

Anticancer Activity of Osthol Molecule is Mediated via Apoptosis and Autophagy Induction, G0/G1 Cell Cycle Arrest, and Downregulation of PI3K/AKT Signalling Pathway and MicroRNA 373

Lingyu SUO¹, Hong HONG², Yongqiang MA¹, Xiaolong LI¹, & Weijie HAN^{1*}

¹ Digestive Minimally Invasive Center, The Second Affiliated Hospital of BaoTou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, BaoTou, 014030 China.

² Nursing Department, The Second Affiliated Hospital of BaoTou Medical College, Inner Mongolia University of Science and Technology, BaoTou, 014030 China.

SUMMARY. Liver cancer is one of the leading causes of cancer-related deaths and its incidence is increasing regularly. The currently used anticancer drugs used against liver cancer are not satisfactory and are loaded with serious side-effects. Therefore, the aim of the current study was to investigate the anticancer effects of a naturally occurring coumarin compound- osthol along with evaluating its effects on cellular apoptosis, autophagy, cell cycle and PI3K/AKT signalling pathway. WTS-1 assay was used to evaluate cell viability of Hep G2 human liver cancer cells. Apoptosis was evaluated by fluorescence microscopy using DAPI and annexin-v assay involving flow cytometry. Autophagy was evaluated by transmission electron microscopy and western blot method. Flow cytometry was used to assess effects on cell cycle while as effects on PI3K/AKT and microRNA-373 related protein expressions were examined by western blot method. Results indicated that osthol molecule led to significant and dose-dependent growth inhibitory effects on Hep G2 human liver cancer cells. Clonogenic assay showed significant decrease in Hep G2 cell colonies. DAPI and annexin v assays revealed that osthol induced significant apoptotic effects in these cells and showed dose-dependence. Electron microscopy revealed that osthol induced autophagy in Hep G2 cells by inducing autophagosomes and autophagic vacuoles. Osthol also triggered G0/G1 phase cell cycle arrest in a dose-dependent manner. Osthol also targeted PI3K/AKT signalling pathway by altering the expression of some key proteins along with up-regulating microRNA-373 expressions. In conclusion, the results indicate that osthol showed strong anticancer effects in Hep G2 human liver cancer cells by triggering apoptosis and autophagy, inducing G0/G1 cell cycle arrest, and targeting PI3K/AKT and microRNA-373 signalling pathway.

RESUMEN. El cáncer de hígado es una de las principales causas de muerte relacionada con el cáncer y su incidencia aumenta periódicamente. Los fármacos anticancerígenos que se utilizan actualmente contra el cáncer de hígado no son satisfactorios y están cargados de graves efectos secundarios. Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue investigar los efectos anticancerígenos de un compuesto de cumarina natural: el osthol, además de evaluar sus efectos sobre la apoptosis celular, la autofagia, el ciclo celular y la vía de señalización PI3K/AKT. Se utilizó el ensayo WTS-1 para evaluar la viabilidad celular de células de cáncer de hígado humano Hep G2. La apoptosis se evaluó mediante microscopía de fluorescencia utilizando DAPI y ensayo de anexina-v con citometría de flujo. La autofagia se evaluó mediante microscopía electrónica de transmisión y método de transferencia Western. Se utilizó citometría de flujo para evaluar los efectos sobre el ciclo celular, mientras que los efectos sobre las expresiones de proteínas relacionadas con PI3K/AKT y microARN-373 se examinaron mediante el método de transferencia Western. Los resultados indicaron que la molécula de osthol produjo efectos inhibidores del crecimiento significativos y dependientes de la dosis en las células de cáncer de hígado humano Hep G2. El ensayo clonogénico mostró una disminución significativa en las colonias de células Hep G2. Los ensayos de DAPI y anexina v revelaron que osthol indujo efectos apoptóticos significativos en estas células y mostró dependencia de la dosis. La microscopía electrónica reveló que osthol inducía la autofagia en las células Hep G2 mediante la inducción de autofagosomas y vacuolas autofágicas. Osthol también desencadenó la detención del ciclo celular en la fase G0/G1 de manera dependiente de la dosis. Osthol también apuntó a la vía de señalización PI3K/AKT alterando la expresión de algunas proteínas clave junto con la regulación positiva de las expresiones de microARN-373. En conclusión, los resultados indican que osthol mostró fuertes efectos anticancerígenos en células de cáncer de hígado humano Hep G2 al desencadenar la apoptosis y la autofagia, inducir la detención del ciclo celular G0/G1 y apuntar a la vía de señalización de PI3K/AKT y microARN-373.

KEY WORDS: apoptosis, autophagy, flow cytometry, liver cancer, osthol.

* Author to whom correspondence should be addressed. E-mail: hanweijie666@sina.com