

基于 Hippo 信号通路的野黄芩苷抗结直肠癌 HCT116 细胞的研究

杨 寒, 任 珊, 刘茂伦, 赵 晖, 陶 秋, 唐 顺, 明天琪, 徐海波*

成都中医药大学药学院药理学 西南特色中药资源国家重点实验室, 成都 611137

摘要: 本文旨在探究野黄芩苷 (scutellarin, SCU) 对人结直肠癌 HCT116 细胞的作用及机制。不同浓度 SCU 处理人结直肠癌 HCT116 细胞, 采用显微镜观察法、MTT 法、平板克隆形成试验、细胞划痕试验、Hoechst 33342/PI 双染法、流式细胞术、qRT-PCR 以及 Western blot 等多种手段进行检测。结果显示, SCU 能明显改变 HCT116 细胞形态, 降低细胞活力; 抑制 HCT116 细胞克隆和迁移 ($P < 0.01$); 诱导细胞核致密浓染, 促进细胞凋亡, 使细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。机制研究结果表明, SCU 能显著上调 caspase-9、caspase-3 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$), 下调 Bcl-2 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.01$), 上调 Bax 的 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.01$)。此外, SCU 能明显升高 MST1、LATS1 的 mRNA 和蛋白表达量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 升高 p-YAP (Ser127) 的蛋白表达量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 降低 YAP1、TAZ 和下游靶点 c-Myc 的 mRNA 和蛋白表达量 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。综上所述, SCU 能通过调节 Hippo 信号通路的活性, 抑制 HCT116 细胞的增殖和迁移, 并诱导细胞凋亡, 从而发挥抗结直肠癌的作用。

关键词: 野黄芩苷; 结直肠癌; 增殖; 迁移; 凋亡; Hippo 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)1-0022-11

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.1.003

Suppression of colorectal cancer HCT116 cells by scutellarin via regulation of Hippo signaling pathway

YANG Han, REN San, LIU Mao-lun,
ZHAO Hui, TAO Qiu, TANG Shun, MING Tian-qi, XU Hai-bo*

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources, Department of Pharmacology, School of Pharmaceutical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: To investigate the efficacy of scutellarin (SCU) on human colorectal cancer HCT116 cells and its underlying mechanism. Colorectal cancer HCT116 cells were treated with SCU at various concentrations, followed by measurement of cell proliferation with MTT assay, clonogenic assay, wound healing assay, Hoechst 33342/PI double staining, flow cytometry analysis of apoptosis, qRT-PCR and Western blotting. The results showed that SCU reduced the proliferation of HCT116 cells with altered morphological profile. SCU markedly deterred the colony formation and migration of HCT116 cells ($P < 0.01$). Moreover, SCU triggered the apoptosis of HCT116 cells, with condensed nuclear staining and increased apoptosis rate, relative to the control ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Mechanistically, SCU significantly up-regulated the mRNA levels of caspase-9 and caspase-3 ($P < 0.01$), promoted the mRNA and protein expression of Bax ($P < 0.01$), and attenuated the mRNA and protein expression of Bcl-2 ($P < 0.01$). In addition, the mRNA and protein expressions of MST1 and LATS1, and the protein level of p-YAP (Ser127) were elevated by SCU ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), which lessened the mRNA and protein expressions of YAP1, TAZ and downstream target c-Myc in HCT116 cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Taken together, SCU may suppress the proliferation, migration and colony formation and induce cell apoptosis of colorectal cancer cells, by regulation of Hippo signaling pathway activity.

Key words: scutellarin; colorectal cancer; proliferation; migration; apoptosis; Hippo signaling pathway

收稿日期: 2022-07-21 接受日期: 2022-10-17

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573813); 四川省中医药管理局课题 (2021XYC007, 2021MS447); 四川省卫生健康委员会医学科技项目 (21PJ107)

* 通信作者 Tel: 86-28-61800231; E-mail: xuhb@hotmail.com

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是一种常见的恶性消化道肿瘤。最新癌症统计数据显示,受老龄化、饮食习惯改变、肥胖、吸烟等因素的影响,CRC 的患病率和死亡率在全球迅速上升,已分别高居第三和第二位,其中发达国家的 CRC 发病率比发展中国家高约 4 倍^[1,2]。尽管近年来 CRC 在诊断技术和治疗方法上已取得较大突破,但其五年生存率仍不足 10%。化疗是抗肿瘤治疗的基石。5-氟尿嘧啶、奥沙利铂、伊立替康等作为 CRC 治疗的常用药物,其在临床上的应用常因黏膜炎、骨髓功能抑制、脱水等毒副作用而受到限制^[3]。因此,探索 CRC 的发病机制,寻求毒副作用低、靶向性强的治疗药物依然是目前 CRC 研究的重点。

实践证明,中药在抗肿瘤治疗中具有多方面的优势,不仅能增强化疗药的疗效、降低不良反应、逆转耐药性,还能改善预后、提高患者的生活质量,而且中药中含有多种活性成分,研究表明,很多活性成分可通过影响细胞的迁移、侵袭以及凋亡等方式来发挥抗肿瘤作用^[4,5]。因此,中药及其活性成分对于肿瘤的治疗具有良好的开发前景。野黄芩苷 (scutellarin, SCU),一种黄酮类化合物,主要来源于中药半枝莲、灯盏花以及黄芩,具有抗炎、抗氧化、抗纤维化、神经保护和心脑血管保护等多种药理作用^[6]。近年的研究发现,SCU 还具有广泛的抗肿瘤活性,能抑制结直肠癌、肝癌、肺癌、食管鳞状细胞癌等多种恶性肿瘤的发生及发展,是一种潜在的抗肿瘤药物^[7]。

Hippo 信号通路是过去十年中在肿瘤研究领域广受关注的一条信号通路。研究证实,Hippo 信号通路的异常阻滞与肿瘤细胞的生存、增殖、侵袭以及耐药性的产生等密切相关^[8]。当 Hippo 信号通路被抑制时,通路的主要效应因子 Yes 相关蛋白 (Yes-associated protein, YAP)/具有 PDZ 结合基序的转录激活因子 (Transcriptional co-activator with PDZ-binding motif, TAZ) 核转位聚集到细胞核中,与 TEA 转录因子 1~4 结合,促进下游靶基因如细胞周期调节因子 cyclin E1、原癌基因 c-Myc 等转录^[9]。Hippo 信号通路在维持正常肠道内稳态以及受损组织的修复和再生中起重要作用,YAP/TAZ 高活性常作为 CRC 预后不良的独立预测因子,与肿瘤的分期、淋巴结状态和转移等呈正相关^[10]。此外,YAP/TAZ 的异常激活与 Hippo 信号通路上游调控因子的缺失有关,哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 1/2 (Mammalian

sterile 20-like kinase 1/2, MST1/2) 或大肿瘤抑制因子 1/2 (Large tumor suppressor 1, LATS1/2) 缺失可导致 YAP/TAZ 不同程度的激活^[11]。

迄今为止,SCU 抗 CRC 的作用已被获得多方面证实。有研究表明,SCU 可通过多种信号通路发挥作用,包括 Hedgehog^[12]、Wnt/ β -catenin^[13] 等。但目前还未见 SCU 通过调控 Hippo 信号通路发挥抗 CRC 作用的研究报道,因此本研究主要以结直肠癌 HCT116 细胞为体外模型,研究 SCU 对结直肠肿瘤细胞增殖、迁移以及凋亡的影响,初步探索其作用机制,为 CRC 治疗药物的开发提供参考和实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株

结直肠癌细胞株 HCT116 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药物与试剂

野黄芩苷 (成都曼思特生物技术有限公司,批号: MUST-20100910, 纯度: 98.13%); 5-氟尿嘧啶 (Merck life Science, 批号: WXBC6532V, 纯度: $\geq 99\%$); McCoy's 5A 培养基 (以色列 Biological Industries, 批号: 01-075-1 ACS 500mL); 胎牛血清 (南美) (依科赛生物科技有限公司, 批号: 20210928); 青链霉素混合液 (双抗) (武汉赛维尔生物技术有限公司, 批号: CR2111084); MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: C0009-2); RIPA 裂解液 (强) (武汉赛维尔生物技术有限公司, 批号: CR2107181); 结晶紫染液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20210922); BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司, 批号: 122120210430); 抗荧光淬灭封片液 (含 Hoechst 33342/PI) (上海碧云天生物技术公司, 批号: 121818191028); Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒 (MultiSciences, 货号: A11015); LATS1 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 00077426); MST1 (Affinity Biosciences, 批号: #10j6740); TAZ (Affinity Biosciences, 批号: #89c2601); YAP1 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 10010504); p-YAP (Ser127) (Affinity Biosciences, 批号: #36z2539); c-Myc (Affinity Biosciences, 批号: #49x79651); Bax (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 00102164); Bcl-2 (武汉三鹰生物技术有限公司, 批号: 10016705); Anti-GAPDH (武汉赛维尔生物技术有限公司, 批号: AC2111015A); HRP 标记山羊抗兔 IgG 二抗 (杭州联科生物技术有限公

司,批号:A00251);HRP 标记山羊抗鼠 IgG 二抗(武汉三鹰生物科技有限公司,批号:10010504);SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:HJ202301);牛血清白蛋白(BSA)(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:CR2108100);BeyoRT™ III cDNA 第一链合成试剂盒(上海碧云天生物技术公司,批号:06162122010);2 × Universal Blue SYER Green qPCR Master Mix(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:MPC2112039)。

1.3 主要仪器

3001 多功能酶标仪(美国 Thermo 公司);SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);DMI30008 倒置显微镜(德国 Leica 公司);CytoFLEX 流式细胞仪(Beckman coulter);QUOTQTION 电泳仪、化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);Forma3111CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司);Allegra X®-12series 离心机(美国 BECK MAN Coulter);CMT5MFV 微孔板成像系统(美国 Bio Tek 公司);CFX Connect 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养

结直肠癌细胞株 HCT116 购自中国科学院上海细胞库,培养于 37 °C、5% CO₂ 的恒温培养箱中,培养液为含 10% 胎牛血清和 1% 青霉素-链霉素的 McCoy's 5A 完全培养基。根据细胞的生长状态,2 ~ 3 d 更换新鲜培养基 1 次,待细胞生长面积达到 80% ~ 90% 时,按 1:3 的比例进行传代培养。

1.4.2 SCU 母液配制

SCU 溶于 DMSO 配制成浓度为 50 mg/mL 的母液,分装保存于 -80 °C 冰箱中,临用前用 McCoy's 5A 完全培养基稀释成不同浓度。

1.4.3 SCU 对细胞形态的影响

收集处于对数生长期的 HCT116 细胞,调整细胞密度至 1×10^6 个/mL,以 500 μL/孔的体积接种在 24 孔板中,培养过夜,吸去培养液,空白对照组(control, Con)加入含 0.28% DMSO 的培养基、给药组分别加入等体积的含 35、70、140 μg/mL SCU 和 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)(40 μmol/L)的培养基,在 37 °C、5% O₂ 的环境中继续培养 24 h 后,使用倒置荧光显微镜于明场模式下观察各组细胞的形态,并拍照记录。

1.4.4 MTT 法检测 SCU 对细胞存活率的影响

收集处于对数生长期的 HCT116 细胞,以 1×10^4 个/孔的密度接种至 96 孔板中,培养过夜,每孔加入 100 μL 不同浓度的 SCU(0、20、40、80、120、160、200、240、280、300 μg/mL)处理 24 h,吸去培养液,每孔加入 100 μL MTT(0.5 mg/mL),37 °C 避光孵育 4 h,吸除上清液,每孔加入 150 μL 二甲基亚(dimethyl sulfoxide, DMSO),摇床上避光反应 10 min,用多功能酶标仪测定波长 490 nm 处的吸光度(A),参照下面公式计算细胞存活率,并求出 SCU 给药 24 h 的半数抑制浓度(50% concentration of inhibition, IC₅₀),根据 IC₅₀ 值设置后续试验的给药浓度,实验重复 6 次。

细胞存活率 =

$$\left[\frac{(A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})} \right] \times 100\%$$

1.4.5 平板克隆形成实验

收集处于对数生长期的 HCT116 细胞,按照 1×10^3 个/孔的密度接种在 6 孔板中,细胞贴壁生长 3 d 后,按“1.4.3”项下分组并分别加入 2 mL 含 0.28% DMSO 和不同浓度药物的培养基,继续在 37 °C、5% CO₂ 的环境中培养 7 d,期间更换培养基 3 次。结束后,吸除培养基,PBS 洗涤 2 次,用 4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,PBS 清洗 2 次,用 0.5% 的结晶紫染液染色 30 min,染色结束后用 PBS 清洗至背景干净,自然风干,拍照。

1.4.6 细胞划痕实验

收集处于对数生长期的 HCT116 细胞,以 5×10^4 个/mL 的密度、500 μL/孔的体积接种至 24 孔板中,每组设 4 个复孔,培养过夜,用 200 μL 移液器枪头的尖端垂直于细胞培养板底部划出十字形的划痕,PBS 清洗后按“1.4.3”项下分组并分别加入 500 μL 含 0.28% DMSO 和不同浓度药物的无血清培养基,并分别于 0、24、48 h 时置于荧光倒置显微镜下成像,记录细胞划痕的愈合情况,使用 Image J 软件测定划痕面积,以 0 h 划痕面积为基准,计算各组细胞 24 h 和 48 h 的划痕愈合率。

1.4.7 Hoechst 33342/PI 双染法观察 SCU 对 HCT116 细胞凋亡的影响

收集处于对数生长期的 HCT116 细胞,以 1×10^6 个/mL 的密度,1 mL/孔的体积接种于 6 孔板中,培养过夜,按“1.4.3”项下分组并分别加入 2 mL 含 0.28% DMSO 和不同浓度药物的培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的环境中培养 24 h。结束后,吸除培养

基, PBS 清洗, 每孔加 100 μL 含 Hoechst 33342/PI 的抗荧光淬灭封片液, 于微孔板成像系统中观察并拍照记录各组细胞的凋亡情况。

1.4.8 流式细胞术检测 SCU 对 HCT116 细胞凋亡率的影响

采用 Annexin V-FITC 凋亡试剂盒测定 SCU 对 HCT116 细胞凋亡的影响。收集处于对数生长期的 HCT116 细胞, 将细胞浓度调整至 2×10^6 个/mL, 以 1 mL/孔的体积接种在 6 孔板中, 每组 3 个复孔, 待细胞贴壁后, 吸除培养液, 按“1.4.3”项下分组并分别加入 2 mL 含 0.28% DMSO 和不同浓度药物的培养基, 于孵箱中继续培养 24 h。收集细胞, 并用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 300 g 离心 5 min, 弃上清; 从样品管中分出小部分细胞, 设置 1 管空白管和 2 管单染管; 再用预冷 PBS 清洗细胞 1 次, 离心后弃上清, 加入 500 μL 预冷的 $1 \times$ Binding Buffer 工作液重悬细胞; 每管样本管加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI 染色液, 2 管单染管中分别加入 5 μL Annexin V-FITC 或 10 μL PI, 轻轻涡旋后混匀, 室温避光孵育 5 min; 打开流式细胞仪, 用空白管调节 FSC、SSC、FITC

和 PI 通道的电压, 在此电压条件下, 用单染管调节 FITC 和 PI 之间的补偿, 然后上机样本。

1.4.9 qRT-PCR 检测 SCU 对 HCT116 细胞凋亡及通路相关 mRNA 表达的影响

收集处于对数生长期的 HCT116 细胞, 以 1×10^6 个/mL 的密度、1 mL/孔的体积接种到 6 孔板中, 培养过夜, 按“1.4.3”项下分组并分别加入 2 mL 含 0.28% DMSO 和不同浓度药物的培养基, 于孵箱中继续培养 24 h, 提取各组细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度, 并按照逆转录和扩增试剂盒说明书, 将 RNA 逆转录为 cDNA 后进行扩增, PCR 反应程序为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 共进行 40 个循环。每组 4 个复孔, 以 β -actin 为内参采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法计算各 mRNA 的相对表达量, 所得数据进行归一化处理。基于 National Center for Biotechnology Information (NCBI) 数据库的基因词典, 查阅相关基因信息, 寻找合适的外显子基因序列, 采用 Blast 检测引物的特异性。引物合成来自上海生工生物工程股份有限公司和北京擎科生物技术有限公司, 引物序列见表 1。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Table 1 Real-time quantitative PCR primer sequences

基因 Gene	引物序列 Sequence of primer	产物长度 Product length (bp)
β -actin	F: 5'-CATGAAGTGTGACGTGGACATC-3' R: 5'-CAGGAGGAGCAATGATCTTGATC-3'	155
MST1	F: 5'-GGTCCAATGCGGAGGAATAC-3' R: 5'-CGGCAATAGTTGTCGTCCAG-3'	141
LATS1	F: 5'-TACTATCAGAGTGGTGACCATCCACG-3' R: 5'-AGAATGTGCTAGACATCGCTGCTG-3'	147
YAP1	F: 5'-CCCTCGTTTTGCCATGAACC-3' R: 5'-GTTGCTGCTGGTTGGAGTTG-3'	122
TAZ	F: 5'-TGGACCAAGTACATGAACCACC-3' R: 5'-CTGGTGATTGGACACGGTGA-3'	108
c-Myc	F: 5'-GCCACTCTGAGGAGGAACAAGAAG-3' R: 5'-CGTAGTTGTGCTGATGTGTGGAGA-3'	136
Bax	F: 5'-ATGATTGCCGCCCTGGACACAG-3' R: 5'-ACAGGGCCTTGAGCACCAGTTTG-3'	142
Bcl-2	F: 5'-TGGGTCATGTCTGTGGAGA-3' R: 5'-TAACACAAGGGCATCCCAGC-3'	139
caspace-3	F: 5'-CCGTGATGTTTCTAAAGAAGATCACAGC-3' R: 5'-GGGTTTTCCAGTTAGACTTCTACAACGA-3'	166
caspace-9	F: 5'-AGCAGAAAGACCATGGGTTTGAAGG-3' R: 5'-CCTCCAGGAAACAAAACCTGGGAA-3'	197

1.4.10 Western blot 检测 SCU 对 HCT116 细胞凋亡及通路相关蛋白表达的影响

收集处于对数生长期的 HCT116 细胞, 以 $1 \times$

10^6 个/mL 的密度、1 mL/孔的体积接种至 6 孔板中, 培养过夜, 按“1.4.3”项下分组并分别加入 2 mL 含 0.28% DMSO 和不同浓度药物的培养基继续培养

24 h, 提取各组细胞蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白样本, 然后依次进行湿法转膜、封闭、一抗孵育、二抗孵育。结束后, 化学发光成像系统显影, 以 GAPDH 为内参, 采用 Image Lab 3.0 软件对蛋白条带进行定量分析。

1.4.11 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学分析, 实验均独立重复 3 次及以上, 所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析, 方差齐时用 LSD 检验, 方差不齐时用 Tamhane T2 和 Dunnet T3 检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。统计图采用

GraphPad Prism 8.0 软件绘制。

2 结果

2.1 SCU 对 HCT116 细胞形态的影响

如图 1 所示, 使用倒置荧光显微镜于明场模式下观察 SCU 处理对 HCT116 细胞形态的影响, 结果表明, 空白对照组中的 HCT116 细胞形态清晰可见, 贴壁生长良好, 胞体饱满。给予 SCU 和阳性药 5-Fu 处理后, HCT116 细胞的贴壁能力明显降低, 细胞皱缩变圆, 且随着 SCU 浓度的增加, 细胞皱缩和碎片化的比例也明显增加, 提示 SCU 能诱导 HCT116 细胞形态的改变。

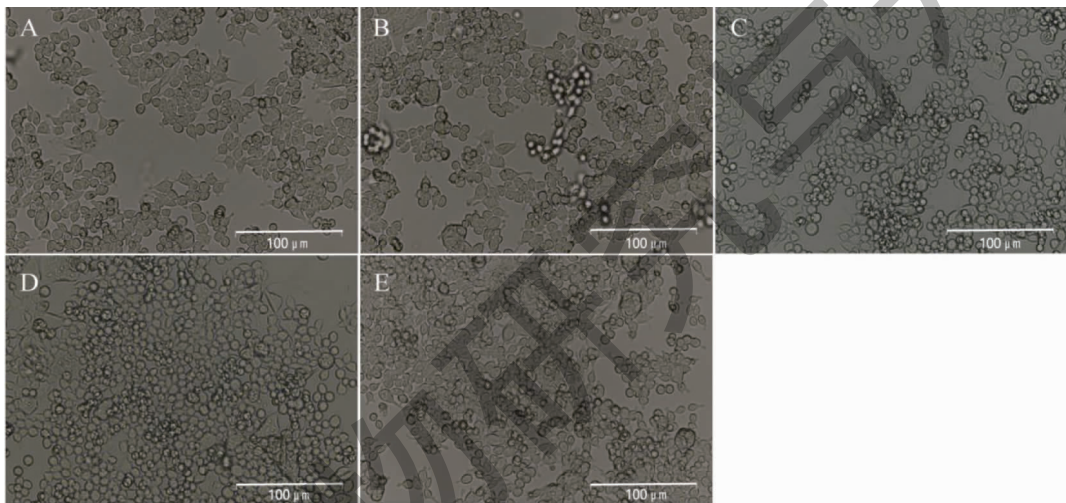


图 1 SCU 对 HCT116 细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of SCU on morphology of HCT116 cells

注: A. 空白对照组; B. SCU 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; C. SCU 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; D. SCU 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组; E. 5-Fu 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 组。Note: A. Control; B. SCU 35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; C. SCU 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; D. SCU 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ group; E. 5-Fu 40 $\mu\text{mol}/\text{L}$ group.

2.2 SCU 抑制 HCT116 细胞活性

如图 2 所示, 使用不同浓度的 SCU (0、20、40、80、120、160、200、240、280、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 处理

HCT116 细胞 24 h 后, 相比空白对照组, SCU 在浓度达到 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后能显著降低 HCT116 细胞的存活率, 呈浓度依赖性, 其 IC_{50} 值为 75.96 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。参

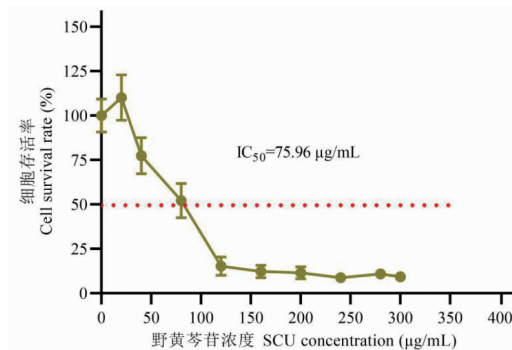


图 2 SCU 对 HCT116 细胞形态的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of SCU on proliferation of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

考以上结果,确定将 35、70、140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 分别作为后续实验的 SCU 低、中、高剂量组,并选择 24 h 作为 SCU 的给药处理时间。

2.3 SCU 抑制 HCT116 细胞克隆形成能力

如图 3 所示,在平板克隆形成试验中,SCU 140

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和阳性药 5-Fu 组能显著减少 HCT116 细胞的集落形成数目,70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的抑制作用其次,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组也能在一定程度上减少 HCT116 细胞的集落形成数目,提示 SCU 对 HCT116 细胞的克隆形成能力具有抑制作用。

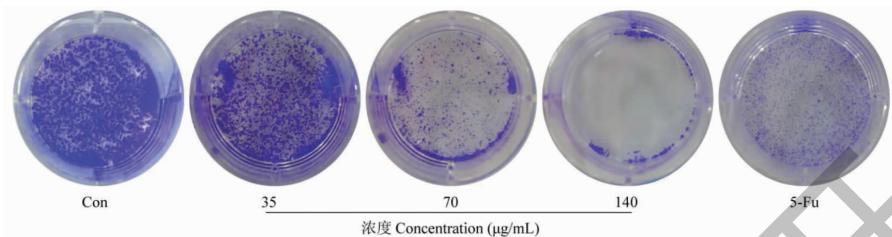


图 3 SCU 对 HCT116 细胞克隆形成能力的影响

Fig. 3 Effect of SCU on colony-formation ability of HCT116 cells

2.4 SCU 抑制 HCT116 细胞迁移

如图 4 和表 2 所示,与空白对照组相比,SCU 处理 24 h 和 48 h 均能显著降低 HCT116 细胞的迁移

率($P < 0.01$),表明 SCU 能有效地抑制 HCT116 细胞迁移,且这种抑制作用随 SCU 的浓度增加而逐渐增强,呈浓度依赖性。

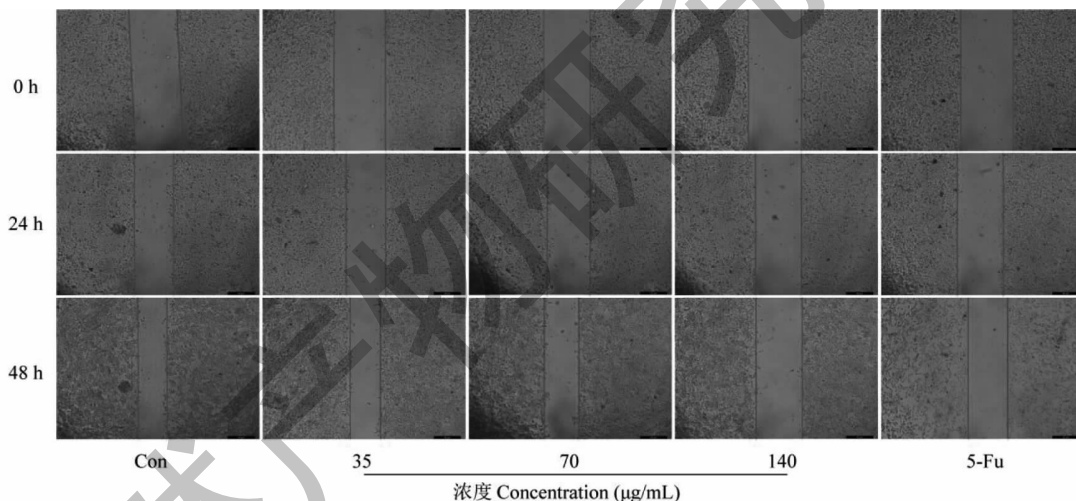


图 4 SCU 对 HCT116 细胞迁移的影响

Fig. 4 Effect of SCU on migration of HCT116 cells

表 2 SCU 对 HCT116 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Effect of SCU on migration of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Group	浓度 Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	细胞迁移率 Migration rate(%)	
		24 h	48 h
Con	-	31.36 \pm 0.90	46.79 \pm 2.50
SCU	35	28.04 \pm 1.88	44.51 \pm 0.98
	70	20.93 \pm 0.35 **	38.19 \pm 1.43 **
	140	16.21 \pm 0.72 **	23.39 \pm 2.65 **

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,下同。

Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

2.5 SCU 诱导 HCT116 细胞凋亡

采用 Hoechst 33342/PI 染色法观察不同浓度的 SCU 对 HCT116 细胞凋亡的影响,结果如图 5 所示,与空白对照组相比,SCU 干预后的 HCT116 细胞表现出凋亡早期染色质固缩所形成的致密浓染,发出

亮蓝色荧光,颜色泛白且比较明亮,提示 SCU 能够诱导 HCT116 细胞凋亡。此外,随着 SCU 给药浓度的增加,发亮蓝色荧光的细胞数目也逐渐增多。值得注意的是,SCU 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组诱导发生凋亡的细胞数目明显多于阳性药 5-Fu。

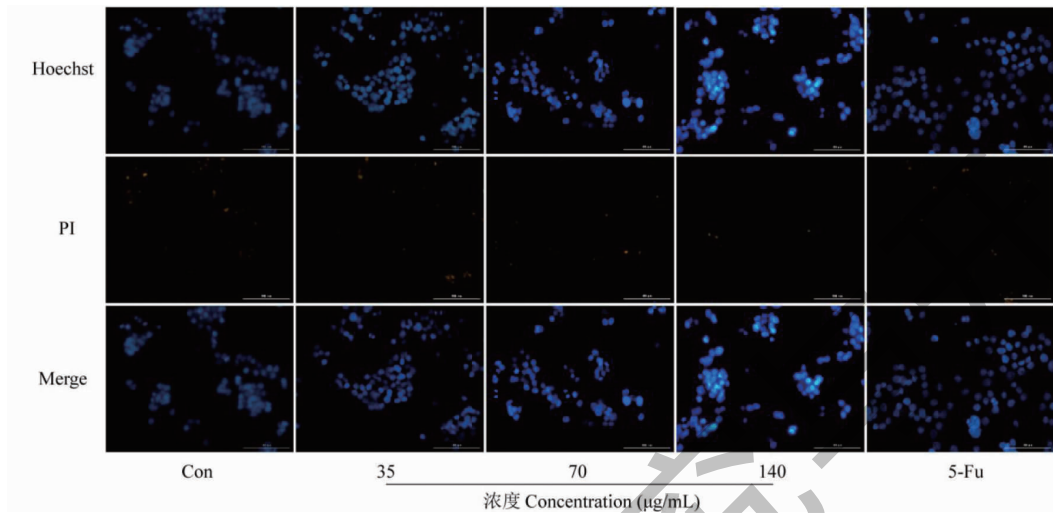


图 5 SCU 对 HCT116 细胞凋亡的影响

Fig. 5 Effect of SCU on apoptosis of HCT116 cells

2.6 SCU 对 HCT116 细胞凋亡率的影响

使用 Annexin V-FITC 流式细胞分析法检测 SCU 处理 24 h 后各组细胞的凋亡率,结果如图 6 和表 3 所示,与空白对照组相比,SCU 各给药组均能显著提高 HCT116 的细胞凋亡率 ($P < 0.05$, $P < 0.01$),且随着给药浓度的提高,细胞总凋亡比例逐

渐增加,呈浓度依赖性。其中,35、70、140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的细胞凋亡率分别为 $(10.62 \pm 0.21)\%$ 、 $(17.26 \pm 0.45)\%$ 和 $(21.51 \pm 2.26)\%$,5-Fu 组的细胞率为 $(14.59 \pm 1.40)\%$,提示 SCU 能诱导 HCT116 细胞发生凋亡,且 70、140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组对 HCT116 细胞凋亡的诱导作用强于阳性药组。

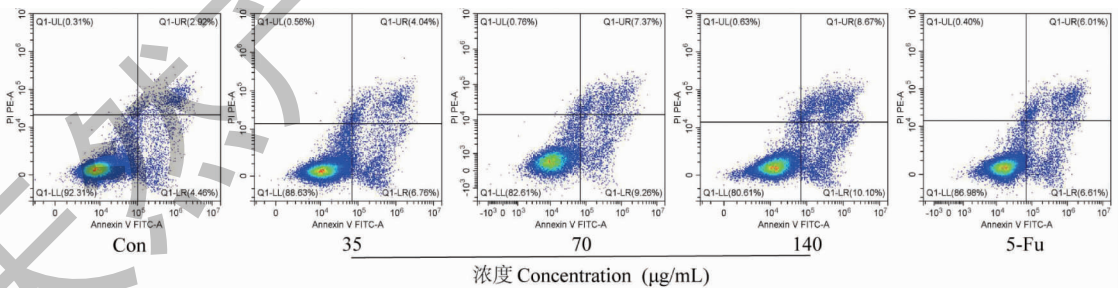


图 6 SCU 对 HCT116 细胞凋亡率的影响

Fig. 6 Effect of SCU on apoptosis rate of HCT116 cells

2.7 SCU 对 HCT116 细胞凋亡相关因子 mRNA 表达水平的影响

如表 4 所示,与空白对照组相比,SCU 处理后能显著上调 Bax、caspase-9 和 caspase-3 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$),下调 Bcl-2 的 mRNA 表达水平 (P

< 0.01),呈浓度依赖性。其中,SCU 70、140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组对上述凋亡相关因子的 mRNA 表达水平的调控作用更加显著,且 140 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的作用强于阳性药 5-Fu 组,表明线粒体介导的凋亡途径在 SCU 诱导结肠直肠癌 HCT116 细胞凋亡中发挥了重要作用。

表 3 SCU 对 HCT116 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 3 Effect of SCU on apoptosis rate of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	浓度 Concentration	凋亡率 Apoptosis rate (%)
Con	-	7.74 ± 0.64
SCU	35 μg/mL	10.62 ± 0.21 *
	70 μg/mL	17.27 ± 0.45 **
	140 μg/mL	21.51 ± 2.26 ** ZB]
5-Fu	40 μmol/L	14.59 ± 1.4 **

表 4 SCU 对 HCT116 细胞凋亡相关因子 mRNA 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 4 Effect of SCU on mRNA expression of apoptosis-related factors in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Group	浓度 Concentration	mRNA/归一化法 mRNA/the normalization method			
		Bcl-2	Bax	caspase-9	casepae-3
Con	-	1.13 ± 0.06	0.87 ± 0.05	0.93 ± 0.03	0.84 ± 0.06
SCU	35 μg/mL	0.78 ± 0.08 **	0.94 ± 0.03	1.07 ± 0.01 **	0.94 ± 0.04
	70 μg/mL	0.35 ± 0.03 **	1.59 ± 0.17 **	1.18 ± 0.06 **	1.22 ± 0.09 **
	140 μg/mL	0.18 ± 0.02 **	2.38 ± 0.18 **	1.64 ± 0.02 **	1.93 ± 0.14 **
5-Fu	40 μmol/L	0.24 ± 0.01 **	2.19 ± 0.07 **	1.06 ± 0.03 **	1.13 ± 0.03 **

2.8 SCU 对 HCT116 细胞 Hippo-YAP/TAZ 信号通路相关因子 mRNA 表达水平的影响

如表 5 所示,与空白对照组相比,SCU 干预后能显著升高 MST1、LATS1 的 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$),降低 YAP1、TAZ 以及通路下游靶基因 c-Myc

的 mRNA 表达水平 ($P < 0.05, P < 0.01$),其中 SCU 70、140 μg/mL 组的作用更加显著,表明 SCU 对结直肠癌 HCT116 细胞的作用与其参与 Hippo 信号通路活性的调控有关。

表 5 SCU 对 HCT116 细胞中 Hippo-YAP/TAZ 通路相关 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 5 Effect of SCU on mRNA expression of Hippo-YAP/TAZ pathway-related factors in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Group	浓度 Concentration	mRNA/归一化法 mRNA / the normalization method				
		MST1	LATS1	YAP1	TAZ	c-Myc
空白对照 Control	-	0.85 ± 0.05	0.82 ± 0.05	1.16 ± 0.04	1.18 ± 0.05	1.16 ± 0.04
SCU	35 μg/mL	1.05 ± 0.05 **	1.01 ± 0.03	1.02 ± 0.03 **	1.10 ± 0.08	0.94 ± 0.09 *
	70 μg/mL	1.29 ± 0.08 **	1.14 ± 0.01 **	0.86 ± 0.04 **	0.97 ± 0.10 *	0.47 ± 0.03 **
	140 μg/mL	1.48 ± 0.03 **	1.43 ± 0.16 **	0.79 ± 0.03 **	0.64 ± 0.08 **	0.39 ± 0.05 **
5-Fu	40 μmol/L	0.85 ± 0.11	1.11 ± 0.09 **	0.93 ± 0.03 **	0.67 ± 0.03 **	0.49 ± 0.10 **

2.9 SCU 对 HCT116 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Western blot 检测 SCU 对 HCT116 细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 表达水平的影响,结果如图 7 所示,与空白对照组相比,SCU 35、70、140 μg/mL 组均能显著升高 HCT116 细胞中促凋亡因子 Bax 的蛋白表达水平 ($P < 0.01$),显著降低抗凋亡因子 Bcl-2 的蛋白表达水平 ($P < 0.01$),与 qRT-PCR 的结果相对

应,从蛋白水平上表明 SCU 能通过调控 HCT116 细胞中凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达来促进细胞凋亡。

2.10 SCU 对 HCT116 细胞 Hippo-YAP/TAZ 通路相关蛋白表达的影响

Western blot 检测 SCU 对 HCT116 细胞中 Hippo-YAP/TAZ 信号通路相关蛋白表达水平的影响,结果如图 8 所示,与空白对照组相比,SCU 能显著升

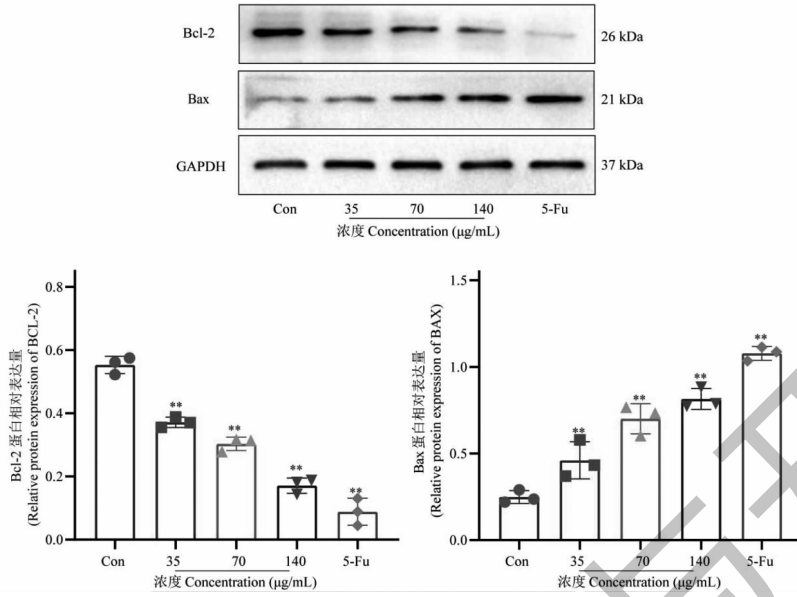


图7 SCU对HCT116细胞凋亡相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of SCU on expression of apoptosis-related proteins in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

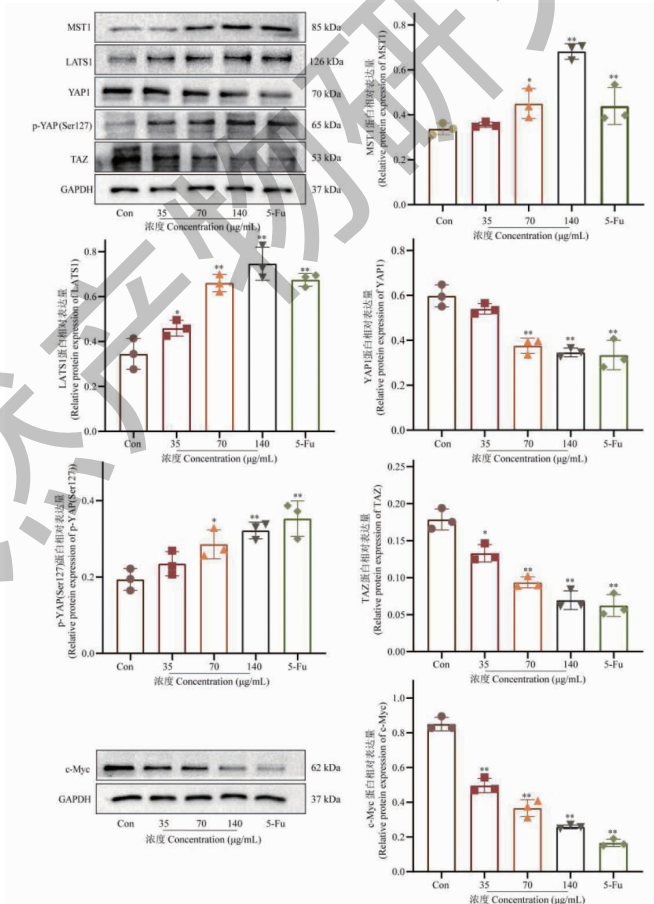


图8 SCU对HCT116细胞中Hippo信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of SCU on expression of Hippo signaling pathway-related proteins in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

高 LATS1、MST1、p-YAP (Ser127) 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 降低 YAP1、TAZ、c-Myc 的蛋白表达水平 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 呈浓度依赖性, 与 qRT-PCR 的结果相对应, 从蛋白水平上表明 SCU 能对 Hippo 信号通路的活性产生影响。

3 讨论与结论

越来越多的证据表明, SCU 可通过多种途径抑制肿瘤的发生和发展, 具有开发成为抗肿瘤药物的潜力。Sun 等^[14]发现, SCU 能明显抑制非小细胞肺癌 PC-9 和 H1975 细胞的增殖。Han 等^[15]的研究结果也表明, SCU 能以浓度依赖的方式显著抑制人骨肉瘤 143B 和 U2OS 细胞的增殖。在本研究中, SCU 能显著降低结直肠癌 HCT116 细胞的活性, 抑制细胞克隆, 阻碍其增殖, 与上述结论一致。

在癌症中, 癌细胞常通过上皮间质转化来获得增殖和侵袭的能力。在肝细胞癌中, Liu 等^[16]研究发现, SCU 可通过下调 Janus 激酶 2 (Janus kinase 2, JAK2)/信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号通路的活性来抑制肝癌细胞上皮间质转化, 降低肝癌细胞侵袭和转移的能力。Li 等^[17]发现, 在胃癌中, SCU 可通过调节 PTEN/PI3K 信号通路的活性, 下调胃癌 MGC-803、AGS 细胞中的上皮性钙黏附蛋白 (E-cadherin) 表达水平, 上调波形蛋白 (Vimentin) 和神经性钙黏附蛋白 (N-cadherin) 的表达水平, 抑制胃癌细胞的上皮间质转化。本研究中, 细胞划痕试验的结果表明, 与空白对照组相比, SCU 给药组 HCT116 细胞的迁移率被显著降低, 并呈浓度依赖性, 提示 SCU 对结直肠癌细胞的迁移能力具有抑制作用, 与前面的研究结果相符。

目前普遍接受的观点认为, 细胞凋亡不足是肿瘤发生、发展的一个重要原因。因此诱导肿瘤细胞凋亡被认为是肿瘤治疗的一种有效手段^[18]。Cao 等^[19]的研究证实, SCU 可通过抑制 AKT/mTOR/4EBP1 和 STAT3 通路, 将顺铂耐药肺腺癌 A549 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期, 并诱导其发生凋亡。在肝癌中, Xu 等^[20]发现, SCU 可通过抑制肝癌 HepG2 细胞中活性氧 ROS 的产生使 STAT3 信号通路的活性降低, 进而下调下游靶蛋白 BCL-XL 和 MCL-1 的表达水平, 诱导细胞凋亡。同样, 在本研究中, 我们通过 Hoechst 33342/PI 双染和细胞流式细胞术检测发现, SCU 能诱导细胞凋亡, 显著提高 HCT116 细胞的凋亡率。然而 SCU 的具体调控机制尚不明确, 因此

在后续研究中做了进一步探索。

有研究指出, Hippo 信号通路能参与细胞增殖的调控, YAP 过度激活或过度表达可导致肝脏、胃肠道、皮肤和心脏等多个组织的细胞过度增殖^[21]。此外, YAP 和 TAZ 还是细胞上皮间质转化的活性诱导剂, 高活性的 YAP 和 TAZ 能诱导上皮间质转化中的关键转录调节因子 ZEB1/2 的表达, 从而促进上皮间质转化^[22]。Hippo 信号通路对细胞凋亡也起重要调控作用。YAP 可通过调控下游抗凋亡基因如 COX-2、Survivin 和 Glut1 等转录促进细胞凋亡^[23]; 而且过表达的 YAP 还能阻断肿瘤坏死因子、FAS 以及化疗药物诱导的凋亡^[24]; He 等^[25]的研究也证实, YAP 可通过 Ser351 驱动 NR4A1 发生 AKT 依赖性的磷酸化, 使其被隔离在细胞核中, 削弱其促进细胞凋亡的作用。

本研究的结果表明, SCU 能上调 HCT116 细胞中 MST1、LATS1 的 mRNA 和蛋白表达水平, 下调 YAP1 和 TAZ 的 mRNA 和蛋白表达水平, 促进 YAP 磷酸化, 使 p-YAP (Ser127) 蛋白表达水平升高, 因此推测 SCU 的作用可能与激活 Hippo 信号通路有关。qRT-PCR 检测结果表明, SCU 处理 24 h 能有效升高 HCT116 细胞中的 Bax、caspase-3、caspase-9 的 mRNA 表达水平, 降低 Bcl-2 的 mRNA 表达水平; Western blot 检测结果也表明, SCU 能显著提高 HCT116 细胞中促凋亡蛋白 Bax 的表达水平, 降低抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平。此外, c-Myc 的 mRNA 和蛋白表达水平也在 SCU 处理 24 h 后被明显降低。以上结果提示, SCU 可能是通过激活 Hippo-YAP/TAZ 信号级联, 促进 YAP/TAZ 磷酸化, 导致其转录活性被抑制, 下游靶基因 c-Myc 的表达受到抑制, 凋亡蛋白家族成员 Bcl-2 表达水平降低, Bax 表达水平升高, 并转位进入线粒体, 促进细胞色素 C 的释放和凋亡复合体的形成, 进而激活 caspase 家族中的凋亡启动因子 caspase-9 及下游的凋亡执行因子 caspase-3, 最终经线粒体途径诱发细胞凋亡, 阻碍结直肠癌细胞的生长, 发挥抗结直肠癌作用。

综上所述, 本研究发现 SCU 能显著抑制结直肠癌 HCT116 细胞增殖、迁移, 并诱导细胞凋亡, 其作用机制可能与激活 Hippo 信号通路有关, 但考虑到结直肠癌的形成原因复杂以及不同来源的肿瘤细胞系之间存在差异等诸多因素, 关于 SCU 抗结直肠癌的作用仍需在其他多个结直肠癌细胞系上进行验证, 并结合体内动物试验做进一步全面探讨。此外,

据报道,Wnt、Notch、Hedgehog 以及 BMP 信号通路都能参与肠道内环境的稳态和再生的调节,并且有研究发现,Hippo 信号通路与这些通路之间能发生相互作用,存在串扰^[26,27]。因此,SCU 是否是通过综合调控 Hippo 信号通路及其串扰通路的活性来发挥抗结肠直肠癌的作用也需要深入探讨。

参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71:209-249.
- 2 Zhou X, Yin Q, Huang R, et al. 8-*O*-Acetylharpagide induces apoptosis of colon cancer HCT116 cells through Wnt signaling pathway[J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2022, 34:996-1004.
- 3 Lim EJ, Kang JH, Kim YJ, et al. ICAM-1 promotes cancer progression by regulating SRC activity as an adapter protein in colorectal cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2022, 13:417.
- 4 Zhang Y, Lou YN, Wang JB, et al. Research status and molecular mechanism of the traditional Chinese medicine and antitumor therapy combined strategy based on tumor microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2020, 11:609705.
- 5 Ji HY, Zhang K, Pan GZ, et al. Deoxyelephantopin induces apoptosis and enhances chemosensitivity of colon cancer via miR-205/Bcl2 Axis[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23:5051.
- 6 Jiang W. Research progress on pharmacological activities of scutellarin[J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2018, 34:1634-1637.
- 7 Wang LP, Ma Q. Clinical benefits and pharmacology of scutellarin; a comprehensive review[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 190:105-127.
- 8 Calses PC, Crawford JJ, Lill JR, et al. Hippo pathway in cancer: aberrant regulation and therapeutic opportunities[J]. *Trends Cancer*, 2019, 5:297-307.
- 9 Zheng YG, Pan DJ. The Hippo signaling pathway in development and disease[J]. *Dev Cell*, 2019, 50:264-282.
- 10 Yin F, Dong JX, Kang LI, et al. Hippo-YAP signaling in digestive system tumors[J]. *Am J Cancer Res*, 2021, 11:2495-2507.
- 11 Moya IM, Halder G. Hippo-YAP/TAZ signalling in organ regeneration and regenerative medicine[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2019, 20:211-226.
- 12 Zeng S, Tan L, Sun Q, et al. Suppression of colitis-associated colorectal cancer by scutellarin through inhibiting Hedgehog signaling pathway activity [J]. *Phytomedicine*, 2022, 98:153972.
- 13 Zeng S, Chen L, Sun Q, et al. Scutellarin ameliorates colitis-associated colorectal cancer by suppressing Wnt/ β -catenin signaling cascade[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 906:174253.
- 14 Sun CY, Li CY, Li XF, et al. Scutellarin induces apoptosis and autophagy in NSCLC cells through ERK1/2 and AKT signaling pathways *in vitro* and *in vivo*[J]. *J Cancer*, 2018, 9:3247-3256.
- 15 Han J, Wang P, Xia X, et al. EGR1 promoted anticancer effects of scutellarin via regulating LINC00857/miR-150-5p/c-Myc in osteosarcoma[J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25:8479-8489.
- 16 Liu K, Tian T, Zheng Y, et al. Scutellarin inhibits proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells via down-regulation of JAK2/STAT3 pathway [J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23:3040-3044.
- 17 Li F, Wang SP, Niu MX. Scutellarin inhibits the growth and EMT of gastric cancer cells through regulating PTEN/PI3K pathway[J]. *Biol Pharm Bull*, 2021, 44:780-788.
- 18 Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21:485-495.
- 19 Cao PK, Liu B, Du F, et al. Scutellarin suppresses proliferation and promotes apoptosis in A549 lung adenocarcinoma cells via AKT/mTOR/4EBP1 and STAT3 pathways[J]. *Thoracic Cancer*, 2019, 10:492-500.
- 20 Xu HT, Zhang SY. Scutellarin-induced apoptosis in HepG2 hepatocellular carcinoma cells via a STAT3 pathway [J]. *Phytother Res*, 2013, 27:1524-1528.
- 21 Harvey KF, Zhang XM, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13:246-257.
- 22 Ma SH, Meng ZP, Chen R, et al. The Hippo pathway: biology and pathophysiology[J]. *Annu Rev Biochem*, 2019, 88:577-604.
- 23 Zhang XB, Abdelrahman A, Vollmar B, et al. The ambivalent function of YAP in apoptosis and cancer[J]. *Int JMol Sci*, 2018, 19:3770.
- 24 Moloudizargari M, Asghari MH, Nabavi SF, et al. Targeting Hippo signaling pathway by phytochemicals in cancer therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2022, 80:183-194.
- 25 He LL, Yuan L, Yu W, et al. A Regulation Loop between YAP and NR4A1 balances cell proliferation and apoptosis [J]. *Cell Rep*, 2020, 33:108284.
- 26 Piccolo S, Dupont S, Cordenonsi M. The biology of YAP/TAZ: hippo signaling and beyond[J]. *Physiol Rev*, 2014, 94:1287-1312.
- 27 Hong AW, Meng ZP, Guan KL. The Hippo pathway in intestinal regeneration and disease[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2016, 13:324-337.