

佛手柑内酯通过 PI3K/Akt 信号通路诱导人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 凋亡的机制

赵丽萍, 王超, 田男, 范春雷*

(浙江中医药大学 生命科学学院, 杭州 310053)

[摘要] **目的:** 探究佛手柑内酯通过磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路诱导人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 凋亡的机制。**方法:** 设立佛手柑内酯 (5, 50, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组和空白组; 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测佛手柑内酯作用 HepG2 和 Hep3B 细胞 24, 48 h 细胞增殖; 磷脂结合蛋白 V/碘化丙啶 (Annexin V-FITC/PI) 双染检测细胞凋亡; 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (Real-time PCR) 及蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关 mRNA 和蛋白的表达含量; 进行平板细胞克隆形成实验评价各组 HepG2 和 Hep3B 细胞的克隆形成率与效果。**结果:** MTT 实验表明, 佛手柑内酯能明显抑制 HepG2 和 Hep3B 细胞的增殖活性, 且呈浓度依赖性; 流式细胞仪分析结果表明, 佛手柑内酯 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组作用于 HepG2 和 Hep3B 细胞 48 h, 有明显促凋亡作用 ($P < 0.05$); Western blot 结果显示, 佛手柑内酯可以上调半胱氨酸蛋白酶 (Caspase)-3, Caspase-8 蛋白表达量 ($P < 0.05$), 并且下调 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2), PI3K 蛋白表达 ($P < 0.05$); Real-time PCR 显示 PI3K, Akt mRNA 相对表达量降低 ($P < 0.05$); 平板细胞克隆形成实验的结果显示, 随着佛手柑内酯浓度的增加, 各组细胞克隆形成率呈递减趋势, 且佛手柑内酯 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组作用降低明显 ($P < 0.05$)。**结论:** 佛手柑内酯对人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 的增殖存在抑制作用, 其可能是通过 PI3K/Akt 信号通路诱导 HepG2 和 Hep3B 细胞的凋亡。

[关键词] 佛手柑内酯; 肝细胞癌; 磷脂酰肌醇-3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt); 凋亡; 信号通路

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)06-0073-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20200623

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20191212.1334.001.html>

[网络出版时间] 2019-12-13 09:08

Effect of Bergapten on Apoptosis of HepG2 and Hep3B Cells Through PI3K/Akt Pathway

ZHAO Li-ping, WANG Chao, TIAN Nan, FAN Chun-lei*

(College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of bergapten on the apoptosis of HepG2 and Hep3B cells through phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) pathway. **Method:** Bergapten (5, 50, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) groups and blank group were set up. The effect of bergapten at different concentrations on proliferation of HepG2 and Hep3B cells for 24, 48 h were detected by thiazolyl blue (MTT) assay. Apoptosis was detected by Annexin V-FITC/propidium iodide double staining. Quantitative real-time fluorescence reverse transcriptional polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot assay were used to detect relevant mRNA and proteins expressions. The clone formation rate and the effect of HepG2 and Hep3B cells in each group were evaluated by plate cell clone formation. **Result:** MTT assay showed that bergapten could significantly inhibit

[收稿日期] 20191202(010)

[基金项目] 浙江省自然科学基金项目 (LY14H290007)

[第一作者] 赵丽萍, 在读硕士, 从事中药抗动脉粥样硬化研究, E-mail: 18920903062@163.com

[通信作者] * 范春雷, 硕士, 教授, 从事中药抗动脉粥样硬化研究, Tel: 0571-86613723, E-mail: taijispear@126.com

the proliferation activity of HepG2 and Hep3B cells in a time-dependent manner. Flow cytometry analysis showed that bergapten in 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration groups had significant pro-apoptotic effect on HepG2 and Hep3B cells after 48 h ($P < 0.05$). Western blot results showed that bergamolactone could up-regulate the protein expressions of Caspase-3, Caspase-8 ($P < 0.05$), and down-regulate protein expressions of B-lymphocytoma-2 (Bcl-2), PI3K ($P < 0.05$). Real-time PCR results showed that mRNA expressions of PI3K and Akt were decreased ($P < 0.05$). The results of plate cell clone formation experiment showed that with the increase of the concentration of bergamolide, the cell clone formation rate of each group showed a decreasing trend, particularly in 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ concentration group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Bergapten can inhibit the proliferation of HepG2 and Hep3B cells, which may be induced through the PI3K/Akt signaling pathway.

[**Key words**] bergapten; hepatocellular carcinoma; phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt); apoptosis; signal pathway

肝细胞癌(HCC)是常见的人类恶性肿瘤,其在亚洲地区的发病率最高,而且5年生存率只有30%~40%^[1]。由于化疗药物易产生耐药性和化疗手术后具有高复发率,肝细胞癌的治疗效果并不理想^[2]。因此,寻找新的肝细胞癌靶向治疗药物已经成为目前研究的热点。佛手柑内酯为5-甲氧基补骨脂素,是一种补骨脂素或紫杉醇(又名为呋喃香豆素)的天然产物,具有催眠、抗炎、镇静和提高免疫力^[3-5]等作用,常见于佛手柑精油和其他柑橘精油中,更是中药蛇床子、白芷、北沙参及化橘红^[6]等主要有效成分之一,在自然界中广泛存在。相关报道表明,佛手柑内酯对乳腺癌^[7]、肺癌^[8]、白血病^[9]、鼻咽癌^[10]及前列腺癌^[11]等恶性肿瘤有明显的抑制作用,但对于肝细胞癌的治疗作用的研究报道较少。本课题组前期研究发现佛手柑内酯可以抑制肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 增殖。但是佛手柑内酯抑制肝癌细胞增殖的具体作用机制尚不明确。磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)通路是一条和肿瘤疾病密切相关的通路,在许多真核细胞的抑制凋亡过程中作用^[12]。本实验通过在人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 中给与不同浓度的佛手柑内酯进行干预,观察佛手柑内酯对人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 凋亡和对 PI3K/Akt 信号通路的影响,为佛手柑内酯作为抗肿瘤药物用于肝癌的治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞与试剂 人肝癌 HepG2 和 Hep3B 细胞购自中科院上海细胞所,传至第 15 代。佛手柑内酯(上海源叶生物技术有限公司,批号 20180223,纯度 $\geq 98\%$);二甲基乙砒,二甲基亚砒(DMSO),牛血清白蛋白(BSA)(上海源叶生物技术有限公司,批号分别为 20170103,20170204,20170213);胎牛血

清,0.25%胰酶,Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)凋亡试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司,批号分别为 20170409,20180923,20180514);trizol reagent(北京康为世纪生物有限公司,批号 30309);ReverTra Ace qPCR RT 试剂盒,SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒(日本 Toyobo 公司,批号分别为 451100,456500);B 淋巴细胞瘤-2 相关 X 蛋白(Bax),半胱氨酸蛋白酶(Caspase)-3, Caspase-8, B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),PI3K, Akt 一抗,辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白(Ig)G, β -肌动蛋白(β -actin)一抗(美国 Proteintech Group 公司,批号分别为 60268,60177,66471,66093,67072,60202,23661,10283);噻唑蓝(MTT,美国 Ameresco 公司,批号 3068B512);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(中国碧云天生物技术有限公司,批号 00171708)。

1.2 仪器 SpectraMax M3 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司),Guava EasyCyte 8 型微流式细胞分析仪(美国 EMD Millipore 公司),Q5000 型全自动化学发光成像分析系统(上海勤翔科学仪器有限公司),Powerpac 型凝胶电泳系统及转膜仪(美国 Bio-Rad 公司),IQ5 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 AB 公司),5427R 型低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司),3548S 型细胞培养箱(美国 Forma Sxientific 公司),DS-5M-L1 型倒置显微镜(日本尼康仪器有限公司),SW-CJ-IF 型层流超净工作台(苏州安泰空气技术公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 体外培养人肝癌 HepG2 和 Hep3B 细胞,以含 100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 青霉素,100 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 链霉素,10% FBS 的高糖培养液在 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 的条件下培养。2 种细胞贴壁生长,待细胞在对数生长期且细胞 70%~80% 进行传代,用 0.25% 胰蛋白酶 1 mL 消化

2 min, 加入完全培养基 1 mL 进行吹打细胞, 至细胞悬浮, 并以 1:4 进行传代 1 次, 然后将处于对数生长期的 HepG2 和 Hep3B 细胞, 进行实验。

2.2 分组 本实验 HepG2 和 Hep3B 各分为 4 组, 空白组使用完全培养基处理 48 h; 3 个加药组为加入 5, 50, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的佛手柑内酯处理 48 h。

2.3 MTT 比色检测细胞增殖 取处于对数生长期的 HepG2 和 Hep3B 细胞, 以 1×10^4 个/孔的细胞数接种于 96 孔细胞培养板; 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养, 在 24 h 细胞贴壁后, 分别加入预先配置好的含佛手柑内酯的溶液, Hep3B, HepG2 细胞分别加入 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 佛手柑内酯溶液, 每孔设置 4 个复孔, 分别处理 24, 48 h。后按说明书处理, 用多功能酶标仪于 450 nm 处测定吸光度 A 。抑制率 = $(1 - A_{\text{药物组}}/A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.4 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达 按 2.2 项分组及加药处理, 收集对数生长期各组 HepG2 和 Hep3B 细胞, 吸取弃去原培养基; 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 次, 然后裂解收集, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒定量测定蛋白浓度, 于上清液中加入为总体积量 1/4 的 5 \times loading buffer, 沸水浴 10 min, 冰浴 5 min。使用 SDS-PAGE 蛋白电泳系统, 以总蛋白 30 μg 为上样量, 转膜, 电转结束后, 用 5% 脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 30 min, TBST 漂洗 3 次每次 10 min, 加入稀释的一抗工作液 Bax (1:5 000), Bcl-2 (1:1 000), Caspase-3 (1:3 000), Caspase-8 (1:1 000), PI3K (1:5 000), Akt (1:5 000) 和 β -actin (1:5 000) 抗体中, 4 $^{\circ}\text{C}$ 放置过夜, TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入按说明书稀释的二抗 (均 1:2 000), 室温孵育 2 h, TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 加入 ECL 发光液, 置 Chemi Doc XRS + 成像系统中, 检测化学发光情况, 实验重复 3 次。条带采用 Image J 软件的光密度分析。

2.5 Annexin V-FITC/PI 检测细胞凋亡 取处于对数生长期的各组 HepG2 和 Hep3B 细胞, 消化细胞, 收集。冰上操作, 用预冷 PBS 洗 2 次, 每管再以 Binding buffer 500 μL 重悬细胞, 每管加入 FITC Annexin, PI 各 5 μL , 室温避光孵育 15 min, 在 1 h 内检测完毕。圈出主细胞群, 并对主细胞群作图分出 Annexin V-FITC 阳性, PI 阴性或阳性的凋亡细胞群 (B1, B2 与 B3 细胞群的和), 得到各组细胞的凋亡率。

2.6 细胞克隆形成实验检测克隆形成率 取处于对数生长期的各组 HepG2 和 Hep3B 细胞, 消化并吹打成单个细胞, 离心, 然后将细胞吹打悬浮。每皿

300 个细胞均匀接种含 2 mL 培养基的培养皿中, 待细胞贴壁后换成含 5, 50, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 佛手柑内酯的培养基。置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中 12 d。每 3 d 换液 1 次。经常观察各组细胞, 当生长成肉眼可见的克隆时, 停止培养。弃去上清液, 用 PBS 小心清洗 2 次。加 4% 多聚甲醛液 1 mL 固定细胞 15 min。弃去培养皿中的多聚甲醛, 加 GIMSA 染色液 1 mL 染 30 min, 用双蒸水缓慢地洗去染色液, 待干燥后, 拍照计数。克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数) $\times 100\%$ 。

2.7 实时荧光定量逆转录聚合酶链反应 (Real-time PCR) 检测各组 mRNA 相对表达量 取处于对数生长期的各组 HepG2 和 Hep3B 细胞, 消化细胞, 收集。采用 trizol reagent 进行总 RNA 提取。在 65 $^{\circ}\text{C}$, 5 min, 42 $^{\circ}\text{C}$, 60 min, 70 $^{\circ}\text{C}$, 5 min 条件下, 逆转录合成 cDNA, 在 95 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, 95 $^{\circ}\text{C}$, 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$, 30 s 的条件下进行 PCR 扩增, 共 40 个循环。PI3K (213 bp): 上游 5'-CATCACTTCCTCCTGCTCTAT-3' 下游 5'-CAGTTGTTGGCAATCTTCTTC-3'; Akt (110 bp): 上游 5'-GGACAACCGCCATCCAGACT-3' 下游 5'-GCCAGC GACCTCCATCTC-3'; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 143 bp): 上游 5'-ATGACAATGAATA TGGCTACAG-3', 下游 5'-CTCTTGCTCTCAGTATCC TT-3', 所有引物由生物工程 (上海) 股份有限公司合成。以 GAPDH 为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 mRNA 的相对表达量。

2.8 统计学处理 采用 GraphPad Prism 7 软件进行统计学处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组数据采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 佛手柑内酯对 HepG2 和 Hep3B 细胞增殖的影响 与空白组比较, 不同浓度的佛手柑内酯处理组抑制率明显上升, 并且浓度依赖性 ($P < 0.05$)。依据 MTT 比色法结果, 选取 5, 50, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 48 h 进行后续实验。见表 1。

3.2 佛手柑内酯对细胞 Bax, Bcl-2, Caspase-3, Caspase-8, PI3K, Akt 蛋白表达水平的影响 与空白组比较, 佛手柑内酯 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组能使 HepG2 和 Hep3B 细胞 Bax, Caspase-3 和 Caspase-8 蛋白表达水平明显上升, Bcl-2, PI3K 和 Akt 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。见图 1, 2 和表 2, 3。

3.3 佛手柑内酯对 HepG2 和 Hep3B 细胞凋亡的影响 与空白组比较, 佛手柑内酯 (5, 50, 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 组, 凋亡率上升 ($P < 0.05$), 且

200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 佛手柑内酯实验组凋亡率明显上升 ($P < 0.05$)。见表 4。

表 1 佛手柑内酯对 HepG2 和 Hep3B 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effect of bergamotide on HepG2 and Hep3B cells proliferation inhibition rate ($\bar{x} \pm s, n = 4$) %

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Hep3B | | HepG2 | |
|-------|---------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| | | 24 h | 48 h | 24 h | 48 h |
| 佛手柑内酯 | 5 | 2.11 \pm 1.31 ¹⁾ | 3.72 \pm 1.62 ¹⁾ | 0.72 \pm 0.29 ¹⁾ | 1.02 \pm 0.87 ¹⁾ |
| | 20 | 16.32 \pm 0.73 ¹⁾ | 18.23 \pm 0.72 ¹⁾ | 4.99 \pm 0.21 ¹⁾ | 8.58 \pm 0.53 ¹⁾ |
| | 40 | 25.62 \pm 0.92 ¹⁾ | 28.94 \pm 0.43 ¹⁾ | 12.94 \pm 0.41 ¹⁾ | 15.49 \pm 0.18 ¹⁾ |
| | 50 | 27.31 \pm 0.68 ¹⁾ | 32.82 \pm 0.47 ¹⁾ | 13.81 \pm 0.38 ¹⁾ | 16.14 \pm 0.52 ¹⁾ |
| | 60 | 29.86 \pm 0.87 ¹⁾ | 34.23 \pm 0.21 ¹⁾ | 15.50 \pm 0.34 ¹⁾ | 17.98 \pm 0.18 ¹⁾ |
| | 80 | 34.43 \pm 0.12 ¹⁾ | 40.17 \pm 0.13 ¹⁾ | 19.27 \pm 0.79 ¹⁾ | 27.32 \pm 0.19 ¹⁾ |
| | 100 | 42.78 \pm 0.31 ¹⁾ | 48.72 \pm 0.89 ¹⁾ | 23.90 \pm 0.96 ¹⁾ | 31.82 \pm 0.52 ¹⁾ |
| | 120 | 47.72 \pm 0.31 ¹⁾ | 51.89 \pm 0.51 ¹⁾ | 25.87 \pm 0.92 ¹⁾ | 34.72 \pm 0.13 ¹⁾ |
| | 140 | 49.33 \pm 0.71 ¹⁾ | 54.72 \pm 0.63 ¹⁾ | 30.31 \pm 0.29 ¹⁾ | 37.98 \pm 0.28 ¹⁾ |
| | 160 | 53.32 \pm 0.13 ¹⁾ | 58.78 \pm 0.46 ¹⁾ | 32.74 \pm 0.27 ¹⁾ | 40.21 \pm 0.86 ¹⁾ |
| | 180 | 56.32 \pm 0.14 ¹⁾ | 62.12 \pm 0.39 ¹⁾ | 35.58 \pm 0.33 ¹⁾ | 46.32 \pm 0.94 ¹⁾ |
| 200 | 58.93 \pm 0.23 ¹⁾ | 70.18 \pm 0.63 ¹⁾ | 38.36 \pm 0.54 ¹⁾ | 53.98 \pm 0.41 ¹⁾ | |

注: 设空白组增殖抑制率为 0; 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ (表 2~4 同)。

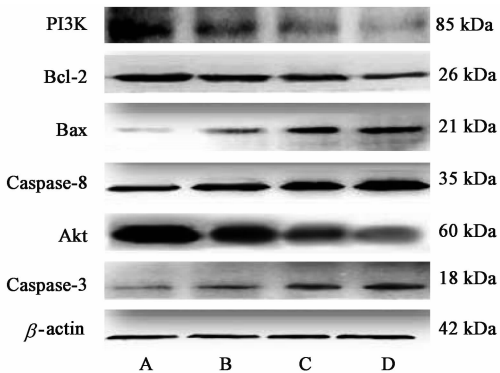


图 1 HepG2 细胞 Bax, Caspase-3, Caspase-8, Bcl-2, PI3K 和 Akt 蛋白电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Bax, Caspase-3, Caspase-8, Bcl-2, PI3K and Akt protein of HepG2

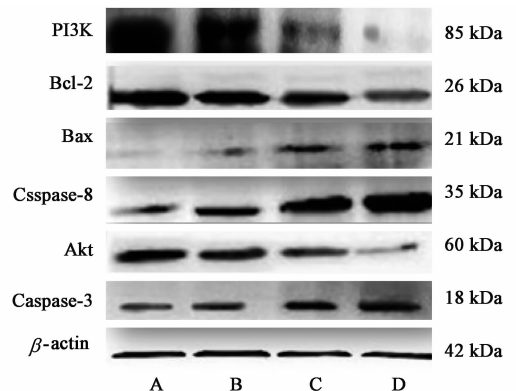


图 2 Hep3B 细胞 Bax, Caspase-3, Caspase-8, Bcl-2, PI3K, Akt 蛋白电泳

Fig. 2 Electrophoresis of Bax, Caspase-3, Caspase-8, Bcl-2, PI3K and Akt protein of Hep3B

表 2 佛手柑内酯对 HepG2 细胞 Bax, Caspase-3, Caspase-8, Bcl-2, PI3K, Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of bergamotide on expressions of Bax, Caspase-3, Caspase-8, Bcl-2, PI3K, Akt protein of HepG2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ | Caspase-3/ β -actin | Caspase-8/ β -actin | Bax/ β -actin | Bcl-2/ β -actin | PI3K/ β -actin | Akt/ β -actin |
|-------|---------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 空白 | - | 0.38 \pm 0.04 | 0.43 \pm 0.13 | 0.05 \pm 0.01 | 1.17 \pm 0.06 | 1.25 \pm 0.02 | 1.06 \pm 0.06 |
| 佛手柑内酯 | 5 | 0.58 \pm 0.02 ¹⁾ | 0.70 \pm 0.09 ¹⁾ | 0.33 \pm 0.13 | 0.91 \pm 0.14 ¹⁾ | 1.00 \pm 0.01 ¹⁾ | 0.80 \pm 0.10 |
| | 50 | 0.69 \pm 0.18 ¹⁾ | 0.79 \pm 0.04 ¹⁾ | 0.70 \pm 0.05 | 0.81 \pm 0.17 ¹⁾ | 0.43 \pm 0.08 ¹⁾ | 0.64 \pm 0.09 |
| | 200 | 0.86 \pm 0.03 ¹⁾ | 0.87 \pm 0.02 ¹⁾ | 0.81 \pm 0.09 ¹⁾ | 0.57 \pm 0.07 ¹⁾ | 0.11 \pm 0.03 ¹⁾ | 0.22 \pm 0.03 ¹⁾ |

3.4 佛手柑内酯对 HepG2 和 Hep3B 细胞各组细胞克隆率的影响 与空白组比较,佛手柑内酯(5,50,

200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组细胞克隆形成率均明显减少 ($P < 0.05$),且呈剂量依赖性。见图 3,表 5。

表 3 佛手柑内酯对 Hep3B 细胞中 Bax, Caspase-3, Caspase-8, Bcl-2, PI3K, Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of bergamotide on expressions of Bax, Caspase-3, Caspase-8, Bcl-2, PI3K, Akt protein of Hep3B ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Caspase-3/ β -actin | Caspase-8/ β -actin | Bax/ β -actin | Bcl-2/ β -actin | PI3K/ β -actin | Akt/ β -actin |
|-------|---|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 空白 | - | 0.36 ± 0.03 | 0.32 ± 0.11 | 0.09 ± 0.02 | 1.26 ± 0.05 | 1.25 ± 0.02 | 1.06 ± 0.06 |
| 佛手柑内酯 | 5 | 0.55 ± 0.06 ¹⁾ | 0.64 ± 0.08 ¹⁾ | 0.47 ± 0.07 ¹⁾ | 0.81 ± 0.11 ¹⁾ | 1.00 ± 0.01 ¹⁾ | 0.86 ± 0.10 ¹⁾ |
| | 50 | 0.76 ± 0.09 ¹⁾ | 0.73 ± 0.07 ¹⁾ | 0.69 ± 0.03 ¹⁾ | 0.82 ± 0.12 ¹⁾ | 0.47 ± 0.08 ¹⁾ | 0.63 ± 0.09 ¹⁾ |
| | 200 | 0.92 ± 0.02 ¹⁾ | 0.93 ± 0.01 ¹⁾ | 0.86 ± 0.04 ¹⁾ | 0.51 ± 0.07 ¹⁾ | 0.18 ± 0.03 ¹⁾ | 0.21 ± 0.03 ¹⁾ |

表 4 佛手柑内酯对 HepG2 和 Hep3 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of bergamotide on apoptosis of HepG2 and Hep3B ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Hep3B | HepG2 |
|-------|---|---------------------------|---------------------------|
| 空白 | - | 3.2 ± 0.83 | 3.1 ± 0.71 |
| 佛手柑内酯 | 5 | 7.3 ± 1.20 ¹⁾ | 5.8 ± 0.97 ¹⁾ |
| | 50 | 17.7 ± 0.72 ¹⁾ | 13.2 ± 1.01 ¹⁾ |
| | 200 | 32.8 ± 0.97 ¹⁾ | 26.4 ± 0.76 ¹⁾ |

表 5 佛手柑内酯对细胞克隆形成率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of bergamotide on clone formation rate of each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Hep3B | HepG2 |
|-------|---|----------------------------|----------------------------|
| 佛手柑内酯 | 5 | 71.54 ± 1.32 ¹⁾ | 78.34 ± 3.14 ¹⁾ |
| | 50 | 44.24 ± 3.27 ¹⁾ | 52.83 ± 1.58 ¹⁾ |
| | 200 | 9.92 ± 3.02 ¹⁾ | 16.06 ± 6.12 ¹⁾ |

注: 设空白组克隆形成率为 100%。

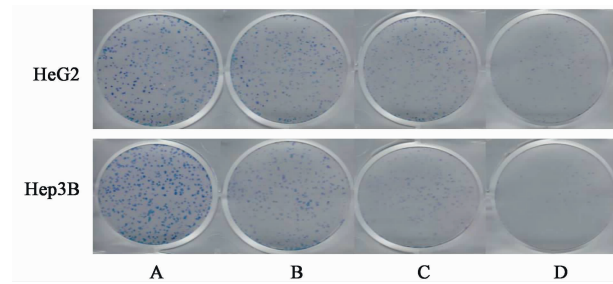


图 3 平板克隆形成实验检测各组细胞克隆形成能力

Fig. 3 Clone formation ability of each group by plate clone foemation experiment

表 6 佛手柑内酯对各组 mRNA 相对表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of bergamotide on relative mRNA expressions of each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

| 组别 | 浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | Hep3B | | HepG2 | |
|-------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | | PI3K | Akt | PI3K | Akt |
| 空白 | - | 1.112 ± 0.043 | 1.050 ± 0.028 | 1.210 ± 0.042 | 1.237 ± 0.014 |
| 佛手柑内酯 | 5 | 1.001 ± 0.042 ¹⁾ | 1.003 ± 0.027 ¹⁾ | 1.107 ± 0.032 ¹⁾ | 1.039 ± 0.029 ¹⁾ |
| | 50 | 0.783 ± 0.029 ¹⁾ | 0.873 ± 0.034 ¹⁾ | 0.835 ± 0.043 ¹⁾ | 0.813 ± 0.023 ¹⁾ |
| | 200 | 0.436 ± 0.013 ¹⁾ | 0.513 ± 0.044 ¹⁾ | 0.725 ± 0.024 ¹⁾ | 0.663 ± 0.017 ¹⁾ |

具有抗炎抗肿瘤的作用效果, 因其不同的药理特性而引起了广泛的关注^[15]。

本研究通过 MTT 比色法表明佛手柑内酯对肝癌细胞有明显的抑制作用, 于是通过平板细胞克隆形成实验和 Annexin V-FITC/PI 双染法中进一步验证, 并且可以得到 Hep3B 细胞对佛手柑内酯更加敏感; Western blot 检测各蛋白的变化, 发现 PI3K, Akt 蛋白相对表达量下降; PCR 具体分析检测 HepG2 和

3.5 佛手柑内酯对 HepG2 和 Hep3B 细胞 PI3K, Akt mRNA 相对表达量的影响 与空白组比较, 佛手柑内酯(5, 50, 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 组细胞中 PI3K, Akt mRNA 表达均明显下调 ($P < 0.05$)。见表 6。

4 讨论

肝癌在中医中属于“癥积”“鼓胀”“伏梁”等^[13]。起病初, 常为气滞血瘀、肝阳上亢; 日久气郁化火, 湿热内生, 导致火热内蕴; 病入晚期, 邪毒耗伤气血致阴阳两虚等^[14]。佛手柑内酯属于黄酮类,

Hep3B 细胞中 PI3K, Akt mRNA 相对表达量, 结果表明细胞中 PI3K, Akt mRNA 相对表达量降低。

异常激活的 PI3K/Akt 信号通路在肿瘤信号传导过程起重要作用。有研究报道, 激活的 PI3K 蛋白可以使已经耐药的肿瘤细胞对化疗药物重新敏感, Akt 在 PI3K 信号传导中起关键作用, 其中 Akt 的磷酸化可以阻滞或活化多个信号的传导, 其中 Bcl-2/Bax 通路蛋白在细胞凋亡中起枢纽作用^[16]。

本实验结果发现佛手柑内酯可以明显降低 PI3K 和 Akt 水平,还抑制了 Bcl-2 蛋白的表达,促使了 Bax 蛋白的表达。于是,佛手柑内酯可以通过 PI3K/Akt 信号通路诱导人肝癌细胞 HepG2 和 Hep3B 凋亡的机制。

综上,佛手柑内酯能够抑制人肝癌细胞的增殖,诱导其凋亡,作用机制可能是抑制 PI3K/Akt 信号通路的活化有关。因此,推测佛手柑内酯可能是一种对于细胞癌的治疗具有积极作用的潜在天然小分子药物,为临床上治疗肝细胞癌提供一定的实验依据。

[参考文献]

[1] 赵文昊,刘雪莲,李宏伟,等.原发性肝癌的营养代谢特点及意义[J].临床肝胆病杂志,2019,35(4):905-907.

[2] 艾望,夏玉坤,王秀萍,等.原发性肝癌中医药治疗研究进展[J].辽宁中医药大学学报,2018,20(3):133-136.

[3] 李红波,杨勇.孙思邈治疗肝脏相关病症方药运用特色[J].中医学报,2018,33(1):88-90.

[4] 吴孝雄,吴申,陈挺松.肝脏癌邪及其临床应用[J].中医临床研究,2017,9(12):118-121.

[5] 耿丹丹,赵博,王建华.佛手柑内酯对大鼠成骨细胞增殖与分化的影响[J].天然产物研究与开发,2017,29(9):1563-1567.

[6] 贾恺宁,朱英.从肾论治原发性肝癌[J].时珍国医国药,2017,28(4):932-934.

[7] 丁燕,傅友,单兰兰,等.佛手柑内酯对双氧水诱导人脐静脉内皮细胞衰老的影响[J].中国组织工程研

究,2016,20(46):6885-6892.

[8] 黄雪涛,陈泰华,祁敏倪,等.佛手柑内酯抑制肺癌细胞分泌可溶性白细胞介素 2 受体[J].中华临床医师杂志:电子版,2016,10(11):1567-1573.

[9] 林碧华,马晓娟,万树伟,等.佛手柑内酯对鼻咽癌细胞凋亡的影响[J].肿瘤防治研究,2014,41(11):1163-1170.

[10] 林碧华,万树伟,刘付梅,等.佛手柑内酯对鼻咽癌细胞周期的影响[J].中国药理学杂志,2014,49(10):837-842.

[11] 董芳,刘汉柱,孙阳,等.北沙参中佛手柑内酯的分离鉴定及体外抗肿瘤活性的初步测定[J].植物资源与环境学报,2010,19(1):95-96.

[12] 刘大江,杨媛,刘畅,等.双酚 A 激活 PI3K/Akt 通路促进子宫内癌膜细胞增殖的研究[J].国际妇产科学杂志,2019,46(3):259-262.

[13] 吴林斌,吴元肇,李晓丹,等.连翘苷经 PI3K/Akt 信号通路干预肾细胞癌的机制研究[J].中草药,2019,50(10):2377-2382.

[14] 刚小青,吴衡慧,周文磊.白桦脂醇通过抑制 PI3K/Akt 途径抑制宫颈癌小鼠移植瘤增殖[J].中国免疫学杂志,2019,35(10):1227-1231.

[15] 周珍,刘少平,周朗,等.黄芩素通过 PI3K/Akt 通路增强三氧化二砷对肝癌细胞的促凋亡作用[J].现代肿瘤医学,2019,27(10):1661-1668.

[16] 陈奕涵,张燕堂.PI3K/Akt 信号通路在中药治疗肝癌过程中的研究进展[J].临床医药文献电子杂志,2018,5(7):179-182.

[责任编辑 张丰丰]