

新藤黄酸通过内质网应激 诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的研究

戴婷婷,程 卉,苏婧婧,李庆林

(省部共建新安医学教育部重点实验室 安徽中医药大学科研实验中心,安徽 合肥 230038)

[摘要]目的 研究新藤黄酸(gambogenic acid,GNA)诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的机制。方法 采用不同浓度的 GNA 作用细胞 24 h,对照组是相同浓度 GNA 加内质网应激抑制剂 4-苯基丁酸(4-phenylbutyric acid,4-PBA)共同作用 HCT116 细胞 24 h。采用甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT)染色测定两组细胞增殖抑制率的差异,采用吖啶橙(acridine orange,AO)和溴化乙锭(ethidium bromide,EB)染色观察细胞的形态学变化,采用膜联蛋白 V (Annexin V,AV)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)/碘化丙啶(propidium iodide,PI)双重染色检测细胞凋亡率。**结果** 内质网应激抑制剂 4-PBA 可以缓解 GNA 对 HCT116 细胞增殖的抑制作用;AO/EB 染色后荧光显微镜观察发现 GNA 作用的细胞具有凋亡特征;流式细胞仪检测显示 4-PBA 可降低 HCT116 细胞的凋亡率。**结论** GNA 能抑制人结肠癌细胞 HCT116 增殖,诱导细胞凋亡,其诱导细胞凋亡的作用可能与内质网应激途径有关。

[关键词]新藤黄酸;人结肠癌细胞 HCT116;细胞凋亡;内质网应激

[中图分类号]R285.5 **[文献标志码]**A **[DOI]**10.3969/j.issn.2095-7246.2014.01.023

藤黄作为我国一种传统的中药,具有良好的药用价值。藤黄味酸涩、有毒,具有攻毒蚀疮、破血散结等功效,主治痈疽、肿毒、顽癣、恶疮、跌打损伤,创伤出血及烫伤等^[1-2]。1984 年,吕归宝^[3]从中药藤黄中提取得到新藤黄酸(gambogenic acid,GNA)。经过研究表明,GNA 较藤黄酸具有抗癌谱广、抗癌作用强和毒性低等特点。细胞凋亡是细胞产生的一种程序性死亡过程,是细胞受损后积极主动发生的一种应对机体损伤的生理过程。细胞内经典的凋亡途径主要有死亡受体活化和线粒体途径,内质网应激介导的凋亡途径是近年来发现的新的凋亡途径。周兰贞等^[4]已经验证 GNA 可以通过影响 HCT116 细胞周期相关蛋白,使细胞阻滞在 G₀/G₁ 期,进而抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡。本实验在此基础上进一步研究 GNA 是否通过影响内质网应激途径发挥诱导 HCT116 细胞凋亡的作用,采用内质网应激

抑制剂 4-苯基丁酸(4-phenyl butyric acid,4-PBA)阻断人结肠癌细胞 HCT116 的应激反应,以探究内质网应激在 GNA 诱导 HCT116 细胞凋亡中的作用。

1 材料

- 1.1 细胞 人结肠癌 HCT116 细胞株:购自中国科学院昆明细胞库。
- 1.2 主要药物及试剂 GNA(亮黄色干燥粉末,纯度 99.0%,批号 2012120101):由安徽中医药大学药物化学教研室提供;RPMI-1640 培养基干粉:Gibco 公司,批号 08612;胎牛血清:杭州四季青生物工程公司,批号 110117;甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium,MTT):Amresco 公司,批号 0793;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO):Amresco 公司,批号 201110108662;膜联蛋白 V (Annexin V,AV)-异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)/碘化丙啶(propidium iodide,PI)细胞凋亡检测试剂盒:南京凯基生物公司;4-PBA:Sigma 公司,批号 STBD2912V;胰蛋白酶:Sigma 公司,批号 0458;吖啶橙(acridine orange,AO)和溴化乙锭(ethidium bromide,EB):Sigma 公司;

基金项目:安徽省自然科学基金项目(11040606M190);国家自然科学基金项目(81173600)

作者简介:戴婷婷(1987-),女,硕士研究生

通信作者:李庆林,qinglin_lee@hotmail.com

significantly decreased blood viscosity and plasma viscosity ($P<0.05$ or $P<0.01$), and significantly down-regulated protein expression of p-RhoA and PAI-1 ($P<0.01$). **Conclusion** TSD is effective in the treatment of postpartum BSS, which is related to the down-regulation of p-RhoA and PAI-1 in the Rho/ROCK pathway.

[Key words] Taohong Siwu Decoction; Rho/ROCK pathway; blood stasis syndrome

其他试剂均为分析纯。

1.3 主要仪器 Olympus CKX41 倒置显微镜和 Olympus BX51 荧光显微镜:日本 Olympus 公司;96 孔、6 孔平底培养板:美国 Corning costar 公司;SpectraMax M2e 酶标仪:美国 Molecular Devices 公司;MCO-175 CO₂ 培养箱:日本三洋公司;JW2502 电子分析天平:上海精密科学仪器有限公司;LD4-8 型低速离心机:北京医用离心机厂;FACS Calibur 流式细胞仪:美国 Becton Dickinson 公司。

2 方法

2.1 细胞培养 人结肠癌细胞株 HCT116 用含 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 U/ml 链霉素的 RPMI-1640 培养基培养于培养瓶中,于 5% CO₂、37 ℃、相对饱和湿度的培养箱中培养。2~3 d 消化传代 1 次。取对数生长期的细胞用于实验。

2.2 MTT 法检测细胞增殖抑制作用 将对数生长的 HCT116 细胞消化后用 RPMI-1640 培养基调整为 6×10^4 /ml 的浓度,再接种于 96 孔板中,每孔 100 μ l,每组设 3 个复孔,培养过夜后待细胞贴壁再加入终浓度为 2.5、5.0、7.5 μ mol/L 的 GNA 培养液 100 μ l,GNA 与 4-PBA 联用组加入 2.5、5.0、7.5 μ mol/L 的 GNA 和 5 mmol/L 4-PBA 培养液 100 μ l,空白对照组加入 100 μ l 完全培养基。37 ℃、5% CO₂、相对饱和湿度的培养箱中继续培养 24 h,每孔加入 5.0 g/L 的 MTT 溶液 20 μ l,继续培养 4 h 后,吸去上清液后每孔加入 150 μ l DMSO,震荡 15 min 后用自动酶标仪检测 570 nm 波长处的光密度(optical density,OD)值,计算细胞活力。细胞活力 = $\frac{\text{实验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$ 。

2.3 AO/EB 染色检测 HCT116 细胞的凋亡 取对数生长期的 HCT116 细胞接种于 6 孔板中,培养过夜后加入不同浓度 GNA 继续培养 24 h。弃去原培养液,再加入新培养基,每孔加入 100 μ g/ml AO 染液和 100 μ g/ml EB 染液,避光孵育 15 min,弃原培养基,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 3 遍后于荧光显微镜下检测。

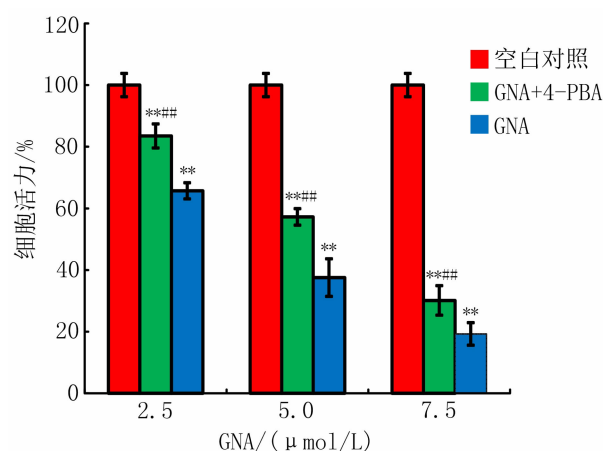
2.4 流式细胞仪 AV-FITC/PI 双染法检测 HCT116 细胞凋亡率 取对数生长期的 HCT116 细胞接种于 6 孔板中,培养过夜后加入不同浓度 GNA 继续培养 24 h 后,弃培养基,用冷 PBS 洗细胞 2 次,弃去 PBS,再用不含有乙二胺四乙酸二钠的胰酶消化,终止消化,再用 PBS 洗涤细胞 2 次,2 000 r/min 离心 5 min,收集 1×10^5 细胞。加入 400 μ l

的 AV-FITC 混匀后,4 ℃条件下作用 15 min,再加入 10 μ l PI,混匀,避光孵育 5 min。于 1 h 内采用流式细胞仪检测 HCT116 细胞凋亡率。

2.5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 进行统计学分析。连续型变量采用“均数±标准差($\bar{x} \pm s$)”进行统计学描述。两组间均数比较采用 Dunnett's T_3 法(方差不齐)或 LSD 法(方差齐),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 MTT 法检测 GNA 和 4-PBA 对人结肠癌细胞 HCT116 活力的影响 2.5、5.0、7.5 μ mol/L 的 GNA 作用 HCT116 细胞 24 h 后,细胞活力随 GNA 浓度的增加而明显降低。4-PBA 与各浓度 GNA 作用 HCT116 细胞 24 h 与单独给予 GNA 组比较,细胞存活力均显著增高(或 $P < 0.01$)。见图 1。

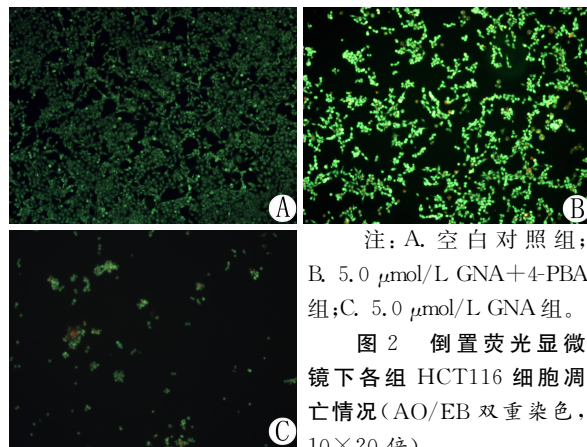


注:与空白对照组比较, * $P < 0.01$;

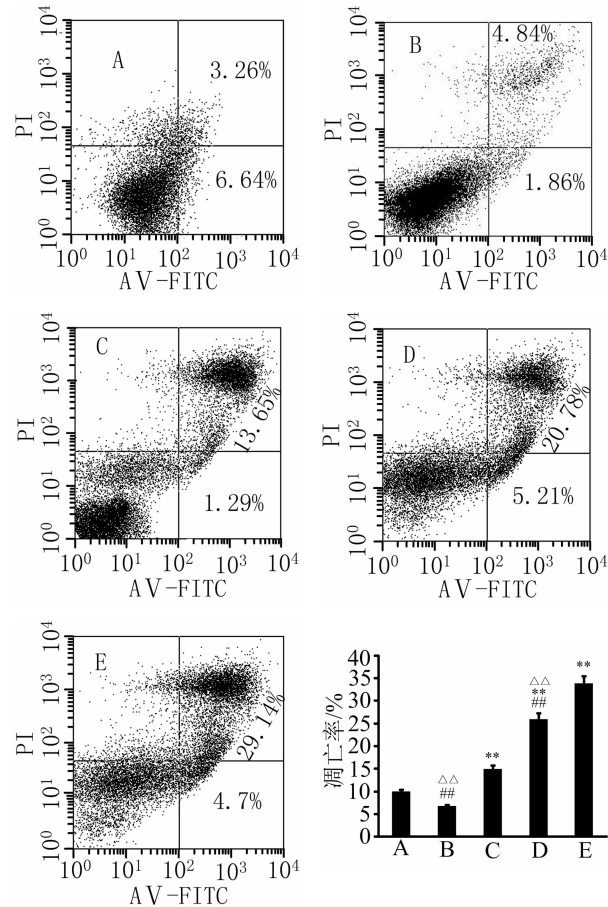
与 GNA 组比较, # $P < 0.01$ 。

图 1 GNA 和 4-PBA 对人结肠癌 HCT116 细胞活力的影响($n=3$)

3.2 荧光显微镜观察 HCT116 细胞凋亡 5.0 μ mol/L GNA 作用 HCT116 细胞 24 h 后,倒置荧光显微镜下可见 HCT116 细胞表现明显的凋亡现象,而 5.0 μ mol/L GNA 与 4-PBA 联用可明显改善细胞的凋亡现象。见图 2。



3.3 AV-FITC/PI 染色流式细胞仪检测 HCT116 细胞凋亡率 2.5、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 GNA 作用 HCT116 细胞 24 h 后,细胞凋亡率随浓度增加而增加,而与 4-PBA 联用后,细胞的凋亡率明显下降。见图 3。



注:A.空白对照组;B.2.5 $\mu\text{mol/L}$ GNA 与 4-PBA 作用细胞 24 h;C.2.5 $\mu\text{mol/L}$ GNA 作用细胞 24 h;D.5.0 $\mu\text{mol/L}$ GNA 与 4-PBA 作用细胞 24 h;E.5.0 $\mu\text{mol/L}$ GNA 作用细胞 24 h;与空白对照组比较, ** $P<0.01$;与 2.5 $\mu\text{mol/L}$ GNA 组比较, # $P<0.01$;与 5.0 $\mu\text{mol/L}$ GNA 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图 3 不同浓度 GNA 和 4-PBA 联合作用 24 h 后 HCT116 细胞凋亡率比较

4 讨论

结肠癌是发生在胃肠道系统中严重威胁人类身体健康的恶性肿瘤。在经济发达的欧美国家,结肠癌致死率在所有癌症致死率中排名第二,而在中国,结肠癌发病率也呈逐年上升的趋势。结肠癌早期治疗与其他常见癌症一样,主要通过手术切除的方式,但术后容易出现转移和复发,此时一些化疗药物就对后期治疗起到重要作用,但目前针对肿瘤治疗的药物存在不良反应较多以及毒性较大的问题。近年来,中药在肿瘤治疗中显现出不良反应少、可持续应

用的优势。藤黄就是研究较广的一种抗肿瘤药物。GNA 是从中药藤黄中提取的新的抗肿瘤化合物。曲宝玺等^[5]通过研究发现 GNA 可以显著抑制小鼠白血病 L1210 细胞的增殖生长。近年来,本实验室通过体内、体外实验证明 GNA 对人结肠癌细胞 HT-29、人白血病细胞 K562、人肝癌细胞 BEL-7402、人非小细胞肺癌细胞 A549 和人鼻咽癌细胞 CNE-1 都具有生长抑制作用^[6-8]。

细胞凋亡是细胞产生的一种程序性死亡过程,是细胞受损后积极主动发生的一种应对机体损伤的生理过程。细胞内经典的凋亡途径主要有死亡受体活化和线粒体途径,内质网应激介导的凋亡途径是近年来发现的新的凋亡途径。

内质网是细胞内由精细的膜系统组成的细胞器,是细胞内一些大分子物质如蛋白质和脂质合成的场所,可以调节胞内蛋白质的折叠和转运,同时也是细胞内钙离子水平调节的重要场所。当外界的一些刺激扰乱内质网中平衡因子时就会中断蛋白质合成信号,造成内质网内未折叠蛋白或错误折叠蛋白的聚集,扰乱内质网稳态,最终导致内质网应激^[9-10]。此时,细胞就会启动未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)以应对内质网应激对细胞造成的损害。UPR 的启动有利于暂缓内质网内未折叠蛋白反应以及清除错误折叠蛋白反应。内质网应激时,UPR 通过 PKR 样内质网激酶至真核起始因子 2 α (PKR-like endoplasmic reticulum kinase-eukaryotic initiation factor 2 α , PERK-eIF2A)、肌醇需要酶 1 至 X 抗原结合蛋白 1(inositol-requiring enzyme 1-X-box binding protein-1, IRE1-XBP1)和激活转录因子 6(activating transcription factor 6, ATF6)三条信号通路减少内质网内未折叠蛋白或错误折叠蛋白的聚集,减轻累积的蛋白质对细胞造成的损害,恢复内质网的稳态,使应激细胞得以存活。但持续剧烈的内质网应激发生时就会使 UPR 的促生存模式转向促凋亡模式^[11-13]。

本实验通过 GNA 与内质网应激抑制剂 4-PBA 联用研究内质网应激在 GNA 对人结肠癌细胞 HCT116 生长的作用。首先采用 MTT 法研究 GNA 与 4-PBA 联用对细胞的增殖抑制作用,实验表明:GNA 可浓度依赖性地抑制 HCT116 细胞的生长增殖,而与 5.0 mmol/L 的 4-PBA 联用可缓解 GNA 对细胞的增殖抑制作用。为进一步研究 GNA 是否诱导细胞凋亡,笔者采用 AO/EB 荧光染色观察细胞形态学变化。正常细胞的细胞膜完整,AO 染成均匀一致的绿色,而 EB 可以把受损的细胞染

成橘红色。实验结果表明:4-PBA可显著降低GNA诱导HCT116细胞的凋亡现象。为验证GNA是通过内质网应激诱导细胞凋亡的,笔者以GNA与4-PBA联用,AV-FITC/PI双重染色法用流式细胞仪检测4-PBA对GNA诱导细胞凋亡的影响。结果显示:4-PBA与GNA联用可以显著降低GNA诱导HCT116细胞的凋亡率,说明GNA可通过内质网应激诱导人结肠癌细胞HCT116凋亡。

参考文献:

- [1] 明·李时珍.本草纲目:第2册[M].北京:人民卫生出版社,1977:1344.
- [2] 南京医学院.药材学[M].北京:人民卫生出版社,1960:1161.
- [3] 吕归宝.藤黄中新藤黄的分离及其结构[J].药学学报,1984,19(8):636-639.
- [4] 周兰贞,晏烽根,李庆林.新藤黄酸诱导人结肠癌HCT116细胞凋亡的作用机制研究[J].肿瘤,2011,31(7):580-584.
- [5] 曲宝玺,郝晓阁,李德华.藤黄Ⅱ号抗肿瘤作用的实验研究[J].中国肿瘤临床,1991,18(1):50-52.
- [6] Li QL, Cheng H, Zhu GQ, et al. Gambogenic acid inhibits proliferation of A549 cells through apoptosis-inducing and cell cycle arresting[J]. Biol Pharm Bull, 2010, 33(3):415-420.
- [7] 晏烽根,李庆林.新藤黄酸诱导人鼻咽癌细胞CNE-1凋

亡以及对p-p38和p-ERK1/2蛋白的影响[J].中国药理学通报,2011,27(3):355-359.

- [8] 朱国旗,程卉,王训翠,等.新藤黄酸体外抑制肺腺癌A549细胞增殖的作用[J].安徽中医学院学报,2011,30(1):53-56.
- [9] Han J, Back SH, Hur J, et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death[J]. Nat Cell Biol, 2013, 15(5):481-490.
- [10] Wahyu Indra Duwi Fanata, Lee SY, Lee KO. The unfolded protein response in plants: a fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses[J]. J Proteomics, 2013, 93:356-368.
- [11] Schonthal AH. Pharmacological targeting of endoplasmic reticulum stress signaling in cancer[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 85(5):653-666.
- [12] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(3):184-190.
- [13] Timmins JM, Ozcan L, Seimon TA, et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II links endoplasmic reticulum stress with Fas and mitochondrial apoptosis pathways[J]. J Clin Invest. 2009, 119(10):2925-2941.

(收稿日期:2013-10-29)

Gambogenic Acid Induces Apoptosis of Human Colon Cancer HCT116 Cells through Endoplasmic Reticulum Stress

DAI Ting-ting, CHENG Hui, SU Jing-jing, LI Qing-lin

(Key Laboratory of Xin'an Medicine Jointly Supported by Ministry of Education and Anhui Province & Experimental Research Center, Anhui University of Chinese Medicine, Anhui Hefei 230038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism by which gambogenic acid (GNA) induces the apoptosis of human colon cancer HCT116 cells. **Methods** Experimental HCT116 cells were treated with 2.5, 5.0, and 7.5 $\mu\text{mol/L}$ GNA for 24 h, while control HCT116 cells were treated with 2.5, 5.0, and 7.5 $\mu\text{mol/L}$ GNA plus 5 $\mu\text{mol/L}$ endoplasmic reticulum stress (ERS) inhibitor 4-phenylbutyric acid (4-PBA) for 24 h. The cellular proliferation inhibition rate was measured by methyl thiazolyl tetrazolium assay; the morphological changes of HCT116 cells were observed by acridine orange (AO)/ethidium bromide (EB) staining under a fluorescence microscope; the cell apoptosis rate was determined by flow cytometry with annexin V-fluorescein isothiocyanate (FITC)/propidium iodide (PI) double staining. **Results** The ERS inhibitor 4-PBA reduced the inhibitory effect of GNA on the proliferation of HCT116 cells. The AO/EB staining indicated the characteristics of apoptosis in GNA-treated HCT116 cells under the fluorescence microscope. The flow cytometry with annexin V-FITC/PI double staining showed that 4-PBA reduced the apoptosis rate of GNA-treated HCT116 cells. **Conclusion** GNA can inhibit proliferation and induce apoptosis in HCT116 cells, and it might induce cell apoptosis through ERS.

[Key words] gambogenic acid; human colon cancer HCT116 cell; cell apoptosis; endoplasmic reticulum stress