

# 光甘草定对结直肠癌细胞 RKO 增殖和凋亡的影响

杨小平 邹多兵 丁延辉 左莉 周青 汪渊

**摘要** 目的 研究光甘草定(Gla)对人结直肠癌细胞株 RKO 增殖和凋亡的影响,并初步探讨其可能的作用机制。方法 选取 RKO 细胞为研究对象,采用 MTT 比色法测定 Gla 对 RKO 细胞增殖的影响,通过 Hoechst 33258 染色检测 RKO 细胞凋亡情况;Western blot 法检测 RKO 细胞内丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路蛋白以及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱天冬氨酸蛋白酶-8(Caspase-8)、半胱天冬氨酸蛋白酶-9 前体(Procaspase-9)、半胱天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)表达水平。结果 Gla 抑制 RKO 细胞的增殖,并呈浓度与时间依赖性( $P < 0.05$ );Gla 能调节 MAPK 信号通路 JNK1/2 p38 磷酸化的水平;Gla 可诱导 RKO 细胞凋亡,下调抗凋亡蛋白 Bcl-2、Procaspase-9 的表达水平( $P < 0.05$ ),上调 Bax、Caspase-3 蛋白的表达( $P < 0.05$ ),而 Caspase-8 蛋白水平在各组变化均不明显。结论 Gla 能抑制结直肠癌 RKO 细胞的增殖,并通过下调 Bcl-2/Bax 的比值诱导凋亡,其可能与 MAPK 信号通路的激活有关。

**关键词** 结直肠癌;RKO 细胞;光甘草定;凋亡

中图分类号 R 735.3;R 963;R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)01-0042-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.01.009

结直肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,2012 年全球结直肠癌死亡例数约 69.4 万,并有逐年增高趋势<sup>[1]</sup>。光果甘草根在亚洲和欧洲被广泛用于解毒、抗炎、镇定等功效已有数百年<sup>[2]</sup>,光甘草定(glabridin, Gla)是光果甘草根的主要活性成分(图 1)研究<sup>[3-5]</sup>表明 Gla 有抗炎、降血脂、心血管保护等功能。近几年研究<sup>[6-8]</sup>显示 Gla 对肝癌、淋巴瘤、乳腺癌等肿瘤有一定的抑癌作用,但在结直肠肿瘤中未见报道。该研究旨在探讨 Gla 作用下结直

肠癌 RKO 细胞增殖的变化及其过程中对 MAPK 信号通路、凋亡相关蛋白等的影响,进一步探究治疗肿瘤可能的分子机制,为 Gla 更好的用于临床治疗奠定理论基础。

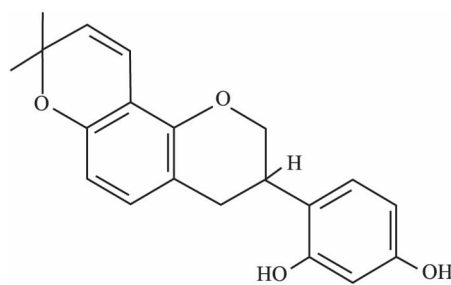


图 1 Gla 结构式

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 人结直肠癌细胞株 RKO 购自美国 ATCC 公司;Gla 购于上海源叶生物科技有限公司,用二甲基亚砜(DMSO)溶解成 20 mmol/L, -20 °C 避光保存;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;DMSO、四甲基偶氮唑蓝(MTT)购自美国 Sigma 公司;高糖 DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;鼠抗人  $\beta$ -actin, 鼠抗人 p-JNK、JNK、Bcl-2、Bax、Caspase-8、Caspase-9、Caspase-3、 $\beta$ -actin 以及兔抗人 pp38、p38 均购自美国 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶(horseradishperoxidase, HRP)标记的羊抗鼠 IgG、羊抗兔 IgG 均购自美国 Millipore 公司。Hoechst 33258 试剂盒、BCA 定量试剂盒和 ECL 发光剂均购于碧云天生物技术公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞株以及细胞培养** 人结直肠癌细胞株 RKO 培养于含 10% 胎牛血清、1% 青霉素、1% 链霉素的高糖 DMEM 培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度细胞培养箱中培养。

**1.2.2 细胞增殖实验(MTT 法)** 收集对数生长期细胞以  $1 \times 10^4$  /孔的密度接种于 96 孔板,每孔 200  $\mu$ l 边缘孔用 200  $\mu$ l PBS 填充。待细胞贴壁后弃去培养液,设置空白孔、细胞对照孔和溶剂对照孔,其

2016-08-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81272399);安徽省自然科学基金(编号:1508085QH167)

作者单位:安徽医科大学分子生物学实验室、生物化学与分子生物学教研室,安徽省/省部共建教育部重要遗传病基因资源利用重点实验室,合肥 230032

作者简介:杨小平,女,硕士研究生;

汪渊,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: aydesm-1@163.com

他实验孔分别加入含有不同浓度(1、5、10、25、50  $\mu\text{mol/L}$ )的 Gla 培养液,每个实验组设 5 个复孔,分别孵育 24 h 和 48 h 后,弃去原培养液,每孔加入含 10% MTT 的完全培养基 200  $\mu\text{l}$ ,于细胞培养箱中继续孵育 4~6 h。小心弃去上清液,每孔加入 150  $\mu\text{l}$  DMSO 37  $^{\circ}\text{C}$  振动 10 min 以溶解结晶,酶标仪检测 570 nm 波长吸光度值(optical density, OD)。细胞存活率(%) = (对照组 OD<sub>570</sub> - 试验组 OD<sub>570</sub>) / 对照组 OD<sub>570</sub> × 100%。

**1.2.3 Hoechst 33258 凋亡染色** 灭菌好的盖玻片置于 12 孔板, RKO 细胞被消化后,以  $5 \times 10^3$  /孔的密度接种,待细胞贴壁长至 50% 加不同浓度的 Gla (1、5、10、25  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 48 h。吸尽培养基, PBS 轻柔洗 3 遍,每次 1 min。固定液固定 30 min, PBS 洗 3 遍,每次 2 min。吸尽液体,加入 Hoechst 33258 染色液 0.2 ml,染色 2 min,弃去染色液, PBS 洗 3 次,每次 5 min。将盖玻片取出,细胞面朝上置于 10  $\mu\text{l}$  抗荧光猝灭剂的载玻片上,尽量避免气泡,盖玻片周边滴加少许透明指甲油固定。激发波长约 350 nm,发射波长约 460 nm,倒置荧光显微镜下观察细胞核形态。

**1.2.4 Western blot 检测蛋白表达** 25  $\mu\text{mol/L}$  Gla 处理 RKO 细胞,提取不同时间点(10、20、30、60、120、240 min)的蛋白;不同浓度的 Gla (1、5、10、25  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用于 RKO 细胞 48 h,均设置对照组。药物处理完毕,取出细胞,倾去培养基,用 4  $^{\circ}\text{C}$  的 PBS 洗涤 3 遍后,每组加入 200  $\mu\text{l}$  蛋白提取缓冲液(Tris-HCl, pH 7.14, 150 mmol/L NaCl, 1 mmol/L EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 5 mg/ml Leupeptin, 1 mmol/L PMSF),冰上放置 20 min 后,细胞刮刮取细胞至 1.5 ml EP 管,并反复冻融 3 次(-80  $^{\circ}\text{C}$ 、4  $^{\circ}\text{C}$ )之后,4  $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 30 min,吸取上清液,使用 BCA 试剂盒定量,调整成终浓度一致,加入等体积的 4 × 蛋白上样缓冲液,煮沸 8~10 min, -80  $^{\circ}\text{C}$  保存。等量样本进行 SDS-PAGE 电泳,将蛋白转移到 PVDF 膜上。转膜成功后,含 5% 的脱脂奶粉封闭 4  $^{\circ}\text{C}$  封闭过夜, TBS 洗 3 次后将膜放入用一抗稀释液配制的一抗中,一抗浓度为 1:500, 1:1 000, 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。经 TBST(含 0.05% Tween-20)洗涤 3 次后加入相应浓度 HRP 标记的二抗室温孵育 2 h,用 TBST 洗涤 3 次后, TBS 洗涤 1 次,每次 10 min。在暗室中将等比例混合后的 ECL 试剂 A 液和 B 液均匀涂于膜上, X 线片曝光,显影,定影。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 软件分析结果,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。使用 Quantity One 软件分析条带的灰度值,组间数据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 Gla 对 RKO 细胞增殖的影响** MTT 结果显示, Gla 处理 RKO 细胞 24 h 后,与细胞对照组相比,低浓度的 Gla 组(1、5、10、25  $\mu\text{mol/L}$ )对 RKO 细胞无明显抑制作用,当作用浓度升至 50  $\mu\text{mol/L}$  开始抑制 RKO 细胞的增殖( $F = 225.032$ ,  $P < 0.05$ ),见表 1、图 2。Gla 处理 RKO 细胞 48 h 后,与细胞对照组相比,10  $\mu\text{mol/L}$  Gla 对 RKO 细胞活力有明显抑制作用( $F = 36.612$ ,  $P < 0.05$ ),50  $\mu\text{mol/L}$  Gla 处理 RKO 细胞 48 h,细胞存活率为 0.42%,提示随着药物处理时间的延长,抑制率逐渐升高。

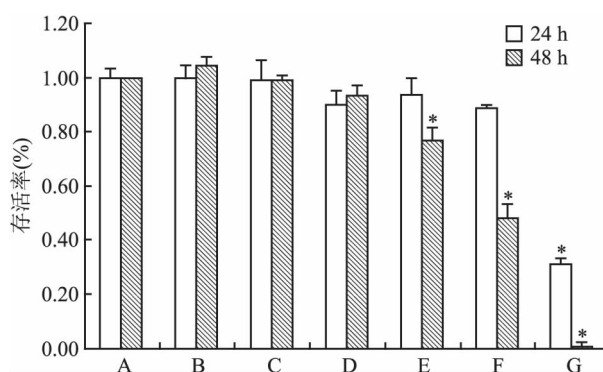


图 2 不同浓度的 Gla 对 RKO 细胞增殖的作用

A: 细胞对照组; B: 溶剂对照组; C: Gla 1  $\mu\text{mol/L}$ ; D: Gla 5  $\mu\text{mol/L}$ ; E: Gla 10  $\mu\text{mol/L}$ ; F: Gla 25  $\mu\text{mol/L}$ ; G: Gla 50  $\mu\text{mol/L}$ ; 与同一时间点细胞对照组比较: \*  $P < 0.05$

**2.2 Gla 对 RKO 细胞凋亡的影响** Gla (1、5、10、25  $\mu\text{mol/L}$ ) 作用于 RKO 细胞 24 h, Hoechst 33258 染色后荧光显微镜下显示对照组 RKO 细胞核形态较一致,着色均匀成蓝色淡染;而 Gla 组细胞核出现浓缩、碎裂,折光性增强,并存在明显的凋亡小体,且随着 Gla 浓度升高,凋亡细胞比例增加,提示 Gla 可诱导 RKO 细胞凋亡。见图 3。

**2.3 Gla 对 RKO 细胞 MAPK 信号通路相关蛋白的影响** 25  $\mu\text{mol/L}$  Gla 处理 RKO 细胞不同时间点(10、20、30、60、120、240 min)检测 JNK 和 p38 的磷酸化水平变化,发现 Gla 上调 JNK 磷酸化水平在 1 h 达到峰值随后又下降;随着时间延长, Gla 上调 p38 磷酸化水平,表明 Gla 可以调节 MAPK 通路相关蛋白的活性,见图 4。

表1 Gla 处理 RKO 细胞 24 h 和 48 h 对增殖的影响 (n = 4,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 ( $\mu\text{mol/L}$ )	24 h		48 h	
		OD <sub>570</sub>	抑制率 (%)	OD <sub>570</sub>	抑制率 (%)
细胞对照	-	2.410 ± 0.030	0.00	1.028 ± 0.060	0.00
溶剂对照	-	2.360 ± 0.056	0.21	1.049 ± 0.026	-1.99
Gla	1	2.384 ± 0.207	1.10	0.973 ± 0.103	5.39
	5	2.183 ± 0.151	9.87	0.896 ± 0.011	13.86
	10	2.269 ± 0.325	13.38	0.759 ± 0.032	26.15*
	25	2.142 ± 0.048	11.14	0.486 ± 0.034	52.75*
	50	0.744 ± 0.065	69.16*	0.004 ± 0.000	99.58*

与同一时间点细胞对照组比较: \* P < 0.05

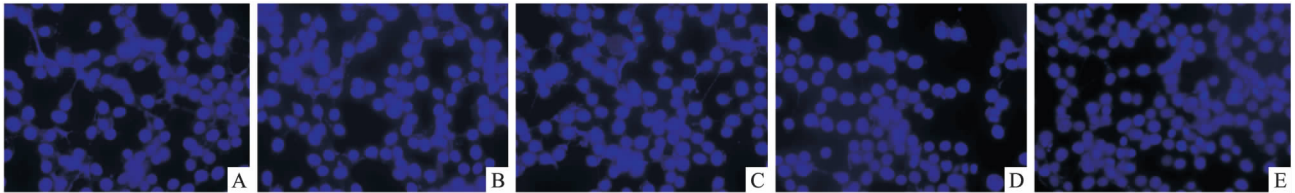


图3 Gla 对结直肠癌 RKO 细胞凋亡的影响

A: 溶剂对照组; B: Gla 1  $\mu\text{mol/L}$ ; C: Gla 5  $\mu\text{mol/L}$ ; D: Gla 10  $\mu\text{mol/L}$ ; E: Gla 25  $\mu\text{mol/L}$

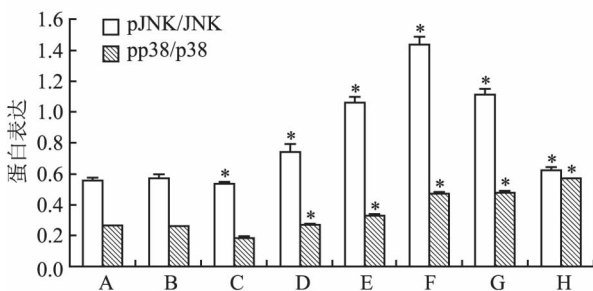
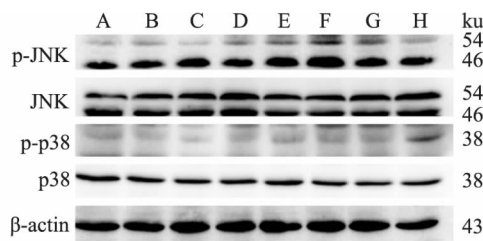


图4 Gla 对 RKO 细胞不同时间点 MAPK 信号通路的影响

A: 细胞对照组; B: 溶剂对照组; C: 10 min; D: 20 min; E: 30 min; F: 1 h; G: 2 h; H: 4 h; 与细胞对照组比较: \* P < 0.05

**2.4 Gla 对 RKO 细胞凋亡相关蛋白的影响** 不同浓度 Gla 处理 RKO 细胞 48 h, Western blot 结果显示 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显下降 ( $F = 2\ 005.84$ ,  $P < 0.05$ ), 促凋亡蛋白 Bax 表达上调 ( $F = 1\ 343.36$ ,  $P < 0.05$ ), 尤其与凋亡密切相关的指标 Bcl-2/Bax 的比值明显下调 ( $F = 1\ 706.48$ ,  $P < 0.05$ ), 说明 Gla 能诱导 RKO 细胞凋亡, 这也可能是其抑制细胞增殖的原因之一 (图 5)。Western blot 检测 Caspase 家族蛋白表达, 结果显示 Caspase-8 在各组中表达变化不明显 ( $F = 0.551$ ), Procaspase-9 是

Caspase-9 的前体蛋白, 其表达明显下降 ( $F = 5\ 294.24$ ,  $P < 0.05$ ), 而 Caspase-3 蛋白表达上升 ( $F = 290.17$ ,  $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

随着社会环境及生活方式等的变化, 肿瘤的疾病率居高不下, 结直肠癌发病率在男性中占所有肿瘤第 3 位, 女性中排第 2 位<sup>[1]</sup>。传统化疗方式对结直肠肿瘤有一定缓解抑制作用, 同时也产生很大毒副作用, 损害正常人体细胞, 因此致力于寻找毒副作用小且抑癌效果明显的药物。

光甘草定俗称“美白黄金”, 是传统中草药光果甘草中特有的异黄酮类药物<sup>[2]</sup>。早期 Gla 作为植物雌激素, 用于治疗乳腺癌<sup>[6]</sup>和子宫内膜癌<sup>[9]</sup>。研究<sup>[6-7, 9]</sup>显示 Gla 对乳腺癌细胞、子宫内膜癌、肝癌细胞有抗增殖、抗迁移浸润和肿瘤血管生成的作用。本实验中 MTT 结果显示 25  $\mu\text{mol/L}$  Gla 能显著抑制结直肠癌 RKO 细胞的增殖, 并呈时间和浓度依赖性。Huang et al<sup>[8]</sup>使用 Gla 作用于两株人正常组织细胞人胚肺成纤维细胞 WI-38 和人口角化细胞 HOK, 显示 0 ~ 80  $\mu\text{mol/L}$  Gla 对这两株细胞无明显毒副作用, 而 40  $\mu\text{mol/L}$  Gla 对四株人淋巴瘤细胞 (HL-60、MV4-11、U937 和 THP-1) 有明显的抑制增殖作用。目前 Gla 用于肿瘤方面的研究刚刚起步, 其抗肿瘤机制有待进一步探究。

细胞凋亡是细胞遭受各种刺激后的程序性死亡, 其中 Bcl-2 家族、Caspase 家族, p53 基因等均参

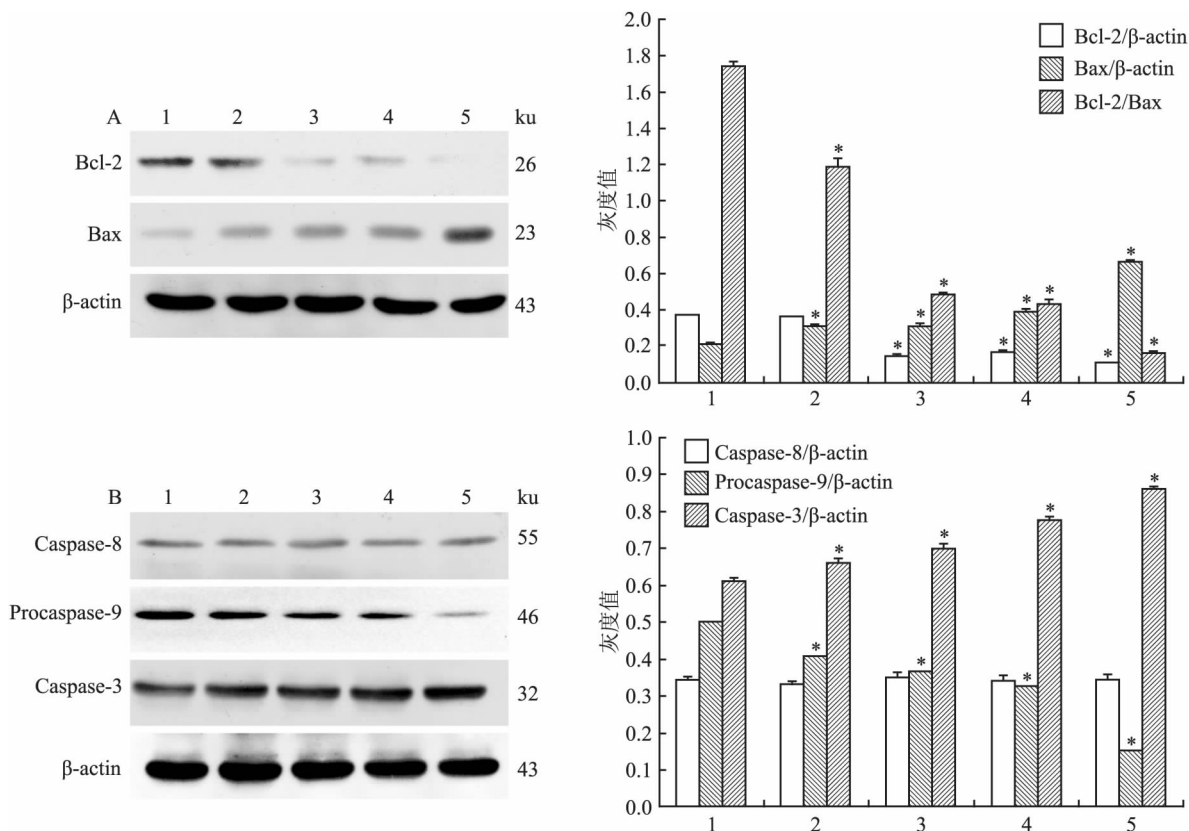


图5 Gla对RKO细胞凋亡相关蛋白的影响

1:溶剂对照组;2:Gla 1  $\mu\text{mol/L}$ ;3:Gla 5  $\mu\text{mol/L}$ ;4:Gla 10  $\mu\text{mol/L}$ ;5:Gla 25  $\mu\text{mol/L}$ ;与溶剂对照组比较:\*  $P < 0.05$

与其调控。Hoechst 结果提示随着 Gla 浓度增加, RKO 细胞中凋亡细胞比例增加。进一步检测与凋亡密切相关的 Bcl-2 家族,包括抗凋亡蛋白(Bcl-2、Bcl-xL 等)和促凋亡蛋白(Bax、Bak、Bid 等),其中 Bcl-2 和 Bax 常形成二聚体形式调节细胞凋亡,而 Bcl-2/Bax 比值将决定细胞存活。本研究发现在 RKO 细胞中, Gla 下调 Bcl-2 蛋白,上调 Bax 蛋白,提示 Gla 通过下调 Bcl-2/Bax 比值诱导 RKO 细胞凋亡。Caspase 家族能通过水解特异性蛋白而介导细胞凋亡,其中 Caspase-3 是 Caspase 家族下游细胞凋亡最重要的执行者之一,它的活化是凋亡进入不可逆阶段的标志;但其发挥作用需要凋亡启动因子 Caspase-8 或 Caspase-9 的活化<sup>[10]</sup>。本研究中 Gla 处理 RKO 细胞 48 h 后, Caspase-3 表达上升, Caspase-8 在各组中没有明显变化,而 Caspase-9 的前体 Procaspase-9 则发生明显降解并与 Gla 浓度存在依赖性。上述结果提示 Gla 促进 RKO 细胞凋亡通过 Caspase 依赖的信号通路。

前期研究<sup>[11-12]</sup>显示各种结直肠癌细胞中 MAPK 信号通路能被化学药物激活或抑制,从而诱导细胞死亡或细胞保护。MAPK 主要包括: p38

MAPK、细胞外信号调节激酶(ERK)、c-jun N 末端激酶等 8 个亚家族,其中 p38 和 JNK 除了参与多种炎症反应,也可以通过调控 Bcl-2 家族而调节细胞凋亡<sup>[13-14]</sup>。研究<sup>[8]</sup>显示 Gla 通过 p38MAPK 和 JNK1/2 信号通路介导 Caspase 家族蛋白激活,并诱导淋巴瘤细胞凋亡。本研究检测 Gla 作用于 RKO 细胞不同时间,结果显示 p38 和 JNK 通路磷酸化水平在 25  $\mu\text{mol/L}$  Gla 刺激下先下降随后升高,分别在 4 h 和 1 h 达到峰值,结果提示 Gla 刺激下 RKO 细胞 p38 和 JNK 通路发生快速磷酸化调节,因此笔者推测 Gla 诱导 RKO 细胞的凋亡可能与 MAPK 信号通路的激活有关。

综上所述, Gla 能抑制 RKO 细胞的增殖和诱导 RKO 细胞凋亡,其作用可能与 MAPK 信号通路的激活有关,并通过下调 Bcl-2/Bax 的比值,从而诱导结直肠癌细胞凋亡。

#### 参考文献

- [1] McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, international agency for research on cancer, WHO press, 2015 [J]. Adv Nutr, 2016 7(2): 418-9.

- [2] Belinky P A , Aviram M , Fuhrman B , et al. The antioxidative effects of theisoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation [J]. *Atherosclerosis* , 1998 , 137(1) :49 – 61.
- [3] Lee J W , Choe S S , Jang H , et al. AMPK activation with glabridin ameliorates adiposity and lipid dysregulation in obesity [J]. *J Lipid Res* , 2012 , 53(7) :1277 – 86.
- [4] Fukai T , Satoh K , Nomura T , et al. Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glabridin from *Glycyrrhiza glabra* [J]. *Fitoterapia* , 2003 , 74(7 – 8) :624 – 9.
- [5] Zhou S , Koh H L , Gao Y , et al. Herbal bioactivation: the good , the bad and the ugly [J]. *Life Sci* , 2012 , 74(8) :935 – 68.
- [6] Ye X Q , Jiang F , Li Y , et al. Glabridin attenuates the migratory and invasive capacity of breast cancer cells by activating microRNA-200c [J]. *Cancer Sci* , 2014 , 105(7) :875 – 82.
- [7] Hsieh M J , Lin C W , Yang S F , et al. Glabridin inhibits migration and invasion by transcriptional inhibition of matrix metalloproteinase 9 through modulation of NF- $\kappa$ B and AP-1 activity in human liver cancer cells [J]. *Br J Pharmacol* , 2014 , 171(12) :3037 – 50.
- [8] Huang H L , Hsieh M J , Chien M H , et al. Glabridin mediates caspases activation and induces apoptosis through JNK1/2 and p38 MAPK pathway in human promyelocytic leukemia cells [J]. *PLoS One* , 2014 , 9(6) :e98943.
- [9] Su Wei Poh M , Voon Chen Yong P , Visweswaran N , et al. Estrogenicity of glabridin in Ishikawa cells [J]. *PLoS One* , 2015 , 10(3) :e0121382.
- [10] Cryns V , Yuan J. Protease to die for [J]. *Genes Dev* , 1998 , 12(11) :1551 – 70.
- [11] Wei Z J , Tao M L , Zhang W , et al. Up-regulation of microRNA-302a inhibited the proliferation and invasion of colorectal cancer cells by regulation of the MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [J]. *Int J Clin Exp Pathol* , 2015 , 8(5) :4481 – 91.
- [12] Zou D B , Wei X , Hu R L , et al. Melatonin inhibits the migration of colon cancer RKO cells by down-regulating myosin light chain kinase expression through cross-talk with p38 MAPK [J]. *Asian Pac J Cancer* , 2015 , 16(14) :5835 – 42.
- [13] Johnson G L , Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK , JNK , and p38 protein kinases [J]. *Science* , 2002 , 298(5600) :1911 – 2.
- [14] Cai B , Chang S H , Becker E B , et al. p38 MAP Kinase mediates apoptosis through phosphorylation of BimEL at ser-65 [J]. *J Biol Chem* , 2006 , 281(35) :25215 – 22.

## Effects of glabridin on the proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells

Yang Xiaoping , Zou Duobing , Ding Yanhui , et al

(Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology , Anhui Medical University ;

Dept of Key Laboratory , Gene Resource Utilization for Severe Disease of Anhui Province , Hefei 230032)

**Abstract Objective** To explore the effects of glabridin on the proliferation of human colorectal cancer cell line RKO and the probable mechanisms. **Methods** MTT assay was used to detect the proliferation of RKO cells treated with different concentrations of glabridin. Hoechst staining was used to detect the apoptosis of RKO cells. The expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway proteins and the proteins associated with apoptosis B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) , Bcl-2 associated X protein (Bax) , cysteinyl aspartate specific proteinases (Caspase-8 , Procaspase-9 , Caspase-3) in RKO cells were detected by Western blot. **Results** Glabridin inhibited the proliferation of RKO cells in a dose- and time-dependent manner compared with cell group ( $P < 0.05$ ). Glabridin regulated the expression of MAPKs. Glabridin induced the apoptosis of RKO cells , down-regulated the expression of Bcl-2 and Procaspase-9 and up-regulated the expression of Bax and Caspase-3 compared with the control group ( $P < 0.05$ ) , while Caspase-8 expression was constant in all groups. **Conclusion** Glabridin exhibits an inhibitory effect on RKO cells proliferation. Glabridin promotes the apoptosis of RKO cells , which may regulate the expression of the proteins associated with apoptosis through MAPK signaling pathway.

**Key words** colorectal cancer; RKO cells; glabridin; apoptosis