

# 褐藻素诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬的机制

廖政邦<sup>1</sup>, 李明<sup>2</sup>, 谢松强<sup>2\*</sup>

(1. 广东省东莞市太平人民医院, 广东 东莞 523900;  
2. 河南大学药学院化学生物学研究所, 河南 开封 475004)

**[摘要]** **目的:**探讨褐藻素诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬的分子机制。**方法:**MTT 法检测细胞增殖, 流式细胞仪检测细胞凋亡, 高内涵活细胞成像系统检测细胞自噬, Western blotting 检测蛋白的表达。**结果:**褐藻素剂量依赖性地抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖, 诱导 Beclin 1 表达显著增强、促进 LC3 I 转化为 LC3 II 以及自噬溶酶体的形成; 褐藻素剂量依赖性地增加 Annexin V 染色阳性细胞数量、诱导 Caspase-3 活化、线粒体膜电位下降并伴随 Cytochrome c 从线粒体释放到细胞浆中、上调 Bax 和 PTEN 的表达及下调 Bcl-2 的表达, 抑制 Akt、p70S6K 及 mTOR 的磷酸化; 自噬抑制剂 3-MA 可增加褐藻素诱导的细胞凋亡率, 并促进 Caspase-3 的活化。**结论:**褐藻素通过抑制 Akt 信号通路诱导肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬, 且该自噬抑制细胞凋亡。

**[关键词]** 凋亡; 自噬; 褐藻素; 肝癌

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)15-0181-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014150181

## Fucoxanthin Induced Hepatoma HepG2 Cells Apoptosis, Autophagy and It's Mechanism

LIAO Zheng-bang<sup>1</sup>, LI Ming<sup>2</sup>, XIE Song-qiang<sup>2\*</sup>

(1. Taiping People' Hospital, Dongguan 523900, China;

2. Institute of Chemical Biology, Pharmaceutical College of Henan University, Kaifeng 475004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the antiproliferative effects of fucoxanthin, a major carotenoid found in edible seaweed, and also to elucidate the molecular mechanism on hepatoma HepG2 cells. **Method:** The antiproliferative effects of fucoxanthin was evaluated using MTT assay. Fucoxanthin-mediated cell apoptosis was evaluated using Flow Cytometer. Autophagy detection with acridine orange staining and Lyso-Tracker Red staining by High Content Screening (HCS). The protein expression was detected using Western blotting. **Result:** Fucoxanthin exerts potent antiproliferative activity on HepG2 cells in a dose-dependent manner. Furthermore, fucoxanthin induces HepG2 cells autophagy and apoptosis. After treatment with fucoxanthin, the protein expression of LC3 II and Beclin 1 were enhanced. Furthermore, fucoxanthin induced cell apoptosis, Caspase-3 activation, mitochondrial membrane potential decrease, cytochrome C release from mitochondria to cytoplasm, upregulation the protein expression of Bax and PTEN, downregulation the protein expression of Bcl-2, and also inhibited the phosphorylation of Akt, p70S6K and mTOR. Whereas 3-methyladenine (3-MA), a phosphatidylinositol 3-phosphate kinase inhibitor, enhanced the fucoxanthin-mediated apoptosis and caspase-3 activation. **Conclusion:** Fucoxanthin-mediated autophagy and apoptosis were due to inhibition of Akt signal pathway in HepG2 cells.

**[Key words]** apoptosis; autophagy; fucoxanthin; hepatoma

**[收稿日期]** 20140317 (009)

**[基金项目]** 河南省科技厅基础与前沿技术研究 (102300410095)

**[第一作者]** 廖政邦, 主管药师, 从事医院药学研究, Tel:13713088382, E-mail: tplzb2008@163.com

**[通讯作者]** \* 谢松强, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事肿瘤药理学研究, Tel:0378-22864665, E-mail: xiesq@henu.edu.cn

褐藻素 (fucoxanthin, Fu) 为海带科植物昆布、裙带菜等的类胡萝卜素成分,具有软坚散结、消痰、利水之功效<sup>[1]</sup>。褐藻素药理作用广泛,如抗氧化、抗肥胖、抗炎及抗肿瘤等<sup>[2-4]</sup>。研究表明褐藻素抗肿瘤谱较广,如对宫颈癌、前列腺癌、淋巴瘤、胃癌等均具有较强的生长抑制作用。其诱导肿瘤细胞的死亡方式不尽相同,如可诱导淋巴瘤、胃癌细胞凋亡,但诱导宫颈癌细胞自噬<sup>[5-8]</sup>,对于肝癌细胞的研究比较少。由于我国肝癌的发病率和死亡率较高,故本实验选用肝癌 HepG2 细胞为研究对象,以期探讨褐藻素抗肝癌作用及其分子机制。结果表明褐藻素可诱导 HepG2 细胞凋亡和自噬,但该自噬抑制细胞凋亡,如预孵自噬抑制剂 3-MA 后,褐藻素诱导 HepG2 细胞的凋亡率明显增加,这为褐藻素治疗肝癌进一步提供了新的实验依据。

## 1 材料

**1.1 药品与试剂** 胰蛋白酶、RPMI1640、胎牛血清购于 Gibco 公司 (Grand Island, NY, USA), MTT、吖啶橙、褐藻素、3-methyl adenine (3-MA) 购于 Sigma (St. Louis, MO, USA), AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 6592s) 和一抗如 phospho-Akt (批号 9271s), PTEN (批号 9551s), phospho-p70S6 kinase (p-p70S6K, Thr389, 批号 9205s), phospho-mTOR (p-mTOR, 批号 2974s) 购于 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA), 一抗如 Beclin 1 (批号 SC-11427) 和 LC3 (批号 SC-28266) 以及辣根过氧化物酶标记的抗鼠或抗兔二抗购于 Santa Cruz Biotechnologies (Santa Cruz, CA, USA), Lyso-Tracker Red 和 Hoechst33342 购于碧云天生物技术研究所 (海门, 中国)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** HepG2 肝癌细胞购于中科院上海细胞生物学研究所,用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养,取对数生长期细胞用于实验。

**2.2 MTT 测试** 以每孔 5 000 个细胞接种于 96 孔板培养 12 h 后,加入不同浓度的褐藻素。48 h 后每孔加入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液  $10 \mu\text{L}$ ,继续培养 4 h 后弃培养液,每孔加入  $100 \mu\text{L}$  二甲基亚砷,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  震荡 30 min 后用酶标仪在 570 nm 波长处测其吸光度,按公式计算细胞抑制率:细胞抑制率 =  $(1 - \text{实验组吸光度} / \text{对照组吸光度}) \times 100\%$ <sup>[7]</sup>。

**2.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率** 经褐藻素作用 48 h 后离心 ( $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 5 min) 收集细胞。PBS 洗涤细胞 1 次 ( $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ , 离心 5 min), 加

入 Binding Buffer 悬浮细胞液  $500 \mu\text{L}$ 。加入 Annexin V-FITC  $5 \mu\text{L}$  混匀后,再加入碘化丙啶  $5 \mu\text{L}$  混匀。室温,避光,反应 15 min,流式细胞仪的检测细胞凋亡率 (激发波长 488 nm,发射波长 530 nm)<sup>[7]</sup>。

**2.4 高内涵活细胞成像系统检测细胞自噬** 收集经褐藻素处理 48 h 后的细胞,应用溶酶体特异性荧光染料 Lyso-Tracker Red ( $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育 45 min 后 Hoechst 33342 ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 复染 15 min,离心后应用高内涵活细胞成像系统检测细胞内溶酶体数量变化。此外,吖啶橙 ( $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 室温染色 15 min,离心后应用高内涵活细胞成像系统进一步检测细胞自噬体,吖啶橙由绿色荧光转换为红色荧光提示有酸性的自噬溶酶体形成。抑制自噬时,在加入褐藻素前 2 h 预孵育 3-MA ( $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )<sup>[7]</sup>。

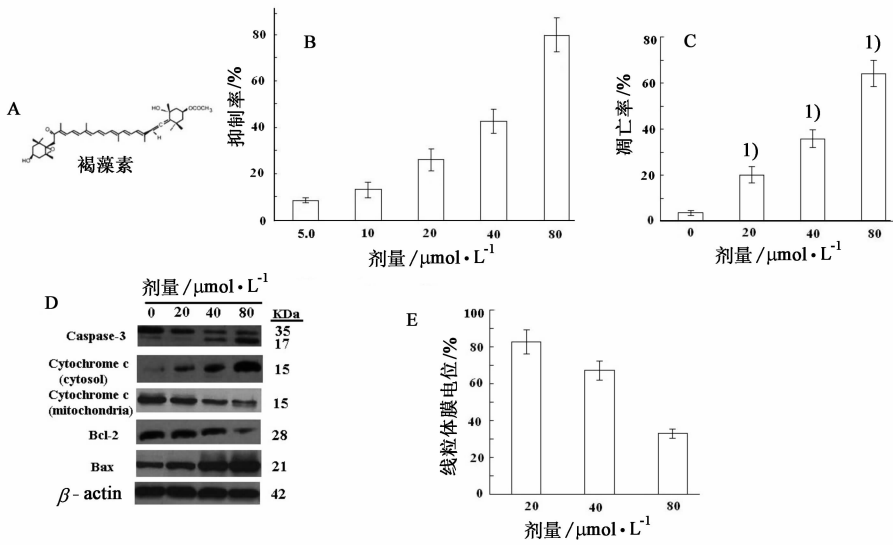
**2.5 Western blotting 检测蛋白的表达** 收集经褐藻素处理 48 h 后的细胞,加入细胞裂解液 (碧云天),冰上裂解 30 min,于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $12\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min,取上清液。蛋白定量后分别取  $50 \mu\text{g}$  蛋白加入上样缓冲液,  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  变性 10 min。12% 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳后,电转移至硝酸纤维素膜上,5% 脱脂奶粉封闭后依次加入一抗和二抗,室温孵育 2 h, TBST 缓冲液洗涤 5 次,每次 10 min。加入化学发光试剂后放入暗盒中压片并依次显影、定影、摄像<sup>[7]</sup>。

**2.6 统计学分析** 所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,应用 SPSS 12.0 统计包进行单因素方差分析,以  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 3 结果

**3.1 褐藻素诱导 HepG2 细胞凋亡** HepG2 细胞经不同浓度的褐藻素作用 48 h 后,细胞增殖均受到不同程度地抑制,且抑制率随剂量的增加而增强,  $\text{IC}_{50}$  为  $(48.3 \pm 5.2) \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (图 1B)。AnnexinV/PI 双染表明褐藻素剂量依赖性地增加 Annexin V 染色阳性细胞数量,提示褐藻素可以引起 HepG2 细胞凋亡 (图 1C)。Western blotting 结果表明褐藻素引起 Caspase-3 活化,进一步证明了褐藻素可以引起 HepG2 细胞凋亡 (图 1D)。此外,褐藻素剂量依赖性地诱导 HepG2 细胞线粒体膜电位下降 (图 1E),并伴发 Cytochrome c 从线粒体释放到细胞浆中,同时抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达降低而促凋亡蛋白 Bax 表达增加,提示线粒体及 Bcl-2 家族成员参与了该凋亡过程 (图 1D)。

**3.2 褐藻素诱导 HepG2 细胞自噬** 经褐藻素作用 48 h 后, Lyso-Tracker Red 红色荧光剂量依赖性地增强,提示褐藻素诱导了 HepG2 细胞溶酶体数量的增



A. 褐藻素的化学结构; B. 褐藻素作用 HepG2 细胞 48 h 后产生较强的抗增殖作用; C. 褐藻素诱导 HepG2 细胞凋亡(与对照组相比<sup>1)</sup> $P < 0.01$ ); D. 褐藻素作用 HepG2 细胞 48 h 后诱导相关蛋白表达改变; E. 褐藻素作用 HepG2 细胞 48 h 后引起线粒体膜电位下降

图 1 褐藻素作用 HepG2 细胞 48 h 后诱导细胞凋亡 ( $\bar{x} \pm s$ )

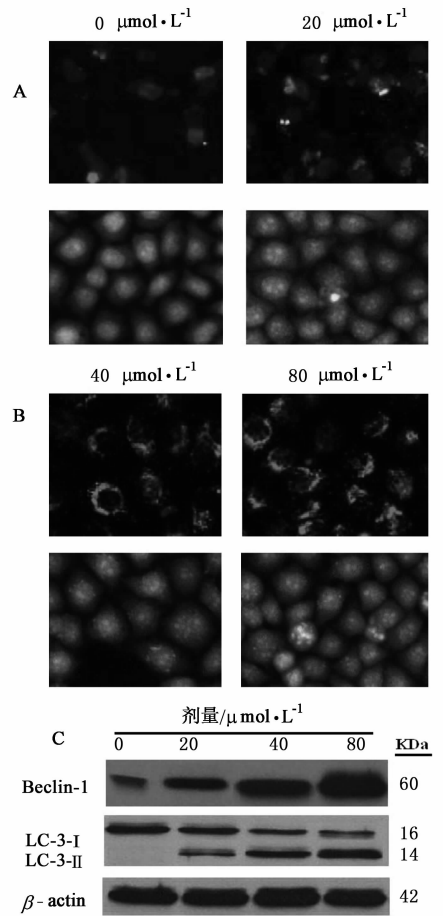
加(图 2 A)。吖啶橙染色进一步表明褐藻素可诱导吖啶橙由绿色荧光转换为红色荧光,并呈剂量依赖性,提示 HepG2 细胞内酸性的自噬溶酶体形成增多(图 2B)。Western blotting 结果表明褐藻素引起 Beclin 1 表达显著增强以及促进 LC3 I 转化为 LC3 II(图 2C)。上述结果表明褐藻素诱导 HepG2 细胞发生了自噬。

**3.3 褐藻素诱导 HepG2 细胞产生的自噬抑制细胞凋亡** 自噬即可促进细胞凋亡也可抑制细胞凋亡,为阐明褐藻素诱导的细胞自噬与凋亡的关系,本实验选用自噬特异性抑制剂 3-MA 预处理 HepG2 细胞。实验结果表明 3-MA 不但抑制褐藻素引起的 HepG2 细胞的 Beclin 1 表达上调和 LC3 I 向 LC3 II 的转化(图 3A),而且增加 HepG2 细胞的凋亡率(图 3B)、促进 Caspase-3 的活化(图 3C)。上述结果表明褐藻素诱导 HepG2 细胞发生的自噬抑制细胞凋亡。

**3.4 褐藻素通过抑制 Akt 磷酸化引起 HepG2 细胞凋亡和自噬** 由于 Akt 信号通路与细胞凋亡和自噬均密切相关,为阐明褐藻素引起 HepG2 细胞凋亡和自噬的分子机制,本实验对 Akt 及其下游关键蛋白进行了研究。实验结果表明褐藻素剂量依赖性的抑制 Akt, p70S6K 及 mTOR 的磷酸化,且上调负调控蛋白 PTEN 的表达(图 4),提示 Akt 信号通路参与了褐藻素介导的 HepG2 细胞凋亡和自噬。

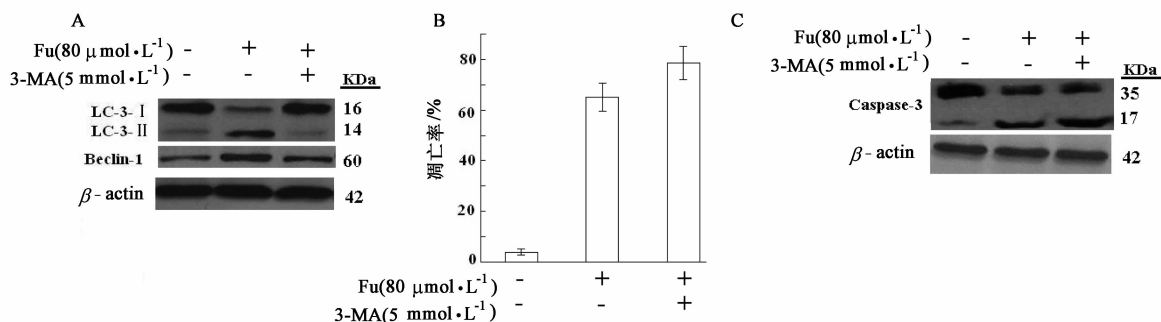
#### 4 讨论

自噬<sup>[9]</sup>过程中溶酶体及酸性的自噬溶酶体数量明显增多,溶酶体特异性染料 Lyso-Tracker Red 的



A. Lyso-Tracker Red 和 Hoechst 33342 双染的代表性图像 (Magnification 20  $\times$ ); B. Acridine orange 染色的代表性图像 (Magnification 20  $\times$ ); C. Beclin-1 和 LC-3 蛋白表达的变化

图 2 褐藻素作用 HepG2 细胞 48 h 后诱导细胞自噬荧光增强,而在酸性的自噬溶酶体中吖啶橙由绿色



A. 3-MA 抑制褐藻素诱导的 HepG2 细胞自噬; B. 3-MA 增强褐藻素诱导的 HepG2 细胞凋亡;

C. 3-MA 增强褐藻素诱导的 HepG2 细胞 Caspase-3 的活化

图 3 3-MA 增强褐藻素诱导的 HepG2 细胞凋亡( $\bar{x} \pm s$ )

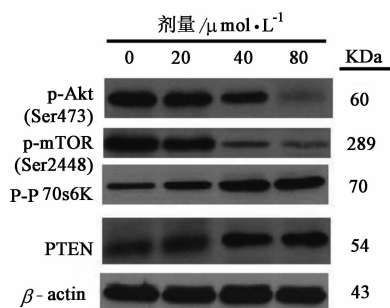


图 4 褐藻素作用 HepG2 细胞 48 h 后相关蛋白表达的变化

荧光转换为红色荧光。抗肿瘤药物经常通过诱导肿瘤细胞凋亡和自噬产生治疗作用,但自噬可能是肿瘤细胞保护自己的方式,即抑制自噬可促进凋亡;也可能是肿瘤细胞死亡的方式之一,即抑制自噬可抑制凋亡<sup>[10]</sup>。本实验发现褐藻素可同时诱导肝癌 HepG2 细胞发生凋亡和自噬,且自噬抑制细胞凋亡;侯莉莉等发现褐藻素仅通过诱导 HeLa 细胞自噬产生抗肿瘤作用<sup>[7]</sup>,而 Yu 等表明褐藻素通过诱导胃腺癌 MGC-803 细胞凋亡产生抗肿瘤作用,这些实验结果表明褐藻素诱导肿瘤细胞死亡的方式具有细胞特异性。

Akt/mTOR 信号通路与细胞凋亡及自噬均密切相关,侯莉莉等发现褐藻素通过抑制该信号通路从而诱导 HeLa 细胞自噬<sup>[7]</sup>,故本实验对 Akt/mTOR 信号通路中的关键蛋白进行了研究。实验结果表明褐藻素抑制 Akt, p70S6K 以及 mTOR 的磷酸化,但上调该信号通路负反馈抑制因子 PTEN 的表达,提示 Akt/mTOR 信号通路参与了褐藻素诱导 HepG2 细胞凋亡和自噬的过程。

由于抑制自噬可增强褐藻素诱导 HepG2 细胞的凋亡率,故褐藻素联合应用自噬抑制剂可增强其抗肝癌作用,目前临床应用的抗疟疾药羟氯喹及质子泵抑制剂 Bafilomycin A1 均为自噬抑制剂,这为褐藻素应用于临床提供了实验基础和理论依据。

### [参考文献]

- [1] D'orazio N, Gemello E, Gammone M A, et al. Fucoxanthin; a treasure from the sea [J]. Mar Drugs, 2012, 10(3):604.
- [2] Kim S M, Jung Y J, Kwon O N, et al. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricoratum* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166(7):1843.
- [3] Kawee-ai A, Kuntiya A, Kim S M. Anticholinesterase and antioxidant activities of fucoxanthin purified from the microalga *Phaeodactylum tricoratum* [J]. Nat Prod Commun, 2013, 8(10):1381.
- [4] Kazuo Miyashita, Nana Mikami, Masashi Hosokawa. Chemical and nutritional characteristics of brown seaweed lipids; A review [J]. J Func Foods, 2013, 5(4):1507.
- [5] Satomi Y. Fucoxanthin induces GADD45A expression and G1 arrest with SAPK/JNK activation in LNCap human prostate cancer cells [J]. Anticancer Res, 2012, 32(3):807.
- [6] Tafuku S, Ishikawa C, Yasumoto T, et al. Anti-neoplastic effects of fucoxanthin and its deacetylated product, fucoxanthinol, on Burkitt's and Hodgkin's lymphoma cells [J]. Oncol Rep, 2012, 28(4):1512.
- [7] Hou L L, Gao C, Chen L, et al. Essential role of autophagy in fucoxanthin-induced cytotoxicity to human epithelial cervical cancer HeLa cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2013, 34(11):1403.
- [8] Rengarajan T, Rajendran P, Nandakumar N, et al. Cancer preventive efficacy of marine carotenoid fucoxanthin; cell cycle arrest and apoptosis [J]. Nutrients, 2013, 5(12):4978.
- [9] Kaushik S, Cuervo A M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world [J]. Trends Cell Biol, 2012, 22:407.
- [10] Marquee R T, Xu L. Bcl-2:Beclin 1 complex; multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch [J]. Am J Cancer Res, 2012, 2:214.

[责任编辑 顾雪竹]