

去氧地胆草素对肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移和糖酵解的影响

吴红雁¹, 周世康², 王春桃¹, 周红成¹, 李 芳¹, 陈 欣¹, 张立虎¹, 秦一雨^{1*}
(1. 江苏医药职业学院医药生物技术研究院, 江苏 盐城 224005; 2. 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 研究去氧地胆草素对肝癌 HepG2 细胞增殖、迁移及糖酵解的影响。**方法** 用不同剂量去氧地胆草素分别处理 HepG2 细胞, CCK-8 法检测细胞增殖情况, 划痕和 Transwell 小室实验检测细胞迁移情况, 试剂盒检测细胞葡萄糖摄取、乳酸生成水平及关键酶 HK2、PFK1、PKM2 活性, RT-qPCR 法检测关键酶 mRNA 表达, Western blot 法检测关键酶及相关信号通路的蛋白表达。**结果** 去氧地胆草素浓度为 5、2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 分别在 24、48 h 抑制 HepG2 细胞增殖和迁移 ($P<0.05$), 10 $\mu\text{mol/L}$ 时能抑制细胞迁移, 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞葡萄糖的摄取减少 ($P<0.05$), 10~20 $\mu\text{mol/L}$ 时减少乳酸生成 ($P<0.05$), 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 时降低糖酵解关键酶 HK2、PFK1、PKM2 活性 ($P<0.05$), 5~20 $\mu\text{mol/L}$ 时抑制关键酶 HK2、PFK1、PKM2 mRNA 及蛋白表达, 同时也抑制了 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α 信号通路的活化。**结论** 去氧地胆草素能够抑制 HepG2 细胞增殖和迁移, 降低 HepG2 细胞的糖酵解水平, 可能与抑制 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α 信号通路活化有关。

关键词: 去氧地胆草素; HepG2 细胞; 增殖; 迁移; 糖酵解

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** B **文章编号:** 1001-1528(2023)01-0208-05

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.01.038

能量代谢重编程是肿瘤细胞基本特征之一, 其中糖酵解是肿瘤细胞重要的能量来源方式, 无论在有氧或无氧条件下, 肿瘤细胞都偏好于采用糖酵解途径作为主要产能方式, 此现象被称为“Warburg 效应”^[1]。Warburg 效应在大多数恶性肿瘤细胞中广泛存在, 一方面, 糖酵解为许多生物合成途径(如磷酸戊糖途径以及氨基酸、脂质等大分子物质的合成)提供前体物质, 满足肿瘤细胞快速增殖过程对能量的需求; 另一方面, 糖酵解终产物乳酸生成导致胞外低 pH、低氧的肿瘤微环境, 更利于肿瘤细胞适应生存。因此, 通过靶向肿瘤能量代谢重编程抑制肿瘤的增殖成为近年来肿瘤研究领域的热点^[2]。

去氧地胆草素又称去氧苦地胆苦素, 来源于菊科植物地胆草全草中的一种倍半萜内酯, 具有抗炎保肝、抗菌、抗病毒等作用^[3]。有研究表明去氧地胆草素能抑制肿瘤细胞增殖和迁移、诱导肿瘤细胞凋亡、增强肿瘤细胞对化疗药物敏感性^[4]。近来有研究证实去氧地胆草素可抑制 NF- κ B 和线粒体功能障碍诱导肝癌细胞凋亡^[5], 但去氧地胆草素对肝癌细胞的能量代谢作用尚未有报道, 且对肝癌细胞糖酵解的作用有待研究。因此本研究拟通过人肝癌 HepG2 细胞考察去氧地胆草素对肝癌细胞增殖、迁移、糖酵解及相关蛋白的作用, 初步探讨其作用机制, 为去氧地

胆草素应用临床肿瘤防治提供实验参考。

1 材料

1.1 细胞 人肝癌 HepG2 细胞, 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药物与试剂 去氧地胆草素(纯度 98%, 批号 Q083, 成都瑞芬思生物科技有限公司)。细胞活力 CCK-8 检测试剂盒(货号 C0038)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒、ECL 化学发光试剂(上海碧云天生物技术有限公司); 葡萄糖检测试剂盒、乳酸测定试剂盒(美国 Sigma-Aldrich 公司, 货号 GAHK20、MAK064); 己糖激酶(HK2)活力测试盒、果糖-6-磷酸激酶(PFK1)活力测试盒、丙酮酸激酶(PKM2)活力测试盒(南京建成生物工程研究所, 货号 M005、H244、M003); PI3K、Akt、mTOR 及其磷酸化抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 1310S、4691S、2983S); PKM2、HK2、PFK1、HIF-1 α 、GAPDH 单克隆抗体和 HRP 标记的二抗(美国 Proteintech 公司, 货号 60268、22029、55028、12045、66009); SYBR Green Master Mix、cDNA 合成试剂盒(日本 TaKaRa 公司, 货号 AK3601); 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

2 方法

2.1 细胞培养与药物配制 HepG2 细胞置于完全培养基

收稿日期: 2022-04-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(81702422, 81873134); 江苏省高校“青蓝工程”中青年学术带头人项目(2020-2023); 江苏高校“青蓝工程”优秀教学团队培养对象项目(2021-2024)

作者简介: 吴红雁(1980—), 男, 博士, 副教授, 从事天然产物活性成分抗肿瘤研究。Tel: 13813439093, E-mail: why20133055@163.com

* **通信作者:** 秦一雨(1983—), 男, 博士, 副教授, 从事肿瘤能量代谢研究。Tel: 15061612321, E-mail: qyy128@163.com

(含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养基) 中, 在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱中培养, 每 2~3 d 传代 1 次, 取对数生长期的细胞用于实验。去氧地胆草素用二甲基亚砷溶解后, 配制成 0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80 μmol/L 溶液用于实验。

2.2 CCK-8 试剂盒检测细胞存活率 取对数期 HepG2 细胞接种于 96 孔板中, 每孔 5×10³ 个细胞, 于 37 ℃ 培养箱中培养至细胞单层融合度达 70% 时, 加入不同浓度去氧地胆草素 (0.625、1.25、2.5、5、10、20、40、80 μmol/L), 另设对照组 (有细胞, 但无药物干预), 每组 6 个复孔, 分别在 24、48 h 按照 CCK-8 试剂盒说明书检测细胞存活率, 采用酶标仪测定 450 nm 波长处的光密度 (OD) 值, 计算细胞存活率, 并据此计算药物对细胞的半数抑制浓度 (IC₅₀) 值。

2.3 划痕实验和 Transwell 小室实验检测细胞迁移

2.3.1 划痕实验 取对数期 HepG2 细胞接种于 6 孔板中, 待细胞呈单层汇合时, 随机分为对照组、去氧地胆草素 (5、10、20 μmol/L) 组, 每组 3 个复孔, 用 20 μL 无菌枪头中间沿直线在孔底划线, PBS 清洗粘附的细胞及碎片, 给予相应药物处理, 于 37 ℃ 培养箱中继续培养 24 h, 分别在镜下观察 0、24 h 细胞迁移情况。划痕修复率= [(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度) /0 h 划痕宽度] ×100%。

2.3.2 Transwell 小室实验 将对数期 HepG2 细胞用无血清培养基制成悬液, 接种到孔径为 8 μm 的 Transwell 上室 (24 孔), 每孔 5×10⁴ 个细胞, 设对照组、去氧地胆草素 (5、10、20 μmol/L) 组, 每组 3 个复孔, 给予相应药物处理, 下室加入 600 μL 含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 37 ℃ 培养箱孵育 24 h, 待细胞穿膜至 Transwell 小室的下层后取出小室, 弃培养基, 棉签轻轻擦去上室细胞, 4% 多聚甲醛固定后用 0.1% 结晶紫染色 30 min, 显微镜下 (×100) 随机选取 5 个视野拍照观察细胞迁移情况。

2.4 葡萄糖摄取量、乳酸水平检测 将对数期 HepG2 细胞按 “2.3” 项下方法分组及给药, 培养 24 h 后收集上清液, 并以新鲜培养基作对照, 取 10 μL 上清液加入 96 孔板中, 用葡萄糖或乳酸盐测定缓冲液将每孔的体积调节至 50 μL, 同时, 使用相同的方案制备标准曲线, 于 37 ℃ 避光反应 30 min 后, 分别于 505、530 nm 波长处测定 OD 值, 参照标准曲线, 计算各组上清液中葡萄糖摄取量和乳酸水平, 公式为葡萄糖摄取量=新鲜培养基葡萄糖水平-样品中的葡萄糖水平。

2.5 HK2、PFK1、PKM2 酶活性检测 将对数期 HepG2 细胞按 “2.3” 项下方法分组及给药, 培养 24 h 后, 按说明书要求收集各组细胞, 加适量提取液超声后匀浆, 4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 按照相应试剂盒说明书, 采用酶耦连比色法检测 HK2、PFK1、PKM2 酶活性。

2.6 RT-qPCR 法检测 HK2、PFK1、PKM2 mRNA 表达 将对数期 HepG2 细胞按 “2.3” 项下方法进行分组及给药, 培养 24 h 后收集各组细胞, 使用细胞总 RNA 提取试剂盒

提取总 RNA, cDNA 合成试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。采用 SYBR Green Master Mix 试剂盒配制反应体系, 通过 QTOWER3G 实时荧光定量 PCR 系统检测基因转录水平。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	序列(5'→3')	
	正向	反向
HK2	GAATGGGAAGTGGGGTGGAG	GAGGAGGATGCTCTCGTCCA
PFK1	CGGTCACAACACCACCAA	GCTTGCCTTTCTAATCTCCT
PKM2	GGGCCATAATCGTCTCACC	TTGCACAGCACAGGGAAGAT
GAPDH	GCCTGCTCTCATAGACAAGA	GAAGGCAGCCCTGGTAACC

2.7 Western blot 法检测各指标蛋白表达 将对数期 HepG2 细胞按 “2.3” 项下方法进行分组及给药, 培养 24 h 后, 收集各组细胞, 加入适量 RIPA 细胞裂解液于冰上裂解, 离心收集蛋白样品, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。取适量蛋白样本电泳、转膜后, 使用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液封闭 2 h, 加一抗 4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗涤, 加二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤, ECL 试剂盒暗室显影, 凝胶成像系统拍摄成像, 以 GAPDH 为内参, 采用 Image J 软件对图像进行灰度值分析, 计算目的蛋白相对表达量。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 22.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验。*P*<0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

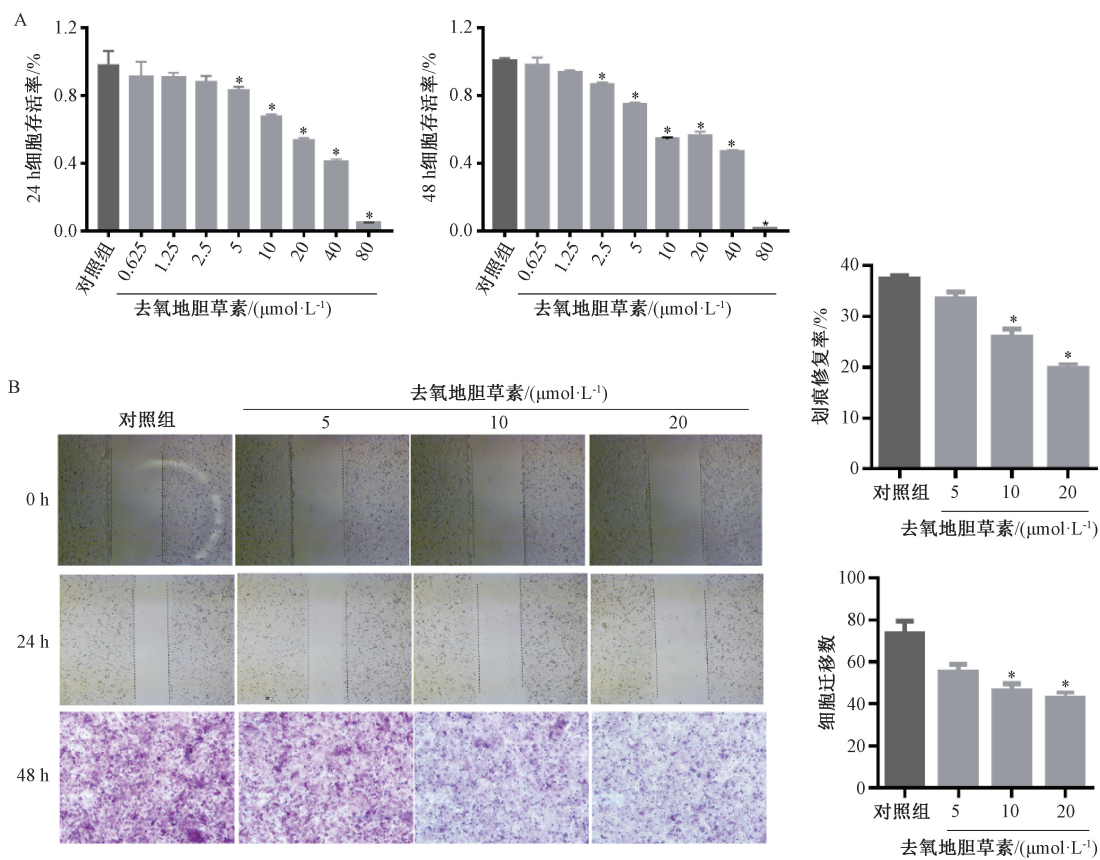
3.1 去氧地胆草素对 HepG2 细胞增殖和迁移的影响 如图 1A 所示, 随着去氧地胆草素浓度增加, 细胞存活率呈下降趋势, 24、48 h 的 IC₅₀ 值分别为 20.71、18.09 μmol/L; 与对照组比较, 5、2.5 μmol/L 去氧地胆草素分别作用 24、48 h 后, 细胞存活率均降低 (*P*<0.05)。如图 1B 所示, 10、20 μmol/L 去氧地胆草素作用 24 h 后, 细胞迁移能力受到抑制 (*P*<0.05)。

3.2 去氧地胆草素对 HepG2 细胞糖酵解的影响 如图 2 所示, 与对照组比较, 各浓度去氧地胆草素组细胞葡萄糖摄取水平均降低 (*P*<0.05); 10、20 μmol/L 去氧地胆草素组细胞乳酸生成水平降低 (*P*<0.05)。

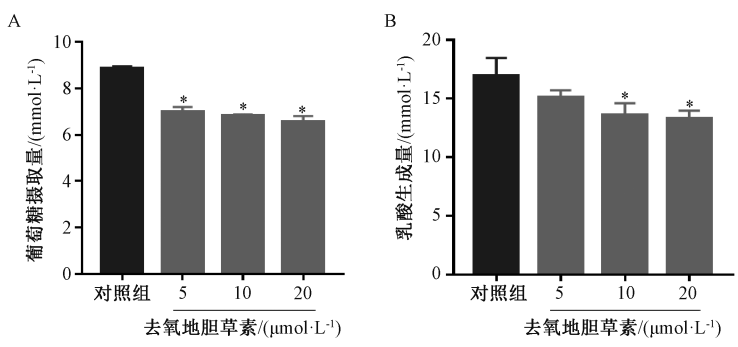
3.3 去氧地胆草素对 HepG2 细胞糖酵解关键酶活性的影响 如图 3 所示, 与对照组比较, 各浓度去氧地胆草素组细胞糖酵解关键酶 HK2、PFK1、PKM2 活性均降低 (*P*<0.05)。

3.4 去氧地胆草素对 HepG2 细胞糖酵解关键酶 mRNA 和蛋白表达的影响 如图 4A 所示, 与对照组比较, 10、20 μmol/L 去氧地胆草素组细胞糖酵解关键酶 HK2、PFK1、PKM2 mRNA 表达降低 (*P*<0.05); 如图 4B 所示, 与对照组比较, 10、20 μmol/L 去氧地胆草素组细胞糖酵解关键酶 HK2、PFK1、PKM2 蛋白表达降低 (*P*<0.05)。

3.5 去氧地胆草素对 HepG2 细胞 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1α 信号通路的影响 如图 5 所示, 与对照组比较, 20 μmol/L 去氧地胆草素组细胞 p-PI3K 蛋白表达降低 (*P*<0.05),



注：与对照组比较，* $P<0.05$ 。
图 1 去氧地胆草素对 HepG2 细胞增殖（A）和迁移（B）的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）



注：A 为各组细胞葡萄糖摄取量，B 为各组细胞乳酸水平。与对照组比较，* $P<0.05$ 。
图 2 去氧地胆草素对 HepG2 细胞糖酵解的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

10、20 $\mu\text{mol/L}$ 去氧地胆草素组细胞 p-Akt、p-mTOR、HIF-1 α 蛋白表达降低（ $P<0.05$ ）。

4 讨论

肿瘤细胞能量代谢重编程对于肿瘤的增殖与转移转移非常重要。与正常细胞不同的是，肿瘤细胞主要依靠糖酵解获得能量，这是因为糖酵解快速产生的 ATP 更能满足肿瘤细胞增殖和转移对于能量的需求^[6-7]。靶向肿瘤能量代谢干预肿瘤发生发展过程及临床诊疗等方面的研究已取得一定进展，如通过抑制糖酵解过程来阻遏肿瘤增殖与转移等恶性生物学行为，为肿瘤治疗提供了新的策略^[8-11]。

HK2、PFK1、PKM2 是糖酵解关键酶，在多种肿瘤组

织中高表达，并与肿瘤的恶性进展密切相关^[12]。HK2、PFK1、PKM2 通过调控肿瘤细胞糖酵解进而对肿瘤细胞增殖、迁移以及凋亡等生物学行为发挥重要作用^[13]。有研究显示，抑制 HK2、PFK1、PKM2 可以抑制肿瘤细胞增殖和迁移、诱导肿瘤细胞凋亡，提示 HK2、PFK1、PKM2 有可能是恶性肿瘤的治疗靶点^[12-13]。

去氧地胆草素是来源于菊科植物地胆草中的一种倍半萜内酯，对包括宫颈癌、肝癌、乳腺癌和结直肠癌在内的多种肿瘤细胞均有抑制作用^[3,14]，其抗肿瘤活性越来越受到关注^[15]，但其对于肿瘤细胞能量代谢的作用未见有研究。本研究结果显示，去氧地胆草素能够抑制肝癌 HepG2

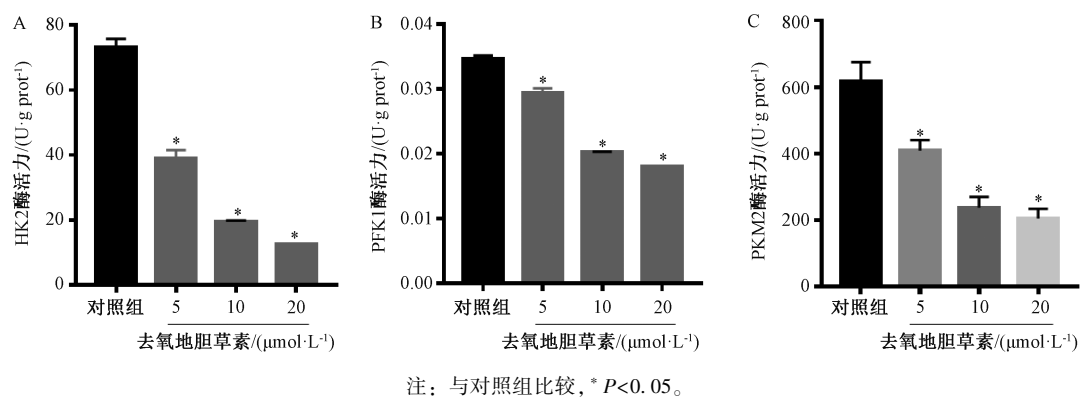


图 3 去氧地胆草素对 HepG2 细胞 HK2、PFK1、PKM2 酶活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

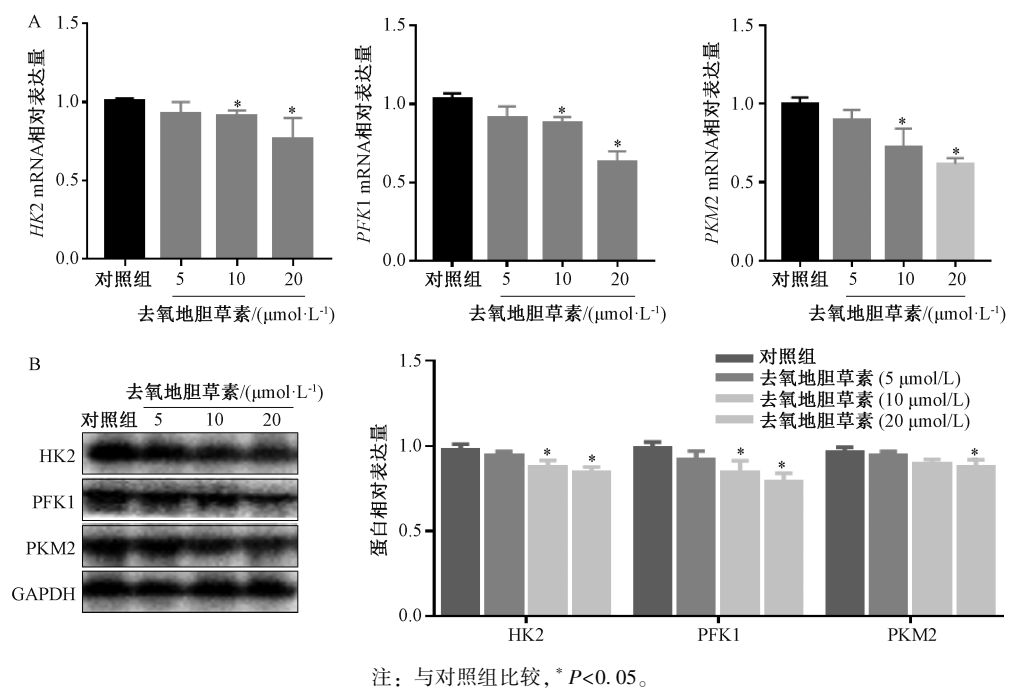


图 4 去氧地胆草素对 HepG2 细胞 HK2、PFK1、PKM2 mRNA (A) 和蛋白 (B) 表达影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

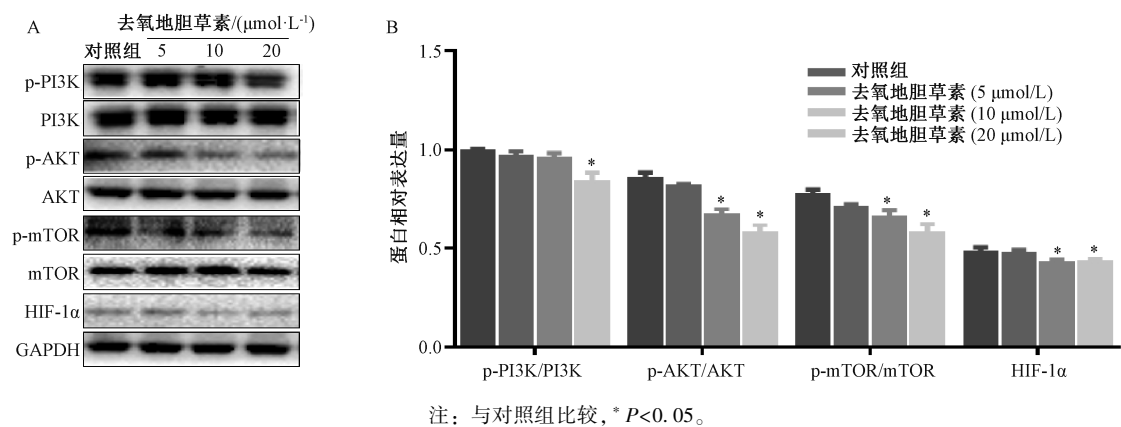


图 5 去氧地胆草素对 HepG2 细胞 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α 信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

细胞的增殖和迁移、细胞葡萄糖摄取、乳酸生成水平，且下调糖酵解关键酶 HK2、PFK1、PKM2 活性、mRNA 及蛋白表达，表明去氧地胆草素对 HepG2 细胞的糖酵解过程也有抑制作用。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路是肿瘤细胞能量代谢最重要的调控通路之一，它的活化是介导肿瘤细胞“Warburg 效应”发生的重要因素。PI3K 磷酸化活化 Akt，激活的 Akt 随即将信号传递给下游因子 mTOR，从而影响肿瘤细胞增

殖、迁移和能量代谢等过程，mTOR 活化又增强转录因子 HIF-1 α 的翻译，进而促进 HK2、PFK1、PKM2 等多个糖酵解酶的基因转录，增强糖酵解水平，抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号转导通路则可降低糖酵解水平^[16-20]，由此可见，PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α 通路在肿瘤细胞的糖酵解代谢中发挥重要作用。本研究结果显示，去氧地胆草素能够抑制 PI3K/AKT/mTOR 信号通路的蛋白磷酸化水平，同时降低 HIF-1 α 蛋白表达，提示 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α 信号通路很可能在去氧地胆草素对 HepG2 细胞增殖、迁移及糖酵解作用过程中发挥不可或缺作用，其具体调控机制有待进一步深入研究。

综上所述，本研究首次从调控糖酵解角度考察了去氧地胆草素对于 HepG2 细胞增殖和迁移的作用，并且发现去氧地胆草素对 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α 信号通路也有调控作用，但其具体机制有待进一步研究。本研究结果为去氧地胆草素作为抗肿瘤药物的研究提供实验依据，也为靶向肿瘤细胞能量代谢的糖酵解途径的药物开发提供参考。

参考文献:

[1] 慕 容, 胡 容, 郭青龙. 肿瘤细胞的糖酵解机制与基于糖酵解的肿瘤治疗策略[J]. 药物生物技术, 2009, 16(6): 573-577.

[2] 刘 洋, 许新华. 恶性肿瘤糖代谢异常的研究进展[J]. 广东医学, 2012, 33(19): 3018-3020.

[3] 姬浩燕. 去氧地胆草素 (DPT) 诱导结直肠癌细胞凋亡并增强 5 氟尿嘧啶化疗敏感性的机制研究[D]. 重庆: 西南大学, 2020.

[4] Kabeer F A, Rajalekshmi D S, Nair M S, *et al.* Molecular mechanisms of anticancer activity of deoxyelephantopin in cancer cells[J]. *Integr Med Res*, 2017, 6(2): 190-206.

[5] Mehmood T, Maryam A, Zhang H, *et al.* Deoxyelephantopin induces apoptosis in HepG2 cells *via* oxidative stress, NF- κ B inhibition and mitochondrial dysfunction[J]. *Biofactors*, 2017, 43(1): 63-72.

[6] 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.

[7] 李 影, 刘红宁, 邓晓霞, 等. 恶性肿瘤有氧糖酵解关键酶研究进展[J]. 江西中医药, 2019, 50(1): 73-77.

[8] 张夜航, 卢文丽, 彭佩克, 等. α -常春藤皂苷协同雷公藤红素对 SMMC-7721 肝癌细胞增殖和周期的影响[J]. 中成药, 2022, 44(4): 1099-1106.

[9] 吴沙沙, 李文燕. 辛伐他汀通过抑制 Warburg 效应改善索拉非尼耐药的肝癌细胞转移侵袭的作用机制[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(22): 2796-2801.

[10] 李 恬, 靳明明, 宋少莉, 等. 雷公藤甲素通过调控糖酵解途径抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞的研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2020, 15(6): 981-985; 990.

[11] 郭 舜, 石 磊, 张 松, 等. 黄芩素通过调控糖酵解及谷氨酰胺代谢抑制肝癌细胞能量代谢[J]. 中国药师, 2021, 24(12): 2154-2159.

[12] 崔 英, 魏顺英. 卵巢癌组织己糖激酶 2、6 磷酸果糖激酶 1、丙酮酸激酶表达变化及其意义[J]. 山东医药, 2017, 57(35): 42-44.

[13] 王 敏, 汪橙橙, 杨振芳, 等. 肿瘤糖酵解途径中关键限速酶及其调节因子的研究进展[J]. 解剖科学进展, 2021, 27(6): 755-758.

[14] 王金妮. 地胆草倍半萜内酯类化学成分及抗肿瘤作用研究进展[J]. 广东化工, 2021, 48(14): 115-117.

[15] Mehmood T, Maryam A, Ghramh H A, *et al.* Deoxyelephantopin and isodeoxyelephantopin as potential anticancer agents with effects on multiple signaling pathways [J]. *Molecules*, 2017, 22(6): 1013.

[16] 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.

[17] 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.

[18] 朱顺昕, 黄渝茜, 刘 云, 等. 斑蝥素酸镁对 SMMC-7721 肝癌细胞 Warburg 效应的影响[J]. 中成药, 2021, 43(11): 3136-3139.

[19] 汪 芊. PRMT2 通过 PI3K/Akt/mTOR/HIF-1 α 通路对乳腺癌细胞有氧糖酵解的影响[D]. 衡阳: 南华大学, 2020.

[20] 苏杰琳, 张斯琳, 赵嘉琪, 等. 人参皂苷 CK 调节 HIF-1 α 介导的糖酵解抑制人肝癌细胞增殖作用机制的研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(7): 1623-1626.