

• 论 著 •

羽扇豆醇对结直肠癌 HCT116 细胞的抑制作用及机制研究*

韩泽平^{1,2}, 蔡 贞^{1△}

1. 南方医科大学南方医院检验科, 广东广州 510515; 2. 广州市
番禺区中心医院中心实验室, 广东广州 511400

摘要:目的 探讨羽扇豆醇对结直肠癌 HCT116 细胞的抑制作用及潜在分子机制。方法 体外培养结直肠癌 HCT116 细胞, 采用 CCK-8 法、克隆形成试验、划痕愈合试验、Transwell 试验及流式细胞术评估不同浓度羽扇豆醇对 HCT116 细胞的增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力, 以及凋亡的影响; 进一步通过 TMT 标记定量蛋白质组学分析及生物信息学分析羽扇豆醇抑制 HCT116 细胞生长的潜在机制, 并运用蛋白质免疫印迹法验证相关蛋白的表达水平。结果 羽扇豆醇具有抑制 HCT116 细胞增殖、克隆形成、迁移和侵袭能力, 以及促进细胞凋亡, 并且均呈浓度依赖性。羽扇豆醇干预 HCT116 细胞后共发现 490 种蛋白表达差异明显。经生物信息学分析发现, 羽扇豆醇主要参与了 HCT116 细胞的分裂、增殖、凋亡及营养物质代谢等生物学过程, 可能与糖酵解/糖异生、缺氧诱导因子(HIF)-1 信号通路、淀粉和蔗糖代谢途径等信号通路有关。蛋白质免疫印迹法结果显示, 羽扇豆醇可下调 HIF-1 α 、 α -烯醇化酶(ENO1)和乳酸脱氢酶 A(LDHA)蛋白表达水平。结论 羽扇豆醇对人结直肠癌 HCT116 细胞的生长及转移有明显抑制作用, 其机制与下调糖酵解信号通路中 HIF-1 α 、LDHA 和 ENO1 蛋白的表达水平有关。

关键词:羽扇豆醇; 结直肠癌 HCT116 细胞; TMT 标记定量蛋白质组学分析; 生物信息学分析; 糖酵解

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2022.20.001

中图法分类号:R735.3;R446.1

文章编号:1673-4130(2022)20-2433-08

文献标志码:A

Inhibitory effect of lupoeol on colorectal cancer HCT116 cells and its mechanism*

HAN Zeping^{1,2}, CAI Zhen^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510515, China; 2. Central Laboratory, Panyu Central Hospital, Guangzhou, Guangdong 511400, China

Abstract:Objective To investigate the inhibitory effect and potential molecular mechanism of lupeol on colorectal cancer HCT116 cells. **Methods** Colorectal cancer HCT116 cells were cultured in vitro, and the effect of different concentrations of lupinol on the proliferation, clone formation, migration and invasion, and apoptosis of HCT116 cells were evaluated by CCK-8 assay, clone formation assay, wound healing assay, Transwell assay and flow cytometry. The potential mechanism of lupeol inhibiting the growth of HCT116 cells was further analyzed by TMT quantitative proteomics analysis and bioinformatics, and the expression levels of related proteins was verified by Western blotting. **Results** Lupeol inhibited the proliferation, clone formation, migration and invasion of colorectal cancer HCT116 cells and promoted apoptosis of cells in a concentration-dependent manner. A total of 490 proteins were found to express differently after the treatment of lupeol on HCT116 cells. Bioinformatics analysis indicated that lupeol was mainly involved in biological processes such as division, proliferation, apoptosis and nutrient metabolism of HCT116 cells, and might be related to glycolysis/gluconeogenesis, hypoxia inducible factor (HIF)-1 signaling pathway, starch and sucrose metabolism pathway and other signaling pathways. Western blotting results showed that lupeol could down-regulate HIF-1 α , α -enolase (ENO1) and lactate dehydrogenase-A (LDHA) proteins expression levels. **Conclusion** Lupeol has a sig-

* 基金项目:广东省中医药局科研项目(20192073);广东省广州市中医药和中西医结合科技项目(20212A010025);广东省广州市番禺区科技计划项目(2020-Z04-026)。

作者简介:韩泽平,男,主管技师,主要从事肿瘤学、分子生物学方面的研究。△ 通信作者, E-mail:jean_cz@yeah.net。

nificant inhibitory effect on the growth and metastasis of human colorectal cancer HCT116 cells, and its mechanism might be related to the down-regulation of the expression levels of HIF-1 α , LDHA and ENO1 proteins in the glycolysis signaling pathway.

Key words: lupeol; colorectal cancer HCT116 cells; TMT quantitative proteomics analysis; bioinformatics analysis; glycolysis

结直肠癌是全球最常见的消化道恶性肿瘤,发病率居恶性肿瘤的第 3 位,也是癌症相关死亡的第二大原因^[1]。手术及放化疗是目前治疗结直肠癌的主要方法,但由于外科手术的局限性、放疗剂量的限制、化疗药物的不良反应及耐药性等影响,导致结直肠癌治疗及预后仍不理想^[2]。近年来,传统中草药及其有效成分的抗癌、调节免疫等作用逐渐引起人们的关注^[3-4]。羽扇豆醇是一种来源于羽扇豆、蒲公英等草本植物中的五环三萜类化合物,相对分子质量为 426.72,分子式为 C₃₀H₅₀O,具有抗炎、抗氧化、抗感染和调节免疫力等作用,提示其具有不同的药理活性及多种作用机制^[5-6]。在抗肿瘤研究中,羽扇豆醇对多种肿瘤具有良好的治疗效果^[7-8],并且具有保护心脏、肝脏、神经等作用^[9-10],但羽扇豆醇抗结直肠癌的作用机制尚未阐明。本文进一步研究羽扇豆醇对结直肠癌 HCT116 细胞生物学功能的影响,通过 TMT 标记定量蛋白质组学分析明确羽扇豆醇抑制结直肠癌增殖和转移的潜在分子机制,推动中医药抗肿瘤研究的发展,并为结直肠癌的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 羽扇豆醇(南京狄尔格医药科技有限公司);胎牛血清、RPMI1640 培养基、DMEM 培养基、胰蛋白酶(美国 HyClone 公司);Matrigel 基质胶(美国 Corning 公司);Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒(凯基生物科技发展有限公司);缺氧诱导因子(HIF)-1 α 、 α -烯醇化酶(ENO1)、乳酸脱氢酶 A(LDHA)、 β -actin 抗体(美国 Bioworld Technology 公司);CO₂ 培养箱和生物安全柜(美国 Thermo 公司);Bio-Tek 酶标仪 ELX-800(美国 Biotek 公司);倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司);ImageQuant LAS 500 生物分子成像仪(美国 GE 公司);750D 照相机(日本 Canon 公司)。

1.2 细胞培养与药物配制 人结直肠癌 HCT116 细胞、人结肠癌上皮 FHC 细胞、人腹膜间皮 HMrSV5 细胞购自武汉普诺赛生物科技有限公司。细胞培养于含 10% 胎牛血清、1% 链霉素(100 μ g/mL)和青霉素(100 U/mL)的 RPMI1640 培养基中,置于 37 $^{\circ}$ C、饱和湿度、5%CO₂ 培养箱内培养。使用 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞用于试验。羽扇豆醇使用无水乙醇和二甲亚砜(DMSO)(1:1)混合

液充分溶解,配制成 23 434.71 μ mol/L 的贮存液,置于 -20 $^{\circ}$ C 分装保存。采用 RPMI1640 完全培养基稀释至相应的工作浓度。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 法 以细胞浓度 5×10^3 个/孔接种至 96 孔板,设空白对照组(不加细胞),阴性对照组(不加药物,即 0 μ mol/L 羽扇豆醇组)、溶剂组(DMSO+无水乙醇)、羽扇豆醇组(药物浓度分别为 10、20、40、80、160 μ mol/L),每组各 5 个复孔,分别于 37 $^{\circ}$ C,5% CO₂ 培养箱中孵育 24、48、72 h。吸弃旧培养基,每孔加入新鲜培养基 100 μ L 和 CCK-8 试剂 10 μ L,于 37 $^{\circ}$ C 孵育 3 h,酶标仪检测 450 nm 处各孔吸光度值(A 值),并计算抑制率和半数抑制浓度(IC₅₀)。抑制率 = (A_{阴性对照组} - A_{羽扇豆醇组}) / (A_{阴性对照组} - A_{空白对照组}) $\times$ 100%。

1.3.2 克隆形成试验 将细胞按 8×10^2 个/孔接种于 12 孔板中,细胞贴壁后,按羽扇豆醇终浓度为 0、20、40、60 μ mol/L 分为 0、20、40、60 μ mol/L 羽扇豆醇组(简称 0、20、40、60 μ mol/L 组)4 组,每组设置 3 个复孔。培养 7 d 后,弃去培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)浸洗 2 次,95%乙醇固定 10 min,风干后用 0.1%结晶紫染色 10 min,蒸馏水冲洗 3 次,风干后拍照,计数细胞克隆数量。

1.3.3 划痕愈合试验 细胞于 12 孔版中培养,待融合率达到 90%以上时,用枪头垂直划痕,PBS 洗去划下的细胞,分别加入终浓度为 0、20、40、60 μ mol/L 羽扇豆醇的无血清培养基继续培养。分别在 0、24、48 h 于倒置显微镜拍摄细胞划痕愈合情况,并使用 Image J 软件计算细胞间距离均值。迁移率 = (1 - 测量的宽度/0 h 的平均测量宽度) $\times$ 100%。

1.3.4 Transwell 试验 用预冷的无血清培养基以 1:3 的体积比稀释 Matrigel 基质胶,取 40 μ L 加入预冷的 Transwell 小室中,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h,使 Matrigel 基质胶凝固。吸走小室中多余的液体,并在上室、下室分别加入 100、600 μ L 无血清培养基,37 $^{\circ}$ C 平衡过夜。计数 1×10^5 个细胞,用 100 μ L 无血清培养基重悬,加入 Transwell 小室上室,分别将终浓度为 0、20、40、60 μ mol/L 羽扇豆醇加载到细胞悬液中。在下室加入 600 μ L 完全培养基。在 37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 培养箱中孵育 48 h 后,取出小室,用棉签擦去上室的细胞,倒置

显微镜观察小室中的细胞并拍照,计数侵袭细胞的总数。

1.3.5 流式细胞术 以 2×10^5 个/孔细胞浓度接种于 6 孔板中,终浓度 0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇干预细胞 48 h 后收集细胞,按照 Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作,并采用流式细胞术检测细胞凋亡情况。

1.4 TMT 标记定量蛋白质组学及生物信息学分析

1.4.1 细胞处理 以 2×10^5 个/孔细胞浓度接种于 6 孔板中,并分为阴性对照组(不加药物)和羽扇豆醇组(加入 48 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇),每组设置 3 个复孔,于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 48 h 后收集细胞,收获细胞沉淀并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4.2 数据检索和差异蛋白筛选 上述标本送广州辉骏生物科技股份有限公司进行 TMT 标记定量蛋白质组学检测,并筛选出差异蛋白,筛选条件设置为:(1)至少 2 次重复鉴定到的蛋白;(2)肽段数 ≥ 2 ;(3)选择重复性好的蛋白,即 $\text{CV}<0.5\%$;(4) $P<0.05$;(5)计算各组数据比值的均值(AVG),以 $\text{AVG}\geq 1.200$ 为上调蛋白, $\text{AVG}\leq 0.833$ 为下调蛋白。

1.4.3 Gene Ontology(GO)功能富集及 KEGG 信号通路注释分析 通过 R 软件,从 GO、KEGG 数据库中获取每个差异蛋白所对应的功能,设置筛选条件为 $P<0.05$,并计算每种功能上的蛋白富集数,最后将排名前 20 的 GO 分析结果和 KEGG 通路绘制成气泡图。

1.4.4 蛋白质互作网络(PPI)分析 应用 STRING 数据库(<https://cn.string-db.org/>)将蛋白与库中的相应物种蛋白进行比对,并提取蛋白序列,进行 PPI 分析。

1.5 蛋白质免疫印迹法检测相关蛋白的表达水平

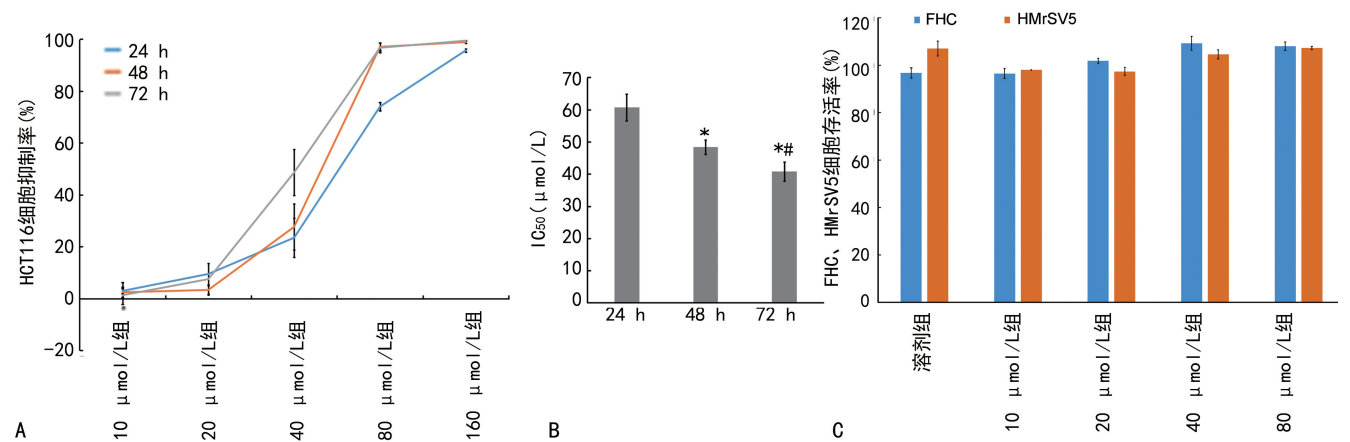
细胞接种于 6 孔板中,以终浓度 0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇干预细胞 48 h 后收集细胞,加入裂解液冰上裂解 30 min, $12\,000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 20 min,取上清液,BCA 法蛋白定量。95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min,每组取 40 μg 总蛋白样本于 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳,用聚偏乙烯(PVDF)膜进行转膜,5%脱脂奶粉对膜封闭 1 h,加入稀释比为 1:1 000 的一抗和稀释比为 1:5 000 的内参后,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST 清洗 PVDF 膜 2 次,每次 15 min,用辣根过氧化物酶标记的二抗在室温下孵育 2 h,TBST 清洗 PVDF 膜 2 次后,加入 ECL 化学发光试剂,通过 ImageQuant LAS 500 生物分子成像仪曝光显色。

1.6 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析处理。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 羽扇豆醇对结直肠癌 HCT116 细胞生物学功能的影响

2.1.1 羽扇豆醇抑制 HCT116 细胞的增殖 分别使用终浓度为 0、10、20、40、80、160 $\mu\text{mol/L}$ 的羽扇豆醇作用 HCT116 细胞 24、48、72 h,如图 1A 所示,不同浓度的羽扇豆醇对 HCT116 细胞有不同程度的增殖抑制作用,并呈明显的时间-剂量依赖性。另外,羽扇豆醇作用 HCT116 细胞 24、48、72 h 后的 IC_{50} 分别为 (60.71 ± 4.11) 、 (48.4 ± 2.26) 和 (40.79 ± 2.97) $\mu\text{mol/L}$, IC_{50} 随作用时间延长而明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1B。图 1C 显示,分别经溶剂和不同浓度的羽扇豆醇干预 48 h 后,人正常结肠上皮 FHC 细胞及人腹膜间皮 HMrSV5 细胞的存活率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。



注:A为羽扇豆醇对HCT116细胞的抑制率;B为羽扇豆醇作用HCT116细胞24、48、72h后的 IC_{50} 比较;C为羽扇豆醇对FHC、HMrSV5细胞的存活率。与24h比较,* $P<0.05$;与48h比较,** $P<0.05$ 。

图1 羽扇豆醇对细胞增殖的抑制作用

2.1.2 羽扇豆醇抑制 HCT116 细胞的克隆形成能力 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, 20 $\mu\text{mol/L}$ 组对 HCT116 细胞的克隆形成能力影响不明显, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 而 40 $\mu\text{mol/L}$ 组及 60 $\mu\text{mol/L}$ 组可明显抑制细胞克隆形成能力, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 并且 HCT116 细胞的克隆形成数量随着羽扇豆醇浓度升高呈减少趋势。见图 2。

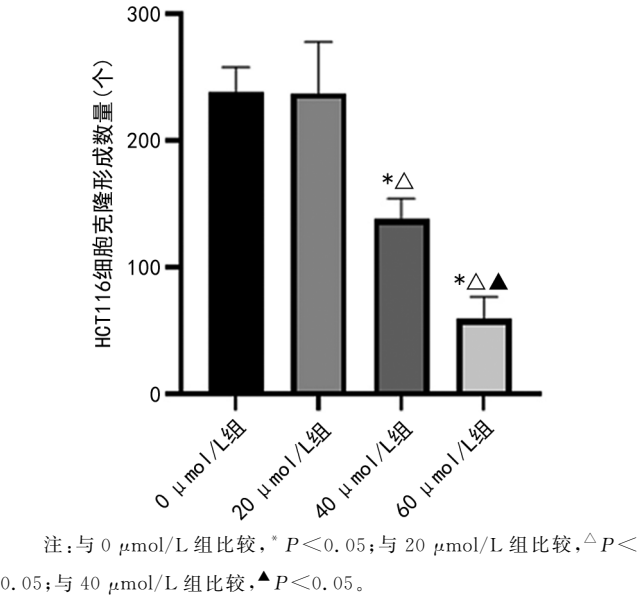


图 2 不同组别 HCT116 细胞克隆形成数量比较

2.1.3 羽扇豆醇抑制 HCT116 细胞的迁移能力 经 40 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇干预 48 h 后, HCT116 细胞的迁移率为 $(50.83\pm5.55)\%$, 明显低于 0 $\mu\text{mol/L}$ 组的 $(81.51\pm2.69)\%$, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。随着羽扇豆醇浓度增加, HCT116 细胞迁移率进一步下降, 在羽扇豆醇浓度为 60 $\mu\text{mol/L}$ 时, HCT116 细胞的迁移率仅为 $(32.62\pm5.30)\%$, 明显低于 0 $\mu\text{mol/L}$ 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 组和 40 $\mu\text{mol/L}$ 组, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 3。

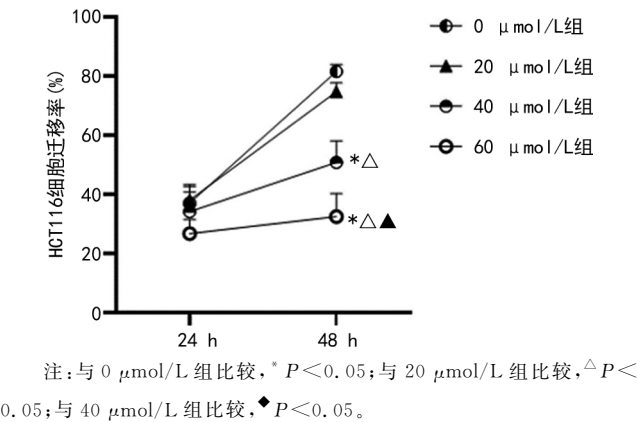


图 3 不同组别 HCT116 细胞迁移率比较

2.1.4 羽扇豆醇抑制 HCT116 细胞的侵袭能力 Transwell 试验结果显示, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较, 20 $\mu\text{mol/L}$ 羽扇豆醇作用 HCT116 细胞后, 细胞侵袭

能力无明显改变, 差异无统计学意义 ($P>0.05$); 而经 40 $\mu\text{mol/L}$ 及 60 $\mu\text{mol/L}$ 的羽扇豆醇干预后, 细胞侵袭个数明显减少, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 4。

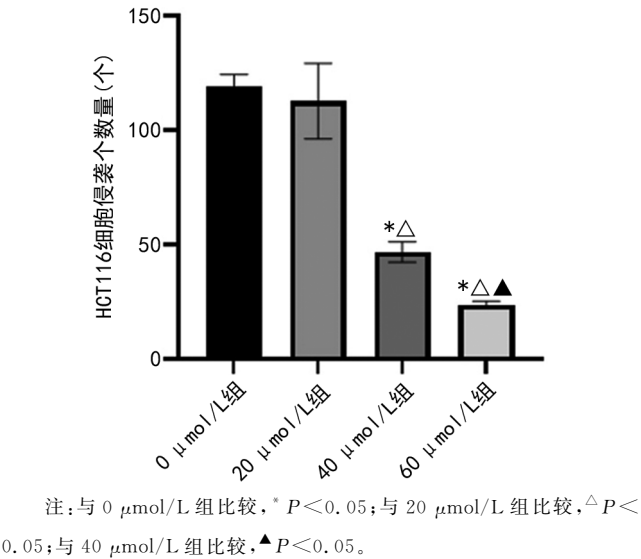


图 4 不同组别 HCT116 细胞侵袭个数比较

2.1.5 羽扇豆醇诱导 HCT116 细胞发生凋亡 20 $\mu\text{mol/L}$ 与 40 $\mu\text{mol/L}$ 的羽扇豆醇干预 HCT116 细胞 48 h 后无明显细胞凋亡发生, 而 60 $\mu\text{mol/L}$ 的羽扇豆醇可明显诱导细胞凋亡, 其中早期凋亡率为 $(7.33\pm0.35)\%$, 晚期凋亡率为 $(7.33\pm1.44)\%$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较明显增高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 但早期、晚期凋亡率比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 5。

2.2 羽扇豆醇对结直肠癌 HCT116 细胞 TMT 标记定量蛋白质组学及生物信息学分析结果

2.2.1 差异表达蛋白分析 共 490 种表达差异明显的蛋白质在 0 $\mu\text{mol/L}$ 组与其他浓度羽扇豆醇组比较中被发现, 其中表达上调蛋白 269 种, 表达下调蛋白 221 种。进一步对蛋白集合的定量信息进行归一化处理, 即归一化至 -1, 1; 同时使用 Complexheatmap R 包 (Version 3.4) 对样品和蛋白表达量 2 个维度进行分类, 并生成层次聚类热图, 见图 6A。热图中列举了差异明显的前 50 种蛋白表达情况, 蛋白上调程度越高, 颜色越红; 蛋白下调程度越低, 颜色越绿, 黑色代表中间表达的蛋白。图 6B 火山图中每个点代表一种蛋白, 黑色是表达在阴性对照组与羽扇豆醇组中无差异的蛋白, 蓝色点代表下调的蛋白, 红色点则代表上调的蛋白。

2.2.2 差异蛋白的 GO 功能富集分析 利用 GO 功能富集分析, 将上述 490 种差异蛋白富集在生物学过程、细胞组分和分子功能 3 个层面上的二级条目及其蛋白数目。在生物学过程中, 差异蛋白主要富集在 L-

丙氨酸跨膜转运、p53 信号通路、纺锤体中区组装、LSU-rRNA 的成熟、二磷酸腺苷代谢过程等生物学过程中。在细胞组分中,差异蛋白主要富集在核仁腔、血小板 α 颗粒腔、内质网内腔等细胞部位。在分子功能中,差异蛋白主要富集在 L-丙氨酸跨膜转运体活性、运货受体活性、丝氨酸型内肽酶抑制剂活性、L-抗坏血酸结合等活性分子功能上。

2.2.3 差异蛋白的 KEGG 信号通路注释分析 差异蛋白进行 KEGG 信号通路注释分析后发现,差异蛋白主要富集在糖酵解/糖异生、HIF-1 信号通路、病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体的相互作用、淀粉和蔗糖代谢途径等信号通路上。见图 7。

2.2.4 差异蛋白 PPI 分析 为进一步探索差异蛋白之间的相互作用,本研究应用 STRING 数据库对 490 种差异蛋白进行分析,并构建 PPI,其中关联度前 10 的蛋白分别为 LDLR、APP、AURKB、ENO1、CAL-

COCO2、CCNB1、CDC20、CDCA8、LDHA、ECT2,这些蛋白与其他蛋白存在较为紧密的相互作用关系(图 8)。另外,参与糖酵解途径的关键酶 ENO1 和 LDHA 位于上述差异蛋白的关键节点上。

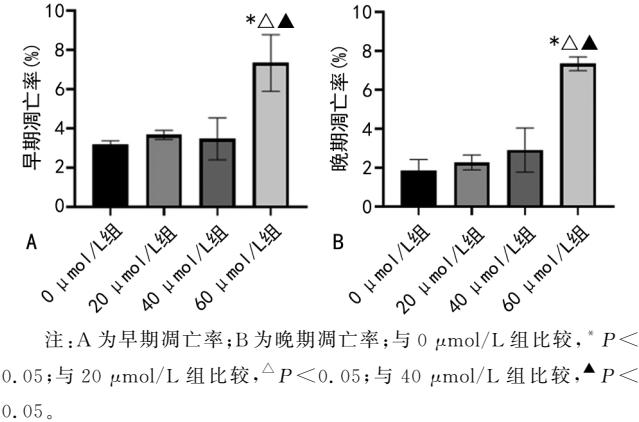


图 5 羽扇豆醇对结直肠癌 HCT116 细胞的凋亡率比较

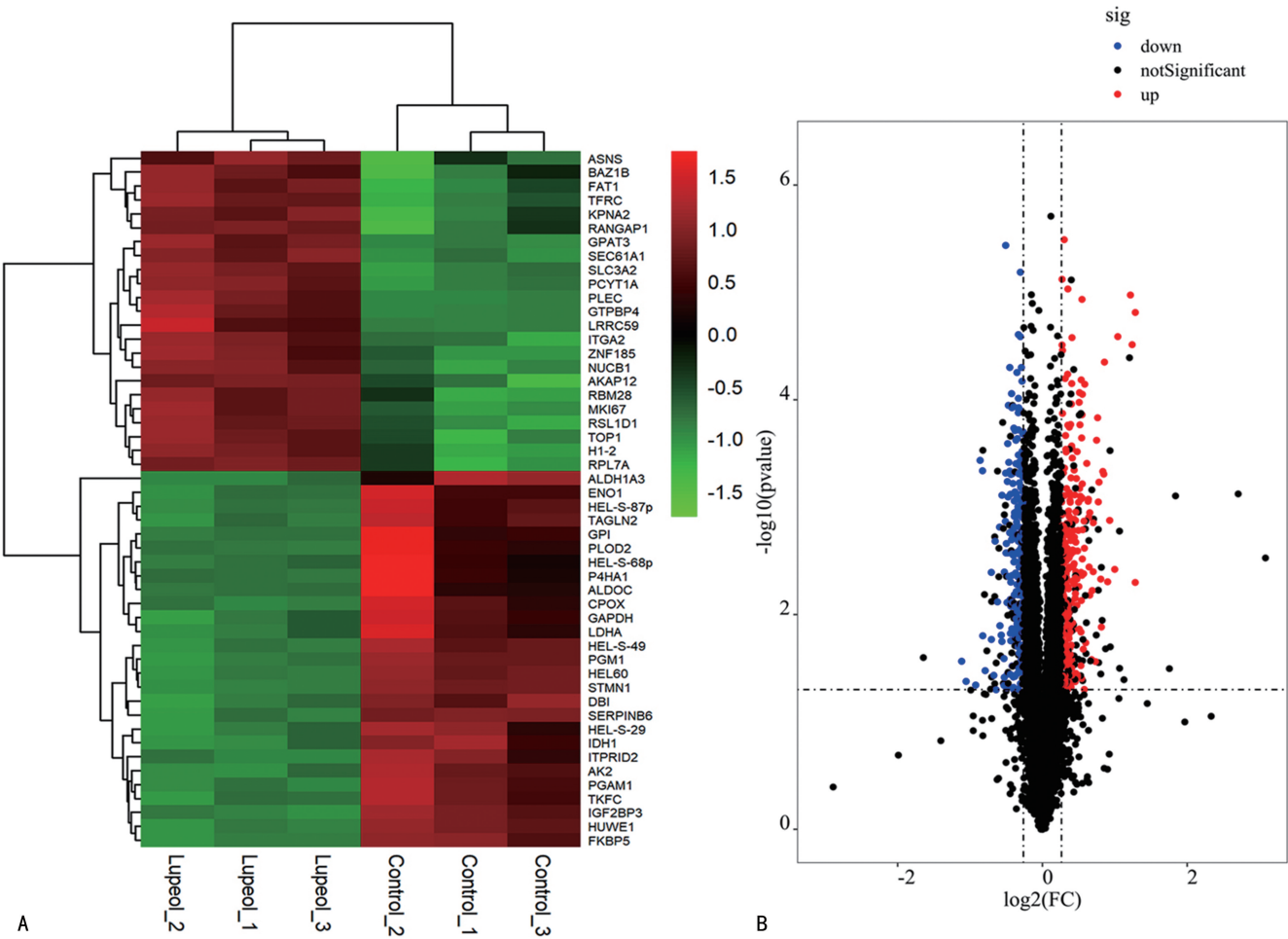


图 6 羽扇豆醇差异蛋白表达量聚类热图及火山图

2.3 羽扇豆醇对糖酵解途径相关蛋白表达水平的影响 经不同浓度的羽扇豆醇干预 HCT116 细胞 48 h 后,细胞中 HIF-1 α 、ENO1 和 LDHA 蛋白表达水平出

现明显改变,随着羽扇豆醇干预浓度增高,HIF-1 α 、ENO1、LDHA 蛋白表达水平均呈不同程度减少(图 9)。

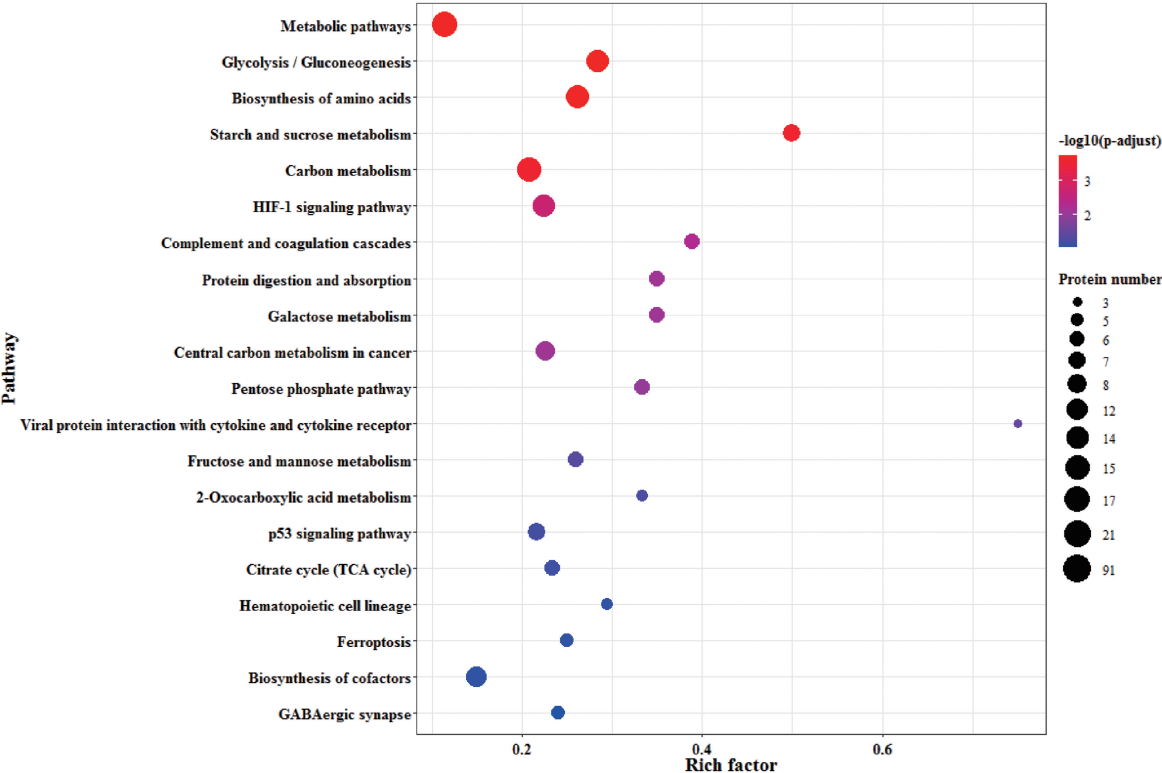


图 7 KEGG 信号通路注释分析气泡图

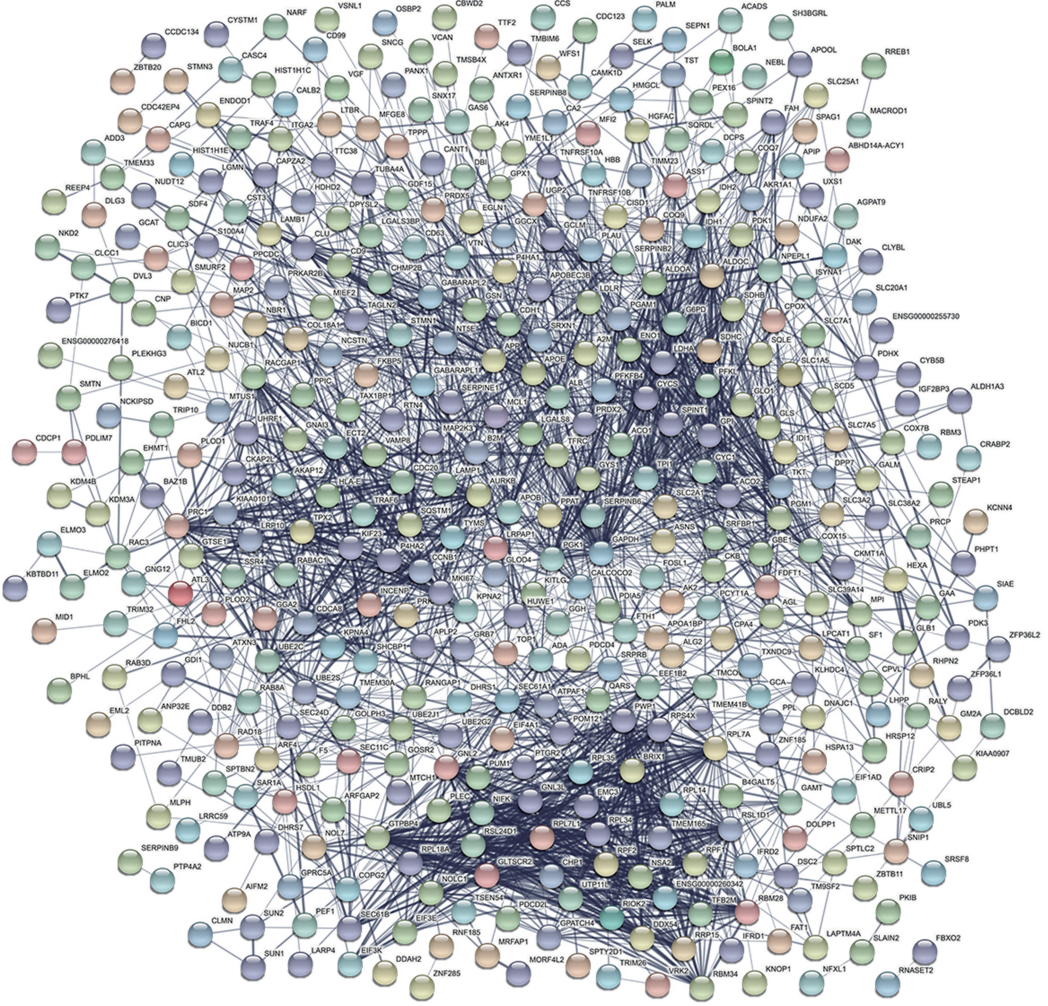
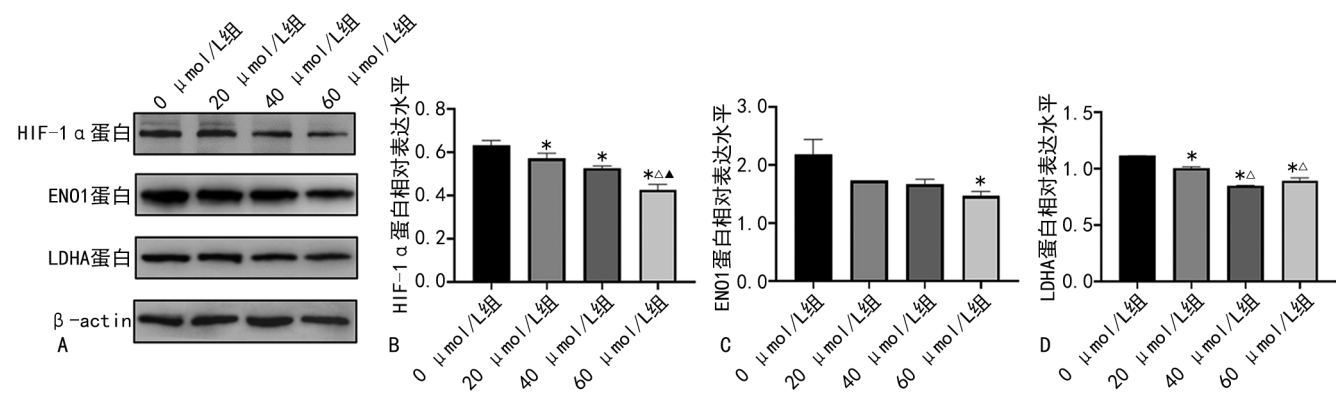


图 8 差异蛋白 PPI 分析结果



注:A为各组 HCT116 细胞的 HIF-1 α 、ENO1、LDHA 蛋白表达情况;B为各组 HIF-1 α 蛋白相对表达水平;C为各组 ENO1 蛋白相对表达水平;D为各组 LDHA 蛋白相对表达水平。与 0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,* $P<0.05$;与 20 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,△ $P<0.05$;与 40 $\mu\text{mol/L}$ 组比较,▲ $P<0.05$ 。

图 9 羽扇豆醇对 HCT116 细胞相关蛋白表达水平的影响

3 讨 论

随着中药扶正祛邪的机制及促进人体免疫力的研究进展,中药在癌症预防、早期治疗,甚至是在癌症中晚期的应用方面具有明显优势^[11-12]。据报道,羽扇豆醇对前列腺癌、肺癌、膀胱癌等恶性肿瘤具有良好的治疗效果,其机制涉及 MAPK/ERK、PI3K/AKT/mTOR 等多种细胞内信号通路的改变^[13-14]。值得注意的是,与传统抗肿瘤药物不同,羽扇豆醇已被证实对正常细胞、组织、小鼠无毒,并且具有有效的治疗剂量^[9-10]。本研究结果显示,羽扇豆醇能明显抑制 HCT116 细胞的增殖,且呈时间-剂量依赖性,但对人正常结肠上皮 FHC 细胞及人腹膜间皮 HMrSV5 细胞无抑制作用。进一步的细胞功能试验提示,羽扇豆醇可明显抑制 HCT116 细胞的克隆形成、迁移和侵袭能力,同时能有效诱导细胞凋亡,由此提示羽扇豆醇在治疗结肠直肠癌方面具有一定的临床价值。

本研究进一步通过 TMT 标记定量蛋白质组学及生物信息学分析探讨其潜在的分子机制。经 TMT 标记定量蛋白质组学分析显示,共筛选出 490 种有明显差异表达的蛋白,其中表达上调蛋白 269 种,表达下调蛋白 221 种。GO 功能富集分析提示,差异蛋白主要参与了细胞分裂、增殖、凋亡及营养物质代谢等生物学过程,以上过程与肿瘤的发生和发展密切相关。通过 KEGG 信号通路注释分析发现,羽扇豆醇的抑癌作用可能与糖酵解/糖异生、HIF-1 信号通路、淀粉和蔗糖代谢途径等信号通路相关。有氧糖酵解途径是肿瘤细胞特征性的代谢方式,肿瘤细胞通过增强糖酵解活性和产生大量乳酸及快速生成三磷酸腺苷(ATP),促进癌细胞的生长与转移^[15]。本研究构建 PPI 分析发现,糖酵解途径中的关键酶 ENO1 和 LDHA 均位于差异蛋白的关键节点上。因此,本研究推测羽扇豆醇的抗结肠直肠癌作用可能与抑制细胞糖酵解通路有关。

ENO1 属于一种烯醇化酶,在糖酵解过程中催化 2-磷酸甘油酸转化为磷酸烯醇丙酮酸,在大多数肿瘤细胞中表达水平升高,是糖酵解途径的关键酶之一^[16]。ENO1 可通过糖酵解途径向肿瘤细胞提供代谢所需要的 ATP,对肿瘤细胞具有抑制凋亡和促进增殖的作用^[17-18],但在正常细胞中无此作用,其原因可能是因为肿瘤细胞处于缺氧微环境,重新调节了糖酵解途径,最终使糖酵解酶增加,而正常细胞则无此现象^[19]。另外,ENO1 可激活糖酵解途径,改善肿瘤细胞对低氧的能量失衡,诱导肿瘤新生血管形成,促进结直肠癌细胞的增殖、侵袭和体外转移^[20]。LDHA 也是糖酵解途径的关键酶,处于糖酵解反应的终末端,在多种癌症中呈过表达,可作为一种生物标志物,与预后不良相关^[21]。LDHA 能将丙酮酸转化为乳酸,降低细胞对氧气的依赖性,为肿瘤细胞生长和增殖提供能量,并且可抑制肿瘤细胞凋亡,促进肿瘤的恶性进展^[22]。

HIF-1 α 是一种氧敏感转录因子,介导对缺氧的适应性代谢反应,在大多数肿瘤组织、细胞中可诱导糖酵解相关基因的表达,通过改变能量代谢、促进细胞增殖、血管生成和血管重塑等方式提高细胞在缺氧环境中的适应性,促进肿瘤生长,与患者预后不良及肿瘤耐药密切相关^[23]。据报道,ENO1 与 LDHA 均是 HIF-1 α 的下游信号分子,在糖酵解过程中,HIF-1 α 可通过与 ENO1 和 LDHA 启动子中的低氧反应原件结合,调节 ENO1 和 LDHA 表达和靶基因转录,诱导细胞对缺氧的适应性反应,同时随着乳酸生成和葡萄糖利用增加,从而促进肿瘤细胞生长^[24-25]。因此,HIF-1 α 与 ENO1、LDHA 的表达均呈正相关,并且均能促进肿瘤细胞的生长和转移。本研究中,羽扇豆醇作用于结肠直肠癌 HCT116 细胞后,HIF-1 α 、ENO1 和 LDHA 蛋白表达水平均明显降低,提示羽扇豆醇可抑制 HIF-1 α 表达,进一步下调其下游靶标 ENO1 和

LDHA 蛋白表达水平,减少乳酸及 ATP 产生,最终抑制糖酵解途径,导致 HCT116 细胞增殖及转移能力受限,并诱导细胞凋亡。上述分子功能和潜在相关通路与生物信息学分析综合结果趋势一致。

综上所述,羽扇豆醇可明显抑制 HCT-116 细胞增殖、克隆、迁移、侵袭的能力,同时可诱导细胞凋亡,其作用机制可能与下调糖酵解信号通路中 HIF-1 α 、LDHA 和 ENO1 蛋白的表达水平有关。

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] AKAGI T, INOMATA M. Essential advances in surgical and adjuvant therapies for colorectal cancer 2018 – 2019 [J]. Ann Gastroenterol Surg, 2020, 4(1): 39-46.

[3] LUO H, VONG C T, CHEN H, et al. Naturally occurring anti-cancer compounds; shining from Chinese herbal medicine [J]. Chin Med, 2019, 14(1): 48-52.

[4] WANG Y, ZHANG Q, CHEN Y, et al. Antitumor effects of immunity-enhancing traditional Chinese medicine[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 121: 109570.

[5] SALEEM M. Lupeol, a novel anti-inflammatrory and anti-cancer dietary triterpene[J]. Cancer Lett, 2009, 285(2): 109-115.

[6] SIDDIQUE H R, SALEEM M. Benefcial health effects of lupeol triterpene; a review of preclinical studies [J]. Life Sci, 2011, 88(7/8): 285-293.

[7] 韩泽平, 麦正均, 黎毓光, 等. 羽扇豆醇联合槲皮素对膀胱癌 5637 细胞的抑制作用[J]. 安徽医药, 2021, 25(5): 854-858.

[8] MAURYA S K, SHADAB G, SIDDIQUE H R. Chemo-sensitisation of therapy resistant tumors; targeting multiple cell signaling pathways by lupeol, a pentacyclic triterpene [J]. Curr Pharm Des, 2020, 26(4): 455-465.

[9] RUIZ-RODRÍGUEZ M A, VEDANI A, FLORES-MIRELES A L, et al. In silico prediction of the toxic potential of lupeol [J]. Chem Res Toxicol, 2017, 30(8): 1562-1571.

[10] PREETHA S P, KANNIAPPAN M, SELVAKUMAR E, et al. Lupeol ameliorates aflatoxin B1-induced peroxidative hepatic damage in rats [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2006, 143(3): 333-339.

[11] 侯莹. 扶正中药辅助治疗肿瘤的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(15): 2728-2730.

[12] ZHAO H, HE M, ZHANG M, et al. Colorectal cancer, gut microbiota and traditional chinese medicine; a systematic review [J]. Am J Chin Med, 2021, 49(4): 805-828.

[13] CHE S, WU S, YU P. Lupeol induces autophagy and apoptosis with reduced cancer stem-like properties in retinoblastoma via phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin inhibition[J]. J Pharm Pharmacol, 2022, 74(2): 208-215.

[14] SOHAG A A M, HOSSAIN M T, RAHAMAN M A, et al. Molecular pharmacology and therapeutic advances of the pentacyclic triterpene lupeol [J]. Phytomedicine, 2022, 99: 154012.

[15] ABBASZADEH Z, ÇESMELI S, BIRAY AVCI Ç. Crucial players in glycolysis: cancer progress [J]. Gene, 2020, 726: 144158.

[16] HUANG C K, SUN Y, LV L, et al. ENO1 and cancer [J]. Mol Ther Oncolytics, 2022, 24: 288-298.

[17] ZHANG J, LI H, MIAO L, et al. Silencing of ENO1 inhibits the proliferation, migration and invasion of human breast cancer cells[J]. J BUON, 2020, 25(2): 696-701.

[18] WANG L, BI R, YIN H, et al. ENO1 silencing impaires hypoxia-induced gemcitabine chemoresistance associated with redox modulation in pancreatic cancer cells [J]. Am J Transl Res, 2019, 11(7): 4470-4480.

[19] HANG Y, LEI W, LIU H L. ENO1 overexpression in pancreatic cancer patients and its clinical and diagnostic significance [J]. Gastroenterol Res Pract, 2018, 2018: 3842198.

[20] HOU J Y, CAO J, GAO L J, et al. Upregulation of α enolase (ENO1) crotonylation in colorectal cancer and its promoting effect on cancer cell metastasis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 578: 77-83.

[21] WOODFORD M R, CHEN V Z, BACKE S J, et al. Structural and functional regulation of lactate dehydrogenase-a in cancer [J]. Future Med Chem, 2020, 12(5): 439-455.

[22] FENG Y, XIONG Y, QIAO T, et al. Lactate dehydrogenase A; A key player in carcinogenesis and potential target in cancer therapy [J]. Cancer Med, 2018, 7(12): 6124-6136.

[23] ELZAKRA N, KIM Y. HIF-1 α metabolic pathways in human cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2021, 1280: 243-260.

[24] ZHENG F, JANG W C, FUNG F K, et al. Up-regulation of ENO1 by HIF-1 α in retinal pigment epithelial cells after hypoxic challenge is not involved in the regulation of VEGF secretion [J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0147961.

[25] CUI X G, HAN Z T, HE S H, et al. HIF1/2 α mediates hypoxia-induced LDHA expression in human pancreatic cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(15): 24840-24852.