

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.12.014

银杏内酯 B 对人结肠癌 SW480 细胞恶性生物学行为及 ROS / XIAP 信号通路的影响*

孙小虎,于洪[△],王璐,艾福录,白静慧

(中国医科大学肿瘤医院·辽宁省肿瘤医院,辽宁 沈阳 110042)

摘要:目的 探讨银杏内酯 B 对人结肠癌 SW480 细胞恶性生物学行为及活性氧(ROS) / X 连锁凋亡蛋白抑制剂(XIAP)信号通路的影响。方法 实验分为模型组(培养基 + SW480 细胞)、紫杉醇组(5 mg / L + 培养基 + SW480 细胞),以及银杏内酯 B 低、高剂量组(50, 100 μmol / L + 培养基 + SW480 细胞)。采用四唑盐(MTT)法测定细胞增殖水平并计算存活率,流式细胞术测定细胞凋亡情况并计算凋亡率,Transwell 法测定细胞迁移侵袭水平,荧光探针法检测活性氧(ROS)水平,反转录聚合酶链反应及 Western blot 法测定细胞 XIAP mRNA 及蛋白表达水平。结果 与模型组比较,紫杉醇组及银杏内酯 B 低、高剂量组细胞存活率显著降低,凋亡率显著升高,细胞侵袭水平显著降低,细胞 ROS 水平及 XIAP mRNA 和蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结论 银杏内酯 B 可有效抑制 SW480 细胞的迁移和侵袭并诱导其凋亡,其机制可能与抑制 ROS / XIAP 信号通路的激活有关。

关键词:银杏内酯 B;人结肠癌 SW480 细胞;恶性生物学行为;ROS / XIAP 信号通路

中图分类号:R965;R285 文献标志码:A 文章编号:1006-4931(2022)12-0060-04

Effect of Ginkgolide B on the Malignant Biological Behavior of Human Colorectal Cancer SW480 Cells and ROS / XIAP Signaling Pathway

SUN Xiaohu, YU Hong, WANG Lu, AI Fulu, BAI Jinghui

(Cancer Hospital of China Medical University · Liaoning Cancer Hospital & Institute, Shenyang, Liaoning, China 110042)

Abstract: Objective To investigate the effect of ginkgolide B on the malignant biological behavior of human colorectal cancer SW480 cells and reactive oxygen species (ROS) / X-linked apoptosis protein inhibitor (XIAP) signaling pathway. **Methods** The model group (medium + SW480 cells), paclitaxel group (5 mg / L of paclitaxel + medium + SW480 cells) and ginkgolide B low- and high-dose groups (50, 100 μmol / L of ginkgolide B + medium + SW480 cells) were set up in the experiment. Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to measure the level of cell proliferation and calculate the survival rate, flow cytometry was used to measure the rate of cell apoptosis, Transwell method was used to measure the level of cell migration and invasion, fluorescent probe method was used to measure the level of reactive oxygen species (ROS), reverse transcription-polymerase chain reaction and Western blot were used to measure the expression level of XIAP mRNA and protein. **Results** Compared with those in the model group, the survival rate of SW480 cells was significantly lower, the apoptosis rate of SW480 cells was significantly higher, while the invasion level, ROS level and expression level of XIAP mRNA and protein of SW480 cells were significantly lower in the paclitaxel group and ginkgolide B low- and high-dose groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Ginkgolide B can effectively inhibit the migration, invasion and apoptosis of SW480 cells, and its mechanism may be related to the inhibition of the activation of ROS / XIAP signaling pathway.

Key words: ginkgolide B; human colorectal cancer SW480 cells; malignant biological behavior; ROS / XIAP signaling pathway

结直肠癌是全球第四大与癌症相关的死亡原因^[1],化学药物治疗(简称化疗)常用于治疗直肠癌,但化疗副作用大,且癌细胞会产生耐药性^[2]。有研究表明,银杏内酯 B 对癌前病变、原位癌、浸润癌、转移及向远端播散阶段均显示出预防或治疗作用^[3-4],且可抑制癌细胞的生长^[5]。活性氧(ROS)可调节细胞生长、增殖、迁移,并可通过 Thr308 磷酸化激活^[6-7]。X 连锁凋亡蛋白抑制剂(XIAP)属凋亡抑制剂家族成员,位于细

胞质中,可作为细胞凋亡的有效调节剂。XIAP 通过抑制半胱氨酸蛋白酶(caspase)-3、caspase-7 和 caspase-9 活性而发挥抗凋亡作用,且在癌症化学耐药性中起关键作用^[8]。此外,ROS 活化可增强 XIAP 蛋白酶体表达从而促进癌细胞生长及增殖。本研究中探讨了银杏内酯 B 对人结肠癌 SW480 细胞恶性生物学行为及 ROS / XIAP 信号通路的影响。现报道如下。

*基金项目:辽宁省重点研发计划指导计划项目[201801788]。

第一作者:孙小虎,男,硕士,主治医师,研究方向为恶性肿瘤病因与放疗,(电子信箱)18900918693@163.com。

[△]通信作者:于洪,女,博士,主任医师,研究方向为恶性肿瘤病因与放疗,(电子信箱)2328901858@qq.com。

4 μL 。反应程序为, 96 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 40个循环。读取循环阈值(C_t 值), 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示目的基因 mRNA 的表达量。每组平行实验3次。

XIAP蛋白表达水平:采用Western blot法。取1. 2. 1项下对数生长期细胞适量, 加入1 mL RIPA蛋白裂解液, 以BCA法测定XIAP蛋白含量。10% SDS - PAGE电泳后电转, 4 $^{\circ}\text{C}$ 下与一抗孵育过夜, 弃一抗; 室温下与免疫球蛋白G的山羊抗兔二抗孵育1 h。加入ECL化学发光试剂, 将PVDF膜放入暗盒中, 压上X胶片, 取出胶片后显影、定影、清洗。以Image J软件将条带灰度值数字化, 目的条带与内参条带灰度比值为各目的蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用SPSS 24.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较行SNK - q 检验, 多组间比较行单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞存活率

与模型组比较, 紫杉醇组及银杏内酯B低、高剂量组细胞存活率显著降低($P < 0.05$)。详见表1。

2.2 细胞凋亡率

与模型组比较, 紫杉醇组及银杏内酯B低、高剂量

组细胞凋亡率显著升高($P < 0.05$)。详见表1及图1。

2.3 细胞侵袭迁移水平

与模型组比较, 各用药组细胞穿膜数显著减少($P < 0.05$)。详见表1。

2.4 各组细胞 ROS 水平

与模型组比较, 紫杉醇组与银杏内酯B低、高剂量组细胞ROS水平显著降低($P < 0.05$)。详见表1。

2.5 细胞 XIAP mRNA 及蛋白表达水平

与模型组比较, 紫杉醇组与银杏内酯B低、高剂量组细胞XIAP mRNA及蛋白表达水平显著降低($P < 0.05$)。详见表1。

3 讨论

结直肠癌发现时常表现为肿瘤转移, 术后易局部浸润和肿瘤复发。银杏内酯B属内酯类生物碱, 可通过减弱肝癌细胞中p38信号通路的活性来阻止细胞的增殖和侵袭^[11], 也可通过肺癌细胞中Akt途径的失活而抑制细胞增殖并诱导其凋亡^[12]。本研究结果显示, 50 $\mu\text{mol/L}$ 和100 $\mu\text{mol/L}$ 的银杏内酯B可显著抑制SW480细胞的增殖、迁移和侵袭, 并促进其凋亡。

本研究中, 与模型组比较, 紫杉醇组及银杏内酯B低、高剂量组细胞ROS、XIAP mRNA和蛋白表达水平均显著降低, 与已有文献结论一致^[13]。生物信息学预测分

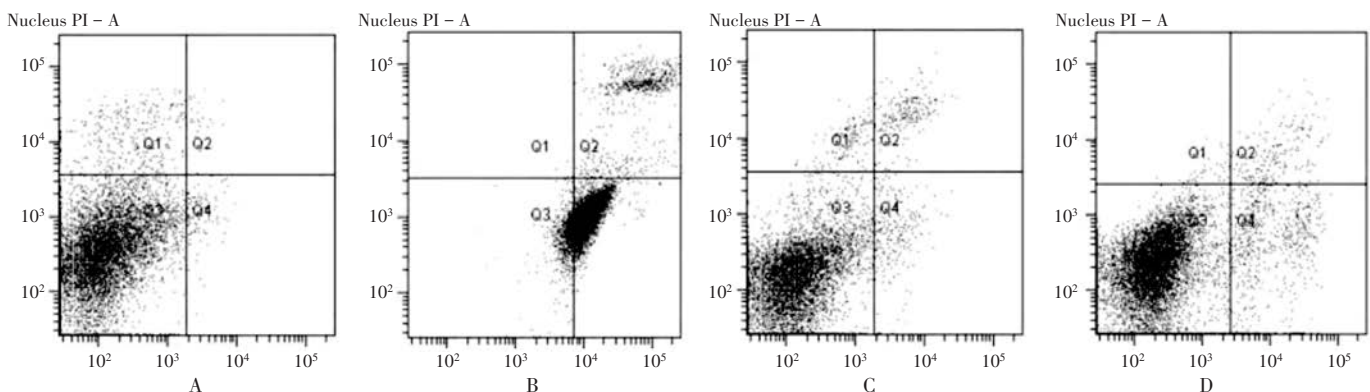
表1 各组观察指标比较($\bar{X} \pm s, n = 6$)

Tab. 1 Comparison of observed indexes in each group ($\bar{X} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	存活率(%)	凋亡率(%)	穿膜数(个)	ROS(ng/ μL)	XIAP mRNA	XIAP蛋白
模型组	0	85.52 \pm 5.16	4.27 \pm 0.53	626.96 \pm 32.69	504.27 \pm 35.53	5.93 \pm 0.36	1.41 \pm 0.31
紫杉醇组	5 mg/L	29.26 \pm 3.18*	15.14 \pm 0.53*	128.26 \pm 29.54*	115.14 \pm 26.53*	1.99 \pm 0.23*	0.39 \pm 0.35*
银杏内酯B低剂量组	50 $\mu\text{mol/L}$	55.15 \pm 2.36*	8.63 \pm 0.55*	418.96 \pm 31.62*	418.63 \pm 30.55*	4.49 \pm 0.29*	1.09 \pm 0.33*
银杏内酯B高剂量组	100 $\mu\text{mol/L}$	38.45 \pm 2.41*	13.25 \pm 0.56*	198.54 \pm 30.29*	213.25 \pm 27.56*	2.98 \pm 0.31*	0.66 \pm 0.34*

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

Note: Compared with those in the model group, * $P < 0.05$.



A. 模型组 B. 紫杉醇组 C. 银杏内酯B低剂量组 D. 银杏内酯B高剂量组

图1 流式细胞图

A. Model group B. Paclitaxel group C. Ginkgolide B low - dose group D. Ginkgolide B high - dose group

Fig. 1 Flow cytometry

析认为, XIAP 是基于序列互补的 ROS 可能的靶标^[14]。ROS 在各种癌症中异常表达, 并促进了乳腺癌、前列腺癌、肺癌的发生与发展, 溴结构域和植物同源结构域的手指转录因子可作为核因子 κ B (NF - κ B) 途径的转录调节因子, 并增强肺癌细胞中 ROS 的转录, 最终导致预后不良^[15]。另一项关于三阴性乳腺癌的研究表明, ROS 表达上调是因为着丝粒蛋白 U (有丝分裂必要的着丝粒成分) 抑制了泛素化和蛋白酶体降解, 此外, 间质相互作用分子 1 (STIM1) 可能通过增强 ROS 的表达和升高前列腺素 E₂ 的水平来促进结肠癌细胞的迁移, 而短发夹 RNA 消耗 STIM1 则抑制了结直肠癌细胞的迁移^[16]。XIAP 是位于 ROS 启动子区域的反义蛋白, XIAP 被认为是通过隔离其抑制剂, p50 同源二聚体和整合剂来激活 NF - κ B 信号传导。这又将 NF - κ B 亚基 p65 募集到 XIAP 启动子并增强了 XIAP 转录。有研究表明, XIAP 与 ROS mRNA 的表达高度相关, 而 XIAP 的异常表达可调节人巨噬细胞对脂多糖刺激及恶性造血的分化, XIAP 也可通过前列腺素的生物合成促进肿瘤发生^[17], 其在人肺癌细胞中高表达, 并多与预后不良相关^[18]。临床研究表明, miR - 451 抑制了肝癌细胞的增殖, 其上调抑制了 XIAP 表达, 并且 XIAP 还可激活 Wnt 通路。同时, 转录共激活子 YAP 可通过与 XIAP 启动子中的 TEAD 结合位点相互作用, 增强 XIAP mRNA 的表达, 从而介导癌细胞耐药性^[19-20]。

综上所述, 银杏内酯 B 可有效抑制 SW480 细胞的迁移和侵袭并诱导其凋亡, 其机制可能与抑制 ROS / XIAP 信号通路的激活有关。

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, GODING SAUER A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020[J]. CA - Cancer J Clin, 2020, 70(3): 145 - 164.
- [2] XIE YH, CHEN YX, FANG JY. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer[J]. Signal Transduct Target Ther, 2020, 5(1): 1 - 30.
- [3] LOU C, LU H, MA Z, et al. Ginkgolide B enhances gemcitabine sensitivity in pancreatic cancer cell lines via inhibiting PAFR / NF - κ B pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 109: 563 - 572.
- [4] WANG X, SHAO QH, ZHOU H, et al. Ginkgolide B inhibits lung cancer cells promotion via beclin - 1 - dependent autophagy[J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20(1): 194.
- [5] FENG ZL, ZHU ZB, CHEN W, et al. Ginkgolide B derivative synthesis and their effects on the viability of SKOV3 cells[J]. Med Chem Res, 2021, 36: 1265 - 1272.
- [6] GENG Y, ZHANG L, WANG GY, et al. Xanthatin mediates G2 / M cell cycle arrest, autophagy and apoptosis via ROS / XIAP signaling in human colon cancer cells[J]. Nat Prod Res, 2020, 34(18): 2616 - 2620.
- [7] ZHAO R, YU QY, HOU L, et al. Cadmium induces mitochondrial ROS inactivation of XIAP pathway leading to apoptosis in neuronal cells[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2020, 121: 105715.
- [8] SUMARNI U, REIDEL U, EBERLE J. Targeting Cutaneous T - Cell Lymphoma Cells by Ingenol Mebutate (PEP005) Correlates with PKC δ Activation, ROS Induction as Well as Downregulation of XIAP and c - FLIP[J]. Cells, 2021, 10(5): 987.
- [9] 韩晓丽, 席作武, 王凯, 等. 毛茛藤碱调控 IL - 6 / STAT3 信号通路抑制结肠癌细胞增殖、迁移及诱导细胞凋亡的体外实验[J]. 中国老年学杂志, 2020, 40(18): 3955 - 3959.
- [10] LI HH, ZHANG WC, WU ZY, et al. Theoretical design, preparation, and evaluation of Ginkgolide B molecularly imprinted polymers[J]. J Sep Sci, 2020, 43(2): 514 - 523.
- [11] LIU J, WU P, XU ZH, et al. Ginkgolide B inhibits hydrogen peroxide - induced apoptosis and attenuates cytotoxicity via activating the PI3K / Akt / mTOR signaling pathway in H9c2 cells[J]. Mol Med Rep, 2020, 22(1): 310 - 316.
- [12] 李雅静, 张洁. 银杏内酯 B 对肺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2021, 41(4): 342 - 347.
- [13] AL - KHAYALK, VAALI - MOHAMMED MA, ELWATIDY M, et al. A novel coordination complex of platinum (PT) induces cell death in colorectal cancer by altering redox balance and modulating MAPK pathway[J]. BMC Cancer, 2020, 20(1): 685.
- [14] PAUL T, ROY R, SARKAR RD, et al. H₂O₂ mediated FLIP and XIAP down - regulation involves increased ITCH expression and ERK - Akt crosstalk in imatinib resistant Chronic Myeloid Leukemia cell line K562[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 166: 265 - 276.
- [15] SANDAG Z, JUNG S, QUYNH NTN, et al. Inhibitory Role of TRIP - Br1 / XIAP in Necroptosis under Nutrient / Serum Starvation[J]. Mol Cells, 2020, 43(3): 236 - 250.
- [16] LIU T, LI Y, SUN JL, et al. Engeletin suppresses lung cancer progression by inducing apoptotic cell death through modulating the XIAP signaling pathway: A molecular mechanism involving ER stress [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 128: 110221.
- [17] TU H, COSTA M. XIAP's Profile in Human Cancer[J]. Biomolecules, 2020, 10(11): 1493.
- [18] CHEUNG CHA, CHANG YC, LIN TY, et al. Anti - apoptotic proteins in the autophagic world: an update on functions of XIAP, Survivin, and BRUCE[J]. J Biomed Sci, 2020, 27(1): 1 - 10.
- [19] KHAN M, MARYAM A, SALEEM MZ, et al. Brevilin A induces ROS - dependent apoptosis and suppresses STAT3 activation by direct binding in human lung cancer cells[J]. J Cancer, 2020, 11(13): 3725 - 3735.
- [20] ZHANG T, GUO S, ZHU XY, et al. Alpinetin inhibits breast cancer growth by ROS / NF - κ B / HIF - 1 α axis[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(15): 8430 - 8440.

(收稿日期: 2021 - 08 - 23; 修回日期: 2021 - 12 - 23)