

小檗碱对高糖环境下 HCCLM3 细胞凋亡与自噬的影响

刘倩¹, 傅纓^{1*}, 资晓飞¹, 熊耀斌², 李媛³

(1. 南昌大学第二附属医院, 南昌 330006; 2. 江西省医学科学院, 南昌 330006;
3. 南昌大学医院, 南昌 330006)

[摘要] **目的:**探讨小檗碱(berberine, BBR)对高糖环境下人肝癌 HCCLM3 细胞增殖、凋亡及自噬相关基因表达的影响,并探究其可能的抗肿瘤分子机制。**方法:**把 HCCLM3 细胞加入低、中、高质量浓度葡萄糖中,通过细胞增殖实验(cell counting kit-8, CCK-8)检测发现高质量浓度葡萄糖对 HCCLM3 细胞增殖的作用最明显。基于此,选择高糖培养 HCCLM3 细胞,加入 BBR(5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)进行体外干预 24 h,研究各组药物对 HCCLM3 细胞增殖的抑制效果,并设顺铂组对照,通过流式细胞仪观察细胞凋亡率的变化,实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测 B 淋巴细胞瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和自噬相关基因 Atg5, Beclin1 mRNA 表达水平。**结果:**与空白组比较,随着葡萄糖浓度的增加,HCCLM3 细胞在高糖组中增殖能力最强($P < 0.05$);BBR 对高糖培养下 HCCLM3 增殖的抑制作用与 BBR 浓度有相关性, BBR(5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组抑制率依次为 33.86%, 40.75% ($P < 0.05$), 49.22%, 55.1%, 60.12%, 61.42% ($P < 0.01$);细胞凋亡率随 BBR 浓度增加有显著上升($P < 0.01$);与单纯高糖组比较,各干预组中凋亡基因 Bcl-2 与自噬基因 Atg5, Beclin1 mRNA 表达上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:** BBR 对高糖环境下 HCCLM3 细胞增殖具有抑制作用,可能是通过调控 Bcl-2 的表达,诱导该细胞凋亡,同时又上调 Beclin1, Atg5 mRNA 表达水平,促进自噬发挥抗肿瘤作用。

[关键词] 小檗碱; HCCLM3 细胞; 高糖; 凋亡; 自噬

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R273; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0068-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182322

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180911.1050.003.html>

[网络出版时间] 2018-9-12 11:52

Effect of Berberine on HCCLM3 Cells Apoptosis and Autophagy Under High Glucose Condition

LIU Qian¹, FU Ying^{1*}, ZI Xiao-fei¹, XIONG Yao-bin², LI Yuan³

(1. The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China;
2. Jiangxi Academy of Medical Sciences, Nanchang 330006, China;
3. Nanchang University Hospital, Nanchang 330006, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-tumor molecular mechanism of berberine (BBR) by observing and analyzing its effect on proliferation, apoptosis and autophagy-related gene expression for HCCLM3 cells under high glucose condition. **Method:** HCCLM3 cells were added into low, medium or high-concentration groups of glucose. It was found in cell counting kit-8 (CCK-8) that the high concentration of glucose had the most obvious effect on HCCLM3 cells proliferation. Based on the above experimental result, HCCLM3 cells treated with high concentration of glucose was selected and then different concentrations of berberine (5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) was added for *in vitro* intervention for 24 h. Then the effect of each drug group on the proliferation of HCCLM3 cells were studied. At the same time, the control group of metformin was arranged. After that, the

[收稿日期] 20180427(011)

[基金项目] 江西省卫生计生委课题项目(A098, 20185252)

[第一作者] 刘倩, 硕士, 从事中西医结合内科研究, E-mail: 501170789@qq.com

[通信作者] * 傅纓, 硕士, 教授, 硕士生导师, 主任中医师, 从事中医药肿瘤治疗与康复的研究, E-mail: yingfu-116@163.com

changes of apoptosis rate were observed by flow cytometry, and the expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and autophagy genes Atg5, Beclin1 were detected by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** With the increase of glucose concentration, HCCLM3 cell had the strongest migration and proliferation ability in high glucose group ($P < 0.05$). The inhibitory effect of BBR on the proliferation of HCCLM3 in high glucose culture was correlated with the concentration of BBR (5, 10, 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), and the inhibition rate was 33.86%, 40.75% ($P < 0.05$), 49.22%, 55.1%, 60.12%, and 61.42% respectively from low concentration to high concentration ($P < 0.01$). The apoptosis rate was significantly increased with the increase of BBR concentration ($P < 0.01$). The expression levels of Bcl-2, Atg5 and Beclin1 gene were significantly up-regulated in all intervening groups as compared with those in single high glucose group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** BBR could inhibit the proliferation of HCCLM3 cells in high glucose environment. Its inhibition effect for HCCLM3 cells might be achieved by inducing apoptosis of the cells, regulating Bcl-2 and up-regulating the expression levels of autophagy gene Beclin1 and Atg5. Thus BBR plays an anti-tumor role through promoting autophagy in high glucose environment.

[**Key words**] berberine; HCCLM3 cells; high glucose; apoptosis; autophagy

糖尿病与恶性肿瘤的发病风险密切相关,糖尿病状态本身也被认为是癌症的独立风险因素^[1]。肝癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,恶性程度高,易转移复发。在与代谢综合征相关较高的肿瘤中,糖尿病并发肝癌的风险最为显著^[2]。研究者通过回顾性分析发现糖尿病是肝癌发生的高危险因素^[3-5],肝癌患者较结直肠癌、乳腺癌、宫颈癌、鼻咽癌等其他癌症患者更易罹患糖尿病与糖耐量异常^[6]。高血糖、高胰岛素血症、胰岛素抵抗等因素被认为是糖尿病与肿瘤之间潜在的生物学联系,也有研究表明降糖药物如胰岛素及胰岛素类似物会增加肿瘤的致病风险^[7-8]。小檗碱(BBR)是从中药黄连根茎中提取的有效生物碱,作为临床抗菌生物制剂,近年来有研究者不断发现其具有良好的降糖、抗肿瘤作用,在临床应用上安全可靠。糖尿病与肝癌的关系复杂,多数实验研究 BBR 主要是通过抑制细胞的增殖、诱导细胞的凋亡的方式达到抗肿瘤作用,对高血糖的影响机制提及较少。本实验在高浓度葡萄糖下培养人肝癌 HCCLM3 细胞,通过 BBR 干预细胞的增殖、凋亡机制,观察 BBR 在高糖作用下对 HCCLM3 细胞增殖抑制及抗凋亡作用,探索 BBR 在高糖下的抗肿瘤机制,以此改进肝癌的预防策略改善糖尿病并发肝癌患者的生存预后。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌细胞株 HCCLM3 购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药物和试剂 氯化小檗碱水合物(上海化成工业发展有限公司,批号 Y5YTF-IL);顺铂注射液(江苏豪森药业股份有限公司,批号 141104);

葡萄糖(天津大茂化学试剂厂,批号 20160412);细胞增殖试剂盒(cell counting kit-8,CCK-8,上海碧云天生物技术有限公司,批号 C0038);Annexin V/碘化丙啶(PI)细胞凋亡双染试剂盒(美国 BD 生物试剂公司,批号 4029834);trizol, EasyScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix, TransStart® Top Green QPCR SuperMix(北京全式金生物技术有限公司,批号分别为#K20605,#K21216,#K31102);0.25%胰蛋白酶,二甲基亚砜(DMSO),结晶紫(上海索莱宝生物科技有限公司,批号分别为 907G0411,302A0327,C8470)。

1.3 仪器 FORMA371 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher 公司),iMark 型多功能酶标仪(美国 Bio-Rad 公司),BX-51 型倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司),FACSAria 型流式细胞仪(美国 BD 公司),UV-型紫外分析仪(珠海黑马医学仪器有限公司),7900 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 仪(美国 ABI 公司),PCT 型基因扩增仪(美国 MJ Research 公司),MD-200-3 型电子天平(上海精科天平厂),ST16R 型超速冷冻离心机(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 将冻存的 HCCLM3 细胞从液氮罐中取出,迅速放入 37 °C 水浴箱中并不时摇动。用吸管吸出细胞悬液,注入离心管,加入 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清,100 U·mL⁻¹青霉素,100 U·mL⁻¹链霉素)3 mL 稀释,1 000 r·min⁻¹,离心 5 min,收集细胞,重悬,置于 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中常规培养,0.25% 胰酶-EDTA 消化液消化

传代。传代 3~4 次后进行实验。

2.2 分组 CCK-8 检测细胞增殖分为空白组(低糖 DMEM 培养基,其中含葡萄糖 $1\ 000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),高糖低、中、高质量浓度组(含葡萄糖 $2, 4, 8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$); CCK-8 增殖抑制设 BBR 组($5, 10, 20, 30, 40, 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$); 凋亡及实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)设高糖组($8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), BBR 组($5, 10, 20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 顺铂组($0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)^[9]。

2.3 CCK-8 增殖检测 取对数生长期的 HCCLM3 细胞,消化计数后调整细胞密度为 7×10^3 个/mL; 充分吹打后接种于 96 孔培养板中,每孔 $100\ \mu\text{L}$,次日吸弃旧培养液,分别加入含 $1, 2, 4, 8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖培养液,每组设 5 个复孔,各孔终体积为 $100\ \mu\text{L}$,继续培养 24 h 后每孔避光加入 CCK-8 溶液 $10\ \mu\text{L}$,继续培养 2 h 后轻微振荡 2 min,在酶标仪检测各孔 $450\ \text{nm}$ 波长处吸光度 A 。按下列公式计算,细胞增殖率 = $(A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}})\times 100\%$ 。取增殖作用最明显的 $8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖组进行细胞培养,统称高糖组。

2.4 CCK-8 增殖抑制检测 高糖培养 HCCLM3 细胞至对数生长期,消化计数后调整细胞密度为 7×10^3 个/mL; 充分吹打后接种于 96 孔培养板中,每孔 $100\ \mu\text{L}$,次日弃去旧培养液,实验组加入不同浓度的 BBR,其终浓度分别为 $5, 10, 20, 30, 40, 50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,每个浓度设 5 个复孔,各孔终体积均为 $100\ \mu\text{L}$ 。继续培养 24 h 后每孔避光加入 CCK-8 溶液 $10\ \mu\text{L}$,继续培养 2 h 后轻微振荡 2 min,在酶标仪检测各孔 $450\ \text{nm}$ 波长处 A 。细胞增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}})\times 100\%$ 。BBR 取不超过半数致死率 $5, 10, 20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组进行后续实验。

2.5 结晶紫染色观察细胞形态 高糖培养 HCCLM3 细胞至对数生长期,消化制成单细胞悬液以 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,每孔 $1\ \text{mL}$,次日弃上清液,设高糖组, BBR 组加入 $5, 10, 20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 培养液,培养 24 h,弃去旧培养液,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 2 次,甲醇固定 1 h, PBS 清洗 2 次,加入结晶紫 $200\ \mu\text{L}$ 染色,室温下放置 2 h,在显微镜下观察 BBR 干预后 HCCLM3 的形态学变化并拍照记录。

2.6 细胞凋亡检测 高糖培养 HCCLM3 细胞至对数生长期,消化制成单细胞悬液以 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,次日弃上清液,按照高糖组, BBR 干预组($5, 10, 20\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 顺铂组($0.5\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 加入相应培养液,使各孔细胞上清液终体积为 $2\ \text{mL}$,培养 48 h,加入胰蛋白酶(不含 EDTA)消化细胞,

$2\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 $5\ \text{min}$ 收集细胞,预冷 PBS 洗 2 次, $10\times\ \text{binding buffer}$ 重悬各组细胞。避光加入 Annexin V-FITC $5\ \mu\text{L}$,轻轻混匀,孵育 $15\ \text{min}$,加入 PI $5\ \mu\text{L}$,轻轻混匀,孵育 $5\ \text{min}$ 。1 h 内用流式细胞仪检测。总凋亡率 = 早期细胞凋亡率 + 中晚期细胞凋亡率。

2.7 Real-time PCR 检测 Bcl-2, Atg5, Beclin1 mRNA 表达 细胞分组同 2.6 项,培养 24 h,采用 trizol 法提取各组细胞总 RNA,测定各组 A_{260}, A_{280} ,总 RNA 的 A_{260}/A_{280} 均在 $1.8\sim 2.0$ 。引物根据软件 Oligo 和 Premier 设计,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, Bcl-2 ($188\ \text{bp}$): 上游 $5'-\text{GTGAAGCTGGGGGAGGATTGT}-3'$, 下游 $5'-\text{GGGCCGTACAGTTCCACAAA G}-3'$; Atg5 ($121\ \text{bp}$): 上游 $5'-\text{TATCATCCCACAGCCAACAG}-3'$, 下游 $5'-\text{TCTTCTTAGGCCAAAGGTTTC}-3'$; Beclin1 ($100\ \text{bp}$): 上游 $5'-\text{GGGTTGCGGTTTCTGGA}-3'$, 下游 $5'-\text{GTGTCTCGCCTTTCTCAA CC}-3'$; 以 β -肌动蛋白(β -actin, $163\ \text{bp}$): 上游 $5'-\text{AGCGAGCATCCCCAAAGTT}-3'$, 下游 $5'-\text{GGG CACGAAGGCTCATCATT}-3'$ 。逆转录反应体系 $20\ \mu\text{L}$,所用 RNA 体积为 $2\ \mu\text{L}$,逆转录条件为 $42\ ^\circ\text{C}$ $15\ \text{min}$; $85\ ^\circ\text{C}$ $5\ \text{s}$,合成 cDNA。采用 $20\ \mu\text{L}$ PCR 反应体系,反应条件: $94\ ^\circ\text{C}$ $30\ \text{s}$, $94\ ^\circ\text{C}$ $5\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}$ $30\ \text{s}$, 40 循环,在 PCR 仪上进行扩增。mRNA 相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 表示。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据处理,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 葡萄糖对 HCCLM3 细胞增殖的影响 随着葡萄糖质量浓度的增加, HCCLM3 细胞的增殖的作用逐渐增强,与空白组比较,高糖中、高质量浓度组分别增加 $27.94\%, 41.92\%$ ($P < 0.05$),见表 1。 $8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖组增殖作用最强 ($P < 0.05$),后续实验中均采用含葡萄糖 $8\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 培养液培养细胞。

表 1 葡萄糖对 HCCLM3 细胞增殖的影响

Table 1 Effect of glucose on proliferation of HCCLM3 cells

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$A(\bar{x}\pm s, n=5)$	细胞增殖率/%
空白	1	0.49 ± 0.06	-
高糖	2	0.51 ± 0.05	10.31
	4	$0.54\pm 0.06^{1)}$	27.94 ¹⁾
	8	$0.55\pm 0.05^{1)}$	41.92 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 BBR 对高糖下 HCCLM3 细胞增殖抑制的影响

BBR 对 HCCLM3 细胞的增殖抑制作用呈浓度依赖性,与高糖组比较, BBR 5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的抑制率为 33.86%, 40.75%, 抑制率明显升高 ($P < 0.05$); BBR 20, 30, 40, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的抑制率分别为 49.22%, 55.10%, 60.12%, 61.42%, 抑制率显著升高 ($P < 0.01$), 见表 2。取不超过半数致死率 BBR 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组进行后续实验。

表 2 BBR 对高糖下 HCCLM3 细胞增殖抑制的影响

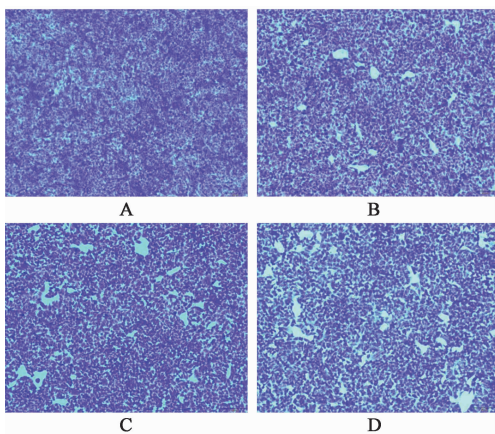
Table 2 Effect of berberine on proliferation of HCCLM3 cells under high glucose condition

组别	浓度	$A(\bar{x} \pm s, n=3)$	增殖率/%	抑制率/%
高糖	8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.74 \pm 0.06	-	-
BBR	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.59 \pm 0.03 ¹⁾	66.14	33.86
	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.56 \pm 0.03 ¹⁾	59.25	40.75
	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.53 \pm 0.03 ²⁾	50.78	49.22
	30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.50 \pm 0.06 ²⁾	44.90	55.10
	40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.48 \pm 0.06 ²⁾	39.87	60.13
	50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.47 \pm 0.07 ²⁾	38.58	61.42

注:与高糖组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 BBR 对高糖下 HCCLM3 细胞形态学变化的影响

在倒置显微镜下观察各组细胞贴壁生长,高糖组生长旺盛,相邻细胞融合成片,加入 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BBR 后,随着浓度的增加,脱壁细胞增多,细胞间空隙增大,见图 1。



A. 高糖 8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; B ~ D. BBR 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

图 1 BBR 对高糖下 HCCLM3 细胞形态学的影响(结晶紫, $\times 400$)

Fig.1 Effect of berberine on morphology of HCCLM3 cells under high glucose condition (crystal violet, $\times 400$)

3.4 BBR 对高糖下 HCCLM3 细胞凋亡的影响

BBR 对高糖下 HCCLM3 细胞的作用以早期凋亡率变化为主,与高糖组比较, BBR 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组、顺

铂组总凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); 与顺铂组比较, BBR 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组凋亡率显著降低 ($P < 0.01$), 见表 3。

表 3 BBR 对高糖下 HCCLM3 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of berberine on apoptosis rates of HCCLM3 cells under high glucose condition ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度	早期凋亡率	中晚期凋亡率	总凋亡率
高糖	8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	4.04 \pm 0.63	10.12 \pm 0.58	14.16 \pm 1.21
顺铂	0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	25.23 \pm 0.91 ^{2,4)}	6.82 \pm 0.64 ^{2,4)}	32.05 \pm 1.55 ^{2,4)}
BBR	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	5.04 \pm 0.81	10.73 \pm 0.73	15.77 \pm 1.54
	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	10.63 \pm 0.57	5.66 \pm 0.38	16.29 \pm 0.95
	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	15.89 \pm 0.54 ^{2,4)}	5.32 \pm 0.46 ^{2,4)}	21.21 \pm 1.00 ^{2,4)}

注:与高糖组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; BBR 与顺铂组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 4 同)。

3.5 BBR 对高糖下 HCCLM3 细胞 Bcl-2, Atg5, Beclin1 mRNA 表达的影响

与高糖组比较, BBR 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组, 顺铂组均能有效提高 Bcl-2, Beclin1 mRNA 表达水平 ($P < 0.01$); 与顺铂组比较, BBR 5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Bcl-2, Beclin1 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与高糖组、顺铂组比较, BBR 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组 Atg5 mRNA 表达水平显著提高 ($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 BBR 对高糖下 HCCLM3 细胞 Bcl-2, Atg5, Beclin1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of berberine on expression of Bcl-2, Atg5 and Beclin1 mRNA in HCCLM3 cells under high glucose condition ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	浓度	Bcl-2	Atg5	Beclin1
高糖	8 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1	1	1
顺铂	0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	14.953 \pm 3.298 ²⁾	1.405 \pm 0.821	29.226 \pm 7.689 ²⁾
BBR	5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	3.434 \pm 1.331 ⁴⁾	1.402 \pm 0.078	2.014 \pm 0.646 ⁴⁾
	10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	7.568 \pm 2.476 ^{1,4)}	1.117 \pm 0.760	9.906 \pm 2.005 ^{2,4)}
	20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	13.503 \pm 4.797 ^{2,3)}	7.230 \pm 0.437 ^{2,4)}	9.092 \pm 3.718 ^{2,4)}

4 讨论

葡萄糖在肝脏分解,是肝癌细胞唯一的能量来源,长期的高血糖状态对肝癌形成慢性刺激。研究结果提示当 HbA1c $\geq 9\%$ 时与慢性肝病有显著关联,控制血糖可减轻肝脏负担^[10]。相关研究通过对糖尿病患者的组织学发现,糖尿病患者较非糖尿病患者更可能发展为肝癌,同时在随访的 3 年间发生肝癌的概率更高^[11]。糖尿病的患者对癌症治疗的反应较差,因素包括增加的感染风险和术中死亡率,

并因此影响到癌症患者的生存周期^[12]。高血糖可诱导活性氧簇(ROS)蓄积并导致氧化应激,促进肿瘤细胞转移与增殖^[13], Kellenberger 等^[14]发现高血糖以浓度依赖性方式加速卵巢癌的生长,调控细胞内 ROS 水平使细胞不受控制无限增殖。在本实验中葡萄糖为肝癌细胞的生长、增殖建立了营养条件,对肝癌的增殖和侵袭均有促进作用。随着葡萄糖浓度的增加,HCCLM3 细胞增殖能力越强,高血糖可能会增加内皮细胞的通透性,通过反应性氧化物的产生增加和基底膜的结构改变,增加了肝癌细胞增殖及促进肝癌复发、转移的可能性。

凋亡是指细胞接受某种信号或受到某些刺激后,在特定基因调控下进行的一种主动性消亡过程,是维持内环境稳定的重要机制之一。自噬是细胞通过双层膜包裹待降解物形成自噬体从而降解其所包裹的内容物,以实现细胞本身的代谢需要和细胞器的更新。细胞凋亡与自噬之间的关系复杂,两者之间的相互作用涉及到自噬基因 Beclin1 与典型的细胞凋亡抑制蛋白 Bcl-2,自噬为凋亡所需,此时自噬通常先于凋亡,进而启动凋亡,对于凋亡而言,自噬是不可缺少^[15-16]。Bcl-2 是凋亡调节蛋白中的关键因子,其在各类刺激信号引起的凋亡中起到负调节作用。Besson 等^[17]发现凋亡和自噬之间的联系可能是抗凋亡蛋白 Bcl-2 的过度表达,并通过与 Beclin1 相互作用抑制自噬,使 Beclin1 的突变体不能结合 Bcl-2 刺激产生自噬来促进细胞死亡。在正常条件下,Beclin1 与 Bcl-2 结合后抑制自噬的产生,但细胞饥饿状态是一种有效的自噬诱导剂,可以刺激 Beclin1 从抑制状态下解离,减少对 Bcl-2 的亲合力^[18]。因此在高糖环境将促进 Beclin1 与 Bcl-2 结合来抑制自噬的发生,在本实验中 BBR 可以同时提高 Beclin1 与 Bcl-2 的表达水平,说明 BBR 对自噬与凋亡间的互动机制进行调控,可以通过凋亡和自噬作用来达到抗肿瘤效果。相关研究利用 Bcl-2/Bcl-xL 拮抗剂联合塞来昔布诱导结肠癌细胞自噬,当敲除异位的 Bcl-2 时,细胞凋亡也随之减弱,这些数据也表明了 Bcl-2 的双重作用家族蛋白质调节细胞凋亡和自噬^[19]。但有研究表明,在顺铂诱导的人胃癌洗白 MKN28 细胞凋亡的实验中发现 Beclin1 过表达,促进凋亡加剧^[20],本实验中顺铂组也表现出有效提高 Beclin1 表达水平的作用。除了自噬基因 Beclin1 在肿瘤中起抑制作用之外,研究者发现自噬基因 Atg5 表达的下调减弱了 Bcl-2 拮抗剂的毒性,但同时也抑制了自噬和凋亡^[21]。Atg5 是形成自噬

体所需的基因产物,在多种肿瘤细胞实验中,Atg5 过表达同时促进自噬和凋亡^[22]。实验结果显示在 BBR 的干预下,Atg5 的表达并没有因为凋亡的作用出现下调,顺铂对 Atg5 的提高无明显作用。促进凋亡和提高自噬同时存在这似乎是一个自相矛盾的情况,当暴露于代谢应激时,肿瘤细胞自噬可能通过坏死预防死亡,这一过程通过加剧局部炎症并由此增加肿瘤生长速率,代谢应激期间的自噬激活阻止了细胞生长^[23]。实验中高糖环境即是一个氧化代谢应激阶段,BBR 可能通过诱导自噬调控细胞内 ROS 水平,负调控 Bcl-2,提高 Beclin1,Atg5 mRNA 表达水平促进细胞凋亡和自噬的发生,来达到抑制肝癌细胞生长、增殖的作用。

在本实验中,高糖环境诱导下 HCCLM3 细胞氧化应激反应可以触发细胞凋亡和(或)自噬,两者都可以被 Bcl-2 蛋白家族所调控。高糖作为一个参与代谢的机制,有助于肿瘤细胞的存活和抵抗治疗诱导细胞凋亡。自噬抑制凋亡,促使肿瘤细胞的凋亡率下降,抑制自噬可能会提高肿瘤细胞对凋亡信号的敏感性。BBR 可以提高自噬基因 Beclin1,Atg5 mRNA 表达水平,上调 Bcl-2 mRNA 表达水平,双向发挥促凋亡和提高自噬的作用,这里自噬表现出抗肿瘤作用。自噬与凋亡之间存在的调节蛋白参与到整个调控过程,自噬与肿瘤之间的关系复杂,BBR 的双向调节作用可能揭示抗肿瘤药物新的作用机制,为肿瘤治疗提高新的研究方向,将更好的利用他们特定的关系推进临床肿瘤治疗。

[参考文献]

- [1] Grote V A, Becker S, Kaaks R. Diabetes mellitus type 2-an independent risk factor for cancer? [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2010, 118(1):4-8.
- [2] HUA F, YU J J, HU Z W. Diabetes and cancer, common threads and missing links [J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(1):54-61.
- [3] Onitilo A A, Engel J M, Glurich I, et al. Diabetes and cancer I: risk, survival, and implications for screening [J]. *Cancer Causes Control*, 2012, 23(6):967-981.
- [4] WANG P, KANG D, CAO W, et al. Diabetes mellitus and risk of hepatocellular carcinoma: a systematic review and Meta-analysis [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2012, 28(2):109-122.
- [5] Arase Y, Kobayashi M, Suzuki F, et al. Effect of type 2 diabetes on risk for malignancies includes hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C [J].

- Hepatology, 2013, 57(3):964-973.
- [6] CHEN R, YI Y, LI B. High prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in liver cancer patients: a hospital based study of 4 610 patients with benign tumors or specific cancers [J]. F1000Res, 2016, 5:1397-1407.
- [7] Wojciechowska J, Krajewski W, Bolanowski M, et al. Diabetes and cancer: a review of current knowledge [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2016, 124 (5) : 263-275.
- [8] Giovannucci E, Harlan D M, Archer M C, et al. Diabetes and cancer: a consensus report [J]. CA Cancer J Clin, 2010, 60(4):207-221.
- [9] 黄玲玲, 傅纓, 资晓飞, 等. 红花黄色素对人肝癌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2016, 22(8):1061-1064.
- [10] Raff E J, Kakati D, Bloomer J R, et al. Diabetes mellitus predicts occurrence of cirrhosis and hepatocellular cancer in alcoholic liver and non-alcoholic fatty liver diseases [J]. J Clin Transl Hepatol, 2015, 3 (1) : 9-16.
- [11] Barone B B, Yeh H C, Snyder C F, et al. Long-term all-cause mortality in cancer patients with preexisting diabetes mellitus: a systematic review and Meta-analysis [J]. JAMA, 2008, 300(23):2754-2764.
- [12] LI T C, CHEN H J, LI C I, et al. Hyperglycemia and chronic liver diseases on risk of hepatocellular carcinoma in Chinese patients with type 2 diabetes-national cohort of Taiwan diabetes study [J]. Int J Cancer, 2015, 136 (11) : 2668-2679.
- [13] Rolo A P, Palmeira C M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 212(2):167-178.
- [14] Kellenberger L D, Petrik J. Hyperglycemia promotes insulin-independent ovarian tumor growth [J]. Gynecol Oncol, 2018, 18(30):122-127.
- [15] Maiuri M C, Le T G, Criollo A, et al. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1 [J]. Embo J, 2007, 26 (10) : 2527-2539.
- [16] CUI Q, Tashiro S, Onodera S, et al. Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30 (5) : 859-864.
- [17] Besson A, Dowdy S F, Roberts J M. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond [J]. Developmental Cell, 2008, 14(2):159-169.
- [18] Levine B, Sinha S, Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy [J]. Autophagy, 2008, 4(5):600-606.
- [19] HUANG S, Sinicrope F A. Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells [J]. Autophagy, 2010, 6(2):256-269.
- [20] Matsushita M, Suzuki N N, Obara K, et al. Structure of Atg5, Atg16, a complex essential for autophagy [J]. J Biol Chem, 2007, 282(9):6763-6772.
- [21] LIANG L Z, MA B, LIANG Y J, et al. Obatoclax induces Beclin 1-and Atg5-dependent apoptosis and autophagy in adenoid cystic carcinoma cells [J]. Oral Dis, 2015, 21(4):470-477.
- [22] Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, et al. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis [J]. Nat Cell Biol, 2006, 8(10):1124-1132.
- [23] LIU D, YANG Y, LIU Q, et al. Inhibition of autophagy by 3-MA potentiates cisplatin-induced apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cells [J]. Med Oncol, 2011, 28(1):105-111.

[责任编辑 张丰丰]