

# 通关藤苷 G 通过 ATM-CHK2-p53 信号通路 抑制结直肠癌细胞增殖

王恺纯<sup>1</sup>, 徐勤芬<sup>1</sup>, 刘 微<sup>2</sup>, 胡道德<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>上海交通大学附属第一人民医院临床药学科; <sup>2</sup>南京医科大学附属上海一院临床医学院临床药学科, 上海 200080

**摘要:**为了探讨通关藤苷 G (tenacissoside G, TG) 对人结直肠癌细胞增殖的影响及其分子机制, 本研究采用 CCK-8 和平板克隆检测通关藤苷 G 对结直肠癌 RKO 和 LoVo 细胞增殖水平的影响, 并利用流式细胞仪观察细胞周期变化、彗星实验检查 DNA 损伤情况、免疫荧光检测  $\gamma$ -H2AX 表达水平以及 Western blot 检测细胞周期与 DNA 损伤相关蛋白表达。实验结果显示, TG 作用于细胞 48 h 后,  $IC_{50}$  分别为 91.71 (RKO) 和 88.34 (LoVo)  $\mu$ M, 可显著抑制结直肠癌细胞增殖; TG 作用于细胞 48 h 后, 细胞在 G0/G1 期比例显著上升 ( $P < 0.01$ ), 周期相关蛋白 CDK2、CDK4、CDK6、Cyclin D1、Cyclin E 表达水平显著下降 ( $P < 0.01$ ), DNA 损伤明显,  $\gamma$ -H2AX、cleaved PARP、cleaved Caspase 3、p-ATM、p-CHK2、p-p53 蛋白表达水平均显著上调 ( $P < 0.01$ ), 同时, p-ATM/ATM、p-CHK2/CHK2 和 p-p53/p53 均显著升高 ( $P < 0.01$ )。说明 TG 通过诱导 DNA 损伤抑制结直肠癌细胞增殖, 其作用机制可能为激活 ATM-CHK2-p53 信号通路介导的细胞凋亡和周期阻滞。

**关键词:** 通关藤苷 G; 结直肠癌; DNA 损伤; 周期阻滞; 凋亡

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2021)4-0554-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2021.4.003

## Tenacissoside G inhibits the proliferation of colorectal cancer cells via ATM-CHK2-p53 pathway

WANG Kai-chun<sup>1</sup>, XU Qin-fen<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>2</sup>, HU Dao-de<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Pharmacology, Shanghai General Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine;

<sup>2</sup>Department of Clinical Pharmacology, Shanghai General Hospital, Nanjing Medical University, Shanghai 200080, China

**Abstract:** To explore the effects and molecular mechanisms of tenacissoside G (TG) on the proliferation of colorectal cancer, we determined the proliferation inhibitory effects of TG on colorectal cancer (CRC) cell lines RKO and LoVo by CCK-8 assay and colony formation. After 48 h treatment of TG, flow cytometry was used to analyze the cell cycle distribution of CRC cell lines; the comet assay and immunofluorescence were adopted to detect the DNA damage degree and the expression level of  $\gamma$ -H2AX; and the expression level of cell cycle and apoptosis related proteins was detected by Western blot. The results showed that TG significantly inhibited the proliferation and colony formation of RKO and LoVo in a dose and time dependent manner. After 48 h treatment of TG, the  $IC_{50}$  values of TG on RKO and LoVo were 91.71 and 88.34  $\mu$ M respectively; the proportion of cells of G0/G1 phase significantly increased ( $P < 0.01$ ) and marked DNA damage was detected with an obvious increase in the expression of  $\gamma$ -H2AX. The expression of cell cycle related proteins including CDK2, CDK4, CDK6, Cyclin D1, and Cyclin E was remarkably downregulated ( $P < 0.01$ ), however, the expression of cleaved Caspase3, cleaved PARP, p-ATM, p-CHK1, and p-p53 was remarkably upregulated ( $P < 0.01$ ). Meanwhile, p-ATM/ATM, p-CHK2/CHK2 and p-p53/p53 were significantly increased ( $P < 0.01$ ). In conclusion, TG exerted proliferation inhibition through DNA damage, which further activated cell cycle arrest and apoptosis mediated by ATM-CHK2-p53 signaling pathway.

**Key words:** tenacissoside G; colorectal cancer; DNA damage; cell cycle arrest; apoptosis

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 作为常见的恶性肿瘤之一, 其发病率位居全球第三, 死亡率位居全球第二<sup>[1]</sup>。虽然诊断与治疗的进步延长了部分患者的生命, 但是, 患者 5 年生存率仍只有 64%<sup>[2]</sup>, 这一数据与 10 年前相比无明显变化。目前, 结直肠癌的主要治疗手段为手术结合放化疗, 其严重的副作用使患者生活质量明显下降。近年来, 相关研究发现, 天然药物在抑制结直肠癌增殖、减轻放化疗毒副作用方面具有一定优势, 是结直肠癌治疗的重要手段之一<sup>[3,4]</sup>。

通关藤药材 (*Marsdenia tenacissima* (Roxb.) Wight et Arn) 是萝藦科植物通关藤的藤茎, 主要产自云南、贵州等省份。研究发现, 通关藤药理作用较为广泛, 具有抗癌、平喘、免疫调节、降压、止痛、利尿以及缓解放化疗导致的肿瘤患者白细胞下降等作用<sup>[5]</sup>。此外, 临床上亦将其用于治疗胃癌、肺癌、肝癌、白血病等多种肿瘤, 疗效较为显著。有研究证明, 通关藤总皂苷具有抗肝癌细胞增殖作用<sup>[6]</sup>, 是其主要抗癌活性成分。通关藤苷 G (tenacissoside G, TG) 化学结构式如图 1 所示, 是通关藤总皂苷中成分之一。有研究报道, TG 可能为通关藤中治疗非小细胞肺癌的主要活性成分, 通过 PI3K/Akt 等多条信号通路发挥抗肺癌作用<sup>[7]</sup>。但目前关于 TG 抗结直肠癌的作用和机制尚未见报道。本实验以人结直肠癌细胞 RKO 和 LoVo 为研究对象, 观察 TG 对结直肠癌细胞增殖活性的影响, 并对其可能的作用机制进行探究。

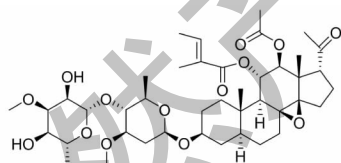


图 1 通关藤苷 G 的化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of tenacissoside G

## 1 材料与仪器

### 1.1 试验药物

通关藤苷 G (纯度  $\geq 98\%$ , 批号 HT177497), 购自宝鸡市辰光生物科技有限公司。

### 1.2 试剂与仪器

DMEM 高糖培养基、F12k 培养基、胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液、胎牛血清 (Gibco 公司); CCK-8 试剂 (MCE 公司); 细胞裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、上样缓冲液 (苏州新赛美公司); 细胞周期检测

试剂盒 (美国 BD 公司); CDK2、CDK4、CDK6、Cyclin D1、Cyclin E1、p21、cleaved Caspase 3、cleaved PARP、ATM、p-ATM、CHK2、p-CHK2、p53、p-p53、GAPDH 抗体 (美国 CST 公司); HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Mouse IgG (H + L)、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L)、CoraLite488-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) (Proteintech 公司); AL104 电子分析天平 (梅特勒-托利多仪器有限公司); 二氧化碳培养箱 (SANYO 公司); 酶标仪 (Bio-Tek 公司); ECLIPSE Ti-5 型荧光倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); BD Accuri C6 流式细胞仪 (美国 BD 公司); Tanon-5500 型化学发光凝胶成像仪器 (中国天能科技有限公司); Power PacTMBasic 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 实验方法

### 2.1 细胞培养液的配制

将 10% 胎牛血清 (V/V)、1% 青霉素-链霉素双抗溶液分别和 DMEM 高糖培养基或 F12k 培养基混匀, 在 4 °C 条件下储存, 备用。

### 2.2 细胞培养

人结直肠癌细胞 RKO (货号: TCHu116) 和 LoVo (货号: TCHu 82) 均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。复苏 RKO 和 LoVo 细胞, 置于细胞培养皿中, 加入细胞培养液, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。1 ~ 2 天更换一次培养液。取对数生长期的细胞用于实验, 细胞融合度约 90% 时用胰蛋白酶消化传代以用于后续实验。

### 2.3 细胞增殖活性检测

取对数生长期的 RKO 和 LoVo 细胞, 用新鲜培养基重悬, 调整细胞浓度为  $8 \times 10^4$  个/mL, 按每孔 100  $\mu$ L 接种于 96 孔板, 每孔设置 6 复孔。贴壁后, 设置空白组 (只加培养液)、对照组 (不加药组)、实验组 (TG 浓度为 25、50、100、200 和 400  $\mu$ M), 每孔均设 6 复孔, 分别处理 24 h 和 48 h, 结束前吸去药液, 每孔加入 10  $\mu$ L CCK-8 试剂和 90  $\mu$ L 培养液。培养箱避光培养 2 h, 置酶标仪上 450 nm 波长处检测吸光度 A。细胞活性 =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ , 实验重复 3 次。

### 2.4 平板克隆检测不同浓度通关藤苷 G 对细胞生长增殖的影响

取对数生长期的 RKO 和 LoVo, 调整细胞浓度为  $5 \times 10^3$  个/mL, 按每孔 100  $\mu$ L 接种于 6 孔板。贴壁后, 弃培养液, 加入 50  $\mu$ M 和 100  $\mu$ M TG, 放入培

养箱中继续培养 14 天。取出 6 孔板,吸弃培养液,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)润洗 3 次,加入多聚甲醛室温固定 30 min 后 PBS 洗 3 次,每孔加入 1 mL 结晶紫溶液,室温染色 30 min 后 PBS 清洗 3 次至肉眼可见紫色细胞集落。记录集落数,计算试验组和对照组集落数比值。实验重复 3 次。

## 2.5 流式细胞术检测细胞周期

取对数生长期的 RKO 和 LoVo,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,按每孔 1 mL 接种于 6 孔板。贴壁后弃培养基,设置对照组(不加药组)、实验组(TG 浓度为 50、100 和 200  $\mu\text{M}$ ),继续培养 48 h,弃去药液,胰酶消化,离心收集细胞,75% 预冷的乙醇重悬,4  $^{\circ}\text{C}$  放置过夜。PBS 清洗两遍,加入 500  $\mu\text{L}$  含 RNase 的碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色液,4  $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min,过筛,上机检测,记录激发波长 488 nm 处红色荧光。实验重复 3 次。

## 2.6 彗星实验检测细胞 DNA 损伤程度

取对数生长期的 RKO 和 LoVo,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,按每孔 1 mL 接种于 6 孔板。贴壁后弃培养基,设置对照组(不加药组)和实验组(药物组)。给药后继续培养 48 h,弃去药液,胰酶消化,离心收集细胞,PBS 重悬。将低熔点琼脂糖凝胶液化,加入稀释后的细胞悬液,混合均匀后铺在彗星载玻片透明孔上,保持水平,避光 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 15 min。将玻片置于裂解缓冲液中避光 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min,吸去裂解液,PBS 清洗后加入预冷的碱性电泳液避光 4  $^{\circ}\text{C}$  放置 30 min,20 V,300 mA 电泳 30 min。将玻片转移至干净容器中,去离子  $\text{H}_2\text{O}$  清洗 3 遍,预冷的 70% 乙醇固定 5 min。室温风干玻片,每个样品加入 100  $\mu\text{L}$  稀释好的 Vista Green DNA 染料,室温孵育 15 min。实验重复 3 次。

## 2.7 免疫荧光检测 $\gamma\text{-H2AX}$ 水平变化

取对数生长期的 RKO 和 LoVo,以每孔  $1 \times 10^4$  个细胞接种于 24 孔板中。贴壁后弃培养基,设置对照组(不加药组)和实验组(药物组)。给药后继续培养 48 h。PBS 清洗 3 遍,预冷的甲醇-20  $^{\circ}\text{C}$  固定 20 min。PBS 清洗 3 遍后,加入 0.1% 的 Triton X-100,室温孵育 15 min。PBS 清洗 3 遍后,加入牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)室温封闭 1 h。吸弃 BSA 后,加入一抗,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。含吐温的 Tris-HCl 缓冲盐溶液(Tris buffered saline with Tween 20, TBST)清洗 4 遍后加入二抗,避光室温孵

育 2 h。用 TBST 清洗 4 遍,再加入 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI),避光室温孵育 30 min。TBST 清洗 3 遍,荧光倒置显微镜观察并拍照。实验重复 3 次。

## 2.8 Western blot 检测 DNA 损伤及凋亡相关蛋白表达水平变化

取对数生长期的 RKO 和 LoVo,调整细胞浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL,按每孔 1 mL 接种于 6 孔板。贴壁后弃培养基,设置对照组(不加药组)和实验组(药物组)。给药后培养 48 h。弃培养液,PBS 洗 3 遍,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  含苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)和磷酸酶抑制剂的 RIPA 细胞裂解液,冰上裂解 30 min,收集至 1.5 mL 离心管中,离心(4  $^{\circ}\text{C}$ , 15 000 g, 10 min)取上清。用 BCA 比色测定法对细胞裂解液中蛋白含量进行定量后,加入上样缓冲液,100  $^{\circ}\text{C}$  金属浴中变性 10 min。用 10%~15% 聚丙烯酰胺 SDS 凝胶电泳蛋白样品,湿转法转至 PVDF 膜上,10% 脱脂牛奶室温封闭 1 h。一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, TBST 洗 4 次,每次 10 min。二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 4 次,每次 10 min。增强化学发光法(ECL)进行显影,ImageJ 对条带进行灰度分析。实验重复 3 次。

## 2.9 统计分析处理

统计学方法采用 SPSS Statistics 25.0 统计分析软件对数据进行分析,实验结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用单因素方差分析和  $t$  检验比较各组差异,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 TG 抑制结直肠癌细胞增殖

利用 CCK-8 法检测 TG 对结直肠癌细胞株 RKO 和 LoVo 细胞生长抑制作用,结果如图 2 所示。不同浓度 TG 分别作用细胞 24、48 和 72 h 后,RKO 和 LoVo 细胞活性受到明显抑制,且抑制效果呈时间和浓度依赖性。平板克隆实验结果同样证明 TG 对细胞的增殖抑制作用,见图 3。根据抑制率结果计算得到,TG 作用于 RKO 细胞 24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 334.68  $\mu\text{M}$ (24 h)、91.71  $\mu\text{M}$ (48 h)和 57.42  $\mu\text{M}$ (72 h);作用于 LoVo 细胞 24、48、72 h 的  $\text{IC}_{50}$  分别为 257.72  $\mu\text{M}$ (24 h)、88.34  $\mu\text{M}$ (48 h)和 63.69  $\mu\text{M}$ (72 h)。

### 3.2 TG 对结直肠癌细胞周期的影响

将 RKO 和 LoVo 细胞进行药物处理,设置 TG 浓度为 50、100 和 200  $\mu\text{M}$ ,利用流式细胞术检测细

胞周期比例变化, 结果见图 4 和表 1。与空白对照组相比较, 给药后 RKO 细胞 G0/G1 期细胞由 39.01% 增至 79.89%, LoVo 细胞 G0/G1 期细胞由 40.19% 增至 81.71%, 且呈浓度依赖性升高 ( $P < 0.05$ )。S 期细胞比例显著递减, 而 G2/M 期细胞比例无明显变化 ( $P > 0.05$ )。上述结果提示 TG 可抑制细胞 G1 期向 S 期的转化, 诱导 G0/G1 期阻滞。

利用不同浓度 TG 处理结直肠癌细胞 48 h 后, Western blot 实验结果(图 5)显示, 与对照组相比, 给药后细胞内 CDK2、CDK4 和 CDK6、Cyclin D1 和 Cyclin E 蛋白表达水平均显著下降且细胞周期抑制剂 p21 的表达水平明显上升 ( $P < 0.01$ )。表明 TG 可通过调控周期相关蛋白表达水平, 诱导结直肠癌细胞 G0/G1 期阻滞作用。

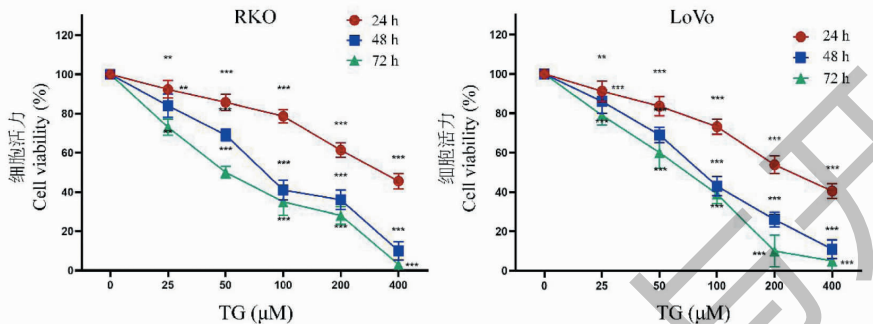


图 2 不同浓度 TG 对结直肠癌细胞增殖的影响 ( $n = 6$ )

Fig. 2 Inhibitory effect of TG on proliferation of colorectal cancer cells ( $n = 6$ )

注: 与对照组比较,  $** P < 0.01$ ;  $*** P < 0.001$ 。Note: Compared with the control group,  $** P < 0.01$ ;  $*** P < 0.001$ .

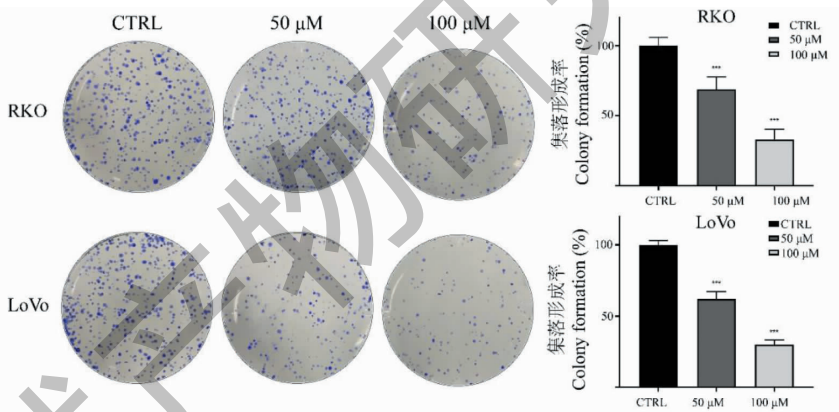


图 3 不同浓度 TG 对结直肠癌细胞集落形成的影响 ( $n = 3$ )

Fig. 3 Effect of TG on colony formation of colorectal cancer cells ( $n = 3$ )

注: CTRL 组为对照组; 与对照组比较,  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ ; 下同。Note: CTRL is the control group; Compared with the control group,  $* P < 0.05$ ,  $** P < 0.01$ ,  $*** P < 0.001$ ; The same below.

表 1 各组人结直肠癌细胞 RKO 和 LoVo 周期比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Comparison of cell cycle of human colorectal cancer RKO and LoVo cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	G0/G1 (%)		S (%)		G2/M (%)	
	RKO	LoVo	RKO	LoVo	RKO	LoVo
CTRL	39.01 ± 2.13	40.19 ± 4.17	48.03 ± 1.02	45.89 ± 3.38	11.69 ± 5.71	13.55 ± 2.89
TG(50 μM)	43.46 ± 2.55*	45.82 ± 1.68*	40.85 ± 5.54*	40.57 ± 1.74*	15.69 ± 3.49	13.61 ± 1.45
TG(100 μM)	46.48 ± 1.08**	52.02 ± 1.67**	38.31 ± 1.89**	34.01 ± 2.33***	15.11 ± 1.79	13.41 ± 1.79
TG(200 μM)	79.89 ± 1.11***	81.71 ± 3.41***	13.01 ± 2.55***	3.71 ± 1.01***	6.35 ± 2.01*	13.34 ± 2.79

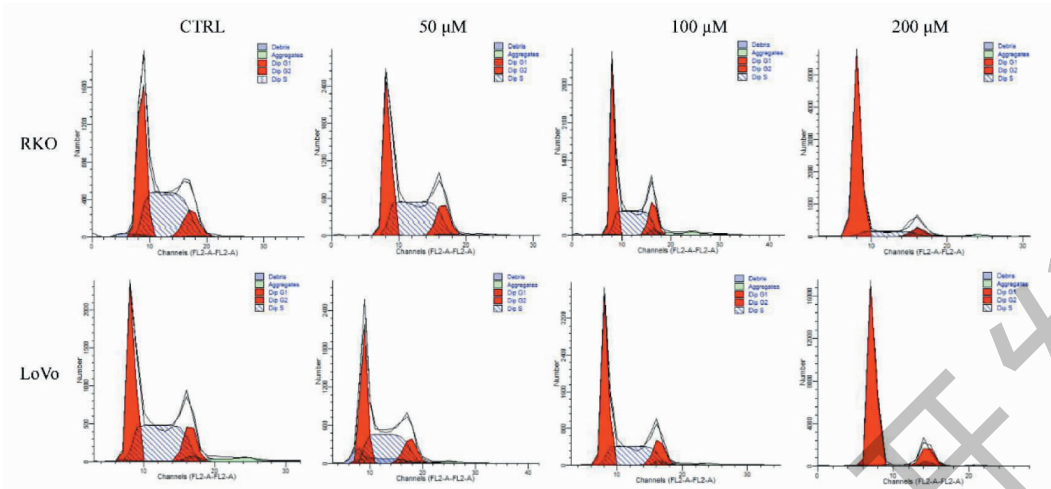


图 4 TG 对结直肠癌细胞周期的影响  
Fig. 4 Effect of TG on cell cycle of RKO and LoVo

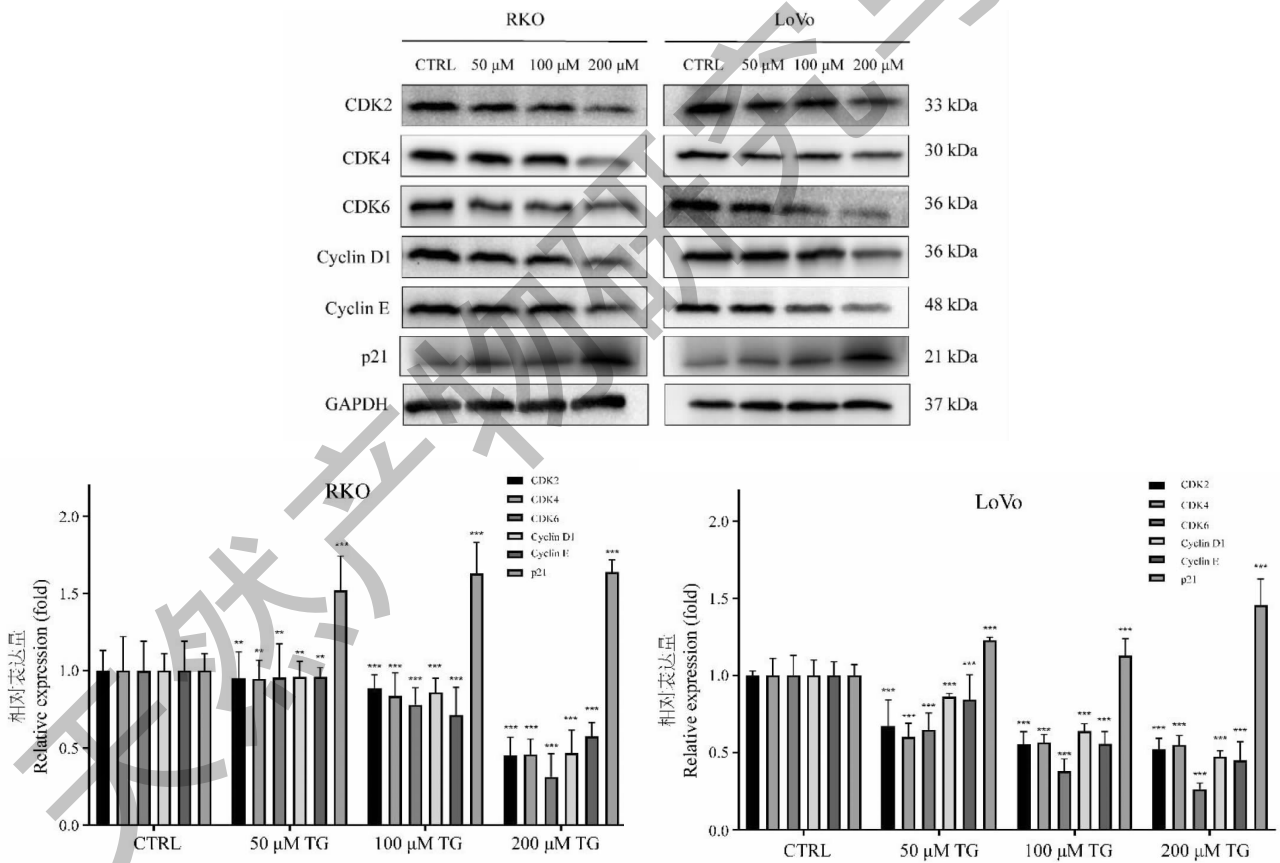


图 5 TG 对结直肠癌细胞内周期相关蛋白表达水平的影响 (n = 3)

Fig. 5 Effect of TG on the expression level of cell cycle related proteins in colorectal cancer cells (n = 3)

### 3.3 TG 诱导结直肠癌细胞 DNA 损伤

碱性彗星实验(图 6)显示,TG 可显著诱导结直肠癌细胞 DNA 损伤。不同浓度(50、100 和 200 μM)TG 处理 48 h 后,RKO 和 LoVo 细胞的彗星拖尾

显著增加,且尾部 DNA 含量由低浓度组的 45.76% (RKO) 和 43.82% (LoVo) 上升至高浓度组的 90.16% (RKO) 和 91.21% (LoVo)。与对照组 0.01% (RKO) 和 0.00% (LoVo) 的 DNA 含量相比显

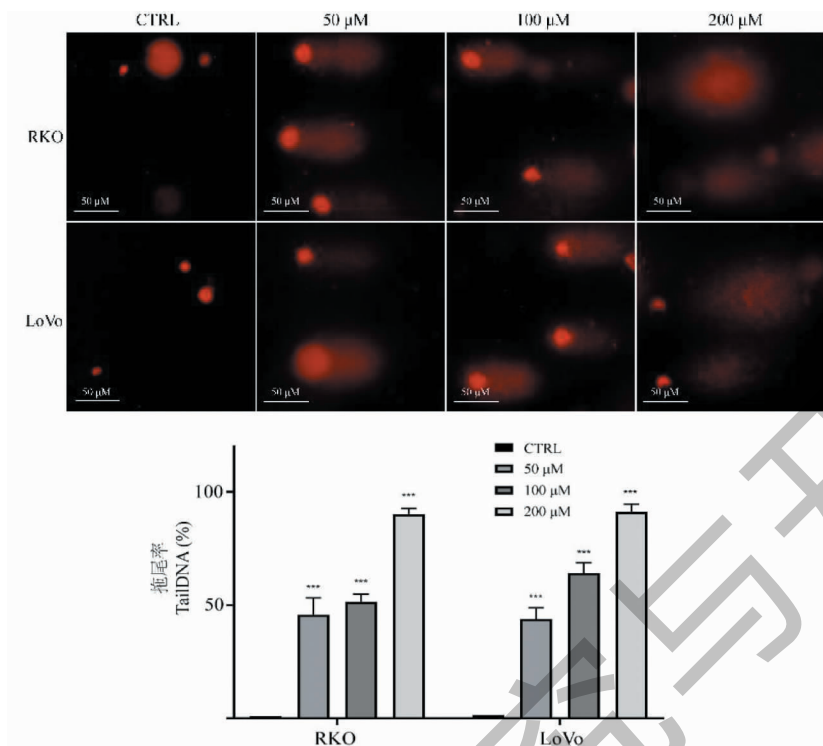


图6 彗星实验结果图及TG对细胞tailDNA含量的影响( $n=3$ )

Fig. 6 Effect of TG on DNA damage in RKO and LoVo ( $n=3$ )

著升高( $P < 0.01$ ),表明给药后细胞DNA单、双链断裂明显增多,DNA损伤水平显著升高。

### 3.4 TG促进DNA双链断裂标记蛋白的表达

利用免疫荧光染色观察给药48 h后RKO和LoVo细胞内 $\gamma$ -H2AX的分布情况。实验结果如图7,与对照组相比,给药组细胞内 $\gamma$ -H2AX阳性灶点数显著增加,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),表明TG诱导结直肠癌细胞RKO和LoVo发生DNA双链断裂。

### 3.5 TG调控ATM-CHK2-p53信号通路诱导结直肠癌细胞凋亡

Western blot实验(图8)结果显示,与对照组相比,给药48 h后内凋亡标志蛋白cleaved PARP和cleaved Caspase 3表达水平显著上升( $P < 0.001$ ),且呈浓度依赖性。为了进一步阐明TG引起凋亡的分子机制,本研究对DNA损伤应答中的关键蛋白ATM表达水平进行检测。结果(图8)显示,药物处理组细胞内ATM磷酸化水平显著升高( $P < 0.01$ )。进一步检测ATM-CHK2-p53信号通路相关蛋白的表达水平后发现,与对照组相比,p-ATM/ATM,p-CHK2/CHK2和p-p53/p53比值均显著升高,表明TG可能通过激活ATM-CHK2-p53信号通

路诱导细胞凋亡。

## 4 讨论

通关藤作为一种传统中药,临床上具有抗癌的功效。相关研究报道,通关藤提取所得的消癌平制剂对肿瘤细胞增殖有显著的抑制作用,其总皂苷提取物可诱导细胞凋亡发挥其抗癌活性作用<sup>[8]</sup>。因此,我们对通关藤的主要有效成分通关藤苷G抗结直肠癌药理作用及分子机制进行研究。实验结果显示,通关藤苷G能显著抑制结直肠癌细胞增殖,并通过诱导细胞DNA损伤、激活ATM-CHK2-p53通路,引起p53介导的周期阻滞和细胞凋亡。

维持基因组DNA的完整性对细胞的生长增殖具有至关重要的意义,然而细胞可能由于内、外部诸多物理或化学因素导致不同程度的DNA损伤。其中,DNA双链断裂是最严重的一种DNA损伤<sup>[9]</sup>。当DNA发生双链断裂时,细胞的DNA损伤应答机制使该DNA周边的H2AX组蛋白发生磷酸化,形成 $\gamma$ -H2AX<sup>[10]</sup>。 $\gamma$ -H2AX可在数分钟内在损伤处簇集形成 $\gamma$ -H2AX焦点,且焦点数量与DNA双链断裂水平呈正向对应关系,因此被公认为是DNA双链断裂的敏感性分子标记物之一。我们首先利用彗星实验对TG给药后细胞内DNA损伤情况进行检测后发

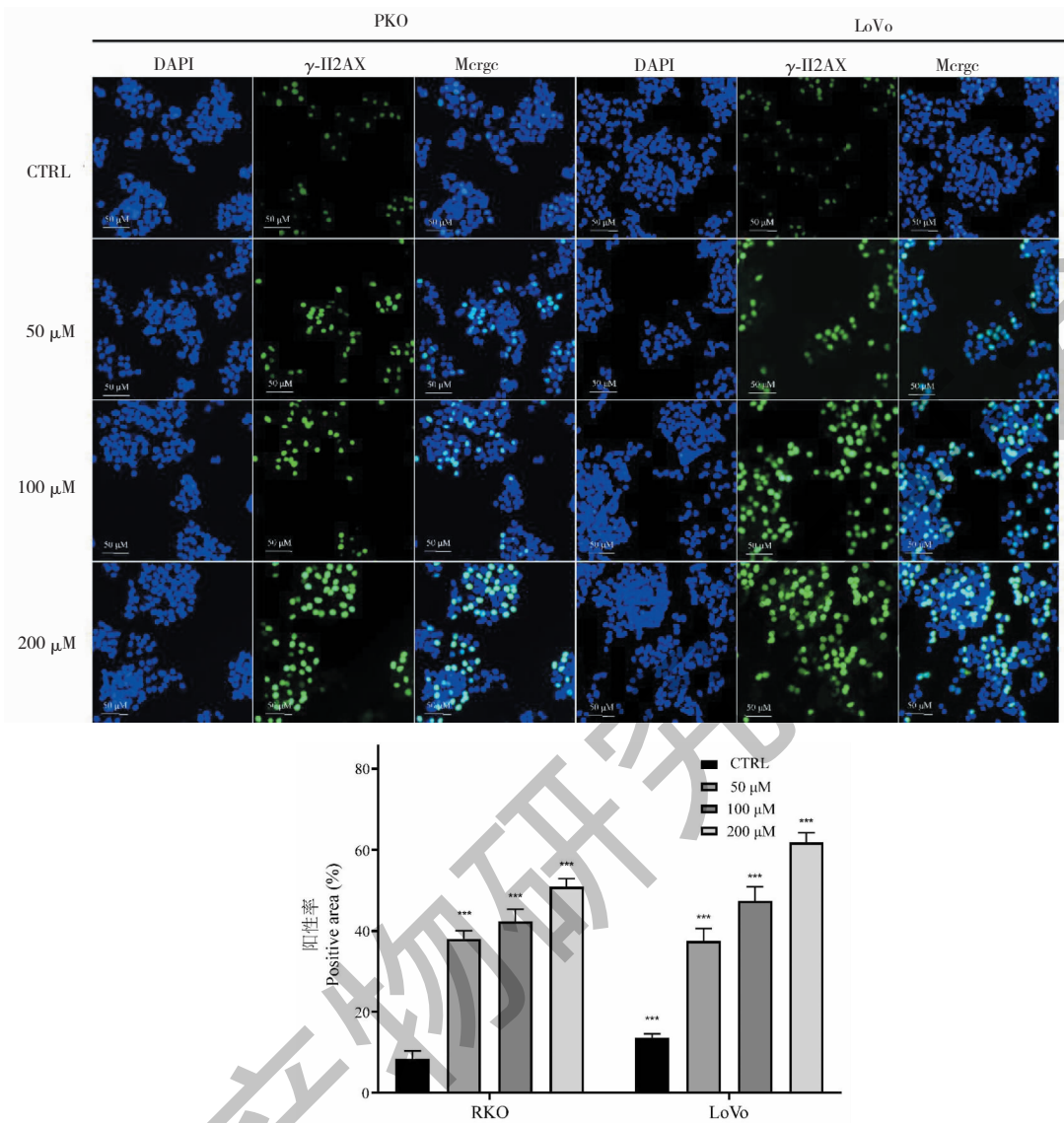


图7 免疫荧光染色检测TG对细胞内 $\gamma$ -H2AX表达水平的影响( $n=3$ )

Fig. 7 Effect of TG on the formation of  $\gamma$ -H2AX foci in colorectal cancer cells(  $n=3$  )

现,药物处理组细胞尾部DNA含量显著升高,证明TG诱导结直肠癌细胞DNA损伤的发生。此外,免疫荧光染色法结果显示,与对照组相比,药物处理组细胞内 $\gamma$ -H2AX阳性灶数量显著升高, $\gamma$ -H2AX表达水平显著上升,进一步证明了TG通过诱导DNA双链断裂引起DNA损伤。

DNA损伤应答,是生物体收到刺激而引起DNA损伤时,机体为保护细胞免受伤害而启动的DNA修饰;主要包括周期检查点的激活、DNA损伤修复以及DNA损伤诱导的细胞凋亡<sup>[11]</sup>。细胞中用于修复DNA损伤的通路复杂多样。当DNA双链断裂时,损伤感受器立即进行损伤识别,采取同源重组修复和非同源末端连接的重组修复<sup>[12]</sup>。其中,ATM蛋

白是参与细胞损伤识别和修复的关键点之一<sup>[13]</sup>,其通过上述两种途径参与DNA损伤应答。当ATM蛋白活化后,下游靶点CHK2发生磷酸化并激活p53<sup>[14]</sup>,引起细胞周期阻滞并诱导细胞凋亡<sup>[15]</sup>。其中,G1/S周期进程阻滞主要由p53诱导的细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂p21水平升高所造成<sup>[16]</sup>。流式细胞术及Western blot结果均表明,TG可通过上调p21水平并抑制周期相关蛋白CDK2、CDK4、CDK6、Cyclin D1和Cyclin E的表达,诱导细胞G0/G1期阻滞。

研究证明,ATM-CHK2-p53信号通路在DNA损伤诱导的细胞凋亡中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。结合其DNA损伤诱导作用,我们就TG对ATM-CHK2-p53

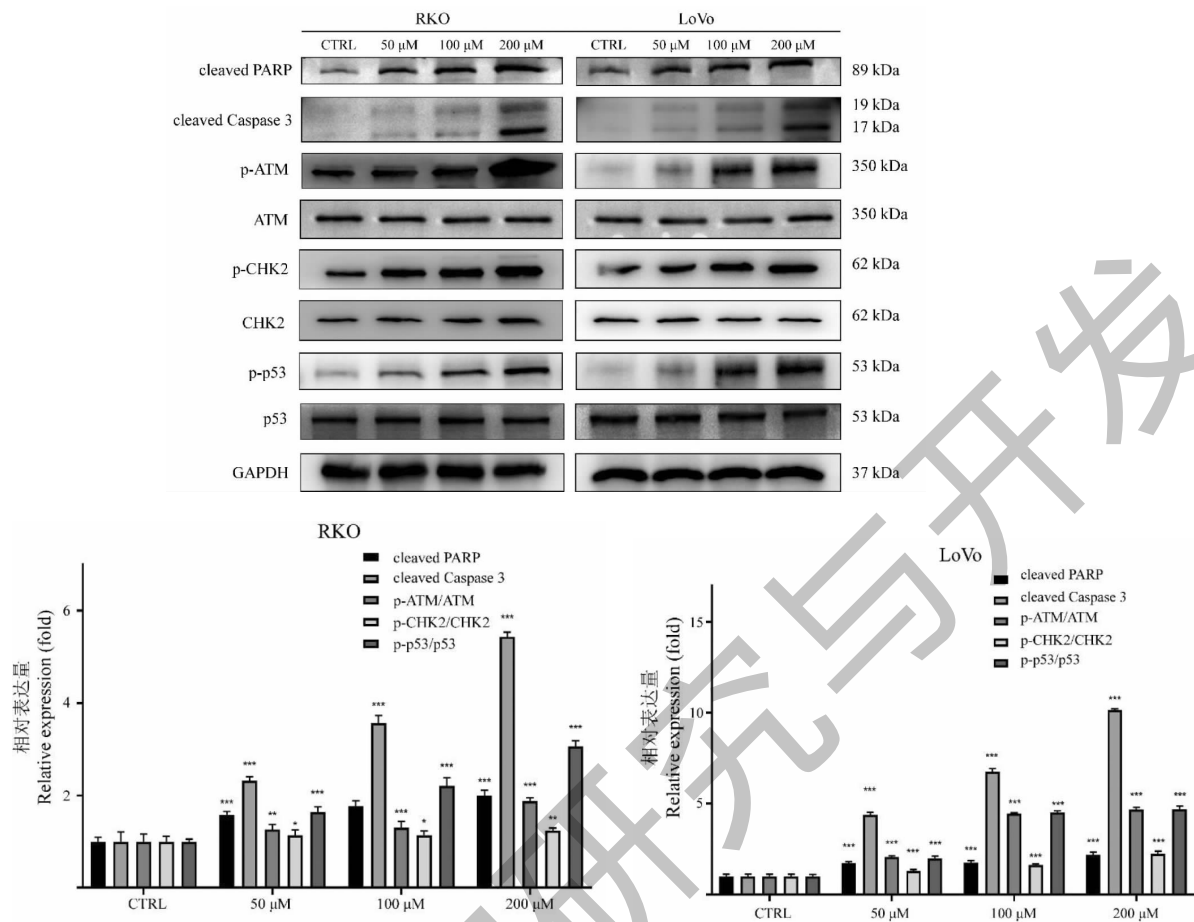


图8 TG对结直肠癌细胞内DNA损伤及凋亡相关蛋白表达水平的影响( $n=3$ )

Fig. 8 Effect of TG on the expression level of DNA damage and apoptosis related proteins in colorectal cancer cells( $n=3$ )

信号通路的调控作用进行分子机制研究。Western blot 实验结果表明, TG 给药 48 h 后, 细胞内 ATM 和 CHK2 磷酸化水平显著升高, 且 p53 蛋白表达及其磷酸化水平也显著上调。同时, 我们对细胞内凋亡标志蛋白 cleaved PARP 及 cleaved Caspase 3 进行检测后发现, 两者细胞内表达水平随给药浓度增大而显著升高, 证明 TG 对结直肠癌细胞具有凋亡诱导作用。由此可以推测, TG 处理后细胞内活化的 ATM 可能通过诱导其下游蛋白 CHK2 磷酸化, 并进一步激活 p53, 引起 p53 介导的细胞凋亡。

细胞周期抑制在抗结直肠癌细胞增殖中发挥重要作用<sup>[18]</sup>。细胞周期蛋白 (Cyclin) 和细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 在细胞周期进程中通过形成 CDK-Cyclin 复合物, 磷酸化目标蛋白实现细胞周期的调控<sup>[19]</sup>。其中, CDK2-Cyclin E 和 CDK4/6-Cyclin D1 对于细胞由 G1 期转入 S 期具有重要作用, 而 p21 对于这一周期转化进程具有抑制作用<sup>[20]</sup>。由于 TG 可通过 ATM-CHK2-p53 信号通路上调 p53 活

性, 活化后的 p53 可能通过激活 p21 从而启动 G1/S 期监测点, 诱导 G0/G1 期细胞周期阻滞。

综上所述, 本研究发现, TG 对结直肠癌细胞具有增殖抑制作用且诱导细胞 G0/G1 期阻滞与凋亡。此外, TG 可引起细胞 DNA 损伤, 激活 ATM-CHK2-p53 信号通路。因此提示 TG 可能通过调控 ATM-CHK2-p53 信号通路, 诱导 p53 介导的周期阻滞与细胞凋亡, 抑制结直肠癌细胞增殖。本研究为通关藤苷 G 治疗结直肠癌提供了一定理论基础, 其他相关作用机制有待进一步的研究。

#### 参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA-Cancer J Clin, 2020, 70:7-30.
- 2 Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2019, 394:1467-1480.
- 3 Li BL, Chen HG, Zhao C, et al. Research progress on the mechanism of Chinese medicine against colorectal cancer



- [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2020,32: 2132-2141.
- 4 Jiang Y, Wang X, Hu D. Furanodienone induces G0/G1 arrest and causes apoptosis via the ROS/MAPKs-mediated caspase-dependent pathway in human colorectal cancer cells; a study *in vitro* and *in vivo*[J]. Cell Death Dis,2017,8(5):e2815.
- 5 He LW, Lu TL, Mao CQ, et al. Chemical constituents and anti-tumor activity of *Marsdenia tenacissima*[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学),2014,31:821-824.
- 6 Chen M, Li YY, Li XR. Progress on antitumor mechanism of *Marsdenia tenacissima*[J]. Chin J Exp Med Form(中国实验方剂学杂志),2012,18:334-336.
- 7 Kang L, Miao JX, Fang XY, et al. Modern mechanism of *Marsdenia tenacissima* in the treatment of non-small cell lung cancer based on network pharmacology and molecular docking[J]. J Chongqing Univ Technol:Nat Sci(重庆理工大学学报:自科版):1-21[2021-01-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1205.t.20201120.1858.006.html>.
- 8 Chen B, Li CP, Chen JH, et al. Effect of extract from *Marsdenia tenacissima* on Jurkat, Raji and RPMI8226 cells *in vitro*[J]. Chin J Biochem Pharm(中国生化药物杂志),2009,30:174-177.
- 9 Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, et al. ROS and the DNA damage response in cancer[J]. Redox Biol,2019,25:101084.
- 10 Berthel E, Ferlazzo ML, Devic C, et al. What does the history of research on the repair of DNA double-strand breaks tell us? -a comprehensive review of human radiosensitivity[J]. Int J Mol Sci,2019,20:5339.
- 11 Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease[J]. Nature,2009,461:1071-1078.
- 12 Alhmodj JF, Woolley JF, Al Moustafa AE, et al. DNA damage/repair management in cancers[J]. Cancers,2020,12:1050.
- 13 Jin MH, Oh DY. ATM in DNA repair in cancer[J]. Pharmacol Ther,2019,203:107391.
- 14 Blackford AN, Jackson SP. ATM, ATR, and DNA-PK: the trinity at the heart of the DNA damage response[J]. Mol Cell,2017,66:801-817.
- 15 Matt S, Hofmann TG. The DNA damage-induced cell death response;a roadmap to kill cancer cells[J]. Cell Mol Life Sci,2016,73:2829-2850.
- 16 Kreis NN, Louwen F, Yuan J. The multifaceted p21 (Cip1/Waf1/CDKN1A) in cell differentiation, migration and cancer therapy[J]. Cancers,2019,11:1220.
- 17 Pitolli C, Wang Y, Candi E, et al. P53-mediated tumor suppression:DNA-damage response and alternative mechanisms[J]. Cancers,2019,11:1983.
- 18 Jiang Y, Mi YS, Wang XQ, et al. Furanodienone induces apoptosis of human colorectal cancer RKO cells[J]. Chin J New Drugs Clin Remed(中国新药与临床杂志),2018,37:223-228.
- 19 Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer[J]. Nature,2004,432:298-306.
- 20 Shamloo B, Usluer S. P21 in cancer research[J]. Cancers,2019,11:1178.

致谢:对以下合作单位参与本刊的学术建设表示由衷的感谢!

昆明医科大学药学院

西南交通大学生命科学与工程学院

西南交通大学期刊社