

青蒿琥酯通过 Akt/Snail 信号通路逆转结直肠癌细胞 上皮间充质转化

刘婷¹, 郭颖¹, 焦保良², 田小菲¹, 罗强³, 孙巴达¹, 薛大忠¹, 张林西^{3*}

(1. 河北北方学院基础医学院, 河北张家口 075000; 2. 河北北方学院附属第一医院, 河北张家口 075000; 3. 河北北方学院生命科学研究中心, 河北张家口 075000)

【摘要】 目的:探讨青蒿琥酯(ART)对结直肠癌 HCT-8 细胞上皮-间充质转化(EMT)的作用,并探讨 ART 对结直肠癌细胞迁移,侵袭,EMT 能力和蛋白激酶 B(Akt)/Snail 信号通路的影响。方法:采用噻唑蓝(MTT)比色法检测不同药物浓度的 ART 对 HCT-8 细胞增殖的影响,采用伤口愈合实验和 transwell 实验,检测 ART 对结直肠癌 HCT-8 细胞迁移侵袭能力的影响。免疫荧光双重染色法检测不同 ART 浓度对肿瘤细胞 HCT-8 细胞中 EMT 相关蛋白波形蛋白(vimentin),E-钙黏蛋白(E-cadherin)分布情况的影响。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白 N-钙黏蛋白(N-cadherin),vimentin,E-cadherin 的蛋白表达情况的影响以及对 Akt/Snail 信号途径中相关蛋白 Akt1,磷酸化 Akt1(p-Akt1)和 Snail1 表达的影响。结果:不同浓度的 ART 作用于 HCT-8 后,计算细胞增殖抑制率,并绘制出量效曲线,得出 ART 对 HCT-8 细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)为(16.67±1.95) μmol·L⁻¹,且与药物质量浓度呈剂量依赖关系,由此实验处理组分为 4 组,空白组(0 μmol·L⁻¹),ART 低剂量组(2 μmol·L⁻¹),ART 中剂量组(10 μmol·L⁻¹),ART 高剂量组(50 μmol·L⁻¹);与空白组比较,ART 组可显著抑制 HCT-8 细胞的迁移和侵袭能力(P<0.05);与空白组比较,ART 组中相关蛋白 E-cadherin 表达明显上调,vimentin 和 N-cadherin 表达明显下调,且 p-Akt1 和 Snail1 的表达水平明显降低从而抑制 EMT(P<0.05)。结论:ART 可以抑制 EMT 引起的迁移和侵袭,其机制可能与抑制 Akt/Snail 通路活化从而逆转 EMT 有关。

【关键词】 结直肠肿瘤;青蒿琥酯;上皮-间充质转化;迁移;侵袭;蛋白激酶 B(Akt)/Snail 信号通路

【中图分类号】 R2-0;R22;R285.5;R73;R975 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-9903(2021)14-0053-07

【doi】 10.13422/j.cnki.syfjx.20211495

【网络出版地址】 <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210527.1100.003.html>

【网络出版日期】 2021-05-27 14:15

Mechanism of Artesunate in Reversing Epithelial-mesenchymal Transition and Akt/Snail Signaling Pathway in Colorectal Carcinoma

LIU Ting¹, GUO Ying¹, JIAO Bao-liang², TIAN Xiao-fei¹, LUO Qiang³,
SUN Si-da¹, XUE Da-zhong¹, ZHANG Lin-xi^{3*}

(1. Basic Medical College of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

3. Life Science Research Center of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China)

【Abstract】 **Objective:** To investigate the effects of artesunate (ART) on epithelial-mesenchymal transformation (EMT) of colorectal cancer HCT-8 cells, and explore the effects of ART on cell migration, invasion, EMT ability, and protein kinase B (Akt)/Snail signaling pathway of colorectal cancer. **Method:** 3-(4-5-Dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect the effects of ART at different concentrations on the proliferation of HCT-8 cells. Wound healing assay and Transwell assay were used

【收稿日期】 20210302(002)

【基金项目】 河北北方学院自然科学研究计划项目(YB2018004)

【第一作者】 刘婷, 硕士, 从事中医药治疗消化道肿瘤研究, E-mail: 1048294612@qq.com

【通信作者】 *张林西, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事消化系统肿瘤基础研究工作, E-mail: zlxwxl@163.com

respectively to detect the effects of ART on migration and invasion of colorectal cancer cells. The effects of different concentrations of ART on the distribution of EMT-related proteins vimentin and E-cadherin in HCT-8 cells were detected by double-immunofluorescent staining. The effects of ART on protein expression levels of EMT markers E-cadherin, vimentin and N-cadherin in HCT-8 cells and the expression of Akt1, p-Akt1, and Snail1 in the Akt/Snail signaling pathway were determined by Western blot. **Result:** The dose-dependent inhibitory effects of ART on the proliferation of HCT-8 cells were determined and the inhibition rate was calculated. A dose-response curve was plotted accordingly. The half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of ART on HCT-8 cells was $(16.67 \pm 1.95) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The following four groups were set up: a control group ($0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and low-, medium-, and high-dose ART groups ($2, 10, 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). Compared with the results in the control group, ART inhibited the migration and invasion of HCT-8 cells ($P < 0.05$). Specifically, the expression of E-cadherin in HCT-8 cells was significantly up-regulated, and that of vimentin and N-cadherin was significantly down-regulated ($P < 0.05$). The expression levels of p-Akt1 and Snail1 were significantly decreased after ART treatment, thus inhibiting EMT ($P < 0.05$). **Conclusion:** The findings of this study suggested that ART inhibited the EMT-triggered migration and invasion of HCT-8 cells presumably by inhibiting the activation of the Akt/Snail pathway to reverse EMT.

[**Keywords**] colorectal neoplasms; artesunate; epithelial-mesenchymal transition (EMT); migration; invasion; protein kinase B (Akt)/Snail signaling pathway

结直肠癌(CRC)是世界上第2大常见恶性肿瘤和第4大癌症相关死亡原因^[1],全球每年约有800万新病例发生,占有恶性肿瘤的10%~15%。结直肠癌高发率呈现逐年上升趋势。由于局部侵袭和远处转移,使其成为世界上最致命的癌症之一。因此,了解肿瘤转移过程中潜在的分子机制是至关重要的^[2-4]。上皮间充质转化(EMT)是癌细胞的可塑性发生改变,细胞间黏附作用丧失,细胞外基质的重塑及获得间充质特征的现象,其本质是通过一个复杂的信号网络调控来减少上皮特征和增加间充质特征的过程。研究表明,EMT在恶性肿瘤的发生发展过程中起着重要作用,包括诱导细胞迁移侵袭和转移以及促进耐药,而结直肠癌存活率低与EMT诱导基因表达增加和间质组织学改变有关^[5-6]。通过以往对磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/Snail信号传导途径的研究证实,PI3K/Akt及其下游的EMT异常参与了肿瘤相关基因介导的鼻咽癌、肝癌、乳腺癌的迁移、侵袭和转移^[7-9]。

青蒿琥酯(ART)是从中草药青蒿中提取的一种活性很强的天然倍半萜的水溶性青蒿素衍生物,在中医中用作治疗发热和寒战已有数千年的历史,具有抗疟疾的作用并且已经成为目前抗疟疾药物的前沿^[10]。近年来,越来越多的研究表明,抗寄生虫药物可以影响肿瘤细胞的多种生物学过程,显示出潜在的抗肿瘤活性及抗炎免疫调节^[11-13]。虽然已发现对肿瘤细胞有抑制作用,但ART对结直肠癌

HCT-8细胞的抑制作用是否与Akt/Snail信号通路内相关调节因子有关,以及如何逆转EMT的具体机制尚不清楚。

本研究以结直肠癌HCT-8细胞为研究对象,对细胞进行了形态学观察与分子生物学的研究。分析ART如何影响结直肠癌HCT-8细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭,研究结肠癌细胞经ART治疗后对EMT的标志物蛋白表达水平的影响,以及调控EMT的具体通路是否与Akt/Snail信号途径有关。

1 材料

1.1 细胞 结直肠癌细胞HCT-8购自江苏凯基生物技术股份有限公司,由河北北方学院生命科学研究中心保存(批号KG028)。

1.2 药品与试剂 注射用青蒿琥酯(桂林南药股份有限公司,国药准字H10930195,批号ZA1190503,规格为每瓶含青蒿琥酯60 mg);RPMI1640(美国Corning公司,批号19619006);胎牛血清(美国Gegrogen公司,批号1604710);MATRIGEL MATRIX基质胶(美国BD公司,批号9119018);胰蛋白酶-EDTA(以色列Biological Industries公司,批号55019);噻唑蓝(MTT)试剂盒(美国Sigma公司,批号P1399);BCA蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号PC0020);山羊抗兔FITC(H+L)(日本KPL公司,批号150348);TRITC山羊抗小鼠免疫球蛋白(Ig)G,山羊抗兔IgG(H+L)辣根过氧化物酶(HRP,日本KPL公司,批号分别为140067,

10226187); β -肌动蛋白(β -actin)(ABclonal生物科技公司,批号9100026001);E-钙黏蛋白(E-cadherin,英国Abcam公司,批号GR3209210-10);波形蛋白(vimentin)(V9),Snail1(G-7),Akt1(B-1),磷酸化(p)-Akt1(5.Ser 473),化学发光底物试剂盒,山羊抗小鼠IgG-HRP(美国Santa Cruz公司,批号分别为B0719,L0518,sc-5298,sc-293125,B0415,J1514);N-钙黏蛋白(N-cadherin,北京博奥森生物技术有限公司,批号AH05243487)。

1.3 仪器 1300 SERIES A2型细胞超净工作台,HEPA CLASS 100型二氧化碳恒温培养箱(美国Thermo公司);SpectraMax M2型全自动酶联免疫检测仪(美国Molecular Devices公司);PowerPac Universal型电泳仪和全能型蛋白转膜仪(美国Bio-Rad公司);Amesham Imager 6000型超灵敏多功能成像仪(美国GE公司);FV10-MCPSU型激光共聚焦显微镜(日本Olympus公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 结直肠癌HCT-8细胞在含10%胎牛血清和1%青霉素和链霉素的RPMI1640培养基中,置于37℃,5%CO₂的恒温细胞培养箱中进行孵育培养,每天传代1次。

2.2 MTT比色法检测ART对HCT-8细胞的抑制率

取对数生长期的HCT-8细胞,制备单细胞悬液,细胞以 5×10^4 个/孔的密度均匀接种于96孔板中,每孔100 μ L。细胞贴壁后,分别加入终浓度为1,2,10,50,250,1 250,6 250 μ mol·L⁻¹的ART作为实验组,同时设空白组,各组设3个复孔。将细胞置于37℃,5%CO₂的恒温培养箱内继续培养48 h后,每孔分别加入10%的MTT 20 μ L孵育4 h,去除上清液后加入二甲基亚砜(DMSO)溶液100 μ L,置于培养箱中继续培养5 min,然后在摇床摇晃10 min使甲瓖充分溶解。用酶联免疫检测仪测波长490 nm处吸光度 A ,用空白组校零。细胞增殖抑制率= $[1 - (A_{\text{实验孔}} - A_{\text{空白孔}}) / (A_{\text{对照孔}} - A_{\text{空白孔}})] \times 100\%$ 。应用GraphPad Prism 7.04绘制细胞量效曲线,并计算ART对HCT-8细胞的半数抑制浓度(IC₅₀)。实验重复3次。

2.3 伤口愈合实验检测HCT-8细胞的迁移能力

将对数生长期的HCT-8细胞制备成单细胞悬液接种于6孔板中,当细胞融合率达到80%左右时,用10 μ L无菌移液枪头尖端将单层细胞划出一个划痕伤口,然后用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次漂浮的细胞碎片。实验分为4组,空白组(0 μ mol·L⁻¹),

ART低浓度组(2 μ mol·L⁻¹),ART中浓度组(10 μ mol·L⁻¹),ART高浓度组(50 μ mol·L⁻¹)。使用倒置光学显微镜,在指定的时间点(0,48 h)的显微镜区域监测和拍摄细胞向覆盖创口间隙内迁移情况的照片。通过随机选择3个点测量伤缘之间的距离,对移行距离进行分析。实验重复3次。

2.4 transwell侵袭实验检测HCT-8细胞的侵袭能力 使用transwell小室,上室中涂有1 g·L⁻¹的MATRIGEL基质胶70 μ L并在恒温箱中静置4 h后水化基底膜。按照伤口愈合实验描述,将这些细胞分成4组。在无血清RPMI1640培养基中制备单细胞悬液,然后将饥饿12 h的HCT-8细胞以 4×10^5 个/孔的密度接种到上述操作完成的上室中,加入100 μ L,下室加含有10%胎牛血清的培养基500 μ L。诱导HCT-8细胞由上室进入下室,每组设置3个复孔。在37℃,5%CO₂加湿恒温培养箱中孵育48 h,用棉签仔细擦去上室中未侵袭的细胞,侵入的细胞用4%多聚甲醛固定15 min,0.1%结晶紫染色15 min,洗去结晶紫凉干后在显微镜下观察并拍摄侵袭到底部的细胞,在5个视野下采集图像并计数。实验重复3次。

2.5 免疫荧光法检测E-cadherin和vimentin蛋白的分布情况 将细胞HCT-8接种到24孔板中,按照伤口愈合实验中描述的将这些细胞分成4组,孵育48 h后,用PBS缓冲液冲洗细胞2次,每次5 min,用4%多聚甲醛固定15 min,然后用适量0.1% TritonX-100孵育10 min,1%BSA封闭30 min,最后在含有一抗E-cadherin(1:250)和vimentin(1:250)中4℃孵育过夜。孵育完成后用PBS缓冲液洗涤3次,每次5 min,对应二抗室温避光孵育1 h(1:200),PBS洗涤3次,每次5 min,用DAPI室温避光染色5 min,PBS洗涤3次,每次5 min,双蒸水洗涤1次,滴加防淬灭封片剂进行避光封片,共聚焦显微镜进行观察成像,实验重复3次。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测HCT-8细胞中EMT相关蛋白的表达水平 提取结直肠癌HCT-8细胞的蛋白,用BCA蛋白分析试剂盒对蛋白质浓度进行定量。在12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白,然后将每个凝胶中分离后的蛋白转移到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的封闭液室温封闭1 h,加入相应一抗E-cadherin(1:1 000),vimentin(1:1 000),N-cadherin(1:1 000), β -actin(1:5 000)4℃孵育过夜。次日,膜用TTBS洗涤3次,每次5 min,分别加入对应辣根

过氧化物标记的二抗(1:5 000)室温下放置于摇床孵育2 h,之后TTBS洗涤3次,每次5 min。使用电化学发光底物试剂盒在Amersham Imager 600扫描仪对蛋白质印迹进行可视化,并使用Image J软件分析,以目的蛋白与内参蛋白 β -actin的条带灰度值的比值表示。实验重复3次。

2.7 统计分析 采用SPSS 20.0统计学软件进行实验数据统计分析处理,并使用GraphPad Prism软件进行绘图,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组数据的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),组间比较采用*t*检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对结肠癌 HCT-8 细胞的生长抑制作用 与空白组比较,ART组的活细胞百分比降低($P<0.05$),呈浓度依赖性,见表1。绘制量效曲线并计算出ART的 $IC_{50}=(16.67\pm 1.95)\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,且对HCT-8细胞无明显毒性。因此将后续实验组分为4组,分别为空白组($0\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),低浓度组($2\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),中浓度组($10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和高浓度组($50\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$),用于后续实验。

3.2 对 HCT-8 细胞迁移能力的影响 与空白组比较,ART各浓度组细胞迁移率显著减弱($P<0.01$),伤口愈合间隙百分比显著升高($P<0.01$)。见表2。

3.3 对 HCT-8 细胞的侵袭能力的影响 与空白组

表1 48 h后ART对HCT-8抑制率的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Effect of artesunate (ART) on HCT-8 inhibition rate after 48 h($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	抑制率/%
空白		1.045 1 \pm 0.09	-
ART	1	0.920 98 \pm 0.01 ¹⁾	12
	2	0.8272 \pm 0.02 ²⁾	22
	10	0.575 68 \pm 0.06 ²⁾	47
	50	0.417 06 \pm 0.01 ²⁾	63
	250	0.201 24 \pm 0.00 ¹⁾	84
	1 250	0.120 78 \pm 0.00 ¹⁾	93
	6 250	0.083 78 \pm 0.00 ¹⁾	96

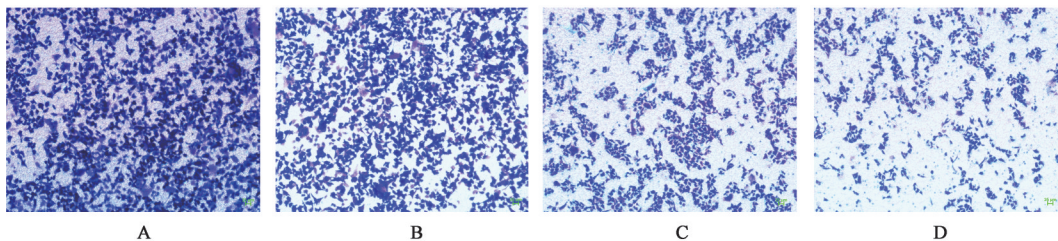
注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$ (表2~6同)

表2 ART对HCT-8细胞迁移率与伤口愈合间隙百分比的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of ART on HCT-8 cells wound healing rate and percentage of distance ratio to 0 h($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞迁移率	愈合间隙百分比
空白		58.66 \pm 9.80	41.34 \pm 9.80
ART	2	24.10 \pm 4.82 ²⁾	75.90 \pm 4.82 ²⁾
	10	15.66 \pm 2.81 ²⁾	84.34 \pm 2.81 ²⁾
	50	9.12 \pm 5.29 ²⁾	92.88 \pm 5.29 ²⁾

比较,ART各浓度组侵袭到下室中的细胞数目明显减少($P<0.05, P<0.01$)。见图1,表3。



A. 空白组;B. ART低浓度组;C. ART中浓度组;D. ART高浓度组(图3,4同)

图1 transwell小室实验检测ART对HCT-8细胞侵袭力的影响(结晶紫, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of ART on the invasion ability of HCT-8 cells were detected by transwell chamber assay(crystal violet, $\times 100$)

表3 ART对HCT-8细胞侵袭力的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

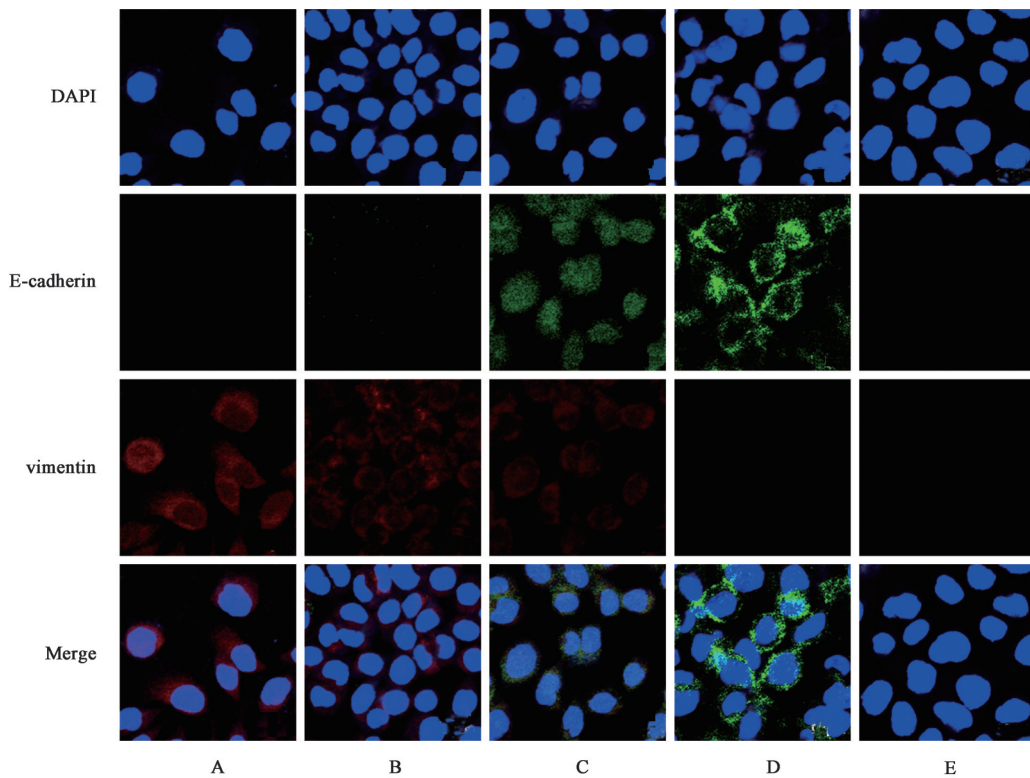
Table 3 Effect of ART on invasion ability of HCT-8 cells($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞数/个
空白		525.3 \pm 57.36
ART	2	414.7 \pm 67.87 ¹⁾
	10	331.7 \pm 45.37 ²⁾
	50	242.0 \pm 17.52 ²⁾

3.4 对 HCT-8 细胞中 EMT 标志物 E-cadherin 和 vimentin 的蛋白分布情况的影响 与空白组相比

较,ART各浓度组中E-cadherin表达明显升高($P<0.05, P<0.01$);蛋白vimentin的分布呈降低趋势,中、高浓度组vimentin的分布显著降低($P<0.01$)。此外,结直肠癌HCT-8细胞分别经ART药物处理48 h后,活细胞数明显减少,并且,细胞形态发生显著变化,观察到DAPI染色显示典型的核固缩、碎裂和染色质萎缩的凋亡形态改变。见图2,表4。

3.5 对 HCT-8 细胞的 EMT 进程中标志物蛋白表达情况的影响 与空白组相比较,ART各浓度组EMT上皮细胞标志物E-cadherin的表达显著升高



A. 空白组; B. ART低浓度组; C. ART中浓度组; D. ART高浓度组; E. IgG组

图2 免疫荧光染色双重法检测不同ART浓度对HCT-8细胞中EMT相关蛋白vimentin, E-cadherin表达的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 2 Protein expression level of vimentin and E-cadherin in HCT-8 cells treated with different drugs concentration were detected by Immunofluorescence staining (Immunofluorescence, ×400)

表4 ART对HCT-8细胞EMT中相关蛋白vimentin, E-cadherin表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of ART on expression of EMT-associated protein vimentin and E-cadherin in HCT-8 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	荧光强度		
		IgG	E-cadherin	vimentin
空白		0.02±0.00	0.04±0.01	0.53±0.02
ART	2	0.02±0.00	0.11±0.02 ¹⁾	0.48±0.00
	10	0.02±0.00	0.32±0.04 ²⁾	0.29±0.07 ²⁾
	50	0.02±0.00	0.58±0.05 ²⁾	0.18±0.04 ²⁾

($P < 0.01$), 间充质细胞标记物 N-cadherin 的表达明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), vimentin 蛋白的表达显著降低 ($P < 0.01$)。见图 3, 表 5。

3.6 ART对HCT-8细胞Akt/Snail通路有关因子表达的影响 与空白组比较, ART实验组中Akt/Snail信号通路的相关蛋白Akt1的表达差异无统计学意义; p-Akt1, Snail1蛋白表达均显著下调 ($P < 0.01$)。见图4, 表6。

4 讨论

全世界每年大约10%的癌症和癌症相关死亡是由结直肠癌引起的, 男性的发病率和死亡率大约

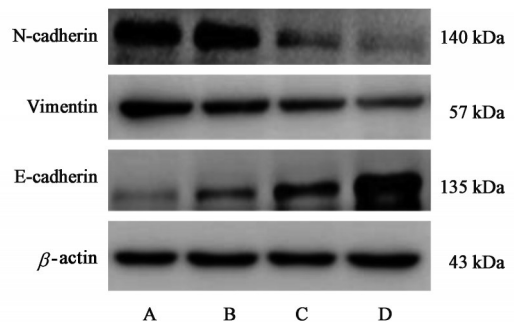


图3 HCT-8细胞中EMT相关蛋白N-cadherin, vimentin, E-cadherin的蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of EMT-related proteins N-cadherin, vimentin and E-cadherin in HCT-8 cells

表5 ART对蛋白N-cadherin, vimentin, E-cadherin表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of ART on expression of protein N-cadherin, vimentin and E-cadherin ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	N-cadherin / $\beta\text{-actin}$	vimentin / $\beta\text{-actin}$	E-cadherin / $\beta\text{-actin}$
空白		0.79±0.08	1.00±0.04	0.41±0.10
ART	2	0.68±0.07 ¹⁾	0.80±0.09 ²⁾	0.61±0.11 ²⁾
	10	0.58±0.08 ²⁾	0.58±0.08 ²⁾	0.72±0.10 ²⁾
	50	0.43±0.09 ²⁾	0.42±0.06 ²⁾	0.88±0.04 ²⁾

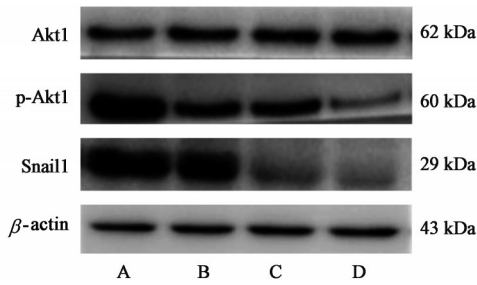


图4 HCT-8细胞Akt/Snail通路的蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of proteins in Akt/Snail pathway of HCT-8 cells

表6 ART对HCT-8细胞Akt/Snail通路中Akt1, p-Akt1和Snail表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of ART on expression of Akt1, p-Akt1 and Snail in Akt/Snail pathway in HCT-8 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Akt1 / $\beta\text{-actin}$	p-Akt1 / $\beta\text{-actin}$	Snail1 / $\beta\text{-actin}$
空白		1.01±0.05	1.26±0.17	0.97±0.07
ART	2	1.03±0.08	1.14±0.22	0.73±0.08
	10	1.06±0.09	0.90±0.03 ²⁾	0.67±0.05 ¹⁾
	50	1.04±0.17	0.80±0.08 ²⁾	0.48±0.14 ²⁾

比女性高25%^[14]。CRC患者的生存通常受到多种人口统计学和疾病相关特征的影响,包括年龄、性别、种族和诊断阶段^[15]。到目前为止,结直肠癌是全球第4大致命癌症,每年导致大约90万人死亡。因为只有在疾病的晚期才会出现症状,所以结直肠癌的诊断和治疗很重要。因此,寻找新的治疗靶点对结直肠癌的治疗具有重要意义。

中医药在世界范围内引起了越来越多的关注。中医药的发展,包括其对恶性肿瘤的治疗作用,未来将有广阔的发展空间。自1993年首次报道青蒿素可能的抗癌作用以来,大量研究强调了青蒿素及其衍生物作为一种新的癌症治疗剂的潜力^[16]。ART是从中药青蒿中提取的一种水溶性青蒿素衍生物,已有报道ART对多种肿瘤细胞具有选择性抑制作用,且对健康组织的毒性较小,还与其他抗癌药物联合使用,用于肿瘤的协同治疗^[17-18]。最近的研究表明,ART可以通过抑制细胞的增殖,诱导细胞凋亡,从而发挥其抗肿瘤作用^[19]。课题组检测ART对HCT-8细胞增殖抑制作用的影响,MTT实验结果提示ART对HCT-8细胞无明显毒性时的 IC_{50} 为 $(16.67 \pm 1.95) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,对HCT-8细胞有明显的抑制作用,然而,ART在结直肠癌HCT-8细胞中如何逆转EMT及具体机制尚少见评估。EMT在肿瘤转移过程中起着至关重要的作用,而ART作为EMT的抑制剂,可能通过多种途径调节肿瘤。

EMT是恶性肿瘤细胞迁移侵袭的重要生物学过程^[20]。目前研究证明,这种现象在恶性肿瘤中非常复杂,上皮细胞的特征包括细胞极性,细胞间相互作用以及基底膜,间充质细胞具有与上皮细胞相反的特性,使其能够发生迁移和侵袭作用。阐明EMT调控恶性肿瘤细胞的分子机制,以及其在恶性肿瘤发生、发展和转移中的作用至关重要。在以往的研究中,EMT与肝癌的增殖、侵袭/迁移和转移有关,并且敲除EMT转录因子Snail可逆转EMT^[21]。课题组采用伤口愈合实验和transwell实验进行检测结果显示,经药物ART处理后,伤口愈合实验中空白组细胞的伤口迁移率明显高于药物组,transwell实验中HCT-8细胞空白组侵袭到下室的细胞数明显高于药物处理组,因此,ART可显著抑制HCT-8细胞的迁移侵袭能力。ART对结直肠癌HCT-8细胞是否通过Akt/Snail信号通路内相关调节因子调节的,以及如何逆转EMT的具体机制尚不清楚。有研究结果显示,转录因子Snail, Twist和Zeb等,可抑制上皮标志物E-cadherin表达,诱导N-cadherin, vimentin等间质标志物表达,从而抑制上皮细胞表达,促进细胞脱离,同时增加间充质基因和蛋白酶的表达^[22]。Snail1和Snail2在所有类型的EMT中发挥积极作用,Snail1转录因子可降低E-cadherin等上皮基因的表达水平,上调vimentin, N-cadherin蛋白等间充质基因的表达水平。ART既能抑制基质金属蛋白酶-9(MMP-9)启动子,又能抑制 β -连环蛋白(β -catenin)-Tcf/Lef信号通路在体外的肿瘤形成,ART可作为一种有效的抗癌药物,通过靶向Wnt/ β -catenin/MMPs调节轴来抑制肿瘤的发生、侵袭、复发和耐药^[23]。这些研究结果与课题组的研究结果一致,即ART可能通过Akt/Snail信号通路诱导EMT标记物的改变,在Western blot实验结果表明ART可能通过上调EMT相关上皮标志物E-cadherin的表达,下调间充质标志物vimentin和N-cadherin的表达从而抑制人结直肠癌HCT-8细胞EMT进程,进一步探索ART对Akt/Snail通路的影响,研究结果提示,ART组中通路相关蛋白p-Akt1和Snail1表达水平与空白组相比显著降低,由此说明其机制可能是通过Akt/Snail通路来调节的。

综上所述,本研究显示ART逆转结直肠癌HCT-8细胞EMT可能通过Akt/Snail信号通路,降低细胞中p-Akt1和Snail1的表达,以及上调EMT的标志物蛋白E-cadherin,下调间充质标志物vimentin和N-cadherin的表达实现的,这些研究结果提示ART

可能是一种有效的结直肠癌抑制剂,可能为提高结直肠癌患者的化疗疗效提供依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, GODING S A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(3):145-164.
- [2] GUREN M G. The global challenge of colorectal cancer [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(12):894-895.
- [3] ARAGHI M, SOERJOMATARAM I, BARDOT A, et al. Changes in colorectal cancer incidence in seven high-income countries: a population-based study [J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(7):511-518.
- [4] ZHOU M, LIU X, LI Z, et al. Caspase-3 regulates the migration, invasion and metastasis of colon cancer cells [J]. *Int J Cancer*, 2018, 143(4):921-930.
- [5] SINGH M, YELLE N, VENUGOPAL C, et al. EMT: mechanisms and therapeutic implications [J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 182:80-94.
- [6] WANG K, SONG K, MA Z, et al. Identification of EMT-related high-risk stage II colorectal cancer and characterisation of metastasis-related genes [J]. *Br J Cancer*, 2020, 123(3):410-417.
- [7] LIANG Z, LIU Z, CHENG C, et al. VPS33B interacts with NESG1 to modulate EGFR/PI3K/AKT/c-Myc/P53/miR-133a-3p signaling and induce 5-fluorouracil sensitivity in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(4):305.
- [8] LI Y, WANG T, SUN Y, et al. p53-Mediated PI3K/AKT/mTOR pathway played a role in PtoxDpt-induced EMT inhibition in liver cancer cell lines [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019:2531493.
- [9] WANG Y, LIU C, XIE Z, et al. Knockdown of TRIM47 inhibits breast cancer tumorigenesis and progression through the inactivation of PI3K/Akt pathway [J]. *Chem Biol Interact*, 2020, 317:108960.
- [10] SUN X, YAN P, ZOU C, et al. Targeting autophagy enhances the anticancer effect of artemisinin and its derivatives [J]. *Med Res Rev*, 2019, 39(6):2172-2193.
- [11] CHEN P, GU W L, GONG M Z, et al. Artesunate decreases β -catenin expression, cell proliferation and apoptosis resistance in the MG-63 human osteosarcoma cell line [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(5):1939-1949.
- [12] HAO D L, XIE R, DE G J, et al. pH-responsive artesunate polymer prodrugs with enhanced ablation effect on rodent xenograft colon cancer [J]. *Int J Nanomedicine*, 2020, 15:1771-1786.
- [13] TU Y Y. The development of the antimalarial drugs with new type of chemical structure-qinghaosu and dihydroqinghaosu [J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2004, 35(2):250-251.
- [14] DEKKER E, TANIS P J, VLEUGELS J L A, et al. Colorectal cancer [J]. *Lancet*, 2019, 394(10207):1467-1480.
- [15] AL-HUSSEINI M J, SAAD A M, JAZIEH K A, et al. Outcome disparities in colorectal cancer: a SEER-based comparative analysis of racial subgroups [J]. *Int J Colorectal Dis*, 2019, 34(2):285-292.
- [16] WONG Y K, XU C, KALESH K A, et al. Artemisinin as an anticancer drug: recent advances in target profiling and mechanisms of action [J]. *Med Res Rev*, 2017, 37(6):1492-1517.
- [17] DU J H, ZHANG H D, MA Z J, et al. Artesunate induces oncosis-like cell death *in vitro* and has antitumor activity against pancreatic cancer xenografts *in vivo* [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 65(5):895-902.
- [18] EFFERTH T. Cancer combination therapy of the sesquiterpenoid artesunate and the selective EGFR-tyrosine kinase inhibitor erlotinib [J]. *Phytomedicine*, 2017, 37:58-61.
- [19] LI Y M, SU R B, XU S Q, et al. Artesunate prevents rats from the clozapine-induced hepatic steatosis and elevation in plasma triglycerides [J]. *Neuropsychiatr Dis Treat*, 2017, 13(1):2477-2487.
- [20] BRABLETZ T, KALLURI R, NIETO M A, et al. EMT in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(2):128-134.
- [21] GIANNELLI G, KOUDELKOVA P, DITURI F, et al. Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatol*, 2016, 65(4):798-808.
- [22] CHATTERJEE A, KOSMACEK E A, OBERLEY-DEEGAN R E, et al. MnTE-2-PyP treatment, or NOX4 inhibition, protects against radiation-induced damage in mouse primary prostate fibroblasts by inhibiting the TGF-beta 1 signaling pathway [J]. *Radiat Res*, 2017, 187(3):367-381.
- [23] SOGAWA C, EGUCHI T, OKUSHA Y, et al. A reporter system evaluates tumorigenesis, metastasis, β catenin/MMP regulation, and druggability [J]. *Tissue Eng Part A*, 2019, 25(19/20):1413-1425.

[责任编辑 王鑫]