

【 实验研究 】

粗糠柴苦素通过自噬调控诱导人结肠癌 HCT116 细胞凋亡的机制研究

梅潇芃, 朱启典, 余丽双, 林 晓, 郭如欣, 陈 莉*

福建中医药大学 药学院, 福建 福州 350122

摘要: 目的 探讨粗糠柴苦素 (RL) 对人结肠癌 HCT116 细胞自噬和凋亡水平的影响, 揭示其潜在的抗肿瘤机制。方法 采用体外培养的 HCT116 细胞, 设置对照组和不同浓度的 RL (3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组。通过 CCK-8 法检测细胞存活率; 通过流式细胞术分析细胞周期和凋亡率; 通过 Western blotting 法检测细胞自噬相关蛋白的表达水平。设置对照组和不同时间 (3、6、12、24 h) 的 RL (12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组, 通过 Western blotting 法检测细胞自噬相关蛋白与凋亡相关蛋白的表达水平; 通过透射电镜检测细胞自噬小体、自噬溶酶体、凋亡小体。进一步设置对照组、RL (12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、3-甲基腺嘌呤 (3-MA, 自噬起始阶段抑制剂, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、RL (12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + 3-MA (5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 以及对照组、RL (12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、氯喹 (CQ, 自噬晚期抑制剂, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组、RL (12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + CQ (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 通过 Western blotting 法检测自噬相关蛋白与凋亡相关蛋白的表达水平; 通过流式细胞术分析细胞凋亡率。结果 CCK-8 法结果显示, 与对照组相比, RL 能够显著抑制 HCT116 细胞的存活率 ($P < 0.01$)。流式细胞术结果显示, RL 能够显著增加细胞 S 期比例和细胞凋亡率 ($P < 0.05$ 、0.01)。Western blotting 结果显示, RL 能够显著提高细胞中 LC3II/LC3I、cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值和 Atg5、p62、Caspase-3 的蛋白水平 ($P < 0.05$ 、0.01), 同时显著降低 Beclin-1、Bcl-2 的蛋白水平 ($P < 0.05$ 、0.01)。透射电镜结果显示, RL 能够显著增加细胞自噬小体、自噬溶酶体、凋亡小体的数量。联合自噬抑制剂的实验中, 联用 3-MA 能够逆转 RL 单独处理对自噬、凋亡蛋白的影响 ($P < 0.05$ 、0.01), 同时其能够逆转 RL 单独处理对细胞凋亡率的显著增加作用 ($P < 0.01$); 而联用 CQ 则进一步增强 RL 单独处理的上述效应 ($P < 0.05$ 、0.01)。结论 RL 通过诱导 HCT116 细胞自噬体生成的同时抑制其降解, 破坏自噬稳态诱导细胞凋亡, 发挥抗肿瘤作用。

关键词: 粗糠柴苦素; HCT116 细胞; 结肠癌; 自噬; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2025)11-3049-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.11.001

Mechanism insights into rottlerin-induced apoptosis in human colon cancer HCT116 cells via autophagy modulation

MEI Xiaopeng, ZHU Qidian, YU Lishuang, LIN Xiao, GUO Ruxin, CHEN Li

College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China

Abstract: Objective To explore the effects of rottlerin (RL) on the autophagy and apoptosis levels of human colon cancer HCT116 cells, and to reveal its potential anti-tumor mechanism. **Methods** HCT116 cells were cultured *in vitro*, and divided into a blank group and groups treated with RL at increasing concentrations (3.125, 6.250, 12.500, 25.000, 50.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Then the cell viability was measured by CCK-8 assay; Cell cycle distribution and apoptosis rate were analyzed by flow cytometry; Cell autophagy-related proteins were assessed by Western blotting. Blank groups and RL treated groups (12.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) at different times (3, 6, 12, 24 h) were set up, and the expression of cell autophagy-related proteins and apoptosis-related proteins were assessed by Western blotting levels; Detection of cellular autophagic vesicles, autophagic lysosomes and apoptotic vesicles by transmission electron microscopy. Additional groups included: blank control, RL alone, 3-methyladenine (3-MA, 5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) / chloroquine (CQ, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) alone, RL combined with 3-MA (5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) or CQ (20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Autophagy-related proteins and apoptosis-related proteins were assessed by Western blotting, while the apoptosis rate was analyzed by flow cytometry. **Results** The CCK-8 assay showed that RL dose-dependently

收稿日期: 2025-06-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903855); 福建省自然科学基金项目 (2023J01860); 福建省科技厅项目 (2024J01130, 2024Y9510)

作者简介: 梅潇芃, 男, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤药理。E-mail: 504238445@qq.com

*通信作者: 陈 莉, 女, 副教授, 研究方向为肿瘤药理。E-mail: 2004007@fjtc.edu.cn

inhibited cell viability of HCT116 cells ($P < 0.05, 0.01$). Flow cytometry revealed that RL induced S phase arrest and significantly increased the rate of cellular apoptosis ($P < 0.05, 0.01$). Western blotting analysis showed that RL treatment significantly increased the LC3II/I ratio and upregulated the levels of Atg5, p62, Caspase3 and its cleaved form ($P < 0.05, 0.01$), while suppressing Beclin-1 and Bcl-2 proteins ($P < 0.05, 0.01$). Transmission electron microscopy results showed that RL significantly increased the number of cellular autophagic vesicles, autophagic lysosomes and apoptotic vesicles. In experiments with combined autophagy inhibitors, 3-MA co-treatment was able to reverse the effects of RL alone on autophagy and apoptosis proteins ($P < 0.05, 0.01$). Additionally, it was able to reverse the significant increase in the rate of cellular apoptosis by RL alone ($P < 0.01$). In contrast, CQ synergistically enhanced these effects of RL treatment alone ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** RL induces autophagy in HCT116 cells while inhibiting its degradation, disrupting autophagy homeostasis and inducing apoptosis, thereby exerting an antitumor effect.

Key words: rottlerin; HCT116 cells; colon cancer; autophagy; apoptosis

结肠癌是一种常见的消化道恶性肿瘤,其全球范围内的发病率与死亡率分别位居第 3 位与第 2 位^[1]。目前,结肠癌的主要治疗手段包括手术、化疗、放疗和免疫治疗^[2]。然而,由于结肠癌早期症状不明显,且晚期具有高侵袭性与高转移性,传统治疗手段难以彻底根治其病灶。因此,深入探究结肠癌发生、发展的分子机制,开发新的治疗策略尤为迫切^[3]。

自噬是一种关键的细胞内稳态调节机制,通过将细胞内的损伤或老化组分传递至溶酶体进行降解和再循环,从而维持细胞的稳态和功能^[4]。自噬在肿瘤进程中具有双重作用:在肿瘤形成的早期阶段,自噬作为一种细胞自我更新机制,能抑制肿瘤的发生和发展;而在肿瘤形成的晚期阶段,自噬则有助于维持肿瘤细胞的生存和稳态。此时,过度激活的自噬可诱导肿瘤细胞的自噬性死亡,从而抑制肿瘤的进一步发展^[5]。

粗糠柴 *Mallotus philippensis* (Lamarck) Müll. Arg. 为大戟科植物,是一种常见的多年生灌木或小乔木^[6]。粗糠柴苦素 (RL) 是从粗糠柴果实的腺毛及茸毛中提取的一种天然化合物,又称楸毒素,呈橙红色粉末状,具有一定抗肿瘤作用^[7]。然而,目前国内外关于 RL 在结肠癌细胞中如何调控自噬水平诱导凋亡的具体机制尚未见报道。本研究采用体外培养的 HCT116 细胞,通过 CCK-8 法、流式细胞术、Western blotting 法检测相关指标,从而阐明 RL 对结肠癌细胞自噬、凋亡水平的影响;通过联用 3-甲基腺嘌呤 (3-MA, 自噬起始阶段抑制剂)、氯喹 (CQ, 自噬晚期抑制剂) 2 种自噬抑制剂,进一步阐明 RL 通过自噬调控诱导结肠癌细胞凋亡的潜在机制,以期对结肠癌的临床治疗及新药开发提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 细胞

人结肠癌 (HCT116) 细胞由福建中医药大学药

学院陈燕老师赠予; 鼠结肠癌 (CT26) 细胞购自武汉普诺塞生物有限公司。

1.2 试剂

RL、3-MA (批号 HS4563W2、HG3173W1, 质量分数 $\geq 98\%$, 宝鸡市生物科技有限公司); CQ (批号 PSD240902-308-10 mg, 质量分数 $\geq 99\%$, 成都普思生物科技股份有限公司); 细胞 RPMI 1640 培养基 (批号 6124609, 美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (批号 2418299, 德国 Vivacell 公司); CCK-8 试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒 (批号 MA0218-Feb-28I、MA0220-1-Dec-30J、A501411, 大连美仑生物技术有限公司); 电镜固定液 (批号 1260712, 北京聚合美生物科技有限公司); 抗体微管相关蛋白轻链 3 (LC3I)、LC3II、p62、自噬相关蛋白 5 同源物 (Atg5)、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、半胱天冬酶-3 (Caspase-3)、cleaved Caspase-3 (货号 12741S、5114T、12994T、15071S、9662S、9664T, 美国 Cell Signaling Technology 公司); Bcl-2 同源结构域蛋白 (Beclin-1, 批号 B0116, 美国 Santa cruz biotechnology 公司); 内参 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (批号 BF2811A, 英国 Cohesion Biosciences 公司)。

1.3 仪器

INFINITE E PLEX 多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); Mini PROTEAN Tetra Cell 电泳仪、小型槽式转印系统 (美国 Bio-Rad 公司); AMERSHAM IMAGEQUANT 800 化学发光成像仪 (美国 GE 公司); NovoCyte 3000 流式细胞仪 (美国安捷伦公司); HT7800 透射电镜显微镜 (日本 Hitachi 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

将 HCT116 细胞与 CT26 细胞在含 10% 胎牛血清

的 RPMI 1640 培养基中培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中, 定期使用胰酶进行消化传代。

2.2 CCK-8 法检测细胞活力

将处于对数生长期的 HCT116 细胞与 CT26 细胞消化计数, 以每孔 1×10^4 个的密度接种于 96 孔板中, 置于培养箱中过夜培养。次日, 将细胞分为对照组和 RL (3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 分别培养 24、48 h 后, 去除药液, 每孔加入 100 μL 的 10% CCK-8 工作液, 再于培养箱中培养 1 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长下检测每孔的吸光度 (A) 值, 计算细胞存活率。

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

2.3 流式细胞术检测细胞周期、凋亡

将处于对数生长期的 HCT116 细胞用不含 EDTA 的胰酶消化, 细胞计数后以每孔 2×10^5 个的密度接种于 12 孔板中, 置于培养箱中过夜培养。次日, 去除原培养基, 将细胞分为对照组和 RL (3.125、6.250、12.500、25.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 在含 1% 血清的培养基中培养 24 h, 去除药液后, 根据细胞周期和凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 上机检测细胞周期和凋亡率。

同上述方法将细胞进一步分为对照组、RL (12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、3-MA (5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、RL (12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + 3-MA (5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 以及对照组、RL (12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、CQ (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组、RL (12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + CQ (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 在含 1% 血清的培养基中培养 24 h, 去除药液后, 根据细胞凋亡检测试剂盒说明书进行操作, 上机检测细胞凋亡率。

2.4 电镜检测细胞自噬小体、自噬溶酶体、凋亡小体

将处于对数生长期的 HCT116 细胞用胰酶消化, 细胞计数后以每孔 6×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 置于培养箱中过夜培养。次日, 去除原培养基, 将细胞分为对照组和不同时间 (3、6、12、24 h) 的 RL (12.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 去除药液后, 离心收集细胞, 加入常温 2.5% 戊二醛固定液, 室温固定 1 h 后送检, 观察细胞自噬小体、自噬溶酶体、凋亡小体。

2.5 Western blotting 法检测细胞蛋白水平

将处于对数生长期的 HCT116 细胞用胰酶消化, 细胞计数后以每孔 6×10^5 个的密度接种于 6 孔板中, 置于培养箱中过夜培养。次日, 去除原培养基, 将细胞分别按“2.3”“2.4”项分组给药, 去除

药液后, 用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白。

根据 BCA 试剂盒说明书计算各蛋白样品的浓度, 加入 $5 \times$ 蛋白上样缓冲液后, 于 100 °C 变性 10 min。根据蛋白浓度进行定量后, 进行十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 并将蛋白转膜至聚偏氟乙烯 (PVDF) 膜, 使用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 加入对应一抗于 4 °C 孵育过夜。次日, 用 TBST 缓冲液洗膜 (10 min $\times$ 3 次), 室温孵育对应二抗 1.5 h, 再用 TBST 缓冲液洗膜 (10 min $\times$ 3 次), 上机显影并使用 Imagine Lab 软件分析条带灰度值。

2.6 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学分析采用 SPSS 27.0 软件进行, 当数据符合正态性分布时, 组间比较采用单因素方差分析; 当各组数据不符合正态性分布时, 采用非参数检验。

3 结果

3.1 不同浓度的 RL 对结肠癌细胞存活率的影响

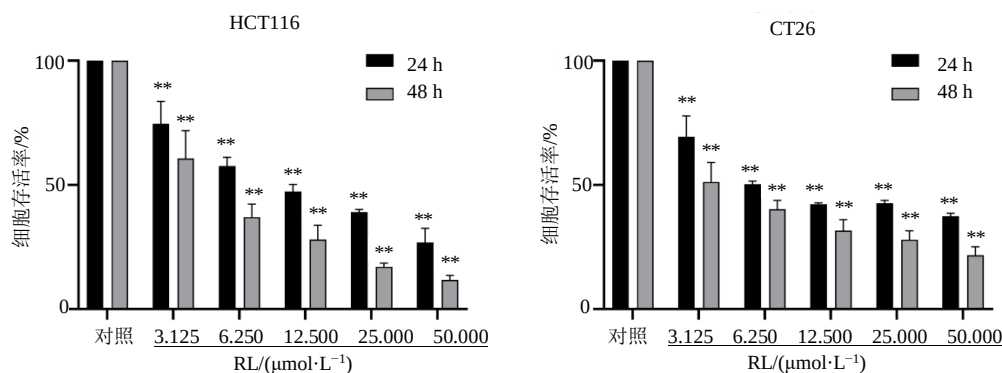
与对照组相比, 处理 24、48 h 后, 3.125、6.250、12.500、25.000、50.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 RL 能够显著降低 HCT116 与 CT26 细胞的存活率 ($P < 0.01$), 见图 1。其中对 HCT116 细胞 24 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 $(11.62 \pm 1.56) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h 的 IC_{50} 为 $(4.39 \pm 1.55) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; 对 CT26 细胞 24 h 的 IC_{50} 为 $(10.25 \pm 2.38) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 48 h 的 IC_{50} 为 $(3.18 \pm 1.74) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。因中、低浓度 (3.125、6.250、12.500、25.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 RL 均能显著降低 HCT116 细胞存活率, 故选择上述剂量进行后续实验。

3.2 不同浓度的 RL 对 HCT116 细胞周期、凋亡率的影响

如图 2 所示, 与对照组相比, HCT116 细胞经不同浓度 RL 处理 24 h 后, 12.500、25.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RL 能够显著增加 S 期细胞的比例 ($P < 0.01$), 将细胞阻滞于 S 期; 6.125、12.500、25.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 RL 能够显著增加细胞凋亡率 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.3 不同浓度的 RL 对 HCT116 细胞中自噬相关蛋白水平的影响

与对照组相比, HCT116 细胞经不同浓度的 RL 处理 24 h 后, 6.25、12.50、25.00 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RL 能显著增加细胞中 p62、Atg5 蛋白的水平 ($P < 0.05$ 、0.01); 12.500、25.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 RL 能显著增加细胞 LC3 II/LC3I 比值 ($P < 0.05$ 、0.01), 并显著降低细胞中 Beclin-1 蛋白的水平 ($P < 0.05$)。见图 3。

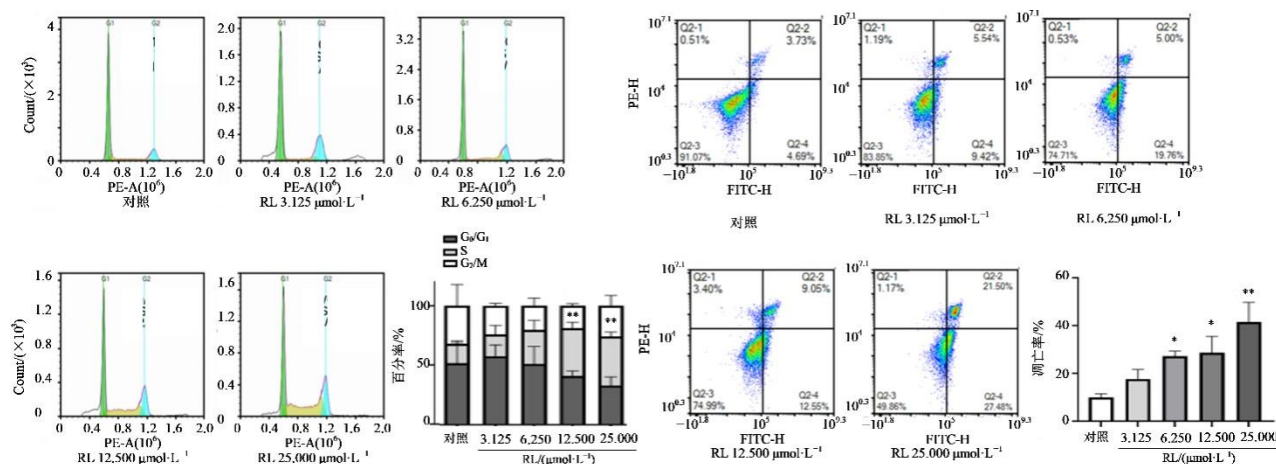


与对照组比较: ** $P < 0.01$ 。

** $P < 0.01$ vs control group.

图 1 RL 对结肠癌细胞增殖活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 1 Effect of RL on proliferative viability of colon cancer cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

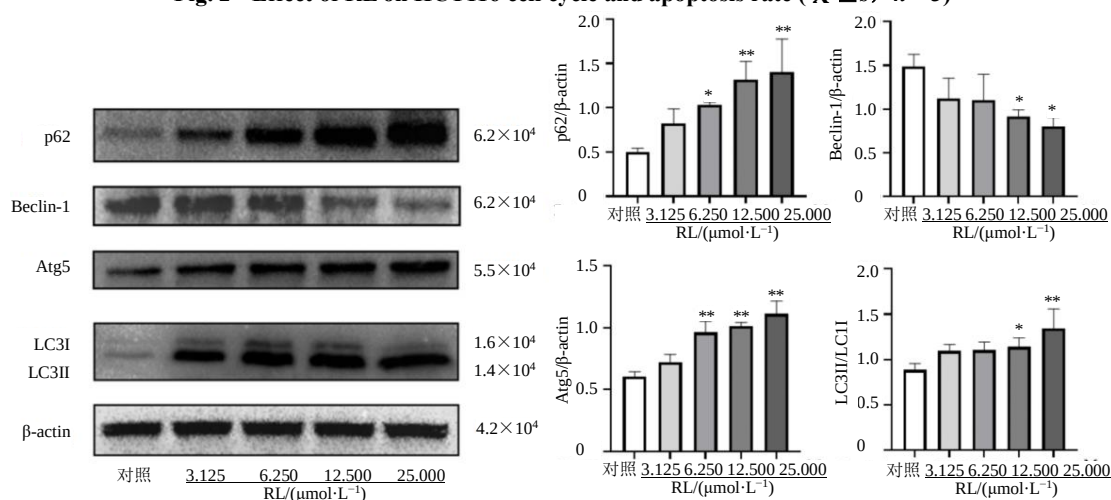


与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 2 RL 对 HCT116 细胞周期、凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 2 Effect of RL on HCT116 cell cycle and apoptosis rate ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ 。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group.

图 3 不同浓度的 RL 对 HCT116 细胞中自噬相关蛋白水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 3 Effects of different concentrations of RL on autophagy-related protein levels in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

因 12.500、25.000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 RL 均能显著调控细胞自噬相关蛋白, 故后续选择 12.500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 RL 进行实验。

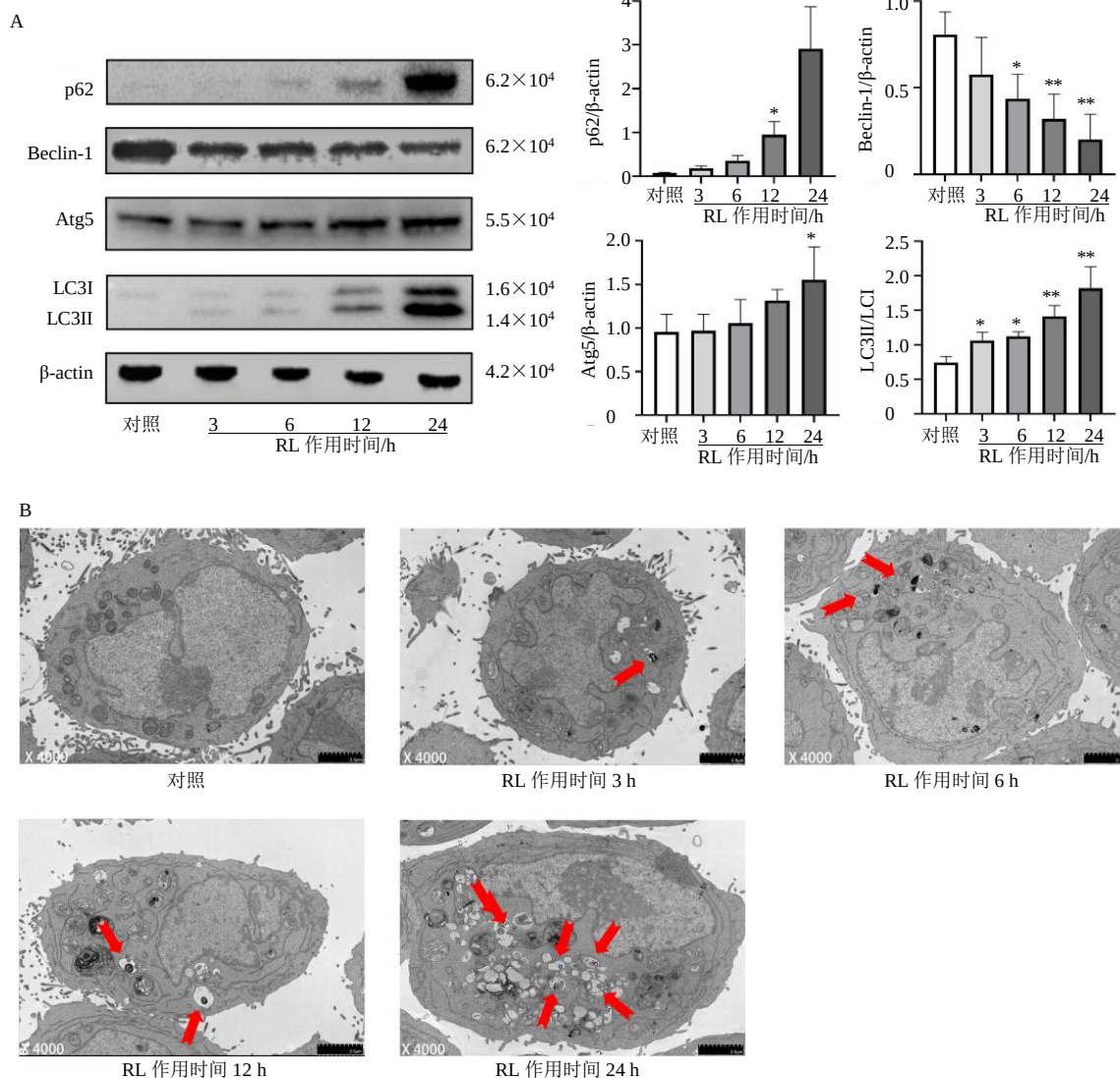
3.4 RL 作用不同时间对 HCT116 细胞自噬的影响

与对照组相比, 经不同时间的 RL (12.500 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理后, RL 作用 3、6、12、24 h 能显著增加细胞中 LC3II/LC3I 比值 ($P<0.05$ 、0.01); 作用 6、12、24 h 的 RL 能显著降低细胞中 Beclin-1 的蛋白水平 ($P<0.05$ 、0.01); 12、24 h 的 RL 能显著增加细胞中 p62 的蛋白水平 ($P<0.05$ 、0.01); 24 h 的 RL 能显著增加细胞中 Atg5 的蛋白水平 ($P<0.05$), 见图

4-A。与对照组相比, 作用 6、12、24 h 的 RL 能明显增加细胞中自噬小体与自噬溶酶体的数量, 见图 4-B。

3.5 RL 作用不同时间对 HCT116 细胞凋亡的影响

与对照组相比, RL 作用 6、12、24 h 能显著增加细胞中 Caspase-3 的蛋白水平 ($P<0.05$ 、0.01); 作用 12、24 h 的 RL 能显著增加细胞中 cleaved Caspase-3/Caspase-3 值的同时显著降低细胞 Bcl-2 的蛋白水平 ($P<0.05$ 、0.01), 见图 5-A。与对照组相比, 作用 12、24 h 的 RL 能明显增加细胞中凋亡小体的数量, 见图 5-B。

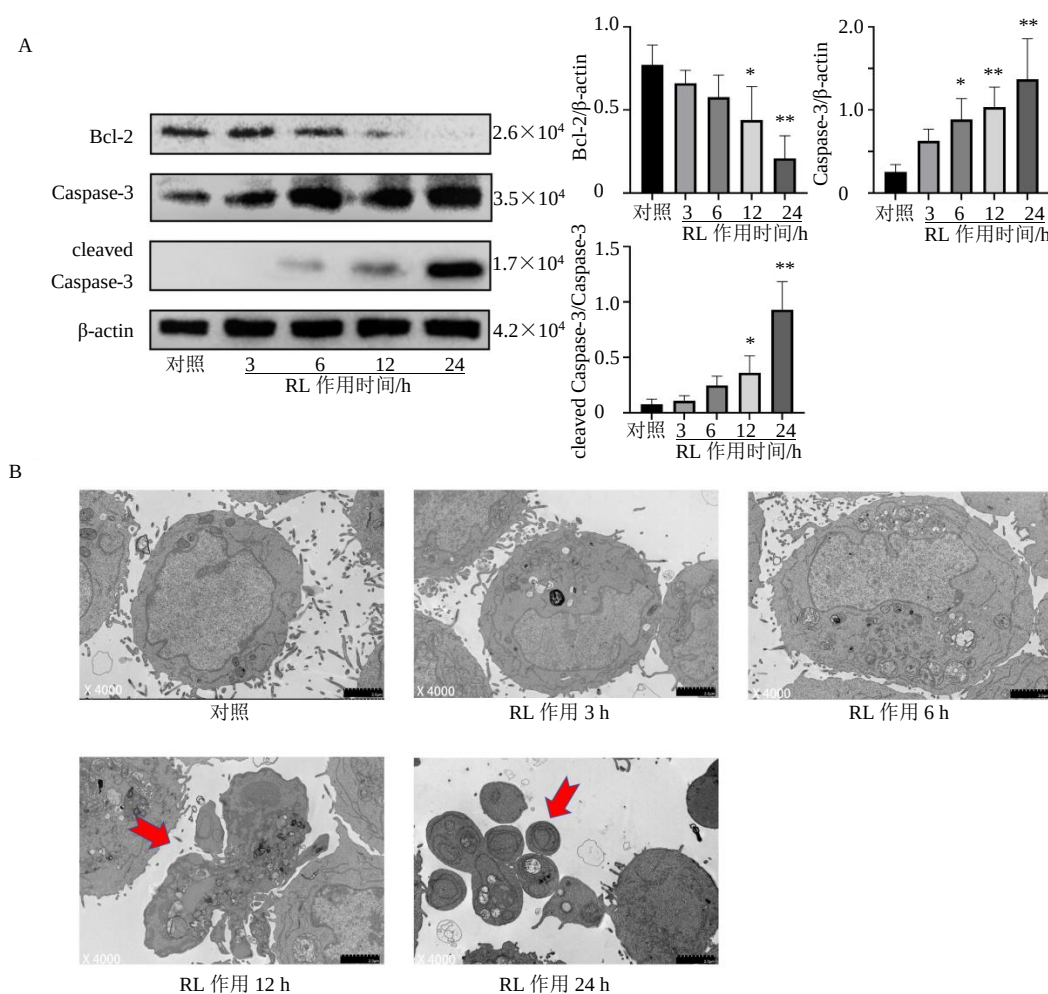


与对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 红色箭头-自噬小体、自噬溶酶体。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs control group; Red arrows-autophagosomes, autophagolysosomes.

图 4 RL 作用不同时间对 HCT116 细胞中自噬相关蛋白表达 (A) 及自噬小体、自噬溶酶体 (B, $\times 4\ 000$) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 4 Effects of RL at different times on expression of autophagy-related proteins (A) and autophagosomes, autophagic lysosomes (B, $\times 4\ 000$) in HCT116 cell ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 红色箭头-凋亡小体。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; Red arrows-apoptotic bodies.

图 5 不同时间的 RL 对 HCT116 细胞中凋亡相关蛋白 (A) 及凋亡小体 (B, $\times 4\ 000$) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 5 Effects of RL at different times on apoptosis-related proteins (A) and apoptotic bodies (B, $\times 4\ 000$) in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 3-MA 与 RL 联用对 HCT116 细胞自噬、凋亡的影响

如图 6 所示, 与 RL 组相比, 联用 3-MA 后细胞中 LC3II 蛋白水平降低, 且 LC3II/LC3I 比值显著降低 ($P < 0.05$); Caspase-3 蛋白的水平与 cleaved Caspase-3/Caspase-3 值显著降低 ($P < 0.05$), Bcl-2 蛋白的水平则显著增加 ($P < 0.01$)。与 RL 组相比, 联用 3-MA 后细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$)。

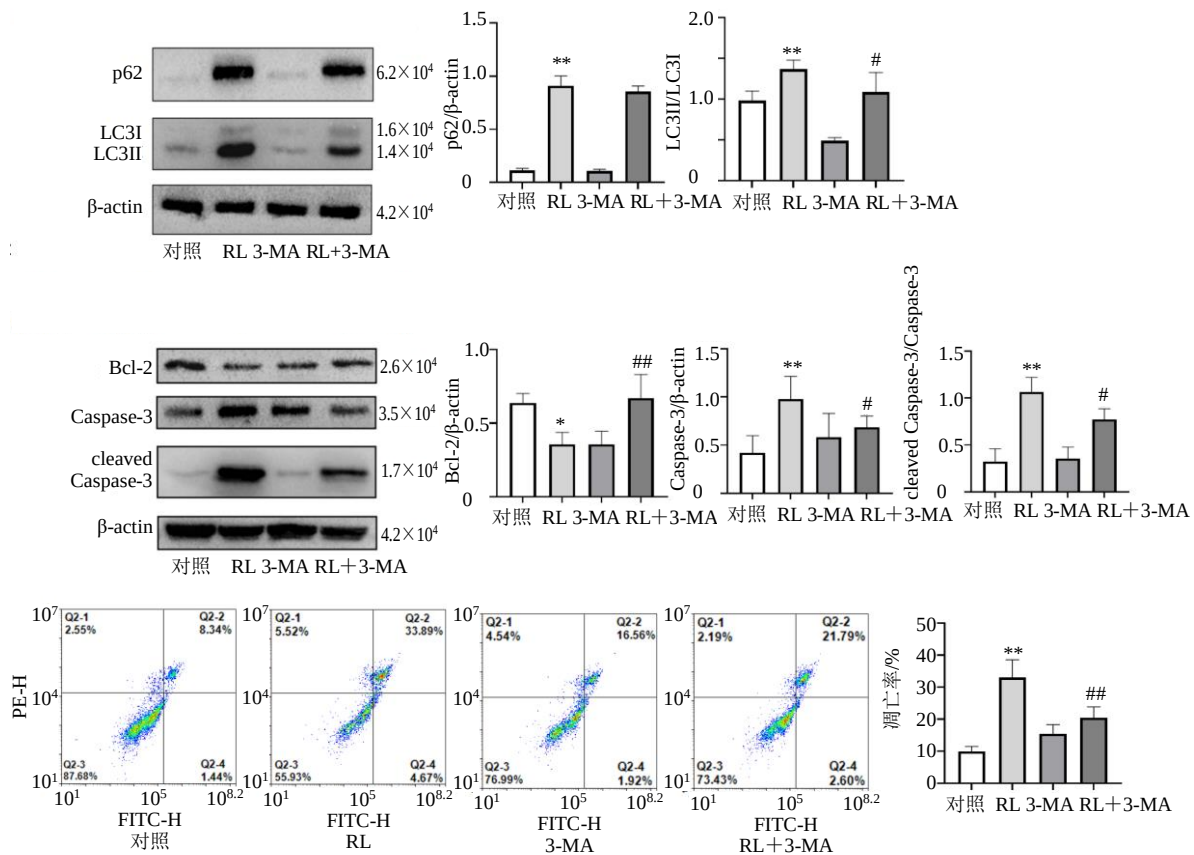
3.7 CQ 与 RL 联用对 HCT116 细胞自噬、凋亡的影响

如图 7 所示, 与 RL 组相比, 联用 CQ 后细胞中 LC3II/LC3I 比值均显著增加 ($P < 0.05$), 同时 p62 蛋白的水平也显著增加 ($P < 0.01$)。与 RL 组相比, 联用 CQ 后细胞中 Caspase-3 蛋白的水平与 cleaved

Caspase-3/Caspase-3 值显著增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), Bcl-2 蛋白的水平显著降低 ($P < 0.05$)。与 RL 组相比, 联用 CQ 后细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.01$)。

4 讨论

本研究采用 CCK-8 实验评估了 RL 对人结肠癌 HCT116 细胞与鼠结肠癌 CT26 细胞存活率的影响, 结果显示药物处理后细胞的存活率显著降低。流式细胞术结果显示, RL 能够显著增加 HCT116 细胞中 S 期的比例, 并促进细胞凋亡; 同时电镜结果显示 RL 能够显著增加 HCT116 细胞中凋亡小体的数量。Bcl-2 是一种细胞抗凋亡蛋白; Caspase-3 在细胞凋亡的过程中发挥着关键的执行功能, 其在细胞中以无活性的前体形式存在, 当细胞接收到凋亡信号时将被切割形成 cleaved Caspase-3 的活性形



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

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs RL group.

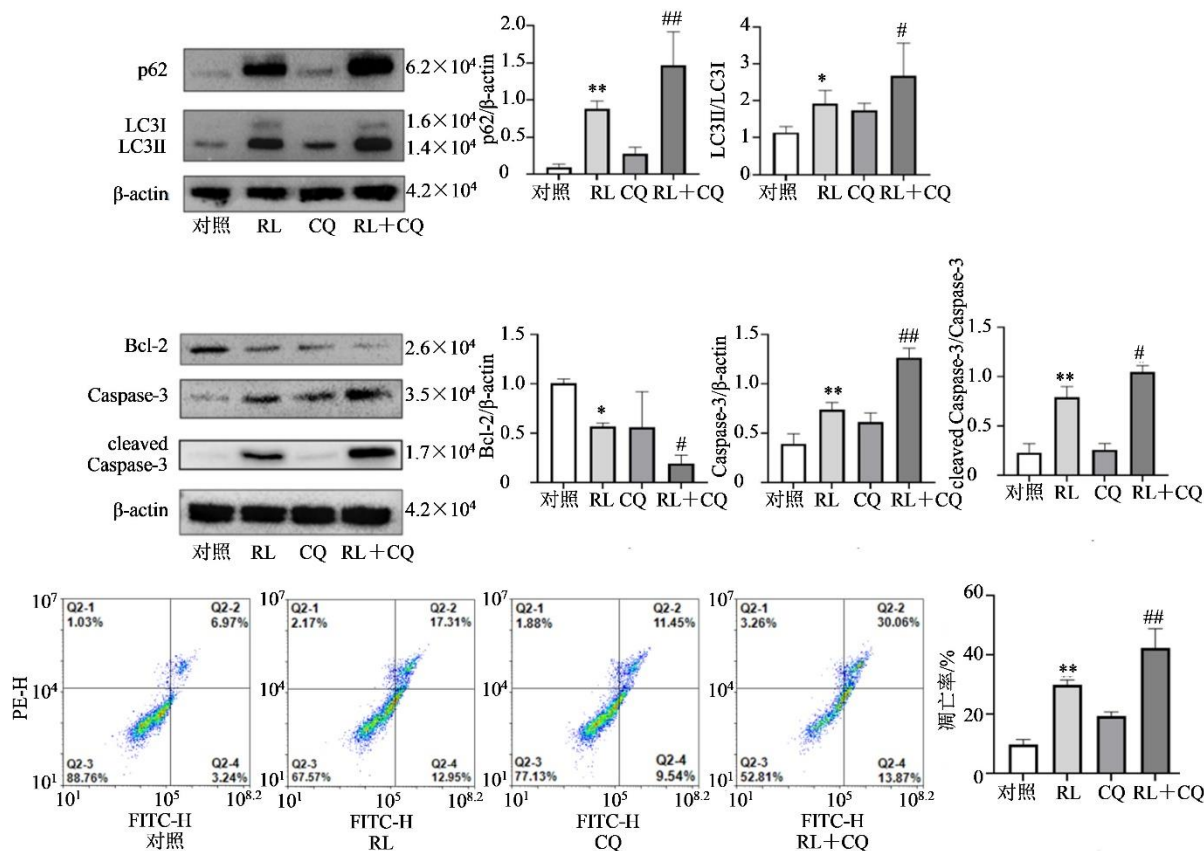
图 6 3-MA 与 RL 联用对 HCT116 细胞自噬、凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Effect of 3-MA in combination with RL on autophagy and apoptosis in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

式^[8]。Western blotting 实验中观察到药物作用后, cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值的升高、Bcl-2 的降低与流式细胞术、电镜结果吻合。据此, RL 可能通过阻滞 HCT116 细胞于 S 期并诱导其凋亡, 进而降低细胞的存活率。

自噬是一种内源性防御机制, 它通过降解细胞内积累的毒性蛋白聚集体与衰老的细胞器维持细胞的稳态平衡^[9]。然而, 自噬是一把“双刃剑”。一方面, 过度的自噬活动会消耗大量细胞器和关键蛋白, 造成细胞内能量耗竭和代谢危机; 另一方面, 自噬流阻滞会导致如 p62/SQSTM1 的自噬底物和受损细胞器异常累积, 引发氧化应激、内质网应激和线粒体损伤等毒性效应^[10-11]。这 2 种自噬功能的失衡, 均可能通过不同机制最终触发细胞凋亡程序^[12]。此外, 如 ATG5、Beclin-1 等自噬相关蛋白在特定条件下可被切割或修饰, 或与凋亡调控因子如 Bcl-2 家族发生相互作用, 转而直接参与凋亡信号的激活^[13]。基于自噬与凋亡之间这种复杂的

串扰关系, 本研究重点探讨了药物对 HCT116 细胞自噬调控网络的双重效应及其与凋亡的联系: 在本研究中 RL 对 HCT116 细胞的自噬调控网络产生了双重效应: (1) 在自噬体形成阶段, RL 显著上调 Atg5 的表达, 该蛋白作为 ATG5-ATG12-ATG16L 复合物的核心组分, 定位于自噬体的外膜, 直接参与自噬泡前体膜结构的延伸与闭合^[14-16]。值得注意的是, 持续高水平的 Atg5 不仅促进自噬体形成, 在特定应激条件下也可能被 Caspase 切割, 产生促凋亡片段^[17], 为后续凋亡发生提供了潜在分子基础; (2) LC3I 在 ATG3、ATG7 和磷脂酰乙醇胺的作用下转化为 LC3II 并插入自噬体膜, 随自噬体膜的增加而积累增多^[18]。在 LC3 加工过程中, RL 处理组 LC3II/LC3I 比值显著升高, 提示在药物作用下自噬体的生成作用增强。这反映了自噬通量的显著提升。综上, 本研究发现 RL 通过显著上调 Atg5 表达和提升 LC3II/LC3I 比值的双重效应, 强烈诱导了 HCT116 细胞的自噬活动。然而, 这种被药物过度



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 RL 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 RL group.

图 7 CQ 与 RL 联用对 HCT116 细胞自噬、凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Fig. 7 Effect of CQ in combination with RL on autophagy and apoptosis in HCT116 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

激活的自噬状态,可能超越了细胞的耐受能力或导致了关键成分(如 Atg5)的功能转换,最终通过上述能量耗竭、代谢压力及潜在的自噬相关蛋白促凋亡作用等机制,协同促进了细胞凋亡的发生。后续的凋亡检测和自噬流阻断实验进一步验证了 RL 这一自噬激活作用在肿瘤细胞中引起了促凋亡效应。

然而,进一步研究发现,RL 对自噬的调控远非单纯的激活,与典型自噬激活不同,实验数据显示参与自噬起始复合物组装的关键调控蛋白 Beclin-1 的表达水平受药物显著抑制。同时介导泛素化底物向自噬体转运的 p62/SQSTM1 蛋白呈现剂量相关性积累。LC3II 升高提示自噬体生成增强,而 Beclin-1 抑制和 p62 积累提示自噬流障碍,这种看似矛盾的现象强烈提示 RL 通过一种独特的双重机制干预自噬进程:一方面如前所述促进自噬体的生成,另一方面却抑制了溶酶体依赖性的降解功能。p62 的异常积累作为自噬底物清除障碍的标志,与 LC3 II/LC3 I 比值的升高所指示的自噬体生成

增强并存,再结合透射电镜观察结果中,RL 处理显著增加了 HCT116 细胞中自噬小体和自噬溶酶体的数量,共同构成了自噬流在溶酶体融合后阶段发生阻滞的经典病理特征。自噬溶酶体数量的异常增多,提示自噬体与溶酶体的融合虽可能发生,但其内容物的降解效率严重降低,导致未降解的自噬溶酶体在细胞内大量堆积。值得注意的是,Beclin-1 的表达抑制具有重要的功能意义。Beclin-1 是 III 型磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 复合物的核心组分,该复合物对自噬的起始和成熟至关重要。Beclin-1 的下调很可能破坏了 PI3K 复合物的稳定性或功能^[19],导致自噬起始信号减弱与自噬体成熟及降解过程的调控失衡,这可能是下游自噬流受阻的重要诱因之一。

这种“促生成-抑降解”的异步调控模式,创造了一种高度不稳定的自噬功能失衡状态,即自噬流严重阻滞。大量累积的未降解自噬小体和自噬溶酶体及其中包裹的毒性底物,以及持续高水平的 p62

积累,共同引发了强烈的细胞内应激反应和细胞器损伤^[20]。这种由自噬流阻滞导致的持续性细胞压力环境,以及前面提及的潜在机制(如持续高表达的 Atg5 可能被激活的 Caspase 切割产生促凋亡片段),最终协同作用,有效地激活了线粒体依赖性和/或死亡受体介导的凋亡信号通路。因此,RL 通过诱导这种特殊的自噬流阻滞状态,成为触发 HCT116 细胞凋亡的关键机制。

为验证 RL 对自噬流的双重调控作用,本研究进一步采用自噬抑制剂 3-MA 和 CQ 进行联合实验。自噬起始阶段验证:3-MA 为自噬起始阶段抑制剂,通过抑制 III 型 PI3K 活性阻断自噬体形成。Western blotting 结果显示,与单用 RL 组相比,3-MA 联用组 LC3 II/LC3 I 比值显著降低,表明其逆转了 RL 诱导的自噬体生成。同时该组细胞凋亡标志物的变化(cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值降低、Bcl-2 蛋白水平升高及凋亡率降低)均显示 RL 引起的凋亡表型被 3-MA 显著逆转。自噬降解阶段验证:CQ 作为经典的自噬晚期抑制剂,通过中和溶酶体内的酸性环境,抑制组织蛋白酶等水解酶的活性,抑制自噬体降解。Western blotting 结果显示,与单用 RL 组相比,CQ 联用组 LC3II/LC3I 比值与 p62 蛋白同步累积,这一典型自噬流阻滞特征表明其协同 RL 抑制细胞自噬体的降解。同时该组细胞凋亡标志物的变化(cleaved Caspase-3/Caspase-3 比值升高、Bcl-2 蛋白水平降低,凋亡率显著增加)均显示 RL 与 CQ 协同加剧细胞的凋亡表型。

RL 是一种特异性的蛋白激酶 C (PKC) δ 抑制剂,在结肠癌模型中,RL 可以通过抑制 PKC δ 活性,直接调控细胞的周期和凋亡^[21],这也是其抗肿瘤的重要机制之一。但本研究通过自噬流检测(LC3II/LC3I、p62 水平的变化),结合自噬抑制剂(3-MA、CQ)的联合使用,证实了 RL 可以通过引起自噬体生成与降解的失衡进一步加剧细胞凋亡,与 PKC δ 途径无关。综上所述,RL 通过促进自噬体生成(3-MA 可逆转)与抑制自噬体降解(CQ 可协同)导致自噬流失衡,进而诱导 HCT116 细胞凋亡。本研究阐明 RL 通过破坏自噬稳态诱导凋亡,在结肠癌细胞中发挥抗肿瘤作用的机制,为其作为潜在抗肿瘤药物的应用提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Malki A, Abu ElRuz R, Gupta I, et al. Molecular

mechanisms of colon cancer progression and metastasis: Recent insights and advancements [J]. Int J Mol Sci, 2020, 22(1): 130.

[2] Abakushina E V, Gel'm Y V, Pasova I A, et al. Immunotherapeutic approaches for the treatment of colorectal cancer [J]. Biochemistry (Mosc), 2019, 84(7): 720-728.

[3] 王明星,董皖辉,张宝瑞,等.中药调控 JAK/STAT 信号通路抗结直肠癌的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(4): 278-287.

Wang M X, Dong W H, Zhang B R, et al. Traditional Chinese medicine regulates JAK/STAT signaling pathway to treat colorectal cancer: A review [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(4): 278-287.

[4] Klionsky D J, Petroni G, Amaravadi R K, et al. Autophagy in major human diseases [J]. EMBO J, 2021, 40(19): e108863.

[5] Meyer N, Henkel L, Linder B, et al. Autophagy activation, lipotoxicity and lysosomal membrane permeabilization synergize to promote pimozone- and loperamide-induced glioma cell death [J]. Autophagy, 2021, 17(11): 3424-3443.

[6] Zhu Y, Wang M J, Zhao X, et al. Rottlerin as a novel chemotherapy agent for adrenocortical carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(14): 22825-22834.

[7] Maioli E, Daveri E, Maellaro E, et al. Non-conventional rottlerin anticancer properties [J]. Arch Biochem Biophys, 2018, 645: 50-53.

[8] Xu P, Cai X H, Zhang W B, et al. Flavonoids of Rosa roxburghii Tratt exhibit radioprotection and anti-apoptosis properties via the Bcl-2(Ca²⁺)/Caspase-3/PARP-1 pathway [J]. Apoptosis, 2016, 21(10): 1125-1143.

[9] Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2018, 19(6): 349-364.

[10] Li H Y, Zhang Y M, Liu S M, et al. Melatonin enhances proliferation and modulates differentiation of neural stem cells via autophagy in hyperglycemia [J]. Stem Cells, 2019, 37(4): 504-515.

[11] Liu Y, Shoji-Kawata S, Sumpter R M Jr, et al. Autosis is a Na⁺, K⁺-ATPase-regulated form of cell death triggered by autophagy-inducing peptides, starvation, and hypoxia-ischemia [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(51): 20364-20371.

[12] Amaravadi R, Kimmelman A C, White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer [J]. Genes Dev, 2016, 30(17): 1913-1930.

[13] Funderburk S F, Wang Q J, Yue Z Y. The beclin 1-VPS34

- complex: At the crossroads of autophagy and beyond [J]. *Trends Cell Biol*, 2010, 20(6): 355-362.
- [14] Luo Y H, Wang C, Xu W T, et al. 18 β -Glycyrrhetic acid has anti-cancer effects via inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest, and inhibiting migration of A549 lung cancer cells [J]. *Onco Targets Ther*, 2021, 14: 5131-5144.
- [15] Fracchiolla D, Chang C M, Hurley J H, et al. A PI3K-WIP1 positive feedback loop allosterically activates LC3 lipidation in autophagy [J]. *J Cell Biol*, 2020, 219(7): e201912098.
- [16] Brier L W, Ge L, Stjepanovic G, et al. Regulation of LC3 lipidation by the autophagy-specific class III phosphatidylinositol-3 kinase complex [J]. *Mol Biol Cell*, 2019, 30(9): 1098-1107.
- [17] Bommareddy A, Hahm E R, Xiao D, et al. Atg5 regulates phenethyl isothiocyanate-induced autophagic and apoptotic cell death in human prostate cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3704-3712.
- [18] Xu G, Wang X, Yu H, et al. Beclin 1, LC3, and p62 expression in paraquat-induced pulmonary fibrosis [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2019, 38(7): 794-802.
- [19] Fu L L, Cheng Y, Liu B. Beclin-1: Autophagic regulator and therapeutic target in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(5): 921-924.
- [20] Rausch V, Liu L, Apel A, et al. Autophagy mediates survival of pancreatic tumour-initiating cells in a hypoxic microenvironment [J]. *J Pathol*, 2012, 227(3): 325-335.
- [21] Wang L, Hou Y, Yin X, et al. RL inhibits cell growth and invasion via down-regulation of Cdc20 in glioma cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(43): 69770-69782.

[责任编辑 兰新新]