

Pifithrin- μ 抑制 *TSC2* 突变肝癌细胞株增殖

范文怡¹, 陈瑜炜², 郑翠婷¹, 吕佳蕊³, 王亚南^{1*}

中国医学科学院北京协和医学院 基础医学研究所 1. 生理学系; 2. 生物化学与分子生物学系, 北京 100005;
3. 中国医科大学附属第一医院 器官移植暨肝胆外科, 辽宁 沈阳 110001

摘要:目的 探究 Pifithrin- μ (Pifi- μ) 对 *TSC2* 突变的肝癌细胞增殖的影响及潜在作用机制。方法 采用多种 *Tsc2* 突变的小鼠胚胎成纤维细胞 (MEFs) 及肝癌细胞株, 通过 CCK8 法检测 Pifithrin- μ 处理后的细胞增殖能力; 利用慢病毒感染技术构建 *TSC2* 敲低及过表达的稳转肝癌细胞株, Western blot 检测 *TSC2* 及 mTOR 通路下游的蛋白质表达, CCK8 法检测其对 Pifithrin- μ 的敏感性; 建立裸鼠皮下移植瘤模型进行体内药效评估; 采用 RNA 测序进行差异基因及通路富集分析, 并通过 Western blot 及 CCK8 法进行验证。结果 Pifithrin- μ 以剂量依赖性方式, 选择性抑制 *Tsc2* 突变的 MEFs 及肝癌细胞株增殖 ($P < 0.05$); 在肝癌细胞中敲低 *TSC2* 会增强其对 Pifithrin- μ 的敏感性, 而过表达 *TSC2* 则能对 Pifithrin- μ 产生抵抗 ($P < 0.05$); Pifithrin- μ 能够在裸鼠体内抑制 *Tsc2* 突变的移植瘤生长 ($P < 0.05$); Pifithrin- μ 能选择性下调 *Tsc2* 突变细胞中 Smad7 蛋白质表达, 导致 p-Smad2/3 水平升高, 过度激活 TGF- β /Smad 信号通路 ($P < 0.05$); 6 种细胞死亡抑制剂分别与 Pifithrin- μ 联合作用发现活性氧抑制剂及 TGF- β /Smad 通路抑制剂能够逆转 Pifithrin- μ 诱导的 *Tsc2* 突变细胞死亡 ($P < 0.05$)。结论 Pifithrin- μ 能选择性抑制 *TSC2* 突变的肝癌细胞株增殖, 其作用机制与下调 Smad7, 破坏 TGF- β /Smad 信号通路平衡有关。

关键词: *TSC2*; 肝癌; Pifithrin- μ ; TGF- β /Smad 信号通路; 细胞增殖

中图分类号: R735.7 文献标志码: A

DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2026.08.1059

Pifithrin- μ inhibits the proliferation of *TSC2* mutant hepatocellular carcinoma cells

FAN Wenyi¹, CHEN Yuwei², ZHENG Cuiting¹, LYU Jiarui³, WANG Yanan^{1*}

1. Department of Physiology; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Basic Medical Sciences,
Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing 100005; 3. Department of Organ Transplantation
and Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China

Abstract: Objective To investigate the effects of Pifithrin- μ on the proliferation of *TSC2* mutant hepatocellular carcinoma cells. **Methods** The effect of Pifithrin- μ on cell proliferation was evaluated using CCK8 assay in multiple lines of *Tsc2* mutant mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and human hepatocellular carcinoma cells. Lentiviral infection was used to construct hepatocellular carcinoma cells with knockdown or overexpression of *TSC2*. The protein expression of *TSC2* and the downstream effectors of the mTOR pathway were detected by Western blot. Cellular

收稿日期: 2025-11-11 修回日期: 2025-12-30

基金项目: 细胞生态海河实验室创新基金 (22HHXBSS00012)

* 通信作者 (corresponding author): shlwangyanan@gmail.com

sensitivity to Pifithrin- μ was detected by CCK8. The nude mouse subcutaneous transplantation tumor model was established for evaluation of drug efficacy *in vivo*. RNA sequencing was used for differential gene and pathway enrichment analysis, which was verified by Western blot and CCK8. **Results** Pifithrin- μ selectively inhibited the proliferation of *Tsc2* mutated MEFs and hepatocellular carcinoma cells in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Hepatocellular carcinoma cells with *TSC2* knockdown showed increased sensitivity to Pifithrin- μ , whereas those with *TSC2* overexpression were resistant ($P < 0.05$). Pifithrin- μ significantly inhibited the growth of *Tsc2* mutant transplantation tumors in nude mice ($P < 0.05$). Pifithrin- μ downregulated the expression of Smad7 protein in *Tsc2* mutant cells, resulting in elevated levels of p-Smad2/3 and over-activation of the TGF- β /Smad signaling pathway ($P < 0.05$). The combination of each of the six cell death inhibitors with Pifithrin- μ revealed that reactive oxygen species inhibitor and TGF- β /Smad pathway inhibitor were able to reverse Pifithrin- μ -induced cell death in *TSC2* mutant cells ($P < 0.05$). **Conclusions** Pifithrin- μ selectively inhibits the proliferation of *TSC2* mutant hepatocellular carcinoma cells. This effect is associated with the downregulation of Smad7 and the disruption of the TGF- β /Smad signaling pathway balance.

Key words: *TSC2*; hepatocellular carcinoma; Pifithrin- μ ; TGF- β /Smad signaling pathway; cell proliferation

肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球第六大常见癌症,也是癌症死亡的第三大原因,中国肝癌发病及死亡病例数分别约占全球 50%^[1],使其成为中国发病率第四、死亡率第二的恶性肿瘤^[2]。尽管目前临床上应用了多种治疗方法,包括手术切除、消融治疗、血管内介入治疗、放射治疗(放疗)、化学治疗(化疗)、分子靶向药物治疗及免疫检查点抑制剂治疗,但由于肝癌起病隐匿,大多数肝癌患者确诊时已处于中晚期,错过手术治疗机会,且中晚期肝癌对系统性治疗不敏感,导致中国肝癌五年生存率仅为 14.4%^[3]。因此,明确肝癌分子分型及开发新型治疗策略,是对肝癌患者开展精准治疗的关键。

结节性硬化症复合体(tuberous sclerosis complex, TSC)主要由 *TSC1*、*TSC2* 蛋白质构成,其中 *TSC2* 亚基具有 GTP 酶活化蛋白质(GTPase activating protein, GAP)结构域,能够导致脑 Ras 同源蛋白质(Ras homolog enriched in brain, Rheb)失活,从而负调控哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)通路,发挥抗肿瘤功能。*TSC1/2* 在肝癌患者中突变率约 10% ~ 16%^[4-5],其造成的 mTOR 过度激活,通过调节细胞的生长、存活、增殖和自噬,从而促进肿瘤的发生发展。目前用于治疗 mTOR 过度活化的一线靶向药物仍为 mTOR 抑制剂(依维莫司、西罗莫司),但其在肿瘤中的治疗效果有限^[6-7]。因此,针对

TSC2 突变的肝癌,亟需发现更有效的靶向治疗药物。

热休克蛋白 70(heat shock protein 70, HSP70)在多种恶性肿瘤中异常表达。Pifithrin- μ ,也被称为 2-苯基乙炔磺酰胺(2-phenylethylenesulfonamide, PES),是一种 HSP70 抑制剂。已有研究报道,Pifithrin- μ 可以抑制非小细胞肺癌细胞系的增殖及迁移,并诱导细胞凋亡,具有抗肿瘤活性^[8]。但 Pifithrin- μ 对 *TSC2* 突变的肝癌细胞株增殖的影响尚不清楚。因此,本研究旨在探究 Pifithrin- μ 对 *TSC2* 突变的肝癌细胞株增殖的影响及可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系:野生型(WT),*Tsc2* 基因缺失突变(*Tsc2*^{-/-})及 *Tsc1* 基因缺失突变(*Tsc1*^{-/-})的小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)系由实验室先前构建^[9-10];鼠源肝癌细胞系 Hepa1-6(武汉普诺赛生物科技有限公司);人源肝癌细胞系 MHCC97H、HCCLM3(国家实验细胞资源共享平台);人源肝癌细胞系 SNU886(南京科佰生物科技有限公司);人源肝癌细胞系 SNU398(广州赛库生物技术有限公司);人胚胎肾细胞 293FT(武汉爱博泰克生物科技有限公司)。

1.1.2 动物:选取 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠共

18 只,6 周龄,体质量为 20~23 g。动物饲养及实验操作均在中国医学科学院基础医学研究所动物中心进行,已通过动物伦理审查委员会审查并批准(批准号 ACUC-XMSB-2024-118)。

1.1.3 主要试剂:DMEM 高糖培养基、RPMI 1640 培养基及胎牛血清(Gibco 公司);Lipo2000 转染试剂盒(Invitrogen 公司);CCK8 检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司);无内毒素大提试剂盒(天根生化科技有限公司);蛋白酶和磷酸酶抑制剂(Roche 公司); β -actin、p-Smad2/3、Smad2/3 抗体(武汉爱博泰克生物科技有限公司);TSC2、TSC1、p-S6、S6、p-4EBP1、4EBP1 抗体(Cell Signaling Technology 公司);Smad6、Smad7 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司);荧光兔二抗-800 通道(LI-COR 公司);Pifithrin- μ (Med Chem Express 公司);Caspase 抑制剂(Z-VAD)、坏死性凋亡抑制剂(necrostatin-1, Nec-1)、抗氧化剂(N-acetyl-L-cysteine, NAC)、自噬抑制剂(chloroquine, CQ)(Selleck 公司);铁死亡抑制剂(ferrostatin-1, Fer-1)(Sigma 公司);TGF- β /Smad 通路抑制剂(SB-431542)(Med Chem Express 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养:MEFs、293FT、Hepa1-6、MHCC97H、HCCLM3 使用 DMEM 高糖培养基, SNU886 及 SNU398 采用 RPMI 1640 培养基,上述两种培养基均添加 10% 的胎牛血清及 1% 的青霉素、链霉素双抗,于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的恒温恒湿培养箱中培养。

1.2.2 CCK8 法检测细胞增殖及活力:将细胞以 3 000~4 000 个/孔接种于 96 孔板中,等待细胞贴壁后,按所需 Pifithrin- μ 药物浓度加药处理,同时设置对照组,48 h 后加入 CCK8 孵育 1~2 h,随后在 450 nm 波长处检测各孔的吸光度值并分析。

1.2.3 慢病毒包装及稳转细胞株构建:两种有效靶向 TSC2 基因的特异性短发夹 RNA(short hairpin RNA, shRNA)质粒及阴性对照质粒购自泓迅生物公司。将 293FT 细胞预先铺于 10 cm 皿中。第 2 天,先将目的质粒、PMD2G、PSPAX2 质粒以 2:1:2 的比例混合,再与 Lipo2000 混合后静置 20 min。将 293FT 细胞培养基更换为无血清的 DMEM 并加入上述转染混合液作用 6~8 h,随后更换为含血清的 DMEM 继续培养。在转染后 48 h 及 72 h 时间点,收集细胞上清并通过 0.45 $\mu\text{mol/L}$ 的滤膜过滤,于

-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。将细胞铺于 12 孔板中,待细胞贴壁并稳定生长后,按培养基:病毒液 1:2 的比例作用于细胞,同时加入聚凝胺浓缩液,以便细胞充分感染。48 h 后,将细胞扩至 6 cm 皿中,并加入嘌呤霉素(终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$)选择性筛选,连续两代后获得稳定表达目的基因的细胞系。过表达 TSC2 的高浓度病毒液购买自吉凯基因公司,以培养基:病毒液为 600:1 的比例作用于待转染细胞,其余操作同上。

1.2.4 Western blot 检测蛋白质表达水平:利用裂解液(加入蛋白酶和磷酸酶抑制剂)对细胞进行裂解,提取细胞内蛋白质并进行 BCA 定量,统一蛋白质浓度。配置 10% 的 SDS-PAGE 进行蛋白质电泳分离,上样前对样品进行 98 $^{\circ}\text{C}$ 加热处理。电泳结束后,通过电转仪,控制电流 400 mA,湿转 1 h 10 min,将蛋白质转至 NC 膜。配置 5% 脱脂牛奶封闭 1~2 h 后,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵一抗过夜。第 2 天,先 TBST 清洗 3 次,后采用与一抗属性相对应的二抗室温孵育 1~2 h,再 TBST 清洗 3 次,最后显影并获取图像,使用 ImageJ 软件对蛋白质表达进行定量。

1.2.5 裸鼠皮下成瘤:在裸鼠右侧背部接种 2×10^6 个 *Tsc2*^{-/-} 的 MEFs 细胞。待大多数肿瘤体积约 100 mm³ 时,将裸鼠随机分为 2 组,每组 9 只,以腹腔注射方式,10 mg/kg,每 2 d 给药处理 1 次。药物配置比为 10% DMSO+20% PEG+5% 吐温+65% PBS,实验组给与 Pifithrin- μ ,对照组给与等量 DMSO。每 2 d 测量一次肿瘤体积及裸鼠体质量。肿瘤体积计算公式为长 $\times$ 宽² $\times$ 0.5。当大多数肿瘤体积达到 1 000 mm³ 时,用 1% 戊巴比妥钠,腹腔注射麻醉裸鼠并拍照,随后颈椎脱臼处死后取材称重。

1.2.6 苏木精-伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE)和免疫组化染色(immunohistochemistry staining, IHC):将裸鼠皮下肿瘤组织于 4% 多聚甲醛溶液中室温固定 1 h,随后将样本送至武汉塞维尔生物科技有限公司进行切片染色。

1.2.7 转录组测序(RNA sequencing, RNA-seq):将细胞预先铺于 6 cm 皿中,待细胞稳定生长后,加入 6 $\mu\text{mol/L}$ Pifithrin- μ 作用 24 h,同时设置对照组。然后用 Trizol 提取细胞中的总 RNA,并于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存。随后将样本送至北京擎科生物科技股份有限公司进行测序及差异分析。项目采用 DESeq2 软件进行差

异显著性分析,将 Adjusted $P<0.05$ 、表达量倍数之比大于等于 2 ($|\log_2FC| \geq 1$) 作为差异显著性标准。

1.2.8 功能富集分析:求取差异基因交集,随后使用 R 4.4.2 软件的“ClusterProfiler”包对该 6 个基因进行 GO 富集分析,以了解这些基因涉及的生物学过程及潜在信号通路,并选取排名前 10 的通路进行展示。

1.3 统计学分析

采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行数据分析,实验结果以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组数据间比较采用独立样本 t 检验,多组样本间比较采用单因素或双因素方差分析。当 $P<0.05$ 时,表示差异有统计学意义。

2 结果

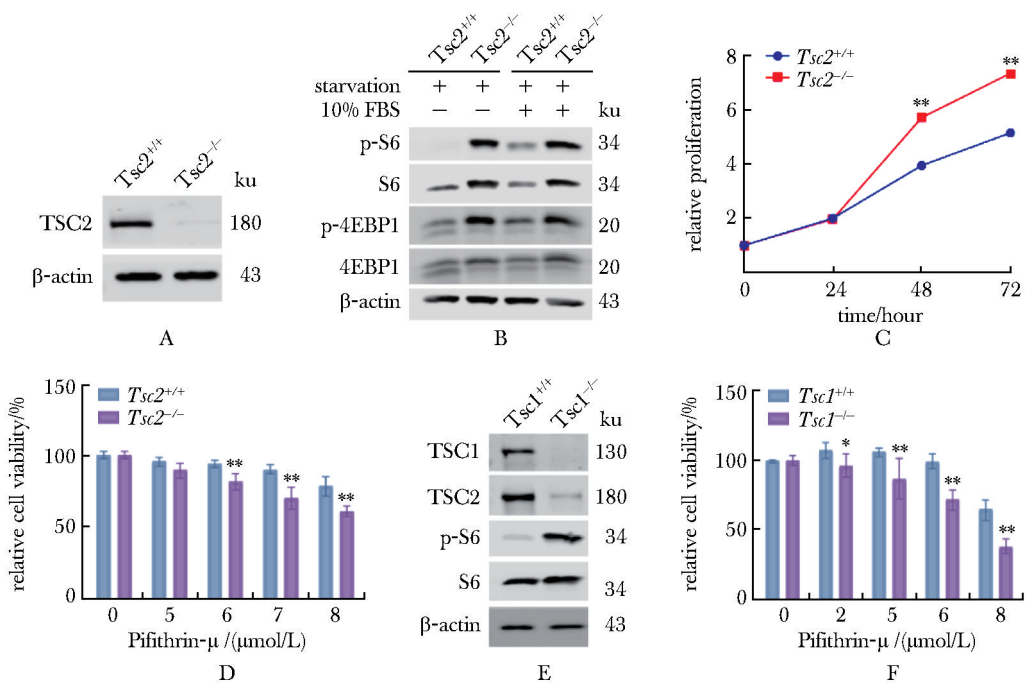
2.1 Pifithrin-μ (Pifi-μ) 选择性抑制 Tsc2 突变的 MEFs 细胞增殖

验证实验室已有的 $Tsc2$ 缺失突变 ($Tsc2^{-/-}$) 的

MEFs 细胞,与对照细胞 ($Tsc2^{+/+}$) 相比, $TSC2$ 蛋白质表达量显著下降 (图 1A), $mTOR$ 通路下游 $p-S6$ 、 $p-4EBP1$ 蛋白质水平升高 (图 1B),说明 $Tsc2^{-/-}$ 成功引起 $mTOR$ 通路激活。饥饿 24 h 后,血清再刺激 10 min 可以使 $p-S6$ 蛋白质水平升高,说明 $mTOR$ 通路功能正常 (图 1B)。在 48 h、72 h 时间点, $mTOR$ 通路激活可以促进细胞增殖 (图 1C)。将 $Pifi-\mu$ 以 0~8 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度作用于 $Tsc2^{-/-}$ 及 $Tsc2^{+/+}$ 细胞,发现 $Pifi-\mu$ 以剂量依赖性方式选择性抑制 $Tsc2^{-/-}$ 细胞增殖 (图 1D)。TSC1 被认为可以稳定 TSC2 并防止其被泛素化降解。通过 $Tsc1$ 缺失突变 ($Tsc1^{-/-}$) 引起 TSC2 蛋白质水平降低的细胞同样对 $Pifi-\mu$ 更敏感 (图 1E、F)。

2.2 TSC2 突变的肝癌细胞对 Pifi-μ 更敏感

在 5 种肝癌细胞系 (Hepa1-6、MHCC97H、HCCLM3、SNU398、SNU886) 中, $Pifi-\mu$ 以剂量依赖性方式显著抑制含有 $TSC2$ 缺失突变的肝癌细胞系增殖 (图 2A、B)。通过两种具有特异性识别位点的



A. the expression of TSC2 protein detected by Western blot; B. the downstream of the mTOR pathway protein expression after starvation re-stimulation detected by Western blot; C. the cell viability at 24 h, 48 h and 72 h detected by CCK8; D. the cell viability of $Tsc2^{+/+}$ and $Tsc2^{-/-}$ with 0~8 $\mu\text{mol/L}$ Pifi-μ for 48 h detected by CCK8; E. the expression of TSC1, TSC2 and downstream proteins of mTOR pathway in $Tsc1^{+/+}$ and $Tsc1^{-/-}$ cells detected by Western blot; F. the cell viability of $Tsc1^{+/+}$ and $Tsc1^{-/-}$ cells after treatment with 0~8 $\mu\text{mol/L}$ Pifi-μ for 48 h detected by CCK8; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group.

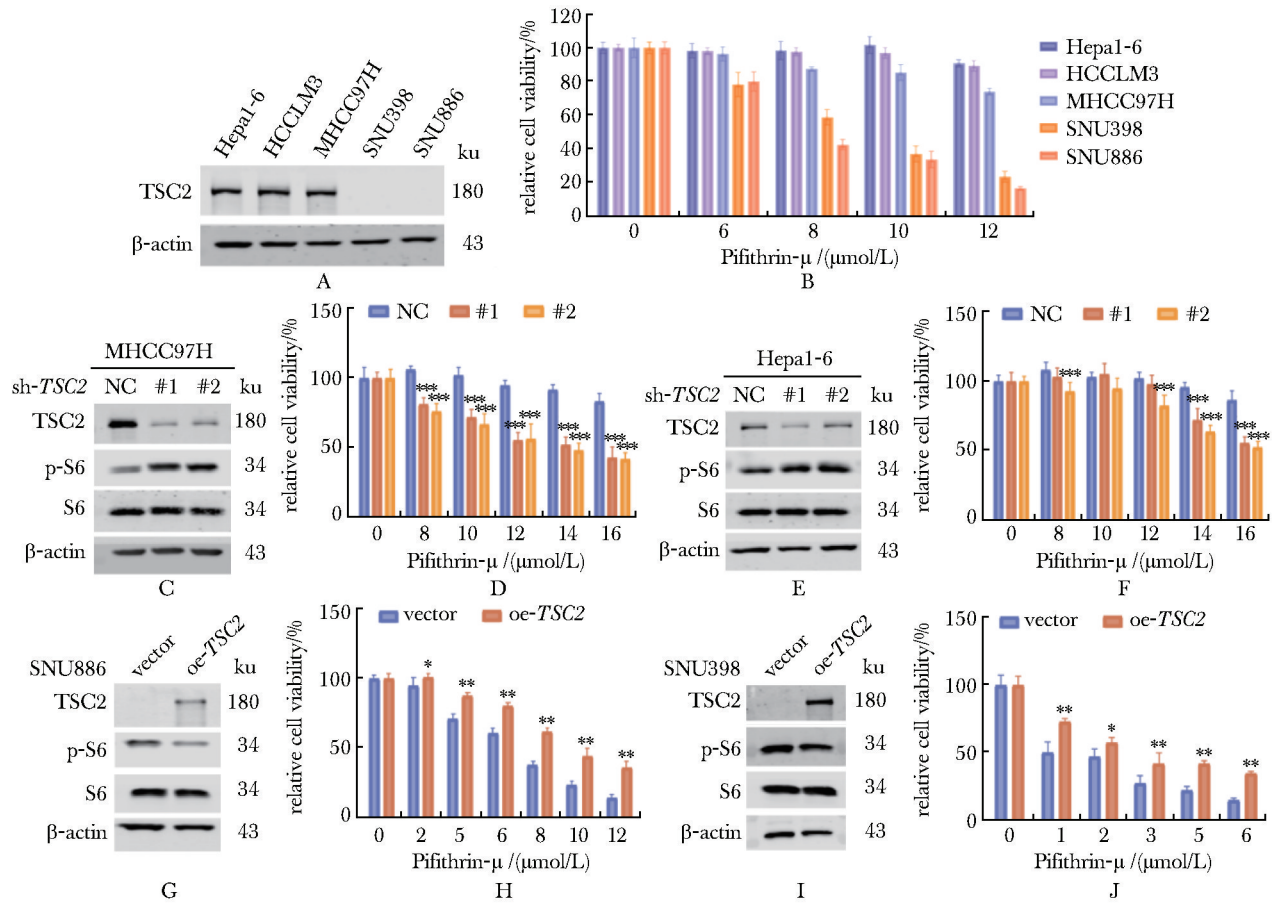
图1 Pifi-μ选择性抑制 Tsc2 突变的 MEFs 细胞增殖

Fig 1 Pifi-μ selectively inhibited the proliferation of $Tsc2$ mutant MEFs ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

shRNA 构建 *TSC2* 敲低的细胞株,在 MHCC97H 和 Hepa1-6 两种细胞株中,与对照组 shNC 相比,*TSC2* 蛋白质水平下降,p-S6 蛋白质水平升高,表明 *TSC2* 敲低细胞株构建成功(图 2C, E)。与对照组 shNC 相比,sh*TSC2* 组的 MHCC97H 和 Hepa1-6 细胞对 Pifi- μ 的敏感性增加(图 2D, F)。在 SNU886 和 SNU398 这两种细胞中,与对照组 vector 相比,过表达 *TSC2* 成功引起 *TSC2* 蛋白质水平升高(图 2G, I),并对 Pifi- μ 引起的细胞死亡产生抵抗(图 2H, J)。

2.3 Pifi- μ 抑制 *Tsc2* 突变的移植瘤生长

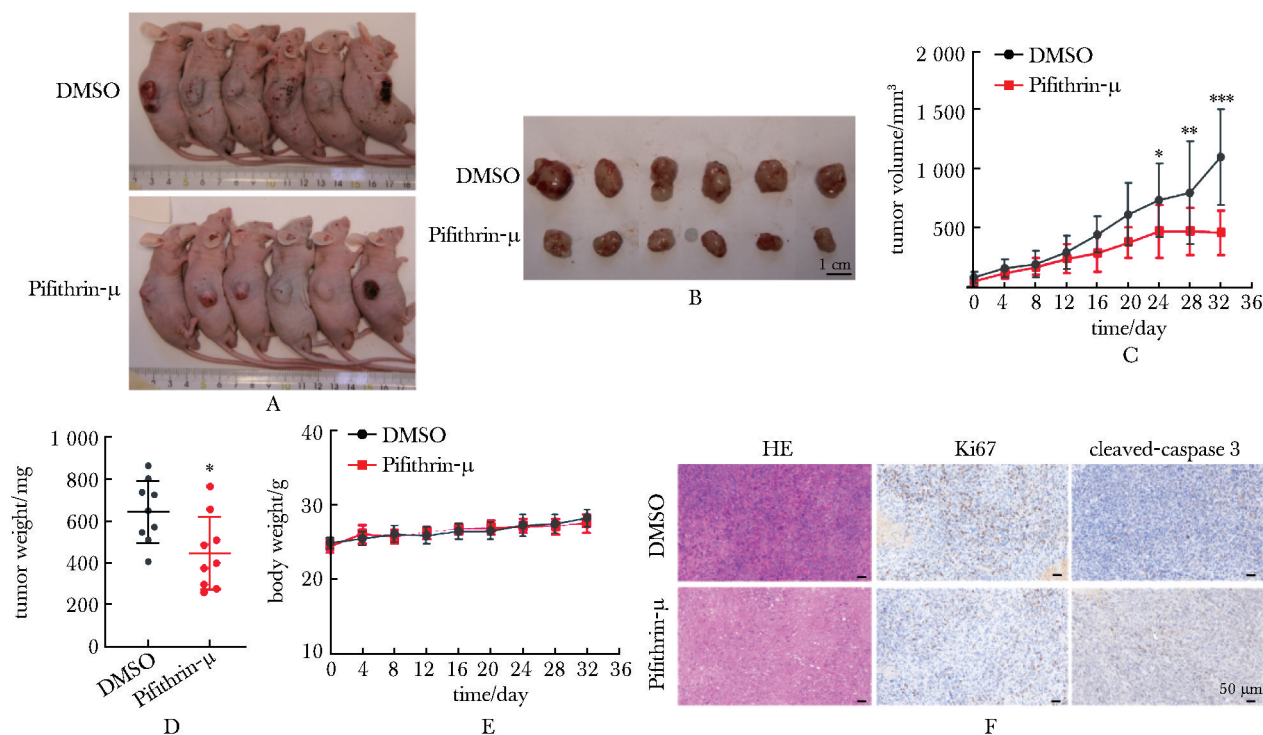
在体内实验中,将有成瘤能力的 *Tsc2*^{-/-} MEFs 细胞接种到裸鼠皮下,成瘤后给药处理,与对照组相比,Pifi- μ 治疗组肿瘤体积较小(图 3A, B, C),质量较轻(图 3D),且不影响裸鼠体质量(图 3E)。对肿瘤组织进行 HE 染色结果表明,与对照组相比,Pifi- μ 治疗可以抑制肿瘤进展,Ki67 染色提示细胞增殖能力下降,cleaved-caspase 3 染色提示细胞凋亡水平升高(图 3F)。此外,本实验室已有研究表明,Pifi- μ 同样可以抑制 *TSC2* 突变的 SNU886 接种的



A. the expression of *TSC2* protein in five types of hepatocellular carcinoma cell lines detected by Western blot; B. the cell viability of five types of hepatocellular carcinoma cell lines after treatment with 0–12 $\mu\text{mol/L}$ of Pifi- μ for 48 h detected by CCK8; C. the changes of *TSC2* protein and mTOR pathway in MHCC97H cells after shNC and sh*TSC2* detected by Western blot; D. the sensitivity of MHCC97H cells to Pifi- μ after shNC and sh*TSC2* detected by CCK8; E, F. the expression of *TSC2* protein and the cell viability of cells after Pifi- μ treatment in Hepa1-6 with shNC and sh*TSC2* detected by Western blot and CCK8; G, H. the expression of *TSC2* protein and the cell viability of cells after Pifi- μ treatment in SNU886 with vector and oe-*TSC2* detected by Western blot and CCK8; I, J. the expression of *TSC2* protein and the cell viability of cells after Pifi- μ treatment in SNU398 with vector and oe-*TSC2* detected by Western blot and CCK8; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group.

图 2 Pifi- μ 选择性抑制 *TSC2* 突变的肝癌细胞增殖

Fig 2 Pifi- μ selectively inhibited proliferation of hepatocellular carcinoma cells with *TSC2* mutation($\bar{x}\pm s$, $n=6$)



A, B. *in vitro* and *in vivo* images of tumors in BALB/c nude mice after subcutaneous tumor formation and treatment for 32 days (control group: $n=9$, Pifi- μ group: $n=9$); C. changes in tumor volume during treatment; D. tumor weight at the end of the treatment; E. changes of body weight in BALB/c nude mice during the treatment; F. the staining images of HE, Ki67, and cleaved-caspase 3 of tumor tissue; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ compared with control group.

图3 Pifi- μ 抑制 *Tsc2* 突变的移植瘤生长

Fig 3 Pifi- μ inhibited the growth of transplanted tumors with *Tsc2* mutation ($\bar{x}\pm s$, $n=9$)

裸鼠异种移植瘤生长^[11]。

2.4 Pifi- μ 通过下调 Smad7 破坏 TGF- β /Smad 通路平衡选择性诱导 *Tsc2* 突变细胞死亡

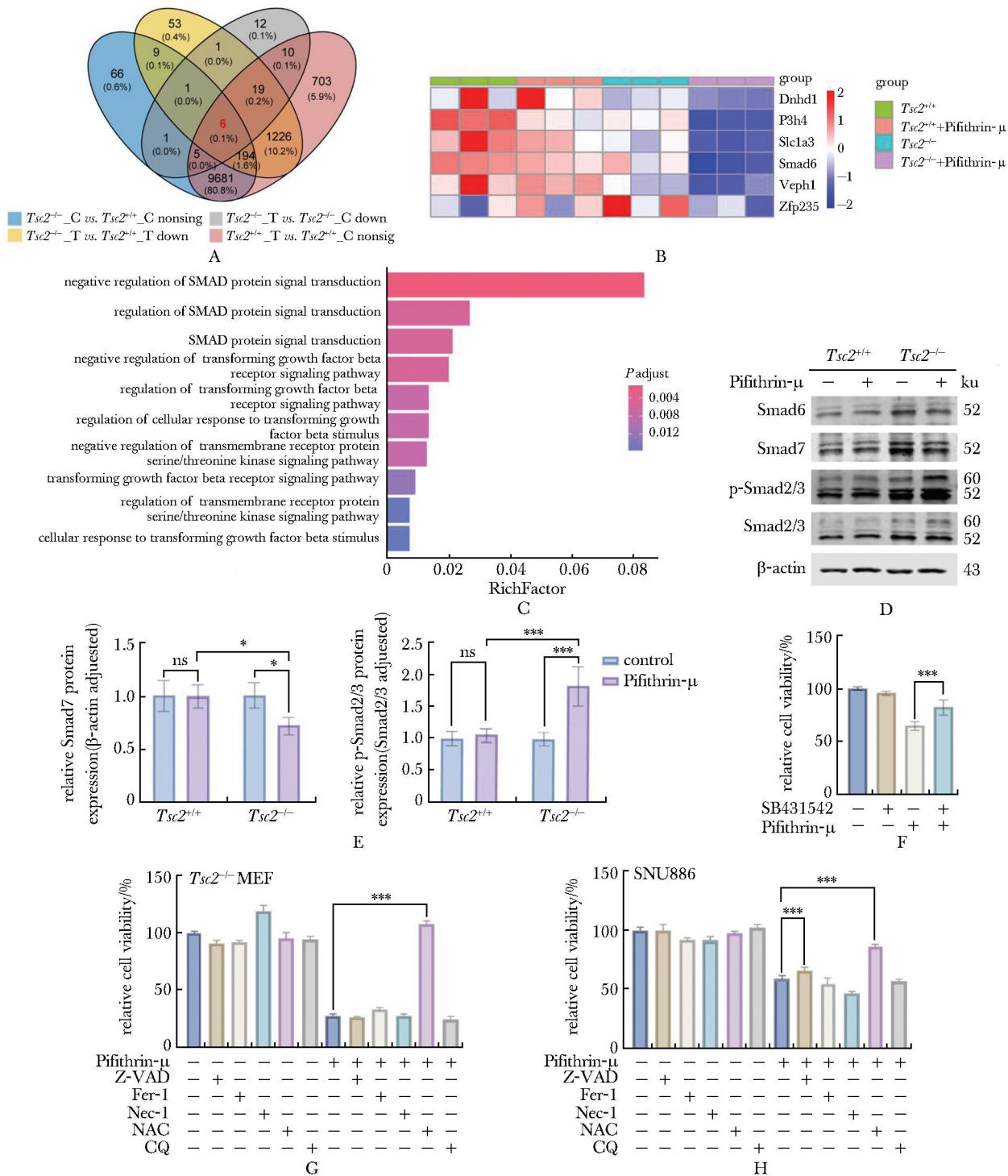
为进一步探讨 Pifi- μ 选择性抑制 *Tsc2*^{-/-} 细胞增殖及诱导死亡的原因,通过 RNA 测序分析 *Tsc2*^{+/+} 和 *Tsc2*^{-/-} 细胞在 Pifi- μ 处理后,与对照组相比,其差异基因表达情况。我们假设某些基因表达水平在 *Tsc2*^{-/-} 及 *Tsc2*^{+/+} 细胞本底中没有明显区别, Pifi- μ 处理可使这些基因表达水平在 *Tsc2*^{-/-} 细胞中下降,而对 *Tsc2*^{+/+} 细胞中该基因表达水平影响不大。结果表明,该假设可以取到基因交集,其中包含 Smad6、Veph1 等 6 个差异表达基因(图 4A, B)。对 6 个差异基因进行功能富集提示 Pifi- μ 处理后 Smad 负调控蛋白及 TGF- β 通路可能出现差异性改变(图 4C)。进一步对 TGF- β /Smad 通路的负调控蛋白 Smad6/7 验证发现,与对照组相比, Pifi- μ 处理后, *Tsc2*^{-/-} 细胞中 Smad7 蛋白质水平下降更为明显,同时 p-Smad2/3 蛋白质水平升高,表明 TGF- β /Smad

通路在 *Tsc2*^{-/-} 细胞中上调(图 4D, E)。将 Pifi- μ 与各种死亡抑制剂联合作用,发现活性氧抑制剂(NAC)及 TGF- β /Smad 通路抑制剂(SB-431542)可以逆转 Pifi- μ 引起的细胞死亡(图 4F, G, H)。

3 讨论

TSC2 是一种抑癌基因,其编码的生长抑制蛋白 tuberlin 为 TSC 的重要成分, *TSC2* 突变导致 mTOR 通路过度激活,进而促进细胞生长并与多种良恶性肿瘤发生有关,如结节性硬化症、淋巴管肌瘤病及乳腺癌、肝癌、肺癌、结直肠癌等。有研究表明, *TSC2* 低表达与肿瘤侵袭性及不良预后有关^[12],然而目前临床应用的 mTOR 抑制剂对引起 mTOR 活化的泛癌疗效差,急需发现新的靶向治疗药物。

已有研究表明, Pifithrin- μ 在非小细胞肺癌及白血病细胞中具有抗肿瘤能力^[8],同时 Pifithrin- μ 也可以作为增敏剂增强 mTOR 活化的肝癌细胞对索拉非尼的敏感性^[11],然而 Pifithrin- μ 对 *TSC2* 突



A. the Venn diagrams for differential gene intersections by RNA-seq (6 μmol/L Pifi-μ for 24 h; C. control; T. treatment); B. heatmap of the expression of 6 genes; C. GO function enrichment analysis of differential 6 genes; D. the protein expression levels of Smad6, Smad7, p-Smad2/3 and Smad2/3 in *Tsc2*^{+/+} and *Tsc2*^{-/-} cells after treatment with 6 μmol/L Pifi-μ for 48 h detected by Western blot; E. quantitative statistics of Smad7 and p-Smad2/3 protein expression; F. the cell viability of Pifi-μ (6 μmol/L) in association with SB 431542 (5 μmol/L) in *Tsc2*^{-/-} cells for 48 h detected by CCK8; G, H. the cell viability of Pifi-μ (8 μmol/L) in association with Z-VAD (20 μmol/L), Fer-1 (20 μmol/L), Nec-1 (20 μmol/L), NAC (1 mmol/L), CQ (5 μmol/L) in *Tsc2*^{-/-} cells and SNU886 for 48 h detected by CCK8; **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 compared with control group.

图 4 Pifi-μ 通过下调 Smad7 选择性诱导 *Tsc2* 突变细胞死亡

Fig 4 Pifi-μ selectively induced *Tsc2* mutant cell death by down-regulation of Smad7 ($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

变的肝癌细胞增殖的影响及其机制有待进一步研究。本研究结果显示,Pifithrin- μ 可以选择性抑制 *Tsc2* 突变的 MEFs 细胞增殖且 *TSC2* 突变的肝癌细胞对 Pifithrin- μ 更敏感。为进一步研究 Pifithrin- μ 对 *TSC2* 突变的肝癌细胞增殖的影响,本研究在肝癌细胞中敲低 *TSC2* 后,其对 Pifithrin- μ 的敏感性增强,在肝癌细胞中过表达 *TSC2* 可以对 Pifithrin- μ 产生抵抗,提示 Pifithrin- μ 对 *TSC2* 突变的肝癌细胞增殖具有选择性抑制作用。此外,在动物体内同样发现 Pifithrin- μ 可以抑制 *Tsc2* 突变的移植瘤生长,为本研究补充了体内实验证据。另外,本实验室已有文章报道,Pifithrin- μ 在 SNU886 接种的异种移植瘤模型及肝脏 *Tsc2*^{-/-} 导致原位自发肝癌小鼠中均具有一定的肿瘤抑制作用^[11]。

已有研究表明,在小鼠肝脏中仅 *Tsc2* 突变就可以导致原位自发肝癌^[11]。本研究采用 *Tsc2* 突变及对照的 MEFs 细胞进行实验,因其基因突变背景干净,不受复杂基因突变的干扰。本研究预先进行了 4 种不同假设[1)用药引发选择性下调:*Tsc2* 突变细胞与对照在基础状态下基因表达相似,Pifi- μ 处理后,某些基因表达在突变细胞中特异性下降;2)用药引发选择性上调:两者基础表达无差异,用药外理后,某些基因在突变细胞中特异性上升;3)纠正原本的高表达:*Tsc2* 突变细胞本身某些基因表达高于对照,用药处理后使这些基因选择性下降;4)逆转原本的低表达:*Tsc2* 突变细胞本身某些基因表达低于对照,用药处理后使这些基因表达选择性上升],通过转录组测序并求取差异基

因交集,发现只有结果展示的这种假设方案可以取到功能明确的基因交集,并提示与 TGF- β /Smad 通路差异性改变有关。已有研究表明 *TSC2* 突变导致 mTOR 过度激活,引发线粒体氧化应激及 ROS 产生增多^[13],ROS 作为第二信使可以激活 TGF- β 信号通路^[14]。Smad 通路作为 TGF- β 下游的经典信号转导通路,TGF- β 1 的活性同源二聚体 TGFR1、TGFR2 结合后,磷酸化 Smad2/3,随后与 Smad4 结合并易位到细胞核并调控基因表达,Smad7 则可以抑制 Smad2/3 的磷酸化过程,负反馈调节并控制 TGF- β /Smad 通路活性。TGF- β /Smad 信号通路在肿瘤发生中具有双重作用,早期阶段其激活被认为可以诱导凋亡、抑制细胞增殖并发挥抗肿瘤功能^[15]。本研究进一步验证发现在 *Tsc2* 突变细胞中 Smad7 表达水平较高,Pifithrin- μ 可以选择性使 *Tsc2* 突变细胞的 Smad7 表达下调,并导致 TGF- β /Smad 信号通路过度激活,破坏其通路平衡,进而抑制细胞增殖。此外,本研究将 Pifithrin- μ 与死亡抑制剂联用发现,活性氧抑制剂及 TGF- β /Smad 通路抑制剂可以逆转 Pifithrin- μ 引起的 *Tsc2* 突变细胞死亡,从而验证了本研究的假设。

综上所述,本研究揭示了 Pifithrin- μ 可以选择性抑制 *TSC2* 突变的肝癌细胞株增殖,并指出 Pifithrin- μ 通过选择性下调 Smad7,从而破坏 TGF- β /Smad 通路平衡,在 *Tsc2* 突变的细胞增殖中发挥关键作用。该研究为针对 *TSC2* 突变的肝癌患者提供了新的潜在治疗策略和理论依据。

参考文献:

- [1] Singal AG, Kanwal F, Llovet JM. Global trends in hepatocellular carcinoma epidemiology: implications for screening, prevention and therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2023, 20: 864-884.
- [2] Han B, Zheng R, Zeng H, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4: 47-53.
- [3] Zeng H, Zheng R, Sun K, et al. Cancer survival statistics in China 2019—2021: a multicenter, population-based study[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4: 203-213.
- [4] Chen L, Zhang C, Xue R, et al. Deep whole-genome analysis of 494 hepatocellular carcinomas [J]. Nature, 2024, 627: 586-593.
- [5] Ho DWH, Chan LK, Chiu YT, et al. TSC1/2 mutations define a molecular subset of HCC with aggressive behaviour and treatment implication[J]. Gut, 2017, 66: 1496-1506.
- [6] 李杰, 浦洋, 张梦迪, 等. mTOR 活化上调 MGST1 并增强细胞抗氧化能力 [J]. 基础医学与临床, 2022, 42: 553-559.

[7] Wood KC, Gutkind JS. Challenges and emerging opportunities for targeting mTOR in cancer [J]. Cancer Res, 2022, 82: 3884-3887.

[8] Zhou Y, Ma J, Zhang J, *et al.* Pifithrin-μ is efficacious against non-small cell lung cancer via inhibition of heat shock protein 70 [J]. Oncol Rep, 2017, 37: 313-322.

[9] Wu Y, Yang S, Han L, *et al.* β-catenin-IRP2-primed iron availability to mitochondrial metabolism is druggable for active β-catenin-mediated cancer [J]. J Transl Med, 2023, 21: 50. doi: 10.1186/s12967-023-03914-0.

[10] Li C, Chen H, Lan Z, *et al.* mTOR-dependent upregulation of xCT blocks melanin synthesis and promotes tumorigenesis [J]. Cell Death Differ, 2019, 26: 2015-2028.

[11] Lv J, Wang Y, Lv J, *et al.* Pifithrin-μ sensitizes mTOR-activated liver cancer to sorafenib treatment [J]. Cell Death Dis, 2025, 16: 42. doi: 10.1038/s41419-025-07332-6.

[12] Zhu QY, He ZM, Cao WM, *et al.* The role of TSC2 in breast cancer: a literature review [J]. Front Oncol, 2023, 13: 1188371. doi: 10.3389/fonc.2023.1188371.

[13] Glorieux C, Enríquez C, Buc Calderon P. The complex interplay between redox dysregulation and mTOR signaling pathway in cancer: A rationale for cancer treatment [J]. Biochem Pharmacol, 2025, 232: 116729. doi: 10.1016/j.bcp.2024.116729.

[14] Chung J, Huda MN, Shin Y, *et al.* Correlation between oxidative stress and transforming growth factor-beta in cancers [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22: 13181. doi: 10.3390/ijms222413181.

[15] Massagué J, Sheppard D. TGF-β signaling in health and disease [J]. Cell, 2023, 186: 4007-4037.

本刊稿件格式要求 (2)

- 2.1 摘要:一般以第三人称撰写,采用“结构式摘要”,包括目的 (Objective)、方法 (Methods)、结果 (Results) 和结论 (Conclusion) 4 部分。摘要应具有独立性和自明性,宜 300~400 字。英文缩写在摘要中首次出现时用“中文全称 (英文缩写)”格式。关键词 5 个以内。在关键词下行标注中图分类号 (按中国图书馆分类法第四版查阅)。中、英文摘要及关键词应一致。
- 2.2 引言:应引用近期参考文献,概述该领域的国内外研究现状及存在的主要问题,明确提出本研究的立题依据、目的及意义,一般 400 字以内。英文缩写在正文中首次出现时用“中文全称 (英文全称,英文缩写)”格式。
- 2.3 方法:新方法或有特殊程序者应写明白。常用方法或可引用参考文献者不必详述,写明“见参考文献 [文献序号]”即可。
- 2.4 结果:只列实验结果,不重复方法,不对结果进行分析、评述。图、表均须有中、英文题目,题目应具有自明性,图表的标目需写完整,图表内的内容及注释只用英文 (注:短篇综述和医学教育栏目的图表内容及注释只用中文)。表格使用“三线表”;计量资料以均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,注明例数 (*n*);图的目标值线分别在横坐标的上侧及纵坐标的右侧;镜下图片应清晰易辨,标明放大倍数。
- 2.5 讨论:应紧扣实验结果进行讨论,不重复具体方法和结果,一般在 800 字以内。