

# 连翘提取物通过 PI3K-AKT-mTOR 信号通路 逆转结肠癌氟尿嘧啶耐药细胞株的研究

俞燕丽<sup>1,2</sup>, 傅睿<sup>3,4</sup>

1. 浙江中医药大学中医内科, 浙江 杭州 310053
2. 杭州市余杭区中医院中医内科, 浙江 杭州 311106
3. 浙江省立同德医院, 浙江 杭州 310012
4. 浙江省中医药研究院, 浙江 杭州 310007

**[摘要]** 目的: 通过体外实验观察中药连翘提取物对结肠癌氟尿嘧啶(5-FU)耐药细胞株的作用及机制。方法: 构建结肠癌5-FU耐药细胞株SW480R, 并运用MTT、流式细胞术、Western Blot检测不同浓度连翘提取物对SW480R的抑制增殖、诱导凋亡以及蛋白磷脂酰肌醇3-激酶(Phosphatidylinositide 3-kinases, PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(Phosphorylated-protein kinase B, P-AKT)、蛋白激酶B(Protein kinase B, AKT)、磷酸化雷帕霉素靶蛋白(Phosphorylated-mammalian target of rapamycin, P-mTOR)、雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)、磷酸化真核翻译起始因子4E结合蛋白1(Phosphorylated-eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, P-4EBP1)、真核翻译起始因子4E结合蛋白1(Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, 4EBP1)的表达。结果: 经过5-FU长期诱导, 构建培养而得到结肠癌5-FU耐药细胞株SW480R的半抑制浓度(The half maximal inhibitory concentration, IC<sub>50</sub>)为62.68 μmol/L, 而正常结肠癌细胞SW480的IC<sub>50</sub>为13.54 μmol/L。与对照组比较, 不同浓度连翘提取物对SW480R有抑制增殖作用(P<0.05), 且呈剂量依赖性, 其IC<sub>50</sub>剂量为13.63 μmol/L。与对照组比较, 不同浓度连翘提取物能使活化型半胱天冬酶3(Cleaved-Caspase 3)、活化型半胱天冬酶9(Cleaved-Caspase 9)的表达增加, 原型Caspase 3、Caspase 9的表达下降, 同时显著下调信号通路蛋白PI3K、P-AKT、P-mTOR、P-4EBP1的表达(P<0.05)。结论: 连翘提取物能从体外明显抑制结肠癌5-FU耐药细胞株SW480R的生长, 诱导凋亡, 其作用机制可能通过抑制PI3K-AKT-mTOR信号通路, 最终起到抑制肿瘤生长的作用。

**[关键词]** 结肠癌; 连翘提取物; 氟尿嘧啶(5-FU); PI3K-AKT-mTOR; 细胞实验

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2019) 05-0027-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2019.05.007

## A Study on Forsythia Suspensa Extract Reversing Fluorouracil Resistant Cell Line in Colon Cancer by PI3K-AKT-mTOR Signaling Pathway

YU Yanli, FU Rui

**Abstract:** **Objective:** To observe the effect and mechanism of Chinese herbal Forsythia suspensa extract on fluorouracil (5-FU) resistant cell line in colon cancer by experiments in vitro. **Methods:** Made a 5-FU drug-resistant cell line called SW480R in colon cancer, and applied MTT, flow cytometry and Western blot to detect the proliferation inhibition and apoptosis induction of different concentrations of Forsythia extract for SW480R and the expressions of phosphatidylinositide 3-kinases (PI3K), phosphorylated-protein kinase B (P-AKT), protein kinase B (AKT), phosphorylated-mammalian target of rapamycin (P-mTOR), mammalian target of rapamycin (mTOR), phosphorylated eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (P-4EBP1), eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4EBP1). **Results:** After long-term induction of 5-FU, the half-immunity inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) of 5-FU-resistant cell line SW480R created by construction and culture in colon cancer was 62.68 μmol/L, while the IC<sub>50</sub> of SW480 in normal colon cancer cells was 13.54 μmol/L. Compared with that in the control group, different concentrations of Forsythia suspensa extract inhibited proliferation inhibition of

**[收稿日期]** 2018-10-12

**[基金项目]** 浙江省中医药科学研究基金项目 (2017ZA015); 浙江省科技厅院所专项 (2017F30045); 浙江省自然科学基金项目 (LQ19H270007)

**[作者简介]** 俞燕丽 (1986-), 女, 主治中医师, 研究方向: 中医治疗脾胃或颈腰腿痛。

**[通信作者]** 傅睿, E-mail: zjzy1956@126.com。

SW480R( $P < 0.05$ ); there was a dose-dependent manner, with its  $IC_{50}$  dose being  $13.63 \mu\text{mol/L}$ . Compared with that in the control group, different concentrations of Forsythia suspensa extract increased the expressions of Cleaved-Caspase 3 and Cleaved-Caspase 9 and decreased the expressions of prototype Caspase 3 and Caspase 9; at the same time it significantly down-regulated the expressions of PI3K, P-AKT, P-mTOR and P-4EBP1( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The application of Forsythia suspensa extract can significantly inhibit the growth of 5-FU resistant cell line SW480R in colon cancer in vitro and induce the apoptosis. The mechanism of action may ultimately be achieved in that Forsythia suspensa extract inhibits the growth of tumor by inhibiting the PI3K-AKT-mTOR signaling pathway.

**Keywords:** Colon cancer; Forsythia suspensa extract; Fluorouracil(5-FU); PI3K-AKT-mTOR; Cell experiment

结肠癌是常见的消化道恶性肿瘤之一, 根据2018年9月最新的世界肿瘤统计报告, 中国结直肠癌的发病率为24.7个/10万, 已超过世界总体发病率24.2个/10万, 成为结直肠癌的高发病率国家<sup>[1]</sup>。氟尿嘧啶(5-FU)类药物是治疗进展期结肠癌患者的一线药物, 然而其治疗的有效率只有10%~15%<sup>[2]</sup>, 患者对5-FU化疗产生耐药是治疗失败的重要原因。因此, 探索有效低毒的逆转剂有重要意义。

连翘为木犀科植物连翘的干燥果实, 广泛分布于我国山西、河南、陕西、山东等地。《神农本草经》记载连翘可用于清热解毒, 治疗疮伤<sup>[3]</sup>。现代研究表明, 连翘提取物有良好的抗癌活性, 对治疗头颈部肿瘤、食道癌、胃癌、乳腺癌、宫颈癌、白血病等多种肿瘤有明显的抑制作用<sup>[4]</sup>。研究表明连翘提取物对化疗药物耐药的原始肿瘤细胞有抗肿瘤作用<sup>[5]</sup>。本研究将探索连翘提取物对结肠癌5-FU耐药细胞株SW480R的抑制作用以及其可能的作用机制, 以期找到对5-FU化疗产生耐药的有效低毒逆转剂。

## 1 材料与方法

**1.1 实验细胞株** 结肠癌细胞株SW480(购于上海细胞库), 连翘提取物(双帆药业有限公司), 5-FU(购自浙江省肿瘤医院)。

**1.2 实验试剂及主要仪器** 活化型半胱天冬酶-3(Cleaved-Caspase 3)、半胱天冬酶-3(Caspase 3)、活化型半胱天冬酶-9(Cleaved-Caspase 9)、半胱天冬酶-9(Caspase 9)、磷脂酰肌醇3-激酶(Phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)、磷酸化蛋白激酶B(Phosphorylated-protein kinase B, P-AKT)、蛋白激酶B(Protein kinase B, AKT)、磷酸化雷帕霉素靶蛋白(Phosphorylated-mammalian target of rapamycin, P-mTOR)、雷帕霉素靶蛋白(Mammalian target of rapamycin, mTOR)、磷酸化真核翻译起始因子4E结合蛋白1(Phosphorylated-eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, P-4EBP1)、真核翻译起始因子4E结合蛋白1(Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, 4EBP1)抗体均购自Santa Cruz公司。MTT购自Biosharp公司, Annexin V-FITC/PI试剂盒购于美天旎生物技术有限公司。流式细胞仪购自美天旎生物技术有限公司; Tanon 5200 化学发光成像系统购自上海天能科技有限公司; Multiskan FC型酶标仪购自赛默飞世尔(上海)仪器有限公司。

**1.3 细胞培养及5-FU耐药细胞株分离** 见图1。将人结肠癌SW480细胞培养于含10%血清的DMEM培养基中(含100 U/mL青霉素和100  $\mu\text{g/mL}$ 链霉素)。置于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  孵箱中培养, 取对数生长期细胞进行后续研究实验。将SW480细胞接种到10 cm培养皿中并在含有10%FBS的DMEM中常规培养24 h, 换成低剂量1.5  $\mu\text{mol/L}$  5-FU含药培养基, 收集存活的细胞进行传代培养, 然后采用逐渐增加5-FU浓度(每次增加5  $\mu\text{mol/L}$ )的方法进行处理, 重复该过程数月后存活的细胞对5-FU有耐药作用, 收集该耐药细胞株SW480R, 进行后续实验。

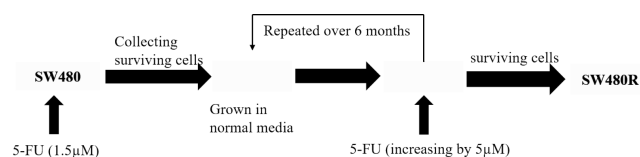


图1 人结肠癌5-FU耐药细胞株SW480R的构建流程

**1.4 MTT法检测细胞增殖** 取对数生长期的SW480及SW480R细胞, 用0.25%胰酶消化, 调整细胞浓度为5 000个/孔, 加入96孔板中, 每孔加入100  $\mu\text{L}$ 细胞悬液, 待细胞融合度约为60%~70%时加入不同浓度实验药物。药物作用24 h后, 加入MTT, 再培养4 h, 弃去培养液加入200  $\mu\text{L}$  DMSO, 震荡10 min, 在酶标仪上490 nm处测每孔的吸光度(A)值, 按公式增殖抑制率=(1-实验组OD值/对照组OD值)×100计算细胞增殖抑制率, 实验重复3次计算半抑制浓度(The half maximal inhibitory concentration,  $IC_{50}$ )。

**1.5 Annexin V-FITC/PI双染法检测细胞凋亡** SW480R细胞株接种于24孔板, 待细胞融合度约为60%~70%时给药组加入不同浓度的连翘提取物溶液, 对照组加一定量的溶媒处理, 培养24 h后收集细胞, 并按照Annexin V-FITC/PI试剂盒说明书进行操作, 利用流式细胞仪(美天旎生物技术有限公司)检测细胞凋亡。

**1.6 Western-Blot检测各蛋白含量** 用RIPA细胞裂解液提取细胞总蛋白, BCA法测蛋白浓度, 加热变性后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 半干转至PVDF膜, 5%脱脂牛奶室温封闭2 h,

加一抗 Cleaved-Caspase 3、Caspase 3、Cleaved-Caspase 9、Caspase 9、PI3K、AKT、P-AKT、mTOR、P-mTOR、4EBP1、P-4EBP1 4℃过夜，再加入稀释的 HRP 辣根过氧化物酶(Horseradish Peroxidase, HRP)。标记的二抗室温孵育 2h，1×TBST 清洗 3 次，加入电化学发光液(Electro-Chemi-Luminescence, ECL)，用 Tanon 5200 化学发光成像系统发光显影。

1.7 统计学方法 MTT 及流式统计柱状图用 Graphpad prime 7 软件处理，Western Blot 结果用 Image J 进行定量，并作统计分析。用 SPSS19.0 软件进行统计学分析，计量资料均用(̄x ± s)表示，单因素方差分析检验各组间差异。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5-FU 对原代 SW480 和 SW480R 的增殖抑制结果 见图 2。MTT 实验结果显示，原代 SW480 的 IC<sub>50</sub> 为 13.54 μmol/L，耐药株 SW480R 的 IC<sub>50</sub> 为 62.68 μmol/L，表明结肠癌 5-FU 耐药细胞株构建成功。

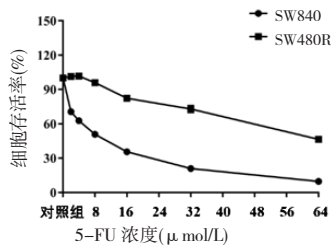
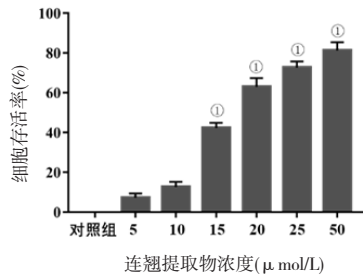


图 2 5-FU 对原代 SW480 和 SW480R 的增殖抑制结果

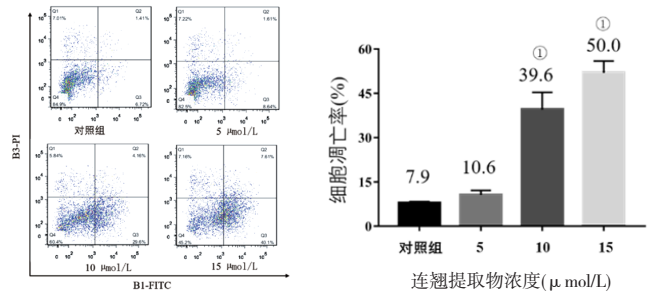
2.2 不同浓度连翘提取物抑制 SW480R 的增殖结果 见图 3。连翘提取物 IC<sub>50</sub> 为 13.63 μmol/L，与对照组比较，各浓度组 SW480R 增殖减弱，细胞抑制率明显升高(P < 0.05)，且呈现剂量依赖性。



与对照组比较，①P < 0.05

图 3 不同浓度连翘提取物抑制 SW480R 的增殖结果

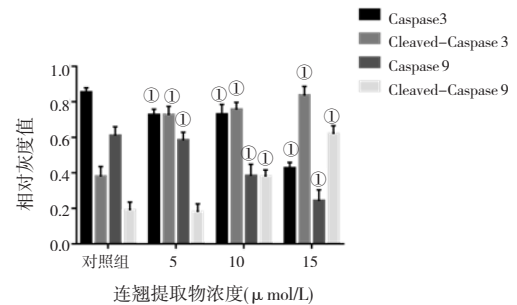
2.3 不同浓度连翘提取物对 SW480R 凋亡的影响 见图 4。与对照组比较，连翘提取物浓度为 10.15 μmol/L 时耐药细胞株 SW480R 凋亡率上升(P < 0.05)，且呈剂量依赖性。



与对照组比较，①P < 0.05

图 4 不同浓度连翘提取物对 SW480R 凋亡的影响

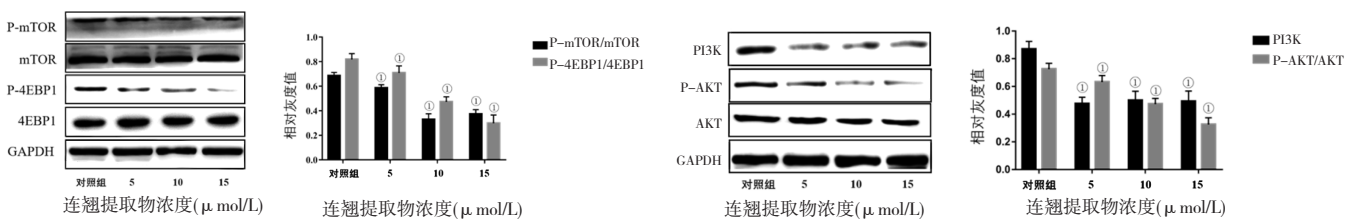
2.4 不同浓度连翘提取物对 SW480R Cleaved-Caspase 3、Caspase 3、Cleaved-Caspase 9、Caspase 9 蛋白表达的影响 见图 5。与对照组比较，不同浓度连翘提取物凋亡蛋白活化型 Cleaved-Caspase 3 的表达增加，原型 Caspase 3，Caspase 9 的表达下降(P < 0.05)。当连翘提取物浓度为 10 μmol/L 和 15 μmol/L 时，Cleaved-Caspase 9 的表达增加(P < 0.05)。



与对照组比较，①P < 0.05

图 5 不同浓度连翘提取物对 SW480R Cleaved-Caspase 3、Caspase3、Cleaved-Caspase 9、Caspase 9 蛋白表达的影响

2.5 不同浓度连翘提取物对 SW480R PI3K、P-AKT、AKT、P-mTOR、mTOR、P-4EBP1、4EBP1 蛋白表达的影响 见图 6。与对照组比较，不同浓度连翘提取物作用后 SW480R PI3K、P-AKT/AKT、P-mTOR、P-4EBP1/4EBP1 蛋白表达均下降(P < 0.05)。



与对照组比较，①P < 0.05

图 6 不同浓度连翘提取物对 SW480R PI3K、P-AKT、AKT、P-mTOR、mTOR、P-4EBP1、4EBP1 蛋白表达的影响

### 3 讨论

结肠癌在我国发病率逐年升高,化疗是治疗晚期结直肠癌的主要手段<sup>[1]</sup>。5-FU 是结肠癌患者化疗,特别是中晚期姑息化疗或预防复发转移的基础化疗药物<sup>[2]</sup>。然而,临床上结肠癌的治疗常常出现对 5-FU 的耐药现象。因此,寻找一种有效的耐药逆转剂显得十分重要。本研究发现连翘提取物可抑制结肠癌耐药细胞株 SW480R 的增殖并诱导其凋亡,同时也能下调 PI3K、AKT、mTOR 蛋白的表达,抑制结肠癌耐药细胞株 SW480R 的激活。

中药有疗效高、靶点多、副作用少等优点,在逆转耐药的同时也能杀伤肿瘤细胞、提高机体免疫功能<sup>[3]</sup>。我国连翘资源丰富,研究表明连翘中主要含有苯乙醇苷类、木脂素类、三萜类、黄酮类、生物碱及挥发油类等化合物<sup>[4]</sup>。连翘中的活性成分对肿瘤细胞有毒副作用,能够阻滞细胞周期、调控信号通路、逆转耐药、同时促进细胞分化和抑制肿瘤细胞转移等<sup>[5]</sup>。刘广遐等<sup>[6]</sup>报道连翘醇提物对化疗药物耐药的原代肿瘤细胞有抗肿瘤作用。本研究成功构建了结肠癌 5-FU 耐药细胞株 SW480R,并观察了连翘提取物对结肠癌 5-FU 耐药细胞株的逆转作用,结果中药连翘提取物对 SW480R 有很好的抑制增殖及诱导细胞凋亡作用,表明连翘提取物能够逆转结肠癌对 5-FU 的耐药。

PI3K/AKT 信号通路有广泛的生物活性,可促进细胞生长、增殖以及抑制细胞凋亡、转移等作用,在恶性肿瘤内往往呈过度激活的状态<sup>[7]</sup>。研究表明 PI3K/AKT 信号通路药物耐药性密切相关,可作为化疗耐药治疗的新靶点。PI3K/AKT 信号通路和结肠癌细胞 5-FU 耐药密切相关,下调或抑制 PI3K/AKT 通路能够增加结肠癌细胞对 5-FU 的敏感性<sup>[8]</sup>。Chen J 等<sup>[9]</sup>将 PI3K/mTOR 双抑制剂 BEZ-235 与镁铝层状双氢氧化物搭载的 5-FU 联用于结肠癌 HCT-116 细胞,发现生存率较 2 组单用均明显下降。mTOR 是 PI3K/AKT 下游的一种重要的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,mTOR 活化并磷酸化 4EBP1,参与形成真核起始因子 4F(eukaryotic translation initiation factor 4F, eIF4F)复合物,启动翻译并编码细胞周期调节蛋白。mTOR 整合细胞外多种信号刺激,参与体内多条信号通路,影响转录及蛋白质合成。对 mTOR 的研究发现,其与细胞凋亡、自噬、生长等均有重要联系<sup>[10]</sup>。本研究发现连翘提取物能够下调 PI3K-AKT-mTOR 信号通路中关键分子的表达,抑制 SW480R 细胞内该信号通路的过度活化,这一作用可能与连翘提取物逆转结肠癌细胞 SW480 对 5-FU 的耐药有关。

综上,连翘提取物能抑制人结肠癌 5-FU 耐药细胞株 SW480R 的增殖,并诱导其发生凋亡,这一现象可能与连翘提取物能抑制细胞内 PI3K-AKT-mTOR 信号通路的过度活化有

关。此结果为寻找低毒有效的逆转剂提供了理论依据,为肿瘤细胞 5-FU 耐药逆转提供新的方向,也为提高癌症患者预后生存率带来新的希望。

### [参考文献]

- [1] 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(6): 394-424.
- [2] ELEZ E, HENDLISZ A, DELAUNOIT T, et al. Phase II study of necitumumab plus modified FOLFOX6 as first-line treatment in patients with locally advanced or metastatic colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2016, 114 (4): 372-380.
- [3] WANG J, WANG X, ZHAO M, et al. Potentially functional SNPs (pfSNPs) as novel genomic predictors of 5-FU response in metastatic colorectal cancer patients[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e111694.
- [4] 叶嘉诺,郑坚,朱莹杰,等. 中药提取物逆转结直肠癌多药耐药的研究进展[J]. 吉林中医药, 2017, 37(4): 429-432.
- [5] 刘广遐,王婷婷,胡文静,等. 连翘醇提物对恶性胸腹水中原代肿瘤细胞的抗肿瘤作用[J]. 实用老年医学, 2009, 23(5): 359-363.
- [6] 邢国秀,李楠,王童,等. 连翘中黄酮类化学成分的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(7): 593-597.
- [7] 毛威. 连翘化学成分及其抗肿瘤活性的研究[D]. 武汉:湖北中医学院, 2009.
- [8] DANIELSEN S A, EIDE P W, NESBAKKEN A, et al. Portrait of the PI3K /AKT pathway in colorectal cancer[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1855(1): 104-121.
- [9] 温彦斐,王俊,毕经旺. PI3K/AKT 信号通路及结肠癌细胞 5-氟尿嘧啶耐药机制的关系[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2015, 22(6): 815-818.
- [10] CHEN J, SHAO R, LI L, et al. Effective inhibition of colon cancer cell growth with MgAl-layered double hydroxide (LDH) loaded 5-FU and PI3K /mTOR dual inhibitor BEZ-235 through apoptotic pathways [J]. Int J Nanomed, 2014, 16(9): 3403-3441.
- [11] LAPLANTE M, SABATINI D M. mTOR signaling in growth control and disease [J]. Cell, 2012, 149(2): 274-293.

(责任编辑:冯天保,钟志敏)