

山茱萸多糖通过上调 Klotho 表达和抑制 PI3K/AKT 通路对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响

李媛¹, 孙锁锋^{2*}

1. 河南中医药大学第三附属医院, 河南 郑州 450003

2. 河南省人民医院 郑州大学人民医院 河南大学临床医学院 消化内科, 河南 郑州 450003

摘要:目的 探究山茱萸多糖通过上调 Klotho 表达和抑制 PI3K/AKT 通路对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响。方法 分别以 6.25、12.5、25 mg/mL 山茱萸多糖作用于人肝癌细胞株 HepG2, CCK8 法检测细胞增殖能力, 采用 Hoechst 33258 荧光染色以及流式 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡率;通过免疫印迹法检测增殖相关蛋白 Ki67、凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 以及 PI3K/Akt 通路相关蛋白水平, 并检测 Klotho 蛋白表达水平。结果 与对照组相比, 6.25、12.5、25 mg/mL 山茱萸多糖组 HepG2 细胞克隆形成数显著下降 ($P < 0.05$), 且随山茱萸多糖浓度升高克隆形成数显著下降;与对照组相比, 6.25、12.5、25 mg/mL 山茱萸多糖组 HepG2 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), 且随山茱萸多糖浓度升高细胞凋亡率逐渐升高 ($P < 0.05$);与对照组相比, 6.25、12.5、25 mg/mL 山茱萸多糖组 HepG2 细胞中 Bax、cleaved-caspase-3、Klotho 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Ki67、Bcl-2、p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达下降 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性。结论 山茱萸多糖可能通过上调 Klotho 表达抑制 PI3K/AKT 通路活化, 抑制 HepG2 细胞增殖, 促进 HepG2 细胞凋亡。

关键词: 山茱萸多糖; 肝癌; 增殖; 凋亡; HepG2; Klotho; 磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-5515(2019)10-2887-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2019.10.002

Effect of *Cornus officinalis* polysaccharide on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by up-regulating Klotho expression and inhibiting PI3K/ AKT pathway

LI Yuan¹, SUN Suo-feng²

1. Third Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450003, China

2. Department of Gastroenterology, Henan People's Hospital, Zhengzhou University People's Hospital, Henan University Clinical Medical College, Zhengzhou 450003, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Cornus officinalis* polysaccharide on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by up-regulating Klotho expression and inhibiting PI3K/AKT pathway. **Methods** *Cornus officinalis* polysaccharide at the concentrations of 6.25, 12.5, and 25 mg/mL were used to treat human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. CCK8 assay was used to detect cell proliferation. Hoechst 33258 fluorescence staining and Annexin V-FITC/PI double staining were used to detect the apoptotic rate, and the levels of proliferation-related protein Ki67, apoptosis-related protein Bax, Bcl-2, Caspase-3, and PI3K/Akt pathway-related protein were detected by Western blotting, and the expression of Klotho protein was detected. **Results** Compared with the control group, the numbers of HepG2 cell clone in 6.25, 12.5, and 25 mg/mL *Cornus officinalis* polysaccharide groups decreased significantly ($P < 0.05$), and the number of clones decreased significantly with the increase of *Cornus officinalis* polysaccharide ($P < 0.05$). Compared with the control group, the apoptotic rate in 6.25, 12.5, and 25 mg/mL *Cornus officinalis* polysaccharide groups increased significantly ($P < 0.05$), and the apoptotic rate increased significantly with the increase of *Cornus officinalis* polysaccharide ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expressions of Bax, cleaved-Caspase-3, and Klotho in

收稿日期: 2019-07-05

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题 (2019ZY2008); 河南中医药大学博士科研基金项目 (BSJJ2018-22)

作者简介: 李媛, 主治医师, 博士, 从事中医药治疗肝胆脾胃相关疾病。E-mail: yuanli0602@163.com

*通信作者 孙锁锋, 助理研究员, 博士, 从事乙型肝炎发病机制及诊治新靶点研究。

HepG2 cells of 6.25, 12.5, and 25 mg/mL *Cornus officinalis* polysaccharide groups increased significantly ($P < 0.05$), but the expressions of Ki67, Bcl-2, p-PI3K/PI3K, and p-Akt/Akt decreased significantly ($P < 0.05$), and they had the dose-dependent. **Conclusion** *Cornus officinalis* polysaccharide may inhibit the activation of PI3K/AKT pathway, inhibit the proliferation of HepG2 cells, and promote the apoptosis of HepG2 cells by up-regulating the expression of Klotho.

Key words: *Cornus officinalis* polysaccharide; liver cancer; proliferation; apoptosis; HepG2; Klotho; PI3K/AKT

肝癌是常见的危害极大的恶性肿瘤,分为原发性与继发性,其中原发性较为常见^[1]。临床上放化疗是治疗肝癌的常见手段,但化疗药物耐药性与毒副作用阻碍药物长期应用,因此在中药中寻找疗效显著且毒副作用小的抗肿瘤药物具有临床价值。山茱萸多糖是山茱萸 *Cornus officinalis* Sieb. et Zucc. 干燥果肉中活性物质的重要成分,抗氧化、抗衰老作用较强,并发挥增强机体免疫功能作用。研究表明山茱萸多糖在抗肺癌、乳腺癌功效显著,可抑制肺癌细胞生长转移,调节细胞增殖、凋亡相关基因表达,提高肿瘤抗原表达^[2-3]。Klotho 是一种衰老抑制基因,研究显示肝癌组织中 Klotho 高表达,与肝癌的发生、病理分期、预后密切相关,是药物治疗肿瘤的潜在靶点^[4-5],因此本研究通过分析不同浓度山茱萸多糖对体外肝癌细胞 HepG2 细胞增殖、凋亡以及 Klotho 蛋白的影响,旨在探讨山茱萸多糖抗肝脏恶性肿瘤的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞株来源、试剂和仪器

肝癌细胞株 HepG2 细胞购自中国科学院细胞库;山茱萸多糖由河南农业大学生命科学园提供,质量分数为 69.72%,试验前制成 50 mg/mL 溶液,灭菌保存;注射用环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司,产品批号 32020856,规格 0.1 g/支);RPMI-1640 培养基、10%胎牛血清、胰酶购自 Thermo Hyclone 公司;CCK8 相关试剂购于美国 Sigama 公司;鼠抗人 Klotho、Ki67、Bax、cleaved-Caspase-3、Bcl-2、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt、GAPDH 一抗以及二抗(辣根过氧化物酶标记羊抗鼠 IgG)均购自美国 Santa Cruz 公司;BCA 蛋白检测试剂盒、AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;ECL 化学发光试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;CO₂ 培养箱购自美国 Bio-Red 公司。

1.2 细胞培养

取出冻存 HepG2 细胞系快速解冻后,添加 PBS 洗涤,置于离心机内 3 000 r/min 离心 10 min 弃上清,

添加含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素-链霉素的 RPMI1640 培养基 4 mL,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,待细胞融合至 80%时,去除上清液,添加 PBS 溶液洗涤细胞,并添加 0.2%胰酶消化后加入培养基传代培养,3 代后进行后续实验。

1.3 山茱萸多糖对 HepG2 细胞增殖的影响

取对数期 HepG2 细胞,密度调整至 1×10^4 个/mL 并接种于 96 孔板中,加入终浓度分别为 0、3.12、6.25、12.5、25、50 mg/mL 山茱萸多糖试剂继续培养,每组设置 6 个复孔。分别培养 0、24、48、72 h 后,采用 CCK-8 法检测 HepG2 细胞生长情况,并计算细胞增殖抑制率,实验重复 3 次,取平均值。

1.4 平板克隆法检测山茱萸多糖对 HepG2 克隆细胞数的影响

取对数期 HepG2 细胞分为对照组,6.25、12.5、25 mg/mL 山茱萸多糖组和 30 μ mol/L 环磷酰胺组。采用平板克隆法检测山茱萸多糖对 HepG2 增殖的影响,每组设 6 个重复,实验重复 3 次,取平均值。

1.5 Hoechst 33258 荧光染色法检测山茱萸多糖对 HepG2 细胞形态的影响

收集 1.4 项中各组细胞,按照 Hoechst 33258 荧光染色法说明进行操作,置于荧光显微镜下观察并拍照。在 340 nm 激发光下,活细胞呈均匀弥散蓝色荧光,凋亡细胞核或细胞质内可见致密浓染的颗粒块状荧光。

1.6 流式 AnnexinV-FITC/PI 双染法检测山茱萸多糖对 HepG2 细胞凋亡的影响

取 1.4 项中各组细胞,严格按照 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒说明书,胰酶消化细胞后生理盐水洗涤后制成 1×10^6 个/mL 单细胞悬液,取其中 100 μ L 加入 5 μ L AnnexinV-FITC 与 5 μ L PI 混合均匀,室温避光孵育 15 min,上流式细胞仪进行检测,并通过 Modfir LT 软件分析试验结果。每组设 6 个重复,实验重复 3 次,取平均值。

1.7 免疫印迹法检测山茱萸多糖对 Klotho、增殖、凋亡相关蛋白以及 PI3K/AKT 通路相关蛋白表达

取 1.4 项中各组细胞,裂解后通过蛋白提取试

剂盒提取细胞总蛋白, BCA 试剂盒测定细胞总蛋白浓度, 经电泳、转膜、封闭后, 添加 (1:500) 鼠抗人 Klotho、Ki67、Bax、cleaved-Caspase-3、Bcl-2、p-PI3K、PI3K、p-Akt、Akt 一抗, 以 GAPDH 为内参, 4 ℃ 过夜后, 添加二抗稀释液孵育 2 h, ECL 显色后, 于凝胶成像仪中观察蛋白表达并保存图像。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 22.0 进行数据分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 描述。若方差齐, 两组数据的组间比较采用独立样本 t 检验, 组内比较采用配对样本 t 检验; 若方差不齐, 两组数据比较采用 Mann-Whitney U 检验, 多组数据比较则采用 Kruskal-Wallis H 检验。

2 结果

2.1 山茱萸多糖对 HepG2 细胞增殖的影响

不同浓度山茱萸多糖均对 HepG2 细胞有良好的杀伤作用, 呈剂量、时间相关性。当山茱萸多糖浓度为 50 mg/mL 时, 增殖抑制率高达 89.72%, 另外, 48、72 h 各浓度山茱萸多糖对 HepG2 细胞增殖抑制率与 24 h 组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 48、72 h 组比较差异无统计学意义, 因此后续试验选取山茱萸多糖 6.25、12.5、25 mg/mL 处理 48 h。见表 1。

表 1 山茱萸多糖对 HepG2 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)
Table 1 Effect of cornus officinalis polysaccharide on proliferation of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂 量/ (mg mL ⁻¹)	抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	0	0	0
山茱萸多糖	3.12	7.05 ± 1.16	19.56 ± 2.28*	21.43 ± 2.72*
	6.25	12.56 ± 1.47	32.38 ± 4.16*	39.28 ± 4.54*
	12.5	12.91 ± 1.52	42.25 ± 4.73*	43.51 ± 4.72*
	25	12.97 ± 1.54	48.61 ± 5.39*	50.36 ± 6.95*
	50	13.72 ± 1.65	87.27 ± 9.85*	89.72 ± 10.37*

与对照组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

2.2 山茱萸多糖对 HepG2 细胞克隆细胞数的影响

与对照组比较, 山茱萸多糖 6.25、12.5、25 mg/mL 组克隆形成数显著下降 ($P < 0.05$); 随着山茱萸浓度的升高, 克隆形成数显著下降, 两两比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 山茱萸浓度为 25 mg/mL 时, 克隆形成数与注射用环磷酰胺组比较差异无统计学意义, 见表 2。

表 2 山茱萸多糖对 HepG2 细胞克隆细胞数的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 2 Effect of Cornus officinalis polysaccharide on clone cell number of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg mL ⁻¹)	克隆细胞数
对照	—	139.15 ± 17.72
注射用环磷酰胺	30 μmol L ⁻¹	34.97 ± 5.11*
山茱萸多糖	6.25	129.64 ± 11.52*
	12.5	72.55 ± 12.71**
	25	35.30 ± 5.86**▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与山茱萸多糖 6.25 mg mL⁻¹ 组比较:

** $P < 0.05$; 与山茱萸多糖 12.5 mg mL⁻¹ 组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; ** $P < 0.05$ vs Cornus officinalis polysaccharide 6.25 mg mL⁻¹ group; ▲ $P < 0.05$ vs Cornus officinalis polysaccharide 12.5 mg mL⁻¹ group

2.3 山茱萸多糖对 HepG2 细胞形态的影响

对照组细胞呈圆形或椭圆形, 细胞核完整, 边缘清晰, 染料未进入细胞。山茱萸多糖 6.25、12.5、25 mg/mL 组、注射用环磷酰胺组细胞密度减少, 呈亮绿色荧光团块, 细胞正常形态被破坏, 细胞碎裂。见图 1。

2.4 山茱萸多糖对 HepG2 细胞凋亡的影响

与对照组相比, 山茱萸多糖 6.25、12.5、25 mg/mL 组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$)。与山茱萸多糖 6.25、12.5 mg/mL 组比较, 山茱萸多糖 25 mg/mL 组的细胞凋亡率升高 ($P < 0.05$); 且山茱萸多糖 25 mg/mL 组的细胞凋亡率接近于注射用环磷酰胺组, 见表 3。

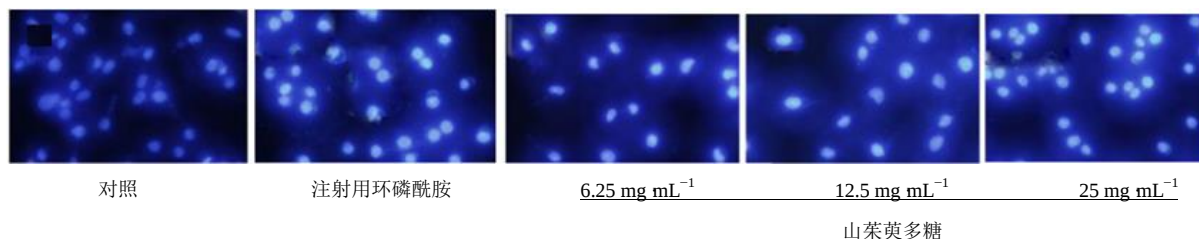


图 1 山茱萸多糖对 HepG2 细胞形态的影响

Fig. 1 Effect of cornus officinalis polysaccharide on morphology of HepG2 cells

表 3 山茱萸多糖对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 3 Effect of *Cornus officinalis* polysaccharide on apoptosis of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg mL ⁻¹)	早期凋亡率/%	晚期凋亡率/%	细胞凋亡率/%
对照	—	4.3±0.8	0.3±0.06	4.6±0.9
注射用环磷酰胺	30 μmol L ⁻¹	10.8±2.2*	7.7±1.5*	21.3±4.3
山茱萸多糖	6.25	7.8±0.9*	9.0±1.8*	15.5±3.1*
	12.5	8.2±1.6*	9.9±1.9*	17.2±3.4*
	25	10.2±2.1* [#] ▲	7.7±1.5* [#] ▲	20.1±4.0* [#] ▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与山茱萸多糖 6.25 mg mL⁻¹ 组比较: [#] $P < 0.05$; 与山茱萸多糖 12.5 mg mL⁻¹ 组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs *Cornus officinalis* polysaccharide 6.25 mg mL⁻¹ group; ▲ $P < 0.05$ vs *Cornus officinalis* polysaccharide 12.5 mg mL⁻¹ group

2.5 山茱萸多糖对 HepG2 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达的影响

与对照组相比, 山茱萸多糖组 Bax、cleaved-caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), Ki67、Bcl-2 蛋白表达下降 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性; 山茱萸多糖 25 mg/mL 组的 Bax、cleaved-caspase-3、Ki67、Bcl-2 蛋白表达与注射用环磷酰胺组比较差异无统计学意义。见图 2、表 4。

2.6 山茱萸多糖对 HepG2 细胞中 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

与对照组相比, 山茱萸多糖组 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 且随山茱萸多糖浓度升高依次下降, 两两比较差异均有统计学意义。

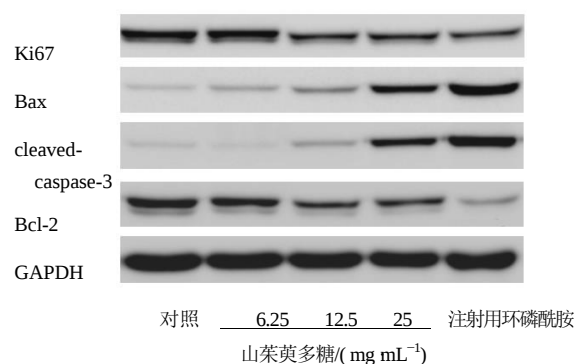


图 2 山茱萸多糖对 HepG2 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of *Cornus officinalis* polysaccharide on proliferation and apoptosis-related proteins of HepG2 cells

表 4 山茱萸多糖对 HepG2 细胞增殖、凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 4 Effect of *Cornus officinalis* polysaccharide on proliferation and apoptosis-related proteins of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg mL ⁻¹)	蛋白表达水平			
		Ki67	Bax	cleaved-caspase-3	Bcl-2
对照	—	1.05±0.21	0.21±0.04	0.17±0.03	0.95±0.19
注射用环磷酰胺	30 μmol L ⁻¹	0.37±0.07*	0.54±0.10*	0.40±0.08*	0.23±0.04*
山茱萸多糖	6.25	0.94±0.18*	0.24±0.05*	0.19±0.04*	0.91±0.18*
	12.5	0.81±0.16*	0.37±0.07* [#]	0.25±0.05* [#]	0.60±0.12* [#]
	25	0.42±0.08* [#] ▲	0.51±0.10* [#] ▲	0.39±0.08* [#] ▲	0.25±0.05* [#] ▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与山茱萸多糖 6.25 mg mL⁻¹ 组比较: [#] $P < 0.05$; 与山茱萸多糖 12.5 mg mL⁻¹ 组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ vs *Cornus officinalis* polysaccharide 6.25 mg mL⁻¹ group; ▲ $P < 0.05$ vs *Cornus officinalis* polysaccharide 12.5 mg mL⁻¹ group

义 ($P < 0.05$); 山茱萸多糖 25 mg/mL 组的 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 蛋白表达与注射用环磷酰胺组比较差异无统计学意义。见图 3、表 5。

2.7 山茱萸多糖对 HepG2 细胞中 Klotho 蛋白表达的影响

与对照组相比, 山茱萸多糖组 Klotho 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), 且呈剂量相关性; 山茱萸多糖 25 mg/mL

组的时 Klotho 蛋白表达与注射用环磷酰胺组比较差异无统计学意义。见图 4、表 6。

3 讨论

肝癌是我国高发的危害极大的恶性肿瘤, 随着环境变化、生存压力增大, 发病率逐年增加。肝癌发生的确切分子机制尚不清楚, 多认为是多因素、多步骤过程。放化疗治疗在肝癌治疗过程中发挥重

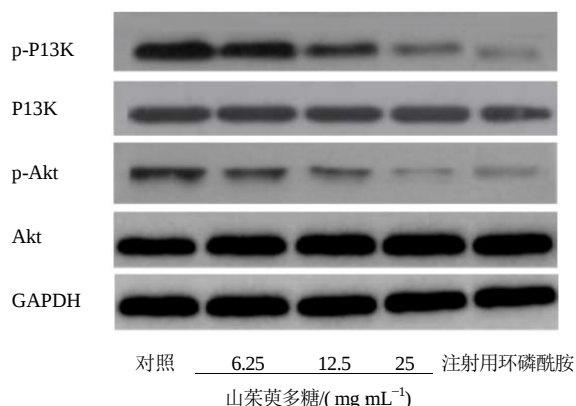


图 3 山茱萸多糖对 HepG2 细胞中 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of *Cornus officinalis* polysaccharide on PI3K/Akt pathway-related proteins of HepG2 cells

表 5 山茱萸多糖对 HepG2 细胞中 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 5 Effect of *Cornus officinalis* polysaccharide on PI3K/Akt pathway-related proteins of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂 量/ (mg mL ⁻¹)	蛋白表达水平	
		p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt
对照	—	1.05 ± 0.21	0.81 ± 0.16
注射用环磷酸胺	30 μmol L ⁻¹	0.42 ± 0.08	0.21 ± 0.04
山茱萸多糖	6.25	0.95 ± 0.19*	0.76 ± 0.15*
	12.5	0.86 ± 0.17*	0.52 ± 0.10**
	25	0.40 ± 0.05**▲	0.23 ± 0.05**▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与山茱萸多糖 6.25 mg mL⁻¹ 组比较:

$P < 0.05$; 与山茱萸多糖 12.5 mg mL⁻¹ 组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs *Cornus officinalis* polysaccharide 6.25 mg mL⁻¹ group; ▲ $P < 0.05$ vs *Cornus officinalis* polysaccharide 12.5 mg mL⁻¹ group

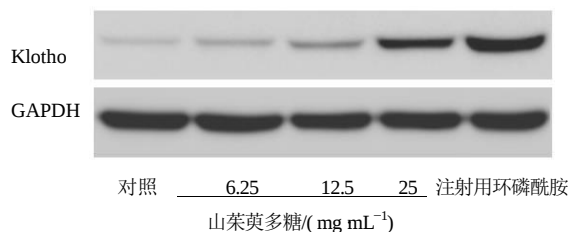


图 4 山茱萸多糖对 HepG2 细胞中 Klotho 蛋白表达的影响
Fig. 4 Effect of *Cornus officinalis* polysaccharide on Klotho proteins of HepG2 cells

要作用, 但放化疗药物毒副作用较大, 且易形成耐药性, 影响化疗效果。多糖具有抗肿瘤、抗氧化等

表 6 山茱萸多糖对 HepG2 细胞中 Klotho 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 6 Effect of *Cornus officinalis* polysaccharide on Klotho proteins of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(mg mL ⁻¹)	Klotho 蛋白表达水平
对照	—	0.09 ± 0.03
注射用环磷酸胺	30 μmol L ⁻¹	0.51 ± 0.10
山茱萸多糖	6.25	0.14 ± 0.05*
	12.5	0.29 ± 0.06**
	25	0.59 ± 0.11**▲

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与山茱萸多糖 6.25 mg mL⁻¹ 组比较:

$P < 0.05$; 与山茱萸多糖 12.5 mg mL⁻¹ 组比较: ▲ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs *Cornus officinalis* polysaccharide 6.25 mg mL⁻¹ group; ▲ $P < 0.05$ vs *Cornus officinalis* polysaccharide 12.5 mg mL⁻¹ group

生理活性, 近年发现山茱萸多糖在宫颈癌、肺癌中具有抗肿瘤作用^[6-7]。但山茱萸多糖对肝癌的作用尚不清楚, 因此本研究采用山茱萸多糖作用肝癌细胞 HepG2, 观察对肝癌细胞增殖、凋亡的影响, 并探讨可能作用机制。

本研究发现 6.25、12.5、25 mg/mL 山茱萸多糖作用于肝癌细胞株 HepG2 时, 细胞增殖抑制率显著升高, 提示山茱萸多糖可抑制肝癌 HepG2 细胞增殖, 且随山茱萸多糖浓度的增加, 对肝癌细胞的增殖抑制率升高。平板克隆试验是测定细胞增殖能力的有效方法之一, 本研究显示, 与对照组比较, 各浓度山茱萸多糖处理后克隆细胞数均显著降低, 且随山茱萸多糖浓度增高而依次降低, 同时, 增殖相关蛋白 Ki67 也随山茱萸多糖浓度增高而降低, 提示山茱萸多糖可抑制肝癌细胞 HepG2 增殖, 呈剂量相关效应。细胞凋亡在肿瘤的进展中发挥重要作用, 本研究发现各浓度山茱萸多糖处理后, 细胞核呈致密浓染状态的 HepG2 细胞数显著增加, HepG2 细胞凋亡率显著升高, 呈浓度相关效应, 其中 25 mg/mL 山茱萸多糖对 HepG2 细胞凋亡率的影响与阳性对照相当, 提示山茱萸多糖可诱导 HepG2 细胞凋亡。进一步研究发现, 山茱萸多糖处理组促凋亡相关蛋白 Bax、凋亡执行蛋白 cleaved-Caspase3 表达增加, 抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达下降, 提示山茱萸多糖可促进 HepG2 细胞中促凋亡相关蛋白表达, 抑制抑凋亡相关蛋白表达^[8]。

Klotho 是一种衰老抑制基因, 于 1997 年被首次分离鉴定, 定位于人 13q12 染色体, 编码蛋白具

有多种生物学功能,在血、尿、脑脊液中均可检测到^[9-10]。Mao等^[11]研究表明肝癌患者癌组织中 Klotho 低表达,且与肝癌患者临床病理特征及预后密切相关。Vargas等^[12]研究表明 Klotho 过表达可促进肝恶性肿瘤增殖、侵袭过程。本研究发现,各浓度山茱萸多糖处理后,HepG2 细胞中 Klotho 蛋白表达水平显著升高,且随山茱萸多糖浓度增加而升高,提示山茱萸多糖可剂量相关地促进 HepG2 细胞中 Klotho 蛋白表达,猜测山茱萸多糖抑制 HepG2 细胞增殖,促进 HepG2 细胞凋亡可能与促进 Klotho 蛋白表达有关。PI3K/Akt 信号通路是调控细胞合成代谢的基本细胞通路,在细胞增殖、分化、凋亡等多个生物过程中发挥重要作用^[13-17]。Zhu等^[18]研究表明乙型肝炎病毒 X 蛋白通过激活 PI3K/Akt 通路发挥促肝脏恶性肿瘤发生发展作用。本研究显示山茱萸多糖处理后,p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 比值显著降低,且随山茱萸多糖浓度的增加而降低,提示山茱萸多糖能显著抑制 PI3K、Akt 蛋白的活化,抑制 PI3K/Akt 信号通路激活。Kim等^[19]研究表明 Klotho 过表达可通过抑制 PI3K/Akt 通路,抑制肾透明癌细胞增殖和迁移。推测山茱萸多糖可能通过上调 Klotho 表达抑制 PI3K/Akt 信号通路激活,抑制 HepG2 细胞增殖、促进 HepG2 细胞凋亡,发挥抗肿瘤作用。

综上所述,山茱萸多糖可能通过上调 Klotho 表达抑制 PI3K/Akt 信号通路活化,抑制人肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖,促进 HepG2 凋亡,为山茱萸多糖临床应用提供理论基础。但本研究也存在一定不足,细胞增殖凋亡涉及多信号途径过程,PI3K/Akt 通路可能仅为其中一条,因此对山茱萸多糖抑制 HepG2 增殖、促进凋亡的具体机制尚有待进一步探索。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[J]. 传染病信息, 2017, 16(7): 635-647.
- [2] 王恩军, 靳 玮, 刘 斌, 等. 山茱萸多糖对肺癌 A549 细胞凋亡的影响及机制[J]. 山东医药, 2012, 52(3): 46-47.
- [3] Telang N T, Li G, Sepkovic D W, et al. Anti-proliferative effects of Chinese herb *Cornus officinalis* in a cell culture model for estrogen receptor-positive clinical breast cancer[J]. *Mol Med Rep*, 2012, 5(1): 22-28.
- [4] Sun H, Gao Y, Lu K, et al. Overexpression of Klotho suppresses liver cancer progression and induces cell apoptosis by negatively regulating wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *World J Surg Oncol*, 2015, 13(1): 307-317.
- [5] Dong K, Li H, Zhang M, et al. Endoplasmic reticulum stress induces up-regulation of hepatic β -Klotho expression through ATF4 signaling pathway[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 459(2): 300-305.
- [6] 王恩军, 靳 玮, 王 哲, 等. 山茱萸多糖诱导宫颈癌细胞凋亡及 Bax 蛋白表达的变化[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(10): 260-262.
- [7] 王恩军, 靳 玮, 季文琦, 等. 山茱萸多糖对肺癌细胞的凋亡作用及 Bcl-2、Bax 表达的影响[J]. 中成药, 2012, 34(5): 808-811.
- [8] Reed J C, Miyashita T, Takayama S, et al. BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy[J]. *J Cell Biochem*, 2015, 60(1): 23-32.
- [9] Avielronen S, Rubinek T, Zadok O, et al. Klotho expression in cervical cancer: differential expression in adenocarcinoma and squamous cell carcinoma[J]. *J Clin Pathol*, 2016, 69(1): 53-57.
- [10] Xie J, Yoon J, An S W, et al. Soluble Klotho protects against uremic cardiomyopathy independently of fibroblast growth factor 23 and phosphate[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2015, 26(5): 1150-1160.
- [11] Mao S, Wang X, Wu L, et al. Association between klotho expression and malignancies risk and progression: a meta-analysis[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 484(1): 14-20.
- [12] Vargas R, Riquelme B, Fernández J, et al. A combined docosahexaenoic acid-thyroid hormone protocol upregulates rat liver β -Klotho expression and downstream components of FGF21 signaling as a potential novel approach to metabolic stress conditions[J]. *Food Funct*, 2017, 8(1): 3980-3988.
- [13] Chang L, Graham P H, Ni J, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in the treatment of prostate cancer radioresistance[J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2015, 96(3): 507-517.
- [14] Sharma N, Nanta R, Sharma J, et al. PI3K/AKT/mTOR and sonic hedgehog pathways cooperate together to inhibit human pancreatic cancer stem cell characteristics and tumor growth[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(31): 32039-32060.
- [15] Zhao R, Chen M, Jiang Z, et al. Platycodin-D induced autophagy in non-small cell lung cancer cells via PI3K/Akt/mTOR and MAPK signaling pathways[J]. *J Cancer*, 2015, 6(7): 623-631.
- [16] 陈 颖, 毕芳芳, 杨 清. PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂在卵巢癌治疗中的研究进展[J]. 现代药物与临

- 床, 2018, 33(5): 1273-1277.
- [17] 张 献, 冯 欣. PI3K/AKT/mTOR 信号通路抑制剂在宫颈癌治疗中的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33(5): 1278-1284.
- [18] Zhu M, Li W, Lu Y, *et al.* HBx drives alpha fetoprotein expression to promote initiation of liver cancer stem cells through activating PI3K/AKT signal pathway [J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(6): 1346-1355.
- [19] Kim J H, Hwang K H, Lkhagvadorj S, *et al.* Klotho plays a critical role in clear cell renal cell carcinoma progression and clinical outcome [J]. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2016, 20(3): 297-304.