

网络出版时间: 2020-2-19 12:57 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200217.1527.013.html>

虫草素抑制 PI3K 通路的活化诱导口腔鳞状细胞癌 SCC9 细胞自噬性死亡

朱兰省, 王艳玲, 刘爱群, 许小婷

摘要 目的 探究虫草素(CP)对口腔鳞状细胞癌SCC9细胞系自噬相关的作用和机制。方法 实验设置SCC9 blank组、CP(5 μg/ml)组、CP(10 μg/ml)组和CP(20 μg/ml)组。通过5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)染色检测细胞增殖,通过Hoechst染色检测细胞凋亡,通过Western blot检测Ki67、PCNA、Caspase-3、Caspase-9、Beclin 1、p62、LC3A/B、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR蛋白表达,通过免疫荧光检测细胞自噬标志分子LC3 II表达。添加PI3K抑制剂LY294002后,通过EdU染色检测细胞增殖,通过Hoechst染色检测细胞凋亡,通过免疫荧光检测细胞自噬标志分子LC3 II表达。结果 与SCC9 blank组比较,各CP处理组细胞发生明显增殖抑制,并且伴随着凋亡发生,增殖相关分子表达下调,凋亡相关分子表达上调,并且伴随着CP使用浓度升高差异增加($P < 0.01$);自噬促进相关分子(Beclin 1、LC3 II)表达上调,自噬抑制相关分子p62表达下调,且自噬通路上游信号分子(PI3K/AKT/mTOR)活性降低,并且伴随着CP使用浓度升高差异增加($P < 0.01$);与CP处理相比,LY294002联合CP处理后细胞发生明显增殖抑制,促进凋亡和自噬。结论 CP可以提高口腔鳞状细胞癌自噬水平,并可以抑制细胞增殖,促进细胞凋亡发生;主要原因可能是通过下调PI3K/AKT/mTOR通路来发挥作用。

关键词 虫草素; 口腔鳞状细胞癌; SCC9 细胞系; 自噬; 凋亡; PI3K

中图分类号 R 739.85

2019-11-01 接收

基金项目: 2016年河南省科学技术厅基金项目(编号: 162102310183)

作者单位: 河南省中医院(河南中医药大学第二附属医院)口腔科, 郑州 450002

作者简介: 朱兰省,男,硕士,副主任医师,责任作者,E-mail: 13513807115@sina.com

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)02-0221-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.02.013

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是最常见的恶性肿瘤之一,其发病总量约占到口腔癌的90%^[1]。在全世界范围内,OSCC发病率为2%~4%,在南亚发病率则上升至10%~40%;这一现象的主要原因可能与南亚地区人民大量食用槟榔果有极大关系^[2]。虽然患者大多属于50岁以上人群,但是患病人群越来越趋向于年轻化^[3]。虫草素(cordycepin, CP)是一种3'-脱氧腺苷(3'-deoxyadenosine),由Cunningham et al^[4]首次在蛹虫草(*Cordyceps militaris*)中培育分离得到。近年来,经过大量国内外科学家证实,CP作为一种核苷酸,具有诸多生物学功能,如抑菌抗病毒、调节免疫功能、对抗炎症反应以及抗肿瘤作用等^[5]。Wong et al^[6]研究证实CP可以通过缩短mRNA的polyA进而抑制肿瘤细胞黏附能力。磷脂肌醇3-激酶(phosphoinositide-3 kinase, PI3K)-蛋白激酶B(protein kinase B, PKB, 亦称Akt)-雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路是生物体细胞内一经典信号通路,自发现以来在肿瘤发生发展中的作用即被广泛研究,已经在多数肿瘤里呈不同程度高表达或异常活化^[7-8]。有研究^[9]显示,Muc-1可以通过PI3K-Akt途径来促进OSCC转移和侵袭。截止目前,OSCC发病机制也不甚清楚,因此如何明确OSCC发生发展机制,寻找其中潜在的分子标志物,对进一步提高OSCC患者的治疗和预后效果具有重要研究意义。现根据前期研究成

transcribed *in vitro* for whole mount *in situ* hybridization of *Schistosoma japonicum* at different developmental stages. Positive signals were detected in the ovaries and vitellarium of 24-day-old and 42-day-old females, and in the ovaries of 18-day-old females. No significant positive signal was observed in males at all developmental stages. **Conclusion** *Nanos1* gene is highly expressed in the ovaries and vitellarium of 24-day-old and 42-day-old females, and in the ovaries of 18-day-old females, but no significant positive signal is observed in males at any developmental stages. The expression pattern of *nanos1* gene in *Schistosoma japonicum* is observed successfully, which provided an important clue for studying the function of *nanos1* gene.

Key words *Schistosoma japonicum*; *nanos1*; phylogenetic analysis; whole mount *in situ* hybridization

果,探讨CP在OSCC细胞中所发挥的功能机制,期望为OSCC治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 DMEM 细胞培养液、胎牛血清和胰酶均购自美国 Gibco 公司; Hoechst 33342 染色试剂盒(货号: ab228551)购自英国 abcam 公司; 虫草素(货号: C9137-1MG, 纯度≥95%)、EdU 染液试剂盒(货号: 900584)购自美国 sigma 公司; Ki67(货号: ab16667)、PCNA(货号: ab29)、Caspase-3(货号: ab13847)、Caspase-9(货号: ab32539)、Beclin 1(货号: ab207612)、p62(货号: ab56416)、LC3A/B(货号: ab128025)、PI3K(货号: ab32089)、p-PI3K(货号: ab182651)、AKT(货号: ab8805)、p-AKT(货号: ab131443)、mTOR(货号: ab2732)、p-mTOR(货号: ab109268)、GAPDH 一抗(货号: ab181062)购自美国 abcam 公司; HRP 标记的山羊抗小鼠二抗购自美国 Santa Cruz 公司; LY294002(货号: S1737)购自上海亚培生物科技有限公司。

1.2 主要仪器 半干转膜仪、电泳仪以及 PCR 仪均购于美国伯乐公司; Multiskan GO 酶标仪购自美国 Thermo; Gel View 6000 化学发光凝胶成像仪购于广州云星仪器有限公司; 分析天平 ME204 购自梅特勒托利多国际贸易(上海)有限公司; 生物安全柜 HR30-HIA2、-86 °C 超低温冰箱 DW-86L578J、-25 °C 低温保存箱 DW-25L262h 和 2~8 °C 医用冷藏箱 HYC-310 购自河南郑州海尔公司; Eppendorf 台式冷冻离心机 5702R 购自德国艾本德股份公司。

1.3 实验方法

1.3.1 EdU 染色 将对数生长期细胞 8×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 过夜培养; 经过 24 h CP 处理后, 用完全培养基按照 1 000 : 1 比例稀释 EdU 溶液(试剂 A), 制备适量 50 $\mu\text{mol/L}$ EdU 培养基; 每孔加入 100 μl 的 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 EdU 培养基进行 2 h 孵育。弃去培养基, PBS 缓冲液清洗细胞 2 次, 每次 5 min。各孔加入 100 μl 的细胞固定液在室温下孵育 30 min, 加 2 mg/ml 的甘氨酸, 脱色摇床进行孵育 5 min; 各孔加 100 μl PBS 缓冲液, 脱色摇床进行孵育 5 min。各孔加入 100 μl 1 \times Apollo 染色反应液后, 室温避光下脱色摇床孵育 30 min。去除染色反应液, 加 100 μl 渗透剂在脱色摇床清洗 2 次, 每次 10 min。准备后续 Hoechst 染色。

1.3.2 Hoechst 染色 对药物处理的细胞培养 48 h 后进行染色处理: 吸尽培养液后加入 0.5 ml 固定液

固定 10 min; 去除固定液用 PBS 洗两遍, 每次 3 min; 加入 0.5 ml Hoechst 染色液染色 5 min; 用 PBS 洗 2 遍, 每次 3 min; 滴加抗荧光淬灭封片液盖上盖玻片, 荧光显微镜下观察。

1.3.3 免疫荧光染色 操作步骤按照说明书进行, 细胞接种于预先用 0.01% 多聚赖氨酸包被的盖玻片, 经药物处理后, 进入 4% 多聚甲醛固定 30 min。PBS 漂洗, 用含 Triton X-100 封闭液在冰上通透 5 min; 吸掉通透液, 加入预温的封闭液, 室温下封闭 1 h; 孵育一抗 4 °C 过夜。次日 PBS 漂洗, 孵育荧光标记的二抗(浓度为 1 : 200), 室温避光孵育 1 h, PBS 漂洗, 50% 甘油 - 指甲油封片, 立即避光共聚焦显微镜观察。

1.3.4 Western blot 检测细胞中蛋白表达 收集四组细胞, PBS 清洗 3 次, 用添加有终浓度为 1 mmol/L 的蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride PMSF)的细胞裂解液进行裂解, 提取各组细胞总蛋白。用 BCA 试剂盒检测总蛋白浓度(具体检测按照试剂说明书进行), 10% SDS-PAGE 胶分离蛋白后用半干转膜仪转移蛋白质至 PVDF 膜。用 5% 脱脂牛奶室温封闭蛋白 2 h, 随后加入一抗于 4 °C 封闭过夜, 第 2 天加入对应二抗室温封闭 1 h, 最后滴加 ECL 曝光显影。SDS-PAGE 凝胶电泳分离并转至 PVDF 膜, 经 5% BSA 封闭后依次孵育相应一抗和二抗。显色并统计灰度值计算相对表达量。

1.4 统计学处理 所有实验数据均用软件 SPSS 19.0 统计分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐且服从正态分布则组间比较用 One-way ANOVA, 反之则用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CP 抑制 SCC9 细胞增殖、促进细胞凋亡

EdU 染色实验结果表明: 与正常 SCC9 blank 组相比, CP 各组 EdU 阳性细胞所占比率均有不同程度的降低($t = 6.445, P < 0.01, n = 10$; $t = 18.064, P < 0.01, n = 10$; $t = 36.200, P < 0.01, n = 10$), 见图 1; 随着 CP 使用浓度逐渐升高, EdU 阳性细胞所占比率逐渐下降。

Hoechst 染色实验显示: 正常 SCC9 blank 组细胞形态均匀一致, 几乎没有皱缩等形态; 与正常 SCC9 blank 组比较, 随着 CP 给药浓度逐渐增大, 各用药组 SCC9 细胞核逐渐凝聚, 细胞皱缩, Hoechst 染色逐渐加深。与正常 SCC9 blank 组相比, CP 各组细胞凋亡率均有不同程度的升高($t = 7.192, P < 0.01, n = 10$), 见图 2。

$P < 0.01, n = 10; t = 18.064, P < 0.01, n = 10; t = 26.964, P < 0.01, n = 10$), 见图2; 随着CP使用浓度逐渐升高, 细胞凋亡率逐渐升高。

Western blot检测显示: 与正常SCC9 blank组细胞相比, 随着CP给药浓度逐渐增大, 细胞内增殖相关因子Ki67($t = 5.542, P < 0.01, n = 10; t = 36.948, P < 0.01, n = 10; t = 56.374, P < 0.01, n = 10$)和PCNA($t = 10.172, P < 0.01, n = 10; t = 38.105, P < 0.01, n = 10; t = 49.760, P < 0.01, n = 10$)表达水平逐渐降低, 而凋亡相关因子Caspase-3($t = 0.456, P < 0.01, n = 10; t = 21.073, P < 0.01, n = 10; t = 41.678, P < 0.01, n = 10$)和Caspase-9($t = 0.992, P < 0.01, n = 10; t = 28.987, P < 0.01, n = 10; t = 58.024, P < 0.01, n = 10$)则逐渐上调($P < 0.01$), 见图3。

2.2 CP促进SCC9细胞自噬 Western blot实验显示, 与正常SCC9 blank组细胞比较, 随着CP给药浓度逐渐增大, 各用药组SCC9细胞中自噬抑制相关因子Beclin 1($t = 14.697, P < 0.01, n = 10; t = 5.146, P < 0.01, n = 10; t = 12.281, P < 0.01, n = 10$)和LC3-II($t = 3.386, P < 0.01, n = 10; t = 42.449, P < 0.01, n = 10; t = 7.382, P < 0.01, n = 10$)表达量逐渐上调; 而促进自噬相关蛋白p62($t = 11.024, P < 0.01, n = 10; t = 12.639, P < 0.01, n = 10; t = 16.246, P < 0.01, n = 10$)表达量则逐渐下降($P < 0.01$), 见图4。

2.3 CP促进SCC9细胞LC3⁺自噬细胞比例 免

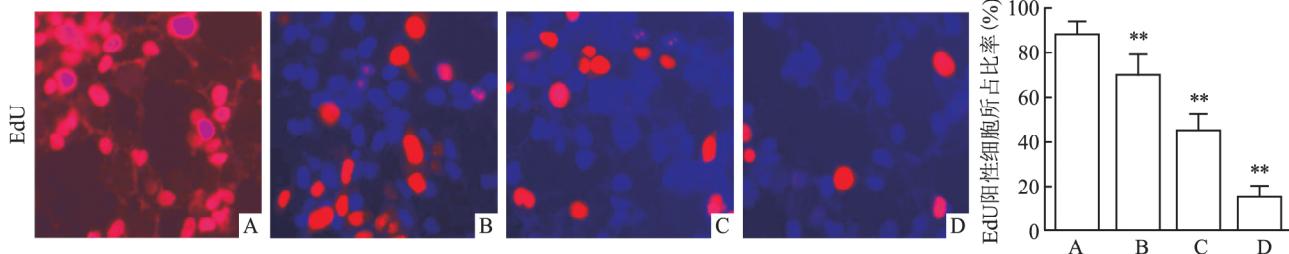


图1 不同处理组EdU染色鉴定细胞增殖 $\times 200$

A: SCC9 blank组; B: CP(5 μg/ml)组; C: CP(10 μg/ml)组; D: CP(20 μg/ml)组; 与SCC9 blank组比较: ** $P < 0.01$

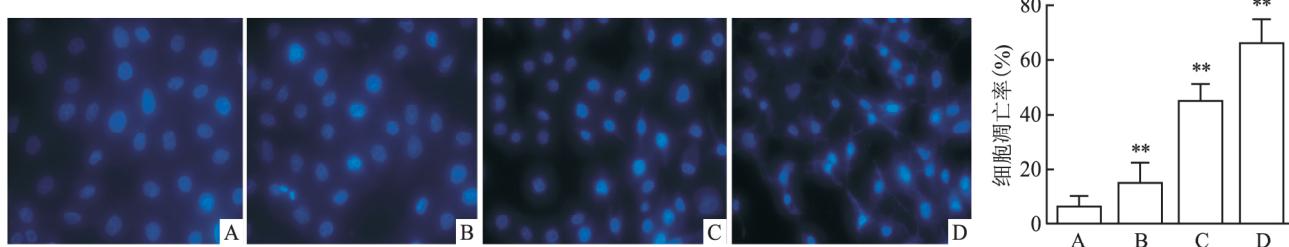


图2 Hoechst染色检测SCC9细胞凋亡 $\times 200$

A: SCC9 blank组; B: CP(5 μg/ml)组; C: CP(10 μg/ml)组; D: CP(20 μg/ml)组; 与SCC9 blank组比较: ** $P < 0.01$

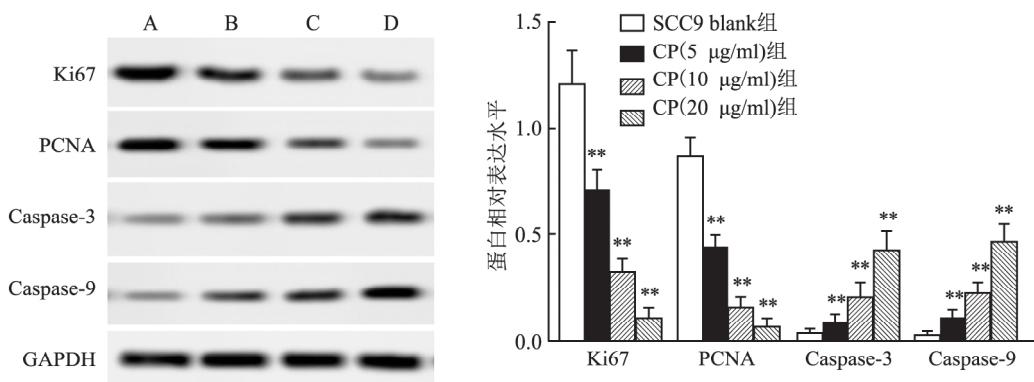


图3 Western blot检测细胞增殖和凋亡蛋白表达

A: SCC9 blank组; B: CP(5 μg/ml)组; C: CP(10 μg/ml)组; D: CP(20 μg/ml)组; 与SCC9 blank组比较: ** $P < 0.01$

免疫荧光染色鉴定 $LC3^+$ 细胞量, 正常 SCC9 blank 组细胞质中很少含有聚集的染色亮点; 与正常 SCC9 blank 组细胞比较, 随着 CP 给药浓度逐渐增大, 各用药组 SCC9 细胞质中荧光亮点数目逐渐增加, 同时伴有荧光亮点面积逐渐增加 ($t = 14.037, P < 0.01, n = 10; t = 39.413, P < 0.01, n = 10; t = 46.135, P < 0.01, n = 10$)。见图 5。

2.4 CP 抑制 SCC9 细胞中 PI3K 通路活性 为了进一步探究 CP 对 SCC9 细胞的作用机制, 通过 Western blot 检测不同处理组细胞中 PI3K 通路相关分子活性情况。与 SCC9 blank 组细胞比较, 随着 CP 给药浓度逐渐增大, 各用药组 SCC9 细胞中自噬通路相关基因 PI3K、AKT 及 mTOR 分子表达激活水平逐渐受到抑制 ($t = 7.257, P < 0.01, n = 10; t = 18.064, P < 0.01, n = 10; t = 21.411, P < 0.01, n = 10; t = 6.521, P < 0.01, n = 10; t = 14.589, P < 0.01, n = 10; t = 22.759, P < 0.01, n = 10; t = 6.653, P < 0.01, n = 10; t = 15.726, P < 0.01, n = 10; t = 23.508, P < 0.01, n = 10$), 见图 6, 在 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 组时达到最强。

2.5 CP 通过抑制 PI3K 通路抑制 SCC9 细胞增殖、促进细胞凋亡、自噬 添加 PI3K 通路抑制剂

LY294002 后, EdU 染色实验结果表明: 与正常 SCC9 blank 组相比, LY294002 组和 CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组 EdU 阳性细胞所占比率均有明显降低 ($t = 14.589, P < 0.01, n = 10; t = 18.064, P < 0.01, n = 10$), 与 CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组相比, LY294002 + CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组 EdU 阳性细胞所占比率明显降低 ($t = 3.386, P < 0.01, n = 10$), 见图 7。

添加 PI3K 通路抑制剂 LY294002 后, Hoechst 染色实验结果表明: 与正常 SCC9 blank 组相比, LY294002 组和 CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组 Hoechst 阳性细胞所占比率均有明显升高 ($t = 11.265, P < 0.01, n = 10; t = 7.156, P < 0.01, n = 10$), 与 CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组相比, LY294002 + CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组 Hoechst 阳性细胞所占比率明显升高 ($t = 3.413, P < 0.01, n = 10$), 见图 8。

添加 PI3K 通路抑制剂 LY294002 后, 免疫荧光染色鉴定 $LC3^+$ 细胞量实验结果表明: 与正常 SCC9 blank 组相比, LY294002 组和 CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组荧光亮点数目明显升高 ($t = 24.798, P < 0.01, n = 10; t = 31.654, P < 0.01, n = 10$), 与 CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组相比, LY294002 + CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组荧光亮点数目明显升高 ($t = 5.122, P < 0.01, n = 10$), 见图 9。

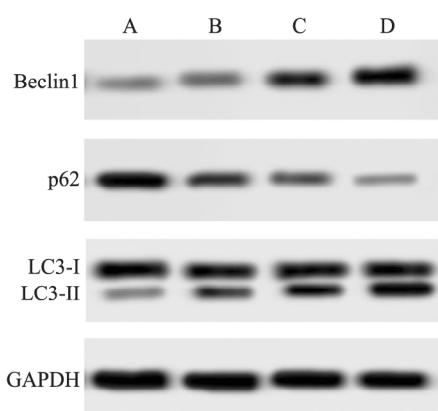


图 4 Western blot 检测细胞自噬相关蛋白表达水平

A: SCC9 blank 组; B: CP($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组; C: CP($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组; D: CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组; 与 SCC9 blank 组比较: ** $P < 0.01$

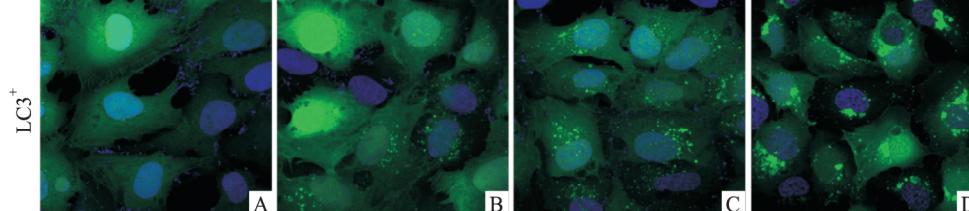
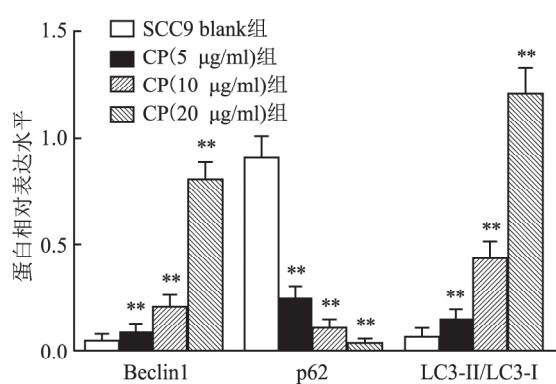
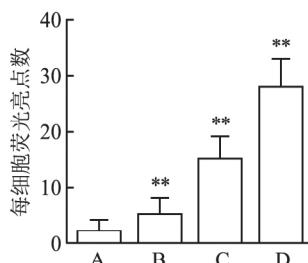


图 5 免疫荧光检测 $LC3^+$ 细胞表达分布 $\times 200$

A: SCC9 blank 组; B: CP($5 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组; C: CP($10 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组; D: CP($20 \mu\text{g}/\text{ml}$) 组; 与 SCC9 blank 组比较: ** $P < 0.01$



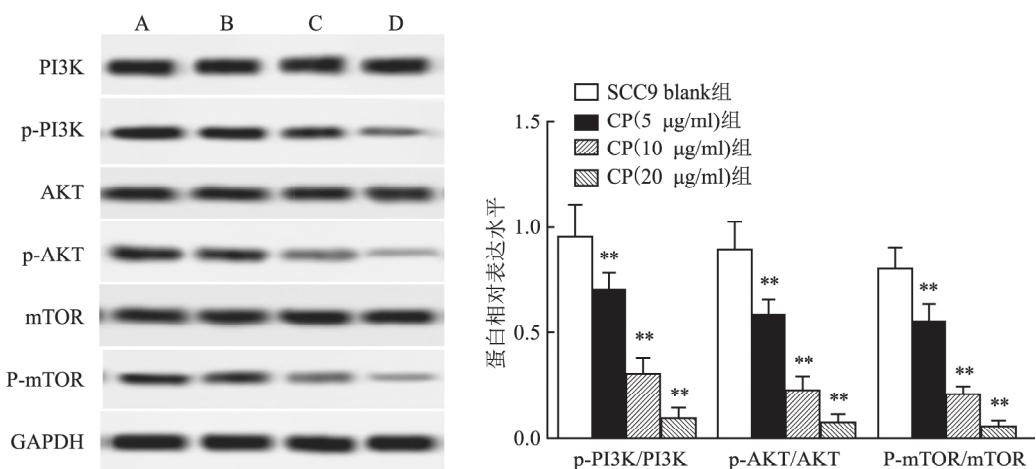
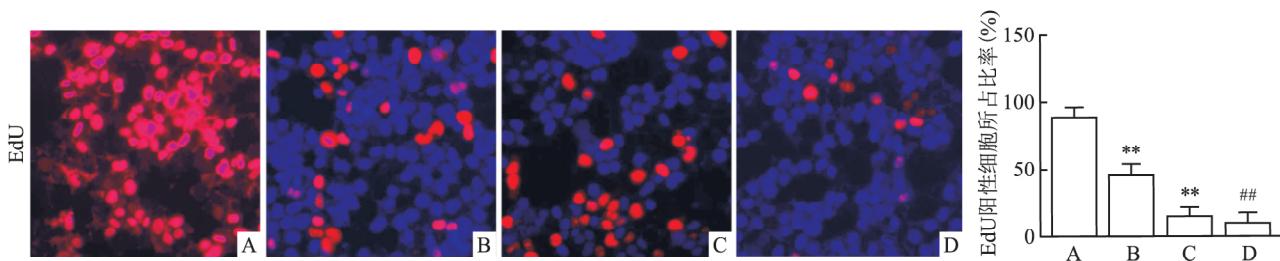
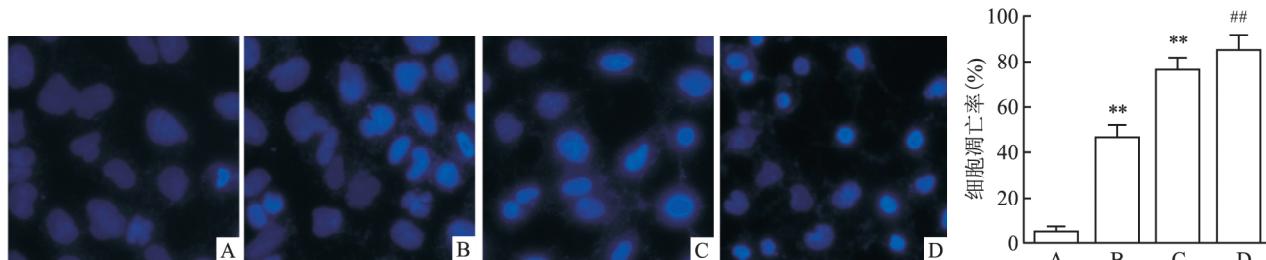
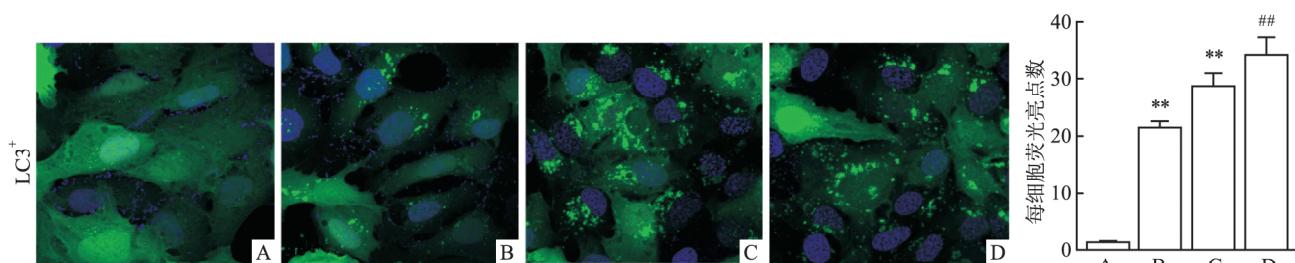


图 6 Western blot 检测各处理组自噬通路相关分子活性

A: SCC9 blank 组; B: CP(5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组; C: CP(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组; D: CP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组; 与 SCC9 blank 组比较: ** $P < 0.01$ 图 7 不同处理组 EdU 染色鉴定细胞增殖 $\times 200$ A: SCC9 blank 组; B: LY294002 组; C: CP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组; D: LY294002 + CP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组; 与 SCC9 blank 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组比较: ## $P < 0.01$ 图 8 Hoechst 染色检测 SCC9 细胞凋亡 $\times 200$ A: SCC9 blank 组; B: LY294002 组; C: CP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组; D: LY294002 + CP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组; 与 SCC9 blank 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组比较: ## $P < 0.01$ 图 9 免疫荧光检测 LC3+ 细胞表达分布 $\times 200$ A: SCC9 blank 组; B: LY294002 组; C: CP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组; D: LY294002 + CP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组; 与 SCC9 blank 组比较: ** $P < 0.01$; 与 CP(20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 组比较: ## $P < 0.01$

3 讨论

鳞状细胞癌一般发生于口腔黏膜和颌面部皮肤部位的鳞状上皮中,病理学表现主要为:增生性鳞状上皮在侵犯周围结缔组织后形成原位癌。鳞状细胞不是角化形态时,有可能会同时具有多形性细胞,这种细胞具有恶性程度较高,称为无角化的鳞状细胞癌。不良的生活习惯会导致 OSCC 发生,如吸烟、饮酒、嚼槟榔等^[10]。随着治疗 OSCC 的不断发展,相关治疗手段已不仅局限在手术治疗,还可以结合化疗、放疗等其他治疗方式。但仍有 60% 以上的患者病情不能得到有效的控制,术后生存率低于 50%^[11]。

植物药中具有抗肿瘤功效的药品因良好效用和相对微小毒副作用逐渐受到人们关注。近些年来,经过大量国内外科学家证实,CP 作为一种核苷酸,具有诸多生物学功能,如抑菌抗病毒、调节免疫功能、对抗炎症反应以及抗肿瘤作用等^[5]。CP 的抗肿瘤机制复杂,诸多学者证实因同腺苷结构类似,CP 可以参与 DNA 或 RNA 的生物合成中,但体内多数酶无法将腺苷与 CP 进行区别,从而终止碱基合成^[12]。Zheng et al^[13] 研究者证实 CP 可以在舌癌中抑制 AMPK-mTOR 通路来抑制肿瘤细胞增殖和诱导细胞自噬。该研究利用 Western blot 和免疫荧光等技术对 Beclin 1、p62 及 LC3 II 和上游信号分子进行验证,发现 CP 可以有效影响自噬相关标记分子和上游信号分子的活性,促进自噬发生。同时还检测到增殖相关蛋白 Ki67 和 PCNA 表达在经过 CP 处理后发生明显下调,说明 OSCC 的增殖能力也受到影响。

PI3K-蛋白激酶 B-雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) 信号通路是生物体细胞内一经典信号通路,自发现以来在肿瘤发生发展中的作用即被广泛研究,已经在多数肿瘤里呈不同程度高表达或异常活化^[7-8]。丹参酮 IIA 可以通过诱导 Beclin 1-Atg5 通路和抑制 PI3K-Akt-mTOR 通路来促进肿瘤自噬发生^[14]。也有研究^[15] 证明 CP 可以下调 p38 AMPK 和 PI3K-Akt 通路活性来诱导小鼠睾丸癌发生凋亡。本研究显示,在正常 OSCC 中,PI3K-Akt-mTOR 通路活性均呈高度异常激活,当使用 CP 处理后,三者活性水平均有所下调,并且随着 CP 使用浓度升高三者活性降低水平越低。这一结果充分说明较高浓度 CP 可以有效降低 OSCC 细胞中 PI3K-Akt-mTOR 通路的活性水平。另外,利用免疫荧光技术鉴定不同处理组 OSCC 中 LC3⁺ 的比例

发现,在细胞进行 CP 处理后,有较多的细胞呈现 LC3⁺ 表达,并且在不同浓度组细胞中呈现出高比例的 LC3⁺ 细胞;同时利用 Western blot 对自噬相关蛋白 Beclin 1、p62 和 LC3 II 的表达水平也进行了验证,发现不同浓度组 CP 处理可以有效对相应分子发生逆转;以上结果充分证明有较多的细胞启动自噬程序。说明不同浓度 CP 可能通过降低 PI3K-Akt-mTOR 来启动 OSCC 自噬发生。

综上,CP 对 OSCC 细胞具有很好的促自噬和生长抑制效果。主要体现在 CP 处理 OSCC 后,可以有效降低细胞内 PI3K-Akt-mTOR 通路分子活性,并激活下游相应自噬相关的标志分子表达。同时 CP 处理还有效降低癌细胞内增殖相关蛋白 Ki67 和 PCNA 的表达,进一步抑制癌细胞的增殖能力。本研究通过 CP 处理 OSCC 后显著激活细胞自噬,并可以抑制癌细胞增殖能力的结果显示,CP 对阐明 OSCC 发生发展机制,寻找其中潜在的分子标志物,对进一步提高 OSCC 患者的治疗和预后效果具有重要的研究意义。

参考文献

- [1] Ramos-Garcia P, Gonzalez-Moles M A, Gonzalez-Ruiz L, et al. Prognostic and clinicopathological significance of cyclin d1 expression in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis [J]. *Oral Oncol*, 2018, 83: 96-106.
- [2] Markopoulos A K. Current aspects on oral squamous cell carcinoma [J]. *Open Dent J* 2012, 6(2): 126-30.
- [3] He K F, Zhang L, Huang C F, et al. Cd163⁺ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 20(14): 838632.
- [4] Cunningham K G, Manson W, Spring F S, et al. Cordycepin, a metabolic product isolated from cultures of *cordyceps militaris* (linn.) link [J]. *Nature*, 1950, 166(4231): 949.
- [5] Chaicharoenaudomrung N, Jaroonwitchawan T, Noisa P. Cordycepin induces apoptotic cell death of human brain cancer through the modulation of autophagy [J]. *Toxicol Vitro*, 2017, 46(3): 1016.
- [6] Wong Y Y, Moon A, Duffin R, et al. Cordycepin inhibits protein synthesis and cell adhesion through effects on signal transduction [J]. Effects of glut1 gene silencing on proliferation, differentiation, and apoptosis of colorectal cancer cells by targeting the tgf- β /pi3k-akt-mtor signaling pathway [J]. *J Cell Biochem* 2018, 119(2): 2356-67.
- [7] Yu F, Sun Y, Huang F, et al. Protective effect of meretrix meretrix oligopeptides on high-fat-diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice [J]. *Mar Drugs*, 2018, 16(2): 23.
- [8] Li P, Xiao L Y, Tan H. Muc-4 promotes migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via PI3K-Akt signaling [J]. *Int*

- J Clin Exp Pathol 2015, 8(9): 10365–74.
- [10] Bakhtiari S, Mortazavi H, Mehdipour M, et al. Frequency of head and neck squamous cell carcinomas and related variables in southern Iran (Ahvaz city): 10-year retrospective study [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2017, 18(2): 375–9.
- [11] Baldwin C, Garnis C, Zhang L, et al. Multiple microalterations detected at high frequency in oral cancer [J]. Cancer Res, 2005, 65(17): 7561–7.
- [12] Chen X, Wang Y, Liu J, et al. Synergistic effect of HMGB1 knockdown and cordycepin in the K562 human chronic myeloid leukemia cell line [J]. Mol Med Rep, 2015, 12(3): 4462–8.
- [13] Zheng Q W, Gao S X, Lv J, et al. Effect of cordycepin on apoptosis and autophagy of tongue cancer cells *in vitro* and the molecular mechanism [J]. J South Med Univ, 2018, 38(4): 390–4.
- [14] Qiu Y, Li C, Wang Q, et al. Tanshinone IIA induces cell death via Beclin-1-dependent autophagy in oral squamous cell carcinoma SCC-9 cell line [J]. Cancer Med, 2018, 7(2): 397–407.
- [15] Pan B S, Wang Y K, Lai M S, et al. Cordycepin induced MA-10 mouse Leydig tumor cell apoptosis by regulating p38 MAPKs and PI3K/AKT signaling pathways [J]. Sci Rep, 2015, 5(1): 3372.

Cordycepin induces autophagic death in oral squamous cell carcinoma SCC9 cells by inhibiting the activation of the PI3K pathway

Zhu Lanxing, Wang Yanling, Liu Aiqun, et al

(Dept of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Henan Province Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450002)

Abstract **Objective** To investigate the effect and mechanism of cordycepin (CP) on autophagy in oral squamous cell carcinoma SCC9 cell line. **Methods** The SCC9 blank group, CP (5 μg/ml) group, CP (10 μg/ml) group and CP (20 μg/ml) group were set in the experiment. Cell proliferation was detected by 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining. Apoptosis was detected by Hoechst staining. Western blot was used to detect the expressions of Ki67, PCNA, Caspase-3, Caspase-9, Beclin 1, p62, LC3A/B, PI3K, p-PI3K, AKT, p-AKT, mTOR and p-mTOR. The autophagy marker molecule LC3 II was detected by immunofluorescence. After adding PI3K inhibitor LY294002, cell proliferation was detected by EdU staining, apoptosis was detected by Hoechst staining, and autophagy marker molecule LC3 II was detected by immunofluorescence. **Results** Compared with the SCC9 blank group, the cells in each CP treatment group showed significant inhibition of proliferation, accompanied by apoptosis, down-regulation of proliferation-related molecules, up-regulation of apoptosis-related molecules, and increased concomitant with increasing concentration of CP ($P < 0.01$); The expression of autophagy-promoting related molecules (Beclin 1 and LC3 II) was up-regulated, the expression of autophagy-inhibiting molecules (p62) was down-regulated, and the activity of the upstream signal molecules (PI3K/AKT/mTOR) decreased, and the difference increased with the increase of CP concentration ($P < 0.01$). Compared with CP treatment, LY294002 combined with CP treatment inhibited cell proliferation and promoted apoptosis and autophagy. **Conclusion** CP can increase the level of autophagy in oral squamous cell carcinoma, inhibit cell proliferation and promote apoptosis. The main reason may be related to the down-regulation of PI3K/AKT/mTOR pathway.

Key words cordycepin; oral squamous cell carcinoma; SCC9 cell line; autophagy; apoptosis; PI3K