

网络出版时间: 2018-3-16 9:32 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180315.1708.009.html>

低剂量阿司匹林诱导产生的自噬减弱 其对肝癌 HepG2 细胞系的抑制作用

朱思雅, 王梦琳, 金娟

摘要 目的 研究一定浓度的阿司匹林对肝癌 HepG2 细胞系的增殖抑制作用及产生抑制作用可能的原因。方法 采用 MTT 法和平板克隆实验研究阿司匹林对肝癌 HepG2 细胞增殖活力的影响。吖啶橙荧光染色法观察阿司匹林对肝癌 HepG2 细胞内自噬小体的影响。Western blot 法检测腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)在肝癌 HepG2 细胞中的表达。结果 10 mmol/L 浓度的阿司匹林能抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖活力, 但增加 HepG2 细胞中自噬小体的数量, 增加 AMPK 表达, 降低 mTOR 的表达, 且和 40 μ m 自噬抑制剂氯喹(CQ)联合使用时, CQ 能够增强 10 mmol/L 浓度阿司匹林对肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制作用。结论 联合自噬抑制剂 CQ 减弱浓度为 10 mmol/L 的阿司匹林诱导产生的自噬从而明显增强其抗 HepG2 作用。

关键词 阿司匹林; 肝癌 HepG2 细胞; 自噬; 自噬抑制剂
中图分类号 R 963

2017-11-17 接收

基金项目: 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2017A179)

作者单位: 安徽医科大学基础医学院药理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 朱思雅, 女, 硕士研究生;

金娟, 女, 研究生导师, 责任作者, E-mail: juanjin163@163.com

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)03-0373-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.03.009

肝细胞癌是现如今社会最为常见的恶性肿瘤之一, 又因其恶性程度高, 且发生发展速度较快, 治疗困难, 而一直是临床研究的重点和热点之一^[1]。阿司匹林是应用最早, 最广泛和最常用的非甾体类解热镇痛抗炎风湿药, 具有解热、镇痛、抗炎、抗风湿和抗血小板聚集等的众多的药理作用, 阿司匹林发挥药效较快且药效稳定, 超剂量易于被发现和解决, 很少发生变态反应。长期规律使用阿司匹林者和未服用阿司匹林者相比, 可有效降低癌症的发生、增殖和转移^[2-3]。细胞自噬是细胞在自噬相关基因的调控下利用溶酶体降解自身受损的细胞器和大分子物质的过程, 发生应激时, 细胞自噬可以阻止致癌的损伤蛋白质和细胞器的累积, 阻止细胞的癌变; 但是如果肿瘤形成, 细胞自噬为癌细胞提供丰富的营养, 促进肿瘤生长。因此, 在肿瘤进展的过程中, 细胞自噬的作用表现出了两面性, 细胞自噬与肿瘤的关系十分复杂且目前尚未完全阐明。该研究旨在研究一定浓

cells after AZD9291 treatment. To explore the efficacy of AZD9291 combined with STAT3 inhibitor on the growth inhibition of H1975 cells and its possible mechanism. **Methods** The expression of phosphorylated and nonphosphorylated STAT3, ERK and AKT protein were detected by Western blot after treatment with different concentrations of AZD9291 to H1975 cells. After using AZD9291 and STAT3 inhibitor alone or in combination to treat H1975 cells, the antiproliferative effects were detected by the MTT method. The changes of apoptosis induced by AZD9291 and STAT3 inhibitor alone or in combination were detected by the flow cytometry. Western blot was used to detect the change of phosphorylation and nonphosphorylation of STAT3 protein in AZD9291 combined with STAT3 inhibitor. **Results** The expression of p-ERK and p-AKT was decreased and p-STAT3 was increased after treatment with AZD9291. The combination therapy with AZD9291 and STAT3 inhibitor showed a synergic effect on proliferative inhibition compared to AZD9291 or STAT3 inhibitor alone therapy ($P < 0.05$), which showed a synergic effect (combination index < 1). In addition, apoptotic rates were significantly increased in combination treatment compared to the single drug. Moreover, the combination of AZD9291 and STAT3 inhibitor produced a stronger inhibitory effects on p-STAT3 expression than single drug treatment. **Conclusion** The combination of AZD9291 and STAT3 inhibitors significantly inhibited the proliferation of H1975 and promoted the occurrence of apoptosis. The main mechanism may contribute to the down-regulation of p-STAT3 protein expression.

Key words non-small-cell lung cancer; AZD9291; STAT3 inhibitor; combination

度的阿司匹林对人肝癌 HepG2 细胞具有增殖抑制作用,并进一步探讨一定浓度阿司匹林对人肝癌 HepG2 细胞增殖抑制作用与细胞内自噬的联系。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人肝癌 HepG2 细胞系购自中国科学院上海细胞库。

1.2 主要试剂 阿司匹林购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;腺苷酸活化蛋白激酶(the expression of Adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase, AMPK) 和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR) 抗体购自英国艾美捷科技有限公司;小牛血清和 DMEM 培养基购自杭州市四季青公司;辣根酶标记的 β -actin、辣根酶标记抗兔 IgG 抗体和辣根酶标记抗鼠 IgG 抗体购自北京中杉金桥生物有限公司;吖啶橙(acridine orange, AO) 染料、四甲基偶氮唑盐(MTT) 购自美国西格玛奥德里奇公司。

1.3 主要仪器 SW-CI-2F 超净工作台(中日合资苏州安泰空气技术有限公司);Multiskan Go [赛默飞世尔科技(中国)有限公司];电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);立式压力蒸汽灭菌器(上海申安医疗器械厂);超纯水仪(上海力新仪器有限公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 将人肝癌 HepG2 细胞从液氮中取出复苏,然后在含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基中,置于 37 °C 和 5% CO₂ 的培养箱中培养。

1.4.2 MTT 法检测人肝癌 HepG2 细胞的增殖活力 HepG2 细胞用含 10% 小牛血清的 DMEM 稀释成 5×10^4 /ml 浓度,接种于 96 孔培养板内,每孔 100 μ l,细胞培养过夜。当细胞生长到 60% ~ 70% 时,加入用 DMEM 配制的不同浓度阿司匹林,各组的终浓度为:2.5、5、10、20 mmol/L 每孔加入 100 μ l(每组设 4 个复孔),继续培养 24、48 h,每孔加入 5 mg/ml 浓度的新鲜配制的 MTT 溶液 20 μ l,继续孵育 4 h 后,弃去各孔中的培养液,每孔加入 DMSO 150 μ l 后室温下在摇床上振荡 10 min,酶标仪 490 nm 波长检测吸光度值。

1.4.3 平板克隆实验 取生长对数期的人肝癌 HepG2 细胞,常规消化离心收集细胞的沉淀,用含有血清的 DMEM 培养基使其重悬成为单细胞悬液(1×10^4 孔),加入用 DMEM 配制的含不同浓度阿

司匹林(2.5、5、10、20、40 mmol/L) 的培养液培养 48 h,后撤去含药培养液,换上正常含血清的 DMEM 培养液。置于 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱中培养 3 周左右。经常观察,当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去上清液,用 PBS 小心浸洗 2 次。加入 5 ml 的 4% 多聚甲醛固定细胞,固定 15 min。去除固定液,加入适量 GIMSA 应用染色液,染色 30 min,使用流水缓慢清洗去染色液,空气干燥,倒置。用肉眼直接计数克隆,后计算克隆形成率。克隆形成率(%) = (克隆数/接种细胞数) $\times$ 100%。

1.4.4 AO 荧光染色 取生长对数期细胞,常规消化离心,接种于 24 孔细胞培养板中(2×10^4 /500 μ l 每孔),待细胞贴壁后弃去原有培养液,换上用 DMEM 培养液配制的不同浓度阿司匹林(10、20 mmol/L) 于 37 °C、5% CO₂ 下孵育,培养液仅含 DM-SO 组作对照组。培养 2、4、6 h 后每孔加入 100 μ l AO 染液(1 μ g/ml) 继续孵育 40 min,弃上清液,95% 乙醇溶液固定 5 min, PBS 清洗细胞 3 ~ 4 次,每次 5 min,倒置荧光显微镜立即观察。

1.4.5 Western blot 法检测蛋白的表达 取生长对数期的人肝癌 HepG2 细胞,细胞裂解法冰上裂解细胞提取蛋白,BCA 法蛋白定量,变性蛋白加入到 SDS-PAGE 凝胶进行电泳,恒压将蛋白转至 PVDF 膜上,脱脂奶粉封闭 1 h。一抗(1 : 1 000) 4 °C 孵育过夜,二抗(1 : 10 000) 室温孵育 2 h, TBST 洗膜,显影。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析,组间比较采用 One-Way ANOVA 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 法测定阿司匹林对 HepG2 细胞增殖活力的影响 阿司匹林 10 mmol/L 作用于人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后对人肝癌 HepG2 细胞产生增殖抑制作用,与未加阿司匹林的对照组比较差异有统计学意义($F = 24.5, P < 0.01$)。阿司匹林 10 mmol/L 作用于细胞 48 h 后对人肝癌 HepG2 细胞产生增殖抑制作用,与未加入阿司匹林的对照组比较差异有统计学意义($F = 34.3, P < 0.01$)。40 μ mol/L 自噬抑制剂氯喹(chloroquine diphosphate salt, CQ) 促进 10 mmol/L 阿司匹林对 HepG2 细胞的增殖抑制,差异有统计学意义($F = 163.8, P < 0.01$)。10

mmol/L 阿司匹林能抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖活力,合用自噬抑制剂 CQ 后 CQ 促进这种增殖抑制。见图 1、2。

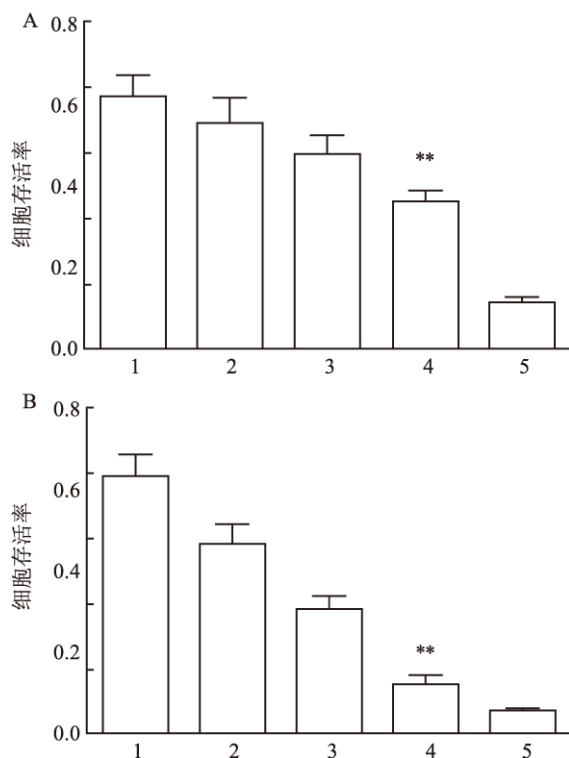


图 1 24、48 h 阿司匹林对人肝癌 HepG2 细胞增殖活力的影响

A: 阿司匹林作用 24 h; B: 阿司匹林作用 48 h; 1: 对照组; 2、3、4、5: 阿司匹林 2.5、5、10、20 mmol/L; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

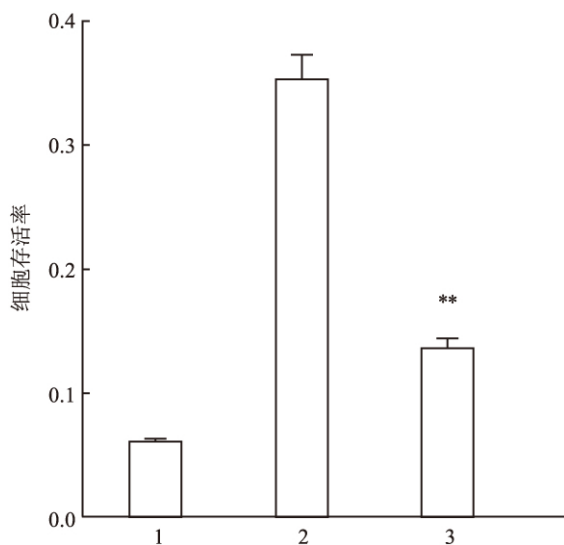


图 2 CQ 联合阿司匹林对 HepG2 细胞增殖活力的影响

1: CQ 40 μm; 2: 阿司匹林 10 mmol/L; 3: CQ + 阿司匹林; 与阿司匹林 10 mmol/L 组比较: ** $P < 0.01$

2.2 平板克隆实验 细胞克隆形成率表示接种细胞后贴壁的细胞成活并形成克隆的数量,贴壁后的细胞不一定每个都能增殖和形成克隆,而形成克隆的细胞必为贴壁和有增殖活力的细胞,反映细胞群体依赖性和增殖能力。阿司匹林(2.5、5、10、20、40 mmol/L)对 HepG2 细胞有抑制作用,见图 3。

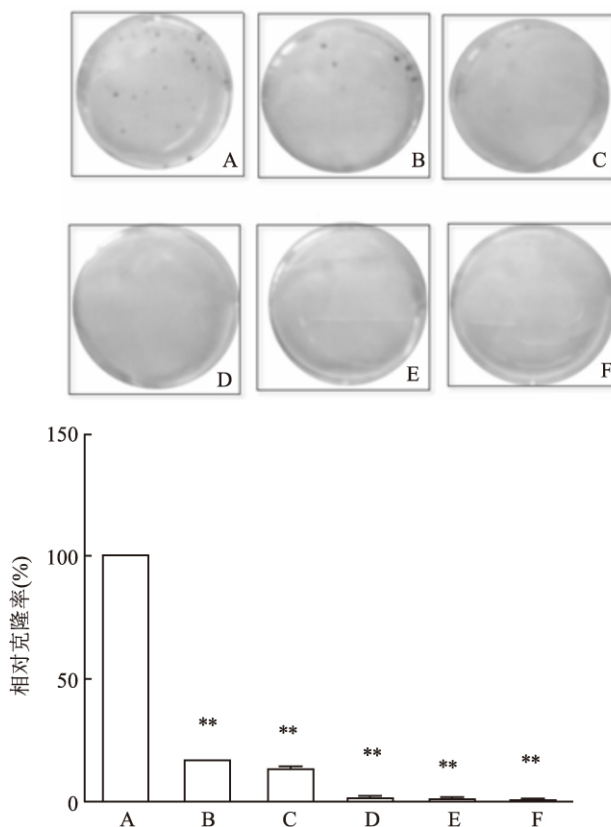


图 3 阿司匹林作用后 HepG2 的相对克隆率

A: 对照组; B、C、D、E、F: 阿司匹林 2.5、5、10、20、40 mmol/L; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

2.3 AO 荧光染色 AO 荧光染色法利用对 pH 敏感标记酸性囊泡细胞器结构,是一种具有细胞渗透性的荧光染色方法,DNA 和胞质为亮绿色,若为酸性囊泡 AO 发出红色荧光,是常用检测细胞自噬的方法之一。10、20 mmol/L 浓度的阿司匹林处理后,出现了橘红色的自噬小体。实验结果见图 4。

2.4 Western blot 法测定 AMPK、mTOR 蛋白表达 阿司匹林(10、20 mmol/L)作用于人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后,提取细胞内蛋白,检测蛋白表达。与对照组比较,AMPK 蛋白表达增加,mTOR 蛋白下调。实验结果见图 5。

3 讨论

肝细胞癌是世界范围内最常见的实体瘤之一,

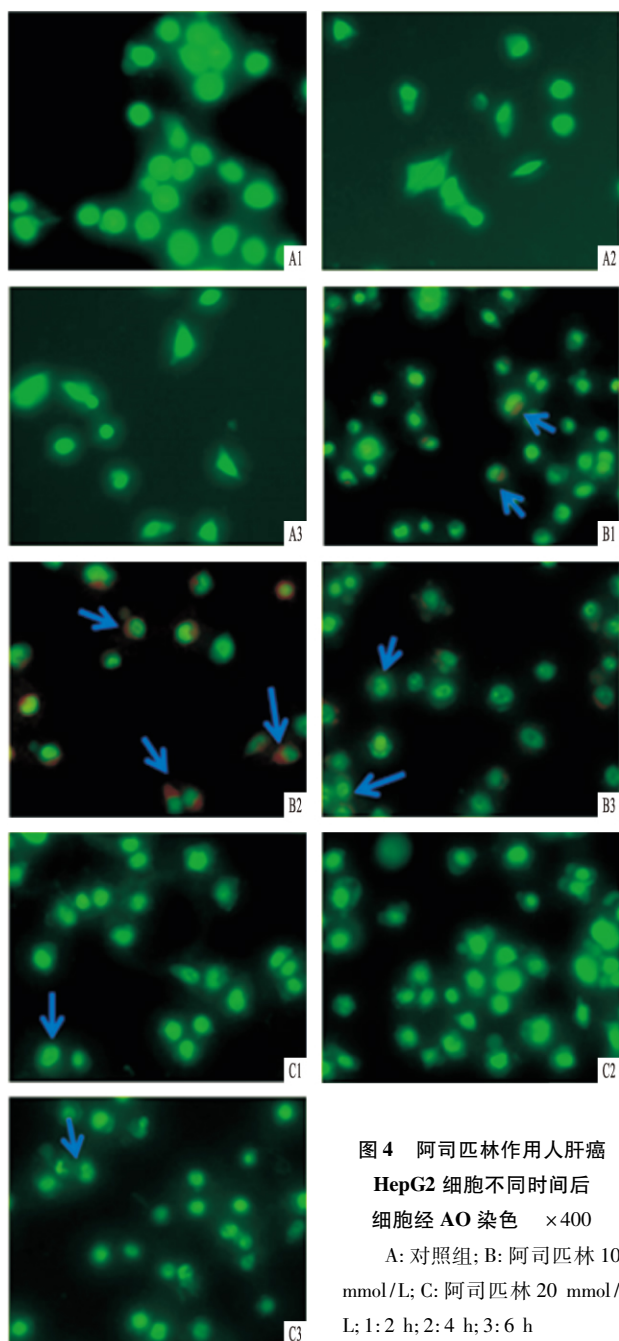


图4 阿司匹林作用人肝癌 HepG2 细胞不同时间后细胞经 AO 染色 ×400

A: 对照组; B: 阿司匹林 10 mmol/L; C: 阿司匹林 20 mmol/L; 1: 2 h; 2: 4 h; 3: 6 h

也是死亡率最高的疾病之一。乙型肝炎病毒(hepadnaviridae, HBV)感染是肝细胞癌发生发展的主要病因之一。HBV 是一种有包膜病毒,含有一个环状的部分双链结构的 DNA 基因组,为亲肝细胞性 DNA 病毒,HBV 进入体内可利用由多聚酶编码的 DNA 多聚酶-逆转录酶复制。病毒特异性 T 细胞反应可激活其他炎症细胞及干扰素、肿瘤坏死因子等细胞因子释放,从而抑制病毒复制并清除感染细胞。没有足够的病毒特异性 T 细胞反应,HBV 以稳

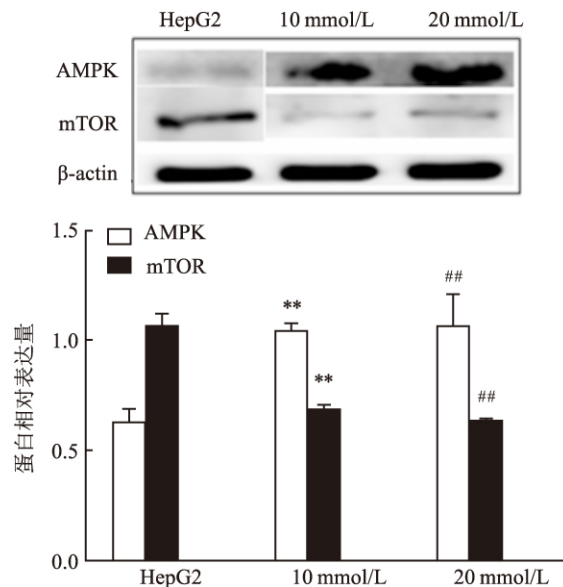


图5 Western blot 法测定相关蛋白表达

与 HepG2 组 AMPK 蛋白的表达比较: ** $P < 0.01$; 与 HepG2 组 mTOR 蛋白表达比较: ## $P < 0.01$

定形式持续存在,其特殊区域复制被认为是导致慢性 HBV 感染的原因。对 HBV 持续性的炎症反应即慢性活动性肝炎,可引起肝细胞坏死、肝纤维化、可能导致肝硬化。HBV 引起的慢性活动性肝炎和肝硬化是肝细胞癌的主要危险因素。我国人口众多,又是 HBV 感染的高发国家之一,由乙肝进展所致的 HCC 给我国医疗资源带来了巨大的负担。然而,目前尚无预防和治疗 HBV 相关的抗 HCC 的有效药物。研究^[4]表明非甾体抗炎药阿司匹林能显著减少肝内 HBV 特异性 T 细胞和非特异性炎性细胞,阻止 HBV 相关的 HCC 的发生和发展。因此,本研究推测阿司匹林可能在 HBV 相关的 HCC 预防和治疗中发挥重要作用。自噬是最近研究热点之一,细胞在正常情况下很少发生自噬,除非有诱发因素,且诱发因素众多,也是最近研究热点。细胞在接受到自噬诱导信号之后会在胞质形成一个像“脂质体”样的膜结构,然后不断扩张,呈扁平状,不断延伸,将胞质中的任何成分,全部揽入其中,成为密闭的球状的自噬体。电镜下可观察到。自噬体与溶酶体融合,期间自噬体的内膜和内容物被溶酶体酶降解合为一体,产物(氨基酸、脂肪酸等)被输送到胞质中,供细胞重新利用,残渣被排出细胞外或留在胞质中。AMPK 被称为细胞的代谢和能量的感受器。在细胞代谢中起作用,而肿瘤细胞内部代谢紊乱,会引起 AMPK 活性变化^[5-6]。肿瘤抑制因子 LKB1 作用于

其上游, P53 和 TSC2 为其下游底物^[7-8]。AMPK 既能通过 mTOR-TSC2 负向调控自噬, 又能磷酸化 ULK1 引发自噬^[9-10]。以上都说明 AMPK 在自噬中起到至关重要的作用。本研究显示, 10 mmol/L 浓度的阿司匹林对人肝癌 HepG2 细胞具有增殖抑制作用且和自噬抑制剂 CQ 合用时此作用会被促进。10 mmol/L 浓度阿司匹林作用于人 HepG2 细胞时会出现自噬小体, 并且增加相关蛋白 AMPK 的表达而降低 mTOR 蛋白表达。提示 10 mmol/L 浓度的阿司匹林对人肝癌 HepG2 细胞增殖抑制作用与自噬有关。

参考文献

- [1] 范洁, 张磊, 王啸. 人参皂苷 Rk3 对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(11): 1604-8.
- [2] Rothwell P M, Wilson M, Price J F, et al. Effect of daily aspirin on risk of cancer metastasis: a study of incident cancers during randomised controlled trials [J]. *Lancet*, 2012, 379(9826): 1591-601.
- [3] Burn J, Gerdes A M, Macrae F, et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial [J]. *Lancet*, 2011, 378(9809): 2081-7.
- [4] Futakuchi M, Ogawa K, Tamano S, et al. Suppression of metastasis by nuclear factor kappaB inhibitors in an *in vivo* lung metastasis model of chemically induced hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Sci*, 2004, 95(1): 18-24.
- [5] Hawley S A, Fullerton M D, Ross F A, et al. The ancient drug salicylate directly activates AMP-activated protein kinase [J]. *Science*, 2012, 336(6083): 918-22.
- [6] Din F V, Valanciute A, Houde V P, et al. Aspirin inhibits mTOR signaling, activates AMP-activated protein kinase, and induces autophagy in colorectal cancer cells [J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(7): 1504-15.
- [7] Okoshi R, Ozaki T, Yamamoto H, et al. Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress [J]. *J Biol Chem*, 2008, 283(7): 3979-87.
- [8] Imamura K, Ogura T, Kishimoto A, et al. Cell cycle regulation via p53 phosphorylation by a 5'-AMP activated protein kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, in a human hepatocellular carcinoma cell line [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 287(2): 562-7.
- [9] Jones R G, Plas D R, Kubek S, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint [J]. *Mol Cell*, 2005, 18(3): 283-93.
- [10] Gwinn D M, Shackelford D B, Egan D F, et al. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(2): 214-26.

Low-dose aspirin induced autophagy comprises its inhibitory effect on HepG2 cells

Zhu Siya, Wang Menglin, Jin Juan

(Dept of Pharmacology, Basic Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the inhibitory effect of aspirin on proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line and its possible mechanism. **Methods** MTT assay and plate cloning experiments were used to detect proliferation of human hepatoma HepG2 cells. Effects of aspirin on autophagosomes in HepG2 cells were detected by acridine orange fluorescence staining. The expression of adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) and mammalian target of rapamycin (mTOR) protein in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells was detected by Western blot. **Results** 10 mmol/L concentration of aspirin could inhibit the proliferation of HepG2 cells, but increase the number of autophagosomes of HepG2 cells, increase AMPK expression, decrease mTOR expression. After combination treatment with 40 μ mol/L autophagy inhibitor chloroquine (CQ), CQ could enhance the inhibitory effect of 10 mmol/L aspirin on proliferation of human hepatoma HepG2 cells. **Conclusion** Combination treatment with autophagy inhibitor CQ attenuates 10 mmol/L aspirin-induced autophagy thus enhance its anti-HepG2 effect.

Key words aspirin; human hepatocellular carcinoma HepG2 cells; autophagy; autophagy inhibitors