

## 川芎内酯抑制结肠癌细胞的生长和肿瘤干细胞样特性

董梁<sup>1</sup>, 张敬<sup>2</sup>, 缪柯<sup>3</sup>

(1. 衡水市人民医院消化内科, 河北衡水 053000; 2. 衡水市人民医院生殖医学科, 河北衡水 053000;  
3. 义乌市中心医院肝胆胰腺外科, 浙江义乌 322000)

**摘要:**【目的】探讨川芎内酯对结肠癌细胞的抑制作用及其机制。【方法】①体外研究: 选择SW620和SW480 2种结肠癌细胞株。应用不同浓度的川芎内酯处理细胞24 h后, 用细胞计数试剂盒8(CCK-8)检测细胞活力。选择浓度为0、25、50、100  $\mu\text{mol/L}$ 的川芎内酯处理SW620和SW480细胞株, 采用克隆形成实验检测增殖能力, 采用流式细胞术检测癌细胞凋亡, 采用蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)及裂解的Caspase-3(cleaved Caspase-3)的表达, 采用流式细胞术检测线粒体膜电位的变化, 按照试剂盒说明方法检测超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的含量, 应用显微镜观察SW620和SW480干细胞成球情况, 采用Aldefluor分析法检测乙醛脱氢酶(ALDH)活性, 采用实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)法检测干细胞标记物Nanog、八聚体结合转录因子4(OCT4)和性别决定域Y蛋白2(SOX2)的表达。②体内研究: 裸鼠皮下接种SW480细胞构建荷瘤模型, 加药组给予川芎内酯5 mg/kg处理, 每5 d检测瘤体积。30 d后, 处死裸鼠取出肿瘤称质量, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)染色检测肿瘤组织细胞凋亡, 免疫组织化学法检测肿瘤组织中p21和SOX2的表达, 按照试剂盒说明方法检测肿瘤组织MDA和SOD含量。【结果】与川芎内酯0  $\mu\text{mol/L}$ 组比较, 川芎内酯50  $\mu\text{mol/L}$ 对SW620细胞活力有明显抑制作用( $P < 0.05$ ), 川芎内酯25  $\mu\text{mol/L}$ 对SW480细胞活力有明显抑制作用( $P < 0.05$ )。川芎内酯明显降低结肠癌细胞存活率( $P < 0.05$ ), 增加细胞凋亡率( $P < 0.05$ ), 上调p21和cleaved Caspase-3的表达水平( $P < 0.05$ ), 降低线粒体膜电位, 增加SOD的含量( $P < 0.05$ ), 减少MDA的含量( $P < 0.05$ ), 减小结肠癌细胞成球直径的大小( $P < 0.05$ ), 降低ALDH活性及Nanog、OCT4和SOX2的表达( $P < 0.05$ )。体内移植实验结果显示, 川芎内酯减小肿瘤体积( $P < 0.05$ ), 增加肿瘤组织中TUNEL阳性细胞数目( $P < 0.05$ ), 减少p21和SOX2阳性细胞数( $P < 0.05$ ), 增加SOD的含量( $P < 0.05$ ), 减少MDA的含量( $P < 0.05$ )。【结论】川芎内酯在体内、体外均可抑制结肠癌细胞的生长, 主要通过诱导氧化应激、破坏线粒体功能诱导细胞凋亡, 抑制结肠癌干细胞特性阻止结肠癌发生转移。

**关键词:** 川芎内酯; 结肠癌; 凋亡; 线粒体膜电位; 乙醛脱氢酶; SW620细胞; SW480细胞; 裸鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)12-2742-09

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.12.032

## Inhibition of Growth and Tumor Stem Cell-Like Properties in Colon Cancer Cells by Ligustilide

DONG Liang<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>2</sup>, MIAO Ke<sup>3</sup>

(1. Dept. of Gastroenterology, Hengshui City People's Hospital, Hengshui 053000 Hebei, China; 2. Dept. of Reproductive Medicine, Hengshui City People's Hospital, Hengshui 053000 Hebei, China; 3. Dept. of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, Yiwu Central Hospital, Yiwu 322000 Zhejiang, China)

**Abstract: Objective** To explore the inhibitory effect and its mechanism of ligustilide on colon cancer cells.

**Methods** ① *In vitro* study: SW620 and SW480 colon cancer cell lines were selected, and treated with different concentrations of ligustilide for 24 h and cell viability was detected by cell counting Kit (CCK-8). SW620 and SW480 cell lines were treated with 0, 25, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$  of ligustilide, the proliferation ability was detected by clonal formation assay, and the apoptosis of cancer cells was detected by flow cytometry. Western Blot was used to detect the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor 1A(p21) and cleaved Caspase-3, and flow cytometry was used to detect mitochondrial membrane potential. The activity of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde

收稿日期: 2020-10-14

作者简介: 董梁(1987), 男, 主治医师; E-mail: d13722817166@163.com

基金项目: 义乌市科学技术项目(编号: 19-3-126)

(MDA) were detected according to the kit instructions. The pellet formation of SW620 and SW480 stem cells was observed by microscope. The activity of aldehyde dehydrogenase (ALDH) was detected by Aldefluor analysis. Real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to detect the expression of stem cell marker Nanog, Octamer binding transcription factor 4 (OCT4) and sex-determining domain Y protein 2 (SOX2). ② *In vivo* study: nude mice were subcutaneously inoculated with SW480 cells to build the tumor-bearing model. The addition group was treated with 5 mg/kg of ligustilide, and the tumor volume was measured every 5 days. After 30 days, the nude mice were sacrificed and the tumor was body was weighed. Cell apoptosis in tumor tissues was detected by terminal deoxynucleotide transferase mediated notched-end labeling (TUNEL) staining, the expression of P21 and SOX2 in tumor tissues was detected by immunohistochemistry, and the content of MDA and SOD in tumor tissues was detected according to the kit instructions. **Results** Compared with ligustilide 0  $\mu\text{mol/L}$  group, 50  $\mu\text{mol/L}$  of ligustilide significantly inhibited the activity of SW620 cells ( $P < 0.05$ ), 25  $\mu\text{mol/L}$  of ligustilide significantly inhibited the activity of SW480 cells ( $P < 0.05$ ). Ligustilide significantly decreased survival rate of colon cancer cells ( $P < 0.05$ ), increased cell apoptosis rate ( $P < 0.05$ ), up-regulated expression levels of P21 and cleaved Caspase-3 ( $P < 0.05$ ), decreased mitochondrial membrane potential, increased SOD content ( $P < 0.05$ ), decreased MDA content ( $P < 0.05$ ), decreased pellet diameter ( $P < 0.05$ ), decreased ALDH activity and expression of Nanog, OCT4 and SOX2 ( $P < 0.05$ ). The results of *in vivo* transplantation showed that ligustilide decreased tumor volume ( $P < 0.05$ ), increased the number of TUNEL positive cells in tumor tissues ( $P < 0.05$ ), decreased the number of P21 and SOX2 positive cells ( $P < 0.05$ ), increased the content of SOD ( $P < 0.05$ ), and decreased the MDA content ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Ligustilide can inhibit the growth of colon cancer cells *in vitro* and *in vivo*, mainly by inducing oxidative stress, destroying mitochondrial function to induce cell apoptosis, and inhibiting characteristics of colon cancer stem cells to prevent metastasis of colon cancer.

**Keywords:** ligustilide; colon cancer; apoptosis; mitochondrial membrane potential (MMP); acetaldehyde dehydrogenase (ALDH); SW620 cells; SW480 cells; nude mice

结肠癌(colorectal cancer)是导致癌症死亡的主要原因之一<sup>[1]</sup>。治疗方案主要包括外科手术和放疗,常伴随严重的副作用,影响患者的生活质量<sup>[2-3]</sup>。寻找高效低毒的抗肿瘤药物是肿瘤治疗的研究热点,而从中药中提取天然活性成分逐渐成为现代抗肿瘤药物开发的新趋势<sup>[4]</sup>。川芎内酯(ligustilide),是中药当归和川芎的主要提取物成分之一,分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_2$ 。研究表明,川芎内酯具有抗炎、抗氧化、镇痛和抗癌等多种药理活性<sup>[5]</sup>。川芎内酯对乳腺癌、非小细胞肺癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤和前列腺癌均具有明显的疗效<sup>[6-9]</sup>。本研究选择2株结肠癌细胞系SW620和SW480,探究川芎内酯对结肠癌的抗癌作用,现将研究结果报道如下。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 药物、试剂与amp;仪器 川芎内酯(成都阿尔法

生物技术有限公司产品,分子量为190.24,批号:AB0194),溶于二甲基亚砜(DMSO)中,于 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。DMEM培养基、TRIzol试剂(美国Invitrogen公司);体积分数为10%的胎牛血清(FBS)(美国Gibco公司);细胞计数试剂盒8(CCK-8)、放射免疫沉淀分析(RIPA)裂解液、二喹啉甲酸(BCA)试剂盒(上海碧云天公司);膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)双染试剂盒(美国BD Pharmingen公司); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂1A(p21)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(Caspase-3)及裂解的Caspase-3(cleaved Caspase-3)等抗体(英国Abcam公司);WesternBright电学发光(ECL)液(美国GE Healthcare公司);BD MitoScreen(JC-1)试剂盒(美国BD Biosciences公司);超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)测定试剂盒(美国Sigma-Aldrich公司);Aldefluor分析试剂盒(加拿大Stem Cell

Technology 公司); 反转录试剂盒(美国 Thermo Scientific) 公司; SybGreen I(上海捷瑞生物公司); 末端脱氧核苷酸转移酶介导的 d UTP 缺口末端标记(TUNEL)试剂盒(美国 R&D 公司)。酶标仪(美国 BioTek 公司); Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD Biosciences 公司); PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司); 光学显微镜(日本尼康公司)。

## 1.2 体外研究

1.2.1 细胞培养 人结肠癌细胞系 SW480 和 SW620 细胞均购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。2 种细胞系均以含 10%FBS 和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基在 37 °C 体积分数为 5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。

1.2.2 细胞活力测定 将 SW480 和 SW620 细胞分别接种到 96 孔板中, 1×10<sup>4</sup> 个/孔, 以含有 10%FBS 的 100 μL DMEM 培养基培养, 贴壁过夜。用不同浓度的川芎内酯处理 24 h 后, 加入 10 μL CCK-8 溶液, 于 37 °C 下孵育 1 h。应用酶标仪测量波长为 450 nm 处的吸光度。实验重复至少 3 遍。

1.2.3 克隆形成实验 将 SW480 和 SW620 细胞以 4×10<sup>3</sup> 个/孔的密度接种在 6 孔板中, 分别以川芎内酯 0、25、50 和 100 μmol/L 的浓度培养 14 d, 直到出现可见的菌落, 进行结晶紫染色。应用 ImageJ 软件计算菌落数, 重复测试 3 次。

1.2.4 Annexin-V-FITC/PI 染色 将 SW480 和 SW620 细胞以 5×10<sup>4</sup> 个/孔的密度接种在 6 孔板中过夜, 然后分别用川芎内酯 0、25、50、100 μmol/L 浓度处理 48 h 后, 根据试剂盒说明书进行 Annexin V-FITC/PI 染色。应用流式细胞仪进行分析。

1.2.5 蛋白质免疫印迹法检测 p21 和活化 Caspase-3 蛋白表达 将 SW480 和 SW620 细胞以 1×10<sup>6</sup> 个/孔的密度接种到 6 孔板中培养, 分别用川芎内酯 0、25、50、100 μmol/L 浓度处理 48 h。加入 RIPA 裂解缓冲液冰上裂解 30 min。将裂解物以 12 000×g 离心 10 min, 使用 BCA 法测定蛋白质浓度。取 40 μg 蛋白裂解物进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 并转移至 PVDF 膜上。用含 5% 牛奶的 TBST 室温封闭 1 h, 再与一抗 β-actin (1:1 000 稀释)、p21(1:1 000 稀释)、Caspase-3 (1:1 000 稀释)、cleaved Caspase-3(1:1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜。洗膜后, 将膜与 IgG-辣根过氧化物酶(HRP)偶联的二抗(1:4 000 稀释) 37 °C 孵育 1 h。最后使用 WesternBright 增强化学发光剂曝

光、显影, 分析免疫反应带。

1.2.6 线粒体膜电位( $\Delta\Psi_m$ ) 使用 BD MitoScreen (JC-1) 试剂盒评估  $\Delta\Psi_m$  的变化。将细胞以 1×10<sup>5</sup> 个/孔的密度接种在 6 孔板中, 分别用川芎内酯 25、50 和 100 μmol/L 的浓度处理 48 h 后, 将细胞悬浮在 500 μL JC-1 工作溶液中, 并在 37 °C 孵育 30 min。应用流式细胞仪进行检测。

1.2.7 SOD 和 MDA 测定 将 SW480 和 SW620 细胞以 7.5×10<sup>3</sup> 个/孔的密度接种到 96 孔板中, 分别用川芎内酯 0、25、50 和 100 μmol/L 的浓度处理 48 h。按照试剂盒说明书方法进行 SOD 和 MDA 含量的测定。

1.2.8 干细胞成球实验 将 SW480 和 SW620 细胞 2×10<sup>3</sup> 个/孔接种于超低附着的 24 孔板中, 分别用加入含川芎内酯 0、25、50 和 100 μmol/L 浓度的 DMEM/F-12 培养基(含有 10 ng/mL EGF, 10 ng/mL bFGF, 1% B27) 培养 10 d 后, 显微镜下拍照, 并使用 ImageJ 软件手动计算球体直径大小。

1.2.9 Aldefluor 分析法检测 ALDH 活性 将 SW480 和 SW620 细胞以 1×10<sup>6</sup> 个/孔的密度接种到 6 孔板中培养, 分别以 0、25、50、100 μmol/L 浓度的川芎内酯培养基培养 48 h 后, 将细胞重悬于 1 mL Aldefluor 缓冲液中, 加入 5 μL BAAA 并短暂混合后, 立即将 300 μL 细胞悬液转移至装有 5 μL DEAB 的离心管中, 用移液器均匀混合。然后将 2 个离心管放入细胞培养箱中, 于 37 °C 孵育 40 min。将细胞用 Aldefluor 缓冲液洗涤 2 次, 并最终重悬于 500 μL 补充有 DAPI 的 Aldefluor 缓冲液中以染色死细胞, 应用流式细胞仪进行分析。

1.2.10 qRT-PCR 检测 Nanog、OCT4 和 SOX2 mRNA 表达 将 SW480 和 SW620 细胞以 1×10<sup>6</sup> 个/孔细胞的密度接种到 6 孔板中培养, 分别用 0、25、50 和 100 μmol/L 浓度的川芎内酯培养基处理 48 h 后, 用 TRIzol 溶液提取总 RNA, 用 Nanodrop 2000 测量 RNA 浓度和质量, 使用 ReverAid First Stand cDNA 在 20 μL 反应系统中将 1 μg RNA 逆转录成 cDNA。根据 SybGreen I 的说明使用 7500 实时 PCR 系统进行以下程序: 95 °C 变性 5 min, 95 °C 15 s、60 °C 60 s 退火, 72 °C 30 s 延伸, 进行 40 次循环。重复 3 次。应用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 方法计算目的基因的 mRNA 的相对定量表达。Nanog (97 bp) 上游引物序列为 5'-CCCCAGCCTTTACTCTTCCTA-3', 下游引物序列为 5'-CCAGGTTGAATTGTTCCAGGTC-3'; OCT4

(164 bp)上游引物序列为5'-CTTGAATCCCGAATGGAAAGGG-3';下游引物序列为5'-GTGTATATCCCAGGGTGATCCTC-3';SOX2(110 bp)上游引物序列为5'-TACAGCATGTCCTACTCGCAG-3',下游引物序列为5'-GAGGAAGAGGTAACCACAGGG-3'。

### 1.3 体内研究

1.3.1 动物 20只5周龄BALB/c nu/nu裸鼠,雌雄各半,体质量16~20 g,购自北京维通利华实验动物公司,动物质量合格证号:SCXK(京)2016-0011。将裸鼠饲养于无菌环境中,房间温度控制在22~25℃,湿度维持在50%~60%,光/暗时间各为12 h,自由饮水进食,适应性喂养7 d后进行实验。

1.3.2 分组、造模与给药 将20只裸鼠随机分为对照组和川芎内酯组,每组10只。2组裸鼠皮下接种100 μL含 $1 \times 10^7$ 个SW480细胞的PBS构建荷瘤模型。约10 d,肿瘤体积达到50 mm<sup>3</sup>,裸鼠腹腔注射5 mg/kg川芎内酯<sup>[10]</sup>。每隔5 d测量并计算一次裸鼠的肿瘤体积( $V$ ), $V = 0.5 \times l \times b^2$ ( $l$ 、 $b$ 分别为肿瘤长度、宽度)。移植30 d后,处死动物并取出肿瘤称质量后保存于40 g/L多聚甲醛溶液以用于后续研究。

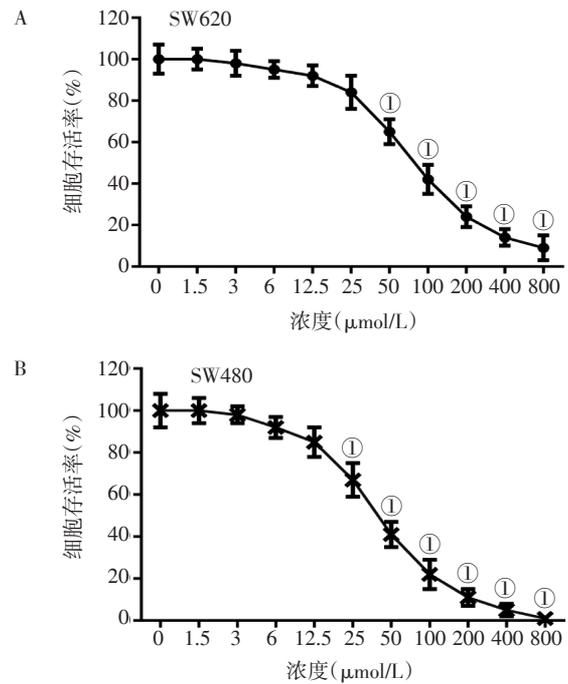
1.3.3 TUNEL染色 取40 g/L多聚甲醛溶液固定的肿瘤组织进行石蜡包埋、切片和脱水,然后与TUNEL反应混合物37℃孵育1 h后,再滴加DAB显色液进行显色。最后在光学显微镜(200倍)下观察并计数TUNEL阳性细胞数。

1.3.4 免疫组织化学法检测肿瘤组织p21和SOX2的表达 取40 g/L多聚甲醛溶液固定的肿瘤组织进行石蜡包埋、切片。石蜡切片脱蜡,柠檬酸钠缓冲液修复。一抗4℃孵育过夜。二抗37℃孵育1 h。洗涤后避光显色并用苏木素复染细胞核。封片后使用光学显微镜观察p21、SOX2阳性表达情况。

1.4 统计方法 采用GraphPad Prism 6.0统计软件进行数据分析,所有数据以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 不同浓度的川芎内酯对结肠癌细胞活力的影响 图1结果显示,川芎内酯剂量依赖性降低SW620和SW480细胞的存活率,可有效抑制细胞



A. SW620细胞存活率; B. SW480细胞存活率

① $P < 0.05$ , 与川芎内酯0 μmol/L组比较

图1 不同浓度的川芎内酯对结肠癌细胞活力的影响

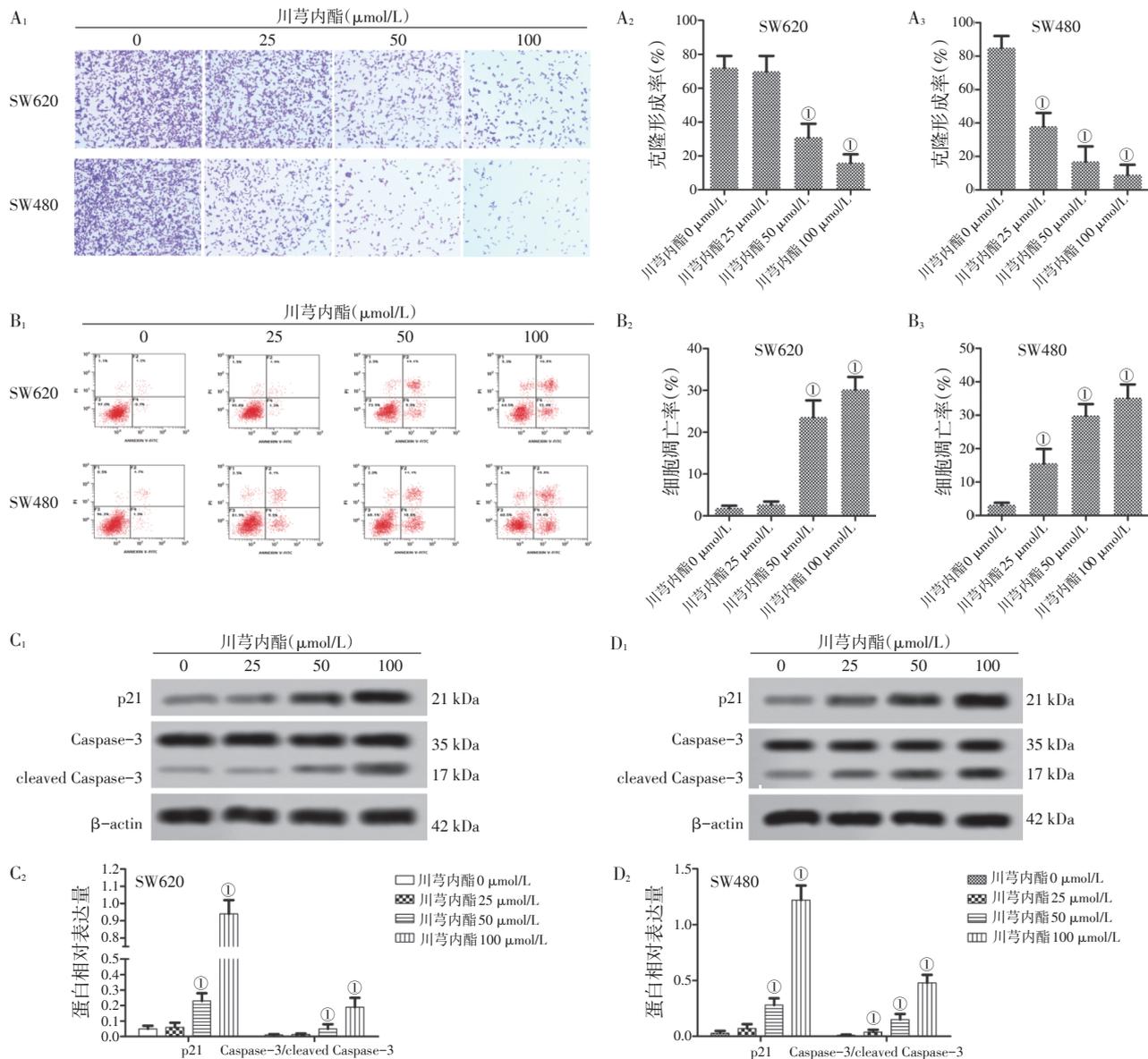
Figure 1 Effect of different concentrations of ligustilide on viability of colon cancer cells

增殖。SW620细胞的 $IC_{50}$ 在50~100 μmol/L之间,SW480细胞的 $IC_{50}$ 在25~50 μmol/L之间,因此选择25、50、100 μmol/L的川芎内酯浓度进行后续实验。

2.2 川芎内酯对结肠癌细胞生长的影响 图2-A<sub>1</sub>~A<sub>3</sub>结果显示,与川芎内酯0 μmol/L组比较,SW620细胞的川芎内酯50、100 μmol/L组克隆形成率明显降低( $P < 0.05$ ),SW480细胞的川芎内酯25、50、100 μmol/L组克隆形成率降低( $P < 0.05$ ),均呈剂量依赖的方式。

图2-B<sub>1</sub>~B<sub>3</sub>结果显示,与川芎内酯0 μmol/L组比较,SW620细胞的川芎内酯50、100 μmol/L组凋亡率显著升高( $P < 0.05$ ),SW480细胞的川芎内酯25、50、100 μmol/L组凋亡率显著升高( $P < 0.05$ ),均呈剂量依赖的方式。

图2-C<sub>1</sub>~C<sub>2</sub>、图2-D<sub>1</sub>~D<sub>2</sub>结果显示,SW620细胞的川芎内酯50、100 μmol/L组中p21、cleaved Caspase-3/Caspase-3蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ ),SW480细胞的川芎内酯25、50、100 μmol/L组中p21、cleaved Caspase-3/Caspase-3蛋白表达水平显著升高( $P < 0.05$ ),均呈剂量依赖的方式。



A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>. 克隆形成实验结果；B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>. 细胞凋亡的流式散点图与细胞凋亡率；C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>. SW620细胞的p21、Caspase-3/cleaved Caspase-3蛋白的Western Blot电泳条带图与表达水平；D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>. SW480细胞的p21、Caspase-3/cleaved Caspase-3的Western Blot电泳条带图与表达水平

①P < 0.05, 与川芎内酯0 μmol/L组比较

图2 川芎内酯抑制结肠癌细胞增殖促进凋亡

Figure 2 Ligustilide inhibiting proliferation of colon cancer cells to promote apoptosis

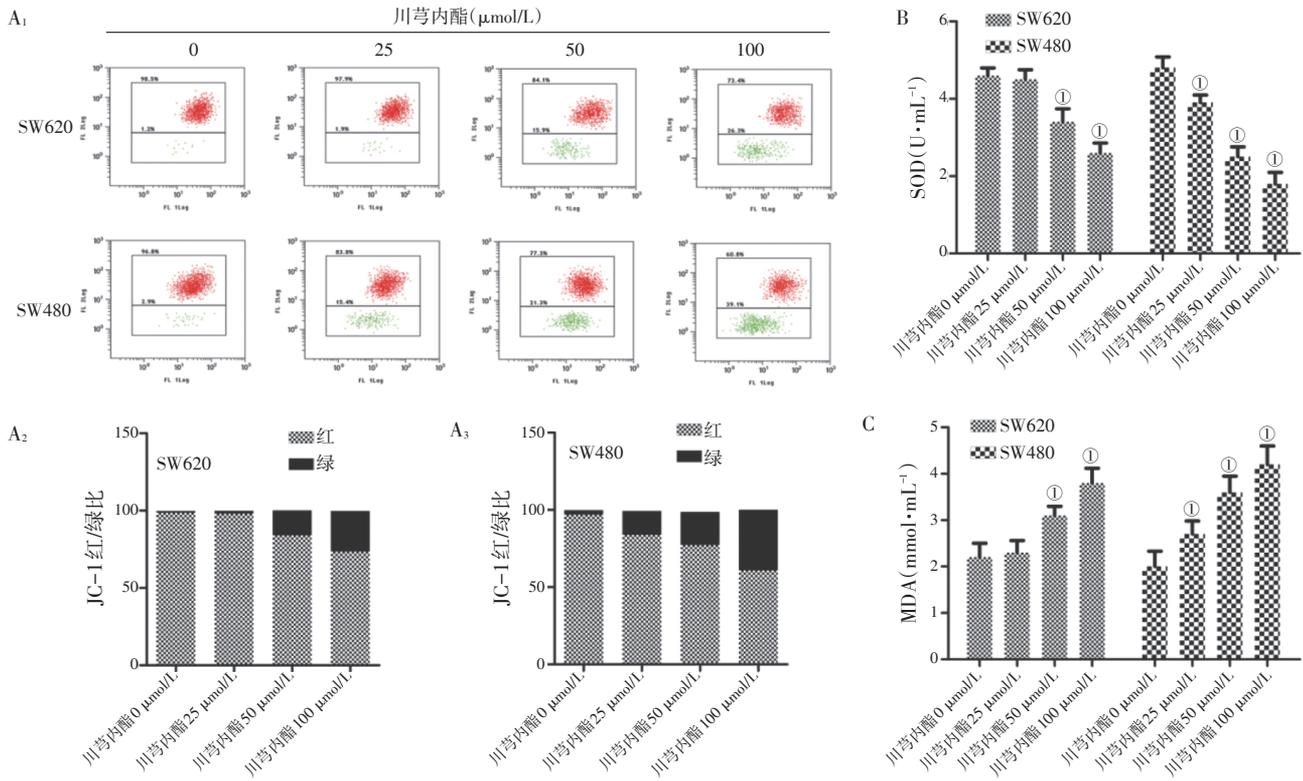
2.3 川芎内酯对结肠癌细胞线粒体膜电位及抗氧化能力的影响 图3-A<sub>1</sub> ~ A<sub>3</sub>结果显示, 川芎内酯处理的SW620、SW480结肠癌细胞中绿色荧光JC-1单体增加, 红色荧光J聚集减少, 表明川芎内酯引起线粒体膜电位的降低。

图3-B、-C结果显示, 与川芎内酯0 μmol/L组比较, SW620细胞的川芎内酯50、100 μmol/L组SOD水平明显降低(P < 0.05), MDA水平明显

升高(P < 0.05), SW480细胞的川芎内酯25、50、100 μmol/L组中SOD水平明显降低(P < 0.05), MDA水平明显升高(P < 0.05), 且均呈剂量依赖的方式。

2.4 川芎内酯对结肠癌细胞干细胞特性的影响

图4-A<sub>1</sub> ~ A<sub>3</sub>结果显示, 与川芎内酯0 μmol/L组比较, SW620细胞的川芎内酯50、100 μmol/L组成球直径均明显减小(P < 0.05), SW480细胞的川芎



A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>. SW620 细胞、SW480 细胞线粒体膜电位的流式细胞术检测结果; B. SW620 细胞、SW480 细胞 SOD 活性; C. SW620 细胞、SW480 细胞 MDA 水平

①  $P < 0.05$ , 与川芎内酯 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较

图 3 川芎内酯对结肠癌细胞线粒体功能的影响

Figure 3 Effect of ligustilide on mitochondrial function of colon cancer cells

内酯 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  组成球直径均明显减小 ( $P < 0.05$ )。

图 4-B<sub>1</sub> ~ B<sub>3</sub> 结果显示, 与川芎内酯 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较, SW620 细胞的川芎内酯 50、100  $\mu\text{mol/L}$  组 ALDH 活性均降低 ( $P < 0.05$ ), SW480 细胞的川芎内酯 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  组 ALDH 活性均降低 ( $P < 0.05$ )。

图 4-C<sub>1</sub> ~ C<sub>2</sub> 结果显示, 与川芎内酯 0  $\mu\text{mol/L}$  组比较, SW620 细胞的川芎内酯 50、100  $\mu\text{mol/L}$  组中 Nanog、OCT4 和 SOX2 表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ), SW480 细胞的川芎内酯 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  组 Nanog、OCT4 和 SOX2 表达水平均明显降低 ( $P < 0.05$ )。

**2.5 川芎内酯抑制裸鼠移植瘤生长及干细胞特性** 图 5 结果显示, 与对照组比较, 川芎内酯 5 mg/kg 组裸鼠肿瘤质量和体积显著减小 ( $P < 0.05$ ), 瘤组织细胞凋亡率和 p21 阳性细胞比例明显增加 ( $P < 0.05$ ), SOX2 阳性细胞比例明显减小 ( $P <$

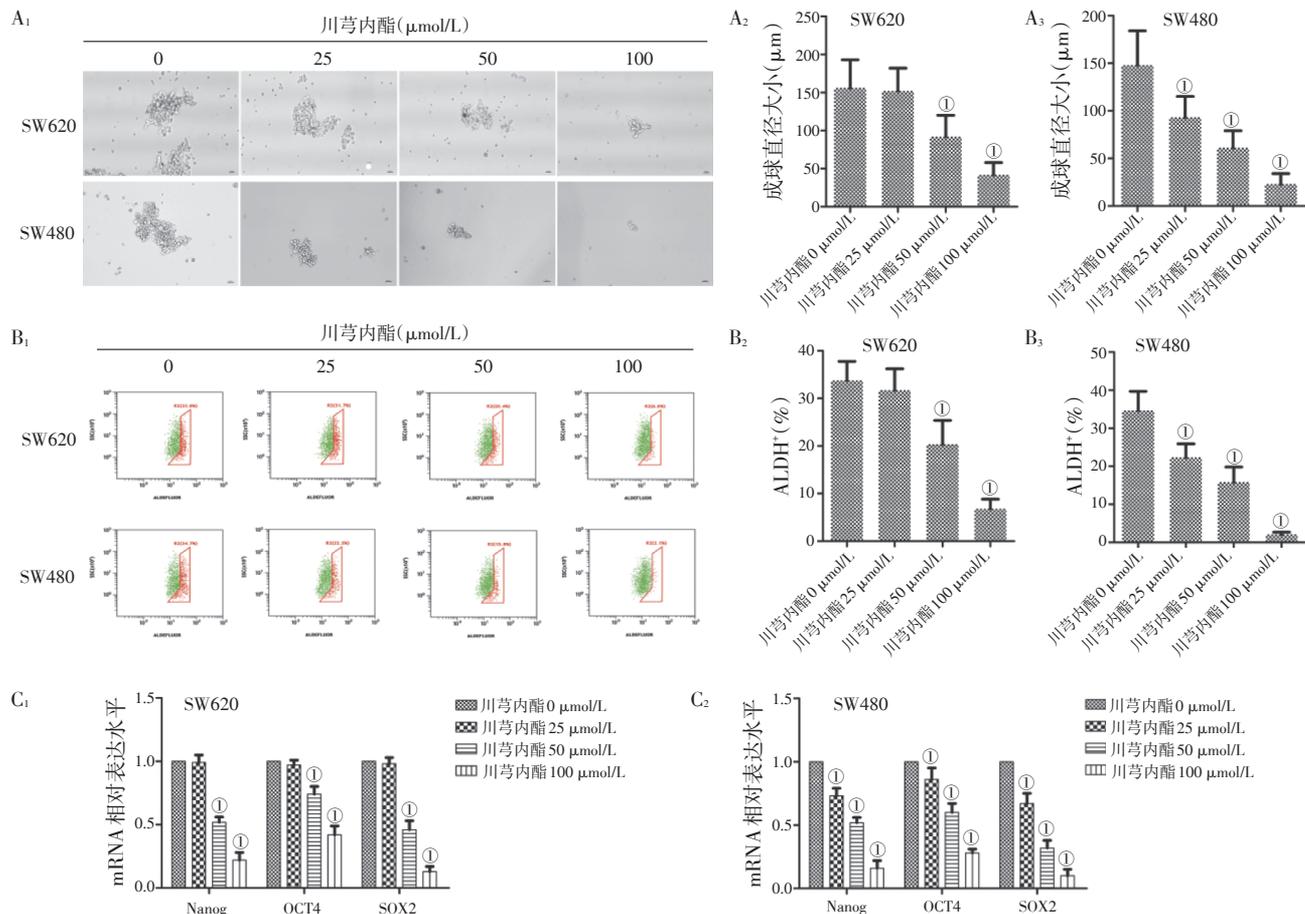
0.05), SOD 活性显著降低 ( $P < 0.05$ ), MDA 含量显著升高 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

本研究选择 2 株结肠癌细胞系 SW620 和 SW480 细胞株, 探讨川芎内酯对其增殖、凋亡、线粒体功能和肿瘤干细胞的作用。

本研究使用不同剂量的川芎内酯分别处理结肠癌 SW620 和 SW480 细胞, 结果显示, 2 种细胞存活率降低, 细胞凋亡率均升高, 且具有剂量依赖性。表明川芎内酯具有抑制结肠癌细胞生长的作用。

细胞凋亡是受诸多因子调控的程序性细胞死亡, 亦是判断药物是否具有抗癌作用的主要指标。线粒体是细胞生命活动的控制中心, 细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心, 以及细胞凋亡的调控中心。线粒体跨膜电位下降被认为是细胞凋亡级联反应过程中最早发生的事件, 一旦线粒体跨膜



A<sub>1</sub>、A<sub>2</sub>、A<sub>3</sub>. SW620、SW480 干细胞成球情况；B<sub>1</sub>、B<sub>2</sub>、B<sub>3</sub>. SW620、SW480 细胞 ALDH 的流式散点图及活性程度；C<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>. SW620、SW480 细胞 Nanog、OCT4 和 SOX2 mRNA 的表达

①  $P < 0.05$ , 与川芎内酯 0 μmol/L 组比较

图 4 川芎内酯对结肠癌细胞干细胞特性的影响

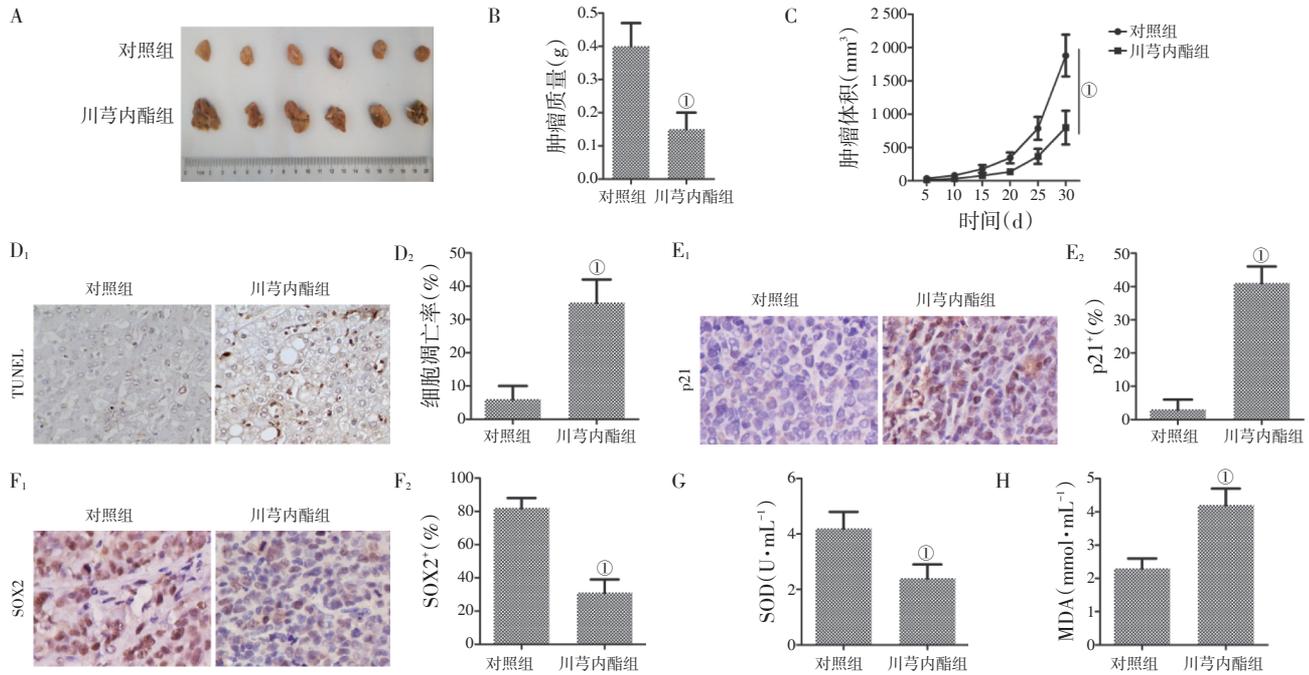
Figure 4 Effect of ligustilide on the stem cell characteristics of colon cancer cells

电位剧变, 则细胞凋亡将不可逆<sup>[11]</sup>。本研究结果显示, 川芎内酯分别处理结肠癌 SW620 和 SW480 细胞后, 线粒体膜电位均明显降低, 表明川芎内酯可使线粒体膜的通透性增加, 从而诱导结肠癌细胞凋亡。

p21 为细胞周期蛋白抑制剂, 可与细胞周期蛋白依赖性激酶复合物结合, 从而抑制它们的激酶活性并阻止细胞周期进程, 并通过 p53 途径诱导细胞凋亡<sup>[12]</sup>。另外, 线粒体外膜通透性是凋亡细胞死亡的关键事件, 可使细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质中, 启动 Caspase 级联反应, 激活 Caspase-3, 引发细胞凋亡<sup>[12]</sup>。本研究结果显示, 以川芎内酯分别处理结肠癌 SW620 和 SW480 细胞后, p21 和 cleaved Caspase-3 表达均上调, 表明川芎内酯可抑制结肠癌细胞增殖, 促进细胞凋亡。

氧化应激引起的氧化损伤在凋亡中也起着至关重要的作用, 可介导线粒体膜电位的改变<sup>[13]</sup>。脂质过氧化最常研究的标志物是 MDA, 抗氧化酶标志物为 SOD<sup>[14]</sup>。本研究结果显示, 川芎内酯分别处理结肠癌 SW620 和 SW480 细胞后, MDA 含量均降低, SOD 含量均升高, 表明川芎内酯可明显降低结肠癌细胞的抗氧化能力, 从而促进细胞的凋亡。

大量研究表明, 分化不良的癌细胞即癌症干细胞 (CSC) 负责肿瘤的发生、发展、复发和转移<sup>[15]</sup>。ALDH 的高酶活性是 CSC 标志之一<sup>[16]</sup>。多种癌症的体外和临床证据支持了高 ALDH 表达与各种癌症的 CSC 样性质之间的联系<sup>[17]</sup>。干细胞基因 OCT4、SOX2 和 Nanog 为结直肠癌自我更新和成瘤能力的标志物<sup>[18]</sup>。本研究结果显示, 川芎内酯



A. 肿瘤组织(肉眼)体积; B. 瘤体质量; C. 荷瘤体积; D<sub>1</sub>、D<sub>2</sub>. 细胞凋亡情况(TUNEL法, ×200); E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>. p21 表达(免疫组织化学法, ×200); F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>. SOX2 表达(免疫组织化学法, ×400); G. SOD 活性; H. MDA 含量

①  $P < 0.05$ , 与对照组比较

图5 川芎内酯对裸鼠移植瘤生长的影响

Figure 5 Effect of ligustilide on growth of xenograft tumor in nude mice

分别处理结肠癌 SW620 和 SW480 细胞后, 结肠癌干细胞成球直径大小均明显减小, ALDH 酶活性均降低, OCT4、SOX2 和 Nanog 等多能性转录因子的表达均下调。表明川芎内酯通过抑制结肠癌干细胞的增殖以防止癌症恶化。

裸鼠移植瘤实验进一步证明了川芎内酯体内抑制肿瘤生长的作用。

综上所述, 川芎内酯在体内、体外均可抑制结肠癌细胞的生长, 主要通过诱导氧化应激、破坏线粒体功能诱导细胞凋亡, 抑制结肠癌干细胞特性阻止结肠癌发生转移。上述研究表明, 川芎内酯有可能成为治疗结肠癌的一种新药物。

#### 参考文献:

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, FEDEWA S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(3): 177-193.
- [2] LI G, LI B, SONG J, et al. Endomorphin-2 analog inhibits the growth of DLD-1 and RKO human colon cancer cells by inducing cell apoptosis[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e921251.
- [3] ZAINAL ABIDIN S A, RAJADURAI P, HOQUE CHOWDHURY M E, et al. Anti-proliferative and apoptosis activity of l-amino acid oxidase from Malaysian cryptotelyrops purpureomaculatus (CP-LAAO) venom on human colon cancer cells[J]. Molecules, 2018, 23(6): 1388.
- [4] 张红阳, 曹世杰, 邱峰, 等. 中药活性成分抑制抗凋亡蛋白抗肿瘤研究进展[J]. 天津中医药, 2019, 36(8): 827-832.
- [5] LEE W, KOO H R, CHOI Y J, et al. Z-ligustilide and n-butylidenephthalide isolated from the aerial parts of Angelica tenuissima inhibit lipid accumulation *in vitro* and *in vivo*[J]. Planta Med, 2019, 85(9-10): 719-728.
- [6] SU Z Y, KHOR T O, SHU L, et al. Epigenetic reactivation of Nrf2 in murine prostate cancer TRAMP C1 cells by natural phytochemicals Z-ligustilide and radix Angelica sinensis via promoter CpG demethylation[J]. Chem Res Toxicol, 2013, 26(3): 477-485.
- [7] QI H, JIANG Z, WANG C, et al. Sensitization of tamoxifen-resistant breast cancer cells by Z-ligustilide through inhibiting autophagy and accumulating DNA damages[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 29300-29317.
- [8] MA H, LI L, DOU G, et al. Z-ligustilide restores tamoxifen sensitivity of ERα negative breast cancer cells by reversing MTA1/IFI16/HDACs complex mediated epigenetic repression of Era[J]. Oncotarget, 2017, 8(17): 29328-29345.
- [9] JIANG X, ZHAO W, ZHU F, et al. Ligustilide inhibits the proliferation of non-small cell lung cancer *via* glycolytic metabolism[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2021, 410: 115336.

- [10] MA J, MEI J, LU J, et al. Ligustilide promotes apoptosis of cancer-associated fibroblasts *via* the TLR4 pathways [J]. *Food Chem Toxicol*, 2020, 135: 110991.
- [11] LANG F, QU J, YIN H, et al. Apoptotic cell death induced by z-ligustilide in human ovarian cancer cells and role of NRF2 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2018, 121: 631-638.
- [12] 杨超, 张彦收, 张庚, 等. 青蒿琥酯对乳腺癌细胞的生长抑制作用及其机制研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2020, 45(8): 804-809.
- [13] SU P, VEERARAGHAVAN V P, KRISHNA MOHAN S, et al. A ginger derivative, zingerone—a phenolic compound—induces ROS-mediated apoptosis in colon cancer cells (HCT-116) [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2019, 33(12): e22403.
- [14] KARIMI GALOUGAHI K, ANTONIADES C, NICHOLLS S J, et al. Redox biomarkers in cardiovascular medicine [J]. *Eur Heart J*. 2015, 36(25): 1576-1582.
- [15] ZHAO H, YAN C, HU Y, et al. Sphere-forming assay vs. organoid culture: determining long-term stemness and the chemoresistant capacity of primary colorectal cancer cells [J]. *Int J Oncol*, 2019, 54(3): 893-904.
- [16] JIANG F, QIU Q, KHANNA A, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer [J]. *Mol Cancer Res*, 2009, 7(3): 330-338.
- [17] LE MAGNEN C, BUBENDORF L, RENTSCH C A, et al. Characterization and clinical relevance of ALDH bright populations in prostate cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2013, 19(19): 5361-5371.
- [18] VOUTSADAKIS I A. The pluripotency network in colorectal cancer pathogenesis and prognosis: an update [J]. *Biomark Med*, 2018, 12(6): 653-665.

【责任编辑：侯丽颖】

## 黄芪多糖对乙醇诱导的大鼠胃黏膜损伤的修复机制

陈自泓<sup>1,2</sup>, 黄可儿<sup>1</sup>

(1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东广州 510405; 2. 广州白云山星珠药业有限公司, 广东广州 510931)

**摘要:**【目的】探讨半仿生提取的黄芪多糖对乙醇诱导大鼠胃黏膜损伤的修复作用及机制。【方法】将50只雄性SD大鼠随机分成正常组, 模型组, 胃乃安组, 黄芪多糖低、高剂量组, 每组10只。各组分别灌胃给药, 1次/d, 连续2 d。末次给药2 h后, 除正常组外, 其余各组分别按照1.4 mL/只灌胃给予无水乙醇诱导急性胃黏膜损伤。1 h后处死大鼠, 取胃进行胃黏膜损伤评分和病理损伤评分, 免疫组织化学法检测凋亡信号通路B细胞白血病2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶3(Caspase-3)的蛋白表达。【结果】黄芪多糖高、低剂量组均能显著降低胃黏膜的损伤分数和病理损伤评分( $P < 0.05$ ), 呈剂量依赖关系。与正常组比较, 模型组大鼠胃黏膜组织中抑凋亡蛋白Bcl-2的表达水平降低( $P < 0.05$ ), 促凋亡蛋白Bax和Caspase-3的表达水平增加( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 黄芪多糖低、高剂量组胃黏膜组织中抑凋亡蛋白Bcl-2的表达水平增加( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ), 促凋亡蛋白Bax和Caspase-3的表达水平降低( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ )。【结论】半仿生提取黄芪多糖对乙醇诱导的大鼠胃黏膜损伤具有明显的修复作用, 可通过升高抑凋亡蛋白Bcl-2的表达, 降低促凋亡蛋白Bax和Caspase-3的表达发挥作用。

**关键词:** 黄芪多糖; 半仿生提取; 胃黏膜保护; 大鼠**中图分类号:** R285.5**文献标志码:** A**文章编号:** 1007-3213(2021)12-2750-07**DOI:** 10.13359/j.cnki.gzxbtem.2021.12.033**收稿日期:** 2021-08-12**作者简介:** 陈自泓(1981-), 男, 硕士研究生, 主管中药师; E-mail: 434328219@qq.com**通讯作者:** 黄可儿(1962-), 女, 博士, 医学研究员; E-mail: hke8989@163.com**基金项目:** 广州中医药大学“双一流学科建设学科研究项目”(编号: 2021XK33); 广州中医药大学第一附属医院“创新强院科研项目之院内制剂开发项目”(编号: 2019ZJ02)