

# rBTI联合奥沙利铂促进结肠癌细胞凋亡

王苗苗<sup>#</sup> 朱建芸<sup>#</sup> 李玉英<sup>\*</sup>

(山西大学生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 生物工程山西省重点实验室, 太原 030006)

**摘要** 该文探讨了重组荞麦胰蛋白酶抑制剂(rBTI)联合奥沙利铂对结肠癌细胞HCT116和DLD-1凋亡的影响。首先通过细胞增殖实验筛选rBTI和奥沙利铂对结肠癌细胞的有效作用浓度, 选取奥沙利铂存活率大于80%的浓度作为联合用药的浓度; 然后采用MTT、形态学观察、克隆形成、流式细胞术、Western blot以及qRT-PCR检测了细胞增殖、形态变化、克隆形成、凋亡情况以及Bcl-2、Bax、Cleaved Caspase-3的蛋白质及mRNA的表达情况; 进一步通过活性氧检测、分子对接以及Western blot分析了联合用药后MAPK信号通路的变化情况。结果显示, rBTI和奥沙利铂均可以抑制结肠癌细胞增殖且具有剂量依赖性; 药物联合作用于结肠癌细胞后, 以协同作用的方式显著抑制结肠癌细胞的增殖; 与单独用药组相比, 联合用药组细胞数量明显减少, 收缩变圆, 体积减小; 细胞克隆形成减少, 细胞凋亡数量增加; Cleaved Caspase-3、Bax的蛋白和mRNA表达量上升, Bcl-2表达量下降; 活性氧含量上升; rBTI和奥沙利铂均可以与MAPK信号通路关键蛋白紧密结合, 并能改变关键蛋白的表达。总之, rBTI联合奥沙利铂可以促进结肠癌HCT116和DLD-1细胞凋亡。

**关键词** rBTI; 奥沙利铂; 联合用药; 结肠癌; 凋亡

## rBTI Combined with Oxaliplatin Promotes Apoptosis in Colon Cancer Cells

WANG Miaomiao<sup>#</sup>, ZHU Jianyun<sup>#</sup>, LI Yuying<sup>\*</sup>

(Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Education Ministry, Shanxi Key Laboratory of Biotechnology, Institute of Biotechnology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

**Abstract** In this paper, the effects of rBTI (recombinant buckwheat trypsin inhibitor) combined with Oxaliplatin on apoptosis of colon cancer cells HCT116 and DLD-1 were investigated. Firstly, the effective concentration of rBTI and Oxaliplatin on colon cancer cells were screened by cell proliferation assay, and the concentration with a survival rate of more than 80% was selected as the concentration of the combined drug. MTT, morphological observation, clonogenesis, flow cytometry, Western blot and qRT-PCR were used to detect cell proliferation, morphology, clonogenesis, apoptosis, Bcl-2, Bax, Cleaved Caspase-3 protein and mRNA expression. Furthermore, the changes of MAPK signaling pathway were analyzed by reactive oxygen species detection, molecular docking and Western blot. The results showed that both rBTI and Oxaliplatin could inhibit the proliferation of colon cancer cells in a dose-dependent manner. The proliferation of colon cancer cells was significantly inhibited by the synergistic action of the drugs. Compared with the single treatment group, the number of cells in the combined treatment group decreased, the contraction became round and the volume decreased. The cell clonal formation decreased and the

收稿日期: 2024-04-01 接受日期: 2024-06-20

山西省回国留学人员科研资助项目(批准号: 2021-017)和山西省中医药管理局科研课题计划(批准号: 2024ZYB053)资助的课题

<sup>#</sup>共同第一作者

<sup>\*</sup>通信作者。Tel: 0351-7011499, E-mail: lyy9030@sxu.edu.cn

Received: April 1, 2024 Accepted: June 20, 2024

This work was supported by the Shanxi Scholarship Council of China (Grant No.2021-017), and the Scientific Research Project in Traditional Chinese Medicine of Shanxi Province (Grant No.2024ZYB053)

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-351-7011499, E-mail: lyy9030@sxu.edu.cn

number of apoptosis increased. Cleaved Caspase-3 and Bax protein and mRNA expressions increased, and Bcl-2 expression decreased. The expression of reactive oxygen species increased; both rBTI and Oxaliplatin could bind closely to the key proteins of MAPK signaling pathway, and could change the expression of key proteins. In conclusion, rBTI combined with Oxaliplatin could promote apoptosis of colon cancer HCT116 and DLD-1 cells.

**Keywords** rBTI; Oxaliplatin; combination medications; colon cancer; apoptosis

中国癌症中心2024年发布的报告指出:结肠癌的发病率和死亡率在不同群体中呈现增加的趋势(<http://www.chinancpcn.org.cn/>)。结肠癌的死亡率在所有癌症中居于第二位<sup>[1]</sup>。化疗是结肠癌治疗的常用方式。奥沙利铂(Oxaliplatin, L-OHP)是结直肠癌肿瘤的一线化疗药物,它是一种非特异性药物,可以促进癌细胞凋亡<sup>[2]</sup>。尽管奥沙利铂对结肠癌的治疗有一定效果,能够对肿瘤细胞起到一定的杀伤作用。但铂类药物缺乏选择性且具有较高的全身毒性<sup>[3]</sup>,导致化疗效果不理想,需要增加用量或使用次数来提高疗效。临床上此类药物通常需要与氟尿嘧啶类化合物联合使用,但联合应用在取得较好疗效的同时,还会增加患者的不良反应。因此寻找新的安全性高的药物治疗方法,最大限度地减少副作用,提高结直肠癌患者的生存率十分必要。而化疗药物与植物来源的抗肿瘤活性肽联合使用为肿瘤治疗和克服耐药性提供了新的治疗方法<sup>[4]</sup>。

荞麦(*Fagopyrum esculentum*)是一种不含麸质的假谷物,富含丰富的营养成分,已被证明具有广泛的生物活性,可以降低胆固醇、抗癌、抗炎、抗糖尿病和改善高血压等<sup>[5]</sup>。荞麦中的胰蛋白酶抑制剂具有抑制肿瘤细胞增殖的功能<sup>[6]</sup>。但由于天然提取的荞麦胰蛋白酶抑制剂含量较低,严重限制其应用,因此课题组前期通过基因克隆方法,在基因工程菌中高效表达获得了一种高纯度的重组荞麦胰蛋白酶抑制剂(recombinant buckwheat trypsin inhibitor, rBTI)。前期研究表明, rBTI可以显著抑制HepG2、EC9706等肿瘤细胞的增殖,并促进细胞凋亡,且对正常细胞影响很小<sup>[7-8]</sup>。由于结肠癌患者对奥沙利铂产生化疗耐药,为了减缓结肠癌细胞对奥沙利铂的耐药性进程并减小奥沙利铂的副作用,提高奥沙利铂治疗效果,本文将rBTI与奥沙利铂联合作用于结肠癌细胞,并对其作用机制进行探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞 人结肠癌细胞HCT116、DLD-1保存

自本实验室-80℃低温冰箱。

1.1.2 主要试剂 RPMI-1640培养基购自Gibco公司;优质胎牛血清购自浙江四季青生物有限公司;青/链霉素混合液购自北京索莱宝科技有限公司;奥沙利铂购自上海阿拉丁试剂有限公司;结晶紫购自上海生工生物工程有限公司;cDNA反转录试剂盒购自ThermoFisher Scientific公司;SYBR PCR Master Mix购自TaKaRa公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒、GAPDH鼠抗人抗体、Cleaved Caspase-3鼠抗人抗体、P38兔抗人抗体、山羊抗兔IgG二抗均购自Bioss公司;JNK鼠抗人抗体和ERK鼠抗人抗体购自Proteintech公司;Bcl-2兔抗人多克隆抗体和Bax兔抗人抗体购自上海碧云天生物技术有限公司。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将冻存的HCT116和DLD-1细胞于37℃快速解冻,1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入完全培养基重悬(含10%胎牛血清和1%青/链霉素双抗混合液),并将细胞悬液转移至培养瓶,加5~6 mL完全培养基,在37℃、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中继续培养。待细胞生长率达到90%以上用0.25%胰蛋白酶(含EDTA)于37℃消化1~2 min,进行细胞传代。

1.2.2 MTT实验检测细胞增殖 当HCT116、DLD-1细胞生长到对数期时,进行细胞传代,将细胞以每孔 $4 \times 10^3$ 个的密度接种到96孔板中,于37℃、5%的CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h,添加不同浓度药物,每个浓度设5个复孔。继续在CO<sub>2</sub>培养箱中培养48 h,每孔加20 μL MTT溶液。继续培养3~4 h后弃去上清液,每孔加入150 μL DMSO,摇床上缓慢振动96孔板,使孔中的紫色晶体得到充分溶解。于酶标仪检测波长为490 nm处的吸光度D值。细胞活力表示为: $D = (D_{\text{加药组}} / D_{\text{对照组}}) \times 100\%$ ,联合指数 $CI = D_{\text{L-OHP+rBTI}} / (D_{\text{L-OHP}} \times D_{\text{rBTI}})$ 。

1.2.3 形态学观察 当结肠癌HCT116和DLD-1细胞生长到对数期时,进行细胞传代和计数。将每孔的细胞数量控制在 $1 \times 10^6$ 个,接种到6孔板中,培养24 h待细胞贴壁后,设置给药组,加药处理48 h后,于倒置荧光显微镜下观察加药处理后细胞形态变化,

并拍照保存。

**1.2.4 克隆形成实验** 当HCT116和DLD-1细胞生长到对数期时,进行细胞传代,将细胞以每孔2 000个的密度接种到6孔板中,培养24 h贴壁后,设置给药组,每隔2~3天给细胞换液、加药处理一次,直到肉眼可以观察到细胞群落,即可停止培养。弃上清,PBS清洗2次,加1 mL甲醇室温固定细胞15 min后吸去甲醇溶液,静置5~10 min,每孔加入1 mL的结晶紫染液,室温染色20 min后吸去结晶紫染液,用PBS清洗,吸去液体,放置在空气中使其干燥后拍照保存。

**1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡** 当HCT116和DLD-1细胞生长到对数期时,进行细胞传代,将细胞以每孔 $1 \times 10^6$ 个的密度接种到6孔板中,培养24 h待细胞贴壁后,设置给药组,加药培养细胞48 h后收集培养基,1 000 r/min室温离心5 min、弃上清,PBS清洗孔内细胞,加入胰酶消化细胞1 min,终止消化后1 000 r/min室温离心5 min,弃上清,加入细胞凋亡检测试剂盒中的Annexin V-FITC/PI染料,室温避光放置15 min,过38  $\mu$ m的细胞筛网,上机检测。

**1.2.6 qRT-PCR检测凋亡相关基因表达** 将细胞在培养皿里培养到对数生长期,按照加药浓度加入药物处理组,继续在培养箱中培养48 h,收集细胞至离心管中1 000 r/min室温离心5 min,弃上清,加入1 mL预冷的PBS重悬细胞,4  $^{\circ}$ C、1 000 r/min离心5 min,弃上清,加1 mL的Trizol吹打细胞为细胞悬液,冰浴5 min,将其转移到无RNA酶的离心管中,加入200  $\mu$ L氯仿,振荡混匀,静置1~2 min。4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心15 min。取上层清液至新的离心管,加入等体积异丙醇,颠倒混匀,静置10 min。4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心10 min。弃上清,加入1 mL 75%乙醇,4  $^{\circ}$ C、7 500 r/min离心5 min,弃上清,重复1次。加入20~30  $\mu$ L DEPC水,56  $^{\circ}$ C助溶,测量所提RNA在260 nm和280 nm的 $D$ 值。根据cDNA反转录试剂盒将RNA反转录成cDNA。根据SYBR PCR Master Mix试剂盒说明书进行qRT-PCR。

**1.2.7 Western blot检测相关蛋白表达情况** 待培养瓶中的细胞长满后进行细胞传代,将细胞培养在培养皿中,待细胞在皿底铺满后,吸出原有培养基,按照加药浓度加入药物处理组,培养箱中培养48 h,收集细胞至4 mL离心管中,1 000 r/min室温离心5 min,弃上清,用预冷的PBS重悬细胞,4  $^{\circ}$ C、1 000 r/min离心5 min,弃上清,加适量细胞裂解液,冰浴30 min,高

速冷冻离心机4  $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心15 min,收集上清液并通过BCA蛋白质定量检测试剂盒说明书计算蛋白浓度,再加上样缓冲液至EP管,沸水煮5 min。4  $^{\circ}$ C、8 000 r/min离心3 min。以每孔30  $\mu$ g蛋白上样进行SDS-PAGE电泳,电泳完成后,湿转法电转1~2 h将蛋白转至PVDF膜上。将PVDF膜浸泡于含5%的脱脂奶粉中室温封闭1.5 h,按照对应抗体说明书效价稀释一抗后4  $^{\circ}$ C孵育过夜。TBST清洗3次,每次10 min。二抗以1:10 000稀释后室温孵育2 h, TBST清洗3次,每次10 min。膜浸泡在化学发光液中(A液:B液=1:1),显色2~3 min后通过蛋白凝胶成像系统进行显影拍照。

**1.2.8 ROS检测细胞活性氧水平** 选取对数期的HCT116和DLD-1细胞进行消化,1 min后终止消化,1 000 r/min室温离心5 min,在96孔板内进行铺板,放在CO<sub>2</sub>培养箱培养24 h,至细胞在孔底铺满,按照计算好的不同浓度组,将药物和培养基加到96孔板中,放到CO<sub>2</sub>培养箱培养48 h。将孔内旧的培养液吸掉,每孔加入100  $\mu$ L稀释后的DCFH-DA溶液,继续放进CO<sub>2</sub>培养箱内培养20 min。通过酶标仪检测吸光度值,设置激发波长和发射波长分别为488 nm和525 nm,每20 min检测一次吸光度值。

**1.2.9 分子对接** 从PDB数据库官网查找并下载P38、JNK、ERK和rBTI蛋白的晶体结构;从ZINC数据库下载奥沙利铂小分子结构;利用PyMol对蛋白结构进行去水、去配体、加电荷、加氢,处理好的大分子和小分子保存为PDBQT格式;通过Autodock软件将奥沙利铂与P38、JNK、ERK分别进行分子对接;登录COCOMapstool网站将rBTI与P38、JNK、ERK进行对接,再将对接后的结果进行比较,从中找出结合能较高、匹配度较高的最佳对接分子。

**1.2.10 数据分析** 所有实验均重复进行3次以上,SPSS 27.0.1软件分析显著性,Origin软件作图,使用公式计算平均值和误差。 $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ 表示为具有显著性差异。

## 2 结果

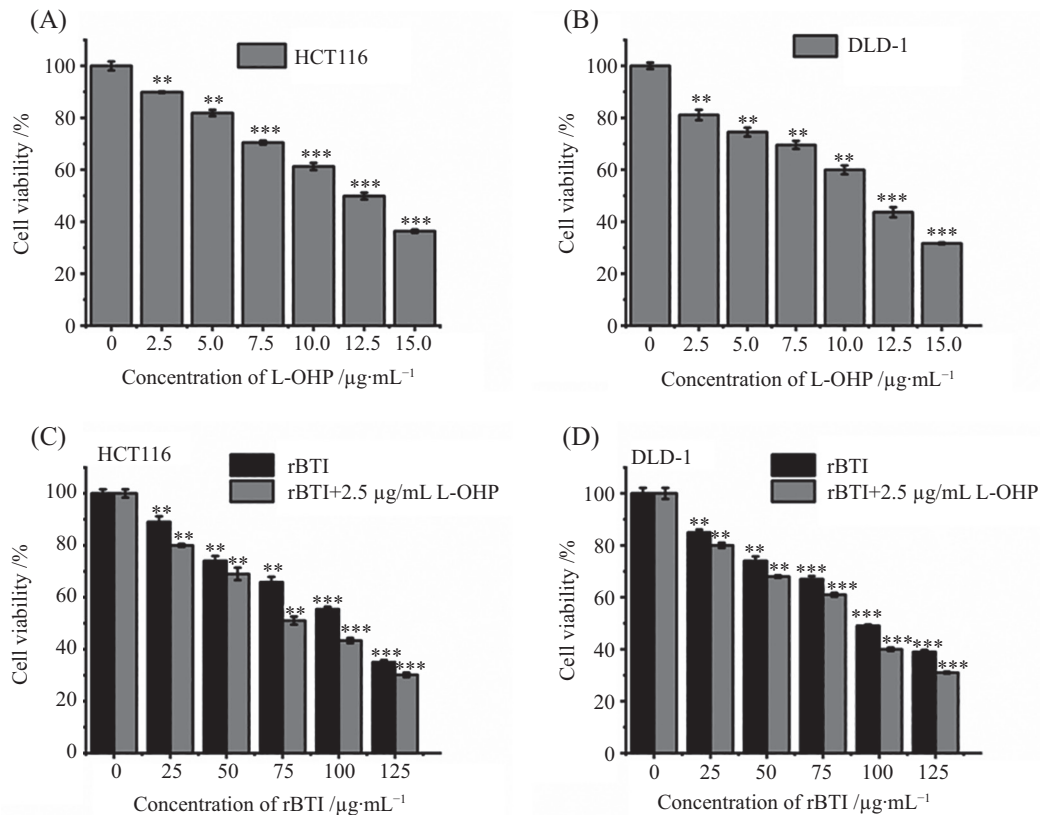
### 2.1 rBTI联合奥沙利铂抑制结肠癌细胞增殖

不同浓度梯度的奥沙利铂作用于结肠癌细胞HCT116和DLD-1的结果如图1A和1B所示,细胞存活率随着奥沙利铂浓度增大而逐渐下降,其IC<sub>50</sub>值分

别为12.71  $\mu\text{g/mL}$ 和12.11  $\mu\text{g/mL}$ 。根据MTT结果, 筛选奥沙利铂对细胞存活率高于80%的浓度, 即2.5  $\mu\text{g/mL}$ 作为之后联合用药的浓度, 此时奥沙利铂对细胞无明显毒性作用。

不同浓度的rBTI单独作用以及用不同浓度的rBTI与2.5  $\mu\text{g/mL}$ 的奥沙利铂联合作用于结肠癌细胞HCT116和DLD-1的结果如图1C、1D所示。与

对照组相比, 随着rBTI浓度增大, 细胞的存活率逐渐下降, 且具有浓度依赖性。联合用药组与奥沙利铂单独用药组相比, 其抑制细胞增殖的作用更强。rBTI单独作用HCT116和DLD-1细胞的 $\text{IC}_{50}$ 值分别为119.40  $\mu\text{g/mL}$ 、109.65  $\mu\text{g/mL}$ , 与奥沙利铂联合作用后, 其 $\text{IC}_{50}$ 值分别为82.79  $\mu\text{g/mL}$ 、93.33  $\mu\text{g/mL}$ 。rBTI与奥沙利铂的联合指数(表1)均小于1。选取rBTI浓



A、B: 不同浓度的奥沙利铂处理48 h对HCT116和DLD-1细胞增殖的影响; C、D: 奥沙利铂联合rBTI和rBTI单独作用于HCT116和DLD-1细胞48 h对细胞增殖的影响。\*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与对照组比较。

A,B: effects of different concentrations of Oxaliplatin on the proliferation of HCT116 and DLD-1 cells at 48 h; C,D: effect of Oxaliplatin combined with rBTI and rBTI alone on cell proliferation in HCT116 and DLD-1 cells for 48 h. \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with the control group.

图1 rBTI联合奥沙利铂对结肠癌细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of rBTI combined with Oxaliplatin on proliferation in colon cancer cells

表1 rBTI和L-OHP的联合指数(CI)随浓度的变化分析

Table 1 Analysis of the CI (combination index) of rBTI and L-OHP as a function of concentration

| 细胞系<br>Cell lines | 浓度<br>Concentration           |                              | 细胞活力<br>Cell viability |      |            | CI   |
|-------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------|------|------------|------|
|                   | L-OHP / $\mu\text{g/mL}^{-1}$ | rBTI / $\mu\text{g/mL}^{-1}$ | L-OHP                  | rBTI | L-OHP+rBTI |      |
| HCT-116           | 2.5                           | 50                           | 1.11                   | 0.93 | 0.76       | 0.74 |
|                   | 2.5                           | 100                          | 1.11                   | 0.69 | 0.54       | 0.71 |
| DLD-1             | 2.5                           | 50                           | 1.58                   | 1.35 | 1.29       | 0.60 |
|                   | 2.5                           | 100                          | 1.58                   | 0.87 | 0.62       | 0.45 |

CI<1, =1, >1分别表示协同、加和以及拮抗的作用。

CI<1, =1, and >1 represent synergistic, additive, and antagonistic effects, respectively.

度为50  $\mu\text{g/mL}$ 、100  $\mu\text{g/mL}$ 分别和2.5  $\mu\text{g/mL}$ 奥沙利铂(细胞存活率在80%左右)联合作用于HCT116和DLD-1细胞,用于后续实验。

## 2.2 rBTI联合奥沙利铂改变结肠癌细胞形态

rBTI与奥沙利铂联合作用于结肠癌细胞HCT116和DLD-1后,观察其形态变化(图2)。与对照组相比,奥沙利铂单独用药组中两株细胞均表现出肿瘤细胞凋亡的形态学特征,包括:数量减少,细胞收缩变圆,体积变小,细胞碎片增多。联合用药组与奥沙利铂单独用药组相比,联合用药可以进一步加强细胞凋亡特征,且随着rBTI浓度增加,凋亡形态学特征变化更明显。

## 2.3 rBTI联合奥沙利铂抑制结肠癌细胞克隆形成

如图3所示:奥沙利铂单独用药组与对照组相比,细胞的克隆形成率显著降低。联合用药组与奥沙利铂单独用药组相比,细胞克隆形成率进一步降低,且呈现浓度依赖性。

## 2.4 rBTI联合奥沙利铂诱导细胞凋亡

通过流式细胞仪检测结肠癌细胞凋亡情况。结果(图4A~4D)表明,与对照组相比,奥沙利铂单独用药可以显著促进结肠癌细胞凋亡。联合用药后,随

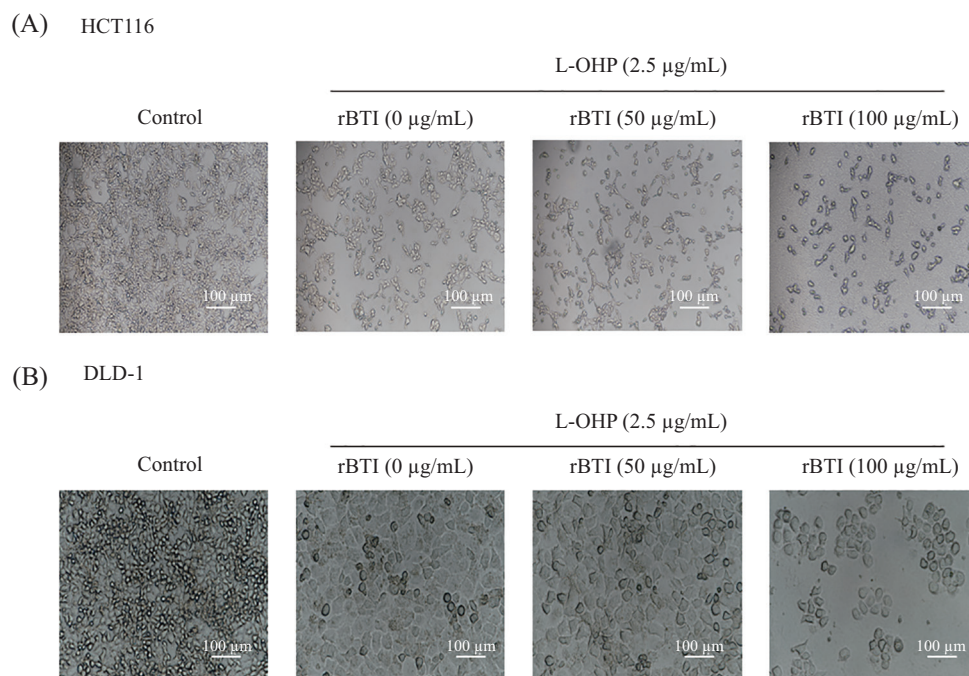
着rBTI浓度增加,凋亡细胞的数量升高。通过 Western blot检测凋亡相关蛋白表达情况(图4E~图4H),结果显示:单独用药组Bcl-2蛋白表达水平显著下调,Cleaved Caspase-3、Bax表达水平上升。联合用药组与单独用药组相比,随着rBTI的浓度增加,Bcl-2蛋白表达水平进一步降低,Cleaved Caspase-3、Bax蛋白表达水平进一步升高。通过qRT-PCR实验(图4I、图4J)检测得到了与Western blot一致的实验结果,Bcl-2的mRNA表达水平显著下降,Cleaved Caspase-3和Bax的mRNA表达水平显著上升。

## 2.5 rBTI联合奥沙利铂提高结肠癌细胞活性氧水平

通过酶标仪检测结肠癌细胞内活性氧水平(图5)。结果表明,与对照组相比,奥沙利铂单独处理后,结肠癌细胞内的活性氧水平显著上升,联合用药组和单独用药组相比,细胞内活性氧显著增多,且呈现rBTI的浓度依赖性。

## 2.6 rBTI、奥沙利铂与P38、JNK、ERK 蛋白分子对接

对接结果如图6所示,rBTI与P38形成三个氢键,结合位点0.4 nm以内的氨基酸残基包括LYS-

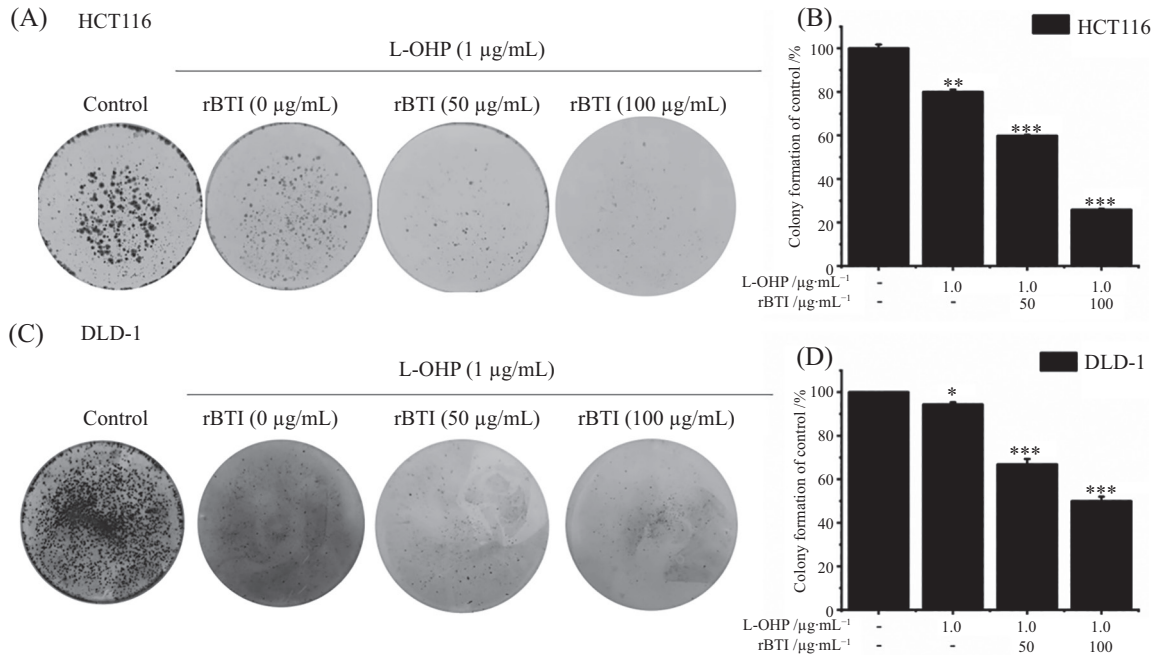


A、B: 不同浓度的rBTI(0、50、100  $\mu\text{g/mL}$ )与奥沙利铂(2.5  $\mu\text{g/mL}$ )联合处理HCT116和DLD-1细胞48 h对细胞形态的影响。

A, B: effect of different concentrations of rBTI (0, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) combined with Oxaliplatin (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) on cell morphology of HCT116 and DLD-1 cells for 48 h.

图2 rBTI联合奥沙利铂对结肠癌细胞形态的影响

Fig.2 Effect of rBTI combined with Oxaliplatin on cell morphology of colon cancer cells



A~D: 不同浓度的rBTI(0、50、100 µg/mL)与奥沙利铂(2.5 µg/mL)联合对HCT116和DLD-1细胞克隆形成的影响。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与对照组比较。

A~D: effect of different concentrations of rBTI (0, 50, 100 µg/mL) combined with Oxaliplatin (2.5 µg/mL) on clonalization in HCT116 and DLD-1 cells. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with the control group.

图3 rBTI联合奥沙利铂对结肠癌细胞克隆形成的影响

Fig.3 Effect of rBTI combined with Oxaliplatin on colon formation of colon cancer cells

121、TYR182、THR-226, 对接打分为4.47。rBTI与JNK形成三个氢键, 结合位点0.4 nm以内的氨基酸残基包括TYR-228、SER-41、ALA-42, 对接打分为5.20。rBTI与ERK形成四个氢键, 结合位点0.4 nm以内的氨基酸残基包括VAL-68、LYS-259、ARG-261、ASN-262, 对接打分为7.21。奥沙利铂与P38、JNK、ERK也分别形成了相应的氢键, 这些氢键在新的复合物形成过程中起到了一定作用, 提高了化合物的稳定性, 使二者结合能力增强, 结合能分别为-7.59 kcal/mol、-6.61 kcal/mol、-7.76 kcal/mol。

## 2.7 rBTI联合奥沙利铂调控MAPK信号通路的表达

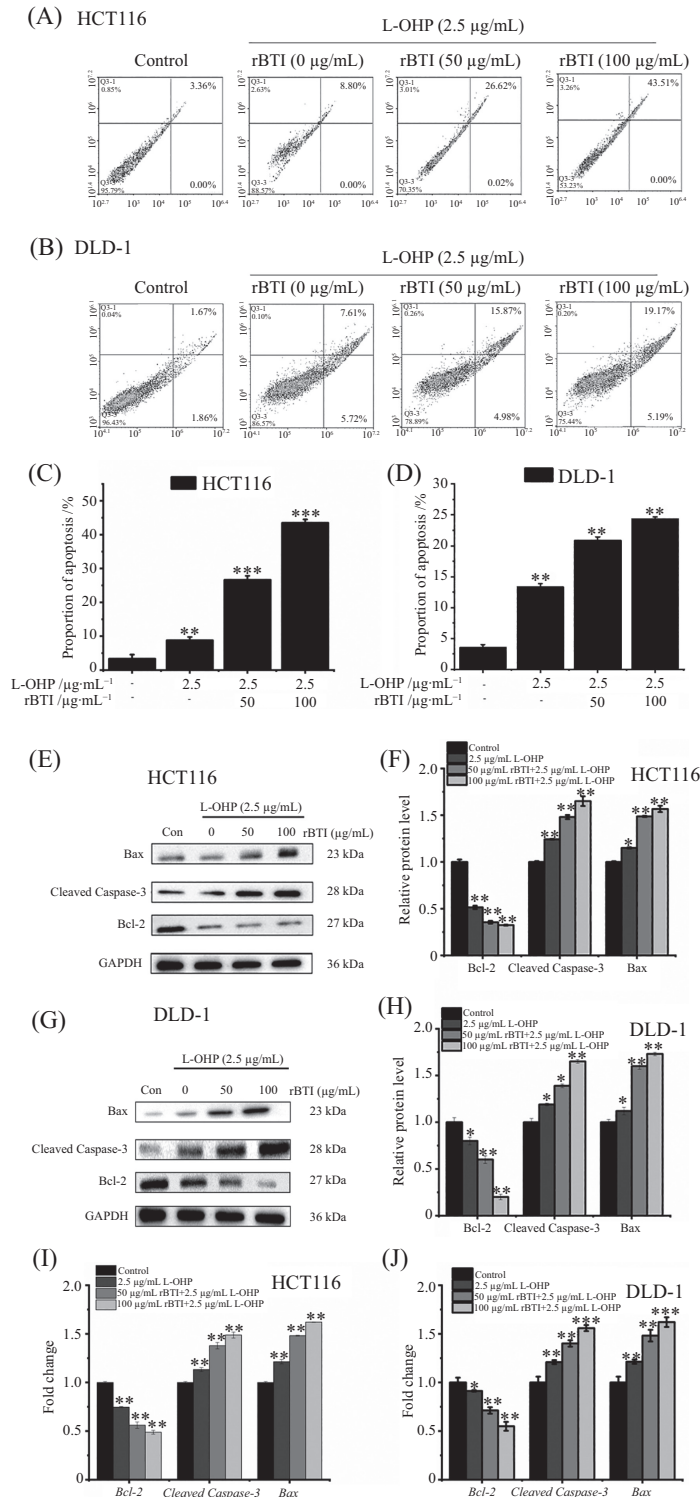
通过Western blot检测MAPK信号通路相关蛋白表达情况(图7)。与对照组和单独用奥沙利铂组相比, rBTI和奥沙利铂联合用药组中, JNK、ERK、P38的蛋白表达水平均显著降低。

## 3 讨论

奥沙利铂是一种铂类抗肿瘤药物, 已被证实对消化道肿瘤和部分实体肿瘤有效。单独用奥沙利铂药物治疗时, 抗癌活性较低, 术后复发率较高<sup>[9]</sup>。

rBTI可以通过改变线粒体膜电位, 通过网格蛋白介导的内吞作用进入细胞, 分布在细胞质以及细胞核中<sup>[10]</sup>, 抑制人类实体瘤细胞HepG2和EC9706等的增殖, 并促进细胞凋亡, 且对正常细胞影响很小。目前研究表明, rBTI与奥沙利铂单独对肿瘤细胞的增殖都起到了抑制作用。为了研究两者能否发挥协同作用, 减缓奥沙利铂的副作用并增加其药效, 本研究通过将rBTI与奥沙利铂联合作用于结肠癌细胞开展实验。

据JAAKS等<sup>[11]</sup>报道, 药物之间的协同作用是罕见的, 在108 259个组合中, 有5.2%显示出协同作用。MTT的结果显示rBTI与奥沙利铂具有协同作用, 因此rBTI与奥沙利铂两者联合作用可以作为一种有效方案增强奥沙利铂治疗结肠癌的效果。结直肠癌的非手术治疗最终均以诱导肿瘤细胞死亡为目标, 奥沙利铂可以联合其他药物诱导结肠癌细胞凋亡<sup>[12]</sup>。为了研究rBTI能否与奥沙利铂协同作用以促进结肠癌细胞凋亡, 我们进行了一系列实验。实验结果证明: rBTI可以与奥沙利铂协同作用使结肠癌细胞显示出比奥沙利铂单独作用时更显著的作用, 包括凋亡细胞形态更明显、克隆形成数量减少、凋亡细胞

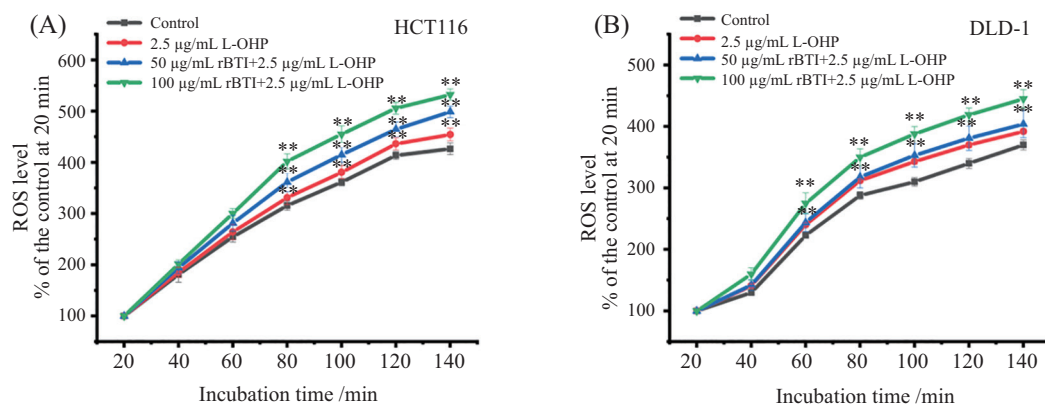


A~D: 不同浓度的rBTI(0、50、100  $\mu\text{g/mL}$ )与奥沙利铂(2.5  $\mu\text{g/mL}$ )联合处理细胞48 h对HCT116和DLD-1细胞凋亡的影响; E~H: 不同浓度的rBTI(0、50、100  $\mu\text{g/mL}$ )与奥沙利铂(2.5  $\mu\text{g/mL}$ )联合处理细胞48 h对HCT116和DLD-1细胞Bcl-2、Cleaved Caspase-3和Bax蛋白表达的影响; I、J: 不同浓度的rBTI(0、50、100  $\mu\text{g/mL}$ )与奥沙利铂(2.5  $\mu\text{g/mL}$ )联合处理细胞48 h对HCT116细胞Bcl-2、Cleaved Caspase-3和Bax mRNA表达的影响。  
\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与对照组比较。

A~D: effect of different concentrations of rBTI (0, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) combined with Oxaliplatin (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) to treat cells for 48 h on the apoptosis of HCT116 and DLD-1 cells; E~H: effects of different concentrations of rBTI (0, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) combined with Oxaliplatin (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) on the expression of Bcl-2, Cleaved Caspase-3 and Bax in HCT116 and DLD-1 cells for 48 h; I, J: effects of different concentrations of rBTI (0, 50, 100  $\mu\text{g/mL}$ ) combined with Oxaliplatin (2.5  $\mu\text{g/mL}$ ) on the mRNA expression of Bcl-2, Cleaved Caspase-3 and Bax in HCT116 cells after 48 h. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with the control group.

图4 rBTI联合奥沙利铂对结肠癌细胞凋亡的影响

Fig.4 Effect of rBTI combined with Oxaliplatin on apoptosis of colon cancer cells

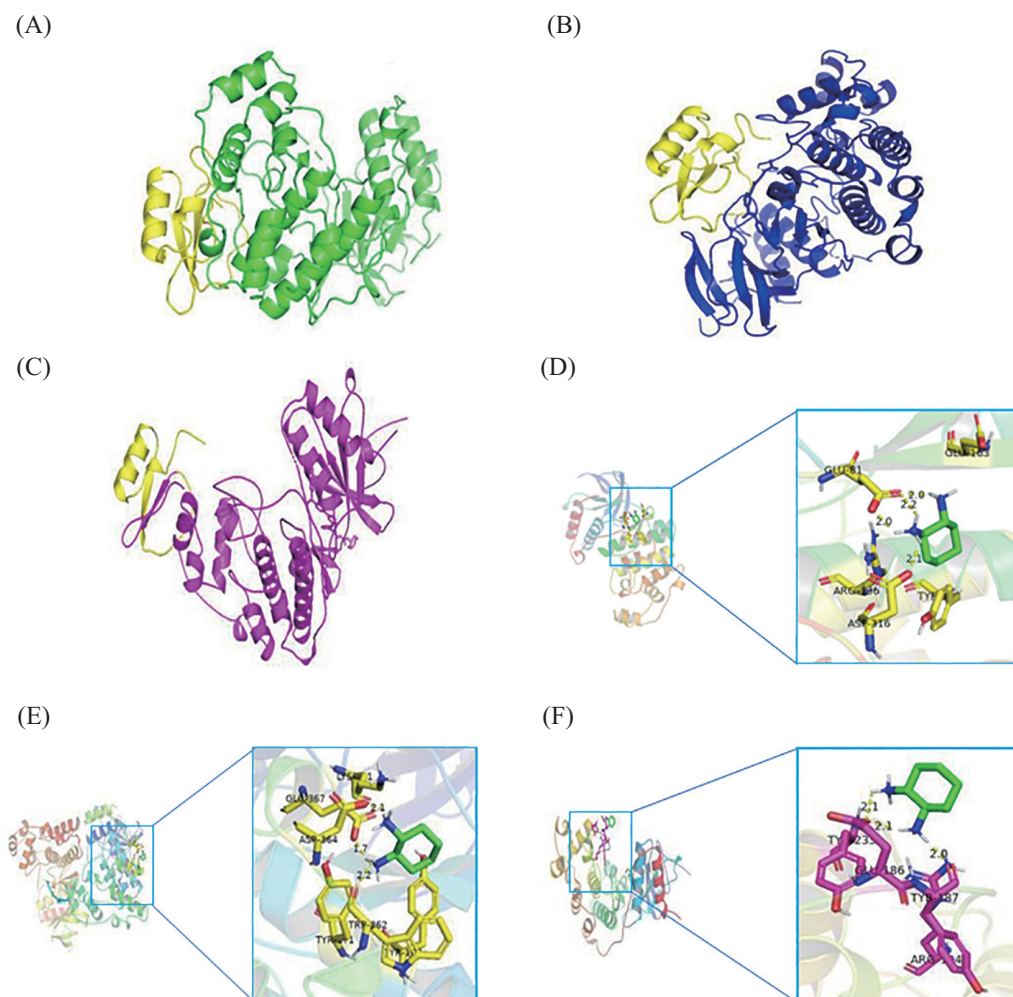


A、B: 不同浓度的rBTI(0、50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )与奥沙利铂(2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )联合处理细胞48 h, 对HCT116和DLD-1细胞的活性氧(ROS)的影响。\*\* $P < 0.01$ , 与对照组比较。

A,B: effect of different concentrations of rBTI (0, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) combined with oxaliplatin (2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) on reactive oxygen species (ROS) in HCT116 and DLD-1 cells after 48 h of treatment. \*\* $P < 0.01$  compared with the control group.

图5 rBTI联合奥沙利铂对结肠癌细胞活性氧水平的影响

Fig.5 Effect of rBTI combined with oxaliplatin on reactive oxygen species in colon cancer cells

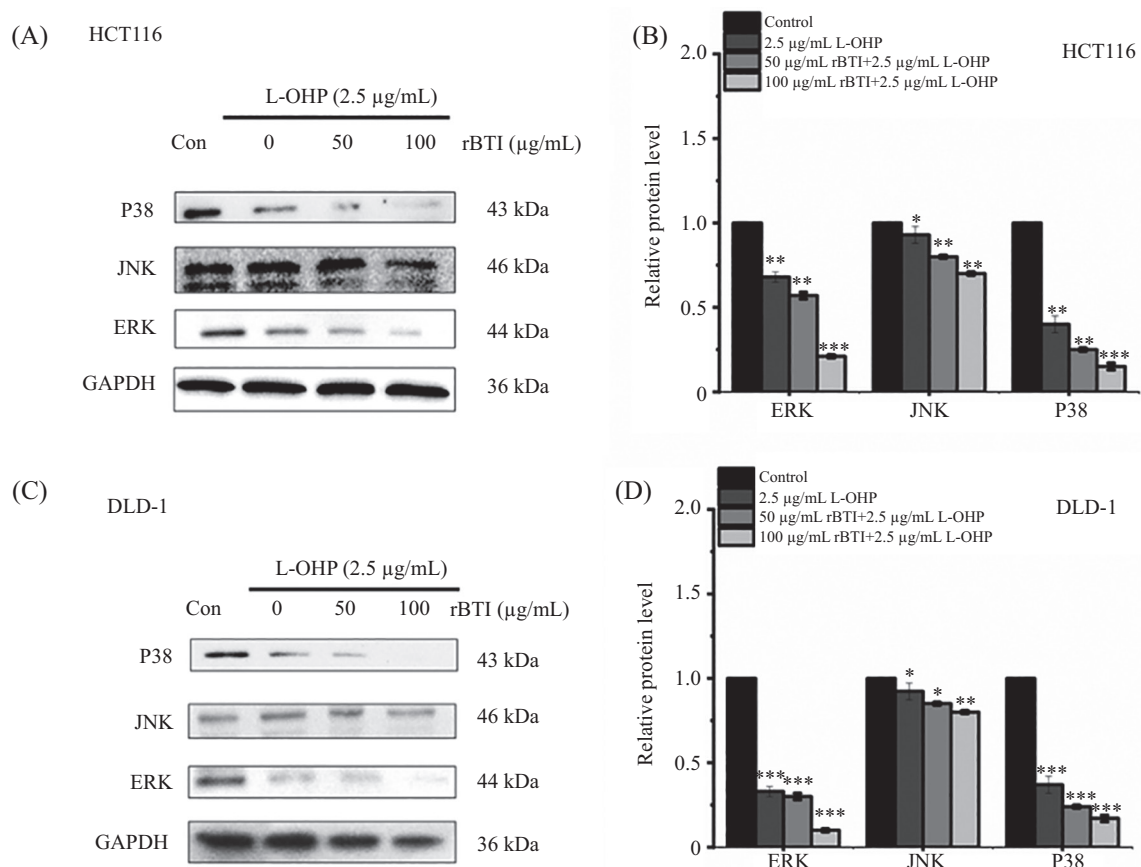


A~C: rBTI分别与P38、JNK、ERK蛋白分子对接的构象; D~F: 奥沙利铂分别与P38、JNK、ERK蛋白分子对接的构象。

A~C: conformations of rBTI docking with P38, JNK, and ERK protein molecules, respectively; D~F: Oxaliplatin docking with P38, JNK, ERK protein molecules, respectively.

图6 rBTI、奥沙利铂与JNK、ERK、P38蛋白的对接构象分析

Fig.6 Conformational analysis of rBTI, Oxaliplatin docking with JNK, ERK, and P38 proteins



A~D: 不同浓度的rBTI(0、50、100 µg/mL)与奥沙利铂(2.5 µg/mL)联合处理细胞48 h对HCT116和DLD-1细胞MAPK相关蛋白表达的影响。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ , 与对照组比较。

A~D: different concentrations of rBTI (0, 50, 100 µg/mL) combined with Oxaliplatin (2.5 µg/mL) treated with cells for 48 h on the expression of MAPK-related proteins in HCT116 and DLD-1 cells. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  compared with the control group.

图7 rBTI联合奥沙利铂调控MAPK信号通路的表达

Fig.7 rBTI combined with Oxaliplatin regulates the expression of MAPK signaling pathway

数量增多、凋亡相关蛋白及mRNA表达情况变化更显著。结果也说明, rBTI与奥沙利铂联合作用可以诱导细胞凋亡, 且效果比奥沙利铂单独作用的效果更显著。

癌细胞的异常生长过程可能部分由活性氧(reactive oxygen species, ROS)异常引起。在正常情况下, 使用一定水平的ROS来维持细胞增殖和凋亡的平衡<sup>[13]</sup>。当ROS积累超过临界点时, 通过诱导调节细胞死亡程序(主要包括细胞凋亡、坏死性凋亡和铁死亡)转变为抗肿瘤作用<sup>[14]</sup>。抗癌药物通过ROS生成诱导癌细胞凋亡和自噬, ROS水平升高是常规癌症治疗的潜在核心作用机制和疗效, 与癌细胞死亡直接相关<sup>[15]</sup>。ROS在细胞内参与细胞凋亡过程, 可以通过多种途径, 启动凋亡信号级联反应, 调节多种细胞内信号通路, 如JNK、P38 MAPK和NF-κB等, 影响凋亡相关基因的表达和细胞凋亡的

发生等。这些机制共同作用, 最终导致细胞凋亡的发生<sup>[16]</sup>。在众多的细胞内信号通路中, MAPK信号通路在细胞的增殖、分化、凋亡中发挥重要作用<sup>[17]</sup>。在真核细胞中已鉴定出以下几种MAPK级联反应: ERK、JNK/应激活化蛋白激酶和P38 MAPK信号转导通路<sup>[18]</sup>。在调节细胞凋亡时, MAPK具有双重作用, 因为它们可以作为激活剂或抑制剂, 例如: JNK和P38 MAPK级联都介导促凋亡过程, 也介导抗凋亡过程, ERK1/2激活通过控制细胞增殖和分化, 与抗凋亡功能广泛相关<sup>[19]</sup>。研究表明, 天然植物化学物质对ERK1/2或JNK通路具有抑制活性<sup>[17]</sup>。

为了研究rBTI与奥沙利铂协同作用的具体机制, 经文献调研发现, 奥沙利铂可以通过改变活性氧水平以及MAPK信号通路发挥作用。崔珊等<sup>[20]</sup>研究指出奥沙利铂可以抑制EGFR-MAPK信号通路以促进HCT116细胞凋亡。奥沙利铂可以和阿兰托内酯

协同作用,使细胞积累ROS,改变MAPK信号通路相关蛋白的表达,诱导细胞凋亡<sup>[21]</sup>。我们的研究结果显示rBTI与奥沙利铂联合作用可以改变细胞中ROS的水平,对JNK、ERK、P38等常见的MAPK信号通路相关的蛋白水平进行检测之后均发现其有显著变化,且联合用药效果比奥沙利铂单独用药效果显著。因此我们推断rBTI联合奥沙利铂可能是通过调节MAPK信号通路相关蛋白因子,从而抑制结肠癌细胞的增殖并促进其发生细胞凋亡的,对于其具体的作用靶点及作用方式在未来仍需进一步深入研究。总之,我们的结果初步显示rBTI与奥沙利铂可以通过协同作用诱导结肠癌HCT116和DLD-1细胞凋亡。

### 参考文献 (References)

- [1] SIEGEL R L, WAGLE N S, CERCEK A, et al. Colorectal cancer statistics, 2023 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2023, 73(3): 233-54.
- [2] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-49.
- [3] ZHANG C, XU C, GAO X, et al. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies [J]. *Theranostics*, 2022, 12(5): 2115-32.
- [4] LOPEZ J S, BANERJI U. Combine and conquer: challenges for targeted therapy combinations in early phase trials [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017, 14(1): 57-66.
- [5] SOFI S A, AHMED N, FAROOQ A, et al. Nutritional and bioactive characteristics of buckwheat, and its potential for developing gluten-free products: an updated overview [J]. *Food Sci Nutr*, 2023, 11(5): 2256-76.
- [6] 郑文骏, 毛智翔, 黄琳娟, 等. 胰蛋白酶抑制剂在肿瘤治疗中的研究进展[J]. *检验医学与临床*(ZHENG W J, MAO Z X, HUANG L J, et al. Research progress of trypsin inhibitors in cancer treatment [J]. *Laboratory Medicine & Clinic*), 2018, 15(16): 2508-11.
- [7] LI Y Y, ZHANG Z, WANG Z H, et al. rBTI induces apoptosis in human solid tumor cell lines by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 189(2): 166-75.
- [8] 李玉英, 白崇智. pEGFP-N1介导BTI的表达抑制肝癌HepG2细胞迁移及细胞周期进程[J]. *中国细胞生物学学报*(LI Y Y, BAI C Z. pEGFP-N1-mediated BTI expression inhibits migration and cell cycle progression in hepatocellular carcinoma HepG2 cell [J]. *Chinese Journal of Cell Biology*), 2020, 42(10): 1748-57.
- [9] PADMAN S, LEE J, KUMAR R, et al. Late effects of oxaliplatin-induced peripheral neuropathy (LEON): cross-sectional cohort study of patients with colorectal cancer surviving at least 2 years [J]. *Support Care Cancer*, 2015, 23: 861-9.
- [10] CUI X, WANG Z, LI Y, et al. Buckwheat trypsin inhibitor enters Hep G2 cells by clathrin-dependent endocytosis [J]. *Food Chem*, 2013, 141(3): 2625-33.
- [11] JAAKS P, COKER E A, VIS D J, et al. Effective drug combinations in breast, colon and pancreatic cancer cells [J]. *Nature*, 2022, 603(7899): 166-73.
- [12] 田春阳, 刘晓政, 范军朝. 奥沙利铂联合柔红霉素诱导结肠癌细胞系HT-29凋亡[J]. *基础医学与临床*(TIAN C Y, LIU X Z, FAN J Z. Oxaliplatin combined with daunorubicin induces apoptosis of colon cancer cell line HT-29 [J]. *Basic Medicine & Clinical*), 2020, 40(3): 310-4.
- [13] QIU J, ZHANG T, ZHU X, et al. Hyperoside induces breast cancer cells apoptosis via ROS-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 21(1):131.
- [14] WANG Y, QI H, LIU Y, et al. The double-edged roles of ROS in cancer prevention and therapy [J]. *Theranostics*, 2021, 11(10): 4839-57.
- [15] AGGARWAL V, TULI H S, VAROL A, et al. Role of reactive oxygen species in cancer progression: molecular mechanisms and recent advancements [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(11): 735.
- [16] ZHENG Z, ZHANG L, HOU X. Potential roles and molecular mechanisms of phytochemicals against cancer [J]. *Food Funct*, 2022, 13(18): 9208-25.
- [17] ZHAO Y, YE X, XIONG Z, et al. Cancer metabolism: the role of ROS in DNA damage and induction of apoptosis in cancer cells [J]. *Metabolites*, 2023, 13(7): 796.
- [18] GUO Y J, PAN W W, LIU S B, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis [J]. *Exp Ther Med*, 2020, 19(3): 1997-2007.
- [19] YUE J, LÓPEZ J M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(7): 2346.
- [20] 崔珊, 黄金清, 韦东雪, 等. 奥沙利铂抑制EGFR-MAPK促进HCT116细胞凋亡[J]. *中国药理学通报*(CUI S, HUANG J X, WEI D X. et al. Oxaliplatin inhibits EGFR-MAPK to promote apoptosis in HCT116 cells [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*), 2022, 38(8): 1279-80.
- [21] CAO P, XIA Y, HE W, et al. Enhancement of oxaliplatin-induced colon cancer cell apoptosis by alantolactone, a natural product inducer of ROS [J]. *Int J Biol Sci*, 2019, 15(8): 1676-84.