

藤梨根对 RKO 结肠癌细胞失巢凋亡的作用

胡兵^{1,2*}, 沈克平¹, 史秀峰³, 邓珊^{1,2}, 魏蒙蒙^{1,2}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院肿瘤科, 上海 200032;

2. 上海中医药大学附属龙华医院, 中医肿瘤研究所, 上海 200032;

3. 上海中医药大学附属龙华医院药剂科, 上海 200032)

[摘要] **目的:**观察藤梨根对人结肠癌 RKO 细胞悬浮生长及失巢凋亡作用。**方法:**200~800 mg·L⁻¹藤梨根作用于 RKO 细胞, CCK-8 (CCK-8) 法检测藤梨根对 RKO 细胞悬浮生长作用, 双嵌入剂乙锭均二聚物 (EthD-1) 染色检测失巢凋亡, 比色法检测半胱天冬酶-3 (caspase-3) 活性, 2-7-二氯化荧光素乙二脂染色法结合荧光酶标仪检测细胞内活性氧的产生。**结果:**200~800 mg·L⁻¹藤梨根可显著抑制 RKO 悬浮生长, 呈剂量依赖性 ($P < 0.01$)。200~800 mg·L⁻¹藤梨根作用后悬浮生长 RKO 细胞吸收 EthD-1 散发红色荧光, 部分细胞可见核碎裂, 呈现凋亡形态改变; 藤梨根组 EthD-1 荧光吸光度与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$)。终质量浓度 200~800 mg·L⁻¹藤梨根可显著增强 RKO 细胞 caspase-3 活性以及细胞内活性氧的产生 ($P < 0.01$)。**结论:**藤梨根可抑制 RKO 细胞悬浮生长, 促使 RKO 细胞发生失巢凋亡, 可能与活化 caspase-3 以及升高细胞内活性氧水平相关。

[关键词] 结肠癌; 藤梨根; 失巢凋亡; 半胱天冬酶-3; 活性氧

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0242-04

[doi] 10.11653/syfyj2013160242

Root of *Actinidia chinensis* Planch Induces Anoikis in Colon Carcinoma RKO Cells

HU Bing^{1,2*}, SHEN Ke-ping¹, SHI Xiu-feng³, DENG Shan^{1,2}, WEI Meng-meng^{1,2}

(1. Department of Oncology, Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 200032, China;

2. Institute of TCM in Oncology, Longhua Hospital,

Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China;

3. Department of Pharmacy, Longhua Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200032, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Tengligen (root of *Actinidia chinensis* Planch) on cell growth in suspension and anoikis in human colon carcinoma RKO cells. **Method:** RKO cells were treated with Tengligen (200-800 mg·L⁻¹) or same volume of RPMI1640. Cell growth in suspension was detected with CCK-8 assay. Anoikis was visualized by EthD-1 staining. Caspase-3 activities were detected by colorimetric assay. Intracellular reactive oxygen species (ROS) production was observed by 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate staining. **Result:** 200-800 mg·L⁻¹ of Tengligen, significantly inhibited RKO cell growth in suspension in a dose dependent manner ($P < 0.01$). After 200-800 mg·L⁻¹ of treatment, EthD-1 was absorbed by suspension-cultured RKO cells to yield a red-fluorescent nuclear staining, and nuclear fragmentation was observed in partial cells. The

[收稿日期] 201210 16(007)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81273726);上海市西部开发科技合作项目(11495801300);上海市中医药事业三年行动计划首批重大项目(ZYSNXD-CC-ZDYJ017);国家中医管理局中医肿瘤重点学科合作项目(LHZLK-1107);上海中医药大学杏林学者项目及龙华医院国家中医临床研究基地“龙医团队、龙医学者”项目(LYTD-04)

[通讯作者] * 胡兵, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事肿瘤生物学与抗癌中药作用及配伍研究, Tel:021-64385700, E-mail: beearhu@hotmail.com

EthD-1 fluorescence in 200-800 mg·L⁻¹ of Tengligen treated RKO cells were compared with controls ($P < 0.01$). 200-800 mg·L⁻¹ of Tengligen also activated caspase-3 and upregulated intracellular ROS generation ($P < 0.01$).

Conclusion: Tengligen could inhibit RKO cell growth in suspension, induce anoikis in RKO cells, and may associate with caspase-3 activation and ROS production.

[**Key words**] colon carcinoma cell; root of *Actinidia chinensis*; anoikis; caspases-3; reactive oxygen species

抗癌中药的使用已成为中医肿瘤临床重要的治疗手段,研究抗癌中药的作用特性具有重要意义^[1]。藤梨根是中医肿瘤临床常用中药,其主要成分包括多糖、熊果酸、齐墩果酸等,藤梨根具有抗氧化、抗癌以及抗血管生成等药理作用^[2-3];已证实藤梨根在大肠癌、胃癌、肺癌等多种肿瘤中具有抗癌作用^[4-7],但藤梨根对悬浮肿瘤细胞的作用缺乏研究。本研究在大肠癌细胞模型中观察了藤梨根对悬浮生长大肠癌细胞的作用,以期为临床用药及进一步研究提供基础。

1 材料

1.1 药材 藤梨根由龙华医院中药房提供,批号 2012040506,产地 江苏,上海华浦中药饮片有限公司;藤梨根由龙华医院药剂科许丽雯副主任药师鉴定,为猕猴桃科植物中华猕猴桃 *Actinidia chinensis* Planch 的干燥根。

1.2 细胞株与试剂 人结肠癌细胞株 RKO(购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库),CytoSelect™ 24-Well Anoikis Assay(批号 11665,美国 Cell Biolabs 公司),Cell Counting Kit-8(CCK-8,批号 DL765,[东仁化学科技(上海)有限公司],poly-HEMA(批号 SLBB4988V,美国 Sigma Aldrich 公司);Caspase-3 活性检测试剂盒(批号 313323,美国 Promega 公司),活性氧检测试剂盒(批号 0402261212,江苏碧云天生物技术研究所)。

1.3 仪器 NAPCO-5410 型二氧化碳培养箱(美国 Napco 公司),Thermo Varioskan 型酶标仪(美国 Thermo 公司),Olympus 1×70 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 中药制备 参考文献方法制备中药^[8],藤梨根 300 g 加 8 倍量水,浸泡 1 h,煎煮 2 次,每次 30 min,纱布粗滤去渣,合并滤液、浓缩,18 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清加入等体积乙醇,4℃ 过夜;18 000 r·min⁻¹ 离心 30 min,取上清液冰冻干燥,称重,无血清 RPMI 1640 溶解,调浓度至 400 g·L⁻¹,依次 0.45,0.22 μm 滤器过滤除菌,1 mL 分装,4℃ 保

存备用。

2.2 细胞悬浮生长检测 1×10⁴ 个对数生长期 RKO 细胞接种于 poly-HEMA 包被 96 孔板,根据预实验结果接种后第 2 天加入终质量浓度 200~800 mg·L⁻¹ 藤梨根或等体积 RPMI 1640,每组 3 个复孔;药物作用 24 h 后加入 10 μL CCK-8,37℃ 反应 2 h,酶标仪 450 nm 波长检测各孔吸光度(A),计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验组}} / A_{\text{对照组}} \times 100\%$$

2.3 失巢凋亡检测 1×10⁵ 个对数生长期 RKO 细胞接种于 poly-HEMA 包被 24 孔板,接种后第 2 天加入不同质量浓度中药或等体积 RPMI 1640,每组 3 个复孔;药物作用 24 h 后加入 1 μL EthD-1,37℃ 反应 1 h,荧光酶标仪检测 A(激发波长 525 nm,发射波长 590 nm),荧光显微镜下观察细胞形态。

2.4 caspase-3 活性检测 1×10⁶ 个对数生长期 RKO 细胞接种于 poly-HEMA 包被直径 6 cm 培养皿,接种后第 2 天加入不同质量浓度中药或等体积 RPMI 1640,每组 3 个样本;药物作用 24 h 后收集细胞,按操作说明书采用酶底物法检测 caspase-3 活性。

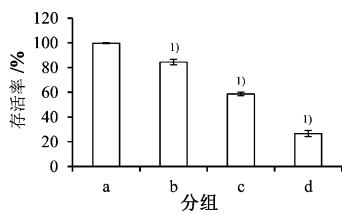
2.5 活性氧检测 5×10⁵ 对数生长期 RKO 细胞接种细胞于 poly-HEMA 包被 6 孔板,接种后第 2 天加入不同浓度中药或等体积 RPMI 1640,空白组不作处理,每组 3 个样本;药物作用 24 h 后收获细胞,加入含 DCFH-DA 探针(10 μmol·L⁻¹)的无血清 RPMI1640,37℃ 孵育 20 min 后,酶标仪测各孔 A(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)。

2.6 统计学分析 采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单向方差分析,组间两两比较用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对 RKO 细胞悬浮生长影响 200~800 mg·L⁻¹ 藤梨根可显著抑制 RKO 细胞悬浮生长,与对照组比较差异显著($P < 0.01$)。见图 1。

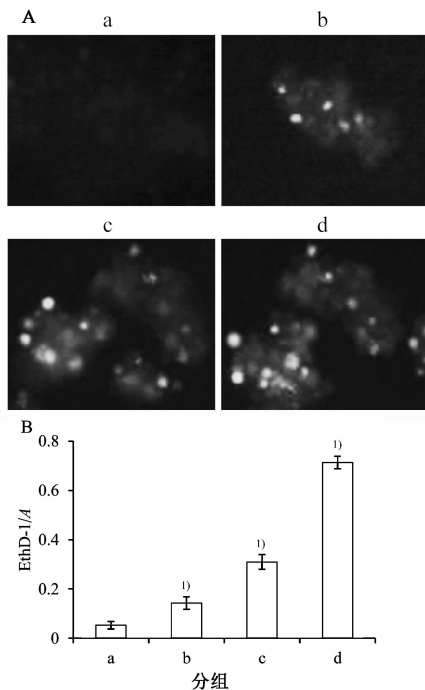
3.2 对 RKO 失巢凋亡作用的影响 200~800 mg·



a. 对照组; b. 藤梨根 200 mg·L⁻¹组;
c. 藤梨根 400 mg·L⁻¹组; d. 藤梨根 800 mg·L⁻¹组;
与对照组比较¹⁾P < 0.01 (图 2~4 同)

图 1 藤梨根对 RKO 细胞悬浮生长影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

L⁻¹藤梨根作用后 RKO 细胞可吸收 EthD-1 呈现红色荧光,部分细胞可见核碎裂,藤梨根不同剂量组荧光吸光度(A)与对照组比较差异显著(P < 0.01),提示藤梨根可促 RKO 细胞失巢凋亡。见图 2。



A. 荧光显微镜下细胞形态(EthD-1 染色, × 200);
B. EthD-1 吸光度(A)

图 2 不同剂量藤梨根对 RKO 细胞失巢凋亡影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 对 RKO 细胞 caspase-3 活性影响 200 ~ 800 mg·L⁻¹藤梨根可以显著增强悬浮生长 RKO 细胞 caspase-3 活性(P < 0.01)。见图 3。

3.4 对 RKO 细胞内活性氧水平影响 200 ~ 800 mg·L⁻¹藤梨根可以显著升高悬浮生长 RKO 细胞内 ROS 水平,藤梨根不同剂量组荧光 A 与对照组比较差异显著(P < 0.01)。见图 4。

4 讨论

上皮细胞需要胞外基质上提供存活信号,脱离胞外基质黏附细胞将发生凋亡,即失巢凋亡

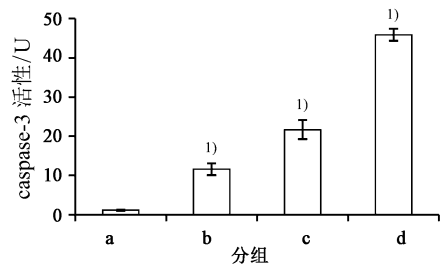


图 3 藤梨根对 RKO 细胞 caspase-3 活性影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

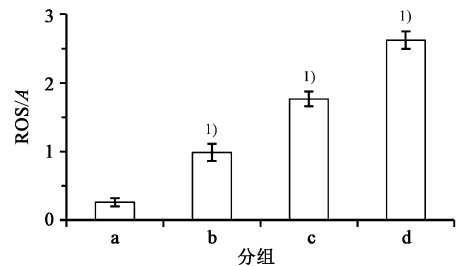


图 4 藤梨根对 RKO 细胞 ROS 生成影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

(anoikis),anoikis 是 1 个希腊词汇,原意无家可归(homelessness);失巢凋亡现象由 Frish 等于 1994 年首次发现。上皮来源肿瘤细胞在血液或淋巴循环中的存活与失巢凋亡耐受相关。肿瘤细胞由于基因表达或活性异常而获得一定程度的失巢凋亡耐受,使得部分肿瘤细胞可以在血液或淋巴循环中存活,最终导致肿瘤转移,失巢凋亡已成为肿瘤治疗新的靶标^[9-10]。

poly-HEMA 是一种无毒阴离子聚合物,具有均匀的非离子特性,铺在培养皿底部,可阻止细胞贴壁,使细胞只能悬浮生长,本研究结果显示藤梨根可以抑制结肠癌细胞在 poly-HEMA 包被板中的生长,提示藤梨根对悬浮生长结肠癌细胞具有抗癌作用。EthD-1 (Ethidium homodimer) 是一种核酸荧光染料, EthD-1 可以进入破损细胞结合核酸,呈现红色荧光信号,但不能渗透活细胞,因此常用作死亡细胞的荧光染色指示剂; CytoSelect™ 24-Well Anoikis Assay 试剂盒以 EthD-1 为标记,结合细胞在 poly-HEMA 包被板悬浮生长检测细胞失巢凋亡。本研究 EthD-1 染色显示藤梨根作用后部分 RKO 细胞吸收 EthD-1 呈现红色荧光,部分细胞还可见核碎裂,提示藤梨根可以促使 RKO 细胞失巢凋亡。

失巢凋亡是一种特殊形式的凋亡,失巢凋亡也是由 caspase 级联反应介导的。上皮细胞与胞外基质黏附后经整合素介导,形成 Focal adhesion plaque,促使黏着斑激酶(FAK)构象变化而活化。FAK 下游信号转导与 MAPK, PI3K-AKT 等信号通路有关。

细胞脱离基质黏附后 FAK 到 MAPK 信号转导受到抑制,致使细胞凋亡分子调控失常,活化 caspases^[10-11]。与细胞凋亡一样,失巢凋亡也可以通过内源或外源通路,分别活化 caspase-9 或 caspase-8,进而激活细胞凋亡执行蛋白酶 caspase-3,引发失巢凋亡。本研究发现藤梨根可以活化悬浮状态 RKO 细胞 caspase-3,提示藤梨根对 RKO 细胞失巢凋亡作用与 caspase-3 活性相关。

ROS 是细胞在有氧代谢过程中产生一系列活性氧簇,细胞内 ROS 水平变化可以引起肿瘤细胞一系列与细胞增殖、凋亡相关信号通路的变化,提高细胞内 ROS 水平可活化细胞内 caspases 活性,诱导肿瘤细胞凋亡^[12]。ROS 是中药活化 caspase 信号通路,介导抗癌作用的重要机制,已发现大黄素、姜黄素等中药组分可以通过提高细胞内 ROS 水平促使肿瘤细胞失巢凋亡^[13-14]。本研究发现藤梨根作用后 RKO 细胞内 ROS 水平显著升高,提示藤梨根对 RKO 细胞失巢凋亡作用可能还与 ROS 相关。

综上所述,本研究结果显示藤梨根可以抑制 RKO 细胞悬浮生长,促 RKO 失巢凋亡,同时活化 RKO 细胞 caspase-3,提升 RKO 细胞内 ROS 水平;本研究提示藤梨根对悬浮生长状态结肠癌细胞作用敏感,值得进一步研究。

[参考文献]

[1] 杜琴,胡兵,沈克平. 抗癌中药配伍研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13):232.

[2] Zuo L L, Wang Z Y, Fan Z L, et al. Evaluation of antioxidant and antiproliferative properties of three actinidia (actinidia kolomikta, actinidia arguta, actinidia chinensis) extracts *in vitro* [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(5):5506.

[3] 邸学,王海波,翟延君,等. HPLC 测定藤梨根中熊果酸、齐墩果酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(1):66.

[4] 陈永杰,史仁杰. 藤梨根提取物对大肠癌 LoVo 细胞增殖的抑制作用及诱导凋亡的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(18):1657.

[5] 附舰,陈光伟,刘理礼,等. 藤梨根提取物对人胃癌 MKN-45 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2011, 19(1):20.

[6] 孙雪飞,裴艳涛,杨国涛,等. 藤梨根提取物对肺癌 A549 细胞凋亡及细胞周期的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(20):4001.

[7] 阮叶萍,郭建友. 藤梨根和益气补肾口服液的体内抗肿瘤作用比较[J]. 中国实验方剂学杂志, 2007, 13(4):41.

[8] 沈克平,胡兵,刘威. 四藤方对 Bel-7402 细胞增殖和凋亡作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(2):120.

[9] Coates J M, Galante J M, Bold R J. Cancer therapy beyond apoptosis: autophagy and anoikis as mechanisms of cell death [J]. J Surg Res, 2010, 164(2):301.

[10] Simpson C D, Anyiwe K, Schimmer A D. Anoikis resistance and tumor metastasis [J]. Cancer Lett, 2008, 272(2):177.

[11] Chiarugi P, Giannoni E. Anoikis: a necessary death program for anchorage-dependent cells [J]. Biochem Pharmacol, 2008, 76(11):1352.

[12] Circu M L, Aw T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 48(6):749.

[13] Cai J, Niu X, Chen Y, et al. Emodin-induced generation of reactive oxygen species inhibits RhoA activation to sensitize gastric carcinoma cells to anoikis [J]. Neoplasia, 2008, 10(1):41.

[14] Pongrakhananon V, Nimmanit U, Luanpitpong S, et al. Curcumin sensitizes non-small cell lung cancer cell anoikis through reactive oxygen species-mediated Bcl-2 downregulation [J]. Apoptosis, 2010, 15(5):574.

[责任编辑 李玉洁]