

2',4'-二羟基-3'-甲基-3-甲氧基查耳酮上调p21抑制人肝癌HepG2细胞的生长

王龙燕^{1,2}, 张云封^{1,2}, 王柱国^{1,2}, 谭 鹏^{1,2}, 魏雪娇^{1,2}, 李 军^{2*}, 胡仲冬^{2*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学 北京中医药研究院 中药现代研究中心, 北京 100029

摘要: 目的 探讨2',4'-二羟基-3'-甲基-3-甲氧基查耳酮(C20)对人肝癌HepG2细胞的体外抗肿瘤作用及其潜在的机制。方法 通过CCK-8法、集落形成实验、5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)染色法检测C20对人肝癌HepG2细胞增殖的影响;通过彗星实验检测C20(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对HepG2细胞DNA损伤的影响;通过流式细胞术检测C20(5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对HepG2细胞周期阻滞的影响;通过Hoechst染色和流式细胞术检测C20(5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对HepG2细胞凋亡的影响。借助Western blotting法检测C20(5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理对HepG2细胞中与凋亡、DNA损伤、细胞周期阻滞相关蛋白表达水平的调控作用。结果 与对照组比较,C20显著抑制HepG2细胞的活力($P<0.001$),给药48 h的半数抑制浓度(IC_{50})为7.937 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$;5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C20能够显著抑制HepG2细胞的集落形成能力($P<0.01$);EdU染色结果显示5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的C20能够抑制人肝癌HepG2细胞的增殖能力;5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的C20显著诱导HepG2细胞G₂/M期阻滞($P<0.001$);5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的C20显著促进HepG2细胞凋亡($P<0.001$),并显著上调Caspas-3、Caspase-9以及PARP的剪切水平($P<0.01$);10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的C20能够诱导HepG2细胞发生DNA损伤,并且5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的C20显著上调 γH2AX 、p21的蛋白水平($P<0.01$)。结论 C20能够造成HepG2细胞发生DNA损伤,上调p21蛋白水平,导致细胞G₂/M期阻滞,并进一步诱发凋亡,发挥体外抗肝癌作用。

关键词: 2',4'-二羟基-3'-甲基-3-甲氧基查耳酮;肝癌;DNA损伤;G₂/M周期阻滞;p21

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)05-0994-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.05.009

2',4'-dihydroxy-3'-methyl-3-methoxychalcone inhibits growth of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells through up-regulation of p21

WANG Longyan^{1,2}, ZHANG Yunfeng^{1,2}, WANG Zhuguo^{1,2}, TAN Peng^{1,2}, WEI Xuejiao^{1,2}, LI Jun², HU Zhongdong²

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Beijing Institute of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

Abstract: Objective To investigate the *in vitro* antitumor effects of 2',4'-dihydroxy-3'-methyl-3-methoxychalcone (C20) on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells and its potential mechanisms. **Methods** The effects of C20 on the proliferation of HepG2 cells were detected by CCK8 assay, colony formation assay, and 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) staining assay. The effects of C20 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on DNA damage of HepG2 cells were detected by comet assay. The effects of C20 (5, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on cell cycle of HepG2 cells were detected by flow cytometry. The effects of C20 (5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on apoptosis of HepG2 cells were detected by Hoechst staining and flow cytometry. The effects of C20 (5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) on expression levels of proteins related to DNA damage, cell cycle, and apoptosis in HepG2 cells were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, C20 significantly inhibited the viability of HepG2 cells ($P<0.001$), with a half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) of 7.937 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ after 48 h of treatment; 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C20 significantly inhibited the colony-forming ability of HepG2 cells ($P<0.01$); the EdU

收稿日期: 2024-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(82074072);中央高校基本科研业务费专项资金(2023-JYB-JBQN-051);北京中医药大学国家级人才精准培育计划(JZPY202206);国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目

第一作者: 王龙燕, 硕士研究生。E-mail: wlongyan2021@163.com

*通信作者: 胡仲冬, 研究员, 主要从事中药活性成分抗肿瘤作用研究。E-mail: huzhongdong@126.com

李 军, 研究员, 主要从事中药药效物质、作用机制和质量评价研究。E-mail: drlj666@163.com

staining results showed that 5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of C20 could inhibit the proliferation of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells; 5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of C20 significantly induced G₂/M phase arrest in HepG2 cells ($P < 0.001$); 5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of C20 significantly promoted apoptosis in HepG2 cells ($P < 0.001$), and significantly upregulated the cleavage levels of Caspas-3, Caspase-9, and PARP ($P < 0.01$); 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of C20 could induce DNA damage in HepG2 cells, and 5 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of C20 significantly upregulated the protein levels of γH2AX and p21 ($P < 0.01$). **Conclusion** We speculate that C20 treatment can induce DNA damage and upregulate p21 expression in HepG2 cells, leading to G₂/M arrest and further inducing apoptosis, which is partially responsible for anti-hepatocellular carcinoma activity of C20.

Key words: 2', 4'-dihydroxy-3'-methyl-3-methoxychalcone; hepatocellular carcinoma; DNA damage; G₂/M arrest; p21

肝癌是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,居全球癌症发病率第6位,死亡率居第4位^[1]。慢性乙型肝炎、慢性丙型肝炎及非酒精性脂肪性肝病^[2]等是形成肝癌的重要病因。由于肝癌发病隐匿,缺乏有效的治疗方法,同时,肝癌预后极差,5年平均生存率不足10%^[3]。目前对于肝癌的有效治疗手段还很有限,外科治疗(包括手术切除和肝移植)仍然是早期肝癌患者首选的治疗方法和唯一能使患者获得长期生存乃至治愈的手段,但是并不是所有患者都符合手术切除的条件,肝移植与局部消融治疗等方法也都存在不足,放疗、化疗、免疫治疗等药物治疗也有局限性,效果不甚满意^[4]。因此,继续寻找高效低毒的抗肝癌药物仍然十分重要。

龙血竭 *Resina Draconis* 为百合科龙血树属植物剑叶龙血树 *Dracaena cochinchinensis* (Lour) S. C. Chen 含脂木材经乙醇提取得到的树脂,主要化学成分为黄酮类、苯丙素类和二苯乙烯类等,具有活血化瘀、敛疮生肌等功效^[5]。现代药理研究表明,龙血竭有抗肿瘤、镇痛、消炎、调节免疫等作用,临床用来治疗心血管疾病、皮肤病等疾病^[6-7]。本课题组前期发现龙血竭醋酸乙酯提取部位能够通过介导转化生长因子- β (TGF- β)/Smad 信号通路抑制人肝癌细胞的增殖能力^[8],而且从醋酸乙酯部位中分离得到的黄酮类化合物 DHMMF 具有较好的体内外抗肝癌活性^[9]。本课题组在对 DHMMF 进行结构修饰的过程中获得了多个查耳酮类化合物,其中 2',4'-二羟基-3'-甲基-3-甲氧基查耳酮(C20)结构新颖且具有良好的体外抗肝癌活性。本研究以人肝癌 HepG2 细胞为研究对象,探究 C20 对 HepG2 细胞的增殖、细胞周期及凋亡的影响,并初步探讨了其分子作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞

人肝癌 HepG2 细胞购买于上海富衡生物科技有限公司(货号 FH0076),培养于含有 10% FBS 及 1% 双抗的 DMEM 完全培养基,在 37℃、5% CO₂ 条

件下培养。

1.2 药品与试剂

C20,质量分数大于 98%,由实验室合成,通过理化性质和 NMR、MS 等谱学数据确定结构。用二甲基亚砜(DMSO)溶解 C20 为 10 mmol·L⁻¹ 母液, -20℃ 储存待用。胎牛血清(中国 Vazyme 公司,货号 F101-01);DMEM 基础培养基、青霉素-链霉素混合液、0.25% 胰酶 EDTA(美国 Thermo Fisher 公司,货号分别为 11960044、15140122、2520007);RIPA 组织/细胞裂解液、5×蛋白上样缓冲液(含 DTT)(北京百瑞极生物科技有限公司,货号 BN25012、BN27020);四唑盐 WST-8(CCK8)溶液、飞克特超敏 ECL 发光液(美仑生物科技有限公司,货号 MA0218、MA0186);细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒(美国 BD 公司,货号 556547、550825);BeyoClickTMEdu-488 细胞增殖检测试剂盒、Hoechst 33258 染液(上海碧云天生物技术有限公司,货号 C0071S、C1018);彗星实验检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,货号 KGA240)。细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白(p21)、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP)、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、磷酸化组蛋白(γH2AX); Anti-rabbit IgG-HRP、Anti-mouse IgG-HRP 的抗体购自于美国 CST 公司,货号分别为 2947S、9532T、9661T、9509T、2577S、7074、7076)

1.3 仪器

DM3600 倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司); EnSpire 酶标仪(美国 Perkin Elmer 公司); LF-2000S 电泳仪(北京龙方科技有限公司); FACSCantoII 流式细胞仪(美国 BD 公司); ChemiDoc Touch 化学发光成像系统(美国 BIO-RAD 公司); MK-20 干式恒温器(杭州奥盛仪器有限公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 法测定细胞增殖实验

取对数生长期的肝癌 HepG2 细胞消化成单细胞悬液。计数后,稀释细胞使浓度为 $3 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$,每

孔100 μL 接种于96孔板,每组设置5个复孔。贴壁24 h后,吸弃旧培养基并加入含C20(2、4、6、8、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的新培养基,对照组加入等体积DMSO。给药处理24、48、72 h后,吸弃上清,每孔加入1:10比例配好的100 μL CCK-8工作液,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2 h。孵育结束后,置于摇床避光摇晃10 min后在450 nm波长下测定吸光度(A)值,并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.2 5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(EdU)法细胞增殖检测

取对数生长期的HepG2细胞消化成单细胞悬液,计数后按每孔 5×10^4 个接种于12孔板中,每组设置3个复孔。贴壁24 h后,吸弃旧培养基并加入含C20(5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的新培养基,对照组加入等体积DMSO。给药处理48 h后,按BeyoClickTMedU-488细胞增殖检测试剂盒说明书步骤操作,最后于倒置荧光显微镜下观察并记录。

2.3 集落形成实验

取对数生长期的HepG2细胞消化成单细胞悬液,计数后按每皿2 000个接种于6 cm皿中,每组设置3个复孔。贴壁24 h后,吸弃旧培养基并加入含C20(5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的新培养基,对照组加入等体积DMSO。每隔4天换液1次。连续给药处理12 d后,吸弃旧培养基并用PBS清洗3次,用4%多聚甲醛固定10 min后加入10 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的结晶紫染液染色30 min。染色结束后,用PBS轻轻清洗2遍并用相机记录。

2.4 彗星实验检测DNA损伤

取对数生长期的HepG2细胞消化成单细胞悬液,计数后按每孔 1×10^5 个接种于6孔板中,每组设置3个复孔。贴壁24 h后,吸弃旧培养基并加入含C20(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的新培养基,对照组加入含等体积DMSO的完全培养基。给药处理24 h后,按照彗星实验检测试剂盒说明书步骤操作,染色后使用倒置荧光显微镜观察给药组细胞DNA拖尾情况。

2.5 流式细胞术检测细胞周期阻滞

取对数生长期的HepG2细胞消化成单细胞悬液,计数后按每孔 1×10^5 个接种于6孔板中,每组设置3个复孔。贴壁24 h后,吸弃旧培养基并加入含C20(5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的新培养基,对照组加入含等体积DMSO的完全培养基。给药处理24 h后,按细胞周期检测试剂盒说明书步骤操作,最后使用流式细胞仪检测并统计处于细胞周期不同时期的细胞数。

2.6 流式细胞术检测细胞凋亡

细胞接种及给药操作同“2.5”项。给药处理48 h后,按细胞凋亡检测试剂盒说明书步骤操作,最后使用流式细胞仪检测并计算细胞凋亡率。

2.7 Hoechst染色法

细胞接种及给药操作同“2.5”项。给药处理48 h后,吸弃旧培养基并用PBS清洗3次,用4%多聚甲醛固定10 min后加入1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Hoechst 33258液染色30 min。染色结束后,用PBS轻轻清洗2遍并置于倒置荧光显微镜下观察并记录。

2.8 Western blotting实验

取对数生长期的肝癌HepG2细胞消化成单细胞悬液,适量接种于6 cm皿中。贴壁24 h后,给药操作同“2.5”项。给药处理48 h后,吸弃旧培养基并用PBS清洗3次,每孔加入适量的RIPA细胞裂解液,冰上裂解10 min并收集于1.5 mL EP管中,加入5 $\times$ 蛋白上样缓冲液。将收集的样品置于95 $^{\circ}\text{C}$ 干式恒温器中加热10 min,-40 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。以适当体积上样,并采用适当的条件进行电泳、电转,用5%脱脂牛奶室温封闭2 h后,分别用相应的一抗(1:1 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜及二抗(1:10 000)4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h。最后加入配置好的超敏发光液并进行曝光。

2.9 数据处理与分析

所有数据均使用GraphPad Prism 8.0.1软件进行统计学分析并采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。实验各组间差异采用 t 检验分析。

3 结果

3.1 C20的结构及相关谱学数据

2',4'-二羟基-3'-甲基-3-甲氧基查耳酮(C20,结构见图1):黄色粉末,熔点:136~137 $^{\circ}\text{C}$ 。 ^1H NMR(400 MHz, CD_3OD) δ 7.86(d, $J=8.8$ Hz, 1H), 7.81(d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.77(d, $J=16.0$ Hz, 1H), 7.34(t, $J=7.6$ Hz, 1H), 7.30(dd, $J=7.6, 1.6$ Hz, 1H), 7.29(d, $J=1.6$ Hz, 1H), 6.99(dd, $J=7.6, 1.6$ Hz, 1H), 6.45(d, $J=8.8$ Hz, 1H), 3.86(s, 3H), 2.07(s, 3H); ^{13}C NMR(100 MHz, CD_3OD) δ 193.53, 165.48, 164.22, 161.64, 144.85, 137.81, 131.01, 130.41, 122.32, 117.51, 114.41, 114.33, 112.49, 108.15, 55.85, 7.63。HRESIMS: m/z 283.096 4,计算值 $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_4$ 283.097 6 $[\text{M}-\text{H}]^{-}$ 。

3.2 C20对肝癌HepG2细胞增殖能力的影响

与对照组相比,2、4、6、8、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ C20显著降低HepG2细胞的存活率($P<0.001$),并具有浓度

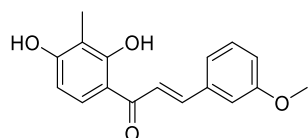


图1 C20的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of C20

与时间相关性, C20 给药处理 24、48、72 h HepG2 细胞的 IC_{50} 分别为 12.99、7.937、3.871 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。结果见图2。

与对照组相比, C20 ($5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 给药处理后能明显降低 HepG2 细胞的集落形成能力, 见图3。

在荧光显微镜下, 正在增殖的细胞能被 EdU 试剂染色并发出非常明亮的绿色荧光。与对照组相比, C20 组 (5 、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 在荧光显微镜下绿色荧光显著减少, 证明细胞增殖受到抑制, 见图4。

3.3 C20 对人肝癌 HepG2 细胞周期的影响

细胞用冰乙醇固定通透后, PI 能与细胞的 DNA

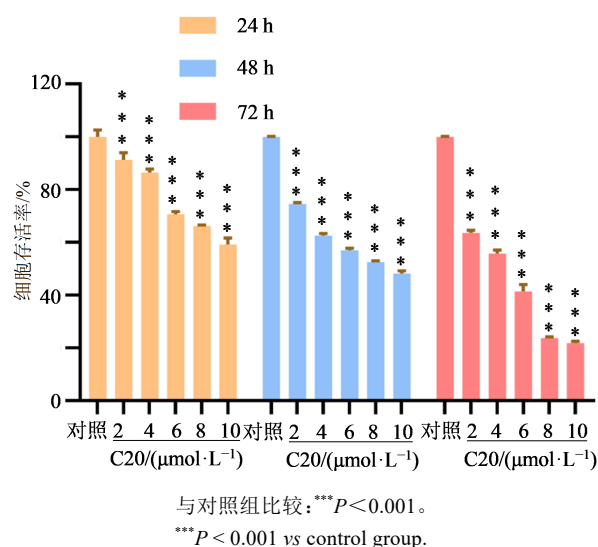
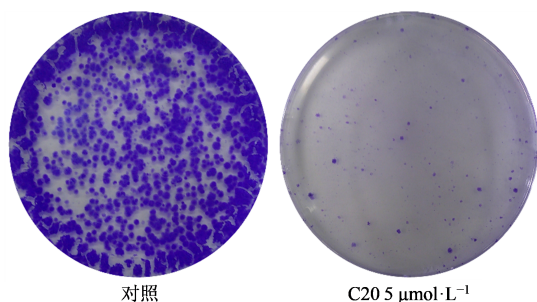
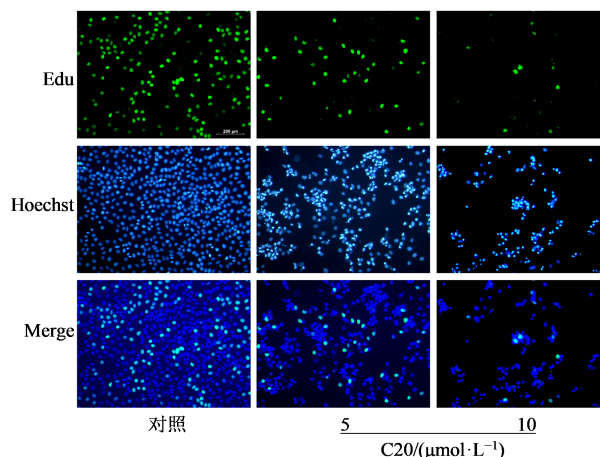
图2 C20 对人肝癌 HepG2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 2 Effect of C20 on cell viability of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

图3 C20 对人肝癌 HepG2 细胞集落形成能力的影响

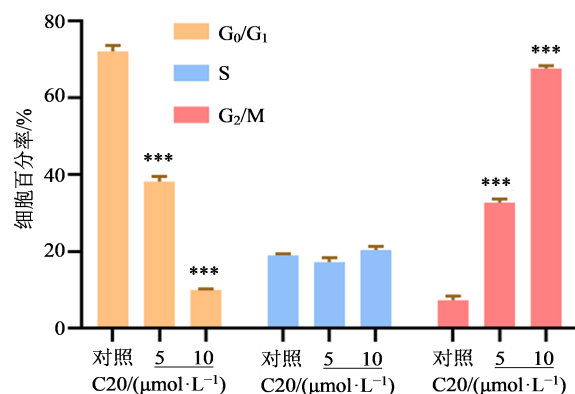
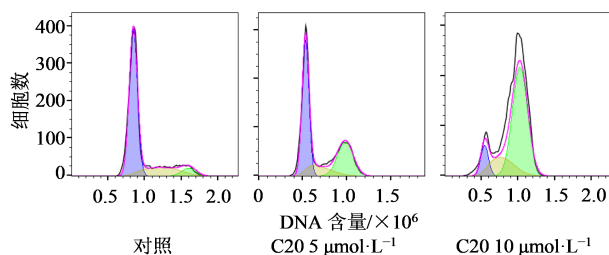
Fig. 3 Effect of C20 on colony-forming ability of HepG2 cells

图4 C20 对 HepG2 细胞增殖的影响 (EdU 染色, $\times 100$)Fig. 4 Effect of C20 on proliferation of HepG2 cells (EdU staining, $\times 100$)

结合, 反映细胞内的 DNA 含量。通过流式细胞仪对细胞内 DNA 含量进行检测, 可以将细胞周期区分为 G_0/G_1 期, S 期和 G_2/M 期。如图 5 所示, 与对照组相比, C20 (5 、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 给药处理 24 h 后, 处于 G_0/G_1 期的细胞明显减少 ($P < 0.001$), 处于 G_2/M 期的细胞明显增多 ($P < 0.001$)。

3.4 C20 对人肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响

如图 6 所示, Hoechst 33258 能与发生凋亡的细胞核结合并在荧光显微镜下呈现亮蓝色荧光。与对照组相比, C20 (5 、 $10\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 给药处理 48 h 后,

图5 C20 对 HepG2 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)Fig. 5 Effect of C20 on cell cycle of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

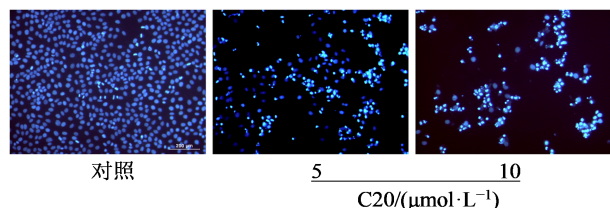


图 6 C20 对 HepG2 细胞凋亡的影响 (Hoechst 染色, ×100)
Fig. 6 Effect of C20 on apoptosis of HepG2 cells (Hoechst staining, ×100)

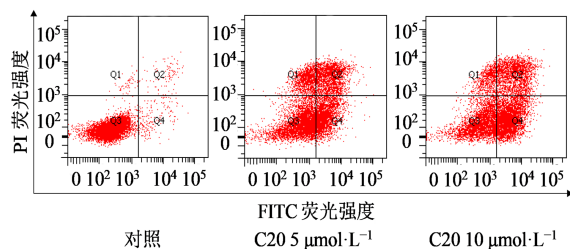


图 7 C20 对 HepG2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of C20 on apoptosis of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

剪切,启动 Caspase 级联激活,Caspase-3 也可作用于 PARP,使其裂解为 8.9×10^4 片段,修复作用丧失,3 者常被作为细胞凋亡的早期检测指标^[10-11]。Western blotting 实验发现,5、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 C20 给药处理 HepG2 细胞 48 h 后,与对照组比较,能够明显上调 Caspase-3、Caspase-9 以及 PARP 的剪切水平($P < 0.01$)。结果见图 8、表 1。

3.5 C20 诱导 HepG2 细胞发生 DNA 损伤

发生 DNA 损伤的细胞进行核酸电泳后通过 PI 染色可以观察到细胞核拖尾的现象。通过倒置荧光显微镜发现(图 9),与对照组相比,10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 C20 处理 24 h,进行核酸电泳后,HepG2 的细胞核发

荧光显微镜下亮蓝色荧光明显增加,提示 C20 能诱导人肝癌 HepG2 细胞发生凋亡。流式细胞术结果(图 7)也进一步证明了该结果,5、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 C20 给药处理 48 h 后,HepG2 细胞凋亡率是 $(43.37 \pm 2.05)\%$ 和 $(52.60 \pm 2.03)\%$,较对照组显著增加($P < 0.001$)。

正常状态下,Caspase-9 以非活性的酶原形式存在于细胞中,当细胞发生凋亡时,pro-Caspase-9 被剪切发生活化,活化的 Caspase-9 使 Caspase-3 发生

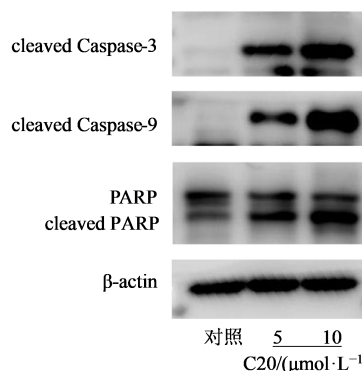
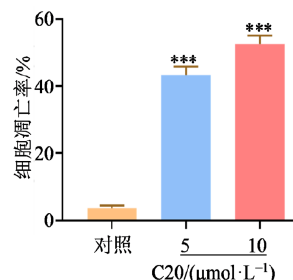


图 8 C20 对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响
Fig. 8 Effect of C20 on expression levels of apoptosis-related proteins in HepG2 cells

表 1 C20 对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Effect of C20 on expression levels of apoptosis-related proteins in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	给药浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$	cleaved Caspase-3/ β -actin	cleaved Caspase-9/ β -actin	cleaved PARP/ β -actin
对照	—	0.08 ± 0.00	0.10 ± 0.01	0.29 ± 0.02
C20	5	$0.66 \pm 0.02^{**}$	$0.45 \pm 0.04^{**}$	$0.82 \pm 0.05^{**}$
	10	$1.00 \pm 0.03^{**}$	$0.95 \pm 0.03^{**}$	$0.95 \pm 0.05^{**}$

与对照组比较: $^{**}P < 0.01$ 。

$^{**}P < 0.01$ vs control group.

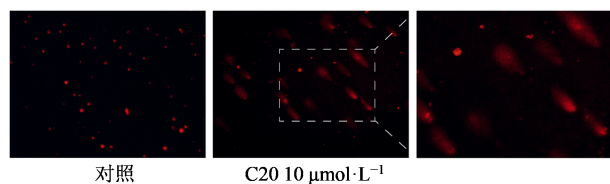


图 9 C20 对人肝癌 HepG2 细胞 DNA 断裂情况的影响
Fig. 9 Effect of C20 on DNA damage in HepG2 cells

生拖尾,表明细胞 DNA 受到损伤。

γH2AX 的出现与 DNA 双链断裂紧密关联,可以作为 DNA 双链断裂的标志物。Western blotting 实验表明,与对照组比较,5、10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 C20 给药处理 24 h 能够明显上调 γH2AX 的蛋白表达水平($P < 0.01$),也进一步说明 C20 组细胞 DNA 受到损伤。结果见图 10、表 2。

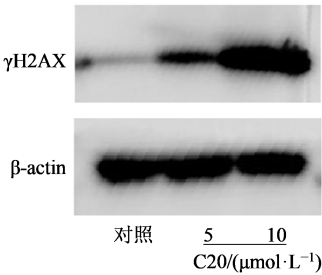


图 10 C20 对 HepG2 细胞中 γ H2AX 表达水平的影响
Fig. 10 Effect of C20 on expression level of γ H2AX in HepG2 cells

表 2 C20 对 HepG2 细胞中 γ H2AX 表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Effect of C20 on expression level of γ H2AX in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	给药浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\gamma\text{H2AX}/\beta\text{-actin}$
对照	—	0.11 $\pm$ 0.01
C20	5	0.42 $\pm$ 0.03**
	10	1.30 $\pm$ 0.07**

与对照组比较:** $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group.

3.6 C20 上调 HepG2 细胞中细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 p21 的蛋白水平

p21 基因是 Kip/Cip 家族中的一员,位于 p53 基因下游,属于细胞周期素依赖性激酶抑制因子,能通过抑制周期素依赖激酶复合物活性,协调细胞周期、DNA 复制与修复之间的关系,发挥肿瘤抑制作用^[12]。采用 Western blotting 法对 p21 蛋白水平进行检测,发现 5、10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 C20 给药处理 24 h 能够明显上调 p21 的蛋白表达水平。结果见图 11、表 3。

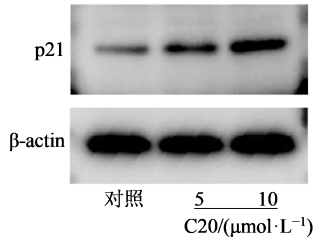


图 11 C20 对 HepG2 细胞中 p21 蛋白表达水平的影响
Fig. 11 Effect of C20 on expression level of p21 in HepG2 cells

4 讨论

目前临床上已有多种中药被应用于肿瘤治疗,例如艾迪注射液、康复新液等,中药抗肿瘤取得了一定的效果^[13-14]。中药来源的单体在基础研究和临

表 3 C20 对 HepG2 细胞中 p21 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effect of C20 on expression level of p21 in HepG2

cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)		
组别	浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	p21/ β -actin
对照	—	0.35 $\pm$ 0.02
C20	5	0.66 $\pm$ 0.05**
	10	0.88 $\pm$ 0.06**

与对照组比较:** $P<0.01$ 。

** $P<0.01$ vs control group.

床中展现的潜力不可忽视,例如,丹参中得到的醌类化合物二氢异丹参酮 I 可以通过诱导肺癌细胞发生铁死亡,抑制裸鼠的肿瘤生长^[15],长春新碱临床用于治疗儿童急性淋巴细胞白血病^[16]等,从中药中筛选抗癌药物或活性先导分子,是抗癌药物发现的有效途径。本课题组前期从中药龙血竭中分离得到一个天然黄烷类化合物 DHMMF,并发现其具有良好的抗肿瘤活性^[9]。后续在对 DHMMF 进行结构修饰过程中,获得了多个查耳酮类化合物,并进行了体外抗肿瘤活性筛选,其中 C20 对 HepG2 细胞展现出良好的细胞毒性,其 IC_{50} 为 $7.937 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。通过集落形成实验、EdU 增殖实验、彗星实验及流式细胞术实验,进一步发现 C20 能够抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖能力,且能够诱导细胞周期阻滞及细胞凋亡,还能够诱导细胞发生 DNA 损伤。

DNA 损伤是复制过程中发生的 DNA 核苷酸序列永久性改变、并导致遗传特征改变的现象,有多种类型,包括碱基损伤与糖基破坏、碱基之间发生错配、DNA 链发生断裂等^[17]。癌细胞具有异常增殖的特性,遗传物质更加不稳定,临床上使用的化疗药物大多都是通过直接或间接作用于 DNA,使得癌细胞发生 DNA 损伤来达到直接杀伤的作用,例如伊立替康^[18]、顺铂^[19]等。p21 蛋白是周期蛋白依赖性激酶抑制因子家族的一员,在细胞的周期调控、DNA 损伤等方面具有重要调控作用^[20]。研究表明,细胞 DNA 损伤发生后,p21 会被激活^[21]。同时,p21 作为周期蛋白依赖性激酶抑制剂,在 DNA 损伤反应中将细胞周期停滞与凋亡等生物学过程联系在一起^[22]。目前有研究表明,一些药物可以通过调控 p21 诱导癌细胞周期阻滞在 G_2/M 期,进而发生凋亡^[23],调控 p21 的表达在发挥抗肿瘤作用中具有重要意义。本研究发现新型查尔酮化合物 C20 具有良好的体外抗肝癌活性,能够抑制人肝癌 HepG2 细胞的增殖,造成 HepG2 细胞 G_2/M 期阻滞并发生凋亡,

并能够诱导DNA损伤,而且能够显著上调p21蛋白水平。因此,C20可能通过诱导人肝癌细胞发生DNA损伤,上调p21蛋白水平,导致细胞G₂/M期阻滞,并进一步诱发凋亡,最终发挥抗肝癌作用。

本研究首次探讨了查耳酮类化合物C20的抗肝癌活性,其药理机制可能与诱导DNA损伤后上调p21表达有关,初步揭示了其成为肝癌治疗候选药物的潜力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Brown Z J, Tsilimigras D I, Ruff S M, et al. Management of hepatocellular carcinoma: A review [J]. JAMA Surg, 2023, 158(4): 410-420.
- [2] Toh M R, Wong E Y T, Wong S H, et al. Global epidemiology and genetics of hepatocellular carcinoma [J]. Gastroenterology, 2023, 164(5): 766-782.
- [3] Donne R, Lujambio A. The liver cancer immune microenvironment: Therapeutic implications for hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 2023, 77(5): 1773-1796.
- [4] General Office of National Health Commission. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(2): 288-303.
General Office of National Health Commission. Standard for diagnosis and treatment of primary liver cancer(2022 edition) [J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(2): 288-303.
- [5] Liu Y, Zhao X S, Yao R Y, et al. Dragon's blood from *Dracaena* worldwide: Species, traditional uses, phytochemistry and pharmacology [J]. Am J Chin Med, 2021, 49(6): 1315-1367.
- [6] 袁勤洋, 曲彩红, 刘长利. 龙血竭的现代临床应用 [J]. 中成药, 2012, 34(12): 2414-2417.
Yuan Q Y, Qu C H, Liu C L. Modern clinical application of dragon's blood [J]. Chin Tradit Pat Med, 2012, 34(12): 2414-2417.
- [7] 陈品秋, 班玮康, 王文艳, 等. 龙血竭及其主要活性成分对脑缺血的药理作用与机制研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(18): 6172-6184.
Chen P Q, Ban W K, Wang W Y, et al. Research progress of pharmacological effects and mechanism of *Resina Draconis* and its active constituents on cerebral ischemia [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2023, 54(18): 6172-6184.
- [8] Ouyang L S, Li J Q, Chen X N, et al. Chinese dragon's blood ethyl acetate extract suppresses gastric cancer progression through induction of apoptosis and autophagy mediated by activation of MAPK and downregulation of the mTOR-Becn1 signalling cascade [J]. Phytother Res, 2023, 37(2): 689-701.
- [9] Tian Y Y, Wang L Y, Chen X N, et al. DHMMF, a natural flavonoid from *Resina Draconis*, inhibits hepatocellular carcinoma progression via inducing apoptosis and G₂/M phase arrest mediated by DNA damage-driven upregulation of p21 [J]. Biochem Pharmacol, 2023, 211: 115518.
- [10] Renatus M, Stennicke H R, Scott F L, et al. Dimer formation drives the activation of the cell death protease caspase 9 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(25): 14250-14255.
- [11] Chang H Y, Fan C C, Chu P C, et al. hPuf-A/KIAA0020 modulates PARP-1 cleavage upon genotoxic stress [J]. Cancer Res, 2011, 71(3): 1126-1134.
- [12] Ruan B J, Liu W, Chen P, et al. NVP-BEZ235 inhibits thyroid cancer growth by p53- dependent/independent p21 upregulation [J]. Int J Biol Sci, 2020, 16(4): 682-693.
- [13] 许康, 白丽. 中药及中药提取物抗肿瘤研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(10): 54-59.
Xu K, Bai L. Research progress on anti-tumor effects of traditional Chinese medicine and its extracts [J]. Chin Arch Tradit Chin Med, 2022, 40(10): 54-59.
- [14] 王姣, 于佳, 胡万福, 等. 临床常用抗肿瘤中药的作用机制及抗肿瘤方剂分析 [J]. 癌症进展, 2020, 18(9): 884-886, 900.
Wang J, Yu J, Hu W F, et al. Analysis of the mechanism and anti-tumor prescription of commonly used anti-tumor Chinese medicines in clinic [J]. Oncol Prog, 2020, 18(9): 884-886, 900.
- [15] Wu C Y, Yang Y H, Lin Y S, et al. Dihydroisotanshinone I induced ferroptosis and apoptosis of lung cancer cells [J]. Biomedecine Pharmacother, 2021, 139: 111585.
- [16] Diouf B, Crews K R, Lew G, et al. Association of an inherited genetic variant with vincristine-related peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia [J]. JAMA, 2015, 313(8): 815-823.
- [17] Carusillo A, Mussolino C. DNA damage: From threat to treatment [J]. Cells, 2020, 9(7): 1665.
- [18] Kciuk M, Marciniak B, Kontek R. Irinotecan-still an important player in cancer chemotherapy: A comprehensive overview [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(14): 4919.
- [19] Dasari S, Tchounwou P B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740: 364-378.
- [20] Manousakis E, Miralles C M, Esquerda M G, et al. CDKN1A/p21 in breast cancer: Part of the problem, or

- part of the solution? [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(24): 17488.
- [21] Nicolae C M, O'Connor M J, Constantin D, et al. NFκB regulates p21 expression and controls DNA damage-induced leukemic differentiation [J]. Oncogene, 2018, 37: 3647-3656.
- [22] Ticli G, Cazzalini O, Stivala L A, et al. Revisiting the function of p21CDKN1A in DNA repair: The influence of protein interactions and stability [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 7058.
- [23] Tseng T H, Chien M H, Lin W L, et al. Inhibition of MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation and tumor growth by apigenin through induction of G2/M arrest and histone H3 acetylation-mediated p21WAF1/CIP1 expression [J]. Environ Toxicol, 2017, 32(2): 434-444.

【责任编辑 兰新新】