

基于 AMPK/ULK1 介导的自噬探讨牡荆素对鼻咽癌 CNE-2 细胞裸鼠移植瘤生长抑制作用及其机制

袁东杰, 李艳峰, 卢振民*

新乡医学院第一附属医院 耳鼻咽喉科, 河南 新乡 453100

摘要: **目的** 探究牡荆素对鼻咽癌 CNE-2 细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用及其可能的调控机制。**方法** 将 BALB/c 裸鼠通过左侧前肢腋窝下接种 CNE-2 细胞构建鼻咽癌裸鼠成瘤模型,待模型构建成功后随机分为模型组、牡荆素组(5、10 mg/kg)、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 激动剂组 (AICAR, 200 mg/kg)、牡荆素 + AMPK 抑制剂组 (Compound C, 20 mg/kg), 每组各 10 只。牡荆素组分别按照相应剂量 ig; AICAR 组 ip 200 mg/kg AICAR; 牡荆素 + Compound C 组采取 ig 10 mg/kg 牡荆素的同时 ip 20 mg/kg Compound C, 以上各组连续给药 21 d。给药结束后测定裸鼠移植瘤体积和质量; 苏木素 - 伊红 (HE) 染色观察移植瘤组织病理学改变; TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡情况; 免疫组织化学检测肿瘤组织微管相关蛋白轻链 3 (LC3) -II、泛素结合蛋白 (p62) 蛋白表达; 免疫荧光检测肿瘤组织 LC3-II 和半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 表达; Western blotting 检测肿瘤组织 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2)、Caspase-3 蛋白及 AMPK/UNC-51 样激酶 1 (ULK1) 通路相关蛋白相对表达。**结果** 与模型组相比, 牡荆素各剂量组、AICAR 组肿瘤生长缓慢, 肿瘤体积和质量均显著降低 ($P < 0.05$); 肿瘤细胞凋亡率, Caspase-3、LC3-II、Bax/Bcl-2、p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 蛋白表达均显著升高, p62 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。与牡荆素 10 mg/kg 组相比, 牡荆素 + Compound C 组肿瘤生长良好, 肿瘤体积和质量均增加 ($P < 0.05$), 肿瘤细胞凋亡率, Caspase-3、LC3-II、Bax/Bcl-2、p-AMPK/AMPK、P-ULK1/ULK1 蛋白表达均显著降低, p62 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.05$)。**结论** 牡荆素能够抑制鼻咽癌 CNE-2 细胞裸鼠移植瘤生长, 其机制与激活 AMPK/ULK1 通路介导的自噬, 促进肿瘤细胞凋亡相关。

关键词: 鼻咽癌; 牡荆素; 自噬; 腺苷酸活化蛋白激酶; UNC-51 样激酶 1

中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)02-0281-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.02.002

Inhibitory effect and mechanism of vitexin on the growth of transplanted nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells in nude mice based on AMPK/ULK1 mediated autophagy

YUAN Dongjie, LI Yanfeng, LU Zhenmin

Department of Otolaryngology, The First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100, China

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of vitexin on the growth of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells transplanted into nude mice and its possible regulatory mechanism. **Methods** BALB/c nude mice were inoculated with CNE-2 cells under the left forearm armpit to construct a nasopharyngeal carcinoma nude mice tumor model. After the model was successfully constructed, they were randomly divided into model group, vitexin group (5 and 10 mg/kg), AMPK agonist group (AICAR, 200 mg/kg), and vitexin + AMPK inhibitor group (Compound C, 20 mg/kg), with 10 mice in each group. Vitexin group was ig administered at corresponding doses, AICAR group received ip injection of 200 mg/kg AICAR, vitexin + Compound C group received 10 mg/kg vitexin by ig and ip injection of 20 mg/kg Compound C, and the above groups were continuously administered for 21 d. Measure the volume and mass of transplanted tumor in nude mice after administration. HE staining was used to observe the pathological changes of the transplanted tumor tissue, TUNEL staining was used to detect apoptosis in tumor tissue. Detection of LC3-II and p62 protein expression by immunohistochemical in tumor tissue, immunofluorescence detection of LC3-II and Caspase-3 expression in tumor

收稿日期: 2023-11-19

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目 (20B320117)

作者简介: 袁东杰, 男, 主治医师, 硕士, 研究方向为耳鼻咽喉科中医药治疗。E-mail: yuandongjie198601@163.com

*通信作者: 卢振民, 男, 主任医师, 研究方向为耳鼻咽喉科中医药治疗。E-mail: lzhmin@126.com

tissue, Western blotting was used to detect the relative expression of Bax, Bcl-2, Casapase-3 proteins, and AMPK/ULK1 pathway related proteins in tumor tissue. **Results** Compared with the model group, the tumor growth was slow, tumor volume and mass were significantly reduced ($P < 0.05$), tumor cell apoptosis rate, the protein expression of Caspase-3, LC3-II, Bax/Bcl-2, p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1 were significantly increased, and p62 protein expression were significantly reduced ($P < 0.05$) in each dose group of vitexin. Compared with the 10 mg/kg group of vitexin, the vitexin + Compound C group showed good tumor growth, increased tumor volume and mass ($P < 0.05$), increased tumor cell apoptosis rate, the protein expression of Caspase-3, LC3-II, Bax/Bcl-2, p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1 were significantly decreased, while p62 protein expression were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Vitexin can inhibit the growth of nasopharyngeal carcinoma CNE-2 cells transplanted into nude mice, and its mechanism is related to activating AMPK/ULK1 pathway mediated autophagy and promoting tumor cell apoptosis.

Key words: nasopharyngeal carcinoma; vitexin; autophagy; AMPK; ULK1

鼻咽癌是临床上常见的头颈部恶性肿瘤，发病率为耳鼻咽喉恶性肿瘤之首，具有很强的地域分布性，常发于我国南方地区^[1]。目前，临床上关于鼻咽癌患者治疗主要通过同步放化疗方式，但是长期的放化疗容易造成患者复发和病灶转移^[2]。因此，积极探寻鼻咽癌的发病机制及相关治疗靶点是当前迫切需要的。细胞自噬在肿瘤的发生发展、浸润转移及耐药性中发挥双重调控作用，被认为是肿瘤治疗潜在的重要机制^[3]。多项研究证实，细胞自噬参与了鼻咽癌细胞的增殖、凋亡及转移^[4-5]。激活细胞自噬能够抑制鼻咽癌细胞增殖，诱导细胞凋亡^[6]。但也有部分研究证实，自噬对鼻咽癌细胞的增殖和生长具有显著的促进作用，通过激活细胞自噬能够抑制细胞凋亡，促进细胞增殖，提高鼻咽癌细胞的存活^[7-8]。以上研究表明自噬在鼻咽癌中可能发挥“双刃剑”作用。因此，以细胞自噬为靶点的研究将对鼻咽癌新药的开发具有重大意义。

牡荆素是一种天然的生物活性黄酮类化合物，具有抗炎、抗氧化以及抗肿瘤等多种生物学活性，且对疾病的治疗效果较为显著，不良反应小、安全性较高等优势，被认为是一种极具开发潜力的活性天然化合物^[9-10]。研究显示，牡荆素能够发挥抗结直肠癌^[11]、肺癌^[12]、肝癌^[13]等作用。Wang 等^[14]研究证实，牡荆素能够通过调控核因子- κ B (NF- κ B) 通路诱导鼻咽癌细胞凋亡，抑制细胞生长，表明牡荆素可能是未来鼻咽癌潜在的治疗药物。腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) /UNC-51 样激酶 1 (ULK1) 是介导细胞自噬形成的重要信号通路，参与鼻咽癌细胞自噬调节，进而抑制细胞增殖，促进细胞凋亡发生^[15]。Zhang 等^[16]研究证实，牡荆素能够通过激活 AMPK 信号通路介导的细胞自噬，改善氧化低密度脂蛋白介导的内皮损伤。此外，牡荆素能够通过激活 AMPK/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信

号通路诱导细胞自噬水平升高，促进细胞凋亡，从而抑制肾细胞癌生长^[17]。以上研究提示牡荆素很有可能通过调控 AMPK/ULK1 介导的细胞自噬途径抑制鼻咽癌裸鼠移植瘤生长。为此，本研究拟通过对 BALB/c 裸鼠左侧前肢腋窝下接种 CNE-2 细胞构建鼻咽癌裸鼠成瘤模型，探究牡荆素对其移植瘤生长及 AMPK/ULK1 介导的细胞自噬通路的影响，旨在阐明牡荆素抗鼻咽癌生长的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和动物 人鼻咽癌细胞 CNE-2 购自中国科学院上海细胞库；50 只 SPF 级的 BALB/c 裸鼠，雌雄各半，体质量 18~20 g，周龄 4~6 周，动物购自北京维通利华实验动物技术有限公司[生产许可证号 SCXK (京) 2021-0012]。动物饲养于新乡医学院实验动物中心，温度 (25±1) °C，相对湿度 60%~70%，昼夜 12 h/12 h 交替光照，自由饮食，饮水，所有小鼠均适应性喂养 1 周，且动物实验经过新乡医学院第一附属医院医学伦理委员会审批 (批准号 LLSC2021-11-002)。

1.1.2 试剂 牡荆素 (质量分数 >98%，成都植标化纯生物技术有限公司，批号 20220312)；AMPK 激动剂 AICAR、AMPK 抑制剂 Compound C (美国 Selleck 公司，货号 S1802、S7306)；苏木素 - 伊红 (HE) 染色试剂盒、TUNEL 染色检测试剂盒、蛋白质浓度测定试剂盒、ECL 发光液、山羊抗兔二抗、山羊抗小鼠二抗、 β -肌动蛋白 (β -actin) 小鼠单克隆抗体、DAPI 染色液 (上海碧云天生物技术公司，货号 C0105S、C1091、P0011、P0018FS、A0409、A0413、AF5001、C1005)；免疫组化检测试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司，货号 SP-9001)；Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (Caspase-3) 抗体、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 抗体、

p-AMPK (Thr172) 抗体、AMPK、p-ULK1 (Ser317) 抗体、ULK1 抗体、微管相关蛋白轻链 3 (LC3) -II 抗体、泛素结合蛋白 (p62) 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 2772、9662、15071、50081、2532、37762、8054、2775、5114)。

1.1.3 仪器 Gel Doc XR⁺型凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 伯乐公司); CKX53 型荧光倒置显微镜 (日本奥林巴斯); H3-18KR 型高速冷冻离心机 (湖南可成仪器设备有限公司); LD-96A 型酶标仪 (山东莱恩德智能科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 鼻咽癌 CNE-2 细胞裸鼠移植瘤模型构建^[18]、分组及给药 取对数生长期的人鼻咽癌 CNE-2 制备成单细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^6 个/mL。将 0.2 mL 细胞悬液 sc 于裸鼠左侧前肢腋窝下, 以皮下肿瘤组织隆起直径大于 0.5 cm 视为模型构建成功。待裸小鼠移植瘤模型构建成功后将其随机分为模型组、牡荆素 (5、10 mg/kg) 组、AICAR (200 mg/kg) 组、牡荆素 (10 mg/kg) + Compound C (20 mg/kg) 组, 每组各 10 只。牡荆素临用前使用生理盐水稀释至所需浓度。

牡荆素组裸鼠分别 ig 5、10 mg/kg 牡荆素^[19]; AICAR 组裸鼠 ip 200 mg/kg AICAR; 牡荆素 + Compound C 组裸鼠 ig 10 mg/kg 牡荆素的同时 ip 20 mg/kg Compound C^[20]; 模型组裸鼠 ig 等量的生理盐水, 各组均给药 1 次/d, 连续给药 21 d。给药后, 次日将裸鼠颈椎脱臼处死, 并剥离肿瘤组织进行相关实验检测。

1.2.2 移植瘤生长体积、质量及抑瘤率测定 各组裸鼠于造模成功后 3、7、14、21 d, 利用游标卡尺测量肿瘤体长径 (a) 和短径 (b), 并计算肿瘤体积。21 d 后各组裸鼠 ip 戊巴比妥钠麻醉, 行颈椎脱臼处死, 剥离肿瘤体, 称量质量 (W), 计算抑瘤率。

$$\text{肿瘤体积} = (a \times b^2) / 2$$

$$\text{抑瘤率} = 1 - W_{\text{给药}} / W_{\text{模型}}$$

1.2.3 肿瘤组织病理学观察 将肿瘤体组织放于 4% 的多聚甲醛中固定 24 h、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、组织石蜡包埋、切片, 行 HE 染色、封片、复染, 之后于显微镜下观察组织形态学变化。

1.2.4 TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡 按照 TUNEL 染色试剂盒进行染色, 通过光学显微镜下观察并计数 TUNEL 阳性细胞数。其中 TUNEL 阳性细胞核呈棕黄色颗粒, 即为凋亡细胞, 每张切片

随机选取 6 个视野, 计算 TUNEL 阳性细胞率。

$\text{TUNEL 阳性细胞率} = \text{TUNEL 阳性细胞数} / \text{总细胞数}$

1.2.5 免疫组化检测肿瘤组织 LC3-II、p62 蛋白表达 给药 21 d 后, 各组裸鼠 ip 戊巴比妥钠麻醉, 行颈椎脱臼处死, 剥离瘤体组织经 4% 多聚甲醛固定, 乙醇脱水, 石蜡包埋、切片后采用内源性过氧化物酶阻断剂阻断、抗原修复、组织封闭后, 滴加 LC3-II 抗体、p62 抗体 (1:500), 孵育过夜, 对应二抗孵育 2 h, 滴加 DAB 显色液, 苏木素复染, 于 200 倍显微镜下观察肿瘤体组织 LC3-II、p62 着色情况, 并通过 Image Pro-Plus 6.0 软件分析肿瘤体组织 LC3-II 及 p62 蛋白相对表达水平。

1.2.6 免疫荧光检测肿瘤组织 LC3-II、Caspase-3 蛋白表达 将各组裸小鼠肿瘤组织切片放入 PBS 缓冲液中清洗, 经 0.2% TritonX-100 透化 5 min, PBS 缓冲液清洗后 10% 的 BSA 溶液封闭 60 min, 阻断非特异性反应, 去除切片上残留的 BSA 后, 行双重免疫荧光染色, 室温条件下分别孵育 LC3-II 抗体 (1:200) 和 Caspase-3 抗体 (1:200) 4 h, 去除一抗后避光条件下孵育荧光素酶标记的山羊抗小鼠或山羊抗兔二抗 2 h, PBS 缓冲液清洗后, DAPI 进行细胞核染色 5 min, 最后滴加抗荧光淬灭剂, 避光条件下荧光显微镜下观察并拍照。LC3-II、Caspase-3 表达水平以平均荧光强度表示。

$\text{平均荧光强度} = \text{区域荧光强度总和} / \text{区域面积}$

1.2.7 Western blotting 检测 AMPK/ULK1 通路及凋亡相关蛋白表达 末次给药结束后, 立即将裸鼠处死, 剥离肿瘤体并提取总蛋白, 按照质量与体积比 1:5 加入细胞裂解液, 于 4 °C 条件下裂解 40 min; BCA 法测定各组肿瘤组织蛋白质浓度; 蛋白上样 (按照每孔上样量 30 μ g 计算得出上样体积); 凝胶电泳; 湿转法转膜; 5% BSA 室温封闭 2 h; 分别加 p-AMPK 抗体 (1:500)、AMPK 抗体 (1:500)、p-ULK1 抗体 (1:500)、ULK1 抗体 (1:500)、Bax 抗体 (1:1000)、Bcl-2 抗体 (1:1000)、Caspase-3 (1:500)、 β -actin 抗体 (1:2000), 4 °C 条件下孵育 16 h; 37 °C 条件下二抗孵育 60 min; 去除二抗后 TBST 洗膜 15 min; 滴加显影液后于 Gel Doc XR⁺成像系统中显影拍照, 并采用 Image Pro Plus 6.0 软件进行蛋白质条带灰度值半定量分析。

1.2.8 统计学分析 SPSS22.0 软件进行统计学数据处理。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据满足正态分布且方差齐性, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间

两两比较采用 LSD-*t* 检验。

2 结果

2.1 牡荆素对鼻咽癌裸鼠移植瘤生长的影响

给药后 3 d, 各组裸鼠移植瘤体积组间比较均无显著差异。给药后 7、14、21 d, 与模型组相比, 牡荆素各剂量组、AICAR 组移植瘤体积均明显减小 ($P < 0.05$)。给药后 7、14、21 d, 与牡荆素 10 mg/kg 组相比, 牡荆素+Compound C 组移植瘤体积显著增大 ($P < 0.05$)。

给药后 21 d, 与模型组相比, 牡荆素各剂量组、AICAR 组移植瘤质量均显著降低 ($P < 0.05$)。与牡

荆素 10 mg/kg 组相比, 牡荆素+Compound C 组移植瘤质量显著增加 ($P < 0.05$), 各给药组肿瘤抑制率分别为 24.86%、35.26%、25.92%、13.76%, 见图 1、表 1。

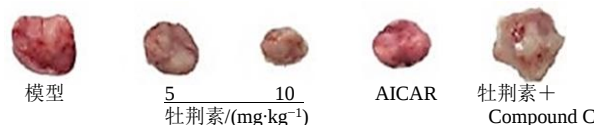


图 1 牡荆素裸鼠移植瘤生长的影响

Fig. 1 Effect of vitexin on the growth of transplanted tumors in nude mice

表 1 各组裸鼠鼻咽癌细胞移植瘤生长变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Growth changes of transplanted nasopharyngeal carcinoma cells of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肿瘤体积/mm ³				肿瘤质量/g
		给药后 3 d	给药后 7 d	给药后 14 d	给药后 21 d	
模型	—	135.87 ± 14.66	410.22 ± 31.99	1 102.46 ± 69.72	1 885.61 ± 100.40	1.89 ± 0.31
牡荆素	5	140.22 ± 18.79	387.13 ± 22.71*	652.03 ± 66.29*	724.45 ± 88.05*	1.35 ± 0.24*
	10	141.01 ± 20.34	356.44 ± 21.02*	471.48 ± 66.23*	542.97 ± 62.55*	1.23 ± 0.18*
AICAR	200	139.20 ± 17.78	389.26 ± 30.15*	671.33 ± 71.25*	749.11 ± 66.43*	1.32 ± 0.26*
牡荆素+Compound C	10+20	136.69 ± 15.46	400.27 ± 28.93 [#]	926.91 ± 81.48 [#]	1 523.84 ± 95.92 [#]	1.63 ± 0.32 [#]

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与牡荆素 10 mg·kg⁻¹ 组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs vitexin 10 mg·kg⁻¹ group.

2.2 牡荆素对鼻咽癌裸鼠移植瘤病理学的影响

与模型组相比, 牡荆素各剂量组、AICAR 组肿瘤细胞生长较差, 可见肿瘤细胞排列疏松, 部分细胞胞质减少, 细胞核出现不同程度的固缩, 细胞间出现淋巴细胞和中性粒细胞浸润。与牡荆素 10 mg/kg 组相比, 牡荆素+Compound C 肿瘤组织细胞生长状态良好, 肿瘤细胞排列相对紧密, 细胞间淋巴细胞和中性粒细胞浸润明显降低, 见图 2。

2.3 牡荆素对鼻咽癌裸鼠移植瘤细胞凋亡的影响

与模型组相比, 牡荆素各剂量组、AICAR 组移植瘤中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达和细胞凋亡

率均显著升高 ($P < 0.05$)。与牡荆素 10 mg/kg 组相比, 牡荆素高剂量+Compound C 组移植瘤中 Caspase-3、Bax、Bcl-2 蛋白表达和细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.05$), 见图 3、4 和表 2。

2.4 牡荆素对鼻咽癌裸鼠移植瘤细胞自噬的影响

与模型组相比, 牡荆素各剂量组和 AICAR 组移植瘤组织中细胞自噬相关蛋白 LC3-II 表达显著升高, p62 表达显著降低 ($P < 0.05$)。与牡荆素 10 mg/kg 组相比, 牡荆素+Compound C 组裸鼠肿瘤组织 LC3-II 表达显著降低, p62 表达显著升高 ($P < 0.05$), 见图 5、表 3。

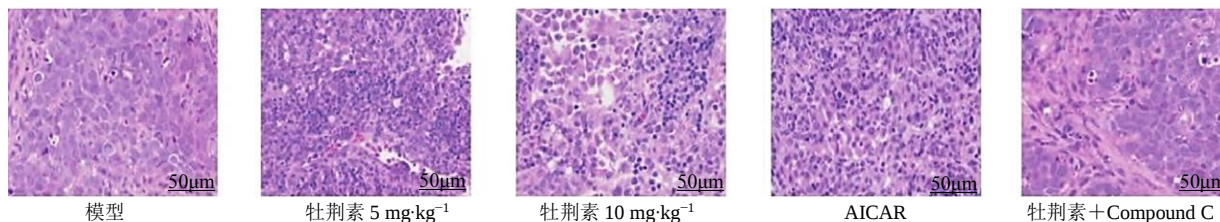


图 2 各组裸鼠移植瘤组织病理学变化 (HE, ×400)

Fig. 2 Pathological changes of xenograft tissues in nude mice of each group (HE, ×400)

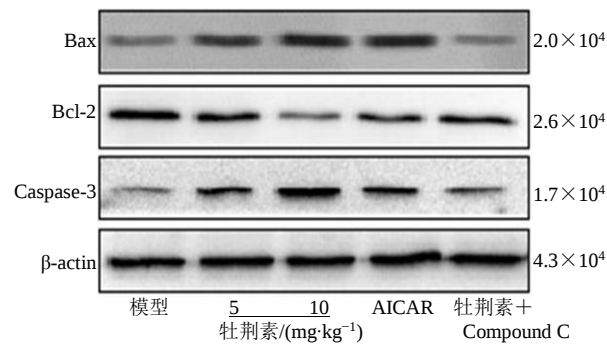


图 3 各组裸鼠移植瘤组织中 Bax、Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达条带图

Fig. 3 Bands of Bax, Bcl-2, and Caspase-3 protein expression in xenograft tissues of nude mice in each group

2.5 牡荆素对鼻咽癌裸鼠移植瘤组织 LC3-II 和 Caspase-3 荧光表达的影响

免疫荧光检测显示,与模型组相比,牡荆素各剂量组和 AICAR 组移植瘤组织中 LC3-II 和 Caspase-3 蛋白表达明显升高 ($P<0.05$)。与牡荆素 10 mg/kg 组相比,牡荆素+Compound C 组能够抑制牡荆素对 LC3-II 和 Caspase-3 的表达,见图 6、表 4。

2.6 牡荆素对鼻咽癌裸鼠移植瘤组织 AMPK/ULK1 信号通路的影响

与模型组相比,牡荆素各剂量组、AICAR 组移植瘤组织中 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 均显著升高 ($P<0.05$)。与牡荆素 10 mg/kg 组相比,牡

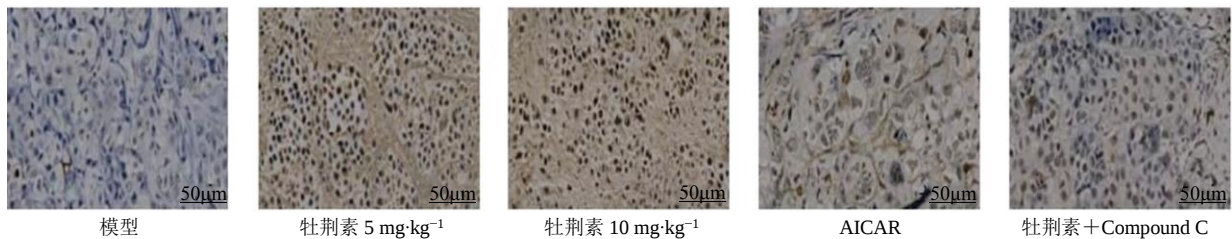


图 4 各组鼻咽癌裸鼠移植瘤组织细胞凋亡染色 (TUNEL, ×400)

Fig. 4 Apoptosis staining of nasopharyngeal carcinoma xenograft tissues in nude mice of each group (TUNEL, ×400)

表 2 各组鼻咽癌裸鼠移植瘤组织 Bax/Bcl-2、Caspase-3 蛋白相对表达和细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Comparison of Bax/Bcl-2, Caspase-3 protein relative expression and apoptosis rate in nasopharyngeal carcinoma xenograft tissues of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	Bax/Bcl-2	Caspase-3	凋亡率/%
模型	—	0.41±0.07	1.01±0.11	18.97±3.66
牡荆素	5	1.03±0.12*	1.83±0.19*	48.37±8.22*
	10	2.11±0.23*	2.31±0.25*	59.55±7.63*
AICAR	200	1.88±0.17*	1.94±0.26*	41.16±6.29*
牡荆素+Compound C	10+20	0.39±0.06 [#]	1.16±0.17 [#]	24.62±4.39 [#]

与模型组比较: * $P<0.05$; 与牡荆素 10 mg·kg⁻¹ 组比较: [#] $P<0.05$ 。

* $P<0.05$ vs model group; [#] $P<0.05$ vs vitexin 10 mg·kg⁻¹ group.

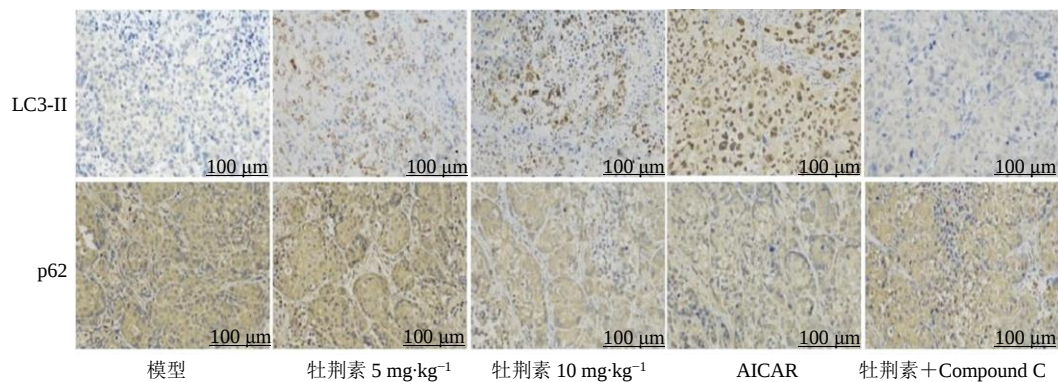


图 5 各组鼻咽癌裸鼠移植瘤组织中 LC3-II、p62 表达 (IHC, ×200)

Fig. 5 Expression of LC3-II and p62 in nude mice xenograft tissues nasopharyngeal carcinoma tissues in each group (IHC, ×200)

表 3 各组鼻咽癌裸鼠移植瘤组织中 LC3-II、p62 蛋白相对表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 3 Comparison of LC3-II and p62 protein relative expression in nasopharyngeal carcinoma xenograft tissues of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	蛋白相对表达量	
		LC3-II	p62
模型	—	0.022±0.004	0.310±0.042
牡荆素	5	0.061±0.007*	0.212±0.021*
	10	0.101±0.012*	0.126±0.013*
AICAR	200	0.234±0.024*	0.091±0.004*
牡荆素+Compound C	10+20	0.033±0.005 [#]	0.254±0.019 [#]

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与牡荆素 10 mg·kg⁻¹组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs vitexin 10 mg·kg⁻¹ group.

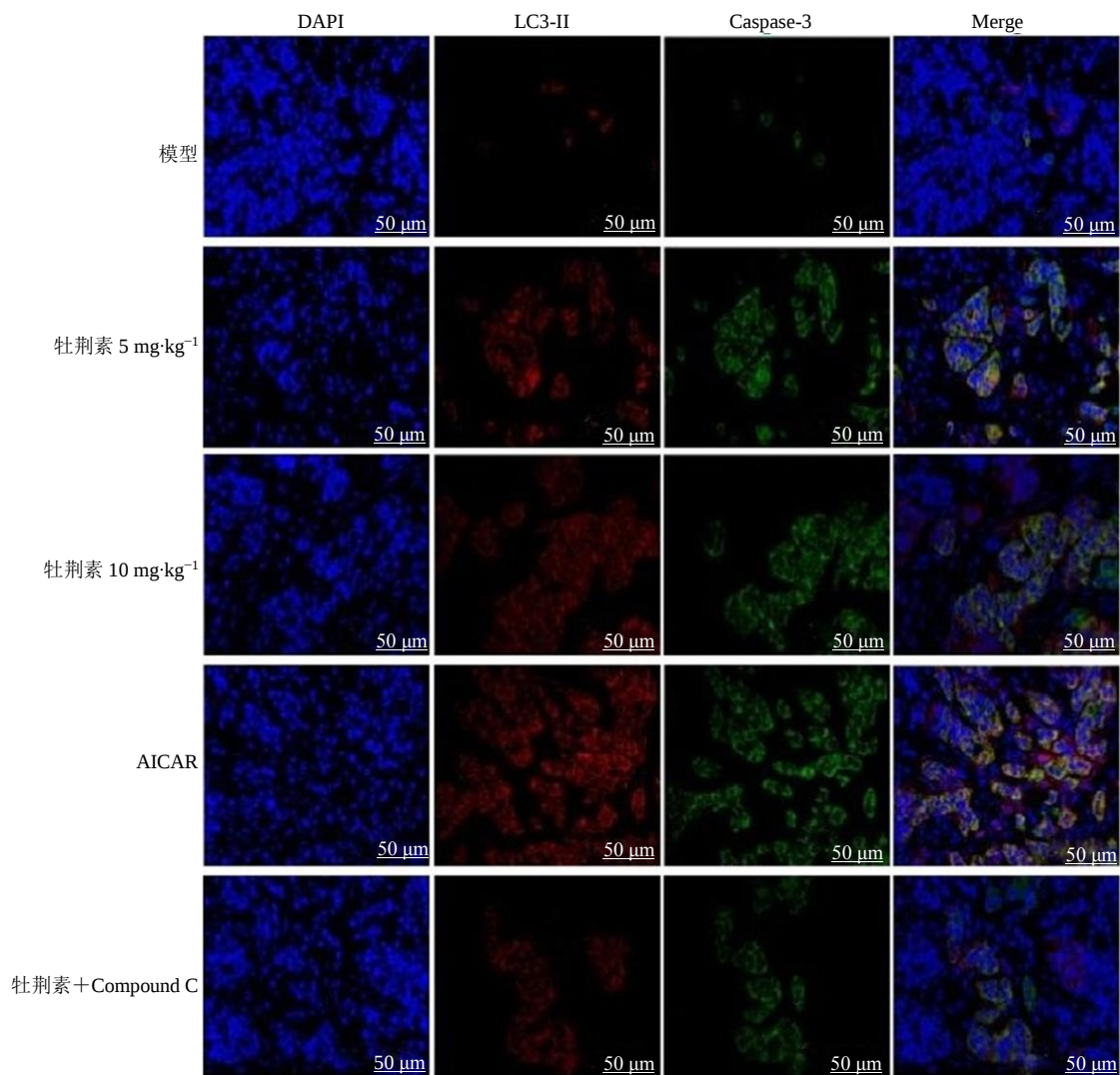


图 6 各组鼻咽癌裸鼠移植瘤组织中 LC3-II、Caspase-3 平均荧光强度表达 (IF, ×400)

Fig. 6 Mean fluorescence intensity expression of LC3-II and Caspase-3 in nude mice xenograft tissues nasopharyngeal carcinoma tissues in each group (IF, ×400)

荆素+Compound C 组移植瘤组织中 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 比值均显著降低 ($P < 0.05$), 见图 7、表 5。

3 讨论

鼻咽癌来源鼻黏膜上皮, 是常见的头颈部恶性肿瘤之一, 具有明显的地域差异, 同步方化疗被认

表 4 各组鼻咽癌裸鼠移植瘤组织中 LC3-II、Caspase-3 平均荧光强度表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Comparison of LC3-II and Caspase-3 mean fluorescence intensity expression in nasopharyngeal carcinoma xenograft tissues of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	LC3-II	Cspase-3
模型	—	100.34 ± 18.91	394.15 ± 25.66
牡荆素	5	437.65 ± 24.67*	779.15 ± 49.82*
	10	734.77 ± 45.77*	994.47 ± 75.58*
AICAR	200	1 048.33 ± 88.14*	1 430.32 ± 124.07*
牡荆素+Compound C	10+20	311.25 ± 45.11 [#]	544.02 ± 52.23 [#]

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与牡荆素 10 mg·kg⁻¹ 组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs vitexin 10 mg·kg⁻¹ group.

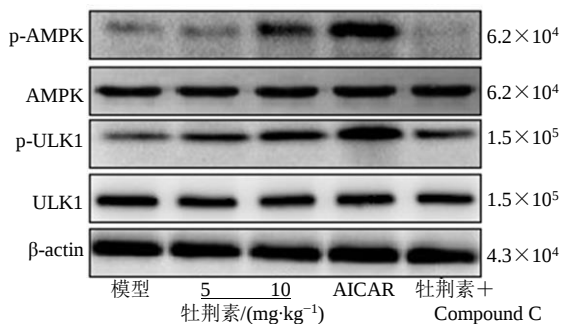


图 7 各组裸鼠移植瘤组织中 AMPK/ULK1 通路相关蛋白表达条带图

Fig. 7 Expression bands of AMPK/ULK1 pathway related proteins in xenograft tissues of nude mice in each group

表 5 各组鼻咽癌裸鼠移植瘤组织 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Comparison of p-AMPK/AMPK, p-ULK1/ULK1 levels in nasopharyngeal carcinoma xenograft tissues of nude mice in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	p-AMPK/AMPK	p-ULK1/ULK1
模型	—	0.32 ± 0.05	0.45 ± 0.08
牡荆素	5	0.48 ± 0.07*	0.81 ± 0.14*
	10	1.18 ± 0.16*	1.27 ± 0.18*
AICAR	200	1.97 ± 0.23*	1.85 ± 0.15*
牡荆素+Compound C	10+20	0.21 ± 0.04 [#]	0.43 ± 0.06 [#]

与模型组比较: * $P < 0.05$; 与牡荆素 10 mg·kg⁻¹ 组比较: [#] $P < 0.05$ 。

* $P < 0.05$ vs model group; [#] $P < 0.05$ vs vitexin 10 mg·kg⁻¹ group.

外,既往多数关于牡荆素抗肿瘤的研究仅停留在细胞水平,体内实验的研究相对缺乏^[9]。为此,本研究首先通过构建鼻咽癌 CNE-2 细胞裸鼠移植瘤模型,观察牡荆素对肿瘤生长的影响。结果显示,与模型组相比,牡荆素各剂量组肿瘤体积明显减小,肿瘤质量明显减轻,且肿瘤细胞生长较差,可见肿瘤细胞排列疏松,部分细胞胞质减少,细胞核出现不同程度的固缩,细胞见出现淋巴细胞和中性粒细胞浸润,细胞凋亡率和 Caspase-3 蛋白表达和 Bax/Bcl-2 均显著升高,表明牡荆素具有抑制鼻咽癌裸鼠移植瘤生长的作用。

为是临床上治疗局部晚期鼻咽癌的主要手段。临床研究发现,长期的化疗药物治疗鼻咽癌具有不良反应大,敏感性差等缺点,常常导致鼻咽癌患者的治疗效果不佳^[8]。近年来,中医药在肿瘤的治疗中显现明显的优势和特色,能够有效改善患者治疗的有效率,提高患者的生活质量。多项研究表明,中药可以通过多靶点、多途径抑制鼻咽癌细胞增殖,促进细胞凋亡^[21-22]。牡荆素是一种生物活性黄酮类化合物,多存在于山里红叶、山楂干燥成熟果实或山楂叶中,具有显著抗炎、抗氧化及抗肿瘤等生物学功能,其中在抗肿瘤生物学作用中对于牡荆素的研究主要局限于肝癌、肺癌、结直肠癌等^[9],是否对其他类型的癌症具有同样的治疗作用尚不清楚。此

细胞自噬是一种程序化的细胞内的降解机制,通过清除受损的细胞器、非功能性蛋白质以及病原微生物等并递送至溶酶体中消化降解,并将回收营养物质供细胞和组织再利用^[23]。已有多项研究证实自噬与多种恶性肿瘤的发生、发展、侵袭和转移密切相关,且自噬对肿瘤细胞的生长具有促进和抑制的双重作用^[24-25]。Wang 等^[26]研究发现,CNE-2 细胞在放疗中诱发的自噬可以明显提高细胞的存活率,从而发挥对 CNE-2 细胞保护效应,而抑制自噬水平能够显著增加 CNE-2 细胞放疗的敏感性,降低细胞的存活率。Chow 等^[27]研究显示,次黄嘌呤能

够诱导鼻咽癌细胞自噬和凋亡, 激活自噬能够通过抑制 mTOR 通路抑制鼻咽癌细胞凋亡。Xu 等^[28]研究发现, 茶黄素能够通过诱导细胞自噬促进鼻咽癌细胞凋亡。以上研究关于自噬对鼻咽癌发挥相反的作用效果可能与治疗药物不同有关。LC3、p62 是自噬发生过程中的重要调控蛋白, 是反映自噬水平高低的标志性蛋白。本研究结果显示, 与模型组相比, 牡荆素组裸鼠肿瘤组织中 LC3-II 表达明显升高, p62 表达明显降低, 表明牡荆素能够通过诱导细胞自噬和凋亡, 从而抑制鼻咽癌肿瘤生长。AMPK/ULK1 信号通路已被证实可同时对细胞凋亡和自噬产生调节作用, 进而发挥抗肿瘤效果^[29]。当细胞受到氧化应激、缺氧刺激后, AMPK 通过磷酸化被显著激活, 从而抑制 mTOR 磷酸化, 促进 ULK1 Ser317 位点磷酸化, 激活细胞自噬^[30]。Xie 等^[15]研究显示, 在鼻咽癌细胞中 AMPK/ULK1 通路及自噬相关蛋白表达降低, 激活 AMPK/ULK1 通路能够诱导细胞自噬, 抑制鼻咽癌细胞增殖, 促进细胞凋亡。本研究结果显示, 与模型组相比, 牡荆素各剂量组 p-AMPK/AMPK、p-ULK1/ULK1 水平明显升高。Min 等^[31]研究发现, 硼替佐米能够通过调控 AMPK/ULK1 介导的细胞自噬, 诱导胰腺癌和结直肠癌癌细胞凋亡和细胞毒性, 但是此作用效果能够被 AMPK 抑制剂 Compound C 所取消。为进一步明确 AMPK/ULK1 介导的细胞自噬在牡荆素诱导鼻咽癌细胞凋亡中的作用。本研究通过对模型裸鼠 ip AMPK 激动剂/抑制剂后观察肿瘤体生长变化。本研究结果显示, 与模型组相比, AICAR 能够促进 AMPK/ULK1 通路活化, 上调 LC3-II, 下调 p62 表达, 促进细胞自噬, 诱导肿瘤细胞凋亡, 并最终抑制肿瘤体生长, 从而发挥与牡荆素相同的保护作用。与牡荆素高剂量组相比, AMPK 抑制剂 Compound C 处理后能够逆转牡荆素对鼻咽癌裸鼠移植瘤的抑制作用。

综上所述, 牡荆素能够通过激活 AMPK/ULK1 通路介导的自噬, 促进肿瘤细胞凋亡, 进而抑制鼻咽癌 CNE-2 细胞裸鼠移植瘤生长。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen Y P, Chan A T C, Le Q T, *et al.* Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2019, 394(10192): 64-80.
- [2] Guan S Z, Wei J R, Huang L K, *et al.* Chemotherapy and chemo-resistance in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Eur J*

- Med Chem*, 2020, 207: 112758.
- [3] 刘明东, 朱锦红. 自噬与肿瘤化疗耐药关系的研究进展 [J]. *现代肿瘤医学*, 2023, 31(17): 3314-3318.
- [4] Zhu Q W, Zhang Q C, Gu M, *et al.* MIR106A-5p upregulation suppresses autophagy and accelerates malignant phenotype in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Autophagy*, 2021, 17(7): 1667-1683.
- [5] Lu Z Y, Zhou Y D, Jing Q C. Wnt5a-mediated autophagy promotes radiation resistance of nasopharyngeal carcinoma [J]. *J Cancer*, 2022, 13(7): 2388-2396.
- [6] 李征, 蔡晓航, 李钢, 等. 去氢木香内酯通过 PI3K/Akt/mTOR 通路对鼻咽癌细胞自噬和凋亡的影响及机制 [J]. *广东药科大学学报*, 2023, 39(1): 100-105.
- [7] Wang J, Liu G X, Li X J, *et al.* Curcumol simultaneously induces both apoptosis and autophagy in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Phytother Res*, 2021, 35(12): 7004-7017.
- [8] 彭佳欣, 陶阳阳, 彭江敏, 等. 血根碱联用 5-氟尿嘧啶对鼻咽癌裸鼠移植瘤细胞自噬和凋亡的影响 [J]. *中国药理学杂志*, 2022, 57(24): 2092-2098.
- [9] 盛亚男, 王长远. 牡荆素预防和治疗疾病作用机制研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(17): 2156-2161.
- [10] 董六一, 邵旭, 江勤, 等. 牡荆素对大鼠实验性心肌缺血损伤的保护作用及其机制 [J]. *中草药*, 2011, 42(7): 1378-1383.
- [11] Chen J F, Zhong J C, Liu Y Y, *et al.* Purified vitexin compound 1, a new neolignan isolated compound, promotes PUMA-dependent apoptosis in colorectal cancer [J]. *Cancer Med*, 2018, 7(12):6158-6169.
- [12] Liu X L, Jiang Q F, Liu H M, *et al.* Vitexin induces apoptosis through mitochondrial pathway and PI3K/Akt/mTOR signaling in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Biol Res*, 2019, 52(1): 7.
- [13] Lee J H, Mohan C D, Shanmugam M K, *et al.* Vitexin abrogates invasion and survival of hepatocellular carcinoma cells through targeting STAT3 signaling pathway [J]. *Biochimie*, 2020, 175: 58-68.
- [14] Wang W B, Cheng H B, Gu X L, *et al.* The natural flavonoid glycoside vitexin displays preclinical antitumor activity by suppressing NF- κ B signaling in nasopharyngeal carcinoma [J]. *Onco Targets Ther*, 2019, 12: 4461-4468.
- [15] Xie X H, Lin W Z, Zheng W L, *et al.* Downregulation of G2/mitotic-specific cyclinB1 triggers autophagy via AMPK-ULK1-dependent signal pathway in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(2): 94.
- [16] Zhang S L, Guo C L, Chen Z G, *et al.* Vitexin alleviates ox-LDL-mediated endothelial injury by inducing

- autophagy via AMPK signaling activation [J]. *Mol Immunol*, 2017, 85: 214-221.
- [17] Li Y H, Sun Q H, Li H, *et al*. Vitexin suppresses renal cell carcinoma by regulating mTOR pathways [J]. *Transl Androl Urol*, 2020, 9(4): 1700-1711.
- [18] 魏璐璐, 吉文伟, 黄维平. 番泻苷 B 抑制 STAT3 和 ERK1/2 活化对鼻咽癌 CNE-2 细胞生长、侵袭及裸鼠成瘤的影响 [J]. *临床与病理杂志*, 2020, 40(3): 547-555.
- [19] 侯芳芳, 李向斌. 牡荆素调控 NF- κ B 信号通路在 MCAO 大鼠中的抗炎、神经保护作用及机制研究 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2022, 20(10): 1779-1785.
- [20] 邓宏哲, 陈昆, 李鹏, 等. 人参皂苷 Rg₁ 通过调控 AMPK/NLRP3 通路介导的细胞焦亡抑制大鼠肺纤维化研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(3): 841-848.
- [21] 杨西国, 杨西霞, 朱婷, 等. 穗花杉双黄酮对鼻咽癌细胞恶性生物学行为的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(21): 3111-3115.
- [22] 胡桐, 勾文峰, 任中昊, 等. 淫羊藿素通过调控铁死亡增加鼻咽癌细胞的放射敏感性 [J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(10): 1665-1673.
- [23] Kocaturk N M, Akkoc Y, Kig C, *et al*. Autophagy as a molecular target for cancer treatment [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2019, 134: 116-137.
- [24] Zamame Ramirez J A, Romagnoli G G, Kaneno R, *et al*. Inhibiting autophagy to prevent drug resistance and improve anti-tumor therapy [J]. *Life Sci*, 2021, 265: 118745.
- [25] Li C, Wang L. TFEB-dependent autophagy is involved in scavenger receptor OLR1/LOX-1-mediated tumor progression [J]. *Autophagy*, 2022, 18(2): 462-464.
- [26] Wang Y S, Yin W Z, Zhu X W. Blocked autophagy enhances radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 *in vitro* [J]. *Acta Otolaryngol*, 2014, 134(1): 105-110.
- [27] Chow S E, Chen Y W, Liang C A, *et al*. Wogonin induces cross-regulation between autophagy and apoptosis via a variety of Akt pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2012, 113(11): 3476-3485.
- [28] Xu J, Wang S J, Bu S S, *et al*. Theaflavin promoted apoptosis in nasopharyngeal carcinoma unexpectedly via inducing autophagy *in vitro* [J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2022, 25(1): 68-74.
- [29] Liu J, Long S Y, Wang H N, *et al*. Blocking AMPK/ULK1-dependent autophagy promoted apoptosis and suppressed colon cancer growth [J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 19: 336.
- [30] 毛治尉, 王东伟, 武永新, 等. 白桦脂酸调节 AMPK/mTOR/ULK1 信号通路对冠心病大鼠血管平滑肌细胞自噬和凋亡的影响 [J]. *实用药物与临床*, 2023, 26(8): 679-686.
- [31] Min H, Xu M, Chen Z R, *et al*. Bortezomib induces protective autophagy through AMP-activated protein kinase activation in cultured pancreatic and colorectal cancer cells [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 74(1): 167-176.

[责任编辑 高源]