

八月札乙醇提取物含药血清通过抑制糖酵解调控 BEL-7404 细胞增殖与凋亡

王春玲¹, 郑作文¹, 莫思平¹, 文晓东^{2*} (1.广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 2.广西中医药大学附属瑞康医院, 南宁 530011)

摘要: 目的 研究八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞增殖和凋亡及糖酵解的影响, 探讨其可能的作用机制。方法 制备八月札乙醇提取物低(生药 3.15 g·kg⁻¹)、中(生药 6.30 g·kg⁻¹)、高(生药 12.60 g·kg⁻¹)剂量组及空白对照组的含药血清作用于体外培养的 BEL-7404 细胞。采用 CCK-8 法检测八月札乙醇提取物含药血清对细胞增殖的影响, 采用 DAPI 荧光染色法观察八月札乙醇提取物含药血清对细胞凋亡的影响, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测八月札乙醇提取物含药血清对细胞凋亡率的影响, 采用葡萄糖检测试剂盒、乳酸检测试剂盒测定葡萄糖摄取量、乳酸生成量, 采用 Western blotting 检测八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞中活化的半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved caspase-3)、活化的多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(cleaved poly ADP-ribose polymerase, cleaved PARP)、己糖激酶 2(hexokinase 2, HK2)、丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2, PKM2)和乳酸脱氢酶 A(lactate dehydrogenase A, LDHA)及丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(serine-threonine kinase 2, Akt2)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(phosphorylated serine-threonine kinase, p-Akt2)蛋白表达的影响。结果 八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞有明显的增殖抑制作用($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 使细胞核分散, 细胞内形成凋亡小体。八月札乙醇提取物含药血清能显著升高 BEL-7404 细胞总凋亡率($P<0.01$), 并伴随着葡萄糖摄取量及乳酸生成量显著降低(均 $P<0.01$), Western blotting 检测表明八月札乙醇提取物中、高剂量组含药血清上调了促凋亡蛋白 cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 的表达($P<0.05$), 下调了糖酵解相关酶 HK2、PKM2 及 LDHA 的蛋白表达($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 抑制 Akt2 的磷酸化($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 八月札乙醇提取物含药血清通过抑制糖酵解从而抑制 BEL-7404 细胞增殖及促进其凋亡。

关键词: 八月札乙醇提取物; 肝癌; 增殖; 凋亡; 有氧糖酵解

中图分类号: R965.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-7693(2022)18-2301-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.18.001

引用本文: 王春玲, 郑作文, 莫思平, 等. 八月札乙醇提取物含药血清通过抑制糖酵解调控 BEL-7404 细胞增殖与凋亡[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(18): 2301-2308.

Serum Containing Ethanol Extract of *Akebia Trifoliata* (Thunb.) Koidz Regulates Proliferation and Apoptosis of BEL-7404 Cells by Inhibiting Glycolysis

WANG Chunling¹, ZHENG Zuowen¹, MO Siping¹, WEN Xiaodong^{2*} (1.Department of Pharmacy, Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China; 2.Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effects of serum containing ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz(EEATK) on proliferation, apoptosis and glycolysis in BEL-7404 cells, and to explore its possible mechanism of action. **METHODS** Drug-containing serum of EEAK low(crude drug 3.15 g·kg⁻¹), medium(crude drug 6.30 g·kg⁻¹), high(crude drug 12.60 g·kg⁻¹) dose group and blank control group were prepared to act on cultured BEL-7404 cell *in vitro*. CCK-8 method was used to detect the effect of EEATK drug-containing serum on inhibitory rate of cells. DAPI fluorescence staining method was used to observe the effect of EEATK drug-containing serum on cell apoptosis, Annexin V-FITC/PI double staining method was performed to analyze the effect of EEATK drug containing serum on apoptotic rate of cells. The glucose assay kit and the lactic acid test kit were used to detect the glucose uptake and the lactic acid production in BEL-7404 cells. Western blotting was used to detect the effect of EEATK drug-containing serum on protein expressions of cleaved caspase-3, cleaved poly ADP-ribose polymerase(cleaved PARP), hexokinase 2(HK2), pyruvate kinase M2(PKM2), lactate dehydrogenase A(LDHA), serine-threonine kinase 2(Akt2) and phosphorylated serine-threonine kinase(p-Akt2) in BEL-7404 cells. **RESULTS** EEATK drug-containing

基金项目: 国家自然科学基金项目(82060888); 广西高校中药药理重点实验室(J14045)

作者简介: 王春玲, 女, 博士, 讲师

E-mail: clingwang1216@163.com

*通信作者: 文晓东, 男, 博士, 副教授

E-mail: 1021643438@qq.com

serum could significantly inhibit the cell proliferation($P<0.05$ or $P<0.01$), and could disperse the nucleus and form apoptotic bodies in the cells. EEATK drug-containing serum could significantly increase the total apoptotic rates of BEL-7404 cells($P<0.01$), accompanied by the decrease of glucose uptake and production of lactic acid(all $P<0.01$). Western blotting result showed that drug-containing serum of EEATK medium and high dose group could not only significantly up-regulate the expressions of cleaved-caspase-3 and cleaved PARP($P<0.05$), but also down-regulate the expressions of HK2, PKM2 and LDHA protein($P<0.05$ or $P<0.01$), and it could inhibit the phosphorylation of Akt2 in BEL-7404 cells($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSION** EEATK drug-containing serum can inhibit the cell proliferation and promote the apoptosis of BEL-7404 cells by inhibiting aerobic glycolysis.

KEYWORDS: *Akebia trifoliata* ethanol extract; hepatic carcinoma; proliferation; apoptosis; aerobic glycolysis

原发性肝癌(以下简称“肝癌”)是消化系统最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率在中国恶性肿瘤中分别排第5位和第2位^[1]。因此迫切需要探索抑制肝癌发生和发展的分子机制,并寻找更有效、更安全的治疗药物。八月札为木通科植物木通 *Akebia quinata* (Thunb.) Decne., 三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.或白木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.var.*australis* (Diels) Rehd.的干燥成熟果实,具有疏肝理气,软坚散结,活血止痛的功效,是中医临床治疗消化系统肿瘤经验方中的核心配伍药^[2-4]。含八月札经验方的研究多限于临床应用,对八月札抗肝癌的实验研究则相对较少。笔者所在项目组前期研究表明,八月札乙醇提取物对肝癌 H22 细胞小鼠移植瘤有抑制作用,能显著抑制 BEL-7404 裸鼠肝癌移植瘤的增殖^[5],但其抑制肝癌生长的作用机制尚不明确。

肿瘤细胞的生长与凋亡、糖酵解等生物学行为密切相关,活跃的糖代谢和凋亡抵抗是肿瘤细胞的重要特征,本研究拟从糖酵解角度研究八月札乙醇提取物含药血清对肝癌 BEL-7404 细胞增殖和凋亡的影响,为考察八月札的抗肝癌作用提供实验基础。

1 试剂与仪器

DM2500 型倒置显微镜(德国 Leica 公司); Forma TM 31 型 CO₂ 细胞培养箱、ST16R 型低速离心机、NanoDropOne 型紫外分光光度计均购自美国 Thermo 公司; 164-5070 型通用型蛋白电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); Synergy LX 型多功能酶标仪(美国 Bio Tek 公司); SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司); TS-1000 型 3D 脱色摇床(中国其林贝尔仪器制造有限公司); FACS Canto II 型流式细胞仪(美国 BD 公司); ZF-258 型全自动凝胶成像分析系统(上海金鹏分析仪器有限公司)。

RPMI1640 培养液、胎牛血清、青霉素/链霉素、胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司,批号分别为

11995073, 10099, 15140148, R001100; CCK-8 检测试剂盒(美国 Abcam 公司,批号: ab228554); Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒(美国 Sigma 公司,货号: APOAF); 葡萄糖检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号: F006-1-1); 乳酸检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号: KGT023); 兔抗人己糖激酶 2(hexokinase 2, HK2)一抗(批号: SAB2108077)、兔抗人丙酮酸激酶(pyruvate kinase M2, PKM2)一抗(批号: SAB4200105)、兔抗人乳酸脱氢酶 A(lactate dehydrogenase A, LDHA)一抗(批号: SAB1100050)均购自美国 Sigma 公司; 兔抗人丝氨酸(serine-threonine kinase 2, Akt2)一抗(美国 Abcam 公司,批号: ab131168); 兔抗人磷酸化 Akt2(phosphorylated serine-threonine kinase, p-Akt2)多克隆抗体(Abnova 公司,批号: PAB11175); 鼠抗 β -actin 单克隆抗体(北京普利莱基因技术有限公司,批号: C1313); 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(美国 Invitrogen 公司,批号: G-21234); 活化的半胱氨酸蛋白酶-3(cleaved caspase-3)抗体(批号: 9661T)、活化的多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(cleaved poly ADP-ribose polymerases, cleaved PARP)抗体(批号: 5625T)均购自美国 CST 公司。

SPF 级 SD 大鼠,♂,体质量(220±20)g,由广西中医药大学动物实验中心提供,实验动物使用许可证号: SYXK(桂)2019-0001; 肝癌 BEL-7404 细胞株,购于中国科学院上海细胞库; 八月札购于广西国药控股公司,由广西中医药大学中药鉴定教研室韦松基教授鉴定为三叶木通 *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.的果实。

2 方法

2.1 八月札乙醇提取物含药血清制备及动物分组、给药

八月札乙醇提取物按笔者所在项目组前期实验采用索氏抽提法制备^[5],每 1 g 浸膏相当于 3.98 g

生药。将 40 只 SPF 级 SD 大鼠(♂)按体质量随机分为八月札乙醇提取物给药组和空白对照组。八月札乙醇提取物给药组:参考八月札临床常用剂量 $[30\text{ g}\cdot(60\text{ kg})^{-1}\cdot\text{d}^{-1}]$ 结合“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”^[6]计算出大鼠等效剂量为生药 $3.15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$;按 1:2:4 设置八月札乙醇提取物低剂量(生药 $3.15\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组、中剂量(生药 $6.30\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组和高剂量(生药 $12.60\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组 10 只。给药方式:低、中、高剂量的八月札乙醇提取物一次给予 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$,每日早 9:00、晚 19:00 各灌胃 1 次。空白对照组给予等量、等频生理盐水灌胃,连续 7 d。末次给药前 12 h 禁食不禁水,末次灌胃 1 h 后腹腔注射 10%水合氯醛($0.3\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)将大鼠麻醉,在无菌条件下进行腹主动脉取血,血液静置 30 min 后 $1\ 006.2\times\text{g}$ 离心 5 min 取血清,合并同组大鼠血清。 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴灭活 30 min, $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌后分装,置 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。实验时用 RPMI 1640 培养基将空白对照组,八月札乙醇提取物各剂量组(生药 3.15, 6.30, $12.60\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)的含药血清分别稀释至体积分数 15%。

2.2 细胞培养

人肝癌 BEL-7404 细胞培养于含有 10%胎牛血清、 $100\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素与 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素的 RPMI1640 培养液,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 和 5% CO_2 饱和湿度条件下培养,细胞单层铺满培养瓶 70%~85%后,加入 0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞用于试验。

2.3 CCK-8 法检测八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞增殖的影响

取对数生长期的 BEL-7404 细胞,常规胰酶消化后用培养液吹打成细胞悬液,调整细胞浓度为 $3\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 。96 孔板先加入培养液 100 μL 再加入细胞悬液 100 μL ,调零孔加培养基 200 μL ,将细胞分为空白对照组和八月札含药血清给药组。细胞贴壁后,吸净培养基,空白对照组每孔加空白血清 200 μL ;八月札乙醇提取物低、中和高剂量组分别加入相应的 15%含药血清(均为 200 μL),每组平行设置 6 个复孔,周围孔用 200 μL 培养基填补。作用 48 h 后吸弃培养基,沿孔的侧壁每孔缓慢加入 10 μL CCK-8 工作液,继续培养 4 h 后取出培养板,在 450 nm 波长下用多功能酶标仪测定各孔吸光度值(OD 值),按下式计算细胞抑制率:细

胞抑制率 $= (1 - \text{给药孔平均 OD 值} / \text{对照孔平均 OD 值}) \times 100\%$ 。

2.4 八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞凋亡的影响

2.4.1 DAPI 染色法观察八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞形态的影响 取对数生长期的 BEL-7404 细胞按 $5\times 10^4\cdot\text{mL}^{-1}$ 的密度接种于 24 孔培养板中,每孔 1 mL,实验分组及加药处理同“2.3”项,以上各组作用 BEL-7404 细胞 48 h 后,75%乙醇固定 10 min,晾干,加入 50 μL 的 DAPI 工作液洗 1 次,再滴加入 500 μL 的 DAPI 工作液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光染色 15~20 min,弃去染色液,甲醇漂洗 1 次,滴加 Buffer A,荧光显微镜激发,观察细胞形态并拍照。

2.4.2 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞凋亡率的影响 取对数生长期的细胞按 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$ 密度接种于 6 孔培养板中,实验分组同“2.3”项,细胞贴壁后,吸弃原培养基,取各组含药血清 2 mL 分别作用于 BEL-7404 细胞,每组设置 3 个复孔,作用 48 h 后吸弃培养液,用 0.25%胰酶收集各组细胞,用预冷的 PBS 洗 2 次,将细胞重悬浮于 250 μL 结合缓冲液中,调整待测细胞的密度为 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$ (结合缓冲液用去离子水稀释 4 倍)。取 100 μL 的细胞悬液于 5 mL 的流式管中,加入 5 μL Annexin-VFITC 和 10 μL 的 PI,轻轻混匀,避光,室温反应 20 min,在反应管中补加 400 μL PBS,立即应用流式细胞仪检测,计算细胞凋亡率。

2.5 比色法测定八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞葡萄糖摄取量及乳酸生成量的影响

取处于对数生长期的 BEL-7404 细胞按 $1\times 10^6\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔培养板中,实验分组及加药处理同“2.3”项,作用于细胞 48 h 后,收集细胞上清液,按照葡萄糖摄取检测试剂盒及乳酸检测试剂盒说明书进行细胞葡萄糖摄取量和乳酸生成量测定。

2.6 Western blotting 检测八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞 cleaved caspase-3、cleaved PARP、HK2、PKM2、LDHA、Akt2、p-Akt2 蛋白表达的影响

按“2.3”项下分组及加药处理,消化收集各组 BEL-7404 细胞,清洗完全后裂解细胞,提取细

胞总蛋白,按照BCA蛋白定量试剂盒定量测定蛋白浓度,以等量的样品进行聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,将经电泳分离的蛋白质转移至PVDF膜上,浸于含5%脱脂奶粉的TBST中封闭1 h,分别加入相应的一抗,4℃孵育过夜后室温摇床孵育2 h,TBST漂洗3次,后加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗,室温孵育2 h,TBST漂洗3次,用化学发光法显色曝光,Image J软件分析条带光密度值。

2.7 统计分析

符合正态分布的实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用SPSS 22.0统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 八月札乙醇提取物含药血清抑制 BEL-7404 细胞增殖

八月札乙醇提取物各剂量组含药血清干预BEL-7404细胞48 h后,CCK-8试验测定结果显示,八月札乙醇提取物低、中、高剂量组的细胞抑制率分别为21.7%,34.8%,54.5%,随八月札乙醇提取物含药血清剂量增加,对细胞的抑制作用增强,差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明八月札乙醇提取物含药血清可以抑制BEL-7404细胞的增殖,见表1。

表1 八月札乙醇提取物含药血清对BEL-7404细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 1 Effect of serum containing ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on the cell proliferation of BEL-7404 cells($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/生药 g·kg ⁻¹	OD值	抑制率/%
空白对照组	—	0.771±0.082	—
八月札乙醇提取物低剂量组	3.15	0.604±0.061 ¹⁾	21.7 ¹⁾
八月札乙醇提取物中剂量组	6.30	0.503±0.049 ²⁾	34.8 ²⁾
八月札乙醇提取物高剂量组	12.60	0.351±0.030 ²⁾	54.5 ²⁾

注:与空白对照组比较,¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

Note: Compared with blank control group, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

3.2 八月札乙醇提取物含药血清促进 BEL-7404 细胞凋亡

BEL-7404细胞经各组含药血清干预48 h,DAPI染色后荧光显微镜下显示,空白对照组细胞边缘清晰,染色均匀胞质丰富;经八月札乙醇提取物含药血清低、中、高剂量组处理的细胞均可见蓝

色荧光,且随着剂量的增加,强蓝色荧光的细胞数目明显增多,大部分细胞缩小,胞质浓缩,核染色体高度凝聚、边缘化,细胞核碎裂呈碎片状,出现典型的新月形的凋亡小体,见图1。流式细胞术结果表明八月札乙醇提取物含药血清各剂量组的晚期凋亡率与空白对照组比较,差异无统计学意义,而早期凋亡率均明显高于空白对照组($P < 0.01$),总凋亡率显著升高($P < 0.01$),且呈现剂量依赖关系,表明八月札乙醇提取物含药血清能够显著促进BEL-7404细胞的凋亡,结果见图2。

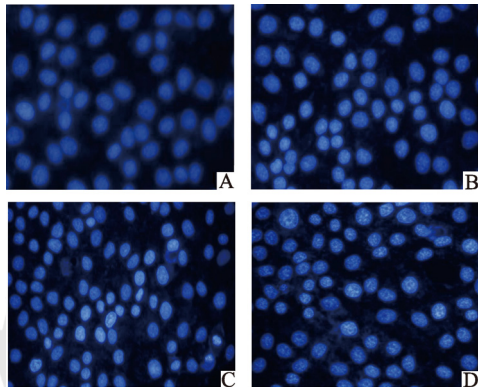


图1 DAPI染色法观察八月札乙醇提取物含药血清对BEL-7404细胞形态学的影响(400×)

A-空白对照组;B-八月札乙醇提取物低剂量组;C-八月札乙醇提取物中剂量组;D-八月札乙醇提取物高剂量组。

Fig. 1 Effect of serum containing ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on cell morphology of BEL-7404 cells detected by DAPI staining(400×)

A-blank control group; B-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz low dose group; C-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz medium dose group; D-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz high dose group.

3.3 八月札乙醇提取物含药血清上调 BEL-7404 细胞中 cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 蛋白表达

Western blotting结果显示,相较于空白对照组,八月札乙醇提取物含药血清高、中剂量组中cleaved PARP、cleaved caspase-3蛋白表达明显增加($P < 0.05$),但低剂量组对细胞中cleaved PARP、cleaved caspase-3蛋白表达较空白对照组差异无统计学意义,见图3。提示八月札乙醇提取物含药血清可以上调促凋亡cleaved PARP、cleaved caspase-3蛋白表达从而促进BEL-7404细胞凋亡。

3.4 八月札乙醇提取物含药血清减少 BEL-7404 细胞葡萄糖摄取和乳酸产量

结果显示,八月札乙醇提取物低、中、高剂量组含药血清处理BEL-7404细胞48 h后葡萄糖

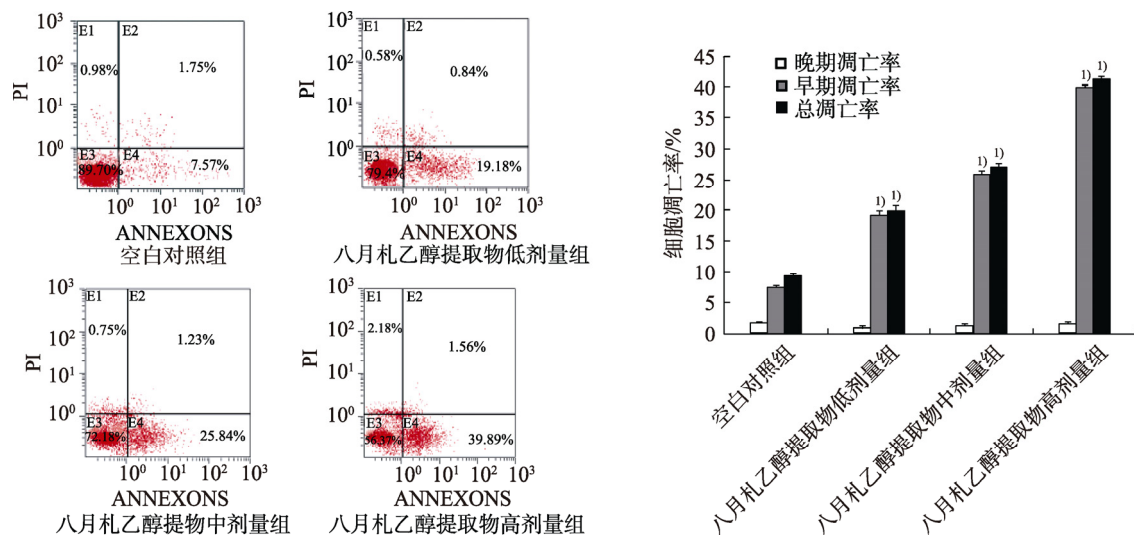


图2 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞凋亡率的影响与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effect of serum containing ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on apoptotic rate of BEL-7404 cells detected by AnnexinV-FITC/PI double staining method Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.01$.

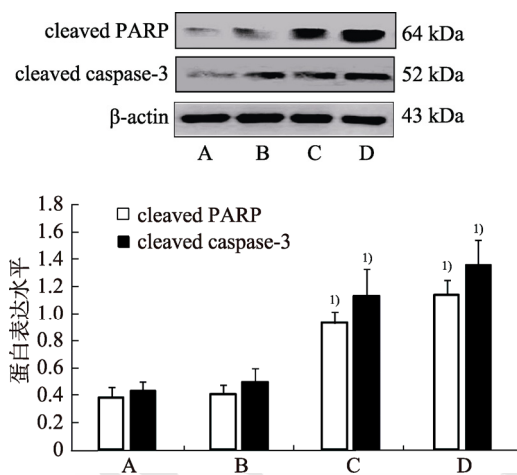


图3 八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞 cleaved PARP 和 cleaved caspase-3 蛋白表达的影响 A-空白对照组; B-八月札乙醇提取物低剂量组; C-八月札乙醇提取物中剂量组; D-八月札乙醇提取物高剂量组; 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effect of serum containing ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on protein expression of cleaved PARP and cleaved caspase-3 in BEL-7404 cells A-blank control group; B-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz low dose group; C-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz medium dose group; D-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz high dose group; compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$.

摄取率分别为 $(40.01 \pm 3.28)\%$, $(21.19 \pm 2.39)\%$, $(11.22 \pm 2.18)\%$, 与空白对照组比较, 各剂量组葡萄糖摄取量显著降低, 差异具有统计学意义(均 $P<0.01$)。八月札乙醇提取物含药血清低、中、高剂量组处理 BEL-7404 细胞 48 h 后细胞外乳酸含量分别为 (4.29 ± 0.39) , (2.77 ± 0.24) , $(1.13 \pm$

$0.53)$ mmol·L⁻¹, 与空白对照组比较, 各剂量组细胞外乳酸含量显著减少, 差异具有统计学意义(均 $P<0.01$)。以上结果表明八月札乙醇提取物含药血清能够显著抑制 BEL-7404 细胞葡萄糖的摄取, 明显减少乳酸的生成, 结果见图 4~5。

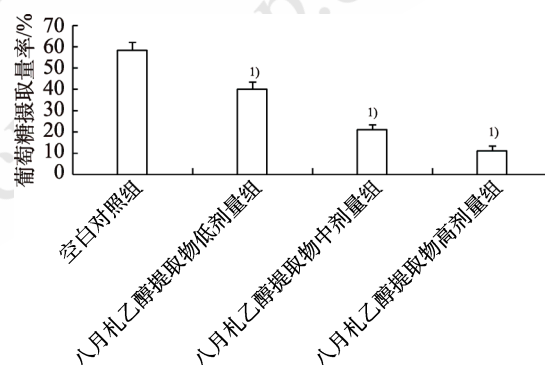


图4 八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞葡萄糖摄取量的影响与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effect of serum containing ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on glucose uptake in BEL-7404 cells Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.01$.

3.5 八月札乙醇提取物含药血清下调 BEL-7404 细胞 HK2、PKM2、LDHA 蛋白的表达

与空白对照组相比, 八月札乙醇提取物中剂量和高剂量组含药血清中 HK2、PKM2、LDHA 蛋白的表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 八月札乙醇提取物低剂量组含药血清对 BEL-7404 细胞糖酵解关键酶 HK2、PKM2 和 LDHA 蛋白的表

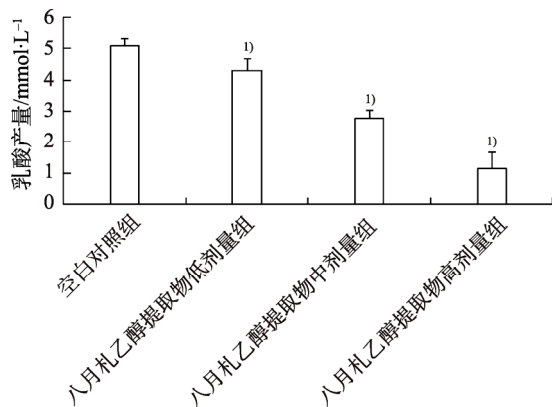


图5 八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞乳酸产量的影响

与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 5 Effect of serum containing ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on lactic acid production in BEL-7404 cells

Compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.01$.

达虽有下降趋势,但差异无统计学意义,见图6。提示八月札乙醇提取物含药血清可以抑制 BEL-7404 细胞糖酵解,据此推测糖酵解途径是 BEL-7404 细胞能量供应的主要来源。因此靶向糖酵解过程中的关键酶,可从代谢层面切断肿瘤能量供应以抑制其合成代谢,有望成为肝癌新的生物治疗靶点。

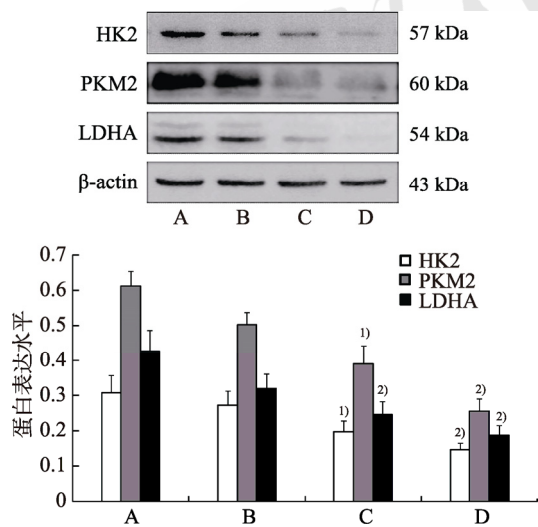


图6 八月札乙醇提取物含药血清对人肝癌 BEL-7404 细胞 HK2 和 PKM2 及 LDHA 蛋白表达的影响

A-空白对照组; B-八月札乙醇提取物低剂量组; C-八月札乙醇提取物中剂量组; D-八月札乙醇提取物高剂量组; 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 6 Effect of serum containing ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on protein expression of HK2, PKM2 and LDHA in BEL-7404 cells

A-blank control group; B-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz low dose group; C-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz medium dose group; D-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz high dose group; compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

3.6 八月札乙醇提取物含药血清抑制 BEL-7404 细胞的 Akt2 磷酸化水平

与空白组比较,八月札乙醇提取物中、高剂量组含药血清中 p-Akt2 的蛋白表达显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),即 Akt2 的活性下降。而总 Akt2 的表达没有明显的减少或增加。说明八月札乙醇提取物能有效地抑制 BEL-7404 细胞 Akt2 磷酸化,但并不影响 Akt2 的蛋白量,见图7。

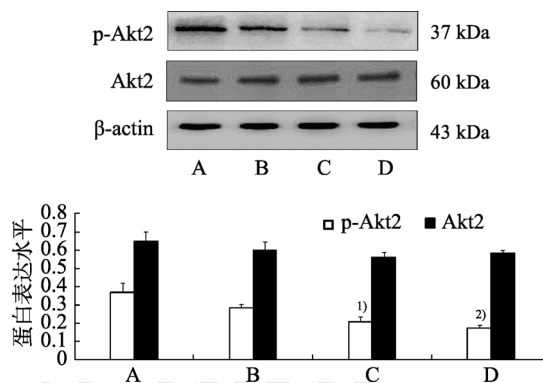


图7 八月札乙醇提取物含药血清对人肝癌 BEL-7404 细胞 Akt2 活化的影响

A-空白对照组; B-八月札乙醇提取物低剂量组; C-八月札乙醇提取物中剂量组; D-八月札乙醇提取物高剂量组; 与空白对照组比较, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ 。

Fig. 7 Effect of serum containing ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on Akt2 activation in BEL-7404 cells

A-blank control group; B-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz low dose group; C-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz medium dose group; D-ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz high dose group; compared with blank control group, ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$.

4 讨论

肿瘤细胞与正常细胞相比需要更多的能量以维持其快速生长。无论在有氧或缺氧条件下,肿瘤细胞均优先选择糖酵解来代谢葡萄糖,为其快速生长提供能量,这被称为“有氧糖酵解”即“Warburg 效应”^[7],有氧糖酵解通过高效摄入葡萄糖为肿瘤细胞快速增殖提供能量^[8],衍生的大量乳酸在细胞局部堆积,形成酸性的肿瘤微环境,在肿瘤生长、免疫耐受和迁移等方面发挥重要作用^[9]。因此,抑制糖酵解水平,切断肿瘤细胞的能量供应可以发挥抑制其生长的作用。

CCK-8 试验结果表明,八月札乙醇提取物含药血清对 BEL-7404 细胞的增殖具有明显的抑制作用,该作用随着含药血清的剂量增大而增强。DAPI 染色结果表明随着含药血清的剂量增大, BEL-7404 细胞核明亮、核破碎的凋亡特征增加明显;流式细胞术结果显示 BEL-7404 细胞在八月札

乙醇提取物含药血清的作用下,随着剂量增加,细胞总凋亡率显著升高。Caspase-3 是凋亡执行因子,正常情况下以酶原形式存在,当 caspase-3 被活化时,被切割成有活性的 cleaved caspase-3。PARP 是一种存在于多种真核细胞中的 DNA 修复酶,cleaved caspase-3 可切割 PARP,被切割后的 cleaved PARP 也被认为是 caspase 3 激活的指标。Cleaved caspase-3 和 cleaved PARP 可促进细胞凋亡^[10]。本研究发现,八月札乙醇提取物含药血清高、中剂量组较空白对照组显著上调促凋亡蛋白 cleaved PARP 和 cleaved caspase-3 的表达($P<0.05$),说明八月札乙醇提取物含药血清可通过促进凋亡进而抑制 BEL-7404 细胞的增殖。

葡萄糖摄取量和乳酸含量可反映糖酵解水平^[11]。本研究结果发现,随着八月札乙醇提取物含药血清剂量增加,葡萄糖摄取量及乳酸生成量显著减少($P<0.01$),说明八月札乙醇提取物减少吸收进入糖酵解过程的葡萄糖,使 BEL-7404 细胞生长过程中的能量供给受到抑制,同时也减少排泌到细胞外的乳酸,使乳酸营造的原本酸性而“舒适”的细胞微环境相对碱化,不利于 BEL-7404 细胞生长增殖,提示八月札乙醇提取物含药血清可抑制糖酵解水平。

糖酵解的活跃程度与催化糖酵解的酶有密切联系,肿瘤细胞进行 Warburg 效应获取能量的关键酶包括 HK2、PKM2 及 LDHA。HK2 是启动 Warburg 效应的关键酶,促进肿瘤细胞快速增殖^[12]。PKM2 是调节 Warburg 效应糖酵解的关键酶,其在肿瘤细胞中过度表达,促进肿瘤细胞糖酵解,是肿瘤细胞增殖、代谢、侵袭和转移所必需的酶^[13-14]。LDHA 控制 Warburg 效应最后一步反应,即催化丙酮酸合成产物乳酸^[15],促进乳酸堆积,降低 pH 值,为肿瘤生长微环境提供必要条件^[16]。本研究观察到八月札乙醇提取物含药血清中、高剂量组 BEL-7404 细胞 HK2 和 PKM2 及 LDHA 的蛋白表达均显著减低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明八月札乙醇提取物含药血清可降低 BEL-7404 细胞糖酵解关键酶表达水平从而抑制糖酵解代谢。

Akt 又称蛋白激酶 B,是一种原癌基因 c-Akt 表达编码丝氨酸/苏氨酸激酶。Akt 是糖酵解通路的关键蛋白之一,可直接活化糖酵解通路元件,具有显著促进肿瘤细胞的糖酵解,增强其恶性程度的能力^[17-18]。Akt 可以激活和调节众多下游靶

点,介导细胞生长、增殖、凋亡等多种生物学行为,其下游调节的糖酵解酶包括 HK2、PKM2、LDHA 等^[19-22]。Akt 包括 Akt1、Akt2、Akt3 等 3 个亚型,其中 Akt2 是主要参与下游底物活化的亚基。Akt2 磷酸化是保持其活性所必需的,磷酸化的 Akt2 可以激活下游的信号分子 HK2,可使 HK2 的表达上调,从而促进葡萄糖摄取、抑制细胞凋亡^[23];Akt2 可以通过调控 PKM2 的表达调节有氧糖酵解,调节肿瘤的生长^[24],且具有显著相关性^[25]。而 PKM2 上调可促进肝癌细胞的增殖,抑制肝癌细胞凋亡^[26-27];另有研究表明,PKM2 表达上调导致葡萄糖摄取增加,乳酸生成增多^[28]。LDHA 在多种肿瘤中表达增高且对肿瘤细胞有氧糖酵解过程起重要调控作用^[29-30]。下调 LDHA 的表达能够明显抑制肿瘤细胞的增殖能力,应用特异性 LDHA 抑制剂抑制 LDHA 的活性则能够促进肿瘤细胞的凋亡^[31-32]。本研究中,与空白对照组比较,八月札乙醇提取物含药血清作用 BEL-7404 细胞,其中、高剂量组可显著降低 Akt2 的磷酸化水平($P<0.01$ 或 $P<0.05$),说明八月札乙醇提取物含药血清可通过抑制 p-Akt2 表达与其降低 HK2、PKM2 及 LDHA 的表达呈正相关,由此推测,Akt2 很可能是调控糖酵解途径的关键调节因子。

综上所述,八月札乙醇提取物含药血清可能通过抑制 BEL-7404 细胞的糖酵解途径中 HK2、PKM2 和 LDHA 酶的活性,抑制 Akt2 磷酸化,促进 cleaved PARP 和 cleaved caspase-3 介导的细胞凋亡,从而抑制 BEL-7404 细胞增殖,但其确切机制还需后续进一步实验研究,本研究结果明确了八月札乙醇提取物对 BEL-7404 细胞糖酵解、增殖和凋亡的影响,为临床应用八月札治疗肝癌提供了实验依据。

REFERENCES

- [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): 209-249.
- [2] 陈龙全, 田卯凤, 高博, 等. 土家名药八月札的应用现状[J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2015, 32(1): 61-62.
- [3] ZHOU B S, CHEN T, YANG X H, et al. Experience introduction of commonly-used couplet medicines in treating cancer by Shu Qijin[J]. J New Chin Med(新中医), 2020, 52(1): 194-197.
- [4] LIU Y, HAN X, HAO L, et al. Analysis of professor Zhang Yixin's commonly used drug pairs in treating chronic liver

- diseases[J]. J Hebei Tradit Chin Med Pharmacol(河北中医药学报), 2018, 33(4): 61-64.
- [5] WANG C L, ZHENG Z W. Screening of anti-hepatocarcinoma active fractions from Akebiae Fructus[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2021, 38(7): 784-789.
- [6] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2002.
- [7] JIANG S H, LI J, DONG F Y, et al. Increased serotonin signaling contributes to the Warburg effect in pancreatic tumor cells under metabolic stress and promotes growth of pancreatic tumors in mice[J]. Gastroenterology, 2017, 153(1): 277-291.e19.
- [8] LU J R, TAN M, CAI Q S. The Warburg effect in tumor progression: Mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism[J]. Cancer Lett, 2015, 356(2): 156-164.
- [9] XIAN Z Y, LIU J M, CHEN Q K, et al. Inhibition of LDHA suppresses tumor progression in prostate cancer[J]. Tumour Biol, 2015, 36(10): 8093-8100.
- [10] KWON Y H, BISHAYEE K, RAHMAN A, et al. *Morus alba* accumulates reactive oxygen species to initiate apoptosis via FOXO-caspase 3-dependent pathway in neuroblastoma cells[J]. Mol Cells, 2015, 38(7): 630-637.
- [11] KEAM B, LEE S J, KIM T M, et al. Total lesion glycolysis in positron emission tomography can predict gefitinib outcomes in non-small-cell lung cancer with activating EGFR mutation[J]. J Thorac Oncol, 2015, 10(8): 1189-1194.
- [12] SUN Z P, TAN Z G, PENG C, et al. HK₂ is associated with the Warburg effect and proliferation in liver cancer: Targets for effective therapy with glycyrrhizin[J]. Mol Med Rep, 2021, 23(5): 343.
- [13] MASAMUNE A, HAMADA S, YOSHIDA N, et al. Pyruvate kinase isozyme M2 plays a critical role in the interactions between pancreatic stellate cells and cancer cells[J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(7): 1868-1877.
- [14] FUKUDA S, MIYATA H, MIYAZAKI Y, et al. Pyruvate kinase M2 modulates esophageal squamous cell carcinoma chemotherapy response by regulating the pentose phosphate pathway[J]. Ann Surg Oncol, 2015, 22(Suppl 3): S1461-S1468.
- [15] URBANŃSKA K, ORZECZOWSKI A. Unappreciated role of LDHA and LDHB to control apoptosis and autophagy in tumor cells[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(9): 2085.
- [16] MENG Y, XU X, LUAN H Y, et al. The progress and development of GLUT1 inhibitors targeting cancer energy metabolism[J]. Future Med Chem, 2019, 11(17): 2333-2352.
- [17] HOSIOS A M, MANNING B D. Cancer signaling drives cancer metabolism: AKT and the Warburg effect[J]. Cancer Res, 2021, 81(19): 4896-4898.
- [18] HOLLOWAY R W, MARIGNANI P A. Targeting mTOR and glycolysis in HER2-positive breast cancer[J]. Cancers, 2021, 13(12): 2922.
- [19] LI H, LU S H, CHEN Y, et al. AKT2 phosphorylation of hexokinase 2 at T473 promotes tumorigenesis and metastasis in colon cancer cells via NF- κ B, HIF1 α , MMP2, and MMP9 upregulation[J]. Cell Signal, 2019(58): 99-110.
- [20] WU J, ZHANG X X, WANG Y H, et al. Licochalcone A suppresses hexokinase 2-mediated tumor glycolysis in gastric cancer via downregulation of the Akt signaling pathway[J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 1181-1190.
- [21] LI R K, WENG L, LIU B Y, et al. TRIM59 predicts poor prognosis and promotes pancreatic cancer progression via the PI3K/AKT/mTOR-glycolysis signaling axis[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(2): 1986-1997.
- [22] ZHOU L Q, LI S H, LIU L, et al. Recombinant methioninase regulates PI3K/Akt/Glut-1 pathway and inhibits aerobic glycolysis to promote apoptosis of gastric cancer cells[J]. J South Med Univ(南方医科大学学报), 2020, 40(1): 27-33.
- [23] CAI L X, XUE Y J, DING J Z, et al. Long non-coding RNA AC118344.1 promotes gastric cancer cell proliferation, invasion, and metastasis via AKT2 and its downstream molecules HK₂ and MMP2[J]. Cancer Manag Res, 2020(12): 12613-12621.
- [24] NEMAZANYI I, ESPEILLAC C, PENDE M, et al. Role of PI3K, mTOR and Akt2 signalling in hepatic tumorigenesis via the control of PKM2 expression[J]. Biochem Soc Trans, 2013, 41(4): 917-922.
- [25] ZHENG B, GENG L, ZENG L, et al. AKT2 contributes to increase ovarian cancer cell migration and invasion through the AKT2-PKM2-STAT3/NF- κ B axis[J]. Cell Signal, 2018(45): 122-131.
- [26] XU Q R, TU J F, DOU C W, et al. HSP90 promotes cell glycolysis, proliferation and inhibits apoptosis by regulating PKM2 abundance via Thr-328 phosphorylation in hepatocellular carcinoma[J]. Mol Cancer, 2017, 16(1): 178.
- [27] IANSANTE V, CHOY P M, FUNG S W, et al. PARP14 promotes the Warburg effect in hepatocellular carcinoma by inhibiting JNK₁-dependent PKM2 phosphorylation and activation[J]. Nat Commun, 2015(6): 7882.
- [28] ZAHRA K, DEY T, ASHISH, et al. Pyruvate kinase M2 and cancer: The role of PKM2 in promoting tumorigenesis[J]. Front Oncol, 2020(10): 159.
- [29] HUANG X J, LI X, XIE X H, et al. High expressions of LDHA and AMPK as prognostic biomarkers for breast cancer[J]. Breast, 2016(30): 39-46.
- [30] GAO S, TU D N, LI H, et al. Pharmacological or genetic inhibition of LDHA reverses tumor progression of pediatric osteosarcoma[J]. Biomed Pharmacother, 2016(81): 388-393.
- [31] YANG Y, SU D, ZHAO L, et al. Different effects of LDH-A inhibition by oxamate in non-small cell lung cancer cells[J]. Oncotarget, 2014, 5(23): 11886-11896.
- [32] LIU X J, YANG Z X, CHEN Z F, et al. Effects of the suppression of lactate dehydrogenase A on the growth and invasion of human gastric cancer cells[J]. Oncol Rep, 2015, 33(1): 157-162.

收稿日期: 2021-07-21
(本文责编: 沈倩)