

本文引用:王华帅,谢彪,罗敏,何永恒.天马颗粒通过 FLI-1/Klotho 通路对结肠癌细胞 HCT116 增殖抑制的作用机制研究[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(10): 1656-1662.

天马颗粒通过 FLI-1/Klotho 通路对结肠癌细胞 HCT116 增殖抑制的作用机制研究

王华帅^{1,2}, 谢彪³, 罗敏³, 何永恒^{2*}

(1.湖南中医药大学,湖南长沙 410208;2.湖南省中医药研究院附属医院肛肠科,湖南长沙 410006;
3.湖南中医药大学第二附属医院肛肠科,湖南长沙 410005)

[摘要] **目的** 研究天马颗粒通过 FLI-1/Klotho 途径对结肠癌细胞(HCT116)增殖抑制的作用机制。**方法** 将 HCT116 细胞分为 blank 组、shRNA 组、shTMKL 组、TMKL 组。blank 组为空白对照,shRNA 组为 HCT116 细胞瞬时转染 FLI-1 shRNA,shTMKL 组为 shRNA 组基础上加入天马颗粒血清干预,TMKL 组为天马颗粒血清干预 HCT116 细胞。各组细胞培育 24 h 后,进行后续实验检测。qPCR 检测各组细胞 FLI-1 mRNA 和 Klotho mRNA 表达;Western blot 法检测各组细胞 FLI-1 蛋白和 Klotho 蛋白相对表达;流式细胞术检测各组细胞周期及凋亡,并计算 S 期细胞比值(S-phase fraction, SPF);CCK-8 法检测各组细胞增殖。**结果** 与 blank 组相比,shRNA 组、shTMKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达量降低($P<0.05$),TMKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达量升高($P<0.05$);与 shRNA 组相比,shTMKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达量差异无统计学意义($P>0.05$),TMKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达量升高($P<0.05$);与 shTMKL 组相比,TMKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达量升高($P<0.05$)。与 blank 组相比,shRNA 组 HCT116 细胞增殖能力增强($P<0.05$),SPF 值升高($P<0.05$)、凋亡率下降($P<0.05$),shTMKL 组、TMKL 组 HCT116 细胞增殖能力受到抑制($P<0.05$)、SPF 值降低($P<0.05$)、凋亡率升高($P<0.05$);与 shRNA 组相比,shTMKL 组、TMKL 组 HCT116 细胞增殖能力受到抑制($P<0.05$)、SPF 值降低($P<0.05$)、凋亡率升高($P<0.05$);与 shTMKL 组相比,TMKL 组 HCT116 细胞增殖能力受到抑制($P<0.05$)、SPF 值降低($P<0.05$)、凋亡率升高($P<0.05$)。**结论** 天马颗粒可通过 FLI-1 基因调控 Klotho 蛋白表达,进而抑制 HCT116 细胞增殖、诱导凋亡。

[关键词] 天马颗粒;FLI-1/Klotho 通路;结肠癌;细胞增殖;质粒转染;中药血清;机制研究

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.10.011

Mechanism of Tianma Granule inhibiting the proliferation of HCT116 (colon cancer cell) through FLI-1/Klotho pathway

WANG Huashuai^{1,2}, XIE Biao³, LUO Min³, HE Yongheng^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Department of Anorectal Surgery, The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China; 3. Department of Anorectal Surgery, The Second Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of Tianma Granule inhibiting the proliferation of HCT116 (colon cancer cell) through FLI-1/Klotho pathway. **Methods** HCT116 cells were randomly divided into blank group, shRNA group, shTMKL group and

[收稿日期] 2022-04-28

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81704089);湖南省自然科学基金重点项目(2021JJ30419);湖南省中医药管理局科研基金重点项目(2021017);湖南中医药大学中医学一流学科开放基金项目(2022ZYX06)。

[第一作者] 王华帅,男,博士研究生,研究方向:中医药防治肛肠疾病研究。

[通信作者] * 何永恒,男,教授,主任医师,E-mail:2320990685@qq.com。

TMKL group. Blank group served as the control group. In shRNA group, HCT116 cells were transiently transfected with FLI-1 shRNA. In shTMKL group, Tianma Granule serum was added on the basis of shRNA. And in TMKL group, Tianma Granule serum was added to intervene HCT116. The cells in each group were cultured for 24 hours. And then, the follow-up experiments were carried out. We detected the expression of FLI-1 mRNA and Klotho mRNA in each group by qPCR, the relative expression of FLI-1 protein and Klotho protein by Western blot, the cell cycle and apoptosis by flow cytometry, calculated the S-phase fraction (SPF) and tested the cell proliferation in each group by CCK8. **Results** Compared with blank group, the expression of FLI-1 protein, Klotho protein and mRNA in the shRNA group and shTMKL group decreased ($P<0.05$), while the expression of FLI-1 protein, Klotho protein and mRNA in TMKL group increased ($P<0.05$). Compared with shRNA group, there was no significant difference in the expression of FLI-1 protein, Klotho protein and mRNA in shTMKL group ($P>0.05$), but the expression of FLI-1 protein, Klotho protein and mRNA in TMKL group increased ($P<0.05$). Compared with shTMKL group, the expression of FLI-1 protein, Klotho protein and mRNA in TMKL group increased ($P<0.05$). Compared with the blank group, shRNA group showed increase in proliferation rate of HCT116 cells ($P<0.05$) and SPF value ($P<0.05$), but decrease in the apoptosis rate ($P<0.05$). The proliferation of HCT116 cells in shTMKL group and TMKL group was inhibited ($P<0.05$), with decrease in SPF value ($P<0.05$), and increase in apoptosis rate ($P<0.05$); compared with shRNA group, the proliferation of HCT116 cells in shTMKL group and TMKL group was inhibited ($P<0.05$), with decrease in the value of SPF ($P<0.05$), and increase in the apoptosis rate ($P<0.05$); compared with shTMKL group, the proliferation of HCT116 cells in TMKL group was inhibited ($P<0.05$), with decrease in the SPF value ($P<0.05$) and increase in the apoptosis rate ($P<0.05$). **Conclusion** Tianma Granule may regulate expression of Klotho protein through FLI-1 gene, and then inhibit proliferation and induce apoptosis of HCT116 cells.

[**Keywords**] Tianma Granule; FLI-1/Klotho pathway; colon cancer; proliferation; plasmid transfection; Chinese medicine serum; mechanism research

结直肠癌是消化系统最常见的恶性肿瘤,也是世界上第三大最常见的恶性肿瘤^[1]。据统计,2018年全球新发癌症病例总数为1810万例,癌症死亡人数为960万人,其中,结直肠癌占总病例的6.1%,占总癌症死亡人数的9.2%^[2]。我国《2019年全国癌症报告》指出,结直肠癌依然是我国主要的恶性肿瘤之一,仅次于肺癌和胃癌^[3]。国内外研究一致认为,结直肠癌会造成沉重的社会和经济负担^[4-5]。目前,认为其发病涉及肠道菌群、遗传、年龄和表观遗传等因素。现代临床常采用手术、放化疗等方法治疗结直肠癌,但术后患者面临着生存质量低、复发转移率高、药物抵抗等困扰,而中医药治疗结直肠癌具有抗复发转移、提高免疫力、减轻放化疗不良反应及延长生存周期等独特优势^[6-7]。

天马颗粒是由何永恒教授结合化痞膏、黄芪益损汤、内消瘰疬丸三方化裁而成,具有“拔癌毒,消结肿,通经络,止疼痛”功效,契合中医治疗结直肠癌中“攻、解、化、散、托”法的科学内涵。在临床使用中,天马颗粒能有效改善中晚期结直肠癌患者的全身状况和生存质量,延长患者术后5年生存期,抑制大肠癌术后局部复发^[8-11]。在方药组成、质量标准、用

药安全等方面不断研究、改进^[12-16],现天马颗粒已获得专利^[17]。

小鼠 Friend 病毒综合因子1(friend leukemia integration 1, FLI-1)在结肠癌细胞中表达低于正常肠上皮细胞,其过表达可正向调控 Klotho 蛋白表达,抑制结肠癌细胞增殖^[18]。本实验在前期研究基础上,以 HCT116 细胞为研究对象,基于 FLI-1/Klotho 通路,探究天马颗粒对结直肠癌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

人结直肠癌细胞株(HCT116)购买于武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:CL-0096;8周龄SD雄性大鼠10只,体质量(200±20)g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物质量合格证:43072720110-1275856,伦理编号:LLBH-202010130001。

1.2 血清制备

使用10只SD雄性大鼠制备天马颗粒血清。按照人-动物体表面积关系换算出大鼠每天中药等效剂量1.86g/kg,给予相应中药药液灌胃,2次/d,连续给药7d。第7天灌胃前禁食8h,2次灌胃间隔

1 h。采用腹主动脉采血法,离心、提取血清、过滤、灭活补体,保存在-20℃冰箱中备用。

1.3 主要试剂

天马颗粒购买于湖南省中医院,批准号:[湘]卫药剂 9706024,规格 10×10 g/包,用法:成人 1 包/次,2 次/d。将上述药物加水加热 30 min,使药物溶解,过滤;在残渣中继续加水加热 30 min,过滤,重复操作,使得药物充分溶解,合并滤液,混合浓缩制备成含药质量浓度为 0.09 g/mL 的药液,灭菌后置入 4℃冰箱保存。

FLI-1 抗体、Klotho 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号:A5644、A12028); β -actin 抗体(美国 proteintech 公司,批号:66009-1-Ig);mRNA 逆转录试剂盒、UltraSYBR Mixture、DM2000 Plus DNA Marker(中国北京康为世纪公司,批号: CW2569、CW2601、CW0632);DEPC(美国 Sigma 公司,批号: D5758-25ML);Tris 缓冲液(美国西格玛公司,批号: V900483);TRIzol(美国赛默飞公司,批号:15596026);BCA 蛋白定量试剂盒(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号: CW0014S);EcoRI 限制性内切酶、AgeI 限制性内切酶、T4 连接酶(美国 NEB 公司,批号: R3101S、R3552S、M0202S);Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒(南京诺维赞医疗科技有限公司,批号: A211、DC201、DC301)。

1.4 主要仪器

流式细胞仪(安捷伦科技公司,型号: Novocyte);摇床、旋涡混合器(中国江苏其林贝尔公司,型号: TS-1、GL-88B);台式冷冻离心机(中国湖南湘仪公司,型号: H1650R);荧光 PCR 板、荧光定量 RCP 仪(美国 Thermo 公司,型号: PIKOREAL96、SPL0960);电泳仪、水平琼脂糖电泳槽(中国北京六一公司,型号: DYY-2C、DYCP-31DN);全自动酶标洗板机、多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司,型号: PW-812、MB-530)。

1.5 细胞培养

HCT116 细胞株采用 McCoy's 5A+1%青-链霉素双抗培养基,37℃,5% CO₂ 条件下常规培养。

1.6 细胞转染与分组

转染前一天将生长至对数期的 HCT116 细胞传代至 6 孔板,每孔 3×10⁵ 个细胞。第 2 天使用 PEI 分别转染 FLI-1 shRNA 和空载 shRNA 质粒^[18],48 h 后加入 10 μ g/mL 的嘌呤霉素进行筛选。

在前期研究中,CCK-8 实验证明,20% 浓度天马颗粒血清干预 24 h 为 HCT116 细胞的最佳干预条件^[15];将 HCT116 细胞分为 blank 组、shRNA 组、shTMKL 组、TMKL 组。blank 组为空白对照,shRNA 组为 HCT116 细胞瞬时转染 FLI-1 shRNA,shTMKL 组为 shRNA 组基础上加入天马颗粒血清干预,TMKL 组为天马颗粒血清干预 HCT116 细胞。各组细胞培育 24 h 后,进行后续实验检测。所有实验检测均重复 3 次。

1.7 Western blot 法检测 FLI-1、Klotho 蛋白表达量

将处理过的细胞经胰酶消化后,离心、去上清液,煮沸、变形、电泳,转膜、PBS 洗涤,加入一抗 FLI-1 (1:1000)、Klotho (1:1000) 和内参 β -actin (1:5000) 孵育过夜,经 PBST 洗膜后加二抗孵育、洗膜,采用化学发光剂显影,使用 Image J 软件进行灰度分析。

1.8 qPCR 检测 FLI-1、Klotho mRNA 表达

提取细胞总 RNA,反转录合成 cDNA,再以得到的 cDNA 为模板,按照 qPCR 说明书进行反应,检测 FLI-1、Klotho mRNA 水平。运用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 方法进行数据分析。引物设计见表 1。

1.9 流式细胞术检测细胞周期、凋亡

收集处理后的细胞,用预冷 70%乙醇固定细胞 30 min,用 PBS 洗去乙醇后重新离心收集细胞,加入预冷 RNase 和 PI,避光孵育 30 min,筛网过滤后用流式细胞仪检测细胞周期变化。计算 S 期细胞比值(S-phase fraction, SPF)。SPF=S/(G0/G1+S+G2/M)×100%

收集处理过的细胞,用预冷 PSB 洗涤 2 次,

表 1 PCR 引物序列

基因名称	正向引物	反向引物	产物长度/bp
β -actin	-ACCCTGAAGTACCCATCGAG-	-AGCACAGCCTGGATAGCAAC-	224
FLI-1	-TCCCCAGGAAGTGGAATTGAG-	-TGGGAGGGGTTGATCTTGT-	156
Klotho	-GGGTGCGTCCATCTGGGATAC-	-ACGAGATGGAGAAGCGCTAGT-	203

1000 r/min、4 ℃,离心半径 17.8 cm,离心 5 min,弃上清液,加入 300 μL 的 1×Binding Buffer 悬浮细胞。加入 5 μL 的 Annexin V-FITC 和 10 μL 的 PI 染色液混匀后,避光,室温孵育 15 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.10 CCK-8 法检测细胞增殖

将 5×10^3 个/mL 细胞液以 100 μL/孔接种在 96 孔板中,培养 24 h 和 48 h 时每个孔中分别加入 10 μL CCK-8 溶液,轻轻敲击培养板混匀,培养箱中孵育 2 h。使用酶标仪测定 450 nm 处 A 值。细胞增殖率=[(对照孔 OD 值-实验孔 OD 值)/对照孔 OD 值]×100%。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,Graphpad Prism 6.0 绘图,计量资料采用 Kolmogorov-Smirnov 法检测数据正态性,符合正态分布的数据均采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,采用独立样本 *t* 检验,不符合正态分布的数据用中位数(四分位间距)描述,行 Mann-Whitney *U* 检验。

2 结果

2.1 天麻颗粒促进 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 相对表达

与 blank 组相比,shRNA 组、shTMKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达量降低($P < 0.05$),TMKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达量升高($P < 0.05$)。与 shRNA 组相比,shTMKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达量差异无统计学意义($P > 0.05$),TMKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达量升高($P < 0.05$)。与 shTMKL 组相比,TMKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达量升高($P < 0.05$)。详见表 2、图 1。

2.2 天麻颗粒抑制 HCT116 细胞增殖

与 blank 组相比,shRNA 组 HCT116 细胞增殖能力增强($P < 0.05$),shTMKL 组、TMKL 组 HCT116

表 2 各组 FLI-1、Klotho mRNA 相对表达量比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	FLI-1 mRNA	Klotho mRNA
blank 组	0.94±0.12	2.32±0.51
shRNA 组	0.68±0.05*	1.52±0.13*
shTMKL 组	0.48±0.02*	1.54±0.11*
TMKL 组	2.21±0.17* ^{##}	3.44±0.36* ^{##}
<i>F</i> 值	176.24	23.54
<i>P</i> 值	0.00	0.00

注:与 blank 组相比,* $P < 0.05$;与 shRNA 组相比,[#] $P < 0.05$;与 shTMKL 组相比,^{##} $P < 0.05$ 。

细胞增殖能力受到抑制($P < 0.05$);与 shRNA 组相比,shTMKL 组、TMKL 组 HCT116 细胞增殖能力受到抑制($P < 0.05$);与 shTMKL 组相比,TMKL 组 HCT116 细胞增殖能力受到抑制($P < 0.05$)。详见图 2A、图 2B。

与 blank 组相比,shRNA 组 SPF 值升高($P < 0.05$),shTMKL 组、TMKL 组 SPF 值降低($P < 0.05$);与 shRNA 组相比,shTMKL 组、TMKL 组 SPF 值降低($P < 0.05$);与 shTMKL 组相比,TMKL 组 SPF 值降低($P < 0.05$)。详见图 2C。

与 blank 组相比,shRNA 组总凋亡率降低($P < 0.05$),shTMKL 组、TMKL 组总凋亡率升高($P < 0.05$);与 shRNA 组相比,shTMKL 组、TMKL 组总凋亡率升高($P < 0.05$);与 shTMKL 组相比,TMKL 组总凋亡率升高($P < 0.05$)。详见表 3、图 2D。

表 3 各组 HCT116 细胞凋亡比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	总凋亡率/%
blank 组	6.16±0.31	0.22±0.06	6.38±0.30
shRNA 组	0.47±0.08	0.23±0.04	0.70±0.09*
shTMKL 组	9.97±0.51	1.68±0.20	11.65±0.69* [#]
TMKL 组	27.87±0.49	6.83±0.98	34.70±1.24* ^{##}
<i>F</i> 值	2 808.64	117.80	1 266.77
<i>P</i> 值	0.00	0.00	0.00

注:与 blank 组相比,* $P < 0.05$;与 shRNA 组相比,[#] $P < 0.05$;与 shTMKL 组相比,^{##} $P < 0.05$ 。

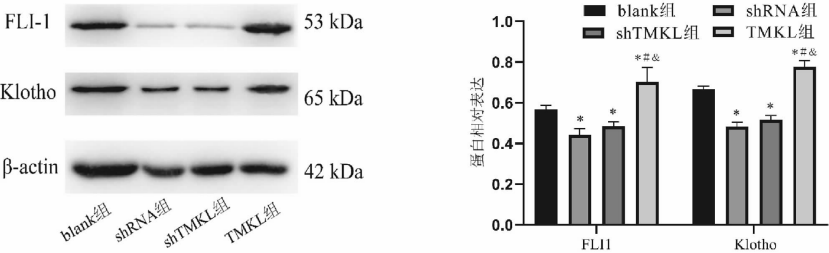


图 1 各组 FLI-1、Klotho 蛋白相对表达

注:与 blank 组相比,* $P < 0.05$;与 shRNA 组相比,[#] $P < 0.05$;与 shTMKL 组相比,^{##} $P < 0.05$ 。

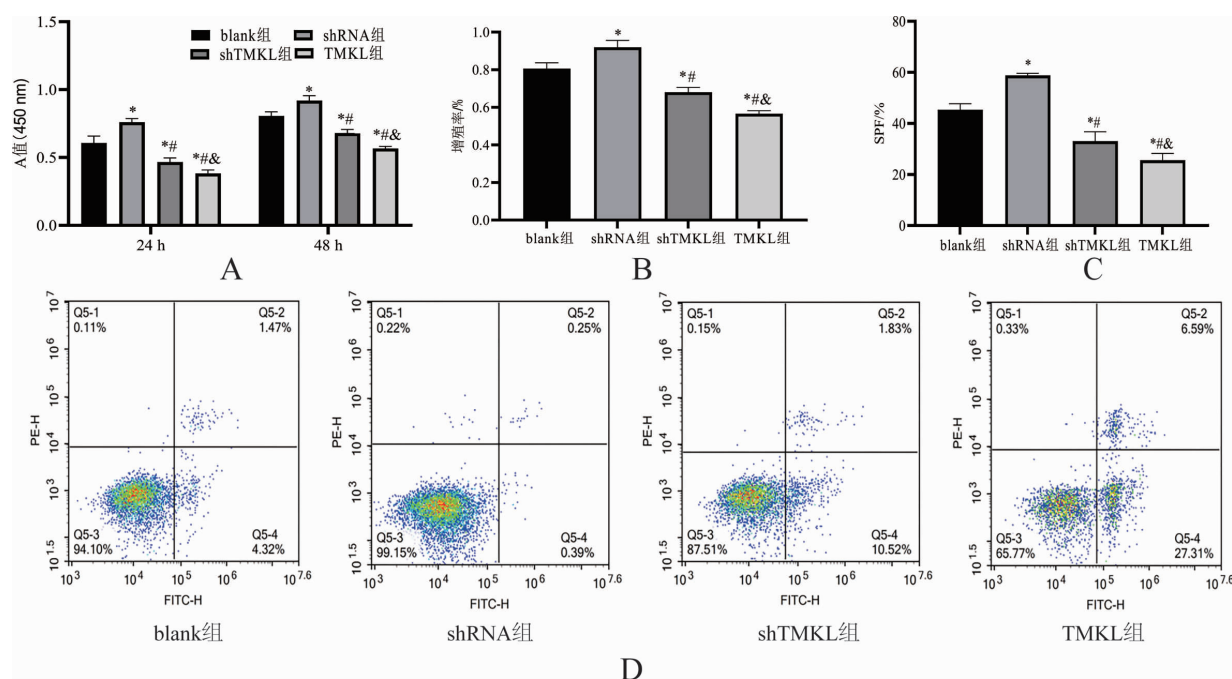


图2 各组 HCT116 细胞增殖、凋亡比较

注:A.各组细胞 CCK-8 OD 值;B.各组细胞增殖率;C.各组细胞 SPF 值;D.各组细胞凋亡图。与 blank 组相比,* $P<0.05$;与 shRNA 组相比,* $P<0.05$;与 shTMKL 组相比,* $P<0.05$ 。

3 讨论

天马颗粒由蜈蚣、全蝎、半边莲、黄柏、三棱、胆南星、海藻、黄芪、山药、熟大黄组成。其中君药全蝎、蜈蚣是现代中药抗肿瘤常用药物,广泛用于治疗结肠癌、肝癌、胃癌、肺癌、脑癌及胰腺癌等,全蝎、蜈蚣相须为用,有“不可离之性”。两药均入肝经,性善走窜,全蝎能穿筋透骨,蜈蚣可通达内外,两药互助,辛散辛开,相辅相成,寒温并用,以“毒”攻毒,达到解毒散结、通络止痛功效。臣药为半边莲、黄柏,二者配伍相须为用,加强清热解毒功效,助君药解癌毒、清瘀热。佐药三棱、胆南星、海藻、黄芪、山药,三棱破瘀行气、消积止痛;胆南星清热化痰、息风定惊;海藻能清热消痰、软坚散结;胆南星、海藻配伍加强祛风通络、化痰散结功效;黄芪、山药益气养阴、扶正培本、托毒外出。使药熟大黄可活血化瘀,使癌毒从下而出,扶正不留邪,配合黄芪攻补兼施。现代药理学研究表明,全蝎抗肿瘤成分为蝎毒,后者对抑制细胞增殖、促进细胞凋亡的作用机制涉及 Bcl-2 信号蛋白及 Caspase-9/Caspase-3、AKT、MAPK、NF- κ B 等信号通路^[19-23]。有研究^[24-25]发现,蝎毒处理过结肠癌 HCT-8 细胞后,细胞出现凋亡富集现象,可能是由于蝎毒增加 ROS、上调 p53、下调 Bcl-2 的表达导致。

此外,TAMADON^[26]发现蝎毒可以激活 Ca^{2+} 通道,进而调控 Wnt 信号通路,促使细胞凋亡。LI 等^[27]对全蝎提取物多肽 Gonerrestide 进行体内外研究,发现其能够通过调控 AKT 信号通路中的负调控因子 PIP3 和 PTEN 表达而抑制 HCT116 细胞的增殖。蜈蚣的抗肿瘤成分包括蜈蚣的醚提取物和醇提取物、生物碱以及分离纯化后的抗肿瘤蛋白。在对蜈蚣提取物抗肿瘤活性进行体外筛选时,发现对多种癌细胞增殖有抑制作用^[28],其中有 4 种组分对结肠癌细胞 KM-12 有抑制增殖的作用。蜈蚣提取液可促进 Bax、Bak(促凋亡基因)等基因的表达,从而经线粒体通路抑制癌细胞增殖^[29]。此外,利用正交实验设计验证了天马颗粒中的中药均有抑制结肠癌细胞增殖的作用,但各个中药的有效成分还未研究明确^[16]。

根据 CCK-8 实验,与 blank 组相比,TMLK 组 HCT116 细胞生长受到抑制;与 shRNA 组相比,shTMKL 组 HCT116 细胞生长受到抑制。可知天马颗粒含药血清可以有效抑制 HCT116 结肠癌细胞增殖,这与课题组前期研究结果一致^[15,30]。与 blank 组对比,shRNA 组 HCT116 细胞增殖能力增强;与 shTMKL 组对比,TMKL 组 HCT116 细胞增殖能力受到抑制。这表明 FLI-1 可以抑制 HCT116 细胞生长,是抑癌基因。与 blank 相比,shTMKL 组 HCT116 结肠癌

细胞增殖受到抑制,说明天马颗粒抑制 HCT116 细胞增殖,可通过 FLI-1 蛋白靶点,还可通过其他靶点抑制癌细胞增殖。G1 期又称合成前期,此期主要合成 RNA 和核糖体。S 期称 DNA 合成期,除了合成 DNA 外,同时还合成组蛋白。DNA 复制所需相关酶也在 S 期合成。SPF 值可反映出细胞的增殖能力,在流式细胞周期检测中,与 blank 组对比,TKL 组 SPF 值降低;与 shRNA 组对比,shTKL 组 SPF 值降低。说明天马颗粒可降低 HCT116 细胞增殖能力。同 blank 组对比,shRNA 组 SPF 值降低;同 shTKL 对比,TKL 组 SPF 值降低。说明 FLI-1 表达可影响细胞周期、抑制细胞增殖。这个结论同 MIAO 等^[31]研究结论一致。同 blank 组相比,shTKL 组 SPF 降低,说明天马颗粒抑制 HCT116 细胞周期的调控,可通过 FLI-1 蛋白靶点,还可通过其他靶点来调控。在双染法检测细胞凋亡时,同 blank 组对比,TKL 组总凋亡率升高;同 shRNA 组对比,shTKL 组总凋亡率升高。说明天马颗粒可以诱导 HCT116 细胞凋亡。同 blank 组对比,shRNA 组总凋亡率降低;同 shTKL 对比,TKL 组总凋亡率升高,可知 FLI-1 蛋白表达促进 HCT116 细胞凋亡。而同 blank 组对比,shTKL 组总凋亡率升高,说明天马颗粒诱导 HCT116 细胞凋亡,可通过 FLI-1 蛋白靶点,还可通过其他靶点来调控。由此可推测,天马颗粒可抑制 HCT116 细胞增殖、诱导凋亡,FLI-1 蛋白具有抑制 HCT116 细胞增殖、诱导凋亡的作用。

FLI-1 属于 E26 转录因子(E26 transformation-specific, ETS)转录因子家族中的一员,随着研究的深入,陆续发现 FLI-1 在尤文肉瘤、小细胞肺癌、乳腺癌、肝细胞癌等中是促癌基因^[32-34]。而 SCHEIBER 等^[35]研究的结果却提示,FLI-1 在乳腺癌中是抑癌基因。前期研究^[18]发现,FLI-1 基因在结肠癌中属抑癌基因,可正向调控 Klotho 蛋白表达,抑制 IGF-1R 和 Wnt3a/ β -catenin 信号通路,进而抑制结肠癌细胞增殖。本研究 qPCR 及 Western blot 实验结果表明,同 blank 组相比,TKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达升高,可认为天马颗粒能促进 HCT116 细胞中 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达;而同 shTKL 组相比,TKL 组 FLI-1、Klotho 蛋白及 mRNA 表达并无差异。结合前期研究^[18]“FLI-1 蛋白可

以正向调控 Klotho 蛋白表达”,可知天马颗粒可以通过 FLI-1 基因调控 Klotho 基因表达。另外,前期研究^[18]发现,FLI-1 启动子存在甲基化,去甲基化后 FLI-1 蛋白表达增加,因此,推测天马颗粒对 FLI-1 基因表达的调控机制可能与启动子甲基化有关。

综上所述,天马颗粒可通过促进 FLI-1 基因表达,进而上调 Klotho 蛋白表达,抑制 HCT116 细胞增殖、诱导凋亡。

参考文献

- [1] LIU S C, PENG X Y, WU X, et al. Construction of a new immune-related lncRNA model and prediction of treatment and survival prognosis of human colon cancer[J]. World Journal of Surgical Oncology, 2022, 20(1): 71.
- [2] BRAY F, FERLAY J, SOERJOMATARAM I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] 郑荣寿,孙可欣,张思维,等.2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志,2019,41(1):19-28.
- [4] PARO A, HYER J M, SHAIKH C F, et al. Financial impact of out-of-pocket costs among patients undergoing resection for colorectal carcinoma[J]. Annals of Surgical Oncology, 2022, 29(9): 5387-5397.
- [5] 贾世欢,董朝晖,孙利华,等.中国结肠癌患者疾病经济负担研究[J]. 现代商贸工业,2019,40(16):82-83.
- [6] 宋琳,张利,蒋益兰.健脾消癌方对缺氧微环境诱导的结肠癌细胞生物学行为影响及抑癌机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2021,41(2):211-217.
- [7] 张涛,丁宁,罗宏标,等.何永恒教授从“毒、虚”辨治结直肠癌经验[J]. 湖南中医药大学学报,2022,42(6):1023-1028.
- [8] 黄晨容,郭颂铭,何永恒.天马颗粒剂对延长大肠癌根治术后生存期的临床研究[J]. 同济大学学报(医学版),2004,25(1):58-60.
- [9] 黄国栋,李家邦,何永恒,等.天马颗粒剂治疗不能行根治术中晚期大肠癌患者临床研究[J]. 中国中医急症,2006,15(12):1346-1347.
- [10] 黄国栋,黄媛华,黄敏,等.天马颗粒剂配合希罗达治疗中晚期大肠癌的临床研究[J]. 中药材,2009,32(5):831-832.
- [11] 彭天书,谢彪,聂甜,等.天马颗粒剂在抑制结直肠癌术后肿瘤复发中的临床效果[J]. 中药药理与临床,2016,32(3):191-193.
- [12] 钟英才. 天马颗粒剂的毒理学实验研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2005.
- [13] 管燕,周平兰. 天马颗粒的质量标准研究[J]. 中医药导报,2006,12(5):76-77,81.
- [14] 彭天书. 天马颗粒剂的拆方研究[D]. 长沙:湖南中医药大学,2015.
- [15] 邓松华. 天马颗粒剂的拆方研究及其精减方对大肠癌 PI3K/Akt/

- mTOR 信号通路的作用[D].长沙:湖南中医药大学,2017.
- [16] 邓松华,谢 彪,彭天书,等.应用正交设计优化天马颗粒剂配方的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2018,38(3):266-269.
- [17] 何永恒,邓松华.一种治疗大肠癌的中药组合物及其制备方法:CN108324880B[P].2021-09-21.
- [18] XIE B, HU F, LI M, et al. FLI-1 mediates tumor suppressor function via Klotho signaling in regulating CRC[J]. *Cell Biology International*, 2020, 44(7): 1514-1522.
- [19] 范红波,黄欣媛.蝎毒多肽的抗肿瘤作用机制[J].湖北工程学院学报,2021,41(6):42-46.
- [20] 蔡雨晴.东亚钳蝎氯毒素抑制胶质瘤细胞增殖的机制研究[D].太原:山西大学,2019.
- [21] 宋 莹,王 振,乌凯迪,等.毒药全蝎药理作用研究[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(12):216-220.
- [22] 张豪健.蝎毒多肽对非小细胞肺癌活化通路 Circ_0016760/HIF-1 α 的影响[D].长沙:湖南中医药大学,2021.
- [23] 李艳灵,赵婷婷,魏艳平,等.蝎毒肽作为 Kv1.3 离子通道阻滞剂研究进展[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(12):4632-4640.
- [24] AL-RABIA M W, ALHAKAMY N A, RIZG W Y, et al. Boosting curcumin activity against human prostatic cancer PC3 cells by utilizing scorpion venom conjugated phytosomes as promising functionalized nanovesicles[J]. *Drug Delivery*, 2022, 29(1): 807-820.
- [25] AL-ASMARI A K, RIYASDEEN A, ISLAM M. Scorpion venom causes upregulation of p53 and downregulation of bcl-xL and BID protein expression by modulating signaling proteins Erk1/2 and STAT3, and DNA damage in breast and colorectal cancer cell lines[J]. *Integrative Cancer Therapies*, 2018, 17(2): 271-281.
- [26] TAMADON H, GHASEMI Z, GHASEMI F, et al. Characterization of functional effects of two new active fractions isolated from scorpion venom on neuronal Ca²⁺ spikes: A possible action on Ca²⁺-dependent dependent K⁺ channels[J]. *Basic and Clinical Neuroscience*, 2019, 10(1): 49-58.
- [27] LI B, LYU P, XI X, et al. Triggering of cancer cell cycle arrest by a novel scorpion venom-derived peptide-Gonearrestide[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2018, 22(9): 4460-4473.
- [28] 吴 越,李贤煜,杨洪军.动物类中药抗癌机制研究[J].中国中医基础医学杂志,2021,27(4):671-677.
- [29] 周恩根.蜈蚣提取液治疗乳腺癌的实验研究[D].长沙:中南大学,2011.
- [30] 周晓丽,高宗跃.天马颗粒剂抑制人结肠癌细胞株 SW480 增殖机制研究[J].中医学报,2018,33(4):511-516.
- [31] MIAO B P, BAUER A S, HUFNAGEL K, et al. The transcription factor FLI1 promotes cancer progression by affecting cell cycle regulation[J]. *International Journal of Cancer*, 2020, 147(1): 189-201.
- [32] PATRA S, TRIVEDI P. Primary Ewing sarcoma of the kidney: A series of four cases[J]. *The Malaysian Journal of Pathology*, 2022, 44(1): 93-99.
- [33] HAWKINS A G, PEDERSEN E A, TREICHEL S, et al. Wnt/ β -catenin-activated Ewing sarcoma cells promote the angiogenic switch[J]. *JCI Insight*, 2020, 5(13): e135188.
- [34] LI L L, YU J, CHENG S, et al. Transcription factor Fli-1 as a new target for antitumor drug development[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 209: 1155-1168.
- [35] SCHEIBER M N, WATSON P M, RUMBOLDT T, et al. FLI1 expression is correlated with breast cancer cellular growth, migration, and invasion and altered gene expression[J]. *Neoplasia*, 2014, 16(10): 801-813.

(本文编辑 周 旦)