

辣椒碱通过 TRPV1 诱导结肠癌 SW480 细胞凋亡

黄贤威, 李戈, 姚梦玮, 魏洪*
(贵州医科大学, 贵阳 550025)

[摘要] 目的:探讨辣椒碱通过瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)对人结肠癌 SW480 细胞的影响及可能的分子机制。方法:设立辣椒碱组及空白组,通过细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)法检测辣椒碱(50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 SW480 细胞 12, 24, 48 h 后的细胞活性,选取有效抑制增殖的辣椒碱浓度;采用流式细胞术检测辣椒碱干预(200, 400, 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)后细胞凋亡及细胞周期的变化;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测辣椒碱(200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)干预后 TRPV1, 肿瘤抑制蛋白 p53, 磷酸化 p53(p-p53), 抑癌基因[B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)], 活化的天冬氨酸蛋白水解酶-3(cleaved Caspase-3), cleaved Caspase-8, 活化的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(cleaved PARP)的蛋白表达的影响;此外,利用微小 RNA(mRNA)沉默技术作用 TRPV1, 观察 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辣椒碱处理沉默 TRPV1 的 SW480 细胞凋亡率的变化,以及上述蛋白表达的影响。结果:与空白组比较,辣椒碱 50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作用对细胞活性未出现显著影响,浓度在 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时,随浓度增加细胞活性逐渐降低($P<0.01$),呈剂量依赖效应;与空白组比较,辣椒碱 200, 400, 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理可明显诱导细胞凋亡($P<0.05$, $P<0.01$);200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辣椒碱干预下,细胞生长表现为 G_2/M 期阻滞,800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 表现为 G_0/G_1 期阻滞($P<0.05$);与空白组比较,辣椒碱 200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理细胞能够明显上调上述凋亡途径中相关蛋白(p53, p-p53, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved PARP)的表达($P<0.05$, $P<0.01$), Bcl-2 蛋白表达显著下调($P<0.01$);沉默 TRPV1 能明显抑制辣椒碱诱导的细胞凋亡及凋亡通路蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:辣椒碱可能通过 TRPV1 受体抑制 SW480 细胞增殖,阻滞细胞周期并诱导细胞凋亡。

[关键词] 辣椒碱; 瞬时受体电位香草酸亚型 1(TRPV1); p53; SW480 细胞; 凋亡

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R2-031;R979.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)17-0075-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211796

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210705.1808.007.html>

[网络出版日期] 2021-07-06 9:33

Capsaicin Induces Apoptosis of Colon Cancer SW480 Cells Through TRPV1

HUANG Xian-wei, LI Ge, YAO Meng-wei, WEI Hong*
(Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of capsaicin on colon cancer SW480 cells and the underlying molecular mechanism through the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). **Method:** Capsaicin groups with different concentrations and a blank group were set up. The cell viability was detected by cell counting kit-8 (CCK-8) after SW480 cells were treated with capsaicin (50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 12, 24, and 48 h to select the concentration of capsaicin which can effectively inhibit proliferation. The cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry after SW480 cells were treated with capsaicin (200, 400, 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. The protein expression levels of TRPV1, p53, p-p53, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved cysteinyl aspartate-specific protease-3 (cleaved

[收稿日期] 20210429(018)

[基金项目] 贵州医科大学乡村振兴研究与农业产业技术攻关项目(062190211);贵州省大学生创新创业训练计划项目(S202010660053);贵州省大学生创新创业训练计划项目(S20195200902)

[第一作者] 黄贤威,在读硕士,从事药食两用资源与肿瘤研究, E-mail: 1293859391@qq.com

[通信作者] *魏洪,博士,副教授,从事病毒溶瘤、药食两用资源与肿瘤研究, E-mail: 263676470@qq.com

Caspase-3), cleaved Caspase-8, and cleaved poly adenosine diphosphate ribose polymerase (PARP) were detected by Western blot after SW480 cells were treated with capsaicin (200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. In addition, the apoptosis was detected after SW480 cells were treated with TRPV1 microRNA (mRNA) and capsaicin (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Western blot analysis was used to detect the protein expression levels of the above proteins. **Result:** As compared with the blank group, capsaicin ($\geq 200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly inhibited the cell viability of SW480 cells ($P < 0.01$) in dose- and time-dependent manners. The cell cycle was arrested in G_2/M phase by 200 and 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ capsaicin treatment, and arrested in G_1 phase by 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ capsaicin treatment ($P < 0.05$). Flow cytometry showed that capsaicin (200, 400, 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly promoted apoptosis of SW480 cells simultaneously ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Western blot showed that capsaicin (200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) significantly up-regulated the protein levels of apoptosis-related proteins (p53, p-p53, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, and cleaved PARP) ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and significantly down-regulated Bcl-2 ($P < 0.01$). In addition, siRNA-mediated knockdown of TRPV1 significantly attenuated capsaicin-induced apoptosis and the protein levels of apoptosis-related proteins in SW480 cells ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Capsaicin can inhibit cell proliferation, arrest cell cycle, and induce apoptosis of SW480 cells, and the possible mechanism may be related to TRPV1 activation.

[**Keywords**] capsaicin; transient receptor potentia vanilloid 1 (TRPV1); p53; SW480 cells; apoptosis

结肠癌是最常见的消化系统肿瘤,每年死于该病人数高达70万余人,且患者在长期化疗过程中易出现严重的毒素蓄积和耐药性,5年生存率仅为31%^[1-2]。因此,寻求新型高效且不良反应小的抗肿瘤药物已成为结肠癌研究的新方向。近年来大量研究发现,从茄科辣椒属植物成熟果实中提取的单体分子辣椒碱对消化道肿瘤具有良好的抑瘤活性,能够抑制肿瘤细胞的增殖,诱导细胞发生凋亡,阻滞细胞周期,抑制迁移与侵袭等^[3-4],但辣椒碱抗结肠癌的分子机制尚未清晰。目前研究显示,辣椒碱抑制肿瘤细胞增殖是通过激活细胞膜上的瞬时受体电位香草酸亚型 (TRPV),促进胞外钙离子进入细胞,进一步诱导线粒体通透性转换孔 (mPTP) 的开放,使细胞发生线粒体途径凋亡^[5]。TRPV1作为胞膜上介导信号因子传递,发挥新陈代谢、电信号传递、癌症发生发展等多种生物学功能的受体^[6]。有报道显示,辣椒碱是通过TRPV1激活结肠癌细胞内T细胞核因子2(NFAT2)上调肿瘤抑制因子p53诱导细胞凋亡;亦或者通过腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)/p53途径上调活性氧(ROS)与c-Jun氨基末端酶(JNK)的基因表达来激活线粒体途径^[7-9],研究虽然提示p53是辣椒碱抑制肿瘤细胞激活的重要抑制因子,但该蛋白的具体修饰尚未清晰。p53不同位点的磷酸化能够在信号转导中发挥不同作用,其中Ser 46位点磷酸化与细胞凋亡密切相关。在细胞受损数小时后,可观察到胞内p53的Ser 46位点磷酸化,且修饰所调控的细胞死亡进程为不可逆,

进一步可致细胞周期停滞和凋亡途径基因的激活^[10]。因此,本实验以p53基因高表达的SW480细胞为研究对象,探讨辣椒碱通过TRPV1修饰p53表达后对SW480细胞增殖、细胞周期分布、凋亡及相关蛋白表达的影响,为辣椒碱机制研究提供新的思路与理论依据。

1 材料

1.1 细胞 结肠癌SW480细胞购自于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),目录号为GDC0306,由贵州医科大学感染与免疫学实验室保存,保存时传至45代。

1.2 药物 辣椒碱对照品(大连美仑生物科技有限公司,批号MB6732,纯度 $\geq 99\%$)。

1.3 试剂 DMEM培养基(美国HyClone公司,批号SH30022.01);0.25%胰酶(以色列Biological Industries公司,批号03-054-1);胎牛血清(四季青公司,批号13011);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒(上海易汇生物公司,批号AAT13479);Annexin V-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)凋亡检测试剂盒(美国Beckman Coulter公司,批号556547);细胞裂解液,蛋白酶抑制剂,BCA蛋白浓度测定试剂盒,十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶快速配置试剂盒,增强化学发光法(ECL)化学发光试剂盒(上海碧云天公司,批号分别为P0013, P1011, P0012, P0690, P0018);p53抗小鼠抗体[安诺伦(北京)生物科技有限公司,批号APG02958];p53(phospho Ser 46)抗兔抗体,TRPV1

抗兔抗体,活化的聚腺苷二磷酸核糖聚合酶1(cleaved PARP1)抗兔抗体,半胱氨酸天冬氨酸水解酶-3(Caspase-3)抗兔抗体,B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗兔抗体,Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗兔抗体,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗兔抗体,免疫球蛋白G(IgG)抗鼠抗体,IgG抗兔抗体(ABclonal公司,批号分别为 ab76242, ab3487, ab32064, ab32351, ab32124, ab32503, ab8245, ab190475, ab6721);青链霉素混合液,一抗稀释液,二抗稀释液,5×Tris-甘氨酸电泳缓冲液,10×电转液,封闭液,TBST缓冲液(北京索莱宝公司,批号分别为 P1400, A1810, A1811, A1070, D1060, SW3015, T1081);GP-transfect-Mate 转染试剂(上海吉玛公司,批号 80932);所用干扰小RNA(siRNA)由上海吉玛基因技术有限公司根据设计合成。序列见表1。

表1 siRNA 序列
Table 1 sequence of siRNA

名称	序列(5'-3')
空白 siRNA	干扰 RNA:UUCUUCGAACGUGUGACGUTT 反义干扰 RNA:ACGUGACACGUUCGGAGAATT
TRPV1 siRNA	干扰 RNA:GGAGACUAUUUCCGAGUUATT 反义干扰 RNA:UAACUCHHAAAUAGUCUCCTT

1.4 仪器 BPN-80CH型CO₂细胞恒温培养箱(上海一恒仪器公司);Epoch2型多功能酶标仪(美国BioTek公司);Micro 21R型冷冻离心机(赛默飞世尔科技公司);FC-500型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司);DYY-2C型电泳仪电源,DY CZ-26B型电泳槽,DY CZ-40G型转印槽(北京六一公司);Gel Doc XR⁺型多功能凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞的培养 取冻藏的结肠癌SW480细胞37℃恒温解冻,培养于含10%胎牛血清,1%双抗(青霉素与链霉素)DMEM培养基,置于37℃,5%CO₂细胞恒温培养箱中培养。待细胞在培养瓶中密度至80%时,使用0.25%EDTA胰酶消化,室温1000r·min⁻¹离心3min(离心半径13.5cm),1:2传代,取对数期细胞用于后续实验。

2.2 辣椒碱溶液的配制 称取辣椒碱0.04mmol(≥99%)溶解于DMSO溶液200μL中,制备成200mmol·L⁻¹的辣椒碱母液,随后用DMEM配置成不同浓度的辣椒碱溶液(DMSO经稀释,细胞毒性可忽略),置于-20℃冰箱冷藏。

2.3 CCK-8法检测细胞株的活性 取对数期的SW480细胞,每孔1×10⁴个接种于96孔板,置于37℃,5%CO₂细胞恒温培养箱中培养,待细胞贴壁后,每孔分别加入不同浓度(50,100,200,300,400,500,600,800,1000μmol·L⁻¹)的辣椒碱溶液,每个实验组5个复孔,空白孔仅加入含1%胎牛血清的DMEM培养基,继续培养24h。每孔加入CCK-8试剂10μL,37℃孵育4h后,采用多功能酶标仪在450nm处测量吸光度A,计算细胞的抑制率,并绘制生长曲线,利用Graph软件计算出半抑制浓度(IC₅₀)。抑制率=(Ac-As)/(Ac-Ab)×100%。其中As表示实验孔A(含有细胞,培养基,CCK-8,辣椒碱);Ab表示空白孔A(含有培养基,CCK-8);Ac表示对照孔A(含有细胞,培养基,CCK-8)。

2.4 流式细胞术检测细胞周期 取对数期生长的SW480细胞,分为空白组、辣椒碱组(200,400,800μmol·L⁻¹)。给药24h后收集细胞,加入预冷4℃的70%乙醇固定过夜,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤固定液,加入PI-核糖核酸酶(RNase)9:1染色液600μL,4℃孵育30min,上流式细胞仪检测。

2.5 流式细胞术检测细胞凋亡 细胞分组与2.4项一致,给药24h后收集细胞,PBS溶液洗涤2次,加入Binding buffer 100μL,吹打混匀,转移至流式管内,加入FITC Annexin V染液5μL与PI染液5μL,震荡混匀,避光孵育15min,上流式细胞仪检测。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测凋亡通路蛋白表达 取对数期生长的SW480细胞,给药24h后PBS溶液清洗3次,加入蛋白裂解液提取细胞总蛋白;4℃,12000r·min⁻¹,离心10min(离心半径8cm),取上清液利用BCA定量试剂盒测定各组总蛋白浓度;并对蛋白加样量衡量至同一水平40μg,电泳,转膜,封闭,TBST溶液清洗3次,加入对应一抗TRPV1抗体(1:2000),p53,p-p53,Bax,Bcl-2,cleaved Caspase-3,cleaved Caspase-8,cleaved PARP抗体(1:1000),GAPDH抗体(1:14000),4℃孵育过夜,二抗室温孵育60min,TBST溶液清洗3次,加入ECL成像试剂,Bio-Rad多功能凝胶成像系统成像,胶片灰度值采用Image Lab软件分析,结果统计分析。

2.7 TRPV1 siRNA沉默后辣椒碱诱导细胞凋亡的影响 取对数期生长的SW480细胞,每孔1×10⁶个接种于6孔板,随机分为辣椒碱组,沉默TRPV1辣椒碱组,沉默TRPV1组,待细胞密度达60%时,依据吉玛基因转染试剂盒步骤操作对沉默TRPV1辣椒

碱组与沉默TRPV1组转染TRPV1 siRNA,转染48 h后,在辣椒碱组与沉默TRPV1辣椒碱组加入200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辣椒碱继续培养24 h,采用Annexin V-FITC/PI双染法检测检测细胞凋亡率,方法与2.5项一致。采用Western blot检测沉默TRPV1后SW480细胞中p53, p-p53, Bax, Bcl-2, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved PARP蛋白表达的变化,方法与2.6项一致。

2.8 统计学方法 实验结果均重复3次以上,数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据通过GraphPad Prism 8.0与SPSS 22.0软件分析处理,组间比较采用One way-

ANOVA方法分析。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 辣椒碱对SW480细胞增殖的影响 研究结果显示,与空白组比较,经50, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的辣椒碱处理12, 24, 48 h后细胞活性无明显变化;200~1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辣椒碱处理12, 24, 48 h后,细胞活力显著下降($P<0.01$),抑制效果呈浓度与时间依赖性,计算得辣椒碱处理24 h的 IC_{50} 值为203.16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。辣椒碱对SW480细胞增殖存在抑制作用。见表2。

表2 辣椒碱对SW480细胞增殖率的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of capsaicin on proliferation of SW480 cells ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	12 h	24 h	48 h
空白		100.00 \pm 0.67	100.00 \pm 0.32	100.00 \pm 1.07
辣椒碱	50	100.00 \pm 1.67	99.30 \pm 2.34	99.10 \pm 2.23
	100	95.43 \pm 5.56	90.28 \pm 9.67	90.03 \pm 8.27
	200	83.43 \pm 4.53 ²⁾	52.33 \pm 4.04 ²⁾	46.90 \pm 2.64 ²⁾
	300	76.23 \pm 2.35 ²⁾	46.00 \pm 3.21 ²⁾	45.10 \pm 4.37 ²⁾
	400	68.07 \pm 3.57 ²⁾	42.00 \pm 4.00 ²⁾	40.60 \pm 3.64 ²⁾
	500	60.54 \pm 5.35 ²⁾	40.67 \pm 2.08 ²⁾	37.69 \pm 2.46 ²⁾
	600	57.96 \pm 4.67 ²⁾	35.67 \pm 2.64 ²⁾	30.34 \pm 1.34 ²⁾
	800	58.32 \pm 2.56 ²⁾	23.33 \pm 2.51 ²⁾	19.75 \pm 1.68 ²⁾
	1 000	40.27 \pm 2.36 ²⁾	15.67 \pm 4.67 ²⁾	10.50 \pm 1.64 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表3~6同)。

3.2 辣椒碱对SW480细胞周期的影响 与空白组相比较,200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辣椒碱处理24 h后,SW480细胞 G_2/M 期细胞量占比相较于空白组增加5.27%, 10.02%, G_2/M 期明显增加($P<0.05$),细胞发生 G_2/M 期阻滞,细胞的S期与空白组对比差异无统

计学意义。800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辣椒碱处理24 h,细胞 G_0/G_1 期相较于空白组增加了21.59%, S期减少了25.9%, S期显著减少($P<0.01$), G_0/G_1 期显著增加($P<0.01$), G_2/M 期差异无统计学意义,细胞发生 G_0/G_1 期阻滞。见表3。

表3 辣椒碱对SW480细胞周期的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of capsaicin on cell cycle of SW480 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	G_0/G_1	S	G_2/M
空白		57.71 \pm 3.53	35.67 \pm 1.23	6.62 \pm 2.63
辣椒碱	200	56.20 \pm 5.23	31.91 \pm 2.86	11.89 \pm 0.90 ¹⁾
	400	48.66 \pm 6.43	34.70 \pm 3.00	16.64 \pm 1.20 ¹⁾
	800	79.30 \pm 6.40 ²⁾	9.77 \pm 1.79 ²⁾	10.93 \pm 0.89

3.3 辣椒碱对SW480细胞凋亡的影响 空白组细胞凋亡率为1.8% \pm 0.58%;200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞凋亡率为10.2% \pm 0.44%;400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞凋亡率为24.3% \pm 4.96%;800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组细胞凋亡率为42.7% \pm 5.00%;与空白组比较,辣椒碱干预组凋亡率

明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),并呈浓度依赖效应。见表4。

3.4 辣椒碱对细胞凋亡相关蛋白的影响 与空白组比较,辣椒碱(200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组中p53, p-p53, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved

表 4 辣椒碱对 SW480 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

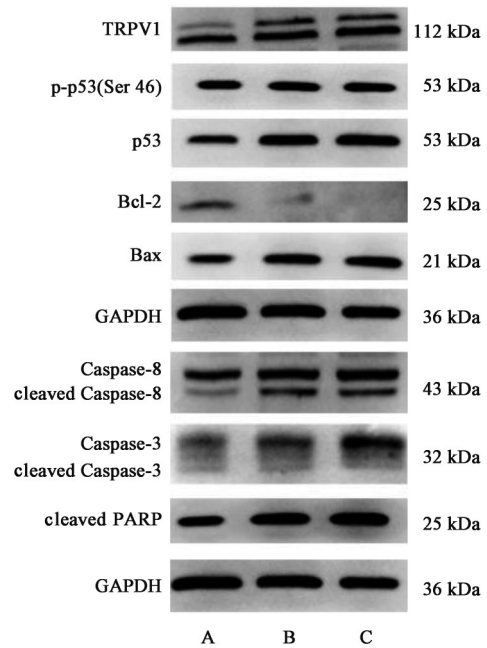
Table 4 Effect of capsaicin on apoptosis of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白		1.80±0.58
辣椒碱	200	10.20±0.44 ¹⁾
	400	24.30±4.96 ²⁾
	800	42.70±5.00 ²⁾

PARP 蛋白表达明显增加 ($P<0.05, P<0.01$), Bcl-2 蛋白明显减少 ($P<0.05, P<0.01$)。见图 1, 表 5, 6。

3.5 沉默 TRPV1 后辣椒碱对细胞凋亡及相关蛋白的影响 研究结果显示, 沉默 TRPV1 组与辣椒碱组的细胞凋亡率分别为 1.63%±1.9% 和 11.63%±0.41%; 与辣椒碱组比较, 沉默 TRPV1 辣椒碱组的细胞凋亡率为 5.64%±0.59%, 明显降低 ($P<0.05$)。见表 7。

在 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 辣椒碱作用下, TRPV1 siRNA 处理组与辣椒碱处理组相比, SW480 细胞中 TRPV1 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.05$), 而凋亡相关蛋白 p53, p-p53, Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved PARP 表达水平明显下调



A. 空白组; B. 辣椒碱 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. 辣椒碱 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 1 各组 SW480 细胞凋亡相关蛋白电泳

Fig. 1 Electrophoresis of capsaicin on expression of apoptosis-related protein of SW480 cells

($P<0.05$), Bcl-2 表达水平明显上调, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 2, 表 8, 9。

表 5 辣椒碱对 SW480 细胞 TRPV1, p53, p-p53, Bax, Bcl-2 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of capsaicin on p53, p-p53, Bax, Bcl-2 expression of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TRPV1/GAPDH	p53/GAPDH	p-p53/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
空白		1.14±0.20	0.89±0.08	0.30±0.08	0.51±0.14	1.15±0.10
辣椒碱	200	1.41±0.02	1.00±0.19 ¹⁾	0.35±0.19 ¹⁾	0.73±0.09 ²⁾	1.02±0.11 ¹⁾
	400	1.52±0.42	1.35±0.12 ²⁾	0.96±0.12 ²⁾	0.73±0.12 ²⁾	0.36±0.16 ²⁾

表 6 辣椒碱对 SW480 细胞 cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved PARP 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of capsaicin on cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved PARP expression of SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	cleaved Caspase-8/GAPDH	cleaved Caspase-3/GAPDH	cleaved PARP/GAPDH
空白		0.64±0.52	1.84±0.12	0.67±0.06
辣椒碱	200	2.07±0.03 ²⁾	3.86±0.11 ²⁾	1.05±0.05 ²⁾
	400	2.15±0.23 ²⁾	5.07±0.33 ²⁾	1.63±0.07 ²⁾

表 7 沉默 TRPV1 后辣椒碱对 SW480 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

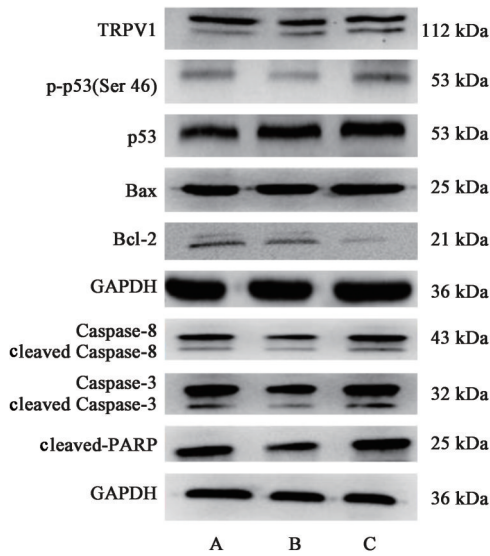
Table 7 Effect of capsaicin on apoptosis of SW480 cells by TRPV1 siRNA ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	凋亡率/%
沉默 TRPV1		1.63±1.98
沉默 TRPV1 辣椒碱	200	5.64±0.59 ¹⁾
辣椒碱	200	11.63±0.41

注: 与辣椒碱组比较 ¹⁾ $P<0.05$ (表 8, 9 同)。

4 讨论

辣椒碱是从茄科辣椒属植物成熟果实中提取的单体分子化合物, 在抗炎、抗氧化、抗神经痛、抗肿瘤等方面具有较好的功效^[11-12]。在以往的研究中, 研究者多选择 p53 相关的凋亡途径来阐述辣椒碱抗结肠癌的分子机制, 但辣椒碱作用后 p53 的修饰位点及 TRPV1/p53 途径与细胞周期的联系仍需进一步探究。TRPV1 除了离子通道功能外, 其余生理功能尚未得到证实, TRPV1/p53 途径诱导肿瘤发



A. TRPV1 siRNA 组; B. 辣椒碱 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +TRPV1 siRNA 组;
C. 辣椒碱 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图2 沉默TRPV1后各组SW480细胞凋亡相关蛋白电泳
Fig. 2 Electrophoresis of capsaicin on expression of apoptosis-related protein of SW480 cells by siRNA TRPV1

生凋亡的分子机制也尚未清晰,因此对其进一步研究显得尤为重要。

本研究以 p53 高表达的细胞株 SW480 作为研究载体,检测不同浓度(50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)辣椒碱对 SW480 细胞增殖情况的影响,结果显示辣椒碱对 SW480 细胞具有明显的抑制作用,其抑制效果呈时间与浓度依赖性。基于此基础提出假设,辣椒碱抑制 SW480 细胞增殖作用可能与修饰 p53 蛋白表达、阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡有关。结果显示,一定浓度(200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的辣椒碱能将细胞周期阻滞于 G_2/M 期,而 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辣椒碱作用下细胞周期将

阻滞于 G_0/G_1 期;随后观察辣椒碱作用后细胞凋亡情况,结果表明凋亡细胞比例显著增加。进一步考察其 p53, p-p53(Ser 46)及凋亡相关蛋白表达水平,结果显示辣椒碱作用后细胞中与周期相关 p53, p-p53 (ser 46) 蛋白上调,凋亡相关 Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved PARP 蛋白水平上调, Bcl-2 下调, Bax/Bcl-2 比例增加。而沉默 TRPV1 受体,能够影响辣椒碱对 SW480 细胞促凋亡作用,并下调 p53, p-p53 (Ser 46) 蛋白水平及凋亡 Bax, cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved PARP 相关蛋白水平,上调 Bcl-2 蛋白水平。

细胞正常的细胞周期可细分为 G_0/G_1 期, S 期, G_2/M 期,而 G_0/G_1 期为分裂准备期, S 期为 DNA 合成期, G_2/M 期为有丝分裂末期,结肠癌的发生与发展与细胞周期紊乱密切相关^[13]。多项研究表明 p53 蛋白是调控细胞周期的重要蛋白,通过激活信号转导分子 p21 蛋白转录可直接抑制细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK),阻滞细胞周期^[14]。另外 Ser 15, Ser 20 及 Ser 46 位点的 p53 磷酸化,均可以诱导结肠癌细胞发生 DNA 损伤,影响细胞周期并激活凋亡途径^[15-16]。本研究观察到 200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辣椒碱作用于 SW480 细胞时,细胞中 p53, p-p53 (Ser 46) 呈高表达,细胞周期发生 G_2/M 期阻滞,细胞分裂增殖受到影响;而 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度处理时,细胞周期发生 G_0/G_1 期阻滞,表明辣椒碱处理可引起 SW480 细胞 DNA 损伤无法正常合成 DNA。活化的 p53 可能是 DNA 损伤后细胞产生的标志,损伤程度较大的情况下,细胞无法正常修复损伤 DNA^[17-18]。

辣椒碱是通过 TRPV 激活多株肿瘤细胞的内部凋亡途径诱导细胞发生凋亡, TRPV 是辣椒碱发挥

表8 沉默TRPV1后辣椒碱对SW480细胞TRPV1, p53, p-p53, Bax, Bcl-2蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 8 Effect of capsaicin on TRPV1, p53, p-p53, Bax, Bcl-2 expression of SW480 cells by TRPV1 siRNA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	TRPV1/GAPDH	p53/GAPDH	p-p53/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/GAPDH
沉默TRPV1		2.15±0.12	0.81±0.06	0.66±0.09	0.80±0.03	0.62±0.11
辣椒碱	200	2.07±0.31	1.40±0.04	0.97±0.02	1.36±0.08	0.35±0.10
沉默TRPV1辣椒碱	200	0.64±0.09 ¹⁾	0.91±0.03 ¹⁾	0.52±0.23 ¹⁾	0.97±0.03 ¹⁾	0.61±0.09 ¹⁾

表9 沉默TRPV1后辣椒碱对SW480细胞cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved PARP蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 9 Effect of capsaicin on cleaved Caspase-3, cleaved Caspase-8, cleaved PARP expression of SW480 cells by TRPV1 siRNA ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	剂量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	cleaved Caspase-8/GAPDH	cleaved Caspase-3/GAPDH	cleaved PARP/GAPDH
沉默TRPV1		1.33±0.31	0.318±0.12	0.600±0.16
辣椒碱	200	2.54±0.33	0.616±0.06	0.986±0.05
沉默TRPV1辣椒碱	200	1.45±0.21 ¹⁾	0.590±0.03 ¹⁾	0.808±0.10 ¹⁾

抗癌效应的靶向作用分子。TRPV/p53途径主要是通过激活细胞内凋亡启动依赖性Caspase转导信号及活化蛋白,本研究显示,沉默TRPV1受体后,细胞内p53与p-p53蛋白水平均降低,辣椒碱诱导的细胞凋亡率明显降低,表明TRPV/p53是辣椒碱诱导细胞凋亡的重要途径。细胞凋亡相关的Caspase有两类,一类为启动子Caspase,另一类为执行子Caspase。Caspase-8属于启动、执行、调控细胞凋亡所必需的顶端Caspase,多数研究表明Caspase-8是一种肿瘤抑制因子,受细胞内环境稳态及死亡受体刺激激活,参与细胞凋亡的外源性途径^[19]。活化的Caspase-8可进一步激活下游Caspase-3或Caspase-7启动细胞凋亡,并与Bax/Bcl-2基因家族联系,使线粒体外膜通透性改变,线粒体间隙蛋白如细胞色素C,第二线粒体来源的Caspase激活剂(SMAC),线粒体丝氨酸蛋白酶(Omi)等释放到细胞质中,活化的细胞色素C可促进凋亡蛋白酶活化因子-1(Apaf-1)的寡聚化,募集活化Caspase-9,SMAC,Omi则使Caspase类酶从抑制蛋白脱离,导致下游的Caspase-3及PARP活化,细胞生存蛋白质与核酸类物质被降解,最终完成凋亡进程^[17]。本研究表明辣椒碱可能是通过p-p53来活化Caspase-8/Caspase-3/PARP的。有研究表明Caspase-8是凋亡途径中典型的信号级联反应蛋白,受p53蛋白的翻译后修饰(磷酸化、乙酰化、泛素化)调控,p-p53的表达将增加活化Caspase-8水平,直接启动凋亡途径;在正常非凋亡情况下p53未修饰及Caspase-3缺乏,p53与Caspase-8的高表达可能会刺激癌症通过增强钙蛋白酶的活性,促进细胞的迁移和转移,但在p-p53与Caspase-3水平增加时,活化的Caspase-8可与Caspase-3相互调节,诱导细胞凋亡^[20-21],上述现象与本研究相一致。值得注意的是,在本研究将TRPV1受体沉默后,辣椒碱作用上调的凋亡相关蛋白表达水平均显著降低,说明TRPV1受体是辣椒碱发挥抑制细胞增殖的作用靶点。

本研究通过检测不同浓度辣椒碱干预SW480细胞后细胞增殖、细胞周期及凋亡的变化情况,并利用小RNA干扰技术调控辣椒碱处理细胞过程中TRPV1的表达,揭示了辣椒碱抑制SW480细胞的分子机制可能是通过激活TRPV1受体调控p53蛋白在Ser 46位点磷酸化,进一步调控Bax/Bcl-2基因表达,并活化Caspase-8,通过级联反应最终活化Caspase-3,PARP诱导细胞的凋亡;TRPV1是辣椒碱抑制SW480细胞的重要分子靶点。通过辣椒碱干

预TRPV1的表达可为临床上治疗结肠癌提供新的思路及依据。但研究仅从细胞层面探讨辣椒碱通过TRPV1/p53途径抑制结肠癌细胞的作用机制,存在一定的局限性,后续有待进一步结合动物实验验证是否存在其他作用机制。

[利益冲突] 本研究不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] OTANI K, KAWAI K, HATA K, et al. Colon cancer with perforation[J]. Surg Today, 2019, 49(1):15-20.
- [2] ANGELL H K, BRUNI D, BARRETT J C, et al. The Immunoscore: colon cancer and beyond [J]. Clin Cancer Res, 2020, 26(2):332-339.
- [3] 陈茂剑, 蒋玮, 覃庆洪, 等. 辣椒碱抗肿瘤作用分子机制的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7):100-108.
- [4] 毛岸云, 陈茂剑, 覃庆洪, 等. 辣椒碱通过下调SIRT1表达抑制乳腺癌MCF-7细胞的迁移和侵袭[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7):94-99.
- [5] KAMARUDDIN M F, HOSSAIN M Z, ALABSI A M, et al. The antiproliferative and apoptotic effects of capsaicin on an oral squamous cancer cell line of asian origin, ORL-48[J]. Medicina (Kaunas), 2019, 55(7):322-334.
- [6] JEONG K Y. Changes in TRPV1-mediated physiological function in rats systemically treated with capsaicin on the neonate [J]. Mol Sci, 2020, 21(9):31-43.
- [7] HOU N, HE X, YANG Y, et al. TRPV1 induced apoptosis of colorectal cancer cells by activating calcineurin-NFAT2-p53 signaling pathway [J]. Biomed Res Int, 2019, doi:10.1155/2019/6712536.
- [8] BAO Z, DAI X, WANG P, et al. Capsaicin induces cytotoxicity in human osteosarcoma MG63 cells through TRPV1-dependent and -independent pathways [J]. Cell Cycle, 2019, 18(12):1379-1392.
- [9] YANG Y, GUO W, MA J, et al. Downregulated TRPV1 expression contributes to melanoma growth via the calcineurin-ATF3-p53 pathway [J]. J Invest Dermatol, 2018, 38(10):2205-2215.
- [10] LI L, SU Z, ZOU Z, et al. Ser46 phosphorylation of p53 is an essential event in prolyl-isomerase Pin1-mediated p53-independent apoptosis in response to heat stress [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(2):96-112.
- [11] BLEY K, BOORMAN G, MOHAMMAD B, et al. A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin [J]. Toxicol Pathol, 2012, 40(6):847-873.

- [12] BSYLIE R L, BRAYDEN J E. TRPV channels and vascular function [J]. *Acta Physiol*, 2011, 203 (1) : 99-116.
- [13] ICARD P, FOURNEL L, WU Z, et al. Interconnection between metabolism and cell cycle in cancer [J]. *Trends Biochem Sci*, 2019, 44(6):490-501.
- [14] 张凯媛,吕玲玲,陈敬贤,等. 莪术二酮对MDA-MB-231细胞周期和凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(12):74-81.
- [15] KANG H, JANG Y J. Selective apoptotic effect of *Zelkova serrata* twig extract on mouth epidermoid carcinoma through p53 activation[J]. *Oral Sci*, 2012, 4 (1):78-84.
- [16] LIEBL M C, HOFMANN T G. Cell fate regulation upon DNA damage: p53 Serine 46 kinases pave the cell death road [J]. *Bioessays*, 2019, doi: 10. 1002/bies. 201900127.
- [17] MORENO-CELIS U, LÓPEZ-MARTÍNEZ F J, CERVANTES-JIMÉNEZ R, et al. Tepary bean (*Phaseolus acutifolius*) lectins induce apoptosis and cell arrest in G₀/G₁ by p53(Ser46) phosphorylation in colon cancer cells [J]. *Molecules*, 2020, 25(5) : 1021-1035.
- [18] SMEENK L, HEERINGEN S J, LOHRUM M, et al. Role of p53 Serine 46 in p53 target gene regulation [J]. *PLoS One*, 2011, doi:10. 1371/journal. pone. 0017574.
- [19] TUMMERS B, GREEN D R. Caspase-8: regulating life and death [J]. *Immunol Rev*, 2017, 277(1): 76-89.
- [20] FRITSCH M, GÜNTHER S D, SCHWARZER R, et al. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and pyroptosis [J]. *Nature*, 2019, 575 (7784):683-687.
- [21] NEWTON K, WICKLIFFE K E, MALTZMAN A, et al. Activity of Caspase-8 determines plasticity between cell death pathways [J]. *Nature*, 2019, 575 (7784) : 679-682.

[责任编辑 王鑫]