doi:10.11659/jjssx.08E022111

·基础研究·

迷迭香酸通过PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制喉癌细胞的增殖和迁移

延 青,杨花荣,王娜娜 (延安大学附属医院鼻咽喉科,陕西 延安 716000)

[摘 要] **目的** 探讨迷迭香酸(RA)对喉鳞状细胞癌(LSCC)细胞增殖、迁移的影响,并分析其潜在机制。**方法** 取对数生长期的Hep-2和TU686细胞,分为对照组(未处理的Hep-2和TU686细胞)、低剂量组(20 μmol/L的RA处理)、中剂量组(50 μmol/L的RA处理)、高剂量组(100 μmol/L的RA处理)、胰岛素生长因子1(IGF-1)组(10 nmol/mL IGF-1处理)、IGF-1+RA组(100 μmol/L的RA与10 nmol/mL IGF-1同时处理)。倒置显微镜观察各组Hep-2和TU686细胞形态;CCK-8法检测各组Hep-2和TU686细胞增殖能力;细胞划痕实验检测各组Hep-2和TU686细胞迁移能力;Western blot检测各组Hep-2和TU686细胞中Ki-67、MMP-2、MMP-9及PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白的表达。**结果** RA可显著抑制Hep-2和TU686细胞的增殖、迁移,降低Ki-67、MMP-2、MMP-9蛋白表达和p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR水平($P<0.05$);IGF-1可有效逆转RA对Hep-2和TU686细胞增殖、迁移以及PI3K/AKT/mTOR信号通路的抑制作用($P<0.05$)。**结论** RA可能通过PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制LSCC细胞的增殖和迁移。

[关键词] 迷迭香酸;PI3K/AKT/mTOR信号通路;喉鳞状细胞癌;细胞增殖;细胞迁移
[中图分类号] R739.65 [文献标识码] A [收稿日期] 2022-08-19

Rosmarinic acid inhibits the proliferation and migration of laryngeal carcinoma cells through the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway

YAN Qing, YANG Hua-rong, WANG Na-na (Department of Rhinolaryngology, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an Shaanxi 716000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of rosmarinic acid (RA) on the proliferation and migration of laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) cells, and analyze its underlying mechanism. **Methods** Hep-2 and TU686 cells in logarithmic growth phase were taken and divided into control group (untreated Hep-2 and TU686 cells), low-dose group (treated with 20 μmol/L RA), middle-dose group (treated with 50 μmol/L RA), high-dose group (treated with 100 μmol/L RA), insulin-like growth factor 1 (IGF-1) group (treated with 10 nmol/L IGF-1) and IGF-1+RA group (co-treated with 100 μmol/L RA and 10 nmol/mL IGF-1). Inverted microscope was used to observe the morphology of Hep-2 and TU686 cells in each group; CCK-8 method was used to detect the proliferation of Hep-2 and TU686 cells in each group; scratch wound healing assay was used to detect the migration ability of Hep-2 and TU686 cells in each group; Western blot was used to detect the expression of Ki-67, MMP-2, MMP-9 and PI3K/pAKT/mTOR signaling pathway-related proteins in Hep-2 and TU686 cells of each group. **Results** RA could significantly inhibit the proliferation and migration of Hep-2 and TU686 cells, reduce the protein expression of Ki-67, MMP-2, MMP-9 and the levels of p-PI3K/PI3K, p-AKT/AKT, and p-mTOR/mTOR ($P<0.05$); IGF-1 could effectively reverse the inhibitory effect of RA on Hep-2 and TU686 cell proliferation, migration and PI3K/AKT/mTOR signaling pathway ($P<0.05$). **Conclusion** RA may inhibit the proliferation and migration of LSCC cells through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway.

Keywords: rosmarinic acid;PI3K/AKT/mTOR signaling pathway;laryngeal squamous cell carcinoma;cell proliferation;cell migration

喉癌是头颈部最常见的恶性肿瘤之一,主要病理类型为喉鳞状细胞癌(laryngeal squamous cell carcinoma,LSCC)。由于该病早期通常无明显临床症状,大多数LSCC患者就诊时已处于具有高侵袭性的晚期阶段[1]。尽管手术和放疗可以延长LSCC患者的生存期,但仍有约30%的患者出现复发或转移。肿瘤侵袭转移是导致LSCC患者生存率低的主要原因[2-3]。因此,迫切需要寻找更有效的治疗策略。迷迭香酸(rosmarinic acid,RA)是一种常见于唇形科植物中的酚类化合物[4],具有抗癌活性,能有效抑制肝癌[5]、乳腺癌[6]细胞的增殖和迁移,还可以调节与细胞增殖、侵袭相关的信号通路。据报道,RA可通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制肝癌细胞的增殖和侵袭[7]。但RA是否能通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路抑制LSCC细胞恶性进展仍不清楚。因此,本研究主要通过观察RA对LSCC细胞增殖和迁移的影响,分析其潜在机制。

[基金项目] 延安市科技计划项目(2016HM-04-06)
[通信作者] 王娜娜,E-mail:471296431@qq.com

1 材料与方法

1.1 药物及细胞

RA(批号:M-024)购自成都瑞芬思生物科技有限公司,纯度≥98%。人LSCC细胞系Hep-2(批号:CCL-23)购自美国ATCC细胞库;人LSCC细胞系TU686(批号:A3079)购自上海酶研生物科技有限公司。

1.2 主要试剂及仪器

CCK-8试剂盒(批号:210508)购自北京索莱宝科技有限公司;细胞总蛋白提取试剂盒(批号:20200815)购自上海雅酶生物医药科技有限公司;BCA试剂盒(批号:210317)购自上海碧云天生物公司;Ki-67、MMP-2、MMP-9、GAPDH兔多克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗(批号:20210506、20210814、20210913、20210425、20211004)均购自英国Abcam公司;PI3K、p-PI3K、AKT、p-AKT、mTOR、p-mTOR(批号:210807、210705、210413、210610、210920、210924)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;PI3K/AKT/mTOR信号通路激活剂胰岛素生长因子1(insulin-like growth factor 1,IGF-1)重组蛋白(批号:211104)购自美国Med Chem Express公司。

细胞培养箱(型号:LW-80A-Ⅲ)购自上海利闻科学仪器有限公司,酶标仪(型号:BIO-RAD-550)购自北京京科瑞达科技有限公司。

1.3 细胞培养、分组与形态观察

将Hep-2和TU686细胞置于含有10% FBS与90% DMEM培养基中,于37 ℃、5% CO_2条件下进行常规传代培养,每3 d更换1次培养基。取对数生长期的Hep-2和TU686细胞,于添加20 μmol/L RA、50 μmol/L RA、100 μmol/L RA、10 nmol/mL IGF-1、10 nmol/mL IGF-1+100 μmol/L RA的培养基中培养48 h[7],分别作为低剂量组、中剂量组、高剂量组、IGF-1组、IGF-1+RA组,另设置对照组(正常培养的对数生长期的Hep-2和TU686细胞)。培养48 h后,使用倒置显微镜观察各组Hep-2和TU686细胞形态,并拍照。

1.4 检测细胞增殖能力

将各组Hep-2和TU686细胞以2×10^{5}个/孔接种到24孔板中,每组分别设置6个复孔,按照1.3项下方法分组处理48 h,然后向每孔加入10 μL CCK-8溶液,5% CO_2、37 ℃孵育2 h,利用酶标仪检测450 nm波长处的吸光度。

1.5 检测细胞迁移能力

取对数生长期的各组Hep-2和TU686细胞,消化重悬。细胞以2×10^{5}个/孔的密度培养于24孔板中,待细胞贴壁后,每孔划出相等距离线条,于37 ℃、5% CO_2的条件下持续培养48 h,倒置显微镜下观察划痕愈合情况并拍照,测量划痕距离,计算划痕愈合率。划痕愈合率(%)=(0 h的划痕距离−48 h的划痕距离)/0 h的划痕距离×100%。

1.6 检测蛋白表达水平

使用RIPA裂解缓冲液提取细胞中总蛋白。通过BCA试剂盒测定蛋白浓度,平衡蛋白浓度后,使用10% SDS-PAGE进行电泳分离获得蛋白,并转至PVDF膜上,用5%脱脂牛奶封闭1 h。随后,加入一抗PI3K(1∶3 000)、AKT(1∶3 000)、mTOR(1∶1 000)、p-PI3K(1∶3 000)、p-AKT(1∶3 000)、p-mTOR(1∶1 000)、Ki-67(1∶1 000)、MMP-2(1∶2 500)、MMP-9(1∶2 000)、GAPDH(1∶1 000)在4 ℃下孵育过夜,再加入羊抗兔IgG二抗(1∶2 000)在室温下孵育2 h。使用ECL化学发光试剂盒将蛋白可视化,通过Image J软件对目标条带的灰度值进行分析。

1.7 统计学分析

使用SPSS 25.0软件对实验所得数据进行统计学分析,结果均以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用*SNK-q*检验,$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组Hep-2和TU686细胞形态

与对照组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组Hep-2和TU686细胞数量均减少,细胞严重皱缩,并有大量细胞碎片出现,且RA浓度越高,Hep-2和TU686细胞数量越少;而IGF-1组Hep-2和TU686细胞数量增多,细胞形态无明显改变;与高剂量组比较,IGF-1+RA组Hep-2和TU686细胞数量增多,贴壁细胞数更多,见图1。

2.2 各组Hep-2和TU686细胞增殖能力

与对照组比较,在48 h时低剂量组、中剂量组、高剂量组Hep-2和TU686细胞OD_{450}值显著降低($P<0.05$),而IGF-1组Hep-2和TU686细胞OD_{450}值显著升高($P<0.05$);与高剂量组比较,在48 h时IGF-1+RA组Hep-2和TU686细胞OD_{450}值显著升高($P<0.05$),见图2。

2.3 各组Hep-2和TU686细胞迁移能力

与对照组比较,低剂量组、中剂量组、高剂量组Hep-2和TU686细胞划痕愈合率显著降低($P<0.05$),而

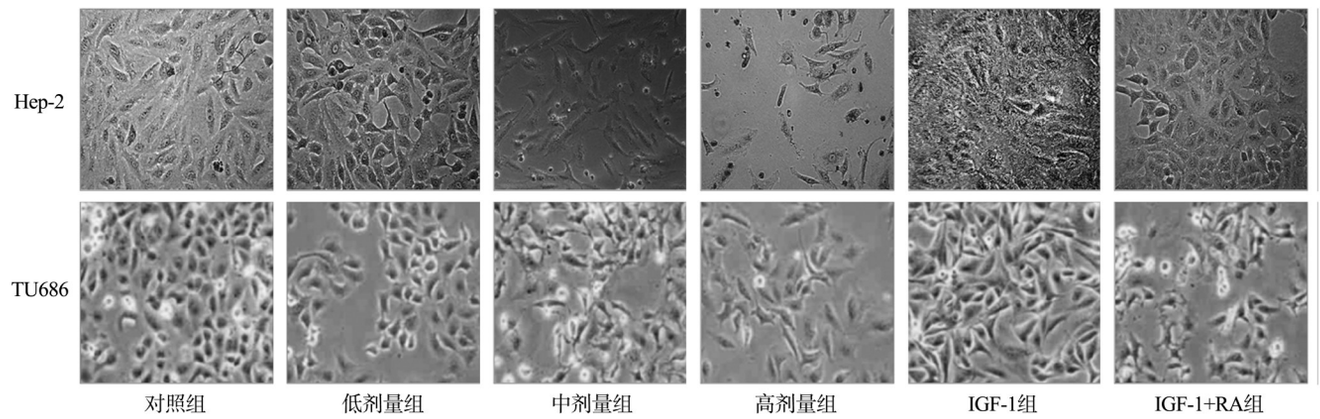
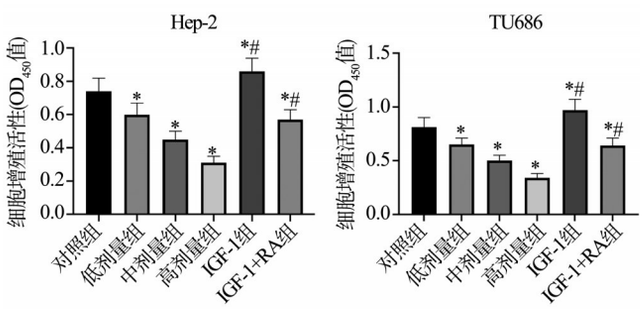
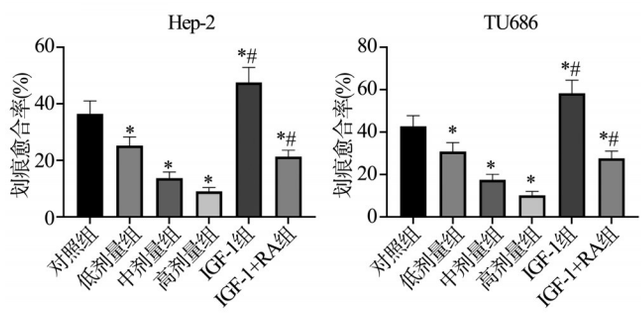


图1 各组Hep-2和TU686细胞形态(×400)



*:与对照组相比,$P<0.05$;#:与高剂量组相比,$P<0.05$

图2 各组Hep-2和TU686细胞的增殖活性



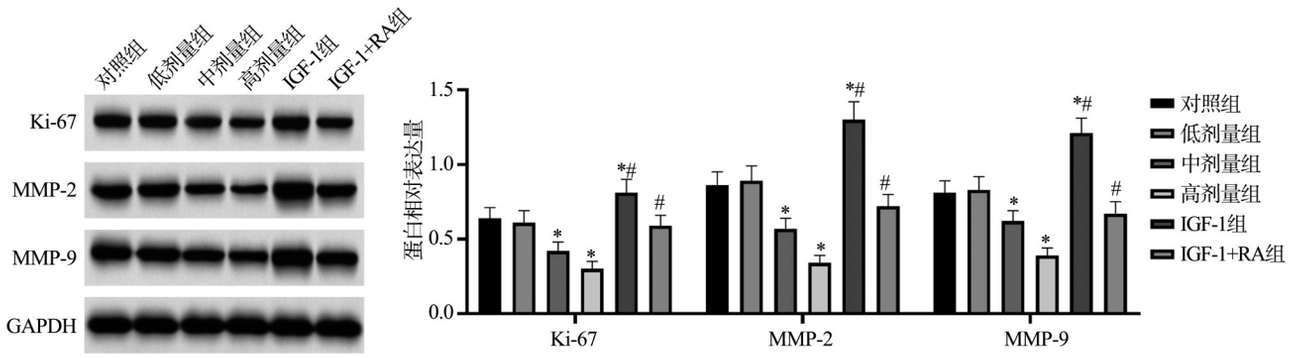
*:与对照组相比,$P<0.05$;#:与高剂量组相比,$P<0.05$

图3 各组Hep-2和TU686细胞愈合率比较

IGF-1组Hep-2和TU686细胞划痕愈合率显著升高($P<0.05$);与高剂量组比较,IGF-1+RA组Hep-2和TU686细胞划痕愈合率显著升高($P<0.05$),见图3。

2.4 各组Hep-2和TU686细胞中增殖、迁移相关蛋白表达情况

与对照组比较,中剂量组、高剂量组Hep-2和TU686细胞中Ki-67、MMP-2、MMP-9蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),而IGF-1组Hep-2和TU686细胞中Ki-67、MMP-2、MMP-9蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);与高剂量组比较,IGF-1+RA组Hep-2和TU686细胞中Ki-67、MMP-2、MMP-9蛋白表达水平显著升高($P<0.05$),见图4~5。

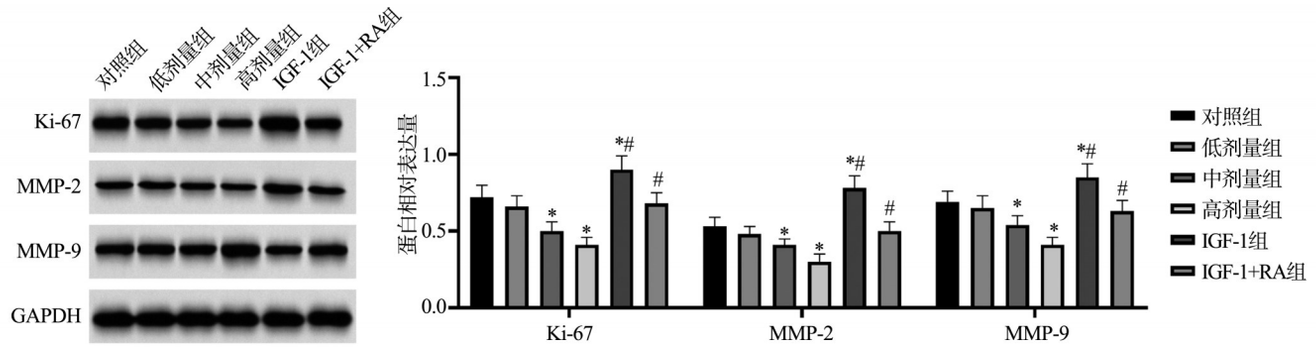


*:与对照组相比,$P<0.05$;#:与高剂量组相比,$P<0.05$

图4 各组Hep-2细胞中增殖、迁移蛋白表达

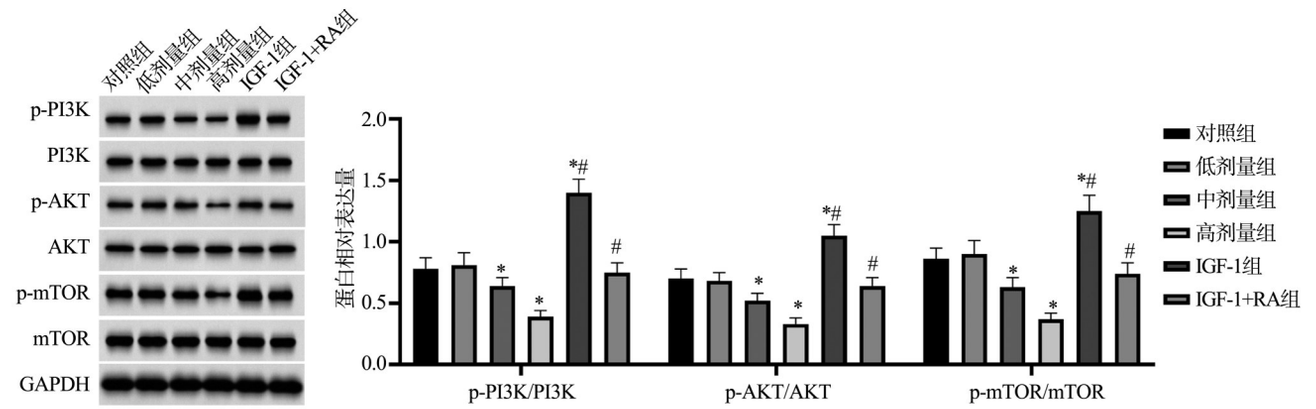
2.5 各组Hep-2和TU686细胞中PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白表达情况

与对照组比较,中剂量组、高剂量组Hep-2和TU686细胞中p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR水平显著降低($P<0.05$),而IGF-1组Hep-2和TU686细胞中p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR水平显著升高($P<0.05$);与高剂量组比较,IGF-1+RA组Hep-2和TU686细胞中p-PI3K/PI3K、p-AKT/AKT、p-mTOR/mTOR水平显著升高($P<0.05$),见图6~7。



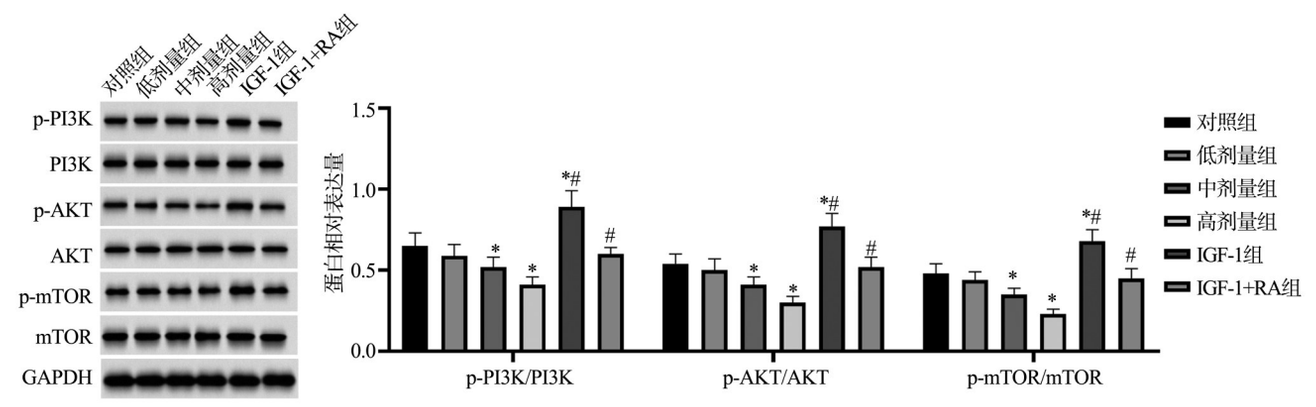
*:与对照组相比,$P<0.05$;#:与高剂量组相比,$P<0.05$

图5 各组TU686细胞中增殖、迁移蛋白表达



*:与对照组相比,$P<0.05$;#:与高剂量组相比,$P<0.05$

图6 各组Hep-2细胞中PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白



*:与对照组相比,$P<0.05$;#:与高剂量组相比,$P<0.05$

图7 各组TU686细胞中PI3K/AKT/mTOR信号通路相关蛋白

3 讨论

LSCC发展到晚期时,较差的预后和有限的治疗方式对患者生命造成严重威胁[8-10]。因此,寻找安全、有效、低毒的治疗药物具有重要意义。RA作为一种天然活性成分,具有广泛的生物学活性,如抗炎、抗氧化、抗感染和保肝[11-12]。此外,RA对多种恶性肿瘤(如乳腺癌[6]、肝癌[7]、结直肠癌[13]和黑色素瘤[14])的恶性进展具有抑制作用。本研究结果显示,RA可抑制Hep-2和TU686细胞增殖、迁移,这与上述研究一致。有研究证实Ki-67在癌组织中高表达,参与癌症的发展进程[15];MMP-2、MMP-9在癌细胞中高表达,能有效促进癌细胞的迁移和侵袭,导致癌症恶化[16]。本研究结果显示,RA能降低Ki-67、MMP-2、MMP-9蛋白水平,表明RA能够有效抑制LSCC细胞的增殖和迁移,提示RA可能是LSCC的潜在治疗药物。

PI3K/AKT/mTOR信号通路在癌症进展中具有关键作用,可调控多种过程,包括新陈代谢、细胞生长、存活、迁移和分化[17-18]。研究显示,PI3K/AKT/mTOR信号通路的过度激活,参与多种癌症进展[19-20]。因此,

PI3K/AKT/mTOR信号通路被认为是治疗癌症的重要靶点。有研究报道,RA在体内外抑制肝癌细胞增殖、侵袭和肿瘤生长的作用与抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活密切相关[7]。本研究发现,中、高剂量的RA可显著降低Hep-2和TU686细胞中p-PI3K、p-AKT、p-mTOR的蛋白表达水平,表明RA可抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路的激活。因此,可以推测RA对LSCC细胞恶性生物学行为的抑制作用可能与抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路有关。为了验证这一机制,本研究在RA处理的基础上,使用PI3K/AKT/mTOR激活剂IGF-1进行干预,结果显示,IGF-1可以有效减轻RA对LSCC细胞恶性生物学行为的抑制作用。提示RA对LSCC细胞增殖、迁移的抑制作用可能是通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路实现的。

综上所述,RA可能通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路,从而抑制LSCC细胞增殖、迁移。本研究进一步明确了RA发挥抗LSCC作用的分子机制,为RA的应用提供理论依据,表明RA有望成为LSCC的潜在治疗药物。但需要进一步的体内实验研究来验证RA对LSCC的抗癌作用。

[参考文献]

[1] Vander Poorten V, Meulemans J, Beitler JJ, et al. Salvage surgery for residual or recurrent laryngeal squamous cell carcinoma after (Chemo) radiotherapy: oncological outcomes and prognostic factors[J]. Eur J Surg Oncol, 2021, 47(11): 2711-2721. doi: 10.1016/j.ejso.2021.05.035.

[2] Lee NY, Ferris RL, Psyrri A, et al. Avelumab plus standard-of-care chemoradiotherapy versus chemoradiotherapy alone in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 trial[J]. Lancet Oncol, 2021, 22(4): 450-462. doi: 10.1016/S1470-2045(20)30737-3.

[3] Liu Y, Song Y, Chen X, et al. miR-206 inhibits laryngeal carcinoma cell multiplication, migration, and invasion[J]. J Healthc Eng, 2021(1): 5614861. doi: 10.1155/2021/5614861.

[4] Hitl M, Kladar N, Gavarić N, et al. Rosmarinic acid-human pharmacokinetics and health benefits[J]. Planta Med, 2021, 87(4): 273-282. doi: 10.1055/a-1301-8648.

[5] An Y, Zhao J, Zhang Y, et al. Rosmarinic acid induces proliferation suppression of hepatoma cells associated with NF-κB signaling pathway[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2021, 22(5): 1623-1632. doi: 10.31557/APJCP.2021.22.5.1623.

[6] Mahmoud MA, Okda TM, Omran GA, et al. Rosmarinic acid suppresses inflammation, angiogenesis, and improves paclitaxel induced apoptosis in a breast cancer model via NF3 κB-p53-caspase-3 pathways modulation[J]. J Appl Biomed, 2021, 19(4): 202-209. doi: 10.32725/jab.2021.024.

[7] Wang L, Yang H, Wang C, et al. Rosmarinic acid inhibits proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells SMMC 7721 via PI3K/AKT/mTOR signal pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 120(1): 109443. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109443.

[8] Wu H, Wang W, Zhu J. Knockdown of long non-coding RNA RP11-297P16.3 inhibits the migration and invasion of laryngeal squamous carcinoma cells[J]. Clin Transl Oncol, 2021, 23(10): 2057-2065. doi: 10.1007/s12094-021-02609-6.

[9] 卜倩倩, 高 伟, 吴勇延, 等. microRNA在喉鳞状细胞癌中的研究进展[J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2021, 35(10): 947-951. doi: 10.13201/j.issn.2096-7993.2021.10.019.

[10] 冯国泰, 李阳松, 张玲莉. 大黄素通过上调lncRNA MEG3表达并抑制PI3K/AKT信号通路影响喉癌细胞的增殖和凋亡[J]. 中国药师, 2021, 24(8): 463-467. doi: 10.19962/j.cnki.issn1008-049X.2021.08.010.

[11] Baranauskaite J, Sadauskiene I, Liekis A, et al. Natural compounds rosmarinic acid and carvacrol counteract aluminium-induced oxidative stress[J]. Molecules, 2020, 25(8): 1807. doi: 10.3390/molecules25081807.

[12] Guo C, Shangguan Y, Zhang M, et al. Rosmarinic acid alleviates ethanol-induced lipid accumulation by repressing fatty acid biosynthesis[J]. Food Funct, 2020, 11(3): 2094-2106. doi: 10.1039/c9fo02357g.

[13] Yang K, Shen Z, Zou Y, et al. Rosmarinic acid inhibits migration, invasion, and p38/AP-1 signaling via miR-1225-5p in colorectal cancer cells[J]. J Recept Signal Transduct Res, 2021, 41(3): 284-293. doi: 10.1080/10799893.2020.1808674.

[14] Huang L, Chen J, Quan J, et al. Rosmarinic acid inhibits proliferation and migration, promotes apoptosis and enhances cisplatin sensitivity of melanoma cells through inhibiting ADAM17/EGFR/AKT/GSK3β axis[J]. Bioengineered, 2021, 12(1): 3065-3076. doi: 10.1080/21655979.2021.1941699.

[15] Awan MJ, Gittleman H, Barnholtz-Sloan J, et al. Risk groups of laryngeal cancer treated with chemoradiation according to nomogram scores--a pooled analysis of RTOG 0129 and 0522[J]. Oral Oncol, 2021, 116(10): 105241. doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105241.

[16] Song Z, Wang J, Su Q, et al. The role of MMP-2 and MMP-9 in the metastasis and development of hypopharyngeal carcinoma[J]. Braz J Otorhinolaryngol, 2021, 87(5): 521-528. doi: 10.1016/j.bjorl.2019.10.009.

[17] 张生义, 张己为, 张旭峰, 等. 华蟾素对非小细胞肺癌细胞株A549细胞增殖及PTEN/AKT/mTOR信号通路表达的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(9): 1159-1162. doi: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.09.004.

[18] 王 雨, 罗 璨, 吉兆宁. 鸦胆子苦素D通过PI3K/Akt信号通路抑制人乳腺癌MDA-MB-231细胞的能量代谢研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2020, 45(5): 561-565. doi: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2020.05.001.

[19] Wang B, Qin H, Wang Y, et al. Effect of DJ-1 overexpression on the proliferation, apoptosis, invasion and migration of laryngeal squamous cell carcinoma SNU-46 cells through PI3K/AKT/mTOR[J]. Oncol Rep, 2014, 32(3): 1108-1116. doi: 10.3892/or.2014.3286.

[20] Tan AC. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway in non-small cell lung cancer (NSCLC)[J]. Thorac Cancer, 2020, 11(3): 511-518. doi: 10.1111/1759-7714.13328.

(编辑:杨 颖)