doi:10.11659/jjssx.01E024030

·基础研究·

高良姜素调节FOXO3-FOXM1轴对结直肠癌细胞增殖、凋亡和5-FU耐药性的影响

杨 柳,冯 丹,杨 莉,唐 玲,罗 飞 (川北医学院附属医院药剂科,四川 南充 637000)

[摘 要] **目的** 探讨高良姜素调节FOXO3-FOXM1轴对结直肠癌(CRC)细胞增殖、凋亡和5-氟尿嘧啶(5-FU)耐药性的影响。**方法** 体外培养CRC细胞HCT8及其耐药细胞株HCT8/5-FU,然后用不同浓度(0、5、10、20、40 μmol/L)的高良姜素处理,筛选实验浓度。将HCT8细胞分为ctrl组(不进行特殊处理)、NC组(转染空载质粒)、L-高良姜素组(10 μmol/L高良姜素处理)、H-高良姜素组(20 μmol/L高良姜素处理)、H-高良姜素+sh-FOXO3组(20 μmol/L高良姜素处理后转染FOXO3 shRNA质粒)。将HCT8/5-FU细胞分为对照组(不做特殊处理)、5-FU+NC组(5 μg/mL 5-FU处理后转染空载质粒)、5-FU组(5 μg/mL 5-FU处理)、5-FU+L-高良姜素组(5 μg/mL 5-FU处理后加入10 μmol/L高良姜素)、5-FU+H-高良姜素组(5 μg/mL 5-FU处理后加入20 μmol/L高良姜素)、5-FU+H-高良姜素+sh-FOXO3组(经5 μg/mL 5-FU和20 μmol/L高良姜素处理后,再转染FOXO3 shRNA质粒)。CCK-8法检测细胞的增殖能力;克隆形成实验检测细胞克隆形成能力;流式细胞术检测细胞凋亡水平;Western blot检测相关蛋白表达。**结果** 在HCT8细胞中,与0 μmol/L高良姜素处理比较,10、20、40 μmol/L高良姜素处理会降低细胞存活率($P<0.05$);在HCT8/5-FU细胞中,与0 μmol/L高良姜素处理比较,40 μmol/L高良姜素处理可降低细胞存活率($P<0.05$)。在HCT8和HCT8/5-FU细胞中,10、20 μmol/L高良姜素干预后细胞凋亡率、FOXO3和Bax蛋白表达升高($P<0.05$),而细胞存活率、克隆形成数、FOXM1和PCNA蛋白表达降低/减少($P<0.05$),HCT8/5-FU细胞中MRP-1蛋白表达降低($P<0.05$)。敲低FOXO3可减弱高剂量高良姜素对HCT8和HCT8/5-FU细胞的作用($P<0.05$)。**结论** 高良姜素可能通过调节FOXO3-FOXM1轴抑制CRC细胞的增殖,促进细胞凋亡,并降低细胞对5-FU的耐药性。

[关键词] 高良姜素;FOXO3-FOXM1轴;结直肠癌;增殖;凋亡;5-氟尿嘧啶;耐药性

[中图分类号] R735.3 [文献标志码] A [收稿日期] 2024-01-08

[基金项目] 南充市科技项目-市校科技战略合作专项(20SXQT0101)

[通信作者] 罗 飞,E-mail:d88qfc@163.com

[16] Zheng X, Chen J, Yang Y, et al. Exogenous luteinizing hormone promotes ovarian survival and function during cryopreservation and transplantation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 526(2): 424-430. doi: 10.1016/j.bbrc.2020.03.014.

[17] Kuokkanen S, Pal L. Follicle-stimulating hormone (and luteinizing hormone) in ovarian stimulation: does the dose matter for cycle success?[J]. Fertil Steril, 2023, 119(2): 166-169. doi: 10.1016/j.fertnstert.2022.12.019.

[18] Ali EMT, Abdallah HI, El-Sayed SM. Histomorphological, VEGF and TGF-β immunoexpression changes in the diabetic rats′ ovary and the potential amelioration following treatment with metformin and insulin [J]. J Mol Histol, 2020, 51(3): 287-305. doi: 10.1007/s10735-020-09880-x.

[19] Kılınç Uğurlu A, Bideci A, Demirel MA, et al. Effects of blue light on puberty and ovary in female rats[J]. J Clin Res Pediatr Endocrinol, 2023, 15(4): 365-374. doi: 10.4274/jcrpe.galenos.2023.2022-12-1.

[20] Zhao X, Li H, Chen X, et al. Long non-coding RNA MSTRG.5970.28 regulates proliferation and apoptosis of goose follicle granulosa cells via the miR-133a-3p/ANOS1 pathway[J]. Poult Sci, 2023, 102(3): 102451. doi: 10.1016/j.psj.2022.102451.

[21] Zhang H, Luo Q, Lu X, et al. Retraction note: effects of hPMSCs on granulosa cell apoptosis and AMH expression and their role in the restoration of ovary function in premature ovarian failure mice [J]. Stem Cell Res Ther, 2022, 13(1): 504. doi: 10.1186/s13287-022-03183-6.

[22] Xiao L, Wang Z, Lu N, et al. GPER mediates the IL6/JAK2/STAT3 pathway involved in VEGF expression in swine ovary GCs[J]. J Mol Endocrinol, 2021, 68(1): 23-33. doi: 10.1530/JME-21-0125.

[23] Jin L, Ren L, Lu J, et al. CXCL12 and its receptors regulate granulosa cell apoptosis in PCOS rats and human KGN tumor cells [J]. Reproduction, 2021, 161(2): 145-157. doi: 10.1530/REP-20-0451.

[24] Sperduti S, Paradiso E, Anzivino C, et al. LH increases the response to FSH in granulosa-lutein cells from sub/poor-responder patients in vitro[J]. Hum Reprod, 2023, 38(1): 103-112. doi: 10.1093/humrep/deac246.

[25] Edmund LN, Salama AM, Murali R. Cytologic features of sex cord-stromal tumors in women[J]. Cancer Cytopathol, 2022, 130(1): 55-71. doi: 10.1002/cncy.22502.

[26] Li XF, Wang QF, He QQ, et al. Low LH level does not indicate poor IVF cycle outcomes with GnRh-a single trigger: a retrospective analysis [J]. BMC Pregnancy Childbirth, 2022, 22(1): 951. doi: 10.1186/s12884-022-05251-4.

[27] 范 培,李庆云,何庭月,等. 补肾益冲方对卵巢储备功能减退大鼠卵巢组织PI3K/Akt/mTOR信号通路的影响[J]. 江西中医药, 2024, 55(10): 64-68. doi: 10.20141/j.0411-9584.2024.10.19.

[28] Hojo T, Skarzynski DJ, Okuda K. Apoptosis, autophagic cell death, and necroptosis: different types of programmed cell death in bovine corpus luteum regression[J]. J Reprod Dev, 2022, 68(6): 355-360. doi: 10.1262/jrd.2022-097.

(编辑:刘 艺)

Effects of galangin on proliferation, apoptosis and 5-FU resistance of colorectal cancer cells by regulating FOXO3-FOXM1 axis

YANG Liu, FENG Dan, YANG Li, TANG Ling, LUO Fei (Department of Pharmacy, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong Sichuan 637000, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of galangin on the proliferation, apoptosis, and 5-fluorouracil (5-FU) resistance of colorectal cancer (CRC) cells by regulating the FOXO3-FOXM1 axis. **Methods** CRC cells HCT8 and its drug-resistant cell lines HCT8/5-FU were cultured in vitro, and then treated with different concentrations (0, 5, 10, 20, 40 μmol/L) of galangin to screen experimental concentrations. HCT8 cells were divided into the ctrl group (without special treatment), NC group (transfected with empty plasmid), L-galangin group (treated with 10 μmol/L of galangin), H-galangin group (treated with 20 μmol/L of galangin), and H-galangin+sh-FOXO3 group (transfected with FOXO3 shRNA plasmid after 20 μmol/L of galangin treatment). HCT8/5-FU cells were divided into the control group (without special treatment), 5-FU+NC group (treated with empty plasmid after 5 μg/mL of 5-FU treatment), 5-FU group (treated with 5 μg/mL of 5-FU), 5-FU+L-galangin group (treated with 10 μmol/L of galangin after 5 μg/mL of 5-FU treatment), 5-FU+H-galangin group (transfected with 20 μmol/L galangin after 5 μg/mL of 5-FU treatment), and 5-FU+H-galangin+sh-FOXO3 group (transfected with FOXO3 shRNA plasmid after 5 μg/mL of 5-FU and 20 μmol/L of galangin treatment). The cell proliferation ability was detected by CCK-8 assay; the cell clone formation ability was detected by clone formation assay; the cell apoptosis was detected by flow cytometry ; the expression of related proteins were detected by Western blot. **Results** In HCT8 cells, compared with 0 μmol/L of galangin treatment, 10, 20, 40 μmol/L of galangin treatment decreased the cell survival rate (P<0. 05). In HCT8/5-FU cells, compared with 0 μmol/L galangin treatment, 40 μmol/L of galangin treatment decreased the cell survival rate (P<0. 05). After 10 and 20 μmol/L of galangin treatment, the apoptosis rate, and the expression of FOXO3 and Bax proteins were increased (P<0. 05), while cell survival rate, clone formation number, and expression of FOXM1 and PCNA proteins decreased in HCT8 and HCT8/5-FU cells (P<0. 05), and the MRP-1 protein expression in HCT8/5-FU cells decreased (P<0. 05). Knocking down sh-FOXO3 could attenuate the effects of high dose of galangin on HCT8 and HCT8/5-FU cells (P<0. 05). **Conclusion** Galangin may inhibit the proliferation, promote apoptosis, and reduce 5-FU resistance of CRC cells by regulating the FOXO3-FOXM1 axis.

Keywords: galangin; FOXO3-FOXM1 axis; colorectal cancer; proliferation; apoptosis; 5-fluorouracil; resistance

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是世界上第三大常见癌症,是第二大癌症相关死亡的原因,且近年来CRC的发病率在50岁以下的人群中明显增加[1-2]。手术、放疗、化疗、靶向治疗等是CRC的主要治疗手段,但CRC化疗耐药性的出现导致治疗效果较差[3]。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是一线化疗药物,已用于治疗CRC等多种癌症,但治疗过程中患者易对5-FU产生耐药性,从而限制了其临床应用[4]。因此,对CRC发生发展以及5-FU耐药性的研究有助于开发更有效的治疗药物。高良姜素是一种具有天然活性的类黄酮物质,主要存在于高良姜中,具有显著的抗癌活性[5]。研究发现,高良姜素可通过影响线粒体功能和caspase依赖途径诱导人结肠癌细胞死亡[6];且高良姜素是蜂胶和蜂蜜中发挥抗CRC潜力的主要生物活性成分之一[7]。这说明高良姜素具有抑制CRC恶性生物学行为的潜力。但高良姜素是否影响CRC细胞的5-FU耐药性目前尚未见报道。

FOX家族蛋白在许多生物学过程中发挥作用,其中FOXO3和FOXM1在癌症中发挥关键作用。FOXO3在CRC等多种癌症中表达下调,其低表达是CRC患者预后不良的独立危险因素[8]。而FOXM1则拮抗细胞凋亡,促进细胞增殖[9];且FOXM1在CRC中高表达,并与其临床病理特征和预后相关,有望成为CRC靶向治疗的新靶点[10]。此外,FOXM1高表达和FOXO3低表达与癌症治疗耐药性的产生有关,且FOXO3可能通过抑制FOXM1表达增强5-FU耐药CRC细胞对5-FU治疗的敏感性,进而阻止CRC的进展[11-12]。然而,高良姜素是否通过调控FOXO3-FOXM1影响CRC细胞进展尚不清楚。因此,本文探讨高良姜素对CRC细胞的影响及FOXO3-FOXM1轴的调节作用,以期为临床提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

人CRC细胞HCT8、耐药细胞株HCT8/5-FU均购自上海雅吉生物科技有限公司。

1.2 试剂与材料

5-FU购自上海博熠生物医药科技有限公司;高良姜素购自江苏永健医药科技有限公司;CCK-8购自上海麦克林生化科技股份有限公司;FOXO3 shRNA质粒购自上海吉凯基因医学科技股份有限公司;细胞凋亡检测试剂盒购自上海优宁维生物科技股份有限公司;一抗FOXO3、Bax购自上海博湖生物科技有限公司;一抗FOXM1、PCNA、MRP-1购自爱必信(上海)生物科技有限公司;β-actin购自上海北诺生物科技有限公司;HRP

偶联山羊抗兔二抗购自北京泰泽嘉业科技发展有限公司。

1.3 细胞培养

将HCT8细胞在含10% FBS和1%双抗的RPMI-1640完全培养液中培养;HCT8/5-FU细胞则在HCT8细胞培养液基础上添加5 μg/mL的5-FU进行培养,以保持HCT8/5-FU的耐药性。

1.4 CCK-8法检测细胞活力

将HCT8和HCT8/5-FU细胞以1×10^4/mL分别接种于96孔板中,用不同浓度(0、5、10、20、40 μmol/L)的高良姜素处理细胞[13],孵育48 h;然后在每孔细胞中加入20 μL CCK-8试剂孵育1 h,在酶标仪上检测细胞在450 nm波长处的吸光度(optical density,OD)值,并计算细胞存活率。细胞存活率(%)=$OD_{治疗组}/OD_{对照组}\times100\%$。每组设置6个复孔,实验重复3次。

1.5 细胞分组及增殖能力检测

将HCT8细胞分为ctrl组、NC组、L-高良姜素组、H-高良姜素组、H-高良姜素+si-FOXO3组。ctrl组细胞不做特殊处理;NC组细胞转染空载质粒;L-高良姜素组、H-高良姜素组细胞分别用10 μmol/L、20 μmol/L的高良姜素处理;H-高良姜素+sh-FOXO3组细胞用20 μmol/L高良姜素处理后再转染FOXO3 shRNA质粒,并确定转染效率。将各组细胞接种在96孔板上孵育,采用CCK-8法检测各组细胞存活率。

将HCT8/5-FU细胞分为对照组、5-FU+NC组、5-FU组、5-FU+L-高良姜素组、5-FU+H-高良姜素组、5-FU+H-高良姜素+sh-FOXO3组。对照组不做特殊处理;5-FU+NC组细胞用5 μg/mL的5-FU处理细胞后再转染空载质粒;5-FU组细胞用5 μg/mL的5-FU处理;5-FU+L-高良姜素组细胞用5 μg/mL 5-FU处理后再用10 μmol/L的高良姜素处理;5-FU+H-高良姜素组细胞用5 μg/mL 5-FU处理后再用20 μmol/L的高良姜素处理;5-FU+H-高良姜素+sh-FOXO3组细胞经5 μg/mL 5-FU和20 μmol/L高良姜素处理后,再转染FOXO3 shRNA质粒,并检测转染效率。采用CCK-8法检测各组HCT8/5-FU细胞存活率。

1.6 克隆形成实验检测细胞克隆形成能力

将各组细胞以500个/孔的密度接种在6孔板中,并在37 ℃下孵育14 d,室温下用4%多聚甲醛固定细胞15 min,然后室温下用0.1%结晶紫溶液染色15 min。光学显微镜下观察克隆形成细胞,分析细胞克隆的数量。

1.7 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

将各组细胞干预培养48 h后,用胰蛋白酶消化处理,并用PBS清洗,然后根据凋亡试剂盒说明书,用Annexin V-FITC/PI对细胞进行染色,使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡率。

1.8 Western blot检测蛋白表达

各组细胞在含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的细胞裂解缓冲液中裂解30 min,提取总蛋白。低温离心后,检测蛋白浓度,凝胶电泳分离蛋白并转膜,封闭1 h后与一抗FOXO3(1∶1 000)、FOXM1(1∶1 000)、MRP-1(1∶1 000)、PCNA(1∶1 000)、Bax(1∶1 000)、β-actin(1∶2 000)在4 ℃下孵育过夜,再与二抗在室温下继续孵育1 h。ECL显影后,采用Image J软件分析蛋白表达情况。

1.9 统计学分析

用Graphpad prism 9.0软件进行统计学分析,数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用*SNK-q*检验。$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高良姜素浓度对HCT8和HCT8/5-FU细胞增殖的影响

在HCT8细胞中,与0 μmol/L高良姜素处理比较,10、20、40 μmol/L高良姜素处理会降低细胞存活率($P<0.05$);在HCT8/5-FU细胞中,与0 μmol/L高良姜素处理比较,40 μmol/L高良姜素处理可降低细胞存活率($P<0.05$),见表1。因此,为了避免高良姜素对HCT8/5-FU细胞活性的影响,选择10、20 μmol/L高良姜素进行后续实验。

表1 不同浓度高良姜素对HCT8和HCT8/5-FU细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$,%)

高良姜素浓度	HCT8细胞	HCT8/5-FU细胞
0 μmol/L	94.69±4.42	97.55±3.43
5 μmol/L	91.67±7.62	93.71±4.56
10 μmol/L	72.78±6.03*	95.65±3.15
20 μmol/L	51.28±7.54*	96.30±3.69
40 μmol/L	36.80±6.90*	72.71±3.04*

*:与0 μmol/L高良姜素处理比较,$P<0.05$

2.2 各组HCT8细胞的增殖能力、克隆形成能力和凋亡率比较

与ctrl组比较,L-高良姜素组、H-高良姜素组HCT8细胞存活率和克隆形成数降低/减少($P<0.05$),细胞凋亡率升高($P<0.05$);与L-高良姜素组比较,H-高良姜素组HCT8细胞存活率和克隆形成数降低/减少($P<0.05$),细胞凋亡率升高($P<0.05$);与H-高良姜素组相比,H-高良姜素+sh-FOXO3组细胞存活率和克隆形成数升高/增加($P<0.05$),细胞凋亡率降低($P<0.05$),见图1~2和表2。

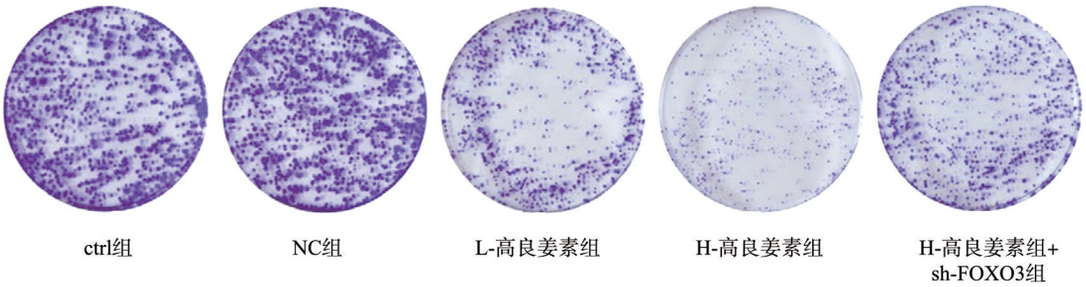


图1　各组HCT8细胞克隆形成能力(×40)

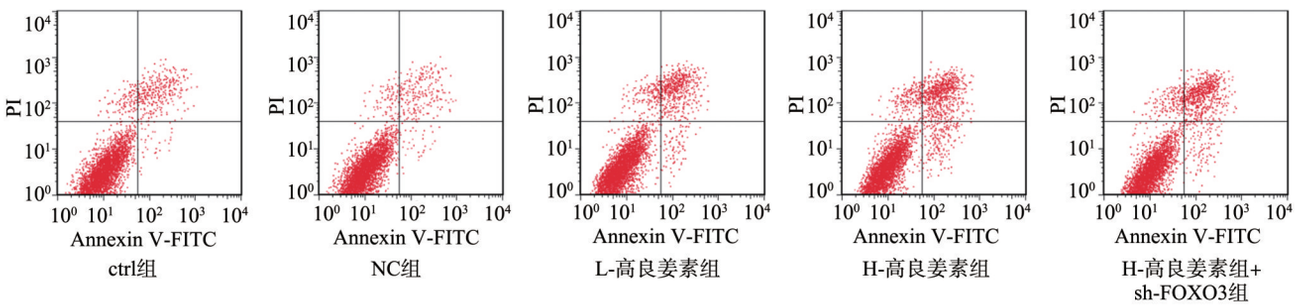


图2　流式细胞术检测各组HCT8细胞凋亡情况

表2　各组HCT8细胞存活率、克隆形成数和凋亡率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞存活率(%)	克隆形成数(个)	细胞凋亡率(%)
ctrl组	93.93±5.43	212.44±16.38	6.01±1.46
NC组	90.34±6.18	215.18±15.90	4.61±1.52
L-高良姜素组	75.83±5.15*	93.75±12.65*	15.73±2.09*
H-高良姜素组	50.45±5.18$^{*\#}$	51.36±10.47$^{*\#}$	23.84±2.47$^{*\#}$
H-高良姜素+sh-FOXO3组	66.95±5.07$^{\triangle}$	87.82±13.15$^{\triangle}$	18.69±1.65$^{\triangle}$

*:与ctrl组比较,P<0.05;#:与L-高良姜素组比较,P<0.05;△:与H-高良姜素组比较,P<0.05

2.3　各组HCT8细胞中FOXO3、FOXM1、PCNA、Bax蛋白表达情况

与ctrl组比较,L-高良姜素组和H-高良姜素组细胞中FOXO3、Bax蛋白表达升高(P<0.05),FOXM1、PCNA蛋白表达降低(P<0.05);与L-高良姜素组比较,H-高良姜素组细胞中FOXO3、Bax蛋白表达升高(P<0.05),FOXM1、PCNA蛋白表达降低(P<0.05);与H-高良姜素组比较,H-高良姜素+sh-FOXO3组细胞中FOXO3、Bax蛋白表达降低(P<0.05),FOXM1、PCNA蛋白表达升高(P<0.05),见图3、表3。

2.4　各组HCT8/5-FU细胞的增殖能力、克隆形成能力和凋亡率比较

与5-FU组比较,5-FU+L-高良姜素组和5-FU+H-高良姜素组细胞存活率和克隆形成数降低/减少(P<0.05),细胞凋亡率升高(P<0.05);与5-FU+L-高良姜素组比较,5-FU+H-高良姜素组细胞存活率和克隆形成数降低/减少(P<0.05),细胞凋亡率升高(P<0.05);与5-FU+H-高良姜素组相比,5-FU+H-高良姜素+sh-FOXO3组细胞存活率和克隆形成数升高/增加(P<0.05),细胞凋亡率降低(P<0.05),见图4~5和表4。

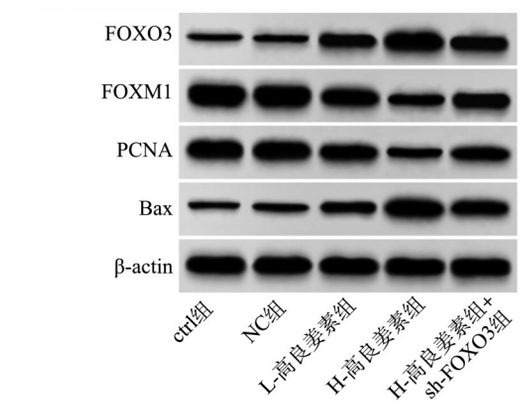


图3　Western blot检测HCT8细胞中相关蛋白表达

表3　各组HCT8细胞中FOXO3、FOXM1、PCNA、Bax蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	FOXO3	FOXM1	PCNA	Bax
ctrl组	0.21±0.04	1.42±0.14	1.28±0.12	0.27±0.05
NC组	0.30±0.05	1.44±0.12	1.20±0.13	0.35±0.04
L-高良姜素组	0.79±0.07*	0.95±0.11*	0.87±0.10*	0.62±0.07*
H-高良姜素组	1.33±0.08$^{*\#}$	0.52±0.08$^{*\#}$	0.46±0.08$^{*\#}$	1.03±0.08$^{*\#}$
H-高良姜素+sh-FOXO3组	0.81±0.05$^{\triangle}$	0.89±0.10$^{\triangle}$	0.78±0.10$^{\triangle}$	0.70±0.06$^{\triangle}$

*:与ctrl组比较,P<0.05;#:与L-高良姜素组比较,P<0.05;△:与H-高良姜素组比较,P<0.05

2.5　各组HCT8/5-FU细胞中相关蛋白表达情况

与5-FU组比较,5-FU+L-高良姜素组、5-FU+H-高良姜素组细胞中FOXO3、Bax蛋白表达升高(P<0.05),FOXM1、MRP-1、PCNA蛋白表达降低(P<0.05);与5-FU+L-高良姜素组比较,5-FU+H-高良姜素组细胞中FOXO3、Bax蛋白表达升高(P<0.05),FOXM1、MRP-1、PCNA蛋白表达降低(P<0.05);与5-FU+H-高良姜素组

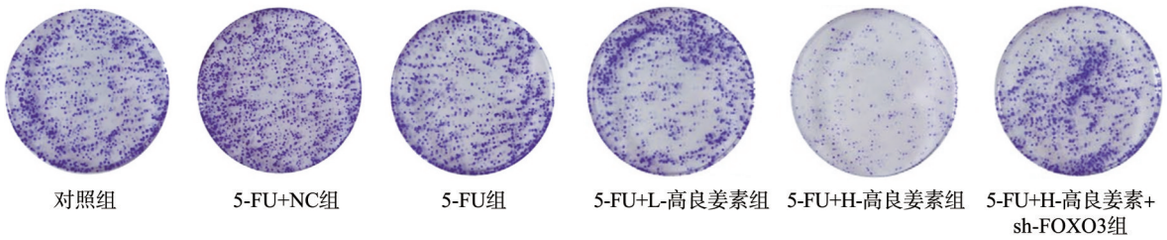


图4 各组HCT8细胞克隆形成能力(×40)

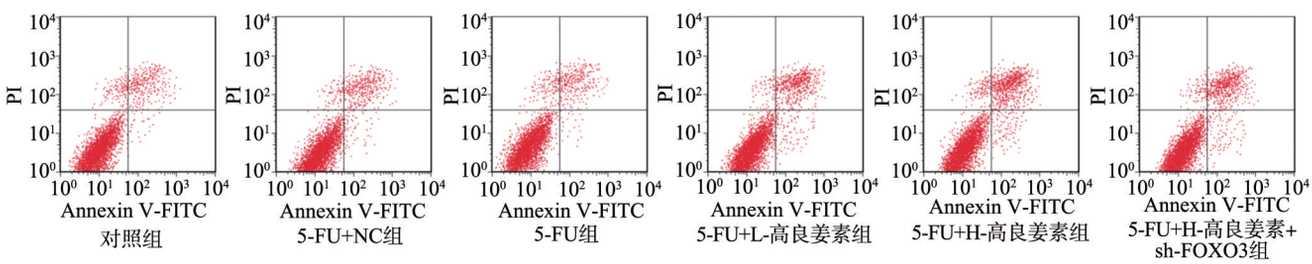


图5 流式细胞术检测各组HCT8细胞凋亡水平

表4 各组HCT8/5-FU细胞存活率、克隆形成数和凋亡率比较($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞存活率(%)	克隆形成数(个)	细胞凋亡率(%)
对照组	95.29±3.65	208.74±15.32	5.90±1.12
5-FU+NC组	97.21±4.90	209.35±17.40	6.87±1.23
5-FU组	92.13±6.67	205.92±14.89	5.97±1.46
5-FU+L-高良姜素组	79.59±5.89*	111.48±13.60*	12.75±1.99*
5-FU+H-高良姜素组	61.41±5.71*#	62.42±10.55*#	19.89±1.80*#
5-FU+H-高良姜素+sh-FOXO3组	74.82±6.23△	105.70±12.26△	14.76±1.67△

*:与5-FU组比较,$P<0.05$;#:与5-FU+L-高良姜素组比较,$P<0.05$;△:与5-FU+H-高良姜素组比较,$P<0.05$

相比,5-FU+H-高良姜素+sh-FOXO3组细胞中FOXO3、Bax蛋白表达降低($P<0.05$),FOXM1、MRP-1、PCNA蛋白表达升高($P<0.05$),见图6、表5。

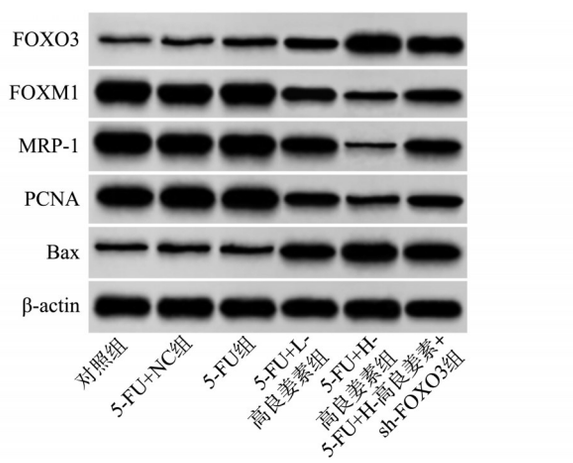


图6 Western blot检测HCT8/5-FU细胞中相关蛋白表达

3 讨论

CRC是常见的恶性肿瘤,虽然其诊疗取得了一定的进展,但CRC仍然是导致全球癌症死亡的主要原因。CRC主要治疗方式为手术、放化疗等,而长期使用化疗药物会使CRC患者产生耐药性,严重影响治疗效果和预后[14-15]。

高良姜素对肺癌、胃癌、胆管癌等多种肿瘤均有治疗效果,可通过抗增殖、促凋亡、抗转移、增强T淋巴细胞活性等抑制癌细胞生长,还可减弱胆管癌对顺铂治疗的耐药性[16-17]。高良姜素也是蜂胶中的主要活性成分,研究显示,蜂胶对CRC细胞具有毒性作用,且可以抑制细胞生长[7]。这提示高良姜素可能是治疗CRC的潜在靶点。本研究中高良姜素处理的HCT8细胞增殖能力下降,细胞凋亡率增加,且PCNA表达降低,Bax表达升高,表明高良姜素能够抑制CRC细胞增殖,促进凋亡,进而抑制CRC的进展;同时,高良姜素处理后的HCT8/5-FU细胞增殖能力也下降,细胞凋亡率也增加,且PCNA及耐药相关蛋白MRP-1表达降低,Bax表达升高,

表5 各组HCT8/5-FU细胞中FOXO3、FOXM1、MRP-1、PCNA、Bax蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	FOXO3	FOXM1	MRP-1	PCNA	Bax
对照组	0.13±0.03	1.39±0.10	1.40±0.10	1.18±0.13	0.26±0.05
5-FU+NC组	0.20±0.04	1.27±0.12	1.30±0.12	1.31±0.10	0.30±0.04
5-FU组	0.31±0.05	1.32±0.14	1.32±0.16	1.34±0.11	0.32±0.04
5-FU+L-高良姜素组	0.68±0.05*	0.87±0.11*	0.93±0.13*	0.76±0.09*	0.85±0.08*
5-FU+H-高良姜素组	1.24±0.07*#	0.40±0.10*#	0.21±0.07*#	0.36±0.07*#	1.26±0.07*#
5-FU+H-高良姜素+sh-FOXO3组	0.89±0.06△	0.68±0.13△	0.72±0.11△	0.69±0.08△	1.03±0.06△

*:与5-FU组比较,$P<0.05$;#:与5-FU+L-高良姜素组比较,$P<0.05$;△:与5-FU+H-高良姜素组比较,$P<0.05$

提示高良姜素可能通过抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,下调耐药蛋白表达来降低CRC耐药细胞株对5-FU的耐药性。

FOXO3-FOXM1轴在多种癌症的发生发展及耐药性中发挥重要作用,FOXO3是肿瘤抑制因子,FOXM1是一种增殖特异性转录因子,在多种癌症中过表达,与癌症进展密切相关[18-19]。据报道,FOXO3过表达可提高HCT8/5-FU细胞对5-FU的敏感性[20]。FOXM1的高表达可通过促进上皮-间充质转化、肿瘤血管生成,调节肿瘤干细胞特性等影响CRC细胞的增殖、侵袭、转移和放化疗抵抗[21]。此外,有研究显示,调节FOXO3-FOXM1轴可增强5-FU耐药结肠癌细胞对5-FU治疗的敏感性[12]。本研究结果显示,经高良姜素处理的HCT8细胞和HCT8/5-FU细胞FOXO3蛋白表达升高,FOXM1蛋白表达降低,提示FOXO3-FOXM1轴可能介导高良姜素的抗CRC细胞进展和耐药作用;进一步研究发现,敲低FOXO3减轻了高浓度高良姜素对HCT8细胞和HCT8/5-FU耐药细胞株的增殖抑制作用和凋亡促进作用,增加了HCT8/5-FU细胞的耐药性。这提示高良姜素对CRC发生发展及5-FU耐药性的抑制作用可能通过调节FOXO3-FOXM1轴实现。

综上,高良姜素可能通过调控FOXO3-FOXM1轴抑制CRC细胞增殖,促进细胞凋亡,并降低细胞对5-FU的耐药性。本研究为CRC的治疗提供了新的理论基础,高良姜素与临床化疗药物5-FU的联合可能是增强抗肿瘤疗效和减少药物副作用的新策略。但高良姜素是否还通过其他途径发挥抗CRC活性,仍需进一步分析。

[参考文献]

[1] Baidoun F, Elshiwy K, Elkeraie Y, et al. Colorectal cancer epidemiology: recent trends and impact on outcomes[J]. Curr Drug Targets, 2021, 22(9): 998-1009. doi: 10.2174/1389450121999201117115717.

[2] Nfonsam V, Wusterbarth E, Gong A, et al. Early-onset colorectal cancer[J]. Surg Oncol Clin N Am, 2022, 31(2): 143-155. doi: 10.1016/j.soc.2021.11.001.

[3] Zou Q, Lei X, Xu A, et al. Chemokines in progression, chemoresistance, diagnosis, and prognosis of colorectal cancer[J]. Front Immunol, 2022, 13(1): 724139-724152. doi: 10.3389/fimmu.2022.724139.

[4] Chauvin A, Bergeron D, Vencic J, et al. Downregulation of KRAB zinc finger proteins in 5-fluorouracil resistant colorectal cancer cells[J]. BMC Cancer, 2022, 22(1): 363. doi: 10.1186/s12885-022-09417-3.

[5] 贺文煜,张海明,余 涛,等. 高良姜素对缺氧诱导因子-1α诱导胃癌细胞上皮间质转化的作用机制[J]. 中国药理学通报,2023,39(5):839-843. doi:10.12360/CPB202209092.

[6] Ha TK, Kim ME, Yoon JH, et al. Galangin induces human colon cancer cell death via the mitochondrial dysfunction and caspase-dependent pathway[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2013, 238(9): 1047-1054. doi: 10.1177/1535370213497882.

[7] Moskwa J, Naliwajko SK, Dobiecka D, et al. Bee products and colorectal cancer-active components and mechanism of action[J]. Nutrients, 2023, 15(7): 1614-1630. doi: 10.3390/nu15071614.

[8] 燕 普,常小伟,张永康. FOXO3联合XPNPEP2和MMP-14对结直肠癌不良预后的预测分析[J]. 中国肿瘤临床与康复,2021,28(10):1169-1172. doi:10.13455/j.cnki.cjcor.2021.10.05.

[9] Moore XTR, Gheghiani L, Fu Z. The role of polo-like kinase 1 in regulating the forkhead box family transcription factors[J]. Cells, 2023, 12(9): 1344-1366. doi: 10.3390/cells12091344.

[10] 陆 明,胡孔旺. HER2及FOXM1在结直肠癌中的临床意义及相互关系的研究进展[J]. 肿瘤,2017,37(12):1329-1333. doi:10.3781/j.issn.1000-7431.2017.55.194.

[11] Yao S, Fan LY, Lam EW. The FOXO3-FOXM1 axis: a key cancer drug target and a modulator of cancer drug resistance[J]. Semin Cancer Biol, 2018, 50(1): 77-89. doi: 10.1016/j.semcancer.2017.11.018.

[12] Ghosh S, Singh R, Vanwinkle ZM, et al. Microbial metabolite restricts 5-fluorouracil-resistant colonic tumor progression by sensitizing drug transporters via regulation of FOXO3-FOXM1 axis[J]. Theranostics, 2022, 12(12): 5574-5595. doi: 10.7150/thno.70754.

[13] Liang X, Wang P, Yang C, et al. Galangin inhibits gastric cancer growth through enhancing STAT3 mediated ROS production[J]. Front Pharmacol, 2021, 12(1): 646628-646640. doi: 10.3389/fphar.2021.646628.

[14] 魏攀凤,邹智勇,庄伊凡. 具核梭杆菌激活Wnt/β-catenin信号通路促进结直肠癌细胞化疗耐药[J]. 局解手术学杂志,2022,31(8):659-663. doi:10.11659/jjssx.02E022089.

[15] Zeng J, Sanders AJ, Ye L, et al. EPLIN, a putative tumour suppressor in colorectal cancer, implications in drug resistance[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(23): 15232-15261. doi: 10.3390/ijms232315232.

[16] Tuli HS, Sak K, Adhikary S, et al. Galangin: a metabolite that suppresses anti-neoplastic activities through modulation of oncogenic targets[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2022, 247(4): 345-359. doi: 10.1177/15353702211062510.

[17] Zou Y, Li R, Kuang D, et al. Galangin inhibits cholangiocarcinoma cell growth and metastasis through downregulation of microRNA-21 expression[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020(1): 5846938-5846950. doi: 10.1155/2020/5846938.

[18] Aimjongjun S, Mahmud Z, Jiramongkol Y, et al. Lapatinib sensitivity in nasopharyngeal carcinoma is modulated by SIRT2-mediated FOXO3 deacetylation[J]. BMC Cancer, 2019, 19(1): 1106-1122. doi: 10.1186/s12885-019-6308-7.

[19] Li J, Chen P, Wu Q, et al. A novel combination treatment of anti-ADAM17 antibody and erlotinib to overcome acquired drug resistance in non-small cell lung cancer through the FOXO3a/FOXM1 axis[J]. Cell Mol Life Sci, 2022, 79(12): 614-627. doi: 10.1007/s00018-022-04647-x.

[20] Liu C, Zhao Y, Wang J, et al. FoxO3 reverses 5-fluorouracil resistance in human colorectal cancer cells by inhibiting the Nrf2/TR1 signaling pathway[J]. Cancer Lett, 2020, 470: 29-42. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.042.

[21] 王思毓,刘 珊,蒋永新. FOXM1在结直肠癌中的作用及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志,2020,27(5):571-576. doi:10.3872/j.issn.1007-385x.2020.05.016.

(编辑:龙小芬)