

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.14.002

竹节香附素 A 调控 mTOR 通路对肠癌 HCT116 细胞自噬及凋亡的影响*

孟春芹¹, 滕钰浩¹, 吴存恩¹, 王瑞平^{2△}

(1. 南京中医药大学附属医院肿瘤科, 南京 210029; 2. 江苏省中医院肿瘤科, 南京 210029)

[摘要] **目的** 探讨竹节香附素 A(RA)抑制 HCT116 细胞的增殖及其相关机制。**方法** 利用四甲基偶氮唑蓝(MTT)检测 RA 对 HCT116 细胞的增殖抑制;流式细胞术(FCM)检测 RA 对细胞凋亡的影响;透射电镜观察 RA 诱导自噬;Western blot 检测凋亡、自噬相关蛋白表达。**结果** RA 能够明显抑制 HCT116 细胞的增殖,并呈浓度、时间依赖性。透射电镜观察到双层膜自噬体的存在;FCM 显示 RA 能够诱导 HCT116 细胞凋亡,且随着浓度的增大凋亡率增加。Western blot 检测显示,自噬相关蛋白 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)表达增高;抑制凋亡蛋白 Bcl-2 表达减少;而促凋亡蛋白 Bax,凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase-3、Cleaved-聚二磷酸腺苷核糖多聚酶(PARP)表达增加;RAPA 靶蛋白(mTOR)信号通路中 mTOR 蛋白表达增加,磷酸化 mTOR(p-mTOR)蛋白表达减少。加入 mTOR 通路抑制剂雷帕霉素(RAPA)后 Beclin-1、LC3 蛋白表达增加,凋亡率增加,且 Cleaved-caspase-3、Cleaved-PARP 表达也增加。**结论** RA 能够抑制肠癌细胞 HCT116 的增殖;并能诱导细胞自噬和凋亡,其机制可能是通过调控 mTOR 信号通路实现。

[关键词] 竹节香附素 A;HCT116 细胞;自噬;细胞凋亡;雷帕雷速靶蛋白信号通路

[中图法分类号] R73-36+1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)14-1845-05

Effect of raddeanin A on autophagy and apoptosis of colon cancer HCT116 cells
through regulating mTOR pathways*

MENG Chunqin¹, TENG Yuhao¹, WU Cunen¹, WANG Ruiping^{2△}

(1. Department of Oncology, Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China; 2. Department of Oncology, Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, Jiangsu 210029, China)

[Abstract] **Objective** To explore raddeanin A(RA) inhibiting the proliferation of HCT116 cells and its related mechanism. **Methods** The MTT method was used to observe the RA inhibition on the proliferation of gastric cancer cells HCT116. Flow cytometry was used to detect the RA effects on cell apoptosis. Transmission electron microscope(TEM) was used to observe RA induced autophagy. Western blot was used to test expression of apoptosis and autophagy related proteins. **Results** RA could significantly inhibit the proliferation of HCT116 cells with concentration and time dependence; double layer membrane of autophagosome was detected by TEM; FCM showed that RA induced apoptosis in HCT116 cells, moreover the apoptosis rate was increased with the concentration increase; Western blot showed that the expression of autophagy related proteins(Beclin-1 and LC3) was increased, the expression of apoptosis inhibition protein Bcl-2 was decreased. On the contrary, the expression of apoptosis promotion proteins(Bax, Cleaved-caspase-3, Cleaved-PARP) was increased, the expression of mTOR protein in the mTOR signal pathway was increased, while the p-mTOR protein expression was decreased. When the mTOR pathway inhibitor rapamycin(RAPA) was added to cells, Beclin-1, LC3, Cleaved-caspase-3, Cleaved-PARP proteins were increased, and apoptosis rate was also increased. **Conclusion** RA can inhibit the proliferation of HCT116 cells and can induce cellular autophagy and apoptosis, its mechanism may be realized by regulating the mTOR signal pathway.

[Key words] raddeanin A; HCT116 cells; autophagy; apoptosis; mammalian target of rapamycin signaling pathway

大肠癌包括结肠癌和直肠癌,是较常见的消化道恶性肿瘤,在美国癌症统计工作组统计 1999—2008 年美国癌症发病率和死亡率时,发现其发病率和死亡

率在恶性肿瘤中分别列第 4 位和第 2 位。根据中国健康状况调查等统计发现,国内大肠癌发病率略低于欧美,其发病率和死亡率在恶性肿瘤中均列第 5

* 基金项目:中国和欧洲医疗保健业发展合作研究计划(FP7/2007-2013/ PIRSES-GA -2013-612589);国家中医临床研究基地业务建设科研专项课题(JDZX2012087);江苏省中医药领军人才项目(LJ200908);江苏省卫生计生委课题(BJ14013);江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(KYLX16-1145)。作者简介:孟春芹(1988—),医师,博士,主要从事中医肿瘤的研究。△ 通信作者, E-mail: wrp61@163.com。

位^[1]。在大肠癌的综合治疗中,手术是惟一具有根治效果的治疗方案,但多数患者在确诊时,已处于进展期,化疗在进展期大肠癌治疗中扮演重要角色。然而,化疗耐药和药物不良反应,限制了其疗效^[1],所以寻找新的低毒抗肿瘤药物是临床迫切的需要。竹节香附素 A(raddeanin A, RA)是从竹节香附(又名银莲花,两头尖)中分离出的一种三萜皂苷,《医方歌括》最早记载了两头尖可治疗乳腺癌。现代药理研究已证实 RA 具有明显的抗肿瘤、抗炎、解热镇痛、抗惊厥、镇静等作用^[2-7]。本课题组前期研究已经证实 RA 能够抑制胃癌细胞增殖和侵袭转移,并能诱导胃癌细胞自噬和凋亡^[8-9]。本实验旨在探讨 RA 能否抑制 HCT116 细胞的增殖、诱导细胞自噬和凋亡,并探讨其可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂及细胞株 RPMI-1640 细胞培养基(含双抗)及胎牛血清(FBS)购自美国 Hyclon 公司;RA 购自中国药品生物制品检定所(批号:141113);四甲基偶氮唑蓝(MTT),购自美国 Sigma 公司(批号:M2128);Annexin-V/PI 凋亡试剂盒购自美国 BD 公司(批号:556547);雷帕霉素(RAPA)、 β -actin、Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、Bcl-2、Bax、caspase-3、聚二磷酸腺苷核糖多聚酶(PARP)、RAPA 靶蛋白(mTOR)、磷酸化 mTOR(p-mTOR)一抗及二抗,购自美国 CST 公司。人结肠癌细胞株 HCT116 由上海生物研究所提供。

1.1.2 仪器 AC2-4S1 超洁净工作台、Thermo CO₂ 恒温培养箱、ELx800 酶标仪,购自美国 Bio Tek 公司;倒置荧光显微镜购自德国 Jena 公司;JEOL-1010 型透射电镜(TEM)购自日本 JEOL 公司;C6 型流式细胞仪购自美国 BD 公司;Mini P-4 型垂直电泳仪购自美国伯乐公司;化学发光成像仪购自美国 LI-COR 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞株培养 人结肠癌细胞株 HCT116 培养于含 10%FBS 的 RPMI-1640 培养基中,置于 37℃,含 5%CO₂、完全饱和湿度的培养箱中培养。

1.2.2 MTT 实验 取对数生长长期的人肠癌 HCT116 细胞,以 8 000 个/孔接种于 96 孔板中,每组设 6 个复孔,培养 24 h。对照组、溶剂对照组、实验组分别每孔 100 μ L 的完全培养液、1%二甲亚砜(DMSO)、不同浓度的 RA(1、2、4、8、16 μ mol/L)培养不同的时间(12、24、36、48 h),每孔加入 MTT 溶液 20 μ L (5 mg/mL)。继续孵育 4 h 后弃上清液,每孔加入 150 μ L DMSO,避光振荡 5~10 min,酶标仪 490 nm 处测吸光度(OD)。重复检测 3 次,计算抑制率:

$$\text{抑制率} = (1 - \text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{对照组}}) \times 100\%$$

1.2.3 TEM 实验 将细胞种植于培养皿中培养 24

h 后加入含 RA(4 μ mol/L)的完全培养液,再培养 12 h,消化收集细胞,2.5%戊二醛固定液固定后制片,然后进行 TEM 观察。

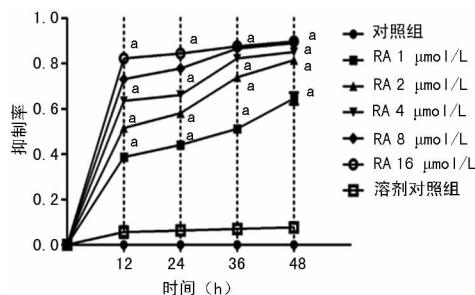
1.2.4 流式细胞术(FCM)实验 HCT116 细胞种植于 6 孔板中培养 24 h,对照组加入完全培养基,实验组分别加入不同浓度的 RA(2、4、8 μ mol/L),继续孵育 12 h。收集各组细胞,PBS 冲洗后重悬于 500 μ L Binding Buffer 中,分别加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μ L,避光振荡 10 min 后上机进行检测。

1.2.5 Western blot 实验 将细胞种植于 6 孔板中,仅选择 RA 4、8 μ mol/L 两个浓度,大体观察 RA 对自噬与凋亡相关蛋白趋势变化的影响。收集细胞总蛋白,采用 Bradford 法测定各样本蛋白水平。每组取 20 μ g 上样,分别用 12%、10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),用湿转法转膜。后 5%牛血清清蛋白(BSA)室温封闭 1 h,一抗 4℃孵育过夜。洗膜缓冲液(TBST)洗膜 3 次后,二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次后使用化学发光成像仪进行条带分析, β -actin 作为内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS16.0 统计学软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

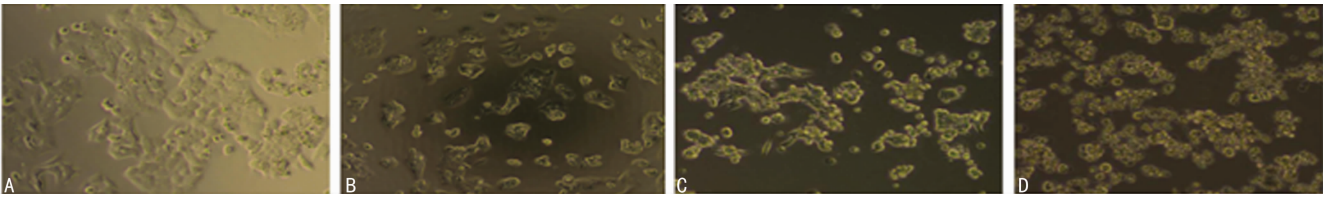
2 结果

2.1 RA 对 HCT116 细胞增殖的影响 RA 能够明显抑制 HCT116 细胞增殖。不同浓度的 RA(1、2、4、8、16 μ mol/L)作用于 HCT116 细胞不同的时间(12、24、36、48 h),其抑制率随着浓度增加、作用时间延长而增大,RA 对 HCT116 细胞的抑制作用呈现浓度、时间依赖性(图 1)。当 RA 1 μ mol/L 作用于 HCT116 细胞 12 h 时,其抑制率为 $(39.08 \pm 2.30)\%$,作用 48 h 时抑制率为 $(67.84 \pm 0.23)\%$,当 RA 16 μ mol/L 作用 48 h 时抑制率为 $(90.10 \pm 1.21)\%$,各实验组抑制率与对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$);而溶剂对照组抑制率与对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。镜下观察,随着 RA 给药浓度的增大,细胞皱缩,细胞间的空隙逐渐增大、数量逐渐减少,形态也由原来的多触角逐渐变圆,细胞活力下降,逐渐趋于死亡,见图 2。



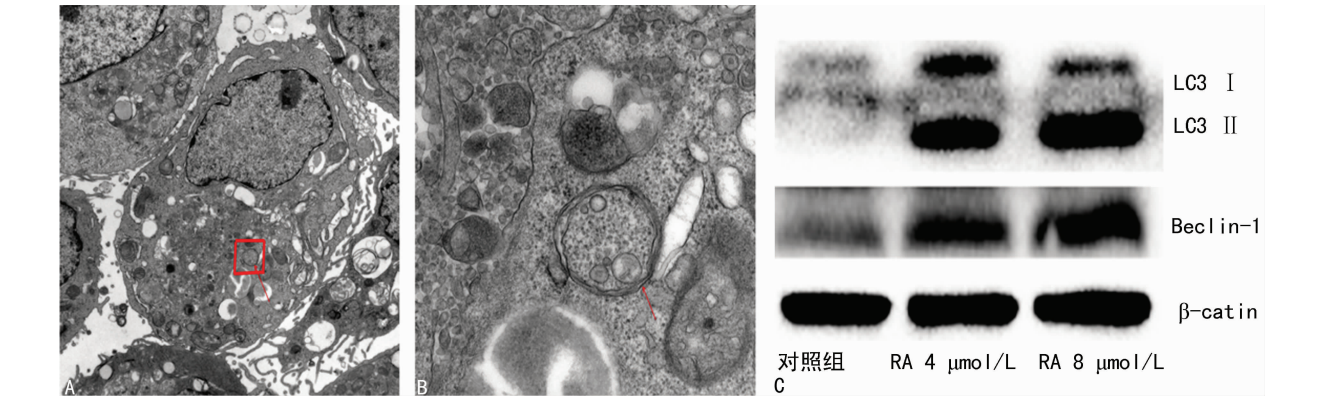
a: $P < 0.05$, 与对照组比较

图 1 RA 对肠癌 HCT116 细胞增殖抑制的影响



A:对照组;B:RA 2 $\mu\text{mol/L}$;C:RA 4 $\mu\text{mol/L}$;D:RA 8 $\mu\text{mol/L}$

图2 MTT 观察各组肠癌 HCT116 细胞形态($\times 200$)



A:TEM($\times 2\,900$,箭头处为自噬体);B:TEM($\times 18\,500$,箭头处为自噬体);C:各组自噬相关蛋白表达

图3 RA 对 HCT116 细胞自噬及自噬相关蛋白的影响

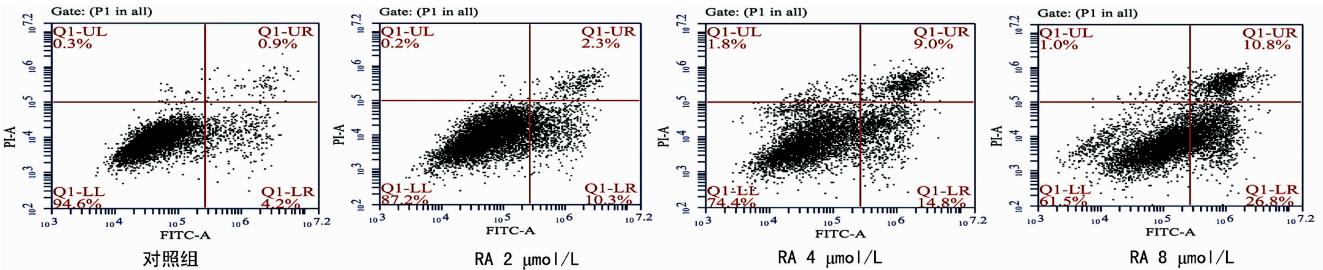


图4 FCM 检测各组肠癌 HCT116 细胞凋亡情况

2.2 RA 对 HCT116 细胞自噬的影响 TEM 结果显示,RA 作用于细胞 12 h 后,在电镜下(>3 个视野)可观察到双层膜自噬体(图 3A、B),而对照组中未找到自噬体。Western blot 结果显示,随着给药剂量的增加,Beclin-1 蛋白表达逐渐增加,LC3 I 蛋白逐渐减少,而 LC3 II 逐渐增加(图 3C)。LC3 分别以 LC3 I 和 LC3 II 的形式存在,LC3 I 在胞质中经过泛素化与磷脂酰乙醇胺(PE)结合,形成 LC3 II,定位于自噬体膜上,是自噬体的标志分子,随自噬体的增多而增多,LC3 II 的水平或 LC3 II/LC3 I 的比值,与自噬体的数量呈正相关。

2.3 RA 对 HCT116 细胞凋亡的影响 FCM 结果显示,当 RA 2 $\mu\text{mol/L}$ 作用于细胞时,早期凋亡率为(10.30 ± 1.25)%,晚期凋亡率为(2.30 ± 0.87)%;当 RA 8 $\mu\text{mol/L}$ 作用于细胞时,早期凋亡率增加至(26.80 ± 2.03)%,晚期凋亡率增加至(10.80 ± 1.03)%(图 4)。Western blot 结果显示,随着给药剂量的增加,抗凋亡蛋白 Bcl-2 逐渐递减,而促凋亡蛋白 Bax 逐渐增加,凋亡标志性蛋白 Caspase-3、PARP 被

剪切成 Cleaved-caspase-3、Cleaved-PARP,见图 5。

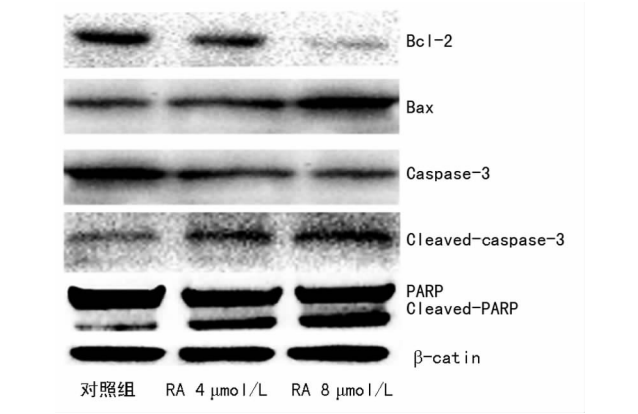
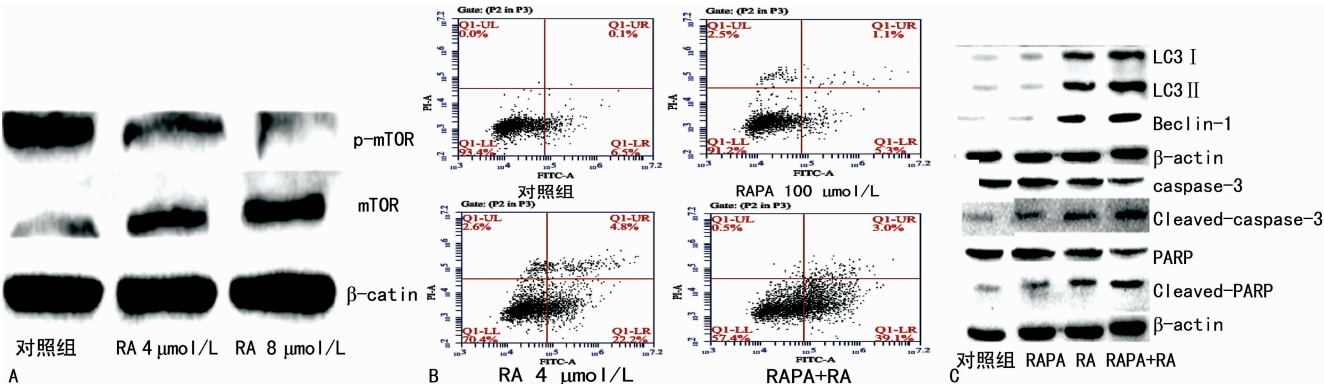


图5 各组肠癌 HCT116 细胞凋亡相关蛋白表达

2.4 mTOR 通路对 RA 诱导的自噬及凋亡的影响 Western blot 检测结果显示,mTOR 蛋白表达增加,而 p-mTOR 蛋白表达递减(图 6A)。使用 mTOR 通路抑制剂 RAPA(100 nmol/L)后,自噬相关蛋白 Becin-1、LC3 表达增加,凋亡率增加,凋亡标志性蛋白 Cleaved-caspase-3、Cleaved-PARP 也增加,见图 6B、C。



A:各组细胞 mTOR 蛋白表达;B:FCM 检测各组 HCT116 细胞自噬情况;C:各组 HCT116 细胞凋亡相关蛋白表达

图 6 mTOR 通路对 RA 诱导的自噬及凋亡的影响

3 讨 论

近年来关于自噬的研究已经成为热门,OHSU-MI^[10]也因阐述了自噬的机制而荣获 2016 年诺贝尔生理及医学奖。研究发现,自噬调控机制的失调可能与肿瘤的发生、发展有重要的联系,一方面,自噬通过参与清理受损的线粒体和过氧化物酶体,促进细胞分化,和(或)增加自噬性死亡发挥抗肿瘤作用;另一方面,肿瘤细胞通过自噬不断适应变化的生长条件,使侵袭及转移过程中的肿瘤细胞有效逃脱凋亡的威胁,在各种恶劣环境下得以存活^[11]。

细胞发生凋亡通常可以分为 3 个阶段:(1)启动阶段,由各种诱因进入细胞,启动细胞凋亡程序;(2)效应阶段,通过调节促凋亡因子与抗凋亡因子来决定是否发生凋亡;(3)执行阶段,凋亡细胞表现出凋亡所特有的形态学特征和生化特点:DNA 断裂、核固缩、核碎裂、核溶解,以凋亡小体形成和 Caspase 激活为特征,最后被吞噬细胞的溶酶体降解^[12]。

自噬与凋亡同属于程序性细胞死亡,为主动死亡,但在形态、分子机制、生化指标方面均存在不同,有研究发现,出现大量自噬小体的细胞,用 Caspase 抑制剂不能阻止细胞死亡,而利用自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤却能阻止细胞死亡,说明自噬性死亡不同于凋亡^[13]。自噬与凋亡虽然是两个不同的过程,但越来越多的研究提示,二者确实存在一些共同的调节因子,如 Bcl-2, Beclin-1。Bcl-2 等抑凋亡因子可以通过 BH3 结构域与 Beclin-1 结合而影响其活性,而 Beclin-1 又是调节自噬的重要靶点,因而 Bcl-2 等凋亡因子又可进一步影响自噬^[14]。YEE 等^[15]研究发现,PU-MA 和 Bax 诱导的自噬,可使损伤的线粒体被选择性的清除,减少凋亡的应答。

本实验 MTT 结果显示,RA 在低浓度(1 μmol/L)就表现出对肠癌细胞 HCT116 增殖抑制作用,且这种抑制作用随浓度的增加及作用时间的延长进一步加强,即呈剂量-时间相关(图 1)。鉴于 RA 能够明显抑

制肠癌细胞增殖,本研究推测 RA 能否诱导自噬和凋亡。为此,采用不同浓度的 RA 作用于 HCT116 细胞,在 TEM 观察到双层膜自噬体的产生(图 3A、B),Western blot 也证实 Beclin-1、LC3 蛋白表达增加(图 3C),说明 RA 能够诱导 HCT116 细胞自噬。FCM 结果显示随着 RA 浓度的增大,细胞凋亡率逐渐增高(图 4);Western blot 结果也证实凋亡标志性蛋白 Cleaved-caspase-3、Cleaved-PARP 表达增高(图 5),提示 RA 能剂量依赖性地诱导肠癌 HCT116 细胞凋亡。

本研究证实了 RA 能够诱导 HCT116 细胞自噬和凋亡,猜想 RA 是通过调控某条信号通路,来实现以上抗肿瘤药效。而关于自噬和凋亡的调控,关注较多的是 mTOR 信号通路。mTOR 作为磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)相关激酶(phosphatidylinositol 3-kinase-related protein kinases, PIKK)家族成员的一员,是一种进化保守的丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(AKT),作为 AKT 通路的下游效应分子,以及作为氨基酸、三磷酸腺苷酸和激素的感受器,与肿瘤细胞增殖、细胞周期、蛋白合成、细胞自噬等密切相关^[16],现已发现许多肿瘤如乳腺癌、前列腺癌、肺癌中都有 mTOR 信号通路的调节异常^[17]。

本实验发现,RA 作用于细胞后,mTOR 蛋白表达增多,而 p-mTOR 蛋白表达减少(图 6A)。而当使用了 mTOR 通路抑制剂 RAPA 后,自噬相关蛋白 Beclin-1、LC3 表达增加。细胞凋亡率较 RA、RAPA 单独给药组也增加,且凋亡相关蛋白 Cleaved-caspase-3、Cleaved-PARP 表达也增加(图 6B、C),说明 RA 诱导 HCT116 细胞自噬和凋亡可能是通过调控 mTOR 通路实现的。

基于以上实验结果,本研究认为 RA 可明显抑制人肠癌 HCT116 细胞株的增殖,且与浓度、时间呈正相关;而调控 mTOR 信号通路,可能是 RA 发挥诱导细胞自噬和凋亡药理作用潜在的分子机制。结合前期相关研究结果,可以推测 RA 可能是一个潜在的有

效的抗肿瘤药物,而目前研究主要集中在体外实验,期待更进一步的动物实验、临床实验获取更多更高级别的证据支持。

参考文献

[1] CHEN W Q,ZHENG R S,BAADE P D,et al. Cancer statistics in China,2015[J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2): 115-132.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:2010 版. 一部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:157.

[3] 刘大有,王晓颖,夏忠庭,等. 两头尖化学成分研究[J]. 长春中医学院学报,2003,19(3):587-592.

[4] 刘大有,李勇,赵博,等. 两头尖地上部分化学成分及其含量测定分析[J]. 长春中医学院学报,2005,21(1):43-44.

[5] 邹忠杰,刘红霞,杨峻山. 银莲花属植物化学成分及其药理活性[J]. 中国药学杂志,2004,39(7):493-495.

[6] GUAN Y Y,LIU H J,LUAN X,et al. Raddeanin a,a triterpenoid saponin isolated from anemone raddeana, suppresses the angiogenesis and growth of human colorectal tumor by inhibiting VEGFR2 signaling[J]. Phytomedicine,2015,2(1):103-110.

[7] WANG M K,DING L S,WU F E. Antitumor effects of raddeanin A on S180, H22 and U14 cell xenografts in mice[J]. Chin J Cancer,2008,27(9):910-913.

[8] XUE G,ZOU X,ZHOU J Y,et al. Raddeanin A induces human gastric cancer cells apoptosis and inhibits their invasion in vitro[J]. Biochem Biophys Res Commum,2013,

439(2):196-202.

[9] TENG Y H,LI J P,LIU S L,et al. Autophagy protects from raddeanin A-Induced apoptosis in SGC-7901 human gastric cancer cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2016(9):9406758.

[10] OHSUMI Y. Historical landmarks of autophagy research [J]Cell Res,2014,24(1):9-23.

[11] ROY S,DEBNATH J. Autophagy and tumorigenesis[J]. Semin Immunopathol,2010,32(4):383-396.

[12] YOSHIDA H,KONG Y Y,YOSHIDA R,et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development[J]. Cell,1998,94(6):739-750.

[13] 李宝秀,张晓实. Beclin1 对抑制肿瘤细胞增殖改善ⅢB 期结肠癌预后的分析[J]. 中华临床医师杂志,2010,4(4) 395-401.

[14] CHAU Y P,LIN S Y,CHEN J H,et al. Endostatin induces autophagic cell death in early human endothelial cells. Histol Histopathol,2003,18(3):715 -726.

[15] YEE K S,WILKINSON S,JAMES J,et al. PUMA-and Bax-induced autophagy contribute to apoptosis[J]. Cell Death Differ,2009,16(8):1135-1145.

[16] 陈松峰,邵增务. 自噬相关信号转导通路研究进展[J]. 国际骨科学杂志,2013,34(4):269-271,280.

[17] 郑鹏生,冀静. mTOR 信号通路与肿瘤的研究进展[J]. 西安交通大学学报(医学版),2010,31(1):1-9.

(收稿日期:2017-08-18 修回日期:2018-01-21)

(上接第 1844 页)

拔地区青年人多脏器改变超声分析[J]. 临床超声医学杂志,2007,9(12):757-758.

[11] 崔建华,王引虎,高亮,等. 驻守海拔 5000 米以上高原 1 年返回平原后血液流变学的随访调查[J]. 中国血液流变学杂志,2006,16(2):246-251.

[12] HUANG H,XUE L,ZHANG X,et al. Hyperbaric oxygen therapy provides neuroprotection following spinal cord injury in a rat model[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2012,6(7):1337-1342.

[13] ZHOU Z,DAUGHERTY W P,SUN D,et al. Protection of mitochondrial function and improvement in cognitive recovery in rats treated with hyperbaric oxygen following lateral fluid-percussion injury[J]. J Neurosurg,2007,106 (4):687-694.

[14] ROCKSWOLD S B,ROCKSWOLD G L,ZAUN D A,et al. A prospective,randomized clinical trial to compare the

effect of hyperbaric to normobaric hyperoxia on cerebral metabolism,intracranial pressure, and oxygen toxicity in severe traumatic brain injury[J]. J Neurosurg,2010,112 (5):1080-1094.

[15] FELLING R J,SNYDER M J,ROMANKO M J,et al. Neural stem/progenitor cells participate in the regenerative response to perinatal hypoxia/ischemia[J]. J Neurosci,2006,26(16):4359-4369.

[16] WANG L,LI W,KANG Z,et al. Hyperbaric oxygen preconditioning attenuates early apoptosis after spinal cord ischemia in rats[J]. J Neurotrauma,2009,26(1):55-56.

[17] MATCHETT G A,MARTIN R D,ZHANG J H. Hyperbaric oxygen therapy and cerebral ischemia: neuroprotective mechanisms[J]. Neurol Res, 2009, 31 (2): 114-121.

(收稿日期:2017-08-19 修回日期:2018-01-22)