

# 荷叶碱抑制 Akt/mTOR/4EBP1-糖酵解通路 抗胆管癌细胞增殖作用研究

屈雅琴<sup>1</sup>, 张倩玉<sup>1</sup>, 谈相云<sup>1</sup>, 郑国华<sup>1,2</sup>, 邱振鹏<sup>1</sup>, 田先翔<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>湖北中医药大学药学院; <sup>2</sup>湖北中医药大学 中药资源与中药复方教育部重点实验室, 武汉 430065

**摘要:**本研究基于网络药理学探究荷叶碱抑制人肝内胆管癌细胞 HuCCT1 增殖的分子机制。采用 MTT 比色法、克隆形成实验检测荷叶碱对 HuCCT1 细胞增殖的影响; 采用比色法、分光光度法检测荷叶碱对糖酵解生化指标的影响; 通过网络构建和富集分析预测荷叶碱作用于肝内胆管癌的潜在靶点及通路, 以此为基础探究荷叶碱影响 HuCCT1 细胞增殖的可能机制。结果表明荷叶碱能抑制 HuCCT1 增殖, 显著降低细胞葡萄糖消耗及乳酸生成, 并呈时间和剂量依赖性; 网络药理学分析显示荷叶碱主要通过 PI3K/ Akt、MAPK、HIF-1 信号通路影响肝内胆管癌生长、运动; 聚合酶链式反应 (PCR) 和蛋白免疫印迹 (Western blot) 结果显示 (30、60、120  $\mu\text{mol/L}$ ) 荷叶碱能降低低氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、己糖激酶 2 (HK2) 和丙酮酸激酶 2 (PKM2) 的 mRNA 水平和蛋白表达, 同时下调 p-Akt<sup>Thr308</sup>、p-mTOR、p-4EBP1 蛋白表达。综上, 荷叶碱可能通过影响 Akt/mTOR/4EBP1 信号级联调控的糖酵解活性抑制 HuCCT1 细胞增殖。

**关键词:** 荷叶碱; 肝内胆管癌; 网络药理学; HIF-1 $\alpha$ ; 糖酵解; 增殖

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)8-1297-09

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.8.002

## Effect of nuciferine against the proliferation of cholangiocarcinoma cells through Akt/mTOR/4EBP1-glycolytic pathway

QU Ya-qin<sup>1</sup>, ZHANG Qian-yu<sup>1</sup>, TAN Xiang-yun<sup>1</sup>,  
ZHENG Guo-hua<sup>1,2</sup>, QIU Zhen-peng<sup>1</sup>, TIAN Xian-xiang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmacy, Hubei University of Chinese Medicine;

<sup>2</sup>Key Laboratory of Chinese Medicine Resource and Compound Prescription, Ministry of Education, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

**Abstract:** The study explores the molecular mechanism of nuciferine in inhibiting the proliferation of human intrahepatic cholangiocarcinoma cell HuCCT1 by network pharmacology. The MTT colorimetric and clone formation assay was used to measure the proliferation activity of HuCCT1 cells. After nuciferine treatment, the glycolytic biochemical indexes were detected by colorimetric and spectrophotometric assay. The potential targets and pathways of nuciferine in intrahepatic cholangiocarcinoma were predicted by constructing a network and the enrichment analysis results. And further investigation of nuciferine inhibiting HuCCT1 cell proliferation is being explored based on it. It is shown that nuciferine improved HuCCT1 proliferation in a time- and dose-dependent manner and significantly reduced cellular glucose consumption and lactate production. Network pharmacological analysis indicated that nuciferine affected intrahepatic cholangiocarcinoma growth and motility mainly through PI3K/ Akt, MAPK, and HIF-1 signaling pathways. Data of polymerase chain reaction (PCR) and Western blot demonstrated that nuciferine was able to downregulate the mRNA and protein expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), hexokinase 2 (HK2), pyruvate kinase 2 (PKM2), as well as protein expression of p-Akt<sup>Thr308</sup>, p-mTOR and p-4EBP1. In conclusion, nuciferine may inhibit the proliferation of HuCCT1 cells through the adjustment of glycolytic activity regulated by the Akt/mTOR/4EBP1 signaling cascade.

**Key words:** nuciferine; intrahepatic cholangiocarcinoma; network pharmacology; HIF-1 $\alpha$ ; glycolysis; proliferation

收稿日期: 2022-11-17 接受日期: 2023-03-30

基金项目: 湖北省自然科学基金 (2015CFB729)

\* 通信作者 E-mail: tianxx71@hbtcu.edu.cn

胆管癌 (cholangiocarcinoma, CCA) 根据解剖部位分为肝外胆管癌 (extrahepatic cholangiocarcinoma)

和肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)<sup>[1]</sup>。ICC 虽仅占原发性肝癌的 10% ~ 20%<sup>[2,3]</sup>,但早期隐匿性强,术后复发率高且预后较差。近几十年,ICC 在亚洲乃至全球发病率及死亡率稳步上升<sup>[4,5]</sup>,ICC 晚期的一线化疗方案长期使用易产生耐药性和药物不良反应<sup>[5]</sup>,因此需探寻安全有效的治疗药物。

从动植物中筛选具有抗肿瘤作用的天然药物活性成分一直是国内外研究热点<sup>[6]</sup>。荷叶碱 (nuciferine, NUF) 来源于睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn 的干燥叶,具有一定抗肿瘤细胞活性<sup>[7]</sup>,但其对 ICC 细胞的作用鲜有报道。本研究探究了荷叶碱对 HuCCT1 细胞增殖及糖酵解过程的影响,初步探讨其作用机制,为研发安全有效 ICC 治疗药物提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞

肝内胆管癌细胞 (系) HuCCT1 购自上海信裕生物科技有限公司,用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100  $\mu$ g/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱进行常规培养。

### 1.2 仪器

MCO-15AC 型 CO<sub>2</sub> 细胞培养箱 (日本 Sanyo 公司);CKX31 型倒置显微镜、TC20 型细胞计数器 (日本 Olympus 公司);CFX96 型实时荧光定量-聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪、Power Pac Basic 型电泳仪、x Mark 型全波长酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

### 1.3 药品与试剂

荷叶碱 (纯度  $\geq 98\%$ ,上海源叶生物科技有限公司,批号 T25S11Z125833);胎牛血清 (美国 Gibco 公司,批号 42F2391K);青霉素和链霉素、RPMI 1640 培养基、0.25% 胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司,批号分别为 J200044、AH29714276、J210005);细胞培养级 DMSO 试剂、乳酸含量检测试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 401Q033、20200612);MTT 试剂 (合肥博美生物科技有限公司,批号 K191422);结晶紫 (美国 Sigma 公司,批号 SLBP0250V);葡萄糖检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司,批号 012522220712);二代逆转录 cDNA 合成 (含基因组 DNA 去除) 试剂盒、通用型彩色示踪 qPCR Master Mix、兔源 HIF-1 $\alpha$  单克隆抗体 (赛维尔生物科技有限公司,批号分别为 MPC2202024、MPC2201066、GB11031);Invitrogen<sup>TM</sup> TRIzol<sup>TM</sup> RNA 提取试剂、M-PERTM 哺乳动物蛋白抽提试剂、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 超敏化学发光

液 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号分别为 15596018、V1311347、VC294999、VC297103);蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂 (康为世纪科技有限公司,批号分别为 01392、01385);鼠源  $\beta$ -actin 抗体 (Proteintech 公司,批号 HRP-60008);兔源磷酸化哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (p-mTOR) 单克隆抗体 (英国 abcam 公司,批号 ab109268);兔源磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt<sup>Thr308</sup>) 单克隆抗体、mTOR 单克隆抗体、磷酸化真核翻译抑制蛋白 1 (p4EBP1) 单克隆抗体、己糖激酶 2 (HK2) 单克隆抗体、丙酮酸激酶 2 (PKM2) 单克隆抗体、HRP 标记的山羊抗兔 Ig G 二抗 (美国 CST 公司,批号分别为 13038、2983、2855、2867、4053、7074)。

### 1.4 荷叶碱母液配制

精密称取 35.44 mg 荷叶碱,溶于 1 mL DMSO,经 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,得到浓度为 120 mmol/L 荷叶碱母液,分装,-20  $^{\circ}$ C 保存备用。临用前使用培养基稀释至所需浓度。

### 1.5 MTT 比色法检测细胞存活率

细胞以  $5 \times 10^3$  个每孔接种于 96 孔板,设置空白组 (只含培养基)、给药组,于培养箱过夜培养后,弃培养液,并分别加入等量不同浓度 (0、10、20、40、60、100、200、400  $\mu$ mol/L) 的荷叶碱,空白组给予等体积培养基,每组设 6 个平行孔。给药 24、48 h 后,每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20  $\mu$ L,继续培养 4 h,后弃上清,每孔加入 150  $\mu$ L DMSO,于 570 nm 波长处检测吸光度,并按照公式 (1) 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{(A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}})}{A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}} \times 100\% \quad (1)$$

### 1.6 平板克隆实验检测细胞克隆形成能力

细胞以  $1 \times 10^3$  个/孔接种于 6 孔板,设置对照 (control, Con) 组和 NUF 低、中、高剂量 (30、60、120  $\mu$ mol/L) 给药组,待其贴壁后每 2 d 换一次液,给药处理 10 d 后弃培养液,PBS 清洗 3 次,4% 多聚甲醛溶液固定 15 min,0.5% 结晶紫溶液染色 30 min,并用 Image J 软件进行细胞集落计数。

### 1.7 细胞葡萄糖消耗及乳酸生成水平检测

细胞正常接种于直径为 5 cm 的培养皿中,待其生长至对数生长期时,按“1.6”项下分组给药处理细胞。24 h 后,收集细胞培养液,同时将细胞消化、计数,并按试剂盒说明书进行操作,分别测定 630、570 nm 处各组吸光度值,计算葡萄糖消耗量和单位细胞乳酸生成量。

### 1.8 荷叶碱治疗 ICC 的网络药理学分析

#### 1.8.1 荷叶碱作用靶点获取

借助 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi>).

nlm.nih.gov/) 获得荷叶碱的 SMILE 号和 InChI 号, 并于 Swiss Target Prediction (<http://swisstargetprediction.ch/>)、BATMAN-TCM (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>) 数据库、中药系统药理学数据库与分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCM-SP, <https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>) 收集荷叶碱相关靶点。

1.8.2 与 ICC 治疗有关靶点获取

于 Gene Cards (<http://www.genecards.org/>)、OMIM (<http://www.omim.org>) 和治疗靶标数据库 (Therapeutic Target Database, TTD, <http://db.idr-blab.net/ttd/>), 以 “intrahepatic cholangiocarcinoma” 为疾病关键词, 收集肝内胆管癌相关靶点。

1.8.3 蛋白互作网络构建

借由 Uniprot 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 对靶点进行基因名转换, 去除重复项, 并对化合物和疾病作用靶点取交集, 得到二者交集靶点。交集靶点导入 STRING (<https://string-db.org/>) 数据库, 种属选择 “Homo sapiens”, 最低置信度为 0.4, 隐藏无相互作用的节点, 并将其分析结果所属的 TSV 文件导入至 Cytoscape3.9.1 软件进一步修饰, 并利用 Analyze Network 网络的拓扑参数, 度值 (degree)、紧密中心性 (closeness centrality)、介数中心性 (betweenness centrality) 筛选核心靶点。

1.8.4 GO 生物功能注释和 KEGG 通路富集分析

利用 Metascape (<https://metascape.org/gp>) 数据库, 对隐藏无相互作用后的交集靶点进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (kyotoencyclopedia of genes and genomes, KEGG) 功能富集分析, 并利用微生信在线平台 (<http://www.Bioinformatics.com.cn/>) 将富集结果绘制成柱状图及气泡图。

1.9 RT-qPCR 法检测细胞 HIF-1 $\alpha$  及 HK2、PKM2 mRNA 表达

细胞以  $2 \times 10^6$  个每孔接种于 6 孔板, 细胞分组及给药浓度同 “1.6” 项。细胞处于对数生长期时收集细胞, 并采用 TRIzol 试剂抽提细胞 RNA, 测定 RNA 浓度和纯度, 按照逆转录试剂盒操作步骤将其逆转录为 cDNA, 并以其为模板,  $\beta$ -actin 为内参, 用 PCR 仪进行扩增, 每个基因重复三次试验, 每组 3 个复孔, 最后以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算相关基因的 mRNA 表达水平。主要引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequence

基因 Gene	引物序列 Primer sequence
$\beta$ -actin	F: 5'-TCGTGCGTGACATTAAGGAGAAGC-3'
	R: 5'-GGCGTACAGGTCTTTGCGGATG-3'
HIF-1 $\alpha$	F: 5'-TGCCTGTGAGGAACTTCTGGATG-3'
	R: 5'-TCCTCGGCTAGTTAGGGTACACTTC-3'
HK2	F: 5'-CCTCGCATCTGCTTGCTACTTC-3'
	R: 5'-TCTCCGTGTTCTGTCCCATCTGG-3'
PKM2	F: 5'-TCTCCAGGGCACACCTATTTCAG-3'
	R: 5'-AGTTCAGACGAGCCACATTCATTC-3'

1.10 Western blot 法检测细胞糖酵解及 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达

收集经不同浓度 NUF (0、30、60、120  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 24 h 后的细胞, 4  $^{\circ}\text{C}$  充分裂解后, 提取细胞总蛋白, 并采用 BCA 法进行蛋白定量。取 30  $\mu\text{g}$  细胞蛋白凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h, 一抗 1:1 000 于 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜后, TBST 洗膜, 二抗 1:10 000 室温孵育 1 h, TBST 清洗 3 次, 每次 10 min, 均匀滴加等量 ECL 发光液后, 于成像系统显影。结果用 Image J 软件进行分析。

1.11 统计学分析

采用 Graph Pad Prism 9.0 软件对数据进行统计分析, 计量资料以平均值  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间均数采用 One-Way ANOVA 检验。  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 荷叶碱抑制人肝内胆管癌细胞 HuCCT1 增殖

MTT 检测结果显示, 不同浓度 NUF (0 ~ 400  $\mu\text{mol/L}$ ) 处理 HuCCT1 细胞 24 h 及 48 h 后, 细胞存活率显著降低 (见图 1)。

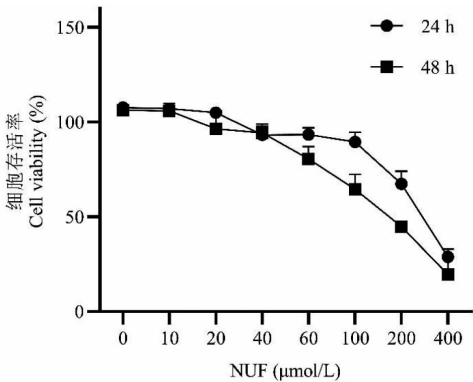


图 1 荷叶碱对 HuCCT1 细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of NUF on the survival rate of HuCCT1 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

当以 30  $\mu\text{mol/L}$  NUF 处理细胞 48 h 时,细胞存活率降至约 90%,其它各组细胞存活率均降低,其中 400  $\mu\text{mol/L}$  NUF 作用最强,细胞存活率降至约 25%。

克隆形成实验结果显示,与 Con 组相比,不同浓度荷叶碱处理后,细胞集落形成数目显著降低( $P < 0.05, 0.01$ ) (见图 2)。

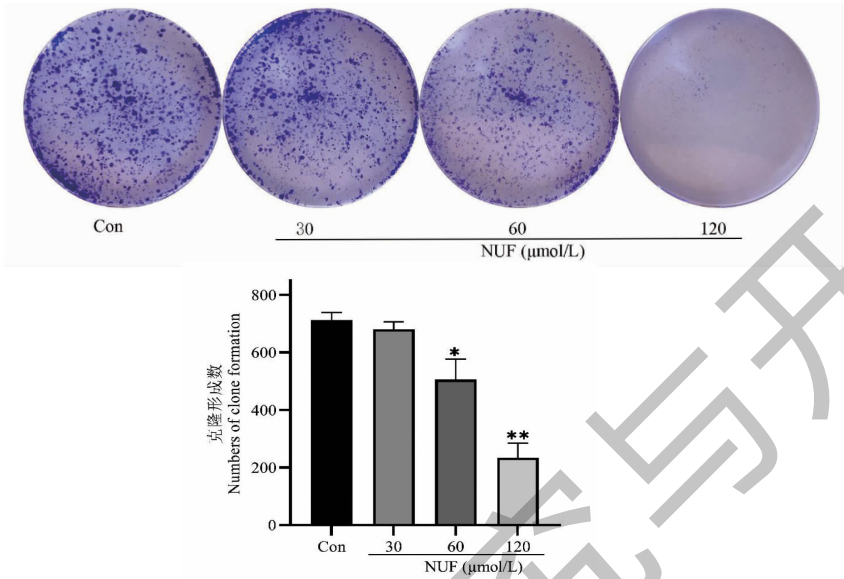


图 2 荷叶碱对 HuCCT1 细胞集落形成能力的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 2 Effect of NUF on colony formation of HuCCT1 cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

2.2 荷叶碱降低 HuCCT1 细胞糖酵解代谢物葡萄糖消耗及乳酸生成量

与 Con 组相比,60、120  $\mu\text{mol/L}$  NUF 可以减少

HuCCT1 细胞葡萄糖消耗量( $P < 0.05$ )。30、60、120  $\mu\text{mol/L}$  NUF 均可显著降低 HuCCT1 细胞乳酸生成量( $P < 0.05, 0.01$ ) (见图 3)。

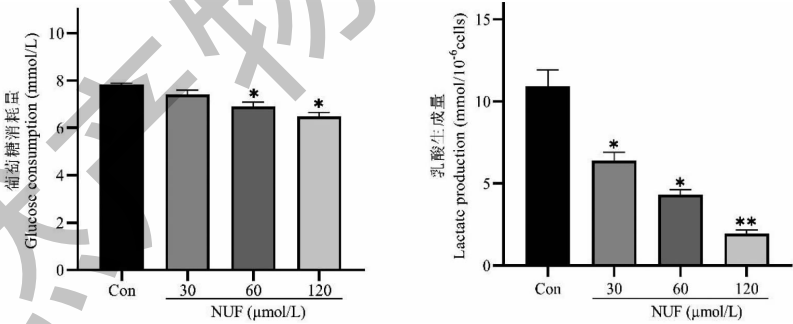


图 3 荷叶碱对 HuCCT1 细胞糖酵解代谢产物的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Fig. 3 Effect of NUF on glycolytic metabolites of HuCCT1 cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

2.3 荷叶碱治疗肝内胆管癌的网络药理学分析结果

2.3.1 荷叶碱治疗肝内胆管癌作用靶点

Swiss Target Prediction 数据库筛选出 Probability 大于 0.1 的有 100 个,TCMSP 数据库筛选得到 27 个,BATMAN-TCM 数据库筛选得到 164 个。由 3 个疾病数据库 Gene Cards、OMIM、TTD 依次筛选出 1 593、44、4 个作用靶点。去重后,分别得到荷叶碱作

用相关靶点 282 个,肝内胆管癌相关靶点 1 546 个,二者交集靶点共 52 个。

2.3.2 蛋白质相互作用(PPI)网络分析结果

荷叶碱治疗肝内胆管癌靶点的网络(见图 4)中,包含了 50 个节点(2 个节点与其他节点无相互作用),300 条边。该网络度值的中位数为 11,紧密度的中位数为 0.515 789,介数中位数为 0.005 948,图中节点个头越大、颜色越深代表其在该网络中的

度值越大,由上述 3 个拓扑参数筛选出与该网络关联度最高的 15 个关键靶点(见表 2),主要与葡萄糖代谢、炎症反应、细胞生长等有关。

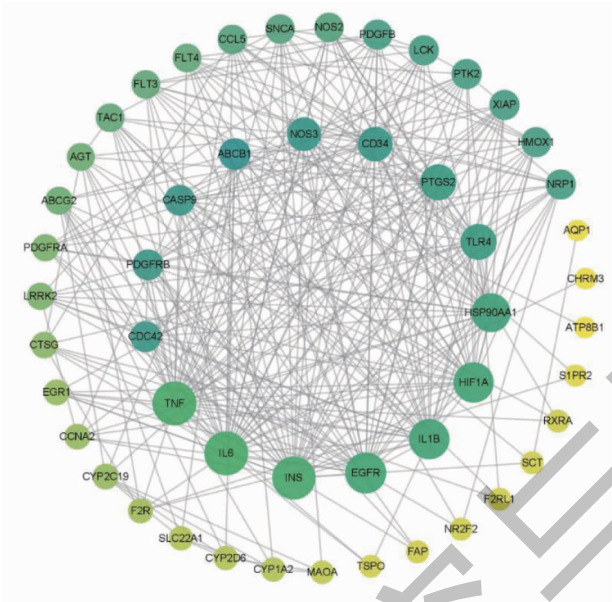


图 4 荷叶碱治疗肝内胆管癌的蛋白质相互作用网络图

Fig. 4 Protein-protein interaction network diagram of NUF against intrahepatic cholangiocarcinoma

表 2 荷叶碱治疗肝内胆管癌关键靶点及拓扑参数

Table 2 Key targets and topological parameters of NUF against intrahepatic cholangiocarcinoma

名称 Name	度值 Degree	紧密中心性 Closeness centrality	介数中心性 Betweenness centrality
IL6	32	0.731 343	0.118 982
TNF	32	0.731 343	0.105 345
INS	31	0.720 588	0.136 009
EGFR	28	0.690 141	0.072 252
HIF1A	27	0.671 233	0.043 004
IL1B	27	0.644 737	0.043 9
HSP90AA1	25	0.662 162	0.033 731
PTGS2	21	0.628 205	0.043 343
TLR4	21	0.597 561	0.035 955
CD34	19	0.604 938	0.021 557
NOS3	18	0.569 767	0.038 954
ABCB1	15	0.550 562	0.114 118
CASP9	14	0.569 767	0.006 021
CDC42	14	0.556 818	0.006 752
PDGFRB	14	0.526 882	0.008 947

2.3.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析结果

通过 Metascape 数据库,以  $P < 0.01$  为条件,共

得到 1 054 条 GO 功能富集条目,按 P 值由小到大排列,筛选排名前 10 的结果绘制柱形图。结果显示,

NUF 参与并调控 ICC 细胞众多生理生化过程,包括调节细胞运动、激酶活性等(如图 5)。KEGG 筛选出 109 条通路,同样 P 值按由小到大排序,再结合文献进一步筛选出与肝内胆管癌相关的主要通路 20 条。富集气泡图(见图 6)显示其主要涉及调控磷脂

酰肌醇-3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、钙信号、缺氧诱导因子-1 (hypoxia-inducible factor-1, HIF-1) 等信号通路与动脉粥样硬化病理过程。

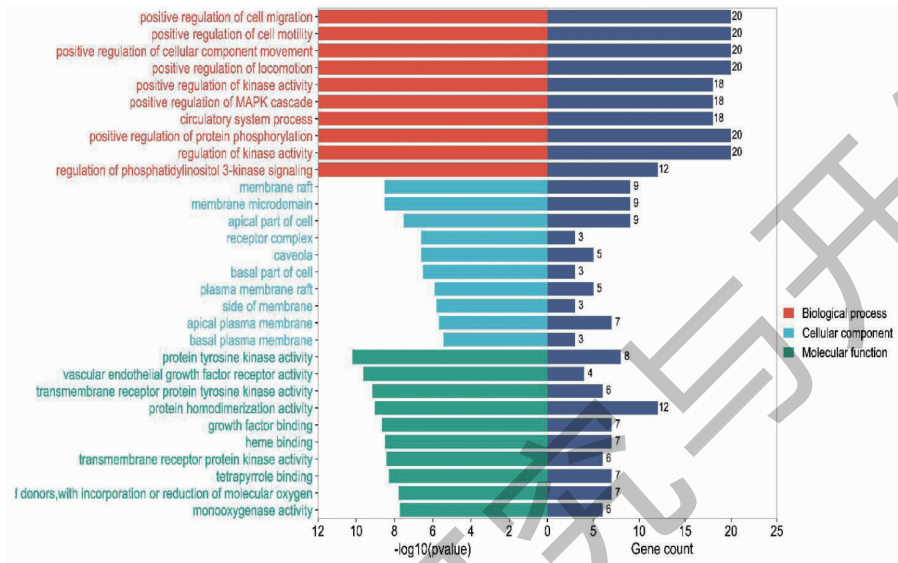


图 5 荷叶碱治疗肝内胆管癌的潜在作用靶点 GO 功能富集分析  
Fig. 5 GO terms of NUF against intrahepatic cholangiocarcinoma

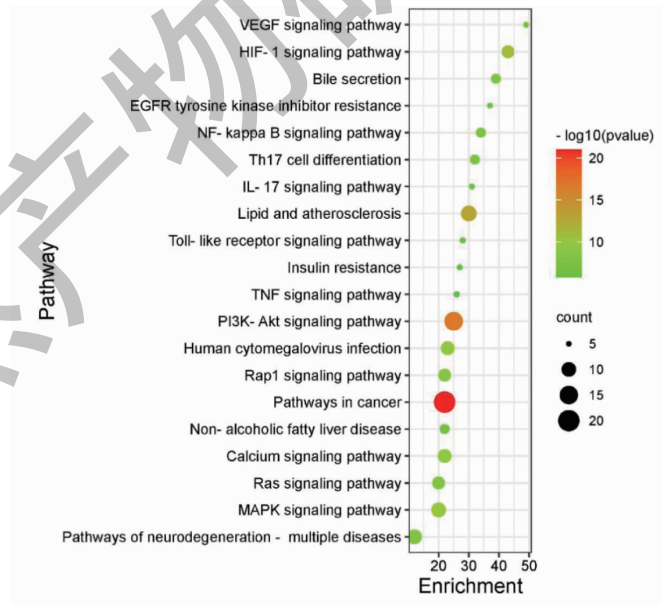


图 6 荷叶碱治疗肝内胆管癌的潜在作用靶点 KEGG 通路富集分析  
Fig. 6 KEGG pathway of NUF against intrahepatic cholangiocarcinoma

**2.4 荷叶碱对 HuCCT1 细胞 HIF-1 $\alpha$  及 HK2、PKM2 mRNA 水平的影响**  
与 Con 组相比,中、高浓度(60、120  $\mu$ mol/L)

NUF 组细胞 HIF-1 $\alpha$ 、HK2、PKM2 的 mRNA 水平显著降低( $P < 0.05, 0.01$ ) (见表 3)。



表3 荷叶碱对 HuCCT1 细胞 HIF-1 $\alpha$  及糖酵解相关基因 HK2、PKM2 mRNA 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of NUF on the mRNA levels of HIF-1 $\alpha$  and glycolysis-related genes HK2 and PKM2 in HuCCT1 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别 Group	浓度 Concentration ( $\mu\text{mol/L}$ )	HIF-1 $\alpha$	HK2	PKM2
对照 Con	0	1.00 $\pm$ 0.06	1.00 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.09
NUF	30	1.11 $\pm$ 0.13	1.00 $\pm$ 0.12	1.07 $\pm$ 0.08
	60	0.69 $\pm$ 0.06 *	0.99 $\pm$ 0.01	0.69 $\pm$ 0.06 *
	120	0.47 $\pm$ 0.08 **	0.50 $\pm$ 0.03 **	0.63 $\pm$ 0.06 *

注:与对照组相比,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ 。  
Note:Compared with Con group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ .

2.5 荷叶碱对 HuCCT1 细胞糖酵解及 Akt/mTOR 信号通路蛋白表达的影响

与 Con 组相比,不同浓度(30、60、120  $\mu\text{mol/L}$ ) NUF 处理后 HuCCT1 细胞 HIF-1 $\alpha$ 、HK2、PKM2 蛋白表达明显下调( $P < 0.01, 0.001$ )。120  $\mu\text{mol/L}$  NUF

处理后的 HuCCT1 细胞 p-mTOR、p-4EBP1 表达量相较 30、60  $\mu\text{mol/L}$  处理组降低更显著,而 p-Akt<sup>Thr308</sup> 表达量则在 120  $\mu\text{mol/L}$  NUF 处理后略微上调( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )(见图 7)。

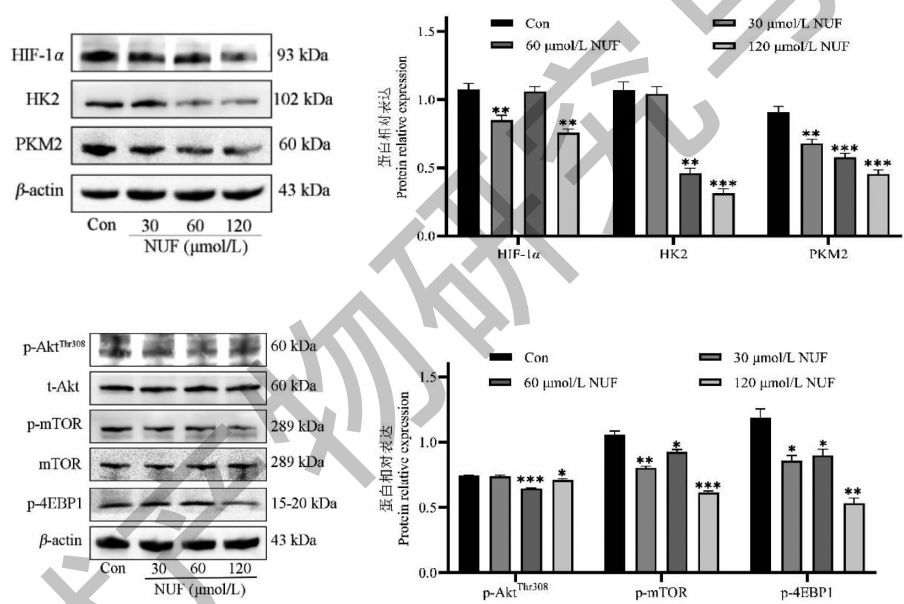


图7 荷叶碱对 HuCCT1 细胞糖酵解及 Akt/mTOR 信号通路蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Effect of NUF on the expression of glycolysis and Akt/mTOR signaling pathway related proteins in HuCCT1 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

3 讨论与结论

现代药理学研究表明,荷叶中提取的活性成分荷叶碱对肝癌<sup>[8]</sup>、肺癌<sup>[9]</sup>、乳腺癌<sup>[10]</sup>等多种肿瘤细胞<sup>[11-13]</sup>均表现出一定的抗生长作用,并能提高其对化疗药物的敏感性<sup>[14]</sup>。本研究发现一定浓度的荷叶碱能明显抑制体外 HuCCT1 细胞增殖,且与降低葡萄糖消耗与乳酸生成呈一定正相关。糖类是细胞生命活动中的重要供能物质,瓦氏效应(Warburg effect)表明:即使在氧含量正常状态下,癌细胞也会优先通过糖酵解作用而非有氧代谢途径供能<sup>[15]</sup>。高水平的糖酵解可为癌细胞的生长快速供能,其产

物如丙酮酸和乳酸,亦为癌细胞物质合成提供原料,并促进癌细胞转移和侵袭。故推测荷叶碱抑制 HuCCT1 细胞的增殖与其抑制细胞糖酵解代谢有关。

网络药理学分析发现荷叶碱与 HIF-1 $\alpha$  和 TNF、INS、EGFR 等靶点关联度较高。HIF-1 $\alpha$  参与肿瘤细胞葡萄糖代谢、细胞增殖、侵袭和转移、炎症反应等多个环节<sup>[16,17]</sup>,能激活葡萄糖转运蛋白(GLUT)及多种糖酵解酶如 HK2、PKM2、丙酮酸脱氢酶激酶 1(PDK1)的活性进而直接参与糖酵解过程<sup>[18]</sup>,极大地促进了肿瘤进展。己糖激酶(HK)和丙酮酸激酶

(PK)是糖酵解过程中较为关键的2种激酶,分别调控糖酵解过程的初始和结尾阶段。本研究发现细胞HIF-1 $\alpha$ 及糖酵解关键酶HK2、PKM2的mRNA水平和蛋白表达均随荷叶碱浓度的升高而逐渐降低,故推测荷叶碱可能通过降低HIF-1 $\alpha$ 的活性进而影响HuCCT1细胞糖酵解过程。

HIF-1是细胞应对低氧或缺氧环境而做出反应的一类转录因子,由HIF-1 $\alpha$ 和HIF-1 $\beta$ 两个亚单位组成。HIF-1 $\alpha$ 的脯氨酸残基在常氧环境下易受到羟基化,并与其调节子(von hippel-lindau, pVHL)结合,之后被泛素化而降解。而在低氧环境下,脯氨酰4-羟化酶结构域相关蛋白(prolyl hydroxylase domain-containing proteins, PHD)活力降低,使HIF-1 $\alpha$ 大量累积,随后移位至细胞核与HIF-1 $\beta$ 形成二聚体,二聚体继而与低氧反应元件(hypoxic response element, HRE)结合以促进HIF-1靶基因的转录<sup>[19]</sup>。此外,HIF-1 $\alpha$ 还可被不依赖于氧气的方式激活,例如PI3K/Akt/mTOR信号级联反应可通过破坏真核翻译起始因子4E(eIF4E)结合蛋白1(4EBP1)的完整性,上调HIF-1 $\alpha$ 的转录和翻译<sup>[16]</sup>。有学者将这种与氧气无关的HIF-1 $\alpha$ 信号的激活机制称为“假性缺氧”<sup>[20]</sup>。本研究中,KEGG分析发现荷叶碱作用于ICC的潜在通路中,PI3K/Akt信号通路显著性较高,免疫印迹发现荷叶碱可降低HuCCT1细胞mTOR、4EBP1蛋白的磷酸化水平,p-Akt<sup>Thr308</sup>蛋白整体呈下降趋势,提示荷叶碱下调HIF-1 $\alpha$ 的转录及翻译水平可能与抑制Akt/mTOR/4EBP1信号通路有关。

多项研究指出荷叶碱除了能体外诱导肿瘤细胞凋亡,抑制侵袭和转移并将其阻滞至不同周期外,还能延缓裸鼠异位移植瘤的生长,发挥显著抗肿瘤作用。主要机制与荷叶碱调节周期及凋亡相关蛋白的表达<sup>[8]</sup>、直接靶向特定基因<sup>[9]</sup>、抑制信号通路如PI3K-Akt<sup>[11]</sup>、Wnt/ $\beta$ -catenin<sup>[21]</sup>、SOX2-Akt与STAT3<sup>[12]</sup>及TLR4/NF- $\kappa$ B<sup>[13]</sup>等有关。而本研究初步发现荷叶碱抑制肝内胆管癌细胞增殖,可能是通过抑制Akt/mTOR/4EBP1信号级联通路调控的细胞糖酵解过程而发挥作用,二者间的内在逻辑关系将在下一步研究中展开探索,以期阐明荷叶碱的抗ICC机制,为深度开发荷叶资源和临床应用提供理论基础。

## 参考文献

1 Sirica AE, Strazzabosco M, Cadamuro M. Intrahepatic cholan-

- giocarcinoma: morpho-molecular pathology, tumor reactive microenvironment, and malignant progression[J]. Adv Cancer Res, 2021, 149: 321-387.
- 2 Pant K, Richard S, Peixoto E, et al. Role of glucose metabolism reprogramming in the pathogenesis of cholangiocarcinoma[J]. Front Med, 2020, 7: 113.
- 3 Raggi C, Taddei ML, Rae C, et al. Metabolic reprogramming in cholangiocarcinoma[J]. J Hepatol, 2022, 77: 849-864.
- 4 Banales JM, Marin JJG, Lamarca A, et al. Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2020, 17: 557-588.
- 5 Sia D, Tovar V, Moeini A, et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma: pathogenesis and rationale for molecular therapies[J]. Oncogene, 2013, 32: 4861-4870.
- 6 Efferth T, Oesch F. Repurposing of plant alkaloids for cancer therapy: pharmacology and toxicology[J]. Semin Cancer Biol, 2021, 68: 143-163.
- 7 Li N, Song JC. Research advance in anti-tumor activity of alkaloids from *Nelumbo nuciferine* Gaertn[J]. Chin Pharm(中国药师), 2016, 19: 2141-2143.
- 8 Li N, Song JC. Effects of nuciferine on apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2 and its mechanism[J]. China J Pharmacov(中国药物警戒), 2017, 14: 715-719.
- 9 Bai X, Liu X, Li S, et al. Nuciferine inhibits TMEM16A in dietary adjuvant therapy for lung cancer[J]. J Agric Food Chem, 2022, 70: 3687-3696.
- 10 Kang EJ, Lee SK, Park KK, et al. Liensinine and nuciferine, bioactive components of *Nelumbo nucifera*, inhibit the growth of breast cancer cells and breast cancer-associated bone loss[J]. Evid-based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 1583185.
- 11 Qi Q, Li R, Li HY, et al. Identification of the anti-tumor activity and mechanisms of nuciferine through a network pharmacology approach[J]. Acta Pharmacol Sin, 2016, 37: 963-972.
- 12 Li Z, Chen Y, An T, et al. Nuciferine inhibits the progression of glioblastoma by suppressing the SOX2-AKT/STAT3-Slug signaling pathway[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2019, 38: 139.
- 13 Xu J, Ying A, Shi T. Nuciferine inhibits skin cutaneous melanoma cell growth by suppressing TLR4/NF- $\kappa$ B signaling[J]. Anticancer Agents Med Chem, 2020, 20: 2099-2105.
- 14 Chen C, Xie YY, Huang LP. Advance of Pharmacological Studies on Nuciferine[J]. J Nanjing Univ Tradit Chin Med Vol(南京中医药大学学报), 2021, 37: 619-624.

(下转第1379页)