

乙酰紫草素联合奥沙利铂对人结肠癌 HT29 细胞增殖及凋亡的影响

赵景明, 李 惠, 李国峰*
(长春中医药大学附属医院, 吉林 长春 130000)

摘要: **目的** 探讨乙酰紫草素联合奥沙利铂对人结肠癌 HT29 细胞增殖及凋亡的影响。**方法** 将人结肠癌 HT29 细胞分为空白组、乙酰紫草素组 (10 μmol/L)、奥沙利铂组 (1 μmol/L) 和联合给药组 (10 μmol/L 乙酰紫草素+1 μmol/L 奥沙利铂), MTT 法检测 HT29 细胞增殖抑制率, 流式细胞术检测 HT29 细胞凋亡率、qRT-PCR 法检测 HT29 细胞 *Ki-67*、*Bcl-2* 及 *Bax* mRNA 表达, Western blot 法检测磷酸化磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (p-PI3K)、磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 蛋白表达。**结果** 人结肠癌 HT29 细胞经乙酰紫草素、奥沙利铂和联合给药处理 24、48、72 h 后, 细胞增殖抑制率均增加, 其中联合给药组细胞增殖抑制率最高 ($P<0.05$)。药物处理 HT29 细胞 48 h 后, 与空白组比较, 乙酰紫草素组、奥沙利铂组和联合给药组凋亡率、*Bax* mRNA 表达增加 ($P<0.05$), 而 *Ki-67*、*Bcl-2* mRNA 表达及 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达降低 ($P<0.05$); 联合给药组的细胞凋亡率、*Bax* mRNA 表达均高于乙酰紫草素组和奥沙利铂组, *Ki-67*、*Bcl-2* mRNA 表达及 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达低于乙酰紫草素组和奥沙利铂组。**结论** 乙酰紫草素和奥沙利铂对人结肠癌 HT29 细胞均具有抑制增殖及诱导凋亡作用, 可能与调控 PI3K/Akt 信号通路有关, 且两者联用时效果更好。

关键词: 乙酰紫草素; 奥沙利铂; 结肠癌; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1001-1528(2020)04-0883-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.04.011

Effects of acetyl shikonin combined with oxaliplatin on the proliferation and apoptosis of human HT29 colon cancer cells

ZHAO Jing-ming, LI Hui, LI Guo-feng*
(The Hospital Affiliated to Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 13000, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effect of acetyl shikonin combined with oxaliplatin on the proliferation and apoptosis of human HT29 colon cancer cells. **METHODS** Human HT29 colon cancer cells were divided into blank group, acetyl shikonin group (10 μmol/L), oxaliplatin group (1 μmol/L), and combinative administration group (10 μmol/L acetyl shikonin+1 μmol/L oxaliplatin). HT29 cells were subjected to the determination of proliferation inhibition rate by MTT and the apoptosis rate by flow cytometry, the identifications of expression of *Ki-67*, *Bcl-2* and *Bax* mRNA by qRT-PCR, and the expression of phosphorylated phosphatidylinositol-3-hydroxykinase (p-PI3K) and phosphorylated protein kinase B (p-Akt) by Western blot. **RESULTS** Human HT29 colon cancer cells treated with acetyl shikonin, or oxaliplatin, or combinative administration for 24, 48, 72 h shared increased cell proliferation inhibition rates, and the combinative administration group was observed with the highest cell proliferation inhibition rate ($P<0.05$). Compared with the blank group, all of the groups exposed to 48 hours of drug treatment had increased apoptosis rate and *Bax* mRNA expression in HT29 cells ($P<0.05$), reduced *Ki-67*, *Bcl-2* mRNA expression and p-PI3K, p-Akt protein expression ($P<0.05$). The combination administration group demonstrated higher apoptosis rate and *Bax* mRNA expression, lower *Ki-67*, *Bcl-2* mRNA expression and p-PI3K, p-Akt protein expression than the acetyl shikonin group and oxaliplatin group. **CONCLUSION** Both acetyl shikonin and oxaliplatin are antiproliferative and cytotoxic, and their combinative use may produce a synergetic effect on human

收稿日期: 2019-06-06

基金项目: 吉林省教育厅“十三五”科学技术研究规划项目 (JJKH20170740KJ); 第六批全国老中医药专家学术继承项目 (2017125)

作者简介: 赵景明 (1977—), 硕士, 副主任医师, 研究方向为肛肠疾病的诊断与治疗。Tel: 15304461060, E-mail: zjm-7883312@163.com

* 通信作者: 李国峰 (1975—), 博士, 主任医师, 研究方向为肛肠疾病的诊断与治疗。Tel: 13844198606, E-mail: doctorlgf@163.com

HT29 colon cancer cells becausee of their effect on PI3K/Akt signaling pathway.

KEY WORDS: Acetyl shikonin; oxaliplatin; colon cancer; PI3K/Akt signaling pathway

结肠癌为消化道高发肿瘤，致死率高居恶性肿瘤的第 2 位^[1]，该疾病早期症状不明显，多数患者确诊时即为晚期，失去了手术的最佳时机，化疗是主要治疗手段，但其较大的毒副作用及耐药性而难以让人满意^[2]。乙酰紫草素为紫草主要活性成分，对黑色素瘤 B16F10、骨肉瘤 S180、Lewis 肺癌及胃癌细胞 SGC-7901 等均有较好的抑制作用^[3-6]。研究发现，中药联合化疗药物能提高抗肿瘤疗效，显著降低化疗药物的毒副作用^[7]，因此，本研究探讨乙酰紫草素联合奥沙利铂对人结肠癌 HT29 细胞增殖及凋亡的影响。

1 材料

1.1 试剂与药物 乙酰紫草素（成都德思特生物技术有限公司，批号 20160518，纯度>98%）；奥沙利铂（美国 Sigma 公司，批号 20160608）；MTT 检测试剂盒（美国 Sigma 公司，批号 20160921）；Annexin V-FITC /PI（上海翊圣生物科技有限公司，批号 40302ES60）；逆转录试剂盒（批号 20161125）、实时定量 PCR 检测试剂盒（批号 20160917）（日本 TaKaRa 公司）；p-PI3K（批号 ab32089）、p-Akt（批号 ab38449）、GAPDH 抗体（批号 ab8245）购自英国 Abcam 公司。

1.2 细胞 人结肠癌 HT29 细胞，来源于中国科学院上海细胞库。

1.3 仪器 WD-2102A 型全自动酶标仪（北京六一仪器厂）；FACS Canto II 流式细胞仪（美国 BD 公司）；ABI 7500 快速实时荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司）；EBX-700 蛋白电泳转印系统（上海书俊仪器设备有限公司）。

2 方法

2.1 细胞增殖抑制率检测 常规条件下，将 HT29 细胞培养至对数生长期，调整细胞浓度为 1×10^5 /mL，以每孔 200 μ L 接种于 96 孔细胞培养板中，分为空白组、乙酰紫草素组（10 μ mol/L）、奥沙利铂组（1 μ mol/L）和联合给药组（10 μ mol/L 乙酰紫草素+1 μ mol/L 奥沙利铂），各组的药物剂量设置依据于徐锦程^[8]、薛德冬等^[9]报道，并结合预实验。细胞培养箱中培养 24 h，弃去培养液，加入含有相应终浓度药物的完全培养基处理 24、48、72 h，测定 490 nm 处光密度值(OD),细胞增殖抑制率=(1-OD_{给药组}/OD_{空白组}) $\times$ 100%。

2.2 细胞凋亡率检测 常规条件下，将 HT29 细胞培养至对数生长期，以每孔 1×10^6 个细胞接种于 6 孔细胞培养板中，分为空白组、乙酰紫草素组（10 μ mol/L）、奥沙利铂组（1 μ mol/L）和联合给药组（10 μ mol/L 乙酰紫草素+1 μ mol/L 奥沙利铂），细胞培养箱中培养 24 h，弃去培养液，加入含有相应终浓度药物的完全培养基继续培养 48 h。4 $^{\circ}$ C 下离心收集细胞，并在预冷的磷酸盐缓冲液中重悬细胞，加入 5 μ L Annexin V-FITC /PI 溶液，避光孵育 20 min 后在流式细胞仪中检测，Cell Quest 软件分析细胞凋亡率。

2.3 细胞凋亡相关基因检测 按“2.2”项下方法处理细胞后收集，TRIzol 提取细胞总 RNA，逆转录法获取 cDNA，实时定量 PCR 反应体系为 6 μ L 蒸馏水、2 μ L cDNA、1 μ L 正向引物、1 μ L 反向引物、10 μ L 2 $\times$ SYBR Green Mix。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法，以 GAPDH 为内参基因，引物由上海基尔顿生物公司合成，序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

基因	引物序列
Ki-67	正向 5'-ACTTGCTCTAATACGC-3'
	反向 5'-CCACTCTTTCTCCTCTCT-3'
Bcl-2	正向 5'-GGGAGAACAGGGTACGATAA-3'
	反向 5'-CCACCGAACTCAAAGAAGG-3'
Bax	正向 5'-T GTCCCGAAGGAGGTTTATT-3'
	反向 5'- TGT CCCGAAGGAGGTTTATT-3'
GAPDH	正向 5'-GCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3'
	反向 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'

2.4 细胞 PI3K/Akt 通路相关蛋白检测 按“2.2”项下方法处理细胞后收集，加入适量 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。BCA 法测定细胞总蛋白浓度，确定蛋白上样量后，经 12% SDS-PAGE 凝胶电泳，半干法转印至 PVDF 膜上，加入稀释后的 p-PI3K、p-Akt 及 GAPDH 抗体（均为 1：2 000），4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜，加入对应二抗，室温下孵育 0.5 h。洗膜后显色、曝光、拍照，分析各条带光密度值，并计算蛋白相对表达量。

2.5 统计学分析 采用 SPSS 17.0 软件进行处理。计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较采用 Bonferroni 法。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 乙酰紫草素联合奥沙利铂对 HT29 细胞增殖的影响 HT29 细胞经乙酰紫草素、奥沙利铂和联合给药处理 24、48、72 h 后，细胞增殖抑制率均增加 ($P<0.05$)；与乙酰紫草素组比较，奥沙利铂组的细胞增殖抑制率增加 ($P<0.05$)；联合给药组的细胞增殖抑制率高于乙酰紫草素组及奥沙利铂组 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 乙酰紫草素联合奥沙利铂对 HT29 细胞增殖的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab. 2 Effect of acetyl shikonin combined with oxaliplatin on HT29 cell proliferation ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	增殖抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
空白组	0±0	0±0	0±0
乙酰紫草素组	15.83±2.24 *	21.63±2.18 *	25.32±3.54 *
奥沙利铂组	24.51±3.29 *#	30.42±3.68 *#	38.06±5.82 *#
联合给药组	38.14±5.41 *#△	56.11±5.57 *#△	69.43±6.59 *#△

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ；与乙酰紫草素组比较，# $P<0.05$ ；与奥沙利铂组比较，△ $P<0.05$ 。

3.2 乙酰紫草素联合奥沙利铂对 HT29 细胞凋亡率的影响 HT29 细胞经乙酰紫草素、奥沙利铂和联合给药处理 48 h 后，细胞凋亡率均增加 ($P<0.05$)；与乙酰紫草素组比较，奥沙利铂组的细胞凋亡率增加 ($P<0.05$)；联合给药组的细胞凋亡率高于乙酰紫草素组及奥沙利铂组 ($P<0.05$)。见图 1。

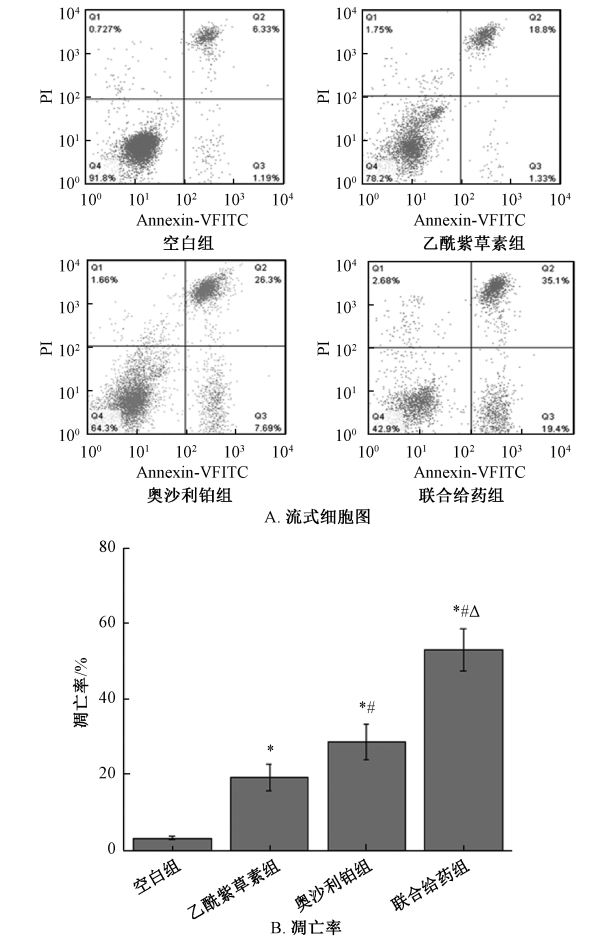
3.3 乙酰紫草素联合奥沙利铂对 HT29 细胞 Ki-67、Bcl-2 及 Bax mRNA 表达的影响 HT29 细胞经乙酰紫草素、奥沙利铂和联合给药处理 48 h 后，Bax mRNA 表达增加，而 Ki-67、Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)；与乙酰紫草素组比较，奥沙利铂组 Bax mRNA 表达增加，而 Ki-67、Bcl-2 mRNA 表达降低 ($P<0.05$)；联合给药组对 Bax mRNA 表达的促进作用，Ki-67、Bcl-2 mRNA 表达的抑制作用最强 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 乙酰紫草素联合奥沙利铂对 HT29 细胞 Ki-67、Bcl-2 及 Bax mRNA 表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab. 3 Effects of acetyl shikonin combined with oxaliplatin on the mRNA expressions of Ki-67, Bcl-2 and Bax in HT29 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

组别	Ki-67	Bcl-2	Bax
空白组	0.67±0.06	0.79±0.08	0.21±0.03
乙酰紫草素组	0.52±0.05 *	0.53±0.06 *	0.29±0.04 *
奥沙利铂组	0.46±0.03 *#	0.42±0.05 *#	0.33±0.04 *#
联合给药组	0.37±0.04 *#△	0.25±0.02 *#△	0.56±0.06 *#△

注：与空白组比较，* $P<0.05$ ；与乙酰紫草素组比较，# $P<0.05$ ；与奥沙利铂组比较，△ $P<0.05$ 。



注：与空白组比较，* $P<0.05$ ；与乙酰紫草素组比较，# $P<0.05$ ；与奥沙利铂组比较，△ $P<0.05$ 。

图 1 乙酰紫草素联合奥沙利铂对 HT29 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Fig. 1 Effect of acetyl shikonin combined with oxaliplatin on HT29 cell apoptosis rate ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

3.4 乙酰紫草素联合奥沙利铂对 HT29 细胞 PI3K/Akt 信号通路的影响 人结肠癌 HT29 细胞经乙酰紫草素、奥沙利铂和联合给药处理 48 h 后，p-PI3K、p-Akt 蛋白表达均降低 ($P<0.05$)；与乙酰紫草素组比较，奥沙利铂组的 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达降低 ($P<0.05$)；联合给药组的 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达均低于乙酰紫草素组及奥沙利铂组 ($P<0.05$)。见图 2、表 4。

4 讨论

随着人们摄入膳食纤维和碳水化合物减少，脂肪增加，结肠癌的发病率逐年递增^[10]。乙酰紫草素存在于紫草科植物紫草的根中，可以抑制人结肠癌 HCT116 细胞的增殖并诱导其凋亡，但关于该成分与化疗药物的联合使用未见报道^[9]。本研究发现，与空白组比较，乙酰紫草素组、奥沙利铂组及联合给药组细胞增殖抑制率均明显增加，以联合给

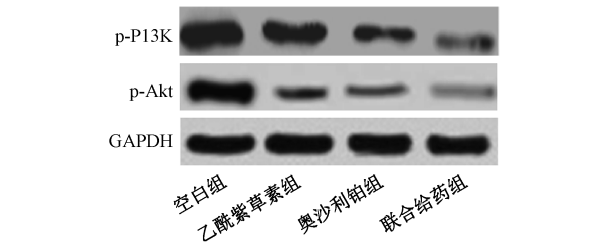


图 2 Western blot 检测 HT29 细胞 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达

Fig. 2 Expressions of p-PI3K and p-Akt protein in HT29 cells detected by Western blot

表 4 乙酰紫草素联合奥沙利铂对 HT29 细胞 PI3K/Akt 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)

Tab. 4 Effects of acetyl shikonin combined with oxaliplatin on the expressions of PI3K/Akt signaling pathway-related proteins in HT29 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=5$)			
组别	p-PI3K	p-Akt	
空白组	1.31±0.17	1.15±0.10	
乙酰紫草素组	1.04±0.11*	0.31±0.04*	
奥沙利铂组	0.37±0.05**	0.26±0.03**	
联合给药组	0.25±0.04** Δ	0.12±0.02** Δ	

注:与空白组比较,* $P<0.05$;与乙酰紫草素组比较,** $P<0.05$;与奥沙利铂组比较, $\Delta P<0.05$ 。

药组更明显。

肿瘤的形成除了与细胞增殖失控有关外,死亡过程受阻也是重要原因^[11],因此,可以通过抑制细胞分裂、增殖,以及诱导细胞凋亡达到预期治疗效果。Ki-67 在多种肿瘤组织中呈现高表达,是评价肿瘤细胞凋亡水平的重要指标^[12]; Bcl-2 家族蛋白成员间的相互作用在调控肿瘤细胞凋亡过程中也发挥着关键性作用,存在于胞浆或线粒体外膜的促凋亡蛋白 Bax 与抗凋亡蛋白 Bcl-2 结合后可以激活 caspase 途径,最终促进肿瘤细胞凋亡的发生^[13]。本研究发现,联合给药组细胞凋亡率、Bax mRNA 表达高于乙酰紫草素组和奥沙利铂组,而 Ki-67、Bcl-2 mRNA 表达更低。

在细胞的凋亡和增殖过程中,PI3K/Akt 信号通路均发挥重要作用,在肿瘤组织和肿瘤细胞中异常激活^[14],p-PI3K 及 p-Akt 表达均明显升高^[15]。研究^[16]表明,抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化是多种化疗药物的共同机制;胡泽成等^[17]报道,青龙衣多糖在体外可直接杀伤或抑制人结肠癌 HCT-116 细胞,其作用机制与抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化有关;本研究也发现,与空白组比较,乙酰紫草素组、奥沙利铂组及联合给药组细胞 p-PI3K、p-Akt 蛋白表达均明显降低,以联合应用组更明显。

综上所述,乙酰紫草素和奥沙利铂对人结肠癌 HT29 细胞均具有抑制增殖及诱导凋亡作用,可能与调控 PI3K/Akt 信号通路有关,而且两者联合作用时效果更好。

参考文献:

[1] Yue M, Wang Y, Kang Z H, *et al.* Short-and long-term outcomes of laparoscopic complete mesocolic excision for transverse colon cancer[J]. *J BUON*, 2018, 23(4): 950-957.

[2] Li X Y, Liao X F, Wang H B, *et al.* Doxorubicin resistance induces IL6 activation in the colon cancer cell line LS180[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 5923-5929.

[3] 陈 虹, 张闪闪, 董锦蕾, 等. 紫檀芪和乙酰紫草素抑制 B16F10 细胞增殖的协同作用[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(6): 818-824.

[4] 曾 云, 罗 刚, 杨文吉, 等. 乙酰紫草素注射液对 S180 荷瘤小鼠抑瘤作用研究[J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(1): 22-23.

[5] 缪世坤, 罗 刚, 周黎明. 乙酰紫草素注射液对小鼠 Lewis 肺癌生长抑制的研究[J]. *四川生理科学杂志*, 2007, 29(4): 154-155.

[6] 曾 云, 罗 刚, 杨文吉, 等. 乙酰紫草素注射液对人胃癌细胞 SGC-7901 的抑制作用[J]. *四川生理科学杂志*, 2007, 29(4): 155-157.

[7] 崔江河, 韩光宇, 何光梅, 等. 人参皂苷 CK 联合 5-氟尿嘧啶对人胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖、凋亡及上皮间质转化的影响[J]. *中国药房*, 2017, 28(31): 4388-4392.

[8] 徐锦程, 夏 飞, 张 配, 等. 衣霉素联合奥沙利铂对人口腔癌 KB 细胞增殖及凋亡的影响[J]. *中国药理学通报*, 2013, 29(7): 956-961.

[9] 薛德冬, 李 锐. 乙酰紫草素对人结肠癌 HCT116 细胞增殖、凋亡及上皮间质转化的影响[J]. *中成药*, 2017, 39(2): 401-404.

[10] Hangaard Hansen C, Gøgenur M, Tvilling Madsen M, *et al.* The effect of time from diagnosis to surgery on oncological outcomes in patients undergoing surgery for colon cancer: a systematic review[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2018, 44(10): 1479-1485.

[11] 郭 锰, 魏艳霞, 任佳伟, 等. 青蒿素联合顺铂对胃癌细胞增殖、凋亡及上皮间质转化的影响[J]. *中成药*, 2016, 38(2): 431-434.

[12] Demir S, Turan I, Aliyazicioglu R, *et al.* *Primula vulgaris* extract induces cell cycle arrest and apoptosis in human cervix cancer cells[J]. *J Pharm Anal*, 2018, 8(5): 307-311.

[13] Lochmann T L, Bouck Y M, Faber A C. BCL-2 inhibition is a promising therapeutic strategy for small cell lung cancer[J]. *Oncoscience*, 2018, 5(7-8): 218-219.

[14] Tian T, Sun J, Wang J, *et al.* Isoliquiritigenin inhibits cell proliferation and migration through the PI3K/AKT signaling pathway in A549 lung cancer cells[J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(5): 6133-6139.

[15] Li B, Ding C M, Li Y X, *et al.* MicroRNA-145 inhibits migration and induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cells through regulation of the EGFR/PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(5): 2944-2954.

[16] Pei L, Kong Y, Shao C, *et al.* Heme oxygenase-1 induction mediates chemoresistance of breast cancer cells to pharmacubicin by promoting autophagy via PI3K/Akt pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, 22(11): 5311-5321.

[17] 胡泽成. 青龙衣多糖对结肠癌 HCT-116 细胞增殖、凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(18): 136-139.