



Комбинация АНСС и ETAS уменьшает миграцию клеток колоректального рака и снижает экспрессию генов *LGR5* и *Notch1* в раковых стволовых клетках: новый потенциальный подход для интегративной медицины

Francesca Paganelli ^{1,2,†}, Francesca Chiarini ^{2,3,*†}, Annalisa Palmieri ⁴, Marcella Martinelli ⁴, Paola Sena ⁵, Jessika Bertacchini ⁵, Luca Roncucci ⁶, Alessandra Cappellini ¹, Alberto M. Martelli ¹, Massimo Bonucci ⁷, Carla Fiorentini ^{7,*} and Ivano Hammarberg Ferri ⁷

Цитирование: Paganelli, F.; Chiarini, F.; Palmieri, A.; Martinelli, M.; Sena, P.; Bertacchini, J.; Roncucci, L.; Cappellini, A.; Martelli, A.M.; Bonucci, M.; et al. The Combination of АНСС and ETAS Decreases Migration of Colorectal Cancer Cells, and Reduces the Expression of *LGR5* and *Notch1* Genes in Cancer Stem Cells: A Novel Potential Approach for Integrative Medicine. *Pharmaceuticals* 2021, 14, 1325. <https://doi.org/10.3390/ph14121325>

Академический редактор: Томас Эфферт

Получено: 6 декабря 2021 г.
Одобрено: 11 декабря 2021 г.
Опубликовано: 18 декабря 2021 г.

Примечание издателя: MDPI остается нейтральным в отношении юрисдикционных претензий в опубликованных картах и институциональной принадлежности.

1. Кафедра биомедицинских и нейромоторных наук, Болонский университет, 40126 Bologna, Italy; francesca.paganelli16@unibo.it (F.P.); alessandra.cappellini@unibo.it (A.C.); alberto.martelli@unibo.it (A.M.M.)
2. CNR-Институт молекулярной генетики им. Луиджи Лука Кавалли-Сфорца, Болонья, 40136 Bologna, Italy
3. IRCCS Ортопедический институт Риццоли, 40136 Bologna, Italy
4. Кафедра экспериментальной, диагностической и специальной медицины Болонского университета, 40138 Bologna, Italy; annalisa.palmieri@unibo.it (A.P.); marcella.martinelli@unibo.it (M.M.)
5. Кафедра хирургии, медицины, стоматологии и морфологических наук с интересом к трансплантологии, онкологии и регенеративной медицине, Университет Модены и Реджо-Эмилии, 41125 Modena, Italy; paola.sena@unimore.it (P.S.); jessika.bertacchini@unimore.it (J.B.)
6. Кафедра диагностики, клинической медицины и медицины общественного здравоохранения, Университет Модены и Реджо-Эмилии, 41124 Modena, Italy; luca.roncucci@unimore.it
7. Ассоциация исследований интегративной онкологической терапии (ARTOI), 00165 Rome, Italy; maxbonucci@artoi.it (M.B.); dottivanoferri@gmail.com (I.H.F.)

Correspondence: francesca.chiarini@cnr.it (F.C.); Carla.fiorentini@artoi.it (C.F.); Tel.: +39-0512091582 (F.C.); +39-3383658357 (C.F.) † Equally contributed.

Резюме: Стандартизированный экстракт культивируемого мицелия *Lentinula edodes* АНСС и стандартизированный экстракт стебля *Asparagus officinalis*, зарегистрированный под торговой маркой ETAS, являются хорошо известными добавками с иммуномодулирующим и противораковым потенциалом. В нескольких сообщениях описаны их терапевтические эффекты, в том числе антиоксидантная и противораковая активность и улучшение иммунного ответа. В этом исследовании мы стремились изучить влияние комбинации АНСС и ETAS на клетки колоректального рака и биоптаты здоровых доноров, чтобы оценить возможное использование у

пациентов с колоректальным раком. Наши результаты показали, что комбинация АНСС и ETAS синергически вызывала значительное снижение роста раковых клеток по сравнению с отдельными агентами. Более того, комбинированное лечение индуцировало значительное усиление апоптоза, сохраняя колоноциты здоровых доноров, и было способно вызвать сильное снижение миграционного потенциала, сопровождающееся значительной модуляцией белков, участвующих в инвазивности. Наконец, комбинированное лечение смогло значительно снизить уровень LGR5 и Notch1 в колоносферах раковых стволовых клеток (CSC) SW620. В целом, эти результаты подтверждают потенциальные терапевтические преимущества комбинированного лечения АНСС и ETAS у пациентов с колоректальным раком.

Ключевые слова: натуральные добавки; комбинированное лечение; миграция раковых клеток; раковые стволовые клетки

1. Введение

Колоректальный рак (КРР) является четвертой по частоте неоплазией во всем мире [1]. Локализованный КРР часто успешно лечится радикальной хирургией с последующей химиотерапией у пациентов с высоким риском рецидива [2]. Однако, поскольку КРР на ранней стадии может протекать бессимптомно, меньшинство (40%) случаев КРР диагностируется на ранней стадии, в результате чего у большого числа пациентов первоначально диагностируется метастатический КРР, у которых 5-летняя выживаемость очень низкая (13%) [3]. Химиотерапия является стандартным методом лечения пациентов с КРР, но ее системная токсичность побуждает к использованию интегративной медицины для облегчения симптомов, связанных с цитотоксичностью, и, возможно, для усиления эффективности химиотерапии.

Интегративная медицина (ИМ) основана на использовании альтернативных методов лечения, безопасность и эффективность которых подтверждены научными данными высокого качества, в сочетании с традиционными методами лечения [4]. В связи с постоянным спросом на новые методы лечения онкологических больных преимущества ИМ широко оценивались при лечении рака [5]. В последние годы природные соединения и их свойства рассматривались как потенциальные противораковые и иммуностимулирующие адьюванты. Лекарственные растения традиционно являются источником активных соединений, которые можно использовать в качестве добавок к традиционной химиотерапии [6,7]. Среди этих соединений АНСС®, стандартизированный экстракт культивируемого мицелия *Lentinula edodes*, в настоящее время оценивается на предмет его врожденных свойств в качестве потенциального адьюванта к традиционным методам лечения [8]. АНСС состоит из различных низкомолекулярных олигосахаридов, полисахаридов, аминокислот, липидов и минералов [8–10]. Основным компонентом является α -глюкан, хорошо известный своими иммуномодулирующими эффектами [8–10]. По этой причине АНСС широко используется в качестве добавки у людей с ослабленным иммунитетом, включая больных раком, и в нескольких исследованиях сообщалось о благотворном влиянии АНСС на лечение рака. АНСС задерживает развитие меланомы на моделях мышей, регулирующих как врожденный, так и адаптивный иммунный ответ [11]. Кроме того, это соединение было способно ингибировать пролиферацию клеток рака яичников и клеток аденокарциномы толстой кишки человека и ингибировать прогрессирование опухоли кишечника у мышей [12,13]. АНСС также оказал благотворное влияние на клетки рака поджелудочной железы, подавляя фактор теплового шока 1, ответственный за резистентность к терапии в этой опухоли [14]. Использование АНСС также показало эффективность в уменьшении побочных эффектов, вызванных химиотерапией, у онкологических больных, облегчении супрессии костного мозга, гепатотоксичности и нефротоксичности [15–18]. Обнадеживающие эффекты АНСС также

были продемонстрированы при хронических заболеваниях [19] и в защите хозяина при бактериальных [20] и вирусных инфекциях [21]. В контексте использования натуральных соединений в качестве вспомогательного средства при некоторых заболеваниях также появляются новые данные о ETAS®, стандартизированном экстракте стеблей спаржи лекарственной. Экстракт содержит 3-алкилдикетопиперазины (аспарапролины), которые участвуют в регуляции экспрессии белка теплового шока (HSP)70 [22]. Кроме того, ETAS подавляет HSP27 в опухолевых клетках поджелудочной железы, что обычно связано с устойчивостью к гемцитабину при этом типе рака [23]. Предыдущие исследования показали, что ETAS также оказывает нейропротекторное действие, регулируя неврологические реакции на старение и нормализуя передачу сигналов циркадного ритма [24, 25]. Кроме того, введение ETAS предотвращало провоспалительные реакции, вызванные активными формами кислорода [26,27].

Здесь мы оценили влияние комбинации АНСС и ETAS на клеточные линии рака толстой кишки и биоптаты здоровых доноров. Мы обнаружили, что комбинация АНСС и ETAS способна снижать жизнеспособность клеток рака толстой кишки, сохраняя при этом колоноциты из биопсий здоровых доноров. Более того, снижение жизнеспособности клеток сопровождалось значительной индукцией апоптоза в клеточных линиях рака толстой кишки с активацией каспаз. Комбинированное лечение также было способно снижать способность к миграции, вызывая значительное снижение ROCK2 (Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2) и металлопротеиназы (MMP9), а также значительное увеличение экспрессии белка Е-кадгерина. Наконец, в раковых стволовых клетках (CSC) опухолевых сфер из SW620 комбинированное лечение АНСС и ETAS вызвало значительное снижение экспрессии генов LGR5 и Notch1, открывая новые перспективы для тестирования этих соединений в сочетании с традиционной химиотерапией.

2. Результаты

2.1. Комбинация АНСС и ETAS синергична и ингибирует рост клеток рака толстой кишки.

Чтобы оценить эффекты АНСС и ETAS, мы инкубировали клетки рака толстой кишки в течение 48 часов с увеличивающимися концентрациями этих соединений в качестве отдельных агентов. Затем мы проанализировали уровень жизнеспособности клеток с помощью анализов МТТ (рис. 1а). АНСС вызывал значительное снижение жизнеспособности клеток на 50% при использовании в концентрациях 2,5–5 мг/мл в клетках НСТ-116, но для значительного влияния на жизнеспособность клеток в клетках LOVO, НТ-29 и SW620 требовались более высокие концентрации АНСС. через 48 ч лечения (рис. 1а).

Обработка ETAS позволила значительно снизить количество жизнеспособных клеток во всех протестированных клеточных линиях. В частности, клетки НТ-29 были наиболее чувствительными с IC50 ниже 1,25 мг/мл, в то время как значительное влияние на жизнеспособность было очевидно между 2,5 и 5 мг/мл в клетках НСТ-116, LOVO и SW620 (рис. 1а). Клетки LOVO не проявляли дополнительных эффектов при использовании возрастающих концентраций ETAS (рис. 1а).

Мы также оценили эффекты комбинации АНСС и ETAS при фиксированном соотношении (6:1). МТТ-анализ показал, что комбинированное лечение оказывает синергетическое действие на индукцию цитотоксичности, влияя на жизнеспособность клеток во всех протестированных клеточных линиях (рис. 1b). Значения комбинированного индекса (CI), рассчитанные с помощью программного обеспечения CompuSyn для анализа доза-эффект, указывали на наличие синергизма (CI <0,9) в клетках SW620 во всех протестированных комбинациях, в то время как клетки НСТ-116 и НТ-29 демонстрировали синергетические эффекты в протестированы все комбинации, кроме самой низкой (рис. 1b). Мы также обнаружили синергический эффект комбинации АНСС и ETAS в клетках LOVO при 7 мг/мл АНСС и 1,16 мг/мл ETAS (рис. 1b).

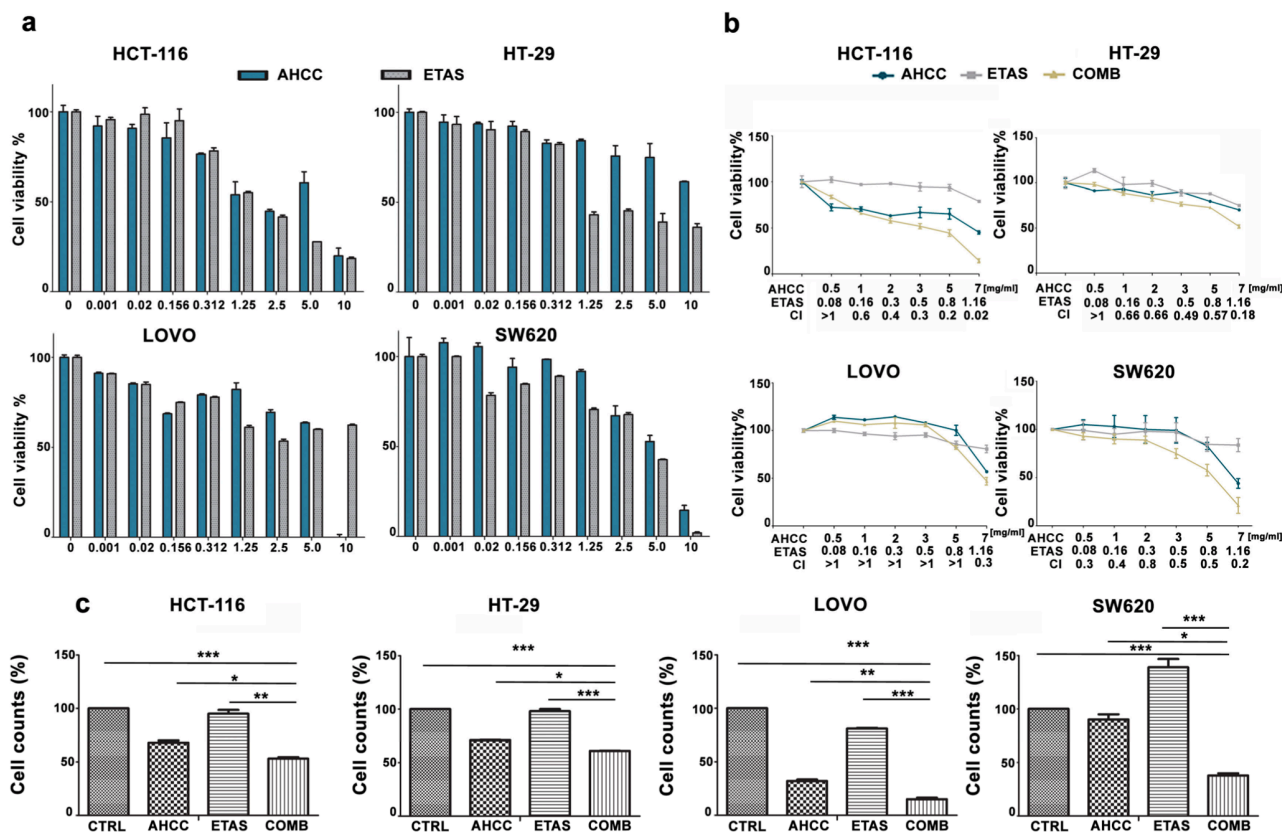


Рисунок 1. Комбинированное лечение АНСС и ETAS ингибирует рост клеток CRC. (а) Анализы МТТ были выполнены для оценки жизнеспособности клеток клеточных линий рака толстой кишки, обработанных в течение 48 часов увеличивающимися концентрациями АНСС и ETAS в качестве отдельных агентов. Результаты представляют собой среднее значение не менее трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение; (б) Анализы МТТ были выполнены для оценки жизнеспособности клеток клеточных линий рака толстой кишки, обработанных в течение 48 часов АНСС и ETAS в качестве отдельных агентов или в комбинации в фиксированном соотношении (соотношение 6: 1). Концентрации соединений, используемых в каждой отдельной точке, представлены на графике. Комбинированный индекс (CI) был рассчитан с помощью программного обеспечения CompuSyn, и значения были нанесены на график, как показано на графике; ДИ <0,9 указывает на синергизм. Результаты представляют собой среднее значение не менее трех независимых экспериментов ± стандартное отклонение; (с) Абсолютное количество жизнеспособных клеток рака толстой кишки с помощью проточной цитометрии, обработанных в течение 48 часов АНСС и ETAS в качестве отдельных агентов или в комбинации (COMB). Для клеток HCT-116, HT-29 и SW620 мы использовали 3 мг/мл АНСС + 0,5 мг/мл ETAS. Для клеток LOVO мы использовали 7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл ETAS. «CTRL» указывает необработанные клетки, используемые в качестве контрольных клеток. Среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов нанесено на график. Звездочками отмечены статистически значимые различия между выборками: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001.

Затем проводили подсчет клеток после обработки клеток рака толстой кишки АНСС или ETAS в качестве отдельных агентов и в комбинации (в соотношении 6:1) в течение 48 часов. Мы использовали АНСС и ETAS при 3 мг/мл АНСС + 0,5 мг/мл ETAS для HCT-116, HT-29 и SW620 и при 7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл ETAS для клеток LOVO. Комбинация АНСС и

ETAS, используемая для каждой клеточной линии, была выбрана на основе предыдущих синергетических эффектов, полученных при обработке клеток АНСС и ETAS, объединенных в фиксированном соотношении.

Эта комбинация смогла вызвать значительное снижение клеточной пролиферации во всех проанализированных клеточных линиях, демонстрируя, что комбинация эффективна в индуцировании остановки роста раковых клеток (рис. 1с).

2.2. Комбинация АНСС и ETAS не влияет на жизнеспособность колоноцитов человека от здоровых доноров

Эффекты комбинированного лечения АНСС и ETAS оценивали в первичных клеточных культурах, полученных из биопсий нормальной слизистой оболочки толстой кишки, с использованием анализов жизнеспособности клеток. С этой целью были использованы образцы от одиннадцати здоровых пациентов. Клетки из биоптатов обрабатывали АНСС и ETAS в течение 48 часов. Как показано на рисунке 2а, эффекты комбинированного лечения не оказывали существенного влияния на жизнеспособность клеток.

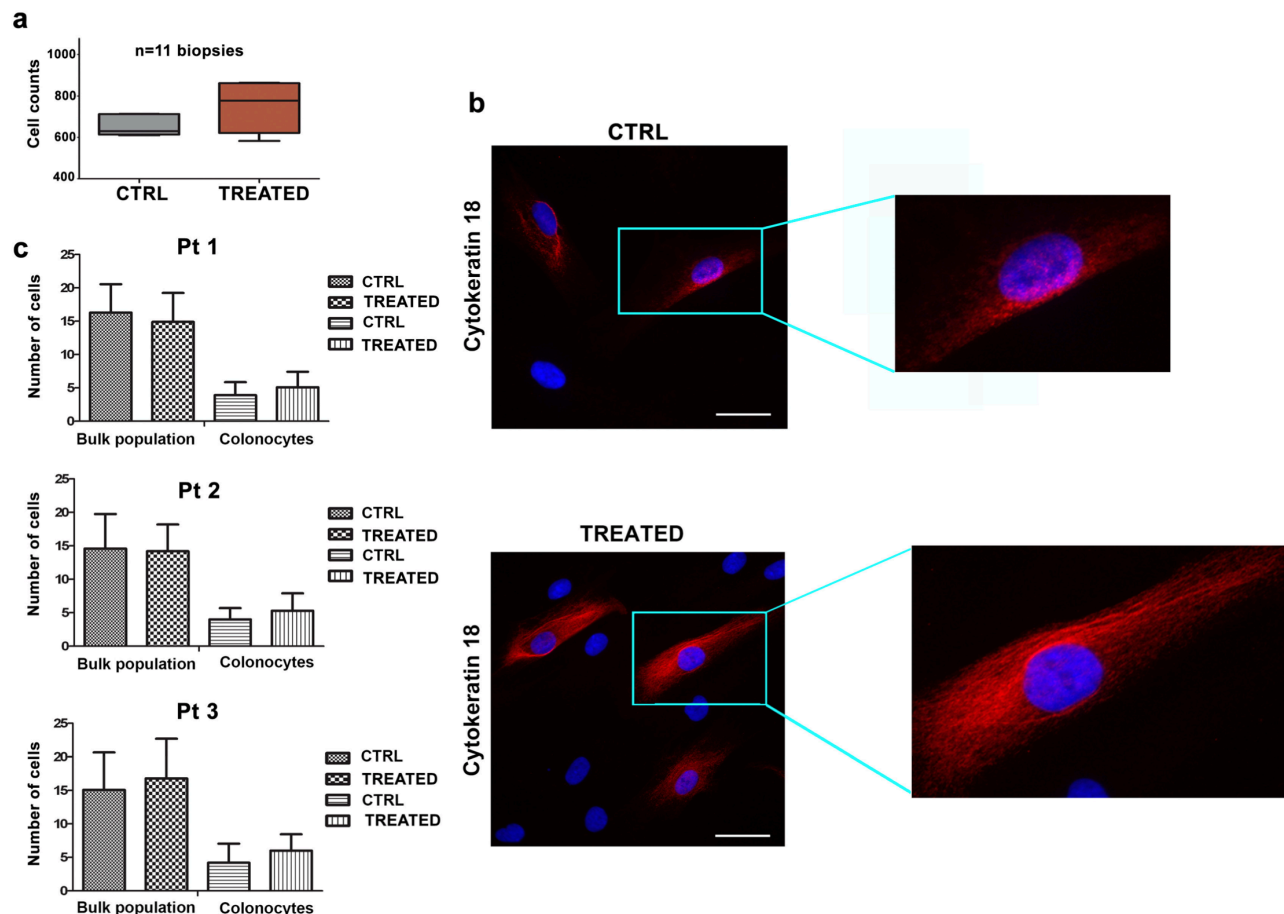


Рисунок 2. Комбинированное лечение АНСС и ETAS не влияет на колоноциты здорового человека. (а) Анализ жизнеспособности клеток в первичных клеточных культурах человека, обработанных комбинацией АНСС и ETAS в течение 48 часов (3 мг / мл для АНСС и 0, 5 мг / мл для ETAS). Результаты представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение, проведенных на нормальных биоптатах слизистой оболочки одиннадцати пациентов; (б) Иммунофлуоресцентный анализ пучков филаментов цитокератина-18, хорошо распознаваемых в цитоплазме колоноцитов в необработанных образцах и обработанных комбинированными образцами АНСС и ETAS. Увеличение 40 \times , масштабная линейка 10 мкм; (с) Количество клеток в биоптатах трех пациентов, посеянных

на предметные стекла и обработанных в течение 48 часов комбинацией 3 мг/мл для АНСС и 0,5 мг/мл ETAS. Показано среднее значение \pm стандартное отклонение для 3 пациентов. В связи с тем, что биоптаты были обогащены фибробластами, стромальными клетками и колоноцитами, мы провели эксперименты по иммунофлуоресценции, чтобы оценить влияние комбинации АНСС и ETAS на основную популяцию и на колоноциты. Образцы от 3 здоровых доноров культивировали на покровных стеклах и обрабатывали в течение 48 часов, а затем колоноциты метили антителом к цитокератину-18, специфическим маркером эпителиальных клеток (рис. 2b). Наши результаты показали, что не было статистически значимой разницы в количестве клеток в обработанной основной популяции по сравнению с необработанными клетками (рис. 2c). Более того, на количество колоноцитов, обработанных комбинацией АНСС и ETAS, лечение не повлияло, что указывает на то, что комбинация АНСС и ETAS не могла индуцировать модуляцию жизнеспособности клеток или числа клеток в клетках из биопсий (рис. 2c).

2.3. Комбинация АНСС и ETAS способствует значительному увеличению клеточного апоптоза в клетках рака толстой кишки

Чтобы оценить, могут ли эффекты АНСС и ETAS на жизнеспособность клеток быть связаны с апоптозом, был проведен проточный цитометрический анализ. Мы обнаружили значительное увеличение процента апоптотических клеток в ответ на комбинированное лечение в клеточных линиях НСТ-116, НТ-29 и LOVO (рис. 3a). Мы также подтвердили усиленный эффект комбинированного лечения по сравнению с одиночным в индукции апоптоза (рис. 3a). Апоптоз дополнительно исследовали с помощью вестерн-блоттинга, который показал расщепление каспазы 9, каспазы 3 и поли(АДФ-рибозо)полимеразы (PARP) в ответ на обработку в клетках НСТ-116 и LOVO (рис. 3b). Наиболее эффективная модуляция была получена, когда клетки обрабатывали как АНСС, так и ETAS (рис. 3b).

Чтобы оценить, какой путь может быть вовлечен в эффекты, опосредованные АНСС и ETAS, мы провели анализ массива белков стресса на клеточных линиях НСТ-116 и LOVO, обработанных АНСС и ETAS в комбинации в течение 48 часов. Мы подтвердили индукцию передачи сигналов апоптоза, о чем свидетельствует снижение уровня белка BCL-2 и повышение уровня белка цитохрома С и р(Ser46)p53 (рис. 3c), хорошо известных маркеров апоптотического процесса [28–30]. Интересно, что мы также обнаружили значительное снижение фосфорилирования HSP27 (рис. 3c). Это фосфорилирование связано с активацией HSP27 и ингибированием апоптоза. Действительно, стрессовое состояние может активировать передачу сигналов р38MAPK, что приводит к фосфорилированию HSP27 и его активации [31]. Активированный HSP27 может ингибировать апоптоз за счет ингибирования расщепления каспаз-9 и каспазы-3 путем прямого взаимодействия с прокаспазой-9 и прокаспазой-3 [32]. Более того, HSP27 связан с устойчивостью к противоопухолевым препаратам и плохим прогнозом при многих типах рака, включая CRC [33–35]. Предыдущие исследования также показали, что АНСС и ETAS способны снижать уровень HSP27 в раковых клетках поджелудочной железы, повышая чувствительность к химиотерапии [23,36]. Модуляция HSP27, полученная в нашей модели путем обработки клеток комбинацией АНСС и ETAS, описывает потенциальные терапевтические преимущества, которые может иметь комбинированное лечение у пациентов с раком толстой кишки.

2.4. Опухоли CSC из клеточных линий CRC подвержены влиянию комбинации АНСС и ETAS

Трехмерные (3D) сферические модели обычно используются для избирательного стимулирования роста популяций опухолевых клеток со стволовыми свойствами, являясь функциональной процедурой для открытия *in vitro* новых сигнальных путей, которые могут стимулировать самообновление и дифференцировку в клетках CSC. В настоящей работе мы использовали две установленные линии клеток рака толстой кишки человека, НТ-29 и SW620, для получения культур опухолевых сфер. С этой целью клетки культивировали в неадгезивных условиях с использованием бессывороточной среды с добавлением факторов

роста. Таким образом, только клетки со свойствами стволовых клеток могут пролиферировать, образуя свободно плавающие многоклеточные сферы. Через 1/3 недели клетки HT-29 и SW620 были способны эффективно формировать опухолевые сферы, что согласуется с другими наблюдениями [37]. Затем клетки из сфер положительно отбирали с помощью шариков CD326 и позволяли расти в виде сфер CSC (рис. 4а). Чтобы оценить профиль экспрессии транскриптов, связанных со стволовостью, мы оценили экспрессию генов NANOG, OCT4, MYC, CD326, LGR5, CD24, CD133, ALDH и STAT3 по сравнению с культурами 2D родительских клеток. Профиль экспрессии этих транскриптов был значительно обогащен ($p < 0,05$), что еще раз подтверждает, что сферообразующие популяции были обогащены CSC (рис. 4b).

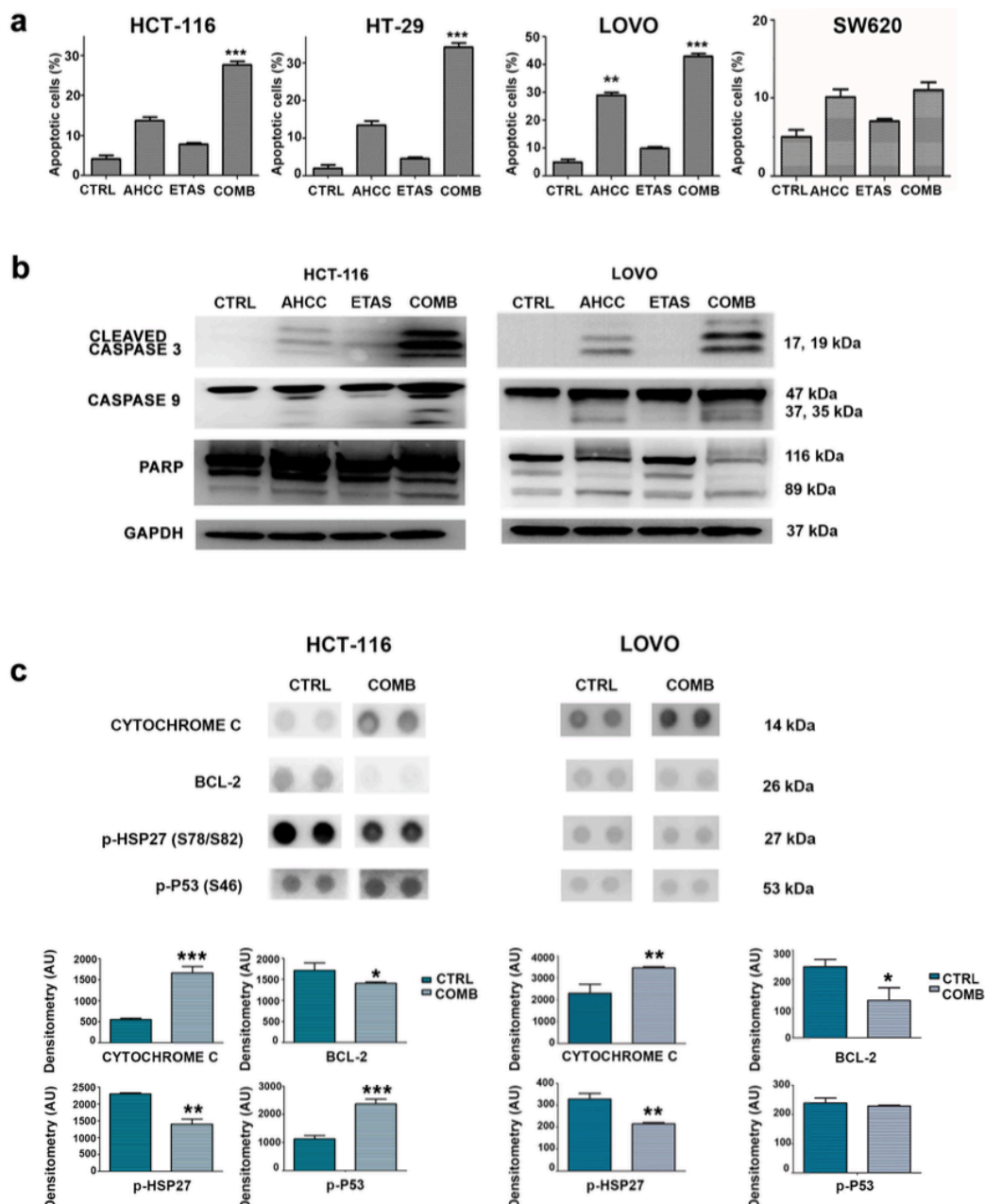


Рисунок 3. Комбинированное лечение AHCC и ETAS вызывает апоптоз в клетках CRC. (а) Анализ апоптоза клеточных линий рака толстой кишки, обработанных в течение 48 часов AHCC и ETAS в качестве отдельных агентов или в комбинации (COMB). Для клеток HCT-116 и SW620 использовали 3 мг/мл AHCC + 0,5 мг/мл ETAS. Для клеток HT-29 и LOVO

использовали 7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл ETAS. CTRL указывает на необработанные клетки. Процент апоптотических клеток представлен как среднее значение трех независимых экспериментов \pm стандартное отклонение. Звездочками отмечены статистически значимые различия по отношению к необработанным клеткам, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; (b) Вестерн-блоттинг анализ экспрессии расщепленной каспазы 3, расщепленной каспазы 9 и белка PARP в клеточных линиях НСТ-116 и LOVO, обработанных АНСС и ETAS в качестве отдельных агентов или в комбинации (COMB). Для НСТ-116 мы использовали 3 мг/мл АНСС + 0,5 мг/мл ETAS; для LOVO мы использовали 7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл ETAS. GAPDH использовали в качестве контроля загрузки; (c) Анализ матрицы стрессовых белков в клетках НСТ-116 и LOVO. Каждый обработанный образец (COMB; для НСТ-116 мы использовали 3 мг/мл АНСС + 0,5 мг/мл ETAS; для LOVO мы использовали 7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл ETAS) сравнивают с необработанным образцом (CTRL). Каждый белок имеет двойное пятно. Гистограммы показывают денситометрический анализ. Оценивали следующие белки: цитохром С, BCL-2, p-HSP27 (S78/S82) и p-P53 (S46). Звездочками отмечены статистически значимые различия по отношению к контролю, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Затем, чтобы определить, может ли комбинация АНСС и ETAS влиять на стволовые клетки CRC, мы обрабатывали сферы CSC комбинацией этих соединений и оценивали влияние на жизнеспособность клеток. Мы наблюдали небольшое снижение жизнеспособности РСК.

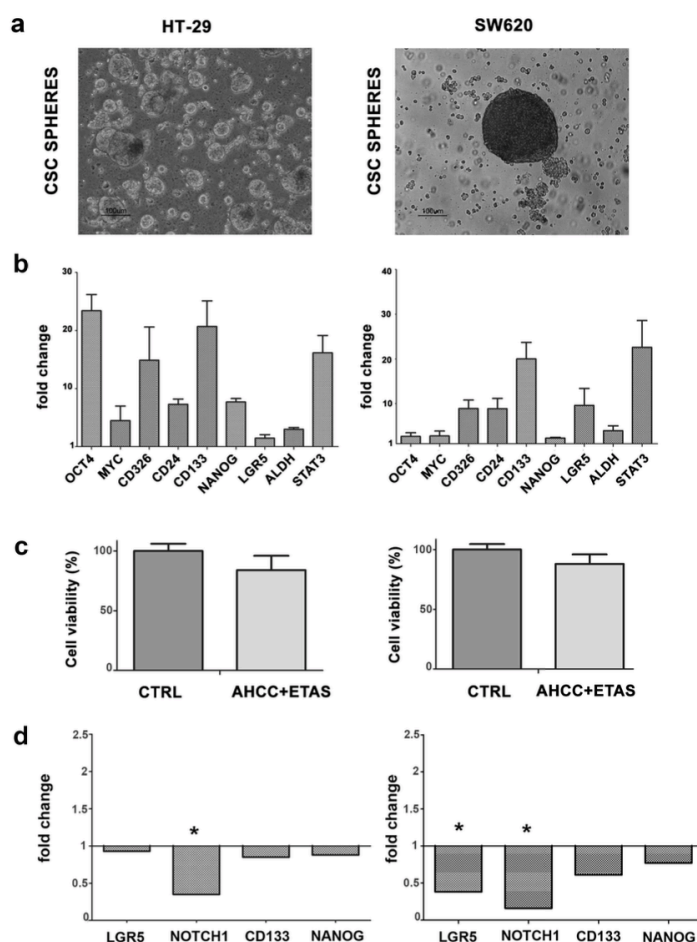


Рисунок 4. Комбинированное лечение АНСС и ETAS воздействует на опухолевые сферы CSC. (a) Репрезентативные изображения показывают трехмерные опухолевые сферы (сферы CSC) суспензионных культур, полученных из клеточных линий HT-29 и SW620. Увеличение 10 \times ; (b) Количественный ОТ-ПЦР-анализ генов, связанных со стволовостью (NANOG, OCT4, MYC, CD326, LGR5, CD24, CD133, ALDH и STAT3) в сферах CSC из HT-29 и SW620 по сравнению с 2D культурами родительских клеток. График изменения кратности, $p < 0,05$;

(c) Жизнеспособность клеток в необработанных или обработанных комбинацией АНСС и ETAS (7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл ETAS) сферах CSC; (d) Количественный анализ RT-PCR генов LGR5, Notch1, CD133 и NANOG в необработанных или обработанных комбинацией сфер АНСС и ETAS CSC. Нанесено изменение кратности, * $p < 0,05$.

2.5. Комбинация АНСС и ETAS снижает подвижность и миграцию клеток в клетках рака толстой кишки

Чтобы понять роль комбинированного лечения в миграции клеток в клетках колоректального рака, выращенных в адгезии, мы обработали клетки АНСС и ETAS в комбинации в течение 24 часов, а затем оценили способность к миграции с помощью тестов на заживление ран. Анализы подвижности показали, что клетки, предварительно обработанные комбинацией АНСС и ETAS, были значительно менее способны мигрировать по сравнению с необработанными клетками (рис. 5а). Мы также провели анализы миграции через лунки, обработав клетки АНСС и ETAS в комбинации в течение 24 часов. Кроме того, чтобы продемонстрировать специфическое влияние на подвижность и миграцию, мы оценили, способна ли концентрация, используемая для анализов заживления ран и анализов трансвелл, вызывать гибель клеток во всех клеточных линиях. С этой целью мы выполнили окрашивание аннексина V/йодида пропидия в контрольных клетках и клетках, обработанных в течение 24 часов комбинацией АНСС и ETAS (7 мг/мл АНСС и 1,16 мг/мл ETAS). Наши результаты показывают, что комбинация, использованная для анализов подвижности и миграции, была неэффективной в индукции апоптоза через 24 часа лечения (дополнительная фигура S1). Однако мы обнаружили значительное снижение способности к миграции после комбинированного лечения во всех оцениваемых клеточных линиях (рис. 5а).

Поскольку прогноз у пациентов с метастазами CRC был очень плохим [38], мы хотели исследовать экспрессию белков, участвующих в миграции клеток. Мы проанализировали экспрессию нескольких белков, таких как ROCK2, MMP9 (матриксная металлопротеиназа 9) и E-кадгерин. Комбинированное лечение вызывало значительное снижение уровней белков ROCK2 и MMP9, сопровождавшееся сильным увеличением уровней белка E-кадгерина по сравнению с однократным лечением (рис. 5б). Эти результаты были очень интересными из-за роли этих белков в некоторых опухолях. Действительно, ROCK2 сверхэкспрессирован и связан с повышенной инвазией и метастазированием при раке молочной железы и раке мочевого пузыря [39–41]. Более того, было обнаружено, что ROCK2 опосредует инвазию клеток рака толстой кишки [39–41].

Снижение уровня MMP9, полученное после комбинированного лечения, представляет потенциальный интерес, поскольку MMP9 экспрессируется на высоких уровнях у пациентов с CRC по сравнению со здоровыми донорами, и эта сверхэкспрессия связана с худшим исходом у этих пациентов [42,43].

Мы также обнаружили сильное увеличение E-кадгерина в клеточных линиях, обработанных АНСС и ETAS. Этот белок является активным супрессором инвазии и роста многих эпителиальных раков, включая рак толстой кишки [44,45]. Действительно, его функциональная потеря представляет собой ключевой шаг в приобретении инвазивного фенотипа для некоторых типов опухолей [44].

2.6. Комбинация АНСС и ETAS усиливает действие оксалиплатина на клетки рака толстой кишки

Чтобы оценить эффективность комбинированного лечения АНСС и ETAS в качестве потенциальной адъювантной стратегии к традиционной химиотерапии при CRC, мы обработали клетки рака толстой кишки в течение 48 часов комбинированным АНСС и ETAS, оксалиплатином в качестве отдельного агента или комбинацией АНСС, ETAS и оксалиплатина. Мы обнаружили значительное снижение количества жизнеспособных клеток во всех протестированных клеточных линиях CRC (рис. 6а). В частности, комбинация АНСС, ETAS и оксалиплатина оказалась значительно более эффективной в снижении роста раковых

клеток (рис. 6а) во всех проанализированных клеточных линиях. Чтобы выяснить, были ли эти эффекты связаны с увеличением апоптотических клеток, мы оценили эффекты комбинированного лечения на клеточных линиях CRC, выполнив проточный цитометрический анализ на клеточных линиях HCT-116, HT-29, LOVO и SW620. В ответ на обработку 10 мкМ оксалиплатина и АНСС и ETAS (3 мг/мл АНСС + 0,5 мг/мл ETAS для всех клеточных линий, кроме клеток LOVO, в которых мы использовали 7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл), мы обнаружили заметное увеличение процента ранних апоптотических (положительных для аннексина V) и/или поздних апоптотических (положительных как для аннексина V, так и для PI) клеток после 48 ч обработки во всех клеточных линиях (рис. 6б). Клетки HCT-116 были наиболее чувствительны к комбинированной обработке с примерно 70% апоптотических клеток, в то время как клетки SW620 были наименее чувствительными с 20% апоптотических клеток после обработки (рис. 6б).

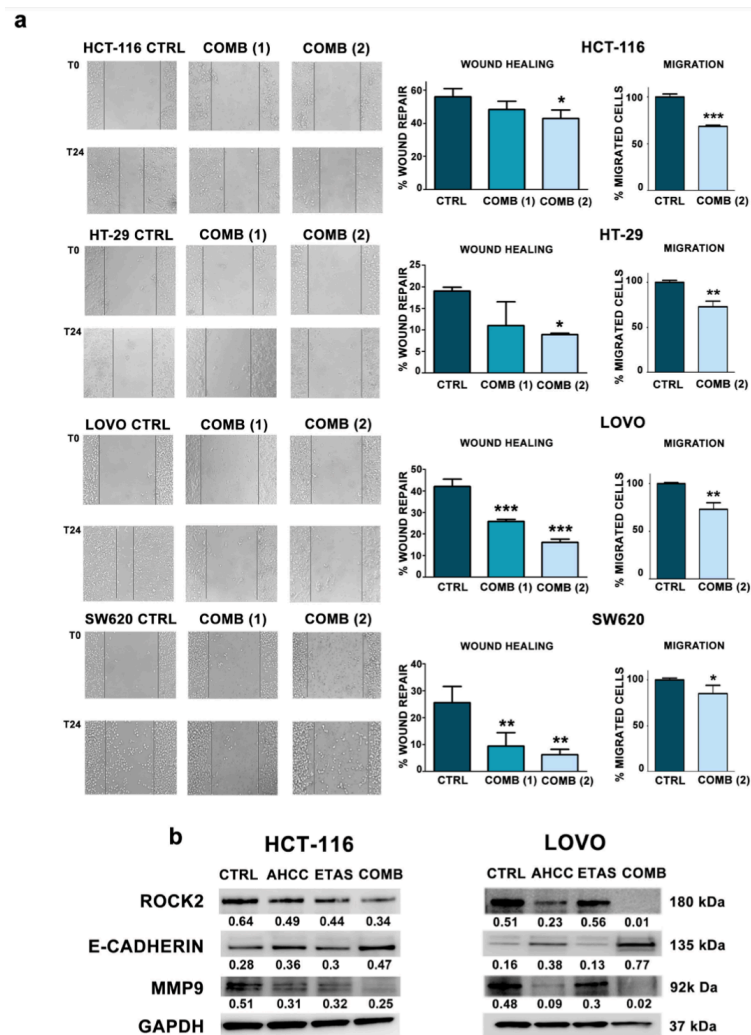


Рисунок 5. Комбинация АНСС и ETAS значительно снижает миграцию клеток CRC. (а) Анализы заживления ран и миграции через лунки, проведенные в клетках HCT-116, HT-29, LOVO и SW620, обработанных комбинированной обработкой АНСС и ETAS с возрастающей концентрацией (COMB). Для комбинации 1 (COMB (1)) мы использовали 3 мг/мл АНСС + 0,5 мг/мл ETAS. Для комбинации 2 (COMB (2)) мы использовали 7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл ETAS. Репрезентативные фотографии были сделаны через 0 и 24 часа после царапания. Для трансвелл-тестов миграцию оценивали через 24 часа после обработки. Увеличение 10х. Гистограммы представлены как среднее ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов. Звездочками отмечены статистически значимые различия по отношению к

контролю, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; (b) Вестерн-блоттинг экспрессии белка ROCK2, E-кадгерина и MMP9 в клеточных линиях HCT-116 и LOVO, обработанных АНСС и ETAS по отдельности или в комбинации (HCT-116 COMB: 3 мг/мл АНСС + 0,5 мг /мл ETAS; LOVO COMB: 7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл ETAS). GAPDH использовали в качестве контроля загрузки. Цифры обозначают денситометрический анализ, построенный как отношение к уровням GAPDH.

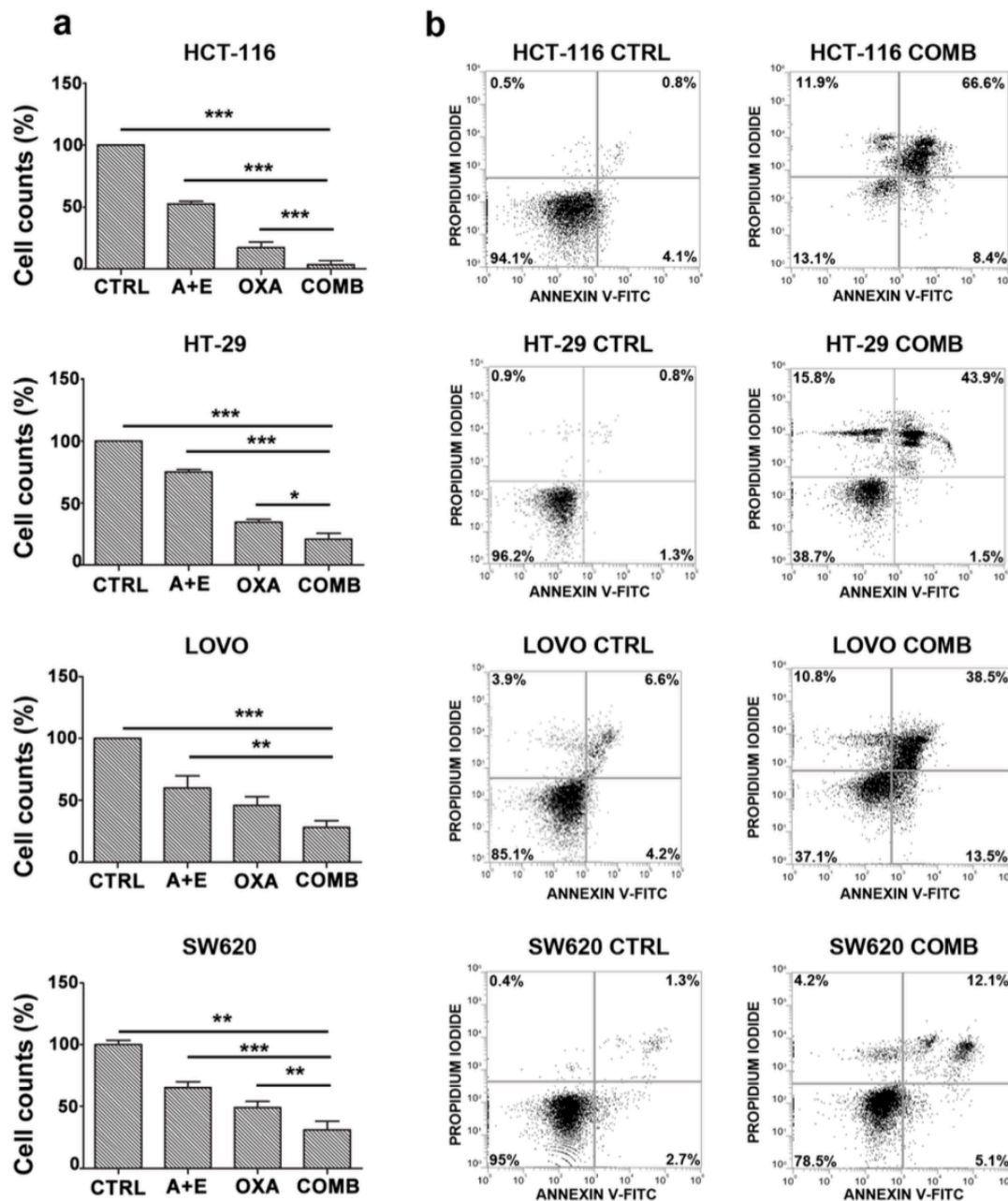


Рисунок 6. Комбинация АНСС и ETAS усиливает действие оксалиплатина на клетки рака толстой кишки (a) Абсолютное количество проточной цитометрии (с йодидом пропидия) жизнеспособных клеток рака толстой кишки, обработанных комбинацией АНСС и ETAS (АНСС + ETAS), только оксалиплатином (ОХА), или с комбинацией АНСС, ETAS и оксалиплатина (COMB) в течение 48 часов. Для клеток HCT-116, HT-29 и SW620 мы использовали 3 мг/мл АНСС + 0,5 мг/мл ETAS. Для клеток LOVO мы использовали 7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл ETAS. Оксалиплатину использовали в концентрации 10 мкМ для всех клеточных линий. «CTRL» указывает на необработанные клетки. Среднее \pm стандартное

отклонение трех независимых экспериментов нанесено на график. Звездочками отмечены статистически значимые различия по отношению к разным образцам. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; (b) Проточный цитометрический анализ окрашенных аннексином V-FITC/PI клеток CRC, обработанных комбинацией АНСС, ЕТАS и оксалиплатина (COMB) в течение 48 часов. Показан процент клеток с ранним апоптозом (аннексин-V FITC+/PI-; нижний правый квадрант) и клеток с поздним апоптозом/некрозом (аннексин-V FITC+/PI+; верхний правый квадрант). «CTRL» указывает на необработанные клетки.

3. Обсуждение

Рак толстой кишки занимает второе место среди онкологических заболеваний в мире [38]. Хотя лечение и терапия КРР основаны на хирургическом вмешательстве, адъювантной радио- и химиотерапии, КРР остается одним из наиболее тяжелых злокачественных новообразований, особенно когда он достигает поздних стадий [2,46]. Приблизительно у 50% пациентов с КРР в конечном итоге образуются метастазы; тем не менее, пациенты с распространенным КРР и отдаленными метастазами не всегда подходят для традиционного вмешательства и демонстрируют плохую 5-летнюю выживаемость $<10\%$ [3].

Для этого заболевания были разработаны многокомпонентные традиционные методы лечения, что привело к значительному улучшению ответа пациентов и общей выживаемости при КРР. Однако лекарственная устойчивость очень распространена на поздних стадиях рака толстой кишки [47]. Поэтому в настоящее время рассматриваются новые агенты, в том числе натуральные продукты, для более эффективного лечения рака и снижения токсичности химиотерапии у пациентов с КРР.

Использование природных соединений может уменьшить неблагоприятные последствия противоопухолевой терапии и симптомы рака, улучшая качество жизни пациентов. Эти терапевтические адъюванты вызывают повышенный интерес из-за способности уменьшать побочные эффекты.

Безопасность АНСС широко изучалась у пациентов с опухолями [48–50]. В многочисленных исследованиях изучалось облегчающее действие АНСС на побочные эффекты, связанные с химиотерапией. Например, АНСС был способен снижать гематологическую токсичность гемцитабина у мышей без опухолей и снижать индуцированное 6-меркаптопурином и метотрексатом повреждение печени на животных моделях [18]. Кроме того, АНСС усиливал химиотерапевтические эффекты UFT (5-фтор-1-(тетрагидрофуран-2-ил)пиримидин-2,4(1H,3H)-дион) на модели аденокарциномы молочной железы у крыс [51]. и цисплатин у мышей с опухолями [16]. ЕТАS — это природное соединение, которое оценивается на предмет его полезного действия при лечении рака и неврологических заболеваний посредством модуляции HSP [23,25]. Кроме того, ЕТАS показал противовоспалительную активность, индуцированную активными формами кислорода [26,27]. Здесь мы впервые оценили *in vitro* эффективность введения АНСС и ЕТАS в комбинации с клетками КРР. Затем мы проверили, способна ли эта комбинация усиливать действие традиционного химиотерапевтического препарата, используемого при колоректальном раке, оксалиплатина, и может быть полезна в качестве адъювантной добавки для интегративной медицины.

Комбинация АНСС и ЕТАS была синергичной в клеточных линиях КРР, вызывая сильное снижение жизнеспособности клеток во всех используемых клеточных линиях. Напротив, лечение не оказало значительного влияния на колоноциты здоровых доноров, подчеркнув, что комбинация АНСС и ЕТАS является потенциальным кандидатом на клиническую пользу в отношении раковых клеток. Мы использовали биопсии здоровых доноров, потому что нормальные клеточные линии толстой кишки происходят из толстой кишки плода и представляют собой иммортализованные клетки, более похожие на опухолевые клетки.

Основываясь на данных других исследований о роли природных соединений в раковых клетках [52], мы показали, что антипролиферативные эффекты являются результатом

индукции апоптоза. Фактически, цитотоксические эффекты, опосредованные комбинацией АНСС и ETAS, коррелируют с индукцией апоптоза, о чем свидетельствует расщепление каспаз 9 и 3 и PARP, а также модуляция BCL-2, цитохрома C и p(Ser46).) с53. Комбинация АНСС и ETAS также снижала фосфорилирование и активацию HSP27, что, как было показано, коррелирует с резистентностью к химиотерапии при раке поджелудочной железы и связано с плохим прогнозом при раке CRC [23,35,36].

Учитывая, что прогноз у пациентов с метастазами КРР очень плохой [38], открытие новых соединений, которые могли бы уменьшить клеточную миграцию, является насущной необходимостью при КРР. Интересно, что мы обнаружили значительное снижение подвижности и миграции клеток после лечения АНСС и ETAS, сопровождающееся снижением уровней экспрессии белка ROCK2, одного из важнейших факторов миграции рака. Фактически, ROCK2, серин-треониновая киназа, участвует в организации цитоскелета, регуляции сократительной способности актомиозина, формировании стрессовых волокон и обновлении фокальных спаек [53]. ROCK2 сверхэкспрессирован и связан с повышенной инвазией и плохой выживаемостью при некоторых опухолях, включая рак толстой кишки [39-41]. И наоборот, ингибирование ROCK2 подавляет инвазию и образование метастазов [54,55].

Мы также обнаружили значительное снижение уровня белка MMP9, и это представляет потенциальный интерес, поскольку сверхэкспрессия MMP9 и других металлопротеаз связана с худшим исходом при раке CRC, и обнаружили, что MMP9 значительно больше экспрессируется у пациентов с CRC по сравнению с здоровым донорам [42,43]. Комбинированное лечение АНСС и ETAS также индуцировало значительное увеличение экспрессии белка E-кадгерина, подавление которого ранее было связано с инвазивностью и способностью к миграции в стволовых клетках рака толстой кишки [45]. Все эти полученные данные указывают на потенциальную роль этих соединений в снижении метастатического потенциала клеток CRC.

Было широко продемонстрировано, что среди клеток CRC можно идентифицировать CSCs, клеточную популяцию с репликативными иммортализованными и самообновляющимися свойствами [56]. В дополнение к роли в росте опухоли и гомеостазе, CSCs считаются основными в метастатических процессах. Существенную роль ОСК в процессе метастазирования демонстрируют данные, показывающие, что метастазирующие клетки приобретают свойства стволовых клеток, например, посредством эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [57-59]. Следовательно, было продемонстрировано, что избирательное истощение ОСК в первичных опухолях защищает от появления отдаленных метастазов [60]. По этим причинам CSC представляют собой критическую мишень для фармацевтического вмешательства. В этом контексте мы проверили эффективность комбинации АНСС и ETAS на сферах CSC, производных от HT-29 и SW620. Предварительные данные показали потенциальную роль комбинации АНСС и ETAS в снижении жизнеспособности ОСК, но концентрация, используемая для 2D-культур, была недостаточной для получения значительного эффекта на пролиферацию опухолевых сфер, которые имитируют физиопатологическое состояние в опухоли.

С другой стороны, комбинация АНСС+ETAS была способна индуцировать значительное подавление экспрессии гена LGR5 в CSCs из SW620. Высокая экспрессия LGR5, специфического маркера стволовости, связана с метастатическим фенотипом и плохим прогнозом при CRC [61]. Понижающая регуляция LGR5, полученная после комбинированного лечения, предполагает потенциальную индукцию дифференцировки клеток. Действительно, экспрессия LGR5 теряется во время физиологической дифференцировки кишечника [62]. Более того, недавнее исследование показало, что LGR5 участвует в поддержании отдаленных метастазов при КРР [63].

Мы также обнаружили значительное снижение экспрессии гена Notch1 в ОСК из клеточной линии SW620. Было продемонстрировано, что Notch1 не регулируется при КРР, что коррелирует с плохой выживаемостью, фенотипом CSC и EMT, что приводит к

прогрессированию опухоли [64]. Снижение экспрессии гена Notch1, которое мы наблюдали в CSC, подтверждает гипотезу о том, что его можно рассматривать как возможную мишень для противоопухолевой терапии.

Наконец, мы продемонстрировали, что комбинация АНСС и ETAS была эффективна в усилении эффектов оксалиплатина, химиотерапевтического препарата, обычно используемого в терапии КРР.

Комбинируемое лечение АНСС и ETAS индуцировало значительное усиление апоптоза, сохраняя колоноциты здоровых доноров, и было способно вызвать сильное снижение миграционного потенциала, сопровождающееся значительной модуляцией белков, участвующих в инвазивности. Комбинируемое лечение смогло значительно усилить цитотоксические эффекты оксалиплатина, проложив путь к новым возможным комбинациям интегративной медицины, вводимым с традиционными химиотерапевтическими препаратами.

4. Материалы и методы

4.1. Подготовка к АНСС и ETAS

АНСС® представляет собой стандартизированный экстракт культивируемого мицелия *Lentinula edodes*, а ETAS® представляет собой стандартизированный экстракт стеблей *Asparagus officinalis*. АНСС и ETAS были предоставлены Amino Up Co., Ltd. (Саппоро, Япония). Свежеприготовленные соединения были растворены в среде DMEM при конечной концентрации 25 мг/мл для АНСС (в виде порошка АНСС-FD) и 20 мг/мл для ETAS (в виде порошка ETAS50). После растворения раствор пропускали через 0,22-микронный фильтр (Sarstedt AG & Co. KG, Нумбрехт, Германия) и использовали в различных концентрациях для АНСС и ETAS.

4.2. Культуры клеточных линий и лечение

Клеточные линии были получены от DSMZ или ATCC и были стандартно проверены на заражение микоплазмой с использованием набора для обнаружения Mycoalert (Lonza, Базель, Швейцария). Линии клеток культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (НСТ-116 и НТ-29), RPMI (LOVO) или среде Leibowitz L 15 (клетки SW620) (Thermo Fisher Scientific Inc., Рокфорд, Иллинойс, США) с добавлением 10–20 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (Thermo Fisher Scientific Inc., Рокфорд, Иллинойс, США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) при 37 °C, во влажной атмосфере 5% CO₂. Клетки SW620 культивировали в среде Leibowitz L-15, составленной для использования в системах, не содержащих CO₂. Клетки обрабатывали комбинацией АНСС и ETAS в следующей концентрации: АНСС 3 мг/мл + ETAS 0,5 мг/мл или АНСС 7 мг/мл + ETAS 1,16 мг/мл в течение 48 часов. Оксалиплатину (от Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) использовали в концентрации 10 мкМ.

4.3. Сбор тканей человека и культура первичных клеток

Биопсии нормальной слизистой оболочки толстой кишки были получены у 11 здоровых пациентов во время рутинной эндоскопии в Университетской больнице Модены. Исследование было одобрено компетентным комитетом по этике и местным агентством здравоохранения Модены, Италия. Каждый пациент, включенный в исследование, подписал подробное письменное информированное согласие. Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией, принципами надлежащей клинической практики для медицинских исследований и действующими правилами, касающимися защиты и обработки персональных и конфиденциальных данных (Европейский регламент № 679/2016). Три образца нормальной слизистой оболочки толстой кишки были взяты у каждого пациента с использованием стандартных эндоскопических биопсийных щипцов (Endo Jaw 2,8 мм, Olympus, Гамбург, Германия) и немедленно помещены в 2 мл среды для роста органоидов Intesticult (Human) (Stemcell Technologies, Ванкувер, Калифорния, США).

Чтобы изолировать единицы крипты/железы, хирургические образцы измельчали скальпелем, и смесь клеток несколько раз пипетировали вверх и вниз, чтобы диссоциировать клетки. Клетки высевали (7×10^4 клеток на лунку) в 96-луночный планшет, инкубировали со средой для роста Organoid и культивировали в течение 72 ч во влажной атмосфере с 5% CO₂.

4.4. Анализ жизнеспособности клеток в клеточных линиях

Пролиферацию клеток после лечения отдельными агентами или комбинированного лечения оценивали с использованием набора МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид] (Roche Diagnostic, Базель, Швейцария) согласно к инструкциям производителя. Комбинированный эффект и потенциальный синергизм оценивали на основе количественного анализа зависимости доза-эффект, как описано Chou и Talalay, с использованием программного обеспечения CompuSyn [65]. Эффекты, зависящие от концентрации и времени, на жизнеспособность клеток АНСС и ETAS (в качестве отдельного агента или в комбинации) определяли с помощью абсолютного подсчета жизнеспособных клеток с помощью проточной цитометрии с использованием 123-кратных eBeads и окрашивания йодидом пропидия (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) для выявления гибели клеток.

4.5. Лечение первичных клеток из биопсии

Клетки, полученные из биоптатов пациентов, обрабатывали комбинацией АНСС и ETAS в следующей концентрации: АНСС 3 мг/мл + ETAS 0,5 мг/мл в течение 48 часов. Каждому пациенту лечение проводилось в трехкратной повторности. Влияние комбинации АНСС и ETAS на жизнеспособность клеток определяли с помощью анализа жизнеспособности клеток MT RealTime-Glo™ (Promega, Фитчбург, Массачусетс, США) в соответствии со стандартными процедурами.

4.6. Выделение раковых стволовых клеток из линий опухолевых клеток

После достижения полуконфлюэнтности в стандартной среде клетки, принадлежащие линиям опухолевых клеток HT-29 и SW620, отделяли от колб с помощью трипсина-ЭДТА и высевали с плотностью 10⁴ клеток/мл в бессывороточную селективную среду, составленную DMEM. / F12 (Sigma-Aldrich, Inc., Сент-Луис, Миссури, США) с добавлением 1 мг/мл EGF (Sigma-Aldrich, Inc., Сент-Луис, Миссури, США), 10 мкг/мл FGF (Gibco, Карлсбад, Калифорния, США) и 1% витамина B27 (Gibco, Карлсбад, Калифорния, США) для индукции селекции раковых стволовых клеток (РСК), способных расти в суспензионных культурах 3D опухолесферы. Через три недели супернатант со сферами РСК собирали, центрифугировали 10 мин при 800 об/мин, затем обрабатывали трипсином-ЭДТА и пипетированием для ферментативной и механической дезагрегации клеток. Селекцию клеток CD326+, предположительно РСК, проводили с использованием набора S-pluriBead (pluriSelect GmbH, Лейпциг, Германия), который позволяет проводить селективную сортировку клеток путем фильтрации клеток, связанных с шариками, конъюгированными со специфическим антителом. Изолированные клетки, отделенные от шариков, немедленно повторно культивировали в соотношении 1:3 для получения селективного и значительного расширения сфер CSC.

4.7. Окрашивание аннексином V-FITC/PI

Клетки обрабатывали АНСС и ETAS (по отдельности или в комбинации) в течение 48 часов, и анализы апоптоза выполняли с помощью набора для обнаружения апоптоза аннексина V-FITC (eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), в соответствии с инструкцией производителя. Анализы выполняли на проточном цитометре FC500 (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США) с соответствующим программным обеспечением (СХР, Beckman Coulter, версия 2.2). Было получено не менее 10 000 событий на образец.

4.8. Иммунофлуоресцентная микроскопия

От каждого пациента было получено 104 клетки, которые были высеяны на предметные стекла с двумя лунками для иммунофлуоресцентного анализа. Клетки обрабатывали АНСС и ETAS в течение 48 часов. В конце периода инкубации клетки фиксировали в 4% параформальдегиде и инкубировали с первичным антителом против человеческого цитокератина-18 (ЕХВ10, Vestec, Чехия) в течение ночи при 4°C. Затем покровные стекла промывали 1× PBS и инкубировали с флуоресцентно-меченым вторичным антителом Alexa Fluor-594 (Thermo Fisher Scientific Inc., Рокфорд, Иллинойс, США) в течение 1 ч при комнатной температуре. Предметные стекла промывали и помещали в 10% раствор DABCO и наблюдали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon A1. Конфокальные серийные срезы обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ для получения трехмерных проекций, а рендеринг изображений выполняли с использованием программного обеспечения Adobe Photoshop CS 8.0 (Adobe Systems, Сан-Хосе, Калифорния, США). Все изображения, показанные в этой статье, являются репрезентативными как минимум для трех независимых экспериментов, проведенных в одинаковых условиях. Для количественного определения цитокератин-18-положительных клеток предметные стекла исследовали при 20-кратном увеличении для каждого условия, чтобы подсчитать почти 150 клеток. Начиная случайным образом, каждое третье поле зрения на одном предметном стекле использовалось для выборки всех клеток в рамках объективной выборки. Этот абсолютный размер выборки практически не зависит от размеров объекта. Каждому состоянию был присвоен кодовый номер, а оценка была определена наблюдателем, который не знал типов образцов во время анализа.

4.9. Вестерн-блоттинг анализы

Иммуноблоттинг проводили с использованием стандартных процедур, как описано ранее [66]. 30 мкг лизатов клеток НСТ-116 и LOVO разделяли с помощью SDS-PAGE с использованием 4–20% полиакриламидных гелей Criterion TGX (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) и наносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad). Все первичные и вторичные антитела были получены от Cell Signaling Technology, Дэнверс, Массачусетс, США. Белки выявляли с использованием ECL, системы визуализации ChemiDoc-It2 и программного обеспечения для анализа VisionWorksLS (UVP, LLC, Upland, CA, USA). Лечение АНСС и ETAS проводили в течение 48 часов. Были показаны репрезентативные изображения вестерн-блоттинга.

4.10. Анализ заживления ран

Клетки (НСТ-116, НТ-29, LOVO и SW620) высевали в 24-луночные планшеты и проводили анализ заживления ран в необработанных (контрольных) и обработанных (АНСС и ETAS) клетках. На следующий день с помощью стерильных наконечников микропипеток делали воспроизводимую продольную царапину в монослое. Процесс закрытия раны контролировали через 0 и 24 ч путем фотографирования центрального поля царапин под инвертированным световым микроскопом (Olympus CKX41, Olympus Corp, Токио, Япония), установленным на цифровую камеру (C-7070 Wide Zoom, Olympus), при 10-кратном увеличении. Изображенное поле каждый раз стандартизировали относительно горизонтальной линии, проведенной на основании планшета, проходящей через центр каждой лунки. Морфометрический анализ миграции клеток проводили с использованием компьютеризированной системы анализа изображений (Qwin, программное обеспечение 3.0, Leica Microsystem Imaging Solution, Ltd., Ветцлар, Германия). Область, которая включала искусственную царапину и соседний клеточный монослой, была выбрана в качестве стандартной интересующей области (ROI). Эффект заживления ран рассчитывали как $(1 - A_x/A_0)\%$, где A_0 и A_x представляли пустую площадь царапины через 0 и 24 часа соответственно.

4.11. Анализ миграции Transwell

Наборы для анализа миграции клеток (анализы CytoSelect) были приобретены у Cell Biolabs (Сан-Диего, Калифорния, США). Мы использовали вставки из поликарбонатной мембраны с размером пор 8 мкм для оценки способности клеток к миграции. Вкратце, в нижние камеры добавляли 500 мкл культуральной среды, содержащей 20% FBS. Клетки ресуспендировали в 300 мкл культуральной среды с 1% FBS и комбинацией АНСС и ETAS (АНСС: 7 мг/мл и ETAS: 1,16 мг/мл) высевали на верхнюю часть мембраны каждой лунки. НСТ-116 высевали при конечной плотности 75000 клеток, тогда как НТ-29, SW620 и LOVO высевали при конечной плотности 300000 клеток. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C в 5% CO₂ во влажной атмосфере. В этот момент клетки инкубировали с раствором для окрашивания клеток в течение 15 минут при комнатной температуре. Затем добавляли раствор для экстракции и инкубировали в течение 15 минут для лизиса клеток. OD при 570 нм измеряли в планшет-ридере ELISA (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Данные были нанесены на график как процент мигрировавших клеток, обработанных лекарственным средством, по сравнению с контрольными мигрировавшими клетками.

4.12. Профилирование протеома

Клетки НСТ-116 и LOVO обрабатывали комбинацией АНСС и ETAS в течение 48 часов. В этот момент стрессовые белки клеток человека определяли с использованием набора массивов стресс-массивов клеток человека Proteome Profiler (R&D systems, Миннеаполис, Миннесота, США) в соответствии с инструкциями производителя. Белки были захвачены с использованием ECL, системы визуализации ChemiDoc-It2 и программного обеспечения VisionWorksLS для анализа (UVP, LLC, Upland, CA, USA).

4.13. CSC Лечение

ОСК, полученные из каждой клеточной линии (НТ-29 и SW620), высевали в 6-луночный микропланшет с плотностью 104 клеток на лунку и обрабатывали следующим раствором: 7 мг/мл АНСС + 1,16 мг/мл ETAS. Все обработки были получены путем растворения маточного раствора АНСС (25 мг/мл) и ETAS (20 мг/мл) в бессывороточной среде, селективной в отношении сфер, составленной DMEM/F12 (Sigma-Aldrich, Inc., Сент-Луис, Миссури, США) с добавлением 1 мг/мл EGF (Sigma-Aldrich, Inc., Сент-Луис, Миссури, США), 10 мкг/мл FGF (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Рокфорд, Иллинойс, США) и 1% витамина B27 (Gibco, Thermo Fisher Scientific Inc., Рокфорд, Иллинойс, США). Эту среду использовали в качестве отрицательного контроля. Все обработки проводились в трехкратной повторности. Через 48 ч обработки клетки собирали и обрабатывали для выделения РНК.

4.14. Экстракция РНК, обратная транскрипция и количественная ОТ-ПЦР

Суммарную РНК выделяли из клеток с помощью набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию и качество общей РНК измеряли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). кДНК получали с использованием набора Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany), начиная с 1 мкг общей РНК каждого образца, и амплифицировали с помощью количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени с использованием Power SYBR® Green Master Mix™ (Life Technologies, Фостер-Сити, Калифорния, США) и специально разработанных прямых и обратных анализов (Sigma-Aldrich, Inc., Сент-Луис, Миссури, США). Последовательности праймеров для маркеров раковых стволовых клеток перечислены в таблице 1.

Был проведен предварительный тест для оценки трех потенциальных эталонных генов (GAPDH, АСТВ, последовательность TFRC-праймер в таблице 2). Ген GAPDH был выбран потому, что его экспрессия была наиболее стабильной среди обработанных и необработанных клеток. Профиль экспрессии выбранных генов оценивали для проверки эффективности лечения (гены и последовательности праймеров в таблице 3).

Таблица 1. Последовательности праймеров маркеров раковых стволовых клеток, использованные в ПЦР в реальном времени (ОТ).

Символ гена	Название гена	Последовательности праймеров 5'–3'
<i>OCT4</i>	POU class 5 homeobox 1	For-CCCGAAAGAGAAAGCGAACC Rev-CTCTCGTTGTGCATAGTCGC
<i>cMyc</i>	Myc proto-oncogene	For-ATTCTCTGCTCTCCTCGACG Rev-TGCGTAGTTGTGCTGATGTG
<i>CD326</i>	Epithelial Cell Adhesion Molecule	For-TCTGTGAAAАCTACAAGCTGGC Rev-GGTTTTGCTCTTCTCCCAAGTT
<i>CD24</i>	CD24 molecule	For-CATGGGCAGAGCAATGGTG Rev-TGGTGGTGGCATTAGTTGGA
<i>CD133</i>	Prominin 1	For-CGACAATGTAАCTCAGCGTCTT Rev-CACACAGTAAGCCCAGGTAGTA
<i>NANOG</i>	Nanog homeobox	For-TGAGTGTGGATCCAGCTTGT Rev-TCTCTGCAGAAGTGGGTTGT
<i>LGR5</i>	Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	For-AAATGCCTTATGCTTACCAG Rev-ATCTTGAGCCTGAAACATTC
<i>ALDH</i>	Aldehyde dehydrogenase	For-GACAATGGAGTCAATGAATGG Rev-ATCAATTGGTATTGTACGGC
<i>STAT3</i>	Signal transducer and activator of transcription 3	For-CCTTTGACATGGAGTTGACC Rev-TAAAAGTGCCCAGATTGCTC

Таблица 2. Последовательности праймеров эталонных генов.

Символ гена	Название гена	Последовательности праймеров 5'–3'
<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	For-ACAGTTGCCATGTAGACC Rev-TTTTTGGTTGAGCACAGG
<i>ACTB</i>	Actin beta	For-GGACTTCGAGCAAGAGATGG Rev-AGCACTGTGTTGGCGTACAG
<i>TFRC</i>	Transferrin Receptor	For-CGCTGGTCAGTTCGTGATTA Rev-GCATTCCCGAAATCTGTTGT

Таблица 3. Последовательности праймеров выбранных генов, использованные в ПЦР в реальном времени (ОТ).

Символ гена	Название гена	Последовательности праймеров 5'–3'
<i>ROCK2</i>	Rho associated coiled-coil containing protein kinase 2	For-ACTCCATTTTATGCGGATTC Rev-CTCCCTATCTGTAAAGAAAGC
<i>TIMP1</i>	TIMP metalloproteinase inhibitor 1	For-CACCTTATACCAGCTTATG Rev-TTTCCAGCAATGAGAAACTC
<i>CDH1</i>	Cadherin 1	For-CTGGGCAGAGTGAATTTTG Rev-GACTGTAATCACACCATCTG
<i>SNAI2</i>	Snail family transcriptional repressor 2	For-CAGTGATTTATTTCCCGTATC Rev-CCCCAAAGATGAGGAGTATC
<i>ITGA5</i>	Integrin subunit alpha 5	For-AAGCTTGGATTCTTCAAACG Rev-TCCTTTTCAGTAGAATGAGGG
<i>LGR5</i>	Leucine rich repeat containing G protein-coupled receptor 5	For-AAATGCCTTATGCTTACCAG Rev-ATCTTGAGCCTGAAACATTC
<i>NOTCH1</i>	Notch 1	For-AAGATATGCAGAACAACAGG Rev-TCCATATGATCCGTGATGTC

Реакции ПЦР проводили в 15 мкл конечного объема, содержащего 7,5 мкл 2× Power SYBR® Green Master Mix™, 100 нМ концентрации каждого праймера и 300 нМ кДНК. Реакции амплификации проводили на приборе ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США). За начальным этапом денатурации при 95°C в течение 10 мин последовали 40 циклов двухэтапного профиля: 15 с при 95°C и 60 с при 60°C. В качестве заключительного этапа был проведен анализ диссоциации кривой плавления. В каждом анализе использовали нематричный контроль, чтобы исключить любые биологические загрязнения.

4.15. Статистика

Данные представлены в виде средних значений ± стандартное отклонение и статистически проанализированы с использованием двустороннего непарного t-критерия или однофакторного дисперсионного анализа и посттеста Бонферрони с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (GraphPad, Сан-Диего, Калифорния, США). Значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым. Количественную оценку экспрессии генов проводили с помощью метода расчета $\Delta/\Delta Ct$ [67]. Статистический анализ для сравнения уровней экспрессии между группами образцов проводили с использованием t-критерия для парных образцов.

5. Выводы

Наше исследование демонстрирует, что комбинация АНСС и ETAS эффективно вызывает противораковые эффекты в клетках КРР, и предполагает потенциальное использование этих соединений в качестве адьювантов для традиционной химиотерапии у пациентов с КРР. Эти данные, возможно, повлияют на имеющийся в нашем распоряжении терапевтический арсенал против КРР.

Дополнительные материалы: следующие материалы доступны в Интернете по адресу <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph14121325/s1>.

Рисунок S1: Лечение АНСС и ETAS не влияет на клетки КРР через 24 часа.

Вклад авторов: концептуализация, исследование, обработка данных, написание первоначального проекта, F.P.; концептуализация, исследование, обработка данных, написание первоначального проекта, F.C.; концептуализация, методология, курирование данных, A.P.; концептуализация, методология, обработка данных, M.M.; методология, обработка данных, визуализация, P.S.; методология, обработка данных, визуализация, J.B.; ресурсы, L.P.; методология, обработка данных, визуализация, A.K.; надзор, обзор и редактирование, A.M.M.; надзор, M.B.; концептуализация, надзор, обзор и редактирование, S.F.; надзор, рецензирование и редактирование, I.H.F. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Это исследование финансировалось РФО 2018, 2019, 2020 (до A.M.M.).

Заявление Институционального наблюдательного совета: исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией, принципами надлежащей клинической практики для медицинских исследований и действующими правилами, касающимися защиты и обработки персональных и конфиденциальных данных (Европейский регламент № 679/2016).). Протокол исследования был специально одобрен местным комитетом по этике (Comitato Etico Provinciale di Modena, Италия) Prot No 4396/C.E.

Заявление об информированном согласии: Информированное согласие было получено от всех участников исследования.

Заявление о доступности данных: данные содержатся в статье и дополнительных материалах.

Благодарности: мы благодарим Агнесе Пеллати (Университет Феррары, факультет трансляционной медицины и Романы) за полезные советы по подготовке культуры опухолевой сферы. Мы также благодарим Аурелио Валмори за его постоянную техническую помощь.

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Использованная литература

1. Rawla, P.; Sunkara, T.; Barsouk, A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Prz. Gastroenterol.* **2019**, *14*, 89–103.
2. Goodwin, R.A.; Asmis, T.R. Overview of systemic therapy for colorectal cancer. *Clin. Colon. Rectal. Surg.* **2009**, *22*, 251–256.
3. Filip, S.; Vymetalkova, V.; Petera, J.; Vodickova, L.; Kubecek, O.; John, S.; Cecka, F.; Krupova, M.; Manethova, M.; Cervena, K.; et al. Distant Metastasis in Colorectal Cancer Patients-Do We Have New Predicting Clinicopathological and Molecular Biomarkers? A Comprehensive Review. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 5255.
4. Rosenthal, D.S.; Dean-Clower, E. Integrative medicine in hematology/oncology: Benefits, ethical considerations, and controversies. *Hematology* **2005**, *2005*, 491–497.
5. Cornelis, F.H.; Najdawi, M.; Ammar, M.B.; Nouri-Neuville, M.; Lombart, B.; Lotz, J.P.; Cadranel, J.; Barral, M. Integrative Medicine in Interventional Oncology: A Virtuous Alliance. *Medicina* **2020**, *56*, 35.

6. Greenwell, M.; Rahman, P.K. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **2015**, *6*, 4103–4112.
7. Balachandran, P.; Govindarajan, R. Cancer—An ayurvedic perspective. *Pharmacol. Res.* **2005**, *51*, 19–30.
8. Shin, M.S.; Park, H.J.; Maeda, T.; Nishioka, H.; Fujii, H.; Kang, I. The Effects of AHCC(R), a Standardized Extract of Cultured *Lentinula edodes* Mycelia, on Natural Killer and T Cells in Health and Disease: Reviews on Human and Animal Studies. *J. Immunol. Res.* **2019**, *2019*, 3758576.
9. Masuda, Y.; Nakayama, Y.; Tanaka, A.; Naito, K.; Konishi, M. Antitumor activity of orally administered maitake alpha-glucan by stimulating antitumor immune response in murine tumor. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0173621.
10. Hoshi, H.; Yagi, Y.; Iijima, H.; Matsunaga, K.; Ishihara, Y.; Yasuhara, T. Isolation and characterization of a novel immunomodulatory alpha-glucan-protein complex from the mycelium of *Tricholoma matsutake* in basidiomycetes. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 8948–8956.
11. Gao, Y.; Zhang, D.; Sun, B.; Fujii, H.; Kosuna, K.; Yin, Z. Active hexose correlated compound enhances tumor surveillance through regulating both innate and adaptive immune responses. *Cancer Immunol. Immunother.* **2006**, *55*, 1258–1266.
12. Choi, J.Y.; Lee, S.; Yun, S.M.; Suh, D.H.; Kim, K.; No, J.H.; Jeong, E.H.; Kim, Y.B. Active Hexose Correlated Compound (AHCC) Inhibits the Proliferation of Ovarian Cancer Cells by Suppressing Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Activation. *Nutr. Cancer* **2018**, *70*, 109–115.
13. Takahashi, M.; Fujii, G.; Hamoya, T.; Kurokawa, Y.; Matsuzawa, Y.; Miki, K.; Komiya, M.; Narita, T.; Mutoh, M. Activation of NF-E2 p45-related factor-2 transcription and inhibition of intestinal tumor development by AHCC, a standardized extract of cultured *Lentinula edodes* mycelia. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **2019**, *65*, 203–208.
14. Tokunaga, M.; Baron, B.; Kitagawa, T.; Tokuda, K.; Kuramitsu, Y. Active Hexose-correlated Compound Down-regulates Heat Shock Factor 1, a Transcription Factor for HSP27, in Gemcitabine-resistant Human Pancreatic Cancer Cells. *Anticancer Res.* **2015**, *35*, 6063–6067.
15. Hangai, S.; Iwase, S.; Kawaguchi, T.; Kogure, Y.; Miyaji, T.; Matsunaga, T.; Nagumo, Y.; Yamaguchi, T. Effect of active hexose-correlated compound in women receiving adjuvant chemotherapy for breast cancer: A retrospective study. *J. Altern. Complement. Med.* **2013**, *19*, 905–910.
16. Hirose, A.; Sato, E.; Fujii, H.; Sun, B.; Nishioka, H.; Aruoma, O.I. The influence of active hexose correlated compound (AHCC) on cisplatin-evoked chemotherapeutic and side effects in tumor-bearing mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2007**, *222*, 152–158.
17. Shigama, K.; Nakaya, A.; Wakame, K.; Nishioka, H.; Fujii, H. Alleviating effect of active hexose correlated compound (AHCC) for anticancer drug-induced side effects in non-tumor-bearing mice. *J. Exp. Ther. Oncol.* **2009**, *8*, 43–51.
18. Sun, B.; Wakame, K.; Sato, E.; Nishioka, H.; Aruoma, O.I.; Fujii, H. The effect of active hexose correlated compound in modulating cytosine arabinoside-induced hair loss, and 6-mercaptopurine- and methotrexate-induced liver injury in rodents. *Cancer Epidemiol.* **2009**, *33*, 293–299.
19. Ye, S.F.; Ichimura, K.; Wakame, K.; Ohe, M. Suppressive effects of Active Hexose Correlated Compound on the increased activity of hepatic and renal ornithine decarboxylase induced by oxidative stress. *Life Sci.* **2003**, *74*, 593–602.
20. Aviles, H.; O'Donnell, P.; Orshal, J.; Fujii, H.; Sun, B.; Sonnenfeld, G. Active hexose correlated compound activates immune function to decrease bacterial load in a murine

- model of intramuscular infection. *Am. J. Surg.* **2008**, *195*, 537–545.
21. Roman, B.E.; Beli, E.; Duriancik, D.M.; Gardner, E.M. Short-term supplementation with active hexose correlated compound improves the antibody response to influenza B vaccine. *Nutr. Res.* **2013**, *33*, 12–17.
 22. Ito, T.; Ono, T.; Sato, A.; Goto, K.; Miura, T.; Wakame, K.; Nishioka, H.; Maeda, T. Toxicological assessment of enzyme-treated asparagus extract in rat acute and subchronic oral toxicity studies and genotoxicity tests. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2014**, *68*, 240–249.
 23. Shimada, T.; Nanimoto, Y.; Baron, B.; Kitagawa, T.; Tokuda, K.; Kuramitsu, Y. Enzyme-treated Asparagus Extract Down-regulates Heat Shock Protein 27 of Pancreatic Cancer Cells. *In Vivo* **2018**, *32*, 759–763.
 24. Chan, Y.C.; Wu, C.S.; Wu, T.C.; Lin, Y.H.; Chang, S.J. A Standardized Extract of Asparagus officinalis Stem (ETAS((R))) Ameliorates Cognitive Impairment, Inhibits Amyloid beta Deposition via BACE-1 and Normalizes Circadian Rhythm Signaling via MT1 and MT2. *Nutrients* **2019**, *11*, 1631.
 25. Sakurai, T.; Ito, T.; Wakame, K.; Kitadate, K.; Arai, T.; Ogasawara, J.; Kizaki, T.; Sato, S.; Ishibashi, Y.; Fujiwara, T.; et al. Enzyme-treated Asparagus officinalis extract shows neuroprotective effects and attenuates cognitive impairment in senescence-accelerated mice. *Nat. Prod. Commun.* **2014**, *9*, 101–106.
 26. Shirato, K.; Takanari, J.; Sakurai, T.; Ogasawara, J.; Imaizumi, K.; Ohno, H. Enzyme-Treated Asparagus Extract Prevents Hydrogen Peroxide-Induced Pro-Inflammatory Responses by Suppressing p65 Nuclear Translocation in Skin L929 Fibroblasts. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 1883–1888.
 27. Shirato, K.; Takanari, J.; Ogasawara, J.; Sakurai, T.; Imaizumi, K.; Ohno, H.; Kizaki, T. Enzyme-Treated Asparagus Extract Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression in Murine Skin Fibroblast L929 Cells. *Nat. Prod. Commun.* **2016**, *11*, 677–680.
 28. Oda, K.; Arakawa, H.; Tanaka, T.; Matsuda, K.; Tanikawa, C.; Mori, T.; Nishimori, H.; Tamai, K.; Tokino, T.; Nakamura, Y.; et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* **2000**, *102*, 849–862.
 29. Li, P.; Nijhawan, D.; Budihardjo, I.; Srinivasula, S.M.; Ahmad, M.; Alnemri, E.S.; Wang, X. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **1997**, *91*, 479–489.
 30. Murphy, K.M.; Ranganathan, V.; Farnsworth, M.L.; Kavallaris, M.; Lock, R.B. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ.* **2000**, *7*, 102–111.
 31. Rouse, J.; Cohen, P.; Trigon, S.; Morange, M.; Alonso-Llamazares, A.; Zamanillo, D.; Hunt, T.; Nebreda, A.R. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* **1994**, *78*, 1027–1037.
 32. Concannon, C.G.; Gorman, A.M.; Samali, A. On the role of Hsp27 in regulating apoptosis. *Apoptosis* **2003**, *8*, 61–70.
 33. Kang, S.H.; Kang, K.W.; Kim, K.H.; Kwon, B.; Kim, S.K.; Lee, H.Y.; Kong, S.Y.; Lee, E.S.; Jang, S.G.; Yoo, B.C. Upregulated HSP27 in human breast cancer cells reduces Herceptin susceptibility by increasing Her2 protein stability. *BMC Cancer* **2008**, *8*, 286.
 34. Hsu, H.S.; Lin, J.H.; Huang, W.C.; Hsu, T.W.; Su, K.; Chiou, S.H.; Tsai, Y.T.; Hung, S.C. Chemoresistance of lung cancer stemlike cells depends on activation of Hsp27. *Cancer* **2011**, *117*, 1516–1528.

35. Yang, Y.; Bao, Y.; Yang, G.K.; Wan, J.; Du, L.J.; Ma, Z.H. MiR-214 sensitizes human colon cancer cells to 5-FU by targeting Hsp27. *Cell Mol. Biol. Lett.* **2019**, *24*, 22.
36. Suenaga, S.; Kuramitsu, Y.; Kaino, S.; Maehara, S.; Maehara, Y.; Sakaida, I.; Nakamura, K. Active hexose-correlated compound down-regulates HSP27 of pancreatic cancer cells, and helps the cytotoxic effect of gemcitabine. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 141–146.
37. Kanwar, S.S.; Yu, Y.; Nautiyal, J.; Patel, B.B.; Majumdar, A.P. The Wnt/beta-catenin pathway regulates growth and maintenance of colonospheres. *Mol. Cancer* **2010**, *9*, 212.
38. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J. Clin.* **2019**, *69*, 7–34.
39. Vishnubhotla, R.; Sun, S.; Huq, J.; Bulic, M.; Ramesh, A.; Guzman, G.; Cho, M.; Glover, S.C. ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging. *Lab Investig.* **2007**, *87*, 1149–1158.
40. Lane, J.; Martin, T.A.; Watkins, G.; Mansel, R.E.; Jiang, W.G. The expression and prognostic value of ROCK I and ROCK II and their role in human breast cancer. *Int. J. Oncol.* **2008**, *33*, 585–593.
41. Kamai, T.; Tsujii, T.; Arai, K.; Takagi, K.; Asami, H.; Ito, Y.; Oshima, H. Significant association of Rho/ROCK pathway with invasion and metastasis of bladder cancer. *Clin. Cancer Res.* **2003**, *9*, 2632–2641.
42. Said, A.H.; Raufman, J.P.; Xie, G. The role of matrix metalloproteinases in colorectal cancer. *Cancers* **2014**, *6*, 366–375.
43. Dragutinovic, V.V.; Radonjic, N.V.; Petronijevic, N.D.; Tatic, S.B.; Dimitrijevic, I.B.; Radovanovic, N.S.; Krivokapic, Z.V. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) in preoperative serum as independent prognostic markers in patients with colorectal cancer. *Mol. Cell Biochem.* **2011**, *355*, 173–178.
44. Hazan, R.B.; Qiao, R.; Keren, R.; Badano, I.; Suyama, K. Cadherin switch in tumor progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2004**, *1014*, 155–163.
45. Zhang, Z.; Bu, X.; Chen, H.; Wang, Q.; Sha, W. Bmi-1 promotes the invasion and migration of colon cancer stem cells through the downregulation of E-cadherin. *Int. J. Mol. Med.* **2016**, *38*, 1199–1207.
46. Cronin, K.A.; Lake, A.J.; Scott, S.; Sherman, R.L.; Noone, A.M.; Howlader, N.; Henley, S.J.; Anderson, R.N.; Firth, A.U.; Ma, J.; et al. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer* **2018**, *124*, 2785–2800.
47. Van der Jeught, K.; Xu, H.C.; Li, Y.J.; Lu, X.B.; Ji, G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 3834–3848.
48. Spierings, E.L.; Fujii, H.; Sun, B.; Walshe, T. A Phase I study of the safety of the nutritional supplement, active hexose correlated compound, AHCC, in healthy volunteers. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **2007**, *53*, 536–539.
49. Terakawa, N.; Matsui, Y.; Satoi, S.; Yanagimoto, H.; Takahashi, K.; Yamamoto, T.; Yamao, J.; Takai, S.; Kwon, A.H.; Kamiyama, Y. Immunological effect of active hexose correlated compound (AHCC) in healthy volunteers: A double-blind, placebo-controlled trial. *Nutr. Cancer* **2008**, *60*, 643–651.
50. Matsui, Y.; Uhara, J.; Satoi, S.; Kaibori, M.; Yamada, H.; Kitade, H.; Imamura, A.; Takai, S.; Kawaguchi, Y.; Kwon, A.H.; et al. Improved prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients when treated with functional foods: A prospective cohort study. *J. Hepatol.* **2002**, *37*, 78–86.
51. Matsushita, K.; Kuramitsu, Y.; Ohiro, Y.; Obara, M.; Kobayashi, M.; Li, Y.Q.; Hosokawa, M. Combination therapy of active hexose correlated compound plus UFT significantly reduces the metastasis of rat mammary adenocarcinoma. *Anticancer Drugs* **1998**, *9*, 343–

350.

52. Rajesh, E.; Sankari, L.S.; Malathi, L.; Krupaa, J.R. Naturally occurring products in cancer therapy. *J. Pharm. Bioallied. Sci.* **2015**, *7*, S181–S183.
53. Amano, M.; Nakayama, M.; Kaibuchi, K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* **2010**, *67*, 545–554.
54. Pinca, R.S.; Manara, M.C.; Chiadini, V.; Picci, P.; Zucchini, C.; Scotlandi, K. Targeting ROCK2 rather than ROCK1 inhibits Ewing sarcoma malignancy. *Oncol. Rep.* **2017**, *37*, 1387–1393.
55. Zucchini, C.; Manara, M.C.; Cristalli, C.; Carrabotta, M.; Greco, S.; Pinca, R.S.; Ferrari, C.; Landuzzi, L.; Pasello, M.; Lollini, P.L.; et al. ROCK2 deprivation leads to the inhibition of tumor growth and metastatic potential in osteosarcoma cells through the modulation of YAP activity. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **2019**, *38*, 503.
56. Dalerba, P.; Dylla, S.J.; Park, I.K.; Liu, R.; Wang, X.; Cho, R.W.; Hoey, T.; Gurney, A.; Huang, E.H.; Simeone, D.M.; et al. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 10158–10163.
57. Guo, W.; Keckesova, Z.; Donaher, J.L.; Shibue, T.; Tischler, V.; Reinhardt, F.; Itzkovitz, S.; Noske, A.; Zurrer-Hardi, U.; Bell, G.; et al. Slug and Sox9 cooperatively determine the mammary stem cell state. *Cell* **2012**, *148*, 1015–1028.
58. Mani, S.A.; Guo, W.; Liao, M.J.; Eaton, E.N.; Ayyanan, A.; Zhou, A.Y.; Brooks, M.; Reinhard, F.; Zhang, C.C.; Shipitsin, M.; et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **2008**, *133*, 704–715.
59. Ye, X.; Tam, W.L.; Shibue, T.; Kaygusuz, Y.; Reinhardt, F.; Ng Eaton, E.; Weinberg, R.A. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* **2015**, *525*, 256–260.
60. de Sousa e Melo, F.; Kurtova, A.V.; Harnoss, J.M.; Kljavin, N.; Hoeck, J.D.; Hung, J.; Anderson, J.E.; Storm, E.E.; Modrusan, Z.; Koepfen, H.; et al. A distinct role for Lgr5(+) stem cells in primary and metastatic colon cancer. *Nature* **2017**, *543*, 676–680.
61. Merlos-Suarez, A.; Barriga, F.M.; Jung, P.; Iglesias, M.; Cespedes, M.V.; Rossell, D.; Sevillano, M.; Hernando-Momblona, X.; da Silva-Diz, V.; Munoz, P.; et al. The intestinal stem cell signature identifies colorectal cancer stem cells and predicts disease relapse. *Cell Stem. Cell* **2011**, *8*, 511–524.
62. Barker, N.; van Es, J.H.; Kuipers, J.; Kujala, P.; van den Born, M.; Cozijnsen, M.; Haegebarth, A.; Korving, J.; Begthel, H.; Peters, P.J.; et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5. *Nature* **2007**, *449*, 1003–1007.
63. Fumagalli, A.; Oost, K.C.; Kester, L.; Morgner, J.; Bornes, L.; Bruens, L.; Spaargaren, L.; Azkanaz, M.; Schelfhorst, T.; Beerling, E.; et al. Plasticity of Lgr5-Negative Cancer Cells Drives Metastasis in Colorectal Cancer. *Cell Stem. Cell* **2020**, *26*, 569–578.
64. Yuan, R.; Ke, J.; Sun, L.; He, Z.; Zou, Y.; He, X.; Chen, Y.; Wu, X.; Cai, Z.; Wang, L.; et al. HES1 promotes metastasis and predicts poor survival in patients with colorectal cancer. *Clin. Exp. Metastasis* **2015**, *32*, 169–179.
65. Chou, T.C.; Talalay, P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: The combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv. Enzyme Regul.* **1984**, *22*, 27–55.
66. Evangelisti, C.; Paganelli, F.; Giuntini, G.; Mattioli, E.; Cappellini, A.; Ramazzotti, G.; Faenza, I.; Maltarello, M.C.; Martelli, A.M.; Scotlandi, K.; et al. Lamin A and Prelamin A Counteract Migration of Osteosarcoma Cells. *Cells* **2020**, *9*, 774.

67. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408.