

• 药理与临床 •

吴茱萸碱通过 Hippo-YAP 通路诱导人肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的实验研究

赵 爽¹, 郭星娴¹, 周 鹏¹, 李国利^{1,2}, 李 静^{1*}, 陈地龙^{1,2*}

1. 重庆医科大学基础医学院 组织细胞工程与干细胞研究室, 组织学与胚胎学教研室, 重庆 400016

2. 重庆三峡医药高等专科学校, 重庆 400016

摘要: **目的** 探讨吴茱萸碱对人肝癌细胞株 BEL-7402 凋亡的影响并阐明其发挥作用的可能机制。**方法** CCK-8 法检测吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞增殖的影响; Hoechst 33258 染色观察吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞凋亡现象的影响; 流式细胞术观察吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞凋亡和周期的影响; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 和 Western blotting 实验检测 Hippo-YAP 通路中哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 1 (MST1)、MST2、大肿瘤抑制因子 1 (LATS1) 和 Yes 相关蛋白 (YAP) 在正常人肝细胞株 HL-7702 与 BEL-7402 细胞中的表达差异及吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞这些关键基因表达水平的影响; 免疫荧光实验观察吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞中 YAP 表达水平的影响。**结果** 吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞增殖活力具有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 呈浓度和时间依赖性; Hoechst 33258 染色显示吴茱萸碱能够引起 BEL-7402 细胞出现核固缩、核边集等凋亡的典型形态学改变。流式细胞术结果提示吴茱萸碱能够诱导 BEL-7402 细胞出现凋亡数目增多和 G₂/M 期阻滞 ($P < 0.01$); qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果提示, 与 HL-7702 细胞相比, MST2 和 LATS1 在 BEL-7402 细胞中的表达明显下调 ($P < 0.05$), YAP 则明显升高 ($P < 0.05$); 吴茱萸碱能够激活 Hippo 信号通路, 分别上调 MST2、LATS1 和抑制 YAP 在 BEL-7402 细胞中的表达水平 ($P < 0.05$)。免疫荧光结果显示吴茱萸碱能够显著抑制 BEL-7402 细胞中过表达的 YAP 荧光强度 ($P < 0.01$)。**结论** 吴茱萸碱能诱导 BEL-7402 细胞的凋亡, 其机制可能是通过激活 Hippo 信号通路, 进而抑制下游关键基因 YAP 的表达。

关键词: 吴茱萸碱; 肝癌; 凋亡; BEL-7402 细胞; Hippo-YAP 通路**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)20-4962-07**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.20.018

Evodiamine induces apoptosis of human hepatoma cell line BEL-7402 by Hippo-YAP pathway

ZHAO Shuang¹, GUO Xing-xian¹, ZHOU Peng¹, LI Guo-li^{1,2}, LI Jing¹, CHEN Di-long^{1,2}

1. Laboratory of Stem Cell and Tissue Engineering, Department of Histology and Embryology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

2. Chongqing Three Gorges Medical College, Chongqing 400016, China

Abstract: Objective To investigate the effects and the underlying mechanisms of evodiamine (EVO) on apoptosis of hepatocellular carcinoma (HCC) BEL-7402 cells. **Methods** Cell counting kit-8 (CCK-8) assay was used to detect the effect of EVO on proliferation activity of BEL-7402 cells. Hoechst 33258 staining was used for observing morphological changes of apoptosis. The cell apoptosis and cycle distribution were analyzed by flow cytometry. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) and Western blotting assay were used to detect the expression levels of key genes from Hippo-YAP pathway in HL-7702 and BEL-7402 cells, including mammalian STE20-like protein kinase 1/2 (MST1/2), large tumor suppressor 1 (LATS1), and Yes-associated protein (YAP), then to examine the effect of EVO on the expression levels of these genes in BEL-7402 cells. The effect of EVO on the expression of YAP in hepatocellular carcinoma BEL-7402 cells was observed by immunofluorescence assay. **Results** The proliferation of BEL-7402 cells were significantly inhibited by EVO in a dose- and time-dependent manners. Hoechst 33258 staining showed that EVO induced BEL-7402 cell typical

收稿日期: 2019-04-21

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31271368); 重庆市教委重点项目 (KJZD-K201802701)

作者简介: 赵 爽 (1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中草药抗肝癌的病理生理机制研究。E-mail: 676788981@qq.com

*通信作者 李 静, 女, 博士, 副教授, 硕士生导师。Tel: (023)68485614 E-mail: 100392@cqmu.edu.cn

陈地龙, 男, 博士, 研究员, 博士生导师。Tel: (023)68485614 E-mail: xinmengyuandlc@163.com

apoptotic morphology, such as nuclear chromatin concentration and edge accumulation. Besides, flow cytometry tests showed that BEL-7402 cell apoptosis were increased and cell cycle arrested in G₂/M phase after being treated with EVO ($P < 0.01$). qRT-PCR and Western blotting showed that the expression level of MST2 and LATS1 were lower in BEL-7402 cell ($P < 0.05$), while the transcription and protein levels of YAP were significantly higher ($P < 0.05$). EVO could activate Hippo signal pathway, upregulate the expression of MST2 and LATS1 and then inhibit the expression of YAP in BEL-7402 cell ($P < 0.05$). Immunofluorescence assay also validated that EVO would significantly inhibit the overexpression of YAP in BEL-7402 cell ($P < 0.01$). **Conclusion** EVO can induce the apoptosis of BEL-7402 cells, which may be through activating Hippo signal pathway and then down-regulate the expression of YAP.

Key words: evodiamine; hepatocellular carcinoma; apoptosis; BEL-7402 cells; Hippo-YAP signal pathway

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是一种常见的消化系统恶性肿瘤^[1], 每年全球有 80 万 HCC 患者, 其中我国占有 50% 以上^[2]。吴茱萸碱是吴茱萸 *Evodia rutaecarpa* Benth 的主要活性成分之一, 研究发现其药理作用广泛, 具有抗炎镇痛和免疫增强等活性, 还能够调控结肠癌 SW480 细胞和肝癌 HepG2 细胞等多种肿瘤细胞的增殖^[3-5], 然而其发挥抗肿瘤作用的机制尚不完全明确。Hippo-Yes 相关蛋白 (yes-associated protein, YAP) 通路是近年新发现参与调节肝癌形成的一条重要传导通路, 在肝癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等恶性行为中发挥重要作用^[6]。前期有学者发现当归提取物紫花前胡素能够通过 Hippo-YAP 信号通路抑制 HepG2 细胞的增殖^[7], 故笔者推测吴茱萸碱促进肝癌细胞凋亡可能也与 Hippo-YAP 信号通路有关, 因此本研究主要就吴茱萸碱诱导肝癌 BEL-7402 细胞凋亡的机制进行初步探讨。

1 材料

1.1 细胞株

正常人肝细胞株 HL-7702 和人肝癌细胞株 BEL-7402 均购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药物与试剂

吴茱萸碱 (质量分数 99.76%, 货号 S2382) 购自美国 Selleck 公司; Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 购于日本 DOJINDO 公司; 胎牛血清购自乌拉圭 Lonser 公司 (货号 S711-001S); RPMI 1640 培养基和高糖培养基 DEME 均购自美国赛默飞世尔公司; PCR 试剂购自日本 TaKaRa 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)、凝胶配制试剂盒、青链霉素和 Hoechst 33258 染液购自碧云天生物技术有限公司; 一抗抗体哺乳动物 STE20 样蛋白激酶 2 (mammalian STE20-like protein kinase 2, MST2)、大肿瘤抑制因子 1 (large tumor suppressor 1, LATS1) 和 YAP 均购自美国 Abcam 公司; GAPDH 购自美国 Sigma 公司; 二抗抗体购自 Cell Signaling Technology 公司;

荧光二抗抗体购自 Abbkine 公司。

1.3 仪器

TGL-185 低温高速台式离心机 (长沙平凡仪器仪表有限公司平凡仪器); PowerPactmBasic 凝胶成像仪、电泳仪、电转仪、荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); DMi8 倒置显微镜、倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

在 37 °C、5% CO₂ 的孵箱中, BEL-7402 和 HL-7702 细胞分别培养于含 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DEME 高糖培养液和 RPMI 1640 培养液中。

2.2 CCK-8 法检测细胞活性

取对数生长期的 BEL-7402 细胞, 以 1×10^4 个/孔细胞接种于 96 孔板各孔中, 每孔 200 μ L 培养基。分为 3 组: 空白组, 未接种细胞, 仅加入 DMEM 高糖完全培养基; 对照组, 接种细胞且常规培养; 吴茱萸碱组, 细胞中分别加入含浓度为 0.25、1、4、8、16、32 μ mol/L 吴茱萸碱的 DMEM 高糖完全培养基。分别培养 24、48、72 h 后, 向每孔中加入 10 μ L CCK-8 工作液, 37 °C 孵育 2 h 后测定其吸光度 (A) 值 (波长 450 nm), 计算细胞生长抑制率, 每组 3 个复孔, 实验重复 3 次。

$$\text{生长抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{加药}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 Hoechst 33258 染色实验

取对数生长期的 BEL-7402 细胞, 以 2×10^4 个/孔细胞接种于已提前放置好细胞专用爬片的 24 孔板各孔中, 每孔 2 mL 培养基。实验分组如下: 对照组, 常规培养; 吴茱萸碱组, 给予含终浓度 16 μ mol/L 吴茱萸碱的 DMEM 高糖完全培养基。培养 48 h, 待细胞长至 80% 左右时取出, 弃培养液, 加入 0.5 mL 固定液, 10 min 后弃固定液并 PBS 清洗 2 遍, 每次 3 min。加入 0.5 mL 染色液, 染色 5 min 后, 去染色液, PBS 清洗 2 遍, 每次 3 min。将细胞爬片取出, 贴有细胞一面朝下放于滴有抗荧光淬

灭剂的载玻片上, 荧光显微镜下观察和采集图片, 每组 3 个复孔, 实验重复 3 次。

2.4 流式细胞术分析细胞凋亡和周期分布

取对数生长期的 BEL-7402 细胞, 以 5×10^4 个/孔细胞接种于 6 孔板各孔中, 每孔 3 mL 培养基。实验分组如下: 对照组, 常规培养; 吴茱萸碱组, 给予含终浓度 $16 \mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱的 DMEM 高糖完全培养基。48 h 后, 使用 0.25% 胰酶将其消化成单细胞悬液, PBS 缓冲液 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 重复 2 次。重悬细胞于 500 μL PBS (pH 7.2) 缓冲液中, 缓慢加入 500 μL 预冷 75% 乙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定并保存。若检测细胞凋亡, 离心弃去固定液, 3 mL PBS 重悬 5 min, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去 PBS, 加入 Annexin V-荧光素 (FTIC) /碘化丙啶 (PI) 染液双染后上机; 若检测周期, 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清, 3 mL 的 PBS 洗涤 1 次, 加入 400 μL PI 和 100 μL RNase A, 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育过夜, 流式细胞仪进行细胞周期检测。

2.5 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 反应

实验分组如下: 正常肝细胞组; 对照组, 常规培养的 BEL-7402 细胞; 吴茱萸碱组, 给予 BEL-7402 细胞含终浓度 $16 \mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱的 DMEM 高糖完全培养基。培养 48 h 后收集各组细胞, 加入 1 mL Trizol 震荡后, 再加入适量氯仿和异丙醇, 提取总 RNA, 在 260 nm 和 280 nm 处检测浓度, 依据 TaKaRa 逆转录和扩增试剂盒说明书, 将提取的 RNA 逆转录为 cDNA 后进行扩增, 扩增体系为 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s, 40 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 s 和 60 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 s。设置 3 个复孔, 以 β -actin 为内参进行 qRT-PCR 检测, 该实验重复 3 次。MST1 引物序列: 正向 5'-CCTCCACAA-TTCCGAAAACCA-3', 反向 5'-GCACTCCTGACAA-ATGGGTG-3'; MST2 引物序列: 正向 5'-AGGAACA-GCAACGAGAATTGG-3', 反向 5'-CCCCTTCACT-CATCGTGCTT-3'; LATS1 引物序列: 正向 5'-AA-TTTGGGACGCATCATAAAGCC-3', 反向 5'-TCGTC-GAGGATCTTGTAAGTCTC-3'; YAP 引物序列: 正向 5'-CAAATCCCCTCCCGACA-3', 反向 5'-TCTGAC-CAGAAGATGTCTTTGC-3'; β -actin 引物序列: 正向 5'-TTGTTACAGGAAGTCCCTTGCC-3', 反向 5'-AT-GCTATCACCTCCCCTGTGTG-3'。

2.6 免疫印迹实验 (Western blotting)

实验分组同“2.5”项, 收集各组细胞, 使用全蛋白裂解液抽提试剂盒提取细胞蛋白和 BCA

蛋白浓度测定试剂盒检测各组蛋白浓度, 蛋白变性后于 -80°C 长期保存至使用。蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 转至硝酸纤维素膜上, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h 后, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育一抗 MST2、LATS1 和 YAP (稀释比例均为 1:1 000)。TBST 洗膜 3 次后, 室温孵育二抗山羊抗兔 (稀释比例均为 1:10 000) 2 h, 再用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 使用 ECL 发光液检测蛋白表达情况, 实验重复 3 次。

2.7 免疫荧光实验

取对数生长期的 BEL-7402 细胞, 以 2×10^4 个/孔接种于提前铺有灭菌爬片的 24 孔板内, 待细胞贴壁后, 对照组常规培养, 加药组给予终浓度为 $16 \mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱, 培养 48 h 后, 使用 PBS 洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min 后, PBS 洗 3 次; 0.1% Triton X-100 作用 30 min, PBS 洗 3 次; 山羊血清封闭 1 h 后, 加入一抗抗体 (YAP, 1:100), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS 洗 3 次, 室温加入荧光二抗 (1:100) 孵育 2 h, 避光加入 DAPI (每孔 10 μL) 染核 5 min 后, PBS 洗 3 次, 取出细胞爬片放于滴有抗荧光淬灭剂的载玻片上, 荧光显微镜下拍照, 实验重复 3 次。

2.8 统计学处理

所有数据使用 SPSS 19.0 进行分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 方法。

3 结果

3.1 对 BEL-7402 细胞增殖的影响

CCK-8 检测结果显示 (图 1): 与对照组比较, 不同浓度的吴茱萸碱 (0.25、1、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$) 分别作用于 BEL-7402 细胞 24、48、72 h 后, BEL-7402 细胞的增殖均受到明显抑制, 差异显著 ($P < 0.01$), 且该生长抑制作用具有浓度和时间依赖性。选择吴茱萸碱 $16 \mu\text{mol/L}$ 和 48 h 作为后续实验最佳作用浓度和作用时间。

3.2 对 BEL-7402 细胞凋亡的影响

Hoechst 33258 染色结果显示 (图 2), 对照组发出均匀、淡蓝色荧光; 而吴茱萸碱诱导后的细胞出现典型细胞凋亡形态学特征, 包括核染色质浓缩聚集、核碎裂、核边集及发出蓝白色荧光等; 流式细胞术凋亡检测结果显示 (图 3): 对照组的凋亡细胞比例仅为 $(2.673 \pm 0.098)\%$, 而经 $16 \mu\text{mol/L}$ 吴茱萸碱处理的细胞凋亡比例明显增多, 达到 $(58.760 \pm 3.002)\%$, 差异显著 ($P < 0.01$)。

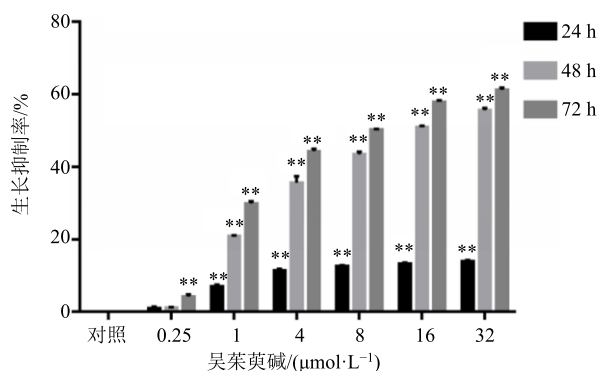


图 1 吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 1 Inhibitory effect of EVO on BEL-7402 cells by CCK-8 assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

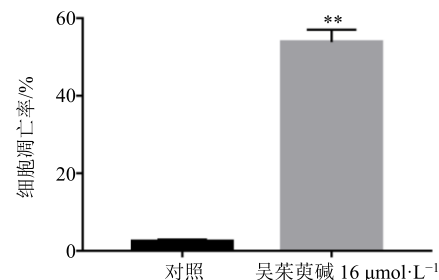
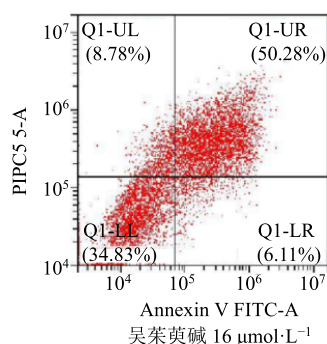
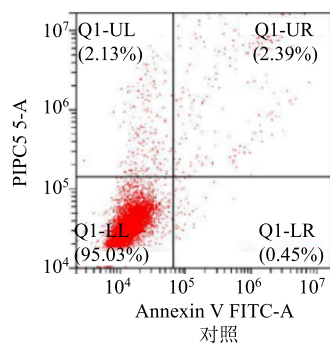


图 3 吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 3 Effect of EVO on apoptosis of BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

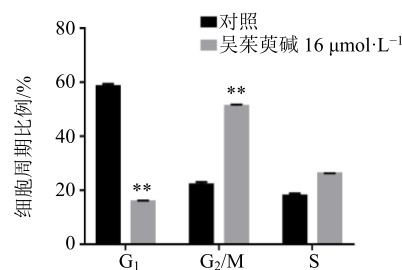
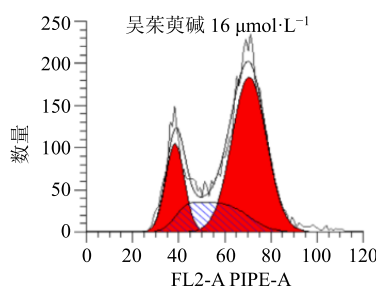
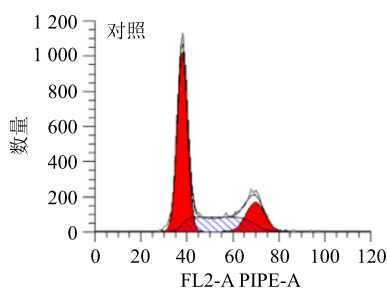


图 4 吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞周期分布的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 4 Effect of EVO on cell cycle distribution of BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 Hippo-YAP 通路在 HL-7702 及 BEL-7402 细胞中的表达

qRT-PCR 和 Western blotting 结果显示 (图 5): 与 HL-7702 细胞比较, BEL-7402 细胞的 Hippo-YAP 信号通路中关键基因 MST2 转录表达水平下调 ($P < 0.01$), LATS1 转录和蛋白表达水平均明显下调 ($P < 0.05$), 而下游 YAP 在转录和蛋白的表达水平均明

显提高 ($P < 0.05, 0.01$), MST1 基因在转录表达水平未见显著性改变, 证实 Hippo-YAP 信号通路在肝癌中有明显变化, 可能发挥有重要作用。

3.5 对 BEL-7402 细胞中 Hippo-YAP 通路相关基因表达水平的影响

qRT-PCR 和 Western blotting 检测结果显示 (图 6): 与对照组比较, BEL-7402 细胞经吴茱萸碱

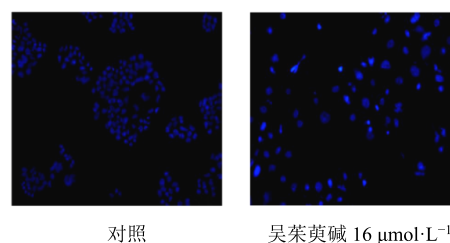


图 2 Hoechst 33258 染色结果 ($\times 200$)
Fig. 2 Results of Hoechst 33258 staining ($\times 200$)

3.3 对 BEL-7402 细胞周期的影响

流式细胞术周期检测结果显示 (图 4): 与对照组比较, BEL-7402 细胞经吴茱萸碱处理后, G_2/M 期的细胞比例明显增多 ($P < 0.01$), 而 G_1 期的细胞比例减少 ($P < 0.01$), 提示吴茱萸碱能通过将 BEL-7402 细胞阻滞在 G_2/M 期, 进而抑制其生长。

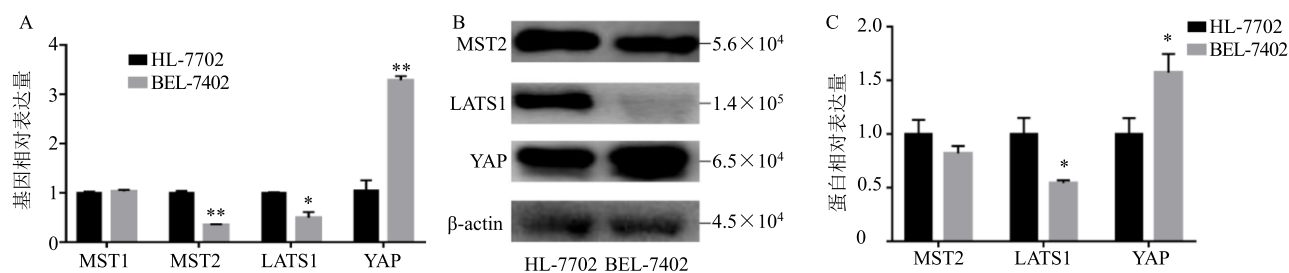


图 5 HL-7702 和 BEL-7402 细胞中 Hippo-YAP 信号通路相关的 mRNA (A) 和蛋白 (B、C) 的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 5 Expression levels of mRNA (A) and proteins (B, C) related to Hippo-YAP signal pathway in HL-7702 and BEL-7402 cell lines ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

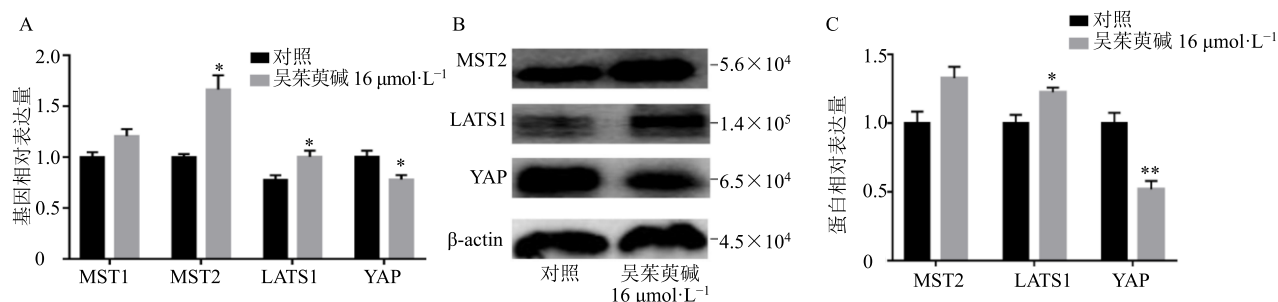


图 6 吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞中 Hippo-YAP 信号通路关键分子基因 (A) 和蛋白 (B、C) 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 6 Effect of EVO on expression (A) of key molecules in Hippo-YAP signaling pathway and protein expression (B, C) levels in BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

处理后, MST2 和 LATS1 基因在转录和蛋白表达水平均上调 ($P < 0.05$), 而 YAP 基因在转录和蛋白表达水平均下调 ($P < 0.05, 0.01$), MST1 基因在转录表达水平未见显著性改变。

3.6 对 BEL-7402 细胞中 YAP 免疫荧光表达水平的影响

免疫荧光结果显示 (图 7): 与对照组比较, 16 $\mu\text{mol/L}$ 的吴茱萸碱作用于 BEL-7402 细胞 48 h 后,

活细胞数量明显减少, YAP 的相对荧光表达强度显著减少 ($P < 0.01$)。

4 讨论

HCC 是目前我国常见的恶性肿瘤之一, 死亡率高, 发病率逐年上升^[1], 外科手术治疗效果差, 临床抗肿瘤治疗药物价格昂贵且副作用较大, 因此急需找到能够有效治疗肝癌的廉价且低毒的药物。中药作为祖国传统医药, 价格低廉, 大量基础研究发

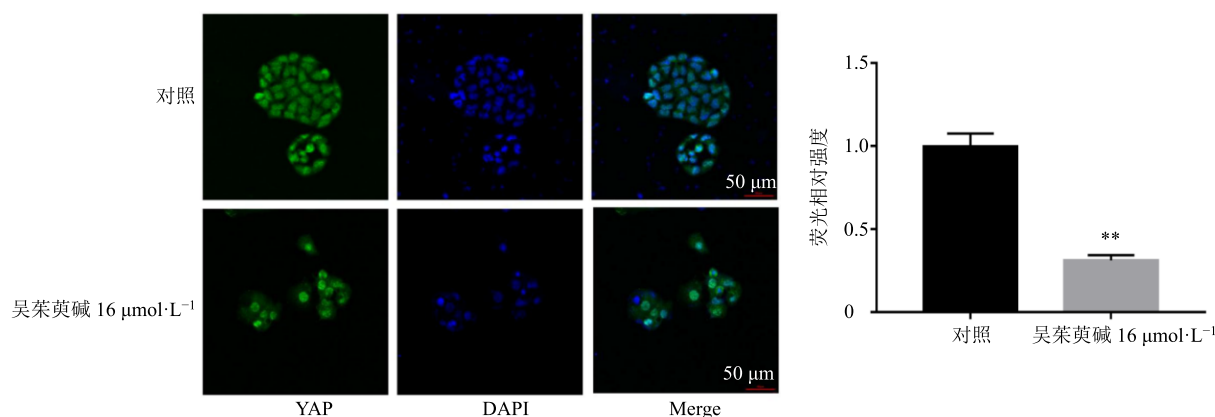


图 7 吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞中 YAP 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 7 Effect of EVO on expression of YAP in BEL-7402 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

现其具有多种潜在生理功能,如抗肿瘤、抗炎等,正逐渐受到研究人员的关注。

吴茱萸碱的抗肿瘤作用是近年来的研究热点,大量研究证实,吴茱萸碱可以显著抑制多种肿瘤细胞的增殖,如肺癌^[8]、卵巢癌^[9]、胃癌^[10]以及肝癌^[11]等。目前有关吴茱萸碱对 HCC 发挥抑制增殖作用的相关机制尚不明确,前期有少量研究发现吴茱萸碱可以通过 WWOX 依赖的信号通路^[12]和 STAT3^[11]等信号通路发挥抗肝癌作用。多项研究已证实 Hippo-YAP 信号通路在肝癌形成中发挥着重要作用,但其是否可被吴茱萸碱所调控,目前尚未见报道。因此本研究主要观察吴茱萸碱对于肝癌细胞凋亡的影响,并初步探索其与 Hippo-YAP 信号通路之间的关系。

本研究首先通过 CCK-8 法检测吴茱萸碱对肝癌细胞 BEL-7402 的增殖抑制作用。结果显示 0.25、1、4、8、16、32 $\mu\text{mol/L}$ 的吴茱萸碱在 24、48、72 h 均可明显抑制该细胞的增殖,并呈时间和浓度依赖性。其中在 16 $\mu\text{mol/L}$ 的吴茱萸碱作用 48 h 后, BEL-7402 细胞发生了明显的增殖抑制,因此在后续的实验中选用该加药浓度和作用时间,进一步研究吴茱萸碱对 BEL-7402 细胞凋亡的影响及可能机制。Hoechst 染色检测吴茱萸碱对肝癌细胞凋亡的影响,发现吴茱萸碱能诱导肝癌细胞凋亡数目增多。流式细胞术结果也证实 BEL-7402 细胞经吴茱萸碱处理后,凋亡细胞数量明显增多,且细胞周期被阻滞在 G₂/M 期。

Hippo-YAP 信号通路可调控肝脏器官的大小,调节肝癌细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等恶性行为^[5,13]。在哺乳动物中,该通路主要由关键基因 MST1/2、LATS1/2 和 YAP 等构成^[14]。Hippo 通路接收到上游活化信号后, MST1/2 激酶被首先激活,进而激活 LATS1/2 激酶,被激活的 LATS1/2 能够抑制下游效应分子 YAP,从而实现对细胞和器官稳态的调控^[15-16]。临床肝癌研究发现, Hippo 信号通路的失调与人类肝癌的发生过程密切相关^[17]。

YAP 是 Hippo 下游最重要的效应子之一,是一种非 DNA 结合的辅助转录因子, YAP 进入细胞核,与核内的转录因子 TEADs 结合,再利用 DNA 中有结合功能的区域,将 YAP/TEADs 的复合物与 DNA 相结合,启动下游靶基因的转录。有文献报道转基因 YAP 过表达小鼠中出现肝细胞过度增殖和癌变的现象^[13],在小鼠肝脏中持续诱导 YAP 基因过量

表达也会引起致死性 HCC^[18],而敲除 YAP 可以明显减缓肝癌细胞的增殖速度^[19],这些结果均提示 YAP 在 HCC 形成过程中起着关键性作用。本研究采用 qRT-PCR 和 Western blotting 实验检测了正常人肝细胞 HL-7702 和 BEL-7402 细胞中的 YAP 表达水平,发现 BEL-7402 细胞中的 YAP 表达水平相对 HL-7702 中明显较高;免疫荧光实验检测了 BEL-7402 细胞中 YAP 的表达,进一步证实了 YAP 的高表达是肝癌发生、发展的可能诱因之一。

Hippo 信号通路的核心作用是失活主要效应分子 YAP,进而影响细胞的增殖、分化以及凋亡,从而影响器官的大小以及肿瘤的形成。研究证实, Hippo 信号通路的调节作用失活,将导致细胞无限增殖,同时抑制细胞凋亡,加快肿瘤的恶性发展。研究发现,阻断 Hippo-YAP 信号通路后,上调 YAP 的表达能够明显促进肝癌的发生和恶化^[20]。在本研究中也发现, BEL-7702 细胞的 Hippo 信号通路中的 MST2 和 LATS1 表达水平相比 HL-7702 细胞明显下调,证实 Hippo 信号通路在肝癌细胞中呈抑制状态,而 YAP 表达水平却明显上调。此外,有研究证实紫花前胡素能够通过 Hippo-YAP 信号通路抑制 HepG2 细胞的生长^[7]。因此,猜测吴茱萸碱可能也是通过激活 Hippo 信号通路,下调 YAP 的表达,从而发挥其诱导肝癌细胞凋亡的作用。本实验通过 qRT-PCR、Western blotting 和免疫荧光实验证实了前期的猜想,吴茱萸碱处理肝癌细胞后, Hippo 信号通路中的关键基因 MST2 和 LATS1 表达水平明显上调,而 YAP 不仅在转录和蛋白水平表达量均明显下调,且 YAP 的荧光表达量也明显下调。以上结果均提示 Hippo 信号通路中的 YAP 在吴茱萸碱发挥抗肝癌中发挥至关重要的作用,因此, YAP 的特异性抑制剂可能也具有抗肝癌的作用,对抑制 YAP 表达的肝癌细胞,吴茱萸碱处理是否还具有抗肝癌作用,这些推测及猜想还有待于后期实验去验证。

本实验结果显示,吴茱萸碱可以明显促进 BEL-7402 细胞的凋亡,其机制可能是通过激活 Hippo 信号通路,上调该信号通路中的关键基因 MST2 和 LATS1 的表达,进而抑制其下游效应分子 YAP 的表达来发挥作用。此外,该体外实验不仅证实了吴茱萸碱是一种潜在治疗肝癌的药物,同时也为以后的肝癌临床药物治疗研究提供了新的方向。

参考文献

- [1] Wallace M C, Preen D, Jeffrey G P, *et al.* The evolving epidemiology of hepatocellular carcinoma: A global perspective [J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 9(6): 765-779.
- [2] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [3] Chan K Y, Leung K T, Tam Y H, *et al.* Genome-wide expression profiles of necrotizing enterocolitis versus spontaneous intestinal perforation in human intestinal tissues: Dysregulation of functional pathways [J]. *Ann Surg*, 2014, 260(6): 1128-1137.
- [4] Guo X X, Li X P, Zhou P, *et al.* Evodiamine induces apoptosis in SMMC-7721 and HepG2 cells by suppressing NOD1 signal pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, doi: 10.3390/ijms19113419.
- [5] 吕艳伟, 郭星娟, 周 鹏, 等. 吴茱萸碱激活结肠癌细胞自噬抑制其增殖的研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(20): 4851-4856.
- [6] Nguyen Q, Anders R A, Alpini G, *et al.* Yes-associated protein in the liver: Regulation of hepatic development, repair, cell fate determination and tumorigenesis [J]. *Dig Liver Dis*, 2015, 47(10): 826-835.
- [7] Li J, Wang H, Wang L, *et al.* Decursin inhibits the growth of HepG2 hepatocellular carcinoma cells via Hippo/YAP signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(12): 2456-2465.
- [8] Lin L, Ren L, Wen L, *et al.* Effect of evodiamine on the proliferation and apoptosis of A549 human lung cancer cells [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(3): 2832-2838.
- [9] Chen T C, Chien C C, Wu M S, *et al.* Evodiamine from *Evodia rutaecarpa* induces apoptosis via activation of JNK and PERK in human ovarian cancer cells [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(1): 68-78.
- [10] Wen Z, Feng S, Wei L, *et al.* Evodiamine, a novel inhibitor of the Wnt pathway, inhibits the self-renewal of gastric cancer stem cells [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 36(6): 1657-1663.
- [11] Yang J, Cai X, Lu W, *et al.* Evodiamine inhibits STAT3 signaling by inducing phosphatase shatterproof 1 in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2013, 328(2): 243-251.
- [12] Hu C Y, Wu H T, Su Y C, *et al.* Evodiamine exerts an anti-hepatocellular carcinoma activity through a WWOX-dependent pathway [J]. *Molecules*, 2017, doi: 10.3390/molecules22071175.
- [13] Camargo F D, Gokhale S, Johnnidis J B, *et al.* YAP1 increases organ size and expands undifferentiated progenitor cells [J]. *Curr Biol*, 2007, 17(23): 2054-2060.
- [14] Edgar B A. From cell structure to transcription: Hippo forges a new path [J]. *Cell*, 2006, 124(2): 267-273.
- [15] Zhao B, Wei X, Li W, *et al.* Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control [J]. *Genes Dev*, 2007, 21(21): 2747-2761.
- [16] Yi J, Lu L, Yanger K, *et al.* Large tumor suppressor homologs 1 and 2 regulate mouse liver progenitor cell proliferation and maturation through antagonism of the coactivators YAP and TAZ [J]. *Hepatology*, 2016, 64(5): 1757-1772.
- [17] Jie L, Fan W, Weiqi D, *et al.* The hippo-yes association protein pathway in liver cancer [J]. *Gastroenterol Res Pract*, 2013, doi: 10.1155/2013/187070.
- [18] Dong J, Feldmann G, Huang J, *et al.* Elucidation of a universal size-control mechanism in *Drosophila* and mammals [J]. *Cell*, 2007, 130(6): 1120-1133.
- [19] Perra A, Kowalik M A, Ghiso E, *et al.* YAP activation is an early event and a potential therapeutic target in liver cancer development [J]. *J Hepatol*, 2014, 61(5): 1088-1096.
- [20] Wang J, Ma L, Weng W, *et al.* Mutual interaction between YAP and CREB promotes tumorigenesis in liver cancer [J]. *Hepatology*, 2013, 58(3): 1011-1020.