

基于PI3K/Akt信号通路探讨华良姜素抗肝癌细胞 HepG2凋亡的作用机制

姚红, 侯宇芯, 任晋宏, 王禹璇, 薛慧清*, 李青山

(山西中医药大学, 基于炎症反应的重大疾病创新药物山西省重点实验室, 太原 030619)

[摘要] 目的:观察华良姜素的体外抗肝癌细胞HepG2凋亡的作用机制。方法:噻唑蓝(MTT)比色法检测华良姜素(0、5、10、25、50、100、150、300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对HepG2细胞不同时间(24、48、72 h)的增殖抑制作用;异硫氰酸荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI)凋亡试剂盒检测华良姜素(0、3、15、75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对HepG2细胞的凋亡作用;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测华良姜素对HepG2细胞中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)表达的影响;转录组学分析华良姜素(15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对HepG2细胞处理后基因差异表达与信号通路改变情况;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)验证差异基因[TEK、血小板源性生长因子 α 受体(PDGFR α)、脾酪氨酸激酶(SYK)、磷酸肌醇-3-激酶催化亚基G β 亚基(PIK3CG)、Janus激酶3(JAK3)、膜相关鸟苷酸激酶转化蛋白2(MAGI2)]mRNA相对表达。结果:与空白组比较,华良姜素组HepG2细胞的增殖降低($P<0.05$, $P<0.01$);凋亡率升高($P<0.01$);Bax蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$),Bcl-2的蛋白表达水平降低($P<0.01$);转录测序得到59 000个受调控的表达基因,受调控显著差异表达基因125个,其中表达上调差异基因47个,表达下调差异基因74个,京都基因和基因组数据库(KEGG)分析显示,加华良姜素后磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路中与凋亡相关的差异基因变化较大。与空白组比较,华良姜素组(15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)TEK、PDGFR α 、SYK、PIK3CG、JAK3、MAGI2的mRNA表达水平降低($P<0.01$)。结论:采用体外细胞学实验研究华良姜素能抑制HepG2细胞增殖,初步验证其凋亡,可能是影响了PI3K/Akt信号通路中部分差异基因的表达。为后续华良姜素抗肿瘤提供实验基础,同时有助于促进黄酮类化合物的开发利用及潜在的应用价值。

[关键词] 华良姜素; HepG2; 凋亡; 转录组学; 磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路

[中图分类号] R933/937;R289;R22;R2-031;R282 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0080-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220799

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20220225.1840.004.html>

[网络出版日期] 2022-03-01 9:02

Anti-hepatocarcinoma HepG2 Cell Mechanism of Jaranol: Based on PI3K/Akt Signaling Pathway

YAO Hong, HOU Yu-xin, REN Jin-hong, WANG Yu-xuan, XUE Hui-qing*, LI Qing-shan

(Shanxi Key Laboratory of Innovative Drugs for the Treatment of Serious Diseases Basing on the Chronic Inflammation, Shanxi University of Chinese Medicine, Taiyuan 030619, China)

[Abstract] **Objective:** To study the *in vitro* anti-hepatocarcinoma HepG2 cell mechanism of Jaranol. **Method:** The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was employed to examine the inhibition of Jaranol (0, 5, 10, 25, 50, 100, 150, 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on HepG2 cell proliferation at different time (24, 48, 72 h), annexin V-fluorescein isothiocyanate/propidium iodide (Annexin V-FITC/PI) kit to detect the effect of Jaranol (0, 3, 15, 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on HepG2 cell apoptosis, and Western blot to determine the influence of Jaranol on the

[收稿日期] 2021-04-14

[基金项目] 国家国际合作专项项目(2013DFA30700);山西省应用基础研究项目(201801D221437);山西省“百人计划”第六批引进人才项目(晋组函字[2013]号)

[第一作者] 姚红, 硕士, 从事中药/天然药物化学研究, E-mail: 947956124@qq.com

[通信作者] *薛慧清, 博士, 教授, 从事中药提取分离结构鉴定与活性筛选研究, E-mail: xuehuiqing@sina.com

expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) and Bcl-2-associated X protein (Bax) in HepG2 cells. Transcriptome sequencing was performed to analyze the differential expression of genes and changes of related signaling pathways after the treatment of HepG2 cells with Jaranol ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Real-time PCR was carried out to verify the relative mRNA content of differential genes [TEK, platelet-derived growth factor receptor α (PDGFRA), spleen tyrosine kinase (SYK), phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma (PIK3CG), Janus kinase 3 (JAK3), membrane-associated guanylate kinase inverted 2 (MAGI2)]. **Result:** Compared with the blank group, Jaranol decreased HepG2 proliferation ($P<0.05$, $P<0.01$), increased apoptosis rate of HepG2 cells ($P<0.05$, $P<0.01$), raised Bax expression ($P<0.05$, $P<0.01$), and reduced Bcl-2 expression ($P<0.05$, $P<0.01$). Transcriptome sequencing yielded 59 000 regulated genes, 125 of which showed significantly different expression, with 47 up-regulated and 74 down-regulated. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) analysis showed that the differential genes related to apoptosis in the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway changed significantly after drug addition. The mRNA expression of TEK, PDGFRA, SYK, PIK3CG, JAK3, and MAGI2 decreased in Jaranol ($15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group compared with that in the control group ($P<0.05$). **Conclusion:** *In vitro* cytological experiment verified that Jaranol inhibited the proliferation of HepG2 cells and promoted the apoptosis, possibly by influencing the expression of some differential genes in the PI3K/Akt signaling pathway. The result lays an experimental basis for the follow-up study of the anti-tumor effect of Jaranol, and the further development and utilization of flavonoids.

[Keywords] Jaranol; HepG2; apoptosis; transcriptome; phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway

黄酮类化合物是天然存在的多酚代谢产物,已显示出广泛的药理特性,如抑制癌细胞的生长,并被认为是前瞻性的抗癌药物^[1]。黄酮类化合物安全且容易获得,使其成为临床上化学预防癌症或相关药物的理想候选药物^[2]。理想的抗癌药对正常组织产生最小的不良影响,具有最大的杀死肿瘤细胞和(或)抑制肿瘤生长的能力^[3]。研究报道长期使用毒性较小,黄酮类化合物和固有的生物学活性使其成为新疗法的理想候选药物^[4]。黄酮类化合物是从黄芪中提取出来的具有多重药理作用的功能性植物雌激素异黄酮,抗肿瘤作用是毛蕊异黄酮(CA)的主要药理特性之一,能够诱导肿瘤细胞的凋亡、抑制肿瘤细胞增殖、阻止肿瘤细胞的侵袭及转移,还可通过调节自噬、增强化疗敏感性等方面发挥作用。随实验研究技术及网络药理学、分子对接、数据挖掘、生物信息学等技术的不断更新和完善,CA的抗肿瘤药理作用和机制得到了进一步得到探索和论证,以期临床CA的应用作出贡献^[5]。

华良姜素又称熊竹素,是一种黄酮类化合物,许多中药中都含有该化合物,如丁香、黄芪及红豆蔻等。该化合物具有抗炎、抗氧化、抑制血管新生及抗肿瘤等药理活性。既往研究发现从鼠尾草中提取分离出的华良姜素对血管的异常新生具有较

强的抑制作用,可用于治疗血管新生引发的癌症及相关疾病^[6]。CHOI等^[7]研究报道,从丁香中分离出的华良姜素对癌细胞凋亡与肿瘤相关巨噬细胞交替活化的影响。华良姜素对抗肝癌的研究未曾有报道过。本实验研究华良姜素对抗肝癌细胞HepG2作用机制,为后续华良姜素对抗肿瘤研究奠定基础。

1 材料

1.1 细胞株 人源肝癌细胞HepG2来源于中国科学院上海有机化学研究所细胞库(编号BFN608006383),保存在山西中医药大学实验管理中心细胞室,传至25代。

1.2 试剂 华良姜素(上海源叶有限公司,批号B30148,纯度 $\geq 98\%$),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)兔一抗(英国Abcam公司,批号分别为ab141523、ab32503),裂解液、蛋白酶抑制剂、ECL超敏发光液(天津博士德生物科技有限公司,批号分别为AR0105、AR1192、AR1174),扩增试剂盒与逆转录试剂盒(日本Takara公司,批号分别为RR820A、RR047A), β -肌动蛋白(β -actin)、噻唑蓝(MTT)、兔二抗、膜联蛋白V-异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)/碘化丙啶(PI)双染试剂盒(索莱宝生物科技有限公司,批号分别为K200058M、

M8180、SPA263、CA1020),胎牛血清(美国Gibco公司,批号为10099133),TRIzol试剂(日本Takara公司,批号9108),异丙醇[生工生物工程(上海)有限公司,批号A507048]。

1.3 仪器 CCL-170B-8型二氧化碳恒温培养箱(新加坡ESCO公司),CHB202型恒温金属浴(杭州博日科技有限公司),XS-700型高压灭菌锅(上海莱睿科学仪器有限公司),SpectraMax® iD5型化学发光荧光酶标仪(美国Molecular devices公司),ML304T型万分之一天平(瑞士Mettler Toledo公司),TGL-16.5M型高速冷冻离心机(上海Genespeed公司),ND-ONE-W型Nano Drop酶标仪、iBright CL750型化学发光凝胶成像仪(美国ThermoFisher公司),7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Applied Biosystem公司),C100型96孔梯度PCR仪、1658033型垂直转印系统、170-3940型半干转膜仪(美国Bio-Rad公司),FACSCalibur型流式细胞仪(美国BD公司)。

2 方法

2.1 检测华良姜素对HepG2细胞的影响

2.1.1 MTT比色法筛选浓度 将HepG2接种到96孔板中,每孔细胞密度为 0.8×10^4 个。细胞贴壁后,加入不同浓度的华良姜素(0、5、10、25、50、100、150、300 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),培养48 h,加入MTT溶液孵育4 h后弃掉培养基,加入二甲基亚砜(DMSO),混匀,用酶标仪检测吸光度A,每组重复3次。

2.1.2 MTT比色法筛选作用时间 按照2.1.1项方法进行细胞铺板,贴壁后加入浓度为0、3、15、75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的华良姜素,培养时间分别为给药24、48、72 h。加入MTT溶液孵育4 h后弃掉培养基,加入DMSO,用酶标仪检测A。实验周期为4 d,每组实验重复3次。

2.2 流式细胞术检测细胞凋亡 取传代HepG2细胞铺于6孔板中,密度为每孔 2.5×10^5 个,细胞贴壁后加入不同浓度的华良姜素(0、3、15、75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。共同孵育48 h,收集原培养液。磷酸盐缓冲液(PBS)1 mL洗涤2次,不含EDTA的胰酶消化,4 $^{\circ}\text{C}$ 1 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心4 min(离心半径8.4 cm),取出4只流式管,离心过程中取出12只流式管,标记空白组(0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、华良姜素组(3、15、75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)。过滤,离心取沉淀(离心条件同上)。每管加入Annexin V-FITC/PI染料20 μL 与Annexin V binding buffer溶液200 μL 。混匀,室温避光染色30 min,上机检测。

2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Bcl-2、Bax蛋白表达 取传代HepG2细胞铺于6孔板中,密度为每孔 2.5×10^5 个,细胞贴壁后加入不同浓度的华良姜素(0、3、15、75 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),共同孵育48 h。去除培养基。加入预冷的PBS 1 mL清洗2次。加入冷裂解液100 μL ,冰上放置5 min,用细胞刮刮下。悬液冰上涡旋30 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心15 min(离心半径8.4 cm),取上清液,用BCA法对蛋白浓度进行测定。加入 $5 \times$ loading buffer,95 $^{\circ}\text{C}$ 蛋白变性后SDS-PAGE电泳,15 V电转25 min,脱脂牛奶封闭1 h,一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 中过夜,TBST洗膜3次,二抗(1:5 000)孵育1 h后洗膜显影,以 β -actin为内参计算各蛋白的表达。

2.4 RNA测序与分析 取传代HepG2细胞铺于10 cm培养皿中,贴壁后加华良姜素培养48 h,弃PBS,在培养皿中TRIzol试剂提取总RNA,液氮速冻,放置干冰中,送往上海中科生命生物科技有限公司进行检测。RNA浓度质检合格后,用Illumina高通量测序得到的原始数据,使用HISAT2软件将Clean Reads与指定的基因组进行序列比对,获取其在参考基因组上的位置信息,对样本间主成分分析进行评估。采用DESeq2进行基因的差异表达分析^[8]。通过京都基因与基因组百科全书(KEGG)数据库(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)对差异基因进行分析。引物由生工生物(上海)股份有限公司设计合成。见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
TEK	上游 CGTGATTGACACTGGACATAAC	190
	下游 GAGTTCATATTCTGTCCGAGGT	190
Janus 激酶 3 (JAK3)	上游 TCTTCACCTACTGCGACAAAAG	167
	下游 CTTTCATGAGCTCGTGAACCTC	167
血小板源性生长因子 α 受体(PDGFR α)	上游 GTAGGGAGTGAGGATTCTTTGG	160
	下游 GAATCTCGTAAATGACCGTCCT	160
SYK	上游 GAAGGCACACCACTACACCATCG	143
	下游 AGGGCTTCTTGAGGAGGCAGAC	143
磷酸肌醇-3-激酶催化亚基G肽(PIK3CG)	上游 CACCCAAAAGCATATCCTAAGC	225
	下游 GTAATGCAGAACATCATCGTCC	225
膜相关鸟苷酸激酶转化蛋白2(MAGI2)	上游 CTTTCAGCAAATCATTCTGTGACA	151
	下游 TTTCTAGGAGAGCACCACCTTTT	151
GAPDH	上游 AGAAGGCTGGGGCTCATTG	258
	下游 AGGGGCCATCCACAGTCTTC	258

2.5 Real-time PCR 验证 mRNA 表达 将 HepG2 细胞加入不同浓度华良姜素(0、15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理 48 h。使用 TRIzol 试剂从 HepG2 细胞中提取总 RNA。逆转录试剂盒将提取的 RNA 转录成 cDNA。将 Real-time PCR 仪开启预热 10 min。上机前设置反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 40 个循环。结果分析使用相对定量法 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法分析目的基因的 mRNA 表达量。

2.6 统计学方法 采用统计学软件 GraphPad Prism 5.0 对数据进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间数据比较采用 *t* 检验, 两组以上数据采用方差分析(ANOVA)。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 华良姜素对 HepG2 细胞生长的影响 与空白组比较, 不同浓度华良姜素组细胞存活率均显著降低($P<0.01$), 随着华良姜素给药浓度的升高, HepG2 细胞的活性受到抑制且呈现浓度依赖性。见表 2。经计算华良姜素的半数抑制浓度(IC_{50}) 值 13.44 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 选定给药浓度为 3、15、75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。给药作用 24、48、72 h, 在细胞给药 24 h 时, 肝癌 HepG2 细胞的生长受到抑制, 抑制效果差异无统计学意义。给药 48 h, 抑制效果较为明显。给药 72 h, HepG2 细胞的生长几乎没有存活。故选给药 48 h 做后续实验。见表 3。

3.2 良姜素对 HepG2 细胞凋亡的影响 与空白组比较, 各浓度组华良姜素凋亡率均显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 随着给药浓度的升高(0、3、15、75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 细胞凋亡率逐渐上升, 表明华良姜素抑制 HepG2 细胞的生长, 可能通过促进细胞凋亡。见表 4。

3.3 华良姜素对 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响 根据以上流式细胞术检测华良姜素对 HepG2 细胞凋亡的结果, 对凋亡蛋白 Bax 与 Bcl-2 蛋白含量变化检

表 2 不同浓度华良姜素对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Effect of different concentrations of jaranol on survival rate of HepG2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%
空白组		1.004 \pm 0.995
华良姜素组	5	0.916 \pm 0.842 ¹⁾
	10	0.619 \pm 0.575 ¹⁾
	25	0.442 \pm 0.388 ²⁾
	50	0.358 \pm 0.314 ²⁾
	100	0.399 \pm 0.197 ²⁾
	150	0.254 \pm 0.115 ²⁾
	300	0.151 \pm 0.006 ²⁾

注: 与空白组比较 ¹⁾ $P<0.05$, ²⁾ $P<0.01$ (表 3-表 8 同)

测。与空白组比较, 华良姜素(15、75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组中 Bax 蛋白水平明显升高($P<0.05$), Bcl-2 蛋白水平显著下降($P<0.01$)。从而进一步验证了华良姜素对 HepG2 细胞抑制致使细胞凋亡。见图 1 和表 5。

3.4 转录组学测序结果 分析华良姜素对 HepG2 细胞的差异基因表达结果, 能检测抑制 HepG2 细胞的作用机制。RNA-seq 测序结果分析, 得到所有空白组与华良姜素组基因的测序原始数据。给药组将近 59 000 个受调控的表达基因, 采用 DESeq2 进行基因的差异表达分析, 根据校正后 P 值(padj) <0.05 , 以 2 为底的倍数变化的对数的绝对值 ($|\log_2\text{foldchange}|>1$) 作为差异显著性标准。筛选出差异表达基因 125 个, 红点表示上调差异基因 47 个, 蓝点表示下调差异基因 74 个。见图 2。

火山图能直观展示在空白组与华良姜素组中差异基因的分布及表达量上下调情况, 横坐标表示基因在不同实验组中表达倍数变化; 纵坐标表示差异基因表达量变化的统计学差异显著性标准。将基因进行聚类分析, 直观的展示基因在不同样本中的表达情况, 如图 3 所示, 左 3 列是华良姜素组, 右 3 列是空白组。聚类的树状图表明, 空白组与华良姜素组分支离的越近, 说明空白组与华良姜素组差异

表 3 不同作用时间华良姜素对 HepG2 细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

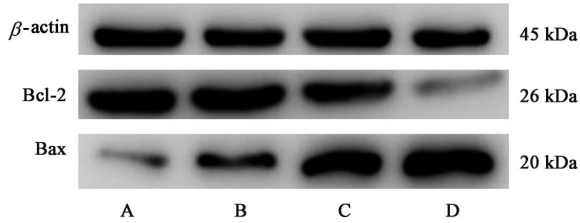
Table 3 Effect of different action times of jaranol on survival rate of HepG2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	细胞存活率/%		
		24 h	48 h	72 h
空白组	0	1.010 \pm 0.995	1.005 \pm 0.992	0.963 \pm 0.946
华良姜素组	3	1.023 \pm 0.953 ²⁾	0.783 \pm 0.758 ²⁾	0.713 \pm 0.698 ²⁾
	15	0.811 \pm 0.757 ²⁾	0.582 \pm 0.572 ²⁾	0.417 \pm 0.401 ²⁾
	75	0.745 \pm 0.705 ²⁾	0.336 \pm 0.309 ²⁾	0.250 \pm 0.260 ²⁾

表4 华良姜素对HepG2细胞凋亡的影响 (n=3)

Table 4 Effect of jaranol on HepG2 cell apoptosis (n=3)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	凋亡率/%
空白组		7.0
华良姜素组	3	15.0 ²⁾
	15	25.0 ²⁾
	75	40.0 ²⁾



注: A. 空白组; B~D. 华良姜素(3、15、75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组

图1 华良姜素对HepG2细胞凋亡蛋白表达蛋白电泳

Fig. 1 Electrophoresis of jaranol on expression of apoptotic protein in HepG2 cells

表5 华良姜素对HepG2细胞凋亡蛋白表达的影响

Table 5 Effect of jaranol on expression of apoptotic protein in HepG2 cells

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Bcl-2/ β -actin	Bax/ β -actin
空白组		1.600 \pm 1.286	0.396 \pm 0.196
华良姜素组	3	1.255 \pm 1.093	0.862 \pm 0.577 ¹⁾
	15	1.080 \pm 0.792 ²⁾	1.270 \pm 0.901 ²⁾
	75	0.381 \pm 0.240 ²⁾	1.555 \pm 1.412 ²⁾

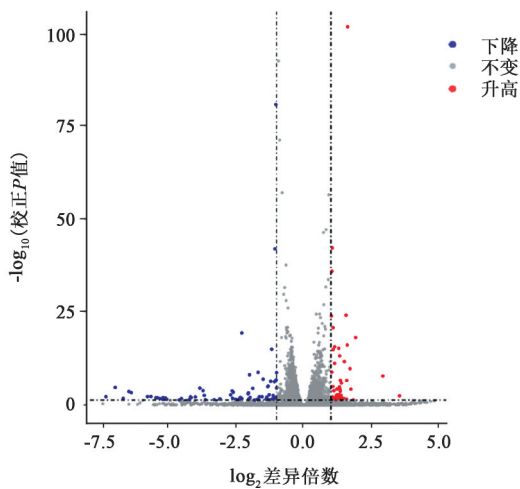


图2 差异基因表达分布火山图

Fig. 2 Volcano map of differential gene expression distribution

基因的表达模式越接近。左侧为基因聚类的树状图,两个基因分支离得越近,说明其表达量越接近。第3个空白组差异基因不太明显,可能是样品的RNA在运输过程中被降解。选择空白组与华良姜素组较为显著的表达差异基因做后续KEGG通路

分析。

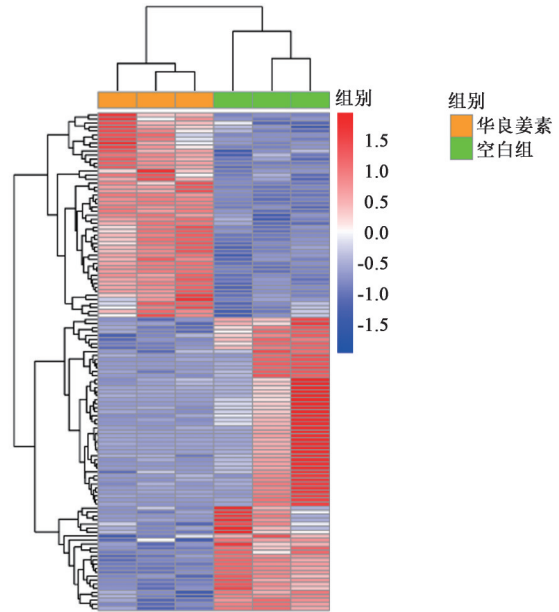


图3 差异基因表达分布聚类图

Fig. 3 Cluster map of differential gene expression distribution

3.5 差异表达基因富集分析 以KEGG通路为单位,以参考基因组为背景,通过Fisher精确检验,来分析计算各个通路基因富集度的显著性水平,从而确定受到显著影响的代谢和信号转导途径,取前5条受调控较为显著的信号通路见表5。结果所知华良姜素可能是通过磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、1型T辅助细胞(Th1)和Th2细胞分化、Ras相关蛋白1(Rap1)信号通路、Ras信号通路及钙信号通路等代谢途径对HepG2细胞有抑制作用。其中PI3K/Akt信号通路的下调基因数较多为11个,查阅文献可知,6个下调的差异基因与癌细胞凋亡相关,5个差异基因与抑制血管新生密切相关。6个凋亡基因分别为TEK、PDGFRA、SYK、PIK3CG、JAK3、MAGI2,其中PIK3CG基因受调控后变化较为显著。WANG等^[9]研究表明藜麦苷A1通过调节PI3K/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路诱导细胞凋亡,从而抑制肿瘤细胞的增殖。华良姜素对HepG2细胞的抑制作用,可能影响PI3K/Akt信号通路中部分差异基因有关,而使HepG2细胞发生凋亡。见表6和表7。

3.6 华良姜素对HepG2细胞中MAGI2、JAK3、PDGFRA、SYK、TEK、PIK3CG mRNA表达的影响

经过Real-time PCR对6个下调差异基因的表达水平进行验证。研究结果显示,与空白组比较,华良姜素组(15 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)中的6个差异基因mRNA相

表6 差异表达基因KEGG分析结果

Table 6 Analysis result of differentially expressed genes KEGG

ID	通路	背景基因数/个	差异基因数/个	P	FDR
hsa04151	PI3K/Akt信号通路	354	11	$2.24 \times 10^{-3(2)}$	3.11×10^{-2}
hsa04658	Th1和Th2细胞分化	90	6	$2.24 \times 10^{-3(2)}$	6.67×10^{-2}
hsa04015	Rap1信号通路	211	8	$3.89 \times 10^{-3(2)}$	3.79×10^{-2}
hsa04014	Ras信号通路	234	7	$2.70 \times 10^{-2(2)}$	2.99×10^{-2}
hsa04020	Calcium信号通路	239	7	$2.70 \times 10^{-2(2)}$	2.93×10^{-2}

表7 PI3K/Akt信号通路相关差异表达基因信息

Table 7 PI3K/Akt signaling pathway related differentially expressed gene information

基因	$\log_2(\text{fold change})$	P	变化趋势
TEK	-2.285 2	$8.42 \times 10^{-4(2)}$	下降
PDGFRA	-2.630 2	$6.69 \times 10^{-4(2)}$	下降
SYK	-5.459 6	$4.84 \times 10^{-4(2)}$	下降
PIK3CG	-6.954 0	$2.53 \times 10^{-7(2)}$	下降
JAK3	-2.642 7	$2.67 \times 10^{-6(2)}$	下降
MAGI2	-3.671 7	$7.01 \times 10^{-5(2)}$	下降

对表达均明显下降($P < 0.05, P < 0.01$),其中PIK3CG的基因表达下降较为显著,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

Real-time PCR结果与测序KEGG中PI3K/Akt信号通路所含基因趋势一致。见表8。

4 讨论

随着公众健康意识的增强,膳食内的黄酮生物活性受到欢迎。对黄酮类化合物进行了深入研究,以了解其靶向的特定蛋白,以发挥抗癌^[10]、抗炎、抗糖尿病^[11-13]、抗氧化剂^[14]、心脏保护^[15]、神经保护和认知增强^[16]作用。本研究采用体外细胞实验研究华良姜素对HepG2抑制作用及机制研究。通过MTT法、流式细胞术及免疫印迹法验证华良姜素使HepG2凋亡而产生抑制作用。研究报道柑橘种子中的橙皮苷通过线粒体和死亡受体途径诱导人肝癌HepG2细胞凋亡^[17]。橙皮苷($200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)通过上调PI3K、Akt、细胞周期蛋白依赖性激酶2(CDK2)信号通路抑制DEN诱导的肝纤维化和肿瘤生长^[18]。Baicalein被发现能够通过上调p21和p27的表达并抑制PI3K/Akt途径,诱导S和G₂/M期细胞

周期停滞,从而抑制Bel-7402细胞的增殖^[19]。BIE等^[20]用不同浓度CA对卵巢癌SKOV3细胞系进行干预,发现CA对其以时间剂量依赖性方式上调Bax/Bcl-2及胱天蛋白酶(Caspase)-3, Caspase-9的表达,从而对卵巢癌细胞产生凋亡作用。华良姜素对HepG2抑制作用的其他原因,有待后续的研究。

转录组(transcriptome)是连接基因组(遗传信息)与蛋白质组(生物功能)之间的纽带,是研究基因表达的主要手段^[21]。通过RNA测序结果分析得出华良姜素使HepG2发生凋亡,可能与PI3K/Akt信号通路中部分差异基因的表达相关。PI3K/Akt通路是细胞内重要的信号转导通路之一,参与细胞增殖、抑制细胞凋亡,影响血管生成与免疫功能及炎症反应等^[22]。采用Real-time PCR对PI3K/Akt信号通路中TEK、PDGFRA、SYK、PIK3CG、JAK3及MAGI2差异基因进行验证。结果表明6个与凋亡相关的基因均呈下调趋势,其中PIK3CG基因下调较为显著,且与RNA测序数据一致。CHEN等^[23]体外实验表明,敲除TEK可以促进ccRCC细胞的增殖和迁移,发现TEK通过调节Akt的磷酸化来促进细胞凋亡,从而抑制细胞增殖。在许多造血系统恶性肿瘤中,SYK提供重要的生存功能,其抑制或沉默作用经常导致细胞凋亡^[24]。肾上腺素通过与JAK3激酶的ATP结合位点结合而选择性抑制JAK3信号传导,治疗由JAK3信号异常激活引起的疾病的有希望的治疗候选药物^[25]。MAGI2-AS3的恢复被确定为显著抑制HCC细胞的生长,迁移能力和侵袭性,并促进细胞凋亡^[26]。PIK3CG是CLBC患者的潜在治疗靶标,抑制PIK3CG激活可增强PTX诱导的CLBC细胞凋亡和迁移抑制^[27]。REN等^[28]研究人

表8 华良姜素对HepG2细胞中MAGI2、JAK3、PDGFRA、SYK、TEK、PIK3CG mRNA表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of jaranol on expression of MAGI2, JAK3, PDGFRA, SYK, TEK, PIK3CG mRNA in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	MAGI2	JAK3	PDGFRA	SYK	TEK	PIK3CG
空白组		1.014±0.958	1.036±0.965	1.027±0.955	1.055±0.970	1.059±0.959	1.092±0.976
华良姜素组	15	0.630±0.442 ²⁾	0.888±0.744 ²⁾	0.752±0.597 ²⁾	0.549±0.435 ²⁾	0.518±0.328 ²⁾	0.138±0.002 ²⁾

类UTP14a通过上调大肠癌中血小板源性生长因子A(PDGF α)的表达促进血管生成,证明了hUTP14a促进了Claudin-low型乳腺癌中的血管生成。LI等^[29]研究发现使用高剂量结直肠癌(CA)可显著抑制乳腺癌MCF-7、T47D细胞系中翼状螺旋转录因子3(FoxP3)的表达水平,进而下调内皮生长因子(VEGF)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达水平,由此表明高剂量CA通过靶向FoxP3介导的VEGF和MMP-9表达抑制乳腺癌细胞转移和侵袭。研究发现,与正常乳腺组织比较,癌基因家族蛋白27B(Rab27B)在乳腺癌组织中呈高表达,Rab27B的表达导致 β -连环蛋白(β -catenin)表达增加,进而引起VEGF表达的上调,而在CA处理的乳腺癌MDA-MB-231细胞系中发现Rab27B、 β -catenin和VEGF的表达受到抑制,此细胞系的转移侵袭潜力显著下降,由此揭示了CA抑制乳腺癌转移侵袭能力是通过Rab27B介导的 β -catenin和VEGF的表达抑制相关^[30]。

综上所述,本研究采用细胞生物学、分子生物学及基因芯片等技术手段得出华良姜素能抑制HepG2细胞凋亡,可能是影响了PI3K/Akt信号通路中部分差异基因的表达。为后续华良姜素抗肿瘤提供实验基础,同时有助于促进黄酮类化合物的开发利用及潜在的应用价值。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LIU H L, JIANG W B, XIE M X. Flavonoids: Recent advances as anticancer drugs [J]. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2010, 5(2): 152-164.
- [2] SHIH Y W, WU P F, LEE Y C, et al. Myricetin suppresses invasion and migration of human lung adenocarcinoma A549 cells; possible mediation by blocking the ERK signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 34903499.
- [3] NINOMIYA M, NISHIDA K, TANAKA K, et al. as naturally occurring inhibitors of cell proliferation in human leukemia HL60 cells [J]. *J Nat Med*, 2013, 67: 460467.
- [4] ZHAO X, SHU G, CHEN L, et al. A flavonoid component from *Docynia Delavayi* (Franch) Schneid represses transplanted H22 hepatoma growth and exhibits low toxic effect on tumorbearing mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50(9): 31663173.
- [5] 王雪振,张小雨,牟悦,等. 毛蕊异黄酮抗肿瘤作用及机制的研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27

(23): 210-217.

- [6] 昆明理工大学. 熊竹素在制备抑制血管异常新生药物中的应用: CN201310187204. 6 [P]. 2013-08-13.
- [7] CHOI J H, AHN J H, LEE K T, et al. Effect of kumatakenin isolated from cloves on the apoptosis of cancer cells and the alternative activation of tumor-associated macrophages [J]. *J Agric Food Chem*, 2017, 65(36): 7893-7899.
- [8] LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 [J]. *Genome Biol*, 2014, 15(12): 550.
- [9] WANG Y E, XU K, YUE W H, et al. Hederacolchiside A₁ suppresses proliferation of tumor cells by inducing apoptosis through modulating PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Chin Herb Med*, 2018, 10(2): 215-222.
- [10] ABOTALEB M, SAMUEL S M, VARGHESE E, et al. Flavonoids in cancer and apoptosis [J]. *Cancers*, 2018, 11(1): 28.
- [11] GEORGE V C, DELLAIRES G, RUPASINGHE H P V. Plant flavonoids in cancer chemoprevention: Role in genome stability [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 45: 1-14.
- [12] PARHIZ H, ROOHBAKHSH A, SOLTANI F, et al. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models [J]. *Phytother Res*, 2015, 29: 323-331.
- [13] HOSSAIN M K, DAYEM A A, HAN J, et al. Molecular mechanisms of the anti-obesity and anti-diabetic properties of flavonoids [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(4): 569.
- [14] FAGGIO C, SUREDA A, MORABITO S, et al. Flavonoids and platelet aggregation: A brief review [J]. *Eur J Pharmacol*, 2017, 807: 91-101.
- [15] SPAGNUOLO C, MOCCIA S, RUSSO G L. Anti-inflammatory effects of flavonoids in neurodegenerative disorders [J]. *Eur J Med Chem*, 2018, 153: 105-115.
- [16] FAVALORO B, ALLOCATI N, GRAZIANO V, et al. Role of apoptosis in disease [J]. *Aging*, 2012, 4(5): 330-349.
- [17] BANJERDPONGCHAI R, WUDTIWAI B, KHAWON P, et al. Hesperidin from *Citrus* seed induces human hepatocellular carcinoma HepG2 cell apoptosis via both mitochondrial and death receptor pathways [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1): 227-237.

- [18] ZHOU Y, LIU Q H, LIU C L, et al. Calycosin induces apoptosis in human ovarian cancer SKOV3 cells by activating Caspases and Bcl-2 family proteins [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(7):5333-5339.
- [19] MO'MEN Y S, HUSSEIN R M, KANDEIL M A. Involvement of PI3K/Akt pathway in the protective effect of hesperidin against a chemically induced liver cancer in rats [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2019, 33(6):e22305.
- [20] BIE B, SUN J, LI J, et al. a Natural anti-cancer compound, alters microRNA expression profiles in Bel-7402 human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 41(4):1519-1531.
- [21] MARTIN M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads [J]. *EMBnet J*, 2011, 17(1):10-12.
- [22] 王丽萍, 刘彦琦, 崔洁, 等. 基于 miR-198 调控 PI3K-Akt 信号通路探讨姜黄素治疗急性胰腺炎的机制 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(15):3707-3712.
- [23] CHEN S M, YU M X, JU L G, et al. The immune-related biomarker TEK inhibits the development of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) by regulating Akt phosphorylation [J]. *Cancer Cell Int*, 2021, 21(1):119.
- [24] KRISENKO M O, GEAHLEN R L. Calling in SYK: SYK's dual role as a tumor promoter and tumor suppressor in cancer [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1853(1):254-263.
- [25] KIM B H, YI E H, JEE J G, et al. Tubulosine selectively inhibits JAK3 signalling by binding to the ATP-binding site of the kinase of JAK3 [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(13):7427-7438.
- [26] PU J, WANG J, WEI H, et al. lncRNA MAGI2-AS3 prevents the development of HCC via recruiting KDM1A and promoting H3K4me2 demethylation of the RACGAP1 promoter [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18:351-362.
- [27] CHANG J, HONG L, LIU Y, et al. Targeting PIK3CG in combination with paclitaxel as a potential therapeutic regimen in claudin-low breast cancer [J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 5(12):2641-2651.
- [28] REN P W, SUN X Y, ZHANG C F, et al. Human UTP14a promotes angiogenesis through upregulating PDGFA expression in colorectal cancer [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 512(4):871-876.
- [29] LI S, WANG Y, FENG C, et al. Calycosin inhibits the migration and invasion of human breast cancer cells by down-regulation of Foxp3 expression [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 44(5):1775-1784.
- [30] WU G, NIU M, QIN J, et al. Inactivation of Rab27B-dependent signaling pathway by calycosin inhibits migration and invasion of ER-negative breast cancer cells [J]. *Gene*, 2019, doi: 10.1016/j.gene.2019.04.005.

[责任编辑 王鑫]