

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2022.09.001

❖ 基础研究 ❖

# α-苦瓜素通过激活 JNK 信号通路诱导口腔鳞癌细胞凋亡的机制研究

冷平<sup>1</sup>, 蒋佩文<sup>2,3</sup>, 杜文倩<sup>4</sup>, 蔡紫微<sup>3</sup>, 张清亮<sup>5</sup>, 汪林<sup>4</sup>, 吴泳洁<sup>4</sup>, 黄敏<sup>4</sup>, 李敏惠<sup>6</sup>

(1. 成都中医药大学医学技术学院, 四川 成都 610075; 2. 金堂县第一人民医院实验医学科, 四川 成都 610400; 成都医学院, 3. 基础医学院; 4. 药学院; 5. 生物科学与技术学院; 6. 科研实验中心, 四川 成都 610500)

**【摘要】目的:** 探讨 α-苦瓜素(α-MMC)对口腔鳞状细胞癌 HSC-3 细胞的增殖抑制作用及通过激活细胞信号传导通路调控细胞凋亡的分子机制。**方法:** 通过 CCK-8 法检测 α-MMC 对 HSC-3 细胞的增殖抑制作用; 利用 PI、Annexin V-FITC/PI、JC-1 染色及流式细胞术测定 α-MMC 对 HSC-3 细胞周期、凋亡、线粒体膜电位的影响; 通过蛋白免疫印迹技术判断 α-MMC 作用后, HSC-3 细胞凋亡相关蛋白及信号通路蛋白的表达情况。**结果:** CCK-8 分析结果显示, α-MMC 以药物浓度和时间梯度依赖的方式抑制 HSC-3 细胞增殖, 其 24 h 和 48 h 的 IC50 值分别为 50.38 μg/mL 和 20.17 μg/mL; 流式细胞术检测发现, α-MMC 阻滞 HSC-3 细胞周期于 G2/M 期, 降低细胞线粒体膜电位, 诱导细胞凋亡; 蛋白免疫印迹结果显示, α-MMC 上调促凋亡蛋白 Bim 表达, 下调抗凋亡蛋白 Mcl-1 的表达; 激活 JNK 信号通路, 即上调 p-MKK4、p-JNK、p-c-Jun 的表达水平。**结论:** α-MMC 对口腔鳞状细胞癌 HSC-3 细胞具有增殖抑制作用, 其机制可能是 α-MMC 激活 JNK 信号通路触发细胞周期阻滞, 并通过线粒体途径诱导细胞凋亡。

**【关键词】** α-苦瓜素; 口腔鳞癌; JNK 信号通路; 线粒体途径

**【中图分类号】** R575 **【文献标志码】** A

## Mechanism of α-MMC in Oral Squamous Cell Carcinoma HSC-3 cells based on JNK signaling pathway

LENG Ping<sup>1</sup>, JIANG Pei-wen<sup>2,3</sup>, DU Wen-qian<sup>4</sup>, CAI Zi-wei<sup>3</sup>, ZHANG Qin-liang<sup>5</sup>, WANG Lin<sup>4</sup>, WU Yong-jie<sup>4</sup>, HUANG Min<sup>4</sup>, LI Min-hui<sup>6</sup>

(1. College of Medical Technology, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075; 2. Department of Laboratory Medicine, Jintang First People's Hospital, Chengdu 610400; 3. School of Basic Medicine; 4. School of Pharmacy; 5. School of Bioscience and Technology; 6. Center of Scientific Research and Experiment, Chengdu Medical College, Chengdu 610500, Sichuan, China)

**【Abstract】Objective:** To explore the inhibitory effect of α-MMC on the proliferation of Oral Squamous Cell Carcinoma HSC-3 cells and explain its molecular mechanism of regulating apoptosis by activating cell signaling pathways. **Methods:** CCK-8 method was used to explore the inhibitory effect of α-MMC on the proliferation of HSC-3 cells. PI, Annexin V-FITC/PI, JC-1 fluorescence dye and flow cytometry were used to detect the effects of α-MMC on the cell cycle proportion, mitochondrial membrane potential and apoptosis of HSC-3 cells. Western blot was used to detect the expression of apoptosis-related and signal pathway-related proteins in HSC-3 cells treated with α-MMC. **Results:** CCK-8 analysis showed that α-MMC inhibited the proliferation of HSC-3 cells in a concentration-dependent and time-dependent manner, and its IC50 values at 24 h and 48 h were 50.38 μg/mL and 20.17 μg/mL, respectively. The results from flow cytometry showed that α-MMC increased the proportion of G2/M, decreased the mitochondrial membrane potential, and induced apoptosis in HSC-3 cells. Western blot showed that α-MMC could down-regulate the expression of Mcl-1, up-regulate the expression of Bim, p-MKK4, p-JNK and p-c-Jun. **Conclusion:** α-MMC can inhibit the proliferation of Oral Squamous Cell Carcinoma HSC-3 cells, and the possible mechanism is that α-MMC activates JNK signaling pathway to induce apoptosis of HSC-3 cells by mitochondrial pathway and G2/M arrest.

**【Key words】** α-momorchain; Oral Squamous Cell Carcinoma; JNK signaling pathway; Mitochondrial pathway

**基金项目:** 四川省科技厅项目(2022NSFSC0690, 2020YFS0321); 四川省大学生创新创业项目(202113705009); 四川省发育与再生重点实验室开放项目(SYS20-06); 成都医学院研究生科研创新项目(YCX2020-16); 成都医学院四川省养老保健协同创新中心项目(YLZBZ2007)

**作者简介:** 冷平(1976-), 女, 硕士, 副教授。E-mail: 596353806@qq.com

**通信作者:** 李敏惠。E-mail: liminhui@cmc.edu.cn

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是头颈部肿瘤中最常见的恶性肿瘤,约占口腔癌总数的 90%<sup>[1]</sup>。近年来,OSCC 发病率呈明显上升趋势。目前 OSCC 仍以外科手术辅以放射治疗和化学药物治疗为主,但由于 OSCC 早期隐匿、恶性程度高、生长速度快等原因,预后未见明显提升,OSCC 患者 5 年生存率低于 50%<sup>[2-3]</sup>。因此,探索安全有效的 OSCC 治疗方法,特别是高效、靶向、无创的 OSCC 治疗药物研究具有重要意义。 $\alpha$ -苦瓜素(alpha-momorchain,  $\alpha$ -MMC)是从苦瓜籽中提取分离的一种核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating proteins, RIPs),具有抗病毒、抗真菌、抗生育及免疫调节等生物学功能<sup>[4]</sup>。有研究<sup>[5-6]</sup>报道  $\alpha$ -MMC 具有潜在抗肿瘤活性,而其抗 OSCC 的活性及机制还未见报道。因此,本研究探讨了  $\alpha$ -MMC 对 OSCC HSC-3 细胞的增殖抑制作用及通过激活细胞信号传导通路调控细胞凋亡的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 药物  $\alpha$ -MMC 由成都医学院沈富兵老师馈赠,提取及鉴定方法见参考文献<sup>[5]</sup>。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清、DMEM 基础培养基购自美国 Gibco 公司;CCK-8 检测试剂盒购自日本同仁化学研究所;碘化丙啶(propidium iodide, PI)购自北京索莱宝科技有限公司;Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒、RIPA 强效裂解液购自中国碧云天生物技术公司;BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自北京兰杰柯科技有限公司(Bio-sharp);实验所用相关抗体均购自美国 CST 公司。

1.1.3 HSC-3 细胞 保存于成都医学院科研实验中心,其 STR 鉴定结果与 ATCC 一致。根据 ATCC 推荐的培养方法,使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液传代培养。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞增殖抑制实验 HSC-3 细胞以  $1 \times 10^4$ /孔的密度接种在 96 孔细胞培养板中;加入供试的  $\alpha$ -MMC,药物作用浓度分别为 100.000、50.000、25.000、12.500、6.250、3.125、1.563、0.000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,每个浓度设置 3 个复孔,同时设置空白孔;药物作用 24、48 h 后,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 试剂;孵育 2 ~ 4 h 后,用酶标仪(BioTek Powerwave XS, 美国)检测 450 nm 处的 OD 值,计算不同药物浓度作用下细胞的存活率。通过 GraphPad Prism 9.0 软件绘制细胞生长抑制曲线并计算  $\alpha$ -MMC 对 HSC-3 细胞的半数抑制浓度(IC50)。

1.2.2 细胞周期检测 HSC-3 细胞以  $5 \times 10^5$ /孔的密度接种在 6 孔细胞培养板中;加入  $\alpha$ -MMC(0.00、5.55、16.66、50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理 12 h 后,收集细胞并用 70% 乙醇固定、Triton X-100 打孔,PI 室温避光染色 30 min,使用流式细胞仪(ACEA NovoCyte, 美国)检测并分析细胞周期分布比例。

1.2.3 细胞凋亡检测  $\alpha$ -MMC(0.00、5.55、16.66、50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )作用 HSC-3 细胞 24 h 后,离心收集细胞;用含 Annexin V-FITC 和 PI 两种荧光染料的结合液重悬细胞,室温避光染色 15 min;用流式细胞仪测定细胞凋亡情况。

1.2.4 线粒体膜电位检测  $\alpha$ -MMC(0.00、5.55、16.66、50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理 HSC-3 细胞 24 h 后,离心收集细胞;用含有 JC-1 荧光染料的 DMEM 完全培养液重悬 HSC-3 细胞,37  $^{\circ}\text{C}$  避光染色 15 min;离心洗涤两次,PBS 重悬,用流式细胞仪采集染色后的细胞并分析线粒体膜电位的改变情况。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(WB)检测  $\alpha$ -MMC(0.00、5.55、16.66  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理 HSC-3 细胞 24 h 后,用 RIPA 强效裂解液(已加蛋白酶及磷酸酶抑制剂)裂解细胞;4  $^{\circ}\text{C}$  离心收集蛋白上清液,通过 BCA 法测定蛋白浓度;采用蛋白免疫印迹法(WB)分析细胞凋亡相关蛋白及信号通路蛋白的表达情况。以 GAPDH 为内参,用 Image J 软件分析结果。

### 1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。定量资料用( $\bar{x} \pm s$ )描述,多组间差异比较采用 One-way ANOVA 分析和组间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

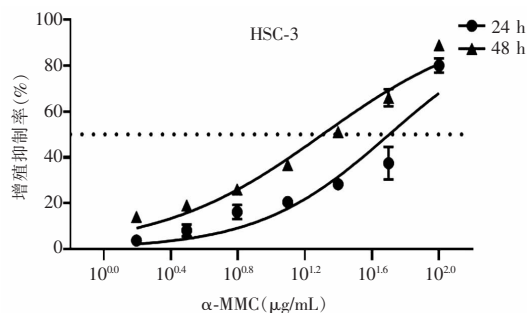
## 2 结果

### 2.1 $\alpha$ -MMC 抑制 HSC-3 细胞增殖

$\alpha$ -MMC 作用 HSC-3 细胞 24 h、48 h 后,CCK-8 法检测细胞活力。GraphPad Prism 9.0 软件绘制细胞生长抑制曲线,计算  $\alpha$ -MMC 对 HSC-3 细胞的 IC50 值。结果发现, $\alpha$ -MMC 以药物浓度依赖和时间依赖的方式抑制 HSC-3 细胞增殖,其 24 h 和 48 h 的 IC50 值分别为 50.38  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20.17  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。见图 1。

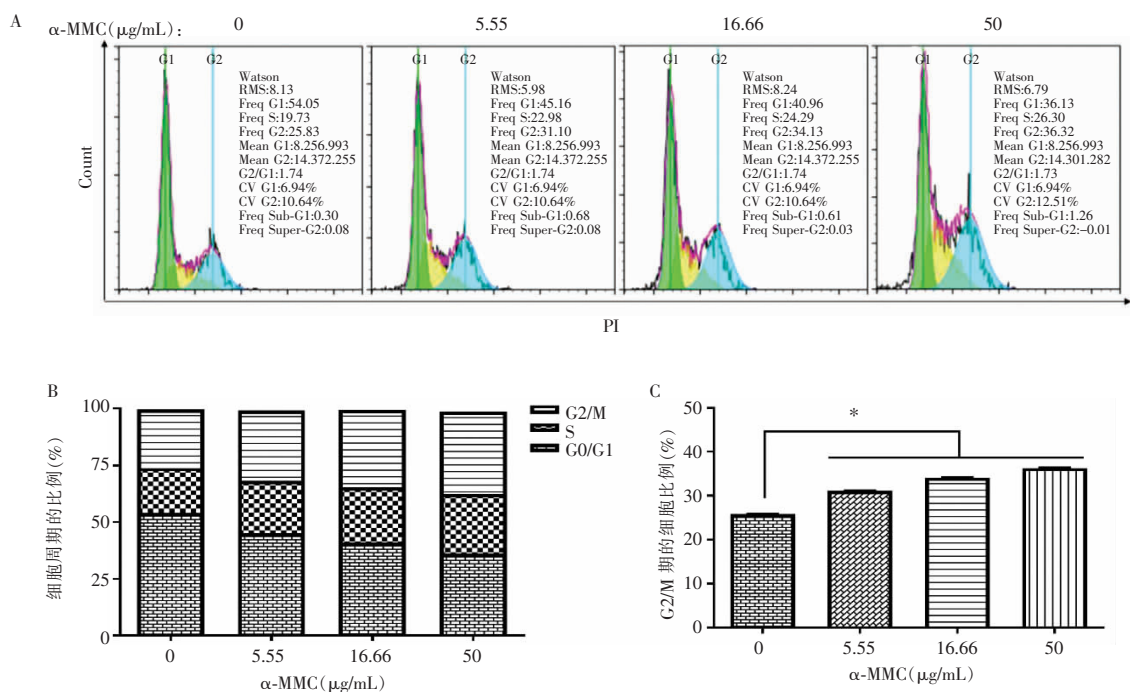
### 2.2 $\alpha$ -MMC 阻滞 HSC-3 细胞周期在 G2/M 期

$\alpha$ -MMC(0.00、5.55、16.66、50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )处理 HSC-3 细胞 12 h 后,PI 单染法检测细胞周期比例,结果显示  $\alpha$ -MMC 作用 HSC-3 细胞 12 h 后,G2/M 期的细胞比例分别为 25.83%、31.10%、34.13%、36.32%;即  $\alpha$ -MMC 阻滞 HSC-3 细胞周期于 G2/M 期。见图 2。

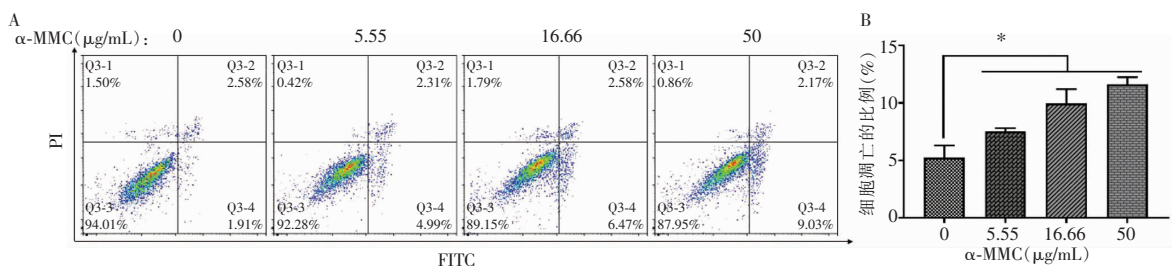
图1  $\alpha$ -MMC 抑制 HSC-3 细胞增殖

### 2.3 $\alpha$ -MMC 诱导 HSC-3 细胞凋亡

$\alpha$ -MMC (0.00、5.55、16.66、50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 作用 HSC-3 细胞 24 h 后,对细胞进行 Annexin V-FITC 和 PI 双染,流式细胞仪检测分析发现 HSC-3 细胞凋亡比例分别为  $(5.99 \pm 1.50)\%$ 、 $(7.72 \pm 0.42)\%$ 、 $(10.84 \pm 1.79)\%$ 、 $(12.06 \pm 0.86)\%$ ,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 3。

图2  $\alpha$ -MMC 引起 HSC-3 细胞周期改变

A. 流式细胞仪检测并分析 5 000 个经 PI 染色的 HSC-3 细胞;B. 不同浓度  $\alpha$ -MMC 作用下,HSC-3 细胞周期构成; C. 不同浓度  $\alpha$ -MMC 作用后 HSC-3 细胞的 G2/M 期细胞比例与空白对照组比较。\* $P < 0.05$ 。

图3  $\alpha$ -MMC 诱导 HSC-3 细胞凋亡

A. 流式细胞仪检测并分析 5 000 个经 Annexin V-FITC 和 PI 双染的 HSC-3 细胞;B. 不同浓度  $\alpha$ -MMC 作用后,HSC-3 细胞凋亡比例与空白对照组比较。\* $P < 0.05$ 。

### 2.4 线粒体途径参与 $\alpha$ -MMC 诱导 HSC-3 细胞凋亡

线粒体膜电位的下降是细胞凋亡早期的一个标志性事件,JC-1 染色法结果显示  $\alpha$ -MMC 诱导 HSC-3

细胞线粒体膜电位下降,药物浓度为 50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的  $\alpha$ -MMC 作用 HSC-3 细胞 24 h 后,线粒体膜电位下降比例达 15.34% (对照组为 2.19%),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见图 4。

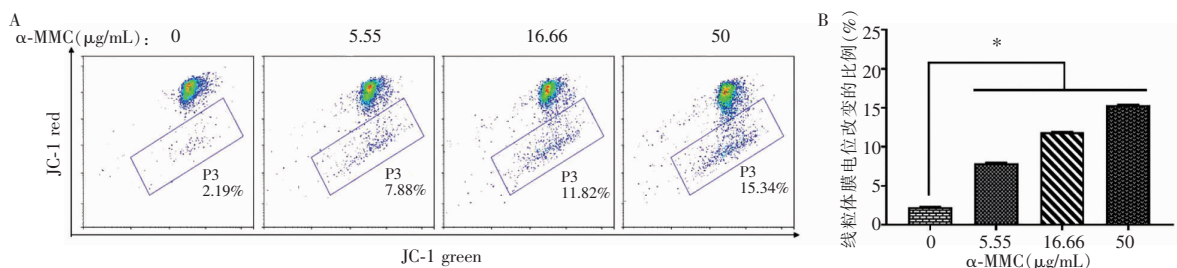


图 4 α-MMC 引起 HSC-3 细胞线粒体膜电位改变

A. 流式细胞仪检测并分析 5 000 个经 JC-1 荧光探针染色的 HSC-3 细胞;B. 不同浓度 α-MMC 作用后,HSC-3 细胞线粒体膜电位改变与空白对照组的比较。\* $P < 0.05$ 。

WB 结果显示,α-MMC 诱导 HSC-3 细胞线粒体途径相关蛋白表达水平改变,即促凋亡蛋白 Bim 的表达增加,抗凋亡蛋白 Mcl-1 的表达及凋亡蛋白

PARP 原片段表达降低。以上结果提示线粒体途径参与 α-MMC 诱导 HSC-3 细胞凋亡。见图 5。

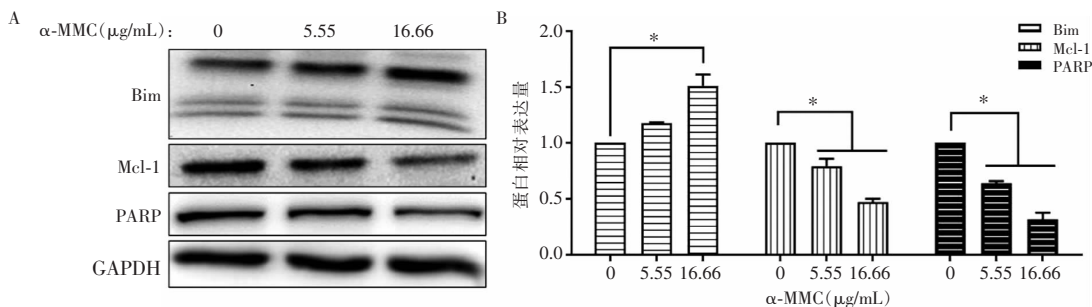


图 5 α-MMC 诱导 HSC-3 细胞凋亡蛋白表达水平改变

A. 通过 WB 检测 α-MMC 作用后,HSC-3 细胞线粒体途径相关凋亡蛋白表达水平;B. 不同浓度 α-MMC 作用后,HSC-3 细胞凋亡蛋白表达与空白对照组比较。\* $P < 0.05$ 。

### 2.5 JNK 信号通路参与 α-MMC 对 HSC-3 细胞的凋亡诱导过程

JNK 信号通路参与细胞多种生理和病理过程,包括细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡等反应过程。通过 WB 检测结果发现 α-MMC 能激活 JNK 信号通

路,即上调 p-MKK4、p-JNK、p-c-Jun 的表达,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。研究结果提示 JNK 信号通路参与 α-MMC 对 HSC-3 细胞的凋亡诱导过程。见图 6。

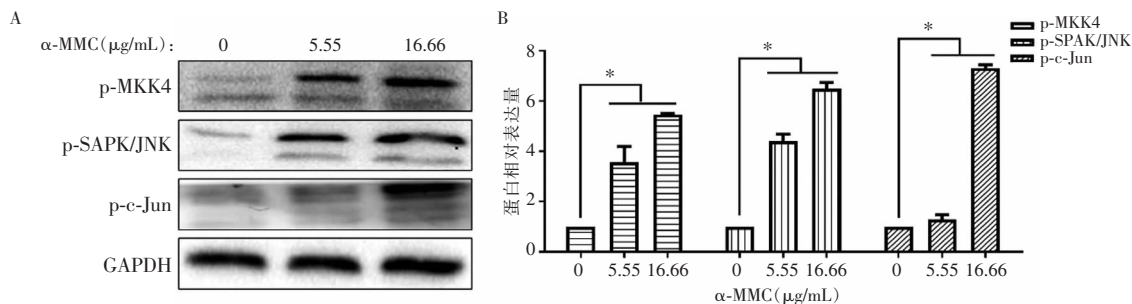


图 6 α-MMC 对 HSC-3 细胞 JNK 信号通路蛋白表达水平影响

A. 通过 WB 检测 α-MMC 作用后,HSC-3 细胞 JNK 信号通路蛋白表达水平;B. 不同浓度 α-MMC 作用后,JNK 信号通路 p-MKK4、p-JNK、p-c-Jun 蛋白表达与对照组比较。\* $P < 0.05$ 。

## 3 讨论

苦瓜在传统医学中常被用于缓解高血压、高胆固醇水平和降低血糖<sup>[7]</sup>,而 α-MMC 是从苦瓜籽中提取的 I 型 RIP,具有 RNA/DNA 水解酶活性、蛋白质合成抑制性和抗肿瘤等多种生物活性<sup>[8]</sup>。已有报道<sup>[5-6]</sup>

表明,α-MMC 对乳腺癌 MDA-MB-231、MCF-7 细胞具有抗肿瘤活性,也可以在常氧和缺氧条件下抑制人鼻咽癌 CNE2、HONE1 细胞。

本研究显示,α-MMC 可抑制 HSC-3 细胞增殖,将细胞周期阻滞于 G2/M 期,降低细胞线粒体膜电位,诱导细胞凋亡,同时免疫印迹实验结果显示促凋亡蛋

白 Bim 表达增加、抗凋亡蛋白 Mcl-1 表达降低。Bim 和 Mcl-1 是 Bcl-2 家族蛋白的成员,其通过控制线粒体膜的通透性从而在线粒体凋亡通路的调控中起到重要作用。Bim 与 Mcl-1 相互作用,可使 Bak 从 Mcl-1 上解离,激活 Bak,引起线粒体外膜通透性改变,从而活化线粒体凋亡途径<sup>[9-10]</sup>。Wang 等<sup>[11]</sup> 研究显示, $\alpha$ -MMC 通过 LRP1 介导的内吞作用和 JNK 的激活诱导 L02 细胞凋亡,提示 JNK 的激活在  $\alpha$ -MMC 诱导的细胞毒性中可能起着重要作用。JNK 是有丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)家族的成员,而 MKK4 是第一个被鉴定的 JNK 激活剂<sup>[12]</sup>,MKK4 通过磷酸化 JNK 的 Tyr(酪氨酸)残基直接激活 JNKs,进而激活转录因子或凋亡前蛋白等底物(如:c-Jun、ATF2、p53、Bim、Bax、Bid 等),从而在细胞增殖、分化和凋亡等过程中发挥着至关重要的作用<sup>[13-14]</sup>。故本研究通过 WB 检测 JNK 信号通路相关蛋白的表达情况,显示  $\alpha$ -MMC 可上调 p-MKK4、p-JNK、p-c-Jun 的表达,从而激活 MKK4/JNK 信号通路。

综上, $\alpha$ -MMC 对口腔鳞状细胞癌 HSC-3 细胞具有增殖抑制作用,其可能机制是  $\alpha$ -MMC 激活 JNK 信号通路触发细胞周期阻滞、并通过线粒体途径诱导细胞凋亡。

#### 参考文献

[1] 曹菲菲,朱记涛,杨森,等. 口腔癌时辰化疗的研究现状及进展[J]. 成都医学院学报,2021,16(4):536-539.

[2] Su LY, Wang S, Yuan T, *et al.* Anti-oral squamous cell carcinoma effects of a potent TAZ inhibitor AR-42[J]. *Journal of Cancer*, 2020, 11(2):364-373.

[3] Schüttrumpf L, Marschner S, Scheu K, *et al.* Definitive chemoradiotherapy in patients with squamous cell cancers of the head and neck—results from an unselected cohort of the clinical cooperation group “personalized radiotherapy in head and neck cancer”[J]. *Radiation Oncology*, 2020, 15(1):7.

[4] 黄文虎,邓緬,孟延发.  $\alpha$ -苦瓜素及  $\alpha$ -苦瓜素-PEG 体外抗 HSV-1 的研究[J]. 华西药学杂志,2012,27(1):1-4.

[5] Cao DL, Sun Y, Wang L, *et al.* Alpha-momorcharin ( $\alpha$ -MMC) exerts effective anti-human breast tumor activities but has a narrow therapeutic window in vivo[J]. *Fitoterapia*, 2015, 100:139-149.

[6] Pan WL, Wong JH, Fang EF, *et al.* Preferential cytotoxicity of the type I ribosome inactivating protein alpha-momorcharin on human nasopharyngeal carcinoma cells under normoxia and hypoxia[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2014, 89(3):329-339.

[7] Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica charantia*): a review of efficacy and safety[J]. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 2003, 60(4):356-359.

[8] Chen YJ, Zhu JQ, Fu XQ, *et al.* Ribosome-inactivating protein  $\alpha$ -momorcharin derived from edible plant *Momordica charantia* induces inflammatory responses by activating the NF- $\kappa$ B and JNK pathways[J]. *Toxins (Basel)*, 2019, 11(12):694.

[9] Singh PK, Roukounakis A, Frank DO, *et al.* Dynein light chain 1 induces assembly of large Bim complexes on mitochondria that stabilize Mcl-1 and regulate apoptosis[J]. *Genes and Development*, 2017, 31(17):1754-1769.

[10] Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, *et al.* The BCL-2 family reunion[J]. *Molecular Cell*, 2010, 37(3):299-310.

[11] Wang L, Shen FB, Zhang M, *et al.* Cytotoxicity mechanism of  $\alpha$ -MMC in normal liver cells through LRP1 mediated endocytosis and JNK activation[J]. *Toxicology*, 2016, 357:33-43.

[12] Davies C, Tournier C. Exploring the function of the JNK (c-Jun N-terminal kinase) signalling pathway in physiological and pathological processes to design novel therapeutic strategies[J]. *Biochemical Society Transactions*, 2012, 40(1):85-89.

[13] Haeusgen W, Herdegen T, Waetzig V. The bottleneck of JNK signaling: molecular and functional characteristics of MKK4 and MKK7[J]. *European Journal of Cell Biology*, 2011, 90(6-7):536-544.

[14] Lai M, Ge Y, Chen M, *et al.* Saikosaponin D inhibits proliferation and promotes apoptosis through activation of MKK4-JNK signaling pathway in pancreatic cancer cells[J]. *OncoTargets and Therapy*, 2020, 13:9465-9479.

(收稿日期:2022-07-03

修回日期:2022-08-10)