

桦木酸通过调节PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导 人结肠癌细胞SW620凋亡及自噬

卓清缘, 陈美先, 王玲娜*

(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的:研究桦木酸对人结肠癌细胞SW620凋亡和自噬的影响及磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路在其中的调控作用。方法:采用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞活性,确定最佳给药时间及给药浓度,用于后续实验;设置空白组、桦木酸低、中、高浓度组。采用苏木素-伊红(HE)染色观察桦木酸对SW620细胞形态的影响。采用Annexin-V/碘化丙啶(PI)双染法检测SW620细胞凋亡率。分别采用Hoechst33258染色及细胞自噬染色(MDC)观察细胞凋亡和自噬体发生情况。采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-9(Caspase-9)、活化的胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、微管相关蛋白I轻链3Ⅱ(LC3Ⅱ)、自噬关键分子酵母Atg6同系物-1(Beclin-1)、p62、磷酸化(p)-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达。结果:桦木酸以浓度、时间依赖性的方式抑制SW620、HT29、HCT116细胞的活性;与桦木酸给药24 h比较,SW620、HT29、HCT116细胞给药48 h细胞活性明显降低($P<0.05$, $P<0.01$),给药48 h的半数抑制浓度(IC_{50})显著降低($P<0.01$),其中SW620细胞给药48 h的 IC_{50} 最小。HE染色、Hoechst33258染色显示,桦木酸组可见浓度依赖性细胞凋亡;MDC染色可见细胞自噬体数量增加。与空白组比较,桦木酸低、中、高浓度组细胞凋亡率显著升高($P<0.01$)。与空白组比较,桦木酸低、中、高浓度组Bax、Caspase-9、cleaved Caspase-3、LC3Ⅱ蛋白表达水平明显升高($P<0.05$, $P<0.01$),桦木酸中、高浓度组Beclin-1蛋白表达显著升高($P<0.01$);桦木酸低、中、高浓度组p62、p-Akt、p-PI3K、p-mTOR蛋白表达显著降低($P<0.01$)。结论:桦木酸对SW620细胞活性有明显的抑制作用,其作用机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路从而诱导人结肠癌细胞SW620的凋亡及自噬有关。

[关键词] 桦木酸; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路; 结肠癌细胞; SW620; 凋亡; 自噬

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R2-0;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)14-0099-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220921

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220222.1422.003.html>

[网络出版日期] 2022-02-22 15:16

Betulinic Acid Induces Autophagy and Apoptosis of Human Colorectal Cancer SW620 Cells by Regulating PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway

ZHUO Qingyuan, CHEN Meixian, WANG Lingli*

(School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of betulinic acid (BA) on apoptosis and autophagy of human colorectal cancer SW620 cells and the regulatory role of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway. **Method:** Cell viability was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetry to determine the optimal administration time and dosage for subsequent experiments. Four groups were designed, including blank group and low-, medium-, and high-dose BA groups. Hematoxylin-eosin (HE) staining was conducted for the observation of SW620 cell

[收稿日期] 2021-12-03

[基金项目] 东莞市社会发展科技项目(20211800905502)

[第一作者] 卓清缘, 硕士, 从事中成药二次开发与分子生物学研究, E-mail: 785329916@qq.com

[通信作者] * 王玲娜, 博士, 副研究员, 从事中药新药开发研究, E-mail: wlingli@gzucm.edu.cn

morphology, and annexin-V/propidium iodide double staining for the determination of apoptosis rate in SW620 cells. Hoechst33258 staining and MDC staining were used for the observation of apoptosis and autophagy, respectively. Western blotting was employed to determine the protein levels of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2)-associated X protein (Bax), aspartate proteolytic enzyme-9 (Caspase-9), activated aspartate proteolytic enzyme-3 (cleaved Caspase-3), microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), the mammalian homolog of yeast Atg6 (Beclin-1), p62, phosphorylated PI3K (p-PI3K), phosphorylated Akt (p-Akt), and phosphorylated mTOR (p-mTOR) in SW620 cells. **Result:** BA inhibited the activity of SW620, HT29, and HCT116 cells in a concentration- and time-dependent manner. The cells treated with BA for 48 h had lower viability than those treated for 24 h ($P<0.05$, $P<0.01$). The half maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of BA at the time point of 48 h was also lower than that at the time point of 24 h ($P<0.01$), and that for SW620 cells was the minimum. BA induced the apoptosis in a concentration-dependent manner and increased the autophagosomes. Compared with the blank group, BA increased the apoptosis rate ($P<0.01$), up-regulated the protein levels of Bax, Caspase-9, cleaved Caspase-3, and LC3 II ($P<0.05$, $P<0.01$), and down-regulated the protein levels of p62, p-Akt, p-PI3K, and p-mTOR ($P<0.01$). Additionally, medium- and high-dose BA up-regulated the protein level of beclin-1 ($P<0.01$). **Conclusion:** BA may inhibit the activity of SW620 cells by hindering the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway to induce cell apoptosis and autophagy.

[Keywords] betulinic acid (BA); phosphatidylinositol-3 kinase/ protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway; colorectal cancer cell; SW620; apoptosis; autophagy

恶性肿瘤(癌症)作为全球第二大死亡原因,严重威胁到人类的生命健康,癌症的病发人数和病死人数均呈逐年增加的趋势,且据世界卫生组织(WHO)估计,未来20年中,全球癌症患者可能会增加60%^[1]。结直肠癌是中国乃至全球常见的恶性肿瘤之一,其发病率和死亡率均逐年升高。药物治疗是结直肠癌的常用治疗方法,临床治疗常用氟尿嘧啶、卡培他滨、奥沙利铂、伊立替康等化疗药物^[2]。天然产物因其具有生物多样性、化学多样性及类药性成为新药研发的最大来源。桦木酸,别名白桦脂酸,是一种天然的羽扇豆烷型五环三萜,分子式 $C_{30}H_{48}O_3$,相对分子质量456.71,是一种气微、味苦的结晶性白色粉末,CAS登记号为472-15-1,最早发现于20世纪90年代生长在非洲东部的鼠李科常绿植物的树皮中。桦木酸可从多种中药如白桦树皮、蒲桃叶、酸枣仁中提取得到,不仅具有抗炎、抗氧化^[3]、免疫调节^[4]、抗菌等作用,还可通过促细胞凋亡、抑制细胞周期与增殖、迁移侵袭等发挥抗肿瘤作用^[5]。体外抗结肠癌活性研究中发现,SW620细胞对桦木酸敏感性优于HT29、HCT116细胞。桦木酸的抗结肠癌作用研究多数集中于HT29、HCT116^[6]等细胞,鲜有SW620细胞抗结肠癌报道。细胞凋亡、自噬是细胞程序性死亡的2条主要途径,存在复杂的交互关系,对肿瘤等疾病的认知与治疗有重要意义^[7]。本研究考察桦木酸对SW620细胞凋亡、自噬的影

响,探究其潜在的作用机制,以期桦木酸治疗结直肠癌提供参考数据,为桦木酸抗肿瘤新药研发提供一定的理论基础。

1 材料

1.1 细胞株 人结肠癌细胞SW620、HT29、HCT116,购于武汉普诺赛生命科技有限公司,货号分别为CL-0225、CL-0118、CL-0096,细胞均传至3代。

1.2 药品与试剂 桦木酸(上海源叶生物科技有限公司,批号J27GB152745,纯度 $\geq 98\%$),胎牛血清(德国PAN-Biotech GmbH公司,货号ST181208),Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)培养基、青霉素-链霉素溶液、0.25%胰酶(美国Gibco公司,批号分别为8120401、1953108、25200072),McCoy's 5A培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号WH01112107XP),噻唑蓝(MTT,德国Biofrox公司,批号EZ6789D144),二甲基亚砜(DMSO,美国MP公司,批号Y190601),Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双染检测试剂盒(上海贝博生物科技有限公司,货号BB21101),细胞自噬染色检测(MDC)试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号20210930),RIPA裂解液、SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶配置试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为052121210817、031720201116、

042521210826), β -肌动蛋白(β -actin)、微管相关蛋白 I 轻链 3(LC3)、自噬关键分子酵母 Atg6 同系物 1(Beclin-1)、SQSTM1/p62、蛋白激酶 B(Akt)、磷酸化(p)-Akt、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、p-PI3K、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、p-mTOR、B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关 X 蛋白(Bax)、胱天蛋白酶-9(Caspase-9)、活化的胱天蛋白酶-3(cleaved Caspase-3)、山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G(美国 Affinity 公司, 货号分别为 AF7018、AF4650、AF5128、AF5384、AF6259、AF0016、AF6241、AF3241、AF6308、AF3308、AF0120、AF6348、AF7022、S0001), ECL 化学发光液(美国 Affinity 公司, 批号 1927b02), TBS+Tween(TBST)缓冲液、5Tris-甘氨酸-SDS 电泳缓冲液、Hoechst33258 染色液(中国 Biosharp 公司, 批号分别为 21259419、21200398、BL804A), 快速转膜液(苏州新赛美生物科技有限公司, 批号 20210902), BCA 蛋白定量试剂盒、无蛋白快速封闭液、双色预染蛋白 Marker(15~150 kDa)(上海雅酶生物医药科技有限公司, 批号分别为 BB21091、03591285、02561410), 预染蛋白 Marker26619(美国 Thermo 公司, 批号 01068430), 苏木素-伊红(HE)染色液(中国武汉赛维尔公司, 货号 G1005)。

1.3 仪器 CelMate 型二氧化碳培养箱(通用型)、Class II BSC 型生物安全柜(新加坡 ESCO 公司)、Multiskan GO 型全波长酶标仪(美国 Thermo)、CytoFLEX S 型流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司)、BX53 型生物显微镜(日本 Olympus 公司)、WIX-EP300 型基础电泳仪电源、WIX-miniPRO4 型垂直电泳槽、WIX-miniBlot 型迷你转印槽[韦克斯科技(北京)有限公司]、Complex2000 型全自动化学发光成像系统(南京奥普欣生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将 SW620 细胞培养于含有 10% 胎牛血清及 1% 青霉素-链霉素溶液的完全培养基中, 放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中贴壁培养约 2 d 至细胞达到 80%~90%, 用 0.25% 胰酶消化收集细胞并进行传代, 传代比例 1:3~1:4。细胞传 2~3 代, 取处于对数生长期的细胞进行实验。

2.2 药物配置 精密称取桦木酸, 加入 DMSO 超声溶解, 配置成 10 mmol·L⁻¹ 的桦木酸母液, 分装后置于 -20 °C 冰箱避光保存。使用时, 取母液加入一定量的完全培养基稀释至给药浓度进行实验。

2.3 MTT 比色法观察细胞活性 取对数生长期的细胞进行实验。消化收集细胞, 调整细胞密度为每

1 mL 细胞液含有 3×10⁵ 个细胞。取一个 96 孔板, 在中间 60 孔内分别加入细胞悬液 100 μ L, 周围加一圈磷酸盐缓冲液(PBS)减少液体蒸发, 放入 CO₂ 培养箱培养。配置浓度分别为 150、100、75、50、25、12.5、6.25、3.13、0 μ mol·L⁻¹ 的桦木酸溶液。待细胞贴壁后每孔分别加入药物溶液 100 μ L, 每个浓度设置 6 个复孔。分别于给药 24、48 h 后进行 MTT 实验。培养完成后, 每孔加入 5 g·L⁻¹ MTT 溶液 20 μ L, 继续培养 4 h; 取出细胞, 移除上清液, 每孔加入 DMSO 溶液 150 μ L, 置于摇床避光振荡 10 min。采用酶标仪检测在 570 nm 下的吸光度 *A*, 计算细胞活力。实验重复 3 次。根据细胞活性结果, 确定实验细胞及最佳给药浓度、时间, 设空白组、桦木酸组(10、20、40 μ mol·L⁻¹) 进行后续实验。细胞活力 = $A_{\text{给药组}} / A_{\text{空白组}} \times 100\%$ 。

2.4 HE 染色检测桦木酸对 SW620 细胞形态 取对数生长期细胞进行实验。将洁净细胞爬片置于 6 孔板中, 并接种 SW620 细胞, 每孔接种约 1×10⁶ 细胞, 培养 24 h, 每孔分别换上浓度为 0、10、20、40 μ mol·L⁻¹ 的含药培养基, 培养 48 h。培养完成后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞约 30 min, PBS 清洗爬片后进行 HE 染色, 在显微镜下观察拍照。

2.5 Annexin-V/PI 检测细胞凋亡 取对数生长期细胞进行实验。细胞培养、给药及分组参考 2.3 项, 每个浓度设置 3 个复孔。细胞培养 48 h 后用不含 EDTA 的胰酶消化并收集细胞, 冷的 PBS 清洗细胞 2 次, 用 Annexin V 结合液重悬细胞, 调整细胞密度为每 1 mL 细胞液含有 1×10⁶ 个细胞。细胞筛网过滤细胞, Annexin V-FITC 染色液避光染色 15 min, PI 染色液避光染色 5 min, 所有操作均在冰上完成。染色完成后, 1 h 内完成流式上机检测。使用 Flowjo V10 分析细胞凋亡结果。

2.6 Hoechst33258 染色观察细胞核凋亡 取对数期细胞进行实验。将洁净的细胞爬片置于 12 孔板中并接种 SW620 细胞, 每孔接种约 1×10⁵ 个细胞, 分为 4 个浓度组, 每组设置 3 个复孔。培养 24 h, 每孔分别换上浓度为 0、10、20、40 μ mol·L⁻¹ 的含药培养基, 培养 48 h。培养完成后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞约 30 min, PBS 清洗 2 次, 每孔加入 Hoechst33258 染色液 100 μ L 室温避光染色 10~15 min, 去除染色液并用 PBS 清洗 2 次, 滴加含防荧光淬灭剂的封片液封片后, 在荧光显微镜下观察并拍照。

2.7 MDC 法观察细胞自噬情况 细胞爬片、分组及给药同 2.5 项。细胞加入药物培养 48 h, 去除培养

基,每孔加入可覆盖爬片表面的MDC染液,室温避光染色30~45 min,滴加含防荧光淬灭剂的封片液封片后,在荧光显微镜下观察并拍照。

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测细胞凋亡、自噬及通路相关蛋白表达 细胞给药培养48 h,胰酶消化细胞,4 °C离心收集细胞。加入裂解液裂解细胞并离心提取细胞总蛋白。采用BCA法进行蛋白定量。蛋白变性后取蛋白40 μg进行SDS-PAGE凝胶电泳,湿法转膜、封闭,4 °C冰箱过夜孵育一抗(β -actin 1:5 000,其余一抗 1:1 000),TBST清洗5次后常温孵育二抗(1:5 000)1 h, TBST清洗5次后用ECL化学发光液进行显色。使用Image J软件对蛋白条带进行分析,以 β -actin作为内参。

2.9 统计学处理 数据通过SPSS 24.0软件及GraphPad Prism 7.04进行分析,所有数据均以 $\bar{x} \pm s$,两组数据之间采用独立样本 t 检验,多组数据之间采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 桦木酸对SW620细胞活性的影响 桦木酸给药24、48 h均可抑制SW620、HT29、HCT116细胞活性,且抑制作用随浓度上升而增大。3.13~150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 桦木酸给药48 h,SW620细胞活性抑制作用较24 h显著降低($P < 0.01$);6.25~150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 桦木酸给药48 h,HT29、HCT116细胞活性抑制作用较24 h明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);表明桦木酸给药48 h对SW620、HT29、HCT116细胞活性抑制作用更强。采用GraphPad Prism 7.04拟合细胞存活率曲线,并计算半数抑制浓度(IC_{50})。与给药24 h比较,给药48 h的 IC_{50} 显著降低($P < 0.01$)。与SW620细胞 IC_{50} 比较,HT29细胞 IC_{50} 降低,但差异无统计学意义,与SW620细胞给药48 h IC_{50} 比较,HCT116细胞 IC_{50} 明显增大($P < 0.01$);SW620细胞对桦木酸表现出最佳敏感性,且随着浓度上升,活性被抑制得更为明显。因此以对桦木酸更敏感的SW620细胞作为实验细胞,设定给药时间48 h,设置空白组,以约1/4倍 IC_{50} 浓度作为低剂量组(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、约1/2倍 IC_{50} 浓度作为中剂量组(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、约1倍 IC_{50} 浓度作为高剂量组(40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行细胞凋亡和自噬的研究。见表1、表2。

3.2 桦木酸对SW620细胞形态的影响 HE染色可将活细胞核染成蓝紫色,细胞质染成淡红色,凋亡细胞则表现为核染色质致密浓缩、核碎裂等^[8]。显微镜下观察不同浓度的桦木酸处理SW620细胞

表1 桦木酸对SW620、HT29、HCT116细胞活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 1 Effect of betulinic acid on cell viability of SW620, HT29, HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

细胞	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活性/%	
		24 h	48 h
SW620细胞	3.13	98.63±0.85	91.60±1.40 ²⁾
	6.25	90.92±1.46	83.21±0.93 ²⁾
	12.5	80.77±1.48	73.02±1.49 ²⁾
	25	72.85±1.76	58.32±1.01 ²⁾
	50	61.63±1.03	41.51±1.66 ²⁾
	75	55.01±1.40	23.44±1.41 ²⁾
	100	47.42±1.34	12.76±0.91 ²⁾
HT29细胞	150	38.95±1.68	11.13±1.65 ²⁾
	3.13	96.47±1.01	94.53±1.26
	6.25	86.24±0.98	82.96±0.63 ¹⁾
	12.5	71.34±1.16	67.67±0.91 ^{1,4)}
	25	64.40±1.43	58.44±1.14 ²⁾
	50	51.48±0.86	44.47±1.05 ²⁾
	75	44.14±0.84	34.77±0.61 ^{2,4)}
HCT116细胞	100	34.18±0.93	26.81±1.27 ^{2,4)}
	150	34.18±0.93	17.51±0.64 ^{2),3)}
	3.13	94.00±0.34	92.41±0.93
	6.25	91.03±0.51	84.74±0.69 ²⁾
	12.5	85.53±0.85	80.53±0.84 ^{2,4)}
	25	75.63±1.49	70.39±0.52 ^{2),4)}
	50	62.58±0.89	58.92±0.74 ^{2,4)}
HCT116细胞	75	53.56±0.68	45.18±0.91 ^{2,4)}
	100	40.90±1.37	29.49±0.94 ^{2,4)}
	150	35.34±0.42	23.55±1.11 ^{2,4)}

注:与给药24 h比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与SW620细胞给药48 h比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$

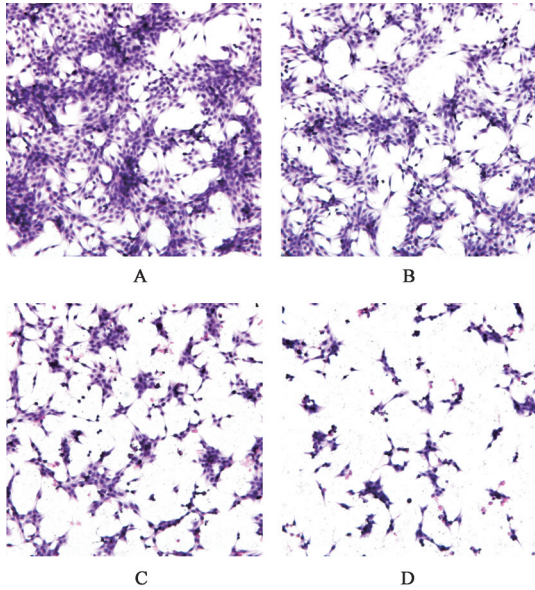
表2 桦木酸对SW620、HT29、HCT116细胞 IC_{50} 的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of betulinic acid on IC_{50} values of SW620, HT29, HCT116 cells at different times ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	$\text{IC}_{50}/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	
	24 h	48 h
SW620细胞	90.47±0.33	42.16±0.72 ¹⁾
HT29细胞	51.70±0.39	43.77±0.46 ¹⁾
HCT116细胞	85.45±0.82	59.04±0.84 ^{1,2)}

注:与24 h细胞 IC_{50} 比较¹⁾ $P < 0.01$;与SW620细胞给药48 h IC_{50} 比较²⁾ $P < 0.01$

48 h,与空白组比较,桦木酸组(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞数有明显减少,随着给药浓度上升,SW620细胞凋亡数量增加,凋亡的细胞变圆变小、细胞核固缩,呈蓝黑色,并出现少量细胞坏死,表现为均质红染、无细胞核结构。见图1。



注: A. 空白组; B~ D. 桦木酸组(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图2~6同)

图1 桦木酸对SW620细胞形态的影响(HE, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of betulinic acid on SW620 cell morphology (HE, $\times 200$)

3.3 桦木酸对SW620细胞凋亡的影响 与空白组比较,桦木酸组(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞的早期、晚期凋亡率及总的细胞凋亡率均显著上升($P < 0.01$),并具有明显的浓度依赖性。见表3。

表3 桦木酸对SW620细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of betulinic acid on SW620 cell apoptosis rate ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
空白组		0.99 \pm 0.07	2.37 \pm 0.59	3.36 \pm 0.60
桦木酸组	10	9.56 \pm 0.86 ¹⁾	4.61 \pm 0.83 ¹⁾	14.17 \pm 1.55 ¹⁾
	20	12.23 \pm 1.03 ¹⁾	5.59 \pm 1.32 ¹⁾	17.82 \pm 2.03 ¹⁾
	40	20.60 \pm 1.70 ¹⁾	7.57 \pm 1.97 ¹⁾	28.17 \pm 2.88 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$

3.4 桦木酸对SW620细胞凋亡的影响 桦木酸处理SW620细胞48 h,给药组在荧光显微镜下可以观察到明显的细胞凋亡增加情况。活细胞细胞核呈弥散均匀的蓝色荧光,凋亡细胞核可见致密浓染的颗粒块状亮蓝色荧光。与空白组比较,桦木酸组(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)亮蓝色荧光均有增加,SW620

细胞的凋亡数量增加,表明桦木酸处理后细胞凋亡呈浓度依赖性趋势。见图2。

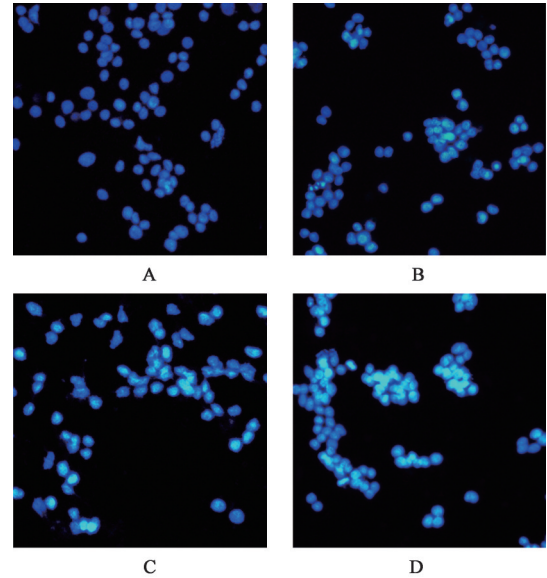


图2 桦木酸对SW620细胞凋亡的影响(Hoechst33258染色, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of betulinic acid on SW620 cell apoptosis (Hoechst33258 staining, $\times 200$)

3.5 桦木酸对SW620细胞自噬的影响 桦木酸处理SW620细胞48 h,在荧光显微镜下可以观察到细胞自噬体的生成情况。荧光显微镜下,可观察到自噬体被MDC染成绿色荧光。与空白组、桦木酸组(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)比较,桦木酸组(20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞自噬体数量有明显的增加,表明SW620细胞自噬增加。见图3。

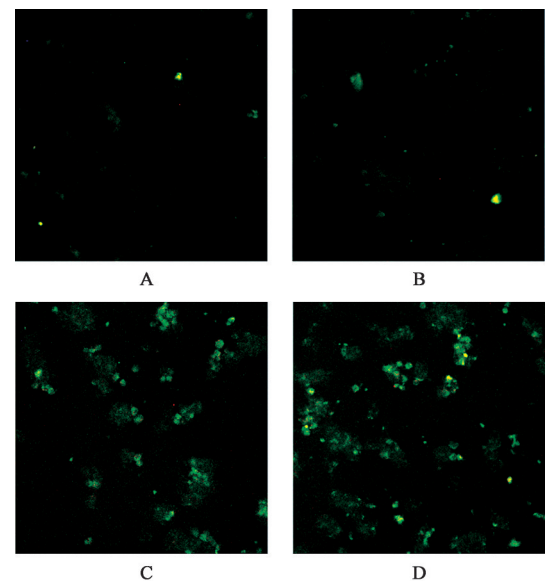


图3 桦木酸对SW620细胞自噬体的影响(MDC, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of betulinic acid on autophagosome of SW620 cells (MDC, $\times 200$)

3.6 桦木酸对SW620细胞凋亡、自噬、PI3K/Akt/mTOR信号通路蛋白表达的影响 与空白组比较,桦木酸组(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Bax、Caspase-9、cleaved Caspase-3蛋白表达水平升高($P<0.01$),且呈现较好的浓度依赖性;表明随着桦木酸浓度增加,细胞凋亡水平上升。与空白组比较,桦木酸组(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) LC3 II蛋白表达水平显著性增加($P<0.01$),桦木酸组(20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) Beclin-1蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$), p62蛋白表达降低($P<0.01$),均呈现浓度依赖性升高/降低;表明随着桦木酸浓度增加,细胞自噬水平上升。与空白组比较,桦木酸组(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) p-Akt、p-PI3K、p-mTOR蛋白表达水平降低($P<0.01$),表现为浓度依赖性减少;表明随着桦木酸浓度增加,PI3K/Akt/mTOR的表达被抑制。表明桦木酸可能通过抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路从而上调Bax、Caspase-9、cleaved Caspase-3、LC3 II、Beclin-1蛋白表达,下调p62、p-Akt、p-PI3K、p-mTOR蛋白表达,从而上调细胞凋亡与自噬。见图4-图6、表4。

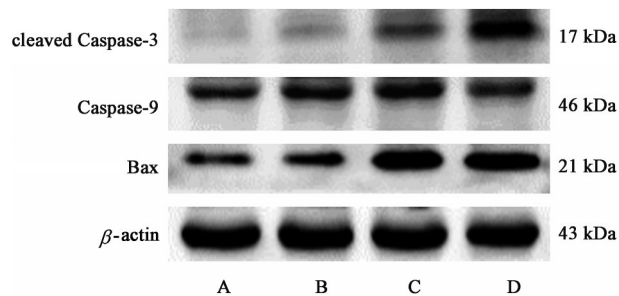


图4 桦木酸作用SW620细胞Bax、Caspase-9、cleaved Caspase-3蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of betulinic acid on relative protein expression of Bax, Caspase-9, cleaved Caspase-3 in SW620 cells

4 讨论

研究表明,桦木酸的抗肿瘤作用具有较高选择性,对正常细胞增殖抑制作用极低^[9],为其作为抗肿瘤

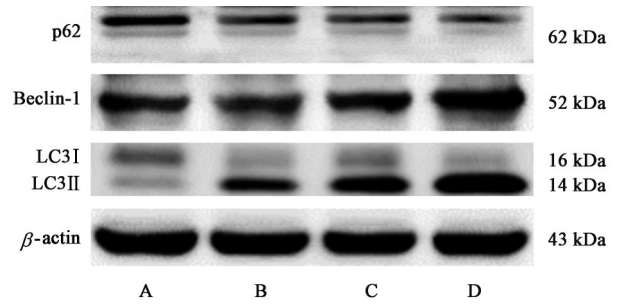


图5 桦木酸作用SW620细胞LC3 II /LC3 I、Beclin-1、p62蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of betulinic acid on relative protein expression of LC3 II /LC3 I, Beclin-1, p62 in SW620 cells

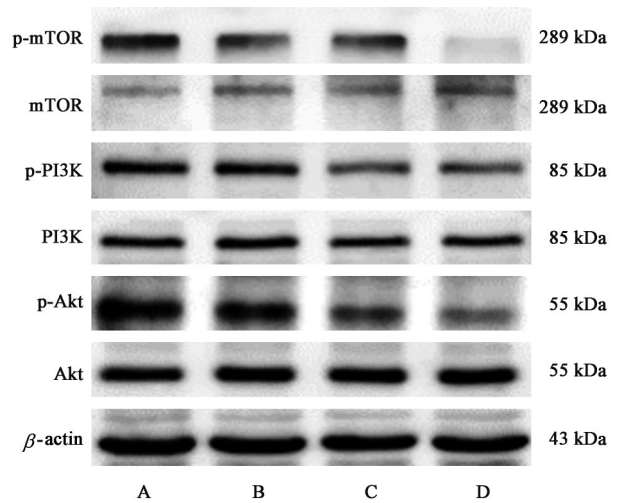


图6 桦木酸作用SW620细胞p-mTOR、p-Akt、p-PI3K蛋白相对表达量的影响

Fig. 6 Electrophoresis of betulinic acid on relative protein expression of p-mTOR, p-Akt, p-PI3K in SW620 cells

新药开发奠定良好基础。以往研究表明,桦木酸可通过多种机制发挥抗结肠癌作用,如通过调节TGF- β /Smad信号通路抑制HCT116细胞生长和转移^[10],通过抑制硬脂酰辅酶 α -去饱和酶(SCD-1)直接诱导肿瘤干细胞死亡^[11],通过下调Bcl-2、上调Bax表达水平诱导肿瘤细胞凋亡^[12-13],通过诱导SW480和RKO细胞中Sp1、Sp3和Sp4的蛋白酶体

表4 桦木酸对Bax、Caspase-9、cleaved Caspase-3、LC3 II /LC3 I、Beclin-1、p62、p-Akt、p-mTOR、p-PI3K蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of betulinic acid on relative protein expression of Bax, Caspase-9, cleaved Caspase-3, LC3 II /LC3 I, Beclin-1, p62, p-Akt, p-mTOR, p-PI3K in SW620 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bax/ β -actin	Caspase-9/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin	LC3 II /LC3 I	Beclin-1/ β -actin	p62/ β -actin	p-mTOR /mTOR	p-Akt /Akt	p-PI3K /PI3K
空白组		0.54 \pm 0.01	0.79 \pm 0.01	0.22 \pm 0.01	0.28 \pm 0.02	1.05 \pm 0.07	1.10 \pm 0.03	1.96 \pm 0.04	2.09 \pm 0.05	1.08 \pm 0.04
桦木酸组	10	0.58 \pm 0.01 ¹⁾	0.96 \pm 0.01 ²⁾	0.32 \pm 0.01 ¹⁾	1.20 \pm 0.06 ²⁾	1.12 \pm 0.01	0.87 \pm 0.01 ²⁾	1.15 \pm 0.06 ²⁾	0.85 \pm 0.05 ²⁾	0.92 \pm 0.02 ²⁾
	20	0.98 \pm 0.01 ²⁾	1.06 \pm 0.06 ²⁾	0.65 \pm 0.01 ²⁾	1.18 \pm 0.03 ²⁾	1.28 \pm 0.06 ²⁾	0.82 \pm 0.01 ²⁾	1.11 \pm 0.05 ²⁾	0.66 \pm 0.02 ²⁾	0.75 \pm 0.02 ²⁾
	40	1.10 \pm 0.02 ²⁾	0.97 \pm 0.01 ²⁾	1.05 \pm 0.06 ²⁾	2.06 \pm 0.07 ²⁾	1.65 \pm 0.04 ²⁾	0.66 \pm 0.01 ²⁾	0.16 \pm 0.01 ²⁾	0.52 \pm 0.03 ²⁾	0.74 \pm 0.01 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P<0.05, ^2)$ $P<0.01$

依赖性和蛋白酶体非依赖性,下调抑制细胞生长并诱导细胞凋亡^[14]。

细胞凋亡与自噬是细胞程序性死亡的两种重要表现形式^[15],在肿瘤的发生发展及治疗过程中有重要作用。同时,细胞凋亡与自噬存在一定的交互作用,二者可通过独立或互补的关系促进细胞死亡^[7]。Caspase蛋白是一组存在于细胞质中结构相似的胱天蛋白酶,与细胞凋亡关系密切。Bcl-2蛋白家族中包含如Bax的促凋亡蛋白及如Bcl-2的抑凋亡蛋白^[15];Caspase蛋白家族中,Caspase-1亚族(1、4、5等)与Caspase-2亚族(2、9)主要负责或激活细胞凋亡,Caspase-3亚族(3、6、7等)主要负责执行细胞凋亡^[16]。Bax蛋白表达增加会破坏线粒体膜完整性从而促进细胞色素C释放,进一步诱导Caspase-9活化并有效切割及激活下游Caspase-3,最终促进细胞凋亡。本研究发现,随着给药浓度的增加,SW620细胞的凋亡率增加,Bax、Caspase-9及cleaved Caspase-3蛋白均有显著性、浓度依赖性增加。这些结果表明,桦木酸具有较好的促进结肠癌细胞凋亡的作用,作用效果随给药浓度增加而加强。LC3蛋白是自噬标志物之一^[17]。当自噬发生时,胞浆型LC3(LC3 I)转变为(自噬体)膜型(LC3 II),通过评价LC3 II/LC3 I的大小可估计自噬发生水平的高低,LC3 II表达增加说明自噬表达水平上调,反之则下调。Beclin-1及p62同样是自噬的重要标志物,Beclin-1蛋白表达水平与自噬成正相关,p62蛋白与自噬成负相关^[18],二者也可以明显反映细胞自噬的发生水平。在本研究中,随着桦木酸浓度的增加,桦木酸组(10、20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)LC3 II/LC3 I、桦木酸组(20、40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)Beclin-1水平均显著性增加,p62蛋白表达水平显著性减少。这些结果均表明,桦木酸具有较好的诱导细胞自噬发生的作用,作用效果随给药浓度增加而加强。

当PI3K与生长因子受体(如EGFR)结合,可改变下游Akt结构并使其活化,对下游一系列底物如凋亡相关蛋白Caspase-9活性产生影响,从而调节细胞的增殖、凋亡、自噬等。mTOR是PI3K/Akt的下游调节因子,能够调节多项生命活动,对细胞凋亡、自噬的发生也有重要的调节作用,mTOR对自噬起负反馈调节,对凋亡的作用则具有两重性^[19-20],在本研究中,mTOR对细胞凋亡表现出负反馈调节。PI3K/Akt/mTOR作为经典的肿瘤信号通路之一,已被证实可同时对细胞凋亡与自噬产生调节作用从而发挥抗肿瘤作用^[21]。本研究发现,桦木酸在上调

SW620细胞凋亡及自噬表达水平的同时,显著下调p-Akt、p-PI3K、p-mTOR蛋白的表达水平。桦木酸诱导SW620细胞凋亡及自噬,二者同时起到促进细胞死亡的作用,可能与桦木酸抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路的表达有关。

细胞的凋亡与自噬还受其他交互通路如Wnt/ β -catenin、MAPK/JNK^[7]及多种调节分子如微RNA^[22]、长链非编码RNAs^[23]调控。本研究探讨了SW620细胞凋亡、自噬与PI3K/Akt/mTOR之间可能存在的联系,细胞凋亡与自噬之间具体深入的交互作用及其他调控通路或分子需要后续实验如使用自噬抑制剂、使用基因敲除技术等进一步验证。肿瘤的发生发展不仅与肿瘤细胞本身有关,还与肿瘤微环境TME密切相关,TME由异常的肿瘤血管、细胞外基质组分、内皮细胞、周细胞、肿瘤相关成纤维细胞、平滑肌细胞和免疫细胞组成^[24],在肿瘤的生长和转移中起到十分重要的作用,在研究药物对肿瘤细胞作用的同时,也要关注药物对TME的影响作用,如考察药物对肿瘤细胞转移侵袭、血管生成等的影响,以更好把握药物对肿瘤的作用机制,为进一步临床研究奠定基础。

桦木酸对黑色素瘤、乳腺癌、结肠癌等多种癌症都有较好的效果,但因其存在水溶性差、体内生物利用度低的问题而限制了临床应用,而随着纳米技术在化疗药物研发过程中的应用,桦木酸及其衍生物纳米制剂的应用使其溶解度和体内生物利用度都大大改善,且有望实现其在体内的靶向释放^[25];桦木酸与其他药物联合使用可以起更好的治疗效果,如桦木酸与吉非替尼联合使用可高胰腺癌细胞Panc-1、Miapaca-2对吉非替尼的敏感性^[26],桦木酸纳米混悬剂与紫杉醇联合使用可以起到对乳腺癌增效减毒的作用^[27],为桦木酸的临床使用奠定较好基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 邹小农,贾漫漫,王鑫,等.《2020全球癌症报告》要点解读[J].中国胸心血管外科临床杂志,2021,28(1):11-18.
- [2] 杨国红.伊立替康联合替吉奥治疗转移性结肠癌的疗效分析[J].实用中西医结合临床,2018,18(10):46-48.
- [3] EKUADZI E, BINEY R P, BENNEH C K, et al. Antiinflammatory properties of betulinic acid and xylopic acid in the carrageenan-induced pleurisy model

- of lung inflammation in mice [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(3): 480-487.
- [4] 易想炼. 基于MAPK/Nrf2-HO-1信号通路探究桦木酸对T-2毒素致小鼠免疫器官氧化损伤的保护作用及其分子机制[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2019.
- [5] 王雪振, 牟悦, 郝倩, 等. 桦木酸抗肿瘤作用及机制的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(21): 223-231.
- [6] WANG S, WANG K, ZHANG C, et al. Overaccumulation of p53-mediated autophagy protects against betulinic acid-induced apoptotic cell death in colorectal cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(10): e3087.
- [7] 齐鑫鑫, 刘涛. 细胞自噬与细胞凋亡及其交互作用在肝癌治疗中的研究进展[J]. *医学综述*, 2020, 26(20): 4038-4042.
- [8] 魏文科. 介绍一种观察凋亡细胞形态学特征的染色方法-苏木素-伊红染色法(HE染色法)[J]. *生物学通报*, 2003, 38(5): 49-50.
- [9] ZUCO V, SUPINO R, RIGHETTI S C, et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 175(1): 17-25.
- [10] 林晓英, 沈阿灵, 吴美珠, 等. 桦木酸通过调节TGF- β -Smad信号通路抑制结肠癌细胞转移的研究[J]. *康复学报*, 2020, 30(1): 58-63.
- [11] POTZE L, DI FRANCO S, KESSLER J H, et al. Betulinic acid kills colon cancer stem cells [J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2016, 11(5): 427-433.
- [12] RZESKI W, STEPULAK A, SZYMAŃSKI M, et al. Betulinic acid decreases expression of Bcl-2 and Cyclin D₁, inhibits proliferation, migration and induces apoptosis in cancer cells [J]. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2006, 374(1): 11-20.
- [13] ZENG A, HUA H, LIU L, et al. Betulinic acid induces apoptosis and inhibits metastasis of human colorectal cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Bioorg Med Chem*, 2019, 27(12): 2546-2552.
- [14] CHINTHARLAPALLI S, PAPINENI S, LEI P, et al. Betulinic acid inhibits colon cancer cell and tumor growth and induces proteasome-dependent and -independent downregulation of specificity proteins (Sp) transcription factors [J]. *BMC Cancer*, 2011, 11: 371-382.
- [15] 卢丹, 彭小兰, 熊珊, 等. 高良姜素促进胰腺癌PCNA-1细胞凋亡和自噬并抑制移植瘤生长[J]. *广州中医药大学学报*, 2021, 38(9): 1963-1971.
- [16] 王娟娟, 王苏美, 吴万垠, 等. 山柰酚调控Akt/Bcl-2/Caspase通路促进非小细胞肺癌细胞发生凋亡[J]. *中药材*, 2021, 44(8): 1959-1960.
- [17] TANIDA I, UENO T, KOMINAMI E. LC3 and autophagy [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 445: 77-88.
- [18] SONG X, LEE D, DILLY A, et al. Crosstalk between apoptosis and autophagy is regulated by the arginylated BIP/Beclin-1/p62 complex [J]. *Mol Cancer Res*, 2018, 16(7): 1077-1091.
- [19] 丁亦含, 李玉峰. mTOR信号通路与自噬、凋亡之间的相互关系[J]. *现代医学*, 2015, 43(6): 801-804.
- [20] LI F, ZHAN Z, QIAN J, et al. Naringin attenuates rat myocardial ischemia/reperfusion injury via PI3K/Akt pathway-mediated inhibition of apoptosis, oxidative stress and autophagy [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(2): 811-818.
- [21] XU Z, HAN X, OU D, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2020, 104(2): 575-587.
- [22] 陈宣辛. microRNA-637靶向NUPR1调控多发性骨髓瘤细胞增殖、凋亡与自噬的作用及机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2021.
- [23] 李铮铮, 刘雪峰. 长链非编码RNAs在肿瘤细胞死亡中的作用[J]. *中国科学: 生命科学*, 2021, 51(12): 1701-1709.
- [24] 周雄, 杨明, 李翔, 等. 中药单体成分调节肿瘤微环境的研究进展[J]. *中草药*, 2021, 52(14): 4398-4409.
- [25] 余洋. 桦木酸靶向脂质体的制备及其抗结肠癌作用机制的研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2020.
- [26] 吴海霞, 艾克白尔·买买提, 王帅, 等. 桦木酸通过抑制STAT3的活化提高胰腺癌细胞对吉非替尼的敏感性[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(9): 948-954.
- [27] 王鑫. 不同粒径白桦脂酸纳米混悬剂体内行为及协同抗乳腺癌活性评价[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.

[责任编辑 张丰丰]