

红景天苷对HepG2细胞增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响

蒋兵¹, 杨韬¹, 封龙飞¹, 王涛², 苏海翔^{1,2*}

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000;

2. 甘肃省医学科学研究所, 甘肃省肿瘤医院, 兰州 730050)

[摘要] 目的:红景天苷是从红景天的根茎部中提取得到的,是红景天中含量最高的天然活性化合物。该实验旨在研究红景天苷对人性肝癌细胞(HepG2细胞)增殖、迁移、侵袭和凋亡的影响。方法:选取未作任何处理的HepG2细胞作为空白组,以终浓度为20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 红景天苷处理的HepG2细胞作为红景天苷组。采用多功能细胞分析仪测定红景天苷对HepG2细胞增殖的影响,划痕实验测定红景天苷对HepG2细胞迁移能力的影响,Transwell小室实验测定红景天苷对HepG2细胞侵袭能力的影响,倒置显微镜观察红景天苷对HepG2细胞形态的影响,透射电镜观察红景天苷对HepG2细胞中线粒体的影响,流式细胞术分析红景天苷对HepG2细胞凋亡及周期分布的影响,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)测定红景天苷对HepG2细胞相关凋亡基因的影响,蛋白免疫印迹法测定红景天苷对HepG2细胞相关迁移、侵袭及凋亡蛋白的影响。结果:与空白组比较,红景天苷组(20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)细胞指数均明显下降($P<0.05$),愈合面积均明显增加($P<0.05$),且呈时间和浓度依赖性;红景天苷组(20、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)中能够穿过Matrigel基质胶的HepG2细胞数量呈浓度依赖性减少;红景天苷组(20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)总凋亡率呈浓度依赖性升高,且阻滞细胞于G₂/M期($P<0.05$);红景天苷组(20、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)表达呈浓度依赖性升高($P<0.05$),神经钙黏附蛋白(N-cadherin)表达呈浓度依赖性降低($P<0.05$)。红景天苷组(20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)胱天蛋白酶-3(Caspase-3)mRNA表达、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)、Caspase-3蛋白及胱天蛋白酶-9(Caspase-9)蛋白表达均呈浓度依赖性升高($P<0.05$),肌动蛋白结合蛋白(Girdin)及Bcl-2表达均呈浓度依赖性降低($P<0.05$)。结论:红景天苷对HepG2细胞的增殖、迁移及侵袭均具有抑制作用,且通过线粒体途径诱导HepG2细胞凋亡。表明红景天苷可作为一种潜在的肝癌化疗候选药物。

[关键词] 肝癌; 红景天苷; 增殖; 迁移; 侵袭; 凋亡

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)17-0075-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20221421

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220429.0949.005.html>

[网络出版日期] 2022-04-29 13:40

Effect of Salidroside on Proliferation, Migration, Invasion, and Apoptosis of HepG2 Cells

JIANG Bing¹, YANG Tao¹, FENG Longfei¹, WANG Tao², SU Haixiang^{1,2*}

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China; 2. Gansu Provincial Academic Institute for Medical Research, Gansu Provincial Cancer Hospital, Lanzhou 730050, China)

[Abstract] **Objective:** Salidroside is the most abundant natural active compound in the famous Chinese herbal medicine *Rhodiola crenulata* Radix et Rhizoma. This study aims to explore the effect of salidroside on the proliferation, migration, invasion, and apoptosis of human hepatoma (HepG2) cells. **Method:** The HepG2 cells without any treatment were selected as the blank group, and the HepG2 cells in the salidroside groups were treated with salidroside at final concentrations of 20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. A multifunctional cell

[收稿日期] 2022-02-02

[基金项目] 甘肃省科技计划项目(18JR2FA010);甘肃省省级重点人才项目(甘组通字[2021]17号);甘肃省中医药科研课题(GZKP-2021-21)

[第一作者] 蒋兵,在读硕士,从事中医药对肿瘤的防治研究工作,E-mail:2561258199@qq.com

[通信作者] *苏海翔,研究员,主任医师,博士生导师,从事肿瘤分子生物学、肿瘤标志物筛选和应用研究工作,E-mail:13909311822@163.com

analyzer, scratch assay, and Transwell assay were employed to determine the proliferation, migration, and invasion of HepG2 cells, respectively. An inverted microscope was used to observe the morphology, and a transmission electron microscope to observe the mitochondria of HepG2 cells. Flow cytometry was employed to determine the apoptosis and cycle distribution of HepG2 cells. Real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot were employed to determine the expression of apoptosis-associated genes and migration-, invasion-, and apoptosis-associated proteins, respectively, in HepG2 cells. **Result:** Compared with the blank group, salidroside (20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) decreased the cell index and increased the healing area in a time- and dose-dependent manner ($P<0.05$). Compared with that in the blank group, the HepG2 cells that could pass through Matrigel reduced in the salidroside (20, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups. Compared with the blank group, salidroside (20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) increased the total apoptosis rate in a dose dependence manner and blocked the cells in the G_2/M phase ($P<0.05$). Compared with the blank group, salidroside up-regulated the expression of epithelial-cadherin (E-cadherin) in a dose-dependent manner ($P<0.05$) and down-regulated that of nerve-cadherin (N-cadherin) in the 20 and 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ groups ($P<0.05$). Compared with the blank group, salidroside (20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) up-regulated the mRNA level of cysteine-containing aspartate-specific protease -3 (Caspase-3) and the protein levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) associated X protein (Bax), Caspase-3, and cysteine-containing aspartate-specific protease-9 (Caspase-9) in a dose-dependent manner ($P<0.05$), while it down-regulated the protein levels of the actin-binding protein Girdin and Bcl-2 in a dose-dependent manner ($P<0.05$). **Conclusion:** Salidroside inhibited the proliferation, migration, and invasion and induced the apoptosis of HepG2 cells through the mitochondrial pathway. The results suggest that salidroside can be used as a potential chemotherapy candidate for liver cancer.

[Keywords] liver cancer; salidroside; proliferation; migration; invasion; apoptosis

根据2020年的全球癌症统计数据显示,肝癌是全球男性第五大常见癌症,女性第七大常见癌症。此外,也是世界上第二大最常见的癌症死亡原因^[1]。目前,随着肝癌治疗方法的快速发展,许多治疗方案(肝切除术、化疗药物、分子靶向治疗和免疫治疗)被用于治疗肝癌^[2-4]。但大多数患者的预后效果非常差,重症患者会因复发或转移而死亡,这与对药物无或较弱的反应、不良反应、多药耐药等有关^[5-6]。因此,探索一种有效、安全的药物治疗肝癌就显得尤为必要。红景天又称“金根”,是景天科的一种多年生草本植物。其广泛生长于高寒冷、干燥、缺氧、高海拔(3 500~5 000米)的地区^[7]。据统计,世界上共有红景天96种,主要分布在亚洲、欧洲和北美洲。在亚洲,红景天被用作草药来治疗一系列疾病,如头痛、瘧病和阿尔茨海默病^[8]。在欧洲和北美洲,红景天常被用作一种膳食补充剂来补充能量^[9-10]。红景天苷作为红景天中含量最高的天然活性化合物,主要是从红景天的根茎中提取得到。研究表明,红景天苷具有多种生物活性,如血管保护^[11]、神经保护^[12]、抗炎^[13]、抗氧化^[14]等。因此,红景天苷可以作为开发的天然植物来源。此外,红景天苷也能发挥抗肿瘤作用。随着红景天苷抗

肿瘤机制的不断研究,发现红景天苷可以通过阻滞癌细胞周期、诱导癌细胞分化为正常细胞、诱导癌细胞凋亡、调节信号通路等方式来抑制肿瘤,从而达到抗癌的目的^[15]。红景天苷也在多种癌症中进行研究,如膀胱癌^[16]、结肠癌^[17]、胃癌^[18]、乳腺癌^[19]、肺癌^[20]等。虽然红景天苷在抗肿瘤方面具有广谱性,但其对人源性肝癌的作用和潜在机制尚不清楚。因此,本实验旨在探究红景天苷对人源性肝癌细胞的增殖、迁移、侵袭及凋亡的影响,进一步研究红景天苷是否通过线粒体途径诱导人源性肝癌细胞凋亡。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌 HepG2 细胞购自上海生物科学研究所细胞库,编号为 BRCC-001-0014,传至3代。

1.2 药物与试剂 红景天苷(美国 Selleck 公司,批号 S239602,纯度 99.56%),DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH30022.01、AG29714104),胎牛血清(美国 BI 公司,批号 04-001-1ACS),青-链霉素、胰蛋白酶(上海源培公司,批号分别为 S110JV、S310JV),16孔板(美国 Acea 公司,批号 G028201),96孔板(武汉

Servicebio公司,批号IMC202111017),100 mm培养皿(广州Beaver公司,批号15T153001),Transwell小室、Matrigel基质胶(美国Corning公司,批号分别为3412、356234),4%组织细胞固定液、1%结晶紫染色液、细胞凋亡试剂盒、高效RIPA裂解液、BCA蛋白浓度检测试剂盒、SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京索莱宝公司,批号分别为P1110、G1062、CA1040、R0010、PC0020、P1200),饱和醋酸铀酰和柠檬酸铅(国药集团化学试剂有限公司,批号分别为100092183、10000418),细胞周期试剂盒(苏州优逸兰迪公司,批号C6031S),总RNA提取试剂盒、mRNA逆转录试剂盒、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(天根生物科技有限公司,批号分别为OSR-M610、FP313-01、U8218),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体、Bcl-2相关X蛋白(Bax)抗体、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)抗体、胱天蛋白酶-9(Caspase-9)抗体、山羊抗小鼠二抗(美国Proteintech公司,批号分别为12789-1-AP、60267-1-Ig、19677-1-AP、10380-1-AP、SA00001-1),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国GeneTex公司,批号分别为GTX627408、GTX109639),上皮性钙黏附蛋白(E-cadherin)抗体、神经钙黏附蛋白(N-cadherin)抗体、肌动蛋白结合蛋白(Girdin)抗体(美国Immunoway公司,批号分别为YT3711、YP0765、YT0185),三色预染色蛋白标记物(上海Yeastem公司,批号20351ES72)。

1.3 仪器 RTCA S16型多功能细胞分析仪(美国Aceaa公司),6B40330型倒置显微镜(日本Olympus公司),HT7700型透射电镜(日本Hitachi公司),FACSCalibu型流式细胞仪(美国BD公司),Quantstudio 12K型PCR仪、Power pac HV型电泳仪、Mini Trans-blot Cell型电转仪、CHEMIDOC™ XRS+型凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 人源性肝癌细胞(HepG2细胞)培养于含10%胎牛血清的DMEM完全培养基,并放置于37℃、5%CO₂及饱和湿度的培养箱中孵育。待细胞的生长密度达到90%时进行传代培养,并取对数生长期细胞用于研究。以不含红景天苷的DMEM完全培养基处理的HepG2细胞作为空白组,以不同浓度红景天苷处理的HepG2细胞作为红景天苷组。

2.2 多功能细胞分析仪检测细胞增殖 将处于对数生长期的HepG2细胞以 5×10^3 个/孔接种于无菌的

16孔板中,并放置在培养箱中过夜培养。次日待细胞贴壁后,参照文献[18]研究方法用终浓度为0、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红景天苷处理HepG2细胞,并将16孔板置于多功能细胞分析仪进行检测,检测时间设置为96 h,在测试期间不需要添加或更换培养基。

2.3 划痕实验检测细胞迁移能力 将处于对数生长期的HepG2细胞以 5×10^4 个/mL的密度接种于无菌的培养皿中,并放置在培养箱中过夜培养。当细胞达到80%~90%,将200 μL 移液管的尖端垂直于每个培养皿的底部,并竖直地划出3条直线。脱落的细胞用PBS洗涤。然后,用终浓度为0、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红景天苷(不含血清)处理细胞,并放置于培养箱中孵育0、12、24、48 h。每隔一段时间,用倒置显微镜观察划痕情况并进行拍照,且使用Image J软件计算伤口面积。

2.4 Transwell小室实验检测细胞侵袭能力 将稀释好的Matrigel基质胶用预冷的枪头均匀地铺于Transwell小室上室膜面上,每个小室加入Matrigel基质胶40 μL ,并放置在培养箱中孵育30 min。取对数生长期的HepG2细胞用终浓度为0、20、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红景天苷预处理48 h。将处理过的HepG2细胞浓度调整为 5×10^4 个/mL。Transwell小室上室部都加入不含血清的细胞悬液100 μL ,下室部每孔加入含20%胎牛血清的DMEM培养基500 μL ,并放置在培养箱中孵育48 h。然后,用4%组织细胞固定液固定膜下的细胞30 min,用PBS漂洗2次,再用1%结晶紫染液染色15 min,并用流动水冲洗小室中残留的结晶紫染液。结束后用1次性棉签轻柔地擦除小室上层未侵袭的细胞,并放置于阴凉处晾干。最后,用倒置显微镜将穿透细胞在3个随机选取的区域进行拍照及人工计数。

2.5 倒置显微镜观察细胞形态 取对数生长期的HepG2细胞以 5×10^5 个/mL接种于无菌的培养皿中,以 5×10^3 个/孔接种于无菌的96孔板中,并放置在培养箱中过夜培养。次日待细胞贴壁后,用终浓度为0、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红景天苷处理HepG2细胞48 h,通过倒置显微镜对细胞的形态变化进行观察并拍照。

2.6 透射电镜观察细胞中线粒体 将HepG2细胞用终浓度为0、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红景天苷处理48 h。先将处理后的细胞收集于离心管中,用PBS洗涤2次。再用2.5%戊二醛室温固定细胞90 min,用1%四氧化锇固定细胞30 min。然后用95%无水

乙醇梯度脱水,将细胞包埋、切片,用饱和醋酸铀酰和柠檬酸铅染色。最后,用透射电镜观察胞质中的线粒体并拍照。

2.7 Annexin-V/PI流式细胞术检测细胞凋亡 取对数生长期的HepG2细胞以 5×10^4 个/mL的密度接种于无菌的培养皿中,并放置在培养箱中过夜培养。当细胞达到80%~90%,用终浓度为0、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红景天苷处理HepG2细胞48 h,收集细胞。用 $1 \times$ Loding buffer清洗细胞2次,加入AV染液5 μL 避光染色30 min,再加入PI染液5 μL 进行染色,通过尼龙目筛过滤细胞悬液,最后进行上机分析。

2.8 流式细胞术检测细胞周期 取HepG2细胞接种于无菌的6孔板中,并放置在培养箱中过夜培养。当细胞达到80%~90%,用终浓度为0、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红景天苷处理HepG2细胞48 h,随后进行胰蛋白酶消化细胞,预冷的PBS洗涤2次,弃上清,加入4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的75%乙醇固定细胞2 h,再用预冷的PBS洗涤2次,重悬细胞,调整细胞密度为 1×10^6 个/mL,加入Rnase A染液100 μL ,室温避光孵育30 min,再加入PI染液400 μL ,4 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育10 min,通过尼龙目筛过滤细胞悬液,最后进行上机分析。

2.9 Real-time PCR检测相关mRNA表达 用终浓度为0、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红景天苷处理HepG2细胞48 h,使用TRIzol试剂提取总RNA,并通过逆转录二步法合成cDNA,逆转录条件:42 $^{\circ}\text{C}$ 反应15 min以退性,95 $^{\circ}\text{C}$ 反应3 min以灭活,再以cDNA为模板,与基因特异性引物,通过PCR扩增Caspase-3,扩增条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性10 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸30 s,共计40个循环。对解离曲线进行分析,确保只有单一产物被扩增,最终进行测定分析,实验重复3次。内参选用GAPDH,mRNA表达水平计算方法,以GAPDH作为内参,计算相对表达量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。引物由苏州金唯智生物科技有限公司设计合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
Caspase-3	上游 AGCAAACCTCAGGGAAA	149
	下游 GGCTCAGAAGCACACAA	
GAPDH	上游 CCCATCACCATCTTCC	142
	下游 TGACCCTTTGGCTCC	

2.10 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测相关蛋白表达 用终浓度为0、20、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红景天苷处理HepG2细胞48 h,使用高效RIPA裂解液提取总蛋白,并通过BCA定量法进行定量,采用Western blot检测E-cadherin、N-cadherin(1:500)相关迁移蛋白的相对表达水平,并选用GAPDH(1:8 000)作为内参。用终浓度为0、20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的红景天苷处理HepG2细胞48 h后,使用高效RIPA裂解液提取总蛋白,并通过BCA定量法进行定量,采用Western blot检测Girdin(1:1 000)相关侵袭蛋白的相对表达水平,Bax、Bcl-2、Casepase-3、Casepase-9(1:1 000)相关凋亡蛋白的相对表达水平,并选用 β -actin(1:5 000)作为内参,以目的蛋白灰度值/内参蛋白灰度值表示蛋白相对表达量。

2.11 统计学分析 应用SPSS 22.0软件对结果进行统计学分析,检测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 红景天苷对HepG2细胞增殖的影响 与空白组比较,红景天苷(20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组中的细胞指数均明显下降($P < 0.05$),且呈时间与剂量的依赖性。在48 h,红景天苷组(20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对HepG2细胞的增殖具有明显的抑制作用($P < 0.05$)。因此,后续实验使用终浓度为20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 红景天苷处理HepG2细胞48 h。见表2。

表2 红景天苷对HepG2细胞指数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

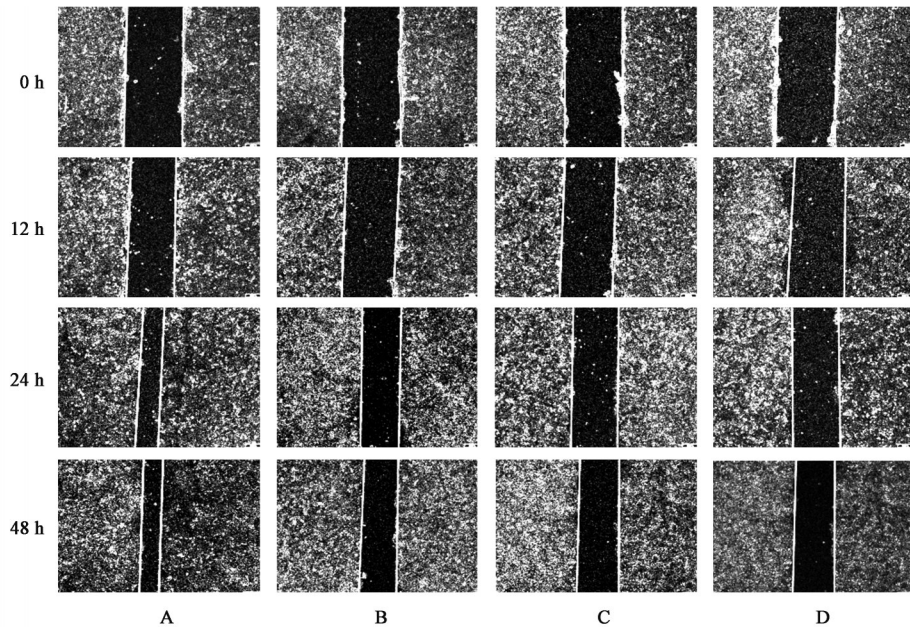
Table 2 Effect of salidroside on cell index in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	24 h	48 h	72 h
空白组		3.140 \pm 0.017	3.689 \pm 0.010	3.406 \pm 0.034
红景天苷组	20	2.639 \pm 0.016 ¹⁾	3.225 \pm 0.005 ¹⁾	3.234 \pm 0.036 ¹⁾
	40	2.109 \pm 0.018 ¹⁾	2.746 \pm 0.008 ¹⁾	2.805 \pm 0.020 ¹⁾
	80	1.806 \pm 0.006 ¹⁾	2.309 \pm 0.006 ¹⁾	2.556 \pm 0.006 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表3-表9同)

3.2 红景天苷对HepG2细胞迁移能力的影响 与空白组比较,红景天苷组(20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)愈合面积均明显增加($P < 0.05$),且呈时间和浓度依赖性。见图1、表3。

与空白组比较,红景天苷组(20、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)HepG2细胞中E-cadherin蛋白表达明显升高($P < 0.05$),N-cadherin蛋白水平明显降低($P < 0.05$)。见图2、表4。



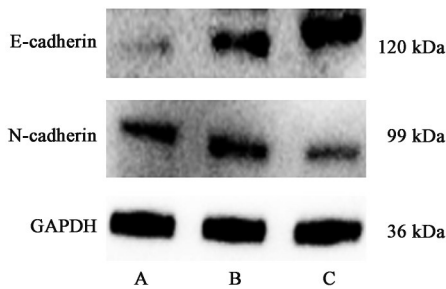
注: A. 空白组; B~D. 红景天苷组 (20, 40, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图4-图7同)

图1 划痕实验检测红景天苷对HepG2细胞迁移能力的影响(倒置显微镜, $\times 40$)

Fig. 1 Effect of salidroside on migration in HepG2 cells (inverted microscope, $\times 40$)

表3 红景天苷对HepG2细胞愈合面积的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	0 h	12 h	24 h	48 h
空白组		513.674 \pm 0.088	415.674 \pm 0.058	272.988 \pm 0.066	112.736 \pm 0.062
红景天苷组	20	506.533 \pm 0.110	473.041 \pm 0.197 ¹⁾	364.910 \pm 0.037 ¹⁾	321.231 \pm 0.021 ¹⁾
	40	508.713 \pm 0.123	483.521 \pm 0.139 ¹⁾	427.066 \pm 0.062 ¹⁾	373.483 \pm 0.052 ¹⁾
	80	513.137 \pm 0.052	500.824 \pm 0.086 ¹⁾	459.295 \pm 0.094 ¹⁾	409.805 \pm 0.060 ¹⁾



注: A. 空白组; B, C. 红景天苷组 (20, 80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) (图3同)

图2 红景天苷作用HepG2细胞E-cadherin、N-cadherin蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of salidroside on E-cadherin and N-cadherin proteins in HepG2 cells

3.3 红景天苷对HepG2细胞侵袭能力的影响 与空白组比较,红景天苷组 (20、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 中能够穿过 Matrigel 基质胶的 HepG2 细胞数量呈浓度依赖性减少。见图3。与空白组比较,红景天苷组 (20、40、80 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 抑制 HepG2 细胞中 Girdin 蛋白表达 ($P<0.05$)。见图4、表5。

表4 红景天苷对HepG2细胞E-cadherin和N-cadherin蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Effect of salidroside on E-cadherin and N-cadherin proteins expression in HepG2 cells ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	E-cadherin /GAPDH	N-cadherin /GAPDH
空白组		0.018 \pm 0.002	0.220 \pm 0.014
红景天苷组	20	0.105 \pm 0.015 ¹⁾	0.178 \pm 0.013 ¹⁾
	80	0.169 \pm 0.007 ¹⁾	0.094 \pm 0.008 ¹⁾

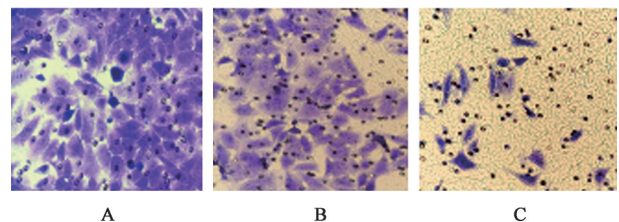


图3 红景天苷对HepG2细胞侵袭能力的影响(倒置显微镜, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of salidroside on invasion in HepG2 cells (inverted microscope, $\times 400$)

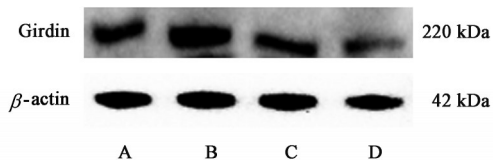


图4 红景天苷作用HepG2细胞Girdin蛋白电泳

Fig. 4 Electrophoresis of salidroside on Girdin protein in HepG2 cells

表5 红景天苷对HepG2细胞Girdin蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 5 Effect of salidroside on expression of Girdin protein in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Girdin/ β -actin
空白组		0.766 \pm 0.009
红景天苷组	20	0.966 \pm 0.029 ¹⁾
	40	0.760 \pm 0.021 ¹⁾
	80	0.562 \pm 0.044 ¹⁾

3.4 红景天苷诱导HepG2细胞凋亡的影响 在不含药物的完全培养基的处理之下,HepG2细胞的形态呈现长梭状。然而,在药物干预48 h,红景天苷组(20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)HepG2细胞逐渐呈现多边形,最后变成圆形的凋亡细胞,且凋亡细胞的数量呈浓度依赖性增加。见图5。

在不含药物的完全培养基的处理之下,HepG2细胞中的线粒体形态呈现短棒状且边界清晰。与空白组比较,红景天苷组(20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)HepG2细胞的线粒体膜均出现不同程度的破损。见图6。

流式细胞结果显示,与空白组比较,红景天苷组(20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)总凋亡率均明显升高($P < 0.05$),且呈浓度依赖性。见表6。

3.5 红景天苷对HepG2细胞周期分布的影响 与空白组比较,红景天苷(20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)组中

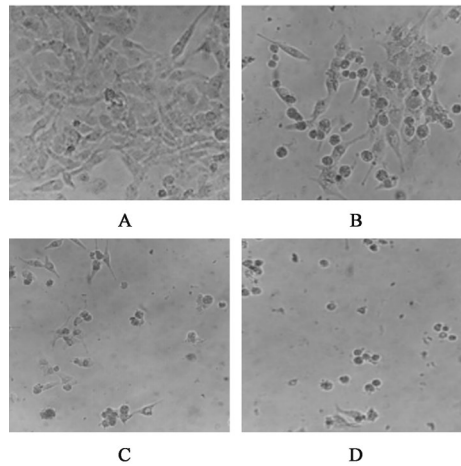


图5 红景天苷促进HepG2细胞凋亡(倒置显微镜, $\times 200$)

Fig. 5 Salidroside promoted apoptosis of HepG2 cells (inverted microscope, $\times 200$)

表6 红景天苷对HepG2细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 6 Effect of salidroside on apoptosis in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	总凋亡率/%
空白组		6.52 \pm 0.29
红景天苷组	20	19.18 \pm 0.23 ¹⁾
	40	27.22 \pm 0.51 ¹⁾
	80	34.48 \pm 0.35 ¹⁾

G_2/M 期的细胞比例以浓度依赖性的方式显著增加,与此同时 G_0/G_1 期的细胞比例以浓度依赖性的方式明显降低($P < 0.05$)。见表7。

3.6 红景天苷对HepG2细胞Caspase-3 mRNA水平的影响 与空白组比较,红景天苷组(20、40、80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)编码凋亡诱导蛋白的Caspase-3 mRNA水平呈浓度依赖性升高($P < 0.05$)。见表8。

3.7 红景天苷对HepG2细胞凋亡相关蛋白表达的影响 与空白组比较,红景天苷组(20、40、

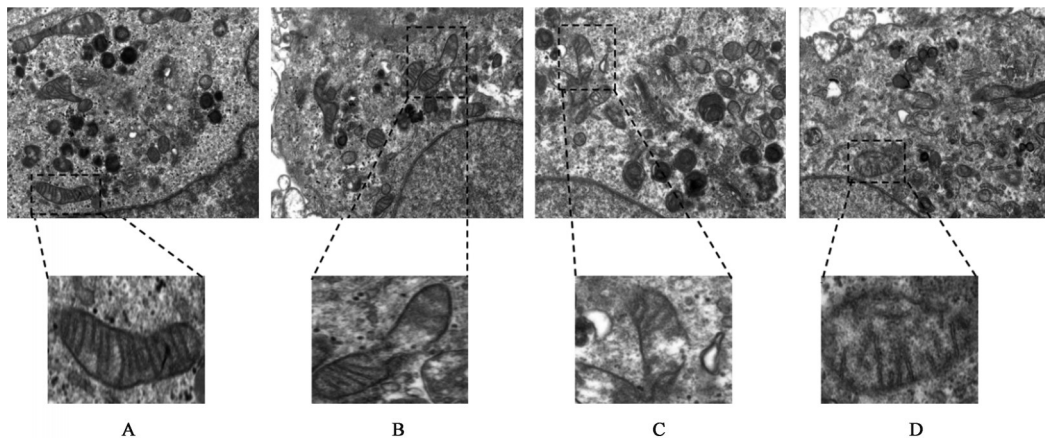


图6 红景天苷促进HepG2细胞中线粒体膜的损伤(透射电镜, $\times 8000$)

Fig. 6 Salidroside promoted damage of mitochondrial membrane in HepG2 cells (TEM, $\times 8000$)

表 7 红景天苷对 HepG2 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 7 Effect of salidroside on cycle in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$) %

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	G_0/G_1	S	G_2/M
空白组		84.68±0.18	10.00±0.18	5.32±0.09
红景天苷组	20	71.02±0.27 ¹⁾	22.90±0.15 ¹⁾	6.08±0.13 ¹⁾
	40	60.57±0.17 ¹⁾	25.08±0.07 ¹⁾	14.35±0.15 ¹⁾
	80	49.51±0.14 ¹⁾	31.69±0.16 ¹⁾	18.80±0.14 ¹⁾

表 8 红景天苷对 HepG2 细胞 Caspase-3 mRNA 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 8 Effect of salidroside on Caspase-3 mRNA in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Caspase-3
空白组		1.000±0.000
红景天苷组	20	1.053±0.166 ¹⁾
	40	1.200±0.022 ¹⁾
	80	1.285±0.120 ¹⁾

表 9 红景天苷对 HepG2 细胞 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 9 Effect of salidroside on expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 proteins in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Bax/ β -actin	Bcl-2/ β -actin	Bax/Bcl-2	Caspase-3/ β -actin	Caspase-9/ β -actin
空白组		0.505±0.005	1.271±0.014	0.397±0.007	0.124±0.004	0.077±0.005
红景天苷组	20	0.788±0.009 ¹⁾	1.175±0.013 ¹⁾	0.672±0.029 ¹⁾	0.267±0.011 ¹⁾	0.131±0.010 ¹⁾
	40	1.321±0.024 ¹⁾	1.020±0.026 ¹⁾	1.296±0.053 ¹⁾	0.583±0.044 ¹⁾	0.238±0.084 ¹⁾
	80	1.439±0.048 ¹⁾	0.775±0.070 ¹⁾	1.864±0.012 ¹⁾	0.703±0.020 ¹⁾	0.347±0.010 ¹⁾

4 讨论

肝癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,其相关的高死亡率是由于其具有易转移、侵袭性强的特点,而其中上皮间质转化(EMT)的发生起到至关重要的作用。EMT 过程中主要分子标志包括细胞黏附相关基因 E-cadherin、间叶细胞标志物 N-cadherin 及 Girdin 蛋白。E-cadherin 和 N-cadherin 都属于钙黏附素家族, E-cadherin 分子之间通过细胞外的免疫球蛋白结构域而相互连接,并通过胞浆内的 α 、 β 连接素与肌动蛋白的骨架相连,从而在细胞间形成稳定的接触,因此 E-cadherin 蛋白水平的上升可以增强细胞的黏附力^[21-23]。N-cadherin 可以克服 E-cadherin 介导的细胞间牢固的黏附而影响上皮细胞的形态和行为,诱导其向间质转化,直接促进肿瘤细胞的浸润,使癌细胞转为具有浸润性的恶性表型,因此 N-cadherin 蛋白水平的下降可以抑制细胞的间质转化^[24]。许雷来等^[25]研究发现,华蟾素能通过上调 E-cadherin 表达和下调 N-cadherin 表达,抑制 MDA-MB-231 细胞的 EMT 转变,从而降低乳腺癌

80 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) Bcl-2 蛋白表达呈浓度依赖性降低 ($P < 0.05$), Bax、Bax/Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达呈浓度依赖性升高 ($P < 0.05$)。见图 7、表 9。

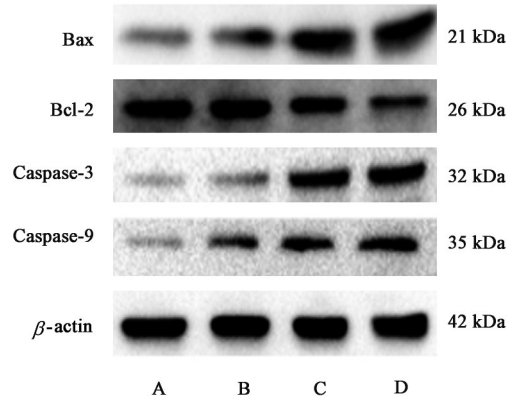


图 7 红景天苷作用 HepG2 细胞 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白电泳

Fig. 7 Electrophoresis of salidroside on Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 proteins in HepG2 cells

MDA-MB-231 细胞的转移能力。李素云等^[26]研究发现,扶正抑癌方含药血清能通过上调 E-cadherin 表达和下调 N-cadherin 的表达,抑制 lovo 细胞的 EMT 转变,从而降低 lovo 细胞的侵袭力和运动能力。本研究通过划痕实验发现,红景天苷能抑制 HepG2 细胞的迁移。且通过蛋白免疫印迹法的结果表明,红景天苷可以通过上调 E-cadherin 的表达和下调 N-cadherin 的表达,增加细胞的黏附,抑制钙黏蛋白转化的发生,从而延缓 EMT 的发生,这与文献报道相符。Girdin 是 2005 年分别由日本、澳大利亚和美国的学者相继各自独立发现并报道的一种肌动蛋白细丝桥梁蛋白,它能够募集并联结、调控细胞内微丝,具有调控细胞侵袭、迁移及血管生成等功能。JIANG 等^[27]研究发现,通过特异性 RNA 抑制 MDA-MB-231、HeLa 和 A431 细胞中内源性 Girdin 的表达,细胞的迁移及侵袭能力也显著下降,说明这些肿瘤细胞在体外的定向迁移和侵袭过程需要 Girdin 的参与。CHENG 等^[28]研究发现,Stelletin B 能通过抑制 Akt/Girdin 信号通路和 Vegf

在胶质母细胞瘤细胞中发挥抗侵袭和抗血管生成作用。本研究发现,红景天苷能延缓 HepG2 细胞的侵袭力,同时红景天苷可以下调 Girdin 蛋白的表达。

抗癌的最终目的是为了抑制癌细胞的活力,并促进癌细胞凋亡,而线粒体作为细胞凋亡中最经典的途径之一。进一步的研究发现,有几种蛋白质可以通过线粒体途径来诱导细胞凋亡。Bax 是一种促凋亡蛋白,而 Bcl-2 是一种抗凋亡蛋白,两者主要黏附于线粒体的膜外,而当 Bax 和 Bcl-2 以异二聚体的形式结合时,就会影响线粒体膜的通透性来促进细胞色素 C 的释放,并通过其下游靶点中的 Apaf-1 与 Caspase-9 结合。而 Caspase-3 作为 Caspase-9 的下游成员,可以水解脱氧核糖核酸酶抑制剂(ICAD),从而释放 CAD,并通过某种方式进入细胞核内,引发核内的 DNA 降解、细胞骨架分离、核碎裂等现象,最终导致细胞凋亡^[29-30]。本研究首次通过多功能细胞分析仪观察到红景天苷能抑制 HepG2 细胞的增殖。通过流式细胞术发现,红景天苷能诱导 HepG2 细胞凋亡,并阻滞细胞于 G₂/M 期,且通过蛋白免疫印迹法的结果进一步表明,红景天苷可以下调 Bcl-2 蛋白的表达,上调 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白的表达。

综上,红景天苷对 HepG2 细胞的增殖、迁移及侵袭均具有抑制作用,且通过线粒体途径诱导 HepG2 细胞凋亡。上述实验为后续进一步研究红景天苷抗肝癌效应的相关分子机制提供了重要的实验依据。同时,也为应用红景天苷治疗临床肿瘤患者提供了新的理论指导与实验基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] FERLAY J, COLOMBET M, SOERJOMATARAM L, et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview [J]. *Int J Cancer*, 2021, 5(10): 335-340.

[2] IKEDA M, MORIZANE C, UENO M, et al. Chemotherapy for hepatocellular carcinoma: Current status and future perspectives [J]. *Jpn J Clin Oncol*, 48(2): 103-114.

[3] KUDO M. Targeted and immune therapies for hepatocellular carcinoma: Predictions for 2019 and beyond [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(7): 789-807.

[4] SHIN J W, CHUNG Y H. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: Current and future [J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(37): 6144-6155.

[5] MARIN J J G, HERRAEZ E, LOZANO E, et al. Models for understanding resistance to chemotherapy in liver cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1677-1680.

[6] 宗静静, 卿鑫, 樊哲, 等. 原发性肝癌治疗进展 [J]. *东南大学学报:医学版*, 2021, 40(4): 542-547.

[7] 李伟, 黄勤妮. 红景天属植物的研究及应用 [J]. *首都师范大学学报:自然科学版*, 2003(1): 55-59.

[8] PANOSSIN A, WIKMAN G, SARRIS J. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): Traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy [J]. *Phytomedicine*, 2010, 17(7): 481-493.

[9] UVAROV D, STEPANOVA A, VASILYEV P, et al. Complex dietary supplements from raw plants provide nutrition for athletes [J]. *Int J Biomed*, 2017, 7(1): 60-62.

[10] XIN T Y, LI X J, YAO H, et al. Survey of commercial *Rhodiola* products revealed species diversity and potential safety issues [J]. *Sci Rep*, 2015, 9(5): 8337-8339.

[11] 许可为, 吴虹. 红景天苷对内皮细胞动脉粥样硬化损伤的保护作用研究 [J]. *实用中西医结合临床*, 2015, 15(7): 92-93.

[12] 刘俊杰, 杨泽霖, 唐宇恒, 等. 红景天苷对永久性大脑中动脉闭塞模型大鼠的神经保护作用 [J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(8): 1063-1068.

[13] 杨泽霖, 黄鑫, 刘俊杰, 等. 红景天苷调控 PI3K/Akt 信号通路对 LPS 诱导的 BV2 小胶质细胞的抗炎作用 [J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(8): 1145-1149.

[14] 侯红平, 张广平, 高云航, 等. 红景天苷对慢性阻塞性肺疾病体外细胞模型的保护作用及抗氧化应激机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2020, 31(12): 1389-1393.

[15] 常娜, 王小平, 胥冰, 等. 红景天苷抗肿瘤机制的研究概况 [J]. *吉林中医药*, 2019, 39(10): 1391-1393.

[16] LI T, XU K, LIU Y F. Anticancer effect of salidroside reduces viability through autophagy/PI3K/Akt and MMP9 signaling pathways in human bladder cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2018, 16(3): 3162-3168.

[17] FAN X J, WANG Y, WANG L, et al. Salidroside induces apoptosis and autophagy in human colorectal cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Oncol Rep*, 2016, 36(6): 3559-3567.

[18] RONG, LI Z D, LENG X, et al. Salidroside induces apoptosis and protective autophagy in human gastric cancer AGS cells through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharm*, 2020, 122(12):

- 109-118.
- [19] KANG D Y, SQ N, KIM D H, et al. Salidroside inhibits migration, invasion and angiogenesis of MDAMB231 TNBC cells by regulating EGFR/Jak2/STAT3 signaling via MMP2 [J]. *Int J Oncol*, 2018, 53(2): 877-885.
- [20] REN M, XU W J, XU T. Salidroside represses proliferation, migration and invasion of human lung cancer cells through Akt and MEK/ERK signal pathway [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 1014-1021.
- [21] 胡帅航, 侯炜, 哈鹏, 等. 《神农本草经》中肿瘤治疗相关药物分析 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(6): 535-540.
- [22] WANG Y F, ZHOU B P. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer progression and metastasis [J]. *Chinese J Cancer*, 2011, 30(9): 603-611.
- [23] REINHOLD W C, REIMERS M A, LORENZI P, et al. Multifactorial regulation of E-cadherin expression: An integrative study [J]. *Mol Cancer Ther*, 2010, 9(1): 1-16.
- [24] 李素云, 周春仙, 卫洪昌. 扶正抑癌方含药血清对结肠癌 Lovo 细胞侵袭转移能力及 TGF- β_1 与 T β R II 蛋白表达的影响 [J]. *上海中医药大学学报*, 2010, 24(1): 68-71.
- [25] 许雷来, 郎雅丽, 谢璐帆, 等. 华蟾素注射液对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞 E-cad、N-cad 表达的影响 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2017, 27(2): 107-109, 112.
- [26] 李素云, 周春仙, 顾燕频, 等. 扶正抑癌方含药血清对结肠癌 lovo 细胞 E-cad、N-cad 和 Snail 蛋白表达的影响 [J]. *中国肿瘤*, 2011, 20(9): 690-693.
- [27] JIANG P, ENOMOTO A, JIJIWA M, et al. An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(5): 1310-1318.
- [28] CHENG S Y, CHEN N F, LIN P Y, et al. Anti-invasion and antiangiogenic effects of stelletin B through Inhibition of the Akt/Girdin signaling pathway and VEGF in glioblastoma cells [J]. *Cancers(Basel)*, 2019, 11(2): 220.
- [29] MOLEUR F L, CHABRE O, GUILLERMET C, et al. Graves-basedow disease goiter: A model of Bax-Bcl-2 regulated apoptosis [J]. *Thyroid*, 1999, 9(5): 483-492.
- [30] FAN T J, HAN L H, CONG R S, et al. Caspase family proteases and apoptosis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37(11): 719-727.

[责任编辑 张丰丰]