

6-姜烯酚诱导人结肠癌细胞 HT29 凋亡及与 VEGFR2 表达变化的关系

王宇锋¹, 孙游², 李海³, 杨春³

(1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心, 上海 200127)

(2. 上海市宝山区仁和医院眼科, 上海 201900) (3. 宁夏医科大学总医院, 宁夏银川 750004)

摘要: 本文通过研究不同浓度 6-姜烯酚诱导结肠癌细胞 HT29 凋亡及与 VEGFR2 (血管内皮细胞受体 2) 不同表达之间的关系, 以探讨其可能的抑制结肠肿瘤相关机制。通过应用不同浓度 6-姜烯酚 (0、10、20 和 40 μM) 分别对体外细胞实验培养的 HT29 细胞株进行诱导处理 24 h, 相差倒置荧光显微镜观察细胞形态变化, CCK8 (Cell Counting Kit-8) 法测定药物诱导后细胞抑制率, Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测不同浓度药物干预后细胞凋亡率及凋亡周期变化, 最后用 Western-blot 检测分析 VEGFR2 蛋白不同表达变化。结果显示, 与对照组相比, 6-姜烯酚可呈浓度依赖性地诱导 HT29 凋亡, 并使细胞周期 G0/G1 期细胞数由 49.48% 下降到 24.39% 和 17.18%, 而 G2/M 期细胞数由 3.44% 增加到 34.78% 和 49.54%, 进而将细胞周期阻滞在 G2/M 期, 抑制细胞增殖, 而且还不同程度地抑制了 VEGFR2 表达 ($p < 0.05$)。结果表明, 6-姜烯酚主要是通过诱导 HT29 凋亡进而起到抑制肿瘤细胞增殖的作用, 这可能与不同程度抑制 VEGFR2 有关。

关键词: 6-姜烯酚; 结肠癌细胞 HT29; 血管内皮细胞受体 2; 凋亡

文章编号: 1673-9078(2018)11-1-7

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.11.001

6-shogaol Induces the HT29 Apoptosis and Its Relationship with VEGFR2 Expression in Human Colon Cancer Cell

WANG Yu-feng¹, SUN You², LI Hai³, YANG Chun³

(1. Shanghai Children's Medical Center Affiliated to Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127, China) (2. Department of Ophthalmology, Renhe Hospital of Baoshan District, Shanghai 201900, China)

(3. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract: In order to unravel the mechanism of the inhibition of colorectal cancer by 6-shogaol, the apoptosis of colon cancer cells HT29 induced by different concentrations of 6-shogaol, as well as its relationship with different expression of VEGFR2 (vascular endothelial cell receptor2) was investigated. The HT29 cells were treated with different concentrations of 6-shogaol (0, 10, 20 and 40 μM) cultured *in vitro*. The cell morphology changes were observed by the contrast inverted fluorescence microscope, and the cell inhibition rate was determined by CCK8 method. Annexin V-FITC/PI flow cytometry was used to detect the changes of apoptosis rate and apoptosis cycle. Finally, the expression of VEGFR2 protein was detected by Western-blot. The results showed that as compared with the control group, 6-shogaol could induce HT29 apoptosis in a concentration dependent manner. The number of cell cycle G0/G1 cells decreased from 49.48% to 24.39% and 17.18%, while the number of G2/M cells increased from 3.44% to 34.78% and 49.54%. Thus, the cell cycle was blocked in G2/M stage to inhibit the cell proliferation. Besides, it also inhibited the expression of VEGFR2 to different extents ($p < 0.05$). Therefore, it can be concluded that 6-shogaol can induce HT29 apoptosis and inhibit the proliferation of tumor cells, which may be related to different degrees of inhibition of VEGFR2.

Key words: 6-shogaol; colon cancer cells HT29; vascular endothelial cell receptor2; apoptosis

收稿日期: 2018-06-22

基金名称: 国家自然科学基金项目 (81460369); 宁夏医科大学优势学科群项目 (2001060304)

作者简介: 王宇锋, 男, 住院医师, 研究方向: 结直肠肿瘤发生发展机制

通讯作者: 杨春, 女, 主任医师, 副教授, 研究方向: 结直肠肿瘤发生发展机制

结直肠癌是消化道最常见的恶性肿瘤之一, 根据最新临床数据表明, 其发病率和死亡率呈逐年上升趋势, 其发病率已位居恶性肿瘤的第三位, 而死亡率位居第四位^[1]。在我国, 尤其是近年来随着居民物质生活水平的不断提高以及饮食结构的改变, 结直肠癌的发病率及死亡率一直呈现升高态势, 且发病多在 40

岁以后, 男女之比例大约为 2:1, 严重危害了人们的生存质量^[2]。结直肠癌早期得到确诊的只有 5%, 60~70% 的结直肠癌患者就诊时已是中晚期, 结直肠癌患者的 5 年生存率: I 期为 93%, II 期约为 80%, III 期约为 60%, IV 期约为 8%, 早期诊断能明显提高患者生存率^[3]。目前外科手术辅助放、化疗治疗手段仍是治疗结直肠癌的主要方法, 但是却给患者带来了巨大的心理负担和经济压力^[4]。故探索结直肠癌的发生发展机制, 对于寻找新的治疗方案, 降低结直肠癌的发病率和死亡率具有很大的意义。

近年来, 根据最新调查研究表明^[5], 饮食因素和饮食习惯的改变与结直肠癌的关系甚为紧密, 这为结直肠癌的有效预防和控制提供了更深层次、更全面的依据。而生姜作为一种膳食补充剂、调味作料和中药成分, 姜酚和姜辣素是其中最主要的辣味活性物质^[6], 当遇热后, 姜酚一方面通过醇醛缩合化学反应转化为脂肪醛和姜油酮, 另一方面可以通过脱水反应生成 6-姜烯酚^[7], 而其中 6-姜烯酚 (6-shogaol, 6S) 不仅具有提高机体免疫力^[8]、诱导细胞自噬^[9]、杀菌消毒^[10]、止吐^[11]等功效, 还可有效抑制平滑肌细胞增殖^[12]、抑制肿瘤增殖^[13]等特性。

本研究拟通过体外细胞实验应用不同浓度 6-姜烯酚诱导结肠癌细胞 HT29 凋亡, 并检测 *VEGFR2* 蛋白的表达水平变化, 进而探讨 6-姜烯酚抑制结肠癌细胞 HT29 增殖的相关可能机制, 旨在为进一步研究 6-姜烯酚抑制结直肠肿瘤增殖的相关靶点或具体机制研究奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验试剂

6-姜烯酚纯度 97%, 购自于成都德瑞可生物科技有限公司; Mc Coy's 5A 培养基、胎牛血清 (FBS) 进口于美国 GIBCO 公司; 1.5 M TRIS HCL 缓冲液、1.0 M TRIS HCL 缓冲液、Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液、Tris-甘氨酸电泳缓冲液、甲醇、TBST、TEMED 均购自于美国 Sigma 公司; 双抗 (青霉素加链霉素)、10×Loading Buffer、CCK8 试剂盒、BCA 蛋白提取试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡周期检测试剂盒购自于南京凯基生物公司; 脱脂牛奶、ECL 显色液购于新西兰生物公司; 0.45 μm PVDF 膜、抗 *VEGFR2* 抗体 (鼠抗人, 1:2000 稀释) 购于 ABCAM 公司; 30% 聚丙烯酰胺购于 Bio-Rad Laboratories (Berkeley, CA); 蛋白 marker (10~180 Ku)、

Tween20、山羊抗兔 IgG 抗体 (含辣根酶)、Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒购自于美国 GIBCO 公司。

1.1.2 实验仪器

超净工作台 (Bio-Rad, 型号 ESCO AC2); 相差倒置荧光显微镜 (型号 CKX 41), 日本 NICON 公司; NICON 图像采集系统 (型号 MM 200), 日本 NICON 公司; Bio-Rad 凝胶成像分析仪 (型号 Gel Doc 2000), 美国 Bio-Rad 公司; -80 °C 低温冰箱 (型号 FYL-YS-81A), 日本 SANYO 公司; -20 °C 冰箱 (型号 BCD-205 HK) 青岛海尔公司; 4 °C 冰箱 (型号 BD-105 DEW), 青岛海尔公司; 低温高速离心机 (型号 5430 R), 美国 EPPENDORF 公司; 电子天平 (型号 FA 1004), 上海京孚仪器有限公司; 水平脱色摇床 (型号 WD-9405 C/D), 江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司。

1.1.3 实验细胞

HT29 (原位结肠癌细胞) 细胞株购自美国 ATCC 细胞库 (American type culture collection), 单层贴壁生长, 集落形成率 40%, 裸鼠致瘤性 100%。细胞培养条件: Mc Coy's 5A 培养基+10%胎牛血清+0.1%双抗 (100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素), 置于 37 °C、95% O₂、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞复苏与常规培养

将 Mc Coy's 5A 培养基、胎牛血清 (FBS) 提前室温或 37 °C 温箱内预热处理, 并将可能用到的实验耗材 (15 mL、50 mL 离心管, EP 管, 1.5 mL 冻存管, 微量加样器, 各型枪头等) 提前放在超净工作台内, 打开紫外线灯照射 30~40 min, 调整水浴锅温度至 37.5 °C, 快速从液氮罐中提出所需要的 1.5 mL 冻存管, 将其底部半浸入水浴锅内快速震荡 1 min 左右, 待到 1.5 mL 冻存管内的冻存细胞液迅速融化后, 立即转入超净工作台内, 移液器吸出冻存液并及时转入已经提前加入了 2~3 mL 含胎牛血清和双抗 (100 U/mL 青霉素、100 mg/L 链霉素) 培养基的 15 mL 离心管内, 混匀后低温高速离心机离心 (4 °C, 1500 r/min, 5 min), 吸除上清液, 并向离心管内加入 1~2 mL 预先配好的完全细胞培养液, 轻轻均匀混悬细胞后继续转入新的培养皿, 并在培养皿上标识细胞系名称及复苏时间, 置于 37.5 °C、5% CO₂ 培养箱中培养备用。

1.2.2 分组药物干预

设立 4 组不同浓度药物干预组: HT29-对照 (DMSO)、HT29-6 姜烯酚 (10 μM)、HT29-6 姜烯酚 (20 μM)、HT29-6 姜烯酚 (40 μM) 组, 于 37 °C、

5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 应用相差倒置显微镜观察不同浓度 6-姜烯酚对不同分组细胞增殖的影响及细胞形态的不同变化, 并拍照。

1.2.3 CCK8 法制作细胞抑制率标准曲线

采用细胞计数板计数不同分组细胞悬液中的细胞数量, 根据细胞计数数量, 再按比例接种培养细胞, 在 96 孔板中按照 1:2 比例依次加入用 Mc Coy's 5 A 培养基等比例稀释成一个细胞浓度梯度 (0、5、10、15、20、25、30、40、45、50 μL), 每组设置 3 到 6 个副孔, 再将 96 孔板内按比例接种的细胞悬液配成 100 μL/孔, 最后置于 37.5 °C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 24、48 h。每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 将细胞培养板在 37.5 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 1~4 h, 调至酶标仪 490 nm 波长处检测每个细胞孔的光密度值。按照公式抑制率=1-加药组 OD 值/对照组 OD 值 (Optical Density), 并计算出细胞存活率及抑制率=50%时的药物浓度, 即 IC₅₀。

1.2.4 提取细胞蛋白, 并测定蛋白含量

将所培养的不同分组细胞培养皿中的细胞培养液全部吸除, 根据比例 (10 mL:150 mm 培养板) 加入之前 4 °C 冰箱预冷处理的 PBS 液重复冲洗 2~3 遍, 摇晃均匀, 最大限度的吸除培养皿内培养液, 在 1 mL 预冷的 Lysis Buffer 中分别加入 10 μL 磷酸酶抑制剂、5 μL 100 mM PMSF 及 1 μL 蛋白酶抑制剂, 加入并充分晃动细胞培养皿, 置于冰上保存 1~2 h 待用。PBS 重复细胞洗涤 2~3 次后, 再次将细胞及其悬液转入预冷的 15 或 50 mL 离心管中, 根据细胞数量和培养皿大小加入上述配置的冷 Lysis Buffer, 最后将加入裂解液的细胞培养皿再次置于 4 °C 水平摇床平台上, 剧烈震荡 30 s, 再次放置于冰上 4~5 min, 重复本次操作 4~5 次, 低温高速离心机内离心 (12000 r/min, 4 °C, 5 min), 吸出离心管内上清液即为细胞全蛋白提取物, 细胞蛋白含量检测试剂盒检测蛋白分子量后分装保存于 -80 °C 冰箱内备用。

1.2.5 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡

将所培养的不同分组细胞, 先用胰酶消化, 细胞计数板计数, 取 $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个/mL 细胞, 低温高速离心机内离心 (1500 r/min, 4 °C, 10 min), 弃上清液, 加入 1 mL 预冷的 PBS, 充分摇晃均匀使细胞悬浮, 再次低温高速离心机内离心 (1500 r/min, 4 °C, 10 min), 弃上清。重复 2~3 次, 将细胞重悬于 200 μL Binding Buffer, 加入 10 μL Annexin V-FITC 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min。加入 300 μL Binding Buffer (总反应体积 500 μL) 以及 5 μL PI, 1 小时内在流式细胞

仪上进行观察、记录检测结果, 并绘制细胞凋亡结果图进行比较。

1.2.6 细胞周期检测试剂盒检测细胞凋亡周期

加入不同浓度的 6-姜烯酚诱导细胞凋亡, 同时设立阴性对照组, 消化、收集不同分组细胞, 预冷的 PBS 洗涤细胞 2~3 次, 并低温高速离心机内离心 (2000 r/min, 4 °C, 5 min), 弃上清液, 调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL 细胞。取 1 mL 上述细胞悬液, 加入体积分数为 70% 冷乙醇 500 μL 进行固定, 过夜, 4 °C 冰箱保存, 染色前用 PBS 洗去固定液 2~3 次, 加入 100 μL RNaseA 后置于 37.5 °C 水浴锅中 30 min, 再加入 400 μL PI 染色均匀, 4 °C 冰箱内避光、保存 30 min, 最后在 488 nm 激发波长处检测周期变化。

1.2.7 Western-Blot 检测蛋白表达

根据上述操作所测蛋白样品浓度, 将不同分组蛋白样品经 SDS-PAGE 电泳 100 V, 1.5~2 h (浓缩胶 5%、分离胶 10%), 然后电转液中湿性电转 100 V、1 h, 电转至 PVDF 膜, 4% 脱脂奶粉 37 °C 封闭 1.5~2 h, 水平摇床摇匀, 加入相应的抗体 VEGFR2 (1:2000 稀释)、β-actin (1:1500 稀释), 4 °C 冰箱孵育、过夜。应用 1% TBST 洗膜 2~3 次, 加入相应的二抗 (鼠抗兔) 进行免疫杂交反应, 37.5 °C 室温孵育 2 h, 再用 1% TBST 洗膜 2~3 次后, 最后再加入适宜剂量的 ECL 显色液 (A 液和 B 液在 EP 管内等体积混合), 在暗室凝胶成像仪下曝光成像, 并用扫描仪扫描出胶片图像, 采用凝胶图像分析软件 (Quantity One) 对结果进行定量分析。每个实验重复 2~3 次, 取其平均值

1.3 统计学分析

应用 SPSS20.0 统计软件进行数据处理, 实验数据以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 ANOVA 方差分析, $p \leq 0.05$ 为检验水准, 差异具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 6-姜烯酚可明显抑制 HT29 细胞增殖

不同分组 HT29 加入不同浓度 6-姜烯酚干预后, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 在相差倒置显微镜下观察细胞的生长状况及形态变化 (放大倍数: 40×10 倍)。

结果如图 1 所示, 阴性对照组细胞生长良好, 随着 6-姜烯酚浓度由 10 μM 增加到 40 μM, 细胞生长状态明显受抑制, 活性较差, 细胞体积变小, 细胞间连接减少, 脱离较多, 且随药物浓度增加, 细胞生长活性受影响越明显。

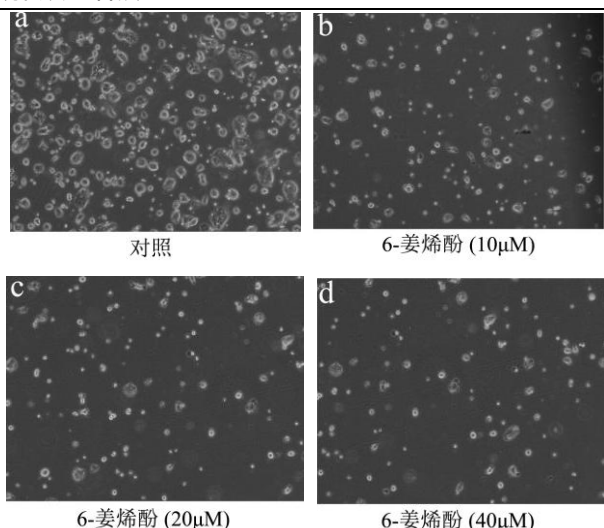


图1 显微镜下不同浓度 6-姜烯酚干预 HT29 24 h 后细胞的形态变化

Fig.1 Morphological changes of HT29 intervened under different concentrations of 6-shogaol by microscope after 24 h ($\bar{x} \pm s$, n=3)

2.2 CCK8 法检测药物干预后细胞抑制率变化

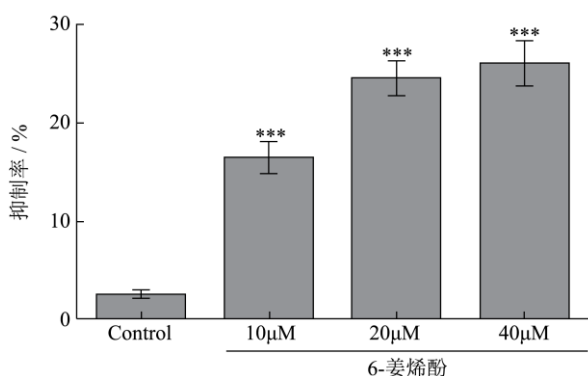


图2 CCK8 法检测不同浓度 6-姜烯酚对 HT29 增殖能力的调控
Fig.2 CCK8 assay was used to detect the proliferation of HT29 at different concentrations of 6-shogaol (24 h) ($\bar{x} \pm s$, n=3)

注: 与对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

不同分组细胞培养板在培养箱内孵育 1~4 h, 并用酶标仪测在 490 nm 处检测、记录吸光度值, 并计算出细胞抑制率。结果如(图 2)显示, 与阴性对照组相比, HT29-6 姜烯酚组细胞存活抑制率明显升高, 尤其在 HT29-6 姜烯酚浓度达到 40 μM 时细胞存活抑制率升高更为明显 ($p < 0.05$); 并计算出 6-姜烯酚对 HT29 细胞的 IC_{50} 为 18.7 μmol/L。

2.3 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测 6-姜烯酚诱导 HT29 凋亡

国内有报道研究^[14], 在研究 6-姜烯酚对结肠癌细

胞 HCT116 的抑制作用中发现, 6-姜烯酚 (20 μM) 通过促进 *FTL* (Recombinant Ferritin, Light Polypeptide)、*GCLC* (谷氨酰半胱氨酸合成酶抗体)、核蛋白 *Nrf2* (核因子 E2 相关因子 2) 表达及抑制 *Keap1* (Kelch like ECH Associated Protein 1)、胞浆蛋白中 *Nrf2* 表达诱导结肠癌细胞 HCT116 发生凋亡, 进而抑制肿瘤细胞增殖。还有研究表明^[15], Tan 通过对微阵列基因表达谱和连通图的进一步分析对比中发现 6-姜烯酚是通过激活 *PPARγ* (peroxisome proliferator activated receptor-γ) 介导的分子信号通路来增加其对肿瘤增殖的抑制作用。而本实验将培养的各分组细胞 (HT29) 分别用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 从荧光双参数点图可以观察(图 3), 其中右上象限和右下象限为死亡细胞数。与阴性对照组相比, HT29-6 姜烯酚组随着药物浓度由低-中-高, 右上象限和右下象限死亡细胞数明显不同程度增加 ($p < 0.05$)。从而证实 6-姜烯酚可以诱导 HT29 发生凋亡, 进而抑制肿瘤细胞增殖。

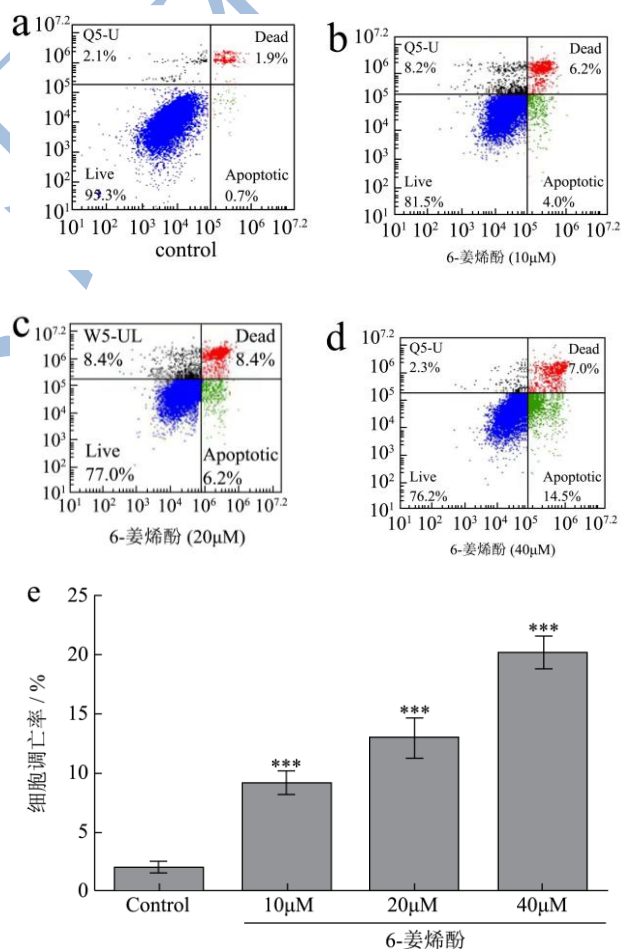


图3 Annexin V-FITC/PI 流式细胞术检测不同浓度 6-姜烯酚诱导人 HT29 凋亡

Fig.3 Annexin V-FITC/PI flow cytometry was used to detect the apoptosis of human HT29 induced by 6-shogaol ($\bar{x} \pm s$, n=3)

注: 与对照组相比, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

2.4 细胞凋亡周期检测试剂盒检测 6-姜烯酚

诱导 HT29 凋亡后细胞增殖周期改变

本课题组在前期研究中发现^[16], 6-姜烯酚可诱导结直肠肿瘤细胞 SW480 发生凋亡, 并导致 G0/G1 期的细胞数由高降到低, 而 G2/M 期的细胞数由低到, 致使该细胞增殖周期被阻断在 G2/M 期, 进而抑制肿瘤细胞增殖。同时赵行宇^[17]在研究 6-姜烯酚对胃癌 BGC-823 细胞凋亡及其机制实验中指出不同浓度 6-姜烯酚处理胃癌细胞 24 h 后, 随药物浓度增加, 胃癌 BGC-823 细胞的早期凋亡率也呈现升高态势, 与对照组相比, 差异具有统计学意义。本实验将培养的各分组细胞 (HT29) 分别用流式细胞仪检测, 如表 1 所示, 可以观察到 HT29-6 姜烯酚组随着药物浓度由低-中-高, 细胞增殖周期中各期细胞构成比发生明显变化。与阴性对照组相比, 其中 G0/G1 期的细胞数由 49.48% 下降到 24.39% 和 17.18% ($p<0.05$), 而 G2/M 期的细胞数由 3.44% 增加到 34.78% 和 49.54% ($p<0.05$), 提示 HT29 细胞被阻断在 G2/M 期。

表 1 细胞凋亡周期检测试剂盒检测不同浓度 6-姜烯酚诱导人 HT29 凋亡细胞周期变化

Table 1 The cell cycle changes of apoptosis induced by different concentrations of 6-shogaol in human HT29 were detected by cell cycle detection kit ($\bar{x}\pm s$, n=3)

6-姜烯酚浓度/ μM	G0/G1/%	S/%	G2/M/%
0	49.48 \pm 0.46	47.08 \pm 0.29	3.44 \pm 0.73
10	37.64 \pm 0.67*	38.47 \pm 1.34*	23.89 \pm 0.85*
20	24.39 \pm 0.99*	40.83 \pm 1.12*	34.78 \pm 0.82*
40	17.18 \pm 1.12*	33.28 \pm 1.46*	49.54 \pm 1.23*

注: 与对照组相比, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。

2.5 6-姜烯酚可不同程度抑制 VEGFR2 的表达

国内学者刘洪金^[18]在研究贝伐珠单抗对结直肠癌细胞 VEGFR1 和 VEGFR2 表达的影响中发现贝伐珠单抗可诱导血管内皮生长因子(VEGF)表达下调, 却使 VEGF 相关受体 (VEGFR1、VEGFR2) 表达升高, 而 VEGFR1 和 VEGFR2 可直接不同程度的提高肿瘤新生血管的生长、侵袭能力, 间接导致了贝伐珠单抗对新血管新生和肿瘤侵袭的抑制作用减弱, 进而产生临床耐药性。同时还有报道^[19]在研究不同浓度的藤黄酸诱导结肠癌细胞 SW480 凋亡与 VEGFR2 蛋白的表达影响一文中指出, 藤黄酸可以诱导人结肠癌细胞株 SW480 发生凋亡, 并使 SW480 细胞发生 G2/M 期阻

滞, 而 VEGFR2 蛋白的表达随药物浓度的增加而减少, 进而推断其作用机制可能与抑制 VEGFR2 表达有关。本研究结果显示如图 4 (a、b) 所示, 药物干预 4 组细胞 24 h 后, 与阴性对照组比较, Western-blot 检测不同浓度的 6-姜烯酚对 VEGFR2 表达水平呈现不同程度降低 ($p<0.05$), 提示 6-姜烯酚诱导 HT29 凋亡进而抑制肿瘤细胞增殖, 可能与不同程度抑制 VEGFR2 有关。

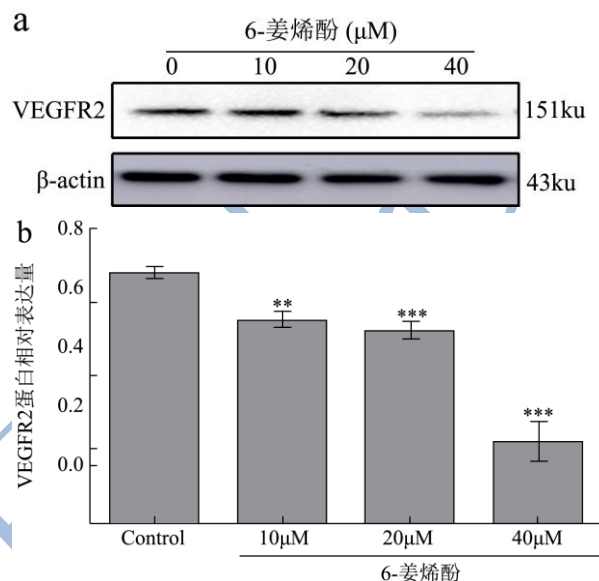


图 4 Western-blot 检测不同浓度 6-姜烯酚对 HT29 中 VEGFR2 表达的影响

Fig.4 The effect of 6-shogaol on the expression of VEGFR2 in HT29 was detected by Western-blot ($\bar{x}\pm s$, n=3)

注: 与对照组相比, * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ 。

3 结论

3.1 细胞凋亡是多细胞生物整个生命过程中不可缺少的环节, 对机体内损伤、衰老细胞的清除、更新及各组织器官的发育都起着十分重要的作用^[20,21]。近年来, 细胞凋亡越来越受到广大科研工作者的关注, 目前发现真核细胞的凋亡过程主要有以下四种: 外部凋亡途径 (经死亡受体介导)、内部凋亡途径 (经线粒体介导)、细胞凋亡途径 (经 B 粒酶介导)、内质网应激途径^[22]。一般情况下, 细胞凋亡过程都会受到机体严格、紧密的调控, 以维持机体各组织器官的正常发育和免疫系统的建立^[23]。

3.2 VEGFR2 (血管内皮细胞生长因子受体 2), 又称 FLK-1, 一般存在于血管和淋巴管内皮等处。VEGFR2 可与 VEGF-C、VEGF-D 等结合进而发挥对淋巴管内皮细胞和血管内皮细胞的调节作用, 其还具有介导淋巴管和血管的新生, 有效调节淋巴细胞的迁移等功能^[24]。众所周知, 血管生长因子和血管生长抑制因子共

同调节新生血管的形成,其中最主要的影响因子是 VEGF (血管内皮生长因子)及其受体 VEGFR-2,而 VEGFR-2 作为 VEGF 调节新生血管生成的核心因子,对内皮细胞的增殖、分化以及肿瘤新生血管的形成都具有重大的意义^[25]。张靖宇^[26]在探讨胰岛素样生长因子 1 受体(IGF-1R)和血管内皮细胞生长因子受体 2(VEGFR2)蛋白在结直肠癌组织中的表达意义中发现结直肠癌患者肿瘤组织中 IGF-1R、VEGFR2 及 mRNA 表达明显升高,且蛋白的表达水平受到结直肠肿瘤组织学分级、浸润深度、有无淋巴结转移及术后辅助化疗的影响,并指出 IGF-1R 和 VEGFR2 联合检测可为结直肠癌患者的靶向治疗提供临床依据。

3.3 本实验从细胞形态学上可以发现随着 6-姜烯酚浓度由低到高,细胞生长活性状态明显受抑制,且随药物浓度增加,细胞生长活性受影响越明显,具有浓度依赖性。进一步通过流式细胞术检测发现 6-姜烯酚可诱导 HT29 发生凋亡,并致使细胞增殖周期被 G2/M 期,干扰了 DNA 合成和有丝分裂,抑制结肠癌细胞 HT29 增殖。而 Western-blot 检测不同浓度的 6-姜烯酚对 VEGFR2 表达水平却呈现不同程度降低,提示 6-姜烯酚诱导 HT29 凋亡进而抑制肿瘤细胞增殖,可能与不同程度抑制 VEGFR2 有关。

3.4 本研究结果虽然证实了 6-姜烯酚诱导结肠癌细胞 HT29 凋亡可能与不同程度地抑制 VEGFR2 表达水平有关,但是 6-姜烯酚是否通过影响其它凋亡途径或者具体的抑制结直肠肿瘤细胞机制是与哪些信号通路有关尚未完全明确,还需要进一步更加系统、深入的研究。随着国内外学者对 6-姜烯酚的不断深入研究,其对结直肠癌的具体相关机制或信号通路必将更加明确,也必将为我们针对结直肠癌的诊治提供更加广阔的空间。

参考文献

- [1] 顾晋,汪建平.中国结直肠癌诊疗规范(2017年版)[J].中华临床医师杂志(电子版),2018,1
- [2] Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, et al. The global burden of cancer 2013 [J]. *Jama Oncology*, 2015, 1(4): 505
- [3] Maruthappu M, Head M G, Zhou C D, et al. Investments in cancer research awarded to UK institutions and the global burden of cancer 2000-2013: a systematic analysis [J]. *Bmj Open*, 2017, 7(4): e013936
- [4] Yusof A S, Isa Z M, Shah S A. Dietary patterns and risk of colorectal cancer: a systematic review of cohort studies (2000-2011) [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* Apjcp, 2012, 13(9): 4713-4717
- [5] 刘晓雪,宇传华,周薇,等.中国近 30 年间结直肠癌死亡趋势分析[J].中国癌症杂志,2018,28(3):177-183
- [6] LIU Xiao-xue, YU Chuan-hua, ZHOU Wei, et al. Analysis of the death trend of colorectal cancer in China in the past 30 years [J]. *Chinese Journal of cancer*, 2018, 28(3): 177-183
- [6] 李琰,王彦志,李泽之,等.干姜中姜酚类成分的分离鉴定[J].中国药学杂志,2017,20:1812-1815
- [7] LI Yan, WANG Yan-zhi, LI Ze-zhi, et al. Isolation and identification of ginger phenolic compounds from dried ginger [J]. *Chinese Journal of pharmacy*, 2017, 20: 1812-1815
- [7] 马思远,申金辰,沈亚,等.HPLC-DAD 法同时测定生姜超临界 CO₂ 萃取物中 6 种成分[J].广东化工,2018,5
- [8] MA Si-yuan, SHEN Jin-chen, SHEN Ya, et al. Simultaneous determination of 6 components in ginger supercritical CO₂ extract by HPLC-DAD [J]. in *Guangdong chemical industry*, 2018, 5
- [8] 高群.生姜醇提物抗肿瘤作用的实验研究[J].科技信息,2010,16:794
- [9] GAO Qun. Experimental study on the antitumor effect of alcohol extract from ginger [J]. *science and technology information*, 2010, 16: 794
- [9] Ray A, Vasudevan S, Sengupta S. 6-Shogaol Inhibits Breast Cancer Cells and Stem Cell-Like Spheroids by Modulation of Notch Signaling Pathway and Induction of Autophagic Cell Death [J]. *Plos One*, 2015, 10(9): e0137614
- [10] 梁淑增.外科手术前消毒的药物及制备方法:中国, CN105477589A[P].2016-04-13
- [11] LIANG Shu-zeng. Pre operative sterilizing drugs and preparation methods: China, CN105477589A [P]. 2016-04-13
- [11] 杨鹏,于博,汤尚文,等.姜酚及其应用研究进展[J].粮食流通技术,2017,2(4):78-81
- [12] YANG Peng, YU Bo, TANG Shang-wen, et al. Advances in ginger and its application [J]. *grain circulation technology*, 2017, 2(4): 78-81
- [12] 陈磊,胡子成,周毅,等.6-姜烯酚通过下调 TLR4/NF-κB 通路抑制血管平滑肌细胞增殖[J].第三军医大学学报,2016,38(3):245-250
- [12] CHEN Lei, HU Zi-cheng, ZHOU Yi, et al. 6-shogaol phenol inhibits proliferation of vascular smooth muscle cells by

- down regulating TLR4/NF- κ B pathway [J]. Journal of Third Military Medical University, 2016, 38(3): 245-250
- [13] Hung J Y, Hsu Y L, Li C T, et al. 6-Shogaol, an active constituent of dietary ginger, induces autophagy by inhibiting the AKT/mTOR pathway in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2009, 57(20): 9809
- [14] 王宇锋,刘旭,陈超,等.6-姜烯酚对结直肠癌细胞中 Keap1/Nrf2 通路及下游基因表达的影响[J].宁夏医科大学学报,2017,10:1127-1132
WANG Yu-feng, LIU Xu, CHEN Chao, et al. Effects of 6-shogaol phenol on Keap1/Nrf2 pathway and downstream gene expression in colorectal cancer cells [J]. Journal of Ningxia Medical University, 2017, 10: 1127-1132
- [15] Tan, B. S., Kang, O., Mai, C. W., et al. 6-Shogaol inhibits breast and colon cancer cell proliferation through activation of peroxisomal proliferator activated receptor gamma (PPAR γ) [J]. Cancer Lett. 2013, 336: 127-139
- [16] 王宇锋,杨春,陈超,等.6-姜烯酚诱导 SW480 凋亡及对 APC 基因表达的影响[J]. 现代食品科技, 2018,2:14-19
WANG Yu-feng, YANG Chun, CHEN Chao, et al. 6-shogaol phenol induces apoptosis of SW480 and its effect on APC gene expression [J]. Modern Food Technology, 2018, 2: 14-19
- [17] 赵行宇,侯以森,刘雅范,等.6-姜烯酚诱导胃癌 BGC-823 细胞凋亡及其机制研究[J].上海中医药杂志,2018,2:84-88
ZHAO Xing-yu, HOU Yi-sen, LIU Ya-fan, et al. 6-shogaol phenol induces apoptosis and its mechanism in gastric cancer BGC-823 cells [J]. Chinese Journal of Chinese medicine, 2018, 2: 84-88
- [18] 刘洪金,付艳,贾森浩,等.贝伐珠单抗对结直肠癌细胞 VEGFR1 和 VEGFR2 表达的影响[J].中国肿瘤,2015,24(8): 708-714
LIU Hong-jin, FU Yan, JIA Sen-hao, et al. Effect of bevacizumab on the expression of VEGFR1 and VEGFR2 in colorectal cancer cells [J]. China cancer, 2015, 24(8): 708-714
- [19] 杨平,曹杰,张通,等.藤黄酸对人结肠癌 SW480 细胞增殖及 VEGFR2 表达的影响[J].中国中医基础医学杂志,2012,18(5):520-522
YANG Ping, CAO Jie, ZHANG Tong, et al. Effect of garcinic acid on proliferation and VEGFR2 expression of human colon cancer SW480 cells [J]. Chinese Journal of basic medicine, 2012, 18(5): 520-522
- [20] 丁大伟,章永红.以细胞凋亡通路为靶点的抗肿瘤中药研究进展[J].中国老年学杂志, 2018,1
DING Da-wei, ZHANG Yong-hong. Progress in the research of anticancer drugs targeting apoptosis pathway [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2018, 1
- [21] Ren L, Li Z, Dai C, et al. Chrysophanol inhibits proliferation and induces apoptosis through NF- κ B/cyclin D1 and NF- κ B/Bcl-2 signaling cascade in breast cancer cell lines, [J]. Molecular Medicine Reports, 2018, 17(3): 4376-4382
- [22] Taabazuing C Y, Okondo M C, Bachovchin D A. Pyroptosis and apoptosis pathways engage in bidirectional crosstalk in monocytes and macrophages [J]. Cell Chem Biol, 2017, 24(4): 507-514
- [23] Matsumoto K, Maeda A, Bochner B S, et al. Induction of apoptosis in human basophils by anti-fas antibody treatment *in vitro* [J]. International Archives of Allergy & Immunology, 2016, 146(Suppl.1): 1437-1443
- [24] Almalki S G, Agrawal D K. ERK signaling is required for VEGF-A/VEGFR2-induced differentiation of porcine adipose-derived mesenchymal stem cells into endothelial cells [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2017, 8(1): 113
- [25] 李敏,林俊.细胞凋亡途径及其机制[J].国际妇产科学杂志,2014,2:103-107
LI Min, LIN Jun. Pathways and mechanisms of apoptosis [J]. International Journal of Obstetrics and Gynecology, 2014, 2: 103-107
- [26] 张靖宇,朱明珍,孙志超,等.IGF-1R 和 VEGFR2 蛋白在结直肠癌组织中的表达及其临床意义[J].中国药房,2017,28(35):4901-4906
ZHANG Jing-yu, ZHU Ming-zhen, SUN Zhi-chao, et al. Expression and clinical significance of IGF-1R and VEGFR2 protein in colorectal cancer [J]. Chinese pharmacies, 2017, 28(35): 4901-4906