

乙酰哈巴昔通过 Wnt 信号通路诱导结肠癌 HCT116 细胞凋亡

周兴,尹倩,黄蓉,简兵,蔡晓明*

川北医学院 基础医学院创新实验室,南充 637100

摘要:本文探讨乙酰哈巴昔诱导结肠癌 HCT116 细胞凋亡机制。采用流式细胞术检测乙酰哈巴昔对 HCT116 细胞周期及凋亡的影响,发现细胞周期被阻滞在 G1 期,0.75 mmol/L 乙酰哈巴昔处理 48 h 后,细胞凋亡明显增加。转录组测序显示乙酰哈巴昔引起 HCT116 细胞 1 921 个 mRNA 上调和 2 208 个 mRNA 下调,可显著影响 Wnt 信号通路。RT-qPCR 和 Western blot 验证实验表明,乙酰哈巴昔处理后,HCT116 细胞中 β -catenin、CyclinD1、Survivin、Bcl-2 和 c-Myc 蛋白显著降低($P < 0.05$),凋亡相关蛋白 Bax 和 cleaved-caspase3 表达增加($P < 0.05$)。上述结果表明,乙酰哈巴昔主要通过 Wnt 信号通路抑制结肠癌细胞增殖并诱导细胞凋亡。

关键词:乙酰哈巴昔;Wnt 信号通路;结肠癌;凋亡

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2022)6-0996-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2022.6.012

8-O-Acetylharpagide induces apoptosis of colon cancer HCT116 cells through Wnt signaling pathway

ZHOU Xing, YIN Qian, HUANG Rong, JIAN Bin, CAI Xiao-ming*

Innovation Lab of College of Basic Medicine, North Sichuan Medical College, Nanchong 637100, China

Abstract: In this study, we investigated the effect and molecular mechanism of 8-O-acetylharpagide in colon cancer. Human colon cancer line HCT116 cell cycle was blocked in G1 phase after 8-O-acetylharpagide treatment. In addition, 0.75 mmol/L 8-O-acetylharpagide significantly increased apoptosis of HCT116 cells. The whole transcriptome sequencing analysis showed that 8-O-acetylharpagide caused a total of 1 921 up-regulated mRNAs and 2 208 down-regulated mRNAs in HCT116 cells, and Wnt signaling pathway-related genes transcription level changed significantly. In cellular experiments *in vitro*, 8-O-acetylharpagide treatment led to significant down-regulation of β -catenin, CyclinD1, Survivin, c-Myc and Bcl-2, while significant up-regulation of proapoptotic proteins Bax and cleaved-caspase3. Together, these results suggest that 8-O-acetylharpagide inhibit the proliferation and induce apoptosis of colon cancer cells mainly through Wnt signaling pathway.

Key words: 8-O-acetylharpagide; Wnt signaling pathway; colon cancer; apoptosis

结肠癌(colon cancer)是世界第四大致命癌症,属于常见的消化系统恶性肿瘤^[1,2],遗传、肥胖、缺乏锻炼和吸烟等是患结肠癌的危险因素^[3]。目前临床上主要依靠手术治疗结肠癌,由于结肠癌在早期不易发现,被确诊时已错过最佳手术时机,此时患者往往需要放化疗来改善预后^[4,5]。但传统化疗药物不良反应多,而天然药物的不良反应少,且更为廉价^[6]。

筋骨草(*Ajuga ciliata* Bunge.)是多年生唇形科

草本植物,主要分布于中国河北、山东、陕西、甘肃、四川等地。筋骨草全草皆可入药,在中国民间广泛被用于治疗肺热咯血、跌打损伤、扁桃腺炎、咽喉炎等疾病,而筋骨草中乙酰哈巴昔(8-O-acetylharpagide, 8-OA)的含量最高。根据 You 等^[7]前期研究显示,乙酰哈巴昔具有强大的抗炎作用,可以减轻毛细血管早期的炎性渗出,由于炎症介质本身可以在肿瘤进展中发挥调节作用,因此乙酰哈巴昔可能通过炎症途径发挥抗肿瘤作用,此外, Konoshima 等^[8]则发现乙酰哈巴昔对一氧化氮诱发的小鼠皮肤癌有明显的抑制作用,并可抑制 *N*-亚硝基二乙胺和苯巴比妥诱发的肝癌细胞增殖,表明乙酰哈巴昔可能是一种潜在的抗肿瘤药物。

收稿日期:2021-09-30 接受日期:2022-04-29

基金项目:南充市市校合作项目筋骨草乙酰哈巴昔提取及其抗炎作用机制研究(18SXHZ0496);南充市科技局项目筋骨草乙酰哈巴昔靶向 PRDX1 信号通路抗炎机制研究(20YFZJ0110)

*通信作者 Tel:86-018990825866; E-mail: xmcai2015@163.com

本研究旨在通过乙酰哈巴昔作用于结肠癌 HCT116 细胞后的一系列生物学行为改变来探讨乙酰哈巴昔在抗肿瘤方面所发挥的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及药物

人结肠癌细胞株 HCT116 购自中国科学院上海细胞库,培养条件为含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,37 °C,5% CO₂ 和 95% 湿度。乙酰哈巴昔(成都曼思特生物技术有限公司,纯度 ≥97%,货号:6926-14-3),溶解于无菌 PBS 中配置成浓度为 2.5 mol/L 的储存液。

1.1.2 试剂

DMEM 培养基、胰蛋白酶(美国 HyClone 公司);胎牛血清(美国 Gibco 公司);培养瓶、96 孔板(美国 Corning 公司);CCK8(上海东仁化学科技有限公司);细胞凋亡试剂盒(中国碧云天公司);Total RNA Extractor(上海生工生物公司);cDNA 反转录试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SYBR Green PCR Master Mix(北京索莱宝公司);引物合成(上海生工生物公司);XAV939(中国 MCE 公司);兔抗人 IgG 一抗、羊抗兔 IgG 二抗(中国 ProteTech 公司)。

1.1.3 仪器设备

3111 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SW-0J-1FD 超净工作台(中国安泰空气技术有限公司);AE 2000 倒置显微镜(日本奥林巴斯公司);BCD-272WDGD -20 °C 冷冻冰箱(中国海尔公司);EasyCyte6-2L 流式细胞仪(美国 Guava 公司);CFX connect 荧光定量 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);5804R 高速低温离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);LUX5187139 全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Chemidoc XRS + 凝胶成像仪(美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 CCK8

收集 HCT116 细胞,离心计数后调整密度为 1×10^5 个/mL,每孔 100 μ L 铺入 96 孔板,待细胞贴壁,实验组分 7 组,每组含乙酰哈巴昔的浓度分别为 0.125、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5 mmol/L,对照组加入与实验组等体积的 PBS 溶液,全程避光加样,完成后放入 37 °C,5% CO₂ 培养箱中培养 24、48、72 h;第二天每孔加入 10 μ L CCK8 试剂,用酶标仪测

定 OD₄₅₀ 值,计算抑制率。

1.2.2 平板克隆形成实验

在 6 孔板中每孔加入 HCT116 细胞 500 个,每组 3 个复孔。实验组以 0.5 mmol/L 乙酰哈巴昔处理,对照组加入与实验组等体积的 PBS 溶液,在作用 HCT116 细胞 7 天后,吸掉培养基,PBS 洗涤细胞 3 次,4% 多聚甲醛固定细胞 5 min,再用 PBS 洗涤细胞 3 次。500 μ L 结晶紫染色细胞 20 min,PBS 洗涤后拍照记录。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡

将细胞计数后调整密度为 1×10^5 个/mL,每孔 2 mL 铺入 6 孔板,实验孔药物浓度为(0.25、0.5、0.75 mmol/L),对照组加入与实验组等体积的 PBS 溶液,培养 48 h 后收集培养液,PBS 洗涤细胞一次,加入胰酶消化 2 min,加入之前收集的细胞培养液,转移到离心管内,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用 PBS 重悬并计数,周期实验加入 1 mL 冰浴 70% 乙醇,混匀后 4 °C 固定 24 h,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 1 mL PBS 离心后弃上清,每管加 0.5 mL 碘化丙啶染料 37 °C 避光孵育 30 min;凋亡实验取 5×10^4 个细胞,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 195 μ L Annexin V-FITC 结合液重悬细胞,再加入 5 μ L AnnexinV-FITC 染色液,混匀,加入 10 μ L 碘化丙啶染色液,混匀,室温避光孵育 10 min,置于冰上,立即用流式细胞仪检测。

1.2.4 转录组测序

将细胞计数后调整密度为 1×10^5 个/mL,每孔 2 mL 铺入 6 孔板中培养,实验组(B1、B2、B3)加入乙酰哈巴昔的终浓度为 0.5 mmol/L,对照组(A1、A2、A3)加入与实验组等体积的 PBS 溶液,培养 48 h 后收集细胞,用 Trizol 法提取总 RNA,以 Illumina HiSeq™ 测序平台进行测序分析。

1.2.5 乙酰哈巴昔对 HCT116 细胞 mRNA 表达的影响

将细胞计数后调整密度为 1×10^5 个/mL,每孔 2 mL 铺入 6 孔板中培养,细胞贴壁后弃原培养基,实验组加入乙酰哈巴昔的终浓度分别为 0.25、0.5 mmol/L,对照组加入与实验组等体积的 PBS 溶液,培养 48 h 后收集细胞,用 Trizol 法提取总 RNA,取 1 μ g 总 RNA 为模板进行逆转录反应,合成 cDNA,反应体系为 20 μ L。先将 RNA 模板和 Random primer 加在一起,补充 RNase-free ddH₂O 至 12 μ L,进行热变性(条件:65 °C,5 min,冰上 1 min),再加入其他

组分,在漩涡混合器上充分混匀,4 000 r/min,15 s 离心;放入 PCR 扩增仪中,设置反应程序:25 ℃ 5 min,42 ℃ 60 min,70 ℃ 5 min,冰上 1 min 进行逆转录合成 cDNA,模板稀释 20 倍后进行 PCR 扩增;体

系:SYBR Mixture 12.5 μ L,F-primer 1 μ L,R-primer 1 μ L,cDNA 5 μ L,DDH₂O 5.5 μ L;PCR 仪器设置为:95 ℃ 预变性 10 min,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 退火 60 s,共进行 40 个循环。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	产物大小 Product size (bp)	长度 Length	溶解温度 Melt temperature(℃)
β -catenin	F:CATCTACACAGTTTGATGCTGCT	150	23	61
	R:GCAGTTTGTTCAGTTCAGGGA		21	60
GSK-3 β	F:GGCAGCATGAAAGTTAGCAGA	180	21	61
	R:GGCGACCAGTTCTCCTGAATC		21	63
Axin-1	F:GACCTGGGGTATGAGCCTGA	103	20	63
	R:GGCTTATCCCATCTTGGTCATC		22	60
APC	F:AAGCATGAAACCGGCTCACAT	108	21	63
	R:CATTCGTGTAGTTGAACCCCTGA		22	60
Survivin	F:AGGACCACCGCATCTCTACAT	118	21	63
	R:AAGTCTGGCTCGTTCTCAGTG		21	62
c-Myc	F:TGGAAAACCAGCCTCCCG	112	18	59
	R:TTCTCCTCTCGTCGCAGTA		20	60
CyclinD1	F:CAATGACCCCGCAGATTTC	146	20	57
	R:CATGGAGGGCGGATTGGAA		19	57
Bax	F:AAACTGCTGCTCAAGCCCC	190	19	60
	R:AAAGTAGGAGAGGAGGCCGT		20	60
Bcl-2	F:GGATAACGGAGGCTGGGATG	156	20	60
	R:TGACTTCACTTGTGCCCCAG		20	60
β -actin	F:CATGTACCTTGCTATCCAGGC	250	21	56
	R:CTCCTTAATGTCACGCACGAT		21	55

1.2.6 乙酰哈巴昔对 HCT116 细胞蛋白表达的影响

培养细胞方法和分组同“1.2.5”,48 h 后收集细胞加入 RIPA 裂解液提取总蛋白。配置 SDS-PAGE 凝胶,100 V 电泳 2 h 左右,直至 Marker 清晰分离即可终止电泳,80 V 转膜 1.5 h 后将 PVDF 膜置于 5% 脱脂奶粉封闭液中,常温封闭 4 h,用 TBST 洗 3 次。在 4 ℃ 冰箱中摇动孵育一抗过夜,用 TBST 在室温下洗膜 3 次,室温下振摇孵育二抗 1 h,用 TBST 洗 3 次,用 Bio-Rad 凝胶成像仪显影。

1.2.7 统计学处理

流式数据采用 FlowJo 7.6 分析,Western blot 采用 Image J 对条带光密度进行定量,所有数据均采用 SPSS20.0 进行统计分析处理,采用单因素方差分

析,计量数据采用均数 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 乙酰哈巴昔对结肠癌细胞增殖情况的影响

CCK8 法检测结果显示,结肠癌 HCT116 细胞的抑制率随乙酰哈巴昔浓度的升高而显著增加($P < 0.05$),乙酰哈巴昔浓度分别为 0.125、0.25、0.5、0.75、1、1.25、1.5 mmol/L 时,作用 HCT116 细胞 24 h 后的抑制率如图 1 所示,分别为(2.22 \pm 0.82)%、(8.24 \pm 0.90)%、(31.18 \pm 6.48)%、(37.12 \pm 4.79)%、(52.71 \pm 1.96)%、(60.76 \pm 3.79)%、(68.65 \pm 3.22)%。结果表明乙酰哈巴昔可呈浓度-时间依赖性地抑制结肠癌细胞体外增殖。作用 24、48、72 h 的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 0.91、0.39、

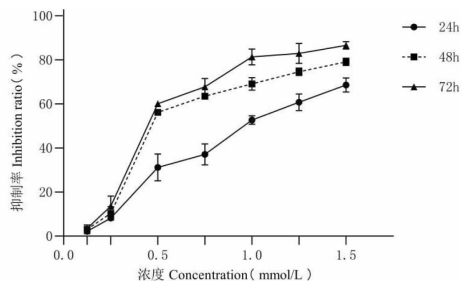


图1 乙酰多巴昔以时间依赖的方式抑制 HCT116 细胞活性

Fig. 1 8-OA inhibit HCT116 cell viability in a time-dependent manner

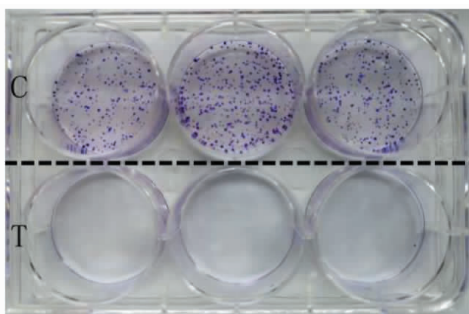


图2 乙酰多巴昔显著抑制 HCT116 细胞增殖

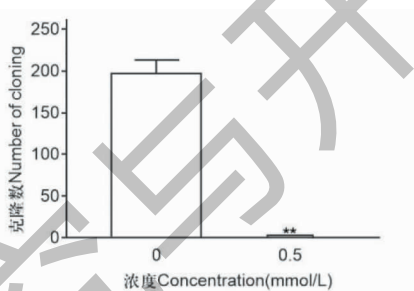
Fig. 2 8-OA significantly inhibited the proliferation of HCT116 cells

注:C:空白对照组;T:0.5 mmol/L 乙酰多巴昔组。与空白组比较, ** $P < 0.01$ 。 Note: C: Control group; T: 0.5 mmol/L 8-OA group. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

0.39 mmol/L, 由于 48 h 至 72 h 其 IC_{50} 值相同, 表明乙酰多巴昔主要在最初的 48 h 内发挥作用, 因此后续取 48 h 为最佳作用时间。

2.2 乙酰多巴昔对结肠癌细胞克隆形成的影响

用 0.5 mmol/L 乙酰多巴昔作用 HCT116 细胞 7 天后, 对照组细胞形成了明显的克隆 (197 ± 16), 而药物处理组的克隆率明显减少 (0.33 ± 0.57)。由图 2 所示, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明乙酰多巴昔能显著降低 HCT116 细胞的分裂能力, 干扰细胞的克隆形成。



2.3 乙酰多巴昔对结肠癌细胞周期和凋亡的影响

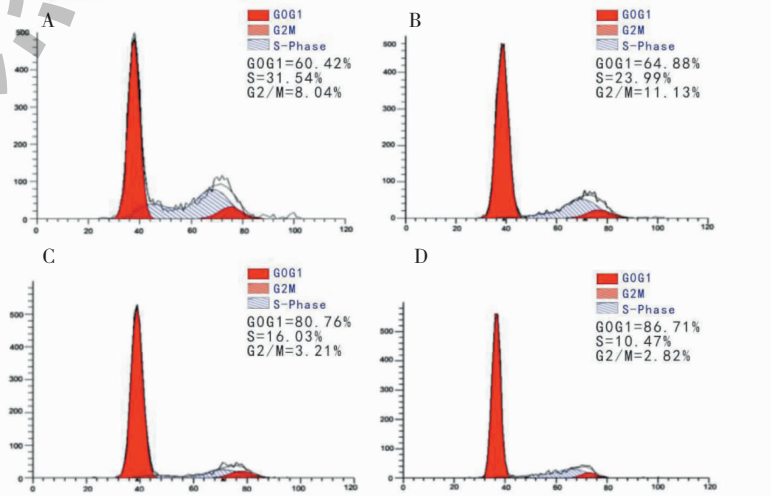
通过流式细胞仪对染色细胞进行分群, 从而判断细胞所处的周期相和凋亡相。结果如图 3 所示, 随着乙酰多巴昔浓度的逐渐增加, G0/G1 期细胞比例由 (59.40 ± 0.98)% 增加到 (85.75 ± 0.84)%, 细胞周期被阻滞在 G1 期。

细胞凋亡实验结果如图 4, 显示 0.75 mmol/L 乙酰多巴昔处理 HCT116 细胞 48 h 后, 早期凋亡细

胞从 (1.21 ± 0.38)% 增加到 (17.84 ± 0.41)%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明乙酰多巴昔可以诱导 HCT116 细胞发生凋亡反应。

2.4 转录组测序筛选乙酰多巴昔作用 HCT116 细胞的靶向信号通路

转录组测序结果数据采用 DESeq 进行分析, 结果如图 5 所示, 对照组与药物治疗组相比存在 4 129 个差异基因, 其中下调基因 2 08 个, 上调基因 1 921 个。



续图 3 (Continued Fig.3)

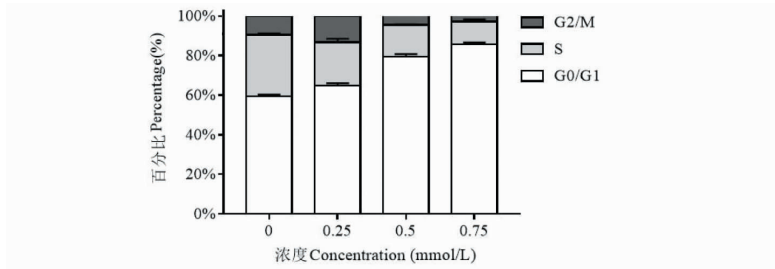


图3 乙酰哈巴昔以剂量依赖的方式抑制 HCT116 细胞周期

Fig. 3 8-OA inhibited HCT116 cell cycle in a dose-dependent manner

注:A:0 mmol/L 8-OA;B:0.25 mmol/L 8-OA;C:0.5 mmol/L 8-OA;D:0.75 mmol/L 8-OA。

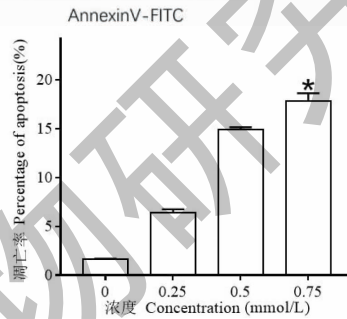
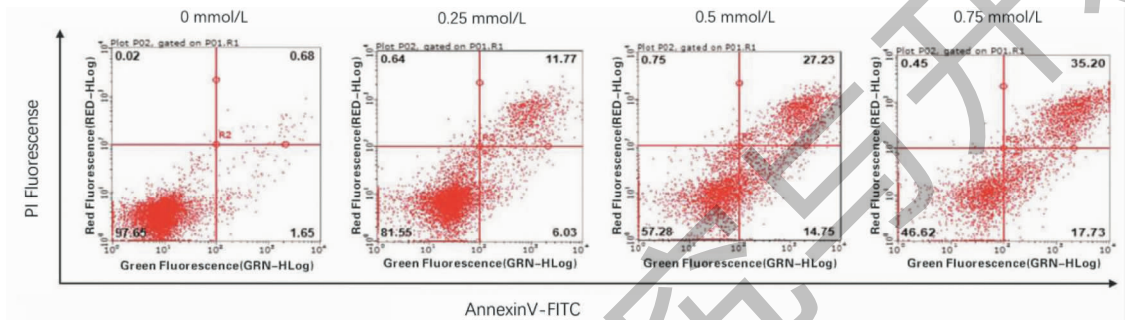


图4 乙酰哈巴昔对 HCT116 细胞凋亡的影响

Fig. 4 Effect of 8-OA on apoptosis of HCT116 cells

注:与空白组比较, * $P < 0.01$. Note: Compared with control group, * $P < 0.01$.

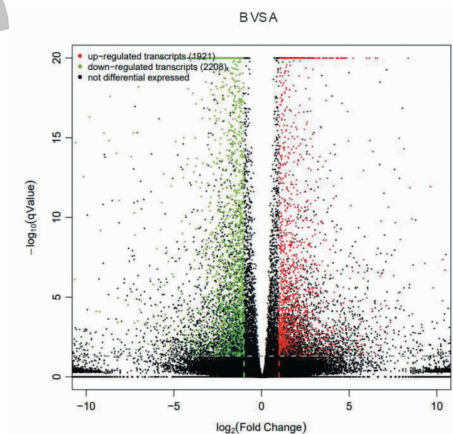


图5 转录组测序火山图

Fig. 5 Volcano map of transcriptome sequencing

注:B:乙酰哈巴昔组;A:空白对照组。Note: B:8-OA group; A: Blank control group.

通过 KEGG 数据库功能富集,结果如图 6,发现 Wnt 通路是有显著差异的通路,表明 Wnt 通路可能是乙酰多巴昔的靶向信号通路。

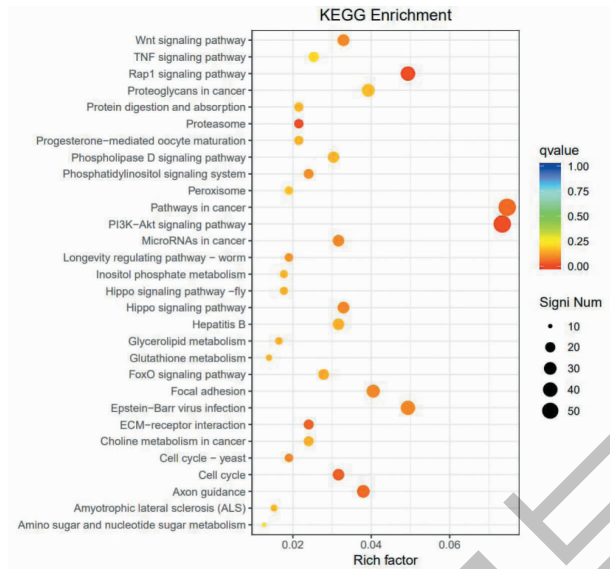


图 6 KEGG 通路富集结果

Fig. 6 Result of KEGG pathway enrichment

显著富集功能蛋白质互作分析结果如图 7,显示乙酰多巴昔影响的主要差异蛋白分子有 PLK1、KIF11、CDC20、WNT16、NOTCH3、BUB1、NOXA1、MAPK15 等,这些分子的功能主要是参与调节细胞周期、有丝分裂、DNA 氧化应激损伤应答和细胞代谢等。

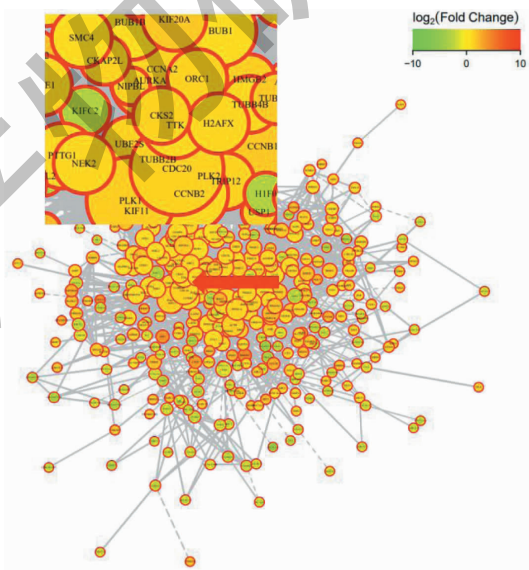


图 7 蛋白质互作网络

Fig. 7 Protein-protein interaction (PPI) network

2.5 乙酰多巴昔对 HCT116 细胞 Wnt 信号通路基因 mRNA 表达的影响

为验证乙酰多巴昔对 HCT116 细胞 Wnt 信号通路的影响,对 Wnt 信号通路相关基因进行检测,实

验结果如图 8。与对照组相比,乙酰多巴昔组 (0.25、0.5 mmol/L) 显著降低了 HCT116 细胞 β -catenin、c-Myc mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。与细胞周期、凋亡相关基因 CyclinD1、Survivin、Bcl-2 显著降

低, Bax mRNA 显著上调 ($P < 0.05$), 以上结果表明乙酰哈巴昔在一定程度上抑制了 Wnt 通路的转录

活性, 同时上调了促凋亡基因的转录并下调了凋亡抑制基因的转录。

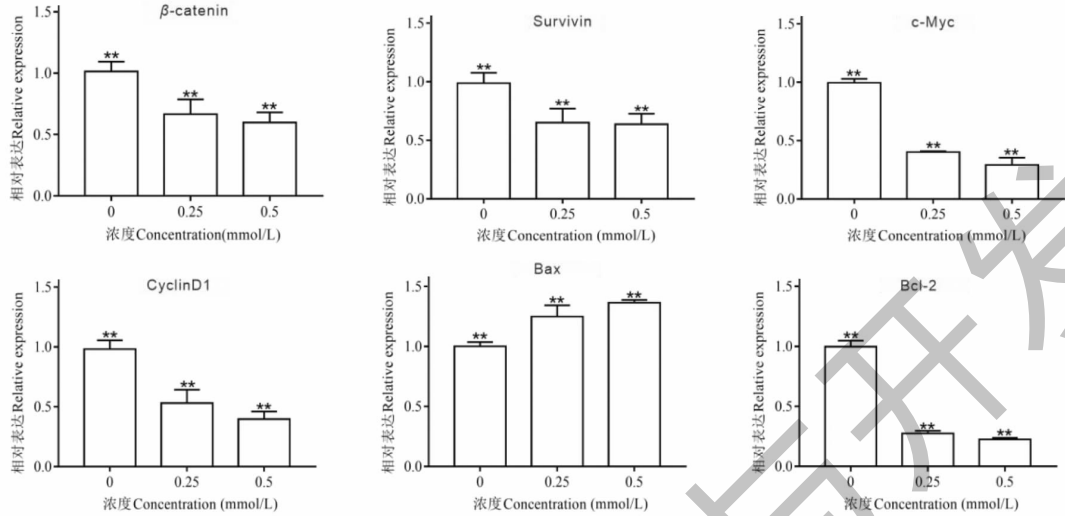


图8 乙酰哈巴昔对 HCT116 细胞中 Wnt 信号通路及细胞凋亡相关基因 mRNA 水平的影响

Fig. 8 mRNA expression of Wnt signaling pathway and apoptosis-related genes in HCT116 cells after treated with 8-OA

注:与空白组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。下同。Note: Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. The same below.

2.6 乙酰哈巴昔对 HCT116 细胞 Wnt 通路蛋白的影响

为验证乙酰哈巴昔对 HCT116 细胞 Wnt 信号通路蛋白的影响,用乙酰哈巴昔作用 HCT116 细胞,检测结果如图 9,显示乙酰哈巴昔引起 Wnt 信号通路

及细胞周期相关蛋白 β -catenin、c-Myc、Survivin、CyclinD1、Bcl-2、pro-caspase3 显著下调 ($P < 0.05$),乙酰哈巴昔引起细胞凋亡相关蛋白 APC、Bax、cleaved-caspase3 显著上调 ($P < 0.05$)。

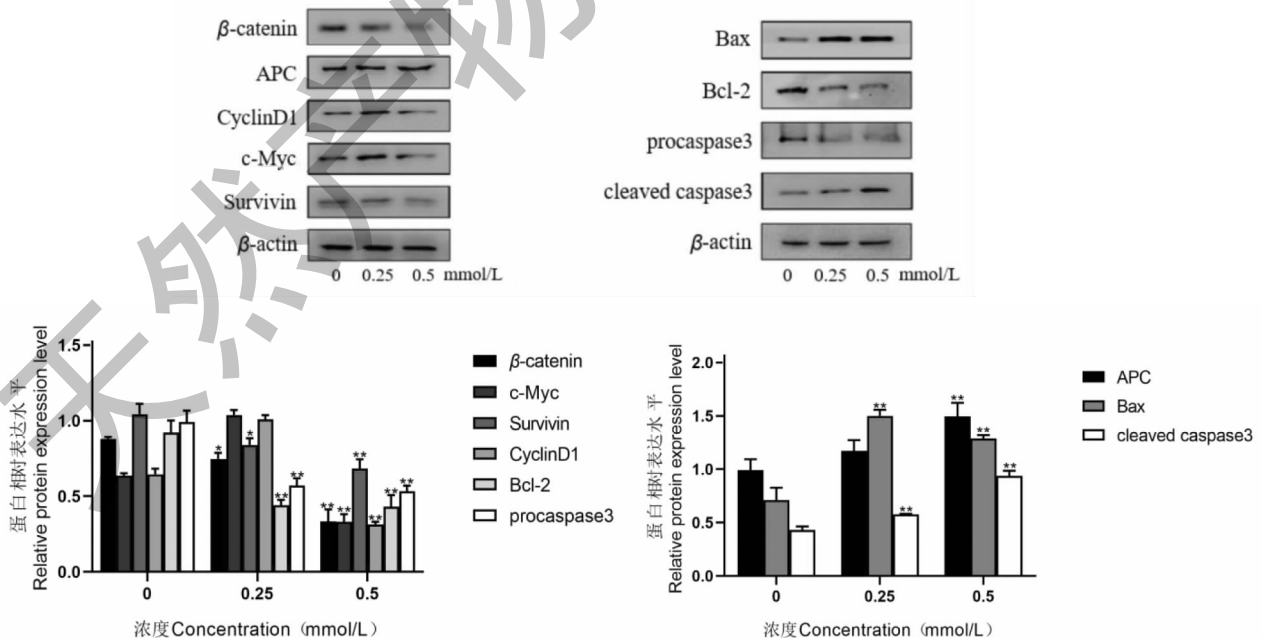


图9 乙酰哈巴昔处理后 Wnt 信号通路相关蛋白的表达

Fig. 9 Wnt signaling pathway-related proteins expression after 8-OA treatment

同时,用 XAV939 和乙酰多巴昔各自单独用药后对 HCT116 细胞进行检测发现都能显著降低 β -catenin 和 c-Myc 蛋白的表达,二者联合用药后如图 10 所示,能进一步降低 β -catenin 和 c-Myc 蛋白的表达并降低了 HCT116 细胞的存活率,差异有统计学

意义($P < 0.05$),这些结果从蛋白水平上表明乙酰多巴昔抑制了 Wnt 通路的活性,同时激活了凋亡通路。乙酰多巴昔与 XAV939 具有协同作用,能进一步抑制 HCT116 细胞的 Wnt/ β -catenin 信号通路。

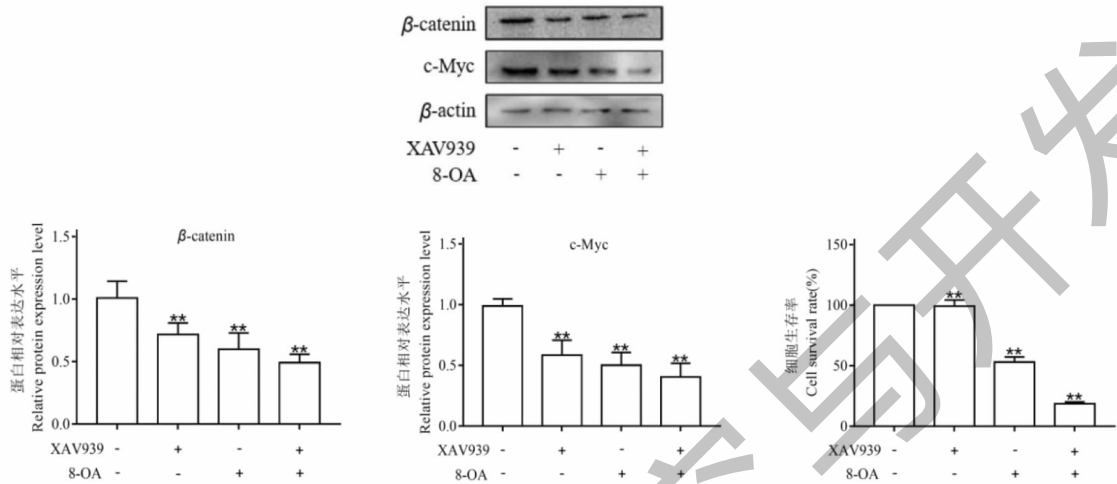


图 10 乙酰多巴昔联合 XAV939 处理对 β -catenin、c-Myc 表达的影响

Fig. 10 The effects of 8-OA combined with XAV939 on β -catenin and c-Myc protein expression

3 讨论与结论

结肠癌约占全世界每年癌症相关死亡人数的 10%^[9]。目前结肠癌的治疗主要以手术为主,化疗和放疗为辅,对于晚期化疗患者来说,化疗的有效率低且副作用明显,生存期只有 18 个月左右^[10]。近年来,在天然植物中寻找能抗肿瘤药物是一大研究热点,因为一些传统的化疗药物,包括紫杉醇和长春新碱^[11]均来源于自然植物。

抗增殖是开发抗癌药物的重要切入点,CCK8 法显示了乙酰多巴昔对 HCT116 细胞的抑制作用呈浓度-时间依赖性,三个时间点的 IC_{50} 分别为 0.91、0.39、0.39 mmol/L,说明乙酰多巴昔主要在最初的 48 h 内发挥作用。此外,通过平板克隆形成实验证明了乙酰多巴昔可导致 HCT116 细胞的克隆形成能力明显减弱。

肿瘤细胞的增殖和生存能力远强于正常细胞^[12],大多数抗癌药物能通过诱导细胞周期阻滞和细胞凋亡来抑制肿瘤细胞增殖^[13]。细胞在死亡过程常发生活性氧水平升高、半胱天冬氨酸蛋白酶激活和染色质凝聚等现象^[14],其中线粒体跨膜电位丢失诱导细胞色素 c 从线粒体释放到胞质是诱导凋亡的关键步骤^[15],而 Bax 和 Bcl2 对细胞色素 c 的释放和下游 caspase 蛋白的激活至关重要^[16]。对此我们

通过流式细胞仪检测发现,乙酰多巴昔可以剂量依赖性地影响结肠癌 HCT116 细胞的细胞周期,引起细胞周期阻滞于 G1 期,同时导致细胞的凋亡率明显升高。

研究证实 Wnt 信号通路与结肠癌发展高度相关^[17],其中, β -连环蛋白(β -catenin)是 Wnt 经典通路的关键分子,E-钙黏蛋白/ β -连环蛋白复合物有助于细胞间粘附稳定,从而减少细胞的侵袭和转移^[18]。在肿瘤细胞中, β -catenin 可激活与癌细胞增殖、周期、凋亡、迁移、侵袭和耐药性相关的基因转录,从而导致肿瘤的恶性增殖^[19]。此外, β -catenin 已被证明是一种有前途的癌症预防和治疗靶点,许多天然产物可作为 β -catenin 信号传导的抑制剂,其机制主要是通过磷酸化、泛素化和抑制其核移位实现的,并且天然产物抑制剂在体内外的各种肿瘤模型中显示出了较好的预防和治疗效果^[20]。 β -catenin 在细胞核中可促进下游分子 Myc 的表达,Myc 属原癌基因家族,在核内编码细胞必需的核转录因子,主要参与调节细胞的生长、增殖、分化、周期、代谢、凋亡等^[21]。在哺乳动物中,Myc 家族蛋白质包含 c-Myc、n-Myc 和 l-Myc 三类,c-Myc 与基因组不稳定性 and 肿瘤发生有关。在静止细胞中,c-Myc 的表达水平较低,一旦细胞进入细胞周期,c-Myc 的表达

迅速增加数倍^[22]。此外,在约 70% 的结肠癌中发现 c-Myc 蛋白显著上调,表明 c-Myc 与结肠癌的恶性程度呈正相关^[23]。

本实验采用高通量转录组测序发现乙酰哈巴昔共引起 HCT116 细胞产生 4 129 个差异基因,其中分别为上调基因 1 921 个,下调基因 2 208 个,差异基因主要与细胞生长、细胞周期、细胞侵袭、细胞免疫、氧化应激、细胞代谢、分子转运和细胞死亡途径有关,在差异基因结合 KEGG 数据库分析后发现,乙酰哈巴昔显著影响了 HCT116 细胞的 Wnt 信号通路,通过乙酰哈巴昔与对照组基因表达和蛋白质检测,证实了 β -catenin 和 c-Myc 的显著下调。乙酰哈巴昔联合 Wnt 小分子抑制剂 XAV939 进一步抑制了 HCT116 结肠癌细胞的生长,表明 Wnt/ β -catenin 通路还介导了 HCT116 的耐药性,抑制 Wnt/ β -catenin 通路可使乙酰哈巴昔的抗肿瘤活性明显增强。

本研究显示,乙酰哈巴昔能有效抑制结肠癌细胞 HCT116 的增殖活性,基因组检测发现细胞的 Wnt/ β -catenin 信号通路发生显著差异,推测乙酰哈巴昔可能通过调控 Wnt/ β -catenin 信号通路使细胞正常的生长受到抑制,进一步诱导细胞凋亡和周期阻滞,从而抑制肿瘤细胞生长。然而,该推测需要佐证,其具体作用途径尚需进一步深入研究。

参考文献

- 1 Choi S, Snider AJ. Diet, lipids and colon cancer[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2019, 347:105-144.
- 2 Shawki S, Ashburn J, Signs SA, et al. Colon cancer: inflammation-associated cancer[J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2018, 27(2):269-287.
- 3 Naito A, Iwamoto K, Ohtsuka M, et al. Risk factors for lymph node metastasis in pathological T1b colorectal cancer[J]. *In Vivo*, 2021, 35:987-991.
- 4 Jiang Y, Zou Z, Zhang Z, et al. Long-term outcomes of radical surgery for transverse colon cancer staged from I to IIIc[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12:13043-13049.
- 5 Yang P, Shao L, Wang J, et al. Preparation of falcariindiol from *Oplopanax elatus* and its mechanism on anti-colorectal cancer[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2019, 31:1265-1270.
- 6 Zhang J, Chai H. Recent advances in drug discovery and cancer diagnoses[J]. *Curr Top Med Chem*, 2020, 20:1855-1857.
- 7 You Y, Wang J, Tong Y, et al. Anti-inflammatory effect of acetylharpagide demonstrated by its influence on leukocyte

adhesion and transmigration in endothelial cells under controlled shear stress[J]. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2014, 56(3):205-217.

- 8 Konoshima T, Takasaki M, Tokuda H, et al. Cancer chemopreventive activity of an iridoid glycoside, 8-acetylharpagide, from *Ajuga decumbens*[J]. *Cancer Lett*, 2000, 157(1):87-92.
- 9 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA-Cancer J Clin*, 2018, 68:394-424.
- 10 Martini G, Troiani T, Cardone C, et al. Present and future of metastatic colorectal cancer treatment: a review of new candidate targets[J]. *World J Gastroentero*, 2017, 23:4675-4688.
- 11 Demain AL, Vaishnav P. Natural products for cancer chemotherapy[J]. *Microb Biotechnol*, 2011, 4:687-99.
- 12 Arumugam P, Arunkumar K, Sivakumar L, et al. Anticancer effect of fucoidan on cell proliferation, cell cycle progression, genetic damage and apoptotic cell death in HepG2 cancer cells[J]. *Toxicol Rep*, 2019, 6:556-563.
- 13 Tian X, Li Y, Shen Y, et al. Apoptosis and inhibition of proliferation of cancer cells induced by cordycepin[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10:595-599.
- 14 Pak JN, Jung JH, Park JE, et al. P53 dependent LGR5 inhibition and caspase 3 activation are critically involved in apoptotic effect of compound K and its combination therapy potential in HCT116 cells[J]. *Phytother Res*, 2020, 34:2745-2755.
- 15 O'Brien MA, Kirby R. Apoptosis: a review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease[J]. *J Vet Emerg Crit Care*, 2008, 18:572-585.
- 16 Bouaziz C, Graiet I, Salah A, et al. Influence of bifenthrin, a pyrethroid pesticide, on human colorectal HCT-116 cells attributed to alterations in oxidative stress involving mitochondrial apoptotic processes[J]. *J Toxicol Env Heal A*, 2020, 83(9):331-340.
- 17 Chen GT, Tifrea DF, Murad R, et al. Disruption of beta-catenin-dependent Wnt signaling in colon cancer cells remodels the microenvironment to promote tumor invasion[J]. *Mol Cancer Res*, 2021, 20:468-484.
- 18 Huang TS, Li L, Moalim-Nour L, et al. A regulatory network involving beta-catenin, e-cadherin, PI3k/Akt, and slug balances self-renewal and differentiation of human pluripotent stem cells in response to Wnt Signaling[J]. *Stem Cells*, 2015, 33:1419-1433.