

# 黑树莓花青素联合奥沙利铂或喜树碱通过 Akt 信号通路协同增强结直肠癌化疗药物的治疗效果及作用机制研究

刘月<sup>1</sup>, 李鑫<sup>1</sup>, 庞文倩<sup>1</sup>, 杨哲<sup>1</sup>, 陈丽莉<sup>1,2</sup>, 张秋华<sup>3</sup>, 李晓龙<sup>4</sup>, 毕秀丽<sup>1\*</sup>

1. 辽宁大学生命科学院, 辽宁 沈阳 110036

2. 辽宁大学数学与统计学院, 辽宁 沈阳 110036

3. 辽宁中医药大学 基础药理教研室, 辽宁 沈阳 110847

4. 深圳福山生物科技有限公司, 广东 深圳 518000

**摘要:** 目的 探究黑树莓花青素联合奥沙利铂或喜树碱在结直肠癌细胞和氧化偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM) 诱导的结直肠癌模型小鼠中的协同作用。方法 结直肠癌细胞系 SW480 和 Caco-2 给予黑树莓花青素、奥沙利铂或喜树碱进行干预, AOM 诱导的结直肠癌模型小鼠给予黑树莓花青素或奥沙利铂进行干预。采用 MTT 法检测黑树莓花青素联合奥沙利铂或喜树碱对结直肠癌细胞增殖的影响; 采用 Western blotting 法检测结直肠癌细胞和小鼠肠上皮细胞中蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路相关蛋白表达; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色检测小鼠结肠组织病理变化。结果 黑树莓花青素与奥沙利铂或喜树碱联合使用可显著抑制 SW480 和 Caco-2 细胞的增殖 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ); 黑树莓花青素与奥沙利铂联合使用显著改善结直肠癌模型小鼠的状态, 增加小鼠体质量, 减少肠道肿瘤数量 ( $P < 0.01$ ); 黑树莓花青素可能通过下调 Akt 信号通路相关蛋白的表达进而增强化疗药物的治疗效果 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。结论 黑树莓花青素可以协同增加奥沙利铂或喜树碱的抗肿瘤作用。

**关键词:** 黑树莓花青素; 结直肠癌; 化疗药物; 协同作用; Akt 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)16-5044-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.16.014

## Black raspberry anthocyanins combined with oxaliplatin or camptothecin synergistically enhance therapeutic effect of colorectal cancer chemotherapy drugs and mechanism through Akt signaling pathway

LIU Yue<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, PANG Wen-qian<sup>1</sup>, YANG Zhe<sup>1</sup>, CHEN Li-li<sup>1,2</sup>, ZHANG Qiu-hua<sup>3</sup>, LI Xiao-long<sup>4</sup>, BI Xiu-li<sup>1</sup>

1. College of Life Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China

2. College of Mathematics and Statistics, Liaoning University, Shenyang 110036, China

3. Department of Basic Pharmacology, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China

4. Shenzhen Fushan Biotech Co., Ltd., Shenzhen 518000, China

**Abstract: Objective** To explore the synergistic effect of black raspberry anthocyanins combined with oxaliplatin or camptothecin on colorectal cancer cells and azoxymethane (AOM)-induced colorectal cancer mouse model. **Methods** Colorectal cancer cell lines SW480 and Caco-2 were treated with black raspberry anthocyanins, oxaliplatin or camptothecin, and AOM-induced colorectal cancer model mice were treated with black raspberry anthocyanins or oxaliplatin. MTT assay was used to detect the effect of black raspberry anthocyanins combined with oxaliplatin or camptothecin on proliferation of colorectal cancer cells; Western blotting was used to detect protein kinase B (Akt) signaling pathway-related protein expression in colorectal cancer cells and mouse intestinal epithelial cells; Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to detect the pathological changes of colon tissue in mice. **Results** The combined use of black raspberry anthocyanins and oxaliplatin or camptothecin could significantly inhibit the proliferation of SW480 and Caco-2 cells ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ ,  $0.001$ ); The combined use of black raspberry anthocyanins and oxaliplatin significantly improved the state of colorectal

收稿日期: 2022-04-27

基金项目: 辽宁省教育厅基础研究重点项目 (LETU#LZD201904); 辽宁大学数学与统计学院学科建设项目 (MSKY202210)

作者简介: 刘月 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肠道肿瘤的预防和治疗。E-mail: 690966813@qq.com

\*通信作者: 毕秀丽 (1977—), 女, 博士生导师, 教授, 研究方向为肠道肿瘤的预防和治疗。E-mail: xiulibi@gmail.com

cancer mouse model, increased the body weight of mice, and reduced the number of intestinal tumors ( $P < 0.01$ ); Black raspberry anthocyanins enhanced the therapeutic effect of chemotherapy drugs by down-regulating the expression of Akt signaling pathway-related proteins ( $P < 0.01, 0.001$ ). **Conclusion** Black raspberry anthocyanins can synergistically increase the antitumor effect of oxaliplatin or camptothecin.

**Key words:** black raspberry anthocyanins; colorectal cancer; chemotherapy drugs; synergistic effect; Akt signaling pathway

结直肠癌 (colorectal cancer, CRC) 是世界第 3 大恶性肿瘤, 2020 年全球范围内约有 190 万 CRC 病例, 其中 90 万人死亡<sup>[1]</sup>。奥沙利铂和喜树碱等药物化疗是临床治疗 CRC 的主要方法之一, 大量临床数据表明, 在初始治疗期间, 化疗药物治疗效果显著, 然而, 长期使用不仅会对正常细胞造成损伤, 也会使肿瘤细胞对药物的敏感性降低, 从而产生耐药性, 导致肿瘤的复发和转移<sup>[2]</sup>。因此如何增强 CRC 的化疗敏感性、改善耐药性是 CRC 治疗的关键。

化疗药物联合天然产物能够提高化疗药物的治疗效果。如白藜芦醇与 5-氟尿嘧啶、依托泊苷、丝裂霉素、奥沙利铂等化疗药物具有协同作用<sup>[3]</sup>, 其机制可能是通过抑制内源性抗氧化能力使 CRC 细胞对化疗药物引起的细胞毒性氧化应激敏感, 或协同诱导细胞凋亡<sup>[4-5]</sup>。表没食子儿茶素-3-没食子酸酯 (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) 与 5-氟尿嘧啶联用的结果显示, EGCG 对 DLD1、SW480 和 COLO201 等 CRC 细胞的生长具有协同增强的抑制作用<sup>[6]</sup>。以上研究提示, 传统化疗药物联合天然产物的治疗方式可能为增强 CRC 的化疗敏感性提供了一个新的视角和方法。

黑树莓 *Rubus occidentalis* H. Lévl. 为蔷薇科勾悬子属浆果, 因其独特的抗氧化、抗炎、抗血管生成、抗癌等活性而受到广泛关注<sup>[7]</sup>。研究表明黑树莓中富含酚酸类、黄酮类、原花青素、鞣质、苯乙烯、木脂素、三萜和甾醇等大量多酚类活性物质<sup>[8]</sup>。本课题组前期研究发现, 黑树莓花青素能够通过调节肠道菌群和分泌型卷曲相关蛋白 2 (secreted frizzled-related protein 2, SFRP2) 去甲基化<sup>[9]</sup>, 还能够通过调控 *miR-24-1-5p*、*miR-483-3p*/Dickkopf 相关蛋白 3 (Dickkopf-related protein 3, DKK3) 相关信号通路, 从而预防 CRC<sup>[10-11]</sup>。然而, 黑树莓花青素的联合使用能否增强化疗药物的治疗效果仍不清楚, 因此本研究旨在探究黑树莓花青素联合奥沙利铂或喜树碱在 CRC 化疗中的协同作用及机制。

## 1 材料

### 1.1 细胞

人结直肠癌细胞系 SW480 和 Caco-2 购自名劲

生物。

### 1.2 动物

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 5 周龄, 体质量 18~20 g, 购自辽宁长生生物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (辽)-2017-0001。小鼠饲养于 12 h/12 h 的明暗循环中, 并给予正常的水与饲料。所有动物实验经辽宁中医药大学伦理委员会批准 (批准号 21000092017048)。

### 1.3 黑树莓花青素饲料

黑树莓花青素 (质量分数 > 90%) 由天津尖峰天然产物有限公司提供。根据本课题组前期研究中 10% 黑树莓冻干粉的小鼠喂食剂量<sup>[9,12]</sup>, 并结合黑树莓花青素的提取率<sup>[13]</sup>, 将黑树莓花青素混合进正常饲料中做成日粮, 具体成分配比见表 1。饲料由辽宁长生生物技术有限公司制作。

表 1 饲料配方

Table 1 Formula and nutrition of diet

原料名称	单位	正常饲料	黑树莓花青素饲料
大豆	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	56	56
玉米淀粉	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	300	300
面粉	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	250	250
糠麸	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	80	80
鱼粉	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	258	258
纤维素	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	40	40
钙	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	10	10
磷	$\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	6	6
黑树莓花青素	$\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$	—	7.0
蛋白质	%	20	20
脂肪	%	10	10
碳水化合物	%	70	70
能量	$\text{MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$	18.8	18.8

### 1.4 药品与试剂

胎牛血清 (批号 SA210623) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 青霉素/链霉素、胰蛋白酶、DMEM 培养基购自美国 Hyclone 公司; 喜树碱 (批号 IC0950, 质量分数为 99%) 购自北京索莱宝科技有限公司; 奥沙利铂 (批号 hzm2212, 质量分数为 99%) 购自上海蓝木化工生物科技有限公司; 氧化偶氮甲烷 (azoxymethane, AOM, 批号 0218397125) 购自美国 Sigma 公司; RIPA 裂解液 (批号 C500005)、

BCA 蛋白定量试剂盒(批号 C503021)、MTT 试剂盒(批号 E606334-0250)、低氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 抗体(批号 14179S)、 $\beta$ -actin 抗体(批号 AB10024) 购自上海生工生物有限公司; ZESTE 同源物增强子 2 (enhancer of zeste homolog 2, EZH2) 抗体(批号 5246S)、蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 抗体(批号 9272)、磷酸化 Akt (phosphorylated Akt, p-Akt) 抗体(批号 13038P)、人第 10 号染色体缺失的磷酸酶 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten, PTEN) 抗体(批号 9188S)、组蛋白 H3 (histone H3, H3) 抗体(批号 4499S) 购自美国 CST 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 抗体(批号 59120300) 购自 Biosharp 公司。

### 1.5 仪器

iMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司); 高速冷冻离心机(美国 Agilent 公司); JY-SCZ2 型垂直电泳仪、转膜仪(北京君意东方电泳设备有限公司); -80 °C 超低温冰箱(日本 Sanyo 公司); 超净工作台(德国 SPETEC 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养和分组

SW480 和 Caco-2 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。

将 SW480 细胞或 Caco-2 细胞以  $1 \times 10^3$  个/孔接种至 96 孔板中, 或以  $2 \times 10^5$  个/孔接种至 6 孔板中, 当细胞融合度为 60%时, 用含或不含黑树莓花青素的奥沙利铂或喜树碱处理。

SW480 细胞分组: 对照组、黑树莓花青素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组、奥沙利铂 (2、4  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 组、喜树碱 (1.25、2.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 组、奥沙利铂 (2、4  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) + 黑树莓花青素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组和喜树碱 (1.25、2.5  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) + 黑树莓花青素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组。

Caco-2 细胞分组: 对照组、黑树莓花青素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 组、奥沙利铂 (4、6  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 组、喜树碱 (3、4  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 组、黑树莓花青素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 奥沙利铂 (4、6  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 组和黑树莓花青素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + 喜树碱 (3、4  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ) 组。

### 2.2 黑树莓花青素联合奥沙利铂或喜树碱对结肠癌细胞增殖的影响

按“2.1”项下方法处理 24 h 或 48 h 后, 加入 MTT 试剂 (0.5  $\text{mg}/\text{mL}$ ), 37 °C 孵育 4 h, 加入 100

$\mu\text{L}$  二甲基亚砜, 测定 490 nm 处的吸光度 ( $A$ ) 值。

### 2.3 结直肠癌小鼠模型的建立及分组

C57BL/6 雄性小鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为对照组、模型组、黑树莓花青素组、奥沙利铂组以及黑树莓花青素联合奥沙利铂组, 每组 10 只。除对照组外, 其余各组小鼠 ip AOM 溶液 (10  $\text{mg}/\text{kg}$ ), 每周 1 次, 持续 6 周, 对照组 ip 等体积无菌生理盐水。本课题组前期研究显示<sup>[4]</sup>, 模型小鼠在相同条件下第 14 周的成瘤率为 100%, 因此第 14 周后, 奥沙利铂组以及黑树莓花青素联合奥沙利铂组小鼠 ip 奥沙利铂 (5  $\text{mg}/\text{kg}$ ), 每周 2 次; 同时黑树莓花青素组和黑树莓花青素联合奥沙利铂组小鼠开始饲喂黑树莓花青素饲料, 持续 6 周, 每组小鼠每天给予同样质量的饲料, 保证进食量一致。第 20 周处死小鼠 (最终每组纳入统计的动物数量  $\geq 8$ ), 解剖观察肠道内部, 统计肿瘤数目, 并收集肠上皮细胞和其他组织器官。实验过程中, 记录各组小鼠的体质量和生活状况。

### 2.4 小鼠肠上皮细胞的收集

取各组小鼠肠组织, 用手术刀纵向切开回肠和结肠, 将肠组织切成段, 置于冷 PBS 缓冲液中冲洗后, 加入 15  $\text{mmol}/\text{L}$  乙二胺四乙酸缓冲液, 37 °C 孵育 30 min, 使用振荡器涡旋振荡, 直到肠组织变白或液体中出现细胞团。在去除肠肌肉组织后, 离心收集上皮细胞沉淀, 置于液氮中冷冻保存备用。

### 2.5 小鼠肠组织的苏木素-伊红 (HE) 染色

小鼠肠道组织去除内容物后, 置于 10%的甲醛溶液中固定过夜, 后续的石蜡包埋、切片和染色等步骤由武汉塞维尔生物科技有限公司完成。取出组织依次通过不同浓度的乙醇, 通过 2 次二甲苯, 将组织取出浸于石蜡中 3 次, 烘干后用石蜡包埋组织, 待石蜡凝固后取出晾干进行切片; 脱蜡处理后用苏木素染色 10 min, 用自来水冲洗使切片颜色变蓝; 将切片放入 1%盐酸乙醇液中褪色进行分化 and 漂洗; 将切片依次放入不同浓度乙醇中各 3~5 min, 用伊红染液染色 1~3 min; 将切片放入 95%乙醇-无水乙醇中 3~5 min, 最后放入二甲苯中脱水透明后, 用中性树胶封片保存拍照。

### 2.6 黑树莓花青素联合奥沙利铂或喜树碱对结肠癌细胞系或小鼠肠上皮细胞中相关蛋白表达的影响

按“2.1”项下方法处理 24 h 或 48 h 后, 收集细胞; 收集“2.4”项下小鼠肠上皮细胞。分别加入 100  $\mu\text{L}$  含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 冰上裂解

30 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清。采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质质量浓度, 加入 20 μL 5×Loading Buffer 混匀后, 95 °C 金属浴 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经 8%~12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 牛血清白蛋白溶液, 室温封闭 1 h, 分别加入 EZH2、H3、H3K27me、Akt、p-Akt、HIF-1α 和 β-actin 抗体, 室温孵育 3 h; TBST 洗涤 3 次, 10 min/次, 加入 HRP 标记的二抗, 孵育 2.5 h, 加入 ECL 发光液显影。

### 2.7 统计分析

使用 Graphpad Prism 6.0 软件分析数据, 组间比较采用 *t* 检验及方差分析。

## 3 结果

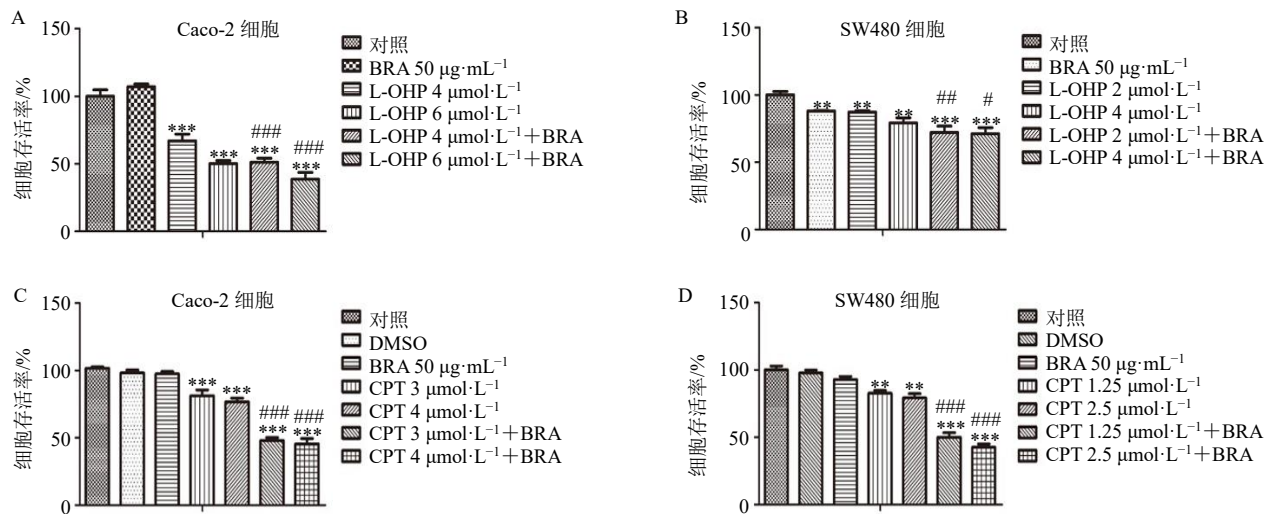
### 3.1 奥沙利铂或喜树碱联合黑树莓花青素可增强对结直肠癌细胞增殖的抑制作用

奥沙利铂和喜树碱是临床常用的化疗药物, 为了探究奥沙利铂或喜树碱联合黑树莓花青素对 CRC 细胞增殖的影响, 将不同浓度的奥沙利铂或喜树碱联合黑树莓花青素分别添加到 Caco-2 或 SW480 细胞的培养体系中, 利用 MTT 检测 CRC 细胞的增殖情况。如图 1-A、B 所示, 在 Caco-2 或 SW480 细胞中, 与对照组相比, 奥沙利铂或奥沙利铂联合黑树莓花青素可显著抑制细胞存活率 ( $P <$

0.01、0.001), 奥沙利铂联合黑树莓花青素对细胞增殖的抑制作用明显高于单独使用奥沙利铂 ( $P <$  0.05、0.01、0.001)。同时, 在喜树碱组或喜树碱联合黑树莓花青素组中也发现了相同的结果 (图 1-C、D)。以上结果表明, 黑树莓花青素可增强奥沙利铂或喜树碱对 CRC 细胞的抗增殖作用。

### 3.2 奥沙利铂或喜树碱联合黑树莓花青素对 CRC 细胞 Akt 信号通路相关蛋白表达的影响

Akt 信号通路与细胞生存密切相关, 其在肿瘤细胞中异常激活通常会促进肿瘤细胞增殖、侵袭、转移并抑制凋亡, 研究表明, Akt 信号通路异常活化与肿瘤耐药密切相关<sup>[15]</sup>。HIF-1α 是在缺氧状态下广泛存在于肿瘤细胞中的一种核转录因子, 可调节肿瘤细胞中化疗药物耐药性的重要因子, 可以被 Akt 等信号通路调节<sup>[16-17]</sup>。因此进一步探讨了 Akt 信号通路相关因子是否参与黑树莓花青素联合奥沙利铂或喜树碱的协同增效作用。如图 2-A、B 所示, 与单独使用奥沙利铂相比, 奥沙利铂联合黑树莓花青素处理后, SW480 和 Caco-2 细胞中 p-Akt 和 HIF-1α 的蛋白表达水平显著降低 ( $P <$  0.01、0.001)。同时, 在喜树碱组或喜树碱联合黑树莓花青素组中也发现了相同的结果 (图 2-C、D)。以上结果提示, Akt 信号通路可能参与了黑树莓花青素协同增强奥沙利铂或喜树碱的抗肿瘤作用。



BRA-黑树莓花青素 L-OHP-奥沙利铂 CPT-喜树碱 与对照组比较: \* $P <$  0.05 \*\* $P <$  0.01 \*\*\* $P <$  0.001; 与奥沙利铂或喜树碱组比较: # $P <$  0.05 ### $P <$  0.01 #### $P <$  0.001, 下图同

BRA-black raspberry anthocyanins L-OHP-oxaliplatin CPT-camptothecin \* $P <$  0.05 \*\* $P <$  0.01 \*\*\* $P <$  0.001 vs control group; # $P <$  0.05 ### $P <$  0.01 #### $P <$  0.001 vs oxaliplatin or camptothecin group, same as below figures

图 1 奥沙利铂或喜树碱联合黑树莓花青素对 CRC 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of oxaliplatin or camptothecin combined with black raspberry anthocyanins on proliferation of CRC cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

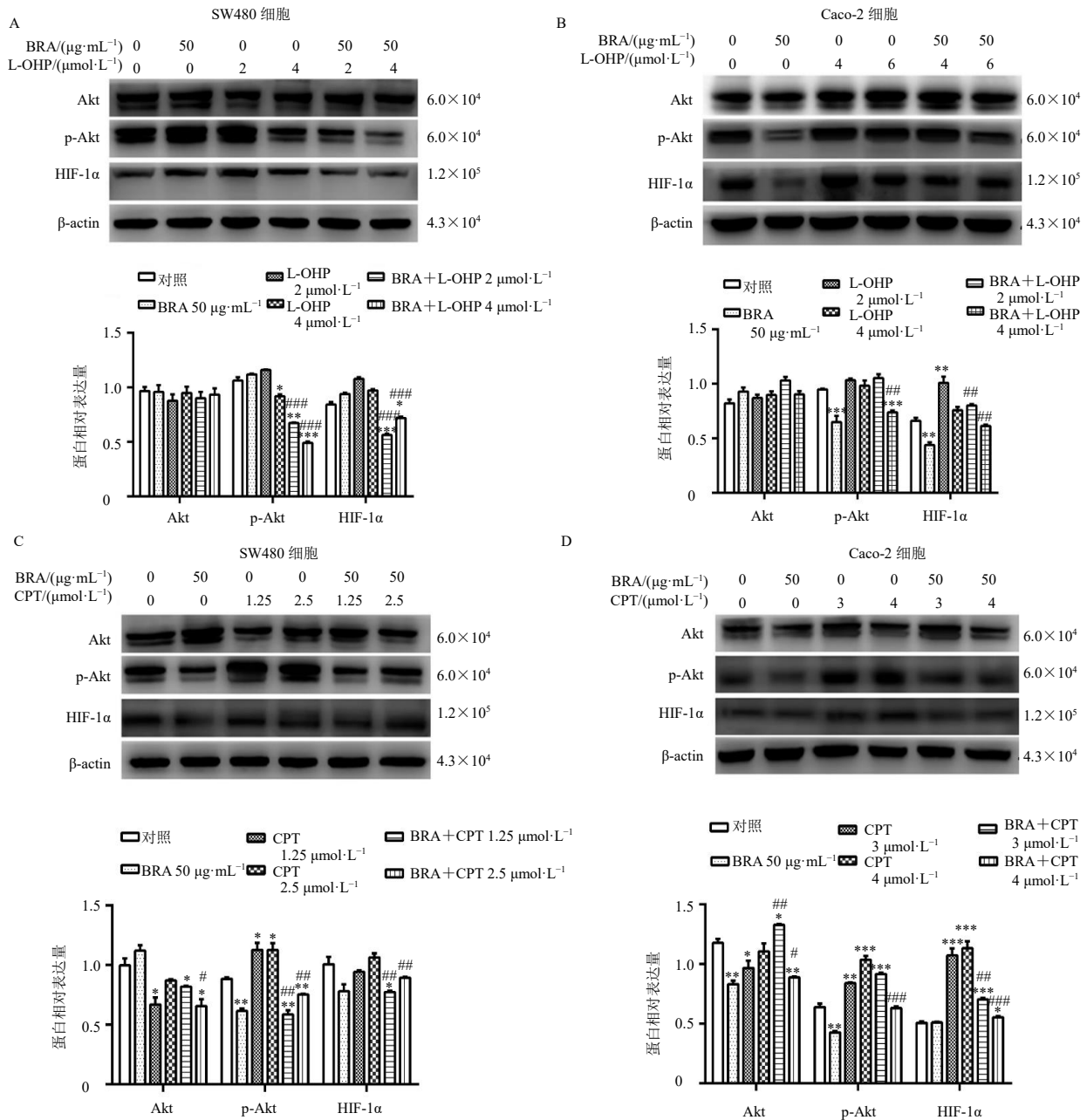


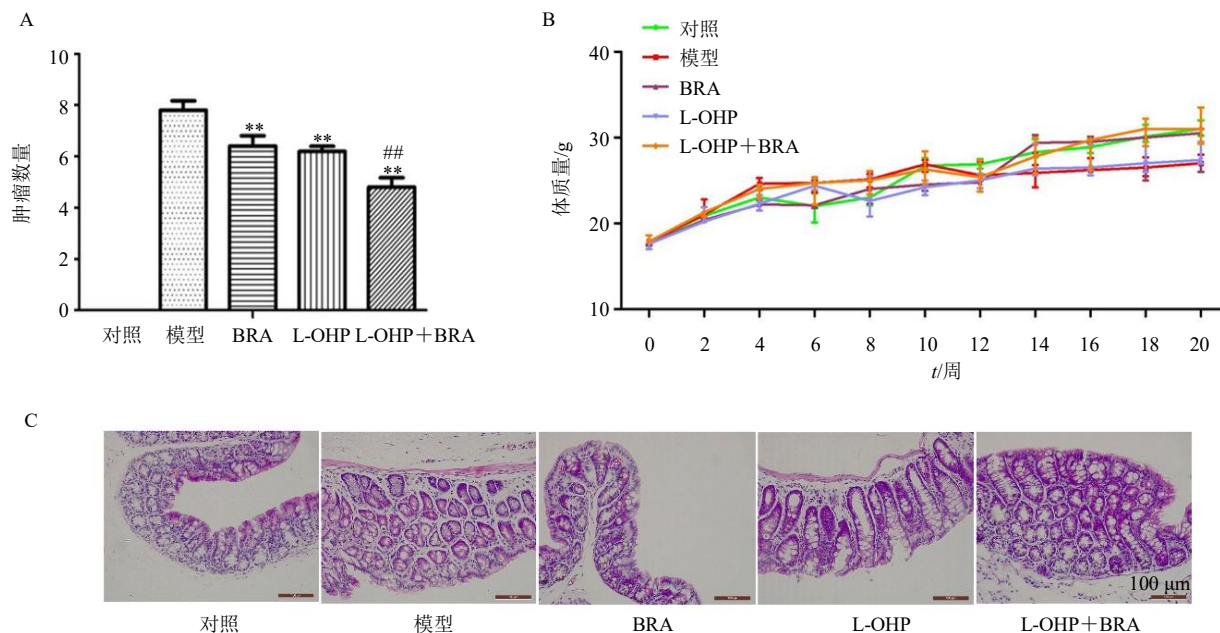
图2 奥沙利铂或喜树碱联合黑树莓花青素对CRC细胞Akt信号通路相关因子表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 2 Effect of oxaliplatin or camptothecin combined with black raspberry anthocyanins on Akt signaling pathway-related factors expression in CRC cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

### 3.3 奥沙利铂联合黑树莓花青素对AOM诱导的CRC小鼠模型肿瘤进展的影响

在体外研究的基础上，选择了效果较好的奥沙利铂进行进一步的体内研究。如图3-A所示，与模型组比较，各给药组小鼠肠道内肿瘤数目显著减少 ( $P < 0.01$ )，黑树莓花青素+奥沙利铂组小鼠肿瘤数目显著低于单独使用奥沙利铂组 ( $P < 0.01$ )。如图3-B所示，在药物治疗期间，与模型组相比，各给药组小鼠体质量得到明显改善，尤其黑树莓花青

素+奥沙利铂组小鼠体质量增加趋势更明显。通过HE染色评估各组小鼠结直肠的病理变化，如图3-C所示，与模型组相比，奥沙利铂组和黑树莓花青素联合奥沙利铂组小鼠肠道结构完整性更高，组织结构的破坏和炎症细胞的浸润程度都有所降低，并且黑树莓花青素联合奥沙利铂比单独使用奥沙利铂效果更好。以上结果表明，黑树莓花青素联合奥沙利铂能显著增强奥沙利铂的治疗效果，抑制小鼠CRC的进展。



A-各组小鼠肠道内肿瘤数量 B-各组小鼠体质量变化 C-各组小鼠肠道组织病理变化 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与奥沙利铂组比较: ### $P < 0.01$   
A-number of tumors in intestinal tract of mice in each group B-body weight of mice in each group C-pathological changes of intestinal tissue of mice in each group \*\* $P < 0.01$  vs model group; ### $P < 0.01$  vs oxaliplatin group

图3 奥沙利铂联合黑树莓花青素对AOM诱导的结直肠癌小鼠模型肿瘤进展的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 3 Effect of oxaliplatin combined with black raspberry anthocyanins on tumor progression of AOM-induced CRC in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

### 3.4 奥沙利铂联合黑树莓花青素治疗CRC小鼠对Akt信号通路相关因子的影响

EZH2是一种组蛋白甲基转移酶,主要作用于组蛋白H3对Lys27(H3K27me)的甲基化,导致其靶基因沉默,参与细胞周期、细胞增殖、细胞分化等多种生物活性<sup>[18]</sup>。EZH2通过调控靶向Akt信号通路的肿瘤抑制因子影响下游信号通路的表达<sup>[19]</sup>。PTEN作为一种肿瘤抑制因子,通过靶向Akt的3'-UTR来抑制Akt的磷酸化<sup>[19-20]</sup>。因此进一步探讨黑树莓花青素联合奥沙利铂处理对CRC小鼠Akt信号通路相关因子的影响,如图4所示,与模型组相比,各给药组小鼠肠上皮细胞中p-Akt、EZH2和H3K27me蛋白表达水平平均显著降低( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ),PTEN蛋白表达水平显著升高( $P < 0.001$ );奥沙利铂组和黑树莓花青素组HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平显著升高( $P < 0.01, 0.001$ );奥沙利铂联合黑树莓花青素组HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达水平显著降低( $P < 0.001$ )。提示奥沙利铂联合黑树莓花青素可调控Akt信号通路相关因子的表达水平,与体外实验结果一致。推测奥沙利铂联合黑树莓花青素可能通过调节Akt通路相关因子,进而调节HIF-1 $\alpha$ 等耐药相关基

因的表达,增强化疗药物的治疗效果缓解CRC的进展。

### 4 讨论

癌细胞对化疗药物的敏感性降低是化疗失败的主要原因之一。已有研究表明,影响化疗药物敏感性的因素包括药物外排转运蛋白的表达增加、药动学的改变等<sup>[21]</sup>。本研究结果表明,黑树莓花青素可能通过调控Akt信号通路相关因子表达降低化疗耐药性,增强化疗药物奥沙利铂或喜树碱的治疗效果。

黑树莓花青素具有独特的多酚、花青素和鞣质等成分,具有较强的抗氧化能力。已有临床研究表明,黑树莓花青素可影响参与致癌物代谢活化和解毒的酶的活性,预防和抑制CRC的进展<sup>[22]</sup>。本课题组前期研究提示,黑树莓花青素作为一种有效的CRC化学预防剂,能够抑制Apc1638<sup>+/-</sup>和Muc2<sup>-/-</sup>CRC小鼠模型中结直肠肿瘤的形成、肿瘤数量和细胞增殖<sup>[23]</sup>。受到天然产物与化疗药物联合研究的启发<sup>[24]</sup>,推测黑树莓花青素是否可以作为化疗药物的增效剂,协同降低CRC细胞的增殖能力,抑制CRC的进程。本研究结果表明,黑树莓花青素联合奥沙利铂或喜树碱对细胞增殖有明显的抑制作用。

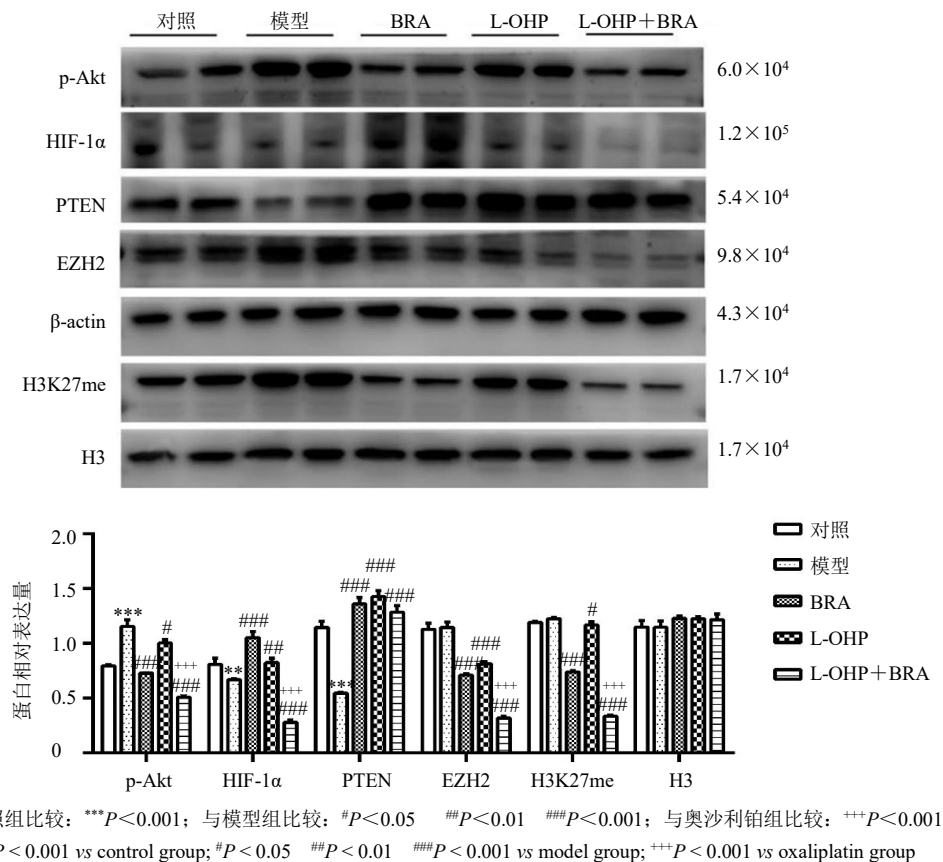


图 4 黑树莓花青素联合奥沙利铂对 CRC 小鼠肠上皮细胞 Akt 信号通路相关因子表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Fig. 4 Effect of oxaliplatin combined with black raspberry anthocyanins on Akt signaling pathway-related factors expressions in intestinal epithelial cells of CRC mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Akt 信号通路异常活化与肿瘤耐药密切相关, 抑制该通路后, 可逆转肿瘤细胞的耐药性, 从而恢复肿瘤细胞对化疗药物的敏感性<sup>[15]</sup>。因此, Akt 信号通路相关因子是影响癌细胞化疗耐药的重要因子。HIF-1α 是广泛存在于肿瘤细胞中的一种核转录因子, 可调节肿瘤细胞中化疗药物耐药性, 被 Akt 信号通路调节<sup>[16-17]</sup>。据报道, 化疗药物在组织、血液缺氧时不能有效转运到细胞中, 使药物不能发挥自身的疗效, 即使在有氧恢复的情况下, 也是不可逆的<sup>[25]</sup>。在本研究中, 与单独使用奥沙利铂或喜树碱组相比, 黑树莓花青素联合组 p-Akt 和 HIF-1α 蛋白表达水平均显著下调。以往的研究表明, EZH2 的过表达可增加非小细胞肺癌和胶质母细胞瘤对化疗药物的耐药性<sup>[26-27]</sup>。在动物实验中, 发现奥沙利铂联合黑树莓花青素处理后, EZH2 和 H3K27me 蛋白表达水平均显著下调, 而 PTEN 蛋白表达水平显著上调。与奥沙利铂组相比, 奥沙利铂联合黑树莓花青素组肿瘤数量减少更明显。提示黑树莓花青素可能通过调控 Akt 信号通路相关因子协同增强化疗药

物的抗肿瘤效果。

综上所述, 黑树莓花青素联合奥沙利铂或喜树碱增强了 CRC 细胞对化疗药物的敏感性, 为黑树莓花青素作为化疗药物的增效剂提供了坚实的理论基础和应用前景。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Xi Y, Xu P F. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040 [J]. *Transl Oncol*, 2021, 14(10): 101174.  
 [2] van der Jeught K, Xu H C, Li Y J, et al. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(34): 3834-3848.  
 [3] Redondo-Blanco S, Fernández J, Gutiérrez-Del-Río I, et al. New insights toward colorectal cancer chemotherapy using natural bioactive compounds [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 8: 109.  
 [4] Santandreu F M, Valle A, Oliver J, et al. Resveratrol potentiates the cytotoxic oxidative stress induced by chemotherapy in human colon cancer cells [J]. *Cell Physiol*

- Biochem*, 2011, 28(2): 219-228.
- [5] Fulda S, Debatin K M. Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by the chemopreventive agent resveratrol [J]. *Oncogene*, 2004, 23(40): 6702-6711.
- [6] Kumazaki M, Noguchi S, Yasui Y, *et al.* Anti-cancer effects of naturally occurring compounds through modulation of signal transduction and miRNA expression in human colon cancer cells [J]. *J Nutr Biochem*, 2013, 24(11): 1849-1858.
- [7] Stoner G D, Wang L S, Zikri N, *et al.* Cancer prevention with freeze-dried berries and berry components [J]. *Semin Cancer Biol*, 2007, 17(5): 403-410.
- [8] Ravoori S, Vadhanam M V, Aqil F, *et al.* Inhibition of estrogen-mediated mammary tumorigenesis by blueberry and black raspberry [J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(22): 5547-5555.
- [9] Chen L L, Jiang B W, Zhong C G, *et al.* Chemoprevention of colorectal cancer by black raspberry anthocyanins involved the modulation of gut microbiota and SFRP2 demethylation [J]. *Carcinogenesis*, 2018, 39(3): 471-481.
- [10] Guo J, Yang Z, Zhou H R, *et al.* Upregulation of DKK<sub>3</sub> by miR-483-3p plays an important role in the chemoprevention of colorectal cancer mediated by black raspberry anthocyanins [J]. *Mol Carcinog*, 2020, 59(2): 168-178.
- [11] Zhang H, Guo J, Mao L P, *et al.* Up-regulation of miR-24-1-5p is involved in the chemoprevention of colorectal cancer by black raspberry anthocyanins [J]. *Br J Nutr*, 2019, 122(5): 518-526.
- [12] 郭君, 毛丽萍, 李倩倩, 等. 黑树莓花青素靶向调控 miR-338-5p/SIRT1 相关信号通路对结直肠癌的化学预防作用 [J]. *中草药*, 2018, 49(4): 853-858.
- [13] Xiao T, Guo Z H, Bi X L, *et al.* Polyphenolic profile as well as anti-oxidant and anti-diabetes effects of extracts from freeze-dried black raspberries [J]. *J Funct Foods*, 2017, 31: 179-187.
- [14] Li X, Chen L L, Gao Y Q, *et al.* Black raspberry anthocyanins increased the antiproliferative effects of 5-Fluorouracil and Celecoxib in colorectal cancer cells and mouse model [J]. *J Funct Foods*, 2021, 87: 104801.
- [15] Liu R, Chen Y W, Liu G Z, *et al.* PI3K/AKT pathway as a key link modulates the multidrug resistance of cancers [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 797.
- [16] Chelakkot V S, Liu K W, Yoshioka E, *et al.* MEK reduces cancer-specific PpIX accumulation through the RSK-ABCB<sub>1</sub> and HIF-1 $\alpha$ -FECH axes [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 22124.
- [17] Li B Y, Liu Y, Li Z H, *et al.* Dexmedetomidine promotes the recovery of renal function and reduces the inflammatory level in renal ischemia-reperfusion injury rats through PI3K/Akt/HIF-1 $\alpha$  signaling pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2020, 24(23): 12400-12407.
- [18] Mohammad F, Weissmann S, Leblanc B, *et al.* EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas [J]. *Nat Med*, 2017, 23(4): 483-492.
- [19] Yang R, Wang M, Zhang G H, *et al.* E2F7-EZH2 axis regulates PTEN/AKT/mTOR signalling and glioblastoma progression [J]. *Br J Cancer*, 2020, 123(9): 1445-1455.
- [20] Yu J H, Li S, Xu Z S, *et al.* CDX2 inhibits epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer by modulation of Snail expression and  $\beta$ -catenin stabilisation via transactivation of PTEN expression [J]. *Br J Cancer*, 2021, 124(1): 270-280.
- [21] Saunders N A, Simpson F, Thompson E W, *et al.* Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: Molecular and clinical perspectives [J]. *EMBO Mol Med*, 2012, 4(8): 675-684.
- [22] Chen T, Hwang H, Rose M E, *et al.* Chemopreventive properties of black raspberries in *N*-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis: Down-regulation of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase, and c-Jun [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(5): 2853-2859.
- [23] Bi X L, Fang W F, Wang L S, *et al.* Black raspberries inhibit intestinal tumorigenesis in *apc1638<sup>+/-</sup>* and *Muc2<sup>-/-</sup>* mouse models of colorectal cancer [J]. *Cancer Prev Res*, 2010, 3(11): 1443-1450.
- [24] Yuan R, Hou Y, Sun W, *et al.* Natural products to prevent drug resistance in cancer chemotherapy: A review [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2017, 1401(1): 19-27.
- [25] Zhang B, Huang X C, Wang H S, *et al.* Promoting antitumor efficacy by suppressing hypoxia via nano self-assembly of two irinotecan-based dual drug conjugates having a HIF-1 $\alpha$  inhibitor [J]. *J Mater Chem B*, 2019, 7(35): 5352-5362.
- [26] Fan T Y, Wang H, Xiang P, *et al.* Inhibition of EZH2 reverses chemotherapeutic drug TMZ chemosensitivity in glioblastoma [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(10): 6662-6670.
- [27] Gardner E E, Lok B H, Schneeberger V E, *et al.* Chemosensitive relapse in small cell lung cancer proceeds through an EZH2-SLFN11 axis [J]. *Cancer Cell*, 2017, 31(2): 286-299.