

虾青素通过激活 MAPK 信号通路诱导睾丸生殖细胞瘤细胞凋亡和自噬

梁少奎^{1,2}, 阳国梁³, 胡 慧¹, 徐 越¹, 肖 沛¹, 罗梓玉¹, 周 畅^{1*}

(1. 湖南师范大学 生命科学学院 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室, 中国湖南 长沙 410081; 2. 广西南宁市天桃实验学校, 中国广西 南宁 530216; 3. 湖南财政经济学院, 中国湖南 长沙 410205)

摘 要: 为了研究虾青素对睾丸生殖细胞瘤细胞株 NCCIT 和 NT2 细胞凋亡、自噬的影响及可能的作用机制, 用梯度浓度的虾青素对 NCCIT 和 NT2 细胞进行处理后, 采用 MTT 实验、台盼蓝拒染法和细胞克隆实验检测各组细胞的增殖速率; 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法流式细胞术检测细胞凋亡率; 采用 Hoechst33258 荧光染色法观察各组细胞的形态变化; 采用 Western-blot 法检测细胞凋亡相关蛋白质(Bcl-2、Bax、caspase-3、PARP)、自噬蛋白(Beclin1、LC3)的表达水平, 以及 MAPK 信号通路蛋白质细胞外信号调控的激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-Jun 氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p38 的表达及磷酸化水平。结果显示, 与空白对照组比较, 虾青素处理组中 NCCIT 和 NT2 细胞的增殖速率明显降低, 细胞凋亡率增加($P<0.05$), 细胞出现体积变小、细胞核荧光强度增高、核固缩等凋亡特征, 同时, 抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达下调, 促凋亡蛋白 Bax、自噬蛋白 Beclin1 和 LC3II 表达上调。此外, 虾青素可剂量依赖性地增加 ERK、JNK、p38 的磷酸化水平。以上结果表明, 虾青素可抑制睾丸生殖细胞瘤细胞系(NCCIT/NT2)生长, 诱导细胞凋亡和自噬, 其机制可能与虾青素激活 MAPK 信号通路有关。

关键词: 虾青素; 睾丸生殖细胞瘤(TGCT); 细胞凋亡; 细胞自噬; MAPK 信号通路

中图分类号: Q5-33, R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1007-7847(2022)01-0039-08

Astaxanthin Induces Apoptosis and Autophagy of Testicular Germ Cell Tumor Cells via Activating MAPK Signaling Pathway

LIANG Shao-kui^{1,2}, YANG Guo-liang³, HU Hui¹, XU Yue¹, XIAO Pei¹,
LUO Zi-yu¹, ZHOU Chang^{1*}

(1. State Key Laboratory of Developmental Biology of Freshwater Fish, College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China; 2. Nanning Tiantao Experimental School, Nanning 530216, Guangxi, China; 3. Hunan University of Finance and Economics, Changsha 410205, Hunan, China)

Abstract: To investigate the effects of astaxanthin on apoptosis and autophagy of testicular germ cell tumor (TGCT) and the possible action mechanism, TGCT NCCIT and NT2 cell lines were treated with gradient concentrations of astaxanthin. The cell proliferation rate of each group was detected by MTT assay, trypan blue dye exclusion and colony formation assay, the cell apoptosis rate was detected by Annexin V-FITC/PI double labeling, and the morphology of cell was observed by Hoechst33258 staining. The apoptosis proteins (Bcl-2, Bax, caspase-3 and PARP), autophagy proteins (Beclin1 and LC3) and MAPK signaling pathway associated proteins [extracellular signal-regulated protein kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38] and their phosphorylated levels were detected with Western-blot. The results showed that, compared

收稿日期: 2020-11-18; 修回日期: 2021-03-07; 网络首发日期: 2022-02-18

基金项目: 省部共建淡水鱼类发育生物学国家重点实验室 2018 年度开放课题基金资助项目; 湖南师范大学“克氏原螯虾生态繁养”产学研合作示范基地资助项目

作者简介: 梁少奎(1996—), 女, 广西南宁人, 硕士研究生, 主要从事基因功能调控研究; *通信作者: 周畅(1972—), 女, 湖南长沙人, 博士, 湖南师范大学教授, 主要从事基因功能研究, E-mail: zhouc@hunnu.edu.cn.

with the blank control group, the proliferation rates of NCCIT and NT2 cells in the astaxanthin-treated groups were significantly reduced, and their apoptosis rates were increased ($P < 0.05$). The treated cells showed apoptotic features such as smaller cell volume, obviously bright cell nuclei and nuclear condensation. The expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 was down-regulated, and the expressions of pro-apoptotic protein Bax and autophagy proteins Beclin1 and LC3 II were upregulated in the treated groups. In addition, astaxanthin increased the phosphorylation levels of ERK, JNK, and p38 in a dose-dependent manner. The results demonstrated that astaxanthin could inhibit the growth of TGCT cell lines (NCCIT and NT2) and induce cell apoptosis and autophagy. Its mechanism may be related to the activation of MAPK signaling pathway by astaxanthin.

Key words: astaxanthin; testicular germ cell tumor (TGCT); cell apoptosis; cell autophagy; MAPK signaling pathway

(*Life Science Research*, 2022, 26(1): 039~046)

睾丸生殖细胞瘤(testicular germ cell tumor, TGCT)在人群中是一种相对罕见癌症,但在15~35岁男性中却是比较常见的恶性肿瘤之一^[1]。目前,其治疗方法主要采取手术与化疗、放疗相结合的方式。虽然睾丸生殖细胞瘤的治愈率很高,但患者术后患继发性肿瘤的概率比较高,且放、化疗可能会导致不育等并发症^[2-4],同时还易产生顺铂抗性等副作用^[5],因此急需寻找更安全的治疗手段。天然药物提取物具有不良反应小、作用独特、研究成本低的特点。当前,很多天然药物提取物的抗肿瘤机制研究取得了突破性进展,并已作为抗肿瘤药或抗肿瘤辅助药得到广泛的应用,例如:Li等^[6]发现槲皮素可以通过上调Bax/Bcl-2比例,以及上调p53和Fas,诱导细胞凋亡;Lü等^[7]在乳腺癌新辅助治疗方案的回顾性研究中发现,结合紫杉醇的辅助治疗具有较好的疗效。

虾青素(astaxanthin, AST)是一种从虾蟹外壳以及藻类等海洋生物中提取的红色天然类胡萝卜素^[8],化学名称为3,3'-二羟基-4,4'-二酮基- β,β' -胡萝卜素,分子式为 $C_{40}H_{52}O_4$,具有极强的抗氧化性^[9]、抗炎和抗肿瘤等多种生物学功能^[10-12]。前期文献报道,虾青素对黑色素瘤细胞、结直肠癌细胞、口腔癌细胞等都具有生长抑制效应^[13-15],但关于虾青素对睾丸生殖细胞瘤的影响及其可能的分子调控机制目前尚未见报道。本研究以睾丸生殖细胞瘤细胞系NCCIT和NT2为研究对象,观察虾青素作用后,细胞的生长情况,探究虾青素对NCCIT和NT2细胞凋亡和自噬的影响,并探讨其对丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路的调控作用,为睾丸生殖细胞瘤防治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

睾丸生殖细胞瘤细胞系NCCIT和NT2均购自上海中科院细胞库。

虾青素(分析对照品,UV $\geq 98\%$,100 mg,批号A9692E769,购自上海Acme公司)溶解于1,2-丙二醇(上海生工生物工程股份有限公司);胎牛血清、DMEM培养基购自美国Gibco公司;PVDF膜购自美国Millipore公司。GAPDH、Bcl-2、Bax、胱天蛋白酶-3(caspase-3)的单克隆抗体购自英国Abcam公司;Beclin1、LC3、p38、p-p38、细胞外信号调控的激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、p-ERK的抗体购自美国Cell Signal Technology公司;c-Jun氨基端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)、p-JNK、多聚ADP核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)的抗体购自武汉爱博泰克生物科技有限公司;二抗goat anti-rabbit和goat anti-mouse购自北京西美杰科技有限公司。其余常规试剂均购自上海生工生物工程股份有限公司。

本研究使用的仪器主要有: FACSCalibur流式细胞仪(BD公司,美国);荧光显微镜Axioskop 2 plus Zeiss (Zeiss公司,德国);Multiskan FC酶标仪(Thermo Fisher Scientific公司,美国);Tanon 5200-Multi凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);SXZX16荧光体式显微镜(OLYMPUS公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养、分组及处理

将NCCIT、NT2细胞用含10%胎牛血清的DMEM培养基置于细胞培养箱(5% CO₂, 37 °C)中

培养,待细胞生长至 90%左右,用 0.2%胰酶消化传代。取对数生长期 NCCIT、NT2 细胞,用胰酶消化离心后重悬细胞,调整细胞密度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,铺板 24 h 后,将其分为空白对照组和 3 个不同处理浓度的实验组。空白对照组细胞不做任何处理(预实验显示含丙二醇的溶剂组与不含任何试剂的空白组的实验结果差异不明显,故仅设一组空白组为对照组),实验组细胞分别加入终浓度为 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L 的虾青素。

1.2.2 MTT 法检测虾青素对 NCCIT、NT2 细胞增殖的影响

细胞分组及处理同 1.2.1。具体检测步骤按照文献[16]的方法,其中,将细胞接种于 96 孔板,同时设 4 个复孔,处理时间分别为 24 h、48 h、72 h。用酶标仪测定每孔 490 nm 处的光密度值(OD 值)。用如下公式计算细胞存活率:细胞存活率(%)=(实验组 OD 值/空白对照组 OD 值) $\times 100\%$ 。

1.2.3 台盼蓝拒染法检测虾青素对 NCCIT、NT2 细胞活力的影响

具体操作按照文献[17]的方法。实验分空白对照组和虾青素实验组,虾青素处理浓度为 0.2 mmol/L,处理时间分别为 24 h、48 h、72 h。用如下公式统计细胞活率:活细胞率(%)=活细胞总数/(活细胞总数+死细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.2.4 细胞克隆形成检测虾青素对 NCCIT 细胞生长的影响

NCCIT 细胞分组及处理同 1.2.1。具体检测步骤按照文献[18]的方法,其中,细胞以 1 000 个/孔接种于 6 孔板。统计细胞克隆数(含 ≥ 50 个细胞数)后用如下公式计算克隆形成率:克隆相对形成率(%)=(实验组克隆数/空白对照组克隆数) $\times 100\%$ 。

1.2.5 Hoechst33258 染色法检测细胞形态变化

实验分空白对照组和虾青素实验组,虾青素处理浓度为 0.2 mmol/L,加药处理 24 h 后,按照文献[19]的方法进行后续操作。

1.2.6 流式细胞仪 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率

细胞分组及处理同 1.2.1。药物处理 24 h 后,按照文献[20]的方法进行后续操作,最后进行凋亡率的计算分析。

1.2.7 Western-blot 检测蛋白质表达

细胞分组及处理同 1.2.1。加药处理 24 h 后,按照文献[20]的方法进行后续操作,检测 Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 和 PARP、自噬相关蛋白质

Beclin1 和 LC3 的表达水平,以及 MAPK 信号通路相关蛋白质(JNK、p38 和 ERK)及其磷酸化水平。用 ImageJ 软件分析蛋白质条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算目的蛋白的相对表达水平。

1.2.8 统计学分析

数据用平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行数据处理及制图,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 虾青素抑制 NCCIT、NT2 细胞增殖

为了检测虾青素对睾丸生殖细胞瘤细胞增殖的影响,采用不同浓度的虾青素(0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L)对 NCCIT 和 NT2 细胞进行处理,通过 MTT、台盼蓝拒染和细胞克隆形成实验检测细胞的增殖情况。MTT 法检测结果如图 1A 所示,与空白对照组相比,虾青素以剂量和时间依赖性抑制 NCCIT 和 NT2 细胞增殖。虾青素处理 72 h 时,0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L 虾青素实验组中 NCCIT 细胞的存活率分别为(81.10 \pm 6.74)%、(63.77 \pm 5.27)%和(53.75 \pm 5.34)%; NT2 细胞的存活率分别为(66.59 \pm 10.81)%、(42.87 \pm 9.91)%和(18.65 \pm 2.75)%,与空白对照组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。台盼蓝拒染实验结果如图 1B 所示,与空白对照组相比,虾青素(0.2 mmol/L)处理可明显降低 NCCIT、NT2 细胞活性。其中,虾青素处理 72 h 时,NCCIT 和 NT2 细胞的活力分别为(60.61 \pm 3.61)%和(52.57 \pm 4.41)%,与空白对照组比较均有显著差异($P < 0.01$)。MTT 和台盼蓝拒染实验结果均提示,NCCIT 细胞较 NT2 细胞对虾青素的耐受性更强。因此,我们用 NCCIT 细胞进行细胞克隆形成实验,结果如图 1C 所示:随着虾青素处理浓度增加,细胞克隆形成能力降低,且与空白对照组比较,实验组的克隆形成率差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.2 虾青素诱导 NCCIT、NT2 细胞凋亡

0.2 mmol/L 虾青素处理 24 h 后,NCCIT 和 NT2 细胞的形态观察结果如图 2A 所示,空白对照组细胞形态、大小均正常,虾青素处理组中,NCCIT 和 NT2 均出现细胞体积变小、细胞核荧光强度增高、核固缩等细胞凋亡现象。为量化凋亡比例,使用流式细胞仪检测凋亡率,结果如图 2B 所示,随着虾青素处理浓度加大,细胞总凋亡率呈递增趋

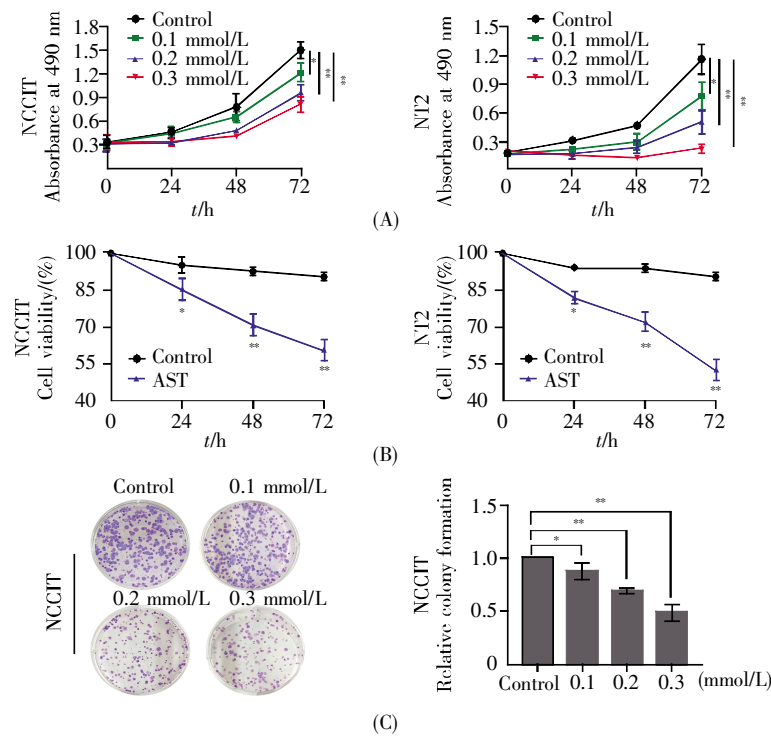


图1 虾青素抑制NCCIT、NT2细胞增殖

(A) 不同浓度的虾青素(0.1~0.3 mmol/L)处理NCCIT和NT2细胞24 h、48 h、72 h后, MTT法检测细胞增殖率; (B) 0.2 mmol/L 虾青素处理NCCIT和NT2细胞24 h、48 h、72 h时, 台盼蓝拒染法检测细胞活性; (C) 不同浓度的虾青素(0.1~0.3 mmol/L) 处理NCCIT细胞7~10 d, 再用结晶紫染色检测克隆形成数目。数据以3组独立实验得到的平均值 \pm 标准差表示; 与空白对照组比较, * P <0.05, ** P <0.01; 两组间比较采用 t 检验。图2~4的统计分析同此图。

Fig.1 Astaxanthin inhibits proliferation in NCCIT and NT2 cells

(A) Cell proliferation rates detected by MTT assay after treatment with different concentrations of astaxanthin (0.1~0.3 mmol/L) for 24 h, 48 h and 72 h; (B) Cell activities measured by trypan blue dye exclusion after treatment with 0.2 mmol/L astaxanthin for 24 h, 48 h and 72 h; (C) Clonogenic growth of NCCIT cells treated with astaxanthin (0.1~0.3 mmol/L) for 7 to 10 days and stained by crystal violet. Data represent the mean \pm SD from three separate experiments. * P <0.05 and ** P <0.01, compared with control group. Comparison between two groups was performed by t -test. The statistical analysis of the Figs.2~4 is the same as this one.

势。在NCCIT细胞中, 空白对照组的总凋亡率为(3.82 \pm 0.51)%, 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L 虾青素处理组的总凋亡率分别为(4.98 \pm 0.45)%、(8.36 \pm 0.65)%、(16.58 \pm 2.32)%; 在NT2细胞中, 空白对照组的总凋亡率为(8.14 \pm 1.32)%, 0.1 mmol/L、0.2 mmol/L、0.3 mmol/L 虾青素处理组的总凋亡率分别为(15.52 \pm 2.62)%、(19.31 \pm 0.37)%、(23.43 \pm 5.10)%, 两个细胞组的结果平行性好, 与空白对照组比较差异均有统计学意义(P <0.05 或 P <0.01)。进一步采用Western-blot检测凋亡相关蛋白质的表达水平, 结果如图2C所示, 虾青素处理组与空白对照组相比, 抗凋亡蛋白Bcl-2的表达水平降低, 而促凋亡蛋白Bax、cleaved caspase-3和cleaved PARP的表达水平升高。以上细胞水平和分子水平实验均表明, 虾青素能诱导NCCIT、NT2细胞凋亡。

2.3 虾青素诱导NCCIT、NT2细胞自噬

细胞自噬是细胞程序性死亡方式之一, 对维

持内环境稳态具有重要作用^[21]。Beclin1与自噬体的成熟相关, LC3 II的表达与自噬小泡发生相关, 反映自噬的发生发展程度。虾青素处理细胞24 h后, 采用Western-blot检测细胞中自噬相关LC3 II和Beclin1蛋白的表达, 结果如图3A所示, LC3的激活体LC3 II和Beclin1蛋白的表达水平随虾青素处理浓度增加而升高, 提示虾青素可能诱导NCCIT和NT2细胞发生自噬。

为明确虾青素诱导LC3 II和Beclin1蛋白表达的升高是通过增加自噬体的生成还是抑制自噬体的降解, 应用抑制自噬体降解的自噬抑制剂氯喹(chloroquine, CQ)进行处理。结果如图3B所示, CQ处理促进了虾青素(0.2 mmol/L)诱导的Beclin1表达增加, 并显著增加虾青素诱导的LC3 II表达上调(P <0.01)。以上数据表明, 虾青素可诱导NCCIT和NT2细胞发生自噬, 且这种作用是通过增强自噬活性使自噬体形成增多实现的, 而不是通

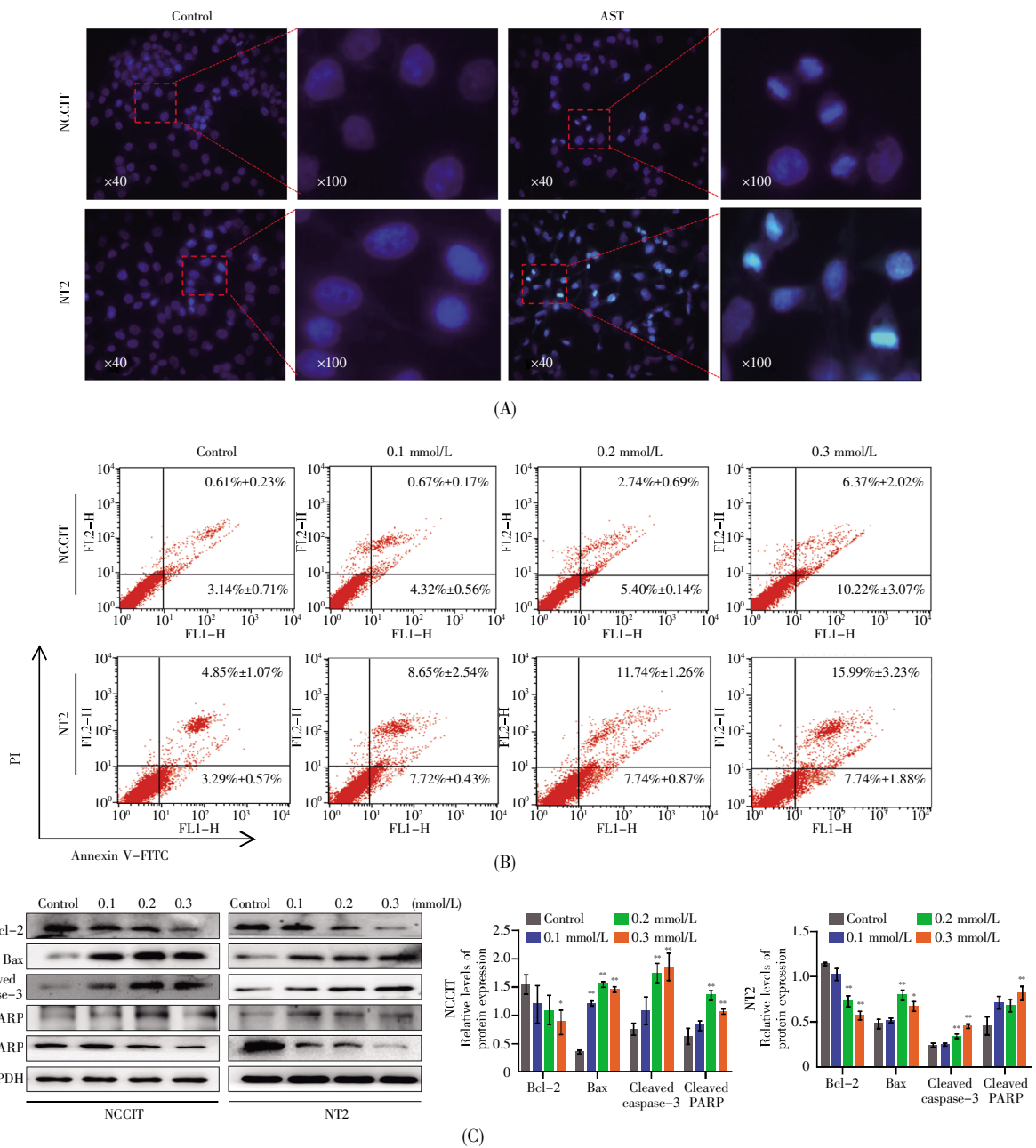


图 2 虾青素诱导 NCCIT、NT2 细胞凋亡

(A) 0.2 mmol/L 虾青素处理 NCCIT 和 NT2 细胞 24 h 后, 将细胞固定并用 Hoechst33258 染色, 荧光显微镜下观察细胞形态; (B) 不同浓度虾青素(0.1~0.3 mmol/L)处理 NCCIT 和 NT2 细胞 24 h 后, 用 Annexin V-FITC/PI 染色, 用流式细胞仪分析细胞凋亡率; (C) 不同浓度虾青素(0.1~0.3 mmol/L)处理 NCCIT 和 NT2 细胞 24 h 后, 采用 Western-blot 检测凋亡相关蛋白质的表达水平。

Fig.2 Astaxanthin induces apoptosis in NCCIT and NT2 cells

(A) Morphology of apoptotic cell nuclei under a fluorescent microscope after cells were exposed to 0.2 mmol/L astaxanthin for 24 h and then stained with Hoechst33258; (B) Apoptosis rates analyzed by flow cytometry after cells were treated with different concentrations of astaxanthin (0.1~0.3 mmol/L) for 24 h and stained with Annexin V-FITC/PI; (C) Expression of apoptosis related proteins in cells analyzed by Western-blot after treatment with different concentrations of astaxanthin (0.1~0.3 mmol/L) for 24 h.

过抑制自噬体的降解实现的。

2.4 虾青素激活 NCCIT、NT2 细胞中 MAPK 信号通路

许多研究证实 MAPK 信号通路在调节肿瘤

细胞生长发育、分化和死亡等生物学过程中具有重要作用^[22-23]。本研究通过检测 MAPK 信号通路中 3 个主要成员的表达, 考察虾青素诱导 NCCIT、NT2 细胞凋亡和自噬的可能机制。结果如图 4

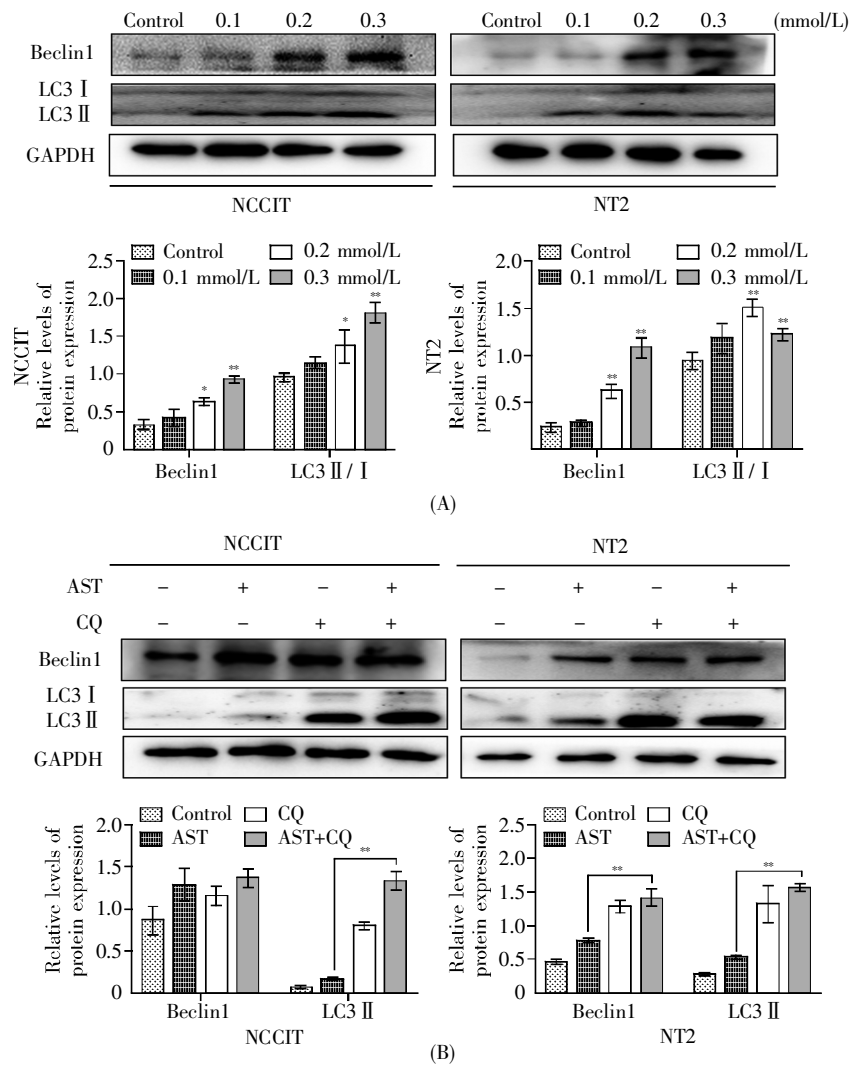


图3 虾青素诱导 NCCIT、NT2 细胞自噬

(A) 不同浓度虾青素(0.1~0.3 mmol/L)处理 NCCIT 和 NT2 细胞 24 h 后, 采用 Western-blot 检测自噬相关蛋白质 Beclin1 和 LC3 的表达水平; (B) 用 CQ (1 μ mol/L) 预处理 NCCIT 和 NT2 细胞 0.5 h, 之后联合虾青素(0.2 mmol/L)共同处理 24 h, 采用 Western-blot 检测 Beclin1 和 LC3 蛋白的表达水平。

Fig.3 Astaxanthin induces autophagy in NCCIT and NT2 cells

(A) Expression of Beclin1 and LC3 in cells analyzed by Western-blot after treatment with different concentrations of astaxanthin (0.1~0.3 mmol/L) for 24 h; (B) Expression of Beclin1 and LC3 analyzed by Western-blot after cells were pretreated with CQ (1 μ mol/L) for 0.5 h, and co-incubated with astaxanthin (0.2 mmol/L) for another 24 h.

所示, 与空白对照组相比, 虾青素处理组中 JNK、p38 和 ERK 的磷酸化水平升高, 而 JNK、p38 和 ERK 蛋白的相对表达水平无明显差异, 表明虾青素可以激活 NCCIT、NT2 细胞中的 MAPK 信号通路。

3 讨论

传统中药中的活性成分日益受到关注。但是, 传统中药成分中大多数活性小分子化合物的药理机制仍不明确, 这极大地限制了中药资源的开发利用。因此, 利用分子生物学及细胞生物学的研究手段, 深入探究天然药物中提取的高活性

小分子化合物的抗肿瘤机制是中药现代化开发利用的必需手段。

虾青素已被证明具有强抗氧化性, 以及抗肿瘤、抗炎和免疫抑制等多种功能, 具有广阔的应用前景。Yasui 等^[14]的研究结果表明, 虾青素可以通过 NF- κ B 信号通路抑制葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导的炎症反应, 减轻偶氮甲烷(azoxymethane, AOM)和 DSS 诱导的结肠增生性病变, 并减少结肠炎相关性结直肠癌的发生。Kavitha 等^[24]利用 7,12-二甲基苯并(a)蒽(7,12-dimethylbenz[a]anthracene, DMBA)诱发仓鼠颊袋

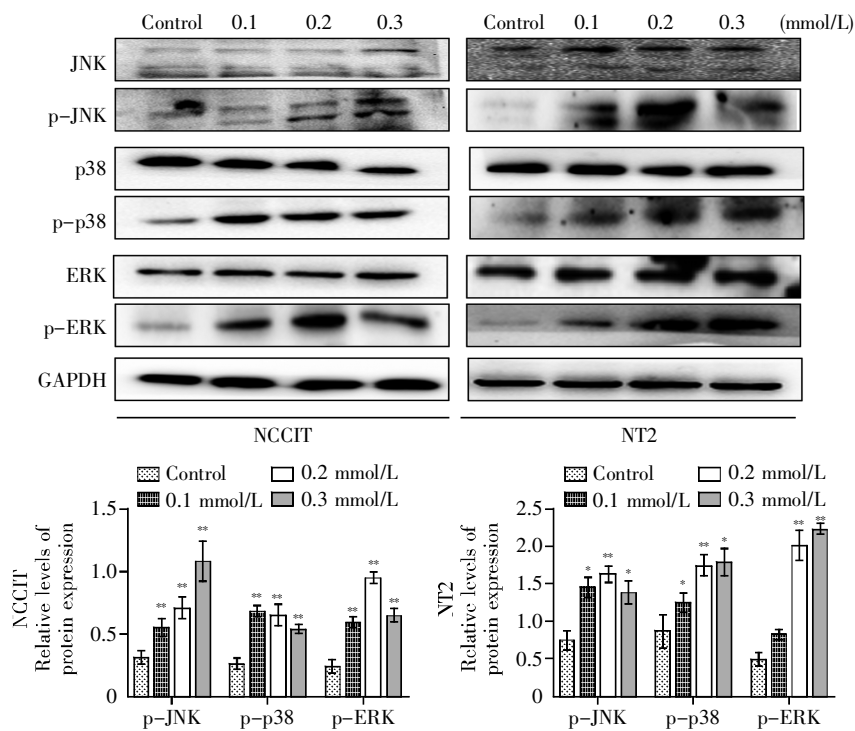


图 4 虾青素激活 NCCIT、NT2 细胞中的 MAPK 信号通路

不同浓度虾青素(0.1~0.3 mmol/L)处理 NCCIT 和 NT2 细胞 24 h 后,采用 Western-blot 检测 JNK/p-JNK、p38/p-p38、ERK/p-ERK 蛋白的表达水平。

Fig.4 Astaxanthin activates MAPK signaling pathway in NCCIT and NT2 cells

Expressions of JNK/p-JNK, p38/p-p38, ERK/p-ERK in cells were analyzed by Western-blot after treatment with different concentrations of astaxanthin (0.1~0.3 mmol/L) for 24 h.

肿瘤,并在仓鼠右侧颊袋涂 0.5% DMBA 诱导肿瘤发生的同时,按照 15 mg/kg 的剂量在其饲料中添加虾青素进行干预,发现虾青素可以预防肿瘤的产生,其保护作用可能与其激活 Nrf2/Keap-1 信号通路有关。虾青素在预防肿瘤发生和癌症治疗方面有很好的潜能^[10],但是,虾青素抗肿瘤的详细分子机制目前仍未完全阐明。

本研究首先通过绘制细胞生长曲线检测了虾青素对睾丸生殖细胞瘤细胞增殖的影响。结果显示,虾青素对两种细胞增殖有着显著的抑制作用,且这种抑制作用在其浓度低至 0.1 mmol/L 时依然存在(图 1A)。克隆形成实验结果确认,虾青素能抑制 NCCIT 细胞的存活能力(图 1C),0.3 mmol/L 虾青素处理组的克隆数与对照组比较下降 50%。进一步的细胞形态观察结果显示,0.2 mmol/L 的虾青素处理 NCCIT、NT2 细胞 24 h 后,细胞形态发生皱缩,甚至变圆脱落,细胞密度显著下降(图 2A)。流式细胞术检测结果显示,不同浓度虾青素处理 NCCIT、NT2 细胞后,细胞凋亡率呈剂量依赖性增高(图 2B)。细胞凋亡主要通过 caspase 通路的级联反应启动。正常情况下,caspase 蛋白及 PARP 以

无活性的前体形式存在,当细胞凋亡发生时其会被上一级 caspase 蛋白切割而活化。因此,caspase 和 PARP 的切割情况可以用来判断细胞是否发生凋亡。本研究发现,用虾青素处理细胞,尤其是高浓度(0.2 mmol/L 和 0.3 mmol/L)处理时,caspase-3 及 PARP 均能检测到明显的切割条带。同时,虾青素处理组细胞中,抗凋亡蛋白 Bcl-2 显著下调,而促凋亡蛋白 Bax 显著上调。Bax 通过与线粒体膜结合,形成渗透性膜转移孔复合物,建立线粒体膜通道,介导促凋亡分子细胞色素 C 和 Smac/Diablo 等的释放,从而激活 caspase 级联反应,并通过 caspase-3 激活破坏基因组 DNA 的核酸内切酶,造成基因组 DNA 裂解,同时失活 DNA 修复相关酶,造成 DNA 修复能力降低,在此基础上进一步分解细胞骨架,引起一系列凋亡执行过程的发生。本文研究结果显示,虾青素可以显著提高 Bax/Bcl-2 的比值,从而促进肿瘤细胞凋亡。该结果与 Hormozi 等^[25]研究虾青素诱导人大肠癌细胞株 LS-180 细胞凋亡的结果一致。

小分子抗肿瘤药物的细胞毒性一般体现为诱导细胞凋亡、坏死及自噬性死亡。自噬既是细胞的

一种自我保护机制,也是一种与凋亡并列的程序性死亡机制。Beclin1 是哺乳动物中 Atg6 的同源蛋白质,是酵母 ATG6/Vps30 在哺乳动物中的同源物,是介导其他自噬蛋白定位于前自噬泡的关键因子。人类的 *Beclin1* 基因位于染色体 17q21,其编码产物是启动自噬过程的标志和调节自噬现象的关键蛋白质。Beclin1 包含 4 个重要的结构域,其中包括 Bcl-2 结合结构域(Bcl-2 homology domains, BH3)。Beclin1 作为一种自噬调节因子,同 Bcl-2 解离的过程可能有两种机制。一是通过 BOP 蛋白(BH3-only protein)竞争性结合 Bcl-2,使二者解离;二是 JNK-1 磷酸化 Bcl-2 的多个丝氨酸苏氨酸位点,磷酸化后的 Bcl-2 蛋白与 Beclin1 蛋白的结合能力大大减弱,从而分离,分离后的 Beclin1 与 PI3K III/Vps34 的相互作用加强,刺激自噬的发生^[26]。因此,我们进一步检测虾青素是否影响自噬体形成的标志蛋白质 LC3 II 和 Beclin1 表达。Western-blot 结果显示,Beclin1 蛋白和 LC3 II 蛋白的表达水平随虾青素处理浓度的升高而增高,并且在联合自噬抑制剂 CQ 处理后,两种蛋白质的表达水平较虾青素单独处理时显著增加,这表明虾青素诱导睾丸生殖细胞瘤细胞发生自噬。虾青素调控 Beclin1 和 Bcl-2 蛋白复合物,诱导细胞凋亡和自噬。

细胞凋亡和自噬的发生受多条信号通路和多种调节因子的作用,MAPK 信号通路是主要信号通路之一。MAPK 级联激活是多种信号通路的中心,MAPK 通路的主要作用是接收膜受体并转换与传递相关信号至细胞核。MAPK 信号通路有 3 个主要家族成员:JNK、p38 和 ERK。活化的 JNK 和 p38 可通过调控与凋亡相关转录因子间接或直接调节 Bax、Bcl-2 和 caspase 蛋白,促进细胞凋亡^[27-28]。本文的研究结果显示,与空白对照组比较,随着虾青素处理浓度的增加,JNK 与 p38 蛋白的表达水平无显著变化,而 p-JNK 和 p-p38 蛋白的表达水平上调,这提示虾青素是通过激活 JNK 和 p38 调控凋亡相关蛋白质,从而诱导细胞凋亡。此外,随着虾青素处理浓度的增加,ERK 蛋白的表达水平也无显著变化,而 p-ERK、剪切的 PARP 以及 Beclin1 和 LC3 II 的表达水平增加,提示虾青素促进 NCCIT、NT2 细胞内 ERK 的磷酸化,可能激活 ERK/MAPK 通路,活化 caspase-3,进而剪切 PARP,促进细胞凋亡,同时上调自噬相关蛋白质 LC3 II 和 Beclin1 的表达,从而诱导细胞自噬。

综上所述,本研究的实验结果证实,虾青素通过激活 MAPK 信号通路诱导睾丸生殖细胞瘤细胞凋亡和自噬。下一步,我们将建立动物实验模型,研究虾青素与低毒性自噬抑制剂联合使用的效果,为虾青素抗肿瘤功效的后期开发利用奠定坚实的理论基础。

参考文献(References):

- [1] SIEGEL R, DESANTIS C, VIRGO K, *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2012[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2012, 62(4): 220-241.
- [2] 陈坤,钱晶,张卓. 睾丸精原细胞瘤的诊治进展[J]. 山东医药(CHEN Kun, QIAN Jing, ZHANG Zhou. Advances in the diagnosis and treatment of testicular seminoma[J]. Shandong Medical Journal), 2019, 59(15): 111-114.
- [3] 陈志霄,张铁宁,胡焯,等. I~II A/B 期睾丸精原细胞瘤诊治及放疗进展[J]. 中国肿瘤(CHEN Zhi-xiao, ZHANG Tie-ning, HU Ye, *et al.* Diagnosis and radiotherapy for patients with testicular seminoma stages I and II A/B[J]. China Cancer), 2014, 23(6): 509-513.
- [4] PAFFENHOLZ P, PFISTER D, HEIDENREICH A. Testis-preserving strategies in testicular germ cell tumors and germ cell neoplasia *in situ*[J]. Translational Andrology and Urology, 2020, 9(Suppl. 1): S24-S30.
- [5] BAGRODIA A, CHA E K, SFAKIANOS J P, *et al.* Genomic biomarkers for the prediction of stage and prognosis of upper tract urothelial carcinoma[J]. The Journal of Urology, 2016, 195(6): 1684-1689.
- [6] LI H, TAN L, ZHANG J W, *et al.* Quercetin is the active component of Yang-Yin-Qing-Fei-Tang to induce apoptosis in non-small cell lung cancer[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2019, 47(4): 879-893.
- [7] LÜ Z D, SONG H M, NIU Z H, *et al.* Efficacy and safety of albumin-bound paclitaxel compared to docetaxel as neoadjuvant chemotherapy for HER2-negative breast cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2021, 11: 760655.
- [8] HUSSEIN G, SANKAWA U, GOTO H, *et al.* Astaxanthin, a carotenoid with potential in human health and nutrition[J]. Journal of Natural Products, 2006, 69(3): 443-449.
- [9] GUERIN M, HUNTLEY M E, OLAIZOLA M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition[J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(3): 210-216.
- [10] 董宝莲,郭玲. 虾青素的研究进展[J]. 中国临床药理学杂志(DONG Bao-lian, GUO Ling. Research progress of astaxanthin[J]. The Chinese Journal of Clinical Pharmacology), 2019, 35(8): 821-824.
- [11] YUAN J P, PENG J, YIN K, *et al.* Potential health-promoting effects of astaxanthin: a high-value carotenoid mostly from microalgae[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55(1): 150-165.
- [12] FARAONE I, SINISGALLI C, OSTUNI A, *et al.* Astaxanthin anticancer effects are mediated through multiple molecular mechanisms: a systematic review[J]. Pharmacological Research, 2020, 155: 104689.
- [13] CHEN Y T, KAO C J, HUANG H Y, *et al.* Astaxanthin reduces MMP expressions, suppresses cancer cell migrations, and triggers apoptotic caspases of *in vitro* and *in vivo* models in melanoma[J]. Journal of Functional Foods, 2017, 31: 20-31.
- [14] YASUI Y, HOSOKAWA M, MIKAMI N, *et al.* Dietary astaxanthin inhibits colitis and colitis-associated colon carcinogenesis in mice via modulation of the inflammatory cytokines[J]. Chemico-Biological Interactions, 2011, 193(1): 79-87.
- [15] KOWSHIK J, NIVETHA R, RANJANI S, *et al.* Astaxanthin inhibits hallmarks of cancer by targeting the PI3K/NF- κ B/STAT3 signalling axis in oral squamous cell carcinoma models[J]. IUBMB Life, 2019, 71(10): 1595-1610.
- [16] 王聪,黄幼生,蔡仁桑. miR-760 调节 integrin β 3 抑制非小细胞肺癌增殖、迁移和侵袭的作用[J]. 实用医学杂志(WANG Cong, HUANG You-sheng, CAI Ren-sang. miR-760 suppresses proliferation, migration and invasion of non-small cell lung cancer by regulating integrin β 3[J]. The Journal of Practical Medicine), 2018, 34(23): 3854-3858.

可以减少心衰细胞凋亡,具体的作用机制可能与其下游通路以及 caspase-3 的下调有关^[15]。在小鼠出生 7 d、心脏失去再生能力后, Crip2 蛋白来源的多肽 K-YFAE 在心脏中的含量明显下降,这可能是因为 Crip2 蛋白与 Wnt3a 相互作用,从而对心肌细胞生长发育起到抑制作用。在心肌梗死中,心肌处于缺血、缺氧状态,蛋白 Crip2 可能会通过上调 Wnt3a 表达减少心肌细胞凋亡。由于 Wnt 信号通路机制复杂,故 Crip2 蛋白与 Wnt3a 是否具有互相调控的作用,尚需要进一步研究。而多肽 K-YFAE 有望成为此通道新的研究对象,且因其易合成、毒性低、相对分子质量小、特异性强等优势,或可为心脏再生或心肌梗死提供新的治疗策略。

综上所述,多肽 K-YFAE 既可以促进 H9C2 心肌细胞的增殖,又可以增强 H9C2 心肌细胞的缺氧耐受,发挥与其前体蛋白 Crip2 相近的作用,而 Crip2 蛋白可能参与调控 Wnt 信号通路,具体机制尚待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] LI M, IZPISUA BELMONTE J C. Mending a faltering heart[J]. *Circulation Research*, 2016, 118(2): 344-351.
- [2] PORRELLO E R, MAHMOUD A I, SIMPSON E, *et al.* Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart[J]. *Science*, 2011, 331(6020): 1078-1080.
- [3] 周诗, 胡慧媛, 郝丽英. 多肽类药物在心血管疾病中作用的研究进展[J]. *生理科学进展(ZHOU Shi, HU Hui-yuan, HAO Li-ying. Advances in the study of the role of polypeptide drugs in cardiovascular diseases[J]. Progress in Physiological Sciences)*, 2017, 48(6): 428-434.
- [4] STIERNBERG J, NORFLEET A M, REDIN W R, *et al.* Acceleration of full-thickness wound healing in normal rats by the synthetic thrombin peptide, TP508[J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2000, 8(3): 204-215.
- [5] 陈燕, 孙晨. 富含半胱氨酸肠蛋白的研究进展[J]. *海洋科学(CHEN Yan, SUN Chen. Research progress of cysteine-rich intestinal protein[J]. Marine Sciences)*, 2020, 44(6): 148-151.
- [6] MOZAFFARIAN D, BENJAMIN E J, GO A S, *et al.* Executive summary: heart disease and stroke statistics-2016 update: a report from the American Heart Association[J]. *Circulation*, 2016, 133(4): 447-454.
- [7] BULLUCK H, YELLON D M, HAUSENLOY D J. Reducing myocardial infarct size: challenges and future opportunities[J]. *Heart*, 2016, 102(5): 341-348.
- [8] MARÍN-JUEZ R, MARASS M, GAUVRIT S, *et al.* Fast revascularization of the injured area is essential to support zebrafish heart regeneration[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2016, 113(40): 11237-11242.
- [9] VIEIRA J M, NORMAN S, VILLA DEL CAMPO C, *et al.* The cardiac lymphatic system stimulates resolution of inflammation following myocardial infarction[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2018, 128(8): 3402-3412.
- [10] ZHANG L J, GUERRERO-JUAREZ C F, HATA T, *et al.* Dermal adipocytes protect against invasive *Staphylococcus aureus* skin infection[J]. *Science*, 2015, 347(6217): 67-71.
- [11] 王艳昕. 新活素治疗急性失代偿心力衰竭疗效观察[J]. *淮海医药(WANG Yan-xin. Therapeutic effect of rhBNP in treatment of acute decompensated heart failure[J]. Journal of Huaihai Medicine)*, 2017, 35(1): 44-46.
- [12] SUN X J, ZHANG R L, LIN X Y, *et al.* Wnt3a regulates the development of cardiac neural crest cells by modulating expression of cysteine-rich intestinal protein 2 in rhombomere 6[J]. *Circulation Research*, 2008, 102(7): 831-839.
- [13] DALLAS D C, GUERRERO A, PARKER E A, *et al.* Current peptidomics: applications, purification, identification, quantification, and functional analysis[J]. *Proteomics*, 2015, 15(5/6): 1026-1038.
- [14] 高胜利, 高淑红, 刘丽霞. Wnt3a 在小鼠胚胎心肌分化中的作用[J]. *现代医药卫生(GAO Sheng-li, GAO Shu-hong, LIU Li-xia. Role of Wnt3a in mouse embryonic cardiomyocyte differentiation[J]. Journal of Modern Medicine & Health)*, 2010, 26(3): 321-322.
- [15] 薛载耀. Wnt3a/β-catenin 信号传导通路在 Survivin 诱导心力衰竭心肌细胞凋亡抵抗中的作用[D]. 北京: 中国人民解放军医学院(XUE Zai-yao. The Role of Wnt3a/β-catenin Signal Pathway in Cardiomyocyte Apoptosis Resist in Heart Failure Induced by Survivin[D]. Beijing: Chinese People's Liberation Army Medical School), 2017.

(上接第 46 页)

- [17] 陈冲, 焦宁, 徐瑞荣, 等. 台盼蓝拒染法、MTT 法、CCK-8 法在研究 As₂O₃ 细胞毒性作用中的意义[J]. *中国医药导报(CHEN Chong, JIAO Ning, XU Rui-rong, *et al.* Significance of the research of trypan blue dye exclusion, MTT and CCK-8 methods on the cytotoxicity of As₂O₃[J]. China Medical Herald)*, 2013, 10(12): 24-26.
- [18] 牛天力, 秦国政. 华蟾酥毒基抑制剂人前列腺癌 PC3 细胞体外增殖研究[J]. *北京中医药大学学报(NIU Tian-li, QIN Guo-zheng. The inhibitory effects of cinobufagin on the *in vitro* proliferation of human castration-resistant prostate cancer PC3 cells[J]. Journal of Beijing University of Traditional Chinese Medicine)*, 2018, 41(12): 1019-1024.
- [19] TAN Z W, XIE S, HU S Y, *et al.* Caudatin targets TNFAIP1/NF-κB and cytochrome c/caspase signaling to suppress tumor progression in human uterine cancer[J]. *International Journal of Oncology*, 2016, 49(4): 1638-1650.
- [20] NING Y C, WANG C Q, LIU X, *et al.* CK2-mediated CDC106 phosphorylation is required for p53 degradation in cancer progression[J]. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 2019, 38(1): 131.
- [21] D'ARCY M S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy[J]. *Cell Biology International*, 2019, 43(6): 582-592.
- [22] ZHANG H J, CHEN M, LIU Y, *et al.* Paroxetine combined with fluorouracil plays a therapeutic role in mouse models of colorectal cancer with depression through inhibiting IL-22 expression to regulate the MAPK signaling pathway[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2020, 20(6): 240.
- [23] WU C, SHANG X Q, YOU Z P, *et al.* TRIM59 promotes retinoblastoma progression by activating the p38-MAPK signaling pathway[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2020, 61(10): 2.
- [24] KAVITHA K, THIYAGARAJAN P, RATHNA NANDHINI J, *et al.* Chemopreventive effects of diverse dietary phytochemicals against DMBA-induced hamster buccal pouch carcinogenesis via the induction of Nrf2-mediated cytoprotective antioxidant, detoxification, and DNA repair enzymes[J]. *Biochimie*, 2013, 95(8): 1629-1639.
- [25] HORMOZI M, GHOREISHI S, BAHARVAND P. Astaxanthin induces apoptosis and increases activity of antioxidant enzymes in LS-180 cells[J]. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 2019, 47(1): 891-895.
- [26] WEI Y J, SINHA S, LEVINE B. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation[J]. *Autophagy*, 2008, 4(7): 949-951.
- [27] 余冬梅, 安输, 杨洋, 等. JNK 激酶在细胞凋亡中的作用及其与癌症的关系[J]. *中国药理学通报(YU Dong-mei, AN Shu, YANG Yang, *et al.* The role of JNK kinase in apoptosis and its relationship with cancer[J]. Chinese Pharmacological Bulletin)*, 2015, 31(12): 1641-1645.
- [28] BRAICU C, BUSE M, BUSUIOC C, *et al.* A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1618.