

白藜芦醇联合奥沙利铂对人结肠癌细胞恶性生物学行为的抑制作用及机制

赵桂柱 孙占军 温志鹏

(内蒙古包钢医院药学部, 包头, 014010)

摘要 目的:探讨白藜芦醇(Res)联合奥沙利铂(Oxa)对人结肠癌细胞恶性生物学行为的抑制作用及机制。方法:将体外培养结肠癌 HCT-116 细胞分为 Res 组、Oxa 组、联合组及对照组,分别以 100 $\mu\text{mol/L}$ Res、2 $\mu\text{mol/L}$ Oxa、100 $\mu\text{mol/L}$ Res + 2 $\mu\text{mol/L}$ Oxa、等量生理盐水处理,各组分别处理 24、36、48 h。采用噻唑蓝(MTT)法检测结肠癌 HCT-116 细胞增殖抑制情况;采用 Transwell 小室实验检测结肠癌 HCT-116 细胞侵袭能力;Wound Healing 法检测结肠癌 HCT-116 细胞迁移能力;采用蛋白免疫印迹法检测结肠癌 HCT-116 细胞波形蛋白(Vimentin)蛋白表达情况。结果:干预 48 h 时,Res 组、Oxa 组及联合组结肠癌 HCT-116 细胞增殖抑制率分别为(28.41 $\pm$ 6.25)%、(36.11 $\pm$ 8.47)%、(83.61 $\pm$ 12.72)%;干预 48 h 时,对照组、Res 组、Oxa 组及联合组结肠癌 HCT-116 细胞侵袭率分别(97.14 $\pm$ 2.81)%、(81.23 $\pm$ 4.52)%、(69.84 $\pm$ 3.97)%、(37.11 $\pm$ 3.58)%;迁移率分别为(68.57 $\pm$ 4.02)%、(46.11 $\pm$ 3.13)%、(31.25 $\pm$ 2.86)%、(18.79 $\pm$ 2.21)%;Vimentin 蛋白相对表达量分别为 0.93 $\pm$ 0.14、0.52 $\pm$ 0.08、0.31 $\pm$ 0.04、0.13 $\pm$ 0.02。Res 组、Oxa 组及联合组结肠癌 HCT-116 细胞增殖抑制率呈逐渐升高趋势($P < 0.05$);与对照组比较,Res 组、Oxa 组及联合组结肠癌 HCT-116 细胞侵袭率、迁移率和 Vimentin 蛋白相对表达量降低,且联合组显著低于 Res 组与 Oxa 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:Res 与 Oxa 联合使用具有显著的协同效应,可更有效抑制结肠癌 HCT-116 细胞增殖,并降低其侵袭和迁移能力,其机制可能与下调 Vimentin 蛋白表达有关。

关键词 结肠癌;白藜芦醇;奥沙利铂;增殖;侵袭;迁移;波形蛋白;抗肿瘤;上皮细胞-间充质转化

Inhibitory Effect and Mechanism of Resveratrol Combined with Oxaliplatin on the Malignant Biological Behavior of Human Colon Cancer Cells

Zhao Guizhu, Sun Zhanjun, Wen Zhipeng

(Department of Pharmacy, Baogang Hospital, Baotou 014010, China)

Abstract Objective: To investigate the inhibitory effect and mechanism of resveratrol (Res) combined with oxaliplatin (Oxa) on the malignant biological behavior of human colon cancer cells. **Methods:** Colon cancer HCT-116 cells were cultured in vitro. The Res group, the Oxa group, the combination group and the control group were treated with 100 $\mu\text{mol/L}$ Res, 2 $\mu\text{mol/L}$ Oxa and 100 $\mu\text{mol/L}$ Res + 2 $\mu\text{mol/L}$ Oxa, the same amount of saline, and each group was treated for 24, 36, 48 h. The inhibition of proliferation of colon cancer HCT-116 cells was detected by MTT assay; Transwell chamber assay was used to detect the invasion ability of colon cancer HCT-116 cells; Wound healing method was used to detect the migration ability of colon cancer HCT-116 cells; The expression of Vimentin protein(vimentin) in colon cancer HCT-116 cells was detected by Western blotting(Wb) method. **Results:** At 48 h after intervention, the proliferation inhibition rates of HCT-116 cells in the Res group, the Oxa group and the combination group were(28.41 $\pm$ 6.25)%, (36.11 $\pm$ 8.47)% and (83.61 $\pm$ 12.72)%, respectively; At 48 h after intervention, the invasive rates of HCT-116 cells in the control group, the Res group, the Oxa group and the combination group were(97.14 $\pm$ 2.81)%, (81.23 $\pm$ 4.52)%, (69.84 $\pm$ 3.97)%, (37.11 $\pm$ 3.58)%, respectively; The mobility rates were(68.57 $\pm$ 4.02)%, (46.11 $\pm$ 3.13)%, (31.25 $\pm$ 2.86)%, and (18.79 $\pm$ 2.21)%, respectively; The relative expression levels of Vimentin protein were(0.93 $\pm$ 0.14), (0.52 $\pm$ 0.08), (0.31 $\pm$ 0.04), and (0.13 $\pm$ 0.02), respectively. The proliferation inhibition rate of colon cancer HCT-116 cells in the Res group, the Oxa group and the combination group increased gradually($P < 0.05$); Compared with the control group, the invasion rate, mobility rate and Vimentin protein expression of HCT-116 cells in the Res group, the Oxa group and the combination group significantly decreased, and the combination group was significantly lower than the Res group and the Oxa group(all $P < 0.05$). **Conclusion:** The combination of Res and Oxa has significant synergistic effect, which can inhibit the proliferation of colon cancer HCT-116 cells and reduce its invasion and migration rate, and its mechanism may be related to the down-regulation of Vim-

基金项目:2019 年内蒙古自治区自然科学基金项目(2019MS08181)

作者简介:赵桂柱(1972.01—),男,本科,副主任药师,研究方向:药事管理、药物治疗和药品管理,E-mail:zg1319069006@163.com

通信作者:温志鹏(1981.11—),男,硕士,主管药师,研究方向:药理学,E-mail:wenzhipeng@163.com

entin protein expression.

Key Words Colon cancer; Resveratrol; Oxaliplatin; Proliferation; Invasion; Migrate; Vimentin; Antitumor; Epithelial-mesenchymal transition

中图分类号:R284;R735.3 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2019.12.022

奥沙利铂(Oxa)是继顺铂和卡铂之后的第三代铂类抗癌药物,具有较好的抗肿瘤效果,且目前已成为临床治疗胃癌及结直肠癌的一线化疗药物,白藜芦醇(Res)具有抗肿瘤、抗衰老、抗炎、抗氧化及抗血栓等多种药理学作用,已有研究证实,Res 可对人乳腺癌、肝癌、胃癌、白血病等多种肿瘤细胞拮抗作用^[1]。研究报道,Oxa 和 Res 联用具有协同抑制结直肠癌细胞增殖的作用,其机制与抑癌基因 miR-34c 表达上调有关^[2]。研究发现,Res 能逆转人大肠癌细胞对 Oxa 耐药,进而抑制人大肠癌细胞增殖,诱导其凋亡^[3]。本研究旨在探讨 Res 联合 Oxa 对人结肠癌细胞恶性生物学行为的抑制作用及机制,为临床治疗结肠癌提供指导。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 结肠癌 HCT-116 细胞,购自南京凯基生物公司。

1.1.2 药物 Res(美国 Sigma 公司,批号:AM569872),规格:5 g,纯度>99%;Oxa(长沙华美医药科技开发有限公司,批号:201845683),规格:50 mg。

1.1.3 试剂与仪器 主要试剂:胎牛血清、DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,型号:CQ-80L);噻唑蓝(MTT)(美国 Sigma 公司,型号:298-93-1);Matrigel 胶(美国 BD 公司,型号:40234A);兔抗人 Vimentin 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司,型号:AZ050)等。主要仪器:CO₂ 培养箱(英国 RS Biotech 公司,型号:GALAXYS);超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司,型号:SW-CJ-1FD);小室(美国 Corning 公司,型号:Transwell);光学倒置显微镜(日本 Olympus 公司,型号:CKX41);蛋白垂直电泳仪(上海能科技有限公司,型号:VE-180);全自动酶标仪(美国 Bio-Rad 公司,型号:606 型);Image Pro Plus 软件(美国 Media Cybernetics 公司,型号:Image Pro Plus);图像分析软件(德国 Leica 公司,型号:Leica QWin)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将结肠癌 HCT-116 细胞分为 Res 组、Oxa 组、联合组及对照组。用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青、链霉素的 DMEM 培养基在 37℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养结肠癌 HCT-116

细胞^[4],取对数期结肠癌 HCT-116 细胞,接种于 96 孔板中。

1.2.2 给药方法 Res 组、Oxa 组、联合组及对照组分别以 100 μmol/L Res、2 μmol/L Oxa、100 μmol/L Res + 2 μmol/L Oxa、等量生理盐水处理,20 μL/孔,各组分别处理 24、36、48 h。

1.2.3 检测指标与方法 MTT 法检测结肠癌 HCT-116 细胞增殖抑制情况:细胞分组及处理同 1.2.1,分别于干预 24、36、48 h 后,加 MTT(5 mg/mL)溶液 20 μL,孵育 4 h,并设置 8 复孔,且各组均重复 3 次^[5]。于 570 nm 波长处检测各孔吸光度值 OD_{570 nm}。结肠癌 HCT-116 细胞增殖抑制率(%) = (1 - 实验组 OD_{570 nm}/对照组 OD_{570 nm}) × 100%。

Transwell 小室实验检测结肠癌 HCT-116 细胞侵袭力:于 Transwell 小室上室铺 Matrigel 基质胶 50 μL,加无血清 DMEM 培养基,平衡 12 h;胰酶消化,离心,1 500 r/min,5 min,收集对数期结肠癌 HCT-116 细胞,无血清培养基悬浮细胞,500 μL/室^[6]。于下室置含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,干预 48 h 时,棉签去除上室上的细胞,0.5% 结晶紫染色。于光学倒置显微镜下观察并计数侵袭细胞数量。侵袭率(%) = 下室细胞数量/细胞总数量 × 100%。

Wound Healing 法检测结肠癌 HCT-116 细胞迁移能力:将对数期细胞调整浓度为 5 × 10⁵ 个/mL,接种于 6 孔板中。以 200 μL 无菌移液器枪头垂直于单层细胞划痕,划痕面积约 10 mm × 1 mm。各孔加含 0.1% 胎牛血清的培养基。由于结肠癌 HCT-116 细胞具有迁移能力,继续培养划痕会逐步融合,分别于干预 0、24、36、48 h 时在光学倒置显微镜下观察^[7],以 Image Pro Plus 软件计算划痕愈合率(%) = (0 h 时划痕宽度 - 24/36/48 h 时划痕宽度)/0 h 时划痕宽度 × 100%。

蛋白免疫印迹法检测结肠癌 HCT-116 细胞 Vimentin 蛋白表达情况:细胞分组及处理同 2.1,收集各组干预 48 h 时的细胞,提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,取 50 μg 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,以 β-actin 为内参,经 Leica QWin 图像分析软件进行分析结肠癌 HCT-116 细胞 Vimentin 蛋白相对表达情况^[8]。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验;多组间比较采用单因素方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组不同时间点结肠癌 HCT-116 细胞增殖抑制情况 各组结肠癌 HCT-116 细胞增殖抑制率均随时间延长而逐渐升高,且联合组显著高于 Res 组、Oxa 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见表 1。

表 1 各组不同时间点结肠癌 HCT-116 细胞增殖抑制情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	24 h	36 h	48 h
对照组(<i>n</i> = 24)	—	—	—
Res 组(<i>n</i> = 24)	7.34 ± 2.12	16.52 ± 4.43	28.41 ± 6.25
Oxa 组(<i>n</i> = 24)	10.69 ± 2.76 *	23.62 ± 5.31 *	36.11 ± 8.47 *
联合组(<i>n</i> = 24)	25.03 ± 5.46 * [△]	51.53 ± 9.93 * [△]	83.61 ± 12.72 * [△]

注:与 Res 组比较,**P* < 0.05;与 Oxa 组比较,[△]*P* < 0.05;—为无数据

2.2 各组干预 48 h 后结肠癌 HCT-116 细胞侵袭能力比较 干预 48 h,对照组、Res 组、Oxa 组及联合组结肠癌 HCT-116 细胞侵袭率分别为 (97.14 ± 2.81)%、(81.23 ± 4.52)%、(69.84 ± 3.97)%、(37.11 ± 3.58)%。与对照组比较,Res 组、Oxa 组及联合组结肠癌 HCT-116 细胞侵袭率均显著降低,且联合组显著低于 Res 组、Oxa 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 1。

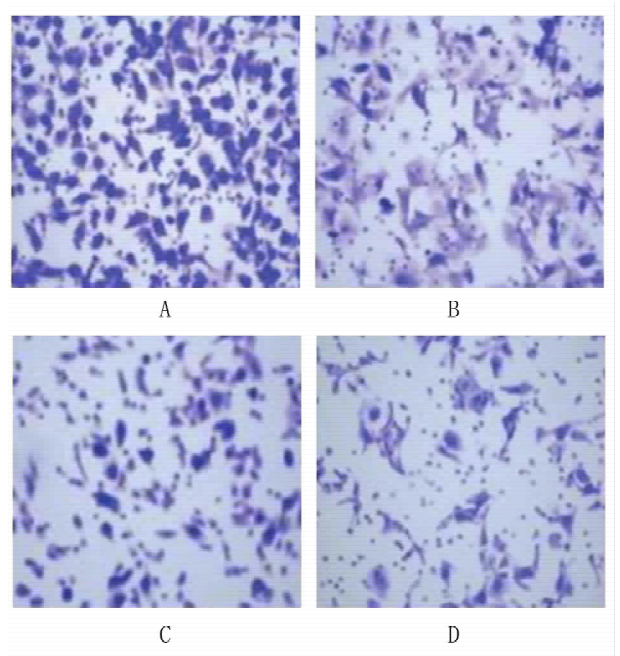


图 1 Transwell 小室实验检测结肠 Resveratrol group 癌 HCT-116 细胞侵袭能力(×200)
注:A:对照组;B:Res 组;C:Oxa 组;D:联合组

2.3 各组干预后结肠癌 HCT-116 细胞迁移能力比较 干预 24 h 时,对照组、Res 组、Oxa 组及联合组结肠癌 HCT-116 细胞迁移率分别为 (18.41 ± 2.16)%、(6.57 ± 0.54)%、(3.12 ± 0.29)%、(1.24 ± 0.11)%;干预 36 h 时,各组迁移率分别为 (37.39 ± 3.22)%、(18.54 ± 2.23)%、(14.11 ± 1.78)%、(2.33 ± 0.25)%;干预 48 h 时,各组迁移率分别为 (68.57 ± 4.02)%、(46.11 ± 3.13)%、(31.25 ± 2.86)%、(18.79 ± 2.21)%。随干预时间延长,各组结肠癌 HCT-116 细胞迁移率逐渐升高;与对照组比较,Res 组、Oxa 组及联合组结肠癌 HCT-116 细胞迁移率均显著降低,且联合组显著低于 Res 组与 Oxa 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 2。

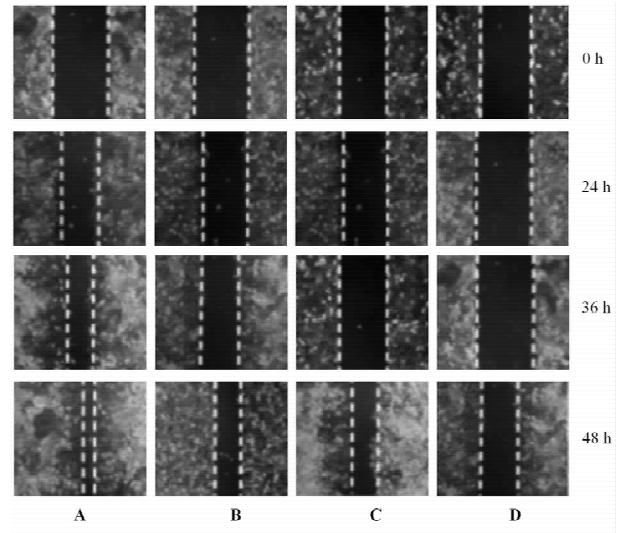


图 2 光学倒置显微镜下观察结肠癌 HCT-116 细胞迁移情况(×200)
注:A:对照组;B:Res 组;C:Oxa 组;D:联合组

2.4 各组干预 48 h 后结肠癌 HCT-116 细胞 Vimentin 蛋白表达情况 干预 48 h,对照组、Res 组、Oxa 组及联合组结肠癌 HCT-116 细胞 Vimentin 蛋白相对表达量分别为 (0.93 ± 0.14)、(0.52 ± 0.08)、(0.31 ± 0.04)、(0.13 ± 0.02)。与对照组比较,Res 组、Oxa 组及联合组 Vimentin 蛋白相对表达量显著降低,且联合组显著低于 Res 组、Oxa 组,差异有统计学意义(*P* < 0.05)。见图 3。

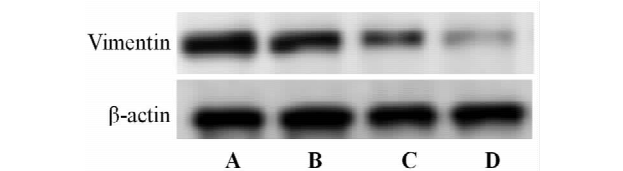


图 3 蛋白质免疫印迹法检测结肠癌 HCT-116 细胞波形蛋白(Vimentin)表达
注:A:对照组;B:Res 组;C:Oxa 组;D:联合组

3 讨论

Oxa 以 DNA 为作用靶点,通过形成铂化 DNA 化合物而抑制 DNA 的合成,并抑制 DNA 的修复,从而激活信号传导通路引起细胞死亡,发挥抗肿瘤的作用。Res 又名芪三酚,是一种天然多酚类的植物抗毒素。研究显示,Res 除具有抗炎、抗氧化、保护神经系统、调节骨代谢及雌激素等多种药理学作用外,还可通过抑制肿瘤细胞增殖,诱导其凋亡,抑制癌基因表达及干预信号转录等发挥抗肿瘤作用^[9]。研究报道,Oxa 可抑制人结肠癌 SW620 细胞增殖,其机制可能与抑制 SW620 细胞内源性核因子- κ B、信号传导与转录激活因子 3 (STAT3) 表达有关^[10]。高俊英等^[11]研究发现,Res 可通过影响上皮细胞-间充质转化 (EMT) 过程、调控 micro RNAs 家族的表达来影响上皮肿瘤细胞的侵袭和迁移,提示 Res 可通过抑制肿瘤细胞的侵袭迁移控制肿瘤的发展。也有研究表明,Res 可显著抑制胰腺癌 Miapaca-2 细胞的侵袭转移,且其抑制能力与药物浓度正相关^[12]。本研究结果显示,联合组结肠癌 HCT-116 细胞增殖抑制率显著高于 Res 组、Oxa 组,与对照组比较,Res 组、Oxa 组及联合组结肠癌 HCT-116 细胞侵袭及迁移率均显著降低,且联合组显著优于 Res 组与 Oxa 组,提示 Res 可抑制结肠癌 HCT-116 细胞增殖,降低其侵袭和迁移能力,且 Res 与 Oxa 联用具有显著的协同效应。EMT 过程与肿瘤细胞侵袭、转移等密切相关。研究发现,三氧化二砷和 Res 联合使用可有效抑制肺癌细胞人侵袭、迁移,可能与下调 Vimentin 水平,抑制细胞基质的降解和 EMT 过程有关^[13]。臧春宝等^[14]研究发现,Res 可调控 EMT 蛋白表达,下调 Vimentin 蛋白表达水平,抑制 EMT,进而降低食管癌细胞的侵袭、迁移,提示 Res 可通过抑制 EMT 发生,控制肿瘤细胞的侵袭和迁移。本研究结果显示,Res 组、Oxa 组及联合组 Vimentin 蛋白相对表达量显著低于对照组,且联合组显著低于 Res 组、Oxa 组,提示 Res 可下调 Vimentin 蛋白的表达,进而发挥抗肿瘤的作用。

综上所述,Res 能明显抑制结肠癌 HCT-116 细

胞增殖,同时降低其侵袭、迁移和 Vimentin 蛋白表达,与 Oxa 联用,可增强抗肿瘤作用,为临床治疗结肠癌提供了新思路。

参考文献

- [1] Carter LG, D'Orazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence [J]. *Endocr Relat Cancer*, 2014, 21 (3): R209-225.
- [2] 常环环, 杨姝, 李文帅, 等. 白藜芦醇与奥沙利铂联合应用抑制结肠癌细胞增殖的机制 [J]. *解剖学杂志*, 2017, 40 (2): 125-128, 136.
- [3] 王子元, 孙筱婷, 吴丽莉, 等. 白藜芦醇对人大肠癌耐药细胞增殖及凋亡的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2017, 4 (3): 55-60.
- [4] 赵绿翠, 廖科, 李科琼, 等. 吴茱萸碱调控人结肠癌 HCT 116 细胞中 JAK2/STAT3 信号通路的机制研究 [J]. *中国药理学通报*, 2015, 14 (10): 1394-1398.
- [5] 张喆, 陈信义, 郑智. 复方浙贝颗粒药物血清对人结肠癌 HCT-116 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. *中医杂志*, 2015, 56 (1): 55-58.
- [6] 杨柳婷, 姜蓬垒, 祖丹丹, 等. NK4 基因联合奥沙利铂对人结肠癌细胞株 HCT116 凋亡和侵袭的影响 [J]. *中国癌症防治杂志*, 2017, 9 (6): 456-461.
- [7] 诸葛春风, 刘诗权, 谭林, 等. SphK1 和 FAK 对人结肠癌 HCT116 细胞上皮间质转化的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2016, 32 (3): 439-444.
- [8] Kurokawa K, Akaike Y, Masuda K, et al. Downregulation of serine/arginine-rich splicing factor 3 induces G1 cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells [J]. *Oncogene*, 2014, 33 (11): 1407-1417.
- [9] 孙菁, 王世卉. 白藜芦醇对刀豆素 A 诱导小鼠自身免疫性肝炎的保护作用 [J]. *贵州医科大学学报*, 2018, 43 (7): 768-774.
- [10] 林昌荣, 杨建荣, 李碧锦, 等. 奥沙利铂对人结肠癌细胞 NF- κ B、STAT3 表达影响 [J]. *中国公共卫生*, 2015, 31 (8): 1053-1055.
- [11] 高俊英, 季淑华, 郑兆娣, 等. 白藜芦醇抑制上皮肿瘤细胞侵袭和迁移的机制 [J]. *生命科学*, 2018, 30 (7): 752-757.
- [12] 秦勇, 马清涌, 党晓燕, 等. 白藜芦醇对胰腺癌 Miapaca-2 细胞侵袭转移能力影响的体外观察 [J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2014, 35 (1): 64-68.
- [13] 郭天利, 李宏健, 庞慧, 等. 三氧化二砷联合白藜芦醇对肺癌细胞侵袭、迁移的影响及机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38 (12): 2972-2974.
- [14] 臧春宝, 刘云琴, 葛宁, 等. 白藜芦醇对食管鳞癌 Eca-109 细胞侵袭迁移及 EMT 的影响 [J]. *蚌埠医学院学报*, 2015, 40 (12): 1617-1620, 1623.

(2019-09-27 收稿 责任编辑: 杨觉雄)