

葡萄籽原花青素对结肠癌细胞抑制作用的初步研究

石焕焕 吕程程 朱运峰*

(北京交通大学生命科学与生物工程研究院, 北京 100044)

摘要 葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidins, GSPs)是自然界中普遍存在的一类多酚类物质,是天然的抗氧化剂,近来抗氧化剂与癌症的关系已引起了极大的关注。该文以结肠癌细胞株SW480和SW620为模型,探索其对结肠癌细胞生物学特征的影响以及作用的分子机制。该研究中分别采用MTT法以及流式细胞仪检测检测GSPs对细胞增殖能力、细胞周期以及细胞凋亡的影响。二代测序筛选GSPs调控的相关基因以及荧光实时定量PCR方法和Western blot验证靶分子的表达变化。结果显示:GSPs作用于SW480和SW620细胞后,两种细胞形态均发生明显改变、细胞增殖能力下降、细胞周期改变、凋亡率升高;机制研究发现,Akt信号通路以及以FoxM1为代表的抗氧化信号途径在此过程中起着重要的作用。该研究得出GSPs可明显影响结肠癌细胞生物学特征,在此过程中Akt信号通路以及FoxM1具有重要的作用。

关键词 葡萄籽原花青素; 结肠癌; 细胞凋亡; Akt; FoxM1

Preliminary Research on the Inhibitory Effect of Grape Seed Proanthocyanidins on Colon Cancer Cells

Shi Huanhuan, Lü Chengcheng, Zhu Yunfeng*

(College of Life Sciences and Bio-engineering, Beijing Jiao-tong University, Beijing 100044, China)

Abstract Objective grape seed proanthocyanidins (GSPs) are a kind of polyphenols commonly found in nature which are natural antioxidants. Recently, the relationship between antioxidants and cancer has attracted great attention. In this paper, colon cancer cell lines SW480 and SW620 were used as models to explore the effect of GSPs on the biological characteristics of colon cancer cells and the molecular mechanisms by which was investigated further. Methods MTT assay and flow cytometry were used to detect the effects of GSPs on cell proliferation, cell cycle and apoptosis. The genes related to GSPs regulation were screened by next-generation sequencing and the expression changes of target molecules were verified by real-time quantitative PCR and Western blotting. Results Both SW480 and SW620 cells were treated by GSPs, the biological characteristics were changed significantly, e.g.: cell morphological changed, the cell proliferation ability decreased, the cell cycle changed, and the apoptosis rate increased. The mechanism by which the Akt signaling pathway as well as antioxidant signaling pathway represented by FoxM1 plays an important role in this process. Conclusion GSPs can significantly affect the biological characteristics of colon cancer cells with which Akt signaling pathway and FoxM1 play important roles.

Keywords grape seed proanthocyanidins; colon cancer cells; apoptosis; Akt; FoxM1

收稿日期: 2018-10-10 接受日期: 2019-04-30

国家高技术研究发展计划(863项目)(批准号: 2011AA02A110)资助的课题

*通讯作者。Tel: 010-51684352, E-mail: yfzhu@bjtu.edu.cn

Received: October 10, 2018 Accepted: April 30, 2019

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program (863 Program) (Grant No.2011AA02A110)

*Corresponding author. Tel: 86-10-51684352, E-mail: yfzhu@bjtu.edu.cn

网络出版时间: 2019-09-12 12:15:05 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190912.1214.008.html>

结肠癌(colorectal cancer, CRC)在全世界范围内是最为常见的恶性肿瘤之一^[1]。研究显示,饮食结构可影响机体炎症状态,而饮食相关炎症可能通过抑制适应性抗肿瘤免疫应答而促进结肠癌的发展,膳食结构的改变可直接影响结肠癌的发生和发展过程^[2-3]。因此,从膳食方面来寻找预防和治疗结肠癌的药物,已成为研究的新热点。

近年来抗氧化物质在肿瘤的预防和治疗中发挥着越来越重要的作用。Elango等^[4]的研究中发现,在放疗期间补充硒的口腔癌患者的抗氧化状态显著改变。卵巢癌患者血浆中抗氧化物质SOD、CAT、维生素C和维生素E水平显著降低^[5]。可见抗氧化物质活性发挥对癌症治疗有积极意义。近年报道显示,多酚类物质的抗癌活性的发挥对癌症治疗有积极意义。植物多酚具有抑制癌细胞生长迁移、抑制蛋白激酶活性、促进凋亡等作用^[6]。

葡萄籽原花青素(grape seed proanthocyanidins, GSPs)是从葡萄籽中提取出来的一种黄酮类多酚化合物,主要是由儿茶素、表儿茶素、或儿茶素与表儿茶素形成的二聚体,此外还有三聚体、四聚体等,具有抗氧化、清除自由基^[7]、保护心血管^[8]、抗炎的作用,同时研究证实,GSPs在胰腺癌、乳腺癌、肝癌等癌症中,能有效抑制癌细胞转移侵袭能力^[9-11]。研究显示,葡萄果皮和种子提取物能够在A431细胞中显著诱导细胞毒性作用,诱导细胞凋亡和凋亡形态学改变^[12]。同时Vaid等^[13]的体内外数据研究结果显示,原花青素能够通过降低 β -catenin的水平抑制人黑色素瘤细胞系A375和Hs294t的增殖并促进细胞的凋亡。对于结肠癌这一消化道肿瘤来说,作为药食同源的原花青素显然是结肠癌防治的理想药物。

因此,本研究以结肠癌细胞SW480和SW620细胞为研究对象,观察GSPs对结肠癌细胞形态、增殖、凋亡及细胞周期等生物行为的影响,并探讨相关的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 人结肠癌细胞SW480和SW620由解放军总医院肿瘤中心实验室惠赠。

1.1.2 主要材料及试剂 GSPs($\geq 95\%$)购自天津市尖峰天然产物研究开发有限公司;胎牛血清购自

Gibco公司;RPMI-1640培养基购自Hyclone公司;硫链丝菌素购自上海懋康生物有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、MTT购自Sigma公司;Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;细胞周期检测试剂盒、细胞及IP裂解液购自江苏海门碧云天生物技术研究所;BCA蛋白浓度测定试剂盒购自美国Thermo公司;Trizol购自美国Invitrogen公司;RNA反转录试剂盒购自Promega公司;抗体 β -actin购自Easy Bio科技有限公司;Cyclin D1、CDK4、Bax、Bcl-2、FoxM1均购自武汉博士德生物工程有限公司;Bad购自Abcam贸易有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理 将人结肠癌细胞SW480和SW620分别置于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中,于37 °C、5% CO₂培养箱中培养。细胞传代后置于培养皿中待其贴壁,实验组加入GSPs使其终浓度达到100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对照组加入0.1% DMSO,继续培养48 h后在倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.2 细胞形态的观察 将对数生长期的细胞SW480和SW620接种于培养皿中,实验组加入GSPs使其终浓度达到100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,对照组加入0.1% DMSO,继续培养48 h后在倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.3 MTT法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞SW480和SW620以 2×10^4 /孔接种于96孔板,实验组分别加入不同浓度的GSPs(20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),每一浓度设6个复孔,对照组加入0.1% DMSO。分别于24 h、48 h、72 h后加入MTT 20 μL ,在培养箱中继续培养4 h。弃掉孔内培养液,加入150 μL DMSO,用酶标仪测定490 nm处的D值。

1.2.4 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡 取对数生长期的细胞SW480和SW620以 2×10^5 /孔接种于6孔板中,实验组加入GSPs使其终浓度达到100 $\mu\text{g}/\text{mL}$,设3个复孔,对照组加入0.1% DMSO。分别于24 h、48 h、72 h后收集细胞,按照试剂盒说明书步骤操作,用流式细胞仪进行检测。

1.2.5 Q-PCR检测细胞周期和凋亡相关基因的表达 取对数生长期的SW480和SW620细胞,实验组分别加入浓度为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的GSPs,对照组不做任何处理,培养48 h后,用Trizol法提取总RNA,利用反转录试剂盒合成cDNA,利用Q-PCR试剂盒进行Q-PCR反

应。实验中所有的引物均由北京三博远志公司合成, 如表1所示。

1.2.6 Western blot检测细胞周期和凋亡相关蛋白的表达 收集浓度为100 $\mu\text{g/mL}$ 的GSPs处理48 h后的细胞, 用细胞裂解液裂解各处理组的细胞, BCA蛋白浓度测定试剂盒检测蛋白浓度。每组取30 μg 进行SDS-PAGE电泳, 再将蛋白转移至硝酸纤维素膜上, 5%脱脂奶粉封闭1 h, 一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 再以辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育1 h, ECL化学发光法进行显色, 胶片进行感光显影, 扫描记录。

1.2.7 硫链丝菌素处理结肠癌细胞 将对数生长期的细胞SW480和SW620接种于培养皿中, 实验组加入硫链丝菌素使其终浓度达到1 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 、4 $\mu\text{mol/L}$, 对照组加入0.01% DMSO, 培养24 h后分别提取RNA、蛋白, 利用QPCR和Western blot方法检测FoxM1的表达。

1.2.8 细胞集落形成检测实验 实验组细胞加入终浓度为2 $\mu\text{mol/L}$ 的硫链丝菌素, 对照组加入0.01% DMSO培养24 h, 胰酶消化细胞后制备成单细胞悬液, 以800个/孔的梯度密度接种于6孔板中, 放入37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 恒温培养箱中静置培养2~3周。弃去上清液, 0.1%结晶紫染色20 min左右, 用PBS缓慢洗去染色液, 风干后计数, 重复3次。

1.2.9 统计学方法 采用SPSS 19.0软件对数据进行统计学分析, 所有实验数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 对两组实验结果间进行 t 检验。以 $P<0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

2.1 GSPs改变细胞的形态

GSPs分别处理SW480和SW620细胞48 h后, 在倒置显微镜下观察两种细胞的形态变化, 结果如图1所示。GSPs处理后, 人结肠癌细胞SW480和SW620形态均发生明显改变, 细胞发生膨胀, 多呈圆形, 周缘毛糙不规则。

2.2 GSPs抑制细胞的增殖

不同浓度的GSPs处理结肠癌细胞SW480和SW620 24 h、48 h和72 h后, 对两种细胞增殖的影响如图2所示。结果表明, 在24 h时, 各浓度的GSPs对SW480和SW620的细胞增殖有显著的促进作用; 在48 h时, 低浓度的GSPs对SW480细胞增殖影响差异不显著, 当浓度达到60 $\mu\text{g/mL}$ 时, GSPs对SW620增殖则有显著的抑制作用; 在72 h时, 各浓度的GSPs对SW480细胞的增殖有明显的抑制作用, 细胞存活率显著降低, 除20 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度组以外, 各浓度的GSPs对SW620细胞的增殖有明显的抑制作用。

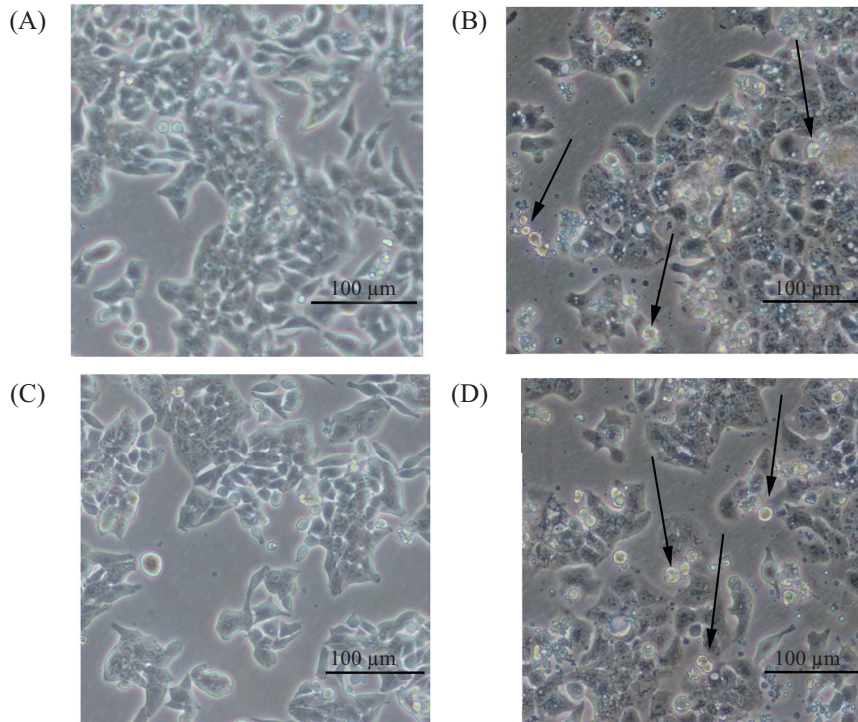
2.3 GSPs促进细胞凋亡

为探究GSPs处理后对细胞凋亡的影响, 细胞经Annexin V/PI双染后用流式细胞仪检测。细胞凋亡早期, 细胞膜中的磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)由脂膜内侧翻向外侧, Annexin V通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合,

表1 引物序列

Table 1 Primers sequence

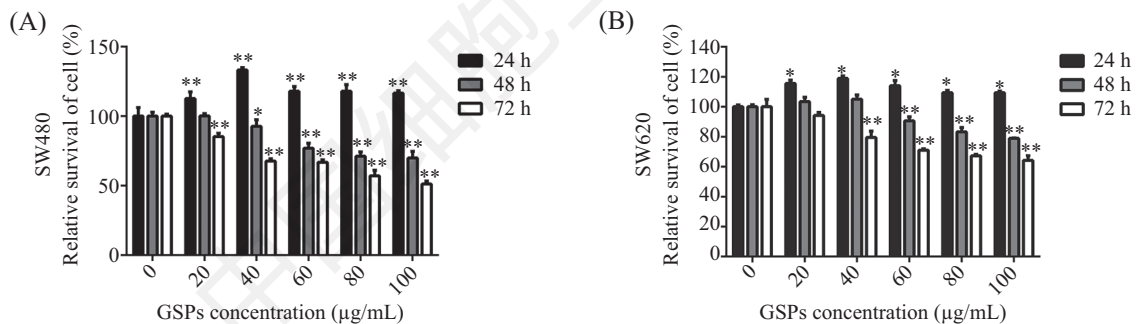
引物名称 Name	引物序列 Sequence
<i>Cyclin D1</i>	F: 5'-CAA TGA CCC CGC ACG ATT TC-3' R: 5'-AAG TTG TTG GGG CTC CTC AG-3'
<i>CDK4</i>	F: 5'-TGC CAA TTG CAT CGT TCA CC-3' R: 5'-AGC CAA CAC TCC ACA TGT CC-3'
<i>Bad</i>	F: 5'-AGA TCC GGA GTC GCC ACA-3' R: 5'-GAG TCC ACA AAC TCG TCA CTC A-3'
<i>Bax</i>	F: 5'-GGA CGA ACT GGA CAG TAA CAT GG-3' R: 5'-GCA AAG TAG AAA AGG GCG ACA AC-3'
<i>Bcl-2</i>	F: 5'-GAT AAC GGA GGC TGG GAT GC-3' R: 5'-TCA CTT GTG GCC CAG ATA GG-3'
<i>FoxM1</i>	F: 5'-CTG AAA GCT CCG GTG CCA GAC-3' R: 5'-GGG TCC CCG GCG GTG CG-3'
<i>GAPDH</i>	F: 5'-CCA TGG AGA AGG CTG GG-3' R: 5'-CGC CAC AGT TTC CCG GA-3'



A: SW480细胞的对照组; B: SW480细胞的GSPs(100 µg/mL)组; C: SW620细胞的对照组; D: SW620细胞的GSPs(100 µg/mL)组。
A: SW480 cell control; B: SW480 cell was treated by GSPs with 100 µg/mL; C: SW620 cell control; D: SW620 cell was treated by GSPs with 100 µg/mL.

图1 GSPs改变SW480和SW620细胞形态

Fig.1 GSPs significantly changes the cell phenotype



A: 各浓度的GSPs分别处理SW480细胞24 h、48 h、72 h的细胞存活率; B: 各浓度的GSPs分别处理SW620细胞24 h、48 h、72 h的细胞存活率。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

A: the cell viability of SW480 cells treated with various concentrations of GSPs for 24 h, 48 h, and 72 h, respectively; B: cell viability of SW620 cells treated with various concentrations of GSPs for 24 h, 48 h, and 72 h. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group.

图2 GSPs抑制SW480和SW620细胞增殖

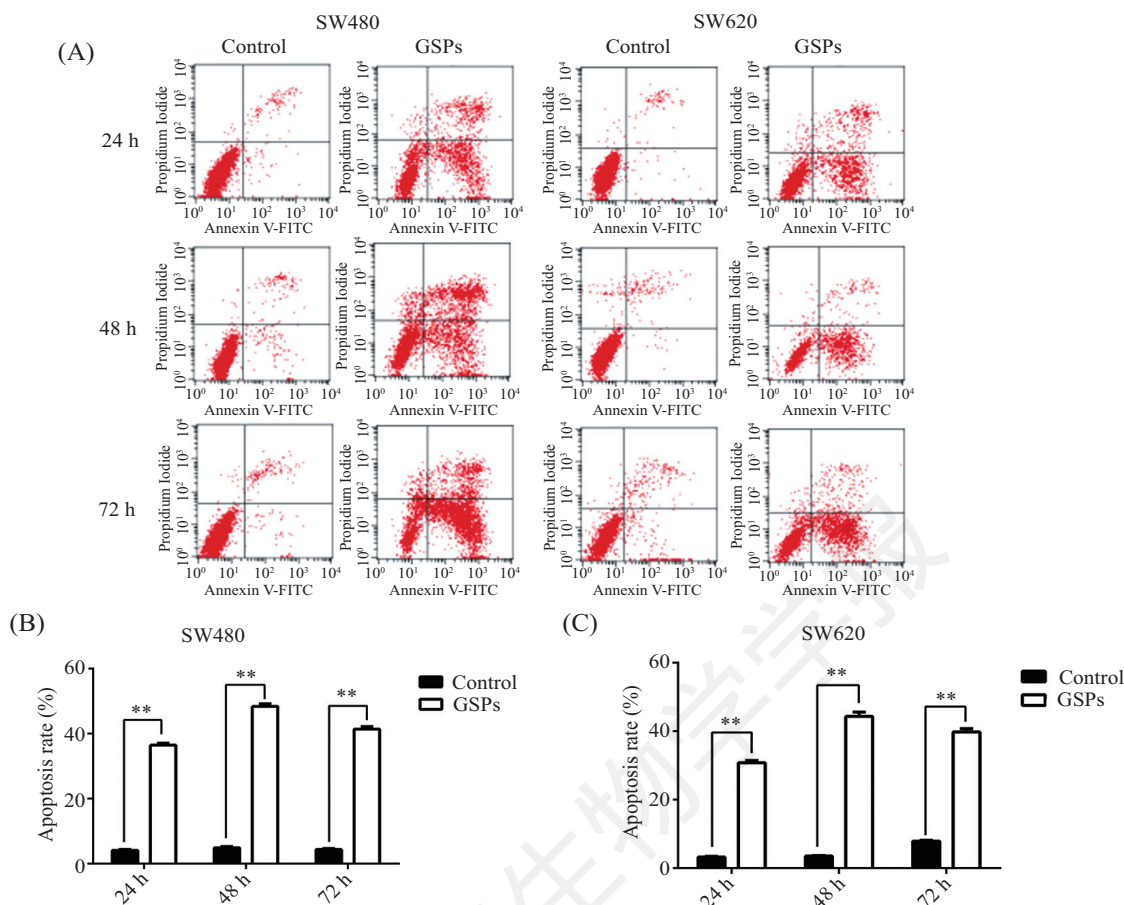
Fig.2 GSPs inhibits the proliferation of SW480 and SW620 cell

碘化丙啶(propidium iodide, PI)是一种核酸染料,能透过凋亡中晚期细胞的细胞膜而使细胞核染红。根据流式图分别计算GSPs(100 µg/mL)作用24 h、48 h和72 h后早期凋亡细胞与晚期凋亡细胞总占比,结果显示,在三个不同的处理时间点上,与对照组相比较,GSPs组凋亡细胞数增多,差异极显著(** $P < 0.01$),并且在48 h时,GSPs对SW480和SW620的细胞凋亡促

进作用最明显,凋亡率最高,分别是(46.27±2.53)%、(51.23±2.22)%(图3A~图3C)。

2.4 GSPs引起细胞周期的阻滞

为探究GSPs处理后对细胞周期的影响,我们分别对两种细胞进行流式细胞仪检测。在此过程中,GSPs(100 µg/mL)作用48 h后,细胞经PI单染后进行流式检测分析,并采用Western blot分别检



A: GSPs(100 µg/mL)对SW480和SW620分别作用24 h、48 h和72 h的流式结果图; B、C: SW480细胞、SW620细胞在24 h、48 h和72 h的细胞凋亡率; ** $P < 0.01$ 。

A: flow cytometry results of SW480 and SW620 treated by GSPs (100 µg/mL) for 24 h, 48 h, and 72 h; B,C: the apoptotic rates of SW480 and SW620 cells treated by GSPs for 24 h, 48 h, and 72 h; ** $P < 0.01$ 。

图3 GSPs作用SW480和SW620细胞后细胞凋亡情况

Fig.3 Apoptosis of colon cancer cells after being treated with GSPs

测了细胞周期相关分子进行分析。结果表明,与对照组相比,在周期分布上,GSPs使两种细胞均出现了 G_0/G_1 期阻滞(图4A~图4B);在蛋白水平上,GSPs使CDK4和cyclinD1的表达量显著降低(图4C)。

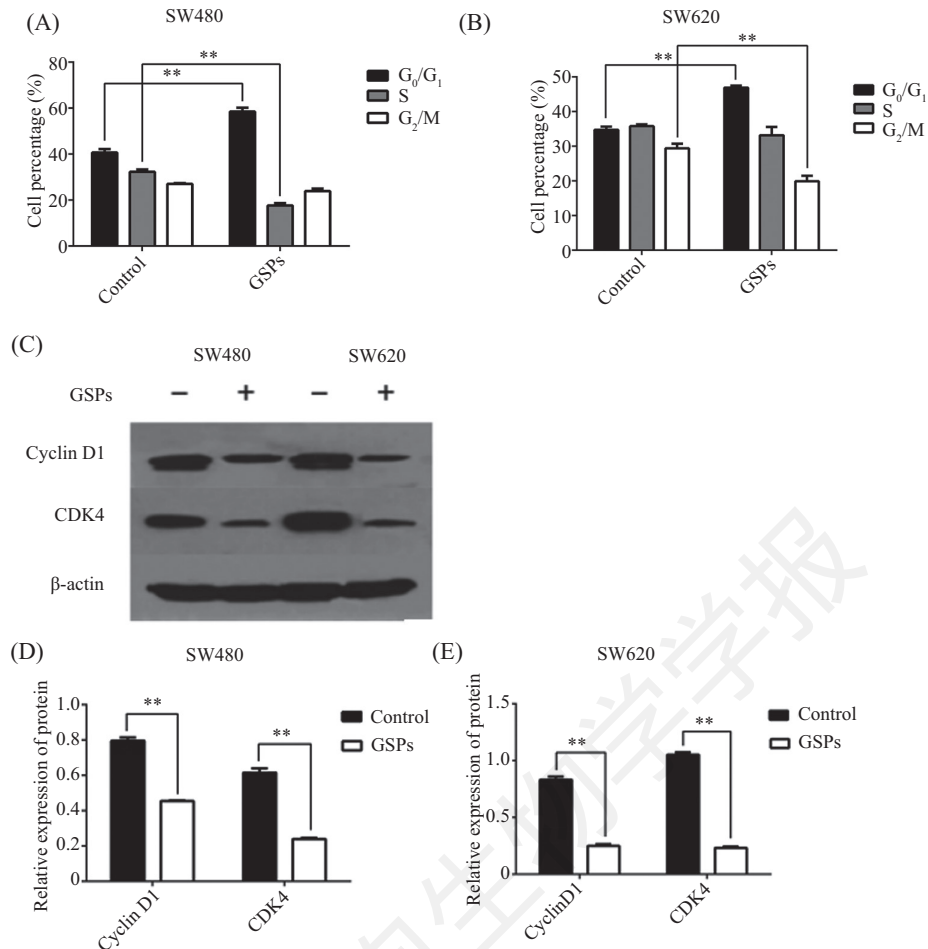
2.5 GSPs调控基因的筛选

为探究GSPs对SW480和SW620调控的机制,利用Illumina HiSeq测序平台对SW480和SW620细胞转录组进行测序分析,结果显示,SW480细胞系中差异表达基因共8 094个,SW620细胞系中差异表达基因共9 200个(图5)。经过GO功能和KEGG pathway的生物信息学分析,其中涉及到差异基因数量较多的几个信号通路分别是代谢途径、PI3K/Akt、癌症途径、HTLV-I感染、癌症中的转录失调信号通路(表2和表3),Akt在细胞存活和凋亡中起重要作用,同

时我们发现超过200个差异基因涉及到Akt通路,SW480细胞中差异基因286个,与Akt通路相关的差异基因占3.85%(表2),SW620细胞中差异基因302个,与Akt通路相关的差异基因占3.58%(表3)。因此,我们从细胞凋亡相关的差异基因里选出了部分基因做进一步的验证(表4)。

2.6 GSPs对Akt信号通路中关键基因的调控

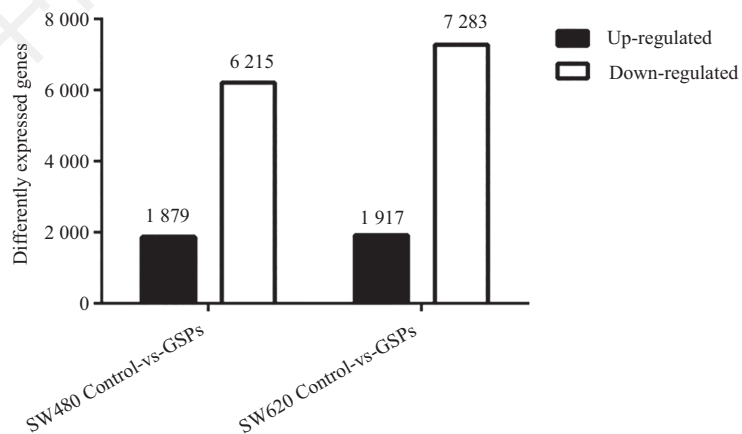
为验证测序结果,我们利用Q-PCR和Western blotting法分别检测GSPs处理前后靶基因的mRNA和蛋白表达水平。实验结果显示,在mRNA水平上,两种细胞的GSPs组 *Bcl-2*显著下调, *Bax*显著上调, *Bad*在SW480中显著上调在SW620中无变化(图6A和图6B);在蛋白水平上, *Bcl-2*的蛋白表达量显著下调, *Bad*、*Bax*显著上调(图6C);两种细胞的GSPs组Akt、p-Akt蛋白水平表达下调(图5D);同时p-



A、B: GSPs分别对SW480、SW620细胞周期分布的影响; C: GSPs对SW480、SW620细胞周期相关分子蛋白表达量的影响; D、E: 灰度扫描结果以β-actin为参照进行标准化处理。 **P<0.01。

A,B: GSPs alters the phases of cell cycle of SW480 and SW620; C: GSPs regulates the expression of cell cycle-related genes in SW480 and SW620. D,E: grayscale scan results normalized with reference to β-actin. **P<0.01.

图4 GSPs对SW480和SW620细胞周期的影响
Fig.4 GSPs alters cell cycle of SW480 and SW620 cells



SW480 Control-vs-GSPs和SW620 Control-vs-GSPs分别指SW480和SW620的GSPs组与对照组相比差异表达的基因, Fold change≥2.000, FDR≤0.001。

SW480 Control-vs-GSPs and SW620 Control-vs-GSPs refers the differential expression of genes in the GSPs group that compared with the control group, Fold change≥2.000, FDR≤0.001.

图5 差异表达基因
Fig.5 Differentially expressed gene

表2 SW480细胞通路富集

Table 2 The results of pathway enrichment in SW480

通路 Pathway	通路相关差异基因(7 424) DEGs with pathway annotation (7 424)	通路相关所有基因(20 655) All genes with pathway annotation (20 655)	通路ID Pathway ID	水平1 Level 1	水平2 Level 2
PI3K-Akt signaling pathway	286 (3.85%)	845 (4.09%)	ko04151	Environmental information processing	Signal transduction
Metabolic pathways	749 (10.09%)	1 990 (9.63%)	ko01100	Metabolism	Global and overview maps
Pathways in cancer	521 (7.02%)	1 232 (5.96%)	ko05200	Human diseases	Cancers: overview
HTLV-I infection	422 (5.68%)	833 (4.03%)	ko05166	Human diseases	Infectious diseases: viral

表3 SW620细胞通路富集

Table 3 The results of pathway enrichment in SW620

通路 Pathway	通路相关差异基因(8 425) DEGs with pathway annotation (8 425)	通路相关所有基因(20 655) All genes with pathway annotation (20 655)	通路ID Pathway ID	水平1 Level 1	水平2 Level 2
PI3K-Akt signaling pathway	302 (3.58%)	845 (4.09%)	ko04151	Environmental information processing	Signal transduction
Metabolic pathways	856 (10.16%)	1 990 (9.63%)	ko01100	Metabolism	Global and overview maps
Pathways in cancer	561 (6.66%)	1 232 (5.96%)	ko05200	Human diseases	Cancers: overview
Transcriptional mis-regulation in cancer	466 (5.53%)	1 047 (5.07%)	ko05202	Human diseases	Cancers: overview

表4 差异表达基因

Table 4 Differentially expressed gene

差异表达基因 DEGs	SW480细胞中(GSPs/对照) 表达量差异 log ₂ Fold change(GSPs/Control) in SW480	上调/下调 Up/Down-regulation	SW620细胞中(GSPs/对照) 表达量差异 log ₂ Fold change(GSPs/Control) in SW620	上调/下调 Up/Down-regulation
<i>Bcl-2</i>	-2.423 211 431	Down	-1.884 522 783	Down
<i>Bax</i>	0.586 841 01	Up	0.405 213 275	Up
<i>Bad</i>	2.187 781 057	Up	1.931 491 815	Up

Akt/Akt和Bcl-2/Bax与对照组相比也减小(图6F和图6G)。

2.7 GSPs对抗氧化途径中关键基因的调控

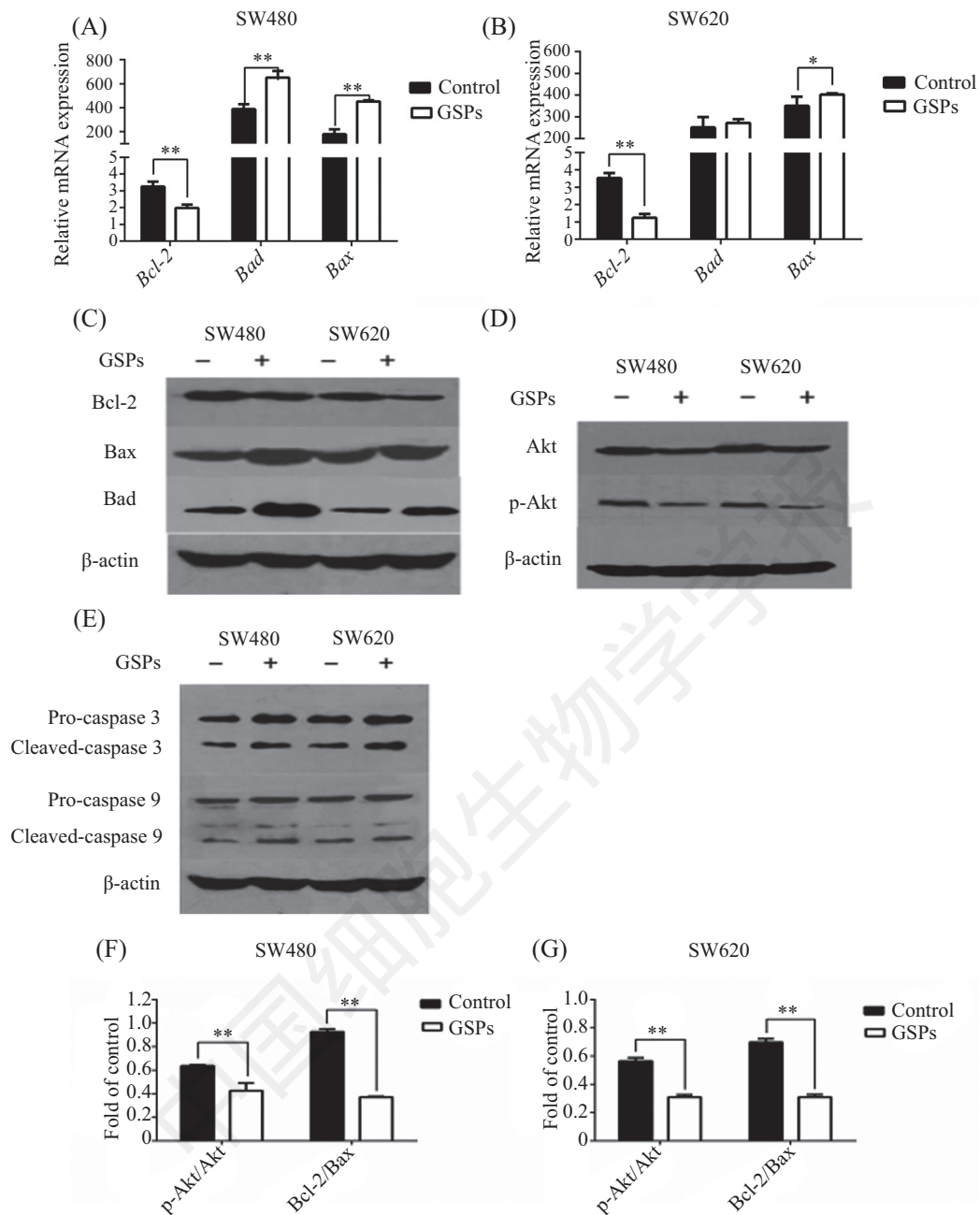
测序结果中显示经GSPs处理后FoxM1表达下调(表5), 而FoxM1在抗氧化调控中具有重要的作用, 为此我们进一步对其功能进行探索。

2.7.1 GSPs下调FoxM1的验证 用Western blot法检测GSPs处理后靶基因的表达, 结果显示, 经GSPs处理后FoxM1表达下调, 与转录组测序结果一致(表5和图7)。

2.7.2 FoxM1的细胞生物学功能鉴定 为探究FoxM1对细胞生物学特征的影响, 我们用不同浓度FoxM1特异抑制剂硫链丝菌素(thiostrepton)处理细

胞, 以Q-PCR和Western blot法检测靶基因的mRNA和蛋白表达, 同时检测细胞集落形成能力是否受到影响。结果显示, mRNA水平上经Thiostrepton处理后FoxM1表达均降低(图8A和8B); 蛋白水平上经Thiostrepton处理后FoxM1表达均降低, 与mRNA水平一致(图8C和8D)。

为检测Thiostrepton下调FoxM1后细胞功能是否受影响, 我们进行了细胞集落形成实验。细胞经0、2 μmol/L Thiostrepton处理后培养2~3周, 结果显示, Thiostrepton处理后细胞克隆形成明显减少, SW480细胞系中对照组(111±13), 实验组(23±4), $P<0.01$; SW620细胞系中对照组(111±11), 实验组(27±3), $P<0.01$ (图9A)。



A、B: GSPs对Akt下游分子mRNA表达量的影响; C~E: GSPs对Akt通路相关分子蛋白表达量的影响; F、G: GSPs处理后p-Akt/Akt, Bcl-2/Bax比值的影响。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

A,B: effect of GSPs on the mRNA expression of Akt downstream molecules. C-E: effect of GSPs on the expression of Akt pathway-associated proteins. F,G: GSPs alters the ratios of p-Akt/Akt and Bcl-2/Bax. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图6 GSPs对Akt信号通路关键基因影响

Fig.6 GSPs effect the expression of Akt downstream molecules

表5 差异表达基因

Table 5 Differentially expressed gene

差异表达基因 DEGs	SW480细胞中(GSPs/对照)表 达量差异 log2Fold change(GSPs/Control) in SW480	上调/下调 Up/Down-regulation	SW620细胞中(GSPs/对照)表 达量差异 log2Fold change(GSPs/Control) in SW620	上调/下调 Up/Down-regulation
<i>FoxM1</i>	-3.233 650 599	Down	-1.489 384 841	Down

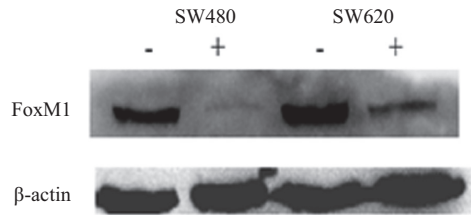
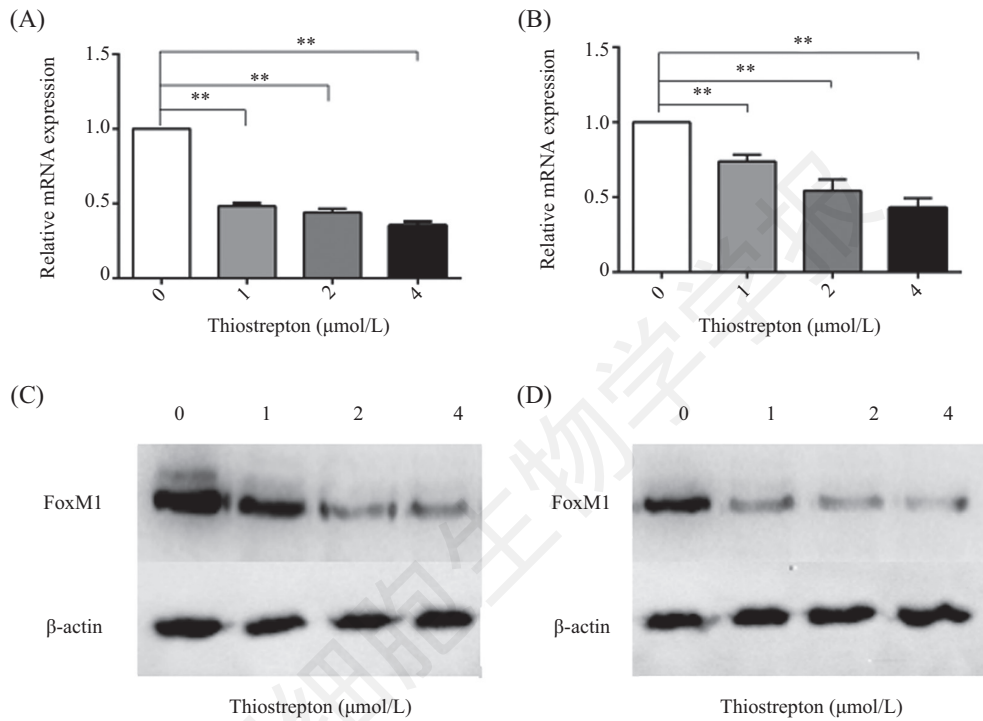


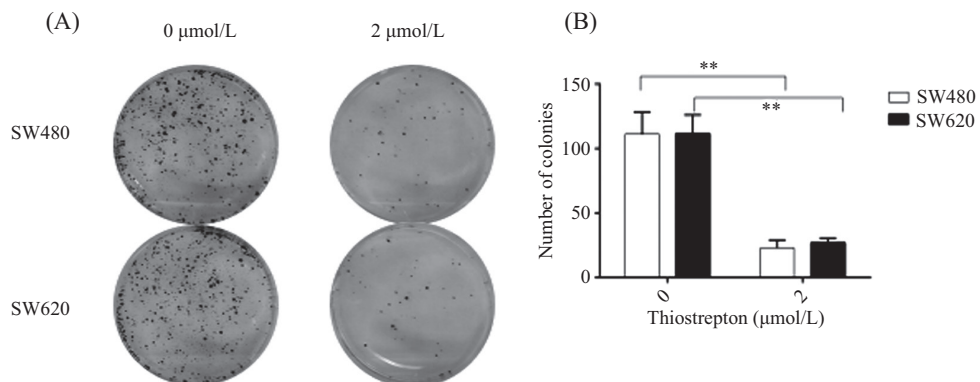
图7 葡萄籽原花青素抑制FoxM1表达
Fig.7 GSPs inhibit FoxM1 level



A、B: 硫链丝菌素对FoxM1 mRNA表达量的影响; C、D: 硫链丝菌素对FoxM1蛋白表达量的影响。 ** $P < 0.01$ 。
A,B: effects of thioestrepton on the expression of FoxM1 mRNA; C,D: effects of thioestrepton on the expression of FoxM1 protein. ** $P < 0.01$.

图8 硫链丝菌素下调FoxM1水平

Fig.8 Thioestrepton down-regulates FoxM1 level



A: 细胞集落; B: 统计学分析。 ** $P < 0.01$ 。
A: cell colony formation; B: statistical analysis. ** $P < 0.01$.

图9 FoxM1下调抑制细胞集落形成

Fig.9 Down-regulation of FoxM1 inhibits cell colony formation

3 结果与讨论

本研究用GSPs对结肠癌SW480和SW620细胞进行干预处理,结果发现,经GSPs处理后SW480和SW620生物学特征明显受到影响。两细胞形态均发生明显改变,在GSPs处理长时间(48 h、72 h)后,则具有抑制细胞增殖,细胞的存活率显著下降。这一结果与GSPs在舌鳞状细胞癌、宫颈癌、胰腺癌的结果相同^[10,14-15]。进一步研究发现,GSPs处理后使SW480和SW620细胞出现凋亡,而且使细胞周期阻滞于G₀/G₁期,这可能是抑制细胞增殖的重要原因。文献报道,Cyclin D1/CDK4在细胞周期的G₁期起着至关重要的作用^[16],神经母细胞瘤中细胞周期蛋白D1(CCND1)、CDK4和CDK6的基因组畸变表明G₁进入检查点的失调,是引起肿瘤发生的重要原因^[17]。本研究结果显示,GSPs处理后Cyclin D1和CDK4在蛋白水平的表达量显著降低,表明GSPs通过抑制Cyclin D1和CDK4的表达来调控细胞周期,从而抑制癌细胞生长。

Akt是PI3K的关键下游调节因子,该通路的异常激活可导致各种癌症的发生,如乳腺癌、卵巢癌、肝癌、和胃癌^[18]。转录组测序结果显示,众多的差异基因参与到PI3K/Akt通路(表2和表3),实验结果表明,GSPs可抑制Akt/p-Akt活化。相类似,多种抗癌药物通过抑制Akt活性从而抑制肿瘤细胞,如人参皂苷(Rg3)通过抑制PI3K/Akt信号通路在肺癌细胞系A549和H23中发挥抗肿瘤活性^[19];冬凌草甲素处理口腔鳞状细胞癌(OSCC)细胞显著抑制PI3K和Akt的磷酸化,抑制裸鼠OSCC异种移植瘤的生长^[20]。作为Akt下游效应分子,Bcl-2和Bax是Bcl-2家族中最具代表性的抑制凋亡和促进凋亡的分子,在调节肿瘤细胞的凋亡中起重要作用^[21]。结果显示,GSPs处理可使Bcl-2表达下调,同时上调Bad和Bax的表达。此外,凋亡中的关键组分cleaved-caspase 9和cleaved-caspase 3也显著增加。与我们结果相似,Chen等^[10]通过GSPs处理HeLa和SiHa细胞,结果显示,GSPs可以抑制细胞活力,增加促凋亡蛋白Bak-1的表达,降低抗凋亡蛋白Bcl-2的表达,以及激活caspase-3。本研究结果提示GSPs抗癌效应的发挥可能通过抑制Akt及其下游相关分子实现。

FoxM1是类似于FoxO转录因子的叉头盒转录因子家族的成员,是很多生物活动的重要组成部分,包括调节细胞周期的G₁/S和G₂/M转换^[22]、维持有

丝分裂纺锤体完整性、血管生成、转移、细胞凋亡^[23]。在胃癌和肺癌中,FoxM1的高表达也使淋巴结转移和远处转移的发生率增加^[24-25]。近年研究显示,FoxM1在调节氧化应激中发挥关键作用,是细胞内活性氧的关键调节因子^[26]。本研究中GSPs具有抗氧化作用,结肠癌细胞经GSPs处理后经转录组测序发现FoxM1表达下调(表4),与此同时Halasi等^[27]的研究显示,FoxM1抑制剂与ROS诱导剂联用,提高了内源ROS水平同时诱导细胞凋亡。本研究中硫链丝菌素为FoxM1特异性抑制剂,处理细胞后能抑制FoxM1的表达,同时细胞功能实验也验证了FoxM1下调后抑制癌细胞克隆形成能力。Yang等^[28]研究结果也显示,结直肠癌中小干扰RNA介导的FoxM1沉默不仅抑制细胞迁移、侵袭和增殖,而且上调E-钙粘蛋白和抑制Vimentin和逆转EMT表型。这些研究提高了我们对FoxM1在调节氧化应激以逃避细胞凋亡中的作用的理解,并将FoxM1鉴定为癌症治疗的潜在靶标。

综上所述,本研究表明,GSPs处理结肠癌SW480和SW620细胞能显著改变两种细胞形态,使细胞增殖能力下降、细胞周期改变、凋亡率升高;机制研究发现,Akt信号通路以及以FoxM1为代表的抗氧化信号途径在此过程中起着重要的作用。

参考文献 (References)

- Roy S, Majumdar AP. Signaling in colon cancer stem cells. *J Mol Signal* 2012; 7(1): 11.
- Tabung FK, Liu L, Wang W, Fung TT, Wu K, Smith-Warner SA, et al. Association of dietary inflammatory potential with colorectal cancer risk in men and women. *JAMA Oncol* 2018; 4(3): 366-73.
- Liu L, Nishihara R, Qian ZR, Tabung FK, Nevo D, Zhang X, et al. Association between inflammatory diet pattern and risk of colorectal carcinoma subtypes classified by immune responses to tumor. *Gastroenterology* 2017; 153(6): 1517-30,e14.
- Elango N, Samuel S, Chinnakkannu P. Enzymatic and non-enzymatic antioxidant status in stage (III) human oral squamous cell carcinoma and treated with radical radio therapy: influence of selenium supplementation. *Clin Chim Acta* 2006; 373(1/2): 92-8.
- Senthil K, Aranganathan S, Nalini N. Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients. *Clin Chim Acta* 2004; 339(1/2): 27-32.
- Kandaswami C, Lee LT, Lee PP, Hwang JJ, Ke FC, Huang YT, et al. The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo* 2005; 19(5): 895-909.
- Iniguez-Franco F, Soto-Valdez H, Peralta E, Ayala-Zavala JF, Auras R, Gamez-Meza N. Antioxidant activity and diffusion of catechin and epicatechin from antioxidant active films made of

- poly(L-lactic acid). *J Agric Food Chem* 2012; 60(26): 6515-23.
- 8 Terra X, Fernandez-Larrea J, Pujadas G, Ardevol A, Blade C, Salvado J, *et al.* Inhibitory effects of grape seed procyanidins on foam cell formation *in vitro*. *J Agric Food Chem* 2009; 57(6): 2588-94.
- 9 Prasad R, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit migration potential of pancreatic cancer cells by promoting mesenchymal-to-epithelial transition and targeting NF-kappaB. *Cancer Lett* 2013; 334(1): 118-26.
- 10 Chen Q, Liu XF, Zheng PS. Grape seed proanthocyanidins (GSPs) inhibit the growth of cervical cancer by inducing apoptosis mediated by the mitochondrial pathway. *PLoS One* 2014; 9(9): e107045.
- 11 Vaid M, Katiyar SK. Grape seed proanthocyanidins inhibit cigarette smoke condensate-induced lung cancer cell migration through inhibition of NADPH oxidase and reduction in the binding of p22(phox) and p47(phox) proteins. *Mol Carcinog* 2015; 54 Suppl 1: E61-71.
- 12 Grace Nirmala J, Evangeline Celsia S, Swaminathan A, Narendhirakannan RT, Chatterjee S. Cytotoxicity and apoptotic cell death induced by *Vitis vinifera* peel and seed extracts in A431 skin cancer cells. *Cytotechnology* 2018; 70(2): 537-54.
- 13 Vaid M, Singh T, Prasad R, Katiyar SK. Bioactive proanthocyanidins inhibit growth and induce apoptosis in human melanoma cells by decreasing the accumulation of beta-catenin. *Int J Oncol* 2016; 48(2): 624-34.
- 14 Yang N, Gao J, Cheng X, Hou C, Yang Y, Qiu Y, *et al.* Grape seed proanthocyanidins inhibit the proliferation, migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma cells through suppressing the protein kinase B/nuclear factor-kappaB signaling pathway. *Int J Mol Med* 2017; 40(6): 1881-8.
- 15 Prasad R, Vaid M, Katiyar SK. Grape proanthocyanidin inhibit pancreatic cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* through induction of apoptosis and by targeting the PI3K/Akt pathway. *PLoS One* 2012; 7(8): e43064.
- 16 Chai XM, Li YL, Chen H, Guo SL, Shui LL, Chen YJ. Cigarette smoke extract alters the cell cycle via the phospholipid transfer protein/transforming growth factor-beta1/CyclinD1/CDK4 pathway. *Eur J Pharmacol* 2016; 786: 85-93.
- 17 Molenaar JJ, Ebus ME, Koster J, van Sluis P, van Noesel CJ, Versteeg R, *et al.* Cyclin D1 and CDK4 activity contribute to the undifferentiated phenotype in neuroblastoma. *Cancer Res* 2008; 68(8): 2599-609.
- 18 Fu X, Feng J, Zeng D, Ding Y, Yu C, Yang B. PAK4 confers cisplatin resistance in gastric cancer cells via PI3K/Akt- and MEK/ERK-dependent pathways. *Biosci Rep* 2014; 34(2). pii: e00094.
- 19 Xie Q, Wen H, Zhang Q, Zhou W, Lin X, Xie D, *et al.* Inhibiting PI3K-AKT signaling pathway is involved in antitumor effects of ginsenoside Rg3 in lung cancer cell. *Biomed Pharmacother* 2017; 85: 16-21.
- 20 Yang J, Ren X, Zhang L, Li Y, Cheng B, Xia J. Oridonin inhibits oral cancer growth and PI3K/Akt signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 2018; 100: 226-32.
- 21 Renault TT, Dejean LM, Manon S. A brewing understanding of the regulation of Bax function by Bcl-xL and Bcl-2. *Mech Ageing Dev* 2017, 161(Pt B):201-10.
- 22 Myatt SS, Lam EW. The emerging roles of forkhead box (Fox) proteins in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(11): 847-59.
- 23 Wang IC, Chen YJ, Hughes D, Petrovic V, Major ML, Park HJ, *et al.* Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 2005; 25(24): 10875-94.
- 24 Li Q, Zhang N, Jia Z, Le X, Dai B, Wei D, *et al.* Critical role and regulation of transcription factor FoxM1 in human gastric cancer angiogenesis and progression. *Cancer Res* 2009; 69(8): 3501-9.
- 25 Xu N, Wu SD, Wang H, Wang Q, Bai CX. Involvement of FoxM1 in non-small cell lung cancer recurrence. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13(9): 4739-43.
- 26 Park HJ, Carr JR, Wang Z, Nogueira V, Hay N, Tyner AL, *et al.* FoxM1, a critical regulator of oxidative stress during oncogenesis. *EMBO J* 2009; 28(19): 2908-18.
- 27 Halasi M, Pandit B, Wang M, Nogueira V, Hay N, Gartel AL. Combination of oxidative stress and FOXM1 inhibitors induces apoptosis in cancer cells and inhibits xenograft tumor growth. *Am J Pathol* 2013; 183(1): 257-265.
- 28 Yang K, Jiang L, Hu Y, Yu J, Chen H, Yao Y, *et al.* Short hairpin RNA- mediated gene knockdown of FOXM1 inhibits the proliferation and metastasis of human colon cancer cells through reversal of epithelial-to-mesenchymal transformation. *J Exp Clin Cancer Res* 2015; 34: 40.