

· 论 著 · DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.12.004

和厚朴酚对人结肠癌细胞及 Wnt 信号通路的影响及调控作用*

吴 柯¹, 薛 莱², 韩 萍^{3△}

(1. 重庆医科大学药理学教研室/重庆市生物化学与分子药理学重点实验室, 重庆 400016;

2. 四川省江油市人民医院临床药学科 621700; 3. 重庆市人民医院肿瘤科 400013)

摘要:目的 探讨和厚朴酚(HNK)对人结肠癌细胞及 Wnt 信号通路的影响和调控作用。方法 采用结晶紫染色法和增殖细胞核抗原(PCNA)蛋白表达检测 HNK 对人结肠癌 LoVo 细胞增殖的抑制作用;利用流式细胞仪和 Caspase-3 蛋白表达观察 HNK 对人结肠癌 LoVo 细胞凋亡的影响;利用荧光素酶报告质粒检测 HNK 对 Wnt 信号通路中 β -catenin/Tcf4 转录活性的影响;蛋白的表达采用 Western blot 检测。结果 HNK 剂量依赖性地抑制细胞增殖($P < 0.05$),并诱导细胞凋亡。荧光素酶报告质粒检测结果显示,HNK 在 $10.0 \mu\text{mol/L}$ 时就能明显降低 LoVo 细胞中 β -catenin/Tcf4 转录活性($P < 0.05$)。结论 HNK 能抑制人结肠癌细胞增殖,诱导其凋亡,该作用可能与 HNK 抑制 Wnt 信号通路的转导有关。

关键词:和厚朴酚; 结肠癌细胞; 增殖; 凋亡

中图法分类号:R965

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)12-1643-04

Effect of honokiol on human colon cancer cells and Wnt signaling pathway*

WU Ke¹, XUE Lai², HAN Ping^{3△}

(1. Teaching and Research Section of Pharmacology of Chongqing Medical University/

Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, Chongqing 400016, China;

2. Department of Clinical Pharmacy, Jiangyou People's Hospital, Jiangyou, Sichuan 621700, China;

3. Department of Oncology, Chongqing General Hospital, Chongqing 400013, China)

Abstract: Objective To investigate the anti-cancer effect of honokiol on colon cancer cells and Wnt signaling pathway. **Methods** The assay of crystal violet staining and the protein expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) were applied to detect the proliferation effect of LoVo cells. Flow cytometric and the protein expression of Caspase-3 were introduced to analyze the effect of apoptosis in LoVo cells. Luciferase reporter assay was used to measure the transcriptional activity of β -catenin/Tcf4 in LoVo cells. The protein expression was detected by Western blot. **Results** Honokiol inhibited the proliferation and induced the apoptosis in LoVo cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). The transcriptional activity of β -catenin/Tcf4 in LoVo cells was inhibited by honokiol at $10.0 \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.05$). **Conclusion** Honokiol could inhibit the proliferation and induce the apoptosis of colon cancer cells, which maybe related to the inhibition of Wnt signal transduction.

Key words: honokiol; colon cancer cells; proliferation; apoptosis

结肠癌是常见胃肠道恶性肿瘤之一,在我国,其发病率在恶性肿瘤中排第 4 位^[1]。长期以来,治疗该病主要依靠抑制核酸生物合成的药物,如 5-氟尿嘧啶,但该药细胞毒性大,不良反应严重。因此,在中草药中寻找具有抗癌作用的有效活性成分是目前肿瘤治疗的发展方向之一。和厚朴酚(HNK)为木兰科落叶乔木植物厚朴的主要成分之一,具有抗炎、抗氧化、抗菌、保护心脑血管等广泛的药理活性^[2];HNK 也有一定的抗肿瘤作用,对肺癌、胃肠道肿瘤、乳腺癌、卵巢癌的生长也有抑制作用^[3]。目前认为,HNK 的抗肿瘤作用主要与其调节凋亡、阻断核因子 κB (NF-

κB)、抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和信号转导与转录激活因子 3(STAT3)等信号通路有关^[3]。现已证实,Wnt 信号通路在结肠癌细胞增殖、转移中具有重要作用,已成为结肠癌治疗的主要靶点之一^[4]。但在 HNK 抗结肠癌的作用中,Wnt 信号通路是否参与其中,目前国内外相关报道较少。本研究拟利用人结肠癌 LoVo 细胞(以下简称“LoVo 细胞”),探讨 Wnt 信号通路在 HNK 抗结肠癌细胞中的调控作用,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 LoVo 细胞购自美国模式培养物集存

* 基金项目:重庆市渝中区科技计划项目(20150134);重庆市基础与前沿计划项目(cstc2015jcyA10046)。

作者简介:吴柯,男,副教授,主要从事肿瘤学方面的研究。△ 通信作者,E-mail:Hanping1225@sina.com。

库(ATCC); HNK 购自成都贝斯特试剂有限公司(纯度 $\geq 98\%$); 二甲基亚砜(DMSO)溶剂购自北京索宝来科技有限公司(美国化学协会标准级); 脂质体 Lipofectamine 购自 Invitrogen 公司; 增殖细胞核抗原(PCNA)抗体、Caspase-3 抗体和 GAPDH 抗体均购自 Santa Cruz Biotechnology 公司。其余试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 采用 McCoy's 5A 培养基(含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素) 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 的培养箱中培养细胞。

1.2.2 结晶紫染色检测细胞增殖情况 将指数生长的细胞接种于 24 孔板, 用 10.0、12.5、15.0、17.5、20.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 HNK 处理细胞。72 h 后进行结晶紫染色, 检测细胞增殖情况。方法如下: 用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗孔板 1 次, 加入 500 μL PBS、10% 甲醛配制的结晶紫饱和溶液。室温孵育 20 min, 用 PBS 冲洗 3 次, 室温晾干后扫描。加入 500 μL 10% 乙酸溶解结晶紫, 轻微振摇, 待结晶紫完全溶解后, 590 nm 测其吸光度。每组重复 3 次。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡情况 将生长良好的细胞接种于 6 孔板, 细胞贴壁后, 加入不同浓度 HNK 或等体积 DMSO。48 h 后收集细胞, 按试剂盒说明书操作, 进行周期分析。或利用不含乙二胺四乙酸(EDTA)的胰酶消化并收集细胞, 按试剂盒说明书操作, 检测后进行凋亡分析。每组重复 3 次。

1.2.4 荧光素酶报告质粒检测 Wnt 信号通路中 β -catenin/Tcf4 转录活性 将指数生长状态的细胞接种于 T25 培养瓶中, 待细胞贴壁后, 用 Lipofectamine 转染荧光素酶报告质粒(质粒量为 3 $\mu\text{g}/\text{T25}$)^[5-6]。4 h 后换液, 12 h 后消化细胞, 重新接种于 24 孔板, 细胞贴壁后加入不同浓度 HNK 或等体积的 DMSO。36 h 后, 裂解细胞并按试剂盒(Promega)说明书进行荧光素酶相对活性测定。BCA 试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 上海)检测蛋白浓度, 用于对荧光素酶相对活性进行校正。荧光素酶相对活性用各实验组与对照组测定比值表示。

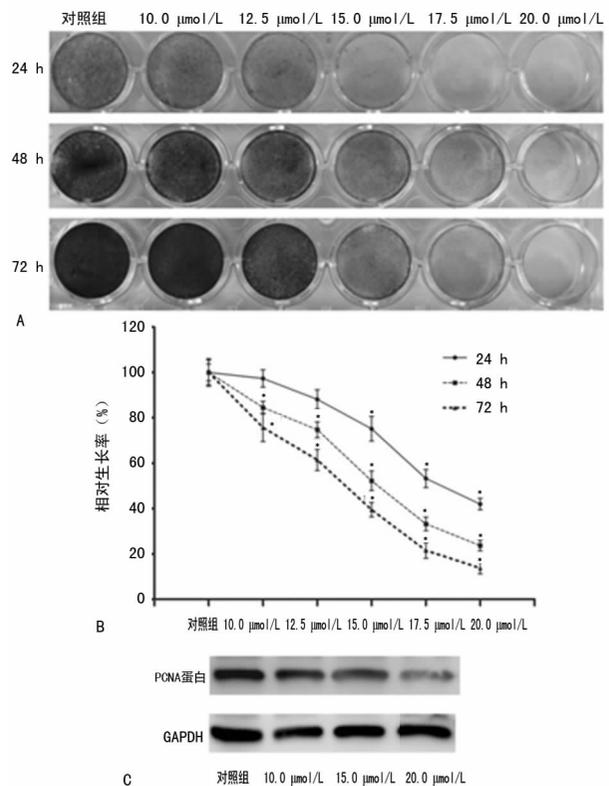
1.2.5 Western blot 检测蛋白表达 将指数生长的细胞接种于 6 孔板中, 细胞贴壁后加入不同浓度 HNK 或等体积 DMSO。24 h 后, 提取各组总蛋白, BCA 试剂盒检测蛋白浓度。常规方法进行 Western blot 操作, 采用化学发光法(ECL)显色并成像。每组重复 3 次。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

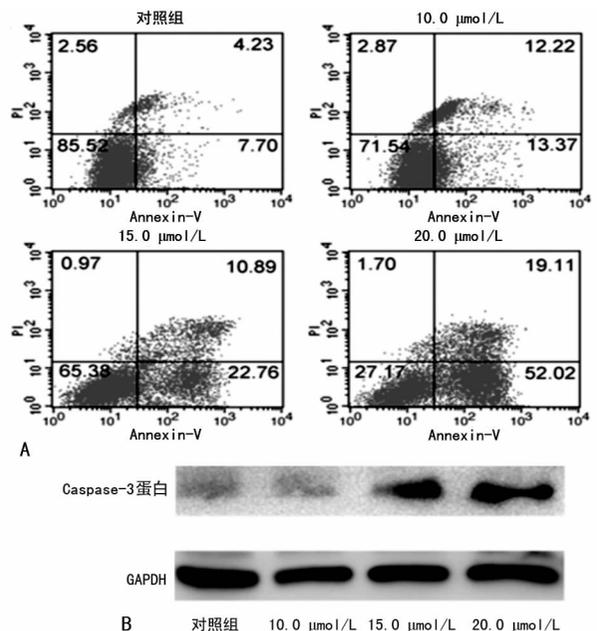
2.1 HNK 对 LoVo 细胞的抑制作用 结晶紫染色结果显示, 随着 HNK 浓度增加, LoVo 细胞生长率明

显下降, 组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$), 见图 1A、图 1B。根据以上结果, 课题组选择了 3 个浓度: 10.0、15.0 和 20.0 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 进行后续的量效及机制验证实验, Western blot 结果显示, PCNA 蛋白表达也明显减少, 见图 1C。说明 HNK 对 LoVo 细胞的生长具有明显抑制作用。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; A 为结晶紫染色; B 为结晶紫染色定量分析; C 为 PCNA 蛋白表达; GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图 1 HNK 对 LoVo 细胞增殖的影响

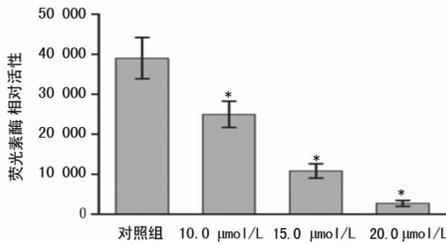


注: A 为流式细胞仪分析结果; B 为 Caspase-3 蛋白表达情况; GAPDH 为甘油醛-3-磷酸脱氢酶

图 2 HNK 对 LoVo 细胞凋亡的影响

2.2 HNK 对 LoVo 细胞的促凋亡作用 流式细胞仪检测结果显示, HNK 浓度依赖性地增加 LoVo 细胞的凋亡比例, 见图 2A。Western blot 结果显示, HNK 使 Caspase-3 蛋白表达升高, 见图 2B。说明 HNK 对 LoVo 细胞凋亡具有促进作用。

2.3 HNK 对 Wnt 信号通路的作用 实验结果显示, 用 HNK 处理 LoVo 细胞 24 h 后, 剂量依赖性地降低荧光素酶相对活性 ($P < 0.05$), 见图 3。提示 HNK 对 Wnt 信号通路中 β -catenin/Tcf4 转导具有抑制作用。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

图 3 HNK 在 LoVo 细胞中对荧光素酶相对活性的影响

3 讨论

结肠癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一, 发病率和病死率居恶性肿瘤前列, 且呈逐年上升趋势^[7]。目前治疗所用化疗药物主要为细胞毒性药物, 寻找低毒高效的药物显得尤为迫切。已有研究发现, HNK 能抑制人结肠癌细胞系 HCT116、SW480、HT29 等的增殖, 并诱导细胞凋亡^[8-10]; 在 RKO 移植瘤裸鼠中, HNK 能延长其生存期^[11]。这些结果提示, HNK 在体内外均能抑制结肠癌生长。本研究结果也显示, 利用结晶紫染色, HNK 可剂量依赖性地抑制 LoVo 细胞增殖; 反映细胞增殖的 PCNA 蛋白检测结果也支持这一结论。同时, 流式细胞仪检测结果显示, HNK 可诱导细胞凋亡; Caspase-3 是细胞凋亡过程中最主要的终末剪切酶, HNK 使其蛋白表达明显增加。这些结果提示, HNK 可抑制 LoVo 细胞的增殖, 并诱导细胞凋亡。

现有研究认为, Wnt 信号通路激活突变是诱导结肠癌发生的主要原因之一^[12]。Wnt 信号通路可分为典型的 Wnt 信号通路和非典型的 Wnt 信号通路, 在胚胎发育、组织内环境平衡的调节中发挥重要作用。典型的 Wnt 信号通路, 即 Wnt/ β -catenin 通路, 可激活核内靶基因的表达, 具有重要作用。一般而言, 内源性 Wnt 配体与细胞膜上卷曲蛋白结合后, β -catenin 不能降解, 而在细胞内聚集, 移位进入细胞核, 从而实现下游靶基因的调节^[13]。在结肠癌细胞中, 各种原因导致 Wnt 信号通路持续异常激活, β -catenin 降解减少, 在核蛋白积累, 促进某些原癌基因(如 c-Myc、Cyclind-1 等)过度表达, 最终使细胞无限制增殖^[14]。因此, Wnt 信号通路已经成为结肠癌治疗的重要靶点

之一。目前对于 HNK 抗结肠癌作用的机制研究中, 主要集中于其对 p53 基因的激活, Notch 信号通路等方面^[8-9, 15], 而关于其对 Wnt 信号通路的影响目前鲜见报道。本研究结果显示, HNK 能抑制 LoVo 细胞增殖, 并抑制 β -catenin/Tcf4 的转导活性, 提示 HNK 对结肠癌细胞的抑制作用与其对 Wnt 信号通路的抑制可能有关。

综上所述, HNK 能抑制 LoVo 细胞增殖和促进凋亡, 其作用机制可能与 HNK 阻止 Wnt 信号通路过度活化有关, 但具体下游机制并不清楚, 仍需进行深入研究。

参考文献

- [1] 刘荣兴, 胡培, 马妍, 等. 和厚朴酚抑制结肠癌细胞增殖与骨形态发生蛋白 7 关系的研究[J]. 中国药理学通报, 2018, 34(7):1012-1019.
- [2] 盛安琪, 刘文涛, 张艳等. 和厚朴酚神经保护作用的研究进展[J]. 药学研究, 2017, 36(11):660-663.
- [3] 陈淑珍. 和厚朴酚的抗肿瘤实验治疗及其分子作用靶点的研究进展[J]. 药学报, 2016, 51(2):202-207.
- [4] VOLOSHANENKO O, ERDMANN G, DUBASH T D, et al. Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells[J]. Nat Commun, 2013, 4:2610.
- [5] GENINI D, GARCIA-ESCUADERO R, CARBONE G M, et al. Transcriptional and non-transcriptional functions of PPAR β/δ in non-small cell lung cancer[J]. PLoS One, 2012, 7(9):e46009.
- [6] 车章洪, 何百成. 人参皂苷 Rg3 抑制人结肠癌细胞生长与 Wnt/ β -catenin 信号的关系[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(13):1353-1356.
- [7] AHMAD N Z, RACHEVA G, ELMUSHARAF H. A systematic review and meta-analysis of randomized and non-randomized studies comparing laparoscopic and open abdominoperineal resection for rectal cancer[J]. Colorectal Dis, 2013, 15(3):269-277.
- [8] LIU R X, REN W Y, MA Y, et al. BMP7 mediates the anticancer effect of honokiol by upregulating p53 in HCT116 cells[J]. Int J Oncol, 2017, 51(3):907-917.
- [9] WYNN M L, CONSUL N, MERAJVER S D, et al. Inferring the effects of honokiol on the notch signaling pathway in SW480 colon cancer cells[J]. Cancer Inform, 2014, 13(5):1-12.
- [10] HUA H, CHEN W, SHEN L, et al. Honokiol augments the anti-cancer effects of oxaliplatin in colon cancer cells [J]. Acta Biochim Biophys Si, 2013, 45(9):773-779.
- [11] CHEN F, WANG T, WU Y F, et al. Honokiol: a potent chemotherapy candidate for human colorectal carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(23):3459-3463.
- [12] IONOV Y, PEINADO M A, MALKHOSYAN S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis [J]. Nature, 1993, 363(6429):558-561.

妄发生率、28 d 病死率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 这可能是例数偏少所致。对照组的重症监护室停留时间长于观察组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示经鼻高流量氧疗对于改善通气功能, 促进恢复有着积极的意义。

在两组患者的治疗耐受度比较中, 观察组优于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。传统的无创机械通气可能会导致患者出现胃胀气、面部皮肤压迫、局部缺血、误吸等情况, 而且对于深部痰液的引流效果比较差。同时, 由于传统的吸氧装置并没有加温装置, 即使使用湿化瓶, 但是加湿效果比较有限, 吸入后容易诱发口、鼻腔的干燥和眼部的不适感, 影响吸氧流量。而经鼻高流量氧疗使用加热单回路对氧气进行加温加湿, 维持患者气道黏膜与纤毛功能的完整性, 使患者的不适感降低, 稳定给氧, 使患者自主呼吸过程顺畅。而且低水平的气道正压可以使解剖学的死腔降低, 使患者的吸气流速增大和肺泡开放度增加, 改善通气状况, 降低吸气阻力, 使氧耗降低, 缓解呼吸肌疲劳, 患者的治疗耐受度增加。

综上所述, 对 COPD 患者在拔管后给予经鼻高流量氧疗, 可以明显改善患者的肺功能与血气指数, 提升患者的治疗耐受度, 值得在临床工作中推广。

参考文献

[1] 张俊, 刘泽玉, 柯张延, 等. 血清 NSE、BNP 和 D-二聚体水平在预测慢阻肺急性加重中的临床意义[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(4): 652-654.

[2] 张扬帆, 郝尧. 支气管上皮中 GULP1 蛋白的表达与慢性阻塞性肺疾病严重程度的关系研究[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(4): 670-673.

[3] 冯晓丽, 姜轶, 巫道琳, 等. 缩唇腹式呼吸联合阻力呼吸训练器对老年慢性阻塞性肺病稳定期患者康复效果和生活方式的影响[J]. 实用医院临床杂志, 2018, 15(2): 121-124.

[4] 李星晶, 沈芳, 王鹏. Padua 预测评分在 AECOPD 住院患者 VTE 风险因素分析中的应用[J]. 临床肺科杂志, 2018, 23(3): 453-456.

[5] 徐晓翠, 王金柱, 姚惠萍, 等. 经鼻高流量湿化氧疗对 COPD 患者拔管后再插管及呼吸衰竭的影响[J]. 齐鲁护

理杂志, 2018, 24(5): 1-3.

[6] 杨再兴, 熊玮. 盐酸氨溴索辅助治疗对 AECOPD 合并呼吸衰竭患者血气指标与肺功能的影响[J]. 山西医药杂志, 2018, 47(4): 428-431.

[7] 悦云. 纤维支气管镜对机械通气治疗 COPD 并呼吸衰竭的效果及并发症的影响[J]. 中国急救医学, 2015, 35(4): 355-357.

[8] 黄海, 陈国忠. 小剂量托拉塞米持续泵注辅助无创机械通气治疗慢性阻塞性肺疾病合并左心功能不全[J]. 内科急危重症杂志, 2018, 24(1): 22-24.

[9] 黄美琪, 吴镇东. 无创双水平正压通气联合呼吸兴奋剂治疗慢性阻塞性肺疾病合并肺性脑病的效果观察[J]. 海南医学, 2017, 28(24): 3977-3979.

[10] 吴娅秋, 丛伟, 梁宗安, 等. 早期无创机械通气治疗慢性阻塞性肺病单侧肺减容术后的疗效评价[J]. 实用医院临床杂志, 2017, 14(6): 185-188.

[11] 陈俊东, 郑利先, 罗巍, 等. 无创机械通气用于 COPD 呼吸衰竭患者治疗效果观察[J]. 山东医药, 2015, 55(14): 78-79.

[12] MIGUEL-MONTANES R, HAJAGE D, MESSIKA J, et al. Use of high-flow nasal cannula oxygen therapy to prevent desaturation during tracheal intubation of intensive care patients with mild-to-moderate hypoxemia[J]. Crit Care Med, 2015, 43(3): 574-583.

[13] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南: 2007 年修订版[J]. 中华内科杂志, 2007, 46(3): 254-261.

[14] 中华医学会重症医学分会. 慢性阻塞性肺疾病急性加重患者的机械通气指南: 2007[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(9): 513-518.

[15] 柴晶晶, 朱华栋, 于学忠, 等. 慢性阻塞性肺疾病评估测试对 COPD 急性加重的有效性评估[J]. 中国急救医学, 2017, 37(2): 158-163.

[16] 陶小华. 有创和无创正压通气对 COPD 急性加重并严重呼吸衰竭患者血浆脑钠肽水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(4): 973-974.

[17] 张晓霞, 艾克伯尔·阿布都热合曼. COPD 合并症对 COPD 急性加重期的影响[J]. 广东医学, 2017, 38(18): 2810-2813.

(收稿日期: 2019-01-08 修回日期: 2019-03-02)

(上接第 1645 页)

[13] JIANG J, GRIFFIN J D. Wnt/ β -catenin pathway modulates the sensitivity of the mutant FLT3 receptor kinase inhibitors in a GSK-3 β dependent manner [J]. Genes Cancer, 2010, 1(2): 164-176.

[14] SHANG S, HUA F, HU Z W. The regulation of β -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities

[J]. Oncotarget, 2017, 8(20): 33972-33989.

[15] PONNURANGAM S, MAMMEN J M, RAMALINGAM S, et al. Honokiol in combination with radiation targets notch signaling to inhibit colon cancer stem cells[J]. Mol Cancer Ther, 2012, 11(4): 963-972.

(收稿日期: 2018-11-16 修回日期: 2019-02-21)