

牡丹籽油抑制结肠癌细胞 HCT116 的体外增殖和调控细胞周期作用

邹佳文¹, 罗依², Akan OD¹, 周潇恬¹, 徐魏¹, 白婕¹, 刘津良¹, 胡作民¹, 周亚萍¹, 罗非君¹

(1. 中南林业科技大学食品科学与工程学院, 湖南长沙 410004) (2. 中南大学湘雅医学院, 湖南长沙 410008)

摘要: 以牡丹籽油为研究对象, 结肠癌细胞 HCT116 为模型, 评估了牡丹籽油对 HCT116 结肠癌细胞体外增殖和周期的影响, 并对其分子机理进行了初步的研究。利用 MTS 实验、蛋白印迹等检测了结肠癌细胞在增殖、迁移和分子水平上的变化。结果表明: 牡丹籽油能显著抑制 HCT116 细胞的增殖和迁移能力; 当牡丹籽油的浓度达到 100 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞周期相关基因 p15、p21、p53 的 mRNA 相对表达量相比对照组 (Con) 分别上升了 5.49、4.56 和 3.73 倍, 具有极显著性差异 ($p < 0.01$)。提示牡丹籽油能调控细胞周期 G1/S 期关键靶基因的表达, 使细胞周期阻滞在 G1/S 期。牡丹籽油也能抑制 MAPK 信号通路的激活, 且能显著抑制其下游转录因子 AP-1 和 NF- κB 的活性。结果提示牡丹籽油可能通过抑制 MAPK 信号通路/AP-1 和 NF- κB 活性下调, 调控细胞周期相关基因的表达, 从而抑制结肠癌细胞的增殖, 课题研究将为功能性抗癌类食用植物油的开发提供科学的理论基础。

关键词: 牡丹籽油; HCT116 细胞; 细胞周期; MAPK; AP-1; NF- κB

文章编号: 1673-9078(2020)05-22-29

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.5.004

In vitro Proliferation-inhibitory and Cell Cycle-regulatory Effects of Peony

Seed Oil on the Colon Cancer Cells HCT116

ZOU Jia-wen¹, LUO Yi², Akan OD¹, ZHOU Xiao-tian¹, XU Wei¹, BAI Jie¹, LIU Jin-liang¹, HU Zuo-min¹, ZHOU Ya-ping¹, LUO Fei-jun¹

(1. College of Food Science and Engineering, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, China) (2. Xiangya Medical College, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: Using peony seed oil as the research object and colon cancer cells HCT116 as the model, the effect of peony seed oil on the *in vitro* proliferation and cell cycle of HCT116 cells were evaluated, and the underlying molecular mechanism was preliminary studied. The changes in proliferation, migration and molecular level of colon cancer cells were detected by the MTS and Western blotting assays. The results showed that peony seed oil inhibited significantly the proliferation and migration abilities of HCT116 cells. When the concentration of peony seed oil reached 100 $\mu\text{g/mL}$, the relative mRNA expression of cell cycle-associated genes, p15, p21 and p53, increased by 5.49, 4.56 and 3.73 times, respectively, with extremely significant differences ($p < 0.01$) compared with the control group. These results suggested that peony seed oil could regulate the expression of key target genes associated with the G1/S period of cell cycle, enabling the cell cycle blocked in G1/S transition period. Peony seed oil could also inhibit the activation of the MAPK signaling pathway, as well as the activities of its downstream transcription factors, AP-1 and NF- κB . The results suggest that peony seed oil may inhibit the down-regulation of AP-1 and NF- κB activities for the MAPK signaling pathway, and regulate the expression of cell cycle-related genes, thereby inhibiting the proliferation of colon cancer cells. The research

引文格式:

邹佳文, 罗依, Akan OD, 等. 牡丹籽油抑制结肠癌细胞 HCT116 的体外增殖和调控细胞周期作用[J]. 现代食品科技, 2020, 36(5): 22-29

ZOU Jia-wen, LUO Yi, Akan OD, et al. *In vitro* proliferation-inhibitory and cell cycle-regulatory effects of peony seed oil on the colon cancer cells HCT116 [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(5): 22-29

收稿日期: 2019-10-27

基金项目: 湖南省自然科学基金 (2018JJ2672); 湖南省研究生科研创新项目 (CX2018B457; 20192040); 中南林业科技大学研究生科技创新基金 (20183010; CX20190629)

作者简介: 邹佳文 (1992-), 男, 研究生, 研究方向: 食品分子营养

通讯作者: 罗非君 (1968-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 食品分子营养

will provide a scientific theoretical basis for the development of functional vegetable oil with anti-cancer activity.

Key words: peony seed oil; HCT116 cells; cell cycle; MAPK; AP-1; NF- κ B

牡丹 (*Paeonia suffruticosa*) 是毛茛科芍药属灌木的一种, 最开始是在我国开始种植生产, 主要的生产地是山东和河南等地。从古代开始, 人们就发现了牡丹的药用价值和观赏价值。其根皮经加工处理后是我们熟知的一种中药材, 即丹皮。牡丹籽是在生产丹皮的过程中产生的副产品, 最近这几年, 逐渐发现其具有良好的食用价值。根据用途不同, 牡丹可分为油用型牡丹和观赏型牡丹。顾名思义, 牡丹籽油来源于油用型牡丹。

牡丹籽油 (PSO) 成分结构分布很合理, 且很难被氧化, 不易沉积在人体心血管等相关部位, 是目前发现的一种对人体营养价值很高的油脂。牡丹籽油具有营养和保健的双重作用, 营养学家称其为“最佳油脂”和“油中珍品”。牡丹籽的出油率为 27%~33%^[1], 有研究表明其含有丰富的不饱和脂肪酸 (PUFAs), 牡丹籽油中所含的多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 种类较多^[2], 牡丹籽油中 α -亚麻酸 (ALA; 18:3n-3)、油酸、亚油酸含量丰富, 共占 83.05%, 此外, 还含有二十碳五烯酸 (EPA; 20:5n-3)、二十二碳六烯酸 (DHA; 22:6n-3) 等不饱和脂肪酸, ALA 是 EPA 和 DHA 代谢的前体物质^[3,4]。有研究表明, 牡丹籽油兼有降血压^[5,6]、降血糖^[7]、抗氧化^[8,9]等多种生理活性功能, 同时对人体没有毒副作用。因此, 牡丹籽油这一功能性植物油脂具有极佳的开发潜力, 在此基础上, 为了进一步开发利用牡丹籽油, 深度研究其生物活性显的很有必要。

多不饱和脂肪酸抗肿瘤是目前的研究热点之一, Truan 等人研究发现: ALA、EPA 和 DHA 可以显著的抑制乳腺癌细胞的增殖并能诱导其发生凋亡^[3,10,11]。Gu 等人阐述了 ω -3 PUFAs 预防前列腺癌的作用机制^[12]。Newell 等人阐述了 DHA 对癌细胞周期进展的影响^[13]。Zhang 等人研究表明 PUFAs 对胰腺癌具有预防、改善和治疗的作用^[14,16]。Zhang 等人表明 PUFAs 对结肠癌细胞的生长具有抑制作用^[17]。Roynette 等综述了 PUFAs 对结肠癌的预防和治疗作用^[18,19]。

结肠癌是最常见的恶性疾病之一, 发病率居胃肠道肿瘤的第三位。根据最新的研究, 每年有超过3000万人被诊断出结肠癌^[20]。目前结肠癌治疗的主要方法: 通过手术切除病变组织^[21], 如腹腔镜手术治疗^[22,23], 此外还有放疗以及化疗等, 但结肠癌患者的传统手术治疗大多表现为高复发、低预后^[24]。此外, 外科治疗的高成本给大多数结肠癌患者带来了巨大的经

济负担。本研究以一种典型的结肠癌细胞HCT116为模型, 评价牡丹籽油对HCT116细胞体外增殖以及周期分布等的影响, 研究结果揭示了牡丹籽油具有显著的抗肿瘤效果, 能够为进一步开发天然无副作用的抗肿瘤功能食用牡丹籽油提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

牡丹籽油 (PSO) 纯度为 98%, 购自西安昊轩生物科技股份有限公司; 甲醇 (HPLC 级), 购自上海国药化学试剂有限公司; 人结肠癌细胞 (HCT116 细胞), 购自中国科学院细胞生物研究所 (上海); 1640 培养基 (Roswell Park Memorial Institute)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶-EDTA, 购自美国 Gibco 公司; MTS[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, 二甲亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO), 购自美国 Sigma 公司; 增强化学发光液 (enhanced chemiluminescence, ECL), 购自美国 Millipore 公司; 细胞周期检测试剂盒购自上海碧云天生物技术公司; 山羊抗小鼠多克隆 IgG (W4021)、山羊抗兔多克隆 IgG (V7951), 购自美国普洛麦格公司; β -actin (M20615), 购自北京全式金生物技术有限公司; p16 (ARG63903), 购自美国 Arigo 公司; p18 (Cat#2896S)、p21 (Cat#2947S)、p27 (Cat#3688S)、p53 (Cat#2527S)、Cyclin D1 (Cat#9910)、磷酸化 MAPK 抗体套装 (Cat#9910)、非磷酸化 MAPK 抗体套装 (Cat#9926), 均购买自 Cell Signaling Technology 公司; 其他常用分析纯试剂均购买于上海国药化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Eppendorf 4 度台式离心机, 德国 Eppendorf 公司; 酶标仪 (Spectra Max i3x), 美国 Molecular Devices 公司; 实时荧光定量 PCR 仪 (C1000 Touch TM Thermal Cycler), 美国 Bio-Rad 公司; 倒置荧光显微镜 (Axio Observer, Axio Vision Rel. 4.8 软件), 德国 ZEISS 公司; 流式细胞仪 (FACS Calibur), 美国 BD 公司; 凝胶成像仪, 美国 Bio-Rad 公司; Western blot 装置, 美国 Bio-Rad 公司。

1.3 MTS 实验

取生长状态良好的 HCT116, 用胰酶消化, 摇动培养皿, 用 1640 完全培养基终止消化后制成细胞液, 细胞计数仪进行细胞计数后, 用培养基调整细胞浓度至 5×10^4 个/mL。将细胞悬液加入 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的 PSO (使其终浓度为 0、12.5、25、50、100 和 200 μ g/mL), 每个浓度设 3 个重复, 加药 24 h 后, 显微镜下观察细胞形态。然后每孔加入 10 μ L 的 MTS, 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 1 h 后, 酶标仪测定 OD 值。

1.4 流式细胞仪测细胞周期

将 HCT116 细胞培养在六孔板中, 待细胞密度适宜时, 加入不同浓度的 PSO (0、25、50 和 100 μ g/mL), 12 h 后弃培养基, 用 PBS 常规清洗 2 次, 胰酶消化后, 用离心管离心收集细胞, 弃上层培养基, 加入 PBS 反复吹打细胞后离心弃上清液, 重复 1 次, 将 PBS 吸干净, 加入实验前冷却好的 70% 的乙醇重悬细胞, 4 $^{\circ}$ C 放置过夜, 离心弃掉乙醇后用 PBS 清洗两次。加入 500 μ L PI 染液, 染色 30 min 后, 用流式细胞仪检测细胞周期的分布。

1.5 划痕实验

取生长状态良好的 HCT116 细胞, 取适量胰酶将其消化下来。用 1640 完全培养基将细胞浓度调整至 10^6 个/mL, 将细胞悬液转移至六孔板中, 每孔 1 mL。水平缓慢的晃动培养皿使细胞均匀分布在六孔板中。37 $^{\circ}$ C 二氧化碳恒温培养箱中培养过夜, 弃掉培养基, 用枪头在细胞表层轻轻划出一道痕迹, 加入适量 PBS 清洗两次, 每孔加入 1 mL 培养基。加入不同浓度的 PSO (0、25、50 和 100 μ g/mL), 12 h 后拍照观察细胞生长情况。

1.6 Transwell 侵袭实验

将 Matrigel 基质胶溶解, 吸取 2.5 μ L 加入预先冷却的 600 μ L 的基础培养基中, 吹打混匀后, 加入 0.1 mL 至 Transwell 上室中, 共 4 个孔, 之后将预冷好的 24 孔板风干。20 min 后, 吸尽残留液体, 加入 50 μ L 含 10% BSA 的基础培养基, 将基底膜在 37 $^{\circ}$ C 的灭菌水中水化 25 min。取 0.5 mL 含 10% 胎牛血清的培养基加入到下室中, 取适量胰酶消化细胞, 补加含 10% BSA 的基础培养基至 1 mL, 然后轻轻吹打混匀, 将细胞浓度调整至 8×10^5 个/mL, 加入 0.1 mL 细胞悬液

至 Transwell 小室中, 然后加入不同体积的 PSO, 使其终浓度分别为 0、25、50 和 100 μ g/mL, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 培养 12 h。取出小室至甲醇中室温固定 15 min 后, 将小室取出并风干甲醇。然后将小室转移至预先准备好的结晶紫染料中浸泡 20 min。染色完成后, 用 PBS 清洗小室 3 次, 每次 15 min, 放在水平摇床上缓慢的摇晃。接下来将小室转移至显微镜下观察并拍照。

1.7 RT-qPCR 测定基因表达水平

使用实时荧光定量 PCR 仪 (C1000 TouchTM Thermal Cycler) 通过 RT-qPCR 的方法^[25]检测与癌症相关的一些关键靶基因的表达水平。分别用不同浓度的 PSO (0、25、50 和 100 μ g/mL) 分组处理 HCT116 细胞 12 h 后, 用 TRIzol 试剂盒的方法从 HCT116 细胞中提取总 RNA, 然后用逆转录试剂盒合成 cDNA。最终结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (RQ) 法计算出目的基因 mRNA 相对表达量。引物使用 Primer 5.0 软件设计并交由公司合成。 β -actin 上游引物: 5' CTC CTC CCT GGA GAA GAG CTA C 3', 下游引物: 5' TGA TGG AGT TGA AGG TAG TTT CG 3'; p15 上游引物: 5' GTT GTT TGG TTA TTG TAT GGG 3', 下游引物: 5' CCC TTA TTC TCC TCA CAC AT 3'; p16 上游引物: 5' CCC AAC GCA CCG AAT AGT TAC 3', 下游引物: 5' GTT CTT TCA ATC GGG GAT GTC 3'; p18 上游引物: 5' GGG GAC CTA GAG CAA CTT ACT AGT TT 3', 下游引物: 5' AAA TCG GGA TTA GCA CCT CTA AGT A 3'; p19 上游引物: 5' CCA CCT CCA TGT TTG ATG ACT AC 3', 下游引物: 5' ACC AGT AAA AGT AAG GAG TCG GG 3'; p21 上游引物: 5' ATG TGG ACC TGT CAC TGT CTT GTA 3', 下游引物: 5' GTT GGA GTG GTA GAA ATC TGT CAT 3'; p27 上游引物: 5' AGT GGA TGA TGA GAT TGT GGA GTT 3', 下游引物: 5' AAC AAG TCT AAG CTG GTG TTT TTC C 3'; p53 上游引物: 5' CCC AAG CAA TGG ATG ATT TGA 3', 下游引物: 5' GGC ATT CTG GGA GCT TCA TCT 3'。

1.8 蛋白质免疫印迹法检测蛋白表达

HCT116 细胞接种在 10 cm 的培养皿中。用不同浓度的 PSO (0、25、50 和 100 μ g/mL) 分组处理 16 h 后, 根据郭天一^[26]等人的方法进行各组细胞总蛋白的提取并进行 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) 凝胶电泳, 化学发光成像仪进行曝光。使用 ImageJ 软件统计各蛋白条带灰度值。

1.9 荧光素酶报道基因检测 AP-1 和 NF- κ B 的活性

取处于对数生长期的 HCT116 细胞, 取适量胰酶将其消化下来, 轻轻吹打混匀。细胞计数仪计数后, 用培养基调整细胞浓度至 4×10^6 个/mL。将细胞悬液接种至 24 孔板中, 每孔 0.5 mL。隔夜培养, 大约生长至 70%~80%, 吸去培养基。用 1640 基础培养基清洗一次, 换成 0.5 mL 新鲜的 1640 基础培养基, 每孔加入转染试剂 Lip 2000 5 μ L, AP-1/NF- κ B 质粒 1 μ g, 转染 3 h 后吸去培养基, PBS 清洗一次后, 加入正常培养基, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养 5 h 后, 加入不同浓度的 PSO (0、25、50 和 100 μ g/mL), 12 h 后, 弃去培养液, 加入 0.2 mL 细胞裂解液, 室温静置 5 min 后, 用枪头将细胞刮下转移至 1.5 mL EP 管中, 10000 rpm 离心 5 min, 吸取上清液。取 30 μ L 上清液至检测板中, 并加入 80 μ L 荧光酶, 每个浓度设置 3 个重复, 上机检测。

1.10 统计分析

数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差 (SD), 实验重复至少三次。使用 SPSS 20.0 统计软件 (IBM SPSS Software) 进行统计分析, 然后进行 Student t 检验。 $p < 0.05$ 表示有统计学显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 PSO 抑制结直肠癌细胞增殖

MTS 实验可以检测细胞的存活和增殖能力, 采用 0、12.5、25、50、100、200 μ g/mL 的 PSO 处理结直肠癌细胞 HCT116, 处理 24 h 后, 在光镜下发现随着 PSO 浓度的增加, 癌细胞数目显著降低, 呈剂量依赖性; 同时, 随着 PSO 浓度的增加, 癌细胞的形态发生明显的变化, 特别是在 200 μ g/mL PSO 处理后, 出现大量死亡的细胞碎片, 说明 PSO 对结直肠癌细胞 HCT116 具有明显的抑制作用, 见图 1a~f。MTS 实验可以检测细胞的存活和增殖能力, 结果发现: 25、50、100、200 μ g/mL 的 PSO 处理能显著抑制 HCT116 细胞增殖, 且呈剂量依赖性, 低浓度 (12.5 μ g/mL) PSO 处理, 虽然在统计学上没有显著的差异, 但细胞活力也呈现下降的趋势, 见图 1B。其于 12.5 μ g/mL 作用效果不明显, 而 200 μ g/mL PSO 处理细胞死亡过多, 本研究后面的研究 PSO 处理采用 0、25、50、100 μ g/mL 这四个浓度梯度。赵郁等^[27]研究也发现不同浓度的不

饱和脂肪酸如 EPA 或 DHA 对多发性骨髓瘤细胞 MM1R 具有明显的抑制增殖作用。PSO 不饱和脂肪酸超过 80%, 提示 PSO 是通过不饱和脂肪酸起抗癌作用。

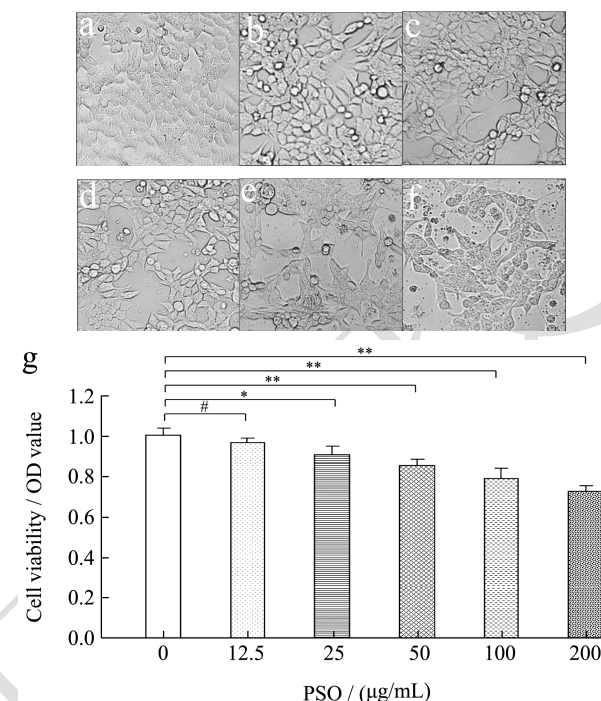


图 1 PSO 对 HCT116 细胞体外增殖能力的影响

Fig.1 the effect of PSO on proliferation of HCT116 cells *in vitro*

注: 图 a~f: 显微镜观察不同浓度 PSO 处理 HCT116 细胞 24 h 后的细胞形态, 其中, 图 a: 0 μ g/mL, 图 b: 12.5 μ g/mL, 图 c: 25 μ g/mL, 图 d: 50 μ g/mL, 图 e: 100 μ g/mL, 图 f: 200 μ g/mL; 图 g: MTS 法检测不同浓度 PSO 处理 HCT116 细胞后的细胞活力。#: 与对照组相比差异不显著 ($p > 0.05$); *: 与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$); **: 与对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$)。

2.2 PSO 对结直肠癌细胞周期分布的影响

癌细胞的不断增殖在于细胞周期调控失控, 在确定 PSO 能抑制 HCT116 细胞增殖的基础上, 评估 PSO 处理对癌细胞周期的影响。用不同浓度的 PSO 处理 24 h 后, 消化、收集 HCT116 细胞, 采用流式细胞分析仪分析 HCT116 细胞周期, 结果发现, 随着 PSO 处理浓度的增加, G₀ 期细胞百分率明显增加, 从 46.9% 上升到 56.1%, 且呈剂量依赖性; 细胞 DNA 合成 S 期百分率则出现下降, 细胞周期呈现阻滞。见图 2。有研究人员发现不饱和脂肪酸能使 G₀/G₁ 期癌细胞逐渐增加, S 期和 G₂ 期细胞逐渐减少, 细胞阻滞在 G₀/G₁ 期^[27]。PSO 富含不饱和脂肪酸, 说明 PSO 也能通过不饱和脂肪酸抑制癌细胞的细胞周期, 减缓癌细胞的分裂和增殖。

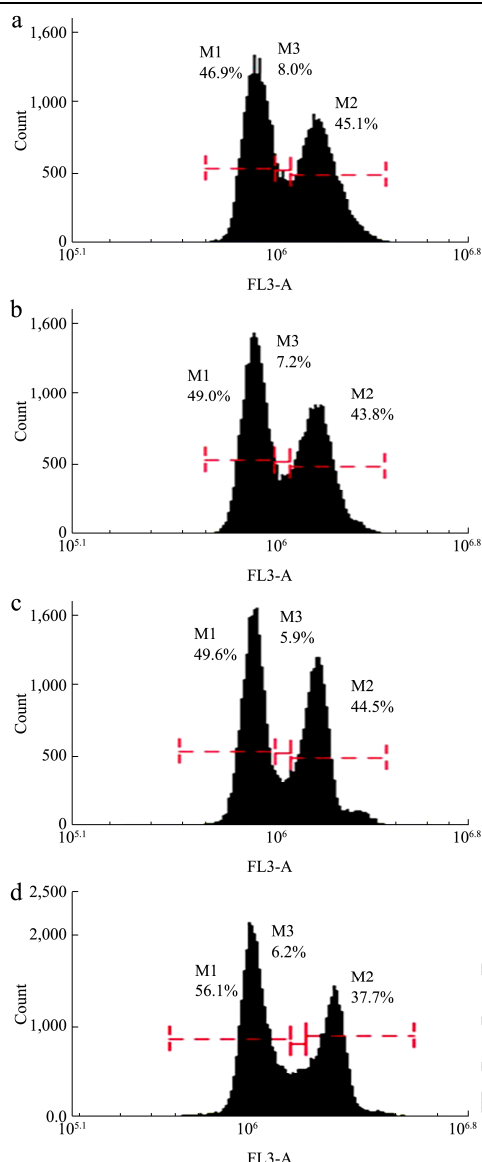


图2 PSO对HCT116细胞周期分布的影响

Fig.2 The cycle distribution effect on HCT116 cells after PSO treatment

注: a: 0 μg/mL; b: 25 μg/mL; c: 50 μg/mL; d: 100 μg/mL。

2.3 PSO抑制结直肠癌细胞的运动和迁移能力

划痕实验能简单有效地反应出细胞迁移能力。用递增浓度的PSO(0、25、50和100 μg/mL)处理HCT116细胞24 h后,观察划痕的愈合程度可知:随着PSO浓度的增高,划痕宽度增加,说明PSO处理可以抑制HCT116细胞的迁移能力,呈浓度依赖性,见图3A。HCT116细胞的迁移能力与PSO处理浓度呈负相关。Transwell实验模仿体内细胞外基质,在细胞基质蛋白酶的作用下,基质胶被降解,细胞可以从小室通过。进入到小室一侧的HCT116细胞通过结晶紫染色后可观察迁移的细胞多少。加入不同浓度的PSO处理24 h后,Transwell实验评估癌细胞的迁移能力,在显微镜

下观察发现,随着PSO处理浓度的增加,侵袭到膜上的细胞数量明显减少,且呈剂量依赖性见图3B。陈可和^[28]等通过细胞划痕实验和侵袭实验发现不饱和脂肪酸能显著抑制肝癌细胞的迁移及侵袭能力。除了抑制癌细胞增殖以外,PSO处理也能抑制癌细胞HCT116的侵袭能力,可能降低的癌症的侵袭与转移。

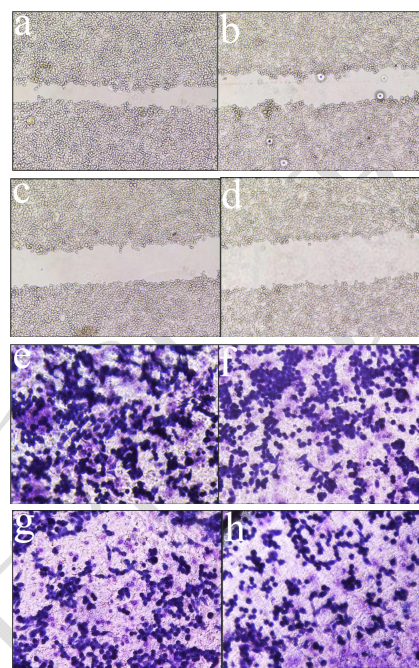


图3 PSO对HCT116细胞迁移和侵袭能力的影响

Fig.3 The effect of PSO treatment on migration and invasion ability in HCT116 cells

注: a~d: 不同浓度PSO处理对HCT116细胞迁移能力的影响,其中a: 0 μg/mL; b: 25 μg/mL; c: 50 μg/mL; d: 100 μg/mL; e~h: 不同浓度PSO处理对HCT116细胞侵袭能力的影响,其中e: 0 μg/mL; f: 25 μg/mL; g: 50 μg/mL; h: 100 μg/mL。

2.4 PSO调控结直肠癌细胞周期相关靶基因

的表达

细胞周期受细胞周期素(Cyclins)、细胞周期依赖的蛋白激酶(Cyclin-dependant protein kinase, CDK)和细胞周期依赖的蛋白激酶抑制子(Cyclin-dependant protein kinase inhibitor, CDKI)的共同调控^[29-31], Cyclin与CDK的结合会使CDK激活,如Cyclin D1与CDK4或CDK6形成复合物并作为它们的调节亚基,对于细胞G1到S期的转变来说是不可或缺的;相反,CDKIs(p15、p16、p18、p19、p21、p27、p53)属于抑癌基因,抑制细胞的增殖,CDK与CDKI结合会使CDK失活,促进细胞周期阻滞,如p15、p16、p18、p19能抑制CDK4或CDK6的激活。PSO处理能阻滞HCT116细胞周期,提示PSO可能通过调控细胞周期

素、CDK、CDKI 影响癌细胞周期。采用不同浓度 (0、25、50 和 100 $\mu\text{g/mL}$) 的 PSO 处理 HCT116 细胞 12 h 后, 提取总 RNA, 通过 RT-qPCR 实验检测细胞周期相关基因的转录水平, 结果发现: PSO 处理能显著上调 p16、p21、p53 的 mRNA 表达, 见图 4A。同样的, 采用不同浓度的 PSO 处理 HCT116 细胞 16 h 后, Western blot 实验结果显示: PSO 处理显著增加 p16、p18、p21、p27、p53 的蛋白表达水平; 与之相反, PSO 处理还能抑制 Cyclin D1 的蛋白表达水平, 见图 4B。类似的研究如张维康^[32]等发现 ω -3 不饱和脂肪酸能抑制胰腺癌细胞增殖, 其作用机理与下调细胞周期调控蛋白 Cyclin E 相关。由于 PSO 处理能上调 CDKI 表达和下调细胞周期素的表达, 细胞周期 G1/S 期转换受阻, 提示 PSO 可能通过多种机制抑制癌细胞周期, 从而抑制了 HCT116 细胞的增殖。

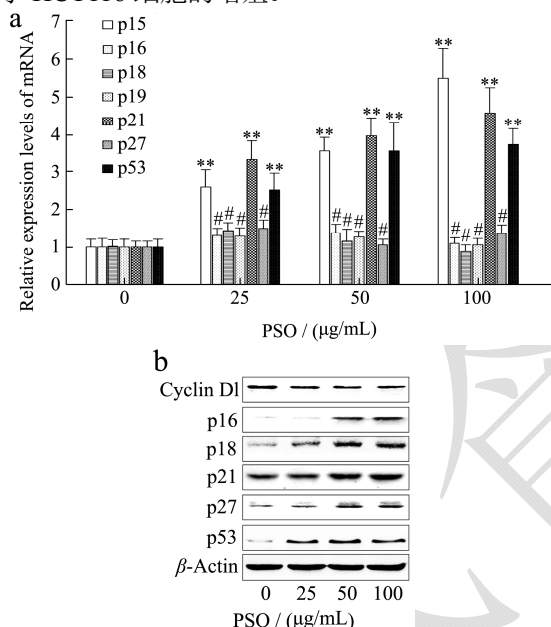


图4 PSO对HCT116细胞周期相关基因表达的影响

Fig.4 The transcription of cycle-related genes effect on HCT116 cells after PSO treatment

注: A: 不同浓度 PSO 处理 HCT116 细胞对细胞周期相关基因 mRNA 表达水平的影响; B: 不同浓度 PSO 处理 HCT116 细胞对细胞周期相关基因蛋白表达水平的影响。#: 与对照组相比差异不显著 ($p>0.05$); *: 与对照组相比差异显著 ($p<0.05$); **: 与对照组相比差异极显著 ($p<0.01$)。

2.5 PSO 抑制 MAPK 信号通路的活化

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 是细胞内的一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。研究证实, MAPKs 信号转导通路存在于大多数细胞内, 在将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内, 在细胞癌变过程中起着关键性作用, 所有的癌细胞内

MAPK 信号通路总处于激活状态。MAPK 信号通路也与细胞周期素、CDK、CDKI 的表达或活化密切相关。采用不同浓度的 PSO 处理结直肠癌细胞 HCT116, 16 h 后提取总蛋白, 并在蛋白提取液中加入磷酸酶抑制剂, Western blot 分析发现, PSO 能抑制 ERK1/2、JNK 的磷酸化, 且呈剂量依赖性的关系; 相反, PSO 也能促使 p38MAPK 的磷酸化, 见图 5。姚安军^[33]的研究也发现不饱和脂肪酸 DHA 可以抑制结肠癌细胞 HT-29 MAPK 信号通路的活化。本研究进一步揭示 PSO 对 HCT116 细胞增殖和周期的影响, 结果提示 PSO 能抑制癌细胞增殖的信号通路, 同时, 也能激活与癌细胞凋亡相关的信号通路。

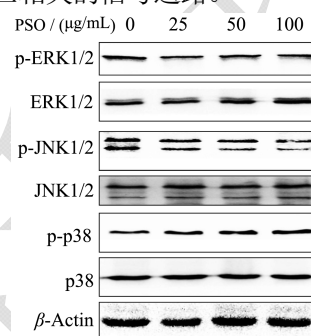


图5 PSO抑制HCT116细胞MAPK信号通路的活化

Fig.5 PSO affects the expression of cycle-related genes in HCT116 cells at the protein level

2.6 PSO 抑制转录因子 AP-1 和 NF- κ B 的活性

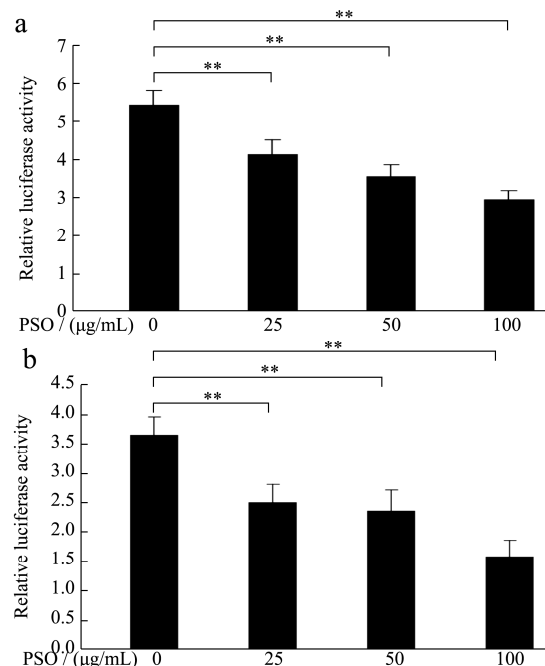


图6 PSO影响HCT116细胞内转录因子AP-1和NF- κ B的表达

Fig.6 PSO affects the expression of transcription factors AP-1 and NF- κ B in HCT116 cells

注: **:与对照组相比差异极显著 ($p<0.01$)。

AP-1 和 NF- κ B 是两种重要的转录因子, 与肿瘤的发生和进展有密切联系, 对细胞的增殖、分化和迁移能力有着重要的影响^[34,35]。PSO 能调控 MAPK 信号通路, AP-1 和 NF- κ B 则是 MAPK 信号通路下游的直接作用靶, 同时也参与细胞周期相关基因的表达调控。采用不同浓度的 PSO 处理 HCT116 细胞, 结果发现, PSO 能显著抑制 AP-1 和 NF- κ B 的转录活性, 且呈剂量依赖性, 见图 6A 和图 6B。Ras/MAPK/ERK 与 mTOR、NF- κ B 可以协同调控肝肿瘤细胞 cyclin D1 的表达^[36]。PSO 可能通过调控 MAPK 信号通路, 抑制 AP-1 和 NF- κ B 的活性, 调控细胞周期相关基因的表达, 从而抑制癌细胞的增殖。

3 结论

基于 PSO 含有的多不饱和脂肪酸成分, 提示牡丹籽油会有良好的抗肿瘤效果。本研究以一种典型的结肠癌细胞 HCT116 为实验模型, 细胞实验结果证实 PSO 可以抑制 HCT116 结肠癌细胞的增殖和迁移能力。深入的研究显示, PSO 主要是通过上调周期抑制因子 p15、p21、p53 等的表达, 下调细胞周期蛋白 Cyclin D1 的表达, 阻碍了细胞 G1/S 期转化过程中所需的蛋白合成, 细胞发生了 G1/S 期的阻滞。此外 PSO 可以改变 MAPK 信号通路的异常激活, PSO 能抑制 ERK1/2、JNK 的磷酸化, 且呈剂量依赖性的关系, 相反, PSO 也能促使 p38MAPK 的磷酸化, 进而抑制了 MAPK 信号通路下游转录因子 AP-1 和 NF- κ B 的表达, 使细胞周期受阻, 达到抑制 HCT116 细胞体外增殖的效果。本研究确定了牡丹籽油具有抗肿瘤的效果, 能够为进一步开发天然无副作用的抗肿瘤功能食用牡丹籽油提供理论基础。

参考文献

- [1] 周海梅, 马锦琦, 苗春雨, 等. 牡丹籽油的理化指标和脂肪酸成分分析[J]. 中国油脂, 2009, 34(7): 72-74
ZHOU Mei-mei, MA Jin-qi, MIAO Chun-yu, et al. Physicochemical indexes and fatty acid composition of peony seed oil [J]. China Oils and Fats, 2009, 34(7): 72-74
- [2] 王伟伟. 牡丹籽油中脂肪酸的构成及生理功能[J]. 中国卫生产业, 2011, 36: 8-9
WANG Wei-wei. Composition and physiological functions of fatty acids in peony seed oil [J]. China Health Industry, 2011, 36: 8-9
- [3] Truan J S, Chen J M, Thompson L U, et al. Flaxseed oil reduces the growth of human breast tumors (MCF-7) at high levels of circulating estrogen [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2010, 54, 1414-1421
- [4] Kaul N, Kreml R, Austria, J A, et al. A comparison of fish oil, flaxseed oil and hempseed oil supplementation on selected parameters of cardiovascular health in healthy volunteers [J]. Journal of The American College of Nutrition, 2013, 27: 51-58
- [5] Prisco D, Panicia R, Bandinelli B, et al. Effect of medium-term supplementation with a moderate dose of n-3 polyunsaturated fatty acids on blood pressure in mild hypertensive patients [J]. Thromb Research, 1998, 91(3): 105-112
- [6] Bellenger-Germain S, Poissen JP, Name M. Antihypertensive effects of a dietary unsaturated FA mixture in spontaneously hypertensive rats [J]. Lipids, 2002, 37(6): 561-567
- [7] Su Jianhui, Wang Hongxin, Ma Caoyang, et al. Anti-diabetic activity of peony seed oil, a new resource food in STZ-induced diabetic mice [J]. Food & Function, 2015, 6(9): 2930-2938
- [8] Gianfranco B, Alfredo B, et al. Oxidative stress as a biomarker of estrogen exposure in healthy vessel calves [J]. Analytica Chimica Acta, 2003, 483: 281-288
- [9] Leaf A, Kang J X, Xiao Y F, et al. Clinical prevention of sudden cardiac death by n-3 polyunsaturated fatty acids and mechanism of prevention of arrhythmias by n-3 fish oils [J]. Circulation, 2003, 107(21): 2646-2652
- [10] Wiggins A K, Kharotia S, Mason J K, et al. Alpha-linolenic acid reduces growth of both triple-negative and luminal breast cancer cells in high and low estrogen environments [J]. Nutrition and Cancer, 2015, 278: 1001-1009
- [11] Chamras H, Ardashian A, Heber D, et al. Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation [J]. Journal of Nutritional Biochemistry, 2002, 13: 711-716
- [12] Gu Z, Suburu J, Chen H, et al. Mechanisms of omega-3 polyunsaturated fatty acids in prostate cancer prevention [J]. Biomed Research International, 2013, 2013(7710): 8245-8263
- [13] Newell M, Baker K, Postovit L M, et al. A critical review on the effect of docosahexaenoic acid (DHA) on cancer cell cycle progression [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(8): e1784
- [14] Zhang W, Long Y, Zhang J, et al. Modulatory effects of EPA and DHA on proliferation and apoptosis of pancreatic cancer cells [J]. Journal of Huazhong University of Science and Technology (Medical Sciences), 2007, 27(5): 547-550
- [15] Ma Y J, Yu J, Xiao J, et al. The consumption of omega-3

- polyunsaturated fatty acids improves clinical outcomes and prognosis in pancreatic cancer patients: A systematic evaluation [J]. *Nutrition and Cancer*, 2015, 67(1): 112-118
- [16] Haqq J, Howells L M, Garcea G, et al. Targeting pancreatic cancer using a combination of gemcitabine with the omega-3 polyunsaturated fatty acid emulsion, Lipedema™ [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2016, 60(6): 1437-1447
- [17] Zhang C, Yu H, Ni X, et al. Growth inhibitory effect of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) on colon cancer cells *via* their growth inhibitory metabolites and fatty acid composition changes [J]. *PLoS One*, 2015, 10(4): e0123256
- [18] Roynette C E, Calder P C, Dupertuis Y M, et al. N-3 polyunsaturated fatty acids and colon cancer prevention [J]. *Clinical Nutrition*, 2004, 23(2): 139-151
- [19] Dupertuis Y M, Meguid M M, Pichard C, et al. Colon cancer therapy: New perspectives of nutritional manipulations using polyunsaturated fatty acids [J]. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 2007, 10(4): 427-432
- [20] Senicourt B, Boudjadi S, Carrier JC, et al. Neoexpression of a functional primary cilium in colorectal cancer cells [J]. *Helicon*, 2016, 2(5): e00109
- [21] Liang X, Luo M, Wei XW, et al. A folate receptor-targeted lipoplex delivering interleukin-15 gene for colon cancer immunotherapy [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(32): 52207-52217
- [22] Chan D K, Tan K K. Laparoscopic surgery should be considered in T4 colon cancer [J]. *International Journal of Colorectal Disease*, 2017, 32(4): 517-520
- [23] Cirocchi R, Cesare Campanile F, Di Saverio S, et al. Laparoscopic versus open colectomy for obstructing right colon cancer: A systematic review and meta-analysis [J]. *Journal of Visceral Surgery*, 2017, 154(6): 387-399
- [24] Ogata K, Takamori H, Hmezaki N, et al. Gastrointestinal perforation during regorafenib administration in a case with hepatic metastases of colon cancer [J]. *Journal of Chemotherapy*, 2016, 20(1): 1-3
- [25] Shi L, Lin Q, Yang T, et al. Oral administration of *Lentinus edodes* β -glucans ameliorates DSS-induced ulcerative colitis in mice *via* MAPK-Elk-1 and MAPK-PPAR γ pathways [J]. *Food Function*, 2016, 7(11): 4614-4627
- [26] Guo T, Lin Q, Li X, et al. Octacosanol attenuates inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2017, 65(18): 3647-3658
- [27] 赵郁,朱晓婷,王铁楠. ω -3 多不饱和脂肪酸诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡及抗增殖机制的研究[J].*实用肿瘤学杂志*,2016, 30(6):516-522
- ZHAO Yu, ZHU Xiao-ting, WANG Yi-nan. The role and mechanisms of ω -3 polyunsaturated fatty acids in inducing cell apoptosis and anti-proliferation in multiple myeloma [J]. *Practical Oncology Journal*, 2016, 30(6): 516-522
- [28] 陈可和,高婷,潘金飞,等.DHA 可抑制黄曲霉素 B1 诱导的肝癌细胞迁移及侵袭[J].*南方医科大学学报*,2016,36(7): 952-956
- CHEN Ke-he, GAO Ting, PAN Jin-fei, et al. Docosahexaenoic acid inhibits aflatoxin B1-induced migration and invasion in hepatocellular carcinoma cells *in vitro* [J]. *Journal of Southern Medical University*, 2016, 36(7): 952-956
- [29] He G, Kwang J, Komen J, et al. Recruitment of trimeric proliferating cell nuclear antigen by G1-phase cyclin-dependent kinases following DNA damage with platinum-based antitumor agents [J]. *British Journal of Cancer*, 2013, 109(9): 2378-2388
- [30] Kitamura K, Aota S, Sakamoto R, et al. Smad7 induces G0/G1 cell cycle arrest in mesenchymal cells by inhibiting the expression of G1 cyclins [J]. *Development, Growth & Differentiation*, 2005, 47(8): 537-552
- [31] Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2009 9(3): 153-166
- [32] 张维康,钱晓辉,龙跃平,等. ω -3 脂肪酸对胰腺癌细胞的抗肿瘤作用及其分子机制[J].*中国癌症杂志*,2007,11:855-858
- ZHANG Wei-kang, QIAN Xiao-hui, LONG Yue-ping, et al. The role and mechanisms of ω -3 polyunsaturated fatty acids in inducing cell apoptosis and anti-proliferation in multiple myeloma [J]. *China Oncology*, 2007, 11: 855-858
- [33] 姚安军.n-3 PUFAs 抑制高脂肪饮食小鼠肠肿瘤形成作用及机制研究[D].浙江:宁波大学,2017
- YAO An-jun. Effect of n-3 polyunsaturated fatty acids on colon tumorigenesis in mice fed with high-fat diet [D]. Zhejiang: Ningbo University, 2017
- [34] Lan T, Wu T, Chen C, et al. Berberine attenuates high glucose-induced proliferation and extracellular matrix accumulation in mesangial cells: involvement of suppression of cell cycle progression and NF- κ B/AP-1 pathways [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2014, 384(1-2): 109-116