

ROS/JNK/FoxO3a信号通路在钩吻素子抑制结肠癌细胞增殖和诱导凋亡中的作用

赵斌¹, 吴紫陆¹, 席作武^{2*}

(1. 河南中医药大学第二临床医学院, 郑州 450002;

2. 河南省中医院, 郑州 450002)

[摘要] 目的:以人结肠癌细胞 HCT-116 细胞为研究对象,通过在培养液中加入不同浓度的钩吻素子(Kou, 0, 100, 200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),进一步探讨 Kou 对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响及其可能的分子作用机制。方法:Kou 体外干预 HCT-116 细胞 24 h 后,用细胞增殖与活性检测(CCK-8)法检测其对细胞增殖的影响;采用流式细胞术检测细胞周期、细胞凋亡及活性氧(ROS)的表达,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测叉头蛋白 O3a(FoxO3a)mRNA 表达情况,采用小干扰核糖核酸(siRNA)进行细胞转染,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 FoxO3a 靶基因蛋白的表达情况。结果:与空白组比较,Kou 处理明显降低了 HCT-116 细胞的增殖率($P<0.05$, $P<0.01$),呈剂量依赖性。与空白组比较,Kou 处理引起细胞周期阻滞于 G_0/G_1 期并诱导 HCT-116 细胞的凋亡($P<0.05$, $P<0.01$),其作用与 Kou 的浓度呈正相关;FoxO3a siRNA 干扰显著降低了 FoxO3a 及其下游相关细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A(p21),细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1B(p27)和细胞死亡调解子(Bim)蛋白的表达($P<0.01$)。与空白组比较,Kou 处理诱导了 HCT116 细胞中氨基末端激酶(JNK)的活化($P<0.01$),JNK 特异性抑制剂(SP600125)处理抑制了 Kou 诱导的 FoxO3a 活化及其下游相关蛋白的表达($P<0.01$);乙酰半胱氨酸(NAC)处理显著降低了 Kou 诱导的 ROS 水平和 JNK 信号的活化($P<0.01$)。结论:Kou 能有效抑制结肠癌细胞 HCT-116 的增殖,促进 HCT-116 细胞的凋亡,其机制可能与其作用于 ROS/JNK/FoxO3a 途径有关。

[关键词] 钩吻素子; 细胞凋亡; 活性氧; 氨基末端激酶; 叉头蛋白 O3a

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)24-0100-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212422

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.202111029.1117.002.html>

[网络出版日期] 2021-11-01 9:31

Effect of Koumine on Proliferation and Apoptosis of Colorectal Cancer Cells via ROS/JNK/FoxO3a Signaling Pathway

ZHAO Bin¹, WU Zi-lu¹, XI Zuo-wu^{2*}

(1. Second Clinical Medical College, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect and underlying mechanism of koumine (Kou) at different concentrations (0, 100, 200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer HCT-116 cells. **Method:** After 24 hours of *in vitro* intervention with HCT-116 cells by Kou, cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect its effect on cell proliferation. Flow cytometry was used to detect cell cycle, apoptosis, and reactive oxygen species (ROS) expression. Real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of forkhead box O3a (FoxO3a). Cells were transfected with

[收稿日期] 20210731(009)

[基金项目] 河南省高等学校重点科研项目(14104691-2019);河南省中医药科学研究专项(2019ZY2025)

[第一作者] 赵斌,在读硕士,住院医师,从事中医药防治肛肠病研究,E-mail:drzhaobin@qq.com

[通信作者] *席作武,硕士,教授,主任医师,博士生导师,从事中医药防治肛肠病研究,E-mail:xizuwu@126.com

small interfering ribonucleic acid (siRNA). Western blot was employed to detect the protein expression of the FoxO3a target gene. **Result:** Compared with the conditions in the blank group, Kou treatment reduced the proliferation rate of HCT-116 cells ($P<0.05$, $P<0.01$) in a dose-dependent manner, caused cell cycle arrest in the G_0/G_1 phase, and induced the apoptosis of HCT-116 cells ($P<0.05$, $P<0.01$), which was positively correlated with the concentration of Kou. FoxO3a siRNA interference reduced the expression of FoxO3a and its downstream target genes cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21), cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27), and Bcl-2 interacting mediator of cell death (Bim) ($P<0.01$). Kou treatment induced the activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in HCT116 cells. SP600125 (JNK specific inhibitor) treatment inhibited the Kou-induced FoxO3a activation and the expression of its downstream target genes. N-acetyl cysteine (NAC) treatment reduced Kou-induced ROS levels ($P<0.01$) and JNK signal activation. The above results were significantly different from those in the blank group ($P<0.01$). **Conclusion:** Kou can effectively inhibit the proliferation of HCT-116 cells and promote apoptosis, and the mechanism may be related to the regulation of the ROS/JNK/FoxO3a pathway.

[Keywords] koumine; cell apoptosis; reactive oxygen species; c-Jun N-terminal kinase; forkhead box O3a

结肠癌(CRC)是肛肠科临床诊疗中常见的消化道恶性肿瘤性疾病之一,其早期多无明显不适症状,中晚期可见排便习惯与大便性状的变化,亦有腹部肿块或不伴疼痛等症状,严重者可并发全身症状,如贫血及低热乏力等。近年来,CRC的发病率和死亡率在我国均呈显著上升趋势,在2020年我国发布的癌症患病及死亡情况统计中,CRC的发病率和死亡率分别排在第3位和第2位,约占癌症新发病总例数的10.0%,死亡总数的9.4%,与肝癌共为10余个国家的男性首位发病癌症^[1-2]。据统计,CRC在近些年的发病中逐渐呈年轻化趋势^[3]。目前,临床治疗多采用手术、化疗、放疗、免疫及靶向结合等方法,但常造成神经毒性及引起肝肾、胃肠道功能异常。随着中医药现代化的发展,中药在抗肿瘤方面无论是临床还是基础研究都已取得较大成就。能够抑制细胞增殖,介导细胞凋亡,被广泛运用于各种癌症的治疗中。

钩吻是马钱科植物胡蔓藤的全草,辛、温、有大毒,《岭南草药志》谓其“能散风热毒,可治疮痈肿毒”。钩吻素子、钩吻素寅及钩吻素卯等为其主要毒性成分,生物碱为其主要活性成分。现代药理研究表明钩吻素子(Kou)具有抗炎、镇痛^[4]、免疫调节^[5]、抗焦虑和缓解神经性疼痛^[6]等功效,最新研究发现其对于包括CRC在内的多种肿瘤细胞都有抑制作用^[7-10]。肿瘤的发生与细胞的增殖与凋亡密切相关,叉头蛋白O3a(FoxO3a)是人类叉头框O(FOXO)家族的一个激活因子,在一系列如细胞增殖、氧化应激、凋亡和转移的过程中有着重要的调

控作用,激活FoxO3a能够抑制肿瘤细胞的增殖并诱导其凋亡^[11-12]。前期研究发现Kou能够抑制CRC细胞的增殖,然而,针对Kou对CRC细胞HCT-116的抑制作用是否与其作用于FoxO3a有关目前尚未有研究报道。因此,本研究采用Kou进行体外实验,旨在探讨其对CRC细胞的抑制作用及其可能的作用机制,以期为钩吻在临床治疗CRC方面提供新的理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人CRC细胞(HCT-116)购自中国科学院上海生命科学院细胞库,编号TCHu103,传至第3代。

1.2 药物及试剂 Kou(成都瑞芬思生物科技有限公司,批号1358-76-5,纯度 $\geq 98\%$);1640培养基(美国Hyclone公司,批号SH30907.02);胎牛血清(美国Gibco公司,批号18000-043),0.25%胰酶(北京Solarbio公司,批号20201002);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号D6979);青霉素-链霉素溶液(中国上海碧云天生物技术有限公司,批号C0322);TRIzol试剂,Lipo 2000转染试剂(美国Invitrogen公司,批号分别为50175121,11668027);氨基末端激酶(JNK),细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21),细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1B(p27),细胞死亡调解子(Bim),FoxO3a,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)和组蛋白H3(Histone H3)一抗(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为7498T, 7982T, 6953T, 6514S, 6098S, 5879S, 5969S);乙酰半胱氨酸(NAC),JNK特异性抑制剂

(SP600125)[翌圣生物科技(上海)股份有限公司,批号分别为50303ES05,52003ES10];细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(广州博徕斯生物科技有限公司,批号BL07);细胞周期检测试剂盒(苏州宇恒生物科技有限公司,批号C6031),细胞凋亡检测试剂盒(上海酶联生物公司,批号A0173);Annexin-V-FITC/碘化丙啶(PI)双染色法流式细胞检测试剂盒,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒,逆转录试剂盒,生物素标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G,生物素标记山羊抗小鼠IgG(中国上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为C1006,D7237,D7168,A0277,A0286)。

1.3 仪器 DK-600型恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司);CX21型倒置显微镜(日本Olympus公司);QP-80型二氧化碳培养箱,Varioskan型酶标仪(美国Thermo公司);VS-840K-U型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);CytoFLEX型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特公司);600A型低速离心机(湖南湘仪离心机仪器有限公司);ABI7500型Real-time PCR仪(美国引用生物系统公司);164-5050型基础电泳仪,170-3930型转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 药物及试剂配制 称取Kou粉末溶于磷酸盐缓冲液(PBS)溶液中,添加不含血清的培养液配制成 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存在。

2.2 HCT116细胞培养 将HCT-116细胞置于1640培养基(含10%胎牛血清,1%青霉素和链霉素)中,静置于恒温 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 的培养箱中进行培养。

2.3 CCK-8法检测细胞增殖 将细胞以 1×10^3 个/孔接种于96孔板中。为观察不同浓度Kou对细胞增殖的影响,将Kou($0,100,200,400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)添加到孔中,每个浓度3个复孔,置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 的培养箱中培养24 h。为研究Kou处理时间对细胞增殖的影响,在培养基中加入 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Kou对HCT-116细胞培养0,6,12,24 h。在处理结束后,每孔加入CCK-8溶液 $10\text{ }\mu\text{L}$,放置于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中再孵育2 h。酶标仪在波长 450 nm 处测量吸光度 A 。重复进行3次。

2.4 PI染色法检测细胞周期 选取对数生长期目的HCT-116细胞,将细胞以 1×10^3 个/孔接种于6孔板培养皿中,常规孵育培养24 h,胰酶消化后使用PBS洗涤2次,加入经预冷后的乙醇(体积分数为75%), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 固定1 h,再用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤

2次,加入PI染色液。染色后使用流式细胞仪检测各个细胞周期的分布。

2.5 流式凋亡双染检测 HCT-116细胞凋亡 选对数生长期的HCT-116细胞,分为Kou组和空白组,将消化离心后的细胞制备呈均匀的单细胞悬浮液,接种于6孔培养板内,每孔加入培养液2 mL,常规培养24 h,等待细胞完全贴壁后同步化。Kou组分别添加Kou($0,100,200,400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),空白组添加等体积的1640培养液。丢弃原培养液,使用PBS溶液洗涤2次,每孔加入胰酶消化收集,使细胞呈现于悬浮状态,加入Annexin-FITC $5\text{ }\mu\text{L}$ 后混匀,再加入PI $2\text{ }\mu\text{L}$ 混匀,室温下避光反应10 min,再加入Binding Buffer $300\text{ }\mu\text{L}$,吹吸细胞悬浮液数次并过滤后使用流式细胞仪重复检测3次。

2.6 流式细胞术检测活性率(ROS) 选取对数生长期的HCT-116细胞,将细胞分为空白组,NAC处理组,Kou组和NAC+Kou组。其中空白组不添加NAC和Kou,NAC组将细胞用 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NAC提前孵育细胞2 h,Kou组用 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Kou处理,NAC+Kou组细胞在Kou处理前先孵育 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NAC 2 h,之后再用 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Kou处理细胞24 h。处理结束后分别加入PBS $200\text{ }\mu\text{L}$ 洗涤,弃去PBS后加入胰酶 $20\text{ }\mu\text{L}$ 消化细胞。收集细胞后用PBS溶液洗涤, $900\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min(离心半径 13.5 cm),弃去细胞上清,加入稀释过的ROS荧光探针染剂 $400\text{ }\mu\text{L}$ 吹打重悬,在细胞培养箱内 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育30 min,间隔5 min吹打1次,孵育后转移至流式细胞仪专用管中,立即采用流式细胞术检测ROS。

2.7 Real-time PCR检测 FoxO3a表达 选对数生长期的HCT-116细胞,分为空白组(不接受Kou和NAC处理),Kou组(分别用 $100,200,400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Kou进行处理24 h),NAC组(提前用 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NAC处理细胞2 h,之后更换新的培养液继续培养24 h),NAC+Kou组(细胞在Kou处理前先孵育 $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的NAC 2 h,之后再用 $400\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Kou继续处理细胞24 h)。处理完成后,加入TRIzol进行裂解,选用RNA提取试剂盒,按照试剂盒的说明提取RNA,放入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存储存。依据美国国家生物信息中心(NCBI)Genbank搜索基因序列,使用NCBI Primer BLAST软件对所筛选的基因引物片段进行比对,引物序列见表1。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的算法推导基因表达量,得出所选基因的标准曲线及扩增效率。每个样品做3个复孔,总反应体系为 $30\text{ }\mu\text{L}$ 。扩增条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性10 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性10 s,

60 °C退火 30 s, 72 °C延伸 20 s, 35 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相关结果。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
FoxO3a	上游 CGGACAAACGGCTCACTCT	150
	下游 GGACCCGCATGAATCGACTAT	
GAPDH	上游 ACAACTTTGGTATCGTGAAGG	101
	下游 GCCATCACGCCACAGTTTC	

2.8 siRNA 细胞转染 选取对数生长期的 HCT-116 细胞, 将细胞分为 siRNA 组(细胞只转染阴性对照 siRNA), Kou+siRNA 组(细胞先转染阴性对照 siRNA, 转染完成后再用 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Kou 继续处理 24 h), FoxO3a siRNA 组(细胞转染特异性针对 FoxO3a 的 siRNA), FoxO3a siRNA+Kou 组(细胞提前转染 FoxO3a siRNA, 转染完成后再用 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Kou 继续处理 24 h)。按照试剂说明书进行转染。转染的时间是 24 h。FoxO3a siRNA 序列 5'-UAAUUGUCCAUGGAGACAGCTT-3'; 对照 siRNA (Scramble siRNA) 序列 5'-UUCUCCG AACGUGUCACGUTT-3'。

2.9 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达 为检测 Kou 对 FoxO3a 下游相关蛋白的影响, 分为空白组(不接受 Kou 和 NAC 处理), Kou 组(分别用 100, 200, $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Kou 进行处理 24 h), NAC 组(提前用 $2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAC 处理细胞 2 h, 之后更换新的培养液继续培养 24 h), NAC+Kou 组(细胞在 Kou 处理前先孵育 $2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAC 2 h, 之后再用 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Kou 继续处理细胞 24 h)。为检测 FoxO3a siRNA 干扰对 FoxO3a 的影响, 将细胞分为 siRNA 组(细胞只转染阴性对照 siRNA), Kou+siRNA 组(细胞先转染阴性对照 siRNA, 转染完成后再用 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Kou 继续处理 24 h), FoxO3a siRNA 组(细胞转染特异性针对 FoxO3a 的 siRNA), FoxO3a siRNA+Kou 组(细胞提前转染 FoxO3a siRNA, 转染完成后再用 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Kou 继续处理 24 h); 为检测 Kou 对 HCT116 细胞中 JNK 信号表达的影响, 使用 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Kou 分别处理(0, 1, 2, 4 h); 为检测 JNK 对 FoxO3a 信号的影响, 分为空白组(不接受 Kou 和 SP600125 处理), Kou 组(细胞用 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Kou 处理), Kou+SP600125(细胞提前用 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SP600125 处理 1 h, 之后用

$400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Kou 继续处理); 为检测 NAC 对 HCT-116 细胞 p-JNK 和 JNK 水平的影响, 分为空白组(不接受 Kou 和 NAC 处理), Kou 组(用 Kou 进行处理), NAC+Kou 组(细胞在 Kou 处理前先孵育 $2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NAC 2 h, 之后再用 $400 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Kou 继续处理细胞)。处理完成后加组织裂解液(RIPA)在冰上裂解, 将裂解液移至 1.5 mL 的离心管内, 于水浴锅内 $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 煮沸 10 min, 离心后提取蛋白上清液。蛋白样品进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)并转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。用含有 5% 脱脂奶粉的封闭液在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下浸泡 2 h。用抗体稀释液分别稀释 JNK(1:1 000), p-JNK(1:500), p21(1:2 000), p27(1:1 000), Bim(1:1 000), FoxO3a(1:1 000), GAPDH(1:5 000) 和 Histone H3(1:2 000)。将 PVDF 膜浸泡于其中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 洗涤液洗 3 次后加入相应抗体室温孵育 2 h, 加入 ECL 显色液于 PVDF 膜上后在曝光仪中测定各组蛋白条带的 A, 用 Image J 分析条带灰度值, 测定蛋白表达水平。

2.10 统计学分析 数据统计分析采用 SPSS 21.0 软件进行, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为具有差异统计学意义。

3 结果

3.1 Kou 对人 CRCHCT-116 细胞增殖活性的影响 与空白组比较, Kou 处理明显抑制了 HCT-116 细胞的增殖($P < 0.05, P < 0.01$), 呈剂量依赖性。见表 2。与空白组比较, 随着 Kou 处理时间的延长, HCT-116 细胞的增殖率逐渐降低($P < 0.01$)。见表 3。

表2 Kou 干预 24 h 对 HCT-116 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of Kou on HCT-116 cells proliferation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$A_{450 \text{ nm}}$	抑制率/%
空白		1.24±0.11	-
Kou	100	1.06±0.09	15.73±1.98 ¹⁾
	200	0.86±0.08	31.57±2.57 ²⁾
	400	0.61±0.05	52.48±2.92 ²⁾

注: 与空白组比较 ¹⁾ $P < 0.05, ^{2)}$ $P < 0.01$ (表 3, 4 同)。

3.2 Kou 对 HCT-116 细胞周期和细胞凋亡的影响 与空白组比较, Kou 处理引起 HCT-116 细胞周期抑制在 G_0/G_1 期, 并诱导细胞的大量凋亡($P < 0.05, P < 0.01$), 且其作用与 Kou 的浓度呈正相关。见表 4。

3.3 NAC 处理对 Kou 诱导的 ROS, 细胞周期和细胞凋亡的影响 与空白组比较, Kou 处理后 ROS 水平明显升高($P < 0.01$); 与 Kou 组比较, NAC 处理后

表 3 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Kou 对 HCT-116 细胞培养不同时间抑制率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of Kou on HCT-116 cell proliferation cultured for different hours ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	时间/h	$A_{450\text{nm}}$	抑制率/%
空白	0	1.17 \pm 0.10	-
Kou	6	1.06 \pm 0.07	9.47 \pm 1.71
	12	0.83 \pm 0.09	30.94 \pm 3.12 ²⁾
	24	0.57 \pm 0.06	51.26 \pm 2.21 ²⁾

明显降低了 Kou 诱导的 ROS 含量 ($P<0.05, P<0.01$); NAC 处理显著缓解 Kou 引起的细胞 G_0/G_1 期

表 5 NAC 处理对 Kou 诱导的 ROS, 细胞周期和细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 5 Effect of NAC treatment on Kou induced ROS, cell cycle and apoptosis ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	ROS 水平	G_0/G_1 期	凋亡率
空白		100	46.15 \pm 0.82	4.17 \pm 0.53
NAC	2×10^3	98.25 \pm 5.71	45.28 \pm 1.35	4.02 \pm 0.41
Kou	400	373.41 \pm 25.92 ¹⁾	71.42 \pm 0.79 ¹⁾	19.83 \pm 1.74 ¹⁾
NAC+Kou	$2\times 10^3+400$	189.57 \pm 11.39 ²⁾	52.68 \pm 1.49 ²⁾	8.78 \pm 0.92 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与 Kou($400\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组比较²⁾ $P<0.05$,³⁾ $P<0.01$ 。

3.4 Kou 对 FoxO3a 及其下游相关 mRNA 表达的影响 与空白组比较, Kou 组 FoxO3a mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.05, P<0.01$), 呈剂量依赖性; 与 Kou 组比较, NAC 处理后降低了 Kou 诱导的 FoxO3a mRNA 水平升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。见表 6。

与空白组比较, Kou 组 FoxO3a 及其下游相关蛋白 p21, p27, Bim 的蛋白表达均显著升高 ($P<0.01$), Kou 的作用效果呈剂量和时间依赖性。

表 4 Kou 对 HCT-116 细胞凋亡和细胞周期阻滞的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Kou effect apoptosis and cycle stagnation of HCT-116 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

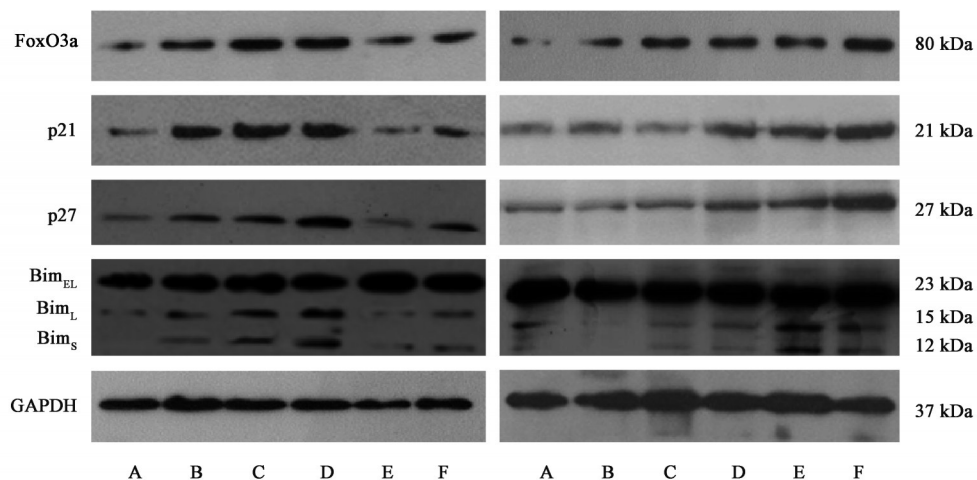
组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	G_0/G_1 期	凋亡率
空白		48.11 \pm 1.65	4.48 \pm 0.64
Kou	100	51.23 \pm 2.42 ¹⁾	9.56 \pm 1.07 ¹⁾
	200	61.15 \pm 3.39 ²⁾	13.22 \pm 1.51 ²⁾
	400	72.34 \pm 2.36 ²⁾	20.08 \pm 1.84 ²⁾

阻滞, 并降低了 Kou 诱导的细胞凋亡率 ($P<0.01$)。见表 5。

与 Kou 组比较, NAC 处理显著降低了 Kou 诱导的 FoxO3a, p21, p27 蛋白表达水平 ($P<0.01$)。见图 1, 表 7, 8。

FoxO3a 进入到细胞核后才能发挥其功能, 与空白组比较, Kou 处理诱导了 FoxO3a 的入核 ($P<0.05, P<0.01$)。见图 2, 表 9。

3.5 抑制 FoxO3a 对 Kou 引起的细胞周期阻滞和凋亡的影响 与空白组比较, FoxO3a siRNA 干扰显著降低了 FoxO3a 蛋白表达水平 ($P<0.01$); 与



左: A. 空白组; B-D. Kou 100, 200, 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; E. NAC 2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 组; F. Kou 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +NAC 组。右: A. 空白组; B-F. Kou 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 4, 8, 12, 16, 24 h

图 1 Kou 对 FoxO3a 和下游相关蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Kou on FoxO3a and downstream associated protein expression

表 6 Kou 对 HCT-116 细胞 FoxO3a mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 6 Effect of Kou on expression of FoxO3a mRNA expressions in HCT-116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FoxO3a
空白		1.00±0.00
Kou	100	1.48±0.16 ¹⁾
	200	2.78±0.24 ²⁾
	400	4.31±0.38 ²⁾
NAC	2×10^3	0.97±0.09
NAC+Kou	$2 \times 10^3 + 400$	1.85±0.23 ³⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与Kou组比较³⁾ $P < 0.01$ (表7,8同)。

表 7 NAC 对 Kou 诱导 HCT-116 细胞 FoxO3a 及其下游相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

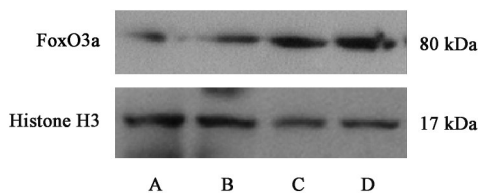
Table 7 Effect of NAC on protein expressions of FoxO3a and downstream associated protein in HCT-116 cells induced by Kou ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FoxO3a /GAPDH	p21 /GAPDH	p27 /GAPDH	Bim _{EL} /GAPDH	Bim _L /GAPDH	Bim _S /GAPDH
空白		0.19±0.06	0.13±0.05	0.11±0.04	1.09±0.13	0.05±0.02	0.02±0.01
Kou	100	0.48±0.09 ²⁾	0.98±0.11 ²⁾	0.36±0.06 ²⁾	1.12±0.14 ²⁾	0.07±0.02 ²⁾	0.09±0.04 ²⁾
	200	0.87±0.10 ²⁾	0.86±0.13 ²⁾	0.78±0.08 ²⁾	1.14±0.15 ²⁾	0.09±0.05 ²⁾	0.19±0.03 ²⁾
	400	0.92±0.12 ²⁾	0.91±0.15 ²⁾	1.09±0.11 ²⁾	1.13±0.15 ²⁾	0.72±0.05 ²⁾	0.74±0.04 ²⁾
NAC	2×10^3	0.30±0.04	0.16±0.02	0.15±0.02	2.15±0.16	0.06±0.03	0.04±0.02
NAC+Kou	$2 \times 10^3 + 400$	0.39±0.05 ³⁾	0.18±0.04 ³⁾	0.93±0.04 ³⁾	1.14±0.14	0.17±0.04 ³⁾	0.13±0.05 ³⁾

表 8 Kou 对 HCT-116 细胞培养不同时间 FoxO3a 及其下游相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 8 Effect of Kou on protein expression of FoxO3a and its downstream associated protein at different times in HCT-116 cell ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	时间/h	FoxO3a/GAPDH	p21/GAPDH	p27/GAPDH	Bim _{EL} /GAPDH	Bim _L /GAPDH	Bim _S /GAPDH
空白	0	0.11±0.02	0.21±0.02	0.24±0.03	1.86±0.09	0.17±0.04	0.07±0.02
Kou	4	0.19±0.03	0.24±0.03	0.21±0.03	1.71±0.05	0.02±0.01	0.01±0.01
	8	0.54±0.06	0.23±0.02	0.25±0.02	1.76±0.06	0.18±0.03	0.17±0.03
	12	0.71±0.08 ²⁾	0.63±0.07 ²⁾	0.57±0.05 ²⁾	1.93±0.12 ²⁾	0.57±0.06 ²⁾	0.54±0.04 ²⁾
	16	0.77±0.09 ²⁾	0.71±0.07 ²⁾	0.69±0.05 ²⁾	1.91±0.10 ²⁾	0.64±0.09 ²⁾	0.82±0.07 ²⁾
	24	0.86±0.09 ²⁾	0.87±0.09 ²⁾	1.09±0.07 ²⁾	1.83±0.24	0.56±0.07 ²⁾	0.76±0.05 ²⁾



A. 空白组; B. Kou 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; C. Kou 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组; D. Kou 400 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组

图 2 Kou 诱导 FoxO3a 的入核电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Kou induces nucleation of FoxO3a

3.8 NAC 对 FoxO3a 及其下游相关蛋白表达的影响
与空白组比较, Kou 引起处理引起的 JNK 磷酸化水平升高 ($P < 0.01$); 与 Kou 组比较, NAC+Kou 组中 JNK 的

Kou+siRNA 组比较, FoxO3a siRNA 干扰显著降低了 Kou 诱导的 FoxO3a 蛋白表达 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 10。

3.6 Kou 对 HCT116 细胞中 JNK 信号的影响
与空白组比较, Kou 组中的 JNK 磷酸化水平随着 Kou 处理时间的延长逐渐增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 4, 表 11。

3.7 SP600125 对 JNK/FoxO3a 信号通路蛋白的影响
与 Kou 组比较, JNK 抑制剂 SP600125 组降低了 Kou 诱导的 JNK 磷酸化水平 ($P < 0.01$), FoxO3a 及其下游基因 p21, p27 和 Bim 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 见图 5, 表 12。

表 9 Kou 诱导 FoxO3a 的入核

Table 9 Kou induces the nucleation of FoxO3a

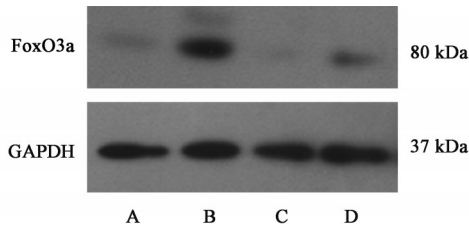
组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FoxO3a/Histone H3
空白		0.21±0.02
Kou	100	0.36±0.03
	200	2.04±0.11 ¹⁾
	400	2.32±0.13 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表 11, 12 同)。

磷酸化水平显著降低 ($P < 0.01$)。见图 6, 表 13。

4 讨论

近年来, 我国国民的生活水平较以往有了普遍



A. siRNA 组; B. Kou 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +siRNA 组; C. FoxO3a siRNA 组; D. Kou 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +FoxO3a siRNA 组

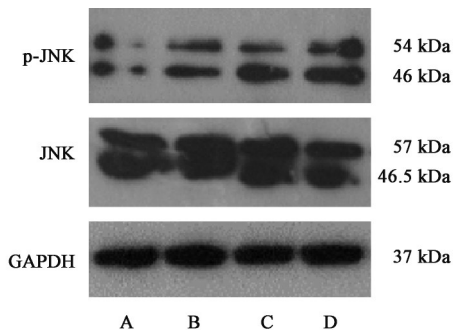
图3 抑制FoxO3a的表达对HCT-116细胞中FoxO3a表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of inhibition of FoxO3a expression on FoxO3a in HCT-116 cells

表10 干扰FoxO3a对Kou引起的细胞周期阻滞和细胞凋亡的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 10 Effect of FoxO3a siRNA on Kou induced cell cycle and apoptosis ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	FoxO3a /GAPDH	G ₀ /G ₁ 周期 /%	凋亡率 /%
siRNA	0.16±0.03	45.13±1.37	4.11±0.52
Kou+siRNA	0.85±0.12	69.27±3.24	19.92±1.68
FoxO3a siRNA	0.03±0.01	47.14±2.08	4.34±0.47
Kou+FoxO3a siRNA	0.22±0.09 ²⁾	57.21±2.52 ¹⁾	11.08±0.69 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与Kou+siRNA组比较²⁾ $P<0.01$ 。



A. 空白组; B~D. Kou(400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)1, 2, 4 h组

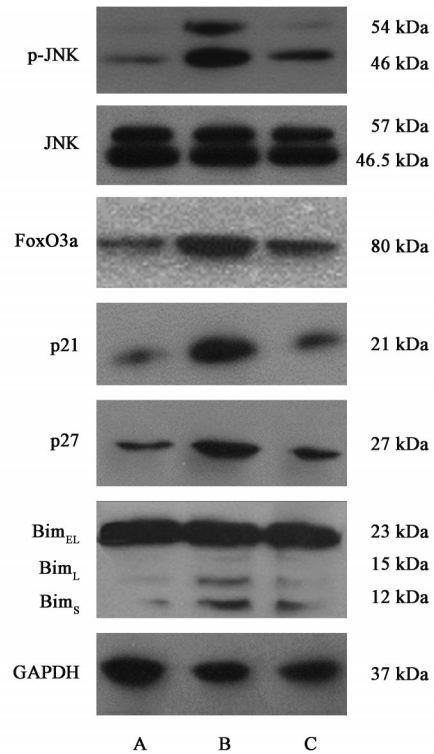
图4 Kou作用不同时间对HCT-116细胞p38和JNK蛋白表达的电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Kou on p38 and JNK expression of HCT-116 cells

表11 Kou作用不同时间对HCT-116细胞JNK蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 11 Effect of Kou on p38 and JNK expression of HCT-116 cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	时间/h	p-JNK/JNK
空白	0	0.57±0.02
Kou	1	0.71±0.04 ¹⁾
	2	0.72±0.05 ¹⁾
	4	0.83±0.07 ¹⁾



A. 空白组; B. Kou (400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组; C. Kou (400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + SP600125(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组

图5 抑制JNK活化对FoxO3a及其下游相关蛋白表达电泳
Fig. 5 Electrophoresis of JNK inhibitor on FoxO3a and its downstream target genes

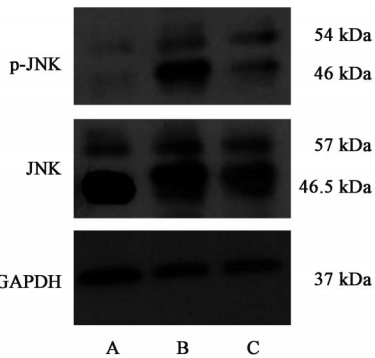
提升,同时人口老龄化进程也明显加快,使得我国CRC的发病率及死亡率呈持续上升趋势^[13]。CRC归属于中医“癌病”的范畴,又称“肠痹”“癥瘕”和“积聚”等。多为先天禀赋不足或后天脾肾失养等因素致使机体阳气虚损,气机无所运化,经络受阻不畅,精、血、津液同时受阻,运行不畅,积滞而成瘀血、痰凝、热毒、湿聚等,多种病理因素互结而致瘤所成。席作武教授认为,人身之正气为抵御邪气入侵的首要防线,阴阳失调、正气亏虚、毒邪聚集乃致使CRC发生发展的基本病因病机。目前,临床上对CRC的西医综合治疗方法虽取得明显进步,但仍存在诸多不足。中医药能够通过多层次、多组分、多靶点的方式发挥抗癌活性^[14]。

目前,肿瘤研究的热点主要集中于对细胞周期的调控及诱导细胞的凋亡^[15]。Kou是中药钩吻的生物碱系吲哚类生物碱,具有镇痛抗炎、促进巨噬细胞吞噬、收缩心脏、抑制血小板聚集、松弛平滑肌、抑制呼吸中枢等多种药理学功能。最新研究发现,Kou同样具有抗肿瘤活性,能够抑制包括CRC细胞在内的多种肿瘤细胞的增殖并诱导其凋亡^[16]。有文献指出,口服钩吻粉剂能够缩小机体肿块、减缓

表12 抑制JNK活化对FoxO3a及其下游相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table12 Effect of JNK inhibitor on FoxO3a and its downstream associated protein ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p-JNK/ JNK	FoxO3a/ GAPDH	p21/ GAPDH	p27/ GAPDH	Bim _{EL} / GAPDH	Bim _L / GAPDH	Bim _S / GAPDH
空白		0.29±0.03	0.27±0.07	0.18±0.04	0.32±0.04	1.27±0.21	0.06±0.02	0.05±0.01
Kou	400	0.84±0.09	0.89±0.06	1.08±0.12	1.06±0.11	1.33±0.25	0.35±0.03	0.49±0.04
SP600125+Kou	20+400	0.43±0.03 ¹⁾	0.50±0.04 ¹⁾	0.45±0.05 ¹⁾	0.44±0.06 ¹⁾	1.32±0.23 ¹⁾	0.14±0.05 ¹⁾	0.28±0.03 ¹⁾



A. 空白组; B. Kou 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. Kou 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + NAC 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图6 NAC对HCT-116细胞p-JNK和JNK蛋白表达的影响
Fig. 6 Electrophoresis of NAC on p-JNK and JNK protein in HCT-116 cell

表13 NAC对HCT-116细胞p-JNK和JNK蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 13 Effect of NAC on p-JNK and JNK protein in HCT-116 cell ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p-JNK/JNK
空白		0.37±0.06
Kou	400	0.90±0.11 ¹⁾
NAC+Kou	$2\times 10^3+400$	0.46±0.04 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$;与Kou组比较²⁾ $P<0.01$ 。

疼痛,具有延长存活期的效用。王万山等^[17]研究发现,Kou能够对人神经胶质瘤细胞的生长产生抑制作用,使细胞周期抑制在 G_0/G_1 期;迟德彪等^[18]研究发现,Kou能够在体外诱导人大肠腺癌LoVo细胞的凋亡。本研究证实Kou能够显著抑制人CRC细胞HCT-116的体外生长,引起细胞周期阻滞并诱导细胞的凋亡。

FoxO3a在调控细胞周期和凋亡的过程中发挥着重要作用^[19]。活化的FoxO3a对多种癌症均有抑制肿瘤细胞生长的作用,并可在其他抑癌因子和药物的抗肿瘤机制中起到介导作用^[20-23]。研究发现,亚硝酸钠处理CRC细胞能够促进FoxO3a的活化,增强其下游相关蛋白的表达,从而诱导细胞凋亡^[24]。本研究结果表明,Kou能够引起FoxO3a的活

化,采用siRNA来干扰FoxO3a的表达可有效减弱Kou对细胞周期和细胞凋亡的影响。这些结果提示,Kou对CRC细胞的抑制作用可能与其引起的FoxO3a的活化有关。

有研究指出,FoxO3a的活化受到JNK的调控。卡那霉素通过JNK途径激活FoxO3a从而引起乳腺癌细胞在 G_0/G_1 期的增殖并诱导细胞的凋亡^[25]。本研究发现,Kou能够激活JNK信号,采用JNK抑制剂能够减弱FoxO3a的活化及其下游相关蛋白p21,p27和Bim的表达。这些结果表明,Kou的抑制作用与FoxO3a引起的JNK的活化有关。

肿瘤细胞中高水平的ROS犹如一把“双刃剑”,既在癌症的发生发展过程中起着重要的作用,同时过量的ROS会对癌细胞带来毒性成为治疗肿瘤细胞的潜在靶点^[7]。研究表明,外源性物质诱导的过量ROS可以使线粒体氧化损伤及还原敏感分子失活,并杀死肿瘤细胞。肿瘤细胞中ROS水平是通过线粒体电子传递链等多种过程生产的,在细胞周期阻滞和细胞凋亡中发挥着重要作用。本研究发现,Kou能够诱导ROS的产生,这与先前的研究结果一致^[26]。本研究发现,NAC预处理后能够减弱Kou诱导的细胞周期阻滞和细胞凋亡。值得注意的是,NAC处理能够降低Kou诱导的JNK/FoxO3a的信号活化,表明ROS/JNK/FoxO3a信号通路在Kou诱导的CRC细胞周期阻滞和凋亡机制中发挥重要作用。

综上所述,Kou能够显著诱导ROS生成,从而激活JNK信号,最终诱导FoxO3a的活化,从而引起细胞 G_0/G_1 期阻滞并诱导其凋亡。本研究为临床上治疗结直肠癌提供了新的方向。然而,未来的研究需要进行裸鼠等体内实验来进一步地验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 刘宗超,李哲轩,张阳,等. 2020全球癌症统计报告解读[J]. 肿瘤综合治疗电子杂志, 2021, 7(2): 1-14.
- [2] 叶德敬,刘超英,张雨洁. 结直肠癌的流行病学及研

- 究现状 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2016, 16 (A2): 34-35.
- [3] LS R, AT L, ISABELLE S, et al. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence in young adults [J]. Gut, 2019, 68(12): 2179-2185.
- [4] XU Y, QIU H Q, LIU H, et al. Effects of koumine, an alkaloid of *Gelsemium elegans* Benth., on inflammatory and neuropathic pain models and possible mechanism with allopregnanolone [J]. Pharmacol Biochem Be, 2012, 101(3): 504-514.
- [5] XU Y K, LIAO S G, NA Z, et al. Gelsemium alkaloids, immunosuppressive agents from *Gelsemium elegans* [J]. Fitoterapia, 2012, 83 (6) : 1120-1124.
- [6] ZHANG J Y, WANG Y X. *Gelsemium analgesia* and the spinal glycine receptor/allopregnanolone pathway [J]. Fitoterapia, 2015, 100:35-43.
- [7] 吴达荣, 秦瑞, 蔡晶, 等. Kou抗肿瘤作用研究 [J]. 中药药理与临床, 2006(5): 6-8.
- [8] 李佳艳, 邬静, 易金娥, 等. 钩吻素子对 H₂O₂ 诱导的 IPEC-J2 细胞氧化应激和凋亡的影响 [J]. 中兽医医药杂志, 2019, 38(3): 4-7.
- [9] 蔡晶, 雷林生, 迟德彪. Kou 对小鼠 H22 实体瘤抑制作用的实验研究 [J]. 南方医科大学学报, 2009, 29 (9): 1851-1852, 1856.
- [10] 黄静. 钩吻生物碱化合物抗肿瘤作用及其作用机制初探 [D]. 福州: 福建医科大学, 2010.
- [11] SREELATHA G, RAOM R, S G C, et al. Co-depletion of cathepsin B and uPAR induces G₀/G₁ arrest in glioma via FoxO3a mediated p27 upregulation [J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11668.
- [12] NHO R S, HERGERT P. FoxO3a and disease progression [J]. World J Biol Chem, 2014, 5 (3) : 346-354.
- [13] 刘晓雪, 宇传华, 周薇. 中国近 30 年间结直肠癌死亡趋势分析 [J]. 中国癌症杂志, 2018, 28(3) : 177-183.
- [14] 侯立强, 赵义军, 杨志欣. 中药治疗结肠癌的药理作用机制 [J]. 中医药学报, 2021, 49(6): 118-121.
- [15] GLOTZER M. The molecular requirements for cytokinesis [J]. Science, 2005, 307 (5716) : 1735-1739.
- [16] MARIKO K, TOMONORI N, NORIYUKI K, et al. Isolation of gelsemine-type indole alkaloids from *Gelsemium elegans* and evaluation of the cytotoxic activity of gelsemium alkaloids for A431 epidermoid carcinoma cells [J]. J Nat Prod, 2006, 69 (4) : 715-718.
- [17] 王万山, 薛侠, 王达安, 等. Kou 对神经胶质瘤细胞 U251 生长抑制及诱导凋亡作用 [J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(24): 2914-2917.
- [18] 迟德彪, 雷林生, 金宏, 等. Kou 体外诱导人结肠腺癌 LoVo 细胞凋亡的实验研究 [J]. 第一军医大学学报, 2003(9): 911-913.
- [19] LIANG F, HUIMING W, LIN Z, et al. FoxO3a reactivation mediates the synergistic cytotoxic effects of rapamycin and cisplatin in oral squamous cell carcinoma cells [J]. Toxicol Appl Pharm, 2011, 251 (1): 8-15.
- [20] ZHANG X H, CHEN Y, GAO B, et al. Apoptotic effect of koumine on human breast cancer cells and the mechanism involved [J]. Cell Biochem Biophys, 2015, 72(2): 411-416.
- [21] TRACHOOTHAM D, ALEXANDRE J, HUANG P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(3rd): 579-591.
- [22] HUM C T, LEE D F, XIA W, et al. IκB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FoxO3a [J]. Cell, 2007, 129(7): 225-237.
- [23] YANG J Y, ZONG C S, XIA W, et al. ERK promotes tumorigenesis by inhibiting FoxO3a via DM2-mediated degradation [J]. Nat Cell Biol, 2008, 10(2): 138-148.
- [24] 罗慧. Akt/β-catenin/FoxO3a 信号通路在亚硒酸钠诱导结直肠癌细胞凋亡中机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2013.
- [25] KONG W W, LI C, QI Q F, et al. Cardamonin induces G₂/M arrest and apoptosis via activation of the JNK-FoxO3a pathway in breast cancer cells [J]. Cell Biol Inter, 2020, 44(1) : 177-188.
- [26] WANG M C, BOHMANN D, JASPER H. JNK extends life span and limits growth by antagonizing cellular and organism-wide responses to insulin signaling [J]. Cell, 2005, 121(1): 115-125.

[责任编辑 张丰丰]