

异甘草素对人肾透明细胞癌 786-O 细胞 抗癌作用及分子机制

辛红, 孙鹏然, 宋鹏, 徐巍*

(哈尔滨医科大学附属第一医院, 哈尔滨 150001)

[摘要] **目的:**研究异甘草素(isoliquiritigenin, ISL)对人肾透明细胞癌 786-O 细胞的抗癌作用,并探讨其可能存在的分子机制。**方法:**通过噻唑蓝(thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)比色法检测 ISL(0, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 786-O 细胞增殖的作用;细胞划痕和 Transwell 实验检测 ISL 对 786-O 细胞迁移、侵袭能力的影响;吖啶橙染色, Ad-GFP-LC3 转染实验观察细胞自噬状态;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测自噬相关蛋白的表达,并分析磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路变化,探讨其可能的作用机制。**结果:** MTT 比色法结果显示,与空白组比较, ISL 能够明显抑制 786-O 细胞的增殖,且呈时间-剂量依赖性($P < 0.05$);划痕和 Transwell 实验结果表明,与空白组比较, ISL 能够抑制 786-O 细胞的迁移和侵袭($P < 0.05$);吖啶橙染色和 Ad-GFP-LC3 转染实验表明 ISL 能够诱导 786-O 细胞发生自噬。此外,与空白组比较, ISL 能够诱导细胞内自噬标志物-II(LC3-II),自噬相关蛋白 Beclin1, Atg5 蛋白表达($P < 0.05$),并显著下调 p62 蛋白表达($P < 0.05$),当加入自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)可逆转上述现象($P < 0.05$);同时 ISL 能够抑制 Akt, mTOR 的磷酸化水平($P < 0.05$),加入抑制剂 LY294002 和雷帕霉素(rapamycin, Rap), LC3-II, Beclin1, Atg5 蛋白表达明显上调($P < 0.05$), p62 蛋白表达明显下调($P < 0.05$)。**结论:** ISL 能够抑制肾透明细胞癌 786-O 细胞的增殖、迁移和侵袭,并通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导细胞发生自噬。

[关键词] 异甘草素(isoliquiritigenin); 肾透明细胞癌; 786-O 细胞; 自噬; 磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素蛋白(PI3K/Akt/mTOR)信号通路

[中图分类号] R22; R242; R23-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0083-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191122

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190218.1345.009.html>

[网络出版时间] 2019-02-19 9:30

Anticancer Effect of Isoliquiritigenin on Human Clear Cell Renal Cell Carcinoma 786-O Cells and Molecular Mechanism

XIN Hong, SUN Peng-ran, SONG Peng, XU Wei*

(The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the anticancer effect of isoliquiritigenin (ISL) on human clear cell renal cell carcinoma 786-O cells, and explore its possible molecular mechanism. **Method:** Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay was used to detect effect of ISL (0, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on proliferation of 786-O cells. The effect of ISL on migration and invasion of 786-O cells was detected by cell scratch test and Transwell assay. The autophagy was observed under the fluorescence microscope through acridine orange staining and Ad-GFP-LC3 transfection experiment. Western blot was used to detect the expression of autophagy related protein and analyze the changes of phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) /

[收稿日期] 20181019(007)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科研项目(10541149)

[第一作者] 辛红, 硕士, 从事肿瘤中西医结合基础与临床研究, E-mail: xinhonghrb@126.com

[通信作者] *徐巍, 博士生导师, 教授, 从事肿瘤中西医结合基础与临床研究, E-mail: 13796059990@163.com

mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway to explore the possible mechanism. **Result:** MTT results showed that ISL could significantly inhibit the proliferation of 786-O cells in a time-dose dependent manner ($P < 0.05$). The results of scratch and Transwell experiments indicated that ISL could inhibit the migration and invasion of 786-O cells ($P < 0.05$). Acridine orange staining and ad-GFP-LC3 transfection showed that ISL can induce autophagy in 786-O cells. Besides, ISL can induce LC3-II, Beclin1, Atg5 protein expressions ($P < 0.05$), and significantly reduce p62 protein expression ($P < 0.05$); autophagy inhibitor 3-methyl adenine (3-MA) can be added to reverse the above phenomena ($P < 0.05$). Meanwhile, ISL can inhibit phosphorylation of Akt, mTOR levels ($P < 0.05$), inhibitor LY294002 and rapamycin (Rap) can be added to significantly re-regulate LC3-II, Beclin1, Atg5 protein expressions ($P < 0.05$) and significantly down-regulate p62 protein expression ($P < 0.05$). **Conclusion:** ISL can inhibit the proliferation, migration and invasion of clear cell renal carcinoma 786-O cells, and induce autophagy by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway.

[**Key words**] isoliquiritigenin (ISL); clear cell renal cell carcinoma; 786-O; autophagy; phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) /mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway

肾细胞癌(RCC)占成人恶性肿瘤的2%~3%,是泌尿系统中最致命的恶性肿瘤。肾透明细胞癌(ccRCC)起源于肾小管上皮细胞,是肾细胞癌最常见的病理类型^[1]。目前肾癌的治疗以手术、分子靶向药物为主,但手术易复发,而绝大多数肾癌患者在接受靶向治疗一年半左右会出现耐药,进而导致治疗失败,因此寻找疗效明确、毒副作用小、价格低廉的药物成为治疗肾癌的一个重要途径。

异甘草素(ISL)是一类具有查尔酮结构的黄酮类化合物,主要存在于甘草的根中^[2-3]。现代药理学实验研究表明 ISL 具有抗炎^[4],抗病毒^[5],抗氧化^[6],抗衰老^[7]以及抗糖尿病^[8]等多种生物活性。体内实验研究发现 ISL 可以防止对氧化偶氮甲烷诱导小鼠结肠异常隐窝灶形成及癌变具有抑制作用^[9],还能够抑制鼠肾细胞癌的肺转移^[10]。体外实验研究发现 ISL 对乳腺癌^[11]、膀胱癌^[12]、口腔癌^[13]、肺癌^[14]、胃癌^[15]均有不同程度的抑制作用。近期实验研究表明 ISL 通过抑制胶质瘤干细胞的增殖和诱导其分化,从而达到抗肿瘤的作用^[16]。这些实验结果提示 ISL 可作为肿瘤治疗的候选药物,本实验旨在研究 ISL 对肾透明细胞癌的影响,并对其机制进行探讨,以期 ISL 的抗肾癌研究提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肾透明细胞癌细胞株 786-O 购自中国科学院上海细胞生物研究所。

1.2 药品与试剂 ISL(成都普非德生物技术有限公司,批号 151020);二甲基亚砷(DMSO),噻唑蓝(MTT),3-甲基腺嘌呤(3-MA),LY294002,雷帕霉素

(Rap),吖啶橙(美国 Sigma 公司,批号分别为 D9170, M2128, M9281, L9908, V900930, A6014);自噬标志物-II(LC3-II),自噬相关蛋白 Beclin1,磷酸化哺乳动物雷帕霉素蛋白(p-mTOR)抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为#2775, #3738, #2971);p62,自噬相关蛋白 Atg5,磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K),磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt),蛋白激酶 B(Akt),哺乳动物雷帕霉素蛋白(mTOR)抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号分别为 18420-1-AP, 10181-2-AP, 20584-1-AP, 66444-1-Ig, 60203-2-Ig, 20657-1-AP);HRP 标记二抗(北京中杉金桥公司,批号分别为 ZB-2301, ZB-2305);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,上海康成生物工程有限公司,批号 KC-5G4);Ad-GFP-LC3 转染试剂(碧云天公司,批号 C3006)。

1.3 仪器 Forma 370 CO₂ 型细胞培养箱(美国 Thermo Scientific 公司);Allegra™ X-22R 型离心机(美国 Beckman 公司);CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Mini-Protean tetra 型垂直电泳槽及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司);SpectraMax M5 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

2 方法

2.1 MTT 比色法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞,以 1×10^4 个/孔接种到 96 孔板中。设 ISL 组、空白组,每组设 5 个复孔,37 °C 5% CO₂ 培养过夜。加入不同浓度的 ISL (0, 10, 25, 50, 75, 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 分别培养 24, 48 h 后,每孔加入 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MTT 溶液 20 μL ,置于 37 °C 培养箱中继续培养 4 h,每孔加入 DMSO 溶液 150 μL ,充分震荡

30 min 溶解甲瓚,酶标仪 490 nm 波长处测定吸光度 A 。

2.2 划痕实验检测细胞愈合率 实验前先用 marker 笔在 6 孔板背面画横线标记,取对数生长期的 786-O 细胞按 2×10^5 个接种至 6 孔板中,37 °C 5% CO₂ 继续培养,当细胞融合至 100% 时用枪头比平直尺,尽量垂至于背面的横线划痕,枪头要垂直,不能倾斜。PBS 洗涤 3 次,去除划下的细胞,加入无血清培养基。分别用 0, 10, 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISL 处理细胞后放入培养箱。于 0, 24, 48 h 取出镜下拍照。用 Image J 软件对图像进行分析,并计算细胞划痕间伤口愈合率。

2.3 Transwell 法细胞迁移和侵袭能力 迁移实验,取对数生长期细胞接种于 6 孔板中,经不同浓度 (0, 10, 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) ISL 处理 24 h 后,用不含血清培养基将细胞消化、重悬,按 1×10^4 个细胞接种于 Transwell 小室 (孔径为 8 μm) 的上室中,体积为 250 μL ,下室加入含有 10% FBS 的培养基 750 μL ,37 °C 5% CO₂ 条件下继续培养 24 h。随后用 PBS 清洗,甲醇室温下固定 30 min,0.1% 的结晶紫染色 30 min,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗,用棉签擦拭掉膜上方的细胞,电子显微镜细胞计数并成像。

侵袭实验,将配置好的 matrigel 胶铺在 Transwell 小室的上室,每个小室 100 μL ,置于 37 °C 培养箱中,孵育 4 ~ 5 h。按上述操作过程将处理后的细胞接种于用 matrigel 基质胶包被过的 Transwell 小室的上室,下室加入含有 10% FBS 的培养基,37 °C 5% CO₂ 条件下继续培养 24 h。随后用 PBS 清洗,甲醇室温下固定 30 min,0.1% 的结晶紫染色 30 min,PBS 清洗,用棉签擦拭掉膜上方的细胞,电子显微镜细胞计数并成像。

2.4 吖啶橙染色检测细胞形态 取对数生长期细胞按 2×10^4 个/L 接种到盖玻片上,进行爬片,37 °C 5% CO₂ 条件下孵育培养,用 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISL 处理 24 h 后弃去旧培养基,PBS 洗涤 3 次,加入 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 吖啶橙染色液,室温下避光染色 15 min,PBS 清洗 3 次,倒置荧光显微镜下观察细胞形态。

2.5 Ad-GFP-LC3 转染实验检测细胞转染 取对数生长期细胞按 2×10^4 个/L 接种到盖玻片上,进行爬片,根据操作说明,待细胞在盖玻片上生长融合度达到 50% 后,病毒载体以 40 ~ 50 的 MOI 值转染到细胞中。感染 6 ~ 8 h,更换新的培养基继续培养 24 h,经 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISL 处理细胞 24 h 后,倒置荧光显微镜下进行观察。

2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白的表达 检测 ISL 和 3-MA 对细胞中自噬相关蛋白表达的影响时,实验分为空白组,ISL 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组,ISL 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;同时分为空白组,ISL 组,3-MA 组,ISL + 3-MA 组。检测 ISL 是否通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路影响细胞自噬时,实验分为空白组,ISL 10, 25, 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组;同时分为空白组,ISL 组,LY294002, ISL + LY294002 组;空白组,ISL 组,Rap 组,ISL + Rap 组。不同组细胞经处理后用裂解液进行裂解,并用 BCA 法测定总蛋白浓度。等量的蛋白样品 (20 μg) 经过 8% 或 15% 的 SDS-PAGE 分离蛋白,转移到 PVDF 膜上,用 5% 脱脂牛奶封闭,加入一抗 (1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜,二抗 (1 : 1 000) 室温孵育 1 h。暗室中进行 X 胶片曝光、显影、定影,并用 Image J 软件进行分析。

2.7 统计学分析 采用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组之间比较用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 ISL 对肾透明细胞癌 786-O 细胞增殖能力的影响 与空白组比较,ISL 对细胞增殖能力的抑制作用明显增强 ($P < 0.05, P < 0.01$),且呈一定的剂量-时间依赖关系 (表 1)。在给药 24, 48 h 后,ISL 对 786-O 细胞的半数抑制浓度 (IC_{50}) 分别为 (64.18 \pm 25.7), (43.10 \pm 6.6) $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

表 1 ISL 对 786-O 细胞增殖存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 1 Effect of ISL on proliferation of 786-O cell ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白	-	100	100
ISL	10	93.7 \pm 2.33	80.8 \pm 1.83 ¹⁾
	25	71.5 \pm 6.16 ¹⁾	58.9 \pm 2.08 ²⁾
	50	50.7 \pm 2.01 ²⁾	42.5 \pm 3.15 ²⁾
	75	38.9 \pm 2.16 ²⁾	29.1 \pm 1.14 ²⁾
	100	35.8 \pm 1.49 ²⁾	24.1 \pm 1.01 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2 ~ 8 同)。

3.2 ISL 对肾透明细胞癌 786-O 细胞迁移和侵袭能力的影响 与空白组比较,ISL 处理后的细胞迁移和侵袭能力明显减弱 ($P < 0.05, P < 0.01$),且呈浓度依赖性 (表 2)。在划痕实验中,与空白组比较,ISL 组划痕伤口愈合率明显降低 ($P < 0.05$) (表 3)。表明 ISL 在调节肾透明细胞癌 786-O 细胞的迁移和侵袭能力中起到重要作用。

表 2 ISL 对 786-O 细胞侵袭能力和迁移能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of ISL on invasion and metastasis in 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n=3$) ↑

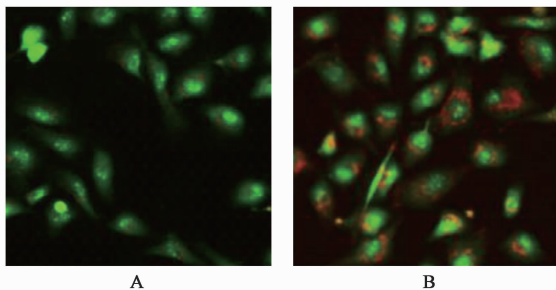
组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	侵袭透膜细胞数	迁移透膜细胞数
空白	-	59.3 ± 4.49	143.3 ± 5.56
ISL	10	38.3 ± 2.62 ¹⁾	66.7 ± 5.79 ²⁾
	25	16.7 ± 2.86 ²⁾	38.6 ± 2.49 ²⁾

表 3 异甘草素对 786-O 细胞划痕愈合率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of ISL on metastasis in 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白	-	77.9 ± 1.10	87.8 ± 1.39
ISL	10	70.6 ± 1.05	81.7 ± 1.52
	25	56.4 ± 1.57 ¹⁾	69.1 ± 1.53 ¹⁾

3.3 ISL 对 786-O 细胞自噬的影响 吖啶橙实验显示, ISL 处理后的细胞内亮红色比例较空白组明显增多(图 1)。Ad-GFP-LC3 转染实验显示, GFP-LC3 转染的细胞经 ISL 处理后出现绿色点状的自噬小体, 而未加 ISL 处理的细胞极少有自噬小体形成(图 2)。



A. 空白组; B. ISL 组(图 2 同)

图 1 ISL 对 786-O 细胞自噬的影响(吖啶橙, ×100)

Fig.1 Effect of ISL on autophagy of 786-O cells(acridine orange, ×100)

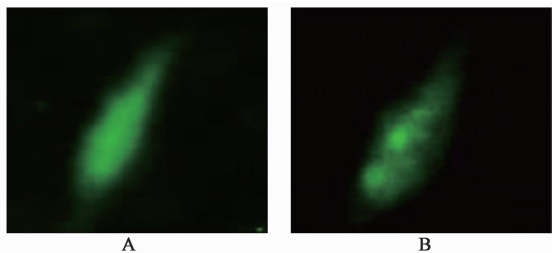
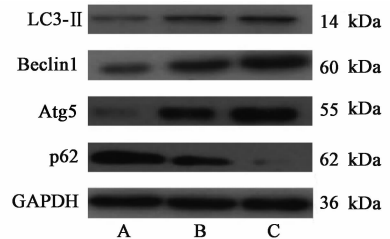


图 2 ISL 对 786-O 细胞自噬的影响(Ad-GFP-LC3, ×400)

Fig.2 Effect of ISL on autophagy of 786-O cells(Ad-GFP-LC3, ×400)

3.4 ISL 诱导 786-O 细胞发生自噬 与空白组比较, ISL 处理后 LC3-II, Beclin1, Atg5 蛋白的表达量明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), p62 蛋白表达水平

显著下降 ($P < 0.01$), 且呈浓度依赖性(图 3)。与空白组比较, 经 3-MA 处理后, LC3-II, Beclin1, Atg5 蛋白的表达量明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), p62 蛋白表达水平增加 ($P < 0.05$)。当 ISL 与 3-MA 联合使用时, LC3-II, Beclin1, Atg5 蛋白的表达量明显增加 ($P < 0.05$), p62 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.01$) (图 4)。见表 4, 5。



A. 空白组; B. ISL 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组; C. ISL 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组

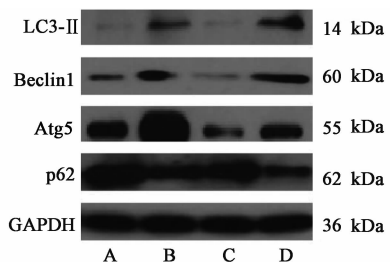
图 3 ISL 对 786-O 细胞中自噬相关蛋白表达的影响

Fig.3 Effect of ISL on autophagy protein of 786-O cells

表 4 ISL 对 786-O 细胞中自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of ISL on autophagy protein of 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	LC3-II /GAPDH	Beclin1 /GAPDH	Atg5 /GAPDH	p62 /GAPDH
空白	-	0.31 ± 0.02	0.52 ± 0.04	0.61 ± 0.07	2.19 ± 0.11
ISL	25	0.52 ± 0.05 ¹⁾	0.66 ± 0.03 ¹⁾	0.84 ± 0.06 ¹⁾	1.38 ± 0.05 ²⁾
	50	0.57 ± 0.03 ¹⁾	0.88 ± 0.02 ²⁾	1.35 ± 0.04 ²⁾	1.18 ± 0.08 ²⁾



A. 空白组; B. ISL 组; C. 3-MA 组; D. ISL + 3-MA 组

图 4 ISL + 3-MA 对 786-O 细胞中自噬相关蛋白表达的影响

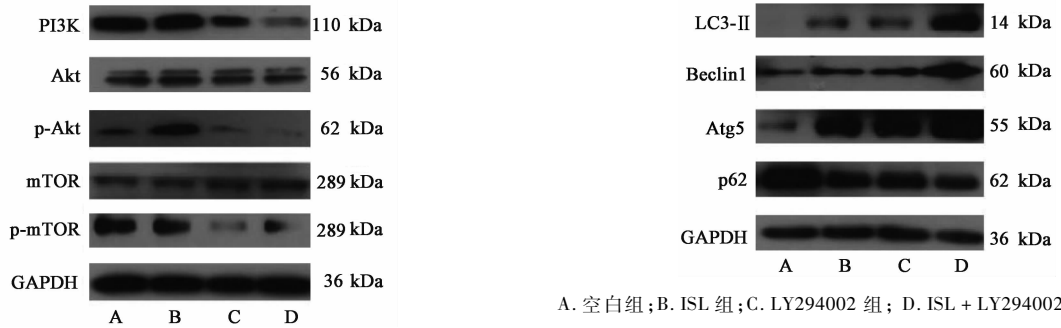
Fig.4 Effect of ISL and 3-MA on autophagy protein of 786-O cells

3.5 ISL 对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导 786-O 细胞自噬的影响 与空白组比较, ISL 作用 786-O 细胞后, PI3K, p-Akt, p-mTOR 蛋白表达降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), 见图 5。与空白组比较, LY294002/Rap 单独或联合 ISL 作用细胞后 LC3, Beclin1, Atg5 蛋白表达明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$), p62 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$) (图 6, 7)。提示 ISL 通过

表 5 ISL + 3-MA 对 786-O 细胞中自噬相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of ISL and 3-MA on autophagy protein of 786-O cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LC3-II/GAPDH	Beclin1/GAPDH	Atg5/GAPDH	p62/GAPDH
空白	-	0.13 ± 0.02	0.41 ± 0.07	0.79 ± 0.03	2.15 ± 0.02
ISL	50	0.18 ± 0.01 ¹⁾	0.53 ± 0.06 ¹⁾	1.35 ± 0.01 ²⁾	1.46 ± 0.04 ²⁾
3-MA	-	0.12 ± 0.01	0.29 ± 0.02 ²⁾	0.62 ± 0.05 ¹⁾	1.67 ± 0.14 ²⁾
ISL + 3-MA	50	0.27 ± 0.02 ²⁾	0.67 ± 0.01 ²⁾	0.96 ± 0.03 ¹⁾	0.97 ± 0.01 ²⁾



A. 空白组; B. 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISL 组; C. 25 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISL 组; D. 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ISL 组

图 5 ISL 对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响

Fig. 5 Effect of ISL on PI3K/Akt/mTOR signal pathways

表 6 ISL 对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of ISL on PI3K/Akt/mTOR signal pathways($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	PI3K/GAPDH	Akt/GAPDH	p-Akt/GAPDH	mTOR/GAPDH	p-mTOR/GAPDH
空白	-	0.99 ± 0.06	0.56 ± 0.02	0.58 ± 0.01	0.24 ± 0.01	0.41 ± 0.01
ISL	10	0.65 ± 0.04 ¹⁾	0.61 ± 0.04	0.46 ± 0.01 ¹⁾	0.25 ± 0.01	0.42 ± 0.01
	25	0.52 ± 0.03 ²⁾	0.57 ± 0.01	0.31 ± 0.01 ²⁾	0.24 ± 0.01	0.27 ± 0.04 ²⁾
	50	0.25 ± 0.01 ²⁾	0.52 ± 0.02	0.19 ± 0.02 ²⁾	0.23 ± 0.01	0.16 ± 0.02 ²⁾

表 7 ISL + LY294002 对 786-O 细胞中自噬相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of ISL and LY294002 on autophagy protein of 786-O cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LC3-II/GAPDH	Beclin1/GAPDH	Atg5/GAPDH	p62/GAPDH
空白	-	0.42 ± 0.01	0.87 ± 0.06	0.95 ± 0.02	4.87 ± 0.15
ISL	50	0.54 ± 0.02 ¹⁾	0.95 ± 0.03 ¹⁾	1.75 ± 0.06 ²⁾	3.36 ± 0.03 ²⁾
LY294002	-	0.63 ± 0.02 ¹⁾	1.01 ± 0.21 ¹⁾	1.24 ± 0.09 ¹⁾	2.27 ± 0.04 ²⁾
ISL + LY294002	50	1.31 ± 0.06 ²⁾	1.25 ± 0.14 ²⁾	1.51 ± 0.06 ²⁾	1.61 ± 0.22 ²⁾

4 讨论

ISL 作为甘草中主要黄酮类化合物,研究发现 ISL 对多种肿瘤具有抑制作用,如乳腺癌^[11]、前列腺癌^[17]、结肠癌^[18]、口腔癌^[13]、宫颈癌^[19]、白血病^[20]等。但 ISL 对肾透明细胞癌细胞的抑制及作用机制未见相关文献报道。本研究以肾透明细胞癌细胞株 786-O 细胞为研究对象,考察了 ISL 对 786-O 细胞的

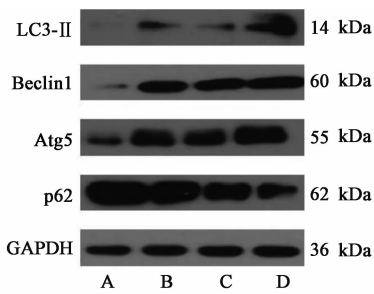
A. 空白组; B. ISL 组; C. LY294002 组; D. ISL + LY294002 组

图 6 ISL + LY294002 对 786-O 细胞中自噬相关蛋白表达的影响
Fig. 6 Effect of ISL and LY294002 on autophagy protein of 786-O cells

抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导 786-O 细胞发生自噬。见表 6 ~ 8。

影响,并阐明了其潜在的作用机制。结果表明,ISL 能够抑制 786-O 细胞增殖、迁移、侵袭,并诱导其自噬的发生。

自噬是一种高度保守的细胞自我降解方式,将受损、变性、衰老的细胞器及大分子物质通过溶酶体吞噬并降解再利用的过程^[21]。LC3-II, Beclin1 蛋白的表达强度与自噬活性密切相关,被认为是自噬



A. 空白组; B. ISL 组; C. Rap 组; D. ISL + Rap 组

图 7 ISL + Rap 对 786-O 细胞中自噬相关蛋白表达的影响

Fig. 7 Effect of ISL and Rap on autophagy protein of 786-O cells

表 8 ISL + Rap 对 786-O 细胞中自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of ISL and Rap on autophagy protein of 786-O cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	LC3-II /GAPDH	Beclin1/GAPDH	Atg5/GAPDH	p62/GAPDH
空白	-	0.21 ± 0.01	0.88 ± 0.08	0.33 ± 0.01	2.98 ± 0.11
ISL	50	0.32 ± 0.01 ¹⁾	1.02 ± 0.01 ¹⁾	0.61 ± 0.01 ²⁾	2.39 ± 0.09 ¹⁾
Rap	-	0.48 ± 0.02 ²⁾	1.09 ± 0.06 ¹⁾	1.22 ± 0.03 ²⁾	1.87 ± 0.08 ²⁾
ISL + Rap	50	0.68 ± 0.01 ²⁾	2.01 ± 0.19 ²⁾	1.71 ± 0.01 ²⁾	0.85 ± 0.04 ²⁾

分子,在调节胰岛素代谢和介导细胞存活中起到重要作用^[27]。Akt 可以通过磷酸化 B 淋巴细胞瘤 (Bcl-2) 家族 Bcl-2 家族抗凋亡因子 (Bad) 蛋白以及阻止细胞色素 C 从线粒体中释放来抑制细胞凋亡^[28]。Akt 的过度表达可能有助于肿瘤的发生和发展。

mTOR 是 PI3K/Akt 下游的一种重要的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,能够抑制自噬,并且可作为营养物质和生长因子的细胞传感器,可以参与肿瘤细胞的多种生命活动^[29]。采用 PI3K/Akt 抑制剂 LY294002 及 mTOR 抑制剂雷帕霉素作用细胞,自噬蛋白 LC3-II, Beclin1, Atg5 表达升高, p62 蛋白表达降低。

综上所述,本研究结果表明 ISL 通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制 786-O 细胞的增殖、迁移、侵袭,并诱导细胞发生自噬。结果显示 ISL 可能成为一种有效的肾透明细胞癌抑制剂,然而关于 ISL 与癌症常规治疗手段之间的相互作用需要深入研究,以期 ISL 应用于肾癌的临床治疗提供实验依据。

[参考文献]

[1] MA J J, JIN H F, WANG H, et al. Expression of NDRG2 in clear cell renal cell carcinoma [J]. Bio Pharm Bull, 2008, 31(7): 1316-1320.

体的标志分子^[22-23]。研究发现 p62 蛋白的降解是细胞自噬的标志之一^[24]。Atg5 在自噬泡形成过程中起重要作用,研究发现 Atg5 可诱导自噬体的形成^[25]。本实验研究发现 ISL 能够提高 LC3-II, Beclin1, Atg5 蛋白表达水平,降低 p62 蛋白表达,且呈浓度依赖性,当加入自噬抑制剂 3-MA 时可以逆转上述情况的发生,结果表明 ISL 能够诱导 786-O 细胞发生自噬。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路参与细胞的生长、生存、血管生成等众多过程^[26]。Akt 是 PI3K 的下游

[2] Asl M N, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza sp. and its bioactive compounds [J]. Phytother Res, 2008, 22(6): 709-724.

[3] Takahashi T, Takasuka N, Iigo M, et al. Isoliquiritigenin, a flavonoid from licorice, reduces prostaglandin E2 and nitric oxide, causes apoptosis, and suppresses aberrant crypt foci development [J]. Cancer Sci, 2004, 95(5): 448-453.

[4] JIN X Y, Sohn D H, Lee S H. Isoliquiritigenin suppresses tumor necrosis factor- α -induced inflammation via peroxisome proliferator-activated receptor- γ in intestinal epithelial cells [J]. Arch Pharm Res, 2016, 39(10): 1465-1471.

[5] Traboulsi H, Cloutier A, Boyapelly K, et al. The flavonoid isoliquiritigenin reduces lung inflammation and mouse morbidity during influenza virus infection [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(10): 6317-6327.

[6] WU T Y, Khor T O, Saw C L, et al. Anti-inflammatory/anti-oxidative stress activities and differential regulation of Nrf2-mediated genes by non-polar fractions of tea *Chrysanthemum zawadskii* and licorice *Glycyrrhiza uralensis* [J]. Aaps J, 2010, 13(1): 1-13.

[7] Cronin H, Draelos Z D. Top 10 botanical ingredients in 2010 anti-aging creams [J]. J Cosmet Dermatol, 2010, 9(3): 218-225.

- [8] Yerra V G, Kalvala A K, Kumar A. Isoliquiritigenin reduces oxidative damage and alleviates mitochondrial impairment by SIRT1 activation in experimental diabetic neuropathy [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 47 (1): 41-52.
- [9] Baba M, Asano R, Takigami I, et al. Studies on cancer chemoprevention by traditional folk medicines XXV. Inhibitory effect of isoliquiritigenin on azoxymethane-induced murine colon aberrant crypt focus formation and carcinogenesis [J]. *Biol Pharm Bull*, 2002, 25 (2): 247-250.
- [10] Yamazaki S, Morita T, Endo H, et al. Isoliquiritigenin suppresses pulmonary metastasis of mouse renal cell carcinoma [J]. *Cancer Lett*, 2002, 183(1): 23-30.
- [11] PENG F, TANG H, LIU P, et al. Isoliquiritigenin modulates miR-374a/PTEN/Akt axis to suppress breast cancer tumorigenesis and metastasis [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 9022-9036.
- [12] SI L, YANG X, YAN X, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis of human bladder cancer T24 cells via a cyclin-dependent kinase-independent mechanism [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(1): 241-249.
- [13] Hsia S M, YU C C, Shih Y H, et al. Isoliquiritigenin as a cause of DNA damage and inhibitor of ataxia-telangiectasia mutated expression leading to G₂/M phase arrest and apoptosis in oral squamous cell carcinoma [J]. *Head Neck*, 2016, 38(Suppl 1): 360-371.
- [14] Jung S K, Lee M H, Lim D Y, et al. Isoliquiritigenin induces apoptosis and inhibits xenograft tumor growth of human lung cancer cells by targeting both wild type and L858R/T790M mutant EGFR [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(52): 35839-35848.
- [15] MA J, FU N Y, PANG D B, et al. Apoptosis induced by isoliquiritigenin in human gastric cancer MGC-803 cells [J]. *Planta Med*, 2001, 67(8): 754-757.
- [16] LIN Y, SUN H, DANG Y, et al. Isoliquiritigenin inhibits the proliferation and induces the differentiation of human glioma stem cells [J]. *Oncol Rep*, 2018, 39 (2): 687-694.
- [17] ZHANG B, LAI Y, LI Y, et al. Antineoplastic activity of isoliquiritigenin, a chalcone compound, in androgen-independent human prostate cancer cells linked to G₂/M cell cycle arrest and cell apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 821(1): 57-67.
- [18] WU M, WU Y, DENG B, et al. Isoiquiritigenin decreases the incidence of colitis-associated colorectal cancer by modulating the intestinal microbiota [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(51): 85318-85331.
- [19] Hirchaud F, Hermetet F, Ablise M, et al. Isoliquiritigenin induces caspase-dependent apoptosis via downregulation of HPV16 E6 expression in cervical cancer Ca Ski cells [J]. *Planta Med*, 2013, 79(17): 1628-1635.
- [20] CHEN H, ZHANG B, YUAN X, et al. Isoliquiritigenin-induced effects on Nrf2 mediated antioxidant defence in the HL-60 cell monocytic differentiation [J]. *Cell Biol Int*, 2013, 37 (11): 1215-1224.
- [21] Kobayashi S. Choose delicately and reuse adequately: the newly revealed process of autophagy [J]. *Biol Pharm Bull*, 2015, 38(8): 1098-1103.
- [22] Levine B, Mizushima N, Virgin H W. Autophagy in immunity and inflammation [J]. *Nature*, 2011, 469 (7330): 325-335.
- [23] CAO Y, Klionsky D J. Physiological functions of Atg6/Beclin 1: a unique autophagy-related protein [J]. *Cell Res*, 2007, 17(10): 839-849.
- [24] Pankiv S, Clausen T H, Lamark T, et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282 (33): 24131-24145.
- [25] PENG J, ZHANG R, CUI Y, et al. Atg5 regulates late endosome and lysosome biogenesis [J]. *China Life Sci*, 2014, 57(1): 59-68.
- [26] Rameh L E, Cantley L C. The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(13): 8347-8350.
- [27] Stal O, Perez-Tenorio G, Akerberg L, et al. Akt kinases in breast cancer and the results of adjuvant therapy [J]. *Breast Cancer Res*, 2003, 5 (2): R37-R44.
- [28] Kennedy S G, Kandel E S, Cross T K, et al. Akt/protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome C from mitochondria [J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8): 5800-5810.
- [29] Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/Akt/mTOR interactive pathway [J]. *Mol Biosyst*, 2015, 11(7): 1946-1954.

[责任编辑 张丰丰]