

• 论 著 •

异甘草素对结直肠癌细胞的体内外抑制作用研究*

唐 越, 李欣雨, 彭钰凌, 贺吉春, 李秋香, 伍怡颖[△]

成都医学院药学院, 四川成都 610000

摘要:目的 探讨异甘草素(ISL)对结直肠癌细胞的体外增殖、细胞凋亡、细胞周期进程和细胞迁移能力的影响,以及对小鼠结直肠癌移植瘤生长的抑制作用。方法 采用溴化噻唑蓝四氮唑(MTT)法、流式细胞术、划痕实验分别检测 ISL 作用后,结直肠癌 HCT-116 细胞及 SW480 细胞的增殖率、凋亡率、细胞周期分布及细胞迁移的变化。复制小鼠结直肠癌移植瘤模型,观察肿瘤生长,同时通过 HE 染色分析 ISL 干预移植瘤后的病理改变情况。结果 ISL 干预后 HCT-116 细胞及 SW480 细胞增殖率明显下降($P < 0.01$),G0/G1 期细胞的比例降低($P < 0.01$),S 期细胞的比例升高($P < 0.05$),细胞凋亡增多($P < 0.05$),同时细胞划痕的间隙增大,细胞迁移的距离较短。经 ISL 处理后,小鼠移植瘤的生长也受到显著抑制($P < 0.05$)。结论 ISL 可促使结直肠癌细胞发生凋亡,细胞周期于 S 期阻滞及细胞迁移力下降,同时可抑制结直肠癌细胞的体外增殖及体内移植瘤生长。

关键词:结直肠癌; 异甘草素; HCT-116 细胞; SW480 细胞; 增殖

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.08.004

中图法分类号:R735.3

文章编号:1673-4130(2021)08-0912-05

文献标志码:A

The inhibitory effect of isoliquiritigenin on colorectal cancer cells*

TANG Yue, LI Xinyu, PENG Yuling, HE Jichun, LI Qiuxiang, WU Yiyang[△]

School of Pharmacy, Chengdu Medical College, Chengdu, Sichuan 610000, China

Abstract:Objective To study the influence of isoliquiritin (ISL) on proliferation, apoptosis, cell cycle progression and cell migration in vitro of colorectal cancer (CRC) cells, as well as the inhibitory effect on the growth of CRC transplanted tumors in mice. **Methods** MTT method, flow cytometry and scratch test were used to detect the changes of proliferation rate, apoptosis rate, cell cycle distribution and cell migration in HCT-116 and SW480 CRC cells treated with ISL. The model of CRC in mice was established and the growth of tumor was observed. HE staining was used to observe the pathological changes of tumor. **Results** After treatment with ISL, the proliferation of HCT-116 and SW480 cells decreased ($P < 0.01$), the rate of cells in S phase was increased ($P < 0.05$) and the proportion of cells in G0/G1 phase was reduced ($P < 0.01$). While, the cell apoptosis rate and cell scratch gap were increased. Furthermore, the growth of transplanted tumors was inhibited by ISL ($P < 0.05$). **Conclusion** ISL can promote the CRC cells apoptosis and cell cycle arrest in S phase, reduce CRC cells proliferation and migration in vitro, and also suppress the growth of transplanted tumor in vivo.

Key words: colorectal cancer; isoliquiritigenin; HCT-116 cells; SW480 cells; proliferation

结直肠癌是消化道常见恶性肿瘤,其发病率在癌症中位于前 4 位^[1-3]。结直肠癌早期不容易被发现,患者确诊时已错过手术治疗最佳时间,同时,该病具有较高的复发及转移率^[4-5],因此大多数患者需要接受传统放化疗改善预后^[6]。但化学治疗药物的不良反应较多,而天然药物具有多种优势,例如毒性小、靶点多等^[7]。

异甘草素(ISL)主要来源于植物甘草,具有增强

免疫功能、减轻炎症等作用^[8-10]。近来在卵巢癌、宫颈癌等多种肿瘤的相关研究中发现,ISL 有较好的抗肿瘤作用^[11-12]。但其对结直肠癌的作用及抗癌机制还不清楚。因此,本研究拟从体内外两方面探讨 ISL 对结直肠癌的抑制作用。

1 材料与方法

1.1 材料 人结直肠癌细胞株 HCT-116、SW480 和小鼠结直肠癌细胞株 CT26 购自中国科学院上海生物

* 基金项目:国家级大学生创新创业训练计划项目(201813705028);四川省大学生创新创业训练计划项目(S201913705090)。

作者简介:唐越,女,本科生,主要从事天然产物的抗肿瘤作用方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: yiyangwu_cmc@163.com。

本文引用格式:唐越,李欣雨,彭钰凌,等.异甘草素对结直肠癌细胞的体内外抑制作用研究[J].国际检验医学杂志,2021,42(8):912-915.

科学研究所细胞库; ISL 购自美伦生物科技有限公司; 溴化噻唑蓝四氮唑 (MTT) 购自碧云天生物有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒购自凯基生物科技发展有限公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法测定 ISL 对 HCT-116、SW480 细胞体外增殖的影响 将 HCT-116、SW480 细胞以 1×10^4 个/孔铺于 96 孔板。待贴壁后, HCT-116 细胞分别加入梯度浓度的 ISL (10、20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$), 同样 SW480 细胞中也加入梯度浓度的 ISL (20、60、100、140、180、220 $\mu\text{mol/L}$), 对照组细胞不经药物处理。24 h 后, 每孔分别加入 10 μL MTT, 4 h 后, 加二甲基亚砷 (DMSO), 于酶标仪 490 nm 波长处检测光密度值。

1.2.2 流式细胞术检测 ISL 对 HCT-116、SW480 细胞凋亡的影响 将 HCT-116、SW480 细胞以 2×10^5 个/孔铺于 6 孔板。待贴壁后, 加入不同浓度的 ISL 处理 24 h, 按说明书收集细胞, 加入 Annexin V-FITC 和碘化丙啶 (PI) 染色, 于流式细胞仪检测。

1.2.3 流式细胞术检测 ISL 对 HCT-116、SW480 细胞周期的影响 将 HCT-116、SW480 细胞以 2×10^5 个/孔铺于 6 孔板。待贴壁后, 加入不同浓度的 ISL (20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h, 按说明书收集固定细胞, PI 染色, 于流式细胞仪检测。

1.2.4 划痕实验分析 ISL 对 HCT-116、SW480 细胞迁移力的影响 将 HCT-116、SW480 细胞以 5×10^5 个/孔铺于 6 孔板。待贴壁后, 加入不同浓度的 ISL 进行干预。用 10 μL 移液枪头在孔板内底部轻划 3~5 条等距平行线, 显微镜下拍照初始划痕距离。待 ISL 作用 24、48、72 h 后, 分次取出 6 孔板, 显微镜下拍照、观察。

1.2.5 复制 CT-26 荷瘤小鼠模型观察 ISL 对小鼠移植瘤生长的影响 将 CT26 细胞制成浓度为 1×10^7 个/毫升的细胞悬液。取雄性 BALB/C 小鼠, 于右侧腋下注射 CT26 细胞, 每只 100 μL , 复制小鼠结直肠癌移植瘤模型。当小鼠腋下肿瘤生长到 40~50 mm^3 时, 将体质量和肿瘤大小较一致的小鼠选出, 共 18 只, 随机分为 ISL 低浓度组、ISL 高浓度组和阴性对照组, 每组 6 只。并按分组给药, 低浓度组腹腔注射 ISL 30 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 高浓度组腹腔注射 ISL 60 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$, 阴性对照组腹腔注射蒸馏水 100 $\mu\text{L}/[(10 \text{ g}) \cdot \text{d}]$ 。每天记录小鼠的体质量和腋下肿瘤体积。10 d 后, 处死全部小鼠, 剥取肿瘤并称取质量。采用 4% 的多聚甲醛固定瘤块, 常规脱水、石蜡包埋、切片、染色、显微镜下拍照、观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计学软件分析数据。正态分布的计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统

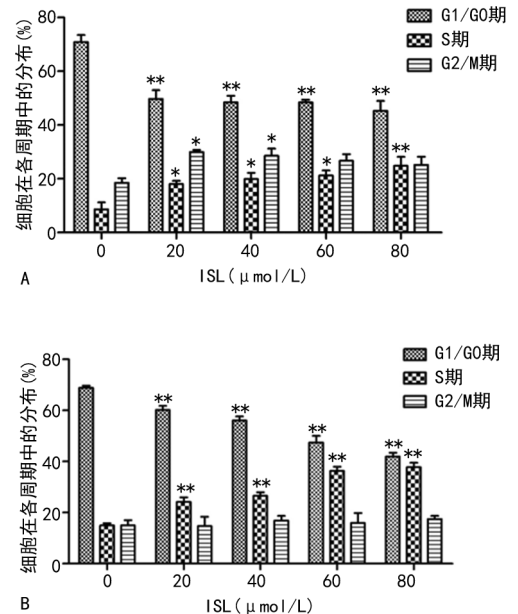
计学意义。

2 结果

2.1 ISL 在体外对结直肠癌细胞增殖情况的影响 MTT 法检测结果显示, 结直肠癌细胞增殖率随 ISL 浓度的升高而显著降低 ($P < 0.01$)。ISL 浓度为 20、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 时, HCT-116 细胞增殖抑制率分别为 $(11.05 \pm 2.84)\%$ 、 $(27.94 \pm 6.69)\%$ 、 $(50.64 \pm 5.68)\%$ 、 $(56.25 \pm 4.24)\%$ 、 $(70.65 \pm 3.86)\%$ 。SW480 细胞在 ISL 浓度为 60、100、140、180、220 $\mu\text{mol/L}$ 时的细胞增殖抑制率分别为 $(34.25 \pm 1.79)\%$ 、 $(40.63 \pm 1.44)\%$ 、 $(50.11 \pm 3.15)\%$ 、 $(81.50 \pm 1.06)\%$ 、 $(58.62 \pm 3.25)\%$ 。结果表明 ISL 可呈浓度依赖性的抑制结直肠癌细胞体外增殖。

2.2 ISL 对结直肠癌细胞凋亡情况的影响 在 ISL 干预 24 h 后, HCT-116 细胞及 SW480 细胞凋亡率较对照组明显升高 ($P < 0.01$)。HCT-116 细胞在 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 ISL 作用后, 总凋亡率为 $(72.22 \pm 5.48)\%$ 。SW480 细胞在 180 $\mu\text{mol/L}$ 的 ISL 作用后, 总凋亡率为 $(62.23 \pm 0.86)\%$ 。结果表明, ISL 呈浓度依赖性促使人结直肠癌细胞发生凋亡。

2.3 ISL 对结直肠癌细胞周期的影响 经 ISL 干预 24 h 后, HCT-116 和 SW480 细胞中 G1/G0 期细胞比例降低 ($P < 0.01$), S 期细胞比例增加 ($P < 0.05$)。结果表明, ISL 可以将结直肠癌细胞阻滞在 S 期, 从而抑制细胞生长。见图 1。



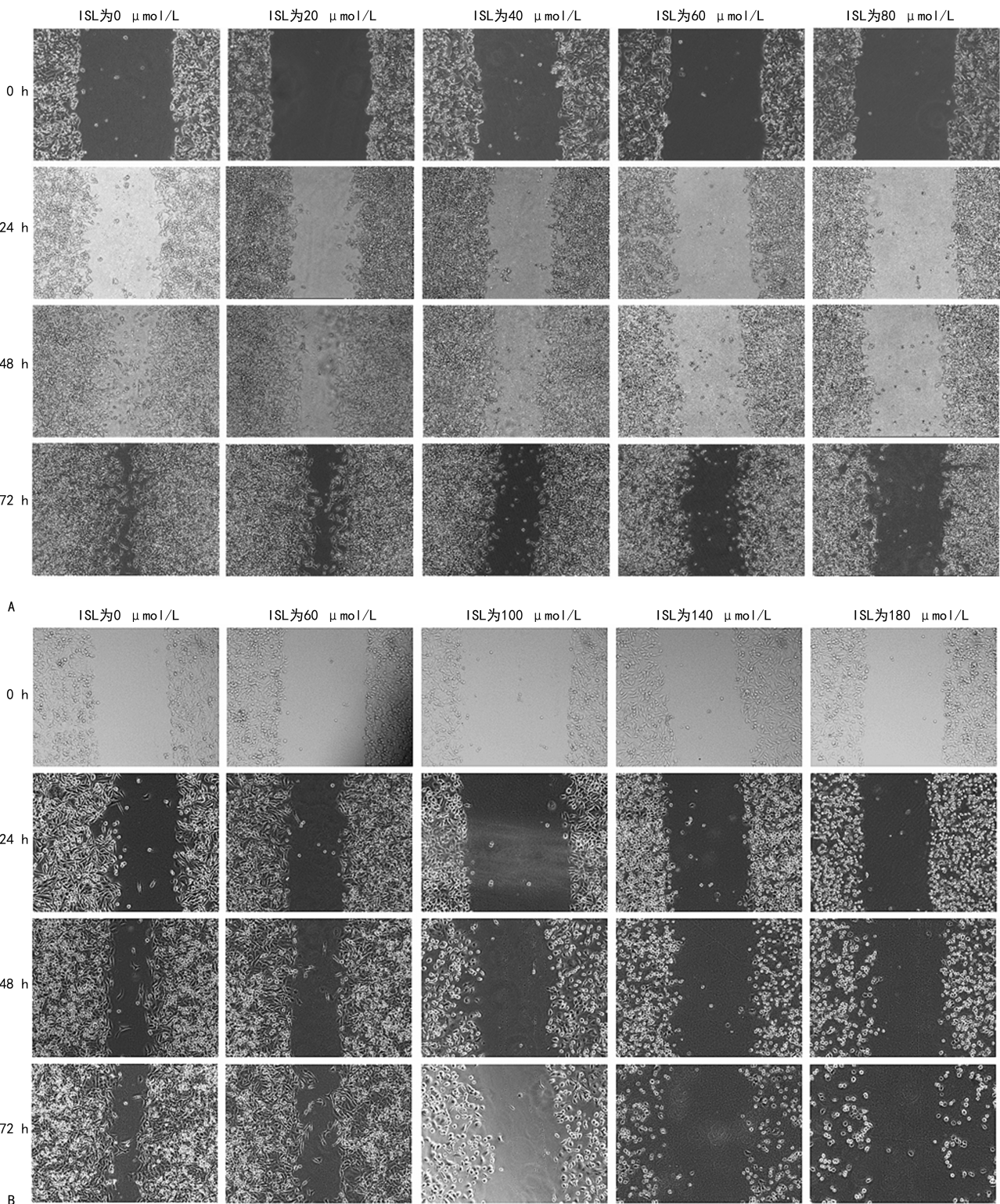
注: A 为不同浓度的 ISL 干预 HCT-116 细胞后, 细胞在各周期中的分布情况; B 为不同浓度的 ISL 干预 SW480 细胞后, 细胞在各周期中的分布情况; 与 ISL 浓度为 0 $\mu\text{mol/L}$ 时比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 ISL 对 HCT-116、SW480 细胞周期的影响

2.4 ISL 对结直肠癌细胞迁移力的影响 对照组的细胞划痕随着时间逐渐变窄, 细胞向中间迁移。而经

ISL 处理后细胞迁移距离较短,划痕间隙较大。结果表明,ISL 可显著抑制 HCT-116 和 SW480 细胞的迁

移。见图 2。

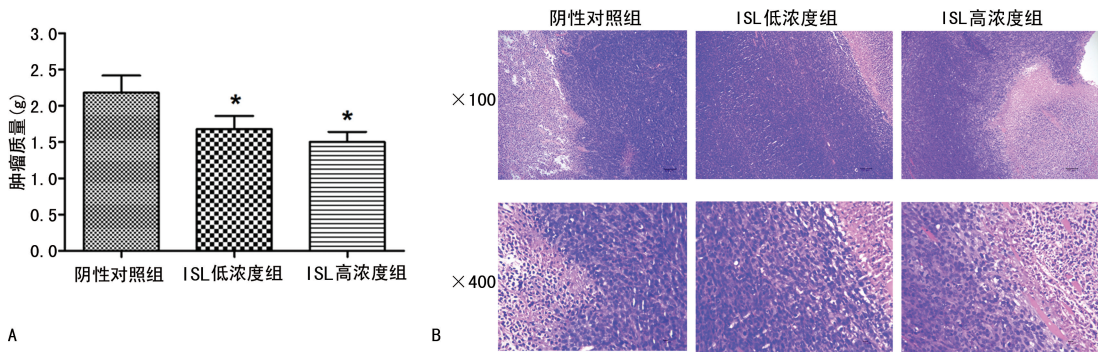


注:A为 ISL 对 HCT-116 细胞迁移力的影响,B为 ISL 对 SW480 细胞迁移力的影响。

图 2 ISL 对 HCT-116、SW480 细胞迁移力的影响(×40)

2.5 ISL 对小鼠结直肠癌移植瘤生长的影响 ISL 干预后小鼠结直肠癌移植瘤生长缓慢,肿瘤体积较小($P<0.05$),质量减轻($P<0.05$)。ISL 低浓度组和高浓度组的抑瘤率分别为(22.89 ± 5.09)%和($30.99\pm$

3.34)%。HE 染色结果显示,ISL 高浓度组肿瘤组织坏死区较大,细胞核溶解,细胞轮廓显示不清,血管轮廓被破坏,而阴性对照组中肿瘤细胞分布紧密,未见大片坏死区域。见图 3。



注:A 为小鼠肿瘤质量在不同浓度 ISL 作用下的变化;与阴性对照组比较,* $P<0.05$ 。B 为采用 HE 染色观察小鼠移植瘤的组织病理改变。

图 3 ISL 对结直肠癌小鼠肿瘤生长的作用

3 讨论

ISL 是从草本类豆科植物甘草中所提取,已发现有器官保护、调节免疫、减轻炎症等作用,属黄酮类化合物^[10]。随着对 ISL 功能活性研究的深入,发现 ISL 对乳腺癌、前列腺癌等恶性肿瘤表现出抗癌潜力。其可通过促使肿瘤细胞凋亡、引发自噬、阻滞细胞周期及抑制新生血管形成等途径,延缓肿瘤的生长及转移^[11]。

如在宫颈癌细胞中,ISL 可通过内质网应激途径,引发 HeLa 细胞凋亡^[13]。ISL 还能通过降低人乳头瘤病毒(HPV)16 E6、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)基因的蛋白表达水平,同时上调 Bax 的表达,从而发挥抑制宫颈癌细胞生长的作用^[14]。ISL 可通过降低乳腺癌 PI3K/Akt 及 NF-kappa B 等信号通路的活性,进而抑制乳腺癌肿瘤的生长、转移^[15]。在前列腺癌中,ISL 可阻滞细胞周期,引发细胞凋亡,降低细胞增殖力,其抗前列腺癌作用可能与活性氧(ROS)水平降低有关^[16-18]。

近年来,随着对 ISL 研究的深入,部分学者发现其在结直肠癌的抗肿瘤活性中具有一定作用,体外研究显示,ISL 可抑制结直肠癌细胞 HCT-116、SW620 细胞增殖及侵袭^[19]。给小鼠用 ISL 灌胃能有效抑制由 AOM/DSS 诱导的结肠癌的发生^[7]。但目前有关 ISL 抗结直肠癌的作用研究还较少,且缺少体内移植瘤的实验研究。

当受到外界干扰或基因调控异常时,细胞周期进程以及增殖失去控制,进而导致肿瘤的形成。因此,阻滞肿瘤细胞周期进程,抑制其增殖或诱发凋亡,均可有效延缓肿瘤的生长和恶性发展,同时也是评估抗肿瘤药物效果的重要指标。本研究首先通过 MTT 法检测 HCT-116、SW480 细胞在梯度浓度 ISL 作用后的增殖变化,结果显示,随着 ISL 浓度增加,细胞增殖率明显下降($P<0.05$),表明 ISL 能抑制结直肠癌细胞的体外增殖,并呈浓度依赖性。同时利用流式细胞术检测 ISL 对结直肠癌细胞凋亡及周期的影响发现,ISL 干预后细胞凋亡率显著升高($P<0.05$),与细胞

增殖实验结果一致。高浓度 ISL 作用后 S 期细胞比例增加($P<0.01$),提示 ISL 具有细胞周期阻滞作用,可将细胞阻滞在 S 期,从而抑制结直肠癌细胞生长。

结直肠癌为易转移性癌,而癌症转移主要取决于癌细胞的迁移、侵袭能力。因此本研究采用划痕实验检测了 ISL 对结直肠癌细胞迁移力的影响。结果显示,ISL 明显抑制 HCT-116 及 SW480 细胞向划痕间隙移动,降低细胞的迁移力。

此外,为进一步明确 ISL 的体内抗结直肠癌作用,本研究还复制了 CT-26 结直肠癌荷瘤小鼠模型。结果发现,ISL 能明显抑制小鼠移植瘤生长,杀伤肿瘤细胞。

综上所述,本研究表明 ISL 可促使结直肠癌细胞发生凋亡,细胞周期于 S 期阻滞以及细胞迁移力下降,并可抑制结直肠癌细胞的体外增殖及小鼠体内移植瘤生长。提示 ISL 将可能成为结直肠癌的潜在治疗药物,但其抗结直肠癌作用分子机制尚不清楚,需进一步研究。

参考文献

- [1] 王宁,刘硕,杨雷,等. 2018 全球癌症统计报告解读[J/CD]. 肿瘤综合治疗电子杂志,2019,5(1):87-97.
- [2] 曹毛毛,陈万青. 中国恶性肿瘤流行情况及防控现状[J]. 中国肿瘤临床,2019,46(3):145-149.
- [3] 李道娟,李倩,贺宇彤. 结直肠癌流行病学趋势[J]. 肿瘤防治研究,2015,42(3):305-310.
- [4] 孙恒恒. 结直肠癌风险因素的探讨及健康生活方式指导[D]. 济南:山东大学,2018.
- [5] WONG M S, CHAN C H, LIN J Y, et al. Lower relative contribution of positive family history to colorectal cancer risk with increasing age: a systematic review and Meta-Analysis of 9.28 million individuals[J]. Am J Gastroenterol, 2018, 3(6):189-196.
- [6] 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.
- [7] 张晓平,邵骏菁,马大龙,等. 天然药物抗肿瘤活性成分及其作用机制研究进展[J]. 药学学报,2019,54(11):1949-1957.

(下转第 920 页)

- Carcinoma Cells[J]. *J Histochem Cytochem*, 2019, 67(7):511-522.
- [6] GUBBIOTTI M A, VALLET S D, RICARD-BLUM S, et al. Decorin interacting network: A comprehensive analysis of decorin-binding partners and their versatile functions[J]. *Matrix Biol*, 2016, 55(3):7-21.
- [7] 徐竞, 李涛, 杨光明, 等. 血管生成素-2 经肌内皮缝隙连接调节血管低反应性[J]. *中华实验外科杂志*, 2018, 35(5):832-834.
- [8] ANDO M, MIYAZAKI E, ABE T, et al. Angiopoietin-2 expression in patients with an acute exacerbation of idiopathic interstitial pneumonias[J]. *Respir Med*, 2016, 117(4):27-32.
- [9] 中华医学会呼吸病学分会间质性肺疾病学组. 特发性肺纤维化诊断和治疗中国专家共识[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2016, 39(6):427-432.
- [10] 李莉红, 白璐, 王鹏. 急性加重期特发性间质性肺炎患者血清多配体蛋白聚糖 4 水平变化及其与近期预后的关系研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2018, 26(12):57-61.
- [11] ENOMOTO N, NAOI H, AONO Y, et al. Acute exacerbation of unclassifiable idiopathic interstitial pneumonia: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis[J]. *Thorax*, 2020, 75(4):165-174.
- [12] ÖZGEN G, ADANAS AYDIN G. Decorin levels in early- and late-onset preeclampsia[J]. *Ginekol Pol*, 2020, 91(5):262-268.
- [13] BOCIAN C, URBANOWITZ A K, OWENS R T, et al. Decorin potentiates interferon- γ activity in a model of allergic inflammation[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(18):12699-12711.
- [14] 丁彦, 袁小亮, 范海伟, 等. TGF- β 1 在不同类型特发性间质性肺炎患者肺组织中的表达及其意义[J]. *现代生物医学进展*, 2014, 14(28):5491-5494.
- [15] BAGHY K, DEZSO K, LÁSZLÓ V, et al. Ablation of the decorin gene enhances experimental hepatic fibrosis and impairs hepatic healing in mice[J]. *Lab Invest*, 2011, 91(3):439-451.
- [16] 马战军, 王天堂, 毛丰刚. 负压通过 Ang/Tie-2 信号通路促进糖尿病大鼠创面微血管成熟的实验研究[J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2018, 33(9):940-944.
- [17] ZHAO L, MA R, ZHANG L, et al. Inhibition of HIF-1 α -mediated TLR4 activation decreases apoptosis and promotes angiogenesis of placental microvascular endothelial cells during severe pre-eclampsia pathogenesis[J]. *Placenta*, 2019, 83(4):8-16.
- [18] 李媛, 王安才. ACE2-Ang(1-7)-Mas 轴与肺动脉高压的研究进展[J]. *疑难病杂志*, 2015, 14(2):210-213.
- [19] LI S, ZHONG M, YUAN Y, et al. Differential roles of p38 MAPK and ERK1/2 in angiopoietin-2-mediated rat pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis induced by lipopolysaccharide[J]. *Exp Ther Med*, 2018, 16(6):4729-4736.
- (收稿日期:2020-08-30 修回日期:2020-12-18)
-
- (上接第 915 页)
- [8] SHI D, YANG J L, JIANG Y E, et al. The antioxidant activity and neuroprotective mechanism of isoliquiritigenin[J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 152:207-215.
- [9] JIN H, SEO G S, LEE S H. Isoliquiritigenin-mediated p62/SQSTM1 induction regulates apoptotic potential through attenuation of caspase-8 activation in colorectal cancer cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 841(841):90-97.
- [10] PENG F, DU Q H, PENG C, et al. A review: the pharmacology of isoliquiritigenin[J]. *Phyto Res*, 2015, 29(7):969-977.
- [11] 石玉花, 李瑞萍, 陈小芸, 等. 异甘草素抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. *实用药物与临床*, 2020, 23(4):371-375.
- [12] WU M, WU Y Q, DENG B G, et al. Isoliquiritigenin decreases the incidence of colitis-associated colorectal cancer by modulating the intestinal microbiota[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51):85318-85331.
- [13] YUAN X, ZHANG B, GAN L, et al. Involvement of the mitochondrion-dependent and the endoplasmic reticulum stress-signaling pathways in isoliquiritigenin-induced apoptosis of HeLa cell[J]. *Biomed Environ Sci*, 2013, 26(4):268-276.
- [14] HIRCHAUD F, HERMETET F, ABLISE M, et al. Isoliquiritigenin induces caspase-dependent apoptosis via downregulation of HPV16 E6 expression in cervical cancer Ca Ski cells[J]. *Planta Med*, 2013, 79(17):1628-1635.
- [15] WANG Z, WANG N, HAN S, et al. Dietary compound isoliquiritigenin inhibits breast cancer neoangiogenesis via VEGF/VEGFR-2 signaling pathway[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e68566.
- [16] ZHANG X, YEUNG E D, WANG J, et al. Isoliquiritigenin, a natural anti-oxidant, selectively inhibits the proliferation of prostate cancer cells[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(8):841-847.
- [17] JUNG J I, LIM S S, CHOI H J, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes in prostate cancer cells[J]. *J Nutr Biochem*, 2006, 17(10):689-696.
- [18] KWON G T, CHO H J, CHUNG W Y, et al. Isoliquiritigenin inhibits migration and invasion of prostate cancer cells: possible mediation by decreased JNK/AP-1 signaling[J]. *J Nutr Biochem*, 2009, 20(9):663-676.
- [19] 王志国, 黄贤明, 赵雁, 等. 异甘草素对结直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响[J]. *中成药*, 2019, 41(8):1800-1805.
- (收稿日期:2020-09-12 修回日期:2020-11-17)