

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.36.003

文章编号: 1005-8982 (2018) 36-0012-06

薯蓣素抑制口腔鳞状细胞癌的机制研究*

李明¹, 赵卿¹, 高峰²

(1. 湖南省长沙市口腔医院, 湖南 长沙 410004; 2. 中南大学湘雅三医院 超声科, 湖南 长沙 410013)

摘要:目的 研究薯蓣素对人口腔鳞状细胞癌的抑制作用。**方法** 薯蓣素处理 TSCCa 和 TCa8113 细胞, MTS 和软琼脂集落实验检测薯蓣素对口腔鳞状细胞癌增殖的影响。蛋白质免疫印迹检测薯蓣素对口腔鳞状细胞癌糖酵解调控蛋白及凋亡调控分子表达的影响。检测过表达己糖激酶 HK2 对薯蓣素诱导细胞凋亡的作用。**结果** 薯蓣素抑制 TSCCa 和 TCa8113 细胞的增殖具有剂量和时间依赖性 ($P < 0.05$)。薯蓣素抑制口腔鳞状细胞癌糖酵解 ($P < 0.05$), 并下调 HK2 和葡萄糖转运蛋白 Glut1 的表达。薯蓣素能诱导口腔鳞状细胞癌 Caspase-3 和 PARP 剪切体表达上调, 过表达 HK2 抑制薯蓣素诱导的细胞凋亡。**结论** 薯蓣素对口腔鳞状细胞癌的抑制作用与其下调 HK2 和对糖酵解的抑制有关。

关键词: 口腔鳞状细胞癌; 薯蓣素; 己糖激酶; 糖酵解; 细胞凋亡

中图分类号: R739.85

文献标识码: A

Inhibitory effect of Dioscin on oral squamous cell carcinoma*

Ming Li¹, Qing Zhao¹, Feng Gao²

(1. Changsha Stomatological Hospital, Changsha, Hunan 410004, China; 2. Department of Ultrasonography, the Third Xiangya Hospital of Central South University, Changsha, Hunan 410013, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of Dioscin on human oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** TSCCa and TCa8113 oral squamous carcinoma cell line were treated with various concentration of Dioscin. Cell proliferation was tested via MTS and soft agar colony formation assay. Cell glycolysis was analyzed. Glycolysis and apoptosis related proteins were measured via immunoblotting assay. Western blot was performed to determine the effect of hexokinase-2 (HK2) overexpression on Dioscin-induced cellular apoptosis. **Results** Dioscin decreased the cell growth of TSCCa and TCa8113 cells in a dose- and time- dependent manner ($P < 0.05$). Dioscin significantly suppressed glycolysis in TSCCa and TCa8113 cells and decreased the protein levels of Glut1 and HK2 ($P < 0.05$). Additionally, Dioscin elevated the expression of cleaved-caspase-3 and cleaved-PARP. Overexpression of HK2 inhibited Dioscin-induced cell apoptosis. **Conclusions** Our results suggests that Dioscin inhibits OSCC growth through inhibition of HK2 and glycolysis.

Keywords: oral squamous cell carcinoma; Dioscin; hexokinase-2; glycolysis; apoptosis

口腔癌是世界第 6 大致死性恶性肿瘤, 其中约 90% 为口腔鳞状细胞癌, 近年来口腔癌发病率呈逐年

升高趋势。来自流行病学及临床与基础研究的多方证据表明, 口腔鳞状细胞癌与长期的化学致癌物 (如烟

收稿日期: 2018-04-17

* 基金项目: 长沙市科技计划项目 (No: kq1701018); 湖南省自然科学基金 (No: 2018JJ2604)

[通信作者] 高峰, E-mail: 184271220@qq.com; Tel: 13873108249

草中的尼古丁、焦油、酒精), 物理致畸变因素暴露, 及病毒感染(人乳头状瘤病毒)等密切相关。由于口腔鳞状细胞癌发病机制复杂, 目前仍没有特定的分子靶向药物应用于临床。手术切除, 结合局部放疗和化疗仍是口腔鳞状细胞癌的主要治疗手段。由于口腔鳞状细胞癌具有极易早期转移的临床特征, 口腔鳞状细胞癌患者的 5 年生存率仍不足 50%^[1-3]。因此, 阐明口腔鳞状细胞癌的发病机制, 寻找有效的药物靶点或研发新型抗肿瘤药物仍是目前研究的热点。

小分子化合物由于其特有的低毒副作用, 多年来备受抗肿瘤药物筛选及研发的青睐。天然产物薯蓣素已被证实具有广谱的体内外抗肿瘤活性。薯蓣素可以通过抑制多条蛋白激酶信号通路及多个转录因子的功能, 阻断肿瘤赖以生存与生长的重要生物大分子的功能, 从而抑制肿瘤的发生发展^[4-6]。但薯蓣素抗口腔鳞状细胞癌的分子机制及其潜在靶点还不清楚。本研究以人口腔鳞状细胞癌 TSCCa 和 TCA8113 为研究模型, 探讨薯蓣素对其增殖存活的抑制作用及其潜在的分子机制。

1 材料与方 法

实验用人口腔鳞状癌细胞 TSCCa 和 TCA8113 购自中南大学医学细胞中心。

1.1 主要试剂和抗体

薯蓣素(Dioscin, 纯度 >97%) 购自美国 Selleck 公司, 分子量 869.04 g/mol。DMEM 细胞培养基和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS) 购自美国 Gibco 公司, 免疫印迹抗体[包括 HK2 (#2867)、PFK (#8164)、PKM2 (#4053)、PARP (#9532) 和 Cleaved-Caspase3 (#9664)] 购自美国 Cell Signaling Technology 公司, Glut1 (ab15309) 购自美国 Abcam 公司, β -actin (A5316) 抗体购自美国 Sigma 公司, MTS 试剂 Cell Titer 96® AQueous One Solution 购买自美国 Promega 公司, Flag-HK2 过表达质粒购自美国 Origene 公司。

1.2 MTS 实验和软琼脂集落形成实验检测薯蓣素对口腔鳞状细胞癌增殖的影响

将 TSCCa 和 TCA8113 细胞消化计数后, 按照 3 000 个/(孔·100 μ l) 密度接种于 96 孔板。24 h 后, 更换含有不同浓度薯蓣素的新鲜培养基至 96 孔板中, 在薯蓣素处理后的不同时间点(24、48 及 72 h) 加入 20 μ l 的 MTS 试剂至 96 孔板中, 并在细胞培养箱中孵育 2 h, 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司) 检测

490 nm 处吸光度值。

将配制好的 2×BME 培养基和 1.25% 琼脂凝胶放置 48℃ 水浴锅中保温备用。取 70 ml 预热的 2×BME, 18 ml 1×PBS, 18 ml FBS, 2 ml L-Glutamine, 100 μ l Gentamicin 以及 72 ml 1.25% 琼脂凝胶混匀后即下层琼脂凝胶混合液, 放置 48℃ 水浴锅保温备用。将不同浓度的薯蓣素和下层琼脂凝胶混匀后 3 ml/孔迅速加入 6 孔板中, 并放置在超净台充分凝固。将 TSCCa 和 TCA8113 细胞消化计数后, 用 1×BME 稀释成 30 000 个/ml 细胞悬液。取 2.4 ml 下层凝胶并与 1.2 ml 细胞悬液及不同浓度的薯蓣素混匀后, 1 ml/孔加入含有下层凝胶的 6 孔板中, 待琼脂凝胶完全凝固后, 将 6 孔板放置培养箱中孵育 2 周, 显微镜拍照并统计克隆数。

1.3 蛋白质免疫印迹检测薯蓣素对口腔鳞状细胞癌糖酵解调控蛋白及凋亡调控分子表达的影响

离心收集薯蓣素处理 24 h 后的 TSCCa 和 TCA8113 细胞, 加入 300 μ l RIPA (25 mmol/L Tris·HCl pH 7.6, 150 mmol/L NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate) 细胞裂解液冰上裂解 30 min, 超声粉碎 15 s, 13 000 r/min 离心 15 min, 上清即为全细胞裂解液。用 BCA 试剂盒定量蛋白浓度, 取 30 μ g 蛋白进行免疫印迹分析。蛋白在 SDS-PAGE 电泳中分离并转移至 PVDF 膜。将 PVDF 膜置于 5% 脱脂牛奶中封闭过夜。次日加入一抗 4℃ 孵育过夜, 二抗室温孵育 30 min。X 射线曝光、显影、定影。

1.4 葡萄糖摄取及乳酸生成效率检测

取 1×10^6 个细胞接种于 6 孔板, 培养箱孵育 6 h 后, 更换含有不同浓度薯蓣素的新鲜培养基, 细胞在培养箱内继续培养 8 h。收集细胞培养上清, 全自动临床生化检测仪检测细胞培养上清内葡萄糖和乳酸浓度。

1.5 统计学方法

数据分析采用 SPSS 16.0 统计软件, 不同时间点和组间的比较采用方差分析或 *t* 检验, 进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 薯蓣素对口腔鳞状细胞癌增殖的影响

MTS 结果显示 1 μ mol/L 薯蓣素处理细胞 24 h 并不能抑制 TSCCa 和 TCA8113 细胞的生长。薯蓣素对 TSCCa 和 TCA8113 细胞 72 h 的 IC₅₀ 值分别为 3.65 和 3.02 μ mol/L。随着时间延长, 1 μ mol/L 薯蓣素处理

72 h 后能抑制这 2 株细胞的增殖。随着薯蓣素浓度升高,在 24 h 时 5 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣素即开始抑制 TSCCa ($F=1.518, P=0.00042$) 和 TCa8113 细胞的增殖 ($F=1.518$ 和 $1.777, P=0.00042$ 和 0.00032), 72 h 时, 5 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣素对细胞增殖的抑制率达到 80%, 薯蓣素处理组与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1。

为进一步证实薯蓣素对口腔鳞状细胞癌的抑制

作用, 笔者采用软琼脂克隆形成实验检测薯蓣素对口腔鳞状细胞癌克隆形成能力的影响。与 MTS 结果一致的是, 薯蓣素呈剂量依赖性抑制 TSCCa 和 TCa8113 细胞克隆的形成, 差异有统计学意义 ($F=14.094$ 和 $21.341, 均 P=0.000$)。5 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣素几乎完全阻断这 2 株细胞的克隆形成 ($P<0.05$)。见图 2。

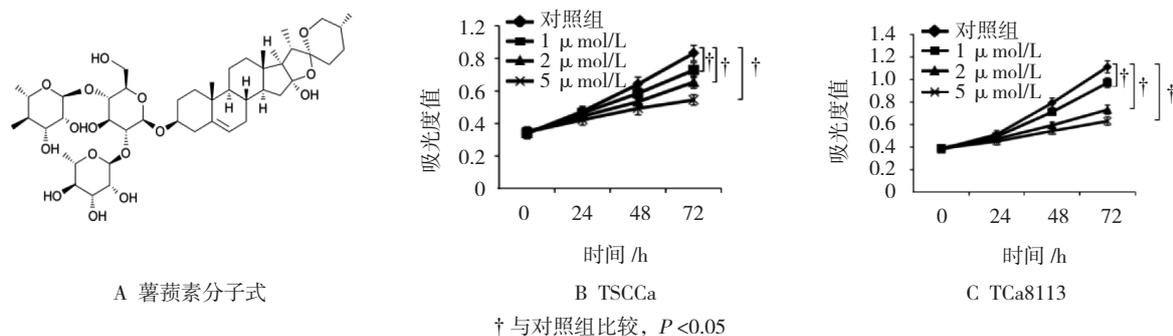


图 1 薯蓣素对 TSCCa 和 TCa8113 细胞增殖的影响

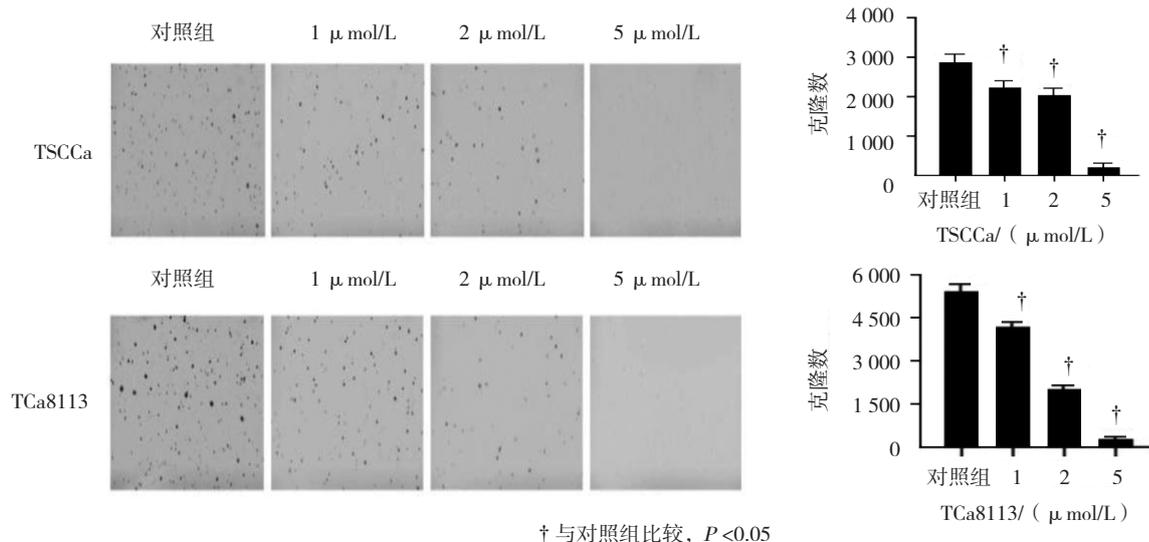


图 2 薯蓣素对细胞停泊非依赖生长的影响

2.2 薯蓣素对有氧糖酵解的影响

对薯蓣素处理前后口腔鳞状细胞癌葡萄糖摄取能力的检测发现, 薯蓣素抑制 TSCCa 和 TCa8113 细胞对葡萄糖的摄取, 该抑制作用具有剂量依赖性。与对照组比较, 5 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣素下调了 TSCCa 细胞 65% 和 TCa8113 细胞 75% 的葡萄糖摄取效率, 差异有统计学意义 ($F=2.866$ 和 $3.874, P=0.001$ 和 0.000)。且这 2 株细胞的乳酸生成也下调。5 $\mu\text{mol/L}$ 薯蓣素抑制 TSCCa 细胞近 50% 和 TCa8113 近 70% 的乳酸生成量, 与对照组比较, 差异有统计学意义 ($F=2.246$ 和 $2.234, 均 P=0.000$)。见图 3。

薯蓣素剂量依赖性抑制 TSCCa 和 TCa8113 细胞内 ATP 水平, 差异有统计学意义 ($F=1.987$ 和 $2.194, P=0.001$ 和 0.000)。见图 4。

2.3 薯蓣素对葡萄糖转运蛋白 Glut1 和己糖激酶 HK2 表达的影响

薯蓣素抑制 Glut1 和 HK2 蛋白的表达, 并不能抑制 PFK 和 PKM2 蛋白的表达。见图 5。

2.4 薯蓣素对凋亡相关分子活化的影响

免疫印迹结果表明, 薯蓣素抑制 HK2 表达的同时, 促进凋亡调控相关蛋白 Caspase-9、Caspase-3 和 PARP 的剪切活化。低浓度薯蓣素只能轻微抑制 HK2

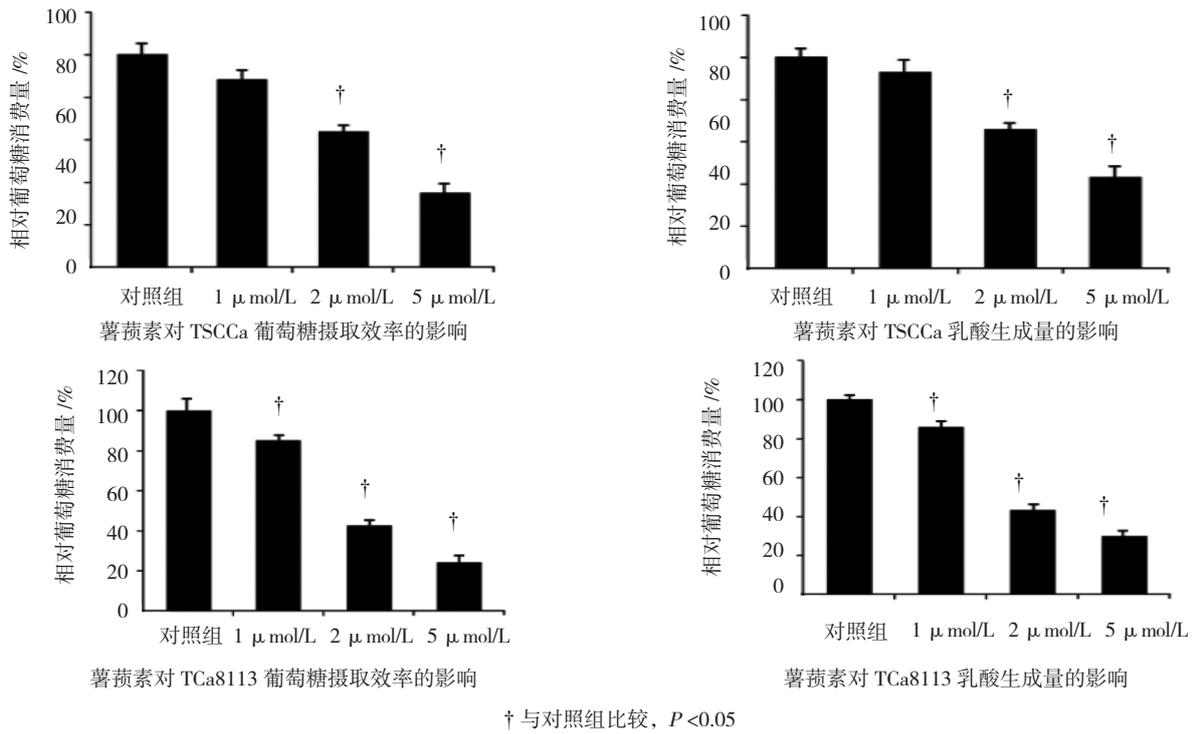


图 3 薯蓣素对口腔鳞状细胞癌糖酵解的影响

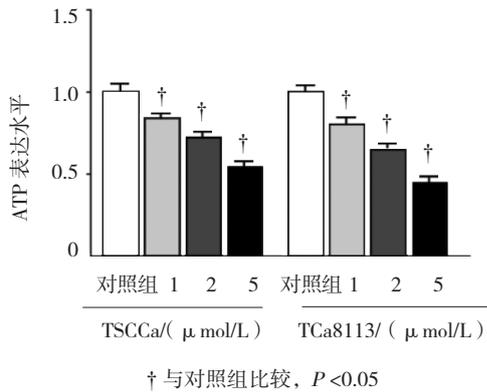


图 4 薯蓣素对口腔鳞状细胞癌 ATP 水平的影响

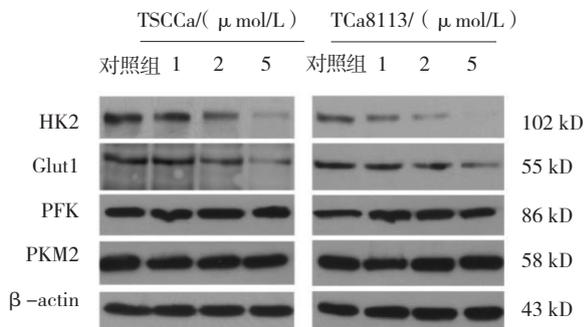


图 5 薯蓣素对 Glut1 和 HK2 表达的影响

的表达, Caspase-9、Caspase-3 和 PARP 的剪切体活化并不明显。随着浓度升高, 5 μmol/L 薯蓣素能促进 Caspase-9、Caspase-3 和 PARP 的剪切体表达。见图 6。

2.5 过表达 HK2 对薯蓣素诱导细胞凋亡的影响

与前期结果一致的是, 2 μmol/L 薯蓣素能促进

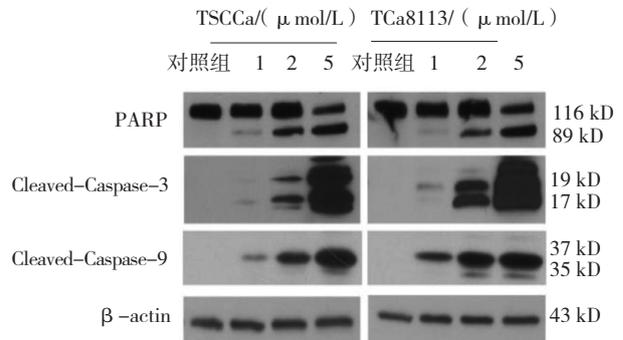


图 6 薯蓣素对口腔鳞状细胞癌 PARP、Caspase-9 和 Caspase-3 剪切体形成的影响

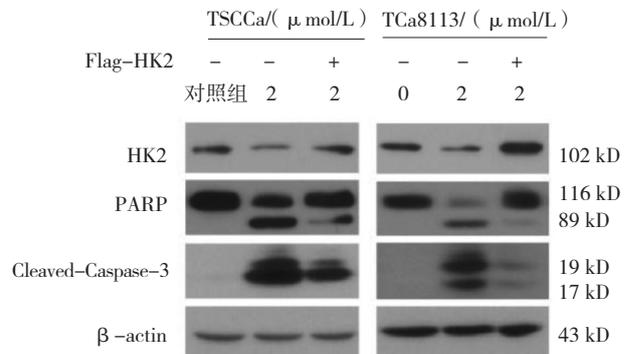


图 7 过表达 HK2 对薯蓣素诱导细胞凋亡的影响

Caspase-3 和 PARP 剪切体的表达上调。过表达 HK2 后,能抑制薯蓣素诱导的 Caspase-3 和 PARP 剪切体表达。见图 7。

3 讨论

有氧糖酵解异常是肿瘤细胞重要生物学特征之一。研究发现,即使在供氧充足的情况下,肿瘤细胞仍倾向于利用有氧糖酵解的方式将葡萄糖分子不完全氧化生产乳酸来为细胞供能,该现象被称为“温伯格效应”^[7]。有氧糖酵解不仅能为肿瘤细胞提供充足的能量供给,其葡萄糖不完全氧化所生产的中间产物更为快速增殖的肿瘤细胞提供了生物大分子合成所必需的原料。己糖激酶 HK2 作为催化葡萄糖向葡萄糖 6 磷酸转化的蛋白激酶,也是糖酵解过程中第一个限速酶。目前共发现 4 种己糖激酶亚型,包括 HK1、HK2、HK3 和 HK4,但只有 HK2 被证明在多种人肿瘤细胞中异常高表达^[8]。HK2 已被证实在人肝癌、肺癌、乳腺癌和食管癌等多种肿瘤内高表达, HK2 过表达不仅满足肿瘤细胞快速增殖而对能量的需求,更促进肿瘤细胞的放疗耐受及死亡逃逸,肿瘤组织内高表达 HK2 提示着预后不良^[9-10]。本研究发现,天然产物薯蓣素能抑制口腔鳞状细胞癌 TSCCa 和 TCa8113 细胞的增殖及克隆形成。进一步研究发现,薯蓣素对 TSCCa 和 TCa8113 细胞的抑制作用与其下调肿瘤细胞的糖酵解及 HK2 的表达有关。虽然薯蓣素在胞内具有多个潜在的分子靶点,如抑制肿瘤相关蛋白激酶的活化,下调肿瘤相关转录因子的入核等,但薯蓣素对肿瘤细胞代谢的影响还未见研究报道。本研究首次证实,薯蓣素可以通过下调 HK2 表达及有氧糖酵解而抑制口腔鳞状细胞癌。该结果提示,靶向抑制 HK2 的表达/活性,或抑制 HK2 介导的有氧糖酵解可能为口腔鳞状细胞癌的临床治疗提供新的药物作用靶点或开创新的肿瘤诊疗手段。

研究表明, HK2 作为线粒体外膜表达蛋白,在控制线粒体电势稳定性和细胞凋亡方面具有重要的生物学功能^[11]。异常高表达 HK2 促进肿瘤细胞对不良环境因素的抵抗及细胞死亡信号的相对不敏感。共同靶向 HK2 介导的有氧糖酵解和细胞自噬促进前列腺癌细胞的死亡^[12]。HK2 在线粒体外膜通过与电压依赖性阴离子通道 VDAC 相互结合而稳定线粒体电势。抑制 HK2 的线粒体表达能有效促进非小细胞性肺癌的凋亡^[13]。本研究发现,薯蓣素下调 HK2 的表达,并诱导 TSCCa 和 Tca8113 细胞的凋亡。进一步研究表明,

薯蓣素诱导的细胞凋亡是 HK2 表达下调依赖的,过表达 HK2 有效抑制薯蓣素诱导的细胞凋亡。本结果提示, HK2 对促进口腔鳞状细胞癌的存活具有重要的作用,薯蓣素诱导的口腔鳞状细胞癌死亡是否与 HK2 表达下调而导致的线粒体电势紊乱有关还有待进一步研究证实。

靶向抑制有氧糖酵解或糖酵解的关键限速酶对促进肿瘤细胞的死亡或放疗增敏具有重要的作用。研究发现,多种天然产物可以通过抑制肿瘤细胞内 HK2 的表达及下调有氧糖酵解而发挥其抗肿瘤功能。如白藜芦醇、鱼藤素通过抑制 HK2 而促进非小细胞性肺癌凋亡等^[13-14]。笔者前期研究发现, EGCG 能抑制 HK2 的表达并促进口腔鳞状细胞癌细胞凋亡^[15]。结合本研究结果,提示 HK2 高表达或上调有氧糖酵解可能对口腔鳞状细胞癌的发生、发展具有重要作用。本研究不仅丰富了小分子化合物薯蓣素抗肿瘤的新机制,更为靶向抑制 HK2 或有氧糖酵解的口腔鳞状细胞癌临床治疗提供了前期的研究基础。

参 考 文 献:

- [1] RIVERA C, OLIVEIRA A K, COSTA RAP, et al. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review[J]. *Oral Oncol*, 2017, 72: 38-47.
- [2] SHEN Z S, LI J S, CHEN W L, et al. The latest advancements in selective neck dissection for early stage oral squamous cell carcinoma[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2017, 18(5): 31.
- [3] LAU A, LI K Y, YANG W F, et al. Induction chemotherapy for squamous cell carcinomas of the oral cavity: a cumulative meta-analysis[J]. *Oral Oncol*, 2016, 61: 104-114.
- [4] TAO X, XU L, YIN L, et al. Dioscin induces prostate cancer cell apoptosis through activation of estrogen receptor-beta[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(8): e2989.
- [5] SONG X, WANG Z, LIANG H, et al. Dioscin induces gallbladder cancer apoptosis by inhibiting ROS-mediated PI3K/AKT signalling[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(6): 782-793.
- [6] KOU Y, JI L, WANG H, et al. Connexin 43 upregulation by dioscin inhibits melanoma progression via suppressing malignancy and inducing M1 polarization[J]. *Int J Cancer*, 2017, 141(8): 1690-1703.
- [7] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [8] LI X B, GU J D, ZHOU Q H. Review of aerobic glycolysis and its key enzymes-new targets for lung cancer therapy[J]. *Thorac Cancer*, 2015, 6(1): 17-24.
- [9] PORPORATO P E, DHUP S, DADHICH R K, et al. Anticancer targets in the glycolytic metabolism of tumors: a comprehensive review[J]. *Front Pharmacol*, 2011, 2: 49.

- [10] COELHO R G, CALACA I C, CELESTRINI D M, et al. Hexokinase and phosphofructokinase activity and intracellular distribution correlate with aggressiveness and invasiveness of human breast carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 29375-29387.
- [11] MCCOMMIS K S, BAINES C P. The role of VDAC in cell death: friend or foe[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2012, 1818(6): 1444-1450.
- [12] WANG L, WANG J, XIONG H, et al. Co-targeting hexokinase 2-mediated Warburg effect and ULK1-dependent autophagy suppresses tumor growth of PTEN- and TP53-deficiency-driven castration-resistant prostate cancer[J]. *EBioMedicine*, 2016, 7: 50-61.
- [13] LI W, GAO F, MA X, et al. Deguelin inhibits non-small cell lung cancer via down-regulating Hexokinases II-mediated glycolysis[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(20): 32586-32599.
- [14] LI W, MA X, LI N, et al. Resveratrol inhibits Hexokinases II mediated glycolysis in non-small cell lung cancer via targeting Akt signaling pathway[J]. *Exp Cell Res*, 2016, 349(2): 320-327.
- [15] GAO F, LI M, LIU W B, et al. Epigallocatechin gallate inhibits human tongue carcinoma cells via HK2-mediated glycolysis[J]. *Oncol Rep*, 2015, 33(3): 1533-1539.

(王荣兵 编辑)