

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.17.005

红景天苷调节 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路 对结肠癌 SW480 细胞裸鼠的肝脏损伤的影响*

王浩¹ 刘志毅² 张斌² 曹宽² 王人颢^{2Δ}

(1 徐州医科大学研究生院 江苏 徐州 221004; 2 徐州医科大学附属医院肝胆胰外科 江苏 徐州 221004)

摘要 目的: 探讨红景天苷 (Sal) 调节单磷酸腺苷活化蛋白激酶 (AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)/Unc51 样激酶 1 (ULK1) 信号通路对结肠癌 SW480 细胞裸鼠肝脏损伤的影响。**方法:** 通过皮下注射 SW480 细胞悬浮液建立肝转移裸鼠模型, 将造模后的裸鼠随机分为模型组、Sal 低剂量 (Sal-L, 50 mg/kg Sal) 组、Sal 中剂量 (Sal-M, 100 mg/kg Sal) 组、Sal 高剂量 (Sal-H, 200 mg/kg Sal) 组、Sal-H+AMPK 抑制剂 (Compound C, 200 mg/kg Sal+10 mg/kg Compound C) 组, 以未接种 SW480 细胞悬液的裸鼠作为对照组。腹部主动脉取血, 检测裸鼠血清中丙氨酸氨基转移酶 (AST)、天冬氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平; 处死裸鼠, 检测肝转移瘤数目及肝脏重量; HE 染色观察肝脏组织病理变化; qRT-PCR 检测肝脏组织中 AMPK、mTOR、ULK1 mRNA 表达水平; Western blot 检测肝脏组织中自噬 (Beclin1、p62) 蛋白及通路相关蛋白表达。**结果:** 与对照组相比, 模型组裸鼠组织中出现肝转移瘤, 肝脏重量、AST、ALT 水平、mTOR mRNA、ULK1 mRNA、p62 表达显著增加 ($P<0.05$); Beclin1、AMPK mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P<0.05$); 与模型组相比, Sal-L、Sal-M、Sal-H 组肝转移瘤数目、肝脏重量、AST、ALT 水平、mTOR mRNA、ULK1 mRNA、p62 表达显著降低 ($P<0.05$); Beclin1、AMPK mRNA 及蛋白表达显著增加 ($P<0.05$); 与 Sal-H 组相比, Sal-H+Compound C 组肝转移瘤数目、肝脏重量、AST、ALT 水平、mTOR mRNA、ULK1 mRNA、p62 表达显著增加 ($P<0.05$); Beclin1、AMPK mRNA 及蛋白表达显著降低 ($P<0.05$)。**结论:** Sal 可通过减少裸鼠肝转移瘤形成, 保护裸鼠肝脏, 其机制可能与激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路, 促进肝脏自噬有关。

关键词: 红景天苷; AMPK/mTOR/ULK1 信号通路; SW480 细胞; 裸鼠; 肝脏

中图分类号: R-33; R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2023)17-3226-06

Influence of Salidroside on Liver Injury in Nude Mice with Colon Cancer SW480 Cells by Regulating AMPK/mTOR/ULK1 Signaling Pathway*

WANG Hao¹, LIU Zhi-yi², ZHANG Bir², CAO Kuan², WANG Ren-hao^{2Δ}

(1 Graduate School of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu, 221004, China;

2 Hepatobiliary Pancreatic Surgery, Xuzhou Medical University Affiliated Hospital, Xuzhou, Jiangsu, 221004, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the influence of salidroside (Sal) on liver injury in nude mice with colon cancer SW480 cells by regulating adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR)/Unc51-like kinase 1 (ULK1) signaling pathway. **Methods:** Liver metastasis nude mice model was established by subcutaneous injection of SW480 cell suspension, and the nude mice after modeling were randomly grouped into model group, low-dose Sal (Sal-L, 50 mg/kg Sal) group, medium-dose Sal (Sal-M, 100 mg/kg Sal) group, high-dose Sal (Sal-H, 200 mg/kg Sal) group, Sal-H+AMPK inhibitor (Compound C, 200 mg/kg Sal+10 mg/kg Compound C) group, and nude mice not inoculated with SW480 cell suspension were performed as the control group. Blood was collected from the abdominal aorta, the serum levels of alanine aminotransferase (AST) and aspartate aminotransferase (ALT) in nude mice were observed. The nude mice were sacrificed, and the number of liver metastases and liver quality were detected. HE staining was used to observe the pathological changes of liver tissue. The expression levels of AMPK, mTOR and ULK1 mRNA in liver tissue were detected by qRT-PCR. Western blot was used to detect the expression of autophagy (Beclin1, p62) proteins and pathway-related proteins in liver tissue. **Results:** Compared with the control group, liver metastases appeared in the nude mice of the model group, the liver weight, levels of AST and ALT, the mTOR mRNA, ULK1 mRNA, and the expression of p62 were obviously increased ($P<0.05$). The mRNA and protein expressions of Beclin1 and AMPK were obviously decreased ($P<0.05$). Compared with the model group, the number of liver metastases, liver weight, levels of AST and ALT, the mTOR mRNA, ULK1 mRNA, and the expression of p62 in the Sal-L, Sal-M, and Sal-H groups were obviously decreased ($P<0.05$). The mRNA and protein expressions of Beclin1 and AMPK were obviously increased ($P<0.05$). Compared with the Sal-H group, the number of liver metastases, liver weight, levels of AST and

* 基金项目: 江苏省自然科学基金面上项目 (BK20191153)

作者简介: 王浩 (1997-), 男, 硕士研究生, 从事肝胆胰外科方向的研究, E-mail: wanghao4019@126.com

Δ 通讯作者: 王人颢 (1964-), 男, 硕士, 主任医师, 从事肝胆胰外科方向的研究, E-mail: wangrenhao@xzhmu.edu.cn

(收稿日期: 2023-04-04 接受日期: 2023-04-27)

ALT, the mTOR mRNA, ULK1 mRNA, and the expression of p62 in the Sal-H+Compound C group were obviously increased ($P<0.05$). The mRNA and protein expressions of Beclin1 and AMPK were obviously decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** Sal can protect the liver of nude mice by reducing the formation of liver metastases in nude mice, and its mechanism may be related to the activation of AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway, and the promotion of liver autophagy.

Key words: Salidroside; AMPK/mTOR/ULK1 signaling pathway; SW480 cells; Nude mice; Liver

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)17-3226-06

前言

结肠癌是全球常见的癌症之一,受多方面的因素影响,其发病率逐年增加^[1]。结肠癌易转移,对肝脏可造成损伤,且预后差^[2,3]。因此进一步研究关键分子机制,探究有效的治疗药物,对改善结肠癌肝转移引发的肝脏损伤具有重要意义。研究发现天然药物对几种类型的人类癌症治疗效果较好且毒性较小^[4]。红景天苷(salidroside, Sal)是红景天的提取物,具有保护心血管、增强免疫功能、抗炎、抗肿瘤作用^[5]。有研究发现 Sal 对人胃癌细胞的增殖具有剂量依赖性抑制作用,可诱导细胞凋亡,在胃癌治疗中具有一定潜力^[6]。虽然红景天提取物在体外具有抗肿瘤转移作用^[7],但 Sal 对转移性肿瘤作用机制尚无报道。研究发现自噬与癌细胞的细胞死亡、生长、分化和存活密切相关^[8]。单磷酸腺苷活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)/Unc51 样激酶 1(unc-51-like kinase1, ULK1)信号通路作为经典的自噬通路,在结直肠癌治疗中,可通过激活该通路,发挥药物抗癌的作用^[9]。本研究旨在探讨 Sal 通过 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对结肠癌 SW480 细胞裸鼠肝脏损伤的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物、细胞来源 雄性无胸腺裸鼠 60 只(BALB/c, SPF 级, 6 周龄, 体重 18-20 g)购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。所有动物均在无特定病原体(SPF)环境(相对湿度: 50-60%; 温度: 23-26℃; 光照: 12 h 光照/黑暗循环)中喂食,持续供应用 Co60 照射的饲料和使用高温灭菌的纯净水。ATCC 提供人结肠癌细胞株 SW480, 将细胞置于 RPMI-1640 培养基(10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素)中,培养于 37℃、5%二氧化碳培养箱中进行常规传代培养,取培养的对数生长期 SW480 细胞进行后续研究。

1.1.2 实验试剂与仪器 Sal 购自 Sigma 公司; AMPK 抑制剂(Compound C) 购自 MCE 公司; HE 染色试剂盒购自上海信帆生物科技有限公司; 丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)试剂盒、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)试剂盒购自南京建成生物工程研究所; TRIzol 试剂和 RIPA 裂解缓冲液购自 Thermo Fisher Scientific 公司; 反转录试剂盒购自美国赛默飞公司; Script RT 试剂盒购自 Takara 公司; Beclin1、p62、AMPK、p-mTOR、p-ULK1、mTOR、ULK1 一抗、HRP 标记山羊抗兔 IgG 购自 Abcam 公司; Elx800 型酶标仪、1855195-OG 型定量 PCR 仪购自 Bio-Rad 公司(美国)。

1.2 方法

1.2.1 肝转移瘤裸鼠模型的制备及干预 将 60 只裸鼠随机分为对照组(10 只)、造模组(50 只)。取出对数生长期 SW480 细胞,加入胰蛋白酶消化后制备细胞悬液。将 SW480 细胞悬液(2.5×10^7 /mL)皮下接种造模组裸鼠,待裸鼠注射部位出现发白、肿胀等现象时,立即拔出注射针头并快速按压防止注射部位出血,建立结肠癌肝转移裸鼠模型^[10],其中对照组未接种 SW480 细胞悬液。造模完成后,常规饲养 7 天,以皮下结节直径大于 0.5 cm 为成瘤标准^[11];其中造模组裸鼠未见死亡并随机分为模型组、Sal 低剂量(Sal-L)组、Sal 中剂量(Sal-M)组、Sal 高剂量(Sal-H)组、Sal-H+AMPK 抑制剂(Compound C)组,经前期预实验及参考文献^[12], Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组分别以 50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg Sal (DMSO 为溶媒)灌胃干预; Sal-H+Compound C 组在 Sal-H 组基础上进行尾静脉注射 10mg/kg Compound C(DMSO 为溶媒)干预^[13],其余各组以等体积的生理盐水灌胃。以上各组每天干预一次,连续 2 周,常规饲养并观察裸鼠的精神活动状态。

1.2.2 样本收集 将裸鼠颈椎脱臼处死,并经腹部取血待检验 ALT、AST 水平;剖腹,取出肝脏组织进行称重并统计肝转移瘤数量;将肝转移瘤组织平均分为二份,一份固定于甲醛溶液中进行 HE 染色;另一份液氮保存用于 Western blot 检测、qRT-PCR 检测。

1.2.3 肝脏称重及统计肝转移瘤数量 将裸鼠处死后,取出肝脏组织,进行称重并统计肝转移瘤数。

1.2.4 试剂盒检测 ALT、AST 水平 将各组裸鼠血液离心, 4000 r/min 离心 15 min, 取上清液,按照试剂盒说明书检测 ALT、AST 水平。

1.2.5 HE 检测肝组织病理学变化 取出 1.2.2 中部分肝组织,采用不同浓度的二甲苯脱水,然后包埋在石蜡中,经 HE 染色后在光学显微镜下观察组织病理学情况。

1.2.6 qRT-PCR 检测肝组织中 AMPK、mTOR、ULK1 mRNA 表达水平 将 1.2.2 中部分肝组织搅碎后溶解在用于提取 RNA 的 TRIzol 试剂中,取适量 RNA 使用 Script RT 试剂盒合成 cDNA。使用实时 PCR 检测系统进行 PCR 反应,初始变性 94℃ 5 min,然后 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min,最后 72℃ 再延伸 10 min,共 35 个循环。以 β -actin 为内参, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算 AMPK、mTOR、ULK1 mRNA 表达水平。所用引物为: AMPK 上游引物: 5'-GTACCAGGTCATCAGTACAC-3', 下游引物: 5'-ACTACTCCAGGTACATCAGA-3'; mTOR 上游引物: 5'-GATGTCAATGAAGCCCTGGT-3', 下游引物: 5'-AGCACCTCAAACATGCCTTT-3'; ULK1 上游引物: 5'-CCCAGCAA-CATCCGAGTCAAGA-3', 下游引物: 5'-CAGGTCAGCCTTCC-

CATCGTAGT-3'; β -actin 上游引物:5'-AGGGAGAACCGTGA-GAAG-3',下游引物:5'-CTGGTCCGACAGGTAGAA-3'。

1.2.7 Western blot 检测自噬相关蛋白 Beclin1、p62 及 AMPK/mTOR/ULK1 通路相关蛋白表达 使用裂解缓冲液、BCA 蛋白质测定试剂盒分别分离组织中蛋白质及蛋白质浓度测定,然后取 30 μ g 蛋白质通过 10% SDS-PAGE 分离并转移到 PVDF 膜上。5%牛奶封闭膜 2.5 h 后,将它们与 Beclin1、p62、AMPK、p-mTOR、p-ULK1、mTOR、ULK1 一抗孵育过夜,然后加入二抗在 4℃下孵育 2 h,以 β -actin 为内参,使用 ECL 检测系统观察膜上的条带灰度,得出蛋白表达水平。

1.3 统计分析

采用 SPSS 25.0 软件分析实验数据,以均数 标准差($\bar{x} \pm s$)表示所得数据,多组间用单因素方差分析,以 snk-q 检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 时,认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Sal 对各组裸鼠一般情况的影响

对照组裸鼠精神状态最佳,腹部未见肿块,饮食及进水一切正常。模型组裸鼠精神萎靡不振,腹部膨隆较为显著,饮食及进水大幅度减少;经 Sal-L、Sal-M、Sal-H 治疗后,裸鼠精神状态有所改善,饮食及进水也较模型组裸鼠增多,腹部肿块逐渐变小,其中以 Sal-H 最为显著。Sal-H+Compound C 组裸鼠摄食量偏少,精神状态较 Sal-H 组欠佳,腹部肿块明显。

2.2 Sal 对各组裸鼠血清中 ALT、AST 水平的影响

各组裸鼠血清中 ALT、AST 水平比较:模型组较对照组显著增加 ($P < 0.05$);Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组较模型组显著降低,组间差异有显著性,Sal-H 组血清中 ALT、AST 降低最为显著 ($P < 0.05$);Sal-H+Compound C 组较 Sal-H 组显著增加 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组裸鼠血清中 ALT、AST 水平的比较($\bar{x} \pm s$, n=10, U/L)

Table 1 Comparison of ALT and AST levels in serum of nude mice in each group($\bar{x} \pm s$, n=10, U/L)

Groups	ALT	AST
Control group	5.14 $\pm$ 0.52	6.45 $\pm$ 0.65
Model group	14.86 $\pm$ 1.49 ^a	17.85 $\pm$ 1.79 ^a
Sal-L group	9.85 $\pm$ 0.99 ^b	13.54 $\pm$ 1.36 ^b
Sal-M group	7.61 $\pm$ 0.77 ^{bc}	9.55 $\pm$ 0.96 ^{bc}
Sal-H group	5.68 $\pm$ 0.57 ^{bcd}	7.24 $\pm$ 0.73 ^{bcd}
Sal-H+Compound C group	9.76 $\pm$ 0.98 ^c	12.37 $\pm$ 1.24 ^c
F	141.995	130.406
P	0.000	0.000

Note: Compared with control group, ^a $P < 0.05$. Compared with model group, ^b $P < 0.05$. Compared with Sal-L group, ^c $P < 0.05$. Compared with Sal-M group, ^d $P < 0.05$. Compared with Sal-H group, ^e $P < 0.05$.

2.3 Sal 对各组裸鼠肝转移瘤数目、肝脏重量的影响

各组裸鼠肝转移瘤数目、肝脏重量比较:模型组较对照组显著增加 ($P < 0.05$);Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组较模型组显著

降低,组间差异有显著性,Sal-H 组降低最为显著 ($P < 0.05$);Sal-H+Compound C 组较 Sal-H 组显著增加 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组裸鼠肝转移瘤数目、肝脏重量比较($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 2 Comparison of the number and weight of liver metastases in nude mice in each group($\bar{x} \pm s$, n=10)

Groups	Number of liver metastases(n)	Liver weight(g)
Control group	0.00 $\pm$ 0.00	1.11 $\pm$ 0.12
Model group	13.85 $\pm$ 1.39 ^a	2.08 $\pm$ 0.21 ^a
Sal-L group	10.24 $\pm$ 1.03 ^b	1.62 $\pm$ 0.17 ^b
Sal-M group	7.22 $\pm$ 0.73 ^{bc}	1.39 $\pm$ 0.14 ^{bc}
Sal-H group	3.28 $\pm$ 0.33 ^{bcd}	1.18 $\pm$ 0.12 ^{bcd}
Sal-H+Compound C group	8.68 $\pm$ 0.87 ^c	1.77 $\pm$ 0.18 ^c
F	335.707	53.566
P	0.000	0.000

Note: Same as Table 1.

2.4 Sal 对各组裸鼠肝组织病理学的影响

对照组裸鼠未见明显病理学现象;模型组肝组织出现灰白

色针尖大小的转移灶,组织被大量肿瘤替代,细胞呈梭形,肝小叶结构被破坏;经 Sal-L、Sal-M、Sal-H 治疗后,上述病理现象逐

渐减轻,以 Sal-H 组最为显著;Sal-H+Compound C 组依然可见肿瘤细胞聚集成团,细胞核固缩,较 Sal-H 组明显加重。见图 1。

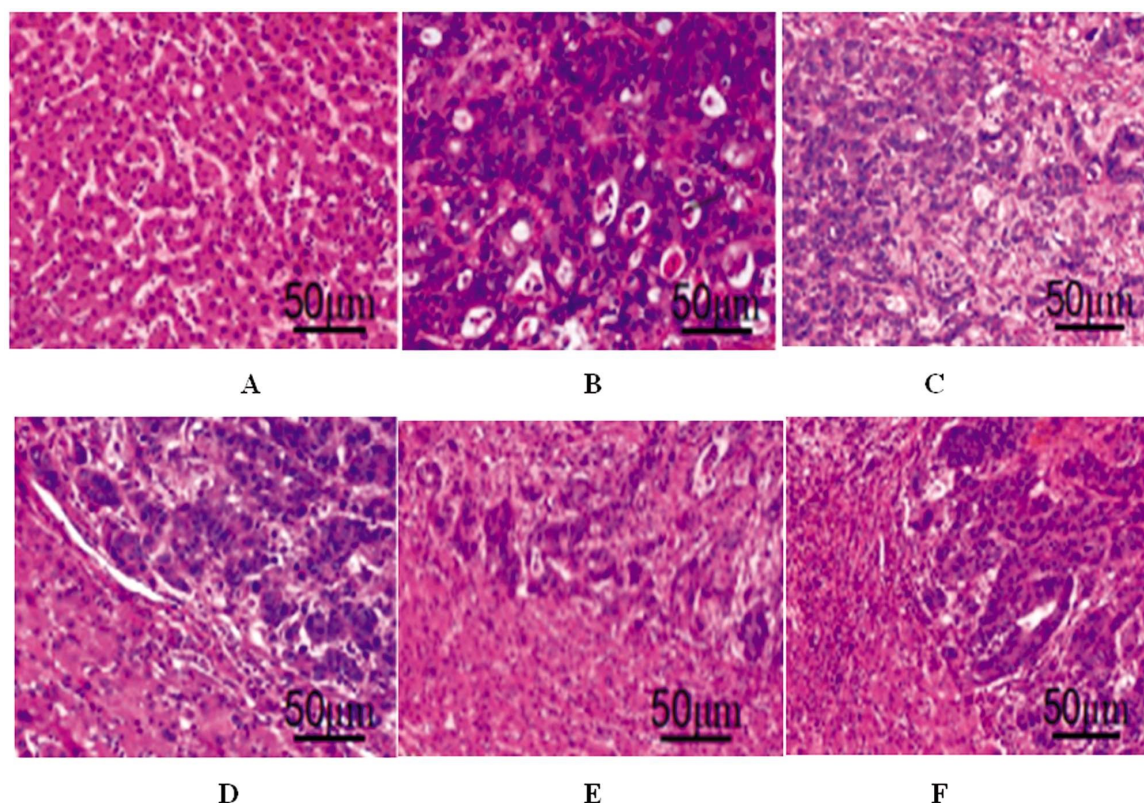


图 1 各组裸鼠肝组织病理学变化(HE, × 400)

Fig.1 Pathological changes of liver tissue of nude mice in each group(HE, × 400)

Note: A. Control group. B. Model group. C. Sal-L group. D Sal-M group. E. Sal-H group. F. Sal-H+Compound C group.

2.5 Sal 对各组裸鼠肝组织中 AMPK、mTOR、ULK1 mRNA 的影响

各组裸鼠肝组织中 AMPK mRNA 表达水平:模型组较对照组显著下降 ($P<0.05$);Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组较模型组显著增加,组间差异有显著性,Sal-H 组增加最为显著 ($P<0.$

05);Sal-H+Compound C 组较 Sal-H 组显著下降 ($P<0.05$)。mTORMRNA、ULK1 mRNA 表达:模型组较对照组显著增加 ($P<0.05$);Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组较模型组显著下降,组间差异有显著性,Sal-H 组降低最为显著 ($P<0.05$);Sal-H+Compound C 组较 Sal-H 组显著增加 ($P<0.05$)。见表 3。

表 3 各组裸鼠肝组织中 AMPK、mTOR、ULK1 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$, n=10)

Table 3 Comparison of AMPK, mTOR and ULK1 mRNA expression in liver tissues of nude mice in each group($\bar{x} \pm s$, n=10)

Groups	AMPK mRNA	mTOR mRNA	ULK1 mRNA
Control group	0.85± 0.09	0.18± 0.02	0.22± 0.03
Model group	0.24± 0.03 ^a	0.95± 0.10 ^a	0.88± 0.09 ^a
Sal-L group	0.42± 0.05 ^b	0.76± 0.08 ^b	0.66± 0.07 ^b
Sal-M group	0.61± 0.07 ^{bc}	0.58± 0.06 ^{bc}	0.46± 0.05 ^{bc}
Sal-H group	0.78± 0.08 ^{bcd}	0.24± 0.03 ^{bcd}	0.28± 0.03 ^{bcd}
Sal-H+Compound C group	0.57± 0.06 ^c	0.49± 0.05 ^c	0.57± 0.06 ^c
F	115.946	221.815	173.674
P	0.000	0.000	0.000

Note: Same as Table 1.

2.6 Sal 对各组裸鼠肝组织中 Beclin1、p62 蛋白及 AMPK/mTOR/ULK1 通路相关蛋白表达的影响

各组裸鼠肝组织中 AMPK、Beclin1 蛋白水平:模型组较对

照组显著下降 ($P<0.05$);Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组较模型组显著增加,组间差异有显著性,Sal-H 组增加最为显著 ($P<0.05$);Sal-H+Compound C 组较 Sal-H 组显著下降 ($P<0.05$)。p62

蛋白、p-mTOR/mTOR、p-ULK1/ULK1 表达水平:模型组较对照组显著增加 ($P<0.05$);Sal-L 组、Sal-M 组、Sal-H 组较模型组显著下降, 组间差异有显著性,Sal-H 组降低最为显著($P<0.05$); Sal-H+Compound C 组较 Sal-H 组显著增加($P<0.05$)。见图 2, 表 4。

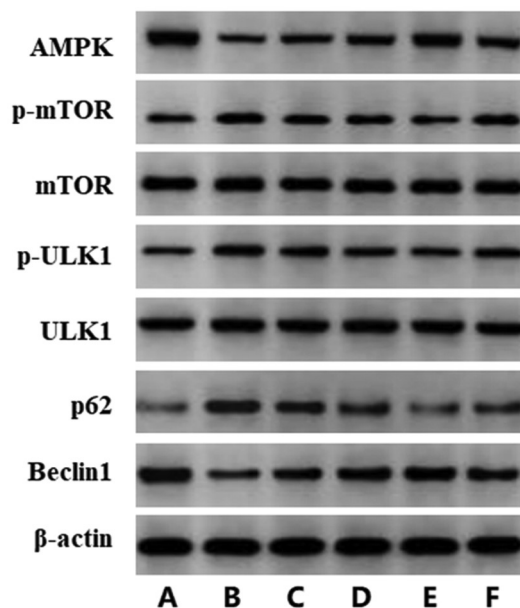


图 2 各组肝组织中 Beclin1、p62 蛋白及 AMPK/mTOR/ULK1 通路蛋白表达(Western blot)

Fig.2 Expression of Beclin1, p62 protein and AMPK/mTOR/ULK1 pathway protein in liver tissues of each group(Western blot)

Note: A. Control group. B. Model group. C. Sal-L group. D Sal-M group. E. Sal-H group. F.Sal-H+Compound C group.

3 讨论

结肠癌仅次于肺癌、前列腺癌,被列为全球第三大流行癌症^[14]。结肠癌肝转移一般是一种无症状的疾病,通常在晚期才被发现,且患者的生存时间仅仅只有 5 至 20 个月^[15],手术切除是目前唯一的根治性手段,但只有 15%~20%的患者适合该方法^[11]。因此迫切需要找寻有效治疗方法。Sal 是红景天的提取物,被证明可通过其抗氧化、抗炎作用对心血管疾病、糖尿病发挥治疗作用^[16]。Sal 被证明可以抑制一系列人类癌细胞的生长,如人类肺癌^[17]。此外,宋汉君等^[18]研究发现 Sal 可以抑制肝癌细胞生长,诱导其凋亡。龚舒等^[19]研究证明 Sal 还可以抑制乳腺癌细胞增殖及侵袭、迁移。基于以上文献研究,表明 Sal 具有抗肿瘤特性。值得一提的是, Sun KX 等^[20] 研究发现 Sal 通过 JAK2/STAT3 通路抑制直肠癌系 SW1116 细胞增殖,降低其迁移和侵袭能力。除此之外,Sal 对肝脏缺血再灌注损伤、肝纤维化、肝脏恶性肿瘤等引发的肝损伤,均具有保肝作用^[21]。本研究发现肝转移裸鼠经 Sal-L、Sal-M、Sal-H 治疗后,肿瘤细胞减少,肝脏重量、AST、ALT 水平降低,在一定程度上表现出抗肿瘤及保肝的作用,但具体作用机制尚不清楚。

自噬是一种独特的自我保护机制,研究发现自噬与肿瘤抑制有关,且由于癌细胞增殖失调引起的代谢需求、生物合成增加,癌细胞更依赖自噬^[22]。AMPK 信号是调节 mTOR 级联的主要信号之一,是自噬的中枢负调节剂,可以触发 mTOR 的去磷酸化,从而导致其与 ULK1 复合物分离,进而导致 ULK1 成功去磷酸化,引起自噬^[23]。AMPK 是一种中枢细胞能量传感器,可作为肿瘤抑制因子,抑制细胞周期停滞和肿瘤生长,从而在癌症预防中发挥关键作用^[24]。抑制 mTOR 表达在体外以及肿瘤移

表 4 各组肝组织中 Beclin1、p62 及 AMPK/mTOR/ULK1 通路蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

Table 4 Comparison of Beclin1, p62 and AMPK/mTOR/ULK1 pathway protein expression in liver tissues of each group($\bar{x} \pm s, n=10$)

Groups	Beclin1/β-actin	p62/β-actin	AMPK/β-actin	p-mTOR/mTOR	p-ULK1/ULK1
Control group	0.88± 0.09	0.15± 0.02	0.79± 0.08	0.22± 0.03	0.34± 0.04
Model group	0.21± 0.03 ^a	0.91± 0.10 ^a	0.18± 0.02 ^a	0.86± 0.09 ^a	0.98± 0.10 ^a
Sal-L group	0.48± 0.05 ^b	0.71± 0.08 ^b	0.34± 0.04 ^b	0.64± 0.07 ^b	0.75± 0.08 ^b
Sal-M group	0.66± 0.07 ^{bc}	0.53± 0.06 ^{bc}	0.58± 0.06 ^{bc}	0.42± 0.05 ^{bc}	0.54± 0.06 ^{bc}
Sal-H group	0.72± 0.08 ^{bcd}	0.22± 0.03 ^{bcd}	0.73± 0.08 ^{bcd}	0.25± 0.03 ^{bcd}	0.36± 0.04 ^{bcd}
Sal-H+Compound C group	0.51± 0.06 ^c	0.43± 0.05 ^c	0.54± 0.06 ^c	0.59± 0.06 ^c	0.62± 0.07 ^c
F	121.696	211.000	146.581	174.851	126.441
P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Note: Same as Table 1.

植模型中可对多种癌症具有显著的抑制作用^[25]。如 Zhang Y 等^[26] 研究发现白桦脂酸通过 AMPK/mTOR/ULK1 途径激活自噬进而抑制人膀胱癌细胞的增殖和迁移。特别是 Bu H 等^[27]研究证明冬凌草甲素通过上调 AMPK 表达, 下调 mTOR、ULK1 磷酸化水平,抑制结直肠癌 DLD-1 细胞恶性行为。本研究发现模型组裸鼠肝组织中 AMPK mRNA 及蛋白表达、自噬蛋白 Beclin1 表达降低,mTORMRNA、ULK1 mRNA、自噬蛋白 p62 表达增加,表明肝转移裸鼠肝脏损伤可能与抑制 AMPK/mTOR/ULK1

通路降低自噬有关,经 Sal-L、Sal-M、Sal-H 治疗后,上述指标发生逆转, 裸鼠肝脏损伤得到缓解, 推测 Sal 可能通过活化 AMPK/mTOR/ULK1 通路促进癌细胞自噬,进而起到保护肝脏的作用。为验证该推测,以 AMPK 抑制剂 -Compound C 进行回复性实验, 结果发现 Compound C 逆转了 Sal 对裸鼠肝脏的保护作用,进而验证了上述推测的合理性。

综上所述,Sal 通过激活 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路,减少裸鼠肝脏组织中肿瘤细胞形成,保护裸鼠肝脏。

参考文献(References)

- [1] 孟玮, 宗治国, 史晓宇, 等. miR-126 对结肠癌 SW480 细胞增殖、凋亡、周期及 SOX2 表达的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(4): 93-97
- [2] 董峰, 马君俊, 薛佩, 等. MMPs 抑制剂对结肠癌细胞凋亡、免疫功能及炎症因子的影响 [J]. 现代生物医学进展, 2022, 22(15): 2801-2806
- [3] Jin H, Gao S, Song D, et al. Intratumorally CpG immunotherapy with carbon nanotubes inhibits local tumor growth and liver metastasis by suppressing the epithelial-mesenchymal transition of colon cancer cells[J]. Anticancer Drugs, 2021, 32(3): 278-285
- [4] Wali AF, Majid S, Rasool S, et al. Natural products against cancer: Review on phytochemicals from marine sources in preventing cancer [J]. Saudi Pharm J, 2019, 27(6): 767-777
- [5] 张明发, 沈雅琴. 红景天苷及其苷元酪醇的抗炎、抗肿瘤和免疫调节作用[J]. 药物评价研究, 2013, 36(3): 228-234
- [6] Dai Z, Zhang X, Li W, et al. Salidroside Induces Apoptosis in Human Gastric Cancer Cells via the Downregulation of ENO1/PKM2/GLUT1 Expression[J]. Biol Pharm Bull, 2021, 44(11): 1724-1731
- [7] 王媛媛, 林宏. 红景天提取物体外抗肿瘤转移作用机制研究[J]. 天津药学, 2015, 27(6): 1-4
- [8] Qian HR, Shi ZQ, Zhu HP, et al. Interplay between apoptosis and autophagy in colorectal cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8 (37): 62759-62768
- [9] Xiang X, Tian Y, Hu J, et al. Fangchinoline exerts anticancer effects on colorectal cancer by inducing autophagy via regulation AMPK/mTOR/ULK1 pathway [J]. Biochem Pharmacol, 2021, 186: 114475
- [10] 李乾元, 周秀扣, 方征宇, 等. 沉默 STC2 对人结肠癌 SW480 细胞肝转移裸鼠模型的影响及作用机制研究 [J]. 国际消化病杂志, 2021, 41(5): 353-359
- [11] 李婷婷, 刘兆喆, 郑振东. 贝伐单抗联合伊立替康对接种人结肠癌 SW480 细胞裸鼠的肝脏损伤研究[J]. 肿瘤药学, 2021, 11(1): 40-44
- [12] 王娜, 谢磊. 红景天苷调节免疫及抑制宫颈癌 U14 荷瘤小鼠肿瘤生长作用的研究[J]. 中药材, 2020, 43(7): 1732-1736
- [13] 方琼. AMPK 在运动调控老年小鼠骨骼肌自噬中的作用[D]. 江苏: 苏州大学, 2020
- [14] Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods[J]. Int J Cancer, 2019, 144(8): 1941-1953
- [15] Kasprzak A, Adamek A. The Neuropeptide System and Colorectal Cancer Liver Metastases: Mechanisms and Management[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(10): 1-40
- [16] Zheng T, Bian F, Chen L, et al. Beneficial Effects of Rhodiola and Salidroside in Diabetes: Potential Role of AMP-Activated Protein Kinase[J]. Mol Diagn Ther, 2019, 23(4): 489-498
- [17] Ma W, Wang Z, Zhao Y, et al. Salidroside Suppresses the Proliferation and Migration of Human Lung Cancer Cells through AMPK-Dependent NLRP3 Inflammasome Regulation [J]. Oxid Med Cell Longev, 2021, 2021: 6614574
- [18] 宋汉君, 吕少春, 李丽疆. 红景天苷诱导小鼠肝癌细胞凋亡作用的机制[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(4): 1026-1027
- [19] 龚舒, 段承刚, 陶忠桦, 等. 红景天苷对人乳腺癌 MDA-MB-435 细胞功能的作用[J]. 泸州医学院学报, 2016, 39(2): 118-123
- [20] Sun KX, Xia HW, Xia RL. Anticancer effect of salidroside on colon cancer through inhibiting JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(1): 615-621
- [21] 叶倩男, 徐列明, 平键. 红景天苷保肝作用及相关机制的研究进展 [J]. 上海中医药大学学报, 2020, 34(1): 83-87, 100
- [22] Song Y, Zhang P, Sun Y, et al. AMPK activation-dependent autophagy compromises oleanolic acid-induced cytotoxicity in human bladder cancer cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(40): 67942-67954
- [23] Zha QB, Zhang XY, Lin QR, et al. Cucurbitacin E Induces Autophagy via Downregulating mTORC1 Signaling and Upregulating AMPK Activity[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0124355
- [24] Heng Y, Liang Y, Zhang J, et al. Camptothecin Inhibits Neddylation to Activate the Protective Autophagy Through NF- κ B/AMPK/mTOR/ULK1 Axis in Human Esophageal Cancer Cells[J]. Front Oncol, 2021, 11: 671180
- [25] Duarte A, André-Grégoire G, Trillet K, et al. Inhibition of mTOR in head and neck cancer cells alters endothelial cell morphology in a paracrine fashion[J]. Mol Carcinog, 2019, 58(1): 161-168
- [26] Zhang Y, He N, Zhou X, et al. Betulinic acid induces autophagy-dependent apoptosis via Bmi-1/ROS/AMPK-mTOR-ULK1 axis in human bladder cancer cells [J]. Aging (Albany NY), 2021, 13(17): 21251-21267
- [27] Bu H, Liu D, Zhang G, et al. AMPK/mTOR/ULK1 Axis-Mediated Pathway Participates in Apoptosis and Autophagy Induction by Oridonin in Colon Cancer DLD-1 Cells [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 8533-8545