

抑制自噬可以增强七叶皂苷钠对肝细胞性肝癌的抑制作用

方超, 周大臣, 崔笑, 魏昇, 耿小平

摘要 目的 探讨七叶皂苷钠对肝细胞性肝癌(HCC)自噬流的影响,以及自噬抑制剂氯喹对七叶皂苷钠的影响。方法

七叶皂苷钠处理 HCC 细胞系(Huh7、HepG2 和 Hep3B)后进行 Western blot 分析,自噬抑制剂氯喹和七叶皂苷钠联合作用于细胞系后进行 Western blot、MTT、细胞凋亡和克隆形成实验。结果 与对照组相比,七叶皂苷钠增加了 LC3B 蛋白的表达量,并且能够抑制 PI3K/AKT 信号通路。七叶皂苷钠和氯喹联合应用后,LC3B 蛋白的表达量明显高于单独用药。另外,与对照组或者单独用药组比较,两种药物联合后,细胞生存率显著下降($P < 0.05$),早期凋亡增加($P < 0.01$),克隆形成能力减弱($P < 0.001$)。结论 七叶皂苷钠作用于 HCC 后,可以诱导保护性自噬,并且氯喹可以增强七叶皂苷钠的作用效果。

关键词 七叶皂苷钠;肝细胞性肝癌;自噬;氯喹

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)12-1866-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.12.004

原发性肝癌的发病率在癌症中位于第 6 位,病死率位于第 4 位,其中,肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)占了 75%~85%^[1]。对于 HCC 患者来说,主要的治疗方法包括肝脏切除、肝脏移植、射频消融、经导管动脉化疗栓塞术和药物治疗,但是这些治疗都存在一定的局限性。自噬(在此特指巨自噬)是细胞内一个重要的高度保守的分解代谢过程,可以为细胞的生长发育提供营养物质^[2]。它能够保护正常肝细胞,阻止其发生癌变,但是当 HCC 形成后,自噬会促进癌细胞的生长^[3]。七叶皂苷钠是中药娑罗子的一种自然提取物,先前的研究^[4-5]已经表明了它在 HCC 中的抗肿瘤作用。这篇文章主要研究七叶皂苷钠对 HCC 细胞自噬流的影响及自噬抑制剂氯喹对七叶皂苷钠作用效果的影响。

2021-09-13 接收

基金项目:安徽医科大学校级科研基金(编号:2017xkj034);安徽省自然科学基金(编号:1808085MH270)

作者单位:安徽医科大学第二附属医院普外科,合肥 230601

作者简介:方超,男,硕士研究生;

耿小平,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: xp_geng@163.net

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 七叶皂苷钠购自美国 APEX BIO 公司;氯喹购自美国 MCE 公司;HCC 细胞系 Huh7、HepG2 和 Hep3B 购自中国科学院上海细胞库;胎牛血清购自美国 Gibco 公司;青霉素/链霉素、BCA 试剂盒和 4% 多聚甲醛购自上海碧云天生物技术有限公司;DMEM 购自美国 Hyclone 公司;0.25% 胰酶购自美国 Wisen 公司; β -Actin, PI3K (p85), AKT, 4E-BP1, Phospho-4E-BP1 (Thr37/46) 购自美国 CST 公司;LC3B 购自美国 Abcam 公司;山羊抗鼠或抗兔二抗购自北京中杉金桥公司;MTT 购自美国 Sigma 公司;二甲基亚砜(DMSO)和 0.1% 结晶紫购自北京索莱宝科技有限公司;Annexin V-异硫氰酸荧光素(FITC)/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒购自美国 BD 公司。

1.1.2 主要仪器 细胞培养箱购自美国 Thermo Fisher 公司;酶标仪购自上海科华生物工程股份有限公司;CytoFLEX 流式细胞仪购自美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 3 种细胞系(Huh7、HepG2 和 Hep3B)均在含有 10% 胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素的 DMEM 中培养,并放置于细胞培养箱中,培养温度为 37 °C,含有 5% CO₂。细胞培养液每 2 d 更换 1 次,每 3~5 d 传 1 次代,用 0.25% 胰酶消化,所有细胞培养不超过 10 代。

1.2.2 细胞蛋白提取及 Western blot 分析 RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂按照 100:10:1 的比例配制成所需的蛋白提取液,裂解细胞 15 min 后收集所有液体在 4 °C 离心机中离心 20 min,转速为 13 000 r/min,吸取上清液,置于 -80 °C 冰箱保存。使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,将蛋白液和上样缓冲液按照比例混合,于 100 °C 变性 10 min。将变性后的蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳、转膜。将蛋白条带置于 5% 胎牛血清白蛋白中,在室温孵育 1 h,在 4 °C 冰箱孵育一抗过夜,第 2 天在室

温孵育相应鼠抗或兔抗 1 h,使用显影仪进行蛋白条带显影。

1.2.3 MTT 检测 细胞种植于 96 孔板中,每孔 3 000 个细胞,100 μ l 培养液。第 2 天,用药物处理细胞 48 h 之后,在每个孔中加入 10 μ l MTT (5 mg/ml),于细胞培养箱中孵育 4 h。然后吸净培养液,每孔加入 150 μ l DMSO 溶解结晶,振荡 10 min 混匀,使用酶标仪在 570 nm 和 630 nm 处测定吸光度,最终吸光度为两者差值。细胞生存率计算方法:处理组吸光度/对照组吸光度。

1.2.4 克隆形成实验 细胞种植于 6 孔板中,每孔 1 000 个细胞。第 2 天,用药物处理细胞 12 h 后换成正常培养基,之后每隔 2~3 d 换 1 次培养液,并于显微镜下观察,直到形成 50 个细胞左右的细胞团。吸弃培养基,加入 1 ml 4% 多聚甲醛固定 10 min。然后吸弃多聚甲醛,加入 1 ml 0.1% 结晶紫染色 15 min,拍照,使用 Image-J 软件计数。

1.2.5 细胞凋亡检测 使用药物处理 6 孔板中的细胞 48 h 后,消化,离心收集细胞,洗涤细胞,将 5 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI 分别加入每一个流式管中,在室温避光孵育 15 min。然后,使用 Cyt-oFLEX 流式细胞仪在 1 h 内检测细胞凋亡。

1.3 统计学处理 使用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计分析。所有实验至少重复 3 次以上,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。3 组或 3 组以上数据使用单因素方差分析,多组间均数两两比较使用 Tukey 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 七叶皂苷钠对 HCC 细胞自噬流的促进作用

根据先前的研究结果,确定了七叶皂苷钠的浓度为 40 μ mol/L。在其处理 3 种细胞系(Huh7、HepG2 和 Hep3B) 24 h 后,Western blot 结果显示,与对照组相比,七叶皂苷钠上调了 LC3B 蛋白的表达水平(图 1)。另外,当七叶皂苷钠和氯喹联合使用 12 h 后,联合处理组的 LC3B 蛋白表达量高于七叶皂苷钠和氯喹单独处理组(图 2)。

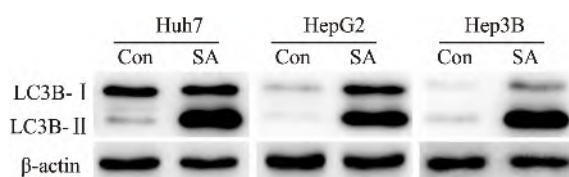


图 1 七叶皂苷钠处理细胞 24 h 后 LC3B 蛋白表达量
Con: 对照组; SA: 七叶皂苷钠处理组,浓度为 40 μ mol/L

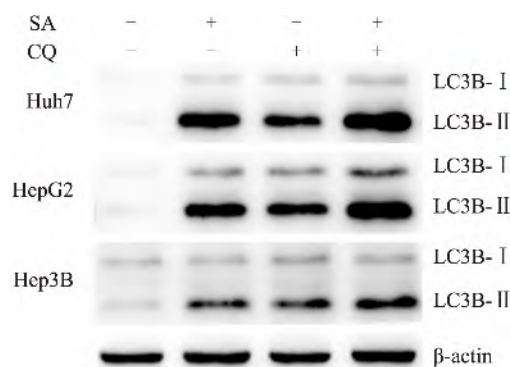


图 2 七叶皂苷钠和氯喹联合用药 12 h 后 LC3B 蛋白表达量
SA: 七叶皂苷钠处理组,浓度为 40 μ mol/L; CQ: 氯喹,浓度为 60 μ mol/L; + 表示加入, - 表示未加入

2.2 七叶皂苷钠对 PI3K/AKT 信号通路的抑制作用

七叶皂苷钠抑制了 Huh7 和 HepG2 细胞内 PI3K/AKT 信号通路。Western blot 结果表明,七叶皂苷钠抑制了 PI3K 以及 AKT 的表达。此外,七叶皂苷钠还下调了蛋白 4EBP1 的表达并抑制了其磷酸化水平(图 3)。

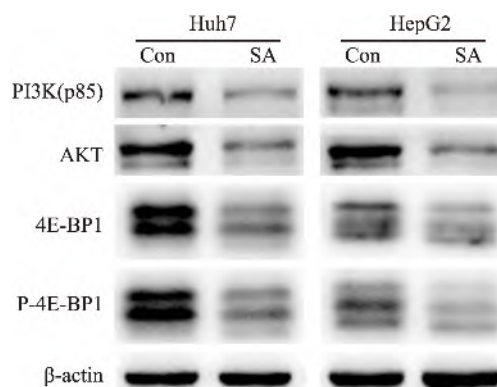


图 3 七叶皂苷钠处理细胞 48 h 后 PI3K/AKT 通路蛋白表达量
Con: 对照组; SA: 七叶皂苷钠处理组,浓度为 40 μ mol/L

2.3 氯喹对七叶皂苷钠抗肿瘤效果的增强作用

在 HCC 细胞系(Huh7、HepG2 和 Hep3B)中,七叶皂苷钠和氯喹联合应用 48 h 后,与对照组或者单独用药相比,细胞生存率降低,差异有统计学意义(3 种细胞系中, F 值分别为 711.90、63.89 和 146.30, $P < 0.05$) (图 4)。此外,联合用药 48 h 后,Huh7 [$F = 17.33$; 七叶皂苷钠 vs 联合用药: $(5.52 \pm 2.33) \%$ vs $(13.53 \pm 3.19) \%$, $P = 0.0067$] 和 HepG2 [$F = 158.00$; 七叶皂苷钠 vs 联合用药: $(31.15 \pm 3.56) \%$ vs $(51.76 \pm 2.51) \%$, $P < 0.001$] 细胞的早期凋亡率增加(图 5)。同时,七叶皂苷钠和氯喹联合处理细

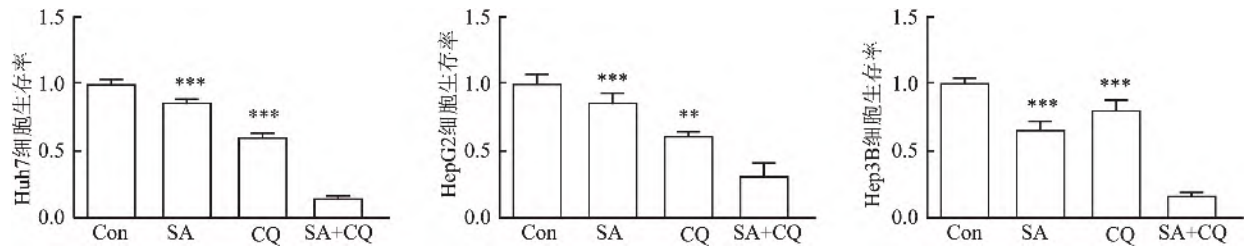


图4 药物处理 48 h 后 MTT 检测结果

Con: 对照组; SA: 七叶皂苷钠处理组, 浓度为 40 μmol/L; CQ: 氯喹处理组, 浓度为 60 μmol/L; SA + CQ: 七叶皂苷钠和氯喹联合用药组; 与 SA + CQ 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

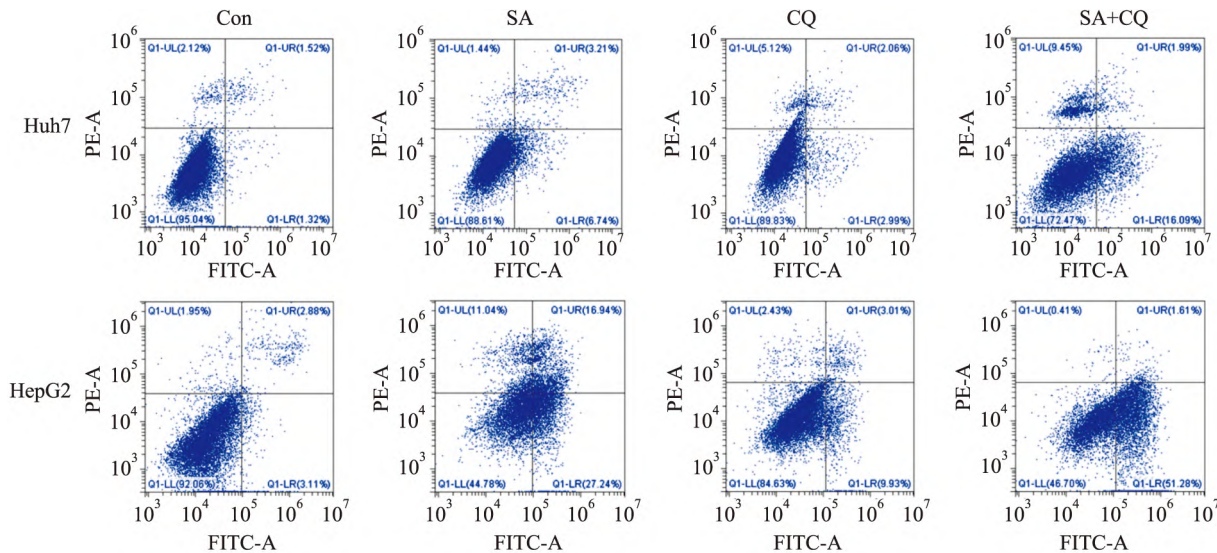
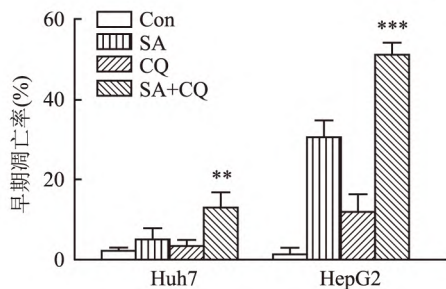


图5 药物处理 48 h 后细胞凋亡检测结果

Con: 对照组; SA: 七叶皂苷钠处理组, 浓度为 40 μmol/L; CQ: 氯喹处理组, 浓度为 60 μmol/L; SA + CQ: 七叶皂苷钠和氯喹联合用药组; 与 SA 组比较: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$



胞 12 h 后, Huh7 [$F = 1789.00$; 七叶皂苷钠 vs 联合用药: (71.00 ± 3.61) vs (9.00 ± 3.61) , $P < 0.001$] 和 HepG2 [$F = 1731.00$; 七叶皂苷钠 vs 联合用药: (225.30 ± 22.19) vs (95.00 ± 9.17) , $P < 0.001$] 的细胞克隆数减少(图 6)。

3 讨论

LC3B-II 蛋白是自噬小体形成的一个重要标志, 主要是通过细胞内的 LC3B-I 蛋白与磷脂酰乙醇胺 (PE) 结合而形成。在该研究中, 七叶皂苷钠作用后的 HCC 细胞, LC3B-II 蛋白的表达水平明显增加, 间接表明七叶皂苷钠可以诱导 HCC 细胞产生大量的自噬小体。而自噬小体的大量增加一般有两个原

因, 一是因为自噬流的分解过程被阻断, 自噬小体不能被降解, 沉积在细胞内; 另一个原因是自噬流增加, 自噬小体的合成增加了。当氯喹被使用去抑制自噬流的分解过程时, 七叶皂苷钠诱导形成的 LC3B-II 蛋白表达量反而比单独用药时更高, 表明自噬小体的增加是由于它的合成增加, 而不是自噬小体的降解被抑制^[6]。因此, 综合这些研究结果可以证实七叶皂苷钠确实能够诱导 HCC 细胞的自噬流。

至于具体的分子机制, 该研究表明七叶皂苷钠可以下调 PI3K 和 AKT 蛋白, 而且 mTOR 的下游蛋白 4EBP1 的磷酸化也被抑制了。通过这个结果, 可以推测七叶皂苷钠抑制了 PI3K / AKT 信号通路,

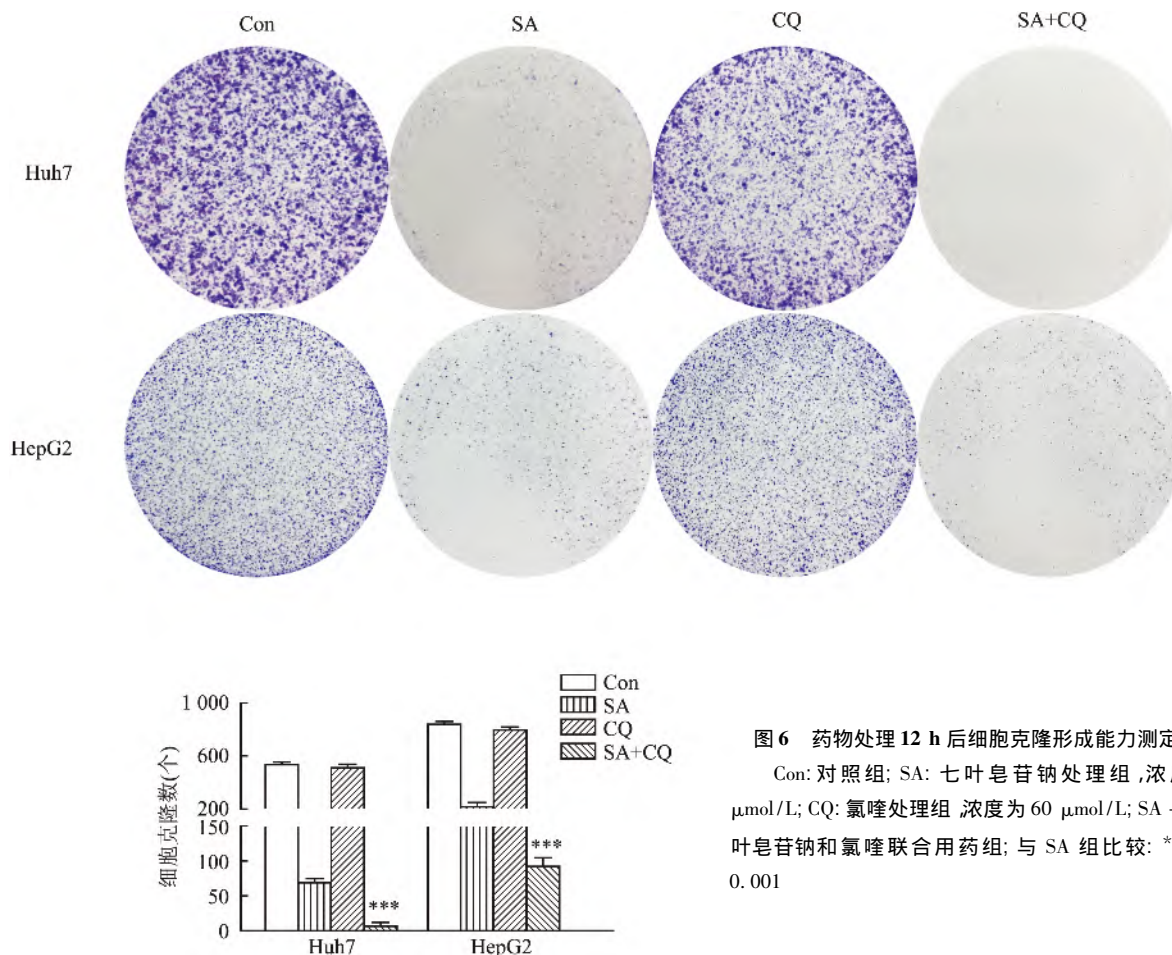


图6 药物处理 12 h 后细胞克隆形成能力测定结果

Con: 对照组; SA: 七叶皂苷钠处理组, 浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$; CQ: 氯喹处理组, 浓度为 60 $\mu\text{mol/L}$; SA + CQ: 七叶皂苷钠和氯喹联合用药组; 与 SA 组比较: *** $P < 0.001$

并且也抑制了 mTOR 蛋白的表达, 因此, 其促进了 HCC 细胞的自噬流^[7]。

尽管已经证实七叶皂苷钠确实促进了 HCC 细胞的自噬流, 但是这个上调的自噬流在 HCC 细胞中所起的作用以及对七叶皂苷钠的影响还不是很明确。从目前已知情况来看, 自噬在 HCC 中所发挥的作用是十分复杂多变的。它能够将细胞内衰老的细胞器, 错误折叠的蛋白等降解成小分子物质(核苷、氨基酸、脂肪酸等), 这样既可以维持细胞内环境的稳定, 也可以为细胞提供生长所必需的营养物质, 所以从这个角度来看, 它可以促进 HCC 细胞的生长, 帮助癌细胞在一些应激环境下生存, 甚至适应这些环境^[3, 8]。然而另一方面, 自噬能够通过抑制 HCC 细胞中的炎症反应来抑制癌细胞生长, 并且自噬介导的自噬性细胞死亡也是杀伤癌细胞的一种方式, 一些研究表明促进自噬流可以延缓 HCC 的发展, 而抑制自噬流则有利于 HCC 的发展^[3, 8]。

为了弄清楚七叶皂苷钠诱导的自噬流对 HCC 细胞的影响, 氯喹被用来抑制 HCC 细胞的自噬流。

实验结果显示, 当自噬流被抑制时, 七叶皂苷钠可以进一步降低癌细胞的生存率, 促进细胞早期凋亡, 抑制细胞克隆形成能力。这些发现表明抑制自噬可以增强七叶皂苷钠的作用效果, 也就是说七叶皂苷钠诱导的自噬是保护性的^[9-10]。当七叶皂苷钠杀伤癌细胞时, 细胞会产生更多的自噬流, 为其自身提供营养物质, 维持生长, 保护细胞, 在一定程度上抵消了药物的作用效果^[11-12]。因此, 当 HCC 细胞的自噬流被氯喹阻断时, 癌细胞失去了这个保护作用, 导致七叶皂苷钠的抗肿瘤效果变强了。

综上所述, 七叶皂苷钠可以增加 HCC 的自噬流, 并且通过阻断自噬流, 可以增强七叶皂苷钠的作用效果。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68 (6): 394-424.
- [2] Kimmelman A C, White E. Autophagy and tumor metabolism [J].

- Cell Metab, 2017, 25(5): 1037–43.
- [3] Liu L, Liao J Z, He X X, et al. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34): 57707–22.
- [4] 王石, 周大臣, 崔笑, 等. 七叶皂苷钠作用 EIF4A1 抑制肝癌细胞增殖的研究 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(8): 1120–5.
- [5] Hou H, Li W X, Cui X, et al. CARMA3_NF- κ B signaling contributes to tumorigenesis of hepatocellular carcinoma and is inhibited by sodium aescinate [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(36): 5483–93.
- [6] Klionsky D J, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1–222.
- [7] Al-Bari M A A, Xu P. Molecular regulation of autophagy machinery by mTOR-dependent and -independent pathways [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, 1467(1): 3–20.
- [8] Yazdani H O, Huang H, Tsung A. Autophagy: dual response in the development of hepatocellular carcinoma [J]. *Cells*, 2019, 8(2): 91.
- [9] Zhao F, Huang W, Zhang Z, et al. Triptolide induces protective autophagy through activation of the CaMKK β -AMPK signaling pathway in prostate cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5): 5366–82.
- [10] Xu W P, Liu J P, Feng J F, et al. miR-541 potentiates the response of human hepatocellular carcinoma to sorafenib treatment by inhibiting autophagy [J]. *Gut*, 2020, 69(7): 1309–21.
- [11] Li Y J, Lei Y H, Yao N, et al. Autophagy and multidrug resistance in cancer [J]. *Chin J Cancer*, 2017, 36(1): 52.
- [12] Li X, Zhou Y, Li Y, et al. Autophagy: a novel mechanism of chemoresistance in cancers [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 119: 109415.

Inhibiting autophagy can potentiate the inhibitory effect of sodium aescinate in hepatocellular carcinoma

Fang Chao, Zhou Dachen, Cui Xiao, et al

(Dept of General Surgery, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the influence of sodium aescinate on the autophagic flux in hepatocellular carcinoma (HCC), and the influence of chloroquine on the effect of sodium aescinate. **Methods** HCC cell lines (Huh7, HepG2 and Hep3B) were treated with sodium aescinate, then the proteins extracted from these cells were analyzed by the Western blot. After the co-administration of sodium aescinate and chloroquine, the Western blot, MTT assay, cell apoptosis assay, and colony formation assay were executed. **Results** Compared with the control, sodium aescinate upregulated the LC3B protein and inhibited the PI3K/AKT signaling pathway. The combination of sodium aescinate and chloroquine induced more expression of LC3B protein than the single drug. Furthermore, compared with the control or single drug, the combined treatment significantly decreased the cell viability ($P < 0.05$), increased the early apoptosis ($P < 0.01$), and attenuated the ability of colony formation ($P < 0.001$). **Conclusion** Sodium aescinate induces the protective autophagy in HCC, and chloroquine can potentiate the effect of sodium aescinate.

Key words sodium aescinate; hepatocellular carcinoma; autophagy; chloroquine

☆ ☆ ☆ ☆ ☆

勘误说明: 因作者申请 将《安徽医科大学学报》2021 年第 3 期 480–485 页“男性 71 例”更正为“男性 72 例”。