

蓝萼甲素通过Bcl-2/Beclin1靶点调节人肝癌HCCLM3细胞自噬与凋亡的机制研究^Δ

朱琳琳*,张明明,郭格格,徐祉轩(新乡医学院医学检验学院/河南省分子检验与医学检验技术协同创新中心/河南省免疫与靶向药物重点实验室,河南新乡 453003)

中图分类号 R965;R735.7 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2022)09-1082-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2022.09.10



摘要 目的 研究蓝萼甲素(GLA)对人肝癌HCCLM3细胞自噬与凋亡的调节作用机制。方法 HCCLM3细胞按不同实验目的主要设对照组、GLA 2.5 μg/mL组、GLA 5 μg/mL组、GLA 10 μg/mL组。对照组仅加入完全培养基,各给药组分别加入含GLA相应终质量浓度的完全培养基。采用流式细胞术检测细胞周期分布与凋亡情况;采用透射电镜观察细胞线粒体形态和自噬情况(仅设对照组、GLA 5 μg/mL组);采用JC-1染色和荧光倒置显微镜观察并检测细胞线粒体膜电位;采用Western blot法检测细胞中Bcl-2、Bax、Beclin1、活性半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cleaved caspase-3)蛋白的表达;采用免疫共沉淀法检测细胞中Bcl-2与Beclin1的结合与解离(仅设GLA 5 μg/mL组、GLA 10 μg/mL组)。结果 与对照组相比,GLA 5、10 μg/mL能够诱发细胞周期显著阻滞于G₂~M期、诱导线粒体膜电位显著下降、增加促凋亡作用,还能显著促进Bax、cleaved caspase-3、Beclin1蛋白表达,显著抑制Bcl-2蛋白表达($P<0.01$);GLA 5 μg/mL还可引发线粒体形态显著改变,自噬小体增多。免疫共沉淀法结果显示,与GLA 5 μg/mL比较,GLA 10 μg/mL能够增强Bcl-2与Beclin1的结合。结论 GLA可能通过Bcl-2/Beclin1靶点调节HCCLM3细胞自噬与凋亡,且作用效果与剂量密切相关。

关键词 蓝萼甲素;靶点;机制;自噬;凋亡;Bcl-2;Beclin1

Study on regulation mechanism of glaucocalyxin A on the autophagy and apoptosis of HCCLM3 hepatocellular carcinoma cells through Bcl-2/Beclin1 target

ZHU Linlin, ZHANG Mingming, GUO Gege, XU Zhixuan (School of Laboratory Medicine, Xinxiang Medical University/Henan Collaborative Innovation Center of Molecular Diagnosis and Laboratory Medicine/Henan Key Laboratory of Immunology and Targeted Therapy, Henan Xinxiang 453003, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To study the regulatory mechanism of glaucocalyxin A (GLA) on autophagy and apoptosis of HCCLM3 hepatocellular carcinoma cells. **METHODS** HCCLM3 cells were taken, and control group, GLA 2.5 μg/mL group, GLA 5 μg/mL group and GLA 10 μg/mL group were mainly set according to different experimental purposes. In control group, only complete medium was added; in each administration group, complete medium containing the corresponding final concentration of GLA was added. Cell cycle distribution and apoptosis were detected by flow cytometry; mitochondrial morphology and autophagy were observed by transmission electron microscope (only control group, GLA 5 μg/mL group); JC-1 staining and fluorescence inverted microscope were used to observe and detect the mitochondrial membrane potential of the cells; Western blot assay was used to detect the protein expression of Bcl-2, Bax, Beclin1 and cleaved caspase-3 proteins in the cells; the co-immunoprecipitation method was used to detect the binding and dissociation of Bcl-2 and Beclin1 (only GLA 5 μg/mL group, GLA 10 μg/mL group). **RESULTS** Compared with control group, GLA 5 μg/mL and GLA 10 μg/mL could induce a significant arrest of the cell cycle in the G₂-M phase for HCCLM3, a significant decrease in mitochondrial membrane potential, an increase in apoptosis as well as significant promotion of the protein expression of Bax, cleaved caspase-3 and Beclin1, and significant inhibition of the protein expression of Bcl-2 ($P<0.01$). GLA 5 μg/mL also significantly changed mitochondrial morphology and increased autophagosomes. The results of co-immunoprecipitation showed that compared with GLA 5 μg/mL, GLA 10 μg/mL could enhance the binding of Bcl-2 and Beclin1. **CONCLUSIONS** GLA can regulate the autophagy and apoptosis of HCCLM3 cells by Bcl-2/Beclin1 target. The effect is closely related to the dose of GLA.

KEYWORDS glaucocalyxin A; target; mechanism; autophagy; apoptosis; Bcl-2; Beclin1

^Δ 基金项目:河南省科技攻关项目(No.212102310753)

* 副教授,博士。研究方向:中草药抗肿瘤作用机制。电话:0373-3832181。E-mail:linbetter@163.com

细胞自噬与凋亡存在诸多联系,与一系列基因激活、表达调控相关。正常情况下,两者处于平衡状态;药物、环境可以打破二者平衡,引发细胞走向不同结局,从

而促进或抑制肿瘤发展。蓝萼甲素(glaucocalyxin A, GLA)是从中草药香茶菜中分离提取的活性成分。基础研究表明,其具有良好的抗肿瘤作用,能够通过线粒体活性氧调节肿瘤细胞自噬,也可通过线粒体Bcl-2相关信号通路引起细胞周期阻滞并诱发细胞凋亡^[1-5]。可见,GLA调节细胞自噬、凋亡均与线粒体密切相关。

研究证实,Bcl-2通过与自噬相关蛋白Beclin1结合可抑制细胞自噬,两者解离则促进细胞自噬、抑制细胞凋亡,Bcl-2/Beclin1复合体对细胞自噬与凋亡转归具有重要的调节作用^[6]。笔者团队前期研究显示,GLA对Bcl-2相关信号通路的表达具有双向调节作用^[7]。若能阐明GLA在细胞自噬与凋亡过程中的作用靶点,有效利用GLA调节细胞自噬与凋亡转归,对临床抗肿瘤治疗具有重要意义。肝癌是常见的恶性肿瘤,也是临床治疗效果欠佳的肿瘤,亟需寻找疗效好、不良反应小的药物。因此,本研究以人肝癌HCCLM3细胞系为载体,以线粒体信号通路中参与调节细胞自噬与凋亡平衡的Bcl-2/Beclin1复合体为靶点,探讨GLA调节细胞自噬与凋亡转归的作用机制及靶点,为深入研究GLA的抗肿瘤作用机制、开发临床抗肿瘤新药提供实验依据。

1 材料

1.1 仪器

371型CO₂细胞培养箱购自美国Thermo Fisher Scientific公司;1658033型电泳仪购自美国Bio-Rad公司;5804R型台式高速冷冻离心机购自德国Eppendorf公司;FACS Carlibur型流式细胞仪购自美国BD公司;Axio Vert.A1型荧光倒置显微镜购自德国Zeiss公司;HT 7800型透射电镜购自日本Hitachi公司;Azure 600型化学发光成像系统购自美国Azure公司。

1.2 药物与试剂

GLA由新乡医学院药学院提供,纯度为99.8%(高效液相色谱法)。胎牛血清、RPMI 1640培养基购自美国Gibco公司;二甲基亚砜、磷酸盐缓冲液、L-谷氨酰胺、青链霉素混合液(批号分别为D8371、P1020、G0200、P1400)购自北京索莱宝科技有限公司;BCA蛋白浓度检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒、JC-1线粒体膜电位检测试剂盒(批号分别为P0012、C1052、C2006)购自上海碧云天生物技术有限公司;细胞凋亡检测试剂盒(批号abs50001)购自上海优宁维生物科技股份有限公司;兔源性Bax抗体、Bcl-2抗体、活性半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(cleaved caspase-3)抗体、Beclin1抗体(批号分别为ab32503、ab32124、ab32042、ab210498)购自英国Abcam公司;鼠源性β-肌动蛋白(β-actin)抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗与山羊抗鼠IgG二抗(批号分别为3700S、7074S、7076S)购自美国CST公司;电镜固定液(批号G1102)购自武汉赛维尔生物科技有限公司。

1.3 细胞

人肝癌HCCLM3细胞系由中国科学院上海细胞库提供。

2 方法

2.1 GLA母液配制

取500 μg GLA溶于50 μL二甲基亚砜中,制备成质量浓度为10 mg/mL的母液,分装保存于-20 °C冰箱,使用时用RPMI 1640培养基稀释至不同浓度。

2.2 细胞培养与分组

HCCLM3细胞在含10%胎牛血清、4 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的完全培养基中进行培养,并置于37 °C、5%CO₂的培养箱中,2~3 d传代1次,取对数生长期的HCCLM3细胞进行后续实验。根据研究目的,细胞周期、线粒体膜电位、细胞凋亡、细胞自噬与凋亡相关蛋白表达水平检测设对照组、GLA 2.5 μg/mL组、GLA 5 μg/mL组、GLA 10 μg/mL组;细胞自噬病理观察设对照组、GLA 5 μg/mL组;Bcl-2与Beclin1的结合与解离实验设GLA 5 μg/mL组、GLA 10 μg/mL组。对照组仅加入完全培养基;GLA各给药组根据前期预实验结果并参考文献[7],分别加入含相应终质量浓度GLA的完全培养基。

2.3 细胞周期检测

采用流式细胞术检测。将对数生长期的HCCLM3细胞接种于6孔板,每孔含1×10⁶个细胞,每组设3个复孔。将细胞按照“2.2”项下方法分组并给药,培养24 h,按细胞周期检测试剂盒操作说明书收集、固定细胞,染色,上机分析细胞周期分布。利用Flow Jo软件分析G₀、G₁、G₂、S、M期细胞占比。

2.4 线粒体膜电位检测

采用JC-1染色和荧光倒置显微镜观察并检测。将对数生长期的HCCLM3细胞接种于12孔板中,每孔含5×10⁵个细胞,每组设3个复孔。将细胞按照“2.2”项下方法分组并给药,培养24 h,收集细胞。采用JC-1线粒体膜电位检测试剂盒检测细胞中红绿荧光并拍照。红绿荧光强度的比值提示线粒体膜电位的变化:当线粒体膜电位较高时,JC-1聚集产生红色荧光;当线粒体膜电位下降时,JC-1主要为单体,产生绿色荧光。

2.5 细胞自噬病理观察

采用透射电镜观察。将对数生长期的HCCLM3细胞接种于10 cm细胞培养皿中,每皿含5×10⁶个细胞,每组设3个复皿。将细胞按照“2.2”项下方法分组并给药,培养24 h,收集细胞。以磷酸盐缓冲液洗涤后重悬细胞,并转移至1 mL尖底离心管,以1 000 r/min离心5 min,吸弃磷酸盐缓冲液,加10倍体积电镜固定液固定细胞,观察细胞线粒体形态和自噬情况,并拍照。

2.6 细胞凋亡检测

采用流式细胞术检测。将对数生长期的HCCLM3

细胞接种于6孔板中,每孔含 1×10^6 个细胞,每组设3个复孔。将细胞按照“2.2”项下方法分组并给药,培养24 h,收集细胞,以预冷磷酸盐缓冲液洗涤后重悬细胞,采用细胞凋亡检测试剂盒中的Annexin V-FITC标记,避光、室温孵育15 min,以PI染色后上机检测细胞凋亡率。

2.7 细胞中自噬与凋亡相关蛋白表达水平检测

采用Western blot法检测。将对数生长期的HCCLM3细胞接种于6孔板中,每孔含 1×10^6 个细胞,每组设3个复孔。将细胞按照“2.2”项下方法分组并给药,培养24 h,提取细胞总蛋白并以BCA法测定蛋白浓度后,取蛋白适量进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后依次转膜,封闭,加入Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、Beclin1、 β -actin一抗(稀释度均为1:1 000),4℃摇床孵育过夜;加入辣根过氧化物酶标记的二抗(稀释度为1:3 000),室温摇床孵育1 h;洗膜后曝光,在化学发光成像系统中成像、扫描。以目的蛋白与 β -actin蛋白条带灰度值的比值表示目的蛋白的表达水平。

2.8 细胞中Bcl-2与Beclin1的结合与解离状态检测

采用免疫共沉淀法检测。将对数生长期的HCCLM3细胞接种于10 cm细胞培养皿中,每皿含 5×10^6 个细胞,每组设3个复皿。按照“2.2”项下方法分组并给药,培养24 h,收集细胞,提取细胞总蛋白,以BCA法测定蛋白浓度。取2组蛋白样品分装于IgG阴性对照管、检测管中。IgG阴性对照管中加入IgG抗体,用于消除非特异性蛋白的影响,作为阴性对照;检测管中加入Bcl-2抗体,用于收集与Bcl-2结合的Beclin1蛋白。将上述阴性对照管和检测管于4℃摇床孵育过夜,每管加入琼脂糖凝珠,筛选出与Bcl-2结合的Beclin1蛋白,变性处理后以Western blot法检测Bcl-2与Beclin1结合的蛋白表达情况。

2.9 统计学分析

采用SPSS 21.0统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 GLA对HCCLM3细胞周期阻滞的影响

流式细胞术检测结果显示,与对照组比较,GLA 5 $\mu\text{g/mL}$ 组、GLA 10 $\mu\text{g/mL}$ 组HCCLM3细胞周期显著阻滞于 $G_2 \sim M$ 期,差异均有统计学意义($P < 0.01$),尤以GLA 10 $\mu\text{g/mL}$ 组作用更为明显;而GLA 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组的细胞周期阻滞作用差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见图1、表1。

3.2 GLA对HCCLM3细胞线粒体膜电位的影响

细胞线粒体膜电位结果显示,对照组、GLA 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组、GLA 5 $\mu\text{g/mL}$ 组、GLA 10 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞中红绿荧光强度比值分别为 1.712 ± 0.335 、 1.673 ± 0.297 、 0.541 ± 0.134 、 0.117 ± 0.041 。与对照组比较,GLA 5 $\mu\text{g/mL}$ 组、GLA 10 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞红绿荧光强度比值降低,提示线

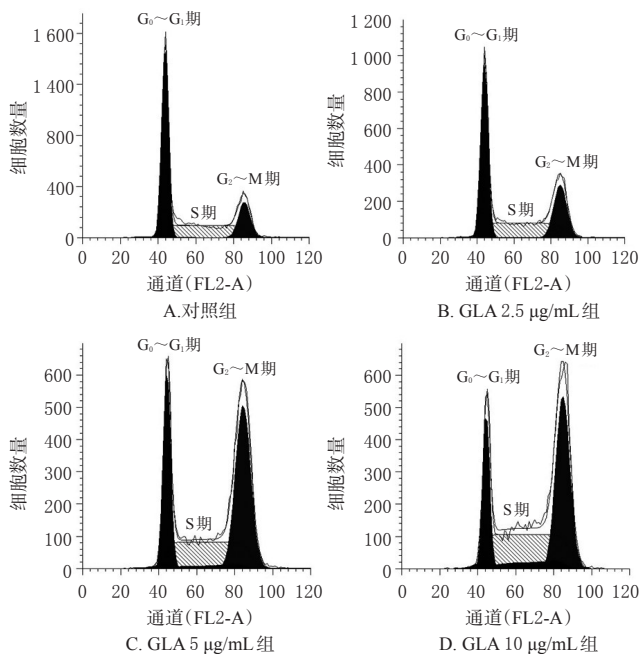


图1 各组HCCLM3细胞周期分布图

表1 各组HCCLM3细胞的不同细胞周期占比检测结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	$G_0 \sim G_1$ 期	S期	$G_2 \sim M$ 期
对照组	56.153 ± 0.798	24.187 ± 0.496	19.660 ± 0.305
GLA 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组	48.960 ± 0.243	24.213 ± 0.248	26.827 ± 0.445
GLA 5 $\mu\text{g/mL}$ 组	39.143 ± 0.385^a	22.063 ± 0.266	38.794 ± 0.206^a
GLA 10 $\mu\text{g/mL}$ 组	30.337 ± 0.280^a	20.090 ± 0.159	49.573 ± 0.439^a

a: 与对照组比较, $P < 0.01$

粒体膜电位降低,尤以GLA 10 $\mu\text{g/mL}$ 组下降更为显著($P < 0.01$)。结果见图2。

3.3 GLA对HCCLM3细胞线粒体形态和自噬的影响

透射电镜观察结果显示,GLA 5 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞线粒体高度肿胀,嵴模糊不清甚至消失,出现较多自噬小体;对照组细胞线粒体形态无异常。结果见图3。

3.4 GLA对HCCLM3细胞凋亡的影响

流式细胞术检测结果显示,对照组、GLA 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组、GLA 5 $\mu\text{g/mL}$ 组、GLA 10 $\mu\text{g/mL}$ 组的细胞凋亡率分别为 $(3.277 \pm 0.415)\%$ 、 $(4.087 \pm 0.945)\%$ 、 $(17.625 \pm 1.433)\%$ 、 $(74.673 \pm 3.402)\%$ 。与对照组比较,GLA 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞凋亡率差异无统计学意义($P > 0.05$),GLA 5 $\mu\text{g/mL}$ 组、GLA 10 $\mu\text{g/mL}$ 组均显示出显著的促凋亡作用($P < 0.01$),且GLA 10 $\mu\text{g/mL}$ 组促凋亡作用更明显。结果见图4。

3.5 GLA对HCCLM3细胞中Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、Beclin1蛋白表达的影响

Western blot法检测结果显示,GLA 5 $\mu\text{g/mL}$ 组、GLA 10 $\mu\text{g/mL}$ 组HCCLM3细胞中Bax、cleaved caspase-3、Beclin1蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$),Bcl-2蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$)。结果见图5。

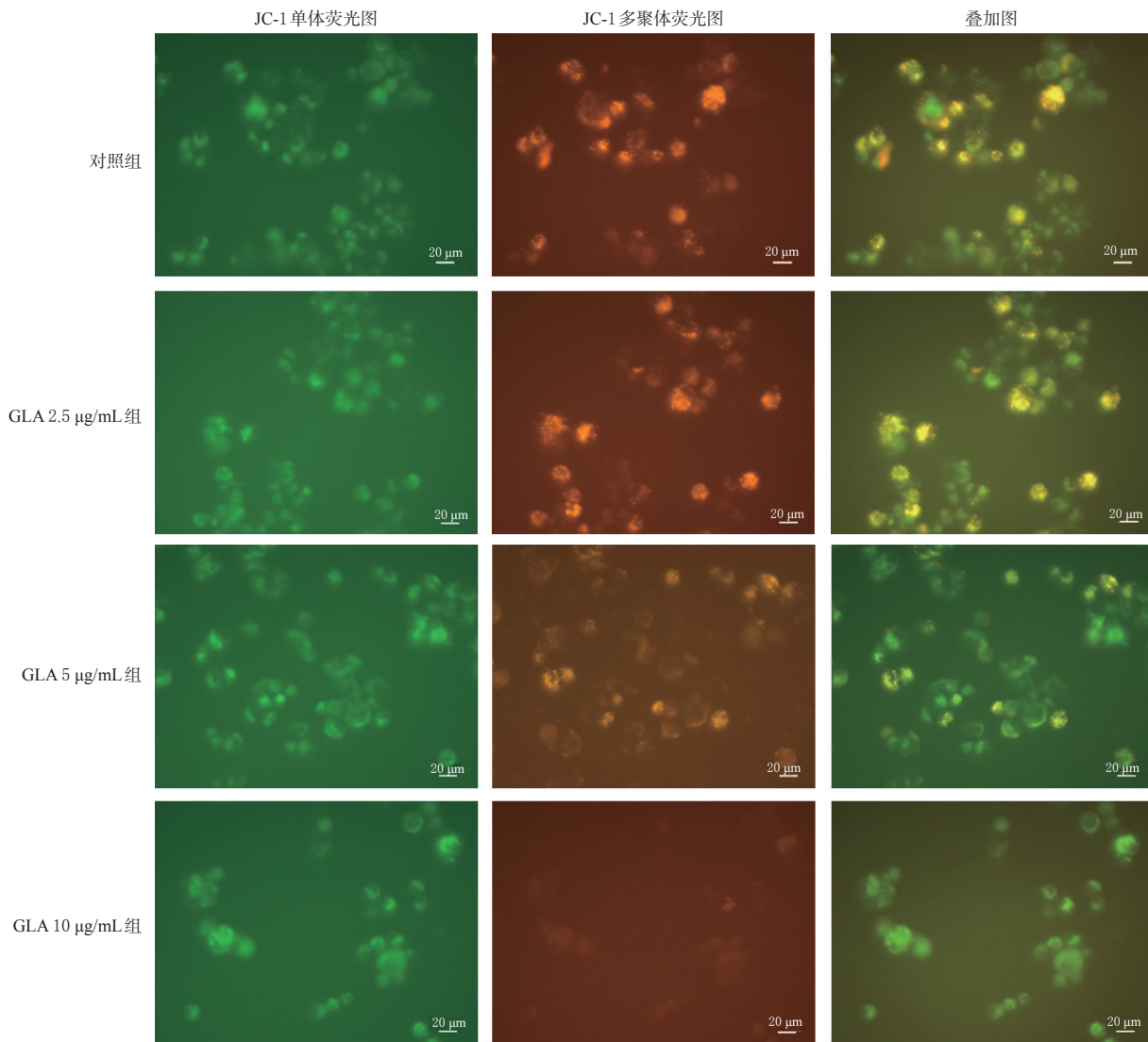
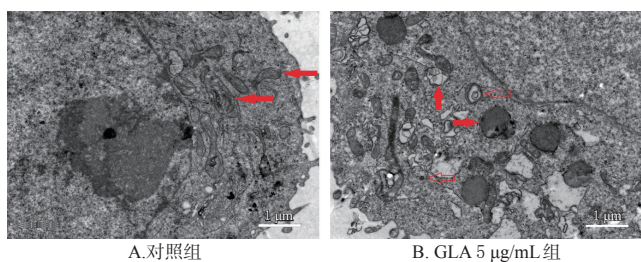


图2 各组HCCLM3细胞线粒体膜电位荧光图



实心箭头:线粒体;空心箭头:自噬小体

图3 GLA对HCCLM3细胞线粒体形态和自噬影响的病理显微图

3.6 GLA对HCCLM3细胞中Bcl-2与Beclin1结合与解离的影响

免疫共沉淀法检测结果见图6,图中Bcl-2列、Beclin1行上的条带代表与Bcl-2结合的Beclin1的量。图6B中的条带比图6A中条带明显,说明GLA 10 μg/mL组Beclin1与Bcl-2的结合较多。IgG列为阴性对照,Input列为阳性对照,两组之间均无明显差异。由此可见,与GLA 5 μg/mL组比较,GLA 10 μg/mL组HCCLM3细胞中Bcl-2与Beclin1的结合增强。

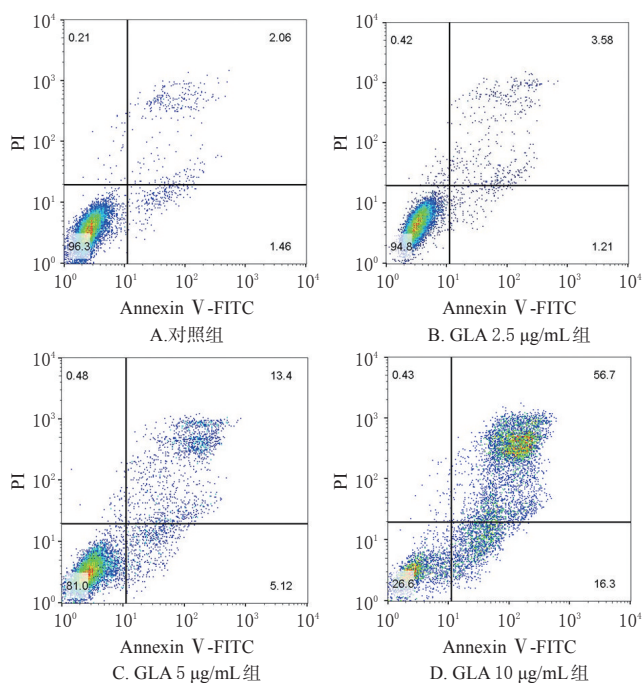
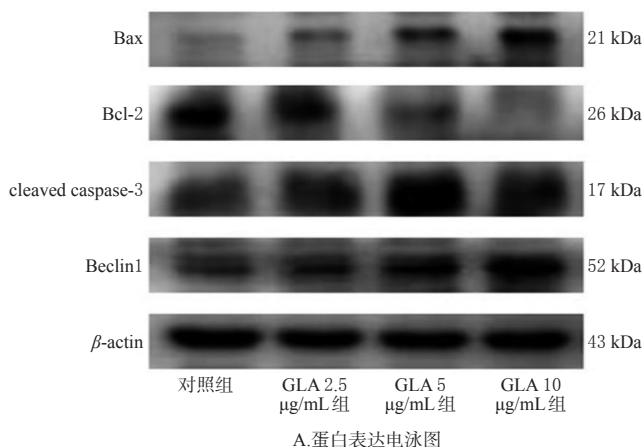
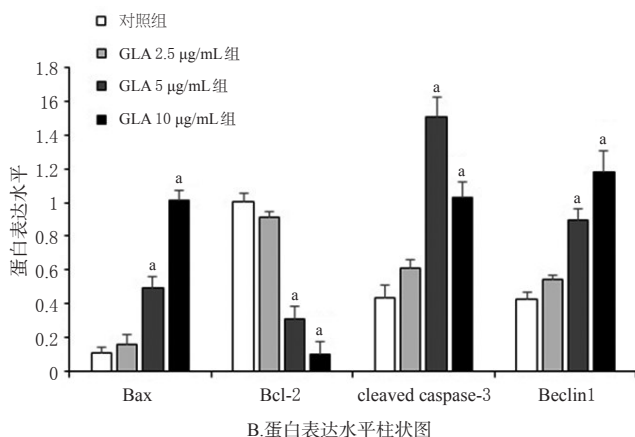


图4 各组HCCLM3细胞凋亡流式图



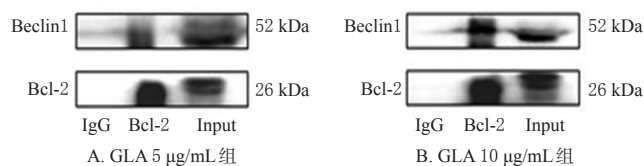
A. 蛋白表达电泳图



B. 蛋白表达水平柱状图

a: 与对照组比较, $P < 0.01$

图5 各组 HCCLM3 细胞中 Bax、Bcl-2、cleaved caspase-3、Beclin1 的蛋白表达结果



A. GLA 5 μg/mL 组

B. GLA 10 μg/mL 组

图6 GLA 对 HCCLM3 细胞中 Bcl-2 与 Beclin1 结合影响的蛋白表达电泳图

4 讨论

细胞周期是细胞从一次分裂完成开始到下一次分裂结束所经历的全过程,分为间期(G_1 、S、 G_2 期)与分裂期(M期): G_2 期是DNA复制结束与有丝分裂开始之间的间隙,为进入M期提供物质条件; $G_2 \sim M$ 期是细胞处于复杂活跃的分子水平变化时期,容易受外界条件的影响;而 G_0 期是具有分裂能力但暂时未进入细胞周期的细胞。如果能够人为调控细胞周期,对深入认识肿瘤的发生及研究抗肿瘤药物的作用机制具有重要意义。研究发现,GLA能够诱发膀胱癌细胞周期阻滞^[4]。本研究结果进一步证实,GLA 5、10 μg/mL能够诱发人肝癌 HCCLM3 细胞明显阻滞于 $G_2 \sim M$ 期。

细胞周期阻滞后通常会诱导线粒体膜电位改变,线粒体跨膜电位下降被认为是细胞凋亡级联反应过程中

最早发生的事件,一旦线粒体膜电位崩溃,则细胞凋亡不可逆转^[8]。本研究中荧光倒置显微镜观察结果显示,GLA 5、10 μg/mL 作用于 HCCLM3 细胞 24 h,均可诱导线粒体膜电位下降,其中 GLA 10 μg/mL 诱导作用更为明显。流式细胞术检测结果也证实,GLA 10 μg/mL 作用于 HCCLM3 细胞 24 h,其促凋亡作用更为明显。这提示 GLA 促进细胞凋亡与其诱导线粒体膜电位下降相关,GLA 能够通过线粒体途径促进细胞凋亡^[9]。

Bax 与 Bcl-2 是线粒体凋亡途径的重要因子,也是内源性凋亡的主要调控者。研究显示,细胞受到信号分子刺激后,Bax 形成寡聚体,从细胞质转移到线粒体膜上,与 Bcl-2 形成多聚体,通过在线粒体外膜上形成孔洞来增强线粒体膜的通透性,诱导细胞色素 C 释放,诱发 caspase 蛋白酶家族的酶联激活,促进细胞凋亡^[10]。Bcl-2 的过表达与较多肿瘤的发生密切相关,以 Bcl-2 为靶点的药物研究一直是抗肿瘤药物研究的热点^[11-13]。

香茶菜属于传统中草药,因其活性强、毒性小而备受关注。GLA 是从香茶菜中分离提取的活性成分,民间用于抗炎、抗肿瘤治疗历史悠久^[1-3]。基础研究显示,在肝癌、膀胱癌、骨肉瘤等裸鼠模型中,GLA 能够显著抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡,且对主要脏器无明显的毒副作用^[2-4,9]。本研究中流式细胞术检测结果显示,GLA 10 μg/mL 能够显著促进细胞凋亡;Western blot 检测结果进一步证实,GLA 10 μg/mL 能够显著促进 Bax、cleaved caspase-3、Beclin1 蛋白表达,显著抑制 Bcl-2 蛋白表达。这提示 GLA 可通过线粒体通路促进 HCCLM3 细胞凋亡,且存在剂量效应趋势。

细胞自噬作为细胞程序性死亡的另一种方式,与细胞凋亡密切相关。线粒体也是参与细胞自噬的重要细胞器。Beclin1 介导的自噬信号通路与 Bax/Bcl-2 线粒体凋亡通路之间存在交叉^[14-15]。Beclin1 通过 BH3 结构域与 Bcl-2 结合,竞争性地抑制 Bax 与 Bcl-2 的结合,导致 Bax/Bcl-2 比值升高,促进细胞凋亡;相反,Beclin1 也可与 Bcl-2 解离,不影响 Bax 与 Bcl-2 的结合,同时释放游离 Beclin1,促进细胞自噬^[14]。研究显示,Beclin1 过表达可以降低线粒体膜电位,并通过与 Bcl-2 结合增加顺铂诱导的细胞凋亡^[15];孕酮受体拮抗剂能够减弱 Bcl-2 与 Beclin1 结合,通过 Bcl-2/Beclin1 轴调节子宫肌瘤细胞自噬与凋亡^[16];氧化鱼油也能够抑制 Bcl-2 与 Beclin1 结合从而促进细胞自噬,并导致线粒体功能障碍^[17]。Beclin1 与 Bcl-2 的结合在调节细胞自噬与凋亡转归中意义重大。本研究通过免疫共沉淀法检测,结果显示 Bcl-2 与 Beclin1 在 HCCLM3 细胞中相互作用,且 GLA 10 μg/mL 作用于 HCCLM3 细胞 24 h,能够促进 Bcl-2 与 Beclin1 结合。再根据 Western blot 法检测结果,笔者推测 GLA 10 μg/mL 在促进 Bcl-2 与 Beclin1 结合的同时,也促进 HCCLM3 细胞表达 Bax 蛋白,使细胞中 Bax/Bcl-2 比值

升高,从而促进细胞凋亡。同时,由于 Bcl-2 与 Beclin1 的结合抑制了 Beclin1 参与细胞自噬激活,所以 GLA 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的作用主要表现为促进细胞凋亡。相较而言, GLA 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 作用于 HCCLM3 细胞 24 h 后,细胞中 Bcl-2 与 Beclin1 的结合较少,因此,该剂量 GLA 促进细胞自噬的作用较为明显,透射电镜下可见细胞内出现较多自噬小体。以往研究也显示, Bcl-2 与细胞凋亡蛋白和细胞自噬蛋白存在交叉反应^[18-19],提示 Bcl-2 极有可能在细胞自噬与凋亡之间起关键性调控作用。

研究显示,多种中草药活性成分均能够诱发肿瘤细胞凋亡并激活细胞自噬,对肿瘤细胞的生物学行为进行双向调节^[20]。笔者团队前期研究结果显示, GLA 对人肝癌 HCCLM3 细胞的炎症反应、侵袭能力、迁移能力具有双向调节作用,且效果呈剂量效应关系^[7]。本研究结果显示, GLA 可通过线粒体途径促进细胞自噬与凋亡,并对 Bcl-2 与 Beclin1 的结合与解离具有双向调节作用,提示 GLA 可能通过 Bcl-2/Beclin1 靶点调节 HCCLM3 细胞自噬与凋亡,作用效果依然可能呈剂量效应关系。

综上所述, GLA 可能通过 Bcl-2/Beclin1 靶点调节 HCCLM3 细胞自噬与凋亡,且作用效果与剂量密切相关。

参考文献

[1] REN L L, WANG J J, CHEN G G. Preparation, optimization of the inclusion complex of glaucocalyxin A with sulfobutylether- β -cyclodextrin and antitumor study[J]. Drug Deliv, 2019, 26(1):309-317.

[2] TANG L S, JIN X F, HU X H, et al. Glaucocalyxin A inhibits the growth of liver cancer Focus and SMMC-7721 cells[J]. Oncol Lett, 2016, 11(2):1173-1178.

[3] HAN M H, LI Z T, GUO Y F, et al. A nanoparticulate drug-delivery system for glaucocalyxin A: formulation, characterization, increased *in vitro*, and *vivo* antitumor activity[J]. Drug Deliv, 2016, 23(7):2457-2463.

[4] LIN W F, XIE J L, XU N J, et al. Glaucocalyxin A induces G₂/M cell cycle arrest and apoptosis through the PI3K/Akt pathway in human bladder cancer cells[J]. Int J Biol Sci, 2018, 14(4):418-426.

[5] SHI F Z, XUE D F, JIANG Q K, et al. Glaucocalyxin A induces apoptosis and autophagy in tongue squamous cell carcinoma cells by regulating ROS[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2021, 88(2):235-246.

[6] FERNÁNDEZ Á F, SEBTI S, WEI Y J, et al. Disruption of the Beclin1-Bcl2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice[J]. Nature, 2018, 558 (7708): 136-140.

[7] 朱琳琳,徐祉轩,张明明.蓝萼甲素通过 IL-6 调节 HCCLM3 细胞 STAT3 信号通路的表达[J].中华微生物学和免疫学

杂志, 2019, 39(8):608-612.

[8] NANA X, MENG M, LI J, et al. Ivermectin induces apoptosis of esophageal squamous cell carcinoma via mitochondrial pathway[J]. BMC Cancer, 2021, 21(1): 1307.

[9] ZHU J W, SUN Y, LU Y, et al. Glaucocalyxin A exerts anticancer effect on osteosarcoma by inhibiting GLI1 nuclear translocation via regulating PI3K/Akt pathway[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(6):708.

[10] LAMERS F, SCHILD L, DEN HARTOG I J, et al. Targeted Bcl2 inhibition effectively inhibits neuroblastoma tumour growth[J]. Eur J Cancer, 2012, 48(16):3093-3103.

[11] TOUZEAU C, MACIAG P, AMIOT M, et al. Targeting Bcl-2 for the treatment of multiple myeloma[J]. Leukemia, 2018, 32(9):1899-1907.

[12] HAN L N, ZHANG Q, DAIL M, et al. Concomitant targeting of Bcl2 with venetoclax and MAPK signaling with cobimetinib in acute myeloid leukemia models[J]. Haematologica, 2020, 105(3):697-707.

[13] KAPOOR I, BODO J, HILL B T, et al. Targeting Bcl-2 in B cell malignancies and overcoming therapeutic resistance[J]. Cell Death Dis, 2020, 11(11):941.

[14] SHI C S, KEHRL J H. Bcl-2 regulates pyroptosis and necroptosis by targeting BH3-like domains in GSDMD and MLKL[J]. Cell Death Discov, 2019, 5:151.

[15] YANG M, YANG X M, YIN D H, et al. Beclin1 enhances cisplatin-induced apoptosis via Bcl-2-modulated autophagy in laryngeal carcinoma cells Hep-2[J]. Neoplasma, 2018, 65(1):42-48.

[16] ZHANG L D, FENG Q L, WANG Z T, et al. Progesterone receptor antagonist provides palliative effects for uterine leiomyoma through a Bcl-2/Beclin1-dependent mechanism [J]. Biosci Rep, 2019, 39(7):BSR20190094.

[17] ZHANG D G, ZHAO T, HOGSTRAND C, et al. Oxidized fish oils increased lipid deposition via oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction and the CREB1-Bcl2-Beclin1 pathway in the liver tissues and hepatocytes of yellow catfish[J]. Food Chem, 2021, 360:129814.

[18] LINDQVIST L M, VAUX D L. Bcl2 and related pro-survival proteins require BAK1 and BAX to affect autophagy [J]. Autophagy, 2014, 10(8):1474-1475.

[19] LIU J, LIU W J, YANG H. Balancing apoptosis and autophagy for Parkinson's disease therapy: targeting BCL-2 [J]. ACS Chem Neurosci, 2019, 10(2):792-802.

[20] 邵鑫,蒋先虹,王瑞,等.紫草素对人结肠癌细胞 HCT116 自噬和凋亡的影响[J].中国药房, 2021, 32(1):51-55.

(收稿日期:2021-10-26 修回日期:2022-03-06)

(编辑:舒安琴)