

土贝母苷乙通过调控 PI3K/Akt 通路及 LLGL2 泛素化抑制结直肠癌细胞增殖和肺转移

张甜甜^{1,2}, 黄家彦¹, 钟昊¹, 杨坤坤^{2*}, 于海洋^{3*}

1. 天津中医药大学中医药研究院, 天津 301617

2. 天津中医药大学中药学院, 天津 301617

3. 天津中医药大学交叉科学研究院, 天津 301617

摘要:目的 探究土贝母苷乙 (tubeimoside II, TUB-II) 抑制结直肠癌生长和转移的作用机制。方法 以人结直肠癌细胞系 RKO 和 SW620 为研究对象, 检测 TUB-II 对 RKO 和 SW620 细胞活力的影响; 克隆形成实验检测细胞增殖能力; 划痕实验检测细胞迁移能力; Western blotting 检测 TUB-II 对 RKO 和 SW620 细胞中致死性 (2) 巨型幼虫同源蛋白 2 [lethal (2) giant larvae homolog 2, LLGL2] 以及上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白表达的影响; 采用免疫共沉淀检测 TUB-II 对 LLGL2 泛素化的影响。体内构建小鼠皮下瘤模型和结直肠癌肺转移模型, 考察 TUB-II 对肿瘤生长和肺转移的影响。结果 TUB-II 显著抑制结直肠癌体内外增殖和转移 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。TUB-II 显著上调 LLGL2 的表达 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 并且抑制磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 通路的活化 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 从而抑制肿瘤细胞的增殖和转移。同时 TUB-II 抑制了双微体同源基因 2 (murine double minute 2, MDM2) 与 LLGL2 的相互作用来抑制 LLGL2 的泛素化, 从而稳定 LLGL2 的表达, 发挥抗结直肠癌作用。结论 TUB-II 抑制结直肠癌的发生发展, 其作用机制可能与抑制 LLGL2 泛素化及 PI3K/Akt 信号通路相关。

关键词: 土贝母苷乙; 致死性 (2) 巨型幼虫同源蛋白 2; 双微体同源基因 2; 泛素化; 结直肠癌

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)15-5931-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.15.013

Tubeimoside II inhibits colorectal cancer cell proliferation and lung metastasis through PI3K/Akt pathway and regulation of LLGL2 ubiquitination

ZHANG Tiantian^{1,2}, HUANG Jiayan¹, ZHONG Hao¹, YANG Shenshen², YU Haiyang³

1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. School of Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. Institute of Interdisciplinary Science, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of tubeimoside II (TUB-II) in inhibiting the growth and metastasis of colorectal cancer. **Methods** Human colorectal cancer cell lines RKO and SW620 were used as research subjects, the effect of TUB-II on viability of RKO and SW620 cells was detected. The cell proliferation ability was detected by colony formation assay. The cell migration ability was detected by scratch assay. Western blotting was used to detect the effect of TUB-II on expressions of lethal (2) giant larvae homolog 2 (LLGL2) and epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related proteins in RKO and SW620 cells. Co-immunoprecipitation was used to detect the effect of TUB-II on ubiquitination of LLGL2. Subcutaneous tumor model and colorectal cancer lung metastasis model *in vivo* were constructed to investigate the effect of TUB-II on tumor growth and lung metastasis. **Results** TUB-II significantly inhibited the proliferation and metastasis of colorectal cancer both *in vitro* and *in vivo* ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). TUB-II significantly upregulated the expression of LLGL2 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$) and inhibited the activation of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) pathway ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), thereby suppressing tumor cell proliferation and metastasis. At the same time, TUB-II inhibited

收稿日期: 2026-03-15

基金项目: 天津市自然科学基金资助项目 (23JCJCJC00040)

作者简介: 张甜甜, 女, 硕士, 研究方向为中药药理学。E-mail: 18019883085@163.com

*通信作者: 杨坤坤, 女, 博士, 副教授, 从事中药制剂研究。E-mail: yss2099@tjutcm.edu.cn

于海洋, 男, 博士, 教授, 从事中药及天然药物抗肿瘤分子作用机制、抗肿瘤药物药理研究。E-mail: hyyu@tjutcm.edu.cn

the interaction between murine double minute 2 (MDM2) and LLGL2 to suppress the ubiquitination of LLGL2, thereby stabilizing its expression and exerting an anti-colorectal cancer effect. **Conclusion** TUB-II inhibits the occurrence and development of colorectal cancer, and its mechanism may be related to the inhibition of LLGL2 ubiquitination and PI3K/Akt signaling pathway.

Key words: tubeimoside II; lethal (2) giant larvae homolog 2; murine double minute 2; ubiquitination; colorectal cancer

结直肠癌是常见的消化道恶性肿瘤^[1]。作为全球恶性肿瘤之一,其发病率位列全球第 2,死亡率位列全国第 4。其死亡率与远处器官转移密切相关,传统治疗以手术切除为主,放化疗为辅,现多着眼于靶向治疗和免疫治疗^[2-3]。但现有的抗癌药物种类有限、不良反应多、价格昂贵,因此探索抗结直肠癌的低成本靶向治疗药物、创新药物或先导化合物是必然趋势。致死性(2)巨型幼虫同源蛋白 2[lethal (2) giant larvae homolog 2, LLGL2]是调节上皮细胞顶端极性建立的支架蛋白,维持细胞不对称分裂和维持细胞上皮顶-底极性,对营养物质的吸收和肠上皮细胞的通透性屏障的建立等生理过程至关重要^[4]; LLGL2 在细胞增殖、分化、不对称分裂、细胞迁移和肿瘤形成等细胞行为中发挥着重要作用^[5-6]。细胞极性蛋白在肿瘤细胞生长中具有重要调节作用^[7]; LLGL2 是果蝇 LGL 蛋白在哺乳动物中的同源基因之一,能够抑制肿瘤生长^[8]。

土贝母苷乙(tubeimoside II, TUB-II, 结构式见图 1)是来源于葫芦科植物土贝母 *Bolbostemma paniculatum* (Maxim.) Franquet 的干燥块茎中含量较多的活性组分,是一种齐墩果烷型三萜皂苷^[9]。土贝母皂苷包括土贝母苷甲、乙、丙、丁、戊(tubeimoside I、II、III、IV、V)及假贝母皂苷 b 等, TUB-I 的研究较广^[10]。其中 TUB-II 在这几种类似物中具有相对最强的生物活性及最佳的生物安全性^[11]。临床上土贝母皂苷注射液常作为抗肿瘤的辅助药物。TUB-I 的

抗肿瘤活性已经被广泛研究^[12-13],但对 TUB-II 的研究相对较少,本研究旨在探究 TUB-II 是否能够影响结直肠癌的发生发展及其分子机制。

1 材料

1.1 细胞与动物

人结肠癌 SW620 细胞(批号 SCSP-5234)、人结肠腺癌 RKO 细胞(批号 SCSP-5236)购自中国科学院细胞库。

SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠 40 只,4~6 周龄,体质量 18~20 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,许可证号 SCXK(京)2021-0006。动物于实验前适应性饲养 1 周,每日给予标准食物和饮水,保持光照和避光循环(10 h/14 h)饲养,室温(25±2)℃。动物实验经天津中医药大学伦理委员会批准(批准号 TCM-LAEC2025270H2032)。

1.2 药品与试剂

TUB-II(批号 A05HB190276,质量分数≥98%)购自上海源叶生物科技有限公司;DMEM 细胞培养基(批号 PM150210,用于 RKO 细胞培养)、RPMI-1640 细胞培养基(批号 PM150110,用于 SW620 细胞培养)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS,批号 FSP500)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO,批号 472301)、噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT,批号 475989)购自美国 Sigma 公司;磷酸盐缓冲液(PBS,批号 201054)购自以色列 Biological Industries 公司;胰蛋白酶(批号 25200-072)购自美国 Gibco 公司;BCA 蛋白定量试剂盒(批号 A55866)购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;Protein A/G 免疫沉淀磁珠(批号 B23201)购自美国 Bimake 生物科技有限公司;兔抗磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)抗体(批号 T40115)、兔抗 p-PI3K 抗体(批号 T40116)、兔抗蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)抗体(批号 T55561)、兔抗 p-Akt(Ser473)抗体(批号 T40067)、兔抗 p-Akt(Ser308)抗体(批号 TP56018)购自艾比玛特医药科技(上海)有限公司;兔抗 β-actin 抗体(批号 AC038)、兔抗 Vimentin 抗体(批号 A19607)、兔抗 E-cadherin 抗体(批号 A0734)、兔

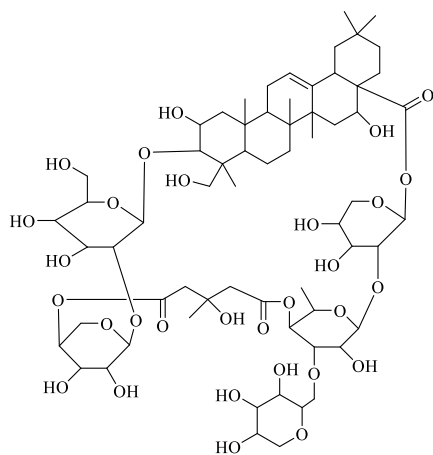


图 1 TUB-II 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of TUB-II

抗 LLGL2 抗体(批号 A13323)、兔抗双微体同源基因 2 (murine double minute 2, MDM2) 抗体(批号 A23388) 购自武汉爱博泰克生物科技有限公司; 柠檬酸钠抗原修复液(批号 C1032)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒(批号 G1120) 购自北京索莱宝科技有限公司; 免疫组化试剂盒(批号 PV-9000) 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 仪器

HH-S 型数显恒温水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂); Heracell VIOS160i 型二氧化碳培养箱、BSC-1600IIA2 型超净工作台、Varioskan LUX 型酶标仪、SORVALL ST16R 型低温高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Milli-Q 超纯水制备仪(美国 Millipore 公司); XS-205DU 型十万分之一天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); Finnpiptette Novus 型微量移液器(德国 Eppendorf 公司); GL-88B 型涡旋混合器(江苏海门麒麟医用仪器厂); 1658001 型电泳仪、1703935 型电转仪(美国 Bio-Rad 公司); HYC-390 型 4 °C 冰箱、DW-86L626 型 -20 °C 冰箱、DW-25L262 型 -80 °C 冰箱(中国海尔公司); EG1150H 型石蜡包埋机、HI1220 型石蜡烤片机(德国 Leica 公司); M1-L213B 型微波炉(韩国 LG 公司); 1 mL 无菌注射器(江西丰临医用器械有限公司)。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 溶液配制 TUB-II 以 DMSO 溶解, 配制成浓度为 10 mmol/L 的母液, 储存于 -20 °C 冰箱。给药时用细胞培养液将 10 mmol/L TUB-II 母液按比例稀释至所用浓度。

2.1.2 细胞培养 SW620 和 RKO 细胞分别用含 10% FBS 和 1% 青霉素/链霉素双抗的 RPMI-1640 或 DMEM 基础培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

2.1.3 细胞存活率检测 取对数生长期的 SW620 和 RKO 细胞, 以 8×10^3 个/mL 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μ L, 培养过夜。待细胞密度至 60% 左右时给予不同浓度(0、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6、3.2、6.4 μ mol/L) 的 TUB-II 处理 24 h。另设置不接种细胞不给药的空白组。弃上清, 避光加入 100 μ L 新鲜配制的 MTT 培养液(5 mg/mL), 培养 4 h, 吸净 MTT 溶液, 每孔加入 100 μ L DMSO 溶液, 置于 96 孔板振荡仪上混匀, 利用酶标仪检测吸光度(A)值,

计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.1.4 平板克隆形成实验 将 SW620 和 RKO 细胞分别以 1×10^3 个/mL 接种于 6 孔板中, 待细胞明显进行增殖时, 吸净培养基, 加入含不同浓度(0、0.1、0.2 μ mol/L) TUB-II 的完全培养基处理 24 h。弃去培养基, 更换为新鲜培养基培养 8~10 d, PBS 润洗, 加入 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.1% 结晶紫染色 15 min, 清水洗净多余结晶紫, 自然倒扣晾干并拍照, 使用 Image J V1.48 软件进行半定量分析。

2.1.5 划痕实验 将 SW620 和 RKO 细胞分别以 8×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 用移液管尖端刮擦每组的细胞形成均匀且宽度一致的划痕区域, 用 PBS 轻轻润洗细胞碎片, 吸净后加入含不同浓度(0、0.1、0.2 μ mol/L) TUB-II 的无血清培养基培养 24 h。在 0、24 h 通过倒置显微镜观察并拍照, 量化划痕区域。

2.1.6 Western blotting 检测 E-cadherin、Vimentin、LLGL2、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt (Ser473) 和 p-Akt (Ser308) 蛋白表达 SW620 和 RKO 细胞分别以 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 加入含不同浓度(0、0.4、0.8、1.6、3.2 μ mol/L) TUB-II 的完全培养基处理 24 h。收集细胞, PBS 清洗 3 次, 加入裂解液裂解后离心, 收集上清液, 测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后加入一抗, 4 °C 孵育过夜; 加入二抗, 室温孵育 1 h, 置于多功能成像系统进行显影, 用 Image J 软件分析条带灰度值, 计算目的蛋白表达量。

2.1.7 免疫共沉淀(co-immunoprecipitation, Co-IP) 检测 MDM2 对 LLGL2 泛素化的影响 SW620 和 RKO 细胞分别以 1×10^6 个/mL 接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后, 加入含不同浓度(0、1.6、3.2 μ mol/L) TUB-II 的完全培养基处理 24 h。收集细胞, 按“2.1.6”项下方法提取蛋白。将蛋白质 A/G 磁性珠(MCE) 用 1 $\times$ Wash 液洗涤 3 遍, 滴加 20 μ L LLGL2 抗体或 MDM2 抗体置于滚筒上, 4 °C 孵育过夜。将提取的蛋白样品分为 INPUT 组和 IP 组, 其中 IP 组加入已结合抗体的磁珠, 100 °C 金属浴 10 min 后, 弃去磁珠, 放凉, 冻存于 -20 °C 冰箱。按“2.1.6”项方法检测 LLGL2 和 MDM2 蛋白表达。

2.1.8 分子对接验证 在 PDB 数据库中检索目标蛋白, 搜索框搜索 LLGL2 名称, 方法中选择 X-射

线衍射法,选最小分辨率,获取 PDB 文件。在 PubChem 数据库中获取 TUB-II 的 SDF 文件,将上述文件上传至 CB-DOCK2 在线平台,生成 TUB-II 与 LLGL2 之间的结合活性数据。

2.2 动物实验

2.2.1 溶液配制 将 10 mmol/L TUB-II 母液用 PBS 按比例稀释至所用浓度,并使 DMSO 终体积分数不超过 10%。

2.2.2 动物模型观察 TUB-II 对肿瘤生长和肺转移的影响

(1) 小鼠皮下瘤模型:取 5×10^5 个 CT26 细胞悬浮于 200 μ L PBS 中,皮下接种于雄性 BALB/c 裸鼠中(100 μ L/只)。每天称定小鼠体质量,接种 4 d 后可见皮下结节,说明模型建立成功。造模小鼠随机分为对照组和 TUB-II 低、高剂量(1、4 mg/kg)^[14]组,每组 5 只。连续 2 周 ip 给药,1 次/d。使用卡尺每 2 天测量肿瘤长度(L)和宽度(W),计算肿瘤体积。实验结束后处死小鼠,并记录肿瘤质量。

$$\text{肿瘤体积} = 1/2 \times L \times W^2$$

(2) 小鼠结直肠癌肺转移模型:取 5×10^5 个 CT26 细胞悬浮于 200 μ L PBS 中,尾 iv 于雄性 BALB/c 裸鼠中(100 μ L/只)。每天称定小鼠体质量,接种 4 d 后,造模小鼠随机分为对照组和 TUB-II 低、高剂量(1、4 mg/kg)组,每组 5 只。连续 2 周 ip 给药,1 次/d。实验结束后统计肺部转移结节,并记录小鼠肺组织质量,计算肺脏指数。

$$\text{肺脏指数} = \text{肺组织质量} / \text{体质量}$$

2.2.3 HE 染色观察 TUB-II 对小鼠组织器官毒性以及肺转移组织的病理变化 收集小鼠主要器官与肿瘤组织,于 4%多聚甲醛中固定 48 h 后,切成适当大小的组织块置于包埋盒中,加入 70%乙醇过

夜,脱水、透明后浸于 55 $^{\circ}$ C 的液体石蜡中 2 h 进行包埋,将组织蜡块切片,随后烤干。脱蜡复水后,用苏木素染液染细胞核、分化液去除多余苏木素、自来水返蓝、充分水洗、伊红染液染细胞质,再脱水透明处理,最后用中性树脂封片,于显微镜下观察并拍照。

2.2.4 免疫组化检测 肿瘤组织中 Ki67 表达 收集小鼠肿瘤组织,经脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、捞片、烘片、脱蜡复水后,切片用 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)进行抗原修复,画封闭圈,滴加山羊血清,室温封闭 2 h。用 3% H_2O_2 室温处理 10 min 去除内源性过氧化酶,滴加一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;滴加二抗,室温孵育 1 h。随后进行 DAB 显色,用苏木素染液染细胞核、分化液去除多余苏木素、自来水返蓝、充分水洗后,再脱水透明处理,最后用中性树脂封片,于显微镜下观察并拍照。

2.2.5 Western blotting 检测肿瘤组织中 LLGL2 蛋白表达 收集小鼠肿瘤组织,加入裂解液提取蛋白。按“2.1.6”项下方法检测 LLGL2 蛋白表达。

2.3 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析。多组间比较使用单因素方差分析(One-way ANOVA),两独立样本之间用 Student's t 检验,方差分析前进行正态性检验。

3 结果

3.1 TUB-II 抑制结直肠癌细胞活性

为探究 TUB-II 对结直肠癌细胞活力的影响,RKO 和 SW620 细胞分别给予不同浓度的 TUB-II 干预 24 h,如图 2 所示,0.4~6.4 μ mol/L TUB-II 显著抑制 RKO 和 SW620 细胞活力($P < 0.05$ 、0.01、0.001),且呈剂量相关性。

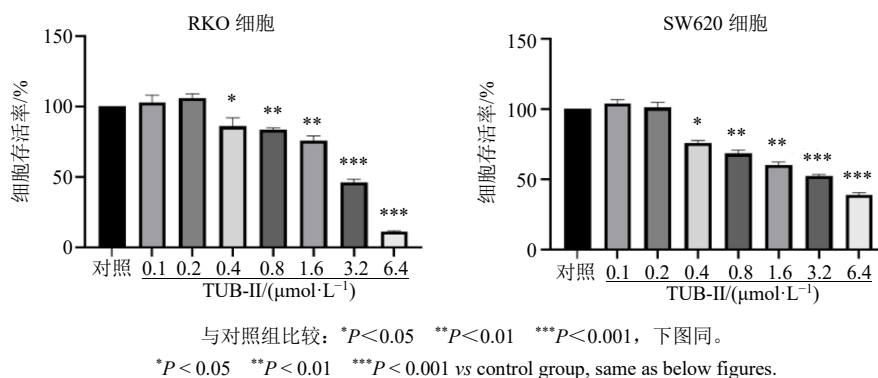


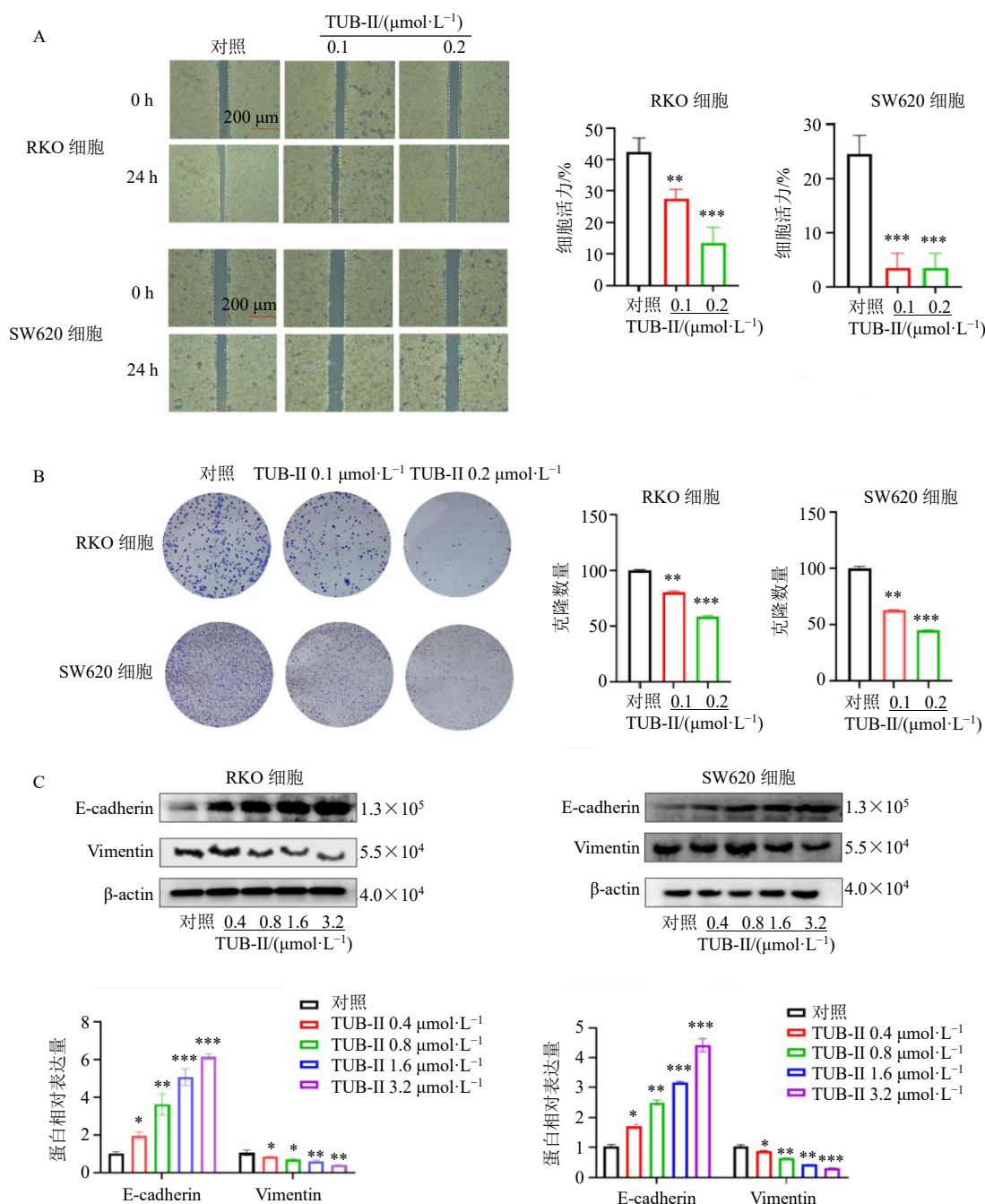
图 2 TUB-II 对 RKO 和 SW620 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of TUB-II on viability of RKO and SW620 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 TUB-II抑制结直肠癌细胞的体外增殖及转移

为了探究 TUB-II 对结直肠癌细胞迁移和增殖的影响, TUB-II 选择细胞活性大于 85% 的浓度 (0.1、0.2 $\mu\text{mol/L}$) [15] 干预 RKO 和 SW620 细胞, 进行划痕实验和平板克隆实验, 结果如图 3-A、B 所示,

与对照组比较, 0.1、0.2 $\mu\text{mol/L}$ TUB-II 显著抑制 RKO 和 SW620 细胞的迁移和克隆形成 ($P < 0.01$ 、0.001)。采用 Western blotting 检测上皮-间充质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 相关蛋白表达, 结果如图 3-C 所示, 在 RKO 和 SW620 细胞



A-TUB-II 对 RKO 和 SW620 细胞迁移的影响 ($\times 100$); B-TUB-II 对 RKO 和 SW620 细胞克隆形成的影响; C-TUB-II 对 RKO 和 SW620 细胞 E-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达的影响。

A-effect of TUB-II on migration of RKO and SW620 cells ($\times 100$); B-effect of TUB-II on colony formation of RKO and SW620 cells; C-effect of TUB-II on expressions of E-cadherin and Vimentin proteins in RKO and SW620 cells.

图 3 TUB-II 抑制结直肠癌细胞的体外增殖及转移 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

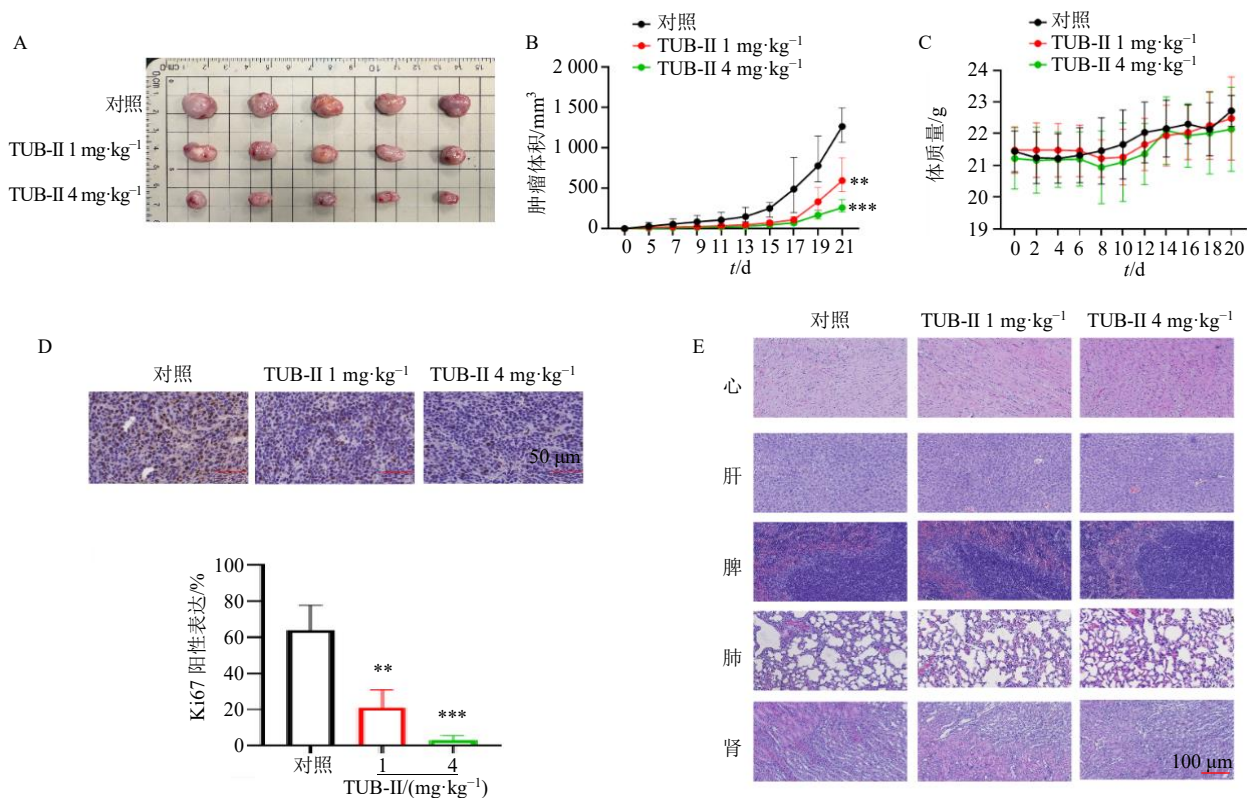
Fig. 3 TUB-II inhibits proliferation and metastasis *in vitro* of colorectal cancer cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

中,与对照组比较,0.4~3.2 $\mu\text{mol/L}$ TUB-II显著上调 E-cadherin 的表达 ($P<0.05$ 、0.01、0.001),显著下调 Vimentin 的表达 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。

3.3 TUB-II 抑制小鼠体内肿瘤生长

为评估 TUB-II对结直肠癌肿瘤生长的影响,构建小鼠结直肠癌皮下瘤模型,给予 TUB-II干预后能够抑制小鼠肿瘤的生长(图 4-A),肿瘤体积显著减

小(图 4-B, $P<0.01$ 、0.001),小鼠体质量无明显变化。采用免疫组化检测肿瘤组织增殖标志物 Ki67 表达,如图 4-D 所示,与对照组比较,给予 TUB-II干预后肿瘤组织 Ki-67 表达显著降低 ($P<0.01$ 、0.001)。如图 4-E 所示,各组小鼠心、肝、脾、肺、肾组织无明显病理变化,表明 TUB-II具有较好的安全性,对脏器无明显影响。



A-各组肿瘤外观形态; B-肿瘤体积变化; C-小鼠体质量变化; D-免疫组化检测肿瘤组织 Ki67 表达 ($\times 400$); E-HE 染色观察各组小鼠脏器组织病理变化 ($\times 200$)。

A-appearance and morphology of tumors in each group; B-changes in tumor volume; C-changes in body weight of mice; D-Ki67 expression in tumor tissues detected by immunohistochemistry ($\times 400$); E-pathological changes in organ tissues of mice in each group observed by HE staining ($\times 200$).

图 4 TUB-II 抑制小鼠体内肿瘤生长 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

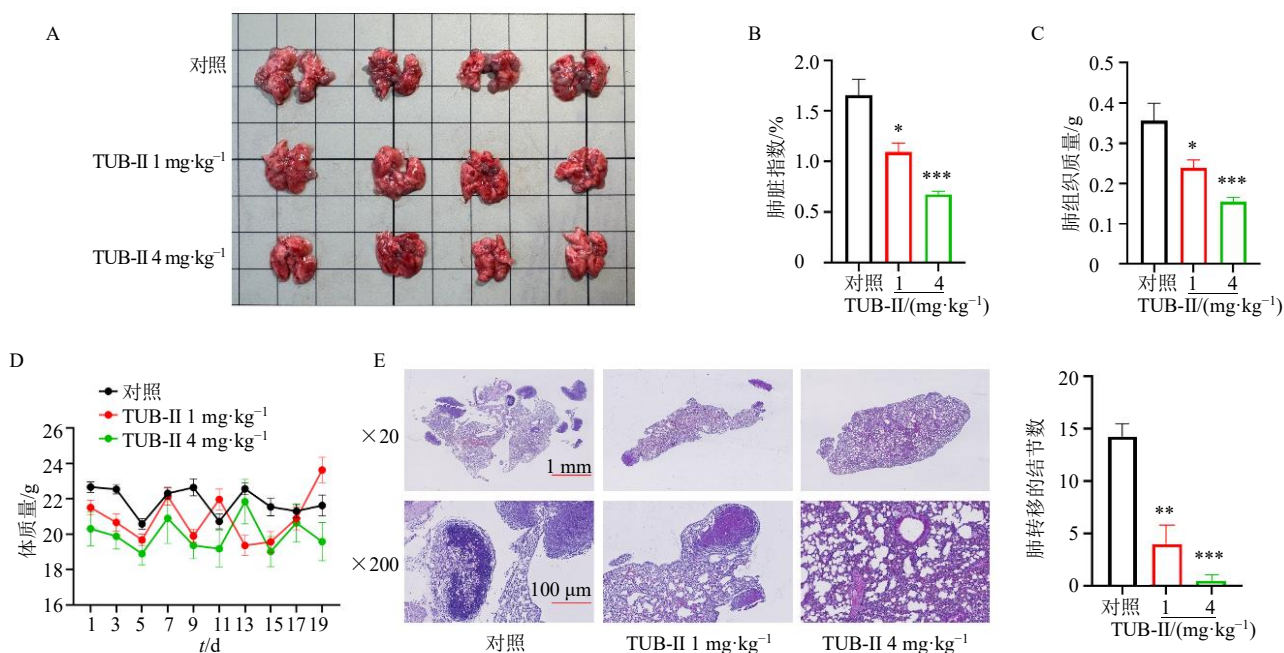
Fig. 4 TUB-II inhibits tumor growth *in vivo* in mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.4 TUB-II 抑制结直肠癌小鼠肺转移

为了进一步探究 TUB-II对结直肠癌细胞体内转移的影响, BALB/c 裸鼠通过尾 iv CT26 细胞建立肺转移模型, 给予 TUB-II干预后能够抑制结直肠癌细胞向肺部的传播(图 5-A), 且肺脏指数和肺组织质量显著降低(图 5-B、C, $P<0.05$ 、0.001), 小鼠体质量无明显变化(图 5-D)。各组小鼠肺组织的 HE 染色结果(图 5-E)显示, 与对照组比较, TUB-II干预后肺转移的结节数显著减少 ($P<0.01$ 、0.001)。

3.5 TUB-II 促进 LLGL2 的表达

分子对接结果(图 6-A)显示, TUB-II与 LLGL2 蛋白结合能力良好。采用 Western blotting 检测 TUB-II对 LLGL2 蛋白表达的影响, 如图 6-B、C 所示, 在 RKO 和 SW620 细胞中, 与对照组比较, 0.4~3.2 $\mu\text{mol/L}$ TUB-II显著上调 LLGL2 的表达 ($P<0.05$ 、0.01、0.001); 如图 6-D 所示, 在小鼠皮下瘤模型中, 与对照组比较, 给予 TUB-II干预后显著上调肿瘤组织 LLGL2 蛋白表达($P<0.05$ 、0.01)。表明 TUB-II可能作为调节 LLGL2 的活性成分。

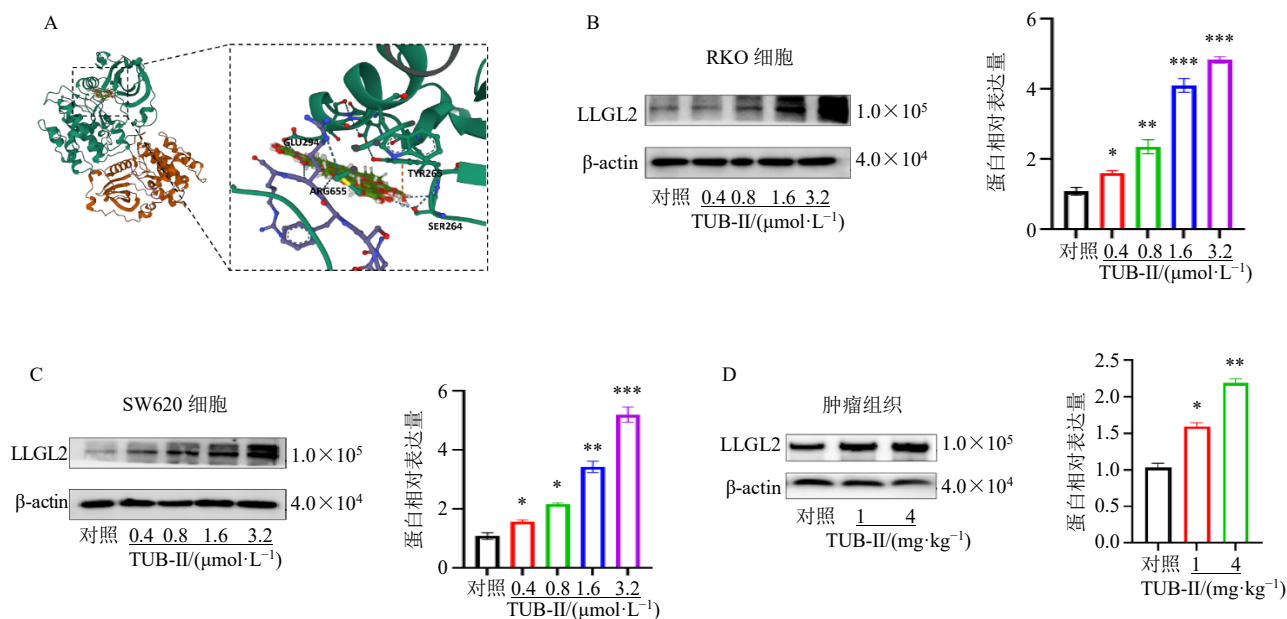


A-各组肺组织外观形态; B-肺脏指数; C-肺组织质量; D-小鼠体重变化; E-HE 染色观察肺组织病理变化。

A-appearance and morphology of lung tissues in each group; B-lung index; C-lung tissue weight; D-changes in body weight of mice; E-pathological changes in lung tissue observed by HE staining.

图5 TTUB-II 抑制结直肠癌小鼠肺转移 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 TUB-II inhibits lung metastasis in colorectal cancer mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



A-TUB-II 与 LLGL2 的分子对接结果; B、C-TUB-II 对 RKO 和 SW620 细胞 LLGL2 蛋白表达的影响; D-TUB-II 对皮下瘤模型小鼠肿瘤组织 LLGL2 蛋白表达的影响。

A-molecular docking results of TUB-II and LLGL2; B, C-effect of TUB-II on LLGL2 protein expression in RKO and SW620 cells; D-effect of TUB-II on expression of LLGL2 protein in tumor tissue of subcutaneous tumor model mice.

图6 TUB-II 促进 LLGL2 的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 TUB-II promotes LLGL2 expression ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.6 TUB-II 抑制 PI3K/Akt 通路的激活

研究发现, LLGL2 可以抑制下游 PI3K/Akt 通路的激活^[16]。如图 7 所示, 在 RKO 和 SW620 细胞中, 与对照组比较, 1.6、3.2 $\mu\text{mol/L}$ TUB-II 均显著抑制 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 的蛋白表达 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 表明 TUB-II 可能通过上调 LLGL2 的表达抑制 PI3K/Akt 通路的激活, 从而抑制结直肠癌的发展。

3.7 TUB-II 抑制 LLGL2 的泛素化

泛素化是细胞内蛋白质质量控制和信号调节的重要机制^[17]。在正常细胞中, LLGL2 的泛素化受到严格控制以维持细胞的正常功能, 而在肿瘤细胞中, 这种调控失衡。LLGL2 可被 E3 泛素连接酶 MDM2 调控, 导致其泛素化降解^[18]。Co-IP 结果 (图

8) 显示, TUB-II 可以抑制 LLGL2 的泛素化从而抑制其降解。

3.8 TUB-II 通过抑制 MDM2 与 LLGL2 之间的相互作用来抑制 LLGL2 的泛素化

MDM2^[19]是一种 E3 泛素连接酶, 可以直接与 p53 肿瘤抑制因子结合, 抑制其转录活性和蛋白稳定性^[20]。并且 MDM2 是 LLGL2 的 E3 泛素连接酶, 为进一步探究其泛素化机制, 给予 TUB-II 干预后发现 MDM2 和 LLGL2 之间的相互作用明显降低, TUB-II 可以抑制 MDM2 对 LLGL2 的泛素化降解 (图 9), 表明 TUB-II 通过下调 MDM2 的表达来抑制 MDM2 与 LLGL2 的相互作用, 并抑制 MDM2 对 LLGL2 的泛素化降解, 进而恢复 LLGL2 的表达。

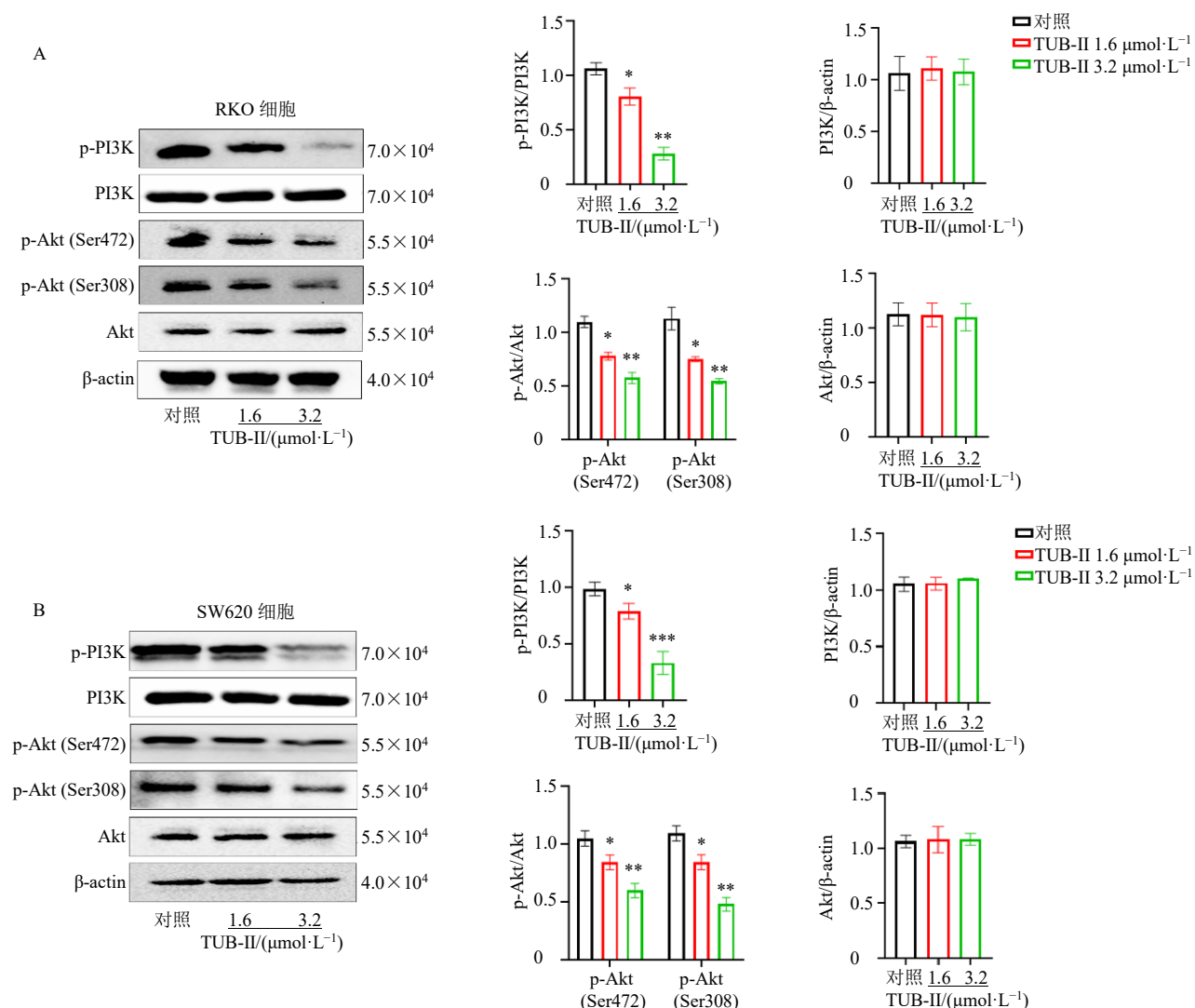


图 7 TUB-II 抑制 RKO (A) 和 SW620 (B) 细胞中 PI3K/Akt 通路的激活 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 7 TUB-II inhibits PI3K/Akt pathway activation in RKO (A) and SW620 (B) cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

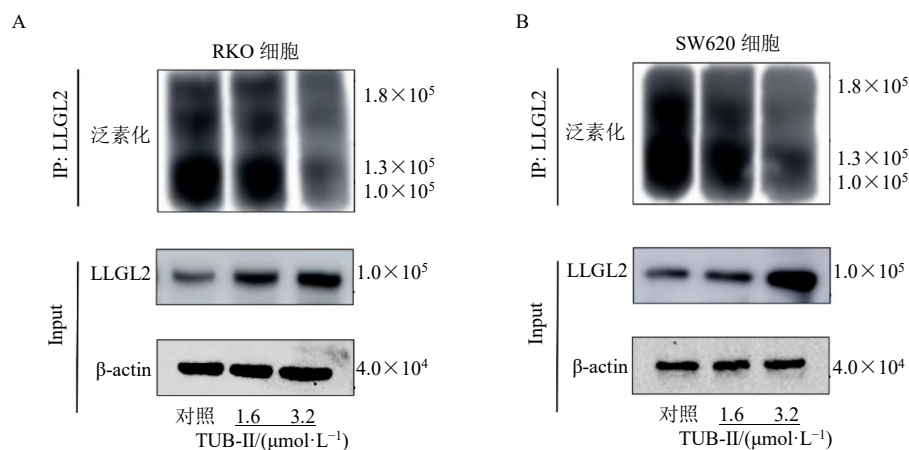


图 8 TUB-II 抑制 RKO (A) 和 SW620 (B) 细胞中 LLGL2 的泛素化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 TUB-II inhibits ubiquitination of LLGL2 in RKO (A) and SW620 (B) cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

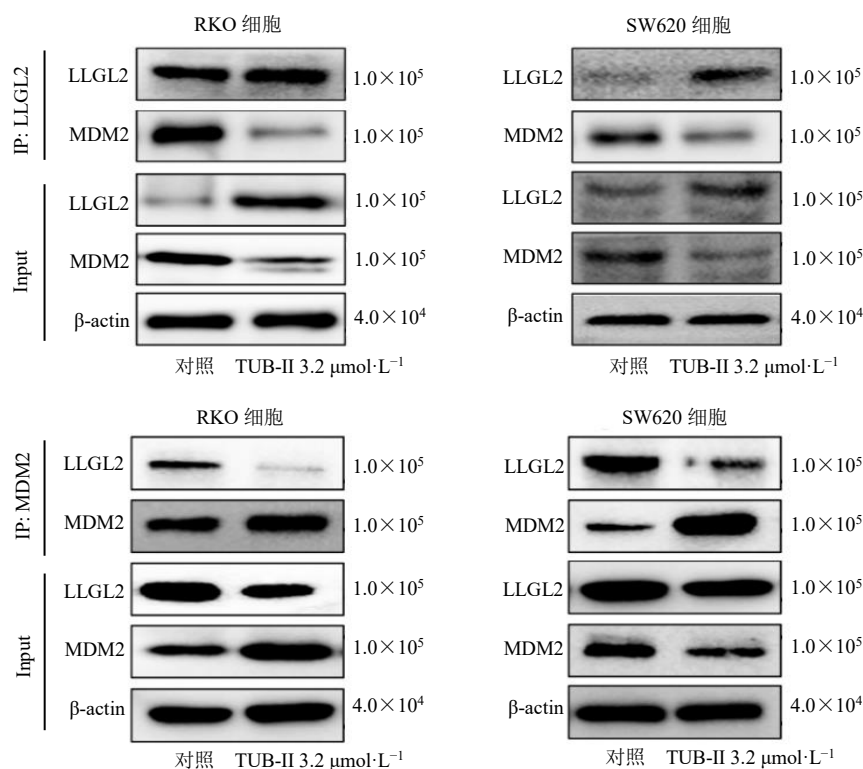


图 9 TUB-II 抑制 MDM2 与 LLGL2 之间的相互作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 TUB-II inhibits interaction between MDM2 and LLGL2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

本研究发现 TUB-II 能有效抑制结直肠癌细胞及肿瘤的生长, 表明其治疗结直肠癌方面具有临床应用潜力, 并且确定了 LLGL2 是 TUB-II 可调节的抑癌基因。课题组前期研究表明, LLGL2 可调节细胞增殖过程并且与 PI3K/Akt 通路相关, LLGL2 与其 E3 泛素连接酶和其之间的相互作用影响结直

肠癌细胞和肿瘤的生长^[21]。本研究发现 TUB-II 在结直肠癌中通过双重机制发挥抑癌作用: 一方面上调了 LLGL2 的表达进而抑制 PI3K/Akt 信号通路, 另一方面通过干扰 LLGL2 的 E3 泛素连接酶 MDM2 和 LLGL2 的相互作用来抑制 LLGL2 的泛素化, 从而稳定了 LLGL2 的蛋白水平。这一发现揭示了 TUB-II 作为天然中药小分子化合物调控细胞极性

蛋白稳定性的新机制,为在结直肠癌治疗当中的应用提供了理论依据。

LLGL2 作为极性调控因子,近年来在肿瘤中的功能逐渐被认识。本研究在课题组前期研究基础上,进一步探索了干预 MDM2 和 LLGL2 相互作用的策略,证实 TUB-II 可有效阻碍两者的结合能力,保护 LLGL2 免受蛋白酶体途径降解。这一结果不仅验证了 MDM2 作为 LLGL2 的负调控因子的关键作用,更提示了靶向蛋白与蛋白之间相互作用是可以恢复 LLGL2 抑癌功能的有效途径。TUB-II 是从土贝母中提取的活性成分,已有报道 TUB-II 可直接结合 E3 泛素连接酶 Herc2,阻断其对铁代谢调控蛋白核受体共激活因子 4 (nuclear receptor coactivator 4, NCOA4) 的泛素化降解;NCOA4 积累会使得铁蛋白自噬,诱导癌细胞铁死亡^[22]。本研究将 TUB-II 与 LLGL2 稳定性调控联系起来,一方面通过增加了 LLGL2 的蛋白水平从而抑制 PI3K/Akt 通路的激活,另一方面通过干扰 MDM2 与 LLGL2 的结合阻断 LLGL2 的泛素化降解,使得土贝母相较于单一靶点药物有更广泛且显著的抑癌效果。

本研究尚存在以下局限性:①TUB-II 直接结合 MDM2 或 LLGL2 的具体结构域尚未确定,后续需通过表面等离子体共振和位点突变等技术明确其结合模式;②TUB-II 是否影响 MDM2 对其他底物的泛素化活性尚不清楚;③对结直肠癌细胞系凋亡的影响需进一步研究^[23];④主要基于体外细胞实验及体内皮下瘤和肺转移模型,后续可利用结直肠癌原位模型及 LLGL2 条件性敲除小鼠验证 TUB-II 的体内疗效及对 LLGL2 调控的特异性^[24];⑤TUB-II 作为天然产物,其生物利用度和体内代谢特征有待系统评估,并且在安全性上还需进一步考察,以便为临床转化提供药理学基础。

综上,本研究发现 TUB-II 通过上调 LLGL2 表达抑制 PI3K/Akt 通路,以及通过抑制 MDM2 和 LLGL2 相互作用介导的 LLGL2 泛素化抑制结直肠癌的发生发展。将 TUB-II 抑制结直肠癌的恶性进展作为探索抗结直肠癌药物的一种有前景的治疗策略,并且为基于天然产物调控细胞极性蛋白稳定性提供了新策略,未来可借助纳米材料构建靶向递送系统^[25],增强药物在肿瘤部位的富集与释放控制,推动土贝母活性成分在结直肠癌精准治疗中的转化应用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Laskar R S, Qu C, Huyghe J R, *et al.* Genome-wide association studies and Mendelian randomization analyses provide insights into the causes of early-onset colorectal cancer [J]. *Ann Oncol*, 2024, 35(6): 523-536.
- [2] Underwood P W, Ruff S M, Pawlik T M. Update on targeted therapy and immunotherapy for metastatic colorectal cancer [J]. *Cells*, 2024, 13(3): 245.
- [3] Yue Y Z, Su L L, Wang Y H, *et al.* Banxia Xiexin Decoction inhibits colitis-associated colorectal cancer development by modulating STAT3 signaling and gut microbiota [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(2): 380-391.
- [4] Saito Y, Li L, Coyaude E, *et al.* LLGL2 rescues nutrient stress by promoting leucine uptake in ER⁺ breast cancer [J]. *Nature*, 2019, 569(7755): 275-279.
- [5] Bii V M, Rudoy D, Klezovitch O, *et al.* Lethal giant larvae gene family (Lgl1 and Lgl2) functions as a tumor suppressor in mouse skin epidermis [J]. *BioRxiv*, 2023, doi: 10.1101/2023.03.06.531408.
- [6] Hong G L, Kim K H, Kim Y J, *et al.* Novel role of LLGL2 silencing in autophagy: Reversing epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer [J]. *Biol Res*, 2024, 57(1): 25.
- [7] Du D, Xu F L, Yu L H, *et al.* The tight junction protein, occludin, regulates the directional migration of epithelial cells [J]. *Dev Cell*, 2010, 18(1): 52-63.
- [8] Gu Q Y, Liu Y X, Wang J L, *et al.* LLGL2 inhibits ovarian cancer metastasis by regulating cytoskeleton remodeling via ACTN1 [J]. *Cancers*, 2023, 15(24): 5880.
- [9] Yu T X, Ma R D, Yu L J. Structure-activity relationship of tubeimosides in anti-inflammatory, antitumor, and antitumor-promoting effects [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2001, 22(5): 463-468.
- [10] Wang J Z, Wang C, Jia Y L, *et al.* Targeted ferroptosis of myofibroblasts by tubeimoside I attenuates hypertrophic scar formation [J]. *Front Pharmacol*, 2025, 16: 1654108.
- [11] Chen Y, Zhu X, Wang K, *et al.* Tubeimoside II inhibits TGF- β 1-induced metastatic progression of human retinoblastoma cells through suppressing redoxosome-dependent EGFR activation [J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 335: 109367.
- [12] Zhang Q X, Cheng W J, Li Y, *et al.* Tubeimoside I inhibits the growth of triple-negative breast cancer via the NR3C2/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2025, 398(11): 15377-15390.
- [13] Wang K, Zhan Y J, Chen B N, *et al.* Tubeimoside I-induced lung cancer cell death and the underlying crosstalk between lysosomes and mitochondria [J]. *Cell Death Dis*,

- 2020, 11: 708.
- [14] Liu X J, Yin M X, Dong J W, *et al.* Tubeimoside-I induces TFEB-dependent lysosomal degradation of PD-L1 and promotes antitumor immunity by targeting mTOR [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(10): 3134-3149.
- [15] Park A, Joo M, Kim K, *et al.* A comprehensive evaluation of regression-based drug responsiveness prediction models, using cell viability inhibitory concentrations (IC₅₀ values) [J]. *Bioinformatics*, 2022, 38(10): 2810-2817.
- [16] Leng S S, Xie F, Liu J Y, *et al.* LLGL2 increases Ca²⁺ influx and exerts oncogenic activities via PI3K/Akt signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 683629.
- [17] Nakayama K I, Nakayama K. Ubiquitin ligases: Cell-cycle control and cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(5): 369-381.
- [18] Koo N, Sharma A K, Narayan S. Therapeutics targeting p53-MDM2 interaction to induce cancer cell death [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 5005.
- [19] Wang Z Q, Yue S R, Chen X X, *et al.* Design of murine double minute 2 proteolysis targeting chimera degraders with a built-in tumor-targeting ability [J]. *J Med Chem*, 2024, 67(21): 18865-18882.
- [20] Wang C, Liu W, Guo H, *et al.* The intrabody against murine double minute 2 via a p53-dependent pathway induces apoptosis of cancer cell [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(11): 5286.
- [21] Huang J Y, Zhang T T, Li H M, *et al.* Ubiquitination-dependent LLGL2 degradation drives colorectal cancer progression via THBS3 mRNA stabilization [J]. *Adv Sci*, 2025, 12(39): e01656.
- [22] Xu T, Liu Q, Ma H T, *et al.* Tubeimoside II potentiates anti-PD-1 therapy in NSCLC by increasing ferroptosis sensitivity and remodeling immune landscape [J]. *Phytomedicine*, 2026, 150: 157660.
- [23] Parhira S, Zhu G Y, Wangteeraprasert A, *et al.* Enhancement of apoptosis in HCT116 and HepG2 cells by *Coix lacryma-jobi* var. *lacryma-jobi* seed extract in combination with sorafenib [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(2): 322-339.
- [24] Roper J, Tammela T, Cetinbas N M, *et al.* In vivo genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(6): 569-576.
- [25] Lai Y Y, Xie B, Zhang W T, *et al.* Pure drug nanomedicines-where we are? [J]. *Chin J Nat Med*, 2025, 23(4): 385-409.

[责任编辑 李亚楠]