

## • 论著—临床研究 •

熊果酸降低结直肠癌细胞内胆固醇含量及  
诱导细胞凋亡的作用及机制<sup>\*</sup>李永静<sup>1</sup> 陈珂<sup>1</sup> 孙沉沉<sup>1</sup> 王松坡<sup>1</sup>

**【摘要】** 目的:基于蛋白质组学探讨熊果酸抑制结直肠癌进展的可能生物学机制。方法:以结肠癌 HCT-116 细胞为研究对象,通过 CCK-8 法检测不同浓度熊果酸对 HCT-116 的增殖抑制率。收集熊果酸处理组和对照组样本进行蛋白质提取、蛋白质组学测序并筛选差异蛋白。对差异蛋白进行 GO 和 KEGG 富集分析,对目标通路进一步进行 GSEA 富集分析验证。IPA 聚焦关键信号通路,Western blot、细胞内胆固醇含量检测、流式细胞术等实验验证 IPA 结果。结果:熊果酸在一定范围内呈浓度依赖抑制 HCT-116 细胞增殖,通过非线性拟合计算出熊果酸对 HCT-116 细胞的 IC<sub>50</sub>、IC<sub>20</sub>、IC<sub>10</sub> 分别为 7.733、5.926、5.072 μg/mL。选取非毒性剂量 1.6 μg/mL 和 3.2 μg/mL 进行后续实验。非毒性剂量下,熊果酸依然呈时间依赖和浓度依赖地抑制 HCT-116 增殖。蛋白质组学发现对照组与熊果酸处理组之间存在 468 个差异蛋白,对差异蛋白进行 GO 和 KEGG 富集分析显示胆固醇代谢、自噬、铁死亡等生物进程被富集,GSEA 进一步发现差异蛋白在胆固醇代谢通路上显著富集(标准化富集评分=1.76,P<0.001)。IPA 显示熊果酸显著激活 LXR/RXR 信号[Z-score=3.00,-log<sub>10</sub>(P)=9.49]。进一步实验验证结果显示,熊果酸能够上调 LXR/RXR 靶蛋白 E<sub>3</sub> 泛素连接酶 MYLIP、三磷酸腺苷结合匣转运蛋白 G1、载脂蛋白 E 的表达,降低细胞内总胆固醇含量,诱导细胞凋亡,胆固醇回补能够拮抗熊果酸所诱导的细胞凋亡。结论:熊果酸激活 LXR/RXR 信号增加靶蛋白 E<sub>3</sub> 泛素连接酶 MYLIP、三磷酸腺苷结合匣转运蛋白 G1、载脂蛋白 E 的表达,导致结直肠癌细胞内胆固醇含量降低,增殖被抑制,凋亡增加。

**【关键词】** 结直肠癌;熊果酸;胆固醇代谢;LXR/RXR 信号

DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.04.06

[中图分类号] R735.7 [文献标志码] A

## The effect and mechanism of ursolic acid on reducing cholesterol abundant and inducing apoptosis in colorectal cancer

LI Yongjing CHEN Ke SUN Chenchen WANG Songpo

(Department of Traditional Chinese Medicine, the First Hospital of Shanghai, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai, 200080, China)

Corresponding author: WANG Songpo, E-mail: wangsp2012@sjtu.edu.cn

**Abstract Objective:** To investigate the mechanism of ursolic acid(UA) suppresses colorectal cancer progression based on proteomics. **Methods:** HCT-116 was selected as the study target, and the CCK-8 assay was used to detect the inhibition rates on HCT-116 after the treatment with different concentrations of UA. Extracted proteins from UA-treated and control cells were analyzed by proteomic analysis. Differential expression proteins(DEPs) were screened and then analyzed by GO and KEGG enrichment analysis. The target pathway was further verified by GSEA pathway enrichment analysis. Ingenuity pathway analysis(IPA) focused on key signaling pathways, and the results of IPA were verified by Western blot, measurement of intracellular total cholesterol level, and flow cytometry. **Results:** UA inhibited HCT-116 cell proliferation in a dose-dependent manner. The IC<sub>50</sub>, IC<sub>20</sub> and IC<sub>10</sub> of UA on HCT-116 were 7.733 μg/mL, 5.926 μg/mL and 5.072 μg/mL, respectively. Next, 1.6 μg/mL and 3.2 μg/mL UA were selected for follow-up experiments. UA inhibited HCT-116 cell proliferation in a time-and dose-dependent manner at non-toxic concentrations. Proteomics identified 468 DEPs between the control group and the UA-treated group. GO and KEGG enrichment analysis showed that the DEPs were associated with many biological processes such as cholesterol metabolism, autophagy, and ferroptosis. GSEA enrichment analysis fur-

<sup>\*</sup>基金项目:上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(中医胃病专科联盟)[(No:ZY(2021-2023)-0302)];上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划(张氏内科流派脾胃病传承创新团队)(No:2021LPTD-010);上海交通大学科技创新专项资金(No:YG2019ZDA28)

<sup>1</sup>上海交通大学医学院附属第一人民医院中医科(上海,200080)

通信作者:王松坡,E-mail:wangsp2012@sjtu.edu.cn

引用本文:李永静,陈珂,孙沉沉,等.熊果酸降低结直肠癌细胞内胆固醇含量及诱导细胞凋亡的作用及机制[J].中国中西医结合消化杂志,2023,31(4):266-273. DOI:10.3969/j.issn.1671-038X.2023.04.06.

ther confirmed that the cholesterol metabolic pathway was related to the DEPs (NES=1.76,  $P<0.001$ ). IPA showed that UA significantly activated the LXR/RXR signaling ( $Z$ -score=3.00,  $-\log_{10}(P)=9.49$ ). The verification experiment results showed that UA up-regulated the expression of LXR/RXR target proteins MYLIP, ABCG1, and apolipoprotein E (APOE). In addition, UA decreased the total cholesterol level and induced apoptosis in HCT-116 cells. Furthermore, cholesterol supplementation could antagonize UA-induced apoptosis. **Conclusion:** UA activates LXR/RXR signaling and increases the expression of target proteins MYLIP, ABCG1 and APOE, which results in the decrease of cholesterol level, inhibition of proliferation, and increase of apoptosis in colorectal cancer cells.

**Key words** colorectal cancer; ursolic acid; cholesterol metabolism; LXR/RXR signaling

结直肠癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,2020年我国结直肠癌新发病例数超过55万,肿瘤相关死亡人数超过18万<sup>[1]</sup>。结直肠癌起病隐匿,早期无典型症状,临床明确诊断者多已发展至中晚期,而中晚期结直肠癌的5年相对生存率仅为14%<sup>[2]</sup>。尽管靶向治疗、免疫治疗等新兴治疗方式不断发展,结直肠癌患者的预后仍然未得到显著改善。因此,新的治疗手段仍需进行探索。蛋白质的种类和丰度差异与肿瘤的复杂性和异质性高度相关,对蛋白质进行分析能反映细胞状态,揭示肿瘤进展机制。定量蛋白质组学能够对给定生物样本的蛋白质成分进行系统的大规模定量分析,在中医证候研究、中药药效评价及筛选等方面具有独特优势<sup>[3-4]</sup>。

熊果酸(ursolic acid, UA)是一种三萜类化合物,广泛存在于食品、药材和其他植物中<sup>[5]</sup>,被认为是一种天然的肿瘤化学预防剂,已被证实可以通过多种信号通路调控肿瘤细胞的生物学行为,在结直肠癌<sup>[6-7]</sup>、肝细胞癌<sup>[8]</sup>、乳腺癌<sup>[9]</sup>等恶性肿瘤中具有抗肿瘤效应,但具体机制尚不清楚。因此,本研究通过蛋白质组学和细胞学实验,进一步探究UA发挥抗结直肠癌效应的可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂** 胎牛血清, RPMI 1640 培养液 (Gibco, 美国), UA (同田生物, 上海), 胆固醇 (MCE, 上海), 总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量检测试剂盒 (Solarbio, 北京), CCK-8 试剂 (MCE, 上海), RIPA 细胞裂解液 (新赛美生物, 上海), BCA 蛋白定量试剂盒 (雅酶生物, 上海), TMT 标记试剂盒 (Thermo, 美国), Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡试剂盒 (联科生物, 杭州),  $\beta$ -Tubulin、三磷酸腺苷结合匣转运蛋白 G1 (ATP-binding cassette sub-family G member 1, ABCG1)、 $E_3$  泛素连接酶 MYLIP ( $E_3$  ubiquitin-protein ligase MYLIP, MYLIP)、载脂蛋白 E (apolipoprotein E, APOE) 一抗抗体 (ABclonal, 武汉), Cleaved-PARP、Bax、Bcl2、Caspase 3、Cleaved-Caspase 3 一抗抗体 (CST, 美国), HRP 辣根酶标记山羊抗兔 (CST, 美国)。

**1.1.2 仪器及设备** 细胞培养箱 (Thermo, 美国), 低温离心机 (Eppendorf, 德国), 超声裂解仪

(Qsonica, 德国), 酶标仪 (Biotek, 美国), ECL 发光显影仪 (Tanon, 上海), 流式细胞仪 (BD Accuri C6, 美国)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 人结肠癌细胞系 HCT-116 购于上海和元生物并进行 STR 鉴定。使用含有 10% 胎牛血清、1% 青霉素/链霉素的 RPMI 1640 培养液进行培养, 培养于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱。

**1.2.2 CCK-8 法检测 UA 对 HCT-116 细胞的抑制率** 将处于对数生长期的 HCT-116 细胞按照  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板, 每孔加入 100  $\mu$ L 完全培养液孵育 24 h, 更换为含有不同浓度 UA 的完全培养液, 孵育 72 h 后弃去原培养液, 每孔加入 100  $\mu$ L 含有 10% CCK-8 溶液的完全培养液, 孵育 1 h 后测 450 nm 处吸收度 ( $A_{450nm}$ )。抑制率 =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\% / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}})$ , 使用 GraphPad Prism 8.0 进行非线性拟合并计算药物 IC<sub>50</sub>、IC<sub>20</sub> 和 IC<sub>10</sub>。

**1.2.3 CCK-8 法检测细胞增殖** 将处于对数生长期的 HCT-116 细胞按照  $1 \times 10^4$  个/孔的密度接种于 96 孔板, 加入完全培养液孵育 24 h, 更换为含有 10% CCK-8 溶液的完全培养液, 孵育 1 h 后测量  $A_{450nm}$  值。检测完毕后去除培养液, PBS 漂洗 1 遍, 加入含有不同浓度 UA 的完全培养液, 分别在培养 24、48、72 h 后, 更换为含有 10% CCK-8 溶液的完全培养液并检测  $A_{450nm}$  值。

**1.2.4 蛋白质组学样本制备** 取对数生长期的 HCT-116 细胞, 以相同密度接种至细胞培养皿, 待细胞贴壁且生长至密度达到 50% 时, 更换含或不含 6.5  $\mu$ g/mL 的 UA 完全培养液, 培养 72 h。培养完成后弃去培养液, 用 PBS 漂洗两遍后冷冻保存于 -80℃ 冰箱, 等待公司取样。

**1.2.5 蛋白质组学检测及表达谱分析** 由上海吉凯基因医学科技股份有限公司提供定制化样品蛋白质提取、测序和分析服务。提取样本的总蛋白质后, 进行 SDS-PAGE 电泳、FASP 酶解、预质谱分析和数据库比对, 以电泳结果和预质谱结果作为质量控制点。通过质量控制的样本进行 TMT 肽段标记, 采用 Agilent 1260 infinity II HPLC 系统进行肽段分级, 随后使用 Easy nLC 系统进行肽段分离, 使用 Q Exactive Plus 质谱仪进行质谱分析获得原始图谱文件。使用 Proteome Discoverer 2.1

软件将 Q Exactive Plus 产生的原始图谱文件(.raw 文件)转化为.mgf 文件,通过软件内置的工具提交到 MASCOT2.6 服务器进行数据库检索。再通过 Proteome Discoverer 2.1 将 MASCOT 服务器上形成的查库文件(.dat 文件)传回软件,进行后续表达图谱分析,以  $P < 0.05$ 、与对照组相比差异倍数  $> 1.2$  为条件筛选差异蛋白。使用 R 4.2.0 进行表达谱可视化。

**1.2.6 生物信息学分析** 使用 IPA (ingenuity pathway analysis) 软件 (www.ingenuity.com) 进行经典通路分析并进行可视化。以  $P < 0.05$  进行筛选,且  $Z\text{-score} > 2$  代表该通路被显著激活, $Z\text{-score} < -2$  代表该通路被显著抑制。使用在线数据库 Metascape (<https://metascape.org/>) 进行 GO 和 KEGG 富集分析 (以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义),使用 R 4.2.0 进行数据可视化。使用 R 4.2.0 中的“clusterProfiler”包进行基于 KEGG 的 GSEA 富集分析 (以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义),并进行可视化。

**1.2.7 细胞内总蛋白提取及 BCA 蛋白质定量** 取对数生长期的 HCT-116 细胞,按照相同密度接种至 6 孔板中,待生长至细胞贴壁且密度达到 50% 时,加入含有不同浓度 UA 的完全培养液,孵育 48 h 后收取样品。处理后的细胞样品,弃去培养液,PBS 漂洗两遍,随后加入 RIPA 细胞裂解液和 1% 的蛋白酶/磷酸酶抑制剂,于冰上裂解 15 min,刮取细胞置于 EP 管中,冰上超声裂解 45 s,4℃、12 500 r/min 离心 15 min,取上清按照 BCA 定量试剂盒步骤进行蛋白质浓度测定,结束后按比例加入蛋白上样缓冲液,100℃水浴 10 min,放入 -20℃ 冰箱备用。

**1.2.8 Western blot** 蛋白质根据分子量在 4%~20% 的 SDS-PAGE 凝胶上分离,随后将蛋白质转移至 PVDF 膜上,用 5% 的脱脂牛奶室温下封闭 90 min,TBST 漂洗 3 遍后将裁剪后的 PVDF 膜与对应的一抗置于 4℃ 下孵育过夜,随之与 HRP 辣根酶标记山羊抗兔室温孵育 90 min,TBST 漂洗后进行显影。条带使用 Image J 进行灰度分析。

**1.2.9 细胞内 TC 含量检测** 取对数生长期的 HCT-116 细胞,以相同密度接种至细胞培养皿,待细胞贴壁且密度达到 50% 时,更换为含有不同浓度 UA 的完全培养液,培养 48 h 后,按照 TC 含量检测试剂盒所示步骤进行检测。

**1.2.10 流式细胞术检测细胞凋亡** 取对数生长期的 HCT-116 细胞,以相同密度接种至 6 孔板中,待细胞贴壁且密度达到 50% 时,更换为含有不同浓度 UA 及胆固醇 (10  $\mu\text{mol/mL}$ ) 的完全培养液,培养 48 h。收集培养液及贴壁细胞,按照 Annexin V-APC/7-AAD 细胞凋亡试剂盒说明书进行染色。

使用 BD Accuri C6 进行上机检测并分析。

### 1.3 统计学方法

采用 GraphPad prism 8 对数据进行统计分析。所有的计量资料均表示为  $\bar{X} \pm S$ 。多组数据比较使用一元方差分析,组内两两比较使用 Dunnett  $t$  检验;涉及多时间点重复测量的多组比较使用二元方差分析,组内两两比较使用 Dunnett  $t$  检验。所有实验均独立重复至少 3 次,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 UA 抑制 HCT-116 细胞增殖

采用不同浓度的 UA 干预 HCT-116 细胞 72 h 并计算细胞增殖抑制率,发现 UA 对结肠直肠癌细胞具有抑制增殖的作用,且抑制率随浓度升高而升高 (图 1)。通过非线性拟合,计算出 UA 在 72 h 对 HCT-116 细胞的  $IC_{50}$ 、 $IC_{20}$ 、 $IC_{10}$  分别为 7.733、5.926、5.072  $\mu\text{g/mL}$ 。为了进一步探索非毒性剂量 UA 对 HCT-116 细胞增殖的影响,最终选择 1.6  $\mu\text{g/mL}$  和 3.2  $\mu\text{g/mL}$  作为低剂量组 (UA-L 组) 和高剂量组 (UA-H 组) 进行实验。CCK-8 增殖实验结果显示,肿瘤细胞在含有不同浓度 UA 的培养液中培养 24 h 后  $A_{450\text{nm}}$  值分别为  $0.479 \pm 0.079$ 、 $0.370 \pm 0.068$ 、 $0.291 \pm 0.022$ ; 培养 48 h 后  $A_{450\text{nm}}$  值分别为  $1.002 \pm 0.139$ 、 $0.712 \pm 0.141$ 、 $0.492 \pm 0.058$ ; 培养 72 h 后  $A_{450\text{nm}}$  值分别为  $2.166 \pm 0.277$ 、 $1.479 \pm 0.220$ 、 $0.963 \pm 0.156$ 。与对照组相比,在培养 48 h、72 h 后,UA 处理组的细胞生存率明显降低 ( $P < 0.05$ ); 在培养 72 h 后,与 UA-L 相比,UA-H 组的细胞生存率进一步降低 ( $P < 0.01$ )。见图 2。

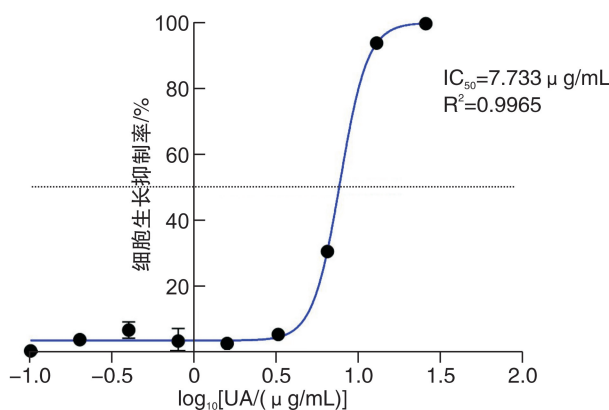


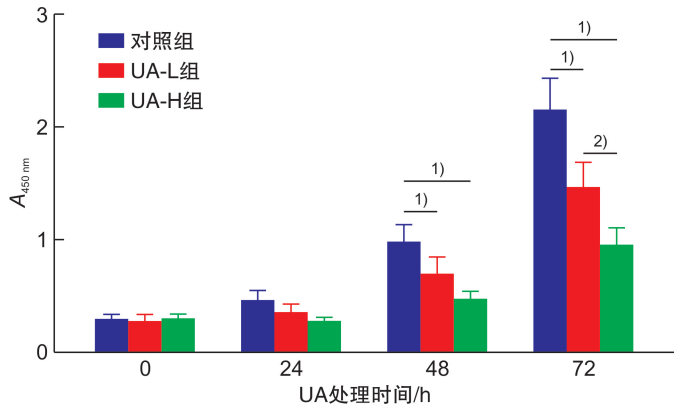
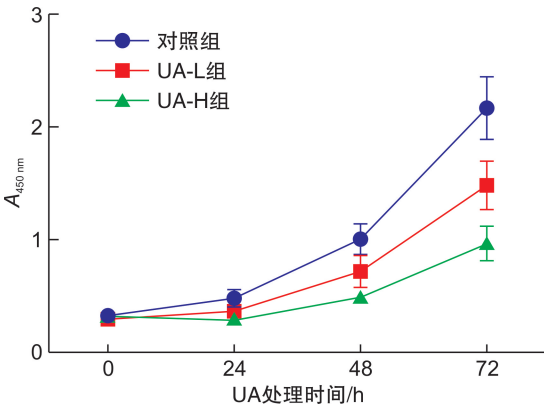
图 1 UA 处理 72 h 对 HCT-116 细胞的抑制曲线

### 2.2 UA 显著改变 HCT-116 细胞蛋白质表达谱

通过蛋白质组学测定了对照组与 UA 处理组 (6.5  $\mu\text{g/mL}$ ) 的细胞内蛋白质表达谱。与对照组相比,UA 处理组中共有 468 个差异蛋白,其中上调 397 个,下调 71 个 (图 3)。其中上调倍数最多的

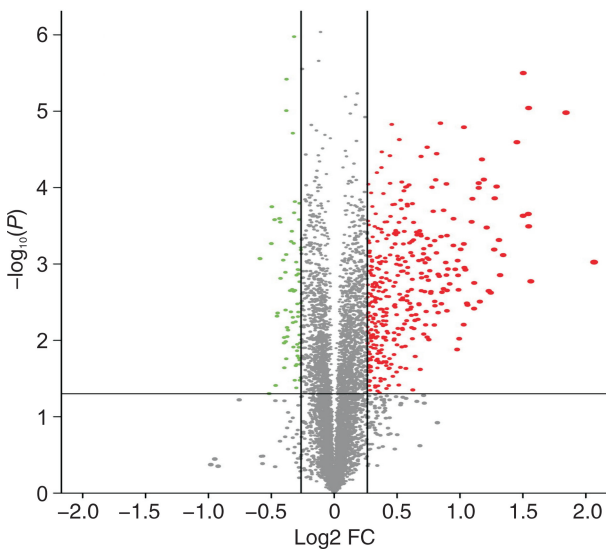
10 个蛋白分别为 CLK2、SLC35A5、VNN3、SLC38A2、RPGRI1、STC2、MB2、ABCA3、MT-DH、CFAP161, 下调倍数最多的 10 个蛋白为 SNAP29、ADIPOR2、TPM2b、KITLG、TUBAL3、PPT1、hCG\_1740677、SIAE、CPD、OTX1。对差异

蛋白做聚类热图,可见对照组与 UA 处理组分别被聚为一类,两组间聚类无交叉,组内变异小,组间差异大;同时,颜色深浅表示蛋白质在不同样本中的表达量水平,可发现对照组与 UA 处理组之间具有显著的表达谱差异(图 4)。



与对照组比较,<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与 UA-L 组比较,<sup>2)</sup> $P < 0.05$ 。

图 2 CCK-8 法检测 HCT-116 细胞在含有不同浓度 UA 的培养液中的生长曲线



以  $|FC| > 1.2, P < 0.05$  为筛选标准,红色表示蛋白表达上调,绿色表示蛋白表达下调,灰色表示蛋白在两组间无差异。

图 3 对照组和 UA 处理组蛋白的表达情况

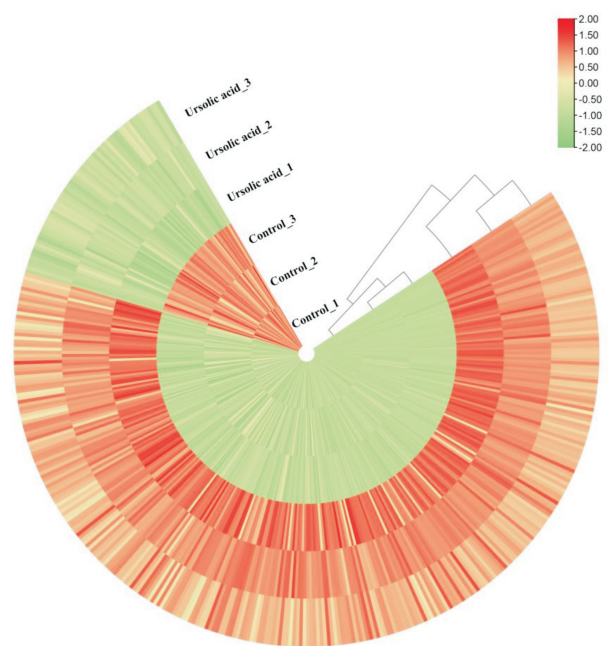


图 4 UA 处理组与对照组间差异蛋白聚类热图

### 2.3 UA 处理组与对照组差异蛋白在胆固醇代谢相关通路富集

为了进一步阐释 UA 对结直肠癌的作用机制,对 UA 组和对对照组的差异蛋白做 GO 和 KEGG 富集分析。GO 富集分析结果显示 UA 主要参与胆固醇代谢、脂质的生物合成、胆固醇的转运活性等生物过程(图 5)。KEGG 通路富集分析显示 UA 主要参与胆固醇代谢、胆固醇生物合成、p53 信号通路等(图 6)。对差异蛋白进行 GSEA 富集分析,结果显示差异蛋白在胆固醇代谢通路上显著富集

[标准化富集评分(NES) = 1.76,  $P < 0.001$ ]。见图 7。

### 2.4 LXR/RXR 信号在 UA 处理组显著激活

对 UA 组与对照组之间的差异蛋白进行基于 IPA 的生物信息学分析,发现 LXR/RXR 信号、PPAR $\alpha$ /RXR 信号、IL-6 信号等经典通路在两组之间差异有统计学意义(图 8)。其中 LXR/RXR 信号在 UA 处理组激活程度最高[Z-score = 3.00,  $-\log_{10}(P) = 9.49$ ], APOE、载脂蛋白 A1 (apolipoprotein A1, APOA1)等 LXR/RXR 信号通路相

关蛋白在 UA 处理组中上调(图 9)。

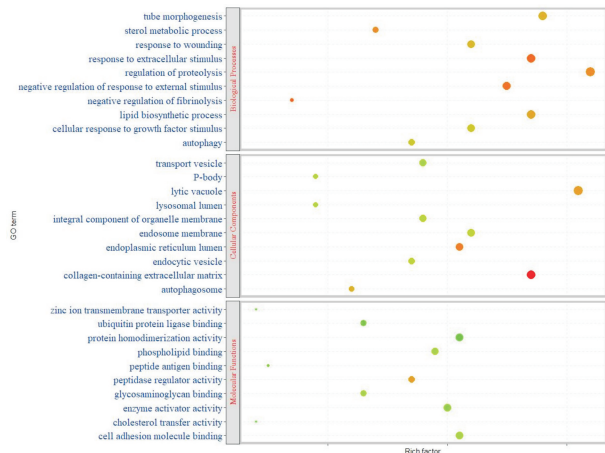


图 5 UA 处理组与对照组间差异蛋白 GO 富集分析结果 TOP10

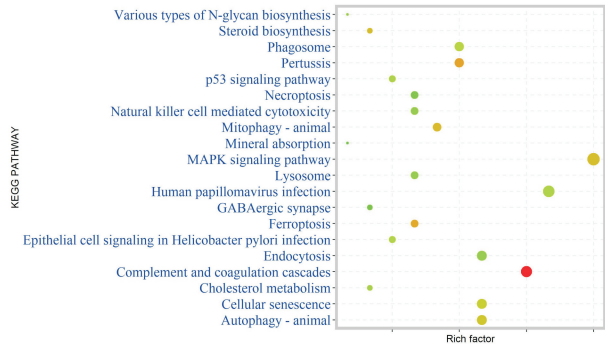


图 6 UA 处理组与对照组间差异蛋白 KEGG 富集分析结果 TOP20

### 2.5 UA 在体外激活 LXR/RXR 信号通路并降低细胞内 TC 含量

进一步对 IPA 结果进行验证,结果显示 LXR/RXR 信号的下游蛋白 ABCG1、MYLIP、APOE 的表达量随着 UA 给药浓度的增加而增加(图 10)。ABCG1<sup>[10]</sup> 和 APOE<sup>[11]</sup> 可介导细胞内胆固醇的外排;MYLIP 可触发低密度脂蛋白受体(Low-density lipoprotein receptor, LDLR)的泛素化降解,降低胆固醇摄取<sup>[12]</sup>。UA 处理 48 h 后,对照组、UA-L 组、UA-H 组细胞内 TC 含量分别为(0.595 ± 0.019) μmol/mL、(0.581 ± 0.024) μmol/mL、(0.406 ± 0.024) μmol/mL。见图 11。

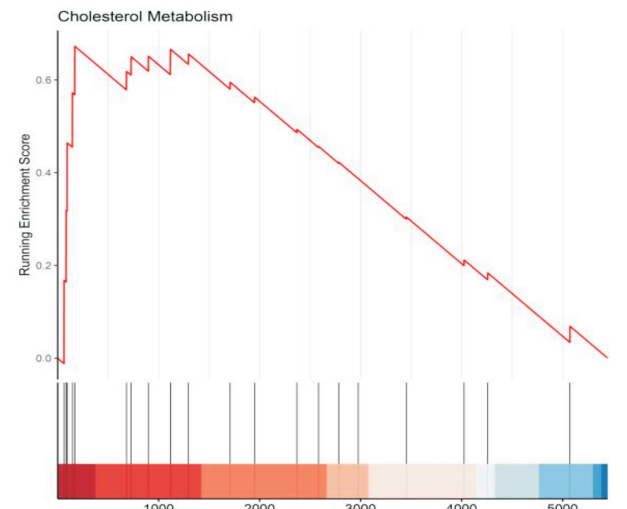
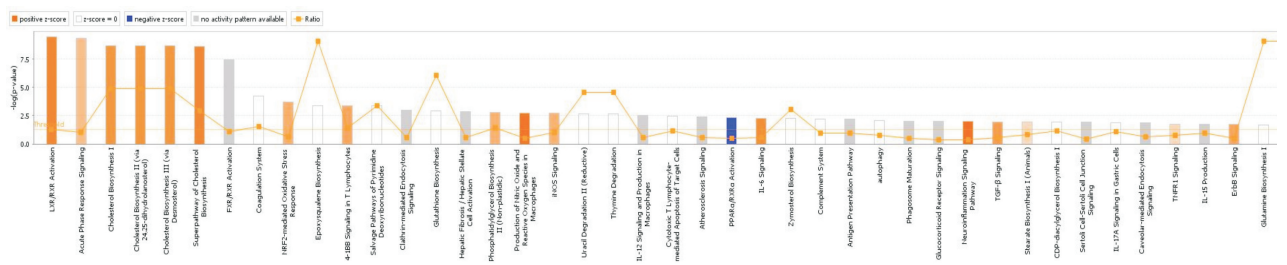


图 7 UA 处理组与对照组间差异蛋白 GSEA 富集分析结果



橙色表示该通路激活,蓝色表示该通路抑制,颜色深浅代表被激活/抑制的程度。Ratio 表示在此信号通路中差异基因数与该通路中包含的所有基因数的比值。

图 8 基于 IPA 的经典通路分析

### 2.6 UA 诱导 HCT-116 细胞凋亡

细胞内胆固醇含量对肿瘤细胞的生存具有很大影响。胆固醇能够在体外降低肿瘤细胞凋亡率<sup>[13]</sup>,而胆固醇缺乏则诱导肿瘤细胞凋亡增加<sup>[14-15]</sup>。如前所述,UA 能够降低细胞内 TC 含量,因此推测 UA 能够通过降低细胞内 TC 含量诱导结肠癌细胞凋亡。为了验证这一假设,我们使用流式细胞术检测 HCT-116 细胞的凋亡情况。结

果显示,UA 能够诱导 HCT-116 细胞凋亡,增加细胞凋亡率;胆固醇回补能够拮抗 UA 所诱导的细胞凋亡(图 12、13)。与流式细胞术结果一致,Western blot 显示,与对照组相比,促凋亡蛋白 Bax 在 UA 处理组上调,抗凋亡蛋白 Bcl2 在 UA 处理组下调,凋亡效应蛋白 Cleaved-PARP、Caspase 3、Cleaved-Caspase 3 在 UA 处理组上调(图 14)。

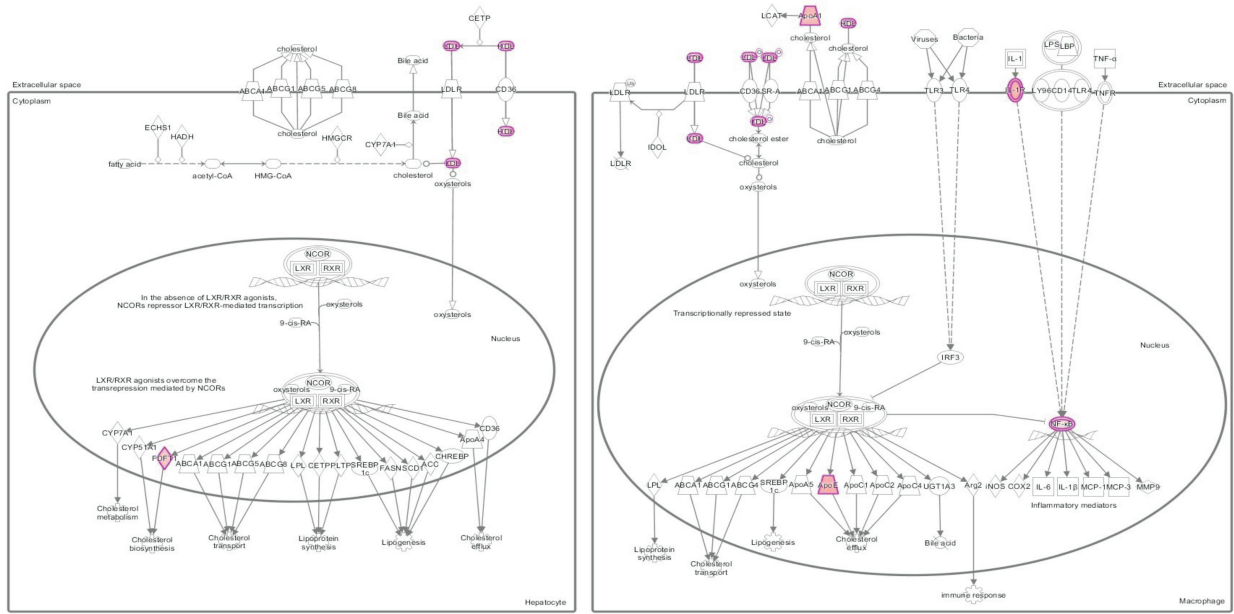
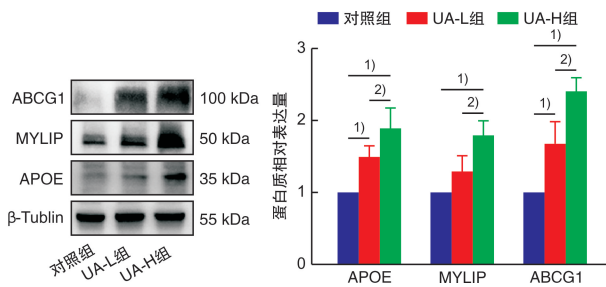
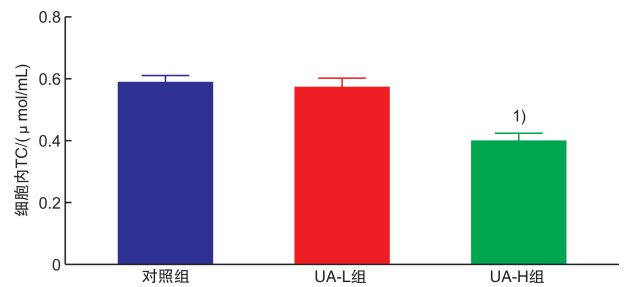


图 9 LXR/RXR 信号通路分子在本次蛋白组测序中的表达情况



与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 UA-L 组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 10 各组蛋白表达情况



与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 11 各组 HCT-116 细胞内 TC 浓度

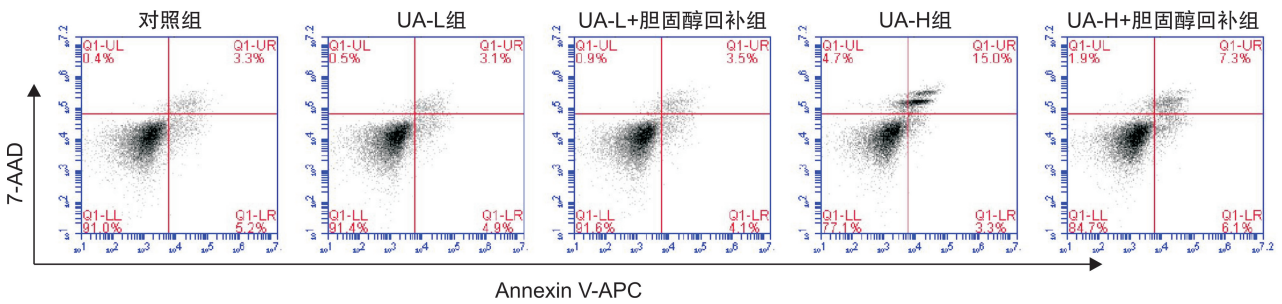
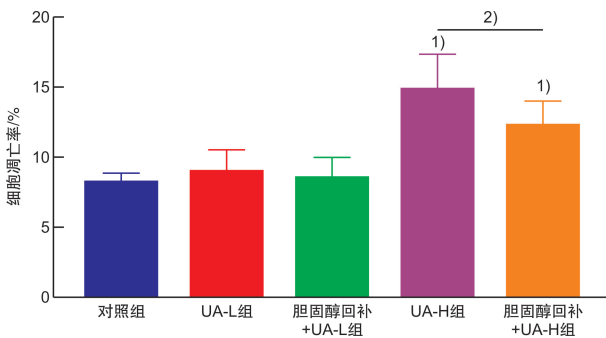
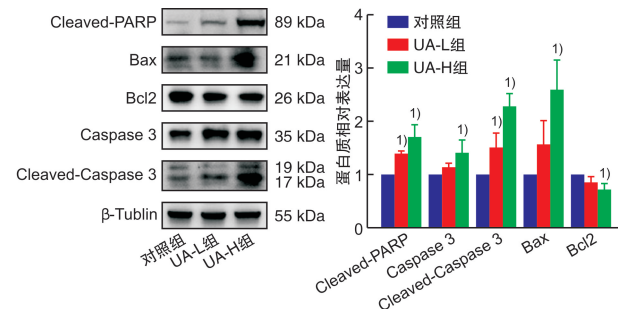


图 12 Annexin V-APC/7AAD 法检测 UA 及胆固醇回补对 HCT-116 细胞凋亡的影响



与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与 UA-H 组比较, <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 13 各组细胞凋亡率



与对照组比较, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

图 14 各组凋亡相关蛋白表达情况

### 3 讨论

中医药干预是我国肿瘤综合治疗的特色优势之一,具有增效减毒、提高患者生存质量的作用<sup>[16]</sup>。UA 是白花蛇舌草、半枝莲等中药的有效成分,是重要的抗肿瘤物质<sup>[17]</sup>。本研究发现 UA 在一定浓度范围内可抑制结直肠癌细胞增殖,并在非毒性浓度下诱导肿瘤细胞凋亡,提示 UA 具有治疗结直肠癌的潜力,探究 UA 抗结直肠癌作用的生物学机制,有助于进一步丰富结直肠癌的相关研究。

肿瘤细胞以代谢重编程作为一大特征,其中,胆固醇代谢紊乱在肿瘤进程中的作用被日益重视。肿瘤细胞内胆固醇合成、摄取活跃,代谢产物异常富集,导致肿瘤细胞存活能力增强、肿瘤进展迅速<sup>[18]</sup>。UA 被认为是一种有潜力的胆固醇代谢调节物,可在体内外通过调节胆固醇代谢相关酶活性和 AMPK、PPAR $\alpha$  信号通路等途径降低血浆胆固醇含量<sup>[19-21]</sup>。除了应用于心脑血管疾病的防治,UA 还被证实能够降低肝癌细胞内 TC 含量,发挥抗癌作用<sup>[22-23]</sup>。但 UA 对结直肠癌胆固醇代谢的影响尚不清楚。本研究通过蛋白质组学技术,检测了 UA 处理组和对照组的蛋白质表达谱,共筛选出 468 个差异蛋白质。GO 富集分析显示差异蛋白主要参与胆固醇代谢、胆固醇转运等生物过程,KEGG 富集分析显示差异蛋白在胆固醇代谢通路上高度富集,GSEA 分析也显示参与胆固醇代谢的蛋白质的表达量在两组之间差异有统计学意义。与之一致,与对照组相比,UA 处理后 HCT-116 细胞内的 TC 含量显著降低。提示 UA 可以调节结直肠癌的胆固醇代谢。

LXR 作为胆固醇稳态的调节器,是 LXR/RXR 信号通路的关键分子。LXR/RXR 信号通路激活时,胆固醇转运蛋白(如 ABCG1、ABCA1)表达上调以增加细胞内胆固醇的排出;同时上调 LDLR 的降解剂 MYLIP,降低肿瘤细胞表面 LDLR 数量,减少胆固醇的摄取,以减轻细胞内胆固醇及其代谢产物堆积<sup>[24]</sup>。本研究基于 IPA 的生物信息学分析显示 UA 可能在结直肠癌中激活 LXR/RXR 信号,Western blot 显示 UA 处理能够显著上调 LXR/RXR 信号通路靶基因 MYLIP、ABCG1、APOE 的表达,表明 UA 可在结直肠癌中激活 LXR/RXR 信号,降低细胞内胆固醇含量,调节胆固醇代谢。

胆固醇的代谢重编程被认为与肿瘤预后不良相关,靶向胆固醇代谢可以延缓肿瘤进展<sup>[25-26]</sup>。LXR/RXR 信号是影响胆固醇代谢的重要通路,LXR 的激动剂主要通过抑制细胞增殖和促进细胞凋亡影响肿瘤进展<sup>[24]</sup>,还可以通过诱导 APOE 的表达,增加 T 细胞活化,重塑免疫景观<sup>[27]</sup>。本研究证实了 UA 能够激活 LXR/RXR 信号,诱导靶基因的表达,调节胆固醇代谢。同时 UA 能在非毒性浓度下抑制细胞增殖并诱导细胞凋亡,与 LXR/RXR

信号激活剂的抗肿瘤效应具有一致性。胆固醇在体外通过增加 Bax/Bcl2 比值,上调凋亡效应蛋白 Cleaved-Caspase3、Cleaved-Caspase9,诱导细胞凋亡<sup>[28-29]</sup>。本研究显示 UA 处理组 Bax、Caspase3 表达上调、Bcl2 表达下调,凋亡效应蛋白 Cleaved-PARP、Cleaved-Caspase 3 上调,细胞凋亡率增加,而胆固醇回补能部分抑制 UA 所诱导的细胞凋亡,提示 UA 可能是一种天然的 LXR/RXR 信号激活剂,能在结直肠癌中通过调节胆固醇代谢发挥抗肿瘤效应。此外,Western blot 显示 UA 能够上调 HCT-116 中 APOE 的表达水平,但是否能通过 APOE 诱导 T 细胞的活化需要进一步的实验证明。

### 4 结论

综上所述,UA 在结直肠癌中激活 LXR/RXR 信号并诱导靶蛋白 MYLIP 和 ABCG1 表达上调,降低细胞内 TC 含量,抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡,胆固醇回补能够部分拮抗 UA 所诱导的凋亡。本研究揭示了 UA 通过 LXR/RXR 信号通路靶向胆固醇代谢,发挥抗肿瘤作用的新机制,为结直肠癌的临床防治提供了一定的理论依据。UA 对胆固醇代谢的调控机制仍值得进一步探索。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Cao W, Chen HD, Yu YW, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2021, 134(7): 783-791.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Goding Sauer A, et al. Colorectal cancer statistics, 2020 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(3): 145-164.
- [3] 柴仲秋,戴广法,周冰. 基于定量蛋白质组学的结直肠癌肿瘤脾气虚证患者差异表达蛋白研究 [J]. *医学信息*, 2021, 34(18): 1-5.
- [4] 张喆,李依洁,魏玮,等. 温肾健脾方对脾肾阳虚证腹泻型肠易激综合征大鼠模型肠组织蛋白组学的影响 [J]. *中国临床保健杂志*, 2021, 24(4): 507-511.
- [5] Liu J. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid [J]. *J Ethnopharmacol*, 1995, 49(2): 57-68.
- [6] Zheng JL, Wang SS, Shen KP, et al. Ursolic acid induces apoptosis and anoikis in colorectal carcinoma RKO cells [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 52.
- [7] 何曼,张梦,孙强,等. 熊果酸通过 hedgehog 信号通路调控结直肠癌细胞 HCT116 自噬的机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5): 1217-1223.
- [8] Gayathri R, Priya DK, Gunassekaran GR, et al. Ursolic acid attenuates oxidative stress-mediated hepatocellular carcinoma induction by diethylnitrosamine in male Wistar rats [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2009, 10(5): 933-938.
- [9] Mandal S, Gamit N, Varier L, et al. Inhibition of breast cancer stem-like cells by a triterpenoid, ursolic acid, via activation of Wnt antagonist, sFRP4 and sup-

- pression of miRNA-499a-5p[J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118854.
- [10] Klucken J, Buchler C, Orso E, et al. ABCG1 (ABC8), the human homolog of the *Drosophila* white gene, is a regulator of macrophage cholesterol and phospholipid transport[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2): 817-822.
- [11] Getz GS, Reardon CA. Apoprotein E and reverse cholesterol transport[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(11): 3479.
- [12] Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, et al. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor [J]. *Science*, 2009, 325(5936):100-104.
- [13] Wang Y, Liu C, Hu L. Cholesterol regulates cell proliferation and apoptosis of colorectal cancer by modulating miR-33a-PIM3 pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 511(3):685-692.
- [14] Gao SS, Soares F, Wang SY, et al. CRISPR screens identify cholesterol biosynthesis as a therapeutic target on stemness and drug resistance of colon cancer[J]. *Oncogene*, 2021, 40(48):6601-6613.
- [15] Riscal R, Bull CJ, Mesaros C, et al. Cholesterol auxotrophy as a targetable vulnerability in clear cell renal cell carcinoma[J]. *Cancer Discov*, 2021, 11(12):3106-3125.
- [16] 赵轩竹, 何国平, 梅汉玮, 等. 中医药联合化疗治疗大肠癌的临床进展[J]. *现代中西医结合杂志*, 2022, 31(14):2036-2039.
- [17] 田春风, 郭宇帆, 商佳琪, 等. 熊果酸的生物活性研究进展[J]. *中国食品卫生杂志*, 2022, 34(6):1361-1365.
- [18] Huang BL, Song BL, Xu CQ. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. *Nat Metab*, 2020, 2(2):132-141.
- [19] Ma XY, Bai YP, Liu KX, et al. Ursolic acid inhibits the cholesterol biosynthesis and alleviates high fat diet-induced hypercholesterolemia via irreversible inhibition of HMGCS1 in vivo[J]. *Phytomedicine*, 2022, 103:154233.
- [20] Cheng J, Liu Y, Liu YJ, et al. Ursolic acid alleviates lipid accumulation by activating the AMPK signaling pathway in vivo and in vitro[J]. *J Food Sci*, 2020, 85(11):3998-4008.
- [21] Jia YY, Kim SY, Kim JY, et al. Ursolic acid improves lipid and glucose metabolism in high-fat-fed C57BL/6J mice by activating peroxisome proliferator-activated receptor alpha and hepatic autophagy[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2015, 59(2):344-354.
- [22] 梁奎英, 初霞. 熊果酸对肝细胞胆固醇代谢的影响[J]. *医药导报*, 2017, 36(1):9-12.
- [23] Kim GH, Kan SY, Kang H, et al. Ursolic acid suppresses cholesterol biosynthesis and exerts anti-cancer effects in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(19):4767.
- [24] Lin CY, Gustafsson JA. Targeting liver X receptors in cancer therapeutics[J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(4):216-224.
- [25] Liu DB, Wong CC, Fu L, et al. Squalene epoxidase drives NAFLD-induced hepatocellular carcinoma and is a pharmaceutical target[J]. *Sci Transl Med*, 2018, 10(437):eaap9840.
- [26] Cardwell CR, Hicks BM, Hughes C, et al. Statin use after colorectal cancer diagnosis and survival: a population-based cohort study[J]. *J Clin Oncol*, 2014, 32(28):3177-3183.
- [27] Tavazoie MF, Pollack I, Tanqueco R, et al. LXR/ApoE activation restricts innate immune suppression in cancer[J]. *Cell*, 2018, 172(4):825-840. e18.
- [28] 张仁文. 胆固醇诱导 HepG2 细胞凋亡的研究[J]. *广东化工*, 2020, 47(17):52-53.
- [29] 郭冰冰. 外源性胆固醇调控 Vigilin/ER $\beta$  影响 KGN 细胞凋亡的机制研究[D]. 衡阳:南华大学, 2019.

(收稿日期:2022-12-16)

(上接第 265 页)

- [16] 李明松, 朱维铭, 陈白莉. 溃疡性结肠炎[M]. 郑州:高等教育出版社, 2015:87-92.
- [17] 沈洪. 溃疡性结肠炎[M]. 南京:东南大学出版社, 2012:134-137.
- [18] 中国人民解放军总后勤部卫生部. 临床疾病诊断依据治愈好转标准[M]. 北京:人民军医出版社, 2007:125-126.
- [19] Shivashankar R, Tremaine WJ, Harmsen WS, et al. Incidence and Prevalence of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis in Olmsted County, Minnesota From 1970 Through 2010[J]. *Clin Gastroenterol Hepatol*, 2017, 15(6):857-863.
- [20] 祁佳, 唐跃年, 张宇锋, 等. 真人养脏汤治疗溃疡性结肠炎的系统评价[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(1):16-19.
- [21] 刘炳林. 药物临床试验中疗效指标的选择[J]. *中国新药杂志*, 2017, 26(18):2113-2120.
- [22] 曾于珍, 陈世耀. 临床研究结局指标选择与样本量估计[J]. *协和医学杂志*, 2018, 9(1):87-92.
- [23] 中国医师协会中西医结合医师分会, 中国中西医结合学会循证医学专业委员会. 中医药与中西医结合临床研究方法指南[J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(8):901-932.
- [24] 郑颂华, 吴泰相, 商洪才, 等. 中药复方临床随机对照试验报告规范 2017——CONSORT 声明的扩展、说明与详述[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2019, 17(1):1-14.
- [25] 张明妍, 张俊华, 张伯礼. 2015 年中药治疗稳定性心绞痛临床试验结局指标文献研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2018, 38(2):191-197.
- [26] 孙亚男, 何丽云, 雒琳, 等. 中医药治疗慢性乙型肝炎临床试验的核心结局指标集研究[J]. *中华中医药杂志*, 2020, 35(9):4684-4688.

(收稿日期:2023-02-04)