

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.002

黄连素抗食管癌 EC109 细胞的作用及其机制

刘红岗, 赖远阳, 朱以芳, 同李平, 董小平, 许娟, 张勇, 郭海华, 李小飞, 闫小龙

(第四军医大学唐都医院胸外科, 西安 710038)

[摘要] 目的: 研究黄连素(berberine, BBR)的抗食管癌作用及其机制。方法: 给予50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ BBR处理EC109细胞24 h, 检测EC109细胞的活力及迁移能力。Western印迹检测pAkt, 蛋白激酶B(protein kinase B, Akt), 叉头转录因子O3(forkhead Class box O3, FOXO3), B淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, bcl-2)及Bax的表达水平, 特别是FOXO3的细胞核转位情况。建立裸鼠皮下肿瘤模型, 腹腔注射BBR, 明确BBR的抗食管癌作用。结果: BBR处理EC109细胞后, 细胞活力下降, 划痕实验检测细胞间距增大($P<0.05$)。BBR降低了Akt的磷酸化水平, pAkt/总Akt下降; 细胞质内的FOXO3下降; 细胞核内的FOXO3升高; bcl-2表达水平下降; Bax则显著升高。在体研究发现BBR剂量依赖地抑制了肿瘤生长。结论: BBR能显著抑制食管癌EC109细胞的增殖、迁移以及在体增殖能力, 该作用可能是通过抑制Akt磷酸化水平、增加FOXO3细胞核转位进而促进细胞凋亡来实现的。

[关键词] 黄连素; 食管癌; 蛋白激酶B; 叉头蛋白转录因子3; 细胞核转位; 细胞凋亡

Inhibition of berberine on EC109 cells in esophageal cancer and its mechanism

LIU Honggang, LAI Yuanyang, ZHU Yifang, TONG Liping, DONG Xiaoping,
XU Juan, ZHANG Yong, GUO Haihua, LI Xiaofei, YAN Xiaolong

(Department of Thoracic Surgery, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract **Objective:** To investigate the role of berberine (BBR) on esophageal cancer and its mechanism. **Methods:** EC109 cells were treated with 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ BBR and the CCK8 assay and cell migration assay were conducted. Further, we detected the phosphorylation level of Akt, the location of FOXO3, B-cell lymphoma-2 (bcl-2) and Bax expression through Western blot. To further evaluate whether BBR has an anti-tumor growth effect in vivo, we measured the tumor volume in a tumor bearing model by transplanting EC109 cells into nude mice. **Results:** After treated by BBR, EC109 cell viability was significantly reduced compared with the control group ($P<0.05$). Distance between cell boundary was significantly increased, indicating a worse migration ability ($P<0.05$). Compared with the control group, pAkt expression/total Akt expression was significantly decreased after BBR treatment. Cytoplasmic FOXO3 decreased and nucleus FOXO3 increased. Bcl-2 was decreased and Bax was increased by BBR. In vivo study showed that tumor volumes in nude mice were significantly reduced after BBR

收稿日期 (Date of reception): 2017-09-20

通信作者 (Corresponding author): 闫小龙, Email: yanxiaolong@fmmu.edu.cn

treatment. **Conclusion:** BBR can inhibit EC109 cell growth and induce cell apoptosis, which might be mediated by regulation of Akt/FOXO3 pathway.

Keywords berberine; esophageal cancer; Akt; forkhead box O3; nuclear translocation; cell apoptosis

食管癌是常见的消化系统肿瘤, 据赫捷团队^[1-2]报道的数据, 2015年食管癌发病率为477.9/10万, 病死率为375/10万。食管癌发生与饮食习惯和健康意识密切相关。多数食管癌患者发现吞咽困难时已发生转移, 失去根治机会。因此食管癌的治疗亟需手术之外的新治疗策略^[3]。

黄连素(berberine, BBR)是传统中医药小檗科植物中提取的喹啉联啶生物碱, 具有杀菌、抗炎等多种生物学功效^[4]。新近研究^[5-7]表明: BBR具有抗多种肿瘤的作用, 能抑制胃癌、膀胱癌、结肠癌、乳腺癌、黑色素瘤、胰腺癌、子宫内膜癌以及肺癌等肿瘤的生长。然而BBR对食管癌的作用及内在机制尚不明确。

叉头转录因子O3(forkhead Class box O3, FOXO3)是叉头转录因子家族的一员。研究^[8-9]发现: FOXO3可以促进包括p27kip1在内的多种促凋亡因子转录。FOXO3受到蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)、AMP依赖的蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)、沉默转录调控因子1(Sirtuin 1, SIRT1)等多个信号分子的调控^[10-11]。一般而言, Akt磷酸化后会进一步磷酸化FOXO3, 促使FOXO3由细胞核向细胞质转移^[12-13]。而抑制Akt磷酸化, 可降低FOXO3的磷酸化水平并促使其向细胞核内转移。BBR具有抗多种肿瘤的作用, 且有报道^[11]称BBR的抗肿瘤作用与Akt密切相关。本研究旨在探究BBR对食管癌EC109细胞的抑制作用, 以及Akt/FOXO3信号通路在该过程中的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞、试剂与仪器

人食管癌EC109细胞系购自中科院上海细胞库。BBR购自美国Sigma-Aldrich公司; CCK8细胞活力检测试剂盒购自上海七海复泰生物科技有限公司; 细胞核分离试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司; 抗FOXO3抗体、抗pAkt抗体、抗Akt抗体、抗bcl-2抗体、抗Bax抗体购自美国Abcam公司; 抗 β -actin抗体购自美国CMCTAG公司。裸鼠购自第四军医大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及处理

食管癌EC109细胞用完全培养基(RPMI-1640培养基+10%胎牛血清), 置于37 °C, 5% CO₂的细胞培养箱中常规培养。

1.2.2 CCK8 法细胞活力检测

将细胞消化、离心、重悬后接种到96孔板(密度为每孔 1×10^5), 将细胞分为对照组、50 μ mol/L BBR组、100 μ mol/L BBR组及200 μ mol/L BBR组。每组10个复孔, 重复3次。药物处理时间为24 h。各组处理完毕后弃去培养基, 磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次, 每孔加入100 μ L RPMI-1640培养基和10 μ L CCK染色液, 避光培养2 h后置于450 nm波长下检测吸光度值。

1.2.3 划痕实验

将细胞消化、离心、重悬后, 接种到6孔板, 细胞贴壁后, 在6孔板底部划3条横线, 用200 μ L枪头在每孔中划1条纵线, 洗去漂浮细胞后再用完全培养基中培养。24 h后测量划痕宽度并记录。

1.2.4 细胞核与细胞质分离

用细胞核提取试剂盒、胞浆组分提取试剂盒分离提取细胞核与细胞质, 具体操作严格参照试剂盒说明书进行。

1.2.5 Western 印迹检测 pAkt, Akt, FOXO3, bcl-2 及 Bax 表达

待处理完毕后收集各组细胞, 提取蛋白, 用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。取30 μ g总蛋白进行SDS-PAGE, 电泳结束后湿转膜至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上。分别用pAkt, Akt, FOXO3, bcl-2及Bax(1:1 000), β -actin(1:2 000)的一抗进行孵育, 4 °C过夜。第2天用TBST洗膜液洗涤后用一抗对应的二抗(1:5 000)常温孵育2 h。洗涤后在Bio-Rad照相系统采集照片并用自带软件进行分析。

1.2.6 裸鼠皮下肿瘤接种及测量

取对数期EC109细胞, 用1 mL空针在裸鼠左肩皮下注射0.1 mL细胞液(1×10^7 个细胞)。接种后饲养于SPF环境并保证水和鼠粮供给。每3天测量一次裸鼠体重和肿瘤体积并记录。待肿瘤体积达到100 mm³时给药处理。对照组每3天腹腔注射生理盐

水, 试验组每3天腹腔注射10或20 mg/kg的BBR, 记录肿瘤体积和小鼠体重, 第27天时处死小鼠并取出皮下肿瘤。

1.3 统计学处理

采用SPSS 13.0统计学软件进行分析, 所有结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 差异显著性检验采用单因素方差分析, 比较2组间差异采用LSD-t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BBR对食管癌EC109细胞的影响

分别用50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的BBR处理EC109细胞24 h, 细胞活力呈剂量依赖性下降, 与对照组相比, 分别下降到 $85.1\% \pm 4.1\%$, $58.0\% \pm 3.2\%$, $42.0\% \pm 3.4\%$, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图1)。

2.2 BBR对食管癌EC109细胞迁移能力的影响

50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的BBR处理EC109细胞24 h后, 与对照组相比, 细胞间距分别扩大到对照组的(1.54 ± 0.061), (1.87 ± 0.068)和(2.23 ± 0.076)倍, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图2)。

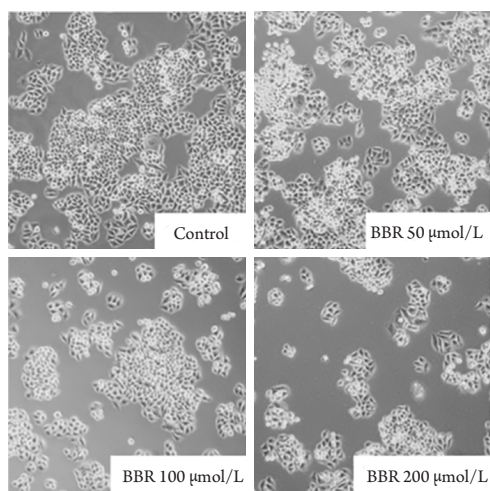


图1 BBR对EC109细胞活力的影响($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

Figure 1 Effects of BBR on EC109 cell vitality ($n=10$, $\bar{x} \pm s$)

与对照组比较, $*P < 0.05$; 与BBR 50 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $^{\&}P < 0.05$; 与100 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, $^{\#}P < 0.05$ 。

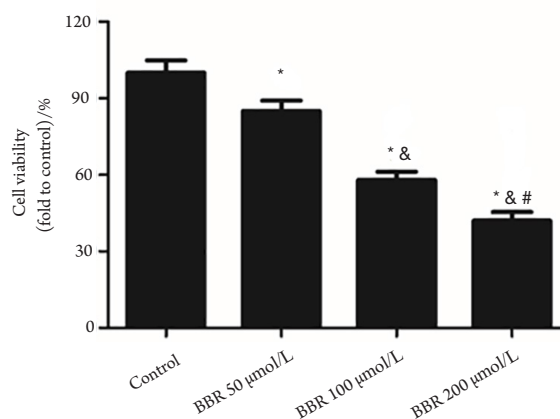
$*P < 0.05$ vs the Control group; $^{\&}P < 0.05$ vs the 50 $\mu\text{mol/L}$ BBR group; $^{\#}P < 0.05$ vs the 100 $\mu\text{mol/L}$ BBR group.

2.3 BBR对食管癌EC109细胞Akt/FOXO3及凋亡水平的影响

分别用50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的BBR处理EC109细胞24 h后, EC109细胞的Akt磷酸化水平下降, pAkt/总Akt分别下降到对照组的(0.61 ± 0.031), (0.42 ± 0.042)和(0.33 ± 0.035)倍, 差异有统计学意义($P < 0.05$, 图3)。既往研究^[14]发现: pAkt/总Akt下会降促使FOXO3向细胞核内转移并激活凋亡通路。本实验发现: 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的BBR处理后, 细胞质内的FOXO3分别下降到对照组的(0.61 ± 0.041), (0.26 ± 0.029)和(0.15 ± 0.025)倍。与之相对, 细胞核内的FOXO3含量升高, 升高到对照组的(1.51 ± 0.12), (2.06 ± 0.13)和(2.30 ± 0.15)倍。抗凋亡蛋白bcl-2表达水平分别下降到对照组的(0.75 ± 0.035), (0.61 ± 0.038)和(0.55 ± 0.034)倍。而凋亡蛋白Bax则升高到对照组的(1.52 ± 0.074), (1.72 ± 0.075)和(2.05 ± 0.076)倍($P < 0.05$, 图3)。

2.4 腹腔注射BBR对裸鼠在体肿瘤的影响

BBR处理没有明显改变裸鼠的体重, 但是剂量依赖地抑制了肿瘤生长($P < 0.05$), 第27天时, 对照组、10 mg/kg组、20 mg/kg组肿瘤体积分别为(920 ± 39), (570 ± 32), (430 ± 31) mm^3 (图4)。



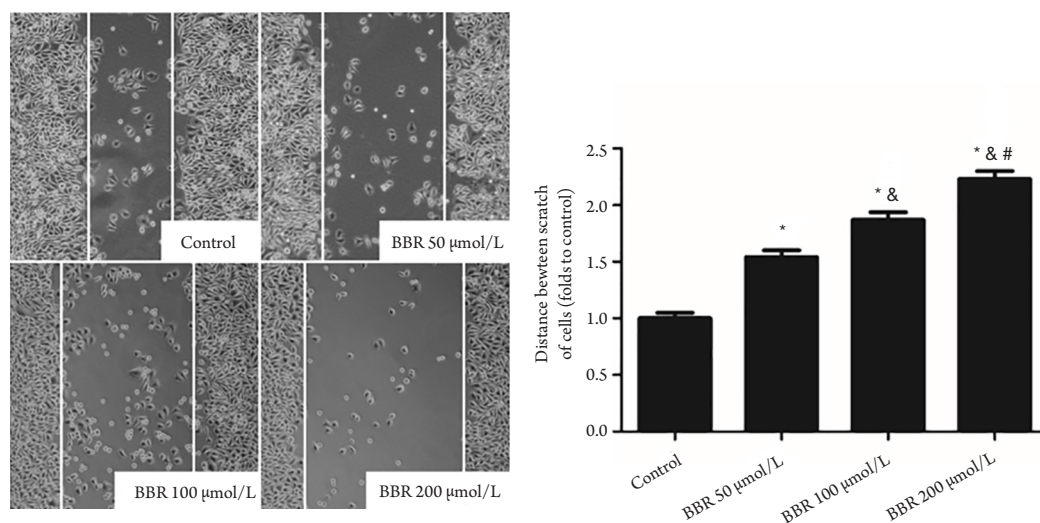


图2 BBR对EC109细胞迁移能力的影响($n=10, \bar{x} \pm s$)

Figure 2 Effects of BBR on cell migration ($n=10, \bar{x} \pm s$)

与对照组比较, * $P<0.05$; 与BBR 50 μmol/L组比较, & $P<0.05$; 与BBR 100 μmol/L组比较, # $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs the Control group; & $P<0.05$ vs the 50 μmol/L BBR group; # $P<0.05$ vs the 100 μmol/L BBR group.

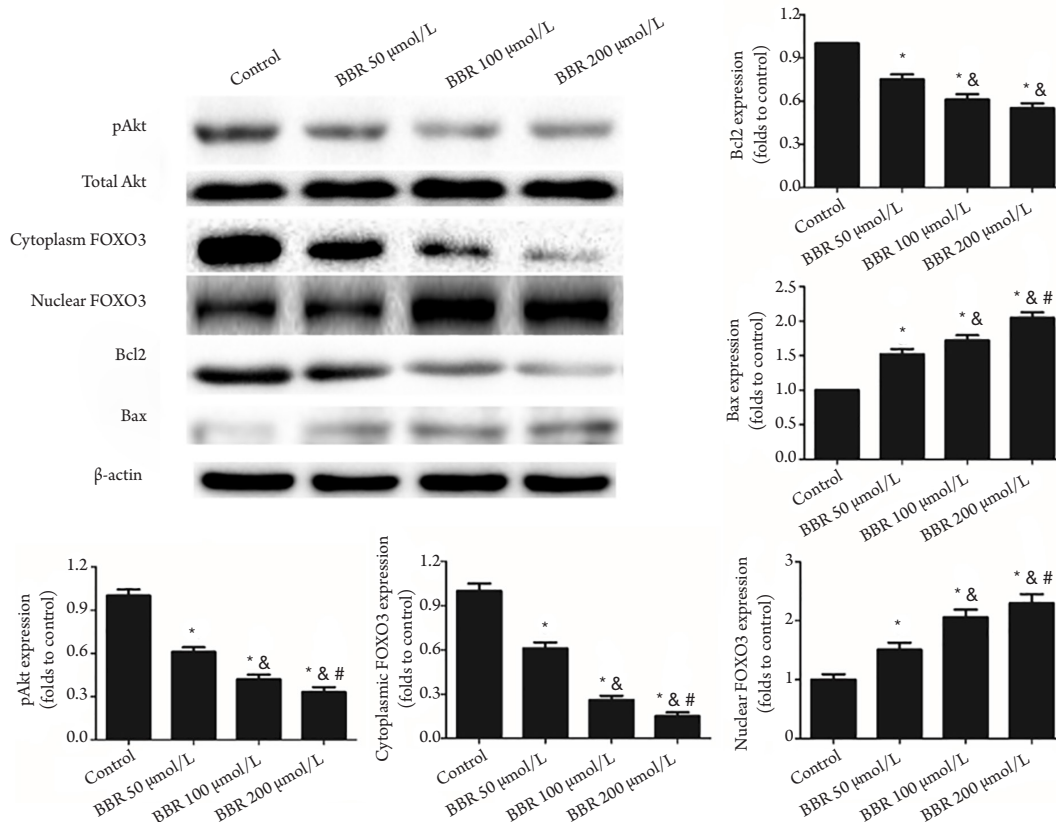


图3 BBR处理对Akt/FOXO3和凋亡信号通路的影响

Figure 3 Effects of BBR on Akt/FOXO3 and apoptosis pathway

与对照组比较, * $P<0.05$; 与BBR 50 μmol/L组比较, & $P<0.05$; 与BBR 100 μmol/L组比较, # $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs the Control group; & $P<0.05$ vs the 50 μmol/L BBR group; # $P<0.05$ vs the 100 μmol/L BBR group.

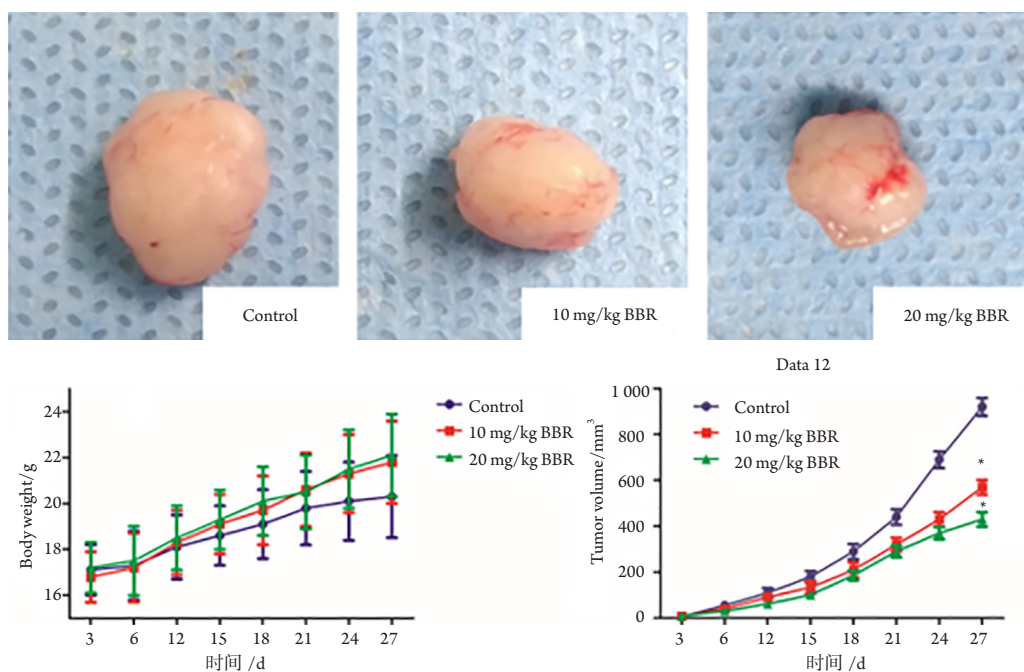


图4 BBR处理对裸鼠皮下EC109肿瘤生长的影响

Figure 4 Effects of BBR on EC109 xenografts in nude mice

与对照组相比, * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs the Control group.

3 讨论

传统中药材提取物因其良好的生物作用及低毒、廉价等特点, 目前已成为肿瘤领域的研究热点^[15]。既往研究^[16-17]发现BBR能诱导食管癌细胞凋亡、促进其放疗敏感性, 然而机制研究尚不全面, 有待进一步探究。FOXO3可以介导多种促凋亡因子转录且受Akt调控。Akt磷酸化后会促使FOXO3由细胞核向细胞质转移, 促进转录^[14]。而抑制Akt磷酸化, 可抑制FOXO3的核转移, 抑制其介导的凋亡分子转录^[18]。有研究^[19]发现: BBR通过调控Akt信号通路抑制黑色素瘤的生长。本研究首先用梯度浓度的BBR处理EC109细胞, 发现BBR显著抑制EC109细胞增殖。划痕实验显示: BBR处理显著降低EC109细胞的迁移能力。进一步检测发现BBR处理显著下调Akt的磷酸化水平。考虑到FOXO3在肿瘤中的关键调控作用及其与Akt的密切关联, 本研究检测FOXO3的细胞核转录情况, 提取BBR处理后的EC109细胞的细胞核与细胞质, 分别提取总蛋白并检测其FOXO3水平, 发现BBR处理后细胞质中的FOXO3显著减少, 而细胞核中的FOXO3显著增多, 提示FOXO3的转录作用增强。进一步检测抗凋亡蛋白Bcl2和凋亡蛋白Bax的表达, 发现BBR处理后Bcl2表达显著下调而Bax表达

显著上调。为进一步明确BBR的抗食管癌EC109作用, 本研究建立裸鼠皮下移植瘤模型并予腹腔注射BBR, 发现10和20 mg/kg的BBR显著抑制裸鼠皮下肿瘤的生长。

本研究证实BBR处理可以通过抑制Akt磷酸化, 促进FOXO3核转移进而诱导细胞凋亡, 最终发挥抗食管癌EC109细胞的作用。本研究证实BBR的抗食管癌作用, 探索其可能的具体机制, 丰富了BBR在食管癌治疗中的应用价值。为BBR抗癌作用的进一步研究提供参考及基于BBR的抗癌药物研发以及临床应用提供了理论支持。

参考文献

1. Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
2. Wei WQ, Chen ZF, He YT, et al. Long-term follow-up of a community assignment, one-time endoscopic screening study of esophageal cancer in China[J]. J Clin Oncol, 2015, 33(17): 1951-1957.
3. Holscher AH, Stahl M, Messmann H, et al. New s3 guideline for esophageal cancer: important surgical aspects[J]. Chirurg, 2016, 87(10): 865-872.
4. Senchina DS, Flinn GN, McCann DA, et al. Bloodroot (sanguinaria

- canadensis L, papaveraceae) enhances proliferation and cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells in an in vitro model[J]. *J Herbs Spices Med Plants*, 2009, 15(1): 45.
5. Gali-Muhtasib H, Hmadi R, Kareh M, et al. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: Beyond apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2015, 20(12): 1531-1562.
 6. Jabbarzadeh Kaboli P, Rahmat A, Ismail P, et al. Targets and mechanisms of berberine, a natural drug with potential to treat cancer with special focus on breast cancer[J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 584-595.
 7. Li CH, Wu DF, Ding H, et al. Berberine hydrochloride impact on physiological processes and modulation of twist levels in nasopharyngeal carcinoma cne-1 cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(4): 1851-1857.
 8. Su K, Hu P, Wang X, et al. Tumor suppressor berberine binds vasp to inhibit cell migration in basal-like breast cancer[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(29): 45849-45862.
 9. Chen J, Gomes AR, Monteiro LJ, et al. Constitutively nuclear foxo3a localization predicts poor survival and promotes akt phosphorylation in breast cancer[J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12293.
 10. Souid S, Najjaa H, Riahi-Chebbi I, et al. Allium roseum L. Extract exerts potent suppressive activities on chronic myeloid leukemia k562 cell viability through the inhibition of bcr-abl, pi3k/akt, and erk1/2 pathways and the abrogation of vegf secretion[J]. *Nutr Cancer*, 2017, 69(1): 117-130.
 11. Zhang C, Li C, Chen S, et al. Hormetic effect of panaxatriol saponins confers neuroprotection in pc12 cells and zebrafish through pi3k/akt/mtor and ampk/sirt1/foxo3 pathways[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41082.
 12. Das TP, Suman S, Alatassi H, et al. Inhibition of akt promotes foxo3a-dependent apoptosis in prostate cancer[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7: e2111.
 13. Chen ZZ. Berberine induced apoptosis of human osteosarcoma cells by inhibiting phosphoinositide 3 kinase/protein kinase b (pi3k/akt) signal pathway activation[J]. *Iran J Public Health*, 2016, 45(5): 578-585.
 14. Qazi AK, Hussain A, Khan S, et al. Quinazoline based small molecule exerts potent tumour suppressive properties by inhibiting pi3k/akt/foxo3a signalling in experimental colon cancer[J]. *Cancer Lett*, 2015, 359(1): 47-56.
 15. Zou K, Li Z, Zhang Y, et al. Advances in the study of berberine and its derivatives: a focus on anti-inflammatory and anti-tumor effects in the digestive system[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(2): 157-167.
 16. Jiang SX, Qi B, Yao WJ, et al. Berberine displays antitumor activity in esophageal cancer cells in vitro[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(14): 2511-2518.
 17. Yang X, Yang B, Cai J, et al. Berberine enhances radiosensitivity of esophageal squamous cancer by targeting hif-1alpha in vitro and in vivo[J]. *Cancer Biol Ther*, 2013, 14(11): 1068-1073.
 18. Rathbone CR, Booth FW, Lees SJ. Foxo3a preferentially induces p27kip1 expression while impairing muscle precursor cell-cycle progression[J]. *Muscle Nerve*, 2008, 37(1): 84-89.
 19. Kou Y, Li L, Li H, et al. Berberine suppressed epithelial mesenchymal transition through cross-talk regulation of pi3k/akt and raralpha/rarbata in melanoma cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 479(2): 290-296.

本文引用: 刘红岗, 赖远阳, 朱以芳, 同李平, 董小平, 许娟, 张勇, 郭海华, 李小飞, 闫小龙. 黄连素抗食管癌EC109细胞的作用及其机制[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(12): 2524-2529. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.002

Cite this article as: LIU Honggang, LAI Yuanyang, ZHU Yifang, TONG Liping, DONG Xiaoping, XU Juan, ZHANG Yong, GUO Haihua, LI Xiaofei, YAN Xiaolong. Inhibition of berberine on EC109 cells in esophageal cancer and its mechanism[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(12): 2524-2529. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.12.002