

· 药理 ·

基于 PI3K/Akt 通路探讨健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480 细胞增殖、凋亡、周期及 P- β -catenin 表达的影响

张 涛¹ 陈 玉² 王小平³ 平 倩² 林春季² 卓少元²

(1. 广西中医药大学附属瑞康医院消化科, 广西 南宁 530011; 2. 广西中医药大学, 广西 南宁 530000; 3. 江西中医药高等专科学校, 江西 抚州 344700)

摘要 目的: 观察健脾清热活血方对人结肠癌 SW480 细胞凋亡、增殖、周期及 P- β -catenin 蛋白的影响, 探讨该方防治结肠癌可能机制。方法: 培养人结肠癌 SW480 细胞, 分别予空白胎牛血清、不同浓度健脾清热活血方含药血清及 PI3K 阻断剂 LY294002 干预 24 h, MTT 法及流式细胞术检测细胞增殖、凋亡及细胞周期, 免疫荧光染色法检测 P- β -catenin 核内转位。结果: 健脾清热活血方含药血清组细胞增殖抑制率及凋亡率显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); 同时 S 期细胞比例显著升高、G₁ 期细胞比例显著降低 ($P < 0.05$)。健脾清热活血方含药血清组及 LY294002 组细胞 P- β -catenin 以膜表达为主, 而空白对照组 P- β -catenin 以膜表达缺失及核内表达增加为主。结论: 健脾清热活血方可能通过调控 P- β -catenin 核内转录, 阻滞 SW480 细胞周期于 G₁ 期, 诱导细胞凋亡, 抑制细胞增殖, 从而发挥防治结肠癌的效用。

关键词 健脾清热活血方; PI3K 阻断剂; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞周期; 磷酸化 β -连环素蛋白

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 1001-4454(2016)07-1618-05

DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2016.07.041

Experiment on Jianpi Qingre Huoxue Decoction Drug Serum Regulates SW480 Cell Proliferation, Apoptosis, Cycle and the Expression of β -Catenin by Altering PI3K/Akt Signal Pathway

ZHANG Tao¹, CHEN Yu², WANG Xiao-ping³, PING Qian², LIN Chun-li², ZHUO Shao-yuan²

(1. Ruikang Affiliated Hospital of Guangxi University of TCM, Nanning 530011, China; 2. Guangxi University of TCM, Nanning 530000, China; 3. Jiangxi Institute of TCM, Fuzhou 344700, China)

Abstract Objective: To study Jianpi Qingre Huoxue decoction (JPQRHX) in preventing colon cancer by observing SW480 cells proliferation, apoptosis, cycle and the expression of P- β -catenin, and to research its mechanism. Methods: SW480 cells were incubated with serum containing blank serum, different concentrations of JPQRHX decoction and PI3K blocking agent LY294002 for 24 h, respectively. Cell proliferation was detected by MTT assay, cell cycle and apoptosis were detected by flow cytometry. The protein translocation of P- β -catenin was assayed by immunofluorescent staining. Results: The inhibitory rate and apoptosis rate in JPQRHX decoction group were higher than control group ($P < 0.05$), respectively. S phase cells were increased significantly, and G₁ phase cells and LY294002 group cells were decreased significantly ($P < 0.05$). The P- β -catenin in JPQRHX decoction groups were mainly expressed in membrane, while the P- β -catenin in the control group was characterized by deletion in membrane and increased in nucleus. Conclusion: JPQRHX decoction has the ability in curing colon cancer, and the mechanism is associated with altering the expression of P- β -catenin in the cells nucleus, blocking SW480 cells cycle at G₁ phase, inhibiting SW480 cells proliferation, and inducing SW480 cell apoptosis.

Key words Jianpi Qingre Huoxue decoction; PI3K blocking agent; Cell proliferation; Cell apoptosis; Cell cycle; P- β -catenin

研究证实溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 在炎症相关结肠癌的发生发展中占据重要地位, 有效控制炎症对于控制结肠癌的发生发展有着重要意义^[1-3]。课题组前期研究初步证实健脾清热活血方能延缓溃疡性结肠炎相关性结肠癌 (ulcerative colitis-associated cancer, UCAC) 的发展进程, 其靶点可能与调控 β -catenin 异常转位相关^[4]。为进一步明确健脾清热活血方干预结肠癌的有效靶点, 课题组

拟通过离体研究, 从 PI3K 信号通路介导肠上皮细胞增殖、癌变角度出发, 以 PI3K 阻断剂 LY294002 为阳性对照, 分析健脾清热活血方含药血清对结肠癌 SW480 细胞增殖、凋亡、周期及 P- β -catenin 蛋白表达变化的影响。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (200 ± 20) g, 购自广西医科大学实验动物中心, 实验动

收稿日期: 2015-11-19

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81260536); 广西自然科学基金项目 (2013GXNSFAA011916); 广西卫生厅重点项目 (2011041)

作者简介: 张涛 (1976-) 男, 博士, 主任医师, 主要从事中医药治疗炎症性肠病基础与临床研究; E-mail: 327664246@qq.com。

物生产许可证号: SCXK(桂)2009-0002, 实验动物合格证号: 0001869。

1.2 细胞株 人结肠癌细胞株 SW480, 购自上海细胞库。

1.3 药物与试剂 健脾清热活血方由救必应 15 g、白术 10 g、白芍 15 g、水蛭 10 g、三七 10 g、炙甘草 6 g 组成, 实验用中药材购自广西中医药大学第一附属医院仁爱分院, 均为广东康美药业中药饮片产品, 独立包装, 经笔者王小平副教授鉴定均为正品; LY294002(货号: L9908, 购自美国 SIGMA 公司); DMEM 培养液、南美洲胎牛血清 FBS(Hyclone, 货号: SH30070.03, 购自上海慧颖公司); Alexa Fluor 488 annexinV/Dead Cell Apoptosis Kit with Alexa Fluor 488 annexin V、PI(货号: V13241、V13245, 购自美国 Invitrogen 公司); 凯基细胞 DNA 含量检测试剂盒(货号: KGA513, 中国凯基生物, 由广西阳光实验公司代购); FS Universal SYBR Green Mas(货号: 3064760001, 广州聚研生物科技); 荧光一抗 β -catenin(货号: sc-16743-R-FITC, 购自美国 Santa-cruz 公司); 芍药苷(批号: 110736-200833)、三七皂苷 R₁(批号: 110745-200415)、人参皂苷 Rg₁(批号: 110703-200726)、甘草酸铵(批号: 110731-201116) 对照品购自中国食品药品检定研究院。

1.4 主要仪器 Axiovert200 倒置相差显微镜(德国蔡司公司); SZ-93 自动双重纯水蒸馏器(中国上海亚荣生化仪器厂); 5810R 高速低温离心机(德国 Eppendorf 公司); 贝克曼 FACSCalibur 细胞流式分析仪(美国贝克曼公司); LSM700 激光共聚焦显微镜(德国蔡司公司); BSA2202S 电子天平(德国赛多利斯公司); AF100 制冰机(意大利思科特曼公司); QL-901 微型振荡器(中国海门市麒麟医用仪器厂); Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); FST-III-10 精密型超纯水机(中国上海富诗特仪器设备有限公司); KQ3200 超声波清洗器(中国昆山舒美超声仪器有限公司); ABI7500 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司); Bio-BRD PowerPac 系列电泳仪(中国上海斯信生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 健脾清热活血方水提液的制备 用蒸馏水煎煮健脾清热活血方药液, 浓缩配制含生药 1 g/1.5 mL 的药液, 过滤分装 4 °C 保存备用。

2.2 健脾清热活血方含药血清的制备 参照文献报道, 选择正常雄性 SD 大鼠, 予健脾清热活血方水提液灌胃, 参照公式: 给药剂量 = 临床常用量 × 动物等剂量系数 × 培养液内稀释度。即动物等效剂量 ×

培养基内稀释浓度。每日给药 2 次, 连续 7 d, 于末次给药后 1 h 严格无菌操作, 腹主动脉采血, 血样置于 10 mL 离心管, 静置 2 h 以上, 待血块收缩良好后, 3 000 r/min, 15 min 无菌分离血清, 血清以 55 °C 处理 30 min, 用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌, 置 -20 °C 保存备用。

2.3 健脾清热活血方含药血清有效成分检测 应用高效液相色谱法检测健脾清热活血方含药血清。色谱条件为色谱柱: Diamonsil C₁₈ 柱(5 μm, 4.6 × 250 mm); 流动相: 乙腈(A)-0.1% 磷酸溶液(B) 梯度洗脱(0~8 min: 5% A→8% A; 8~20 min: 8% A→8% A; 20~35 min: 8% A→20% A; 35~45 min: 20% A→18% A; 45~55 min: 18% A→15% A; 55~85 min: 15% A→50% A); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 0~64 min: 254 nm; 64~70 min: 203 nm; 70~85 min: 254 nm; 柱温: 35 °C。对照品溶液的制备: 取芍药苷、三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、甘草酸铵对照品适量, 精密称定, 加入甲醇制成每 1 mL 分别含 15.10、10.03、10.22、6.24 μg 的混合对照品溶液, 即得。药物溶液: 取煎煮液 10 mL, 加乙酸乙酯萃取 4 次, 每次 10 mL, 合并萃取液, 蒸干, 用甲醇定容至 2 mL, 临用前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。血清处理: 取空白对照组血清及含药血清各 4 mL, 分别加 8 mL 甲醇, 超声处理 15 min, 离心, 取上清液, 蒸干, 用甲醇定容至 1 mL, 临用前用 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 即得。建立 HPLC 图谱: 精密吸取参照物溶液、空白血清与含药血清 20 μL 及药物溶液 2 μL, 依次注入液相色谱仪, 记录色谱图, 并将其导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统。

2.4 SW480 细胞培养 人结肠癌 SW480 细胞株生长于含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液中, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱, 每间隔 48 h 更换 1 次培养基, 实验时, 细胞用消化液进行消化, 并接种于 96 或 6 孔板中。

2.5 MTT 法检测健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480 细胞增殖的影响 收集对数期的细胞, 调整细胞悬液密度为 1×10^5 /mL, 每孔加入 100 μL, 设 4 个复孔(边缘孔用无菌 PBS 填充), 5% CO₂, 37 °C 培养过夜, 去掉培养液, 加入含不同浓度(5%、10%、20%) 的中药含药血清培养基或正常血清、LY294002, 5% CO₂, 37 °C 培养 24 h, 每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg/mL, 即 0.5% MTT), 继续培养 4 h, 终止培养, 小心吸去孔内培养液, 每孔加入 150 μL 二甲基亚砜, 置摇床上低速振荡 10 min, 使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 490 nm 处测量各孔的

光密度 $D(\lambda)$ 值。

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率}(\%) = \frac{D(\lambda)_{\text{对照孔}} - D(\lambda)_{\text{加药组}}}{D(\lambda)_{\text{对照孔}}} \times 100\%$$

100%

2.6 流式细胞仪检测人结肠癌 SW480 细胞凋亡及周期

2.6.1 细胞凋亡检测: 细胞处理同“2.5”项下, 应用 Annexin V FITC 检测细胞凋亡, 离心(2 000 r/min 离心 5 min) 收集细胞; 用 PBS 洗涤细胞 2 次(2 000 r/min 离心 5 min) 收集 1×10^5 个细胞; 加入 400 μL 的 Binding Buffer 悬浮细胞; 加入 5 μL Annexin V-FITC 混匀后, 加入 5 μL Propidium Iodide, 混匀; 室温、避光、反应 5 ~ 15 min; 用流式细胞仪检测, 激发波长 Ex = 488 nm; 发射波长 Em = 530 nm。

2.6.2 细胞周期检测: 将 SW480 细胞以 1×10^6 接种于 60 mm 培养板, 80% 汇合后传代, 24 ~ 72 h 用胰酶消化收集细胞, PBS 洗 2 遍, 弃上清, 加入 70% 预冷乙醇中, 吹打均匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 12 h 以上, PBS 洗涤去乙醇, 1 000 r/min, 5 min, 洗 2 遍; 0.5 mL PBS 重悬细胞, 加入 PI 和 RNAase 至终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 30 min, 用流式细胞仪检测, 激发波长 Ex = 488 nm; 发射波长 Em = 530 nm。

2.7 激光共聚焦显微镜 + 免疫荧光染色检测 β -catenin 核内转位 细胞爬片后固定-免疫染色封闭液封闭-多重荧光染色-荧光显微镜下观察并拍照 (具体步骤按试剂盒说明操作)。

2.8 统计学处理 应用 SPSS 18.0 统计软件, 所有实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 符合正态分布资料采用单因素方差分析(ANOVA) 检验; 若为非正态分布资料采用 Mann-Whitney U 秩和检验来比较两组间差异是否有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾清热活血方含药血清药效成分的检测 结果如图 1 所示, 药物溶液分别出现了三七皂苷 R_1 、人参皂苷 R_g1 、甘草酸铵对照品峰, 而未见芍药苷峰, 可能原因是白芍药材量少, 且在前处理过程中水解损失所致。在含药血清图 23 个峰信号中, 第 10 号来源于药液; 第 1、2、3、6、7、8、12、13、16、19、20、21、22、23 号峰来源于空白血清, 但峰面积大小存有差异; 第 4、5、9、11、14、15、17、18 号为新增峰信

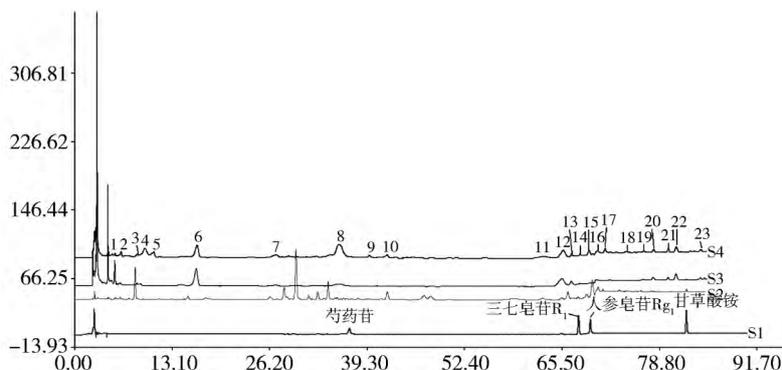


图 1 参照物溶液、空白对照组血清与试验组药物血清图
S1. 参照物 S2. 药物溶液 S3. 空白血清 S4. 药物血清

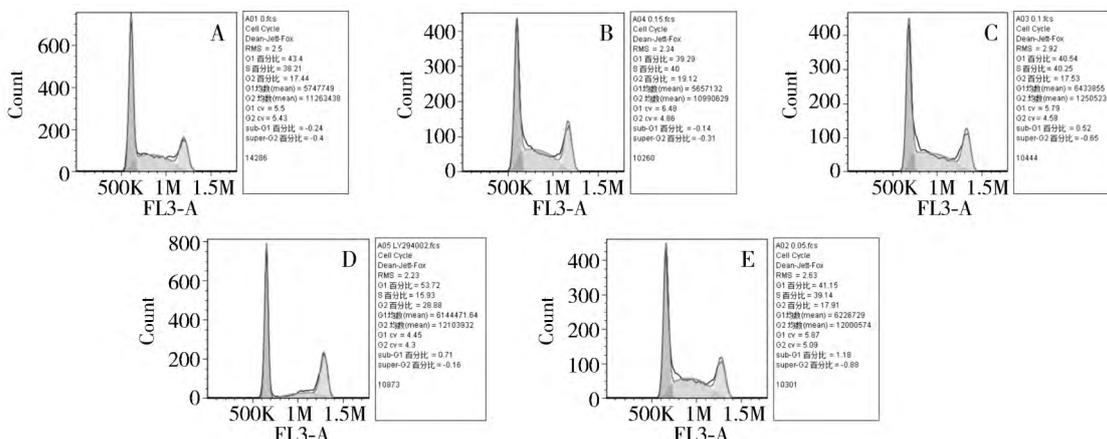


图 2 健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480 细胞周期的影响

A. 健脾清热活血方含药血清低浓度组 B. 健脾清热活血方含药血清中浓度组 C. 健脾清热活血方含药血清高浓度组
D. 空白对照组 E. LY294002 组

号。以上结果表明给药组小鼠血清谱图较空白血清有明显差异,且差异峰信号并非来源于药液中原成分,提示药液中化学成分是经分解或代谢后的产物吸收入血。

3.2 健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480 细胞周期的影响 结果如图 2 所示,与空白对照组比较,各给药组 S 期细胞显著增多, G₁ 期细胞显著减少 ($P < 0.05$),含药血清作用呈浓度依赖性。

3.3 健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480

细胞凋亡的影响 结果如图 3 所示,健脾清热活血方含药血清低浓度组凋亡率 (4.07 ± 0.13)%、中浓度组凋亡率 (5.45 ± 0.15)%、高浓度组凋亡率 (6.72 ± 0.08)%, LY294002 组凋亡率 (14.65 ± 2.54)%; 空白对照组凋亡率 (2.52 ± 0.06)% 各给药组细胞凋亡率均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

3.4 健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480 细胞增殖的影响 结果如图 4 所示,各给药组增殖抑制率均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$)。

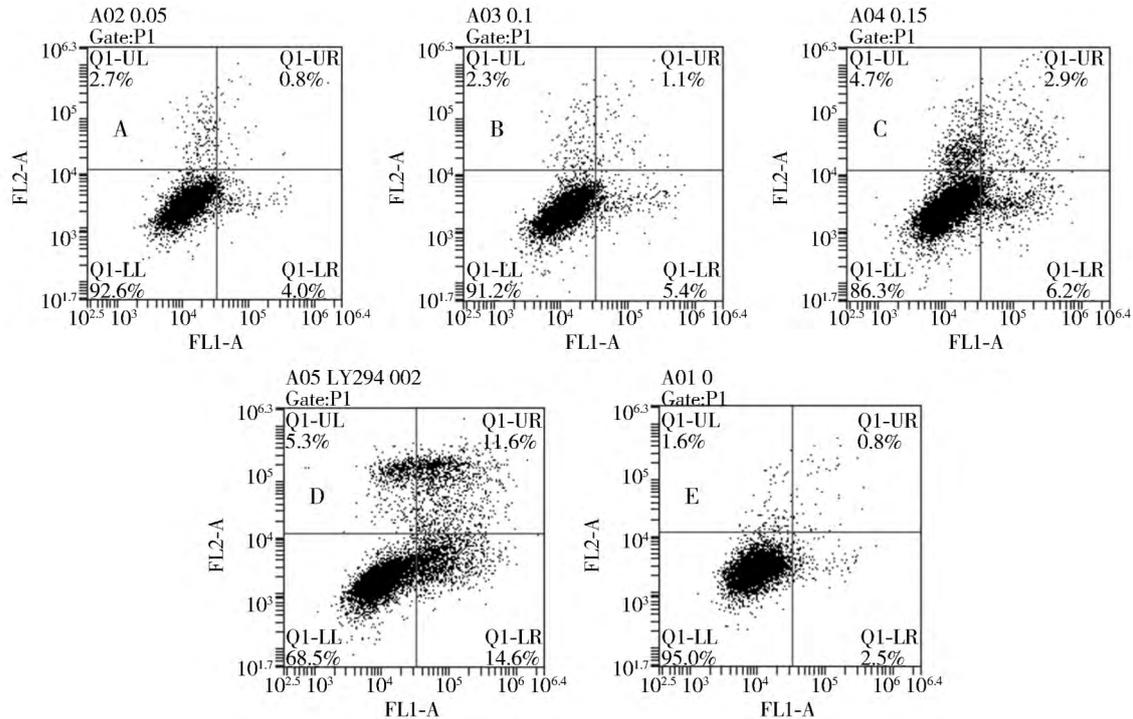


图 3 健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480 细胞凋亡的影响

A. 健脾清热活血方含药血清低浓度组 B. 健脾清热活血方含药血清中浓度组 C. 健脾清热活血方含药血清高浓度组 D. 空白对照组 E. LY294002 组

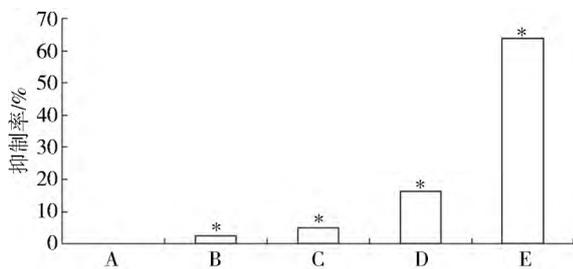


图 4 健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480 细胞增殖的影响

A. 空白对照组 B. 健脾清热活血方含药血清低浓度组 C. 健脾清热活血方含药血清中浓度组 D. 健脾清热活血方含药血清高浓度组 E. LY294002 组

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$

3.5 健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480 细胞 P-β-catenin 蛋白表达的影响 结果如图 5 所示,各含药血清组 P-β-catenin 以膜表达为主,而空

白对照组 P-β-catenin 核内表达增加变化, LY294002 组 P-β-catenin 以膜表达为主,核内表达减少。

4 讨论

UCAC 属于炎症相关性结肠癌,其形成关键在于细胞周期及增殖异常。防治 UCAC 的中心环节在于控制炎症、调控上皮细胞的细胞周期,从而使其增殖减慢或诱导凋亡,进而预防癌变⁽⁸⁻¹⁰⁾。前期课题组已证实 UCAC 发生、发展与炎症持续及 PI3K-Akt/mTOR 信号通路的过度活化及肠上皮细胞的代谢异常有关,阻断 PI3K 通路将有望为 UCAC 的防治提供新的靶点⁽⁶⁾。LY294002 是 PI3K 通路的抑制剂,能化学阻断 PI3K 的磷酸化过程,从而阻碍通路激活。本研究结果显示 LY294002 有明确诱导 SW480 细胞凋亡,阻滞细胞周期,减少磷酸化 β-catenin 蛋白异位转位作用。健脾清热活血方含药血清在诱导 SW480 细胞凋亡,阻滞细胞周期及减少磷酸化 β-

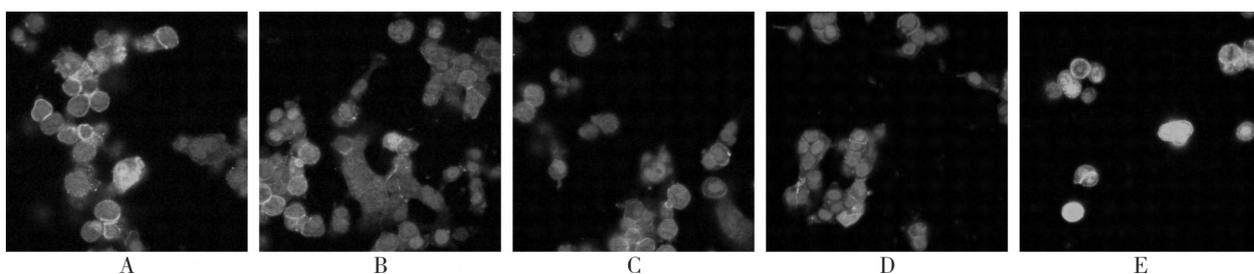


图 5 健脾清热活血方含药血清对人结肠癌 SW480 细胞 P- β -catenin 蛋白表达的影响

A. 健脾清热活血方含药血清低浓度组 B. 健脾清热活血方含药血清中浓度组 C. 健脾清热活血方含药血清高浓度组
D. 空白对照组 E. LY294002 组

catenin 蛋白异位核转录较 LY294002 作用弱,仍具有一定阻滞细胞周期,诱导细胞凋亡,防治结肠癌的效用。

炎症状态下,PI3K 信号亦参与 β -catenin 磷酸化介导肠上皮细胞内瘤变^[7,8]。本实验免疫荧光染色结果提示空白对照组磷酸化 β -catenin 主要表达在胞浆、胞核中,说明磷酸化 β -catenin 异常表达在结肠癌发病中可能占据关键地位;而 LY294002 组磷酸化 β -catenin 蛋白表达以包膜表达为主,核内表达减少;健脾清热活血方含药血清组磷酸化 β -catenin 蛋白表达与 LY294002 组相似。由此可推测健脾清热活血方具有减少磷酸化 β -catenin 蛋白核内表达的作用。

综上所述,健脾清热活血方具有阻滞 SW480 细胞周期于 G₁ 期,诱导细胞凋亡,抑制细胞增殖,发挥防治结肠癌的作用,且呈浓度依赖关系。其机制可能与介导 PI3K 通路,调控磷酸化 β -catenin 核内转录相关。

参 考 文 献

- [1] Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC, et al. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(1): 37-49.
- [2] Schetter AJ, Nguyen GH, Bowman ED. Association of inflammation-related and microRNA gene expression with cancer-specific mortality of colon adenocarcinoma [J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(18): 5878-5887.
- [3] Wasan SK, Coukos JA, Farraye FA, et al. Vaccinating the inflammatory bowel disease patient: deficiencies in gastroenterologists knowledge [J]. *Inflammatory bowel diseases*, 2011, 17(12): 2536-2540.
- [4] 王喜周, 张涛, 陈远能, 等. 健脾清热活血类方药介导 β -catenin、C-myc 表达干预溃疡性结肠炎相关癌变研究 [J]. *中成药*, 2012, 34(2): 226-229.
- [5] 张涛, 梁建英, 黄会云, 等. Wnt/ β -catenin-TCF 信号通路介导溃疡性结肠炎相关癌变分子机制研究 [J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(6): 1536-1537.
- [6] 张涛, 黄会云, 曹火留, 等. PI3K-Akt/mTOR 通路调控 P- β -catenin 介导溃疡性结肠炎相关癌变及健脾清热活血方防治研究 [J]. *时珍国医国药*, 2013, 24(8): 2039-2041.
- [7] Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue *in vitro* [J]. *Nature*, 2011, 470(7332): 105-109.
- [8] Munding J, Ziebarth W, Pox CP, et al. The influence of 5-aminosalicylic acid on the progression of colorectal adenomas via the β -catenin signaling pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(3): 637-643.