

·基础研究·

## 芩苳酰胺通过诱导口腔鳞癌细胞自噬抑制增殖

许小鸿<sup>1</sup>, 邹程<sup>2</sup>, 袁忠民<sup>3</sup>

(1. 广州医科大学附属第二医院口腔科; 2. 广州医科大学附属第二医院病理科; 3. 广州医科大学附属第二医院神经科学研究所, 广东 广州 510260)

**摘要:**【目的】探讨芩苳酰胺(PPLGM)对口腔癌存活的影响及机制。【方法】体外培养口腔鳞状细胞癌 Cal27 及 UM1 细胞株,经不同浓度的芩苳酰胺处理后,MTT 比色法检测芩苳酰胺对增殖的影响,蛋白质印迹法检测胞内微管相关蛋白轻链 3-I、3-II (LC3-I、LC3-II)、Beclin1、p62、雷帕霉素靶蛋白(mTOR)及 ribosomal S6 (S6) 的表达或活性变化;用自噬抑制剂 3-Methyladenine (3-MA) 或者 Bafilomycin A1 (BAFA1) 和芩苳酰胺共处理细胞后,检测 LC3-II、p62 表达和细胞活力。【结果】与对照组比较,芩苳酰胺显著抑制 Cal27 及 UM1 细胞株增殖能力,呈浓度及时间依赖性( $P<0.05$ );Western blot 结果显示,不同浓度(1.0、3.0 和 5.0  $\mu\text{mol/L}$ )芩苳酰胺处理细胞均使 LC3-I、LC3-II 表达水平显著高于对照组( $P<0.05$ ),而 Beclin1 和 p62 表达低于对照组( $P<0.05$ );芩苳酰胺处理组中 p-mTOR 和 p-S6 磷酸化水平显著低于对照组( $P<0.05$ );与单独芩苳酰胺处理比较,3-MA 和芩苳酰胺共处理使胞内 LC3-I 和 LC3-II 表达水平明显下降,p62 表达升高( $P<0.05$ ),但 BAFA1 和芩苳酰胺共处理使细胞内 p62 表达升高( $P<0.05$ ),LC3-II 表达水平无明显改变;3-MA 和 BAFA1 处理都能拮抗芩苳酰胺对细胞活力的抑制效应。【结论】芩苳酰胺通过抑制 mTOR/S6 通路活性诱导口腔鳞癌细胞发生自噬,进而抑制增殖。

**关键词:** 芩苳酰胺; 口腔鳞状细胞癌; 自噬; LC-3; mTOR

中图分类号: R739.85

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(2021)04-0543-07

DOI: 10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ.(med.sci).2021.0409

## Piperlongumine Suppresses Proliferation of Oral Squamous Cell Carcinoma via Promoting Autophagy

XU Xiao-hong<sup>1</sup>, ZHI Cheng<sup>2</sup>, YUAN Zhong-min<sup>3</sup>

(1. Department of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China; 2. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China; 3. Institute of Neuroscience, The Second Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China)

Correspondence to: YUAN Zhong-min; E-mail: yzm@gzhmu.edu.cn

**Abstract:** 【Objective】 To explore the effect of piperlongumine (PPLGM) on the proliferation of oral squamous cell carcinoma (OSCC) cells and the potential mechanism involved. 【Methods】 OSCC cell lines Cal-27 and UM1 cultured in vitro were treated with PPLGM at different doses and time courses. Then the viability of Cal-27 and UM1 cells was evaluated by MTT assay and the expression of LC3-I, LC3-II, Beclin1, p62 and the phosphorylation of mTOR and S6K were determined by Western blot. Autophagy inhibitors 3-Methyladenine (3-MA) at 100 nmol/L and Bafilomycin A1 (BAFA1) at 400 nmol/L were administrated to observe the rescued effects on the PPLGM-treated cells. 【Results】 PPLGM treatment caused a dose- and time-dependent inhibition on the viability of both Cal-27 and UM1 cells ( $P<0.05$ ). Western blot results showed the expression levels of LC3-I and LC3-II in PPLGM (1.0, 3.0, 5.0  $\mu\text{mol/L}$ ) group were significantly high-

收稿日期: 2020-11-12

基金项目: 广东省中医药局基金(20181158); 广州市科学技术局基金(202002020088)

作者简介: 许小鸿, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 抑制舌鳞癌细胞生长的药物筛选及机制研究, E-mail: Mr.xuxiaohong@outlook.com; 袁忠民, 通信作者, 研究员, E-mail: yzm@gzhmu.edu.cn

er ( $P < 0.05$ ) and p62 expression levels were lower ( $P < 0.05$ ) compared with the control group. PPLGM treatment at 3.0 or 5.0  $\mu\text{mol/L}$  caused a significant decrease of p-mTOR and p-S6 ( $P < 0.05$ ). Autophagy inhibitors 3-MA significantly rescued PPLGM-induced increase of LC3-I, LC-3 II and decrease of p62, while BAFA1 just recovered PPLGM-caused decrease of p62. Both 3-MA and BAFA1 could effectively rescue PPLGM-mediated inhibitory effects on the viability of cells. 【Conclusion】 PPLGM suppresses the viability of OSCC cells through promoting mTOR activity loss-dependent autophagy.

**Key words:** piperlongumine; oral squamous cell carcinoma; autophagy; LC3; mTOR

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2021, 42(4): 543-549]

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是一种常见的头颈部恶性肿瘤,占全身恶性肿瘤的3%,口腔恶性肿瘤的90%,具有浸润性生长、局部转移、高复发率及预后差等特点,恶性肿瘤排名第六<sup>[1-3]</sup>。虽然手术切除联合放疗、新辅助化疗、靶向生物治疗等在诊断和临床治疗方面取得了巨大进展,但OSCC患者总体生存率仅略有提高,3年生存率为50%~75%,5年生存率约为50%<sup>[4]</sup>。因此,寻求早期诊断和靶向治疗OSCC的新策略,成为提高此类患者预后和生存率的关键<sup>[5-6]</sup>。自噬是真核生物进化上保守的能量代谢循环过程,它可以降解细胞内大分子物质和受损的细胞器来维持内环境稳态,是细胞生长发育、成熟分化及死亡的重要调控机制<sup>[7]</sup>。同时,自噬也是一种重要的细胞损伤机制,通过诱导自噬发生甚至引起自噬性死亡,发挥抗肿瘤作用<sup>[8]</sup>。茛菪酰胺(piperlongumine, PPLGM)是胡椒科植物的生物活性成分,具有抗血小板凝集、抗焦虑、抗抑郁等多种药理学作用<sup>[9]</sup>。近年来,PPLGM的抗肿瘤作用得到格外关注,它对前列腺癌、结肠癌、肺腺癌、肝癌和黑色素瘤等恶性肿瘤都具有显著的抑制作用<sup>[10-13]</sup>。本文以口腔鳞状细胞癌Cal27及UM-1细胞为研究对象,探究PPLGM对口腔鳞状细胞癌细胞自噬的作用及机制,为将PPLGM作为治疗口腔鳞状细胞癌潜在药物提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

人口腔鳞癌细胞株Cal27及UM1购自上海细胞生物研究所中国科学院细胞库。胎牛血清、0.25%胰酶购于Invitrogen公司。高糖培养基DMEM购于Invitrogen。茛菪酰胺(PPLGM)购自Selleck公司。Anti-Beclin1、anti-p62、anti-LC3、anti-p-mTOR、anti-mTOR、anti-p-S6和anti-GAPDH均购于Cell Signaling Technology。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将Cal27及UM1细胞置于体积分数100 ml/L胎牛血清、高糖DMEM液体培养液,37℃、体积分数5% CO<sub>2</sub>及饱和湿度条件下培养,每3~5 d用胰酶消化传代1次。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 MTT比色法检测茛菪酰胺对Cal27及UM1细胞增殖的影响 收集对数期细胞,调整细胞悬液浓度,铺96孔板,每组设6个复孔,每孔加入100  $\mu\text{L}$ 细悬液;体积分数5% CO<sub>2</sub>,37℃孵育24 h后,换含有溶剂、不同浓度PPLGM(3、6和12  $\mu\text{mol/L}$ )的培养基或换含有溶剂,每组分别在培养24、48和72 h后,每孔加入10  $\mu\text{L}$  MTT溶液(5 mg/mL),继续培养4 h。终止培养,小心吸去孔内培养液。每孔加入100  $\mu\text{L}$ 二甲基亚砜,置摇床上低速振荡10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪OD 490 nm处测量各孔的吸光值,数值控制在0.1~0.7之间。细胞计数方法:将细胞等比稀释后求出线性回归方程, $R > 0.95$ 。根据回归方程算出每个样本的细胞数,然后计算均值和标准差。相对细胞数=处理组细胞/对照组细胞数。

1.2.3 免疫印迹法检测茛菪酰胺对Cal27及UM1细胞增殖的影响 参考已发表文献<sup>[6]</sup>。不同浓度PPLGM(3及6  $\mu\text{mol/L}$ )作用Cal27及UM-1细胞,37℃培养箱培养24 h后,每孔PBS 2 mL漂洗2遍,每孔加入150  $\mu\text{L}$  IP细胞裂解液(50 mmol/L Tris, HCl pH8.0, 150 mmol/L NaCl, 1% Triton X-100, 100  $\mu\text{g/mL}$  PMSF),10 min后收集各组细胞。按照IP裂解液法提取细胞总蛋白,并进行BCA法测定蛋白浓度。灌制4%集成胶和10%分离胶。200 V电压电泳45 min。100 V电压转膜60 min。50 g/L脱脂奶粉室温封闭1 h。一抗(Anti-Beclin1 1:1 000、anti-LC3 1:1 000、anti-mTOR 1:1 000、anti-p-mTOR 1:1 000、anti-p-s6K 1:1 000和anti-GAPDH 1:5 000)4℃孵育过夜,HRP标记抗兔或抗鼠室温孵育1 h。ECL化学发光后曝光。

### 1.3 统计学分析

用 SPSS 20.0 统计分析软件包进行数据处理, 所有数据以  $(\bar{x} \pm s)$  表示, 多样本间比较采用单因素方差分析 one-way ANOVA, 方差分析有统计学意义时采用 Bonferroni 法进行两两比较。两组间比较采用独立样本 *t* 检验。  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 茛菪酰胺对 Cal27 及 UM1 细胞株增殖的影响

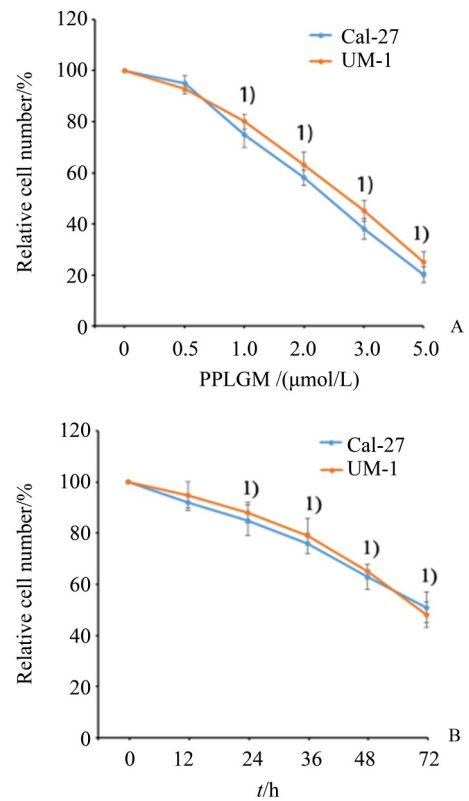
**2.1.1 不同浓度茛菪酰胺对 Cal27 及 UM1 细胞株增殖的影响** 不同浓度 (0.5、1.0、2.0、3.0 和 5.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 Cal27 及 UM1 细胞 72 h, 然后 MTT 比色分析法测定统计相对细胞数。随着 PPLGM 浓度增加, Cal27 及 UM1 细胞数逐渐减少, 呈浓度依赖关系, 差异有统计学意义 (Cal27:  $F=196.859$ ,  $P=0.000$ , UM1:  $F=314.018$ ,  $P=0.000$ ; 图 1)。采用 Bonferroni 法进一步作两两比较, 发现 Cal27 细胞药物浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 余组间两两比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 而 UM1 细胞组间两两比较, 除药物浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组及药物浓度为 0.5  $\mu\text{mol/L}$  组与 1.0  $\mu\text{mol/L}$  比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 余组间两两比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

**2.1.2 不同作用时间茛菪酰胺对 Cal27 及 UM1 细胞株增殖的影响** 同对照比, 3.0  $\mu\text{mol/L}$  PPLGM 使细胞数减少约 50%。采用 3.0  $\mu\text{mol/L}$  PPLGM 处理细胞, 24 h 后细胞数显著少于对照组, 随着处理时间增加, 细胞数越来越少, 差异有统计学意义 (Cal27:  $F=187.723$ ,  $P=0.000$ ; UM1:  $F=113.237$ ,  $P=0.000$ )。采用 Bonferroni 法进一步作两两比较, Cal27 各组间两两比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); UM1 细胞组间两两比较, 除作用时间为 12 h 组与各组比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 余组间两两比较均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。以上结果表明, PPLGM 能抑制口腔癌 Cal27 及 UM1 细胞的增殖活力。

### 2.2 茛菪酰胺诱导口腔鳞状细胞癌细胞发生自噬

不同浓度 PPLGM (1.0、3.0 和 5.0  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 Cal27 和 UM1 细胞 24 h 后收集蛋白。与对照组相比, PPLGM 处理使 LC3-I 和 LC3-II 表达增加, 而 Beclin-1 和 p62 蛋白降低, 差异具有统计学意义 (图 2)。

PPLGM 处理 Cal27 细胞株 LC3-I、LC3-II、



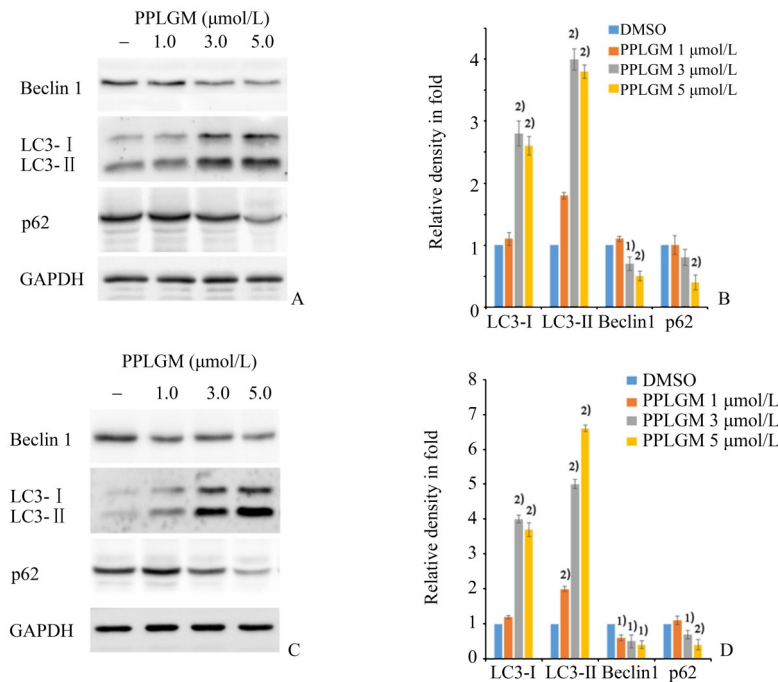
A: Cal27 or UM1 cells were treated with different concentrations of Piperlongumine (PPLGM) and cell proliferation was determined by MTT assay after 72 h. 1)  $P < 0.05$  vs. the control group or the front group. B: Cal27 or UM1 cells were treated with PPLGM at 3.0  $\mu\text{mol/L}$  for different durations and cell proliferation was determined by MTT assay. 1)  $P < 0.05$  vs. the control group or the front group.

图1 茛菪酰胺抑制口腔鳞状细胞癌细胞增殖

Fig. 1 PPLGM suppresses the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells

Beclin-1 和 p62 统计结果分别为:  $F=114.949$ ,  $P=0.000$ 。除 1.0  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组比较无统计学意义 ( $P_{\text{LC3-I}} > 0.05$ ), 余组间两两比较均  $P_{\text{LC3-I}} < 0.05$ 。除 1.0  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组比较无统计学意义 ( $P_{\text{LC3-II}} > 0.05$ ), 余组间两两比较均有统计学意义 ( $P_{\text{LC3-II}} < 0.05$ )。除药物浓度为 1.0  $\mu\text{mol/L}$  组与对照及 3.0  $\mu\text{mol/L}$  组与 5.0  $\mu\text{mol/L}$  组比较无统计学意义外 ( $P_{\text{Beclin-1}} > 0.05$ ), 余组间两两比较均有统计学意义 ( $P_{\text{Beclin-1}} < 0.05$ )。药物浓度 5.0  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组与 5.0  $\mu\text{mol/L}$  组与 1.0  $\mu\text{mol/L}$  组比较具有统计学意义 ( $P_{\text{p62}} < 0.05$ ), 其余组间比较无统计学意义 ( $P_{\text{p62}} > 0.05$ )。

PPLGM 处理 UM1 细胞株 LC3-I、LC3-II、Beclin-1 和 p62 统计结果:  $F=21.111$ ,  $P=0.000$ 。药物浓度 5.0  $\mu\text{mol/L}$  组与对照组、1.0  $\mu\text{mol/L}$  及 3.0



PPLGM induces autophagy in both Cal27(A) and UM1(C). Cal27 or UM1 cells were incubated with PPLGM at the indicated concentration for 24 hours and following Western blot was performed to detect the expression levels of Beclin-1, LC3 and p62. GAPDH was detected as a loading control. B and D. The relative density of each was analyzed by ImageJ software. 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ .

图2 萆菱酰胺促进 Cal27 和 UM1 自噬

Fig. 2 PPLGM promotes autophagy in Cal27 and UM1

$\mu\text{mol/L}$  比较具有统计学意义 ( $P_{\text{LC3-I}} < 0.05$ ); 其余组间比较无统计学意义 ( $P_{\text{LC3-I}} > 0.05$ )。除药物浓度为  $1.0 \mu\text{mol/L}$  组与对照组比较无统计学意义外 ( $P_{\text{LC3-II}} > 0.05$ ), 余组间两两比较均有统计学意义 ( $P_{\text{LC3-II}} < 0.05$ )。  $1.0 \mu\text{mol/L}$  组和  $5.0 \mu\text{mol/L}$  组与对照组比较具有统计学意义 ( $P_{\text{Beclin-1}} < 0.05$ ), 其余组间比较无统计学意义 ( $P_{\text{Beclin-1}} > 0.05$ )。除药物浓度为  $1.0 \mu\text{mol/L}$  组与对照组比较无统计学意义外 ( $P_{\text{p62}} > 0.05$ ), 余组间两两比较均有统计学意义 ( $P_{\text{p62}} < 0.05$ )。

### 2.3 萆菱酰胺通过抑制 mTOR 信号通路诱导自噬

为了探讨 PPLGM 引起自噬的机制, 我们首先检测 PPLGM 是否通过影响 mTOR 信号通路活性, 该信号通路活性改变与细胞自噬发生密切相关。将不同浓度 PPLGM ( $1.0$ 、 $3.0$  和  $5.0 \mu\text{mol/L}$ ) 处理两株细胞 24 h 后收集蛋白, 进行 Western blot 检测。如图 3 结果所示, 与对照组相比, PPLGM 处理未使 mTOR 总蛋白发生明显变化 (Cal27:  $F_{\text{mTOR}}=2.672$ ,  $P_{\text{mTOR}}=0.118$ 。UM-1:  $F_{\text{mTOR}}=1.769$ ,  $P_{\text{mTOR}}=0.231$ ), 但 p-mTOR 磷酸化水平显著下降, 其下游底物 p-S6 也随之而降, 差异具有统计学意义。

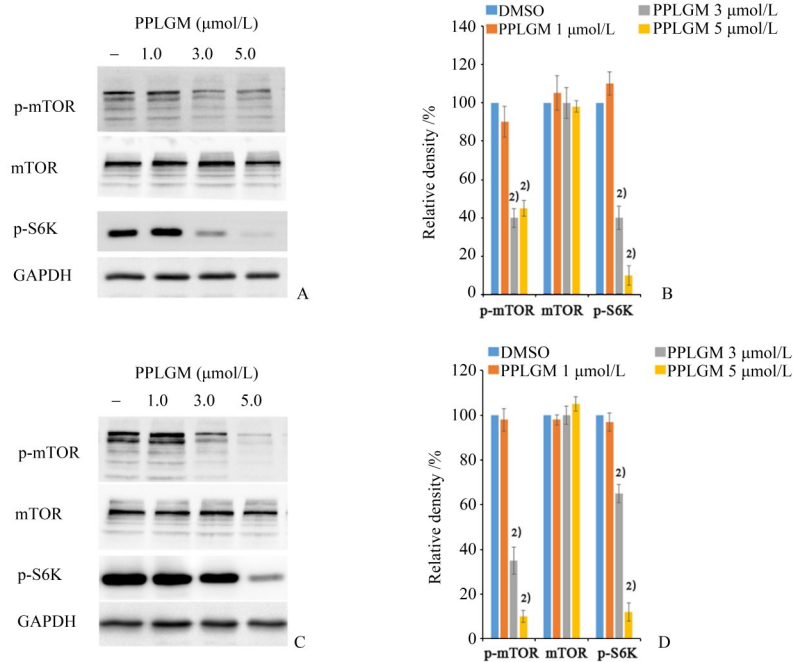
不同浓度 PPLGM ( $1.0$ 、 $3.0$  和  $5.0 \mu\text{mol/L}$ ) 处理

Cal27 后 p-mTOR 水平比较,  $F=6.114$ ,  $P=0.018$ 。对照组、药物浓度为  $1.0 \mu\text{mol/L}$  组分别与  $3.0 \mu\text{mol/L}$  组及  $5.0 \mu\text{mol/L}$  组比较有统计学意义 ( $P_{\text{p-mTOR}} < 0.05$ ), 余组间两两比较均无统计学意义 ( $P_{\text{p-mTOR}} > 0.05$ )。除药物浓度为  $1.0 \mu\text{mol/L}$  组与对照组及  $3.0 \mu\text{mol/L}$  组与  $5.0 \mu\text{mol/L}$  组比较无统计学意义外 ( $P_{\text{p-S6K}} > 0.05$ ), 余组间两两比较均有统计学意义 ( $P_{\text{p-S6K}} < 0.05$ )。

不同浓度 PPLGM ( $1.0$ 、 $3.0$  和  $5.0 \mu\text{mol/L}$ ) 处理 UM1 后,  $F=60.523$ ,  $P=0.000$ 。除药物浓度为  $1.0 \mu\text{mol/L}$  组与对照组及  $3.0 \mu\text{mol/L}$  组与  $5.0 \mu\text{mol/L}$  组比较无统计学意义外 ( $P_{\text{p-mTOR}} > 0.05$ ), 余组间两两比较均有统计学意义 ( $P_{\text{p-mTOR}} < 0.05$ )。药物浓度为  $1.0 \mu\text{mol/L}$  和  $3.0 \mu\text{mol/L}$  组与对照组及  $1.0 \mu\text{mol/L}$  组与  $3.0 \mu\text{mol/L}$  组比较无统计学意义外 ( $P_{\text{p-S6K}} > 0.05$ ), 余组间两两比较均有统计学意义 ( $P_{\text{p-S6K}} < 0.05$ )。这些结果表明 PPLGM 通过下调 mTOR/S6 通路活性引起 Cal27 和 UM-1 细胞发生自噬。

### 2.4 自噬抑制剂 3-MA 或 BAFA1 阻断萆菱酰胺诱导的自噬信号通路

细胞接受自噬诱导信号后, 在胞浆里形成自噬体 (autophagosome), 这个过程中 LC3-II 的生成是



PPLGM treatment leads to a decrease of p-mTOR and p-S6K activity in Cal27(A) and UM1(C) cells. Cal27 or UM1 cells were incubated with PPLGM at the indicated concentration for 24 h and following Western blot was performed to detect the levels of p-mTOR, mTOR and p-S6K. GAPDH was detected as a loading control. B and D: The relative density of each band was analyzed by ImageJ software. 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ .

图3 萜萘酰胺抑制 p-mTOR 及 p-S6 磷酸化

Fig. 3 PPLGM treatment causes a decrease of p-mTOR and p-S6

关键标志。自噬体形成后,可与溶酶体融合,自噬体中的内容物随即被降解,产物(氨基酸、脂肪酸等)被输送到胞浆中,供细胞重新利用,而残渣或被排出细胞外或滞留在胞浆中,这个阶段 p62 的降解是标志性事件之一。这两个过程统称为自噬流。于是,我们分别用自噬流两个阶段的抑制剂 3-MA (抑制 LC3- II 生成)或 BAFA1 (抑制 p62 降解),检测能否阻断 PPLGM 引起的自噬流。见图 4 所示,3-MA 和 PPLGM 共处理细胞 24 h,会显著抑制 LC3- II 表达和 p62 的降解。

3-MA 和 PPLGM 共处理 Cal27 细胞 ( $P=0.001$ ;  $P=0.000$ )。3-MA 和 PPLGM 共处理 UM1 细胞 ( $P=0.885$ ;  $P=0.001$ ),而 BAFA1 仅能抑制 p62 的降解 ( $P=0.000$ ;  $P=0.000$ )。这些结果进一步证明 PPLGM 可引起 Cal27 和 UM-1 细胞发生完整的自噬流。

### 2.5 自噬抑制剂 3-MA 或 BAFA1 可阻断萜萘酰胺的抑制增殖效应

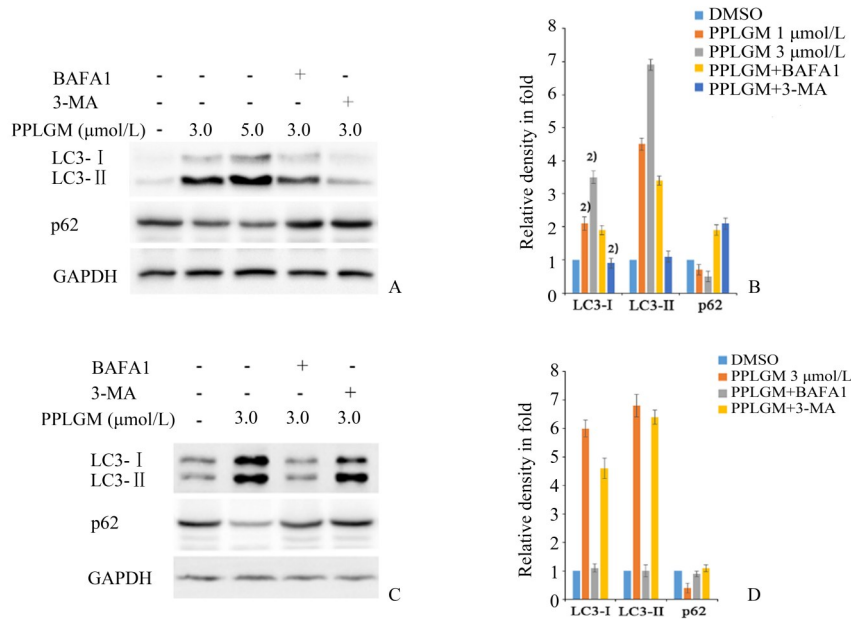
为了证明 PPLGM 引起的自噬是否导致增殖抑制,我们将 3-MA 或 BAFA1 和 PPLGM 共处理细胞 72 h,用 MTT 检测细胞增殖情况。图 5 结果显示,与单独 PPLGM 处理比较,3-MA 或 BAFA1 会显著恢复 PPLGM 对细胞增殖的抑制作用。Cal27 细胞:

$F=157.446$ ,  $P=0.000$ 。除 PPLGM+BAFA 组与 PPLGM+3-MA 组比较无统计学意义外 ( $P_{\text{Cal}} > 0.05$ ),余组间两两比较均有统计学意义 ( $P_{\text{Cal}} < 0.05$ )。Um1 细胞:  $F=133.649$ ,  $P=0.000$ 。除 PPLGM+BAFA 组与 PPLGM+3-MA 组比较无统计学意义外 ( $P_{\text{Um1}} > 0.05$ ),余组间两两比较均有统计学意义 ( $P_{\text{Um1}} < 0.05$ )。这些结果表明 PPLGM 通过引起自噬抑制细胞生长。

## 3 讨论

口腔鳞状细胞癌作为危害人类健康和生命常见的恶性肿瘤之一,严重影响患者的生存质量和精神状态<sup>[14]</sup>。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<sup>[1,4]</sup>。因此,寻找更有效但毒性较小的新型抗肿瘤制剂逐渐成为研究热点。

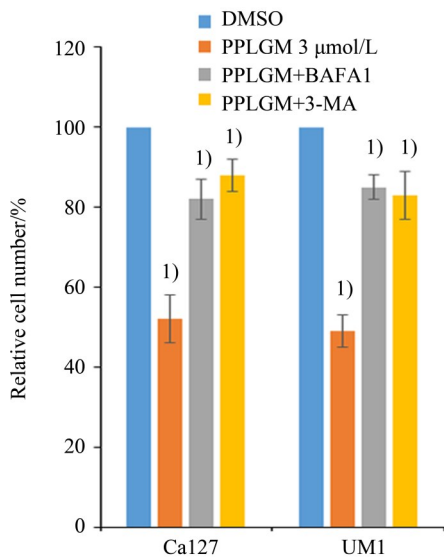
作为抗肿瘤药物的有效来源,天然药物在肿瘤的治疗中发挥了重要作用。PPLGM 属生物碱类化合物,具有广泛的生物学活性,对多种肿瘤细胞具有较强的杀伤力且对正常细胞、组织、器官无明显毒副作用<sup>[3,15]</sup>,但 PPLGM 是否能抑制口腔鳞癌细胞



Autophagy inhibitor 3-MA or BAFA1 rescues PPLGM-induced autophagy in Cal27(A) and UM1(C) cells. Cal27 or UM1 cells were incubated with 3.0 μmol/L PPLGM in the present or absent of 100 nmol/L 3-MA or 400 nmol/L BAFA1 for 24 h and following Western blot was performed to detect the levels of LC3-I, LC3- II and p62. GAPDH was detected as a loading control. B and D: The relative density of each band was analyzed by ImageJ software. 1)  $P < 0.05$ ; 2)  $P < 0.01$ .

图4 3-MA或BAFA1可抑制萆菱酰胺引起的自噬

Fig. 4 The inhibitor 3-MA or BAFA1 rescues PPLGM-induced autophagy



Notes: Autophagy inhibitor 3-MA or BAFA1 rescues PPLGM-induced growth arrest in Cal27 and UM1 cells. Cal27 or UM1 cells were incubated with 3.0 μmol/L PPLGM in the present or absent of 50 nmol/L 3-MA or 1 μmol/L BAFA1 for 72 h and following MTT was performed to detect the proliferation of cells. 1)  $P < 0.05$ .

图5 3MA或BAFA1可拮抗萆菱酰胺对增殖的抑制效应  
Fig. 5 3MA or BAFA1 rescues PPLGM-caused inhibition on proliferation

增殖及相关机制尚未见报道。本课题组研究了PPLGM抑制口腔鳞癌细胞株 Cal27 和 UM1 细胞增殖的作用。MTT 分析法结果显示, PPLGM 明显抑制 Cal27 和 UM1 细胞的增殖, 并随着浓度和时间的增加而增强。进一步研究发现 PPLGM 通过抑制口腔鳞状细胞癌自噬导致细胞增殖活力减弱。据我们所知, 这是首次验证 PPLGM 对口腔鳞癌细胞增殖的抑制作用。

自噬是一种保守的细胞内降解通路, 通过形成自噬体并与溶酶体融合, 从而将细胞内大分子及细胞器进行降解, 以维持细胞稳态<sup>[16]</sup>。自噬是一把双刃剑, 根据细胞环境和功能状态的不同, 可提高细胞活力, 或诱导细胞程序性死亡<sup>[17]</sup>。自噬活化时, LC3-I 酯化形成 LC3-II 型蛋白, 并定位于自噬泡, 因此其水平在一定程度上反映了自噬体的数量和自噬的程度, 也常作为自噬发生的一个指标<sup>[18]</sup>。本研究结果发现, PPLGM 可明显增加 Cal27 和 UM1 细胞 LC3-II 蛋白的表达量, 而 3-MA 和 BAFA1 能阻断的 PPLGM 引起的自噬效应和抑制增殖效应。以上结果提示, PPLGM 诱导 Cal27 和 UM1 细胞发生自噬是其发挥抑制口腔鳞癌细胞增殖的关键机制之一。

PI3K/mTOR 信号通路是调控自噬的经典通路

之一。mTOR 活性抑制可诱导 ULK1 蛋白磷酸化, 促进 LC3、Beclin1 等自噬蛋白的招募, 诱导自噬的发生<sup>[13, 18-19]</sup>。磷酸化 S6 核糖体蛋白 (p-S6) 是 mTOR 信号通路下游执行功能的关键靶蛋白, 当 mTOR 信号通路异常激活时, 下游通路将接收持续的刺激信号, 异常激活靶蛋白 p-S6, 影响下游效应分子的改变, 引起细胞持续增殖, 导致肿瘤形成<sup>[20-21]</sup>。本文研究发现, PPLGM 能显著降低 p-

mTOR 及 p-S6K 磷酸化水平, 表明 PPLGM 通过调控 mTOR 信号通路调控 Cal27 和 UM1 细胞自噬。

综上所述, PPLGM 能抑制口腔癌 Cal27 和 UM1 细胞增殖; 同时, 升高 LC3-II 的蛋白表达水平及降低 p-mTOR 和 p-s6 表达水平, 诱导口腔癌细胞自噬, 从而导致细胞增殖活力下降。本文研究为将 PPLGM 用于治疗口腔鳞状细胞癌提供了实验证据。

### 参考文献

- [1] Chow L. Head and neck cancer [J]. *N Engl J Med*, 2020, 382(1):60-72.
- [2] Sarode GS, Sarode SC, Maniyar N, et al. Oral cancer databases: A comprehensive review [J]. *J Oral Pathol Med*, 2018, 47(6): 547-556.
- [3] Shield KD, Ferlay J, Jemal A, et al. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 51-64.
- [4] Polverini P, Lingen M. A History of innovations in the diagnosis and treatment of oral and head and neck cancer [J]. *J Dent Res*, 2019, 98(5): 489-497.
- [5] Sasahira T, Kirita T. Hallmarks of cancer related newly prognostic factors of oral squamous cell carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): E2413.
- [6] 邹程, 袁忠民, 赖妙玲, 等. 口腔鳞状细胞癌中 Tip60 (KAT5) 的表达及其相关性分析 [J]. *中山大学学报 (医学科学版)*, 2020, 41(1): 112-117.  
Zhi C, Yuan ZM, Lai ML, et al. Expression of Tip60 (KAT5) in oral squamous cell carcinoma and their correlation [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2020, 41(1): 112-117.
- [7] Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) [J]. *Autophagy*, 2016, 12(1): 1-222.
- [8] Amaravadi RK, Kimmelman AC, Debnath J. Targeting autophagy in cancer: recent advances and future directions [J]. *Cancer Discov*, 2019, 9(9): 1167-1181.
- [9] Tripathi SK, Biswal BK. Piperlongumine, a potent anti-cancer phytotherapeutic: Perspectives on contemporary status and future possibilities as an anticancer agent [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 156: 104772.
- [10] Gagat M, Hałas-Wiśniewska M, Zielińska W, et al. The effect of piperlongumine on endothelial and lung adenocarcinoma cells with regulated expression of profilin-1 [J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 8275-8292.
- [11] Dai F, Yuan CH, Ji Y, et al. Keto-enol-based modification on iperlongumine to generate a potent Cu(II) ionophore that triggers redox imbalance and death of HepG2 cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 120: 124-132.
- [12] Makhov P, Golovine K, Teper E, et al. Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signalling and mediates cancer cell death [J]. *Br J Cancer*, 2014, 110(4): 899-907.
- [13] Harsha C, Banik K, Ang HL, et al. Targeting AKT/mTOR in oral cancer: mechanisms and advances in clinical trials [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3285.
- [14] 陈洋, 刘佳梦, 冯崇锦. 人远端上游原件结合蛋白在舌癌组织中的表达及其与临床病理参数和预后的关系 [J]. *中山大学学报 (医学版)*, 2018, 39(3): 393-399.  
Cheng Y, Liu JM, Feng CJ. Far upstream element-binding protein 1 (Fubp1) expression in tongue carcinoma and its relationship with the clinicopathological parameters and prognosis [J]. *J Sun Yat-sen Univ (Med Sci)*, 2018, 39(3): 393-399.
- [15] Bezerra DP, Pessoa C, de Moraes MO, et al. Overview of the therapeutic potential of piperlongumine [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2013, 48(3): 453-463.
- [16] Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(6): 349-364.
- [17] Levy J, Towers C, Thorburn A. Targeting autophagy in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2017, 17(9): 528-542.
- [18] Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer [J]. *Mol Cancer*, 2020, 19(1): 12.
- [19] Xiang H, Zhang J, Lin C, et al. Targeting autophagy-related protein kinases for potential therapeutic purpose [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2020, 10(4): 569-581.
- [20] Murugan AK. mTOR: Role in cancer, metastasis and drug resistance [J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 92-111.
- [21] Liu GY, Sabatini DM. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2020, 21(4): 183-203.

(编辑 余菁)