论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201410125

白藜芦醇抑制人结肠癌细胞增殖及其与PTEN的关系研究

胡 培,伍秋香,袁霜雪,王东旭,刘映孜,何百成,孙文娟 (400016 重庆,重庆医科大学药学院药理教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室)

[摘要] **目的** 研究白藜芦醇(resveratrol, Res)对人结肠癌细胞增殖的抑制作用及可能的机制。**方法** 采用结晶紫染色、流式细胞术和Western blot分析Res对HCT116细胞增殖的抑制作用;应用流式细胞术和免疫荧光分析Res对HCT116细胞凋亡的促进作用;采用Western blot和PCR分析Res对HCT116细胞内Akt1/2及PTEN表达水平的影响;通过重组腺病毒介导的PTEN过表达或沉默表达,分析Res抑制HCT116细胞增殖及其与PTEN的关系。**结果** 与对照组相比,Res处理组HCT116细胞增殖受到抑制($P<0.05$, $P<0.01$),G_1期细胞比例也随Res浓度增加而升高,同时PCNA蛋白表达水平下降;流式细胞术分析结果显示,Res能明显促进HCT116细胞凋亡; Western blot和PCR分析结果显示,Res对Akt1/2 mRNA表达无明显影响,但能降低Akt1/2的磷酸化水平,同时促进PTEN表达。外源性过表达PTEN能增强Res对HCT116细胞的增殖抑制作用($P<0.01$),而沉默PTEN表达能部分逆转Res对HCT116细胞增殖的抑制作用($P<0.01$)。**结论** Res对HCT116细胞增殖具有抑制作用,并能促进其凋亡;Res的这种作用可能与其促进PTEN表达,抑制PI3K/Akt活化有关。

[关键词] 白藜芦醇;结肠癌;增殖抑制;凋亡;PTEN;PI3K/Akt

[中图法分类号] R285.5;R73-354;R735.35 [文献标志码] A

Relationship of inhibitory effect of resveratrol on proliferation with PTEN in colon cancer cells

Hu Pei, Wu Qiuxiang, Yuan Shuangxue, Wang Dongxu, Liu Yingzi, He Baicheng, Sun Wenjuan (Department of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, College of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of resveratrol (Res) on inhibiting proliferation of colon cancer cells and explore the possible mechanism. **Methods** The inhibitory effect of Res on proliferation of HCT116 colon cancer cells was measured by crystal violet staining, flow cytometry and Western blotting. Then, the apoptosis was detected by immunofluorescence assay and flow cytometry. The expression of Akt1/2 and PTEN and the phosphorylation of Akt1/2 in HCT116 cells was analyzed by RT-PCR and Western blotting. Finally, the effect of PTEN on the proliferation inhibition effect of Res was evaluated by recombinant adenovirus for PTEN over-expression or knockdown in HCT116 cells. **Results** Res inhibited the proliferation of HCT116 cells in a concentration-dependent manner ($P<0.05$ and $P<0.01$), arrested the cell cycle at G_1 phase, down-regulated the protein level of PCNA, and promoted the apoptosis of HCT116 cells. PCR and Western blot results indicated that Res had no significant effect on the mRNA expression of Akt1/2, but could decrease the phosphorylation of Akt1/2. Res could increase the expression of PTEN in mRNA and protein levels. Over-expression of PTEN could potentiate the proliferation inhibition effect of Res in HCT116 cells ($P<0.01$), but the knockdown of PTEN can reverse this effect partly ($P<0.01$). **Conclusion** Res can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of HCT116 cells, and this effect may be mediated by up-regulating the expression of PTEN to inhibit the PI3K/Akt signal transduction.

[**Key words**] resveratrol; colon cancer; proliferation inhibition; apoptosis; PTEN; PI3K/Akt

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81372120). Corresponding author: Sun Wenjuan, E-mail: 1115494605@qq.com

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81372120)

[通信作者] 孙文娟,E-mail: 1115494605@qq.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/j.1000-5404.201410125.html(2015-01-05)

白藜芦醇(resveratrol, Res)是一种天然多酚类物质,又名芪三酚。主要来源于葡萄、虎杖、花生和桑葚等植物[1-2]。Res除具有抗氧化作用外,还能降低血小板聚集。因此,临床可将Res用于动脉粥样硬化、冠心病、缺血性心脏病和高血脂等疾病的防治[3-4]。近年研究表明,Res能抑制多种肿瘤细胞增殖和促进凋亡作用,如肺癌、肝癌、乳腺癌和结肠癌细胞等,但具体分子机制仍不清楚。结肠癌作为一种常见的消化系统恶性肿瘤,其死亡率仅次于肺癌和肝癌,严重危害人类的健康[5]。Res能抑制结肠癌细胞增殖,但目前尚不清楚这种作用是否与其调节PTEN表达或磷酸化水平有关。

本实验拟通过研究Res对HCT116细胞增殖和凋亡的影响,并分析这种作用与PTEN/PI3K/Akt信号的可能关系,为进一步深入分析Res抑制结肠癌细胞增殖提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂及细胞培养

人结肠癌细胞HCT116购自American Type Culture Collection(ATCC)。白藜芦醇(Res)购自西安昊轩生物科技有限公司。实验所用抗体均购自Santa Cruz Biotechnology公司。Lipofectamine购自Invitrogen公司。采用DMEM培养基(高糖)培养细胞(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和0.1 mg/mL链霉素),培养条件为5%的CO_2及37 ℃。

1.2 实验设计及分组

将HCT116细胞分为对照组和实验组。将Res用DMSO溶解,实验组细胞用不同浓度的Res处理,对照组细胞用相同体积的DMSO处理。

1.3 结晶紫染色检测细胞增殖

将处于指数生长期的细胞铺于24孔板,用不同浓度的Res处理。分别于处理24、48和72 h后进行结晶紫染色,检测细胞增殖情况。按文献[6]报道进行操作,简述如下:弃培养基,用PBS小心清洗孔板1次。每孔加500 μL结晶紫溶液,室温下孵育20 min。然后弃结晶紫染液,用PBS小心清洗3次。将孔板在室温下晾干后,每孔加入1 mL 10%的乙酸溶解,最后测定570 nm光密度。每组实验重复3次。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期、凋亡

将处于指数生长期的细胞铺于6孔板中,待细胞贴壁后按实验设计进行相应处理。24 h后将细胞进行Annexin-V EGFP免疫荧光染色或通过流式细胞仪进行周期、凋亡检测(按试剂盒的操作说明进行)[7]。每组实验重复3次。

1.5 Western blot检测

将处于指数生长期的细胞种于6孔板中,按实验设计加入不同浓度的Res,并于不同时间点提取各组总蛋白。采用10%的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,按常规操作方法进行Western blot检测。最后采用ECL试剂盒显影并成像。每组实验重复3次。

1.6 RNA提取及RT-PCR实验

RT-PCR实验按如下步骤进行:将细胞铺于T25培养瓶中,用含1%胎牛血清的完全培养基培养细胞。TRIzol法提取总RNA,采用逆转录反应制备cDNA,然后进行PCR检测目的基因mRNA表达水平。所用引物如下:GAPDH上游引物5′-CAACGAATTTGGCTACAGCA-3′,下游引物5′-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3′;PTEN上游引物5′-TAAAGGCACAAGAGGCCCTA-3′,下游引物5′-CGCCACTGAACATTGGAATA-3′;Akt1上游引物5′-CATCACACCACCTGACCAAG-3′,下游引物5′-CTCAAATGCACCCGAGAAAT-3′;Akt2上游引物5′-GCTTAAGAAGGACCCCAAGC-3′,下游引物5′-CTGGTCCAGCTCCAGTAAGC-3′;每组实验重复3次。

1.7 重组腺病毒的构建

本实验所用重组腺病毒均采用Ad-Easy系统构建[8]。构建方法如下:用PCR从EST克隆中扩增目的基因的编码序列,并克隆到穿梭质粒。最后将穿梭质粒线性化并与含腺病毒骨架序列的质粒进行重组,将重组正确的质粒线性化并转染到HEK-293细胞(human embryonic kidney-293)进行病毒包装,得到目的基因编码序列的重组腺病毒。即GFP重组腺病毒(Ad-GFP)、PTEN重组腺病毒(Ad-PTEN)和PTEN沉默siRNA片段重组腺病毒(Ad-siPTEN)。Ad-GFP作为空载重组腺病毒对照。

1.8 统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 16.0统计软件对数据进行处理,采用t-test进行组间比较。

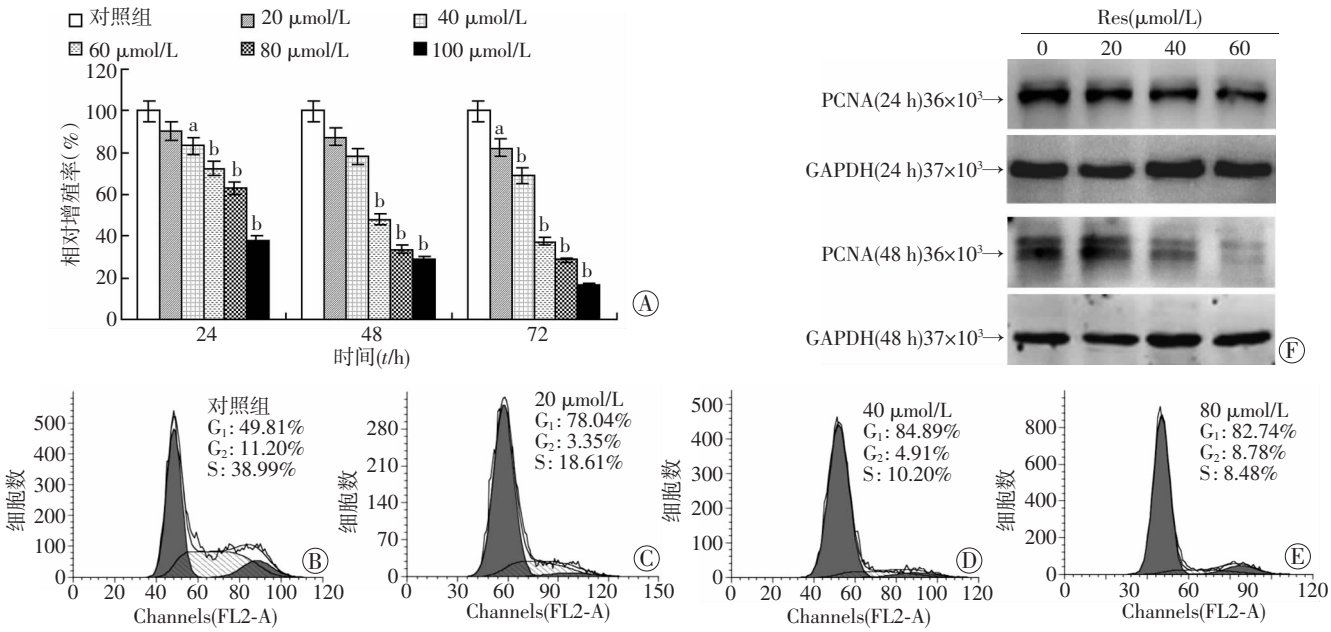
2 结果

2.1 Res对HCT116细胞增殖的影响

结晶紫染色定量分析结果显示(图1A),Res能抑制HCT116细胞增殖,并且这种作用随着药物浓度增加和作用时间延长而增强($P<0.05$, $P<0.01$);与对照组比较,Res在40 μmol/L时已能明显抑制HCT116细胞生长。周期分析结果显示,G_1期细胞数量明显增加,而S期细胞数量明显减少(图1B~E)。Western blot检测结果显示,Res对PCNA的表达也具有抑制作用(图1F)。以上结果提示,Res对HCT116细胞增殖具有抑制作用。

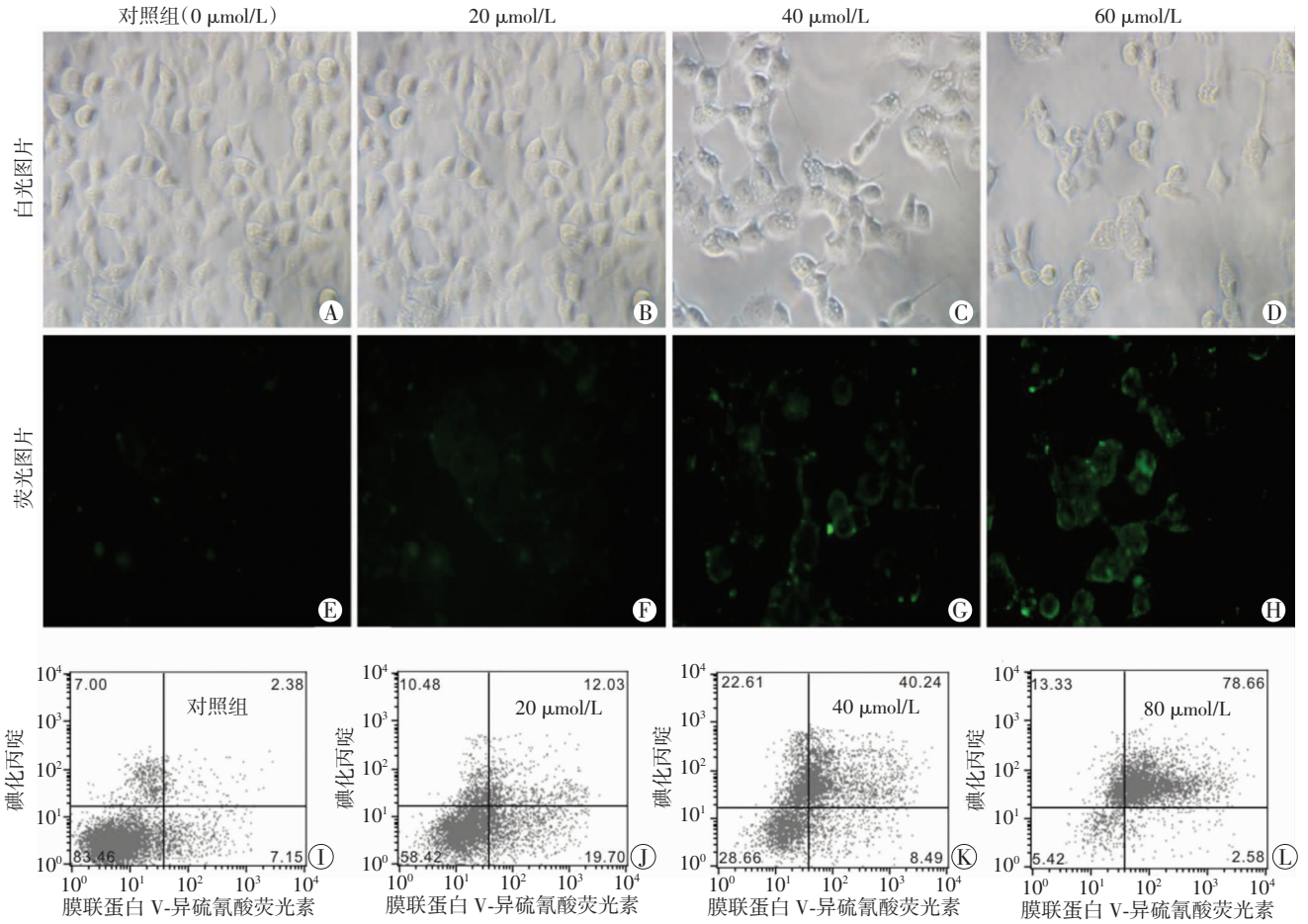
2.2 Res对HCT116细胞凋亡的影响

Annexin-V EGFP免疫荧光染色结果显示,用Res处理HCT116细胞24 h后,凋亡细胞数量明显增加(图2A~H);流式分析结果也显示,细胞凋亡比例随药物浓度增加而增加(图2I~L)。结果提示,Res能促进HCT116细胞凋亡。



A:结晶紫染色定量分析结果 a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与相同时间对照组比较;B~E:流式细胞仪检测不同浓度Res对HCT116细胞周期阻滞作用;F:Western blot检测结果

图1 Res对HCT116细胞增殖的影响

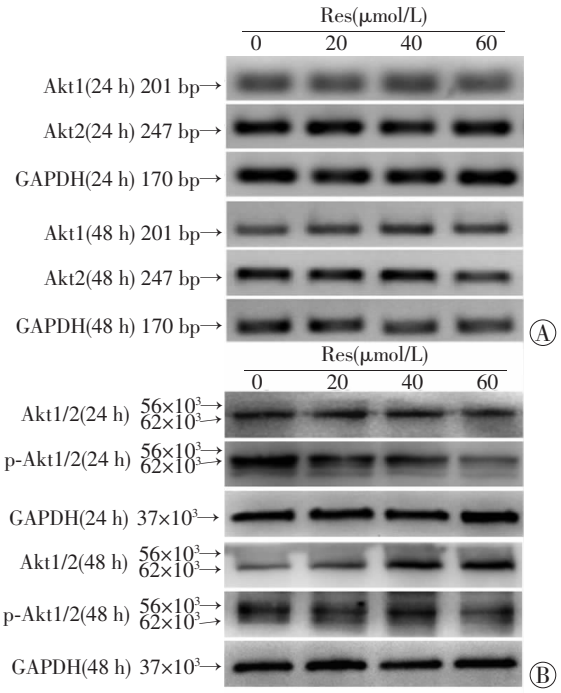


A~H:Annexin V-EGFP染色检测结果(×200);I~L:流式细胞仪检测不同浓度Res对HCT116细胞凋亡的影响

图2 Res对HCT116细胞凋亡的影响

2.3　Res 对 HCT116 细胞中 Akt1/2 表达水平的影响

PCR 分析结果显示，Res 对 Akt1 和 Akt2 的 mRNA 表达水平没有明显影响（图 3A）。Western blot 分析结果表明，Res 能明显降低 Akt1/2 磷酸化水平（图 3B）。提示，Res 对 HCT116 细胞中的 PI3K/Akt 信号转导具有抑制作用。



A：PCR 检测 Res 对 Akt1/2 表达的影响；B：Western blot 检测 Res 对 Akt1/2 表达和磷酸化的影响

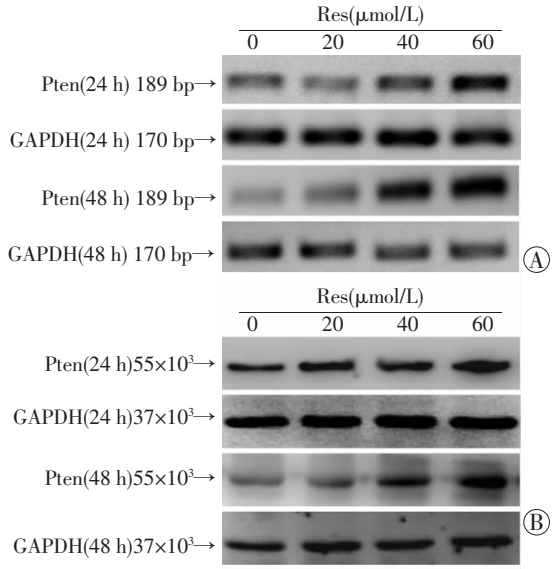
图 3　Res 对 HCT116 细胞中 Akt1/2 表达水平的影响

2.4　Res 对 HCT116 细胞中 PTEN 表达的影响

PCR 分析结果显示，Res 能明显增加 PTEN 的 mRNA 表达水平，并且这种作用具有浓度依赖性（图 4A）。Western blot 分析结果也显示，Res 能明显增加 PTEN 的蛋白表达水平（图 4B）。结果提示，Res 对 HCT116 细胞中 PI3K/Akt 信号的抑制作用可能与其促进 PTEN 的表达有关。

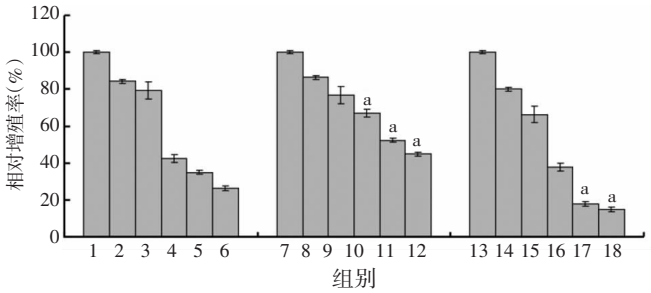
2.5　PTEN 对 Res 抑制 HCT116 细胞增殖作用的影响

结晶紫染色结果显示，PTEN 过表达能明显增强 Res 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用（$P<0.01$），而沉默 PTEN 表达能部分逆转 Res 对 HCT116 细胞增殖的抑制作用（$P<0.01$，48 h，图 5）。Western blot 分析结果显示，PTEN 过表达能增强 Res 对 Akt1/2 磷酸化的抑制作用（图 6A），而沉默 PTEN 表达则能逆转 Res 对 Akt1/2 磷酸化的抑制作用（图 6B）。结果提示，Res 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用可能与其通过促进 PTEN 表达，进而抑制 PI3K/Akt 信号转导有关。



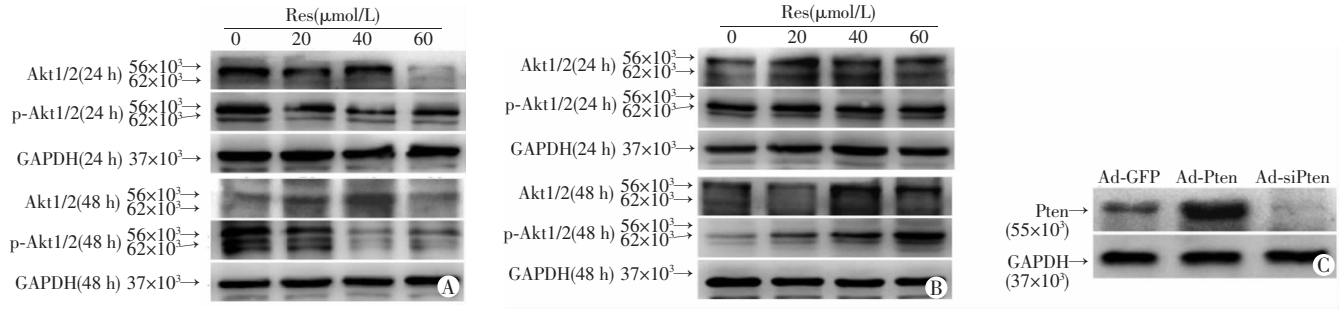
A：PCR 检测 Res 对 HCT116 细胞中 PTEN 表达的影响；B：Western blot 检测 Res 对 HCT116 细胞中 PTEN 表达水平的影响

图 4　Res 对 HCT116 细胞中 PTEN 表达的影响



1：对照组；2：Res 20 μmol/L；3：Res 40 μmol/L；4：Res 60 μmol/L；5：Res 80 μmol/L；6：Res 100 μmol/L；7：Ad-siPTEN；8：Res 20 μmol/L + Ad-siPTEN；9：Res 40 μmol/L + Ad-siPTEN；10：Res 60 μmol/L + Ad-siPTEN；11：Res 80 μmol/L + Ad-siPTEN；12：Res 100 μmol/L + Ad-siPTEN；13：Ad-PTEN；14：Res 20 μmol/L + Ad-PTEN；15：Res 40 μmol/L + Ad-PTEN；16：Res 60 μmol/L + Ad-PTEN；17：Res 80 μmol/L + Ad-PTEN；18：Res 100 μmol/L + Ad-PTEN　a：$P<0.01$，与相同浓度单用药处理组比较

图 5　结晶紫定量分析 PTEN 外源性过表达或沉默表达对 Res 抑制 HCT116 细胞增殖作用的影响



A:外源性过表达 PTEN 对 Res 调节 Akt1/2 表达和磷酸化作用的影响;B:PTEN 沉默表达对 Res 调节 Akt1/2 表达和磷酸化作用的影响;C:不同重组腺病毒对 PTEN 表达的影响

图6 Western blot 检测 PTEN 对 Res 抑制 HCT116 细胞增殖作用的影响

3 讨论

结肠癌是一种常见的消化系统恶性肿瘤,其发病率和致死率均较高,仅次于肝癌、肺癌及胃癌,对人类健康具有很大危害,全球每年约有 50 万患者死于结肠癌[9]。尽管对结肠癌的诊断和治疗水平都有了较大提高,但结肠癌的治疗效果仍不乐观。传统植物药来源的有效单体成分,或其衍生物在各种肿瘤的治疗中发挥着重要作用[10-11]。本研究表明,Res 对人结肠癌 HCT116 细胞的增殖具有明显抑制作用,并能促进凋亡;这种作用可能与 Res 通过促进 PTEN 表达,进而抑制 PI3K/Akt 信号有关。

研究表明,结肠癌的发生与饮食习惯、肥胖和基因突变有关[12],大部分结肠癌发病与遗传因素无关[13]。基因突变可引起调控细胞增殖、分化及凋亡的信号转导异常,从而使细胞增殖失控导致肿瘤发生。在多种肿瘤细胞中存在 PI3K/Akt 信号转导异常[14]。PTEN 是一种抑癌基因,在多种癌症发生中,都高频率出现 PTEN 的功能缺失或突变。

近年研究表明,Res 对多种肿瘤细胞,如肺癌、肝癌、乳腺癌和结肠癌细胞具有增殖抑制和促进凋亡作用[15]。在乳腺癌中,这种作用可能与抑制 PI3K/Akt 信号转导有关[16],但目前还不清楚 Res 抑制结肠癌细胞生长是否与抑制该信号转导有关。本研究发现,Res 能够明显抑制人结肠癌细胞增殖,这种作用可能与 Res 降低 Akt1/2 磷酸化水平,抑制 PI3K/Akt 信号转导有关。PTEN 作为 PI3K/Akt 信号的重要抑制基因,因此课题组进一步分析了 Res 在结肠癌细胞对 PTEN 表达的影响。结果显示 Res 在 HCT116 细胞中能明显促进 PTEN 表达,这一结果表明 Res 对 PI3K/Akt 信号转导的抑制作用很可能与其上调 PTEN 表达有关。外源性过表达 PTEN 或 PTEN 沉默表达对 Res 抑制 HCT116 增殖作用影响分析结果显示,外源性过表达 PTEN 可增强 Res 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用,而 PTEN 沉默表达则能部分逆转 Res 对 HCT116 细胞的增殖抑制作用。

本研究结果表明,Res 对 HCT116 细胞增殖具有抑制作用,并且这种作用可能与 Res 通过促进 PTEN 表达,进而抑制 PI3K/Akt 信号转导有关;但 Res 对 PTEN 表达调控的详细机制还有待进一步研究。本课题组将利用其他结肠癌细胞株,进一步确认 Res 抑制结肠癌细胞生长与 PTEN/PI3K/Akt 信号转导的关系;分析 Res 对 PTEN 表达调控的可能分子机制,为将 Res 用于结肠癌的临床治疗提供理论依据。

参考文献:

[1] Baur J A, Sinclair D A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence[J]. Nat Rev Drug Discov, 2006, 5(6): 493-506.

[2] Wang K H, Lai Y H, Chang J C, *et al*. Germination of peanut kernels to enhance resveratrol biosynthesis and prepare sprouts as a functional vegetable[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(2): 242-246.

[3] Tamaki N, Cristina-Orihuela-Campos R, Inagaki Y, *et al*. Resveratrol improves oxidative stress and prevents the progression of periodontitis *via* the activation of the Sirt1/AMPK and the Nrf2/antioxidant defense pathways in a rat periodontitis model[J]. Free Radic Biol Med, 2014, 75: 222-229.

[4] Tomayko E J, Cachia A J, Chung H R, *et al*. Resveratrol supplementation reduces aortic atherosclerosis and calcification and attenuates loss of aerobic capacity in a mouse model of uremia[J]. J Med Food, 2014, 17(2): 278-283.

[5] Tarraga-Lopez P J, Albero J S, Rodriguez-Montes J A. Primary and secondary prevention of colorectal cancer[J]. Clin Med Insights Gastroenterol, 2014, 7: 33-46.

[6] 杨秋珺, 周龙洋, 刘映孜, 等. 小檗碱抑制 HCT116 细胞生长与 Wnt/β-catenin 信号的关系研究[J]. 中国药理学通报, 2012, 28(9): 1234-1238.

[7] 刘映孜, 金洁利, 黄军, 等. 粉防己甲素抑制人结肠癌细胞增殖与 Wnt/β-catenin 信号的关系研究[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(1): 30-34.

[8] He T C, Zhou S, da-Costa L T, *et al*. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998, 95(5): 2509 - 2514.
[9] Merika E, Saif M W, Katz A, *et al*. Review. Colon cancer vaccines: an update [J]. In Vivo, 2010, 24(5): 607 - 628.
[10] Wu K, Yang Q, Mu Y, *et al*. Berberine inhibits the proliferation of colon cancer cells by inactivating Wnt/β-catenin signaling[J]. Int J Oncol, 2012, 41(1): 292 - 298.
[11] He B C, Gao J L, Luo X, *et al*. Ginsenoside Rg3 inhibits colorectal tumor growth through the down-regulation of Wnt/β-catenin signaling[J]. Int J Oncol, 2011, 38(2): 437 - 445.
[12] Markowitz S D, Bertagnolli M M. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2009, 361(25): 2449 - 2460.
[13] Watson A J, Collins P D. Colon cancer: a civilization disorder[J]. Dig Dis, 2011, 29(2): 222 - 228.
[14] Martini M, De-Santis M C, Braccini L, *et al*. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review[J]. Ann Med, 2014, 46(6): 372 - 383.
[15] Chen H J, Hsu L S, Shia Y T, *et al*. The β-catenin/TCF complex as a novel target of resveratrol in the Wnt/β-catenin signaling pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2012, 84(9): 1143 - 1153.
[16] Tsai J H, Hsu L S, Lin C L, *et al*. 3, 5, 4'-Trimethoxystilbene, a natural methoxylated analog of resveratrol, inhibits breast cancer cell invasiveness by downregulation of PI3K/Akt and Wnt/β-catenin signaling cascades and reversal of epithelial-mesenchymal transition[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 272(3): 746 - 756.

（**收稿**:2014-10-21;**修回**:2014-11-18）
（编辑 张 维）

DOI:10.16016/j.1000 - 5404.201503029

个案与短篇

经纤支镜钬激光辅助取支气管异物 1 例

吴 娇,杨再兴,胡建林,沈渝菊 （400038 重庆,第三军医大学西南医院呼吸内科）

[**关键词**] 钬激光; 支气管异物
[**中图法分类号**] R768.1 [**文献标志码**] B

1 临床资料

患者,男性,78 岁,有“高血压、糖尿病、冠心病”既往史,于 2014 年 12 月 10 日服药时不慎将盛药塑料容器(图 1)吸入气道,随即呛咳、伴胸闷、呼吸困难,后出现少量白痰。就诊当地医院,行胃镜、喉镜等检查未见明显异常,胸部 CT 见双肺纹理增多、增粗、紊乱,予抗感染、舒张支气管等治疗后症状无明显好转,来我院就诊。于 2015 年 1 月 4 日门诊纤支镜见右主支气管开口一透明异物阻塞管腔,异物为塑料呈“U”型凹槽,开口朝上,予异物钳反复钳取,异物被钳夹至声门时,因患者咳嗽剧烈,将异物振落,进入左主支气管。遂重新钳夹,但因异物光滑,嵌顿紧密,无法钳取。尝试高频电凝在容器远端打孔,因塑料绝缘,无法实现。后以冷冻方法将异物与冷冻探头连接,因连接不够牢固,也未能取出,为继续治疗于当天收入院。入院查体左肺呼吸音低,无其他异常体征。2014 年 1 月 5 日于手术室静注射丙泊酚,并结合环甲膜穿刺注射利多卡因,经喉罩插入纤支镜,见左主远端支气管异物嵌顿,无法钳牢异物,故以钬激光对异物盲端进行反复烧灼,将底部灼出一小口,可见黄色黏稠分泌物自小口不断溢出,用生理盐水反复冲洗吸引清除分泌物,随后将活检钳通过小孔插入,将活检钳张开回拉,将异物固定在纤支镜远端(图 1),退出纤支镜将异物顺利带出,可见异物为一长 1.9 cm,直径 1.5 cm,壁厚为 0.1 cm 透明“U”型塑料盖,术后患者未述特殊不适,术后见左主支气管远端充血水肿,并吸出较多脓性分泌物,术后使用抗生素 5 d 出院,现随访未诉特殊不适。

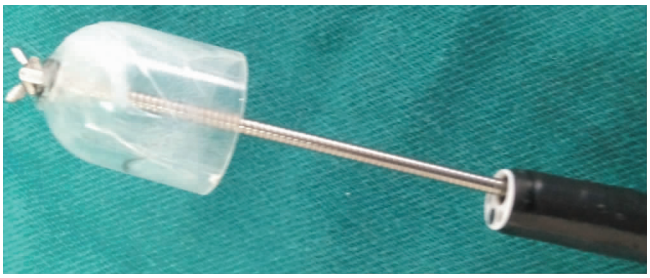


图 1 经纤支镜钬激光辅助取出支气管异物大体观察

[**通信作者**] 胡建林,电话:(023)68765177,E-mail: jianlinhu63@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150427.0854.001.html(2015-04-27)

（下转 1016 页）