

姜黄素体内外逆转结肠癌的 5-氟尿嘧啶耐药研究及机制探讨

陆怡^{1,2}, 张鑫杰³, 张闰哲³, 张波^{1,2}, 姚庆华^{1,2*} [1. 中国科学院大学附属肿瘤医院(浙江省肿瘤医院), 杭州 310022; 2. 中国科学院肿瘤与基础医学研究所, 杭州 310022; 3. 浙江中医药大学第二临床医学院, 杭州 310053]

摘要: 目的 探究姜黄素在体内外对结肠癌 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)耐药的逆转作用及其相关机制。方法 以 SW480 结肠癌细胞为亲代细胞, 构建 5-FU 耐药细胞株 SW480R, 采用 MTT 法检测 SW480R 细胞的耐药指数以及不同浓度的姜黄素对 SW480R 细胞增殖能力的影响; 流式细胞术检测姜黄素对 SW480R 细胞周期和凋亡的影响; Western blotting 检测姜黄素对 SW480R 细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)相关蛋白以及 Wnt 信号通路相关蛋白的影响; 采用裸鼠移植瘤模型检测肿瘤体积变化情况, 计算姜黄素的体内抑瘤率, Western blotting 检测肿瘤组织中相关蛋白变化。结果 SW480R 的耐药指数为 12.16, 姜黄素能够剂量依赖性地抑制 SW480R 细胞的增殖, 阻滞 SW480R 细胞周期于 G₀/G₁ 期, 以及诱导 SW480R 细胞凋亡; Western blotting 结果表明姜黄素能够在体内外抑制 EMT 和 Wnt 信号通路的活性; 体内试验表明姜黄素能够有效抑制裸鼠移植瘤的生长。结论 姜黄素能够在体内外逆转结肠癌的 5-FU 耐药, 可能是通过调控 Wnt 信号通路从而抑制 EMT 的发生。

关键词: 姜黄素; 逆转; 结肠癌; 5-氟尿嘧啶; 耐药

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2020)15-1793-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.15.001

引用本文: 陆怡, 张鑫杰, 张闰哲, 等. 姜黄素体内外逆转结肠癌的 5-氟尿嘧啶耐药研究及机制探讨[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1793-1800.

Study on Reversal Effect of Curcumin on 5-fluorouracil Resistance in Colon Cancer *in vitro* and *in vivo* and Its Mechanism

LU Yi^{1,2}, ZHANG Xinjie³, ZHANG Runzhe³, ZHANG Bo^{1,2}, YAO Qinghua^{1,2*} [1. Cancer Hospital of the University of Chinese Academy of Sciences(Zhejiang Cancer Hospital), Hangzhou 310022, China; 2. Institute of Cancer and Basic Medicine(IBM), Chinese Academy of Sciences, Hangzhou 310022, China; 3. Second Clinical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the reversal effect of curcumin on 5-fluorouracil(5-FU) resistance in colon cancer *in vivo* and *in vitro* and its related mechanism. **METHODS** SW480 colon cancer cells were used as parental cells to construct 5-FU resistant cell line SW480R. MTT assay was used to determine the resistance index of SW480R cells and the effect of different concentrations of curcumin on the proliferation of SW480R cells. The effects of curcumin on cell cycle and apoptosis of SW480R cells were determined by flow cytometry. Western blotting was used to detect the effects of curcumin on EMT-related proteins and Wnt signaling pathway related proteins in SW480R cells. The tumor volume changes were detected by using the xenograft model of nude mice, the tumor-inhibiting rate of curcumin was calculated, and the changes of related proteins in tumor tissues were detected by Western blotting. **RESULTS** The resistance index of SW480R was 12.16. Curcumin could dose-dependently inhibit proliferation, arrest cell cycle in G₀/G₁ phase, and induce apoptosis of SW480R cells. The result of Western blotting showed that curcumin inhibited EMT and Wnt signaling activity *in vivo* and *in vitro*. *In vivo* experiments showed that curcumin could effectively inhibit the growth of transplanted tumor in nude mice. **CONCLUSION** Curcumin can reverse 5-FU resistance in colon cancer *in vivo* and *in vitro*, possibly by regulating the Wnt signaling pathway to inhibit EMT.

KEYWORDS: curcumin; reverse; colon cancer; 5-fluorouracil; resistance

结肠癌是最常见的消化道肿瘤之一, 为全球第三大常见恶性肿瘤^[1], 死亡率仅次于肺癌。目前, 化疗仍是进展期结肠癌患者行之有效的治疗手

段。一直以来, 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)类药物是治疗进展期结肠癌患者的最主要的药物之一, 然而 5-FU 在进展期结肠癌中治疗的有效率

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673813)

作者简介: 陆怡, 女, 硕士, 主治医师 Tel: 13588316980
E-mail: yaoqh@zjcc.org.cn

E-mail: luyi@zjcc.org.cn

*通信作者: 姚庆华, 女, 博士, 主任医师

Tel:

只有 10%~15%，其中 5-FU 的化疗耐药是导致患者化疗失败的重要原因^[2-3]。相关研究^[4-5]表明，表观遗传学调控下活化的 Wnt 信号在细胞上皮-间充质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)进展中发挥了重要作用，而 EMT 进程促使了细胞结构和功能的改变产生耐药。中药单体姜黄素是从活血化瘀类中药姜黄中提取的主要活性成分^[6]。已有研究表明，姜黄素在结肠癌细胞中能有效阻断 NF- κ B 激活的 EMT 进程，抑制其生长周期^[7]，本研究旨在探讨姜黄素阻断结肠癌细胞对 5-FU 的耐药效应，并探究其作用机制与 Wnt 信号通路的关系。

1 材料

1.1 细胞与动物

人正常结肠上皮细胞 NCM460 和人结肠癌细胞 SW480 购买于中国科学院上海细胞库；裸鼠，30 只，体质量(19±1)g，♂，由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供，动物生产许可证号为 SCXK(沪)2018-0006，饲养条件：恒温，温度(22±2)℃，湿度 50%~60%，光照每 12 h 明暗交替，换风次数为每小时 15~20 次，由浙江中医药大学动物实验研究中心饲养，实验饲养室许可证号为 SYXK(浙)2018-0012。实验方案通过实验动物使用与管理委员会(IACUC)审批，IACUC 号：ZSLL-2019-102。

1.2 药物与试剂

姜黄素($C_{21}H_{20}O_6$ ，批号：08511；纯度≥98.0%)、5-FU(批号：04541)、噻唑蓝(MTT，批号：M2128)均购自美国 Sigma 公司；细胞周期染色液、Annexin V/PI 细胞凋亡检测试剂盒(美国 BD 公司，批号分别为 5205995、4136994)；DMEM 培养液、胎牛血清(美国 Hyclone 公司，批号分别为 SH30021.01，SH30084.03)；抗体(E-Cadherin、Vimentin、beta Catenin、TCF4、Axin、GAPDH)购自美国 Abcam 公司，批号分别为 ab194982，b8978，ab32572，ab217668，ab32197，ab181602。

1.3 仪器

BB150 细胞培养箱、Micro17R 低温高速离心机(美国 Thermo 公司)；PowerPac Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)；3300 Mini 化学发光成像系统(中国 CLInX 公司)；Guava easyCyte 流式细胞仪(美国 BD 公司)；UTP-313 电子天平(上海花潮电器有限公司)；SW-CJ-2FD 超净工作台(苏州净化设备有限公司)。

2 方法

2.1 SW480R 耐药细胞株的构建及培养

NCM460 细胞和亲本 SW480 细胞培养于含

10%的胎牛血清、青霉素 200 U·mL⁻¹、链霉素 200 U·mL⁻¹ 的完全培养液中。构建 SW480R 耐药株：先将 SW480 细胞暴露于含 10 μ mol·L⁻¹ 5-FU、5%胎牛血清的 DMEM 培养液中，即用高浓度 5-FU 刺激诱导，进行药物压力筛选，每 3 d 换液 1 次，在此高浓度 5-FU 环境中培养 21 d 后，用 PBS 洗 2 遍，洗去已死亡的细胞，用不含 5-FU 的培养液替换原先培养液，筛选出的细胞在无 5-FU 的培养液中扩增 7 d，最终将细胞培养在含有 1 μ mol·L⁻¹ 5-FU 的培养液中维持其耐药性，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.2 MTT 法检测 SW480R 细胞耐药性以及姜黄素的逆转耐药作用

取对数期的 SW480 细胞和 SW480R 细胞接种到 96 孔板，加入不同浓度的 5-FU(5, 10, 15, 20, 25 μ mol·L⁻¹)处理 SW480 细胞，同时加入 5-FU(50, 100, 150, 200, 250 μ mol·L⁻¹)处理 SW480R 细胞，每个浓度设置 4 个复孔。培养 48 h 后，每孔加入 20 μ L MTT 溶液，培养箱中继续孵育 4 h 后每孔加入 200 μ L 三联液，继续培养 18 h 后，用酶标仪在 570 nm 条件下测定吸光度 OD 值，计算耐药指数(resistance index, RI)。采用 Graphpad Prism 5 软件计算半抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)值， $RI=IC_{50}(SW480R)/IC_{50}(SW480)$ 。

待各组细胞贴壁后加入姜黄素，其药物终浓度分别为 0, 5, 10, 20, 40 μ mol·L⁻¹，培养 48 h，每孔加入 20 μ L MTT 溶液后，培养箱中继续孵育 4 h，每孔加入 200 μ L 三联液，将 96 孔板放到外用 37℃恒温培养箱中作用 18 h，用酶标仪在 570 nm 条件下测定吸光度 OD 值。重复实验 3 次，以平均值统计结果，计算各浓度下细胞相对存活率。

2.3 流式细胞术检测细胞周期

将状态良好的 SW480R 细胞以每孔 6×10^5 传代于 6 孔板中，等待细胞贴壁之后，加入不同浓度的姜黄素干预(0, 5, 10, 20, 40 μ mol·L⁻¹)，每组设置 3 个复孔，继续培养 24 h 后用 PBS 洗 2 遍，用胰酶消化后，用 PBS 重悬细胞，洗涤离心后立即加入 70%的冰乙醇，4℃过夜，将前 1 d 的细胞悬液在离心机上离心，吸去用于固定的乙醇，再用冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，除去上清液，加入含有 RNase 的 PI 染液，避光室温染色 30 min，流式细胞仪检测每组细胞中的荧光强度。

2.4 流式细胞术检测细胞凋亡

前期处理同细胞周期实验，加入不同浓度的

姜黄素($0, 5, 10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)干预后,继续培养 24 h, PBS 洗 2 遍,用胰酶消化后用 PBS 重悬细胞,离心后加入 $1\times\text{Binding buffer } 500 \mu\text{L}$ 重悬细胞成细胞悬液,分别加入 $10 \mu\text{L}$ Annexin V-FITC 和 $10 \mu\text{L}$ PI,避光孵育 10 min,采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.5 裸鼠移植瘤模型检测肿瘤生长

将健康裸鼠随机分成 4 组,每组 6 只,分别为:对照组、姜黄素低剂量组、姜黄素中剂量组以及姜黄素高剂量组。适应性饲养 1 周后,收集对数生长期的 SW480R 细胞,用生理盐水调整细胞浓度至 $1\times 10^7\cdot\text{mL}^{-1}$,以每只 0.2 mL 接种于裸鼠背部皮下。各组按 $10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量给予 5-FU,灌胃给药,每周 1 次,共 4 次。其中姜黄素低、中、高剂量组分别按 $100, 200, 400 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的剂量口服给予姜黄素 28 d。自给药开始后,每周用游标卡尺测量一侧裸鼠肿瘤的长径和短径,瘤体积公式:瘤体积=长径 $\times$ 短径 $\div 2$ 。给药 4 周后解剖裸鼠,取肿瘤组织称重,根据各组肿瘤质量计算抑瘤率。

2.6 Western blotting 检测细胞和组织中相关蛋白变化

细胞蛋白制备:弃上清后 PBS 洗 2 次,加入 $600 \mu\text{L}$ RIPA 裂解液,冰上裂解 30 min,收集细胞, $12\ 000\times g, 4^\circ\text{C}$ 离心 5 min,取上清转移至新的预冷的离心管中。组织蛋白制备:取 100 mg 肿瘤组织样品置于培养皿中,用干净的剪刀将组织块尽量剪碎,加入 1 mL 冷 Lysis Buffer,组织匀浆机中进行匀浆($3\times 20 \text{ s}$),使组织尽量碾碎,冰上静置裂解 15~30 min 放入离心管中, $12\ 000\times g, 4^\circ\text{C}$ 离心 5 min,取上清转移至新的预冷的离心管中。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度后,处理蛋白随后上样。用 SDS-PAGE 分离总蛋白,随后用湿转法转移至 PVDF 膜上,一抗 4°C 过夜,二抗室温孵育 2 h 后显影。

2.7 统计学分析

所有计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,检验方法采用 One-way ANOVA 分析、 t 检验及卡方检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 SW480R 的耐药性验证

MTT 检测 5-FU 对 SW480 细胞和 SW480R 细胞的不良反应,结果见图 1。5-FU 对 SW480 细胞的作用效果明显强于 SW480R 细胞。通过 Graphpad

Prism 5 软件分析可知 5-FU 对 SW480 细胞及 SW480R 细胞的 IC_{50} 分别为 $(11.89\pm 1.24) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $(144.62\pm 2.44) \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,差异具有统计学意义 ($P<0.01$),计算得到 RI 为 12.16,表明 SW480R 耐药模型建立成功。

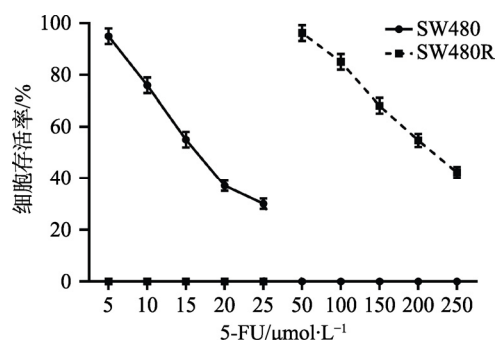


图 1 不同浓度的 5-FU 对 SW480 细胞和 SW480R 细胞增殖能力的影响

Fig. 1 Effects of different concentrations of 5-FU on proliferation of SW480 and SW480R cells

3.2 姜黄素对正常结肠上皮细胞和结肠癌细胞增殖能力的影响

MTT 检测不同浓度的姜黄素对人正常结肠上皮细胞 NCM460 和结肠癌细胞 SW480、SW480R 增殖能力的影响,结果见图 2。姜黄素对 SW480 细胞和 SW480R 细胞增殖均有明显的抑制作用。相比于 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素组,姜黄素干预后 SW480 细胞和 SW480R 细胞的相对细胞活力逐渐降低,呈现剂量依赖性,在姜黄素浓度为 $10, 20, 40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,差异具有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。另外,姜黄素对 NCM460 细胞抑制作用不明显,仅在 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时细胞活力显著降低 ($P<0.05$)。

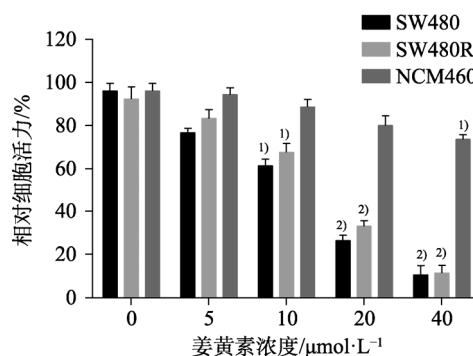


图 2 不同浓度的姜黄素对 NCM460、SW480 和 SW480R 细胞增殖能力的影响

与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素组相比, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$ 。

Fig. 2 Effects of different concentrations of curcumin on proliferation of NCM460, SW480 and SW480R cells Compared with $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin group, $^{1)}P<0.05$, $^{2)}P<0.01$.

3.3 姜黄素对 SW480R 细胞周期的影响

流式细胞术检测不同浓度的姜黄素对 SW480R 细胞周期的影响, 结果见图 3。与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素组相比, 姜黄素加药组随着药物浓度的增加, SW480R 细胞 G_0/G_1 期细胞含量逐渐增加, 在姜黄素

浓度 $\geq 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明姜黄素能够阻滞 SW480R 细胞周期于 G_0/G_1 期。

3.4 姜黄素对 SW480R 细胞凋亡的影响

流式细胞术检测不同浓度的姜黄素对 SW480R 细胞凋亡的影响, 结果见图 4。与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄

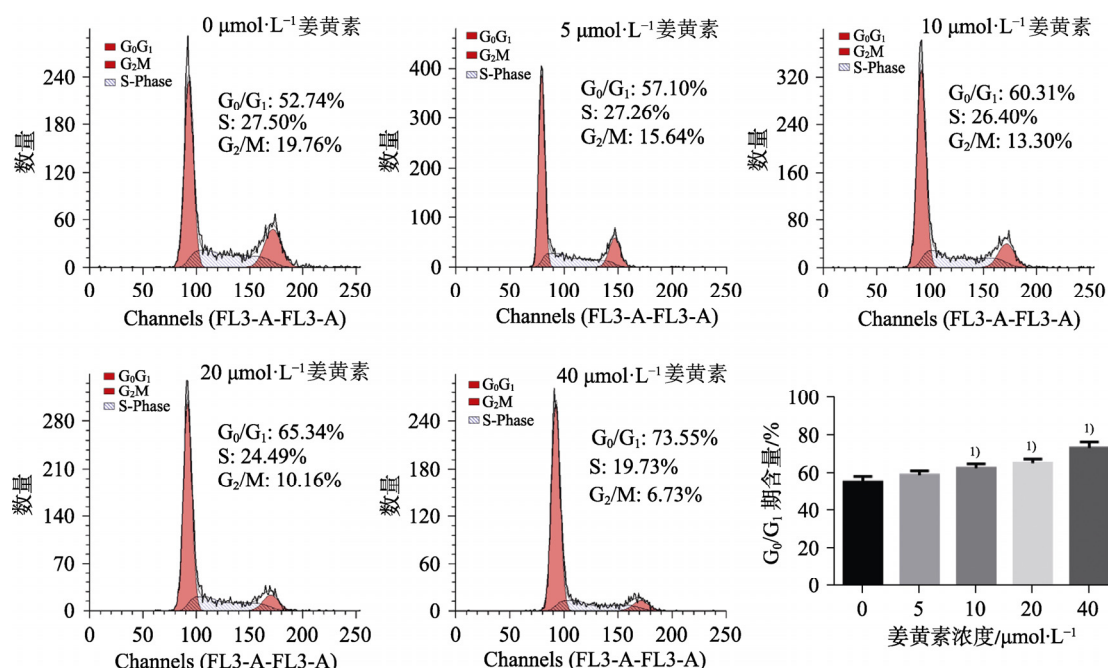


图 3 姜黄素对 SW480R 细胞周期的影响
与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素组相比, $^1P < 0.05$ 。

Fig. 3 Effects of curcumin on cell cycle of SW480R cells
Compared with $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin group, $^1P < 0.05$.

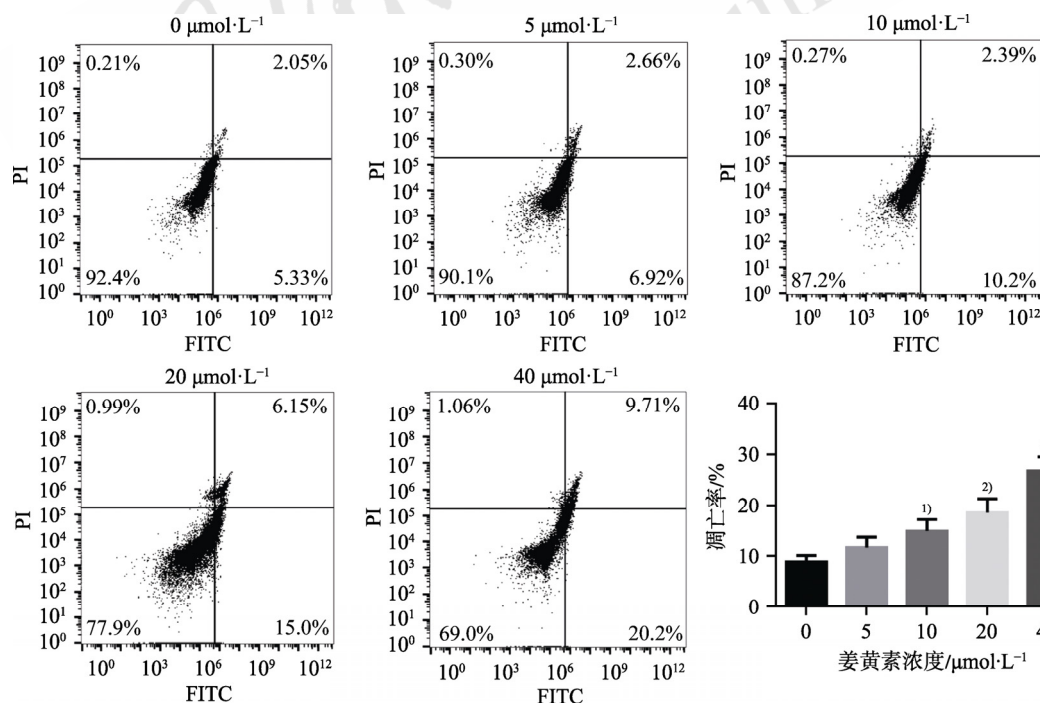


图 4 姜黄素对 SW480R 细胞凋亡的影响
与 $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素组相比, $^1P < 0.05$, $^2P < 0.01$ 。

Fig. 4 Effect of curcumin on apoptosis of SW480R cells
Compared with $0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin group, $^1P < 0.05$, $^2P < 0.01$.

素组相比,姜黄素加药组能够剂量依赖性地增加 SW480R 细胞的总凋亡率,在姜黄素浓度 $\geq 10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。表明姜黄素能够明显诱导 SW480R 细胞凋亡。

3.5 SW480 和 SW480R 细胞中相关蛋白表达差异

Western blotting 检测 SW480 和 SW480R 细胞中 EMT 相关蛋白 E-cadherin、Vimentin 及 Wnt 信号通路相关蛋白 β -catenin、TCF4、Axin 的表达情况,结果见图 5。与亲本细胞 SW480 相比,SW480R 细胞中 E-cadherin 和 Axin 蛋白表达降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Vimentin、 β -catenin 以及 TCF4 蛋白表达显著上升($P<0.01$)。表明 SW480R 细胞 EMT 水平增加,且 Wnt 信号通路被激活。

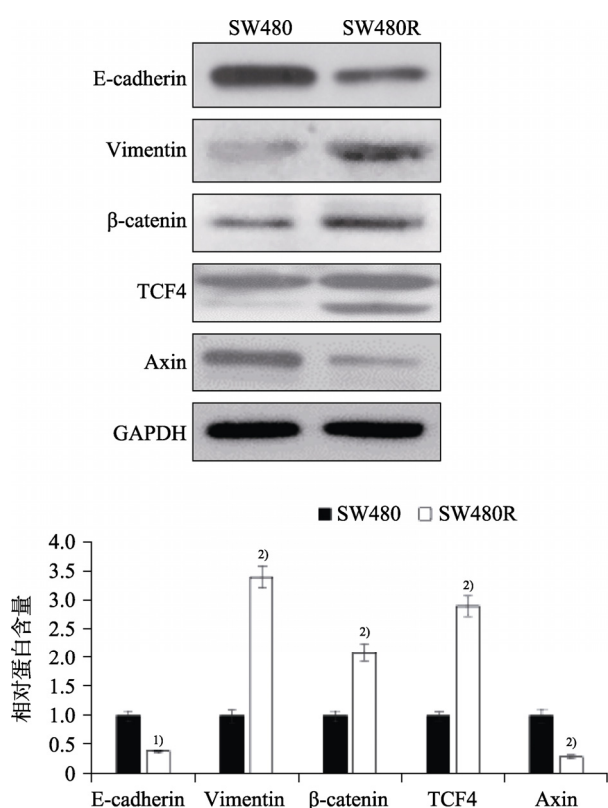


图 5 SW480 和 SW480R 细胞中 EMT 及 Wnt 信号通路相关蛋白表达情况

与 SW480 细胞相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Expression of EMT and Wnt signaling pathway related proteins in SW480 and SW480R cells

Compared with SW480 cells, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.6 姜黄素对 SW480R 细胞内相关蛋白表达水平的影响

姜黄素干预后能够在一定程度上下调 SW480R 细胞内 Vimentin、 β -catenin 以及 TCF4 蛋白的表达,上调 E-cadherin 和 Axin 蛋白的表达,其中

E-cadherin 在各浓度组均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Vimentin、 β -catenin 在 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, TCF4、Axin 在 10, 20, 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,差异具有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图 6。

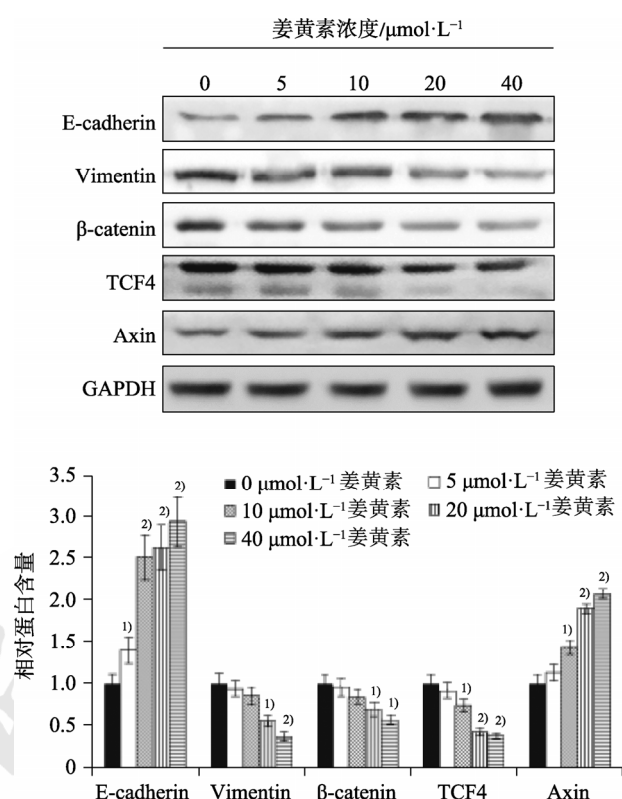


图 6 EMT 及 Wnt 信号通路相关蛋白表达情况

与 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 姜黄素组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Expression of EMT and Wnt signaling pathway related proteins

Compared with 0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ curcumin group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.7 姜黄素对裸鼠移植瘤体积变化的影响

与对照组比,姜黄素低、中、高剂量组瘤体积有下降趋势。姜黄素低剂量组裸鼠瘤体积在给药 4 周后显著下降($P<0.05$);姜黄素中剂量组裸鼠瘤体积在给药 3 周后显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$),姜黄素高剂量组瘤体积在给药 2 周后显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见表 1。

3.8 肿瘤抑瘤率分析

给药 4 周后解剖裸鼠,取出瘤块,根据瘤块质量计算抑瘤率。与对照组相比,姜黄素干预后裸鼠肿瘤质量明显降低,其中姜黄素中、高剂量组肿瘤质量显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),姜黄素低、中、高剂量组抑瘤率分别为(29.80 ± 11.3)%, (45.05 ± 9.00)%, (67.51 ± 4.11)%。结果见图 7 和表 2。

表 1 裸鼠瘤体积变化($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 1 Changes of tumor volume in nude mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

mm³

组别	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周
对照组	0.00±0.00	0.69±0.10	192.77±25.54	510.36±59.91	1 342.96±142.20
姜黄素低剂量组	0.00±0.00	0.69±0.12	193.75±25.38	445.57±49.58	1 146.78±106.63 ¹⁾
姜黄素中剂量组	0.00±0.00	0.68±0.09	166.46±21.72	437.93±44.35 ¹⁾	911.08±113.53 ²⁾
姜黄素高剂量组	0.00±0.00	0.63±0.10	151.66±19.43 ¹⁾	313.44±34.38 ²⁾	521.02±76.30 ²⁾

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

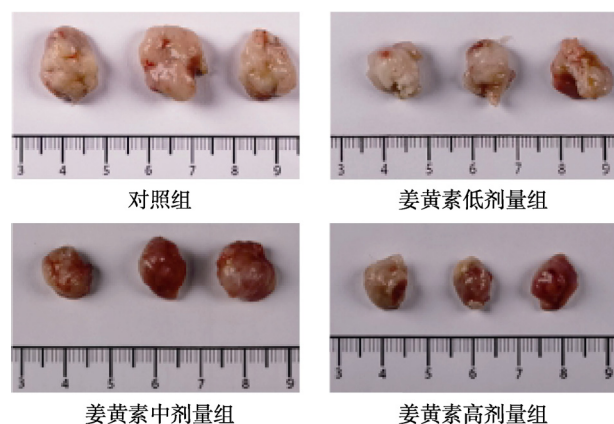


图 7 姜黄素对裸鼠抑瘤率的影响

Fig. 7 Effect of curcumin on tumor inhibition in nude mice

表 2 姜黄素对裸鼠抑瘤率的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 2 Effect of curcumin on tumor inhibition in nude mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	肿瘤质量/g	瘤体比	抑瘤率/%
对照组	3.90±0.70	0.19±0.05	—
姜黄素低剂量组	2.74±0.44	0.13±0.02	29.80±11.3
姜黄素中剂量组	2.14±0.35 ¹⁾	0.10±0.02 ¹⁾	45.05±9.00
姜黄素高剂量组	1.27±0.16 ²⁾	0.05±0.01 ²⁾	67.51±4.11

注: 与对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Note: Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.9 姜黄素对裸鼠肿瘤组织内相关蛋白表达水平的影响

Western blotting 检测姜黄素对裸鼠肿瘤组织内 EMT 相关蛋白 E-cadherin、Vimentin 及 Wnt 信号通路相关蛋白 β -catenin、TCF4、Axin 表达的影响, 结果见图 8。与对照组相比, 姜黄素低剂量组 E-cadherin、Axin 表达显著升高($P<0.01$), Vimentin 表达显著降低($P<0.05$); 姜黄素中、高剂量组 E-cadherin、Axin 表达显著升高, Vimentin、 β -catenin、TCF4 表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。

4 讨论

多药耐药(multidrug resistance, MDR)的产生是导致结肠癌化疗失败的主要原因^[8-9]。治疗结肠癌的药物有 5-FU、奥沙利铂和伊立替康等^[10], 5-FU

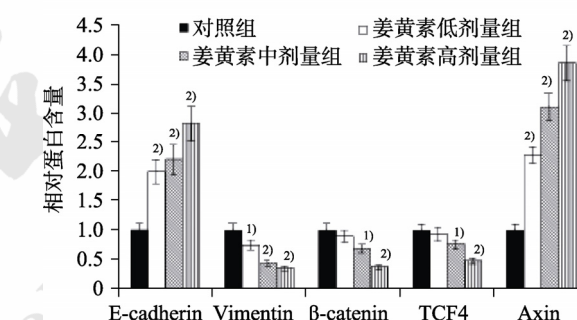
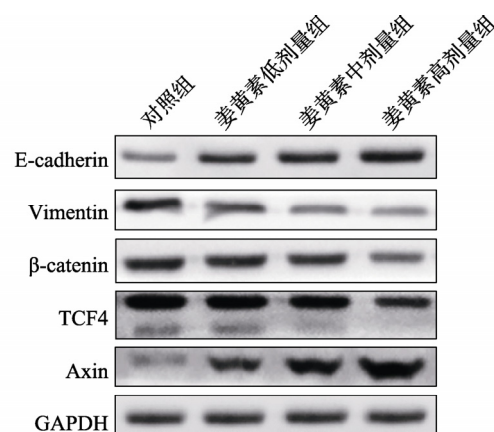


图 8 EMT 及 Wnt 信号通路相关蛋白表达情况

与对照组相比, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 8 Expression of EMT and Wnt signaling pathway related proteins

Compared with control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

是一种胸腺嘧啶合成酶(thymidylate synthetase, TS)的抑制剂, 有抑制 DNA 和 RNA 合成的作用^[11], 然而 5-FU 的化疗耐药问题是限制其疗效的主要原因, 研究 5-FU 的耐药机制对于结肠癌的治疗具有重要的意义^[12]。中药单体由于其化学结构丰富以及其低毒高效的优点备受关注^[13]。姜黄素是姜黄根茎中提取的脂溶性疏水多酚, 具有低毒、抗炎等作用^[14]。已有研究证实姜黄素对 MDR 具有一定的逆转作用^[15]。本研究以人结肠癌细胞 SW480 为亲代细胞, 诱导建立 5-FU 耐药细胞模型 SW480R, MTT 试验表明 SW480R 细胞已对 5-FU 耐药, 通过 IC_{50} 计算耐药指数 RI 为 12.16。并证实不同浓

度的姜黄素对 SW480R 细胞具有一定的增殖抑制作用,并表现出浓度依赖性,表明姜黄素能够在一定程度上逆转 SW480R 细胞的耐药性,同时姜黄素对正常结肠上皮细胞无显著的抑制作用,表明其具有较好的选择性。流式细胞术检测 SW480R 细胞的周期和凋亡情况,细胞周期实验结果显示,姜黄素干预后, G₀/G₁ 期细胞含量逐渐增多, G₀/G₁ 期是细胞静止期和 DNA 合成准备期,结果表明姜黄素能够阻滞 SW480R 细胞于 G₀/G₁ 期。另外,细胞凋亡结果表明,姜黄素能够显著增加 SW480R 细胞凋亡百分比。上述结果表明,姜黄素能够在体外逆转 SW480R 细胞 5-FU 耐药,其机制与阻滞细胞周期以及诱导细胞凋亡相关。

EMT 现象在上皮源性肿瘤细胞中普遍存在,其主要特征为肿瘤细胞的细胞膜中 E-cadherin 等上皮表达缺失, Vimentin 表达增强,获得间叶表型。越来越多的研究^[16-17]表明, EMT 可能参与了肿瘤细胞的多药耐药。已有报道^[18]称 EMT 在大肠癌细胞奥沙利铂耐药中发挥着重要的作用。Wnt 信号通路参与多种肿瘤的发生和发展,其中 β -catenin 是 Wnt 信号通路的关键蛋白; TCF4 是一种 Wnt 通路转录因子,在结肠癌中高表达, Axin 是 Wnt 信号通路中的一种负调控因子^[19]。并且 Wnt 信号通路也是调控 EMT 的主要通路,在 EMT 的发生发展中发挥着重要的作用^[20]。目前已有研究证实,姜黄素能够在结肠癌中通过下调 Wnt 信号通路的活性以及上调 NKD2 的表达从而抑制上皮间质转化^[19]。本研究中采用 Western blotting 检测 SW480 细胞和 SW480R 细胞中 EMT 和 Wnt 信号通路相关蛋白的表达情况,结果显示, SW480R 细胞中 E-cadherin 和 Axin 蛋白下调表达, Vimentin、 β -catenin 以及 TCF4 蛋白上调表达,表明 SW480R 细胞 EMT 水平明显增强,且 Wnt 信号通路被激活。而在经过姜黄素干预后, E-cadherin 和 Axin 蛋白表达上升, Vimentin、 β -catenin 以及 TCF4 蛋白表达降低,该结果表明姜黄素能够在 SW480R 细胞中通过下调 Wnt 信号通路从而抑制 EMT。

裸鼠移植瘤模型是研究体内抗肿瘤作用的常用模型^[21],本研究通过注射 SW480R 细胞,构建裸鼠移植瘤模型,研究姜黄素体内逆转结肠癌 5-FU 耐药作用。裸鼠肿瘤体积增长曲线结果显示,与对照组相比,姜黄素能够显著降低肿瘤体积的

增长速度。给药 4 周后,解剖裸鼠取出肿瘤,姜黄素干预后裸鼠的肿瘤质量显著低于对照组,根据各组肿瘤质量计算抑瘤率,测得抑瘤率随姜黄素浓度的增大而逐渐增大。同时,本研究采用 Western blotting 检测肿瘤组织中 EMT 相关蛋白和 Wnt 信号通路相关蛋白的表达情况,结果显示,姜黄素能够在体内上调 E-cadherin 和 Axin 蛋白的表达,下调 Vimentin、 β -catenin、TCF4 蛋白的表达,蛋白表达趋势与细胞层面一致,该结果证明了姜黄素能够在体内抑制 SW480R 细胞的生长,并且通过下调 Wnt 信号通路抑制 EMT。

上述所有数据证明,姜黄素能够从体内外逆转结肠癌对 5-FU 的耐药性,其作用机制可能跟阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡以及通过下调 Wnt 信号通路,从而抑制 EMT 有关。本研究为临床解决结肠癌耐药问题提供了理论支持。

REFERENCES

- [1] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] WANG W C, GUO W J, LI L L, et al. Andrographolide reversed 5-FU resistance in human colorectal cancer by elevating Bax expression [J]. Biochem Pharmacol, 2016(121): 8-17.
- [3] MARJANEH R M, KHAZAEI M, FERNS G A, et al. The role of microRNAs in 5-FU resistance of colorectal cancer: Possible mechanisms [J]. J Cell Physiol, 2019, 234(3): 2306-2316.
- [4] HASHIDA S, YAMAMOTO H, SHIEN K, et al. Acquisition of cancer stem cell-like properties in non-small cell lung cancer with acquired resistance to afatinib [J]. Cancer Sci, 2015, 106(10): 1377-1384.
- [5] TESCHENDORFF A E, LEE S H, JONES A, et al. HOTAIR and its surrogate DNA methylation signature indicate carboplatin resistance in ovarian cancer [J]. Genome Med, 2015(7): 108. Doi: 10.1186/s13073-015-0233-4.
- [6] 周阿容, 葛胜哈, 孔子浩, 等. 姜黄素的功能特性及其毒理学研究进展[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(16): 219-224.
- [7] RAJITHA B, BELALCAZAR A, NAGARAJU G P, et al. Inhibition of NF- κ B translocation by curcumin analogs induces G₀/G₁ arrest and downregulates thymidylate synthase in colorectal cancer [J]. Cancer Lett, 2016, 373(2): 227-233.
- [8] XU Y, YU F, CUI J H, et al. MCL-1 siRNA reverses the chemoresistance of cisplatin-resistant SW480 cells via the pathway of mitochondrial apoptosis [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2016, 33(7): 883-888.
- [9] LIU M, HUANG X D, HAN Z, et al. Establishment of several human colon cancer cell lines resistant to 5-fluorouracil and preliminary analysis of the mechanism for drug resistance [J]. Chin J Gen Surg(中国普通外科杂志), 2019, 28(10):

- 1245-1252.
- [10] ATTOUB S, ARAFAT K, KHALAF T, et al. Frondoside A enhances the anti-cancer effects of oxaliplatin and 5-fluorouracil on colon cancer cells [J]. *Nutrients*, 2018, 10(5): 560.
- [11] SCHERF U, ROSS D T, WALTHAM M, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer [J]. *Nat Genet*, 2000, 24(3): 236-244.
- [12] POULSEN L, QVORTRUP C, PFEIFFER P, et al. Review on adjuvant chemotherapy for rectal cancer - why do treatment guidelines differ so much? [J]. *Acta Oncol*, 2015, 54(4): 437-446.
- [13] 徐淦. 中药单体逆转大肠癌多药耐药的研究进展[J]. *中成药*, 2018, 40(12): 2728-2731.
- [14] BIMONTE S, BARBIERI A, LEONGITO M, et al. Curcumin anticancer studies in pancreatic cancer [J]. *Nutrients*, 2016; 8(7): 433.
- [15] 王维兵. 姜黄素通过调节 p38MAPK 信号通路逆转食管癌 Eca-109/VCR 细胞耐药研究[D]. 张家口: 河北北方学院, 2019.
- [16] LIANG S Q, MARTI T M, DORN P, et al. Blocking the epithelial-to-mesenchymal transition pathway abrogates resistance to anti-folate chemotherapy in lung cancer [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(7): e1824.
- [17] NAMBA T, KODAMA R, MORITOMO S, et al. Zidovudine, an anti-viral drug, resensitizes gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells to gemcitabine by inhibition of the Akt-GSK3 β -Snail pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(6): e1795.
- [18] XIANG D B, DONG H, QUAN J, et al. The role and molecular mechanism of epithelial-mesenchymal transition in chemoresistance to oxaliplatin in colorectal cancer cells [J]. *Chongqing Med(重庆医学)*, 2016, 45(36): 5045-5048.
- [19] ZHANG Z, CHEN H, XU C, et al. Curcumin inhibits tumor epithelial mesenchymal transition by downregulating the Wnt signaling pathway and upregulating NKD2 expression in colon cancer cells [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(5): 2615-2623.
- [20] YANG S, LIU Y, LI M Y, et al. FOXP3 promotes tumor growth and metastasis by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway and EMT in non-small cell lung cancer [J]. *Mole Cancer*, 2017, 16(1): 124.
- [21] 应希旺, 李亚清, 冷报浪. ABT-737 逆转 EGFR T790M 突变肺腺癌细胞 EGFR-TKIs 耐药的机制研究[J]. *中国现代医师*, 2019, 57(18): 9-14, 19, 169.

收稿日期: 2020-02-27
(本文责编: 李艳芳)