

植酸抗结肠癌细胞的作用及其机制

何贤禄¹, 雷 雲², 蒲玲玲^{2*}

¹成都医学院第二附属医院, 成都 610057; ²成都医学院, 成都 610500

摘要:为研究植酸(IP6)抑制结肠癌细胞增殖的作用及其机制,我们采用MTT、克隆形成及TUNEL染色检测植酸对结肠癌细胞增殖及凋亡的影响;免疫印迹(Western blot)法检测细胞凋亡相关标志蛋白cleaved-caspase3、PARP、Cyt C、Bax;自噬相关标志蛋白Beclin1、LC3、p62的表达以及自噬AKT-mTOR通路的抑制情况。结果显示植酸对结肠癌细胞HCT116具有明显的抑制作用且呈药物浓度依耐性;并且植酸通过抑制AKT-mTOR通路诱导结肠癌自噬而不影响细胞凋亡而达到抑制结肠癌增殖的效果。因此植酸通过抑制AKT-mTOR信号通路来激活细胞自噬,从而抑制结肠癌细胞的增殖。

关键词:结肠癌;植酸;自噬;AKT-mTOR信号通路;作用机制

中图分类号:R93

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)Suppl-0088-04

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.S.014

Inhibitory effects and mechanism of phytic acid in colorectal cancer cells

HE Xian-lu¹, LEI Yun², PU Ling-ling^{2*}

¹The Second Affiliated Hospital of Chengdu Medical College, Chengdu 610057, China;

²Chengdu Medical College, School of Biological Science and Technology, Chengdu 610500, China

Abstract: To investigate the effect and mechanism of phytic acid (IP6) on the proliferation of colorectal cancer cells, we performed MTT, clone formation and TUNEL staining to detect the effect of phytic acid on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells; Western blot was detected the expression of apoptosis-related proteins caspase3, PARP, Cyt C, and Bax; the autophagy-related proteins Beclin1, LC3, p62 and AKT-mTOR pathway. The results showed that phytic acid had a significant inhibitory effect with drug-dose-dependent on colorectal cancer cell HCT116; and phytic acid can inhibit colorectal cancer proliferation by inhibiting AKT-mTOR pathway to induce autophagy without apoptosis. Therefore, phytic acid activates autophagy by inhibiting the AKT-mTOR signaling pathway to inhibit the proliferation of colorectal cancer cells.

Key words: colorectal cancer cells; IP6; autophagy; AKT-mTOR signal pathway; mechanism

结肠癌是全球最为常见的恶性肿瘤之一,目前结肠癌的发病率位居第三,在全球癌症致死率居第二位^[1]。由于结肠癌复发和转移率高,常规治疗手段和药物毒副作用较大,因此寻找毒性小、安全有效的天然药物用于结肠癌治疗尤为重要。植酸(phytic acid),又名肌醇六磷酸(inositol hexaphosphate, IP6),是一种天然抗氧化剂,广泛存在于谷物,蔬菜,坚果和天然油中。曾一度被认为是抗营养因子;已有研究报道IP6对不同疾病的预防和治疗作用,大量的体内、体外实验证明植酸对多种肿瘤具有抑制作用^[2]。自噬(autophagy)在各种细胞应激条件下

诱导的高度保守的分解代谢过程,在能量或营养物短缺的情况下防止细胞损伤并促进存活^[3]。近年来大量证据表明自噬在结肠癌的发生发展过程中起重要作用^[4],然而自噬是否参与植酸对结肠癌细胞的抑制作用及其机制尚不清楚,因此本研究拟采用人结肠癌细胞HCT116,通过研究植酸诱导自噬在抑制结肠癌中的作用,从而探讨植酸抑制结肠癌分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

人结肠癌细胞HCT116(成都医学院生物医学实验教学中心,于液氮冻存);DMEM培养基(Biological Industries);胎牛血清(Biological Industries);MTT试剂;DMSO(丰源精细化工股份有限公司);

TUNEL 试剂盒; CQ; 3-MA; 蛋白质预染 Marker; PVDF 膜; Tween-20; Beclin-1、LC3、P62、Caspase3、PrAPP、Cyt C、Bax、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR、 β -actin 单克隆抗体(Santa Cruz 公司); 兔二抗(成都正能生物技术有限责任公司); 植酸。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

将人结肠癌细胞 HCT116 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 MTT、克隆形成和 TUNEL 染色法检测植酸对结肠癌细胞增殖和凋亡的影响

MTT: 将 100 μ L HCT116 细胞悬液以 1×10^5 个/mL 密度加入 96 孔板中于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 按浓度梯度 0、1、2、4、8、16、32、64、128 mmol/L 向 96 孔板中加入植酸溶液各 100 μ L, 每组设 5 个复孔, 培养 24 h。药物处理结束后, 加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT 培养箱中孵育 4 h。将 96 孔板中的液体全部吸掉, 再向每孔中加入 150 μ L DMSO, 然后将 96 孔板置于恒温振荡器上振荡 10 min, 使其充分混匀。酶标仪中测 490 nm 处的 OD 值, 检测细胞活力。

克隆形成: 以 50 个/孔细胞接种于六孔板中, 待细胞贴壁后用 2、4 mmol/L 的植酸分别处理, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 10 天, 培养结束后弃上清液, 终止培养。用 PBS 小心浸洗两次, 4% 多聚甲醛固定细胞, 去除固定液, 加入适量结晶紫染色液染色 30 min, 缓慢洗去染色液后, 空气干燥, 再于显微镜下观察计算克隆形成率。克隆形成率 = (克隆数/接种细胞) \times 100%。

TUNEL 染色: 将 500 μ L HCT116 细胞悬液加入盖玻片的 12 孔板中, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育至细胞贴壁。按浓度梯度为 0、2、4 mmol/L 的植酸加入 12 孔板中, 处理 24 h。用 4% 的多聚甲醛固定细胞后, PBS 洗涤一次, 加入 0.1% Triton X-100 的 PBS, 冰浴 2 min; 在样品上加 50 μ L TUNEL 检测液, 37 °C 避光孵育 60 min, PBS 洗涤 3 次后封片, 在荧光显微镜下观察。

1.2.3 免疫印迹 (Western blot) 法检测细胞凋亡、细胞自噬体的形成及其通路相关基因表达

收集经 0、2、4 mmol/L 的植酸处理 24 h 的 HCT116 细胞, 加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液, 冰上裂解 2 h, 4 °C、 1.3×10^4 rpm 离心 15 min, 取上清。取蛋白样品 1 μ L 于 200 μ L/孔的考马斯亮

蓝 G250 中, 酶标仪 595 nm 处测定 OD 值, 以确保蛋白的上样量一致。12% 的 SDS-PAGE 电泳后, 转膜至 PVDF 膜上, 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤三次 (5 min/次) 后, 二抗孵育 1 h, TBST 洗涤三次 (5 min/次), 加入显影液进行曝光检测蛋白表达量。

2.2.4 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析, 定量资料均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 ANOVA 单因素方差分析数据, 两两比较采用 Dunnett T 检验。检验水准 α 设定为 0.05。

2 结果与讨论

2.1 结果

2.1.1 植酸对 HCT116 细胞增殖的影响

用不同浓度植酸 (0、1、2、4、8、16、32、64、128 mmol/L) 处理结肠癌细胞 HCT116 24 h 后, MTT 检测显示植酸能促进人结肠癌细胞 HCT116 细胞活力下降, 并呈现出剂量依赖 (图 1)。根据其半抑制浓度 (IC₅₀) 作为最适浓度, 在克隆形成实验中, 以 0、2、4 mmol/L 的植酸浓度处理 HCT116 24 h, 显微镜下观察克隆形成结果, 随着植酸浓度增加, 结肠癌细胞 HCT116 单克隆数目明显减少, 抑制了结肠癌细胞增殖 (图 2)。

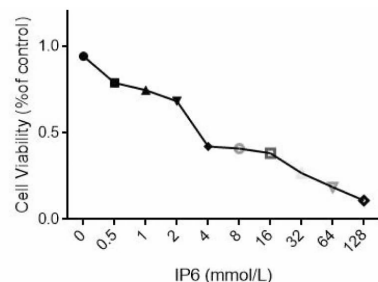


图 1 植酸对结肠癌细胞 HCT116 细胞活力的影响

Fig. 1 Effect of phytic acid on cell viability of colorectal cancer cells HCT116

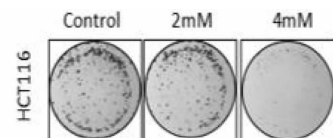


图 2 植酸对结肠癌细胞 HCT116 克隆形成的影响

Fig. 2 Effect of phytic acid on the formation of colorectal cancer cells HCT116

2.1.2 植酸对 HCT116 细胞凋亡的影响

采用 TUNEL 染色法及 Western blot 检测经 0、

2、4 mmol/L 植酸处理 HCT116 细胞 24 h 细胞凋亡情况。TUNEL 染色结果显示 HCT116 细胞在不同浓度的植酸作用下其细胞凋亡水平并未发生明显变化(图 3); Western blot 检测凋亡相关标志蛋白 cleave-caspase3、PARP、Cyt C、Bax 的表达量几乎无变化(图 4),这些结果表明植酸并非通过诱导细胞凋亡抑制结肠癌细胞。

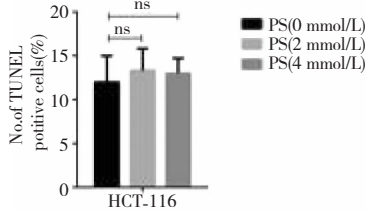


图 3 TUNEL 染色检测植酸诱发 HCT116 细胞凋亡的情况

Fig. 3 Detection of apoptosis induced by phytic acid in HCT116 cells by TUNEL Staining

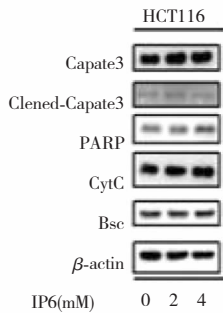


图 4 Western Blot 检测植酸诱导 HCT116 细胞凋亡相关蛋白表达

Fig. 4 Detection of expression of apoptosis-related protein in HCT116 cells by Western blot

2.1.3 植酸刺激 HCT116 细胞自噬的发生

越来越多的证据显示药物诱导的自噬是否能够诱导自噬发挥抑制结肠癌的作用。首先我们检测了自噬相关蛋白的表达水平来评估植酸对自噬体形成的影响,结果显示植酸处理结肠癌细胞 HCT116 后 Beclin1、LC3-II 的表达量增加,p62 表达量减少,植酸处理 HCT116 后诱导了自噬的发生(图 5)。然后我们通过加入自噬抑制剂氯喹(CQ)和 3-MA,CQ 抑制自噬体与溶酶体的融合,结果显示加入氯喹处理后 LC3-II 表达量明显则增加(图 6),说明植酸促进的 HCT116 细胞自噬是一个完整的自噬流过程;3-MA (PI3K 抑制剂)抑制自噬的发生,加入 3-MA 后 HCT116 细胞的存活率增加(图 7),由此我们可以得

到植酸诱导结肠癌细胞 HCT116 发生自噬从而抑制结肠癌细胞。

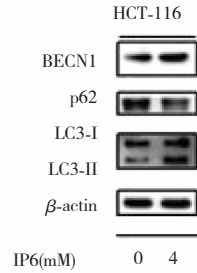


图 5 Western blot 检测植酸诱导 HCT116 细胞自噬相关蛋白表达

Fig. 5 Detection of expression of autophagy-related protein in HCT116 cells by Western blot

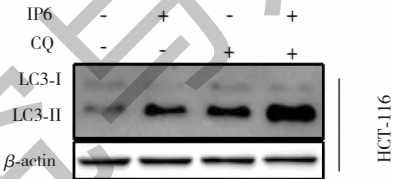


图 6 Western blot 检测植酸与 CQ 共处理后 LC3 蛋白表达

Fig. 6 Detection of expression of LC3 through co-treatment with phytic acid and CQ by Western blot

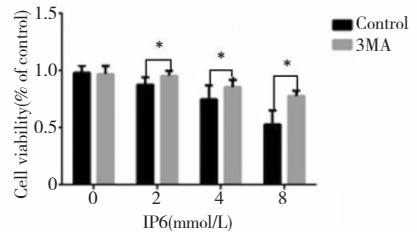


图 7 植酸与 3-MA 共处理后 HCT116 细胞活性

Fig. 7 Detection of HCT116 cell activity after co-treatment with phytic acid and 3-MA

注: * 表示与未被 3-MA 处理对比结果, $P < 0.05$ 。Note: * indicates that the result is not compared with 3-MA treatment, $P < 0.05$ 。

2.1.4 Akt/mTOR 信号通路在植酸诱导的自噬中发挥重要作用

已有研究证实 Akt/mTOR 是重要的自噬负调控因子,抑制 Akt/mTOR 信号传导能诱导自噬的发生^[6]。我们检测植酸处理结肠癌细胞 HCT116 后 Akt/mTOR 信号通路是否收到抑制,如图 8 所示,植酸处理后 Akt、mTOR 磷酸化水平减少,说明植酸阻断 Akt/mTOR 信号通路从而诱导细胞自噬。

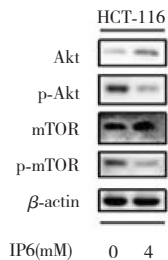


图8 Western blot 检测植酸处理 HCT116 细胞 Akt/mTOR 通路相关蛋白表达

Fig. 8 Detection of expression of Akt/mTOR signal pathway-related protein in HCT116 cells by Western blot

3 讨论

植酸作为天然的抗氧化剂, 现已用于多种疾病模型治疗^[7], 最近, 植酸由于其显著的抑制肿瘤作用而作为有希望的抗癌剂, 受到广泛的关注^[8-10]。然而, 植酸对于肿瘤的抑制机制仍不明确。在这项研究中, 我们的结果显示植酸通过抑制 Akt/mTOR 信号通路从而激活细胞抑制性自噬, 导致抑制结肠癌的生长。

自噬在肿瘤的治疗作用是多重的。通常认为自噬通过清除癌细胞中受损的细胞器和代谢物质, 供给营养物质以促进癌细胞存活^[11]。然而有研究发现某些药物引起的自噬在癌细胞中发挥抑制作用, 揭示了两种其他功能形式的自噬, 其中一种是细胞毒性功能, 导致自噬性死亡或促进细胞凋亡; 另一种是细胞抑制功能, 不依赖于细胞凋亡的形式抑制细胞增殖^[12]。

在本项研究中, 我们证明植酸诱导的自噬抑制结肠癌细胞的增殖, 但是并没有观察到细胞凋亡现象。常规的抗癌疗法主要通过诱导细胞凋亡达到治疗肿瘤的作用, 然而越来越多的证据显示癌细胞可以通过产生耐药性和细胞凋亡抗性来解除肿瘤凋亡^[13,14], 细胞抑制性自噬可以通过避免这些缺陷而抑制肿瘤生长, 作为一种潜在的治疗策略。我们的研究结果表明植酸诱导抑制性自噬抑制结肠癌细胞的生长, 为临床植酸治疗结肠癌提供理论基础。

参考文献

1 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, 68:394-424.

2 Silva EO, Bracarense A. Phytic acid: from antinutritional to multiple protection factor of organic systems[J]. J Food Sci, 2016, 81:R1357.

3 Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19:349-364.

4 Li J, Hou N, Faried A, et al. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colorectal cancer *in vitro* and *in vivo* model[J]. European J Cancer, 2010, 46:1900-1909.

5 Liu R, Li J, Zhang T, et al. Itraconazole suppresses the growth of glioblastoma through induction of autophagy: involvement of abnormal cholesterol trafficking. [J]. Autophagy, 2014, 10:1241-1255.

6 Heras-Sandoval D, Pérez-Rojas JM, Hernández-Damián J, et al. The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration[J]. Cell Signal, 2014, 26:2694-2701.

7 Zhou JR, Jr JWE. Phytic acid in health and disease[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 1995, 35:495-508.

8 Barahúie F, Dorniani D, Saifullah B, et al. Sustained release of anticancer agent phytic acid from its chitosan-coated magnetic nanoparticles for drug-delivery system [J]. Int J Nanomed, 2017, 12:2361-2372.

9 Wang K, Gao X, Tian W, et al. Effect of phytic acid ketone on expression of HPV16/18 E6/E7 mRNA and protein in human cervical cancer cell line[J]. Shandong J Med, 2016, 7:10-12.

10 Midorikawa K, Murata M, Oikawa S, et al. Protective effect of phytic acid on oxidative DNA damage with reference to cancer chemoprevention [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2001, 288:552.

11 Fulda S, Kögel D. Cell death by autophagy: emerging molecular mechanisms and implications for cancer therapy[J]. Oncogene, 2015, 34:5105-5113.

12 Gewirtz DA. The four faces of autophagy: implications for cancer therapy[J]. Cancer Res, 2014, 74:647-651.

13 Indran IR, Tufo G, Pervaiz S, et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1807:735-745.

14 Das CK, Linder B, Bonn F, et al. BAG3 overexpression and cytoprotective autophagy mediate apoptosis resistance in chemoresistant breast cancer cells [J]. Neoplasia, 2018, 20:263.