

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.006

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.006>

## 二苯乙烯苷通过PI3K/AKT通路抑制TGF $\beta$ 诱导的 结直肠癌上皮间质转换

李品玉, 刘其礼, 王敏, 张霞, 杨坚

(肇庆医学高等专科学校病理学与病理生理学教研室, 广东 肇庆 526000)

**[摘要]** 目的: 探讨二苯乙烯苷(2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside, THSG)对TGF $\beta$ 诱导的结直肠癌细胞上皮间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响及可能的分子机制。方法: 通过转化生长因子(transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ )诱导HCT116细胞发生EMT, 倒置显微镜观察细胞形态变化, Western印迹检测EMT相关分子标志物的表达; 划痕实验、细胞迁移实验、倒置显微镜观察不同浓度THSG干预TGF $\beta$ 刺激对HCT116细胞运动、迁移能力以及形态学的影响, Western印迹检测EMT相关标志物及PI3K/AKT通路的改变。结果: TGF $\beta$ 刺激HCT116细胞后, 细胞由圆形变为长梭形, E-cadherin表达降低, vimentin和N-cadherin表达增加; 与对照组相比, THSG可增加E-cadherin和PTEN的表达, 降低vimentin和N-cadherin和p-AKT表达, 同时抑制细胞的迁移及运动( $F=454.723$ ,  $P<0.001$ ;  $F=412.161$ ,  $P<0.001$ )。结论: THSG可通过PI3K/AKT通路抑制TGF $\beta$ 诱导的HCT116细胞EMT, 并降低其运动迁移能力。

**[关键词]** 二苯乙烯苷; 转化生长因子; 结直肠癌; PI3K/AKT

## 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside inhibits TGF $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer via PI3K/AKT pathway

LI Pinyu, LIU Qili, WANG Min, ZHANG Xia, YANG Jian

(Department of Pathology and Pathophysiology, Zhaoqing Medical College, Zhaoqing Guangdong 526000, China)

**Abstract** **Objective:** To investigate the effect of 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside (THSG) on TGF $\beta$  induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in HCT116 cells and further to explore the potential molecular mechanism. **Methods:** Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) was used to induce EMT in HCT116 cells, the morphological changes were observed under inverted microscope, and EMT related molecular markers were detected by Western blot. Wound Healing assay, Transwell assay, inverted microscope were performed to detect whether THSG could reverse the motility, migration ability and morphological changes induced by TGF $\beta$ , the

收稿日期 (Date of reception): 2017-03-22

通信作者 (Corresponding author): 李品玉, Email: lipingyu24@163.com

基金项目 (Foundation item): 肇庆市科技创新指导类项目 (2016040301-22)。This work was supported by Zhaoqing Science and Technology Innovation Guidance Project, China (2016040301-22).

effect of THSG on EMT-related molecular markers and PI3K/AKT pathway were measured by Western blot. **Results:** TGF $\beta$  treated HCT116 cells transformed from round type to spindle-shaped form, compared with the losing of E-cadherin and increasing of vimentin, N-cadherin. However, combination treatment with THSG neutralized the effect of TGF $\beta$  on E-cadherin, vimentin, N-cadherin. Meanwhile, THSG treatment increase the expression of PTEN and suppress p-AKT expression. Moreover, THSG could inhibited TGF $\beta$  induced migration and motility ability ( $F=454.723, P<0.001; F=412.161, P<0.001$ ). **Conclusion:** THSG can inhibit TGF $\beta$  induced EMT in colorectal cancer via PI3K/AKT pathway, and suppress the ability of motility and migration.

**Keywords** 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside; transforming growth factor; colorectal cancer; PI3K/AKT

结直肠癌是常见的消化系统恶性肿瘤之一,其发病率和病死率均居所有恶性肿瘤前5位<sup>[1]</sup>。转移是导致结直肠癌患者死亡的主要原因之一。已有研究<sup>[2]</sup>证实上皮间质转换(epithelial-mesenchymal transition, EMT)在促进结直肠癌侵袭和转移中起着至关重要的作用。通过发生EMT,肿瘤细胞失去紧密连接和极性、获得更强的侵袭力和运动能力,并伴随着上皮标志物如E-cadherin和ZO-1等表达的减少和间质标志物vimentin和N-cadherin表达的增加,促使肿瘤实现远处组织和器官的转移<sup>[3]</sup>。EMT的发生与多种细胞因子和信号通路的激活密切相关,而转化生长因子(transforming growth factor  $\beta$ , TGF $\beta$ )是被证实能诱导结直肠癌细胞发生EMT的经典刺激因子<sup>[4]</sup>。因此,针对TGF $\beta$ 及其相关通路进行干预,有望成为解决肿瘤转移的突破点。

二苯乙烯苷(2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O- $\beta$ -D-glucoside, THSG)是从中药何首乌中提取的一种水溶性有效成分,其结构与白藜芦醇相似,仅二位多一个酚羟基并形成糖苷,均属于二苯乙烯类<sup>[5]</sup>。已有研究<sup>[6-7]</sup>报道白藜芦醇可通过抑制PI3K/AKT通路抑制恶性胶质瘤、胰腺癌的侵袭和EMT来发挥其抗癌作用,而THSG在结直肠癌中的研究较少,主要为其对细胞增殖的抑制,THSG能否通过参与EMT发挥其抗癌作用还未见报道。本研究旨在探讨THSG对TGF $\beta$ 诱导结直肠癌细胞HCT116 EMT的影响,以及PI3K/AKT在其中发挥的作用,为将其开发成为抗癌药物提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

人结肠癌细胞株HCT116由南方医科大学病理实验室提供。胎牛血清、RPMI-1640为美国GIBICO公司产品,THSG(纯度>98%)购于成都百科通生物科技有限公司,TGF $\beta$ , E-cadherin,

vimentin和N-cadherin购于美国Cell Signaling Technology公司。GAPDH和鼠、兔二抗均购于北京中杉金桥有限公司。Transwell小室购于美国BD公司。吉姆萨染液购于广州市一科生物科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 划痕实验

取对数生长期细胞铺种植于6孔板中,待细胞密度长到60%~80%时用10  $\mu$ L无菌小枪头划2条垂直线,PBS洗涤后用含2%FBS培养基培养,显微镜下拍照后放孵箱37  $^{\circ}$ C培养48 h,PBS洗涤后再次拍照。比较各组细胞运动情况,计算划痕修复率。

#### 1.2.2 Transwell 实验

将TGF $\beta$ 刺激后的细胞常规消化,计数 $30 \times 10^4$ 个细胞,离心后PBS洗2次,加入200  $\mu$ L RPMI-1640稀释后均匀接种到上室,下室加入600  $\mu$ L 20% FBS的培养基,48 h后取出小室,PBS清洗小室2次,甲醇固定细胞15 min,常规PBS清洗3次,吉姆萨染色液染色15 min,清洗干净后显微镜下随机选取3个视野拍照计数。

#### 1.2.3 Western 印迹

提取细胞全蛋白,用10%SDS-PAGE凝胶将蛋白进行电泳分离,湿法转印至PVDF膜上,转膜结束后5%牛奶室温封闭1h,加入E-cadherin, vimentin, N-cadherin, PTEN, p-AKT, AKT一抗4  $^{\circ}$ C孵育过夜,次日常温复温30 min, PBST洗3次后二抗室温孵育1 h, PBST清洗3次,化学发光法显色成像,Quantity One软件分析系统对结果扫描分析。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS19.0进行统计学分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两样本均数比较采用t检验,多组间的均数比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)。P<0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 TGFβ 诱导 HCT116 细胞发生 EMT

形态学观察发现: 10 ng/mL TGFβ 刺激 HCT116 细胞后, 细胞由之前的立方形、圆形变为长梭形, 细胞间连接减少, 呈现明显的间质形态 (图1A)。Transwell 细胞迁移实验结果显示: TGFβ 刺激 HCT116 细胞后, 迁移出的细胞数目明显增多 ( $F=131.848$ ,  $P<0.001$ )。Western 印迹结果显示: TGFβ 可以诱导 EMT 的发生, 具体表现为 TGFβ 刺激 HCT116 细胞后, EMT 上皮标志物 E-cadherin 表达下降 ( $F=41.627$ ,  $P<0.001$ ), 间质标志物 vimentin 和 N-cadherin 表达增加 ( $F=481.77$ ,  $P<0.001$ );

$F=244.562$ ,  $P<0.001$ , 图1B)。

### 2.2 THSG 逆转 TGFβ 刺激对 HCT116 细胞迁移、运动的影响

Transwell 细胞迁移实验结果显示: 与未处理对照组相比, TGFβ 刺激 HCT116 细胞后细胞的迁移能力明显增强, 而 TGFβ 与 THSG 共同刺激 HCT116 细胞后, 细胞的迁移能力又被减弱 ( $F=454.723$ ,  $P<0.001$ ); 细胞划痕实验结果显示: 与未处理对照组相比, TGFβ 刺激 HCT116 细胞后细胞的运动能力明显增加, 而 TGFβ 与 THSG 共同刺激 HCT116 细胞后, 细胞的运动能力又被抑制 ( $F=412.161$ ,  $P<0.001$ , 图2)。

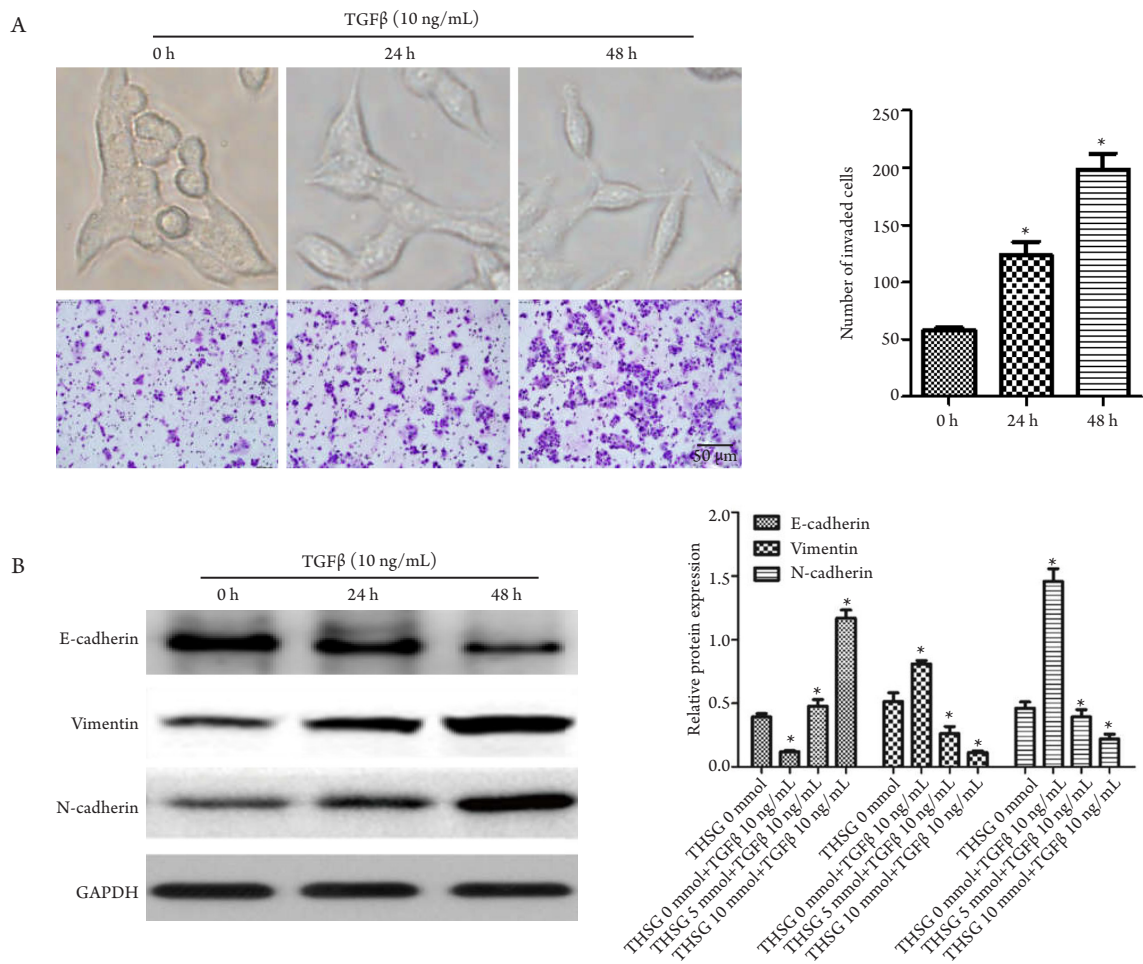


图1 TGFβ诱导HCT116细胞EMT和迁移能力

Figure 1 TGFβ induced EMT and migration ability in HCT116 cells

(A) TGFβ对HCT116细胞形态学( $\times 400$ )以及迁移能力的影响( $*P<0.001$ ); (B) Western印迹检测TGFβ对HCT116细胞EMT相关标志物的影响。

(A) Effect of TGFβ on morphological change and migration ability in HCT116 cells ( $*P<0.001$ ); (B) Western blot was performed to detect the effect of TGFβ on EMT related markers.



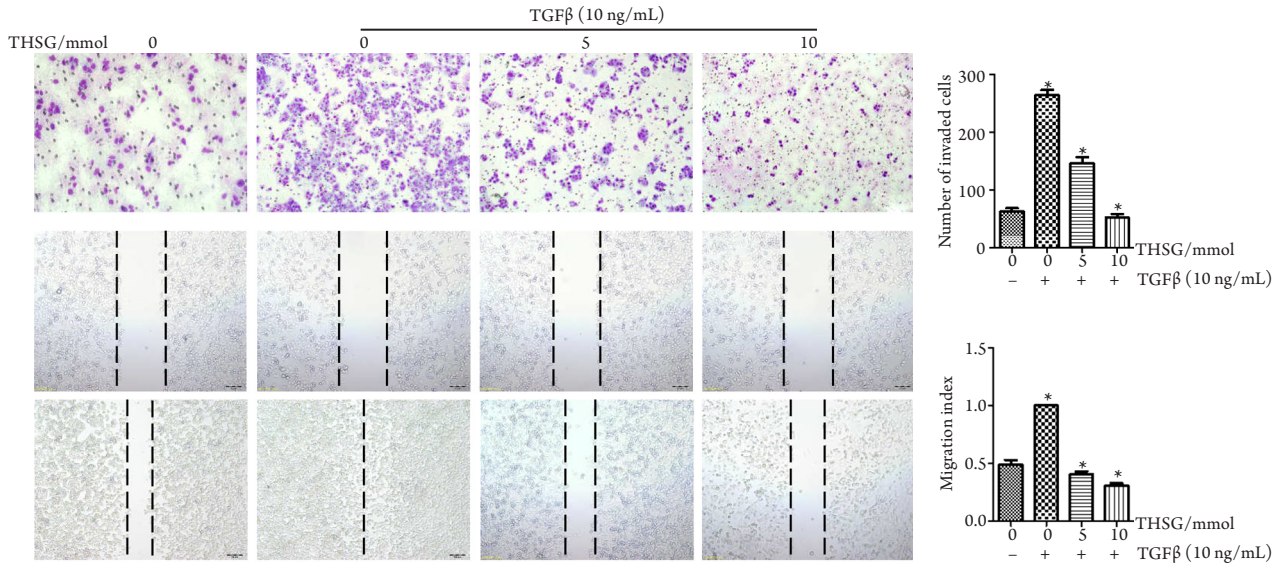


图2 THSG对TGFβ诱导后细胞迁移、运动能力的的影响(\* $P < 0.001$ )

Figure 2 Effect of THSG on TGFβ induced cell migration and motility ability (\* $P < 0.001$ )

### 2.3 THSG 逆转 TGFβ 刺激对 HCT116 细胞 EMT 的影响

形态学观察发现：与TGFβ单纯刺激相比，TGFβ与THSG共同刺激HCT116细胞后，细胞由长梭形向圆形转变(图3A)。Western印迹结果显示：

与TGFβ单纯刺激相比，TGFβ与THSG共同刺激HCT116细胞后，EMT上皮标志物E-cadherin表达增加( $F = 315.546, P < 0.001$ )，间质标志物vimentin，N-cadherin表达降低( $F = 132.225, P < 0.001$ ； $F = 224.635, P < 0.001$ )，EMT被抑制(图3B)。

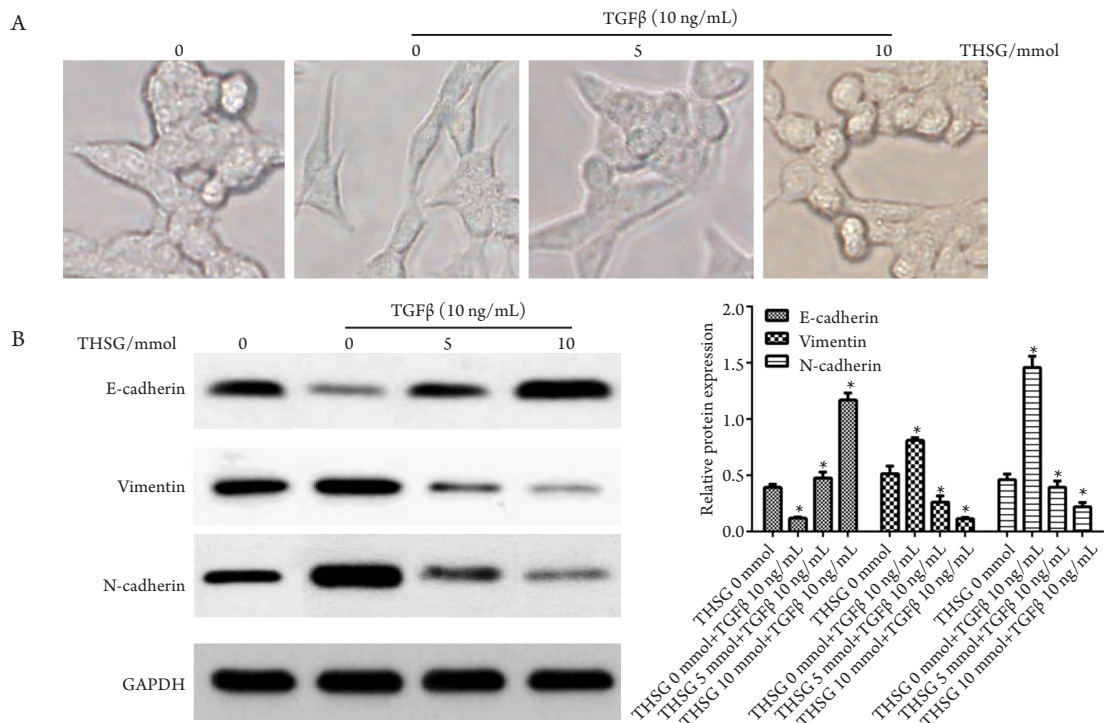


图3 THSG逆转TGFβ诱导的EMT

Figure 3 THSG reversed TGFβ induced EMT

(A) THSG逆转TGFβ诱导的HCT116细胞形态学的改变(×400)；(B) THSG逆转TGFβ诱导的EMT标志物表达的改变。

(A) THSG reversed the effect of TGFβ on morphological change in HCT116 cells (×400)；(B) THSG reversed the effect of TGFβ on expression of EMT related markers.

## 2.4 THSG 通过抑制 PI3K/AKT 通路逆转 TGF $\beta$ 对 HCT116 细胞运动、迁移 EMT 的影响

Western印迹结果显示: TGF $\beta$ 刺激HCT116细胞后, PTEN表达降低, p-AKT表达增加, 而TGF $\beta$ 与THSG共同刺激HCT116细胞后, 与单纯使用TGF $\beta$ 刺激相比, PTEN表达增加, p-AKT表达降低(图4), 提示可通过抑制PI3K/AKT通路发挥作用。

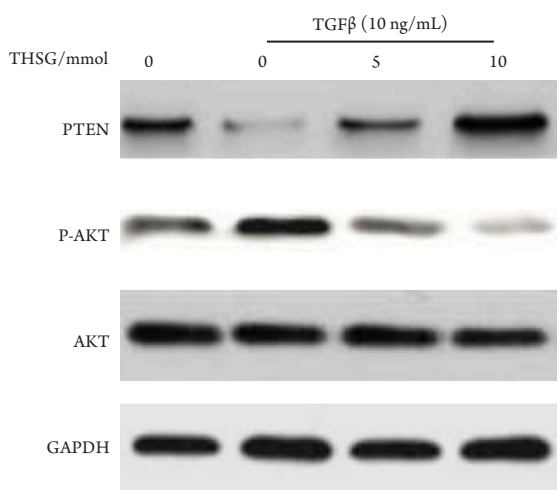


图4 THSG逆转TGF $\beta$ 对PI3K/AKT通路的影响

Figure 4 THSG reversed the effect of TGF $\beta$  on PI3K/AKT pathway

## 3 讨论

结直肠癌全世界高发, 在我国, 结直肠癌的发病率和病死率均位居各类恶性肿瘤第5位<sup>[1]</sup>。临床上, 肿瘤转移是导致患者死亡的主要原因, I期肿瘤患者5年生存率达到90%以上, 而IV期肿瘤患者则不足10%<sup>[8]</sup>。肿瘤转移是个极其复杂的过程, 涉及到抑癌基因的失活、原癌基因的激活、肿瘤间质、肿瘤微环境等多因素综合作用。近年来研究<sup>[9]</sup>表明: 肿瘤转移过程中可通过形态学的变化来获得更强的单细胞迁移和侵袭能力, 由椭圆形变为长梭形, 伴随着E-cadherin, ZO-1, Claudins, Occludin等上皮标志物的减少和vimentin, N-cadherin, fibronectin等间质标志物的增加, 该过程被称为EMT。TGF $\beta$ 是诱导肿瘤细胞EMT的经典刺激因子之一, 一方面通过与受体TGF $\beta$ R结合, 磷酸化Smad2/3, 与Smad4结合形成转录复合体, 以Smad依赖方式调控EMT; 另一方面调控PI3K/AKT, MAPK, JNK, NF- $\kappa$ B通路等,

以非Smad依赖方式调控EMT<sup>[10-11]</sup>。鉴于TGF $\beta$ 是促进EMT和肿瘤转移的重要原因, 靶向TGF $\beta$ 及其相关通路进行干预为治疗转移性结直肠癌提供新的方法。

THSG是从中药何首乌中提取的一种水溶性物质, 其结构与白藜芦醇相似, 仅2位多一个酚羟基并形成了糖苷, 均属于二苯乙烯类<sup>[5]</sup>。白藜芦醇已被广泛报道通过抗氧化作用、抑制肿瘤相关信号通路等方式发挥抗肿瘤作用<sup>[12-16]</sup>, THSG又与其结构相似, 并且在乳腺癌<sup>[17]</sup>和黑色素瘤<sup>[18]</sup>中也见其抑制增殖的报道, 我们推测THSG也可能有潜在的抗癌功效。但是, THSG是否抑制肿瘤转移以及是否逆转TGF $\beta$ 介导的EMT及其分子机制仍不清楚。

本研究发现: 结直肠癌细胞HCT116在10 ng/mL浓度的TGF $\beta$ 刺激下, 细胞发生明显的形态学变化, 逐渐由椭圆形变为针刺状的长梭形, 该变化呈时间依赖性, 并且伴随细胞迁移能力的提高。同时Western印迹检测结果证实上皮标志物E-cadherin呈时间依赖性的减少, 间质标志物vimentin, N-cadherin呈时间依赖性增加, 该部分结果说明TGF $\beta$ 诱导结直肠癌细胞EMT和迁移能力。值得一提的是, 当TGF $\beta$ 和THSG共同刺激后, TGF $\beta$ 介导的迁移和运动能力被THSG抑制, 形态学观察也发现TGF $\beta$ 诱导的长梭形间质形态被THSG抵消, 并呈THSG浓度依赖性。Western印迹证实THSG恢复TGF $\beta$ 下调的上皮标志物E-cadherin, 抵消TGF $\beta$ 上调的间质标志物vimentin, N-cadherin, 并呈现THSG浓度依赖性, 该部分实验证实THSG刺激可以抑制TGF $\beta$ 介导的EMT和迁移、运动能力, 但潜在的分子机制仍不清楚。文献[6-7]报道白藜芦醇可通过抑制PI3K/AKT通路抑制恶性胶质瘤、胰腺癌的侵袭和EMT, 而THSG又与白藜芦醇具有相似结构, 且PI3K/AKT信号通路也是TGF $\beta$ 诱导EMT的重要的非Smad依赖途径, 因此我们推测THSG削弱TGF $\beta$ 的生物学功能可能与其调控PI3K/AKT通路相关, 后续实验针对THSG对PI3K/AKT通路的影响进行探讨。Western印迹证实THSG恢复了PI3K/AKT通路抑制因子PTEN的表达, 削弱了TGF $\beta$ 对AKT的磷酸化, 表明THSG抑制了TGF $\beta$ 活化的PI3K/AKT通路, THSG抑制PI3K/AKT通路可能是其发挥抗癌功效的重要途径之一。

综上, 我们的研究发现中药何首乌提取物THSG能有效抑制TGF $\beta$ 诱导的迁移运动能力和EMT, 并且这种作用与THSG抑制PI3K/AKT信号通路活化有关, 我们证实THSG在结直肠癌中具有

潜在抗癌价值, 有望成为治疗转移性结直肠癌的新选择。

## 参考文献

- Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132.
- Cao H, Xu E, Liu H, et al. Epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: A system review[J]. *Pathol Res Pract*, 2015, 211(8): 557-569.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15(3): 178-196.
- Zhang F, Luo Y, Shao Z, et al. MicroRNA-187, a downstream effector of TGFbeta pathway, suppresses Smad-mediated epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer[J]. *Cancer Lett*, 2016, 373(2): 203-213.
- 陈冰冰, 姜爱玲, 张岩. 何首乌有效成分二苯乙烯苷的药理活性研究进展[J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2016, 21(6): 710-715. CHEN Bingbing, JIANG Ailing, ZHANG Yan. Research progress on pharmacological activities of stilbene glucoside, active component from *Polygonum multiflorum* Thunb[J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2016, 21(6): 710-715.
- Li W, Ma J, Ma Q, et al. Resveratrol inhibits the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells via suppression of the PI-3K/Akt/NF-kappaB pathway[J]. *Curr Med Chem*, 2013, 20(33): 4185-4194.
- Ko HS, Lee HJ, Kim SH, et al. Piceatannol suppresses breast cancer cell invasion through the inhibition of MMP-9: involvement of PI3K/AKT and NF-kappaB pathways[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(16): 4083-4089.
- Brenner H, Kloor M, Pox CP. Colorectal cancer[J]. *Lancet*, 2014, 383(9927): 1490-1502.
- Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(1): 28-39.
- Gonzalez DM, Medici D. Signaling mechanisms of the epithelial-mesenchymal transition[J]. *Sci Signal*, 2014, 7(344): e8.
- Derynck R, Muthusamy BP, Saeteurn KY. Signaling pathway cooperation in TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2014, 31: 56-66.
- Wang L, Wang C, Jia Y, et al. Resveratrol increases anti-proliferative activity of bestatin through downregulating P-glycoprotein expression via inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway in K562/ADR cells[J]. *J Cell Biochem*, 2016, 117(5): 1233-1239.
- Jing X, Cheng W, Wang S, et al. Resveratrol induces cell cycle arrest in human gastric cancer MGC803 cells via the PTEN-regulated PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 472-478.
- Jiao Y, Li H, Liu Y, et al. Resveratrol inhibits the invasion of glioblastoma-initiating cells via down-regulation of the PI3K/Akt/NF-kappaB signaling pathway[J]. *Nutrients*, 2015, 7(6): 4383-4402.
- Liu YZ, Wu K, Huang J, et al. The PTEN/PI3K/Akt and Wnt/beta-catenin signaling pathways are involved in the inhibitory effect of resveratrol on human colon cancer cell proliferation[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(1): 104-112.
- 高倩, 刘卫, 唐郡. 白藜芦醇抗肿瘤作用机制研究进展[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2016, 30(9): 845-847. GAO Qian, LIU Wei, TANG Jun. Progress of effect of resveratrol on anti-tumor[J]. *Journal of Chinese Practical Diagnosis and Therapy*, 2016, 30(9): 845-847.
- 王文权, 张韶辉, 赵立波, 等. 二苯乙烯苷抑制人乳腺癌MCF-7细胞增殖及对PI3K/Akt信号通路的影响[J]. *肿瘤*, 2009, 29(1): 26-30. WANG Wenquan, ZHANG Shaohui, ZHAO Libo, et al. Effects of 2,3,5,4-Tetrahydroxy stilbene-2-O-beta-D-glucoside (THSG) on proliferation of human breast cancer MCF-7 cells and Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway[J]. *Tumor*, 2009, 29(1): 26-30.
- Jiang Z, Xu J, Long M, et al. 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside (THSG) induces melanogenesis in B16 cells by MAP kinase activation and tyrosinase upregulation[J]. *Life Sci*, 2009, 85(9/10): 345-350.

本文引用: 李品玉, 刘其礼, 王敏, 张霞, 杨坚. 二苯乙烯苷通过PI3K/AKT通路抑制TGFβ诱导的结直肠癌上皮间质转换[J]. *临床与病理杂志*, 2017, 37(9): 1803-1808. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.006

**Cite this article as:** LI Pinyu, LIU Qili, WANG Min, ZHANG Xia, YANG Jian. 2,3,5,4'-tetrahydroxy stilbene-2-O-beta-D-glucoside (THSG) inhibits TGFβ-induced epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer via PI3K/AKT pathway[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2017, 37(9): 1803-1808. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2017.09.006