

# 苦参碱调控肝癌细胞 HepG2 自噬作用机制研究

郭浩, 周淑妮, 冉瑞智<sup>△</sup>

(湖北省恩施土家族苗族自治州中心医院, 湖北 恩施 445000)

**摘要:**目的 探讨苦参碱调控肝癌细胞 HepG2 自噬的作用机制。方法 体外培养肝癌细胞 HepG2, 用苦参碱染毒 48 h 后收获细胞, 分为苦参碱高、中、低剂量组和对照组(苦参碱质量浓度分别为 2.0, 1.0, 0.5, 0 g/L), 以单丹磺酰戊二胺(MDC)染色观察肝癌细胞 HepG2 自噬现象; 以逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测蛋白激酶 B(Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和自噬相关蛋白 LC3B mRNA 的表达水平; Western Blot 法检测 Akt, p-Akt, mTOR, LC3B 蛋白水平。结果 与对照组比较, 苦参碱高、中、低剂量组肝癌细胞 HepG2 荧光强度明显增强, mTOR mRNA 和蛋白及 p-Akt 蛋白表达水平明显降低, LC3B mRNA 和蛋白表达水平明显升高, Akt mRNA 和蛋白表达水平无明显变化( $P > 0.05$ )。结论 苦参碱可促进肝癌细胞 HepG2 的自噬作用, 其机制与抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路有关。

**关键词:**苦参碱; PI3K/Akt/mTOR 通路; 肝癌细胞 HepG2; 自噬作用; 作用机制

中图分类号: R932; R285.5; R273

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)06-0014-04

## Mechanism of the Matrine in Regulating Autophagy of Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2

GUO Hao, ZHOU Shuni, RAN Ruizhi

(The Central Hospital of Enshi Tujia and Miao Autonomous Prefecture, Enshi, Hubei, China 445000)

**Abstract: Objective** To investigate the mechanism of matrine in regulating autophagy of hepatocellular carcinoma cell line HepG2.

**Methods** HepG2 cells were cultured *in vitro*, 48 h after exposure to matrine, the cells were collected and divided into high, middle and low dose matrine group and the control group (the matrine concentration was 2.0, 1.0, 0.5, 0 g/L), the monodansylcadaverine (MDC) staining was used to observe matrine-induced HepG2 autophagy. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the mRNA expression of Akt, mTOR and LC3B. Western Blot was used to detect the protein levels of Akt, p-Akt, mTOR and LC3B. **Results** Compared with the control group, the fluorescence intensity of HepG2 cells was significantly increased, the expression levels of mTOR mRNA and protein and p-Akt protein were significantly decreased, the expression levels of LC3B mRNA and protein were significantly increased in the high, middle and low dose groups, but the expression levels of Akt mRNA and protein were not significantly changed in the high, middle and low dose groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Matrine can promote autophagy of hepatocellular carcinoma cell line HepG2 by inhibiting PI3K/Akt/mTOR pathway.

**Key words:** matrine; PI3K/Akt/mTOR pathway; hepatocellular carcinoma cell line HepG2; autophagy; mechanism of action

全球每年有超过 60 万患者死于肝癌, 其中 50% 发生在中国<sup>[1-2]</sup>。目前, 肝癌的有效治疗方法是手术切除和肝移植, 再辅助放射治疗、化学治疗(简称放化疗), 但患者 5 年生存率仅为 5%<sup>[3]</sup>。加之大部分肝癌患者合并肝硬化, 限制了化疗药物的使用<sup>[4]</sup>, 有必要寻找同时具有抗肿瘤和抗纤维化活性的药物。目前, 苦参碱已被广泛应用于肝炎、肝纤维化、癌症等疾病的治疗<sup>[5]</sup>, 但对其抗肿瘤作用的确切机制研究还不够深入<sup>[6-7]</sup>。研究发现, 苦参碱可诱导肿瘤细胞发生 II 型程序性死亡, 即自噬<sup>[8]</sup>, 但机制尚不清楚。有研究证实, 磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路在肿瘤细胞自噬过程中发挥关键作用<sup>[9]</sup>。本研究中将不同剂量苦参碱作用于肝癌细胞 HepG2, 确认肝癌细胞 HepG2 是否发生了自噬, 同时初步探讨其分子机制。现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试药: 苦参碱(西安天园生物制剂公司, 批号为 16092317, 纯度  $\geq 99\%$ ); DMEM 高糖培养基、胎牛血清(武汉普诺赛生命科技有限公司, 批号分别为 PM150210B, 164210-100); 胰酶(美国 Gibco 公司, 批号为 11080907); 单丹磺酰戊二胺(MDC, 美国 Sigma 公司, 批号为 15596018); Trizol Reagent RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司, 批号为 15596018); 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)RNA 反转录试剂盒(大连 TaKaRa 公司, 批号为 RR047A); 荧光定量 PCR 试剂盒(宝生物工程 < 大连 > 有限公司, 批号为 TK08045); 细胞蛋白抽提试剂(碧云天生物技术研究, 批号为 P0033); 鼠抗 p-Akt (Ser473) 抗体, 兔抗 Akt、mTOR、自噬相关蛋白 LC3B 抗体, 均购自美国 Santa Cruz 公司, 批号分别为 HZ-

第一作者: 郭浩, 男, 大学本科, 副主任医师, 研究方向为恶性肿瘤的内科治疗, (电子信箱) GuoHao445000@163.com。

<sup>△</sup>通信作者: 冉瑞智, 男, 大学本科, 主任医师, 研究方向为恶性肿瘤的内科治疗, (电子信箱) rrz1966@126.com。

0670R2, HZ-0670R1, HZ-0670R22, HZ-0673R6; 辣根过氧化物酶(HRP)标记抗小鼠 IgG、HRP 标记抗兔 IgG 和鼠抗 GAPDH 抗体均购自武汉艾美捷科技有限公司(批号分别为 115-035-003, C1313)。

仪器: TE2000-U + PXM1200 型倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); MCO-15AC 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱和 NanoDrop2000c 型蛋白核酸检测仪(美国 Thermo Revco 公司); CFX96 型 PCR 仪 Mini-PROTEAN Tetra 型垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); ChemiDoc TMXRS 型凝胶成像仪(美国 UVP 公司)。

细胞: 肝癌细胞 HepG2, 购自中国科学院典型培养物保藏中心昆明细胞库, 批号为 CM-1250。

## 1.2 方法

细胞培养及分组: 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37℃ 及 5% CO<sub>2</sub> 条件下培养肝癌细胞 HepG2, 隔天换液, 取处于对数生长期的肝癌细胞 HepG2, 分为对照组及苦参碱低、中、高剂量组, 待细胞贴壁后弃培养液, 加入终质量浓度依次为 0, 0.5, 1.0, 2.0 g/L 的苦参碱, 继续培养 48 h 后收获细胞。

MDC 染色观察自噬体: 取培养细胞加入 MDC(终浓度为 50 μmol/L), 室温避光染色 10 min 后, 用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次, 再加入无 MDC 的 DMEM 培养基, 在 380 nm 波长处观察细胞染色情况。自噬细胞质呈绿色荧光亮点。

RT-PCR 法检测 Akt、mTOR 和 LC3B mRNA 表达: 取培养细胞, 5 000 r/min 离心 5 min, 以 Trizol 法提取总 RNA, 逆转录合成 cDNA, 以 GAPDH 引物为内参。Akt 上游 5'-AGACATACATCTTTGCTGGAGACA-3', 下游 5'-CTTGAAGAAGTAGCTGTGACCG-3'; mTOR 上游 5'-AGAAGGCTCCCAGCTA-3', 下游 5'-TATTCGGGTGATCGG-3'; LC3B 上游 5'-ACTGGATTTGCGGCATGTGA-3', 下游 5'-CCATGTTGAAGTAGGAGCAGTGA-3'; GAPDH 上游 5'-TCCCATCACCATCTTCAG-3, 下游 5'-GGTATCCATCGCCATGCTC-3'; PCR 条件 95℃ 预变性 1 min; 95℃ 变性 15 s, 58℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 循环 40 次, 72℃ 延伸 5 min 终止反应。

读取循环阈值(C<sub>t</sub>值), 采用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 表示目的基因 mRNA 的表达量。以 Akt/GAPDH, mTOR/GAPDH, LC3B/GAPDH 比值分别代表各自的相对表达水平, 各组设 3 个复孔, 重复 3 次。

Western Blot 法检测 Akt、p-Akt、mTOR 和 LC3B 蛋白水平: 取培养细胞, 5 000 r/min 离心 5 min, 洗涤 2 次, 加入 1 μL PMSF, 加入蛋白抽提试液, 冰浴 2 h; 4℃ 下 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液, 检测蛋白含量; 调整蛋白浓度, 加入 1/5 体积的 5× Buffer, 沸水变性, 进行电泳、转膜; 加入一抗, 4℃ 下孵育过夜, 回收一抗, 清洗加入二抗, 加入发光试剂, 显影、定影、清洗, 将目的条带灰度值数字化, 目的条带与内参条带灰度值之比为各目的蛋白相对表达水平, 各组设 3 个平行样, 重复 3 次。

## 1.3 统计学处理

采用 SPSS 19.0 统计学软件分析。计量资料以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 行单因素方差分析; 组间两两比较用 SNK-q 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 对细胞自噬行为的影响

结果见图 1。与对照组比较, 苦参碱高、中、低剂量组肝癌细胞 HepG2 荧光强度明显增强, 且与剂量呈正相关, 说明苦参碱诱导肝癌细胞 HepG2 发生了自噬。

### 2.2 对细胞 AKT 和 p-Akt 蛋白表达的影响

结果见表 1。与对照组比较, 苦参碱高、中、低剂量组肝癌细胞 HepG2 Akt mRNA 和蛋白表达水平无明显差异(P > 0.05), 肝癌细胞 HepG2 p-Akt 蛋白表达水平明显降低(P < 0.05), 且与剂量呈正相关。

### 2.3 对细胞 mTOR mRNA 和蛋白表达的影响

结果见表 2。与对照组比较, 苦参碱高、中、低剂量组肝癌细胞 HepG2 mTOR mRNA 和蛋白表达水平明显降低(P < 0.05), 且与剂量呈正相关。

### 2.4 对肝癌细胞 HepG2 LC3B 表达的影响

结果见表 3。与对照组比较, 苦参碱高、中、低剂量组肝癌细胞 HepG2 LC3B mRNA 和蛋白表达水平明显升高(P < 0.05), 且与剂量呈正相关。

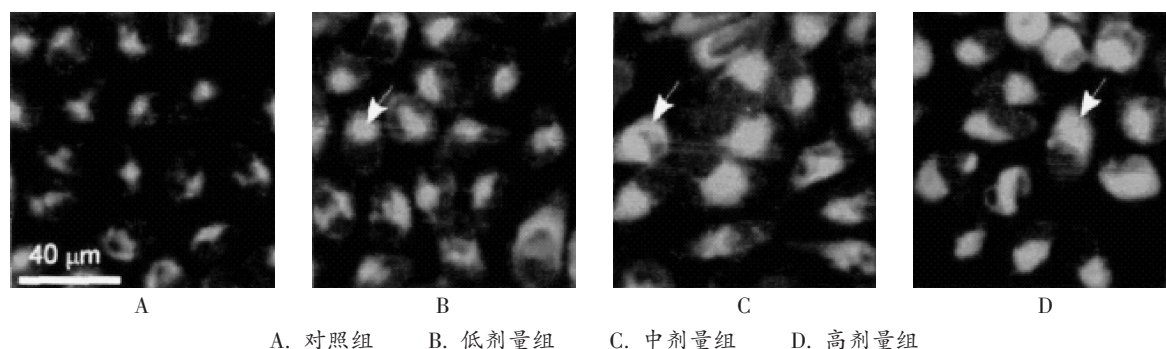


图 1 苦参碱诱导肝癌细胞 HepG2 自噬行为(×320, 箭头标记处为自噬体)

表1 各组肝癌细胞 HepG2 Akt 和 p-Akt 蛋白  
表达水平比较 ( $\bar{X} \pm s, n=3$ )

| 组别       | 质量浓度(g/L) | Akt mRNA    | Akt 蛋白      | p-Akt 蛋白     |
|----------|-----------|-------------|-------------|--------------|
| 对照组      | 0         | 1.02 ± 0.06 | 1.67 ± 0.23 | 1.11 ± 0.17  |
| 苦参碱 低剂量组 | 0.5       | 0.98 ± 0.03 | 1.84 ± 0.18 | 0.83 ± 0.14* |
| 中剂量组     | 1.0       | 1.04 ± 0.03 | 1.73 ± 0.22 | 0.57 ± 0.06* |
| 高剂量组     | 2.0       | 1.02 ± 0.05 | 1.77 ± 0.31 | 0.39 ± 0.05* |

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ 。表2、表3同。

表2 各组肝癌细胞 HepG2 mTOR mRNA 和蛋白  
表达水平比较 ( $\bar{X} \pm s, n=3$ )

| 组别       | 质量浓度(g/L) | mTOR mRNA    | mTOR 蛋白      |
|----------|-----------|--------------|--------------|
| 对照组      | 0         | 0.98 ± 0.04  | 1.12 ± 0.12  |
| 苦参碱 低剂量组 | 0.5       | 0.85 ± 0.08* | 0.97 ± 0.13* |
| 中剂量组     | 1.0       | 0.63 ± 0.06* | 0.79 ± 0.09* |
| 高剂量组     | 2.0       | 0.46 ± 0.07* | 0.36 ± 0.06* |

表3 各组肝癌细胞 HepG2 LC3B mRNA 和蛋白  
表达水平比较 ( $\bar{X} \pm s, n=3$ )

| 组别       | 质量浓度(g/L) | LC3B mRNA    | LC3B 蛋白      |
|----------|-----------|--------------|--------------|
| 对照组      | 0         | 1.00 ± 0.03  | 0.16 ± 0.03  |
| 苦参碱 低剂量组 | 0.5       | 1.63 ± 0.16* | 0.28 ± 0.05* |
| 中剂量组     | 1.0       | 2.57 ± 0.32* | 0.71 ± 0.16* |
| 高剂量组     | 2.0       | 3.15 ± 0.37* | 1.55 ± 0.22* |

### 3 讨论

苦参碱是一种从豆科槐属植物中提取的生物碱,主要从苦参、苦豆子中提取,在肝炎、肝纤维化、肿瘤治疗等方面有重要价值<sup>[10]</sup>。目前,我国已批准了多种含有苦参碱成分的药物,临床药理试验结果显示,对中晚期肝癌患者给予苦参碱注射液能显著提高抗肿瘤效果,延长生存时间和改善生活质量<sup>[11]</sup>。体外研究显示,苦参碱能抑制肿瘤细胞增殖和转移,促进肿瘤细胞凋亡<sup>[12]</sup>。同时,研究苦参碱诱导肿瘤细胞凋亡过程时,发现苦参碱还可诱导大鼠神经胶质瘤细胞产生大量的自噬体,出现自噬现象<sup>[13]</sup>。

自噬现象广泛存在于真核细胞的生物学过程中,是细胞在应激状态下的自我消化过程,作为一种细胞程序性死亡,对体内细胞合成和降解稳态的维持具有重要意义<sup>[14]</sup>。自噬是一把“双刃剑”,抑制自噬可促进肿瘤细胞持续增殖,同时,当无法提供肿瘤生长所需的足够营养时,自噬体通过降解肿瘤细胞的蛋白或细胞器来提供能量,维持机体或细胞的生存<sup>[15]</sup>。自噬泡的形成是自噬的关键步骤,通常通过形态学和特殊标志分子检测细胞的自噬情况,形态学检测通常用 MDC 染色进行,细胞中 LC3B 含量与自噬泡的数量呈正相关<sup>[16]</sup>。本研究结果显示,苦参碱处理后肝癌细胞 HepG2 荧光强度明显增强,且与剂量呈正相关,说明苦参碱诱导肝癌细胞 HepG2

发生了自噬;同时,LC3B mRNA 和蛋白表达水平随苦参碱剂量增加而升高,也验证了肝癌细胞 HepG2 发生了自噬。

近年有研究发现,很多抗肿瘤药物可诱导肿瘤细胞自噬,甚至直接导致肿瘤细胞自噬性死亡,故认为自噬现象是治疗肿瘤的一种新途径<sup>[17]</sup>。目前对自噬现象分子机制的研究还处于框架阶段,PI3K/Akt/mTOR 通路被认为是细胞自噬的主要调控途径<sup>[18]</sup>。PI3K 可磷酸化磷脂酰肌醇 4-磷酸和磷脂酰肌醇 4,5-二磷酸,产物可激活 Akt, Akt 是 PI3K/Akt/mTOR 通路下游主要的效应分子,当其磷酸化被抑制时促进细胞自噬的发生<sup>[19]</sup>。mTOR 是细胞自噬的负调控因子,抑制自噬的发生,发挥“门卫”作用。研究证明,通过抑制 mTOR 可促进 HeLa 细胞、肝癌细胞 HepG2 等自噬<sup>[20]</sup>。本研究结果显示,苦参碱处理后肝癌细胞 HepG2 内 Akt mRNA 和蛋白表达变化不明显,但 Akt 的磷酸化被明显抑制,同时, mTOR 也受到抑制,与之前的研究结果相一致。

综上所述,苦参碱可促进肝癌细胞 HepG2 的自噬作用,其机制与抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路相关。

### 参考文献:

- [1] TAKAOKA S, KAMIOKA Y, TAKAKURA K, et al. Live imaging of TAK1 activation in Lewis lung carcinoma 3LL cells implanted into syngeneic mice and treated with polyinosinic: polycytidylic acid[J]. Cancer Science, 2016, 107(5): 644-652.
- [2] 胡海东, 张见增. 216 例肝硬化门静脉高压症患者 CT 血管成像门静脉侧支血管表现研究[J]. 实用肝脏病杂志, 2016, 19(1): 73-76.
- [3] LI J, LIU W, ZHU W, et al. Transcatheter hepatic arterial chemoembolization and sorafenib for hepatocellular carcinoma: a meta-analysis of randomized, double-blind controlled trials[J]. Oncotarget, 2017, 19(16): 59601-59608.
- [4] 韩秀国, 马宽生, 夏 锋, 等. 肝硬化肝癌和无肝硬化肝癌患者围术期肝衰竭和死亡的相关因素分析[J]. 中华消化外科杂志, 2016, 15(6): 605-614.
- [5] 王珂欣, 高 丽, 周玉枝, 等. 基于网络药理学的苦参碱抗肝癌作用及机制研究[J]. 药理学报, 2017, 13(6): 888-896.
- [6] 周开宇, 吉海龙, 史鹏飞. 苦参碱对体外人髓母细胞瘤 D341 细胞凋亡、增殖及凋亡相关蛋白的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(1): 74-77.
- [7] WU L, LIU S, WEI J, et al. Synthesis and biological evaluation of matrine derivatives as anti-hepatocellular cancer agents[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016, 26(17): 4267-4275.
- [8] 胡美薇, 傅丽娟, 范翠华, 等. 苦参碱诱导人白血病耐药细胞 K562/IM 自噬和凋亡的研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(2): 213-218.
- [9] SAMARIN J, LAKETA V, MALZ M, et al. PI3K/AKT/mTOR-dependent stabilization of oncogenic far-upstream element binding