

芹菜素通过PI3K/Akt和MAPK信号通路诱导人大肠癌 CL187细胞凋亡

林思^{1,2}, 秦慧真^{1,2}, 邓玲玉^{1,2}, 李泽宇¹, 谢凤凤^{1,2}, 张森^{1,2}, 朱华^{1,2*}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530200;

2. 广西中医药大学壮瑶药重点实验室, 南宁 530200)

[摘要] 目的:观察芹菜素对人大肠癌CL187细胞增殖和凋亡的作用及相关机制。方法:选择人大肠癌CL187细胞,利用芹菜素(0、30、45、60 mg·L⁻¹)进行干预后,采用噻唑蓝(MTT)比色法和克隆形成实验检测芹菜素对CL187细胞的增殖作用;Hoechst 33258染色法观察细胞凋亡;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测芹菜素对CL187细胞胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)mRNA表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)观察芹菜素对细胞凋亡相关蛋白Caspase-3、Bcl-2、Bax和磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路中Akt、磷酸化(p)-Akt及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路中细胞外调节蛋白激酶(ERK1/2)、p-ERK1/2、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、p-JNK、p38 MAPK、p-p38 MAPK蛋白表达的影响。结果:与空白组比较,芹菜素组细胞存活率显著降低,细胞增殖抑制率显著升高($P<0.01$);与空白组比较,芹菜素组细胞克隆数和克隆形成率显著降低,克隆形成抑制率显著升高($P<0.01$);不同浓度芹菜素干预CL187细胞48 h,与空白组比较,在荧光显微镜下可观察到细胞核固缩,染色质凝聚,细胞荧光反应增强等典型的细胞凋亡特征;与空白组比较,芹菜素组(45、60 mg·L⁻¹)抑凋亡基因Bcl-2 mRNA表达水平显著降低($P<0.01$),芹菜素组促凋亡基因Bax和Caspase-3 mRNA表达明显升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白组比较,芹菜素组促凋亡蛋白Caspase-3蛋白表达水平明显上调($P<0.05$, $P<0.01$),芹菜素组(45、60 mg·L⁻¹)促凋亡蛋白Bax蛋白表达显著上调($P<0.01$),芹菜素组抑凋亡蛋白Bcl-2表达水平明显下调($P<0.05$, $P<0.01$)。与空白组比较,芹菜素组(60 mg·L⁻¹)Akt蛋白表达显著下调($P<0.01$),芹菜素组(45、60 mg·L⁻¹)p-Akt、ERK1/2、p-ERK1/2蛋白表达显著下调($P<0.01$),芹菜素组JNK、p-JNK蛋白表达明显上调($P<0.05$, $P<0.01$),芹菜素组(60 mg·L⁻¹)p38 MAPK蛋白表达明显上调($P<0.05$),芹菜素组p-p38 MAPK蛋白表达显著上调($P<0.01$),芹菜素组p-Akt/Akt明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),芹菜素组p-ERK1/2/ERK1/2显著降低($P<0.01$),芹菜素组(45、60 mg·L⁻¹)p-JNK/JNK明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),芹菜素组p-p38 MAPK/p38 MAPK显著升高($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:芹菜素可抑制大肠癌CL187细胞增殖并促进细胞凋亡,其作用机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路和调控MAPK信号通路相关蛋白的表达有关。

[关键词] 芹菜素; 大肠癌; CL187细胞; 增殖; 凋亡; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路; 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)19-0097-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221122

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220328.1159.003.html>

[网络出版日期] 2022-03-29 17:38

Apigenin Induces Apoptosis of Human Colorectal Cancer CL187 Cells via PI3K/Akt and MAPK Signaling Pathways

LIN Si^{1,2}, QIN Huizhen^{1,2}, DENG Lingyu^{1,2}, LI Zeyu¹, XIE Fengfeng^{1,2}, ZHANG Miao^{1,2}, ZHU Hua^{1,2*}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2. Guangxi Key Laboratory of

[收稿日期] 2022-01-17

[基金项目] 广西壮瑶药重点实验室项目(桂科基字[2014]32号);广西壮瑶药协同创新中心项目(桂教科研[2013]20号);广西第八批特聘专家项目(壮瑶药质量标准研究,桂人才通字[2019]13号);广西一流学科中药学(民族药学)(桂教科研[2018]12号);广西民族药资源与应用工程研究中心(桂发改高技函[2020]2605号);广西中医药大学-中南大学壮瑶药研究联合实验室(桂科计字[2021]238号);广西产5种壮瑶药材质量标准与产品开发研究(桂科计字[2021]196号)

[第一作者] 林思,在读硕士,从事中药鉴定与分析研究,E-mail:1751493407@qq.com

[通信作者] *朱华,博士,教授,博士生导师,从事中药品种、质量及资源开发研究,E-mail:zhuhuagx@163.com

Zhuang and Yao Ethnic Medicine, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

[Abstract] Objective: To study the effect of apigenin on the proliferation and apoptosis of human colon cancer CL187 cells and the underlying mechanisms. **Method:** Human colorectal cancer CL187 cells were treated with different concentrations of apigenin (0, 30, 45, 60 mg·L⁻¹) according to the results of the preliminary experiment. The proliferation of CL187 cells was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) and colony formation assays, and the apoptosis was observed via Hoechst 33258 staining. Real-time fluorescence quantitative PCR was conducted to determine the mRNA levels of cysteine protease-3 (Caspase-3), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and Bcl-2-associated X protein (Bax) in the CL187 cells treated with apigenin. Western blot was employed to measure the protein levels of Caspase-3, Bcl-2, and Bax associated with apoptosis, protein kinase B (Akt) and phosphorylated Akt (p-Akt) in phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) pathway, and extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2), p-ERK1/2, c-Jun N-terminal kinase (JNK), p-JNK, p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), and p-p38 MAPK protein in MAPK pathway. **Result:** Compared with the blank group, the apigenin groups had low cell survival rates and high inhibition rates on cell proliferation ($P<0.01$). Apigenin decreased the cell clone number and clone formation rate, and increased the inhibition rate on clone formation ($P<0.01$). After CL187 cells were treated with different concentrations of apigenin for 48 h, typical apoptosis characteristics such as nuclear pyknosis, chromatin condensation, and enhanced fluorescence reaction were observed. Compared with blank group, 45, 60 mg·L⁻¹ apigenin treatments down-regulated the mRNA level of anti-apoptotic gene Bcl-2 ($P<0.01$) and all the apigenin treatments up-regulated those of the pro-apoptotic genes Bax and Caspase-3 ($P<0.05$, $P<0.01$). Similarly, apigenin treatments down-regulated the protein level of Bcl-2 ($P<0.05$, $P<0.01$) and up-regulated those of Caspase-3 ($P<0.05$, $P<0.01$) and Bax ($P<0.01$, 45, 60 mg·L⁻¹). The blank group had higher protein level of Akt than the 60 mg·L⁻¹ apigenin group ($P<0.01$), higher protein levels of p-Akt, ERK1/2, and p-ERK1/2 than the 45, 60 mg·L⁻¹ apigenin groups ($P<0.01$), and higher protein levels of JNK and p-JNK than the apigenin groups ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with blank group, 60 mg·L⁻¹ apigenin up-regulated the protein level of p38 MAPK ($P<0.05$), and all the apigenin groups up-regulated that of p-p38 MAPK ($P<0.01$). Furthermore, apigenin lowered the p-Akt/Akt ratio ($P<0.05$, $P<0.01$) and p-ERK1/2/ERK1/2 ratio ($P<0.01$), while it increased the p-JNK/JNK ratio (45, 60 mg·L⁻¹; $P<0.05$, $P<0.01$) and p-p38 MAPK/p38 MAPK ratio ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** Apigenin can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of CL187 cells by inhibiting the PI3K/Akt signaling pathway and regulating the expression of proteins in the MAPK signaling pathway.

[Keywords] apigenin; colon cancer; CL187 cells; proliferation; apoptosis; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway; mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway

大肠癌又名结直肠癌,是常见的消化道恶性肿瘤之一。据统计,大肠癌在2020年全球恶性肿瘤死亡率位居第2位,发病率位居第3位^[1]。随着社会经济的发展和人们生活方式的改变,大肠癌发病率和死亡率逐年增加,且发病人群逐渐趋于年轻化,又因多数大肠癌患者早期无明显症状,不易诊断,被确诊发现时多已发展为中晚期,导致该病死亡率较高,严重威胁着人类生命健康^[2]。目前临床上大肠癌以手术治疗为主,其他治疗包括化疗、放疗、靶向治疗和中医药治疗等,以控制患者病情恶化发

展,但由于其不良反应,存在明显的局限性^[3-5]。研究开发高效、低不良反应的抗肿瘤药物一直以来都是研究学者的热点,我国中药资源丰富,在长期生产生活中积累了丰富的防病治病经验,故从中药及其有效成分中筛选低不良反应高效的抗肿瘤药物成为研究热点。

芹菜素是一种广泛存在于多种植物中的黄酮类化合物,具有抗肿瘤、抗氧化、抗炎等多种药理活性^[6]。研究表明,芹菜素的抗肿瘤效果显著,可通过抑制肿瘤细胞增殖,抑制侵袭与迁移,阻滞细胞周

期,诱导肿瘤细胞凋亡及调控肿瘤细胞相关信号转导通路等途径^[7-8]对多种恶性肿瘤均表现出良好的抑制作用,包括结直肠癌^[9]、胰腺癌^[10]、肺癌^[11]、乳腺癌^[12]等。芹菜素能抑制结肠癌HT-29细胞的增殖并诱导其发生凋亡,相关机制与调控哺乳动物雷帕霉素靶蛋白/磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(m-TOR/PI3K/Akt)信号通路下游的相关凋亡及细胞自噬蛋白有关^[13]。目前,有关芹菜素对人大肠癌CL187细胞的影响,尚未见报道。本课题组前期预实验发现,芹菜素能够促进CL187细胞凋亡,其半数抑制浓度(IC₅₀)为45 mg·L⁻¹,但芹菜素对CL187细胞的作用机制尚不清楚,基于此,本实验将在体外探讨芹菜素对CL187细胞的作用及潜在作用机制,为芹菜素用于治疗大肠癌提供理论与实验数据支撑。

1 材料

1.1 细胞 人大肠癌CL187细胞购自江苏凯基生物技术有限公司,编号KG104,实验用为7~12代。

1.2 药品与试剂 芹菜素(纯度≥95%)、过硫酸铵、四甲基乙二胺(上海麦克林生化科技有限公司,批号分别为C12462383、C11707916、C11742763);磷酸盐缓冲液(PBS)缓冲液、DMEM/F-12不完全培养液、胰蛋白酶-EDTA消化液、结晶紫染色液(江苏凯基生物技术有限公司,批号分别为20210908、20210727、20210818、20210419);胎牛血清(南美Lonsera公司,批号RA01991);噻唑蓝(MTT)、30%制胶液、TE缓冲液、1 mol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液、1.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液、20×TBST缓冲液、Hochest 33258染色液(北京索莱宝生物科技有限公司,批号分别为309E058、20200422、20210714、20200927、20201120、20210507、20210705);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号RNBj8184);BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)、RIPA裂解液、100×蛋白酶抑制剂混合物、超敏ECL化学发光试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为062521210726、092520201124、101320201119、112020210420);Omni-ECL超灵敏化学发光检测试剂盒(上海雅酶生物科技有限公司,批号01593098);Millipore Immobilon-P卷膜(PVDF膜,0.45 μm,德国Merk Millipore公司,批号R0AB93964);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、细胞外调节蛋白激酶(ERK)1/2、磷酸化(p)ERK1/2(p-ERK1/2)、p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)、p-p38 MAPK、蛋白激酶B(Akt)、

p-Akt、c-Jun氨基末端激酶(JNK)、p-JNK抗体(美国CST公司,批号分别为2118S、4223T、5023T、14220T、4695T、4370T、8690T、4511T、4691T、4063T、9252T、4668T);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗(美国Immunoway公司,批号B0201);GAPDH、Bcl-2、Bax及Caspase-3引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;GeneJET RNA Purification Kit、RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit、PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix(美国Thermo Fisher scientific公司,批号分别为01099643、01127783、01112585)。

1.3 仪器 C170型CO₂细胞培养箱(德国Binder公司);Epoch2型全波长酶标仪(美国BioTek公司);ECLIPSE Ni-U型正置荧光生物显微镜(日本Nikon公司);超微量核酸测定仪(天根生化科技有限公司);T100™ Thermal Cycler PCR仪、Mini-PROTEAN Tetra Cell型垂直电泳仪、Mini Trans-Blot Cell型蛋白转印模块(美国Bio-Rad公司);Light Cycler 960型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Roche公司);UVP ChemStudio 815多功能分子成像系统(德国耶拿公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人大肠癌细胞CL187培养于含10%胎牛血清和1%青-链霉素的DMEM/F-12培养基中,并置于37℃、5%CO₂培养箱中培养。

2.2 MTT比色法检测细胞增殖作用 取对数生长期CL187细胞,用新鲜完全培养液调整细胞密度至2.5×10⁴个/mL,200 μL/孔接种于96孔板,置于CO₂培养箱内培养24 h。设空白组和芹菜素组(30、45、60 mg·L⁻¹),空白组不含药物仅含培养基,各给药组用完全培养基稀释为相应药物浓度,200 μL/孔,各组设置6个复孔。药物分别干预24、48、72 h,每孔加入5 g·L⁻¹ MTT溶液20 μL,继续培养4 h。弃上清液,再加入DMSO 150 μL/孔,室温振荡5 min,酶标仪490 nm波长处测定各孔的吸光度A,并计算细胞增殖抑制率。抑制率=(A_{空白组}-A_{给药组})/A_{空白组}×100%。

2.3 细胞克隆形成实验观察细胞的增殖能力 取处于对数生长期的CL187细胞,按500个/孔接种于6孔板,培养24 h。按2.2项下分组,给予药物干预48 h,弃去含药培养基,PBS清洗,加入含10% FBS的新鲜培养基,每3 d换液1次,继续培养12 d。弃去上清,预冷的PBS清洗细胞,每孔加入4%多聚甲醛1 mL固定15 min,弃去固定液,PBS洗涤2次,用

结晶紫染色液染色 10 min, PBS 清洗 3 次, 室温下自然干燥, 拍照并计算克隆形成率。细胞数 > 50 的克隆记为 1 个细胞克隆。克隆形成率 = 细胞克隆数 / 接种细胞数 × 100%。

2.4 Hochest 33258 荧光染色检测细胞凋亡 取对数生长期 CL187 细胞, 以 1.0×10^6 /孔接种于 6 孔板 (内置无菌盖玻片) 中, 培养 24 h。按 2.2 项下分组, 给予药物干预 24 h, 弃培养基, PBS 洗涤 2 次, 4% 多聚甲醛固定 15 min, 弃固定液, PBS 清洗 3 次, 加入 Hochest 33258 染色液 500 μ L, 避光染色 10 min, 弃染色液, PBS 洗涤 3 次, 取出盖玻片, 于荧光显微镜下观察细胞凋亡情况并拍照。

2.5 Real-time PCR 检测细胞中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 mRNA 表达水平 将处于对数生长期的 CL187 细胞接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中, 待细胞汇合度达 80%, 给予药物干预, 按 2.2 项下分组, 培养 48 h, 按试剂盒操作说明提取总 RNA 并合成 cDNA 第一链, 进行 PCR 分析, 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 120 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 60 s, 循环 40 次。以 GAPDH 作为内参基因, 结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法进行相对定量分析。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
Bcl-2	上游 TCGCCCTGTGGATGACTGAGTAC	129
	下游 ACAGCCAGGAGAAATCAAACAGAGG	
Bax	上游 AGCGACTGATGTCCCTGTCTCC	112
	下游 AGATGGTGAGTGAGCGGGTGAG	
Caspase-3	上游 GTGGAGGCCGACTTCTTGTATGC	100
	下游 TGGCACAAAGCGACTGGATGAAC	
GAPDH	上游 CAGGAGGCATTGCTGATGAT	138
	下游 GAAGGCTGGGGCTCATT	

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测细胞蛋白表达水平 将处于对数生长期的 CL187 细胞接种于 25 cm^2 细胞培养瓶中, 待细胞汇合度达 80%, 给予药物干预, 按 2.2 项下分组, 继续培养 48 h。每瓶加入裂解液 300 μ L, 冰上裂解 30 min, 收集细胞于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min (离心半径 10 cm), 取细胞上清液进行 BCA 蛋白浓度测定。加入适量上样缓冲液, 沸水煮 10 min 使蛋白变性, 蛋白上样量 30 μ g, 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离, 转至 PVDF 膜, 5% 脱

脂牛奶室温封闭 1 h, TBST 洗膜 4 次, 5 min/次, 分别加入抗体 (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜 4 次, 5 min/次, 加入辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔抗体 (1:5 000) 摇床孵育 1 h, TBST 清洗 4 次, 5 min/次, 加入 ECL 发光试剂显影, 多功能分子成像系统进行图像收集, 以 GAPDH 为内参, 采用 Image J 进行蛋白条带灰度值分析。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计数资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较满足正态分布及方差齐性的用最小显著性差异法 (LSD)-*t* 检验, 不满足正态分布及方差齐性的用秩和检验, 多组间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 芹菜素对 CL187 细胞增殖的影响 与空白组比较, 芹菜素干预 CL187 细胞 24、48、72 h, 对细胞有不同程度的抑制作用, 随着芹菜素浓度的增大和作用时间的延长, 细胞存活率显著降低, 细胞增殖抑制率显著升高 ($P < 0.01$), 表明芹菜素能明显抑制 CL187 细胞的增殖, 并存在浓度-时间相关性。见表 2。

表 2 芹菜素对 CL187 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

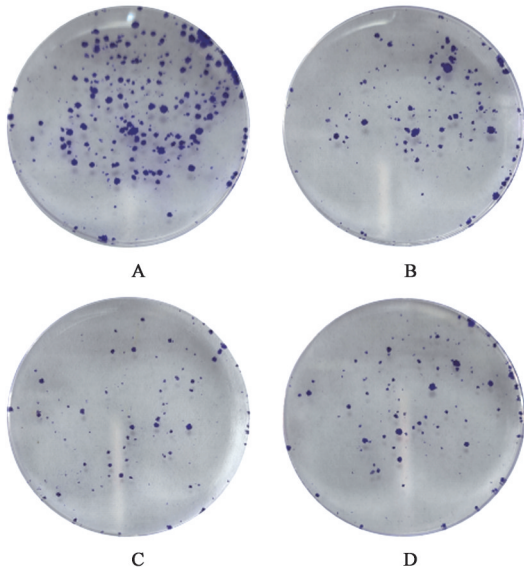
Table 2 Effect of apigenin on proliferation inhibition rate of CL187 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$) %

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
芹菜素组	30	38.16 \pm 8.08 ¹⁾	42.56 \pm 6.48 ¹⁾	68.20 \pm 3.27 ¹⁾
	45	40.37 \pm 5.28 ¹⁾	49.54 \pm 4.93 ¹⁾	79.28 \pm 1.31 ¹⁾
	60	44.00 \pm 8.97 ¹⁾	53.50 \pm 3.54 ¹⁾	79.72 \pm 1.52 ¹⁾

注: 空白组增殖抑制率为 0; 与同时间点空白组比较 ¹⁾ $P < 0.01$

3.2 芹菜素对 CL187 细胞克隆形成能力的影响 与空白组比较, 芹菜素组细胞克隆数和克隆形成率显著降低 ($P < 0.01$); 与空白组比较, 芹菜素组细胞克隆形成抑制率显著升高 ($P < 0.01$), 且随着芹菜素浓度的增加而升高, 表明芹菜素能够剂量依赖性地抑制 CL187 细胞集落形成。见图 1 和表 3。

3.3 芹菜素对 CL187 细胞凋亡形态学的影响 空白组 CL187 细胞细胞呈均匀蓝色荧光, 不同浓度芹菜素干预 CL187 细胞 24 h, 与空白组比较, 随着芹菜素浓度增大, 细胞形态发生染色质固缩, 细胞核呈致密浓染, 或呈碎块状致密浓染的比例显著增多, 细胞出现明显凋亡形态学特征, 凋亡数量增加, 表明芹菜素能促进 CL187 细胞发生凋亡。见图 2。



注:A.空白组;B-D.芹菜素组(30、45、60 mg·L⁻¹)(图2、图3同)

图1 芹菜素对CL187细胞克隆形成能力的影响

Fig. 1 Effect of apigenin on clone formation of CL187 cells

表3 芹菜素对CL187细胞克隆形成能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of apigenin on clone formation of CL187 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	细胞克隆数/个	克隆形成率/%	克隆形成抑制率/%
空白组		187±9	100.00±0.00	0.00±0.00
芹菜素组	30	104±6 ²⁾	55.60±6.03 ²⁾	44.40±6.03 ²⁾
	45	82±8 ²⁾	43.52±8.08 ²⁾	56.48±8.08 ²⁾
	60	78±9 ²⁾	41.92±9.02 ²⁾	58.08±9.02 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾P<0.05,²⁾P<0.01(表4-表6同)

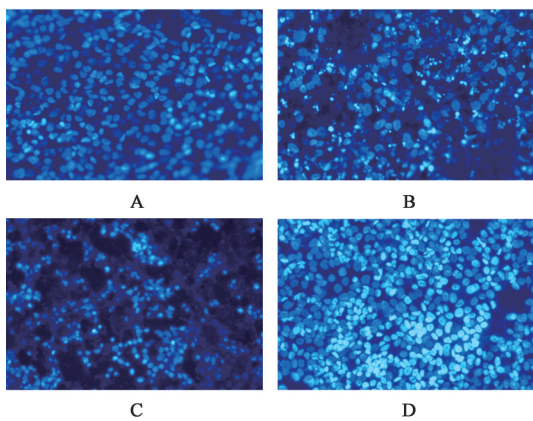


图2 芹菜素对CL187细胞凋亡的影响(荧光正置显微镜,×200)

Fig. 2 Effect of apigenin on apoptosis of CL187 cells (fluorescence positive microscope, ×200)

3.4 芹菜素对CL187细胞Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA表达的影响 与空白组比较,芹菜素组(45、60 mg·L⁻¹)抑凋亡基因Bcl-2 mRNA表达水平显著降低(P<0.01);与空白组比较,芹菜素组促凋亡基因

Bax和Caspase-3 mRNA表达明显升高(P<0.05, P<0.01),表明芹菜素能够通过抑制CL187细胞Bcl-2 mRNA的表达及促进Bax和Caspase-3 mRNA的表达,诱导CL187细胞凋亡。见表4。

表4 芹菜素对CL187细胞Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of apigenin on expressions of Bcl-2、Bax and Caspase-3 mRNA in CL187 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Bcl-2	Bax	Caspase-3
芹菜素组	30	0.96±0.05	3.46±0.25 ²⁾	1.18±0.03 ²⁾
	45	0.22±0.02 ²⁾	6.24±0.28 ²⁾	1.36±0.11 ¹⁾
	60	0.04±0.01 ²⁾	5.56±0.38 ²⁾	1.46±0.12 ¹⁾

注:设空白组Bcl-2、Bax和Caspase-3 mRNA相对表达为1

3.5 芹菜素对CL187细胞凋亡相关蛋白表达的影响 与空白组比较,芹菜素组促凋亡蛋白Caspase-3表达水平明显上调(P<0.05, P<0.01);芹菜素组(45、60 mg·L⁻¹)促凋亡蛋白Bax表达水平显著上调(P<0.01);芹菜素组抑凋亡蛋白Bcl-2表达水平明显下调(P<0.05, P<0.01)。见图3、表5。

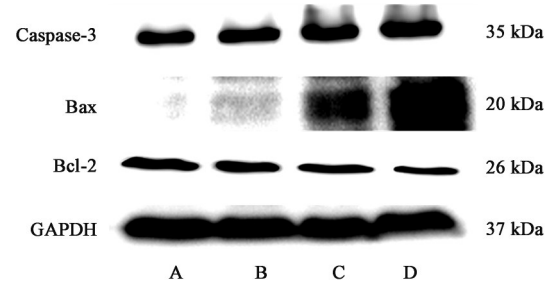


图3 芹菜素对CL187细胞凋亡相关蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of apigenin on expression of apoptosis-related proteins in CL187 cells

表5 芹菜素对CL187细胞凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of apigenin on expression of apoptosis-related proteins in CL187 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	Caspase-3 /GAPDH	Bax /GAPDH	Bcl-2 /GAPDH
空白组		0.58±0.07	0.12±0.10	0.80±0.05
芹菜素组	30	0.74±0.07 ¹⁾	0.37±0.21	0.62±0.04 ¹⁾
	45	0.86±0.05 ²⁾	0.65±0.05 ²⁾	0.59±0.07 ¹⁾
	60	1.05±0.10 ²⁾	1.16±0.07 ²⁾	0.41±0.08 ²⁾

3.6 芹菜素对CL187细胞PI3K/Akt及MAPK信号通路相关蛋白表达的影响 与空白组比较,芹菜素组(60 mg·L⁻¹)Akt蛋白表达显著下调(P<0.01),p38

MAPK 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$); 芹菜素组 ($45、60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) p-Akt、ERK1/2、p-ERK1/2 蛋白表达显著下调 ($P < 0.01$), p-JNK/JNK 明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 芹菜素组 JNK、p-JNK、p-p38 MAPK/p38 MAPK 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05, P < 0.01$), p-p38 MAPK 蛋白表达显著上调 ($P < 0.01$), p-Akt/Akt 明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), p-ERK1/2/ERK1/2 显著降低 ($P < 0.01$)。表明芹菜素可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路和调控 MAPK 信号通路相关蛋白的表达, 从而诱导 CL187 细胞凋亡。见图 4、表 6。

4 讨论

大肠癌作为胃肠道常见的恶性肿瘤之一, 其病发率、死亡率高, 早期不易诊断, 具有发病隐匿、恶化率高、病程速度快、复发率高的特点, 严重威胁着人们的生命健康。因此, 寻找更加高效的治疗结直肠癌的药物对其临床治疗和预后极其重要, 并进一步探索其潜在作用机制。细胞凋亡是一种正常的新陈代谢现象, 是调节体内环境稳定的关键。异常增殖和分化异常是肿瘤细胞的两个基本特征, 故抑制肿瘤细胞异常增殖能力是评价抗肿瘤药物药效的指标之一, 而癌症通过放疗、化疗等治疗手段均主要是通过诱导肿瘤细胞凋亡而实现治疗目的^[14-15]。结肠癌细胞无限增殖和抑制有序凋亡与结肠癌的发生发展密切相关, 因此有效抑制结肠癌细胞的增殖并诱导结肠癌细胞凋亡即可有效预防癌细胞的繁殖。本实验结果显示, 芹菜素可显著抑制 CL187 细胞增殖并降低 CL187 集落形成, 并且在荧光显微镜下可观察到 CL187 细胞核固缩, 染色质凝聚, 细胞不规则等典型的细胞凋亡特征。表明芹菜素抑制 CL187 细胞增殖可能与其诱导 CL187 细胞

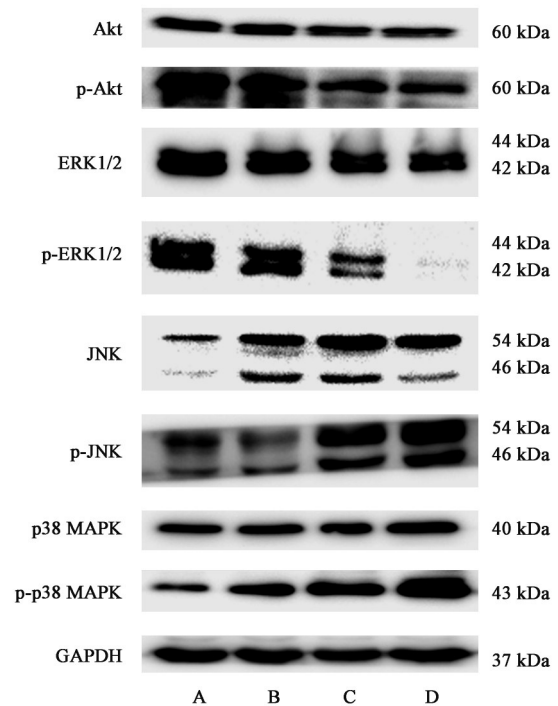


图 4 芹菜素对 CL187 细胞 PI3K/Akt 及 MAPK 信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of apigenin on expression of PI3K/Akt and MAPK pathways related proteins in CL187 cells

凋亡相关。

Bcl-2 和 Bax 属于 Bcl-2 家族成员, 两者均是调控细胞凋亡的重要细胞因子, Bcl-2 主要是抑制细胞凋亡, 而 Bax 则是促进细胞凋亡^[16]。Bax 在收到细胞死亡信号刺激时, 可上调促凋亡因子的释放, 诱导细胞发生凋亡, 而 Bcl-2 则在此过程中抑制细胞凋亡^[11]。Caspase-3 是 Caspase 家族成员之一, 是调控细胞凋亡的关键分子, 激活 Caspase-3 可促进细胞凋亡, 其活化程度是评价细胞凋亡的一个重要指

表 6 芹菜素对 CL187 细胞 PI3K/Akt 及 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of apigenin on expression of PI3K/Akt and MAPK pathways related proteins in CL187 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Akt /GAPDH	p-Akt /GAPDH	ERK1/2 /GAPDH	p-ERK1/2 /GAPDH	JNK /GAPDH	p-JNK /GAPDH
空白组		1.09±0.03	1.08±0.07	0.99±0.04	0.75±0.02	0.32±0.03	0.35±0.04
芹菜素组	30	1.07±0.05	0.95±0.09	1.05±0.05	0.67±0.04	0.73±0.03 ²⁾	0.57±0.07 ¹⁾
	45	0.88±0.10	0.72±0.03 ²⁾	0.85±0.03 ²⁾	0.41±0.02 ²⁾	0.79±0.08 ²⁾	1.10±0.07 ²⁾
	60	0.85±0.04 ²⁾	0.56±0.05 ²⁾	0.73±0.02 ²⁾	0.04±0.04 ²⁾	0.58±0.10 ¹⁾	1.20±0.20 ¹⁾
组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	p38 MAPK /GAPDH	p-p38 MAPK /GAPDH	p-Akt/Akt	p-ERK1/2 /ERK1/2	p-JNK /JNK	p-p38 MAPK /p38 MAPK
空白组		0.75±0.07	0.30±0.03	0.99±0.03	0.76±0.01	1.08±0.15	0.40±0.07
芹菜素组	30	0.75±0.11	0.64±0.03 ²⁾	0.89±0.04 ¹⁾	0.64±0.01 ²⁾	0.78±0.06	0.86±0.14 ¹⁾
	45	0.84±0.06	0.93±0.06 ²⁾	0.82±0.05 ¹⁾	0.41±0.02 ²⁾	1.39±0.08 ¹⁾	1.11±0.13 ²⁾
	60	0.94±0.08 ¹⁾	1.09±0.05 ²⁾	0.64±0.03 ²⁾	0.06±0.05 ²⁾	2.08±0.21 ²⁾	1.17±0.13 ²⁾

标^[17]。因此,靶向这些蛋白已成为治疗肿瘤的新方法。本实验结果显示,芹菜素可明显上调CL187细胞中Caspase-3、Bax蛋白及mRNA的表达,同时显著下调Bcl-2蛋白及mRNA的表达,诱导肿瘤细胞发生凋亡。

PI3K/Akt信号通路在肿瘤中常过度表达,该通路激活是癌症的标志^[18-19],并且该通路与结直肠癌的发生和发展密切相关,该通路过度激活能够促进癌细胞增殖、抑制癌细胞凋亡、促进结直肠癌的侵袭和转移以及促进肿瘤血管的形成,故PI3K/Akt信号通路可作为治疗结直肠癌一个新靶点^[20-23]。MAPK信号通路包括ERK、JNK、p38等,是调控细胞增殖、凋亡的重要信号通路,研究表明,该信号通路异常激活与胃癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌等多种肿瘤疾病的发生发展密切相关^[24-26]。ERK1/2信号传导蛋白是经典的MAPK通路,能调控细胞增殖、凋亡、分化及肿瘤化等生物学反应^[27],ERK1/2在黑色素瘤、乳腺癌、胶质瘤患者中常被过度激活^[28]。JNK信号通路作为MAPK家族成员之一,与细胞凋亡过程有密切的关系,激活该信号通路能显著诱导肿瘤细胞发生凋亡^[29-30]。p38 MAPK具有多种病理和生理功能,对肿瘤的发生发展起重要作用,激活后的p38 MAPK信号通路能够调控细胞增殖、分化、凋亡等^[31]。本实验结果显示,芹菜素能够显著下调p-Akt、p-ERK1/2表达,上调p-JNK、p-p38 MAPK的表达,说明芹菜素通过抑制PI3K/Akt信号通路及调控MAPK信号通路相关蛋白的表达来诱导CL187细胞凋亡。

本研究结果表明,芹菜素能够呈浓度依赖性的抑制大肠癌CL187细胞增殖及集落形成,并通过上调促凋亡蛋白Caspase-3、Bax及下调抑凋亡蛋白Bcl-2的表达水平促进细胞凋亡,其机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路以及调控MAPK信号通路相关蛋白的表达有关,为芹菜素的开发利用提供了理论依据。本研究仅从细胞凋亡层面探讨芹菜素对CL187的作用机制,存在一定局限性,芹菜素对大肠癌的治疗效果是否与阻滞细胞周期、诱导细胞自噬等作用途径相关尚不清楚,还需进一步探究,体外实验结果受众多因素影响存在一定的不确定性,有待后续进一步的动物体内实验进行验证。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] SUNG H, FERLA Y J, SIEGEL R L, et al. Global

cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209-249.

[2] CHANG L, ZHOU R, HE Y H, et al. Total saponins from Rhizoma Panacis Majoris inhibit proliferation, induce cell cycle arrest and apoptosis and influence MAPK signalling pathways on the colorectal cancer cell[J]. Mol Med Rep, 2021, 24(2):542.

[3] 刘静,朱琰,范佳伟. 及早中医药健脾治疗对大肠癌术后患者生存质量影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2021, 23(9):6-9.

[4] MA M, WANG X, LIU N, et al. Low-dose naltrexone inhibits colorectal cancer progression and promotes apoptosis by increasing M₁-type macrophages and activating the Bax/Bcl-2/Caspase-3/PARP pathway[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 83:106388.

[5] WANG Y X, LIN C, CUI L J, et al. *Rauwolfia vomitoria* extract represses colorectal cancer cell autophagy and promotes apoptosis[J]. Pharmacology, 2021, 106(9/10):488-497.

[6] 付海洋,姜良勇,齐亚军,等. 芹菜素药理作用的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2020, 47(10):787-792, 797.

[7] 陈亭亭,杨培伟,张树辉. 芹菜素抗肿瘤机制的研究进展[J]. 中国现代应用药学, 2019, 36(4):507-510.

[8] LMRAN M, ASLAM GONDAL T, ATIF M, et al. Apigenin as an anticancer agent[J]. Phytother Res, 2020, 34(8):1812-1828.

[9] CHENG Y, HAN X J, MO F, et al. Apigenin inhibits the growth of colorectal cancer through down-regulation of E2F1/3 by miRNA-215-5p [J]. Phytomedicine, 2021, doi: 10.1016/j. phymed. 2021. 153603.

[10] WARKAD M S, KIM C H, KANG B G, et al. Metformin-induced ROS upregulation as amplified by apigenin causes profound anticancer activity while sparing normal cells[J]. Sci Rep, 2021, 11(1):14002.

[11] AIDA R, HAGIWARA K, OKANO K. miR-34a-5p might have an important role for inducing apoptosis by down-regulation of SNAIL in apigenin-treated lung cancer cells [J]. Mol Biol Rep, 2021, 48(3):2291-2297.

[12] SHENDGE A K, CHAUDHURI D, BASU T, et al. A natural flavonoid, apigenin isolated from *Clerodendrum viscosum* leaves, induces G₂/M phase cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 cells through the regulation of p53 and Caspase-cascade pathway [J]. Clin Transl Oncol, 2021, 23(4):718-730.

- [13] CHEN X, XU H, YU X, et al. Apigenin inhibits *in vitro* and *in vivo* tumorigenesis in cisplatin-resistant colon cancer cells by inducing autophagy, programmed cell death and targeting m-TOR/PI3K/Akt signalling pathway[J]. J Buon, 2019, 24(2):488-493.
- [14] 李龙妹, 黄锦鹏, 河文峰, 等. 龙葵提取物澳洲茄碱诱导 A549 细胞凋亡的机制研究[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(12):1422-1427.
- [15] GONG Y, ZHANG L, ZHANG A Q, et al. GATA4 inhibits cell differentiation and proliferation in pancreatic cancer [J]. PLoS One, 2018, 13 (8) : e0202449.
- [16] LIN P, TIAN X H, YI Y S, et al. Luteolin-induced protection of H₂O₂-induced apoptosis in PC12 cells and the associated pathway [J]. Mol Med Rep, 2015, 12 (5):7699-7704.
- [17] MEANS J C, LOPEZ A A, KOULEN P. Resveratrol protects optic nerve head astrocytes from oxidative stress-induced cell death by preventing Caspase-3 activation, tau dephosphorylation at Ser422 and formation of misfolded protein aggregates [J]. Cell Mol Neurobiol, 2020, 40(6):911-926.
- [18] GU Y, WANG Q, GUO K, et al. TUSC3 promotes colorectal cancer progression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through WNT/ β -catenin and MAPK signalling [J]. J Pathol, 2016, 239 (1):60-71.
- [19] WEI L, WANG X W, LV L Y, et al. The emerging role of noncoding RNAs in colorectal cancer chemoresistance [J]. Cell Oncol, 2019, 42 (6) : 757-768.
- [20] WEI L L, ZENG K X, GAI J J, et al. Effect of acupuncture on neurovascular units after cerebral infarction in rats through PI3K/Akt signaling pathway [J]. Clin Hemorheol Micro, 2020, 4(6):3233-3237.
- [21] ZHOU Z Y, DUN L L, WEI B X, et al. Musk ketone induces neural stem cell proliferation and differentiation in cerebral ischemia via activation of the PI3K/Akt signaling pathway [J]. Neuroscience, 2020, 435(1):1-9.
- [22] MARI A, GOPIKRISHNAN M, NAGABHISHEK S N, et al. Carvacrol promotes cell cycle arrest and apoptosis through PI3K/Akt signaling pathway in MCF-7 breast cancer cells [J]. Chin J Integr Med, 2020, 6(22):1007-1011.
- [23] 冯跃, 张永涛, 夏利锋, 等. PI3K/Akt/mTOR 信号通路相关蛋白在结直肠癌中的表达及与临床病理特征和预后的关系[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(24):18-23.
- [24] 张海燕, 孙丽慧, 潘洪明, 等. 曲古抑菌素 A 通过 JNK/MAPK 信号通路介导乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的凋亡[J]. 中国临床解剖学杂志, 2021, 39(2):174-181.
- [25] LIU Y T, HSIEH M J, LIN J T, et al. Erianin induces cell apoptosis through ERK pathway in human nasopharyngeal carcinoma [J]. Biomed Pharmacother, 2019, 111(3):262-269.
- [26] BUROTTO M, CHIOU V L, LEE J M, et al. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective [J]. Cancer, 2014, 120(22):3446-3456.
- [27] KHAN M, KHAN M, AL-MARRI A H, et al. Apoptosis inducing ability of silver decorated highly reduced graphene oxide nanocomposites in A549 lung cancer [J]. Int J Nanomedicine, 2016, doi: 10.2147/IJN.S100903.
- [28] HANNEN R, HAUSWALD M, BARTSCH J W. A rationale for targeting extracellular regulated kinases ERK1 and ERK2 in glioblastoma [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2017, 76(10):838-847
- [29] XU P, DAVIS R J. Correction for Xu and Davis, "c-Jun NH2-terminal kinase is required for lineage-specific differentiation but not stem cell self-renewal" [J]. Mol Med Rep, 2017, 37(17):e00280- e00317.
- [30] KRAJARNG A, IMOTO M, TASHIRO E, et al. Apoptosis induction associated with the ER stress response through up regulation of JNK in HeLa cells by gambogic acid [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, doi:10.1186/s12906-015-0544-4.
- [31] 蒋师, 张兴强. 槲皮素诱导人结肠癌细胞 HT-29 凋亡的机制研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(11):1535-1538.

[责任编辑 张丰丰]