

以 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 为靶点的小檗碱对人结肠癌细胞 SW620 的作用及机制

温丽娜^{1*}, 韩宗强²

(1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038; 2. 北京小汤山医院, 北京 102211)

[摘要] **目的:**通过研究小檗碱对结肠癌细胞增殖的影响以及小檗碱是否通过调控 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) 启动子 G-四链体结构抑制结肠癌细胞 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) mRNA 的表达,探究以 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 为靶点的小檗碱对人结肠癌细胞系 SW620 的作用及可能机制。**方法:**采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测小檗碱对 SW620 细胞的增殖抑制率。采用荧光光谱研究小檗碱和 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 的结合能力,采用阴离子淬灭实验和荧光各向异性及荧光偏振实验研究二者结合的结合模式,采用圆二色光谱方法研究小檗碱对 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 构型的影响,采用圆二色光谱变温实验研究小檗碱对 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 构型热稳定性的影响,采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测小檗碱对 SW620 细胞 KRAS 基因转录的影响。**结果:**小檗碱可以抑制 SW620 细胞的增殖,且呈剂量依赖性。KRAS 启动子 G-四链体与小檗碱以近 1:1 计量比结合,二者的结合常数为 $(0.93 \pm 0.21) \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合能力较强,结合模式为末端堆积和沟槽结合的复合模式。小檗碱可维持 KRAS 启动子的平行 G-四链体构型及热稳定性。100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 小檗碱能抑制 SW620 细胞 KRAS mRNA 的表达。**结论:**小檗碱能够与 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 结合并维持其平行构型的稳定性,小檗碱可能通过调控 KRAS 启动子 G-四链体结构下调 SW620 细胞 KRAS 基因转录,这可能是小檗碱抑制其细胞增殖的机制之一。KRAS 启动子区域 G-四链体结构可能成为结肠癌治疗的新靶点。

[关键词] KRAS 启动子; G-四链体; 小檗碱; 结肠癌; 作用机制

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R273;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)12-0143-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181212

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180327.1135.008.html>

[网络出版时间] 2018-03-27 14:18

Function and Mechanism of Berberine on Colon Cancer Cell SW620 Based on KRAS Promoter G-quadruplex DNA Target

WEN Li-na^{1*}, HAN Zong-qiang²

(1. Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China;

2. Beijing Xiaotangshan Hospital, Beijing 102211, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the function and possible mechanism of berberine on colon cancer cell SW620 based on Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) promoter G-quadruplex target, by investigating its effect on colon cancer cells proliferation and whether berberine could inhibit mRNA expression of KRAS in colon cancer cells through regulating its promoter G-quadruplex. **Method:** The inhibition rate of berberine on SW620 cell lines proliferation was determined by using 3-(4, 5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay. The binding capacity of KRAS G-quadruplex DNA with berberine was detected by methods of fluorescence spectra, and the anionic quenching experiment, and fluorescence anisotropy and

[收稿日期] 20171220(003)

[基金项目] 中国铁路总公司科技研究开发计划项目(J2017Z607);首都医科大学附属北京世纪坛医院中青年学科骨干培养专项(2015-QB02)

[通信作者] *温丽娜,博士,研究实习员,从事抗癌药物作用机制研究,Tel:010-63926418,E-mail:can_858@163.com

fluorescence polarization experiment were used to investigate their binding mode. The effect of berberine on conformation of KRAS G-quadruplex was studied by using circular dichroism spectra; the effect of berberine on thermal stability of KRAS G-quadruplex was studied by using circular dichroism spectra variable-temperature experiment, and the effect of berberine on KRAS genetic transcription of SW620 cells was detected by real-time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** Berberine can inhibit the proliferation of SW620 cells in a dose dependent manner. KRAS G-quadruplex DNA had a stronger binding capacity with berberine at a stoichiometric ratio of about 1:1, with a binding constant of $(0.93 \pm 0.21) \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, under a binding mode of complex patterns of terminal stacking and groove binding. Berberine can keep the parallel conformation and thermostability of KRAS G-quadruplex, and $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ berberine can inhibit the mRNA expression of KRAS in SW620 cells. **Conclusion:** Berberine can bind with KRAS promoter G-quadruplex DNA and keep the thermostability of its parallel conformation, and may down-regulate KRAS genetic transcription of SW620 cells by affecting its G-quadruplex structure, which may be one of the mechanisms for inhibiting the proliferation of cells. KRAS promoter G-quadruplex structure may become a new target in colon cancer therapy.

[**Key words**] Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS) promoter; G-quadruplex; berberine; colon cancer; anti-tumor mechanism

结直肠癌是最常见的恶性肿瘤之一。目前首选治疗方案仍为外科手术治疗,但是肿瘤靶向治疗和化疗亦成为结直肠癌综合治疗的重要组成部分。然而,对于某些伴随基因突变的结直肠癌,目前仍缺乏有效治疗策略。毛茛科和罂粟科多种药用植物的重要生物碱类有效成分小檗碱除了具有消炎抑菌、抗心律失常、降糖、降压等药理作用外,其抗癌作用也备受关注^[1]。小檗碱能够通过调节 β -链蛋白 (β -catenin) 信号通路、增强泛素连接酶 Cbl 的活性等机制抑制结肠癌细胞增殖,通过产生活性氧和激活 JNK/p38 分裂原激活的蛋白激酶 (MAPK) 通路诱导结肠癌细胞凋亡^[2-5],但其抗结肠癌的作用机制尚未十分明确。G-四链体是由富含鸟嘌呤的核酸序列折叠而成的特殊核酸二级结构,在生物体内广泛存在,并参与了转录调节, DNA 重组,基因组稳定和端粒保持等多种生物学过程^[6]。Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog (KRAS), B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), 肝细胞生长因子 (HGF) 的受体 (MET) 等多种癌基因启动子区域都存在这种特殊结构,维持 G-四链体结构的稳定能够抑制基因的转录^[7]。因此,癌基因启动子区域的 G-四链体结构可能成为肿瘤基因治疗的有效靶点。研究表明,小檗碱及其衍生物可以通过稳定端粒 G-四链体结构引发端粒脱帽进而诱导肿瘤细胞生长周期停滞和衰老^[8-10]。KRAS 基因突变与结肠癌的发生、发展、愈后密切相关^[11]。本研究探讨小檗碱能否通过调控 KRAS 启动子区域 G-四链体结构抑制癌细胞增殖,G-四链体是否是小檗碱抗结肠癌作用的新靶点,揭示小檗碱

抗癌作用的机制。

1 材料

1.1 药物 盐酸小檗碱水合物 (纯度 $\geq 98\%$) 购自上海晶纯实业有限公司,批号 I1523001。

1.2 细胞 人结肠癌细胞系 SW620 由北京大学医学部基础医学院惠赠。

1.3 试剂 KRAS 启动子 DNA 序列 5'-AGGGCGGTGTGGGAAGAGGGAAGAGGGGGAGG-3' [生工生物工程(上海)股份有限公司,批号 9201309095]; DMEM 培养基,胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 1676968, 1652790); 噻唑蓝 (MTT, 美国 Sigma 公司,批号 MKB06849V); cDNA 第一链合成试剂盒 SuperRT cDNA Synthesis Kit (康为世纪生物科技有限公司,批号 10133); 引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司提供; KRAS, 上游 5'-CGAATATGATCCAACAATAGAG-3', 22 bp, 下游 5'-ATGTACTGGTCCCTCATT-3', 18 bp; 内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH), 上游 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3', 19 bp, 下游 5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3', 20 bp。

1.4 仪器 SPARK10M 型全波长化学发光仪 (瑞士 Tecan 公司); FluoroMax-4 型荧光光谱仪 (法国 Horiba Jobin Yvon 公司); J-815 型圆二色光谱仪 (日本 Jasco 公司); BSA224S 型电子分析天平 (德国 Sartorius 公司); SW-CJ-2FD 型细胞超净工作台 (苏州净化设备有限公司); 3111 型二氧化碳培养箱 (美国 Thermo 公司); Veriti 96 Well 型热循环仪, QuantStudio™ 6 Flex 型荧光定量 PCR 系统 (美国

ABI 公司)。

2 方法

2.1 KRAS 启动子 DNA 和小檗碱溶液配置 将 KRAS 启动子 DNA 溶解于 tris-HCl 缓冲液中, 配置成浓度为 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (吸光度 $A_{260 \text{ nm}} > A_{280 \text{ nm}}$) 储存液, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 加热 5 min 后, 缓慢冷却至室温, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。将盐酸小檗碱水合物配置成浓度为 $500 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液, 置于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 避光备用。

2.2 细胞培养 采用 DMEM 培养基于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 饱和湿度培养箱中培养 SW620 细胞。当细胞融合接近 $80\% \sim 90\%$ 时, 采用胰酶消化, 传代, 培养备用。

2.3 MTT 比色法检测细胞增殖活性 取对数生长期 SW620 细胞, 配置细胞悬液, 调整细胞密度为 2×10^4 个/mL, 接种于 96 孔板, $200 \mu\text{L}$ /孔, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中培养至细胞贴壁, 空白组每孔加入 $200 \mu\text{L}$ 培养基, 小檗碱组每孔加入同体积含药培养基 ($3, 10, 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 每组设 3 个复孔, 培养 48 h 后, 每孔加入 $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT $20 \mu\text{L}$, 于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ $5\% \text{ CO}_2$ 培养箱中孵育 4 h, 每孔加入 DMSO $200 \mu\text{L}$, 振荡使结晶物充分溶解, 同时设置调零孔, 采用全波长化学发光仪检测各孔 570 nm 处 A 。依据公式(1)计算药物对细胞增殖的抑制率。

$$\text{抑制率} = \left(1 - \frac{A_{\text{干预组}} - A_{\text{调零孔}}}{A_{\text{空白组}} - A_{\text{调零孔}}} \right) \times 100\% \quad (1)$$

2.4 稳态荧光光谱检测 将小檗碱母液用缓冲液稀释至 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 加入不同体积的 KRAS 启动子 DNA 溶液, 调整其终浓度分别为 $0, 0.40, 0.79, 1.19, 1.57, 1.96, 2.34, 2.72, 3.10, 3.47, 3.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶液混匀后, 采用荧光光谱仪, 474 nm 激发, 激发和发射狭缝设置为 5 nm , 测定其荧光发射光谱。每个实验重复 3 次。

2.5 阴离子猝灭检测 在小檗碱与 KRAS 启动子 DNA 的混合溶液中加入不同体积的 KI 溶液, 分别测定加入 KI 前后混合溶液的荧光发射光谱。每个实验重复 3 次。

2.6 荧光偏振及荧光各向异性检测 将小檗碱母液用缓冲液稀释至 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 加入不同体积的 KRAS 启动子 DNA 溶液, 调整其终浓度分别为 $0, 0.40, 0.79, 1.19, 1.57, 1.96, 2.34, 2.72, 3.10, 3.47, 3.85 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 溶液混匀后, 采用荧光光谱仪, 分别测定其荧光各向异性及荧光偏振。每个实验重复 3 次。

2.7 圆二色光谱及热稳定性检测 将 KRAS 启动

子 DNA 储存液稀释至 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 加入小檗碱溶液, 调整其终浓度为 $200, 400, 600, 800, 1000 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 设空白组, 采用 J-815 型圆二色光谱仪检测其圆二色谱。扫描波长 $230 \sim 350 \text{ nm}$, 步进 0.5 nm , 带宽 1 nm , 扫描速率为 $50 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, 室温。样品测试前, 进行基线校正。每个样品扫描 3 次, 数据由仪器自带分析软件进行采集和处理。

采用圆二色光谱仪附带的 PTC-423S 温控系统测量其热稳定性。记录温度从 $10 \sim 90 \text{ }^\circ\text{C}$ 逐渐变化时 262 nm 处椭圆率的变化, 绘制熔解曲线, 计算熔解温度 $T_m^{[12]}$ 。

2.8 KRAS mRNA 表达检测 将 SW620 细胞随机分为空白组和小檗碱组, 采用最低浓度 $3 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱对 SW620 细胞 KRAS mRNA 表达的影响。药物作用 48 h 后, 弃去培养基, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 3 次, 提取细胞总 RNA, 采用第一链合成试剂盒将其逆转录为 cDNA, 采用实时荧光定量 PCR 系统进行基因扩增检测。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行数据分析。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间数据比较采用单因素方差分析, 两组间数据比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为组间差异有统计学意义。

3 结果

3.1 小檗碱对人结肠癌 SW620 细胞增殖的影响 小檗碱干预 SW620 细胞 48 h 后, 与空白组比较, $3, 10, 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱组 A 不同程度地降低 ($P < 0.05$), 说明所选浓度的小檗碱能够抑制细胞的增殖。与空白组比较, $3, 10, 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱对细胞增殖的抑制率显著升高 ($P < 0.01$)。见表 1, 2。

表 1 小檗碱对人结肠癌 SW620 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Effect of berberine on proliferation of SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A
空白	-	2.1637 ± 0.0758
小檗碱	3	$1.8449 \pm 0.0279^{1)}$
	10	$1.4503 \pm 0.1749^{1)}$
	100	$0.2852 \pm 0.0565^{1)}$

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.2 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 对小檗碱荧光发射光谱的影响 荧光滴定曲线可以间接地提供小分子与 DNA 分子的表观结合常数及位点数, 从而有效地研究二者的结合能力。在 $\text{pH } 7.4$ 的缓冲溶液中,

表 2 小檗碱对 SW620 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of berberine on inhibition rate of SW620 cells proliferation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%
空白	-	-
小檗碱	3	$14.95 \pm 1.71^{1)}$
	10	$33.67 \pm 6.12^{1)}$
	100	$88.38 \pm 2.21^{1)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

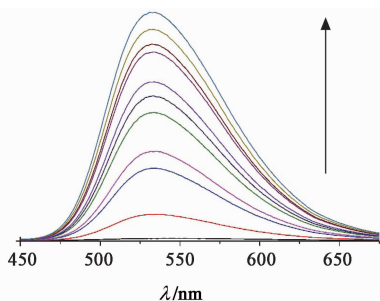
KRAS G-四链体 DNA 可引起小檗碱的荧光发射增强。随着 DNA 浓度的增加,小檗碱的荧光发射强度逐渐增大。依据 Scatchard 方程 [公式 (2) ~ (5)]^[13] 计算二者表观结合常数为 $(0.93 \pm 0.21) \times 10^6 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$, 结合位点数为 (0.76 ± 0.09) , 说明小檗碱分子与 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 具有较强的结合能力,可以近 1:1 的化学计量比形成复合物。见图 1。

$$r/C_f = K(n - r) \quad (2)$$

$$C_f = C_i - C_b \quad (3)$$

$$C_b = C_i [(F - F_0)/(F_{\max} - F_0)] \quad (4)$$

$$r = C_b/[DNA] \quad (5)$$



小檗碱浓度 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 依箭头方向, DNA 浓度依次为 0, 0.40, 0.79, 1.19, 1.57, 1.96, 2.34, 2.72, 3.10, 3.47, 3.85 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

图 1 不同浓度 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 对小檗碱荧光发射光谱的影响

Fig. 1 Effect of different concentrations of KRAS promoter G-quadruplex DNA on fluorescence emission spectra of berberine

3.3 小檗碱与 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 结合的分子机制 阴离子淬灭实验是推断药物和 DNA 结合模式的有效方法。其原理是当药物以插入模式与 DNA 结合时, DNA 分子外侧带负电荷的磷酸骨架将强烈地排斥阴离子淬灭剂, 有效地保护药物而减小淬灭剂对其的淬灭, 因此 DNA 存在时阴离子淬灭剂对药物的淬灭程度与没有 DNA 时相比要小一些; 当药物以沟槽模式与 DNA 结合时, 药物结合在 DNA 的大沟或小沟上, 暴露于溶剂分子中, 使阴离子淬灭

剂更易于与其发生作用, 因此 DNA 存在时阴离子淬灭剂对药物的淬灭程度与没有 DNA 时相比要大一些^[13]。

阴离子对发光体荧光淬灭的程度可以用 K_{SV} 来衡量, 即反应过程的淬灭常速。 K_{SV} 越大, 说明其淬灭的程度越大。 K_{SV} 的数值通过 Stern-Volmer 方程得到 [公式 (6)]^[14]。

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (6)$$

F_0 为淬灭剂不存在时发光体的荧光强度, F 为加入淬灭剂后发光体的荧光强度。 $[Q]$ 为加入的淬灭剂的浓度。

本实验研究了在 KRAS G-四链体 DNA 存在与否的情况下, KI 对小檗碱的荧光淬灭情况。在 KRAS G-四链体 DNA 不存在的情况下, KI 对小檗碱的淬灭程度 (淬灭常数为 $0.75 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 比 KRAS G-四链体 DNA 存在时的淬灭程度 (淬灭常数为 $9.64 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$) 小, 说明小檗碱可能以沟槽模式与 DNA 结合。见图 2。

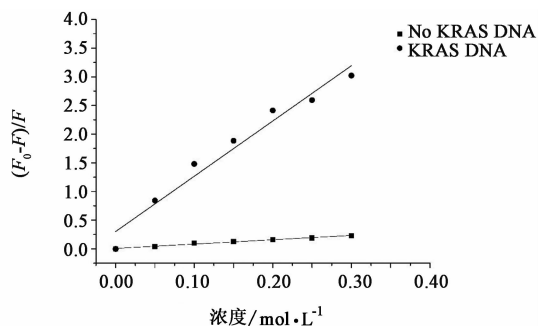


图 2 KI 对小檗碱的荧光淬灭效应

Fig. 2 Fluorescence quenching effect of KI on berberine

荧光各向异性和荧光偏振可以为药物与 DNA 相互作用模式研究提供有效的参考。由于水溶液的黏度较小, 具有荧光性质的药物分子自由转动和扭曲较快, 荧光各向异性值一般偏小。当药物以插入方式进入双螺旋 DNA 分子中时, 其自由转动和扭曲受限, 转动速度减慢, 因而荧光各向异性值增大; 当药物以沟槽结合模式或静电作用与 DNA 分子发生作用时则荧光各向异性值不会增加。荧光各向异性和荧光偏振可以分别通过公式 (7) ~ (9) 求得^[14]。

$$r = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + 2GI_{VH}) \quad (7)$$

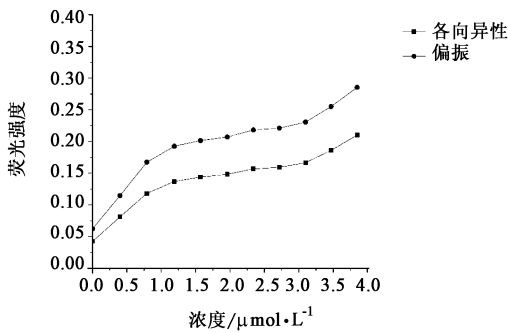
$$P = (I_{VV} - GI_{VH}) / (I_{VV} + GI_{VH}) \quad (8)$$

$$G = I_{HV} / I_{HH} \quad (9)$$

其中 r 为荧光各向异性值, P 为荧光偏振值, I_{VV} 和 I_{VH} 分别代表起偏器在水平方向, 检偏器在垂直及

平行方向时得到的荧光强度, I_{HV} 和 I_{HH} 则分别代表起偏器在垂直方向, 检偏器在垂直及平行方向时得到的荧光强度, G 是仪器的校正因子。

本实验考察了小檗碱的荧光各向异性 and 荧光偏振值随 KRAS DNA 浓度增加的变化情况。加入 DNA 后, 小檗碱的荧光各向异性 and 荧光偏振不同程度的随 DNA 浓度的增加而增大。因此从这个角度推测, 小檗碱与 KRAS 启动子 DNA 是以插入的方式发生相互作用的, 对于 G-四链体 DNA 结构而言, 这种插入方式为末端堆积。当 KRAS DNA 的浓度增加至一定程度时, 其荧光各向异性 and 荧光偏振值的变化趋于平缓, 意味着体系的反应已接近于平衡状态。见图 3。



小檗碱浓度 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$; DNA 浓度依次为 0, 0.40, 0.79, 1.19, 1.57, 1.96, 2.34, 2.72, 3.10, 3.47, 3.85 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

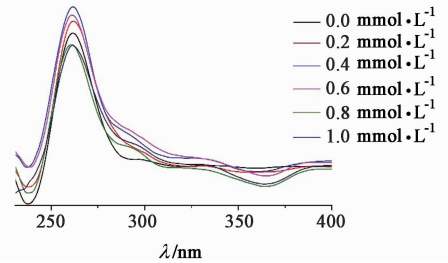
图 3 小檗碱荧光各向异性及荧光偏振随 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 浓度增加的变化

Fig. 3 Changes of fluorescence anisotropy and fluorescence polarization of berberine with concentration increase of KRAS promoter G-quadruplex DNA

综合以上 2 种分析方法认为, 小檗碱与 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 的结合模式为复合模式, 即既有末端堆积结合模式, 又有沟槽结合模式。

3.4 小檗碱对 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 构型的影响 圆二色谱可以有效地提供溶液中生物大分子的二级结构信息。G-四链体 DNA 具有典型的圆二色谱特征。在圆二色谱上, KRAS 启动子 G-四链体 DNA 分别于 262, 240 nm 处呈现正峰和负峰, 具有 G-四链体 DNA 平行构型的典型结构特征^[14]。加入小檗碱后, 随着其浓度的增加, 小檗碱引起 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 正峰强度先增加后下降, 负峰强度先下降后增加, 最后基本保持不变, 在所选浓度范围内仍可维持平行 G-四链体构型。在 290 nm 附近, 小檗碱具有诱导肩峰形成的趋势, 意味着四链体构型有向复合构型转变的趋势。在 300 ~ 400 nm 出现了负峰 (365 nm

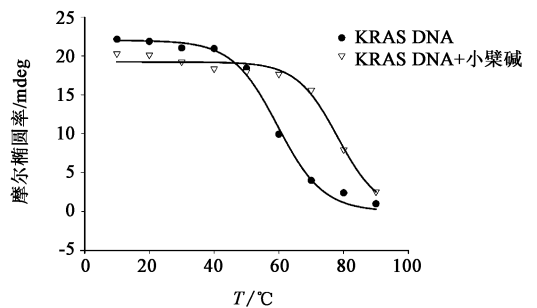
附近), 说明小檗碱与 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 形成了复合物。但是, 负峰强度的变化随药物浓度的增加呈不规律的变化趋势, 这可能与小檗碱与四链体结构复杂的结合模式有关, 还需要进一步探讨。见图 4。



DNA 的浓度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 4 小檗碱对 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 构型的影响
Fig. 4 Effect of berberine on conformation of KRAS promoter G-quadruplex DNA

3.5 小檗碱对 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 结构热稳定性的影响 圆二色谱变温实验可以有效地研究小檗碱对 KRAS 启动子 DNA G-四链体结构热稳定性的影响。从溶解曲线可以看出, 未与小檗碱结合时, G-四链体 DNA 呈现“S”型溶解曲线, 其溶解温度 T_m 为 $64 \text{ }^\circ\text{C}$ 。加入 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱后, DNA 的溶解曲线右移, 溶解温度 T_m 增加至 $89 \text{ }^\circ\text{C}$, 说明 G-四链体 DNA 与小檗碱结合后热稳定性显著提高。因此, 小檗碱有利于维持 KRAS 启动子 DNA 平行 G-四链体结构的热稳定性。见图 5。



DNA 浓度 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 小檗碱浓度 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

图 5 小檗碱对 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 平行构型热稳定性的影响

Fig. 5 Effect of berberine on thermal stability of parallel conformation of KRAS promoter G-quadruplex DNA

3.6 小檗碱对 SW620 细胞 KRAS mRNA 表达的影响 以 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱处理 SW620 细胞 48 h 后, 与空白组相比, KRAS mRNA 表达水平降低 ($P < 0.05$), 表明小檗碱能够抑制其 mRNA 的表达。见表 3。

表 3 小檗碱对 SW620 细胞 KRAS mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of berberine on mRNA expression of KRAS in SW620 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	KRAS/%
空白	-	100
小檗碱	100	$34.49 \pm 16.82^{1)}$

4 讨论

存在于人类染色体末端的 G-四链体 DNA 结构可以通过抑制端粒酶诱导的端粒延长阻止细胞的无限增殖,从而防治肿瘤的发生,是癌症治疗的有效靶点。除端粒 DNA 外,许多癌基因的启动子区域亦存在 G-四链体结构。TMPyP4 和血根碱可分别通过靶向 MET 启动子 G-四链体和端粒 G-四链体抑制肿瘤细胞的增殖已被报道^[16-17]。KRAS 启动子区域可以形成稳定的平行 G-四链体结构,这种结构能够抑制 KRAS 基因转录^[15, 18]。KRAS 编码的 p21 蛋白通过激活表皮生长因子受体(EGFR)通路促进细胞永生。因此, KRAS 启动子区域的 G-四链体结构能够调控与 KRAS 基因突变密切相关的肿瘤细胞的增殖。能够稳定 G-四链体结构的多环生物碱及其衍生物在体外作为端粒稳定剂,可以诱导多种肿瘤细胞的衰老和凋亡^[10, 19]。其中的典型代表分子小檗碱,能否通过稳定癌基因启动子 G-四链体结构发挥抗癌作用,值得探索。研究小檗碱与 KRAS 基因启动子区域 G-四链体 DNA 相互作用及小檗碱对 KRAS 基因转录的影响对于研究与 KRAS 基因突变高度相关的结肠癌的靶向治疗具有重要意义。

本研究在证实小檗碱能够抑制结肠癌细胞系 SW620 细胞增殖的基础上进一步借助光谱学分析方法探究了小檗碱与 KRAS 基因启动子区域 G-四链体 DNA 相互作用的分子机制。荧光滴定曲线揭示了小檗碱与 KRAS G-四链体 DNA 结合常数和结合比例,说明二者可以 1:1 结合且结合能力较强。KI 阴离子淬灭实验和荧光偏振及各向异性研究表明小檗碱与 KRAS 启动子 G-四链体 DNA 的结合模式为末端堆积和沟槽结合共存的复合结合模式。圆二色光谱研究表明在所选浓度范围内小檗碱基本能够维持 KRAS 启动子 DNA 的平行 G-四链体构型。圆二色谱变温实验证实小檗碱可以维持 KRAS 启动子平行 G-四链体结构的热稳定性。聚合酶链扩增结果表明 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 小檗碱在抑制 SW620 细胞增殖的同时可以抑制其 KRAS 基因 mRNA 的表达。因此,小檗碱与 KRAS 基因启动子区域 G-四链体

DNA 结合并维持其平行构型的热稳定性从而下调 KRAS 基因转录水平,可能为小檗碱抑制 SW620 细胞增殖的作用机制之一, KRAS 启动子 G-四链体可能成为结肠癌治疗的新靶点。

既往研究表明小檗碱对正常细胞的毒性极低^[3]。然而,在正常体细胞内小檗碱是否也能通过与 KRAS 基因启动子区域 G-四链体结合抑制其 mRNA 表达, KRAS 启动子 G-四链体作为治疗结肠癌的靶点是否具有特异性,还有待于进一步研究。本研究可为以 KRAS 启动子 G-四链体为靶点的结肠癌的治疗与药物研发提供有效参考。

[参考文献]

- [1] Lee K H, Lo H L, TANG W C, et al. A gene expression signature-based approach reveals the mechanisms of action of the Chinese herbal medicine berberine [J]. *Sci Rep*, 2014, doi: 10.1038/srep06394.
- [2] RUAN H, ZHANG Y Y, HOU J, et al. Berberine binds RXR α to suppress β -catenin signaling in colon cancer cells[J]. *Oncogene*, 2017, 36(50): 6906-6918.
- [3] WU K, YANG Q J, MU Y Q, et al. Berberine inhibits the proliferation of colon cancer cells by inactivating Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 292-298.
- [4] WANG L H, CAO H L, LU N, et al. Berberine inhibits proliferation and down-regulates epidermal growth factor receptor through activation of Cbl in colon tumor cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e56666.
- [5] Hsu W H, Hsieh Y S, KUO H C, et al. Berberine induces apoptosis in SW620 human colonic carcinoma cells through generation of reactive oxygen species and activation of JNK/p38 MAPK and FasL [J]. *Arch Toxicol*, 2007, 81(10): 719-728.
- [6] Lyons S M, Gudanis D, Coyne S M, et al. Identification of functional tetramolecular RNA G-quadruplexes derived from transfer RNAs [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 1127.
- [7] Hansel-Hertsch R, Berdi D, Lsing S V, et al. G-quadruplex structures mark human regulatory chromatin [J]. *Nat Genet*, 2016, 48(10): 1267-1272.
- [8] Moraca F, Amato J, Ortuso F, et al. Ligand binding to telomeric G-quadruplex DNA investigated by funnel-metadynamics simulations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, 114(11): E2136-E2145.
- [9] Noureini S K, Esmaili H, Abachi F, et al. Selectivity of major isoquinoline alkaloids from *Chelidonium majus*

- towards telomeric G-quadruplex: a study using a transition-FRET (t-FRET) assay[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1861(8): 2020-2030.
- [10] XIONG Y X, SU H F, LV P, et al. A newly identified berberine derivative induces cancer cell senescence by stabilizing endogenous G-quadruplexes and sparking a DNA damage response at the telomere region [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(34): 35625-35635.
- [11] Cicens J, Tamosaitis L, Kvederaviciute K, et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma[J]. *Med Oncol*, 2017, 34(2): 26.
- [12] Wachter E, Moya D, Parkin S, et al. Ruthenium complex "light switches" that are Selective for different G-quadruplex structures[J]. *Chemistry*, 2016, 22(2): 550-559.
- [13] LI X L, HU Y J, WANG H, et al. Molecular spectroscopy evidence of berberine binding to DNA: comparative binding and thermodynamic profile of intercalation[J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13(3): 873-880.
- [14] Sahoo D, Bhattacharya P, Chakravorti S. Quest for mode of binding of 2-(4-(dimethylamino)styryl)-1-methylpyridinium iodide with calf thymus DNA [J]. *J Phys Chem B*, 2010, 114(5): 2044-2050.
- [15] Cogoi S, Xodo L E. G-quadruplex formation within the promoter of the KRAS proto-oncogene and its effect on transcription [J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(9): 2536-2549.
- [16] 阎敬, 贺安宁, 郝凤进, 等. TMPyP4 对肝癌细胞 HepG2 生长抑制作用的研究 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2016, 23(12): 775-779.
- [17] 杨舒, 刘岩, 杨千帆, 等. 博落回抗肿瘤作用及诱导人体端粒 DNA 形成 G-四链体分子机制研究 [J]. *中草药*, 2011, 42(4): 738-742.
- [18] 张士伟, 李卉卉, 周江, 等. 电喷雾质谱法研究 KRAS 基因启动子区 G-四链体的形成与性质 [J]. *质谱学报*, 2015, 36(6): 521-528.
- [19] Jan J, Mondal S, Bhattacharjee P, et al. Chelerythrine down regulates expression of VEGFA, Bcl2 and KRAS by arresting G-quadruplex structures at their promoter regions[J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/srep40706.

[责任编辑 张丰丰]