

斑蝥素酸镁对 SMMC-7721 肝癌细胞 Warburg 效应的影响

朱顺昕¹, 黄渝茜², 刘 云^{3,4}, 刘 流¹, 刘美辰¹, 李晓飞^{1,3}, 晏 容^{1,3*}
(1. 遵义医科大学基础医学院, 贵州 遵义 563000; 2. 赣南卫生健康职业学院, 江西 赣州 341000;
3. 遵义医科大学贵州省普通高等学校特色药物肿瘤防治特色重点实验室, 贵州 遵义 563000; 4. 遵义医科大学医学与生物学研究中心, 贵州 遵义 563000)

摘要: **目的** 探讨斑蝥素酸镁对 SMMC-7721 肝癌细胞 Warburg 效应的影响及其机制。**方法** 体外培养人肝癌细胞 SMMC-7721, 并将其分为空白对照组、冈田酸组、斑蝥素酸镁 (1/2IC₅₀) 组、斑蝥素酸镁 (IC₅₀) 组、斑蝥素酸镁 (2IC₅₀) 组, 分别干预 24 h 后, 收集细胞。葡萄糖摄取率、乳酸水平检测试剂盒检测葡萄糖摄取率和乳酸生成量, Western blot 检测葡萄糖转运蛋白 1 (GLUT1)、乳酸脱氢酶 (LDHA) 蛋白表达及 PI3K、Akt、mTOR 蛋白磷酸化表达。**结果** 与空白对照组比较, 斑蝥素酸镁组葡萄糖摄取率和乳酸生成量降低, 具有浓度依赖性 ($P<0.01$), 而冈田酸组葡萄糖摄取率和乳酸生成量升高 ($P<0.01$)。斑蝥素酸镁组 GLUT1、LDHA 蛋白表达低于空白对照组 ($P<0.01$), 并具有浓度依赖性, 而冈田酸组两者蛋白表达高于空白对照组 ($P<0.01$)。与空白对照组比较, 斑蝥素酸镁组的 PI3K、Akt、mTOR 蛋白磷酸化表达下调 ($P<0.01$), 并具有浓度依赖性, 而冈田酸组 3 种蛋白磷酸化表达上调 ($P<0.01$)。**结论** 斑蝥素酸镁可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路, 下调 GLUT1 和 LDHA, 减少葡萄糖的摄取和糖酵解代谢产物乳酸生成量, 使 Warburg 效应减弱, 最终抑制 SMMC-7721 肝癌细胞增殖。
关键词: 斑蝥素酸镁; SMMC-7721 肝癌细胞; Warburg 效应; PI3K/Akt/mTOR 信号通路
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2021)11-3136-04
doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.11.038

斑蝥是一类重要的抗癌昆虫药物, 隶属于芜菁科斑芫菁属 *Meloidae*, *Mylabris*, 常被用于治疗多种癌症, 特别是对原发性肝癌有特效。我们的前期研究已证实抗癌中药斑蝥体内除了含有斑蝥素以外, 还存在大量的斑蝥素盐类物质 (如斑蝥素酸镁、斑蝥素酸钙等)^[1-2], 且体内外实验证实斑蝥素酸镁抑制肝癌细胞增殖的效果明显优于斑蝥素和其它斑蝥素盐类衍生物^[3-5]。在此基础上, 课题组利用 RNA-seq 技术检测斑蝥素酸镁干预肝癌细胞 SMMC-7721 后的转录组变化, 结果发现斑蝥素酸镁可下调 SMMC-7721 细胞 *PI3K*、*Akt* 的 mRNA 表达^[6]。提示斑蝥素酸镁对肝癌细胞的增殖抑制作用可能与其抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关。

研究表明, 过度增殖是肿瘤细胞重要的恶性行为之一, 其多数肿瘤细胞增殖过程中需要摄取的大量能量主要来源于有氧糖酵解 (Warburg 效应)。PI3K/Akt/mTOR 信号转导

通路作为恶性肿瘤细胞 Warburg 效应最重要的调控通路之一, 能够介导肿瘤细胞糖酵解的发生^[7-10]。那么抗癌中药斑蝥素酸镁抑制肝癌细胞增殖是否也与 Warburg 效应有关, 其初步的调控机制如何? 基于此, 本实验以促进肝癌细胞增殖的冈田酸为对照, 探讨斑蝥素酸镁是否可以通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响肝癌细胞的 Warburg 效应, 进而抑制肿瘤细胞增殖, 发挥抗肝癌作用。

1 材料

1.1 试剂与药物 斑蝥素酸镁是将斑蝥素与氢氧化镁反应制备而来, 干燥后得到白色结晶粉末, 纯度在 90% 以上; 斑蝥素酸镁由课题组自主合成, 制备方法已授权国家发明专利 (ZL201110149288.5)^[11]。SMMC-7721 人肝癌细胞株由本实验室保存, 并由上海吉凯基因化学技术有限公司进行短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 种源鉴定。冈田酸购自美国 Sigma 公司, 批号 SLBV0493; 胎牛血清购

收稿日期: 2020-10-27
基金项目: 国家自然科学基金 (81560669, 81660611, 81760746); 贵州省科技厅科技创新人才团队项目 (黔科合平台人才 [2020] 5007); 贵州省科学技术计划项目 (黔科合基础 [2019] 1346); 遵义市科技计划项目 (遵科合 [2016] 35); 遵义医科大学硕士启动基金 (F-767)
作者简介: 朱顺昕 (1997—), 女, 硕士生, 从事医学昆虫资源开发与利用研究。Tel: 15104218898, E-mail: zsx2021@126.com
* 通信作者: 晏 容 (1978—), 女, 硕士, 教授, 从事医学昆虫资源开发与利用研究。Tel: 18685620335, E-mail: 1437830397@qq.com
网络出版日期: 2021-08-03
网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210802.1520.004.html>

自美国 Gibco 公司; RPMI-1640 培养基购自美国 HyClone 公司; 葡萄糖摄取率检测试剂盒购自美国 Abnova 公司; 乳酸水平检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)、0.25% 胰蛋白酶、Goat anti-Rabbit IgG、Akt、p-Akt 购自武汉贝茵莱生物科技有限公司; PI3K、p-PI3K、GLUT1、LDHA 购自英国 Abcam 公司; mTOR、p-mTOR 购自美国 CST 公司。

1.2 仪器 311 型 CO₂ 培养箱、Multiskan spectrum 全波长酶标仪购自美国 Thermo 公司; 超净工作台购自苏州智净净化设备有限公司; mini protean 3 cell 电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; SP-9 型电转仪购自大连竞迈生物科技有限公司。

2 方法

2.1 细胞培养 SMMC-7721 细胞复苏后, 加入含 10% 胎牛血清、1% 双抗的完全培养基 (RPMI-1640), 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中, 待细胞在培养瓶长成致密单层时用于后续实验。

2.2 分组 将细胞随机分为空白对照组、冈田酸组、斑蝥素酸镁 (1/2IC₅₀) 组、斑蝥素酸镁 (IC₅₀) 组、斑蝥素酸镁 (2IC₅₀) 组, 其中冈田酸浓度为 0.059 nmol/L, 斑蝥素酸镁 IC₅₀ 为 2.26 μmol/L^[5]。

2.3 葡萄糖摄取率检测 取对数生长期细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化, 制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 5×10⁴/mL, 按照每孔 100 μL 将细胞均匀接种于 96 孔板, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。次日待细胞贴壁后, 加入不同浓度 (4.52、2.26、1.13 μmol/L) 斑蝥素酸镁及冈田酸 (0.059 nmol/L), 空白对照组加入等体积 RPMI-1640 细胞培养基, 每组设置 3 个复孔, 在 37 ℃、5% CO₂ 下培养 24 h, 收集细胞培养液, 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清, 按照试剂一 (R1)-试剂二 (R2) (1:1) 的比例进行配制, 参照葡萄糖摄取率检测试剂盒进行操作, 混匀后, 在 37 ℃ 下保温 5 min, 酶标仪在 570、610 nm 波长处测定各孔光密度 (OD), 计算培养基中葡萄糖摄取率, 公式为摄取率 = (OD_{570 nm}/OD_{610 nm}) × 100%。

2.4 乳酸生成量检测 细胞分组、加药处理同“2.3”项, 培养 24 h 后收集细胞培养液, 2 500 r/min 离心 10 min, 取上清, 按照乳酸测定试剂盒说明书进行操作, 混匀后, 双蒸馏水调零, 于 530 nm 波长处测定各管光密度 (OD), 计算培养基中乳酸浓度, 公式为乳酸浓度 = [(测定 OD - 空白 OD) / (标准 OD - 空白 OD)] × 标准品浓度 (3 mmol/L) × 样本测试前稀释浓度。

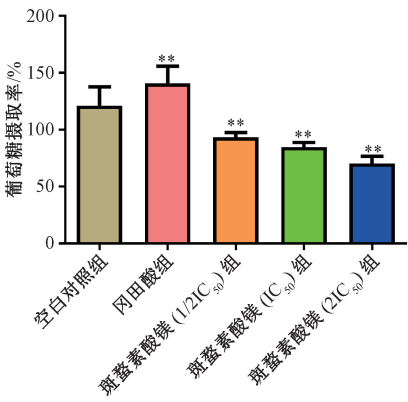
2.5 Western blot 检测 取对数生长期细胞, 0.25% 胰蛋白酶消化, 制备单细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10⁵/mL, 按照每孔 2 mL 将细胞均匀种于 6 孔板, 置于培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度斑蝥素酸镁 (4.52、2.26、1.13 μmol/L) 及冈田酸 (0.059 nmol/L), 空白对照组加入等体积的 RPMI-1640 细胞培养基, 每组设置 3 个复孔, 在 37 ℃、5% CO₂ 下培养 24 h, 弃上清, 收集细胞, RIPA 裂解, 提取蛋白, BCA 定量, 样品蛋白终质量浓度为

5 μg/μL, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 半干式电转至硝酸纤维素膜后室温封闭 2 h, 一抗兔抗 GAPDH (1:1 000)、GLUT1 (1:100 000)、LDHA (1:5 000)、PI3K (1:1 000)、p-PI3K (1:1 000)、Akt (1:1 000)、p-Akt (1:1 000)、mTOR (1:1 000)、p-mTOR (1:1 000) 在 4 ℃ 下孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min, HRP 标记羊抗兔二抗 (1:10 000) 在 37 ℃ 下孵育 1 h, TBST 再漂洗 3 次, 每次 5 min, 将其浸于发光液中 2 min, 并拍照成像, Tanon GIS 软件进行灰度分析。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 18.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多重比较采用邓肯氏新复极差法。P<0.05 表示差异具有统计学意义。

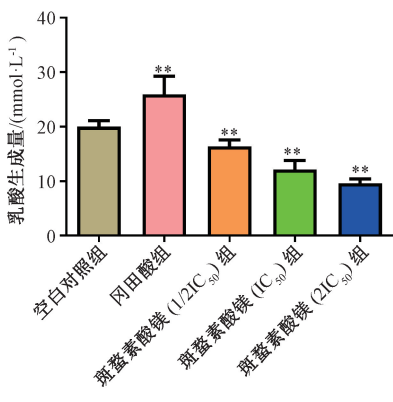
3 结果

3.1 葡萄糖摄取率、乳酸生成量 如图 1~2 所示, 与空白对照组比较, 斑蝥素酸镁组葡萄糖摄取率、乳酸生成量降低 (P<0.01), 并呈浓度依赖性, 而冈田酸组两者升高 (P<0.01)。



注: 与空白对照组比较, ** P<0.01。

图 1 各组葡萄糖摄取率 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

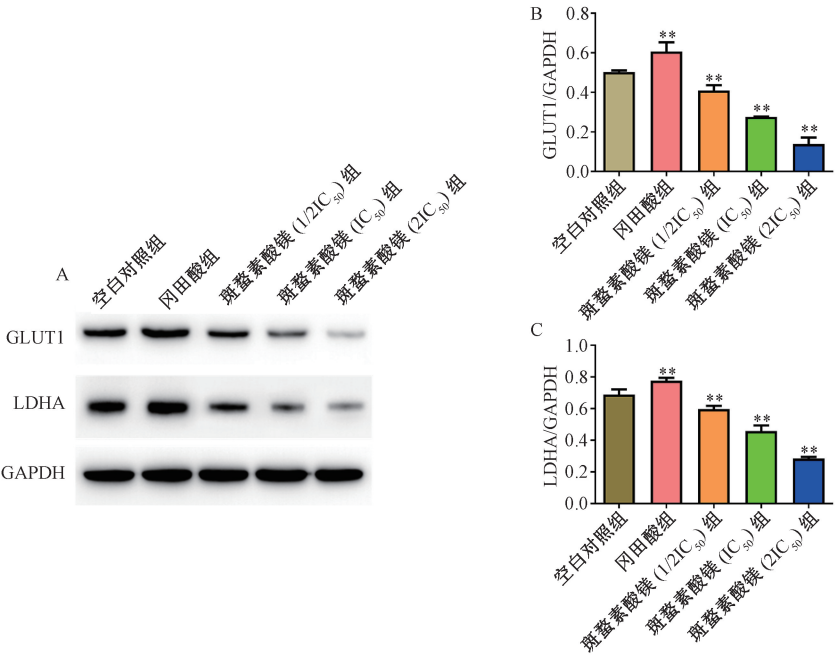


注: 与空白对照组比较, ** P<0.01。

图 2 各组乳酸生成量 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

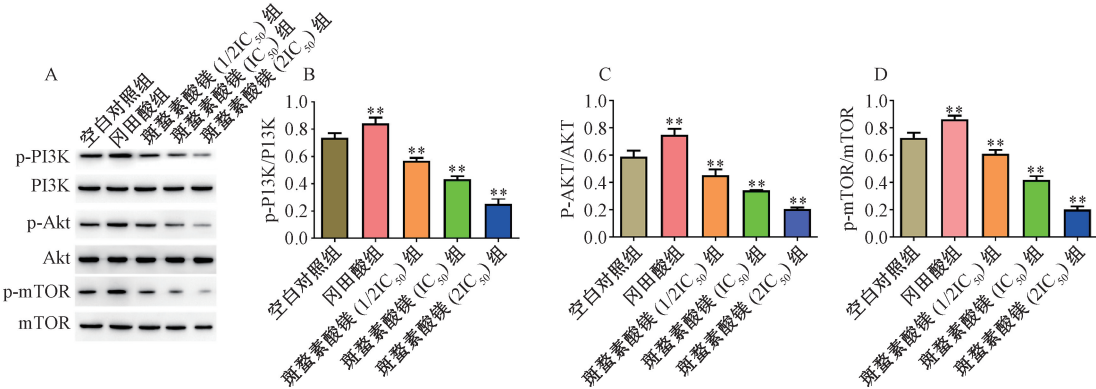
3.2 GLUT1、LDHA 蛋白表达 如图 3 所示, 斑蝥素酸镁组 GLUT1、LDHA 蛋白表达低于空白对照组 (P<0.01), 并呈浓度依赖性, 而冈田酸组两者表达高于空白对照组 (P<0.01)。

3.3 PI3K、Akt、mTOR 蛋白磷酸化表达检测 如图 4 所



注：A 为 GLUT1 和 LDHA 蛋白条带图，B 为各组 GLUT1 蛋白表达，C 为各组 LDHA 蛋白表达。与空白对照组比较，** $P<0.01$ 。

图 3 各组 GLUT1 和 LDHA 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)



注：A 为 PI3K、Akt、mTOR 蛋白及其磷酸化蛋白条带图，B 为各组 PI3K 蛋白磷酸化表达，C 为各组 Akt 蛋白磷酸化表达，D 为各组 mTOR 蛋白磷酸化表达。与空白对照组比较，** $P<0.01$ 。

图 4 各组 PI3K、Akt、mTOR 蛋白及其磷酸化蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

示，与空白对照组比较，斑蝥素酸镁组 PI3K、Akt、mTOR 蛋白磷酸化表达降低 ($P<0.01$)，并呈浓度依赖性，而冈田酸组三者磷酸化表达升高 ($P<0.01$)。

4 讨论

肿瘤是对人类健康危害最大的疾病之一，其同时也是造成全球范围内疾病负担的重要原因^[12]。过度增殖是肿瘤细胞重要的恶性行为之一，肿瘤细胞增殖过程中需要摄取大量能量，其主要来源于有氧糖酵解，即肿瘤细胞即使在氧气充足的情况下，仍依赖于糖酵解生成乳酸的方式进行无氧供能，又称 Warburg 效应^[13-14]。Warburg 效应在肿瘤的发生发展中发挥重要作用^[15-17]。例如肝癌细胞可充分利用糖酵解过程中产生的 ATP 和中间代谢产物，以供其快速生长^[18]。本实验发现，与冈田酸组不同的是，斑蝥素酸镁组的葡萄糖摄取率和乳酸生成量降低，提示斑蝥素酸镁能减

弱肝癌细胞的 Warburg 效应，进而抑制肿瘤细胞的增殖。课题组通过前期的 RNA-seq 分析，并结合本实验的 Western blot 检测，结果发现斑蝥素酸镁抑制肝癌细胞增殖与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路失活有关。PI3K/Akt/mTOR 信号通路作为恶性肿瘤细胞 Warburg 效应最重要的调控通路之一，能够介导肿瘤细胞糖酵解的发生^[7-10]。其机制一方面是 PI3K 磷酸化活化 Akt，活化的 Akt 引起 GLUT1 向细胞膜转移并激活 GLUT1，增加葡萄糖的摄取；另一方面随着 PI3K/Akt 被激活，mTOR 的 Ser2 448 位点被磷酸化，活化的 mTOR 使肿瘤细胞中缺氧诱导因子 HIF-1 α 激活，从而促进 LDHA 等多个编码糖酵解酶的基因转录，提高了糖酵解水平，进而使葡萄糖消耗增加，并转化为乳酸^[19-22]。而抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路则可降低糖酵解水平，例如文献 [7] 报道，PI3K/Akt/mTOR 信号通路失活后结

肠癌细胞中 HIF-1 α 下调，导致糖酵解相关蛋白 GLUT1、LDHA 的表达降低，糖酵解代谢产物乳酸浓度降低。本研究结果与之相符，即斑蝥素酸镁组的 GLUT1 和 LDHA 蛋白表达与空白对照组比较降低。其中 GLUT1 作为最常见的葡萄糖转运蛋白，在细胞转运葡萄糖跨膜进入胞质的过程中起到了重要作用，影响葡萄糖的摄取；LDHA 作为重要的糖酵解酶，则参与了糖酵解过程中乳酸的形成。本实验中葡萄糖摄取率和乳酸生成量的变化分别与 GLUT1 和 LDHA 蛋白表达变化一致。

综上所述，与促进肝癌细胞增殖的冈田酸不同的是，斑蝥素酸镁可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路，下调 GLUT1 和 LDHA 表达，减少葡萄糖的摄取和糖酵解代谢产物乳酸生成量，使 Warburg 效应减弱，最终抑制 SMMC-7721 肝癌细胞增殖。但对于斑蝥素酸镁是否靶向抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路继而调控 Warburg 效应还有待深入研究。下一步本课题组将利用 PI3K/Akt/mTOR 激动剂，观察斑蝥素酸镁对 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路及 Warburg 效应的影响，明确其具体调控机制，为斑蝥素酸镁抗肝癌机制的深入研究提供理论依据。

参考文献：

[1] 李晓飞，陈祥盛，王雪梅，等. 芫菁体内斑蝥素的含量及存在形式[J]. 昆虫学报，2007，50(7)：750-754.

[2] 李晓飞. 芫菁体内结合斑蝥素与金属元素含量的比较[J]. 湖北农业科学，2011，50(13)：2762-2764.

[3] 李晓飞，娄方明，晏 容，等. 三种斑蝥素盐类物质对肝癌 QGY-7703 细胞生长的抑制作用[J]. 中国老年学杂志，2013，33(9)：2049-2050.

[4] 晏 容，刘 云，朱欣婷，等. 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 及其裸鼠皮下移植瘤的影响[J]. 应用昆虫学报，2015，52(2)：477-485.

[5] 邹倩倩. 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721MAPK 信号通路和 G2/M 期调控蛋白的影响[D]. 遵义：遵义医学院，2016.

[6] 谭香玉，晏 容，刘 云，等. 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞株 SMMC-7721 转录组的影响[J]. 中成药，2018，40(3)：691-695.

[7] 周晓黎，舒 磊，廖 艳，等. PI3K/AKT 通路在低氧环境下对结肠癌细胞 HIF-1 α 及糖酵解的作用[J]. 华中科技大学学报（医学版），2018，47(2)：203-206.

[8] 袁 维，王云莲，王晓艳. 肿瘤与糖酵解[J]. 医学信息，2014，27(1)：493.

[9] 尹承龙，劳学军. PI3K-AKT-mTOR 信号通路的研究进展[J]. 中国医学创新，2016，13(1)：145-148.

[10] Evangelisti C, Martelli A M. The PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Encyclopedia Cell Biology*, 2016，3：128-135.

[11] 李晓飞. 斑蝥素酸镁及其制备方法：中国，CN102250110A [P]. 2011-11-23.

[12] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020，70(1)：7-30.

[13] Pacini N, Borziani F. Cancer stem cell theory and the warburg effect, two sides of the same coin? [J]. *Int J Mol Sci*, 2014，15(5)：8893-8930.

[14] Elliott R L, Jiang X P, Head J F. Want to cure cancer? Then revisit the past; “Warburg was correct”, cancer is a metabolic disease[J]. *J Cancer Ther*, 2014，5(3)：297-305.

[15] Christofk H R, Vander Heiden M G, Harris M H, *et al.* The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth [J]. *Nature*, 2008，452(7184)：230-233.

[16] 揭小华，彭 雄，黄 波，等. 乳酸脱氢酶编码基因在肿瘤中表达及其转录调控机制的研究进展[J]. 肿瘤，2015，35(11)：1271-1277.

[17] 张凤娟，张红胜，刘 洋. 肿瘤有氧糖酵解的研究进展[J]. 生命的化学，2015，35(3)：331-336.

[18] Gerresheim G K, Roeb E, Michel A M, *et al.* Hepatitis C virus downregulates core subunits of oxidative phosphorylation, reminiscent of the Warburg effect in cancer cells[J]. *Cells*, 2019，8(11)：1410.

[19] 蒋晓月，江 瑛. 乳酸脱氢酶和 Warburg 效应的研究进展[J]. 生理科学进展，2017，48(5)：352-356.

[20] 袁济钢，陈 敏，李 旭，等. LY294002 对人胃癌腺癌细胞株 BGC-823 糖酵解水平的影响及其机制探讨[J]. 胃肠病学，2013，18(5)：260-265.

[21] Chen Z Q, Zuo X L, Zhang Y, *et al.* MiR-3662 suppresses hepatocellular carcinoma growth through inhibition of HIF-1 α -mediated Warburg effect [J]. *Cell Death Dis*, 2018，9(5)：549.

[22] Zhang Y Y, Zhang C B, Zhao Q, *et al.* The miR-873/ NDFIP1 axis promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis through the AKT/mTOR-mediated Warburg effect [J]. *Am J Cancer Res*, 2019，9(5)：927-944.