

• 基础研究 •

双氢青蒿素通过 mTOR 信号通路对肝癌 Hep-G2 细胞凋亡的影响

福建省福州市第二医院 (福州 350007) 陈 扬 萨本仲 张 韬 汪 涛¹ 尤龙木

【摘 要】 目的 探讨双氢青蒿素 (Dihydroartemisinin, DHA) 诱导人肝癌 Hep-G2 细胞凋亡的作用机制。**方法** 将实验分为实验组 (DHA)、无水乙醇组 (C_2H_5O) 及空白对照组 (Mock), 利用分光光度法检测细胞的增殖, 流式细胞仪检测细胞的生长周期, Western Blot 检测 mTOR 信号通路关键因子的表达。**结果** DHA 在 $15\mu M$ 处对 Hep-G2 有较好的抑制效果, DHA 组的相对吸光率在第二天开始就与 Mock 组与 C_2H_5O 组差异性显著, 并随着增殖天数的增加, 差异性逐步加大; DHA 组的细胞凋亡率高于 Mock 组与 C_2H_5O 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$), DHA 对细胞凋亡的影响发生在 G1 期; DHA 组的 p21、Bax 的 mRNA 及蛋白相对表达量高于 Mock 组与 C_2H_5O 组 ($P < 0.001$), Bcl-2 的 mRNA 及蛋白相对表达量低于 Mock 组与 C_2H_5O 组 ($P < 0.001$)。**结论** DHA 对 HepG2 细胞的作用是通过影响 mTOR 信号通路来实现的。

【关键词】 双氢青蒿素; 肝癌; mTOR 信号通路

【中图分类号】 R73 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1002-2600(2022)04-0121-03

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的恶性肿瘤之一, 研究表明 HCC 居男性肿瘤第 5 位, 在女性肿瘤中占第 9 位, 在癌症导致的死亡中排第 2 位^[1]。目前的肝癌的治疗以肝切除术、肝移植、射频消融术、经肝动脉化疗栓塞术和索拉非尼等手段为主要的治疗方式^[2]。早期肝癌 5 年生存率为 40% 至 70%, 中期肝癌 3 年生存率仅为 60%, 晚期肝癌通过口服多靶点激酶抑制剂索拉非尼可提高 3 个月的生存期, 但其平均生存期不到 1 年^[3-4]。青蒿素是我国学者在 20 世纪 70 年代从中草药黄花蒿中分离出的一种倍半萜内酯类抗疟药。随着机制研究的深入, 发现青蒿素及其衍生物 (青蒿琥酯、青蒿醚、蒿甲醚、双氢青蒿素等) 除了表现出抗疟疾功能以外, 在抗炎、抗真菌、抗病毒、抗癌等方面也发挥重要作用。本研究通过考察 DHA 对人肝癌 Hep-G2 细胞增殖、凋亡以及蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (protein kinase B/mammalian target of rapamycin, Akt/mTOR) 信号通路相关基因表达的影响来明确 DHA 对 Hep-G2 的确切作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料和仪器: 人肝癌 HepG2 细胞系购自美国 ATCC 公司, DHA 购自成都瑞芬思生物科技有限公司, 荧光定量 PCR 试剂盒、AnexinV-FITC、PI 染色液购自美国 Thermo scientific 公司, 胎牛血清 (FBS)、双抗购自美国 Gibco 公司, 胰酶、Tris-base、EDTA、SDS、聚丙烯酰胺、甘氨酸、 β -巯基乙醇、亚甲双丙烯酰胺、10% 过硫酸铵、TEMED、Tween20、cocktai、DMSO、DEPC 水、结晶紫、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、RNA 提取试剂 Total RNA Extractor 购自上海生工生物公司, CCK-8、超敏 ECL 化学发光显影液购自碧云天生物公司, 迁移实验用的小室、PVDF 膜购自美国 Millipore 公司, 无水乙醇、甲醇、异丙醇、氯仿等均均为国产分析纯。

1.2 方法:

1.2.1 人肝癌 Hep-G2 细胞系的培养: 取人肝癌 Hep-G2 细胞系置于含 15% 的胎牛血清的 DMEM 培养基中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、0.05% CO_2 条件下每 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期细胞以 0.25% 的胰酶进行消化, 制备单细胞悬液用于实验。

1.2.2 DHA IC₅₀ 的测定: 消化收集细胞悬液, 接种于 96 孔板中 (5 000 个/100 μL /孔, 每组设 5 个平行孔, 共需 35 孔), 将 DHA 溶解于生理盐水并用细胞培养液稀释, 由高到低设置浓度分别为 20、10、5、2.5、0 μM (共 5 组) 加入细胞培养皿中孵育细胞 48 h 后, 移除培养基后用 PBS 洗涤, 每孔加入 100 μL 培养基及 10 μL CCK-8 再培养 3 h, 用酶标仪检测各孔波长 480 nm 处的吸光度, 取每组平均值, 以选取合适的 DHA 浓度。

1.2.3 实验分组: 将实验分为实验 (DHA) 组、无水乙醇组 (C_2H_5O) 组及空白对照 (Mock) 组; 实验组中加入 1.2.2 确定的 DHA 浓度的 DHA, 无水乙醇组加入与实验组中同等剂量的无水乙醇, 空白对照组则不做处理。

1.2.4 不同组细胞增殖能力的测定: 细胞计数器收取 5 000 个细胞置于 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 对细胞进行 1.2.3 分组处理。每隔 24 h 移除培养基用 PBS 洗涤, 随后每孔加入 100 μL 培养基及 10 μL CCK-8 再培养 3 h, 最后采用酶标仪检测各孔 480 nm 波长处的吸光度。

1.2.5 不同组细胞凋亡水平的检测: 取同体积细胞悬液接种于培养皿中, 按照前述分组处理细胞并置于孵箱中培育 24 h, 消化后制备各组细胞悬液, PBS 洗涤后加入 5 μL AnexinV-FITC 及 5 μL PI 染色液混匀, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min 后, 使用 BD Accuri C6 型流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况。

1.2.6 不同组细胞周期、凋亡和转移相关基因蛋白表达的检测: 去除各组细胞上清废液, PBS 清洗细胞 4 次, 吸去

基金项目: 福州市科技计划项目 (2019-SZ-15)

1 福建医科大学附属口腔医院

PBS, 随后加适量的裂解液到孔中, 收取蛋白。冰上放置 10 min, 14 000 rpm、4 °C 条件下离心 10 min, 将蛋白移到新 EP 管中, 按照 BCA 试剂盒说明书测定蛋白浓度。随后进行 SDS-PAGE 电泳, 加入变性剂 SDS, 金属浴加热到 95 °C 处理 10 min, 电泳结束后利用电转膜法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 洗膜 3 次后采用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 分别加入不同种类一抗 4 °C 孵育过夜。次日去除一抗, 50 mL 的 TTBS 和膜置于洗膜盒中, 洗膜 3 次, 每次 10 min。继续二抗孵育 1 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min, 随后用天能 5100 显影仪进行显影。

1.2.7 不同组迁移侵袭能力的检测: 提前 12~24 h 换上无血清培养基来饥饿各组细胞, 利用 Transwell 小室进行实验。上室种入 105 个细胞, 下室加 500 μ L 含 15% FBS 的 DMEM 培养基。48 h 后取出小室, 甲醛固定, 结晶紫染色观察。上皮间充质转化相关蛋白检测同 1.2.6。

1.3 统计学方法: 应用 SPSS 21.0 对结果进行统计分析。数值表示为均值 \pm 标准差, 采用 Student's *t*-检验分析两组间的差异, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 青蒿素 IC₅₀ 的确定: 根据 OD 值计算得 IC₅₀ (15.4 μ M), 结果见图 1A。根据 IC₅₀ 值设置浓度梯度对 HepG2 细胞进行处理后提取蛋白检测 p-mTOR, 随着 DHA 浓度增加其表达量下调, 在 15 μ M 处有较好的抑制效果, 表明 DHA 通过 mTOR 信号通路影响肝癌细胞 HepG2 的生物学进程, 结果见图 1B。

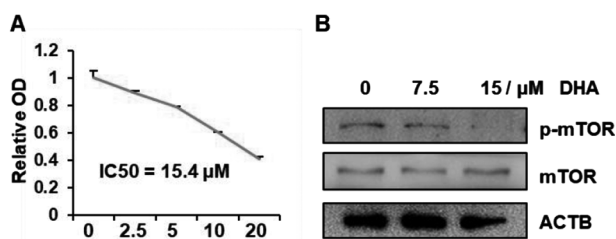


图 1 不同浓度 DHA 对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用

2.2 DHA 对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响: 结果见图 2, Mock 组与 C₂H₆O 组在细胞增殖水平上无显著性差异并持续至第 5 天, 而 DHA 组则在第 2 天开始就与 Mock 组与 C₂H₆O 组差异性显著, 并随着增殖天数的增加, 差异性逐步加大。

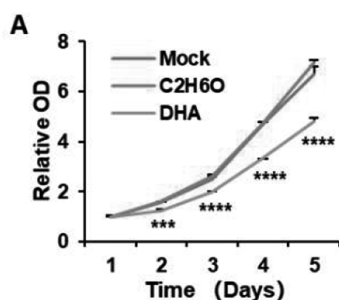


图 2 不同组对人肝癌 HepG2 细胞增殖的影响

2.3 DHA 对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响: 从图 3A、图 3B 可以看出, DHA 组的细胞凋亡率要显著高于 Mock 组与 C₂H₆O 组, 差异性显著 ($P < 0.001$), Mock 组与 C₂H₆O 组无显著性差异。从图 3C、图 3D 可以看出, DHA 对细胞凋亡的影响发生在 G1 期。

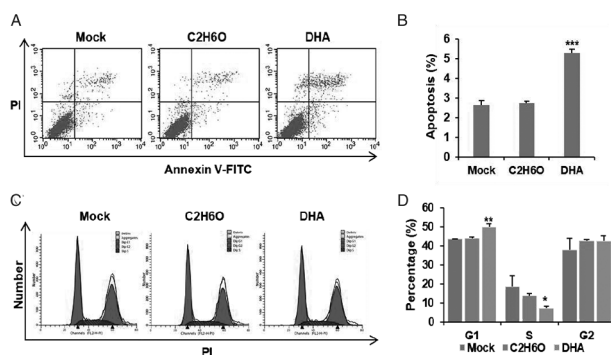


图 3 不同组对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响

2.4 DHA 对人肝癌 HepG2 细胞凋亡、mTOR 基因表达的影响: 图 4A 示 DHA 组的 p21、Bax 的 mRNA 相对表达量高于 Mock 组与 C₂H₆O 组, 而 DHA 组中 Bcl-2 的 mRNA 低于 Mock 组与 C₂H₆O 组, 结果表明 DHA 在基因水平促进 Hep-G2 细胞凋亡基因表达。图 4B 示 DHA 组 Bax、p21 蛋白表达上升, 而 Bcl-2 表达下调, 同时 p-mTOR 表达上调, 说明 DHA 在蛋白水平通过磷酸化 mTOR 促进细胞凋亡。

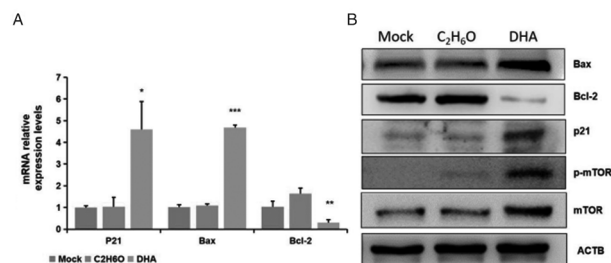


图 4 不同组对人肝癌 HepG2 细胞周期、凋亡和转移相关基因表达的影响

2.5 DHA 对 Hep-G2 细胞上皮间充质转化的影响: 图 5A、B 示 DHA 抑制 Hep-G2 细胞侵袭力, 图 5C 示 DHA 降低了间质标志物 (MMP9、Snail、Slug) 的表达。结果表明 DHA 可以抑制 Hep-G2 细胞的迁移、侵袭能力。

3 讨论

DHA 是青蒿素的一类衍生物, 研究表明 DHA 在多种癌细胞中发挥抗癌作用。其主要通过活性氧和一氧化氮的氧化应激反应、DNA 损伤和修复 (碱基切除修复、同源重组、非同源末端连接)、各种细胞死亡模式 (细胞凋亡、自噬、坏死)、抑制血管生成, 抑制肿瘤相关的信号转导途径 (如 Wnt/ β -catenin 途径, AMPK 途径等) 以及信号转导 (NF- κ B, MYC/MAX) 等方式发挥作用。

本研究发现, DHA 能够抑制 Hep-G2 细胞增殖、促进凋亡基因及其蛋白表达, 通过流式细胞仪对细胞周期进一步

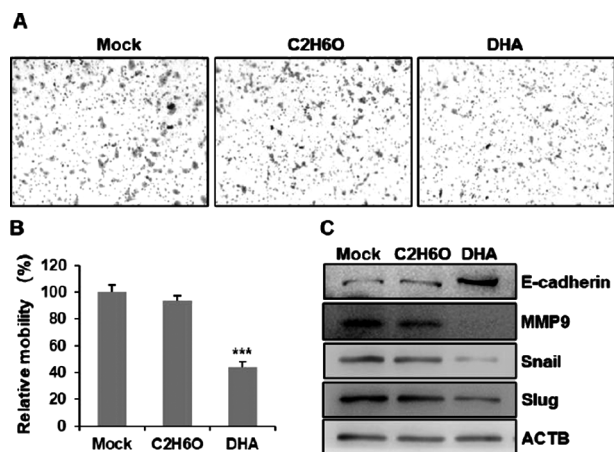


图 5 DHA 对 HepG2 细胞上皮间充质转化的影响

检测发现 DHA 能够将肿瘤细胞的生长阻碍在 G1 期, 进一步说明 DHA 通过影响 HepG2 细胞的凋亡和周期来抑制细胞增殖。在胰腺癌细胞系中, DHA 可降低 Cyclin E、CDK2、CDK4 和 CDK6 的表达, 在抑制 NF- κ B 活性的同时上调 p27 表达水平, 从而阻滞细胞由 G0/G1 期进入 S 期^[5]。这与本研究结果相符。本文进一步证实 DHA 可磷酸化 mTOR, 影响 p21、Bax 及 Bcl-2 表达, 从而激活下游基因发挥抗癌作用。这也说明了 DHA 对 Hep-G2 细胞的作用可能是通过影响 mTOR 信号通路来实现的, 但与其他抑制肝癌细胞活性的机制是否存在相互作用或联系仍有待进一步研究。同时 DHA 降低 MMP9、Snail、Slug 蛋白表达水平, 促进 E-cadherin 表达上调, 表明 DHA 具有促进间充质-上皮转化, 降低癌细胞侵袭转移能力。

目前恶性肿瘤的治疗需要综合序贯治疗或联合用药。现有研究表明^[6]利用 DHA 处理神经胶质瘤细胞后, 发现其通过诱导细胞凋亡显示出抗肿瘤作用, DHA 联合使用替莫唑胺 (TMZ) 通过增强 TMZ 自噬效能, 诱导胶质瘤细胞自噬, 提高 TMZ 的抗胶质瘤活性。Lee DH 等也发现 DHA 与多西紫杉醇具有协同作用, 能提高人前列腺癌小鼠模型的总体生存率^[7]。而在肝癌细胞中, 关于 DHA 联合用药相关的研究较少, 有待进一步研究。

近年研究发现, DHA 可通过抑制 mTOR 通路促进横纹肌肉瘤、尤因肉瘤细胞的凋亡, 而 mTOR 在癌症进程中具有重要调控作用^[8]。mTOR 位于 PI3K/Akt 途径的下游, mTOR 在 HCC 中经常上调, 并且与预后不良, 分化差、及早期复发相关, 且 mTOR 的激活在 HCC 发病机制中起核心作用^[9], 因此阻断 mTOR 途径可能是 HCC 治疗的极具前景的治疗思路。本研究证实 DHA 通过抑制 mTOR 信号通路促进 HCC 凋亡, 这为 HCC 的治疗提供新的研究视角。

参考文献

- [1] 胡铭洋, 吴绮楠, 吴永忠. 肝癌的靶向和免疫治疗 [J]. 重庆医科大学学报, 2019, 44 (12): 1547-1552.
- [2] 马婧, 王霄, 宋争放, 等. 肝癌 AASLD、EASL、JSH 指南及中国诊疗规范的比较 [J]. 肿瘤的预防与治疗, 2019, 32 (11): 1031-1038.
- [3] Gory I, Fink M, Bell S, et al. Radiofrequency ablation versus resection for the treatment of early stage hepatocellular carcinoma: a multicenter Australian study [J]. Scand J Gastroenterol, 2015, 50 (5): 567-576.
- [4] Maucourt-Boulch D, de MC C, Franceschi S, et al. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide [J]. Int J Cancer, 2018, 142 (12): 2471-2477.
- [5] Hua C, Bei S, Wang S, et al. Growth inhibitory effects of dihydroartemisinin on pancreatic cancer cells: involvement of cell cycle arrest and inactivation of nuclear factor- κ B [J]. Journal of Cancer Research & Clinical Oncology, 2010, 136 (6): 897-903.
- [6] 严峻, 文静, 陈海南, 等. 二氢青蒿素联合替莫唑胺抑制胶质瘤细胞增殖和诱导凋亡 [J]. 中华实验外科杂志, 2019, 36 (2): 274-276.
- [7] Lee D H, Hasanuzzaman M, Kwon D, et al. 10-phenyltriazoyl artemisinin is a novel p-glycoprotein inhibitor that suppresses the overexpression and function of P-glycoprotein [J]. Curr Pharm Des, 2018, 24: 5590-5597.
- [8] 曹鹏, 冷东瑾, 李滢, 等. 双氢青蒿素抗肿瘤分子生物学机制研究进展 [J]. 浙江大学学报: 医学版, 2016, 45 (5): 501-507.
- [9] 郑鹏生, 冀静. mTOR 信号通路与研究进展 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2010, 31 (1): 5-9.

• 基础研究 •

PI3K/AKT/mTOR 信号通路及细胞周期蛋白在头颈部 HPV 相关鳞癌中表达分析

浙江省宁波市临床病理诊断中心组织病理科 (宁波 315021) 高尤亮 甘咏莉 陈佳意 胡苏琴

【摘要】目的 研究 PI3K/AKT/mTOR 信号通路及细胞周期蛋白在头颈部人乳头瘤病毒 (HPV) 相关鳞癌中表达。**方法** 选择头颈部鳞癌组织 40 例, 其中 HPV 相关鳞癌 20 例, 非 HPV 相关鳞癌 20 例, 同时以 20 例正常鳞状上皮为对照组, 免疫组化检测癌组织与正常组织 PI3K、AKT、mTOR、细胞周期蛋白 cyclin D1、cyclin B1、cyclin E 表达。**结果** 20