

基于 BNIP3/BNIP3L 信号通路的芹菜素诱导结直肠癌线粒体自噬的机制研究

何紫雨,唐晓梦,刘晓虹,
罗文雯,胡佳豪,明天琪,李煜兵,徐海波*

成都中医药大学药学院 西南特色中药资源国家重点实验室,成都 611137

摘要:研究芹菜素对结直肠癌细胞线粒体自噬的影响及其基于 B 细胞淋巴瘤 2/腺病毒 E1B 19 kDa 相互作用蛋白 3 (B-cell lymphoma 2 (BCL-2)/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3, BNIP3)/BCL-2/腺病毒 E1B 19 kDa 相互作用蛋白 3 样蛋白 (BCL-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like, BNIP3L) 信号通路的作用机制。用 MTT 实验研究芹菜素对人结直肠癌 LoVo 细胞增殖的影响;用克隆形成实验研究芹菜素对 LoVo 细胞克隆形成能力的影响;用透射电镜观察芹菜素对 LoVo 细胞线粒体自噬形态学的影响;用 ATP 试剂盒检测芹菜素对 LoVo 细胞 ATP 含量的影响;用 JC-1 试剂盒检测芹菜素对 LoVo 细胞线粒体膜电位的影响;用 RT-qPCR 检测芹菜素对 LoVo 细胞线粒体自噬相关 mRNA 表达的影响;用 Western blot 检测芹菜素对 LoVo 细胞线粒体自噬相关蛋白水平的影响。实验结果表明,与对照组比较,芹菜素能够显著抑制 LoVo 细胞的增殖和克隆形成,诱导 LoVo 细胞呈现出线粒体自噬的形态学特征。同时,芹菜素能够降低 LoVo 细胞 ATP 含量和线粒体膜电位,此作用可被线粒体自噬激动剂 CCCP 协同增强,又可被线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 拮抗减弱。另外,芹菜素显著升高 LoVo 细胞的微管相关蛋白 1A/1B 轻链 3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3, LC3)、BNIP3 和 BNIP3L mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但降低 P62 (sequestosome 1, SQSTM1)、线粒体内膜转位酶 23 亚基 (translocase of the inner mitochondrial membrane 23 kDa subunit, TIMM23) 和 TOMM20 mRNA 和蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。综上,芹菜素可通过增强结直肠癌细胞 BNIP3/BNIP3L 信号通路活性诱导线粒体自噬,从而发挥抗结直肠癌作用。

关键词: 芹菜素;结直肠癌;线粒体自噬;BNIP3;BNIP3L;LoVo 细胞

中图分类号:R93

文献标志码:A

文章编号:1001-6880(2026)8-1652-10

DOI:10.16333/j.1001-6880.2026.8.003

CSTR:32307.14.1001-6880.2026.8.003

Mechanism of apigenin-induced mitophagy in colorectal cancer based on BNIP3/BNIP3L signaling pathway

HE Zi-yu, TANG Xiao-meng, LIU Xiao-hong,
LUO Wen-wen, HU Jia-hao, MING Tian-qi, LI Yu-bing, XU Hai-bo*

State Key Laboratory of Southwestern Chinese Medicine Resources,
School of Pharmaceutical Sciences, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China

Abstract: The study aims to investigate the effect of apigenin on the mitophagy in colorectal cancer cells and its underlying mechanism based on the B-cell lymphoma 2 (BCL-2)/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3 (BNIP3)/BCL-2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like (BNIP3L) signaling pathway. The effect of apigenin on the proliferation of human colorectal cancer LoVo cells was detected by MTT assay. The efficacy of apigenin on the clonality of LoVo cells was examined by colony formation assay. The influence of apigenin on the morphology of the mitophagy in LoVo cells was observed by transmission electron microscopy. The impact of apigenin on the ATP content in LoVo cells was assessed by the ATP kit. The potency of apigenin on the mitochondrial membrane potential was evaluated by the JC-1 kit. The RT-qPCR was

收稿日期:2025-08-21

接受日期:2026-02-10

基金项目:国家自然科学基金(81573813);四川省自然科学基金面上项目(2023NSFSC0653)

* 通信作者 E-mail: xuhb@hotmail.com

performed to analyze the effect of apigenin on the mitophagy-related mRNA expressions in LoVo cells. The Western blot analysis was conducted to probe the influence of apigenin on the mitophagy-related protein levels in LoVo cells. Compared with the control, apigenin significantly inhibited the proliferation and colony formation of LoVo cells, and induced the morphological features of mitophagy in LoVo cells. Meanwhile, apigenin decreased the ATP content and mitochondrial membrane potential of LoVo cells, which was synergized by the activator of mitophagy named CCCP, and antagonized by the inhibitor of mitophagy named Mdivi-1. Additionally, apigenin significantly increased the mRNA and protein expression levels of microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3), BNIP3 and BNIP3L in LoVo cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but mitigated the mRNA and protein expression levels of P62 (sequestosome 1, SQSTM1), the translocase of the inner mitochondrial membrane 23 kDa subunit (TIMM23) and the translocase of the outer mitochondrial membrane 20 kDa subunit (TOMM20) in LoVo cells ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Taken together, apigenin can induce the mitophagy of colorectal cancer by heightening the activity of the BNIP3/BNIP3L signaling pathway, so as to exert the anti-colorectal cancer effect.

Key words: apigenin; colorectal cancer; mitophagy; BNIP3; BNIP3L; LoVo cells

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)作为一种恶性肿瘤,其病理机制涉及基因突变、表观遗传改变与细胞微环境紊乱等诸多因素^[1]。线粒体自噬是细胞通过自噬——溶酶体途径对受损、老化或多余线粒体进行选择清除的一种生理病理现象。线粒体自噬作为维持线粒体质量的核心机制,其通过调控细胞代谢、氧化应激和凋亡抵抗,与CRC等肿瘤病机密切相关。细胞线粒体损伤(如DNA突变、膜电位丧失)会导致活性氧(reactive oxygen species, ROS)过度积累,引发DNA损伤和致癌突变^[2]。线粒体自噬通过清除这些残损的线粒体,抑制ROS介导的基因组不稳定,阻止肿瘤的病理进程。线粒体自噬的发生机制主要分为泛素依赖通路和非泛素依赖的受体介导通路。在受体介导通路中,BNIP3和BNIP3L是线粒体外膜上的缺氧诱导蛋白,它们既是促凋亡因子又是线粒体自噬受体^[3]。高表达的BNIP3可以结合LC3/ γ -氨基丁酸A受体相关蛋白(γ -aminobutyric acid receptor-associated protein, GABARAP)并招募自噬体包裹线粒体^[4],进而诱导CRC细胞发生线粒体自噬,抑制CRC发生发展^[5]。因此,调控肿瘤细胞线粒体自噬是治疗肿瘤的一种有效策略。

芹菜素是一种黄酮类化合物,其广泛存在于败酱草、鱼腥草、野菊花、芹菜、洋葱、柑橘等多种中药和食物中^[6]。研究表明,芹菜素具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化和抗菌等药理作用^[7]。例如,芹菜素可以通过调控核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)和磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)/雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of rapamycin, mTOR)等信号通路抑制CRC细胞的增殖和恶性转化^[8]。此外,芹菜素

还能够通过改善乳腺癌细胞微环境,诱导乳腺癌细胞凋亡^[9]。但是,芹菜素抗CRC的机制尚不明晰,尤其是芹菜素对CRC线粒体自噬的影响更不清楚。因此,本文旨在研究芹菜素对CRC细胞线粒体自噬的影响,及其基于BNIP3/BNIP3L信号通路的作用机理,以期为含芹菜素中药抗CRC的临床应用提供实验依据和基于芹菜素的抗CRC创新药物研发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人结直肠癌LoVo细胞(批号:20250626,湖南丰晖生物有限公司)。

1.2 药品与试剂

芹菜素(纯度>98%,批号:MUST-24120121,成都曼斯特生物科技有限公司);线粒体自噬激动剂CCCP(批号:HY-100941,美国MedChemExpress公司);线粒体自噬抑制剂Mdivi-1(批号:338967-87-6,美国GlpBio公司);阳性对照药顺铂(*cis*-diamminedichloroplatinum, CDDP)(批号:C14103808,上海麦克林生化科技有限公司);Ham's F-12K培养液(批号:BC20230422,南京生航生物技术有限公司);南美胎牛血清(批号:C8010-500 mL,上海泰坦科技股份有限公司);BNIP3抗体(批号:10032361)、BNIP3L抗体(批号:00101177)、LC3抗体(批号:00167871)、TOMM20抗体(批号:00156195)、TIMM23抗体(批号:00149916)、P62抗体(批号:00515765)和 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号:10038080,武汉三鹰生物技术有限公司);胰蛋白酶细胞消化液(批号:C0203)、MTT细胞增殖和细胞毒性检测试剂盒(批号:C0009S)、BCA蛋白浓度测定试剂盒(批号:040224240531)、ATP检测试剂盒(批

号:032224240430)、JC-1 检测试剂盒(批号:092723240411)、BeyoRT™ III cDNA 第一链合成试剂盒(批号:120622230413)、RNAeasy™ Plus 动物 RNA 抽提试剂盒(批号:Z928240930,上海碧云天生物科技有限公司);2 × Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix(批号:G3326-15,武汉赛维尔生物科技有限公司)。

1.3 仪器

3001 型多功能酶标仪、Forma 3111 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);SW-CT-2FD 型超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);MF53-N 型倒置荧光显微镜(广州市明美光电技术有限公司);CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪、ChemiDoc XRS + 化学发光凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);SpectraMax iD5e 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司)。

1.4 方法

1.4.1 细胞培养

用 Ham's F-12K 培养液(含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液)于 37 °C、5% CO₂ 的条件下培养人结直肠癌 LoVo 细胞。每 2 d 更换 1 次培养液,待细胞长满 85% 以上时,用胰蛋白酶消化细胞,传代继续培养,用于后续实验。

1.4.2 LoVo 细胞增殖检测

取处于对数生长期的 LoVo 细胞,按 8×10^3 个/孔的细胞密度接种于 96 孔板,孵育 24 h 后,用含 0、1.25、2.5、5、10、20、40、60 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素的完全培养液处理细胞 48 h。随后,用含 MTT 的培养液继续孵育 4 h,再加入 100 μL DMSO 溶液,避光振摇 15 min 后,于 570 nm 检测吸光度(A),根据公式(1)计算细胞存活率(R),并计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)。

$$R = (A_D - A_B) / (A_C - A_B) \times 100\% \quad (1)$$

式中, A_D 代表药物处理组吸光度; A_B 代表空白组吸光度; A_C 代表溶剂对照组吸光度。

1.4.3 LoVo 细胞克隆形成能力检测

取处于对数生长期的 LoVo 细胞,按 1×10^3 个/孔的细胞密度接种于 24 孔板。24 h 后,用含芹菜素(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)或阳性对照药 CDDP(10 $\mu\text{mol/L}$)的完全培养液处理细胞,每隔 3 d 更换一次培养液。14 d 后,用 4% 多聚甲醛溶液固定细胞 20 min,再用 0.1% 结晶紫溶液染色 20 min,于光学显微镜下计数细胞克隆(≥ 50 细胞/克隆或直径 ≥ 0.4

mm)。

1.4.4 LoVo 细胞线粒体自噬形态观察

消化收集处于对数生长期的 LoVo 细胞,接种于 T25 培养瓶,分为对照组、芹菜素组和线粒体自噬激动剂 CCCP 组。待细胞贴壁后,用含 20 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素或 10 $\mu\text{mol/L}$ CCCP 的完全培养液处理细胞 48 h。用预冷的 2.5% 戊二醛固定细胞 1 h,再用细胞刮刀收集细胞。将细胞团脱水、包埋、固化、切片和染色。用透射电镜观察芹菜素对 LoVo 细胞线粒体自噬形态学的影响。

1.4.5 LoVo 细胞 ATP 含量检测

消化收集处于对数生长期的 LoVo 细胞,以 5×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板,分为对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素组、10 $\mu\text{mol/L}$ 线粒体自噬激动剂 CCCP 组、5 $\mu\text{mol/L}$ 线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素 + 10 $\mu\text{mol/L}$ CCCP 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素 + 5 $\mu\text{mol/L}$ Mdivi-1 组。24 h 后,用含上述药物试剂的完全培养液处理细胞 48 h,再根据 ATP 试剂盒说明书操作,于冰上裂解细胞,离心后取上清液,最后用 SpectraMax iD5e 多功能酶标仪进行化学发光测定 ATP 含量。

1.4.6 LoVo 细胞线粒体膜电位检测

消化收集处于对数生长期的 LoVo 细胞,以 1×10^5 个/孔的细胞接种于 24 孔板,分为对照组、20 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素组、10 $\mu\text{mol/L}$ 线粒体自噬激动剂 CCCP 组、5 $\mu\text{mol/L}$ 线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素 + 10 $\mu\text{mol/L}$ CCCP 组、20 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素 + 5 $\mu\text{mol/L}$ Mdivi-1 组。24 h 后,用含上述药物试剂的完全培养液处理细胞 48 h,再根据 JC-1 试剂盒说明书操作,避光染色细胞,最后用倒置荧光显微镜观测绿色的 JC-1 单体和红色的 JC-1 聚合物,并用 ImageJ 软件定量分析荧光强度。

1.4.7 RT-qPCR 检测 LoVo 细胞线粒体自噬相关 mRNA 表达

消化收集处于对数生长期的 LoVo 细胞,以 5×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板,24 h 后,用含芹菜素(10、20、40 $\mu\text{mol/L}$)或阳性对照药 CDDP(10 $\mu\text{mol/L}$)的完全培养液处理细胞 48 h。用 RNAeasy™ Plus 动物 RNA 抽提试剂盒提取细胞总 RNA,再用 BeyoRT™ III cDNA 第一链合成试剂盒逆转录得到 cDNA,随后用 2 × Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 在 CFX96 Touch 实时荧光定量 PCR 仪上进行扩增。qPCR 反应程序为 95 °C 预变

性 30 s, 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 引物序列见表 1。以 *GAPDH* 内参, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列 Primer sequence(5'→3')
<i>GAPDH</i>	F: CCTCGTCCCGTAGACAAAATG R: TGAGGTCAATGAAGGGGTGCT
<i>BNIP3</i>	F: ACAGCTCACAGTCTGAGGAAGATGA R: CGGCTGTTTAAAGAGGAACCTCTGG
<i>BNIP3L</i>	F: GGACCATAGCTCTCAGTCAGAAGA R: GGTGTCTGAAGTGAACCTCTTG
<i>TIMM23</i>	F: TACCTCGTCAGGATACAGATGAG R: GTTCTGGGTTTCCTTCAATCCTAGC
<i>TOMM20</i>	F: CTGGGCTTTCCAAGTTACCTGAC R: AAGACCTGCAGTAAGTCTGTG
<i>LC3B</i>	F: CCGCACCTTCGAACAAAGAGTAG R: GCTCACTCATGTTGACATGCTCAG
<i>P62</i>	F: CTCGGAAGGTGAAACACGGAC R: CCGATGGACCAGAAGCTGATTCTG

1.4.8 Western blot 检测 LoVo 细胞线粒体自噬相关蛋白水平

消化收集处于对数生长期的 LoVo 细胞, 以 5×10^5 个/孔的细胞密度接种于 6 孔板, 24 h 后, 用含芹菜素 (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 或阳性对照药 CDDP (10 $\mu\text{mol/L}$) 的完全培养液处理细胞 48 h。随后, 用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白, 并

用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 在室温下用 5% 脱脂奶粉封闭 45 min, 再加入一抗 BNIP3 (1: 20 000)、BNIP3L (1: 2 000)、P62 (1: 20 000)、LC3B (1: 1 500)、TIMM23 (1: 2 000)、TOMM20 (1: 10 000)、内参 β -actin (1: 20 000), 于 4 ℃ 轻摇孵育过夜。次日, 用辣根过氧化物酶偶联的二抗 (1: 20 000) 于室温下轻摇孵育 PVDF 膜 90 min。用 TBST 洗膜 3 次后, 最后用 ECL 化学发光试剂在 ChemiDoc XRS + 化学发光凝胶成像系统显影蛋白条带, 以 β -actin 为内参, 用 Image J 软件分析蛋白表达量。

1.5 数据分析

采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计学分析和绘图, 数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芹菜素对 LoVo 细胞增殖的影响

如图 1 所示, 用不同浓度的芹菜素处理 LoVo 细胞 48 h 后, 与对照组比较, 2.5、5、10、20、40、60 和 80 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素显著降低 LoVo 细胞的增殖活性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且此抑制作用呈现出浓度依赖性。芹菜素对 LoVo 细胞的 IC_{50} 为 18.35 $\mu\text{mol/L}$ 。在后续研究中, 采用 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作为芹菜素的实验浓度。

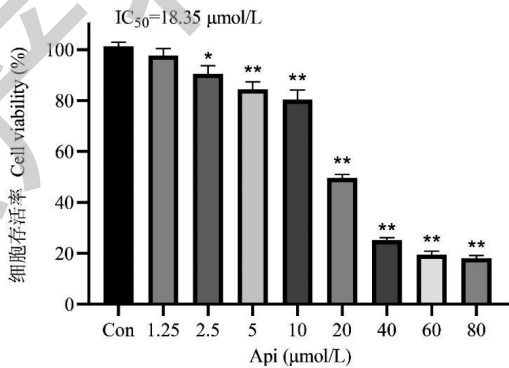


图 1 芹菜素对 LoVo 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effect of apigenin on the proliferation of LoVo cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

注: Api 为芹菜素; 与对照组 (Con) 比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 下同。Note: Api is apigenin; Compared with control (Con), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

2.2 芹菜素对 LoVo 细胞克隆形成的影响

如图 2 所示, 用不同浓度芹菜素和 CDDP 处理 LoVo 细胞 14 d 后, 与对照组比较, 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$

芹菜素和 10 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 显著减少细胞克隆数量 ($P < 0.01$), 且芹菜素的抑制作用呈现出浓度依赖性。实验结果提示, 芹菜素和 CDDP 能够抑制 LoVo

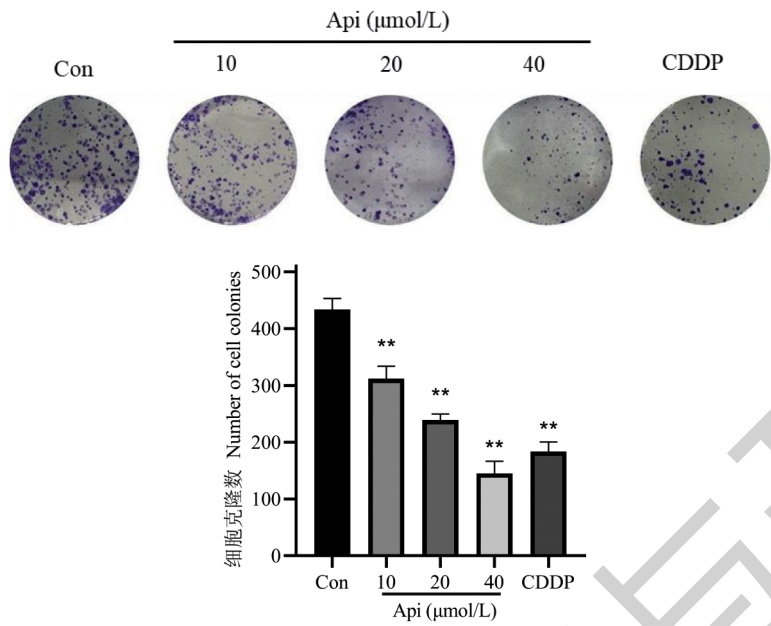


图 2 芹菜素对 LoVo 细胞克隆形成的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 2 Effect of apigenin on the colony formation of LoVo cells($\bar{x} \pm s, n = 4$)

细胞克隆形成。

2.3 芹菜素对 LoVo 细胞线粒体自噬形态学的影响

如图 3 所示,用 20 μmol/L 芹菜素、10 μmol/L 线粒体自噬激动剂 CCCP 处理 LoVo 细胞 48 h 后,LoVo 细胞呈现出线粒体自噬的形态学特征,用透射电镜能观察到增多的自噬小体和自噬溶酶体以及线粒体肿胀。实验结果提示,芹菜素和 CCCP 能够诱导 LoVo 细胞发生线粒体自噬。

2.4 芹菜素对 LoVo 细胞 ATP 含量的影响

如图 4 所示,与对照组比较,20 μmol/L 芹菜素和 10 μmol/L 线粒体自噬激动剂 CCCP 均显著降低 LoVo 细胞内 ATP 含量,而 5 μmol/L 线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 能够升高 LoVo 细胞内 ATP 含量($P < 0.01$)。并且,芹菜素的此作用既被 CCCP 协同增强,又被 Mdivi-1 拮抗减弱($P < 0.01$)。实验结果提示,芹菜素可通过诱导 LoVo 细胞发生线粒体自噬而降低细胞内 ATP 含量。

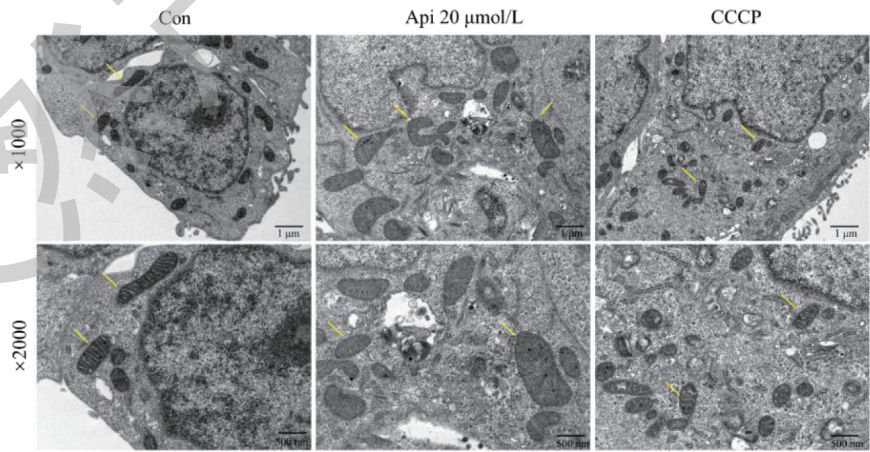


图 3 芹菜素对 LoVo 细胞线粒体自噬形态学的影响

Fig. 3 Effect of apigenin on the morphology of mitophagy in LoVo cells

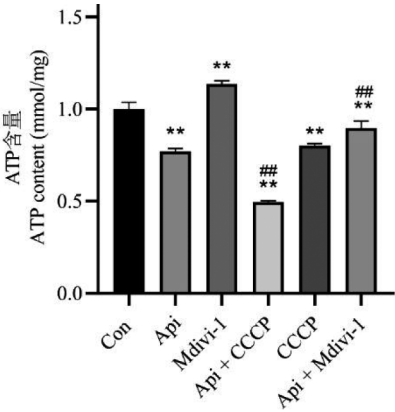


图4 芹菜素对 LoVo 细胞 ATP 含量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of apigenin on ATP content in LoVo cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与 Api 组比较, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, 下同。Note: Compared with Api group, $^{\#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$, the same below.

2.5 芹菜素对 LoVo 细胞线粒体膜电位的影响

如图 5 所示,与对照组比较,20 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素和 10 $\mu\text{mol/L}$ 线粒体自噬激动剂 CCCP 均显著降低 LoVo 细胞线粒体膜电位(JC-1 单体的绿色荧光增强,JC-1 聚合体的红色荧光减弱),而 5 $\mu\text{mol/L}$ 线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 能够升高 LoVo 细胞线粒体膜电位(JC-1 单体的绿色荧光减弱,JC-1 聚合体的红色荧光增强)($P < 0.01$)。并且,芹菜素的此作用既被 CCCP 协同增强,又被 Mdivi-1 拮抗减弱($P < 0.01$)。实验结果提示,芹菜素可通过诱导 LoVo 细胞发生线粒体自噬而降低细胞线粒体膜电位。

2.6 芹菜素对 LoVo 细胞线粒体自噬相关 mRNA 表达的影响

如图 6 所示,用不同浓度芹菜素和 CDDP 处理

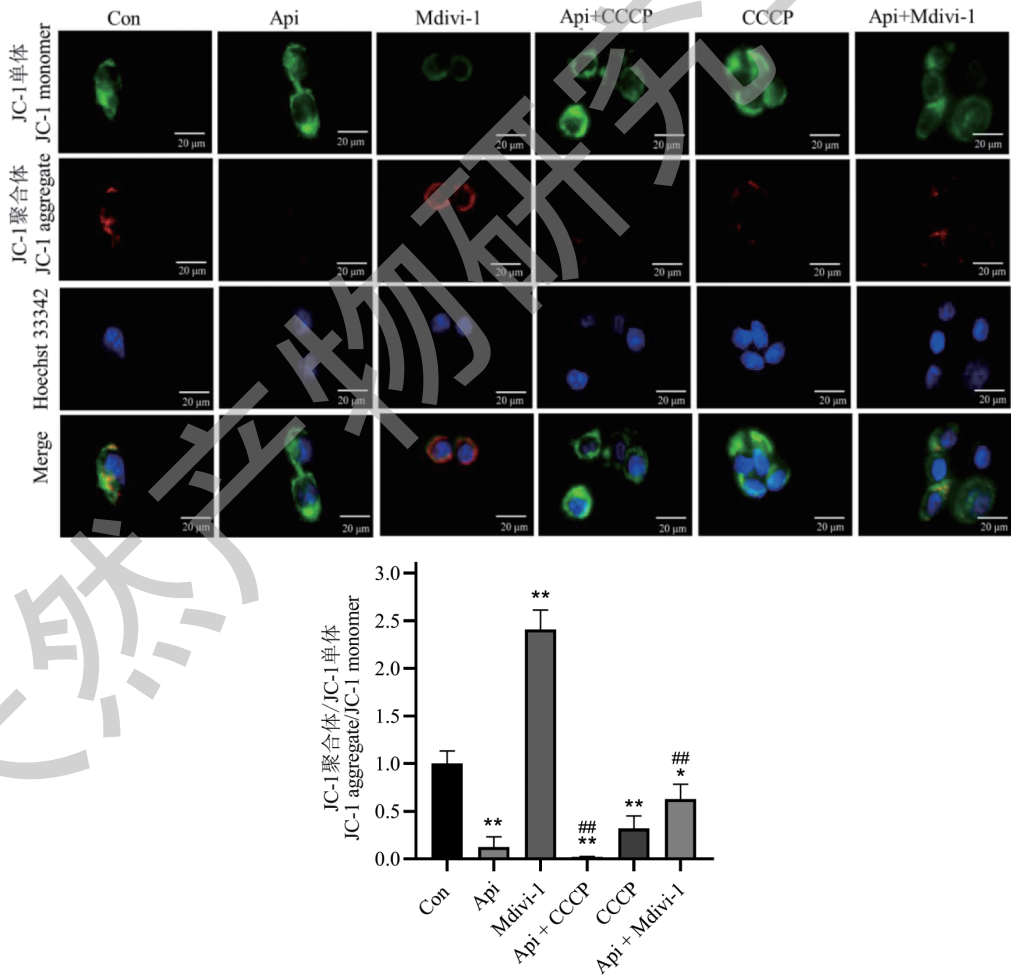


图5 芹菜素对 LoVo 细胞线粒体膜电位的影响($\times 400; \bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of apigenin on the mitochondrial membrane potential of LoVo cells ($\times 400; \bar{x} \pm s, n = 3$)

LoVo 细胞 48 h 后,与对照组比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素和 10 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 能够升高 LoVo 细胞 *LC3B* 的 mRNA 水平,但是降低 LoVo 细胞 *P62*、

TIMM23 和 *TOMM20* 的 mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。实验结果提示,芹菜素能够诱导 LoVo 细胞发生线粒体自噬。

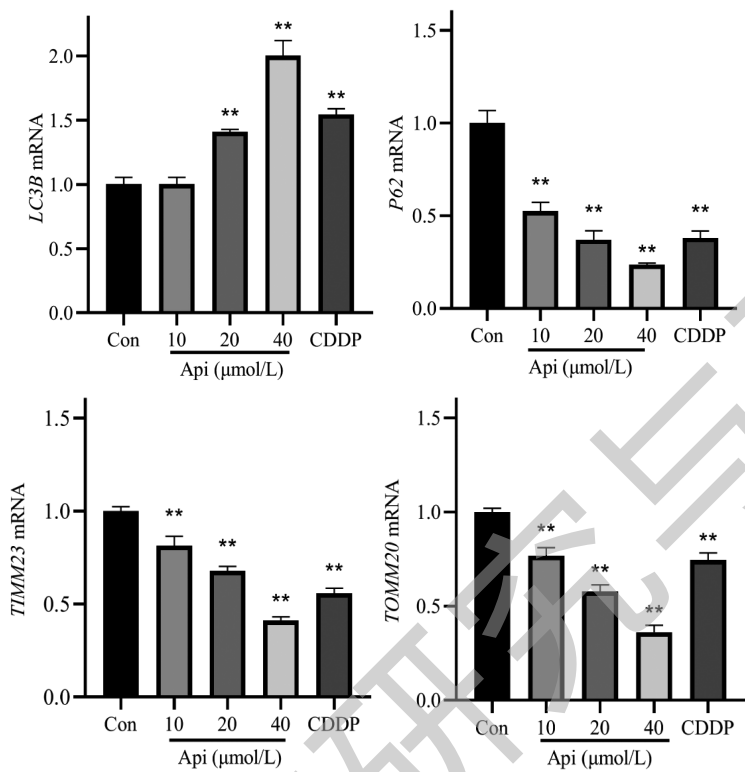


图6 芹菜素对 LoVo 细胞线粒体自噬相关 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Fig. 6 Effect of apigenin on the mitophagy-related mRNA expressions in LoVo cells($\bar{x} \pm s, n = 4$)

2.7 芹菜素对 LoVo 细胞线粒体自噬相关蛋白水平的影响

如图 7 所示,用不同浓度芹菜素和 CDDP 处理 LoVo 细胞 48 h 后,与对照组比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素和 10 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 能够升高 LoVo 细胞 LC3-II/LC3-I 蛋白水平比值,但是降低 LoVo 细胞 P62、TIMM23 和 TOMM20 的蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。实验结果提示,芹菜素能够诱导 LoVo 细胞发生线粒体自噬。

2.8 芹菜素对 LoVo 细胞 BNIP3/BNIP3L 信号通路 mRNA 表达的影响

如图 8 所示,用不同浓度芹菜素和 CDDP 处理 LoVo 细胞 48 h 后,与对照组比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素和 10 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 能够提高 LoVo 细胞 *BNIP3* 和 *BNIP3L* 的 mRNA 表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。实验结果提示,芹菜素能够增强 LoVo 细胞 *BNIP3/BNIP3L* 信号通路活性,进而诱导 LoVo 细胞发生线粒体自噬。

2.9 芹菜素对 LoVo 细胞 BNIP3/BNIP3L 信号通路蛋白水平的影响

如图 9 所示,用不同浓度芹菜素和 CDDP 处理 LoVo 细胞 48 h 后,与对照组比较,10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 芹菜素和 10 $\mu\text{mol/L}$ CDDP 能够升高 LoVo 细胞 *BNIP3* 和 *BNIP3L* 的蛋白水平($P < 0.05$, $P < 0.01$)。实验结果提示,芹菜素能够增强 LoVo 细胞 *BNIP3/BNIP3L* 信号通路活性,进而诱导 LoVo 细胞发生线粒体自噬。

3 讨论与结论

芹菜素是一种广泛存在于多种中药和食物中的活性成分。本研究发现,芹菜素能够抑制 CRC 细胞增殖和克隆形成,这与芹菜素能够抗 CRC 的报道一致^[10]。本研究进一步发现,芹菜素抗 CRC 的机制与其诱导 CRC 细胞线粒体自噬相关。线粒体自噬主要的病理特征是线粒体损伤引起细胞内 ATP 含量下降和线粒体膜电位降低,造成受损线粒体累积,最终引发自噬溶酶体清除线粒体而导致细胞死

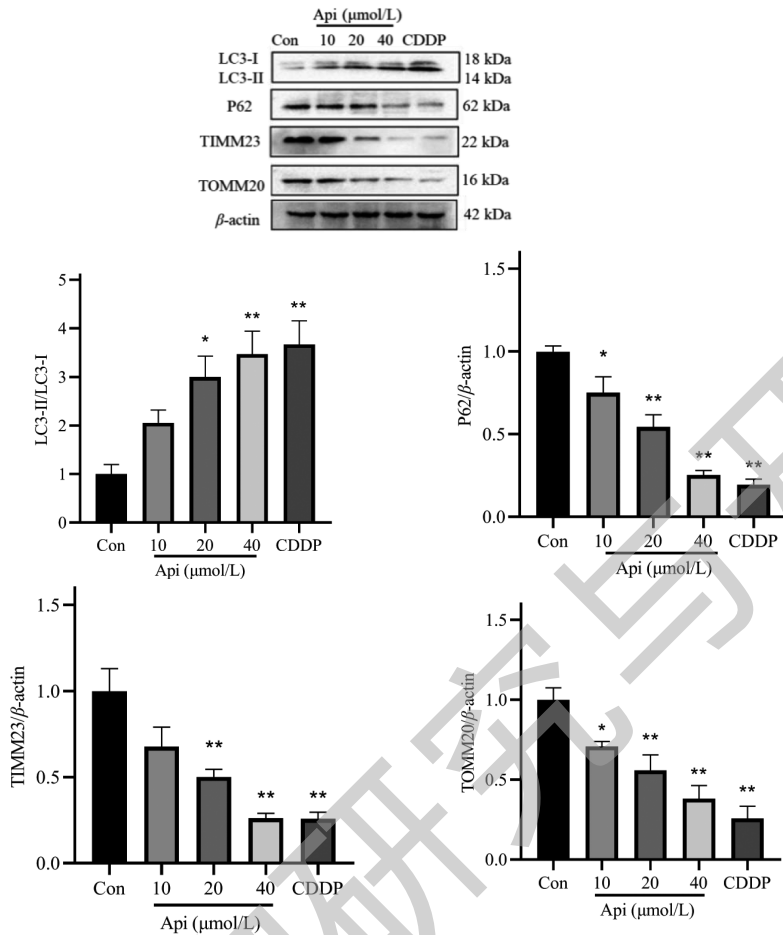


图 7 芹菜素对 LoVo 细胞线粒体自噬相关蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of apigenin on the mitophagy-related protein levels in LoVo cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

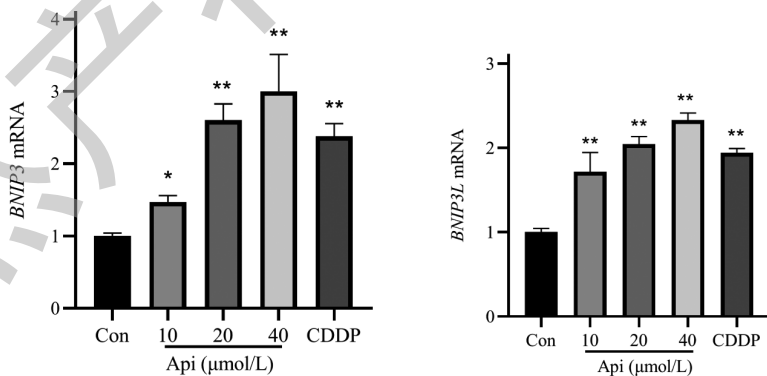


图 8 芹菜素对 LoVo 细胞 BNIP3/BNIP3L 信号通路 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Fig. 8 Effect of apigenin on the mRNA expressions of BNIP3/BNIP3L signaling pathway in LoVo cells($\bar{x} \pm s, n=4$)

亡^[11]。BNIP3 和 BNIP3L 作为重要的线粒体自噬受体,其定位于线粒体外膜,并通过 LC3 相互作用区与自噬体标记物 LC3 结合^[12],从而将待降解的线粒体招募至自噬体。在肿瘤中,BNIP3/BNIP3L 功能较复杂,其既可因缺氧等应激发挥抗癌作用^[13],也

可能在某些情况下促进肿瘤适应和存活^[14]。本研究发现,芹菜素可以提高 CRC 细胞 BNIP3 和 BNIP3L 表达,增强 BNIP3/BNIP3L 信号通路活性,从而诱导线粒体自噬。

CCCP 是一种线粒体自噬的激动剂,其能够影

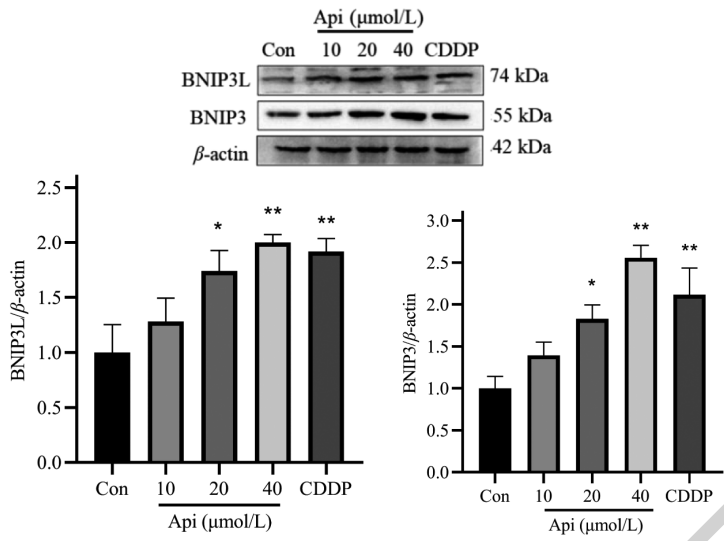


图9 芹菜素对 LoVo 细胞 BNIP3/BNIP3L 信号通路蛋白水平的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 9 Effect of apigenin on the protein levels of BNIP3/BNIP3L signaling pathway in LoVo cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

响线粒体的动态平衡。本研究发现,芹菜素和 CCCP 均诱导 LoVo 细胞呈现出线粒体自噬的形态学特征,包括线粒体破损、受损线粒体的体积增大和基质肿胀等。并且,芹菜素的此作用可被 CCCP 协同增强,也被线粒体自噬抑制剂 Mdivi-1 拮抗减弱。ATP 是细胞能量代谢的核心调控分子,这种调控不仅体现在能量感知通路对自噬的全局性调节,也影响线粒体自噬过程中的能量依赖环节^[15]。业已证明,线粒体自噬伴随有细胞内 ATP 含量下降^[16],且 CRC 细胞的线粒体膜电位通常高于正常肠上皮细胞^[17]。本研究发现,芹菜素能够降低 LoVo 细胞内 ATP 含量并导致线粒体膜电位降低,从而引发 LoVo 细胞线粒体损伤,促使细胞启动清除受损线粒体的程序,最终诱发线粒体自噬。

本研究仅在体外细胞系探索了芹菜素诱导 CRC 细胞发生线粒体自噬的作用,及其基于 BNIP3/BNIP3L 信号路通的机制。今后,亟需在 CRC 动物模型上进一步阐明芹菜素诱导 CRC 线粒体自噬的分子机制。另外, HIF-1α、FOXO 转录因子家族、AMPK/mTOR 信号轴、P53 等都可能调控 BNIP3/BNIP3L 表达^[18,19]。所以,今后应聚焦 BNIP3/BNIP3L 信号通路上游各分子的交互作用,以期阐释芹菜素诱导 CRC 线粒体自噬的整合机制。

综上所述,芹菜素可通过增强 CRC 细胞 BNIP3/BNIP3L 信号通路活性诱导线粒体自噬,从而发挥抗 CRC 作用,这为含芹菜素中药抗 CRC 的临床应用提供了科学支撑,也为基于芹菜素的抗

CRC 创新药物研发奠定了基础。

数据可用性声明: 本篇论文的关联数据可在 ScienceDB 数据库 (<https://doi.org/10.57760/sciencedb.nprd.00023>) 中访问获取。

参考文献

- 1 Wang P, Wang CF, Han SL, et al. Tuberous fritillaria glycoside A induces ferroptosis in colorectal cancer cells by promoting the ubiquitination and degradation of GPX4[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2025, 37: 403-410.
- 2 André T, Shiu KK, Kim TW, et al. Pembrolizumab in microsatellite-instability-high advanced colorectal cancer[J]. N Engl J Med, 2020, 383: 2207-2218.
- 3 Wang ZY, Yu C, Xie GC, et al. USP14 inhibits mitophagy and promotes tumorigenesis and chemosensitivity through deubiquitinating BAG4 in microsatellite instability-high colorectal cancer[J]. Mol Med, 2025, 31: 163.
- 4 Poole LP, Macleod KF. Mitophagy in tumorigenesis and metastasis[J]. Cell Mol Life Sci, 2021, 78: 3817-3851.
- 5 Xie YC, Liu J, Kang R, et al. Mitophagy receptors in tumor biology[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 594203.
- 6 Patel D, Shukla S, Gupta S. Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise (review)[J]. Int J Oncol, 2007, 30: 233-245.
- 7 Shukla S, Gupta S. Apigenin: a promising molecule for cancer prevention[J]. Pharm Res, 2010, 27: 962-978.
- 8 Goleij P, Heidari MM, Motevalli H, et al. Targeting the HGF/MET axis in cancer: therapeutic promise for natural compounds[J]. Eur J Med Chem, 2025, 298: 118027.