

异鼠李素诱导 HCT116 细胞自噬

刘 佳^{1,2}, 郭文洁¹, 耿 骥¹, 谈德斐¹, 汤新慧^{2*}, 高 静^{1*}

(1. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 2. 盐城师范学院江苏省滩涂生物资源与环境保护重点建设实验室, 江苏 盐城 224051)

摘要: **目的** 研究中华补血草 [*Limonium sinense* (Girard) Kuntz] 中主要抗癌活性成分之一异鼠李素诱导人结直肠癌 (HCT116) 细胞自噬的机理。**方法** 采用四唑盐比色法 (MTT) 检测异鼠李素对 HCT116 细胞的抑制作用, 单丹尸磷酰胺 (MDC) 染色法检测自噬小泡的形成, 蛋白印迹法 (Western blot) 检测自噬相关蛋白 LC3 的表达情况。**结果** 异鼠李素明显抑制 HCT116 细胞的增殖, 且呈剂量依赖性效应。异鼠李素处理 24 h 后, 自噬小泡形成增多, LC3 蛋白表达增强。3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 预处理能够明显降低异鼠李素对肿瘤细胞的抑制作用。**结论** 实验结果显示中华补血草中的异鼠李素可以诱导 HCT116 细胞发生自噬, 导致细胞死亡。

关键词: 中华补血草; 异鼠李素; HCT116 细胞; 细胞自噬

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2015)12-2596-04

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2015.12.005

Isorhamnetin induces autophagy in HCT116 cells

LIU Jia^{1,2}, GUO Wen-jie¹, GEN Ji¹, TAN De-fei¹, TANG Xin-hui^{2*}, GAO Jing^{1*}

(1. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Jiangsu Provincial Key Laboratory of Coastal Wetland Bioresources and Environmental Protection, Yancheng Normal University, Yancheng 224051, China)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the mechanism for the isorhamnetin-induced autophagy of human colon carcinoma cell line HTC116, which was one of the anticancer constituents from *Limonium sinense* (Girard) Kuntze. **METHODS** (MTT) assay was performed on the inhibitory effect of isorhamnetin against HCT116 cells; the formation of autophagic vacuoles and the expression of autophagy-related protein LC3 were assessed by monodansylcadervarine (MDC) staining and Western blot, respectively. **RESULTS** Isorhamnetin obviously exhibited the inhibition on HCT116 cells proliferation in a dose-dependent manner. After being treated with isorhamnetin for 24 hours, both the fluorescence intensity of MDC and the expression of protein LC3 were significantly enhanced. Furthermore, the inhibitory effect of isorhamnetin against HCT116 cells was weakened as these cells were pretreated with 3-methyladenine (3-MA). **CONCLUSION** Isorhamnetin can induce the autophagic cell death in HCT116.

KEY WORDS: *Limonium sinense* (Girard) Kuntze; isorhamnetin; human colon carcinoma cell line (HCT116 cells); autophagy

中华补血草 [*Limonium sinense* (Girard) Kuntz] 是蓝雪科补血草属植物, 为多年泌盐草本植物, 具有耐盐、耐瘠、耐旱、耐湿等特点, 广泛分布于我国东北、华北等地区, 尤以江苏、浙江、福建省沿海滩涂分布甚广^[1]。该植物适应性强, 人工栽培产量高^[2]。中华补血草是一种传统的中草药, 具有清热解毒、止血散瘀、祛风消炎、抗癌等作用^[3], 它的活性成分主要包括异鼠李素、甘

收稿日期: 2014-10-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81102817)

作者简介: 刘 佳 (1990—), 女, 硕士生, 主要从事生药药理研究。Tel: 18361811921, E-mail: average97@126.com

* 通信作者: 汤新慧 (1966—), 女, 教授, 博士, 主要从事药理学研究。E-mail: xinhuitang@sina.com

高 静 (1966—), 女, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事药理学研究。E-mail: jinggao@ujs.edu.cn

露醇、 β -谷甾醇、齐墩果酸、槲皮素、没食子酸乙酯、山柰酚等^[4-5]。

异鼠李素 (isorhamnetin), 也称 3,5,7-三羟基-2-(4-羟基-3-甲氧基苯基) 苯并吡喃-4-酮, 是一种黄酮类化合物, 存在于多种植物中, 是中华补血草中主要单体之一^[6]。已有研究表明, 异鼠李素具有清除氧自由基、扩张血管降血压、降低血胆固醇、防止冠状动脉粥样硬化等作用^[7]。另外, 异鼠李素还具有显著的抗肿瘤作用, 可抑制如胃癌、肺癌、肝癌等细胞的生长^[8-9]。目前, 有关异鼠李素抗肿瘤作用的机理研究主要集中在其抑制细胞增殖、诱导凋亡方面^[10-12], 而细胞的死亡方式不仅有凋亡, 作为细胞发生死亡的另一种机制—自噬, 在抗肿瘤的研究中日渐引起广泛注意^[13]。因此, 本实验从抑制肿瘤细胞生长, 诱导细胞自噬方面对异鼠李素抑制 HCT116 细胞的作用进行了研究。

1 材料与仪器

DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (杭州四季青生物工程公司); MTT、胰酶 (美国 Amresco 公司); MDC (美国 Sigma 公司); LC3 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司); 中华补血草, 采自江苏省盐城滩涂, 由盐城师范学院于延球副教授鉴定。

HealForce CO₂ 孵箱; TS100 Nikon 倒置相差显微镜 (日本 Nikon 公司); Spectra Max 190 酶标仪 (美国 Molecular Device 公司); Nikon eclipse Ti-E 荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); Mini-PROTEIN 电泳系统 (美国 Biorad 公司)。

2 方法

2.1 异鼠李素提取与分离方法 中华补血草根 3.6 kg, 粉碎, 用 95% 乙醇回流提取 3 次, 滤过, 合并滤液, 减压浓缩回收溶剂, 得粗浸膏, 加水依次用等体积石油醚、氯仿、乙酸乙酯、正丁醇各萃取浓缩物 3 次, 回收溶剂得各部分萃取物, 分别合并萃取物, 得到 5 个萃取部位, 分别为: 石油醚部位 (LSPF) 62.7 g, 氯仿部位 (LSCF) 40.6 g, 乙酸乙酯部位 (LSEF) 58.2 g, 正丁醇部位 (LSBF) 81.3 g 和水部位 (LSWF) 93.4 g。取氯仿部位和乙酸乙酯部位, 利用凝胶柱色谱、制备薄层色谱、ODS 柱色谱、Sephadex LH-20 进一步纯化, 从氯仿部位得到化合物 **1** (30.7 mg)、**2** (16.8 mg)、**3** (24.1 mg)、**4** (56.8 mg)、**5** (46.2 mg); 从乙酸乙酯部位得到化合物 **6** (103.4 mg)、**7** (22.6 mg)、**8** (206.0 mg)、**9** (31.9 mg)、**10** (93.4

mg)、**11** (9.7 mg)、**12** (32.7 mg)、**13** (45.3 mg)、**14** (21.7 mg)。经过抗肿瘤活性筛选, 取活性较好的化合物 **1**、**4**、**5**、**6**、**8**、**10**, 经结构鉴定分别为异鼠李素 (纯度 $\geq 95\%$)、齐墩果酸、乌苏酸、槲皮素、没食子酸、木犀草素。

2.2 细胞培养 人肿瘤细胞, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37 ℃、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。

2.3 MTT 法检测细胞活性 取对数生长期细胞, 以 4×10^4 个/mL 的密度接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μ L。以不同剂量的化合物处理细胞 48 h 后, 去上清, 每孔加入 100 μ L MTT (1 mg/mL), 继续培养 4 h, 弃上清, 每孔加入 100 μ L 二甲基亚砷, 振荡混匀, 用酶标仪在 570 nm 处测定吸光度值 (*D*) 值, 每组 5 个复孔, 实验重复 3 次。计算抑制率, 公式: 抑制率 (%) = (1 - 给药组吸光度值/对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。

2.4 MDC 染色检测自噬小泡的形成 取对数生长期的 HCT116 细胞, 以 4×10^4 个/mL 的密度接种于 24 孔板中, 每孔 500 μ L, 以一定剂量的化合物处理细胞后, 加入 50 μ mol/L MDC 染液 300 μ L 避光孵育 30 min, 荧光显微镜下观察自噬小泡的产生。

2.5 Western blot 检测 LC3 蛋白的表达 收集细胞, 离心, PBS 洗两次, 加入一定量的细胞裂解液, 置冰上裂解 30 min, $12\,000 \times g$ 离心 5 min, 吸上清。用 BCA (bicinchoninic acid) 蛋白定量法进行定量, 其余样品按比例加入 6 $\times$ SDS 凝胶上样缓冲液溶解, 煮沸 5 min。取 20 μ g 蛋白样品进行 15% 的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳; 在 300 mA 恒流的条件下、将蛋白转至聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上; 将膜置于封闭液中封闭 2 h; 一抗孵育 4 ℃ 过夜; 之后用磷酸盐吐温缓冲液 (PBST) 清洗; 二抗室温孵育 2 h; 再用 PBST 清洗; ECL 发光液检测目的条带。

3 结果

3.1 异鼠李素抑制 HCT116 细胞的增殖 将不同剂量的异鼠李素作用于 3 种肿瘤细胞株 (HCT116、Hela、HepG2), 48 h 后检测细胞活性, 计算 IC₅₀。从表 1 可以看出, 异鼠李素对不同肿瘤细胞作用效果不同, 对 HCT116 细胞的效果最为明显, 如图 1 所示, 随着剂量的增加, 异鼠李素对 HCT116 细胞的抑制率也有所增加。用倒置相差显微镜观察细胞的生长情况 (图 2), 与空白组相比, 异鼠李素处

理组随着剂量的增加，细胞的形态学发生明显改变，细胞数目减少。

表 1 异鼠李素作用 48 h 抑制不同肿瘤细胞增殖的 IC₅₀ 值
Tab. 1 IC₅₀ of isorhamnetin on different tumor cell lines for 48 h

肿瘤细胞株	IC ₅₀ / (μmol · L ⁻¹)
HCT116	53. 4 ± 0. 25
Hela	63. 4 ± 0. 94
HepG2	79. 0 ± 1. 35

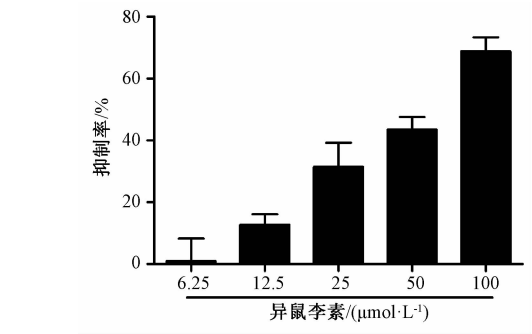


图 1 异鼠李素剂量依赖性抑制 HCT116 细胞增殖 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)
Fig. 1 Dose-dependent effect of isorhamnetin on cell proliferation of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

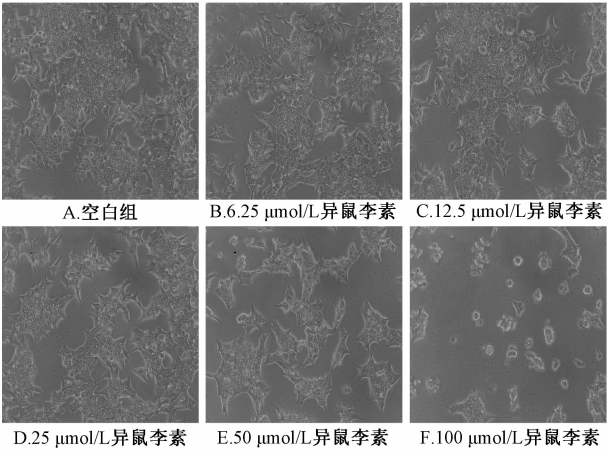


图 2 异鼠李素诱导 HCT116 细胞损伤的形态学观察 (× 200)
Fig. 2 Morphological changes of HCT116 cells were induced by isorhamnetin (× 200)

3. 2 异鼠李素诱导自噬小泡的形成 MDC 染色结果表明，10、30、100 μmol/L 异鼠李素作用于 HCT116 细胞 24 h，随着剂量的增大细胞内点状荧光增多，荧光强度增加，即自噬小泡显著增多，如图 3 所示。

3. 3 异鼠李素诱导 LC3 蛋白表达增加 为了进一步验证异鼠李素诱导 HCT116 细胞发生自噬，我们还对其自噬标志性的蛋白 LC3 的表达情况进行了检测。如图 4 所示，以不同剂量（0、10、30、100 μmol/L）的异鼠李素处理细胞 24 h，能增加细胞内 LC3 总蛋白的量以及活性形式 LC3- II 的表达，且在 30 μmol/L 时最为显著。以上结果均说明，异鼠李素可剂量依赖性诱导 HCT116 细胞发生自噬。

3. 4 3-MA 降低异鼠李素对 HCT116 的抑制作用 为了检测本实验中异鼠李素诱导的自噬在细胞死亡过程中发挥的作用，我们使用 3-MA（自噬阻断剂）预处理细胞，结果如图 5 所示，当自噬被阻断后，异鼠李素对细胞的抑制率明显降低，表明本实验中异鼠李素诱导的自噬是导致细胞死亡的一种方式。

4 讨论 本研究采用 MTT 法、细胞形态学观察等方法考察了异鼠李素对结肠癌细胞 HCT116 体外生长的

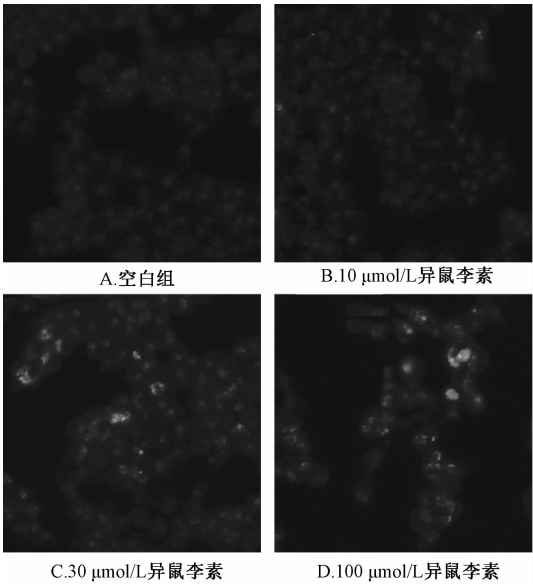


图 3 异鼠李素诱导自噬小泡形成 (MDC 染色, × 200)
Fig. 3 Formation of autophagosomes was induced by isorhamnetin (× 200)

步验证异鼠李素诱导 HCT116 细胞发生自噬，我们还对其自噬标志性的蛋白 LC3 的表达情况进行了检测。如图 4 所示，以不同剂量（0、10、30、100 μmol/L）的异鼠李素处理细胞 24 h，能增加细胞内 LC3 总蛋白的量以及活性形式 LC3- II 的表达，且在 30 μmol/L 时最为显著。以上结果均说明，异鼠李素可剂量依赖性诱导 HCT116 细胞发生自噬。

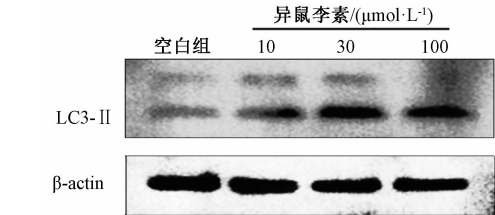
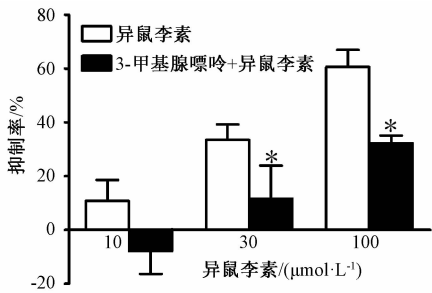


图 4 异鼠李素剂量依赖性诱导 LC3 表达增加
Fig. 4 Dose-dependent effect of isorhamnetin on the expression of protein LC3



注：与同剂量异鼠李素组比较，**P* < 0.05

图 5 3-甲基腺嘌呤降低异鼠李素对 HCT116 细胞的抑制率 (*n* = 5)

Fig.5 3-MA induces the inhibition rate of isorhamnetin in HCT116 cells (*n* = 5)

影响。结果表明，异鼠李素可以剂量依赖性抑制 HCT116 的生长。从本实验结果可以看出异鼠李素处理过的细胞，出现自噬的特征性变化，随着异鼠李素剂量的增加，自噬小泡增多，自噬标志性蛋白 LC3 的总量及其活化形式 LC3-II 表达增多。自噬抑制剂 3-MA 预处理后能够明显降低异鼠李素对细胞的抑制作用。因此，我们推测异鼠李素的抗肿瘤活性除了通过抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡外，诱导细胞自噬在此过程中也起着重要作用。异鼠李素诱导自噬的发生的信号通路则需进一步的研究。综上所述，中华补血草活性成分异鼠李素对肿瘤有一定的调节作用，将来可被开发用于肿瘤治疗。

参考文献：

[1] 郭巧生，苏筱娟. 江苏省沿海滩涂野生药用植物生物多样性

性及其保护 [J]. 中国野生植物资源, 1999, 18 (3): 28-30.

[2] 董必慧. 江苏沿海滩涂中华补血草的保护性研究 [J]. 中国野生植物资源, 2005, 24 (6): 28-30.

[3] 张华彬, 张代臻, 葛宝明, 等. 中华补血草的生物学研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22 (12): 2847-2848.

[4] 刘兴宽. 中华补血草的化学成分研究 [J]. 中草药, 2011, 42 (2): 230-233.

[5] 李均, 陈炳华, 苏安玲. 中华补血草根提取物抗氧化活性的初步研究 [J]. 福建师范大学学报, 2008, 24 (3): 83-86.

[6] 胡珊, 邓雨川. 异鼠李素对乳腺癌细胞的作用机制 [J]. 中国药科大学学报, 2013, 44 (6): 563-567.

[7] Sun J, Sun G, Meng X, *et al*, Isorhamnetin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in *vivo* and in *vitro* [J]. *PLoS One*, 2013, 8 (5): e64526.

[8] 李 垚, 王鹏祖, 张慧颖. 异鼠李素对人胃癌细胞生长的抑制作用 [J]. 中国初级卫生保健, 2008, 22 (6): 58-59.

[9] Li C, Yang X, Chen C, *et al*, Isorhamnetin suppresses colon cancer cell growth through the PI3K-Akt-mTOR pathway [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9 (3): 935-940.

[10] 左爱仁, 汪满红, 万春鹏, 等. 东方肉穗草异鼠李素诱导 HepG2 细胞凋亡研究 [J]. 时珍国医国药, 2011, 22 (2): 427-428.

[11] 蒋晨春, 向 义, 钟 勇. 异鼠李素对人肝癌 HepG2 细胞增殖与凋亡影响的实验研究 [J]. 西南军医, 2012, 14 (3): 432-435.

[12] 李 炯, 王 刚, 杜士明, 等. 异鼠李素抗肿瘤的作用及机制研究进展 [J]. 山西医药杂志, 2011, 40 (12): 1215-1217.

[13] 王 宠, 张 萍, 朱卫国. 细胞自噬与肿瘤发生的关系 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2010, 26 (11): 988-997.