

重楼皂苷 I 对结肠癌 HCT116 细胞 FOXQ1 及 上皮间质转化的影响

罗燕¹, 蒋益兰¹, 李勇敏¹, 谭小宁¹, 刘佳琴², 吕元¹, 罗吉^{1*}

(1. 湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006; 2. 湖南中医药大学研究生院, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 观察重楼皂苷 I 对转录因子叉头框 Q1 (forkhead box Q1, FOXQ1) 及上皮间质转化相关因子表达的影响, 探讨重楼皂苷 I 抑制结肠癌转移的可能作用机制。方法: 用 1.25, 2.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 重楼皂苷 I 作用于结直肠癌 HCT116 细胞, 蛋白免疫印迹法 (Western blot), 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 分别检测 FOXQ1, E-钙黏蛋白 (E-cadherin), 波形蛋白 (Vimentin) 蛋白和 mRNA 表达情况。结果: 与空白组比较, 1.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 重楼皂苷 I 组 FOXQ1 蛋白和 mRNA 相对表达量降低, E-cadherin mRNA 相对表达量升高, 但差异无统计学意义; Vimentin 蛋白和 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$); E-cadherin 蛋白相对表达显著升高 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 2.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 重楼皂苷 I 组中的 FOXQ1, Vimentin 蛋白和 mRNA 相对表达量降低, E-cadherin 蛋白和 mRNA 相对表达量升高 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 1.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 重楼皂苷 I 组比较, 2.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 重楼皂苷 I 组中的 Vimentin 蛋白和 mRNA 相对表达量降低, 但差异无统计学意义; E-cadherin 蛋白和 mRNA 相对表达量升高, FOXQ1 蛋白和 mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。结论: 重楼皂苷 I 抑制结肠癌的转移, 可能与抑制 FOXQ1 的表达, 上调 E-cadherin 的表达, 降低 Vimentin 的表达相关。

[关键词] 重楼皂苷 I; 结肠癌; HCT116 细胞; 叉头框 Q1; 上皮-间质转化

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)11-0119-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201121

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200225.0939.001.html>

[网络出版日期] 2020-2-25 11:38

Effect of Polyphyllin I on Transcriptional Factor FOXQ1 and Epithelial-mesenchymal Transition in Colorectal Cancer Cell HCT116

LUO Yan¹, JIANG Yi-lan¹, LI Yong-min¹, TAN Xiao-ning¹, LIU Jia-qin², LYU Yuan¹, LUO Ji^{1*}

(1. Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine Affiliated Hospital, Changsha 410006, China; 2. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of polyphyllin I on the expressions of forkhead box Q1 (FOXQ1) and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related factors, in order to explore the possible mechanism of polyphyllin I in inhibiting the metastasis of colon cancer. **Method:** After the treatment with 1.25, 2.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ polyphyllin I on HCT116 cells, Western blot and Real-time PCR were used to detect the expressions of FOXQ1, E-cadherin, Vimentin protein and mRNA. **Result:** Compared with the blank group, relative expressions of FOXQ1 protein and mRNA in low-concentration polyphyllin I group were decreased, while relative expression of E-cadherin mRNA was increased, the differences were not statistically significant, and relative expressions of Vimentin protein and mRNA in low-concentration polyphyllin I group were decreased ($P < 0.05$), and relative expression of E-cadherin protein in low-concentration polyphyllin I group

[收稿日期] 20200207(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81774287); 中央引导地方科技发展专项(2017CT5029, 2018CT5005); 湖南省自然科学基金青年基金项目(2017JJ3186); 湖南省中医药研究院重点课题项目(201604)

[第一作者] 罗燕, 硕士, 助理研究员, 从事中西医结合防治肿瘤疾病的研究, E-mail: 125987235@qq.com

[通信作者] *罗吉, 博士, 副研究员, 从事中西医结合防治肿瘤疾病的研究, Tel: 0731-85920129, E-mail: luoji927@163.com

was increased ($P < 0.01$). Compared with the blank group, relative expressions of FOXQ1, Vimentin protein and mRNA in high-concentration polyphyllin I group were decreased, while relative expressions of E-cadherin protein and mRNA were increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with low-concentration polyphyllin I group, relative expressions of Vimentin protein and mRNA in high-concentration polyphyllin I group were decreased, but the difference was not statistically significant, relative expressions of E-cadherin protein and mRNA in high-concentration polyphyllin I group were increased, whereas relative expressions of FOXQ1 protein and mRNA were decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Mechanism of polyphyllin I inhibiting the metastasis of colon cancer may be related to the decrease of FOXQ1 and Vimentin expressions, and the up-regulation of E-cadherin.

[Key words] polyphyllin I; colon cancer; HCT116 cells; forkhead box Q1 (FOXQ1); epithelial-mesenchymal transition (EMT)

结直肠癌是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,据全球肿瘤数据统计,结直肠癌的发病率与死亡率分居恶性肿瘤的第3位和第2位^[1]。而我国结直肠癌每年新发38.8万例,死亡18.7万例,给我国人民群众造成了沉重的疾病负担^[2]。目前,60%以上的结直肠癌患者在发现时已处于晚期,多有转移性病灶,虽经手术、放疗、靶向治疗等手段综合治疗,5年生存率为8%~9%^[3-4]。重楼皂苷I (polyphyllin I)是从天然草本植物云南重楼或七叶一枝花中提取的具有抗肿瘤作用的活性物质,研究表明,其可通过阻滞肿瘤细胞的增殖,诱导细胞分化与凋亡,抗血管生成等发挥抗肿瘤的作用^[5-6]。本课题组前期实验也证实重楼皂苷I可抑制细胞生长,通过降低线粒体途径相关的细胞凋亡因子B淋巴细胞瘤-2蛋白(Bcl-2)的表达,升高B淋巴细胞瘤-2相关X蛋白(Bax)表达,并上调线粒体通路下游的含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)诱导细胞的凋亡^[7]。研究表明,转录因子叉头框Q1(FOXQ1)不仅在恶性肿瘤组织中表达升高,且其调控上皮-间质转化(EMT)是肿瘤发生侵袭转移的重要原因之一^[8-9]。但是重楼皂苷I能否通过调控FOXQ1,抑制EMT在结直肠癌中起作用尚未见报道,本实验拟从该信号通路进一步研究重楼皂苷I治疗结直肠癌的作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 人结肠癌细胞株HCT116细胞购自中国科学院上海细胞中心(编号TCHu99)。

1.2 药物 重楼皂苷I购自四川维克奇生物科技有限公司,批号wkq19051309,含量 $\geq 99.5\%$ 。

1.3 试剂 Dulbecco's modified eagle media (DMEM)培养基(美国Hyclone公司,批号AE20005267);胎牛血清(澳大利亚Cell-Box公司,批号U-02G16920-E1093);RNA提取及cDNA逆转

录试剂盒,聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(日本Takara公司,批号分别为RR047Q,RR430A);PVDF膜(美国Millipore公司,批号R8AA8000F);M-PER™哺乳动物细胞裂解液(美国Thermo Fisher公司,批号S1254449);FOXQ1抗体,二抗山羊抗兔抗体(美国Proteintech公司,批号分别为23718-1-AP,SA00001-2);E-钙黏蛋白(E-cadherin),波形蛋白(Vimentin)蛋白, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国Abcam公司,批号分别为ab40722,ab92547,ab179467)。

1.4 仪器 HERAcell2401型二氧化碳细胞培养箱(美国Thermo公司);SE300型蛋白质电泳仪,TE22型蛋白质转膜仪(美国Hoefer公司);GBOX型凝胶成像系统(美国Syngene公司),FAST480 II型实时荧光定量PCR(Real-time PCR)仪(瑞士ROCHE公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 从液氮罐内取出冻存的HCT116细胞,复苏,培养于含10%胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素和链霉素的DMEM(高糖)培养液的培养皿中,置于37℃5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱内进行培养,细胞汇合率达85%左右,胰酶消化细胞成单个细胞悬液并进行传代培养,取对数生长期的HCT116细胞进行各项实验。

2.2 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测FOXQ1, E-cadherin, Vimentin蛋白的相对表达 取对数生长期的HCT116细胞,分别加入重楼皂苷I(1.25, 2.50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),每皿10 mL,加入药物后继续培养24 h。同时设置不含药物、细胞培养液培养的空白组。M-PER™哺乳动物细胞裂解液裂解后提取总蛋白,BCA蛋白浓度测定试剂盒测定所提取的蛋白质浓度。在收集的蛋白样品中加入适量浓缩的SDS-PAGE蛋白上样缓冲液,将蛋白样品上样到SDS-

PAGE胶加样孔内,湿转法将蛋白转移到PVDF膜上,蛋白免疫印迹封闭液(含5%BSA)室温状态封闭3.5 h,分别加入FOXQ1(1:2 000),E-cadherin(1:1万),Vimentin(1:1 000), β -actin(1:1万),室温摇床孵育4 h;TBST洗涤15 min/次,洗涤3次,分别加入二抗,FOXQ1,E-cadherin,Vimentin组加入山羊抗兔(1:5 000), β -actin组加入山羊抗小鼠(1:5 000),室温摇床孵育1 h,TBST洗涤15 min次,洗涤2次,TBS洗涤15 min,加入适量增强化学发光法发光试剂,在凝胶成像仪中显影后得到蛋白条带图,软件Image J进行分析。实验重复3次。

2.3 Real-time PCR 检测 FOXQ1, E-cadherin, Vimentin mRNA 的表达 酚-三氯甲烷法提取高、低浓度重楼皂苷 I 组、空白组细胞总 RNA,进行 RNA 定量分析,按 cDNA 逆转录试剂盒说明书进行总 RNA 逆转录实验,逆转录条件:37 °C 30 min,85 °C 20 s,-20 °C 保存。以 cDNA 为模板,与基因特异性引物,通过 PCR 扩增 FOXQ1, E-cadherin, Vimentin, 扩增条件:94 °C 30 s,1 个循环;94 °C 5 s,59 °C 30 s,40 个循环;95 °C 2 s,60 °C 15 s,95 °C 2 s,1 个循环;50 °C 保存。检测分析解离曲线,确保只有单一产物被扩增;以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,利用 $\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{目的基因}}} - \Delta C_{t_{\text{内参基因}}}$; $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{最低样本}}} - \Delta C_{t_{\text{其他样本}}}$, $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$ 对被扩增基因进行相对定量分析,引物序列见表1。实验重复3次。

2.4 统计学分析 采用 GraphPad prism 6 软件进行统计分析,计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据进行正态分布检验及组间方差齐性检验,符合正态分布及方差齐性,采用单因素方差分析,并采用最小显著性差异法(LSD)进行两两比较;不符合正态分布、方差分析,采用 Kruskal-Wallis H 进行统计处理。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

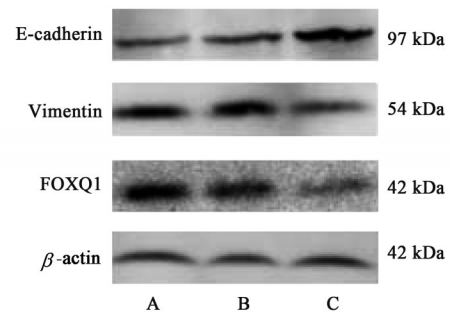
3.1 重楼皂苷 I 作用于各组 HCT116 细胞中 FOXQ1, E-cadherin, Vimentin 蛋白表达的影响 与

表1 引物序列

Table 1 Primer list

引物	序列(5'-3')	扩增片段长度/bp
FOXQ1	ATTCTTGCTATTGACCGATGC CCCAAGGAGACCACAGTTAGAG	236
E-cadherin	CTACTGTAAATGACACATCTC TGCCAGTTTCTGCATCTTGC	252
Vimentin	CCTGAACCTGAGGGAAACTAA GCAGAAAGGCACTTGAAAGC	245
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGT GAAGATGGTGATGGGATTTC	226

空白组比较,低浓度重楼皂苷 I 组 Vimentin 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白相对表达量显著升高($P < 0.01$);高浓度重楼皂苷 I 组中的 Vimentin 蛋白相对表达量明显降低($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白相对表达量显著升高,FOXQ1 蛋白相对表达量显著降低($P < 0.01$);与低浓度重楼皂苷 I 组比较,高浓度重楼皂苷 I 组 E-cadherin 蛋白相对表达量明显升高($P < 0.05$),FOXQ1 蛋白相对表达量显著降低($P < 0.01$)。见图1,表2。



A. 空白组; B. 低浓度重楼皂苷 I 组; C. 高浓度重楼皂苷 I 组

图1 重楼皂苷 I 作用于各组 HCT116 细胞后 FOXQ1, E-cadherin, Vimentin 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of FOXQ1, E-cadherin, Vimentin protein expression after polyphyllin I acting on HCT116 cells of three groups

表2 重楼皂苷 I 对 FOXQ1, E-cadherin, Vimentin 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of polyphyllin I on expressions of FOXQ1, E-cadherin and Vimentin($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	FOXQ1/ β -actin	E-cadherin/ β -actin	Vimentin/ β -actin
空白	-	1.053 \pm 0.055	1.023 \pm 0.025	1.070 \pm 0.062
重楼皂苷 I	1.25	0.963 \pm 0.021	1.153 \pm 0.035 ²⁾	0.950 \pm 0.030 ¹⁾
	2.50	0.720 \pm 0.040 ^{2,4)}	1.523 \pm 0.175 ^{2,3)}	0.863 \pm 0.051 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与低浓度重楼皂苷 I 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表3同)。

3.2 重楼皂苷 I 对细胞 FOXQ1, E-cadherin, Vimentin mRNA 相对表达的影响 与空白组比较, 低浓度重楼皂苷 I 组 Vimentin mRNA 表达降低 ($P<0.05$); 高浓度重楼皂苷 I 组中的 FOXQ1,

Vimentin mRNA 表达降低, E-cadherin mRNA 表达升高 ($P<0.01$)。与低浓度重楼皂苷 I 组比较, 高浓度重楼皂苷 I 组 E-cadherin mRNA 相对表达升高 ($P<0.05$), FOXQ1 mRNA 表达降低 ($P<0.01$)。见表 3。

表 3 重楼皂苷 I 对 FOXQ1, E-cadherin, Vimentin mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of polyphyllin I on mRNA expressions of FOXQ1, E-cadherin and Vimentin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	FOXQ1	E-cadherin	Vimentin
空白	-	1.010 \pm 0.010	1.057 \pm 0.056	1.035 \pm 0.049
重楼皂苷 I	1.25	0.957 \pm 0.032	1.107 \pm 0.103	0.823 \pm 0.065 ¹⁾
	2.50	0.720 \pm 0.046 ^{2,4)}	1.373 \pm 0.068 ^{2,3)}	0.767 \pm 0.045 ²⁾

4 讨论

EMT 是指上皮细胞在某些因素作用下, 失去细胞极性和黏附特性, 而获得侵袭性和游走迁移能力, 并产生大量细胞外基质, 抑制细胞凋亡的病理生理过程。与胚胎发育、器官形成和纤维化、肿瘤进展等密切相关^[10-11]。在癌细胞中的 EMT 标记因子 E-cadherin, Vimentin 受到来源于肿瘤微环境的细胞外刺激以及肿瘤内物理应激的异常调节, 使肿瘤细胞适应人类肿瘤环境的不断变化, 提高肿瘤细胞的迁移和侵袭能力, 是促进肿瘤细胞转移的关键过程^[12-13]。

FOXQ1 作为一类转录因子, 属于叉头框 (FOX) 转录因子家族, 位于 6p23-25 号染色体上, 在细胞周期、凋亡、代谢、免疫和肿瘤发生中起重要作用^[14]。FOXQ1 可通过调控 EMT 的相关表达因子影响肿瘤的转移, GUO 等^[8] 沉默胃癌细胞中的 FOXQ1 基因后, 发现肿瘤相关巨噬细胞中 Vimentin 的表达下降, E-cadherin 的表达升高, 以此影响肿瘤微环境, 抑制胃癌细胞的转移。彭旭东等^[9] 沉默结肠癌 SW480 细胞中的 FOXQ1 基因后, 发现其可导致 SW480 细胞的上皮标志因子 E-cadherin 表达显著增高, 而间质细胞标志因子 N-cadherin, Vimentin, 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 表达降低。

重楼皂苷 I 作为重楼的甙体皂苷成分之一, 具有较好的抗肿瘤活性, 诸多研究表明, 重楼皂苷 I 主要通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导细胞凋亡等途径在肝癌、结肠癌、卵巢癌等恶性肿瘤发挥治疗作用^[15-17]。本研究为了进一步明确重楼皂苷 I 抑制结肠癌的作用机制, 检测了与转移密切相关的 EMT 相关因子, 并证实其受转录因子 FOXQ1 的调控, 阐释重楼皂苷 I 抑制结肠癌转移的机制可能与抑制转录因子 FOXQ1 的表达, 升高 E-cadherin 的表达, 降

低 Vimentin 的表达, 逆转 EMT 过程有关。

[参考文献]

- [1] PHD B B M F, ME F J, PHD S M M I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] 孙可欣, 郑荣寿, 张思维, 等. 2015 年中国分地区恶性肿瘤发病和死亡分析 [J]. 中国肿瘤, 2019, 28 (1): 1-11.
- [3] ZHANG F, ZHANG Y Y, ZHAO W W, et al. Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review [J]. Oncotarget, 2017, 8 (21): 35460-35472.
- [4] 杨宇飞. 晚期结直肠癌中西医并重中国治疗方案的思考与探索 [J]. 中国中西医结合杂志, 2019, 39 (1): 15-17.
- [5] 钱芳芳, 阙祖俊, 田建辉. 重楼皂苷的抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. 癌症进展, 2018, 16 (14): 1709-1712.
- [6] XIAO T, ZHONG W L, ZHAO J M, et al. Polyphyllin I suppresses the formation of vasculogenic mimicry via Twist1/VE-cadherin pathway [J]. Cell Death Dis, 2018, 9 (9): 906.
- [7] 罗吉, 罗燕, 李勇敏, 等. 重楼皂苷 I 对结肠癌 HCT116 细胞凋亡及 Bax, Bcl-2, Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24 (6): 172-176.
- [8] GUO J, YAN Y, YAN Y, et al. Tumor-associated macrophages induce the expression of FOXQ1 to promote epithelial-mesenchymal transition and metastasis in gastric cancer cells [J]. Oncol Rep, 2017, 38 (4): 2003-2010.
- [9] 彭旭东, 魏正强, 彭红霞, 等. 沉默 FOXQ1 可逆转

- SW480细胞的上皮-间质转化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2014, 30(11): 1133-1140.
- [10] NIETO M A, HUANG R Y J, JACKSON R A, et al. EMT: 2016[J]. Cell, 2016, 166(1): 21-45.
- [11] TRUNG V, PRAN K. Regulation of EMT in colorectal cancer: a culprit in metastasis[J]. Cancers (Basel), 2017, 9(12): 171-182.
- [12] ZHANG J J, ZHU L Y, FANG J Y, et al. LRG1 modulates epithelial-mesenchymal transition and angiogenesis in colorectal cancer via HIF-1 α activation [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2016, 35(1): 29-35.
- [13] SANTAMARIA P G, MORENO-BUENO G, PORTILLO F, et al. EMT: Present and future in clinical oncology [J]. Mol Oncol, 2017, 11(7): 718-738.
- [14] YING L, WANG H Q, WANG A C H, et al. Overexpression of FOXQ1 correlates with poor prognosis in papillary thyroid carcinoma [J]. Clin Endocrinol (Oxf), 2019, 90(2): 334-342.
- [15] FONSECA S G. Role of the death receptor and endoplasmic reticulum stress signaling pathways in polyphyllin I -regulated apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 1-11.
- [16] YU S, WANG L J, CAO Z X, et al. Anticancer effect of Polyphyllin I in colorectal cancer cells through ROS-dependent autophagy and G₂/M arrest mechanisms [J]. Nat Prod Res, 2018, 32(12): 1489-1492.
- [17] GU L H, FENG J G, ZHENG Z G, et al. Polyphyllin I inhibits the growth of ovarian cancer cells in nude mice [J]. Oncol Lett, 2016, 12(6): 4969-4974.

[责任编辑 张丰丰]