

葫芦素 B 调控糖酵解抑制 HuCCT1 细胞增殖的作用机制

李励¹, 邓冬杰¹, 谈相云¹, 孙懿¹, 王楚婷¹, 郑国华^{1,2*}, 胡俊杰^{1*}

(1. 湖北中医药大学药学院, 武汉 430065;

2. 湖北中医药大学中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065)

[摘要] 目的:探究葫芦素 B(CuB)抑制细胞增殖和糖酵解的作用机制。方法:采用细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)法检测 CuB(0、40、80、120、160、200、400、800 nmol·L⁻¹)对 HuCCT1 细胞增殖的影响;采用平板克隆实验检测 CuB(50、100、200 nmol·L⁻¹)对 HuCCT1 细胞集落形成能力的影响;采用流式细胞术检测 CuB(50、100、200 nmol·L⁻¹)对 HuCCT1 细胞周期的影响;采用可见分光光度法检测 CuB(50、100、200 nmol·L⁻¹)给药后 HuCCT1 细胞中糖酵解关键酶己糖激酶(HK)、丙酮酸激酶(PK)活性,及葡萄糖消耗量、乳酸生成量和三磷酸腺苷(ATP)生成量的变化;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 CuB 对细胞周期相关蛋白、增殖相关蛋白、糖酵解关键蛋白及蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Akt/mTOR)通路相关蛋白表达情况的影响。结果:与空白组比较,给药 24 h,160~800 nmol·L⁻¹CuB,给药 48 h 后 80~800 nmol·L⁻¹可以抑制 HuCCT1 细胞增殖($P<0.05$, $P<0.01$),并呈时间和浓度依赖性,给药 48 h 半数抑制浓度为 200 nmol·L⁻¹;CuB 可以呈浓度依赖性的抑制 HuCCT1 细胞集落形成能力($P<0.01$);CuB 能够将 HuCCT1 细胞周期阻滞在 G₂ 期($P<0.05$, $P<0.01$);CuB(100、200 nmol·L⁻¹)可以抑制糖酵解关键酶 HK、PK 的活性,并降低细胞葡萄糖消耗量及乳酸和 ATP 的生成量($P<0.05$, $P<0.01$)。Western blot 结果显示,CuB(100、200 nmol·L⁻¹)可以抑制周期相关蛋白 Cyclin B₁、增殖细胞核抗原(PCNA)、己糖激酶 1(HK1)、己糖激酶 2(HK2)、丙酮酸激酶 1(PKM1)、丙酮酸激酶 2(PKM2)、磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、磷酸化 mTOR(p-mTOR)及磷酸化核糖体蛋白(p-RPS6)的蛋白表达水平($P<0.05$, $P<0.01$)。结论:CuB 可能通过调控 Akt/mTOR 通路抑制 HuCCT1 细胞糖酵解进而影响细胞增殖。

[关键词] 葫芦素 B; 肝内胆管癌; 蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Akt/mTOR)通路; 糖酵解; HuCCT1 细胞增殖

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)16-0074-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221624

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220621.1106.004.html>

[网络出版日期] 2022-06-22 10:00

Mechanism of Cucurbitacin B in Regulating Glycolysis and Inhibiting Proliferation of HuCCT1 Cells

LI Li¹, DENG Dongjie¹, TAN Xiangyun¹, SUN Yi¹, WANG Chuting¹, ZHENG Guohua^{1,2*}, HU Junjie^{1*}

(1. Pharmacy School, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China;

2. Key Laboratory of Chinese Medicine Resource and Compound Prescription,

Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the mechanism of cucurbitacin B (CuB) in inhibiting cell proliferation and glycolysis. **Method:** Cell counting kit-8 (CCK-8) was applied to investigate the effect of different concentrations of CuB (0, 40, 80, 120, 160, 200, 400, and 800 nmol·L⁻¹) on the proliferation of HuCCT1 cells. The effect of different concentrations of CuB (50, 100, and 200 nmol·L⁻¹) on the colony

[收稿日期] 2022-02-27

[基金项目] 湖北省教育厅科学研究重点项目(D20202004)

[第一作者] 李励, 硕士, 从事中药新制剂、新剂型研究, E-mail: 1758242135@qq.com

[通信作者] * 胡俊杰, 博士, 高级实验师, 从事中药物质基础及作用机制研究, E-mail: hero0712@163.com;

* 郑国华, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药新制剂、新剂型的研究, E-mail: zgh1227@sina.com

formation ability of HuCCT1 cells was detected by plate cloning assay. The effect of different concentrations of CuB (50, 100, 200 nmol·L⁻¹) on the HuCCT1 cell cycle was analyzed by flow cytometry. Visible spectrophotometry was employed to detect the activity of key glycolytic enzymes hexokinase (HK) and pyruvate kinase (PK) and changes in glucose consumption, lactate production, and adenosine triphosphate (ATP) production in HuCCT1 cells after administration of different concentrations of CuB (50, 100, 200 nmol·L⁻¹). Western blotting was used to assay the effect of CuB on the expression of cell cycle-related proteins, proliferation-related proteins, key glycolytic proteins, and Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway-related proteins. **Result:** As compared with the blank group, CuB at dose of 160-800 nmol·L⁻¹ after 24 h administration and CuB at dose of 80-800 nmol·L⁻¹ after 48 h administration inhibited the proliferation of HuCCT1 cells in a time- and dose-dependent manner ($P<0.05$, $P<0.01$), and the median inhibitory concentration was 200 nmol·L⁻¹ 48 h after administration. CuB can restrain the colony formation ability of HuCCT1 cells in a dose-dependent manner ($P<0.01$), and block HuCCT1 cell cycle in G₂ phase ($P<0.05$, $P<0.01$). CuB (100 and 200 nmol·L⁻¹) can suppress the activities of HK and PK and reduce cell glucose consumption and production of lactate and ATP ($P<0.05$, $P<0.01$). Western blot results showed that CuB (100 and 200 nmol·L⁻¹) can inhibit the protein levels of cycle-related protein Cyclin B₁, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), HK1, HK2, PKM1, PKM2, phosphorylated Akt (p-Akt), phosphorylated mTOR (p-mTOR), and phosphorylated ribosomal protein S6 (p-RPS6) ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion:** CuB can inhibit aerobic glycolysis in HuCCT1 cells via the Akt/mTOR pathway, thereby affecting cell proliferation.

[Keywords] cucurbitacin B; intrahepatic cholangiocarcinoma; Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway; glycolysis; HuCCT1 cell proliferation

肝内胆管癌(ICC)是一种起源于胆管但位于肝内的特殊癌症^[1],其在原发性肝癌中的发病率仅次于肝癌(HCC),是第二常见的肝脏肿瘤且在全世界范围内呈上升趋势^[2]。据近30年来的ICC发病率的调查报告显示,全球ICC的发病率从0.32/10万上升到0.85/10万,增加了165%^[3]。因此,寻找更加安全有效的药物对临床上治疗ICC具有重要意义。研究表明,异常的能量代谢是肿瘤的主要特征之一^[4]。其中,糖酵解是能量代谢的主要形式之一,可以为肿瘤细胞的快速增殖提供能量和生物大分子原料^[5]。而且,糖酵解在ICC的发病机制及临床诊治应用中起着重要作用^[6]。蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(Akt/mTOR)信号通路是细胞进程中细胞对环境信号反应的重要调控因子,能控制细胞的糖酵解代谢^[7]。同时研究表明,调控Akt/mTOR通路可以抑制糖酵解途径中关键酶的表达水平,从而减少肿瘤细胞能量供应,致使肿瘤细胞增殖受到抑制甚至杀死肿瘤细胞^[8-10]。因此,抑制Akt/mTOR信号通路调控的糖酵解途径,降低肿瘤细胞的能量供应可能成为治疗ICC的一种有效策略。

葫芦素B(CuB)是一种天然四环三萜类化合物,存在于葫芦科和十字花科等科植物中^[11]。越来越多的研究表明天然中药不良反应较小,在肿瘤治

疗方面的优势日益凸显。CuB具有保护肝、消炎和抗肿瘤等多种生物学活性,对多种癌症具有抑制作用,包括乳腺癌^[12]、肺癌^[13]和肝癌^[12]等。另外,研究证实,CuB可以抑制巨噬细胞中的糖酵解关键酶己糖激酶1(HK1)等的表达^[14]。ZHOU等^[15]研究发现,CuB可以通过调控Akt/mTOR通路抑制胰腺癌细胞的增殖。然而,CuB对肝内胆管癌的治疗作用及机制尚无报道。本实验以HuCCT1细胞为研究对象,探究CuB对HuCCT1细胞增殖及糖酵解水平的影响及其潜在的分子机制,为CuB应用于临床肝内胆管癌的治疗提供了理论依据。

1 材料

1.1 细胞 人ICC细胞HuCCT1购自上海信裕生物科技有限公司。细胞编号为20161209-06,传至5~7代。

1.2 试剂 葫芦素B(纯度≥98%,成都普思生物科技股份有限公司,批号PS010049),RPMI 1640培养基、0.25%胰蛋白酶、青-链霉素(美国Hyclone公司,批号分别为AG29546226、J200033、J120017),胎牛血清(美国Gibco公司,批号2059461RP),细胞增殖与活性检测-8(CCK-8)试剂盒(日本同仁化学研究所,批号KQ749),结晶紫(美国Sigma公司,批号SLBP0250V),细胞周期试剂盒(广州捷倍斯生物科

技术有限公司,批号EG20201109),组织细胞葡萄糖氧化酶测定试剂盒(北京普利莱基因技术有限公司,批号E1011),乳酸、三磷酸腺苷(ATP)、己糖激酶(HK)、丙酮酸激酶(PK)检测试剂盒(索莱宝生物科技有限公司,批号分别为20200612、BC0305、BC0745、20210610),M-PERTM哺乳动物蛋白抽提试剂、BCA蛋白定量试剂盒、ECL超敏化学发光液(美国Thermo Fisher Scientific公司,批号分别为V1311347、SI251119、VF304274),兔源磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(p-mTOR)单克隆抗体、兔源核糖体蛋白(RPS6)单克隆抗体(英国Abcam公司,货号分别为ab109268、ab225676),兔源蛋白激酶B(t-Akt)多克隆抗体、周期蛋白B₁(CyclinB₁)单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记鼠源β-肌动蛋白(β-actin)单克隆抗体(中国Proteintech公司,货号分别为10176-2-AP、11554-1-AP、HRP-60008),兔源磷酸化蛋白激酶B(p-Akt)单克隆抗体、总-Akt(t-Akt)单克隆抗体兔源磷酸化核糖体蛋白(p-RPS6)单克隆抗体、兔源己糖激酶1(HK1)单克隆抗体、兔源己糖激酶2(HK2)单克隆抗体、兔源丙酮酸激酶1(PKM1)单克隆抗体、兔源丙酮酸激酶2(PKM2)单克隆抗体、兔源增殖细胞核抗原(PCNA)单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠IgG二抗(美国Cell Signaling Technology公司,货号分别为13038、13037、4858、2024、2867、7067、4053、13110、7074、7076),十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶试剂盒(美国EpiZyme Scientific公司,批号18D250)。

1.3 仪器 MCO-15AC型CO₂细胞培养箱(日本Sanyo公司),VCX750型超声波破碎仪(美国Sonics公司),CKX31型倒置显微镜、TC20型细胞计数器(日本Olympus公司),Trans-Blot Turbo™型全能型蛋白转膜仪、Power Pac Basic型电泳仪、xMark型全波长酶标仪(美国Bio-Rad公司),G-BOX型成像分析系统(英国Syngene公司),NovoCyte D2060R型流式细胞仪(艾森生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 葫芦素B母液的配制 精密称取葫芦素B原料药13.97 mg溶于DMSO 5 mL中,配成浓度为5 mmol·L⁻¹的CuB母液,0.22 μm微孔滤膜滤过,避光保存于4℃。使用时用培养基稀释。

2.2 CCK-8法检测细胞增殖 取对数生长期人肝内胆管癌细胞HuCCCT1,以细胞数5 000个/孔种植

于96孔板中。设置药物组、溶剂组(不含药物)和空白组(只含空白培养基)。培养箱培养过夜后药物组加入一系列浓度梯度的CuB,溶剂组加入等体积的培养基。每个剂量设6个复孔。分别培养24、48 h,每孔加入CCK-8溶液10 μL,继续培养2 h,用酶标仪在450 nm处测定吸光度A,计算细胞存活率。细胞存活率=(A_{给药}-A_{空白})/(A_{溶剂}-A_{空白})×100%,并计算CuB给药24、48 h的半数抑制浓度(IC₅₀)。根据IC₅₀设置后续实验的给药浓度,设置低、中、高3个浓度。

2.3 平板克隆实验检测细胞集落形成能力 取对数生长期的肝内胆管癌细胞HuCCCT1,以细胞数1 000个/孔种植于6孔板中,使细胞单个均匀分布于孔中。每2 d换液,设置50、100、200 nmol·L⁻¹ CuB组和空白组。培养细胞直至肉眼能看到板底长出的白色小点,在显微镜下看到细胞集落成团,且空白组绝大部分细胞落中细胞数≥50个时,即视为集落形成。PBS清洗2次,4%多聚甲醛固定15 min后加入结晶紫染液1 mL于每孔中染色15 min,放入清水中清洗干净残留在6孔板中的染液,沥干水分。显微镜拍摄记录每孔集落的大致情况,显微镜下数1 cm²正方格内细胞集落数(黏连在一起的多个细胞落算作多个,边角处数上不数下,数左不数右),再乘以每个孔的面积即为总的细胞集落数。

2.4 流式细胞术检测细胞周期 取对数生长期的肝内胆管癌细胞,接种于5 cm培养皿中,细胞分组及给药同2.3项。收集细胞悬液,1 000 r·min⁻¹离心5 min(离心半径12 cm,下同),重悬细胞沉淀转移至1.5 mL离心管中。加入在4℃预冷过的70%乙醇1 mL重悬细胞,在4℃条件下固定细胞2 h。1 000 r·min⁻¹离心5 min,染色缓冲液0.5 mL重悬细胞,加入碘化丙啶染色液25 μL和RNase A酶10 μL,混匀。锡箔纸包裹离心管避光,于37℃孵育30 min后上流式细胞仪检测。

2.5 可见分光光度法检测细胞葡萄糖消耗量及ATP、乳酸生成量 取对数生长期的肝内胆管癌细胞,种植于直径为5 cm的培养皿中,细胞分组及给药同2.3项。收集培养基并离心后取上清液,按照说明书处理后,使用酶标仪检测各孔505 nm波长的葡萄糖和550 nm波长乳酸A,根据说明书计算各组细胞葡萄糖消耗量及乳酸生成量。收集细胞悬液并计数,按照ATP检测试剂盒说明书进行操作,计算各组细胞内ATP水平。

2.6 可见分光光度法检测细胞HK、PK活力 取对

数生长期的肝内胆管癌细胞,种植于直径为5 cm的培养皿中,细胞分组及给药同2.3项。收集细胞悬液并计数,按照HK、PK检测试剂盒说明书进行操作,计算各组细胞内HK和PK活力。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Akt/mTOR及糖酵解相关蛋白的表达 用细胞裂解液充分裂解细胞,提取总蛋白,在SDS聚丙烯酰胺凝胶中电泳,PVDF膜转膜,5%的脱脂奶粉封闭非特异性抗原后,加一抗(按1:1 000),4℃孵育24 h,加入相应二抗(1:1万),室温孵育2 h,加入A发光液、B发光液各200 μL混匀后显影;扫描电泳条带,以β-actin(1:6 000)为内参,目的条带与内参条带比值表示目的蛋白相对表达量。

2.8 统计学分析 使用Graphpad Prism 7.0软件作图并统计分析,所有实验均重复3次。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数采用t检验比较,多组均数间采用One-way ANOVA检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CuB对HuCC1细胞增殖的影响 CuB给药24 h、48 h后对HuCC1细胞的抑制率随着给药浓度的上升而逐渐增加,且随着给药时间延长,对细胞的抑制率增加。与空白组比较,给药24 h,160~800 nmol·L⁻¹CuB组细胞生长活力明显抑制($P < 0.05$, $P < 0.01$),给药48 h,80~800 nmol·L⁻¹CuB细胞生长活力明显抑制($P < 0.05$, $P < 0.01$)。通过Grapad Prism7.0软件计算得HuCC1细胞24、48 h的IC₅₀分别为440、200 nmol·L⁻¹。后续实验选用50、100、200 nmol·L⁻¹CuB进行。见表1。

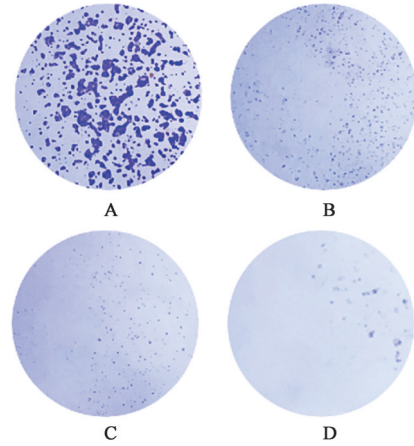
表1 CuB对HuCC1细胞生长的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/nmol·L ⁻¹	24 h抑制率/%	48 h抑制率/%
空白组		0.00±0.85	0.00±1.68
CuB组	40	5.64±1.15	6.78±4.26
	80	7.42±3.12	10.13±0.97 ¹⁾
	120	10.16±2.45	23.10±3.24 ²⁾
	160	17.66±1.95 ²⁾	29.60±3.612 ²⁾
	200	39.06±3.96 ¹⁾	52.18±4.12 ²⁾
	400	52.43±4.12 ²⁾	69.90±7.84 ¹⁾
	800	57.36±2.21 ²⁾	81.39±2.07 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表2-表6同)

3.2 CuB对HuCC1细胞集落形成能力的影响 随着给药浓度增加,HuCC1细胞集落形成数逐

渐降低。与空白组比较,50、100、200 nmol·L⁻¹CuB组的克隆形成率显著降低($P < 0.01$),表明CuB能够抑制HuCC1细胞集落形成能力及细胞的增殖。见图1、表2。



注:A.空白组;B~D. CuB组(50、100、200 nmol·L⁻¹)(图2-图4同)

图1 CuB对HuCC1细胞集落形成能力的影响(显微镜,×10)

Fig. 1 Effect of CuB on colony formation of HuCC1 cells (microscope, ×10)

表2 CuB对HuCC1细胞克隆形成率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of CuB on colony formation rate of HuCC1 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/nmol·L ⁻¹	克隆形成率/%
空白组		100.00±0.00
CuB组	50	13.39±4.26 ²⁾
	100	5.36±4.34 ²⁾
	200	0.82±0.44 ²⁾

3.3 CuB对HuCC1细胞周期于G₂期的影响 与空白组比较,CuB给药后HuCC1细胞G₂期细胞数目明显增多,且随着给药浓度的增加G₂期细胞逐渐增多($P < 0.05$, $P < 0.01$),表明CuB将HuCC1细胞周期阻滞于G₂期。并且Western blot结果显示,G₂期相关的特异性周期蛋白Cyclin B₁和增殖蛋白PCNA的表达与流式细胞仪结果相符。与空白组比较,CuB给药显著降低了G₂期相关的特异性周期蛋白Cyclin B₁和增殖蛋白PCNA的表达($P < 0.01$)。见图2、表3、表4。

3.4 CuB抑制HUCCT1细胞的葡萄糖消耗量及ATP和乳酸的生成的影响 与空白组比较,CuB给药后,HuCC1细胞葡萄糖消耗量、ATP和乳酸的生成呈浓度依赖性下降($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表5。

3.5 CuB对HuCC1细胞中糖酵解相关酶的表达和活性的影响 与空白组比较,CuB给药后

表3 CuB对HuCCCT1细胞周期的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Effect of CuB on cell cycle of HuCCCT1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/nmol·L ⁻¹	G ₂ 期/%
空白组		17.33±1.53
CuB组	50	22.67±1.53 ¹⁾
	100	32.33±2.52 ²⁾
	200	52.67±2.89 ²⁾

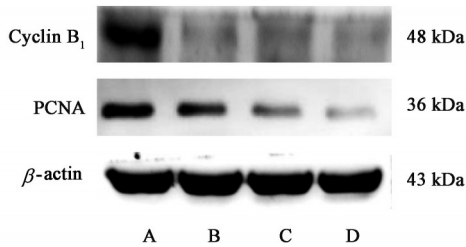


图2 CuB给药后HuCCCT1细胞Cyclin B₁和PCNA蛋白表达电泳
Fig. 2 Electrophoresis of Cyclin B₁ and PCNA protein expression in HuCCCT1 cells after CuB administration

表5 CuB对HuCCCT1细胞葡萄糖消耗量、ATP和乳酸生成量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Effect of CuB on glucose consumption, ATP and lactate production in HuCCCT1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/nmol·L ⁻¹	葡萄糖消耗量/mmole·(10 ⁶ cell) ⁻¹	ATP生成量/mmole·(10 ⁴ cell) ⁻¹	乳酸生成量/mmole·(10 ⁴ cell) ⁻¹
空白组		16.07±0.30	2.02±0.13	8.03±0.09
CuB组	50	13.71±0.26 ²⁾	1.86±0.13	6.57±0.58
	100	12.74±0.23 ²⁾	1.55±0.07 ¹⁾	5.37±0.36 ²⁾
	200	9.19±0.15 ²⁾	0.92±0.17 ²⁾	0.19±0.18 ²⁾

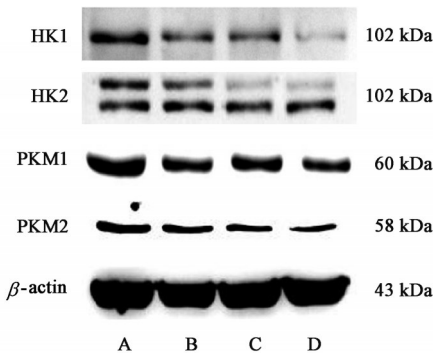


图3 CuB给药后HuCCCT1细胞糖酵解关键酶表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of CuB on expression of key glycolysis enzymes in HuCCCT1 cells

3.6 CuB对HuCCCT1细胞中Akt/mTOR信号通路的活化的影响 与空白组比较, CuB组 p-Akt、p-mTOR、p-RPS6蛋白表达水平均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05, P<0.01$), t-Akt、RPS6水平差异无统计学意义。实验结果表明, CuB抑制了HuCCCT1细胞中Akt/mTOR信号通路的活化。见表7、图4。

表4 CuB对HuCCCT1细胞Cyclin B₁和PCNA蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of CuB on expression of Cyclin B₁ and PCNA proteins in HuCCCT1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/nmol·L ⁻¹	CyclinB ₁ /β-actin	PCNA/β-actin
空白组		0.98±0.08	0.46±0.02
CuB组	50	0.36±0.04 ²⁾	0.35±0.01 ²⁾
	100	0.26±0.08 ²⁾	0.19±0.02 ²⁾
	200	0.16±0.02 ²⁾	0.10±0.01 ²⁾

HuCCCT1细胞中糖酵解关键酶HK1、HK2、PKM1、PKM2的表达均明显降低 ($P<0.05, P<0.01$), 表明CuB可以抑制HuCCCT1细胞糖酵解相关酶的表达。而糖酵解进程不仅与酶的含量有关, 也与酶的活性有关, 因此进一步检测了CuB对HuCCCT1细胞糖酵解关键酶活力的影响。结果表明, 与空白组比较, HK、PK的活力明显下降 ($P<0.05, P<0.01$), 并呈浓度依赖性。见图3、表6。

4 讨论

药物对肿瘤细胞增殖的作用是抗肿瘤药物研究的基础, 而肿瘤细胞增殖时从生长到分裂的过程称为细胞周期。CuB对多种肿瘤细胞增殖具有抑制作用, 尤其是肝癌^[16]和胆管癌^[17]。本研究中CCK-8和平板克隆结果表明, CuB可以抑制HuCCCT1细胞增殖, 同时流式细胞仪结果和Western blot结果显示CuB可以将HuCCCT1细胞周期阻滞于G₂期。

肿瘤细胞增殖需要肿瘤细胞的代谢重编程, 以满足增加的生物能量和生物合成的需求, 并减轻肿瘤细胞增殖和存活所需的氧化应激^[16]。研究发现, 在许多人类恶性肿瘤中可以观察到糖酵解过度激活^[17], 抑制糖酵解可有效抑制恶性肿瘤的增殖。WARBURG等^[5]提出正常细胞的生长主要依靠氧化磷酸化, 而肿瘤细胞生长的能量主要是葡萄糖经糖酵解获得。虽然此过程中产生的ATP含量低于氧化磷酸化反应, 但肿瘤细胞中的糖酵解水平远高于正常细胞。同时, 肿瘤细胞也会通过增加葡萄糖摄

表6 CuB对HuCC1细胞HK、PK表达及活性的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Effect of CuB on expression and activity of HK and PK in HuCC1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度 /nmol·L ⁻¹	蛋白表达				酶活性	
		HK1/ β -actin	HK2/ β -actin	PKM1/ β -actin	PKM2/ β -actin	HK/U/10 ⁻⁴ cell	PK/ U/10 ⁻⁴ cell
空白组		0.58±0.05	0.39±0.01	0.70±0.10	0.24±0.01	0.67±0.04	3.4±0.39
CuB组	50	0.56±0.07	0.46±0.04 ¹⁾	0.62±0.08 ¹⁾	0.23±0.02	0.49±0.03 ²⁾	2.79±0.56 ¹⁾
	100	0.19±0.03 ²⁾	0.27±0.01 ²⁾	0.39±0.09 ²⁾	0.15±0.01 ²⁾	0.36±0.02 ²⁾	2.42±0.26 ²⁾
	200	0.11±0.02 ²⁾	0.26±0.02 ²⁾	0.25±0.03 ²⁾	0.12±0.01 ²⁾	0.16±0.02 ²⁾	1.87±0.3 ²⁾

表7 CuB对HuCC1细胞中Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 7 Effect of CuB on expression of Akt/mTOR signaling pathway related proteins in HuCC1 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/nmol·L ⁻¹	p-Akt/ β -actin	t-Akt/ β -actin	p-RPS6/ β -actin	p-mTOR/ β -actin	RPS6/ β -actin
空白组		0.29±0.01	0.34±0.01	2.58±0.03	0.30±0.01	0.30±0.01
CuB组	50	0.30±0.02 ¹⁾	0.40±0.03	2.57±0.11	0.25±0.02 ¹⁾	0.36±0.04
	100	0.22±0.02 ¹⁾	0.41±0.03	1.79±0.02 ¹⁾	0.13±0.01 ²⁾	0.30±0.02
	200	0.13±0.01 ²⁾	0.37±0.01	1.66±0.05 ²⁾	0.10±0.01 ²⁾	0.29±0.03

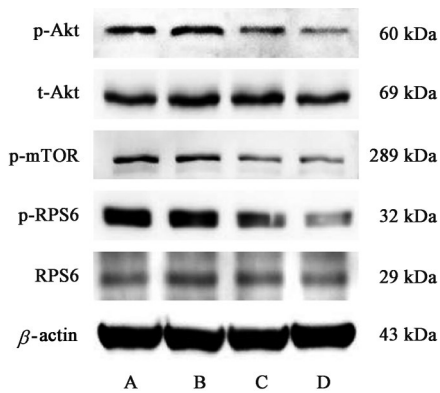


图4 CuB给药后HuCC1细胞中Akt/mTOR信号通路相关蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of Akt/mTOR signaling pathway-related protein expression in HuCC1 cells after CuB administration

取来促进糖酵解途径。且与正常细胞比较,肿瘤细胞即使在氧气充足的条件下,也优先通过糖酵解途径产生能量,因此糖酵解是癌细胞最基本的生化特征之一^[18]。由糖酵解产生的丙酮酸可以直接进入三羧酸循环途径或者由LDHA转化为乳酸^[19]。

糖酵解途径是组织中葡萄糖经酶催化降解等一系列的反应过程^[20],HK和PK是糖酵解进程中的关键酶。葡萄糖通过HK磷酸化为不能透过细胞膜的葡萄糖-6-磷酸,从而将其限制在细胞内。LEE等^[21]发现HK2在ICC中高表达,而已糖激酶抑制剂BNBZ可以直接靶向HK2来抑制体内外的糖酵解和乳腺癌细胞的增殖^[22]。PKM2是糖酵解途径中的主要限速酶之一,PKM2的过表达在糖酵解中具有至关重要的意义^[23]。QIAN等^[24]发现PKM2在ICC中表达上调,且敲除了ICC细胞中的PKM2后抑制

了细胞的增殖、侵袭和转移。本研究结果显示,HuCC1细胞糖酵解处于高度激活状态,CuB可以降低HuCC1细胞的葡萄糖摄取量,及ATP和乳酸的生成,并且可以降低HK和PK的表达和酶活力。以上结果说明CuB可以降低HuCC1细胞糖酵解相关酶的表达水平及活力,抑制糖酵解途径,减少葡萄糖摄取量、乳酸生成量和ATP生成量,从而有效抑制肝内胆管癌细胞快速增殖。

研究表明,Akt/mTOR通路在肿瘤细胞糖酵解进程中发挥重要作用^[25-26]。Akt被磷酸肌醇(PI)-3-激酶(PI3K)通过磷酸化激活,磷酸化后,Akt激活关键的下游效应子mTOR。作为催化亚基,mTOR与mTOR的调控相关蛋白(RAPTOR)一起形成mTOR complex1(mTORC1),与不依赖雷帕霉素的mTOR(RICTOR)伴侣形成mTORC2。mTORC1磷酸化p70核糖体蛋白S6激酶(p70S6K)和真核生物起始因子4E结合蛋白1(4EBP1),后者激活核糖体蛋白S6(RPS6)并缓解真核生物起始因子4E(eIF4E)。这导致mRNA翻译和蛋白质合成增加,从而导致细胞增殖和生长。mTORC2通过激活包括Akt在内的几种激酶发挥其细胞增殖和促进生存的作用^[27]。研究发现,Akt/mTOR/HK2介导的糖酵解能够促进THCA(甲状腺癌)细胞的增殖和迁移^[28]。本研究结果显示,CuB能够抑制HuCC1细胞Akt/mTOR通路。综上,本研究证实CuB可能通过Akt/mTOR通路抑制HuCC1细胞糖酵解进而影响细胞增殖。

本文将肿瘤细胞增殖与能量代谢联系起来,阐述了CuB抑制肿瘤细胞生长的分子机制,提示CuB

抑制肿瘤细胞能量代谢可能作为抑制肝内胆管癌的有效治疗方法。研究证实 HIF-1 α 是协调糖酵解酶表达的关键转录因子^[29-32], Akt/mTOR 通路调控 HIF-1 α 的转录和翻译^[33], 因此课题组后续将结合体内实验并采用激动剂和抑制剂更加深入地探究 Akt/mTOR 通路与 HIF-1 α 及糖酵解的关系, 以阐明 CuB 防治肿瘤的作用机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] BLECHACZ B, KOMUTA M, ROSKAMS T, et al. Clinical diagnosis and staging of cholangiocarcinoma [J]. *Nat Rev Gastro Hepat*, 2011, 8(9):512-522.
- [2] 王葵, 沈锋. 肝内胆管癌的诊治进展[J]. *肝胆外科杂志*, 2019, 27(1):1-6.
- [3] PATEL T. Worldwide trends in mortality from biliary tract malignancies[J]. *BMC Cancer*, 2002, 2(1):1-5.
- [4] HANAHAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: The next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5):646-674.
- [5] WARBURG O, WIND F, NEGELEIN E. The metabolism of tumors in the body[J]. *J Gen Physiol*, 1927, 8(6):519-530.
- [6] 魏妙艳, 汤朝晖, 全志伟. 代谢在肝内胆管癌发病机制及临床诊治中的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2017, 25(33):2929-2937.
- [7] LUU M, PAUTZ S, KOHL V, et al. The short-chain fatty acid pentanoate suppresses autoimmunity by modulating the metabolic-epigenetic crosstalk in lymphocytes[J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1):1-12.
- [8] ZHU W, LI Y, ZHAO D, et al. Dihydroartemisinin suppresses glycolysis of LNCaP cells by inhibiting PI3K/Akt pathway and downregulating HIF-1 α expression [J]. *Life Sci*, 2019, doi: 10.1016/j.lfs. 2019. 116730.
- [9] DENG X, ZHAO J, QU L, et al. Ginsenoside Rh₄ suppresses aerobic glycolysis and the expression of PD-L1 via targeting Akt in esophageal cancer [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, doi: 10.1016/j.bcp. 2020. 114038.
- [10] WU H, ZHAO H, CHEN L. Deoxyshikonin inhibits viability and glycolysis by suppressing the Akt/mTOR pathway in acute myeloid leukemia cells [J]. *Front Oncol*, 2020, doi:10.3389/fonc.2020.01253.
- [11] UENO M, KARIYA R, SITITHUMCHARIEE G, et al. Cucurbitacin B induces apoptosis of primary effusion lymphoma via disruption of cytoskeletal organization[J]. *Phytomedicine*, 2021, doi:10.1016/j.phymed. 2021. 153545.
- [12] 徐菲, 曾杨丽, 李娟, 等. 中药复方防治肝癌作用机制研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(24):196-204.
- [13] LIU P, XIANG Y, LIU X, et al. Cucurbitacin B induces the lysosomal degradation of EGFR and suppresses the CIP2A/PP2A/Akt signaling axis in gefitinib-resistant non-small cell lung cancer [J]. *Molecules*, 2019, 24(3):647.
- [14] XUE Y, LI R, FANG P, et al. NLRP3 inflammasome inhibitor cucurbitacin B suppresses gout arthritis in mice[J]. *J Mol Endocrinol*, 2021, 67(2):27-40.
- [15] ZHOU J, ZHAO T, MA L, et al. Cucurbitacin B and SCH772984 exhibit synergistic anti-pancreatic cancer activities by suppressing EGFR, PI3K/Akt/mTOR, STAT3 and ERK signaling [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(61):103167-103181.
- [16] MARTINEZ-REYES I, CHANDEL N S. Cancer metabolism: Looking forward [J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(10):669-680.
- [17] THONSRI U, SEUBWAI W, WARAASAWAPATI S, et al. Overexpression of lactate dehydrogenase A in cholangiocarcinoma is correlated with poor prognosis [J]. *Histol Histopathol*, 2017, 32(5):503-510.
- [18] GONG X, TANG H, YANG K. PER1 suppresses glycolysis and cell proliferation in oral squamous cell carcinoma via the PER1/RACK1/PI3K signaling complex[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(3):276.
- [19] MARCUCCI F, RUMIO C. Glycolysis-induced drug resistance in tumors-A response to danger signals?[J]. *Neoplasia*, 2021, 23(2):234-245.
- [20] 严家文, 钟俊, 王国成, 等. 靶向肿瘤糖酵解途径用于肿瘤治疗的研究进展[J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(5):550-556.
- [21] LEE J D, YANG W I, PARK Y N, et al. Different glucose uptake and glycolytic mechanisms between hepatocellular carcinoma and intrahepatic mass-forming cholangiocarcinoma with increased (18) F-FDG uptake [J]. *J Nucl Med*, 2005, 46(10):1753-1759.
- [22] ZHENG M, WU C, YANG K, et al. Novel selective hexokinase 2 inhibitor Benitrobenrazide blocks cancer cells growth by targeting glycolysis [J]. *Pharmacol Res*, 2021, doi:10.1016/j.phrs.2020.105367.
- [23] QIAO H, HE X, ZHANG Q, et al. Alpha-synuclein induces microglial migration via PKM2-dependent glycolysis [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, doi:

- 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.02.
- [24] QIAN Z, HU W, LV Z, et al. PKM2 upregulation promotes malignancy and indicates poor prognosis for intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Clin Res Hepatol Gas, 2020, 44(2):162-173.
- [25] JIA L, HUANG S, YIN X, et al. Quercetin suppresses the mobility of breast cancer by suppressing glycolysis through Akt/mTOR pathway mediated autophagy induction[J]. Life Sci, 2018, doi:10.1016/j.lfs.2018.07.027.
- [26] CHEN M, ZHU Z, LV Y, et al. Effects and possible mechanism of inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway on glycolysis of gastric adenocarcinoma cell lines[J]. Gastroenterology, 2014, 146(5):S328-S329.
- [27] ZHANG S, SONG X, CAO D, et al. Pan-mTOR inhibitor MLN0128 is effective against intrahepatic cholangiocarcinoma in mice[J]. J Hepatol, 2017, 67(6):1194-1203.
- [28] HUANG J, GAO W, LIU H, et al. Up-regulated ANP32E promotes the thyroid carcinoma cell proliferation and migration via activating Akt/mTOR/HK2-mediated glycolysis [J]. Gene, 2020, doi:10.1016/j.gene.2020.144681.
- [29] LIU G, BI Y, SHEN B, et al. SIRT1 limits the function and fate of myeloid-derived suppressor cells in tumors by orchestrating HIF-1alpha-dependent glycolysis[J]. Cancer Res, 2014, 74(3):727-737.
- [30] SHI L Z, WANG R, HUANG G, et al. HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells[J]. J Exp Med, 2011, 208(7):1367-1376.
- [31] DANG E V, BARBI J, YANG H Y, et al. Control of T_H17/T_{reg} balance by hypoxia-inducible factor 1 [J]. Cell, 2011, 146(5):772-784.
- [32] CORZO C A, CONDAMINE T, LU L, et al. HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment [J]. J Exp Med, 2010, 207(11):2439-2453.
- [33] LUO J, SUN P, ZHANG X, et al. Canagliflozin modulates hypoxia-induced metastasis, angiogenesis and glycolysis by decreasing HIF-1alpha protein synthesis via Akt/mTOR pathway [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(24):13336.

[责任编辑 张丰丰]