

白杨素对肝癌干样细胞球形成及 CK2 α 和 Gli1 表达的影响

张燕琴¹, 潘伟男¹, 阎敏², 曹建国³, 陈锋^{2*}

¹湖南食品药品职业学院药学院, 长沙 410208; ²中南大学湘雅医院药剂科, 长沙 410008;

³湖南师范大学医学院药学院, 长沙 410013

摘要: 本文研究了中药蜂胶胶囊主要活性成分白杨素对人肝癌细胞系 SMMC-7721 肝癌干样细胞 (liver cancer stem-like cells, LCSLCs) 球形成抑制作用及其机制。采用干细胞条件培养基悬浮培养 SMMC-7721 细胞得到第 3 代球细胞定义为 (SFCs)。通过球形成试验评价白杨素对 SFCs 球形成率的影响, Western blot 分析白杨素处理 SFCs 的 CD133、CD44、CK2 α 和 Gli1 蛋白表达水平, CK2 α siRNA 转染 SFCs 探讨白杨素的作用机制。结果表明不同浓度白杨素降低 SFCs 球形成率, 下调 CD133、CD44、CK2 α 和 Gli1 蛋白表达。与乱序对照 siRNA 转染细胞相比, CK2 α siRNA 转染下调 CK2 α 和 Gli1 蛋白表达, 同时, 协作增强白杨素抑制 CK2 α 和 Gli1 蛋白表达作用。说明白杨素可能通过抑制 CK2 α 表达阻断 Hedgehog 信号转导从而抑制 SFCs 球形成。

关键词: 白杨素; 肝癌; 肿瘤干细胞; Hedgehog 信号通路

中图分类号: R961.1; R737.31

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.12.020

Effects of Chrysin on Expression of CK2 α and Gli1 and Spheroid Formation in Liver Cancer Stem-like Cells from SMMC-7721 Cell Line

ZHANG Yan-qin¹, PAN Wei-nan¹, YAN Min², CAO Jian-guo³, CHEN Feng^{2*}

¹Hunan Food and Drug Vocational College, Department of Pharmacy, Changsha 410208, China;

²Central South University, Xiangya Hospital, Pharmacy Department, Changsha 410008, China;

³Hunan Normal University School of Medicine, Department of Pharmacy, Changsha 410013, China

Abstract: To investigate the inhibitory effect of chrysin from traditional Chinese medicine propolis capsule on sphere forming capability of liver cancer stem-like cells derived from human hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cell line and its mechanism. Suspension culture with the stem cell-condition medium was used to obtain the third generation spheroids derived from SMMC-7721 cell line defined as SFCs. Sphere formation assay was used to evaluate the effects of chrysin on sphere forming rate of SFCs. Western blot was used to analyze the expression levels of CD133, CD44, CK2 α and Gli1 proteins in SFCs treated with chrysin. CK2 α siRNA transfection was employed to approach the mechanism of chrysin action. The result showed that chrysin reduced the sphere forming rate and down-regulated expressions of CD133, CD44, CK2 α and Gli1 proteins of SFCs. Compared with SFCs transfected with scrambled control siRNA, a decrease of CK2 α and Gli1 protein expression level in SFCs transfected with CK2 α siRNA was observed. In addition, CK2 α siRNA transfection cooperatively enhanced chrysin down-regulated the expression of CK2 α and Gli1 proteins in SFCs. It was showed that chrysin inhibited the sphere forming capability of SFCs may down-regulate CK2 α expression through blocking Hedgehog signaling.

Key words: chrysin; hepatocellular carcinoma; cancer stem cell; Hedgehog signaling

肿瘤干细胞学说认为肿瘤组织中存在极少数具有自我更新能力、多向分化潜能和高致瘤性的肿瘤细胞即肿瘤干细胞, 是肿瘤增殖生长、转移和复发的根源。肿瘤干细胞特有的生物学功能和潜在的临床

应用价值受到广泛的关注, 同时也为肝癌的研究防治提供了新思路。

白杨素 (Chrysin, ChR) 是中成药蜂胶胶囊的主要活性成分。最近研究发现白杨素类似物 8-溴-7-甲氧基白杨素优先抑制来自肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞系肝癌干细胞增殖活性和自我更新, 呈浓度依赖性^[1]。有研究表明, 白杨素具有 CK2 抑制剂

收稿日期: 2017-04-27 接受日期: 2017-06-16

基金项目: 湖南省中医药管理局科技计划 (201499); 国家自然科学基金面上项目 (81172375)

* 通信作者 E-mail: scorpion_cf@163.com

的性质^[2]。CK2 是一种普遍存在的酪氨酸蛋白激酶,在多种类型肿瘤组织高表达^[3]。新近研究报道下调 CK2 α 表达阻断人非小细胞肺癌干样细胞 Hedgehog (Hh) 信号转导^[4]。因此,本文研究白杨素是否通过抑制 CK2 α 表达阻断 Hh 信号转导,进而抑制肝癌干样细胞球形成。

1 材料与方法

1.1 细胞系与球培养

人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞购自中国科学院细胞库(中国上海市)。参照文献^[1]的方法,常规单层贴壁细胞生长培养和干细胞条件培养基悬浮培养。干细胞培养基悬浮细胞培养 6d 得到非粘附三维克隆性生长的肿瘤球,第 3 代球细胞用于随后的药效学和分子机制实验。

1.2 试剂与抗体

白杨素购自美国 Sigma-Aldrich 公司。鼠抗人 CD133、CD44 单克隆抗体为美国 Santa Cruz Biotechnology 公司产品;鼠抗人 β -actin、CK2 α 、Gli1 单克隆抗体源自美国 Sigma-Aldrich 公司。CK2 α siRNA

(ON-TARGET plus SMARTpool) 和乱序对照 siRNA 购自美国 Thermo Scientific 公司。

1.3 球形形成试验

按照文献^[1,5,6]描述的方法和步骤,细胞用无血清干细胞条件培养基以 1000 个/mL 的密度每孔 1.0 mL 接种于 24 孔超粘附培养板,培养 6 d,计数每孔肿瘤球数。球形形成率计算公式如下:球形形成率(100%) = 每孔肿瘤球均数/接种活细胞总数(1000 个细胞) \times 100%。

1.4 Western Blot

参照文献^[1,5,6]描述的方法获得细胞总提取物。细胞裂解液经 $13200 \times g$, 4°C 下离心 5 min,用 Bradford 试剂盒测定蛋白质含量。以 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,转移至 PVDF 膜上。用 5% BSA(牛血清蛋白)室温封闭膜 1.5 h。然后用相应的一抗 4°C 孵育膜过夜,用 5% BSA 溶液稀释抗体。之后,用 Tris 缓冲液(TBS; pH 7.4)洗涤膜,并与相应的连接辣根过氧化物酶(HRP)的二抗室温孵育 2 h。用增强型化学发光试剂盒(Amersham Biosciences)检测蛋白表达。

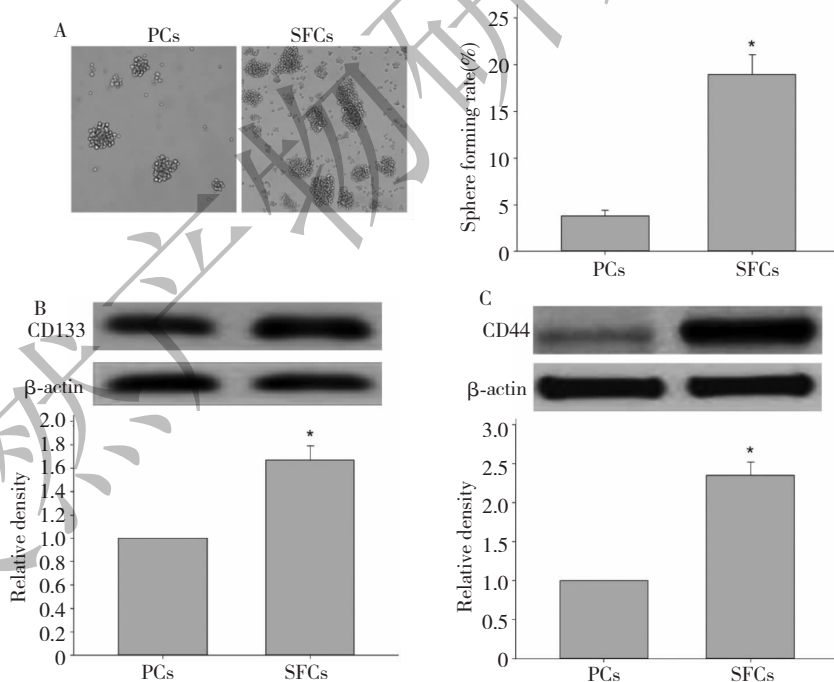


图1 源自人肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞的肿瘤干细胞鉴定

Fig. 1 Characteristics of cancer stem cells in spheroids derived from human hepatoma carcinoma SMMC-7721 cell line

注: A: 人肝癌细胞系 SMMC-7721 第 3 代球细胞和亲本细胞球形形成率的比较(放大倍数:100); B 和 C: 人肝癌细胞系 SMMC-7721 第 3 代球细胞和亲本细胞 CD133(B) 与 CD44(C) 蛋白表达比较。 β -肌动蛋白用作加样对照。数据为 3 次独立实验的均数 \pm 标准差。* $P < 0.05$

Note: A: Comparison of sphere formation rate between SFCs and PCs from SMMC-7721 cell line (100 \times); B and C: Comparison of CD133 (B) and CD44 (C) protein expression between SFCs and PCs from SMMC-7721 cell line (100 \times). β -actin was used as the loading control. Data are presented as the mean \pm S. D. of three independent experiments. * $P < 0.05$ vs PCs.

1.5 统计学分析

各组实验数据录入 SPSS 20.0 软件建立数据库,用 $\bar{x} \pm SD$ 表示。采用 One Way ANOVA 方差分析。首先进行方差齐性检验,在方差齐性时,多组均数比较采用 LSD 法;在方差不齐时,多组均数间比较采用 Tukey's 检验。 $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 实验结果

2.1 SMMC-7721 细胞系球细胞的干细胞特性鉴定

球形成法测定人肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞的球形成率,图 1A 表明:SFCs 的球形成率($37\% \pm 4\%$)较亲本细胞(parental cells,PCs)高了近三倍($P < 0.05$)。Western blot 分析 SMMC-7721 细胞系

球细胞与亲本细胞表面标志物 CD133 和蛋白 CD44 蛋白表达水平。结果如图 1B、C 所示:球细胞高表达干细胞表面标志物 CD133 和 CD44 蛋白。

2.2 白杨素对 SMMC-7721 细胞系球细胞的干细胞特性的影响

球形成法测定结果表明:不同浓度白杨素(终浓度为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)显著降低人肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞的球形成率(图 2A)。Western blot 分析结果显示:不同浓度白杨素(终浓度为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)显著降低 SMMC-7721 细胞系球细胞 CD133(图 3B)和 CD44(图 3C)蛋白表达水平。这些结果说明:白杨素具有抑制 SMMC-7721 细胞系球细胞肝癌干细胞样特性作用。

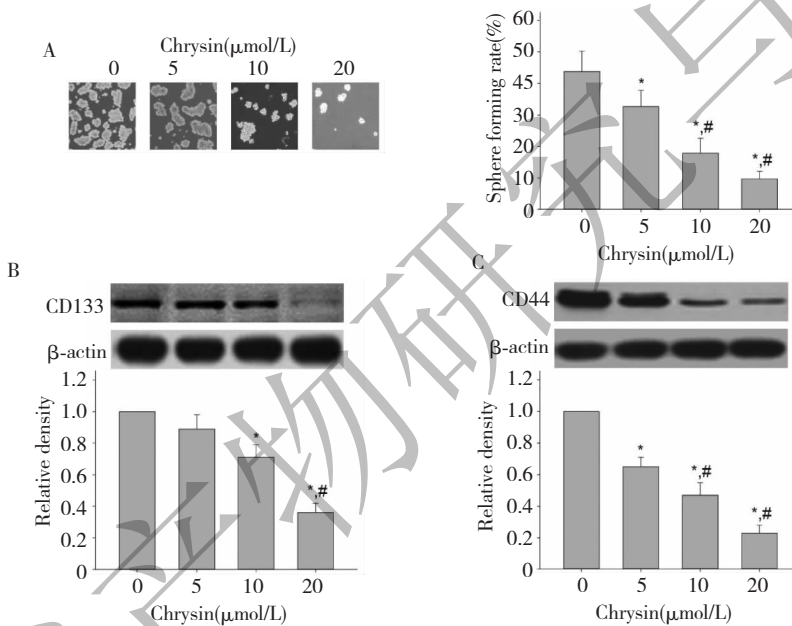


图2 白杨素对人肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞干细胞特性的影响

Fig. 2 Effects of chrysin on cancer stem cell characteristics in spheroids from human hepatoma carcinoma SMMC-7721 cell line. Note: A: 球形成法测定白杨素(0、5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{mol/L}$)处理 SMMC-7721 细胞系球细胞的球形成率。B 和 C: western blot 分析白杨素(0、5.0、10.0 和 20.0 $\mu\text{mol/L}$)处理球细胞 CD133(B)和 CD44(C)蛋白表达情况。 β -肌动蛋白用作加样对照。数据为 3 次独立实验的均数 \pm 标准差。与溶媒对照组比较, * $P < 0.05$; 与 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 白杨素处理组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: A: Sphere forming rate of spheroids from SMMC-7721 cell line treated with chrysin (0, 5.0, 10.0 and 20.0 $\mu\text{mol/L}$) using sphere formation assay. B and C: Expressions of CD133 (B) and CD44 (C) protein of spheroids treated with chrysin (0, 5.0, 10.0 and 20.0 $\mu\text{mol/L}$) was analyzed by western blotting. β -actin was used as the loading control. Data are presented as the mean \pm S. D. of three independent experiments. * $P < 0.05$, vs vehicle (0.1% DMSO) group; # $P < 0.05$, vs 5.0 $\mu\text{mol/L}$ chrysin treatment group

2.3 白杨素对 SMMC-7721 细胞系球细胞 CK2 α 和 Gli1 蛋白表达的影响

Western blot 分析显示人肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞高表达 CK2 α (图 3A)和 Gli1(图 3B)蛋白;不同浓度白杨素(终浓度为 5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)

处理显著降低球细胞 CK2 α (图 3C)和 Gli1(图 3D)蛋白表达水平。

2.4 CK2 α siRNA 转染对白杨素抑制 SMMC-7721 细胞系球细胞 CK2 α 和 Gli1 蛋白表达作用

Western blot 分析结果表明:与乱序对照(Cont)

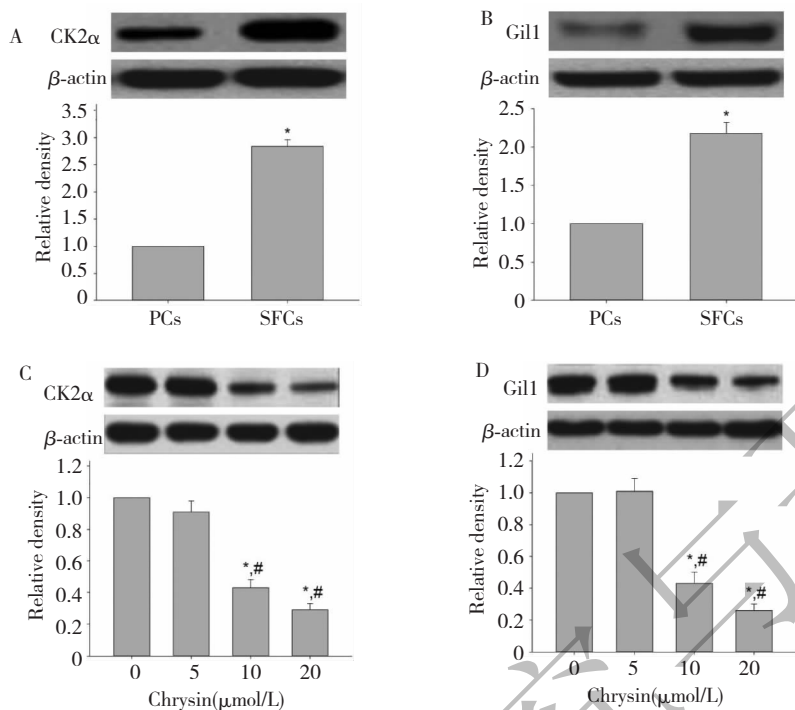


图3 白杨素对 SMMC-7721 细胞系球细胞 CK2α 和 Gli1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of chrysin on protein expression of CK2α and Gli1 in spheroids from SMMC-7721 cell line

注: A 和 B: Western blot 分析 SMMC-7721 细胞系球细胞和亲本细胞 CK2α (A) 和 Gli1 (B) 蛋白表达情况。β-肌动蛋白用作加样对照。数据为 3 次独立实验的均数 ± 标准差。与亲本细胞相比: * $P < 0.05$ 。C 和 D: Western blot 分析白杨素 (0、5.0、10.0 和 20.0 μmol/L) 处理球细胞 CK2α (C) 和 Gli1 (D) 蛋白表达情况。β-肌动蛋白用作加样对照。数据为 3 次独立实验的均数 ± 标准差。与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$; 与 5.0 μmol/L 白杨素处理组比较: # $P < 0.05$

Note: A and B: Comparison of CK2α (A) and Gli1 (B) protein expression between the spheroids and the parental cells from SMMC-7721 cell line was analyzed by western blotting. β-actin was used as the loading control. Data are presented as the mean ± S. D. of three independent experiments. * $P < 0.05$, vs PCs. C and D: The protein expression of CK2α (C) and Gli1 (D) in spheroids treated with chrysin (0, 5.0, 10.0 and 20.0 μmol/L) was analyzed by western blotting. β-actin was used as the loading control. Data are presented as the mean ± S. D. of three independent experiments. * $P < 0.05$, vs vehicle (0.1% DMSO) group; # $P < 0.05$, vs 5.0 μmol/L chrysin treatment group.

siRNA 转染细胞比较, CK2α siRNA 转染下调 CK2α 和 Gli1 蛋白表达; 同时, CK2α siRNA 转染协同增强白杨素 (5.0 μmol/L) 降低人肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞 CK2α 和 Gli1 蛋白表达水平作用 (图 4)。

3 讨论与结论

肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞具有自我更新、高致瘤性等肝癌干样细胞特性^[1,5,6]。我们的结果表明肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞的球形成率高于亲本细胞, 且高表达肿瘤干细胞标志物 CD133、CD44 蛋白。再次证实人肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞具有肝癌干样细胞特性。

有研究报道, 中成药蜂胶胶囊主要活性成分白杨素具有增强辐射诱导宫颈癌 HeLa 细胞系球形成

细胞凋亡作用^[7], 并有研究显示白杨素新型衍生物 8-溴-7-甲氧基白杨素逆转人宫颈癌 SiHa 细胞系球细胞上皮-间充质转化^[8]。我们的结果表明, 不同浓度白杨素显著降低细胞系 SMMC-7721 球细胞的球形成率, 同时下调肿瘤干细胞标志物 CD133、CD44 蛋白表达。这些结果说明, 白杨素具有抑制 LSCs 作用, 具有作为靶向肝癌干样细胞治疗肝癌新型药物的潜在价值。

CK2 异常表达抑制肿瘤细胞凋亡、促进肿瘤新生血管形成和增强 JAK/STAT、NF-κB、PI3K/AKT、Hsp90、Wnt 和 Hh 信号通路活化^[4]。敲除 CK2α 表达能有效地阻断 Hedgehog/Gli 信号通路, 同时, 导致人肺癌干细胞样侧群细胞减少^[4]。最近有报导人卵巢癌 SKOV3 源性球形成细胞和宫颈癌 HeLa 源性球形成细胞高水平表达 CK2α 蛋白^[9,10]。我们的

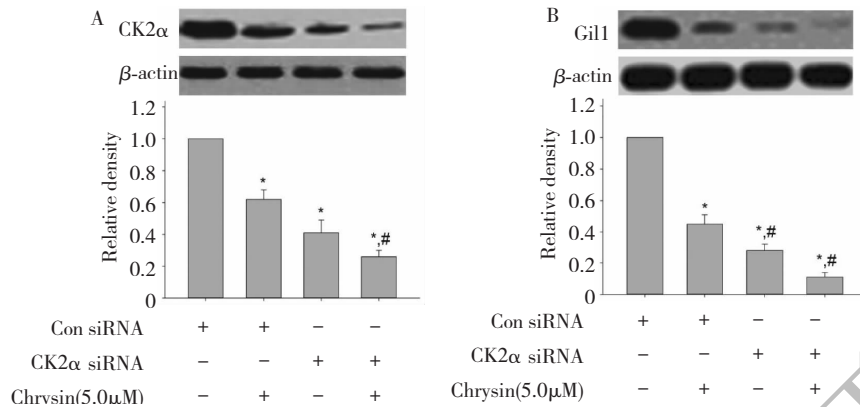


图4 CK2 α siRNA 增强白杨素抑制 SMMC-7721 细胞系球细胞 CK2 α 和 Gli1 蛋白表达作用

Fig. 4 CK2 α siRNA enhanced the inhibitory effects of chrysin on the protein expressions of CK2 α and Gli1 of spheroids from SMMC-7721 cell line

注: Western blot 分析用或不用白杨素(5.0 μ mol/L)处理或乱序对照 siRNA 或 CK2 α siRNA 转染 SMMC-7721 细胞系球细胞 CK2 α (A) 和 Gli1 (B) 蛋白表达。 β -肌动蛋白用作加样对照。数据为 3 次独立实验的均数 \pm 标准差。与乱序对照 siRNA 组比较: * $P < 0.05$; 与 5.0 μ mol/L 白杨素处理乱序对照 siRNA 组比较: # $P < 0.05$

Note: The protein expressions of CK2 α (A) and Gli1 (B) in the spheroids from SMMC-7721 cell line treated with or without chrysin (5.0 μ mol/L) or with Cont siRNA or with CK2 α siRNA transfection were analyzed by western blotting. β -actin was used as the loading control. Data are presented as the mean \pm S. D. of three independent experiments. * $P < 0.05$, vs scrambled control siRNA; # $P < 0.05$, vs scrambled control siRNA treated with 5.0 μ mol/L chrysin

结果亦证实肝癌 SMMC-7721 球细胞 CK2 激酶组成性活化。

Hh 信号通路涉及干细胞功能和特性的维持, 并已经证明其在某些肿瘤, 包括肝癌中异常激活^[11]。Hh 通路活化从 Hh 配体结合其细胞表面受体 Patched(Ptc) 开始, 然后, 导致效应蛋白, 一种 G 蛋白偶联受体 Smoothed (Smo) 抑制的解除^[12]。最后, Smo 活化 Gli 家族转录因子及其靶基因。本研究发现人肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞 Gli1 蛋白表达水平更高。提示人肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞 Hh 信号传导通路组成性激活。

我们的研究结果清楚地表明白杨素降低人肝癌细胞系 SMMC-7721 球细胞 CK2 α 和 Gli1 蛋白表达水平。进一步的干预试验发现, 联合应用白杨素处理和 CK2 α siRNA 转染协同下调球细胞 CK2 α 和 Gli1 蛋白表达。从而首次阐释了白杨素通过抑制 CK2 激酶活性阻断 Hh 信号传导通路抑制人肝癌细胞系 SMMC-7721 肝癌干细胞特性的新作用, 但确切的机制还有待进一步研究。

参考文献

1 Ren KQ(任凯群), Cao XZ(曹小正), Cao JG(曹建国), et al. 8-bromo-5-hydroxy-7-methoxychrysin targeting for inhibi-

tion of the properties of liver cancer stem cells by modulation of Twist signaling. *Int J Oncol*, 2013, 43: 1719-1729.

2 Li CM(李春梅), Liu XG(刘新光), Chen XW(陈小文), et al. Structure-activity relationship of 7 flavonoids on recombinant human protein kinase CK2 holoenzyme. *J Central South Univ, Med Sci* (中南大学学报, 医学版), 2009, 34: 20-26.

3 Zheng Y, McFarland BC, Bredel M, et al. Benveniste EN. Targeting protein kinase CK2 suppresses rosurvival signaling pathways and growth of glioblastoma. *Clin Cancer Res*, 2013, 19: 6484-6494.

4 Zhang S, Wang Y, You L, et al. Inhibition of CK2 α down-regulates Hedgehog/Gli signaling leading to a reduction of a stem-like side population in human lung cancer cells. *PLoS One*, 2012, 7: 2500-2515.

5 Zhu Z, Hao X, Li J, et al. Cancer stem/progenitor cells are highly enriched in CD133 + CD44 + population in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*, 2010, 126: 2067-2078.

6 Cao L, Zhou Y, Yin Z, et al. Sphere-forming cell subpopulations with cancer stem cell properties in human hepatoma cell lines. *BMC Gastroenterol*, 2011, 11: 71.

7 Zhou TF(周亭芳), Cao JG(曹建国), Luo Q(罗琼), et al. Chrysin enhance radiation-induced apoptosis of sphere-forming cells from cervical cancer Hela cell line. *J Hunan Normal Univ, Med Sci* (湖南师范大学学报, 医学版), 2015, 12: 1-3. (下转第 2086 页)