DOI:10.16016/j.1000-5404.201507069

葫芦素 E 诱导结肠癌细胞凋亡

随何欢,李 丽,王 虎,周运江,黄家君 (400016 重庆,重庆医科大学药学院药理学教研室,重庆市生物化学与分子药理学重点实验室)

[摘要] **目的** 体外研究葫芦素 E(CuE)对人结肠癌细胞株 Caco-2 凋亡的影响及其相关分子机制。**方法** 用 0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L CuE 分别处理培养的 Caco-2 细胞 24、48、72 h,Hoechst 33258 染色法观察细胞核形态变化,TUNEL 染色法及 Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞分析法检测细胞凋亡,蛋白免疫印迹法检测 Caspase-3、cleaved Caspase-3、PARP、cleaved PARP 及 Bcl-2 蛋白表达变化。**结果** Hoechst 33258 染色法和 TUNEL 染色法结果均显示,CuE 能明显诱导 Caco-2 细胞凋亡($P<0.05$),并呈现出剂量及时间依赖性。Annexin V-FITC/PI 双染色流式细胞分析表明,随着 CuE 浓度升高,凋亡细胞占总细胞比例明显升高($P<0.05$)。蛋白印迹分析结果显示,用 CuE 处理 Caco-2 细胞 24 h 后,Caspase-3 及 PARP 蛋白表达明显降低,而 cleaved Caspase-3 及 cleaved PARP 蛋白表达明显增加,同时 Bcl-2 蛋白表达明显降低($P<0.05$)。**结论** CuE 能明显引起人结肠癌细胞 Caco-2 发生凋亡,其分子机制可能与其抑制 Bcl-2 表达,激活 Caspase-3,从而引起 PARP 裂解有关。

[关键词] 葫芦素 E;结肠癌;Caco-2 细胞;细胞凋亡
[中图法分类号] R282.71; R73-36; R735.35 [文献标志码] A

Effects of cucurbitacin E on apoptosis in human colonic cancer cells

Sui Hehuan, Li Li, Wang Hu, Zhou Yunjiang, Huang Jiajun (Department of Pharmacology, Chongqing Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Pharmacology, School of Pharmacy, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of cucurbitacin E (CuE) on the apoptosis in human colonic cancer Caco-2 cells and investigate the underlying molecular mechanism. **Methods** The Caco-2 cells were treated with CuE at 0.001, 0.01, 0.1, 1 and 10 μmol/L for 24, 48 or 72 h respectively. The morphological changes of the nuclei were observed after Hoechst 33258 staining. The changes of cell apoptosis were detected by TUNEL assay and flow cytometry coupled with Annexin V-FITC/PI staining respectively. Western blot assay was used to detect the protein expression of Caspase-3, cleaved Caspase-3, PARP, cleaved PARP and Bcl-2. **Results** The results of both Hoechst 33258 staining and TUNEL assay showed that CuE obviously induced the apoptosis of Caco-2 cells in a dose- and time-dependent manner ($P<0.05$). The results of flow cytometry coupled with Annexin V-FITC/PI staining revealed that with the increase of CuE dose, the proportion of apoptotic cells to total cells was increased significantly ($P<0.05$). Western blot analysis showed that after treating Caco-2 cells with CuE for 24 h, the protein expression of Caspase-3 and PARP was obviously decreased, whereas that of cleaved Caspase-3 and cleaved PARP was significantly increased. Meanwhile, the expression of Bcl-2 protein was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** CuE induces the apoptosis in human colonic cancer Caco-2 cells, which might be due to its inhibiting Bcl-2 expression, activating Caspase-3, and then triggering PARP cleavage.

[**Key words**] cucurbitacin E; colonic cancer; Caco-2 cells; apoptosis

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2010BB5111). Corresponding author: Huang Jiajun, E-mail:huangjiajun1964@163.com

[基金项目] 重庆市科委自然科学基金(CSTC2010BB5111)
[通信作者] 黄家君,E-mail: huangjiajun1964@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151202.1623.011.html(2015-12-02)

结肠癌是严重危害人类健康的恶性肿瘤之一,随着生活方式、饮食习惯、环境因素等的变化,其发病率和死亡率呈明显的逐年上升趋势[1]。目前结肠癌除手术治疗外,尚无疗效确切的治疗药物。因此,探索新型的高效低毒的靶向抗癌药物对结肠癌的药物治疗显得非常重要。研究表明,天然植物中存在具有治疗价值的抗癌有效成分,以其低毒、有效、无耐药性及整体调节等优势,在肿瘤治疗中起着越来越重要的作用[2]。近年来,葫芦科植物的有效成分葫芦素的药用价值已逐渐受到重视[3-4]。葫芦素 E(cucurbitacin E, CuE)是从葫芦科植物中提取的四环三萜类化合物,具有抗肿瘤、抗化学致癌、抗炎等多种生物活性[5],能有效抑制卵巢癌、肝癌、乳腺癌等细胞的增殖与迁移[6-7],被认为是极具潜力的抗肿瘤药物。本课题组新近研究[8]表明,CuE 对人结肠癌细胞株 Caco-2 增殖与迁移具有明显抑制作用。但 CuE 抑制结肠癌细胞增殖的同时,是否也影响其凋亡呢? 本研究分析 CuE 对人结肠癌细胞株 Caco-2 细胞凋亡的影响,初步探讨其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

CuE 购自宝鸡市晨光生物科技有限公司,用 DMSO 配置成储存液,-20 ℃保存。DMEM 培养基及胎牛血清购自美国 Gibco 公司,胰蛋白酶购自 BBI 公司,细胞培养箱购自美国 Thermo 公司,Hoechst 33258 荧光染料购自上海碧云天公司,TUNEL 凋亡检测试剂盒购自 Vazyme 公司,荧光显微镜是德国 Leica 公司产品,Annexin V-FITC、PI、FACSCalibur 型流式细胞仪均为美国 BD 公司产品,UP-201 型组织细胞超声细胞破碎仪购自日本 TOMY 公司,Caspase-3、PARP、cleaved PARP、Bcl-2 抗体购自 Cell Signaling 公司,β-actin 抗体购自 Sigma 公司,超敏 ECL 化学发光试剂盒购自美国 GE 公司,PVDF 膜为 MILIPORE 公司产品,电泳及转膜、封闭系统、Chemi Doc™ XRS + 型凝胶成像仪均购自 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人结肠癌细胞株 Caco-2 购自中国生命科学院上海细胞研究所,参照一般细胞培养技术,用 pH 7.4、含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、1 mmol/L 非必需氨基酸的 DMEM 培养基,于 37 ℃、饱和湿度、5% CO_2 的培养箱中培养,每 2 天换液 1 次,每 4 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 Hoechst 33258 染色 取无菌盖玻片置于 24 孔板内,加入鼠尾胶原晾干,将 Caco-2 细胞接种于盖玻片上,细胞培养至 50% ~80% 融合时分别用终浓度为 0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L CuE 进行处理,对照组仅用 DMEM 培养液。分别于 CuE 处理后 24、48、72 h 用 PBS 洗细胞 1 次,4% PFA 固定 25 min,PBS 洗 2 次,用 0.1% Triton X-100 打孔,PBS 洗涤,滴加 Hoechst 33258 染色液,染色 10 min,PBS 洗涤。滴加抗荧光衰减液后封片,置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.3 TUNEL 染色 Caco-2 细胞的处理同 1.2.2 Hoechst 33258 染色,TUNEL 染色方法按试剂盒说明书操作。固定并洗涤细胞后,加入 20 μg/mL Proteinase K 室温孵育 5 min,PBS 洗涤,每个样本加入 1 × Equilibration Buffer 室温孵育 20 min,平衡后吸除液体,滴加 TdT 孵育缓冲液,37 ℃避光湿润孵育 1 h,PBS 洗涤 2 次,BSA 洗涤 3 次,去离子水洗涤 1 次。封片后置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术 参照文献[9]方法,将 Caco-2 细胞接种于 6 孔板上,不同浓度 CuE 处理 24、48、72 h 后,加入胰酶收集细胞,以 1∶1∶50 的比例配置 Annexin V-FITC、PI、1 × apoptosis binding buffer 液,每个样本加 100 μL Annexin V-FITC/PI 标记,室温避光 15 min,加入 1 倍体积的 binding buffer 稀释样本,用 BD 公司的 FACSCalibur 型流式细胞仪进行分析,每个样本计数 1×10^6 个细胞,用 ModFit 3.2 软件进行数据分析。

1.2.5 蛋白印迹法检测 Caspase-3、cleaved Caspase-3、PARP、cleaved PARP 及 Bcl-2 蛋白表达 将 Caco-2 细胞接种于 6 孔板,待细胞完全融合后,加入不同浓度 CuE 处理 24 h,用 PBS 洗涤,加入细胞裂解液提取细胞总蛋白,细胞破碎后离心 10 min(12 000 r/min, 8 ℃),沸水变性蛋白。行 10% SDS-PAGE 电泳,再电转移至 PVDF 膜上,用 5% 脱脂奶室温封闭 1 h 后加一抗 4 ℃孵育过夜,Caspase-3、PARP、cleaved PARP、Bcl-2 及内参 β-actin 的一抗稀释度分别为 1∶1 000、1∶1 000、1∶500、1∶1 000 与 1∶5 000。洗膜后加二抗室温孵育 1 h,TBST 洗涤 4 次后化学发光显色并凝胶成像采集图像,用 BIO-RAD Quantity one 4.4.0 软件进行目的蛋白相对定量分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,两样本均数比较采用 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

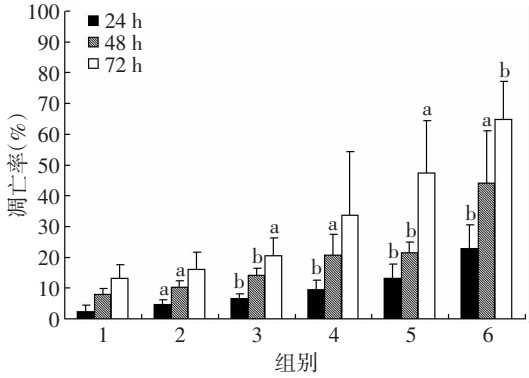
2.1 Hoechst 33258 染色观察 CuE 对 Caco-2 细胞核形态的影响

不同浓度 CuE 处理 Caco-2 细胞后,细胞核形态发生明显变化,总体呈现出染色质边集、核固缩、核片断

化、凋亡小体形成等改变(图 1)。0.001、0.1 μmol/L CuE 处理 72 h 后,与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$),其余各浓度及各时相点与对照组比较,差异均有统计学差异($P<0.05$,图 2)。随着 CuE 浓度的增加和作用时间的延长,发生细胞核改变的细胞数量逐渐增多,甚至出现大片细胞脱落形成细胞脱失区。提示 CuE 对 Caco-2 细胞核形态的影响具有浓度依赖性和时间依赖性。

2.2　TUNEL 染色观察 CuE 对 Caco-2 细胞凋亡的影响

与对照组相比较,不同浓度的 CuE 处理 Caco-2 细胞后,TUNEL 染色阳性细胞数量所占比例增加,表明凋亡的细胞明显增多。CuE 引起 Caco-2 细胞凋亡呈现出浓度及时间依赖性,浓度越高及作用时间越长,CuE 引起细胞凋亡越明显(图 3)。与对照组相比,1 μmol/L CuE 作用 72 h,10 μmol/L CuE 作用 24、48、72 h 后阳性细胞所占比例明显增多($P<0.05$),并随着 CuE 浓度的增加和作用时间的延长,阳性细胞数量逐渐增多(图 4)。



1:对照组;2~6:分别为 0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L CuE 组
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 2　定量分析不同浓度 CuE 对 Caco-2 细胞形态的影响

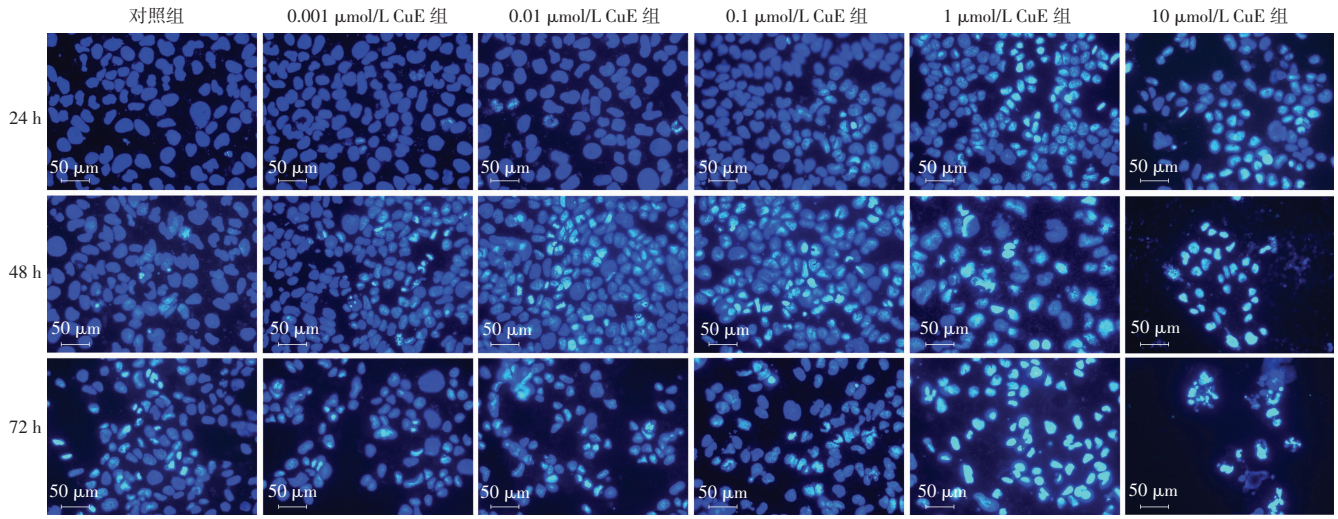


图 1　荧光显微镜观察不同浓度 CuE 对 Caco-2 细胞形态的影响　(Hoechst 33258 染色)

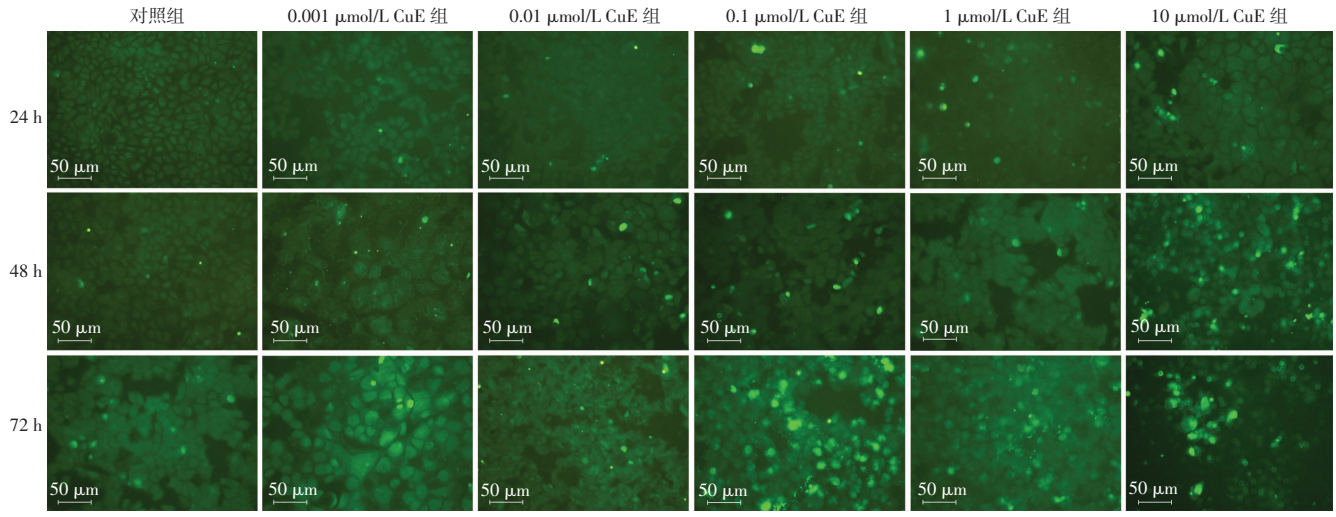


图 3　荧光显微镜观察不同浓度 CuE 对 Caco-2 细胞凋亡的影响　(TUNEL 染色)

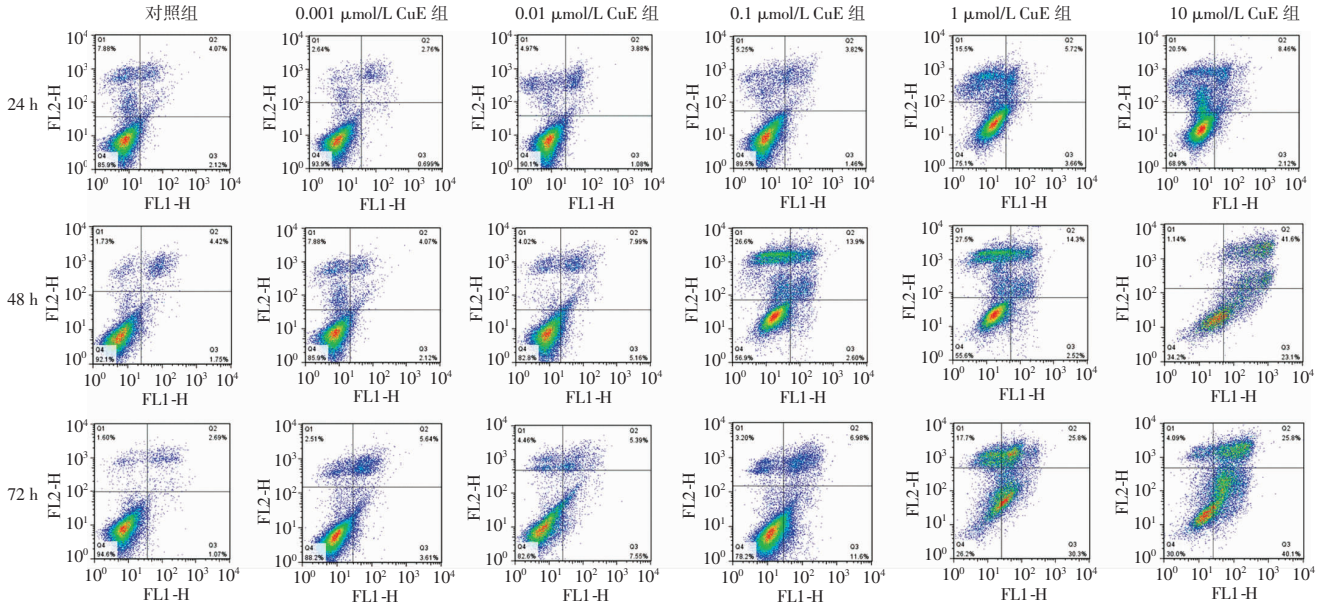
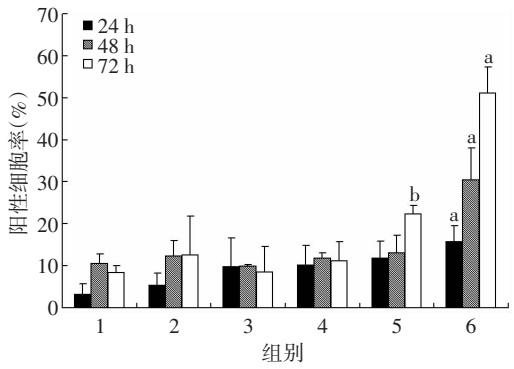


图 5　流式细胞术检测不同浓度 CuE 对 Caco-2 细胞凋亡的影响



1:对照组;2~6:分别为 0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L CuE 组
a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与对照组比较

图 4　定量分析不同浓度 CuE 对 Caco-2 细胞凋亡的影响

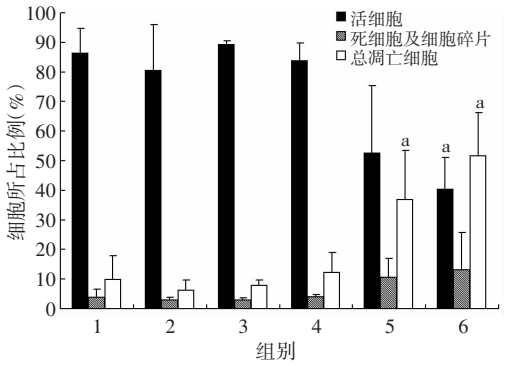
2.3　流式细胞术分析 CuE 对 Caco-2 细胞凋亡的影响

与对照组相比,不同浓度 CuE 处理细胞 24、48、72 h 后,随作用时间增加、药物浓度加大,细胞凋亡率逐渐升高(图 5)。

不同浓度 CuE 处理 Caco-2 细胞 72 h 后凋亡现象最显著。活细胞在总细胞中所占比例随浓度升高逐渐减少,死细胞和细胞碎片所占比例增多;与对照组相比,10 μmol/L CuE 处理时显著增多($P<0.05$)。细胞总凋亡率所占比例随浓度升高逐渐增加;与对照组相比,1、10 μmol/L CuE 处理时显著升高($P<0.05$)。见图 6。

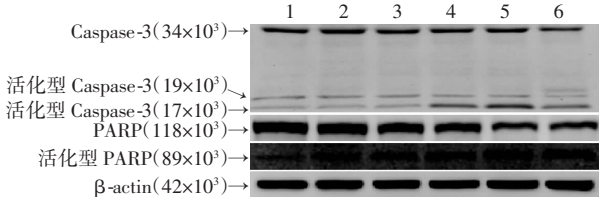
2.4　CuE 对 Caspase-3、cleaved Caspase-3、PARP、cleaved PARP 及 Bcl-2 蛋白表达的影响

不同浓度 CuE 处理 Caco-2 细胞 24 h 后,0.001、0.01 μmol/L CuE 对 Caspase-3 及 cleaved Caspase-3 蛋白表达均无明显影响,但 0.1、1、10 μmol/L CuE 能不同程度地引起 Caspase-3 蛋白表达降低,同时引起 cleaved Caspase-3 蛋白表达增加。与此一致,5 种浓度的 CuE 均能不同程度地引起 Caco-2 细胞 PARP 蛋白表达降低,并引起 cleaved PARP 蛋白表达增加(图 7)。表明 CuE 能引起 Caco-2 细胞 Caspase-3 活化,导致 PARP 裂解。



1:对照组;2~6:分别为 0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L CuE 组
a:$P<0.05$,与对照组比较

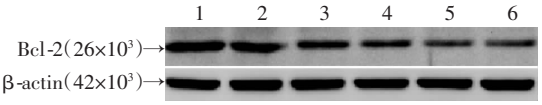
图 6　不同浓度 CuE 处理 Caco-2 细胞 72 h 后活细胞、死细胞和凋亡细胞百分比



1:对照组;2~6:分别为 0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L CuE 组

图 7　不同浓度 CuE 对 Caco-2 细胞 Caspase-3、cleaved Caspase-3、PARP 及 cleaved PARP 蛋白表达的影响

5 种浓度 CuE 处理 Caco-2 细胞 24 h 后,Bcl-2 蛋白表达较对照均有不同程度的降低。CuE 浓度为 0.001 μmol/L 时 Bcl-2 蛋白表达仅有轻微降低,随着 CuE 浓度的增加,Bcl-2 蛋白表达进一步降低(图 8)。表明 CuE 抑制 Bcl-2 蛋白表达具有浓度依赖性。



1:对照组;2~6:分别为 0.001、0.01、0.1、1、10 μmol/L CuE 组

图 8 不同浓度 CuE 对 Caco-2 细胞 Bcl-2 蛋白表达的影响

3 讨论

细胞凋亡是在内源性凋亡相关基因控制下,由一系列细胞代谢变化引起的细胞程序性自主毁灭,通过合成特殊蛋白质而完成的细胞主动死亡过程,是细胞主要功能性活动的重要组成部分[10]。细胞凋亡涉及机体发育过程、组织损伤的修复、血细胞的生成、肿瘤发生、病毒致病等过程,对于多细胞动物正常生命活动有着重要的意义[11]。既往研究[12]表明,细胞凋亡的失控与肿瘤的发生发展密切相关,通过诱导肿瘤细胞凋亡的抗肿瘤措施可能比杀伤肿瘤细胞的抗肿瘤措施具有更明显的优越性。因此,寻找有效诱导肿瘤细胞凋亡的药物是抗肿瘤药物治疗研究的又一重要方面。

事实上,许多抗肿瘤药物均能通过抑制细胞增殖及诱导细胞凋亡这两个肿瘤发生发展的关键环节来发挥抗肿瘤效果。我们近期研究[8]发现,CuE 呈剂量依赖性及时间依赖性地抑制培养的人结肠癌细胞 Caco-2 的增殖与迁移,其机制与 CuE 影响 Caco-2 细胞骨架肌动蛋白的聚合与解聚的动态平衡有关。但 CuE 是否对 Caco-2 的凋亡也有影响,目前尚不清楚。为进一步明确 CuE 抗结肠癌的分子机制,本研究分析了 CuE 在体外对结肠癌 Caco-2 细胞凋亡的影响。本研究细胞核染色、TUNEL 染色及流式分析结果均表明,CuE 能明显引起 Caco-2 细胞凋亡,且与浓度及作用时间有关。浓度越高、作用时间越长,CuE 诱导细胞凋亡的效果越明显。与本研究结果相似,研究[13-15]表明,CuE 能诱导膀胱癌 T24 细胞、口腔鳞状细胞癌 SAS 细胞以及乳腺癌 MDA-MB-468 与 SW527 细胞发生凋亡。

目前关于 CuE 诱导细胞凋亡的机制并不十分清楚。研究[13]认为,CuE 诱导细胞凋亡可能与抑制细胞内 STAT3 磷酸化,升高 P53 和 P21,并减少 CDK1 和 cyclin B 有关。另有研究[14]发现,CuE 可通过线粒体途径和半胱天冬酶依赖途径诱导肿瘤细胞凋亡,Caspase-3 在其中起着非常重要的作用。CuE 诱导肿瘤细胞凋亡的机制也可能与其上调 cyclin D1、survivin、Bcl-2 和 Mcl-1 的表达有关[15]。

细胞凋亡受多个基因调控,其中最重要的是 Bcl-2 家族,主要是抑制细胞凋亡。同时,Caspase 家族在细胞凋亡的过程中起着重要作用,其中 Caspase-3 是介导细胞凋亡的核心蛋白酶,被认为是细胞凋亡蛋白酶级联反应最关键的执行者,在各种因素启动的凋亡程序中起最后枢纽作用[16]。Caspase-3 被上游信号 Bcl-2 等激活后可发生级联反应,通过切割其底物 PARP,导致细胞凋亡发生[17]。为进一步明确 CuE 引起结肠癌细胞 Caco-2 发生凋亡的分子机制,本研究又检测了 CuE 对 Caco-2 细胞 Bcl-2、Caspase-3 及 PARP 蛋白表达的影响。结果表明,CuE 能明显抑制 Bcl-2 蛋白表达,引起 Caspase-3 活化,以及 Caspase-3 的底物 PARP 被剪切。因此,推测 CuE 引起 Caco-2 细胞凋亡的机制可能是通过抑制抗凋亡基因 Bcl-2 表达,激活 Caspase-3,引起 PARP 裂解。至于 CuE 是如何抑制 Bcl-2 表达,目前尚不清楚,有待进一步研究。

综上所述,CuE 能明显引起结肠癌细胞 Caco-2 发生凋亡,其分子机制可能与其抑制 Bcl-2 表达,激活 Caspase-3,从而引起 PARP 裂解有关。

参考文献:

[1] 刘秀均, 李毅, 甄永苏. 博安霉素对小鼠结肠癌及其肝转移的抑制作用[J]. 药学学报, 2001, 36(1): 14-18.

[2] 徐佳, 伍春莲, 彭聪, 等. 雷公藤红素对人肺癌细胞增殖与凋亡的影响[J]. 西华师范大学学报: 自然科学版, 2014, 35(1): 51-56.

[3] Feng H, Zang L, Zhao Z X, *et al*. Cucurbitacin-E inhibits multiple cancer cells proliferation through attenuation of Wnt/beta-catenin signaling [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2014, 29(5): 210-214. DOI: 10.1089/cbr.2014.1614

[4] Ding T, Zhang Y, Chen A, *et al*. Effects of cucurbitacin e, a tetracyclic triterpene compound from Cucurbitaceae, on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in rats [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2015, 116(5): 385-389. DOI: 10.1111/bcpt.12329

[5] Chen J C, Chiu M H, Nie R L, *et al*. Cucurbitacins and cucurbitane glycosides: structures and biological acivities[J]. Nat Prod Rep, 2005, 22(3): 386-399. DOI: 10.1039/b418841c

[6] Abe M, Matsuda K. Chemical factors influencing the feeding preference of three Aulacophora leaf beetle species (Coleoptera: Chrysomelidae) [J]. Appl Entomol Zool, 2005, 40(1): 161-168.

[7] Jayaprakasam B, Seeram N P, Nair M G. Anticancer and antiinflammatory activities of cucurbitacins from Cucurbita andreana[J]. Concer Lett, 2003, 189(1): 11-16.

[8] 李丽, 随何欢, 黄家君. 葫芦素E对人结肠癌细胞Caco-2增殖与迁移的影响及其作用机制[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(13): 1342-1348. DOI: 10.16016/j.1000-5404.201411205

[9] Huang W W, Ko S W, Tsai H Y, *et al*. Cantharidin induces G2/M phase arrest and apoptosis in human colorectal cancer colo 205 cells through inhibition of CDK1 activity and caspase-dependent signaling pathways [J]. Int J Oncol, 2011, 38(4): 1067-1073. DOI: 10.3892/ijo.2011.922

[10] Hassan I H, Zhang M S, Powers L S, *et al*. Influenza A viral replication is blocked by inhibition of the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) stress pathway[J]. J Biol Chem, 2012, 287(7): 4679-4689. DOI: 10.1074/jbc.M111.284695

[11] 陈文强, 于森, 李健. 内质网应激反应诱导细胞凋亡研究[J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2014, 30(1): 21-24. DOI: 10.3969/j.issn.1672-0946.2014.01.005

[12] Kerr J F, Winterford C M, Harmon B V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy[J]. Cancer, 1994, 73(8): 2013-2026.

[13] Huang W W, Yang J S, Lin M W, *et al*. Cucurbitacin E induces G(2)/M phase arrest through STAT3/p53/p21 signaling and provokes apoptosis via Fas/CD95 and mitochondria-dependent pathways in human bladder cancer T24 cells[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 952762. DOI: 10.1155/2012/952762

[14] Hung C M, Chang C C, Lin C W, *et al*. Cucurbitacin E as inducer of cell death and apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cell line SAS[J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(8): 17147-17156. DOI: 10.3390/ijms140817147

[15] Kong Y, Chen J, Zhou Z, *et al*. Cucurbitacin E induces cell cycle G2/M phase arrest and apoptosis in triple negative breast cancer[J]. PLoS One, 2014, 9(7): e103760. DOI: 10.1371/journal.pone.0103760

[16] Pop C, Salvesen G S. Human caspases: activation, specificity, and regulation[J]. J Biol Chem, 2009, 284(33): 21777-21781. DOI: 10.1074/jbc.R800084200

[17] Oliver F J, de-la-Rubia G, Rolli V, *et al*. Importance of poly(ADP-ribose) polymerase and its cleavage in apoptosis. Lesson from an uncleavable mutant[J]. J Biol Chem, 1998, 273(50): 33533-33539.

(**收稿**:2015-07-11;**修回**:2015-07-23)

(编辑 张 维)