

阿司匹林对人结肠癌HT-29细胞肠分化标志物表达的影响

朱 蓉, 李伶俐, 李仕宇, 陈小燕, 赵 逵

遵义医学院附属医院消化内科, 贵州 遵义 563000

[摘要] **背景与目的:** 非甾体抗炎药阿司匹林临床防治结肠癌确切有效, 近年来有研究认为其防治结肠癌最终通过对结肠癌干细胞调控而实现。当结肠癌干细胞分化成熟时, 结肠癌将不再进展、甚至消退。本研究旨在探讨非甾体抗炎药阿司匹林对人结肠癌HT-29细胞株分化的影响。**方法:** 采用活细胞计数试剂盒CCK-8检测不同浓度阿司匹林抑制HT-29细胞增殖的作用, 得出 IC_{50} ; 采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)检测阿司匹林 IC_{50} 干预24、48和72 h, 肠分化标志物黏蛋白2(mucin 2, MUC2)、三叶因子3(trefoil factor 3, TFF3)、蔗糖酶-异麦芽糖酶(sucrose-isomaltase)和溶菌酶(lysozyme)的mRNA表达情况; 采用免疫细胞化学法检测MUC2蛋白在细胞中的表达情况; 采用蛋白[质]印迹法(Western blot)检测sucrase-isomaltase及lysozyme的蛋白表达情况。**结果:** 阿司匹林能明显抑制HT-29细胞的增殖, 且呈时间和剂量依赖性; RTFQ-PCR和Western blot结果显示, 阿司匹林干预HT-29细胞48、72 h, 与对照组比较, 肠杯状细胞标志物MUC2、TFF3的mRNA表达均上调($P<0.05$), 肠吸收细胞标志物sucrase-isomaltase和潘氏细胞标志物lysozyme的mRNA及蛋白表达均下调($P<0.05$); 免疫细胞化学实验结果显示, 阿司匹林干预48 h, MUC2蛋白表达较对照组上调, 差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论:** 非甾体抗炎药阿司匹林能影响人结肠癌HT-29细胞肠分化标志物的表达, 且可能导致其向杯状细胞表型分化。

[关键词] 阿司匹林; 结肠癌; 黏蛋白2; 三叶因子3; 蔗糖酶-异麦芽糖酶; 溶菌酶

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2017.11.005

中图分类号: R735.3+5 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2017)11-0867-06

Effects of aspirin on the expressions of intestinal differentiation markers in human colon cancer HT-29 cells ZHU Rong, LI Lingli, LI Shiyu, CHEN Xiaoyan, ZHAO Kui (Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, Guizhou Province, China)

Correspondence to: ZHAO Kui E-mail: Kuizhao95868@MSN.com

[Abstract] **Background and purpose:** Aspirin (one of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs) is effective in the prevention and treatment of colon cancer. And recently, it has been indicated that regulating colon cancer stem cells might be the underlying mechanism. When colon cancer stem cells become mature, colon cancer will not progress, and even subside. Therefore, this study aimed to explore the effects of aspirin on differentiation in human colon cancer cell line HT-29. **Methods:** The inhibitory effects of different concentrations of aspirin on HT-29 cells were detected by living cell counting kit CCK-8, and the IC_{50} was calculated. Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (RTFQ-PCR) was used to detect the mRNA expressions of intestinal differentiation markers [mucin 2 (MUC2), trefoil factor 3 (TFF3) lysozyme and sucrase-isomaltase] after aspirin IC_{50} intervention for 24, 48 and 72 h. Immunocytochemistry was used to detect the MUC2 protein expression. And Western blot was used to detect the protein expressions of lysozyme and sucrase-isomaltase. **Results:** Aspirin inhibited the proliferation of HT-29 cells significantly in a time- and dose-dependent manner. RTFQ-PCR and Western blot showed that the mRNA expressions of goblet cell markers (MUC2 and TFF3) were increased ($P<0.05$), and the mRNA and protein expressions of Paneth cell marker (lysozyme) and absorptive cell marker (sucrase-isomaltase) were decreased ($P<0.05$), compared with the control group, after aspirin intervention for 48 and 72 h. Immunocytochemistry showed that the MUC2 protein

expression was increased ($P < 0.05$) compared with the control group after aspirin intervention for 48 h. **Conclusion:** Nonsteroidal anti-inflammatory drug aspirin can affect the expressions of intestinal differentiation markers in human colon cancer HT-29 cells, and may lead to their differentiation into the phenotype of goblet cell.

[Key words] Aspirin; Colon cancer; Mucin 2; Trefoil factor 3; Sucrase-isomaltase; Lysozyme

结肠癌是常见的肠道恶性肿瘤,其发生机制复杂,多数是由正常结肠黏膜上皮异常增生至腺瘤,最终至癌变这一逐步递进的“经典”过程所致,在此过程中发生了一系列的基因改变。近年来,大量学者认为肿瘤干细胞才是结肠癌的“根源”细胞,对结肠癌的发生、转移和复发耐药过程起决定性作用。当结肠癌干细胞不再自我复制和更新,而发生分化成熟时,结肠癌将走向消退;相反,若出现异常分化、过度增殖,将促进癌的发生、发展。Bao等^[1]研究发现,杯状细胞分化标志物黏蛋白2(mucin 2, MUC2)的基因敲除小鼠会发生结肠癌。鲁明良等^[2]研究也表明,黏蛋白1(mucin1, MUC1)的表达上调或MUC2的表达下调可能参与了直肠癌的发生、发展、浸润及转移。阿司匹林作为临床上常用的非甾体抗炎药,研究表明,长期应用能降低患结肠癌的风险,预防结肠癌的发生^[3-4]。但具体作用机制不完全清楚,主要与抑制肠道炎性反应相关,而关于阿司匹林对肿瘤细胞分化方面的研究鲜有报道^[5]。本研究以肠分化标志物MUC2、三叶因子3(trefoil factor 3, TFF3)、蔗糖酶-异麦芽糖酶(sucrose-isomaltase)和溶菌酶(lysozyme)作为研究目标分子,观察阿司匹林干预对以上肠分化标志物表达的影响,旨在探讨阿司匹林对结肠癌细胞分化的影响。

1 材料和方法

1.1 细胞株及主要试剂

人结肠癌HT-29细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库,阿司匹林购自美国Sigma公司,CCK-8试剂盒、实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction, RTFQ-PCR)扩增试剂盒和BCA

蛋白浓度测定试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司,MUC2、TFF3、lysozyme、sucrase-isomaltase和 β -actin引物由宝生物工程(大连)有限公司合成,MUC2、TFF3和lysozyme单克隆一抗购自美国Abcam公司,sucrase-isomaltase单克隆一抗购自美国Santa Cruz公司,免疫组织化学试剂盒购自基因科技(上海)股份有限公司。

1.2 细胞培养

结肠癌HT-29细胞常规培养在10%胎牛血清的RPMI-1640完全培养液中,在37℃、CO₂体积分数为5%的温箱中恒温培养,细胞处于对数生长期时用于实验。

1.3 活细胞计数试剂盒CCK-8检测药物对细胞增殖的改变

HT-29细胞常规消化吹散后调整细胞数目 1×10^4 个/孔,接种于96孔板内,空白组不含细胞,培养24 h后进行分组加药,加入阿司匹林终浓度分别为0(对照组)、1.5、2.5、5.0、10.0和15.0 mmol/L,每个浓度5个复孔,再培养24、48和72 h后,每孔加入10 μ L的CCK-8溶液,温育4 h,予酶标仪测定450 nm波长处的吸光度(D)值,实验重复3次,取平均值。细胞的增殖抑制率=(1-实验组 D 值/对照组 D 值) $\times 100\%$;计算阿司匹林干预48 h的IC₅₀进行进一步的实验。

1.4 RTFQ-PCR检测阿司匹林对HT-29细胞4种肠分化标志物mRNA表达的改变

细胞计数调整密度 2×10^5 /mL在培养瓶中接种培养。实验分为对照组及阿司匹林组,培养24、48和72 h后,按TRIzol使用说明书提取总RNA,于紫外分光光度仪测定总RNA的纯度和浓度;按照反转录试剂盒说明书进行cDNA的合成,反转录反应体系为20 μ L;从GenBank查出相关基因,引物由宝生物工程(大连)有限公司合成(表1);以cDNA为模板,按扩增试剂盒说明书进行目的基因扩增,扩增体系20 μ L,反应条件:95℃ 5 min,95℃ 15 s,

60 ℃ 30 s, 65 ℃ 10 s, 共36个循环; 采用相对定量法($2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法)计算mRNA的相对表达量。实验重复至少3次。

1.5 免疫细胞化学法检测药物对HT-29细胞分化标志物MUC2蛋白表达的改变

取对数生长期的HT-29细胞常规消化后爬

片培养; 实验设对照组及阿司匹林组, 培养48 h后, 取出固定, 按照S-P法进行免疫细胞化学染色, 加入兔抗人MUC2单克隆抗体(1:100), 封片后采用显微镜观察, 分析测算结果。实验重复3次。

表1 RTFQ-PCR引物对

Tab. 1 Primer pairs used in RTFQ-PCR

Gene	Primer pairs (5'-3')	Length/bp
MUC2	F: GGGGAGTGCTGTAAGAAGTGTGA	165
	R: GTTGGAGACGGACGAGATGAG	
TFF3	F: AGCCAAGGACAGGGTGGACT	110
	R: GCTTGAAACACCAAGGCACTC	
Sucrase-isomaltase	F: GCACTGTTATCCGACCCCTTT	164
	R: GTAGTCAAACCACCGAGCATTG	
Lysozyme	F: GGGCTTGTCTCTCTTTCTGTTAC	122
	R: CACATCCAGTTTGCTAGGCTGA	

1.6 蛋白[质]印迹法(Western blot)检测药物对HT-29细胞分化标志物sucrase-isomaltase和lysozyme蛋白表达的改变

取对数生长期的HT-29细胞, 培养及分组同RTFQ-PCR实验, 收集细胞标本, 提取总蛋白, 按照BCA法进行蛋白定量, 随后进行配胶, 上样, 电泳, 制作“三明治”结构, 转膜, 封闭, 加一抗, 洗涤, 加二抗, 洗涤, 发光, 最后以全自动凝胶成像分析系统扫描、分析结果。实验重复至少3次。

1.7 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件进行分析, 数据均为计量资料, 使用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 阿司匹林抑制人结肠癌HT-29细胞株增殖

CCK-8检测结果显示, 阿司匹林抑制HT-29细胞增殖, 且呈量效性和时效性(图1); 经计算得出阿司匹林干预48 h的 IC_{50} 为4.865 mmol/L。

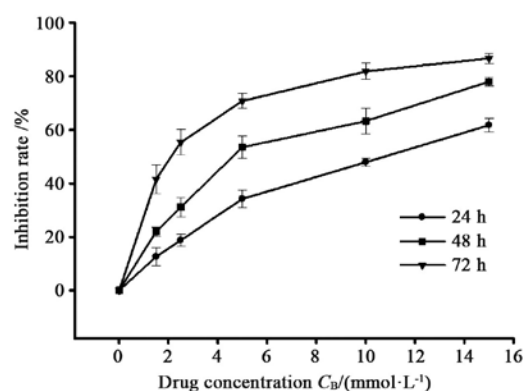


图1 阿司匹林抑制人结肠癌HT-29细胞株增殖($\bar{x}\pm s$)

Fig. 1 Aspirin inhibits proliferation of human colon cancer cell line HT-29 ($\bar{x}\pm s$)

2.2 阿司匹林对结肠癌HT-29细胞株肠分化标志物mRNA表达的影响

RTFQ-PCR结果显示, 阿司匹林 IC_{50} 作用于HT-29细胞24、48和72 h, 与对照组比较, 肠杯状细胞分化标志物MUC2和TFF3的mRNA相对表达量出现不同程度的上调, 作用48、72 h时差异有统计学意义(MUC2: $P=0.004$, $P=0.000$; TFF3: $P=0.046$, $P=0.000$); 肠潘氏细胞分化标志物lysozyme的mRNA相对表达量逐渐下调, 与

对照组比较, 作用24、48和72 h时差异均有统计学意义($P=0.036$ 、 0.001 和 0.000); 肠吸收细胞分化标志物sucrase-isomaltase的mRNA相对表达量较对照组也逐渐下调, 作用48、72 h时差异有统计学意义($P=0.007$ 、 0.000 , 图2)。

2.3 阿司匹林上调HT-29细胞分化标志物MUC2蛋白的表达

免疫细胞化学结果显示, 阿司匹林干预48 h, 肠杯状细胞标志物MUC2蛋白表达明显增多, 与对照组比较差异有统计学意义($P=0.001$, 图3)。

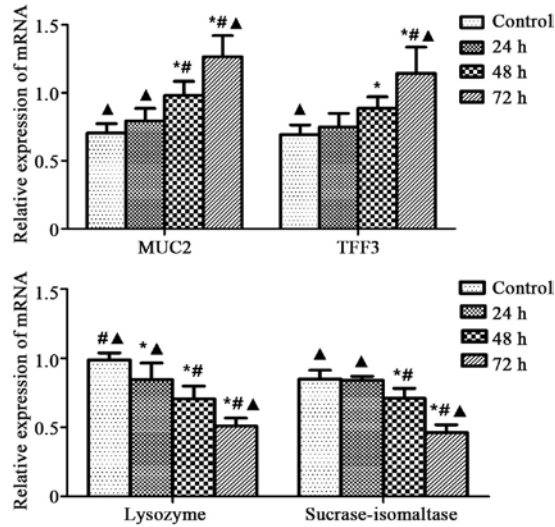


图2 阿司匹林对结肠癌HT-29细胞株分化标志物mRNA表达的影响

Fig. 2 Effects of aspirin on the mRNA expressions of intestinal differentiation markers in colon cancer cell line HT-29

*: $P<0.05$, compared with control; #: $P<0.05$, compared with 24 h; ^: $P<0.05$, compared with 48 h

2.4 阿司匹林对结肠癌HT-29细胞株肠潘氏细胞分化标志物lysozyme和肠吸收细胞分化标志物sucrase-isomaltase蛋白表达的影响

Western blot结果显示, 阿司匹林干预24、48和72 h时, 与对照组比较, lysozyme的蛋白表达逐渐减少, 差异有统计学意义($P=0.028$ 、 0.000 和 0.000); Sucrase-isomaltase蛋白表达也出现下调, 干预48、72 h时差异有统计学意义($P=0.011$ 、 0.000 , 图4)

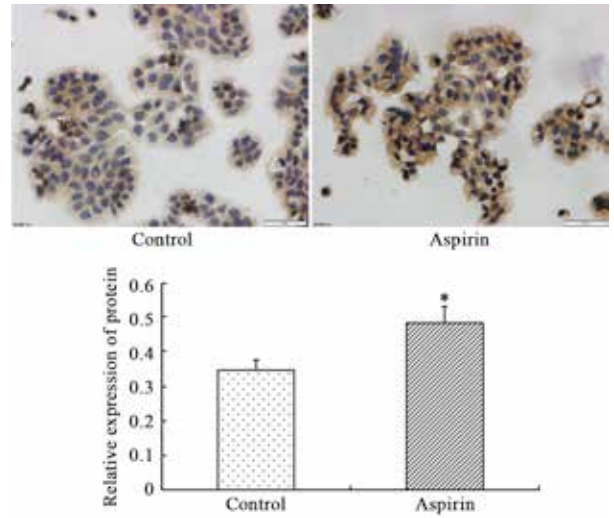


图3 阿司匹林上调结肠癌HT-29细胞株MUC2的蛋白表达
Fig. 3 Aspirin up-regulated the protein expression of MUC2 in colon cancer cell line HT-29

*: $P<0.05$, compared with control

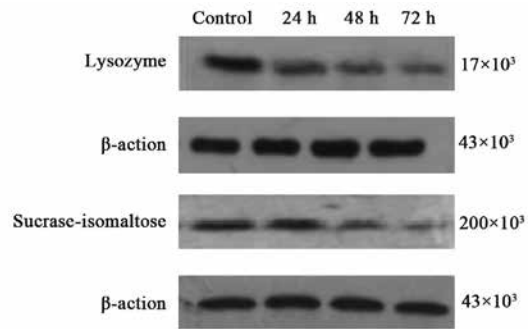


图4 阿司匹林下调HT-29细胞lysozyme和sucrase-isomaltase蛋白的表达

Fig. 4 Aspirin down-regulated the protein expressions of lysozyme and sucrase-isomaltase in colon cancer cell line HT-29

3 讨 论

结肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤, 是导致人类死亡的重要原因。目前, 对中晚期结肠癌的治疗及如何解决治疗后的复发仍是世界性难题。结肠癌病因复杂, 涉及遗传、环境及饮食等多个方面, 其发病机制目前仍不完全明确。近年来, 许多学者提出作为肿瘤“种子”的肿瘤干细胞才是结肠癌的最终“源头”, 对结肠癌的发生、转移和复发耐药等过程起决定作用^[6]。肿瘤干细胞具有自我更新、无限增殖、多向分化、高致瘤和强耐药等“干性”

特点。只有当结肠癌干细胞不再自我复制和更新,而发生分化走向成熟时,结肠癌才将走向消退;相反,若出现异常分化、过度增殖,将促进癌的发生、发展。因此,研究肿瘤细胞的分化具有重要意义。

正常成体肠干细胞最终分化为杯状细胞、吸收细胞、潘氏细胞和内分泌细胞等终末细胞表型。这些细胞不断地分化成熟并凋亡,维持肠上皮的更新稳态,而不至于异常增殖发生肿瘤。不同类型的分化成熟细胞,具有不同的表型特征,分泌和表达不同的标志物,其功能也不同。

MUC2和TFF3是肠杯状细胞分泌的标志物,其中MUC2是一种相对分子质量较大的分泌型黏蛋白,生理状态下,在肠道黏膜上皮细胞中100%表达,其主要存在于杯状细胞的细胞质中,对肠道起润滑及保护作用。有研究证实,MUC2在结肠癌组织中表达减少,甚至在结肠腺瘤中表达也有下调^[7-8]。TFF3是由杯状细胞分泌的多肽物质,对肠道上皮也有保护功能,且在肠道黏膜的损伤修复中起重要作用。John等^[9]研究发现,TFF3在结肠炎性组织、腺瘤性息肉及结肠癌组织中的表达逐渐降低,与肿瘤细胞的增殖负相关,但也有研究得出相反的结论^[10]。本研究结果显示,结肠癌HT-29细胞株中存在MUC2和TFF3的表达,且在阿司匹林干预后表达增加。

Sucrase-isomaltase正常时仅在成人小肠吸收细胞的刷状缘及胎儿结肠中表达,在成人结肠中没有表达^[11]。但很早就有研究发现,sucrose-isomaltase在HT-29、Caco2结肠癌细胞株及结肠癌组织中高表达,并且其表达升高与结肠癌患者死亡风险增加有关^[12-13]。本研究结果也证实,sucrase-isomaltase在结肠癌HT-29细胞中高表达,且阿司匹林干预后表达明显降低,说明阿司匹林干预防治结肠癌有效可能也与该酶相关。

Lysozyme一般由小肠Paneth细胞分泌,具有天然抗菌作用。正常情况下结肠黏膜无Paneth细胞存在,因此没有lysozyme分泌。但有研究提

出,在结肠癌发生、发展过程中,可能因Paneth细胞化生,从而导致结肠癌组织lysozyme的表达明显增多^[14]。本研究结果发现,结肠癌HT-29细胞株中存在lysozyme高表达,且阿司匹林干预后表达明显降低。

阿司匹林是一种非常古老的非甾体抗炎药,具有解热镇痛、抗炎抗风湿和抑制血小板聚集等作用。近年来研究发现,小剂量长期使用还具有防治一些肿瘤的作用,包括结肠癌、前列腺癌和乳腺癌等^[15-16]。大量流行病学和实验室研究均表明,阿司匹林等非甾体抗炎药能抑制甚至逆转结肠癌癌前病变^[3],能明显降低结肠癌的发病率和死亡率^[4]。我们的前期实验^[17]及本次实验结果也证实,阿司匹林可以抑制结肠癌HT-29细胞增殖,并且呈时间和剂量依赖性。

阿司匹林等非甾体抗炎药防治结肠癌机制复杂,主要通过COX-2和非COX-2两大途径发挥作用,具体包括:抑制COX-2表达、促进15-PGDH表达,抑制前列腺素合成,抑制Wnt/ β -catenin信号通路,抑制细胞内DNA的合成;抑制细胞周期;抑制细胞增殖、促进凋亡,增强免疫,抑制血管生成和抗氧化作用等^[18-19]。近年来随着结肠癌干细胞理论的提出和发展,有学者认为,阿司匹林等非甾体抗炎药防治结肠癌最终通过对结肠癌干细胞的调控而实现^[20]。而当结肠癌干细胞分化成熟时,结肠癌将不再进展、甚至消退。因此我们设想,阿司匹林防治结肠癌有效,可能通过促进结肠癌细胞分化而实现。本研究结果显示,阿司匹林干预后,肠杯状细胞分化标志物MUC2、TFF3表达上调,肠吸收细胞标志物sucrose-isomaltase和Paneth细胞标志物lysozyme的mRNA及蛋白表达下调,说明阿司匹林干预后,结肠癌细胞向杯状细胞表型分化成熟,而可能并不向吸收细胞和潘氏细胞表型分化。

总之,本研究作为初探发现,阿司匹林对人结肠癌HT-29细胞细胞株分化具有重要影响,但是其促进HT-29细胞向杯状细胞分化具体机制如何,其对真正的结肠癌干细胞的分化

影响又如何, 以及对人类结肠癌患者的结肠癌细胞分化如何影响, 均尚待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] BAO Y H, GUO Y C, LI Z X, et al. MicroRNA profiling in Muc2 knockout mice of colitis-associated cancer model reveals epigenetic alterations during chronic colitis malignant transformation [J] . PLoS One, 2014, 9(6): e99132.
- [2] 鲁明良, 何 瑾, 叶卫东. MUC1联合MUC2在结直肠腺瘤及结直肠癌中联合表达与临床病理的相关性研究 [J] . 结直肠肛门外科, 2014, 20(3): 158-163.
- [3] DREW D A, CHIN S M, GILPIN K K, et al. ASPIrin Intervention for the REDuction of colorectal cancer risk (ASPIRED): a study protocol for a randomized controlled trial [J] . Chan Trials, 2017, 18(1): 50.
- [4] 童 朵, 张 文. 阿司匹林与大肠癌防治及其相关机制研究进展 [J] . 中国癌症杂志, 2016, 26(9): 795-800.
- [5] RICCHI P, PIGNATA S, DIPOLO A, et al. EFFECT of aspirin on cell proliferation and differentiation of colon adenocarcinoma Caco-2 cells [J] . Int. J. Cancer, 1997, 73(6): 880-884.
- [6] SAVAGE P. Chemotherapy curable malignancies and cancer stem cells: a biological review and hypothesis [J] . BMC Cancer, 2016, 16(1): 906.
- [7] 左晓旭, 朱袭嘉, 李盛国, 等. 黏蛋白2在结肠癌中的表达及其相关临床意义的研究 [J] . 中国医学创新, 2015, 12(29): 12-14.
- [8] 马晓娟, 孟高克, 胡建国, 等. MUC2 在结肠癌及结肠腺瘤的表达及意义 [J] . 宁夏医科大学学报, 2015, 37(5): 524-526, 605.
- [9] JOHN R, EI-ROUBY N M, TOMASETTO C, et al. Expression of TFF3 during multistep colon carcinogenesis [J] . Histol Histopathol, 2007, 22(7): 743-751.
- [10] 李凤玉, 吕 洋, 刘 博, 等. 肠三叶因子与Wnt/ β -Catenin信号通路在结直肠癌中的表达及其与患者预后的关系 [J] . 中国老年学杂志, 2015, 35(22): 6441-6444.
- [11] RODRIGUEZ D, RAMSAY A J, QUESADA V, et al. Functional analysis of sucrase-isomaltase mutations from chronic lymphocytic leukemia patients [J] . Human Molecular Genetics, 2013, 22(11): 2273-2282.
- [12] ZWEIBAUM A, TRIADOU N, KEDINGER M, et al. Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon [J] . Int J Cancer, 1983, 32(4): 407-412.
- [13] JESSUP J M, LAVIN P T, ANDREWS C W, et al. Sucrase-isomaltase is an independent prognostic marker for colorectal carcinoma [J] . Diseases of the Colon and Rectum, 1995, 38(12): 1257-1264.
- [14] OSBORNE C L E, KHAN A, OGUNBIYI O, et al. Metalplastic paneth cells in ulcerative colitis and colorectal cancer [J] . Gut, 2003, 52(Suppl1): A62.
- [15] VIDAL A C, FREEDLAND S J. Aspirin and prostate cancer prevention [J] . Aging (Albany NY), 2015, 7(5): 292-293.
- [16] BARDIA A, KEENAN T E, EBBERT J O, et al. Personalizing aspirin use for targeted breast cancer chemoprevention among postmenopausal women [J] . Mayo Clin Proc, 2016, 91(1): 71-80.
- [17] 朱 蓉, 赵 遼, 方兴国等. 丙谷胺、阿司匹林对人结肠癌HT-29细胞增殖的抑制作用 [J] . 遵义医学院学报, 2013, 36(6): 536-541.
- [18] EGASHIRA I, TAKAHASHI-YANAGA F, NISHIDA R, et al. Celecoxib and 2,5-dimethylcelecoxib inhibit intestinal cancer growth by suppressing the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J] . Cancer Sci, 2017, 108(1): 108-115.
- [19] YANG H B, YIN P, SHI Z, et al. Sinomenine, a COX-2 inhibitor, induces cell cycle arrest and inhibits growth of human colon carcinoma cells in vitro and in vivo [J] . Oncol Lett, 2016, 11(1): 411-418.
- [20] MOON C M, KWON J H, KIN J S, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress cancer stem cells via inhibiting PTGS2 (cyclooxygenase 2) and NOTCH/HES1 and activating PPAR γ in colorectal cancer [J] . Int J Cancer, 2014, 134(3): 519-529.

(收稿日期: 2017-06-03 修回日期: 2017-08-09)