

丹皮酚对大肠癌细胞增殖、凋亡及自噬的影响

程 玉 李 明 谭诗云 周中银

摘 要 **目的** 观察丹皮酚(Paeonol)对大肠癌细胞增殖、凋亡及自噬的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法** 用不同浓度的丹皮酚(0、30、60、120mg/L)在体外处理大肠癌 LoVo 细胞,分别用 CCK-8 比色法、PI/Annexin V 双染法、蛋白质印迹法检测 LoVo 细胞活力、细胞凋亡率、细胞凋亡相关蛋白(Bax 和 Bcl-2)及自噬相关基因蛋白(Atg5、LC3-Ⅱ和 Beclin1)的表达情况。**结果** 通过丹皮酚处理后,CCK-8 比色法显示丹皮酚以剂量、时间依赖的方式抑制 LoVo 细胞的增殖;PI/Annexin V 双染后流式细胞仪检测显示,随着药物浓度的增加,LoVo 细胞凋亡率也逐渐增加;免疫印迹结果显示,LoVo 细胞凋亡相关蛋白 Bax 蛋白表达增加,抗凋亡相关蛋白 Bcl-2 蛋白的表达降低;此外,丹皮酚能上调 LoVo 细胞自噬相关基因 Atg5、LC3-Ⅱ和 Beclin1 蛋白的表达。**结论** 丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞有明显的抗增殖和促凋亡作用,其机制可能是通过诱导细胞自噬实现的。

关键词 丹皮酚 大肠癌 增殖 凋亡 自噬

中图分类号 R574

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.10.031

Effects of Paeonol on Cell Proliferation, Apoptosis and Autophagy in Colorectal Cancer Cells. Cheng Yu, Li Ming, Tan Shiyun, et al. Department of Gastroenterology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430060, China

Abstract **Objective** To observe the effects of paeonol on the cell proliferation, apoptosis and autophagy in colorectal cancer cells and explore the possible mechanisms. **Methods** The LoVo cells were treated with paeonol at different concentrations (0, 30, 60 and 120mg/L) respectively at different time. The proliferation of LoVo cells was measured by CCK-8 assay. Apoptosis was detected by PI/Annexin V staining. Western blot were used for Bax, Bcl-2, Atg5, LC3-Ⅱ and Beclin1 protein analysis. **Results** From the data of CCK-8, the cell proliferation of LoVo cells was inhibited by paeonol in a dose-dependent and time-dependent manner. After treated with paeonol, the apoptosis rate of LoVo cells increased. The treatment with paeonol promoted the expression of pro-apoptotic factor Bax, and suppressed the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2. Paeonol could promoted the expressions of Atg5, LC3-Ⅱ and Beclin1 protein. **Conclusion** Paeonol could inhibit the cell proliferation and induce the cell apoptosis of LoVo cells, which may be associated with promotion of autophagy.

Key words Paeonol; Colorectal cancer; Proliferation; Apoptosis; Autophagy

在全球恶性肿瘤中,大肠癌的发生率位居第4位,病死率位居第2位,每年有超过120万新增病例,并有超过60万病例死亡^[1,2]。外科手术是目前最有效的治疗方法,而对于大肠癌晚期患者,放、化疗则是主要的治疗手段。尽管抗肿瘤治疗不断取得进展,但进展期大肠癌的总体疗效仍不尽如人意。常规传统的化疗药物毒性不良反应较大,对患者生活质量影响也较大,患者耐受差,因此,需要积极探索新的治疗手段。自噬是广泛存在于真核细胞内利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,是细胞应对

恶劣环境的生存机制^[3-5]。经研究证实,自噬与肿瘤的发生、增殖、侵袭转移等关系密切^[6]。

丹皮酚(paeonol)是一种从牡丹中分离出来的天然酚类化合物,具有多种功效。其药理学活性广泛,镇静催眠、抗炎、抗肿瘤、肝肾保护、降低血糖、免疫调节、心血管保护、抗菌、解热镇痛、抗过敏、抑制血小板聚集和中枢抑制等作用^[7-11]。本研究拟观察丹皮酚对大肠癌细胞增殖、凋亡及自噬的影响,并探讨其可能的作用机制。

材料与方法

1. 药品试剂:丹皮酚[宁波天真药业有限公司(纯度>98%)]；AnnexinV/PI试剂盒(德国 Bender 公司)；胎牛血清(美国 Gibco 公司)；DMEM/F-12 培养液及蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究)；CCK-8 试剂盒(上海同仁化学研究所)；细胞培养瓶、细胞培养皿、96 孔及 6 孔培养板(美国 Cor-

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金资助项目(2042017kf0092);湖北省自然科学基金资助项目(2019CFB142)

作者单位:430060 武汉大学人民医院消化内科(程玉、李明、谭诗云、周中银);430060 武汉,消化系统疾病湖北省重点实验室(李明、谭诗云、周中银)

通讯作者:李明,电子信箱:liming870221@sina.com

ning 公司); Bcl-2、Bax、自噬相关基因 Atg5、LC3 - II 和 Beclin1 蛋白及内参 β -actin 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司); 辣根酶标记山羊抗兔或山羊抗鼠 IgG(武汉博士德生物科技有限公司)。

2. 实验细胞: 大肠癌 LoVo 细胞(中国科学院上海细胞库)。主要仪器: Cytotflex 流式细胞仪(美国 Beckman 公司)、Enspire 多功能酶标分析仪(美国 PerkinElmer 公司)、MCO-170MUVL 培养箱(日本 Panasonic 公司)、GloMax 20/20 型发光检测仪(美国 Promega 公司)、LYNX 6000 冷冻高速离心机(美国 Thermo 公司)。实验分组: 本实验分为实验组、空白组、对照组, 实验组和空白组分别加入浓度为 0、30、60、120、240mg/L 的丹皮酚, 对照组不加丹皮酚。

3. 细胞处理: 大肠癌 LoVo 细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM/F-12 培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 饱和湿度条件的恒温箱中孵育, 选取处于对数生长期的细胞, 消化离心洗涤后重悬。根据不同检测方法调整细胞接种浓度及培养时间。

4. CCK-8 法检测细胞活力: 将上述处理后的大肠癌 LoVo 细胞按 5×10^4 /ml 接种于 96 孔板, 每孔 200 μ l, 培养 24h 至细胞贴壁。将上述贴壁细胞分别加入实验组和空白组中继续培养 24、48 和 72h。到达预定时间后, 每孔加入 20 μ l 的 CCK-8 试剂, 待培养液显色, 用酶标仪测定各孔在 450nm 处的吸光度值(A 值), 根据公式计算细胞存活率(%) = (实验组 A 值 - 空白组 A 值)/(对照组 A 值 - 空白组 A 值) $\times$ 100%, 以细胞存活率表示细胞增殖情况。

5. 流式细胞仪检测细胞凋亡率: 按 1×10^5 /ml 浓度将大肠癌 LoVo 接种至 6 孔板内, 每孔 2ml, 直至细胞贴壁。将贴壁后的细胞加入不同实验分组中, 处理 48h 后收集细胞, 均加入 500 μ l 缓冲液进行重悬。各实验分组中分别加入 PI 及 Annexin V 试剂 5 μ l, 避光室温孵育 15min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

6. 蛋白质印迹法检测凋亡及自噬相关蛋白: 用 200 μ l 预冷的含 PMSF 的蛋白裂解液裂解上述细胞, 用移液器反复抽吸后震荡、离心, 将上清液移至经高压消毒的 EP 管内。各组中取 40 μ g 等量蛋白行 SDS-PAGE 电泳, 转膜至 PVDF 膜, 用 5% BSA 封闭, 依据蛋白分子量进行相应切割, 加入一抗, 于室温下孵育, 2h 后再次洗膜、显色、显影。根据蛋白测定试剂盒说明书检测蛋白质浓度并计算蛋白质含量, 采用蛋白质印迹法检测蛋白质表达情况。

7. 统计学方法: 采用 SPSS 17.0 统计学软件对数

据进行统计分析, 所有计量数值进行正态性检验, 均为正态分布, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两样本间均数比较采用独立样本 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞增殖的抑制作用: 经不同浓度丹皮酚处理 LoVo 细胞, 分别于 24、48、72h 后结束培养, CCK-8 比色法检测细胞活力。在相同药物浓度下, 培养时间越长, 细胞存活率越低; 在相同作用时间内, 丹皮酚药物浓度越高, 细胞存活率越低; 同对照组(0mg/L)比较, 差异有统计学意义(图 1)。

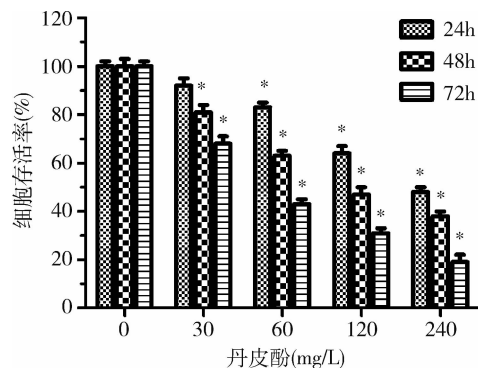


图 1 丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞存活率的作用
与 0mg/L 比较, * $P < 0.05$

2. 丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞凋亡的诱导作用: 采用 PI/Annexin V 双染标记, 流式细胞仪检测细胞凋亡率(图 2)。丹皮酚处理 48h 后可诱导 LoVo 细胞凋亡, 30、60、120mg/L 丹皮酚组的细胞凋亡率分别为 $13.43\% \pm 2.34\%$ 、 $22.26\% \pm 2.28\%$ 和 $36.25\% \pm 3.21\%$, 与对照组的细胞凋亡率 $3.24\% \pm 1.35\%$ 比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 3)。

3. 丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的作用: 丹皮酚(0、30、60、120mg/L)处理 LoVo 细胞 48h 后, 蛋白质免疫印迹结果显示, 随着药物浓度的增加, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达量逐渐降低, 同时促凋亡蛋白 Bax 的表达量逐渐增加(图 4)。

4. 丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞自噬相关基因 Atg5、LC3 - II 和 Beclin1 蛋白表达的作用: 大肠癌 LoVo 细胞经不同浓度丹皮酚(0、30、60、120mg/L)处理 48h 后, 蛋白质印迹检测结果显示, 随着药物浓度的升高, 自噬相关基因 Atg5、LC3 - II 和 Beclin1 蛋白表达量逐渐增加(图 5)。

讨 论

尽管近年来在肿瘤治疗等方面取得了许多重大

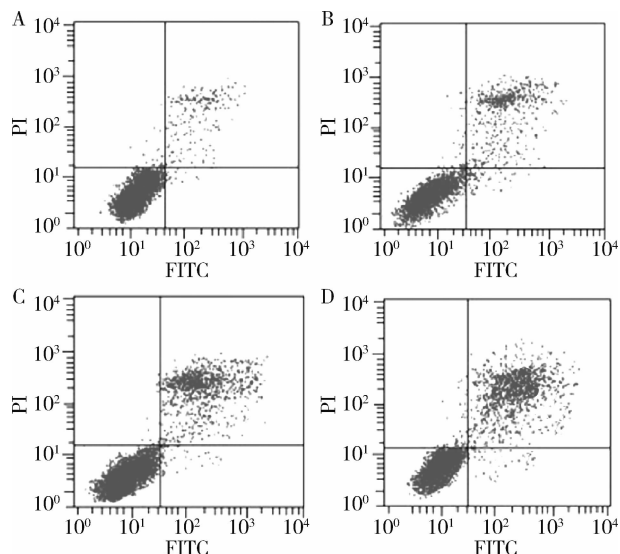


图2 丹皮酚诱导大肠癌 LoVo 细胞凋亡散点图

A. 0mg/L; B. 30mg/L; C. 60mg/L; D. 120mg/L

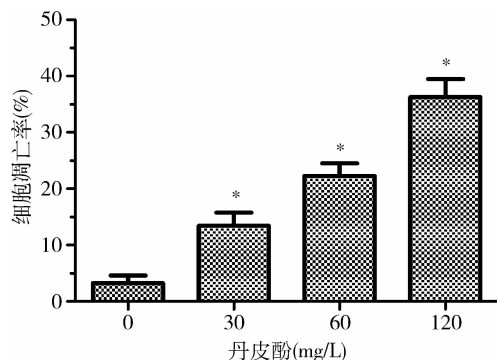


图3 丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞凋亡率的作用

与 0mg/L 比较, * $P < 0.05$

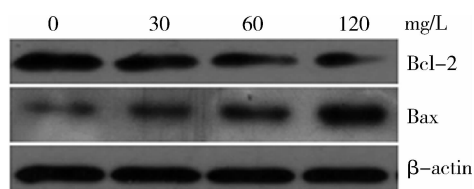


图4 丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 Bax 表达的作用

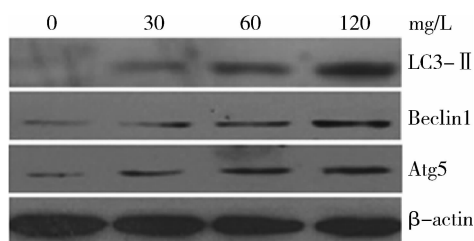


图5 丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞自噬相关基因 Atg5、LC3-II 和 Beclin1 蛋白表达的作用

进步,新的抗肿瘤药或方案层出不穷,但进展期大肠癌患者的生存率并未明显提高,进展期大肠癌患者的生存率不足 2 年^[12]。因此,新的抗肿瘤方法和策略成为肿瘤治疗研究的重点。

丹皮酚是从中草药牡丹皮中提取的天然酚类化合物,丹皮酚能抑制食管癌、胃癌、乳腺癌、前列腺癌、肝癌、肠癌、皮肤癌等多种恶性肿瘤细胞的增殖;目前对丹皮酚的药理作用已有了一定的了解,但丹皮酚对大肠癌细胞的作用机制仍有待于进一步阐明。本实验不仅观察了不同浓度丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞增殖、凋亡的影响,还通过自噬相关基因蛋白检测探讨其实现途径可能是通过自噬实现的。

为了观察丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞增殖和凋亡的影响,首先按照不同浓度梯度进行实验分组,结果显示随着药物浓度的升高,细胞存活率逐渐降低;同时,比较了相同浓度处理不同时间对细胞的抑制作用,结果发现随着作用时间的延长,细胞存活率也逐渐降低,即丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞的抑制作用呈时间和浓度依赖效应。然后,采用 PI/Annexin V 双染检测丹皮酚对大肠癌 LoVo 细胞凋亡率的影响,结果发现,随着药物浓度的升高,细胞凋亡率逐渐升高,呈量-效关系。上述两者结果提示丹皮酚可抑制大肠癌 LoVo 细胞增殖并诱导细胞凋亡。

本实验还对调控细胞凋亡具有重要作用的 Bcl-2 和 Bax 蛋白进行了探讨,结果发现丹皮酚处理大肠癌 LoVo 细胞后,随着药物浓度的升高,抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白表达量逐渐降低,且促凋亡蛋白 Bax 逐渐升高。细胞凋亡过程受凋亡相关蛋白的严格调控, Bcl-2 与 Bax 均属于 Bcl-2 家族, Bcl-2 是细胞凋亡的关键抑制剂,其在多种实体肿瘤中高表达,包括大肠癌, Bcl-2 在高分化癌症中的表达更高^[13]。 Bax 能促进细胞凋亡,并且 Bax 可直接激活死亡效应因子 caspase 导致细胞凋亡,且 Bax 与 Bcl-2 同源, Bax 的过度表达可拮抗 Bcl-2 的抗凋亡效应,促进细胞凋亡,因此, Bax 的存在可能与更好的预后相关^[14]。

自噬是广泛存在于真核细胞内利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程,自噬的溶酶体降解途径在细胞、组织和机体稳态中发挥着重要作用,控制自噬的基因突变与癌症发生有明确的因果关系。自噬在肿瘤发生、发展的过程中扮演着复杂又重要的角色,是一种细胞生存机制^[15]。在形成肿瘤前自噬发挥抑癌作用,但当肿瘤形成后,因缺氧等不利因素,自噬维持肿瘤的生存功能^[16]。本研究发现,丹

皮酚处理后,大肠癌 LoVo 细胞自噬相关基因 Atg5、LC3 - II 和 Beclin1 蛋白表达上调,提示丹皮酚可诱导大肠癌 LoVo 细胞自噬水平升高。

综上所述,经丹皮酚处理后,大肠癌 LoVo 细胞增殖能力显著降低,细胞凋亡率增加,且抗凋亡蛋白 Bcl - 2 蛋白量表达降低,促凋亡蛋白 Bax 表达量增加,同时,丹皮酚也可诱导 LoVo 细胞发生自噬。由此提示丹皮酚可能通过促进大肠癌 LoVo 细胞自噬抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡,丹皮酚对大肠癌具有抗肿瘤作用,为大肠癌的治疗提供了新的治疗策略和方法。丹皮酚对大肠癌肿瘤侵袭的相关性报道仍较少,笔者也将进一步探讨丹皮酚诱导的自噬在细胞增殖、凋亡和侵袭中的作用机制^[17]。

参考文献

- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram 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
- Danese E, Ruzzenente A, Montagnana M, *et al.* Current and future roles of mucins in cholangiocarcinoma - recent evidences for a possible interplay with bile acids[J]. Ann Transl Med, 2018, 6(17): 333
- Rabinowitz JD, White E. Autophagy and metabolism[J]. Science, 2010, 330(6009): 1344 - 1348
- Doherty J, Baehrecke EH. Life, death and autophagy[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(10): 1110 - 1117
- Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. Functions of autophagy in the tumor microenvironment and cancer metastasis[J]. FEBS J, 2018, 285(10): 1751 - 1766
- White E, Mehnert JM, Chan CS. Autophagy, metabolism, and cancer[J]. Clin Cancer Res, 2015, 21(22): 5037 - 5046
- Fu J, Yu L, Luo J, *et al.* Paeonol induces the apoptosis of the SGC7901 gastric cancer cell line by downregulating ERBB2 and inhibiting the NFkappaB signaling pathway[J]. Int J Mol Med, 2018,

42(3): 1473 - 1483

- Hafez HM, Morsy MA, Mohamed MZ, *et al.* Mechanisms underlying gastroprotective effect of paeonol against indomethacin - induced ulcer in rats[J]. Hum Exp Toxicol, 2018; 1798763570
- Lee H, Lee G, Kim H, *et al.* Paeonol, a major compound of moutan cortex, attenuates Cisplatin - induced nephrotoxicity in mice[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2013, 2013: 310989
- Fu PK, Wu CL, Tsai TH, *et al.* Anti - inflammatory and anticoagulative effects of paeonol on LPS - induced acute lung injury in rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 837513
- Ha DT, Trung TN, Hien TT, *et al.* Selected compounds derived from Moutan Cortex stimulated glucose uptake and glycogen synthesis via AMPK activation in human HepG2 cells[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 131(2): 417 - 424
- Brown K, Solomon MJ. Progress and future direction in the management of advanced colorectal cancer[J]. Br J Surg, 2018, 105(6): 615 - 617
- Brzozowa - Zasada M, Kurek J, Piecuch A, *et al.* Correlation study of GAPDH, Bcl - 2, and Bax protein immunoreexpression in patients with colorectal adenocarcinoma[J]. Prz Gastroenterol, 2018, 13(4): 322 - 331
- Lin B, Li D, Zhang L. Oxymatrine mediates Bax and Bcl - 2 expression in human breast cancer MCF - 7 cells[J]. Pharmazie, 2016, 71(3): 154 - 157
- Levine B, Kroemer G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective[J]. Cell, 2019, 176(1 - 2): 11 - 42
- Cotzomi - Ortega I, Aguilar - Alonso P, Reyes - Leyva J, *et al.* Autophagy and its role in protein secretion: implications for cancer therapy[J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 4231591
- Lyu ZK, Li CL, Jin Y, *et al.* Paeonol exerts potential activities to inhibit the growth, migration and invasion of human gastric cancer BGC823 cells via downregulating MMP2 and MMP9[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(5): 7513 - 7519

(收稿日期: 2019 - 01 - 18)

(修回日期: 2019 - 02 - 16)

(接第 151 页)

- Kristensen B, Ilegedii L, Lundy SK, *et al.* Characterization of regulatory B cells in Graves' disease and hashimoto's thyroiditis[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127949
- Kristensen B. Regulatory B and T cell responses in patients with autoimmune thyroid disease and healthy controls[J]. Dan Med J, 2016, 63(2): pii: B5177
- Qin Q, Wang X, Yan N, *et al.* Aberrant expression of miRNA and miRNAs in lesioned tissues of Graves' disease[J]. Cell Physiol Biochem, 2015, 35(5): 1934 - 1942
- Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers[J]. Mutat Res, 2011, 717(1 - 2): 1 - 8
- EBert MS, Sharp PA. Roles for microRNAs in conferring robustness to

Biological processes[J]. Cell, 2012, 149(3): 515 - 524

- Liu R, Ma X, Xu L, *et al.* Differential microRNA expression in peripheral blood mononuclear cells from Graves' disease patients[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2012, 97(6): E968 - 972
- Holmström K, Pedersen AE. Analysis of miR - 146a and miR - 142 - 3p as potential markers of freshly isolated or in vitro - expanded human Treg cells[J]. Scand J Immunol, 2017, 85: 113 - 121
- Huang B, Zhao J, Lei Z, *et al.* miR - 142 - 3p restricts cAMP production in CD4⁺CD25⁻T cells and CD4⁺CD25⁺TREG cells by targeting AC9 mRNA[J]. EMBO Rep, 2009, 10(2): 180 - 185
- Raker VK, Becker C. The cAMP pathway as therapeutic target in autoimmune and inflammatory diseases[J]. Front Immunol, 2016, 7: 123

(收稿日期: 2018 - 12 - 29)

(修回日期: 2019 - 01 - 16)