

# 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%<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。七叶皂苷钠是中药娑罗子的一种自然提取物,先前的研究<sup>[4-5]</sup>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; $\beta$ -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% CO<sub>2</sub>。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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l Annexin V-FITC 和 5  $\mu$ 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  $\mu$ 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)。

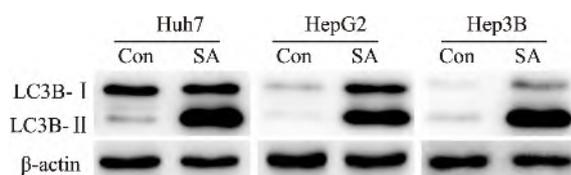


图 1 七叶皂苷钠处理细胞 24 h 后 LC3B 蛋白表达量  
Con: 对照组; SA: 七叶皂苷钠处理组, 浓度为 40  $\mu$ mol/L

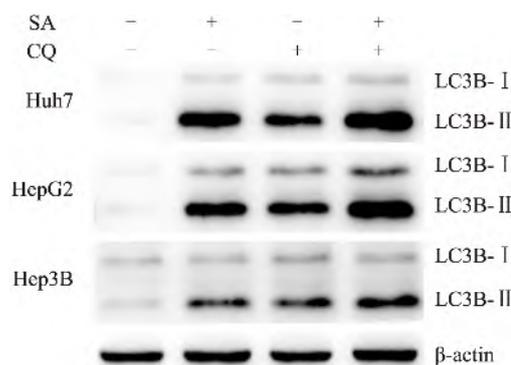


图 2 七叶皂苷钠和氯喹联合用药 12 h 后 LC3B 蛋白表达量  
SA: 七叶皂苷钠处理组, 浓度为 40  $\mu$ mol/L; CQ: 氯喹, 浓度为 60  $\mu$ mol/L; + 表示加入, - 表示未加入

### 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)。

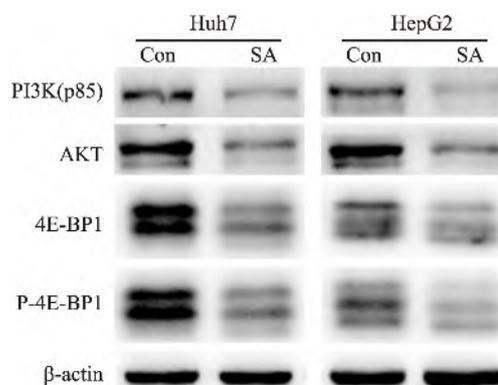


图 3 七叶皂苷钠处理细胞 48 h 后 PI3K/AKT 通路蛋白表达量  
Con: 对照组; SA: 七叶皂苷钠处理组, 浓度为 40  $\mu$ mol/L

### 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

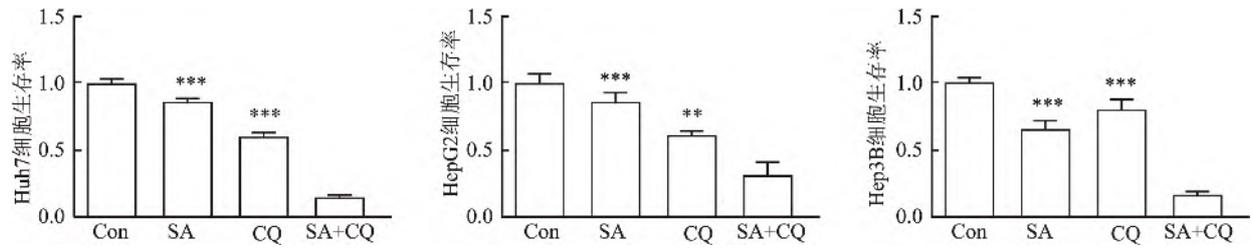


图4 药物处理 48 h 后 MTT 检测结果

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: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

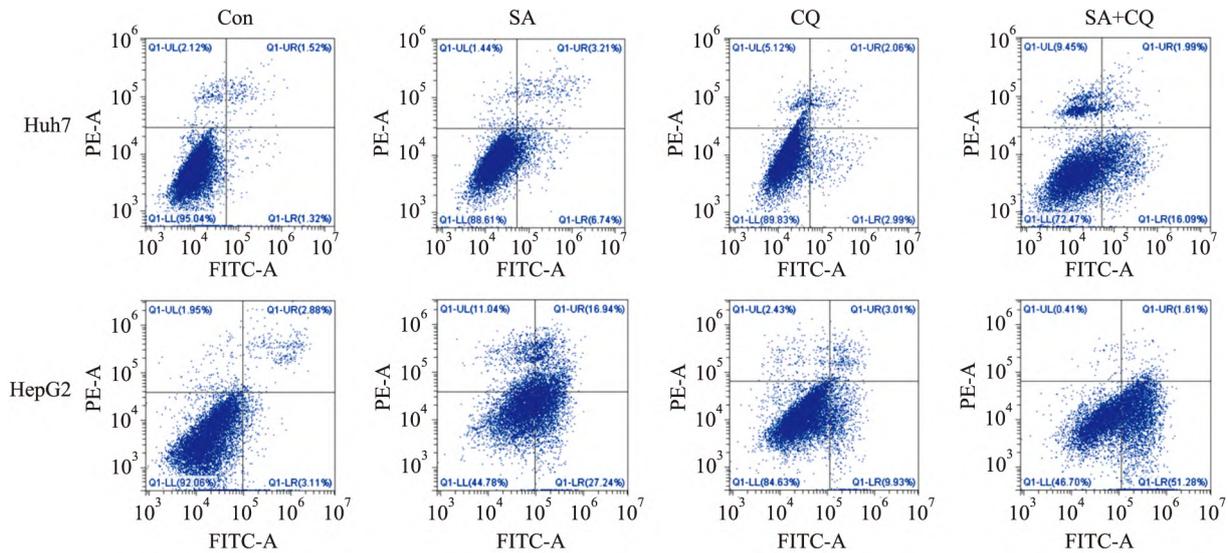


图5 药物处理 48 h 后细胞凋亡检测结果

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:  $(71.00 \pm 3.61)$  vs  $(9.00 \pm 3.61)$ ,  $P < 0.001$ ] 和 HepG2 [ $F = 1731.00$ ; 七叶皂苷钠 vs 联合用药:  $(225.30 \pm 22.19)$  vs  $(95.00 \pm 9.17)$ ,  $P < 0.001$ ] 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<sup>[6]</sup>。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,

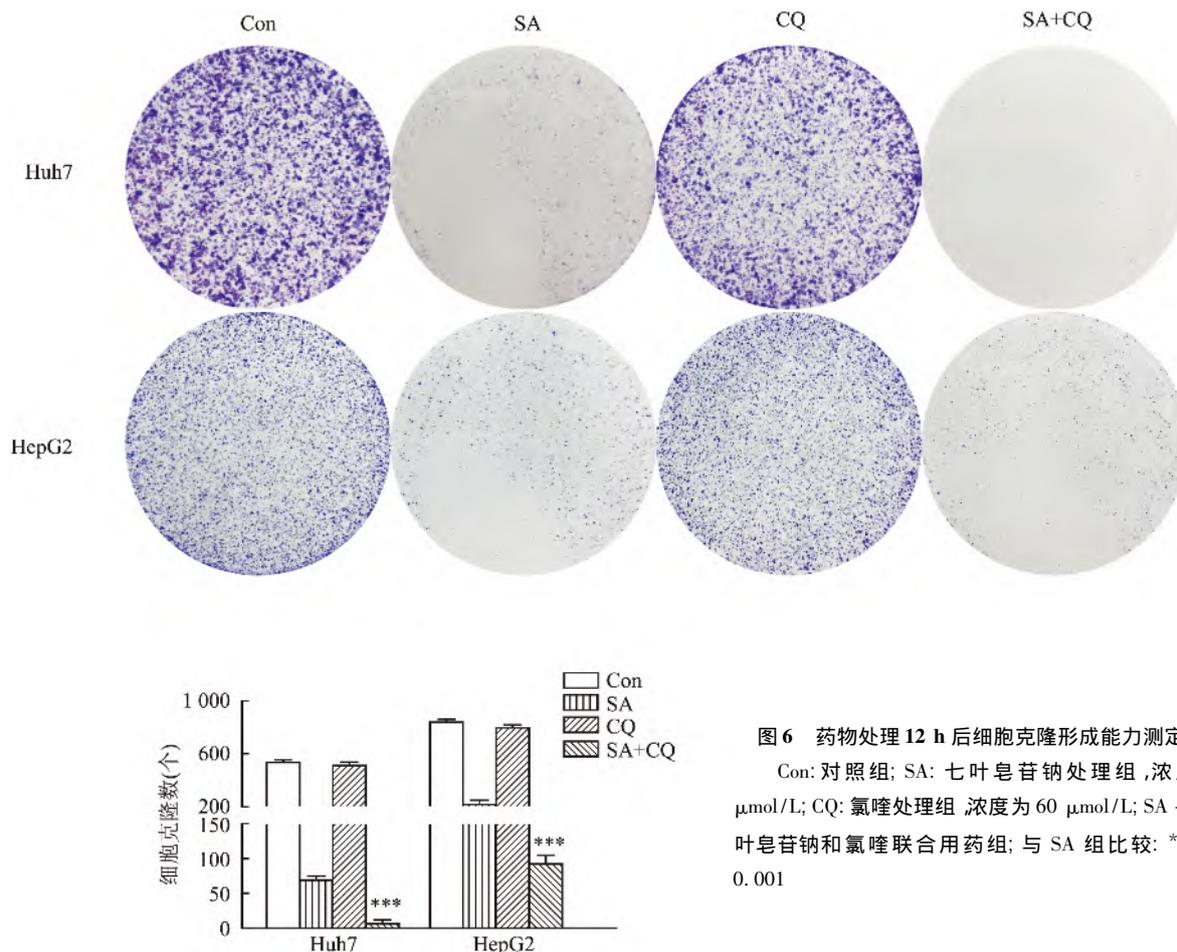


图6 药物处理12 h后细胞克隆形成能力测定结果

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<sup>[7]</sup>。

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。从目前已知的情况来看, 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<sup>[3, 8]</sup>。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<sup>[3, 8]</sup>。

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<sup>[9-10]</sup>。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<sup>[11-12]</sup>。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- $\kappa$ 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 $\beta$ -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”。