

山楂酸通过 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导鼻咽癌 CNE2 细胞自噬研究

周芳亮^{1,2}, 胡梅^{1,2}, 胡晶², 蔺婷², 何迎春^{1,2*}

1. 湖南中医药大学医学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南省中医药防治眼耳鼻咽喉疾病与视功能保护工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208

摘要: 目的 研究山楂酸对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖和自噬的影响, 探讨 PI3K/Akt/mTOR 通路在该过程中的调控作用。方法 采用 CCK-8 法检测不同浓度的山楂酸作用不同时间对 CNE2 细胞增殖的影响; MDC 染色法检测不同浓度山楂酸处理 CNE2 细胞 24 h 后自噬小体的形成情况; Western blotting 法检测山楂酸对 CNE2 细胞自噬相关蛋白及 PI3K/AKT/mTOR 通路关键蛋白表达的影响。结果 与溶剂对照组相比, 山楂酸可以抑制 CNE2 细胞的增殖, 而且随药物处理时间和浓度的增加, 抑制效果增强 ($P < 0.05$); 山楂酸能够诱导细胞自噬小体的形成, 且可显著提高 Atg5 和 LC3-II/LC3-I 的表达, 降低 p62 的表达; 此外, 山楂酸可抑制 PI3K-p110 α 、p-Akt 和 p-mTOR 的蛋白表达。结论 山楂酸可抑制鼻咽癌细胞增殖, 诱导鼻咽癌细胞发生自噬, 其机制与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有关, 可作为治疗鼻咽癌的潜在药物研究。

关键词: 山楂酸; 自噬; 鼻咽癌; PI3K/Akt/mTOR; 细胞增殖

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)09-2481-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.024

Maslinic acid induces autophagy through PI3K/Akt/mTOR pathway in human nasopharyngeal carcinoma cells

ZHOU Fang-liang^{1,2}, HU Mei^{1,2}, HU Jing², LIN Ting², HE Ying-chun^{1,2}

1. College of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. Hunan Provincial Engineering and Technological Research Center for Prevention and Treatment of Ophthalmology and Otolaryngology Diseases with Chinese Medicine and Protecting Visual Function, Changsha 410208, China

Abstract: **Objective** To investigate the effects of maslinic acid (MA) on the proliferation and autophagy in nasopharyngeal carcinoma CNE2 cells and to elucidate the regulatory role of PI3K/Akt/mTOR pathway in this process. **Methods** The effect of MA on the proliferation of CNE2 cells was assessed by CCK-8. MDC staining of autophagic vacuoles was performed for autophagy analysis. Additionally, the levels of autophagy-and PI3K/Akt/mTOR-associated proteins were examined using western blot analysis. **Results** MA significantly inhibited the proliferation of CNE2 cells in a dose-and time-dependent manner. MA displayed autophagy-inducing effect, as shown by the increased MDC-labeled vacuoles, up-regulated LC3-II/LC3-I ratio and Atg5, as well as the down-regulated p62 level after MA treatment. Moreover, we observed that MA inhibited the expression of PI3K-p110 α and the phosphorylation of Akt and mTOR. **Conclusion** MA inhibits the proliferation and induces the autophagy of CNE2 cells, the mechanism may be related to the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. These results imply that MA may be a potential anti-cancer agent for use in the treatment of nasopharyngeal carcinoma.

Key words: maslinic acid; autophagy; nasopharyngeal carcinoma; PI3K/Akt/mTOR; cell proliferation

鼻咽癌是一种最常见的鳞状上皮细胞癌, 高发于东南亚和北非地区, 我国南方各省也是高发地区^[1]。在我国, 鼻咽癌的发病率为万分之二, 且每年新增

约 60 000 个鼻咽癌患者, 呈指数增长趋势^[2]。目前鼻咽癌的发病机制尚未完全明晰, 可能与遗传易感性 (如 11q、14q、3p 和 9p 的杂合性缺失)、EB 病

收稿日期: 2019-12-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81874408); 湖南省自然科学基金项目 (2017JJ3246); 湖南省自然科学基金项目 (2016JJ6117); 湖南中医药大学基础医学学科基金; 湖南省教育厅优秀青年基金 (19B439)

作者简介: 周芳亮, 女, 博士, 讲师, 研究方向为中医药防治肿瘤。Tel/Fax: (0731)88458710 E-mail: 6489032@qq.com

*通信作者 何迎春, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中医药防治鼻咽癌。Tel/Fax: (0731)88458710 E-mail: yingchunhe@aliyun.com

毒感染、免疫因素以及环境影响（化学致癌物）密切相关^[3]。因此，深入研究鼻咽癌的发生机制及其防治方法具有重要意义。

自噬是一种与凋亡、坏死并列的细胞程序性死亡方式，又被称作是 II 型程序性细胞死亡。近年来的研究发现自噬信号通路异常跟肿瘤的发生和发展密切相关，适度的自噬可使细胞适应不利因素从而利于肿瘤细胞的存活；但过度的自噬会损伤细胞器，从而导致细胞发生自噬性死亡^[4]。因此以自噬为靶点，寻找肿瘤等疾病的新治疗方法，也成为了研究的热点。

山楂酸是一种五环三萜酸，广泛存在于枇杷叶、油橄榄和山楂等多种天然植物中。研究发现山楂酸具有抗肿瘤、降血糖、抗炎、抗寄生虫等多种生物学活性^[5]。大多研究认为山楂酸通过诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用^[6-8]，近期有研究发现山楂酸可诱导肿瘤细胞自噬^[9]。但山楂酸对鼻咽癌细胞自噬是否有影响尚未见报道。本研究通过实验研究山楂酸对鼻咽癌 CNE2 细胞增殖及自噬的影响，并进一步探明其抗鼻咽癌的可能机制，从而为山楂酸治疗鼻咽癌的研究和应用提供理论基础。

1 材料

1.1 药物

山楂酸（质量分数≥98%）购自美国 Cayman-Chemical，批号 4373-41-5，用 DMSO（≤1%）溶解成 80 mmol/L 的母液，分装后-20℃避光保存，临用时用 RPMI 1640 完全培养液稀释，配成所需要的工作浓度。阳性药雷帕霉素（Rapamycin）购自 MCE 公司，批号 53123-88-9。

1.2 细胞

人鼻咽癌细胞株 CNE2 购自北京北纳创联生物技术研究院，用含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 完全培养液于 37℃、5% CO₂ 的恒温细胞培养箱中培养。

1.3 试剂

RPMI 1640 培养基，美国 Hyclone 公司；青霉素-链霉素混合液、0.25%胰蛋白酶-EDTA 消化液，北京索莱宝公司；胎牛血清，美国 Gibco 公司；CCK-8 试剂盒，日本同仁公司；细胞自噬染色检测试剂盒（单丹碘酞戊二胺，MDC 法），上海源叶生物科技有限公司；BCA 蛋白定量试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒，康为世纪公司；抗体 PI3K、Akt、p-Akt、p-mTOR、LC3 A/B、Atg5、

p62、GAPDH 与辣根过氧化物酶标记羊抗兔均购自美国 CST 公司。

1.4 仪器

SW-CJ-2FD 双人单面净化工作台，苏州净化设备有限公司；贺利氏 HER Acell 150 ICO₂ 培养箱，美国赛默飞世尔公司；ELX800 全自动酶标分析仪，美国 BioTek 公司；荧光倒置光学显微镜及图像采集系统，日本 Olympus 公司；Tanon-6200 化学发光成像仪，上海天能科技有限公司。

2 方法

2.1 CCK-8 法检测细胞增殖能力

将处于对数生长期的 CNE2 细胞按 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中，待细胞贴壁后，吸弃旧培养液，加入含不同浓度（10、20、30、40、50、60 μmol/L）山楂酸的培养液，同时设置溶剂对照组（0.1% DMSO）和空白组（只加培养液、不加 CNE2 细胞），每个组设 5 个复孔，置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。分别培养 24、48、72 h 后，弃培养液，每孔加入 100 μL 现配的 CCK-8 溶液，于培养箱中继续培养 1.5 h，用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度（A）值。实验重复 3 次，计算细胞增殖率。

$$\text{细胞增殖率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{溶剂对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 MDC 染色法检测细胞自噬小体

将处于对数生长期的 CNE2 细胞按 1×10^5 个/孔细胞接种至 6 孔板中，培养 12 h 后吸弃旧培养液，给予不同浓度的山楂酸（10、20、40 μmol/L）和阳性药物（雷帕霉素，25 nmol/L）处理 36 h 后，PBS 冲洗 2 次，加入 50 μL MDC 溶液，培养箱中孵育 1 h。吸弃 MDC 溶液，PBS 洗涤细胞 3 次，荧光显微镜下拍照。

2.3 Western blotting 检测自噬相关蛋白表达

CNE2 细胞经不同浓度（10、20、40 μmol/L）山楂酸处理 36 h 后，加入含 1% PMSF 的 RIPA 裂解液处理 15 min，4℃条件下 $1000 \times g$ 离心 5 min 后取上清，BCA 法测定蛋白质量浓度。每组取 30 μg 总蛋白，10% SDS-PAGE 分离蛋白，运用电转移法将蛋白转移至 PVDF 膜。含 5%脱脂牛奶的 TBST 封闭 1 h 后加入相应一抗，4℃孵育过夜，洗膜后孵育二抗 1 h，化学发光法 ECL 显影。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析，服从正态分布数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，单因素设计，多组间计量资料比较采用单因素方差分析，满足方差齐性，多重

比较用 LSD 检验, 方差不齐用 Dunnett T3 检验。不服从正态分布计量资料以中位数表示, 采用秩和检验。

3 结果

3.1 山楂酸对 CNE2 细胞增殖的影响

不同浓度 (10、20、30、40、50、60 $\mu\text{mol/L}$) 的山楂酸分别处理 CNE2 细胞 24、48、72 h 后, CCK-8 检测结果显示, 与溶剂对照组比较, 山楂酸可以抑制 CNE2 细胞的增殖 ($P < 0.05$), 并且随着浓度的增加、作用时间的延长, 增殖抑制效果增强 (图 1)。

3.2 山楂酸对 CNE2 细胞自噬的影响

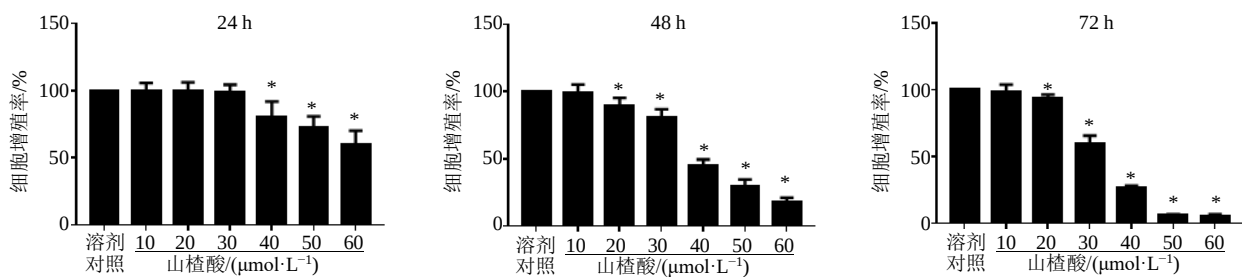
MDC 结果显示, 不同浓度山楂酸处理 CNE2

细胞 36 h 后, 山楂酸组细胞荧光强度 (MDC 标记的自噬小体) 显著增强 ($P < 0.05$), 结果见图 2。

Western blotting 结果显示, 与溶剂对照组比较, 山楂酸组 LC3A/B II 与 LC3A/B I 比值和 Atg5 的蛋白表达明显增加, 而 p62 的蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 结果见图 3。以上结果表明山楂酸可诱导 CNE2 细胞自噬。

3.3 山楂酸对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响

Western blotting 结果显示, 与溶剂对照组比较, 山楂酸组 PI3K-p110 α 、p-Akt 和 p-mTOR 的蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$), 结果见图 4。结果提示山楂酸可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 诱导鼻咽癌细胞发生自噬。



与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$, 下同
* $P < 0.05$ vs solvent control group, same as below

图 1 山楂酸对 CNE2 细胞增殖的抑制作用 (CCK-8, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 1 Inhibition of maslinic acid on proliferation of CNE2 cells (CCK-8, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

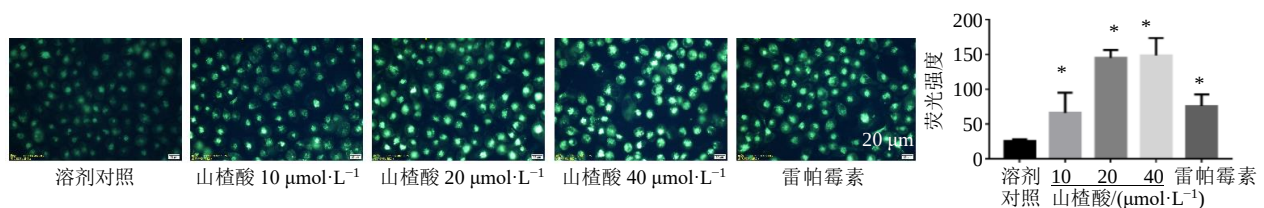


图 2 山楂酸对 CNE2 细胞自噬的影响 ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 2 Effect of maslinic acid on autophagy of CNE2 cells ($\times 400$, $\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

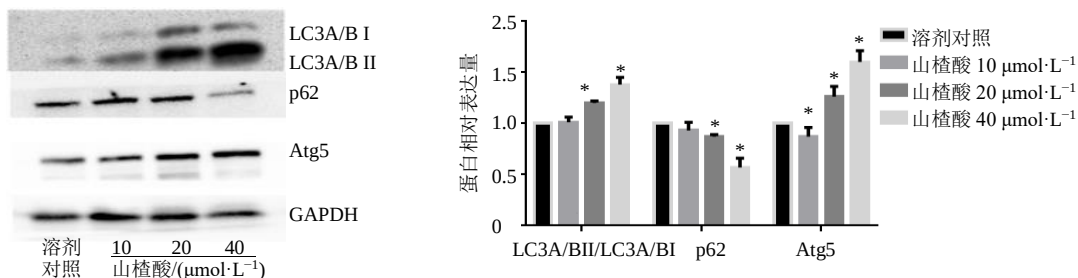


图 3 山楂酸对 CNE2 细胞自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 3 Effect of maslinic acid on expression of autophagy-related protein in CNE2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

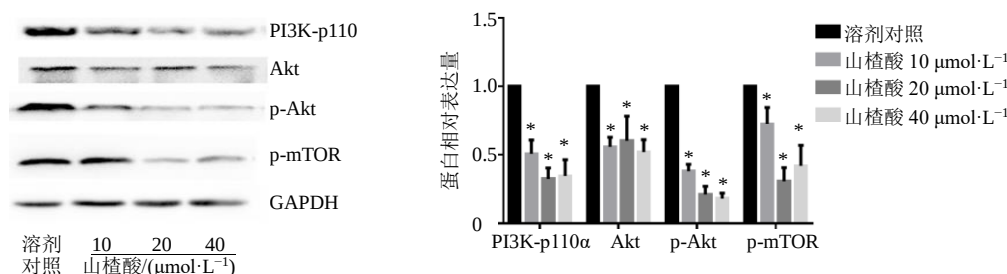


图4 山植酸对 CNE2 细胞 PI3K/Akt/mTOR 信号通路关键蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 4 Effect of maslinic acid on expression of key proteins in PI3K/Akt/mTOR pathway in CNE2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

4 讨论

鼻咽癌是一种易发生于鼻咽黏膜上皮细胞的恶性肿瘤，其恶性程度高且具有早期转移的特点，严重危害了人民的身体健康。放疗与化疗是目前比较有效的治疗鼻咽癌的方法，但晚期高分化患者对放疗敏感度较差，预后效果不佳，容易复发甚至转移^[10]。因此，寻求更加安全高效的治疗方法和药物是鼻咽癌临床治疗过程中迫切需要解决的问题。

山植酸是从枇杷叶、山楂等中药中提取出的一种五环三萜酸，研究发现山植酸在结肠癌、肺癌等多种肿瘤中具有较好的抗肿瘤活性^[5]，但对鼻咽癌的影响尚未见报道。本研究通过实验发现山植酸可以抑制鼻咽癌细胞的增殖，提示山植酸可能可作为治疗鼻咽癌的潜在药物。目前对山植酸作用机制的研究主要集中在抑制细胞增殖、阻滞细胞周期、诱导细胞凋亡等方面，但近期 Dong 等^[9]发现山植酸可通过扰乱 Bcl2 与 Beclin1 的相互作用诱导大鼠嗜铬细胞瘤 PC12 细胞的自噬，Tian 等^[11]的研究表明山植酸通过下调 HSPA 诱导胰腺癌 Panc-28 细胞发生自噬。而自噬和鼻咽癌的发生间存在着复杂关系，如 Wang 等^[12]发现抑制细胞自噬可增强鼻咽癌 CNE2 细胞对放射治疗的敏感性，而 Li 等^[13]研究表明拓扑替康等药物可诱导 CNE2 细胞发生自噬，加速鼻咽癌细胞 CNE2 死亡。这些研究表明自噬在鼻咽癌发展的不同阶段具有不同的作用^[14]，因此需要更多的研究来探讨药物诱导鼻咽癌自噬的复杂过程。本研究中探讨了山植酸对鼻咽癌细胞自噬的影响，结果发现山植酸处理鼻咽癌细胞后，自噬小体和相关蛋白的表达增加，提示山植酸可诱导鼻咽癌细胞发生自噬，揭示了山植酸的一个新的药理机制。但山植酸诱导的自噬在鼻咽癌中的具体作用仍需在今后研究中通过联合使用山植酸与自噬抑制剂来继续探索。

PI3K/Akt/mTOR 信号通路在肿瘤细胞自噬的调控中发挥着极其重要的作用，是肿瘤治疗的潜在关键靶点^[15-16]。因此，检测了山植酸对 PI3K/Akt/mTOR 信号通路关键蛋白表达的影响。结果表明，山植酸能够抑制 PI3K-p110 α 、p-Akt 和 p-mTOR 的蛋白表达，提示山植酸可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导鼻咽癌细胞发生自噬。

综上所述，本研究结果表明山植酸可能通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路，导致其下游的自噬相关蛋白 LC3、Atg5 的活性增加，进而诱导鼻咽癌细胞自噬，抑制鼻咽癌细胞增殖，从而发挥抗鼻咽癌的作用。

参考文献

- [1] Chua M L K, Wee J T S, Hui E P, et al. Nasopharyngeal carcinoma [J]. *Lancet*, 2016, 387(10022): 1012-1024.
- [2] He R, Hu Z, Wang Q, et al. The role of long non-coding RNAs in nasopharyngeal carcinoma: A systematic review [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(9): 16075-16083.
- [3] Nor Hashim N A, Ramzi N H, Velapasamy S, et al. Identification of genetic and non-genetic risk factors for nasopharyngeal carcinoma in a Southeast Asian population [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(12): 6005-6010.
- [4] Levy J M M, Towers C G, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9): 528-542.
- [5] Lin X, Ozbey U, Sabitaliyevich U Y, et al. Maslinic acid as an effective anticancer agent [J]. *Cell Mol Biol*, 2018, 64(10): 87-91.
- [6] Wang D, Tang S, Zhang Q. Maslinic acid suppresses the growth of human gastric cells by inducing apoptosis via inhibition of the interleukin-6 mediated Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(6): 4875-4881.
- [7] Zhang S, Ding D, Zhang X, et al. Maslinic acid induced

- apoptosis in bladder cancer cells through activating p38 MAPK signaling pathway [J]. *Mol Cell Biochem*, 2014, 392(1/2): 281-287.
- [8] Hsia T C, Liu W H, Qiu W W, *et al.* Maslinic acid induces mitochondrial apoptosis and suppresses HIF-1 α expression in A549 lung cancer cells under normoxic and hypoxic conditions [J]. *Molecules*, 2014, 19(12): 19892-19906.
- [9] Dong X, Zhang J, Zhou Z, *et al.* Maslinic acid promotes autophagy by disrupting the interaction between Bcl2 and Beclin1 in rat pheochromocytoma PC12 cells [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(43): 74527-74538.
- [10] 梁 铨, 杨 剑, 高 婷, 等. 中国鼻咽癌流行概况 [J]. *中国肿瘤*, 2016, 25(11): 835-840.
- [11] Tian Y, Xu H, Farooq A A, *et al.* Maslinic acid induces autophagy by down-regulating HSPA8 in pancreatic cancer cells [J]. *Phytother Res*, 2018, 32(7): 1320-1331.
- [12] Wang Y, Yin W, Zhu X. Blocked autophagy enhances radiosensitivity of nasopharyngeal carcinoma cell line CNE-2 *in vitro* [J]. *Acta Otolaryngol*, 2014, 134(1): 105-110.
- [13] Li D D, Wang L L, Deng R, *et al.* The pivotal role of c-Jun NH2-terminal kinase-mediated Beclin 1 expression during anticancer agents-induced autophagy in cancer cells [J]. *Oncogene*, 2009, 28(6): 886-898.
- [14] 蔺 婷, 周芳亮, 罗晶婧, 等. 自噬与鼻咽癌关系的研究进展 [J]. *广西医学*, 2019, 41(5): 610-613.
- [15] 丁志丹, 方泽民, 王旭广, 等. 贝母素乙调控 PI3K/Akt/mTOR 通路减缓上皮-间质转化进程抑制人肺癌 A549 细胞侵袭及迁移的研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(6): 1382-1387.
- [16] Aoki M, Fujishita T. Oncogenic roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis [J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2017, 407: 153-189.