

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.21.001

· 基础研究 ·

花生四烯酸通过 COX-2 酶代谢氧化失活 PTEN 促进结直肠癌生长 *

常 剑 陶 京[△] 朱忠超[△] 方 琦 李汉军 朱孔凡

(武汉大学人民医院普通外科 湖北 武汉 430060)

摘要 目的:本研究旨在阐明过表达 COX-2 的结直肠癌中花生四烯酸代谢与 PTEN 及其下游通路的相互关系。**方法:**利用过表达 COX-2 结直肠癌细胞系 CT26 和 Apc^{Min/+} 小鼠腺瘤模型,联合花生四烯酸、COX-2 抑制剂 NS-398 和 COX-2 基因敲除的干预,采用流式细胞仪检测细胞凋亡、细胞周期及活性氧的产生;Transwell 和克隆形成试验观察细胞的迁移和增殖能力;Western blot 和免疫组化检测 PTEN 及其下游相关蛋白的表达。**结果:**花生四烯酸通过 COX-2 酶代谢产生活性氧并失活 PTEN 抑癌基因表达,从而激活 PI3K-AKT 蛋白促进 CT26 结直肠癌细胞迁移和增殖,抑制细胞凋亡;而 COX-2 抑制剂 NS-398 阻止了花生四烯酸在 CT26 结直肠癌细胞中的恶性生物学行为。同时,在 COX-2 基因敲除 Apc^{Min/+} 小鼠腺瘤组织中,减弱了氧化应激水平,增加了 PTEN 表达,抑制了 PI3K-AKT 磷酸化,进一步抑制腺瘤生长,提高小鼠生存率。**结论:**花生四烯酸通过 COX-2 酶代谢产生活性氧下调 PTEN 活性,并激活 PI3K-AKT 促进结直肠癌生长;COX-2 抑制剂可间接促进 PTEN 表达,抑制结直肠癌生长,能够作为 CRC 的潜在治疗靶点。

关键词:结直肠癌;COX-2;PTEN/PI3K/AKT 途径;花生四烯酸

中图分类号:R-33;R735.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)21-4001-06

Arachidonic Acid Promotes the Growth of Colorectal Cancer by Oxidative Inactivation of PTEN Through COX-2 Enzyme Metabolism*

CHANG Jian, TAO Jing[△], ZHU Zhong-chao[△], FANG Qi, LI Han-jun, ZHU Kong-fan

(Department of general surgery, People's Hospital of Wuhan University, Wuhan, Hubei, 430060, China)

ABSTRACT Objective: This study aimed to clarify the relationship between arachidonic acid metabolism, PTEN and its downstream pathways in COX-2 overexpressing colorectal cancer. **Methods:** By using an over-expressed COX-2 of colorectal cancer cell line CT26 and Apc^{Min/+} mouse adenoma model, combined with arachidonic acid, COX-2 inhibitor NS-398 treatment and COX-2 gene knockout intervention, flow cytometry was used to detect apoptosis, cell cycle and the generation of reactive oxygen species; transwell and colony formation assay were used to test the migration and proliferation capacity of cells; western blot and immunohistochemistry were used to detect the expression of PTEN and its downstream related proteins. **Results:** In CT26 colorectal cancer, arachidonic acid is metabolized by COX-2 enzymes to produce reactive oxygen species and inactivate PTEN, thereby activating PI3K-AKT protein to promote cell migration and proliferation, and inhibit apoptosis; while COX-2 inhibitor NS-398 prevents the malignant biological behavior of arachidonic acid in CT26 colorectal cancer cells. Moreover, in the COX-2 gene knockout Apc^{Min/+} mouse adenomas tissue, NS-398 treatment reduced the level of oxidative stress, increased the expression of PTEN, inhibited the phosphorylation of PI3K-AKT, further inhibited the growth of adenomas, and improved the survival rate of mice. **Conclusion:** Arachidonic acid could produce active oxygen to down-regulate PTEN activity and activate PI3K-AKT to promote colorectal cancer growth through COX-2 enzyme; COX-2 inhibitors can indirectly promote PTEN expression and inhibit colorectal cancer growth, and can act as a potential target for CRC treatment.

Key words: Colorectal cancer; COX-2; PTEN/PI3K/AKT pathway; Arachidonic acid

Chinese Library Classification (CLC): R-33; R735.3 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2020)21-4001-06

前言

结直肠癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一^[1],我国结直肠

癌的发病率和死亡率呈逐年上升趋势^[2]。流行病学和动物研究的证据表明,高脂肪和高蛋白饮食与结直肠癌患病风险有关^[3-5]。花生四烯酸(arachidonic acid, AA)是一种参与炎症反应的必需

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81702368);湖北省自然科学基金项目(2016CFB121)

作者简介:常剑(1984-),男,主治医师,主要研究方向:消化道肿瘤及肝胆胰疾病,E-mail: changjian1022@sina.com

[△] 通讯作者:陶京(1963-),男,主任医师,主要研究方向:消化道肿瘤及胰腺炎相关研究,E-mail: tj918@163.com;

朱忠超(1973-),男,副主任医师,主要研究方向:胆胰管疾病,E-mail: zhuzhongchao@163.com

(收稿日期:2020-05-28 接受日期:2020-06-24)

脂肪酸。它是由细胞内磷脂酶 A₂ 从膜磷脂中分裂出来,经环氧化酶(cyclooxygenase, COX)和脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)分别代谢为前列腺素 (prostaglandin, PG) 和白三烯(leukotrienes, LT)。这些代谢产物与结直肠癌的发生有关^[6-8]。最近的报告表明,AA 可通过增加 AKT 磷酸化刺激细胞生长,但具体机制尚不清楚^[9]。

第 10 号染色体上缺失的磷酸酶和张力素同源物 (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10, PTEN) 是一种磷酸酶和抑癌基因^[10,11]。据报道在胰腺癌细胞中,AA 通过 COX-2 代谢使 PTEN 逐渐失活,从而激活 AKT 及其下游作用靶点 (GSK-3 β 和 S6K),刺激胰腺癌细胞增殖^[12]。但在高表达 COX-2 的结直肠癌中,AA 代谢与 PTEN 及其下游信号之间的关系尚未见报道。因此,本研究利用高表达 COX-2 结直肠癌细胞 CT26 和 Apc^{Mm+/+} 小鼠腺瘤模型,联合 AA、COX-2 抑制剂 NS-398 和 COX-2 基因敲除的干预方法,通过体内外实验深入探讨 AA 经 COX-2 代谢途径与 PTEN 及其下游信号之间通路在结直肠癌发生发展中的相互关系,为探索结直肠癌的潜在治疗靶点提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

高表达 COX-2 小鼠结直肠癌细胞系 CT26 购自中国科学院细胞库。细胞在含 4500 mg/L 葡萄糖、2 mmol/L 谷氨酰胺、10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素的 RPMI-1640 培养基中于 5% CO₂ 和 37℃ 恒温培养箱中培养。花生四烯酸 (AA) 加入细胞的终浓度为 10 μ M, COX-2 抑制剂 NS-398 加入细胞的终浓度为 15 μ M。

1.2 流式细胞术检测细胞凋亡

将 2×10^4 细胞重新悬浮在 500 μ L annexin 结合缓冲液中,并在 37℃ 下添加 4 μ L Annexin-V-Alexafluor 488 (Invitrogen) 与细胞孵育 30 分钟。孵育后,用冰冻 Annexin 缓冲液洗涤一次,加入 1 μ L 的 7-氨基放线菌素 D (7-AAD) (Invitrogen)。流式细胞仪检测每个样本的凋亡率。

1.3 分析细胞周期

在用 AA 和 COX-2 抑制剂处理 48 h 后,收集所有细胞 (5×10^4 细胞/mL),并用 70% 乙醇预冷固定过夜。然后,将细胞与碘化丙二钠 (PI, sigma) 在室温下孵育 20 分钟。最后用流式细胞仪进行检测,分析细胞周期变化。

1.4 Transwell 细胞侵袭试验

用含有多孔聚碳酸酯膜插入物 (孔径 8 μ m, Corning, NY, USA) 的 Transwell 小室测量细胞侵袭。将上室在 37℃ 涂覆基质胶作用 2 h, 然后加入含 5×10^4 细胞/mL 无血清培养过夜后的细胞 100 μ L, 在下室内加入 500 μ L 的 RPMI-1640 培养液, 在 37℃ 下 5% CO₂ 培养 24 h 后,用棉拭子去除膜上表面细胞,将膜插入物下表面的侵袭细胞用 75% 的甲醇固定,结晶紫染色,在光学显微镜下 (200 倍) 对细胞进行计数。

1.5 克隆形成试验

将约 1×10^3 个/mL 的 CT26 细胞接种于 6 孔板中,在 RPMI-1640 培养液中培养 10 天。用 10% 甲醛固定细胞 40 分钟,然后在室温下用 0.1% 结晶紫染色 20 分钟,最后拍摄并进行统

计学分析。

1.6 活性氧检测

每组 1×10^5 个/mL 细胞与 10 μ L 的 DCFH-DA 在 37℃ 下 5% CO₂ 孵育箱中孵育 20 分钟,用流式细胞仪测定 2', 7'-二氯荧光素 (-dichlorodihydrofluorescein, DCF) 的平均荧光强度 (Mean fluorescence intensity, MFI), 分析细胞内 ROS 水平。用硝基酪氨酸染色法检测组织水平的氧化应激水平。

1.7 Western Blot 检测

总蛋白分别用细胞或组织总蛋白提取试剂盒 (南京建城生物工程研究所) 提取。然后取 50 μ g 蛋白上样并用 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后将蛋白转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉作用 2 小时阻断非特异性结合,然后将膜与 PTEN (编号 AB31392; 1:1500 稀释)、p-PI3K p85 (编号 AB86714; 1:1000 稀释) 和 p-AKT (编号 Ab3844; 1:1200 稀释) 抗体 (Abcam, Cambridge, UK) 在 4℃ 下过夜。 β 肌动蛋白抗体 (No. ab8227; 1:3000 稀释; Abcam, Cambridge, UK) 作为对照。接下来,将膜与山羊抗兔二抗 IgG (HRP) (No. ab7090; 1:5000 稀释; Abcam, Cambridge, UK) 室温下孵育 1 小时。最后,利用多功能凝胶成像系统 (Image Quant LAS 500, General Electric, Fairfield, CT, USA) 对结果进行摄像,对每个波段的灰度值进行量化分析,并用软件 IQTL 8.18.1 (γ 比值 / 肌动蛋白) 进行分析。

1.8 COX-2^{-/-} Apc^{Mm+/+} 小鼠模型建立

Apc^{Mm+/+} 小鼠是一种良好的早期结直肠癌动物模型。COX-2 基因敲除 Apc^{Mm+/+} 小鼠 (n=15) 和正常 Apc^{Mm+/+} 小鼠 (n=15) 购自 Jackson 实验室 (C57BL/6 小鼠, 雄性, 8 周龄, 20~25 g)。所有小鼠均置于特定的无病原体 (SPF) 环境中,光/暗循环 12 h, 温度 21℃, 湿度 30%~70%, 每天自由饮水和进食。所有动物实验经武汉大学动物实验中心动物伦理委员会批准。

1.9 腺瘤组织的 IHC 分析

小鼠安乐死后切除腺瘤,立即用 10% 甲醛固定,乙醇脱水,石蜡包埋。切成约 0.5 μ m 厚的切片。然后,将切片脱蜡,再水化,浸泡在 3% 过氧化氢中 10 min, 消耗内源性过氧化物酶。用 PBS 洗涤后,将组织切片分别在 4℃ 下与一抗孵育过夜后在室温下与二抗孵育 60 min。最后,使用 DAB (No. ab64238; 1:100 稀释; Abcam, Cambridge, UK) 显色 30 秒,用中性胶密封。图像在光学显微镜 (200 倍) 下获得。并用 Image-Pro plus 6.0 软件 (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) 对结果进行分析。

1.10 腺瘤生长的检测

对于腺瘤实验中使用的所有 Apc^{Mm+/+} 小鼠, 每组 5 只在生长 20 周后用戊巴比妥钠 (腹腔注射; 150 mg/kg) 麻醉后处死,切除肠道,对腺瘤进行拍照、测量和计数。在实验过程中,每组剩余 10 只小鼠的存活率一直持续到 47 周。

1.11 统计学方法

所有实验数据均表示为平均数 $\pm$ 标准差,并用 SPSS19 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 进行分析。使用 t 检验、单因素方差分析和 TUKEY 试验确定多重比较差异的统计学意义。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 AA 促进 CT26 细胞生长、迁移和增殖, COX-2 抑制剂阻止

AA 生物学行为

AA 通过 COX-2 代谢途径产生促炎介质。我们发现 AA 抑制了细胞凋亡,而在 COX-2 抑制剂 NS-398 的作用下,细胞凋亡率(b2+b4 象限)显著增加($P<0.01$,图 1A)。AA+NS-398 组中大部分细胞阻滞在 G0/G1 期($P<0.01$,图 1B)。在我们的研究

中,AA 组 CT26 细胞的迁移和增殖能力比对照组显著增强($P<0.05$,图 1C、D),而 COX-2 抑制剂显著降低 AA 诱导的 CT26 细胞的迁移和增殖能力($P<0.01$ 图 1C、D),表明 AA 促进结肠癌生长,而抑制 COX-2 能阻止 AA 诱导的细胞增殖。

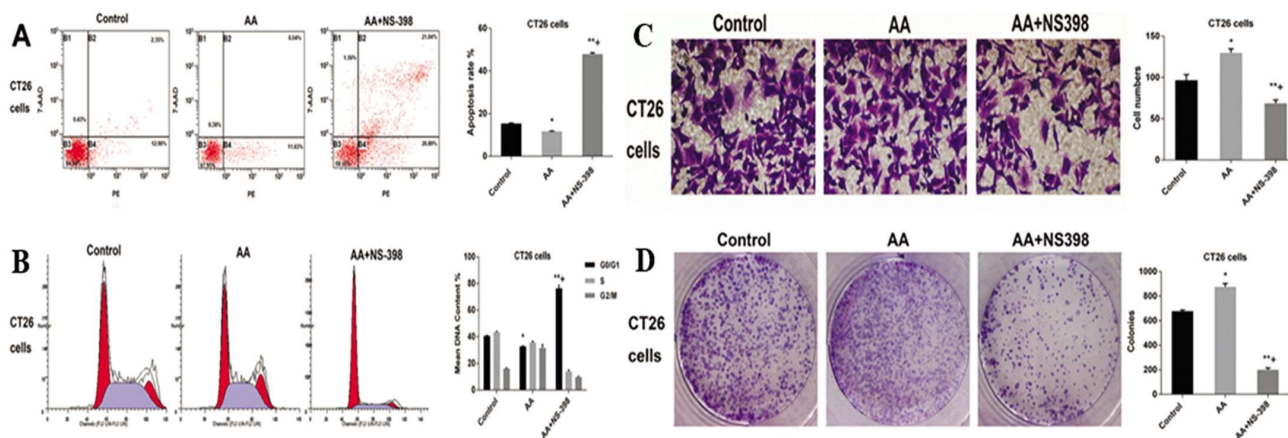


图 1 COX-2 抑制剂 NS-398 显著促进 CT26 细胞凋亡,导致细胞周期阻滞(200×)

Fig.1 Inhibitor of COX-2(NS-398) improve the apoptosis of CT26 Cells(200×)

注:(A)AA 和 NS-398 干预前后 CT26 细胞凋亡水平;(B)AA 和 NS-398 干预前后 CT26 细胞周期阻滞情况;

(C)AA 和 NS-398 干预前后 CT26 细胞的侵袭能力;(D)AA 和 NS-398 干预前后 CT26 细胞的增殖能力

Note: (A) The necrosis level of CT26 treated by AA and NS-398; (B)CT26 cell cycle block treated by AA and NS-398;

(C) The capacity of invasion in CT26 treated by AA and NS-398; (D) The capacity of proliferation in CT26 Cells treated by AA and NS-398

2.2 AA 代谢产生 ROS 抑制 PTEN 表达,COX-2 抑制剂去氧化增强 PTEN 表达

大量研究表明,肿瘤的进展与活性氧(ROS)的产生有显著的相关性。本研究采用流式细胞术检测各组细胞 ROS 产生水平,平均荧光强度代表各组 ROS 含量。结果显示 AA 促进 ROS 的产生,而 COX-2 抑制剂 NS-398 显著降低 ROS 的含量($P<0.05$,图 2A)。用 Western blot 方法检测 CT26 细胞中 PTEN 蛋白的表达水平。结果显示 AA 组 CT26 细胞 PTEN 表达明显低于对照组($P<0.05$,图 2B),AA+NS-398 组 PTEN 表达显著高于 AA 组($P<0.01$,图 2B),这与图 2A 中 ROS 的产生呈正相关性。此外,我们发现 AA 自分泌所衍生代谢产物对 CT26 细胞中 PTEN 的表达并没有影响(图 2C)。于是,我们检测了 AA、 H_2O_2 以及抗氧化剂钛试剂(Tiron),自由基清除剂(tempol)对 CT26 细胞中 PTEN 表达水平的影响,结果显示 AA 和 H_2O_2 均降低了 PTEN 的表达,而 Tiron 和 tempol 均增加了 PTEN 的表达,证明氧化应激作为第二信使在此过程中发挥重要作用(图 2D)。这与我们认为 AA 代谢导致 PTEN 氧化失活的假设是一致的。

2.3 在 COX-2 基因敲除 Apc^{Min/+} 小鼠腺瘤组织中,通过减弱氧化应激水平增加 PTEN 表达,抑制了 PI3K-AKT 磷酸化

为了进一步证实和明确其作用机制,我们利用 COX-2^{-/-}Apc^{Min/+} 小鼠腺瘤模型,通过 Western blot 和免疫组化检测 COX-2 基因敲除后腺瘤组织中 PTEN 及其下游蛋白的表达。结果显示,COX-2^{-/-}Apc^{Min/+} 小鼠腺瘤组织中 PTEN 蛋白表达水平显著高于对照组 Apc^{Min/+} 小鼠($P<0.01$,图 3A),PTEN 下游蛋白 PI3K 和 AKT 及其下游 mTOR,p70S6 的磷酸化水平明

显低于对照组 Apc^{Min/+} 小鼠($P<0.01$, $P<0.05$,图 3A),同时表达增殖能力的 c-myc 和 Cyclin D1 也显著降低;这与细胞实验结果相一致。而表达肿瘤信号转导的其他通路如 ERK,p38,JNK 却未见明显改变。为了进一步验证 PTEN 及其下游蛋白的表达,我们进行了免疫组化分析,结果与上述一致(图 3C)。通过上述细胞实验我们证实,氧化应激作为第二信使在此过程中发挥重要作用。我们在动物实验中利用硝基酪氨酸染色法测定腺瘤组织的氧化应激水平,阳性程度代表氧化应激水平,对照组 Apc^{Min/+} 小鼠的腺瘤组织中硝基酪氨酸染色阳性部分显著高于 COX-2^{-/-}Apc^{Min/+} 小鼠腺瘤组织(图 3D),证明 COX-2 基因敲除后氧化应激反应减少。

2.4 小鼠腺瘤生长和生存率的比较

在 20 周时处死部分实验组和对照组小鼠,我们发现实验组 COX-2^{-/-}Apc^{Min/+} 小鼠的腺瘤数目和大小比对照组 Apc^{Min/+} 小鼠明显减少($P<0.05$,图 4A-C);观察剩余对照组 Apc^{Min/+} 小鼠均在 29 周内死亡,而实验组 COX-2^{-/-}Apc^{Min/+} 小鼠在 47 周内未出现自然死亡,COX-2^{-/-}Apc^{Min/+} 小鼠的生存率大大改善(图 4D)。

3 讨论

结直肠癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一^[13],近年来随着生活水平的提高,饮食结构发生了明显的改变,CRC 已经成为中国第三大常见消化道肿瘤,严重困扰人类健康和威胁患者生命安全。因此,明确其发生发展机制对结肠癌的防治具有重要的指导意义。

临床流行病学和动物研究表明,高脂饮食是 CRC 发生的

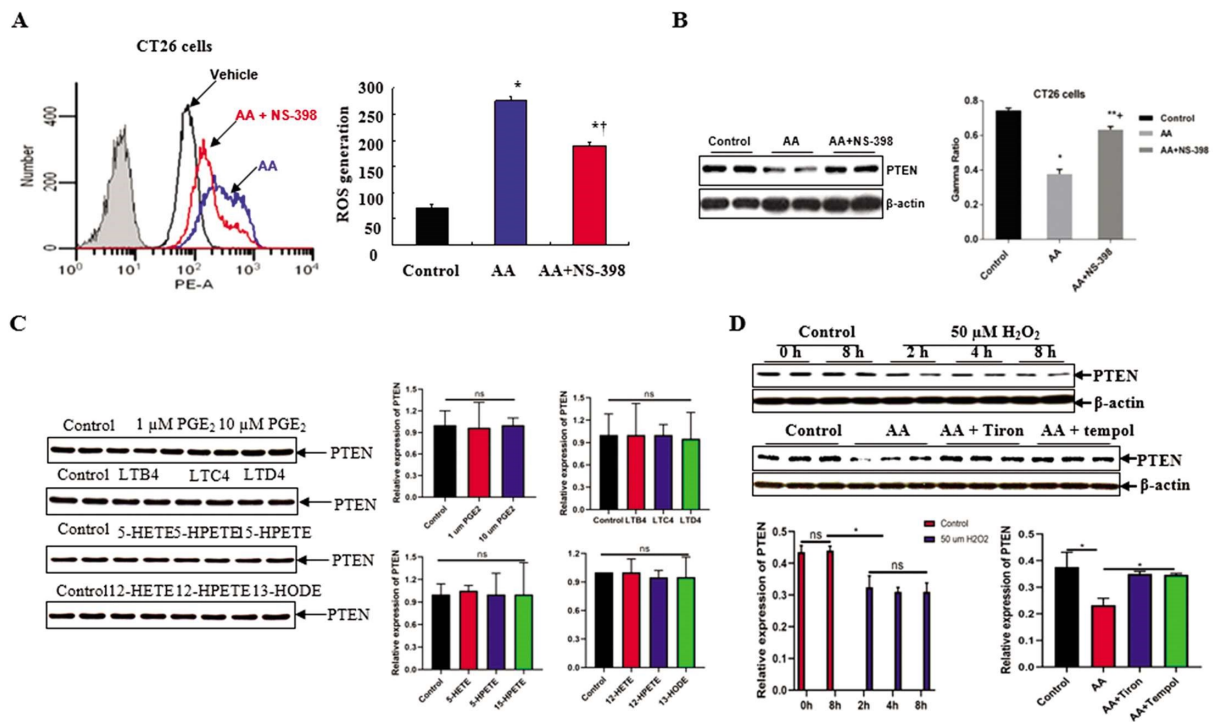


图 2 AA 通过 COX-2 代谢途径产生的 ROS 调节 PTEN 失活

Fig.2 AA regulate the inactivation of PTEN through ROS by COX-2 metabolic pathway

注:(A)流式细胞术检测各组 CT26 细胞中 ROS 含量水平;(B)Western blot 方法检测各组 CT26 细胞中 PTEN 蛋白的表达水平;(C)AA 所衍生代谢产物对 CT26 细胞中 PTEN 蛋白的表达无影响;(D)AA 和 H₂O₂ 均降低了 PTEN 的表达,而 Tiron 和 Tempol 均增加了 PTEN 的表达。

Note: (A) The content of ROS in different groups of CT26 detected by flow cytometry; (B) The expression of protein PTEN in different groups of CT26 detected by western blot; (C) AA derived metabolic production has no influence to the expression of PTEN in CT26; (D) AA and H₂O₂ decrease the expression of PTEN, Tiron and Tempol increase the expression of PTEN

高危因素^[14,15]。花生四烯酸(arachidonic acid, AA)是动物脂肪衍生的具有生物活性的主要脂质成分,COX-2 是其分解过程中的重要限速酶,细胞受到各种刺激因素时可迅速合成,涉及多种病理生理变化^[16]。在癌症相关基因中,COX-2 是常见的促癌基因,而选择性地抑制 COX-2 表达有利于阻止癌细胞增殖、侵袭和转移^[17]。本研究结果显示,AA 通过 COX-2 酶的代谢促进 CT26 细胞生长、迁移和增殖,而 COX-2 的抑制剂 NS-398 阻滞大部分细胞在 G₀/G₁ 期生长;表明 COX-2 对结肠癌细胞的侵袭和转移具有促进作用,与文献报道一致。同时动物实验结果显示 COX-2 基因敲除小鼠腺瘤数目和大小明显减少,生存率也得到了很大的改善,表明 COX-2 在结肠癌发生、发展过程中发挥重要作用。但其具体机制尚未完全阐明。

近年来,越来越多的研究关注 PTEN/PI3K/Akt 信号转导途径在细胞修复、增殖、血管再生及转移过程中发挥的作用,同时该信号通路的不适当激活与糖尿病、自身免疫性疾病及肿瘤等疾病的发生发展密切相关^[18-20]。研究发现在结肠癌中的 PTEN 表达明显低于正常小肠黏膜和腺瘤性息肉,并且在癌变晚期 PTEN 的低表达与不良的临床病理特征密切相关^[21-23]。表明 PTEN 基因的突变及低表达可能是结肠癌发生的始动因素之一,参与了癌细胞侵袭、转移的过程^[24-27]。

同时有研究证实:结肠腺癌组织和复发转移结肠癌患者血清中 PTEN 与 COX-2 呈明显负相关,两者之间存在某种调控机制。目前认为二者相关抑癌机制在于通过 PI3K 去磷酸化负

调控 PI3K/Akt 途径调节的增殖和凋亡,COX-2 可通过调节 PTEN 和 Akt 抑制由 Fas 介导的细胞凋亡^[28]。本研究结果显示:在结肠癌 CT26 细胞中,AA 通过 COX-2 代谢产生 ROS 并抑制 PTEN 表达,AA 自分泌所衍生代谢产物对 CT26 细胞中 PTEN 的表达并没有影响,而 COX-2 抑制剂增加了 PTEN 的表达,表明氧化应激作为第二信使在可能在此过程中发挥重要作用。这之前报道的在脂多糖和佛波酯刺激的巨噬细胞、胰岛素刺激的 HEK293 细胞、表皮生长因子(EGF)刺激的 HeLa 细胞和血小板源性生长因子(PDGF)刺激的成纤维细胞中,ROS/H₂O₂ 对 PTEN 的氧化失活作用相一致^[29,30]。同时我们在 COX-2 基因敲除小鼠腺瘤组织中发现,通过减弱氧化应激水平增加 PTEN 表达,抑制了 PI3K-AKT 磷酸化;而表达肿瘤信号转导的其他通路如 ERK, p38, JNK 却未见明显改变。但也有研究认为 PTEN 可能通过调控 AKT 通路抑制了 COX-2 的表达,当 PTEN 缺失时,AKT 通路上调,COX-2 的表达则明显增高^[31]。PTEN 和 COX-2 可能协同参与了结肠癌的发生和发展过程,PTEN 表达缺失和 COX-2 的高表达预示肿瘤组织侵袭和转移能力增强,二者相互调节。PTEN 和 COX-2 谁占主导作用抑或是二者相互影响,具体机制尚需进一步研究。

4 结论

目前的研究表明,花生四烯酸通过 COX-2 酶代谢氧化和失活 PTEN,进而激活其下游 PI3K/AKT 通路,可能是结肠癌

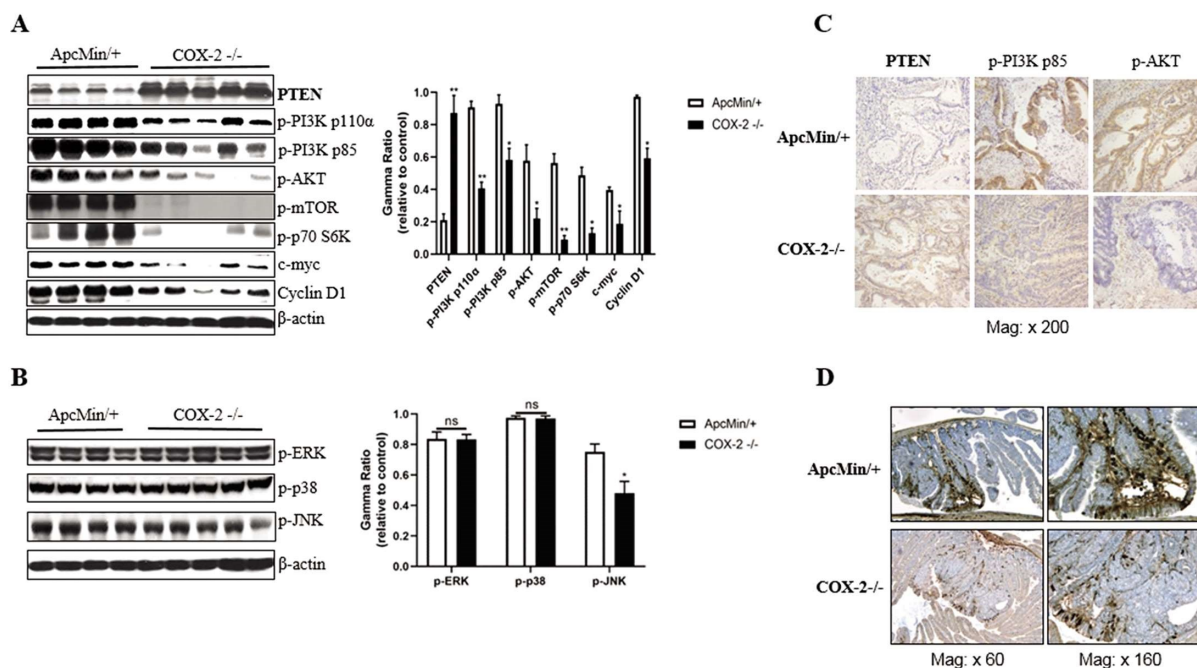


图3 用 Western blot、免疫组化检测 $Apc^{Min/+}$ 小鼠和 $COX-2^{-/-}Apc^{Min/+}$ 小鼠腺瘤组织中 PTEN 及其下游蛋白 PI3K、AKT 的表达水平；硝基酪氨酸染色检测腺瘤组织中氧化应激反应。

Fig.3 The detection of the expression of PTEN, PI3K, AKT by Western blot and IHC in $Apc^{Min/+}$ mice and $COX-2^{-/-}Apc^{Min/+}$ mice.

The detection of Oxidative Stress Response by Nitrotyrosine Staining in adenoma tissue.

注：(A)western blot 检测 PTEN、PI3K-AKT- mTOR-p70S6 及 c-myc 和 Cyclin D1 在腺瘤组织中的表达水平；

(B)western blot 检测 ERK, p38, JNK 在腺瘤组织中的表达水平；(C)免疫组化法检测 PTEN、PI3K 和 AKT 在腺瘤组织中的表达水平，200 倍；

(D)硝基酪氨酸染色法测定腺瘤组织中氧化应激水平，分别为 60 倍和 160 倍。

Note: (A) The expression of PTEN, PI3K-AKT-mTOR-p70S6, Cyclin D1 in adenoma tissue detected by Western blot; (B) The expression of ERK, p38, JNK in adenoma tissue detected by Western blot; (C) The expression of PTEN, PI3K, AKT in adenoma tissue detected by immunohistochemical staining;

(D) The detection of oxidative stress response by Nitrotyrosine staining in adenoma tissue, 60 times and 160 times respectively.

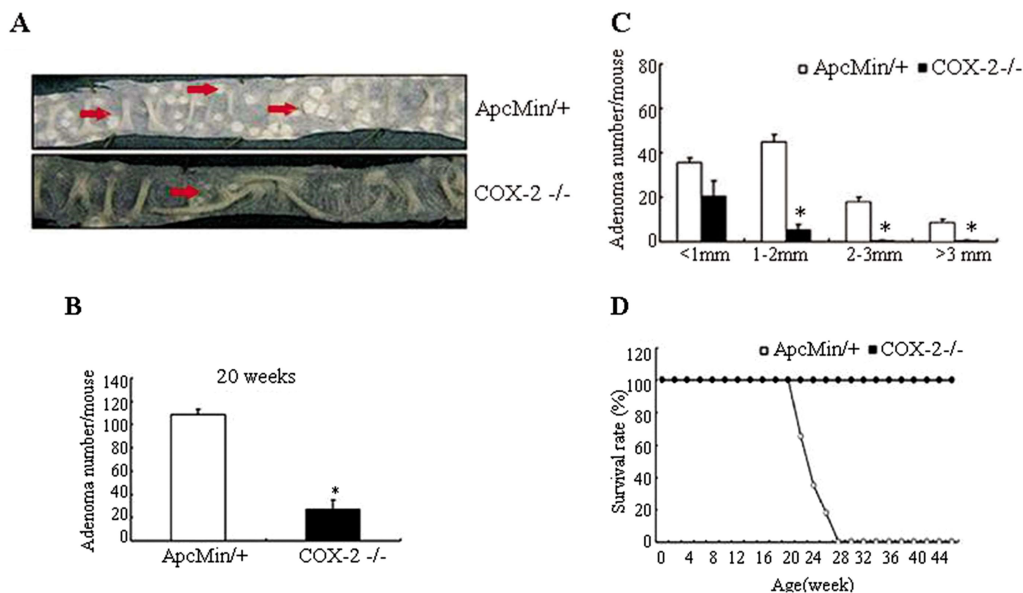


图4 观察小鼠腺瘤生长和生存率

Fig.4 The detection of mice survival rate and the growth of adenoma

注：(A)留取小鼠小肠纵行剖开后，观察统计两组小肠腺瘤数目及大小，红色箭头标记是腺瘤；(B)对照组 $Apc^{Min/+}$ 和实验组 $COX-2^{-/-}Apc^{Min/+}$ 小鼠腺瘤数目的比较；(C)对照 $Apc^{Min/+}$ 和实验组 $COX-2^{-/-}Apc^{Min/+}$ 小鼠腺瘤大小的比较；(D)对照组 $Apc^{Min/+}$ 和实验组 $COX-2^{-/-}Apc^{Min/+}$ 小鼠生存率的比较。

Note: (A) The adenomas in the intestines of different groups of mice. Where the red arrow marks are the adenomas; (B) The comparison of adenoma's number in normal $Apc^{Min/+}$ mice and $COX-2^{-/-}Apc^{Min/+}$ mice; (C) The comparison of adenomas number in normal $Apc^{Min/+}$ mice and $COX-2^{-/-}Apc^{Min/+}$ mice;

(D) The comparison of survival rate in normal $Apc^{Min/+}$ mice and $COX-2^{-/-}Apc^{Min/+}$ mice.

进展的机制之一。通过对 PTEN/PI3K/Akt 通路相关基因在 CRC 中的表达及生物学行为的研究,有助于揭示其发生、发展机制,从而为其诊断、靶点治疗提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] Miller KD, Siegel RL, Lin CC, et al. Cancer treatment and survivorship statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(4): 271-289
- [2] Zhu J, Tan Z, Hollis-Hansen K, et al. Epidemiological Trends in Colorectal Cancer in China: An Ecological Study [J]. *Dig Dis Sci*, 2017, 62(1): 235-243
- [3] Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, et al. Colorectal cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(3): 177-193
- [4] O'Neill AM, Burrington CM, Gillaspie EA, et al. High-fat Western diet-induced obesity contributes to increased tumor growth in mouse models of human colon cancer[J]. *Nutr Res*, 2016, 36(12): 1325-1334
- [5] Alexander DD, Cushing CA, Lowe KA, et al. Meta-analysis of animal fat or animal protein intake and colorectal cancer[J]. *Am J Clin Nutr*, 2009, 89(5): 1402-1409
- [6] Gomez A, Nekvindova J, Travica S, et al. Colorectal cancer-specific cytochrome P450 2W1: intracellular localization, glycosylation, and catalytic activity[J]. *Mol Pharmacol*, 2010, 78(6): 1004-1011
- [7] Wang D, Dubois RN. Eicosanoids and cancer [J]. *Nature reviews Cancer*, 2010, 10(3): 181-193
- [8] Panigrahy D, Edin ML, Lee CR, et al. Epoxyeicosanoids stimulate multiorgan metastasis and tumor dormancy escape in mice [J]. *J Clin Invest*, 2012, 122(1): 178-191
- [9] Shao J, Wang HX, Yuan GL, et al. Involvement of the arachidonic acid cytochrome P450 epoxygenase pathway in the proliferation and invasion of human multiple myeloma cells[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e1925
- [10] Lee C, Kim JS, Waldman T. PTEN gene targeting reveals a radiation-induced size checkpoint in human cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2004, 64(19): 6906-6914
- [11] Haddadi N, Lin YG, Travis G, et al. PTEN/PTENP1: 'Regulating the regulator of RTK-dependent PI3K/Akt signalling', new targets for cancer therapy[J]. *Mol Cancer*, 2018, 17(1): 37-50
- [12] Ma J, Sawai H, Ochi N, et al. PTEN regulates angiogenesis through PI3K/Akt/VEGF signaling pathway in human pancreatic cancer cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2009, 331(1-2): 161-171
- [13] Miller KD, Nogueira L, Mariotto AB, et al. Cancer treatment and survivorship statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(5): 363-385
- [14] Woutersen R A, Appel M J, van Garderen-Hoetmer A, et al. Dietary fat and carcinogenesis[J]. *Mutat Res*, 1999, 443: 111-127
- [15] Arita S, Ogawa T, Murakami Y, et al. Dietary Fat-Accelerating Leptin Signaling Promotes Protumorigenic Gastric Environment in Mice[J]. *Nutrients*, 2019, 11(9): 2127-2140
- [16] Menczer J. Cox-2 expression in ovarian malignancies: a review of the clinical aspects [J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2009, 146(2): 129-132
- [17] Cai S, Zhang Y X, Han K, et al. Expressions and clinical significance of COX-2, VEGF-C, and EGFR in endometrial carcinoma [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2017, 296(1): 93-98
- [18] McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, et al. Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/ PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance[J]. *Adv Enzyme Regul*, 2006, 46: 247-279
- [19] Fragoso R, Barata JT. Kinases, tails and more: regulation of PTEN function by phosphorylation[J]. *Methods*, 2015, 77-78: 75-81
- [20] Lu JM, Zhang ZZ, Ma X, et al. Repression of microRNA-21 inhibits retinal vascular endothelial cell growth and angiogenesis via PTEN dependent-PI3K/Akt/VEGF signaling pathway in diabetic retinopathy [J]. *Exp Eye Res*, 2020, 190: 107886
- [21] Dariusz Waniczek, Dariusz Lange, Marek Rudzki, et al. PTEN expression profiles in colorectal adenocarcinoma and its precancerous lesions[J]. *Pol J Pathol*, 2013, 64(1): 15-20
- [22] Brito MB, Goulielmaki E, Papakonstanti EA. Focus on PTEN Regulation[J]. *Front Oncol*, 2015, 166
- [23] Liu T, Wang YW, Wang YB, et al. Multifaceted Regulation of PTEN Subcellular Distributions and Biological Functions[J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(9): 1247-1273
- [24] Colakoglu T, Yildirim S, Kayaselcuk F, et al. Clinicopathological significance of PTEN loss and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in sporadic colorectal neoplasms: is PTEN loss predictor of local recurrence?[J]. *Am J Surg*, 2008, 195(6): 719-725
- [25] Gao TY, Mei YP, Sun HL, et al. The association of Phosphatase and tensin homolog (PTEN) deletion and prostate cancer risk: A meta-analysis[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 83: 114-121
- [26] Liu JC, Wang DY, Egan SE, et al. Common and distinct features of mammary tumors driven by Pten-deletion or activating Pik3ca mutation[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 9060-9068
- [27] Kotelevets L, Scott MGH, Chastre E. Targeting PTEN in Colorectal Cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, 1110: 55-73
- [28] Honjo S, Osaki M, Ardyanto TD, et al. COX-2 inhibitor, NS398, enhances Fas-mediated apoptosis via modulation of the PTEN-Akt pathway in human gastric carcinoma cell lines[J]. *DNA Cell Biol*, 2005, 24(3): 141-147
- [29] Kwon J, Lee SR, Yang KS, et al. Reversible oxidation and inactivation of the tumor suppressor PTEN in cells stimulated with peptide growth factors[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 16419-16424
- [30] Seo JH, Ahn Y, Lee SR, et al. The major target of the endogenously generated reactive oxygen species in response to insulin stimulation is phosphatase and tensin homolog and not phosphoinositide-3kinase (PI-3 kinase) in the PI-3 kinase/Akt pathway[J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 348-357
- [31] Covey TM, Edes K, Fitzpatrick FA. Akt activation by arachidonic acid metabolism occurs via oxidation and inactivation of PTEN tumor suppressor[J]. *Oncogene*, 2007, 26(39): 5784-5792