

# 三叶青黄酮调控 AMPK/mTOR 信号通路介导的线粒体自噬抑制肝癌细胞增殖与侵袭的分子机制研究

张云飞<sup>1</sup>, 叶春林<sup>1\*</sup>, 陈信佳<sup>2</sup>

1. 浙江科技大学 生物与化学工程学院 浙江省农产品化学与生物加工技术重点实验室, 浙江 杭州 310023

2. 前海人寿南宁医院 中医科, 广西 南宁 530000

**摘要:** 目的 探讨三叶青 *Tetrastigma Hemsleyani Radix* 黄酮 (THRF) 对肝癌细胞增殖、侵袭和细胞焦亡的影响, 以及其对腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号介导的线粒体自噬的调控机制。方法 以低、高质量浓度 (50、100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 的 THRF 处理 SK-HEP-1 细胞; 同时以 AMPK 信号抑制剂化合物 C (CC) 进行功能挽救实验, 即设置 THRF (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) + CC (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组; 以自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 进行功能回复实验, 即设置 THRF (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) + CC (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + 3-MA (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 组; 对照组不加药, THRF、CC、3-MA 同时加药, 加药后培养 24 h。5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 试剂盒检测细胞的增殖; Transwell 小室检测细胞的侵袭; JC-1 检测线粒体的膜电位; DCFH-DA 染色实验检测活性氧 (ROS) 的含量; MitoTracker Red-Lysotracker green 双染色检测线粒体自噬; 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测线粒体自噬、细胞焦亡相关的 mRNA 的表达; Western blotting 检测细胞中 AMPK、mTOR、磷酸化-mTOR (p-mTOR)、酵母自噬相关基因 6 同源物 (Beclin1)、自噬相关基因 5 (Atg5)、核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含热蛋白结构域蛋白 3 (NLRP3) 和消皮素 D (GSDMD) 的表达水平。结果 与对照组比较, THRF 明显降低 SK-HEP-1 细胞的增殖、侵袭以及线粒体膜电位 ( $P < 0.05$ ), 明显升高细胞中 ROS 含量 ( $P < 0.05$ ), 明显升高自噬体的表达; 明显升高 *BECN1*、*Atg5*、*NLRP3* 和 *GSDMD* mRNA 相对表达量 ( $P < 0.05$ ); 升高细胞中 AMPK、*BECN1*、*Atg5*、*NLRP3* 和 *GSDMD* 的蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 降低 p-mTOR 的蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。CC 可部分逆转 THRF 的上述效应, 而 3-MA 可部分恢复 THRF 的抑癌效用, 差异均具有统计意义 ( $P < 0.05$ )。结论 THRF 能明显下调细胞的线粒体膜电位, 促进细胞的线粒体自噬过度激活, 抑制肝癌细胞的增殖与侵袭活性, 上调细胞焦亡相关基因的表达, 这可能与 THRF 对 AMPK/mTOR 信号介导的线粒体自噬的调控有关。

**关键词:** 三叶青黄酮; 肝癌; 增殖; 侵袭; 细胞焦亡; 腺苷酸活化蛋白激酶/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号; 线粒体自噬

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)08-2135-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.08.008

## Molecular mechanism study on regulation of AMPK/mTOR signaling pathway mediated mitochondrial autophagy by *Tetrastigma Hemsleyani Radix* flavone, inhibiting proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells

ZHANG Yunfei<sup>1</sup>, YE Chunlin<sup>1</sup>, CHEN Xinjia<sup>2</sup>

1. Zhejiang Key Laboratory of Agricultural Chemistry and Bioprocessing Technology, College of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, China

2. Traditional Chinese Medicine Department, Qianhai Life Insurance Nanning Hospital, Nanning 530000, China

**Abstract: Objective** To investigate the effects of *Tetrastigma Hemsleyani Radix* flavone (THRF) on the proliferation, invasion, and the pyroptosis of hepatocellular carcinoma cells, as well as its regulatory mechanism on AMP-activated protein kinase (AMPK)/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling-mediated mitochondrial autophagy. **Methods** SK-HEP-1 cells were treated with low and high concentrations (50, 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) of THRF. Meanwhile, a functional rescue experiment was conducted using the AMPK

收稿日期: 2025-01-10

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LY17C020003)

作者简介: 张云飞 (1997—), 男, 硕士研究生, 从事中药抗肝癌的研究。E-mail: ZHANGyunfei8880@126net.com.cn

\*通信作者: 叶春林 (1969—), 从事天然产物的提取工艺及其生物活性的研究。E-mail: chlye2005@126.com

signaling inhibitor compound C (CC), setting up a THRF (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) + CC (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group. A functional recovery experiment was also performed using the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3-MA), setting up a THRF (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) + CC (50  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) + 3-MA (5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) group. The control group was not treated with any drugs. All groups were treated for 24 hours. Cell proliferation was detected using the 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) kit; cell invasion was detected using Transwell chambers; mitochondrial membrane potential was detected using JC-1; reactive oxygen species (ROS) content was detected using DCFH-DA staining; mitochondrial autophagy was detected using MitoTracker Red-Lysotracker green double staining; the expression of mRNAs related to mitochondrial autophagy and pyroptosis was detected using real-time fluorescence quantitative PCR (qRT-PCR); and the expression levels of AMPK, mTOR, phosphorylated-mTOR (p-mTOR), Beclin1, Atg5, NLRP3, and GSDMD in cells were detected using Western blotting. **Results** Compared with the control group, THRF significantly reduced the proliferation, invasion, and mitochondrial membrane potential of SK-HEP-1 cells ( $P < 0.05$ ), significantly increased the ROS content in cells ( $P < 0.05$ ), significantly increased the expression of autophagosomes; significantly increased the relative expression levels of BECN1, Atg5, NLRP3, and GSDMD mRNAs ( $P < 0.05$ ); increased the protein expression of AMPK, BECN1, Atg5, NLRP3, and GSDMD in cells ( $P < 0.05$ ), and decreased the protein expression of p-mTOR ( $P < 0.05$ ). CC could partially reverse the above effects of THRF, while 3-MA could partially restore the anti-cancer effect of THRF, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** THRF could significantly down-regulate the mitochondrial membrane potential, promote the excessive activation of mitochondrial autophagy, inhibit the proliferation and invasive activity of hepatocellular carcinoma cells, and up-regulate the expression of cell pyrogenesis-related genes, which may be related to the regulation of APMK/mTOR signal-mediated mitochondrial autophagy.

**Key words:** *Tetragium Hemsleyani* Radix flavone; hepatocellular carcinoma cell; proliferation; invasion; pyroptosis; AMP-activated protein kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway; mitochondrial autophagy

肝癌是一种常见的消化道恶性肿瘤之一，严重影响患者的日常生活。临床医师主要通过外科手术辅以化疗来帮助患者缓解痛苦，但是伴随难以避免的骨髓抑制以及胃肠道反应等不良反应，使得肝癌的临床治疗难度加大<sup>[1]</sup>。而肝作为机体的主要的免疫与解毒器官，临床上可调控药物摄入量以及药物活性影响肿瘤细胞的耐药性。

正常生理状态下，线粒体自噬是细胞选择性清除异常线粒体的重要过程，是细胞进行线粒体质量控制的重要手段<sup>[2]</sup>。Deng 等<sup>[3]</sup>研究显示，过度激活的线粒体自噬在肝癌细胞生长、增殖、免疫浸润、侵袭以及化疗耐药性等病理进展中发挥重要作用。研究显示<sup>[4]</sup>腺苷活化蛋白激酶 (AMPK) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号是一条重要的能量相关的分子转导通路，其表达的异常与线粒体的物质代谢、融合与裂变、氧化应激以及质量控制等关系密切。Sun 等<sup>[5]</sup>研究显示，在肝癌中，激活 AMPK/mTOR 信号，升高 AMPK 的表达，降低磷酸化-mTOR (p-mTOR) 的表达，能明显升高细胞中自噬标志因子酵母自噬相关基因 6 同源物 (Beclin1) 和自噬相关基因 5 (Atg5) 的表达，降低细胞线粒体的膜电位，降低肿瘤细胞中活性氧 (ROS) 的水平，降低肝癌细胞的增殖与侵袭性能。

中医药干预措施，尤其是具有抗肿瘤效应的单体成为肝癌治疗中具有前景的潜在药物<sup>[6-8]</sup>。三叶青

黄酮 (THRF) 是三叶青的主要的活性成分之一。现代药理学研究显示<sup>[9]</sup>，THRF 具有良好的抗炎、抗氧化、免疫调节以及抗肿瘤等作用。Peng 等<sup>[10]</sup>研究显示在皮肤鳞状细胞癌中，THRF 能明显升高核苷酸结合寡聚化结构域样受体家族含热蛋白结构域蛋白 3 (NLRP3) 和消皮素 D (GSDMD) 的表达，诱导肿瘤细胞的焦亡，下调细胞的血管生成能力，但是有关 THRF 在肝癌中的应用的报道较少。本研究以 AMPK 信号抑制剂化合物 C (CC) 进行功能挽救实验，以自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤 (3-MA) 进行功能回复实验，探讨 THRF 对肝癌细胞 SK-HEP-1 细胞焦亡的影响。

## 1 材料

### 1.1 实验细胞

肝癌细胞系 SK-HEP-1 购自中国科学院上海细胞库。

### 1.2 主要试剂

THRF，质量分数 >99%，规格每袋 10 mg，批号 202311-04-DNFT-001，购自成都曼斯特生物有限公司；3-MA、CC 均购自上海碧云天生物技术有限公司；鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH)、AMPK、p-mTOR、Beclin1、Atg5 单克隆抗体 (美国 Jackson 公司)；5-乙炔基-2'-脱氧尿苷 (EdU) 细胞增殖试剂盒、细胞免疫组化、Western blotting 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司)；2, 7-二氯双氢荧光素

二乙酸酯 (DCFH-DA) 染色试剂盒、Transwell 小室 (美国的 Sigma-Aldrich 公司); 线粒体膜电位检测试剂盒 (JC-1, 天津百浩鑫生物技术有限公司)。

### 1.3 主要仪器

1658033 型垂直蛋白质电泳仪、GelDoc Go Z2X 型凝胶成像分析仪、Trans-Blot Turbo 全能型转膜仪 (美国 Bio-Rad 公司); BM1000 显微镜 (深圳市博视达光学仪器有限公司); MGC-450Q/MGC-300Q 智能细胞培养箱 (江苏迅迪仪器科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞复苏以及分组处理

将肝癌细胞 SK-HEP-1 在 37 °C 水浴锅中复苏, 接种在含有青霉素-链霉素的 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下贴壁生长, 待细胞汇合度达 85%~95% 后, 含 0.25% 的胰酶消化, 取对数生长期的细胞进行实验。

细胞分组如下<sup>[11]</sup>: 对照组, THRF 低、高质量浓度组 (50、100 μg·mL<sup>-1</sup>), THRF (100 μg·mL<sup>-1</sup>) + CC (50 μmol·L<sup>-1</sup>) 组, THRF (100 μg·mL<sup>-1</sup>) + CC (50 μmol·L<sup>-1</sup>) + 3-MA (5 μmol·L<sup>-1</sup>) 组, 对照组不加药, THRF、CC、3-MA 同时加药。

### 2.2 EdU 染色检测各组 SK-HEP-1 细胞的增殖活性

将每孔 1×10<sup>5</sup> 个的 SK-HEP-1 细胞接种在 96 孔板中, 细胞分组给药同“2.1”项, 给药后继续培养 24 h, 设定条件 37 °C、5% CO<sub>2</sub>; 每孔加入适量 EdU 工作液, 避光孵育, 核染之后再次避光孵育, 镜下观察并拍照, 计数 EdU 阳性细胞率。

### 2.3 Transwell 小室检测各组 SK-HEP-1 细胞侵袭

将每孔 6×10<sup>4</sup> 个的 SK-HEP-1 细胞接种在预铺 Matrigel 基质胶的 Transwell 小室上室, 细胞分组给药同“2.1”项, 将细胞下室加入细胞完全培养基, 继续培养 24 h, 加入适量多聚甲醛固定液 10 min 后, 漂洗 3 次, 加入结晶紫<sup>[12]</sup>, 避光孵育后, 显微镜下观察, 统计穿过细胞的数量。

### 2.4 JC-1 染色检测各组 SK-HEP-1 细胞中线粒体膜电位的变化

将每孔 1×10<sup>6</sup> 个的 SK-HEP-1 细胞接种在 24 孔板, 分组给药同“2.1”项, 给药后培养 24 h, 弃掉培养基, 无菌操作台上, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min, 加入适量的 JC-1 染色液, 室温下孵育 90 min, PBS 再次冲洗, 荧光显微镜下观察并拍照, 细胞的线粒体膜电位为红色荧光强度与绿色荧光强度的比值<sup>[13]</sup>。

### 2.5 DCFH-DA 染色检测各组 SK-HEP-1 细胞中的 ROS 含量

将每孔 1×10<sup>6</sup> 个的 SK-HEP-1 细胞接种在 24 孔板, 分组给药同“2.1”项, 给药后培养 24 h, 弃掉培养基, 在 DCFH-DA 试剂盒说明书的指导下进行染色, 再经清洗、透明、封片, 显微镜下观察, 细胞中 ROS 的水平为细胞中绿色荧光强度的均值<sup>[14]</sup>。

### 2.6 MitoTracker Red-Lysotracker green 双染色检测线粒体自噬

将每孔 1×10<sup>6</sup> 个的 SK-HEP-1 细胞接种在 24 孔板, 分组给药同“2.1”项, 给药后培养 24 h, 收集各组细胞后, 加入适量 MitoTracker Red 染色液, 37 °C 避光孵育 20 min, 漂洗 3 次后, 加入 Lysotracker green 染色液, 37 °C 避光孵育 20 min, 拍照分析, 线粒体的自噬情况为绿色荧光强度的均值<sup>[15]</sup>。

### 2.7 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测线粒体自噬、细胞焦亡相关的 mRNA 的表达

将每孔 1×10<sup>6</sup> 个的 SK-HEP-1 细胞接种在 24 孔板, 分组给药同“2.1”项, 给药后培养 24 h, 收集各组细胞, Trizol 法提取总的 RNA, Nano Drop 2000 分光光度计测定其浓度后, Prime Scrip TM 试剂盒合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 扩增, 条件如下: 预变性: 95 °C, 5 s; 变性: 95 °C, 5 s; 退火: 60 °C, 60 s, 40 个循环, 通过 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法来表示各目的基因的相对表达量<sup>[16]</sup>。

### 2.8 Western blotting 检测细胞中 AMPK、mTOR、p-mTOR、Beclin1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的蛋白表达

将每孔 1×10<sup>6</sup> 个的 SK-HEP-1 细胞接种在 24

表 1 各基因的引物序列

Table 1 Primer sequence of each gene

基因		序列 (5'→3')
BECN1	正义链	GGACGAGCTACCCCTTCGGT
	反义链	CTGTCTCACCCCCAGCATAG
Atg5	正义链	TTTCCACAGCAGTCCACCTC
	反义链	AGCATCCTAGCCTTCTCACCC
NLRP3	正义链	GCCTACAGGTGGAGTTGGAG
	反义链	CGGATCTTTTTGCGGTAGAC
GSDMD	正义链	TCTACAGACCTTCCGCGAC
	反义链	GCTTACCAGCACCTCACT
GAPDH	正义链	CTGGTCTTCTGGAGTCCGT
	反义链	TGGTCCTTAGCCACTCCTTCT

孔板, 分组给药同“2.1”项, 给药后培养 24 h, 收集细胞, 在细胞中添加适量的细胞裂解液, 提取样本中的总蛋白。以 50  $\mu\text{g}$  进行电泳分离, 转膜, 封闭; 加入一抗 (1:500) 孵育过夜, 加入二抗 (1:1000) 孵育 30 min, 二氨基联苯胺 (DAB) 显色, 以 GAPDH 作为内参, Image J 图像分析软件统计分析各条带的灰度值<sup>[17]</sup>。

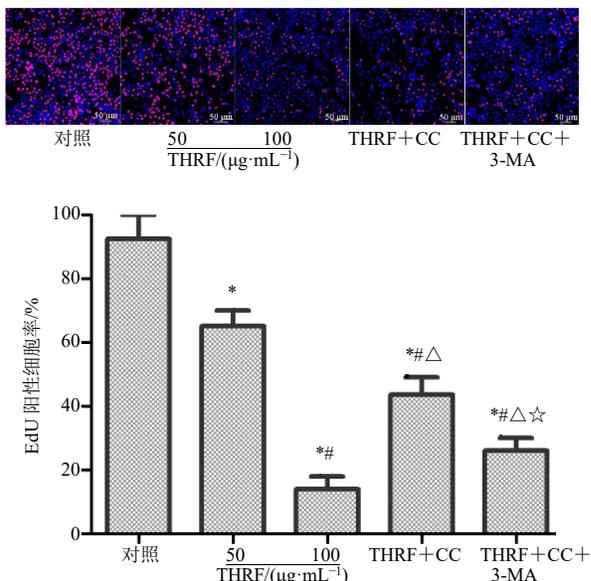
### 2.9 统计学分析

数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析, 采用 Graphpad 8.0 作图, 对于各组样本中的细胞增殖率以及样本中蛋白的表达含量等符合正态分布的数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素分析, 两两比较采用 *t* 检验。

## 3 结果

### 3.1 各组 SK-HEP-1 细胞的增殖活性

EdU 染色检测结果 (图 1) 显示, 与对照组相比, THRF 50 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组、THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组 EdU 阳性细胞率明显降低 ( $P<0.05$ ), SK-HEP-1 细胞的增殖活性明显降低; 与 THRF 低质量浓度组相比, THRF 高质量浓度组细胞中 EdU 阳性细胞率明显降低 ( $P<0.05$ ); 与 THRF 高质量浓度组相比, THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组细



与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与 THRF 低质量浓度组比较: # $P<0.05$ ; 与 THRF 高质量浓度组比较:  $\Delta P<0.05$ ; 与 THRF+CC 组比较: \* $P<0.05$ 。

\* $P<0.05$  vs control group; # $P<0.05$  vs THRF low quality concentration group;  $\Delta P<0.05$  vs THRF high quality concentration group; \* $P<0.05$  vs THRF + CC group.

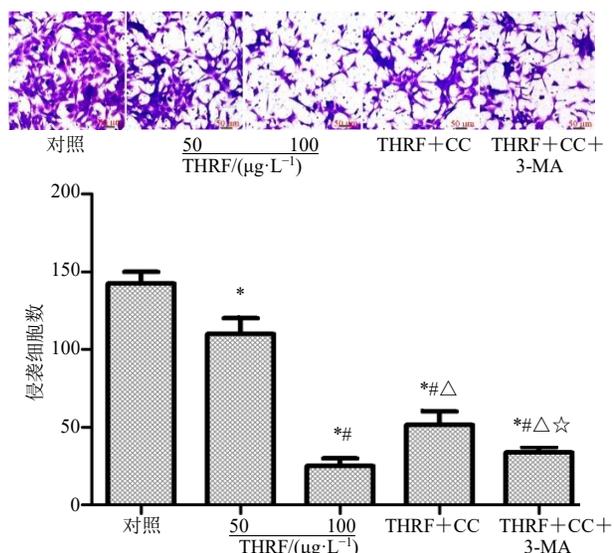
图 1 各组细胞的增殖活性 ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Fig. 1 Proliferation activity of cells in each group ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

胞中 EdU 阳性细胞率明显升高 ( $P<0.05$ ), 与 THRF+CC 组相比, THRF+CC+3-MA 组细胞中 EdU 阳性细胞率明显降低 ( $P<0.05$ )。

### 3.2 各组 SK-HEP-1 细胞的侵袭性能

Transwell 小室染色检测结果显示, 与对照组相比, THRF 50 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组、THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组侵袭细胞的数量明显降低 ( $P<0.05$ ), SK-HEP-1 细胞的侵袭性能明显降低; 与 THRF 低质量浓度组相比, THRF 高质量浓度组侵袭细胞的数量明显降低 ( $P<0.05$ ); 与 THRF 高质量浓度组相比, THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组细胞的侵袭细胞的数量明显升高 ( $P<0.05$ ), 与 THRF+CC 组相比, THRF+CC+3-MA 组细胞的侵袭细胞的数量明显降低 ( $P<0.05$ )。结果见图 2。



与对照组比较: \* $P<0.05$ ; 与 THRF 低质量浓度组比较: # $P<0.05$ ; 与 THRF 高质量浓度组比较:  $\Delta P<0.05$ ; 与 THRF+CC 组比较: \* $P<0.05$ 。

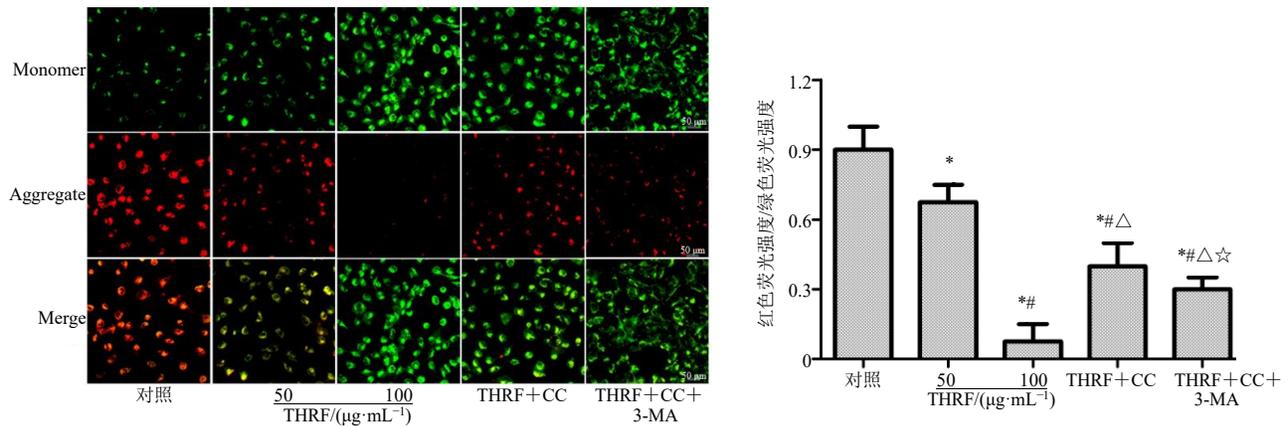
\* $P<0.05$  vs control group; # $P<0.05$  vs THRF low quality concentration group;  $\Delta P<0.05$  vs THRF high quality concentration group; \* $P<0.05$  vs THRF + CC group.

图 2 各组细胞的侵袭能力 ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Fig. 2 Invasive ability of each group of cells ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

### 3.3 各组细胞的线粒体膜电位

如图 3 所示, 与对照组相比, 50 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  THRF 组、THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组细胞中红绿荧光强度的比值明显降低 ( $P<0.05$ ), 线粒体的膜电位明显降低; 与 THRF 低质量浓度组细胞相比, THRF 高质量浓度组细胞中红绿荧光强度的比值明显降低 ( $P<0.05$ ); 与 THRF 高质量浓度组相比, THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组细



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 THRF 低质量浓度组比较: # $P < 0.05$ ; 与 THRF 高质量浓度组比较:  $\Delta P < 0.05$ ; 与 THRF+CC 组比较: \* $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs THRF low quality concentration group;  $\Delta P < 0.05$  vs THRF high quality concentration group; \* $P < 0.05$  vs THRF + CC group.

图 3 各组细胞的线粒体膜电位 ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

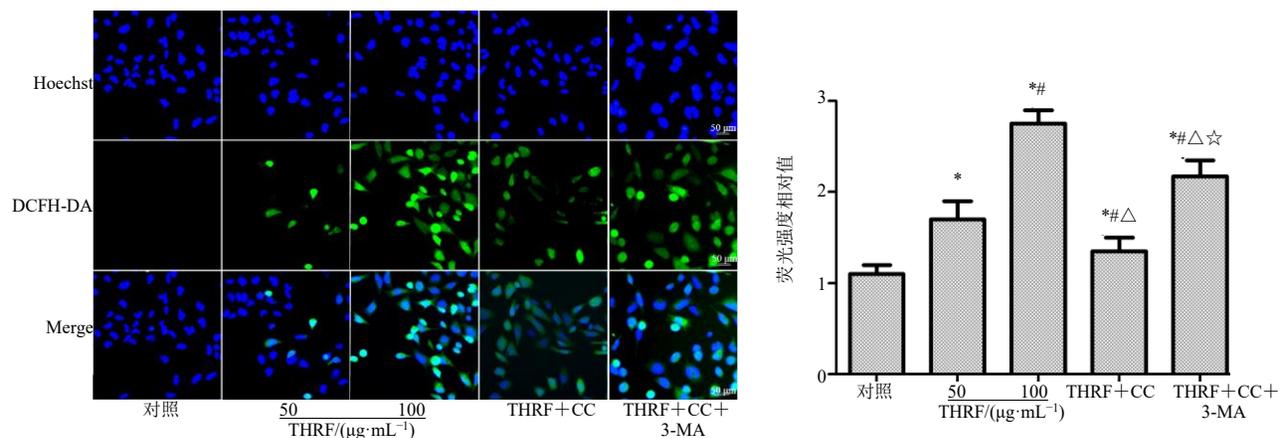
Fig. 3 Mitochondrial membrane potential of each group of cells ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

胞红绿荧光强度的比值明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 THRF+CC 组相比, THRF+CC+3-MA 组细胞中红绿荧光强度的比值明显降低 ( $P < 0.05$ )。

### 3.4 各组 SK-HEP-1 细胞中 ROS 含量

DCFH-DA 染色结果显示, 与对照组相比, THRF 50 和  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组、THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组细胞中绿色荧光强度明显升高 ( $P <$

$0.05$ ), 细胞中的 ROS 的含量明显升高; 与 THRF 低质量浓度组细胞相比, THRF 高质量浓度组细胞中绿色荧光强度明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与 THRF 高质量浓度组相比, THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组细胞绿色荧光强度明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 THRF+CC 组相比, THRF+CC+3-MA 组细胞中绿色荧光强度明显升高 ( $P < 0.05$ )。结果见图 4。



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 THRF 低质量浓度组比较: # $P < 0.05$ ; 与 THRF 高质量浓度组比较:  $\Delta P < 0.05$ ; 与 THRF+CC 组比较: \* $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs THRF low quality concentration group;  $\Delta P < 0.05$  vs THRF high quality concentration group; \* $P < 0.05$  vs THRF + CC group.

图 4 各组细胞中 ROS 的含量 ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Fig. 4 Content of ROS in each group of cells ( $\times 400$ ,  $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

### 3.5 各组 SK-HEP-1 细胞中的线粒体自噬

MitoTracker Red 为一种红色线粒体荧光染料, Lysotracker green 为一种绿色标记自噬体的荧光染

料, 2 者荧光共定位可检测胞内自噬体的进展。本研究中 MitoTracker Red-Lysotracker green 双染色结果显示 (图 5), 对照组中自噬体未见明显染色, 呈现明

显的红色，与对照组相比，THRF 50 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组、THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组细胞中绿色荧光明显增强，自噬体的表达明显升高；与 THRF 低质量浓度组相比，THRF 高质量浓度组细胞中绿色荧光明显增强，自噬体的表达明显升高；与 THRF 高质量浓度组相比，THRF+CC 组、THRF+CC+3-

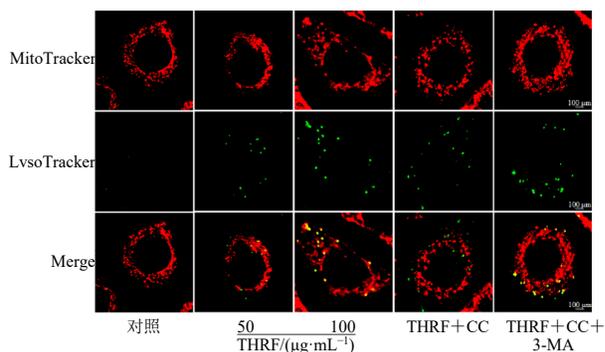
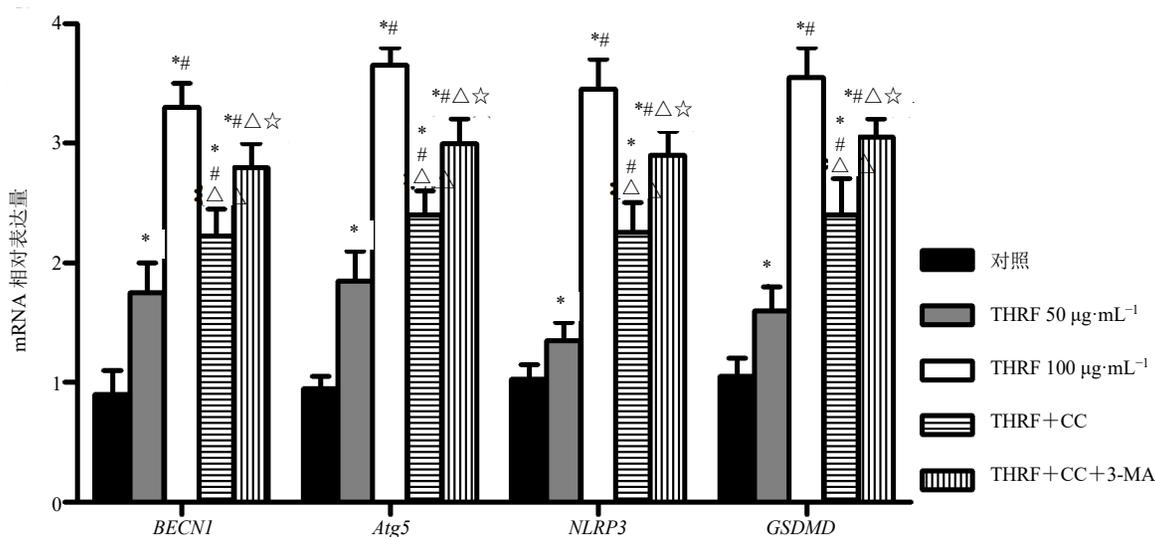


图 5 各组细胞中线粒体自噬的进展 ( $\times 200$ )

Fig. 5 Progress in mitochondrial autophagy each group of cells ( $\times 200$ )



与对照组比较: \* $P < 0.05$ ; 与 THRF 低质量浓度组比较: # $P < 0.05$ ; 与 THRF 高质量浓度组比较: ^ $P < 0.05$ ; 与 THRF+CC 组比较: \* $P < 0.05$ 。

\* $P < 0.05$  vs control group; # $P < 0.05$  vs THRF low quality concentration group; ^ $P < 0.05$  vs THRF high quality concentration group; \* $P < 0.05$  vs THRF + CC group.

图 6 各组细胞中相关基因的 mRNA 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 6 Expression of related genes mRNA in each group of cells ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

### 3.7 Western blotting 检测细胞中 AMPK、mTOR、p-mTOR、Beclin1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的表达

如图 7 所示，与对照组相比，50 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  THRF 组、THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组细胞中 p-mTOR 的表达明显降低 ( $P < 0.05$ )，

MA 组细胞中的绿色荧光强度明显降低，自噬体的表达明显下降；与 THRF+CC 组相比，THRF+CC+3-MA 组细胞中绿色荧光明显增强，自噬体的表达明显升高。

### 3.6 各组 SK-HEP-1 细胞中相关基因的 mRNA 的表达

与对照组相比，THRF 50 和 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组、THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组细胞中 BECN1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的 mRNA 的表达明显升高 ( $P < 0.05$ )；与 THRF 低质量浓度组相比，THRF 高质量浓度组细胞中 BECN1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的 mRNA 的表达明显升高 ( $P < 0.05$ )；与 THRF 高质量浓度组相比，THRF+CC 组、THRF+CC+3-MA 组细胞中 BECN1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的 mRNA 的表达明显降低 ( $P < 0.05$ )；与 THRF+CC 组相比，THRF+CC+3-MA 组细胞中 BECN1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的 mRNA 的表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。结果见图 6。

AMPK、Beclin1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的表达明显升高 ( $P < 0.05$ )；与 THRF 低质量浓度组细胞相比，THRF 高质量浓度组细胞中 p-mTOR 的表达明显降低 ( $P < 0.05$ )，AMPK、Beclin1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的表达明显升高 ( $P < 0.05$ )；与 THRF 高质量浓度组相比，THRF+CC 组、THRF+

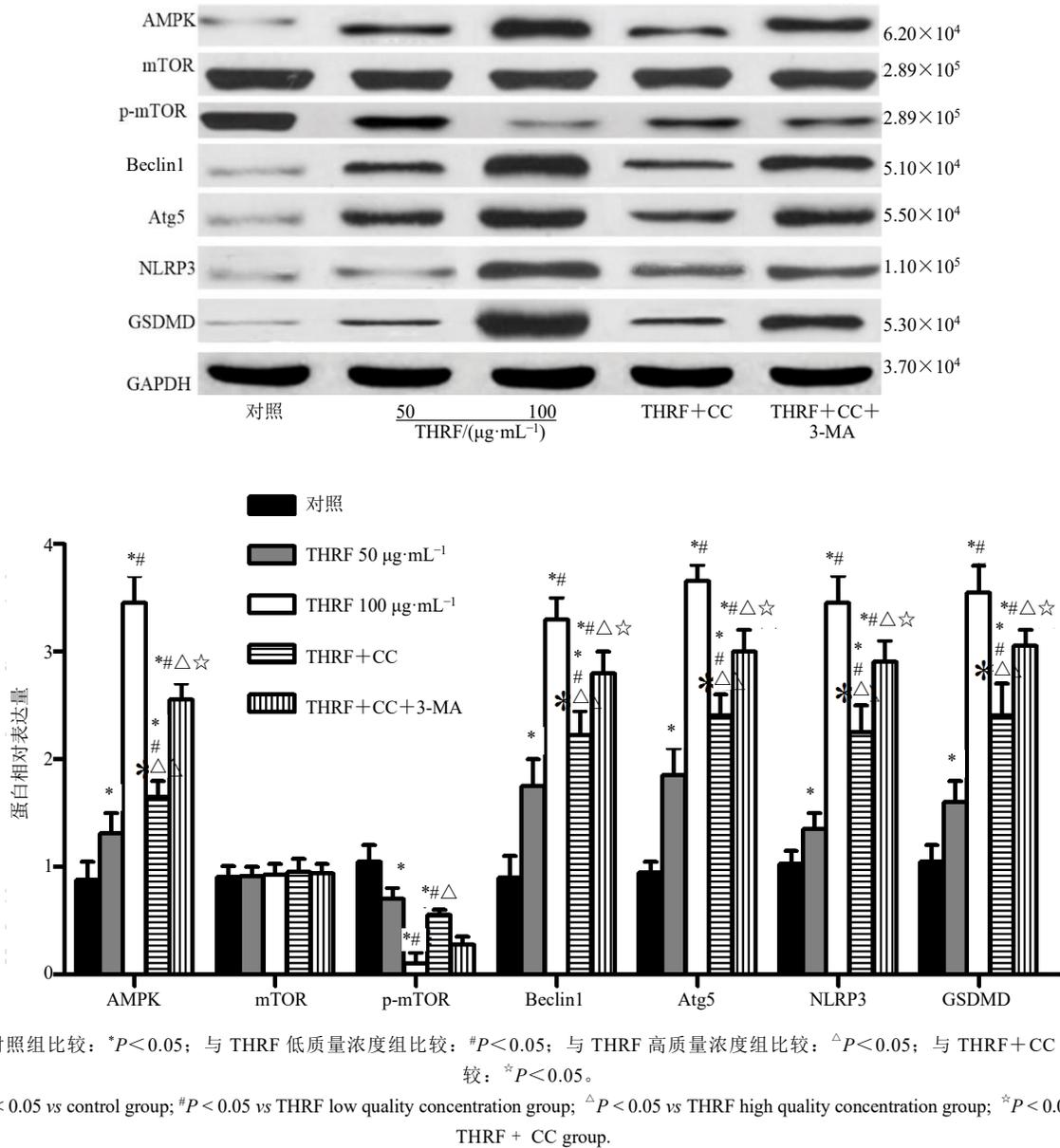


图 7 各组细胞中 AMPK、mTOR、p-mTOR、Beclin1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

Fig. 7 Expression of AMPK, mTOR, p-mTOR, Beclin1, Atg5, NLRP3 and GSDMD in cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n=8$ )

CC+3-MA 组细胞中 p-mTOR 的表达明显升高 ( $P < 0.05$ ), AMPK、Beclin1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的表达明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与 THRF+CC 组相比, THRF+CC+3-MA 组细胞中 p-mTOR 的表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), AMPK、BECN1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的表达明显升高 ( $P < 0.05$ )。

#### 4 讨论

肝癌具有隐匿性高, 致死率高以及术后预后不良等特征, 尽管相关研究取得了一定的进展, 但是疾病的 5 年生存率并未出现明显的提升。因此积极的探索肝癌的发生、发展的分子机制, 探寻有效、

安全而不良反应低的干预药物或措施, 一方面有利于有针对性的基因靶向干预的开展, 另一方面为疾病的诊断与预后提供可靠的靶标信息<sup>[18]</sup>, 还能推动针对疾病的有效新型药物的开发与应用, 有利于提高肝癌晚期患者的生命质量。

在传统医学中, 肝癌隶属于“积证、积聚”“膨胀、肥气”“癥瘕、痞癖”范畴, 《中藏经》指出“积聚癥瘕杂虫者, 皆五脏六腑真气失而邪气并, 遂乃生焉, 久之不除也, 或积, 或聚, 或癥, 或痞”, 因此临床中医师在“清热解毒, 化瘀消肿、软坚散结”等指导下, 减轻患者的临床痛苦, 提高其生命生存

质量, 延长其生存期<sup>[19]</sup>。而作为一种应用广泛的“植物抗生素”, 葡萄科崖爬藤属中的三叶青是一味具有清热解毒、化痰消结、祛风止痛的中草药, 而 TFHR 作为其主要活性组分, 在临床应用上显示了良好的抗肿瘤、免疫调节以及消炎、抗氧化等效用<sup>[20]</sup>。殷金成等<sup>[21]</sup>研究显示以 TFHR 干预人膀胱癌 BIU-87 细胞后, 肿瘤细胞中血管内皮生长因子的表达明显降低, 癌细胞的新生血管能力明显降低, 其增殖性能以及对靶器官的侵袭性能明显下降。李天平等<sup>[22]</sup>研究显示经 TFHR 干预肺癌荷瘤小鼠后, 小鼠肿瘤组织中 BECN1、Atg5、NLRP3 和 GSDMD 的表达明显升高, 肿瘤组织的质量明显降低, 癌细胞的体内生长增殖受限, 线粒体功能紊乱, 显示了良好的体内抑瘤效应。本研究以 SK-HEP-1 细胞为研究对象, 通过低、高剂量的 TFHR 干预后, SK-HEP-1 细胞的增殖、侵袭性能明显降低; 肿瘤细胞的线粒体膜电位下降, 线粒体出现明显的功能紊乱, 细胞中 ROS 的含量明显下降, 这些结果均可证实 TFHR 对 SK-HEP-1 细胞生长的抑制作用。

在正常状态下, 线粒体自噬是胞内进行线粒体质量控制的重要途径之一, 而在疾病如肿瘤等因素的影响下, 线粒体的自噬呈现出过度激活的状态, 而过度线粒体自噬会导致线粒体出现明显的功能紊乱, 进而影响癌细胞的增殖以及运动等生物学行为, 损害肿瘤细胞的生长。而诱导癌细胞趋于过度激活的线粒体自噬过程, 成为干预肿瘤生长的新策略之一<sup>[23]</sup>。作为“能量工厂”——线粒体中最重要的监测器, APMK/mTOR 不仅可在细胞水平作为能量的感受器, 还可以通过调控相关介质或细胞因子

的表达(比如 ROS 等)调控肿瘤细胞的能量的消耗与摄入<sup>[24]</sup>。Peng 等<sup>[25]</sup>研究显示在肺癌细胞中, 激活 AMPK 信号, 提高细胞中 AMPK 的表达, 能明显降低细胞的线粒体膜电位, 升高细胞中 ROS 的含量, 细胞中氧化应激加剧, 肺癌细胞中的物质代谢紊乱, 细胞的增殖率下降, 凋亡升高。Su 等<sup>[26]</sup>研究显示在胰腺癌细胞中, 升高 APMK 的表达降低, p-mTOR 的表达, 能明显增加细胞焦亡相关基因 NLRP3 和 GSDMD 的表达, 降低细胞增殖和侵袭性能。在肝癌细胞 SK-HEP-1 中, APMK/mTOR 信号处于表达受限的状态, 细胞中 APMK 的表达降低, p-mTOR 的表达升高, 细胞中的线粒体自噬能够维系细胞线粒体的正常功能; 细胞中的 ROS 处于较高的状态, 细胞中的 NLRP3 和 GSDMD 的表达处于较低的水平, 细胞焦亡受限; 当以 THRF 干预后, APMK/mTOR 被激活, APMK 的表达升高, p-mTOR 的表达降低, 线粒体自噬呈现过度激活的状态, 线粒体的自噬程度较高, 线粒体膜电位降低, 细胞中 ROS 的水平降低, NLRP3 和 GSDMD 的表达升高, 促进细胞的焦亡; 当以 AMPK 信号抑制剂 CC 进行功能挽救实验, 以自噬抑制剂 3-MA 进行功能回复实验, 结果显示, CC 可部分逆转 THRF 的抑癌效应, 而 3-MA 可部分恢复 THRF 的抑癌效用, THRF 通过 APMK/mTOR 信号介导的线粒体自噬对肝癌细胞的影响机制见图 8。

综上所述, THRF 能明显下调细胞的线粒体膜电位, 升高细胞中 ROS 的含量, 促进细胞的线粒体自噬过度激活, 抑制肝癌细胞的增殖与侵袭活性, 上调细胞焦亡相关基因的表达, 这可能与 THRF 对

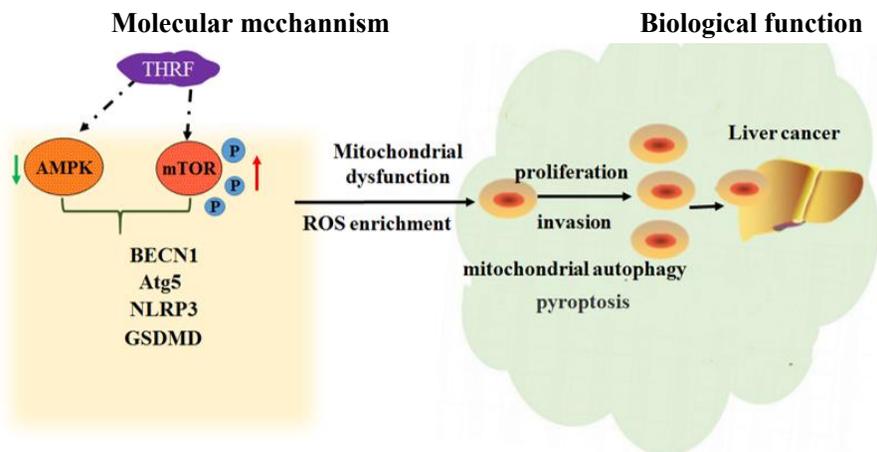


图 8 THRF 通过 APMK/mTOR 信号介导的线粒体自噬对肝癌细胞的影响机制

Fig. 8 Mechanism of THRF mediated mitochondrial autophagy in liver cancer cells through APMK/mTOR signaling

APMK/mTOR 信号介导的线粒体自噬的调控有关。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Sun Y F, Wu P, Zhang Z F, et al. Integrated multi-omics profiling to dissect the spatiotemporal evolution of metastatic hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell*, 2024, 42(1): 135-156.
- [2] Cai N, Cheng K, Ma Y, et al. Targeting MMP9 in CTNNB1 mutant hepatocellular carcinoma restores CD8<sup>+</sup> T cell-mediated antitumour immunity and improves anti-PD-1 efficacy [J]. *Gut*, 2024, 73(6): 985-999.
- [3] Deng Z T, Liang S F, Huang G K, et al. Autophagy plays a pro-apoptotic role in arsenic trioxide-induced cell death of liver cancer [J]. *J Integr Med*, 2024, 22(3): 295-302.
- [4] von Bülow V, Schneider M, Dreizler D, et al. Schistosoma mansoni-induced oxidative stress triggers hepatocellular proliferation [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2024, 17(1): 107-117.
- [5] Sun Z B, Liu L X, Liang H Y, et al. Nicotinamide mononucleotide induces autophagy and ferroptosis via AMPK/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2024, 63(4): 577-588.
- [6] 马祯慧, 李洪霖, 李娜娜, 等. 中药调控 AMPK 信号通路抗消化道肿瘤的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2025, 48(7): 1992-2003.
- Ma Z H, Li H L, Li N N, et al. Research progress on traditional Chinese medicine regulating AMPK signaling pathway against gastrointestinal tumors [J]. *Drug Eval Res*, 2025, 48(7): 1992-2003.
- [7] Zhou Y, Wang Z, Ren S, et al. Mechanism of action of protopanaxadiol ginsenosides on hepatocellular carcinoma and network pharmacological analysis [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 548-557.
- [8] 吕瑞龙, 窦芬瑜, 柴梦娜, 等. 中药调控线粒体自噬抗肿瘤作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2025, 56(8): 3005-3013.
- Lü R L, Dou F Y, Chai M N, et al. Research progress on antitumor mechanism of mitophagy regulated by traditional Chinese medicine [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2025, 56(8): 3005-3013.
- [9] Wang W T, Wang T, Lin H Y, et al. Ropivacaine combined with sorafenib attenuates hepatocellular carcinoma cell proliferation and metastasis by inhibiting the miR-224/HOXD10 axis [J]. *Environ Toxicol*, 2024, 39(4): 2429-2438.
- [10] Peng J Z, Luo X Y, Wang T, et al. *Radix tetragymna Hemsleyana* flavone represses cutaneous squamous cell carcinoma via Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3 pathway inactivation [J]. *Cytokine*, 2024, 175: 156480.
- [11] Ren J H, Yao X Y, Yang M L, et al. Kinesin family member-18A (KIF18A) promotes cell proliferation and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Dig Dis Sci*, 2024, 69(4): 1274-1286.
- [12] Gu X Y, Li P H, Gao X H, et al. RNA 5-methylcytosine writer NSUN5 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation via a ZBED3-dependent mechanism [J]. *Oncogene*, 2024, 43(9): 624-635.
- [13] Gu Y Y, Ding C, Yu T Z, et al. SIRT7 promotes Hippo/YAP activation and cancer cell proliferation in hepatocellular carcinoma via suppressing MST1 [J]. *Cancer Sci*, 2024, 115(4): 1209-1223.
- [14] Yao J P, Liang X, Xu S D, et al. TRAF2 inhibits senescence in hepatocellular carcinoma cells via regulating the ROMO1/NAD<sup>+</sup>/SIRT3/SOD2 axis [J]. *Free Radic Biol Med*, 2024, 211: 47-62.
- [15] Ren X F, Shen L Q, Gao S. Transcription factor E2F1 enhances hepatocellular carcinoma cell proliferation and stemness by activating GINS1 [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2024, 43(1): 79-90.
- [16] Zhang Q Y, Tsui Y M, Zhang V X, et al. Reciprocal interactions between malignant cells and macrophages enhance cancer stemness and M2 polarization in HBV-associated hepatocellular carcinoma [J]. *Theranostics*, 2024, 14(2): 892-910.
- [17] Li Z Y, Pai R, Gupta S, et al. Presence of onco-fetal neighborhoods in hepatocellular carcinoma is associated with relapse and response to immunotherapy [J]. *Nat Cancer*, 2024, 5(1): 167-186.
- [18] 周凤玲, 袁彬, 叶一娴, 等. 基于 CKB/p53 信号通路探讨白花丹醌对人肝癌细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2024, 49(9): 2345-2354.
- Zhou F L, Yuan B, Ye Y X, et al. Effects of plumbagin on proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells based on CKB/p53 signaling pathway [J]. *China J Chin Mater Med*, 2024, 49(9): 2345-2354.
- [19] 张楠楠, 林登梅, 杨凯平, 等. 阔叶十大功劳作用于 FABP5 介导免疫细胞干预肝癌的研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(5): 201-205, 289-294.
- Zhang N N, Lin D M, Yang K P, et al. Study on effect of Kuoye Shida Gonglao [*Mahonia bealei* (Fort.) Carr.] on FABP5 mediated immune cells in liver cancer [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med*, 2024, 42(5): 201-205, 289-294.
- [20] 徐首航, 戴艳, 陆鑫嫣, 等. 三叶青粉联合益肺豁痰解毒汤治疗肺结节 97 例观察 [J]. *浙江中医杂志*, 2024,

- 59(5):401.
- Xu S H, Dai Y, Lu X Y, et al. Observation on the treatment of 97 cases of pulmonary nodules with three leaf green powder combined with Yifei Huotan Jiedu Decoction [J]. Zhejiang J Tradit Chin Med, 2024, 59(5): 401.
- [21] 殷金成, 刘洪新, 顾燕青, 等. 三叶青总黄酮通过 STAT3 信号通路诱导膀胱癌细胞凋亡 [J]. 中国老年学杂志, 2023, 43(19): 4777-4780.
- Yin J C, Liu H X, Gu Y Q, et al. Total flavonoids of *Trifolium* induces apoptosis of bladder cancer cells through STAT3 signal pathway [J]. Chin J Gerontol, 2023, 43(19): 4777-4780.
- [22] 李天平, 贺灵芝, 轩贵平, 等. 三叶青黄酮对肺癌小鼠抗肿瘤作用的研究 [J]. 临床医学进展, 2023, 13(7):11103-11107.
- Li T P, He L Z, Xuan G P, et al. Study on the Anti-Tumor Effect of Sanyeqing Flavonoids on Lung Cancer Mice [J]. Progress in Clinical Medicine, 2023, 13(7):11103-11107.
- [23] Awad D, Cao P H A, Pulliam T L, et al. Adipose triglyceride lipase is a therapeutic target in advanced prostate cancer that promotes metabolic plasticity [J]. Cancer Res, 2024, 84(5): 703-724.
- [24] He J, Xiang L, Zhu T T, et al. Maackiain suppresses the development of cervical cancer via AMPK priming autophagy [J]. J Pharm Pharmacol, 2024, 76(1): 23-33.
- [25] Peng S J, Chen G D, Yu K N, et al. Synergism of non-thermal plasma and low concentration RSL3 triggers ferroptosis via promoting xCT lysosomal degradation through ROS/AMPK/mTOR axis in lung cancer cells [J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 112.
- [26] Su J, Wang D S, Hu G X, et al. Anti-pancreatic cancer activity of cassane diterpenoids isolated from the seeds of *Caesalpinia sappan* mediated by autophagy activation via ROS/AMPK/mTORC1 pathway [J]. Phytochemistry, 2024, 222: 114105.

[责任编辑 兰新新]