

黄芩素通过调控糖酵解及谷氨酰胺代谢抑制肝癌细胞能量代谢

郭舜¹ 石磊¹ 张松¹ 刘靖圆² 魏俊² 赵晓余³ (1. 空军军医大学第二附属医院药剂科 西安 710038; 2. 中国人民解放军空军九八六医院; 3. 西安大兴医院)

摘要 目的: 探讨黄芩素对肝癌细胞能量代谢能力的影响及机制。**方法:** 不同人肝癌细胞 SMMC-7721、HepG2 中给予不同浓度的黄芩素,通过检测细胞 ATP 含量、乳酸含量、谷氨酰胺代谢评价黄芩素对肝癌细胞增殖及能量代谢的影响,同时分别采用 siRNA 干扰己糖激酶 2(HK2)及溶质载体家族 1A5(SLC1A5)表达后,考察黄芩素对肝癌细胞增殖及能量代谢能力的影响。**结果:** 黄芩素可以浓度、时间依赖性的抑制肝癌细胞活力,SMMC-7721 细胞 24,48,72 h 处理后的半数抑制浓度(IC₅₀)分别为 26.07,20.9,18.7 μmol · L⁻¹,HepG2 细胞 24,48,72 h 处理后的 IC₅₀ 分别为 27.8,24.5,22.6 μmol · L⁻¹。与对照组比较,20 μmol · L⁻¹ 黄芩素可明显降低 SMMC-7721 和 HepG2 细胞对葡萄糖的消耗及乳酸含量(*P*<0.05),同时显著降低 SMMC-7721 和 HepG2 细胞中谷氨酰胺含量(*P*<0.05)。与敲除 HK2 的肝癌细胞联合培养 72 h 后,与对照组比较,20 μmol · L⁻¹ 黄芩素仍可降低细胞能量代谢水平(*P*<0.05),但对肝癌细胞的糖酵解能力无显著影响。与敲除 SLC1A5 后的肝癌细胞联合培养 72 h 后,与对照组比较,20 μmol · L⁻¹ 黄芩素能显著降低肝癌细胞的能量代谢及糖酵解能力(*P*<0.05)。在无谷氨酰胺环境下,20 μmol · L⁻¹ 黄芩素对于敲除 HK2 肝癌细胞的能量代谢调节作用与 siRNA HK2 组无显著差异。**结论:** 黄芩素可抑制肝癌细胞的增殖,降低肝癌细胞的能量代谢水平,其作用机制与其同时参与肝癌细胞糖酵解及谷氨酰胺代谢相关。

关键词 黄芩素;肝癌;谷氨酰胺;己糖激酶 2;溶质载体家族 1A5

中图分类号:R965.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-049X(2021)12-2154-06

DOI:10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2021.12.003

Baicalein Inhibiting the Energy Metabolism of Hepatoma Cells by Regulating Glycolysis and Glutamine Metabolism

Guo Shun¹, Shi Lei¹, Zhang Song¹, Liu Jingyuan², Wei Jun², Zhao Xiaoyu³(1. Department of Pharmacy, Second Affiliated Hospital of Air Force Military Medical University, Xi'an 710038, China; 2. Number 986 Hospital of Air Force of the PLA; 3. Xi'an Daxing Hospital)

ABSTRACT Objective: To investigate the effects and mechanism of baicalein on the energy metabolism of hepatocellular carcinoma cells. **Methods:** Different concentrations of baicalein were given to different human hepatoma cells SMMC-7721 and HepG2. The effects of baicalein on the proliferation and energy metabolism of hepatocellular carcinoma cells were evaluated by detecting ATP content, lactate content and glutamine metabolism. Meanwhile, siRNA interference with hexokinase 2 (HK2) and solute carrier family 1A5 (SLC1A5) were used respectively, to investigate the effects of baicalein on the proliferation and energy metabolism of hepatocellular carcinoma cells. **Results:** Baicalein inhibited hepatocellular carcinoma cells activity in a concentration and time-dependent manner, the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of SMMC-7721 and HepG2 cells was 26.07, 20.9 and 18.7 μmol · L⁻¹, and 27.8, 24.5 and 22.6 μmol · L⁻¹ respectively for 24, 48 and 72 h. Compared with the control group, 20 μmol · L⁻¹ baicalein significantly reduced the glucose consumption and lactic acid content of SMMC-7721 and HepG2 cells (*P*<0.05), at the same time, the content of glutamine in SMMC-7721 and HepG2 cells was significantly decreased (*P*<0.05). The effect of baicalein on the glycolysis ability of hepatocellular carcinoma cells disappeared after co-cultured with HK2 knockout hepatocellular carcinoma cells for 72 h. However, compared with that of the normal control group, the energy metabolism of hepatocellular carcinoma cells was still inhibited (*P*<0.05). Furthermore, it had no significant effect on the glycolysis ability of hepatoma cells. When baicalein was combined with SLC1A5 knockout hepatocellular carcinoma cells for 72 h, compared with the normal control group, 20 μmol · L⁻¹ baicalein could significantly reduce the energy metabolism and glycolysis ability of hepatocellular carcinoma cells (*P*<0.05). However, when baicalein was combined with siRNA HK2 cells without glutamine, there were no significant differences in energy metabolism and glycolysis between 20 μmol · L⁻¹ baicalein group and siRNA HK2 group. **Conclusion:** Baicalein can inhibit the proliferation and reduce the energy metabolism of hepatocellular carcinoma cells. Its mechanism is related to its involvement in glycolysis and glutamine metabolism of hepatocellular carcinoma cells.

KEY WORDS Baicalein; Hepatoma; Glutamine; Hexokinase 2; Solute carrier family 1A5

肝细胞癌是常见的恶性肿瘤,预极差,尤其是在 亚洲东部和东南部、非洲和南欧并发率更加显

基金项目:陕西省重点研发计划一般项目(编号:2019SF-281);陕西省中医药管理局科研课题(编号:2019-ZZ-ZY015);唐都医院创新发展基金(编号:2018QYTS005)
通信作者:赵晓余 Tel:(029)86450296 E-mail: zhaoxiaoyuman@163.com

著^[1]。肝癌常由病毒性肝炎、非酒精性脂肪肝、酒精性肝硬化和其他类型的慢性肝损伤诱发。最新的流行病学研究发现在北美和一些欧洲地区,HCC 发病率和死亡率不断上升,而我国及东亚国家,如日本属于传统高危地区。HCC 是美国癌症相关死亡人数上升最快的原因。在一项包括美国所有 50 个州的分析中,经年龄调整的肝癌发病率从 2000 年的 4.4/100 000 上升到 2012 年的 6.7/100 000,2000~2009 年每年增长 4.5%^[2]。

黄芩含有丰富黄酮类化合物,在中医药的临床治疗中用途广泛。临床中该药主要用于治疗高脂血症、高血压、动脉粥样硬化、痢疾、炎症和肿瘤^[3,4]。近年的研究发现,黄芩作为中药组方,如黄芩汤和小柴胡汤中的主要组分,可用于肝癌防治。黄芩素(5,6,7-三羟基黄酮)是黄芩的主要活性成分,近期研究发现其在肿瘤治疗中参与癌细胞增殖的抑制、细胞凋亡的诱导、自噬性细胞死亡及其抗肿瘤细胞转移中体现诸多活性^[5,6]。肿瘤细胞的能量代谢重组是肿瘤的特征,其中糖酵解是肿瘤细胞的显著特征,糖酵解是肿瘤的常见生化特征,无论是否存在缺氧环境,在多种肿瘤细胞内均发现了高活性的糖酵解,该现象称为 Warberg 效应。而导致 Warberg 效应的机制很多^[7]。糖酵解主要受 3 种限速酶调控,己糖激酶(hexokinase, HK)、磷酸果糖激酶 1(phosphofructokinase-1, PFK-1)和丙酮酸激酶(pyruvate kinase, PK),其中己糖激酶是第一步限速酶。此外近年的研究发现谷氨酰胺是肿瘤细胞线粒体能量代谢的关键能量原料^[8]。已有的研究表明黄芩素对肝癌细胞具有显著的抑制作用,同时有研究表明其参与神经细胞的能量代谢变化,参与调节细胞谷氨酰胺含量^[9~12]。但其对肝癌的能量代谢作用尚未报道,且其对肝癌细胞的糖酵解及谷氨酰胺代谢的影响还有待明确。因此本研究拟通过人肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 考察黄芩素对肝癌细胞能量代谢的影响,并采用基因编辑技术考察黄芩素对细胞糖酵解及谷氨酰胺代谢的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器

二氧化碳培养箱(Heal Force HF90,上海力申),多功能酶标仪(Tecan Mpro200,瑞士 Tecan 公司);低温离心机(TGL-20MV,湖南赫西);生物洁净工作台(BSC--IIA2,苏州安泰空气有限公司);电泳槽(Mini-PROTEAN^R Tetra System,美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 试剂

DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号 8120370);不含谷氨酰胺 DMEM 培养基(美国 Thermo Fisher 公司,批号:A14431);胎牛血清(美国 Hyclon 公司,批号:1962355);青-链霉素(美国 HyClone 公司,批号:J180027);黄芩素(美国 Sigma-Aldrich 公司,批号:2012815,纯度>98%);CCK8 试剂盒(恩晶生物科技有限公司,批号:EG20200415);HK2、SLC1A5 siRNA(上海吉玛制药技术有限公司);转染试剂 Lipofectamine 2000[®] reagent(美国 Invitrogen 公司,批号:0000317095);HK2 一抗抗体(英国 Abcam 公司,批号:ab209847);SLC1A5、GAPDH 一抗抗体(美国 NOVUS 公司,批号分别为:NBP1-89327、NB300-221);葡萄糖含量检测试剂盒,乳酸含量检测试剂盒、ATP 含量检测试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为:BC2505、BC2235、BC0305);谷氨酰胺检测试剂盒(英国 Abcam 公司,批号:197011);其他试剂均为国产分析纯。

1.3 细胞

人肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721 购自 ATCC。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养 人肝癌细胞株 SMMC-7721、HepG2 细胞采用 DMEM/F12 培养基(含 10% FBS、青霉素 10^5 u · L⁻¹、链霉素 0.1 g · L⁻¹)培养,均置于 37℃、5% CO₂培养箱中培养;每天观察细胞生长状态并进行传代培养;收集对数生长期细胞接种于 6 孔板(5×10^5 个细胞/孔)继续培养。

建立谷氨酰胺剥夺细胞模型,去除正常 DMEM,洗涤正常细胞或转染 PBS 1 次。添加不含谷氨酰胺的 DMEM 培养基。此外,在培养基中加入 10% 的 DFBS(Gemini Bio Products, Sacramento, California, USA)。细胞在该培养基中培养 24 h。细胞适应培养基后,正常传代培养,继续使用。

1.4.2 肝癌细胞 siRNA HK2 及 SLC1A5 的干预模型 转染前 1 d 按 5×10^5 个细胞接种于 24 孔板,每孔加入 500 μl 完全培养基,每孔中加入用 50 μl Opti-MEM I 减血清培养基稀释 1 μl Lipofectamine 2000 转染试剂,每孔中加入 siRNA 终浓度为 50 nmol · L⁻¹ 的目的片段,继续培养 24 h,更换含药培养基,药物干预培养 24 h。

1.4.3 CCK8 法检测细胞活力 将 SMMC-7721、HepG2 细胞用 DMEM/F12 培养基制备成单细胞悬液,以 5 000 个/孔的密度接种于 96 孔细胞培养板,100 μl/孔,放置于 37℃、5% CO₂恒温培养箱中培养

过夜,次日按浓度梯度加入黄芩素低、中、高剂量组浓度分别为 5,10,20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,每孔加入 100 μl ,未经黄芩素处理的细胞设为对照组,继续培养 48 h 后,弃去原培养基,每孔加入配置好的 CCK8 工作液(1:10)100 μl 。将培养板置于 37℃,5 % CO_2 恒温培养箱中孵育 1 h。用酶标仪在 450 nm 处测定光密度(OD)值。

1.4.4 乳酸分泌与葡萄糖利用检测 采用乳酸含量检测试剂盒检测细胞培养基中的乳酸含量,按试剂盒的操作步骤进行;葡萄糖含量检测采用试剂盒提供的操作说明进行分析。

1.4.5 细胞 ATP 含量及谷氨酰胺检测 收集培养液中细胞,每孔加入 200 μl ATP 裂解液,并加入对应的细胞,冰上反复吹打,4℃,10 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清。按照 1:5 比例用 ATP 检测试剂稀释液稀释 ATP 检测试剂配制成 ATP 检测工作液。取 100 μl 检测工作液加至检测孔内,室温静置 5 min,对应每孔加入 50 μl 样品,迅速混匀,多功能酶标仪检测各孔的化学发光值。用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒检测各样品的蛋白浓度。

谷氨酰胺含量按试剂盒说明书操作,分别取空白组、标准组、样品组,按试剂盒具体步骤加入相应试剂,混匀后,于 37℃水浴 15 min,于 630 nm 处读取 OD 值,计算谷氨酰胺浓度[(测定 OD –空白 OD)/(标准 OD –空白 OD) $\times$ 标准品浓度(2 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$)]。

1.4.6 Western Blot 检测细胞内 HK2、SLC1A5 蛋白表达 各组细胞接种于 6 孔板中,培养 48 h 后,给各孔中细胞加入 RIPA 裂解液,于冰上裂解 30 min,12 000 $\times g$ 、4℃离心 15 min 后收集上清,BCA 进行蛋白含量检测,20 μg 蛋白样品上样,进行 SDS-PAGE 电泳,电泳结束后将 SDS-PAGE 胶采用湿转法转印

至 PVDF 膜上,用 5%脱脂奶粉封闭液室温封闭 1 h,4℃过夜孵育一抗 HK2 和 SLC1A5 (分别按照 1:500 和 1:1 000 稀释),TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加入羊抗兔二抗(1:4 000),室温孵育 1 h 后 TBST 洗膜 3 次每次 10 min,洗膜,ECL 显色液显色,采用 BIO-RAD ChemiDoc TM XRS+凝胶成像系统采集图像。每个组重复 3 次,取均值代表测定结果。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件进行对实验数据进行统计分析,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间差异比较采用单因素方差分析(One Way ANOVA, LSD),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芩素对细胞活力的影响

与对照组比较,不同肝癌细胞在黄芩素干预后的 24,48 和 72 h 细胞活力均降低,其中 48 和 72 h 的中、高剂量组差异有统计学意义($P<0.05$),且黄芩素呈浓度依赖性。SMMC-7721 细胞 24,48,72 h 处理后的半数抑制浓度(IC_{50})分别为 26.07,20.9,18.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,HepG2 细胞 24,48,72 h 处理后的 IC_{50} 分别为 27.8,24.5,22.6 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。见表 1。

2.2 黄芩素对肝癌细胞糖酵解的水平

随着黄芩素给药浓度的增加,HepG2 和 SMMC-7721 细胞对葡萄糖的消耗逐渐降低,同时 HepG2 和 SMMC-7721 细胞中乳酸含量也降低。与对照组相比,黄芩素高剂量组在两种肝癌细胞中的差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 黄芩素对细胞能量代谢及谷氨酰胺的影响

与对照组及黄芩素低剂量组相比,高剂量黄芩素可以显著提高肝癌细胞能量代谢水平,降低 ATP、谷氨酰胺含量($P<0.05$),见表 3。

表 1 黄芩素对肝癌细胞增殖活性影响(OD 值)比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SMMC-7721			HepG2		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
对照组	–	0.213 $\pm$ 0.031	0.477 $\pm$ 0.029	0.726 $\pm$ 0.039	0.197 $\pm$ 0.021	0.384 $\pm$ 0.034	0.677 $\pm$ 0.042
黄芩素低剂量组	5	0.194 $\pm$ 0.039	0.407 $\pm$ 0.031 ^a	0.548 $\pm$ 0.046 ^a	0.186 $\pm$ 0.027	0.341 $\pm$ 0.047	0.611 $\pm$ 0.064
黄芩素中剂量组	10	0.161 $\pm$ 0.042	0.357 $\pm$ 0.027 ^a	0.438 $\pm$ 0.045 ^{ab}	0.147 $\pm$ 0.014 ^{ab}	0.276 $\pm$ 0.031 ^{ab}	0.546 $\pm$ 0.046 ^{ab}
黄芩素高剂量组	20	0.134 $\pm$ 0.028 ^a	0.311 $\pm$ 0.036 ^{ab}	0.384 $\pm$ 0.040 ^{ab}	0.112 $\pm$ 0.019 ^{ab}	0.237 $\pm$ 0.024 ^{ab}	0.437 $\pm$ 0.041 ^{ac}

注:与对照组比,^a $P<0.05$;与黄芩素低剂量组比较,^b $P<0.05$;与黄芩素中剂量组比较,^c $P<0.05$ 。

表 2 细胞葡萄糖消耗及乳酸含量比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	SMMC-7721		HepG2	
		葡萄糖消耗量 ($\mu\text{mol}/10^5$ 细胞)	乳酸含量 ($\mu\text{mol}/10^5$ 细胞)	葡萄糖消耗量 ($\mu\text{mol}/10^5$ 细胞)	乳酸含量 ($\mu\text{mol}/10^5$ 细胞)
对照组	–	12.3 $\pm$ 2.7	25.8 $\pm$ 2.9	18.8 $\pm$ 3.7	28.5 $\pm$ 3.2
黄芩素低剂量组	5	11.9 $\pm$ 2.2	23.7 $\pm$ 2.9	16.9 $\pm$ 4.1	27.0 $\pm$ 4.3
黄芩素中剂量组	10	9.9 $\pm$ 1.9	20.2 $\pm$ 3.3	14.7 $\pm$ 3.7 ^a	24.2 $\pm$ 3.8
黄芩素高剂量组	20	6.5 $\pm$ 2.3 ^a	16.2 $\pm$ 3.8 ^a	10.5 $\pm$ 4.4 ^a	18.8 $\pm$ 4.1 ^a

注:与对照组比,^a $P<0.05$ 。

表 3 细胞能量代谢能力比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	剂量 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	SMMC-7721		HepG2	
		ATP($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	谷氨酰胺($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	ATP($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	谷氨酰胺($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照组	—	282.5 $\pm$ 28.7	183.5 $\pm$ 22.4	266.3 $\pm$ 39.2	192.6 $\pm$ 17.3
黄芩素低剂量组	5	265.2 $\pm$ 32.1	177.6 $\pm$ 25.7	246.5 $\pm$ 32.1	182.7 $\pm$ 13.5
黄芩素中剂量组	10	245.6 $\pm$ 38.3	159.3 $\pm$ 19.4 ^a	230.3 $\pm$ 27.7	174.2 $\pm$ 20.1
黄芩素高剂量组	20	220.3 $\pm$ 34.6 ^{a,b}	133.5 $\pm$ 21.9 ^{a,b}	195.5 $\pm$ 24.8 ^{a,b}	150.5 $\pm$ 17.2 ^{a,b}

注:与对照组比,^a $P<0.05$;与黄芩素低剂量组比较,^b $P<0.05$ 。

2.4 黄芩素对肝癌细胞 HK2 及 SLC1A5 蛋白的影响

与对照组比较,黄芩素低、中、高剂量组均可明显降低 HK2 蛋白的表达($P<0.05$),黄芩素中、高剂量可明显降低 SLC1A5 蛋白的表达($P<0.05$)。见图 1 和表 4。

2.5 黄芩素对 siRNA HK2 干扰后的肝癌细胞活力及能量代谢水平的影响

采用 siRNA HK2 干扰肝癌细胞 72 h 后,肝癌细胞糖酵解能力和能量代谢水平显著降低($P<0.05$)。给予黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,细胞能量代谢水平仍然降低($P<0.05$),但糖酵解水平没有显著影响($P>0.05$),谷氨酰胺代谢水平仍有明显降低($P<0.05$),结果见表 5。

2.6 黄芩素对 siRNASLC1A5 干扰后的肝癌细胞活力及能量代谢水平的影响

SLC1A5 是肿瘤细胞谷氨酰胺代谢的关键限速酶,当采用 siRNA SLC1A5 干扰肝癌细胞 72 h 后,肝癌细胞谷氨酰胺代谢能力和细胞能量代谢水平明显降低($P<0.05$)。给予黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,肝癌细胞糖酵解水平明显降低($P<0.05$);但对细胞能

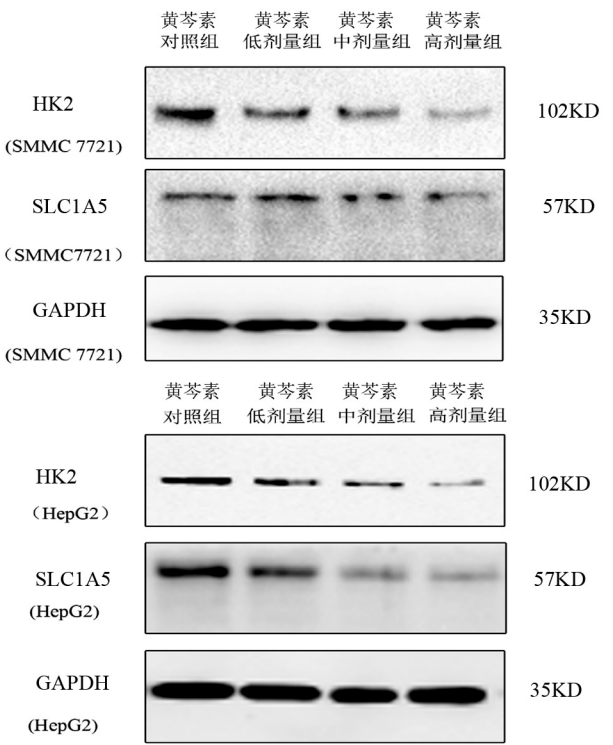


图 1 不同浓度黄芩素处理肝癌细胞对 HK2 及 SLC1A5 蛋白表达的影响

表 4 不同浓度黄芩素处理肝癌细胞对 HK2 及 SLC1A5 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s,n=3$)

组别	剂量($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	SMC7721		HepG2	
		HK2 相对表达量	SLC1A5 相对表达量	HK2 相对表达量	SLC1A5 相对表达量
对照组	—	1.01 $\pm$ 0.01	1.07 $\pm$ 0.05	1.02 $\pm$ 0.01	1.02 $\pm$ 0.01
黄芩素低剂量组	5	0.72 $\pm$ 0.02 ^a	0.95 $\pm$ 0.04	0.79 $\pm$ 0.03 ^a	0.94 $\pm$ 0.03
黄芩素中剂量组	10	0.65 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.76 $\pm$ 0.04 ^a	0.68 $\pm$ 0.05 ^{ab}	0.80 $\pm$ 0.07 ^{ab}
黄芩素高剂量组	20	0.49 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.57 $\pm$ 0.08 ^{ab}	0.39 $\pm$ 0.07 ^{ab}	0.48 $\pm$ 0.06 ^{ab}

注:与对照组比较,^a $P<0.05$;与黄芩素低剂量组比较,^b $P<0.05$ 。

表 5 黄芩素对肝癌细胞增殖活性及能量代谢影响的比较($\bar{x}\pm s,n=6$)

组别	SMMC-7721				HepG2		
	细胞活力 (OD 值)	乳酸 ($\mu\text{mol}/10^5$ 细胞)	ATP ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	谷氨酰胺 ($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	细胞活力 (OD 值)	乳酸 ($\mu\text{mol}/10^5$ 细胞)	ATP ($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)
对照组	0.7 $\pm$ 0.028	26.7 $\pm$ 3.6	279.3 $\pm$ 25.7	190.7 $\pm$ 26.9	0.7 $\pm$ 0.013	29.1 $\pm$ 2.9	265.8 $\pm$ 30.2
黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.4 $\pm$ 0.031 ^a	18.0 $\pm$ 2.9 ^a	228.4 $\pm$ 28.1 ^a	146.2 $\pm$ 21.8 ^a	0.4 $\pm$ 0.018 ^a	20.3 $\pm$ 3.5 ^a	217.4 $\pm$ 28.9 ^a
siRNA HK2	0.5 $\pm$ 0.022 ^a	16.3 $\pm$ 3.1 ^a	202.9 $\pm$ 26.3 ^a	144.7 $\pm$ 22.9 ^a	0.5 $\pm$ 0.024 ^a	17.8 $\pm$ 2.9 ^a	184.8 $\pm$ 19.3 ^a
黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + siRNA HK2	0.267 $\pm$ 0.011 ^b	16.13 $\pm$ 2.2	169.7 $\pm$ 23.3 ^b	115.2 $\pm$ 21.4 ^b	0.233 $\pm$ 0.015 ^b	16.47 $\pm$ 3.7	146.1 $\pm$ 21.7 ^b

注:与对照组比,^a $P<0.05$;与 siRNA HK2 组比较,^b $P<0.05$ 。

量代谢水平和谷氨酰胺含量水平没有显著影响($P>0.05$)。见表6。

2.7 黄芩素对在无谷氨酰胺环境下的 siRNA HK2 肝癌细胞增殖及能量代谢的影响

在无谷氨酰胺环境下, siRNA HK2 细胞培养的

表 6 黄芩素对肝癌细胞增殖活性及能量代谢影响的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	SMMC-7721			
	细胞活力(OD 值)	乳酸($\mu\text{mol}\cdot10^5\text{ cell}^{-1}$)	ATP($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	谷氨酰胺($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照组	0.7±0.013	27.8±2.9	279.5±23.1	186.3±23.7
黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.4±0.022 ^a	17.3±2.1 ^a	207.9±24.7 ^a	152.1±19.4 ^a
siRNA SLC1A5	0.6±0.013 ^a	36.0±2.3 ^a	228.1±21.4 ^a	137.6±18.2 ^a
黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + siRNA SLC1A5	0.3±0.015 ^b	24.8±1.6 ^b	155.2±24.7	140.2±27.7

组别	HepG2			
	细胞活力(OD 值)	乳酸($\mu\text{mol}\cdot10^5\text{ cell}^{-1}$)	ATP($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	谷氨酰胺($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
对照组	0.7±0.019	28.4±3.1	272.1±27.6	189.0±17.3
黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0.4±0.021 ^a	21.6±2.7 ^a	224.5±25.5 ^a	141.1±11.5 ^a
siRNA SLC1A5	0.6±0.021 ^a	31.8±3.3	219.2±28.7 ^a	139.3±14.2 ^a
黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + siRNA SLC1A5	0.3±0.011	20.1±2.9 ^b	144.3±20.6	140.9±22.1

注:与对照组比,^a $P<0.05$;与 siRNA SLC1A5 组比较,^b $P<0.05$ 。

表 7 无谷氨酰胺条件下黄芩素对肝癌细胞增殖活性及能量代谢影响的比较($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	SMMC-7721			HepG2		
	细胞活力(OD 值)	乳酸($\mu\text{mol}\cdot10^5\text{ cell}^{-1}$)	ATP($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)	细胞活力(OD 值)	乳酸($\mu\text{mol}\cdot10^5\text{ cell}^{-1}$)	ATP($\mu\text{mol}\cdot\text{mg}^{-1}$)
对照组	0.732±0.012	20.15±1.9	220.3±31.0	0.672±0.011	21.12±1.8	215.1±20.3
siRNA HK2	0.439±0.012 ^a	13.75±2.3 ^a	146.3±22.9 ^a	0.372±0.013 ^a	14.79±2.8 ^a	149.7±30.1 ^a
黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ + siRNA HK2	0.448±0.011	12.83±1.9	164.1±25.5	0.384±0.015	14.81±2.5	150.2±24.7

注:与对照组比,^a $P<0.05$ 。

3 讨论

黄芩素因其抗癌作用而引起越来越多的关注。现代分子药理学研究发现黄芩素可以抑制癌细胞增殖,诱导癌细胞凋亡及自噬性死亡,减少癌细胞转移等^[13]。到目前为止黄芩素已被证实在多种癌症中具有生物活性。在膀胱癌研究中黄芩素可通过抑制 CDC2 从而抑制肿瘤细胞生长激酶活性。在乳腺癌中,黄芩素可抑制癌细胞的黏附、迁移和侵袭,抑制基质金属蛋白酶的表达^[14]。黄芩素能够靶向 GTPa 介导自噬,可消除肝肿瘤始发的抗 mTORC1 抑制的干细胞样细胞。黄芩素还可以通过轴抑制 PDGF-BB 诱导的肝星状细胞增殖、凋亡、侵袭、迁移和活化^[15,16]。但是黄芩素调控细胞增殖、凋亡等生理作用的机制仍有待明确。

糖酵解是细胞在无氧条件下能量合成来源的关键途径,肿瘤利用糖酵解提高能量的方式称为 Warburg 效应^[17~19]。肿瘤糖酵解可以为肿瘤的快速生长提供充足的能量,糖酵解产物乳酸等也为促进肿瘤转移提供适宜的微环境^[20]。HKs 被认为是最重要糖酵解效应因子之一。此外除了葡萄糖,谷氨酰胺在提供合成代谢所需的碳和氮方面也起着重要作用。癌细胞吸收大量的葡萄糖,但大部分的碳源通

细胞活力、ATP 含量、乳酸水平等较对照组显著降低($P<0.05$)。黄芩素 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 加入无谷氨酰胺条件下的 siRNA HK2 细胞,细胞活力、ATP 含量、乳酸水平等与 siRNA HK2 组无显著差异($P>0.05$)。结果见表7。

过有氧糖酵解作用都生成了乳酸,而不是用于三羧酸(TCA)循环中。而谷氨酰胺可促进 TCA 循环,产生代谢中间产物,作为脂质、蛋白质和核酸的组成部分,这些物质对合成代谢的生长和增殖至关重要。TCA 循环是细胞有氧条件下的基础代谢途径,也是肿瘤细胞能量代谢的关键途径之一。值得注意的是,这些相同的代谢程序也被归因于促进与 T 细胞活化和增殖相关^[21]。肿瘤细胞特殊代谢的一个重要结果是创造了一个缺氧、酸性、缺乏营养的肿瘤微环境(TME),癌细胞的特殊代谢程序不仅促进肿瘤生长,而且可以阻断有效的抗肿瘤免疫反应的产生。但是黄芩素对肿瘤细胞能量代谢能力的影响及其对肿瘤细胞糖酵解及谷氨酰胺代谢的影响未知。

本研究通过采用不同人肝癌细胞 SMMC-7721、HepG2,通过给予不同浓度的黄芩素干预,明确其对肝癌细胞细胞 ATP 含量、乳酸含量及谷氨酰胺代谢的影响,同时分别采用 siRNA 干扰己糖激酶 2 (HK2)及溶质载体家族 1 中性氨基酸转运蛋白成员 5(SLC1A5)表达后,明确黄芩素对肝癌细胞增殖及能量代谢能力的影响。研究结果发现,不同浓度黄芩素可浓度依赖性抑制肝癌细胞活力,降低癌细胞能量代谢水平。黄芩素可显著抑制肝癌细胞中

HK2 的表达,抑制肝癌细胞糖酵解能力,同时可显著影响肝癌细胞谷氨酰胺能量代谢水平,从而影响细胞 TCA 循环。糖酵解及谷氨酰胺代谢是维持肿瘤细胞能量代谢的关键途径。作为重要的糖酵解酶,HKs 是糖代谢过程中第一个限速步骤,即促进葡萄糖磷酸化为葡萄糖-6-磷酸,其中 HK-2 在恶性肿瘤中高表达,并在 Warburg 表型的形成中起关键作用。HK-2 在各种癌症中均高表达,如肝癌、胃癌、卵巢癌、乳腺癌、宫颈癌、食管腺癌和鼻咽癌^[22~25]。将黄芩素给予敲除 HK2 的肝癌细胞联合培养后,黄芩素对肝癌细胞的糖酵解能力显著降低,但仍可抑制细胞能量代谢,该结果表明黄芩素还可以通过其他途径影响肿瘤细胞的能量代谢。糖酵解及谷氨酰胺参与的 TCA 循环是细胞能量代谢的两个关键途径,两者可相关影响。谷氨酰胺通过细胞中的转运蛋白 SLC1A5 运送到细胞中。在营养匮乏的条件下,癌细胞可以通过分解大分子获得谷氨酰胺。致癌基因 RAS 过度激活可以促进胞饮作用,癌细胞清除胞外蛋白,降解为包括谷氨酰胺在内的氨基酸,为癌细胞提供营养物质。而当黄芩素与敲除 SLC1A5 后的肝癌细胞联合培养后其肝癌细胞的能量代谢能力显著降低,但仍可抑制细胞能量代谢,该结果表明单一抑制糖酵解途径或 TCA 途径不能完全干预黄芩素对细胞能量代谢的影响。但将黄芩素与敲除 HK-2 的肝癌细胞且无谷氨酰胺条件下培养,其对肝癌细胞的能量代谢调节作用消失。因此,黄芩素可抑制肝癌细胞的增殖降低肝癌细胞能量代谢水平,其作用机制与其同时参与肝癌细胞糖酵解及谷氨酰胺代谢相关。

参 考 文 献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020 [J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70 (1): 7-30
- 2 Lortet-Tieulent J, Ferlay J, Bray F, et al. International patterns and trends in endometrial cancer incidence, 1978-2013 [J]. J Natl Cancer Inst, 2018, 110(4): 354-361
- 3 姜希红,刘树民. 黄芩药理作用及其化学物质基础研究[J]. 中国药师, 2020, 23(10): 2004-2010
- 4 单慧,杜胤骁,白鹤群,等. 黄芩素的研发进展及其临床药理学[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2020, 25(6): 701-708
- 5 杜忠良,崔东娟,王利萍. 黄芩素抑制 HepG2 肝癌细胞裸鼠移植瘤生长及其机制研究[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2020, 27(11): 848-854
- 6 敖鹏,陈晋,边晓燕,等. 黄芩素对人胰腺癌细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国药师, 2018, 21(7): 1154-1158
- 7 罗湘建,曹亚. 肿瘤能量代谢机制研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2011, 38(7): 585-592
- 8 Wang YF, Li T, Tang ZH, et al. Baicalein triggers autophagy and inhibits the protein kinase B/mammalian target of rapamycin pathway in hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Phytother Res, 2015, 29(5): 674-679
- 9 Xu Q, Liu L, Vu H, et al. Can galactose be converted to glucose in HepG2 cells? Improving the *in vitro* mitochondrial toxicity assay for the assessment of drug induced liver injury [J]. Chem Res Toxicol, 2019, 32(8): 1528-1544
- 10 Vozza A, Parisi G, De Leonadis F, et al. UCP2 transports C4 metabolites out of mitochondria, regulating glucose and glutamine oxidation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2014, 111(3): 960-965
- 11 Zhdanov AV, Waters AH, Golubeva AV, et al. Availability of the key metabolic substrates dictates the respiratory response of cancer cells to the mitochondrial uncoupling [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1837(1): 51-62
- 12 Li XX, He GR, Mu X, et al. Protective effects of baicalein against rotenone-induced neurotoxicity in PC12 cells and isolated rat brain mitochondria [J]. Eur J Pharmacol, 2012, 674(2-3): 227-233
- 13 宋超,刘霞,邵启祥,等. 黄芩素对肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响及 miR-34a 在其机制中的作用 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2011, 21(6): 470-475
- 14 Chao JI, Su WC, Liu HF. Baicalein induces cancer cell death and proliferation retardation by the inhibition of CDC2 kinase and survivin associated with opposite role of p38 mitogen-activated protein kinase and AKT [J]. Mol Cancer Ther, 2007, 6(11): 3039-3048
- 15 Wu R, Murali R, Kabe Y, et al. Baicalein targets gtpase-mediated autophagy to eliminate liver tumor-initiating stem cell-like cells resistant to mTORC1 inhibition [J]. Hepatology, 2018, 68(5): 1726-1740
- 16 Wu X, Zhi F, Lun W, et al. Baicalin inhibits PDGF-BB-induced hepatic stellate cell proliferation, apoptosis, invasion, migration and activation via the miR-3595/ACSL4 axis [J]. Int J Mol Med, 2018, 41(4): 1992-2002
- 17 Liberti MV, Locasale JW. The warburg effect: how does it benefit cancer cells? [J]. Trends Biochem Sci, 2016, 41(3): 211-218
- 18 Schwartz L, Supuran CT, Alfaraouk KO. The warburg effect and the hallmarks of cancer [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2017, 17(2): 164-170
- 19 Lebelo MT, Joubert AM, Visagie MH. Warburg effect and its role in tumourigenesis [J]. Arch Pharm Res, 2019, 42(10): 833-847
- 20 Gill KS, Fernandes P, O'Donovan TR, et al. Glycolysis inhibition as a cancer treatment and its role in an anti-tumour immune response [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1866(1): 87-105
- 21 Dyer A, Schoeps B, Frost S, et al. Antagonism of glycolysis and reductive carboxylation of glutamine potentiates activity of oncolytic adenoviruses in cancer cells [J]. Cancer Res, 2019, 79(2): 331-345
- 22 Tan VP, Miyamoto S. HK2/hexokinase-II integrates glycolysis and autophagy to confer cellular protection [J]. Autophagy, 2015, 11(6): 963-964
- 23 Lis P, Dyla M, Niedzwiecka K, et al. The HK2 dependent "warburg effect" and mitochondrial oxidative phosphorylation in cancer: targets for effective therapy with 3-bromopyruvate [J]. Molecules, 2016, 21(12): 1730-1745
- 24 Li S, Li J, Dai W, et al. Genistein suppresses aerobic glycolysis and induces hepatocellular carcinoma cell death [J]. Br J Cancer, 2017, 117(10): 1518-1528
- 25 Garcia SN, Guedes RC, Marques MM. Unlocking the potential of HK2 in cancer metabolism and therapeutics [J]. Curr Med Chem, 2019, 26(41): 7285-7322

(2021-03-10 收稿 2021-08-31 修回)