

温郁金凝集素蛋白重组及对结肠癌 HCT-116 细胞凋亡、迁移和侵袭的影响

周 丹¹, 张丽萍², 丰梦熠¹, 朱 强³, 任仙樱⁴, 吴志刚¹, 姜程曦^{1*}

1. 温州医科大学 药学院, 浙江 温州 325035

2. 温州大学 生命科学研究院, 浙江 温州 325035

3. 安徽济人药业有限公司, 安徽 亳州 236800

4. 温州莪金医药有限公司, 浙江 乐清 325600

摘 要: 目的 获取温郁金凝集素 (CWL) 重组蛋白, 并研究其对结肠癌细胞凋亡、迁移和侵袭的影响。方法 根据 CWL 基因全长编码序列, 采用大肠杆菌原核表达系统重组表达及纯化 CWL; 观察 CWL 对兔红细胞的凝血作用; CCK-8 法评价 CWL (10、20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对结肠癌 HCT-116 细胞的毒性; 流式细胞仪检测 CWL (40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对 HCT-116 细胞凋亡的影响; 划痕实验检测细胞迁移能力; Transwell 小室法检测细胞侵袭能力; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 实验分析 *Caspase-3*、*Caspase-9*、*BAX*、*PARP* mRNA 表达水平; Western blotting 检测 cleaved-Caspase-3、cleaved-Caspase-9、BAX、cleaved-PARP 蛋白表达水平。结果 重组纯化获得相对分子质量为 3×10^4 的 CWL; 高质量浓度的 CWL 导致红细胞出现明显的凝血情况, 随着 CWL 质量浓度的降低, 其凝血活性逐渐下降, 直至消失。与对照组比较, CWL 对 HCT-116 细胞活性具有显著抑制作用 ($P<0.001$); 40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ CWL 可显著降低 HCT-116 细胞的迁移和侵袭能力 ($P<0.001$), 显著升高 HCT-116 细胞凋亡率 ($P<0.01$ 、 0.001); 显著升高 *Caspase-3*、*Caspase-9*、*BAX*、*PARP* 的 mRNA 表达水平 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 同时显著增加 cleaved-Caspase-3、cleaved-Caspase-9、BAX、cleaved-PARP 蛋白表达水平 ($P<0.05$ 、 0.01)。结论 CWL 可通过线粒体凋亡途径促进 HCT-116 细胞凋亡并抑制其迁移和侵袭, 从而发挥抗肿瘤作用。

关键词: 温郁金凝集素; HCT-116 细胞; 凋亡; 迁移; 侵袭; 线粒体凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 11-2366-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.11.011

Protein recombination of *Curcuma wenyujin* lectin and its effects on apoptosis, migration and invasion of HCT-116 cells

ZHOU Dan¹, ZHANG Liping², FENG Mengyi¹, ZHU Qiang³, REN Xianying⁴, WU Zhigang¹, JIANG Chengxi¹

1. School of Pharmacy, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China

2. Institute of Life Sciences, Wenzhou University, Wenzhou 325035, China

3. Anhui Jiren Pharmaceutical Co., Ltd., Bozhou 236800, China

4. Wenzhou Ejin Pharmaceutical Co., Ltd., Yueqing 325600, China

Abstract: **Objective** *Curcuma wenyujin* lectin (CWL) recombinant protein was obtained, and its effect on the apoptosis, migration and invasion of colon cancer cells were investigated. **Methods** According to the coding sequence of CWL gene, CWL was heterogeneously expressed and purified using *Escherichia coli* prokaryotic expression system. CCK-8 method was used to evaluate the toxicity of CWL to colon cancer HCT-116 cells, apoptosis was detected by flow cytometry, and cells were detected by scratch test. Migration ability, cell invasion ability was assessed using transwell chamber method. the expression levels of genes in signal pathways such as *Caspase-3*, *Caspase-9*, *BAX* and *PARP* were performed using real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR) analysis. Western blotting was used to detect the expression levels of cleaved-Casase-3, cleaved-Casase-9, BAX, and cleaved-PARP proteins. **Results** Recombinant purification yielded CWL of relative molecular weight of 3×10^4 . High quality concentration of CWL caused to significant coagulation of red blood cells, and as the concentration of CWL decreases, its coagulation activity gradually decreases until it disappears. Compared with control group, CWL had a significant inhibitory effect on the activity of HCT-

收稿日期: 2023-05-29

基金项目: 安徽济人药业有限公司课题(KJHX2009); 合肥未来药物开发有限公司横向课题(KJHX2008)

第一作者: 周 丹(1996—), 女, 陕西商洛人, 硕士研究生, 研究方向为中药资源开发与利用。Tel: (0577)86699891

*通信作者: 姜程曦(1971—), 男, 安徽青阳人, 教授, 研究方向为中药生物技术。E-mail: jiangchengxi@126.com

116 cells ($P < 0.001$), CWL of 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could significantly reduce the migration and invasion ability of HCT-116 cells ($P < 0.001$), and significantly increased the apoptosis rate of HCT-116 cells ($P < 0.01, 0.001$). CWL of 40, 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ significantly increased mRNA expression levels of *Caspase-3*, *Caspase-9*, *BAX*, and *PARP* ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while significantly increased protein expression levels of cleaved- *Caspase-3*, cleaved-*Caspase-9*, *BAX*, and cleaved-PAP ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** CWL can promote HCT-116 cell apoptosis through the mitochondrial apoptosis pathway, inhibit HCT-116 cell migration and invasion, thereby exerting anti-tumor effects and providing a new source of drugs for the development of clinical tumor drugs.

Key words: *Curcuma wenyujin* lectin; HCT-116 cells; apoptosis; migration; invasion; mitochondrial apoptosis

凝集素是一类非免疫来源的蛋白质或糖蛋白，能与糖专一、非共价地可逆结合，并具有凝集细胞和沉淀聚糖或糖复合物的作用^[1-2]。近年来的研究发现凝集素具有一定的抗癌特性，可直接抑制恶性肿瘤细胞的增殖，且该过程不影响正常细胞的生长^[3]。在许多肿瘤组织中都存在异常的糖基化，基于植物凝集素与糖链特异性结合的特点，可以将载有抗癌药物的纳米颗粒表面连接上植物凝集素，进一步将药物靶向结合到肿瘤细胞表面，以增强对肿瘤细胞的杀伤力，减少副作用。因此，凝集素作为一类潜在的抗肿瘤药物具有极广阔的前景。

温郁金 *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling 是姜科姜黄属药用植物,其根茎提取物对多种肿瘤细胞有较好的治疗效果, β -榄香烯、 δ -榄香烯、蓬莪术二烯等倍半萜为其主要活性成分,其中, β -榄香烯乳注射液在 1995 年就被国家批准为二类抗癌新药^[4-5]。但目前关于温郁金中功能活性蛋白报道较少。本课题组在前期转录组测序数据中^[6],发现了在温郁金根茎中高表达的凝集素编码基因(i1_LQ_W_c183679/f1p10/1008),鉴于此,本研究基于该基因序列,试图利用大肠杆菌原核表达及蛋白亲和色谱技术获得温郁金凝集素(*Curcuma wenyujin* lectin, CWL),并研究 CWL 对结肠癌细胞凋亡、迁移和侵袭的影响及相关抗肿瘤作用,从而为温郁金抗癌药物新药源的开发提供基础。

1 材料

1.1 主要仪器

高灵敏核酸蛋白成像系统(Cytiva公司,型号Amersham Imager 600);实时荧光定量PCR仪(Eppendorf公司,型号Eppendorf AG 22331 Hamburg);酶标仪(赛默飞世尔仪器有限公司,型号:Multiskan FC);流式细胞仪(ACEA Biosciences公司,型号NovoCyte 2040R);倒置显微镜(Nikon公司,型号ECLIPSE Ts2)。

1.2 主要试剂

结肠癌 HCT-116 细胞购自中国科学院上海细胞研究所;原核表达载体 pET28a(+),限制性内切酶

NdeI、XhoI、ApaI, 感受态细胞 TOP10、Rosetta(DE3), DNA 回收纯化试剂盒, 质粒小提试剂盒, 2×M5 HiPer SYBR Premix EsTaq plus (with Tli RNaseH), 均购自北京聚合美生物科技有限公司; 异丙基-β-D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 购自北京索莱宝科技有限公司; 胎牛血清购自中国杭州四季青公司; CCK-8 试剂盒、Annexin V-FITC/PI 试剂盒、PAGE 凝胶制备试剂盒购自翌圣生物科技(上海)股份有限公司; 抗体 BAX、cleaved-Caspase-3、cleaved-PARP、cleaved-Caspase-9、β-actin 购自沈阳万类生物科技有限公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L) 购自上海碧云天生物技术有限公司; 2% 兔红细胞购自广州鸿泉生物科技有限公司。

2 方法与结果

2.1 原核表达载体的构建

根据本课题组前期温郁金转录组数据获得1条mRNA表达水平最高的凝集素编码序列(i1_LQ_W_c183679/flp10/1008),根据开放阅读框(ORF)区序列设计合成引物(F-CCATGGGCAGCAGCCA TCATCATCATCATCACGCTAGTCTGGTTATGCT GAGCGCAGCAGTGCTGCTGG; R-AGCCGGATC TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTTCGAGTCAAT TTTTGGCAATTTTACGATTACGCGGTTC),通过PCR扩增获得目的基因片段。PCR扩增得到约845 bp大小的片段,与预测的片段大小837 bp(加上保护碱基)相符(图1A)。

目标线性片段与 NdeI-XhoI 双酶切的载体 pET-28a(+) 进行无缝克隆连接, 构建蛋白原核表达载体; 进一步转化大肠杆菌感受态细胞 TOP10, PCR 方法鉴定阳性菌株; 提取阳性质粒, XhoI-ApaI 双酶切, 获得 1 847、4 193 bp 2 个片段, 与预期 1 812、4 210 bp 的大小一致, 并测序, 结果表明原核表达载体构建成功(图 1B)。

2.2 重组蛋白的表达与纯化

2.2.1 重组蛋白的表达 取测序正确的重组质粒采用冻融法转化至大肠杆菌 Rosetta (DE3) 感受态细胞,涂板后 37 °C 倒置培养过夜。挑取单菌落,移

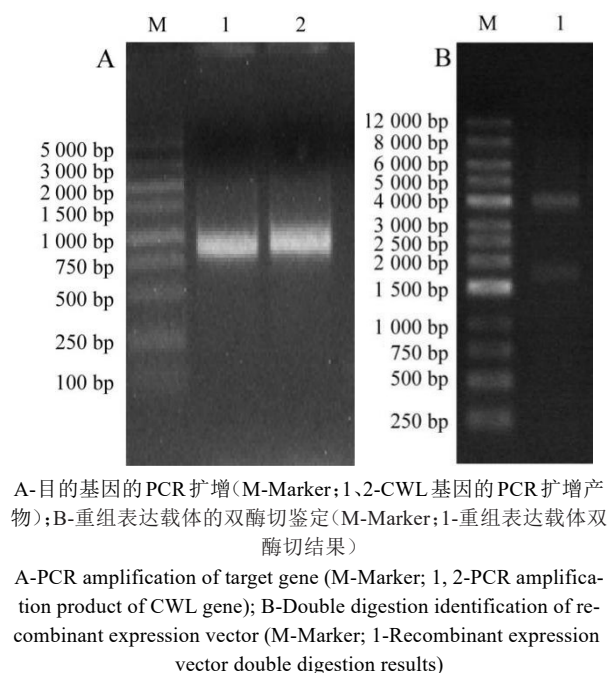


图1 目的基因的PCR扩增及双酶切鉴定

Fig. 1 PCR amplification and double enzyme digestion identification of target gene

入含 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 氨苄青霉素的LB液体培养基, 37°C 、 $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇至菌体 A_{600} 为 $0.6\sim 0.8$, 加入IPTG至终浓度为 $0.5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 37°C 培养4 h, 对所得菌液进行SDS-PAGE^[7]电泳和Western blotting^[8]检测。

SDS-PAGE电泳结果表明CWL基因编码蛋白成功在Rosetta感受态细菌中表达, 条带所对应的蛋白相对分子质量约为 3×10^4 , 与预测的蛋白相对分子质量一致(图2-A)。Western blotting结果显示, 该重组蛋白可与His单克隆抗体特异性结合, 证实了 3×10^4 处为重组目的蛋白(图2-B)。结果初步判断重组CWL蛋白表达成功。

2.2.2 重组蛋白的纯化 诱导表达的菌体超声波破碎后取沉淀, 经变性缓冲液溶解, 离心, 上清、沉淀分别制样, 经SDS-PAGE分析表明目的蛋白已全部在上清中, 上清液用Ni-IDA柱亲和色谱纯化。步骤如下: (1)在 4°C 下用5 mL离心管离心收集细胞; (2)用8 mL平衡缓冲液重悬细胞, 可以加入适量蛋白酶抑制剂; (3)超声破碎细胞, 在冰上进行操作, 破碎1 s, 冷却3 s, 共破碎30 min; (4)破碎好的细胞冰上孵育15 min; (5) 4°C 、 $12\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10 min, 用裂解液沉淀细胞碎片, 收集上清液用N-IDA亲和色谱纯化。收集洗脱液即为目的蛋白(图3-A)。得到的目的蛋白是包涵体形式, 经透析复性后, SDS-PAGE结果表明获得了高纯度的目的蛋白(图3-B)。

2.3 凝血活性测定

96孔V型板中加入 $50 \mu\text{L}$ 0.9%氯化钠溶液(含

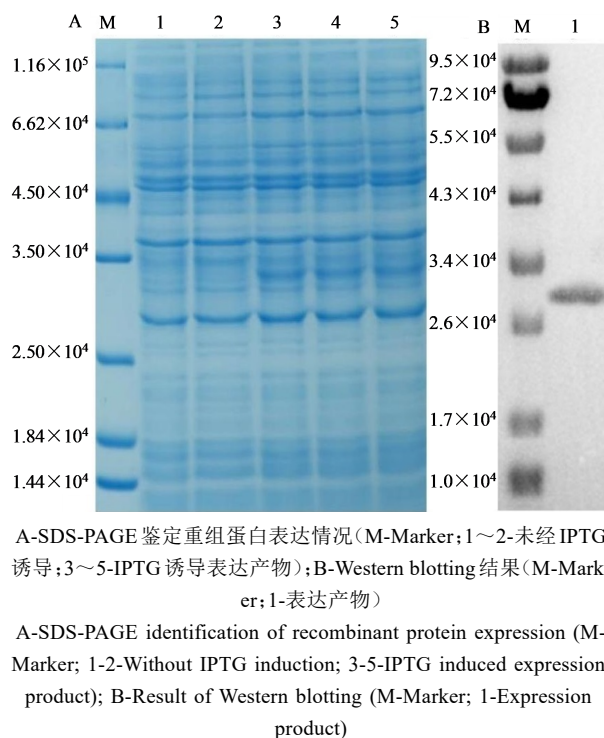
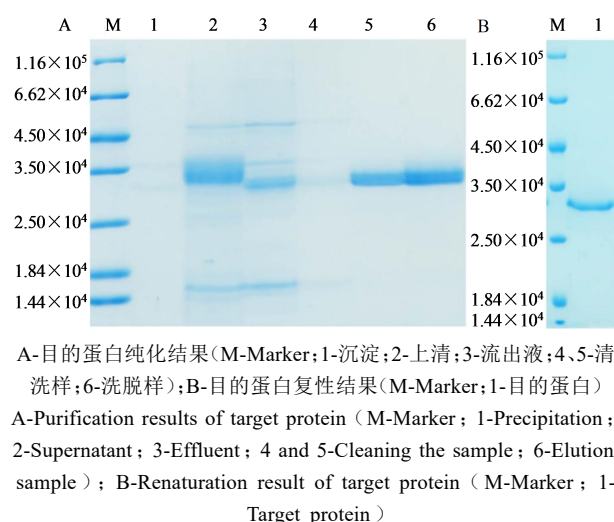
图2 诱导产物的SDS-PAGE检测和Western blotting分析
Fig. 2 SDS-PAGE detection and Western blotting analysis of induced products

图3 目的蛋白的纯化及复性结果

Fig. 3 Purification and renaturation results of target protein

$10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Ca}^{2+}$), 在各行的首孔中加入 $50 \mu\text{L}$ 的CWL, 混匀后取 $50 \mu\text{L}$ 加入到第2个孔中, 依此类推, 倍比稀释, 之后每孔加入 $50 \mu\text{L}$ 的2%兔红细胞悬液混匀, 室温静置2 h, 观察结果。

通常发生血凝反应的红细胞将聚集成网络状, 整个V型孔通红, 未凝集的应在孔底沉积呈小红点状。CWL的凝血活性结果显示, 加入CWL后, 红细胞出现明显的凝血情况, 随着CWL质量浓度的降低, 其凝血活性逐渐下降, 直至消失(图4)。

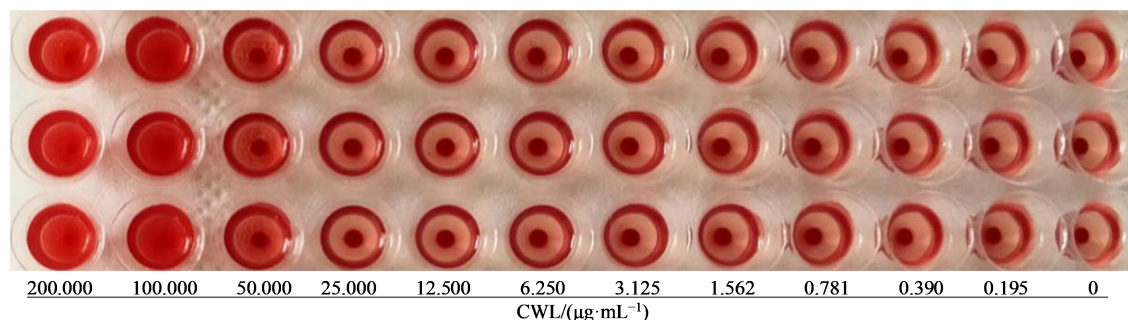


图4 CWL凝血活性检测

Fig. 4 CWL coagulation activity detection

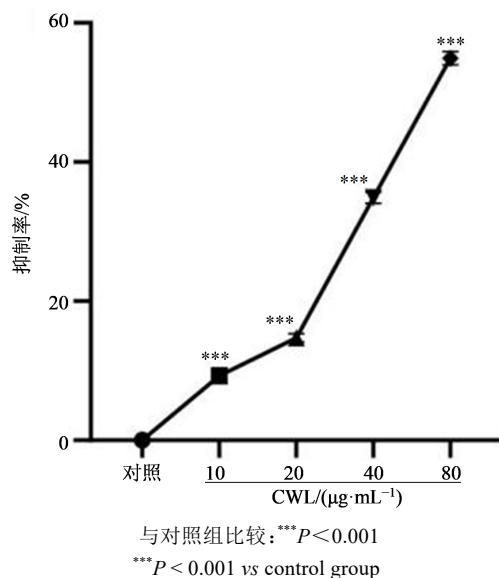
2.4 CCK-8法检测细胞毒性

HCT-116细胞用含10%胎牛血清和1%青-链霉素的RPMI 1640培养基在37℃、5% CO₂培养箱常规传代培养,选择处于生长对数期的细胞进行实验。

细胞以每孔 7×10^3 接种于96孔板中,培养至贴壁,分别加10、20、40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的CWL培养48 h。每孔加10 μL CCK-8溶液,放置于培养箱中孵育1 h,在酶标仪450 nm处读取吸光度(A)值,重复实验3次,计算细胞抑制率。以具有培养基和CCK-8溶液而没有细胞的孔作为空白对照,以具有细胞、CCK-8溶液而没有药物的孔为对照。

$$\text{生长抑制率} = 1 - (A_{\text{加药}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白对照}})$$

结果如图5所示,与对照组比较,随着CWL质量浓度的增加,对细胞的生长抑制作用越明显,差异有统计学意义($P < 0.001$)。

图5 CWL对HCT-116细胞增殖能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 5 Effect of CWL on proliferation ability of HCT-116 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.5 划痕实验检测细胞迁移

24孔细胞培养板中放入Culture-insert插件,取70 μL 浓度为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液加入到Culture-insert每个孔中,待细胞长满后取出插件,加入CWL终质量浓度为40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的含2%胎牛血清的RPMI 1640培养基,对照组不加药,分别在0、24 h用倒置显微镜拍照,观察划痕区域面积的变化情况,Image J软件计算划痕面积。

划痕愈合率 = (0 h划痕面积 - 24 h划痕面积) / 0 h划痕面积

CWL处理HCT-116细胞24 h后,CWL组细胞划痕宽度与对照组相比显著增宽($P < 0.001$),伤口愈合率呈浓度相关性下降(图6-A)。

2.6 Transwell检测细胞侵袭

将HCT-116细胞悬液浓度调整为 $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,取100 μL 接种于已经铺有基底胶的Transwell上室中,培养至贴壁,分别加40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的CWL处理48 h,对照组不加药。下室加含20%血清的培养基600 μL 。24 h后,细胞经固定、染色,倒置显微镜拍照。

$$\text{侵袭率} = \text{加药组侵袭细胞数} / \text{对照组侵袭细胞数}$$

与对照组相比,CWL组HCT-116细胞穿过Transwell小室的细胞数显著减少($P < 0.001$),CWL以浓度相关性方式降低HCT-116细胞的侵袭性(图6-B)。结果表明CWL对HCT-116细胞的迁移和侵袭能力具有良好的抑制效果。

2.7 流式细胞术检测细胞凋亡

将HCT-116细胞接种于6孔板中,培养至贴壁,分别加40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的CWL处理48 h,对照组不加药。收集细胞,参照Annexin V-FITC/PI试剂盒说明,通过流式细胞仪检测细胞凋亡。

与对照组比较,CWL处理HCT-116细胞表现出剂量相关性地诱导凋亡作用(图7-A),差异显著($P < 0.01, 0.001$)。

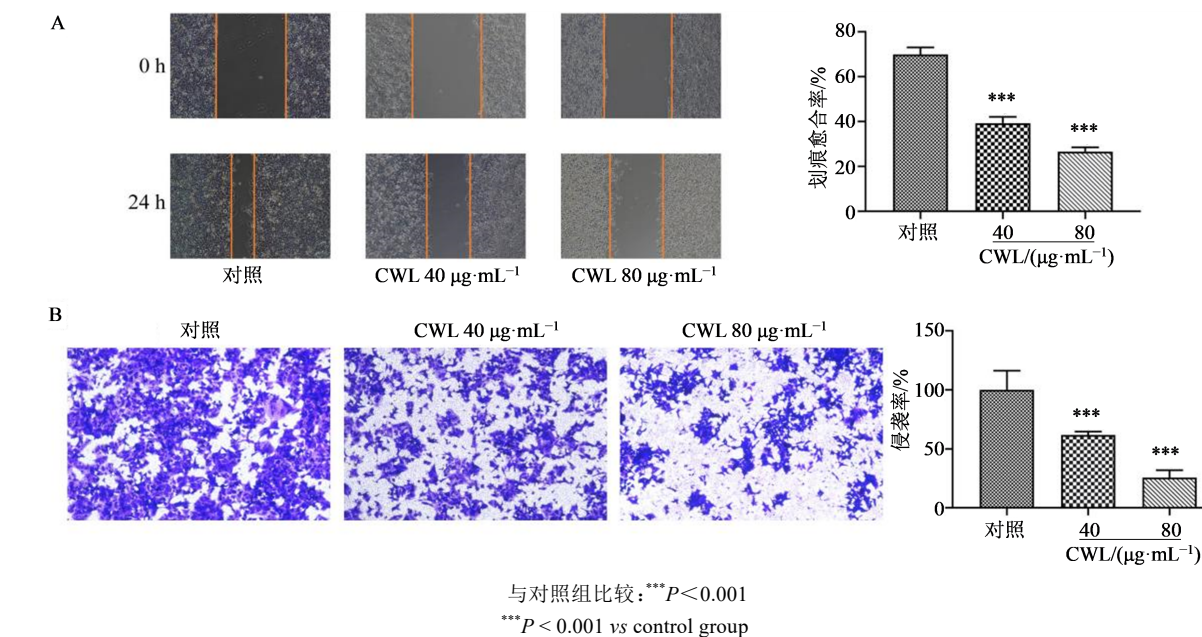
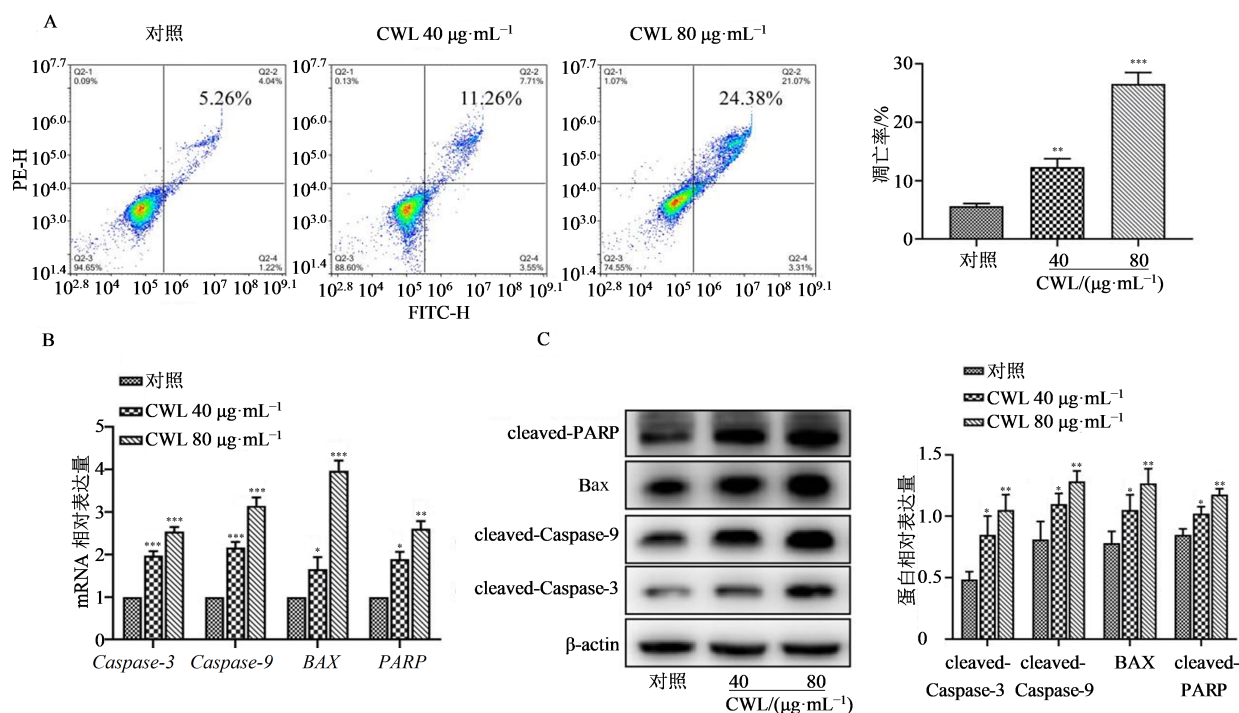


图6 CWL对HCT-116细胞的迁移(A)和侵袭(B)的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effect of CWL on migration (A) and invasion (B) of HCT-116 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)



A-流式细胞术检测细胞凋亡; B-qRT-PCR检测 *Caspase-3*、*Caspase-9*、*BAX*、*PARP* 的 mRNA 表达; C-Western blotting 检测 cleaved-Caspase-3、cleaved-Caspase-9、BAX、cleaved-PARP 的蛋白表达; 与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

A-Flow cytometry to detect cell apoptosis; B-qRT-PCR to detect mRNA expressions of *Caspase-3*, *Caspase-9*, *BAX* and *PARP*; C-Western blotting to detect protein expression of Cleaved-caspase-3, Cleaved-caspase-9, BAX and Cleaved-PARP; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

图7 CWL诱导HCT-116细胞凋亡结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 CWL induced apoptosis of HCT-116 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.8 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)实验

细胞接种及给药操作同“2.7”项,收集细胞,Trizol法提取各组细胞的总RNA,并测定RNA的浓度和纯度,使用逆转录试剂盒进行逆转录得到

cDNA。采用 $2 \times M5$ HiPer SYBR Premix EsTaq plus (with Tli RNaseH) 试剂盒配制qRT-PCR体系,引物由杭州锐普特生物科技有限公司合成(引物序列见表1)。记录各孔 C_t 值,以 β -actin 为内参,采用

表1 qRT-PCR引物
Table 1 qRT-PCR primers

基因	forward primer(5'→3')	reverse primer(5'→3')
<i>Caspase 3</i>	CATGGAAGCGAATCAATGGACT	CTGTACCAGACCGAGATGTCA
<i>Caspase 9</i>	CTCAGACCAGAGATTCGCAAAC	GCATTTCCTCTCAAACCTCTCAA
<i>BAX</i>	CCCGAGAGGTCTTTTCCGAG	CCAGCCCATGATGGTTCTGAT
<i>PARP</i>	CGGAGTCTTCGGATAAGCTCT	TTTCCATCAAACATGGGCGAC
<i>β-actin</i>	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

2^{-ΔΔCt}法计算各组细胞 mRNA 相对表达水平。

qRT-PCR 结果显示,与对照组相比,CWL 处理后 *Caspase-3*、*Caspase-9*、*BAX*、*PARP* 的 mRNA 表达水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001) (图 7-B)。

2.9 Western blotting 实验

细胞接种及给药操作同“2.7”项,收集细胞,加入裂解液提取总蛋白。蛋白用 12.5% SDS-PAGE 进行电泳分离,电转移到 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 1.5 h,加入一抗 cleaved-Caspase-3 (1:500)、cleaved-Caspase-9 (1:1 000)、BAX (1:500)、cleaved-PARP (1:750)、β-actin (1:500),4 °C 孵育过夜;洗膜后,山羊抗兔二抗 (1:1 000) 室温孵育 1 h, ECL 工作液显影后拍照。用 Image J 进行灰度定量,β-actin 作为内参。

Western blotting 结果表明,与对照组比较,CWL 处理后 HCT-116 细胞中 cleaved-Caspase-3、cleaved-caspase-9、BAX、cleaved-PARP 的蛋白表达水平显著升高($P < 0.05$ 、 0.01 ,图 7-C)。结果表明 CWL 可能通过线粒体凋亡途径诱导 HCT-116 细胞凋亡。

3 讨论

结肠癌是最常见的胃肠道肿瘤之一,在全球发病率和死亡率均位于前列,具有起病隐匿、转移早、进展快的特点^[9-10]。根治性手术切除和化疗是结肠癌的主要临床治疗方法,但由于其不适用性、耐药性和不良反应等问题,取得的治疗效果并不理想^[11]。中医药防治肿瘤具有多途径、多靶点、多通路的优势,起到增强机体免疫力、抗肿瘤转移复发的作用,从中药中寻找更好的抗肿瘤药物成为中医药或肿瘤研究的热点^[12-13]。目前众多中药活性成分相继被发现对结肠癌具有明确的作用,譬如白藜芦醇、粉防己碱、姜黄素等,其用药剂量小,作用机制明确,在基础研究和新药研发中具有一定优势^[14-16]。最近,植物凝集素蛋白在抗肿瘤方面日益受到众多

学者的关注。黄精凝集素 PCL-2 被发现可显著抑制前列腺癌 LNCap 细胞的增殖和凋亡,可作为抑制前列腺癌的潜在药物^[17];苦荞凝集素对正常肠细胞无毒性,特异性抑制结肠癌细胞^[18];富含凝集素的欧洲槲寄生制剂已在临床上用于乳腺癌、胰腺癌、大肠癌等的辅助治疗^[19-21]。本研究基于 CWL 编码基因序列,利用大肠杆菌原核表达及蛋白亲和色谱技术,成功表达纯化出 CWL,并发现 CWL 可浓度相关性抑制 HCT-116 细胞生长。

侵袭转移是导致结肠癌患者术后复发、死亡的重要原因,故而抑制癌细胞侵袭转移是治疗结肠癌的关键^[22-23]。本研究用划痕实验和 Transwell 实验检测结肠癌细胞迁移和侵袭,结果显示随着 CWL 浓度的增加,对 HCT-116 细胞迁移和侵袭的抑制效果越强。CWL 对迁移和侵袭的有效抑制证明了 CWL 具有抗转移潜力。已知的具有抗转移作用的凝集素,如槲寄生凝集素已成功通过临床试验^[24]。

细胞凋亡是结肠癌发生发展和组织内环境稳定的重要生物学过程,同时也是评价抗癌药物有效性的评价指标之一^[25-26]。Bax 是线粒体凋亡信号传导途径的必需组分,当细胞受到凋亡信号刺激后,Bax 的表达增加,促进细胞色素 C 释放。释放的细胞色素 C 可与 ATP 结合,导致启动子 Caspase-9 和效应子 Caspase-3 在细胞凋亡的执行阶段被激活^[27-28]。激活的 Caspase-3 使其底物 PARP 裂解而失去修复损伤 DNA 的功能,核小体间 DNA 最终被降解,导致细胞走向凋亡^[29]。本实验通过流式细胞术分析表明,CWL 对 HCT-116 细胞毒性的增强作用与诱导细胞凋亡相关。QRT-PCR 结果显示,与对照组相比,CWL 处理 HCT-116 细胞后,*Caspase-3*、*Caspase-9*、*BAX*、*PARP* 的 mRNA 表达显著升高。Western blotting 实验也呈现出相似的结果,加药后 cleaved-Caspase-3、cleaved-caspase-9、Bax、cleaved-PARP 的蛋白表达显著升高。以上结果表明 CWL 可能通过线粒体凋亡途径诱导结肠癌细胞凋亡。

CWL在结肠癌中发挥明显的抗肿瘤作用,能够抑制结肠癌HCT-116细胞迁移及侵袭能力,并促进细胞凋亡。CWL显著上调了Caspase-3、Caspase-9、BAX、PARP的基因及其编码蛋白的表达水平,提示其促凋亡机制可能是与线粒体凋亡途径相关。本研究成功获得高纯度的CWL蛋白,并分析了CWL对结肠癌表观指标的影响,为抗结肠癌蛋白药物的开发提供了新药源,但相关的作用机制有待今后深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 余金凤, 冯云利, 方媛, 等. 大型真菌凝集素研究进展 [J]. 食用菌, 2021, 29(6): 488-495, 518.
Yu J F, Feng Y L, Fang Y, et al. Research progress of macrofungal lectin [J]. Edible Med Mushrooms, 2021, 29 (6): 488-495, 518.
- [2] Oliveira MV, Osterne VJS, Lossio CF, et al. Purification and characterization of a highly thermostable GlcNAc-binding lectin from *Collaea speciosa* seeds [J]. Int J biolog Macromol, 2021, 193(Pt B): 1562-1571.
- [3] 王琪琳, 桑青, 曲爱琴. 多糖凝集素的细胞免疫和抗肿瘤研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2009, 37(5): 1894-1896.
Wang Q L, Sang Q, Qu A Q. Research progress on the cellular immunity and anti-tumor of polysaccharide agglutinin [J]. J Anhui Agric Sci, 2009, 37(5): 1894-1896.
- [4] 曾欣, 练美林, 毛碧增. 温郁金化学成分、药理作用及病害研究进展 [J]. 药物生物技术, 2017, 24(6): 554-560.
Zeng X, Lian M L, Mao B Z. The research progress in chemical components, pharmacological activity and main pathogenic diseases in *Curcuma wenyujin* [J]. Pharm Biotechnol, 2017, 24(6): 554-560.
- [5] 刘梅, 郭小红, 孙全, 等. 温郁金的化学成分和药理作用研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2021, 36(1): 204-208.
Liu M, Guo X H, Sun Q, et al. Research progress on chemical constituents and pharmacological activity of *Curcuma wenyujin* [J]. Drugs Clin, 2021, 36(1): 204-208.
- [6] Jiang C X, Fei X, Pan X J, et al. Tissue-specific transcriptome and metabolome analyses reveal a gene module regulating the terpenoid biosynthesis in *Curcuma wenyujin* [J]. Ind Crops Prod, 2021, 170: 113758.
- [7] 庞小静. 利用小RNA深度测序鉴定白术、半夏和地黄病毒病原 [D]. 晋中: 山西农业大学, 2021.
Identification of virus infecting *Atractylodes macrocephala* Koidz, *Pinellia ternata* Breit and *Rehmannia glutinosa* Libosch by small RNA deep sequencing [J]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2021.
- [8] 葛立春, 李红. Lrig1在结肠癌组织和细胞株中表达意义 [J]. 中国公共卫生, 2016, 32(10): 1343-1345.
Ge L C, Li H. Expression and significance of Lrig1 in colon cancer tissue and cell lines [J]. Chin J Public Health, 2016, 32(10): 1343-1345.
- [9] 彭俊, 吕慧婕, 丁星星, 等. microRNA在结肠癌诊断及中医药防治的研究进展 [J]. 医学理论与实践, 2021, 34 (21): 3713-3714, 3718.
Peng J, Lü H J, Ding X X, et al. Research progress of microRNA in diagnosis of colon cancer and prevention and treatment of traditional Chinese medicine [J]. J Med Theory Pract, 2021, 34(21): 3713-3714, 3718.
- [10] 杨洋, 彭文丽. miR-138通过靶向SIRT1调控结肠癌细胞的凋亡 [J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(19): 1877-1883.
Yang Y, Peng W L. miR-138 promotes apoptosis of colon cancer cells by targeting SIRT1 [J]. J Third Mil Med Univ, 2021, 43(19): 1877-1883.
- [11] Sandhu J, Lavingia V, Fakih M. Systemic treatment for metastatic colorectal cancer in the era of precision medicine [J]. J Surg Oncol, 2019, 119(5): 564-582.
- [12] 梁研, 孙若岚, 刘夫艳, 等. 基于网络药理学和实验验证分析黄芪-莪术-蚤休角药配伍抗结直肠癌的作用机制 [J]. 中国中药杂志, 2022, 47(3): 776-785.
Liang Y, Sun R L, Liu F Y, et al. Based on network pharmacology and experimental verification, the anti-colorectal cancer mechanism of *Radix Astragali-Rhizoma Curcumae-Rhizoma Paridis* is analyzed [J]. China J Chin Mater Med, 2022, 47(3): 776-785.
- [13] 谢欣, 吴玉玲, 李想, 等. 有毒中药调控凋亡通路抑制肿瘤细胞增殖 [J]. 中药与临床, 2021, 12(5): 71-74, 88.
Xie X, Wu Y L, Li X, et al. Toxic traditional Chinese medicine regulate apoptosis-related pathways and inhibittumor cell proliferation [J]. Pharm Clin Chin Mater Med, 2021, 12(5): 71-74, 88.
- [14] 王静宇, 黄凌鲲, 王剑鸣. 白藜芦醇通过调控Wnt/ β -catenin信号通路抑制结肠癌细胞生长的研究 [J]. 中南药学, 2015, 13(5): 499-501.
Wang J Y, Huang L K, Wang J M. Inhibition of resveratrol on the growth of colon cancer cells by Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. Central South Pharm, 2015, 13(5): 499-501.
- [15] 王东旭, 袁霜雪, 伍秋香, 等. 胰岛素样生长因子结合蛋白5与汉防己甲素抑制人结肠癌细胞增殖的关系研究 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(10): 1403-1408.
Wang D X, Yuan S X, Wu Q X, et al. Study on the relationship between Insulin-like growth factor binding protein 5 and anti-proliferating effect of tetrandrine on human colon cancer cells [J]. Chin Pharmacol Bull, 2015, 31(10): 1403-1408.
- [16] Jiang X E, Li S G, Qiu X M, et al. Curcumin inhibits cell viability and increases apoptosis of SW620 human colon adenocarcinoma cells via the caudal type homeobox-2 (CDX2)/wnt/ β -catenin pathway [J]. Med Sci Monit, 2015, 21(10): 2253-2258.

- 2019, 25: 7451-7458.
- [17] 孙婷婷, 刘洋, 李卓柯, 等. 黄精凝集素 PCL-2 诱导人前列腺癌 LNCap 细胞凋亡及机制研究 [J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(2): 255-262.
- Sun T T, Liu Y, Li Z K, et al. Lectin PCL-2 of *Polygonatum cyrtoneura* induces apoptosis of human prostate cancer LNCap cells and its mechanism [J]. Nat Prod Res Dev, 2022, 34(2): 255-262.
- [18] 郭培钰, 崔晓东, 贾乔瑾, 等. 苦荞凝集素靶向抑制结肠癌细胞 HCT116 增殖的机制 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(1): 73-80.
- Guo P Y, Cui X D, Jia Q J, et al. The mechanism of Tartary buckwheat lectin-targeted inhibition of HCT116 colon cancer cell proliferation [J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2017, 33(1): 73-80.
- [19] Pelzer F, Tröger W. Complementary treatment with mistletoe extracts during chemotherapy: Safety, neutropenia, fever, and quality of life assessed in a randomized study [J]. J Altern Complementary Med, 2018, 24(9/10): 954-961.
- [20] Tröger W, Galun D, Reif M, et al. *Viscum album* L. extract therapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer: A randomised clinical trial on overall survival [J]. Eur J Cancer, 2013, 49(18): 3788-3797.
- [21] Bergmann L, Aamdal S, Marreud S, et al. Phase I trial of r viscumin (INN: Aviscumine) given subcutaneously in patients with advanced cancer: A study of the european organisation for research and treatment of cancer (EORTC protocol number 13001) [J]. Eur J Cancer, 2008, 44(12): 1657-1662.
- [22] 李蓉蓉, 殷先利, 刘振洋, 等. HIF-1 α 诱导结肠癌 HCT116 细胞 EMT 和侵袭转移的作用机制研究 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2020, 25(7): 893-898.
- Li R R, Yin X L, Liu Z Y, et al. The role and mechanism of HIF-1 α inducing EMT and invasion and metastasis of colon cancer HCT116 cells by regulating transcription factor Snail1 [J]. Mod Dig Interv, 2020, 25(7): 893-898.
- [23] 刘桂. 结肠癌组织 Wnt7a 蛋白高表达与病理特征及预后的关系 [J]. 中华普通外科学文献: 电子版, 2021, 15(5): 370-374.
- Liu G. Prognostic value of Wnt7a expression in colon cancer tissues and its relationship with pathological characteristics [J]. Chin Arch Gen Surg Electron Ed, 2021, 15(5): 370-374.
- [24] Park W B, Lyu S Y, Kim J H, et al. Inhibition of tumor growth and metastasis by Korean mistletoe lectin is associated with apoptosis and antiangiogenesis [J]. Can Biother Radiop, 2001, 16(5): 439-447.
- [25] Hackshaw-McGeagh L E, Perry R E, Leach V A, et al. A systematic review of dietary, nutritional, and physical activity interventions for the prevention of prostate cancer progression and mortality [J]. Can Caus Contr, 2015, 26(11): 1521-1550.
- [26] 刘芳媛, 徐佳越, 韩凤娟. 桂枝茯苓丸治疗卵巢癌作用机制研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(3): 220-225.
- Liu F Y, Xu J Y, Han F J. Mechanisms of Guizhi fulingwan against ovarian cancer: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(3): 220-225.
- [27] 崔勇和, 沈先敏. 白藜芦醇通过 PI3K/Akt 信号通路协同 5-氟尿嘧啶对结肠癌细胞的抑制作用 [J]. 天津中医药, 2021, 38(10): 1345-1349.
- Cui Y H, Shen X M. Resveratrol synergizes the inhibitory effect of 5-fluorouracil in colon cancer by suppressing PI3K/Akt signaling pathway [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2021, 38(10): 1345-1349.
- [28] 张淑华, 官学苹, 阮奇军, 等. 黄芩苷对人结肠癌 SW480 细胞增殖和凋亡的影响及机制研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2021, 30(21): 2299-2304.
- Zhang S H, Guan X P, Ruan Q J, et al. Effect of baicalin on proliferation and apoptosis of human colon cancer SW480 cells and its mechanism [J]. Mod J Integr Tradit Chin West Med, 2021, 30(21): 2299-2304.
- [29] 冯振宇, 孟霜, 马小娟, 等. 马钱子碱对人结肠癌 HT-29 细胞增殖、细胞周期的影响及其作用机制 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(4): 2359-2362.
- Feng Z Y, Meng S, Ma X J, et al. Effects of brucine on cell proliferation and cell cycle of human colon cancer HT-29 cells and its mechanism [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 36(4): 2359-2362.

[责任编辑 兰新新]