

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.16.012

实验研究

解毒三根汤对结肠癌 SW480 细胞侵袭转移及 AKT/GSK-3 β 信号通路的影响

阮善明¹, 周萌萌², 袁莉¹, 沈敏鹤^{1*}

(1. 浙江中医药大学附属第一医院, 浙江省杭州市上城区邮电路 54 号, 310006; 2. 浙江省衢州市人民医院)

摘要 **目的** 探讨解毒三根汤抗结肠癌侵袭转移的可能作用机制。**方法** 在结肠癌 SW480 细胞中建立蛋白激酶 B (AKT) 敲减和相应阴性的细胞稳定株。实验分为阴性对照组、阴性三根汤组、AKT 敲减对照组、AKT 敲减三根汤组。首先用终浓度为 50 ng/ml 表皮细胞生长因子诱导各组细胞 48 h 建立上皮间质转化 (EMT) 模型。再用 6 g/L 解毒三根汤干预阴性三根汤组和 AKT 敲减三根汤组 48 h。通过划痕实验、Transwell 迁移和侵袭实验观察细胞侵袭转移能力, 采用 Western blot 法检测 EMT 相关标记物 (E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Occludin、Twist、Slug、Snail、ZEB1) 及蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶 3 β (AKT/GSK-3 β) 信号通路相关蛋白表达。**结果** 与阴性对照组比较, 其余 3 组细胞 12 h 及 24 h 迁移距离均缩短, 迁移及侵袭过膜细胞数均减少 ($P < 0.05$); 与 AKT 敲减对照组比较, AKT 敲减三根汤组细胞 12 h 及 24 h 迁移距离缩短, 迁移及侵袭过膜细胞数减少 ($P < 0.05$)。与阴性对照组比较, 其余 3 组细胞 E-cadherin、Occludin 上调, N-cadherin、Vimentin、Slug、Twist、Snail、ZEB1、AKT、GSK-3 β 下调 ($P < 0.05$)。与 AKT 敲减对照组比较, AKT 敲减三根汤组 E-cadherin、Occludin 上调, N-cadherin、Vimentin、Snail、Slug、Twist、ZEB1、AKT、GSK-3 β 下调 ($P < 0.05$)。**结论** 解毒三根汤可能通过 AKT/GSK-3 β 信号通路逆转结肠癌细胞的 EMT, 从而抗结肠癌侵袭转移。

关键词 结肠癌; 解毒三根汤; 上皮间质转化; 侵袭转移; AKT/GSK-3 β 信号通路

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是常见消化道恶性肿瘤之一, 其发病率在美国排第三^[1], 在中国排第五^[2]。目前手术、放疗、化疗、靶向治疗已成为 CRC 治疗的主要方法, 但中晚期 CRC 发生侵袭转移是其疗效不理想的主要原因, 也是致死的关键因素^[3]。因此, 寻找安全有效的药物来抑制 CRC 侵袭转移是当前研究的热点和难点。解毒三根汤为浙江省中医院从 20 世纪 70 年代开始在临床上广泛应用于结肠癌治疗的经验方, 由藤梨根、虎杖根、水杨梅根组成。我们前期研究^[4-5]发

现, 解毒三根汤能逆转结肠癌细胞的上皮间质转化 (EMT) 及抑制结肠癌的侵袭转移, 但具体机制尚未明确。EMT 指上皮细胞失去极性, 转变为具有活动能力、能自由移动的间质细胞的生物学过程^[6]。EMT 使肿瘤细胞间失去相互黏附作用, 导致细胞侵袭、运动能力增强, 从而启动肿瘤的恶性进展^[7]。而 EMT 的发生发展受多条信号通路的调节, 其中蛋白激酶 B/糖原合成酶激酶 3 β (AKT/GSK-3 β) 是最重要的信号通路之一。研究表明, AKT/GSK-3 β 信号通路调控着多种肿瘤细胞的 EMT 和侵袭转移能力^[8-9]。因此, 我们从 AKT/GSK-3 β 信号通路入手, 探讨解毒三根汤抗结肠癌侵袭转移的可能作用机制。

1 材料

1.1 细胞株及细胞培养

人结肠癌细胞株 SW480, 购自上海中国科学

基金项目: 国家自然科学基金 (81573902); 中国博士后科学基金 (2017M612040, 2018T110610); 浙江省自然科学基金 (LY17H270007); 浙江省中医药科技计划项目 (2015Z013); 浙江省重大科技专项计划 (2014C03036); 中华中医药学会青年人才托举工程 (QNRC2-C08); 浙江省高等学校中青年学科带头人培养对象项目 (2017-248); 浙江省卫生高层次创新人才培养工程项目资助 (2015-43)

* 通讯作者: shenminhe@zcmu.edu.cn, (0571) 87071083

院典型培养物保藏委员会细胞库。培养于含 10% 胎牛血清和 1% 的青-链双抗的 1640 培养基中,置于 5% CO₂、37℃ 恒温细胞培养箱中培养,2~3 天传代,细胞生长状态良好时用于实验。

1.2 主要试剂

嘌呤霉素 (货号: ST551) 购于上海吉凯基因化学技术有限公司; 胎牛血清 (FBS, 货号: 10082147) 购于美国 Gibco 公司; 1640 培养基 (货号: GNM31800)、胰蛋白酶 (货号: GNM25200) 均购于杭州吉诺生物医药技术有限公司; Puromycin (货号: REVG1001) 购于上海吉凯公司; 表皮细胞生长因子 (EGF, 货号: 236-EG-200) 购于美国 R&D SYSTEMS; Transwell 小室 (8 μm, 24 孔, 货号: 3422)、Matrigel 胶 (货号: 356234) 均购于 Corning 公司; 结晶紫 (货号: C0528-25g) 购于上海生工生物工程有限公司; 4% 多聚甲醛 (货号: AR1068) 购于 BOSTER 公司; 波形蛋白 (Vimentin) 抗体 (货号: 5741S)、AKT 抗体 (货号: 4691S) 均购于 Cell Signaling Technology 公司; N-钙黏蛋白 (N-Cadherin) 抗体 (货号: 76011)、E-钙黏蛋白 (E-Cadherin) 抗体 (货号: 76319)、Slug 抗体 (货号: 27568)、Snail 抗体 (货号: 3879S)、Twist 抗体 (货号: 175430) 均购于 Abcam 公司; 兔二抗 (货号: DW-GAR007)、鼠二抗 (货号: DW0990)、β-actin 抗体 (货号: 66009-1-Ig)、紧密连接蛋白 (Occludin) 抗体 (货号: 13409-1-AP)、GSK-3β 抗体 (货号: 22104-1-AP)、ZEB1 抗体 (货号: 21544-1-AP) 均购于 Proteintech 公司。

1.3 主要仪器

倒置显微镜 (Olympus 公司, 型号: CX22); 台式冷冻多用离心机 (型号: Micro21R)、CO₂ 培养箱 (型号: TC3111)、多功能全波长酶标仪 (型号: Multiskan Spectrum) 均为 Thermo 公司产品; 蛋白印迹检测系统 (Bio-Rad 公司, 型号: Chemi-Doc Touch)。

1.4 解毒三根汤的制备

解毒三根汤由藤梨根、水杨梅根、虎杖根按照 1:1:1 的比例组成,购自浙江省中医院中药房。藤梨根 (批号: 20160721)、水杨梅根 (批号: 20160810)、虎杖根 (批号: 20160702),均产自浙江。解毒三根汤混合提取物由中国药科大学制备,最终制备成含生药浓度为 2 g/ml 的母液,分装灭菌备用。

2 方法

2.1 转染实验

本研究在结肠癌 SW480 细胞中成功建立了 AKT 敲减和相应阴性 (无敲减) 的细胞稳定株。AKT 敲减的质粒及慢病毒包装由上海吉凯基因化学技术有限公司协助完成。设计了 3 条 AKT1-siRNA 序列及 1 条阴性对照 RNA 序列,根据敲减效率选择其中敲减效率最高的 AKT1-siRNA 序列进行质粒构建和慢病毒包装,感染 SW480 细胞株 [感染条件: 感染复数 (MOI) = 10,感染时间为 16 h],感染 72 h 后用含嘌呤霉素的培养液筛选 (浓度为 1.5 μg/ml)。经 TR-PCR 及 Western Blot 分别验证,建立稳定敲减 AKT 及无敲减的细胞株用于后续实验。

2.2 实验分组及模型建立

实验分为阴性对照组、阴性三根汤组、AKT 敲减对照组、AKT 敲减三根汤组。首先用终浓度为 50 ng/ml EGF 干预 4 组诱导阴性细胞及 AKT 敲减细胞 48 h 后,建立 EMT 模型^[4]。

2.3 划痕实验

实验时用 2×10^5 /ml 的 SW480 细胞接种于 6 孔培养板中,细胞贴壁后用 50 ng/ml 的 EGF 处理 4 组细胞 48 h 建立 EMT 模型。然后根据前期实验结果^[4]再用 6 g/L 解毒三根汤干预阴性三根汤组和 AKT 敲减三根汤组 48 h。细胞铺满孔底后,用 200 μl 的枪头垂直于背后的横线划痕;用 PBS 漂洗 3 次,除去悬浮的细胞,加入无血清培养基 3 ml;放入 5% CO₂、37℃ 培养箱培养;每组随机取 3 个视野,分别于 12 h、24 h 在 100 倍光学显微镜下拍照,应用 Image-Pro Plus Version 6.0 软件测量迁移距离 (以像素值表示)。实验重复 3 次。

2.4 Transwell 迁移实验

取加药处理完成的细胞 (加药处理同划痕实验),消化离心后用无血清培养液调整细胞浓度为 2×10^6 /ml,每个 Transwell 小室的上室加入 200 μl 细胞悬液,下室加入 600 μl 胎牛血清;37℃、5% CO₂ 恒温培养箱培养 48 h,取出小室,吸去上室培养基后用棉签小心除去未过膜的细胞,PBS 轻轻洗上室 1 遍;4% 多聚甲醛固定 20 min,PBS 洗 1 遍风干;0.1% 结晶紫染色 30 min,PBS 洗 2 遍;显微镜下 (400 倍) 观察并拍照计数。

2.5 Transwell 侵袭实验

用预冷后的枪头将过夜液化的 Matrigel 人工基质胶与 4℃ 预冷的无血清培养基 1:4 比例混合,

每个 Transwell 小室的上室均匀铺入 40 μ l 稀释过的 Matrigel 胶, 此步操作均在冰上进行。将铺好胶的小室放入恒温培养箱 1h 使胶固化; 余下步骤同 Transwell 迁移实验。

2.6 Western Blot 法检测 EMT 相关标记物及 AKT/GSK-3 β 信号通路相关蛋白的表达

EMT 相关标记物有 E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Twist、Slug、Occludin、Snail、ZEB1, AKT/GSK-3 β 信号通路相关蛋白有 AKT、GSK-3 β 。药物干预后 (加药处理同划痕实验) 各组提取总蛋白; 蛋白浓度测定并计算上样量; 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE 电泳)、转膜、封闭后, 一抗孵育 4 $^{\circ}$ C 层析柜过夜, TBST 漂洗 3 次; 二抗孵育 2h 后 TBST 漂洗 3 次; 显影。用 Image-Pro Plus Version 6.0 软件分析目的条带的积分光密度 (IOD) 值。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计软件进行分析。计量资料符合正态分布以均数 $\pm$ 标准差表示, 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 人结肠癌稳转 AKT 敲减及相应阴性的 SW480 细胞株构建结果

选择 AKT1-RNAi (17646-1)、AKT1-RNAi (17647-1)、AKT1-RNAi (19127-1) 3 条序列和 1 条阴性对照序列进行比较。表 1 示, 与阴性对照序列比较, 其余 3 条 siRNAi 序列细胞中 AKT mRNA 表达均降低 ($P < 0.05$)。其中 AKT1-RNAi (17646-1) 序列 AKT 基因敲减效率最高, 达到 83.5%, 故选择此序列为最佳干扰序列。进一步采用 Western Blot 法检测细胞在筛选的序列干扰下细胞中 AKT 蛋白表达情况。结果显示: SW480 细胞与阴性对照序列细胞中 AKT 蛋白表达无差异, 而 AKT1-RNAi (17646-1) 序列细胞中 AKT 蛋白表达较 SW480 细胞与阴性对照序列细胞明显减少, 详见图 1。以上结果说明人结肠癌稳转 AKT 敲减及相应阴性的 SW480 细胞株构建成功, 可进行后续实验。

3.2 各组细胞划痕实验不同时间细胞迁移距离比较

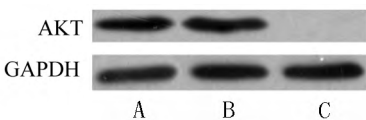
表 2 示, 与阴性对照组比较, 其余 3 组细胞 12h 及 24h 迁移距离均明显缩短 ($P < 0.05$); 与 AKT 敲减对照组比较, AKT 敲减三根汤组细胞 12h 及 24h 迁移距离也缩短 ($P < 0.05$); 与阴性三根汤组比较, AKT 敲减三根汤组细胞 12h 及 24h 迁移距离延长 ($P < 0.05$)。说明 AKT 敲减和

解毒三根汤均可抑制细胞的迁移, 但 AKT 敲减后解毒三根汤抑制细胞迁移的能力减弱。

表 1 各序列细胞中 AKT mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

序列	样本数	AKT mRNA
阴性对照序列	3	1.006 $\pm$ 0.004
AKT1-RNAi (17646-1) 序列	3	0.165 $\pm$ 0.017*
AKT1-RNAi (17647-1) 序列	3	0.546 $\pm$ 0.066*
AKT1-RNAi (19127-1) 序列	3	0.203 $\pm$ 0.062*

注: AKT, 蛋白激酶 B; 与阴性对照序列比较, * $P < 0.05$



注: AKT, 蛋白激酶 B; A, SW480 细胞; B, 阴性对照序列细胞; C, AKT1-RNAi (17646-1) 序列细胞

图 1 AKT 在不同细胞中蛋白表达电泳图

表 2 各组细胞 12h、24h 细胞迁移距离比较 (像素值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	12h	24h
阴性对照组	9	90.05 $\pm$ 20.48	200.08 $\pm$ 20.77
阴性三根汤组	9	19.75 $\pm$ 9.69* Δ	40.11 $\pm$ 10.33* Δ
AKT 敲减对照组	9	72.88 $\pm$ 14.56* Δ	111.11 $\pm$ 21.52* Δ
AKT 敲减三根汤组	9	60.27 $\pm$ 7.03*	91.64 $\pm$ 5.12*

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$; 与 AKT 敲减三根汤组比较, $\Delta P < 0.05$

3.3 各组细胞 Transwell 迁移及侵袭实验结果比较

表 3 示, 与阴性对照组比较, 其余 3 组迁移及侵袭过膜细胞数均明显减少 ($P < 0.05$); 与 AKT 敲减对照组比较, AKT 敲减三根汤组迁移及侵袭过膜细胞数也减少 ($P < 0.05$); 与阴性三根汤组比较, AKT 敲减三根汤组迁移及侵袭过膜细胞数增加 ($P < 0.05$)。说明解毒三根汤和 AKT 敲减均可抑制 SW480 细胞的迁移和侵袭, 而 AKT 敲减后解毒三根汤抑制结肠癌 SW480 细胞迁移及侵袭的能力减弱。

表 3 各组细胞 Transwell 实验迁移过膜细胞数及侵袭过膜细胞数比较 (个, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	迁移过膜细胞数	侵袭过膜细胞数
阴性对照组	9	90.07 $\pm$ 6.74	73.33 $\pm$ 5.48
阴性三根汤组	9	9.21 $\pm$ 2.29* Δ	13.11 $\pm$ 1.97* Δ
AKT 敲减对照组	9	50.25 $\pm$ 4.99* Δ	38.56 $\pm$ 4.83* Δ
AKT 敲减三根汤组	9	42.96 $\pm$ 3.91*	35.56 $\pm$ 8.16*

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$; 与 AKT 敲减三根汤组比较, $\Delta P < 0.05$

表 4 各组细胞上皮间质转化相关标记物及 AKT/GSK-3 β 信号通路相关蛋白表达比较 (IOD 值, $\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	E-cadherin	N-cadherin	Vimentin	Twist	Slug
阴性对照组	3	364.03 $\pm$ 31.53	1645.06 $\pm$ 51.41	1295.76 $\pm$ 80.34	2481.80 $\pm$ 101.00	1165.43 $\pm$ 88.78
阴性三根汤组	3	1782.93 $\pm$ 81.45 ^{*Δ}	161.72 $\pm$ 21.00 ^{*Δ}	132.35 $\pm$ 20.66 ^{*Δ}	893.33 $\pm$ 65.71 ^{*Δ}	261.94 $\pm$ 31.00 ^{*Δ}
AKT 敲减对照组	3	838.49 $\pm$ 52.16 ^{*Δ}	328.12 $\pm$ 25.71 ^{*Δ}	642.85 $\pm$ 46.81 ^{*Δ}	2165.73 $\pm$ 102.01 ^{*Δ}	616.54 $\pm$ 25.51 ^{*Δ}
AKT 敲减三根汤组	3	1104.87 $\pm$ 79.94 [*]	272.91 $\pm$ 24.58 [*]	587.92 $\pm$ 46.81 [*]	1350.47 $\pm$ 82.29 [*]	347.33 $\pm$ 45.51 [*]

组别	样本数	Occludin	Snail	ZEB1	AKT	GSK-3 β
阴性对照组	3	1348.83 $\pm$ 79.74	1923.6 $\pm$ 91.97	1212.13 $\pm$ 64.09	2083.33 $\pm$ 90.64	1069.17 $\pm$ 65.63
阴性三根汤组	3	1735.06 $\pm$ 77.07 [*]	248.55 $\pm$ 46.82 ^{*Δ}	947.03 $\pm$ 65.65 ^{*Δ}	555.55 $\pm$ 20.44 ^{*Δ}	274.48 $\pm$ 31.59 ^{*Δ}
AKT 敲减对照组	3	1569.40 $\pm$ 81.97 ^{*Δ}	920.67 $\pm$ 64.09 ^{*Δ}	631.54 $\pm$ 57.65 ^{*Δ}	56.12 $\pm$ 5.57 ^{*Δ}	421.89 $\pm$ 56.51 ^{*Δ}
AKT 敲减三根汤组	3	1773.80 $\pm$ 90.91 [*]	764.67 $\pm$ 50.24 [*]	423.93 $\pm$ 38.73 [*]	42.77 $\pm$ 10.93 [*]	372.47 $\pm$ 20.51 [*]

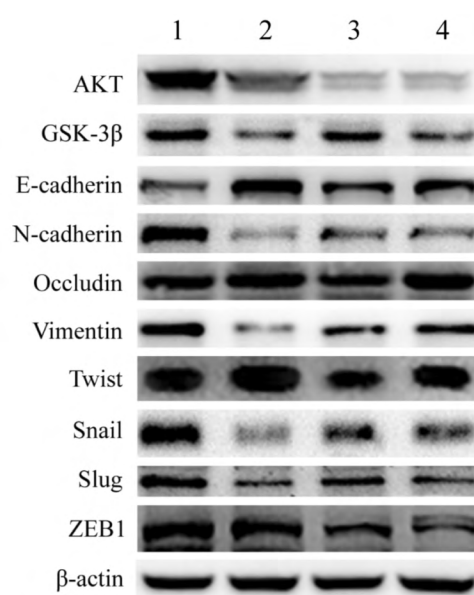
注: E-cadherin, E-钙黏蛋白; N-cadherin, N-钙黏蛋白; Vimentin, 波形蛋白; Occludin, 紧密连接蛋白; AKT, 蛋白激酶 B; GSK-3 β , 糖原合成酶激酶 3 β ; 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$; 与 AKT 敲减三根汤组比较, $\Delta P < 0.05$

3.4 各组细胞 EMT 相关标记物及 AKT/GSK-3 β 信号通路相关蛋白表达比较

表 4 示, 与阴性对照组比较, 其余 3 组细胞 E-cadherin、Occludin 上调, N-cadherin、Vimentin、Twist、Slug、Snail、ZEB1、AKT、GSK-3 β 下调 ($P < 0.05$)。与 AKT 敲减对照组比较, AKT 敲减三根汤组 E-cadherin、Occludin 上调, N-cadherin、Vimentin、Slug、Twist、Snail、ZEB1、AKT、GSK-3 β 下调 ($P < 0.05$)。与阴性三根汤组比较, AKT 敲减三根汤组 E-cadherin、ZEB1、AKT 下调, N-cadherin、Vimentin、Twist、Slug、Snail、GSK-3 β 上调 ($P < 0.05$)。以上表明 AKT 基因敲减和解毒三根汤干预均可使 AKT/GSK-3 β 信号通路失活, 在一定程度上逆转结肠癌细胞的 EMT。但在 AKT 基因敲减, AKT/GSK-3 β 信号通路失活状态下, 解毒三根汤逆转结肠癌细胞 EMT 的作用明显减弱。各组细胞 EMT 相关标记物及 AKT/GSK-3 β 信号通路相关蛋白电泳图见图 2。

4 讨论

结直肠癌归属于中医学“锁肛痔”“肠中积”“肠覃”“肠辟”等范畴。《外科正宗》云“蕴毒结于脏腑, 火热流注肛门, 结而为肿”, 阐明热毒内蕴与 CRC 的发生密不可分。近年来越来越多的研究证实, 清热解毒中药能抑制肿瘤细胞的迁移及侵袭, 从而阻止肿瘤浸润的发生及转移灶的形成^[1]。解毒三根汤中藤梨根性凉, 味酸、涩, 具有清热解毒、祛风除湿、利尿止血等功效, 主要含有表儿茶素、大黄素、槲皮素等化学成分^[12]。王银辉等^[13]用藤梨根制剂干预卵巢癌细胞发现其可以调节基质金属蛋白酶 2 (MMP-2)、基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 和基质金属蛋白酶抑制剂 1 (TIMP-1) 的表达, 进而抑制卵巢癌 A2780 细胞的



注: 1, 阴性对照组; 2, 阴性三根汤组; 3, AKT 敲减对照组; 4, AKT 敲减三根汤组; AKT, 蛋白激酶 B; GSK-3 β , 糖原合成酶激酶 3 β ; 波形蛋白; Occludin; E-cadherin, E-钙黏蛋白; N-cadherin, N-钙黏蛋白; Vimentin, 紧密连接蛋白

图 2 各组细胞上皮间质转化相关标记物及 AKT/GSK-3 β 信号通路相关蛋白电泳图

增殖、迁移及侵袭能力。水杨梅根性凉, 味苦, 具有清热解表、活血解毒等功效, 主要含有 5, 7-二羟基-2-甲基色原酮-7-O- β -D-葡萄糖苷、东莨菪苷、齐墩果酸等有效成分^[14]。叶勇等^[15]研究证实, 水杨梅根提取物对直肠癌细胞具有明显的增殖抑制作用。虎杖根性微寒, 味苦, 具有活血散瘀、祛风通络、清热利湿、解毒等功效, 主要含有蒽醌类、二苯乙烯类、黄酮类、香豆素类化合物等, 也具有显著的抗肿瘤作用^[16]。

EMT 使肿瘤细胞间失去相互黏附作用, 导致细胞侵袭、运动能力增强, 从而启动肿瘤的恶性进展^[17]。当肿瘤细胞发生 EMT 时, 增强细胞间黏附

的蛋白如 E-cadherin 等表达减少, 间质细胞的分子标志物如 Vimentin、纤维黏连蛋白、基质金属蛋白酶及 N-cadherin 等表达增加, 从而导致细胞之间黏附能力下降或丧失, 细胞间连接松散、失去极性, 获得更强侵袭、运动能力^[18]。EMT 的发生由多种转录因子调节, 包括锌指蛋白家族 (Snail, Slug)、bHLH 转录家族 (Twist、E47)、ZEB 家族 (ZEB1、ZEB2) 等^[19]。其中 Snail/Slug 可与 Smad 作用蛋白 (Sip1) 竞争性结合 E-cadherin 启动子区 E-box 序列, 抑制 E-cadherin 表达, 促进 Vimentin 上升, 诱导 EMT 发生^[20]。而 Twist 的异常表达导致 E-cadherin 下调或缺失, 促进 EMT 的发生^[21], 且 Twist 还可通过增加 circ-10720 的表达来上调 Vimentin, 诱发 EMT^[22]。另有研究表明, 增加 ZEB1 的表达可抑制 E-cadherin 的表达^[23]; 而 ZEB1 功能受损时, E-cadherin 的表达也被恢复^[24]。本研究用解毒三根汤干预结肠癌细胞 SW480 后, 其 EMT 相关标记物 Snail、Slug、Twist、ZEB1 下调, 表明解毒三根汤可调节 EMT 转录因子进而逆转结肠癌细胞的 EMT。

另外, 有研究^[25]表明, 磷酸化的 AKT (p-AKT) 可以下调上皮标志物并上调间质标志物, 促进 EMT; 相反, 抑制 AKT 的磷酸化则可抑制 EMT。GSK-3 β 是 AKT 的经典下游, 常与 AKT 共同参与 EMT 的发生发展^[26]。AKT/GSK-3 β 信号通路激活后可上调 Snail 的表达, 促进骨肉瘤细胞发生 EMT^[27]; 而 AKT/GSK-3 β 信号通路抑制后则可下调 Slug、N-cadherin、Vimentin, 从而逆转肺癌细胞的 EMT 状态^[28]。本研究结果发现, 解毒三根汤及 AKT 基因敲减均可以逆转结肠癌细胞的 EMT 状态及抑制其侵袭转移能力。同时 AKT 基因敲减后, AKT/GSK-3 β 信号通路失活状态下, 解毒三根汤逆转结肠癌细胞的 EMT 状态及抑制其侵袭转移能力的作用明显减弱, 表明解毒三根汤可能通过 AKT/GSK-3 β 信号通路逆转 EMT 抗结肠癌侵袭转移。未来我们将进一步寻找解毒三根汤抗肿瘤最有效的成分及其相应作用靶点, 以期为其临床应用推广提供更好的证据。

参考文献

- [1] SIEGEL RL, MILLER KD, JEMAL A. Cancer statistics, 2018 [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(1): 7-30.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in china, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [3] BRENNER H, KLOOR M, POX CP. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2014, 383(9927): 1490-1502.

- [4] 阮善明, 缪昊均, 严卿莹, 等. 解毒三根汤调节肿瘤相关成纤维细胞 Sirt1-NF- κ B 途径抗结肠癌侵袭转移 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(9): 3082-3086.
- [5] ZHANG K, PENG T, YAN Q, et al. Jiedu Sange decoction inhibits migration and invasion of colon cancer SW480 cells via suppressing epithelial mesenchymal transition [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2018; 1495768. doi: 10.1155/2018/1495768.
- [6] SINGH M, YELLE N, VENUGOPAL C, et al. EMT: Mechanisms and therapeutic implications [J]. Pharmacol Ther, 2018, 182: 80-94. doi: 10.1016/j.pharmthera.2017.08.009.
- [7] CHO ES, KANG HE, KIM NH, et al. Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (emt) [J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(1): 14-24.
- [8] CAO ZQ, WANG XX, LU L, et al. Beta-sitosterol and gemcitabine exhibit synergistic anti-pancreatic cancer activity by modulating apoptosis and inhibiting epithelial-mesenchymal transition by deactivating akt/gsk-3 β signaling [J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1525. doi: 10.3389/fphar.2018.01525.
- [9] MATSUMOTO T, YOKOI A, HASHIMURA M, et al. Tgf-beta-mediated lefty/akt/gsk-3 β /snail axis modulates epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell properties in ovarian clear cell carcinomas [J]. Mol Carcinog, 2018, 57(8): 957-967.
- [10] ZHENG D, CHANG X, LIU Y, et al. 2-methoxy-5-(3, 4, 5-trimethoxyphenyl) seleninyl phenol reverses egf-induced cell migration and invasion through down-regulation of mdm2 in breast cancer cell lines [J]. Cancer Biol Ther, 2018; 1-11. doi: 10.1080/15384047.2018.1537578.
- [11] 张欢欢, 张树辉. 清热解法治疗原发性肝癌述评 [J]. 中医学报, 2018, 33(7): 1174-1178.
- [12] 王敏, 王玉梅, 周晓松. 黔产野生藤梨根的化学成分分析 [J]. 贵州农业科学, 2017, 45(12): 122-124, 127.
- [13] 王银辉, 罗丽华, 冉瑞智, 等. 藤梨根制剂对卵巢癌细胞株 A2780 MMP-2、MMP-9 和 TIMP-1 表达的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(18): 1937-1941.
- [14] 张磊, 高颖, 蒋云涛, 等. 水杨梅根的化学成分 [J]. 中国药科大学学报, 2015, 46(5): 556-560.
- [15] 叶勇, 涂先琴, 宋兴文, 等. 水杨梅根提取物的体外抗肿瘤活性 [J]. 浙江中医药大学学报, 2007, 31(3): 372-373.
- [16] 时圣明, 潘明佳, 王文倩, 等. 虎杖的化学成分及药理作用研究进展 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 317-321.
- [17] BRABLETZ T, KALLURI R, NIETO MA, et al. Emt in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2018, 18(2): 128-143.
- [18] WRIGHTON KH. Cell migration: Emt promotes contact inhibition of locomotion [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2015, 16(9): 518. doi: 10.1038/nrm4045.
- [19] VAN STAALDUINEN J, BAKER D, TEN DIJKE P, et

- al. Epithelial-mesenchymal-transition-inducing transcription factors: New targets for tackling chemoresistance in cancer? [J]. *Oncogene*, 2018. doi: 10.1038/s41388-018-0378-x.
- [20] MEDICI D, HAY ED, OLSEN BR. Snail and slug promote epithelial-mesenchymal transition through β -catenin-TCF-4-dependent expression of transforming growth factor- β 3 [J]. *Mol Biol Cell*, 2008, 19(11): 4875-4887.
- [21] YANG J, MANI SA, DONAHER JL, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis [J]. *Cell*, 2004, 117(7): 927-939.
- [22] MENG J, CHEN S, HAN J, et al. Twist1 regulates vimentin through cul2 circular rna to promote emt in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2018, 78(15): 4150-4162.
- [23] ASAKURA T, YAMAGUCHI N, OHKAWA K, et al. Proteasome inhibitor-resistant cells cause emt-induction via suppression of e-cadherin by mir-200 and zeb1 [J]. *Int J Oncol*, 2015, 46(5): 2251-2260.
- [24] QIN Y, TANG B, HU CJ, et al. An htert/zeb1 complex directly regulates e-cadherin to promote epithelial-to-mesenchymal transition (emt) in colorectal cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(1): 351-361.
- [25] ZHANG H, SUN JD, YAN LJ, et al. Pdgfr-d/pdgfrbeta promotes tongue squamous carcinoma cell (tscc) progression via activating p38/akt/erk/emt signal pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(2): 845-851.
- [26] DOU Y, LEI JQ, GUO SL, et al. The enpy2 enhances epithelial-mesenchymal transition via activating the akt/gsk3beta pathway in non-small cell lung cancer [J]. *Cell Biol Int*, 2018, 42(8): 959-964.
- [27] CHENG Z, GUO Y, YANG Y, et al. Nitidine chloride suppresses epithelial-to-mesenchymal transition in osteosarcoma cell migration and invasion through akt/gsk-3beta/snail signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(2): 1023-1029.
- [28] TREESUWAN S, SRITULARAK B, CHANVORACHOTE P, et al. Cypripedin diminishes an epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer cells through suppression of akt/gsk-3beta signalling [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 8009. doi: 10.1038/s41598-018-25657-5.

Effects of *Jiedu Sangen Decoction* (解毒三根汤) on Invasion and Metastasis of Colon Cancer SW480 Cells and AKT/GSK-3 β Signaling Pathway

RUAN Shanming¹, ZHOU Mengmeng², YUAN Li¹, SHEN Minhe¹

(1. The First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006; 2. Quzhou People's Hospital, Zhejiang Province)

ABSTRACT Objective To investigate the possible mechanism of *Jiedu Sangen Decoction* (解毒三根汤) against colon cancer invasion and metastasis. **Methods** Protein kinase B (AKT) knockdown and corresponding negative cell stable strains were successfully established in colon cancer SW480 cells. The experiment was divided into a negative control group, a negative Sangen Decoction group, a AKT knockdown control group, and a AKT knockdown Sangen Decoction group. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) model was established by inducing epidermal growth factor at a final concentration of 50 ng/ml for 48 h. The 6 g/L *Jiedu Sangen Decoction* was used to intervene in the negative Sangen Decoction group and the AKT knockdown *Jiedu Sangen Decoction* group for 48 h. The invasion and metastasis ability of cells was observed by scratch test, Transwell migration and invasion assay. EMT-related markers (E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, Occludin, Twist, Slug, Snail, ZEB1) and protein kinase B/glycogen synthase kinase 3 β (AKT/GSK-3 β) signaling pathway-associated protein expression were detected by Western blot. **Results** Compared with the negative control group, the migration distances of the other 3 groups were shortened at 12 h and 24 h, and the number of migration and invasion of membrane cells decreased ($P < 0.05$). Compared with the AKT knockdown control group, the migration distance was shortened at 12 h and 24 h in AKT knockdown Sangen Decoction group, and the number of migration and invasion of membrane cells was decreased ($P < 0.05$). Compared with the negative control group, the E-cadherin and Occludin was up-regulated, and N-cadherin, Vimentin, Slug, Twist, Snail, ZEB1, AKT and GSK-3 β were down-regulated in the other 3 groups ($P < 0.05$). Compared with the AKT knockdown control group, E-cadherin and Occludin were up-regulated, N-cadherin, Vimentin, Snail, Slug, Twist, ZEB1, AKT and GSK-3 β were down-regulated in the AKT knockdown Sangen Decoction group ($P < 0.05$). **Conclusion** *Jiedu Sangen Decoction* may reverse the EMT of colon cancer cells through AKT/GSK-3 β signaling pathway, thus resisting colon cancer invasion and metastasis.

Keywords colon cancer; *Jiedu Sangen Decoction* (解毒三根汤); epithelial-mesenchymal transition; invasion and metastasis; AKT/GSK-3 β signaling pathway

(收稿日期: 2018-09-28; 修回日期: 2019-02-26)

编辑: 邓 媛