

紫草素抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路诱导人结肠癌SW480细胞凋亡和自噬的作用研究

王 军, 杨雅娟, 刘海涛, 张向梅, 李 静

邯郸市第一医院 消化内科, 河北 邯郸 056000

摘 要: 目的 探讨紫草素对人结肠癌SW480细胞凋亡和自噬的影响及其机制。方法 取对数生长期人结肠癌SW480细胞, 设对照组(DMSO)、紫草素(0.3、0.5、0.7 $\mu\text{g/mL}$)和LY294002(PI3K特异性抑制剂, 5 $\mu\text{g/mL}$)组。药物干预48 h后, 四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测SW480细胞增殖抑制率, Annexin V-FITC流式细胞术分析细胞凋亡状况, 蛋白免疫印迹法(Western blotting)检测p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax、LC3蛋白表达并计算Bax/Bcl-2和LC3-II/LC3-I值。结果 与对照组比较, 经紫草素0.3、0.5、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 或LY294002 5 $\mu\text{g/mL}$ 干预能够显著提高人结肠癌SW480细胞增殖抑制率和凋亡率($P < 0.01$); 经紫草素0.5、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 或LY294002 5 $\mu\text{g/mL}$ 干预能够显著下调p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、Bcl-2蛋白表达, 并上调Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bax蛋白表达($P < 0.05, 0.01$), 提高Bax/Bcl-2和LC3-II/LC3-I值($P < 0.01$)。与LY294002组比较, 经紫草素0.7 $\mu\text{g/mL}$ 干预能够显著提高SW480细胞增殖抑制率和凋亡率($P < 0.05, 0.01$), 下调p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达并上调Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bax蛋白表达($P < 0.05, 0.01$), 提高Bax/Bcl-2和LC3-II/LC3-I值($P < 0.01$)。结论 紫草素能够促进人结肠癌SW480细胞凋亡和自噬, 作用机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路活化有关。

关键词: 紫草素; 结肠癌; 细胞凋亡; 自噬; PI3K/Akt/mTOR

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)02-0338-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.02.012

Induction of shikonin on apoptosis and autophagy of human colon cancer SW480 cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway

WANG Jun, YANG Yajuan, LIU Haitao, ZHANG Xiangmei, LI Jing

First Department of Digestion, Handan First Hospital, Handan 056000, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of shikonin on apoptosis and autophagy of human colon cancer SW480 cells. **Methods** The human colon cancer SW480 in logarithmic growth phase was treated with DMSO (control group), shikonin (0.3, 0.5, 0.7 $\mu\text{g/mL}$) and LY294002 (PI3K-specific inhibitor, 5 $\mu\text{g/mL}$). Totally 48 h after the drugs were given, the proliferation inhibition rate of the SW480 cells was detected by MTT method, the analysis of apoptotic status and calculation of apoptotic rate were detected by Annexin V-FITC staining flow cytometry, the expression of p-PI3K, p-Akt, p-mTOR, Caspase-3, cleaved Caspase-3, Bax, Bcl-2, LC3 proteins were detected by Western blotting, the ratio of Bax/Bcl-2 and LC3-II/LC3-I were calculated. **Results** Compared with control group, intervened by shikonin 0.3, 0.5, 0.7 $\mu\text{g/mL}$ or LY294002 5 $\mu\text{g/mL}$ could increase SW480 cells proliferation inhibition rate and apoptosis rate ($P < 0.01$); intervened by shikonin 0.5, 0.7 $\mu\text{g/mL}$ or LY294002 5 $\mu\text{g/mL}$ could down-regulate the expression of p-PI3K, p-Akt, p-mTOR and up-regulate the expression of Caspase-3, cleaved Caspase-3, Bax ($P < 0.05$ or 0.01), increase the ratio of Bax/Bcl-2 and LC3-II/LC3-I ($P < 0.01$). Compared with LY294002 5 $\mu\text{g/mL}$ group, intervened by shikonin 0.7 $\mu\text{g/mL}$ could increase SW480 cells proliferation inhibition rate and apoptosis rate ($P < 0.05$ or 0.01); down-regulate the expression of p-PI3K, p-Akt, p-mTOR and up-regulate the expression of Caspase-3, cleaved Caspase-3, Bax ($P < 0.05$ or 0.01); increase the ratio of Bax/Bcl-2 and LC3-II/LC3-I ($P < 0.01$). **Conclusions** Shikonin can promote apoptosis and autophagy of human colon cancer SW480 cells; which mechanism may be related to inhibiting the activation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

Key words: shikonin; colon cancer; apoptosis; autophagy; PI3K/Akt/mTOR

收稿日期: 2020-04-07

基金项目: 河北省医学科学研究课题计划(20191801)

第一作者: 王 军(1981—),男,本科,主治医师,主要从事消化内科疾病研究。E-mail:hdsyywj@163.com

结肠癌是世界范围内第三大恶性肿瘤,也是我国常见的消化道恶性肿瘤之一,发病率居恶性肿瘤第3位,每年新确诊病例约40万、致死病例约20万^[1],严重危害人民的生命健康。随着医疗技术的发展,手术结合化疗、生物治疗等是目前临床上治疗结肠癌的常规方案,但晚期患者5年生存率仍不足10%^[2],所以寻找新型高效的抗结肠癌药物仍是目前的研究热点。

紫草素是存在于紫草中的一种萘醌类化合物,具有增强机体免疫力^[3]、抗病毒^[4]、抗炎^[5]等多种生物学活性,近年来研究发现紫草素具有广泛的抗肿瘤活性^[6-7],而诱导细胞凋亡和自噬是其主要作用机制^[8]。磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路对细胞增殖和凋亡具有关键的调控作用^[9-10],本研究以人结肠癌SW480细胞为受试细胞,探讨紫草素对结肠癌细胞凋亡和自噬的影响,以及PI3K/Akt/mTOR信号通路在其中发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞

人结肠癌SW480株购自中国科学院细胞库,解冻复苏、重悬后接种在RPMI1640培养基(含10%胎牛血清、100 U/mL的青霉素和链霉素),置5%的CO₂、恒温37℃、饱和湿度的细胞培养箱进行培养,2 d换液1次,取对数生长期细胞进行实验。

1.2 药物与主要试剂

紫草素购自成都普瑞法科技开发有限公司(质量分数≥98.9%,批号S190827);LY294002(PI3K特异性抑制剂)购自美国Sigma公司(批号L9908);RPMI1640培养基购自美国Gibco公司(批号1951038);二甲基亚砜(DMSO)、0.25%胰酶、胎牛血清购自上海源叶生物科技有限公司(批号20180915、20190508、20190426);Annexin V-FITC凋亡试剂盒、四甲基偶氮唑盐(MTT)试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司(批号20190322、20190131);磷酸化PI3K(p-PI3K)、磷酸化Akt(p-Akt)、磷酸化mTOR(p-mTOR)、Caspase-3、cleaved Caspase-3、B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、微管相关蛋白1轻链3(LC3)单克隆抗体购自上海碧云天生物技术有限公司(批号201904016、201901025、201903011、20190422、201905016、201901005、201901017、201901024);β-actin单克隆抗体购自美国Abcam公司(批号ab179467);RIPA裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂

盒、DAB显色试剂盒购自杭州四季青生物工程材料有限公司(批号20190423、20190603、20190412);PVDF膜(美国Millipore公司,批号R8AA8000F)。

1.3 主要仪器

HF240型细胞培养箱(上海力申科学仪器有限公司);CyFlow Counter型流式细胞仪(德国Partec公司);5427R型低温高速离心机(德国Eppendorf公司);SE300型电泳仪、TE22型转膜仪(美国Hoefer公司);Mini-PROTEANTetra System型垂直电泳槽(美国Bio-Rad公司);Spectramax M3型多功能酶标仪(美国BioTek公司)。

2 方法

2.1 MTT法测定人结肠癌SW480细胞增殖抑制率

取对数生长期人结肠癌SW480细胞经0.25%胰酶消化后制备浓度 5×10^4 /mL的单细胞悬液,100 μL/孔接种于96孔板,置细胞培养箱培养至细胞贴壁后,设对照组(DMSO)、紫草素(0.3、0.5、0.7 μg/mL)^[11]和LY294002(5 μg/mL)组,每组设10个复孔;药物干预48 h后,20 μL/孔加入质量浓度5 mg/mL的MTT溶液,继续培养4 h后150 μL/孔加入DMSO避光震荡10 min后,通过酶标仪测定490 nm处吸光度(A_{490nm})值,计算增殖抑制率。

$$\text{增殖抑制率} = 1 - \frac{\text{实验组 } A_{490nm}}{\text{对照组 } A_{490nm}}$$

2.2 Annexin V-FITC双染流式细胞术分析人结肠癌SW480细胞凋亡状况

取对数生长期人结肠癌SW480细胞经0.25%胰酶消化后制备浓度 5×10^4 /mL的单细胞悬液,100 μL/孔接种于6孔板,继续培养至细胞贴壁后,设对照组(DMSO)、紫草素(0.3、0.5、0.7 μg/mL)和LY294002(5 μg/mL)组,每组设10个复孔;药物干预48 h后,经0.25%胰酶消化,1 500 r/min离心5 min(离心半径为10 cm),弃上清,经PBS溶液洗涤后置70%乙醇固定1 h,按照Annexin V-FITC凋亡检查试剂盒操作说明进行处理后,通过流式细胞仪分析细胞凋亡状况,并计算凋亡率。

2.3 Western blotting法检测人结肠癌SW480细胞凋亡和自噬相关蛋白表达

取对数生长期人结肠癌SW480细胞经0.25%胰酶消化后,4℃、1 500 r/min离心5 min(离心半径为10 cm)后,弃上清,RIPA裂解液冰上裂解40 min,4℃、12 000 r/min离心15 min(离心半径为10 cm),取上清,BCA法检测总蛋白浓度,95℃高温变性

后,取40 μg 总蛋白上样、行SDS-PAGE凝胶电泳、转PVDF膜后,浸入5%脱脂牛奶室温封闭1 h,滴加p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax、LC3、 β -actin一抗后置恒4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜,洗膜后滴加山羊抗兔IgG二抗室温孵育1 h,洗膜后滴加DAB显色剂显影;以 β -actin为内参,使用软件Image J分析蛋白条带灰度,通过条带灰度值半定量目标蛋白表达量。

2.4 统计学方法

计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用SPSS 13.0中文软件包进行统计分析,两组间比较采用独立样本 t 检验、多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 紫草素对人结肠癌SW480细胞增殖的影响

与对照组比较,紫草素0.3、0.5、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 组和LY294002 5 $\mu\text{g/mL}$ 组SW480细胞增殖抑制率显著升高($P < 0.01$);与LY294002组比较,紫草素0.7 $\mu\text{g/mL}$ 组SW480细胞增殖抑制率显著升高($P < 0.05$)。见表1。

3.2 紫草素对人结肠癌SW480细胞凋亡的影响

与对照组比较,紫草素0.3、0.5、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 组和LY294002组SW480细胞凋亡率显著提高($P <$

表1 紫草素对人结肠癌SW480细胞增值和凋亡的影响
($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 1 Effects of shikonin on proliferation and apoptosis of human colon cancer SW480 cells ($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	增殖抑制率/%	凋亡率/%
对照	—	0.00 $\pm$ 0.00	3.46 $\pm$ 0.88
LY294002	5.0	35.86 $\pm$ 4.10**	38.16 $\pm$ 6.75**
紫草素	0.3	25.94 $\pm$ 3.62**	18.72 $\pm$ 3.15**
	0.5	33.57 $\pm$ 4.28**	27.03 $\pm$ 4.92**
	0.7	40.71 $\pm$ 4.55**#	46.87 $\pm$ 7.58**#

与对照组比较:** $P < 0.01$;与LY294002组比较: # $P < 0.05$

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs LY294002 group

0.01);与LY294002组比较,紫草素0.7 $\mu\text{g/mL}$ 组凋亡率显著提高($P < 0.05$)。见表1和图1。

3.3 紫草素对人结肠癌SW480细胞p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达的影响

与对照组比较,紫草素0.5、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 组和LY294002组SW480细胞p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白显著下调($P < 0.05$ 、0.01);与LY294002组比较,紫草素0.7 $\mu\text{g/mL}$ 组p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白显著下调($P < 0.05$ 、0.01)。见图2和表2。

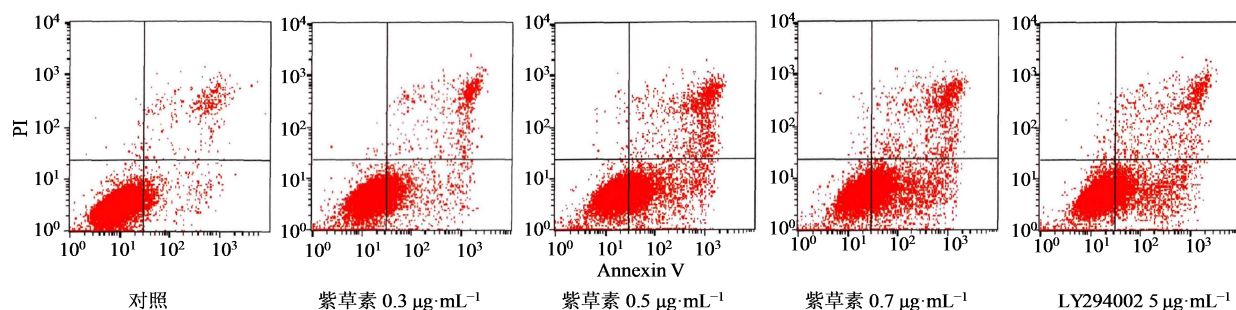


图1 紫草素对人结肠癌SW480细胞凋亡的影响

Fig. 1 Effects of shikonin on apoptosis of human colon cancer SW480 cells

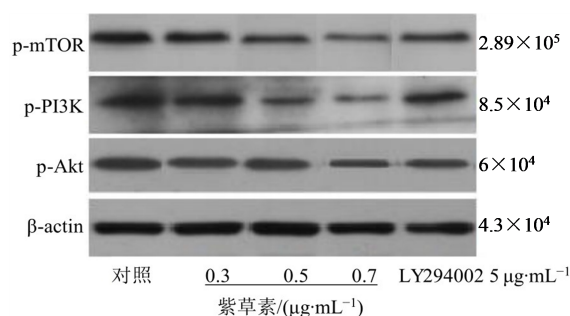


图2 紫草素对人结肠癌SW480细胞p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of shikonin on expression of p-PI3K, p-Akt, p-mTOR in human colon cancer SW480 cells

3.4 紫草素对人结肠癌SW480细胞凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组比较,紫草素0.5、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 组和LY294002组SW480细胞Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bax蛋白表达显著上调,Bcl-2表达显著下调($P < 0.05$ 、0.01),Bax/Bcl-2值显著升高($P < 0.05$ 、0.01);与LY294002组比较,紫草素0.7 $\mu\text{g/mL}$ 组Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bax表达显著上调($P < 0.05$ 、0.01),两组间Bcl-2表达差异无统计学意义,Bax/Bcl-2值显著升高($P < 0.01$)。见图3和表3。

表2 紫草素对人结肠癌SW480细胞p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 2 Effects of shikonin on expression of p-PI3K, p-Akt, p-mTOR in human colon cancer SW480 cells ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	p-PI3K/ β -actin	p-Akt/ β -actin	p-mTOR/ β -actin
对照	—	0.42 $\pm$ 0.08	0.45 $\pm$ 0.08	0.89 $\pm$ 0.17
LY294002	5.0	0.26 $\pm$ 0.07**	0.19 $\pm$ 0.04**	0.51 $\pm$ 0.11**
紫草素	0.3	0.40 $\pm$ 0.11	0.41 $\pm$ 0.06	0.75 $\pm$ 0.18
	0.5	0.18 $\pm$ 0.06**	0.36 $\pm$ 0.07*	0.48 $\pm$ 0.13**
	0.7	0.11 $\pm$ 0.04***	0.15 $\pm$ 0.04***	0.21 $\pm$ 0.05***

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与LY294002组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs LY294002 group

3.5 紫草素对人结肠癌SW480细胞LC3-II/LC3-I值的影响

与对照组比较, 紫草素 0.5、0.7 $\mu\text{g/mL}$ 组和LY294002组SW480细胞LC3-II、LC3-I蛋白表达明显上调($P<0.01$), LC3-II/LC3-I值显著升高($P<0.05$ 、0.01); 与LY294002 5 $\mu\text{g/mL}$ 组比较, 紫草素 0.7 $\mu\text{g/mL}$ 组LC3-II、LC3-I蛋白表达上调($P<0.01$), LC3-II/LC3-I值显著升高($P<0.05$)。见图4

表3 紫草素对人结肠癌SW480细胞Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达和Bax/Bcl-2值的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)Table 3 Effects of shikonin on expression of Caspase-3, cleaved Caspase-3, Bcl-2, Bax and Bax/Bcl-2 ratio in human colon cancer SW480 cells ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Caspase-3/ β -actin	cleaved Caspase-3/ β -actin	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Bax/Bcl-2
对照	—	0.18 $\pm$ 0.04	0.17 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.04	0.32 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.09
LY294002	5.0	0.49 $\pm$ 0.10**	0.38 $\pm$ 0.08**	0.26 $\pm$ 0.06*	0.15 $\pm$ 0.04**	1.73 $\pm$ 0.34**
紫草素	0.3	0.23 $\pm$ 0.06	0.21 $\pm$ 0.07	0.23 $\pm$ 0.03	0.29 $\pm$ 0.06	0.79 $\pm$ 0.14*
	0.5	0.35 $\pm$ 0.08**	0.29 $\pm$ 0.07**	0.27 $\pm$ 0.05**	0.25 $\pm$ 0.08*	1.08 $\pm$ 0.19**
	0.7	0.61 $\pm$ 0.12***	0.57 $\pm$ 0.11***	0.43 $\pm$ 0.08***	0.14 $\pm$ 0.03**	3.07 $\pm$ 0.88***

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 与LY294002组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ vs LY294002 group

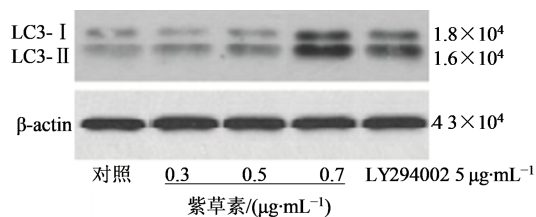


图4 紫草素对人结肠癌SW480细胞LC3蛋白表达的影响
Fig. 4 Effects of shikonin on expression of LC3 in human colon cancer SW480 cells

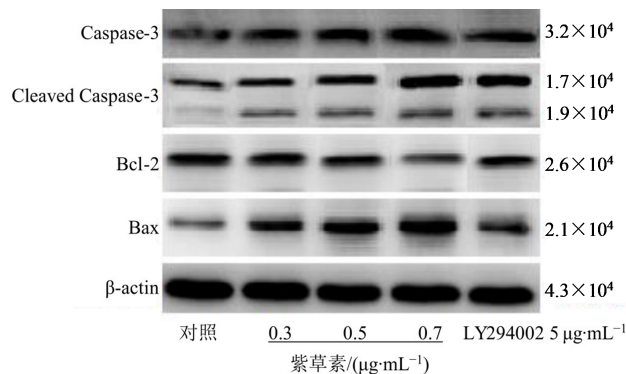


图3 紫草素对人结肠癌SW480细胞Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bcl-2、Bax蛋白表达的影响

Fig. 3 Effects of shikonin on expression of Caspase-3, Cleaved Caspase-3, Bcl-2, Bax in human colon cancer SW480 cells

和表4。

4 讨论

结肠癌在中医属“肠积”“积聚”“症瘕”“肠覃”“脏毒”“下痢”等范畴, 忧思抑郁, 脾胃失和所致湿热邪毒蕴结、乘虚下注浸淫肠道、气滞血瘀、湿毒瘀滞凝结成块是其主要病理。中医药是我国的宝贵财富, 近年随着国家振兴中医药发展战略的实施与深入, 中药抗肿瘤日益得到重视与关注, 并且中药抗肿瘤具有独特的优势^[12]。

紫草为紫草科植物新疆紫草或内蒙紫草的干燥根, 是我国传统中药品种, 在《神农本草经》《名医别录》《本草纲目》等医学典籍中均有记载, 其味甘咸、性寒, 有凉血、活血、解毒透疹之功效, 临床常用于疮疡、淋浊、热症等症的治疗。紫草素为紫草的主要活性成分, 是一类具有多种生物学活性的萘醌类化合物, 具有广泛的抗肿瘤活性, 已证实紫草素对非小细胞肺癌^[13]、肝癌^[14]、乳腺癌^[15]、人骨肉瘤^[16]等具有抑制作用, 促进细胞凋亡与自噬是其主要

表4 紫草素对人结肠癌SW480细胞LC3蛋白表达和LC3-II/LC3-I值的影响($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Effects of shikonin on expression of LC3 and ratio of LC3-II/LC3-I in human colon cancer SW480 cells

($\bar{x} \pm s, n=10$)				
组别	剂量/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LC3-II/ β -actin	LC3-I/ β -actin	LC3-II/ LC3-I
对照	—	0.03 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	1.48 $\pm$ 0.27
LY294002	5.0	0.31 $\pm$ 0.08**	0.18 $\pm$ 0.05**	1.72 $\pm$ 0.19*
紫草素	0.3	0.05 $\pm$ 0.03	0.03 $\pm$ 0.02	1.67 $\pm$ 0.25
	0.5	0.11 $\pm$ 0.03**	0.06 $\pm$ 0.02**	1.83 $\pm$ 0.36*
	0.7	0.61 $\pm$ 0.13***	0.31 $\pm$ 0.07***	1.97 $\pm$ 0.32***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与LY294002组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs LY294002 group

作用机制。本研究发现,经紫草素或PI3K抑制剂LY294002干预能够显著提高人结肠癌SW480细胞增殖抑制率和凋亡率,并且紫草素0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组作用优于LY294002干预组,提示紫草素具有促进人结肠癌细胞凋亡并抑制其增殖的作用。

细胞凋亡与自噬是细胞程序性死亡的两种主要途径,可共同促进肿瘤细胞死亡^[17]。半胱氨酸天冬氨酸酶(Caspase)和Bcl-2家族基因在细胞凋亡过程中发挥着重要的调控作用,cleaved Caspase-3是Caspase-3的活性形式,是细胞凋亡的重要启动因子和效应因子,调控作用贯穿于细胞凋亡全过程^[18]; Bcl-2是一种膜蛋白,通过调控线粒体膜通透性而抑制细胞色素C(Cyto-C)释放,抑制Caspase-3活化等发挥抑凋亡作用;Bax能够与Bcl-2形成二聚体而抑制Bcl-2活性,能够破坏线粒体膜的完整性而导致Cyto-C释放、激活Caspase-3而促进细胞凋亡^[19]。LC3反映细胞自噬活性的标志蛋白,具有LC3-I和LC3-II两种亚型,LC3-II是自噬相关蛋白LC3在自噬发生时的主要存在形式,并且细胞自噬发生时LC3-I将转化为LC3-II,因此LC3-II/LC3-I值能够反映细胞自噬水平^[20]。

PI3K/Akt/mTOR信号通路对凋亡和自噬的调控发挥着重要作用^[9,21]。Akt是PI3K的下游基因并在其信号传导中起重要作用,PI3K被磷酸化(p-PI3K)活化后将激活Akt(p-Akt),p-Akt能够诱导具有促凋亡作用的糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)和cleaved Caspase-3磷酸化而失活,并下调Bax表达。mTOR为Akt下游基因,能够被p-Akt直接或

间接诱导磷酸化(p-mTOR)而激活,p-mTOR是自噬过程主要调节蛋白,p-mTOR能够诱导上调细胞周期素而促进细胞增殖,并且能够清除泛素蛋白抑制细胞自噬^[22]。本研究发现,经紫草素或LY294002干预能够有效下调人结肠癌SW480细胞p-PI3K、p-Akt、p-mTOR蛋白表达,上调cleaved Caspase-3、Bax蛋白并下调Bcl-2表达,提高Bax/Bcl-2和LC3-II/LC3-I值,并且紫草素0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组对p-PI3K、p-Akt、p-mTOR、Caspase-3、cleaved Caspase-3、Bax蛋白表达和Bax/Bcl-2、LC3-II/LC3-I值的调控作用优于LY294002干预组,提示紫草素诱导SW480细胞凋亡和自噬的作用可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路进而影响其下游蛋白表达有关。

紫草素能够促进人结肠癌SW480细胞凋亡和自噬,作用机制可能与抑制PI3K/Akt/mTOR信号通路活化进而影响其下游凋亡和自噬相关蛋白表达有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] Zhang F, Zhang Y Y, Zhao W W, et al. Metabolomics for biomarker discovery in the diagnosis, prognosis, survival and recurrence of colorectal cancer: a systematic review [J]. Oncotarget, 2017, 8(21): 35460-35472.
- [3] Guo C, He J, Song X, et al. Pharmacological properties and derivatives of shikonin-a review in recent years [J]. Pharmacol Res, 2019, 149: 104463.
- [4] Gao H, Liu L, Qu Z Y, et al. Anti-adenovirus activities of shikonin, a component of Chinese herbal medicine *in vitro* [J]. Biol Pharm Bull, 2011, 34(2): 197-202.
- [5] Fan C, Zhang X, Upton Z. Anti-inflammatory effects of shikonin in human periodontal ligament cells [J]. Pharm Biol, 2018, 56(1): 415-421.
- [6] 陈静,侯尧,伍春莲. 紫草素及其衍生物抗妇科肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(14): 3814-3820.
Chen J, Hou Y, Wu C L. Research progress of anti-gynecological tumors effect of shikonin and its derivatives [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(14): 3814-3820.
- [7] 陈阳,陈忠坚,高赟,等. 紫草素及其衍生物抗肿瘤作用研究进展 [J]. 中草药, 2019, 50(14): 3503-3509.
Chen Y, Zhang Z J, Gao Y. Research progress on anti-tumor activity of shikonin and its derivatives [J]. Chin

- Tradit Herb Drugs, 2019, 50(14): 3503-3509.
- [8] 谢羽, 侯小龙, 伍春莲, 等. 紫草素诱导细胞凋亡及凋亡信号途径研究进展 [J]. 中国中医药信息杂志, 2017, 24(3): 125-129.
- Xie Y, Hou X L, Wu C L. Research progress in cell apoptosis induced by shikonin and signal pathway of apoptosis [J]. Chin J Inf Tradit Chin Med, 2017, 24(3): 125-129.
- [9] 王书惠, 尹秀艳, 刘海英, 等. 紫草素通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导人宫颈癌 HeLa 细胞凋亡和自噬 [J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(7): 1189-1193.
- Wang S H, Yin X Y, Liu H Y, et al. Shikonin induces apoptosis and autophagy of human cervical cancer HeLa cells by PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Chin J Pathophysiol, 2019, 35(7): 1189-1193.
- [10] 王健, 李健, 王勇, 等. 黄芩素通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导膀胱癌细胞凋亡 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2019, 57(9): 74-82.
- Wang J, Li J, Wang Y, et al. Baicalein induces apoptosis of bladder cancer cells via inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. J Shangdong Univ: Health Sci, 2019, 57(9): 74-82.
- [11] 余思云, 黄彩梅, 胡国华. 紫草素通过 PI3K/Akt 信号通路诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(12): 1303-1306.
- Yu S Y, Huang C M, Hu G H. Ishikawa apoptosis in endometrial cancer with shikonin via PI3K/Akt [J]. World J Integ Tradit West Med, 2014, 9(12): 1303-1306.
- [12] 汪选斌, 李洪亮, 李明伦, 等. 基于肿瘤特征的抗肿瘤中药药理学机制探析 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2019, 21(1): 25-32.
- Wang X B, Li H L, Li M L, et al. Exploration on pharmacological mechanism of Chinese medicines targeting cancer hallmarks [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med, 2019, 21(1): 25-32.
- [13] 刘晓莉, 姚草原, 熊弢. 紫草素对人非小细胞肺癌 A549 细胞增殖与凋亡的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(19): 2052-2056.
- Liu X Li, Yao C Y, Xiong T. Effects of alkannin on proliferation and apoptosis of human non-small cell lung cancer A549 cell [J]. J Clin Exp Med, 2019, 18(19): 2052-2056.
- [14] 张淑玲, 梁兰, 邹冶, 等. 紫草素对 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡的影响 [J]. 河北医学, 2018, 24(12): 2012-2016.
- Zhang S L, Liang L, Zou Y, et al. Effects of Shikonin on cell apoptosis of human liver cancer cell line SMMC-7721 [J]. Hebei Med, 2018, 24(12): 2012-2016.
- [15] 安兴晨, 董天睿, 王晶, 等. 紫草素诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡及其机制探讨 [J]. 中国医刊, 2019, 54(11): 1223-1226.
- An X C, Dong T R, Wang J, et al. Shikonin induce the apoptosis of breast cancer MCF-7 cells and its mechanism [J]. Chin J Med, 2019, 54(11): 1223-1226.
- [16] 缪明星, 黄莉莉, 王欣, 等. 紫草素通过内质网应激蛋白抑制人骨肉瘤 U-2 OS 细胞增殖的研究 [J]. 现代药物与临床, 2019, 34(10): 2899-2904.
- Miou M X, Huang L L, Wang X. Inhibition of shikonin on proliferation of human osteosarcoma U-2OS cells by promoting endoplasmic reticulum stress protein [J]. Drugs Clin, 2019, 34(10): 2899-2904.
- [17] 阚月一, 王娅杰, 李琦, 等. 肿瘤发展过程中自噬与凋亡的相互作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 106-112.
- Kan Y Y, Wang Y J, Li Q, et al. Interaction between autophagy and apoptosis during tumor development [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(2): 106-112.
- [18] Liang S, Sun K, Wang Y, et al. Role of Cyt-C/caspase-9, 3, Bax/Bcl-2 and the FAS death receptor pathway in apoptosis induced by zinc oxide nanoparticles in human aortic endothelial cells and the protective effect by alpha-lipoic acid [J]. Chem Biol Interact, 2016, 258(25): 40-51.
- [19] Zhu L, Hao J, Cheng M, et al. Hyperglycemia-induced Bcl-2/Bax-mediated apoptosis of schwann cells via mTORC1/S6K1 inhibition in diabetic peripheral neuropathy [J]. Exp Cell Res, 2018, 367(2): 186-195.
- [20] Tamrakar S, Yashiro M, Kawashima T, et al. Clinicopathological significance of autophagy-related proteins and its association with genetic alterations in gliomas [J]. Anticancer Res, 2019, 39(3): 1233-1242.
- [21] 郝艳梅, 殷红梅, 朱超莽, 等. 苦参碱通过抑制 PI3K/AKT/mTOR 通路促进非小细胞肺癌 A549 细胞的自噬和凋亡 [J]. 南方医科大学学报, 2019, 39(7): 760-765.
- Hao Y M, Yin H M, Zhu C M, et al. Matrine inhibits proliferation and promotes autophagy and apoptosis in non-small cell lung cancer cells by deactivating PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. J South Med Univ, 2019, 39(7): 760-765.
- [22] Zhang Y, Zheng Y, Ali F, et al. A novel AKT inhibitor, AZD5363, inhibits phosphorylation of AKT downstream molecules, and activates phosphorylation of mTOR and SMG-1 dependent on the liver cancer cell type [J]. Oncol Lett, 2016, 11(3): 1685-1692.