

厚朴酚衍生物 CT2-3 对结肠癌细胞的抑制作用及其机制

黄小飞¹, 陈子德², 陶成^{3*}, 陈健^{1,2*}

(1. 广州中医药大学基础医学院, 广州 510006;

2. 暨南大学中西医结合博士后流动站, 广州 510632; 3. 深圳市老年医学研究所, 广东深圳 518020)

[摘要] 目的:研究厚朴酚衍生物CT2-3对结肠癌细胞的抑制作用及其机制,为CT2-3在治疗结肠癌中的应用奠定基础。方法:体外培养SW480和LoVo细胞,不同浓度(10,20,40,80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)CT2-3和厚朴酚分别干预24,48 h,采用细胞增殖-毒性检测(CCK-8)法检测CT2-3和厚朴酚对结肠癌细胞增殖的影响;采用平板克隆形成实验检测CT2-3对结肠癌细胞克隆形成能力的影响;进一步采用流式细胞术和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测CT2-3对结肠癌细胞凋亡和DNA损伤标志物磷酸化组蛋白H2AX(γH2AX)蛋白表达的影响;采用活性氧(ROS)试剂盒检测CT2-3对结肠癌细胞内ROS产生的影响;最后用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测CT2-3对结肠癌细胞内线粒体凋亡相关基因Bcl-2和Bcl-2相关X基因(Bax)表达的影响。结果:给药24,48 h,厚朴酚对两株结肠癌细胞SW480和LoVo的半数抑制浓度(IC_{50})均 $>80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,CT2-3对SW480细胞的 IC_{50} 分别为(54.59 \pm 1.73) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和(29.82 \pm 1.13) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,对LoVo细胞的 IC_{50} 分别为(66.68 \pm 2.11) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和(46.70 \pm 1.81) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;与空白组比较,CT2-3(20,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组结肠癌细胞克隆形成能力显著下降($P<0.01$),且呈浓度依赖性。CT2-3组凋亡细胞显著增加($P<0.01$), γH2AX 蛋白相对表达显著增加($P<0.01$);CT2-3组细胞内ROS水平显著增加($P<0.01$);CT2-3组细胞Bcl-2 mRNA相对表达显著下调($P<0.01$),Bax mRNA相对表达显著上调($P<0.01$)。结论:CT2-3对结肠癌细胞具有显著抑制作用,其机制可能是通过激活Bcl-2/Bax信号通路使线粒体功能受损,促进ROS的产生,进一步诱导DNA损伤,从而导致结肠癌细胞凋亡。

[关键词] 厚朴酚;厚朴酚衍生物CT2-3;结肠癌;细胞凋亡;活性氧

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)23-0113-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202122

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200820.0943.001.html>

[网络出版日期] 2020-8-20 14:14

Inhibitory Effect of Magnolol Analogue CT2-3 on Colon Cancer Cells and Its Mechanism

HUANG Xiao-fei¹, CHEN Zi-de², TAO Cheng^{3*}, CHEN Jian^{1,2*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 2. Integrated Chinese and Western Medicine Postdoctoral Research Station, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Shenzhen Institute of Geriatrics, Shenzhen 518020, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-colon cancer effect and mechanism of magnolol analogue CT2-3, in order to lay a foundation for the application of CT2-3 in anti-colon cancer area. **Method:** Colon cancer cells SW480 and LoVo were cultured *in vitro*. Different concentrations (10, 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of CT2-3 and magnolol were used to stimulate colon cancer cells for 24, 48 h. The effect of CT2-3 and magnolol on the cell viability of colon cancer cells was detected by cell counting kit (CCK-8). Colony formation assay was used to detect the colony formation capacity of CT2-3 on colon cancer cells. Flow cytometry and Western blot

[收稿日期] 20200331(013)

[基金项目] 广东省基础与应用基础研究基金区域联合基金项目(2019A1515110874);中国博士后科学基金项目(2019M663396)

[第一作者] 黄小飞,在读硕士,从事中医药抗肿瘤研究,E-mail:535434113@qq.com

[通信作者] *陶成,博士,助理研究员,从事有机合成、天然产物全合成和结构修饰研究,E-mail:taoch09@lzu.edu.cn;

*陈健,博士,助理研究员,从事抗肿瘤新药研究,E-mail:chenjian@jnu.edu.cn

were used to determine the effect of CT2-3 on the apoptosis of colon cancer cells and the expression of DNA damage marker phosphorylated histone H2AX (γ H2AX). Reactive oxygen species (ROS) generation was measured by ROS assay kit. Real time quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the effect of CT2-3 on expressions of mitochondrial apoptosis-related genes B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X (Bax) in colon cancer cells. **Result:** The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of magnolol in two kinds of colon cancer cells after treatment for 24, 48 h were both higher than $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. While the IC_{50} of CT2-3 in SW480 cells after treatment for 24, 48 h were $(54.59\pm 1.73) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $(29.82\pm 1.13) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. The IC_{50} of CT2-3 in LoVo cells after treatment for 24, 48 h were $(66.68\pm 2.11) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $(46.70\pm 1.81) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Compared with the blank group, the colony formation capacity of colon cancer cells in CT2-3 groups ($20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was significantly decreased in a dose-dependent manner ($P<0.01$), apoptotic colon cancer cells were significantly increased ($P<0.01$), relative expression of DNA damage marker γ H2AX was significantly increased ($P<0.01$), ROS was significantly increased ($P<0.01$). In addition, relative mRNA expression of Bcl-2 was significantly decreased ($P<0.01$), while relative mRNA expression of Bax was significantly increased ($P<0.01$). **Conclusion:** CT2-3 can remarkably inhibit colon cancer cells, and the underlying mechanism might be that CT2-3 promotes mitochondria dysfunction and ROS generation by regulating expressions of mitochondrial apoptosis-related genes, so as to further induce DNA damage and finally lead to apoptosis.

[**Key words**] magnolol; magnolol analogue CT2-3; colon cancer; apoptosis; reactive oxygen species (ROS)

结直肠癌(CRC)是消化系统常见的恶性肿瘤之一,同时也是世界范围内第三大恶性肿瘤^[1]。近年来,我国结直肠癌的发生率和死亡率呈逐渐升高趋势,并已成为我国第四大致命癌症,其致死率仅次于肺癌、肝癌和胃癌^[2]。目前,临床上结肠癌的治疗主要有手术、放疗和化疗等手段,其中化疗作为一种疗效显著的治疗手段,在结肠癌的治疗中发挥着重要的作用。然而,化疗药物治疗常伴随严重的副作用及并发症,影响患者预后^[3-4]。此外,长期使用化疗药物治疗结肠癌容易产生耐药性,且相关机制尚不明确^[5-6]。因此,探寻有效治疗结肠癌的手段迫在眉睫。

厚朴酚(magnolol)是常用中药厚朴的主要活性成分之一,于1973年由日本学者从原药材中分离获得,此后国内外学者对厚朴酚展开了诸多研究^[7]。既往研究证实厚朴酚具有多种生物活性,其中包括抗炎^[8]、抗氧化^[9]、抗肿瘤^[10]等。虽然厚朴酚的抗肿瘤活性并不突出,但其天然结构为其类似物的结构修饰提供了重要参考,因此也备受科学家的青睐。以厚朴酚为先导化合物进行结构修饰的化合物也表现出良好的生物活性^[11-12]。CT2-3是以厚朴酚为先导化合物进行结构修饰所得到的厚朴酚衍生物,化学结构式见图1,是本课题组新合成的化合物。本课题组曾报道CT2-3具有抑制非小细胞肺癌的作

用^[13],但其抑制结肠癌细胞的活性尚未报道。本研究发现CT2-3对结肠癌细胞也具有明显的抑制作用,并初步探讨了其作用机制,为CT2-3的进一步开发利用奠定基础。

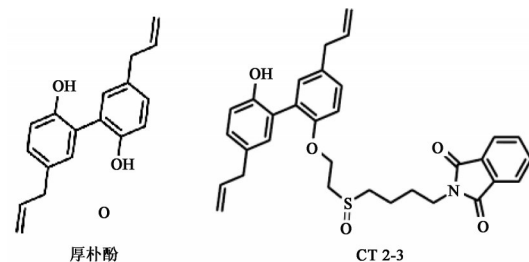


图1 厚朴酚和CT2-3的结构式

Fig. 1 Structures of magnolol and CT2-3

1 材料

1.1 细胞 SW480细胞(CCL-228), LoVo细胞(CCL-229),均购于美国ATCC公司;细胞培养传至第5代。

1.2 药物 CT2-3(本课题组合成);厚朴酚,购自安耐吉化学公司,批号E1003380250,纯度>95%。

1.3 试剂 胎牛血清, RPMI 1640培养基,青-链霉素, 0.25%胰蛋白酶(美国Gibco公司,批号分别为42Q9281K, 8119124, 2076676, 2048080);二甲基亚砜(DMSO,美国Sigma公司,批号RNBH0539);细胞增殖-毒性检测(CCK-8)试剂盒(大连美仑生物技

术有限公司,批号 MA0218-L-Apr-25E);RNAiso Plus, PrimeScript RT Master Mix, TB Green Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)(日本 Takara 公司,批号分别为 108-95-2, AHF1307A, AI53168A);无水乙醇(广州化学试剂厂,批号 20180802);4%多聚甲醛(广州瑞舒生物科技有限公司,批号 MA0192-May-28E);吉姆萨染液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号 AR-0752);Pierce BCA protein assay kit(美国 Thermo 公司,批号 SL260211);ECL 发光液(美国 Millipore 公司,批号 1723301);硝酸纤维素(NC)膜,活性氧检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0011, S0033);甲醇(上海麦克林生化科技有限公司,批号 20190101-19); $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH 6.8), $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl(pH 8.8), 十二烷基硫酸钠(SDS), 蛋白酶抑制剂混合物, RIPA Lysis Buffer, PMSF(杭州弗德生物科技有限公司,批号分别为 20180825, 20180805, 1030C0610, 516D003, 20180801, 2060120);Tris(广州赛国生物科技有限公司,批号 ZE160912313);氯化钠(天津市大茂化学试剂厂,批号 20190502);甘氨酸(上海麦克林生化科技有限公司,批号 C10197701);30%丙烯酰胺,过硫酸铵(天骏生物科技有限公司,批号分别为 YJ017-2, 0486);Annexin V/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(杭州联科生物技术股份有限公司,批号 70-AT101);脱脂奶粉(美国 BD 公司,批号 8964872);鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin, 美国 Proteintech 公司,批号 60008-1-Ig);兔抗 H2AX, 兔抗磷酸化组蛋白 H2AX(γ H2AX), Anti-Rabbit 免疫球蛋白(Ig)G H&L 辣根过氧化物酶(HRP)二抗(美国 CST 公司,批号分别为 7631T, 9718S, 7074S);Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP)二抗(Abcam 公司,批号 ab6789)。

1.4 仪器 H1850R 型高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);SC-04 型低速离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司);AE2000 型倒置生物显微镜(Motic 公司);HF90(HT)型细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司);1300 SERIES A2 型生物安全柜(美国 Thermo 公司);SpectraMax190 型光吸收酶标仪(Molecular Devices 公司);ME304E/02 型电子天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);T100 Thermal Cycler 梯度 PCR 仪, CFX96 Optic Module 型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪, 1645050 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);Tanon-5200 型化学发光凝胶成像仪(上海天能科技

有限公司);NanoDrop one 型核酸蛋白定量仪(美国 Thermo 公司);DK-98-II 型电热恒温水浴锅(天津市泰斯特仪器有限公司);FY20001-R0 型超纯水机(青岛富勒姆科技有限公司);DW-86L578J 型-86 °C 超低温冰箱(中国海尔公司);LSRFortessa 型细胞流式分析仪(美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 药物溶解 称取适量厚朴酚和 CT2-3 粉末,分别加入相应体积的 DMSO 溶液,充分溶解成浓度为 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液,存放于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$,用细胞培养液稀释母液至所需工作浓度,现配现用。

2.2 CCK-8 法检测结肠癌细胞增殖 取对数生长期的 SW480 和 LoVo 细胞,以 5.0×10^3 个细胞/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板中,设空白组(不加药),CT2-3 组($10, 20, 40, 80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)共 5 组,每组 6 个复孔。孵育过夜后,空白组更换培养液,CT2-3 组分别给予 CT2-3 终浓度为 $10, 20, 40, 80\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养液。分别孵育 24, 48 h,每孔加入 CCK-8 检测试剂 $10\text{ }\mu\text{L}$,继续在培养箱中孵育 2 h,然后用光吸收酶标仪测定 450 nm 处吸光度 A 。以空白组细胞生存率为 100%,计算其他组的细胞生存率。

2.3 平板克隆形成实验测定结肠癌细胞克隆形成能力 取对数生长期的 SW480 和 LoVo 细胞,以 300 个/孔的密度接种于 6 孔细胞培养板中,设空白组,CT2-3 组($20, 40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)共 3 组,每组 3 个复孔。孵育过夜后,空白组更换培养液,CT2-3 组分别给予 CT2-3 终浓度为 $20, 40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养液,每隔 3 d 更换相应的培养液以维持给药浓度,给药 12 d,终止培养。弃去培养液,加入 4%多聚甲醛固定细胞 15 min,用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,每孔加入吉姆萨染色液 $800\text{ }\mu\text{L}$,染色 20 min,然后用流水缓慢洗去染色液,室温干燥,拍照并计数每孔细胞克隆数。以空白组细胞克隆成率为 100%,计算其他组的细胞克隆形成率。

2.4 流式细胞术检测结肠癌细胞凋亡 取对数生长期的 SW480 和 LoVo 细胞,以 3.0×10^5 个细胞/孔接种于 6 孔细胞培养板,设空白组,CT2-3 组($40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)共 2 组,每组 3 个复孔。孵育过夜后,空白组更换培养液,CT2-3 组给予 CT2-3 终浓度为 $40\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的培养液。干预 24 h 后收集细胞,根据细胞凋亡检测试剂盒说明书进行染色,并用流式细胞仪检测凋亡细胞。

2.5 蛋白免疫印迹法(Wester blot)检测结肠癌细胞 DNA 损伤标志物 γ H2AX 蛋白表达 取对数生长

期的SW480和LoVo细胞,以 3.0×10^5 个/孔接种于6孔细胞培养板,设空白组和CT2-3组($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)共2组。孵育过夜后,空白组细胞更换培养液,CT2-3组给予CT2-3终浓度为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液。干预24 h后收集细胞,提取总蛋白并用BCA法检测蛋白浓度,然后用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行蛋白分离。蛋白电泳后,将蛋白电转移至NC膜,然后用5%的脱脂奶粉室温封闭2 h,再分别加入H2AX(1:1 000), γ H2AX(1:1 000)和 β -actin一抗(1:1 000),4 °C孵育过夜。次日用 $1 \times \text{TBST}$ 洗膜,然后分别加入山羊抗小鼠IgG二抗(1:2 000)或山羊抗兔IgG二抗(1:2 000),摇床上室温孵育1 h, $1 \times \text{TBST}$ 洗膜后根据ECL试剂盒说明书进行曝光,蛋白条带用Image J软件分析灰度值,以 β -actin为内参计算目的蛋白相对表达量。

2.6 检测结肠癌细胞ROS产生 取对数生长期的SW480和LoVo细胞,以 5.0×10^3 个细胞/孔接种于96孔细胞培养板中,设空白组和CT2-3($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组共2组。孵育过夜,空白组细胞更换培养液,CT2-3组给予CT2-3终浓度 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 培养液。干预24 h,每孔加入 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的DCFH-DA,孵育30 min,然后在荧光显微镜下观察和拍照,以空白组细胞ROS荧光强度为参照,计算干预组细胞ROS相对荧光强度。

2.7 Real-time PCR检测结肠癌细胞线粒体凋亡相关基因表达 取对数生长期的SW480和LoVo细胞,以 3.0×10^5 个/孔接种于6孔细胞培养板,设空白组和CT2-3($40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组共2组。孵育过夜后,空白组细胞更换培养液,CT2-3组给予CT2-3终浓度为 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的培养液。干预24 h后收集细胞,并提取总RNA。每孔加入RNAiso Plus 1 mL,裂解5 min后将细胞裂解液转至1.5 mL离心管,每管加入三氯甲烷200 μL ,剧烈震荡15 s后室温静置5 min。4 °C, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min;吸取上清液450 μL 转移至另一新的1.5 mL离心管,每管加入异丙醇450 μL ,室温静置10 min,然后4 °C, $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min;弃上清,每管加入75%乙醇1 mL,然后4 °C, $7\ 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心5 min;弃上清,室温干燥2~5 min,加入RNase-free水10~30 μL 溶解,并检测总RNA质量和浓度。按照反转录试剂盒说明书,将总RNA反转录成cDNA,通过Real-time PCR扩增目的基因。引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成,见表1。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析目的基因相对表达水平。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Bcl-2	上游 CTGTGGATGACTGAGTACC	131
	下游 TTCAGAGACAGCCAGGAG	
Bax	上游 GGCTGGACATTGGACTTC	229
	下游 ACGCATTATAGACCACATCT	
β -actin	上游 AGCGAGCATCCCCAAAGTT	285
	下游 GGGCACGAAGGCTCATCATT	

2.8 统计学方法 应用SPSS 19.0软件包进行统计学分析。所有计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,并采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CT2-3对结肠癌细胞增殖的影响 与空白组比较,不同浓度CT2-3干预24,48 h,2株结肠癌细胞SW480和LoVo细胞增殖抑制率均发生明显改变,且与CT2-3浓度和干预时间之间存在明显的剂量-效应和时间-效应关系。进一步计算厚朴酚和CT2-3对2株结肠癌细胞24,48 h的 IC_{50} 发现,厚朴酚对2种结肠癌细胞24,48 h的 IC_{50} 均 $> 80 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;CT2-3对SW480 24,48 h的 IC_{50} 分别为(54.59 ± 1.73), (29.82 ± 1.13) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;对LoVo 24,48 h的 IC_{50} 分别为(66.68 ± 2.11), (46.70 ± 1.81) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上表明,CT2-3能显著抑制结肠癌细胞的增殖,且对结肠癌细胞的抑制作用显著强于其先导化合物厚朴酚。见表2,3。

表2 CT2-3与厚朴酚对结肠癌SW480细胞增殖的抑制作用($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Inhibitory effect of CT2-3 and magnolol on proliferation of colon cancer SW480 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞抑制率/%	
		24 h	48 h
空白	-	0.00 \pm 2.01	0.00 \pm 1.87
CT2-3	10	7.14 \pm 2.40	17.06 \pm 2.78 ¹⁾
	20	15.26 \pm 3.83 ¹⁾	35.30 \pm 3.67 ²⁾
	40	44.23 \pm 4.41 ²⁾	74.94 \pm 4.89 ²⁾
	80	73.12 \pm 5.81 ²⁾	95.32 \pm 5.04 ²⁾
厚朴酚	10	1.04 \pm 0.82	3.22 \pm 1.12
	20	3.21 \pm 1.54	6.35 \pm 2.24
	40	9.84 \pm 4.19	18.19 \pm 3.78 ¹⁾
	80	21.33 \pm 4.58 ²⁾	38.28 \pm 4.53 ²⁾

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

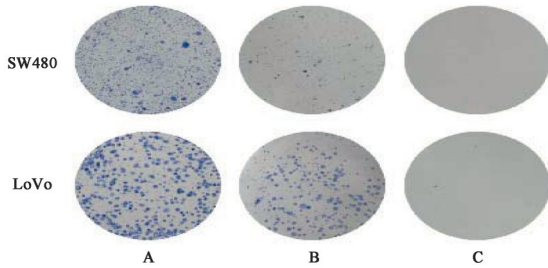
3.2 CT2-3对细胞克隆形成能力的影响 与空白组比较,CT2-3(20,40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组2株结肠癌细胞

表3 CT2-3与厚朴酚对结肠癌LoVo细胞增殖抑制的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Inhibitory effect of CT2-3 and magnolol on proliferation of colon cancer LoVo cells ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞抑制率/%	
		24 h	48 h
空白	-	0.00±1.72	0.00±2.05
CT2-3	10	5.23±2.44	11.43±2.31
	20	12.32±3.78	27.38±3.43 ²⁾
	40	32.21±5.04 ²⁾	52.28±4.67 ²⁾
	80	60.09±5.78 ²⁾	78.19±5.18 ²⁾
厚朴酚	10	1.14±0.78	2.06±1.01
	20	2.67±1.35	5.09±1.43
	40	9.14±3.62	14.32±3.46 ¹⁾
	80	19.71±4.11 ¹⁾	30.03±4.19 ²⁾

SW480和LoVo的克隆形成率显著降低($P<0.01$),且与其浓度之间存在明显的剂量-效应关系,随着CT2-3浓度的增加,其抑制结肠癌细胞克隆形成的效果增强。见图2,表4。



A.空白组;B,C.CT2-3(20,40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组

图2 CT2-3对结肠癌细胞克隆形成能力的影响

Fig. 2 Effect of CT2-3 on colony formation capacity of colon cancer cells

表4 CT2-3对结肠癌细胞克隆形成能力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of CT2-3 on colony formation capacity of colon cancer cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	克隆形成率/%	
		SW480	LoVo
空白	-	100.00±8.84	100.00±8.61
CT2-3	20	25.64±6.34 ¹⁾	56.49±10.85 ¹⁾
	40	2.27±1.49 ¹⁾	7.79±3.51 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.01$ (表5-9同)。

3.3 CT2-3对结肠癌细胞凋亡的影响 与空白组比较,CT2-3(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组结肠癌细胞SW480和LoVo凋亡显著增加($P<0.01$)。表明CT2-3可明显诱导结肠癌细胞凋亡。见表5。

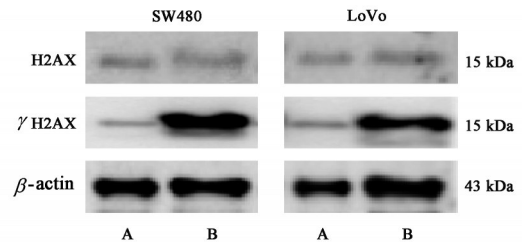
3.4 CT2-3对结肠癌细胞DNA损伤标志物 γH2AX

表5 CT2-3对结肠癌细胞凋亡的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of CT2-3 on apoptosis of colon cancer cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞凋亡率/%	
		SW480	LoVo
空白	-	5.42±3.28	2.83±1.62
CT2-3	40	38.13±5.81 ¹⁾	25.31±4.43 ¹⁾

蛋白表达的影响 与空白组比较,CT2-3(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组结肠癌细胞SW480和LoVo的DNA损伤标志物 γH2AX 蛋白表达均显著上调($P<0.01$),见图3,表6。该结果表明,CT2-3可以促进H2AX磷酸化形成 γH2AX ,诱导结肠癌细胞DNA损伤,激活DNA损伤信号通路。



A.空白组;B.CT2-3组(图4同)

图3 CT2-3作用结肠癌细胞 γH2AX 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of CT2-3 on γH2AX expression of colon cancer cell

表6 CT2-3对结肠癌细胞 γH2AX 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of CT2-3 on γH2AX expression of colon cancer cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$\gamma\text{H2AX}/\beta\text{-actin}$	
		SW480	LoVo
空白	-	1.00±0.18	1.00±0.12
CT2-3	40	6.95±1.32 ¹⁾	3.18±0.63 ¹⁾

3.5 CT2-3对结肠癌细胞ROS产生的影响 与空白组比较,CT2-3组(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)能显著增加2株结肠癌细胞SW480和LoVo的ROS产生($P<0.01$),其中CT2-3对SW480细胞ROS产生的促进效果比LoVo稍强。表明CT2-3可以显著促进结肠癌细胞ROS的产生。见图4,表7。

3.6 CT2-3对结肠癌细胞线粒体凋亡相关基因表达的影响 与空白组比较,CT2-3(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组结肠癌细胞SW480和LoVo的线粒体凋亡相关Bcl-2 mRNA相对表达量均显著下调($P<0.01$),而Bax mRNA相对表达量均显著上调($P<0.01$),表明CT2-3可以调控结肠癌细胞线粒体凋亡Bcl-2/Bax信号通路。见表8,9。

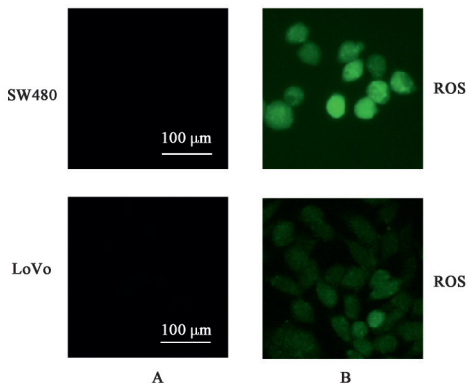


图4 CT2-3对结肠癌细胞ROS产生的影响(DCFH-DA染色, ×200)

Fig. 4 Effect of CT2-3 on ROS generation of colon cancer cells (DCFH-DA staining, ×200)

表7 CT2-3对结肠癌细胞ROS产生的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of CT2-3 on ROS generation of colon cancer cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	ROS相对荧光强度	
		SW480	LoVo
空白	-	1.00±0.12	1.00±0.08
CT2-3	40	5.45±0.93 ¹⁾	3.01±0.54 ¹⁾

表8 CT2-3对结肠癌SW480细胞线粒体凋亡相关基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of CT2-3 on mitochondrial apoptosis-related gene expression in colon cancer SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Bcl-2相对表达	Bax相对表达
空白	-	1.00±0.08	1.00±0.05
CT2-3	40	0.32±0.09 ¹⁾	2.20±0.21 ¹⁾

表9 CT2-3对结肠癌LoVo细胞线粒体凋亡相关基因表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of CT2-3 on mitochondrial apoptosis-related gene expression in colon cancer LoVo cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Bcl-2相对表达	Bax相对表达
空白	-	1.00±0.06	1.00±0.09
CT2-3	40	0.58±0.08 ¹⁾	1.84±0.12 ¹⁾

4 讨论

结肠癌因其高发生率和死亡率而备受关注,过去数10年,结肠癌的治疗取得了一定的进展。然而,随着治疗结肠癌的手段局限性的进一步显露,如化疗药物具有较大的毒副作用,且容易产生耐药性等^[5],因此探寻治疗结肠癌的有效手段依然是势在必行。

CT2-3是通过修饰其先导化合物厚朴酚所得到

的单体化合物,并表现出良好的抑制肺癌的生物活性,且无明显的细胞毒性作用^[13]。基于此,本研究推测CT2-3可能具有发展成为广谱的抗肿瘤化疗药的潜力。本研究发现,CT2-3可以明显抑制2株结肠癌细胞SW480和LoVo的增殖,且抑制效果明显强于其先导化合物厚朴酚。此外,本研究也证实,CT2-3可以明显促进2株结肠癌细胞SW480和LoVo的凋亡,其中SW480更为敏感。DNA损伤诱导剂是目前最有效的化疗药物之一,很多化疗药物如顺铂和依托泊苷等通过诱导DNA损伤而破坏DNA的功能,进而诱导细胞凋亡^[14-15]。本研究进一步探讨CT2-3促进结肠癌细胞凋亡的作用机制发现,CT2-3可以明显促进2株结肠癌细胞SW480和LoVo的DNA损伤标志物 γH2AX 的表达,说明CT2-3激活了结肠癌细胞DNA损伤信号通路。

ROS是有氧代谢产生的一类活性含氧分子的总称。正常情况下,细胞可维持正常的氧化还原平衡状态,而在病理情况下,ROS的产生则会显著增加,细胞内的氧化还原平衡将会被破坏,从而造成细胞内氧化应激。肿瘤细胞内ROS水平较正常细胞高,且其对ROS的敏感性较高。ROS在肿瘤的发生和发展过程扮演着重要的角色,而过多的ROS可作为不利因素抑制肿瘤的发生和发展过程。研究表明,提高肿瘤细胞内ROS水平有助于药物发挥抗肿瘤作用。因此,开发新的可以促进肿瘤细胞ROS产生的药物已经成为目前抗肿瘤研究的热点之一。很多抗肿瘤药物如顺铂和紫杉醇等可通过直接或间接诱导ROS的产生,进而诱导肿瘤细胞凋亡和自噬而发挥抗肿瘤作用^[16-17]。本课题组最近报道,蜜橘黄素可通过诱导ROS的产生调控自噬和焦亡,进而导致卵巢癌细胞凋亡^[18]。

本研究已经证实,CT2-3可以通过诱导结肠癌细胞DNA损伤,进而促进结肠癌细胞凋亡。为了进一步探讨CT2-3的促进肿瘤凋亡的作用机制,本研究发现CT2-3干预2株结肠癌细胞后,结肠癌细胞ROS的产生明显增加,且对CT2-3较为敏感的结肠癌细胞株SW480产生的ROS量比LoVo多。该结果与CT2-3促进结肠癌细胞凋亡效果一致,说明CT2-3促进肿瘤凋亡很可能是通过诱导ROS产生实现的。研究发现,线粒体功能受损是导致ROS过度产生的主要原因之一^[19]。于是,本研究进一步检测了线粒体凋亡信号通路中重要的2个基因Bcl-2和Bax的表达情况。结果发现,在2株结肠癌细胞中Bcl-2 mRNA表达下调,而Bax mRNA表达上调,说

明CT2-3促进结肠癌细胞凋亡很可能是通过激活线粒体凋亡信号通路实现的。

总而言之,本研究发现厚朴酚衍生物CT2-3具有显著抑制结肠癌细胞的活性,其作用机制可能是通过激活Bcl-2/Bax信号通路,导致线粒体功能受损,从而增加ROS的产生,进一步诱导DNA损伤,最终促进结肠癌细胞凋亡。该发现为CT2-3在抗结肠癌中的开发利用奠定了基础,具有重要的科学意义。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, GODING S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(3):145-164.
- [2] MD C P W, MPH Z R, PHD D B P, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] JEE S H, MOON S M, SHIN U S, et al. Effectiveness of adjuvant chemotherapy with 5-FU/leucovorin and prognosis in stage II colon cancer [J]. J Korean Soc Coloproctol, 2011, 27(6): 322-328.
- [4] PHIPPS A I, SHI Q, LIMBURG P J, et al. Alcohol consumption and colon cancer prognosis among participants in north central cancer treatment group phase III trial N0147 [J]. Int J Cancer, 2016, 139(5): 986-995.
- [5] CHEN H P, LEE Y K, HUANG S Y, et al. Phthalate exposure promotes chemotherapeutic drug resistance in colon cancer cells [J]. Oncotarget, 2018, 9(17): 13167-13180.
- [6] XIE Z Y, WANG F F, XIAO Z H, et al. Overexpressing microRNA-34a overcomes ABCG2-mediated drug resistance to 5-FU in side population cells from colon cancer via suppressing DLL1 [J]. J Biochem, 2020, 167(6):557-564.
- [7] ZHANG Y, TANG F. Advance in latest studies on pharmacological effects of magnolol [J]. Chin J Chin Meter Med, 2012, 37(23): 3526-3530.
- [8] ZHOU F, JIANG Z, YANG B, et al. Magnolol exhibits anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat model of intracerebral haemorrhage [J]. Brain Behav Immun, 2019, 77: 161-167.
- [9] SUBRAMANIYAN S, ALUGOJU P, SJ S, et al. Magnolol protects *Saccharomyces cerevisiae* antioxidant-deficient mutants from oxidative stress and extends yeast chronological life span [J]. FEMS Microbiol Lett, 2019, 366(8): fnz065
- [10] CHEI S, OH H J, SONG J H, et al. Magnolol suppresses TGF-beta-induced epithelial-to-mesenchymal transition in human colorectal cancer cells [J]. Front Oncol, 2019, 9: 752.
- [11] OUFENSOU S, SCHERM B, PANI G, et al. Honokiol, magnolol and its monoacetyl derivative show strong anti-fungal effect on *Fusarium* isolates of clinical relevance [J]. PLoS One, 2019, 14(9): e0221249.
- [12] KUMAR S, GURU S K, PATHANIA A S, et al. Autophagy triggered by magnolol derivative negatively regulates angiogenesis [J]. Cell Death Dis, 2013, 4: e889.
- [13] CHEN J, TAO C, HUANG X, et al. CT2-3, a novel magnolol analogue suppresses NSCLC cells through triggering cell cycle arrest and apoptosis [J]. Bioorg Med Chem, 2020, 28(6): 115352.
- [14] SEARS C R, COONEY S A, CHIN-SINEX H, et al. DNA damage response (DDR) pathway engagement in cisplatin radiosensitization of non-small cell lung cancer [J]. DNA Repair (Amst), 2016, 40: 35-46.
- [15] LI X, LIU W, WANG H, et al. Rap1 is indispensable for TRF2 function in etoposide-induced DNA damage response in gastric cancer cell line [J]. Oncogenesis, 2015, 4: e144.
- [16] XUE D F, PAN S T, HUANG G, et al. ROS enhances the cytotoxicity of cisplatin by inducing apoptosis and autophagy in tongue squamous cell carcinoma cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2020, 122: 105732.
- [17] REN X, ZHAO B, CHANG H, et al. Paclitaxel suppresses proliferation and induces apoptosis through regulation of ROS and the Akt/MAPK signaling pathway in canine mammary gland tumor cells [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(6): 8289-8299.
- [18] ZHANG R, CHEN J, MAO L, et al. Nobiletin triggers reactive oxygen species-mediated pyroptosis through regulating autophagy in ovarian cancer cells [J]. J Agric Food Chem, 2020, 68(5): 1326-1336.
- [19] LIOU G Y, STORZ P. Reactive oxygen species in cancer [J]. Free Radic Res, 2010, 44(5): 479-496.

[责任编辑 张丰丰]