

## 青龙衣多糖对结肠癌 HCT-116 细胞增殖、 凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响

胡泽成\*

(南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421000)

**[摘要]** 目的:从磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路方面探讨青龙衣多糖对结肠癌 HCT-116 细胞增殖、凋亡的影响。方法:青龙衣多糖(10,20,50,100 mg·L<sup>-1</sup>)处理处于对数生长期的 HCT-116 细胞,另设空白组,MTS 法检测 24,48,72,96 h 后的细胞增殖抑制率,PI 单染法,Annexin-FITC/PI 双染法分别检测 48 h 后细胞周期及细胞凋亡情况,蛋白质免疫印迹(Western blot)法检测 48 h 后 Akt 及 p-Akt 蛋白表达水平。结果:青龙衣多糖对 HCT-116 细胞的增殖具有明显的抑制作用,呈剂量依赖和时间依赖效应;与空白组比较,各处理组 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例增加,S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞比例下降,且各质量浓度间的差异具有统计学意义( $P < 0.05$ );与空白组比较,除 10 mg·L<sup>-1</sup> 组外,其余组早期凋亡率均有显著性增加,而各剂量组的晚期凋亡率及总凋亡率均明显升高,且各质量浓度间的凋亡率均具有统计学意义( $P < 0.05$ );与空白组比较,各给药组 p-Akt/Akt 明显降低,且各质量浓度间 p-Akt/Akt 差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论:青龙衣多糖在体外可直接抑制或杀伤人结肠癌 HCT-116 细胞,具有较强的增殖抑制及诱导凋亡能力,其抗肿瘤机制可能与 PI3K/Akt 信号通路相关。

**[关键词]** 青龙衣多糖; 结肠癌; 增殖; 凋亡; 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)18-0136-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2016180136

## Effects of Juglandis Immaturum Exocarpium Polysaccharide on Proliferation, Apoptosis and PI3K/Akt Signaling Pathway of Human Colon Carcinoma Cell Line HCT-116

HU Ze-cheng\*

(First Affiliated Hospital of Nanhua University, Hengyang 421000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effects of Juglandis Immaturum Exocarpium polysaccharide (JIP) on the proliferation, apoptosis and phosphatidylinositol 3'-OH kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway of human colon carcinoma cell line HCT-116. **Method:** The HCT-116 cells in logarithmic growth phase were treated with JIP (10, 20, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>), and another blank group was set up. The inhibition rates of proliferation at 24, 48, 72, 96 h post-treatment were measured by MTS assay. The cell cycle and apoptosis rate at 48 h post-treatment were detected by PI single staining and Annexin-FITC/PI double staining methods, and the protein levels of Akt and p-Akt at 48 h post-treatment were detected by Western blot assay. **Result:** JIP presented significant inhibitory effect on HCT-116 cell proliferation in a dose-and time-dependent manner. As compared with the blank group, the cells ratio in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase was increased and cells ratio in S phase and G<sub>2</sub>/M phase was declined with significant differences in various groups ( $P < 0.05$ ). As compared with the blank group, the early apoptosis rate of JIP in all the groups except 10 mg·L<sup>-1</sup> group was significantly increased, and the apoptosis rate of late phase and total apoptosis rate in various groups were significantly increased with statistical significance ( $P < 0.05$ ). As compared with the blank group, the ratio of p-Akt/Akt was decreased in various treatment groups, and

**[收稿日期]** 20150912(011)

**[基金项目]** 吉林省教育厅“十二五”科学技术研究项目(吉教科合字 2014 第 203 号)

**[通讯作者]** \* 胡泽成, 硕士, 主治医师, 从事胃肠道肿瘤的基础和临床研究, Tel: 13875710120, E-mail: huzecheng1981@126.com

there was statistically significant difference in ratio of p-Akt/Akt between various concentrations ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** JIP can directly inhibit or kill human colon cells HCT-116 cells *in vitro*, and present ability to inhibit proliferation and induce apoptosis. The mechanism might associated with PI3K/Akt signaling pathway.

**[Key words]** Juglandis Immaturum Exocarpium polysaccharide; colon carcinoma; proliferation; apoptosis; phosphatidylinositol 3'-OH kinase/protein kinase B

结肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一,在西方国家高居肿瘤引起死亡原因的第 2 位,在我国也位居肿瘤死因的第 4 位,并且其发病率呈逐年上升趋势<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着经济的迅猛发展,改变了人们原有的生活方式,尤其是饮食结构的变化,使结肠癌成为我国发病率增加最为迅猛的恶性肿瘤之一,严重威胁着人们的健康和生命<sup>[3]</sup>。由于患者无早期症状,较难发现,导致多数人就诊时就是晚期,已经发生了转移,从而错过了手术治疗的机会,病死率较高<sup>[4]</sup>。化疗是治疗结肠癌最为重要的手段之一,但大多数化疗药物由于其严重的毒副反应而限制了其在临床上的进一步应用<sup>[5]</sup>。寻找低毒、高效的抗肿瘤药物,是目前国内外医学界肿瘤研究的热点<sup>[6-7]</sup>。

青龙衣主产于中国北方地区,为胡桃科胡桃属植物胡桃楸的未成熟果实的外果皮,具有清热解毒,止痛止痢,祛风疗癣等功效,为传统中药材之一<sup>[8]</sup>。近年来,青龙衣抗肿瘤作用的报道较多,季宇彬等<sup>[9]</sup>的研究表明青龙的不同提取部位对 H22 细胞具有明显的抑制作用;段玉敏等<sup>[10]</sup>通过研究也进一步证实青龙衣胶囊具有抑制 S180 荷瘤小鼠肿瘤生长的作用。青龙衣的抗肿瘤成分主要为醌类、黄酮类、萜类、多酚类等小分子化合物。Wang 等<sup>[11]</sup>的研究表明青龙衣多糖在体外对 S180 细胞有一定的抑制作用,同时,可以提高小鼠细胞免疫和分子免疫应答水平。鉴于青龙衣多糖对结肠癌 HCT-116 细胞的作用及机制研究未见报道,并结合传统中医药多以青龙衣水提物治疗肿瘤的基础上,开展了青龙衣多糖对 HCT-116 细胞增殖、凋亡及 PI3K/Akt 信号通路影响的研究,以期将来为结肠癌的治疗提供一种新的可行性方案。本文以青龙衣中的多糖类成分为研究对象,探讨其对结肠癌 HCT-116 细胞增殖、凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响,为进一步的应用奠定基础。

## 1 材料

**1.1 细胞株** 人结肠癌 HCT-116 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所。

**1.2 药物及试剂** 青龙衣多糖(由南华大学药学与生物学院提供,批号 140308),MTS 试剂盒(美国

Promega 公司,批号 3410);新生牛血清及 RPMI-1640 培养液(美国 Hyclon 公司,批号分别为 1134290,1250203),Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒(美国 Biomiga 公司,批号 20150215);Akt 及 p-Akt 抗体(美国 Biolegend 公司,批号分别为 150K1027,151R0815)。

**1.3 仪器** Sunrise 型全自动酶标仪(瑞士 Tecan 公司),Himac CR21 型低温高速离心机(日本 Hitachi 公司),BD FACSCanto 型流式细胞仪(美国 BD 公司),MCO-20AIC 型 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司),BG-sub MIDI 型多用途水平电泳仪(美国 Baygene 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞复苏、传代与培养** 将冻存的结肠癌 HCT-116 细胞复苏后,37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中常规培养,培养液为 RPMI-1640 培养液(含 10% 新生牛血清,100 mg·L<sup>-1</sup> 链霉素及 100 U·mL<sup>-1</sup> 青霉素),正常换液并传代。

**2.2 MTS 法检测细胞增殖抑制率** 取处于对数生长期的结肠癌 HCT-116 细胞,经胰酶常规消化成单细胞悬液,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL(1 × 10<sup>4</sup> 个细胞);培养 24 h 待细胞贴壁后,加入青龙衣多糖,使其终质量浓度分别为 10, 20, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>,空白组加入等体积的培养液;放入恒温培养箱中继续培养,分别于培养的 24, 48, 72, 96 h 后,向每孔中加入 20 μL MTS/PMS 混合液,放于恒温培养箱中孵育 1 h,在 490 nm 波长处用酶标仪检测每孔吸光度 A。每组均设立 3 个复孔,按下述公式计算细胞增殖抑制率。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (A_{\text{空白组}} - A_{\text{给药组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$$

**2.3 PI 染色检测细胞周期** 青龙衣多糖(10, 20, 50, 100 mg·L<sup>-1</sup>)处理结肠癌 HCT-116 细胞 48 h 后,收集细胞并调整细胞密度为 1.0 × 10<sup>6</sup> 个/mL,在冰上放置 20 min,漂洗细胞后加入 PI(50 mg·L<sup>-1</sup>),4 ℃ 避光染色 0.5 h,流式细胞仪检测细胞周期,并用 Cell Quest 进行分析。

**2.4 Annexin V/PI 染色检测细胞凋亡** 取处于对数生长期的结肠癌 HCT-116 细胞,经胰酶常规消化

成单细胞悬液,接种于 6 孔培养板,每孔 2 mL( $1 \times 10^6$  个细胞);培养 24 h 待细胞贴壁后,加入青龙衣多糖,分组同上;培养 48 h 后,收集细胞,然后加入 Annexin V/FITC 和 PI 各 5  $\mu$ L,避光染色 15 min 后,流式细胞仪检测细胞早期凋亡、晚期凋亡及总凋亡情况。

**2.5 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法检测 p-Akt/Akt** 收集经 10, 20, 50, 100  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  青龙衣多糖处理 48 h 后的 HCT-116 细胞,经预冷的 PBS 漂洗后,4  $^{\circ}\text{C}$  条件下 2 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,加入细胞裂解液,BCA 法测定样本总蛋白量。每个样本取等量蛋白,加入等体积的上样缓冲液,煮沸 5 min 后,加样行 12% SDS-PAGE 电泳。电泳结束后,半干转至 PVDF 膜,加入适量 p-Akt 和 Akt 抗体(1:100),4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱放置过夜后,加入二抗(1:2 000),室温放置 2 h,增强型化学发光

试剂 (ECL) 发光试剂盒进行显色,应用 Gel-Pro analyzer 软件分析蛋白条带积分吸光度。

**2.6 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,计量资料均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析进行多组样本均数比较,采用 SNK- $q$  法进行两两比较,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 HCT-116 细胞增殖的影响** 青龙衣多糖对 HCT-116 细胞的增殖具有明显的抑制作用,随药物浓度的增加及作用时间的延长,抑制作用逐渐增强,呈剂量依赖效应和时间依赖效应。

**3.2 对 HCT-116 细胞周期的影响** 与空白组比较,各给药组  $G_0/G_1$  期细胞比例增加,S 期和  $G_2/M$  期细胞比例下降( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 青龙衣多糖对 HCT-116 细胞周期的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$G_0/G_1$	S	$G_2/M$
空白	-	43.21 $\pm$ 5.47	31.26 $\pm$ 4.41	22.20 $\pm$ 4.35
青龙衣多糖	10	46.07 $\pm$ 6.25 <sup>1)</sup>	28.79 $\pm$ 3.39 <sup>1)</sup>	19.16 $\pm$ 2.81 <sup>1)</sup>
	20	53.54 $\pm$ 5.76 <sup>1, 2)</sup>	24.25 $\pm$ 2.25 <sup>1, 2)</sup>	16.67 $\pm$ 1.34 <sup>1, 2)</sup>
	50	62.51 $\pm$ 6.87 <sup>1, 2, 3)</sup>	20.77 $\pm$ 2.08 <sup>1, 2, 3)</sup>	12.95 $\pm$ 1.92 <sup>1, 2, 3)</sup>
	100	67.82 $\pm$ 5.64 <sup>1, 2, 3, 4)</sup>	16.54 $\pm$ 1.96 <sup>1, 2, 3, 4)</sup>	9.02 $\pm$ 1.80 <sup>1, 2, 3, 4)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ;与青龙衣多糖 10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ;与青龙衣多糖 20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ;与青龙衣多糖 50  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.05$ (表 2,图 1 同)。

**3.3 对 HCT-116 细胞凋亡的影响** 与空白组比较,青龙衣多糖各剂量组的早期凋亡率均有明显增

加( $P < 0.05$ );而青龙衣多糖各剂量组的晚期凋亡率及总凋亡率均高于空白组( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 2 青龙衣多糖对 HCT-116 细胞凋亡的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	早期	晚期	总凋亡
空白	-	6.31 $\pm$ 1.23	2.33 $\pm$ 0.42	8.64 $\pm$ 1.46
青龙衣多糖	10	7.24 $\pm$ 1.62	4.12 $\pm$ 1.68 <sup>1)</sup>	11.36 $\pm$ 2.52 <sup>1)</sup>
	20	14.22 $\pm$ 3.76 <sup>1, 2)</sup>	6.63 $\pm$ 2.35 <sup>1, 2)</sup>	20.85 $\pm$ 4.69 <sup>1, 2)</sup>
	50	17.81 $\pm$ 3.96 <sup>1, 2, 3)</sup>	8.05 $\pm$ 2.82 <sup>1, 2, 3)</sup>	25.86 $\pm$ 5.08 <sup>1, 2, 3)</sup>
	100	20.38 $\pm$ 5.27 <sup>1, 2, 3, 4)</sup>	10.52 $\pm$ 2.66 <sup>1, 2, 3, 4)</sup>	30.90 $\pm$ 5.81 <sup>1, 2, 3, 4)</sup>

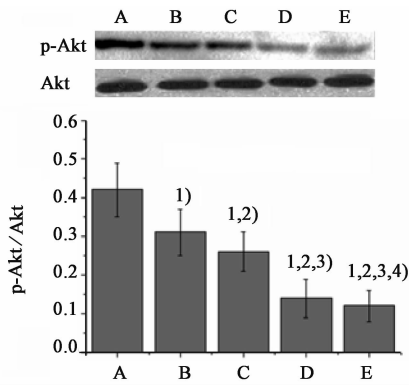
**3.4 对 HCT-116 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响** 与空白组比较,青龙衣多糖各给药组 p-Akt/Akt 明显降低,给药质量浓度越大,降低趋势越为明显( $P < 0.05$ ),表明青龙衣多糖可以抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活。见图 1。

因此,对于恶性肿瘤的治疗,一方面可以通过阻断细胞期而抑制增殖,另一方面也可以通过促进细胞凋亡而实现。结果证实,青龙衣多糖可以呈剂量和时间依赖的方式抑制 HCT-116 细胞的增殖;青龙衣多糖处理 48 h 后的 HCT-116 细胞, $G_0/G_1$  期细胞升高,而 S 期和  $G_2/M$  期细胞降低,提示青龙衣多糖可能是通过  $G_0/G_1$  期的阻滞作用而影响肿瘤细胞的增殖。

### 4 讨论

PI3K/Akt 信号通路在细胞增殖、凋亡等过程中发挥重要作用,在多种肿瘤细胞中该信号通路均处于激活状态<sup>[15]</sup>。Akt 蛋白为 PI3K/Akt 信号通路的重要组成部分之一,当该信号通路被激活时,Akt 蛋

一直以来,细胞增殖失控被认为是引起肿瘤的重要原因之一<sup>[12]</sup>。但近来年的研究发现,有些肿瘤细胞的增殖率并不高于正常细胞,其数量的无限增加是由于细胞死亡过程被阻滞而导致<sup>[13]</sup>。由此可见,肿瘤的产生不仅是由于细胞的增殖能力异常增强,同时也是由于细胞凋亡相对减少而造成的<sup>[14]</sup>。



A. 空白组; B. 青龙衣多糖 10 mg·L<sup>-1</sup> 组; C. 青龙衣多糖 20 mg·L<sup>-1</sup> 组; D. 青龙衣多糖 50 mg·L<sup>-1</sup> 组; E. 青龙衣多糖 100 mg·L<sup>-1</sup> 组

图 1 青龙衣多糖对 HCT-116 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effects of *Juglandis Immaturum Exocarpium polysaccharide* on HCT-116 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

白以磷酸化形式为主, p-Akt 的比例 (p-Akt/Akt) 显著升高<sup>[16]</sup>。研究表明, 多种化疗药物可以通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活而发挥抗肿瘤作用<sup>[17]</sup>。翟丽娜等<sup>[18]</sup>的研究表明苦参碱可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活而抑制非霍奇金淋巴瘤 Raji 细胞的增殖, 并诱导其凋亡; 徐佳等<sup>[19]</sup>研究也证实了雷公藤红素可以通过抑制 p-Akt 的表达来抑制肺癌 H1299 细胞的增殖及转移。本实验结果表明与空白组比较, 经青龙衣多糖处理后, HCT-116 细胞中 p-Akt/Akt 降低, 提示青龙衣多糖具有抑制 HCT-116 细胞 PI3K/Akt 信号通路激活的作用。

综上所述, 青龙衣多糖在体外可直接抑制或杀伤人结肠 HCT-116 细胞, 具有较强的增殖抑制及诱导凋亡能力, 其抗肿瘤机制可能与 PI3K/Akt 信号通路相关。

[参考文献]

[ 1 ] Bosetti C, Levi F, Rosato V, et al. Recent trends in colorectal cancer mortality in Europe [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(1): 180-191.  
 [ 2 ] Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2012, 62(1): 10-29.  
 [ 3 ] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69-90.  
 [ 4 ] 美国结直肠外科医师协会标准实践工作组织. 结肠癌治疗指南[J]. *中华胃肠外科杂志*, 2005, 8(3): 269-272.  
 [ 5 ] 刘洋, 尤振宇, 苏晓辉, 等. 贝伐单抗结核化疗治疗完全结肠癌的生存分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2015, 23(10): 1394-1398.  
 [ 6 ] Auyeung K K, Cho C H, Ko J K. A novel anticancer

effect of *Astragalus saponins*: Transcriptional activation of NSAID-activated gene [J]. *Int J Cancer*, 2009, 125(5): 1082-1091.  
 [ 7 ] Park E H, Kim Y J, Yamabe N, et al. Stereospecific anticancer effects of ginsenoside Rg3 epimers isolated from heat-processed American ginseng on human gastric cancer cell [J]. *J Ginseng Res*, 2014, 38(1): 22-27.  
 [ 8 ] 刘薇, 林文翰, 季宇彬. 青龙衣毒性作用及体外抗肿瘤作用的实验研究[J]. *中国中药杂志*, 2004, 29(9): 887-890.  
 [ 9 ] 季宇彬, 马宏图, 杨波, 等. 青龙衣不同提取部位的抗肿瘤作用研究[J]. *中草药*, 2004, 35(10): 1145-1147.  
 [ 10 ] 段玉敏, 张洪娟, 张志华, 等. 青龙衣胶囊在荷瘤小鼠体内抗肿瘤活性的研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(9): 125-127.  
 [ 11 ] Wang R J, Wang S, Xia Y J, et al. Antitumor effects and immune regulation activities of a purified polysaccharide extracted from *Juglan regia* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2015, 72(1): 771-775.  
 [ 12 ] Liu T, Song Y, Chen H, et al. Matrine inhibits proliferation and induces apoptosis of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2010, 33(10): 1740-1745.  
 [ 13 ] Meng X H, Lu C F, Zang G H. Spermicidal effect of alcohol extracts from different ratios of *Sophora flavescens* Ait/Chinese Bulbul *in vitro* [J]. *Nat J Androl*, 2012, 18(1): 83-87.  
 [ 14 ] 常城, 饶德利, 邱晓明, 等. 苦参碱对人结肠癌 HT29 细胞生长抑制作用的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(1): 62-65.  
 [ 15 ] Wang H, Duan L, Zou Z, et al. Activation of the PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway is involved in S100A4-induced viability and migration in colorectal cancer cells [J]. *Int J Med Sci*, 2014, 11(8): 841-849.  
 [ 16 ] Bhutani J, Sheikh A, Niazi A K. Akt inhibitors: mechanism of action and implications for anticancer therapeutics [J]. *Infect Agent Cancer*, 2013, 8(1): 49.  
 [ 17 ] Zhang X, Li X R, Zhang J. Current status and future perspectives of PI3K and mTOR inhibitor as anticancer drugs in breast cancer [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2013, 13(2): 175-187.  
 [ 18 ] 翟丽娜, 翁翔, 黄强. PI3K/Akt 通路参与苦参碱抑制 Raji 细胞增殖与凋亡过程的机制研究[J]. *中国肿瘤*, 2015, 24(6): 517-523.  
 [ 19 ] 徐佳, 伍春莲, 黄杰. 雷公藤红素通过影响 Akt 信号通路和整合素表达抑制肺癌细胞的转移[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(6): 1129-1133.

[责任编辑 周冰冰]