

· 药理 ·

参白解毒方通过调控PTEN/PI3K/Akt信号通路 抑制结直肠癌细胞增殖

刘见荣^{1,2}, 黄敏¹, 范旻旻^{1,3*}, 程海波^{1,3}, 沈卫星^{1,3}, 肖君⁴, 徐长亮^{1,3},
谭佳妮^{1,3}, 赖岳阳^{1,3}, 余成涛^{1,3}, 孙东东^{1,3}, 李柳^{1,3}

(1. 南京中医药大学第一临床医学院, 南京 210023;

2. 南京市中医院, 南京 210012;

3. 江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023;

4. 南京中医药大学附属医院江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:研究参白解毒方基于磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路抑制结直肠癌细胞HCT116增殖的作用机制。方法:采用水提醇沉法提取参白解毒方有效部位进行冻干粉制备;体外培养HCT116细胞,用参白解毒方(2、4、8、16 g·L⁻¹)对HCT116细胞进行处理,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测参白解毒方对HCT116细胞增殖的抑制作用;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测细胞PTEN、PI3K、Akt、糖原合成酶激酶-3β(GSK-3β)、c-核蛋白类基因(c-Myc)、生存素(Survivin)和细胞周期蛋白D₁(CyclinD₁) mRNA表达水平;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测PTEN、磷酸化磷酸酶及张力蛋白同源物(p-PTEN)、PI3K、Akt、磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)、GSK-3β、磷酸化糖原合成酶激酶-3(p-GSK-3β)、c-Myc、Survivin、CyclinD₁的蛋白表达水平;免疫荧光检测β-连环蛋白(β-catenin)入核情况。结果:与空白组比较,参白解毒方各质量浓度均可以显著抑制HCT116细胞的增殖(P<0.01),且具有浓度依赖性。与空白组比较,参白解毒方处理细胞后PTEN、GSK-3β mRNA表达水平均上调,PI3K、Akt、c-Myc、Survivin、CyclinD₁ mRNA表达水平均下调(P<0.01);细胞PTEN、p-PTEN和GSK-3β蛋白表达水平上调,PI3K、Akt、p-Akt、GSK-3β、p-GSK-3β、c-Myc、Survivin、CyclinD₁蛋白表达水平均下调(P<0.05, P<0.01)。免疫荧光结果显示参白解毒方可以抑制结直肠癌细胞HCT116中β-catenin的入核。结论:参白解毒方可以抑制结直肠癌细胞HCT116的增殖,其作用机制可能是通过调节PTEN/PI3K/Akt信号通路。

[关键词] 参白解毒方; 结直肠癌; 细胞增殖; 磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)/磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(PKB/Akt)信号通路; β-连环蛋白(β-catenin)入核

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)14-0036-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220721

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220129.1446.010.html>

[网络出版日期] 2022-01-29 17:08

Shenbai Jiedu Prescription Inhibits Proliferation of Colorectal Cancer Cells by Regulating PTEN/PI3K/Akt Signaling Pathway

LIU Jianrong^{1,2}, HUANG Min¹, FAN Minmin^{1,3*}, CHENG Haibo^{1,3}, SHEN Weixing^{1,3}, XIAO Jun⁴,
XU Changliang^{1,3}, TAN Jiani^{1,3}, LAI Yueyang^{1,3}, YU Chengtao^{1,3}, SUN Dongdong^{1,3}, LI Liu^{1,3}

(1. *The First School of Clinical Medical, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023,*

China; 2. Nanjing Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanjing 210012, China;

3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of TCM Prevention and Treatment of Tumor, Nanjing 210023,

China; 4. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Province Hospital of

[收稿日期] 2021-10-20

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81930117);江苏高校优势学科建设工程项目(PAPD)

[第一作者] 刘见荣,博士,主治中医师,从事中医肿瘤临床及研究,E-mail: liujianrong-zz@163.com

[通信作者] * 范旻旻,博士,讲师,从事中医药防治肿瘤研究,E-mail: fanminmin825@163.com

(China Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] Objective: To study the mechanism of Shenbai Jiedu prescription inhibiting the proliferation of HCT116 colorectal cancer (CRC) cells by regulating the phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/ protein kinase B (Akt) signaling pathway. **Method:** Shenbai Jiedu prescription was extracted by water extraction and alcohol precipitation to prepare freeze-dried powder. HCT116 cells were cultured *in vitro*, and treated with different concentrations of Shenbai Jiedu prescription (2, 4, 8, 16 g·L⁻¹). The inhibitory effect of Shenbai Jiedu prescription on the proliferation of HCT116 cells was tested by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT). Real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA expression levels of PTEN, PI3K, Akt, glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), c-Myc, survivin and Cyclin D₁. Western blot was employed to measure the protein expression levels of PTEN, phosphorylated PTEN (p-PTEN), PI3K, Akt, phosphorylated Akt (p-Akt), GSK-3 β , phosphorylated GSK-3 β (p-GSK-3 β), c-Myc, survivin and Cyclin D₁. β -catenin nuclear import was explored by immunofluorescence assay. **Result:** Compared with the control group, Shenbai Jiedu prescription inhibited the proliferation of HCT116 cells in a dose-dependent manner ($P < 0.01$). Compared with the control group, the mRNA expression levels of PTEN and GSK-3 β were up-regulated whereas those of PI3K, Akt, c-Myc, survivin and CyclinD₁ were down-regulated after treatment with Shenbai Jiedu prescription ($P < 0.01$). The protein expression levels of PTEN, p-PTEN and GSK-3 β were up-regulated whereas those of PI3K, Akt, p-Akt, GSK-3 β , p-GSK-3 β , c-Myc, survivin and CyclinD₁ were down-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Immunofluorescence assay showed that Shenbai Jiedu prescription suppressed β -catenin nuclear import in HCT116 cells. **Conclusion:** Shenbai Jiedu prescription inhibited the proliferation of HCT116 cells via the mechanism of regulating the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway.

[Keywords] Shenbai Jiedu prescription; colorectal cancer; cell proliferation; phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN)/phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway; β -catenin nuclear import

结直肠癌(CRC)是一种发病率和致死率都极高的消化道恶性肿瘤,是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,据国际癌症研究机构发布的2020年全球癌症发病率和死亡率估计数据显示,其发病率位列全球第三,死亡率位列全球第二^[1]。结直肠癌发病隐匿,早期无明显临床表现,目前临床上针对结直肠癌的治疗药物仍十分有限,需要寻找结直肠癌的新型治疗药物及靶标。磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路与多种肿瘤的发生发展密切相关^[2]。活化的PI3K产生第二信使3,4,5-三磷酸磷脂肌醇(PIP3),后者通过一系列信号级联反应导致Akt的活化^[3]。Akt活化后可通过磷酸化作用抑制或激活其下游一系列底物,进一步调节细胞的分化、增殖、迁移以及凋亡等^[4]。糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)是PI3K/Akt信号通路的下游基因,PI3K/Akt通路的激活可以抑制GSK-3 β 的活性^[5],而GSK-3 β 的失活可导致细胞核内 β -连环蛋白(β -catenin)的累积^[6],后者引起一系列靶分子表达

异常,促进结直肠癌的恶性进展^[7]。磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)是一种10号染色体缺失的抑癌基因,可以通过催化PIP3的3位脱磷酸下调PIP3的水平,从而拮抗PI3K的作用^[8]。PTEN/PI3K/Akt信号通路在肿瘤的发生及进展过程中发挥着重要的作用,可引起结直肠癌等多种肿瘤细胞的增殖、凋亡及侵袭的异常^[9-11]。研究发现通过调控PTEN/PI3K/Akt信号通路可以调节结肠癌细胞的增殖和凋亡^[12]。

中药是结直肠癌综合治疗的重要组成部分,其疗效已得到广泛认可,从中医药中寻找治疗结直肠癌变方法是值得探索的一条路径。国医大师周仲瑛认为痰瘀郁毒是肿瘤的核心病机,并根据多年临床经验提出“癌毒”学说。本团队在传承国医大师周仲瑛教授“癌毒”学说的基础之上创建了癌毒病机理论体系^[13],参白解毒方是岐黄学者程海波教授基于癌毒病机理论指导下研制的临床经验方,主要由白花蛇舌草、苦参、党参、黄连、乌梅等药物组成。

本课题组前期研究发现其具有良好抗结直肠癌活性^[14],但其作用机制仍需进一步探究,因此本研究通过对结直肠癌细胞HCT116进行体外实验,检测其对于HCT116细胞生长的抑制作用,并应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)等检测参白解毒方对PTEN/PI3K/Akt信号通路的调控作用,从分子水平阐明其作用机制。

1 材料

1.1 细胞 人结直肠癌细胞株HCT116,购自中国科学院细胞库,编号TCHu 99,传至10~15代。

1.2 药品与试剂 参白解毒方由白花蛇舌草、苦参、党参、黄连等药物组成,药材购于苏州市天灵中药饮片有限公司(批号分别为CC03701、CG00901、CG00301、CG04601等),经南京中医药大学邹立思教授鉴定均为正品;噻唑蓝(MTT,美国Sigma-Aldrich公司,批号M5655),胎牛血清(美国Gibco公司,批号10099-141C),RPMI 1640培养基(上海源培生物科技有限公司,批号D120705),RNAiso Plus[宝日医生物生物技术(北京)有限公司,批号9108],HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、Cham Universal SYBR PCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为R211-01、Q711),BCA蛋白定量试剂盒、Alexa Fluor 594山羊抗小鼠荧光二抗(Thermo Scientific™公司,批号分别为23227、A11005),Western及IP细胞裂解液、DAPI(碧云天生物技术公司,批号分别为P0013、C1002),PTEN单抗、磷酸化(p)-PTEN单抗、PI3K单抗、Akt单抗、p-Akt单抗、c-核蛋白类基因(c-Myc)单抗、20× LumiGLO® Reagent and 20× Peroxide(美国CST公司,批号分别为9559、9554、4249、9272、4060、5605、7003),GSK-3β、p-GSK-3β、β-catenin、生存素(Survivin)单抗(美国Santa Cruz公司,批号分别为sc-377213、sc-373800、sc-7963、sc-17779),细胞周期蛋白D₁(CyclinD₁)单抗(英国Abcam公司,批号ab134175),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单抗(Abmart公司,批号M20006F)。

1.3 仪器 Airstream垂直流超净工作台(新加坡Esco科技有限公司),NANODROP 2000型分光光度仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),SPARK 10M型多功能酶标系统(瑞士Tecan公司),供应AB/Life梯度PCR仪Veriti™ 96孔、StepOnePlus型Real-time PCR仪(美国ABI公司),TS100-F型倒置成像显微镜[Zealway致微(厦门)仪器有限公司],

ECLIPSE Ti-S型倒置荧光显微镜(德国Leica公司),PowerPac HC恒定恒流电泳仪、转膜仪(美国Bio-Rad公司),Tanon 5500型凝胶图像分析系统[上海天能(Tanon)科技有限公司]。

2 方法

2.1 细胞培养 HCT116细胞使用含有青霉素-链霉素及10%胎牛血清的RPMI 1640培养基,在37℃和5% CO₂条件下培养。

2.2 参白解毒方冻干粉的制作 取参白解毒方饮片加10倍量水于室温下浸泡1 h,煎煮2 h,纱布过滤收集滤液;药渣用8倍量水继续煎煮1.5 h,过滤后合并2次滤液,回收溶剂、减压浓缩使其溶度达到2 g·mL⁻¹。药液冷却后,边搅拌边缓慢加入乙醇至含醇量80%后密闭冷藏24~48 h。取出含乙醇的水提液,过滤后旋转蒸馏去除乙醇,-80℃冻存24 h,于放冻干机中冻干7~10 d,得到参白解毒方冻干粉。使用时称量所需量的冻干粉溶于细胞培养基中,并用孔径为0.22 μm的滤膜过滤,细胞实验给药浓度按生药量计算。

2.3 MTT比色法检测HCT116细胞增殖能力 取对数生长期的HCT116细胞以3×10³个/孔的密度种至96孔板,每孔100 μL,贴壁过夜。随后加入含不同浓度参白解毒方的培养基100 μL,使参白解毒方生药终质量浓度依次为0、2、4、8、16、32 g·L⁻¹,于37℃培养箱中继续培养72 h;或用8 g·L⁻¹参白解毒方处理HCT116细胞24~72 h。每组各3个复孔,药物处理结束后加入4 g·L⁻¹ MTT溶液20 μL,继续培养4 h;弃去上清,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)200 μL。将孔板置于平板振荡器上振荡10 min,用酶标仪在570 nm吸收波长检测吸光度A。通过阴性空白组计算每组细胞的存活率。

2.4 Real-time PCR检测细胞PTEN/PI3K/Akt通路相关分子mRNA表达 取对数生长期的HCT116细胞种至6孔板,贴壁过夜,随后加入含参白解毒方的培养基,使参白解毒方的终质量浓度依次为0、4、8 g·L⁻¹,于37℃培养箱中培养48 h;弃去上清,PBS洗涤后加入RNAiso Plus 1 mL提取RNA,使用HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit将提取的RNA反转录得到cDNA,反应条件:25℃,5 min,50℃,15 min,85℃,2 min。随后使用Cham Universal SYBR PCR Master Mix进行PCR,反应条件:95℃预变性3 min,95℃变性10 s,60℃退火30 s,40个循环;在60℃时,设定荧光检测点,分别读取C_t。溶解曲线条件:95℃、15 s,60℃、60 s,

95 °C, 15 s。计算 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 进行统计分析。引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成, 见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
PTEN	上游 TTTGAAGACCATAACCCACCAC	134
	下游 ATTACACCAGTTCGTCCTTTC	
PI3K	上游 CCACGACCATCATCAGGTGAA	112
	下游 CCTCACGGAGGCATTCTAAAGT	
Akt	上游 AGCGACGTGGCTATTGTGAAG	96
	下游 GCCATCATTCTTGAGGAGGAAGT	
GSK-3 β	上游 AGACGCTCCCTGTGATTTATGT	89
	下游 CCGATGGCAGATTCCAAAGG	
Survivin	上游 AGGACCACGCATCTCTACAT	118
	下游 AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG	
CyclinD ₁	上游 CAATGACCCCGCACGATTTC	146
	下游 CATGGAGGGCGGATTGGAA	
c-Myc	上游 GTCAAGAGGCGAACACACAAC	162
	下游 TTGGACGGACAGGATGTATGC	
GAPDH	上游 GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	197
	下游 GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG	

2.5 Western blot检测细胞PTEN/PI3K/Akt通路相关分子蛋白表达 样品制备: 将HCT116细胞接种至6孔板, 加入含参白解毒方的培养基, 使参白解毒方的终质量浓度依次为0、1、2、4、8 g·L⁻¹, 于37 °C培养箱中培养48 h。收集细胞至1.5 mL离心管中, PBS洗涤细胞3遍后加入适量体积的Western及IP细胞裂解液, 涡旋混匀, 置于冰上裂解30 min。得到的上清即为蛋白样品。用BCA蛋白定量试剂盒对蛋白样品进行定量并计算浓度, 每个蛋白样品取30 μ g, 加入6 \times loading buffer, 沸水浴5 min。电泳: 将凝胶SDS聚丙烯酰胺凝胶置于电泳槽内, 加入电泳缓冲液, 上样后在恒压状态下电泳, 浓缩胶内电压60 V, 分离胶时内120 V。转膜: 预冷转膜缓冲液, 用湿转法将胶上的蛋白转至PVDF膜, 350 mA恒流1.5 h。封闭及抗体孵育: 转膜结束后, 把PVDF膜放入5%的脱脂奶粉中室温封闭1 h; 加入一抗(1:1 000), 4 °C缓慢摇荡过夜孵育; 次日取出PVDF膜, 后加入二抗(1:1 000), 室温孵育2 h。显影和灰度扫描: 采用ECL化学发光法, 在PVDF膜上滴加荧光底物, 随后放入凝胶成像系统曝光拍摄。使用Image J软件检测各条带灰度值。

2.6 免疫荧光检测参白解毒方对HCT116细胞内 β -catenin入核 用75%乙醇浸泡玻片, 在超净台中

烘干后放入24孔板, 取HCT116细胞接种至带玻片的24孔板, 贴壁过夜。加入含参白解毒方的培养基, 使参白解毒方终质量浓度依次为0、2、4、8 g·L⁻¹, 于37 °C培养箱中培养48 h。弃去上清, PBS洗涤3遍后加入4%多聚甲醛室温固定30 min, 加入含0.05% TritonX-100的PBS, 4 °C破膜0.5~1 h; 弃去上清, 加入3% BSA室温封闭1 h; 加入一抗(1:1 000), 4 °C过夜; 次日弃去一抗, 加入荧光二抗(1:200)室温孵育2 h, 加入DAPI染液室温孵育5 min复染细胞核, 在盖玻片上滴加抗荧光猝灭剂, 将玻片取出倒扣在载玻片上, 用透明指甲油封片。

2.7 统计学方法 使用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 先使用单因素方差分析, 有差异后两组之间的比较使用Student's-*t* test检验, 两组以上比较使用Dunnett's test检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 参白解毒方对结直肠癌细胞HCT116增殖的影响 与空白组比较, 参白解毒方组各个时间和浓度下细胞存活率均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 处理72 h时半数抑制浓度(IC₅₀)为4.693 g·L⁻¹。8 g·L⁻¹参白解毒方在48 h时已对HCT116细胞的增殖具有良好的抑制效果, 因此使用0~8 g·L⁻¹参白解毒方进行后续实验, 给药时间为48 h。见表2、表3。

表2 参白解毒方对HCT116细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 2 Effect of Shenbai Jiedu prescription on survival rate of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	细胞存活率/%
空白组		100.00 \pm 2.62
参白解毒方组	2	73.81 \pm 5.77 ¹⁾
	4	51.24 \pm 5.18 ¹⁾
	8	30.17 \pm 2.94 ¹⁾
	16	14.74 \pm 1.09 ¹⁾
	32	4.94 \pm 0.38 ¹⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ (表4同)

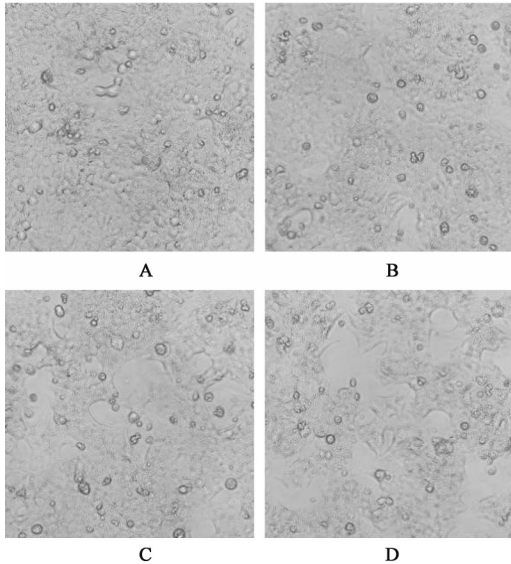
表3 不同时间参白解毒方HCT116细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Table 3 Effect of Shenbai Jiedu prescription for different treatment time on survival rate of HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	时间/h	细胞存活率/%
空白组		100.00 \pm 9.07
参白解毒方组	24	83.60 \pm 4.90 ¹⁾
	48	53.72 \pm 6.58 ²⁾
	72	14.39 \pm 0.98 ²⁾

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表5同)

与空白组比较,随着参白解毒方浓度的升高,HCT116细胞的生长受到抑制。见图1。



注:A. 空白组;B~D. 参白解毒方组(2、4、8 g·L⁻¹)(图3同)
图1 参白解毒方对HCT116细胞生长的影响(倒置显微镜,×100)
Fig. 1 Effect of Shenbai Jiedu prescription on growth state of HCT116 cells (inverted microscope, ×100)

3.2 参白解毒方对HCT116细胞PTEN/PI3K/Akt通路相关分子mRNA表达的影响 与空白组比较,参白解毒方组(8 g·L⁻¹)PTEN和GSK-3β mRNA表达显著上调($P<0.01$),PI3K、Akt、c-Myc、Survivin和CyclinD₁ mRNA表达显著下调($P<0.01$)。见表4。

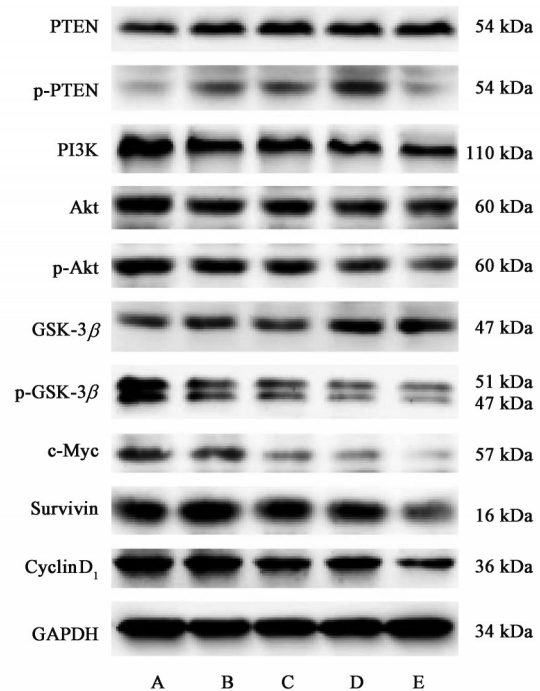
表4 参白解毒方对PTEN/PI3K/Akt通路相关分子mRNA表达水平的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of Shenbai Jiedu prescription on mRNA expression of PTEN/PI3K/Akt pathway in HCT116 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	PTEN	PI3K	Akt	GSK-3β	c-Myc	Survivin	CyclinD ₁
空白组		1.00±0.141	1.00±0.093	1.00±0.158	1.00±0.093	1.00±0.102	1.00±0.145	1.00±0.067
参白解毒方组	4	1.55±0.074 ¹⁾	0.81±0.105	0.97±0.167	1.76±0.133 ¹⁾	0.81±0.058	0.93±0.114	0.68±0.093 ¹⁾
	8	2.45±0.156 ¹⁾	0.44±0.061 ¹⁾	0.46±0.056 ¹⁾	1.93±0.299 ¹⁾	0.46±0.068 ¹⁾	0.52±0.074 ¹⁾	0.42±0.041 ¹⁾

3.4 参白解毒方对β-catenin入核的影响 β-catenin是一种双功能蛋白,调节细胞-细胞粘附和基因转录的协调。β-catenin主要位于细胞膜,而在胞浆中游离量较少,当其从细胞间连接复合物中脱离,进入细胞质的β-catenin一是被整合蛋白结合最终分解,二是进入细胞核影响基因的表达。GSK-3β的失活可导致细胞核内β-catenin的累积。与空白组比较,参白解毒方8 g·L⁻¹时可显著升高GSK-3β的表达水平($P<0.01$)。通过免疫荧光观察HCT116细胞胞浆和核内β-catenin表达情况,与空白组比较,参白解

3.3 参白解毒方对HCT116细胞PTEN/PI3K/Akt通路相关分子蛋白表达水平的影响 与空白组比较,参白解毒方组(2、4、8 g·L⁻¹)PTEN和GSK-3β蛋白表达显著上调($P<0.01$),参白解毒方组(8 g·L⁻¹)PI3K、Akt、p-Akt、p-GSK-3β、c-Myc、Survivin和CyclinD₁蛋白表达显著下调($P<0.01$)。见图2、表5。



注:A. 空白组;B~E. 参白解毒方组(1、2、4、8 g·L⁻¹)
图2 HCT116细胞PTEN/PI3K/Akt通路相关分子蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of protein expression of PTEN/PI3K/Akt pathway in HCT116 cells

毒方处理后细胞核中β-catenin明显减少,即参白解毒方可以降低细胞核内β-catenin的表达,并抑制其下游基因的转录。见表5和图3。

4 讨论

结直肠癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,具有极高的发病率和致死率^[1]。目前临床上治疗结直肠癌的药物多以化疗药物为主。通过研究中医药抗结直肠癌的药效和作用机制可以为结直肠癌的治疗提供新方法和候选药物。

中医认为,肠癌属“肠覃”“肠癖”等范畴,其病

表5 参白解毒方对HCT116细胞PTEN/PI3K/Akt通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of Shenbai Jiedu prescription on protein expression of PTEN/PI3K/Akt pathway in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	PTEN/GADPH	p-PTEN/GADPH	PI3K/GADPH	Akt/GADPH	p-Akt/GADPH
空白组		0.627±0.058	0.115±0.016	0.909±0.044	0.985±0.08	0.978±0.048
参白解毒方组	1	0.892±0.073 ¹⁾	0.464±0.084	0.839±0.065	0.907±0.068	0.904±0.041
	2	0.979±0.081 ²⁾	0.480±0.104 ²⁾	0.763±0.058 ¹⁾	0.887±0.038	0.800±0.075 ¹⁾
	4	0.906±0.088 ¹⁾	0.786±0.039 ²⁾	0.631±0.047 ²⁾	0.787±0.065 ¹⁾	0.624±0.034 ²⁾
	8	0.876±0.081 ¹⁾	0.231±0.029	0.541±0.107 ²⁾	0.618±0.024 ²⁾	0.401±0.051 ²⁾
组别	质量浓度/g·L ⁻¹	GSK-3β/GADPH	p-GSK-3β/GADPH	c-Myc/GADPH	Survivin/GADPH	CyclinD ₁ /GADPH
空白组		0.454±0.063	0.775±0.061	0.743±0.029	0.731±0.043	0.920±0.060
参白解毒方组	1	0.640±0.069 ¹⁾	0.510±0.065 ¹⁾	0.737±0.044	1.027±0.060	0.967±0.060
	2	0.650±0.066 ¹⁾	0.443±0.033 ¹⁾	0.410±0.062 ²⁾	0.865±0.065	0.783±0.066
	4	0.881±0.030 ²⁾	0.280±0.026 ²⁾	0.336±0.031 ²⁾	0.707±0.056	0.711±0.051 ¹⁾
	8	0.810±0.031 ²⁾	0.212±0.011 ²⁾	0.128±0.011 ²⁾	0.325±0.027 ²⁾	0.376±0.030 ²⁾

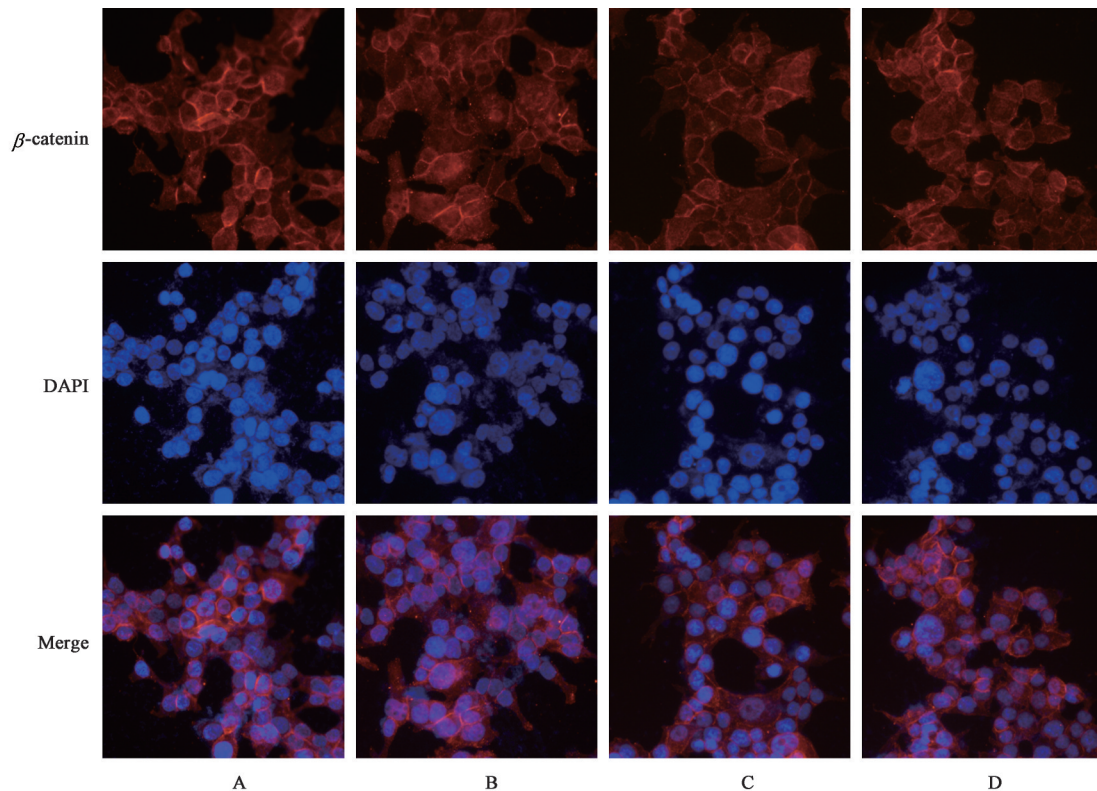


图3 参白解毒方对HCT116细胞β-catenin入核的影响(免疫荧光,×200)

Fig. 3 Effect of Shenbai Jiedu prescription on β-catenin nuclear import in HCT116 cells (immunofluorescence, ×200)

因病机多为饮食不节,导致脾不健运,湿浊内生下迫大肠,日久成瘀,损伤肠络,湿热雍滞酿毒而逐渐发生癌肿。概括起来,其主要病理基础为“脾虚”“湿蕴”,兼挟“瘀”“毒”。国医大师周仲瑛教授认为痰瘀郁毒是肿瘤的核心病机,具有指导中医临床辨治肿瘤的普遍意义^[15],根据其多年的临床实践,提出了“癌毒”学说。癌毒是导致癌病的一类特异性致病因子,是在脏腑功能失调、气血郁滞的基础上,

受内外多种因素诱导而生成的,可与湿浊、瘀血等病理因素交杂复合,搏结于肠腑,伤及肠道,形成息肉肿块^[13]。脾气亏虚是导致肠癌产生的前提条件,癌毒是导致肠癌发生的关键病机,因此肠癌前病变的基本病机是“脾虚毒蕴”,治疗大法为“益气健脾、解毒散结”。参白解毒方主要由白花蛇舌草、苦参、党参、黄连、乌梅等药物组成,全方攻补兼施,共奏抗癌祛毒、健脾益气化湿、寒热并调之功。本课题

组前期研究发现,参白解毒方可以抑制结直肠癌细胞的增殖^[14],但其作用机制仍需进一步探究。

PTEN/PI3K/Akt信号通路的失调与肿瘤的发生、发展密切相关^[2]。PTEN的异常表达和失活可以促使PI3K/Akt信号通路激活,从而进一步抑制GSK-3 β 的活性,促进 β -catenin的入核及其下游靶基因c-Myc、Survivin、CyclinD₁表达。Survivin作为凋亡抑制蛋白具有肿瘤特异性,与肿瘤细胞的增殖、分化及侵袭转移密切相关。研究发现Survivin在结肠正常黏膜、腺瘤及癌组织中表达逐渐升高,且与结肠腺瘤大小及分级相关,与结肠癌的淋巴结转移及TNM分期密切相关^[16]。c-Myc基因可以促进肿瘤细胞增殖,在多种肿瘤中表达增高^[17-19],包括结直肠癌^[20]。CyclinD₁作为周期蛋白,可以促进细胞增殖,在包括结直肠癌的多种肿瘤中也均发现了其表达的增高^[21]。因此可以通过调控PTEN/PI3K/Akt信号通路抑制结直肠癌细胞的增殖。

本研究通过确定参白解毒方对HCT116细胞增殖的抑制作用,进一步探讨参白解毒方对PTEN/PI3K/Akt通路相关分子mRNA和蛋白的表达情况。与空白组比较,参白解毒方可以浓度和时间依赖的抑制HCT116细胞的增殖。PCR结果显示与空白组比较,参白解毒方可以促进PTEN和GSK-3 β mRNA表达,并明显抑制Akt、GSK-3 β 、c-Myc、Survivin和CyclinD₁的表达。Western blot结果显示抑癌因子PTEN和保护因子GSK-3 β 蛋白表达与mRNA结果一致,在参白解毒方用药后均表达增加,p-PTEN的蛋白表达呈上调趋势,p-GSK-3 β 蛋白表达下调。PI3K、Akt、p-Akt、c-Myc、Survivin和CyclinD₁蛋白表达也均可被参白解毒方抑制。因GSK-3 β 的失活可导致细胞核内 β -catenin的累积,免疫荧光结果显示参白解毒方处理HCT116细胞后,可以有效抑制 β -catenin的入核。

综上所述,参白解毒方可以增加靶蛋白PTEN的表达,调控其下游PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路相关蛋白分子的表达,即通过抑制PI3K/Akt通路的激活,使GSK-3 β 表达增高或活化,减少p-GSK-3 β 的表达,从而抑制 β -catenin的入核,使其下游凋亡抑制蛋白Survivin和促进细胞增殖的周期蛋白c-myc、CyclinD₁表达下调,发挥抑制结直肠癌细胞的增殖的作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] YANG Q, JIANG W, HOU P. Emerging role of PI3K/Akt in tumor-related epigenetic regulation [J]. Semin Cancer Biol, 2019, 59: 112-124.
- [3] 耿军辉,张丽军,王亚丽,等. PI3K/Akt信号通路与肿瘤血管新生的研究进展 [J]. 现代肿瘤医学, 2018, 26(9): 1462-1466.
- [4] 李建,周怀君. PI3K/Akt信号通路在肿瘤研究中的进展 [J]. 东南大学学报:医学版, 2014, 33(3): 392-395.
- [5] TSAI W B, AIBA I, LONG Y, et al. Activation of Ras/PI3K/ERK pathway induces c-Myc stabilization to upregulate argininosuccinate synthetase, leading to arginine deiminase resistance in melanoma cells [J]. Cancer Res, 2012, 72(10): 2622-2633.
- [6] HEERY R, FINN S P, CUFFE S, et al. Long non-coding RNAs: Key regulators of epithelial-mesenchymal transition, tumour drug resistance and cancer stem cells [J]. Cancers, 2017, 9(4): 38.
- [7] RUBINSTEIN M R, WANG X, LIU W, et al. Fusobacterium nucleatum promotes colorectal carcinogenesis by modulating E-cadherin/beta-catenin signaling via its FadA adhesin [J]. Cell Host Microbe, 2013, 14(2): 195-206.
- [8] WANG L L, HAO S, ZHANG S, et al. PTEN/PI3K/Akt protein expression is related to clinicopathological features and prognosis in breast cancer with axillary lymph node metastases [J]. Hum Pathol, 2017, 61: 49-57.
- [9] ZHANG L L, MU G G, DING Q S, et al. Phosphatase and tensin homolog (PTEN) represses colon cancer progression through inhibiting paxillin transcription via PI3K/Akt/NF-kappaB pathway [J]. J Biol Chem, 2015, 290(24): 15018-15029.
- [10] LI L, ZHU X, SHOU T, et al. MicroRNA-28 promotes cell proliferation and invasion in gastric cancer via the PTEN/PI3K/Akt signalling pathway [J]. Mol Med Rep, 2018, 17(3): 4003-4010.
- [11] ZHANG R, LI G, ZHANG Q, et al. Hirsutine induces mPTP-dependent apoptosis through ROCK1/PTEN/PI3K/GSK3beta pathway in human lung cancer cells [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6): 598.
- [12] QIN Y, HUO Z, SONG X, et al. mir-106a regulates

- cell proliferation and apoptosis of colon cancer cells through targeting the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3): 3197-3201.
- [13] 程海波, 李柳, 吴勉华, 等. 癌毒病机理论辨治肠癌探讨[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(10): 2487-2488.
- [14] 江东. 基于炎癌转化探讨参白解毒方抑制结肠腺瘤癌变的药效及机制研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [15] 程海波, 周仲瑛, 李柳, 等. 基于癌毒病机理论的中医学临床辨治体系探讨[J]. *中医杂志*, 2015, 56(23): 1989-1992.
- [16] 王林娜, 张清泉, 侯素平, 等. Reg IV、EGFR和Survivin在结直肠癌癌变过程中的表达及意义[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(6): 44-49.
- [17] YANG J, GONG Z, SHEN X, et al. FSH receptor binding inhibitor depresses carcinogenesis of ovarian cancer via decreasing levels of K-Ras, c-Myc and FSHR [J]. *Anim Biotechnol*, 2021, 32(1): 84-91.
- [18] LEE D H, KIM G W, YOO J, et al. Histone demethylase KDM4C controls tumorigenesis of glioblastoma by epigenetically regulating p53 and c-Myc [J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(1): 89.
- [19] 鲁鑫宇, 王忠泽, 万思成, 等. 粉防己碱对胶质母细胞瘤细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(24): 6520-6529.
- [20] HUANG W, DONG S, CHA Y, et al. SNHG11 promotes cell proliferation in colorectal cancer by forming a positive regulatory loop with c-Myc [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 527(4): 985-992.
- [21] LIU J, QIAN J, MO Q, et al. LncRNA NR2F2-AS1 silencing induces cell cycle arrest in G₀/G₁ phase via downregulating Cyclin D₁ in colorectal cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 1835-1843.
- [责任编辑 张丰丰]

· 书讯 ·

慢性乙型肝炎急性肾损伤(AKI)患者的发病及预后分析 ——评《实用慢性肝炎诊治重点》

慢性乙型肝炎属于一种常见的慢性传染病,直接损害被感染者肝细胞,随着病情的发展,会演变成慢性肝炎、肝纤维化及肝硬化导致肝癌,严重者还会导致肝衰竭的现象。有学者认为乙肝病毒相关的慢性肝病的发病机制是由于肝细胞被损伤所致失衡,且体内肝细胞逐渐呈凋亡状态使乙型肝炎病毒清除率降低,自然造成感染趋向慢性化;而体内肝细胞在凋亡的过程中出现肝细胞大量死亡就会引发乙肝病毒相关肝衰竭。慢性乙型肝炎病毒常见并发症为急性肾损伤(AKI),AKI发病率会增加患者的死亡率。所以深入研究慢性乙型肝炎急性肾损伤患者的发病特点,对改善患者肾功能及预后生存具有重要的作用。

《实用慢性肝炎诊治重点》由唐红主编,科学技术文献出版社2018年出版。本书以临床实践为参考依据,同时兼顾融合最新的研究进展,内容新颖,在描述肝病领域的知识上体现了真实性与客观性。全书共分为两部分,第一篇基础与临床分九个章节,涵盖肝脏领域上常见疾病,收集了二十一个有关肝病的典型病例和疑难病例。第一章对慢性肝炎的现状与研究做了简要分析,突出了肝病的预防工作的相关知识,从整体上看,近年来我国医疗质量呈显著提升。第二章分析了慢性病毒性肝炎的要点,包括慢性乙型肝炎、丙型肝炎、丁型肝炎及其他肝炎病毒引起的慢性肝炎,特殊人群的预防措施及病房内的终末消毒。第三章至第八章则讲述了临床上不同类型的肝病,主要有乙醇性、脂肪性、药物性、遗传代谢性肝病等。第九章为慢性肝炎并发症的诊治,总结了相关并发症的特征,提高医生的诊疗水平。第二篇列举了临床一线诊治肝病的优秀案例,重点是帮助肝病及相关专业的医师达到规范性诊治水平,以及加强对疑难病例的认识。基于AKI患者的发病及预后分析,结合临床一线的诊治,制定一系列治疗肝病的内容,旨在为肝病专业的临床医师提高更好的指导,提升肝病患者的生活质量。慢性乙型肝炎伴发急性肾损伤患者的病死率逐渐升高,尽早对慢性乙型肝炎伴发急性肾损伤的高危人群进行干预,对疾病的治疗和改善预后是一件至关重要的医学任务。目前医学上对AKI的系统研究尚不全面,当前国内外医学上对AKI患者早期诊断的关注及重视越来越高,在疾病定义上逐渐呈现统一规范的特征,对慢性乙型肝炎患者中AKI的发病特征及预后情况的深入分析提供了有力的参考依据。慢性乙型肝炎在临床治疗上主要采取抗病毒类药物以此控制疾病恶性发展,缓解出现肝细胞炎性坏死及肝纤维化,降低肝功能出现衰竭、肝癌及AKI等相关并发症的发生情况,实现患者生活质量和生存时间的增加。引发慢性乙型肝炎患者伴发AKI的原因与消化道出血有关,其发病机制为患者血流动力学产生异常,在其影响下激活了肾素血管紧张素醛固酮系统及交感神经系统,促使各种血管活性因子的分泌,从而导致肾血管收缩及机体钠水滞留的发生。该病症的预后可能跟慢性肝脏疾病的情况有关,具体为患者肝脏储备功能,肾损害的严重程度及低钠血症等因素。且慢性乙型肝炎伴发的AKI的病因主要以肾前性为主,肾性及肾后性其次。探讨慢性乙型肝炎AKI疾病的病因有助于提高临床医师的重视程度,有效避开易患因素,降低感染。只有加强对该病症的认识与预防,才能为早期诊断与进一步治疗提供保障,进而改善患者预后。

《实用慢性肝炎诊治重点》全面地阐述慢性肝炎的临床诊断与治疗,AKI患者的发病及预后分析对慢性肝病的临床防治有一定的帮助。由肝病专业的资深专家和临床医师组成编写小组,凝聚了专业的临床经验与理论基础,在肝病诊疗的发展上起到了推动作用,帮助提高肝病及相关专业医生的规范化诊治水平及对疑难病例的认识,可供在职医师学习分析。

(作者叶程军,吴国红,祝国宁,龙游县人民医院,浙江 龙游 324400)