

辣木籽异硫氰酸酯衍生物抑制 结肠癌 HCT-116 细胞的生长和迁移

杨茗茸^{1,2}, 杨扬², 彭麟杰^{1,2}, 毛家英^{1,2}, 盛军^{2,3}, 解静^{2,3*}, 田洋^{1,2,3*}

(1. 云南农业大学食品科学技术学院, 云南昆明 650201) (2. 国家辣木加工技术研发专业中心, 云南昆明 650201)
(3. 教育部食药同源资源开发与利用工程中心, 云南省药食同源功能食品开发工程中心, 云南昆明 650201)

摘要: 该研究旨在探讨辣木籽异硫氰酸酯衍生物 (MITC-21) 抑制结肠癌 HCT-116 细胞生长和迁移的作用。采用 MTT 实验、克隆形成实验、流式细胞术、细胞划痕实验和蛋白印迹法, 检测经不同浓度 MITC-21 处理的 HCT-116 细胞增殖、凋亡、迁移和相关蛋白表达水平的变化情况。结果表明, MITC-21 呈剂量依赖性和时间依赖性的方式显著降低 HCT-116 细胞的存活率, 半致死剂量分别为 6.79 $\mu\text{mol/L}$ (24 h)、3.71 $\mu\text{mol/L}$ (48 h) 和 1.13 $\mu\text{mol/L}$ (72 h); 克隆形成实验表明, MITC-21 (2 和 4 $\mu\text{mol/L}$) 显著抑制 HCT-116 细胞克隆形成, 处理 48 h 后克隆形成率从 100% 降低到 68.36% ($p < 0.05$) 和 49.51% ($p < 0.01$); 当 MITC-21 浓度为 4 $\mu\text{mol/L}$ 时 HCT-116 发生明显的细胞形态变化; 流式细胞术分析得出, HCT-116 细胞的凋亡率随着 MITC-21 浓度和处理时间的增加而上升, 处理 48 h 后, 细胞凋亡率从 14.97% 增加到 21.60% ($p < 0.001$) 和 22.78% ($p < 0.001$); 细胞划痕实验表明, MITC-21 显著降低细胞迁移率, 迁移率从 61.53% 降低到 32.89% ($p < 0.01$) 和 24.30% ($p < 0.001$); 蛋白表达水平检测表明, MITC-21 (4 $\mu\text{mol/L}$) 显著增加凋亡相关蛋白 Bax/Bcl-2 比率 ($p < 0.01$), 降低迁移相关蛋白 MMP2 表达水平 ($p < 0.05$)。MITC-21 能够抑制 HCT-116 细胞增殖、诱导细胞凋亡和抑制细胞迁移。

关键词: 辣木籽异硫氰酸酯衍生物; HCT-116 细胞; 细胞生长; 细胞迁移

文章编号: 1673-9078(2021)10-46-54

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0067

Isothiocyanate Derivatives from *Moringa oleifera* Seeds Inhibit the Growth and Migration of Colon Cancer HCT-116 Cells

YANG Ming-rong^{1,2}, YANG Yang², PENG Lin-jie^{1,2}, MAO Jia-ying^{1,2}, SHENG Jun^{2,3}, XIE Jing^{2,3*}, TIAN Yang^{1,2,3*}

(1. College of Food Science and Technology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

(2. National Research Center for Moringa Processing Technology, Kunming 650201, China)

(3. Engineering Center for Development and Utilization of Food and Drug Homologous Resources, Ministry of Education, Yunnan Engineering Research for Drug and Food Homologous Functional Food, Kunming 650201, China)

Abstract: This study aimed to investigate the inhibitory effect of the isothiocyanate derivatives from *Moringa oleifera* seeds (MITC-21) on the growth and migration of colon cancer HCT-116 cells. Changes in cell proliferation, apoptosis, migration and protein expression levels of HCT-116 cells treated with different concentrations of MITC-21 were determined by the MTT assay, colony formation assay, flow cytometry, wound-healing assay and western blotting. The results showed that MITC-21 treatment decreased significantly the viability of HCT-116 cells in a dose- and time-dependent manner, with the IC_{50} values for MITC-21 against HCT-116 cells for 24, 48 and 72 h being 6.79 $\mu\text{mol/L}$, 3.71

引文格式:

杨茗茸, 杨扬, 彭麟杰, 等. 辣木籽异硫氰酸酯衍生物抑制结肠癌 HCT-116 细胞的生长和迁移[J]. 现代食品科技, 2021, 37(10): 46-54

YANG Ming-rong, YANG Yang, PENG Lin-jie, et al. Isothiocyanate derivatives from *Moringa oleifera* seeds inhibit the growth and migration of colon cancer HCT-116 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 46-54

收稿日期: 2021-01-19

基金项目: 云南省科技厅重大专项 (202002AA1000005); 云南省重大科技专项-绿色食品国际合作研究中心项目 (2019ZG009); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才 (2018HB040); 云南省教育厅科学研究基金项目 (2019J0180)

作者简介: 杨茗茸 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 功能食品, E-mail: 2235670878@qq.com

通讯作者: 解静 (1988-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 功能食品, E-mail: jingxie0624@163.com; 共同通讯作者: 田洋 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 功能食品, E-mail: tianyang1208@163.com

$\mu\text{mol/L}$, and $1.13 \mu\text{mol/L}$, respectively. The results of the colony formation assay indicated that MITC-21 (0, 2 and $4 \mu\text{mol/L}$) significantly decreased the colony-forming ability of HCT-116 cells and after a 48 h treatment, the colony formation rate decreased from 100% to 68.36% ($p < 0.05$) and 49.51% ($p < 0.01$). When MITC-21 was at $4 \mu\text{mol/L}$, the cell morphology of HCT-116 cells changed significantly. Flow cytometry analysis showed that the apoptosis rate of HCT-116 cells increased with an increase of the dose and time of MITC-21 treatment. After a 48 h treatment, compared with that of the control cells (14.97%), the apoptosis rate of MITC-21-treated groups increased to 21.60% ($p < 0.001$) and 22.78% ($p < 0.001$), respectively. The wound-healing assay revealed that MITC-21 significantly inhibited the migration of HCT-116 cells, with the cell migration rate decreasing from 61.53% to 32.89% ($p < 0.01$) and 24.30% ($p < 0.001$), respectively. MITC-21 at $4 \mu\text{mol/L}$ significantly increased the Bax/Bcl-2 ratio and decreased the expression levels of the cell migration-related proteins MMP2. Thus, MITC-21 can inhibit the proliferation, induce apoptosis and suppress migration of HCT-116 cells.

Key words: *Moringa oleifera* seeds isothiocyanate derivatives; HCT-116 cells; cell growth; cell migration

结直肠癌作为一种常见的消化道恶性肿瘤,在世界范围内严重威胁人类健康,其发病率高居全球第三位,是导致癌症相关死亡的第二大病因^[1-3]。结直肠癌主要通过手术切除和化学疗法治疗,但结肠癌患者的传统手术治疗大多会出现高复发、低预后的情况^[4],且辅助化疗价格昂贵,并易产生毒性及耐药性^[5,6]。因此,探索低毒、高效的抗肿瘤药物正成为结肠癌治疗研究领域的新热点。

辣木 (*Moringa oleifera* Lam.) 为辣木科辣木属多年生热带乔木。作为一种新开发利用的食品,近年来,对辣木保健食品开发及有效成分的提取多有研究。辣木籽是辣木的种子,除了具有丰富的蛋白质、油脂、维生素、多糖等营养物质^[7],同时富含多种活性成分。研究发现,辣木籽具有抗氧化^[8]、抗菌^[9]、抗癌^[10]、降血糖血脂^[11,12]等作用。

异硫氰酸酯类化合物 (Isothiocyanates, ITCs) 是广泛存在于十字花科植物中的一类含硫有机化合物,具有多种生物学活性^[13-15]。大量研究表明,辣木籽异硫氰酸酯类化合物具有抗炎^[16]、降血压^[17]、抗菌^[18]、抗癌^[19]等活性。其中,对肝癌 Hep 3B 细胞^[20]、结肠癌 Caco-2 细胞^[21]、人前列腺癌 PC-3 细胞^[22]的增殖具有抑制作用,也可通过调节 NF- κ B 和凋亡相关因子抑制 SH-SY5Y 人神经母细胞瘤细胞生长^[23]。

异硫氰酸酯已被证明是具有活力的天然抗癌产物,但部分异硫氰酸酯由于其独特的化学结构,在温度、pH 值、光照、溶剂等因素的影响下易降解^[24-26]。此类辣木籽异硫氰酸酯 (MITC) 对热不稳定^[27],有待优化结构。课题组前期对 MITC 进行了结构优化,并合成了一系列的 MITC 衍生物,通过抗癌活性筛选发现 MITC-21 的抗癌活性最佳。因此,本研究在前期工作基础上,进一步探讨 MITC-21 对 HCT-116 细胞增殖、凋亡和迁移的调控作用,明确 MITC-21 抑制 HCT-116 细胞生长和迁移的效果,为辣木资源的有效利用及结肠癌的防治奠定科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品与试剂

人结肠癌细胞 (HCT-116)、人胃粘膜细胞 (GES-1)、人前列腺癌细胞 (PC-3)、人肾透明细胞腺癌细胞 (786-O)、人宫颈癌细胞 (Hela)、人乳腺癌细胞 (MDA-MB-231) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, MITC、MITC-21 由教育部食药同源资源开发与利用工程中心提供。F/12 培养基, Hyclone 公司; 胎牛血清, BI 公司; Bax、Bcl-2、MMP2、 β -tubulin 一抗, Abcam 公司; 噻唑蓝 MTT, sigma 公司; 结晶紫, 阿拉丁生化科技股份有限公司; 细胞凋亡检测试剂盒, 翊圣生物有限公司; RIPA 及 PMSF, 索莱宝生物技术公司; BCA 测定试剂盒, 碧云天生物技术有限公司; 超敏 ECL 化学发光试剂盒, 万类生物科技有限公司。

1.1.2 仪器与设备

低速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; CO₂ 培养箱, 德国宾德; 多功能酶标仪、倒置显微镜, 上海蔡康光学仪器有限公司; 细胞计数器, Count star; Molecular Devices; 恒温金属浴, 上海一恒科技有限公司; 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 曝光机, 科锐; 高速冷冻离心机, (CT15RE) Hitachi; 流式细胞仪, BDC6。

1.2 实验方法

1.2.1 辣木籽异硫氰酸酯衍生物制备

加入辣木籽中提取的异硫氰酸酯与 3,5-二溴邻氨基氨基苯甲酸以乙醇作溶剂加入三乙胺催化, 在 90 °C 条件下反应, 置于油浴锅中进行, 通过薄层层析点板的方法检测, 到产生新物质后结束反应, 反应结束后通过沙漏冲洗法和柱层析法分离出产物后蒸干。

1.2.2 细胞培养

细胞培养在含有 10%胎牛血清和 1%双抗的 F/12 培养基中,并置于 37 °C, 5%的 CO₂ 培养箱中,每隔两天传代一次。

1.2.3 MTT 法检测细胞存活率

收集对数生长期的细胞,胰蛋白酶消化后计数,以 1×10⁴ cells/孔接种于 96 孔板中,于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 12~24 h,分别用不同浓度的 MITC-21 (0、0.5、1、2、4、8 和 16 μmol/L) 处理细胞 24、48、72 h,移除培养基,加入 100 μL 浓度为 0.25 mg/mL 的 MTT 溶液,孵育 4 h 后终止培养,移除 MTT 溶液,每孔加入 100 μL DMSO,振荡 10 min 至结晶充分溶解,在酶标仪 OD_{490 nm} 处检测各孔的吸光度值,计算细胞存活率。

1.2.4 克隆形成实验

收集对数生长期的 HCT-116 细胞,胰蛋白酶消化后计数,以 500 cells/孔接种于 6 孔板中培养 24 h,用不同浓度的 MITC-21 (0、2 和 4 μmol/L) 处理 24、48、72 h,更换正常培养基继续培养至空白对照组细胞生长至 80%后,吸弃培养基,用磷酸盐缓冲液清洗两次,甲醇固定 10 min,用 0.1%结晶紫染色 30 min,洗涤晾干后拍照,并用 10%的冰乙酸溶解结晶紫,在酶标仪 OD_{560 nm} 处测量吸光值,计算克隆形成率。

1.2.5 倒置显微镜观察细胞形态变化

收集生长状态良好的 HCT-116 细胞,以适当浓度接种于 6 孔板中培养 12~24 h,用不同浓度的 MITC-21 (0、2 和 4 μmol/L) 处理 48 h,倒置显微镜下观察细胞形态变化,并拍照。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期细胞接种于 6 孔板中,每孔 2×10⁵ cells,过夜贴壁生长,采用不同浓度的 MITC-21 (0、2 和 4 μmol/L) 处理细胞 24、48、72 h,用预冷的磷酸盐缓冲液清洗后,胰蛋白酶消化收集细胞于离心管中,300 g, 4 °C 离心 5 min,弃上清液收集细胞,用 PBS 清洗 2 次。使用 100 μL 1×Binding Buffer 重悬细胞,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI Staining Solution,避光、室温反应 10~15 min。加入 400 μL 1×Binding Buffer,混匀后放置于冰上,样品在 1 h 内用流式细胞仪检测。

1.2.7 细胞划痕实验

取对数生长期的 HCT-116 细胞接种于 60 mm 培养皿中培养,待过夜贴壁生长后,用枪头对细胞层划痕,加入磷酸盐缓冲液清洗,用不同浓度的 MITC-21 (0、2 和 4 μmol/L) 处理细胞,48 h 后拍照观察细胞

划痕愈合情况。

1.2.8 Western blot 法检测相关蛋白表达量

取对数生长期细胞接种于 60 mm 培养皿中,每孔 5×10⁵ 个,于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中过夜贴壁生长,加入不同浓度的 MITC-21 (0、2 和 4 μmol/L) 处理细胞 48 h,吸弃培养基,用预冷的磷酸盐缓冲液清洗后,使用 RIPA 裂解液和 PMSF (RIPA:PMSF=100:1) 提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。在质量分数 10%的聚丙烯酰胺凝胶上分离后,将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上,用 5%的脱脂奶粉在室温下封闭 1 h,与一抗在 4 °C 下过夜孵育。第 2 d 用 1×TBST 清洗 PVDF 膜 3 次,再将 PVDF 膜与相应二抗在室温下孵育 1 h,1×TBST 清洗 3 次,最后用曝光仪曝光显影。

1.2.9 数据处理与分析

使用 Graphpad prism、ImageJ、SPSS 等软件进行分析统计,组间比较采用单因素方差分析,*表示 $p<0.05$,**表示 $p<0.01$,***表示 $p<0.001$ 。

2 结果与讨论

2.1 MITC-21 对 HCT-116 细胞存活率的影响

MITC、MITC-21 结构式如图 1a 所示。首先采用 MTT 法对 MITC-21 进行抗癌活性筛选。研究发现,与对照组相比,MITC-21 剂量为 10 μmol/L 时,PC-3 细胞、HCT-116 细胞、Hela 细胞和 MDA-MB-231 细胞的存活率受到其显著抑制,且抑制率分别为 18.72% ($p<0.01$)、59.87% ($p<0.001$)、54.4% ($p<0.001$) 和 53.87% ($p<0.001$) (表 1)。结果表明,MITC-21 具有一定的抗癌活性,且其对结肠癌 HCT-116 细胞的抗癌活性最为显著。因此,在后续的实验,进一步探究 MITC-21 对 HCT-116 细胞生长和迁移的抑制作用。

表 1 辣木籽异硫氰酸酯衍生物对 5 种癌细胞存活率的影响

Table 1 Effect of *Moringa oleifera* seeds isothiocyanate derivatives on the survival rate of five kinds of cancer cells

细胞系	存活率/%	
	0 μmol/L	10 μmol/L
PC-3	100.00±0.07	81.28±0.06**
786-0	100.00±0.10	102.15±0.05
HCT-116	100.00±0.14	40.13±0.05***
Hela	100.00±0.02	45.60±0.02***
MDA-MB-231	100.00±0.04	46.13±0.04***

注:与空白对照组 (0 μmol) 比较,组间差异用*表示 ($p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)。

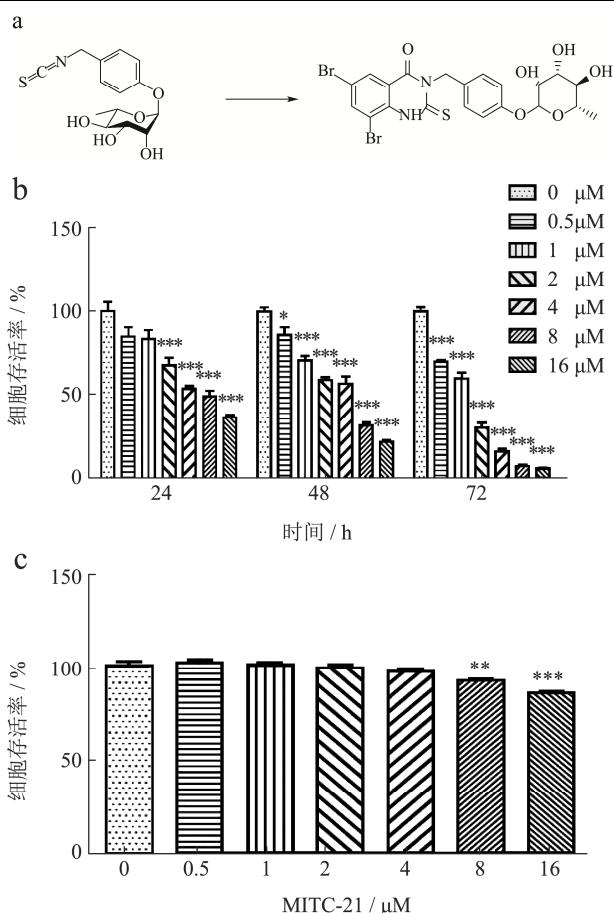


图1 辣木籽异硫氰酸酯及衍生物对 HCT-116 细胞及 GES-1 细胞存活率的影响

Fig.1 Effects of *Moringa oleifera* seeds isothiocyanate and its derivatives on the survival rate of HCT-116 cells and IEC-6 cells

注: 与对照组(0 μmol)比较, 组间差异用*表示(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$), 下同。

为了进一步研究 MITC-21 抑制 HCT-116 细胞生长是否具有时间和剂量依赖性, 采用不同浓度的 MITC-21 (0、0.5、1、2、4、8 和 16 μmol/L) 处理结肠癌 HCT-116 细胞 24、48 和 72 h, 并使用 MTT 法检测细胞存活率。研究发现, 随着 MITC-21 浓度的增加, 细胞存活率逐渐降低, 并且在 MITC-21 处理 HCT-116 细胞 24 h 后, 细胞存活率从 100.00% 降低到 84.84%、83.98%、67.86% ($p < 0.001$)、54.09% ($p < 0.001$)、49.68% ($p < 0.001$) 和 36.42% ($p < 0.001$); 处理 48 h 后细胞存活率从 100.00% 降低到 86.09% ($p < 0.05$)、70.90% ($p < 0.001$)、59.14% ($p < 0.001$)、56.90% ($p < 0.001$)、32.24% ($p < 0.001$) 和 22.03% ($p < 0.001$); 处理 72 h 后细胞存活率从 100.00% 降低到 94.21% ($p < 0.001$)、93.68% ($p < 0.001$)、85.25% ($p < 0.001$)、72.49% ($p < 0.001$)、69.07% ($p < 0.001$) 和 42.94% ($p < 0.001$) (图 1b)。三个时间段的半致死剂量 (IC_{50}) 分别为 6.79 μmol/L、3.71 μmol/L、1.13 μmol/L。结果表明, MITC-21

呈时间和剂量依赖性的方式显著抑制 HCT-116 细胞存活率。为了研究 MITC-21 对正常细胞是否具有毒性, 使用相同剂量的 MITC-21 处理人胃粘膜细胞(GES-1)。研究发现, MITC-21 对 GES-1 细胞的存活率没有太大影响, 且细胞存活率分别为 100.00%、101.78%、100.42%、99.01%、97.02%、91.85% ($p < 0.05$)、85.28% ($p < 0.001$) (图 1c)。以上结果表明, MITC-21 具有显著抑制 HCT-116 细胞生长的作用, 且对正常细胞无毒。

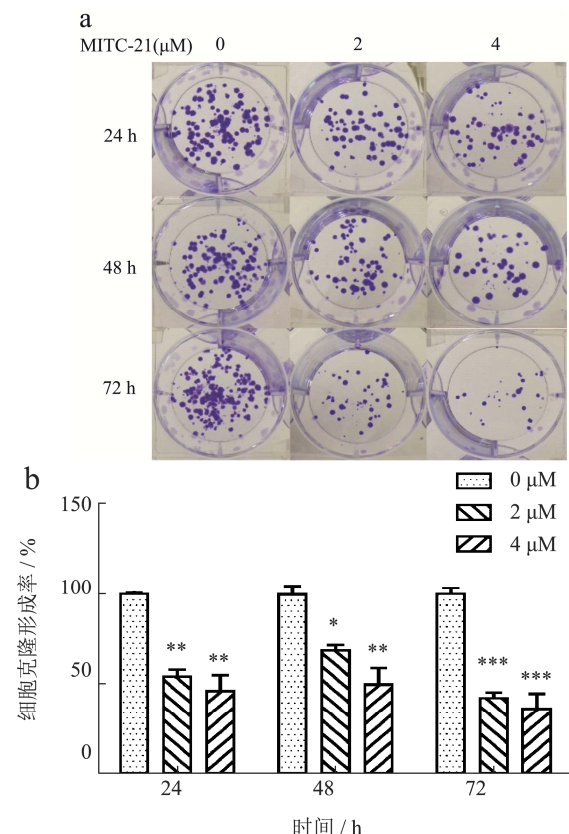


图2 辣木籽异硫氰酸酯衍生物对 HCT-116 细胞克隆形成率的影响
Fig.2 Effect of *Moringa oleifera* seeds isothiocyanate derivatives on the colony formation rate of HCT-116 cells

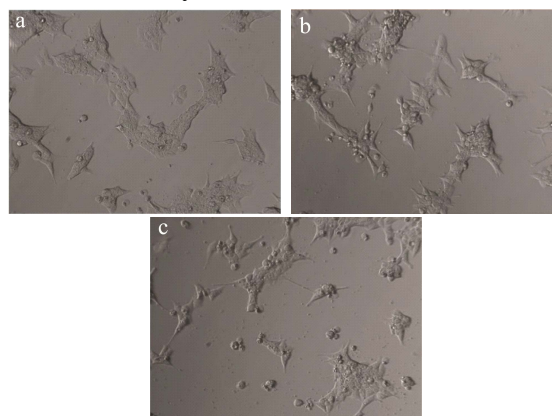


图3 辣木籽异硫氰酸酯衍生物对 HCT-116 细胞形态的影响
Fig.3 Effect of *Moringa oleifera* seeds isothiocyanate derivatives on morphology of HCT-116 cells

注: a~c: MITC-21 浓度分别为 0、2、4 μmol。

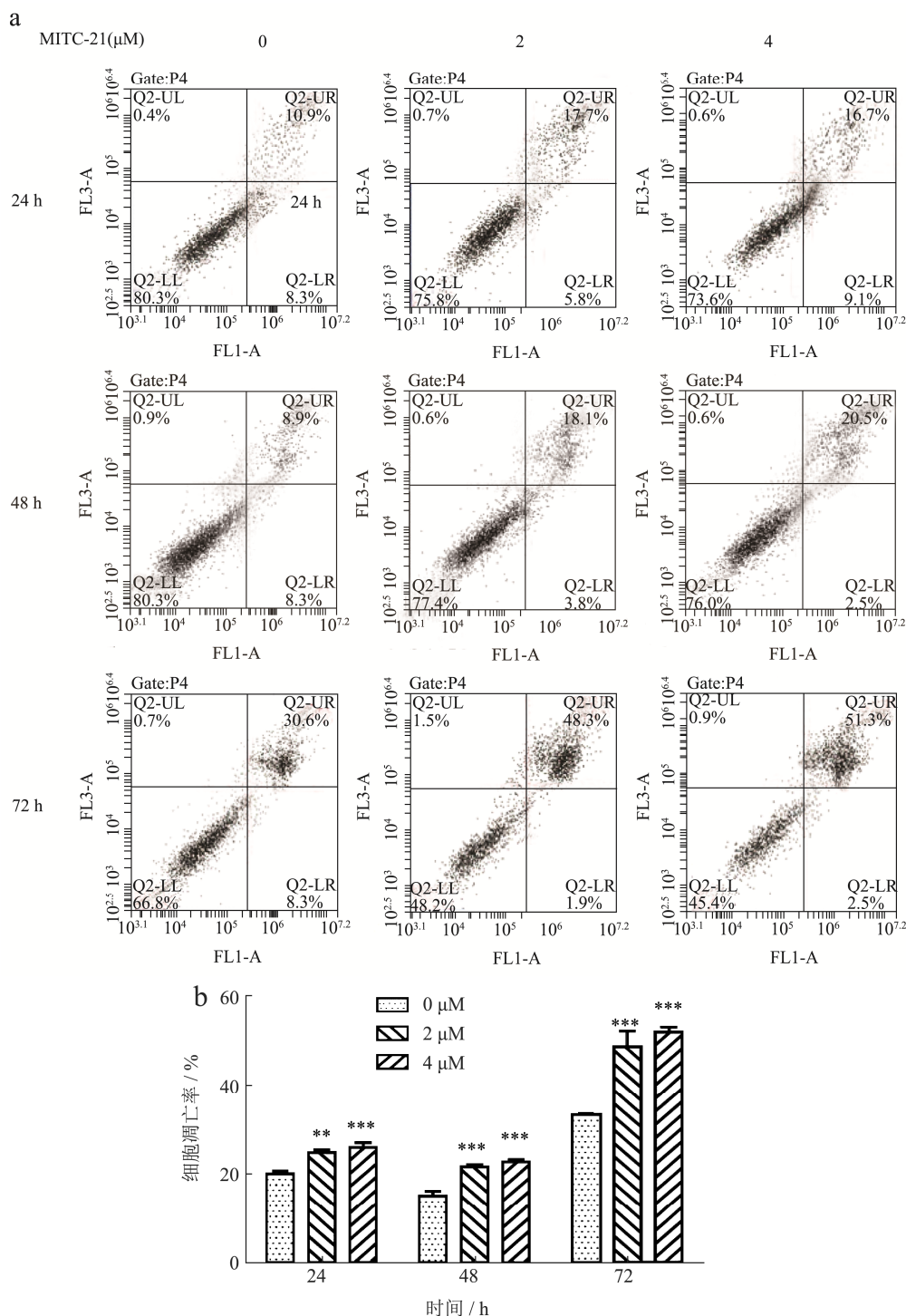


图4 辣木籽异硫氰酸酯衍生物对 HCT-116 细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of *Moringa oleifera* seeds isothiocyanate derivatives on apoptosis of HCT-116 cells

2.2 MITC-21 对 HCT-116 细胞克隆形成的影响

当单个细胞在体外增殖 6 代以上，其后代所组成的细胞群体，称为集落或克隆。细胞克隆形成实验是检测细胞增殖能力的有效方法之一^[28]，通过计算克隆形成率，来测定细胞的增殖能力。已有研究表明，辣木籽异硫氰酸酯能显著抑制皮肤癌 A431 细胞克隆形成，5 μmol/L 处理细胞 48 h 后克隆形成率降低到

48.54% ($p < 0.001$)^[29]。本研究通过克隆形成实验评价 MITC-21 对 HCT-116 细胞集落形成的影响。综合 24、48 和 72 h 半致死剂量 (IC_{50})，选择具有抑制细胞生长效果且浓度小于或接近半致死剂量的 2 和 4 μmol/L 进行后续实验。结果如图 2 所示，采用不同剂量的 MITC-21 (0、2 和 4 μmol/L) 处理 HCT-116 细胞 24 h 后，与对照组相比，细胞克隆形成率分别降低到 53.95% ($p < 0.01$) 和 46.16% ($p < 0.01$)；处理 48 h 后，

与对照组相比, 细胞克隆形成率分别降低到 68.36% ($p<0.05$) 和 49.51% ($p<0.01$); 处理 72 h 后, 与对照组相比, 细胞克隆形成率分别降低到 42.22% ($p<0.001$) 和 35.79% ($p<0.001$)。结果表明, MITC-21 具有显著抑制 HCT-116 细胞克隆形成的作用。

2.3 MITC-21 对 HCT-116 细胞形态的影响

细胞发生凋亡时, 会出现细胞体积缩小, 连接消失, 与周围的细胞脱离等形态学变化。采用不同剂量的 MITC-21 (0、2 和 4 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HCT-116 细胞 48 h 后, 在倒置显微镜下观察细胞形态变化。如图 3 所示, 显微镜下观察到对照组细胞长势较好, 细胞紧密排列, 脱落细胞较少, MITC-21 处理细胞 48 h 后的细胞出现变圆、皱缩, 脱落细胞悬浮于培养液中, 随着 MITC-21 浓度的升高, 培养液中脱落细胞越来越多, 贴壁细胞变得更加稀疏, 间隙增大, 体积缩小, 细胞碎片较多。以上结果表明, MITC-21 能够使 HCT-116 细胞形态发生非正常改变, 初步提示 MITC-21 能够引起细胞的凋亡。

2.4 MITC-21 对 HCT-116 细胞凋亡的影响

细胞凋亡 (或程序性细胞死亡) 在动物的发育过程中起着关键作用, 是由基因控制的细胞自主、有序的死亡, 参与了组织的形成重塑^[30]。甘辉云等^[31]研究发现, 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 苯乙基异硫氰酸酯处理 Hep-2 细胞后凋亡率与空白对照组比较无明显差异 ($p>0.05$), 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 组相较空白对照组有显著差异 ($p<0.05$)。为了进一步证实 MITC-21 是否引起 HCT-116 细胞凋亡, 采用流式细胞术评价 MITC-21 对 HCT-116 细胞凋亡的影响。如图 4 所示, MITC-21 处理 24 h 后, 细胞凋亡率分别从 20.00% 增加到 24.85% ($p<0.01$) 和 26.02% ($p<0.001$); 处理 48 h 后, 细胞凋亡率分别从 14.97% 增加到 21.60% ($p<0.001$) 和 22.78% ($p<0.001$); 处理 72 h 后, 细胞凋亡率分别从 33.40% 增加到 48.78% ($p<0.001$) 和 52.12% ($p<0.001$)。随着 MITC-21 剂量的增加, 细胞凋亡率显著增加, 并呈现出一定的时间依赖性。以上结果表明, MITC-21 具有诱导结肠癌 HCT-116 细胞凋亡的作用。

2.5 MITC-21 对 HCT-116 细胞迁移的影响

迁移是肿瘤细胞生长过程中必不可少的环节之一, 对于肿瘤的发展至关重要, 也是恶性肿瘤细胞共同的特征^[32]。因此, 采用细胞划痕愈合实验探讨 MITC-21 对 HCT-116 细胞迁移能力的影响。Chou 等^[33]研究表明, 异硫氰酸苯乙酯以剂量依赖的方式减少

GBM 8401 细胞的迁移, 并通过抑制 uPA、Rho A 和 RAS, 抑制 MMP-2、-7 和-9 基因的表达。在本文研究中发现, MITC-21 (0、2 和 4 $\mu\text{mol/L}$) 处理 HCT-116 细胞 48 h 后, 细胞划痕愈合率分别从 61.53% 降低到 32.89% ($p<0.01$) 和 24.30% ($p<0.001$) (图 5)。与对照组相比, 随着 MITC-21 剂量的增加, 细胞划痕愈合率逐渐降低, 细胞迁移显著减少。结果表明 MITC-21 显著抑制结肠癌 HCT-116 细胞迁移。

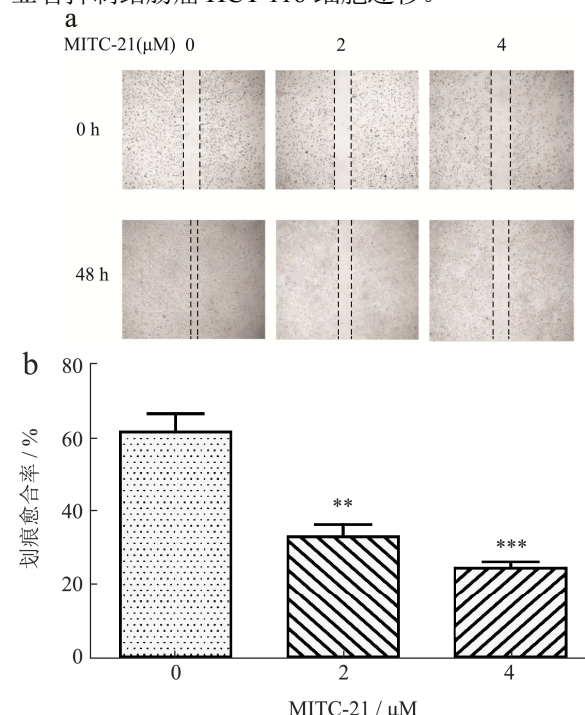
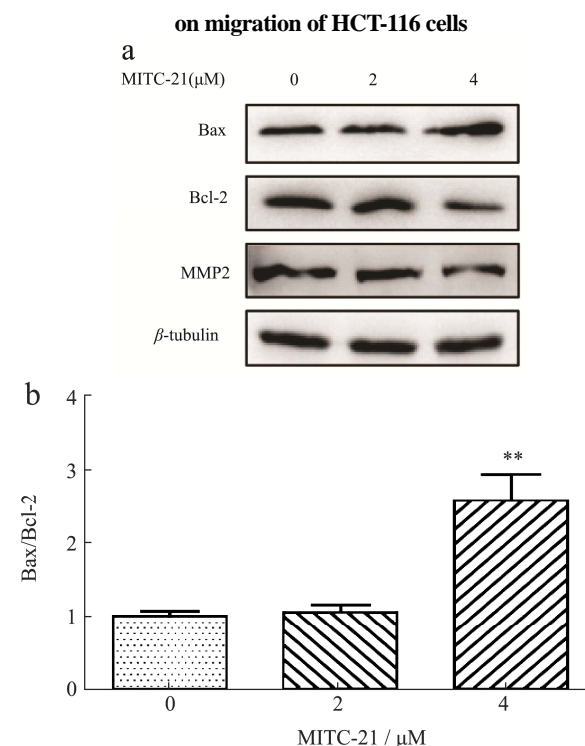


图 5 辣木籽异硫氰酸酯衍生物对 HCT-116 细胞迁移的影响
Fig.5 Effect of *Moringa oleifera* seeds isothiocyanate derivatives on migration of HCT-116 cells



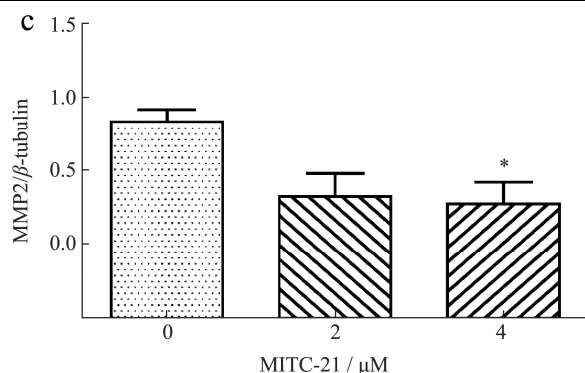


图6 辣木籽异硫氰酸酯衍生物对HCT-116细胞凋亡及迁移蛋白的影响

Fig.6 Effects of *Moringa oleifera* seeds isothiocyanate derivatives on apoptosis and migration protein of HCT-116 cells

2.6 MITC-21 对 HCT-116 细胞凋亡及迁移蛋白表达的影响

细胞凋亡可受内源性线粒体途径诱导,在细胞凋亡途径中, Bcl-2 和 Bax 是两个主要的相关蛋白,线粒体膜的完整性严格受到 Bcl-2 蛋白家族的调控, Bcl-2 属原癌基因,定位于线粒体外膜,阻止线粒体外膜的透化,高表达的 Bcl-2 可抑制细胞凋亡。Bax 促进线粒体外膜的透化,具有促凋亡作用, Bax/Bcl-2 比值的变化对决定细胞凋亡或存活至关重要^[34,35]。刘海彬等^[36]研究发现缩氨基硫脲-噻唑啉衍生物通过诱导 Bax 的激活,抑制 Bcl-2 的活性,诱导 A549 细胞的凋亡。为进一步证实 MITC-21 是否通过调控 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达诱导 HCT-116 细胞凋亡,将 MITC-21 (0、2 和 4 μmol/L) 处理 HCT-116 细胞 48 h 后,通过蛋白印迹法检测凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的表达情况。结果如图 6a 和 6b 所示,与对照组相比, MITC-21 (4 μmol/L) 增加了促凋亡蛋白 Bax 的表达水平,降低了抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达水平,并显著增加 Bax/Bcl-2 的比例。结果表明 MITC-21 调控了 HCT-116 细胞中 Bax 及 Bcl-2 蛋白的表达,这可能导致了线粒体膜完整性的破坏,从而促进 HCT-116 细胞凋亡。在 Liu 等^[37]的研究中得到相似的结果,异硫氰酸苯乙酯能通过线粒体介导的 Bax/Bcl-2 途径诱导 IPEC-J2 细胞凋亡。MMP2 是基质金属蛋白酶家族成员,当被细胞外蛋白酶分解后发生激活、降解和重塑细胞外基质,参与肿瘤细胞的迁移和侵袭^[38,39]。端传友^[40]通过检测 MMP-2 在 86 例结肠癌组织及正常结肠组织中的表达,发现结肠癌组织中 MMP-2 表达水平及阳性率均显著高于正常结肠组织,提示 MMP-2 高表达与肿瘤转移密切相关。通过 MITC-21 (0、2 和 4 μmol/L) 处理 HCT-116

细胞 48 h, 采用蛋白印迹法检测迁移相关蛋白 MMP2 的表达情况,结果如图 6a 和 b 所示,与对照组相比, MITC-21 (4 μmol/L) 显著降低 MMP2 蛋白表达水平,表明 MITC-21 可通过抑制 HCT-116 细胞中迁移蛋白 MMP2 的表达进而抑制细胞的迁移。

综上所述, Bax/Bcl-2、MMP2 检测结果与流式细胞术及细胞划痕愈合结果相一致,进一步验证了 MITC-21 对细胞凋亡和细胞迁移的调控效应。

3 结论

本研究以结肠癌 HCT-116 细胞为研究对象,通过 MTT 实验、克隆形成实验、流式细胞术、划痕愈合实验和蛋白印迹法,检测经不同浓度的 MITC-21 处理后的 HCT-116 细胞增殖、凋亡和迁移的变化情况。结果表明 MITC-21 具有抑制 HCT-116 细胞增殖和迁移并诱导细胞凋亡的作用,同时可调控 Bax/Bcl-2 比率和 MMP2 蛋白的表达水平。本研究确定了 MITC-21 具有良好的抗肿瘤效果,可为辣木资源的有效利用及结直肠癌的防治提供理论基础和实验依据。

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(6): 394-424
- [2] 王湘,赵林.结直肠癌辅助化疗回顾与进展[J].实用肿瘤杂志,2019,6:479-485
WANG Xiang, ZHAO Lin. Review and progress of adjuvant chemotherapy for colorectal cancer [J]. Journal of Practical Oncology, 2019, 6: 479-485
- [3] Haddock Michael G. Intraoperative radiation therapy for colon and rectal cancers: a clinical review [J]. Radiat Oncol, 2017, 12: 11
- [4] Ogata Kenichi, Takamori Hiroshi, Umezaki Naoki, et al. Gastrointestinal perforation during regorafenib administration in a case with hepatic metastases of colon cancer [J]. J Chemother, 2017, 29: 314-316
- [5] 龙建武,王松,徐志广.奥曲肽对人结肠癌细胞抑制及凋亡的影响[J].中国肿瘤外科杂志,2016,8(6):373-376
LONG Jian-wu, WANG Song, XU Zhi-guang. Effect of octreotide on inhibition and apoptosis of human colon cancer cells [J]. Chinese Journal of Tumor Surgery, 2016, 8(6): 373-376
- [6] Chirca A, Radu E, Minca D G, et al. Relationship between parameters linked to surgery, hospitalization and single

- nucleotide polymorphism in patients with colorectal cancer [J]. *Maedica (Buchar)*, 2018, 13(3): 202-207
- [7] 虎斌真,陶宁萍,许长华.基于食药价值的辣木籽研究进展[J].*食品科学*,2018,39(15):302-309
HU Xiao-zhen, TAO Ning-ping, XU Chang-hua. Research progress on *Moringa* seeds based on food value [J]. *Food Science*, 2018, 39(15): 302-309
- [8] Singh R S G, Negi P S, Radha C. Phenolic composition, antioxidant and antimicrobial activities of free and bound phenolic extracts of *Moringa oleifera* seed flour [J]. *J Funct Foods*, 2013, 5(4): 1883-1891
- [9] Kaur H. Anticancer activity of a constituent from *Moringa oleifera* leaves [J]. *J Chem Pharm Res*, 2015, 7(1) :701-705
- [10] Elsayed E A, Sharaf-Eldin M A, Wadaan M. *In vitro* evaluation of cytotoxic activities of essential oil from *Moringa oleifera* seeds on Hela, HepG2, MCF-7, CACO-2 and L929 cell lines [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2015, 16(11): 4671-4675
- [11] Busari M B, Muhammad H L, Ogbadoyi E O, et al. Hypoglycaemic properties of *Moringa oleifera* Lam seed oil in normoglycaemic rats [J]. *Iosr Journal Pharmacy & Biological Sciences*, 2014, 9(6): 23-27
- [12] Gopalakrishnan L, Doriya K, Kumar D S. *Moringa oleifera*: a review on nutritive importance and its medicinal application [J]. *Food Science & Human Wellness*, 2016, 5(2): 49-56
- [13] Abbaoui Besma, Lucas Christopher R, Riedl Ken M, et al. Cruciferous vegetables, isothiocyanates, and bladder cancer prevention [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62: e1800079
- [14] Romeo L, Iori R, Rollin P, et al. Isothiocyanates: an overview of their antimicrobial activity against human infections [J]. *Molecules*, 2018, 23(3): 624
- [15] Burčul Franko, Generalić Mekinić Ivana, Radan Mila, et al. Isothiocyanates: cholinesterase inhibiting, antioxidant, and anti-inflammatory activity [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2018, 33: 577-582
- [16] Cheenpracha S, Park E J, Yoshida W Y, et al. Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits [J]. *Bioorg Med Chem*, 2010, 18(17): 6598-602
- [17] Faizi S, Siddiqui B S, Saleem R, et al. Isolation and structure elucidation of new nitrile and mustard oil glycosides from *Moringa oleifera* and their effect on blood pressure [J]. *J Nat Prod*, 1994, 57(9): 1256-1261
- [18] Padla E P, Solis L T, Levida R M, et al. Antimicrobial isothiocyanates from the seeds of *Moringa oleifera* Lam [J]. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2012, 67: 557-564
- [19] Giacoppo S, Iori R, Rollin P, et al. *Moringa* isothiocyanate complexed with alpha-cyclodextrin: a new perspective in neuroblastoma treatment [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17: 362
- [20] Antonini E, Iori R, Ninfali P, et al. A combination of moringin and avenanthramide 2f inhibits the proliferation of Hep3B liver cancer cells inducing intrinsic and extrinsic apoptosis [J]. *Nutr Cancer*, 2018, 70: 1159-1165
- [21] Maiyo Fiona C, Moodley Roshila, Singh Moganavelli. Cytotoxicity, antioxidant and apoptosis studies of quercetin-3-O glucoside and 4-(β -D-glucopyranosyl-1 \rightarrow 4- α -L-rhamnopyranosyloxy)-benzyl isothiocyanate from *Moringa oleifera* [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2016, 16: 648-56
- [22] Rajan T S, De Nicola G R, Iori R, et al. Anticancer activity of glucomoringin isothiocyanate in human malignant astrocytoma cells [J]. *Fitoterapia*, 2016, 110: 1-7
- [23] Cirmi S, Ferlazzo N, Gugliandolo A, et al. *Moringa oleifera* moringin from seeds inhibits growth, arrests cell-cycle, and induces apoptosis of SH-SY5Y human neuroblastoma cells through the modulation of NF- κ B and apoptotic related factors [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1930
- [24] 刘艳凤,喻少帆,李嘉诚,等.烯丙基异硫氰酸酯在水溶液中的稳定性研究[J].*海南大学学报(自然科学版)*,2011,29(1): 33-38
LIU Yan-feng, YU Shao-fan, LI Jia-cheng, et al. Study on the stability of allyl isothiocyanate in aqueous solution [J]. *Journal of Hainan University (Natural Science Edition)*, 2011, 29(1): 33-38
- [25] 梁浩,李瑞敏,袁其朋.天然活性异硫氰酸酯类化合物的研究进展[J].*北京化工大学学报(自然科学版)*,2015,42(2):1-12
LIANG Hao, LI Rui-min, YUAN Qi-peng. Research progress of natural active isothiocyanates [J]. *Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science Edition)*, 2015, 42(2): 1-12
- [26] 刘翠婷.莱菔素的稳定性及新型纳米载体构建与抗癌活性研究[D].北京:北京化工大学,2017
LIU Cui-ting. Stability of sulforaphane and construction of novel nano carrier and its anticancer activity [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2017
- [27] 杨扬,贺水莲,唐明霆,等.从辣木籽中制备 4- α -L-鼠李糖基-异硫氰酸苄酯的工艺优化研究[J].*云南农业大学学报(自然科学)*,2019,34(2):303-308

- YANG Yang, HE Shui-lian, TANG Ming-ting, et al. study on process optimization of 4- α -L-rhamnosyl-benzylisothiocyanate from *Moringa oleifera* seeds [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science), 2019, 34(2): 303-308
- [28] 张春丽.西多福韦抑制宫颈癌 SiHa 细胞增殖作用的研究[J]. 中国全科医学,2009,12(22):2021-2024
- ZHANG Chun-li. Study on the inhibitory effect of cidofovir on the proliferation of cervical cancer SiHa cells [J]. Chinese Journal of General Practice, 2009, 12(22): 2021-2024
- [29] 钱颖艳,杨茗茸,罗凤仙,等.辣木籽异硫氰酸酯抑制皮肤鳞状癌 A431 细胞的生长[J].现代食品科技,2020,36(8):8-14
- QIAN Ying-yan, YANG Ming-rong, LOU Feng-xian, et al. Isothiocyanate from *Moringa oleifera* seeds inhibited the growth of skin squamous cell carcinoma of A431 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(8): 8-14
- [30] Monier B, Suzanne M. The morphogenetic role of apoptosis [J]. Curr Top Dev Biol, 2015, 114: 335-362
- [31] 甘辉云,杜敬东,欧阳虹,等.苯乙基异硫氰酸酯对喉癌 Hep-2 细胞增殖、凋亡、周期和侵袭转移能力的影响及机制[J].中国老年学杂志,2018,38(22):5529-5533
- GAN Hui-yun, DU Jing-dong, OU Yang-hong, et al. Effect and mechanism of phenylethyl isothiocyanate on proliferation, apoptosis, cycle, invasion and metastasis of laryngeal cancer HEp-2 cells [J]. Chinese Journal of Gerontology, 2018, 38(22): 5529-5533
- [32] 何可,许庆文.n-3 多不饱和脂肪酸及结直肠癌模型建立的研究现状[J].海南医学,2013,24(2):272-274
- HE Ke, XU Qing-wen. The status of the established model of colorectal cancer by n-3 polyunsaturated fatty acids [J]. Hainan Medical Journal, 2013, 24(2): 272-274
- [33] Chou Yu-cheng, Chang Meng-ya, Wang Mei-jen, et al. PEITC inhibits human brain glioblastoma GBM 8401 cell migration and invasion through the inhibition of uPA, Rho A, and Ras with inhibition of MMP-2, -7 and -9 gene expression [J]. Oncol Rep, 2015, 34: 2489-2496
- [34] 冯嘉昆,刘伟,李正发,等.半夏提取物调节 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达诱导白血病细胞凋亡[J].中国组织工程研究,2020,24(31):5023-5029
- FENG Jia-kun, LIU Wei, LI Zheng-fa, et al. Pinellia ternate extract regulates Bax, Bcl-2, caspase-3 protein expression and induces apoptosis of leukemia cells [J]. Chinese Tissue Engineering Research, 2020, 24(31): 5023-5029
- [35] You J, Gao F, Tang H, et al. A medicinal and edible formula YH0618 ameliorates the toxicity induced by doxorubicin via regulating the expression of Bax/Bcl-2 and FOXO4 [J]. J Cancer, 2019, 10(16): 3665-3677
- [36] 刘海彬,沈继伟,边圣杰,等.缩氨基硫脲-唑啉啉衍生物 S-2BEBD 对 A549 细胞增殖的影响及机制研究[J].中国药理学通报,2018,34(11):1616-1621
- LIU Hai-bin, SHEN Ji-wei, BIAN Sheng-jie, et al. Effect and mechanism of thiosemicarbazone quinazoline derivative s-2bebd on proliferation of A549 cells [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2018, 34(11): 1616-1621
- [37] LIU Shui-ping, ZHU Yuan-yuan, YAN Si-si, et al. Phenethyl isothiocyanate induces IPEC-J2 cells cytotoxicity and apoptosis via S-G/M phase arrest and mitochondria-mediated Bax/Bcl-2 pathway [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2019, 226: 108574
- [38] Henriet Patrick, Emonard Hervé. Matrix metalloproteinase-2: not (just) a "hero" of the past [J]. Biochimie, 2019, 166: 223-232
- [39] YANG Lan, SONG Xiao-yue, ZHU Jian-bo, et al. Tumor suppressor microRNA-34a inhibits cell migration and invasion by targeting MMP-2/MMP-9/FNDC3B in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Oncol, 2017, 51: 378-388
- [40] 端传友.MMP-2、MMP-9 及 VEGF 在结肠癌中的表达及其与肿瘤转移的相关性[J].中国医药导报,2012,9(21):44-45, 48
- DUAN Chuan-you. Expression of MMP-2, MMP-9 and VEGF in colon cancer and their correlation with tumor metastasis [J]. Chinese Medical Journal, 2012, 9(21): 44-45, 48