

MAP4K3—mTOR 信号在甘草查而酮 A 诱导的鳞癌 细胞自噬与凋亡中的作用研究

曾光 卫克文*

(第四军医大学唐都医院口腔科 陕西 西安 710038)

[摘要] 目的:探索 MAP4K3—mTOR 信号级联在甘草查而酮 A 诱导的人口腔鳞癌细胞自噬与凋亡中的作用。方法:分别采用 0、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 甘草查而酮 A 刺激人口腔鳞癌 SCC—25 系细胞,并于刺激后 0、6 及 24 h 收集细胞,采用 Western blot 检测 MAP4K3、AKT、mTOR 通路分子,细胞自噬标识分子 LC3—II、beclin1,以及细胞凋亡标记分子 caspase—3、caspase—9 及 bcl—2 等的蛋白表达水平,采用 Annexin V—PI 染色检测细胞凋亡状况。结果:甘草查而酮 A 可剂量及时间依赖性地降低 SCC—25 细胞 MAP4K3、p—mTOR 及 p—p70S6 蛋白的表达水平,促进其 LC3—II、beclin1、caspase—3 及 caspase—9 蛋白表达水平,并抑制其 bcl—2 蛋白表达水平($P<0.05$)。采用慢病毒过表达 MAP4K3 后,p—mTOR、caspase—3 及 caspase—9 蛋白表达水平显著增高,LC3—II、beclin1 及 bcl—2 蛋白表达水平则显著降低($P<0.05$)。经甘草查而酮 A 刺激后,SCC—25 细胞早期凋亡数与晚期凋亡数均较对照组显著增多,该效应可被 MAP4K3 过表达处理显著增强($P<0.05$)。结论:甘草查而酮 A 可时间剂量依赖地抑制 MAP4K3—mTOR 信号级联,并促进人口腔鳞癌细胞的自噬与凋亡,当过表达 MAP4K3 活化 mTOR 信号级联后,鳞癌细胞自噬活动受到抑制,但其凋亡活动则显著增强。

[关键词] 甘草查而酮 A 口腔鳞癌细胞 MAP4K3 mTOR 信号通路 自噬 凋亡

[中图分类号] R739.8 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2017)12—1241—05

[doi] 10.13701/j.cnki.kqxyj.2017.12.001

Effect of MAP4K3—mTOR Signaling in Licochalcone A—induced Autophagy and Apoptosis of Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. ZENG Guang, WEI Ke—wen*. *Department of Dentistry, Tangdu Hospital, The Forth Military Medical University, Xi'an 710038, China.*

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of MAP4K3—mTOR signaling in licochalcone A—induced autophagy and apoptosis of human oral squamous cell carcinoma cells (OSCC). **Methods:** OSCC SCC—25 cells were adopted and treated once with licochalcone A for 0, 6, and 24 h at 0, 25 and 50 μM . The cells were harvested for further investigation. Western blot analysis was adopted to detect the protein expression of MAP4K3, AKT, mTOR, and autophagy marker molecules LC3—II and beclin1, and apoptosis marker molecules caspase—3, caspase—9, and bcl—2. Annexin V—PI staining was used to detect the cell apoptosis. **Results:** Exposure of SCC—25 cells to licochalcone A dose— and time— dependently decreased the protein expression of MAP4K3, p—mTOR, and p—p70S6, and increased the protein expression of LC3—II, beclin1, caspase—3, and caspase—9. When the MAP4K3 was overexpressed, the protein expressions of p—mTOR, caspase—3, and caspase—9 were increased, while the expressions of LC3—II, beclin1, and bcl—2 were decreased ($P<0.05$). In addition, licochalcone A stimulation increased the number of early and late apoptotic SCC—25 cells, which could be obviously reversed by MAP4K3 overexpression ($P<0.05$). **Conclusion:** Licochalcone A dose— and time— dependently decreased MAP4K3—mTOR signaling, but increased the autophagy and apoptosis of SCC—25 cells. When MAP4K3 was overexpressed, the licochalcone A—induced autophagy decreased, but licochalcone A—induced apoptosis increased.

[Key words] Licochalcone A Human oral squamous cell carcinoma cells (OSCC) MAP4K3 mTOR signaling Autophagy Apoptosis

基金项目 国家自然科学基金(编号:81502337)

陕西省自然科学基金(编号:2015JM8486)

作者简介 曾光(1982~),男,北京市人,博士,主治医师,讲师,主要从事抗肿瘤化合物研究。

* 通讯作者 卫克文, E—mail: weikewen1010@126.com

肿瘤细胞的凋亡(Apoptosis)与自噬(Autoph-

age)是近年来肿瘤研究领域的热点,其被认为与肿瘤的存活、生长、转移等活动密切相关,也是化疗药物抗肿瘤的重要作用机制^[1]。细胞凋亡过程由半胱天冬酶(Caspase)和 Bcl-2 家族蛋白分子执行。细胞自噬过程被认为受到多种分子和细胞信号通路的调节,如自噬相关基因家族分子 Beclin-1^[1],丝裂原活化激酶(Mitogen-activated protein kinases, MAPKs MAPKs)家族分子^[2],以及磷脂酰肌醇 3-激酶-AKT-雷帕霉素靶蛋白(PI3K-AKT-mTOR)级联途径^[3]。

甘草查尔酮 A(Licochalcone A)是存在于甘草中的一种酚类查尔酮化合物,本课题组及国际上其他研究组织的最新研究结果显示,甘草查尔酮 A 具有显著的抗肿瘤作用,可时间及剂量依赖地激活人鳞癌细胞的凋亡与自噬活动,而对正常口腔角化细胞的增殖及凋亡活动均无显著影响^[4,5],但其中的分子调控机制仍不清楚。本研究旨在揭示 MAPKs 以及 PI3K-AKT-mTOR 信号级联在甘草查尔酮 A 促进鳞癌细胞的自噬与凋亡活动中的调控作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料 SCC-25 人口腔鳞状细胞癌细胞系购自美国细胞株保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC),甘草查尔酮 A 购自瑞芬思生物科技有限公司(批号:58749-22-7,成都),胰酶消化液(C0201)及细胞裂解液 RIPA(P0013B)均购自上海碧云天生物科技有限公司。MAP4K3(1:400, sc-7256)、p-AKT(1:800, #4056)、p-mTOR(1:800, #5536)、p-p70S6(1:800, #9234)抗体均购自美国 Cell Signalling Technology 公司, Beclin-1(1:400, sc-11427)、LC3-II(1:400, sc-28266)、caspase-3(1:400, sc-271759)、caspase-9(1:400, sc-133109)、bcl-2(1:400, sc-7386)抗体均购自美国 Santa Cruz 生物技术公司。 β -Actin 抗体(CW0096)、山羊抗兔二抗(CW0103)、山羊抗小鼠二抗(CW0105)及 BCA 蛋白定量试剂盒均购自北京康为世纪公司。MAP4K3 过表达慢病毒载体 pGC-MAP4K3-LV 及其空白对照载体均购自上海吉玛制药技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组和处理 取 SCC-25 系细胞,按照 1×10^7 /孔密度接种于 6 孔板中,分别用甘草查尔酮 A 终浓度为 0、25、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 RPMI 1640 培养液继续培养 0、6、24 h 后,收集各组细胞进行下述检测。

1.2.2 MAP4K3 过表达慢病毒转染 将 SCC-25 系细胞按照 1×10^7 /孔密度接种于 6 孔板中,按照预实验中确定的最适病毒感染复数(MOI)值为 50 的病毒细胞比加入 MAP4K3 过表达病毒及对照空病毒感染细胞 24 h 后,再分别换用甘草查尔酮 A 终浓度为 0 及 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 RPMI1640 培养液继续培养 24 h 后,收集各组细胞进行下述检测。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达量 加入细胞裂解液 RIPA 裂解细胞,取上清测定总蛋白浓度,十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,再以半干法转印到 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉封闭 1 h,滴加一抗 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜;TBST 洗膜后,再滴加二抗室温孵育 2 h;TBST 洗膜后,ECL 化学发光试剂显影,化学发光凝胶成像系统检测蛋白条带,并计算蛋白的表达水平。

1.2.4 Annexin V-PI 染色检测细胞凋亡 常规收集上述各组细胞,以 $1 \times$ 标记缓冲液重悬细胞至 1×10^6 细胞/mL,吸取 100 μL 细胞悬液进行标记,加入 5 μL AnnexinV-FITC 和 5 μL PI,将细胞混匀,在室温下避光孵育 20 min 后,每管中另加 200 微升 $1 \times$ 标记缓冲液,FACS-Aria flow 流式细胞仪检测。

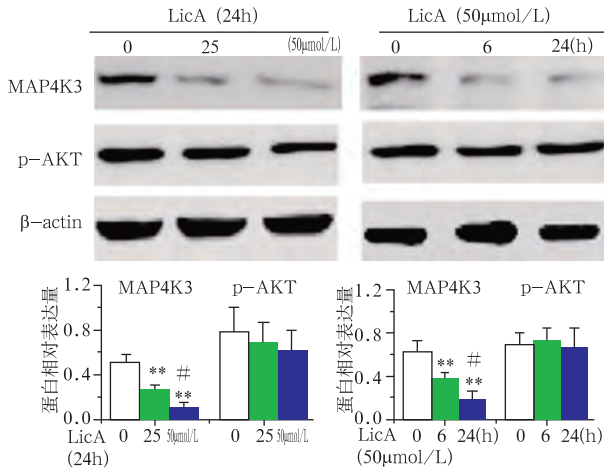
1.3 统计学分析 上述数据的计算均由 2 个对实验设计不了解的实验员各计数 2 次,并间隔 1 周。采用标准一致性检验,结果显示 2 人所得数据高度吻合($r > 0.9$),因此计数均值被用于统计分析。采用 SPSS11.0 统计软件对数据进行方差分析,两两比较用 Tukey 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 甘草查尔酮 A 可抑制鳞癌细胞 MAP4K3 及 m-TOR 信号 SCC-25 细胞经 25 $\mu\text{mol/L}$ 甘草查尔酮 A 刺激 24 h 后,其 MAP4K3、p-mTOR 及 p-p70S6 蛋白的表达水平较溶剂对照组显著降低($P < 0.05$);当甘草查尔酮 A 浓度升高到 50 $\mu\text{mol/L}$ 时,其细胞中 MAP4K3、p-mTOR 及 p-p70S6 蛋白的表达水平较 25 $\mu\text{mol/L}$ 刺激组及对照组显著降低($P < 0.05$),见图 1、图 2;此外,细胞经 50 微摩尔甘草查尔酮 A 后,其 MAP4K3、p-mTOR 及 p-p70S6 蛋白的表达水平均随着培养时间的延长而逐渐降低,3 组间两两相比差异均具有统计学意义,见图 1、图 2($P < 0.05$)。

2.2 MAP4K3 过表达可逆转甘草查尔酮 A 抑制鳞癌细胞 m-TOR 信号活化的作用 经 MAP4K3 过表达病毒处理的 SCC-25 细胞内 MAP4K3 及 p

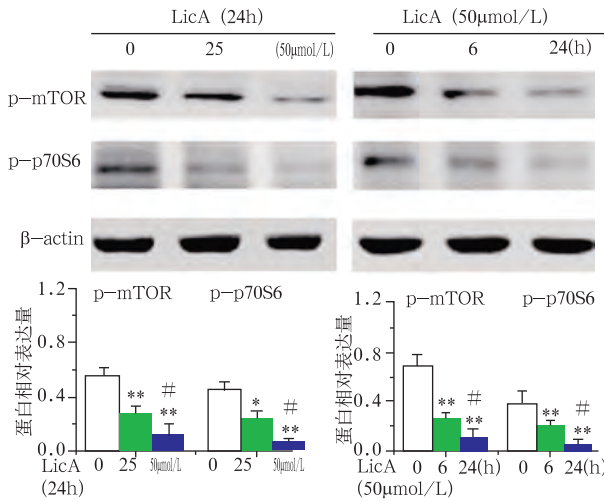
一 mTOR 蛋白的表达较空白病毒对照组均显著增高,见图 3($P < 0.05$)。



LicA: 甘草查尔酮 A; * 表示与空白对照组或刺激 0 小时组相比 $P < 0.01$; # 表示与 25 $\mu\text{mol/L}$ 刺激组或刺激 6 h 组相比 $P < 0.05$

图 1 Western blot 检测甘草查尔酮 A 刺激对人鳞癌细胞 MAP4K3 及 p-AKT 蛋白表达水平的影响

Fig. 1 Western blot analysis of the expression of MAP4K3 and p-AKT in the squamous cell carcinoma cells stimulated by licochalcone A.



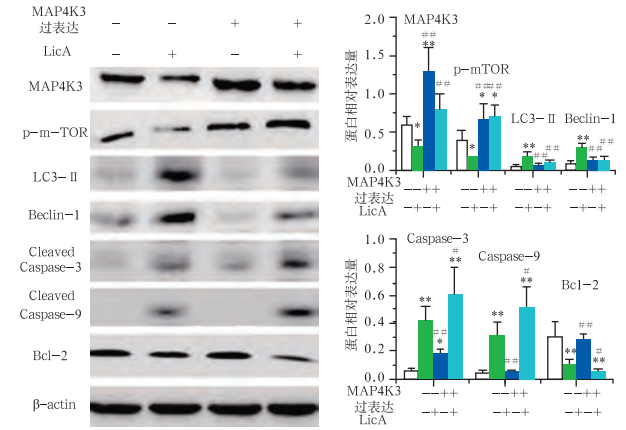
* 表示与空白对照组或刺激 0 h 组相比 $P < 0.05$, ** 表示与空白对照组或刺激 0 h 组相比 $P < 0.01$; # 表示与 25 $\mu\text{mol/L}$ 刺激组或刺激 6 h 组相比 $P < 0.05$, ## 表示与 25 $\mu\text{mol/L}$ 刺激组或刺激 6 h 组相比 $P < 0.01$

图 2 Western blot 检测甘草查尔酮 A 刺激对人鳞癌细胞 p-mTOR 及 p-p70S6 蛋白表达水平的影响

Fig. 2 Western blot analysis of the expression of p-mTOR and p-p70S6 in the squamous cell carcinoma cells stimulated by licochalcone A.

2.3 MAP4K3 过表达可逆转甘草查尔酮 A 促进鳞癌细胞自噬的作用 MAP4K3 过表达组自噬标识分子 LC3-II 及 beclin-1 蛋白的表达与空白病毒对照组无显著差异,见图 3($P > 0.05$); 50 $\mu\text{mol/L}$

L 甘草查尔酮 A 刺激 SCC-25 细胞 24 h,可显著促进其 LC3-II 及 beclin-1 蛋白的表达,见图 3($P < 0.05$),但当 SCC-25 细胞 MAP4K3 蛋白过表达后再行甘草查尔酮 A 刺激,其 LC3-II 及 beclin-1 蛋白的表达则较单纯甘草查尔酮 A 刺激组显著降低,见图 3($P < 0.05$)。

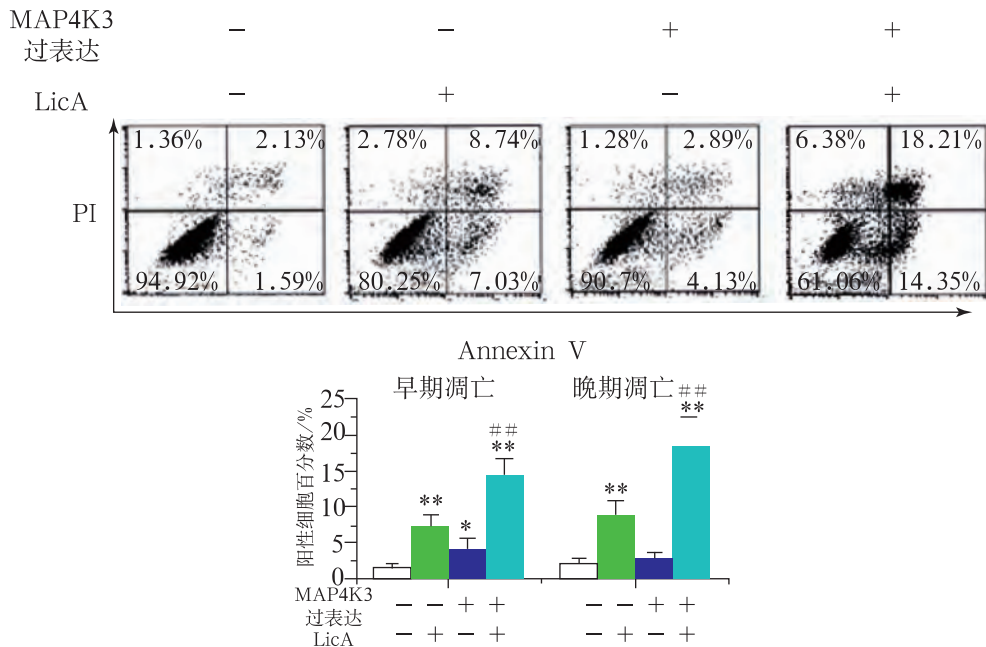


* 表示与空白对照组相比 $P < 0.05$, ** 表示与空白对照组相比 $P < 0.01$; # 表示与甘草查尔酮 A 刺激组相比 $P < 0.05$, ## 表示与甘草查尔酮 A 刺激组相比 $P < 0.01$

图 3 Western blot 检测 MAP4K3 过表达或/及甘草查尔酮 A 刺激对人鳞癌细胞 MAP4K3-mTOR 信号级联,自噬相关分子 LC3-II、beclin-1,凋亡相关分子 caspase-3、caspase-9 及 bcl-2 蛋白水平表达的影响

Fig. 3 Western blot analysis of the expression of MAP4K3, p-mTOR, LC3-II, beclin-1, caspase-3, caspase-9, and bcl-2 in the squamous cell carcinoma cells stimulated by licochalcone A and/or MAP4K3 overexpression.

2.4 MAP4K3 过表达可增强甘草查尔酮 A 促进鳞癌细胞凋亡的作用 MAP4K3 过表达组细胞凋亡分子 caspase-3 蛋白表达与空白病毒对照组相比显著增高(见图 3, $P < 0.05$),而 caspase-9 及 bcl-2 蛋白表达则在两组间无显著差异($P > 0.05$),见图 3; 50 $\mu\text{mol/L}$ 甘草查尔酮 A 刺激 SCC-25 细胞 24 h,可显著促进其凋亡分子 caspase-3 及 caspase-9 蛋白的表达,抑制其抗凋亡分子 bcl-2 蛋白的表达,见图 3($P < 0.05$),但当 SCC-25 细胞 MAP4K3 蛋白过表达后再行甘草查尔酮 A 刺激,其 caspase-3 及 caspase-9 蛋白的表达则较单纯甘草查尔酮 A 刺激组显著增强, bcl-2 蛋白的表达则进一步降低($P < 0.05$),见图 3。此外,MAP4K3 过表达组早期细胞凋亡数较空白病毒对照组显著增高,见图 4($P < 0.05$),但晚期凋亡细胞数在两组间无显著差异($P > 0.05$),见图 4; 经甘草查尔酮 A 刺激后, SCC-25 细胞早期凋亡数与晚期凋亡数均较对照组显著增高,该效应可被 MAP4K3 过表达处理



*表示与空白对照组相比 $P < 0.05$, **表示与空白对照组相比 $P < 0.01$; #表示与甘草查尔酮 A 刺激组相比 $P < 0.05$, ##表示与甘草查尔酮 A 刺激组相比 $P < 0.01$

图 4 流式细胞计数检测 MAP4K3 过表达或/及甘草查尔酮 A 刺激对人鳞癌细胞凋亡活动的影响

Fig. 4 Flow cytometry analysis of the apoptosis of the squamous cell carcinoma cells stimulated by licochalcone A and/or MAP4K3 overexpression.

显著增强,见图 4($P < 0.05$)。

3 讨论

口腔鳞状细胞癌(Oral squamous cell cancer, OSCC)约占口腔颌面部恶性肿瘤中的 80%以上,且每年有超过 50 万的新发病例,严重影响患者的生活质量^[6,7]。丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen activated protein kinases, MAPKs)级联是细胞内重要的信号传导系统,细胞运用这一系统将胞外刺激信号(如化疗药物刺激等)传递给细胞核,参与细胞生长、发育、死亡等一系列生理病理过程^[2]。MAP4K3 是 MAPKs 家族中的一员,文献报道紫外线辐射及肿瘤坏死因子 α 均可激活 MAP4K3,从而启动内源性细胞凋亡通路,可见 MAP4K3 具有显著的促凋亡作用^[8,9]。MAP4K3 亦被证实可显著抑制细胞自噬活动,其可通过促进 mTOR 下游关键分子 p70S6K 蛋白激酶的磷酸化从而正向激活 mTOR 信号通路,发挥抑制细胞自噬的作用^[10]。Tsai 等对人宫颈癌细胞的最新研究显示,甘草查尔酮 A 可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号级联从而激活细胞自噬活动^[11]。本研究结果显示,甘草查尔酮 A 可时间及剂量依赖地促进人鳞癌细胞的自噬及凋亡活动,这与本课题组前期研究结果吻合^[4,5]。同时,甘草查尔酮 A 可显著抑制 MAP4K3-mTOR 信号级联,提

示 MAP4K3-mTOR 信号级联参与了甘草查尔酮 A 的抗肿瘤效应。与 Tsai 等研究不同的是,PI3K-Akt 信号通路在本研究中并未激活,这可能与不同细胞来源有关。当本文采用慢病毒使 MAP4K3 过表达后,mTOR 信号通路被活化,人鳞癌细胞的自噬活动受到显著抑制,但其凋亡活动则显著增强,表明 MAP4K3-mTOR 信号级联可通过抑制自噬,促进凋亡的途径进一步加强甘草查尔酮 A 对人鳞癌细胞的抑瘤效果,这一结果与 Tsai 等采用雷帕霉素激活 mTOR 信号从而促进人宫颈癌细胞凋亡的结果吻合^[14]。上述结果表明,无论是在人鳞癌细胞或是宫颈癌细胞中,mTOR 信号通路具有抑制细胞自噬活动,促进细胞凋亡的效应。但由于本研究仅使用了 SCC25 舌癌细胞系进行实验,后续研究采用其他组织来源的鳞癌细胞系或原代分离的鳞癌患者细胞进行验证,将有助于增强本研究结果的说服力。

在本研究中,甘草查而酮 A 能诱导 SCC25 细胞的自噬和凋亡,而 MAP4K3-mTOR 信号在此过程中是被抑制的。当过表达 MAP4K3 后,却只能抑制甘草查而酮 A 诱导的自噬过程,其诱导的凋亡作用却进一步增强了。这一看似矛盾的结果可能有如下解释:其一,过表达 MAP4K3 已被证实可升高

细胞内 bax/bcl-2 比例,从而启动内源性细胞凋亡通路^[8,9],但甘草查尔酮 A 诱导鳞癌细胞凋亡可能并不通过 MAP4K3 信号通路;其二,过表达 MAP4K3 抑制了鳞癌细胞的自噬,而抑制细胞自噬已被证实可加强甘草查尔酮 A 促进肿瘤细胞凋亡的抗肿瘤效应^[11]。

综上所述,本研究结果显示甘草查尔酮 A 可时间剂量依赖地抑制 MAP4K3-mTOR 信号级联,并促进口腔鳞癌细胞的自噬与凋亡,当过表达 MAP4K3 活化 mTOR 信号级联后,鳞癌细胞自噬活动受到抑制,但其凋亡活动则显著增强,该研究为抑制肿瘤细胞的自噬,从而促进甘草查尔酮 A 的抗肿瘤效果提供了重要理论依据。

参考文献

- [1] Chude CI, Amaravadi RK. Targeting Autophagy in Cancer: Update on Clinical Trials and Novel Inhibitors [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(6). pii: E1279
- [2] Zhou YY, Li Y, Jiang WQ, Zhou LF. MAPK/JNK signaling: a potential autophagy regulation pathway [J]. *Biosci Rep*, 2015, 35(3). pii: e00199
- [3] Sun H, Wang Z, Yakisich JS. Natural products targeting autophagy via the PI3K/Akt/mTOR pathway as anticancer agents [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2013, 13(7): 1048-1056
- [4] Zeng G, Shen H, Yang Y, et al. Licochalcone A as a potent

antitumor agent suppresses growth of human oral cancer SCC-25 cells in vitro via caspase-3 dependent pathways [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(7): 6549-6555

- [5] 曾光,柴治国,任高彤,等.甘草查尔酮 A 对人口腔鳞癌细胞自噬活动的影响[J].牙体牙髓牙周病学杂志,2017,27(3): 134-140
- [6] 王倩,马金宝,白桦.自噬相关蛋白 LC3Av1 在口腔鳞状细胞癌中表达及甲基化对其的影响[J].口腔医学研究,2015,31(4): 373-376
- [7] 蒋芳艳,王瑜,陈吉荣,等.转录因子 XBP1 在口腔鳞状细胞癌中的表达[J].口腔医学研究,2016,32(2): 139-142
- [8] Lam D, Dickens D, Reid EB, et al. MAP4K3 modulates cell death via the post-transcriptional regulation of BH3-only proteins [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106(29): 11978-11983
- [9] Lam D, Martins LM. MAP4K3 enhances the expression of the BH3-only protein BID [J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(20): 3248-3249
- [10] Findlay GM, Yan L, Procter J, et al. A MAP4 kinase related to Ste20 is a nutrient-sensitive regulator of mTOR signaling [J]. *Biochem J*, 2007, 403(1): 13-20
- [11] Tsai JP, Lee CH, Ying TH, et al. Licochalcone A induces autophagy through PI3K/Akt/mTOR inactivation and autophagy suppression enhances Licochalcone A-induced apoptosis of human cervical cancer cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 28851-28866

[收稿日期:2017-05-26]

(本文编辑 李四群)

欢迎订阅 2018 年《口腔医学研究》杂志

《口腔医学研究》为武汉大学口腔医学院主办、国内外公开发行的口腔医学专业学术期刊。是科技部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),《中文核心期刊要目总览》2014 年版核心期刊,美国《化学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、波兰《哥白尼索引》(国际医学科学数据库)收录期刊。

《口腔医学研究》创刊于 1985 年 6 月,主编为陈智教授,编委会由全国各大口腔医学院校各学科专家组成。《口腔医学研究》创刊 30 多年来,始终坚持刊物的科学性、实用性,面向院、系和基层,以普及、提高、服务为宗旨。最快捷地报道国内外口腔医学的新进展、新技术,为口腔医学临床和科研及教学服务,为读者服务;辟有专家论坛、基础研究论著、临床研究论著、讲座、临床经验交流、专业英语、综述、病例报道、学术动态、会务消息等栏目,读者对象为全国各地口腔医疗、教学、科研人员,口腔专业学生、护理、医技人员等。《口腔医学研究》也可为国内外各医疗器械、材料、药品和保健牙膏生产商或经营商刊登广告,是国家认定的处方药广告的宣传媒体。

《口腔医学研究》为月刊,每月 28 日出版。每期定价 7.00 元,全年 12 期,共 84.00 元(含邮资),欢迎广大读者到当地邮局订阅。如错过邮局订阅时间,可随时向编辑部邮购。编辑部地址:武汉市洪山区珞瑜路 237 号武汉大学口腔医学院,邮政编码:430079。电话:027-87686117,传真:027-87873260。http://www.kqxyj.com, E-mail:kqxyj@163.com。国内统一刊号:CN 42-1682/R,国际标准出版物号:ISSN 1671-7651。国内总发行:湖北省邮政报刊发行局,邮发代号 38-119。国外总发行:中国国际图书贸易总公司(北京 399 信箱),国外代号 6427BM。广告经营许可证号:4201004000419。