

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.03.004

◇ 药学研究 ◇

利拉鲁肽对结肠癌细胞增殖、凋亡及转录活化因子6通路的影响

智会¹, 张志永²作者单位:¹周口市中心医院肛肠外科, 河南 周口 466000; ²郑州大学第一附属医院肛肠外科, 河南 郑州 450000

摘要:目的 探究利拉鲁肽对结肠癌细胞增殖、凋亡的影响及对转录活化因子6(ATF6)通路的影响。方法 按照利拉鲁肽浓度0、10、100、1 000 nM培养人结肠癌HCT116细胞24、48、72 h, 人胆囊收缩素/缩胆囊素八肽(CCK-8)法检测细胞增殖情况, 流式细胞仪检测细胞周期、凋亡情况, 蛋白质印迹法(Western Blot)检测作用后细胞中21KD蛋白(Bax)、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)及ATF6通路蛋白ATF6 p50、CCAAT-增强子结合蛋白(C/EBP)同源蛋白(CHOP)的表达水平。结果 与对照组相比, 利拉鲁肽各浓度间增殖率均有显著变化($P < 0.05$), 同一时间点随着利拉鲁肽浓度的增加, 0、10、100、1 000 nM各组细胞的增殖率分别为(97.16±35.67)%、(81.69±33.37)%、(76.12±30.23)%、(70.65±28.89)%、(86.17±33.98)%、(58.68±26.77)%、(39.74±10.67)%、(30.17±9.24)%、(83.82±31.19)%、(38.77±10.19)%、(22.98±6.78)%、(16.63±6.12)%, 均呈下降趋势。同一浓度随着时间推移, 24、48、72 h各时间点细胞增殖率分别为(97.16±35.67)%、(86.17±33.98)%、(83.82±31.19)%、(81.69±33.37)%、(58.68±26.77)%、(38.77±10.19)%、(76.12±30.23)%、(39.74±10.67)%、(22.98±6.78)%、(70.65±28.89)%、(30.17±9.24)%、(16.63±6.12)%。不同浓度利拉鲁肽作用于HCT116细胞72 h后, 10、100、1 000 nM浓度的利拉鲁肽组的G2/M期细胞比例较0 nM组显著减少($P < 0.05$), 且随着浓度的增加G2/M期细胞呈现下降趋势。0、10、100、1 000 nM利拉鲁肽作用下细胞凋亡率分别为(9.06±0.98)%、(10.45±1.12)%、(13.89±1.54)%、(56.08±14.33)%, 依次升高($P < 0.05$)。与0 nM组比较, 10、100、1 000 nM浓度的利拉鲁肽组细胞的凋亡率依次显著升高($P < 0.05$); 与10 nM组比较, 100、1 000 nM组凋亡率依次显著升高($P < 0.05$); 与100 nM组比较, 1 000 nM组凋亡率显著升高($P < 0.05$)。蛋白质印迹法结果显示, 10、100、1 000 nM利拉鲁肽作用后细胞中Bax蛋白表达量分别为(0.69±0.13)、(0.93±0.24)、(1.19±0.25), 显著升高($P < 0.05$), 1 000 nM组Bax蛋白表达量显著高于10 nM组($P < 0.05$), 100、1 000 nM两组间差异无统计学意义($P > 0.05$); Caspase-3蛋白表达量分别为(0.26±0.06)、(0.76±0.15)、(1.15±0.16)依次显著升高($P < 0.05$), 100、1 000 nM组Caspase-3蛋白表达量显著高于10 nM组($P < 0.05$), 1 000 nM组Caspase-3蛋白表达量显著高于100 nM组($P < 0.05$); ATF6 p50蛋白表达量分别为(0.69±0.11)、(0.96±0.09)、(1.20±0.08); CHOP蛋白表达量分别为(0.27±0.06)、(0.79±0.08)、(0.99±0.09), 均显著升高($P < 0.05$), 100、1 000 nM组ATF6 p50、CHOP蛋白表达量显著高于10 nM组($P < 0.05$), 1 000 nM组ATF6 p50、CHOP蛋白表达量显著高于100 nM组($P < 0.05$)。结论 利拉鲁肽对结肠癌HCT116细胞具有增殖抑制和凋亡促进作用, 且呈时间-剂量的依赖性, 其可能通过激活ATF6通路发挥促凋亡作用。

关键词:结肠肿瘤; 基因, ras; CCAAT增强子结合蛋白类; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶; 原癌基因蛋白质c-bcl-2; 细胞增殖; 细胞凋亡; 利拉鲁肽; 转录活化因子6通路

The influences of liraglutide on proliferation, apoptosis, and ATF6 pathway of colon cancer cells

ZHI Hui¹, ZHANG Zhiyong²Author Affiliations: ¹Department of Anorectal Surgery, Zhoukou Central Hospital, Zhoukou, Henan 466000, China;²Department of Anorectal Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000, China

Abstract: Objective To investigate the influences of liraglutide on proliferation, apoptosis and ATF6 pathway of colon cancer cells. **Methods** Human colon cancer HCT116 cells were cultured at liraglutide concentrations of 0, 10, 100, and 1 000 nM for 24, 48, and 72 h. Cell proliferation was measured by the human cholecystokinin/cholecystokinin octapeptide (CCK-8) method. Cell cycle and apoptosis were detected by cell cytometry, 21KD protein (Bax), caspase-3 and activated transcription factor 6 (ATF6) pathway were detected by Western Blot Protein ATF6 p50, CCAAT-enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein (CHOP) expression levels. **Results** Compared with the control group, the proliferation rate of all concentrations of liraglutide significantly changed ($P < 0.05$). At the same time, with the increase of liraglutide concentration, the cell proliferation rate of 0, 10, 100, and 1 000 nM group was (97.16±35.67)%, (81.69±33.37)%, (76.12±30.23)%, (70.65±28.89)%; (86.17±33.98)%, (58.68±26.77)%, (39.74±

10.67)% , (30.17±9.24)% ; (83.82±31.19)% , (38.77±10.19)% , (22.98±6.78)% , and (16.63±6.12)% , all of which exhibit a downward trend. With the same concentration over time, the cell proliferation rate at 24, 48, and 72 h point was (97.16±35.67)% , (86.17±33.98)% , (83.82±31.19)% ; (81.69±33.37)% , (58.68±26.77)% , (38.77±10.19)% ; (76.12±30.23)% , (39.74±10.67)% , (22.98±6.78)% ; (70.65±28.89)% , (30.17±9.24)% , (16.63±6.12)% . After 72 h of treatment with different concentrations of liraglutide on HCT116 cells, the proportion of G2/M phase cells in 10, 100, and 1 000 nM liraglutide groups was significantly lower than that in 0 nM group ($P < 0.05$), and G2/M cells showed a decreasing trend with the increase of drug concentration. The apoptosis rate increased under the action of 0, 10, 100, and 1, 000 nM liraglutide were (9.06±0.98)% , (10.45±1.12)% , (13.89±1.54)% , (56.08±14.33)% , respectively ($P < 0.05$). Compared with the 0 nM group, the apoptosis rate of cells in the liraglutide group at the concentrations of 10, 100, and 1 000 nM significantly increased sequentially ($P < 0.05$). Compared with the 10 nM group, the apoptosis rate increased significantly ($P < 0.05$) in the 100, 1 000 nM group. Compared with the 100 nM group, the apoptosis rate in the 1, 000 nM group increased significantly ($P < 0.05$). Western blot results showed that Bax protein expression in cells treated with liraglutide at 10, 100, and 1 000 nM was (0.69±0.13) , (0.93±0.24) and (1.19±0.25) , which increased significantly ($P < 0.05$). Bax protein expression in the 1 000 nM group was significantly higher than that in the 10 nM group ($P < 0.05$), and there was no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). The expression of Caspase-3 protein was (0.26±0.06) , (0.76±0.15) and (1.15±0.16) significantly increased ($P < 0.05$), and the expression of Caspase-3 protein in the 100 and 1 000 nM groups was significantly higher than that in the 10 nM group ($P < 0.05$). The expression of Caspase-3 protein in the 1 000 nM group was significantly higher than that in the 100 nM group ($P < 0.05$). The expression levels of ATF6 p50 protein were (0.69±0.11) , (0.96±0.09) and (1.20±0.08). The expression of CHOP protein was (0.27±0.06) , (0.79±0.08) , and (0.99±0.09) , all significantly increased ($P < 0.05$). The expression levels of ATF6 p50 and CHOP protein in the 100 and 1, 000 nM groups were significantly higher than those in the 10 nM group ($P < 0.05$). The expression of ATF6 p50 and CHOP protein in the 1 000 nM group was significantly higher than that in the 100 nM group ($P < 0.05$). **Conclusion** Liraglutide can inhibit proliferation and promote apoptosis of colon cancer HCT116 cells, and in a time-dose dependent manner, which may play a role in promoting apoptosis by activating ATF6 pathway.

Key words: Colonic neoplasms; Genes, ras; CCAAT-enhancer-binding proteins; Caspases; Proto-oncogene proteins c-bcl-2; Cell proliferation; Apoptosis; Liraglutide; ATF6 pathway

结肠癌是临床较为常见的恶性肿瘤之一,是世界范围排名第3的恶性肿瘤。对结肠癌的早期治疗手段主要以切除和放化疗为主,但癌细胞的转移和化疗药物产生的抗性是结肠癌治疗过程中亟待解决的问题。近年来发现糖尿病合并肿瘤病人增多,胃肠道癌症与肥胖伴糖尿病病人发病风险相关,这可能与胰岛素生长因子受体1(insulin growth factor receptor 1, IGFR-1)、胰高血糖素样肽-1(glucagon like peptide 1, GLP-1)通路相关^[1-2]。部分研究报道,胰岛素通过IGFR-1促进细胞增殖,增加肿瘤的发生风险^[3]。近年来肠促胰素效应的降糖药GLP-1类似物——利拉鲁肽在临床上应用广泛。研究报道GLP-1类似物促进前列腺癌细胞、乳腺癌细胞的凋亡,抑制其增殖^[4-5]。但GLP-1类似物对人结肠癌细胞的作用鲜有报道。研究发现转录活化因子6(transcription activator 6, ATF6)是内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)的主要靶点,活化的ATF6可促进ERS相关因子的表达促进细胞凋亡^[6]。故本实验于2016年5月至2018年5月探讨利拉鲁肽作用人结肠癌HCT116细胞后对其增殖、凋亡及ATF6通路的影响,以期对癌症的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 人结肠癌细胞HCT116中国医学科学院提供,利拉鲁肽原药粉剂(批号20171106)购于上海华谊药厂有限公司,RPMI1640培养基(批号20181206)、胎牛血清(批号20181109)、0.25%胰蛋白酶(批号20181209)购于美国HyClone公司,DMSO(批号20181207)购于美国Amresco公司,MTT试剂盒(批号20181011)购于上海碧云天生物技术有限公司,细胞凋亡试剂盒(批号20180916)购于BD试剂公司,Trizol试剂盒(批号20180508)购于invitrogen公司,冻存管(货号NB-362J)、96孔板(货号HD-9J45)、细胞计数板(货号KDN73)购于Fisher Lab-Serv公司,PVDF微孔滤膜(货号N-67DNA)购于美国Bio-Rad公司,BCA蛋白试剂盒(批号20180916)购于上海碧云天生物技术有限公司, β -肌动蛋白抗体(批号20181109)、ATF6抗体(20181107)、CCAAT-增强子结合蛋白(C/EBP)同源蛋白(CHOP)抗体(批号20181206)、caspase-3抗体(20181207)、21KD蛋白(Bax)抗体(20181209)购于美国Proteintech公司,二抗辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠IgG(批号20181102)购于美国Pierce公司,ECL化学发光试剂盒(批号20171209)购于Amersham Pharmacia Bio-

tech。高压灭菌锅(型号YX280A)购于日本SAKURA公司,多功能酶标仪(型号M-10082)购于美国Bio-Rad公司,FACS流式细胞仪(型号EPICS XL)购于美国BD公司,二氧化碳恒温培养箱(型号ND-28NJ)购于美国Thermo Fisher Scientific公司,凝胶成像系统(型号GenoSen2000)购于美国UVP公司,离心机(型号BU-289)、微量加样器(型号PG-2415)、荧光定量仪(型号NG-J28)购于德国Eppendorf公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与处理 细胞培养:人结肠癌细胞HCT116,10%胎牛血清,置于37℃、5%二氧化碳的培养箱中培养,2~3 d换液1次,当细胞融合度达到80%左右时,弃掉培养基,适量磷酸缓冲盐溶液(PBS)清洗,使用1 mL 0.25%的胰蛋白酶进行消化,1 000 r/min离心收集细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 /mL,接种到96孔板中培养。

实验分组及处理:细胞悬液于96孔板中培养,实验组按照利拉鲁肽浓度0、10、100、1 000 nM加入96孔板中培养24、48、72 h,每组设置3个复孔。

药物溶解:称取3.7 g利拉鲁肽粉剂溶解于1 mL多肽稀释液中,配置成终浓度为1 mM的储存液,分装后-20℃保存备用^[7]。

1.2.2 人胆囊收缩素/缩胆囊素八肽(CCK-8)检测细胞增殖 HCT116细胞悬液以 2×10^5 /mL接种于96孔板中,每孔100 μL,孔周边用灭菌双蒸水(dd H₂O)填充,37℃、5%二氧化碳孵育箱中培养,24 h后观察细胞进入对数生长期,弃掉培养基,分别以0、10、100、1 000 nM利拉鲁肽作用细胞24、48、72 h,每个组做3个复孔;弃培养基,每孔加入10 μL CCK-8试剂及100 μL培养基,37℃、5%二氧化碳培养箱中培养2 h,弃掉孔内液体,全自动酶标仪检测450 nm波长处各孔吸光度(OD)值,取均值,以空白对照孔调零,计算利拉鲁肽对细胞的抑制率。

1.2.3 流式细胞仪检测细胞周期 将对数生长期细胞制备成单细胞悬液,以 2×10^5 /mL接种于12孔板,每孔1 mL,培养24 h贴壁后,分别以0、10、100、1 000 nM利拉鲁肽作用细胞,每24小时换新鲜加药培养液,药物作用72 h后,弃掉培养基,PBS洗涤2次,1 000 r/min离心5 min,300 μL PBS重悬细胞沉淀,然后加入700 μL无水乙醇,4℃避光过夜。细胞固定后预冷PBS洗2次,1 000 r/min离心5 min,500 μL PBS重悬细胞沉淀,用冷PBS洗2次,离心,500 μL PBS重悬细胞沉淀,加入核酸酶(RNAase)2.5 μL,2 μL 0.2%聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)室温30 min,冰上孵育15 min,加入100 μg/mL的碘

化丙啶(PI)500 μL,4℃避光染色30 min,流式细胞仪测细胞周期。

1.2.4 细胞凋亡检测 采用流式细胞仪检测处理72 h的细胞凋亡情况。0.25%胰蛋白酶进行消化,室温1 000 r/min离心5 min收集各组细胞;设置浓度为0、10、100、1 000 nM利拉鲁肽,每个浓度设置3个重复,培养72 h后收集细胞,PBS洗涤细胞两次,调整细胞为 2×10^5 /mL;吸取1 mL细胞悬液于离心管中,1 000 r/min离心5 min,弃上清,PBS洗涤2次,沉淀中加入200 μL膜联蛋白V结合缓冲液(Binding Buffering)悬浮细胞,上机前加入5 μL PI和5 μL膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC),室温避光反应5~15 min,再加400 μL缓冲液,1 h内使用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

1.2.5 蛋白质印迹法(Western Blot)检测蛋白表达 采用蛋白质印迹法检测各细胞中Bax、半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)、ATF6 p50、CHOP蛋白含量的表达,取0、10、100、1 000 nM利拉鲁肽作用72 h后细胞,RI-PA裂解液裂解细胞,提取细胞中总蛋白,BCA法测定蛋白浓度,记录562 nm处OD值,计算样品浓度,SDS变性蛋白;取等量蛋白样品(每孔50 μg),SDS-PAGE电泳凝胶,跑胶完成后湿转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF膜)上,5%脱脂奶封闭1 h,稀释一抗4℃孵育过夜,洗膜3次/5 min,二抗孵育1 h,洗膜3次/5 min,ECL显影液显影,以β-肌动蛋白(β-actin)为内参。

1.3 统计学方法 数据采用SPSS 19.0统计软件进行分析。多组间比较采用单因素方差分析+LSD-*t*检验。均以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度利拉鲁肽对结肠癌细胞增殖的影响 将对数期生长的HCT116细胞分别加入0、10、100、1 000 nM浓度的利拉鲁肽,在加药后24、48、72 h进行CCK-8检测,结果显示:与对照组相比,利拉鲁肽各浓度间增殖率均有显著变化($P < 0.05$)。比较同一时间点,随着药物浓度的增加0、10、100、1 000 nM各组细胞的增殖率分别为(97.16 ± 35.67)%、(81.69 ± 33.37)%、(76.12 ± 30.23)%、(70.65 ± 28.89)%、(86.17 ± 33.98)%、(58.68 ± 26.77)%、(39.74 ± 10.67)%、(30.17 ± 9.24)%、(83.82 ± 31.19)%、(38.77 ± 10.19)%、(22.98 ± 6.78)%、(16.63 ± 6.12)%、均呈下降趋势,提示利拉鲁肽对HCT116细胞的抑制作用增强呈明显的剂量依赖作用。比较同一浓度,随着时间推移,24、48、72 h各时间点细胞增殖率分别为(97.16 ± 35.67)%、(86.17 ± 33.98)%、(83.82 ± 31.19)%、(81.69 ± 33.37)%、(58.68 ± 26.77)%、

(38.77±10.19)%、(76.12±30.23)%、(39.74±10.67)%、(22.98±6.78)%、(70.65±28.89)%、(30.17±9.24)%、(16.63±6.12)%，利拉鲁肽作用于HCT116细胞均有抑制作用，且随着时间的延长抑制作用显著增强($P < 0.05$)，提示利拉鲁肽对HCT116细胞的抑制作用存在时间依赖性。见图1。

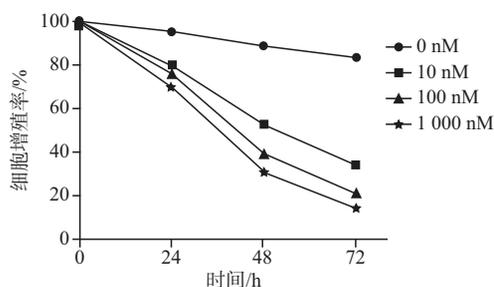


图1 不同浓度利拉鲁肽对结肠癌细胞增殖情况检测

2.2 不同浓度利拉鲁肽对结肠癌细胞周期分布的影响 不同浓度利拉鲁肽作用于HCT116细胞72 h后，采用流式细胞术检测细胞周期，检测结果显示：10、100、1 000 nM浓度的利拉鲁肽组的G2/M期细胞比例较0 nM组显著减少($P < 0.05$)，且随着浓度的增加呈现下降趋势。见图2。

2.3 不同浓度利拉鲁肽对结肠癌细胞凋亡的影响 不同浓度利拉鲁肽作用于结肠癌细胞HCT116 72 h后，采用流式细胞术检测细胞凋亡，结果显示：0、10、100、1 000 nM利拉鲁肽作用下细胞凋亡率分别为(9.06±0.98)%、(10.45±1.12)%、(13.89±1.54)%、(56.08±14.33)%，依次升高($P < 0.05$)。与0 nM组比较，10、100、1 000 nM浓度的利拉鲁肽组细胞的凋亡率依次显著升高($P < 0.05$)；与10 nM组比较，100、1 000 nM组凋亡率依次显著升高($P < 0.05$)；与100 nM组比较，1 000 nM组凋亡率显著升高($P < 0.05$)，表明利拉鲁肽浓度越高对HCT116细胞的促凋亡作用越明显。见图3。

2.4 利拉鲁肽对凋亡因子Bax、Caspase-3的影响 对培养72 h的HCT116细胞进行蛋白质印迹法检测，结果显示，10、100、1 000 nM浓度利拉鲁肽作用于细胞后，细胞中Bax蛋白表达量分别为(0.69±0.13)、(0.93±0.24)、(1.19±0.25)，显著升高($P < 0.05$)，1 000 nM组Bax蛋白表达量显著高于10 nM组($P < 0.05$)，100、1 000 nM两组间差异无统计学意义($P > 0.05$)；Caspase-3蛋白表达量分别为(0.26±0.06)、(0.76±0.15)、(1.15±0.16)依次显著升高($P < 0.05$)，100、1 000 nM组Caspase-3蛋白表达量显著高于10 nM组($P < 0.05$)，1 000 nM组Caspase-3蛋白表达量显著高于100 nM组($P < 0.05$)。表明在

1 000 nM范围内随着浓度的增加细胞凋亡蛋白表达逐渐上升。见图4。

2.5 利拉鲁肽对ATF6 p50、CHOP的影响 对各浓度培养72 h的HCT116细胞进行蛋白质印迹法检测，结果显示，10、100、1 000 nM浓度利拉鲁肽作用于细胞后，细胞中ATF6 p50蛋白表达量分别为(0.69±0.11)、(0.96±0.09)、(1.20±0.08)；CHOP蛋白表达量分别为(0.27±0.06)、(0.79±0.08)、(0.99±0.09)，均显著升高($P < 0.05$)。100、1 000 nM组ATF6 p50、CHOP蛋白表达量显著高于10 nM组($P < 0.05$)，1 000 nM组ATF6 p50、CHOP蛋白表达量显著高于100 nM组($P < 0.05$)。见图5。

3 讨论

糖尿病作为慢性代谢障碍性疾病，可引起组织器官的异常，多项研究表明，2型糖尿病患者恶性肿瘤的发病率是正常人的2倍，特别在胰腺癌、乳腺癌、结肠癌中^[7]。这可能与2型糖尿病治疗药物及类似物影响肿瘤的增长相关^[8]。GLP-1是一种由肠道L细胞分泌的肠促胰岛素，其受体在胃、肠、胰腺等多种组织中分布^[9]。利拉鲁肽是一种新的GLP-1受体激动剂，GLP-1主要通过胃、肠、胰腺及中枢神经系统的GLP-1受体介导^[10]。以往对GLP-1的研究主要在糖尿病领域，近年来发现利拉鲁肽可通过抑制p38丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号通路抑制乳腺癌细胞的生长^[11]。癌细胞无限增殖、凋亡减少是治疗的主要挑战，因此抑制癌细胞增殖，诱导其凋亡成为治疗癌症的新的切入点。结肠癌在我国的发病率逐渐升高，本研究通过对利拉鲁肽作用后人结肠癌HCT116细胞增殖、凋亡的观察分析利拉鲁肽对结肠癌细胞的作用。

研究报道，小鼠结肠癌CT26细胞表面存在GLP-1受体，GLP-1受体激动剂通过激活GLP-1受体减少糖原合成酶激酶3的表达，抑制细胞的增殖^[12]。细胞实验证明GLP-1受体激动剂可减少CT26细胞集落的形成，提示GLP-1受体激动剂抑制细胞的增殖^[13]。本研究CCK-8结果显示，利拉鲁肽作用后HCT116细胞的增殖受到抑制，且呈时间剂量的依赖性，表明利拉鲁肽对人结肠癌细胞的增殖有抑制作用，可有效控制癌细胞的无限增殖。以上实验结果与体外实验报道的GLP-1受体激动剂-艾塞那肽改变小鼠结肠癌CT26细胞的形态，抑制细胞增殖结果一致^[14]。越来越多研究表明，调控细胞周期可影响细胞体外增殖活性^[15]。细胞周期检测结果显示利拉鲁肽作用后细胞G2/M期细胞比例减少，且随着浓度的增加比例逐渐减少，提示利拉鲁肽阻滞结

肠癌细胞 HCT116 细胞停滞在 G2/M 期, 细胞增殖周期异常, 阻滞细胞无限增殖。

肿瘤细胞中 ERS 可因不同的环境改变而发生, ERS 可促进癌细胞适应应激环境, 抵抗某些化疗药物, 但 ERS 时间过长则会启动凋亡通路, 因此通过 ERS 促进细胞的凋亡是治疗肿瘤的新靶点^[16]。ATF6 是 ERS 的重要靶点, 其是内质网上的 II 型跨膜蛋白, C 端位于内质网腔中, 可感受 ERS^[17]。ERS 发生时 ATF6 被运送到高尔基体水解, 继而释放结构域, 激活 CHOP, 激活后的 CHOP 可促进细胞的凋亡^[18]。本研究结果显示利拉鲁肽作用 HCT116 细胞后, ATF6 p50、CHOP 蛋白表达升高, 细胞凋亡率显著升高, 且随着浓度的增加而增加, 提示利拉鲁肽可通过促进 ATF6 通路的激活发挥促凋亡作用, 抑制肿瘤的发展。研究发现, ERS 通过促进 CT-26 细胞的凋亡发挥抗癌作用^[19]。肝癌 HepG2 细胞中, ATF6 通路激活, 促进 CHOP 的表达, 进而诱导细胞的凋亡^[20]。细胞凋亡过程涉及一系列基因的表达, 高表达 CHOP 能够抑制 Bcl 蛋白家族中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达, 同时 Bax 蛋白表达增加, 迁移至线粒体和核膜上, 使线粒体膜通透性增加, 激活 Caspase-3 分子, 进而产生 Caspase 级联反应而诱发细胞凋亡^[21]。本研究中蛋白质印迹法检测显示凋亡因子 Bax、Caspase-3 蛋白均显著增加, 提示利拉鲁肽可能是通过 ATF6 通路调控 Bcl-2/Bax 表达, 促进 Caspase-3 凋亡因子激活而实现对结肠癌细胞 HCT116 凋亡的诱导作用。

综上所述, 利拉鲁肽能够显著抑制结肠癌细胞 HCT116 体外增殖, 引起细胞周期阻滞, 通过激活 ATF6 通路促进细胞凋亡, 发挥抗肿瘤作用。然而利拉鲁肽诱导结肠癌细胞凋亡作用机制十分复杂, 其抗肿瘤的具体作用机制尚需深入研究。

(本文图 2~5 见插图 3-3)

参考文献

- [1] JIN T. Why diabetes patients are more prone to the development of colon cancer? [J]. *Medical Hypotheses*, 2008, 71(2): 241-244.
- [2] CHEN YC, HO CC, YI CH, et al. Exendin-4, a glucagon-like peptide-1 analogue accelerates healing of chronic gastric ulcer in diabetic rats [J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187434. DOI: 10.1371/journal.pone.0187434.
- [3] 宋东, 韩冰, 乔伟松, 等. 胰岛素样生长因子受体 1 在乳腺癌组织中的表达及意义 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2010, 36(3): 550-553, 封3.
- [4] 马渊, 汤磊, 冯连成, 等. 下调组蛋白去乙酰化酶表达抑制前列腺癌细胞恶性表型及其机制 [J]. *中华实验外科杂志*, 2017, 34(12): 2026-2030.
- [5] 桑谊荃, 马向华, 沈捷, 等. GLP-1 类似物及受体激动剂对人乳

- 腺癌(MCF-7)增殖作用的影响 [J]. *实用糖尿病杂志*, 2013, 9(1): 53-55.
- [6] BU LJ, YU HQ, FAN LL, et al. Melatonin, a novel selective ATF-6 inhibitor, induces human hepatoma cell apoptosis through COX-2 downregulation [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(6): 986-998.
- [7] SUN Y, FAN L, MENG J, et al. Should GLP-1 receptor agonists be used with caution in high risk population for colorectal cancer? [J]. *Medical Hypotheses*, 2014, 82(3): 255-256.
- [8] ZHAO H, WANG L, WEI R, et al. Activation of glucagon-like peptide-1 receptor inhibits tumorigenicity and metastasis of human pancreatic cancer cells via PI3K/Akt pathway [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2014, 16(9): 850-860.
- [9] KAKKAR AK. GLP-1 receptor agonists and the risk of colorectal cancer [J]. *Medical Hypotheses*, 2014, 82(6): 796-796.
- [10] 万丽娟, 陈明卫. 胰高血糖素样肽-1 对糖尿病周围神经病变的影响 [J]. *安徽医药*, 2016, 20(9): 1617-1620.
- [11] 赵琳琳, 郭珏函, 夏雪, 等. 利拉鲁肽对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖影响的体外研究 [J]. *医学研究生学报*, 2014, 27(5): 482-486.
- [12] KOEHLER JA, KAIN T, DRUCKER DJ. Glucagon-like peptide-1 receptor activation inhibits growth and augments apoptosis in murine CT26 colon cancer cells [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(9): 3362-3372.
- [13] 张瑞, 刘羞菲, 王慧, 等. GLP-1 受体激动剂艾塞那肽对肿瘤细胞增殖、迁移的影响 [J]. *第三军医大学学报*, 2014, 36(17): 1785-1789.
- [14] LIGUMSKY H, WOLF I, ISRAELI S, et al. The peptide-hormone glucagon-like peptide-1 activates cAMP and inhibits growth of breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Research & Treatment*, 2012, 132(2): 449-461.
- [15] YIP H, HIGA A, TAOUJI S, et al. Sorafenib-mediated targeting of the AAA⁺ ATPase p97/VCP leads to disruption of the secretory pathway, endoplasmic reticulum stress, and hepatocellular cancer cell death [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2012, 11(12): 2610-2620.
- [16] CLARKE R, COOK KL, HU R, et al. Endoplasmic reticulum stress, the unfolded protein response, autophagy, and the integrated regulation of breast cancer cell fate [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(6): 1321-1331.
- [17] CEREZO M, BENHIDA R, ROCCHI S. Targeting BIP to induce Endoplasmic Reticulum stress and cancer cell death: [J]. *Oncoscience*, 2016, 3(11/12): 306-307.
- [18] MARTINS I, KEPP O, SCHLEMMER F, et al. Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress [J]. *Oncogene*, 2011, 30(10): 1147-1158.
- [19] 耿娜娜, 吴明松, 郑翔, 等. 单宁酸调控 ATF6-CHOP 通路增强顺铂诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡的作用 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(1): 12-15.
- [20] KIM A, IM M, MA JY. A novel herbal formula, SGE, induces endoplasmic reticulum stress-mediated cancer cell death and alleviates cachexia symptoms induced by colon-26 adenocarcinoma [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(23): 16284-16296.
- [21] ZHANG Y, LIAO S, FAN W, et al. Tunicamycin-induced ER stress regulates chemokine CCL5 expression and secretion via STAT3 followed by decreased transmigration of MCF-7 breast cancer cells [J]. *Oncology Reports*, 2014, 32(6): 2769-2776.

(收稿日期: 2018-12-24, 修回日期: 2019-04-04)