

新疆阿魏乙酸乙酯提取物对人结肠腺癌 Caco-2 细胞迁移、侵袭的影响及相关机制

雷亚江¹, 刘柏里¹, 罗福祥¹, 张海英^{1,2*}

(1. 新疆医科大学, 乌鲁木齐 830011; 2. 新疆医科大学附属中医医院, 乌鲁木齐 830000)

[摘要] 目的:研究新疆阿魏乙酸乙酯提取物对人结肠腺癌 Caco-2 细胞迁移、侵袭的影响,并探讨其相关机制。方法:以 Caco-2 细胞为研究对象,用 6.25,12.5 mg·L⁻¹ 新疆阿魏乙酸乙酯提取物和顺铂分别作用于处于对数生长期的人结肠腺癌 Caco-2 细胞,并设空白组,用划痕愈合合法观察 0~48 h 各组 Caco-2 细胞迁移情况,用 transwell 小室法计数 72 h 各组 Caco-2 细胞穿过基质膜个数,并计算出每个时间段 Caco-2 细胞迁移率和侵袭抑制率。采用荧光实时定量 PCR 法和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组 Caco-2 细胞中磷酸酶 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN), 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (serine/threonine, Akt), 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 基因和蛋白的表达水平。结果:与空白组比较,新疆阿魏乙酸乙酯提取物和顺铂组在 24,48 h 细胞愈合程度变慢 ($P < 0.05$);72 h 时穿过基质膜的细胞个数显著减少 ($P < 0.01$),各用药组 PTEN 基因表达水平明显升高, Akt, mTOR 基因表达水平明显较低 ($P < 0.05$)。结论:新疆阿魏乙酸乙酯提取物可以显著抑制人结肠腺癌 Caco-2 细胞的迁移和侵袭,可能与提高 PTEN 基因表达水平有关。

[关键词] 新疆阿魏; Caco-2 细胞; 迁移; 侵袭; 磷酸酶; 丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)03-0110-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017030110

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161117.1619.048.html>

[网络出版时间] 2016-11-17 16:19

Ferula Sinkiangensis Ethyl Acetate Extract on Migration and Invasion of Human Colon Adenocarcinoma Cell Line Caco-2 and Relevant Mechanism

LEI Ya-jiang¹, LIU Bai-li¹, LUO Fu-xiang¹, ZHANG Hai-ying^{1,2*}

(1. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;

2. Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine of Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Ferulae Resina ethyl acetate extract on the migration and invasion of human colon adenocarcinoma cell line Caco-2 and its relevant mechanism. **Method:** With Caco-2 cells as the research object, 6.25, 12.5 mg·L⁻¹ of Ferulae Resina ethyl acetate extract and cisplatin were respectively applied in human colon adenocarcinoma Caco-2 cells in the logarithmic phase of growth. A blank control group was set up. Scratch healing method and transwell chamber were used to observe 0-48 h Caco-2 cells migration in each group and the number of Caco-2 cell passing through the matrix membrane in 72 h in each group, and calculate Caco-2 cell migration rate and invasion rate at each time point. Gene and protein expressions of phosphatase and tensin homolog (PTEN), serine/threonine (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), and protein in Caco-2 cells were detected by Real-time PCR and Western blot. **Result:** Ferulae Resina and cisplatin groups showed

[收稿日期] 20160410(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81260625)

[第一作者] 雷亚江, 硕士, 从事中药与民族药理学研究, Tel:15160877238, E-mail:1213129027@qq.com

[通讯作者] * 张海英, 博士, 主任中药师, 副教授, 从事中药与民族药理学研究, Tel:15999157921, E-mail:1030737878@qq.com

slower cells healing degrees at 24 h and 48 h compared with the blank group ($P < 0.05$), at 72 h, the number of cells passing through the matrix membrane was significantly less than that in blank group ($P < 0.01$). In each dose group, PTEN gene expression levels were significantly higher, and Akt, mTOR gene expression levels were significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion:** Ferulae Resina ethyl acetate extract can significantly inhibit the migration and invasion of human colon adenocarcinoma Caco-2 cells, which may be correlated with increase in PTEN gene expression.

[**Key words**] Ferulae Resina; Caco-cell; metastasis; invasion; phosphatase; serine/threonine (Akt) protein kinase; mammalian target of rapamycin (mTOR)

新疆阿魏系伞形科阿魏属植物,是我国特有品种,也是 2015 年版《中国药典》收录的阿魏属植物之一,只分布在新疆。作者前期对新疆阿魏抗肿瘤抗氧化的活性部位进行筛选,发现新疆阿魏各提取部位均对肿瘤 HCT116 细胞, Caco-2 细胞, HepG2 细胞, MFC 细胞增殖具有抑制作用,且乙酸乙酯提取部位增殖抑制率最高,活性最强^[1]。国外对阿魏属植物研究已经非常广泛, Lee 等^[2]在阿魏中分离出阿魏内酯 (Farnesiferol C, FC), 并发现 FC $10 \sim 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可以抑制血管内皮生长因子 (VEGF) 分泌,抑制细胞的增殖、迁移、侵入、小管形成。Jamal 等^[3]从新疆阿魏中分离的倍半萜内酯化合物 dehydroopodin, 分别以 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 和 $15 \mu\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ 作用于人乳腺癌细胞 MCF7 和人白血病细胞 K562, 均具有显著的抑制作用。Maryam Moghaddam 等^[4]从羊食阿魏 *Ferula ovina* 中分出萜类化合物 Ferutin, 能使人乳腺癌细胞 MCF7 和膀胱移行细胞癌 TCC 快速凋亡。HUANG 等^[5]从全裂叶阿魏 *F. dissecta* 的根中分离出两个新倍半萜甲酸衍生物 syreiteate A 和 syreiteate B, 对宫颈癌 HeLa 细胞有生长抑制作用。基于国内外对阿魏属植物抗肿瘤作用的研究,作者以新疆阿魏为研究对象,通过划痕愈合实验和 transwell 小室实验,研究新疆阿魏乙酸乙酯提取物对人结肠腺癌 Caco-2 细胞迁移及侵袭的影响,同时检测与细胞迁移和侵袭相关的 Caco-2 细胞中磷酸酶 (PTEN) 基因和蛋白的表达的水平。

1 材料

1.1 细胞株 人结肠腺癌 Caco-2 细胞株,购自上海中国科学院细胞研究所,实验使用在 3 ~ 5 代。

1.2 药物 伞形科植物新疆阿魏 *F. sinkiangensis* 的树脂,经新疆伊犁州食品药品检验所检验合格 (批号 20091012),顺铂购自江苏泰森药业股份有限公司,批号 150901。

1.3 试剂 FBS 胎牛血清,磷酸盐缓冲溶液 (PBS)

(美国 Hyclone 公司,批号分别为 F120121, NYCO830); transwell 小室 (美国密理博公司,批号 2500655); 青霉素-链霉素双抗 (Hyclone 公司,批号 J130071); Trizol (Invitrogen 公司,批号 15596018); Agarose (Sangon Biotech 公司,批号 9156); $6 \times$ Loading buffer (Takara 公司,批号 E8751); FastQuant RT Kit (Tiangen 公司,批号 KR106-02); SYBR Select Master Mix (ABI 公司,批号 4472920); bicinchoninic acid assay (BCA) Protein Assay Kit [天根生化科技 (北京)有限公司,批号 PA115-02]; β -肌动蛋白 (β -actin, Abcam 公司,货号 ab8226); PTEN, Akt, mTOR Antibody (CST 公司,货号分别为 #9552S, #9282S, #2972S)。引物序列由生工生物工程 (上海)有限公司合成, mTOR (114 bp): 上游 5'-GCAGATTTGCCAACTATCTTCGG-3', 下游 5'-CAGCGGTA AAAAGTGTCCCTG-3'; Akt (218 bp): 上游 5'-GTCATCGAACGCACCTTCCAT-3', 下游 5'-AGCTTCAGGTACTCAA ACTCGT-3'; PTEN (134 bp): 上游 5'-TTTGAAGACCATAACCCACCAC-3', 下游 5'-ATTACACCAGTTCGTCCTTTC-3'; β -actin (211 bp): 上游 5'-ATGATGATATCGCCGCGCTC-3', 下游 5'-TCGATGGGGTACTTCAGGG-3。

1.4 仪器 120913 型荧光倒置显微镜 (北京 Solarbio 公司); 20000128 型 TGL-16B 离心机 (上海安亭科学仪器厂); xMark™ 型酶标仪, T100 型 PCR 扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司); DYCZ-24DN 型电泳仪 (北京六一仪器设备厂); 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); Tanon 3500R 型凝胶成像系统 (上海天能科技有限公司); Chemiscope 3000 型化学发光成像仪系统 (上海勤翔科学仪器有限公司); Neofuge 15R 型高速冷冻离心机 (上海力申科学仪器制造厂)。

2 方法

2.1 新疆阿魏有效成分的提取及处理 新疆阿魏 400 g, 用石油醚 2 000 mL 超声提取 40 min, 控温在

40 ℃ 以下,相同方法提取 1 次,过滤,浓缩,60 ℃ 干燥,至无气泡产生,即得石油醚部位。上述残渣再用 95% 乙醇 2 000 mL 相同方法提取 1 次,过滤,合并提取液,减压浓缩。浓缩的膏液用硅藻土拌样分散均匀后,用乙酸乙酯超声提取 5 min,滤过,滤液浓缩干燥即得乙酸乙酯提取物。新疆阿魏乙酸乙酯提取物溶于二甲基亚砷(DMSO)溶液,用完全培养液稀释,配置成终质量浓度为 500 mg·L⁻¹ 的储备液,逐级调整含药质量浓度至 12.5,6.25 mg·L⁻¹ (经预实验 Caco-2 细胞对药物最适浓度进行筛选,新疆阿魏乙酸乙酯提取物对 Caco-2 细胞无明显杀伤的质量浓度为 12.5 mg·L⁻¹,细胞活力 > 80%); 顺铂以 10% 胎牛血清的培养液稀释至 12.5,6.25 mg·L⁻¹,备用。

2.2 Caco-2 细胞培养 将冻存的 Caco-2 细胞复苏后,置于培养瓶中用含 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 高糖培养液培养,在 37 ℃ 5% CO₂ 的培养箱中培养,保持饱和湿度。2~3 d 换液,传代培养,取对数生长的细胞用于各实验。

2.3 划痕愈合合法检测 Caco-2 细胞迁移能力 取处于对数生长期的人结肠腺癌 Caco-2 细胞,经处理调整其密度为 1 × 10⁵ 个/mL。取 2 个 6 孔板,每孔加入细胞混悬液 2 mL 常规培养。待细胞铺满单层约 80%,进行划痕。加入药物,每个设 2 个复孔,每孔 2 mL。常规培养,记录 0,24,48 h 后的划痕距离。实验重复 3 次,记录结果,计算划痕迁移率。

$$\text{迁移率} = \frac{\text{划痕时两侧距离} - \text{检测时两侧距离}}{\text{划痕时两侧距离}} \times 100\%$$

2.4 transwell 小室检测 Caco-2 细胞侵袭能力 将 2.3 项中实验板上清液弃去,常规消化、离心,以无血清培养基稀释,细胞计数板计数制成 1 × 10⁶ 个/mL 的细胞混悬液,加至 transwell 小室上层(含基质胶),每孔 200 μL。小室下层加完全培养液 600 μL,常规培养 48 h。弃去 transwell 小室上下层液,PBS 清洗小室 2 次,4% 多聚甲醛固定细胞 30 min 后,取出小室,用 PBS 清洗 2 次,加染色液染色,30 min 后取出小室用流动的去离子水清洗后,用棉签拭去小室上层细胞,小室晾干后进行拍照。显微镜每孔选取 5 个视野 200 倍拍照后计算穿过基质胶的细胞个数,重复 3 次,计算细胞侵袭抑制率。

$$\text{侵袭抑制率} = \frac{\text{正常细胞组穿膜个数} - \text{给药组细胞穿膜个数}}{\text{正常组细胞穿膜个数}} \times 100\%$$

2.5 实时荧光定量 PCR 检测各组细胞 PTEN,丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt),哺乳动物雷帕霉素靶

蛋白(mTOR)mRNA 表达 细胞处理同 2.3 项,用 Trizol 试剂盒提取每组 Caco-2 细胞的总 RNA。通过酶标仪法对总 RNA 纯度进行检测。电泳后 RNA 条带的完整性非常好,温度梯度实验,根据溶解曲线和峰判断引物扩增的特异性、均一性、引物特异性均适合本实验。TaKaRa 逆转录试剂盒逆转录得到 cDNA,利用 SYBR Green 染料检测细胞目的基因的表达情况,并将 β-actin 作为内参照,cDNA 样品总反应体积为 20 μL。将制备好的 cDNA 样品置于 50 ℃ 水浴 2 min,在另一水浴锅中 95 ℃ 水浴 2 min 预变性后,将 cDNA 样品置于 95 ℃ 水浴 15 s,60 ℃ 水浴 60 s,将供试品移至 PCR 扩增仪中进行扩增,共进行 30 个循环扩增。采用相对定量公式 2^{-ΔΔC_t},荧光定量计算细胞目的基因的相对表达量。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组蛋白表达 细胞处理同 2.3 项,收集各组细胞,获得细胞总蛋白,用 BCA 法测定蛋白浓度。加入适量 5 × SDS-PAGE loading buffer,100 ℃ 沸水加热 5 min,使蛋白充分变性,12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清备用。将蛋白质电转至硝酸纤维素膜,5% 脱脂奶粉的 TBST 稀释一抗分别加入 β-actin (1:2 500),PTEN (1:1 000),4 ℃ 孵育过夜。洗膜,加入适当稀释的二抗(1:1 万),室温孵育 1 h,将显色液 NBT-BCIP-buffer(1:1:50)显色,用 ChemiScope mini 化学发光仪检测、拍照,计算目的蛋白的积分光密度值,并与 β-actin 比较,计算目的蛋白表达量。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件,数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料先进行正态性检验和方差齐性检验,若满足正态分布和方差齐性,多组间均数比较采用 One-Way ANOVA 方差分析,两组比较采用独立样本 *t* 检验,方差不齐时数据进行对数转换后再进行方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,*P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

3 结果

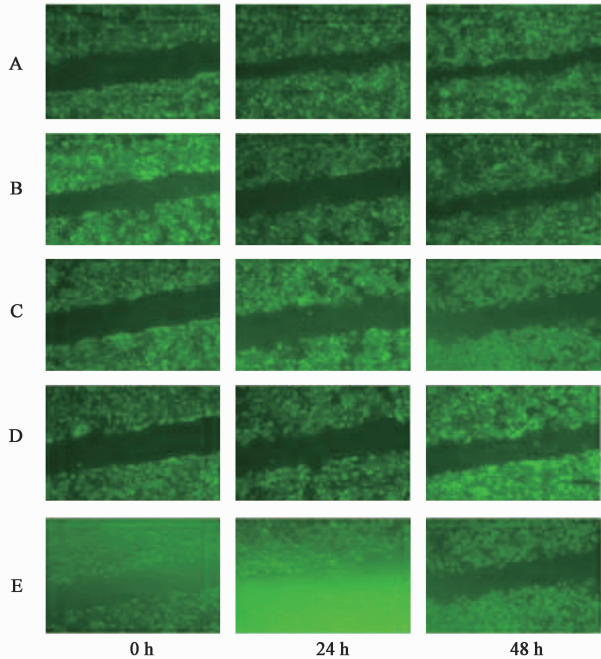
3.1 新疆阿魏乙酸乙酯提取物对人结肠腺癌 Caco-2 细胞迁移的影响 药物作用 24,48 h 后,顺铂、新疆阿魏各剂量组划痕距离愈合程度较空白组明显降低(*P* < 0.05),且新疆阿魏高剂量组均比低剂量组愈合程度低;新疆阿魏低、高剂量组,顺铂低、高剂量组 24 h 迁移率分别为 26.4%,18.1%,18.9%,13.8%,48 h 迁移率分别是 24.4%,50.8%,42.9%,18.7%,与空白组比较均有降低趋势。表明新疆阿魏乙酸乙酯提取物抑制了 Caco-2 细胞的迁移,并且具有明显的剂量依赖性。见表 1,图 1。

表 1 新疆阿魏乙酸乙酯提取物对 Caco-2 细胞划痕愈合的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 1 Effect of ethyl acetate extract of Ferulae Resina on scratch-healing of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0 h 痕距/nm	24 h 痕距/nm	48 h 痕距/nm	24 h 迁移率/%	48 h 迁移率/%
空白	-	531.4 ± 7.7	265.7 ± 10.6	196.6 ± 16.4	50.0 ± 1.3	63.0 ± 2.5
新疆阿魏乙酸乙酯提取物	6.25	525.5 ± 12.5	386.8 ± 14.2 ²⁾	258.5 ± 10.5 ¹⁾	26.4 ± 0.9	50.8 ± 0.8
	12.5	525.0 ± 12.8	429.8 ± 23.2 ²⁾	396.7 ± 26.3 ²⁾	18.1 ± 2.4	24.4 ± 3.1
顺铂	6.25	537.2 ± 12.4	435.8 ± 9.4 ²⁾	306.5 ± 10.3 ²⁾	18.9 ± 0.1	42.9 ± 0.6
	12.5	531.0 ± 19.9	457.5 ± 11.6 ²⁾	431.6 ± 19.7 ²⁾	13.8 ± 1.0	18.7 ± 0.6

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2, 3 同, 图 3 同)。



A. 空白组; B ~ C. 乙酸乙酯提取物 (6.25, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组; D ~ E. 顺铂 (6.25, 12.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组 (图 2, 3 同)

图 1 新疆阿魏乙酸乙酯提取物对 Caco-2 细胞迁移能力的影响 (荧光倒置显微镜, $\times 200$)

Fig. 1 Effect of ethyl acetate extract of Ferulae Resina on migratory ability of Caco-2 cells (fluorescence inverted microscope, $\times 200$)

3.2 新疆阿魏乙酸乙酯提取物对人结肠腺癌 Caco-2 细胞侵袭的影响 药物作用 72 h 后, 新疆阿魏、顺铂各剂量组穿过基质胶的细胞数较空白组均显著减少 ($P < 0.05$), 并且新疆阿魏高剂量组均比低剂量组穿过的细胞数少, 新疆阿魏低、高剂量组, 顺铂低、高剂量组在 72 h 后 Caco-2 细胞的侵袭抑制率分别为 78.9%, 89.5%, 81.3%, 91.5%。表明新疆阿魏乙酸乙酯提取物抑制了 Caco-2 细胞的侵袭, 并且具有明显的剂量依赖性。见表 2, 图 2。

3.3 新疆阿魏乙酸乙酯提取物对 PTEN 及相关基因表达水平的影响 药物作用细胞 24 h 后, 对各组细胞中的 PTEN, Akt, mTOR 基因进行检测, 与空白组比较, 新疆阿魏各剂量组和顺铂组 PTEN 基因

表 2 新疆阿魏乙酸乙酯提取物对 Caco-2 细胞侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effect of ethyl acetate extract of Ferulae Resina on invasion ability of Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	穿膜细胞/个	72 h 侵袭抑制率/%
空白	-	496.2 ± 14.3	-
新疆阿魏乙酸乙酯提取物	6.25	105.5 ± 5.0 ²⁾	78.9 ± 0.5
	12.5	52.4 ± 3.1 ²⁾	89.5 ± 0.3
顺铂	6.25	93.7 ± 5.1 ²⁾	81.3 ± 0.5
	12.5	42.3 ± 3.2 ²⁾	91.5 ± 0.4

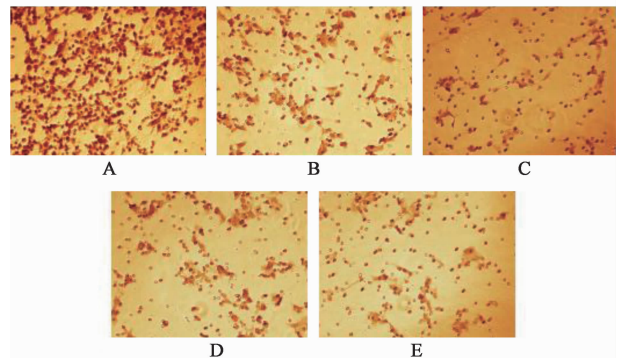


图 2 新疆阿魏乙酸乙酯提取物对 Caco-2 细胞侵袭的影响 (伊红染色, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of ethyl acetate extract of Ferulae Resina on invasion of Caco-2 cells (eosin, $\times 200$)

表达水平显著增高 ($P < 0.01$); Akt 和 mTOR 基因的表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 新疆阿魏乙酸乙酯提取物对 PTEN 及相关蛋白表达的影响 与空白组比较, 新疆阿魏乙酸乙酯提取物和顺铂各剂量组 PTEN 蛋白表达量增高 ($P < 0.05, P < 0.01$), Akt, mTOR 蛋白表达量降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 3。

4 讨论

肿瘤转移不仅导致肿瘤恶化, 同时也是影响患者生活质量和导致死亡的主要原因。而发生转移的基础则是肿瘤细胞侵袭和转移的能力增强, 侵袭和

表 3 新疆阿魏对 Caco 细胞 24 h 后相关基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of Ferulae Resina on protein expression of relevant genes in Caco cells after 24 h ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	PTEN	Akt	mTOR
空白	-	1.06 ± 0.39	1.08 ± 0.46	1.01 ± 0.18
新疆阿魏乙酸乙酯提取物	6.25	3.62 ± 1.01 ²⁾	0.61 ± 0.19 ¹⁾	0.48 ± 0.13 ¹⁾
	12.5	3.91 ± 1.03 ²⁾	0.57 ± 0.23 ¹⁾	0.43 ± 0.10 ¹⁾
顺铂	6.25	3.85 ± 1.26 ²⁾	0.54 ± 0.28 ¹⁾	0.42 ± 0.12 ¹⁾
	12.5	4.04 ± 1.41 ²⁾	0.52 ± 0.22 ¹⁾	0.39 ± 0.11 ¹⁾

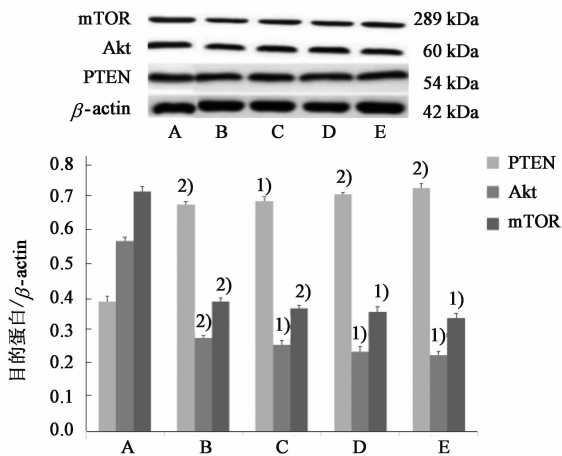


图 3 新疆阿魏对 Caco-2 细胞 PTEN, Akt, mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of Ferulae Resina on protein expression of PTEN, Akt and mTOR in Caco-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

转移占肿瘤相关死亡率的 90% 以上^[6]。因此,抑制肿瘤细胞的侵袭和转移对肿瘤患者的生存就显得尤为重要,在抗肿瘤方面具有重大意义。

本实验结果显示新疆阿魏乙酸乙酯提取物和顺铂各剂量组在 24, 48 h 细胞愈合程度较空白组小,作用 Caco-2 细胞 72 h 后,细胞穿过基质膜的个数较空白组明显减少,本实验证明了新疆阿魏乙酸乙酯提取物对 Caco-2 细胞的迁移和侵袭具有显著的抑制作用。肿瘤细胞迁移和侵袭是肿瘤细胞向周围组织和血管转移的关键步骤^[7]。据此推测,新疆阿魏乙酸乙酯提取物可以通过抑制肿瘤细胞转移到周围的组织和血管中,阻断肿瘤细胞的转移,对肿瘤的生长起到一定的控制作用。

PTEN 基因又被称为 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同系物,是细胞重要的调控因子^[8]。在多数肿瘤组织中表达会出现缺失或者突变,例如子宫内膜癌^[9]、肝癌^[10]等。大量实验表明 PTEN 在多种肿瘤的迁移和侵袭中发挥重要作用^[11-13]。HOU 等^[14]研究发现 PTEN 蛋白的表达与食管癌的大小、有无淋巴结转移呈负相关。也有研究报道

PTEN 的过表达能够显著抑制子宫内膜癌细胞 (HEC-B1) 的迁移和侵袭^[15]。本实验 PCR 结果显示新疆阿魏乙酸乙酯提取物可以显著提高 Caco-2 细胞中 PTEN 基因的表达水平。为了证明药物作用细胞后 PTEN 基因表达水平增高的同时,也发挥了自身的调控作用,本实验对其自身指导的蛋白和作用的下游相关基因 Akt, mTOR 及蛋白进行检测,结果发现 Akt, mTOR 基因表达水平与空白组比较明显降低,相关蛋白表达量也明显降低。说明新疆阿魏乙酸乙酯提取物可以通过提高 PTEN 的表达从而对 Caco-2 细胞的迁移和侵袭能力起到抑制作用。提示 PTEN 通过负调控 PI3K/Akt 通路可以抑制 Akt 磷酸化,活化的 Akt 可以通过诱导金属蛋白酶 (MMPs) 的表达而促进癌细胞的迁移和侵袭^[16]; mTOR 是 Akt 的下游靶分子之一,磷酸化的 Akt 可以活化 mTOR, mTOR 激活后可以分泌 MMP-2 和 MMP-9,导致细胞外基质 (ECM) 重构,从而促进肿瘤细胞转移^[17]。

Hanafi-Bojd 等^[18]在同源小鼠腹膜内给予加硼酸 (GBA) 注射剂后,免疫组化显示在 GBA 治疗的肿瘤减少了 CD34 微血管密度指数和 Ki-67 增殖指数。PTEN 的过表达可以调控促血管生成素/血管紧张素 2 (Ang/Tie2) 体系,间接影响血管内皮细胞 (EC) 的周期,进而影响肿瘤血管的生成^[19-20]。据此推测,新疆阿魏乙酸乙酯提取物可能抑制肿瘤血管增生。

[参考文献]

[1] ZHANG H Y, LU J, ZHOU L L, et al. Antioxidant and antitumor effects of *Ferula sinkiangensis* K. M. Shen [J]. Int Clin Med, 2015, 8 (11) : 20845-20852.
[2] Lee J H, Choi S, Lee Y, et al. Herbal compound farnesiferol C exerts an antiangiogenic and antitumor activity and targets multiple aspects of VEGFR1 (Flt1) or VEGFR2 (Flk1) signaling cascades [J]. Mol Cancer Ther, 2010, 9 (2) : 389-399.
[3] Jamal K, Milad I, Milena M, et al. Sesquiterpene lactones from *Ferula oopoda* and their cytotoxic properties [J]. J

- Asian Nat Prod Res, 2014, 16(3):248-253.
- [4] Maryam Moghaddam M, Hossein N, Ahamd Reza B, et al. Ferutinin an apoptosis inducing terpenoid from *Ferula ovina*[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2014, 15 (5) : 2123-2128.
- [5] HUANG J, HAN H Y, LI G Y, et al. Two new terpenoid benzoates with antitumor activity from the roots of *Ferula dissecta*[J]. J Asian Nat Prod Res, 2013, 15(10):1100-1106.
- [6] JIN X, ZHU Z, SHI Y. Metastasis mechanism and gene/protein expression in gastric cancer with distant organs metastasis[J]. Bull Cancer, 2014, 101(1):1-12.
- [7] Fantozzi A, Gruber D C, Pisarsky L, et al. VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation [J]. Cancer Res, 2014, 74(5):1566-1575.
- [8] 周密, 邱峰, 张渊, 等. 美洛昔康对人结肠癌细胞增殖、迁移和 PTEN 基因表达的影响[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(12):1704-1712.
- [9] Garcia-dios D A, Lambrechts D, Coenegrachts L, et al. High-throughput interrogation of PIK3CA, PTEN, KRAS, FBXW7 and TP53 mutations in primary endometrial carcinoma[J]. Gynecol Oncol, 2013, 128(2):327-334.
- [10] TIAN T, NAN K J, GUO H, et al. PTEN inhibits the migration and invasion of HepG2 cells by coordinately decreasing MMP expression via the PI3K/Akt pathway [J]. Oncol Rep, 2010, 23(6):1593-1600.
- [11] LI L, Ross A H. Why is PTEN an important tumor suppressor? [J]. J Cell Biochem, 2007, 102 (6) : 1368-1374.
- [12] QI L, SUN B, LIU Z, et al. Dickkopf-1 inhibits epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells and contributes to colon cancer suppression[J]. Cancer Sci, 2012, 103(4):828-835.
- [13] Atreya C E, Sangale Z, XU N, et al. PTEN expression is consistent in colorectal cancer primaries and metastases and associates with patient survival [J]. Cancer Med, 2013, 2(4):496-506.
- [14] HOU G, LU Z, LIU M, et al. Mutational analysis of the PTEN gene and its effects in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Dig Dis Sci, 2011, 56(5):1315-1322.
- [15] 李云云, 贺文凤, 黄婷婷, 等. PTEN 对子宫内膜癌细胞株迁移和侵袭能力的影响[J]. 中国肿瘤杂志, 2013, 23(10):813-820.
- [16] CHEN J S, WANG Q, FU X H, et al. Involvement of PI3K/PTEN/Akt/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MM-9[J]. Hepatol Res, 2009, 39(2):177-186.
- [17] Osman B, Ei-S A, Doller A, et al. Differential modulation of the cytokine-induced MM-9/TIMP-1 protease-antiprotease system by the mTOR inhibitor rapamycin [J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(1):134-143.
- [18] Hanafi-Bojd M Y, Iranshahi M, Mosaffa F, et al. Farnesiferol A from *Ferula persica* and galbanic acid from *Ferula szowitsiana* inhibit P-glycoprotein-mediated rhodamine efflux in breast cancer cell lines[J]. Planta Med, 2011, 77(14):1590-1593.
- [19] 沈存思, 范方田, 陶丽, 等. 抑癌基因 PTEN 与肿瘤血管生成研究进展[J]. 中国药理学通报, 2013, 29(5):597-600.
- [20] Tarnawski A S, Pai R, Tanigawa T, et al. PTEN silencing reverses aging-related impairment of angiogenesis in microvascular endothelial cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(2):291-296.

[责任编辑 张丰丰]