

网络出版时间: 2018-4-23 09:59 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180420.1408.001.html>

◇基础医学研究◇

## $\beta$ -榄香烯诱导人结肠癌细胞 DLD-1 的增殖抑制和凋亡研究

汪国玉<sup>1</sup>, 张 蕾<sup>2</sup>, 耿亚迪<sup>2</sup>, 冯晓俊<sup>2</sup>, 陈昭琳<sup>2</sup>, 赵晓晓<sup>1</sup>, 姜 玲<sup>1,2</sup>, 魏 伟<sup>1</sup>

**摘要** 目的 研究  $\beta$ -榄香烯对人结肠癌细胞 DLD-1 的增殖、凋亡及对活性氧(ROS)的影响。方法 体外培养人结肠癌细胞 DLD-1, 采用 MTS 法、克隆形成实验检测不同浓度  $\beta$ -榄香烯对 DLD-1 细胞增殖的影响, 使用 Hoechst 33342 染色、流式细胞术检测  $\beta$ -榄香烯对 DLD-1 细胞凋亡的影响, Western blot 法检测凋亡相关蛋白表达水平的变化, DCFH-DA 荧光染色检测 ROS 水平。结果 MTS 法和克隆形成实验显示  $\beta$ -榄香烯对 DLD-1 细胞具有增殖抑制作用; Hoechst 33342 染色显示  $\beta$ -榄香烯可使细胞出现细胞核聚缩和致密浓染的表现, Annexin V/PI 双染结果显示,  $\beta$ -榄香烯可诱导 DLD-1 细胞出现凋亡; Western blot 结果显示  $\beta$ -榄香烯作用后 Cleaved PARP、Cleaved Caspase-9 和 Cleaved Caspase-3 表达明显上调; ROS 的测定结果显示  $\beta$ -榄香烯可使细胞内 ROS 水平显著升高。结论  $\beta$ -榄香烯能显著抑制人结肠癌细胞 DLD-1 增殖并能够促进细胞凋亡, ROS 升高可能是其发挥作用的机制之一。

**关键词**  $\beta$ -榄香烯; 人结肠癌细胞; 增殖; 凋亡

**中图分类号** R 965.2

**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2018)04-0491-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.001

榄香烯是从传统中药姜黄属温郁金中提取分离的一种新型抗肿瘤药物,  $\beta$ -榄香烯是其主要成分, 占 60%~72%<sup>[1]</sup>。到目前为止,  $\beta$ -榄香烯作为一种非细胞毒性抗肿瘤药物, 临床上已经用于脑癌、乳腺癌及肝癌等一些肿瘤的治疗<sup>[2]</sup>。结肠癌是一种常见的恶性肿瘤, 在我国男女发病率和死亡率呈显著上

升趋势, 且多数患者发现时已属于中晚期<sup>[3]</sup>。目前结肠癌的治疗多以手术为主, 5-氟尿嘧啶、奥沙利铂等化疗和放疗为辅, 但会出现恶心呕吐、脱发、免疫功能下降等副作用, 且患者容易复发, 因此急需有效低毒的抗肿瘤药物治疗结肠癌<sup>[4]</sup>。有研究<sup>[5-6]</sup>表明  $\beta$ -榄香烯对结肠癌 HT-29 细胞和 Lovo 细胞有抑制增殖作用, 但具体作用特点和机制尚未提及。故该研究旨在观察  $\beta$ -榄香烯对结肠癌细胞 DLD-1 增殖及凋亡的影响, 并初步探讨  $\beta$ -榄香烯对 DLD-1 细胞活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)生成的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 药品与试剂**  $\beta$ -榄香烯(大连金港制药有限公司); CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒(MTS)(普洛麦格北京生物技术有限公司); Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒(贝博生物有限公司); Hoechst 33342 活细胞染色液(100 $\times$ )、活性氧检测试剂盒(DCFH-DA)、Western 及 IP 细胞裂解液、PMSF(100 mmol/L)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术研究); 凋亡抗体套盒(美国 Cell Signaling Technology 公司); 辣根酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.2 细胞培养** DLD-1 细胞由安徽医科大学药学院细胞库馈赠, 复苏后加入含 10% 胎牛血清、20 U/ml 的青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的条件培养箱中培养。待细胞长至 80%~90% 时用胰酶消化进行传代, 细胞传 3 代稳定后采用状态良好的对数生长期细胞进行实验操作。

**1.3 MTS 法检测细胞活力** 胰酶消化处于对数生长期的 DLD-1 细胞并制成单细胞悬液, 以每孔 5 $\times$ 10<sup>3</sup> 个细胞接种至 96 孔板中, 每孔 200  $\mu$ l, 当细胞长至 50%~60% 时依序加入不同浓度  $\beta$ -榄香烯(25、50、100、200、300、400、500、600  $\mu$ mol/L) 作为药物组, 设一个空白对照组, 每组设 6 个复孔。分别处理 24、48、72 h 后, 显微镜观察细胞生长状况。相应时

2017-12-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81603339、81602344); 安徽省自然科学基金(编号: 1708085QH175)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学临床药理研究所、抗炎免疫药物教育部重点实验室、抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

<sup>2</sup> 安徽医科大学附属安徽省立医院药剂科, 合肥 230001

作者简介: 汪国玉, 女, 硕士研究生;

姜 玲, 女, 主任药师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: ahslyyjl@126.com;

魏 伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

间后每孔加入 MTS/PMS 混合物 40  $\mu\text{l}$ , 1 h 后于 490 nm 波长下测定各孔吸光度 (optical density, OD) 值。结果以细胞活力大小表示, 细胞活力 (%) = 药物组 OD / 空白对照组 OD  $\times 100\%$ 。

**1.4 克隆形成实验** 取对数生长期 DLD-4 细胞接种到 6 孔板中, 每孔 2 ml,  $1 \times 10^3$  个细胞; 待细胞贴壁后每孔依次加入不同浓度  $\beta$ -榄香烯 (50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ) 作为药物组, 设一个空白对照组。24 h 后吸弃药液, 每孔加入 2 ml 含 10% 胎牛血清、20 U/ml 的青霉素和链霉素的 DMEM 高糖培养基后继续培养, 每隔 2 d 换液 1 次。待长出细胞集落, 14 d 后处理。PBS 清洗细胞 2 次, 每孔加入 1 ml 多聚甲醛固定液固定 30 min 后吸弃, 加入 1 ml 过滤的结晶紫染色液染色 15 min, 用清水轻轻冲掉结晶紫染色液, 将 6 孔板残余的水分晾干、拍照。

**1.5 Hoechst 33342 染色实验** 取对数生长期 DLD-4 细胞接种到 12 孔板中, 每孔 1 ml,  $1 \times 10^5$  个细胞; 待细胞贴壁后每孔依次加入不同浓度  $\beta$ -榄香烯 (50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ) 作为药物组, 设一个空白对照组。24 h 后吸弃药液, PBS 清洗 1 次, 每孔加入 1 ml Hoechst 33342 染色液, 放入培养箱孵育 15 min 后吸弃, PBS 清洗 2 次后于荧光显微镜下观察。

**1.6 Annexin V/PI 双染法检测细胞凋亡** 取对数生长期 DLD-4 细胞接种到 6 孔板中, 细胞密度为  $10^5$  个/ml。待细胞贴壁后依次加入不同浓度  $\beta$ -榄香烯 (50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ) 作为药物组, 设一个空白对照组。置培养箱中培养 24 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化细胞, 并进行细胞计数, 取  $5 \times 10^5$  个细胞进行 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测实验。细胞收集后用冷 PBS 洗涤 2 次, 离心后用 400  $\mu\text{l}$   $1 \times$  Annexin V 结合液重悬细胞, 加入 5  $\mu\text{l}$  Annexin V-FITC 进行染色, 2 ~ 8  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 15 min, 再加入 10  $\mu\text{l}$  PI 染色液轻轻混匀, 于 2 ~ 8  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 5 min, 用流式细胞仪进行检测。

**1.7 Western blot 法检测凋亡相关蛋白的表达**  $\beta$ -榄香烯 (100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ) 及空白对照组处理 DLD-4 细胞 24 h 后, 提取各组细胞总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度并将蛋白调整为相同浓度。SDS-PAGE 法将蛋白转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h, 兔抗人 GAPDH (1 : 1 000)、Cleaved PARP (1 : 1 000)、PARP (1 : 1 000)、Cleaved Caspase-9 (1 : 1 000)、Caspase-9 (1 : 1 000)、Cleaved Caspase-3 (1 : 1 000) 和 Caspase-3 (1 : 1 000) 一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过

夜, 二抗 (1 : 5 000) 室温孵育 2 h, 显影。

## 1.8 ROS 检测

**1.8.1 荧光显微镜观察 ROS 水平**  $\beta$ -榄香烯 (50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ) 及空白对照组处理 DLD-4 细胞 24 h 后, PBS 清洗 2 次, 每孔加入 1 ml DCFH-DA 荧光探针, 放入培养箱孵育 20 min, 用无血清培养基清洗 3 次, 去掉未进入细胞的 DCFH-DA, 荧光显微镜下观察。

**1.8.2 流式细胞术检测 ROS 水平**  $\beta$ -榄香烯 (50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ) 及空白对照组处理 DLD-4 细胞 24 h 后, 收集细胞于 1.5 ml 离心管, 用 PBS 清洗 2 次离心, 每管加入 1 ml DCFH-DA 荧光探针, 吹打混匀放入培养箱孵育 20 min, 3 min 颠倒混匀 1 次, 用无血清培养基清洗 3 次, 充分去掉未进入细胞的 DCFH-DA, 上机检测。

**1.9 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析, 所有实验重复 3 次以上。数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组资料比较采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1  $\beta$ -榄香烯对 DLD-4 细胞活力的影响**  $\beta$ -榄香烯 (25、50、100、200、300、400、500、600  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞 24 h 后, 倒置显微镜下观察, 空白对照组细胞贴壁生长, 呈不规则梭形、边缘光滑;  $\beta$ -榄香烯药物组随着药物浓度的升高, 细胞存活数目减少、细胞间隙变大, 细胞皱缩且形态模糊, 见图 1。MTS 法结果显示, 50 ~ 400  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -榄香烯显著抑制 DLD-4 细胞的活力 ( $F = 97.78, 153.3, 175.7, P < 0.05, P < 0.01$ ), 见图 2。

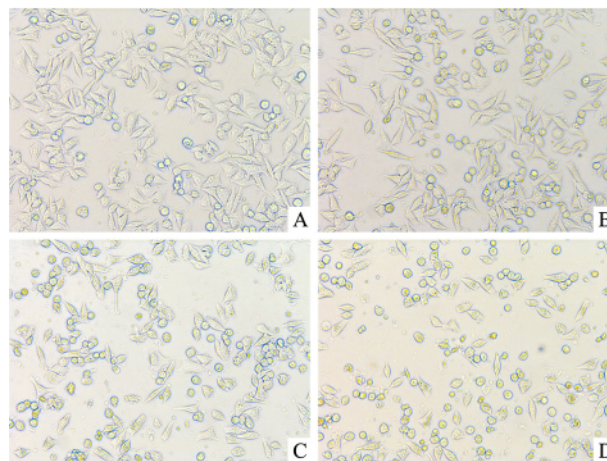
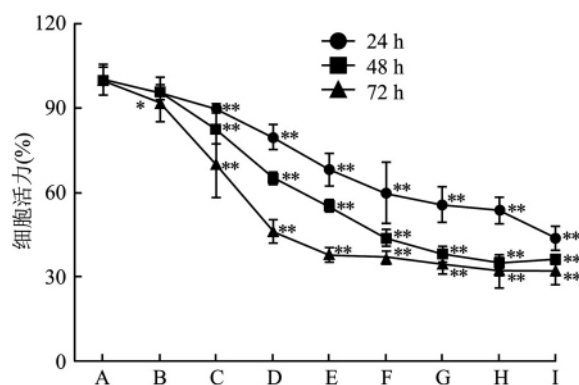


图1  $\beta$ -榄香烯处理 DLD-4 细胞 24 h 后细胞形态  $\times 200$   
A: 空白对照组; B ~ D:  $\beta$ -榄香烯 100、200、300  $\mu\text{mol/L}$

图2  $\beta$ -榄香烯抑制 DLD-1 细胞增殖

A: 空白对照组; B ~ I:  $\beta$ -榄香烯 25、50、100、200、300、400、500、600  $\mu\text{mol/L}$ ; 与同一时间空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

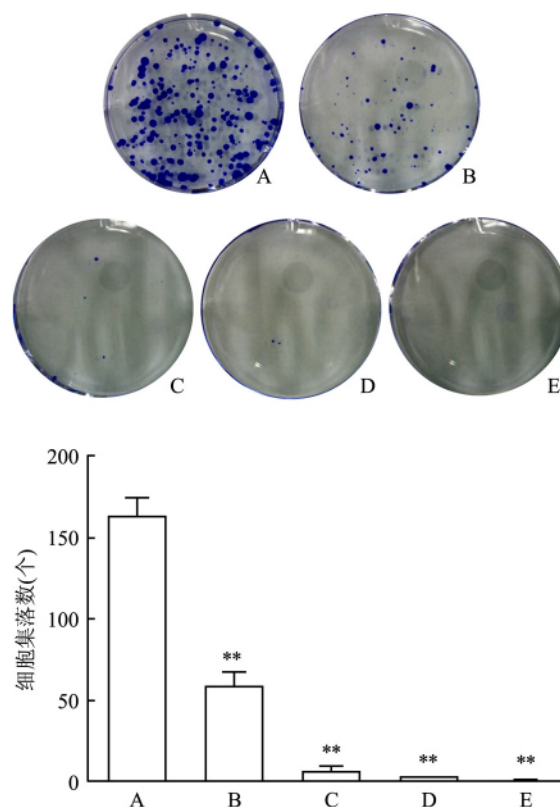
## 2.2 $\beta$ -榄香烯对 DLD-1 细胞克隆形成能力的影响

克隆形成实验结果表明,  $\beta$ -榄香烯显著抑制 DLD-1 细胞增殖。与空白对照组相比, 随着  $\beta$ -榄香烯浓度增大, 细胞克隆数目变少, 细胞集落数逐渐减少 ( $F = 337.9$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 3。

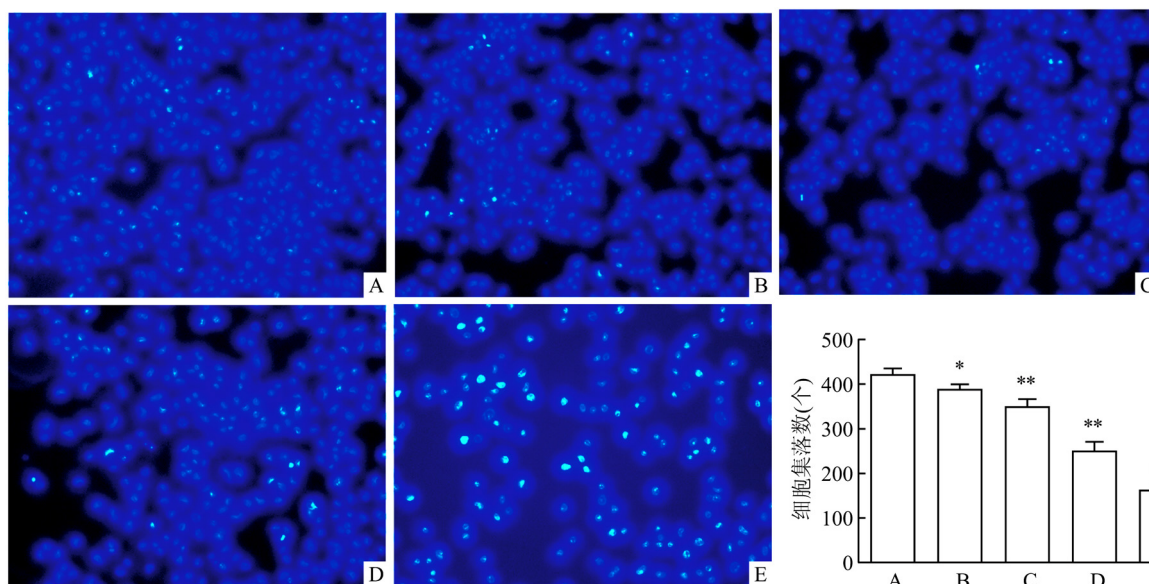
**2.3  $\beta$ -榄香烯对 DLD-1 细胞核的影响**  $\beta$ -榄香烯 (50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理细胞 24 h 后进行 Hoechst 33342 染色, 结果显示细胞均出现蓝染, 空白对照组细胞核规则均匀, 核膜完整, 但药物组随着  $\beta$ -榄香烯浓度增加, 部分细胞核成碎块状, 核染色质固缩发生高亮呈现致密浓染 ( $F = 140.9$ ,  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见图 4。

**2.4  $\beta$ -榄香烯对 DLD-1 细胞凋亡的影响** 采用  $\beta$ -榄香烯 (50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 DLD-1 细胞

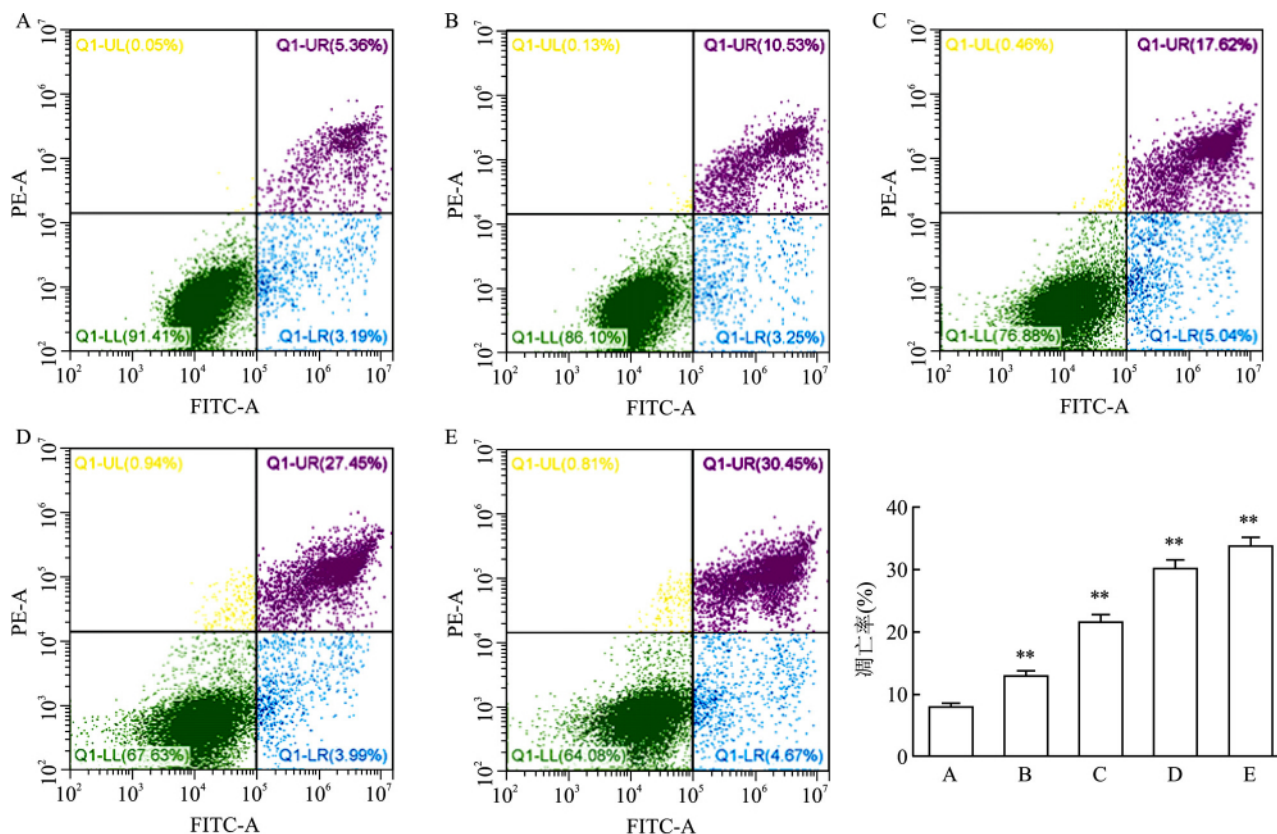
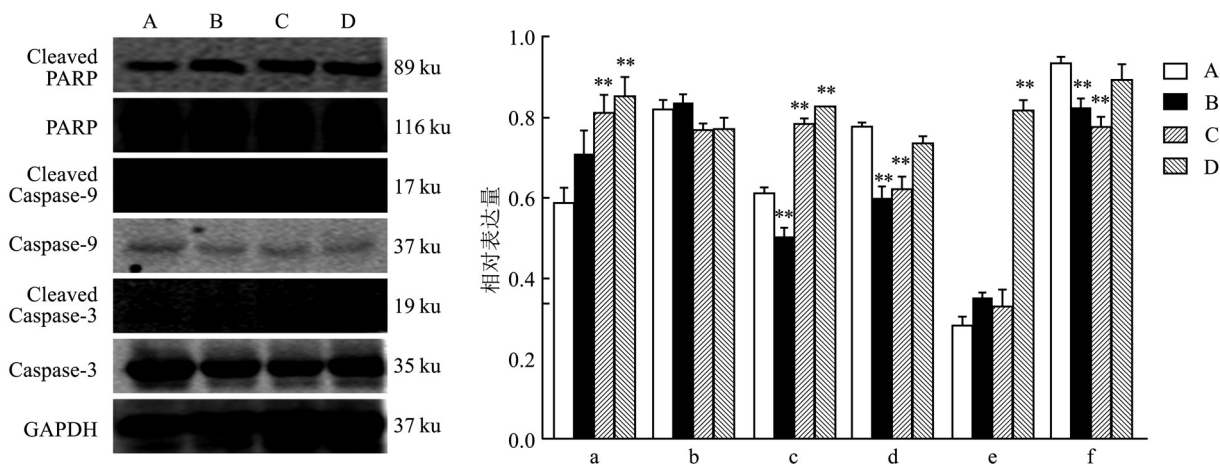
24 h 后, 与空白对照组相比,  $\beta$ -榄香烯给药组的凋亡率增加 ( $F = 305.4$ ,  $P < 0.01$ ), 表明当  $\beta$ -榄香烯浓度增大时, 可以诱导 DLD-1 细胞出现凋亡, 抑制细胞的生长, 见图 5。

图3  $\beta$ -榄香烯对 DLD-1 细胞克隆形成能力的影响

A: 空白对照组; B ~ E:  $\beta$ -榄香烯 50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$

图4 Hoechst 33342 染色实验测定 DLD-1 细胞凋亡  $\times 200$ 

A: 空白对照组; B ~ E:  $\beta$ -榄香烯 50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ; 与空白对照组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

图5  $\beta$ -榄香烯诱导 DLD-1 细胞凋亡A: 空白对照组; B ~ E:  $\beta$ -榄香烯 50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ 图6  $\beta$ -榄香烯对 DLD-1 细胞凋亡相关蛋白表达的影响A: 空白对照组; B ~ D:  $\beta$ -榄香烯 100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ; a: Cleaved PARP; b: PARP; c: Cleaved Caspase-9; d: Caspase-9; e: Cleaved Caspase-3; f: Caspase-3; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ 

**2.5  $\beta$ -榄香烯对 DLD-1 细胞凋亡相关蛋白表达的影响** Western blot 结果表明,  $\beta$ -榄香烯作用 DLD-1 细胞 24 h 后, Cleaved PARP、Cleaved Caspase-9 和 Cleaved Caspase-3 表达水平随着  $\beta$ -榄香烯浓度增大而增加; PARP、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白的表达水平变化不明显 ( $F = 18.61、7.92、261.3、33.68、$

$213.9、17.99, P < 0.01$ )。提示  $\beta$ -榄香烯促进 PARP、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白剪切, 促进了 DLD-1 细胞的凋亡, 见图 6。

**2.6 DLD-1 细胞内 ROS 的表达** 荧光显微镜下观察结果显示,  $\beta$ -榄香烯 (50、100、200、300  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用于 DLD-1 细胞 24 h 后, 与空白对照组相比,

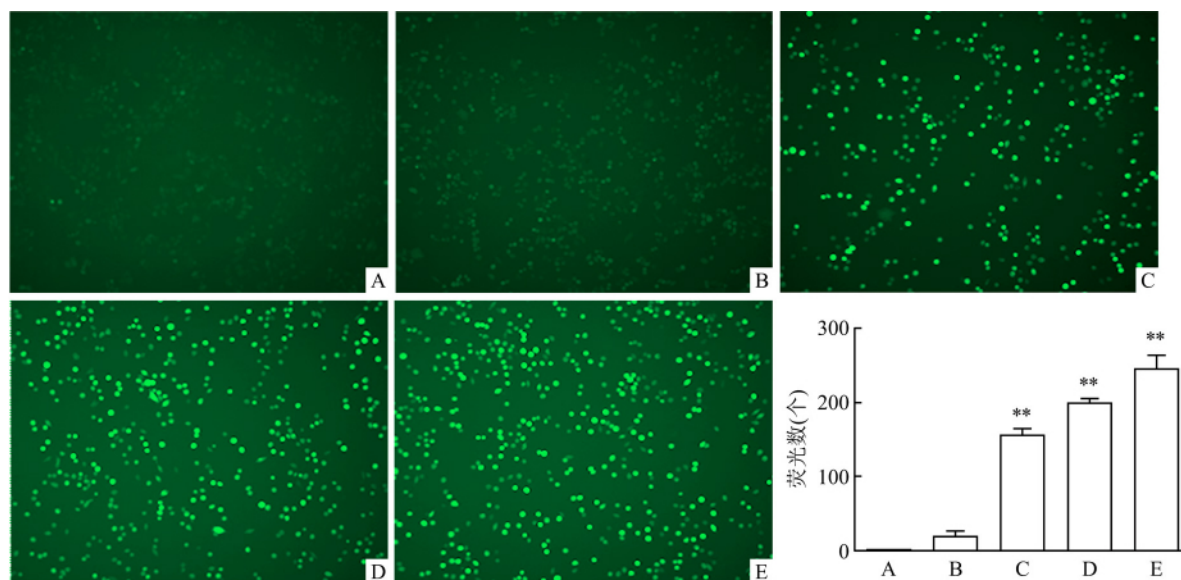


图7 荧光显微镜下观察 β-榄香烯对 DLD-1 细胞内 ROS 的影响 ×100

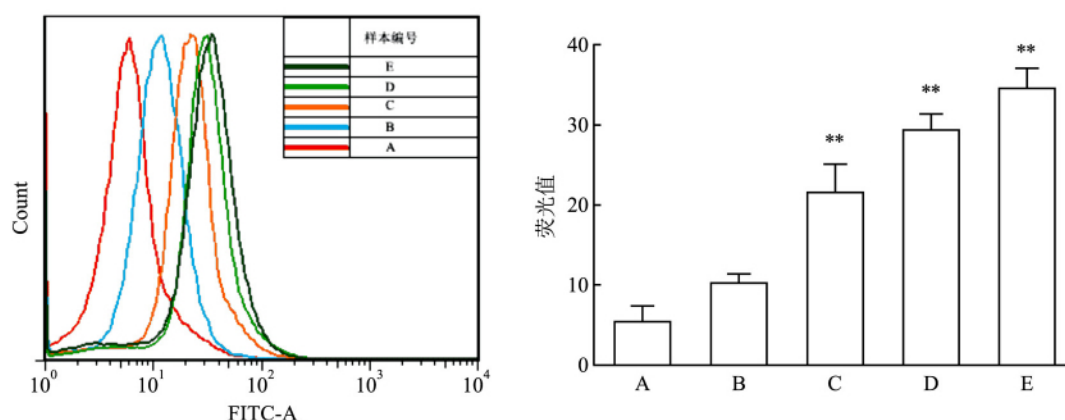
A: 空白对照组; B~E: β-榄香烯 50、100、200、300 μmol/L; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ 

图8 流式细胞仪检测 β-榄香烯对 DLD-1 细胞内 ROS 的影响

A: 空白对照组; B~E: β-榄香烯 50、100、200、300 μmol/L; 与空白对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ 

β-榄香烯药物组 DCF 的荧光强度依次增加 ( $F = 279.7$ ,  $P < 0.01$ )。流式细胞仪检测结果与荧光显微镜相一致 ( $F = 280.22$ ,  $P < 0.01$ )。表明 β-榄香烯浓度增大使细胞内 ROS 水平增加, 见图 7、8。

### 3 讨论

姜黄属植物莪术作为我国常用的传统中药, 具有行气止痛、积散结、破血祛瘀作用, 《医家心法》论“广茂即莪术, 凡行气破血, 消积散结皆用之”等。大量研究<sup>[7-8]</sup>表明莪术对多种肿瘤如乳腺癌、肝癌及胃癌等有很好的治疗作用, β-榄香烯是从中药莪术根茎中提取并分离的有效活性单体, 其具有低毒有效、广谱的性质, 对多种肿瘤有明显的抑制作用, 是临床上常用的抗肿瘤药物。有研究<sup>[9]</sup>表明, β-榄香烯作为一种天然的抗血管生成剂, 可以通过抑制

VEGF 介导的血管生成, 抑制黑素瘤的生长和转移。另外, β-榄香烯通过上调 P53 蛋白的表达促进外泌体的释放, 抑制人肺癌细胞的增殖<sup>[10]</sup>。在本研究中, MTS 实验和克隆形成实验显示, β-榄香烯能够显著抑制结肠癌 DLD-1 细胞的增殖。

在一定条件下, 细胞受内在遗传机制的控制自动结束生命的过程称之为细胞凋亡, 其对多细胞生物体的胚胎发育和组织稳态起着至关重要的作用<sup>[11]</sup>。当细胞发生凋亡时, 细胞体积缩小, 线粒体膜电位消失, 核质浓缩, DNA 降解, 胞膜内侧外翻到膜表面, 最终细胞被分割包裹为几个凋亡小体, 继而吞噬细胞吞噬<sup>[12]</sup>。在细胞凋亡过程中, Caspases 扮演着十分重要的角色, 细胞凋亡过程其实就是 Caspases 不可逆有限水解底物的级联放大反应过程。当细胞色素 C 进入细胞质后, 募集 Caspase-9

前体并使其剪切活化,从而进一步激活效应 Caspase-7 和 Caspase-3,而 PARP 是细胞凋亡核心元件 Caspase-3 的切割底物,共同启动 Caspase 级联反应,最终引发细胞凋亡<sup>[13]</sup>。本研究探讨了  $\beta$ -榄香烯诱导 DLD-1 细胞凋亡的初步机制。Hoechst 33342 染色显示  $\beta$ -榄香烯可使细胞出现细胞核聚缩和致密浓染的表现,Annexin V/PI 双染结果表明  $\beta$ -榄香烯可诱导 DLD-1 细胞出现凋亡;Western blot 结果表明  $\beta$ -榄香烯诱导 DLD-1 细胞凋亡与 PARP、Caspase-3、Caspase-9 的活化有关。以上说明  $\beta$ -榄香烯作为中药有效活性成分能够诱导结肠癌 DLD-1 细胞发生凋亡。

ROS 作为一种自由基,与肿瘤之间的关系密切,越来越多的研究表明 ROS 不仅与肿瘤的发生和发展有关,还和肿瘤的治疗有着密切联系。ROS 在不同水平下会有不同的作用。低水平的 ROS 促进细胞分裂与增殖,中等水平的 ROS 导致细胞周期阻滞,而高水平的 ROS 诱导细胞发生凋亡或坏死<sup>[14]</sup>。许多抗癌药物如烷化剂和喜树碱等会通过介导 ROS 的大量释放和线粒体膜电位的变化,激活 Caspase-3 等蛋白酶来诱导癌细胞发生凋亡<sup>[15]</sup>。本研究观察了  $\beta$ -榄香烯对 ROS 的影响,荧光显微镜下观察和流式细胞仪检测结果显示  $\beta$ -榄香烯处理 DLD-1 细胞 24 h 后,随着  $\beta$ -榄香烯作用浓度增加,药物组细胞内 ROS 水平与空白对照组相比明显增加,表明 ROS 可能在  $\beta$ -榄香烯抑制 DLD-1 细胞增殖及诱导凋亡中发挥重要作用。

综上所述, $\beta$ -榄香烯抑制人结肠癌细胞 DLD-1 的增殖并诱导细胞凋亡,这可能与 ROS 升高及上调凋亡相关蛋白有关,为  $\beta$ -榄香烯应用于结肠癌的临床治疗提供了实验依据。

#### 参考文献

[1] Zhang X, Li Y, Zhang Y, et al. Beta-elemene blocks epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer cell line MCF-7

- through Smad3-mediated down-regulation of nuclear transcription factors[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58719.
- [2] Guan C, Liu W, Yue Y, et al. Inhibitory effect of  $\beta$ -elemene on human breast cancer cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(7): 3948–56.
- [3] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115–32.
- [4] 孙燕,顾晋,汪建平,等. 中国结直肠癌诊疗规范(2015版)[J]. 中华普通外科学文献(电子版), 2015, 9(6): 506–23.
- [5] 苏影,王成昆,彭波.  $\beta$ -榄香烯对 HepG2 和 HT-29 细胞体外抗癌作用的实验研究[J]. 当代医学(学术版), 2008, 14(18): 1–3.
- [6] 黄富春,郑树. 榄香烯乳对结肠癌 Lovo 细胞端粒酶活性、细胞凋亡及细胞周期的影响[J]. 医药导报, 2004, 23(10): 712–4.
- [7] Tan W, Lu J, Huang M, et al. Anti-cancer natural products isolated from Chinese medicinal herbs[J]. *Chinese Medicine*, 2011, 6(1): 27.
- [8] Ooko E, Kadioglu O, Greten H J, et al. Pharmacogenomic characterization and isobologram analysis of the combination of ascorbic acid and curcumin-two main metabolites of curcuma longa-in cancer cells[J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 38.
- [9] Chen W, Lu Y, Wu J, et al. Beta-elemene inhibits melanoma growth and metastasis via suppressing vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2011, 67(4): 799–808.
- [10] Li J, Yu J, Liu A, et al.  $\beta$ -elemene against human lung cancer via up-regulation of P53 protein expression to promote the release of exosome[J]. *Lung Cancer*, 2014, 86(2): 144–50.
- [11] Millimouno F M, Dong J, Yang L, et al. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature[J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014, 7(11): 1081–107.
- [12] Redza-Dutordoir M, Averill-Bates D A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(12): 2977–92.
- [13] Julien O, Wells J A. Caspases and their substrates[J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(8): 1380–9.
- [14] Tong L, Chuang C C, Wu S, et al. Reactive oxygen species in redox cancer therapy[J]. *Cancer Lett*, 2015, 367(1): 18–25.
- [15] Ozben T. Oxidative stress and apoptosis: impact on cancer therapy[J]. *J Pharm Sci*, 2007, 96(9): 2181–96.

## Study of $\beta$ -elemene on tumor inhibition and apoptosis of human colon cancer DLD-1 cells

Wang Guoyu<sup>1</sup>, Zhang Lei<sup>2</sup>, Geng Yadi<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup>Dept of Clinical Pharmacology of Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine of Education Ministry, Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032; <sup>2</sup>Dept of Pharmacy, The Affiliated Provincial Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230001)

**Abstract Objective** To investigate effects of  $\beta$ -elemene on the proliferation and apoptosis of human colon cancer

网络出版时间: 2018-4-23 09:59 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20180420.1408.002.html>

## 大鼠脑缺血再灌注后 GRP78、CHOP 表达变化

仇 健<sup>1</sup>, 武 菲<sup>2</sup>, 王春梅<sup>2</sup>, 万 磊<sup>2</sup>, 唐 斌<sup>1</sup>, 白 波<sup>2</sup>

**摘要** 目的 研究 Wistar 大鼠脑缺血 2 h 再灌注不同时间点葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) 及 C/EBP 环磷酸腺苷反应元件结合转录因子同源蛋白 (CHOP) 的表达变化。方法 选体质量 (240 ± 10) g Wistar 大鼠, 分别在缺血 2 h、缺血 2 h 再灌注 2 h、缺血 2 h 再灌注 12 h、缺血 2 h 再灌注 24 h 时间点进行取材, 随机抽取成功大鼠模型进行 TTC 染色证明模型成功, Western blot 检测不同时间点 GRP78 及 CHOP 的表达, TUNEL 技术检测大鼠模型损伤侧以及对侧细胞凋亡的数量。结果 与正常组相比, 成功模型在缺血 2 h 引起 GRP78 ( $P < 0.001$ ) 及 CHOP ( $P < 0.05$ ) 表达升高, 且 GRP78 和 CHOP 的升高点不完全重合。与自身健侧相比, 个别模型健侧脑组织 CHOP 明显升高, 然而 GRP78 未升高。与健侧相比, 损伤侧 TTC 染色梗死面积增大 ( $P < 0.001$ ), 损伤侧 TUNEL 染色显示凋亡细胞多 ( $P < 0.001$ ); 健侧 TTC 染色正常, 同时健侧 TUNEL 染色为阴性。结论 在缺血相同时间内再灌注不同时间 GRP78 和 CHOP 升高不一致, 细胞受到短时间的缺血再灌注损伤, 显示 GRP78 表达持续上升, 当细胞受到长时间的缺血再灌注时, GRP78 虽然高表达, 但细胞

已经发生了凋亡坏死。本研究显示短时间细胞受损后 GRP78 与 CHOP 共同表达时能促进细胞的凋亡。

**关键词** GRP78; CHOP; 缺血再灌注模型

**中图分类号** R 338.2

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2018)04-0497-05

**doi:** 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.04.002

临床上缺血性脑卒中是神经系统常见病和多发病, 现正趋向年轻化。脑缺血后相当一部分血管可以自身再通, 如短暂性脑缺血发作, 也有一部分通过溶栓后再通, 但是缺血再灌注损伤时间的长短严重影响患者预后的生活质量。动物实验已经充分证实缺血再灌注后大量神经细胞会受损死亡, 而缺血半暗带的细胞会发生凋亡, 为检测缺血半暗带凋亡细胞, 做了半暗带取材。内质网应激是细胞凋亡的重要途径之一, 葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein 78, GRP78) 是内质网应激的重要标志物<sup>[1]</sup>, CHOP 是 CCAAT/增强结合蛋白同源蛋白 (CCAAT/enhancer binding proteins homologous protein, CHOP) 是细胞凋亡的重要标志物, 检测标志物对细胞的功能做出客观的评价。GRP78 是热休克蛋白 70 家族成员的一份子<sup>[2]</sup>, 生理作用下 GRP78 在内质网内参与蛋白质的正确折叠, 协助蛋白质跨膜转运, 并与蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (RNA de-

2017-12-18 接收

基金项目: 山东省自然科学基金项目 (编号: ZR2015CL021)

作者单位: <sup>1</sup> 山东大学齐鲁医学院内科学, 济南 250100

<sup>2</sup> 济宁医学院神经生物研究所, 济宁 272067

作者简介: 仇 健, 男, 硕士研究生;

白 波, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: bbai@mail.jnmc.edu.cn

DLD-4 cell line and its effect on reactive oxygen species (ROS). **Methods** Human colon cancer DLD-4 cell line was cultured *in vitro*. MTS and cell clone forming experiments were performed to reveal the inhibitory effect on DLD-4 cells proliferation with different concentrations of  $\beta$ -elemene. Hoechst 33342 staining and flow cytometry were used to determine the apoptosis of DLD-4 cells after treated with  $\beta$ -elemene, and the protein expression levels of polymerase (PARP), the cleavage of PARP (Cleaved PARP), Cleaved Caspase-9, Caspase-9, Cleaved Caspase-3 and Caspase-3 were determined by Western blot. DCFH-DA fluorescence staining was used to detect the level of ROS. **Results** MTS and cell clone forming experiments showed that  $\beta$ -elemene significantly inhibited the proliferation of DLD-4 cells. Hoechst 33342 staining showed that  $\beta$ -elemene caused DLD-4 cells nucleus condensation and dense staining. Annexin V/PI double staining showed that  $\beta$ -elemene could induce DLD-4 cells apoptosis. Western blot showed that the protein expression levels of Cleaved PARP, Cleaved Caspase-9 and Cleaved Caspase-3 were significantly up-regulated after  $\beta$ -elemene treatment. ROS assay showed that  $\beta$ -elemene obviously elevated ROS level of DLD-4 cells. **Conclusion**  $\beta$ -elemene significantly inhibited DLD-4 cells proliferation and promoted DLD-4 cells apoptosis, and the increasement of ROS level may play one of the mechanisms.

**Key words**  $\beta$ -elemene; human colon cancer cells; proliferation; apoptosis