

# 桂皮醛通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 TGF- $\beta_1$ 诱导的结肠癌细胞 LoVo 上皮间质转化

李洁玼<sup>1</sup>, 秦垠<sup>1</sup>, 邹玺<sup>2</sup>, 潘迎英<sup>1\*</sup>

(1. 南京中医药大学附属张家港市中医医院, 江苏 张家港 215600; 2. 江苏省中医院, 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨桂皮醛对转化生长因子- $\beta_1$  (Transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ ) 诱导的结肠癌 LoVo 细胞增殖、侵袭及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响及其与磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 信号通路的关系。方法:通过 TGF- $\beta_1$  诱导结肠癌细胞株 LoVo 发生上皮间质转化,使用桂皮醛(0, 20, 40, 80 mg·L<sup>-1</sup>)干预由 TGF- $\beta_1$  诱导的 LoVo 细胞的增殖,采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色法检测桂皮醛对 TGF- $\beta_1$  诱导的细胞增殖能力的影响。转移小室(transwell)侵袭实验检测细胞侵袭能力变化。蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 E-钙黏蛋白(E-cadherin), N-钙黏蛋白(N-cadherin), 波形蛋白(Vimentin)及 PI3K/Akt 信号通路关键蛋白的表达。采用 PI3K/Akt 抑制剂 LY290004 来验证桂皮醛通过 PI3K/Akt 信号通路抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的 EMT。结果:与空白组比较,桂皮醛能有效抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的增殖及侵袭能力( $P < 0.01$ ),显著增加 E-cadherin 的表达,抑制 N-cadherin, Vimentin 及 TGF- $\beta_1$  刺激的 p-Akt 和 p85 的表达( $P < 0.01$ );同时通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活逆转 TGF- $\beta_1$  诱导的 EMT ( $P < 0.01$ )。结论:桂皮醛可通过调节 PI3K/Akt 信号通路抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的结肠癌细胞 LoVo 的上皮间质转化,降低其侵袭能力。

**[关键词]** 桂皮醛; 结肠癌; 上皮间质转化; 磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B; 转化生长因子- $\beta_1$

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)18-0105-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017180105

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170612.1040.034.html>

**[网络出版时间]** 2017-06-12 10:40

## Cinnamaldehyde Inhibits TGF- $\beta_1$ Induced Epithelial-mesenchymal Transition of Human Colorectal Carcinoma Cells LoVo via PI3K/Akt Signaling Pathway

LI Jie-pin<sup>1</sup>, QIN Yin<sup>1</sup>, ZOU Xi<sup>2</sup>, PAN Ying-ying<sup>1\*</sup>

(1. Zhangjiagang Hospital of Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanjing University of Chinese Medicine, Zhangjiagang 215600, China; 2. Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of cinnamaldehyde on transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )-induced proliferation, metastasis and epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human colorectal carcinoma cells LoVo and explore its relationship with phosphatidylinositol 3 kinase / protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway. **Method:** TGF- $\beta_1$  was used to induce EMT of human colorectal carcinoma cells LoVo, and then different concentrations of cinnamaldehyde (0, 20, 40, 80 mg·L<sup>-1</sup>) were used to intervene the TGF- $\beta_1$ -induced cells proliferation. The effect of cinnamaldehyde on cell proliferation was measured by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. Transwell assay was used to observe the changes in invasive ability of cells, and Western blot was used to analyze the expression levels of epithelial phenotype marker protein E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and key protein of phosphatidylinositol-3-kinases/ protein kinase B (PI3K/Akt) signaling

**[收稿日期]** 20161214(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81202954);苏州市科技发展计划项目(SYSD2015160)

**[第一作者]** 李洁玼, 硕士, 住院医师, 从事中西医结合抗肿瘤的基础及临床研究, Tel:15150224526, E-mail:lijiepin@yeah.net

**[通讯作者]** \*潘迎英, 主任中医师, 从事肿瘤疾病的诊断与中医疗法研究, Tel:15995995868, E-mail:576563700@qq.com

pathway. PI3K/Akt inhibitor LY290004 was used to verify the cinnamaldehyde effect in inhibiting TGF- $\beta_1$ -induced EMT through the PI3K/Akt signaling pathway. **Result:** As compared with blank controls, cinnamaldehyde effectively inhibited TGF- $\beta_1$ -induced proliferation and invasion ability ( $P < 0.01$ ), significantly increased the expression of E-cadherin, decrease the expression of N-cadherin, Vimentin, stimulated by TGF- $\beta_1$  ( $P < 0.01$ ), and meanwhile, it could reverse the expression TGF- $\beta_1$ -induced EMT through inhibiting the activation of the PI3K/Akt signaling pathway ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Cinnamaldehyde can inhibit TGF- $\beta_1$ -induced proliferation, metastasis of colorectal carcinoma cells LoVo, and the mechanism may be associated with PI3K/Akt signaling pathway.

[ **Key words** ] cinnamaldehyde; colorectal carcinoma; epithelial-mesenchymal transition (EMT); phosphatidylinositol-3-kinases/ protein kinase B (PI3K/Akt); transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ )

结直肠癌 (colorectal carcinoma, CRC) 是最常见的恶性肿瘤之一,在欧美发达国家是第 2 大癌症致死原因,在我国随着生活水平的提高,膳食结构发生改变,结直肠癌的发病率已跃居为第 3 位,严重威胁着人类的生命和健康<sup>[1-2]</sup>。有研究表明上皮间质转化 (EMT) 是癌症侵袭和转移的第一步也是关键步骤<sup>[3]</sup>,与结直肠癌的发生、进展和耐药性密切相关<sup>[4-5]</sup>。EMT 的发生与众多信号通路及细胞因子的调控密切相关,其中转化生长因子- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) 是诱导细胞发生 EMT 的关键因子,本研究利用 TGF- $\beta_1$  诱导结肠癌细胞 LoVo 发生了 EMT<sup>[6-7]</sup>。近年来,从中药中寻找具有抗肿瘤作用的化合物已成为目前学者们广泛关注的一个方向。桂皮醛 (cinnamaldehyde, CA) 已被证实具有抗氧化、抗微生物和抗糖尿病的作用<sup>[8-10]</sup>。此外,研究表明其能通过抑制增殖和诱导细胞凋亡来对抗多种肿瘤<sup>[11]</sup>。实验表明桂皮醛能通过诱导 p53 及 CD95 (APO-1) 信号通路的激活抑制肝癌 HepG2 细胞增殖,使其凋亡,其中有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路的激活也可能参与其中<sup>[12]</sup>。但以往的研究主要集中在抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡等方面,关于桂皮醛对于结肠癌细胞侵袭转移作用的研究较少,是否通过阻断 EMT 发挥其抗侵袭转移作用的研究不多,磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 通路在此过程中的作用机制也未明确。本文重点在于研究桂皮醛对结肠癌细胞 LoVo 增殖、侵袭转移及 EMT 的影响,并分析潜在机制,讨论其与 PI3K/Akt 信号通路的关系。

## 1 材料

**1.1 药物制备** 取桂皮醛原液 1  $\mu\text{L}$  (桂皮醛对照品为中国食品药品检定研究院提供,批号 110710-201516) 加入无水乙醇 49  $\mu\text{L}$ ,混匀制成 21  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  药液。实验前取 21  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  桂皮醛乙醇制备液,使用

培养液稀释得到终质量浓度为 80, 40, 20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。以上药物均在实验前现用现配。

**1.2 细胞株** 人结肠癌 LoVo 细胞株购于中国科学院上海细胞生物研究所细胞库。细胞株用含 10% 小牛血清 RPMI-1640 培养液,在 37  $^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  的环境下常规培养,取对数期生长期的细胞进行细胞实验。

**1.3 试剂** RPMI 1640 培养液 (美国 HyClone 公司,批号 AAK208935); 小牛血清,0.25% 胰酶 (美国 Gibco 公司,批号分别为 1757812, 25200-072); 甲基偶氮唑蓝 (MTT), 纤连蛋白 (FN) (美国 Sigma 公司,批号分别为 M2128, SLBM6118V); transwell 小室 (美国 Corning 公司,批号 3421); Matrix 胶 (美国 BD 公司,批号 4272007); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司,批号 IPVH00010); TGF- $\beta_1$  冻干粉 (美国 Peprotech 公司,批号 0611209-1); E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt,  $\beta$ -actin 兔抗人多克隆抗体 (Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 08/2015, 08/2016, 12/2015, 08/2015, 10/2015, 09/2015, 08/2015, 07/2015); 二抗兔抗、鼠抗 (CST 公司,批号分别为 08/2016, 09/2015)。

**1.4 仪器** 3111 型  $\text{CO}_2$  培养箱, Multiskan FC 型酶标定量测定仪 (美国 Thermo 公司); SZ61 型光学显微镜及数码相机 (日本奥林巴斯公司); 5417R 型冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司); ChemiDoc<sup>TM</sup> Touch 型蛋白质免疫印迹 (Western blot) 电泳仪, Gel Doc XR + 型凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); ACB-A 型超净工作台 (新加坡 Esco 公司); MDF-C8V1 型超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司)。

## 2 方法

**2.1 MTT 检测细胞增殖** 设置 TGF- $\beta_1$  (5  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + 桂皮醛 0, 20, 40, 80  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组, 溶剂组, 每组均设 6 个复孔。12, 24, 48 h 后, 将上清吸去, 加入 PBS 洗

1~2次,每孔加入含 MTT 的 1640 培养液 (RPMI-1640 100  $\mu\text{L}$  + MTT 20  $\mu\text{L}$ ) 120  $\mu\text{L}$ ,放入培养箱中培养 4 h。将上清弃去,每孔加入 DMSO 溶液 150  $\mu\text{L}$ ,用锡纸包裹完全后轻度振荡 8~10 min,用全自动酶标仪测量 490 nm 波长处吸光度  $A$ ,计算出各浓度桂皮醛对 LoVo 细胞的增殖抑制率,抑制率 =  $(1 - A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。实验重复 3 次。

**2.2 transwell 实验检测细胞侵袭** transwell 小室上室中加入由无血清培养液配制试剂,分组为 TGF- $\beta_1$  5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  组和桂皮醛组,先使用不同质量浓度桂皮醛 (0, 20, 40, 80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理细胞 6 h 后加入上室,此时各个浓度的桂皮醛尚未对细胞增殖产生明显的抑制作用。下室均加入完全培养基 200  $\mu\text{L}$ 。将 transwell 小室放入 24 孔板然后继续培养 24 h。24 h 后取出小室,用结晶紫染色附着于滤膜背面的细胞 30 min。每个小室随机计数 3 个视野进行拍照,在光学显微镜倍数下计数细胞,计算穿过基质胶的细胞个数,重复 3 次。

**2.3 Western bolt 检测相关蛋白表达** 向直径 10 cm 培养皿中接种  $2 \times 10^6$  个 LoVo 细胞,培养使细胞贴壁,加入不同浓度含药培养液或普通 RPMI 1640 培养液 5 mL 继续培养 24 h 后,提取细胞总蛋白,以双辛丁酸 BCA 法进行蛋白定量检测上样量。上样后进行电泳分离蛋白质。电泳结束后,采用湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜上,5% 牛血清白蛋白室温封闭 1 h 后,一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜 (一抗 1:1 000,  $\beta$ -actin 1:5 000), TBST 洗膜,二抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜,使用 ChemiDoc<sup>TM</sup> Touch 高灵敏度化学发光成像系统检测,拍照,计算目标蛋白灰度值,以目的蛋白灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值表示蛋白相对表达量。

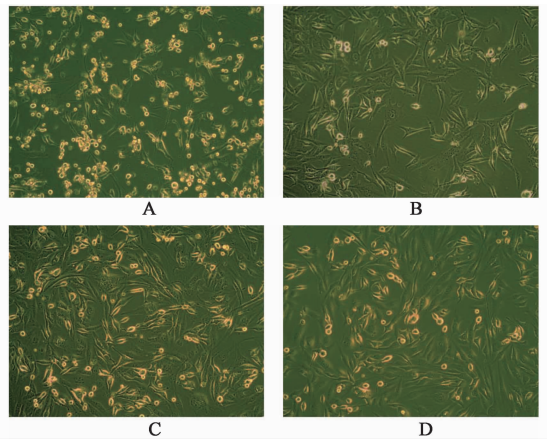
**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计分析软件处理数据,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组数据间的比较采用 Oneway-ANOVA 分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 TGF- $\beta_1$  对 LoVo 细胞形态变化的影响** 使用 TGF- $\beta_1$  (5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 诱导结肠癌细胞 LoVo 发生 EMT, TGF- $\beta_1$  刺激 12 h 即显示出较为明显的形态学改变,在 24 h 大部分细胞失去了圆形及长触角形态,多表现为长梭形或纺锤形,作用 48 h 后,细胞形态较前完全改变,细胞间距增大,连接松散,呈现明显的间质形态。见图 1。

**3.2 桂皮醛对 TGF- $\beta_1$  诱导 LoVo 细胞增殖的影响**

桂皮醛 (20, 40, 80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 分别作用 TGF- $\beta_1$



A. 0 h; B. 12 h; C. 24 h; D. 48 h

图 1 TGF- $\beta_1$  对 LoVo 细胞形态变化的影响 (倒置显微镜,  $\times 400$ )  
Fig. 1 Effect of TGF- $\beta_1$  on LoVo cell morphology changes (inverted microscope,  $\times 400$ )

(5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 诱导的 LoVo 细胞 12, 24, 48 h 时,给药浓度越高以及作用时间越长,这种抑制作用也就越强。与空白组比较,在 6 h 以内桂皮醛尚未对细胞增殖产生明显的抑制作用,在后续 transwell 侵袭实验中采用了预处理 6 h 的方式,在 48 h 时溶剂对细胞增殖有了抑制作用 ( $P < 0.05$ ),并且 48 h 后 TGF- $\beta_1$  对细胞增殖有了明显促进作用 ( $P < 0.05$ ),12 h 细胞最大抑制率未能超过,故后续均采用 24 h 给药方式。见表 1。

**3.3 桂皮醛对 TGF- $\beta_1$  诱导 LoVo 细胞侵袭能力的影响** 与空白组比较,LoVo 细胞经 TGF- $\beta_1$  刺激 24 h 后,穿膜细胞显著增多 ( $P < 0.01$ ),提示 TGF- $\beta_1$  能提高细胞侵袭能力,溶剂组对于侵袭能力没有明显影响。桂皮醛干预后,与空白组及 TGF- $\beta_1$  组比较,穿过细胞数显著降低 ( $P < 0.01$ ),且随着浓度的增加,这种抑制作用不断增强。见表 2,图 2。

**3.4 桂皮醛对 TGF- $\beta_1$  诱导 LoVo 细胞 EMT 的影响**

桂皮醛 (20, 40, 80  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用于通过 TGF- $\beta_1$  (5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 刺激的 LoVo 细胞 24 h 后,与 TGF- $\beta_1$  组比较,桂皮醛联合 TGF- $\beta_1$  组均上调了上皮型标记蛋白 E-cadherin 表达 ( $P < 0.01$ ),降低间质型标记蛋白 N-cadherin, Vimentin 的表达 ( $P < 0.01$ ),且呈一定的浓度依赖性。桂皮醛可抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的 LoVo 细胞 EMT 的发生。见图 3,表 3。

**3.5 桂皮醛及 TGF- $\beta_1$  分别对 PI3K/Akt 信号通路的影响** 与空白组比较,桂皮醛 (40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 作用细胞 24 h 后,显著抑制了活化的 p-PI3K 及 p-Akt 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ),说明桂皮醛 (40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 即可抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化。为了确定 TGF- $\beta_1$

表 1 桂皮醛对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 LoVo 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**Table 1 Effect of cinnamaldehyde on TGF-β<sub>1</sub>-induced proliferation of LoVo cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )**

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	6 h	12 h	24 h	48 h
空白	-	0	0	0	0
TGF-β <sub>1</sub>	-	0.21 ± 0.13	0.47 ± 0.64	1.09 ± 0.37	4.80 ± 0.21 <sup>1)</sup>
桂皮醛 + TGF-β <sub>1</sub>	20	1.45 ± 0.93	25.36 ± 3.153 <sup>2)</sup>	31.93 ± 1.47 <sup>2)</sup>	47.04 ± 1.47 <sup>2,4)</sup>
	40	1.11 ± 0.85	35.08 ± 2.18 <sup>2)</sup>	53.21 ± 2.34 <sup>2,4)</sup>	65.38 ± 4.78 <sup>2,4)</sup>
	80	1.83 ± 0.76	45.55 ± 3.45 <sup>2)</sup>	84.04 ± 1.99 <sup>2,4)</sup>	91.90 ± 1.54 <sup>2,4)</sup>
溶剂	-	0.69 ± 0.43	0.44 ± 0.37	1.28 ± 0.12	5.923 ± 0.33 <sup>2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与 TGF-β<sub>1</sub> 组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (图 2 同,表 2 ~ 6 同)。

表 2 桂皮醛对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 LoVo 细胞侵袭能力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

**Table 2 Effect of cinnamaldehyde on cell invasion of LoVo cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )**

组别	质量浓度/mg·L <sup>-1</sup>	穿膜细胞数/个
溶剂	-	243.73 ± 16.33
空白	-	229.66 ± 9.67
TGF-β <sub>1</sub>	-	251.33 ± 18.11 <sup>2)</sup>
桂皮醛 + TGF-β <sub>1</sub>	20	148.36 ± 14.45 <sup>2,4)</sup>
	40	100.08 ± 11.52 <sup>2,4)</sup>
	80	60.55 ± 11.23 <sup>2,4)</sup>

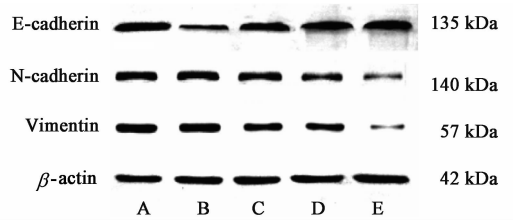


图 3 桂皮醛逆转 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 LoVo 细胞发生 EMT

**Fig. 3 Cinnamaldehyde inhibited TGF-β<sub>1</sub> induce EMT of LoVo cells**

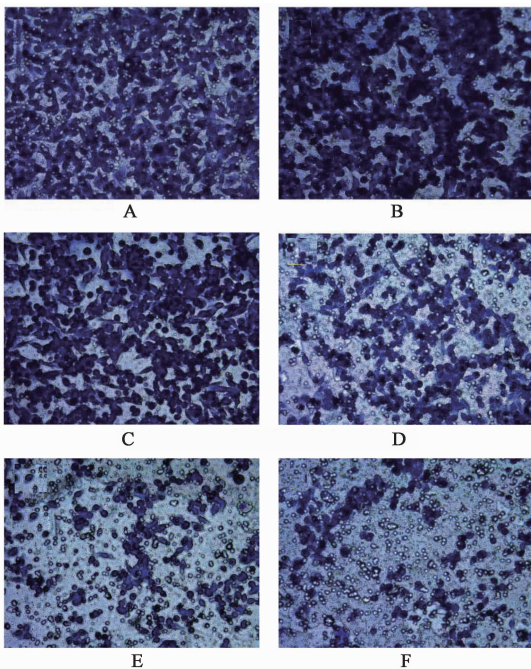
最佳刺激时间,比较 TGF-β<sub>1</sub> (5 μg·L<sup>-1</sup>) 不同时间点 (0, 0.5, 1, 2 h) 刺激细胞后 p-Akt, p-PI3K 表达, 结果发现 1 h 即可使 PI3K/Akt 通路活化, 2 h 后活化效果更佳,故采用预先 2 h 刺激细胞。见表 4, 5, 图 4。

**3.6 桂皮醛通过 PI3K/Akt 信号通路对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导 EMT 的影响** 采用抑制作用及位点明确的 LY294002 作为阳性组,检测以上各组 PI3K, Akt, p-Akt, p-PI3K 蛋白表达,明确桂皮醛的阻断效果。结果发现桂皮醛对该通路有明显的阻滞作用,与 TGF-β<sub>1</sub> 组比较,加入 LY294002 和桂皮醛后, p-Akt 水平下降 ( $P < 0.01$ ),说明 TGF-β<sub>1</sub> 对 Akt 促磷酸化的作用被 PI3K 通路阻断剂 LY294002 和桂皮醛所阻断。较 LY294002,桂皮醛即可阻滞 PI3K 的活化,亦可阻滞 Akt 活化 ( $P < 0.01$ )。

与空白组比较, TGF-β<sub>1</sub> 组上调了 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达,抑制了 E-cadherin 蛋白表达 ( $P < 0.01$ ); 与 TGF-β<sub>1</sub> 组比较,桂皮醛组及 LY294002 组 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达降低, E-cadherin 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ ),两者联合时的效果更加显著 ( $P < 0.01$ )。桂皮醛可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活实现逆转 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的上皮间质转化。见图 5,表 6。

#### 4 讨论

EMT 是指在特定的生理和病理条件下,分化的



A. TGF-β<sub>1</sub> (5 μg·L<sup>-1</sup>) 组; B. 溶剂组; C. 空白组; D. TGF-β<sub>1</sub> + 20 mg·L<sup>-1</sup> 桂皮醛组; E. TGF-β<sub>1</sub> + 40 mg·L<sup>-1</sup> 桂皮醛组; F. TGF-β<sub>1</sub> + 80 mg·L<sup>-1</sup> 桂皮醛组(图 3 同)

图 2 桂皮醛对 TGF-β<sub>1</sub> 诱导的 LoVo 细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色, ×400)

**Fig. 2 Cinnamaldehyde inhibited TGF-β<sub>1</sub> induced invasion of LoVo cells (crystal violet stained, ×400)**

表 3 桂皮醛对 EMT 相关 E-cadherin, N-cadherin, Vimentin 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Effect of cinnamaldehyde on E-cadherin, N-cadherin, Vimentin protein expression of EMT ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度	E-cadherin/ $\beta$ -actin	N-cadherin/ $\beta$ -actin	Vimentin/ $\beta$ -actin
TGF- $\beta_1$	5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.91 $\pm$ 0.16 <sup>1)</sup>	0.77 $\pm$ 0.12 <sup>2)</sup>	0.89 $\pm$ 0.13 <sup>2)</sup>
空白	-	1.04 $\pm$ 0.06	0.65 $\pm$ 0.07	0.75 $\pm$ 0.07
TGF- $\beta_1$ + 桂皮醛	5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 20 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.33 $\pm$ 0.19 <sup>2,4)</sup>	0.58 $\pm$ 0.08 <sup>2,4)</sup>	0.49 $\pm$ 0.11 <sup>2,4)</sup>
	5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.55 $\pm$ 0.08 <sup>2,4)</sup>	0.51 $\pm$ 0.07 <sup>2,4)</sup>	0.45 $\pm$ 0.06 <sup>2,4)</sup>
	5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	1.75 $\pm$ 0.06 <sup>2,4)</sup>	0.25 $\pm$ 0.05 <sup>2,4)</sup>	0.21 $\pm$ 0.02 <sup>2,4)</sup>

表 4 桂皮醛对 PI3K/Akt 信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

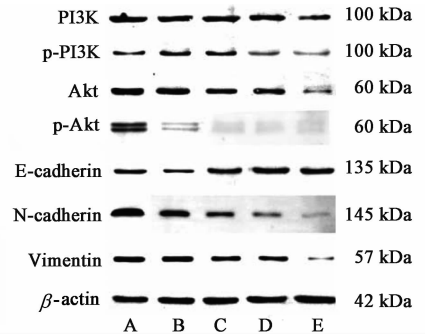
Table 4 Effect of cinnamaldehyde on PI3K/Akt signaling pathway ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	p-Akt /Akt	p-PI3K / $\beta$ -actin
空白	-	0.74 $\pm$ 0.15	0.83 $\pm$ 0.08
桂皮醛	40	0.35 $\pm$ 0.11 <sup>2)</sup>	0.42 $\pm$ 0.13 <sup>2)</sup>

表 5 TGF- $\beta_1$  对 PI3K/Akt 信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 5 Effect of TGF- $\beta_1$  on PI3K/Akt signaling pathway ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

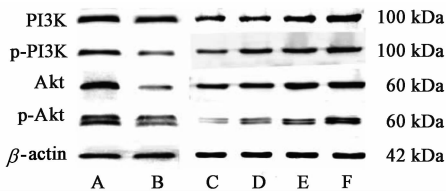
组别	时间/h	p-Akt/Akt	p-PI3K/ $\beta$ -actin
空白	-	0.19 $\pm$ 0.05	0.09 $\pm$ 0.17
TGF- $\beta_1$	0.5	0.28 $\pm$ 0.2	0.34 $\pm$ 0.09 <sup>2)</sup>
	1	0.49 $\pm$ 0.16 <sup>2)</sup>	0.62 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>
	2	0.73 $\pm$ 0.16 <sup>2)</sup>	0.81 $\pm$ 0.19 <sup>2)</sup>



A. TGF- $\beta_1$  (5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组; B. 空白组; C. TGF- $\beta_1$  (5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + LY294002 (50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 组; D. TGF- $\beta_1$  (5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + 桂皮醛 40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; E. TGF- $\beta_1$  (5  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + LY294002 (50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + 桂皮醛 40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组

图 5 桂皮醛通过 PI3K/Akt 信号通路对 TGF- $\beta_1$  诱导的 EMT 的影响

Fig. 5 Effect of cinnamaldehyde on TGF- $\beta_1$ -induced EMT via PI3K/Akt signaling pathway



A. 空白组; B. 桂皮醛 40  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  组; C. 0 h; D. 0.5 h; E. 1 h; F. 2 h

图 4 桂皮醛及 TGF- $\beta_1$  分别对 PI3K/Akt 信号通路的影响

Fig. 4 Effect of TGF- $\beta_1$  and cinnamaldehyde on PI3K/Akt signaling pathway

表 6 桂皮醛通过 PI3K/Akt 信号通路对 TGF- $\beta_1$  诱导的 EMT 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 6 Cinnamaldehyde effect on TGF- $\beta_1$ -induced EMT via PI3K/Akt signaling pathway ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	浓度	p-Akt /Akt	p-PI3K / $\beta$ -actin	E-cadherin / $\beta$ -actin	N-cadherin / $\beta$ -actin	Vimentin / $\beta$ -actin
空白	-	0.32 $\pm$ 0.16	0.39 $\pm$ 0.15	0.96 $\pm$ 0.22	0.89 $\pm$ 0.13	0.74 $\pm$ 0.27
TGF- $\beta_1$	5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	0.78 $\pm$ 0.15 <sup>2)</sup>	0.53 $\pm$ 0.22 <sup>2)</sup>	0.69 $\pm$ 0.14 <sup>2)</sup>	1.02 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	0.87 $\pm$ 0.15 <sup>1)</sup>
TGF- $\beta_1$ + LY294002	5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.17 $\pm$ 0.12 <sup>2,4)</sup>	0.42 $\pm$ 0.08 <sup>4)</sup>	1.16 $\pm$ 0.14 <sup>1,4)</sup>	0.78 $\pm$ 0.22 <sup>1,3)</sup>	0.64 $\pm$ 0.21 <sup>1,4)</sup>
TGF- $\beta_1$ + 桂皮醛	5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.15 $\pm$ 0.11 <sup>2,4)</sup>	0.20 $\pm$ 0.07 <sup>1,4)</sup>	1.23 $\pm$ 0.06 <sup>2,4)</sup>	0.68 $\pm$ 0.13 <sup>2,4)</sup>	0.61 $\pm$ 0.13 <sup>2,4)</sup>
TGF- $\beta_1$ + LY294002 + 桂皮醛	5 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ + 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ + 40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>2,4)</sup>	0.07 $\pm$ 0.03 <sup>2,4)</sup>	1.54 $\pm$ 0.11 <sup>2,4)</sup>	0.35 $\pm$ 0.12 <sup>2,4)</sup>	0.23 $\pm$ 0.08 <sup>2,4)</sup>

上皮细胞向间充质细胞的转变的现象。在病理条件下, EMT 与上皮细胞来源的肿瘤侵袭转移紧密相关<sup>[13]</sup>。这个过程伴随着细胞形态、细胞与细胞间的黏附、基质的变化及细胞信号通路转导的活性改变。通过上述途径, 肿瘤细胞才能够侵入周围环境并最终实现血液和淋巴转移。在许多上皮来源的肿瘤如乳腺癌等的侵袭和转移过程中均有 EMT 的发生<sup>[14]</sup>。E-cadherin 是上皮细胞表达的最主要的分子标记物, 参与了细胞间黏附结构的形成, 在维持上皮

细胞的黏附性和完整性中发挥着重要的作用,其表达缺失与肿瘤分期和分级呈正相关。在 EMT 的过程中,上皮细胞下调 E-cadherin,而 Vimentin 和 N-cadherin 等表达上调<sup>[15]</sup>。TGF- $\beta_1$  作为一种多功能的细胞因子,在早期作为肿瘤抑制基因,能抑制肿瘤细胞的增殖、诱导分化,促进细胞凋亡。而在晚期阶段能够通过多种机制促进肿瘤的进展,TGF- $\beta$  与受体结合后可促进多种转录因子的表达,引起上皮生物标志物 E-cadherin 表达下调,间质生物标志物 N-cadherin, Vimentin 等蛋白表达上调,使上皮来源的肿瘤细胞失去极性呈纤维样表型,黏附能力下降,细胞迁移和侵袭能力增强,促进 EMT 的发生。因此,抑制或阻断 TGF- $\beta_1$  诱导的 EMT 的发生将可成为抑制肿瘤转移的新思路<sup>[16]</sup>。目前关于小分子药物,单克隆抗体,miRNA 等抑制 EMT 的文章数以百计,其中中药单体及复方展现出较为出色的抗肿瘤及逆转 EMT 的作用,这对临床药物开发有着指导意义<sup>[17]</sup>。

桂皮醛作为从肉桂树皮中提取的一种生物活性物质,已被证实具有抗癌、抗菌、抗突变、免疫调节等多种功效<sup>[18-20]</sup>。多项研究表明桂皮醛能通过抑制增殖、诱导凋亡、逆转耐药、增强免疫力多个机制发挥抗肿瘤的作用<sup>[21-22]</sup>。但是关于桂皮醛干预结肠癌细胞侵袭转移尤其是逆转 EMT 的研究仍旧稀缺,值得探索。本研究验证了桂皮醛对 TGF- $\beta_1$  诱导的 LoVo 细胞增殖具有明显的抑制作用,与时间及浓度呈正相关性。此外 transwell 侵袭实验结果显示桂皮醛联合 TGF- $\beta_1$  组穿膜的细胞明显减少,与浓度呈正相关。进一步表明桂皮醛具有降低 LoVo 细胞侵袭的能力。

PI3K/Akt 信号通路在调节细胞增殖、维持肿瘤细胞的恶性生物学特性方面起着重要的作用,其介导 EMT 过程,对于转移性肿瘤的预防和治疗来说是一个重要靶点。研究表明 TGF- $\beta$  超家族的成员,在诱导胰腺癌细胞发生 EMT 过程中依赖于 Akt 的激活<sup>[23]</sup>。Bakin 等<sup>[24]</sup> 研究显示 PI3K/Akt 激活在肿瘤细胞中 TGF- $\beta$  诱导的 EMT 过程中必不可少。并且这一过程可以由 PI3K 抑制剂 LY294002 抑制。EMT 中最为重要的上皮标记物 E-cadherin 的表达亦受 PI3K/Akt 信号通路调控,PI3K 激活后产生第二信使 PI3K 继而使 Akt 活化,从而上调转录因子表达,直接降低细胞内的 E-cadherin 水平,导致 EMT 发生。另外 PI3K/Akt 信号通路激活后还可以通过促进基质金属蛋白酶的表达从而降解 E-cadherin<sup>[25-26]</sup>。结直肠癌组织中 PIK3 基因突变,

PTEN 表达的丢失,是导致 PI3K/Akt 信号通路异常激活的重要原因,其中 PTEN 的丢失,可直接促使结直肠癌细胞发生 EMT<sup>[27]</sup>。另外 PI3K/Akt 信号通路还可以通过调控下游 mTOR 信号的表达,激活 RhoA 信号通路来介导结直肠癌的侵袭转移<sup>[28]</sup>。以上研究表明 PI3K/Akt 信号通路的激活对诱导 EMT 有着重要的作用。本研究发现,经 TGF- $\beta_1$  诱导后 LoVo 细胞的形态变为长梭形,细胞间距增大,连接松散,呈现明显的间质形态。桂皮醛则可以逆转这一过程,不仅明显降低了 TGF- $\beta_1$  诱导的侵袭能力,促进了 E-cadherin 的表达,且降低了 N-cadherin 和 Vimentin 的表达,呈现浓度依赖性。进一步研究发现,桂皮醛能够抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化。为了进一步验证,本研究通过使用 PI3K 抑制剂 LY294002 作为阳性参照物,与 TGF- $\beta_1$  组比较,加入 PI3K 抑制剂 LY290004 明显抑制了上皮间质转化过程,表现为上调 E-cadherin,下调 N-cadherin, Vimentin, p-PI3K, p-Akt 的表达。桂皮醛作用与之相似。这些研究结果进一步验证,桂皮醛可能是通过 PI3K/Akt 通路抑制 TGF- $\beta_1$  诱导 LoVo 细胞的上皮间质转化和侵袭。

综上所述,桂皮醛可抑制 TGF- $\beta_1$  诱导的结肠癌细胞 LoVo 的侵袭及 EMT 发生,其机制可能是通过抑制 PI3K/Akt 信号通路活化来实现。这将为桂皮醛在结肠癌分子靶向治疗的应用提供新的理论依据。

#### [参考文献]

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1):5-29.
- [2] CHEN W Q, ZHENG R S, Baade P D. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [3] YE X, Weinberg R A. Epithelial-mesenchymal plasticity: a central regulator of cancer progression [J]. Trends Cell Biol, 2015, 25(11):675-686.
- [4] 陈彦, 奚松阳, 滕钰浩, 等. 常春藤皂苷元对肠癌 SW480 细胞上皮-间质转化 (EMT) 及侵袭的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(12):133-138.
- [5] DING Z, XU F, TANG J, et al. Physcion 8-O- $\beta$ -glucopyranoside prevents hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer HCT116 cells by modulating EMMPRIN [J]. Neoplasia, 2016, 63(3):351-361.
- [6] XU J, Lamouille S, Derynck R. TGF- $\beta$ -induced epithelial to mesenchymal transition [J]. Cell Res, 2009, 19(2):156-172.

- [ 7 ] Derynck R, Akhurst R J, Balmain A. TGF-beta signaling intumor suppression and cancer progression [ J ]. Nat Genet, 2001, 29( 2 ) : 117-129.
- [ 8 ] Anderson R A, Broadhurst C L, Polansky M M, et al. Isolation and characterization of polyphenol type-a polymers from cinnamon with insulin-like biological activity [ J ]. J Agric Food Chem, 2004, 52( 1 ) : 65-70.
- [ 9 ] Matan N, Rimkeeree H, Mawson A J, et al. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions [ J ]. Int J Food Microbiol, 2006, 107( 2 ) : 180-185.
- [ 10 ] Singh G, Maurya S, Delampasona M P, et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents [ J ]. Food Chem Toxicol, 2007, 45( 9 ) : 1650-1661.
- [ 11 ] Cabello C M, Lamore S D, Ley S, et al. The cinnamon-derived Michael acceptor cinnamic aldehyde impairs melanoma cell proliferation, invasiveness, and tumor growth [ J ]. Free Radic Biol Med, 2009, 46( 2 ) : 220-231.
- [ 12 ] LIN L T, TAI C J, CHANG S P, et al. Cinnamaldehyde-induced apoptosis in human hepatoma PLC/PRF/5 cells involves the mitochondrial death pathway and is sensitive to inhibition by cyclosporin A and z-VAD-fmk [ J ]. Anticancer Agents Med Chem, 2013, 13( 10 ) : 1565-1574.
- [ 13 ] Gurzu S, Turdean S, Kovcesi A, et al. Epithelial-mesenchymal, mesenchymal-epithelial, and endothelial-mesenchymal transitions in malignant tumors: an update [ J ]. World J Clin Cases, 2015, 3( 35 ) : 393-404.
- [ 14 ] Lamouille S, Subramanyam D, Blelloch R. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs [ J ]. Curr Opin Cell Biol, 2013, 25( 2 ) : 200-207.
- [ 15 ] TANG H, Massi D, Hemmings B A, et al. Akt-ions with a TWIST between EMT and MET [ J ]. Oncotarget, 2016, 38( 7 ) : 62767-62777.
- [ 16 ] HAN J, Alvarez-Breckenridge C A, WANG Q E. TGF-beta signaling and its targeting for glioma treatment [ J ]. Am J Cancer Res, 2015, 5( 3 ) : 945-955.
- [ 17 ] 朱耀东, 刘延庆. 中药抑制肿瘤上皮间质转化的研究 [ J ]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20( 6 ) : 228-232.
- [ 18 ] Ali S M, Khan A A, Ahmed I, et al. Antimicrobial activities of eugenol and cinnamaldehyde against the human gastric pathogen helicobacter pylori [ J ]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2005, 43( 1 ) : 5275-5277.
- [ 19 ] Reddy A M, Seo J H, Ryu S Y, et al. Cinnamaldehyde and 2-methoxycinnamaldehyde as NF- $\kappa$ B inhibitors from cinnamomum cassia [ J ]. Planta Med, 2004, 70( 9 ) : 823-827.
- [ 20 ] Imai T, Yasuhara K, Tamura T, et al. Inhibitory effects of cinnamaldehyde on 4-( methylnitrosamino )-1-( 3-pyridyl )-1-butanone-induced lung carcinogenesis in rasH2 mice [ J ]. Cancer Lett, 2002, 175( 1 ) : 9-16.
- [ 21 ] Kwon B M, Lee S H, Choi S U, et al. Synthesis and *in vitro* cytotoxicity of cinnamaldehydes to human solid tumor cells [ J ]. Arch Pharm Res, 1998, 21( 2 ) : 147-152.
- [ 22 ] Koppikar S J, Choudhari A S, Suryavanshi S A, et al. Aqueous cinnamon extract ( ACE-c ) from the bark of cinnamomum cassia causes apoptosis in human cervical cancer cell line ( SiHa ) through loss of mitochondrial membrane potential [ J ]. BMC Cancer, 2010, 10( 1 ) : 1-12.
- [ 23 ] CHEN X, LIAO J, LU Y, et al. Activation of the PI3K/ Akt pathway mediates bone morphogenetic protein 2-induced invasion of pancreatic cancer cells Panc-1 [ J ]. Pathol Oncol Res, 2011, 17( 2 ) : 257-261.
- [ 24 ] Bakin A V, Tomlinson A K, Bhowmick N A, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration [ J ]. J Biol Chem, 2000, 275( 47 ) : 36803-36810.
- [ 25 ] Natalwala A, Spychal R, Selepis C. Epithelial-mesenchymal transition mediated tumorigenesis in the gastrointestinal tract [ J ]. World J Gastroenterol, 2008, 14( 24 ) : 3792-3797.
- [ 26 ] KANG M H, Oh S C, Lee H J, et al. The role of PI3K/ Akt, MAPK, the NF-kappaB pathway, and MMP-9 expression [ J ]. Exp Cell Res, 2011, 317( 12 ) : 1746-1762.
- [ 27 ] Katoh K, Katoh M. Cross-talk of WNT and FGF signaling pathways at GSK3beta to regulate beta-catenin and SNAIL signaling cascades [ J ]. Cancer Biol Ther, 2006, 5( 9 ) : 1059-1064.
- [ 28 ] TANG F Y, PAI M H, Chiang E P. Consumption of highfat diet induces tumor progression and epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer in a mouse xenograft model [ J ]. Nutr Biochem, 2012, 23( 10 ) : 1302-1313.

[ 责任编辑 张丰丰 ]