

羽扇豆醇通过抑制RhoA-ROCK1信号通路 抑制结肠癌细胞增殖

蒋亦雯 洪丹 楼哲丰 金龙金*

(温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 温州 325000)

摘要 该文探讨了羽扇豆醇(Lupeol)对人结肠癌HCT116和SW620细胞增殖的影响及相关作用机制。使用不同浓度的Lupeol处理HCT116和SW620细胞后, 用MTT法检测细胞活性, CCK8法检测细胞增殖能力, 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力, 流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡, (quantitative real-time PCR, qPCR)和Western blot检测相应mRNA和蛋白表达水平, 免疫荧光检测 β -Catenin蛋白细胞内分布情况。通过构建shRNA敲低两种结肠癌细胞中*RhoA*, 进一步研究Lupeol影响细胞增殖的分子机制。结果显示, Lupeol处理后, HCT116和SW620细胞增殖能力明显下降, 克隆形成能力受到抑制, 细胞周期阻滞于G₀/G₁期, 细胞内RhoA、ROCK1、 β -Catenin、Cyclin D1 mRNA和蛋白表达水平均显著下降, β -Catenin蛋白胞质和胞膜上分布减少。敲低*RhoA*后抑制了细胞增殖, 同时使得RhoA-ROCK1- β -Catenin信号通路蛋白受到抑制, β -Catenin蛋白胞质和胞膜上分布减少。综上所述, Lupeol可通过抑制RhoA-ROCK1信号通路, 抑制 β -Catenin蛋白表达, 进而抑制HCT116和SW620细胞增殖, Lupeol有望成为临床结肠癌治疗的新药物。

关键词 羽扇豆醇; RhoA-ROCK1信号通路; 结肠癌; 增殖

Lupeol Inhibits Proliferation of Colorectal Cancer Cells by Suppressing RhoA-ROCK1 Signaling Pathway

JIANG Yiwen, HONG Dan, LOU Zhefeng, JIN Longjin*

(School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China)

Abstract This study aimed to explore the effect of Lupeol on the proliferation of CRC (colorectal cancer) cells and its underlying mechanism. HCT116 and SW620 cells were treated with Lupeol for 48 h. Then, MTT assay, CCK8 assay, Plate clone assay, and flow cytometry were performed to detect the cell viability, proliferation ability, colony-forming ability, cell cycle, and cell apoptosis. The qPCR (quantitative real-time PCR) and Western blot experiments were used to evaluate the mRNA and protein expression levels. Immunofluorescence assay was used to explore the intracellular distribution of the β -Catenin protein. Further, *RhoA* was knockdown in CRC cells to explore the mechanism of Lupeol. Our results showed that Lupeol inhibited the proliferation of HCT116 and SW620 cells but did not induce cell apoptosis at selected doses. And the cell cycle was arrested in the G₀/G₁ phase after Lupeol treatment. In addition, Lupeol downregulated the expression of RhoA, ROCK1, β -Catenin and Cyclin D1 in both CRC cells. The distribution of β -Catenin protein in the cytoplasm and membrane was reduced after Lupeol administration. Moreover, the proliferation ability was inhibited after *RhoA* knockdown. In conclusion, Lupeol

收稿日期: 2019-09-15 接受日期: 2019-11-26

*通讯作者。Tel: 13968891143, E-mail: jlj@wmu.edu.cn

Received: September 15, 2019 Accepted: November 26, 2019

*Corresponding author. Tel: +86-13968891143, E-mail: jlj@wmu.edu.cn

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5170>

could suppress the proliferation of HCT116 and SW620 cells by inhibiting the RhoA-ROCK1 signaling pathway and might provide an effective agent for CRC patients.

Keywords Lupeol; RhoA-ROCK1 signaling pathway; colorectal cancer cells; proliferation

羽扇豆醇(Lup-20(29)-en-3h-ol, Lupeol), 是一种天然的三萜烯类化合物, 广泛存在于各种水果(例如草莓、芒果)、蔬菜(卷心菜、青菜)和药用植物等之中^[1-3]。据相关研究显示, 它在体内外均具有多种药理学活性, 可诱导细胞凋亡、抗炎症^[4]、抗诱变以及抑制体内外肿瘤生长^[5-6]。但不同于传统的抗肿瘤药物, Lupeol对机体低毒性, 在治疗剂量范围内对正常组织和细胞均没有毒性作用^[7-8]。同时, 研究表明, Lupeol作为一种潜在的新型抗癌药物, 可抑制口腔癌、喉癌等多种癌症的发生发展^[9]。然而, Lupeol如何调节结肠癌发生发展的相关分子机制尚不明确。

结肠癌仍是世界上最常见的消化道恶性肿瘤之一。肠镜检查的普及大大提高了结肠黏膜早期病变的检出率, 降低了结肠癌的患病风险。但2018年全球癌症数据分析发现, 结肠癌的死亡率仍排在恶性肿瘤的第二位^[10-11]。结肠癌涉及多因素和多步进展, 其中Ras同系物家族成员A(Ras homolog family member A, RhoA)的异常表达在结肠癌的发生发展中起关键作用^[12]。RhoA属于小GTP/GDP结合蛋白的Rho家族成员之一, 主要由鸟嘌呤核苷酸交换因子(guanine nucleotide exchange factors, GEFs)、GTP酶活化蛋白(GTPase-activating proteins, GAPs)和鸟嘌呤核苷酸解离抑制因子(Guanine nucleotide dissociation inhibitors, GDIs)调节其活性和非活性状态^[13]。活化的RhoA是不同细胞过程的调节者, 可以调控细胞增殖、参与肌动蛋白细胞骨架重构、涉及细胞信号通路激活并调节核转录因子的活化^[14]。Rho相关卷曲螺旋蛋白激酶-1(Rho-associated coiled-coil kinases 1, ROCK1)是RhoA下游最重要的效应分子之一, 参与多种肿瘤细胞生长的调节^[15]。研究发现, RhoA-ROCK1信号通路可诱导 β -Catenin蛋白的积累, 从而促进肿瘤细胞增殖和迁移^[16]。

因此, 本实验通过使用HCT116和SW620细胞探索Lupeol对结肠癌细胞增殖的影响, 构建shRNA敲低两种结肠癌细胞中RhoA, 进一步研究Lupeol调节结肠癌的相关分子机制。研究发现, Lupeol可通过RhoA-ROCK1信号通路抑制 β -Catenin蛋白的表达, 进而显著抑制两种结肠癌细胞的增殖。本研究为

Lupeol如何调节结肠癌发生发展的潜在分子机制提供实验依据, 并提示Lupeol可能成为结肠癌的潜在治疗药物。

1 材料与方法

1.1 药物

羽扇豆醇(Lupeol)购自Sigma公司, 用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶解配制成24 mmol/L的储存液, -20°C 冰箱避光长期储存, 备用。使用完全细胞培养基稀释储备液并制备用于不同实验的Lupeol工作液, -4°C 避光短期储存。

1.2 试剂和抗体

RPMI 1640培养基购自Gibco公司; 胎牛血清购自杭州沃森生物技术有限公司; 胰蛋白酶细胞消化液、结晶紫染色液、BCA蛋白质浓度测定试剂盒、MTT细胞毒性和细胞增殖检测试剂盒、GAPDH鼠抗人抗体、兔抗人 β -Catenin、HRP标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔IgG二抗均购自上海Beyotime公司; PolyJet™ *In Vitro* DNA Transfection Reagent购自SignaGen公司; 细胞周期检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司; Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒和7-AAD染液均购自BD公司; TRIZOL试剂购自Thermo Fisher公司; 逆转录试剂盒和qPCR试剂盒均购自TaKaRa公司; 兔抗人RhoA抗体、兔抗人ROCK1抗体、兔抗人CyclinD1抗体均购自Cell Signaling Technology公司。

1.3 细胞培养和细胞转染

人结肠癌细胞HCT116、人结肠癌细胞SW620购自上海中国科学院细胞保藏中心。HCT116和SW620细胞培养于RPMI 1640完全细胞培养基中(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 $\mu\text{g/mL}$ 链霉素), 均置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养。

取对数生长期的HCT116和SW620细胞分别以 6×10^5 个/孔接种到6孔板中, 待细胞融合度为80%~90%时, 进行细胞转染。提前30~60 min更换新鲜培养基。按照PolyJet™ *In Vitro* DNA Transfection Reagent说明进行转染。转染后加入G418选择培养基培养, 并挑取单克隆以获得稳转细胞系。

1.4 MTT法检测细胞活性实验

取对数生长期的HCT116和SW620细胞分别以 8×10^3 个/孔接种到96孔板中,每个浓度设3个复孔,置于培养箱中培养。待细胞贴壁后,弃去旧培养基,再分别加入0、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol培养24 h和48 h。后续按照试剂盒说明书进行操作。用酶标仪于570 nm处测定吸光度(D)值,并计算 IC_{50} 和增殖抑制率 $=[1-(\text{实验组平均}D\text{值}/\text{对照组平均}D\text{值})] \times 100\%$ 。

1.5 CCK8法检测细胞增殖实验

取对数生长期的HCT116和SW620细胞分别以 2×10^3 个/孔接种到96孔板中,每个浓度设3个复孔,置于培养箱中培养。待细胞贴壁后,弃去旧培养基,分别加入0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol培养。每种细胞分别培养0~5天后,按照试剂盒说明书进行操作。

取对数生长期的HCT116、SW620细胞、敲低*RhoA*的HCT116、SW620细胞以及空载质粒组分别以 2×10^3 个/孔接种到96孔板中,每组设3个复孔,分别于培养箱中培养0~5天后,加入CCK8溶液并测定吸光度值。

1.6 克隆形成实验

取对数生长期的HCT116和SW620细胞分别以 1×10^3 个/孔接种到6孔板中,每个浓度设置3个复孔,置于细胞培养箱中培养7~14天,直至显微镜下观察到细胞集落开始形成。弃去旧培养基,加入0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol培养48 h。弃去旧培养基,PBS洗涤3次,加入2 mL/孔甲醇室温固定30 min。再用PBS洗涤3次,加入2 mL/孔结晶紫染液染色30 min。PBS洗涤3次后,晾干拍照。

1.7 流式细胞术检测细胞周期

HCT116和SW620细胞分别以 3×10^5 个/孔接种到6孔板中,无血清基础培养基饥饿处理24 h,再加入0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol培养48 h。消化收集细胞后,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 r/min离心5 min。弃上清,PBS洗涤,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 r/min离心5 min后弃上清。每管逐滴加入70%预冷乙醇(PBS配制),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜固定。次日,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 r/min离心15 min后弃上清。PBS洗涤,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 500 r/min离心15 min后弃上清,避光加入30 μL /孔RNA酶和270 μL /孔PI染色液,4 $^{\circ}\text{C}$ 染色30 min。流式细胞仪上机检测。

1.8 流式细胞术检测细胞凋亡

HCT116和SW620细胞分别以 4×10^5 个/孔接种

到6孔板中,贴壁后加入0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol处理48 h。消化收集细胞,用预冷的PBS洗涤2次,4 $^{\circ}\text{C}$ 、1 000 r/min离心5 min。弃上清,加入100 μL /孔的1 $\times$ 结合缓冲液重悬,制备单细胞悬液。加入5 μL /孔的Annexin V-FITC,混匀后,再加入5 μL /孔的7-AAD染色液混匀,室温避光染色15 min。加入400 μL /孔1 $\times$ 结合缓冲液重悬,吹打混匀。分别设置空白管、Annexin V-FITC和7-AAD单染管。于1 h内流式细胞仪上机检测细胞凋亡。

1.9 逆转录和quantitative real-time PCR

不同浓度的Lupeol处理HCT116和SW620细胞48 h后,使用TRIZOL法提取总RNA。再使用Prime-ScriptTM RT试剂盒进行总RNA的逆转录。以2 μL cDNA作为模板,根据TB Green[®] Premix Ex TaqTM II(Tli RNase H Plus)试剂盒说明书在荧光定量PCR仪(BIO-RAD公司,型号:CFX 96 Touch)上进行qPCR。本实验选用的引物序列如下。*RhoA*-F: 5'-GAT TGG CGC TTT TGG GTA CAT-3', R: 5'-AGC AGC TCT CGT AGC CAT TTC-3'; *ROCK1*-F: 5'-AAC ATG CTG CTG GAT AAA TCT GG-3', R: 5'-TGT ATC ACA TCG TAC CAT GCC T-3'; *CTNNB1*-F: 5'-CAT CTA CAC AGT TTG ATG CTG CT-3', R: 5'-GCA GTT TTG TCA GTT CAG GGA-3'; *CCND1*-F: 5'-GCT GCG AAG TGG AAA CCA TC-3', R: 5'-CCT CCT TCT GCA CAC ATT TGA A-3'; *GAPDH*-F: 5'-GGA GCG AGA TCC CTC CAA AA T-3', R: 5'-GGC TGT TGT CAT ACT TCT CAT GG-3'。并计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的值进行分析。

1.10 Western blot检测相关蛋白表达水平

不同浓度的Lupeol处理HCT116和SW620细胞48 h后,加入相应RIPA裂解液冰上裂解20 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 500 r/min离心20 min,收集上清液。用BCA法检测总蛋白浓度。95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min,取30 μg 总蛋白样本以10% SDS-PAGE蛋白质电泳,再将蛋白转移到PVDF膜上,5%脱脂奶粉封闭90 min, *RhoA*、*ROCK1*、 β -Catenin、CyclinD1、*GAPDH*抗体(1:1 000)于4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。次日,TBST洗涤,5 min $\times$ 4次。二抗室温孵育1 h,再用TBST洗涤,15 min $\times$ 3次。使用ECL化学发光试剂盒显影,Bio-Rad ChemiDoc MP成像系统曝光拍照,以*GAPDH*为内参,使用Image Lab 3.0软件进行半定量统计分析。

1.11 免疫荧光检测 β -Catenin蛋白表达情况

HCT116、SW620细胞、*RhoA*敲低的HCT116、

SW620细胞进行细胞爬片, 用不同浓度Lupeol处理48 h(*RhoA*敲低实验不进行药物处理)。4%多聚甲醛室温固定30 min。预冷的PBS洗涤细胞, 5 min×3次。0.1% Triton X-100室温通透10 min。再用预冷的PBS洗涤细胞, 5 min×3次。5% BSA室温封闭45 min。再用预冷的PBS洗涤细胞, 5 min×3次。 β -Catenin抗体(1:200) 4 °C孵育过夜。次日, 预冷的PBS洗涤细胞, 5 min×3次。再滴加荧光二抗工作液(1:500), 室温避光孵育60 min。再用预冷的PBS洗涤细胞, 5 min×3次。滴加DAPI染色工作液, 避光孵育15 min。再用预冷的PBS洗涤细胞, 5 min×3次。滴加荧光淬灭剂封片, 于Nikon A1激光共聚焦显微镜下观察拍照。

1.12 统计学分析

统计数据用于两样本均值之间比较选用unpaired Student's *t*-test, 用于多样本均值之间比较选用One-Way ANOVA。所有统计分析均使用SPSS 22.0和GraphPad Prism 7.0进行处理。所有数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 所有实验均独立重复3次, $P < 0.05$

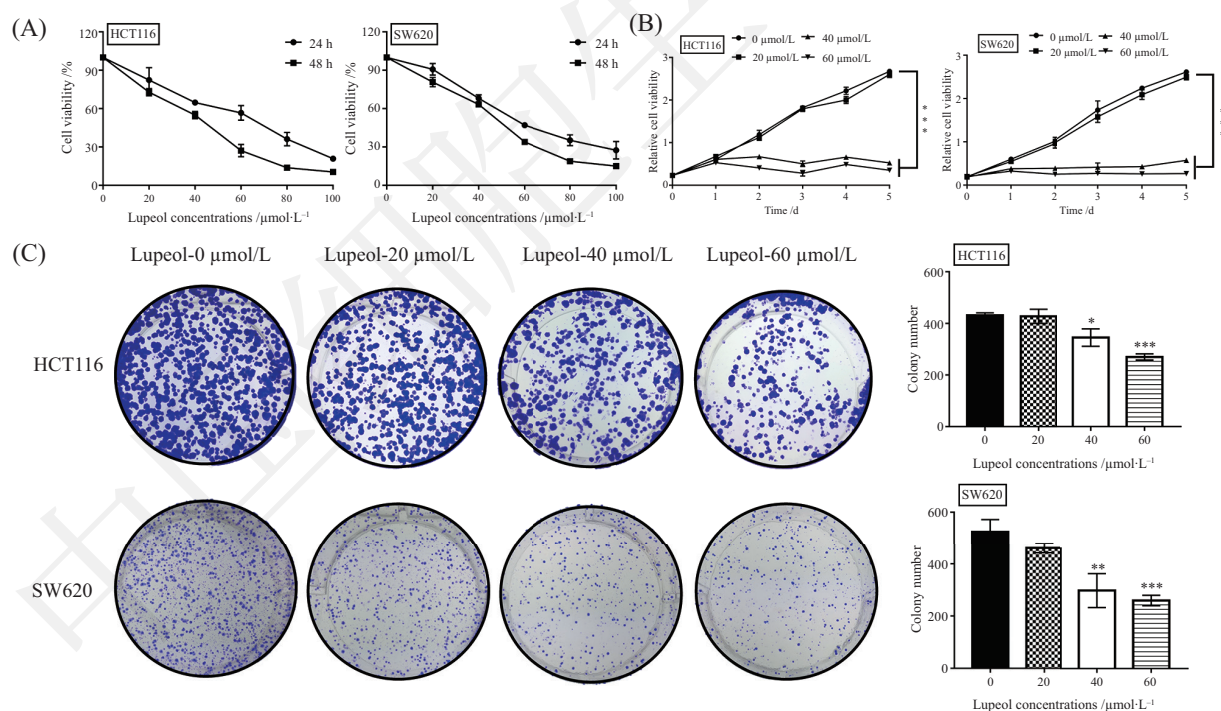
具有统计学意义。

2 结果

2.1 Lupeol对HCT116和SW620细胞增殖和克隆形成的影响

我们首先使用MTT法检测不同浓度Lupeol分别作用HCT116和SW620细胞24 h和48 h对细胞活性的影响。Lupeol作用HCT116细胞24 h和48 h的 IC_{50} 分别为64.547和45.454 $\mu\text{mol/L}$ 。Lupeol作用SW620细胞24 h和48 h的 IC_{50} 分别为66.172和52.214 $\mu\text{mol/L}$ (图1A)。故后续实验选用0、20、40和60 $\mu\text{mol/L}$ 作为给药浓度, 48 h选为药物作用时间, 以进一步研究Lupeol对HCT116和SW620细胞增殖的影响。

CCK8法检测细胞增殖实验结果显示, Lupeol可以显著抑制HCT116细胞和SW620细胞的增殖, 且呈时间和浓度依赖性(图1B)。进一步, 克隆形成实验结果表明, 使用0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 的Lupeol作用HCT116和SW620细胞48 h后, 随着给药浓度的增高, 两种结肠癌细胞的克隆形成数量减少(图1C)。这提



A: MTT实验检测不同浓度Lupeol处理24 h和48 h对HCT116和SW620细胞活性的影响; B: CCK8实验检测不同浓度Lupeol处理对HCT116和SW620细胞增殖的影响; C: 平板克隆实验检测不同浓度Lupeol处理对HCT116和SW620细胞克隆集落的影响并统计分析。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol组比较。

A: the cell viability of HCT116 and SW620 after Lupeol treatment was detected by MTT assay; B: the cell proliferation ability of HCT116 and SW620 after Lupeol treatment was detected by CCK8 assay; C: plate clone assay was used to analyze the colony-forming ability after Lupeol treatment. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control (0 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol treatment).

图1 Lupeol对HCT116和SW620细胞增殖和克隆形成的影响

Fig.1 The effects of Lupeol on the proliferation and clonal formation of HCT116 and SW620 cells

示我们, Lupeol对结肠癌细胞克隆形成呈现浓度依赖性抑制作用。

2.2 Lupeol对HCT116和SW620细胞细胞周期和细胞凋亡的影响

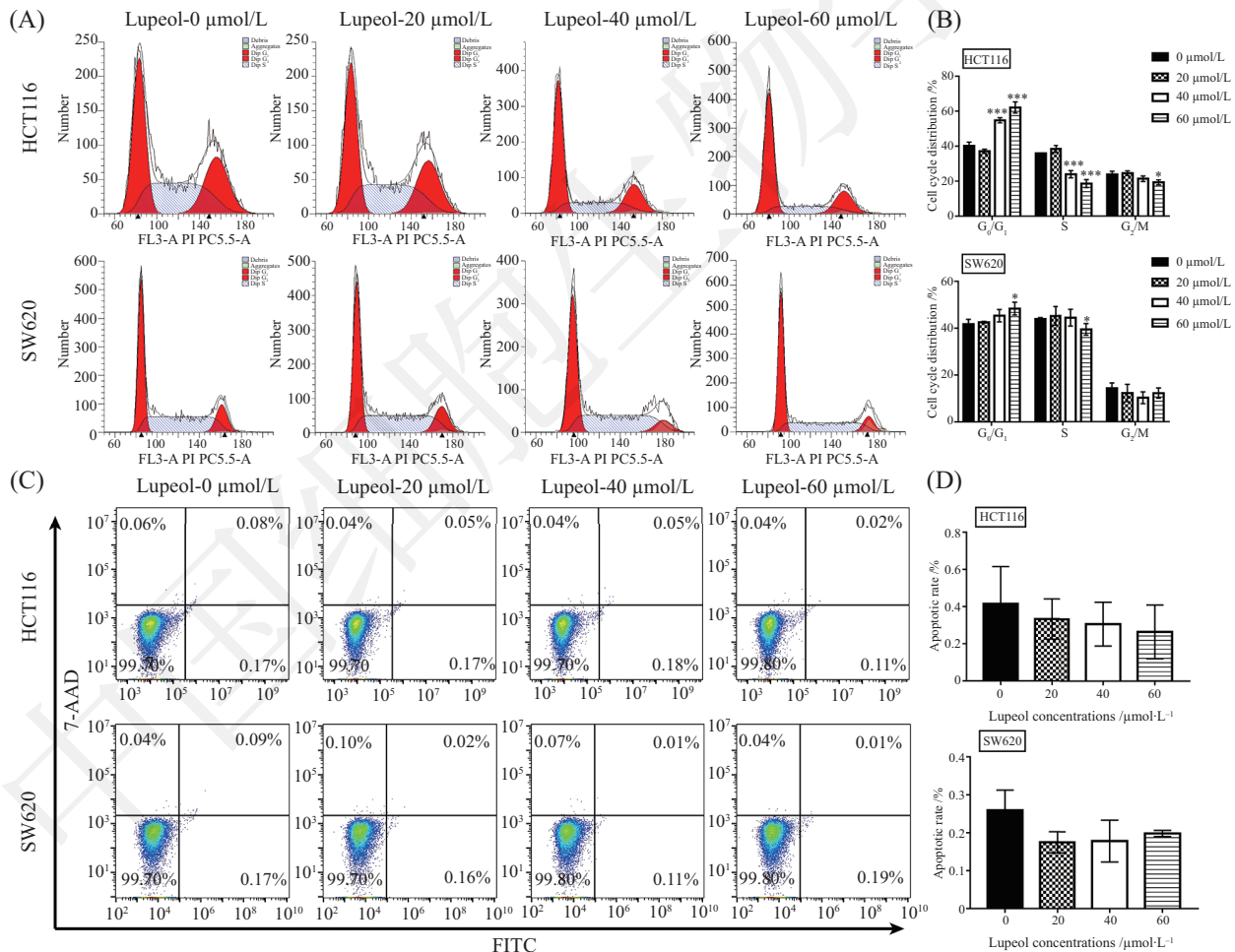
为了进一步探索Lupeol对两种结肠癌细胞增殖的影响, 我们使用流式细胞术对细胞周期进行检测。分析结果显示, 不同浓度Lupeol处理HCT116和SW620细胞48 h后, 随着给药浓度的增高, 两种结肠癌细胞在G₀/G₁期的细胞比例明显增高, S期细胞比例降低, 细胞阻滞于G₀/G₁期。且随着Lupeol浓度增高, G₀/G₁期细胞阻滞越明显, 具有统计学意义($P<0.05$)(图2A和图2B)。这提示我们, Lupeol可能通过阻滞两种结肠癌细胞于G₀/G₁期, 从而抑制肿瘤细胞增殖。

同时, 我们使用流式细胞术检测不同浓度的Lupeol对HCT116和SW620细胞凋亡的影响。实验结果显示, 与对照组相比, 不同浓度Lupeol处理48 h后, 两种结肠癌细胞的细胞凋亡率没有明显的变化(图2C和图2D)。这提示我们, Lupeol对HCT116和SW620细胞凋亡可能没有影响。

2.3 Lupeol对RhoA-ROCK1信号通路的影响

运用qPCR检测了Lupeol作用48 h后两种结肠癌细胞中RhoA-ROCK1信号通路中相关基因mRNA的表达水平。结果显示, 随着Lupeol给药浓度增加, HCT116和SW620细胞中RhoA、ROCK1、 β -Catenin mRNA表达水平显著下降, 细胞周期相关的CyclinD1 mRNA表达水平也显著下降($P<0.05$)(图3A)。

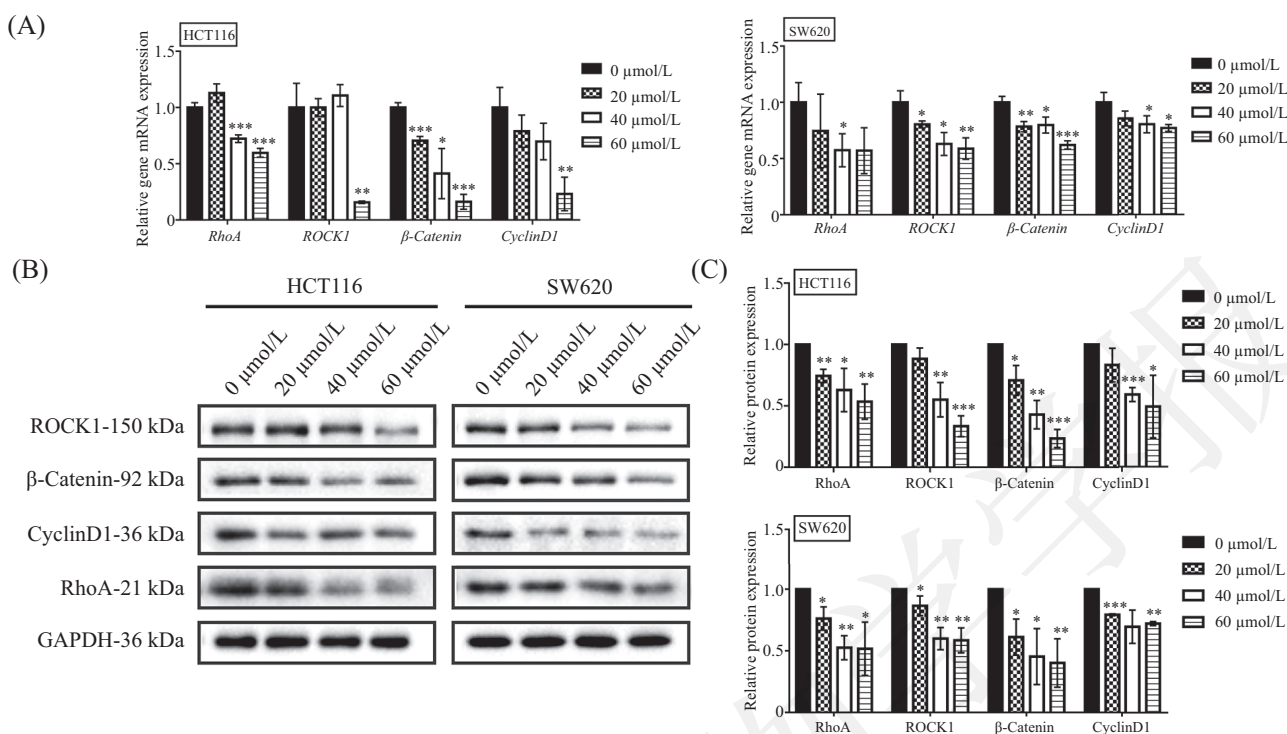
同时, Western blot结果也显示, 随着Lupeol给药



A: HCT116和SW620细胞流式检测细胞周期; B: 细胞周期比例分布; C: HCT116和SW620细胞流式检测细胞凋亡; D: 细胞凋亡率统计图。
* $P<0.05$, *** $P<0.001$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol组比较。

A: cell cycle distribution was detected by flow cytometry; B: the ratio of cell cycle distribution of HCT116 and SW620 cells; C: cell apoptosis was detected by flow cytometry; D: the ratio of cell apoptosis of HCT116 and SW620 cells. * $P<0.05$, *** $P<0.001$ vs control (0 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol treatment).

图2 Lupeol对HCT116和SW620细胞周期和细胞凋亡的影响
Fig.2 The effects of Lupeol on the cell cycle and cell apoptosis of HCT116 and SW620 cells



A: qPCR检测相关基因mRNA表达水平; B: Western blot检测相关蛋白表达水平条带图; C: Western blot蛋白半定量统计图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与0 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol组比较。

A: the expression of mRNA was detected by qPCR assay; B: the expression of proteins was detected by Western blot assay; C: the statistical results of Western blot assay. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control (0 $\mu\text{mol/L}$ Lupeol treatment).

图3 Lupeol对HCT116和SW620细胞相关基因和蛋白表达水平的影响

Fig.3 The effects of Lupeol on the Gene and protein expression of HCT116 and SW620 cells

浓度增加, HCT116和SW620细胞中RhoA-ROCK1信号通路蛋白, 以及下游 β -Catenin蛋白和细胞周期蛋白CyclinD1表达水平均显著下降($P < 0.05$)(图3B和图3C)。

2.4 Lupeol对 β -Catenin蛋白分布的影响

免疫荧光染色结果显示, 对照组 β -Catenin蛋白主要分布在HCT116和SW620细胞的胞质和胞膜上。当不同浓度Lupeol处理48 h后, 随着给药浓度增加, 两种结肠癌细胞胞质和胞膜上的 β -Catenin蛋白分布减少(图4A和图4B)。

2.5 敲低RhoA对HCT116和SW620细胞增殖的影响

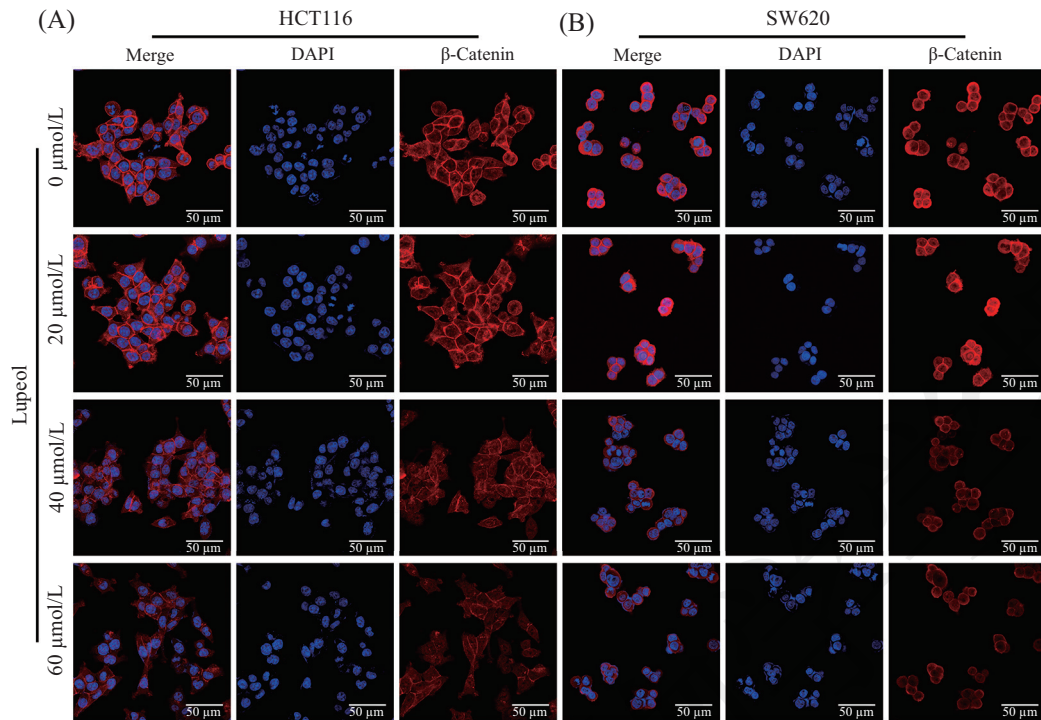
为了进一步验证Lupeol是否通过RhoA-ROCK1信号通路抑制两种结肠癌细胞的增殖。我们将shRNA转染入HCT116和SW620细胞, 成功构建了敲低RhoA的两种结肠癌细胞株。接着, CCK8法检测敲低RhoA对两种结肠癌细胞增殖的影响, 结果显示, 与对照组(转染shNC)细胞相比, 敲低RhoA的HCT116和SW620细胞的增殖在第5天受到明显的抑

制($P < 0.05$)。这提示我们, 敲低RhoA对两种结肠癌细胞增殖有一定的抑制作用(图5A)。

同时, qPCR和Western blot结果显示, 与对照组相比, 敲低RhoA的两种结肠癌细胞的ROCK1、 β -Catenin和CyclinD1的mRNA表达水平呈现下降趋势, 蛋白表达水平显著下降(图5B和图5C)。这提示我们, 敲低RhoA以后, 抑制了RhoA-ROCK1信号通路的表达。进一步免疫荧光染色结果显示, 与对照组相比, 敲低RhoA的HCT116和SW620细胞中 β -Catenin在胞质和胞膜中的含量减少(图5D), 这与Western blot结果相一致。进一步提示我们, Lupeol主要通过抑制RhoA的表达, 从而影响RhoA-ROCK1信号通路的表达, 抑制下游 β -Catenin蛋白的表达, 进而抑制结肠癌细胞的增殖。

3 讨论

相关研究报道显示, Lupeol作为一种天然三萜烯类化合物, 可有效对抗多种恶性肿瘤的发生发展^[17-19]。Lupeol可通过抑制NF- κ B信号通路抑制头颈部鳞状



A: 免疫荧光检测HCT116细胞内 β -Catenin蛋白分布; B: 免疫荧光检测SW620细胞内 β -Catenin蛋白分布。

A: the distribution of β -Catenin protein in HCT116 cells was detected by Immunofluorescence assay; B: the distribution of β -Catenin protein in SW620 cells was detected by Immunofluorescence assay.

图4 Lupeol对HCT116和SW620细胞内 β -Catenin蛋白分布的影响

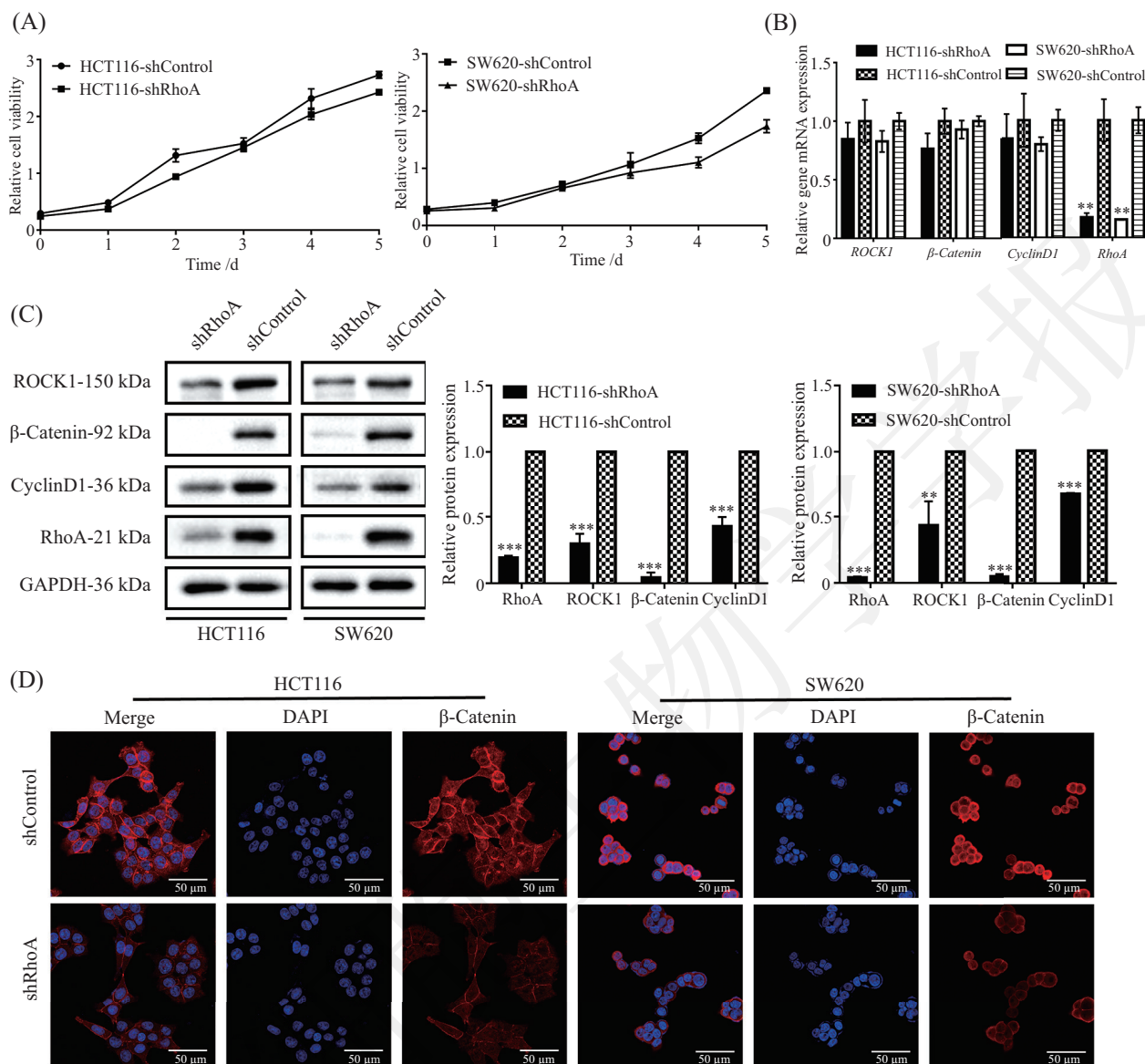
Fig.4 The effects of Lupeol on the distribution of β -Catenin protein in HCT116 and SW620 cells

细胞癌的生长^[5], 可靶向调节Wnt/ β -Catenin信号通路抑制人黑色素瘤细胞的增殖^[20], 还可以通过PI3K/AKT/mTOR途径诱导人骨肉瘤细胞的凋亡^[18]。但是目前对于Lupeol调控结肠癌的研究较少, 且相关分子机制尚不明确。我们先前的研究初步表明, Lupeol可通过Wnt/ β -Catenin信号通路影响结肠癌的生长^[21], 但具体机制仍需进一步探讨。因此, 在这项研究中, 我们进一步研究了Lupeol对结肠癌增殖的影响。我们发现, Lupeol通过RhoA-ROCK1信号通路抑制了HCT116和SW620细胞的克隆形成, 阻滞了细胞周期进程从而抑制了细胞增殖。

研究显示, RhoA在结肠癌中高表达, 是结肠癌进展的重要因素之一^[12]。KIM等^[16]研究发现, RhoA异常活化可促进ROCK1活化, ROCK的激活可诱导糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase 3 beta, GSK-3 β)磷酸化和 β -Catenin蛋白积累, 进而导致小鼠巨噬细胞和人胚肾细胞的增殖和迁移。RODRIGUES等^[22]的研究发现, RhoA的异常表达可导致人结肠癌细胞中 β -Catenin蛋白重新分布, 并增强Wnt/ β -Catenin信号传导, 导致细胞增殖、

侵袭和去分化。我们的研究结果显示, Lupeol作用后, HCT116和SW620细胞内RhoA、ROCK1和 β -Catenin mRNA和蛋白表达水平均显著下降。为了进一步验证Lupeol是否通过RhoA起作用, 我们构建shRNA特异敲低HCT116和SW620细胞中的RhoA。结果显示, 敲低RhoA的两种结肠癌细胞中ROCK1和 β -Catenin蛋白表达水平均显著下降。给予细胞ROCK1抑制剂或者si-ROCK处理可抑制 β -Catenin蛋白的表达^[16]。这提示我们, Lupeol可通过抑制RhoA的表达, 从而抑制其下游效应分子ROCK1的表达, 进而抑制 β -Catenin蛋白的积累。

β -Catenin是基于钙黏蛋白黏附连接的整体结构组分, 并且是细胞核中经典Wnt信号传导的关键核效应物。 β -Catenin结构和信号传导的不平衡通常会导致癌症和转移相关的疾病^[23]。研究显示, ROCK1可促进 β -Catenin蛋白积累, 使得 β -Catenin蛋白核转位^[16,22]。我们通过免疫荧光实验结果显示, Lupeol作用后, β -Catenin在胞质胞膜的积累减少。这可能与Lupeol作用后 β -Catenin蛋白表达受抑制相关。同时, 这也使得 β -Catenin核转位减少。 β -Catenin蛋白



A: CCK8法检测敲低*RhoA*对HCT116和SW620细胞增殖的影响; B: qPCR法检测敲低*RhoA*对相关基因mRNA表达水平的影响; C: Western blot法检测敲低*RhoA*对相关蛋白表达水平的影响; D: 免疫荧光检测敲低*RhoA*后HCT116和SW620细胞内β-Catenin蛋白分布。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与sh-Control组比较。

A: the cell proliferation ability of HCT116 and SW620 cells after *RhoA* knockdown was detected by CCK8 assay; B: the expression of mRNA after *RhoA* knockdown was detected by qPCR assay; C: the expression of proteins after *RhoA* knockdown was detected by Western blot assay; D: the distributions of β-Catenin protein in HCT116 and SW620 cells were detected by Immunofluorescence assay. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs sh-control.

图5 敲低*RhoA*对HCT116和SW620细胞增殖的影响

Fig.5 The effects of *RhoA* knockdown on the proliferation of HCT116 and SW620 cells

转入核内与TCF/LEF结合, 激活下游靶基因*C-myc*和*CyclinD1*的转录^[24]。与之相符, 我们的研究发现, Lupeol作用后, 细胞周期蛋白Cyclin D1 mRNA和蛋白表达水平均明显下降。Cyclin D1常与CDK4或CDK6形成复合物并作为其调节亚基, 促进细胞由G₁期进入S期^[25]。而我们的研究也发现, Lupeol作用后HCT116和SW620细胞增殖受到明显抑制, 细

胞周期阻滞于G₀/G₁期。这提示我们, Lupeol作用后, β-Catenin表达下降, 使得β-Catenin核转位减少, 可能抑制了其下游靶基因*Cyclin D1*的表达, 从而抑制了结肠癌细胞的增殖。此外, RhoA另一个主要的功能是调控细胞增殖。RhoA已被证实是细胞进入细胞周期G₁期的必需成分^[14]。RhoA组成性活化的突变体可以促进细胞进入G₁期以及促进DNA的合成。我

们的研究结果显示, Lupeol作用后, 细胞周期阻滞于G₀/G₁期。*RhoA*敲低的两种结肠癌细胞增殖均受到一定程度的抑制, 这也进一步提示我们, *RhoA*与细胞增殖密切相关。

综上所述, Lupeol可通过抑制*RhoA*的表达, 从而抑制其下游ROCK1的表达, 影响 β -Catenin的表达和积累, 进而抑制细胞周期蛋白Cyclin D1的表达, 最终抑制HCT116和SW620细胞的增殖。Lupeol也有望成为临床结肠癌治疗的新药物。然而, 本实验对于Lupeol的机制研究是基于两种结肠癌细胞系的反应, 可能无法精确地反映完整生物体内的过程。因此, 需要进一步进行动物水平的研究。

参考文献 (References)

- [1] LIBY K T, YORE M M, SPORN M B. Triterpenoids and rexinoids as multifunctional agents for the prevention and treatment of cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7(5): 357-69.
- [2] SETZER W N, SETZER M C. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2003, 3(6): 540-56.
- [3] BRADFORD P G, AWAD A B. Phytosterols as anticancer compounds [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51(2): 161-70.
- [4] SALEEM M, AFAQ F, ADHAMI V M, et al. Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice [J]. *Oncogene*, 2004, 23(30): 5203-14.
- [5] LEE T K, POON R T P, WO J Y, et al. Lupeol suppresses cisplatin-induced nuclear factor-KB activation in head and neck squamous cell carcinoma and inhibits local invasion and nodal metastasis in an orthotopic nude mouse model [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8800-9.
- [6] SALEEM M, KAUR S, KWEON M-H, et al. Lupeol, a fruit and vegetable based triterpene, induces apoptotic death of human pancreatic adenocarcinoma cells via inhibition of Ras signaling pathway [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(11): 1956-64.
- [7] RUIZ-RODRIGUEZ M A, VEDANI A, FLORES-MIRELES A L, et al. In silico prediction of the toxic potential of lupeol [J]. *Chem Res Toxicol*, 2017, 30(8): 1562-71.
- [8] PRASAD S, KALRA N, SHUKLA Y. Hepatoprotective effects of lupeol and mango pulp extract of carcinogen induced alteration in Swiss albino mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2007, 51(3): 352-9.
- [9] BHATTACHARYYA S, SEKAR V, MAJUMDER B, et al. CDKN2A-p53 mediated antitumor effect of Lupeol in head and neck cancer [J]. *Cell Oncol*, 2017, 40(2): 145-55.
- [10] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [11] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [M]. *CA Cancer J Clin*. 2019: 7-34.
- [12] YU X, WANG D, WANG X, et al. CXCL12/CXCR4 promotes inflammation-driven colorectal cancer progression through activation of *RhoA* signaling by sponging miR-133a-3p [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(32): 1-18.
- [13] RIDLEY A J. *RhoA*, *RhoB* and *RhoC* have different roles in cancer cell migration [J]. *J Microsc*, 2013, 251(3): 242-9.
- [14] DER C J. *Rho* family proteins [M]. *Encyclopedia of Cancer*. 2014: 1-7.
- [15] ZHANG C, ZHANG S, ZHANG Z, et al. ROCK has a crucial role in regulating prostate tumor growth through interaction with c-Myc [J]. *Oncogene*, 2013, 33(49): 5582-91.
- [16] KIM J G, KIM M J, CHOI W J, et al. Wnt3A induces GSK-3 β phosphorylation and β -Catenin accumulation through *RhoA*/ROCK [J]. *J Cell Physiol*, 2017, 232(5): 1104-13.
- [17] TARAPORE R S, SIDDIQUI I A, ADHAMI V M, et al. The dietary terpene lupeol targets colorectal cancer cells with constitutively active Wnt/ β -catenin signaling [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2013, 57(11): 1950-8.
- [18] LIU Y, BI T, SHEN G, et al. Lupeol induces apoptosis and inhibits invasion in gallbladder carcinoma GBC-SD cells by suppression of EGFR/MMP-9 signaling pathway [J]. *Cytotechnology*, 2016, 68(1): 123-33.
- [19] HSU M J, PENG S F, CHUEH F S, et al. Lupeol suppresses migration and invasion via p38/MAPK and PI3K/Akt signaling pathways in human osteosarcoma U-2 OS cells [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2019, 83(9): 1729-39.
- [20] TARAPORE R S, SIDDIQUI I A, SALEEM M, et al. Specific targeting of Wnt/ β -catenin signaling in human melanoma cells by a dietary triterpene lupeol [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(10): 1844-53.
- [21] WANG Y, HONG D, QIAN Y, et al. Lupeol inhibits growth and migration in two human colorectal cancer cell lines by suppression of Wnt- β -catenin pathway [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 7987-99.
- [22] RODRIGUES P, MACAYA I, BAZZOCCO S, et al. RHOA inactivation enhances Wnt signalling and promotes colorectal cancer [J]. *Nat Commun*, 2014, 5: 5458.
- [23] VALENTA T, HAUSMANN G, BASLER K. The many faces and functions of β -catenin [J]. *EMBO J*, 2012, 31(12): 2714-36.
- [24] CLEVERS H, NUSSE R. Wnt/ β -Catenin signaling and disease [J]. *Cell*, 2012, 149(6): 1192-205.
- [25] FU M, WANG C, LI Z, et al. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions [J]. *Endocrinology*, 2004, 145(12): 5439-47.