

拉罗替尼通过 AMPK/mTOR 信号通路调控结肠癌细胞自噬和抑制增殖与迁移的实验研究

柏希慧¹, 刘诗雨², 孙媛媛¹ (1. 西安交通大学第一附属医院药学部, 西安 710061;
2. 西安市阎良区人民医院, 西安 710089)

摘要: **目的** 探讨拉罗替尼 (Larotrectinib, Lar) 对结肠癌细胞自噬、增殖和迁移的影响及其分子机制。**方法** 用不同浓度的 Lar (0, 100, 200, 400, 800, 1 600 和 3 200 nmol/L) 作用于人结肠癌细胞 COLO 205, HCT 116 及人结肠黏膜上皮细胞 CP-H040。采用 CCK-8 比色法检测 Lar 对 COLO 205, HCT 116 和 CP-H040 细胞存活率的影响。将 COLO 205 和 HCT 116 细胞随机分为对照组 (Con 组)、Lar 组、氯喹组 (hydroxychloroquine, CQ 组) 和 Lar+CQ 组, 采用 Transwell 实验检测细胞侵袭能力; 划痕实验检测细胞迁移能力; Ki67 免疫荧光染色检测细胞增殖能力; 实时荧光定量聚合酶链式反应检测 Lar 对结肠癌细胞上皮-间充质转化相关标志物 mRNA 表达的影响; 腺病毒转染实验和透射电子显微镜检测细胞自噬情况; 蛋白免疫印迹法检测腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (adenosine monophosphate-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin, AMPK/mTOR) 通路相关蛋白的表达。**结果** Lar 可显著抑制 COLO 205 和 HCT 116 细胞的存活率, 具有浓度依赖性 ($F=355.181, 403.758$, 均 $P<0.001$)。与 Con 组相比, Lar 组结肠癌细胞侵袭细胞数、Ki67 荧光强度和划痕愈合率均明显降低, E-钙黏附蛋白 (E-cadherin) mRNA 表达水平升高, 波形纤维蛋白 (Vimentin) 和基质金属蛋白酶 2 (MMP2) mRNA 表达降低, 自噬小体和自噬流形成增多, 微管相关蛋白轻链 3 (LC3) II/I 和 p-AMPK/AMPK 比值升高, p62 蛋白表达和 p-mTOR/mTOR 比值降低, 差异具有统计学意义 ($t=4.399 \sim 54.214$, 均 $P<0.05$)。与 Lar 组相比, Lar+CQ 组细胞自噬小体形成减少, p62 蛋白表达升高, 差异具有统计学意义 ($t=2.755 \sim 24.784$, 均 $P<0.05$)。**结论** Lar 能够抑制结肠癌细胞增殖和迁移, 其潜在机制与激活 AMPK/mTOR 信号通路从而诱发细胞内自噬有关。

关键词: 结肠癌; 拉罗替尼; 腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白通路; 自噬

中图分类号: R735.35; R730.43 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414 (2024) 06-029-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2024.06.005

Experimental Study of Larotrectinib Regulating Autophagy and Inhibiting Proliferation and Migration of Colon Cancer Cells Through AMPK/mTOR Signaling Pathway

BAI Xihui¹, LIU Shiyu², SUN Yuanyuan¹ (1. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 2. People's Hospital of Yanliang District, Xi'an 710089, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of Larotrectinib (Lar) on autophagy, proliferation and migration of colon cancer cells and its molecular mechanism. **Methods** Human colon cancer cell lines COLO 205, HCT 116 and human colonic epithelial cell line CP-H040 were treated with different concentrations of Lar (0, 100, 200, 400, 800, 1600 and 3 200 nmol/L). CCK-8 assay was used to detect the cell viability of COLO 205, HCT 116 and CP-H040 cells. COLO 205 and HCT 116 cells were randomly divided into control group (Con group), Lar group, Chloroquine group (CQ group) and Lar+CQ group. Cell invasion was detected by Transwell assay. Scratch test was used to detect cell migration ability. Ki67 immunofluorescence staining was used to detect cell proliferation. Real-time quantitative polymerase chain reaction was used to detect the mRNA expression of epithelial-mesenchymal transition related markers in colon cancer cells. Autophagy was detected by adenovirus transfection experiment and transmission electron microscopy. Western blot was used to detect the expression of adenosine monophosphate-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin (AMPK/mTOR) pathway related proteins. **Results** Lar significantly inhibited the viability of COLO 205 and HCT 116 cells in a concentration-dependent manner ($F=355.181, 403.758$, all $P<0.001$). Compared with the Con group, the number of invasive cells, Ki67 fluorescence intensity and scratch healing rate of colon cancer cells in the Lar group were decreased, the expression of E-cadherin mRNA was increased, the expressions of Vimentin and MMP2 mRNA

基金项目: 陕西省科学技术研究发展计划项目 (2020JM4132)。

作者简介: 柏希慧 (1991-), 女, 硕士研究生, 初级药师, 研究方向: 临床药理学, E-mail: baixihui5464@126.com。

通讯作者: 孙媛媛 (1988-), 女, 本科, 主管药师, 研究方向: 临床药理学, E-mail: 348556492@qq.com。

were decreased, the formation of autophagosomes and autophagic flow, the ratio of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) II/I and p-AMPK/AMPK were increased, and the expression of p62 protein and p-mTOR /mTOR ratio were decreased, with significant differences ($t=4.399 \sim 54.214$, all $P<0.05$). Compared with the Lar group, the formation of autophagosome was decreased and the expression of p62 protein was increased in the Lar+CQ group, and the difference was statistically significant ($t=2.755 \sim 24.784$, all $P<0.05$). **Conclusion** Lar can inhibit the proliferation and migration of colon cancer cells, and the underlying mechanism is related to activation of the AMPK/mTOR signaling pathway and thus induces autophagy.

Keywords: colon cancer; larotrectinib; AMPK/mTOR pathway; autophagy

结肠癌 (colon cancer) 是胃肠道系统最常见的恶性肿瘤, 其发病率和病死率逐年上升, 严重威胁患者生命健康^[1]。化疗联合结肠癌根治术是治疗结肠癌的主要手段, 但对提高患者术后生存率的效果并不理想, 故寻找新的辅助治疗药物迫在眉睫。随着人类基因组计划的完成和基因测序技术的发展, 癌症治疗已进入精准医疗时代, 原肌球蛋白受体激酶 (tropomyosin receptor kinase, TRK) 抑制剂是精准治疗药物的重要代表之一^[2-3]。研究显示, TRK 家族是包括结肠癌在内的多种癌症的主要致癌驱动基因, TRK 融合过表达后, 触发下游系列级联信号转导, 通过影响自噬相关信号通路, 促进癌症恶性进展^[4-5]。拉罗替尼 (Larotrectinib, Lar) 作为一种高选择性的强效 TRK 蛋白小分子抑制剂, 已被批准应用于 TRK 融合阳性癌症的临床治疗^[6]。但目前国内外尚无关于 Lar 对结肠癌的作用研究。鉴于此, 本研究拟通过 Lar 干预结肠癌细胞观察其对自噬的影响, 旨在为结肠癌治疗提供新依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象 人结肠癌 COLO 205 和 HCT 116 细胞 (中国科学院上海细胞生物研究所细胞库); 人结肠黏膜上皮 CP-H040 细胞 (武汉普诺赛生命科技有限公司)。所有细胞均接种于含 10g/dl 胎牛血清、100 μ g/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养液, 置于 37℃, 5ml/dl CO₂ 的加湿恒温细胞培养箱中培养。

1.2 仪器与试剂 拉罗替尼 (美国 Stellect 公司, 批号: S5860); 羟氯喹 (hydroxychloroquine, CQ) (美国 Sigma 公司, 批号: C6628); 胎牛血清和 RPMI 1640 培养液 (美国 Gibco 公司); CCK-8 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); 人源腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK), 磷酸化 (phosphorylated, p) - AMPK, 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR), p - mTOR, 微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3-I (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-I, LC3-I), LC3-II, 泛素结合蛋白 p62 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 单克隆抗体 (美国 CST

公司); 人源 Ki67 抗体 (美国 Abcam 公司); GFP - mCherry - LC3 或 GFP - LC3 腺病毒 (上海吉凯生物技术有限公司); Cytation3 多功能酶标仪 (美国 BioTek 公司); Chemi Doc XRS 化学发光凝胶成像分析系统 (美国 Bio-Rad 公司); NIB 910 光学显微镜 (深圳博士达器械设备有限公司); HBS-ScanX 酶标仪 (南京德铁生物科技有限公司); OLS5100 激光共聚焦显微镜分析 (日本 Olympus 公司); JEM-1400 透射电子显微镜 (日本电子株式会社)。

1.3 方法

1.3.1 CCK-8 法测定细胞存活率: 将 COLO205, HCT116, CP-H040 细胞以 3×10^3 个/孔的密度接种至 96 孔板。分别与 0, 100, 200, 400, 800, 1 600 和 3 200 nmol/L 的 Lar 共培养 24 h 后, 每孔加入含有 CCK-8 溶液 10 μ l CCK-8, 37℃ 孵育 1 h 后测定 450 nm 波长处的吸光度值 (A 值)。细胞存活率计算公式如下: 存活率 (%) = ($A_{\text{处理组}}/A_{\text{未处理组}}$) $\times 100\%$ 。

1.3.2 细胞分组及处理: 取对数生长期的 COLO 205 或 HCT 116 细胞 (1×10^5 个/孔) 接种于 6 孔板, 待细胞融合度达 60% 左右时, 随机分为对照组 (Con 组) 和 Lar 组。Lar 组每孔加入 300 nmol/L 的 Lar, Con 组每孔加入等量磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS), 每组设置 3 个复孔, 处理 24 h 后进行后续实验。

1.3.3 Transwell 实验检测细胞侵袭能力: 将 COLO205 或 HCT116 细胞 (1.5×10^4 个/200 μ l 无血清培养液细胞悬液) 添加到含侵袭测定 Matrigel 浸润的 Transwell 上部腔室中, 然后将 500 μ l 含 10 g/dl 血清的培养液添加到下部腔室中。24 h 后用 4 g/dl 多聚甲醛固定穿膜细胞, 并用 0.1 g/dl 结晶紫染色。在光学显微镜下观察并计数穿膜细胞数。

1.3.4 免疫荧光检测细胞增殖抗原 Ki67 表达: 将 COLO205, HCT116 (1×10^5 个/孔) 接种于 6 孔板。按照 1.3.2 所述处理 24 h 后, 室温下用 4 g/dl 多聚甲醛固定, 0.2 g/dl TritonX-100 打孔, 5 g/dl 牛血清蛋白封闭, 再加入 Ki67 抗体 (1:50), 4℃ 孵育过夜。次日在室温下用羊抗兔 IgG/FITC 二抗避光孵育 2 h, PBS 清洗, 加入 200 μ l 含 4, 6-联脒 2-

苯基吡啶 (DAPI) 的抗荧光淬灭封片液, 共聚焦显微镜下观察并拍照, Image J 软件分析计算平均荧光强度, 计算公式如下: 平均荧光强度 (%) = (该区域 Ki67 荧光强度综合 / 该区域面积) × 100%。

1.3.5 划痕实验检测细胞迁移能力: 将 COLO205 或 HCT116 (1×10^5 个 / 孔) 接种于 6 孔板, 待细胞铺满孔板底部 95% 后, 用 200 μ l 无菌移液管尖端在单层细胞上划出均匀直线划痕。用无菌 PBS 去除细胞碎片并加入 2 ml 完全培养液, 在导致显微镜下拍照并记为 0 h。继续培养 24 h 后, 于同一位置观察并记录, 记录为 24 h 结果。划痕愈合率 (%) = (0 h 划痕宽度 - 24 h 划痕宽度) / 0 h 划痕宽度 × 100%。

1.3.6 qRT-PCR 检测上皮-间充质转化 (EMT) 相关标志物 mRNA 相对表达: 按照 TRIzol 试剂说明书提取结肠癌细胞 COLO205 或 HCT116 总 RNA, 用 PrimeScript RT 逆转录试剂盒将 1 μ g RNA 逆转录为 cDNA, 转录条件: 65℃ 5 min (RNA 变性), 25℃ 5 min (退火), 42℃ 30 min (反转录工作温度), 85℃ 5 min (逆转录酶失活)。配置 20 μ l PCR 反应体系, 进行 RT-PCR 扩增。PCR 扩增程序为 94℃ 5 min (预变性), 94℃ 40 s (变性), 40℃ 40 s (退火), 72℃ 1 min (延伸), 共 40 个循环。引物由上海生工生物科技有限公司设计合成, 序列如下: E-钙黏附蛋白 (E-cadherin): F: 5'-GGGGTTAAGCACAACAGCAA-3', R: 5'-CAAAATCCAAGCCCGTGGTG-3'; 波形纤维蛋白 (Vimentin): F: 5'-GCTTCAGAGAGAGGAAGCCG-3', R: 5'-AAGGTCAA GACGTGCCAGAG-3'; 基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2): F: 5'-GGCGGT CACAGCTACTTCTT-3', R: 5'-GAGGGTTGGTGGG ATTGGAG-3'; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH): F: 5'-GCGC CGTCTAGAAAACCTGCC-3', R: 5'-ACCACCTGG TGCTCAGTGTA-3'。以 GAPDH 为参照, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析各目的 mRNA 的相对水平, $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参}}$ 。

1.3.7 腺病毒转染实验检测自噬体及自噬溶酶体: 将结肠癌细胞 COLO205 和 HCT116 (1×10^5 个 / 孔) 接种到 6 孔板中, 其中放置盖玻片, 并且将所述板在 37℃ 孵育 24 h。利用 Lipofectamine 2000 试剂盒将 GFP-mCherry-LC3 或 GFP-LC3 腺病毒载体转染细胞 24 h。之后按照 1.3.2 所述处理 24 h, 4 g/dl 多聚甲醛固定, 并使用激光共聚焦显微镜拍照记录, Image J 软件分析计算 GFP+/mCherry+ (黄色, 自噬体) 或 GFP-/mCherry+ (红色, 自噬溶酶体) 的平均荧光强度, 计算公式如下: 平均荧光强度 (%) = (该

区域 Ki67 荧光强度综合 / 该区域面积) × 100%, 并以红色荧光强度与黄色荧光强度的比值来确定自噬通量。

1.3.8 透射电子显微镜观察细胞自噬情况: 将结肠癌细胞 COLO205 和 HCT116 (1×10^5 个 / 孔) 接种到 6 孔板中, 当细胞达 80%~90% 融合度时, 随机分为 Con 组、Lar 组、CQ 组和 Lar+CQ 组, Lar 组每孔加入 300 nmol/L 的 Lar, CQ 组每孔加入 20 μ mol/L 的 CQ, Lar+CQ 组每孔加入 300 nmol/L 的 Lar 和 20 μ mol/L 的 CQ 处理。24 h 后, 3 g/dl 戊二醛固定 2 h, PBS 冲洗后加入 1g/dl 锇酸固定 1 h。丙酮梯度脱水, 环氧树脂包埋细胞, 制作超薄切片并用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, 透射电子显微镜观察结肠癌细胞超微结构, 随机选取 5 个视野计数自噬小体数量。

1.3.9 Western blot 检测自噬和 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达: 收集各组待测细胞, 加入适量含有蛋白酶抑制剂的蛋白裂解缓冲液, 离心后提取细胞内总蛋白。使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度, 所有样品 (50 μ g / 泳道) 均进行 10g/dl SDS-PAGE 电泳。此后, 将蛋白转移到聚偏二氟乙烯膜上, 5g/dl 脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入 AMPK/mTOR 通路相关蛋白 p-AMPK, AMPK, p-mTOR, mTOR; 自噬相关蛋白 LC3II/I, p62; 内参 GAPDH 的抗体, 4℃ 孵育过夜。次日, TBST 洗膜三次, 室温下用二抗孵育 1 h, 电化学发光法显影。用 Image J 软件采集条带灰度值, 用目的条带灰度值与内参条带灰度值的比值作为相对表达量。

1.4 统计学分析 使用 GraphPad Prism 9.0 软件分析数据。本研究中所有实验均重复三次实验。呈正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用独立样本 *t* 检验, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 两两组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 Lar 对结肠癌细胞及正常结肠黏膜上皮细胞存活率的影响 见表 1。CCK-8 结果显示, 不同浓度 Lar 处理的 CP-H040 细胞存活率比较, 差异无统计学意义 (P>0.05)。不同浓度 Lar 处理的 COLO 205 和 HCT 116 细胞存活率受到抑制, 且具有浓度依赖性, 差异具有统计学意义 (均 P<0.001)。本研究 Lar 对 COLO 205 和 HCT 116 细胞的半数抑制率 IC50 值分别为 356 nmol/L 和 305 nmol/L, 因此, 后续实验使用对正常细胞无影响且仅对癌细胞具有毒性作用的 300 nmol/L 的 Lar。

表 1 不同浓度 Lar 处理后结肠癌细胞及正常结肠粘膜上皮细胞存活率比较 [$n=3$, ($\bar{x} \pm s$) %]

细胞	Lar 浓度 (nmol/L)							F 值	P 值
	0	100	200	400	800	1 600	3 200		
COLO 205	100 ± 1.23	91.32 ± 3.21	70.23 ± 4.56	36.87 ± 1.23	19.89 ± 1.12	15.34 ± 1.34	7.87 ± 0.98	355.181	<0.001
HCT 116	100 ± 5.76	78.34 ± 1.98	58.34 ± 8.98	28.34 ± 5.78	24.31 ± 1.21	11.65 ± 1.56	5.87 ± 1.45	403.758	<0.001
CP-H040	100 ± 0.09	99.67 ± 1.43	98.34 ± 1.87	98.76 ± 1.21	99.56 ± 1.45	98.46 ± 1.02	97.45 ± 1.87	1.956	0.127

2.2 Lar 对结肠癌细胞侵袭、增殖和迁移能力的影响 见表 2。与 Con 组相比, Lar 组 COLO 205 和 HCT 116 细胞侵袭细胞数, Ki67 荧光强度和划痕愈合率均显著降低, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。

表 2 Lar 对结肠癌细胞侵袭、增殖和迁移能力的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

项 目		Con 组	Lar 组	t 值	P 值
COLO 205 细胞	侵袭细胞数 (个)	378.23 ± 23.21	86.34 ± 8.97	31.591	<0.001
	Ki67 荧光强度 (AU)	100.23 ± 3.89	40.65 ± 0.65	30.619	<0.001
	划痕愈合率 (%)	41.34 ± 5.56	11.65 ± 0.79	37.513	<0.001
HCT116 细胞	侵袭细胞数 (个)	446.76 ± 34.76	135.65 ± 23.12	32.957	<0.001
	Ki67 荧光强度 (AU)	100.41 ± 2.87	56.34 ± 8.31	54.214	<0.001
	划痕愈合率 (%)	38.78 ± 5.21	9.86 ± 0.32	46.341	<0.001

2.3 Lar 对结肠癌细胞中 EMT 相关标志物 mRNA 表达的影响 见表 3。qRT-PCR 结果显示, 与 Con 组比较, Lar 组 COLO 205 和 HCT116 细胞中 E-cad

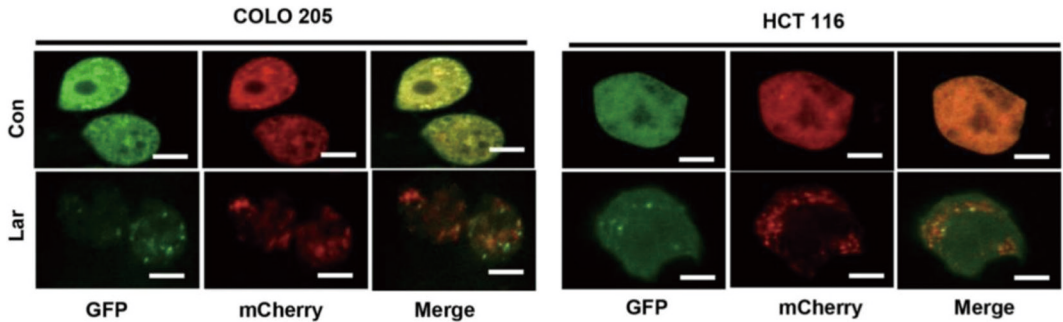
mRNA 水平升高, Vimentin 和 MMP2 的 mRNA 水平降低, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。

表 3 Lar 对结肠癌细胞中 E-cad, Vimentin 和 MMP2 mRNA 表达的影响 ($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

项 目		Con 组	Lar 组	t 值	P 值
COLO 205 细胞	E-cad	1.02 ± 0.47	1.87 ± 0.41	14.783	<0.001
	Vimentin	1.05 ± 0.68	0.17 ± 0.02	12.024	<0.001
	MMP2	1.01 ± 0.26	0.23 ± 0.05	28.653	<0.001
HCT116 细胞	E-cad	1.03 ± 0.31	1.72 ± 0.51	11.352	<0.001
	Vimentin	1.07 ± 0.61	0.33 ± 0.17	6.876	<0.001
	MMP2	1.10 ± 0.67	0.36 ± 0.06	7.853	<0.001

2.4 Lar 对结肠癌细胞自噬流的影响 见图 1。GFP - mCherry - LC3 荧光报告实验结果显示, Con 组 COLO 205 和 HCT 116 细胞中红色荧光的自噬溶酶体与黄色荧光的自噬小体的数量比为 1.03 ± 0.43 和 1.16 ± 0.64, Lar 处理后 COLO 205 和 HCT 116

细胞中红黄荧光数量比为 3.14 ± 0.62 和 5.17 ± 0.75。与 Con 组相比, Lar 组结肠癌细胞自噬流形成显著增多, 差异具有统计学意义 ($t=24.763$, 32.631 , 均 $P<0.001$)。



绿色荧光表示 GFP⁺/mCherry⁻-LC3 单荧光标记的溶酶体, 红色荧光表示 GFP⁺/mCherry⁺-LC3 单阳性自噬溶酶体, 黄色荧光表示 GFP⁺/mCherry⁺-LC3 双阳性自噬小体, 以红色荧光强度与黄色荧光强度比值确定自噬流通量。红色荧光越多, 黄色荧光越少, 则从自噬体到自噬溶酶体阶段流通得越顺畅。

图 1 GFP - mCherry - LC3 荧光报告实验检测 Lar 对结肠癌细胞自噬流的影响 (1 000 ×)

2.5 Lar 对结肠癌细胞自噬小体形成的影响 见图2。透射电子显微镜下自噬小体形态为胞质内形成的包裹有未消化细胞器的双层膜结构。Con 组、CQ 组、Lar 组和 Lar+CQ 组每 5 个视野的 COLO 205 细胞自噬小体平均数量分别为 4.00 ± 0.82 , 4.26 ± 0.91 , 10.73 ± 2.16 和 6.76 ± 0.63 个, HCT 116 细胞自噬小体平均数量分别为 3.82 ± 0.69 , 4.18 ± 0.73 ,

11.36 ± 2.93 和 6.34 ± 0.67 个。与 Con 组和 CQ 组相比, Lar 组细胞胞质内自噬小体形成显著增多, 差异具有统计学意义 ($t=4.610, 4.399, 5.601, 5.571$, 均 $P<0.05$)。与 Lar 组比较, Lar+CQ 组细胞自噬小体形成数量明显降低, 差异具有统计学意义 ($t=2.755, 3.735$, 均 $P<0.05$)。

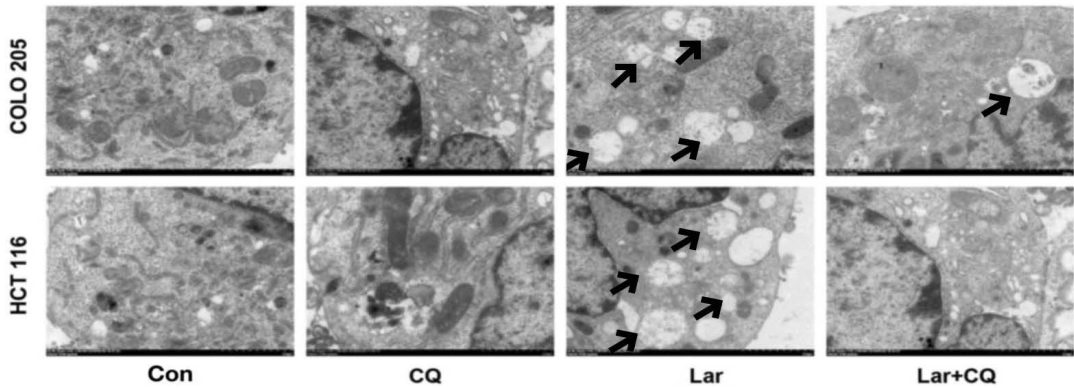


图2 透射电子显微镜检测 Lar 对结肠癌细胞自噬小体形成的影响 (40 000 ×)

2.6 Lar 对结肠癌细胞自噬相关蛋白表达的影响 见图3, 表4。与 Con 组相比, Lar 组 COLO 205 和 HCT116 细胞中 LC3II/I 比值升高, p62 蛋白表达降低 ($t=46.629, 55.320, 9.492, 55.320$, 均 $P<0.001$) ; 而 CQ 组 COLO 205 和 HCT116 细胞中 LC3II/I 比值和 p62 蛋白表达高于 Con 组 ($t=73.040, 49.806, 17.816, 79.755$, 均 $P<0.001$) , 差异具有统计学意义。与 Lar 组比较, Lar+CQ 组 COLO 205

和 HCT116 细胞中 p62 蛋白表达升高 ($t=15.982, 47.338$, 均 $P<0.001$) , 而两组间 LC3II/I 比值比较, 差异无统计学意义 ($t=0.346, 0.775, P=0.746, 0.482$)。

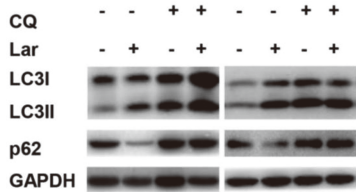


图3 WB 检测各组结肠癌细胞 LC3II/I 和 p62 蛋白表达 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

项目	COLO 205				F	P	HCT116				F	P
	Con	Lar	CQ	Lar+CQ			Con	Lar	CQ	Lar+CQ		
LC3II/I	1.01 ± 0.32	3.23 ± 0.28	4.08 ± 1.97	3.65 ± 0.86	213.718	<0.001	1.06 ± 0.3	2.07 ± 0.18	2.28 ± 0.34	2.37 ± 0.52	298.279	<0.001
p62 蛋白	1.05 ± 0.03	0.51 ± 0.09	1.74 ± 0.06	1.46 ± 0.56	259.758	<0.001	1.03 ± 0.04	0.72 ± 0.04	2.13 ± 0.65	2.47 ± 0.75	216.860	<0.001

2.7 Lar 对结肠癌细胞中 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响 见图4, 表5。Western blot 结果显示, 与 Con 组相比, Lar 组 COLO 205 和 HCT116 细胞 p-AMPK/AMPK 显著升高, p-mTOR/mTOR 明显降低, 差异具有统计学意义 (均 $P<0.001$)。

3 讨论

Lar 作为目前已上市的一种口服小分子 TRK 抑制剂, 对 TRK 的选择性是对其他激酶的 100 倍, 可以选择性抑制 TRK 融合阳性癌细胞的自磷酸化^[7]。前期临床研究已证实, Lar 在儿童和成人晚期或转移性实体瘤患者中显示出相较于非选择性 TRK 抑制剂的更好疗效和安全性^[8-9]。但目前国内外尚无关于 Lar 对结肠癌的作用研究, 这就使得 Lar 治疗结肠癌的临床研究缺乏理论基础。因此, 本研究试图

探讨 Lar 在结肠癌细胞中的作用和分子机制。结果发现, Lar 处理可呈剂量依赖关系抑制人结肠癌细胞 COLO 205 和 HCT116 的活性, 而对正常人结肠黏膜上皮细胞 CP-H040 无影响。

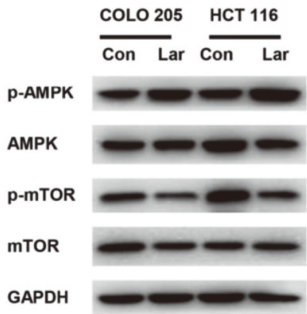


图4 WB 检测各组结肠癌细胞 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白表达

表 5 Lar 对 AMPK/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响 (n=3, $\bar{x} \pm s$)

项目	COLO 205		t 值	P 值	HCT 116		t 值	P 值
	Con	Lar			Con	Lar		
p-AMPK/AMPK	1.01 ± 0.21	1.94 ± 0.47	30.578	<0.001	1.06 ± 0.26	1.75 ± 0.12	28.665	<0.001
p-mTOR/mTOR	1.02 ± 0.26	0.63 ± 0.15	26.753	<0.001	1.10 ± 0.07	0.36 ± 0.06	27.957	<0.001

结肠癌的发生和发展可能是遗传、环境因素和生活方式共同作用的结果,但具体发病机制仍不清楚。一些证据已经表明,TRK 在胚胎发育和癌症发展过程中发挥关键作用,通过与神经营养因子配体结合后发生二聚化和自身磷酸化转化为活化状态,激活下游信号通路,进而调控细胞增殖、分化、代谢和凋亡等作用,是多种癌症的主要致癌驱动基因^[10]。TRK 抑制剂已成为癌症精准治疗药物的重要代表。CHEN 等^[11]研究发现,靶向抑制 TRK 可抑制肾癌细胞的增殖和迁移,诱导 G0/G1 期阻滞和细胞凋亡。邢增术等^[12]发现,siRNA 靶向沉默 TRK B 基因可通过抑制膀胱癌细胞 EMT 转化,从而降低肿瘤细胞增殖及转移侵袭能力。此外,TRK B 抑制剂可抑制脑源性神经生长因子 (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) 介导的神经母细胞瘤增殖和转移^[13]。ZHANG 等^[14]近期发现,Lar 在体内外均可增加前列腺癌细胞对铁死亡的敏感度,从而抑制前列腺癌的增殖和侵袭转移。这些研究强调了抑制 TRK 蛋白激酶在癌症临床治疗中的关键靶点效应。然而尚未研究 Lar 对结肠癌细胞的可能作用。近期报道的 1 例 43 岁女性复发转移性结肠癌患者,接受 Lar 治疗后显示病理完全缓解^[15],揭示了 Lar 在结肠癌患者早期治疗中的应用潜力。本研究结果与上述研究结论类似,发现经 TRK 全家族选择性抑制剂 Lar 处理后,结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭水平均显著下降,提示 Lar 对结肠癌的发生发展具有显著抑制作用。

EMT 是上皮细胞的可塑性发生改变,细胞间黏附作用丧失,细胞外基质发生重塑,获得间充质细胞特征的现象^[16]。癌细胞在 EMT 过程中,上皮细胞标志物 (E-cadherin) 缺失和间充质细胞标志物 (vimentin) 的表达上调,获得较高的迁移和侵袭能力。MMP 家族成员在肿瘤的恶性行为中发挥关键作用,其中 MMP2 可通过水解细胞间基质成分和基底膜 IV 型胶原蛋白,在结肠癌细胞中加速肿瘤生长并促进细胞侵袭^[17],是影响恶性肿瘤 EMT 过程的重要因素。杨琦等^[18]研究发现,黄芪-莪术配伍通过上调 E-cadherin 并下调 vimentin 和 MMP2 的表达,抑制 EMT,从而改善结肠癌细胞迁移和侵袭。本研究同样发现,Lar 能够降低 Vimentin 和 MMP2 表达水平,而升高 E-cadherin 表达,提示 Lar

抑制了结肠癌细胞的 EMT,进而抑制细胞迁移和侵袭。

目前报道的 TRK 抑制剂抗癌作用机制多为诱导细胞周期阻滞和凋亡,但 LEE 等^[19]在近期证实了 TRK 抑制剂在结肠癌细胞中具有诱导自噬的作用。自噬是一种高度保守的自我降解过程,通过这一过程,细胞内不必要的成分在自噬溶酶体中降解或回收,从而维持机体平衡^[20]。自噬过程需要多种相关蛋白参与,其中 LC3 作为一种自噬体膜蛋白,自噬发生后,LC3I 经泛素化修饰形成 LC3II,参与自噬过程的各个阶段,是自噬体形成的特异靶标。最近的研究表明^[21],自噬和 EMT 在调节肿瘤的发生和进展中密切相关。在肿瘤的初始阶段,自噬通过选择性降解 EMT 过程中的重要信号分子来抑制癌细胞的侵袭和转移。相反,在肿瘤转移和扩散过程中,癌细胞需要激活自噬以获得足够的能量并促进 EMT。韩昭等^[22-23]研究发现,自噬提供的能量可以通过诱导皮肤黑色素瘤和结直肠癌细胞的 EMT 促进癌细胞的侵袭和转移。本研究结果发现,在 Lar 处理后,LC3II/I 比值显著升高,提示 Lar 促进了自噬小体的形成和自噬的增强。此外,Lar 降低了自噬底物 p62 的表达,而 p62 被认为是反映自噬通量的指标。自噬流在维持人体健康方面发挥重要作用,已有研究表明,自噬流减少有助于癌症的发生,并可能加剧痴呆等慢性疾病^[24]。因此,探索激活自噬流的化学试剂可能有助于抗肿瘤治疗。本研究发现 Lar 可以激活自噬流,在 Lar 处理的结肠癌细胞中,红色荧光点状斑点的数量高于对照细胞。相比之下,自噬抑制剂 CQ 处理同样可以增强自噬体的形成并抑制自噬体-溶酶体融合,这与 Lar 发挥的作用效果一致。基于以上研究结果,本研究提出 Lar 诱导的自噬性细胞死亡可能是 Lar 对结肠癌细胞发挥抑制作用的重要机制。

自噬的分子机制非常复杂,往往涉及多个信号通路,而 AMPK 介导的 mTOR 通路已被证明是参与自噬的重要机制,与鼻咽癌、多发性骨髓瘤、胃癌和结肠癌等多种癌细胞的自噬水平密切相关。研究显示,AMPK 是一种正性自噬调节因子,其激活通过负调节 mTOR 通路中可调节抑癌基因如 p53,ULK1 等,参与自噬的下游信号分子活动,引起细胞周期阻滞并抑制肿瘤生长^[25]。HAN 等^[26]发现,

激活 AMPK/mTOR 信号通路可显著促进活性氧生成,降低线粒体膜电位,激活自噬,减弱结肠癌细胞的体外增殖和迁移。与这些发现一致,本研究发现 Lar 在结肠癌细胞中促进 p-AMPK 激活并抑制 mTOR 磷酸化。这些数据表明, Lar 对结肠癌细胞自噬的促进作用可能是通过 AMPK/mTOR 通路的激活来实现的。

综上所述, Lar 能抑制结肠癌细胞的增殖、迁移和侵袭,其潜在机制与激活 AMPK/mTOR 信号通路从而诱发细胞内自噬有关。由于本实验仅进行了细胞层面的研究,未在动物模型和人体中进行验证,故 Lar 在临床的应用前景有待进一步研究。

参考文献:

- [1] FABREGAS J C, RAMNARAIGN B, GEORGE T J. Clinical updates for colon cancer care in 2022[J]. *Clinical Colorectal Cancer*, 2022, 21(3): 198-203.
- [2] DEVENPORT S N, SHAH Y M. Functions and implications of autophagy in colon cancer[J]. *Cells*, 2019, 8(11): 1349.
- [3] ZHANG Ziqing, LU Yan, ZHANG Hao, et al. Enriched environment ameliorates fear memory impairments induced by sleep deprivation via inhibiting PIEZO1/calpain/autophagy signaling pathway in the basal forebrain[J]. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 2024, 30(2): e14365.
- [4] TAVERNARAKIS N. Regulation and roles of autophagy in the brain[J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2020, 1195: 33.
- [5] 宋永嘉, 宋敏, 巩彦龙. 自噬通过 BDNF/Trk B 信号通路对脊髓损伤的保护作用 [J]. *生命的化学*, 2020, 40(2): 211-215.
SONG Yongjia, SONG Min, GONG Yanlong. Protective effect of autophagy on spinal cord injury through BDNF/Trk B signaling pathway[J]. *Chemistry of Life*, 2020, 40(2): 211-215.
- [6] HONG D S, DUBOIS S G, KUMMAR S, et al. Larotrectinib in patients with TRK fusion-positive solid tumours: a pooled analysis of three phase 1/2 clinical trials[J]. *Lancet Oncology*, 2020, 21(4): 531-540.
- [7] RICCIUTI B, GENOVA C, CRINÒ L, et al. Antitumor activity of larotrectinib in tumors harboring NTRK gene fusions: a short review on the current evidence[J]. *Onco Targets and Therapy*, 2019, 12: 3171-3179.
- [8] 罗详冲, 刘晶晶, 李高峰. 拉罗替尼治疗 NTRK 基因融合阳性癌症患者的研究进展 [J]. *中国肿瘤临床*, 2019, 46(11): 575-580.
LUO Xiangchong, LIU Jingjing, LI Gaofeng. Research progress in the treatment of cancer patients with positive NTRK gene fusion with larotrectinib[J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*, 2019, 46(11): 575-580.
- [9] 杨雪晴, 代金连, 吴呈龙, 等. 原肌球蛋白受体激酶小分子抑制剂研究进展 [J]. *药学进展*, 2023, 47(3): 194-206.
YANG Xueqing, DAI Jinlian, WU Chenglong, et al. Advances in research on small molecule inhibitors of tropomyosin receptor kinase[J]. *Progress in Pharmaceutical Sciences*, 2023, 47(3): 194-206.
- [10] HAN S Y. TRK inhibitors: Tissue-agnostic anti-cancer drugs[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2021, 14(7): 632.
- [11] CHEN Yicheng, WANG Huan, CHEN Yuanlei, et al. Trk inhibitor GNF-5837 suppresses the tumor growth, survival and migration of renal cell carcinoma[J]. *Oncology Reports*, 2019, 42(5): 2039-2048.
- [12] 邢增术, 张冲, 刘振湘, 等. siRNA 靶向沉默 TrkB 基因对人膀胱癌细胞株 T24 生长和转移的影响及其分子机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(17): 4262-4265.
XING Zengshu, ZHANG Chong, LIU Zhenxiang, et al. Effects of siRNA targeting silencing TrkB gene on growth and metastasis of human bladder cancer cell line T24 and its molecular mechanism[J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2018, 38(17): 4262-4265.
- [13] ZOU Jian, ZHANG Zhang, XU Fang, et al. GZD2202, a novel TrkB inhibitor, suppresses BDNF-mediated proliferation and metastasis in neuroblastoma models[J]. *Journal of Drug Targeting*, 2019, 27(4): 442-450.
- [14] ZHANG Yu, HUANG Zhenlin, LI Keqiang, et al. TrkA promotes MDM2-mediated AGPS ubiquitination and degradation to trigger prostate cancer progression[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2024, 43(1): 16.
- [15] KASI P M, AFGHAN M K, BELLIZZI A M, et al. Larotrectinib in mismatch-repair-deficient trk fusion-positive metastatic colon cancer after progression on immunotherapy[J]. *Cureus*, 2022, 14(7): e26648.
- [16] 王希方, 郑伟, 马东瑞, 等. ALKBH5 调控 GEFT 的 m6A 修饰对胆管癌转移及 EMT 的实验研究 [J]. *现代检验医学杂志*, 2023, 38(4): 1-7, 21.
WANG Xifang, ZHENG Wei, MA Dongrui, et al. Experimental study of GEFT m6A modification regulated by ALKBH5 on cholangiocarcinoma metastasis and EMT[J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2023, 38(4): 1-7, 21.
- [17] BUTTACAVOLI M, DI CARA G, ROZ E, et al. Integrated multi-omics investigations of metalloproteinases in colon cancer: focus on MMP2 and MMP9[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(22): 12389.
- [18] 杨琦, 孙正, 朱亦邈, 等. 黄芪-莪术配伍调控 EMT 对结肠癌 HT-29 细胞增殖、迁移和侵袭能力的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2023, 48(3): 736-743.
YANG Qi, SUN Zheng, ZHU Yimiao, et al. Astragali radix-curcumae rhizoma combination inhibits proliferation, migration, and invasion of colon cancer HT-29 cells by regulating EMT[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2023, 48(3): 736-743.
- [19] LEE H J, MOON Y, CHOI J, et al. Characterization of KRC-108 as a TrkA kinase inhibitor with anti-tumor effects[J]. *Biomolecules & Therapeutics*, 2022, 30(4): 360-367.
- [20] VARGAS J N S, HAMASAKI M, KAWABATA T, et

- al. The mechanisms and roles of selective autophagy in mammals[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2023, 24(3): 167-185.
- [21] BABAEI G, AZIZ S G, JAGHI N Z Z. EMT, cancer stem cells and autophagy; the three main axes of metastasis[J]. *Biomedecine & Pharmacotherapie*, 2021, 133: 110909.
- [22] 韩昭, 高艳玲, 李志锋, 等. 丹参酮 II A 对雷帕霉素诱导自噬 M2 巨噬细胞共培养的皮肤黑素瘤 A375 细胞 EMT 的影响[J]. *皮肤性病诊疗学杂志*, 2022, 29(4): 291-298.
- HAN Zhao, GAO Yanling, LI Zhifeng, et al. The mechanism of tanshinone II A on regulating EMT in cutaneous melanoma A375 cells through TAMs autophagy[J]. *Journal of Diagnosis and Therapy on Dermato-Venereology*, 2022, 29(4): 291-298.
- [23] WEI Ran, XIAO Yuhong, SONG Yi, et al. FAT4 regulates the EMT and autophagy in colorectal cancer cells in part via the PI3K-AKT signaling axis[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1): 112.
- [24] BENSALAM J, HATTERSLEY K J, HEIN L K, et al. Measurement of autophagic flux in humans: an optimized method for blood samples[J]. *Autophagy*, 2021, 17(10): 3238-3255.
- [25] 石拴霞, 阎一鑫, 王纪田, 等. AMPK/mTOR 信号通路在线粒体自噬中的研究进展[J]. *海南医学*, 2023, 34(5): 736-740.
- SHI Shuanxia, YAN Yixin, WANG Jitian, et al. Research progress of AMPK/mTOR signaling pathway in mitochondrial autophagy[J]. *Hainan Medical Journal*, 2023, 34(5): 736-740.
- [26] HAN Yohan, KEE J Y, HONG S H. Rosmarinic acid activates AMPK to inhibit metastasis of colorectal cancer[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2018, 9: 68.
- 收稿日期: 2023-09-21
修回日期: 2024-03-18
-
- (上接第 22 页)
- al. Mortality, morbidity, and risk factors in China and its provinces, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017[J]. *Lancet* (London, England), 2019, 394(10204): 1145-1158.
- [11] LUO Huiyan, WEI Wei, YE Ziyi, et al. Liquid biopsy of methylation biomarkers in cell-free DNA[J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2021, 27(5): 482-500.
- [12] YE Qianwei, LING Sunbin, ZHENG Shusen, et al. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA[J]. *Molecular Cancer*, 2019, 18(1): 114.
- [13] JOHNSON P, ZHOU Qing, DAO D Y, et al. Circulating biomarkers in the diagnosis and management of hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 2022, 19(10): 670-681.
- [14] MENG Zuowei, REN Qingqi, ZHONG Guolin, et al. Noninvasive detection of hepatocellular carcinoma with circulating tumor DNA features and α -fetoprotein[J]. *Journal of Molecular Diagnostics*, 2021, 23(9): 1174-1184.
- [15] HAN H S, LEE K W. Liquid biopsy: an emerging diagnostic, prognostic, and predictive Tool in gastric cancer[J]. *Journal of Gastric Cancer*, 2024, 24(1): 4-28.
- [16] XU Ruihua, WEI Wei, KRAWCZYK M, et al. Circulating tumour DNA methylation markers for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Nature Materials*, 2017, 16(11): 1155-1161.
- [17] OLMEDILLAS-LÓPEZ S, OLIVERA-SALAZAR R, GARCÍA-ARRANZ M, et al. Current and emerging applications of droplet digital PCR in oncology: an updated review[J]. *Molecular Diagnosis & Therapy*, 2022, 26(1): 61-87.
- [18] 张婷婷, 韩佳迪, 刘岩峰. 电压门控钠离子通道在肿瘤转移中的作用[J]. *国际药理学研究杂志*, 2018, 45(8): 569-574.
- ZHANG Tingting, HAN Jiadi, LIU Yanfeng. Role of voltage-gated sodium channel in tumor metastasis[J]. *Journal of International Pharmaceutical Research*, 2018, 45(8): 569-574.
- [19] 吴珏堃, 熊志勇, 林良奕, 等. SCN1M 在乙肝相关性肝癌中的表达及临床意义[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(1): 188-192.
- WU Juekun, XIONG Zhiyong, LIN Liangyi, et al. Expression and clinical significance of SCN1M in hepatitis B-related hepatocellular carcinoma[J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2019, 35(1): 188-192.
- [20] 唐巧萍, 段志强, 乔控. 钠离子通道调节蛋白 1 与肝癌患者 3 年预后的相关性研究[J]. *肝脏*, 2020, 25(6): 610-612.
- TANG Qiaoping, DUAN Zhiqiang, QIAO Kong. Study on the correlation between SCN1M and 3-year prognosis in HCC patients[J]. *Chinese Hepatology*, 2020, 25(6): 610-612.
- 收稿日期: 2024-02-28
修回日期: 2024-06-30

欢迎来稿

欢迎订阅