MA 组的细胞生存率升高,而自噬泡(AVO)的数量显著下降,微管相关蛋白-Ⅱ(LC3-Ⅱ)表达也降低。结论:COE 可能通过上调 Bcl-2 同源结构域蛋白抗体-1(Beclin-1)和 LC3-Ⅱ 的表达来增加 HT-29 细胞的自噬活性,从而抑制 HT-29 细胞的增殖作用。

关键词 南蛇藤提取物(COE) 细胞自噬 人结直肠癌细胞 细胞存活率 病理学 体外实验
中图分类号 R282.710.5 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2017)02-0075-04

南蛇藤(*Celastrus orbiculatus* Thunb.),又名过山风、降龙草、黄藤等,为卫矛科南蛇藤属植物,始载于清代《植物名实图考》。现代药物化学研究证实,南蛇藤植物体的萜类、黄酮类、生物碱等含量较高。本课题组前期研究表明,南蛇藤总萜(*C. orbiculatus ethyl acetate extract*, COE)可以诱导肿瘤细胞凋亡,降低肿瘤细胞的侵袭和黏附能力,抑制肿瘤血管生成,增加机体免疫功能等,具有多方面抗肿瘤作用^[1-5]。本研究利用透射电镜、Western-blot 等技术检测自噬相关标志物变化,从细胞自噬角度来研究 COE 抗结直肠癌作用的可能机制。

1 实验材料

1.1 药物与细胞 南蛇藤购自广州致信药业有限公司,批号 070510,经中国药科大学中药资源研究室秦民坚教授鉴定为卫矛科南蛇藤 *C. orbiculatus* Thunb. 的藤茎。人大肠癌 HT-29 细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 试剂 RPMI 1640 培养基,胰蛋白酶 EDTA 购买于 Gibco 公司;胎牛血清(FBS,批号:NWC03888),

购于 Hyclone 公司;四甲基偶氮唑盐(MTT,批号 298-93-1)、3-甲基腺嘌呤(3-MA)购于 Sigma 公司;吖啶橙(上海生工生物工程有限公司);Beclin-1、LC3 抗体购于 Cell Signaling 公司。

1.3 仪器 8000 WJ CO₂ 培养箱、CL30R 高速台式冷冻离心机均为美国 Thermo Scientific Forma 公司产品;iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);荧光显微镜(Olympus BX51,日本 Olympus 公司);JEM1230 透射电镜(日本电子株式会社)。

2 实验方法

2.1 药物制备 将南蛇藤茎切断、粉碎成粉,烘干(15kg),用 95%乙醇(150L)提取 3h,重复 3 次,合并提取液,旋转蒸发仪回收乙醇,浸膏(900g)加水分散后,石油醚萃取 3 次,再用乙酸乙酯萃取 3 次,收集乙酸乙酯层,水洗涤 3 次,减压浓缩,真空冻干,得南蛇藤茎乙酸乙酯提取物 250g,每克提取物含生药 60g,4℃贮存。以 DMSO(终浓度<0.1%)助溶,培养液稀释,0.2 μm 孔径过滤器过滤后,4℃避光保存,2 周内使用,用时调整至实验需要浓度。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81274141、81450051、81403232、81573656);江苏省自然科学基金资助项目(BK20141280);江苏省中医药科技项目(YB2015183、LZ11210)

2.2 细胞培养 人大肠癌 HT-29 细胞生长于含 10%胎牛血清、 1×10^5 U/L 青霉素和 100mg/L 链霉素的 RPMI 1640 培养基中,于 37℃含 5%CO₂ 及饱和湿度的二氧化碳培养箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。

2.3 MTT 法检测细胞存活率 将 COE 配置成 10×160mg/L 的母液,悬浮 5×10^4 mL 的 HT-29 细胞接种于 96 孔板中,每孔 100μL,设 control 组 (COE 为 0mg/L)和 COE 10、20、40、80、160、320mg/L 组,另设 5-Fu 组作阳性对照 (给予 25mg/L 的 5-Fu),5 孔/组,加不同浓度的 COE 或 5-FU 溶液,于 37℃含 5%CO₂ 及饱和湿度的二氧化碳培养箱中分别培养 24h、48h、72h 后,去上清,每孔加入 20μL MTT 溶液 (5g/L,用 PBS 配制,pH7.5),继续孵育 4h 后,每孔加入 150μL DMSO,微孔板振荡器振荡 10min,酶标仪 490nm 检测各孔吸光度 (A 值)。实验重复 3 次,按以下公式计算细胞存活率:

$$\text{细胞存活率} = (\text{加药组 D 值} - \text{空白组 D 值}) / (\text{对照组 D 值} - \text{空白组 D 值}) \times 100\%$$

2.4 自噬形态学观察 胰酶消化培养皿中的细胞,离心收获细胞,PBS 清洗 2 遍,2.5%戊二醛 (0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,pH7.4)固定 30min,1% OsO₄ (0.1mol/L 磷酸盐缓冲液,pH7.2)4℃继续固定 2h,乙醇进行系列脱水,接着切成 60nm 厚度的薄片,醋酸铀-柠檬酸铅 (Fluka)复染,JEM1230 透射电镜 (日本)下观察。

2.5 Western blot 检测相关蛋白表达 接种细胞密度为 5×10^4 mL 的 HT-29 细胞于 6 孔板中,加入不同浓度的 COE 溶液培养 24h,收集细胞,提取蛋白,煮沸 10min 后上样,SDS-PAGE 电泳分离,电转至 PVDF 膜上,洗膜,封闭,加一抗,4℃过夜,洗膜,加辣根过氧化物酶标记的二抗,37℃孵育 2h,TBST 缓冲液洗涤后,HRP 发光法检测蛋白表达。

2.6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件处理收据,数据采用 (means±SD),用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义,实验数据均重复 3 次以上。

3 实验结果

3.1 COE 对人大肠癌 HT-29 细胞存活率的影响 结果见图 1。COE 能抑制 HT-29 细胞的增殖,且抑制效果随着浓度、时间的增加而增强,24h 的 IC₅₀ 是 156.6μg/mL。

3.2 COE 诱导结肠癌 HT-29 细胞自噬的产生 电镜观察是检测自噬体的金标准,为确定自噬现象,我们通过电镜直接观察自噬体的变化,80、160mg/L COE 浓度组的 HT-29 细胞出现大量的双层或单层包含胞浆成分的自噬体,显著多于对照细胞 (图 2A),表明 COE 能诱导 HT-29 细胞自噬产生。

LC3 是检测自噬现象的特异标记分子,自噬形成时,胞浆型微管相关蛋白 (LC)3 (即 LC3-I) 被酶解掉一个小段多肽,转变为膜型 LC3 (即 LC3-II,表达于自噬体膜上),因此,LC3-II 的表达可估计自噬水平的高低。Western blotting 观察到,随着 COE 浓度增高,LC3-II 蛋白表达逐渐增加,COE 高浓度组 (80、160mg/L) 与 control 组相比有显著性差异 ($P < 0.01$, 图 2B、C)。

Bcl-2 同源结构域蛋白抗体-1 (Beclin-1) 是哺乳动物参与自噬的特异性基因,作为自噬活化的直

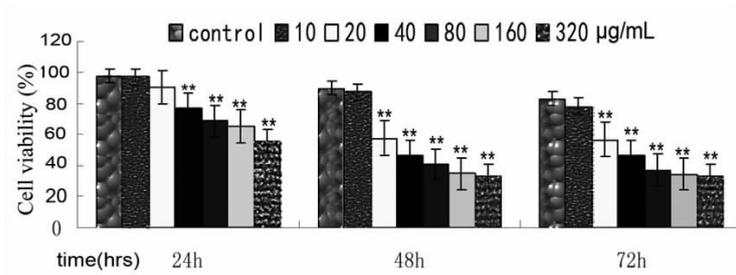


图 1 不同浓度 COE 作用不同时间对人大肠癌 HT-29 细胞的存活率的影响
注:与 control 组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

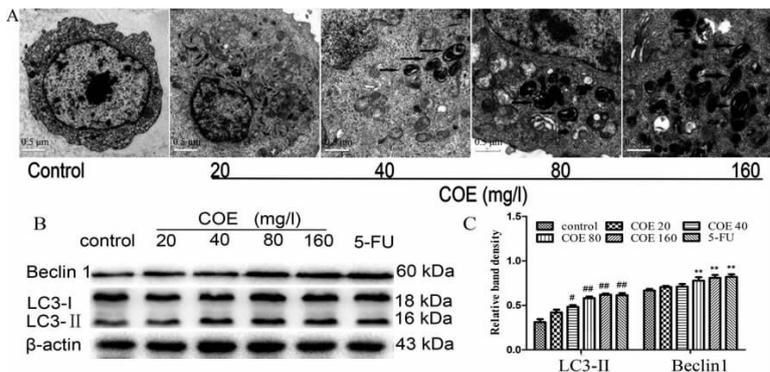


图 2 不同浓度 COE 诱导人大肠癌 HT-29 细胞自噬
注:A. TEM 观察 COE 诱导 HT-29 细胞自噬;B、C. WB 检测 COE 对 HT-29 细胞 LC3-I/II、Beclin-1 表达的影响。与 control 组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$;与 control 组比较,** $P < 0.01$ 。

接执行者,可通过诱导自噬、促进凋亡抑制肿瘤的进程,COE 作用于 HT-29 细胞 24h,Western blotting 观察到,Beclin-1 表达水平随着 COE 浓度上升而增加,COE 高浓度组(80、160mg/L)与 control 组相比有显著性差异($P<0.01$,图 2B、C)。

3.3 自噬抑制剂 3-MA 对 COE 抑制细胞增殖的影响 为进一步探讨 COE 诱导的自噬对细胞增殖的影响,在 COE 处理细胞时,同时加入自噬抑制剂 3-MA,并用吖啶橙染色细胞,自噬泡与酸性囊泡溶酶体结合形成自噬溶酶体,此时的酸性囊泡可被吖啶橙染成亮红色,作为自噬的一种标志,而细胞核可被染上亮绿色。用不同浓度的 COE 处理 HT-29 细胞 24h,吖啶橙染色结果显示,与 control 组相比,低浓度的 COE 组细胞形态无异常;未加 3-MA 的 COE 高浓度组(80、160mg/L)细胞,细胞质出现空泡化,酸性囊泡增多(箭头所示),COE 160mg/L 组细胞核固缩明显,与电镜下观察的结果一致;加入 3-MA 的 COE 高浓度组(80、160mg/L)细胞,酸性囊泡相对减少,视野下细胞数均增加(图 3A),与加入 3-MA 后,MTT 法检测结果一致(图 3B);同时加入 3-MA 后,LC3-I 降解成 LC3-II 的比例显著减少(图 3C)。结果表明,当 3-MA 抑制自噬后,细胞存活率增加。

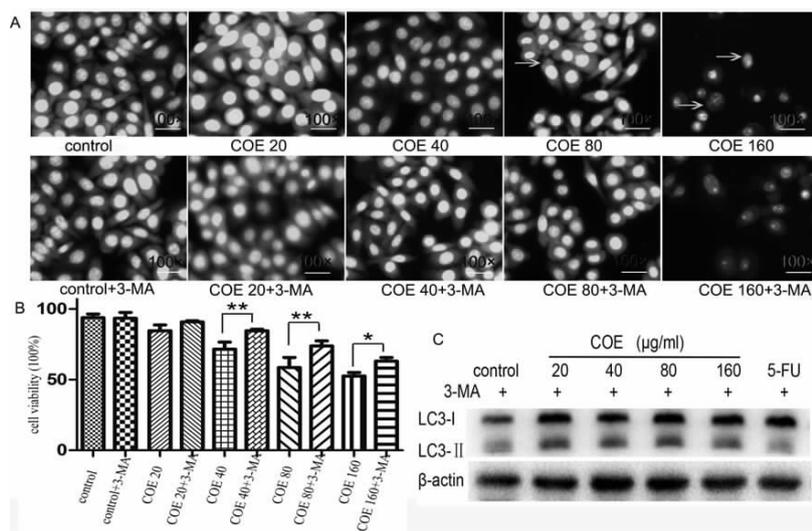


图3 COE 诱导 HT-29 细胞自噬

注:A.吖啶橙染色观察;加入 3-MA,不同浓度的 COE 对 HT-29 细胞自噬与增殖的影响(100 \times);B.加入 3-MA,阻断自噬,COE 对 HT-29 细胞存活率的影响;C.COE 对 HT-29 细胞自噬蛋白表达的影响。与 control 组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

4 讨论

化疗是结直肠癌的主要治疗手段之一,但化疗具有抑制骨髓造血系统等副作用从而限制了化疗药物的疗效,因此,寻求中西医结合治疗,减少化疗

的副作用成为研究热点。现代药物化学研究证实,南蛇藤植物体的萜类、生物碱、黄酮类含量较高,实验还发现南蛇藤提取物可以诱导大肠癌 HT-29 细胞自噬。

自噬在肿瘤的发生发展过程中扮演着重要角色,它不仅可维持细胞自我稳态,促进细胞生存,且自噬过度上调也可引起细胞死亡,即“自噬性细胞死亡”,亦称 II 型程序化细胞死亡。目前对于自噬与肿瘤发生、发展之间的关系尚无统一结论。一方面,自噬有促癌效应,肿瘤的快速生长,常处于营养缺乏的状态,自噬通过对细胞内大分子物质和细胞器的再循环,从而发挥了维持细胞自身能量平衡的重要功能;另一方面,自噬在多种肿瘤细胞中发挥着抗癌作用,许多肿瘤抑制因子如 DAPK、PTEN 及 p53 等都可刺激自噬^[6-9],促进细胞死亡。推测自噬或许通过选择性地清除被损伤的胞质内成分(尤其是线粒体)而在亚细胞水平发挥了一个监测功能。最近的一项研究结果提示,在小鼠肝脏中特异敲除自噬基因 Atg7(autophagy related gene7)能明显引起肝癌的形成^[10]。因此,在肿瘤治疗过程中,研究药物诱导的自噬对细胞增殖的影响显得尤为重要。

许多治疗癌症的药物都与诱导自噬有关。研究

发现,苦参碱可诱导肝癌细胞形成自噬体而抑癌^[11];他莫昔芬可诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞发生自噬性死亡^[12];Mujumdar 等^[13]通过肿瘤细胞系和裸鼠荷瘤实验发现,雷公藤甲素可以通过上调 ATG5、Beclin-1 和 LC3 的表达来诱导胰腺癌细胞发生自噬,从而抑制肿瘤细胞生长。在自噬形成过程中 LC3 和 Beclin-1 均参与了自噬体的形成。Beclin-1 是哺乳动物参与自噬的特异性基因,作为自噬活化的直接执行者,可通过诱导自噬、促进凋亡抑制肿瘤的进程,其对于自噬体的形成是必不可少^[13]。LC3 是检测自噬

现象的特异标记分子,自噬形成时,胞浆型 LC3(即 LC3-I)被酶解掉一个小段多肽,转变为膜型 LC3(即 LC3-II,表达于自噬体膜上),LC3-II 可进一步诱导自噬体双层膜结构形成,包裹待降解的细胞器等内

容物,其表达与自噬结构形成成正比^[14]。因此,本研究选用 Beclin-1、LC3-II 蛋白表达变化,来检测 COE 对 HT-29 细胞自噬的影响。

本实验中,用不同浓度的 COE 处理 HT-29 细胞 24h、48h、72h,发现 COE 抑制细胞的生长呈现时间、剂量依赖关系。形态学观察及分子标记检测结果显示,80、160mg/L 的 COE 处理 24h 时,HT-29 细胞自噬明显。用不同浓度的 COE 处理 HT-29 细胞 24h,吖啶橙染色结果显示,与 control 组相比,低浓度的 COE 组细胞形态无异常;未加 3-MA 的 COE 高浓度组(80、160mg/L)细胞,细胞质出现空泡化,酸性囊泡增多,COE 160mg/L 组细胞核固缩明显,与电镜下观察的结果一致;加入 3-MA 的 COE 高浓度组(80、160mg/L)细胞,酸性囊泡相对减少,视野下细胞数均数增加,与加入 3-MA 后,MTT 检测结果一致;同时加入 3-MA 后,LC3-I 降解成 LC3-II 的比例显著减少,表明当 3-MA 抑制自噬后,细胞存活率增加。本研究为开发高效、低毒、具有自主知识产权的抗癌新药奠定基础。下一步将采用 HT-29 细胞株于 BALB/c 小鼠经皮下接种造模,研究 COE 对结肠癌细胞自噬的影响,为开发高效、低毒、具有自主知识产权的抗癌新药奠定基础。

参考文献

- [1] LI G, LIU D, ZHANG Y, et al. Celastrol Inhibits Lipopolysaccharide-Stimulated Rheumatoid Fibroblast-Like Synovocyte Invasion through Suppression of TLR4/NF- κ B-Mediated Matrix Metalloproteinase-9 Expression[J]. PLoS ONE, 2013, 8(7): e68905.
- [2] LI G Q, ZHANG Y, LIU D, et al. PI3 kinase/Akt/HIF-1 α pathway is associated with hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in fibroblast-like synoviocytes of rheumatoid arthritis[J]. Mol Cell Biochem, 2013, 372(1-2): 221.
- [3] LI G, ZHANG Y, QIAN Y, et al. Interleukin-17A promotes rheumatoid arthritis synoviocytes migration and invasion under hypoxia by increasing MMP2 and MMP9 expression through NF- κ B/HIF-1 α pathway [J]. Mol Immunol, 2013, 53(3): 227.
- [4] LI G Q, LIU D, ZHANG Y, et al. Anti-invasive effects of celastrol in hypoxia-induced fibroblast-like synovocyte through suppressing of HIF-1 α /CXCR4 signaling pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2013, 17(4): 1028.
- [5] ZHANG H, QIAN Y, LIU Y, et al. Celastrol orbiculatus extract induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells[J]. Journal of Traditional Chinese Medicine, 2012, 32(4): 621.
- [6] BOVELLAN M, FRITZSCHE M, STEVENS C, et al. Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: blebbing in programmed cell death[J]. FEBS J, 2010, 277(1): 58.
- [7] GALLUZZI L, MORSELLI E, KEPP O, et al. Defective autophagy control by the p53 rheostat in cancer[J]. Cell Cycle, 2010, 9(2): 250.
- [8] INAMI Y, WAGURI S, SAKAMOTO A, et al. Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells[J]. J Cell Biol, 2011, 193(2): 275.
- [9] MÜNZ C. Antigen processing via autophagy-not only for MHC class II presentation anymore[J]. Curr Opin Immunol, 2010, 22(1): 89.
- [10] RAMAKRISHNAN S, NGUYEN TM, SUBRAMANIAN IV, et al. Autophagy and angiogenesis inhibition[J]. Autophagy, 2007, 3(5): 512.
- [11] 皇甫超申, 刘彬, 马永超, 等. 苦参碱诱导人肝癌细胞 BEL-7402 自吞噬性死亡[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1347.
- [12] QIAN W, LIU J, JIN J, et al. Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1[J]. Leuk Res, 2007, 31(3): 329.
- [13] MUJUMDAR N, SALUJA A K. Autophagy in pancreatic cancer: an emerging mechanism of cell death[J]. Autophagy, 2010, 6(7): 997.
- [14] YOSHIOKA A, MIYATA H, DOKI Y, et al. LC3, an autophagosome marker, is highly expressed in gastrointestinal cancers[J]. Int J Oncol, 2008, 33(3): 461.

第一作者: 杨林(1971—), 男, 博士研究生, 讲师, 研究方向为中药对肿瘤的防治。

通讯作者: 刘延庆, 医学博士, 教授, 博士研究生导师。liuyq@yzu.edu.cn

收稿日期: 2016-09-18

编辑: 吴宁

江苏中医药信息网(www.jstcm.com)

——做最专业的中医药网络传媒!