

延胡索乙素通过线粒体活性氧调控能量代谢表型转换促进人肝细胞癌凋亡

尹逊哲¹, 刘作家^{1*}, 汪劲^{2*}

(1. 中国科学院 长春应用化学研究所 电分析化学国家重点实验室, 吉林 长春 130022;

2. 纽约州立大学 石溪分校 化学与物理系, 纽约 11790-3400)

[摘要] 线粒体是维持细胞稳态的重要细胞器,在决定细胞命运中起着至关重要的作用。该文旨在探讨延胡索乙素(levotetrahydropalmatine, THP)上调线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS)对人肝细胞癌自噬流和能量代谢表型的影响。选用 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞株作为模型,经 THP ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和/或 *N*-乙酰-L-半胱氨酸(*N*-acetyl-L-cysteine, NAC) ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞 24 h 后,利用 MitoSOX 荧光探针与流式细胞术检测 mtROS 变化水平,并同时通过荧光显微镜对 mtROS 进行可视化观察;利用 CYTO-ID 自噬荧光探针检测自噬流的变化情况,采用 Western blot 检测 2 种肝癌细胞中微管相关蛋白轻链 3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)与磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)蛋白表达;Seahorse XFP 检测细胞线粒体能量代谢变化趋势,通过实时无标记 RTCA 检测对肝癌细胞增殖的影响;Annexin V-FITC 和 PI/RNase 染色流式细胞术检测细胞凋亡率,MitoTracker Red CMXRos 荧光探针可视化观察线粒体膜电位变化。结果表明,与对照组相比,THP 可促进 SMMC-7721 和 BEL-7402 肝癌细胞内 mtROS 产生,发现联合 NAC 后削弱了由 THP 单独引发的自噬或自噬流的增加。添加自噬抑制剂氯喹(chloroquine, CQ)后发现,THP 可进一步促进 mtROS 产生并增加凋亡率。进一步实验表明,THP 可以抑制线粒体呼吸水平,导致线粒体基础呼吸、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)产量及最大呼吸能力下降。同时,THP 显著降低了肝癌细胞的增殖指数和线粒体膜电位,进而诱导细胞发生凋亡达到抑制细胞增殖的目的,而 NAC 则缓解这种细胞凋亡的产生。结果表明,THP 上调 mtROS 水平可显著促进人肝细胞癌细胞自噬,引发的自噬为保护性自噬,并通过重编程能量代谢表型进而抑制线粒体呼吸,激活线粒体凋亡途径而引发细胞凋亡。

[关键词] 延胡索乙素; 肝细胞癌; 自噬; 能量代谢; 线粒体呼吸

Levo-tetrahydropalmatine promotes apoptosis of human hepatocellular carcinoma through switching energy metabolism phenotype via upregulation of mitochondrial reactive oxygen species

YIN Xun-zhe¹, LIU Zuo-jia^{1*}, WANG Jin^{2*}

(1. State Key Laboratory of Electroanalytical Chemistry, Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130022, China; 2. Department of Chemistry and Physics, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, New York 11790-3400, USA)

[Abstract] Mitochondrion is an important organelle that maintains cellular homeostasis and plays a crucial role in determining cell fate. The present study investigated the effect of levo-tetrahydropalmatine (THP) on autophagic flux and energy metabolism phenotype

[收稿日期] 2022-05-20

[基金项目] 吉林省科技发展计划项目(20200301009RQ)

[通信作者] * 刘作家, 博士, 副研究员, 主要从事药物毒理学研究, E-mail: zjliu@ciac.ac.cn; * 汪劲, 博士, 教授, 主要从事生物物理学研究, E-mail: jin.wang.1@stonybrook.edu

[作者简介] 尹逊哲, 博士, E-mail: xzyin@ciac.ac.cn

of human hepatocellular carcinoma (HCC) SMMC-7721 and BEL-7402 cells. SMMC-7721 and BEL-7402 cells were treated with THP ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) with or without *N*-acetyl-L-cysteine (NAC, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 24 h. The mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) was detected by flow cytometry (FCM) with MitoSOX probe and fluorescence microscopy, respectively. Thereafter, autophagic flux was detected by FCM with CYTO-ID probe, and the protein levels of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3-I (LC3 I), LC3 II, and phosphorylated AMP-activated protein kinase (p-AMPK)/AMPK were measured by Western blot. Mitochondrial respiration was examined by Seahorse XFp assay and cell proliferation by a system. Annexin V-FITC and PI/RNase staining was employed to detect apoptosis of SMMC-7721 and BEL-7402 cells treated with THP and/or NAC. Subsequently, membrane potential was measured with MitoTracker Red CMXRos. Compared with the control group, THP promoted mtROS production and THP combined with NAC attenuated the autophagic flux increase induced by THP alone in SMMC-7721 and BEL-7402 cells. When cells were co-treated with THP and chloroquine (CQ, an autophagy inhibitor), THP further increased mtROS and apoptosis. In addition, THP significantly reduced mitochondrial respiration in terms of mitochondrial basal respiration, ATP production, and maximal respiration. Meanwhile, THP significantly reduced the proliferation index and mitochondrial membrane potential of HCC cells accompanied by the increased apoptosis. This study demonstrates that the up-regulation of mtROS by THP significantly promotes HCC cell autophagy (protective autophagy) and impairs mitochondrial respiration through reprogramming energy metabolism, ultimately inducing the mitochondria-mediated apoptosis of SMMC-7721 and BEL-7402 cells.

[Key words] levo-tetrahydropalmatine; hepatocellular carcinoma; autophagy; energy metabolism; mitochondrial respiration

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20220823.502

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)已成为全球第六大常见癌症和第三大癌症死亡原因^[1],具有高隐匿性、高病死率和预后差等特征,其五年生存率约为14.1%^[2]。我国属于HCC高风险地区,每年肝癌新发病例和病死人数约占全球总数的55%^[3]。现阶段,化疗和免疫治疗是临床治疗HCC的主要方法,但因肿瘤异质性及治疗耐受性等问题的困扰^[4-5],亟需发现新的治疗机制以指导治疗药物的开发。

线粒体作为细胞能量工厂可为大多数真核细胞提供细胞能量代谢所需的ATP,同时产生线粒体活性氧(mitochondrial reactive oxygen species, mtROS),使肿瘤细胞对增强其调节氧化还原稳态能力的治疗变得脆弱,为抗肿瘤治疗创造新机会^[6]。因此,选择性靶向线粒体调控能量代谢表型转换将有助于增加药物抗肿瘤的特异性。从天然产物中发现新的抗肿瘤活性成分已成为抗肿瘤药物开发的主要途径之一。目前已发现多种抗肿瘤活性成分,如高良姜素^[7]、苦参碱^[8]和千金藤碱^[9]等诱导肿瘤细胞自噬进而诱导细胞死亡。延胡索乙素(levotetrahydropalmatine, THP)又称四氢巴马汀,是中药延胡索的主要有效成分之一,具有镇静、催眠、镇痛、抗心律失常及抗肿瘤等功效^[10]。文献报道,THP对恶性胶质瘤细胞^[11]、人白血病细胞^[12]及乳腺癌细胞^[13]具有较强的生长抑制作用,但对HCC的治疗效果鲜有报道。

本实验表明,THP通过上调SMMC-7721和

BEL-7402细胞mtROS水平及调控癌细胞能量代谢表型的转化,促进HCC细胞程序性死亡,抑制HCC细胞增殖。本研究可为治疗HCC提供新的治疗思路和候选药物。

1 材料

延胡索乙素(批号#ST8100,纯度 $\geq 98\%$)购自北京索莱宝科技有限公司,人肝癌SMMC-7721和BEL-7402细胞购自中国科学院上海细胞库;*N*-乙酰-L-半胱氨酸(*N*-acetyl-L-cysteine, NAC)(批号A9165)购自美国Sigma公司;氯喹(chloroquine, CQ)(批号ENZ-51031-0050)购自美国Enzo公司;RPMI-1640、DMEM培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清(批号2022057)和青霉素-链霉素(批号1938917)购自以色列BI公司;MitoSOXTM Red线粒体ROS指示剂(批号M36008)购自美国ThermoFisher公司;抗LC3抗体(批号128025)、抗p-AMPK抗体(批号ab92701)、抗AMPK抗体(批号ab32047)、抗 β -actin抗体(批号ab6276)购自英国Abcam公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗鼠(批号ZB-2305)及兔IgG抗体(批号ZB-2301)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;CYTO-ID自噬检测试剂盒(批号ENZ-51031-0050)购自美国Enzo公司;16孔细胞微孔培养板购自美国Roche公司;Seahorse XFp细胞线粒体压力测试试剂盒(批号103010)、Calibrant校准液、细胞微孔培养板和探针板购自美国Agilent公司;FITC偶联Annexin-V凋亡

试剂盒(批号 556547)购自美国 BD 公司;增强型蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010S)、线粒体膜电位与细胞凋亡检测试剂盒(批号 C1071S)购自上海碧云天生物技术有限公司。

实时无标记细胞功能分析系统(美国 Roche 公司);Infinite M200Pro 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 公司);激光共聚焦成像系统(日本 Nikon 公司);Milli-Q 超纯水系统(美国 Millipore 公司);Bio-Imaging Systems 化学发光成像仪(以色列 DNR 公司);Accuri C6 流式细胞仪(美国 BD 公司);Seahorse Extracellular Flux Analyzer 体外流量分析仪(美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人肝癌 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞分别培养于含 10%胎牛血清及 1%青霉素-链霉素的 RPMI-1640 和 DMEM 培养基,并置于 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱中进行培养。当细胞融合度达到 80%以上时进行细胞传代,采用无菌磷酸缓冲盐溶液清洗细胞 1~2 次。胰酶消化细胞,然后终止消化并反复轻轻吹打,形成单细胞悬液。随后将单细胞悬液 1 000~2 000 r·min⁻¹ 离心,用完全培养基重悬细胞并按最适比例传代。

2.2 MitoSOX™ Red 检测细胞 mtROS 选择处于对数生长期的 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞制备细胞悬液,完全培养基将细胞浓度稀释至 2.5×10⁴ 个/mL,每个共聚焦细胞培养皿加入 2 mL 细胞悬液,放于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜;THP (100 μmol·L⁻¹)和/或 NAC(10 μmol·L⁻¹)处理细胞 24 h,将细胞消化后收集细胞(或不进行此步骤),采用 1.0~2.0 mL MitoSOX(5 μmol·L⁻¹)工作液重悬细胞悬液(或覆盖细胞),37 °C 避光孵育 10 min。PBS 缓冲液清洗细胞 3 次。采用流式细胞术检测或共聚焦显微镜成像。

2.3 Western blot 检测细胞自噬蛋白表达 分别制备 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞培养至 6 孔板,细胞密度为 2×10⁵ 个/孔,于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h,然后 THP (100 μmol·L⁻¹)和/或 NAC (10 μmol·L⁻¹)处理细胞 24 h。采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定总蛋白浓度并进行定量。每孔加 20~30 μg 蛋白样品,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),电转至聚偏二氟乙烯膜(PVDF),5%脱脂乳室温封闭,抗 LC3、抗 AMPK 和抗 p-AMPK 抗

体孵育过夜。用含有聚山梨酯 20 的 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)充分洗膜,在室温下结合山羊抗鼠或兔 IgG,用 TBST 充分洗膜,曝光,显影。利用 ImageJ 软件进行灰度值分析,分别计算 LC3 和 p-AMPK/AMPK 蛋白相对表达量。

2.4 CYTO-ID 检测细胞自噬流 分别制备 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞悬液,培养于 6 孔细胞培养板,细胞密度为 2×10⁵ 个/孔,于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜,THP (100 μmol·L⁻¹, 24 h)和/或 NAC(10 μmol·L⁻¹, 24 h)或 CQ(10 μmol·L⁻¹, 18 h)处理细胞。到达作用时间后收集细胞,采用 1×Assay buffer 清洗细胞 2 次。1 mL 的 1×Assay buffer 添加 5% FBS 和 2 μL CYTO-ID 检测液,充分混匀,使每个样品的单层细胞染色均匀。37 °C 避光孵育 30 min,孵育后用 100 μL 的 1×Assay buffer 清洗细胞。流式细胞仪在 488 nm 下收集细胞。

2.5 Seahorse XFp 检测细胞能量代谢表型 选择处于对数生长期的 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞制备细胞悬液,向细胞微孔培养板中加入细胞稀释悬液 50 μL/孔(5×10³ 个/孔),于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养过夜;THP (100 μmol·L⁻¹)和/或 NAC (10 μmol·L⁻¹)处理 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞 24 h。到时间后进行线粒体呼吸压力测试:葡萄糖 2.5 mol·L⁻¹、谷氨酰胺 0.2 mol·L⁻¹、丙酮酸钠 0.1 mol·L⁻¹,加入到不含血清、碳酸氢盐的细胞培养基中,调整 pH 至 7.3~7.4,代谢调节药物配制为寡霉素 1 μmol·L⁻¹、线粒体氧化磷酸化解偶联剂(FCCP) 1 μmol·L⁻¹、鱼藤酮/抗霉素 A 0.5 μmol·L⁻¹,寡霉素加入第 1 个药物注射槽,FCCP 加入第 2 个注射槽,鱼藤酮/抗霉素 A 加入第 3 个注射槽,选择 Seahorse XFp 线粒体呼吸程序进行分析,使用 Wave 软件进行后续数据分析。

2.6 RTCA 实时监测 THP 对细胞增殖的影响 将处于对数生长期的 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞制备细胞悬液,向细胞微孔培养板中精准加入细胞稀释悬液 50 μL/孔(5×10³ 个/孔),继续精准补加 50 μL/孔培养基,室温静置 30 min。空白培养液测基线,随后放入实时无标记细胞分析系统。24 h 后,添加 THP (100 μmol·L⁻¹)和/或 NAC (10 μmol·L⁻¹),继续放入无标记细胞分析系统,实时监测细胞增殖指数,持续 3 d。

2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 制备 SMMC-7721

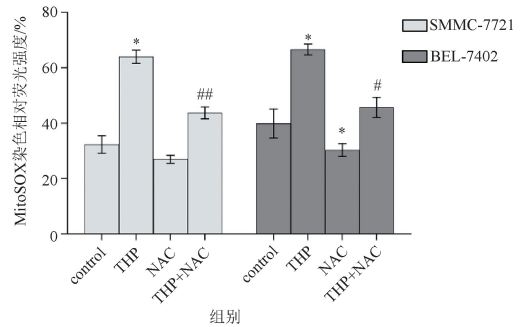
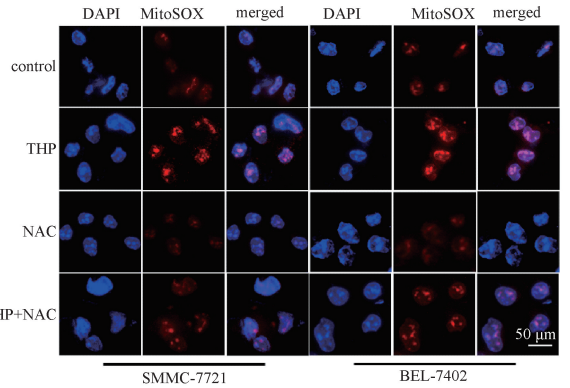
和 BEL-7402 细胞单层细胞悬液,培养于 6 孔细胞培养板,细胞密度为 2×10^5 个/孔,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养过夜,THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和/或 NAC ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞 24 h。到时间后采用 FITC 偶联 Annexin-V 凋亡试剂盒染色 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞,将细胞通过 BD C6 流式细胞仪上样检测,分析细胞凋亡率。

2.8 检测细胞线粒体膜电位变化与凋亡的相关性 选择处于对数生长期的 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞制备细胞悬液,接种于共聚焦细胞培养皿中,于 $37\text{ }^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 12~24 h,使细胞融合度达到 70%~80%。THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和/或 NAC ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理细胞 24 h 后收集细胞悬液,分别加入 Annexin V-FITC 结合液和 Annexin V-FITC 染液,轻轻混匀。此后加入 MitoTracker Red CMXRos 和 Hoechst 33342 染色液,轻轻混匀,室温避光孵育 20~30 min。在荧光显微镜下观察, MitoTracker Red CMXRos 为红色荧光, Annexin V-FITC 为绿色荧光, Hoechst 33342 为蓝色荧光。

2.9 统计分析 采用 GraphPad Prism 7.04 统计软件,计量数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 THP 特异性诱导 HCC 细胞 mtROS 的产生 MitoSOX (红色荧光) 选择性靶向活细胞产生的 mtROS。共聚焦显微镜显示 (图 1), THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组的相对红色荧光强度较对照组变强;联合 NAC ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 后削弱了红色荧光强度的增加。MitoSOX 染色流式细胞术检测结果显示 (图 2), THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组 (SMMC-7721 细胞 $67.0\% \pm 4.6\%$; BEL-7402 细胞 $82.7\% \pm 3.7\%$) 细胞 mtROS 相对含量比对照组 (SMMC-7721 细胞 $30.1\% \pm 2.6\%$; BEL-7402 细胞 $42.5\% \pm 0.6\%$) 明显增加。NAC ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组 (SMMC-7721 细胞 $29.8\% \pm 1.7\%$; BEL-7402 细胞 $26.6\% \pm 2.9\%$) 细胞相对 mtROS 含量比对照组略有降低。THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + NAC ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组 (SMMC-7721 细胞 $43.7\% \pm 2.1\%$; BEL-7402 细胞 $45.7\% \pm 3.6\%$) 细胞相对 mtROS 含量比 THP 处理组显著降低。因此, THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + NAC ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组显著逆转了由 THP 引起的 mtROS 的增加。



control. 对照组; THP. 延胡索乙素 ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组; NAC. *N*-乙酰-L-半胱氨酸 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组; THP+NAC. 延胡索乙素 ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + *N*-乙酰-L-半胱氨酸 ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组; 与 control 组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 THP 组比较 # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ (图 2~10 同)。

图 1 共聚焦显微镜检测 THP 对 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞 mtROS 的影响 ($\times 100$; $\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effects of THP on mtROS in SMMC-7721 and BEL-7402 cells detected by confocal microscope ($\times 100$; $\bar{x}\pm s$, $n = 3$)

3.2 mtROS 激发 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞自噬 流式细胞术检测 THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 和/或 NAC ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理后自噬流变化。与对照组相比, THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组细胞自噬流显著增加, 而 NAC ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组则降低 (图 3)。THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + NAC ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组减弱了由 THP 造成的自噬流增加。此外, THP 联合自噬抑制剂 CQ 发现 (图 4、5), 自噬抑制进一步增强 mtROS 水平并提高细胞凋亡率。Western blot 结果显示 (图 6), 与对照组相比, THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组自噬标志物 LC3 II/LC3 I 表达量显著提高, THP ($100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) + NAC ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理组则逆转高表达现象。腺苷酸激活蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 作为调节代谢的核心蛋白, p-AMPK/AMPK 蛋白表达与自噬流变化及

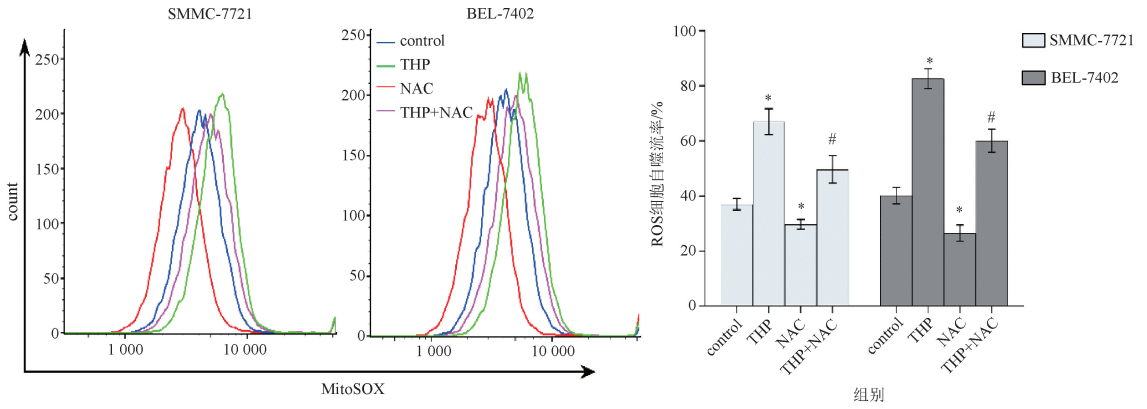


图2 流式细胞术检测 THP 对 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞 mtROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of THP on mtROS in SMMC-7721 and BEL-7402 cells detected by fluorescence microscopy ($\bar{x} \pm s, n=3$)

LC3 II/LC3 I 蛋白表达趋势保持一致。以上结果表明, THP 可诱导 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞发生

自噬并为保护性自噬, 若增强其抗癌效果, 应阻断 THP 诱导的自噬。

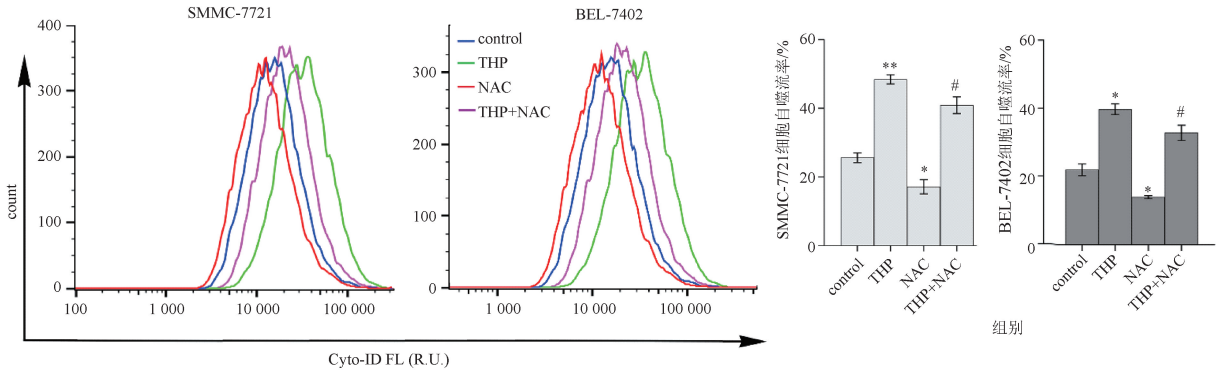


图3 THP 对 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞 mtROS 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of THP on mtROS of SMMC-7721 and BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

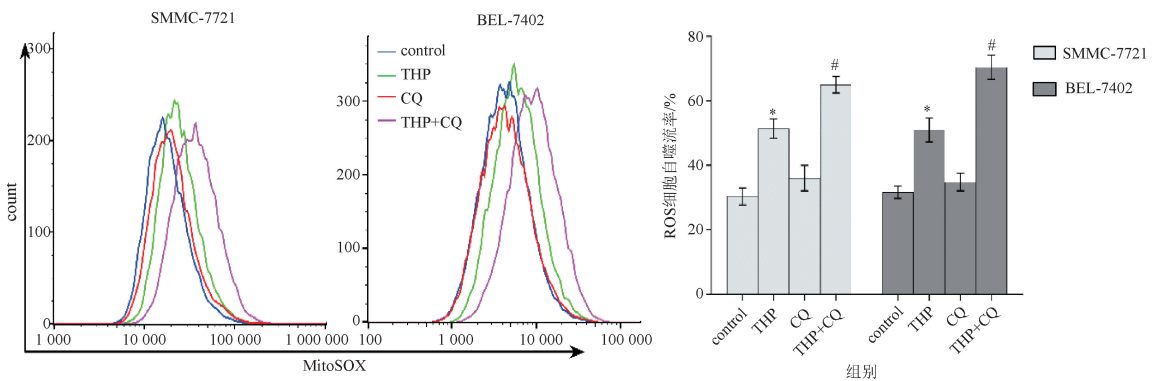


图4 THP 联合氯喹对 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞自噬流的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 4 Effects of THP combined with chloroquine on autophagic flux of SMMC-7721 and BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.3 THP 通过重编程细胞能量代谢表型抑制细胞增殖 Seahorse XFP 细胞外流量分析仪检测细胞的耗氧

率 (oxygen consumption rate, OCR) 评估细胞线粒体呼吸在肿瘤能量代谢中的作用。THP ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)

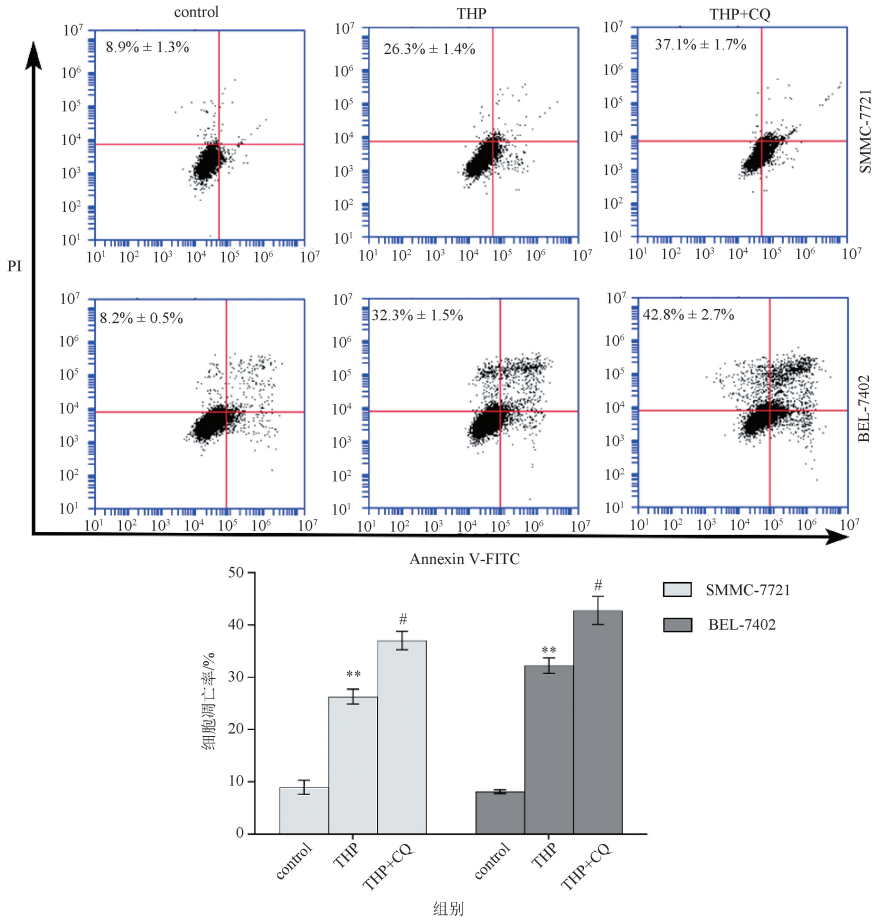


图5 THP联合氯喹对SMMC-7721和BEL-7402细胞凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effects of THP combined with chloroquine on apoptosis of SMMC-7721 and BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

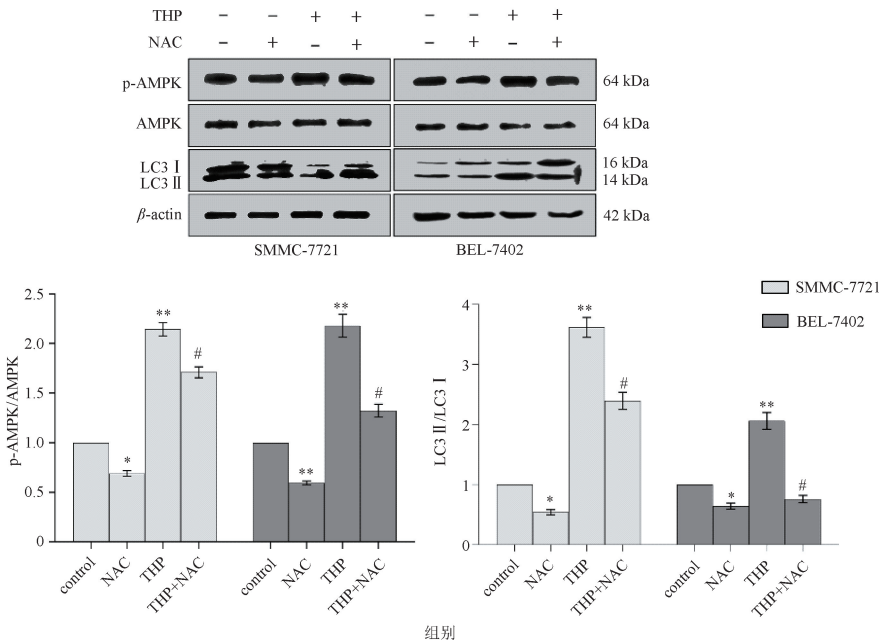
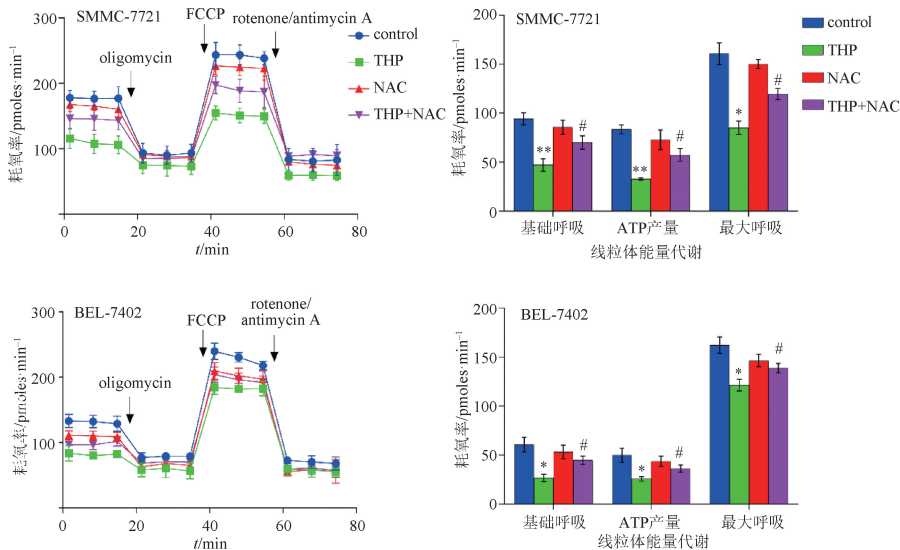


图6 THP对SMMC-7721和BEL-7402细胞LC3及AMPK蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effects of THP on protein levels of LC3 and AMPK in SMMC-7721 and BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

处理组 OCR 显示(图 7),线粒体基础呼吸、ATP 产量和最大呼吸均出现显著下降,表明 THP 抑制肝癌细胞的线粒体能量代谢,剥夺肿瘤细胞能量供应。实时无标记细胞分析显示(图 8),THP 可明显抑制细胞增殖,THP (100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + NAC (10 $\mu\text{mol} \cdot$

L^{-1})处理组提高了细胞增殖指数。结果表明,THP 可引发肝癌细胞的线粒体呼吸紊乱,进而抑制肿瘤细胞增殖;联合 NAC 在一定程度上恢复由 THP 单独造成线粒体功能损伤,表明 mtROS 参与并介导 THP 引起的能量代谢表型改变和增殖抑制。



oligomycin. 寡霉素; FCCP. 线粒体氧化磷酸化解偶联剂; rotenone/antimycin A. 鱼藤酮/抗霉素 A。

图 7 THP 对 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞线粒体呼吸的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effects of levo-tetrahydropalmatine on mitochondrial respiration in SMMC-7721 and BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

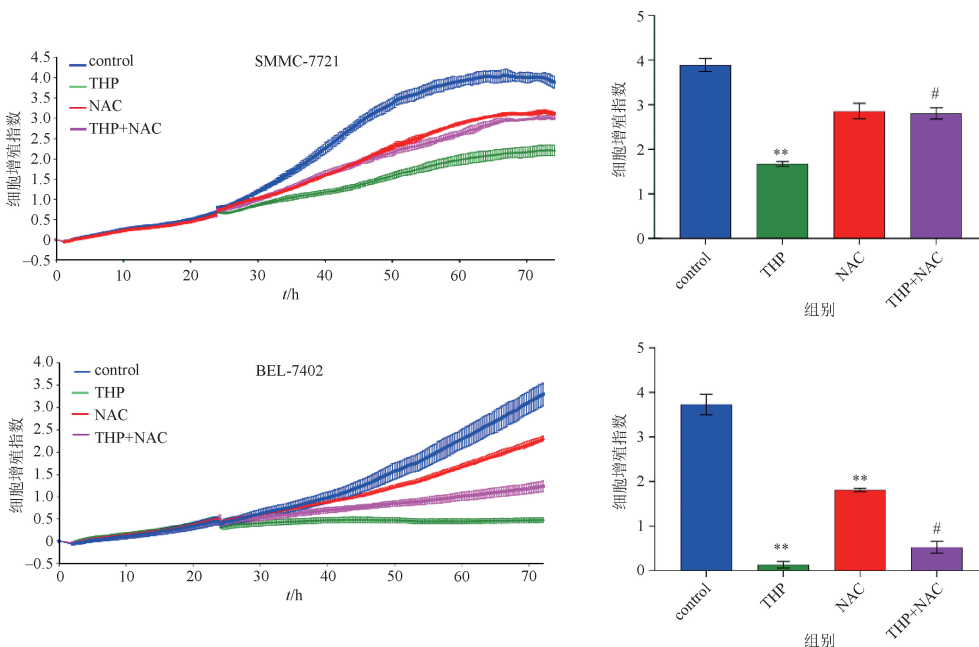


图 8 THP 对 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞实时增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 8 Effects of levo-tetrahydropalmatine on real-time proliferation of SMMC-7721 and BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 THP 促进 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞凋亡 Annexin V-FITC 染色流式细胞术检测结果显示(图 9),THP($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理组能够诱导肝癌细胞凋亡,凋亡率(SMMC-7721 细胞 $28.5\% \pm 1.4\%$; BEL-7402 细胞 $33.7\% \pm 1.2\%$)显著高于对照组。THP($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+NAC($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理组细胞凋亡率降低(SMMC-7721 细胞 $20.1\% \pm 2.4\%$; BEL-7402 细胞 $26.8\% \pm 1.5\%$)。MitoTracker Red CMXRos 和 Annexin V-FITC 分别是一种线粒体膜电位依赖性的红色荧光探针和细胞凋亡绿色荧光探针,联合使用可用来检测线粒体膜电位和细胞凋亡。

MitoTracker Red CMXRos 可标记保持线粒体膜电位的活细胞,而 Annexin V-FITC 可标记发生凋亡或坏死的细胞。结果显示(图 10),与对照组相比,THP($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理组 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞出现强绿色荧光,同时红色荧光显著减弱,表明肝癌细胞发生凋亡,且线粒体膜电位下降。与 THP($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理组相比,NAC($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理组和 THP($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+NAC($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理组相对绿色荧光强度削弱,缓解了 THP 诱导的细胞凋亡程度。表明 THP 可引发细胞凋亡,进而影响 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞增殖。

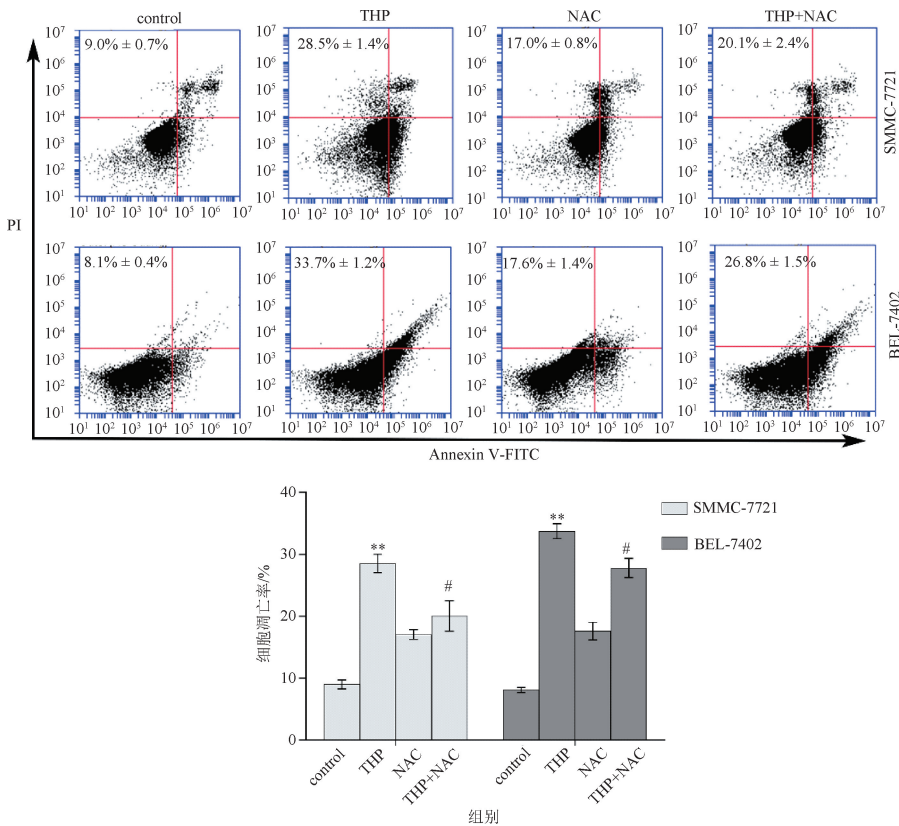


图 9 THP 对 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 9 Effects of levo-tetrahydropalmatine on apoptosis of SMMC-7721 and BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

4 讨论

肝癌具有高发病率和 high 病死率,其发生与多种因素相关,包括细胞增殖、转移、凋亡、肿瘤微环境和自身免疫系统,从不同角度影响着恶性肿瘤的初发、进展和转移^[14]。因此,基础和临床研究对新治疗方法和策略的需求仍比较迫切。中药天然产物已广泛用于各种疾病的治疗,可作用于不同的信号转导通

路且不良反应相对较少^[15]。本研究采用 THP 联合 NAC 作用人肝癌 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞,主要探讨其产生的 mtROS 对 HCC 细胞自噬流和能量代谢表型转化的改变与细胞增殖之间的联系。

在代谢应激压力下,与正常细胞相比,肿瘤细胞氧化还原平衡状态被破坏,进而导致 mtROS 水平失衡^[16]。尽管肿瘤细胞中的抗氧化系统表现出增强

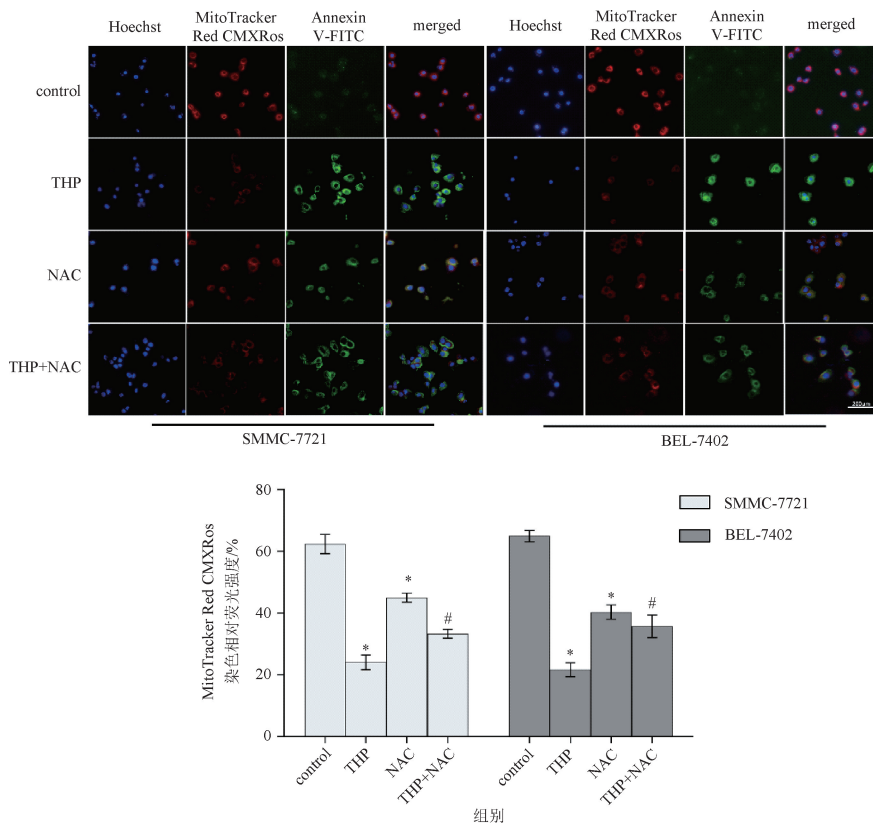


图 10 THP 对 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞膜电位的影响 ($\times 40$) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 10 Effects of levo-tetrahydropalmatine on mitochondrial membrane potential of SMMC-7721 and BEL-7402 cells ($\times 40$) ($\bar{x} \pm s, n=3$)

的态势,但仍保持比正常细胞更高的 mtROS 水平^[17-18]。由于 mtROS 负荷随着肿瘤进展而增加,或许中断肿瘤细胞这种非正常的氧化还原稳态是抑制肿瘤细胞增殖的潜在策略。在本研究中,通过刺激 mtROS 产生来实现中断非正常氧化还原稳态的目的。使用 MitoSOX 探针检测 mtROS 水平,发现 THP 可特异性增加 mtROS 的产生。此外,mtROS 的产生和消除也可以调节生物能量代谢的关键分子 AMPK,它能够串联能量代谢并维持氧化还原平衡,集中体现在可调控肿瘤细胞自噬使其适应敌对环境的应激反应^[16],因此 mtROS 通过激活 AMPK 可关键性诱导自噬^[16,19]。越来越多的证据表明,自噬是响应 mtROS 的一种应答反应,不同的肿瘤治疗药物也被证明可以激活 mtROS 并介导自噬,进而诱导细胞凋亡^[20-22]。本研究发现,THP 可明显上调 mtROS 水平进而促进 AMPK 磷酸化及 LC3 II/LC3 I 表达,使 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞呈现出高自噬流,表明自噬依赖 mtROS 产生。THP 联合 CQ 进一步

表明,THP 引发的自噬为保护性自噬。THP 可同时诱导细胞自噬和凋亡,自噬抑制后细胞凋亡率升高,说明细胞凋亡才是细胞死亡的主要途径。

在代谢压力下,多种不同类型的肿瘤细胞会优先使用氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 产生 ATP,所以基于线粒体产生的能量对于肿瘤细胞生存具有至关重要作用^[23],因此若采用代谢重编程的策略将有助于改善癌症治疗过程中的代谢负担。本研究使用细胞外能量分析系统测量 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞内线粒体呼吸作用活性,通过 OCR 可以呈现出基础呼吸、ATP 产量及最大呼吸量的改变程度,来反映 OXPHOS 变化。结果表明,THP 可重编程 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞的能量代谢表型,间接反应出增加 mtROS 可使肿瘤细胞线粒体呼吸功能紊乱,OXPHOS 水平降低,导致细胞增殖所需能量供应链阻断 Annexin V-FITC 及 PI/RNase 染色表明,THP 可诱导 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞凋亡。MitoTracker Red CMXRos 可视

化结果也发现,THP 可改变线粒体通透性,使线粒体膜受损,导致线粒体膜电位下降。mtROS 胞内蓄积会引起氧化应激反应,其过量产生可通过增加线粒体膜通透性直接启动凋亡^[24]。在联合 NAC 处理的条件下,直接表明诱导 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞凋亡需依赖 THP 产生的 mtROS。同时,利用 CQ 抑制自噬后,细胞凋亡增加的同时胞内 mtROS 水平也随之升高,说明胞内 mtROS 产生参与了抑制自噬促进 THP 诱导的凋亡过程。以上发现为深入研究 THP 治疗肝癌的分子机制、靶点提供了新的契机。

综上,本研究证明 THP 可特异性上调 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞中 mtROS 水平,其产生的 mtROS 可诱导肿瘤细胞自噬并促进自噬流。同时,THP 抑制线粒体 OXPHOS 作用,重编程肿瘤细胞代谢表型以此来削弱其线粒体生物功能。由于代谢应激诱导的 mtROS 位于代谢重编程和氧化还原稳态之间的冲突极大地影响了肿瘤细胞的命运,这可能是 THP 诱导人肝癌 SMMC-7721 和 BEL-7402 细胞线粒体凋亡的潜在途径(图 11),为延胡索乙素作为一种新的肝癌治疗选择提供了参考。

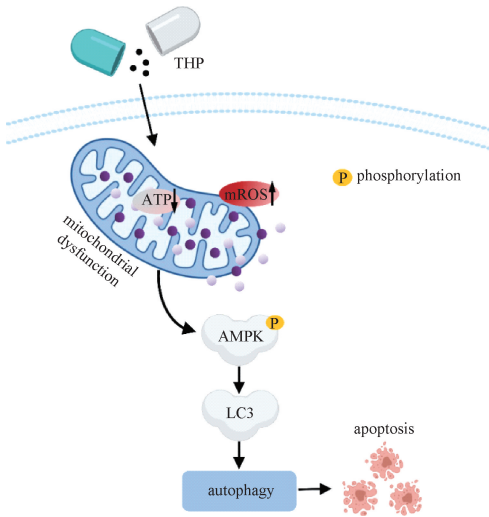


图 11 THP 重编程肝癌细胞能量表型发挥抑制细胞增殖的示意图

Fig. 11 The schematic diagram of THP reprogramming energy phenotype to inhibit cell proliferation

[参考文献]

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer

statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3):209.

[2] ALLEMANI C, MATSUDA T, DI C V, et al. Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3); analysis of individual records for 37 513 025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. Lancet, 2018, 391(10125):1023.

[3] 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.

[4] AHMED O, PILLAI A. Hepatocellular carcinoma: a contemporary approach to locoregional therapy [J]. Am J Gastroenterol, 2020, 115(11):1733.

[5] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1873(1):188314.

[6] NUNNARI J, SUOMALAINEN A. Mitochondria: in sickness and in health [J]. Cell, 2012, 148(6):1145.

[7] 梁晓晖,余明珠,石海莲,等.高良姜素抑制胃癌 MGC803 细胞 NF- κ B 通路促进自噬 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(16):4167.

[8] 李振,王科,王凯强,等.苦参碱治疗肝癌的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022,40(4):99.

[9] 张攀,张宜凡,陈群力,等.生物碱类天然产物抗乳腺肿瘤机制研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2021, 46(2):312.

[10] 王安铸,马晓昌.延胡索乙素的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2020, 35(4):1927.

[11] 赵妍.模拟微重力及延胡索乙素对恶性胶质瘤细胞 U251MG 凋亡的影响及机制研究 [D]. 西安:第四军医大学, 2015.

[12] 崔燎,吴铁.左旋四氢巴马汀增强长春新碱对人白血病细胞株的抑制作用 [J]. 中国药理学通报, 1995, 11(4):348.

[13] XIA X, HE J, LIU B, et al. Targeting ER α degradation by L-tetrahydropalmatine provides a novel strategy for breast cancer treatment [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(12):2192.

[14] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma [J]. Lancet, 2018, 391(10127):1301.

[15] ZHANG L, SONG J, KONG L, et al. The strategies and techniques of drug discovery from natural products [J]. Pharmacol Ther, 2020, 216:107686.

[16] ZHAO Y, HU X, LIU Y, et al. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway [J]. Mol Cancer, 2017, 16(1):79.

[17] TRACHOOTHAM D, ALEXANDRE J, HUANG P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach [J]. Nat Rev Drug Discov, 2009, 8(7):579.

[18] KAYNAR H, MERAL M, TURHAN H, et al. Glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, catalase, xanthine oxidase,

- Cu-Zn superoxide dismutase activities, total glutathione, nitric oxide, and malondialdehyde levels in erythrocytes of patients with small cell and non-small cell lung cancer [J]. *Cancer Lett*, 2005, 227(2):133.
- [19] YANG Y, KARAKHANOVA S, HARTWIG W, et al. Mitochondria and mitochondrial ROS in cancer: novel targets for anticancer therapy[J]. *J Cell Physiol*, 2016, 231(12):2570.
- [20] GAO L, LOVELESS J, SHAY C, et al. Targeting ROS-mediated crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2020, 1260:1.
- [21] ARFIN S, JHA N K, JHA S K, et al. Oxidative stress in cancer cell metabolism[J]. *Antioxidants (Basel)*, 2021, 10(5):642.
- [22] POILLET-PEREZ L, DESPOUY G, DELAGE-MOURROUX R, et al. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy [J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 184.
- [23] WEI H, WEI S, GAN B, et al. Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis [J]. *Genes Dev*, 2011, 25(14):1510.
- [24] PAYEN V L, ZAMPIERI L X, PORPORATO P E, et al. Pro- and antitumor effects of mitochondrial reactive oxygen species[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2019, 38(1/2):189.

[责任编辑 张燕]