

[文章编号] 1000-4718(2019)06-1042-05

# 7-羟基异黄酮通过 Id1 影响结直肠癌细胞增殖\*

陈慧菁, 廖锦容, 李洁羽, 叶韵斌<sup>△</sup>

(福建省肿瘤医院, 福建医科大学附属肿瘤医院肿瘤免疫学研究室, 福建省肿瘤转化医学重点实验室, 福建 福州 350014)

**[摘要]** **目的:** 探讨 7-羟基异黄酮(7-HIF)对结直肠癌细胞增殖、凋亡和干细胞相关特性的影响。**方法:** 采用 WST-1 法和集落形成实验检测 7-HIF 对人结肠癌 HCT116 细胞增殖的影响;流式细胞术检测 7-HIF 对 HCT116 细胞细胞周期分布和凋亡的影响;Western blot 法检测细胞周期相关分子和干细胞相关分子的表达。**结果:** 在 200 μmol/L 的 7-HIF 作用下, HCT116 细胞的活力受到明显抑制,形成的细胞集落数及大小明显减少( $P < 0.05$ );细胞周期 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 的比例上升, S 期的比例下降, 主要阻滞在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期; HCT116 细胞的凋亡率较对照组明显增加( $P < 0.05$ )。7-HIF 可降低 HCT116 细胞中分化抑制因子 1(Id1)的蛋白表达水平, 导致细胞周期相关蛋白 cyclin D1 和 cyclin E 的表达下降, 增殖相关蛋白 survivin 和 PCNA 的表达也明显下降( $P < 0.05$ )。7-HIF 还能降低干细胞相关标志分子 CD133、ALCAM 和 EpCAM 的表达水平( $P < 0.05$ )。**结论:** 7-HIF 能抑制结直肠癌细胞的增殖, 诱导结直肠癌细胞的凋亡, 并影响其干细胞相关特性, 可能与其抑制 Id1 的表达有关。

**[关键词]** 7-羟基异黄酮; 结直肠癌; 分化抑制因子 1; 细胞增殖; 细胞凋亡

**[中图分类号]** R735.3; R730.23 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1000-4718.2019.06.013

## Effect of 7-hydroxyisoflavone on HCT116 cells proliferation by Id1

CHEN Hui-jing, LIAO Jin-rong, LI Jie-yu, YE Yun-bin

(Immuno-Oncology Laboratory, Fujian Cancer Hospital & Fujian Medical University Cancer Hospital, Fujian Key Laboratory of Translational Cancer Medicine, Fuzhou 350014, China. E-mail: zjyunbin@189.cn)

**[ABSTRACT]** **AIM:** To investigated the effect of 7-hydroxyisoflavone (7-HIF) on the proliferation, apoptosis and stem-like cell feature of colorectal cancer cells. **METHODS:** The effect of 7-HIF on the proliferation of HCT116 cells was detected by WST-1 assay and colony formation assay. The effects of 7-HIF on the cell cycle distribution and apoptosis in the HCT116 cells were analyzed by flow cytometry. The expression of cell-cycle related proteins and the stemness related proteins was determined by Western blot. **RESULTS:** After treated with 7-HIF (200 μmol/L), the viability of HCT116 cells was inhibited, and the size and number of the colony were decreased as compared with control group ( $P < 0.05$ ). The G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase of the cell cycle was increased. The proportion of S phase was decreased and the cells were mainly arrested in G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase. The apoptotic rate of HCT116 cells was 21.4%, which was significantly higher than that in the control group (1.1%). The results of Western blot revealed that the expression of inhibitor of differentiation 1 (Id1) was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The expression of cell cycle markers cyclin D1 and cyclin E, the proliferative markers survivin and PCNA, and stem cell markers CD133, ALCAM and EpCAM were all down-regulated by 7-HIF treatment ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** 7-HIF inhibits the proliferation and induces the apoptosis of colorectal cancer cells, and inhibits the stem-like cell feature, which may be related to Id1 inhibition.

**[KEY WORDS]** 7-Hydroxyisoflavone; Colon cancer; Inhibitor of differentiation 1; Cell proliferation; Apoptosis

结直肠癌是常见的恶性肿瘤,发病率已经位居我国恶性肿瘤发病率的第 5 位,近年来,结直肠癌的发病率趋向年轻化,发病有明显的性别差异性,青年女性的发病率低于同年龄段的男性,而女性绝经后结直肠癌的发病率明显上升,略高于同年龄段的男性<sup>[1]</sup>。有不少相关报道表明雌激素可能在结直肠癌的发生发展中起重要的作用。

7-羟基异黄酮(7-hydroxyisoflavone, 7-HIF)是一

种植物类雌激素,为大豆异黄酮的代谢产物,与大豆异黄酮的主要成分 3-羟基异黄酮结构类似。研究表明 3-羟基异黄酮对于乳腺癌和黑色素瘤等多种肿瘤具有抗肿瘤作用<sup>[2-3]</sup>,其主要的机制包括抑制肿瘤细胞血管生成及蛋白酪氨酸激酶活性、诱导细胞的凋亡<sup>[4]</sup>等。但关于 7-HIF 是否具有抗肿瘤作用目前鲜有报道,7-HIF 对肿瘤细胞的作用机制目前仍不清楚。

肿瘤干细胞(cancer stem cells, CSCs)是肿瘤组

[收稿日期] 2018-07-11 [修回日期] 2018-12-26

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (No. 81472720)

△ 通讯作者 Tel: 0591-83660063-8486; E-mail: zjyunbin@189.cn

织中存在的、为数不多的具有自我更新能力、多分化潜能和无限增殖的细胞。肿瘤干细胞是肿瘤生长、侵袭、复发和转移的根源。分化抑制因子 1 (inhibitor of differentiation 1, Id1) 是分化抑制因子家族成员,属于螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix, HLH) 转录因子。本实验室的前期研究发现沉默人结直肠癌细胞 HCT116 中的 *Id1* 基因后细胞中干性相关分子的 mRNA 和蛋白表达水平均下降,提示 Id1 能够与结直肠癌细胞的干性特征相关<sup>[5]</sup>。有文献报道 3-羟基异黄酮通过抑制 Notch1/NF- $\kappa$ B/Slug/E-cadherin 信号通路能逆转结直肠癌细胞干性,因此可作为潜在抑制肿瘤转移的药物<sup>[6]</sup>。与其结构相似的 7-HIF 是否也能通过 Id1 调控结直肠癌细胞的干性影响其生长?因此本研究通过细胞实验观察 7-HIF 对结直肠癌细胞增殖的影响,并初步研究 7-HIF 是否通过 Id1 影响结直肠癌细胞的干细胞特性。

## 材 料 和 方 法

### 1 试剂

7-HIF 系福建医科大学药学系陈翔飞博士惠赠; RPMI-1640 培养基、胎牛血清和胰酶均购自 Gibco; Western blot 裂解液和定量相关试剂购自碧云天生物试剂公司; WST-1 试剂盒购自 Roche; 凋亡及细胞周期检测相关试剂购自 BD; Anti-rabbit IgG HRP-linked antibody 和抗 GAPDH 抗体购自 Cell Signaling; 抗 Id1 抗体购自 Santa Cruz; 抗细胞周期蛋白 (cyclin) D1、cyclin E、survivin、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、CD133、白细胞活化黏附因子 (activated leukocyte cell adhesion molecule, AL-CAM) 和上皮细胞黏附分子 (epithelial cell adhesion molecule, EpCAM) 抗体均购自 Abcam。

### 2 方法

**2.1 细胞培养** 人结直肠癌细胞 HCT116 购自上海细胞库,用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养箱中培养。

**2.2 WST-1 法检测细胞活力** 取对数生长期的 HCT116 细胞经胰酶消化后,调整细胞个数至每孔  $5 \times 10^3$ ,接种到 96 孔板,每孔做 3 个复孔,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养 12 h,分别加入 0  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L、200  $\mu$ mol/L 和 400  $\mu$ mol/L 的 7-HIF 继续培养 48 h,弃培养液,加入 10  $\mu$ L WST-1 工作液,37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 2 h,酶标仪测 490 nm 处吸光度(A)值。

**2.3 集落形成实验** 胰酶消化后的 HCT116 细胞,按每孔 1 500 个细胞(2 mL)接种到 6 孔板中,24 h 后换液加入 200  $\mu$ mol/L 7-HIF,每隔 3~4 d 补充新鲜培养液,10 d 后弃培养液,PBS 洗涤 2 次,甲醇固定 30 min,0.1% 结晶紫染液染色,显微镜下观察超过 50 个细胞为 1 个克隆,计算集落数。

**2.4 流式细胞术检测细胞周期** HCT116 细胞消化后调整密度至  $4 \times 10^8$ /L,接种于 6 孔板,5% CO<sub>2</sub> 培养 18 h 贴壁后,同步化处理(无血清培养 24 h)后,换液加入含 10% FBS 的培养液及 200  $\mu$ mol/L 的 7-HIF 培养 24 h,收集细胞,PBS 洗涤后按试剂盒说明书分别依次加入相应的细胞周期相关试剂,避光孵育 10 min,用 50  $\mu$ m 的尼龙膜过滤,上机检测。

**2.5 流式细胞术检测细胞凋亡** HCT116 细胞按 2.4 操作,PBS 洗涤后加入 Binding Buffer 重悬细胞,加入 Annexin V-FITC 混匀后,再加入 PI,避光室温孵育 10 min,用 50  $\mu$ m 的尼龙膜过滤,上机检测。

**2.6 Western blot 实验** 收集细胞,加入裂解液提取蛋白,BCA 法进行蛋白浓度测定,40  $\mu$ g 总蛋白等量上样,10% SDS-PAGE 分离蛋白,湿法转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, I 抗用 5% 脱脂奶粉 1:1 000 稀释,4 °C 孵育过夜,用缓冲液 TBST 漂 3 次,然后加入 II 抗室温下孵育 1 h,荧光发光试剂显影后使用图像成像系统检测条带。

### 3 统计学处理

使用 SPSS 16.0 统计软件进行数据处理和统计分析。数据采用均数  $\pm$  标准差 (mean  $\pm$  SD) 表示,两两比较采用 *t* 检验,多组间比较采用方差分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 结 果

### 1 7-HIF 抑制结肠癌细胞 HCT116 活力

WST-1 法检测细胞的活力,结果显示,与对照组相比,药物浓度为 200  $\mu$ mol/L 和 400  $\mu$ mol/L 时细胞的生长受到明显抑制( $P < 0.05$ ),见图 1。

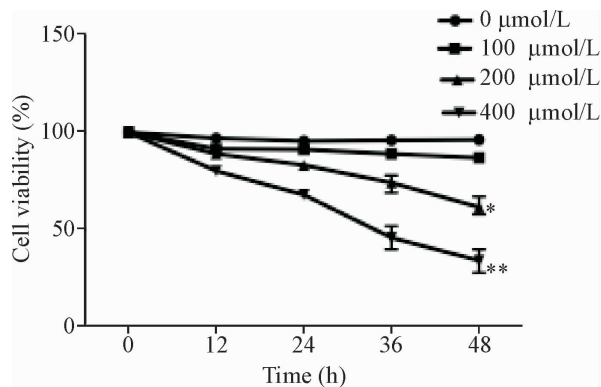


Figure 1. WST-1 assay was used to measure the cell viability after exposure to 7-HIF. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0  $\mu$ mol/L group.

### 图 1 不同浓度的 7-HIF 对 HCT116 细胞活力的影响

### 2 7-HIF 抑制结肠癌细胞 HCT116 克隆形成

从生长曲线可知当药物浓度为 200  $\mu$ mol/L 时, HCT116 细胞的生长受到明显抑制,因此在后续的实验我们均采用 200  $\mu$ mol/L 的浓度。集落形成实

进一步验证 7-HIF 对 HCT116 细胞增殖的影响。结果显示 7-HIF 作用 10 d 后的 HCT116 细胞的集落

形成的数目及大小均较未处理组明显减少 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。

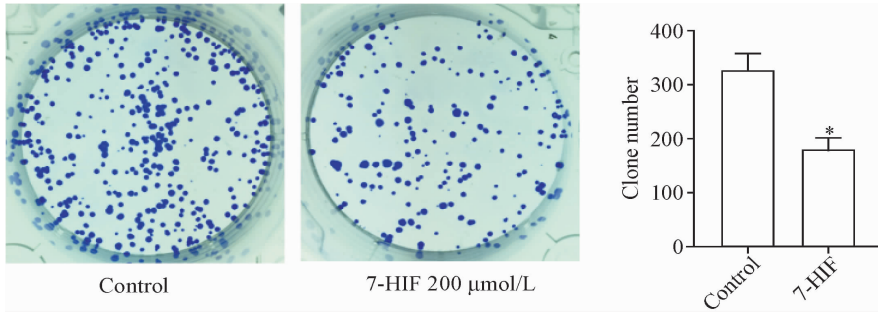


Figure 2. The colony formation ability of HCT116 cells after exposure to 200  $\mu\text{mol/L}$  7-HIF. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.  
图 2 集落形成实验验证 7-HIF 对 HCT116 细胞增殖的影响

### 3 7-HIF 对结肠癌细胞 HCT116 细胞周期的影响

结果显示与对照组相比, 200  $\mu\text{mol/L}$  7-HIF 处理后的 HCT116 细胞周期  $G_0/G_1$  期的比例显著升高 ( $P < 0.05$ ), 而 S 期的比例显著下降 ( $P < 0.05$ ), 提示 7-HIF 能使 HCT116 细胞阻滞于  $G_0/G_1$  期, 从而抑

制细胞的生长, 见图 3A。7-HIF 处理后细胞周期蛋白 cyclin D1、cyclin E、凋亡抑制因子 survivin 和 PCNA 表达较对照组均明显下降 ( $P < 0.05$ ), 见图 3B。提示 7-HIF 可能是通过抑制 HCT116 细胞周期相关蛋白和增殖相关蛋白的表达从而抑制了细胞的增殖。

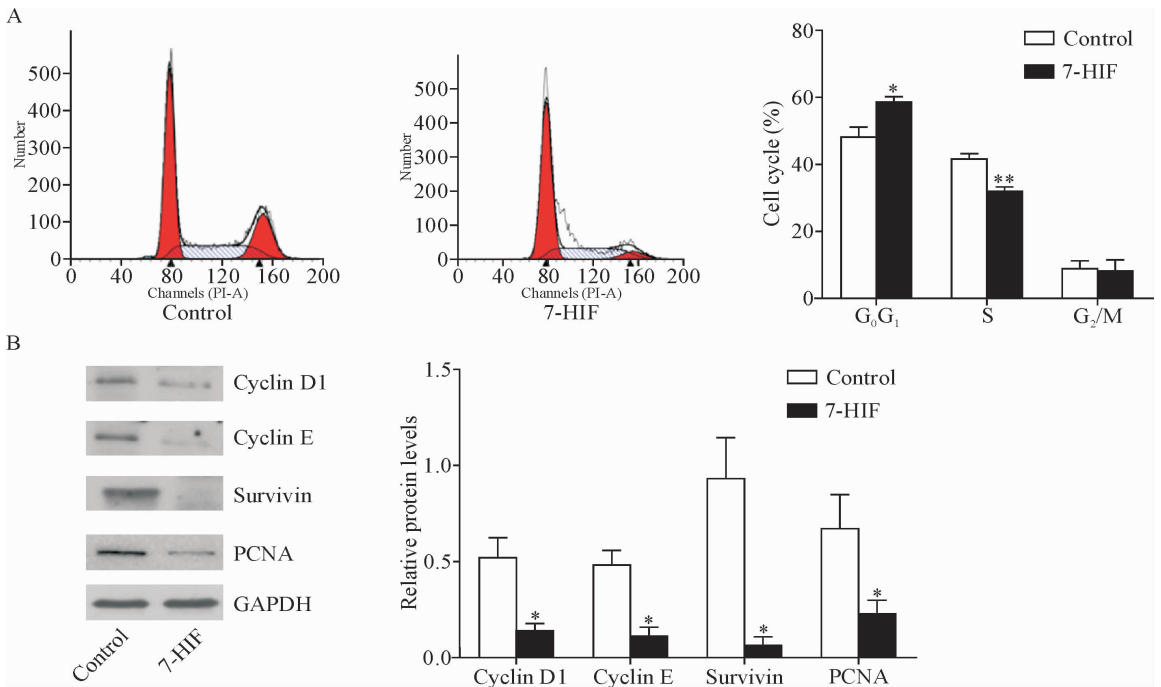


Figure 3. 7-HIF induced cell cycle arrest at  $G_0/G_1$  phase and blocked the expression of proliferation-related protein in the HCT116 cells. A: HCT116 cells were treated with 7-HIF at 200  $\mu\text{mol/L}$  for 24 h and the cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry; B: the effect of 7-HIF on the expression of proliferation-related proteins in the HCT116 cells determined by Western blot. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs control group.

### 图 3 7-HIF 对 HCT116 细胞周期及相关增殖蛋白的影响

### 4 7-HIF 诱导 HCT116 细胞凋亡

流式细胞术检测 7-HIF (200  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 48 h 后的 HCT116 细胞的凋亡率显示: 7-HIF 处理组的 HCT116 细胞凋亡率较对照组明显增高 ( $P < 0.05$ ), 见图 4。

### 5 7-HIF 影响 HCT116 细胞干性相关蛋白的表达

7-HIF 处理后 HCT116 细胞干性相关蛋白 CD133、ALCAM 和 EpCAM 的表达较对照组明显降低

( $P < 0.05$ ), 见图 5。提示 7-HIF 能抑制 HCT116 细胞的干性。

### 6 7-HIF 下调 HCT116 细胞中 Id1 的表达

Western blot 实验结果显示, 给予 200  $\mu\text{mol/L}$  7-HIF 处理 48 h 后, HCT116 细胞中 Id1 的蛋白表达水平较对照组降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 6。表明 7-HIF 能抑制 HCT116 细胞中 Id1 的表达。

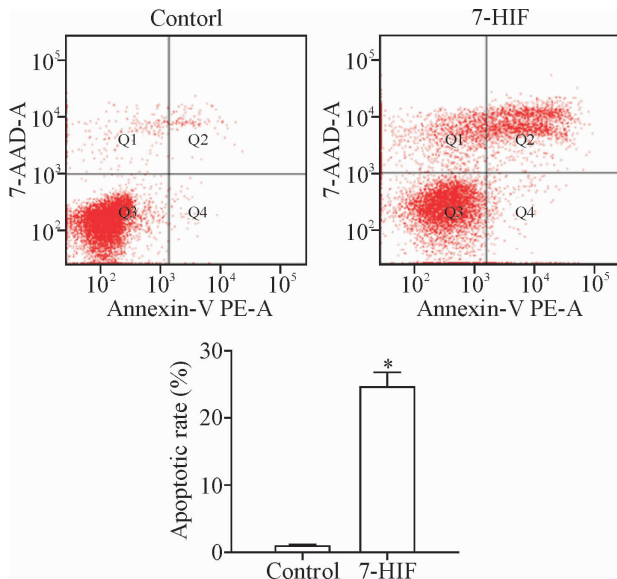


Figure 4. The effect of 7-HIF on the apoptosis of HCT116 cells was analyzed by flow cytometry. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

图4 7-HIF对HCT116细胞凋亡的影响

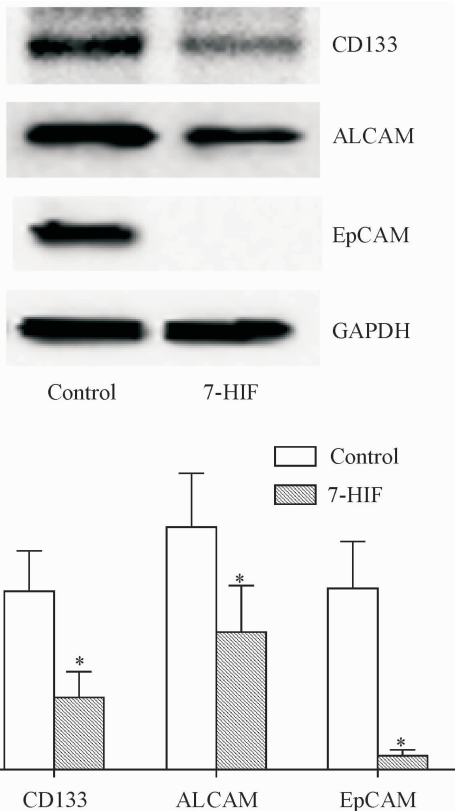


Figure 5. The effect of 7-HIF on the expression of stemness related proteins in the HCT116 cells was detected by Western blot. GAPDH served as an internal control. Mean  $\pm$  SD.  $n = 3$ . \*  $P < 0.05$  vs control group.

图5 Western blot法检测7-HIF对HCT116细胞干性相关蛋白的影响

### 讨 论

研究表明,雌激素与大肠癌存在密切关系,上个

世纪70年代流行病学研究表明,大肠癌与乳腺癌具有相似的流行病学特点,提示雌激素可能是大肠癌的致病因素之一<sup>[7]</sup>。随着研究的深入,关于雌激素究竟具有促进肿瘤还是抑制肿瘤的作用仍然存在争议。流行病学的研究发现,在一些经常食用大豆的国家里,结肠癌的发病率较低<sup>[8]</sup>;Meta分析显示,大豆异黄酮的摄入能显著的降低女性大肠癌的发病风险<sup>[9]</sup>;另有学者研究发现,年龄大于56岁的妇女使用雌激素,结直肠癌的发病率比未使用者明显降低,提示适量雌激素可能抑制结直肠癌肿瘤的生长<sup>[10]</sup>。

大豆异黄酮是目前应用最广的植物雌激素,其化学结构与雌激素类似,3-羟基异黄酮是其中最主要的有效成分。研究证实,3-羟基异黄酮能活化雌激素受体 $\beta$ ,通过雌激素受体 $\beta$ 选择性激活促凋亡信号发挥抗肿瘤效应,抑制炎症肿瘤微环境的信号<sup>[11]</sup>。雌激素受体 $\beta$ 在大肠组织中可能发挥抑癌基因作用,在防止大肠黏膜细胞恶变,抑制癌细胞增殖的同时促进肠癌细胞凋亡<sup>[12]</sup>。7-HIF作为大豆异黄酮的代谢产物,与3-羟基异黄酮结构类似,在研究中我们发现7-HIF能抑制结肠癌细胞HCT116的生长,使其细胞周期阻滞于 $G_0/G_1$ 期。进一步对细胞周期相关蛋白进行检测,结果显示7-HIF能降低细胞周期蛋白cyclin D1和cyclin E的表达,同时能降低增殖相关蛋白survivin和PCNA的表达,提示7-羟基异黄酮通过抑制细胞周期蛋白及增殖相关的表达而使肠癌细胞处于静止的状态,从而抑制肠癌细胞的生长。由于肿瘤发生是肿瘤细胞增殖和凋亡平衡失调的结果,进一步的凋亡研究表明7-HIF作用后能使肠癌细胞的凋亡率明显上升,提示7-HIF可能通过抑制结直肠癌细胞的生长和促进其凋亡发挥抗肿瘤作用。

复发和转移是结直肠癌患者死亡的主要原因。肿瘤干细胞学说认为肿瘤干细胞是肿瘤复发和转移的根源。肿瘤干细胞具有自我更新能力,无限增殖的潜能,增强侵袭和转移能力<sup>[13]</sup>、抗常规放疗和化疗的能力,这些可能是肿瘤治疗失败的主要原因<sup>[14]</sup>。鉴定肿瘤干细胞最权威的方法之一是筛选确定肿瘤干细胞的细胞表面标志物。目前比较确定的结直肠癌干细胞标志物主要有EpCAM、ALCAM、CD133、CD44、CD24和CD166等<sup>[15]</sup>。Id1是分化抑制因子家族成员,其生物学功能是对抗分化转录因子而让细胞停留在未分化的状态,具有维持其自我更新的功能。研究发现雌激素能影响Id1的表达,Schoppmann等<sup>[16]</sup>在191例乳腺癌组织中发现Id1的高表达与孕激素受体的表达量呈负相关,提示激素疗法可能会影响Id1的表达;Jang等<sup>[17]</sup>对263例乳腺癌组织标本分析发现Id1高表达与雌激素受体阴性和

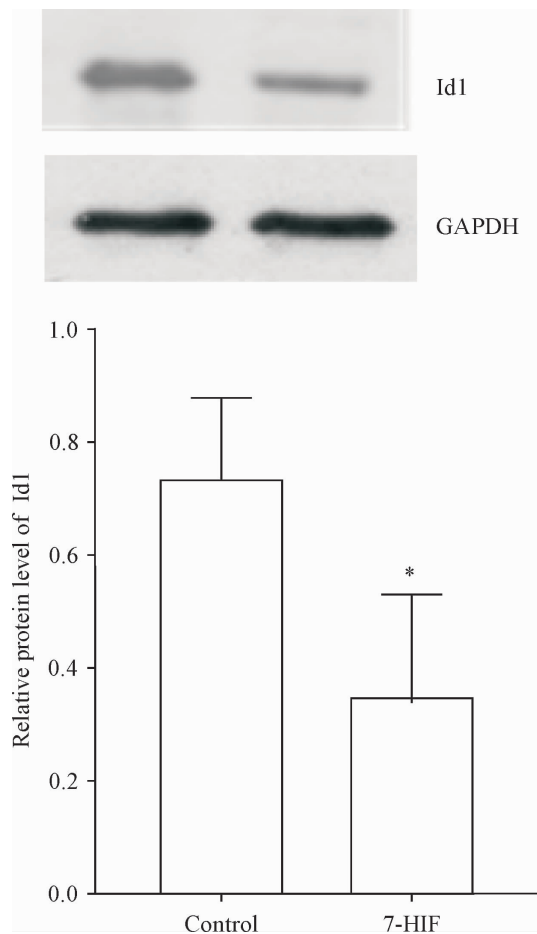


Figure 6. The protein expression of Id1 was reduced by treating with 200 μmol/L 7-HIF. Mean ± SD. n = 3. \*P < 0.05 vs control group.

**图 6 7-HIF 对 HCT116 细胞 Id1 表达的影响**

结节型乳腺癌以及微血管密度明显相关,这些均提示在乳腺癌中雌激素能影响 Id1 的表达。本实验室前期研究也发现在 HCT116 细胞中 Id1 呈高表达状态,小干扰 RNA 沉默 Id1 后其增殖活性和克隆形成能力明显下降,结直肠癌干细胞标志物 CD24、CD44、CD133、CD166 和 EpCAM 的 mRNA 和蛋白表达水平均明显下降<sup>[5]</sup>,提示在结直肠癌中 Id1 的表达与肿瘤的增殖、干性密切相关。本研究结果显示 7-HIF 能抑制结肠癌细胞的生长、增殖,促进其凋亡。7-HIF 作用于 HCT116 细胞能降低 Id1 蛋白表达的水平,同时 7-HIF 能明显降低结肠癌细胞干性相关标志物 CD133、ALCAM 和 EpCAM 的表达,提示 7-HIF 可能是通过下调 Id1 影响了 HCT116 细胞的干性,从而影响了 HCT116 细胞的生长和增殖。

**[参 考 文 献]**

[1] Jemal A, Bray F, Centre M, et al. Global cancer statistic [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.  
 [2] Magee PJ, McGlynn H, Rowland IR. Differential effects of isoflavones and lignans on invasiveness of MDA-MB-231

breast cancer cells *in vitro* [J]. Cancer Lett, 2004, 208(1):35-41.  
 [3] Yan C, Han R. Genistein suppresses adhesion-induced protein tyrosine phosphorylation and invasion of B16-BL6 melanoma cells[J]. Cancer Lett,1998, 129(1):117-124.  
 [4] Zhou JR, Gugger ET, Thangaka T, et al. Soy bean phytochemicals inhibit the growth of transplantable human prostate carcinoma and tumor anogenesis in mice[J]. J Nutr, 1999, 129(9):1628-1635.  
 [5] Lai X, Liao J, Lin W, et al. Inhibitor of DNA-binding protein 1 knockdown arrests the growth of colorectal cancer cells and suppresses hepatic metastasis *in vivo*[J]. Oncol Rep, 2014, 32(1):79-88.  
 [6] Zhang ZY, Wang CZ, Du GJ, et al. Genistein induces G<sub>2</sub>/M cell cycle arrest and apoptosis via ATM/p53-dependent pathway in human colon cancer cells[J]. Int J Oncol, 2013, 43(1):289-296.  
 [7] Stedman KE, Moore GE, Morgan RT. Estrogen receptor proteins in diverse human tumors[J]. Arch Surg, 1980, 115(3):244-248.  
 [8] Allred CD, Allred KF, Ju YH, et al. Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner [J]. Cancer Res, 2001, 61(13):5045-5050.  
 [9] Yan L, Spitznagel EL, Bosland MC. Soy consumption and colorectal cancer risk in humans: a meta-analysis[J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(1):148-158.  
 [10] Murff HJ, Shrubsole MJ, Smalley WE, et al. The interaction of age and hormone replacement therapy on colon adenoma risk[J]. Cancer Detect Prev,2007, 31(2):161-165.  
 [11] Caiazza F, Ryan EJ, Doherty G, et al. Estrogen receptors and their implications in colorectal carcinogenesis [J]. Front Oncol, 2015, 5:19.  
 [12] Raigoso P, Sanz L, Vizoso F, et al. Estrogen and progesterone receptors in colorectal cancer and surrounding mucosa[J]. Int J Biol Markers, 2001, 16(4):262-267.  
 [13] Wang P, Gao Q, Suo Z, et al. Identification and characterization of cells with cancer stem cell properties in human primary lung cancer cell lines [J]. PLoS One, 2013, 8(3):e57020.  
 [14] Sales KM, Winslet MC, Seifalian AM. Stem cells and cancer: an overview[J]. Stem Cell Rev, 2007, 3(4):249-255.  
 [15] Vaiopoulos AG, Kostakis ID, KoutsilierisM, et al. Colorectal cancer stem cells[J]. Stem Cells, 2012, 30(3):363-371.  
 [16] Schoppmann SF, Schindl M, Bayer G, et al. Overexpression of Id-1 is associated with poor clinical outcome in node negative breast cancer[J]. Int J Cancer, 2003, 104(6):677-682.  
 [17] Jang KS, Han HX, Paik SS, et al. Id-1 overexpression in invasive ductal carcinoma cells is significantly associated with intratumoral microvessel density in er-negative/node-positive breast cance[J]. Cancer Lett, 2006, 244(2):203-210.

(责任编辑:陈妙玲,余小慧)