

- in the ICU [J]. *Semin Respir Crit Care Med*, 2011, 32 (5): 626–638.
- [14] 蒋 艳, 赵琳琳, 马 静, 等. 藏药三果汤调节 Nrf2/HO-1 信号通路干预高脂血症大鼠的作用机制 [J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41 (6): 743–749. JIANG Y, ZHAO LL, MA J, *et al*. Mechanism of tibetan medicine Sanguo decoction prevent high-fat diet-induced hyperlipidemia rats by regulating Nrf2/HO-1 signal pathway [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2024, 41 (6): 743–749.
- [15] ZHANG Q, LIU J, DUAN H, *et al*. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: an important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress [J]. *J Adv Res*, 2021, 34: 43–63.
- [16] LI J, LU K, SUN F, *et al*. Panaxydol attenuates ferroptosis against LPS-induced acute lung injury in mice by Keap1-Nrf2/HO-1 pathway [J]. *J Transl Med*, 2021, 19 (1): 96.

[文章编号] 1007-7669(2024)07-0540-07

[DOI号] 10.14109/j.cnki.xyylc.2024.07.11

## 卡格列净激活 cGAS-STING 通路抑制肝癌细胞增殖

崔茜如<sup>1</sup>, 吴 勇<sup>2</sup>, 冯 吉<sup>2,3</sup>, 周 静<sup>1</sup>, 卢国栋<sup>2,3</sup>

(1. 广西医科大学基础医学院 生理学教研室, 广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学公共卫生学院 卫生毒理学教研室, 广西 南宁 530021; 3. 复旦大学公共卫生学院, 上海 200032)

[关键词] 卡格列净; 肝癌; 降血糖药; DNA, 线粒体; cGAS-STING

[摘要] 目的 探究卡格列净对肝癌细胞的影响及调控机制。方法 卡格列净处理人肝癌细胞 HepG2、Huh7 和 HCCM 以及人正常肝细胞 MIHA 细胞后, 通过细胞克隆形成实验和 CCK-8 实验检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞和线粒体内活性氧 (ROS) 水平和线粒体膜电位变化, Western blot 法检测增殖相关蛋白和 cGAS-STING 通路相关蛋白表达情况, RT-qPCR 法检测线粒体 DNA (mtDNA) 释放水平和炎症因子 mRNA 表达水平。结果 与人正常肝细胞 MIHA 相比, 卡格列净对 HepG2 细胞增殖的抑制作用更显著 ( $P<0.05$ , 半抑制浓度分别为  $>40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )。与对照组相比, 卡格列净组肝癌细胞增殖数目、增殖相关蛋白的表达均降低, 呈浓度依赖性, 细胞内和线粒体 ROS 水平升高, 线粒体膜电位降低, 胞质 mtDNA 释放水平、cGAS-STING 通路相关蛋白表达和炎症因子 mRNA 水平均升高 (均  $P<0.05$ )。与卡格列净组相比, *N*-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) + 卡格列净组细胞内和线粒体 ROS 水平、胞质 mtDNA 释放水平, cGAS-STING 通路相关蛋白的表达和炎症因子的 mRNA 水平均降低 (均  $P<0.05$ )。与卡格列净组相比, cGAS 抑制剂 RU.521+ 卡格列净组肝癌细胞增殖活力和增殖相关蛋白的表达均显著增加 (均  $P<0.05$ )。结论 卡格列净诱导肝癌细胞氧化应激和线粒体功能受损, 导致 mtDNA 外泄至胞质中, 进而激活 cGAS-STING 通路, 引起细胞内炎症因子水平升高, 最终抑制肝癌细胞增殖。

[中图分类号] R977.1; R979.1

[文献标志码] A

## Canagliflozin inhibits proliferation of liver cancer cells by activating cGAS-STING pathway

[收稿日期] 2023-11-08 [接受日期] 2024-05-08

[基金项目] 国家自然科学基金委员会面上项目 (81972291); 广西自然科学基金委员会重点项目 (2018GXNSFDA050006); 广西研究生教育创新计划项目 (YCBZ2023087)

[作者简介] 崔茜如, 女, 硕士在读, 主要从事肿瘤分子生物学的研究, E-mail: 1159390632@qq.com。卢国栋, 男, 教授, 博士, 主要从事肿瘤分子生物学和毒理学的研究, E-mail: lugd@fudan.edu.cn

[责任作者] 卢国栋

CUI Qian-ru<sup>1</sup>, WU Yong<sup>2</sup>, FENG Ji<sup>2,3</sup>, ZHOU Jing<sup>1</sup>, LU Guo-dong<sup>2,3</sup>

( 1. Department of Physiology, School of Basic Medicine, Guangxi Medical University, Nanning GUANGXI 530021, China;  
2. Department of Toxicology, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning GUANGXI 530021, China;  
3. School of Public Health, Fudan University, SHANGHAI 200032, China )

[ KEY WORDS ] canagliflozin; liver cancer; hypoglycemic agents; DNA, mitochondrial; cGAS-STING

[ ABSTRACT ] AIM To investigate the effect of canagliflozin on liver cancer cells and its regulatory mechanism. METHODS The effects of canagliflozin on the proliferation of liver cancer cell HepG2, Huh7 and HCCM were detected by cell clone formation assay and CCK-8 assay. Flow cytometry was used to measure changes in reactive oxygen species ( ROS ) levels, both intracellular and mitochondrial ROS levels, as well as alterations in mitochondrial membrane potential. Western blot was employed to assess the expression of proteins related with proliferation and cGAS-STING pathway. Mitochondrial DNA ( mtDNA ) release and inflammatory factor mRNA expression level were detected by RT-qPCR. RESULTS Compared with human normal liver cell MIHA, the inhibitory effect of canagliflozin on HepG2 cell proliferation was more significant (  $P < 0.05$ , semi-inhibitory concentrations were  $>40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively ). Compared with the control group, the clone number of liver cancer cells and the expression of proliferation-related proteins in the canagliflozin group were decreased in a concentration dependent manner (  $P < 0.05$  ). Additionally, the intracellular and mitochondrial ROS levels were increased, the mitochondrial membrane potential was decreased, and the cytoplasmic mtDNA release level, cGAS-STING pathway-related protein expression and pro-inflammatory factor mRNA levels were increased ( all  $P < 0.05$  ). Compared with the canagliflozin group, the intracellular and mitochondrial ROS levels, cytoplasmic mtDNA release levels, cGAS-STING pathway-related protein expression and pro-inflammatory factor mRNA levels in the *N*-acetyl-*L*-cysteine ( NAC ) + canagliflozin group were decreased ( all  $P < 0.05$  ). Compared with the canagliflozin group, the proliferation activity and the expression of proliferation-related proteins in the cGAS inhibitor RU.521 + canagliflozin group were significantly increased ( all  $P < 0.05$  ). CONCLUSION Canagliflozin induces oxidative stress in liver cancer cells, leading to the accumulation of ROS within cells and mitochondria, impairment of mitochondrial function, leakage of mtDNA into the cytoplasm, activation of the cGAS-STING pathway, and subsequent release of intracellular pro-inflammatory factors. These processes collectively contribute to the modulation of liver cancer cells proliferation.

2024 年国家癌症中心全国癌症报告指出, 肝癌是中国发病率第四和死亡率第二的恶性肿瘤, 肝癌仍然是我国的重大公共卫生问题<sup>[1]</sup>。代谢性疾病如 2 型糖尿病和非酒精性脂肪肝已成为肝癌的主要危险因素<sup>[2]</sup>。2 型糖尿病患者通常伴随胰岛素抵抗和脂代谢紊乱等多种代谢异常, 这些因素进一步增加了罹患肝癌的风险。有研究发现, 2 型糖尿病患者的肝癌发病率较非 2 型糖尿病患者增加了 2~5 倍<sup>[3]</sup>。因此, 抗糖尿病药物对肝癌发生和发展的影响越来越受到关注。已有证据表明, 不同抗糖尿病药物对肝癌的影响不同, 其中二甲双胍可以降低患肝癌的风险<sup>[4]</sup>, 而胰岛素可以通过激活多种信号通路, 如 PI3K/Akt 和 MAPK 通路, 促进肝癌细胞的增殖<sup>[5,6]</sup>。钠-葡萄糖共转运蛋白 2 ( SGLT-2 ) 抑制剂对肝癌的作用及其机制仍有待阐明。在早期临床研究中发现, SGLT-2 抑制剂卡格列净对肝癌可能具有一定的抗肿瘤特性<sup>[7]</sup>,

ZENG 等<sup>[8]</sup>发现卡格列净可通过对糖酵解和谷氨酰胺代谢的双重作用诱导肝癌细胞发生铁死亡, 从而增强顺铂化疗敏感性。HUNG 等<sup>[9]</sup>研究发现卡格列净能够抑制肝癌细胞移植瘤的生长, 而达格列净和恩格列净对移植瘤的抑制效果并不明显, 提示了卡格列净可能通过其他靶点效应发挥抗肿瘤作用。

线粒体通过调节氧化还原稳态、代谢和免疫信号, 在肿瘤的发生发展过程中起着关键作用<sup>[10]</sup>。线粒体损伤的一个关键特征是将线粒体 DNA ( mtDNA ) 释放到胞质中, 并被 DNA 传感器 cGAS 识别, 从而调控细胞免疫、代谢和凋亡等多种细胞功能<sup>[11]</sup>。本研究旨在观察卡格列净对肝癌细胞的作用及其对 cGAS-STING 通路的影响。

#### 材料与amp;方法

药物、试剂与仪器 卡格列净 ( canagliflozin, 纯度  $>99\%$  )

购自美国 AdooQ Bioscience 公司。基因组 DNA 小量抽提试剂盒购自中国碧云天公司, CCK-8 试剂盒、H<sub>2</sub>DCFDA 探针、MitoSox 探针、RU.521 (RU320521, cGAS 抑制剂)、兔源抗表皮生长因子受体 (EGFR) 单克隆抗体、兔源抗 p-EGFR 单克隆抗体购自美国 MedChemExpress 公司; 兔源抗 cGAS 单克隆抗体、兔源抗 STING 单克隆抗体、兔源抗 p-STING 单克隆抗体、兔源抗 TANK 结合激酶 1 (TBK1) 单克隆抗体、兔源抗 p-TBK1 单克隆抗体、兔源抗核因子  $\kappa$ B p65 (NF- $\kappa$ B p65) 单克隆抗体、兔源抗 p-NF- $\kappa$ B p65 单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 鼠源抗增殖细胞核抗原 (PCNA) 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司; *N*-乙酰-*L*-半胱氨酸 (NAC) 和胎牛血清购自美国 Sigma 公司; 高糖和无糖培养基 DMEM 和 TMRM 探针购自美国 Thermo Fisher 公司; 引物购自南宁捷尼斯生物科技有限公司。371 型二氧化碳细胞培养箱、智能凝胶成像系统和 StepOne Plus 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo Fisher 公司; PowerPac™ 基础电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司; Cyto FLEX 流式细胞仪购自美国 Beckman 公司。

**细胞培养** 人肝癌 Huh7 细胞株由广西医科大学公共卫生学院梁浩团队赠予, 人肝癌 HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库, 人肝癌 HCCM 细胞由新加坡国立大学 E.C.Ren 博士赠予, 人正常肝细胞 MIHA 购自湖南丰晖生物。肝癌细胞与 MIHA 细胞均用 10% FBS+1% 青霉素-链霉素+DMEM 培养基培养, 置于 37 °C 恒温细胞培养箱, 当细胞生长至汇合率达到 80%~90% 时, 传代培养备用。

**细胞克隆形成** 使用对数生长期的 HepG2、Huh7 和 HCCM 细胞分别用胰酶消化吹打成单细胞悬液, 以每孔  $1 \times 10^3$  个细胞接种在 6 孔板, 放入 37 °C 细胞培养箱中培养 24 h 后, 更换含不同浓度 (10、20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 卡格列净的培养基继续培养 10 d, 吸去培养基, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入 4% 多聚甲醛 1 mL 固定 20 min; 吸去细胞固定液, 每孔加入结晶紫染液 1 mL 染色 20 min, 用 PBS 将染色液洗涤干净, 晾干后用扫描仪拍照, 使用 Image J 软件进行统计分析。

**CCK-8 法检测细胞增殖活力** 制备 HepG2 细胞悬液并计数, 在 96 孔板中接种细胞悬液 100  $\mu\text{L}$  (每孔  $5 \times 10^3$  个), 每组设置 5 个复孔, 将 96 孔板放入细胞培养箱中过夜培养以待细胞贴壁。不同浓度卡格列净及 RU.521 (10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + 卡格列净 (20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 12 h 后, 每孔加入 CCK-8 溶液 10  $\mu\text{L}$ , 在培养箱内孵育 1~4 h, 用

酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度 (*A*) 值。细胞活力计算公式: 细胞活力 (%) =  $(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白对照组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白对照组}}) \times 100\%$ 。采用 SPSS 22.0 软件计算半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ )。

**Western blot 法检测增殖及 cGAS-STING 通路相关蛋白表达** 使用含有磷酸酶抑制剂的 SDS 裂解液提取 HepG2 细胞蛋白样品, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度并制样。通过 SDS-PAGE 电泳, 将样品加载至凝胶中, 转膜后用含有 5% 脱脂牛奶的 TBST 封闭, 与一抗 STING 抗体 1:1 000、p-STING 抗体 1:1 000、cGAS 抗体 1:1 000、p-TBK1 抗体 1:1 000、TBK1 抗体 1:1 000、p-NF- $\kappa$ B p65 抗体 1:1 000、NF- $\kappa$ B p65 抗体 1:1 000、EGFR 抗体 1:1 000、p-EGFR 抗体 1:1 000、PCNA 抗体 1:1 000 和  $\alpha$ -tubulin 抗体 1:10 000 孵育过夜, 加入二抗 1:5 000 稀释孵育 1 h; 用 ECL 化学发光液曝光蛋白条带, 使用 Image J 软件进行条带分析。

**线粒体膜电位** HepG2 细胞以每孔  $1.8 \times 10^5$  个细胞接种于 12 孔板中贴壁培养 24 h, 用不同浓度 (10、20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 卡格列净处理 HepG2 细胞 12 h 或 24 h。处理结束时, 在无血清 DMEM 中加载染料 TMRM, 并在 37 °C 下避光孵育 30 min, 然后用 PBS 洗涤 3 次,  $1 114 \times g$  离心 5 min 收集细胞, 用 PBS 500  $\mu\text{L}$  重悬细胞, 使用流式细胞仪的绿色荧光通道 FITC-A (激发波长 488 nm, 最大发射波长 525 nm) 检测细胞的荧光水平。

**活性氧 (ROS) 检测** HepG2 细胞以每孔  $1.8 \times 10^5$  个细胞接种于 12 孔板中贴壁培养 24 h, 然后用不同浓度 (10、20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 卡格列净和 NAC (10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) + 卡格列净 (40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 处理 HepG2 细胞 12 h。处理结束时, 在无血清 DMEM 中加载染料 H<sub>2</sub>DCFDA 或 MitoSox 并在 37 °C 下避光孵育 30 min, 然后用 PBS 洗涤 3 次,  $1 114 \times g$  离心 5 min 收集细胞, 用 PBS 500  $\mu\text{L}$  重悬细胞, 使用流式细胞仪的绿色荧光通道 FITC-A 或红色荧光通道 PE-A (激发波长 488 nm, 最大发射波长 575 nm) 检测荧光进行流式分析。

**细胞质 mtDNA 定量** HepG2 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中贴壁培养 24 h, 然后用 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡格列净和 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAC 处理 HepG2 细胞 24 h, 处理结束时裂解细胞。使用细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒分离细胞上清与沉淀, 分别表示细胞质与总的 DNA 组分。基因组 DNA 小量抽提试剂盒分别提取上清与沉淀部分 DNA, 采用 mtDNA 特异的引物 (线粒体编码基因 *tRNA-Leu* 和非编码区序列 *Beta-2-microglobulin*) 进行 PCR 定量, *tRNA-Leu*

上游 5'-CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG-3', 下游 5'-GAGGACCTGGGAGTAGATGAG-3'; *Beta-2-microglobulin* 上游 5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3', 下游 5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGA-3'。每个样本细胞质 mtDNA 与总的 mtDNA 进行标准化。

**RT-qPCR 法检测炎症因子 mRNA 水平** HepG2 细胞接种于 10 cm 细胞培养皿中贴壁培养 24 h, 然后用 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡格列净和 10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NAC 处理 HepG2 细胞 24 h, 处理结束时裂解细胞。Trizol 法提取总 RNA, 检测 RNA 浓度和纯度合格后, 将 RNA 逆转录成 cDNA, 进行后续的 PCR 扩增。*TNF- $\alpha$*  上游 5'-CCTCTCTCTAATCAGCCCTCTG-3', 下游 5'-GAGGACCTGGGAGTAGATGAG-3'; *IL-1* 上游 5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3', 下游 5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGA-3'; *IL-6* 上游 5'-ACTCACCTCTTCAGAACGAATG-3', 下游 5'-CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG-3'; *GAPDH* 上游 5'-GGAAGCTTGCATCAATGGAAATC-3', 下游 5'-TGATGACCCTTTGGCTCCC-3'。mRNA 相对表达

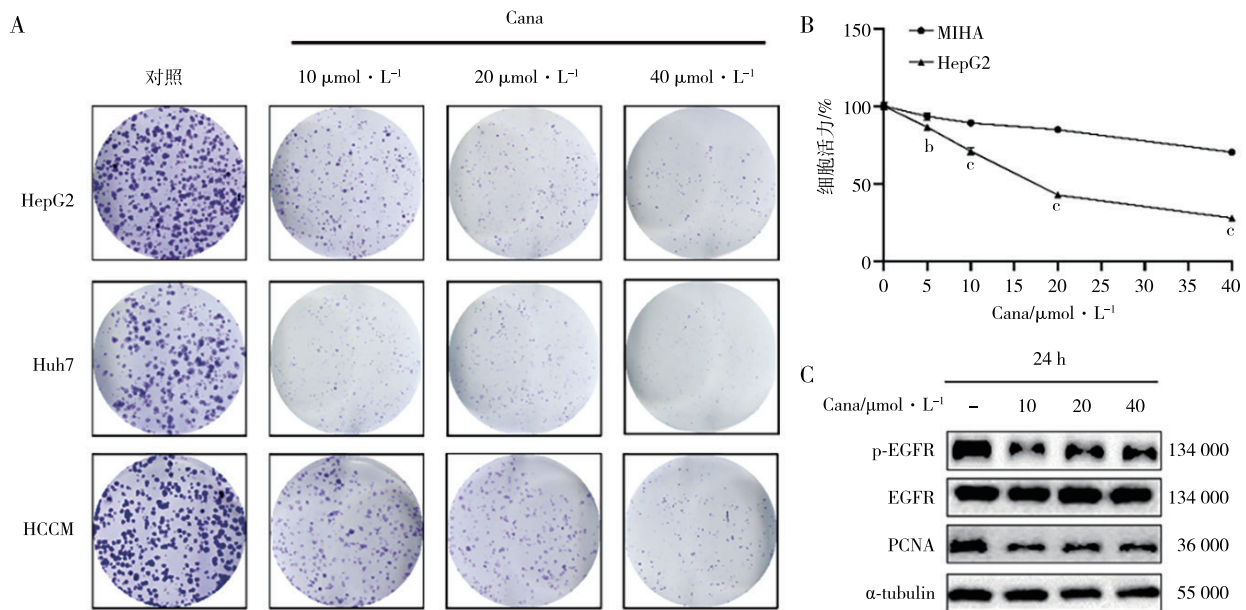
量采用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  公式进行换算。

**统计学方法** 所有统计均使用 SPSS 22.0 软件分析, 实验数据以平均值  $\pm$  标准差表示, 多组比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 Students' *t* 检验, 以  $P < 0.05$  为有显著差异。

### 结 果

**卡格列净抑制肝癌细胞增殖** 使用卡格列净处理后, 随着药物浓度的增加, 肝癌细胞克隆形成数逐渐减少, 见图 1A 和表 1。与人正常肝细胞 MIHA ( $\text{IC}_{50} > 40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 相比, 卡格列净对 HepG2 细胞的增殖抑制作用更显著 ( $\text{IC}_{50} = 15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 具有显著差异 ( $P < 0.05$ ), 见图 1B。与对照组比较, 卡格列净组 PCNA 蛋白水平显著降低, p-EGFR/EGFR 蛋白水平显著降低, 均呈浓度依赖性 ( $P < 0.05$ ), 见图 1C 和表 1。

**卡格列净导致细胞内发生氧化应激并损伤线粒体功能** 与对照组相比, 10、20、40  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡格列净组 HepG2 细胞荧光水平增加 ( $P < 0.05$ ), ROS 积聚



**图 1 卡格列净 (Cana) 抑制肝癌细胞克隆形成** A: 平板克隆实验检测卡格列净处理后肝癌细胞的增殖能力 (结晶紫染液), B: CCK-8 检测卡格列净处理 24 h 后 HepG2 细胞和 MIHA 细胞增殖活性 ( $n=6, \bar{x} \pm s$ ), C: 卡格列净处理后 HepG2 细胞增殖相关蛋白的表达。经单因素方差分析: 与 MIHA 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$

**表 1 各组肝癌细胞克隆数目及增殖相关蛋白表达**

$n=3, \bar{x} \pm s$

组别	细胞克隆数			p-EGFR/EGFR	PCNA
	HepG2	Huh7	HCCM		
对照	374.40 $\pm$ 8.82	296.20 $\pm$ 9.78	341.40 $\pm$ 8.41	1.00 $\pm$ 0.03	1.00 $\pm$ 0.09
10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡格列净	139.80 $\pm$ 7.01 <sup>c</sup>	83.60 $\pm$ 11.97 <sup>c</sup>	186.60 $\pm$ 12.46 <sup>c</sup>	0.74 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>	0.56 $\pm$ 0.09 <sup>b</sup>
20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡格列净	96.00 $\pm$ 11.34 <sup>cf</sup>	56.00 $\pm$ 9.35 <sup>cf</sup>	158.80 $\pm$ 3.96 <sup>cf</sup>	0.71 $\pm$ 0.07 <sup>cf</sup>	0.52 $\pm$ 0.07 <sup>cf</sup>
40 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡格列净	45.00 $\pm$ 6.89 <sup>cf</sup>	42.80 $\pm$ 10.40 <sup>cf</sup>	47.00 $\pm$ 11.60 <sup>cf</sup>	0.63 $\pm$ 0.06 <sup>cf</sup>	0.46 $\pm$ 0.05 <sup>cf</sup>

经单因素方差分析: 与对照组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡格列净组比较, <sup>f</sup> $P < 0.01$ ; 与 20  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡格列净组比较, <sup>e</sup> $P > 0.05$ , <sup>i</sup> $P < 0.01$

在胞质和线粒体中; 与  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡格列净组相比, NAC+ 卡格列净组细胞内 ROS 水平和线粒体 ROS 水平降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2A、2B。与对照组相比, 20、 $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡格列净组处理 12 h 和 24 h 后 HepG2 细胞绿色荧光变弱, 线粒体膜电位降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 2C。

**卡格列净促进线粒体 mtDNA 释放激活 cGAS-STING 通路** 与对照组相比, 卡格列净组细胞质中的 mtDNA 拷贝数显著增加 ( $P < 0.05$ ), NAC+ 卡格列净组的 mtDNA 释放减少 ( $P < 0.05$ ), 见图 3A。与对照组比较, 卡格列净组 cGAS、p-STING/STING、p-TBK1/TBK1 和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 水平显著增高 ( $P < 0.05$ ), 见图 3B 和表 2。与卡格列净组相比, NAC+ 卡格列净

组 cGAS、p-STING/STING、p-TBK1/TBK1 和 p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ), 见图 3C 和表 3。

**卡格列净对肝癌细胞内炎症因子水平的影响** 与对照组相比, 卡格列净组 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平显著增高, IL-10 水平降低 ( $P < 0.05$ ); 与卡格列净组相比, NAC+ 卡格列净组 IL-1、IL-6 和 TNF- $\alpha$  水平降低, IL-10 水平升高 ( $P < 0.05$ ), 见表 4。

**卡格列净激活 cGAS-STING 通路从而影响肝癌细胞的生长增殖** 与对照组相比, 卡格列净组 HepG2 细胞增殖活力、PCNA 蛋白水平和 p-EGFR/EGFR 水平显著降低 ( $P < 0.05$ ); 与卡格列净组相比, RU.521+ 卡格列净组细胞增殖活力、PCNA 蛋白水平和 p-EGFR/EGFR 水平显著增加 ( $P < 0.05$ )。见图 5 和表 5。

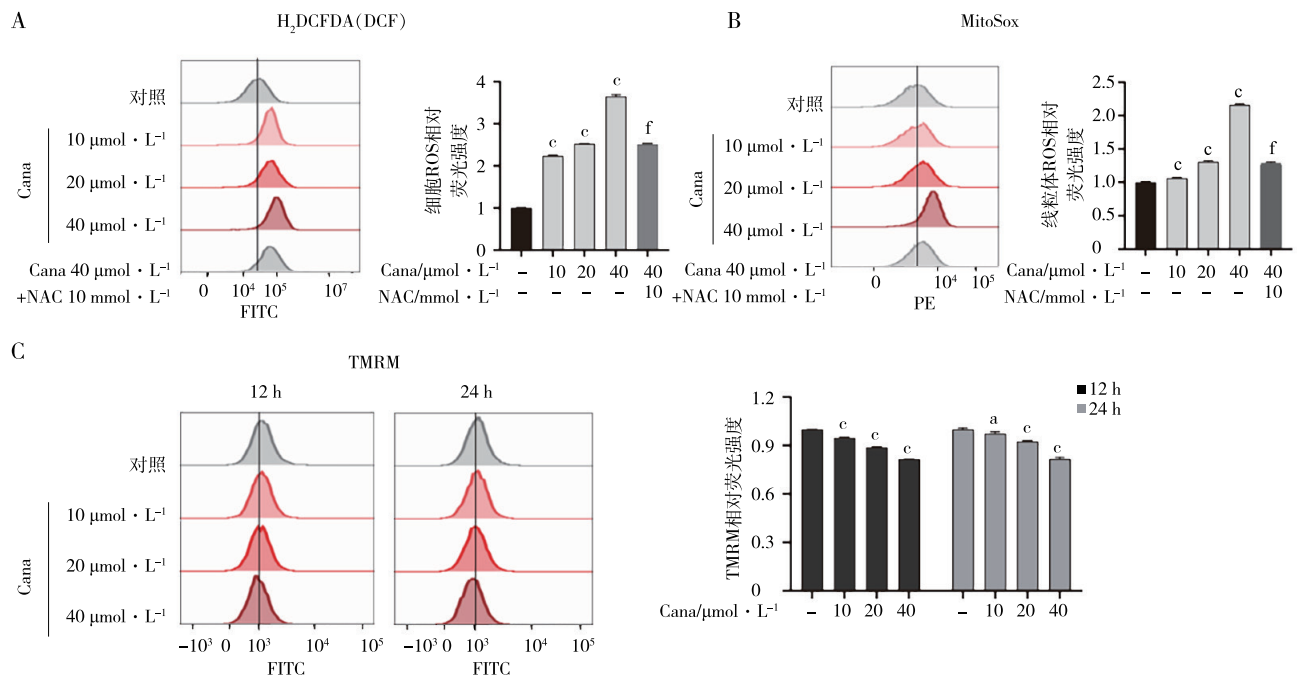


图 2 卡格列净 (Cana) 对 HepG2 细胞线粒体功能的影响 A: 细胞质 ROS 水平, B: 线粒体 ROS 水平, C: 线粒体膜电位水平。NAC: N-乙酰-L-半胱氨酸。经单因素方差分析: 与对照组比较: <sup>a</sup> $P > 0.05$ , <sup>c</sup> $P < 0.01$ ; 与  $40 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  卡格列净组比较, <sup>f</sup> $P < 0.01$

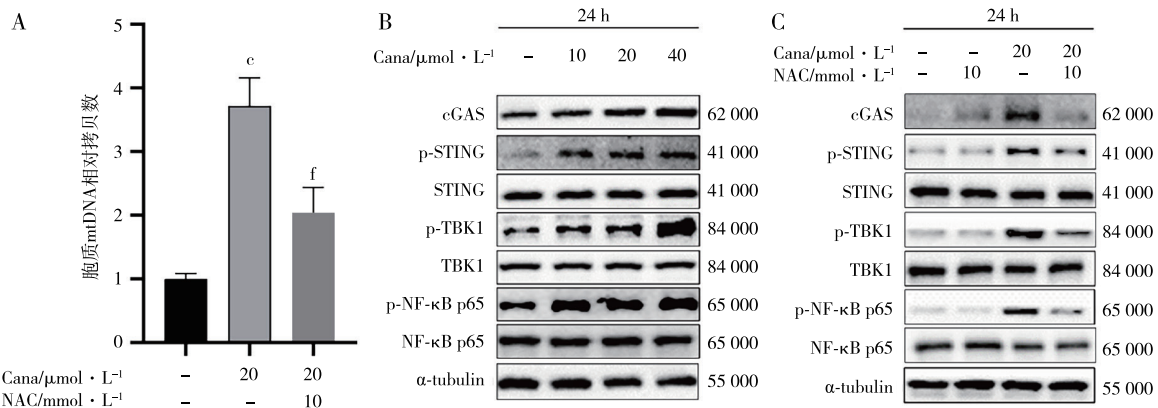


图 3 卡格列净 (Cana) 诱导 HepG2 细胞线粒体 mtDNA 释放入胞质激活 cGAS-STING 通路 A: 细胞质 mtDNA 的水平 ( $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ ), B: cGAS-STING 通路蛋白表达, C: N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) 预处理后 cGAS-STING 通路蛋白表达的影响。经单因素方差分析: 与对照组比较, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与卡格列净组比较, <sup>f</sup> $P < 0.01$

表 2 各组 HepG2 细胞 cGAS-STING 通路相关蛋白表达比较

n=3,  $\bar{x} \pm s$ 

组别	cGAS	p-STING/STING	p-TBK1/TBK1	p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65
对照	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.1	1.00 ± 0.09
10 $\mu$ mol · L <sup>-1</sup> 卡格列净	1.15 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.51 ± 0.10 <sup>c</sup>	1.59 ± 0.11 <sup>c</sup>	1.66 ± 0.03 <sup>c</sup>
20 $\mu$ mol · L <sup>-1</sup> 卡格列净	1.45 ± 0.04 <sup>c</sup>	1.57 ± 0.13 <sup>c</sup>	1.83 ± 0.18 <sup>c</sup>	2.12 ± 0.30 <sup>c</sup>
40 $\mu$ mol · L <sup>-1</sup> 卡格列净	1.83 ± 0.10 <sup>c</sup>	2.41 ± 0.09 <sup>c</sup>	3.11 ± 0.21 <sup>c</sup>	2.21 ± 0.34 <sup>c</sup>

经单因素方差分析：与对照组比较，<sup>b</sup>P<0.05, <sup>c</sup>P<0.01

表 3 N-乙酰-L-半胱氨酸 (NAC) 预处理后各组 HepG2 细胞 cGAS-STING 通路相关蛋白表达比较

n=3,  $\bar{x} \pm s$ 

组别	cGAS	p-STING/STING	p-TBK1/TBK1	p-NF- $\kappa$ B p65/NF- $\kappa$ B p65
对照	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.02
NAC	1.13 ± 0.08 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.07 <sup>a</sup>	1.07 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.02 ± 0.01 <sup>a</sup>
卡格列净	1.61 ± 0.11 <sup>c</sup>	2.13 ± 0.07 <sup>c</sup>	2.94 ± 0.07 <sup>c</sup>	1.67 ± 0.05 <sup>c</sup>
NAC + 卡格列净	0.67 ± 0.01 <sup>f</sup>	1.37 ± 0.09 <sup>f</sup>	1.68 ± 0.05 <sup>f</sup>	1.25 ± 0.01 <sup>f</sup>

经单因素方差分析：与对照组比较，<sup>a</sup>P>0.05, <sup>c</sup>P<0.01；与卡格列净组比较，<sup>f</sup>P<0.01表 4 不同处理组 HepG2 细胞白细胞介素 (IL)-1、IL-6、肿瘤坏死因子 (TNF)- $\alpha$  和 IL-10 mRNA 表达的比较n=4,  $\bar{x} \pm s$ 

组别	IL-1	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-10
对照	1.00 ± 0.36	1.00 ± 0.27	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.13
卡格列净	3.44 ± 0.40 <sup>c</sup>	2.99 ± 0.39 <sup>c</sup>	2.81 ± 0.17 <sup>c</sup>	0.36 ± 0.07 <sup>c</sup>
NAC+ 卡格列净	2.67 ± 0.43 <sup>c</sup>	1.99 ± 0.25 <sup>c</sup>	1.82 ± 0.35 <sup>f</sup>	0.82 ± 0.03 <sup>f</sup>

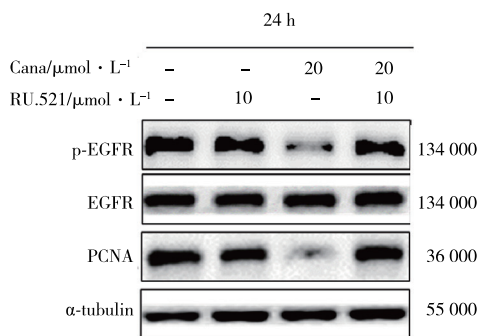
经单因素方差分析：与对照组比较，<sup>c</sup>P<0.01；与卡格列净组比较，<sup>c</sup>P<0.05, <sup>f</sup>P<0.01

图 5 RU.521 减少卡格列净对 HepG2 细胞增殖相关蛋白的表达

表 5 各组 HepG2 细胞增殖活力及相关蛋白表达比较

n=3,  $\bar{x} \pm s$ 

组别	细胞增殖活力	p-EGFR/EGFR	PCNA
对照	1.02 ± 0.05	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.09
RU.521	0.97 ± 0.08 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.09 <sup>a</sup>	0.98 ± 0.01 <sup>a</sup>
卡格列净	0.60 ± 0.03 <sup>c</sup>	0.40 ± 0.15 <sup>c</sup>	0.49 ± 0.02 <sup>c</sup>
RU.521 + 卡格列净	0.75 ± 0.07 <sup>f</sup>	1.09 ± 0.11 <sup>f</sup>	1.06 ± 0.02 <sup>f</sup>

经单因素方差分析：与对照组比较，<sup>a</sup>P>0.05, <sup>c</sup>P<0.01；与卡格列净组比较，<sup>f</sup>P<0.01

## 讨论

作为一种 SGLT-2 抑制剂，卡格列净可减少肾脏对葡萄糖的重吸收，已经被广泛应用于 2 型糖尿病的治疗。近年来，越来越多的研究证实了卡格列净有超出降血糖作用的额外获益，特别是其对恶性肿瘤增殖的抑制能力。例如，已有研究证明卡格列净可以降低胰腺癌细胞活性，抑制肿瘤增殖和集落形成<sup>[12]</sup>；NAKANO 等<sup>[13]</sup> 针对卡格列净对肝癌细胞生长的影响

进行了代谢组学和绝对定量蛋白质组学分析，结果发现卡格列净可以调节代谢重编程来抑制肝癌细胞的增殖。本研究体外培养人肝癌细胞 HepG2、Huh7 和 HCCM 发现，卡格列净可以显著抑制肝癌细胞增殖，与既往研究结果一致。

本研究发现 cGAS-STING 通路在卡格列净诱导的肝癌细胞增殖抑制中发挥关键作用。cGAS-STING 通路与癌症免疫监视和癌症治疗密切相关，是抗肿瘤的重要通路。cGAS 作为一种胞质 DNA 感应器，能够迅速感知线粒体氧化应激引起的 mtDNA 外泄，产生第二信使 cGAMP，激活膜蛋白 STING。激活的 STING 进一步易位到高尔基体，与 TBK1 结合并磷酸化核因子 NF- $\kappa$ B，进而刺激促炎细胞因子的释放，影响机体的炎症水平<sup>[14]</sup>。mtDNA 作为唯一的非核基因组，与氧化磷酸化和线粒体功能高度相关。由于 mtDNA 位于线粒体内膜上，稳定性较差，靠近线粒体 ROS 的产生位点且缺乏修复机制，更容易受到线粒体氧化应激的影响<sup>[15]</sup>。本研究发现，在线粒体 ROS 刺激下，mtDNA 泄漏至胞质中并激活 cGAS-STING 通路，从而诱导细胞炎症因子的产生，介导卡格列净诱导的肝癌细胞增殖抑制。提示 mtDNA 的释放以及 cGAS-STING 通路可作为卡格列净抑制肝癌细胞增殖的重要干预靶点，值得进一步深入研究。

cGAS-STING 通路在肿瘤治疗中起到双向调控的作用，其负向调控可促进免疫抑制并介导肿瘤的形成与转移，如 QIU 等<sup>[16]</sup> 发现线粒体 cGAS 以不依

赖于 STING 的途径抑制铁死亡从而促进肝癌的发生发展;另外,它还可以通过激活免疫细胞产生干扰素来抑制肝癌的发展,正向调控肿瘤免疫杀伤作用。THOMSEN 等<sup>[17]</sup>提出 cGAS-STING 通路的调节可以影响肝癌的进展,并有可能用于肝癌患者的治疗。QI 等<sup>[18]</sup>提出 cGAS-STING 通路成员具有作为肝癌患者的预后生物标志物和免疫治疗靶点的潜力。本研究发现,卡格列净诱导的胞质 mtDNA 外泄显著激活 cGAS-STING 通路,导致 STING、TBK1 和 NF- $\kappa$ B P65 蛋白的磷酸化水平升高,促进下游炎症细胞因子的释放。在加入抗氧化剂 NAC 预处理后,可以显著降低细胞内和线粒体的 ROS 水平、减少线粒体损伤和 mtDNA 释放以及抑制下游 cGAS-STING 通路的激活。以上结果均表明,卡格列净通过激活 cGAS-STING 通路,具有正向调控和抑制肝癌发展的重要潜力。

本研究证实了卡格列净对肝癌细胞的抗肿瘤特性及其炎症反应机制。即在卡格列净处理后,肝癌细胞内和线粒体的 ROS 水平升高,线粒体膜电位下降,同时 mtDNA 外泄至胞质中,激活 cGAS-STING 通路,导致细胞内炎症因子水平释放升高,从而抑制肝癌细胞的增殖。值得注意的是,肝癌作为一种复杂的肿瘤,其发生和发展涉及多种分子机制和信号通路的异常变化,因此单一药物的治疗效果可能有限。目前,研究人员也在探索卡格列净与其他治疗方法如免疫疗法、放疗等联合应用的潜力,以提高肝癌治疗的效果。

#### [参考文献]

- [1] 郑荣寿,陈茹,韩冰峰,等. 2022 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2024, 46 (3): 221-231. ZHENG RS, CHEN R, HAN BF, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. Chin J Oncol, 2024, 46 (3): 221-231.
- [2] RANJBAR G, MIKHAILIDIS DP, SAHEBKAR A. Effects of newer antidiabetic drugs on nonalcoholic fatty liver and steatohepatitis: Think out of the box![J]. Metabolism, 2019, 101: 154001.
- [3] TILG H, MOSCHEN AR, RODEN M. NAFLD and diabetes mellitus[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2017, 14 (1): 32-42.
- [4] CHEN HP, SHIEH JJ, CHANG CC, *et al.* Metformin decreases hepatocellular carcinoma risk in a dose-dependent manner: population-based and *in vitro* studies[J]. Gut, 2013, 62 (4): 606-615.
- [5] LIU TY, SHI CX, GAO R, *et al.* Irisin inhibits hepatic gluconeogenesis and increases glycogen synthesis via the PI3K/Akt pathway in type 2 diabetic mice and hepatocytes[J]. Clin Sci (Lond), 2015, 129 (10): 839-850.
- [6] RIBBACK S, CALVISI DF, CIGLIANO A, *et al.* Molecular and metabolic changes in human liver clear cell foci resemble the alterations occurring in rat hepatocarcinogenesis[J]. Hepatol, 2013, 58 (6): 1147-1156.
- [7] KAWAGUCHI T, NAKANO D, OKAMURA S, *et al.* Spontaneous regression of hepatocellular carcinoma with reduction in angiogenesis-related cytokines after treatment with sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor in a cirrhotic patient with diabetes mellitus[J]. Hepatol Res, 2019, 49 (4): 479-486.
- [8] ZENG Y, JIANG H, ZHANG X, *et al.* Canagliflozin reduces chemoresistance in hepatocellular carcinoma through PKM2-c-Myc complex-mediated glutamine starvation[J]. Free Radic Biol Med, 2023, 208: 571-586.
- [9] HUNG MH, CHEN YL, CHEN LJ, *et al.* Canagliflozin inhibits growth of hepatocellular carcinoma via blocking glucose-influx-induced  $\beta$ -catenin activation[J]. Cell Death Dis, 2019, 10 (6): 420.
- [10] PORPORATO PE, FILIGHEDDU N, PEDRO JMB, *et al.* Mitochondrial metabolism and cancer[J]. Cell Res, 2018, 28 (3): 265-280.
- [11] PLATNICH JM, CHUNG H, LAU A, *et al.* Shiga toxin/lipopolysaccharide activates caspase-4 and gasdermin D to Trigger mitochondrial reactive oxygen species upstream of the NLRP3 inflammasome[J]. Cell Rep, 2018, 25 (6): 1525-1536.
- [12] XU D, ZHOU Y, XIE X, *et al.* Inhibitory effects of canagliflozin on pancreatic cancer are mediated via the downregulation of glucose transporter-1 and lactate dehydrogenase A[J]. Int J Oncol, 2020, 57 (5): 1223-1233.
- [13] NAKANO D, KAWAGUCHI T, IWAMOTO H, *et al.* Effects of canagliflozin on growth and metabolic reprogramming in hepatocellular carcinoma cells: multi-omics analysis of metabolomics and absolute quantification proteomics (iMPAQT)[J]. PLoS One, 2020, 15 (4): e0232283.
- [14] DECOUT A, KATZ JD, VENKATRAMAN S, *et al.* The cGAS-STING pathway as a therapeutic target in inflammatory diseases[J]. Na Rev Immunol, 2021, 21 (9): 548-569.
- [15] SCHEIBYE-KNUDSEN M, FANG EF, CROTEAU DL, *et al.* Protecting the mitochondrial powerhouse[J]. Trends Cell Biol, 2015, 25 (3): 158-170.
- [16] QIU S, ZHONG X, MENG X, *et al.* Mitochondria-localized cGAS suppresses ferroptosis to promote cancer progression[J]. Cell Res, 2023, 33 (4): 299-311.
- [17] THOMSEN MK, NANDAKUMAR R, STADLER D, *et al.* Lack of immunological DNA sensing in hepatocytes facilitates hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2016, 64 (3): 746-759.
- [18] QI Z, YAN F, CHEN D, *et al.* Identification of prognostic biomarkers and correlations with immune infiltrates among cGAS-STING in hepatocellular carcinoma[J]. Biosci Rep, 2020, 40 (10): BSR20202603.