

α -番茄碱对人肝癌细胞 HuH-7 增殖、迁移及糖酵解活性的影响

何志龙^{1,2}, 林莹¹, 邓有麟³, 蒋利和^{1,2,3*}

[1. 广西大学轻工与食品工程学院, 广西 南宁 530004; 2. 广西农产资源化学与生物技术重点实验室 (玉林师范学院), 广西 玉林 537000; 3. 右江民族医学院基础医学院、药学院, 广西 百色 533000]

摘要: 目的 研究 α -番茄碱对人肝癌细胞 HuH-7 增殖、凋亡、迁移及相关蛋白的影响。方法 不同浓度 α -番茄碱 (1、1.5、2、2.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理肝癌细胞 24 h, 检测 HuH-7 细胞糖酵生化指标变化, 细胞增殖实验和平板克隆实验检测细胞增殖活性变化, 划痕实验和 Transwell 实验检测细胞迁移活性变化, Western blot 检测糖酵解相关蛋白 HIF-1 α 、MCT4、LDHA 表达, 生物信息分析 MCT4 的基本情况。结果 与对照组比较, α -番茄碱处理后 HuH-7 细胞葡萄糖消耗水平、乳酸生成水平、ATP 水平、细胞增殖能力、转移能力、HIF-1 α 、MCT4 和 LDHA 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且生信分析表明 MCT4 在肝癌细胞中高表达并且与不良预后有密切关系。结论 α -番茄碱可能通过抑制糖酵解降低人肝癌细胞 HuH-7 增殖与迁移能力, 且可能抑制 MCT4 进而在预防肝癌中发挥重要作用。

关键词: α -番茄碱; 肝癌细胞 HuH-7; 糖酵解; 增殖; 迁移

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-2005-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.051

据报道, 全世界每年约有 841 000 例新增肝细胞癌病例, 其中约有 781 000 例患者死于此病^[1]。肿瘤细胞即使在供氧充足的情况下, 仍然高度依赖葡萄糖进行糖酵解作为产生能量的主要方式, 产生大量乳酸, 这种现象被称为 Warburg 效应^[2-3]。尽管尚不完全清楚这种代谢行为在肿瘤细胞中的机制, 但干扰糖酵解已成为一种治疗癌症的策略^[4-5]。

α -番茄碱是番茄中天然存在的甾体类生物碱, 抑制许多类型的癌细胞的生长, 例如结肠癌、乳腺癌、白血病、肺癌和肝癌等^[6-11]。研究证明 α -番茄碱与血管生成有关, 可以抑制肿瘤细胞促血管生成因子 VEGF 释放^[12]。而缺氧与缺氧诱导因子 (HIF-1 α) 水平升高和随之而来的 VEGF 表达升高有关^[13]。另外, 单羧酸转运蛋白 4 (MCT4) 在肿瘤细胞中的高表达可以防止乳酸盐诱导的质子应激的积累, 并将细胞内 pH 维持在一个碱性水平^[14], 同时也可以酸化细胞外环境, 增强肿瘤细胞的迁移和侵袭^[15]。MCT4 介导的乳酸外排和产生的 pH 稳态可能是抑制肿瘤的潜在治疗靶点。

本研究为了探讨 α -番茄碱对肝细胞癌的抑制作用和可能的机制, 检测了 α -番茄碱对人肝癌细胞增殖、凋亡及迁移等表型变化, 初步分析 α -番茄碱对糖酵解的生化指标和相关蛋白的变化, 为 α -番茄碱抑制肝细胞癌提供了科学依据。

1 材料

1.1 仪器 HH-ZK600 恒温水浴锅购自英峪高科仪器厂;

TriStar LB94 多功能酶标仪购自德国 Berthold Technologies 公司; UV-1750 紫外可见光光度计购自苏州岛津仪器有限公司; DMIL-FL 荧光倒置生物显微镜购自德国 Leica 公司; Tanon-5200Multi 全自动化学发光图像分析系统购自上海天能科技有限公司。

1.2 试剂与药物 α -番茄碱 (成都普瑞法生物科技有限公司, 纯度 95%, 货号 BP1726)。CCK-8 试剂盒 (美国 MedChemExpress 公司, 货号 HY-K0301); 葡萄糖试剂盒 (货号 A154-1-1)、乳酸检测试剂盒 (货号 A019-2-1) 购自南京建成生物工程研究所有限公司; ATP 检测试剂盒 (货号 S0026)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒 (货号 P0010) 购自上海碧云天生物技术有限公司; MCT4 抗体 (货号 20889-1-AP)、HIF-1 α 抗体 (货号 20960-1-AP)、乳酸脱氢酶 A (LDHA) 抗体 (货号 19987-1-AP)、GAPDH 抗体 (货号 60004-1-Ig) 购自武汉三鹰生物技术有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养 人肝癌 HuH-7 细胞 (中国科学院上海细胞研究所) 培养于含有 10% 胎牛血清和 1 $\times$ 青链霉素混合液的 DMEM 高糖培养基中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中。

2.2 细胞增殖检测 取对数生长期的 HuH-7 细胞, 每孔 3×10^3 个接种于 96 孔板中, 培养 24 h 后待细胞贴壁, 分别加入不同浓度 α -番茄碱处理 12、24、48 h, 加入 CCK-8 试剂, 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 1 h, 在 450 nm 波长处检测各孔吸光度值。

2.3 平板克隆实验 取对数生长期的 HuH-7 细胞, 每孔

收稿日期: 2021-10-11

基金项目: 国家级大学生创新训练项目项目 (202010599016); 广西农产资源化学与生物技术重点实验室开放课题 (2020)

作者简介: 何志龙 (1992—), 男, 硕士生, 研究方向为食品功能因子。E-mail: 383981680@qq.com

*通信作者: 蒋利和 (1976—), 男, 博士, 副研究员, 博士生导师, 研究方向为肿瘤生物学。E-mail: jianglihe@ymun.edu.cn

1×10^3 个接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后待细胞贴壁, 分别加入 0、1.5、2、2.5 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱进行干预, 7 d 后弃培养基, PBS 清洗 3 次, 加入固定液固定 15 min, 结晶紫染色 10 min, PBS 清洗, 静置晾干, 显微镜下观察并拍照。

2.4 糖酵解实验

2.4.1 葡萄糖消耗检测 取对数生长期的 HuH-7 细胞, 每孔 3×10^5 个接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后待细胞贴壁, 分别加入 0、1.5、2、2.5 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱干预 24 h。根据葡萄糖检测试剂盒说明书检测葡萄糖消耗, 使用多功能酶标仪在 505 nm 波长处检测各孔吸光度值。

2.4.2 乳酸水平检测 HuH-7 细胞按“2.4.1”项下方法处理, 根据乳酸检测试剂盒说明书操作步骤检测乳酸水平, 使用多功能酶标仪在 530 nm 波长处检测各孔吸光度值。

2.4.3 ATP 水平检测 HuH-7 细胞按“2.4.1”项下方法处理, 根据 ATP 检测试剂盒说明书操作步骤检测 ATP 水平, 使用多功能酶标仪在 562 nm 波长处检测各孔吸光度值。

2.5 划痕实验 取对数期 HuH-7 细胞, 每孔 6×10^5 个接种于 6 孔板中, 培养 24 h 后待细胞贴壁, 用 200 μL 枪头垂直画线, 用 PBS 清洗 2 次, 镜下观察并拍照, 再分别加入含有不同浓度 α -番茄碱的无血清培养基, 干预 48 h 后显微镜下观察并拍照。伤口面积越小, 表明细胞迁移能力越低。

2.6 Transwell 实验 取对数期 HuH-7 细胞, 每孔 2×10^4 个接种于不含血清培养基的 Transwell 上室, 加入不同浓度 α -番茄碱进行干预, Transwell 下室放入完全培养基, 孵育 24 h 后取出小室, 用棉签擦去滤膜上室的细胞, 固定液固定 15 min, 0.1% 结晶紫染色 30 min, PBS 清洗 2 次, 倒扣于滤纸上风干, 显微镜下观察并拍照。穿过小室基底膜细胞数越少, 表明细胞迁移能力越低。

2.7 Autodock-1.5.6 进行 α -番茄碱与 HIF-1 α 蛋白的分子对接 从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound/?term=>) 获取 α -番茄碱结构, 从 Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) 获取 HIF-1 α 蛋白结构, 分别对候选靶点利用 Autodock-1.5.6 进行分子对接。

2.8 生物信息学分析 MCT4 (SLC16A3) 在肝细胞癌中的表达 利用 Ualcan 数据库研究 MCT4 在肝细胞癌和肝细胞

正常组织中的表达情况分析和 MCT4 在肝细胞癌中的预后分析, 采用人类蛋白组图谱 (the human protein atlas, THPA) 初步探讨 MCT4 在人体的分布以及表达, 分析 MCT4 蛋白表达变化, 通过在线分析工具 STRING 分析 MCT4 的蛋白互作网络。

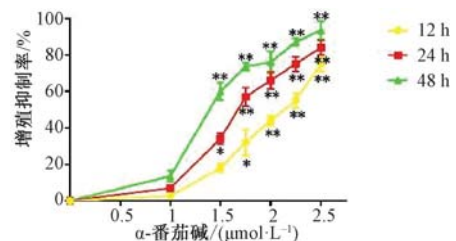
2.9 Western blot 检测蛋白表达 HuH-7 细胞按“2.4.1”项下方法处理, 24 h 后加入细胞裂解液裂解细胞, 根据 BCA 试剂盒说明书检测蛋白浓度, 凝胶电泳后, 湿转到 PVDF 膜上, 3% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗膜, 室温孵育二抗 2 h, TBST 洗膜, 滴加 ECL 发光液, 使用发光成像系统进行成像并拍照, 以 GAPDH 为内参, 计算蛋白相对表达。

2.10 统计学分析 通过 GraphPad Prism 7 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 α -番茄碱对人肝细胞癌 HuH-7 生长的影响

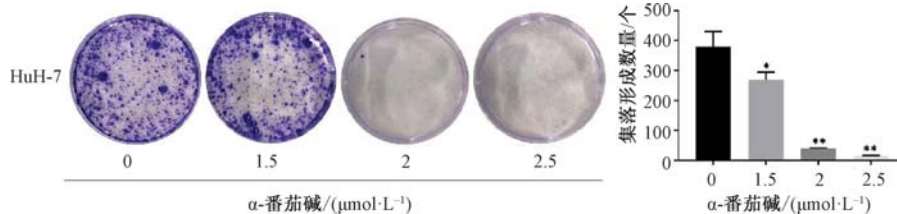
3.1.1 α -番茄碱对 HuH-7 细胞增殖的抑制作用 如图 1 所示, α -番茄碱对 HuH-7 细胞的增殖能力具抑制作用, 且呈剂量和时间依赖性, 24 h 的 IC_{50} 值为 (1.83 ± 0.31) $\mu\text{mol/L}$ 。



注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 α -番茄碱对 HuH-7 细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

3.1.2 α -番茄碱对 HuH-7 细胞克隆形成能力的抑制作用 与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, 不同浓度 α -番茄碱处理后, HuH-7 细胞集落形成数量减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 说明 α -番茄碱能抑制 HuH-7 细胞的克隆形成能力, 见图 2。



注: 与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 α -番茄碱对 HuH-7 细胞克隆形成能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 α -番茄碱对 HuH-7 细胞葡萄糖消耗的影响 与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, 2、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 番茄碱组 HuH-7 细胞葡萄糖消耗水平降低 ($P < 0.01$), 1.5 $\mu\text{mol/L}$ 番茄碱组 HuH-7 细胞葡萄糖消耗水平无明显变化 ($P > 0.05$), 见

表 1。

3.3 α -番茄碱对 HuH-7 细胞乳酸生成的影响 与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, 不同浓度 α -番茄碱均能降低 HuH-7 细胞乳酸的生成 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 2。

表 1 α -番茄碱对 HuH-7 细胞葡萄糖摄取的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

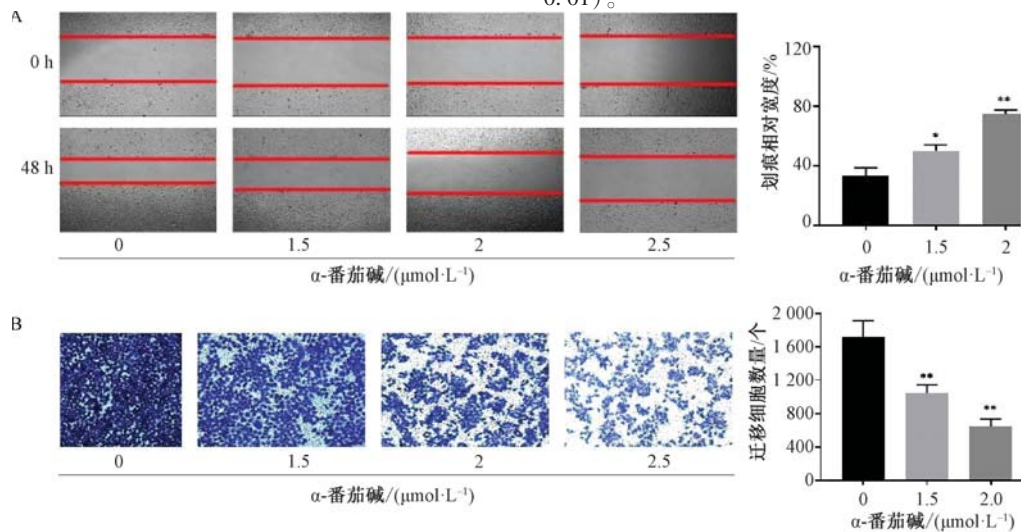
α -番茄碱浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	葡萄糖摄取/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
0	10.51 $\pm$ 2.63
1.5	9.98 $\pm$ 3.18
2	5.29 $\pm$ 1.21**
2.5	4.37 $\pm$ 1.04**

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, ** $P < 0.01$ 。

表 2 α -番茄碱对 HuH-7 细胞乳酸生成的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

α -番茄碱浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	乳酸生成/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
0	6.32 $\pm$ 1.08
1.5	5.31 $\pm$ 1.21*
2	4.62 $\pm$ 0.76*
2.5	2.98 $\pm$ 0.23**

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。



注: A 为划痕实验, B 为 Transwell 实验。与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 α -番茄碱对 HuH-7 细胞迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

3.6 分子对接 当结合能小于-4.25 kcal/mol, 说明该分子与靶蛋白可能结合。如图 4 所示, α -番茄碱与 HIF-1 α 蛋白中的 GLN-387 之间具有氢键作用, 结合能为-4.41 kcal/mol, 说明 α -番茄碱与 HIF-1 α 蛋白具有结合能力。

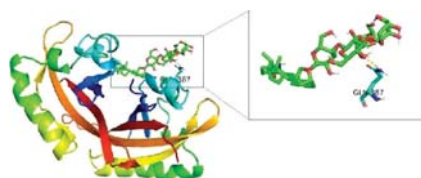


图 4 α -番茄碱与 HIF-1 α 蛋白对接

3.7 MCT4 在肝细胞癌中高表达 由图 5A 可知, MCT4 在肝细胞癌中高表达, 在正常组织中低表达。图 5B 是 MCT4 在肝细胞癌中的生存曲线, 从图中可知高表达组的病人比低表达组的病人生存时间短, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。MCT4 蛋白的免疫组化结果见图 5C, 在正常组织中 MCT4 主要呈低表达, 而在肿瘤组织中 MCT4 主要呈高表达; MCT4 蛋白在肝细胞癌中表达高于正常肝细胞组织

3.4 α -番茄碱对 HuH-7 细胞 ATP 水平的影响 与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, 不同浓度 α -番茄碱干预后 HuH-7 细胞内 ATP 水平均降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 见表 3。

表 3 α -番茄碱对 HuH-7 细胞 ATP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

α -番茄碱浓度/($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	ATP 水平/($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
0	186.13 $\pm$ 21.42
1.5	137.24 $\pm$ 17.57*
2	110.57 $\pm$ 20.47*
2.5	88.34 $\pm$ 13.31**

注:与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.5 α -番茄碱对 HuH-7 细胞转移能力的影响 如图 3 所示, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, 不同浓度 α -番茄碱干预后 HuH-7 细胞迁移距离缩短, 迁移面积减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

($P < 0.01$)。最后通过 String 数据库找到了 MCT4 的共表达基因 LDHA, 为肝细胞癌的治疗提供了新线索, 见图 5D。

3.8 α -番茄碱对 HuH-7 细胞糖酵解相关蛋白的影响 如图 6 所示, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较, 不同浓度 α -番茄碱均能降低 HuH-7 细胞中 HIF-1 α 蛋白、糖酵解关键酶 LDHA 及相关转运蛋白 MCT4 表达 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

4 讨论

目前, 虽然已经有很多的化学合成类抗肿瘤药物问世并进入临床, 但这类药物副作用较强, 限制了抗肿瘤药物的应用范围。 α -番茄碱在体外可抑制肿瘤细胞增殖, 诱导细胞凋亡^[9,16], 是易获得、疗效稳定、毒副作用低, 具有抗肿瘤等多种生物活性的天然产物。本实验结果显示 α -番茄碱对 HuH-7 细胞的增殖抑制作用, 且能有效抑制肿瘤细胞的转移。

肿瘤代谢过程的抑制已在一些实体瘤的临床前研究中显示出一定的效果。糖酵解作为肿瘤细胞重要的能量来源, 即使在氧气存在的情况下也通过糖酵解快速生成 ATP^[17]。

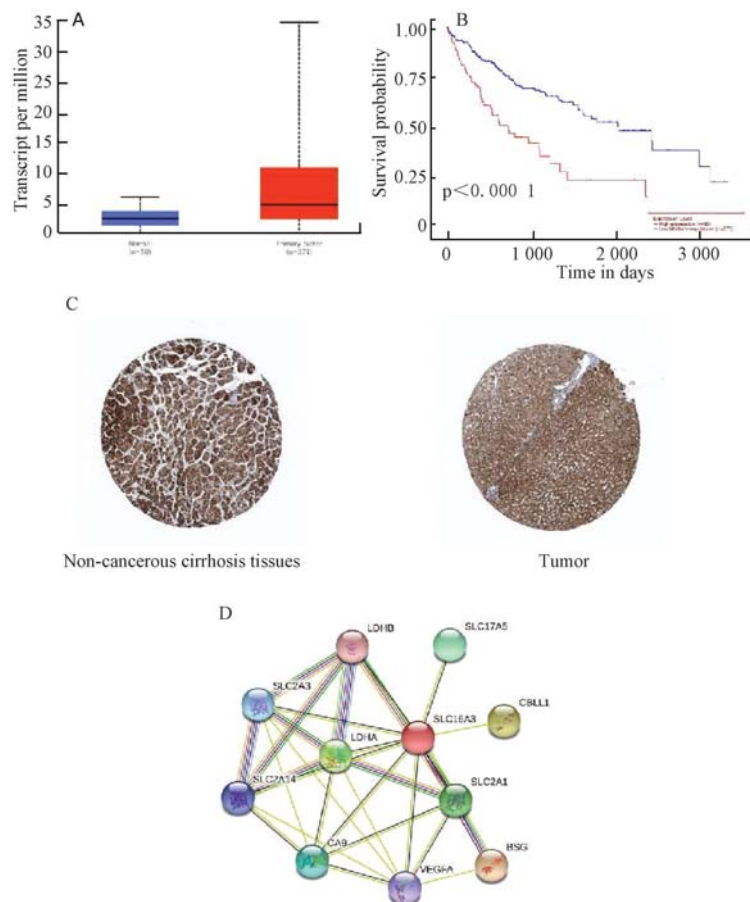
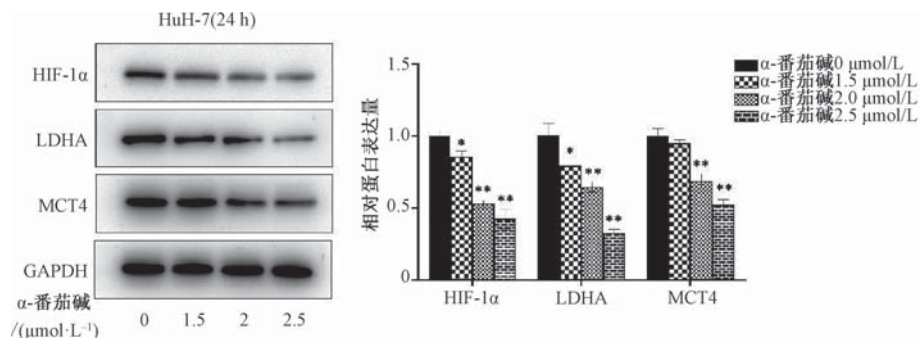


图 5 MCT4 在肿瘤里的表达情况和生存曲线



注：与 0 $\mu\text{mol/L}$ α -番茄碱组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图 6 α -番茄碱对 HuH-7 细胞糖酵解相关蛋白的影响

ATP 作为能量的最直接载体，是生物体内能量转换最基本的载体，与各器官的能量代谢水平密切相关，参与生物体内的多种代谢过程。瓦伯格（Warburg）效应在肿瘤细胞中主要表现在葡萄糖的消耗，乳酸以及 ATP 的生成，因此，通过检测细胞消耗的葡萄糖水平，生成的乳酸及细胞内 ATP 水平，可以判断药物是否对糖酵解过程产生影响。本研究结果显示， α -番茄碱能降低 HuH-7 细胞葡萄糖的摄取，降低乳酸的生成，降低细胞内 ATP 水平，提示 α -番茄碱能抑制 HuH-7 细胞糖酵解水平。

HIF-1 α 在原发性和转移性肿瘤中表达量升高，是肿瘤细胞糖酵解的过程中重要调控因子，且在肿瘤的侵袭与转

移方面起着重要作用^[18]。HIF-1 α 的激活参与癌细胞中关键基因的转录，包括血管生成、细胞存活、葡萄糖代谢和细胞侵袭等^[19]。MCT4 对于适应肿瘤特异性代谢过程至关重要，并且对肿瘤生长也很重要^[20]，HIF-1 α 直接或间接调节 MCT4 表达以增强癌细胞的糖酵解和能量代谢^[21-22]。研究发现，MCT4 表达也影响肿瘤细胞中 HIF-1 α 活化，并且抑制 MCT4 可诱导 HIF-1 α 的失活，抑制肿瘤细胞葡萄糖代谢和转移^[23]。葡萄糖进入细胞后，在 LDHA 的催化下生成乳酸，并产生 ATP 供应肿瘤细胞增殖的过程，最后由 MCT4 把胞内乳酸转运出去。本研究发现， α -番茄碱处理 HuH-7 细胞会降低 MCT4、HIF-1 α 、LDHA 蛋白表达，同时通过数

据库挖掘发现, MCT4 在肝癌组织中表达高于正常组织, 并且与 LDHA 表达密切相关。PI3K/Akt 信号通路是激活 Warburg 效应的机制之一, 大量研究发现 MCT4、HIF-1 α 和 LDHA 作为参与 Warburg 效应的蛋白, 受到 PI3K/Akt 信号通路的调控^[24-26]。另有研究表明, α -番茄碱可以抑制 PI3K/Akt 信号通路的激活^[9, 27-28], 提示 α -番茄碱可能通过抑制细胞中 PI3K/Akt 信号通路或 HIF-1 α 蛋白, 调控 Warburg 效应相关蛋白的表达, 抑制肿瘤细胞的糖酵解和能量代谢, 从而抑制细胞的增殖和转移。但是, α -番茄碱对肝细胞癌的抑制机制还有待进一步研究。

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] Liberti M V, Locasaleand J W. The Warburg effect: How does it benefit cancer cells? [J]. *Trends Biochem Sci*, 2016, 41(3): 211-218.
- [3] Nakazawa M S, Keith B, Simon M C. Oxygen availability and metabolic adaptations[J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(10): 663-673.
- [4] Hanahan D, Weinberg R A. The hallmarks of cancer[J]. *Cell*, 2000, 100(1): 57-70.
- [5] Dong B, Zhu Y M. Molecular-targeted therapy for cancer[J]. *Chin J Cancer*, 2010, 29(3): 340-345.
- [6] Kim S P, Nam S H, Friedman M. The tomato glycoalkaloid α -tomatine induces caspase-independent cell death in mouse colon cancer CT-26 cells and transplanted tumors in mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2015, 63(4): 1142-1150.
- [7] Yelken B Ö, Balci T, Süslüer S Y, *et al.* The effect of tomatine on metastasis related matrix metalloproteinase (MMP) activities in breast cancer cell model[J]. *Gene*, 2017, 627: 408-411.
- [8] Huang H R, Chen S H, Doren J V, *et al.* α -Tomatine inhibits growth and induces apoptosis in HL-60 human myeloid leukemia cells[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 11(6): 4573-4578.
- [9] Shih Y W, Shieh J M, Wu P F, *et al.* Alpha-tomatine inactivates PI3K/Akt and ERK signaling pathways in human lung adenocarcinoma A549 cells: effect on metastasis[J]. *Food Chem Toxicol*, 2009, 47(8): 1985-1995.
- [10] Huang H R, Chen X, Li D L, *et al.* Combination of α -tomatine and curcumin inhibits growth and induces apoptosis in human prostate cancer cells [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0144293.
- [11] Lee K R, Kozukue N, Han J S, *et al.* Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(10): 2832-2839.
- [12] Serrati S, Porcelli L, Guida S, *et al.* Tomatine displays antitumor potential in *in vitro* models of metastatic melanoma[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(15): 5243.
- [13] Semenza G L. Targeting hypoxia-inducible factor 1 to stimulate tissue vascularization [J]. *J Invest Med*, 2016, 64(2): 361-363.
- [14] Chiche J, Fur Y L, Vilmen C, *et al.* *In vivo* pH in metabolic-defective Ras-transformed fibroblast tumors: key role of the monocarboxylate transporter, MCT4, for inducing an alkaline intracellular pH[J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(7): 1511-20.
- [15] Miranda-Gonçalves V, Reis R M, Baltazar F. Lactate transporters and pH regulation: Potential therapeutic targets in glioblastomas[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2016, 16(5): 388-399.
- [16] Lee S T, Wong P F, He H, *et al.* Alpha-tomatine attenuation of *in vivo* growth of subcutaneous and orthotopic xenograft tumors of human prostate carcinoma PC-3 cells is accompanied by inactivation of nuclear factor-kappa B signaling[J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57708.
- [17] Koppenol W H, Bounds P L, Dang C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(5): 325-337.
- [18] Rankin E B, Giaccia A J. Hypoxic control of metastasis [J]. *Science*, 2016, 352(6282): 175-180.
- [19] 穆克飞, 刘 勇, 曹延炜. MCT1 和 MCT4 在肿瘤发展中的作用及作为肾癌潜在治疗靶点的研究进展[J]. 泌尿外科杂志 (电子版), 2017, 9(2): 43-46.
- [20] Todenhöfer T, Seiler R, Stewart C, *et al.* Selective inhibition of the lactate transporter MCT4 reduces growth of invasive bladder cancer [J]. *Mol Cancer Ther*, 2018, 17(12): 2746-2755.
- [21] Kroemer G, Pouyssegur J. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel[J]. *Cancer Cell*, 2008, 13(6): 472-482.
- [22] Ullah M S, Davies A J, Halestrap A P. The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1 α -dependent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(14): 9030-9037.
- [23] Gao H J, Zhao M C, Zhang Y J, *et al.* Monocarboxylate transporter 4 predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma and is associated with cell proliferation and migration [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(7): 1151-1162.
- [24] Yiyan S, Yang S, Li D, *et al.* Vitamin D affects the Warburg effect and stemness maintenance of non-small-cell lung cancer cells by regulating PI3K/AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2021, 22(1): 86-95.
- [25] Baenke F, Dubuis S, Brault C, *et al.* Functional screening identifies MCT4 as a key regulator of breast cancer cell metabolism and survival [J]. *J Pathol*, 2015, 237(2): 152-165.
- [26] Rashid M, Zadeh L R, Baradaran B, *et al.* Up-down regulation of HIF-1 α in cancer progression [J]. *Gene*, 2021, 798: 145796.
- [27] Shieh J M, Cheng T H, Shi M D, *et al.* α -Tomatine suppresses invasion and migration of human non-small cell lung cancer NCI-H460 cells through inactivating FAK/PI3K/Akt signaling pathway and reducing binding activity of NF- κ B [J].

- Cell Biochem Biophys*, 2011, 60(3): 297-310.
- [28] Wu H L, Li W B, Wang T T, et al. α -Tomatine, a novel early-stage autophagy inhibitor, inhibits autophagy to enhance apoptosis via Beclin-1 in Skov3 cells[J]. *Fitoterapia*, 2021, 152: 104911.

阿魏酸钠通过 miR-136-5p 对 ox-LDL 诱导内皮细胞增殖、迁移和侵袭的影响

黄泓轲¹, 罗健玮², 冉 华³

(1. 乐山职业技术学院药学系, 四川 乐山 614000; 2. 乐山职业技术学院医学系, 四川 乐山 614000; 3. 重庆市黔江中心医院心内科, 重庆 409000)

摘要:目的 探讨阿魏酸钠对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导内皮细胞增殖、迁移和侵袭的影响。方法 将人脐静脉内皮细胞株 EA. HY926 分为对照组、ox-LDL 组、不同浓度阿魏酸钠组、miR-NC+ox-LDL 组、miR-136-5p+ox-LDL 组、anti-miR-NC+ox-LDL 组、anti-miR-136-5p+ox-LDL 组、阿魏酸钠+miR-NC+ox-LDL 组、阿魏酸钠+miR-136-5p+ox-LDL 组。CCK-8 检测细胞活性, Transwell 检测细胞迁移和侵袭, Western blot 法检测细胞 Ki67、MMP2、MMP9、p-p65、p-IkB α 蛋白表达, RT-qPCR 法检测 miR-136-5p 表达。结果 ox-LDL 可诱导内皮细胞的增殖、迁移和侵袭。阿魏酸钠处理后, ox-LDL 诱导的内皮细胞中 Ki67 蛋白表达升高, 细胞活性升高, MMP2、MMP9 蛋白表达升高, 迁移和侵袭细胞数升高, miR-136-5p 表达降低 ($P<0.05$)。抑制 miR-136-5p 表达可促进 ox-LDL 诱导的内皮细胞增殖、迁移和侵袭。过表达 miR-136-5p 逆转了阿魏酸钠对 ox-LDL 诱导的内皮细胞增殖、迁移和侵袭的作用。阿魏酸钠可降低内皮细胞 p-p65、p-IkB α 蛋白表达 ($P<0.05$), 而过表达 miR-136-5p 逆转了阿魏酸钠对 p-p65、p-IkB α 蛋白表达的抑制作用。结论 阿魏酸钠可能通过下调 miR-136-5p 表达抑制 NF- κ B 信号通路, 进而抑制内皮细胞的增殖、迁移和侵袭。

关键词: 阿魏酸钠; 内皮细胞; miR-136-5p; NF- κ B 信号通路; 增殖; 迁移; 侵袭

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)06-2010-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.06.052

动脉粥样硬化是一种病因复杂的慢性疾病, 内皮细胞损伤及功能障碍是动脉粥样硬化的始动环节, 参与动脉粥样硬化的进展过程^[1]。药物治疗是动脉粥样硬化及其相关心血管疾病的主要治疗手段之一, 因此有必要筛选有效的预防和治疗动脉粥样硬化的药物, 并探讨其作用机制, 寻找敏感的靶点^[2]。阿魏酸钠是传统活血化瘀类中药当归、川芎等的主要成分, 具有抗细胞凋亡、抑制血小板聚集、抗血栓形成等作用^[3]。阿魏酸钠通过抑制 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38 MAPK) 通路能够有效降低氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 诱导的细胞凋亡, 发挥内皮保护作用^[4], 阿魏酸钠还能促进内皮细胞的增殖和迁移^[5]。核因子- κ B (NF- κ B) 信号通路参与炎症反应、内皮细胞损伤、氧化应激等过程, 其可促进动脉粥样硬化的进展^[6], 抑制 NF- κ B p65 信号通路激活可减弱内皮细胞的增殖和迁移^[7]。阿魏酸钠可通过抑制 NF- κ B p65 核转位减轻缺血再灌注大鼠脑神经细胞炎症反应, 发挥脑保护作用^[8]。沉默 miR-136-5p 通过靶向 I κ B 激酶 β (IKK β) 调控 NF- κ B 信号通路改善大鼠脊髓损伤^[9]。因此, 用 ox-LDL 损伤人脐静脉内皮细胞

EA. HY926 建立体外细胞模型, 研究阿魏酸钠通过 miR-136-5p 调控 NF- κ B 信号通路对 ox-LDL 诱导内皮细胞增殖、迁移和侵袭的影响。

1 材料

人脐静脉内皮细胞株 EA. HY926 购自中国科学院上海细胞库。阿魏酸钠 (纯度>98%) 购自北京索莱宝科技有限公司。DMEM 培养基、胎牛血清购自美国 HyClone 公司; 氧化低密度脂蛋白 (ox-LDL) 购自上海泽叶生物科技有限公司; CCK-8 试剂盒购自日本同仁研究所; 蛋白提取试剂盒、BCA 试剂盒购自北京凯瑞基生物科技有限公司; TRIzol 试剂、反转录试剂盒、荧光定量试剂盒购自日本 TaKaRa 公司。Transwell 小室、Matrigel 购自美国 BD 公司。

2 方法

2.1 细胞处理与分组 人脐静脉内皮细胞株 EA. HY926 培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂, 待细胞融合至 90% 左右时进行传代。用 50 μ g/mL ox-LDL 诱导 EA. HY926 细胞模拟动脉粥样硬化模型, 为 ox-LDL 组; 正常培养的细胞作为对照组; 分别用

收稿日期: 2020-09-09

作者简介: 黄泓轲 (1986—), 男, 硕士, 副教授, 研究方向为药理学