

柴胡不同极性部位对肝癌 SMMC-7721 细胞的影响及机制研究

王威宇^{1,2,3}, 陈一笑^{1,2,3}, 白帅东^{1,2,3}, 冯建有^{1,2,3}, 秦雪梅^{1,2,3}, 高晓霞^{1,2,3*}

1. 山西大学 中医药现代研究中心, 山西 太原 030006

2. 山西大学 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006

3. 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

摘要: 目的 探究柴胡 *Bupleuri Radix* 不同极性部位对人肝癌 SMMC-7721 细胞的影响及相关机制。方法 不同极性部位的柴胡作用于 SMMC-7721 细胞后, 采用 MTT 法考察细胞增殖能力; 采用划痕实验考察细胞迁移能力; 采用流式细胞仪检测细胞周期及凋亡; 采用 qRT-PCR 及 Western blotting 检测柴胡低极性部位 (LPB) 组和中极性部位 (MPB) 组干预后肝癌细胞与周期阻滞、凋亡及迁移相关的基因与蛋白表达; 采用代谢组学技术检测 LPB 和 MPB 干预前后肝癌细胞内源性差异物的变化, 采用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析 LPB 和 MPB 调节的代谢通路。结果 与对照组比较, LPB、MPB 能够显著抑制 SMMC-7721 细胞增殖 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), LPB 能够显著抑制细胞迁移 ($P < 0.05$ 、 0.01)。LPB 阻滞细胞于 G₁ 期和 G₂ 期, MPB 阻滞细胞于 G₂ 期。LPB 显著下调肝癌细胞中神经元 PAS 结构域蛋白 2 (neuronal pas domain protein 2, NPAS2)、细胞周期蛋白依赖性激酶 1 (cyclin dependent kinase 1, CDK1)、CDK2、细胞周期蛋白 B1 (Cyclin B1)、Cyclin E 基因表达 ($P < 0.05$), MPB 显著下调细胞分裂周期蛋白 25B (cell division cycle 25B, CDC25B)、CDK1、Cyclin B1 基因表达 ($P < 0.05$)。LPB 显著下调 NPAS2、CDC25A 蛋白表达 ($P < 0.01$), LPB 和 MPB 显著下调 B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 蛋白表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 上调 Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9)、组织金属蛋白酶抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。代谢组学结果显示肝癌的发生与甘油磷脂代谢、鞘磷脂代谢等 7 种代谢通路的紊乱密切相关。结论 LPB 和 MPB 能够抑制肝癌细胞的增殖, 并促进其凋亡, 肝癌细胞阻滞于 G₁ 期主要与 Npas2-CDC25A-CDK2-Cyclin E 复合物有关, 阻滞于 G₂ 期主要与 CDC25B-CDK1-Cyclin B1 复合物有关, 凋亡主要与 Npas2-CDC25A 靶点以及激活线粒体凋亡途径相关。此外, LPB 和 MPB 可干预甘油磷脂代谢、鞘磷脂代谢等代谢途径发挥抗肝癌作用。

关键词: 柴胡; 肝癌; 凋亡; 细胞周期; 代谢组学; 甘油磷脂代谢; 鞘磷脂代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)07-2271-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.07.014

Effect and mechanism of different polarity fractions of *Bupleuri Radix* on hepatocellular carcinoma SMMC-7721 cells

WANG Weiyu^{1,2,3}, CHEN Yixiao^{1,2,3}, BAI Shuidong^{1,2,3}, FENG Jianyou^{1,2,3}, QIN Xuemei^{1,2,3}, GAO Xiaoxia^{1,2,3}

1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

2. Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

3. Shanxi Key Laboratory of Active Constituents Research and Utilization of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030006, China

Abstract: Objective To explore the effect and related mechanisms of different polarity parts of Chaihu (*Bupleuri Radix*) on human liver cancer SMMC-7721 cells. **Methods** After treating SMMC-7721 cells with different polarity parts of *Bupleuri Radix*, the cell

收稿日期: 2023-10-03

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82174099); 山西省基础应用项目面上项目 (20210302123432); 名优晋药再开发山西省重点实验室 (202104010910001); 地产中药功效物质研究与利用山西省重点实验室 (201605D111004); 山西省科技创新人才团队专项资助

作者简介: 王威宇 (1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中医药代谢组学。Tel: 13516090366 E-mail: 202224303012@email.sxu.edu.cn

*通信作者: 高晓霞, 女, 博士生导师, 教授, 从事中药药代动力学、中医药代谢组学等方面研究。

Tel: (0351)7019297 E-mail: gaioxiaxia@sxu.edu.cn

proliferation ability was evaluated using MTT assay; Scratch assay was used to examine cell migration ability; Flow cytometry was used to detect cell cycle and apoptosis; qRT-PCR and Western blotting were used to detect the expressions of gene and protein related to cycle arrest, apoptosis and migration in liver cancer cells after intervention with low polarity part (LPB) and medium polarity part (MPB) of *Bupleuri Radix*; Metabolomics techniques was used to detect changes in endogenous foreign bodies in liver cancer cells before and after LPB and MPB intervention, and the metabolic pathways regulated by LPB and MPB were analyzed by Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG). **Results** Compared with control group, LPB and MPB could significantly inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), LPB could significantly inhibit the cell migration ($P < 0.05, 0.01$). LPB blocked cells in G₁ and G₂ phases, while MPB blocked cells in G₂ phase. LPB significantly down-regulated the gene expressions of neuronal PAS domain protein 2 (*NPAS2*), cyclin dependent kinase 1 (*CDK1*), *CDK2*, *Cyclin B1* and *Cyclin E* in liver cancer cells ($P < 0.05$), while MPB significantly down-regulated the gene expressions of cell division cycle 25B (*CDC25B*), *CDK1* and *Cyclin B1* ($P < 0.05$). LPB significantly down-regulated the protein expressions of NPAS2 and CDC25A ($P < 0.01$), LPB and MPB significantly down-regulated the protein expressions of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) ($P < 0.01, 0.001$), and up-regulated the protein expressions of Bcl-2 associated X protein (Bax), cytochrome C (Cyt-C), cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The metabolomics results showed that the occurrence of liver cancer was closely related to the disruption of seven metabolic pathways, including glycerophospholipid metabolism and sphingophospholipid metabolism. **Conclusion** LPB and MPB can inhibit the proliferation of liver cancer cells and promote cell apoptosis. The arrest of liver cancer cells in the G₁ phase is mainly related to the Npas2-CDC25A-CDK2-Cyclin E complex, and in the G₂ phase is mainly related to the CDC25B-CDK1-Cyclin B1 complex. Apoptosis is mainly related to the Npas2-CDC25A target and the activation of mitochondrial apoptosis pathway. In addition, LPB and MPB can intervene in metabolic pathways such as glycerophospholipid metabolism and sphingophospholipid metabolism to exert anti liver cancer effects.

Key words: *Bupleuri Radix*; liver cancer; apoptosis; cell cycle; metabolomics; glycerophospholipid metabolism; sphingophospholipid metabolism

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤，为前 5 种最致命癌症中唯一一种发病率每年增加的癌症^[1]。具有前期不易诊断、晚期致死率高等特点，严重威胁到患者的生命。而长时间使用肿瘤消融技术和化疗治疗不仅随着时间增加会产生耐药性，而且给患者增加了经济负担，而中医药在治疗肝癌方面的功效日渐突出，其针对肝癌伴发病状的改善、癌痛的减轻或减缓、癌症患者生存期的延长等方面发挥着重大作用^[2-4]。

柴胡是伞形科植物柴胡 *Bupleurum chinense* DC.或狭叶柴胡 *B. scorzonifolium* Willd.的干燥根，具有疏散退热、疏肝解郁的功效^[5]。柴胡对肝纤维化，肝癌等肝脏性疾病疗效显著，以柴胡为君药的柴胡类方防治肝癌成为临床报道及研究的焦点^[6]。张雯雯等^[7]将小柴胡汤联合肝动脉化疗栓塞治疗原发性肝癌疗效显著，显著提高了患者生活质量；王克穷运用大柴胡汤于治疗原发性肝癌^[8]，取得了满意的疗效。现代药理学研究表明，柴胡注射液对人肝癌 SMMC-7721 细胞有阻滞及促凋亡的作用^[9]；小柴胡汤含药血清诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡和自噬^[10]。柴胡有效成分柴胡皂苷能够发挥抗肝癌作用，柴胡皂苷 b₂ 能够通过调控丝氨酸/苏氨酸蛋白

激酶 4 (serine/threonine-protein kinase 4, STK4) /白细胞介素-1 受体相关激酶 1 (IL-1 receptor associated kinase 1, IRAK1) /核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 通路抑制原发性肝癌^[11]；柴胡皂苷 D 对 HepG2 细胞增殖和裸鼠肝癌形成具有抑制作用^[12]。但柴胡其他有效成分如柴胡多炔、挥发油类等抗肝癌作用尚未研究。柴胡不同极性部位的化学成分不同，如课题组前期发现柴胡低极性部位含有多种多炔类成分^[13]，因此探究柴胡不同极性部位的抗肝癌药效和作用机制的研究尤为重要。

本研究以 SMMC-7721 细胞及人正常肝细胞 LO-2 为对象，明确柴胡不同极性部位抗肝癌药效强弱，采用分子生物学与代谢组学的方法探究柴胡不同极性部位的抗肝癌作用与机制，从而在分子层面及代谢方面对柴胡抗肝癌机制有更深入的认识，为临床肝癌治疗提供理论基础。

1 材料

1.1 细胞

SMMC-7721 和 LO-2 细胞均购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 药材

北柴胡 (批号 1805215131) 购自安国市吉腾达

药材有限公司, 经山西大学秦雪梅教授鉴定为伞形科植物柴胡 *B. chinense* DC. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

DMEM 高糖培养基 (批号 E709FA0003) 购自上海生物工程股份有限公司; 0.25% 胰酶 (批号 13F09A67) 购自武汉博士德生物工程有限公司; 胎牛血清 (批号 20170621) 购自天杭生物科技股份有限公司; MTT、二甲基亚砷 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自北京索莱宝科技有限公司; 分析级石油醚、醋酸乙酯购自北京化工试剂; 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-FU) 购自北京北大药业有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 PAB180007) 购自武汉贝茵莱生物科技有限公司; SYBR Green PCR 试剂盒 (批号 KM4101) 购自美国 Kapa Biosystem 公司; 逆转录试剂盒 (批号 639505) 购自日本 Takara 公司; 兔抗人神经元 PAS 结构域蛋白 2 (neuronal pas domain protein 2, NPAS2) 抗体 (批号 H00004862-D01)、细胞分裂周期蛋白 25A (cell division cycle 25A, CDC25A) 抗体 (批号 PAB0425) 购自 Abnova 公司; 基质金属蛋白酶-9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 抗体 (批号 HPA001238) 购自美国 Sigma-Aldrich 公司; B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体 (批号 AB112)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (批号 AG1208) 购自 Beyotime 公司; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3) 抗体 (批号 ab49822) 购自英国 Abcam 公司; 组织金属蛋白酶抑制因子-1 (tissue inhibitor of metalloproteinase-1, TIMP-1) 抗体 (批号 orb1248799)、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C) 抗体 (批号 orb804756) 购自英国 Biorbyt 公司; 无水乙醇、氯仿、异丙醇 (批号分别为 10009218、10006818、80109218) 购自国药集团有限公司; 乙腈、甲酸 (质谱级) 购自 Thermo Fisher Scientific 公司; β -actin 抗体 (批号 AC038) 购自武汉爱博泰克公司; HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗 (批号 A1054) 购自美国 Boster 公司。

1.4 仪器

Infinite M200 Pro 型酶标仪 (瑞士 Tecan 公司); Neofuge 1600R/1600 型低温离心机 (力康集团); D180 型细胞培养箱 (瑞沃德生命科技有限公司); NovoCyte 型流式细胞分析仪 (ACEA 公司); EPS300r 型电泳仪、5200 型化学发光分析仪 (上海天能科技有限公司); Q Exactive UPLC-MS 型超高

效液相色谱与质谱联用仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

2 方法

2.1 柴胡不同极性部位及给药溶液的制备

2.1.1 柴胡不同极性部位的制备 柴胡不同极性部位的制备详见课题组前期报道^[14], 以 95% 乙醇提取柴胡 (1 kg), 后采用石油醚萃取得到低极性部位 (LPB); 石油醚萃取后剩余部位加入醋酸乙酯超声萃取, 得中极性部位 (MPB); 醋酸乙酯萃取后, 剩余部位与药渣 2 次水提物合并, 得到高极性部位 (HPB)。浓缩减压干燥 (60 °C), 分别得到 LPB 64 g、MPB 33 g、HPB 168 g。LPB 含柴胡多炔 RB₂、RB₄ 等代表性活性成分; MPB 含芦丁、腺苷等成分; HPB 含柴胡皂苷 A、柴胡皂苷元 G 等 20 种皂苷成分。

2.1.2 给药溶液的制备

(1) LPB 的制备: 称取约 15 mg LPB 置于 1.5 mL EP 管, 加入 150 μ L DMSO, 涡旋、超声、离心, 得到 150 μ L 质量浓度为 0.1 mg/ μ L 的储备液; 取 10 μ L 储备液加入到 10 mL DMEM 高糖培养基中制得 100 μ g/mL 的工作液, 依次稀释工作液得到质量浓度分别为 5、15、25、35、45、65 μ g/mL (折合成生药量分别为 0.078、0.234、0.390、0.546、0.703、1.015 mg/mL) 的给药溶液。

(2) MPB 的制备: 同 LPB 的制备方法, 得到质量浓度分别为 2、4、6、8、14、16 μ g/mL (折合成生药量分别为 0.061、0.121、0.181、0.242、0.424、0.485 mg/mL) 的溶液。

(3) HPB 的制备: 配制得到质量浓度为 1 000 μ g/mL (折合成生药量为 5.952 mg/mL) 的给药溶液。

2.2 细胞培养

SMMC-7721 和 LO-2 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U/L 青霉素、100 μ g/L 链霉素的 DMEM 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

2.3 MTT 法检测 SMMC-7721 和 LO-2 细胞增殖

SMMC-7721 和 LO-2 细胞分别以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中, 100 μ L/孔, 培养 24 h 待细胞贴壁后, 设置对照组, LPB 组 (生药量 0.078、0.234、0.390、0.546、0.703、1.015 mg/mL), MPB 组 (生药量 0.061、0.121、0.181、0.242、0.424、0.485 mg/mL) 和 HPB 组 (生药量 5.952 mg/mL), 每组设 3 个复孔。各给药组加入相应药物, 对照组加入不含药物的培养基, 培养 24 h。每孔加入 100 μ L 含 10% MTT 的培养基, 培养 4 h 后弃上清液, 加入 100 μ L DMSO,

振荡摇匀,采用酶标仪在 490 nm 处测定吸光度(A)值,计算细胞存活率^[9]。

2.4 流式细胞仪检测 SMMC-7721 细胞周期及凋亡

SMMC-7721 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,设置对照组,LPB(生药量 0.234、0.390、0.546 mg/mL)组和 MPB(生药量 0.121、0.181、0.242 mg/mL)组,检测细胞周期;设置对照组、LPB(生药量 0.390 mg/mL)组和 MPB(生药量 0.181 mg/mL)组,检测细胞凋亡。对照组仅加入培养基,其余各组加入相应药物,培养 24 h,收集细胞,按照文献方法处理^[15-16],上机检测细胞周期与凋亡。

2.5 划痕实验检测 SMMC-7721 细胞迁移

SMMC-7721 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,培养 12 h 后,于孔中央用 200 μ L 枪头垂直“一”字划痕,用预冷的 PBS 缓冲液洗涤以清除细胞碎片。设置对照组、LPB(生药量 0.390 mg/mL)组和 MPB(生药量 0.181 mg/mL)组,对照组加入培养基,给药组加入药物,分别于 0、12、24、36 h 观察划痕伤口愈合情况并拍照,用 Photoshop CS4 软件“多边形套索工具”计算划痕面积^[9]。

2.6 qRT-PCR 和 Western blotting 检测相关基因和蛋白表达

SMMC-7721 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中,设置对照组、LPB(生药量 0.390 mg/mL)和 MPB(生药量 0.181 mg/mL)组,对照组加入培养基,给药组加入药物,培养 24 h,收集细胞,按照试剂盒说明书提取总 RNA 并合成 cDNA,进行 qRT-PCR 分析,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')	扩增片段/bp
Npas2	F: GCACTAAAGGACAAGGG	93
	R: TGGCGAATGACTGGTAT	
CDC25A	F: CCTTGACAACCGATGC	202
	R: CAGGGATAAAGACTGATGAA	
CDC25B	F: ACAGCGAAACCCAAAGA	243
	R: TGATGGCAAACCTGCTCGT	
CDK1	F: GGAACCTTCGTCATCCAAATA	129
	R: TACTGACCAGGAGGGATAGA	
CDK2	F: GAAACAAGTTGACGGGAGA	171
	R: TGATGAGGGGAAGAGGAA	
Cyclin B1	F: GCACTTTCCTCCTTCTCA	100
	R: CGATGTGGCATACTTGTT	
Cyclin E	F: GGATGTTGATGCCTTGA	105
	R: CACCACTGATACCCTGAAA	
GAPDH	F: CCACTCCTCCACCTTGT	106
	R: CACCACCCTGTTGCTGT	

收集细胞,加入含蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液,4 $^{\circ}$ C 充分裂解细胞,95 $^{\circ}$ C 加热 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,收集上清。BCA 法进行蛋白定量,蛋白样品经 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h 后,分别加入一抗(1:1 000),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜;加入二抗,室温孵育 1 h,用 ECL 显影,扫描条带^[9]。

2.7 代谢组学研究

2.7.1 分组及给药处理 取 8 mL SMMC-7721 细胞培养液置于培养皿中培养 24 h,弃去培养液,分别加入 8 mL LPB(生药量 0.390 mg/mL)和 MPB(生药量 0.181 mg/mL)继续培养 24 h,以不加入药物的 SMMC-7721 细胞作为模型组,不加入药物的 LO-2 作为正常组,每组平行 6 个样本。刮取细胞,加入预冷 PBS 离心清洗 2 遍,超声破碎细胞,乙腈沉淀蛋白,低温 13 000 r/min 离心 15 min,取上清液转移到干净 EP 管,于真空冷冻离心机干燥。以 200 μ L 初始流动相(0.1%甲酸水溶液-乙腈 9:1)复溶,低温 13 000 r/min 离心 15 min,上清液进 UPLC-MS 分析^[17]。另各取正常组、模型组、LPB 组、MPB 组细胞样本液 20 μ L 混合,作为质控样本。

2.7.2 液相条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m);流动相为 0.1%甲酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱:0~4 min,2% B;4~5 min,2%~3% B;5~8 min,3%~15% B;8~13 min,15%~35% B;13~17 min,35%~55% B;17~23 min,55%~70% B;23~26 min,70%~80% B;26~28 min,80%~85% B;28~36 min,85%~95% B;36~38 min,95% B;38~40 min,95%~2% B;40~41 min,2% B;体积流量 0.2 mL/min;进样量 5 μ L;柱温 40 $^{\circ}$ C。

2.7.3 质谱条件 采用 ESI 离子化方式,喷雾电压为正极 3.5 kV,负极-2.5 kV;毛细管温度 320 $^{\circ}$ C;加热器温度 300 $^{\circ}$ C;鞘气体积流量 35 arb;辅助气体积流量 10 arb;扫描模式为 Full Scan/dd-MS²,采集范围 m/z 100~1 500,正、负离子切换采集模式。分辨率采用 MS Full Scan 35 000 FWHM,MS/MS 17 500 FWHM,碰撞能量为 12.5、25、37.5 eV^[18]。

2.7.4 数据处理 原始 LC-MS/MS 数据 raw 文件导入 Compound Discoverer 3.0 软件,使用 SIMCA 14.1 进行分析,结合变量投影重要性(variable importance in the project, VIP) >1 和独立样本 t 检验 $P < 0.05$ 筛选共线性最大的差异变量。差异代谢物鉴定指认

主要通过相关文献报道、HMDB及NCBI数据库；接着将已鉴定的差异代谢物借助京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)在线数据库及相关文献报道富集到相关代谢通路。

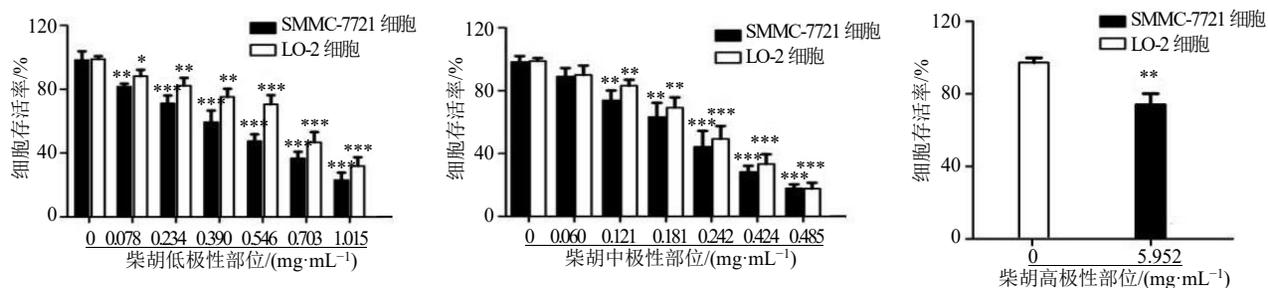
2.8 统计学分析

SPSS statistics 16.0、Graphpad Prism 7.0、Excel 2016等软件处理，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组数据间差异性比较采用SPSS 16.0软件进行t检验，采用GraphPad Prism 7.0软件绘图。

3 结果

3.1 柴胡不同极性部位对SMMC-7221和LO-2细胞增殖的影响

如图1所示，LPB的质量浓度为0.078~1.015 mg/mL时，显著抑制SMMC-7221和LO-2细胞存活率($P < 0.05, 0.01, 0.001$)，且呈剂量相关性，其中对SMMC-7221细胞的抑制作用更强；MPB的质量浓度为0.060~0.484 mg/mL时，显著抑制SMMC-7221和LO-2细胞存活率($P < 0.01, 0.001$)，且呈剂量相关性，其中对SMMC-7221细胞的抑制作用



与对照组(0 mg·mL⁻¹)比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group (0 mg·mL⁻¹), same as below figures.

图1 柴胡不同极性部位对SMMC-7221和LO-2细胞增殖的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of different polarity fractions of *Bupleuri Radix* on proliferation of SMMC-7221 and LO-2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

更强。HPB的质量浓度为5.952 mg/mL时，干预肝癌细胞24 h后，肝癌细胞的存活率仍大于75%，药效相较于LPB和MPB弱，故后续实验未对该部位进行机制研究。

3.2 LPB和MPB对SMMC-7221细胞周期和凋亡的影响

如图2-A所示，与对照组比较，LPB(0.546 mg/mL)组G₁期细胞比例显著升高($P < 0.05$)，LPB(0.390、0.546 mg/mL)组S期细胞比例显著降低($P < 0.05$)，G₂期细胞比例显著升高($P < 0.05$)，表明LPB阻滞SMMC-7221细胞于G₁期和G₂期；如图2-B所示，与对照组比较，MPB(0.181 mg/mL)组G₁期细胞比例显著降低($P < 0.05$)，S期和G₂期细胞比例显著升高($P < 0.05$)；MPB(0.242 mg/mL)组S期细胞比例显著降低($P < 0.05$)，G₂期细胞比例显著升高($P < 0.05$)。根据半数抑制浓度(half inhibitory concentration, IC₅₀)值选择LPB(0.390 mg/mL)组和MPB(0.181 mg/mL)组进行凋亡实验。

如图3所示，LPB(0.390 mg/mL)组和MPB

(0.181 mg/mL)组作用于SMMC-7221细胞24 h后，细胞凋亡率明显升高($P < 0.001$)。

3.3 LPB和MPB对SMMC-7221细胞迁移的影响

如图4所示，与对照组比较，LPB显著抑制SMMC-7221细胞迁移($P < 0.05, 0.01$)，表明LPB具有抑制肝癌细胞迁移的作用。

3.4 LPB和MPB对SMMC-7221细胞周期、凋亡和迁移相关基因和表蛋白达的影响

3.4.1 细胞周期相关基因与蛋白表达 如图5-A、B所示，与对照组比较，LPB组NPAS2、CDK1、CDK2、Cyclin B1、Cyclin E mRNA表达水平均显著下降($P < 0.05$)，CDC25A、CDC25B mRNA呈下降趋势；MPB组CDC25B、CDK1、Cyclin B1 mRNA表达水平显著下降($P < 0.05$)。为了探究LPB组诱导阻滞与生物钟NAPS2基因的关系，采用Western blotting检测NAPS2、CDC25A蛋白表达(图5-C)，结果显示，LPB组NAPS2、CDC25A蛋白表达水平均显著下降($P < 0.01$)。

3.4.2 凋亡相关蛋白表达 如图5-D所示，与对照组比较，LPB和MPB组Bax、Bax/Bcl-2、Cyt-C、

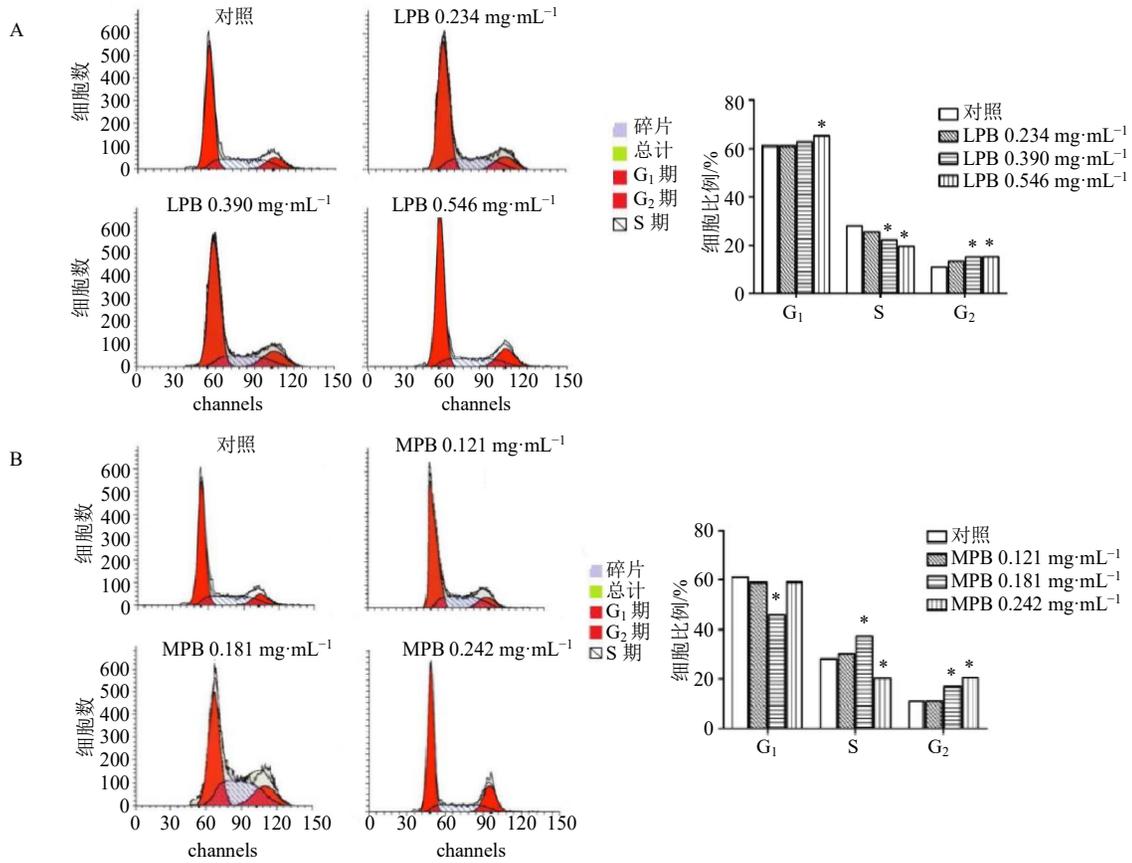


图2 LPB (A) 和 MPB (B) 对 SMMC-7721 细胞周期的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effects of LPB (A) and MPB (B) on cell cycle of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

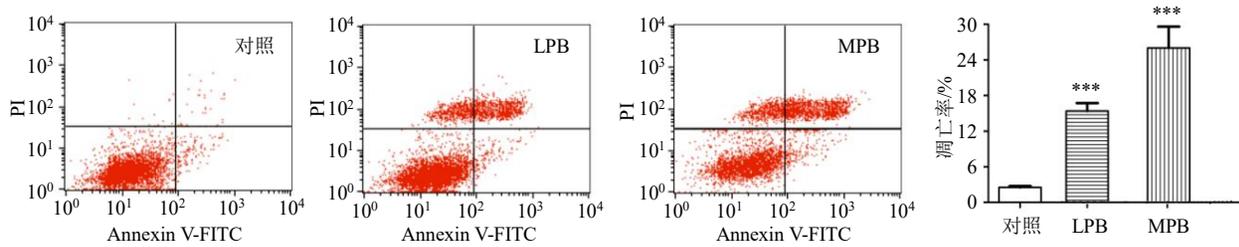


图3 LPB 和 MPB 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Effects of LPB and MPB on apoptosis of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

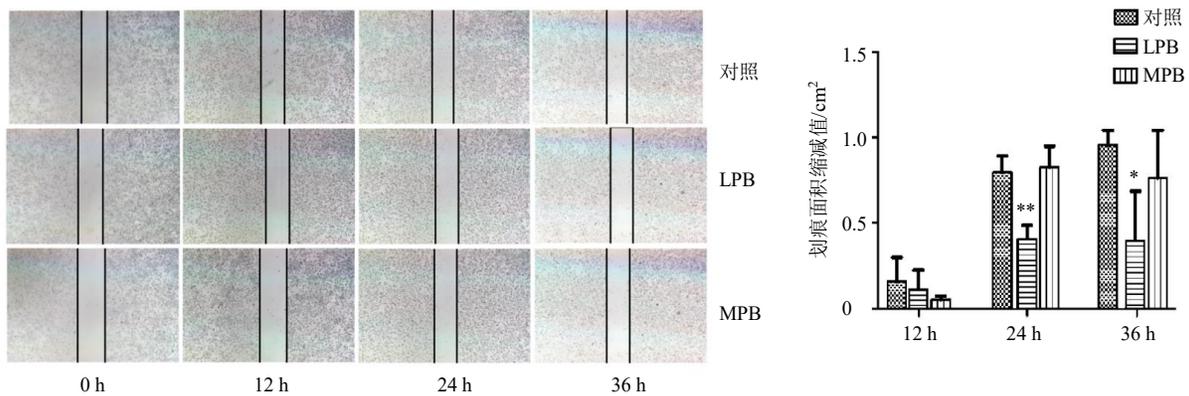


图4 LPB 和 MPB 对 SMMC-7721 细胞迁移的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effects of LPB and MPB on migration of SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

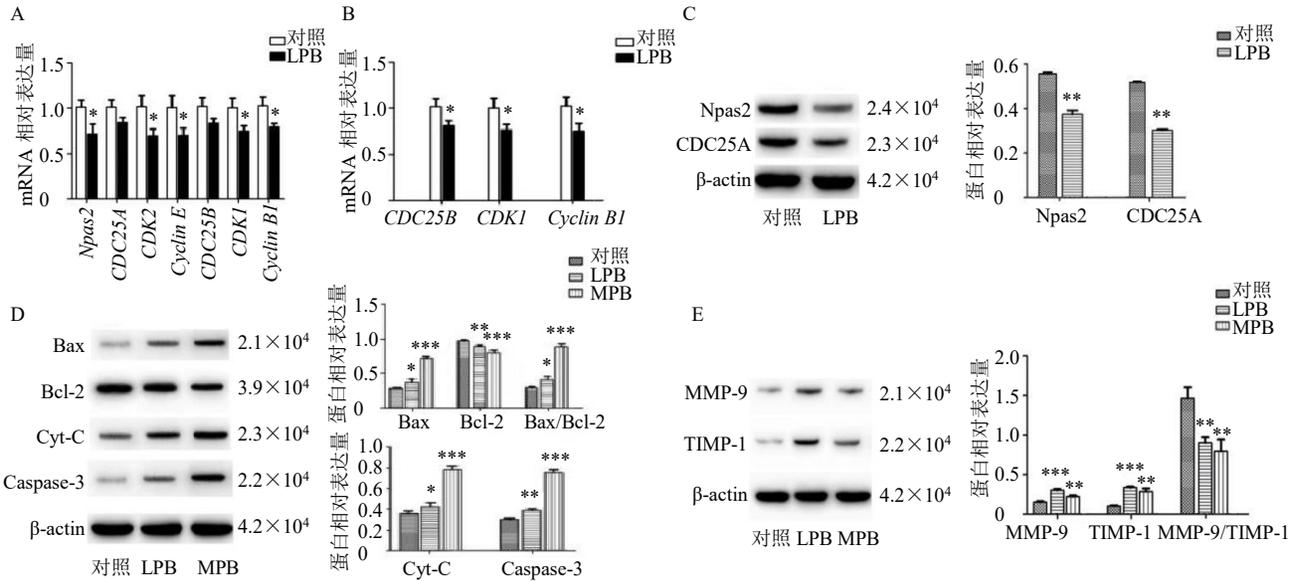


图5 LPB和MPB对SMMC-7721细胞周期(A~C)、凋亡(D)和迁移(E)相关蛋白及基因表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
 Fig. 5 Effects of LPB and MPB on cell cycle (A—C), apoptosis (D) and migration (E) related protein and gene expressions in SMMC-7721 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Caspase-3 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), Bcl-2 蛋白水平显著降低 ($P < 0.01, 0.001$)。3.4.3 迁移相关蛋白表达 如图 5-E 所示, 与对照组比较, LPB 和 MPB 组 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.01, 0.001$), MMP-9/TIMP-1 值显著降低 ($P < 0.01$)。

3.5 代谢组学分析

3.5.1 代谢轮廓数据采集 采用课题组前期建立的 UPLC-MS 方法^[9]对正常组、模型组、LPB 组和 MPB 组样品进行数据采集, 分别采集正、负离子 2 种模式来提高代谢物的覆盖度。由总离子流色谱图 (图 6) 可知, 各组之间代谢成分具有差异。

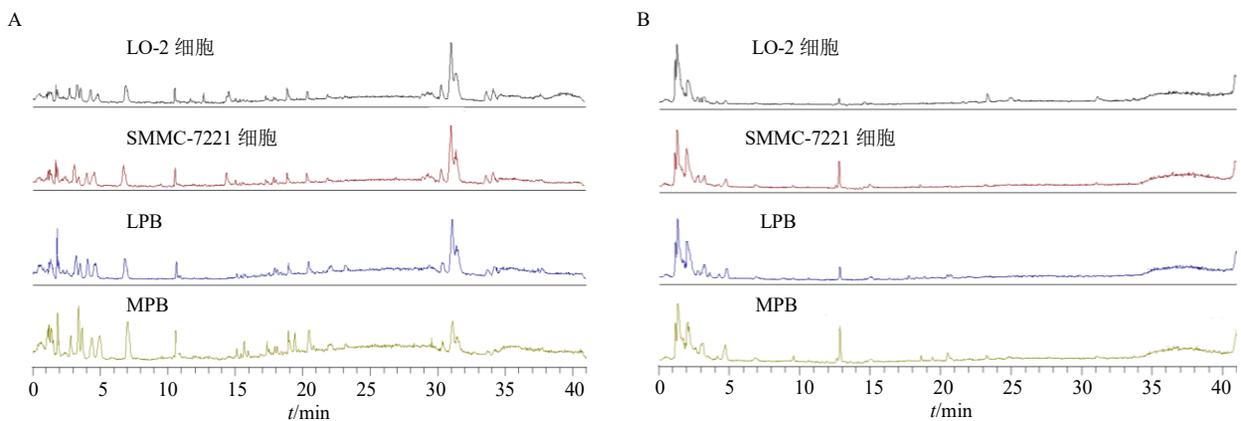


图6 正(A)、负(B)离子模式下各组样本总离子流色谱图
 Fig. 6 Total ion flow chromatograms of samples in each group in positive (A) and negative (B) ion modes

3.5.2 差异代谢物分析与鉴定 偏最小二乘-判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 得分图 (图 7) 可看出, 正常组和模型组明显分离, 表明肝癌细胞与正常肝细胞内源性代谢产生差异; 给药组与模型组明显分离。为了验证模型可靠

性, 对上述模型数据进行排列实验 (permutation test, $n = 200$); 评判标准参考本课题组前期报道^[18]; 相关验证结果表明模型可靠。借助 HMDB 及 NCBI 数据库对正常肝细胞组和肝癌组的显著性差异物进行鉴定, 共鉴定出 20 个与肝癌相关的差异代谢物 (表 2)。

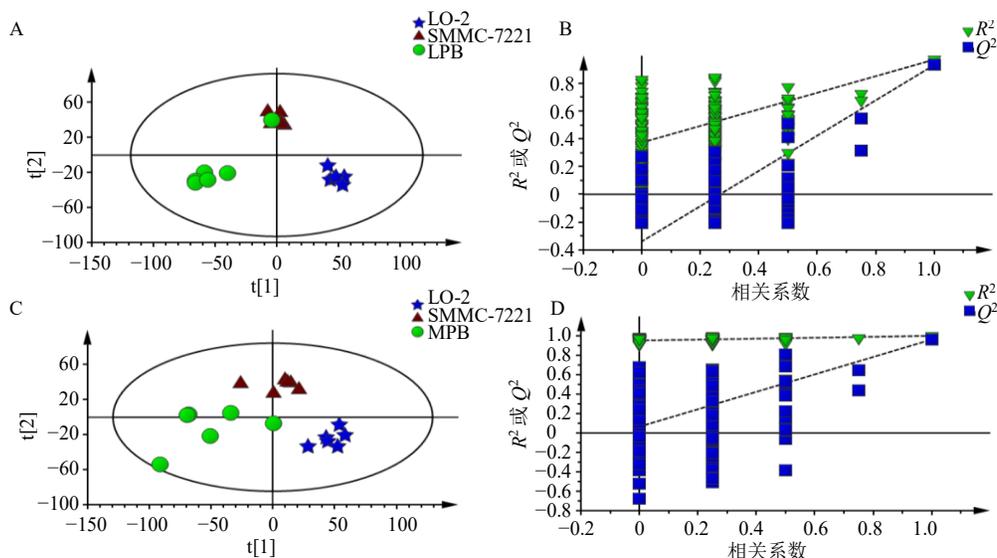


图 7 各组肝细胞样品 PLS-DA 评分图 (A、C) 及其模型验证图 (B、D)

Fig. 7 PLS-DA score chart (A, C) of hepatocyte samples in each group and its model validation chart (B, D)

表 2 各组样本差异代谢物

Table 2 Differential metabolites of samples in each group

编号	t_R/min	m/z	离子模式	代谢物	对照 vs 模型	LPB vs 模型	MPB vs 模型	通路
1	1.50	149.105 2	$[M+H]^+$	三乙醇胺	↓			甘油磷脂代谢
2	20.97	299.282 4	$[M+H]^+$	鞘氨醇	↓			甘油磷脂代谢
3	30.61	538.519 7	$[M+H]^+$	神经酰胺 (d18 : 1/16 : 0)	↑		↓	甘油磷脂代谢
4	21.46	467.301 3	$[M+H]^+$	溶血卵磷脂 (14 : 0/0 : 0)	↓		↓	甘油磷脂代谢
5	1.92	185.992 4	$[M-H]^-$	3-磷酸甘油酸	↑	↓		糖酵解途径
5	6.91	148.052 5	$[M-H]^-$	肉桂酸	↑		↓	脂肪酸代谢
6	13.03	132.077 9	$[M-H]^-$	2-羟基己酸	↑		↓	脂肪酸代谢
7	1.91	203.115 9	$[M+H]^+$	乙酰肉碱	↓	↑	↑	脂肪酸代谢
8	18.54	465.309 0	$[M+H]^+$	甘氨酸	↓		↓	胆固醇代谢
9	20.23	449.314 4	$[M-H]^-$	甘氨酸脱氧胆酸	↓		↓	胆固醇代谢
10	3.43	131.094 8	$[M-H]^-$	L-正亮氨酸	↑		↓	氨基酸代谢
11	1.55	147.052 9	$[M+H]^+$	谷氨酸	↓	↑		氨基酸代谢
12	1.40	146.069 2	$[M-H]^-$	谷氨酰胺	↑	↓	↓	氨基酸代谢
14	2.10	111.043 5	$[M+H]^+$	胞嘧啶	↑			核苷酸代谢
15	1.93	243.085 6	$[M+H]^+$	胞嘧啶核苷	↑			核苷酸代谢
16	3.16	244.069 4	$[M+H]^+$	尿苷	↑	↓	↓	核苷酸代谢
17	2.73	136.038 6	$[M+H]^+$	次黄嘌呤	↓	↑		核苷酸代谢
18	3.10	152.033 2	$[M-H]^-$	黄嘌呤	↓	↑		核苷酸代谢
19	5.74	151.049 5	$[M+H]^+$	鸟嘌呤	↑			核苷酸代谢
20	2.00	347.063 1	$[M+H]^+$	5'-磷酸腺苷	↓		↓	核苷酸代谢

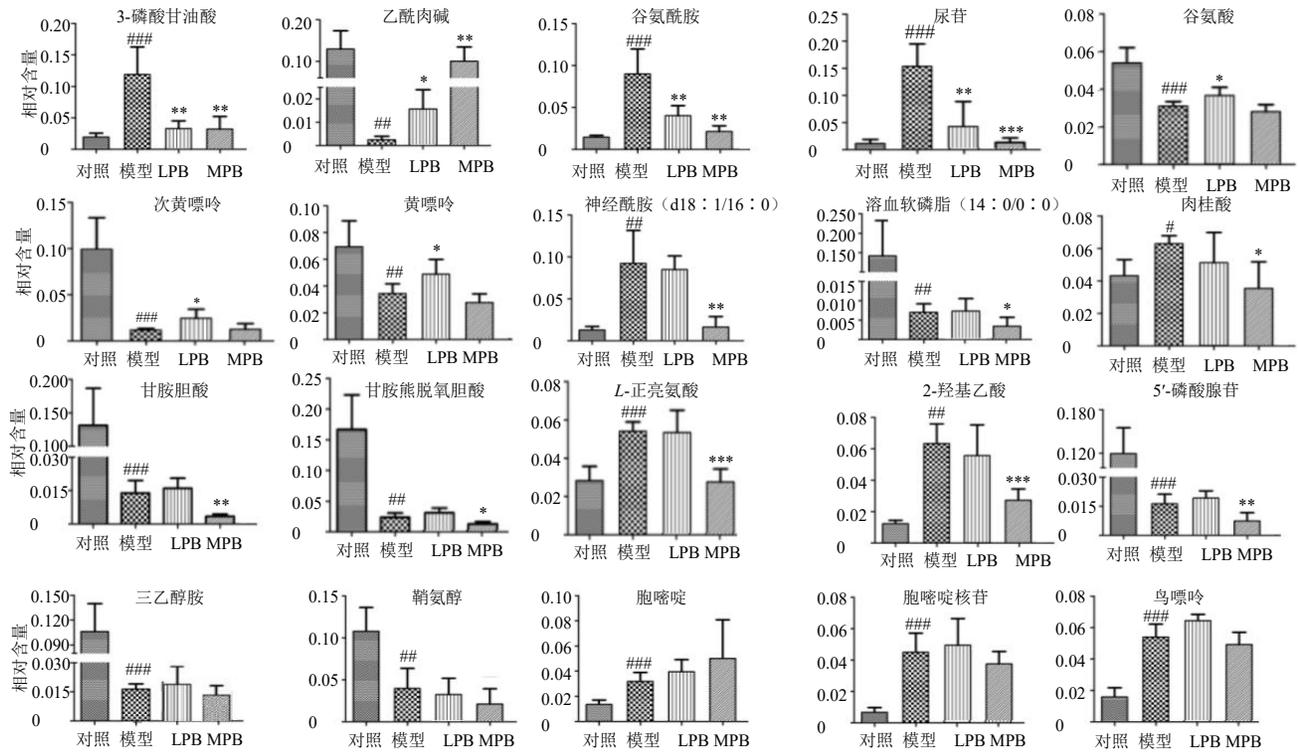
“↑”表示上调，“↓”表示下调。

“↑” indicates up-regulation, “↓” indicates down-regulation.

3.5.3 LPB 和 MPB 对差异代谢物的影响 如图 8 所示,与模型组比较,LPB 能够回调的肝癌细胞差异代谢物有 7 种,MPB 组能够回调的肝癌细胞差异代谢物有 12 种。LPB 和 MPB 能够共同干预 3-磷酸甘油酸、乙酰肉碱、谷氨酰胺和尿苷等差异代谢物;LPB 能够干预谷氨酸、次黄嘌呤和黄嘌呤等差异代谢物;MPB 能够干预神经酰胺 (d18 : 1/16 : 0),溶血卵磷脂 (14 : 0/0 : 0)、肉桂酸、2-羟基己酸、甘氨酸、甘

氨酸脱氧胆酸、L-正亮氨酸和 5'-磷酸腺苷等代谢物。

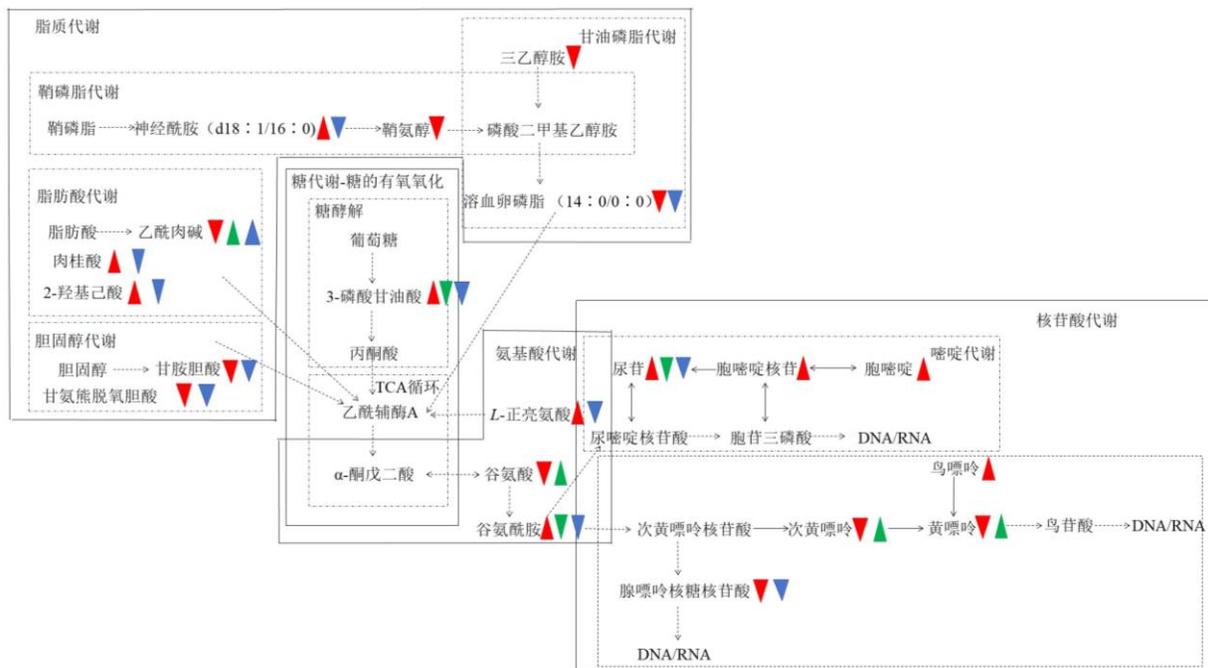
3.5.4 差异代谢物的代谢通路分析 为更好地分析各差异代谢物在各组间的内在联系,借助在线 KEGG 数据库对上述差异代谢物进行整合代谢通路分析 (图 9)。7 种 LPB 和 12 种 MPB 回调的差异代谢物涉及甘油磷脂代谢、鞘磷脂代谢、脂肪酸代谢、胆固醇代谢、糖酵解途径、氨基酸代谢、脂肪酸代谢和核苷酸代谢途径等。



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$.
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group.

图 8 各组差异代谢物相对含量变化

Fig. 8 Changes in relative content of differential metabolites in each group



红色代表模型组与正常组比较的变化; 绿色代表 LPB 组与模型组比较的变化; 蓝色代表 MPB 组与模型组比较的变化。

Red represents the changes in comparison between model group and normal group; Green represents the changes in comparison between LPB group and model group; Blue represents the changes in comparison between MPB group and model group.

图 9 差异代谢物的代谢通路分析

Fig. 9 Metabolic pathway analysis of differential metabolites

4 讨论

已有研究表明,使用中医药作为术后辅助治疗可以取得更好疗效,如调补气血、疏肝理气和恢复体质^[19]。此外,中医药可以缓解患者的肿瘤症状,控制肿瘤的大小,从而提高患者的生活质量并延长患者的生存时间^[20],因此探究中药在癌症治疗的作用机制至关重要。柴胡归肝、胆经,具有疏肝解郁等功效,临床上以柴胡为君药的柴胡类方用于治疗肝癌。现代药理学研究也表明,柴胡有效成分如柴胡皂苷 D 能够抑制肿瘤生长,通过调控哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin complex, mTORC)信号通路诱发肝癌细胞自噬^[21-22]。因此柴胡不同极性部位抑制肝癌细胞增殖以及诱导其凋亡的作用机制需要深入探究。

研究表明,细胞周期由大量调节蛋白参与,主要受 CDK-Cyclin 复合物的调控,是细胞周期的核心过程。相关癌症数据提示 CDK-Cyclin 复合物在癌组织中表达增高,而癌旁组织表达相对较低,提示癌症的大量增殖可能与 CDK-Cyclin 复合物的表达密切相关^[23-24]。同时细胞周期节律基因的紊乱与肿瘤的发生、发展密切相关,且已在乳腺癌等肿瘤中得到证实^[25]。*Npas2* 基因在肝癌细胞中高表达,且为哺乳动物中最大的生物钟基因,而 *CDC25A* 的转录表达受到 *NPAS2* 基因的调控^[26],且可以调控 Bcl-2 蛋白去磷酸化参与肝癌细胞凋亡。*CDC25B* 为 G_2/M 期过度的关键基因,通过调节下游 CDK1-Cyclin B1 复合物去磷酸化参与 G_2/M 期的进程^[27-29]。本研究发现,LPB 作用于细胞后, G_1 和 G_2 期细胞比例增加,表明 LPB 可通过阻滞肝癌细胞周期,从而影响肝癌细胞增殖。qRT-PCR 及 Western blotting 结果表明,LPB 可能通过下调 *NPAS2* 表达,进而导致 CDK2-Cyclin E 复合物表达下调,肝癌细胞过度到 S 期受阻, G_1 期细胞大量增多,同时通过下调 *CDC25B* 基因表达,引起 CDK1-Cyclin B1 复合物表达下降,干预 G_2/M 肝癌周期进程,发挥抑制肝癌增殖细胞的作用。LPB 可能会通过下调 *Npas2*, 进而下调 *CDC25A* 的表达,下调 Bcl-2 蛋白去磷酸化,从而促进肝癌细胞凋亡;而 MPB 作用于肝癌细胞后,主要表现为 G_2 期细胞比例增加,表明 MPB 可通过阻滞肝癌细胞周期,影响细胞增殖。qRT-PCR 结果表明,MPB 通过下调 *CDC25B* 基因,进而引起 CDK1-Cyclin B1 复合物表达下降,干预 G_2/M 肝癌周期进程,发挥抑制肝癌细胞增殖的作用。MPB 通

过升高 Bax/Bcl-2 比值,促使 Cyt-C 从线粒体释放,进而激活下游 Caspase-3 蛋白,从而引起肝癌细胞凋亡(图 10)。

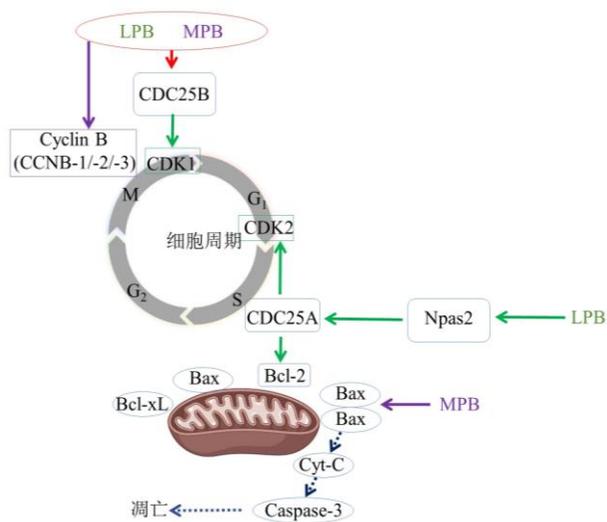


图 10 柴胡不同部位抑制增殖及促进凋亡机制通路图
Fig. 10 Pathways of mechanism of inhibition of proliferation and promotion of apoptosis in different polarity fractions of *Bupleuri Radix*

采用代谢组学方法鉴定了 20 个与肝癌相关的差异代谢物,其中 LPB 能够回调 7 种差异代谢物,MPB 能回调 12 种,并利用 KEGG 数据库对差异代谢物进行整合通路分析。研究表明,鞘磷脂代谢改变和肿瘤增加密切相关^[30]。神经酰胺为鞘脂代谢的中心纽带分子,在调节癌细胞恶性增殖及抑制肿瘤增殖发挥重要作用^[31-32]。本研究结果发现 LPB 能调控 C16 神经酰胺合成,激活内质网应激,从而发挥促进肝癌细胞凋亡。研究表明,癌细胞增殖所必需的叶酸代谢和氧化还原稳态的平衡可能需要活性丝氨酸合成,3-磷酸甘油酸是合成丝氨酸的原料^[33]。肝癌细胞中 3-磷酸甘油酸含量大幅增加,LPB 和 MPB 干预后,含量被回调接近至正常组发挥抗肝癌作用。谷氨酰胺的增加会导致肿瘤细胞快速生长^[34],可以调节程序性死亡受体 1 (programmed death receptor 1, PD-1) /程序性死亡配体 1 (programmed death ligand 1, PD-L1) 的表达通过 Wnt/ β -连环蛋白途径,因此可能是肝细胞癌的新治疗靶点^[35]。而 LPB 和 MPB 组可以显著逆转肝癌导致的谷氨酰胺含量,达到抗肝癌作用。

综上,LPB 和 MPB 能够抑制肝癌细胞的增殖而且能够使其凋亡,肝癌细胞阻滞于 G_1 期主要与 *Npas2*-*CDC25A*-*CDK2*-*Cyclin E* 通路有关,阻滞于

G₂期主要与CDC25B-CDK1-Cyclin B1复合物有关, 凋亡主要与Npas2-CDC25A靶点以及激活线粒体凋亡途径相关, 代谢组学结果显示肝癌的发生与甘油磷脂代谢、鞘磷脂代谢、脂肪酸代谢、胆固醇代谢、糖酵解途径、氨基酸代谢和核苷酸代谢7种代谢通路的紊乱密切相关。LPB主要通过干预脂肪酸代谢、糖酵解、氨基酸代谢和核苷酸代谢4种途径发挥抗肝癌作用, MPB主要通过干预甘油磷脂代谢、鞘磷脂代谢、脂肪酸代谢、胆固醇代谢、糖酵解途径、氨基酸代谢和核苷酸代谢7种途径发挥抗肝癌作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Anwanwan D, Singh S K, Singh S, *et al.* Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 1883-14.

[2] 徐瑞雪, 王宇. 中药有效成分逆转肝癌顺铂耐药机制的研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2024, 39(1): 257-262.

[3] Li Z Y, Hao E W, Cao R, *et al.* Analysis on internal mechanism of zedoary turmeric in treatment of liver cancer based on pharmacodynamic substances and pharmacodynamic groups [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(4): 479-493.

[4] 鲍宁, 陈子超, 赵春芹, 等. 黄芪-莪术药对及其活性成分抗肝癌作用机制研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(15): 5101-5111.

[5] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 293.

[6] 张国顺, 李盛楠, 孟冬梅, 等. 肝动脉化疗栓塞术联合射频消融术治疗原发性肝癌 [J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(8): 1855-1857.

[7] 张雯雯, 蒋吟啸, 杨丹, 等. 小柴胡汤联合经导管动脉栓塞化疗治疗原发性肝癌的有效性与安全性的系统评价 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2020, 20(2): 149-153.

[8] 杨柳依, 王克穷, 王文敏, 等. 王克穷主任医师运用大柴胡汤治疗原发性肝癌经验体会 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(93): 246-247.

[9] 陈一笑, 王威宇, 冯建有, 等. 基于分子生物学及代谢组学的柴胡注射液抗肝癌作用机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(17): 5590-5600.

[10] 张磊. 小柴胡汤含药血清诱导人 HepG2 细胞凋亡和自噬的实验研究 [D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2014.

[11] 高子涵. 柴胡皂苷-b₂ 通过调控 STK4/IRAK1/NF-κB 通路抑制原发性肝癌的研究 [D]. 洛阳: 河南科技大学, 2019.

[12] 吴勤祥, 李好朝, 乔泽强, 等. 柴胡皂苷 D 对人肝癌 HepG2 细胞系增殖和裸鼠肝癌形成的抑制作用 [J]. 中

国免疫学杂志, 2018, 34(11): 1664-1668.

[13] 张峰, 方媛, 周玉枝, 等. UPLC-PDA 同时测定柴胡中 8 种多炔类化合物的含量 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(9): 1704-1710.

[14] 孟美黛. 柴胡抗抑郁活性部位与体内过程研究 [D]. 太原: 山西大学, 2020.

[15] 金艳书, 吴学敏, 娄金丽. 苦参碱对人肝癌细胞增殖、细胞周期及细胞凋亡的影响 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(3): 107-109.

[16] 司维柯, 罗朝学, 陈庆海. 流式细胞术分析苦参碱诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡 [J]. *肿瘤*, 2001, 21(3): 213-214.

[17] 王珂欣, 高丽, 周玉枝, 等. 苦参碱抗肝癌细胞增殖的 ¹H-NMR 代谢组学研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(20): 4275-4283.

[18] 梁梅丽, 赵芳, 方媛, 等. 基于 LC-MS 技术的柴胡石油醚部位对抑郁症模型大鼠海马组织的代谢组学研究 [J]. *中草药*, 2018, 49(10): 2291-2301.

[19] 陈长怀. 肝癌的中医药辅助治疗 [J]. *家庭医药*, 2002(6): 36.

[20] 夏小军, 段赟, 雷旭东, 等. 中医药辅助治疗肺癌 45 例疗效观察 [J]. *西部中医药*, 2023, 36(10): 120-124.

[21] 常彦祥, 孙利平. 柴胡皂苷 D 对肝癌大鼠肿瘤生长和免疫功能的影响 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(14): 2059-2062.

[22] 王宗明, 王敏, 肖欢智. 柴胡皂苷 D 通过调控 mTORC 信号通路诱发肝癌细胞自噬的作用研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2018, 53(19): 1652-1657.

[23] 贾未玲, 于淼. CyclinB1 与肿瘤细胞周期调控 [J]. *哈尔滨商业大学学报: 自然科学版*, 2016, 32(6): 659-662.

[24] 杨正平, 石欣. Cyclin/Cdks 复合物相关调控分子与肿瘤关系的研究进展 [J]. *实用肿瘤学杂志*, 2008, 22(2): 185-188.

[25] 郭静. 周期节律蛋白 NPAS2 抑制乳腺癌细胞增殖的机制研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2018.

[26] Tu Y S, Kang X L, Zhou J G, *et al.* Involvement of Chk1-Cdc25A-cyclin A/CDK2 pathway in simvastatin induced S-phase cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells [J]. *Eur J Pharmacol*, 2011, 670(2/3): 356-364.

[27] Li J X, Zhu F, Lubet R, *et al.* Quercetin-3-methyl ether inhibits lapatinib-sensitive and-resistant breast cancer cell growth by inducing G₂/M arrest and apoptosis [J]. *Mol Carcinog*, 2013, 52(2): 134-143.

[28] Lammer C, Wagerer S, Saffrich R, *et al.* The cdc25B phosphatase is essential for the G₂/M phase transition in human cells [J]. *J Cell Sci*, 1998, 111 (Pt 16): 2445-2453.

[29] Terzoudi G I, Jung T, Hain J, *et al.* Increased G2

- chromosomal radiosensitivity in cancer patients: The role of cdk1/cyclin-B activity level in the mechanisms involved [J]. *Int J Radiat Biol*, 2000, 76(5): 607-615.
- [30] 吕冰洁, 杨阳, 张建初. 鞘磷脂代谢物与肺癌关系的研究进展 [J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2014, 43(5): 603-605.
- [31] Koybasi S, Senkal C E, Sundararaj K, *et al*. Defects in cell growth regulation by C_{18:0}-ceramide and longevity assurance gene 1 in human head and neck squamous cell carcinomas [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(43): 44311-44319.
- [32] Senkal C E, Ponnusamy S, Bielawski J, *et al*. Antiapoptotic roles of ceramide-synthase-6-generated C16-ceramide via selective regulation of the ATF6/CHOP arm of ER-stress-response pathways [J]. *FASEB J*, 2010, 24(1): 296-308.
- [33] 崔畅婉, 孙峥嵘. 3-磷酸甘油酸脱氢酶促进丝氨酸合成在肿瘤进展中的机制 [J]. 现代肿瘤医学, 2021, 29(5): 885-888.
- [34] 乔万佳, 董娜, 刘小军. 靶向谷氨酰胺代谢途径提高放疗疗效研究进展 [J]. 肿瘤防治研究, 2023, 50(3): 298-302.
- [35] 蔡宇, 罗利琼. 靶向谷氨酰胺和 PD1 抑制剂在肝癌中的研究进展 [J]. 现代医学, 2022, 50(8): 1077-1081.

[责任编辑 李亚楠]