

褐藻素诱导人宫颈癌 HeLa 细胞的自噬作用机制研究

廖政邦^{1*}, 于五辈², 赵 辉^{2#}(1. 东莞市第五人民医院, 广东 东莞 523900; 2. 河南大学药学院化学生物学研究所, 河南 开封 475004)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)19-2657-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.19.20

摘要 目的: 研究褐藻素诱导人宫颈癌 HeLa 细胞的自噬作用机制。方法: 1、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素培养 HeLa 细胞 48 h 后, MTT 法测定细胞活力并计算抑制率。0(空白对照)、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素培养 HeLa 细胞 48 h 后, 流式细胞仪测定细胞周期与凋亡率; 通过吖啶橙染色与 Lyso-Tracker Red 染色、HeLa-GFP-LC3 细胞测试法在荧光显微镜下观察细胞自噬状态; Western blot 法检测细胞自噬流量与相关蛋白的表达。结果: 10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素培养细胞 48 h 后对细胞生长有明显抑制作用。10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素培养细胞 48 h 后可将细胞阻滞于 G_0/G_1 期, 但对细胞凋亡无明显影响; 40 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素培养细胞 48 h 后细胞自噬程度加重; 与空白对照比较, 40 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素可促进 LC3 I 转化为 LC3 II 以及 Beclin-1、PTEN、p21 的表达, 但抑制 p-Akt、p-p70S6K、p-mTOR、Cyclin D1、CDK2 表达。自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-MA, 5 mmol/L) 预处理可逆转褐藻素诱导的 HeLa 细胞自噬作用; U0126 可部分逆转褐藻素诱导的 HeLa 细胞自噬作用。结论: 褐藻素可通过抑制 Akt 信号通路以及激活 MEK/ERK 信号通路诱导 HeLa 细胞自噬。

关键词 褐藻素; 细胞周期; 自噬; 蛋白激酶 B; MEK/ERK 信号通路; 人宫颈癌 HeLa 细胞

Study on the Mechanism of Autophagy of HeLa Cells in Human Cervical Cancer Induced by Fucoxanthin

LIAO Zheng-bang¹, YU Wu-bei², ZHAO Hui² (1. The Fifth People's Hospital of Dongguan, Guangdong Dongguan 523900, China; 2. Institute of Chemical Biology, Pharmaceutical College of Henan University, Henan Kaifeng 475004, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the mechanism of autophagy of HeLa cell in human cervical cancer induced by fucoxanthin. METHODS: MTT was adopted to determine the cell activity and calculate the inhibition rate after HeLa cells were cultured by 1, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ of fucoxanthin for 48 h. Flow cytometry was used to determine the cell cycle and apoptosis rate after HeLa cells were cultured by 0 (blank control), 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ of fucoxanthin for 48 h; acridine orange staining, LysoTracker Red staining, HeLa-GFP-LC3 method and fluorescence microscope were used to observe the autophagy state; Western blot was used to determine the expressions of proteins related to autophagy. RESULTS: The cells had obvious inhibition effect on the cell growth after being cultured by 0, 10, 20, 40 and 80 $\mu\text{mol/L}$ of fucoxanthin. The cell was blocked in G_0/G_1 stage after being cultured by 10, 20 and 40 $\mu\text{mol/L}$ of fucoxanthin, and had no obvious effect on the apoptosis rate; autophagy degree was increased after the cells were cultured by 40 $\mu\text{mol/L}$ fucoxanthin for 48 h. Compared with blank control, 40 $\mu\text{mol/L}$ fucoxanthin could promote LC3 I transferring into LC3 II and the expressions of Beclin-1, PTEN, p21; and inhibit the phosphorylation of p-Akt, p-p70S6K and p-mTOR. The pre-treatment by autophagy inhibitor 3-methyladenine (5 mmol/L) could reverse the autophagy of HeLa cells induced by fucoxanthin; U0126 could partly reverse the autophagy of HeLa cells induced by fucoxanthin. CONCLUSIONS: Fucoxanthin can induce the autophagy of HeLa cells by inhibiting Akt signaling pathway and activating MEK/ERK signaling pathway.

KEYWORDS Fucoxanthin; Cell cycle; Autophagy; Akt; MEK/ERK signal pathway; HeLa cell in human cervical cancer

[5] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 442.

[6] 任守忠, 郭建生, 马志健, 等. 安胃丸对慢性胃炎模型大鼠的保护作用研究[J]. 中国药房, 2012, 23(43): 4 052.

[7] 王莹, 丁世兰, 齐学洁, 等. 应激性胃溃疡发病机制与中药治疗的研究进展[J]. 天津中医药, 2013, 30(3): 186.

[8] 王彩冰, 晋玲, 黄俊杰, 等. 维生素 E 对胃黏膜损伤模型小鼠的保护作用研究[J]. 中国药房, 2012, 23(9): 811.

[9] 问慧娟, 李玉巧, 崔玉英, 等. 白藜芦醇对大鼠应激性胃溃疡的保护作用[J]. 中国医院药学杂志, 2014, 34(1): 15.

[10] 曲怡, 才丽平, 郑洪新, 等. 中药消痈溃得康对乙酸胃溃疡模型大鼠 PGE_2 及 EGF 含量的影响[J]. 中华中医药杂志, 2011, 26(10): 2 255.

* 主管药师。研究方向: 医院药学。E-mail: tplzb2008@163.com

通信作者: 副教授, 硕士。研究方向: 肿瘤药理学。电话:

0371-23880680。E-mail: tzz1113@163.com

(收稿日期: 2015-04-27 修回日期: 2015-05-28)

(编辑: 张 静)

宫颈癌是病死率最高的常见妇科肿瘤,严重威胁着女性健康。复发的宫颈癌往往对临床常用的抗肿瘤药物耐药,因此亟需开发以新方式引起肿瘤细胞死亡的药物以克服耐药^[1]。自噬是继凋亡和坏死后发现的第3种细胞死亡形式,虽然细胞通过自噬可以降解受损、衰老和失去功能的大分子或细胞器,维持细胞的内稳态,但自噬的过度激活又会损伤细胞器,促进自噬性细胞死亡。近年来发现很多药物可通过诱导肿瘤细胞自噬产生抗肿瘤作用,例如维生素K₃可通过细胞外调节蛋白激酶(Extracellular regulated protein kinases, ERK)途径诱导宫颈癌HeLa细胞发生自噬^[2];麦冬皂苷B通过抑制蛋白激酶B(Protein kinase B, PKB, 又称Akt)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)通路诱导HeLa细胞自噬^[3]。以上研究表明,诱导肿瘤发生自噬是研发抗肿瘤药物的一种有效策略^[4]。

褐藻素(Fucoxanthin)是一种具有独特结构的海洋类胡萝卜素成分,具有消痰、软坚散结、利水作用。现代医学研究表明,褐藻素具有抗肿瘤、促凋亡、抗炎及清除自由基等药理作用。已有研究表明,褐藻素可通过抑制Akt、mTOR的磷酸化来诱导肝癌HepG2细胞发生凋亡和自噬^[5]。由于药物抗肿瘤作用机制往往取决于肿瘤类型,因而褐藻素是否对宫颈癌具有抗肿瘤作用尚不得而知,本研究对褐藻素抗宫颈癌作用及其分子机制进行了研究。

1 材料

1.1 仪器

FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司);DMI3000B型倒置荧光显微镜(德国徕卡公司);Multiskan Spectrum型全波长酶标仪(美国热电公司)。

1.2 药品与试剂

胰蛋白酶、RPMI1640培养液、胎牛血清(美国Gibco公司);褐藻素(纯度:98.0%)、洛霉素A1(Baf A1,纯度:98.0%)、新雷素(纯度:>98%)、氯化铵(NH₄Cl)、MTT、核糖核酸酶(RNase) A、吖啶橙、3-甲基腺嘌呤(3-MA,纯度:98.0%)、U0126(纯度:98.0%)、碘化丙啶、一抗均购自美国Sigma公司;细胞裂解液试剂盒、Lyso-Tracker Red、Hoechst33342、Annexin V-FITC凋亡试剂盒均购于上海碧云天生物技术有限公司;Akt一抗、phospho-Akt(p-Akt)一抗、p21一抗、CDK2一抗、Cyclin D1一抗、Phospho-p70S6 kinase (p-p70S6K, Thr389)一抗、PTEN一抗、Phospho-mTOR (p-mTOR)一抗均购于美国Cell Signaling Technology公司;Beclin-1、LC3及相应二抗均购自美国Santa Cruz公司。

1.3 细胞

HeLa细胞购于中国科学院上海细胞生物研究所。

2 方法

2.1 细胞的培养^[6]

细胞冻存液清洗后,加入RPMI1640培养液重悬细胞沉淀至细胞培养瓶中,置37℃、5% CO₂培养箱中培养。

2.2 细胞抑制率测定

取对数生长期的细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 并接种于96孔培养板,培养12 h使细胞贴壁。以1、10、20、40、80 μmol/L褐藻素,1、10、20、40、80 μmol/L褐藻素+3-MA(5 mmol/L)培养细胞48 h。于试验终止前4 h每孔加入MTT(5 mg/ml)10 μl,37℃下继续孵育4 h后,终止培养。每孔加入二甲亚砜100 μl,37℃下振荡30 min后,以酶标仪于570 nm

波长处测定光密度(OD),以OD代表细胞活力并计算细胞抑制率与半数抑制浓度(IC₅₀)^[5]。

2.3 细胞周期与凋亡测定

取对数生长期的细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 并接种于96孔培养板,培养12 h使细胞贴壁。以0(空白对照)、10、20、40 μmol/L褐藻素培养细胞48 h。同一浓度重复3孔。培养细胞结束后以70%冰冷乙醇固定过夜,RNase A(50 μg/ml)处理后碘化丙啶(100 g/ml)避光染色,以流式细胞仪分析细胞周期分布;培养细胞结束后按照Annexin V-FITC凋亡检测试剂盒说明书处理细胞,以流式细胞仪分析细胞凋亡率^[5]。

2.4 细胞自噬测定(自噬剂:3-MA)

2.4.1 吖啶橙染色法 取对数生长期的细胞,以5 000个/孔细胞接种于6孔板,以40 μmol/L褐藻素培养细胞48 h,弃去培养基。同一浓度重复3孔。吖啶橙(1 mg/ml)避光染色15 min,荧光显微镜观察并拍照,当细胞内酸性小囊泡增多时吖啶橙由绿色荧光转变成红色荧光。自噬抑制性试验则加入自噬抑制剂3-MA(5 mmol/L)培养细胞2 h后,再加入40 μmol/L褐藻素培养细胞48 h,弃去培养基,染色方法同上^[6]。试验设空白对照(0 μmol/L)。

2.4.2 Lyso-Tracker Red 染色法 取对数生长期的细胞,以5 000个/孔细胞接种于6孔板,以40 μmol/L褐藻素培养细胞48 h,弃去培养基。同一浓度重复3孔。加入Lyso-Tracker Red(50 nmol/L)37℃避光染色45 min,Hoechst 33342(1 μmol/L)复染15 min,荧光显微镜观察并拍照,当溶酶体数量增加时红色荧光增强。自噬抑制性试验则加入自噬抑制剂3-MA(5 mmol/L)培养细胞2 h后再加入40 μmol/L褐藻素培养细胞48 h,弃去培养基,染色方法同上^[6]。试验设空白对照(0 μmol/L)。

2.4.3 稳定转染HeLa-GFP-LC3细胞测试法 选择对数生长期细胞加入自噬抑制剂3-MA(5 mmol/L)培养细胞2 h,进行pGFP-LC3质粒转染,用新霉素筛选细胞克隆。收获HeLa-GFP-LC3细胞以5 000个/孔接种于6孔板,40 μmol/L褐藻素培养细胞48 h后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次,荧光显微镜观察并拍照。细胞内绿色荧光呈点状分布则说明细胞发生自噬,反之呈弥散性绿色荧光。对于自噬抑制性试验则为加入自噬抑制剂3-MA(5 mmol/L)培养细胞2 h后再加入40 μmol/L褐藻素培养细胞48 h,弃去培养基,染色方法同上^[7]。试验设空白对照(0 μmol/L)。

2.5 细胞自噬相关蛋白的测定

以Western blot法测定蛋白表达。取对数生长期的细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 并接种于96孔培养板,培养12 h使细胞贴壁,单独加入40 μmol/L褐藻素或者先加入自噬抑制剂3-MA(5 mmol/L)或U0126(10 μmol/L)培养细胞2 h后再加入40 μmol/L褐藻素,继续培养细胞48 h后,PBS洗3次,以离心半径为13.5 cm、1 000 r/min离心5 min后用细胞裂解液裂解细胞。同一浓度重复3孔。蛋白定量后取50 μg蛋白加入上样缓冲液,95℃变性10 min。8%聚丙烯酰胺-十二烷基磺酸钠(SDS)凝胶电泳,电转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭后依次加入相应的一抗和二抗,室温孵育2 h,TBST缓冲液洗涤5次,每次10 min。凝胶成像系统分析细胞自噬相关蛋白条带^[5]。试验设空白对照(0 μmol/L)。

2.6 自噬流量测定

取对数生长期的细胞,调整细胞密度为 $5 \times 10^5 \text{ ml}^{-1}$ 并接种于96孔培养板,培养12h使细胞贴壁。单独加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 褐藻素或先加入自噬抑制剂Baf A1或 NH_4Cl 后,再加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 褐藻素,继续培养细胞48h,测定LC-3 I、LC-3 II、p62表达水平。对于溶酶体内Cathepsin D检测,则分别加入10、20、 $40 \mu\text{mol/L}$ 褐藻素培养细胞48h后,PBS洗3次,以离心半径为13.5 cm、1 000 r/min离心5 min,用细胞裂解液裂解细胞后,测定Cathepsin D表达水平。同一浓度重复3孔。蛋白定量后取 $50 \mu\text{g}$ 蛋白加入上样缓冲液, 95°C 变性10 min。8%聚丙烯酰胺-SDS凝胶电泳,电转移至硝酸纤维素膜上,5%脱脂奶粉封闭后依次加入相应的一抗和二抗,室温孵育2 h, TBST缓冲液洗涤5次,每次10 min。凝胶成像系统分析蛋白条带^[9]。试验设空白对照($0 \mu\text{mol/L}$)。

2.7 统计学方法

采用SPSS 12.0软件处理试验数据。各组数据均为计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 t 检验进行分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 细胞抑制率测定结果

1、10、20、40、80 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素培养细胞48 h后,对细胞生长具有明显抑制作用,且呈浓度依赖关系, IC_{50} 为 $(55.1 \pm 7.6) \mu\text{mol/L}$ 。细胞抑制率测定结果见表1。

表1 细胞抑制率测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Determination results of cell inhibition rate($\bar{x} \pm s, n=3$)

药物	浓度	抑制率, %
褐藻素	1 $\mu\text{mol/L}$	5.2 ± 0.3
褐藻素	10 $\mu\text{mol/L}$	13.5 ± 1.6
褐藻素	20 $\mu\text{mol/L}$	26.9 ± 3.1
褐藻素	40 $\mu\text{mol/L}$	46.8 ± 5.1
褐藻素	80 $\mu\text{mol/L}$	75.9 ± 6.7
褐藻素+3-MA	1 $\mu\text{mol/L}$ +5 mmol/L	1.1 ± 0.2
褐藻素+3-MA	10 $\mu\text{mol/L}$ +5 mmol/L	3.4 ± 0.4
褐藻素+3-MA	20 $\mu\text{mol/L}$ +5 mmol/L	4.7 ± 0.6
褐藻素+3-MA	40 $\mu\text{mol/L}$ +5 mmol/L	6.4 ± 0.5
褐藻素+3-MA	80 $\mu\text{mol/L}$ +5 mmol/L	9.8 ± 0.8

3.2 细胞周期与凋亡测定结果

与空白对照比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素培养细胞48 h后,可剂量依赖性阻滞细胞于 G_0/G_1 期,但对细胞凋亡无显著影响。细胞周期与凋亡测定结果见表2。

表2 细胞周期与凋亡测定结果

Tab 2 Determination results of cell cycle and apoptosis

药物	浓度, $\mu\text{mol/L}$	凋亡率, %	G_0/G_1 , %	G_2/M , %	S, %
褐藻素	0(空白对照)	4.2 ± 0.5	51.3 ± 2.9	19.6 ± 2.1	29.1 ± 2.3
褐藻素	10	4.7 ± 0.5	$66.8 \pm 5.1^*$	18.4 ± 1.9	$14.8 \pm 1.6^{**}$
褐藻素	20	6.3 ± 0.7	$71.6 \pm 7.6^{**}$	17.3 ± 1.4	$11.1 \pm 0.9^{**}$
褐藻素	40	8.1 ± 0.8	$76.8 \pm 6.1^{**}$	16.6 ± 1.5	$6.6 \pm 0.7^{**}$

注:与空白对照比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: vs. blank control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3.3 细胞自噬测定结果

吖啶橙染色结果表明,经40 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素处理48 h后,HeLa细胞内红色荧光明显增强,提示细胞内的酸性小囊泡增多;Lyso-Tracker Red染色结果进一步提示褐藻素可诱导溶酶体数量的增多及活性的增强;HeLa-GFP-LC3细胞内点状绿色

荧光明显增多,而空白对照细胞内呈现弥散性绿色荧光。细胞自噬测定结果见图1。

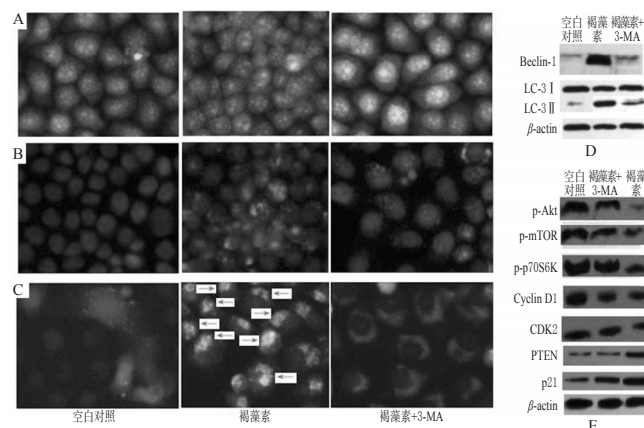


图1 细胞自噬与相关蛋白测定结果($\times 20$)

A. 吖啶橙染色; B. LysoTracker Red染色; C. HeLa-GFP-LC3细胞测试法; D. Beclin-1和LC3 I、LC3 II表达; E. p-Akt、p-mTOR、p-p70S6K、Cyclin D1、CDK2、PTEN、p21表达

Fig 1 Determination results of autophagy and related proteins($\times 20$)

A. acridine orange staining; B. LysoTracker Red staining; C. HeLa-GFP-LC3 cell method; D. Beclin-1 and LC3 I, LC3 II expression; E. p-Akt, p-mTOR, p-p70S6K, Cyclin D1, CDK2, PTEN, p21 expression

3.4 细胞自噬相关蛋白的测定结果

40 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素可增强自噬标志性蛋白Beclin-1的表达,可促进LC3 I转变为LC3 II,提示褐藻素诱导细胞发生了自噬。与空白对照比较,40 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素作用细胞48 h后,p-Akt及其下游靶蛋白p70S6K和p-mTOR表达减弱,总Akt蛋白表达并无明显改变;Akt信号通路的负调控蛋白PTEN表达增强,提示褐藻素通过Akt/mTOR信号通路诱导HeLa细胞发生了自噬。与空白对照比较,40 $\mu\text{mol/L}$ 褐藻素可抑制CDK2、Cyclin D1蛋白表达,增强p21蛋白表达。自噬抑制剂3-MA几乎完全逆转褐藻素对HeLa细胞的生长抑制作用,但对细胞凋亡无明显影响,提示褐藻素的生长抑制作用取决于自噬的发生。此外,3-MA部分逆转褐藻素对自噬相关蛋白表达的调控。细胞自噬相关蛋白的测定结果(自噬剂:3-MA)见图1。

3.5 细胞自噬流量测定结果

自噬的发生是一个连续动态过程,自噬流量的检测能反映该过程。Baf A1是囊泡 H^+ ATPases特异性抑制剂,可抑制酸性溶酶体和自噬体/溶酶体的形成。结果显示Baf A1可明显增加褐藻素诱导的LC3 II蛋白的表达。 NH_4Cl 通过抑制溶酶体酸化可以抑制自噬底物的降解,结果显示 NH_4Cl 明显逆转了褐藻素诱导的p62表达降低。此外,褐藻素浓度依赖性地诱导分布在溶酶体内Cathepsin D表达上调。细胞自噬流量测定结果(自噬剂:Baf A1或 NH_4Cl)见图2。

3.4 细胞自噬相关蛋白测定结果(自噬剂:U0126)

综合上述试验可知,自噬发生的分子机制涉及多种信号通路。由于3-MA并不完全抑制褐藻素对AKT/mTOR信号通路中关键蛋白的调控,提示可能有其他信号通路参与褐藻素诱导的细胞自噬。经过筛选,笔者发现褐藻素活化MEK/ERK信号通路,而MEK抑制剂U0126不仅可以抑制MEK/ERK信号通路的活化,而且可以部分逆转褐藻素诱导的Beclin-1表达

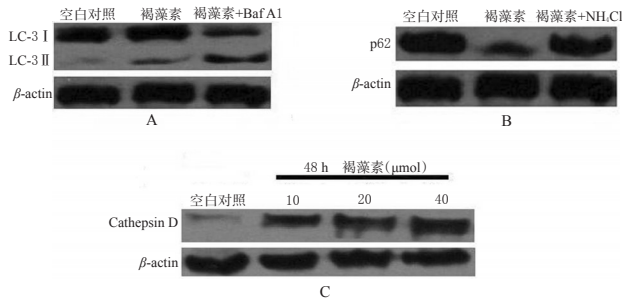


图2 细胞自噬流量测定结果(自噬剂:Baf A1或NH₄Cl)

A. 褐藻素+Baf A1; B. 褐藻素+NH₄Cl; C. 褐藻素

Fig 2 Determination results of autophagy flow of cells (autophagy agent: Baf A1 or NH₄Cl)

A. fucoxanthin+Baf A1; B. fucoxanthin+NH₄Cl; C. fucoxanthin

增强及LC3 I转变为LC3 II,提示MEK/ERK信号通路也参与了褐藻素诱导的细胞自噬。细胞自噬相关蛋白测定结果(自噬剂:U0126)见图3。

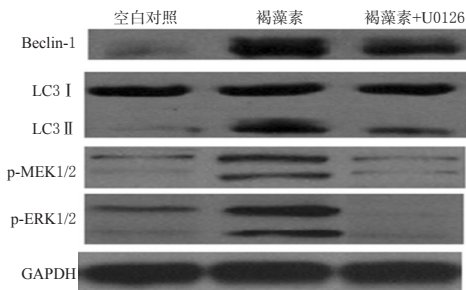


图3 细胞自噬相关蛋白测定结果(自噬剂:U0126)

Fig 3 Determination results of autophagy related proteins (autophagy agent:U0126)

4 讨论

自噬在肿瘤化疗中的作用目前仍未完全阐明,肿瘤细胞通过发生自噬得以存活并抵抗药物的治疗作用,抑制自噬可以促进细胞凋亡,而一些抗肿瘤药物通过诱导肿瘤细胞发生自噬而产生治疗作用^[8]。本研究表明,褐藻素的抗 HeLa 细胞增殖作用几乎完全被自噬抑制剂 3-MA 逆转,说明其抗增殖作用是通过自噬产生的。此外,褐藻素并不诱导 HeLa 细胞发生凋亡,这与以前的研究结果不同:褐藻素诱导人肝癌 HepG2 细胞同时发生自噬和凋亡,且自噬是抑制凋亡^[6]。以上结果提示褐藻素可通过不同的机制产生抗肿瘤作用,具有肿瘤细胞特异性。

自噬的发生是一个动态的连续过程,待降解物质由双层膜包裹而形成自噬体,随后与溶酶体融合并形成自噬溶酶体,溶酶体内的酸性水解酶消化水解待降解物质并释放回细胞质中,从而实现物质的循环利用^[9]。褐藻素引起 HeLa 细胞内吖啶橙的红色荧光和 Lyso-Tracker Red 的红色荧光增强,提示褐藻素诱导 HeLa 细胞发生了自噬。此外,Beclin-1 表达增加、LC3 I 转变为 LC3 II 和 HeLa-GFP-LC3 转染细胞试验均进一步证实褐藻素诱导 HeLa 细胞发生了自噬。

Akt/mTOR 信号通路往往参与细胞自噬的发生^[10]。研究结果表明,褐藻素能明显调控 Akt/mTOR 信号通路中一些关键蛋白,如 Akt、mTOR、p70S6K 的磷酸化以及上调 PTEN(Akt/mTOR 信号通路的负调控蛋白)的表达,提示褐藻素诱导 HeLa

细胞发生的自噬是通过抑制该信号通路中关键蛋白的活化产生的。由于 3-MA 并不完全抑制褐藻素对 Akt/mTOR 信号通路中关键蛋白的调控,提示可能有其他信号通路参与褐藻素诱导的细胞自噬。经过筛选发现,褐藻素通过使 MEK1/2 和 ERK1/2 磷酸化从而活化 MEK/ERK 信号通路,进一步研究表明 MEK 抑制剂 U0126 不仅可以抑制 MEK/ERK 信号通路的活化,而且可以部分逆转褐藻素诱导的 Beclin-1 表达增加及 LC3 I 转变为 LC3 II,提示 MEK/ERK 信号通路也参与了褐藻素诱导的细胞自噬,即褐藻素通过抑制 AKT/mTOR 信号通路和激活 MEK/ERK 信号通路共同介导了 HeLa 细胞的自噬。此外,褐藻素是通过抑制 p53、CDK2、Cyclin D1 的表达以及促进 p21 的表达从而诱导 HeLa 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期。实验结果表明,褐藻素可诱导宫颈癌 HeLa 细胞发生自噬和细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期,但并不诱导细胞凋亡。预孵自噬抑制剂 3-MA 后,褐藻素抗增殖作用被逆转,提示褐藻素抗 HeLa 细胞的作用取决于自噬,进一步研究表明褐藻素是通过抑制 Akt 信号通路以及激活 MEK/ERK 信号通路诱导 HeLa 细胞自噬。

本研究进一步完善了褐藻素抗肿瘤作用的分子机制,并为其应用于临床提供了理论基础和实验依据。

参考文献

- [1] Shigetomi H, Higashiura Y, Kajihara H, *et al*. Targeted molecular therapies for ovarian cancer: an update and future perspectives[J]. *Oncol Rep*, 2012, 28(2):395.
- [2] 于春艳,刘希,于春荣,等.维生素 K₃ 诱导氧化应激经 ERK 信号途径介导 HeLa 细胞发生自噬[J]. *吉林大学学报*, 2014, 40(2):229.
- [3] 许秋菊,侯莉莉,胡国强,等.麦冬皂苷 B 诱导人宫颈癌 HeLa 细胞自噬的机制[J]. *药学学报*, 2013, 48(6):855.
- [4] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, *et al*. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis[J]. *Cell Prolif*, 2012, 45(6):487.
- [5] 廖政邦,李明,谢松强.褐藻素诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬的机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(15):181.
- [6] 张艳霞,吴勇杰,李文广.蛇葡萄素钠协同卡铂对人肺腺癌 GLC-82 细胞增殖的抑制作用[J]. *中国药房*, 2015, 26(4):488.
- [7] 童洋飞,郭奉洁,潘夕春,等.雷公藤甲素对大鼠心肌 H9c2 细胞肥大的抑制作用[J]. *中国药房*, 2015, 26(7):878.
- [8] Abrahamsen H, Stenmark H, Platta HW. Ubiquitination and phosphorylation of Beclin 1 and its binding partners: tuning class III phosphatidylinositol 3-kinase activity and tumor suppression[J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(11):1584.
- [9] Gordy C, He YW. The crosstalk between autophagy and apoptosis: where does this lead[J]. *Protein Cell*, 2012, 3(1):17.
- [10] Zou CY, Smith KD, Zhu QS, *et al*. Dual targeting of AKT and mammalian target of rapamycin: a potential therapeutic approach for malignant peripheral nerve sheath tumor[J]. *Mol Cancer Ther*, 2009, 8(5):1157.

(收稿日期:2015-04-26 修回日期:2015-05-27)

(编辑:张静)