

索拉非尼对人 RKO 结肠癌细胞增殖、周期及凋亡的影响

刘蒙蒙¹,倪谦枝²,李晶晶²,谢东²,陈天伟²,高振军¹,黄继英¹,庄一心³

摘要 目的 研究索拉非尼对人 RKO 肠癌细胞增殖、周期及凋亡的影响。方法 将人肠癌 RKO 细胞给予不同浓度(0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{mol/L}$)的索拉非尼处理,MTT 法检测索拉非尼对 RKO 细胞增殖的抑制作用,确定半数抑制浓度(IC_{50}),设为实验组。对照组为二甲基亚砜处理。针对两组细胞,通过细胞克隆形成平板法检测增殖能力,流式细胞术检测细胞凋亡和细胞周期变化,同时通过 Western blot 法检测细胞内凋亡相关蛋白 caspase-3、caspase-8 和 PARP 的表达水平。结果 索拉非尼对 RKO 细胞增殖有抑制作用,并呈浓度依赖关系,索拉非尼对 RKO 细胞株作用的 IC_{50} 为 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 。与对照组比较,索拉非尼(10.0 $\mu\text{mol/L}$)可以抑制 RKO 细胞克隆形成能力($P < 0.001$),并提高细胞凋亡率[(32.53 \pm 6.64)% vs (4.47 \pm 2.09)% , $P < 0.01$],影响细胞周期($P < 0.01$),促进凋亡相关蛋白 caspase-3、caspase-8 和 PARP 的表达水平($P < 0.05$)。结论

索拉非尼具有抑制人肠癌 RKO 细胞的增殖能力,其机制可能和促进 RKO 细胞凋亡、影响细胞周期有关。

关键词 索拉非尼;RKO 细胞;细胞周期;细胞凋亡

中图分类号 R 735.3

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2022)03-0433-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.03.018

结肠癌是全球第三大常见肿瘤,随着居民生活水平的提高及饮食习惯的改变,其国内发病率排在恶性肿瘤和致死因素的第四位,且正逐步攀升^[1]。目前治疗结肠癌的手段主要为手术切除、放化疗、中医治疗和靶向治疗。手术和放化疗对进展期的结肠癌治疗效果不理想,而靶向治疗逐渐成为治疗结肠癌的热点^[2]。索拉非尼是一种多激酶抑制剂,其主要通过受体酪氨酸激酶抑制肿瘤生长和血管生成,

是晚期肝细胞癌患者为数不多的全身治疗方案^[3-4]。研究^[5]表明索拉非尼可通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通,抑制肝癌细胞的增殖。该研究探究索拉非尼对人结肠癌 RKO 细胞的增殖抑制作用及其可能作用机制,为将来临床采用索拉非尼治疗结肠癌提供一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 材料 人结肠癌 RKO 细胞购自中国科学院细胞库,DMEM 及胎牛血清 FBS 购自美国 Thermo Fisher 公司,凋亡检测试剂盒购自美国 BD Pharmingen 公司,caspase-3、caspase-8、PARP 和 GADPH 一抗抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司,索拉非尼片购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 增殖检测 将人肠癌 RKO 细胞稳定培养后消化、传代,96 孔板中每孔中加入 1×10^4 个/ml 人肠癌 RKO 细胞悬浊液 200 μl 。贴壁后,更换完全培养基,添加不同浓度(0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、40.0 $\mu\text{mol/L}$)索拉非尼,对照组为二甲基亚砜处理。培养 48 h 后,MTT 法测定 490 nm 吸光度值。取索拉非尼的半数抑制浓度(the half inhibition of concentration, IC_{50})组为实验组。

1.2.2 细胞克隆形成 针对上述对照组及实验组处理细胞,于 6 孔板中每孔中加入 1 500 个人肠癌 RKO 细胞,培养 10 d 后,弃去上清液,4% 多聚甲醛固定,结晶紫染色 15 min。

1.2.3 流式检测细胞凋亡及细胞周期 针对实验组及对照组,用胰蛋白酶法收获细胞。在 FITC-Annexin V 和碘化丙啶双重染色后,使用 FITC-Annexin V 凋亡检测试剂盒,通过流式细胞仪进行细胞凋亡检测。使用 cycle TEST PLUS DNA 试剂盒对细胞进行碘化丙啶染色后,通过流式细胞仪进行细胞周期检测,并通过 FACScan 软件进行分析。

1.2.4 Western blot 检测凋亡相关蛋白 caspase-3、caspase-8 和 PARP 表达 使用含有蛋白酶抑制剂混合物的裂解缓冲液裂解细胞,BCA 蛋白分析试剂盒对提取的总蛋白浓度进行定量,10% SDS-PAGE 凝

2021-09-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82003076);国家重点研发计划课题(编号:2018YFC1604404);复旦大学附属中山医院青浦分院课题(编号:QY2020-06)

作者单位:复旦大学附属中山医院青浦分院¹ 消化科、³ 普外科,上海 201700

² 中国科学院上海分院健康研究院,上海 200031

作者简介:刘蒙蒙,女,住院医师;

庄一心,男,副主任医师,责任作者,E-mail:zhuang_yixin@

126.com

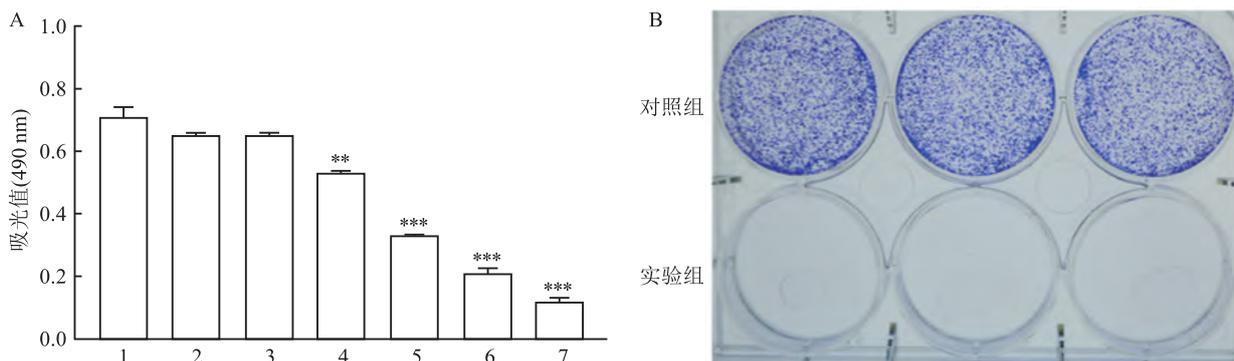


图1 不同浓度索拉非尼对结肠癌 RKO 细胞增殖的影响

A: MTT 检测 RKO 细胞增殖结果; B: 克隆形成实验结果; 1: 对照组; 2: 索拉非尼(0.5 μmol/L)组; 3: 索拉非尼(1.0 μmol/L)组; 4: 索拉非尼(5.0 μmol/L)组; 5: 索拉非尼(10.0 μmol/L)组; 6: 索拉非尼(20.0 μmol/L)组; 7: 索拉非尼(40.0 μmol/L)组; 与对照组比较: * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$

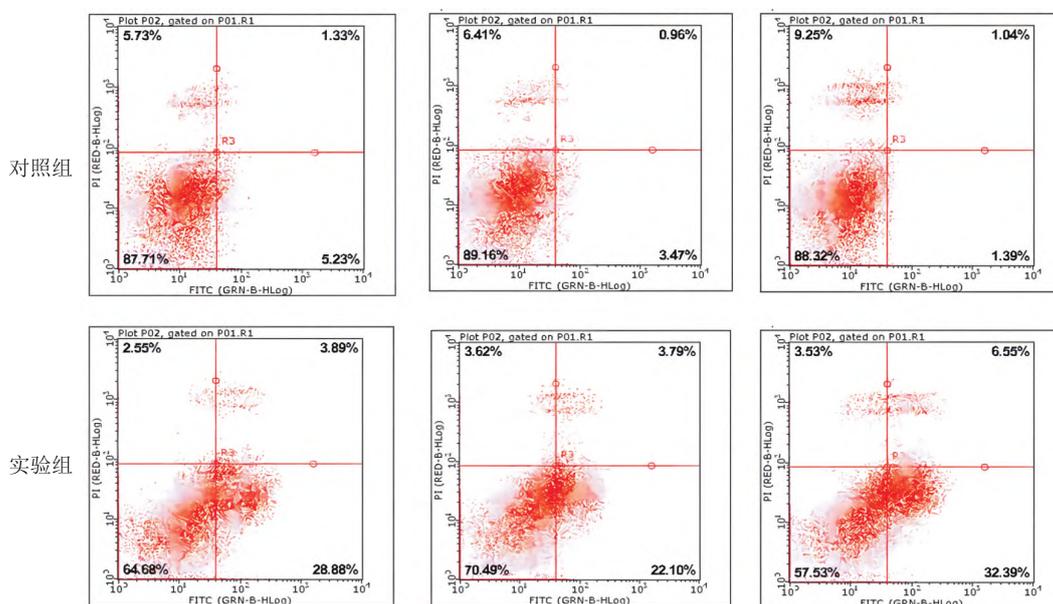


图2 索拉非尼对结肠癌细胞 RKO 凋亡的影响

胶分离等量的总蛋白,然后转移到 PVDF 膜上。在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,将膜与对应的一抗抗体(caspase-3、caspase-8 和 PARP)在 4 °C 孵育过夜。辣根过氧化物酶结合山羊抗兔二抗在室温下以 1 : 5 000 的稀释度作用 1 h,并且使用 Pierce ECL Western 印迹底物检测蛋白质信号。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 统计软件进行数据分析,采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述,组间差异比较采用单因素方差分析,如方差分析结果显示组间差异有统计学意义,则进一步采用 t 检验进行组间差异的两两比较。应用 χ^2 检验分析 SH3BP5-AS1 和 TM6SF2 表达的关系。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度索拉非尼对结肠癌 RKO 细胞增殖的影响 MTT 检测 RKO 细胞增殖,结果显示索拉非尼对 RKO 细胞具有抑制作用,并呈浓度依赖的关系(图 1A)。索拉非尼对 RKO 细胞株作用的 IC_{50} 为 10.0 μmol/L。克隆形成实验结果显示,索拉非尼(10.0 μmol/L)对细胞增殖具有抑制作用($P < 0.001$,图 1B)。

2.2 索拉非尼对结肠癌细胞 RKO 凋亡的影响 通过 Annexin V-FITC/PI 法测定两组凋亡率,结果显示实验组细胞凋亡率为 $(32.53 \pm 6.64)\%$,对照组凋亡率为 $(4.47 \pm 2.09)\%$,两组比较差异有统计学意义($P < 0.01$,图 2)。

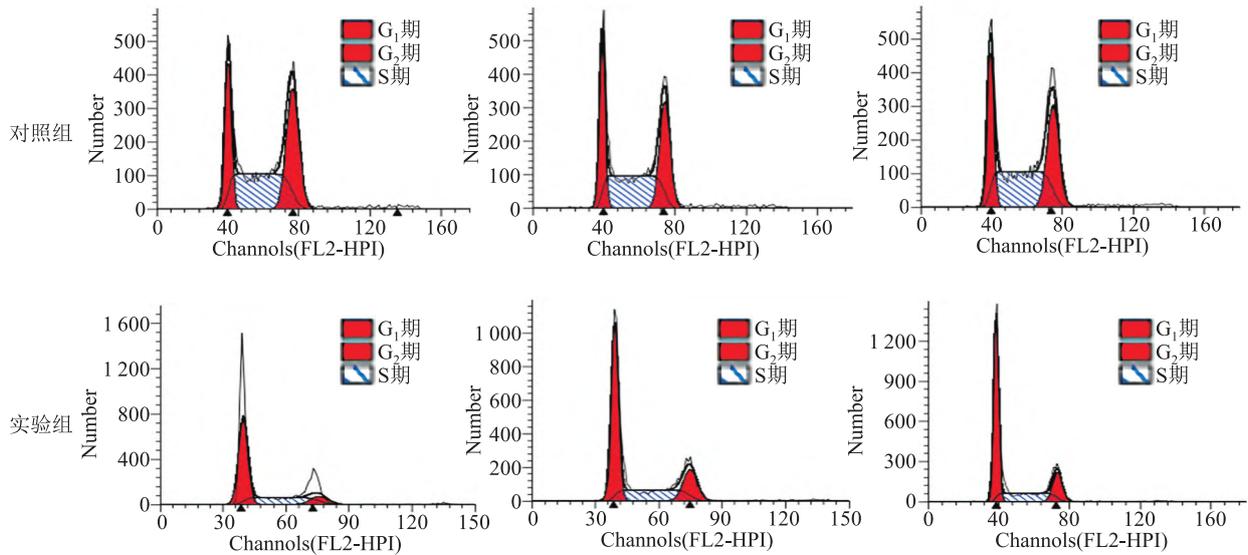


图3 索拉非尼对结肠癌细胞 RKO 周期的影响

2.3 索拉非尼对结肠癌细胞 RKO 周期的影响

PI 法检测两组细胞周期,结果显示实验组 RKO 细胞处于 G₁ 期的比例为 (56.92 ± 2.25)%, G₂ 期比例为 (14.94 ± 5.01)%, S 期比例为 (28.14 ± 3.04)%; 对照组处于 G₁ 期细胞的比例为 (24.53 ± 1.70)%, G₂ 期比例为 (31.70 ± 2.88)%, S 期比例为 (43.77 ± 1.19)%; RKO 的三个细胞时期比例均有变化 ($P < 0.01$, 图 3)。

2.4 索拉非尼对结肠癌细胞 RKO 凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,实验组凋亡关键蛋白酶 caspase-3 和 caspase-8 表达水平高于对照组,并且 caspase-3 激活指示蛋白 PARP 的表达水平同样高于对照组 ($P < 0.05$, 图 4)。

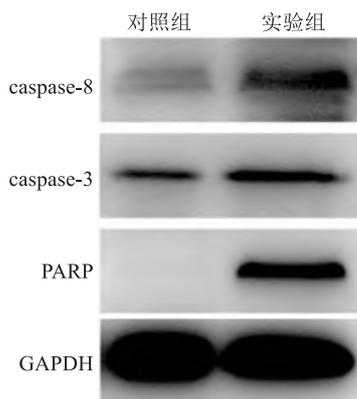


图4 索拉非尼对结肠癌细胞 RKO 凋亡相关蛋白表达的影响

3 讨论

结肠癌是病死率最高的三大消化系统肿瘤之一,确诊病例中约 50% ~ 60% 的肿瘤发生转移,预

后很差^[6-7]。化疗被认为是结肠癌患者的标准治疗方法,但化疗的局限性不容忽视,如选择性低、在肿瘤组织中浓度不足、全身毒性等^[8]。所以挖掘肿瘤有效治疗靶标具有重要的临床指导价值。

索拉非尼是一种酪氨酸激酶抑制剂,是美国食品药品监督管理局于 2007 年批准的首个治疗肝癌的一线全身治疗药物。索拉非尼具有多种作用部位,抑制 VEGFR1、VEGFR2、VEGFR3、PDGFR-β、RAF 家族激酶^[9]。在具有里程碑意义的临床 III 期试验中,针对 602 例肝癌患者,与安慰剂比较,索拉非尼提高了中位总生存期 (10.7 个月 vs 7.9 个月, $P < 0.001$)^[10]。作为一种多功能抑制剂,索拉非尼具有抑制肿瘤生长、进展、转移、血管生成和下调机制的潜力,可保护肿瘤不受凋亡的影响。

Liu et al^[11] 证实索拉非尼通过 ATP-AMPK-mTOR-SREBP1 信号通路阻断 SCD1 介导的单不饱和脂肪酸的合成,从而杀死肝癌细胞。Gounder et al^[12] 针对 87 例进行性、症状性或复发性硬纤维瘤患者,接受索拉非尼 (400 mg/片, 每天一次) 或安慰剂,在平均 27.2 个月的随访中,索拉非尼组 2 年无进展生存率为 81% (95% CI 为 69% ~ 96%), 安慰剂组为 36% (95% CI 为 22% ~ 57%) (进展或死亡危险比为 0.13, 95% CI 为 0.05 ~ 0.31, $P < 0.001$), 研究表明在进行性、复发性或有症状的硬纤维瘤患者中,索拉非尼延长无进展生存期并诱导持久反应。Corrado et al^[13] 证实索拉非尼在体内外对甲状腺癌细胞具有抗增殖和抗血管生成作用。所以,本研究尝试探索索拉非尼对人 RKO 肠癌细胞的抑制作用及其可能机制。

本研究结果表明,索拉非尼对结肠癌 RKO 细胞有增殖抑制和促凋亡作用,而且随着索拉非尼浓度增加,对 RKO 细胞的抑制效果越明显。同时发现,索拉非尼主要是通过增加 caspase-8、caspase-3 以及 PARP 的表达来促进结肠癌细胞的凋亡。在肿瘤中,常见调节细胞周期机制和频率元件的错乱反映出异常的细胞周期对肿瘤恶性增殖表型的重要性^[14]。长期以来,靶向细胞周期被视为一个潜在的治疗的靶点,但由于早期细胞周期抑制剂特异性较低,限制了这种靶向抑制的发展^[15]。本研究发现索拉非尼对肠癌细胞 RKO 的细胞周期有影响,索拉非尼处理之后,G₁ 期细胞增多,而 S 期和 G₂ 期细胞减少,说明索拉非尼可以将 RKO 细胞阻断在 DNA 合成前期,从而抑制细胞增殖。

综上所述,本研究发现索拉非尼对结肠癌 RKO 细胞增殖有抑制作用,而且和使用的浓度呈正相关。索拉非尼通过促进 RKO 细胞的凋亡来抑制结肠癌细胞的增殖。同时,本研究还发现索拉非尼会影响 RKO 细胞的细胞周期。这为将来用索拉非尼治疗结肠癌提供一定的参考价值。

参考文献

- [1] Xue L, Williamson A, Gaines S, et al. An update on uolorectal uancer[J]. *Curr Probl Surg*,2018,55(3):76-116.
- [2] Modest D P, Pant S, Sartore-Bianchi A. Treatment sequencing in metastatic colorectal cancer[J]. *Eur J Cancer*,2019,109:70-83.
- [3] Pearson H, Marshall L V, Carceller F. Sorafenib in pediatric hepatocellular carcinoma from a clinician perspective[J]. *Pediatr Hematol Oncol*,2020,37(5):412-23.
- [4] Arai H, Battaglin F, Wang J, et al. Molecular insight of regorafenib treatment for colorectal cancer[J]. *Cancer Treat Rev*,2019,81:101912.
- [5] Boland P, Wu J. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: Beyond sorafenib[J]. *Chin Clin Oncol*,2018,7(5):50.
- [6] Heinimann K. Hereditary colorectal cancer: Clinics, diagnostics and management[J]. *Ther Umsch*,2018,75(10):601-6.
- [7] Otani K, Ishihara S, Hata K, et al. Colorectal cancer with venous tumor thrombosis[J]. *Asian J Surg*,2018,41(3):197-202.
- [8] Piawah S, Venook A P. Targeted therapy for colorectal cancer metastases: A review of current methods of molecularly targeted therapy and the use of tumor biomarkers in the treatment of metastatic colorectal cancer[J]. *Cancer*,2019,125(23):4139-47.
- [9] Escudier B, Worden F, Kudo M. Sorafenib: Key lessons from over 10 years of experience[J]. *Expert Rev Anticancer Ther*,2019,19(2):177-89.
- [10] Llovet J M, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*,2008,359(4):378-90.
- [11] Liu G, Kuang S, Cao R, et al. Sorafenib kills liver cancer cells by disrupting SCD1-mediated synthesis of monounsaturated fatty acids via the ATP-AMPK-mTOR-SREBP1 signaling pathway [J]. *FASEB J*,2019,33(9):10089-103.
- [12] Gounder M M, Mahoney M R, Van Tine B A, et al. Sorafenib for advanced and refractory desmoid tumors[J]. *N Engl J Med*,2018,379(25):2417-28.
- [13] Corrado A, Ferrari S M, Politti U, et al. Aggressive thyroid cancer: targeted therapy with sorafenib[J]. *Minerva Endocrinol*,2017,42(1):64-76.
- [14] Jing X, Wang X J, Zhang T, et al. Cell-cycle-dependent phosphorylation of PRPS1 fuels nucleotide synthesis and promotes tumorigenesis[J]. *Cancer Res*,2019,79(18):4650-64.
- [15] Knudsen E S, Pruitt S C, Hershberger P A, et al. Cell cycle and beyond: Exploiting new Rb1 controlled mechanisms for cancer therapy[J]. *Trends Cancer*,2019,5(5):308-24.

Effects of sorafenib on the proliferation, cycle and apoptosis of human RKO colon cancer cells

Liu Mengmeng¹, Ni Qianzhi², Li Jingjing², Xie Dong², Chen Tianwei², Gao Zhenjun¹, Huang Jiying¹, Zhuang Yixin³
 (¹Dept of Gastroenterology, ³Dept of General Surgery, Qingpu Branch, Zhongshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201700; ²Institute of Health, Shanghai Branch, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Abstract Objective To study the effects of sorafenib on the proliferation, cycle and apoptosis of human intestinal cancer RKO cells. **Methods** RKO cells were treated with sorafenib at different concentrations (0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 μmol/L), and the inhibitory effect of sorafenib on the proliferation of RKO cells was detected by MTT method, and the half inhibition of concentration (IC₅₀) was determined, set as the experimental group. The control group was treated with dimethyl sulfoxide. For the two groups of cells, the cell clone formation plate method was used to detect the proliferation ability, the flow cytometry was used to detect cell apoptosis and cell cycle chan-

ges, and the expression level of intracellular apoptosis-related proteins Caspase-3, Caspase-8 and PARP were detected by Western blot. **Results** Sorafenib had an inhibitory effect on the proliferation of RKO cells in a concentration-dependent manner. The IC_{50} of sorafenib on RKO cell lines was 10 $\mu\text{mol/L}$. Compared with the control group, sorafenib (10 $\mu\text{mol/L}$) could inhibit the clone formation ability of RKO cells ($P < 0.001$) and increase the apoptosis rate [(32.53 \pm 6.64) % vs (4.47 \pm 2.09) % , $P < 0.01$], affect the cell cycle ($P < 0.01$) and promote the expression levels of apoptosis-related proteins Caspase-3, Caspase-8 and PARP ($P < 0.05$). **Conclusion** Sorafenib has the ability to inhibit the proliferation of human colorectal cancer RKO cells, and its mechanism may be related to promoting RKO cells apoptosis and affecting the cell cycle.

Key words sorafenib; RKO cells; cell cycle; cell apoptosis

(上接第 432 页)

[11] Wang C, Li W, Drabek D, et al. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 2251.

[12] Ju B, Zhang Q, Ge J, et al. Human neutralizing antibodies elicited

by SARS-CoV-2 infection[J]. *Nature*, 2020, 584(7819): 115 - 9.

[13] Gralinski L E, Menachery V D. Return of the coronavirus; 2019-nCoV[J]. *Viruses*, 2020, 12(2): 135.

Preparation and identification of monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein

Liu Jiangli¹, Li Yingying¹, Wang Jiawen¹, Xu Yujun^{1,2}, Zhang Yan¹, Huang Jiangtao^{1,2}, Hu Zuquan¹, Zeng Zhu^{1,2}

(¹Key Laboratory of Infectious Immune and Antibody Engineering of Guizhou Province/Key Laboratory of Biology and Medical Engineering, School of Biology and Engineering, ²State Key Laboratory of Functions and Applications of Medicinal Plants, Guizhou Medical University, Guiyang 550025)

Abstract Objective To prepare monoclonal antibodies (mAbs) against nucleocapsid protein (N) of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and identify their biological characteristics. **Methods** The recombinant SARS-CoV-2 N protein was induced for expression in *Escherichia coli*. Based on hybridoma technology, SP2/0 mouse myeloma cells were fused with the spleen cells of BALB/c mice immunized with the recombinant protein. The positive hybridoma cell lines were screened by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and limiting dilution method. The subtype of mAbs was also identified by indirect ELISA. Then, a large amount of mAbs was produced by ascites injection. After purification with Protein G affinity column, the purity, titer and specificity of mAbs were measured by SDS-PAGE, indirect ELISA and Western blot. **Results** A total of five hybridoma cell lines that could stably secrete SARS-CoV-2 N protein specific mAbs were obtained and named as N1 to N5. Five mAbs were collected from ascites. Their subtypes were identified as IgG2a * κ for one mAb and IgG1 * κ for the others, and their titers were above 2×10^4 . Western blot showed that the five mAbs could bind to recombinant SARS-CoV-2 N protein. **Conclusion** Five mAbs that can specifically recognize recombinant SARS-CoV-2 N protein were successfully prepared by hybridoma technology, which lays a foundation for exploration of immunodiagnostic reagents.

Key words severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; nucleocapsid protein; monoclonal antibodies; immunological detection