

罗格列酮对 HT29、HCT116 结肠癌细胞凋亡影响及机制探究

张 琪¹, 杨光华¹, 葛志鹏¹, 丁家杉², 黄志强¹, 郑 阳¹, 张国志¹, 王长友^{1*}

(1. 华北理工大学附属医院, 河北 唐山 063000; 2. 华北理工大学临床医学院, 河北 唐山 063000)

【摘要】 目的 探讨罗格列酮对结肠癌 HT29、HCT116 细胞增殖、凋亡情况的影响以及 AKT/GSK3 β 信号通路的变化。**方法** HT29、HCT116 结肠癌细胞经不同浓度罗格列酮(20.0 $\mu\text{mol/L}$, 40.0 $\mu\text{mol/L}$, 80.0 $\mu\text{mol/L}$) 处理后, 采用 MTT 法检测细胞增殖能力的变化, annexin-V FITC/PI 试剂盒检测细胞凋亡情况, Western blot 检测 Bcl2、Bax 以及 Akt、GSK3 β 表达情况。**结果** 与空白对照组相比, 不同浓度的罗格列酮对 HT29、HCT116 结肠癌细胞的增殖均有影响($P < 0.01$), 并且影响呈剂量依赖关系; 不同浓度的罗格列酮对 HT29、HCT116 细胞均有诱导凋亡的作用($P < 0.01$), 且诱导 HT29、HCT116 细胞凋亡呈剂量依赖性; 罗格列酮处理细胞 48 h 后, 与空白对照组相比 Bcl2/Bax 表达水平、P-GSK3 β 、P-Akt 表达水平明显下降($P < 0.01$), Akt、GSK3 β 表达水平较空白对照组差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** 罗格列酮可能通过抑制 Akt/GSK3 β 通路的激活, 改变 Bcl2/Bax 情况, 发挥抑制细胞增殖、诱导凋亡的作用。

【关键词】 罗格列酮; 结肠癌; 凋亡; Bcl2; Bax; Akt; GSK3 β

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 12-0056-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.12.010

Rosiglitazone promotes apoptosis in colon cancer HT29 and HCT116 cells through AKT/GSK3 β signalling pathway

ZHANG Qi¹, YANG Guang-hua¹, GE Zhi-peng¹, DING Jia-shan², HUANG Zhi-qiang¹, ZHEN Yang¹,
ZHANG Guo-zhi¹, WANG Chang-you^{1*}

(1. Affiliated Hospital of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000, China; 2. Clinical Medical School of North China University of Science and Technology, Tangshan 063000)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of rosiglitazone on the proliferation and apoptosis of colon cancer cells and the changes in the AKT/GSK3 β signaling pathway. **Methods** Different concentrations of rosiglitazone (20.0 $\mu\text{mol/L}$, 40.0 $\mu\text{mol/L}$, 80.0 $\mu\text{mol/L}$) were used to treat colon cancer HT29 cells and HCT116 cells. Cell proliferation was detected by MTT assay. Annexin V FITC/PI cell death detection kit was used to test the cell apoptosis rate. The expression of apoptotic protein Bcl-2, Bax and Akt, GSK3 β were detected by Western blot. **Results** Different concentrations of rosiglitazone had different effect on the proliferation of colon cancer cells compared with the blank control group, and showed a dose dependence ($P < 0.01$). With the increase of rosiglitazone dose, the apoptosis-inducing effect

【基金项目】 2017 年政府资助省级临床医学优秀人才项目; 中国煤炭工业协会 2017 年度科学技术研究指导性计划项目 (MTKJ2017 - 331)。

【作者简介】 张琪(1992 -), 男, 硕士研究生, 研究方向: 胃肠道肿瘤。E-mail: izhangqi1004@163.com

【通讯作者】 王长友(1971 -), 男, 教授, 硕士生, 研究方向: 胃肠道肿瘤。E-mail: fhbj-2004@163.com

was increased dose-dependently ($P < 0.01$). When the cells were treated with rosiglitazone for 48 h, the expressions of Bcl-2/Bax, p-GSK3 β , and p-Akt were significantly decreased compared with the blank control group ($P < 0.01$), but the expression level of Akt and GSK3 β was not significantly different compared with the blank control group ($P > 0.05$).

Conclusions Rosiglitazone significantly induces apoptosis and inhibits the proliferation of HT29 cells. It may be via inhibiting Akt/GSK3 β signaling pathway and change the ratio of Bcl-2/Bax.

【Key words】 Rosiglitazone; Colon cancer; Apoptosis; Bcl-2; Bax; Akt; GSK3 β

由于人口结构和饮食习惯的改变,结肠癌在我国发病率呈逐年上升趋势^[1]。在世界范围内,结肠癌的发病率分别位列女性和男性肿瘤的第二位和第三位^[2],因此对于结肠癌的防治研究尤为重要。噻唑烷二酮类药物罗格列酮 (rosiglitazone, ROZ) 是一种 PPAR γ 特异性配体。作为胰岛素增敏剂,本身具备较少、较轻的药物毒副作用,同时已有许多研究证实在肝癌、乳腺癌、结肠癌等多种肿瘤细胞的生物学行为有明显的抑制作用,但是对于结肠癌细胞的抑制作用研究甚少,具体发挥作用的信号通路尚不可知^[3]。因此,我们进行体外研究,采用 HT29、HCT116 人结肠癌细胞系,予以不同浓度的罗格列酮,探讨结肠癌细胞的凋亡情况以及 AKT/GSK3 β 信号通路的变化。

1 材料和方法

1.1 细胞系及试剂仪器

人结肠癌细胞株 HT29、HCT116,购买于中国科学院干细胞库;DMEM 培养基 (Gibco 公司);四季青胎牛血清 (浙江天杭生物公司);抗体 Bcl-2、Bax、P-Akt、Akt、P-GSK3 β 、GSK3 β 、annexin-V FITC/PI 染料试剂盒 (Sigma 公司);HR 标记山羊抗兔 IgG 二抗、 β -actin 抗体、MTT 试剂盒、DAB 显影液 (上海碧云天生物技术研究);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RIPA 裂解液、PMSF、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司);酶标仪、湿转系统 (上海 Bio-Rad 公司);流式细胞仪 (FACS Calibur, BD 公司);罗格列酮 (上海三维制药有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

HT29、HCT116、细胞用含 10% FBS 的 DMEM 培养基,37.0℃,5% CO₂ 条件下培养,每 2 d 传代 1 次。

1.2.2 细胞增殖能力检测

采用 MTT 法,取对数生长期的细胞,制备成单细胞悬液,按 5×10^3 /孔接种于 3 个 96 孔板中,细胞贴壁后以不含 FBS 的培养基培养 12 h 同步化细胞。

弃去培养基,配置 ROZ 终浓度为 20.0 μ mol/L、40.0 μ mol/L、80.0 μ mol/L 的含 10% FBS 的完全培养基处理各组细胞,空白对照组为不含 ROZ 的完全培养基。每组设 9 个复孔,培养 24 h、48 h。各孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 10 μ L,继续培养箱中反应 4 h,弃培养基,每孔加入 DMSO 100 μ L,置于培养箱中反应 15 min。用酶标仪在波长 570 nm 处测定各孔吸光度值 (OD 值)。因 OD 值与孔内存活细胞数呈正比,故用 OD 值表示细胞增殖能力。

1.2.3 Annexin-V/PI 染色检测罗格列酮对细胞凋亡影响

取对数生长期细胞,制备成单细胞悬液,接种于 6 孔板中,同步化细胞。按空白对照组,以及不同浓度的 ROZ 分组,每孔加入 2 mL 培养基。37℃,5% CO₂ 条件下培养 48 h,胰酶消化,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,PBS 重悬细胞,1000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 185 μ L annexin V-FITC 结合液重悬细胞后,加入 5 μ L annexin V-FITC、10 μ L PI 染色液混匀。室温避光孵育 10 min,1 h 内上机进行流式细胞仪检测分析,以早期凋亡和晚期凋亡细胞的含量合计为凋亡细胞,3 次独立的重复实验获得以下数据。

1.2.4 Western blot 检测相关蛋白表达

两株细胞经浓度为 40.0 μ mol/L ROZ 处理 48 h 后,RIPA 裂解液充分裂解细胞,离心收集蛋白。BCA 法定量总蛋白,加入等体积 $2 \times$ 蛋白上样缓冲液后 100℃变性 5 min, -80℃保存备用。进行 SDS-PAGE 蛋白电泳,再分别进行转膜 (90 V, 90 min),10% 脱脂奶封闭,一抗孵育过夜 (1:1000),二抗 (1:100) 37℃ 孵育 2 h,荧光显色。Image J 软件分析灰度值。相关蛋白表达量计算 = (所测蛋白灰度值/内参灰度值) $\times$ 100%。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件,实验数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,资料数据采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 不同浓度 ROZ 对结肠癌细胞增殖的影响

MTT 结果显示,培养 24 h、48 h、72 h 后不同浓度的 ROZ 对两株结肠癌细胞的增殖均有影响,并且影响呈剂量依赖关系。ROZ 浓度越高,对细胞增殖影响越大,20.0 μmol/L、40.0 μmol/L、80.0 μmol/L 组与空白对照组相比差异有显著性 ($P < 0.01$)。(见表 1)

表 1 各组不同时间 OD 值检测
Tab. 1 OD values of different cells at different time points

组别 Groups	HT29			HCT116		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
对照组 Control group	0.299 ± 0.047	0.558 ± 0.057	1.107 ± 0.059	0.305 ± 0.046	0.539 ± 0.048	1.121 ± 0.063
ROZ 20.0 μmol/L	0.235 ± 0.035 *	0.439 ± 0.059 *	0.801 ± 0.051 *	0.224 ± 0.038 *	0.451 ± 0.057 *	0.807 ± 0.055 *
ROZ 40.0 μmol/L	0.199 ± 0.032 *	0.387 ± 0.050 *	0.560 ± 0.066 *	0.190 ± 0.026 *	0.387 ± 0.053 *	0.582 ± 0.072 *
ROZ 80.0 μmol/L	0.175 ± 0.035 *	0.257 ± 0.061 *	0.324 ± 0.046 *	0.171 ± 0.036 *	0.256 ± 0.061 *	0.306 ± 0.066 *

注:与空白对照组比, * $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.01$.

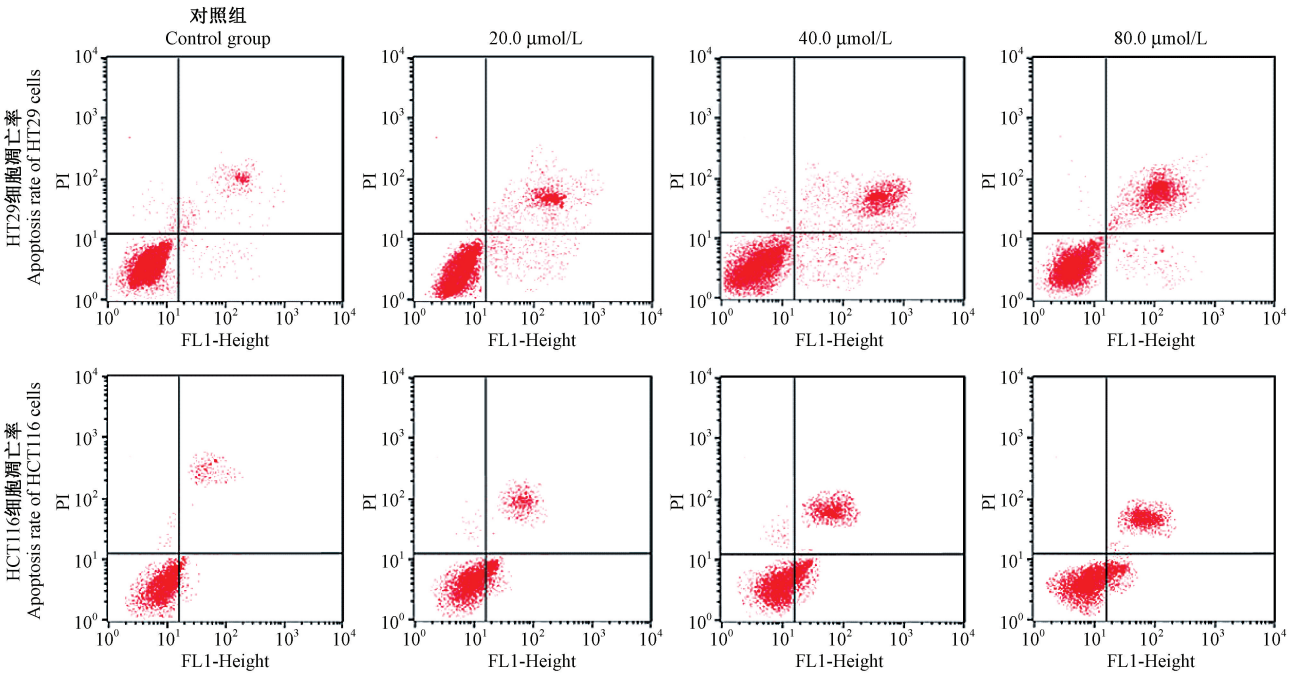


图 1 罗格列酮对 HT29、HCT116 细胞凋亡率的影响

Fig. 1 Effect of ROZ on the apoptosis rate of HT29 and HCT116 cells

表 2 罗格列酮对 HT29、HCT116 细胞凋亡率的影响

Tab. 2 Effect of ROZ on the apoptosis rate of HT29 and HCT116 cells

组别 Groups	凋亡率/% Apoptosis rate	
	HT29	HCT116
对照组 Control group	2.57 ± 0.36	3.50 ± 0.36
ROZ 20.0 μmol/L	4.87 ± 0.38 ▲	5.96 ± 0.52 ▲
ROZ 40.0 μmol/L	7.37 ± 1.12 ▲	9.54 ± 1.05 ▲
ROZ 80.0 μmol/L	13.56 ± 1.01 ▲	15.93 ± 0.55 ▲

2.2 不同浓度 ROZ 对 HT29、HCT116 结肠癌细胞凋亡促进作用

通过 annexin-V/ PI 染色检测细胞凋亡,结果显示,浓度为 20.0 μmol/L、40.0 μmol/L、80.0 μmol/L 的 ROZ 对 HT29、HCT116 细胞均有诱导凋亡的作用,各组凋亡率均高于空白对照组,差异有显著性 ($P < 0.01$)。且 ROZ 诱导 HT29、HCT116 细胞凋亡呈剂量依赖性,两两比较 LSD 检验组间差异有显著性 ($P < 0.01$)。(见图 1,表 2)

注:与空白对照组比, ▲ $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, ▲ $P < 0.01$.

2.3 ROZ 诱导 HT29、HCT116 结肠癌凋亡相关蛋白的检测

Western blot 进行相关凋亡蛋白表达量的检测,结果显示(图 3),与空白对照组相比,抗凋亡蛋白 Bcl2 表达水平降低,促凋亡蛋白 Bax 表达水平上

升,差异有显著性($P < 0.01$)。这表示,ROZ 诱导 HT29、HCT116 结肠癌细胞凋亡可能与 Bcl-2/Bax 表达水平下降有关系。(见图 2)

2.4 ROZ 对 HT29、HCT116 细胞 Akt/GSK3β 蛋白信号通路蛋白的调控

细胞经浓度为 40.0 μm/L 的 ROZ 处理 48 h 后,消化收集细胞提取蛋白。在验证了细胞发生凋亡了之后,我们验证了 Akt 及其下游 GSK3β 的表达

情况。结果显示,各组总 Akt、GSK3β 的表达含量不变,与对照组相比差异无显著性($P > 0.05$),但各组 p-Akt 和 p-GSK3β 的表达含量下降明显,与对照组相比差异有显著性($P < 0.01$)。p-Akt 减少可以使 GSK3β 磷酸化下降,导致 GSK3β 失活减少,从而促进凋亡。这表明在 ROZ 诱导细胞凋亡的过程中,Akt/GSK3β 信号通路可能起到了重要的作用。(见图 3)

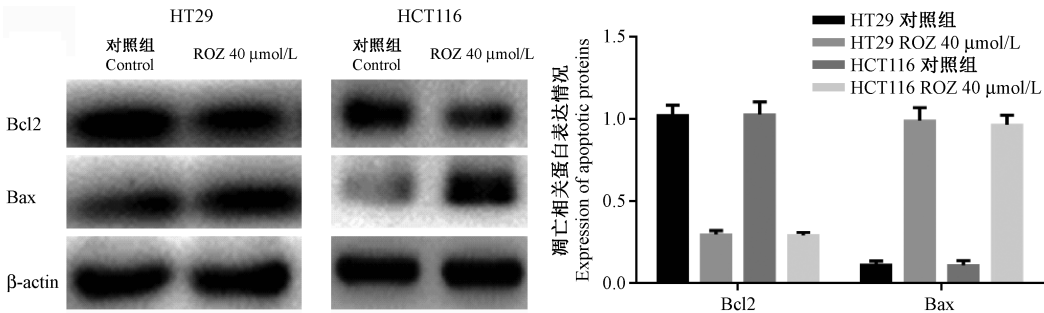


图 2 ROZ 对 HT29、HCT116 细胞凋亡蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of ROZ on apoptosis protein expression in HT29 cells and HCT116 cells detected by Western blot

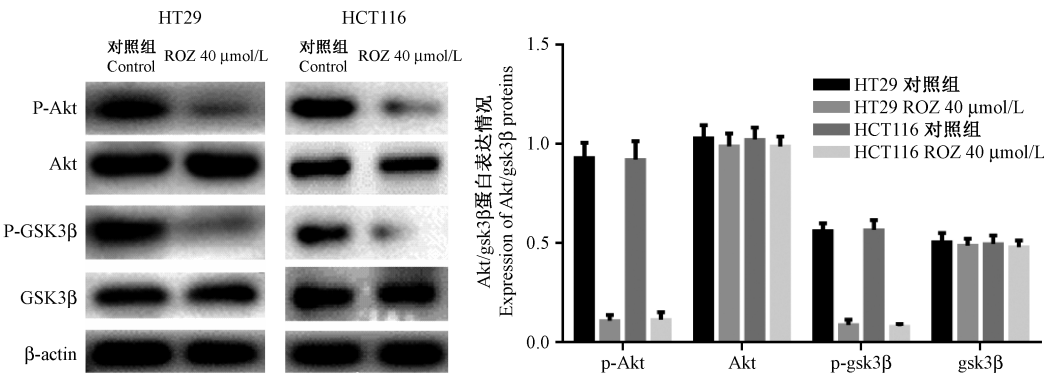


图 3 ROZ 对 HT29、HCT116 细胞 AKT/GSK3β 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of ROZ on protein expressions of AKT/GSK3β of HT29 cells and HCT116 cells detected by Western blot

3 讨论

结肠癌发病原因及机制尚不清楚,目前研究认为,结肠癌的发生是由环境、饮食、生活习惯以及遗传因素等共同作用的结果^[4, 5]。目前对于结肠癌的治疗依然是以手术治疗为主并结合放化疗,但治疗效果并不理想,面对着复发转移、抗药性同时以及辅助治疗时严重的副作用等问题^[6, 7]。

既往大量研究发现 PPARγ 在肿瘤组织中表达均有不同程度的上调,PPARγ 配体可以抑制肿瘤细胞生长从而达到肿瘤的化学预防和治疗的作用^[8-11]。Chen 等^[12]研究证明 PPARγ 配体抑制 HT29 细胞生长和诱导其凋亡是通过下调 bcl-2 的表

达来实现的。许多研究证实 Bcl-2 家族不仅调节细胞凋亡而且能改变化疗药物对肿瘤的敏感性^[13, 14]。诱导细胞凋亡是目前大多数抗癌药物的主要作用位点,这也成为评价抗癌药物能力的指标^[15]。本次实验通过 MTT,流式细胞仪检测细胞凋亡,Western blot 检测相关凋亡蛋白表达证实了 ROZ 可以通过凋亡途径抑制 HT29 和 HCT116 细胞,并且呈剂量依赖性。Western blot 结果显示抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调,促凋亡蛋白 Bax 表达上调,我们推测 ROZ 促进 HT29、HCT116 细胞凋亡可能是通过 Bcl-2/Bax 表达水平下降来实现的。

Akt/GSK3β 信号通路是一个重要的抗凋亡、促增殖的信号通路,在多种人类肿瘤中都可检测到该

信号通路的异常^[16-18], GSK3 β 的磷酸化可以抑制 Bax 线粒体转位和 Bcl-2 的降解,从而抑制凋亡,故干扰 Akt/GSK3 β 的表达可诱导肿瘤细胞凋亡的发生^[19-21]。因此本实验探究了 ROZ 对 Akt/GSK3 β 信号通路的影响。

本次实验结果显示 ROZ 处理 HT29、HCT116 细胞 48 h 后, GSK3 β 、Akt 的活化产物 P-GSK3 β 、P-Akt 表达水平明显降低,因此推测 ROZ 可能通过抑制 Akt/GSK3 β 通路的激活,破坏 Bcl-2/Bax 比例,发挥抑制细胞增殖、诱导凋亡的作用。但 Akt/GSK3 β 可能不是 ROZ 诱导 HT29、HCT116 细胞凋亡的唯一通路,其对凋亡的影响及其中具体的作用机制需后续实验进一步深入研究。

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] Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012 [J]. Int J Cancer, 2015, 136(5): E359-E386.
- [3] Goel H, Tikoo K, Arun Karpe P, et al. Ameliorated chemotherapeutic potential of diverse dose flouropyrimidine therapy by etodolac via NF-KB pathway, PPAR- γ expression and COX-II inhibition in DMH induced colon cancer rats [J]. Clin Cancer Drugs, 2016, 3(2): 109-120.
- [4] Vargas AJ, Thompson PA. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk [J]. Nutr Clin Pract, 2012, 27(5): 613-623.
- [5] 张海燕, 孙勇, 夏惠, 等. 脱氧紫色杆菌素抑制结肠癌 TH29 细胞增殖及诱导凋亡作用与机制[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(05): 89-93.
- [6] Laszlo L. Predictive and prognostic factors in the complex treatment of patients with colorectal cancer [J]. Magy Onkol, 2010, 54(4): 383-394.
- [7] Zhang Q, Sha S, Xu B, et al. Prevalence of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: A retrospective, monocenter study in China [J]. J Cancer Res Ther, 2015, 11(4): 899-903.
- [8] Galli A, Ceni E, Mello T, et al. Thiazolidinediones inhibit hepatocarcinogenesis in hepatitis B virus-transgenic mice by peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent regulation of nucleophosmin [J]. Hepatology, 2010, 52(2): 493-505.
- [9] Rageul J, Mottier S, Jarry A, et al. KLF4-dependent, PPAR γ -induced expression of GPA33 in colon cancer cell lines [J]. Int J Cancer, 2009, 125(12): 2802-2809.
- [10] Toaldo C, Pizzimenti S, Cerbone A, et al. PPAR γ ligands inhibit telomerase activity and hTERT expression through modulation of the Myc/Mad/Max network in colon cancer cells [J]. J Cell Mol Med, 2010, 14(6A): 1347-1357.
- [11] Tencer L, Burgermeister E, Ebert MP, et al. Rosiglitazone induces caveolin-1 by PPAR γ -dependent and PPRE-independent mechanisms: the role of EGF receptor signaling and its effect on cancer cell drug resistance [J]. Anticancer Res, 2008, 28(2A): 895-906.
- [12] Chen GG, Lee JF, Wang SH, et al. Apoptosis induced by activation of peroxisome-proliferator activated receptor-gamma is associated with Bcl-2 and NF- κ B in human colon cancer [J]. Life Sci, 2002, 70(22): 2631-2646.
- [13] Wang J, Liu X, Jiang W. Co-transfection of MRP and bcl-2 antisense S-oligodeoxynucleotides reduces drug resistance in cisplatin-resistant lung cancer cells [J]. Chin Med J (Engl), 2000, 113(10): 957-960.
- [14] Haddad JJ. On the antioxidant mechanisms of Bcl-2: a retrospective of NF-kappaB signaling and oxidative stress [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 322(2): 355-363.
- [15] Safarzadeh E, Sandoghchian SS, Baradaran B. Herbal medicine as inducers of apoptosis in cancer treatment [J]. Adv Pharm Bull, 2014, 4(Suppl 1): 421-427.
- [16] Chiara F, Rasola A. GSK-3 and mitochondria in cancer cells [J]. Front Oncol, 2013, 3: 16.
- [17] Ban KC, Singh H, Krishnan R, et al. GSK-3beta phosphorylation and alteration of beta-catenin in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Lett, 2003, 199(2): 201-208.
- [18] Shakoori A, Ougolkov A, Yu ZW, et al. Deregulated GSK3beta activity in colorectal cancer: its association with tumor cell survival and proliferation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 334(4): 1365-1373.
- [19] Dan S, Yoshimi H, Okamura M, et al. Inhibition of PI3K by ZSTK474 suppressed tumor growth not via apoptosis but G0/G1 arrest [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379(1): 104-109.
- [20] Sokolosky M, Chappell WH, Stadelman K, et al. Inhibition of GSK-3beta activity can result in drug and hormonal resistance and alter sensitivity to targeted therapy in MCF-7 breast cancer cells [J]. Cell Cycle, 2014, 13(5): 820-833.
- [21] Dinamarca MC, Sagal JP, Quintanilla RA, et al. Amyloid-beta-Acetylcholinesterase complexes potentiate neurodegenerative changes induced by the A β peptide. Implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Mol Neurodegener, 2010, 5: 4.

[收稿日期]2017-06-10