

基于 Akt/mTOR 通路研究地榆皂苷 II 诱导肝癌细胞凋亡和自噬作用机制

朱晓敏¹, 钟颖¹, 黄娜娜¹, 孙蓉^{1,2*}

1. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033

2. 山东大学高等医学研究院, 山东 济南 250012

摘要: **目的** 探讨地榆皂苷 II 抑制肝癌细胞增殖、诱导肝癌细胞凋亡和自噬的作用机制。**方法** 采用不同浓度 (0、10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 地榆皂苷 II 处理人肝癌 HepG2 细胞和小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞, 通过 CCK-8 和 EdU 实验观察地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 细胞增殖的影响; 运用流式细胞术检测地榆皂苷 II 对细胞凋亡的影响; 通过 Western blotting 检测地榆皂苷 II 对细胞凋亡和自噬相关蛋白半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cysteine-aspartic acid protease-3, Caspase-3)、Caspase-8、Caspase-9、B 细胞淋巴瘤 2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2-associated X protein, Bax)、cleaved Caspase-3、微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3-II (microtubule-associated protein light chain3-II, LC3II)、微管相关蛋白 1A/1B-轻链 3-I (microtubule-associated protein light chain3-I, LC3I)、自噬相关蛋白 p62、Beclin1 及蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路关键蛋白表达的影响。**结果** 地榆皂苷 II 显著抑制 HepG2 和 Hepa1-6 细胞活力, 且呈现一定的剂量相关性; 流式细胞检测发现地榆皂苷 II 给药后细胞凋亡率显著增加 ($P < 0.01$ 、 0.001); Western blotting 结果显示, 与对照组比较, 地榆皂苷 II 给药后 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2 表达显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), cleaved Caspase-3、Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), LC3II/LC3I 值显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), Beclin1 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), p62 蛋白表达量显著下降 ($P < 0.05$ 、 0.01), p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 值显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。 **结论** 地榆皂苷 II 通过 Akt/mTOR 通路诱导 HepG2 和 Hepa1-6 细胞自噬和凋亡实现对肝癌细胞增殖的抑制, 为抗肝细胞癌新药发现提供药理学证据。

关键词: 地榆皂苷 II; 增殖; 凋亡; 自噬; 肝细胞癌; Akt/mTOR

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)11-3726-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.11.015

Mechanism of ziyuglycoside II on apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells based on Akt/mTOR pathway

ZHU Xiaomin¹, ZHONG Ying¹, HUANG Nana¹, SUN Rong^{1,2}

1. The Second Hospital of Shandong University, Jinan 250033, China

2. Institute of Advanced Medical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of ziyuglycoside II on inhibiting liver cancer cell proliferation, inducing liver cancer cell apoptosis and autophagy. **Methods** HepG2 and Hepa1-6 cells were treated with different concentrations (0, 10, 20, 40 $\mu\text{mol/L}$) of ziyuglycoside II, and the effect of ziyuglycoside II on proliferation of HepG2 and Hepa1-6 cells were observed by CCK-8 and EdU experiments; Flow cytometry was used to detect the effect of ziyuglycoside II on cell apoptosis; Western blotting was used to detect the effect of ziyuglycoside II on expressions of apoptosis and autophagy-related proteins, including cysteine-aspartic acid protease-3 (Caspase-3), Caspase-8, Caspase-9, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), cleaved Caspase-3, microtubule-associated protein light chain3-II (LC3-II), microtubule-associated protein light chain3-I (LC3-I), p62, Beclin1 and key proteins in protein kinase B (Akt)/mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. **Results** Ziyuglycoside II significantly inhibited the viability of HepG2 and Hepa1-6 cells in a dose-dependent manner; Flow cytometry showed that the apoptosis rate was significantly increased after administration of ziyuglycoside II ($P < 0.01$, 0.001); Western blotting results showed that comparison with control

收稿日期: 2024-02-27

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC3502100); 高等医学研究院前沿学科发展基金 (GGY2023QY01)

作者简介: 朱晓敏, 女, 硕士研究生, 从事消化病学的基础研究。E-mail: zxmdoct@163.com

*通信作者: 孙蓉, 博士生导师, 教授, 从事中药消化药理学研究。E-mail: sunrong107@163.com

group, the expressions of Caspase-3, Caspase-8, Caspase-9 and Bcl-2 were significantly decreased after treatment with ziyuglycoside II ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), cleaved Caspase-3 and Bax protein expressions were significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), LC3II/LC3I was significantly increased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), Beclin1 protein expression was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), p62 protein expression was significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and p-Akt/Akt and p-mTOR/mTOR were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** Ziyuglycoside II can induce autophagy and apoptosis in HepG2 and Hepa1-6 cells through Akt/mTOR pathway to inhibit the proliferation of hepatoma cells, which provides pharmacological evidence for the development of novel therapies for hepatocellular carcinoma.

Key words: ziyuglycoside II; proliferation; apoptosis; autophagy; hepatocellular carcinoma; Akt/mTOR

肝癌是全球第 3 大癌症死亡原因，其中肝细胞癌约占所有肝癌类型的 80%^[1]。据世界卫生组织统计，每年因肝细胞癌死亡的人数高达 83 万例，且其发病率和死亡率仍呈现上升趋势，严重损害人类生命健康^[2]。在慢性肝病的基础上，基因突变、表观遗传变化、信号通路失调和血管生成异常等分子机制相互作用，共同推动慢性肝病向肝细胞癌过程的发展^[3]。目前肝细胞癌治疗的一线药物主要是索拉菲尼、仑伐替尼等靶向药及阿替利珠单抗、贝伐珠单抗等免疫治疗药物^[4]。然而，靶向药及免疫治疗药的耐药性和不良反应导致肝细胞癌的 5 年生存率仍然不高。因此，亟需寻找安全性高、不良反应少的治疗药物，为肝细胞癌患者提供更有效、安全的治疗选择。

近年来，随着对肝细胞癌研究的不断深入，自噬在肝细胞癌中的作用逐渐被关注。在肝细胞癌的发展过程中，自噬一方面通过维持细胞内稳态来抑制肿瘤起始，另一方面通过影响信号通路的效应因子来抑制早期肝细胞癌的进程^[5]。自噬受到多种机制的严格调控和影响，涉及自噬的几条重要信号通路有 Wnt/ β -catenin、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR)、p53 通路等^[6]，这些通路在肝细胞癌中异常激活，参与肝癌细胞的增殖、凋亡和自噬等生物学行为。研究表明，mTOR 通路在自噬调控机制中发挥至关重要的作用^[7]，mTOR 是自噬的负性调控因子，可以与 UNC-51 样激酶 1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1, ULK1) 的丝氨酸结合抑制自噬的启动过程，也可以通过磷酸化使自噬调节复合物失活影响自噬小体的发生，磷酸化自噬相关蛋白 14 (autophagy-related protein 14, Atg14)、自噬和 Beclin-1 调节器 1 (activating molecule in beclin-1 regulated

autophagy protein 1, AMBRA1) 和核受体结合因子 2 (nuclear receptor binding factor 2, NRBF2) 直接调节自噬的成核步骤^[8]。因此，针对自噬及其机制开展治疗可能是肝细胞癌的有效对抗策略。

地榆为蔷薇科植物地榆 *Sanguisorba officinalis* L. 的干燥根，具有凉血止血、解毒敛疮的功效。地榆皂苷 II 是从地榆中提取的一种三萜皂苷类化合物，现代药理学研究发现，地榆皂苷 II 不仅具有抗炎、抗氧化、免疫调节的药理作用，同时具有广泛的抗肿瘤活性^[9-11]，能通过多种途径抑制多种癌症的发生和发展，其机制可能与阻滞细胞周期、促进细胞凋亡和细胞自噬有关^[12-15]。课题组前期研究发现，地榆皂苷 II 能够抑制小鼠肝细胞癌的发展^[15]。然而，地榆皂苷 II 是否能够通过影响 Akt/mTOR 通路诱导凋亡和自噬抑制肝细胞癌尚不明确。本研究中选择人肝癌 HepG2 细胞和小鼠肝癌 Hepa1-6 细胞作为研究对象，探究地榆皂苷 II 对肝癌细胞增殖、自噬和凋亡的影响，探讨地榆皂苷 II 在抗肝细胞癌方面的潜在作用机制，为将来用于临床治疗提供数据支持。

1 材料

1.1 细胞

HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞生物研究所，Hepa1-6 细胞购自上海富衡生物科技有限公司。

1.2 药品与试剂

地榆皂苷 II (批号 MUST-11051204, 质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司；PVDF 膜 (批号 IPVH00010) 购自美国 Sigma 公司；青霉素-链霉素 (批号 S11JV) 购自上海源培生物科技股份有限公司；DMEM 培养基 (批号 C11995500BT)、胎牛血清 (批号 A3160801) 购自美国 Gibco 公司；PBS (批号 WHB823K091) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司；0.25% 胰酶消化液 (批号 C0203)、RIPA 组织/细胞裂解液 (批号 P0013C)、蛋白酶抑制剂混

合物(批号 P1050-1)、磷酸酶抑制剂混合物(批号 P1050-2)、EdU-555 细胞增殖检测试剂盒(批号 C0075S)购自上海碧云天生物技术有限公司; CCK-8 试剂盒(批号 A311-02)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 E112-01)、高敏型 ECL 化学发光检测试剂盒(批号 E412-01)、相对分子质量为 1.8×10^5 的蛋白 marker(批号 MP-102AA)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 一抗稀释液(批号 G2025)、二抗稀释液(批号 G2009)、高相对分子质量 marker(批号 26625)购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 7.5% PAGE 凝胶快速制备试剂盒(批号 PG111)、10% PAGE 凝胶快速制备试剂盒(批号 PG112)、12.5% PAGE 凝胶快速制备试剂盒(批号 PG113)购自上海雅酶生物医药科技有限公司; β -actin、Beclin1 抗体(批号分别为 20536-1-AP、11306-1-AP)购自美国 Proteintech 公司; B 淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、p62 抗体(批号分别为 ab196495、ab56416)购自英国 Abcam 公司; Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、Caspase-8、cleaved Caspase-3、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 抗体(批号分别为 5023T、9662S、4790T、9664T、4685S、4060T、2972S、5536T)购自美国 CST 公司; 甲醇(批号 10014118)购自国药集团化学试剂有限公司; 山羊抗兔二抗(批号 RS0002)购自美国 ImmunoWay 公司; Annexin V-FITC 染色液(批号 E-CK-A211)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司。

1.3 仪器

AL104 型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多有限公司); HH-S 型恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂); CKX53 型倒置生物显微镜、IX73 倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 3111 型 CO₂ 培养箱、Multiskan Go-1510 型全波长酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Centrifuge 5424R 型微量离心机(德国 Eppendorf 公司); SDS PAGE 凝胶电泳及转膜电泳仪(美国 Bio-Rad 公司); BETS-M5 型转移微型翘板摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司); XH-C 型涡旋混合器(金坛市医疗仪器厂); MINI-4K 型微型离心机(杭州米欧仪器有限公司); 5200 型全自动化学发光图像分析系统(上海天能科技有限公司); CytoFLEX 流式细胞仪(美国贝克曼库尔特有限公司); ThermoCell 恒温金属

浴(杭州博日科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 CCK-8 实验

将 HepG2 和 Hepa1-6 细胞分别以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中, 贴壁生长 24 h, 设置对照组、不同剂量地榆皂苷 II 组, 对照组仅加入培养基, 其余各组分别加入 5、10、15、20、30、40、60、80、100 $\mu\text{mol/L}$ 相应药物, 继续培养 24 h, 用 CCK-8 试剂盒测定各组吸光度(A)值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

2.2 EdU 实验

将 HepG2 和 Hepa1-6 细胞分别以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中, 贴壁生长 24 h, 设置对照组和地榆皂苷 II (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组, 给药组给予相应药物, 对照组仅加入培养基, 继续培养 24 h。将 EdU 稀释到 $2 \times \text{EdU}$ 工作液 (20 $\mu\text{mol/L}$), 预热后等体积加入 96 孔板中, 孵育细胞 2 h 后去除培养液, 加入 100 μL 固定液 (4%多聚甲醛), 孵育 10 min 后去除固定液, 用 100 μL 洗涤液洗涤细胞 3 次后每孔加入 100 μL 通透液 (含 0.3% Triton X-100 的 PBS), 室温孵育 15 min。去除通透液, 每孔用 1 mL 洗涤液洗涤细胞 2 次, 每次 5 min。参考说明书配制 Click 反应液。每孔加入 50 μL Click 反应液, 轻轻摇晃培养板后室温避光孵育 30 min。洗涤液洗涤 3 次, 吸除洗涤液后, 每孔加 Hoechst 33342 溶液 100 μL , 室温避光孵育 10 min。用洗涤液洗涤 3 次, 每次 3~5 min, 随后进行荧光检测。

2.3 细胞凋亡检测

将 HepG2 和 Hepa1-6 细胞分别以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 贴壁生长 24 h, 设置对照组和地榆皂苷 II (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组, 给药组给予相应药物, 对照组仅加入培养基, 继续培养 24 h。用胰酶消化细胞, $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清, 收集细胞, PBS 洗涤, 轻轻重悬细胞, $300 \times g$ 离心 5 min, 弃上清。用 PBS 洗涤细胞, 离心后弃上清, 加入 Annexin V Binding Buffer 重悬细胞。细胞悬液中加入 Annexin V-FITC Reagent 和 5 μL 的碘化丙啶(PI), 轻柔涡旋混匀后, 室温避光孵育 15~20 min, 立即上机检测。

2.4 Western blotting 检测相关蛋白表达

将 HepG2 和 Hepa1-6 细胞分别以 1×10^5 个/mL 接种于 6 孔板中, 贴壁生长 24 h, 设置对照组和地榆皂苷 II (10、20、40 $\mu\text{mol/L}$) 组, 给药组给予相

应药物, 对照组仅加入培养基, 继续培养 24 h。加入 RIPA 中强度缓冲液裂解后收集细胞, 使用 BCA 蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。蛋白样品经凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂奶粉, 封闭 1.5 h, 加入一抗, 4 ℃ 孵育过夜; 洗膜 3 次后加入二抗, 4 ℃ 孵育 1.5 h; 最后使用 ECL 化学发光检测试剂盒, 用化学发光图像分析系统显影。

2.5 统计学分析

采用 GraphPad Prism 9 统计软件对实验数据进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采

用单因素方差分析 (One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 肝癌细胞增殖的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 随着地榆皂苷 II 浓度的升高, HepG2 和 Hepa1-6 肝癌细胞的存活率明显降低, 且呈剂量相关性。经 GraphPad Prism 9 软件分析, 地榆皂苷 II 对 HepG2、Hepa1-6 细胞的 IC_{50} 值分别为 26.94、26.18 $\mu\text{mol/L}$, 因此以 10、20、40 $\mu\text{mol/L}$ 作为后续地榆皂苷 II 的给药剂量。

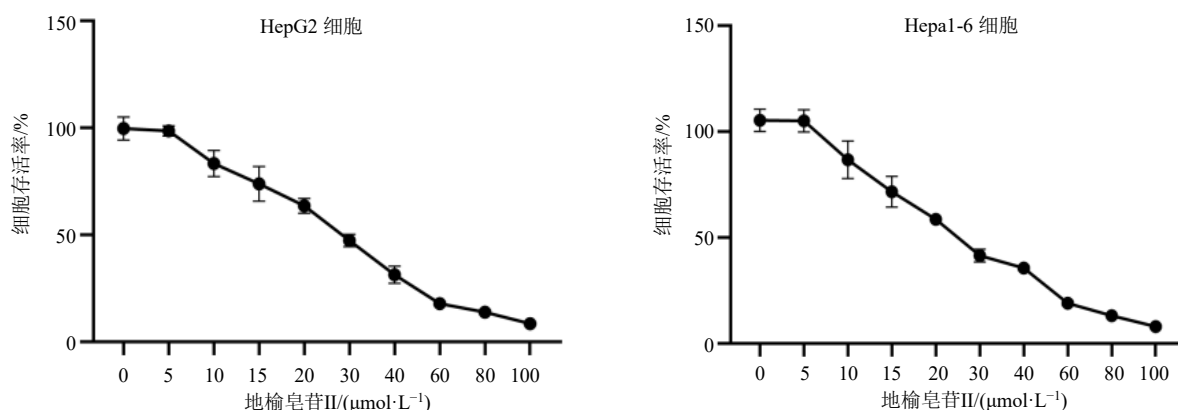


图 1 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effect of ziyuglycoside II on survival rate of HepG2 and Hepa1-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 肝癌细胞增殖的影响

EdU-555 阳性表示细胞正处于增殖状态, Hoechst33342 阳性指示细胞为活细胞, EdU-555/Hoechst33342 表示细胞的增殖率。如图 2 所示, 与对照组比较, 地榆皂苷 II 给药后 HepG2 和 Hepa1-6 细胞的 EdU-555/Hoechst33342 值明显降低 ($P < 0.05$ 、0.001), 表明地榆皂苷 II 能够抑制肝癌细胞的增殖。

3.3 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 肝癌细胞凋亡的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 地榆皂苷 II 给药组 HepG2 和 Hepa1-6 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001)。凋亡蛋白 (包括调控凋亡的激活因子和执行凋亡的效应因子) 参与细胞凋亡的过程。采用 Western blotting 检测地榆皂苷 II 对 HepG2 细胞和 Hepa1-6 细胞凋亡相关蛋白表达的影响, 如图 4 所示, 与对照组比较, 地榆皂苷 II 给药组 Caspase-3、Caspase-8、Caspase-9、Bcl-2 蛋白表达量显著降

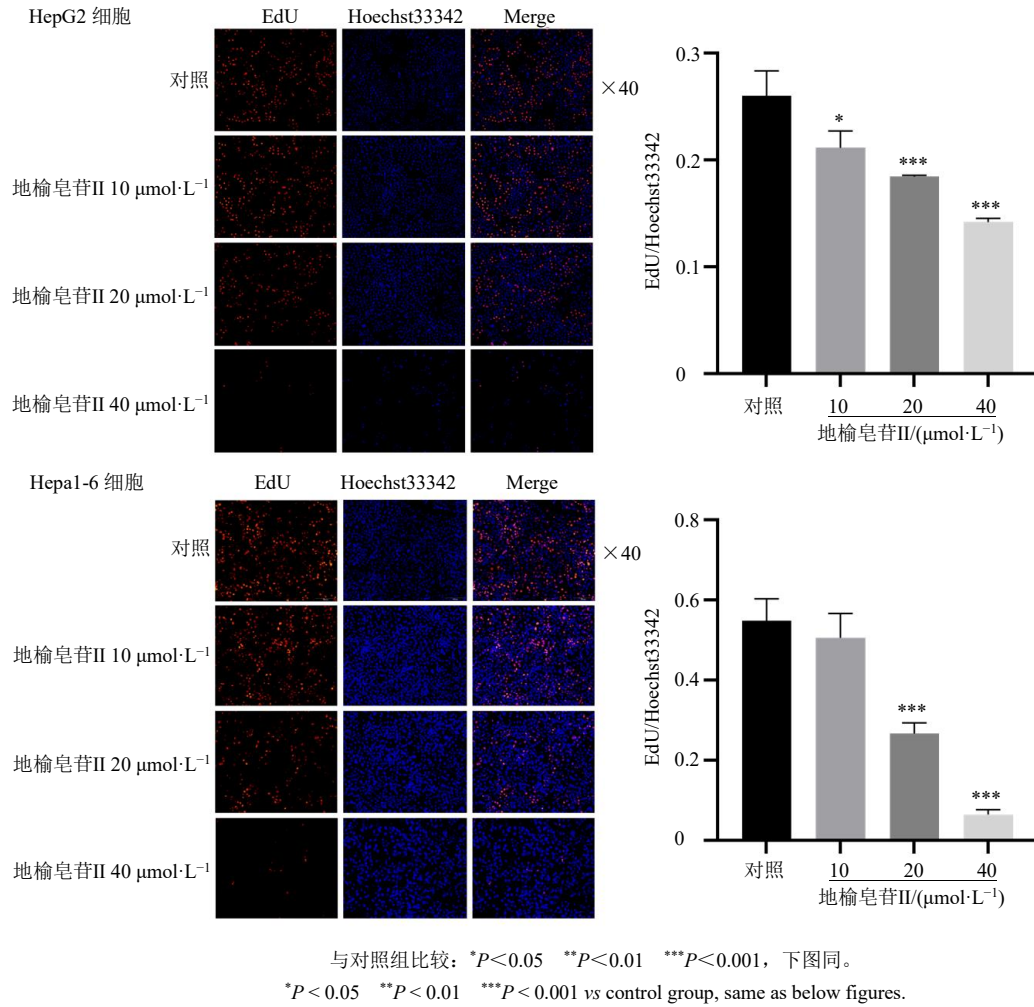
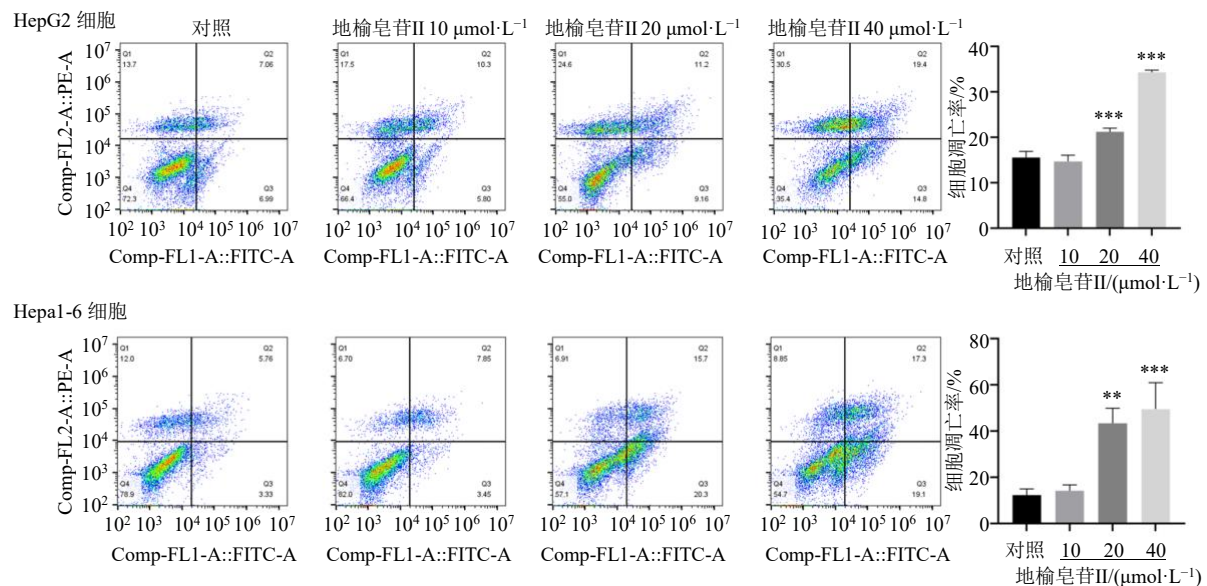
低 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), cleaved Caspase-3、Bax 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01)。以上结果说明地榆皂苷 II 促进 HepG2 和 Hepa1-6 细胞的凋亡。

3.4 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 肝癌细胞自噬的影响

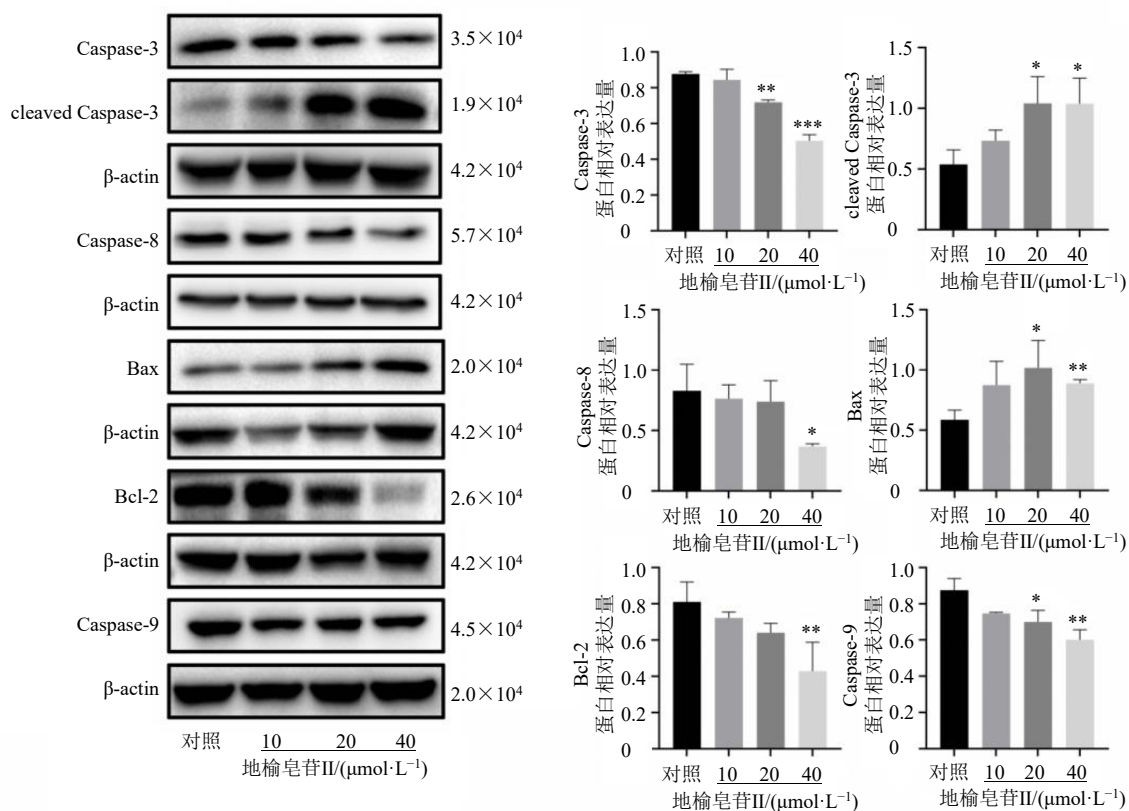
采用 Western blotting 检测细胞中代表自噬的核心蛋白 LC3II、LC3I、Beclin1、p62 表达量, 如图 5 所示, 与对照组比较, 地榆皂苷 II 给药组 LC3II/LC3I 值明显升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), Beclin1 蛋白表达量上升 ($P < 0.05$ 、0.01), p62 蛋白表达量明显下降 ($P < 0.05$ 、0.01), 表明地榆皂苷 II 促进 HepG2 和 Hepa1-6 肝癌细胞的自噬。

3.5 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 细胞中 Akt/mTOR 信号通路蛋白表达的影响

采用 Western blotting 检测地榆皂苷 II 给药后 Akt/mTOR 信号通路蛋白表达量, 如图 6 所示, 与对照组比较, 地榆皂苷 II 给药组 p-Akt/Akt、p-mTOR/mTOR 值明显下降 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 表明地榆皂苷 II 能够抑制 Akt/mTOR 信号通路。

图 2 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Effect of ziyuglycoside II on cell proliferation of HepG2 and Hepa1-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 3 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effect of ziyuglycoside II on cell apoptosis of HepG2 and Hepa1-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

HepG2 细胞



Hepa1-6 细胞

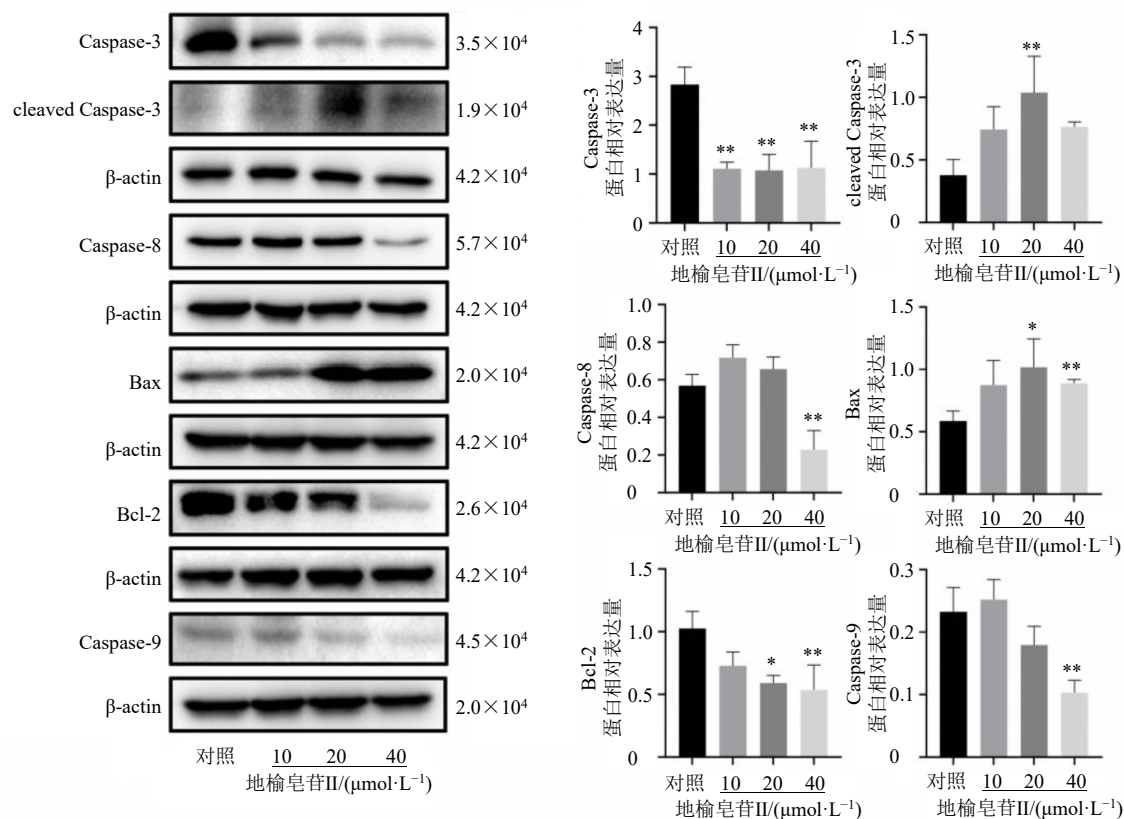
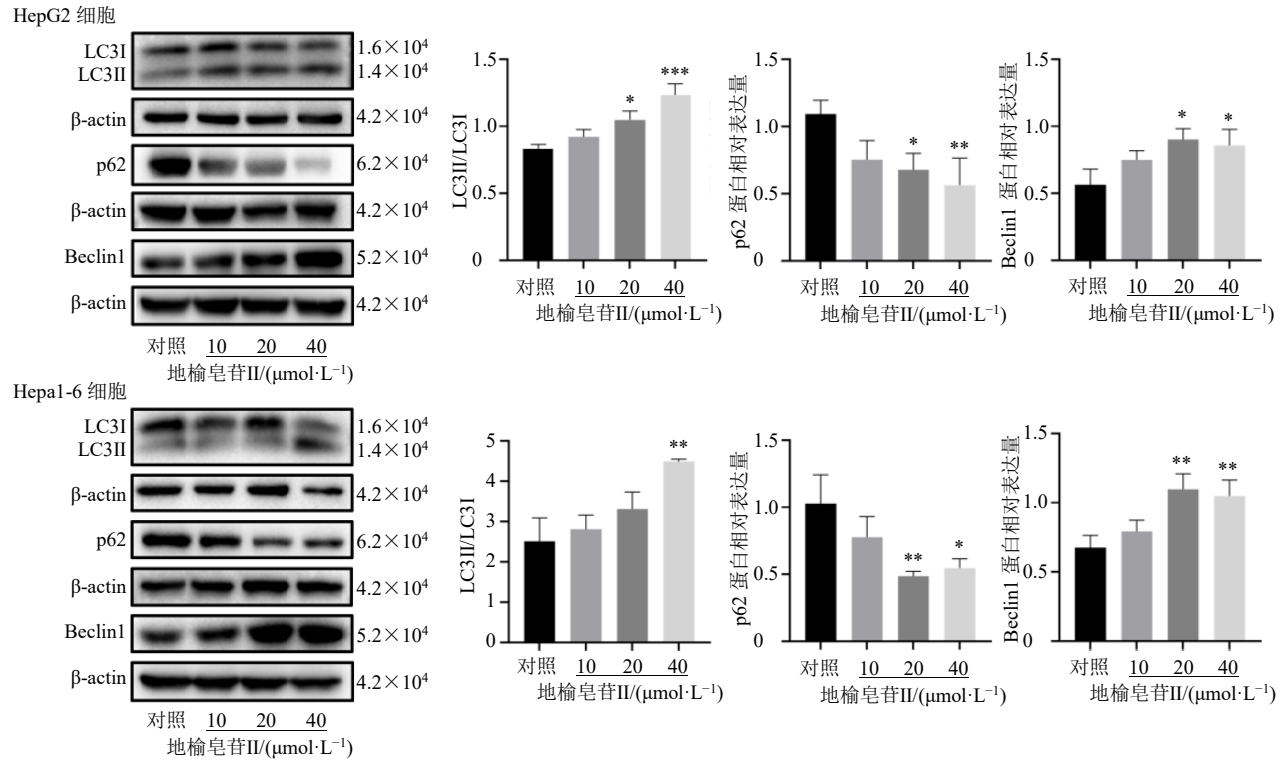
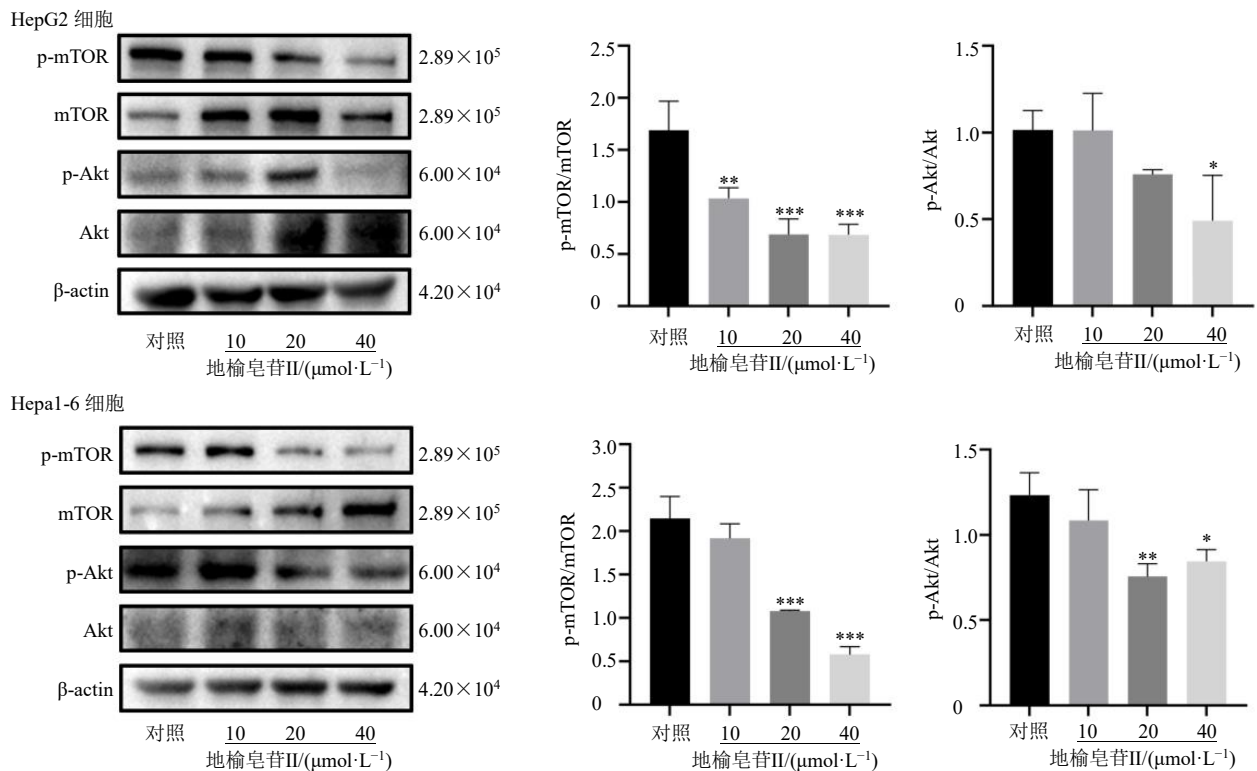


图 4 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 细胞凋亡蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of ziyuglycoside II on protein expressions in cell apoptosis of HepG2 and Hepa1-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

图 5 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 细胞自噬蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 5 Effect of ziyuglycoside II on protein expressions in cell autophagy of HepG2 and Hepa1-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 6 地榆皂苷 II 对 HepG2 和 Hepa1-6 细胞 Akt/mTOR 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 6 Effect of ziyuglycoside II on expressions of Akt/mTOR signaling pathway related proteins in HepG2 and Hepa1-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

肝细胞癌具有高发病率、高病死率的特点，虽然目前肝细胞癌研究备受关注，但其 5 年生存率仍为 14.1%^[16]。因此，迫切需要发现新的治疗策略和候选药物。近年来，地榆皂苷 II 在抗肿瘤方面的研究不断深入，研究发现地榆皂苷 II 抑制肿瘤与细胞自噬和凋亡存在紧密的关联，地榆皂苷 II 可通过诱导细胞凋亡来显著抑制乳腺癌 MDA-MB-435 细胞和胃癌 BGC-823 细胞的增殖^[14-15]，诱导自噬显著抑制结直肠癌细胞增殖^[17]。课题组既往研究证明，地榆皂苷 II 可在体内抑制肝细胞癌，其机制可能与抑制表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor, EGFR）信号通路有关^[15]。然而，目前关于地榆皂苷 II 是否通过自噬和凋亡抑制肝细胞癌及其机制尚不明确。因此，本研究利用体外实验对地榆皂苷 II 刺激后肝癌细胞的增殖、自噬、凋亡及相关机制进行探究，结果表明，地榆皂苷 II 能抑制肝癌细胞的增殖，促进肝癌细胞的凋亡和自噬，其机制与抑制 Akt/mTOR 通路有关。

自噬又被称为 II 型程序性死亡，负责真核生物细胞质中细胞器、蛋白质和大分子的降解和回收。细胞中降解和回收的底物被吞噬后形成自噬体，自噬体与溶酶体结合形成自噬酶体最后降解。本研究检测了自噬中具有代表性的 LC3、p62 和 Beclin1 蛋白。Beclin1 蛋白是一种自噬启动子，帮助自噬过程中囊泡的形成^[18]，地榆皂苷 II 作用于肝癌细胞后，Beclin1 蛋白表达量上升，促进自噬启动，囊泡形成增多，从而自噬水平升高。在自噬形成时，LC3I 通过泛素激活酶 E1 和泛素结合酶 E2 与磷脂酰乙醇胺偶联，生成 LC3II，LC3II 存在于自噬体的表面，负责膜的融合和选择性降解过程^[19]，p62 在自噬体表面与 LC3II 相互作用后包裹进自噬体降解，与 LC3II 共同调节选择性降解过程^[20]。地榆皂苷 II 给药后 LC3II/LC3I 值增高，p62 蛋白表达量下降，促进自噬过程中自噬囊泡的融合和降解，进而促进自噬。Beclin1 是自噬过程中的核心因子，已有研究证明 Beclin1 可以与抗凋亡因子 Bcl-2 相互作用，从而对凋亡过程产生影响^[21]。细胞凋亡是一种生理性或病理性的程序性的死亡过程，近年来通过诱导促进癌细胞的凋亡来控制癌症一直是抗肿瘤的热点。Caspase 级联反应是细胞凋亡过程的关键步骤，其启动受到抗凋亡因子和促凋亡因子 Bcl-2 和 Bax 的调节。在 Caspase 级联反应中，启动性 Caspase 包括

Caspase-8、Caspase-9 被激活后调控下游执行性 Caspase 如 Caspase-3 进而引起凋亡反应^[22-24]。地榆皂苷 II 作用于肝癌细胞后，细胞中的 Bcl-2 蛋白表达量减少，Bax 蛋白表达量增多，Bax 蛋白在线粒体表面形成孔道，释放细胞色素 C，引发 Caspase 级联反应，Caspase-8、Caspase-9 激活进而诱导下游的 Caspase-3 活化为 cleaved Caspase-3，切割下游多种底物，促进细胞凋亡典型形态变化。

Akt/mTOR 信号通路在正常细胞生理过程中发挥关键作用，同时在多种癌症中，该通路的异常激活对自噬、细胞凋亡、化疗耐药性及转移过程产生重要影响^[25]。诸多研究证据表明，Akt/mTOR 途径是调控癌症细胞自噬反应的核心通路^[26-28]。地榆皂苷 II 作用于肝癌细胞后，Akt 和 mTOR 蛋白的磷酸化水平显著下降，Akt/mTOR 信号通路被抑制，激活肝癌细胞凋亡和自噬，抑制肝癌细胞的增殖（图 7，由 Figdraw 绘制）。

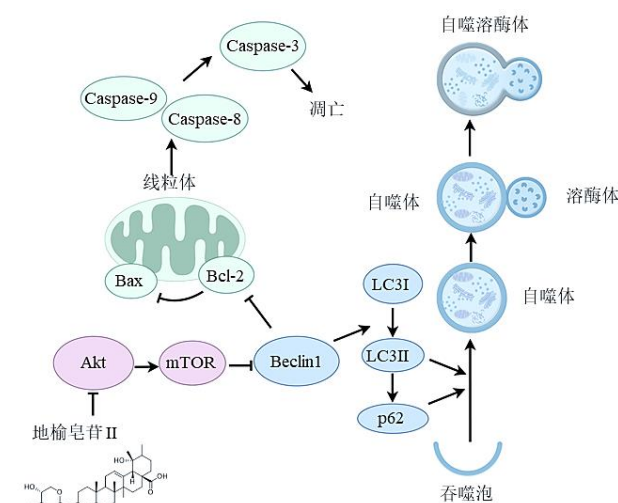


图 7 地榆皂苷 II 通过 Akt/mTOR 信号通路调控肝癌细胞自噬和凋亡

Fig. 7 Ziyuglycoside II regulates autophagy and apoptosis in liver cancer cells through Akt/mTOR signaling pathway

上述体外研究结果初步解析了地榆皂苷 II 抑制肝细胞癌的机制，即地榆皂苷 II 通过抑制 Akt/mTOR 信号通路诱导肝癌细胞的凋亡和自噬，抑制肝癌细胞增殖，为地榆皂苷 II 在肝细胞癌治疗的药物研究开发中提供了药理学证据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] Devarbhavi H, Asrani S K, Arab J P, *et al.* Global burden of liver disease: 2023 update [J]. *J Hepatol*, 2023, 79(2): 516-537.
- [3] Alqahtani A, Khan Z, Alloghbi A, *et al.* Hepatocellular carcinoma: Molecular mechanisms and targeted therapies [J]. *Medicina*, 2019, 55(9): 526.
- [4] 国家卫生健康委员会. 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.
- [5] Chao X J, Qian H, Wang S G, *et al.* Autophagy and liver cancer [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2020, 26(4): 606-617.
- [6] Cui J Z, Shen H M, Lim L H K. The role of autophagy in liver cancer: Crosstalk in signaling pathways and potential therapeutic targets [J]. *Pharmaceuticals*, 2020, 13(12): 432.
- [7] Kim Y C, Guan K L. mTOR: A pharmacologic target for autophagy regulation [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(1): 25-32.
- [8] Dossou A S, Basu A. The emerging roles of mTORC1 in macromanaging autophagy [J]. *Cancers*, 2019, 11(10): 1422.
- [9] Jang E, Inn K S, Jang Y P, *et al.* Phytotherapeutic activities of *Sanguisorba officinalis* and its chemical constituents: A review [J]. *Am J Chin Med*, 2018, 46(2): 299-318.
- [10] 许运巧, 刚小清, 李金锋. 地榆皂苷 I 调控 IGFL2-AS1/miR-138-5p 抑制卵巢癌细胞增殖、侵袭和迁移 [J]. 中草药, 2024, 55(4): 1248-1254.
- [11] Nam S H, Lkhagvasuren K, Seo H W, *et al.* Antiangiogenic effects of ziyuglycoside II, a major active compound of *Sanguisorba officinalis* L. [J]. *Phytother Res*, 2017, 31(9): 1449-1456.
- [12] Zhu X, Wang K, Zhang K, *et al.* Ziyuglycoside II inhibits the growth of human breast carcinoma MDA-MB-435 cells via cell cycle arrest and induction of apoptosis through the mitochondria dependent pathway [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(9): 18041-18055.
- [13] 蒋永旭, 陈颖, 汪雷, 等. 地榆皂苷 II 抑制乳腺癌 MDA-MB-468 细胞的作用机制 [J]. 皖南医学院学报, 2023, 42(5): 409-413.
- [14] Zhu A K, Zhou H, Xia J Z, *et al.* Ziyuglycoside II-induced apoptosis in human gastric carcinoma BGC-823 cells by regulating Bax/Bcl-2 expression and activating caspase-3 pathway [J]. *Rev Bras De Pesquisas Med E Biol*, 2013, 46(8): 670-675.
- [15] Zhong Y, Li X Y, Zhou F, *et al.* Ziyuglycoside II inhibits the growth of digestive system cancer cells through multiple mechanisms [J]. *Chin J Nat Med*, 2021, 19(5): 351-363.
- [16] Allemani C, Matsuda T, di Carlo V, *et al.* Global surveillance of trends in cancer survival 2000-14 (CONCORD-3): Analysis of individual records for 37513025 patients diagnosed with one of 18 cancers from 322 population-based registries in 71 countries [J]. *Lancet*, 2018, 391(10125): 1023-1075.
- [17] Bai C, Zhang Z, Zhou L, *et al.* Repurposing ziyuglycoside II against colorectal cancer via orchestrating apoptosis and autophagy [J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 576547.
- [18] Tran S, Fairlie W D, Lee E F. BECLIN1: Protein structure, function and regulation [J]. *Cells*, 2021, 10(6): 1522.
- [19] Glick D, Barth S, MacLeod K F. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms [J]. *J Pathol*, 2010, 221(1): 3-12.
- [20] Jeong S J, Zhang X Y, Rodriguez-Velez A, *et al.* p62/SQSTM1 and selective autophagy in cardiometabolic diseases [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2019, 31(6): 458-471.
- [21] Kang R, Zeh H J, Lotze M T, *et al.* The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 2011, 18(4): 571-580.
- [22] Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, *et al.* Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2 [J]. *Science*, 1997, 277(5324): 370-372.
- [23] Julien O, Wells J A. Caspases and their substrates [J]. *Cell Death Differ*, 2017, 24(8): 1380-1389.
- [24] Eskandari E, Eaves C J. Paradoxical roles of caspase-3 in regulating cell survival, proliferation, and tumorigenesis [J]. *J Cell Biol*, 2022, 221(6): e202201159.
- [25] Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer [J]. *Front Oncol*, 2014, 4: 64.
- [26] Fattahi S, Amjadi-Moheb F, Tabaripour R, *et al.* PI3K/AKT/mTOR signaling in gastric cancer: Epigenetics and beyond [J]. *Life Sci*, 2020, 262: 118513.
- [27] Shen J Y, Zhu X R, Wu Z R, *et al.* Uvangoletin, extracted from *Sarcandra glabra*, exerts anticancer activity by inducing autophagy and apoptosis and inhibiting invasion and migration on hepatocellular carcinoma cells [J]. *Phytomedicine*, 2022, 94: 153793.
- [28] 何曼, 陈莉, 曾沙, 等. 中药调控肿瘤细胞自噬的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(10): 3142-3150.

[责任编辑 李亚楠]