

• 药理与临床 •

洛克米兰醇对肝癌 HepG2 细胞的抗增殖作用及其机制研究

王 辉, 杨 蕾, 孔令义*

中国药科大学 天然药物化学教研室 天然药物活性组分与药效国家重点实验室, 江苏 南京 210009

摘要:目的 研究传统中药米仔兰 *Aglaia odorata* 中洛克米兰醇对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响及抗肿瘤作用机制。方法 MTT、细胞克隆形成、EdU 染色和 CFDA 染色方法考察洛克米兰醇对 HepG2 细胞的抗增殖效果; 流式细胞仪检测洛克米兰醇对 HepG2 细胞细胞周期和细胞凋亡的变化; Western blotting 检测洛克米兰醇对细胞周期调控蛋白和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路相关蛋白表达的影响。结果 洛克米兰醇可以时间和浓度依赖性抑制 HepG2 细胞增殖。同等浓度下洛克米兰醇抗 HepG2 细胞增殖的效果好于阿霉素, 而对正常肝细胞 (L02) 的毒性弱于阿霉素。流式细胞技术检测发现洛克米兰醇给药 48 h 能够诱导 HepG2 细胞 G₂/M 期细胞周期阻滞, 但不诱导细胞凋亡。Western blotting 研究发现该化合物抑制调控 G₂/M 周期相关蛋白 cdc25C、cdc2 和 cyclin B1 的表达并且激活细胞外调节蛋白激酶 (ERK) 和 c-Jun 氨基末端激酶 (JNK)。对其机制深入研究发现, ERK 抑制剂 (U0126) 可以部分逆转洛克米兰醇对 HepG2 的抗增殖和 G₂/M 周期阻滞及其抑制蛋白 cdc25C 和 cdc2 表达的效果。结论 洛克米兰醇在抑制肝癌细胞增殖的效果和对正常肝细胞的选择性方面优于阿霉素。洛克米兰醇能够通过过度活化 ERK, 从而引起 HepG2 细胞 G₂/M 周期阻滞而达到抗增殖效果。

关键词: 米仔兰; 洛克米兰醇; 肝癌; G₂/M 周期阻滞; cdc25C; ERK

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)16-4208-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.16.014

Antiproliferative effect and mechanism of rocaglaol on HepG2 cells

WANG Hui, YANG Lei, KONG Ling-yi

State Key Laboratory of Natural Medicines, Department of Natural Medicinal Chemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract: **Objective** To study the effect of rocaglaol from *Aglaia odorata* on HepG2 proliferation and to explore the potential anti-tumor mechanism. **Methods** The MTT, colony formation, EdU incorporation, and CFDA-SE assays were used to determine the anti-proliferative activity of rocaglaol in HepG2 cells. Apoptosis and cell cycle distribution effect induced by rocaglaol were carried out by flow cytometry. The effect of rocaglaol on protein involved in the G₂/M checkpoint and the MAPK pathway were performed by Western blotting analysis. **Results** Rocaglaol significantly inhibited the viability of HepG2 cells in a dose-dependent and time-dependent manner. Rocaglaol was more effective than doxorubicin in the growth inhibition of HepG2 cells. However, rocaglaol-induced cytotoxicity in normal human hepatic cell line L02 was lower than that of doxorubicin. Treatment with different concentrations of rocaglaol at 48 h caused G₂/M cell cycle progression inhibition, rather than apoptosis in HepG2 cells. Rocaglaol can significantly reduce the expression of G₂/M cell cycle-regulating proteins cdc25C, cdc2, and cyclin B1 as well as increase the expression of ERK and JNK phosphorylation levels. Further study found that U0126 can partly abrogate the anti-proliferative activity in HepG2 cells, G₂/M phase arrest and the reduction in the protein expression levels of cdc2 and cdc25C induced by rocaglaol. **Conclusion** Our results demonstrated that rocaglaol was superior to doxorubicin in the inhibition of HepG2 cells proliferation and the selectivity of L02 cell activity. We provided evidence that the rocaglaol had the ability to continuously over-activate the ERK signaling in HepG2 cells, leading to the inhibition of cell proliferation through G₂/M phase arrest.

Key words: *Aglaia odorata* Lour; rocaglaol; hepatocellular carcinoma; G₂/M cycle arrest; cdc25C; ERK

原发性肝癌作为一种恶性肿瘤, 多年来手术切除治疗效果差并且复发率高, 化疗等综合治疗效果也不尽如人意^[1]。肝癌的发病率在全国乃至世界范围内都呈逐年增高的趋势^[2]。寻找对肝癌敏感且低

收稿日期: 2020-02-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81773886); 中国药科大学双一流学科创新团队建设项目 (CPU2018GF03)

作者简介: 王 辉, 硕士研究生, 从事中药和天然产物活性物质的筛选以及作用机制的研究。E-mail: wanghui0822129@163.com

*通信作者 孔令义, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药化学和天然药物化学。E-mail: cpu_lykong@126.com

毒副作用的药物,成为目前肝癌治疗研究的重要内容。米仔兰 *Aglaia odorata* Lour 是一种民间常用中药,具有祛风湿、散瘀肿的功效,主治风湿关节痛、跌打损伤、痈疽肿毒^[3]。近年来,研究人员发现米仔兰中环戊烷并苯呋喃类化合物在体内外均有显著的抗肿瘤^[4-6]和抗病毒^[7-9]活性,并且其体外的抗肿瘤活性在纳摩尔级别,活性与传统的化疗药物相当。更重要的是这类化合物与传统的抗肿瘤药物相比对正常细胞的毒性小^[10-12]。因此,这类化合物受到研究者的广泛关注,其抗肿瘤功效正越来越被人们重视。

洛克米兰醇(rocaglaol)是从米仔兰中分离得到的具有环戊烷并苯呋喃骨架的化合物,分子式为 $C_{26}H_{26}O_6$, 相对分子质量为 434.48。有研究表明洛克米兰醇对多种人类肿瘤细胞的生长有显著的抑制作用^[13-14],而对人脐静脉管内皮细胞(HUVEC)^[10]、肠细胞^[11]和心肌细胞^[12]等正常细胞的毒性较小。本实验室在活性筛选中发现洛克米兰醇能够显著抑制人肝癌细胞的生长,并且对正常肝细胞的毒性小。表明洛克米兰醇是潜在的抗肝癌的化合物,但该化合物对肝癌细胞的作用及其抗肿瘤机制研究国内外文献报道较少,因此本研究探讨洛克米兰醇对肝癌细胞 HepG2 生长增殖的影响及其抗肿瘤机制。

1 材料

1.1 细胞

人肝癌 HepG2 细胞和人正常肝细胞(L02)购于中国科学院上海细胞库。

1.2 药品和试剂

洛克米兰醇由本实验室从米仔兰植物中分离得到,质量分数>98%;阿霉素(北京索莱宝科技有限公司,批号 060710)。DMEM 和 RPMI 1640 培养基(Gibco 公司);胎牛血清(杭州四季青生物工程研究所);胰酶、MTT (Biosharp 公司);EdU 细胞增殖检测试剂盒(广州锐博生物科技有限公司);Western blotting 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、AnnexinV-FITC/PI 凋亡检测试剂盒、CFDA-SE 细胞增殖检测试剂盒(碧云天生物技术有限公司);一抗 GAPDH、Cdc25C、Cdc2、CyclinB1、细胞外调节蛋白激酶(ERK)、p-ERK、p38、p-p38、JNK、p-JNK 和羊抗兔二抗(Cell Signaling 公司)。

1.3 仪器

311 型气套二氧化碳培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);BSC-1000IIA2 生物安全柜(上海博迅实业有限公司);CKX41 倒置显微镜(日本 Olympus 公司);Easy pureII 实验试剂超纯水仪、

DioFuge PRIMO 型台式高速离心机、-80 °C 超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);Spectra Max Plus 384 酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);Milli-Q labconco 纯水仪(美国 MilliPore 公司);激光共聚焦显微镜(德国 Leica Microsystems 公司);FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司);Mini-Protean® Tetra 电泳槽、ChemiDOC™ XRS 分子成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

HepG2 和 L02 细胞株复苏后,HepG2 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液培养,L02 用含 20%胎牛血清的 RPMI 1640 培养液培养,置于细胞培养箱(37 °C、5% CO₂、相对湿度 95%)培养。每 2~3 天传代 1 次,取对数生长期细胞进行实验。

2.2 MTT 法检测细胞活力

取对数生长期的 HepG2 或者 L02 细胞,调整细胞密度为每孔 4 000 个,常规培养 24 h,加入药物,使洛克米兰醇或阿霉素的终浓度为 30、60、120、240、480、960 nmol/L。每个药物浓度设 6 个平行孔,对照组加入等量的培养液。于 37 °C 分别培养 24、48、72 h 后,每孔加入 10 μL 的 MTT (终质量浓度为 0.5 mg/mL),继续孵育 4 h,小心弃去培养基,每孔加入 150 μL DMSO,振荡器振荡 10 min,以 490 nm 为检测波长,650 nm 为参照波长,用酶标仪检测各孔的吸光度(A)值,计算各组细胞存活率。

$$\text{存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.3 细胞克隆形成实验

取对数生长期 HepG2 细胞,每孔接种 800 个细胞于 6 孔培养板,每组设 3 个复孔,置 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养 24 h 后加药,使洛克米兰醇的终浓度为 0、30、120、480 nmol/L,给药 48 h 后,弃去含药培养基,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 遍,加入新鲜不含药培养基继续培养 8 d。在倒置显微镜下观察并记录每组细胞克隆数目,细胞数大于 50 的克隆记为 1 个细胞克隆。计数后弃去培养基,PBS 洗涤 2 次后,用 4%多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 30 min 后流水冲洗,拍照。计算克隆形成率。

$$\text{克隆形成率} = \text{细胞克隆数} / \text{接种细胞数}$$

2.4 EdU 染色

取对数生长期 HepG2 细胞,以每孔 1×10^5 个细胞接种于激光共聚焦平皿中,培养 24 h 后,给药组分别给予 30、120、480 nmol/L 的洛克米兰醇,

药物孵育 36 h 后, 加入 EdU (终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$) 溶液, 与药物继续共同孵育 8 h。弃培养基; PBS 清洗细胞 1~2 次, 将未渗入 DNA 的 EdU 洗脱掉。按照试剂盒操作固定细胞并染色, 将激光共聚焦平皿置于激光共聚焦显微镜下, 以 550 nm 激发波长, 565 nm 发射波长拍照, 被标记的细胞为红色, 未标记的细胞为蓝色。用软件统计被标记的细胞数目。

细胞增殖率 = 标记的细胞数 / (标记的细胞数 + 未标记的细胞数)

2.5 CFDA-SE 染色

按照试剂盒的说明将 HepG2 细胞标记 CFDA-SE, 将标记了 CFDA-SE 的细胞混匀置于 6 孔板中, 每孔 2×10^5 个细胞, 培养 24 h 后给药组分别给予终浓度为 30、120、480 nmol/L 的洛克米兰醇。药物孵育 48 h 后收集细胞。将细胞上清液收集于离心管中, 用冷的 PBS 洗涤细胞 2 次, 用 FACS Calibur 流式细胞仪测定细胞的平均荧光强度, 用 FlowJo 软件处理结果。

2.6 细胞凋亡检测

取对数生长期的 HepG2 细胞, 调细胞数为 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔培养板, 24 h 后给药。给药组加入含不同浓度 (30、120、480 nmol/L) 洛克米兰醇的培养基, 给药组和对照组各设 3 个复孔, 48 h 后收集细胞, 按 Annexin V-FIT-C/PI 双染细胞检测说明书操作, 流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.7 细胞周期检测

取对数生长期的 HepG2 细胞, 以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板培养。先用无血清的 DMEM 培养基处理 HepG2 细胞 24 h 使处于细胞周期不同阶段的细胞达到同步化。分别用最高浓度 (480 nmol/L) 洛克米兰醇处理 HepG2 细胞不同时间 (24、48、72 h) 或者不同浓度 (30、120、480 nmol/L) 的洛克米兰醇处理 HepG2 细胞 48 h, 收集细胞, 乙醇固定过夜, 加入 PI 综合染液染色, 流式细胞仪检测。

2.8 Western blotting 法检测相关蛋白表达

取对数生长期的 HepG2 细胞, 以 1×10^6 个/mL 的密度接种于培养皿。按照“2.7”项下方式给药, 收集细胞, 预冷 PBS 洗涤 2 次, 加入 Western blotting 及 IP 细胞裂解液, 冰上裂解 5 min, 12 000 r/min 离心 20 min, 吸取上清液, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度。加入适量 $2 \times$ 蛋白上样缓冲液, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min, -80°C 保存备用。取出 40 μg 蛋白样品, 灌制 12% 分离胶、4% 浓缩胶的

SDS-PAGE 凝胶电泳, 电泳完成后, 用湿法转膜方法将蛋白转至 PVDF 膜, 转膜完成后将 PVDF 膜置于 5% BSA 于室温下封闭 2 h, 一抗和二抗按照说明书比例稀释, 一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 10 min, 使用 Bio-Rad 发光成像系统曝光。实验重复 3 次。

2.9 MAPK 抑制剂作用实验

取对数生长期的 HepG2 细胞, 调整细胞浓度为每孔 4 000 个, 每孔接种 190 μL 于 96 孔板培养, 常规培养 24 h, 给药前 MAPK 抑制剂组以及洛克米兰醇联合 MAPK 抑制剂组加入终浓度 20 $\mu\text{mol/L}$ ERK 抑制剂 U0126 或 20 $\mu\text{mol/L}$ JNK 抑制剂 SP600125 孵育 1 h, 给药组其后加入含 480 nmol/L 洛克米兰醇的培养基。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别培养 48 h 后弃去培养液, 然后按照“2.2”项下方式方法处理。取对数生长期的 HepG2 细胞, 以 1×10^5 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板培养。先用无血清的 DMEM 培养基处理 HepG2 细胞 24 h 使处于细胞周期不同阶段的细胞达到同步化。给药前 MAPK 抑制剂组以及洛克米兰醇联合 MAPK 抑制剂组加入终浓度 20 $\mu\text{mol/L}$ ERK 抑制剂 U0126 孵育 1 h, 给药组其后加入含 480 nmol/L 洛克米兰醇的培养基。于 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别培养 48 h 后弃去培养液, 然后按照“2.7”和“2.8”项下方式方法处理。

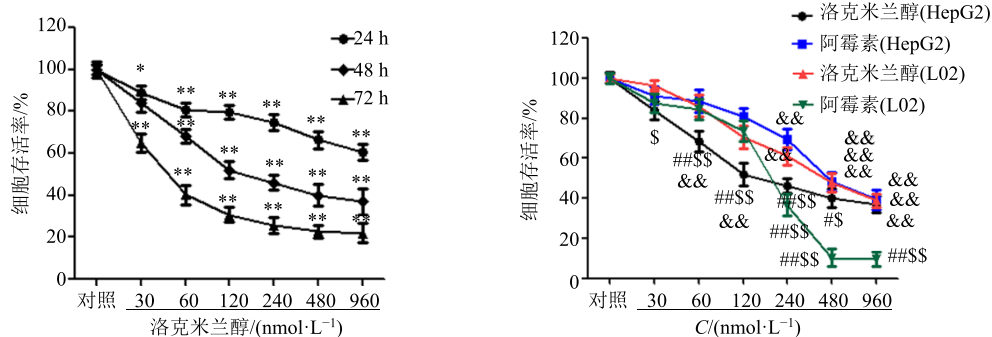
2.10 数据统计

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 22.0 进行统计分析, 多组均数间的比较采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 两组间用 t 检验检测显著性。

3 结果

3.1 洛克米兰醇对人肝癌细胞 HepG2 或正常肝 L02 细胞存活率的影响

结果见图 1, 洛克米兰醇能够浓度和时间依赖性抑制 HepG2 细胞增殖, 与对照组相比, 差异显著 ($P < 0.01$)。不同浓度的洛克米兰醇和传统治疗肝癌的化疗药物阿霉素作用于 HepG2 细胞和 L02 细胞 48 h 后发现, 洛克米兰醇作用于 HepG2 细胞在 48 h 的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 (251.62 ± 30.56) nmol/L, 作用于 L02 细胞的 IC_{50} 值为 (441.69 ± 43.83) nmol/L。阿霉素作用于 HepG2 细胞在 48 h 的 IC_{50} 值为 (559.32 ± 40.43) nmol/L, 作用于 L02 细胞的 IC_{50} 值为 (164.62 ± 25.94) nmol/L。以上结果表明洛克米兰醇在抑制 HepG2 细胞增殖效果和对 L02 细胞选择性方面好于传统化疗药阿霉素。



与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与阿霉素 (HepG2) 组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 与阿霉素 (L02) 组比较: & $P < 0.05$ && $P < 0.01$; 与洛克米兰醇 (L02) 组比较: \$ $P < 0.05$ \$\$ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs doxorubicin (HepG2) group; & $P < 0.05$ && $P < 0.01$ vs doxorubicin (L02) group; \$ $P < 0.05$ \$\$ $P < 0.01$ vs rocaglaol (L02) group

图 1 洛克米兰醇对 HepG2 和 L02 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of rocaglaol on HepG2 and L02 cells viability ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 洛克米兰醇对人肝癌细胞 HepG2 增殖的影响

EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine) 是一种胸腺嘧啶核苷类似物,能够在 DNA 复制时期 (S 期) 代替胸腺嘧啶 (T) 渗入正在合成的 DNA 分子中,可直接并准确地检测出 DNA 复制活性^[15]。实验结果如图 2-A 所示,图中红色的细胞为 EdU 标记的细胞,表示处于增殖状态的细胞。蓝色的细胞表示总的细胞。图片重叠后粉色的细胞表示处于增殖状态的细胞。使用软件处理统计后发现,对照组的细胞增殖率为 $(61.78 \pm 3.90)\%$ 。给予 30、120、480 nmol/L 洛克米兰醇后各组的细胞增殖率分别为 $(36.24 \pm 1.27)\%$ 、 $(29.38 \pm 1.99)\%$ 、 $(1.96 \pm 0.03)\%$ 。与对照组比较,随着洛克米兰醇作用于 HepG2 细胞的药物浓度的增加,增殖细胞的比例逐渐减少,差异显著 ($P < 0.01$)。

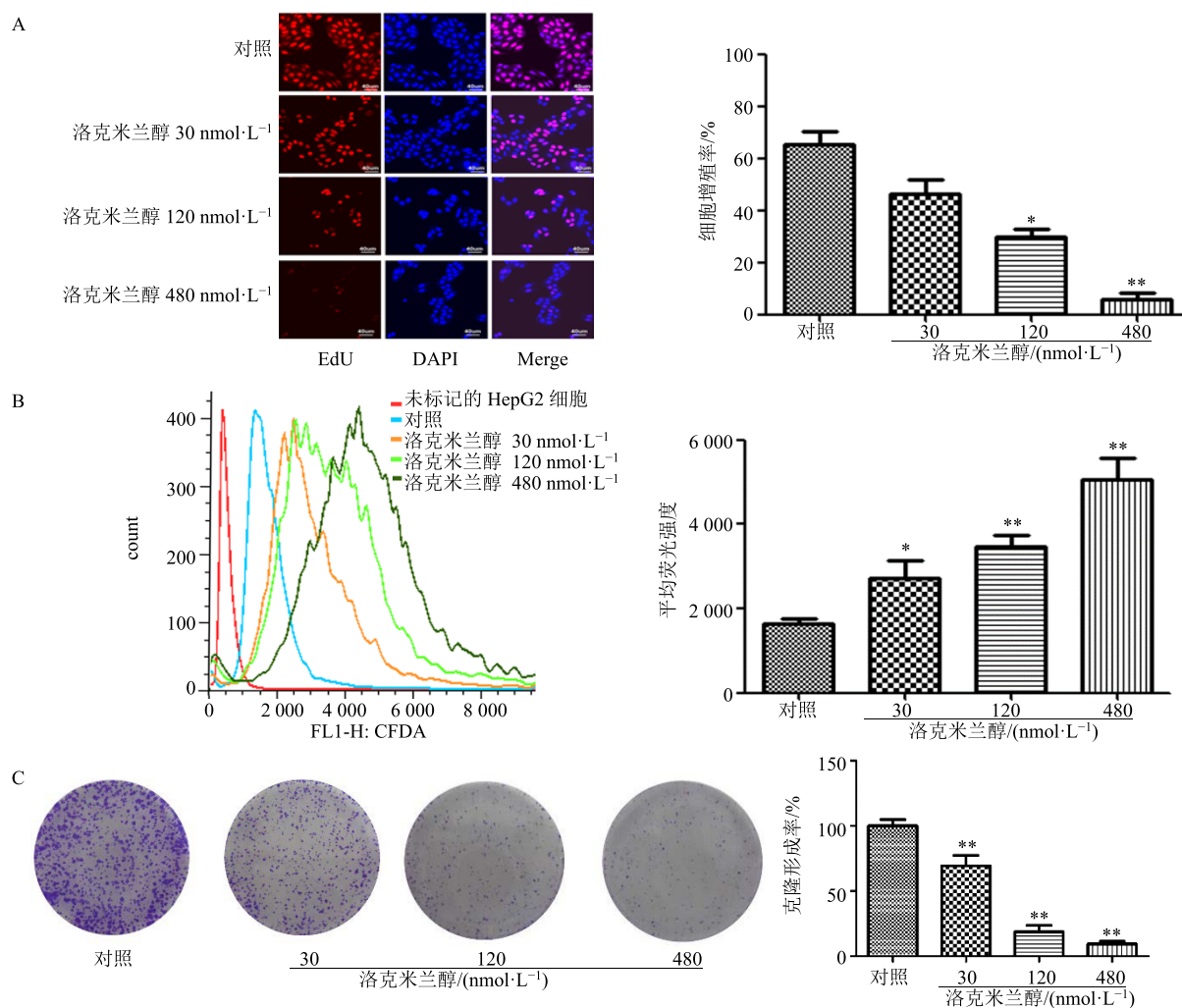
CFDA-SE 标记细胞的荧光非常均匀和稳定,每分裂一次子代细胞的荧光会减弱一半,细胞分裂次数越多,平均荧光强度越低^[16]。实验结果如图 2-B 所示,洛克米兰醇在 30、120、480 nmol/L 的平均荧光强度为对照组的 1.66、2.12、3.09 倍。与对照组比较,随着洛克米兰醇作用于 HepG2 细胞的药物浓度的增加,平均荧光强度逐渐增加,差异显著 ($P < 0.01$)。

细胞克隆形成实验是评价药物敏感性的金标准。实验结果如图 2-C 所示,洛克米兰醇在 30、120、480 nmol/L 剂量下 HepG2 细胞的克隆形成率分别为 $(69.42 \pm 8.07)\%$ 、 $(18.95 \pm 4.92)\%$ 、 $(9.61 \pm 2.18)\%$ 。

与对照组比较,随着洛克米兰醇作用于 HepG2 细胞的药物浓度的增加,细胞克隆数目和大小逐渐减少,差异显著 ($P < 0.01$)。以上结果表明洛克米兰醇能够剂量依赖性地抑制 HepG2 细胞增殖,其抑制 HepG2 细胞增殖的活性可能与其抑制细胞 DNA 合成有关。

3.3 洛克米兰醇对人肝癌 HepG2 细胞周期和细胞凋亡的影响

结果如图 3-A 所示,对各组 G_2/M 期细胞比例进行统计发现,对照组 G_2/M 期细胞比例为 $(11.35 \pm 2.76)\%$ 。在 480 nmol/L 洛克米兰醇作用 24、48、72 h 时, G_2/M 期细胞比例分别为 $(28.04 \pm 3.41)\%$ 、 $(38.24 \pm 4.08)\%$ 、 $(31.85 \pm 3.37)\%$ 。表明洛克米兰醇诱导了 HepG2 细胞 G_2/M 周期阻滞,并且在 48 h 效果最好。因此选择 48 h 进行下一步研究。考察不同浓度的洛克米兰醇在 48 h 时对 HepG2 细胞周期分布的影响,结果如图 3-B 所示,对照组 G_2/M 期细胞比例为 $(14.15 \pm 1.86)\%$,而 30、120、480 nmol/L 洛克米兰醇作用 48 h 时, G_2/M 期细胞比例分别为 $(15.07 \pm 1.76)\%$ 、 $(31.25 \pm 1.98)\%$ 、 $(39.25 \pm 1.70)\%$,结果表明洛克米兰醇可以浓度依赖性诱导 HepG2 细胞 G_2/M 周期阻滞。同时探索了洛克米兰醇对 HepG2 细胞的抗增殖机制是否与细胞凋亡有关,结果如图 3-C 所示,在 48 h 时,与对照组相比,各浓度洛克米兰醇组细胞凋亡率未发生显著变化,该结果表明在 48 h 以内,洛克米兰醇没有诱导 HepG2 细胞凋亡。



A-EdU 染色 B-CFDA-SE 染色 C-克隆形成, 与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下图同

A-EdU incorporation B-CFDA-SE assays C-colony formation, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group, same as following figures

图 2 洛克米兰醇对 HepG2 细胞的抗增殖活性 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Anti-proliferative activity of rocaglaol in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 洛克米兰醇对调控 G₂/M 细胞周期相关蛋白的影响

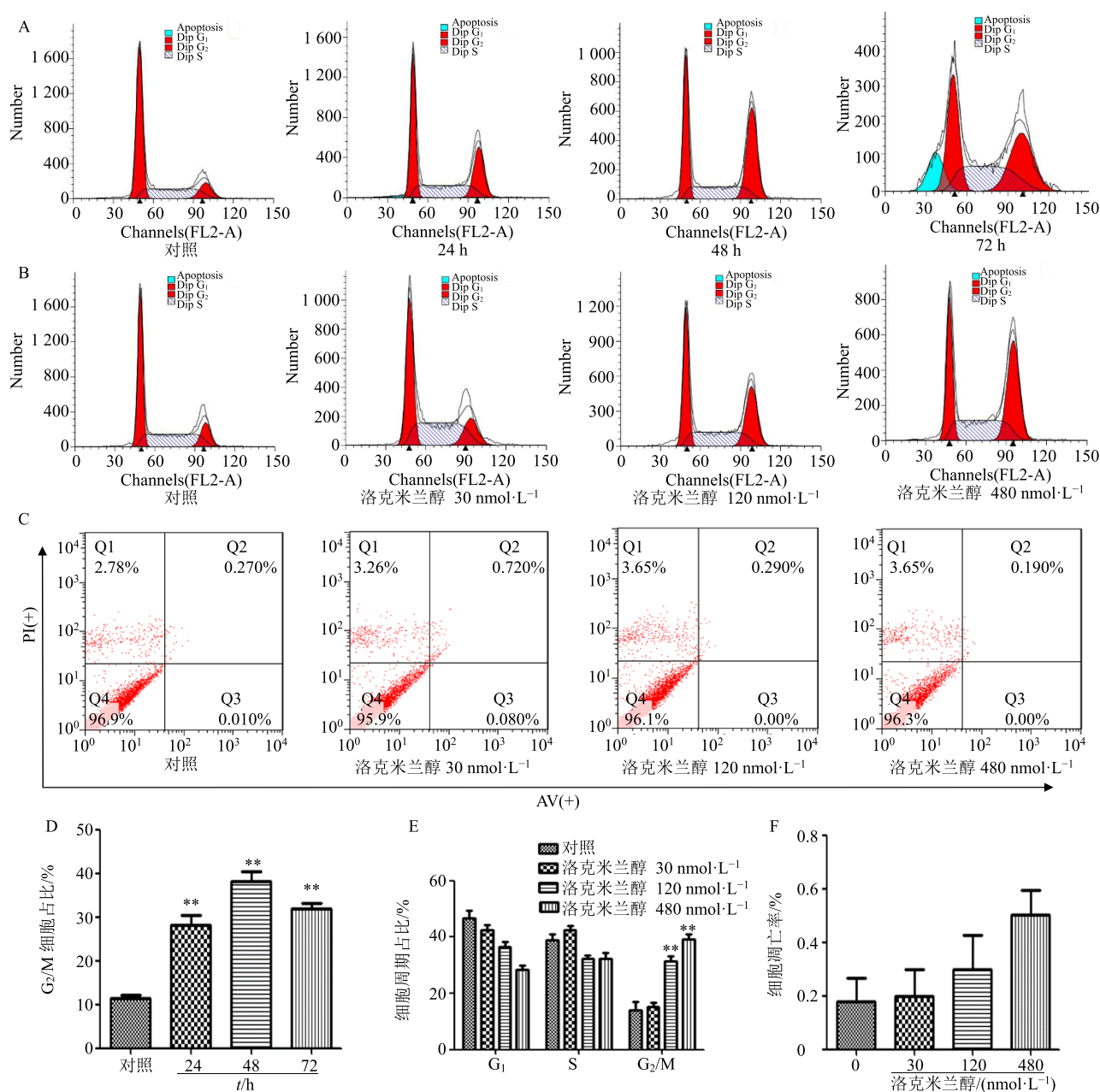
结果如图 4-A 所示, 在 480 nmol/L 洛克米兰醇作用 24、48、72 h 时, 洛克米兰醇可以时间依赖性显著抑制 cdc25C、cdc2 和 cyclinB1 蛋白的表达。同时考察在 48 h 时不同浓度洛克米兰醇对周期蛋白表达的影响, 结果如图 4-B 所示, 洛克米兰醇可以浓度依赖性显著抑制 cdc25C、cdc2 和 cyclinB1 蛋白的表达。因此, 推测洛克米兰醇可能通过浓度和时间依赖性显著抑制 cdc25C 蛋白的表达从而导致 cdc2/cyclin B1 复合物的活性受抑制, 进而引起 HepG2 细胞 G₂/M 周期阻滞。

3.5 洛克米兰醇对人肝癌 HepG2 细胞 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响

结果如图 5 所示, 洛克米兰醇可以时间和浓度依赖性显著激活 ERK 蛋白的磷酸化, 差异显著 ($P < 0.01$), 而对总的 ERK 蛋白没影响。洛克米兰醇可以浓度依赖性激活 JNK 的磷酸化, 而对总的 JNK 蛋白没有影响。洛克米兰醇对 p-p38 与总的 p38 蛋白均有抑制作用, 但是 p-p38/p38 没有变化, 表明洛克米兰醇对 p38 的磷酸化没有显著影响。以上结果表明洛克米兰醇可以显著激活 ERK 和 JNK 蛋白的磷酸化。

3.6 MAPK 信号通路在洛克米兰醇诱导的 HepG2 细胞 G₂/M 细胞周期阻滞中的作用

为了明确 ERK 和 JNK 通路激活在洛克米兰醇



A、D-480 nmol·L⁻¹ 洛克米兰醇作用 24、48、72 h, B、C、E、F-30、120、480 nmol·L⁻¹ 洛克米兰醇作用 48 h

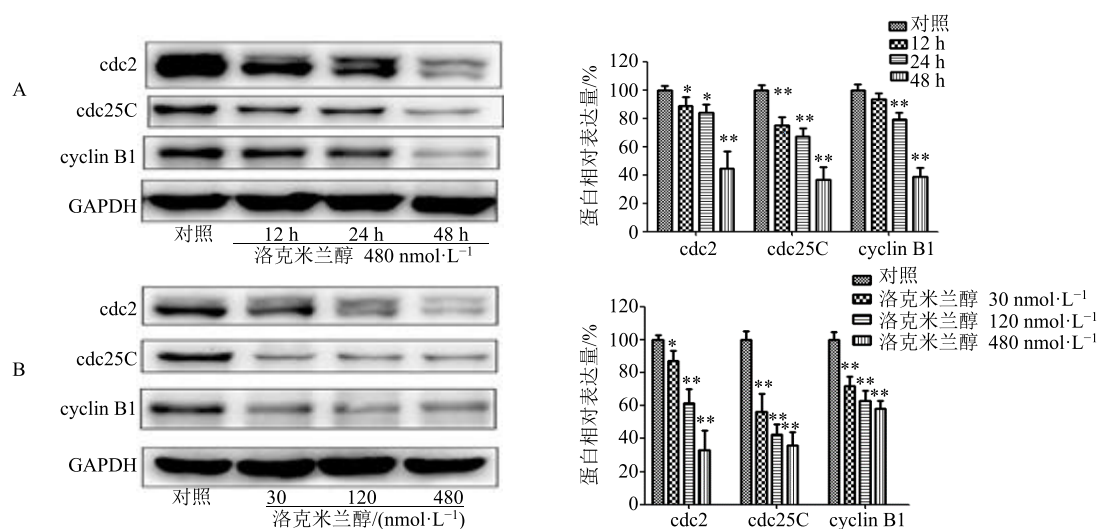
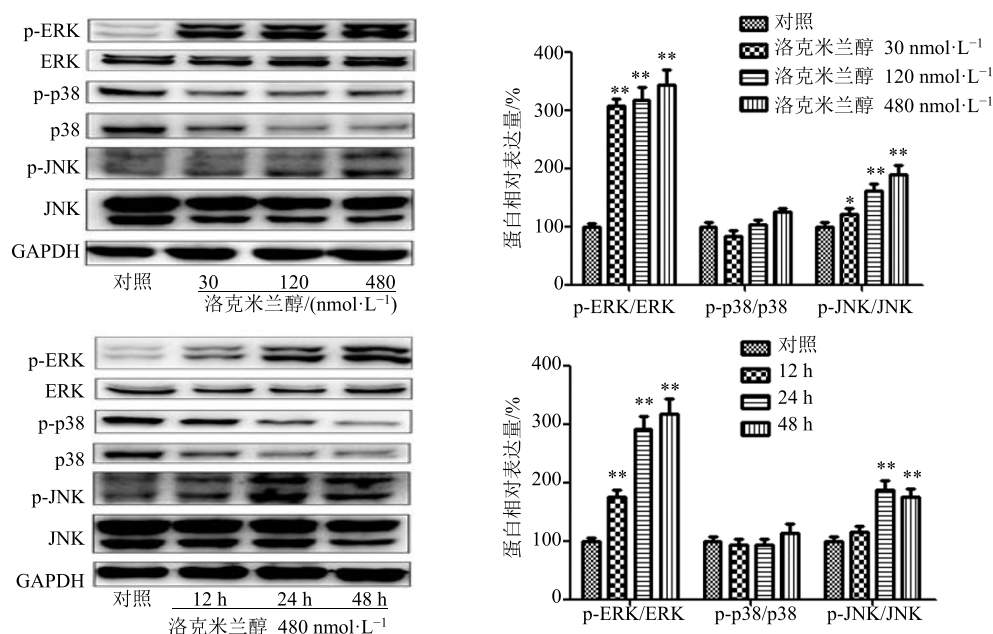
A、D-HepG2 cells were incubated in 480 nmol·L⁻¹ rocaglaol for 24, 48 and 72 h; B、C、E、F-rocaglaol treated HepG2 cells for 48 h at 30, 120, and 480 nmol·L⁻¹ dose

图 3 洛克米兰醇对 HepG2 细胞周期和细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Cell cycle and apoptosis analysis of rocaglaol-treated HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

诱导的 HepG2 细胞抗增殖作用, 用 JNK 抑制剂 SP600125 和 ERK 的抑制剂 U0126 来研究激活 ERK 和 JNK 与洛克米兰醇诱导的 HepG2 细胞抗增殖是否有关联。结果如图 6 所示, MTT 检测结果显示, U0126 预处理洛克米兰醇 480 nmol/L 组细胞存活率较 480 nmol/L 洛克米兰醇单独处理组显著升高 ($P < 0.05$); 而 SP600125 预处理洛克米兰醇 480 nmol/L 组细胞存活率较 480 nmol/L 洛克米兰醇单独

处理组基本没有变化。细胞周期结果显示 U0126 预处理洛克米兰醇 480 nmol/L 组 G₂/M 期细胞比例较 480 nmol/L 洛克米兰醇单独处理组显著降低 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果显示与 480 nmol/L 洛克米兰醇处理组相比, U0126 预处理洛克米兰醇 480 nmol/L 组 G₂/M 期相关蛋白 cdc25C 和 cdc2 的表达明显增加 ($P < 0.05$)。以上结果表明, ERK 信号通路通过调控 G₂/M 期调控蛋白 cdc25C 和 cdc2 的表达

图 4 洛克米兰醇对 G₂/M 细胞周期调控相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Modulation of expression of G₂/M cell cycle-regulating proteins by rocaglaol ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 5 洛克米兰醇对 MAPK 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Regulation of MAPK signaling pathway by rocaglaol ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

参与洛克米兰醇诱导的 HepG2 细胞 G₂/M 期阻滞。

4 讨论

目前,化疗药物杀伤肿瘤细胞的同时,对正常细胞也有较强的细胞毒性作用。阿霉素是治疗肝癌的常用化疗药物,由于其有严重的心脏毒副作用限制了其在临床上的应用^[17]。因此,继续从天然产物中寻找疗效更好、毒副作用更小的治疗肝癌的化合物是目前的研究热点之一。洛克米兰醇是从传统中药米仔兰植物分离得到的天然化合物,已有研究发现洛克米兰醇对乳腺癌^[13]、前列腺癌^[13]和白血病

细胞^[14]有显著的抑制效果,并且对正常细胞^[10-12]的毒性较小。本研究也发现洛克米兰醇对 HepG2 细胞有显著的抑制作用,对 L02 细胞的毒性较小。对洛克米兰醇和传统化疗药阿霉素抑制肝癌细胞的效果和对正常肝细胞的毒性评价发现,洛克米兰醇在抑制 HepG2 细胞增殖的效果和对 L02 细胞选择性优于阿霉素。表明洛克米兰醇是一个潜在的治疗肝癌的化合物。

为了阐明洛克米兰醇抑制肝癌细胞 HepG2 的分子机制,采用细胞克隆、CFDA-SE 和 EdU 实验

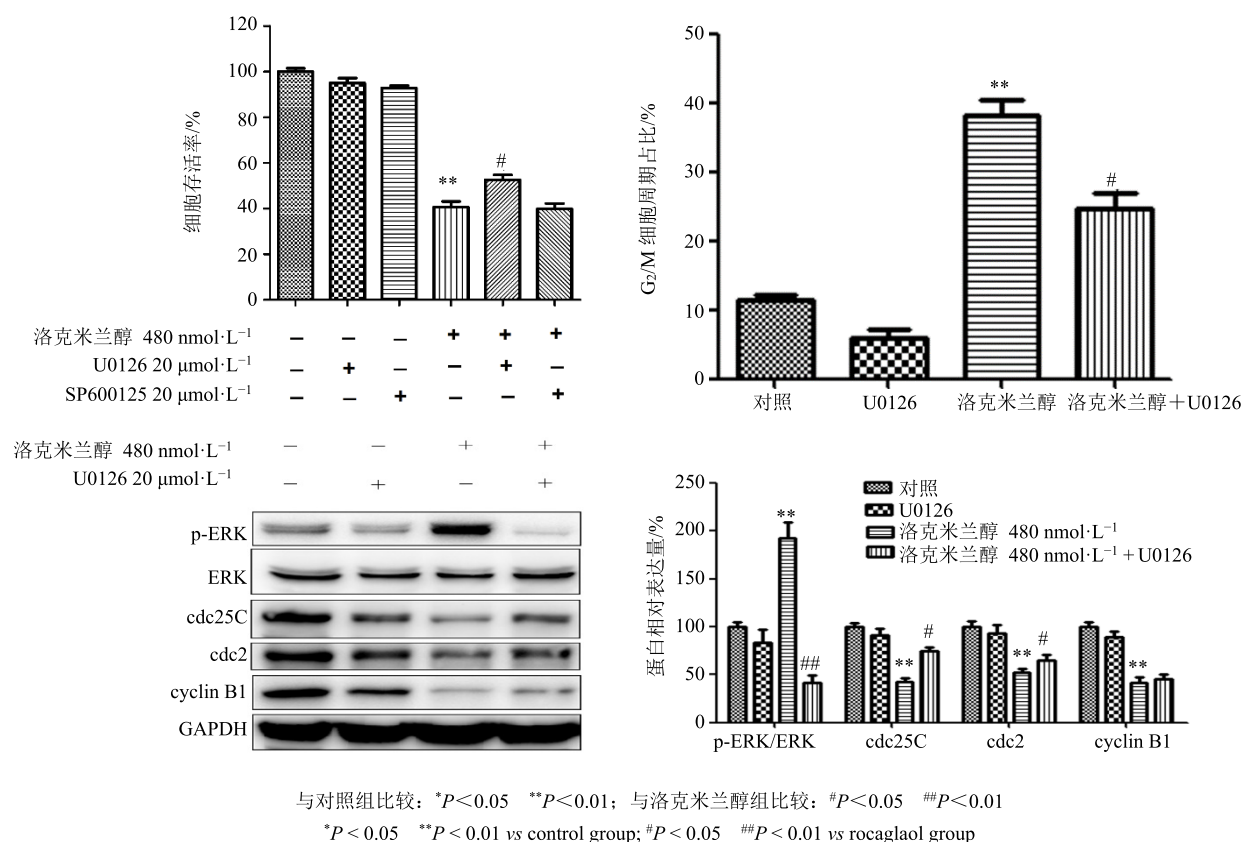


图 6 ERK 信号通路参与洛克米兰醇诱导的 HepG2 细胞 G₂/M 周期阻滞 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Activation of ERK signaling pathway participated in rocaglaol-induced G₂/M cycle arrest of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

方法发现洛克米兰醇能够抑制 HepG2 细胞 DNA 的合成,对 HepG2 细胞造成不可逆转的损伤。有研究表明洛克米兰醇能够在前列腺癌细胞 (LNCaP) 引起 G₂/M 细胞周期阻滞和细胞凋亡^[13]。Song 等^[14]研究发现洛克米兰醇可显著抑制致癌基因 Fli-1 的表达从而诱导恶性白血病细胞凋亡。Yuan 等^[18]研究发现 FL3 (洛克米兰醇溴代物) 可通过抑制 Akt 和 PHB 的相互作用激活 GADD45α 引起尿路上皮癌细胞 G₂/M 细胞周期阻滞。本研究证实洛克米兰醇主要通过引起 HepG2 细胞 G₂/M 细胞周期阻滞起到抗增殖的效果。Cdc2 (CDK1)-cyclinB1 复合物又称有丝分裂促进因子 (maturation promoting factor, MPF), 是 G₂/M 期检验点的关键调节因子, 当细胞在 G₂ 期遭受 DNA 损伤时, G₂/M 期 DNA 损伤检验点就会抑制 MPF 的活性而防止细胞进入有丝分裂^[19]。在许多肿瘤细胞中, cdc2 和 cyclinB1 会过表达, cdc2 和 cyclinB1 过表达往往导致细胞周期进程发生紊乱, 恶性增殖, 形成肿瘤^[20]。本研究同时采用 Western blotting 方法证实洛克米兰醇能够显著抑制 cdc2 和 cyclin B1 的表达, 这使得 cdc2/cyclin B1 复

合物的形成显著减少, 从而使 HepG2 细胞阻滞在 G₂/M 期。Cdc25C 磷酸酶是一种细胞周期调控蛋白, 在调控 G₂/M 细胞周期中具有重要的作用^[21]。Cdc25C 能使 cdc2 第 14 位的苏氨酸 (Thr14) 和第 15 位的酪氨酸 (Tyr15) 去磷酸化, 从而激活 cdc2^[22]。在有丝分裂开始时 cdc2/cyclin B1 在核中被 cdc25C 完全活化, 促进细胞从 G₂ 期进入 M 期。当 cdc25C 活性受抑制时, cdc2/cyclin B1 复合物的活性也将受抑制, 发生 G₂/M 期阻滞^[23]。本研究发现洛克米兰醇可显著抑制 cdc25C 蛋白的表达。因此, 洛克米兰醇抑制肝脏细胞 G₂/M 周期阻滞的机制是洛克米兰醇可通过下调 cdc25C 的表达进而抑制 cdc2 的去磷酸化, 进而降低 cdc2/cyclin B1 复合物活性, 最终诱导 HepG2 细胞发生 G₂/M 周期阻滞。

MAPK 信号通路在调控细胞增殖方面具有重要作用。有研究表明 ERK、JNK 和 p38 MAPK 信号通路都能通过不同的途径对 G₂/M 细胞周期进行调控。ERK 还可以直接参与 cdc25C 的激活过程, 对 G₂/M 期检测点进行调控^[24]; JNK 可以参与介导 G₂/M 期相关蛋白 cdc25C 的磷酸化^[25]; p38 MAPK

可以参与 cyclin B1 的蛋白降解, 在 G₂/M 期阻滞中起到重要作用^[26]。关于 MAPK 信号通路是否参与了洛克米兰醇诱导肝癌细胞 HepG2 细胞 G₂/M 周期阻滞还未发现相关研究。本研究发现洛克米兰醇可以激活 ERK 和 JNK, 并且对 p38 没有影响。研究发现 ERK 抑制剂 U0126 而不是 JNK 抑制制 SP600125 可以部分逆转洛克米兰醇对 HepG2 细胞的增殖抑制作用, 同时 ERK 抑制剂 U0126 可以部分逆转洛克米兰醇对 HepG2 细胞的 G₂/M 期阻滞效果, 也可部分恢复洛克米兰醇对 HepG2 细胞 G₂/M 周期调控蛋白 cdc25C 和 cdc2 的抑制作用。因此, 推测 ERK 参与了洛克米兰醇诱导肝癌细胞 HepG2 细胞 G₂/M 周期阻滞。

综上所述, 洛克米兰醇可显著抑制 HepG2 细胞增殖, 其在抑制肝癌细胞增殖的效果和对正常肝细胞的选择性方面优于阿霉素。洛克米兰醇主要通过引起 HepG2 细胞 G₂/M 周期阻滞起到抗肝癌细胞增殖的效果。其作用机制可能为洛克米兰醇过度激活 ERK 信号转导通路, 作用于 cdc25C 磷酸酶而使其失活, 导致其无法激活 cdc2 而使 cdc2/cyclinB1 复合物活性降低, 从而引起 HepG2 细胞 G₂/M 周期阻滞。对于洛克米兰醇在体内抗肝癌的活性和机制还需进一步研究。

参考文献

- [1] Mak L Y, Cruz-Ramón V, Chinchilla-López P, *et al.* Global epidemiology, prevention, and management of hepatocellular carcinoma [J]. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, 2018, 38: 262-279.
- [2] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [3] 吴征镒. 新华本草纲要 (第一册) [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1988.
- [4] Yao C, Ni Z Y, Gong C Y, *et al.* Rocaglamide enhances NK cell-mediated killing of non-small cell lung cancer cells by inhibiting autophagy[J]. *Autophagy*, 2018, 14(10): 1831-1844.
- [5] Pan L, Woodard J L, Lucas D M, *et al.* Rocaglamide, silvestrol and structurally related bioactive compounds from *Aglaia* species [J]. *Nat Prod Rep*, 2014, 31(7): 924-939.
- [6] An F L, Wang X B, Wang H, *et al.* Cytotoxic rocaglate derivatives from leaves of *Aglaia perviridis* [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 20045.
- [7] Todt D, Moeller N, Praditya D, *et al.* The natural compound silvestrol inhibits hepatitis E virus (HEV) replication *in vitro* and *in vivo* [J]. *Antiviral Res*, 2018, 157: 151-158.
- [8] Henss L, Scholz T, Grünweller A, *et al.* Silvestrol inhibits chikungunya virus replication [J]. *Viruses*, 2018, 10(11): E592.
- [9] Glitscher M, Himmelsbach K, Woytinek K, *et al.* Inhibition of hepatitis E virus spread by the natural compound silvestrol[J]. *Viruses*, 2018, 10(6): E301.
- [10] Su B N, Chai H, Mi Q W, *et al.* Activity-guided isolation of cytotoxic constituents from the bark of *Aglaia crassinervia* collected in Indonesia [J]. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(4): 960-972.
- [11] Pan L, Acuña U M, Li J, *et al.* Bioactive flavaglines and other constituents isolated from *Aglaia perviridis* [J]. *J Nat Prod*, 2013, 76(3): 394-404.
- [12] Thuaud F, Bernard Y, Türkeri G, *et al.* Synthetic analogue of rocaglaol displays a potent and selective cytotoxicity in cancer cells: Involvement of apoptosis inducing factor and caspase-12 [J]. *J Med Chem*, 2009, 52(16): 5176-5187.
- [13] Mi Q W, Su B N, Chai H, *et al.* Rocaglaol induces apoptosis and cell cycle arrest in LNCaP cells [J]. *Anticancer Res*, 2006, 26(2A): 947-952.
- [14] Song J L, Yuan C M, Yang J, *et al.* Novel flavagline-like compounds with potent Fli-1 inhibitory activity suppress diverse types of leukemia [J]. *FEBS J*, 2018, 285(24): 4631-4645.
- [15] Sun X J, Zhang C P, Jin H, *et al.* Flow cytometric analysis of T lymphocyte proliferation *in vivo* by EdU incorporation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 41: 56-65.
- [16] Lyons A B, Blake S J, Doherty K V. Flow cytometric analysis of cell Division by dilution of CFSE and related dyes [J]. *Curr Protoc Cytom*, 2013, doi: 10.1002/0471142956.cy0911s64.
- [17] Pugazhendhi A, Edison T N J I, Velmurugan B K, *et al.* Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems [J]. *Life Sci*, 2018, 200: 26-30.
- [18] Yuan G J, Chen X, Liu Z W, *et al.* Flavagline analog FL3 induces cell cycle arrest in urothelial carcinoma cell of the bladder by inhibiting the Akt/PHB interaction to activate the GADD45a pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res: CR*, 2018, 37(1): 21.
- [19] Kishimoto T. MPF-based meiotic cell cycle control: Half a century of lessons from starfish oocytes [J]. *Proc Jpn Acad, Ser B, Phys Biol Sci*, 2018, 94(4): 180-203.
- [20] Chen H, Huang Q, Dong J, *et al.* Overexpression of CDC2/CyclinB1 in gliomas, and CDC2 depletion inhibits proliferation of human glioma cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *BMC Cancer*, 2008, 8: 29.
- [21] Sur S, Agrawal D K. Phosphatases and kinases regulating CDC25 activity in the cell cycle: Clinical implications of CDC25 overexpression and potential treatment strategies [J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 416(1/2): 33-46.
- [22] Moura M, Conde C. Phosphatases in mitosis: Roles and regulation [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(2): E55.
- [23] 彭花, 蒋孝华. Cdc25C 和 CyclinB1 在细胞周期调控及肿瘤发生发展中的作用 [J]. 现代医药卫生, 2015, 31(8): 1170-1173.
- [24] Wang R N, He G G, Nelman-Gonzalez M, *et al.* Regulation of Cdc25C by ERK-MAP kinases during the G₂/M transition [J]. *Cell*, 2007, 128(6): 1119-1132.
- [25] Gutierrez G J, Tsuji T, Cross J V, *et al.* JNK-mediated phosphorylation of Cdc25C regulates cell cycle entry and G₂/M DNA damage checkpoint [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(19): 14217-14228.
- [26] Li J P, Yang J L. Cyclin B1 proteolysis via p38 MAPK signaling participates in G₂ checkpoint elicited by arsenite [J]. *J Cell Physiol*, 2007, 212(2): 481-488.