

川陈皮素调节 RAS/RAF/MEK/ERK 信号通路对直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

李 赞, 阮 英, 孙燕玲, 李涛岚, 吴 喆*

湖北科技学院, 湖北 咸宁 437100

摘 要: **目的** 探究川陈皮素调节肾素血管紧张素系统(RAS)/蛋白激酶(RAF)/促分裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路对直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响。**方法** 用质量浓度为5、10、20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的川陈皮素处理人直肠癌细胞(SW480), 筛选合适的实验浓度; 随机将SW480细胞分为对照组, 川陈皮素低、中、高质量浓度(10、20、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组, 川陈皮素40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ +RAS激活剂(RASAL1)组; 检测SW480细胞增殖、迁移、侵袭能力; Western blotting检测蛋白表达; 裸鼠成瘤实验检测川陈皮素对直肠肿瘤的影响。**结果** 与对照组比较, 川陈皮素低、中、高质量浓度组5-乙炔基-2'-脱氧尿嘧啶核苷(Edu)阳性率、细胞侵袭数、划痕愈合率下降, 细胞周期蛋白依赖性激酶1(CDK1)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、RAS、RAF、MEK、ERK蛋白表达水平下降($P<0.05$); 与川陈皮素高质量浓度组相比, RASAL1组Edu阳性率、细胞侵袭数、划痕愈合率升高, CDK1、MMP-2、MMP-9、RAS、RAF、MEK、ERK蛋白表达水平升高($P<0.05$)。川陈皮素组移植瘤生长速度比对照组缓慢, 瘤体积减小, 瘤质量下降, RAS、RAF、MEK、ERK蛋白表达下调($P<0.001$)。**结论** 川陈皮素抑制RAS/RAF/MEK/ERK信号通路的激活, 进而抑制直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭。

关键词: 直肠癌; 川陈皮素; 肾素血管紧张素系统(RAS)/蛋白激酶(RAF)/促分裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号通路; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)11-2567-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.11.012

Effects of nobiletin on proliferation, migration, and invasion of rectal cancer cells by regulating RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway

LI Yun, RUAN Ying, SUN Yanling, LI Taolan, WU Zhe

Hubei University of Science and Technology, Xianning 437100, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of nobiletin on the proliferation, migration, and invasion of rectal cancer cells by regulating the renin-angiotensin system(RAS)/RAF/mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular regulated protein kinase (ERK) signaling pathway. **Methods** Human rectal cancer cells (SW480) were treated with nobiletin at concentrations of 5, 10, 20, 40, and 80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and suitable experimental concentrations were screened. SW480 cells were randomly divided into control group, nobiletin low-, mid-, and high- doses (10, 20, 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) groups, and a high dose nobiletin+RAS activator group (RASAL1 group). The proliferation, migration, and invasion ability of SW480 cells were detected. Western blotting was applied to detect protein expression. Nude mice were used to detect the effect of nobiletin on rectal tumors. **Results** By screening the concentrations, concentrations of 10, 20, and 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ of nobiletin were selected for the experiment. Compared with the control group, the Edu positive rate, cell invasion number, and scratch healing rate decreased in the nobiletin groups, while the expression levels of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), RAS, RAF, MEK, and ERK decreased ($P<0.05$). Compared with nobiletin high dose group, the Edu positive rate, cell invasion number, and scratch healing rate increased in the nobiletin + RASAL1 group, while the expression levels of CDK1, MMP-2, MMP-9, RAS, RAF, MEK,

收稿日期: 2024-05-11

基金项目: 湖北科技学院2020年五官医学院专项科研基金项目(2020WG07)

第一作者: 李 赞(1981—), 本科, 实验师, 研究方向为肿瘤治疗。E-mail: l9e7zuo@163.com

*通信作者: 吴 喆(1982—), 女, 副教授, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤相关疾病。E-mail: seedlyfx@163.com

and ERK ($P < 0.05$). The growth rate of transplanted tumors in the nobiletin groups was slower than that in the control group, the tumor volume decreased, the quality decreased, and the expression of RAS, RAF, MEK, and ERK proteins was down regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** Nobiletin inhibits the activation of the RAS/RAF/MEK/ERK signaling pathway, thereby inhibiting the proliferation, migration, and invasion of rectal cancer cells.

Key words: rectal cancer; nobiletin; RAS/RAF/mitogen-activated protein kinase (MEK)/extracellular regulated protein kinase (ERK) signaling pathway; proliferation; migration; invasion

结直肠癌(CRC)是全球第3大最常见的恶性肿瘤,直肠癌占CRC病例的三分之一以上,由于解剖结构复杂,术后并发症和局部复发率高,直肠癌在治疗和器官保存方面一直具有挑战性,尤其是局部晚期直肠癌。研究发现,与不放疗的新辅助化疗相比,放化疗在治疗效果方面没有优势,并且存在严重的不良反应^[1]。目前,基于新辅助长程放化疗联合延迟手术或短程放疗联合即刻手术的多学科治疗是晚期直肠癌的主要治疗方式^[2]。研究表明,仅有15%~20%的直肠癌患者治疗后实现了完全病理消退,其余患者则反应不完全或无反应。研究表明,直肠癌的放疗耐药性可能通过细胞凋亡、自噬、细胞周期和DNA损伤修复的机制进行调节。因此,探索直肠癌患者肿瘤细胞存活抑制的途径,并探索针对这些机制的新治疗药物具有重要意义^[3]。许多天然产物已被证明具有抗癌特性^[4]。这些药物活性成分可以通过多种机制影响整个致癌过程。一方面,这些药物可能诱导恶性细胞的细胞死亡,另一方面降低正常细胞毒性^[5]。川陈皮素是从柑橘类水果的果皮中分离出的类黄酮化合物,研究表明,川陈皮素在多种癌症中具有抗癌作用,包括皮肤癌、前列腺癌、结肠癌和乳腺癌^[6]。研究发现,川陈皮素抑制胃癌细胞增殖,引起细胞周期停滞,诱导胃癌细胞凋亡^[7]。然而,川陈皮素在直肠癌中的抗癌机制尚不清楚。肾素血管紧张素系统(RAS)/蛋白激酶(RAF)/促分裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)/细胞外信号调节激酶(ERK)/丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)是CRC发病机制中最经典的通路。据报道,约50%的CRC患者存在该通路基因突变。RAS是介导细胞对生长信号反应的RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK通路的成员。RAS和RAF都是多基因家族的成员,有3个RAS成员(KRAS、NRAS和HRAS)和3个RAF成员(BRAF、RAF1和ARAF)^[8]。研究表明,ALDH6A1通过下调RAS/RAF/MEK/ERK通路相关标志物的表达来抑制结肠癌进展^[9]。但川陈皮素是否调节RAS/RAF/MEK/ERK/信号通路影响直肠癌细胞的增殖、迁移、侵袭

仍未十分明确。故本研究探讨川陈皮素对直肠癌细胞增殖、侵袭和迁移的影响和机制。

1 材料

1.1 细胞与动物

直肠癌细胞(SW480)(货号:CS-C1558)购自莼试生物公司;BALB/C雄性裸鼠,12只,体质量18~20 g,购买于武汉生物制品研究有限责任公司,许可证号:SCXK(鄂)2022—0013。本研究经华中科技大学武汉光电国家实验室医学伦理委员会审核通过(编号:2023-02632)。

1.2 药物与试剂

川陈皮素(货号:SN8160,质量分数 $\geq 98\%$)购自Solarbio公司;RAS激活剂RASAL1(6088R)购自雅吉生物公司;兔抗CDK1(MA5-32055)、MMP-2(PA5-16504)、MMP-9(PA5-27191)、RAS(33-7200)、RAF(702187)、MEK(PA5-96087)、ERK(701183)抗体购于Thermo Fisher公司。CCK-8试剂盒(CK04-500T)购自浙江联硕生物科技有限公司;Edu细胞增殖检测试剂盒(远红荧光)(XY6046S)购自上海恒雅生物科技有限公司。BCA蛋白质定量试剂盒(PA115-01)天根生化科技(北京)有限公司;Transwell小室(3462)购自北京诺博莱德科技有限公司。

1.3 仪器

酶标仪(CLARIOstar PLUS)购自广州进科驰安科技有限公司;倒置荧光显微镜(24956165)购自上海远耀生物科技有限公司;凝胶成像分析仪(20220207135)购自上海远耀生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养以及川陈皮素处理

取直肠癌SW480细胞常规培养,对数生长期时,SW480细胞接种到96孔板中,每孔 4×10^4 个,接种24 h后给药,使用0(对照)、5、10、20、40、80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的川陈皮素分别处理SW480细胞24、48、72 h,加CCK-8工作液。37 °C培养1.5 h,450 nm测吸光度(A值),测SW480细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 细胞分组

细胞接种同“2.1”项将SW480细胞分为对照组、川陈皮素低、中、高质量浓度(10、20、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组、川陈皮素高质量浓度+RASAL1(40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 川陈皮素+2 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ RASAL1)组^[10],除对照组外,其余各组SW480细胞用相应药物处理24 h。

2.3 Edu染色法检测SW480细胞增殖

将各组SW480细胞接种到96孔细胞培养板,常规24 h培养,给药操作同“2.2”项,加入含Edu培养基孵育、固定,避光加荧光染料。显微镜下拍照,计算阳性率。

$\text{Edu阳性细胞率} = \text{Edu染色阳性细胞数} / \text{总细胞数}$

2.4 细胞迁移

将SW480细胞接种于6孔培养板,每孔 5×10^5 个,给药操作同“2.2”项,用无菌枪头垂直划痕细胞,培养24 h,显微镜观察,计算愈合率。

$\text{划痕愈合率} = (\text{0 h划痕宽度} - \text{24 h划痕宽度}) / \text{0 h划痕宽度}$

2.5 细胞侵袭

用基质胶包被Transwell小室,无胎牛血清培养基重悬SW480细胞,调整SW480细胞浓度为 3×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,接种上室,给药操作同“2.2”项,培养24 h,甲醛固定,结晶紫染色。显微镜观察,统计细胞侵袭数目。

2.6 蛋白表达

细胞分组及处理同“2.2”项,取每组SW480细胞总蛋白,BCA法测浓度,取蛋白电泳分离、转膜、封闭,与CDK1(1:2 000)、MMP-2(1:2 000)、MMP-9(1:2 000)、RAS(1:2 000)、RAF(1:2 000)、MEK(1:2 000)、ERK(1:2 000)一抗稀释液在4℃条件下孵育过夜过夜孵育,加二抗孵育,显色,Image J分析蛋白表达。

2.7 裸鼠移植瘤实验

制备SW480细胞悬液,浓度为 9×10^6 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,取0.2 mL于小鼠右侧靠近腋下注射。当肿瘤生长至30 mm^3 时,将小鼠分为对照组、药物组,每组6只。药物组ip给予40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 川陈皮素^[11];对照组小鼠ip相同剂量0.9%氯化钠溶液。观察小鼠状态,测量瘤体积,于裸鼠饲养35 d后,将其安乐死,肿瘤称质量,并检测通路蛋白表达,将肿瘤组织破碎,匀浆,加入裂解液,提取蛋白,其余方法同“2.6”项。

2.8 统计学方法

用SPSS 25.0进行分析,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,组间两两比较采用SNK-*q*检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 川陈皮素质量浓度确定

使用5、10、20、40、80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的川陈皮素处理SW480细胞24 h后,川陈皮素质量浓度在10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 以上时,SW480细胞的存活率下降,选择10、20、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的川陈皮素用于后续实验,见表1。

表1 川陈皮素对SW480细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of nobiletin on proliferation of SW480 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

川陈皮素/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞存活率/%		
	24 h	48 h	72 h
0(对照)	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00	100.00 $\pm$ 0.00
5	99.87 $\pm$ 3.62	99.54 $\pm$ 3.83	99.75 $\pm$ 3.26
10	88.43 $\pm$ 3.97*	87.25 $\pm$ 3.89*	85.16 $\pm$ 3.24*
20	76.45 $\pm$ 3.57*	74.31 $\pm$ 3.39*	71.93 $\pm$ 3.44*
40	65.48 $\pm$ 2.79*	63.56 $\pm$ 1.98*	60.42 $\pm$ 2.31*
80	62.77 $\pm$ 1.85*	61.57 $\pm$ 1.94*	57.34 $\pm$ 1.83*

与对照组比较: * $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs control group.

3.2 川陈皮素对直肠癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

与对照组比较,川陈皮素低、中、高质量浓度组Edu阳性率、细胞侵袭数、划痕愈合率逐渐下降($P < 0.05$ 、0.01、0.001);与川陈皮素高质量浓度组相比,川陈皮素+RASAL1组Edu阳性率、细胞侵袭数、划痕愈合率升高($P < 0.001$),见图1~3、表2。

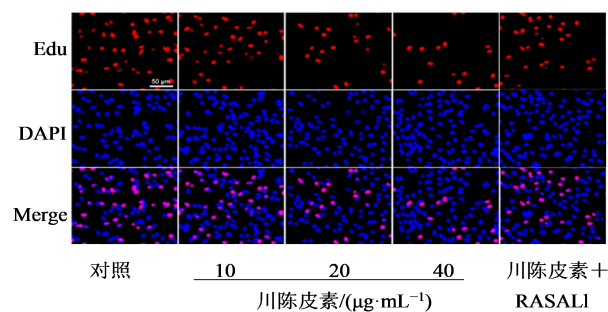


图1 SW480细胞增殖($\times 200$)

Fig. 1 Proliferation of SW480 cell ($\times 200$)

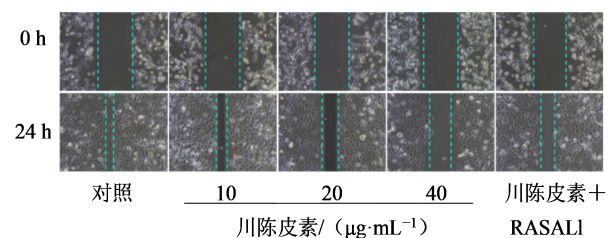


图2 SW480细胞迁移($\times 200$)

Fig. 2 Migration of SW480 cell ($\times 200$)

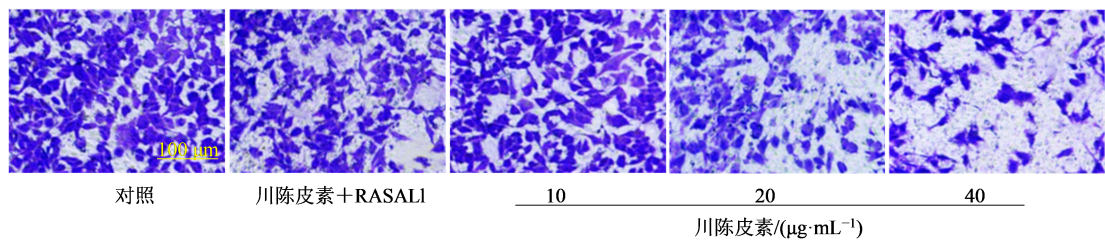


图3 SW480细胞侵袭(×200)
Fig. 3 Invasion of SW480 cell (×200)

表2 川陈皮素对SW480细胞增殖、迁移、侵袭的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Effects of nobiletin on proliferation, migration and invasion of SW480 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Edu 阳性率/%	划痕愈合率/%	细胞侵袭数/个
对照	—	56.75±5.83	86.89±8.95	164.78±17.05
川陈皮素	10	43.62±4.79***	71.36±7.52**	140.36±15.49*
	20	29.24±3.02***###	53.49±5.74***###	114.12±14.72***#
	40	17.98±1.96***###&&&	34.21±3.63***###&&&	75.26±7.90***###&&&
川陈皮素+RASAL1	40+0.002	34.85±3.76△△△	60.13±6.25△△△	120.58±13.29△△△

与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$; 与川陈皮素 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: # $P<0.05$ ### $P<0.001$; 与川陈皮素 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: &&& $P<0.001$; 与川陈皮素 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: △△△ $P<0.001$ 。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ### $P<0.001$ vs nobiletin 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; &&& $P<0.001$ vs nobiletin 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; △△△ $P<0.001$ vs nobiletin 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group.

3.3 川陈皮素对SW480细胞相关蛋白表达的影响

与对照组比较,川陈皮素低、中、高质量浓度组 CDK1、MMP-2、MMP-9 表达水平逐渐下降 ($P<0.001$); 与川陈皮素高质量浓度组相比,川陈皮素 RASAL1 组 CDK1、MMP-2、MMP-9 表达水平升高 ($P<0.001$), 见图4、表3。

3.4 川陈皮素对SW480细胞信号通路的影响

与对照组相比,川陈皮素低、中、高质量浓度组 RAS、RAF、MEK、ERK 蛋白表达依次下调 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001); 与川陈皮素高质量浓度组比较,川陈皮素+RASAL1 组 RAS、RAF、MEK、ERK 表达上调 ($P<0.001$), 见图5、表4。

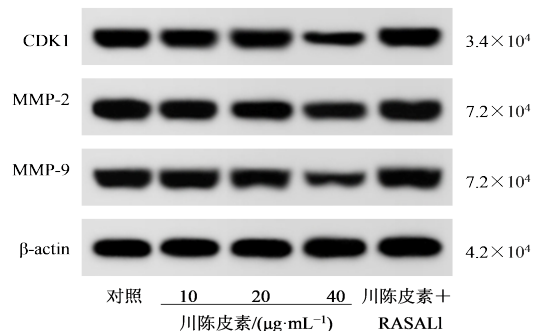


图4 Western blotting 检测 CDK1、MMP-2、MMP-9 蛋白表达

Fig. 4 Expression of CDK1, MMP-2 and MMP-9 protein detected by Western blotting

表3 川陈皮素对SW480细胞CDK1、MMP-2、MMP-9蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of nobiletin on expression of CDK1, MMP-2 and MMP-9 protein in SW480 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	CDK1/ β -actin	MMP-2/ β -actin	MMP-9/ β -actin
对照	—	1.12±0.13	1.25±0.18	1.07±0.19
川陈皮素	10	0.85±0.08***	0.96±0.10***	0.78±0.07***
	20	0.62±0.05***###	0.75±0.07***#	0.56±0.05***##
	40	0.33±0.03***###&&&	0.41±0.04***###&&&	0.24±0.03***###&&&
川陈皮素+RASAL1	40+0.002	0.76±0.07△△△	0.87±0.08△△△	0.66±0.06△△△

与对照组比较: *** $P<0.001$; 与川陈皮素 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$; 与川陈皮素 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: &&& $P<0.001$; 与川陈皮素 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较: △△△ $P<0.001$ 。

*** $P<0.001$ vs control group; # $P<0.05$ ## $P<0.01$ ### $P<0.001$ vs nobiletin 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; &&& $P<0.001$ vs nobiletin 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group; △△△ $P<0.001$ vs nobiletin 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group.

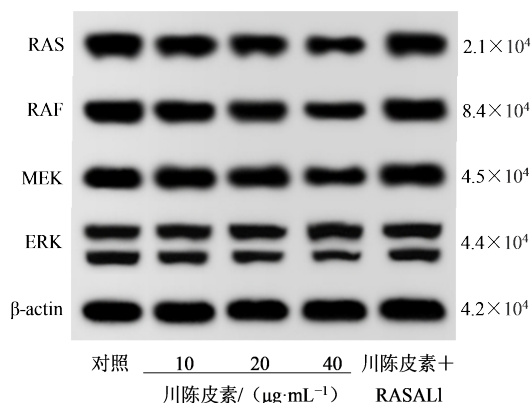


图5 Western blotting检测RAS、RAF、MEK、ERK蛋白表达
Fig. 5 Protein expression of RAS, RAF, MEK and ERK detected by Western blotting

表4 川陈皮素对RAS、RAF、MEK、ERK蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 Effects of nobiletin on expression of RAS, RAF, MEK and ERK protein ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	RAS/ β -actin	RAF/ β -actin	MEK/ β -actin	ERK/ β -actin
对照	—	1.28 $\pm$ 0.25	1.19 $\pm$ 0.23	1.07 $\pm$ 0.16	0.98 $\pm$ 0.12
川陈皮素	10	1.01 $\pm$ 0.16*	0.92 $\pm$ 0.11**	0.85 $\pm$ 0.08**	0.79 $\pm$ 0.07**
	20	0.74 $\pm$ 0.07***#	0.71 $\pm$ 0.07***	0.60 $\pm$ 0.06***###	0.53 $\pm$ 0.05***###
	40	0.50 $\pm$ 0.05***###	0.48 $\pm$ 0.05***###&	0.44 $\pm$ 0.04***###&	0.32 $\pm$ 0.03***###&&
川陈皮素+RASAL1	40+0.002	0.90 $\pm$ 0.09 $\triangle\triangle\triangle$	0.82 $\pm$ 0.08 $\triangle\triangle\triangle$	0.73 $\pm$ 0.07 $\triangle\triangle\triangle$	0.62 $\pm$ 0.06 $\triangle\triangle\triangle$

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与川陈皮素 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较: # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$; 与川陈皮素 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.001$; 与川陈皮素 140 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组比较: $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ### $P < 0.001$ vs nobiletin 10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group; & $P < 0.05$ && $P < 0.001$ vs nobiletin 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group; $\triangle\triangle\triangle P < 0.001$ vs nobiletin 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ group.

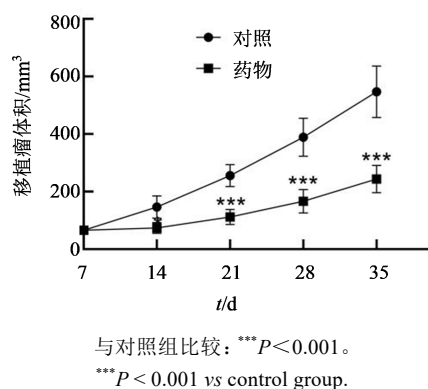


图6 川陈皮素对瘤体积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 6 Effect of nobiletin on tumor volume($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

究,揭示了许多治疗靶点,但治疗效果仍不理想。因此,探索CRC的发病机制和有效药物,对于实施有效的预防措施和改进治疗方法十分重要^[15]。

作为主要的补充和替代药物,中药在我国已有数千年的历史。在癌症治疗中具有靶点多、不良反应小、临床疗效显著等优点。从天然药物中筛选药物是一种可行的捷径。川陈皮素是柑橘叶的主要成分之一,其为聚甲氧基黄酮类成分,由于其甲氧

3.5 川陈皮素对移植瘤的影响

与对照组比较,药物组移植瘤生长速度缓慢,瘤体积减小,瘤质量下降($P < 0.001$),RAS、RAF、MEK、ERK蛋白表达下调($P < 0.001$),见图6、7、表5。

4 讨论

CRC是全球最常见的致命性恶性肿瘤类型之一,发病年龄逐渐减小。近年来,在50岁以下的人群中,发病率和死亡率每年呈上升趋势。目前,我国的CRC发病率也持续上升^[12]。CRC是由结肠和直肠中管状腺瘤和锯齿状息肉逐渐演变而来的,约20%的CRC患者在诊断时表现为远处转移,预后不良,死亡率高^[13-14]。随着对CRC发病机制的深入研

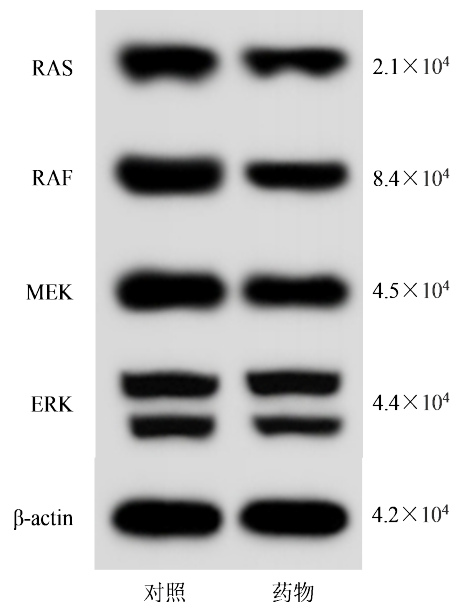


图7 移植瘤中RAS、RAF、MEK、ERK蛋白表达

Fig. 7 Expression of RAS, RAF, MEK and ERK protein in transplanted tumor

基较多,有高脂肪溶解度,除了从柑橘叶中分离川陈皮素外,柑橘果皮中也存在少量川陈皮素。川陈

表5 川陈皮素对移植瘤的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)
Table 5 Effect of nobiletin on transplanted tumor ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	移植瘤质量/g	移植瘤体积/mm ³	RAS/ β -actin	RAF/ β -actin	MEK/ β -actin	ERK/ β -actin
对照	0.85 $\pm$ 0.16	546.78 $\pm$ 89.36	0.76 $\pm$ 0.09	0.85 $\pm$ 0.09	0.96 $\pm$ 0.13	0.80 $\pm$ 0.08
药物	0.37 $\pm$ 0.04***	243.52 $\pm$ 47.81***	0.32 $\pm$ 0.03***	0.43 $\pm$ 0.04***	0.52 $\pm$ 0.05***	0.39 $\pm$ 0.04***

与对照组比较:*** $P < 0.001$ 。*** $P < 0.001$ vs control group.

皮素具有广泛的药理作用,包括抗炎、抗病毒、抑制氧化应激、抗动脉粥样硬化、神经保护、抗痴呆、缓解缺血再灌注损伤和抗糖尿病,且川陈皮素在肿瘤治疗中也发挥十分重要的作用,包括鼻咽癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、CRC、肝癌、前列腺癌、卵巢癌等。其可以抑制肿瘤细胞的生长和增殖,可以通过抑制上皮间质转化(EMT)和血管生成来抑制肿瘤细胞侵袭和迁移,调节肿瘤细胞周期以阻断G₁期,并且诱导细胞凋亡^[16]。Turdo等^[17]研究证实,川陈皮素和其他药物组合降低了CRC干细胞(CR-CSC)的细胞活力,并与5-氟尿嘧啶和奥沙利铂(FOX)化疗具协同作用,调节细胞周期的S和G₂/M期减少,上调细胞凋亡相关基因表达,增加CR-CSC化疗的敏感性。研究报道,川陈皮素通过调节miR-200b/JAZF1轴诱导乳腺癌细胞凋亡和细胞焦亡,川陈皮素可能是治疗乳腺癌的新药物^[18]。本研究中,通过对川陈皮素进行浓度筛选,使用10、20、40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的川陈皮素对直肠癌细胞进行处理,发现SW480细胞的Edu阳性率、侵袭数、划痕愈合率呈浓度依赖性降低,同时相关蛋白CDK1、MMP-2、MMP-9的表达水平呈下降趋势,推测川陈皮素能够对直肠癌细胞的增殖、迁移、侵袭发挥抑制作用,在直肠癌中具有抗肿瘤作用。研究发现,川陈皮素可以通过抑制Akt信号传导和血管生成来预防CRC进展^[19]。本研究结果与此研究一致,说明川陈皮素能够抑制直肠癌肿瘤进展。

丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路,又称RAS/RAF/MEK/ERK信号通路。MAPK通路在肿瘤发生中起主要作用,MAPK通路是一种生长因子通路,参与细胞增殖、分化、发育、转化和凋亡。MAPK通路被激活的作用机制是通过配体与膜受体的细胞外结构域的结合,启动典型的MAPK信号级联反应,包括RAS蛋白、RAF蛋白、MEK1/2激酶的磷酸化,ERK蛋白,ERK蛋白同时具有细胞质和核作用。蛋白质将易位到细胞核中控制转录因子,这些转录因子调节参与细胞增殖和分化过程中基因的转录^[20]。RAS/RAF/MEK/ERK通路的刺激可增强癌

细胞的生长、存活和代谢。RAS/RAF/MEK/ERK信号通路已被确定为治疗癌症有希望的靶点^[21]。许多研究证明了RAS/RAF/MEK/ERK是CRC潜在的治疗靶点,比如Wang等^[22]研究报道,FOXD3基因的下调可能通过RAS/RAF/MEK/ERK通路促进CRC骨转移细胞系的增殖,并通过EMT促进其迁移,是一个潜在的治疗靶点;Kan等^[23]研究报道,DKC1调节的RP还与HRAS相互作用并抑制RAS/RAF/MEK/ERK通路抑制CRC细胞的生长;Qian等^[24]研究中证实了,钠通道亚基SCNN1B通过抑制RAS/RAF/MEK/ERK级联反应来抑制CRC。本研究通过使用川陈皮素浓度梯度处理直肠癌细胞,发现MAPK通路蛋白RAS、RAF、MEK、ERK表达均下调,并且呈浓度相关性,推测川陈皮素可以抑制RAS/RAF/MEK/ERK通路蛋白表达,抑制RAS/RAF/MEK/ERK通路的激活,为了进行回复验证,本研究用RAS激活剂RASAL1与高浓度的川陈皮素共同处理直肠癌细胞,发现逆转了川陈皮素对直肠癌细胞的抑制作用,进一步证明了川陈皮素可能通过调控RAS/RAF/MEK/ERK信号通路抑制直肠癌细胞的增殖、迁移与侵袭。本研究还进行了裸鼠体内实验,构建移植瘤模型,发现通过川陈皮素处理后的小鼠,其体内移植瘤的生长速度减慢,进一步分析发现,小鼠瘤体积和瘤质量均降低,同时RAS、RAF、MEK、ERK蛋白表达水平降低,这一结果说明了川陈皮素能够抑制直肠癌肿瘤生长,并且可能是抑制RAS/RAF/MEK/ERK信号通路激活实现。

综上,川陈皮素可通过调节RAS/RAF/MEK/ERK信号通路抑制直肠癌细胞的恶性行为。但是否存在其他信号通路从而间接参与直肠癌的调控,或者在信号转导过程中是否与其他通路进行相互作用仍未可知,需要进一步研究证明。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Qin P F, Chen H X, Wang Y H, et al. Cancer-associated fibroblasts undergoing neoadjuvant chemotherapy suppress rectal cancer revealed by single-cell and spatial

- transcriptomics [J]. Cell Rep Med, 2023, 4(10): 101231.
- [2] Lin Z Y, Cai M, Zhang P, et al. Phase II, single-arm trial of preoperative short-course radiotherapy followed by chemotherapy and camrelizumab in locally advanced rectal cancer [J]. J Immunother Cancer, 2021, 9(11): e003554.
 - [3] Zhu L L, Wang M J, Chen N, et al. Mechanisms of microRNA action in rectal cancer radiotherapy [J]. Chin Med J, 2022, 135(17): 2017-2025.
 - [4] 刘宏, 李佳, 林俊芝, 等. 植物精油及其活性成分防治结直肠癌作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(3): 956-965.
 - [4] Liu H, Li J, Lin J Z, et al. Research progress on mechanism of plant essential oils and their active components against colorectal cancer [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(3): 956-965.
 - [5] Moazamiyanfar R, Rezaei S, AliAshrafzadeh H, et al. Nobiletin in cancer therapy; Mechanisms and therapy perspectives [J]. Curr Pharm Des, 2023, 29(22): 1713-1728.
 - [6] Han S H, Han J H, Chun W J, et al. Nobiletin inhibits non-small-cell lung cancer by inactivating WNT/ β -catenin signaling through downregulating miR-15-5p [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 7782963.
 - [7] Chen M L, Zhang R J, Chen Y L, et al. Nobiletin inhibits *de novo* FA synthesis to alleviate gastric cancer progression by regulating endoplasmic reticulum stress [J]. Phytomedicine, 2023, 116: 154902.
 - [8] Jafari M, Laraqui A, Baba W, et al. Prevalence and patterns of mutations in RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK signaling pathway in colorectal cancer in North Africa [J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 1142.
 - [9] Li X, Wang N, Wu Y T, et al. ALDH6A1 weakens the progression of colon cancer *via* modulating the RAS/RAF/MEK/ERK pathway in cancer cell lines [J]. Gene, 2022, 842: 146757.
 - [10] 杨西国, 杨西霞, 朱婷, 等. 穗花杉双黄酮对鼻咽癌细胞恶性生物学行为的影响 [J]. 中国临床药理学杂志, 2023, 39(21): 3111-3115.
 - [10] Yang X G, Yang X X, Zhu T, et al. Impacts of amentoflavone on the malignant biological behavior of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2023, 39(21): 3111-3115.
 - [11] Wei D, Zhang G, Zhu Z, et al. Nobiletin inhibits cell viability *via* the SRC/AKT/STAT3/YY1AP1 pathway in human renal carcinoma cells [J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 690.
 - [12] Tan G, Huang C Y, Chen J Y, et al. HMGB1 released from GSDME-mediated pyroptotic epithelial cells participates in the tumorigenesis of colitis-associated colorectal cancer through the ERK1/2 pathway [J]. J Hematol Oncol, 2020, 13(1): 149.
 - [13] Singh J, Rajesh N G, Dubashi B, et al. Pattern of expression of CDX2 in colorectal cancer and its role in prognosis [J]. J Cancer Res Ther, 2022, 18(Supplement): S420-S427.
 - [14] Gong D M, Adomako-Bonsu A G, Wang M J, et al. Three specific gut bacteria in the occurrence and development of colorectal cancer: A concerted effort [J]. PeerJ, 2023, 11: e15777.
 - [15] Yin L, Tang Y, Xiao M, et al. The role of histone chaperone spt2d1 in human colorectal cancer [J]. Mol Cell Probes, 2022, 64: 101832.
 - [16] Wu Y, Cheng C S, Li Q, et al. The application of *Citrus folium* in breast cancer and the mechanism of its main component nobiletin: A systematic review [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2021, 2021: 2847466.
 - [17] Turdo A, Glaviano A, Pepe G, et al. Nobiletin and xanthohumol sensitize colorectal cancer stem cells to standard chemotherapy [J]. Cancers, 2021, 13(16): 3927.
 - [18] Wang J G, Jian W J, Li Y, et al. Nobiletin promotes the pyroptosis of breast cancer *via* regulation of miR-200b/JAZF1 axis [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2021, 37(7): 572-582.
 - [19] Kisacem M A. Nobiletin is capable of regulating certain anti-cancer pathways in a colon cancer cell line [J]. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol, 2023, 396(3): 547-555.
 - [20] Hendrikse C S E, Theelen P M M, van der Ploeg P, et al. The potential of RAS/RAF/MEK/ERK (MAPK) signaling pathway inhibitors in ovarian cancer: A systematic review and Meta-analysis [J]. Gynecol Oncol, 2023, 171: 83-94.
 - [21] Asati V, Mahapatra D K, Bharti S K. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: Structural and pharmacological perspectives [J]. Eur J Med Chem, 2016, 109: 314-341.
 - [22] Wang K W, Chu Y, Zhang H Q, et al. *FOX D3* suppresses the proliferation of CRC bone metastatic cells *via* the ras/raf/MEK/ERK signaling pathway [J]. Comb Chem High Throughput Screen, 2024, 27(3): 436-445.
 - [23] Kan G Y, Wang Z Y, Sheng C J, et al. Dual inhibition of DKC1 and MEK1/2 synergistically restrains the growth of colorectal cancer cells [J]. Adv Sci, 2021, 8(10): 2004344.
 - [24] Qian Y, Zhou L X, Luk S T Y, et al. The sodium channel subunit SCNN1B suppresses colorectal cancer *via* suppression of active c-Raf and MAPK signaling cascade [J]. Oncogene, 2023, 42(8): 601-612.