

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.003

· 基础研究 ·

超微氧化铁纳米粒子通过强化自噬机制抑制人肝细胞癌 HepG2 细胞的迁移和侵袭

陈汉仁¹, 蒋淑莲^{2▲}, 张鹏^{3,4}, 任中玉^{3,4}, 陈剑娇¹, 文剑^{3,4} (1. 桂林医学院 药学院, 广西 桂林 541040; 2. 南京市第二医院 中西医结合科, 江苏 南京 210003; 3. 桂林医学院 临床医学院, 广西 桂林 541040; 4. 桂林医学院附属医院 神经内科, 广西 桂林 541001)

[摘要] **目的:** 探讨超微氧化铁纳米粒子 (ultrasmall iron oxide nanoparticle, USIONP) 对人肝细胞癌 HepG2 细胞迁移和侵袭的影响及其可能的机制。**方法:** 采用粒径分析仪和透射电镜分别分析 USIONP 的水合粒径和核心粒径, Zeta 电位和胶体稳定性实验分析 USIONP 的分散性及其稳定性以鉴定 USIONP 的成功制备; 用不同质量浓度 USIONP (0、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$) 或 200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP+5 mmol/L 3-MA (自噬抑制剂) 联合处理 HepG2 细胞, CCK-8 法检测 HepG2 细胞的增殖活力, Transwell 法检测细胞的迁移和侵袭能力, WB 实验检测自噬标志物 Beclin1、LC3、p62 的表达, 2', 7'-二氯二氢荧光素二醋酸 (DCFH-DA) 法测定细胞内活性氧 (ROS) 水平, 铁离子比色法检测细胞内铁离子水平。**结果:** USIONP 的平均水合粒径为 (37.86 $\pm$ 12.90) nm、核心粒径约 10 nm, Zeta 电位为 -23.8 mV, 有良好的水溶分散性, 证实了 USIONP 的成功制备。随 USIONP 质量浓度升高和处理时间延长, HepG2 细胞的增殖活力明显降低 (均 $P<0.05$); 与对照组相比, 200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 处理 HepG2 细胞 24 h 后, 迁移、侵袭细胞数量均显著减少 (均 $P<0.05$), 而 3-MA 能够部分抵消上述影响 (均 $P<0.05$)。与对照组相比, 100、200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 处理组的 HepG2 细胞中 Beclin1 和 LC3 II 蛋白相对表达水平均显著升高 (均 $P<0.05$), 而 p62 蛋白表达水平下降 (均 $P<0.05$); 200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 可显著提高细胞内 ROS 水平与铁离子水平, 而加入 3-MA 可阻断其作用 (均 $P<0.05$)。**结论:** USIONP 能促进 HepG2 细胞发生自噬, 而自噬通路激活后降解 USIONP 释放铁离子和导致细胞 ROS 水平升高, 从而抑制 HepG2 细胞的迁移和侵袭。

[关键词] 氧化铁纳米粒子; 肝细胞癌; HepG2 细胞; 迁移; 侵袭; 自噬

[中图分类号] R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)08-0783-07

Ultrasmall iron oxide nanoparticles inhibit the migration and invasion of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by enhancing autophagy

CHEN Hanren¹, JIANG Shulian^{2▲}, ZHANG Peng^{3,4}, REN Zhongyu^{3,4}, CHEN Jianjiao¹, WEN Jian^{3,4} (1. School of Pharmacy, Guilin Medical University, Guilin 541040, Guangxi, China; 2. Department of Integrated Chinese and Western Medicine, the Second Hospital of Nanjing, Nanjing 210003, Jiangsu, China; 3. School of Clinical Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541040, Guangxi, China; 4. Department of Neurology, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of ultrasmall iron oxide nanoparticles (USIONPs) on the migration and invasion of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and its possible mechanism. **Methods:** The hydrate particle size and core particle size of USIONPs were analyzed by particle analysis device and transmission electron microscope, respectively. The dispersity and stability of USIONPs were characterized by Zeta potential and colloid stability analysis, respectively, to identify the successful preparation of USIONPs. Different concentrations of USIONPs (0, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) or 200 $\mu\text{g/ml}$ USIONPs+5 mmol/L 3-MA (autophagy inhibitor) were used to treat human liver cancer HepG2 cells; then, CCK-8 assay was used to detect the proliferation viability of

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金资助项目 (No. 32060228); 广西自然科学基金资助项目 (No. 2017GXNSFAA198112, No. 2019GXNSFAA245077); 广西研究生教育创新计划资助项目 (No. YCSW2019214, No. YCSW2020225); 桂林市科学研究与技术开发计划资助项目 (No. 20190219-2)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 32060228), the Natural Science Foundation of Guangxi Autonomous Region (No. 2017GXNSFAA198112, No. 2019GXNSFAA245077), the Postgraduate Education Innovation Project of Guangxi Autonomous Region (No. YCSW2019214, No. YCSW2020225), and the Scientific Research and Technology Development Project from Guilin City (No. 20190219-2)

[作者简介] 陈汉仁 (1995—), 男, 硕士生, 主要从事神经系统疾病及肿瘤综合治疗的研究, E-mail: 591965255@qq.com; 蒋淑莲 (1977—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事中西医结合治疗肿瘤相关研究, E-mail: 448960823@qq.com。▲为共同第一作者

[通信作者] 文剑 (WEN Jian, corresponding author), 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事神经系统疾病以及肿瘤综合治疗的相关研究, E-mail: wenjian2400@163.com

HepG2 cells; Transwell method was used to detect the migration and invasion ability of HepG2 cell; WB experiment was applied to detect the expression of autophagy markers Beclin1, LC3 and p62; 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetic acid (DCFH-DA) method was used to determine the intracellular reactive oxygen species (ROS) level, and the iron ion colorimetric method was used to detect the iron ion level in the cells. **Results:** The average hydrate particle size of USIONPs was (37.86 ± 12.90) nm, the core particle size was about 10 nm, and the Zeta potential was -23.8 mV, and confirmed the successful preparation of USIONP. The USIONPs had good water solubility and dispersibility. As the mass concentration of USIONPs increased and the incubation time prolonged, the proliferation viability of HepG2 cells showed a decreasing trend. Compared with the control group, after incubating HepG2 cells with $200 \mu\text{g/ml}$ USIONPs for 24 h, the numbers of migrated and invaded cells were significantly reduced (all $P < 0.05$), and the addition of 3-MA could partially offset the above effects ($P < 0.05$). Compared with the control group, the relative protein expression levels of beclin1 and LC3II in HepG2 cells in the 100 and $200 \mu\text{g/ml}$ USIONPs treatment groups increased significantly (all $P < 0.05$), while the p62 protein expression decreased significantly (all $P < 0.05$); $200 \mu\text{g/ml}$ USIONPs could significantly increase the level of intracellular ROS and iron ions, while the autophagy inhibitor 3-MA could block its effect (all $P < 0.05$). **Conclusion:** USIONPs may promote autophagy of HepG2 cells, which consequently degrades USIONPs to release iron ions, leading to increased intracellular iron levels and ROS levels, thereby inhibiting the migration and invasion of HepG2 cells.

[Key words] iron oxide nanoparticle; hepatocellular carcinoma (HCC); HepG2 cell; migration; invasion; autophagy

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(8): 783-789. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.08.003]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球癌症死亡的第三大原因^[1],手术切除有潜在的疗效^[2],但复发率高^[3]。迁移和侵袭是手术切除后复发的独立预测因子^[4]。肿瘤迁移和侵袭缺乏有效治疗手段,导致较高病死率^[5]。肿瘤细胞迁移是指其脱落进入血管中,至远端组织形成新的转移灶^[6]。侵袭是指肿瘤细胞降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)后,突破基底膜和组织屏障迁移到周围组织中^[7]。近年来,纳米医学因能克服传统疗法的局限性而受到广泛关注^[8]。目前,水合粒径小于 50 nm 的超微氧化铁纳米粒子(ultrasmall iron oxide nanoparticle, USIONP)是FDA批准可临床应用的纳米粒子,不易被巨噬细胞作为异物吞噬^[9],可靶向于肿瘤细胞^[10]。在微环境中,巨噬细胞可极化为M1型和M2型。M1型巨噬细胞促进肿瘤细胞清除,而M2型巨噬细胞有利于肿瘤的形成和发展^[11]。已有报道USIONP可刺激巨噬细胞M1极化,从而间接抑制癌细胞的迁移和侵袭^[12]。本课题组前期研究合成了一种USIONP,联合超声处理可降低小鼠肝癌细胞H22的细胞活力,抑制细胞增殖^[13]。目前尚没有USIONP直接抑制肝癌细胞的报道。本课题组还发现USIONP能促进自噬蛋白高表达^[14],说明USIONP抑制肝癌活性可能与自噬通路有关。基于此,本研究探讨USIONP能否直接抑制人肝癌HepG2细胞的迁移和侵袭及其可能与自噬相关的机制,旨在为肝癌治疗探索新的手段。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

人HepG2细胞来源于美国ATCC细胞库,用含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素的DMEM培养基于37℃、5% CO₂的加湿环境培养箱中培养,每

3 d传代培养1次,选取生长至50%~80%汇合时细胞进行后续实验。氯化亚铁(FeCl₂)、乙酰丙酮铁[Fe(acac)₃]、油胺、油酸均购自上海阿拉丁公司,氯仿购自国药集团,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[methoxy (polyethylene glycol)-2000](DSPE-PEG2000)购自上海艾韦特公司,DMEM培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶均购自美国Gibco公司,青链霉素溶液、4%细胞固定液、0.1%结晶紫溶液均购自索莱宝公司,CCK-8法检测试剂盒、自噬抑制剂3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine, 3-MA)均购自MCE公司,基质胶购自美国BD公司,活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒购自碧云天公司,铁离子比色法检测试剂盒购自普利莱公司,p62(ab109012)、Beclin1(ab207612)、LC3 I 和 II (ab192890)、GAPDH(ab181602)抗体均购自美国Abcam公司,辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的IgG购自江苏凯基生物公司,ECL化学发光试剂盒购自美国Millipore公司。粒径分析仪购自美国Brookhaven公司,透射电子显微镜购自日本JEOL公司,细胞培养箱购自美国赛默飞世尔科技公司,酶标仪购自美国Molecular Devices公司,Transwell小室购自美国康宁公司,化学发光成像仪购自美国Azure Biosystems公司,倒置荧光显微镜购自日本尼康公司。

1.2 USIONP的制备

本课题组前期研究合成了USIONP^[13]。第一步,采用高温热解法制备油酸包覆的氧化铁纳米粒子(iron oxide nanoparticle, IONP);第二步,在油酸包覆的粒子混合物中加入50 mg DSPE-PEG 2000粉末,通过相转移的方法合成USIONP。

1.3 USIONP的鉴定

采用颗粒分析设备和透射电子显微镜分别测定了USIONP的水合粒径和核心粒径。用Zeta电位装

置测量 USIONP 的 Zeta 电位,胶体稳定性实验分析在去离子水中溶解的 USIONP 的稳定性。

1.4 CCK-8 法检测 USIONP 对 HepG2 细胞增殖的影响

取对数生长期 HepG2 细胞接种于 96 孔板中,加入不同质量浓度 USIONP (0、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$) 分别处理 24、48、72 h 后,用 PBS 洗涤细胞 3 次,然后每孔加入 10 μl CCK-8 溶液孵育 4 h,酶标仪测定 450 nm 波长处每孔光密度 (D) 值。相对细胞增殖活力 = (实验孔 D 值 - 空白孔 D 值) / (对照孔 D 值 - 空白孔 D 值) $\times 100\%$ 。

1.5 Transwell 法检测 HepG2 细胞的迁移和侵袭能力

取对数生长期 HepG2 细胞加入不同质量浓度 USIONP (0、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$) 或 200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP + 5 mmol/L 3-MA, 分别处理 24 h, 收集各组 HepG2 细胞后接种于 Transwell 上室并加入含 1% 胎牛血清的 100 μl 培养基, 下室中加入含 20% 胎牛血清培养基, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 环境中培养 24 h 后, 去除 Transwell 上室侧的细胞, 将迁移穿过膜的细胞固定、结晶紫染色后计数。

细胞侵袭实验在 Transwell 上室底部膜上预先加入 30 μl 基质胶, 37 $^{\circ}\text{C}$ 凝固 20 min 形成薄薄的凝胶层, 其余操作与迁移实验相同。

1.6 WB 法检测 USIONP 对 HepG2 细胞中 LC3 I、LC3 II、Beclin 1 和 p62 表达的影响

HepG2 细胞分别与不同质量浓度 USIONP (0、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$) 共孵育 24 h 后, PBS 洗涤细胞, 裂解液裂解, 提取细胞总蛋白, 经 10% SDS-PAGE 分离后转移到 PVDF 膜上, 用 5% 脱脂牛奶溶液封闭 PVDF 膜, 然后用 TBS/Tween 稀释一抗 [兔抗 p62 抗体 (1:1 000), Beclin 1 抗体 (1:2 000), LC3 II 抗体 (1:2 000), LC3 I 抗体 (1:2 000) 以及 GAPDH 抗体 (1:1 000)]。用 TBST 清洗 3 次, 与辣根过氧化物酶标记二抗 (1:5 000) 孵育 2 h, 以 TBST 清洗后用化学发光法检测。ImageJ 软件分析蛋白条带灰度值, 目的蛋白相对表达量 = 实验组灰度值 / 对照组灰度值。

1.7 DCFH-DA 染色法检测 USIONP 对 HepG2 细胞内 ROS 水平的影响

将对数生长期的 HepG2 细胞接种于 96 孔板中, 分别加入不同质量浓度的药物处理 (0 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 组、200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 组、200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP + 5 mmol/L 3-MA 联合组) 后共孵育 24 h, 收集细胞用 PBS 冲洗 3 次, 加入 20 $\mu\text{mol/L}$ DCFH-DA 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下处理 30 min。PBS 洗涤细胞 3 次, 用 Max M2 荧光酶标仪检测在 535 nm 的发射波长下各组细胞的荧光强度 (激发波长为 485 nm)。以实验组相对于空白组荧光强度的百分比表示细胞内 ROS 水平。

1.8 铁离子比色法检测 USIONP 对 HepG2 细胞内铁

离子浓度的影响

将对数生长期的 HepG2 细胞接种于 6 孔板中, 分组处理同 1.7, 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 24 h, PBS 冲洗 2 次, 加入 200 μl 裂解液裂解细胞 2 h, 取 100 μl 含细胞的裂解液与 100 μl 缓冲液、4.5% 高锰酸钾混合液混匀, 60 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 冷却至室温, 离心后取上清液加入 30 μl 铁离子检测剂, 混匀后置室温下孵育 30 min, 取 200 μl 混合液置于 96 孔板中, 用 Max M2 荧光酶标仪检测在 570 nm 波长处的 D 值, 对照标准曲线中 D 值可测知细胞内铁离子浓度。

1.9 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用方差分析 (ANOVA), 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 USIONP 的鉴定

对 USIONP 的鉴定结果 (图 1) 表明, USIONP 的平均水合粒径为 (37.86 $\pm$ 12.90) nm, 核心粒径约 10 nm; Zeta 电位为 -23.8 mV; USIONP 在去离子水中分散 30 d 未见沉淀; 胶体稳定性实验结果显示, USIONP 在去离子水中 5 周内未见明显聚集。

2.2 USIONP 抑制 HepG2 细胞的增殖和侵袭能力

CCK-8 法检测结果 (图 2) 显示, 在 0、50、100、200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 的作用下, 相同时间内, 随 USIONP 质量浓度升高, HepG2 细胞增殖活力明显降低 (均 $P < 0.05$); 在相同 USIONP 浓度下, 随作用时间延长, HepG2 细胞增殖活力亦逐步下降 (均 $P < 0.05$), 呈现剂量依赖性和时间依赖性。

Transwell 侵袭实验结果 (图 3) 显示, 与对照组相比, USIONP 作用 24 h 后, HepG2 细胞的侵袭能力受明显的抑制 (均 $P < 0.05$), 且随浓度增加抑制作用逐渐增强, 表明 USIONP 对 HepG2 细胞侵袭能力的抑制作用呈剂量依赖性。

2.3 USIONP 和 3-MA 对 HepG2 细胞迁移和侵袭的影响

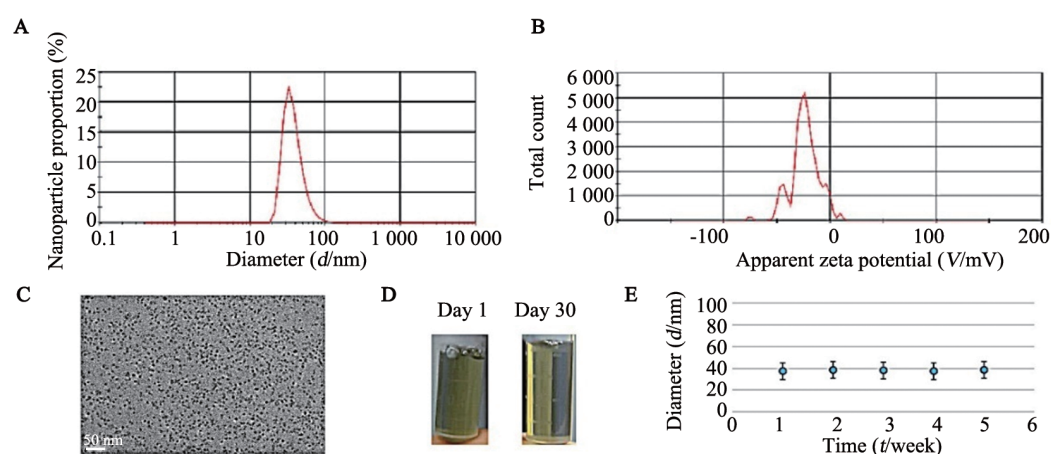
Transwell 实验检测结果 (图 4) 显示, 与 0 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 对照组相比, 200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 作用 HepG2 细胞 24 h 后, 迁移、侵袭细胞数量均显著减少 ($P < 0.05$); 3-MA 与 200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 共处理 HepG2 细胞 24 h 后, 迁移、侵袭细胞数均较 200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 组显著增加 ($P < 0.05$), 表明 3-MA 可以拮抗 USIONP 对 HepG2 细胞迁移和侵袭的抑制作用。

2.4 USIONP 对 HepG2 细胞自噬相关蛋白表达的影响

WB 检测结果 (图 5) 显示, 与对照组相比, 100、200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP 处理组的 HepG2 细胞中 Beclin1

和LC3 II蛋白相对表达水平均显著升高(均 $P<0.05$), 且呈剂量依赖性, 而p62蛋白表达水平呈剂量依赖性

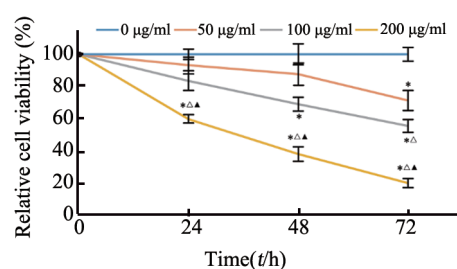
下降(均 $P<0.05$)。这表明, USIONP可促进HepG2细胞自噬, 且呈剂量依赖性。



A: Hydrate particle size of USIONPs; B: Zeta potential of USIONPs; C: Representative photo of USIONPs under TEM (Bar=50 μm in the field); D: Representative photos of aqueous solution of USIONPs taken at the 1st and the 30th day; E: Colloid stability test of USIONPs dissolved in deionized water

图1 USIONP的鉴定

Fig.1 Characteristics of USIONPs

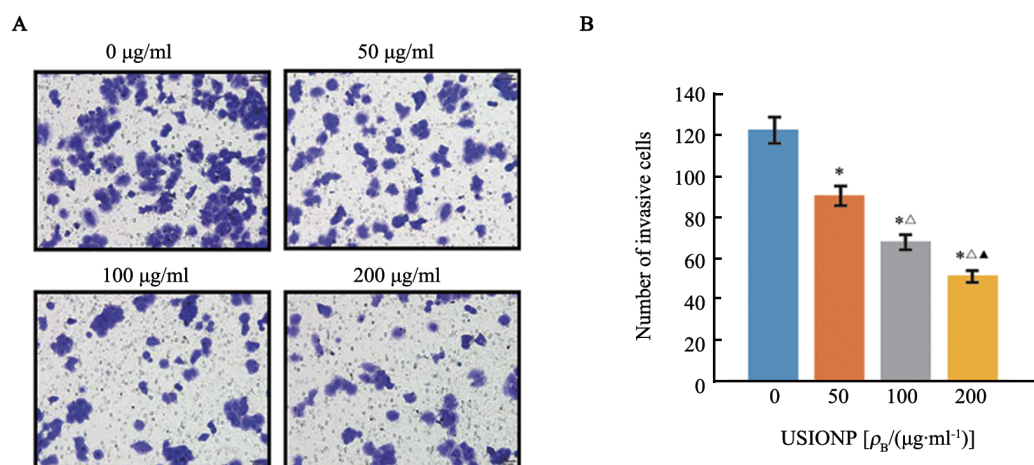


* $P<0.05$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ USIONP group; $\Delta P<0.05$ vs 50 $\mu\text{g/ml}$ USIONP group; $\blacktriangle P<0.05$ vs 100 $\mu\text{g/ml}$ USIONP group

图2 USIONP对HepG2细胞增殖的影响呈时间和剂量依赖性
Fig.2 USIONPs affected the proliferation of HepG2 cells in a time- and dose-dependent manner

2.5 USIONP和3-MA对HepG2细胞内ROS水平及铁离子浓度的影响

铁离子比色法(图6A)及DCFH-DA染色法(图6B)检测结果显示, 与对照组相比, 孵育24 h后, 200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP处理组HepG2细胞内铁离子浓度及ROS水平均显著升高(均 $P<0.05$); 与200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP处理组相比, 200 $\mu\text{g/ml}$ USIONP+3-MA联合处理组细胞内ROS水平和内铁离子浓度均显著降低(均 $P<0.05$)。这表明, USIONP可以提高HepG2细胞内ROS及铁离子水平, 且这种现象可以被自噬抑制剂3-MA逆转。



* $P<0.05$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ USIONP group; $\Delta P<0.05$ vs 50 $\mu\text{g/ml}$ USIONP group; $\blacktriangle P<0.05$ vs 100 $\mu\text{g/ml}$ USIONP group

A: Invasion of HepG2 cells detected by Transwell assay; B: Number of invasive HepG2 cells per field of microscopy view

图3 USIONP对HepG2细胞侵袭的影响呈时间和剂量依赖性($\times 200$)

Fig.3 USIONPs affected the invasion of HepG2 cells in a time- and dose-dependent manner ($\times 200$)

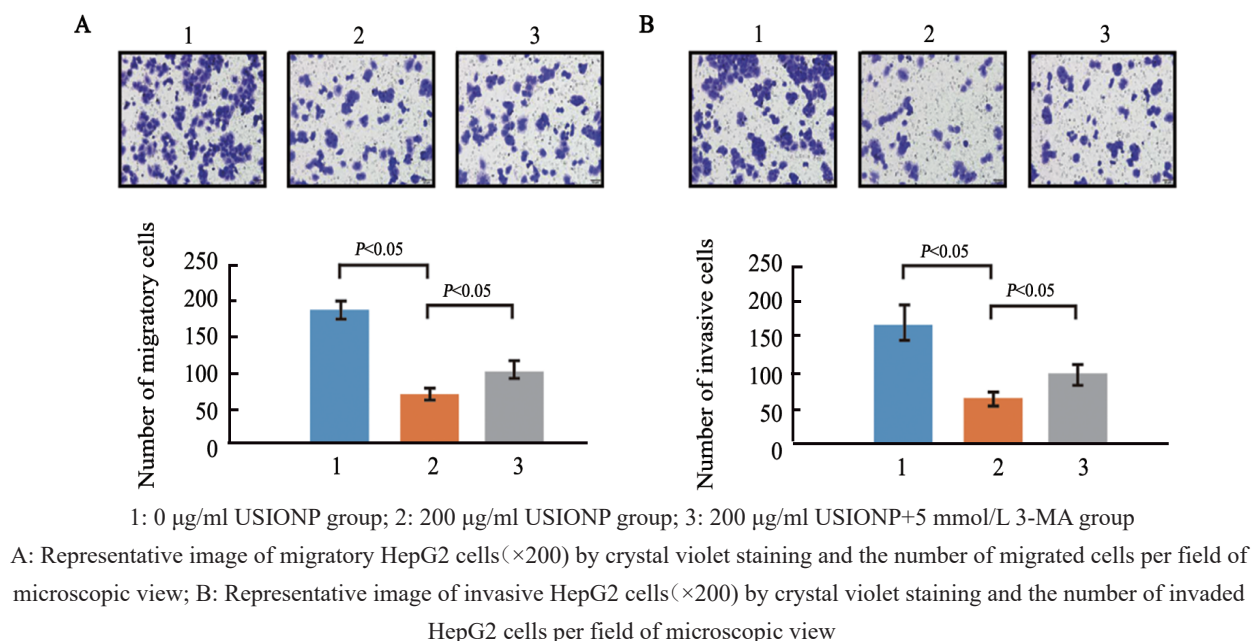
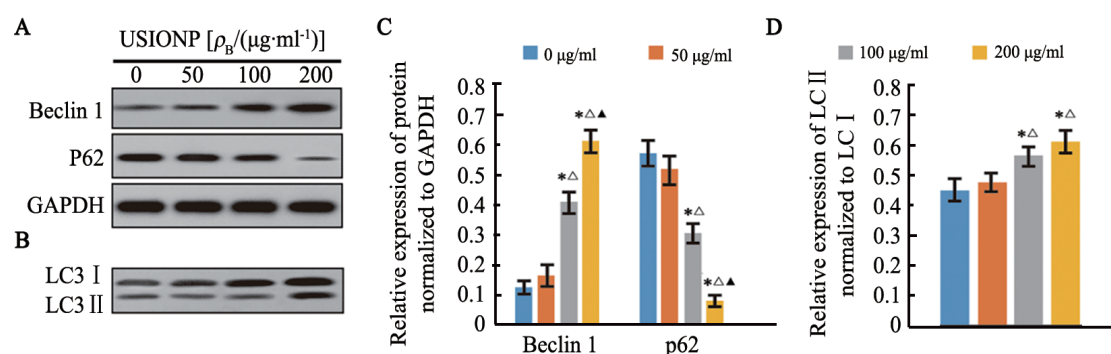


图4 USIONP及自噬抑制剂3-MA对HepG2细胞迁移与侵袭能力的影响

Fig.4 Effects of USIONPs and autophagy inhibitor 3-MA on the migration and invasion of HepG2 cells



* $P < 0.05$ vs 0 $\mu\text{g/ml}$ USIONP group; $^{\Delta}P < 0.05$ vs 50 $\mu\text{g/ml}$ USIONP group; $^{\Delta\Delta}P < 0.05$ vs 100 $\mu\text{g/ml}$ USIONP group

A: Representative images of Beclin 1 and P62 proteins in HepG2 cells determined by WB; B: Representative images of LC3 I and LC3 II protein in HepG2 cells determined by WB; C: Relative protein expressions of Beclin 1 and P62 normalized to GAPDH in HepG2 cells; D: Protein expressions of LC3 II relative to LC3 I in HepG2 cells

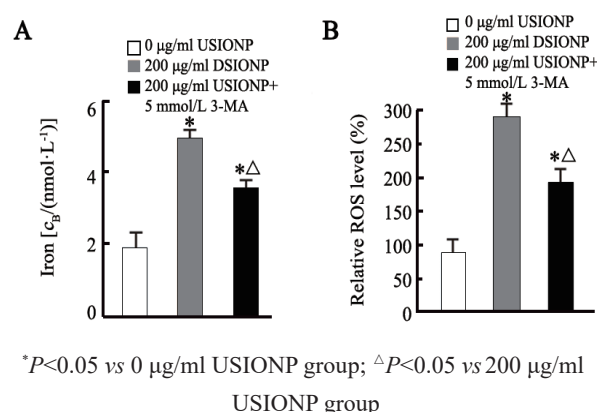
图5 USIONP对HepG2细胞中自噬相关蛋白表达的影响

Fig.5 Effects of USIONPs on the expression of autophagy-related proteins in HepG2 cells

3 讨论

本研究在制备 USIONP 后,水合粒径和透射电镜检测证明 USIONP 是超微结构;胶体稳定性检测证明 USIONP 具有良好的溶解性和稳定性且分布均匀;Zeta 电位为负值,粒子间相互排斥,不发生聚集;在水溶液中充分溶解 5 周后,未观察到纳米粒子聚集。这些鉴定检测结果表明,USIONP 是一种适合于机体体内外实验的水溶性的超微氧化铁纳米粒子。进一步研究发现,USIONP 可直接抑制 HepG2 细胞的增殖活性和侵袭能力,而这种抑制作用随着 USIONP 剂量的增加而增加,提示 USIONP 可能以剂量依赖的方式抑制 HepG2 细胞的增殖活性和侵袭能力。

自噬是真核细胞通过蛋白溶酶体降解途径去除异常蛋白和受损细胞器的分解代谢过程^[15],Beclin-1、LC3 和 p62 是参与自噬通路的关键蛋白^[16]。Beclin-1 是一种肿瘤抑制因子,调节自噬小体的形成^[17-19]。LC3 II 由 LC3 I 转化而生成,插入自噬小泡的内层和外层。自噬空泡的数量与 LC3 II 和 LC3 I 的比例成正比,通常作为自噬小体的标志^[20]。本研究发现,在 HepG2 细胞中,LC3 II (相对于 LC3 I 的水平)和 Beclin-1 的表达水平随着 USIONP 浓度的增加而显著升高,提示 USIONP 可能以剂量依赖的方式促进自噬。选择性自噬底物 p62 通过自噬持续降解。在本研究中发现 p62 的表达随着 USIONP 浓度的增加而显著降低,进一步证明了 USIONP 以剂量依赖的方式促进自噬。



A: Relative level of iron in HepG2 cells with different treatments (0 μg/ml USIONP, 200 μg/ml USIONP, 200 μg/ml USIONP and 5 mmol/L 3-MA) for 24 h; B: Relative ROS level in HepG2 cells with different treatments (0 μg/ml USIONP, 200 μg/ml USIONP, 200 μg/ml USIONP and 5 mmol/L 3-MA) for 24 h

图6 USIONP和自噬抑制剂3-MA对HepG2细胞内铁离子与ROS水平的影响

Fig.6 Effects of USIONPs and autophagy inhibitor 3-MA on intracellular ROS and iron level in HepG2 cells

3-MA是一种常用的细胞渗透性自噬隔离阻滞剂,可抑制自噬体的形成^[21-22]。本研究发现,3-MA能逆转USIONP对HepG2细胞迁移和侵袭的抑制作用。因此推测,USIONP抑制迁移和侵袭的作用与自噬通路有关。本实验结果进一步表明,USIONP可刺激HepG2细胞产生高水平的铁离子与ROS,但与自噬抑制剂3-MA共孵育后,铁离子与ROS水平显著下降。由此推测,3-MA可阻断自噬过程,从而抑制了自噬通路对USIONP的降解,导致细胞内铁离子水平下降;由于ROS可通过铁离子芬顿反应产生,相应ROS水平也下降,从而逆转了对细胞增殖活性和侵袭能力的抑制^[23]。

综上所述,USIONP可直接抑制肝癌HepG2细胞的增殖活性和迁移与侵袭能力,该作用与细胞自噬机制相关。

[参 考 文 献]

- GRANATA V, GRASSI R, FUSCO R, et al. Diagnostic evaluation and ablation treatments assessment in hepatocellular carcinoma [J/OL]. *Infect Agent Cancer*, 2021, 16(1): 53[2021-02-23]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8287696>. DOI: 10.1186/s13027-021-00393-0.
- GLANTZOUNIS G K, KARAMPA A, PERISTERI D V, et al. Recent advances in the surgical management of hepatocellular carcinoma[J]. *Ann Gastroenterol*, 2021, 34(4): 453-465. DOI: 10.20524/aog.2021.0632.
- BÁRCENA-VARELA M, LUJAMBIO A. Dissecting early relapse in liver cancer, one cell at a time[J/OL]. *Hepatology*, 2021[2021-01-11]. <https://aasldpubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/hep.31903>. DOI:10.1002/hep.31903.
- NISHIDA N, NISHIMURA T, KAITO T, et al. Molecular scoring of hepatocellular carcinoma for predicting metastatic recurrence and requirements of systemic chemotherapy[J/OL]. *Cancers*, 2018, 10(10): 367[2021-01-11]. <https://www.mdpi.com/2072-6694/10/10/367>. DOI:10.3390/cancers10100367.
- OLUGBAMI J O, DAMOISEAUX R, FRANCE B, et al. Atomic force microscopy correlates antimetastatic potentials of HepG2 cell line with its redox/energy status: effects of curcumin and Khaya senegalensis[J]. *J Integr Med*, 2017, 15(3): 214-230. DOI: 10.1016/s2095-4964(17)60337-6.
- YEUNG K T, YANG J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(1): 28-39. DOI: 10.1002/1878-0261.12017.
- JAYKUMAR A B, JUNG J, PARIDA P, et al. WNK1 enhances migration and invasion in breast cancer models[EB/OL]. *Mol Cancer Ther*, 2021[2021-01-11]. https://www.researchgate.net/publication/349951420_WNK1_Enhances_Migration_and_Invasion_in_Breast_Cancer_Models. DOI:10.1101/2021.03.09.434610.
- CHEN G, ROY I, YANG C, et al. Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy[J]. *Chem Rev*, 2016, 116(5): 2826-2885. DOI:10.1021/acs.chemrev.5b00148.
- WEN J, JIANG S L, CHEN B A. The effect of 100 Hz magnetic field combined with X-ray on hepatoma-implanted mice[J]. *Bioelectromagnetics*, 2011, 32(4): 322-324. DOI: 10.1002/bem.20646.
- XU Y L, WU H, HUANG J, et al. Probing and enhancing ligand-mediated active targeting of tumors using sub-5 nm ultrafine iron oxide nanoparticles[J]. *Theranostics*, 2020, 10(6): 2479-2494. DOI: 10.7150/thno.39560.
- KOH Y C, YANG G L, LAI C S, et al. Chemopreventive effects of phytochemicals and medicines on M1/M2 polarized macrophage role in inflammation-related diseases[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(8): 2208[2021-01-11]. <https://www.mdpi.com/1422-0067/19/8/2208>. DOI:10.3390/ijms19082208.
- ZANGANEH S, HUTTER G, SPITLER R, et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues[J]. *Nat Nanotechnol*, 2016, 11(11): 986-994. DOI:10.1038/nnano.2016.168.
- ZHANG P, REN Z, CHEN Z, et al. Iron oxide nanoparticles as nanocarriers to improve chlorin e6-based sonosensitivity in sonodynamic therapy[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2018, 12: 4207-4216. DOI:10.2147/dddt.s184679.
- REN Z, LIANG J, ZHANG P, et al. Inhibition of human glioblastoma cell invasion involves PION@E6 mediated autophagy process[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11: 2643-2652. DOI:10.2147/cmar.s200151.
- EFEYAN A, COMB W C, SABATINI D M. Nutrient-sensing mechanisms and pathways[J]. *Nature*, 2015, 517(7534): 302-310. DOI:10.1038/nature14190.
- SCHLÄFLI A M, BEREZOWSKA S, ADAMS O, et al. Reliable LC3 and p62 autophagy marker detection in formalin fixed paraffin embedded human tissue by immunohistochemistry[J/OL]. *Eur J Histochem*, 2015, 59(2): 2481[2021-01-11]. <http://wuropepmc.org/article/pmc/4503968>. DOI:10.4081/ejh.2015.2481.

- [17] LIU K, JIAN Y, SUN X, et al. Negative regulation of phosphatidylinositol 3-phosphate levels in early-to-late endosome conversion[J]. *J Cell Biol*, 2016, 212(2): 181-198. DOI: 10.1083/jcb.201506081.
- [18] ASHKENAZI A, BENTO C F, RICKETTS T, et al. Polyglutamine tracts regulate beclin 1-dependent autophagy[J]. *Nature*, 2017, 545 (7652): 108-111. DOI:10.1038/nature22078.
- [19] ZHU J, CAI Y, XU K, et al. Beclin1 overexpression suppresses tumor cell proliferation and survival via an autophagy-dependent pathway in human synovial sarcoma cells[J]. *Oncol Rep*, 2018, 40 (4): 1927-1936. DOI:10.3892/or.2018.6599.
- [20] KLIONSKY D J, ABDEL-AZIZ A K, ABDELFATAH S, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)¹[J]. *Autophagy*, 2021, 17(1): 1-382. DOI: 10.1080/15548627.2020.1797280.
- [21] ZHANG J, MAO W, LIU Y Y, et al. 3-MA enhanced chemosensitivity in cisplatin resistant hypopharyngeal squamous carcinoma cells via inhibiting beclin -1 mediated autophagy[J]. *Curr Pharm Des*, 2021, 27 (7): 996-1005. DOI:10.2174/1381612826666201221150431.
- [22] DONG Y, WU Y, ZHAO G L, et al. Inhibition of autophagy by 3-MA promotes hypoxia-induced apoptosis in human colorectal cancer cells[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(3): 1047-1054. DOI:10.26355/eurrev_201902_16992.
- [23] POILLET-PEREZ L, DESPOUY G, DELAGE-MOURROUX R, et al. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy[J]. *Redox Biol*, 2015, 4: 184-192. DOI:10.1016/j.redox.2014.12.003.
- [收稿日期] 2021-02-25 [修回日期] 2021-07-22
[本文编辑] 黄静怡, 沈志超