文章编号:1001-6880(2017)12-2044-07

大黄素抑制 LPS 诱发的结肠癌转移的研究

兰景彬[1],潘克俭[2],汪　宏[3],旷　喜[3*]

[1]成都医学院基础医学院;[2]成都医学院生物医学系,成都 610500;

[3]四川大学华西药学院药理系,成都 610041

摘　要:研究大黄素对炎症介导的结肠癌细胞转移的抑制作用。采用 MTT 法确定大黄素有效作用浓度。细胞划痕、Transwell、基质胶实验检测大黄素对 LPS 诱发的结肠癌细胞 SW480 的迁移、侵袭能力的影响。ELISA 实验检测经药物处理后细胞培养基中炎性因子的变化;蛋白质免疫印迹检测 LPS 单独处理和 LPS、大黄素共处理结肠癌细胞后,胞内 EMT 标志蛋白及炎症信号通路相关蛋白的表达变化;建立小鼠肺转移模型评价大黄素抑制 LPS 诱发的结肠癌转移的能力。结果发现,大黄素能有效抑制 LPS 诱发的结肠癌细胞 SW480 增殖、迁移和侵袭;大黄素与 LPS 共处理和 LPS 单独处理结肠癌细胞相比,培养基上清中炎性因子 IL-1β、TNF-α、IL-6 含量下降;此外,蛋白质免疫印迹结果显示大黄素与 LPS 共处理较 LPS 单独处理,EMT 过程受到抑制,NF-κB、TLR4 表达下调;肺转移模型实验显示大黄素能抑制 LPS 诱发的结肠癌细胞的肺转移。实验结果表明,大黄素通过抑制 LPS 诱发炎症因子的释放和炎性信号通路激活,进而抑制结肠癌细胞转移。

关键词:大黄素;结肠癌;炎性因子;转移

中图分类号:R28　　**文献标识码**:A　　DOI:10.16333/j.1001-6880.2017.12.008

The Inhibition of Emodin on Metastasis of Colon Cancer Induced by LPS

LAN Jing-bin[1],PAN Ke-jian[2],WANG Hong[3],KUANG Xi[3*]

[1]*School of Basic Medical Scienc of Chengdu Medical College*;

[2] *Department of Biomedicine Sciences*,*Chengdu Medical College*,*Chengdu 610500*,*China*

[3] *Department of Pharmacology*,*West China School of Pharmacy*,*Sichuan University*,*Chengdu 610041*,*China*

Abstract:To investigate the inhibitory effect of emodin on inflammatory mediated metastasis of colon cancer cells. MTT assay was used to determine the effective concentration of emodin. The effect of emodin on migration and invasion of colon cancer cell line SW480 induced by LPS was evaluated by wound healing,Transwell,Matrigel invasion assay. The expression of inflammatory cytokines in the culture supernatants was determined by enzyme-linked immunosorbent assay after colon cancer cells were treated with LPS alone or combined with emodin. Intracellular EMT marker and inflammatory-related protein was detected by Western blot after LPS treated alone and cotreated with emodin on colon cancer cells. The lung metastasis mouse model was established to evaluate the inhibitory effect of emodin on the tumor metastasis induced by LPS. The results indicated that emodin could inhibit the proliferation,migration and invasion induced by LPS in SW480 colon cancer cells. In colon cancer cells cotreated with LPS and emodin,the level of inflammatory factors such as IL-1,TNF-α and IL-6 was reduced and western-blot analysis revealed that EMT was suppressed and expression of NF-kB and TLR4 was down-regulated when compared with treatment with LPS alone. In vivo,emodin can inhibit lung metastasis of colon cancer induced by LPS. The results suggested that emodin suppressed the EMT process of colon cancer cells by inhibiting release of inflammatory factors induced by LPS and activation of inflammatory signaling pathways,thereby inhibiting metastasis of colon cancer cells.

Key words:emodin;colon cancer;inflammatory factors;metastasis

结肠癌(Colorectal cancer,CRC)是世界上最常见的消化道恶性肿瘤之一,其发病率逐年上升,已跃居恶性肿瘤发病率的第 3 位,其死亡率为恶性肿瘤死因的第 2 位。截至目前,结肠癌的治疗手段为放、化疗及手术,但由于结肠癌术后的高复发、转移及药物抵抗,因此迫切地需要寻找新型治疗药物和治疗途径。炎症与肿瘤发生、发展密切相关,是结肠癌转移的驱动力[1],抑制炎症被广泛认为对结肠癌的治

收稿日期:2017-10-18　　接收日期:2017-11-23

*通信作者 E-mail:kuangxi56@163.com

天然产物研究与开发

疗有着很重要的作用。近年来,传统中药在肿瘤治疗中得到广泛认可,其有效成分对肿瘤有抑制作用。大黄素作为从大黄属、蓼属、鼠李属植物和番泻叶中分离出来的蒽醌类物质,具有抗炎、抗菌、抗肿瘤等多种生物学功能[2-6]。大黄素对结肠癌、肝癌、前列腺癌、乳腺癌多种癌症细胞均有抑制作用。研究报道,大黄素能有效抑制 LPS 诱导 NF-kB 活化,抑制炎性因子的分泌;同时大黄素被报道称,能有效抑制结肠癌、乳腺癌细胞转移。但未曾见大黄素对炎性介导的癌症转移的研究报道,因此本研究拟采用结肠癌细胞为研究对象,采用 LPS 为炎症诱导剂,研究大黄素对炎性诱导结肠癌细胞转移的分子作用机制,探讨大黄素的炎性肿瘤细胞的药用价值。

1 材料与方法

1.1 细胞株

人结肠癌细胞 SW480 和小鼠结肠癌 CT26 细胞均购自中科院上海生命科学研究院细胞资源中心

1.2 主要试剂

大黄素购自上海谱振生物科技有限公司;DMEM 培养基购自美国 Gibco;胎牛血清购于杭州四季青生物公司;MTT 、Transwell 和基质胶均购自美国 Sigma 公司;蛋白质预染 Marker 购自 ThermoFisher 公司; ECL 显影液、PVDF 膜购自美国 Millipore 公司; β-actin、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、β-catenin、Snail、TLR4、NF-κB p65、p-NF-κB P65 单克隆抗体均购自购自 Santa Cruz 生物技术有限公司;人白介素 1β、人白介素 6 和人肿瘤坏死因子 TNF-α 的 ELISA 检测试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司;BALB/c 小鼠(SPF 级)购自成都达硕实验动物有限公司;其它化学试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞培养

SW480 细胞和 CT26 细胞均用 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素、100 μg/mL 链霉素)于 37 ℃,5% CO_2 培养。

1.4 MTT 法测细胞活力

将 100 μL SW480、CT26 细胞悬液以 30000 个/mL 的密度接种于 96 孔板,在 CO_2 孵箱中 37 ℃ 培养孵育过夜。待细胞贴壁后,加入不同浓度(0、5、10、20、40、80 和 160 μM)的药物 100 μL 继续培养 48 h,每组设 4 个复孔,另设不含细胞仅有培养基的空白孔为空白对照孔。药物处理结束后,加入 MTT(5 mg/mL)试剂 20 μL,37 ℃ 5% CO_2 孵育 4 h,以空白孔调零,酶标仪测定仪检测 490 nm 波长下的吸光值。

1.5 细胞划痕实验

将生长良好的 SW480 细胞以 6×10^4 个/孔接种于 6 孔板中,培养 24 h 后,待密度达到 90% 以上时,用 200 μL 的枪头在 6 孔板中划痕,PBS 洗 2 次,加入双无培养基、LPS、LPS + 大黄素的双无培养基,继续培养 48 h 。在 48 h 时,照相观察划痕愈合情况。

1.6 Transwell、基质胶实验

参考文献方法[7],将经大黄素及 LPS 处理 48 h 后的 SW480 细胞,PBS 洗 2 次,用无血清培养液重悬。将 200 μL 细胞悬液(3×10^5/mL、4×10^5/mL)加入上室或含基质胶的小室,将含 20% 胎牛血清 DMEM 培养基 540 μL 加入 24 孔板下室,每组设 3 个复孔,培养 48 h,取出小室,经 4% 多聚甲醛固定后,结晶紫染色,用湿棉签擦去膜上面未穿过膜的细胞,自然风干后,在显微镜下照相,低倍镜下随机选取 5 个视野计数。最终以穿膜细胞的数目代表体外迁移能力、外侵袭能力。

1.7 蛋白免疫印迹

将 LPS 单独处理以及 LPS 与大黄素共处理 48 h 后的 SW480 细胞按 1×10^6 的细胞浓度加入 500 μL RIPA 细胞裂解缓冲液,振荡混匀,冰上裂解 30 min,将细胞裂解液 13 000 rpm/min 离心 15 min,取上清。然后将上清蛋白质经考马斯亮蓝试剂盒进行定量检测,以确定电泳时总蛋白上样量一样。将上清蛋白制样经 15% SDS-PAGE 电泳分离后,转膜至 PVDF 膜上,膜经封闭缓冲液、相应一抗和辣根过氧化物酶标记的相应二抗 37 ℃ 各孵育 1 h,每步骤间均用 TBST 洗涤 PVDF 膜 5 次,每次 10 min。之后加入 ECL 化学发光显影试剂,通过曝光机进行图像拍照。

1.8 酶联免疫吸附实验(ELISA)

收集 LPS 单独处理以及 LPS 与大黄素共处理 48 h 后的 SW480 细胞的上清培养基,于 1500 × g,离心 5 min,收取上清,按照 ELISA 试剂盒生产商提供的说明书进行实验,检测上清培养基中 IL-1β、IL-6 和 TNF-α 蛋白的含量。

1.9 动物肺转移模型试验

参考文献方法[8],收集 LPS 单独处理以、LPS 与大黄素共处理 48 h 后及未经药物处理小鼠 CT26 细

天然产物研究与开发

胞,用生理盐水洗细胞 3 次,制成细胞悬液(细胞密度为 2×10^7 个/mL)。用 1 mL 注射器(无菌)吸取 100 μL 细胞悬浮液,从小鼠的尾静脉高压注入。14 天后采用颈椎脱臼处死小鼠,取肺观察,并计数其上的结结数和称重。

1.10 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件 进行数据处理,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间采用独立样本 t 检验分析,检测水准 $\alpha=0.05$。

2 结果

2.1 大黄素对结肠癌细胞生存力的影响

为了评估大黄素对结肠癌细胞增殖的影响,采用 MTT 法检测经同药物浓度的大黄素处理结肠癌细胞 SW480、CT26 48 h 后的细胞活力的变化(图 1)。如题所示:大黄素能显著抑制结肠癌细胞 SW480(图 1A)和 CT26(图 1B)的细胞增殖,且抑制程度呈药物浓度依赖性。

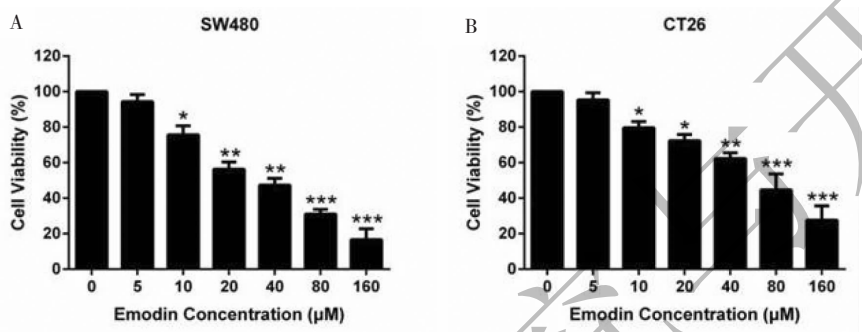

图 1 大黄素对结肠癌细胞 SW480 和 CT26 生存力的影响

Fig. 1 Effect of emodin on viability of colon cancer cell line SW480 and CT26

注:与空白对照组比较,$^*P<0.05$;$^{**}P<0.01$;$^{***}P<0.001$

Note: Compared with control group, $^*P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$

2.2 大黄素抑制 LPS 诱导的结肠癌细胞迁移、浸润能力

为评估大黄素对 LPS 处理后结肠癌细胞 SW480 迁移、侵袭能力的影响,采用细胞划痕、Transwell、基质胶实验检测大黄素处理 LPS 诱导后的结肠癌细胞 SW480 的迁移能力、侵袭能力的影响。划痕实验结果显示:经 LPS 单独处理后细胞划痕处细胞的愈合程度明显高于对照组,而 LPS 与大黄素共同处理组的划痕愈合程度低于 LPS 组(图 2A)。Transwell 实验结果显示,经 LPS 处理后穿过基底膜的细胞数明显多于对照组,而 LPS 与大黄素共同处理组的穿过基底膜的细胞数少于 LPS 组(图 2B)。如图 2C 显示:经 LPS 处理后穿到下室的细胞数明显多于对照组,而 LPS 与大黄素共同处理组穿到下室的细胞数少于 LPS 组(图 2C)。同时为了进一步验证大黄素对 LPS 诱导结肠癌细胞浸润能力的抑制作用,我们采用蛋白质免疫印迹实验检测经药物处理后细胞内 MMP-2、9 的蛋白表达(图 2D)。结果显示:LPS 显著上调 MMP-2 和 MMP-9 的蛋白表达,同时大黄素有效抑制 LPS 诱导 MMP 活化。以上实验结果表明:大黄素有效抑制 LPS 诱导的细胞迁移和浸润能力。

2.3 大黄素抑制 LPS 诱导的结肠癌细胞 EMT 过程

恶性上皮肿瘤细胞中,细胞迁移和浸润能力的改变往往伴随着其形态的变化[9],如上皮细胞向间质细胞转变(EMT)。在此过程中,上皮细胞中 E-cadherin[10] 的表达减少,间质细胞标志蛋白的表达增加,如 N-cadherin[11] 和 vimentin[12],从而增强细胞转移的能力。为了验证 EMT 过程是否参与大黄素抑制 LPS 诱导结肠癌细胞转移事件中,我们采用蛋白质免疫印迹检测经 LPS 单独处理和 LPS、大黄素共同处理后细胞胞内 EMT 相关标志蛋白的表达情况,如图 3 所示:LPS 能抑制 E-cadherin 的表达,增强 N-cadherin、Vimentin、β-catenin 及 EMT 相关转录因子 Snail 的表达;而 LPS 与大黄素共同处理组却能增强 E-cadherin 的表达,抑制 N-cadherin、Vimentin、β-catenin 和 Snail 的表达。以上结果表明:大黄素负调控 LPS 诱发的 EMT 过程进而抑制结肠癌细胞的转移。

天然产物研究与开发

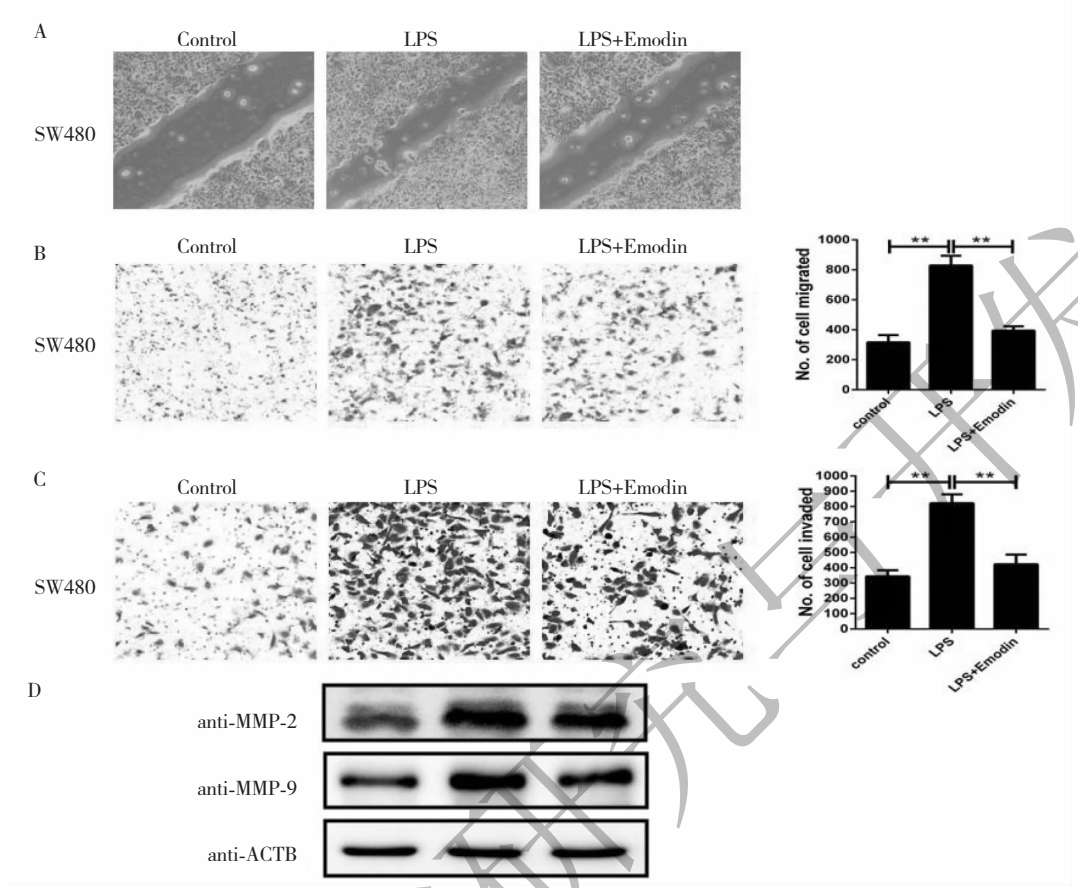

图 2　大黄素抑制 LPS 诱导的结肠癌细胞迁移、浸润能力

Fig. 2　Emodin inhibits the migration and invasion of colon cancer cells induced by LPS

注:与 LPS 单独处理组比较,** $P < 0.01$

Note: Compared with LPS alone treatment group, ** $P < 0.01$

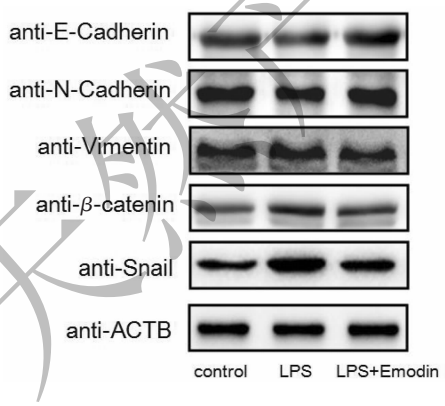

图 3　大黄素对 EMT 相关标志蛋白表达的影响

Fig. 3　Effect of emodin on the expression of EMT related marker protein

2.4　大黄素抑制 LPS 诱导的促炎细胞因子的分泌及 TLR4-NF-κB 信号通路

炎症微环境与肿瘤发生、发展密切相关,具有生物活性的炎症因子(如 IL-1β、TNF-α、IL-6)的升高又与癌症的进程是密切相关的。因此,我们通过 ELISA 实验检测了大黄素对 LPS 诱导的结肠癌细胞炎症微环境中炎性因子的表达量的影响(图 4A、4B、4C)。结果显示:LPS 能显著引起 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 表达水平的增加,而 LPS 与大黄素共同处理组却能显著下调 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 的表达水平。以上结果说明:大黄素抑制 LPS 诱导的炎性因子分泌。

研究表明,IL-6 、IL-1β、TNF-α 等炎性因子能够激活 EMT,进而促进肿瘤细胞的转移[13]。LPS 能与细胞膜上的 TLR4 受体结合,激活 NF-κB 信号通路,促进肿瘤细胞转移。因此,我们检测了大黄素对 LPS 活化的 TLR4-NF-κB 信号通路的影响(图 4D)。结果显示:LPS 能促进 TLR4 的表达,引发 NF-κB p65 发生磷酸化;而 LPS 与大黄素共同处理组却能

天然产物研究与开发

抑制这种效应。因此我们可以得出结论,大黄素抑制 LPS 诱导的炎症信号通路进而抑制结肠癌细胞的转移。

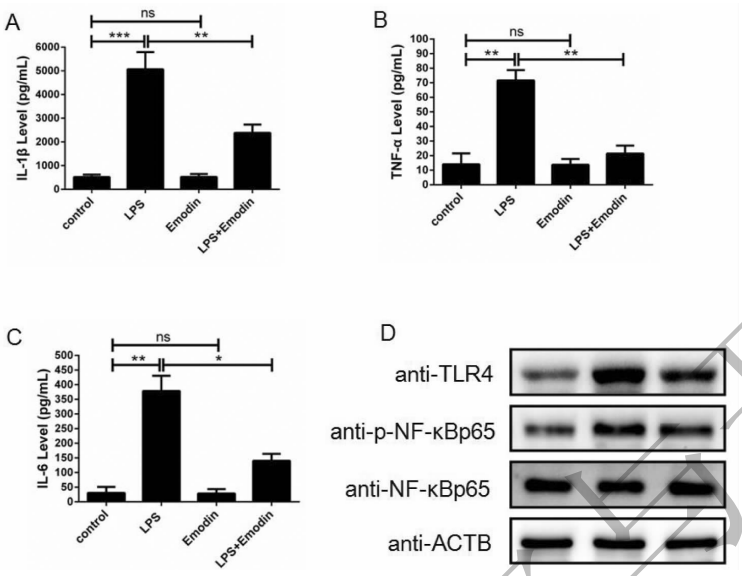

图 4 大黄素抑制 LPS 诱导的促炎细胞因子的分泌及 TLR4-NF-κB 信号通路

Fig. 4 Emodin inhibits the secretion of proinflammatory cytokines induced by LPS and the TLR4-NF-κB signaling pathway

注:与空白对照组比较,ns:差异无统计学意义;$^{**}P < 0.01$;$^{***}P < 0.001$。与 LPS 单独处理组比较,$^{*}P < 0.05$;$^{**}P < 0.01$

Note:Compared with control group,ns: $P > 0.05$;$^{**}P < 0.01$;$^{***}P < 0.001$. Compared with LPS alone treatment group,$^{*}P < 0.05$;$^{**}P < 0.01$

2.5 大黄素抑制 LPS 诱导的结肠癌细胞的体内转移

为了进一步评估大黄素抑制 LPS 诱导结肠癌细胞转移的能力,采用经大黄素处理 LPS 诱导的小鼠结肠癌细胞 CT26 构建小鼠肺转移模型,在体内检测大黄素对炎症诱导的细胞转移的抑制能力(图 5)。结果显示:经过注射了 LPS 单独处理的细胞的肺组织的结结数较比对照组多($P < 0.01$),重量增加($P < 0.05$)。而大黄素与 LPS 共处理组的细胞的肺组织结结数则明显少于 LPS 单独处理组($P < 0.01$),重量也减少($P < 0.05$)。结果在体内表明大黄素同样能有效抑制 LPS 诱导的结肠癌细胞的转移。

3 讨论

在抗癌药物的发展中,天然产物被广泛开发利用。许多中药已被使用若干年,历史证据表明,中药在疾病的治疗中具有非常重要的作用。蒽醌类化合物是传统中药中的有效成分之一,具有多种有益的生物学功能。大黄素是从许多中药(如虎杖、大黄、何首乌等)中提取出来一种蒽醌类物质,具有良好的抗病毒、抗炎、抗肿瘤等多种药理功效[14]。研究发现,大黄素可抑制肺癌、肝癌、胰腺癌、宫颈癌、前列腺癌等多个系统的肿瘤细胞生长[15-19],本研究实验数据就表明了大黄素能够有效抑制结肠癌细胞的增殖,并具有浓度依赖性。

癌症的发生发展受肿瘤微环境调控,炎症在肿瘤转移中就发挥着非常重要的作用[20]。炎症反应能够增强炎性肿瘤微环境中的促增殖、抗凋亡的信号,进而促进癌症的发生[21]。研究发现,LPS 能够诱导炎性反应进而诱导结肠癌细胞的迁移和侵袭[22]。本研究证实了 LPS 能促进结肠癌细胞的迁移和侵袭,而大黄素能有效抑制 LPS 诱导的结肠癌细胞迁移和侵袭。

NF-κB 转录因子通路是炎症与免疫反应中的一个重要调节因子,能够调节许多促进肿瘤的促炎细胞因子的表达,如 IL-1β、TNF- α、IL-6 等[23]。研究也发现,NF-κB 能调节基质金属蛋白酶(特别是 MMP-2 和 MMP-9)的表达,降解细胞外基质,从而增强肿瘤细胞的侵袭能力[24]。本研究数据就显示大黄素能抑制 LPS 诱导的结肠癌细胞中 MMP-2 和 MMP-9 的表达。而且,大黄素能显著下调 IL-1β、TNF- α 和 IL-6 的表达。

在炎症微环境中,多种促炎细胞因子可以通过活化 TLR4-NF-κB 等信号通路,促进 EMT 相关转录

天然产物研究与开发

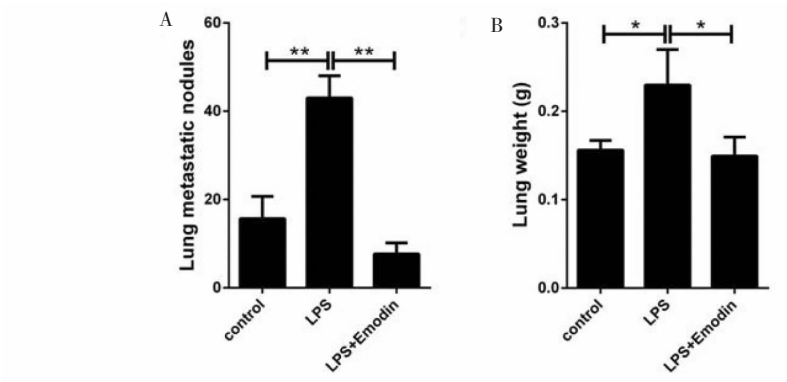

图 5 大黄素抑制 LPS 诱导的结肠癌 CT26 细胞向肺转移

Fig. 5 Emodin inhibits lung metastasis of CT26 colon cancer cells induced by LPS

注:与空白对照组比较,$^{*}P < 0.05$;$^{**}P < 0.01$。与 LPS 单独处理组比较,$^{*}P < 0.05$;$^{**}P < 0.01$

Note: Compared with control group, $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$. Compared with LPS alone treatment group, $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$

因子 Snail 的转录及稳定,进而下调 E-cadherin 的表达水平,诱导间质细胞标志蛋白的表达,从而诱导 EMT 的发生[25]。LPS 是 TLR4 的主要配体,能激活 TLR4-NF-κB 信号通路,诱导 EMT 的发生,从而促进肿瘤转移[26]。本研究数据显示,大黄素能抑制 LPS 诱导的 TLR4 的表达以及 NF-κB p65 的磷酸化,导致 NF-κB 活化受抑制,影响 LPS 诱导的 EMT 相关标志蛋白的变化。

综上所述,本研究结果解释了大黄素通过阻遏 LPS 诱导 TLR4-NF-κB 信号通路活化,进而抑制 LPS 诱发的结肠癌细胞的转移,为深入解析大黄素对炎症诱导结肠癌转移过程及其广泛运用于炎性疾病及炎性肿瘤治疗奠定了理论基础。

参考文献

1 Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 2011, 144: 646-674.

2 Kuo YC, Meng HC, Tsai WJ. Regulation of cell proliferation, inflammatory cytokine production and calcium mobilization in primary human T lymphocytes by emodin from Polygonum hypoleucum Ohwi. *Inflamm Res*, 2001, 50: 73-82.

3 Dong X, Fu J, Yin X, *et al*. Emodin: A review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. *Phytother Res*, 2016, 30: 1207-1218.

4 Heo SK, Yun HJ, Park WH, *et al*. Emodin inhibits TNF-alpha-induced human aortic smooth-muscle cell proliferation via caspase- and mitochondrial-dependent apoptosis. *J Cell Biochem*, 2008, 105: 70-80.

5 Wei WT, Lin SZ, Liu DL, *et al*. The distinct mechanisms of the antitumor activity of emodin in different types of cancer (Review). *Oncol Rep*, 2013, 30: 2555-2562.

6 Lu Y, Zhang J, Qian J. The effect of emodin on VEGF receptors in human colon cancer cells. *Cancer Biother Radiopharm*, 2008, 23: 222-228.

7 Zhang Y, Wang ZQ, Chen M, *et al*. MicroRNA-143 Targets MACC1 to Inhibit Cell Invasion and Migration in colorectal cancer. *Mol Cancer*, 2012, 11: 23.

8 Shuning He, Gerda EM Lamers, Jan-Willem M. Beenakker, *et al*. Neutrophil-mediated experimental metastasis is enhanced by VEGFR inhibition in a zebrafish xenograft model. *The Journal of Pathology*, 2012, 227: 431-445.

9 Krisanaprakornkit S, Iamaroon A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *ISRN Oncol*, 2012, 2012: 681469.

10 Buda A, Pignatelli M. E-cadherin and the cytoskeletal network in colorectal cancer development and metastasis. *Cell Commun Adhes*, 2011, 18: 133-143.

11 Hao L, Ha JR, Kuzel P, *et al*. Cadherin switch from E- to N-cadherin in melanoma progression is regulated by the PI3K/PTEN pathway through Twist and Snail. *Br J Dermatol*, 2012, 166: 1184-1197.

12 Pan X, Xiong D, Yao X, *et al*. Up-regulating ribonuclease inhibitor inhibited epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis in murine melanoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2012, 44: 998-1008.

13 Shrimali D, Shanmugam MK, Kumar AP, *et al*. Targeted abrogation of diverse signal transduction cascades by emodin for the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Lett*, 2013, 341: 139-149.

14 Srinivas G, Babykutty S, Sathiadevan PP, *et al*. Molecular mechanism of emodin action: transition from laxative ingredient to an antitumor agent. *Med Res Rev*, 2007, 27: 591-608.

(下转第 2055 页)

天然产物研究与开发