

## 小檗碱与吴茱萸碱联用对结直肠癌细胞迁移、侵袭能力的影响

陈宁宁<sup>1</sup>, 蒋义芳<sup>1</sup>, 杨懿<sup>1</sup>, 赵梓亦<sup>1</sup>, 由凤鸣<sup>1,2</sup>, 严然<sup>1,2\*</sup>

(1. 成都中医药大学附属医院, 代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室, 成都 610075;

2. 成都中医药大学肿瘤研究所, 成都 610072)

**[摘要]** 目的: 观察小檗碱与吴茱萸碱联用对结直肠癌HCT116、RKO细胞迁移、侵袭能力的影响, 并探究其可能机制。方法: 细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)法检测小檗碱(30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、吴茱萸碱(0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )及两药联用(30+0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对HCT116及RKO细胞增殖的抑制作用; 划痕实验、转移小室(Transwell)实验检测小檗碱、吴茱萸碱及两药联用对HCT116及RKO细胞迁移、侵袭能力的影响; 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小檗碱、吴茱萸碱及两药联用对HCT116及RKO细胞中上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、蛋白激酶B(Akt)蛋白表达的影响。结果: 与空白组比较, 小檗碱组和吴茱萸碱组对HCT116及RKO细胞增殖、迁移、侵袭能力无明显抑制作用, 两药联用组能显著抑制HCT116及RKO细胞增殖、迁移、侵袭能力( $P<0.01$ ); 与空白组比较, 小檗碱组和吴茱萸碱组对HCT116及RKO细胞中PI3K、N-cadherin、E-cadherin蛋白表达无明显作用, 而两药联用组能显著降低HCT116及RKO细胞中PI3K、N-cadherin蛋白表达( $P<0.01$ ), 升高E-cadherin蛋白表达( $P<0.01$ )。其中, 吴茱萸碱组也能显著抑制HCT116及RKO细胞中Akt蛋白表达( $P<0.05$ ), 但这种抑制作用弱于两药联用组。结论: 小檗碱与吴茱萸碱联用能够显著抑制结肠癌HCT116、RKO细胞迁移、侵袭能力, 发挥协同增效作用, 其作用机制可能与下调PI3K、Akt蛋白表达水平相关。

**[关键词]** 小檗碱; 吴茱萸碱; 结肠癌; 细胞迁移; 细胞侵袭; 磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)24-0098-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20221529

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220602.1724.003.html>

**[网络出版日期]** 2022-06-06 11:38

### Effect of Berberine Combined with Evodiamine on Migration and Invasion of Colorectal Cancer Cells

CHEN Ningning<sup>1</sup>, JIANG Yifang<sup>1</sup>, YANG Yi<sup>1</sup>, ZHAO Ziyi<sup>1</sup>, YOU Fengming<sup>1,2</sup>, YAN Ran<sup>1,2\*</sup>

(1. *Traditional Chinese Medicine (TCM) Regulating Metabolic Diseases Key Laboratory of*

*Sichuan Province, Hospital of Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China;*

*2. Cancer Institute, Chengdu University of TCM, Chengdu 610072, China)*

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of berberine combined with evodiamine on the migration and invasion of colorectal cancer HCT116 and RKO cells and to explore the underlying mechanism. **Method:** cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to examine the proliferation of HCT116 and RKO cells treated by berberine (30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), evodiamine (0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and combination of two (30  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ +0.8  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), respectively. Scratch assay and Transwell assay were employed to detect the migration and invasion of HCT116 and RKO cells treated with berberine, evodiamine, and the combination, separately. In addition, the protein expression of epithelial cadherin (E-cadherin), neural cadherin (N-cadherin), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), and protein kinase B (Akt) in HCT116 and RKO cells treated with the berberine, evodiamine, and the

**[收稿日期]** 2022-02-15

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81803994); 成都中医药大学“杏林学者”学科人才科研提升计划项目(QJRC2021003)

**[第一作者]** 陈宁宁, 在读硕士, 从事中医肿瘤病证治法与方药研究, E-mail: 2416408380@qq.com

**[通信作者]** \* 严然, 硕士, 讲师, 主治医师, 从事中医肿瘤病证治法与方药研究, E-mail: yanran@cdutcm.edu.cn

combination was respectively measured by Western blot. **Result:** Compared with the blank group, berberine alone and evodiamine alone had no significant inhibitory effect on the proliferation, migration, and invasion of HCT116 and RKO cells, while the combination showed significant inhibition ( $P < 0.01$ ). Berberine alone and evodiamine alone had no remarkable influence on the expression of PI3K, N-cadherin, and E-cadherin in HCT116 and RKO cells, but the combination significantly reduced the expression of PI3K and N-cadherin ( $P < 0.01$ ) and increased the expression of E-cadherin ( $P < 0.01$ ) in HCT116 and RKO cells. Evodiamine alone also significantly suppressed the expression of Akt protein in HCT116 and RKO cells ( $P < 0.05$ ), but the suppression was weaker than that of the combination. **Conclusion:** The combination of berberine and evodiamine can significantly inhibit the migration and invasion of colorectal cancer HCT116 and RKO cells and the two show synergy. The mechanism is the likelihood that the combination down-regulates the expression of PI3K and Akt.

**[Keywords]** berberine; evodiamine; colon cancer; cell migration; cell invasion; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway

结直肠癌(CRC)是威胁全球人类健康的重大疾病之一。据2020年全球癌症数据统计显示,在全球范围内,结直肠癌以每年超110万新发病例数、57万死亡病例数位居所有恶性肿瘤第5位,发病率与死亡率呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>。在中国,仅2020年新发结直肠癌病例就近56万,位居所有新发癌症第2位,死亡病例数高达29万<sup>[2]</sup>。尽管早期诊断、手术、放/化学等方法在治疗结直肠癌取得了重大进展,但局部肿瘤演进直至发展为远处转移仍是导致患者不良预后与死亡的主要原因<sup>[3]</sup>。药对是中医临床常用的最小组方单位,其具有减毒增效之用,如“麻黄无桂枝不汗”“附子无干姜不热”等。黄连-吴茱萸药对始于宋朝时期,两者一寒一热,一苦一辛,调复脏腑升降平衡,常用于消化系统疾病,现代研究发现该药对对消化道肿瘤具有显著的药理作用。小檗碱属于异喹啉类生物碱,是黄连的主要成分之一,已有多项研究证明其具有明确的抗菌、抗炎和抗癌等作用<sup>[4-5]</sup>;吴茱萸碱是活性生物碱,为吴茱萸的主要成分之一,目前已表明其具有抗癌、抗炎和抗肥胖等作用<sup>[6]</sup>。既往研究小檗碱和吴茱萸碱联合使用可以通过靶向微小RNA-17-92基因簇(microRNA-17-92)抑制转录因子E2F1蛋白的表达,进而抑制HT29细胞的增殖<sup>[7]</sup>,并且二者联合使用可以下调端粒酶逆转录酶(hTERT)基因的表达,降低端粒酶的活性,对结肠癌HT29细胞具有显著生长抑制<sup>[8]</sup>。同时研究中也发现在小檗碱和吴茱萸碱联合使用抑制多药耐药糖蛋白(P-gp)基因的过表达,对结肠癌Caco-2细胞的生长具有显著的抑制作用<sup>[9]</sup>。可见,小檗碱和吴茱萸碱联用对结肠癌治疗具有一定的疗效。但小檗碱和吴茱萸碱联合使用对结肠癌细胞转移是否发挥相同的抑制作用,尚未

见报道。本实验拟通过观察小檗碱与吴茱萸碱联用对结直肠癌HCT116、RKO细胞迁移和侵袭的影响,并进一步探究其可能作用机制。

## 1 材料

**1.1 细胞** HCT116和RKO细胞(成都Beyotime公司,批号分别为C6309、C6763),由成都中医药大学附属医院代谢性疾病中医药调控四川省重点实验室传至第3代用于后续实验。

**1.2 药品与试剂** 小檗碱、吴茱萸碱(成都Chroma公司,批号分别为483158, 518172, 纯度 $\geq 98\%$ ); DMEM高糖培养基、0.25%胰蛋白酶、胎牛血清、青链霉素(美国Gibco公司,批号分别为8121512、2277233、30044333、10378016);  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)、磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)、上皮型钙黏蛋白(E-cadherin)、神经型钙黏蛋白(N-cadherin)一抗(美国Abcam公司,批号分别为AH11286487、AH09204985、ab40772、ab207608);一抗蛋白激酶B(Akt)、二抗羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G-HRP(美国Proteintech公司,批号分别为60203-2-Ig、BJ08079044);细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒(美国AbMole公司,批号C0038);Transwell小室、Matrigel基质胶(美国Corning公司,批号分别为0308002、3422);二甲基亚枫、0.1%结晶紫(成都Solarbio公司,批号分别为D8370、G1063)。

**1.3 仪器** Biobase型酶标仪(山东博科生物公司); 1X71型倒置显微镜(日本Olympus公司); MINICHEMI™型凝胶成像系统(美国Thermo Fisher Scientific公司); 371型CO<sub>2</sub>细胞培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司); Power Pac HV型电泳仪、Trans-blot SD型转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 人结肠癌HCT116、RKO细胞培养及传代** 将HCT116、RKO细胞均培养于含有10%胎牛血清+1%青链霉素的DMEM高糖培养基中,待细胞长至90%时,按1:2进行传代,待后续实验使用。

**2.2 分组与给药** 取对数生长期细胞,制成细胞悬液 $1 \times 10^4$ 个/mL,均匀铺于96孔板,每孔100  $\mu$ L。分为空白组、小檗碱组(30  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )、吴茱萸碱组(0.8  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )及两药联用组(30+0.8  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )。除空白组正常培养外,小檗碱、吴茱萸碱组及两药联用组分别予相应药物浓度处理24 h,加入CCK-8工作液(10  $\mu$ L/孔)检测小檗碱组、吴茱萸碱组及两药联用组对细胞活力的影响。

**2.3 小檗碱与吴茱萸碱联用对结肠癌细胞迁移能力的影响** 划痕实验检测细胞迁移能力。使用Mark笔在6孔板的背面画十字交叉的横线。取对数生长期的细胞,0.25%胰酶消化后,制成单细胞悬液 $1 \times 10^6$ 个/mL均匀铺于6孔板中,待细胞铺满板底时,分为空白组、小檗碱组(30  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )、吴茱萸碱组(0.8  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )及两药联用组(30+0.8  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ ),随后用无菌200  $\mu$ L枪头进行划痕,盐酸缓冲液冲洗漂浮的细胞;每孔中加入不含胎牛血清的DMEM培养基2 mL,37  $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下培养24 h。在倒置显微镜下随机选择3个独立视野观察划痕愈合情况。

**2.4 小檗碱与吴茱萸碱联用对结肠癌细胞侵袭、迁移能力的影响** Transwell侵袭实验检测结肠癌细胞侵袭能力。DMEM培养基、Matrigel基质胶按8:1比例稀释混匀后,50  $\mu$ L垂直缓慢的加入上室中,放于37  $^{\circ}$ C下4 h待其凝固。取对数生长期的细胞,0.25%胰酶消化后,用不含胎牛血清的DMEM培养基调整细胞密度至 $5 \times 10^3$ 个/mL,取200  $\mu$ L加入上室中;在下室中加入含10%胎牛血清的DMEM培养基500  $\mu$ L。分为空白组、小檗碱组(30  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )、吴茱萸碱组(0.8  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )及两药联用组(30+0.8  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ ),置于37  $^{\circ}$ C、5% CO $_2$ 条件下培养48 h,使用10%多聚甲醛固定10 min,0.1%结晶紫染色20 min。倒置显微镜下随机选择3个独立视野进行拍照。Image J分析穿膜细胞个数。Transwell迁移实验不加Matrigel基质胶,其余步骤同Transwell侵袭实验。

**2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测E-cadherin、N-cadherin、PI3K、Akt蛋白的表达** 取对数生长的细胞,0.25%胰酶消化,均匀铺于6孔板

中,分为空白组、小檗碱组(30  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )、吴茱萸碱组(0.8  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )及两药联用组(30+0.8  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )。蛋白提取后按照BCA试剂盒说明书进行蛋白浓度测定。采用PAGE凝胶快速制备试剂盒制备1.0 mm凝胶,SDS-PAGE电泳,先90 V后转140 V跑胶60 min,300 mA转膜90 min,5%脱脂奶粉封闭30 min,一抗 $\beta$ -actin(1:3 000)、PI3K(1:1 000)、Akt(1:1 000)、E-cadherin(1:500)、N-cadherin(1:2 000)进行稀释后孵育,4  $^{\circ}$ C过夜,TBST清洗3次,每次5 min,二抗羊抗兔(1:5 000)稀释比例进行稀释,室温孵育2 h,随后TBST清洗3次,每次5 min,ECL化学发光显色,用凝胶成像分析系统进行拍照,Image J软件测定条带灰度值,进行统计分析。

**2.6 统计学分析** GraphPad Prism 8.0软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义)。

## 3 结果

**3.1 小檗碱与吴茱萸碱联用对结肠癌细胞增殖的影响** 与空白组比较,小檗碱组(30  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )、吴茱萸碱组(0.8  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )对HCT116及RKO细胞增殖无明显抑制作用,两药联用组(30+0.8  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )能显著抑制HCT116和RKO细胞的增殖能力( $P < 0.01$ )。并且这种联用效果在RKO细胞中效果更显著。见表1、表2。

表1 小檗碱、吴茱萸碱对HCT116、RKO细胞活力的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of berberine and evodiamine on viability of HCT116 and RKO cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$	细胞活力/%	
		HCT116	RKO
空白组		100.00 $\pm$ 6.20	100.00 $\pm$ 3.50
小檗碱组	10	97.60 $\pm$ 5.23	98.55 $\pm$ 0.60
	20	98.56 $\pm$ 4.29	96.16 $\pm$ 0.34
	30	96.00 $\pm$ 0.44	95.68 $\pm$ 0.68
	35	85.78 $\pm$ 4.59	76.23 $\pm$ 1.70 <sup>2)</sup>
空白组		100.00 $\pm$ 0.03	100.00 $\pm$ 0.29
吴茱萸碱组	0.1	98.47 $\pm$ 0.25	96.86 $\pm$ 4.60
	0.4	95.93 $\pm$ 2.42	97.61 $\pm$ 2.35
	0.8	94.03 $\pm$ 1.16	90.85 $\pm$ 4.46
	1	78.89 $\pm$ 4.17 <sup>2)</sup>	85.33 $\pm$ 3.70 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表2-表7同)

**3.2 小檗碱与吴茱萸碱联用对细胞迁移能力的影响** 与空白组比较,小檗碱组(30  $\mu$ mol $\cdot$ L $^{-1}$ )、吴茱

表2 两药联用对HCT116、RKO细胞活力的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of combination of two drugs on viability of HCT116 and RKO cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞活力/%	
		HCT116	RKO
空白组		100.00±2.36	100.00±4.75
小檗碱组	30	83.50±1.85	97.21±5.77
吴茱萸碱组	0.8	86.22±6.32	96.21±0.51
两药联用组	30+0.8	56.04±9.91 <sup>2)</sup>	65.18±4.34 <sup>2)</sup>

萸碱组( $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对HCT116及RKO细胞划痕愈合率无明显影响,两药联用( $30+0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )能显著抑制HCT116及RKO细胞的划痕愈合率( $P<0.01$ )。见表3、图1。

与空白组比较,小檗碱组( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、吴茱

表3 两药联用对HCT116、RKO细胞划痕愈合率的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of combination of two drugs on wound healing rate of HCT116 and RKO cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	划痕愈合率/%	
		HCT116	RKO
空白组		39.22±3.14	50.07±2.93
小檗碱组	30	33.03±2.79	49.07±4.34
吴茱萸碱组	0.8	31.53±1.92	49.56±3.62
两药联用组	30+0.8	3.90±1.21 <sup>2)</sup>	13.30±1.84 <sup>2)</sup>

萸碱组( $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对HCT116及RKO细胞迁移个数无明显影响,两药联用( $30+0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )能显著抑制HCT116及RKO细胞的迁移个数( $P<0.01$ )。见图2、表4。

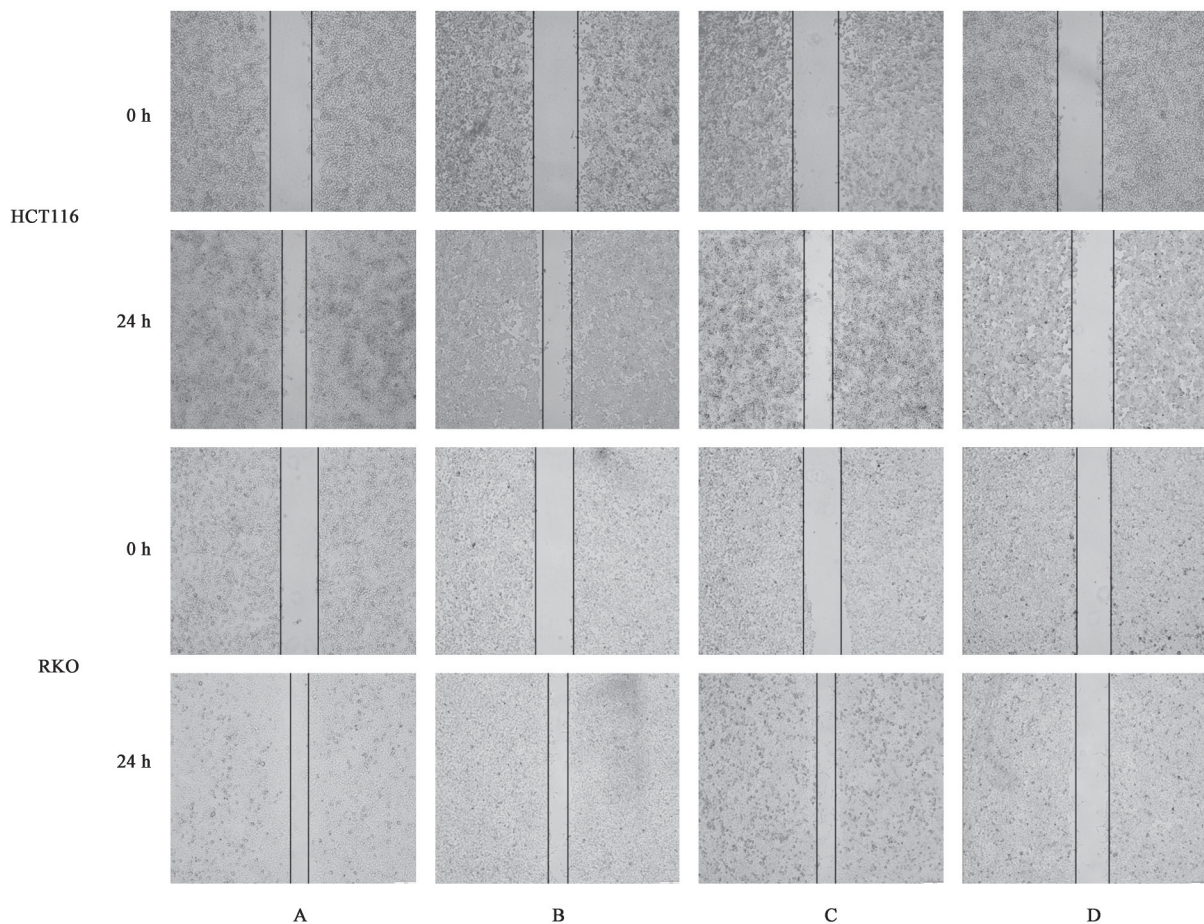


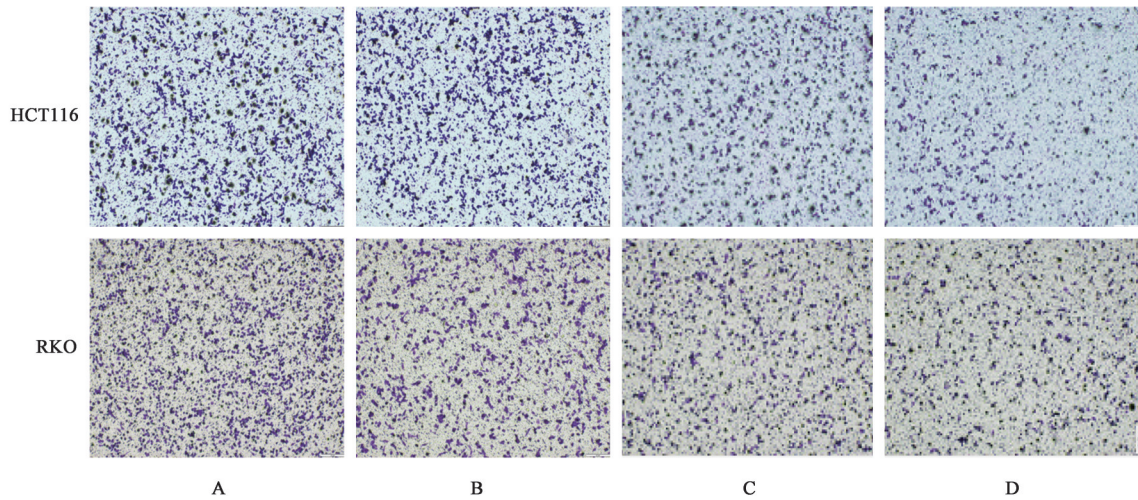
图1 两药联用对HCT116、RKO细胞迁移能力的影响(倒置显微镜,×200)

Fig. 1 Effect of combination of two drugs on migration ability of HCT116 and RKO cells (inverted microscope, ×200)

**3.3 小檗碱与吴茱萸碱联用对细胞侵袭能力的影响** 与空白组比较,小檗碱组( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、吴茱萸碱组( $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对HCT116及RKO细胞穿膜个数无影响,两药联用( $30+0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )能显著抑制HCT116及RKO细胞的穿膜个数( $P<0.01$ )。见

表5、图3。

**3.4 小檗碱与吴茱萸碱联用对细胞E-cadherin、N-cadherin、PI3K、Akt蛋白表达的影响** 与空白组比较,小檗碱组( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、吴茱萸碱组( $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对HCT116及RKO细胞中



注:A.空白组;B.小檗碱组;C.吴茱萸碱组;D.两药联用组(图2、图3同)

图2 两药联用对HCT116、RKO细胞迁移能力的影响(倒置显微镜,×200)

Fig. 2 Effect of combination of two drugs on migration ability of HCT116 and RKO cells (inverted microscope, ×200)

表4 两药联用对HCT116、RKO细胞迁移个数的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of combination of two drugs on migration number of HCT116 and RKO cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞迁移个数/个	
		HCT116	RKO
空白组		3 941±264	4 074±129
小檗碱组	30	3 667±237	3 936±60
吴茱萸碱组	0.8	3 637±158	3 876±61
两药联用组	30+0.8	1 978±125 <sup>2)</sup>	2 942±82 <sup>2)</sup>

表5 两药联用对HCT116、RKO细胞穿膜个数的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of combination of two drugs on number of penetration patterns of HCT116 and RKO cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	细胞穿膜个数/个	
		HCT116	RKO
空白组		5 230±144	4 602±143
小檗碱组	30	5 089±124	4 231±175
吴茱萸碱组	0.8	4 820±59	4 143±150
两药联用组	30+0.8	2 639±290 <sup>2)</sup>	2 645±226 <sup>2)</sup>

E-cadherin、N-cadherin、PI3K蛋白的表达无影响,两药联用( $30+0.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )能显著上调HCT116及RKO细胞中E-cadherin蛋白表达( $P<0.01$ ),下调N-cadherin、PI3K蛋白表达( $P<0.01$ )。同时,吴茱萸

碱组( $0.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )能显著抑制HCT116及RKO细胞中Akt蛋白表达( $P<0.05$ ),这种抑制作用小于两药联用组( $30+0.8 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )对HCT116及RKO细胞Akt的蛋白表达( $P<0.01$ )。见表6、表7、图4。

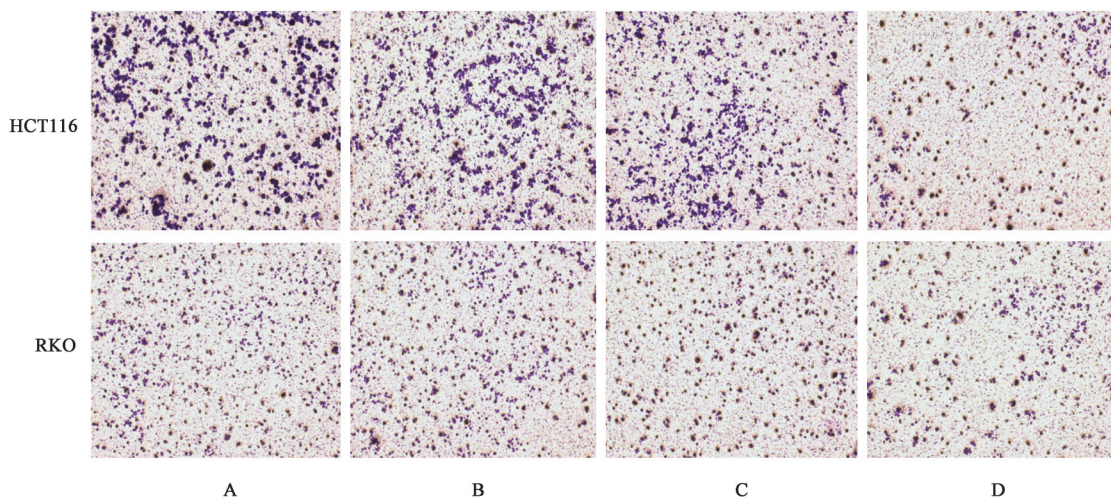


图3 两药联用对HCT116、RKO细胞侵袭能力的影响(结晶紫,×200)

Fig. 3 Effect of combination of two drugs on invasive ability of HCT116 and RKO cells (crystalviolet, ×200)

表6 两药联用对HCT116细胞PI3K、Akt、E-cadherin、N-cadherin蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of combination of two drugs on PI3K, Akt, E-cadherin and N-cadherin in HCT116 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PI3K/ $\beta$ -actin	Akt/ $\beta$ -actin	E-cadherin/ $\beta$ -actin	N-cadherin/ $\beta$ -actin
空白组		0.95 $\pm$ 0.01	0.97 $\pm$ 0.03	0.98 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.02
小檗碱组	30	0.96 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.02	0.98 $\pm$ 0.01	0.94 $\pm$ 0.02
吴茱萸碱组	0.8	0.97 $\pm$ 0.01	0.84 $\pm$ 0.06 <sup>1)</sup>	0.97 $\pm$ 0.04	0.91 $\pm$ 0.04
两药联用组	30+0.8	0.59 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.62 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	1.21 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>	0.59 $\pm$ 0.01 <sup>2)</sup>

表7 两药联用对RKO细胞PI3K、Akt、E-cadherin、N-cadherin蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of combination of two drugs on PI3K, Akt, E-cadherin and N-cadherin in RKO cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PI3K/ $\beta$ -actin	Akt/ $\beta$ -actin	E-cadherin/ $\beta$ -actin	N-cadherin/ $\beta$ -actin
空白组		0.96 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.01	0.96 $\pm$ 0.03	0.98 $\pm$ 0.02
小檗碱组	30	0.95 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0.01	0.95 $\pm$ 0.02
吴茱萸碱组	0.8	0.96 $\pm$ 0.01	0.80 $\pm$ 0.02 <sup>1)</sup>	0.98 $\pm$ 0.02	0.93 $\pm$ 0.01
两药联用组	30+0.8	0.44 $\pm$ 0.02 <sup>2)</sup>	0.53 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	1.33 $\pm$ 0.04 <sup>2)</sup>	0.47 $\pm$ 0.03 <sup>2)</sup>

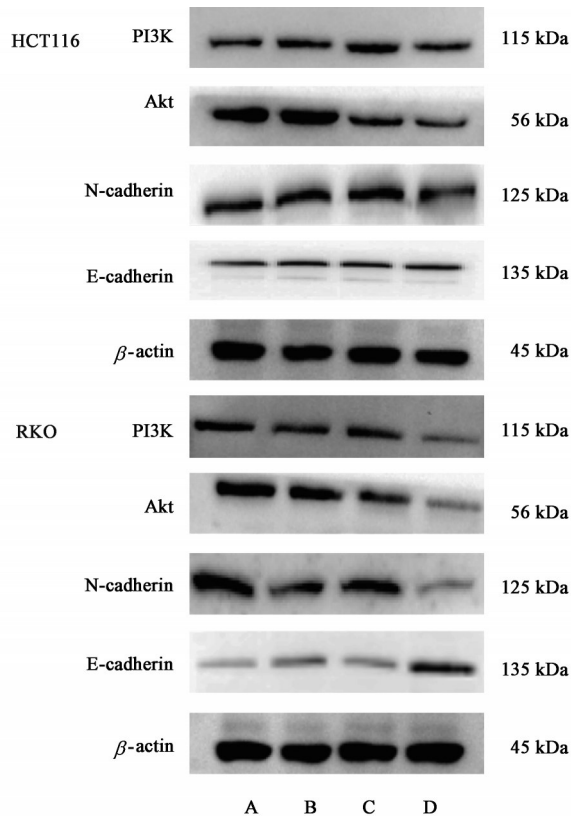


图4 HCT116、RKO细胞中PI3K、Akt、E-cadherin、N-cadherin电泳

Fig. 4 Electrophoresis of combination of two drugs on PI3K, Akt, E-cadherin and N-cadherin in HCT116 and RKO cells

#### 4 讨论

结直肠癌侵袭与转移是受多种因素调控、多阶段发展的动态过程,同时也是结肠癌患者死亡的主要原因。即使在接受6个月术后辅助化疗,仍有接近25%的Ⅲ期结肠癌患者在术后3年内发生转移。一旦出现转移,患者术后5年生存率仅为10%左

右<sup>[10]</sup>。因此,预防结直肠癌的侵袭与转移是至关重要的。

既往研究表明,小檗碱和吴茱萸碱联合用药对癌细胞转移发挥潜在的协同作用。研究发现小檗碱和吴茱萸碱联合用药后可以协同增效,并且可以通过调控PI3K/Akt信号通路抑制人胃癌SGC7901细胞的上皮间质转化<sup>[11]</sup>,以及可以通过基质金属蛋白酶(MMP)抑制B16F-10黑色素瘤的侵袭与迁移能力<sup>[12]</sup>,同时小檗碱和吴茱萸碱联合使用也可以抑制乳腺癌细胞的侵袭与转移<sup>[13]</sup>。然而小檗碱和吴茱萸碱联合使用对结肠癌转移尚未进行深入的探讨。本研究首次探讨了小檗碱和吴茱萸碱联合使用对结肠癌转移的影响。结果表明,小檗碱组(30  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )、吴茱萸碱组(0.8  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )对结肠癌HCT116、RKO细胞均不产生杀伤细胞的作用,但两药联用组(30+0.8  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )时不仅能显著抑制结肠癌HCT116、RKO细胞增殖能力,而且对结肠癌细胞HCT116、RKO侵袭、迁移能力的抑制作用较单独使用小檗碱、吴茱萸碱显著增加。该结果在细胞水平证实了小檗碱和吴茱萸碱联用具有抑制结肠癌细胞增殖、侵袭、迁移的作用。

PI3K/Akt信号通路失调与肿瘤细胞的活化增殖、凋亡及侵袭转移行为密切相关<sup>[14]</sup>。激活后的PI3K,能催化PIP2的3位羟基磷酸化生成PIP3,生成的PIP3充当第二信使,同时招募PDK1和Akt蛋白到质膜上,导致Akt活化<sup>[15]</sup>。活化后的Akt不但可以改变上皮细胞的形态、诱导细胞成瘤,还可以通过下调E-钙黏蛋白及 $\beta$ -连环蛋白和上调间充质细胞波形蛋白,诱导EMT发生<sup>[16]</sup>。在本研究中,小

槲碱组( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、吴茱萸碱组( $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )对结肠癌 HCT116、RKO 细胞 E-cadherin、N-cadherin、PI3K、Akt 的蛋白表达均无明显作用,而两药联用( $30+0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )能明显抑制 HCT116、RKO 细胞中 PI3K、Akt、N-cadherin 的蛋白表达,同时上调 E-cadherin 的蛋白表达。同时本研究也发现,吴茱萸碱组( $0.8 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )也能够抑制结肠癌 HCT116、RKO 细胞中 Akt 蛋白的表达,但其抑制作用小于两药联用。以上结果说明小檗碱和吴茱萸碱联用可能通过下调 PI3K、Akt 蛋白的表达发挥协同抗结肠癌转移的作用。

综上所述,小檗碱和吴茱萸碱联用可以显著抑制结肠癌的侵袭与迁移,并且小檗碱和吴茱萸联合使用的效果远大于单独使用小檗碱和吴茱萸碱。本研究仅进行了体外实验,缺乏体内研究,下一步将建立动物实验模型,进一步确认小檗碱和吴茱萸碱抗结肠癌转移的作用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] BIRGISSON H, OLAFSDOTTIR E J, SVERRISDOTTIR A, et al. Screening for cancer of the colon and rectum A review on incidence, mortality, cost and benefit[J]. Laeknabladid, 2021, 107(9):398-405.
- [2] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: A secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. Chin Med J (Engl), 2021, 17134(7):783-791.
- [3] BALCIK-ERCIN P, CAYREFOURCQ L, SOUNDARARAJAN R, et al. Epithelial-to-mesenchymal plasticity in circulating tumor cell lines sequentially derived from a patient with colorectal cancer[J]. Cancers (Basel), 2021, 2813(21):5408.
- [4] ATANASOV A G, ZOTCHEV S B, DIRSCH V M, et al. International natural product sciences taskforce, supuran CT. Natural products in drug discovery: Advances and opportunities [J]. Nat Rev Drug Discov, 2021, 20(3):200-216.
- [5] RAUF A, ABU-IZNEID T, KHALIL A A, et al. Berberine as a potential anticancer agent: A comprehensive review [J]. Molecules, 2021, 426(23):7368.
- [6] 杨春启,连闻雨,王宇光,等. 吴茱萸碱药理与毒理研究进展[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(20):5218-5225.
- [7] 常金荣,王建华,邝枣园,等. 从 miRNA-17-92 途径探讨小檗碱和吴茱萸碱对大肠癌 HT29 细胞周期调控机制[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3):19-22.
- [8] 常金荣,陈蔚文,王建华,等. 吴茱萸碱和盐酸小檗碱对大肠癌 HT29 细胞端粒酶活性的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(7):1326-1329.
- [9] GUAN X, ZHENG X, VONG C T, et al. Combined effects of berberine and evodiamine on colorectal cancer cells and cardiomyocytes *in vitro* [J]. Eur J Pharmacol, 2020, 15875:173031.
- [10] GURBA A, TACIAK P, SACHARCZUK M, et al. Gold (III) derivatives in colon cancer treatment [J]. Int J Mol Sci, 2022, 1023(2):724.
- [11] 王小兰,幸尚平,肖建勇,等. 左金方及其主要成分小檗碱对人胃癌细胞 SGC7901 上皮间质转化的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(12):62-67.
- [12] 王旭华,徐顶巧,黄露,等. 黄连-吴茱萸药对配伍机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3):266-274.
- [13] 吴焱,李想,石海莲,等. 盐酸小檗碱与吴茱萸碱联用抑制乳腺癌转移的作用机制 [J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(12):1165-1168.
- [14] LEI Y, WANG Y H, WANG X F, et al. LINC00657 promotes the development of colon cancer by activating PI3K/Akt pathway [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2021, 25(6):2460.
- [15] THAPA N, CHEN M, HORN H T, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase signalling is spatially organized at endosomal compartments by microtubule-associated protein 4 [J]. Nat Cell Biol, 2020, 22(11):1357-1370.
- [16] 胡蕾,姜汉国. PI3K/Akt 信号转导通路与肿瘤转移及其机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2006, (22):1375-1377.

[责任编辑 张丰丰]