

橙皮苷靶向 β -catenin 抑制肝癌细胞干性并增强索拉非尼敏感性

孙念梓, 孙象军*

广州中医药大学临沂市人民医院研究生培养基地, 山东 临沂 276000

摘要:目的 探讨橙皮苷通过靶向 β -连环蛋白 (β -catenin) 对肝癌细胞干性的抑制作用, 评估其对索拉非尼敏感性的增强效果。方法 取对数生长期的 HepG2 细胞, 设置对照组和橙皮苷低、高剂量 (0.5、1.5 mmol/L) 组, 进行肿瘤成球实验, 采用 Western blotting 和免疫荧光技术检测干性相关蛋白表达, 采用 qRT-PCR 检测干性相关基因表达。HepG2 细胞培养 1 周后, 测定细胞对索拉非尼的半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC_{50}) 曲线, 观察细胞增殖与凋亡情况。构建稳定过表达 β -catenin 的 HepG2 细胞系, 设置过表达 β -catenin 组和过表达 β -catenin+橙皮苷 (1.5 mmol/L) 组, 进行肿瘤成球实验, 并检测干性相关蛋白表达; 测定细胞对索拉非尼的 IC_{50} 曲线, 观察细胞增殖与凋亡情况。裸鼠注射 HepG2 细胞后, 给予橙皮苷或索拉非尼治疗, 定期观察并记录瘤体大小, 采用免疫组化与 Western blotting 检测肿瘤组织 Ki67、 β -catenin、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、CD44、CD133 蛋白表达。**结果** 橙皮苷能有效抑制肿瘤细胞成球能力 ($P < 0.001$), 减少细胞球体的体积和数量 ($P < 0.001$), 并显著降低干性相关蛋白表达 ($P < 0.001$)。此外, 橙皮苷可增强肿瘤细胞对索拉非尼的敏感性, 影响 β -catenin 的定位。体内实验结果显示, 橙皮苷具有抑瘤作用, 与索拉非尼联用时效果更佳。**结论** 橙皮苷通过靶向 β -catenin, 抑制肝癌细胞干性, 并显著增强了索拉非尼对肝癌细胞的敏感性。

关键词: 橙皮苷; 肝癌细胞; β -连环蛋白; 细胞干性; 索拉非尼耐药

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)09-3187-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.09.016

Hesperidin targeting β -catenin inhibits hepatocellular carcinoma stemness and enhances sorafenib sensitivity

SUN Nianzi, SUN Xiangjun

Graduate Training Base of Linyi People's Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Linyi 276000, China

Abstract: Objective To explore the inhibitory effect of hesperidin on stemness of hepatoma cells by targeting β -catenin, and evaluate its enhancing effect on sorafenib sensitivity. **Methods** HepG2 cells in logarithmic growth phase were selected, and control group, hesperidin low-, high-dose (0.5, 1.5 mmol/L) groups were set up for tumor spheroidization experiments, Western blotting and immunofluorescence techniques were used to detect the expressions of stemness related proteins, and qRT PCR was used to detect the expressions of stemness related genes. After one week of HepG2 cells culture, the half inhibitory concentration (IC_{50}) curve of cells against sorafenib was measured to observe cell proliferation and apoptosis. A stable HepG2 cell line overexpressing β -catenin was constructed, overexpressing β -catenin group and overexpressing β -catenin + hesperidin (1.5 mmol/L) group were set up for tumor spheroidization experiments, and the expressions of stemness related proteins were detected; The IC_{50} curve of cells against sorafenib was measured to observe cell proliferation and apoptosis. After injecting HepG2 cells into nude mice, hesperidin or sorafenib was administered, tumor size was regularly observed and recorded. Immunohistochemistry and Western blotting were used to detect the expressions of Ki67, β -catenin, cysteine aspartate protease-3 (Caspase-3), CD44 and CD133 proteins in tumor tissue. **Results** Hesperidin could effectively inhibit the spheroidization ability of tumor cells ($P < 0.001$), reduce the volume and quantity of cell spheroids ($P < 0.001$), and significantly decrease the expressions of stemness related proteins ($P < 0.001$). In addition, hesperidin could enhance the sensitivity of tumor cells to sorafenib and affect the localization of β -catenin. The *in vivo* experimental results showed that hesperidin had anti-tumor effects, and the combination with sorafenib had a better effect. **Conclusion** Hesperidin inhibits the stemness

收稿日期: 2024-12-27

基金项目: 山东省中医药科技面上项目 (M-2023215)

作者简介: 孙念梓, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向为中西医结合治疗肝胆疾病。E-mail: 15866917590@163.com

*通信作者: 孙象军, 男, 博士生导师, 主任医师, 研究方向为中西医结合治疗肝胆疾病。E-mail: sunxiangjun552@163.com

of hepatoma cells by targeting β -catenin, and significantly enhances the sensitivity of sorafenib to hepatoma cells.

Key words: hesperidin; hepatoma cells; β -catenin; cell stemness; sorafenib resistance

肝癌是全球第 5 大常见的癌症类型，也是导致癌症相关死亡的第 4 个主要原因^[1]。2022 年，我国的肝癌发病率排名第 4，死亡率排名第 2^[2]。80% 肝癌发生在肝硬化肝脏内^[3]，诱导其发病的主要危险因素为病毒性肝炎，其他已知危险因素为酗酒和一些遗传性代谢疾病^[4]。索拉非尼是目前唯一被认可的晚期肝癌的一线治疗药物，但长期使用会产生显著的抗血管生成作用，造成肿瘤区域营养供应不足和氧气缺乏，从而促使细胞耐药。有研究指出，表观遗传变化、物质转运机制、调控的细胞死亡过程及肿瘤微环境等因素，均与索拉非尼在肝癌中的耐药性发展及其后续疾病进展密切相关^[5]。 β -连环蛋白 (β -catenin) 是一种在细胞间连接和信号传导中起关键作用的蛋白质，其异常表达与多种癌症的发生、发展密切相关。肿瘤干细胞是指一类具备自我更新能力和分化潜能的肿瘤细胞。具有致瘤潜能的肝癌干细胞是肝癌复发和治疗抵抗的关键因素，因此目前认为肝癌干细胞是治疗肝癌的一个重要靶点^[6]。在肝癌中， β -catenin 的异常激活可能促进肝癌干性的形成，即肝癌细胞获得类似干细胞的特性，从而增强肿瘤的侵袭性和耐药性。

橙皮苷是一种来源于柑橘类水果的黄烷酮糖苷，因其具有广泛的药理作用而受到越来越多的关注。其主要作用包括抗炎、抗氧化、抗血栓形成、保护心血管与神经系统以及调节糖脂代谢^[7-8]。此外，橙皮苷在抗肿瘤方面也展现出显著的潜力，适用于多种癌症类型，包括肺癌^[9]、乳腺癌^[10]、前列腺癌^[11]等。其抗癌机制主要通过抗氧化、基因保护、抗炎反应以及诱导癌细胞凋亡来实现，而非直接杀伤肿瘤细胞^[12]。近年来，橙皮苷在抗癌领域的研究逐渐深入，尤其是其在癌症预防与治疗方面的积极作用得到了证实^[13-15]，并在多种体内及体外癌症模型中展现出显著的抗增殖与抑制肿瘤活性，可以诱导细胞周期阻滞及促进细胞凋亡^[16]。还有研究表明，橙皮苷在体外通过激活细胞外调节蛋白激酶 1/2 (extracellular regulated protein kinases 1/2, ERK1/2) 信号通路诱导肝癌细胞凋亡，并能在乳腺癌细胞中显著引发细胞周期停滞^[17-18]。此外，橙皮苷还能够通过抑制高胆固醇血症及脂肪肝改善肝脏功能^[19]。尽管橙皮苷在细胞增殖、迁移和干性方面的调控已

有一定研究，但其在肝癌干性调控中的作用尚不明确。因此，本研究旨在探讨橙皮苷通过靶向 β -catenin 抑制肝癌干性，并增强肝癌细胞对索拉非尼的敏感性。本研究不仅有助于深入理解橙皮苷在肝癌治疗中的潜力，也为开发基于橙皮苷的靶向治疗策略提供新的理论依据。

1 材料

1.1 动物和细胞

3~4 周龄的 SPF 级雄性无胸腺裸鼠 (BALB/c-nu)，购自北京维通利华生物科技有限公司，动物合格证号：00223Q22416R1M。在临沂市人民医院继续饲养，动物使用许可证号 SYXK (鲁) 2024 0014。所有小鼠均于室温 22~25 °C、相对湿度 50%、明暗周期为 12 h 的 SPF 级环境中适应性饲养 1 周。动物实验经临沂市人民医院伦理委员会批准 (批准号 L2023064)。

人肝癌 HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

橙皮苷 (质量分数 $\geq 98\%$ ，批号 B20182) 购自上海源叶生物科技有限公司；甲苯磺酸索拉非尼 (批号 161107，200 mg/片) 购自德国 BayerAG 公司； β -actin 抗体 (批号 K101527P) 购自北京索莱宝科技有限公司； β -catenin、Ki67、CD44、CD133 抗体购自英国 Abcam 公司，批号分别为 ab32572、ab16667、ab92494、ab243894；半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 (cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)、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) 抗体购自美国 ImmunoWay 公司，批号分别为 YT0656、YT0470、YT0459；EdU 增殖检测试剂盒 (批号 C0071S) 购自上海碧云天生物技术有限公司；Trizol 试剂盒 (批号 SH-2366)、反转录试剂盒 (批号 SOS-1046) 购自北京凯诗源生物科技有限公司；Fast Start Universal SYBR Green Master (ROX) 试剂盒 (批号 18570700) 购自罗氏公司；过表达 β -catenin 质粒购自山东维真生物科技有限公司。

1.3 仪器

NU-5700e 型 CO₂ 恒温培养箱 (美国 Nuair 公司)；SPecraMax i3X 型多功能酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)；5430R 型冷冻离心机 (德国

Eppendorf 公司); IX83 型倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); MEV 型冰冻切片机 (德国 SLEE 公司); DYY-6C 型电泳仪 (北京六一仪器公司); ABI StepOnePlus 型 qRT-PCR 仪 (美国 Life Technologies 公司)。

2 方法

2.1 体外实验

2.1.1 细胞培养 HepG2 细胞用含 10%热灭活胎牛血清和 1%青霉素的高糖 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

2.1.2 稳定过表达 β -catenin 的细胞株 (OE- β -catenin) 构建 HepG2 细胞通过胰酶消化获得单细胞悬液后, 设置阴性对照组 (未进行稳定过表达, OE-NC) 和实验组 (OE- β -catenin), 分别加入阴性空载质粒和 β -catenin 过表达质粒, 进行转染、纯化和稳定株筛选等, 最终得到 OE- β -catenin 细胞株。

2.1.3 细胞分组和处理

(1) 橙皮苷对肝癌细胞干性特征的抑制作用研究: 设置对照组和橙皮苷低、高剂量 (0.5、1.5 mmol/L) 组, 对照组加入含 1% DMSO 的培养基, 各给药组加入不同浓度的橙皮苷。

(2) 橙皮苷调节肝癌对索拉非尼敏感性的作用研究: 设置对照组、橙皮苷 (1.5 mmol/L) 组、索拉非尼 (1 μ mol/L) 组和橙皮苷 (1.5 mmol/L) + 索拉非尼 (1 μ mol/L) 组, 对照组加入含 1% DMSO 的培养基, 各给药组加入相应药物。

(3) 橙皮苷靶向 β -catenin 抗肿瘤作用研究: 过表达 β -catenin 的 HepG2 细胞用含 10%热灭活胎牛血清和 1%青霉素的高糖 DMEM 培养基培养, 细胞状态稳定后, 设置过表达 β -catenin 组、过表达 β -catenin + 橙皮苷 (1.5 mmol/L) 组、过表达 β -catenin + 索拉非尼 (1 μ mol/L) 组和过表达 β -catenin + 橙皮苷 (1.5 mmol/L) + 索拉非尼 (1 μ mol/L) 组, 另取 HepG2 细胞设置对照组和橙皮苷 (1.5 mmol/L) 组。对照组加入含 1% DMSO 的培养基, 各给药组加入相应药物。

2.1.4 细胞活力检测 96 孔板中每孔接种 2×10^3 个细胞, 培养 24 h 后, 按 “2.1.3” 项下分组, 分别加入 0.05、0.50、1.00、1.50、10.00、50.00、100.00 μ mol/L 索拉非尼处理细胞 24 h。加入 CCK-8 试剂, 采用酶标仪测定吸光度 (A) 值, 计算半数抑制浓度 (half inhibitory concentration, IC₅₀) 值。

2.1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 按 “2.1.3” 项下

分组处理细胞 24 h, 收集细胞, PBS 洗涤, 用预冷的 70%乙醇于 4 °C 固定 1~2 h, 离心去除乙醇固定液, 用 PBS 重悬细胞。加入 PI 染色液于 4 °C 避光染色 30 min, 采用流式细胞仪上机检测。

2.1.6 EdU 实验检测细胞增殖 96 孔板中每孔接种 2×10^4 个细胞, 培养 24 h 后, 按 “2.1.3” 项下分组处理细胞 24 h, 按照 EdU 试剂盒说明书进行染色, 于倒置荧光显微镜下观察并拍照。

2.1.7 细胞悬浮成球实验 按 “2.1.3” 项下分组处理细胞 24 h, 胰酶消化后重悬, 利用血球计数板对细胞进行计数后, 在低吸附 24 孔板的每孔中加入含 1×10^3 个细胞的 1 mL 培养基。将 24 孔板放置于恒温细胞培养箱中培养 10 d, 之后在显微镜下对形成的细胞团拍照, 并随机选择 5 个高倍视野统计细胞球的数量。

2.1.8 免疫荧光检测 CD44、CD133、 β -catenin 蛋白表达 按 “2.1.3” 项下分组处理细胞 24 h, 取 100 μ L 细胞悬液滴于载玻片上, 制作细胞玻片, 将玻片依次浸入二甲苯中脱蜡, 梯度乙醇逐步脱水后进行抗原修复, 使用牛血清白蛋白封闭。加入 CD44、CD133 抗体 (1:100), 4 °C 孵育过夜, PBS 漂洗 3 次。然后加入二抗 (1:200) 室温孵育 30 min, PBS 漂洗 3 次。加入 DAPI 后封片, 暗室内使用荧光显微镜观察, Image J 软件分析图像。

2.1.9 Western blotting 检测 CD44、CD133、 β -catenin、Bcl-2、Bax 蛋白表达 按 “2.1.3” 项下分组处理细胞 24 h, 收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 于 4 °C 摇床上振荡 5 min 后, 4 °C、14 000 r/min 离心 5 min, 取上清, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入封闭液于室温下封闭 1 h 后, 分别加入 β -catenin、CD44、CD133、Bcl-2、Bax 一抗 (1:1 000), 4 °C 孵育过夜, TBST 清洗 3 次。次日, 用 PBST 缓冲液清洗后, 加入二抗 (1:2 000), 室温避光孵育 1 h, PBST 清洗 3 次。使用 ECL 显影液显影, Image J 软件分析灰度值后进行统计分析。

2.1.10 qRT-PCR 检测 CD44、CD133 mRNA 表达 按 “2.1.3” 项下分组处理细胞 24 h, 收集细胞, 按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA, 进行 qRT-PCR 分析。引物序列见表 1。

2.2 体内实验

2.2.1 动物造模、分组、给药与取材 HepG2 细胞

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
CD44	F: ATGGACAAGTTTTGGTGGCACGC
	R: AAGATGTAACCTCCTGAAGTGCTGC
CD133	F: TGGATGCAGAACTTGACAACGT
	R: ATACCTGCTACGACAGTCGTGGT
β -catenin	F: CTTCACCTGACAGATCCAAGTC
	R: CCTTCCATCCCTTCCTGTTTAG
GAPDH	F: TCGTGAAGGACTCATGACC
	R: TCCACCACCCTGTTGCTGTA

常规培养,待细胞密度达到70%~80%时,去除培养基,用PBS缓冲液清洗细胞,加入胰蛋白酶消化,离心收集细胞,并调整细胞密度至 5×10^7 个/mL。在SPF级别的环境下,取200 μ L细胞悬液(1×10^7 个细胞)接种至裸鼠左侧前肢腋窝位置,裸鼠随机分为对照组、橙皮苷(400 mg/kg)组、索拉非尼(30 mg/kg)组和橙皮苷(400 mg/kg)+索拉非尼(30 mg/kg)组,每组6只。从接种细胞开始,每隔3 d检查裸鼠皮下肿瘤形成情况,并记录肿瘤体积的变化。接种细胞7 d后开始ig给药,对照组ig等量的蒸馏水,1次/d,连续给药14 d。接种细胞21 d,对

所有裸鼠实施安乐死,取出肿瘤组织进行尺寸测量和拍照记录。

2.2.2 免疫组化检测肿瘤组织 Ki67、 β -catenin、Caspase-3、CD44、CD133 蛋白表达 取各组肿瘤组织,于福尔马林溶液中固定,石蜡包埋后切片,于二甲苯中浸泡3次,每次10 min,随后将其置于不同质量分数的乙醇和蒸馏水中浸泡,每次5 min。进行抗原修复后,5%牛血清白蛋白封闭,然后加入一抗(1:500),室温孵育1 h。再加入二抗(1:200),室温孵育30 min。DAB显色后,用苏木素复染3 min。将切片在梯度乙醇中逐步脱水后封片,于显微镜下观察并拍照,用Image J软件对图像进行分析。

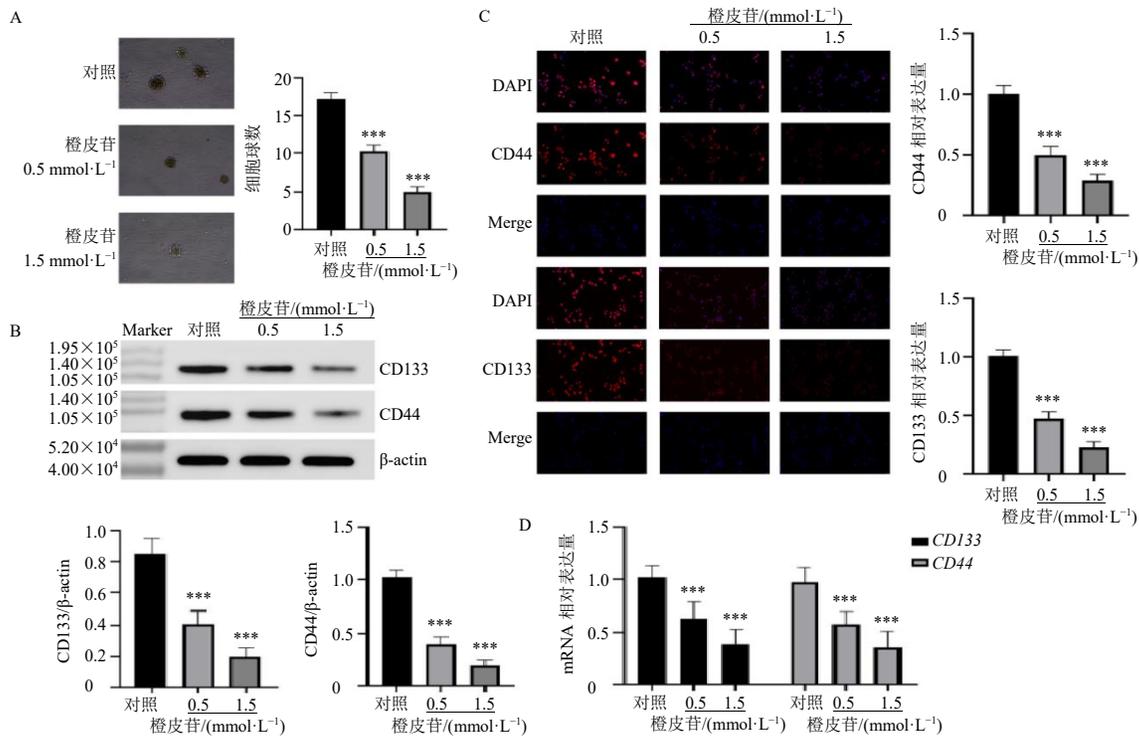
2.3 统计学分析

使用GraphPad Prism软件进行数据分析和图表绘制,实验数据的统计处理则采用SPSS 25.0软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组之间的差异性比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 橙皮苷抑制肝癌细胞的干性特征

肿瘤细胞成球实验结果(图1-A)表明,橙皮



A-肿瘤悬浮成球实验($\times 100$); B-Western blotting 检测 CD44、CD133 蛋白表达; C-免疫荧光检测 CD44、CD133 蛋白表达($\times 200$); D-qRT-PCR 检测 CD44、CD133 mRNA 表达; 与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

A-tumor suspension spheroid experiment ($\times 100$); B-protein expressions of CD44 and CD133 detected by Western blotting; C-protein expressions of CD44 and CD133 detected by immunofluorescence ($\times 200$); D-mRNA expressions of CD44 and CD133 detected by qRT-PCR; *** $P < 0.001$ vs control group.

图 1 橙皮苷对肝癌细胞干性特征的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Inhibitory effect of hesperidin on stemness characteristics of hepatoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

昔各剂量组细胞球体体积明显小于对照组，细胞球体数量明显少于对照组 ($P < 0.001$)。Western blotting、免疫荧光和 qRT-PCR 结果显示，与对照组比较，橙皮昔各剂量组 CD44、CD133 蛋白和基因表达水平均显著降低 ($P < 0.001$, 图 1-B~D)。表明橙皮昔可抑制肝癌细胞的干性特征。

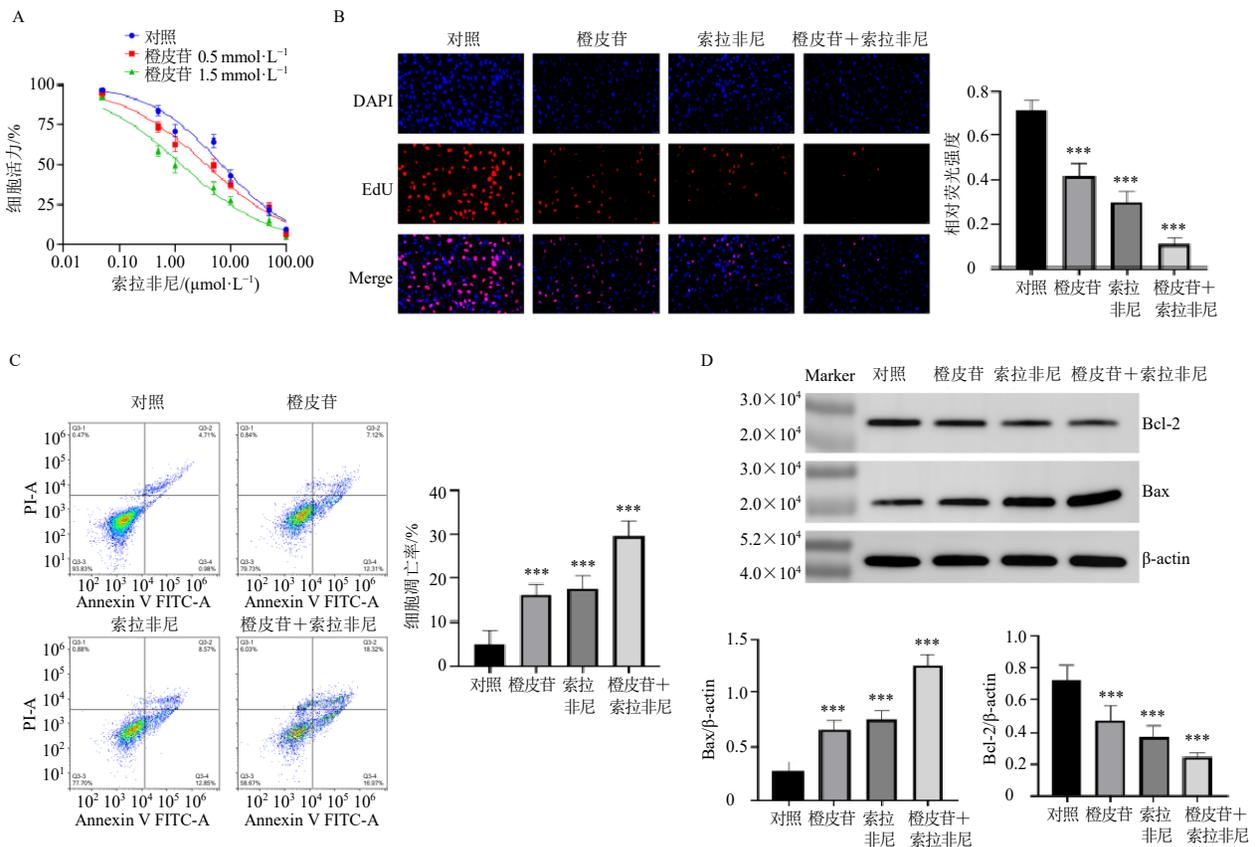
3.2 橙皮昔增强肝癌细胞对索拉非尼的敏感性

为了研究橙皮昔调节肝癌对索拉非尼敏感性的作用，在 HepG2 细胞中加入 0.5、1.5 mmol/L 橙皮昔进行预处理，然后加入不同浓度的索拉非尼进行培养，测定索拉非尼对 HepG2 细胞的 IC₅₀ 值。结果显示，橙皮昔各剂量组对索拉非尼敏感性均高于对照组 (图 2-A)。EdU 染色结果显示，与对照组比较，橙皮昔组和索拉非尼组 EdU 阳性细胞数量明显减少 ($P < 0.001$, 图 2-B)，表明橙皮昔能够抑制肝癌细胞的增殖。此外，相较于索拉非尼组，橙皮昔+索拉非尼组 EdU 阳性细胞数量进一步减少，表明橙皮

昔可以提高肝癌细胞对索拉非尼的敏感性，从而更有效地抑制细胞增殖。采用流式细胞术检测各组细胞凋亡情况，结果显示，与对照组比较，橙皮昔组和索拉非尼组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$, 图 2-C)；相较于索拉非尼组，橙皮昔+索拉非尼组细胞凋亡率进一步升高。Western blotting 结果显示，与对照组比较，橙皮昔组和索拉非尼组 Bax 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$, 图 2-D)，Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.001$)；相较于索拉非尼组，橙皮昔+索拉非尼组 Bax 蛋白表达水平进一步升高，Bcl-2 蛋白表达水平进一步降低。以上结果表明橙皮昔能够增强肝癌细胞对索拉非尼的敏感性，从而促进细胞凋亡。

3.3 橙皮昔靶向 β -catenin 并抑制其核移位进而抑制肝癌细胞干性和增强索拉非尼敏感性

细胞悬浮成球实验结果显示，与对照组比较，橙皮昔组细胞球体体积明显缩小 ($P < 0.001$, 图 3-A)，

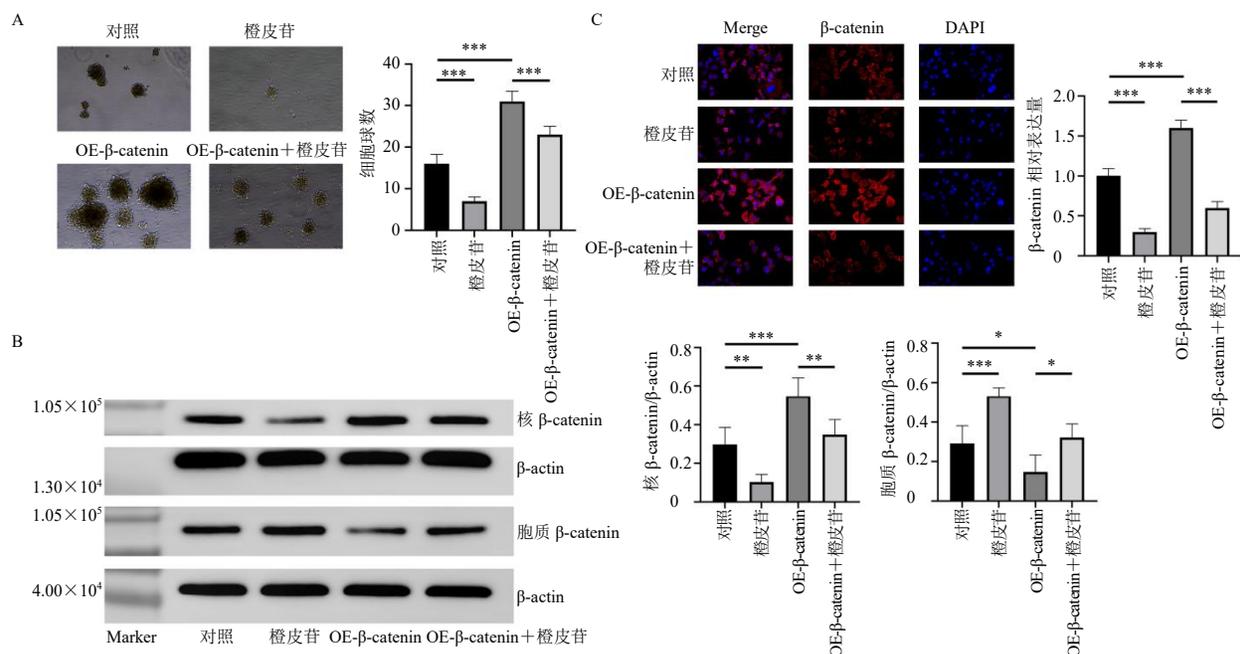


A-索拉非尼对 HepG2 细胞的 IC₅₀ 曲线; B-EdU 实验检测细胞增殖情况 ($\times 400$); C-流式细胞术检测细胞凋亡情况; D-Western blotting 检测 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达; 与对照组比较: *** $P < 0.001$ 。

A-IC₅₀ curve of sorafenib against HepG2 cells; B-cell proliferation detected by EdU experiment ($\times 400$); C-cell apoptosis detected by flow cytometry; D-protein expressions of Bcl-2 and Bax detected by Western blotting; *** $P < 0.001$ vs control group.

图 2 橙皮昔增强肝癌细胞对索拉非尼的敏感性 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Hesperidin enhances sensitivity of hepatoma cells to sorafenib ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A-肿瘤悬浮成球实验 (×100); B-Western blotting 检测 β-catenin 蛋白表达; C-免疫荧光检测 β-catenin 蛋白表达 (×200); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 4、5 同。

A-tumor suspension spheroid experiment (×100); B-β-catenin protein expression detected by Western blotting; C-β-catenin protein expression detect by immunofluorescence (×200); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, same as Figs. 4, 5.

图 3 橙皮苷靶向 β-catenin 并抑制其核移位 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

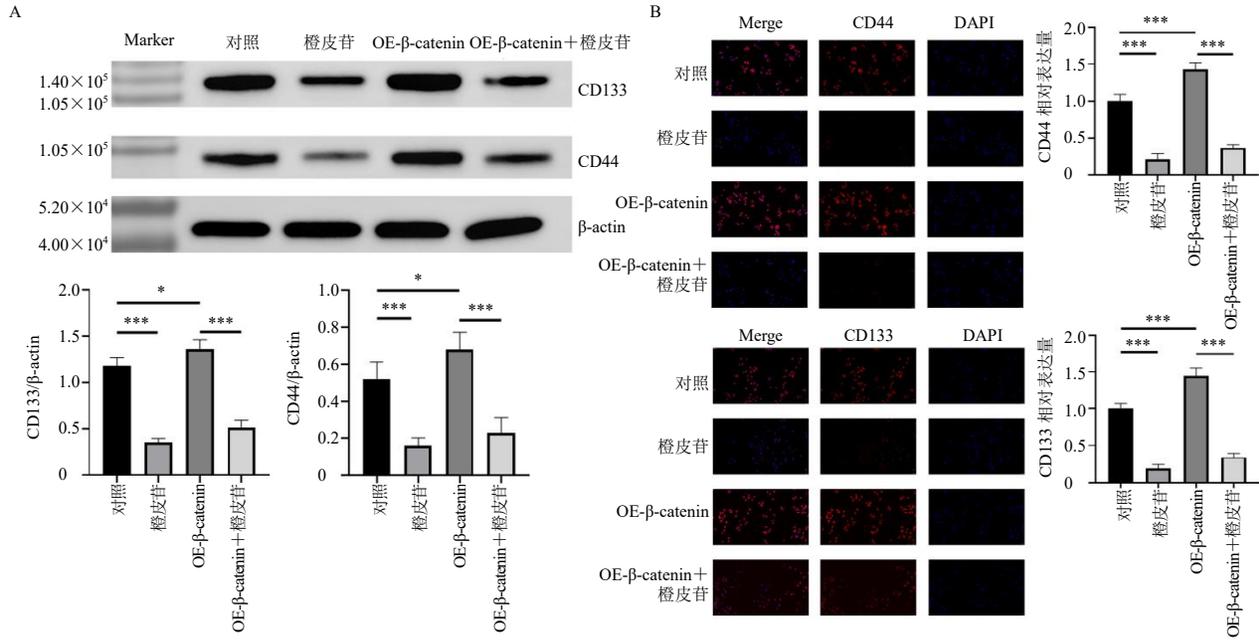
Fig. 3 Hesperidin targets β-catenin and inhibits its nuclear translocation ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

而 OE-β-catenin 组细胞球体积显著增大 ($P < 0.001$); OE-β-catenin + 橙皮苷组细胞球体积相较于 OE-β-catenin 组明显缩小 ($P < 0.001$)。通过 Western blotting 和免疫荧光实验检测 β-catenin 在细胞核与细胞质中的分布, 结果见图 3-B、C, 与对照组比较, 橙皮苷组细胞核内 β-catenin 蛋白表达降低 ($P < 0.01、0.001$), 而细胞质内 β-catenin 蛋白表达增加 ($P < 0.001$); OE-β-catenin 组则呈现相反的趋势, 细胞核 β-catenin 蛋白表达显著上升 ($P < 0.001$), 细胞质 β-catenin 表达降低 ($P < 0.05$)。OE-β-catenin + 橙皮苷组细胞核 β-catenin 蛋白表达相较于 OE-β-catenin 组降低 ($P < 0.01、0.001$), 而细胞质中 β-catenin 表达显著升高 ($P < 0.05$)。以上结果表明, 橙皮苷可能通过靶向 β-catenin 并抑制其核移位来发挥抗肿瘤作用。

通过 Western blotting 和免疫荧光实验进一步检测肿瘤干细胞标志物 CD44 和 CD133 的表达, 结果见图 4-A、B, 与对照组比较, 橙皮苷组 CD44 和 CD133 的表达显著降低 ($P < 0.001$), 而 OE-β-catenin 组 CD44 和 CD133 的表达显著升高 ($P < 0.05、0.001$); OE-β-catenin + 橙皮苷组逆转了 β-catenin 过

表达对 CD44 和 CD133 表达的影响 ($P < 0.001$), 表明橙皮苷在抑制肿瘤干细胞特性方面可能依赖于 β-catenin 的核移位。

测定索拉非尼对 HepG2 细胞的 IC_{50} 值, 结果如图 5-A 所示, 与对照组比较, OE-β-catenin 组对索拉非尼的敏感性降低; 与 OE-β-catenin 组相比, OE-β-catenin + 橙皮苷组对索拉非尼的敏感性增加。表明橙皮苷能够通过靶向 β-catenin, 增强肝癌细胞对索拉非尼的敏感性, 从而提高索拉非尼的治疗效果。EdU 染色结果表明, 与 OE-β-catenin 组比较, OE-β-catenin + 橙皮苷组和 OE-β-catenin + 索拉非尼组 EdU 阳性染色细胞数量显著减少 ($P < 0.001$, 图 5-B); OE-β-catenin + 橙皮苷 + 索拉非尼组 EdU 阳性染色数量进一步减少, 提示橙皮苷可以增强肝癌细胞对索拉非尼的敏感性, 进而抑制肝癌细胞的增殖。流式细胞术检测结果如图 5-C 所示, 与 OE-β-catenin 组比较, OE-β-catenin + 橙皮苷组和 OE-β-catenin + 索拉非尼组细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.001$); OE-β-catenin + 橙皮苷 + 索拉非尼组细胞凋亡率进一步升高, 表明橙皮苷可靶向 β-catenin, 增强肝癌细胞对索拉非尼的敏感性, 进而促进肝癌细

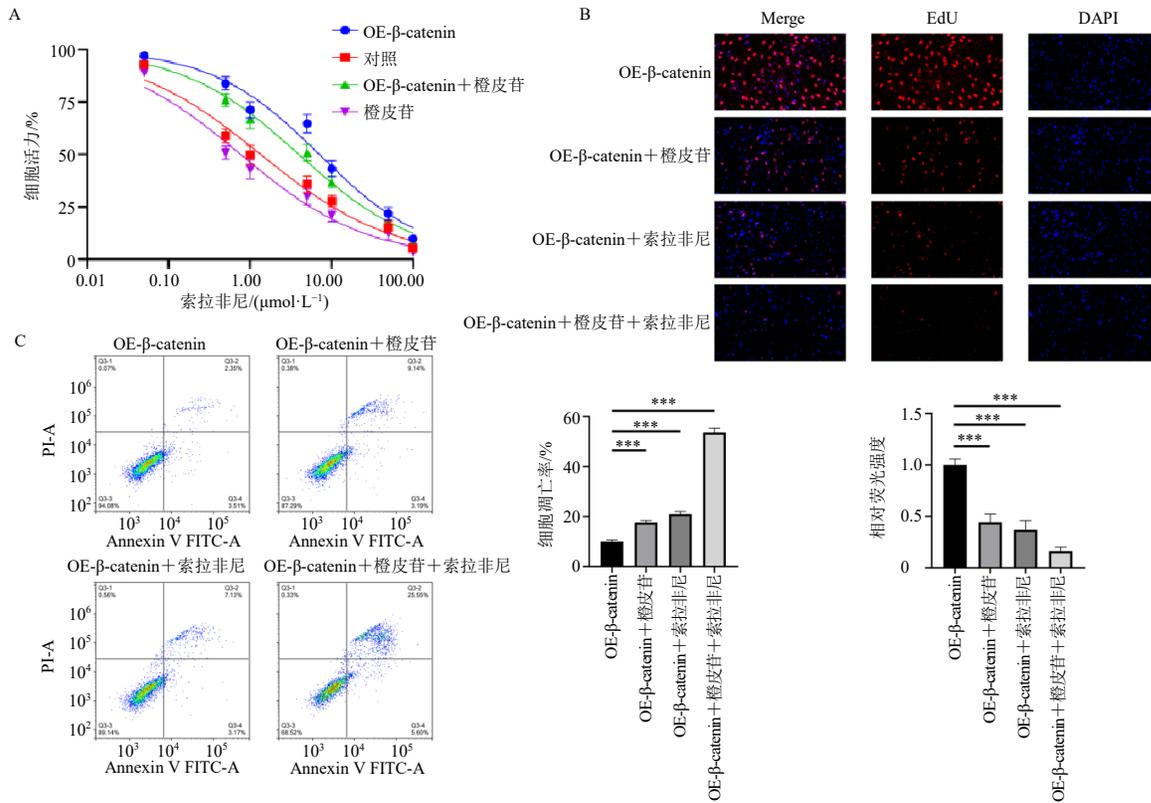


A-Western blotting 检测 CD44、CD133 蛋白表达; B-免疫荧光检测 CD44、CD133 蛋白表达 (×200)。

A-CD44 and CD133 protein expressions detected by Western blotting; B-CD44 and CD133 protein expressions detected by immunofluorescence (× 200).

图4 橙皮苷靶向 β-catenin 进而抑制肝癌细胞干性 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 4 Hesperidin targets β-catenin to inhibit stemness of hepatoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A-索拉非尼对 HepG2 细胞的 IC₅₀ 曲线; B-EdU 实验检测细胞增殖情况 (×400); C-流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

A-IC₅₀ curves of sorafenib against HepG2 cells; B-cell proliferation detected by EdU experiment (× 400); C-cell apoptosis detected by flow cytometry.

图5 橙皮苷靶向 β-catenin 进而增强索拉非尼敏感性 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Hesperidin targets β-catenin to enhance sorafenib sensitivity ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

胞的凋亡。

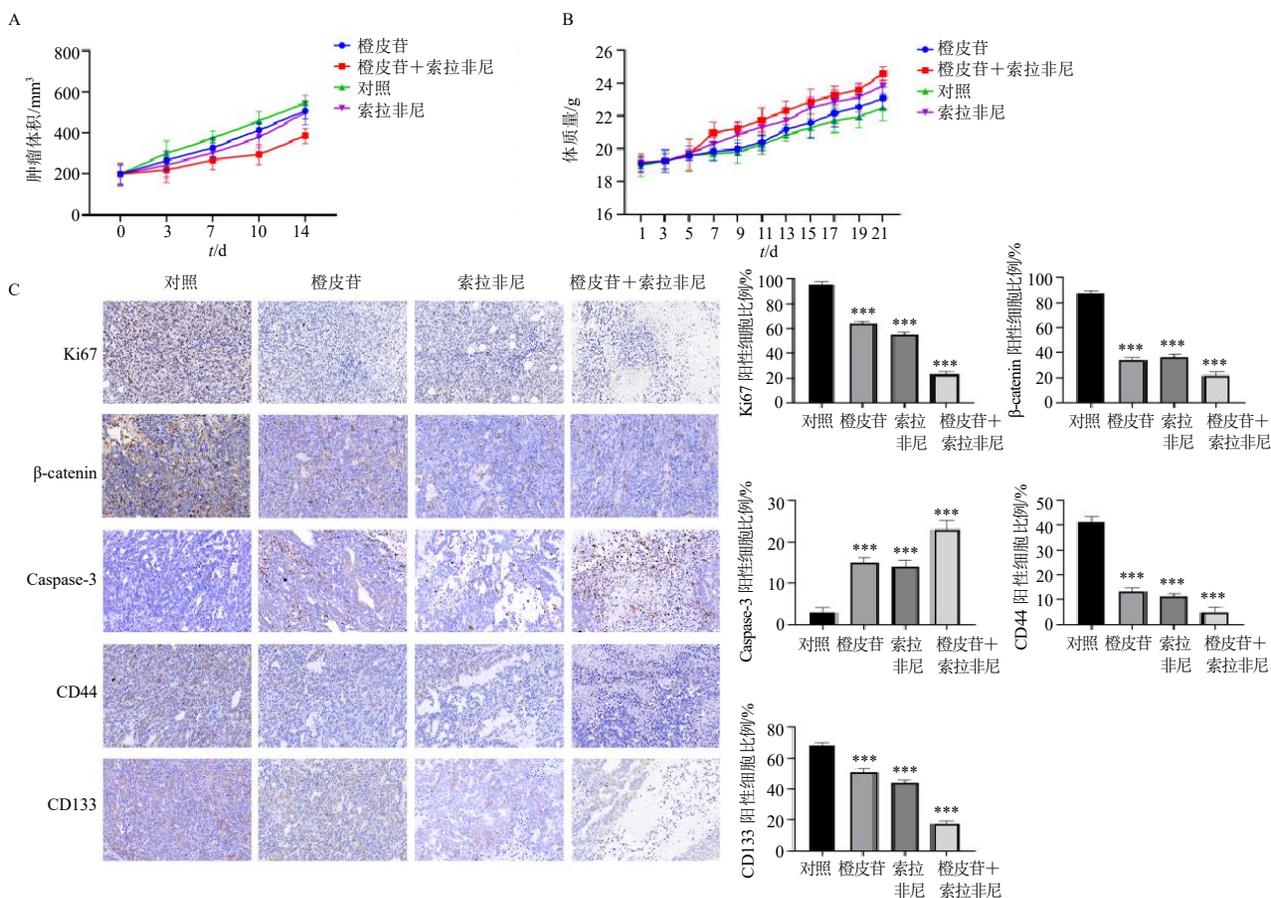
3.4 橙皮苷在体内抑制肝癌细胞干性并增强索拉非尼敏感性

为了进一步探究橙皮苷体内抗肿瘤作用,构建肝癌移植瘤动物模型,给予橙皮苷或索拉非尼干预后,记录小鼠肿瘤体积与体质量变化,并绘制肿瘤生长曲线与体质量变化曲线(图6-A、B),结果显示,与对照组比较,橙皮苷组裸鼠肿瘤组织块的体积明显降低;与索拉非尼组相比,橙皮苷+索拉非尼组裸鼠肿瘤组织块体积显著降低。表明橙皮苷抑制了裸鼠移植瘤的生长,且橙皮苷可增强索拉非尼敏感性。免疫组化实验结果(图5-C)表明,与对照组比较,橙皮苷组肿瘤组织 Ki67 表达量显著降低($P<0.001$),表明肿瘤细胞的生长被抑制;CD44、CD133 表达量明显降低($P<0.001$),表明橙皮苷可在体内抑制肝癌细胞干性;β-catenin 的表达量显著

降低($P<0.001$),表明橙皮苷靶向减少β-catenin; Caspase-3 的表达量显著增加($P<0.001$),表明橙皮苷促进了肿瘤细胞凋亡。与索拉非尼组比较,橙皮苷+索拉非尼组 Ki67、CD44、CD133、β-catenin 的表达量进一步降低, Caspase-3 的表达量进一步升高。以上结果表明,橙皮苷可在体内靶向β-catenin,抑制肝癌细胞的干性并增强索拉非尼敏感性,进而抑制肝癌细胞生长。

4 讨论

柑橘类黄酮具有抗氧化、抗炎、神经保护、抗癌和抗肥胖等多种生理活性^[20]。橙皮苷作为柑橘类黄酮典型的代表成分,普遍存在于橘子、橙子及柠檬等柑橘类水果中,具有抗炎、抗菌和抗氧化等作用^[21]。橙皮苷对 HepG2 细胞表现出剂量相关性的增殖抑制作用,尤其在橙皮苷质量浓度达到或超过 150 mg/L 时,其对 HepG2 细胞的抑制作用显著加



A-肿瘤体积生长曲线; B-小鼠体质量变化曲线; C-免疫组化检测肿瘤组织 Ki67、β-catenin、Caspase-3、CD44、CD133 蛋白表达(×400); 与对照组比较: *** $P<0.001$ 。

A-tumor volume growth curve; B-body weight change curve of mice; C-expressions of Ki67, β-catenin, Caspase-3, CD44 and CD133 proteins in tumor tissue detected by immunohistochemistry (× 400); *** $P<0.001$ vs control group.

图6 橙皮苷在体内抑制肝癌细胞干性并增强索拉非尼敏感性 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 6 Hesperidin inhibits stemness of hepatoma cells and enhances sorafenib sensitivity *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

强^[22]。此外,橙皮苷可阻滞细胞周期,诱导促凋亡基因上调和抗凋亡基因下调,进而诱导 HepG2 细胞凋亡^[23]。本研究通过肿瘤细胞成球实验观察到,与对照组相比,经不同浓度橙皮苷处理的细胞球体积较小,且形成的细胞球数量较少。Western blotting 及免疫荧光结果显示,与对照组比较,橙皮苷处理组与干细胞特性相关的蛋白表达水平显著降低;qRT-PCR 结果进一步证实,与对照组比较,橙皮苷处理组干细胞标志物的 mRNA 表达水平也显著下降。表明橙皮苷能够抑制肝癌细胞的干细胞特性。

肿瘤干细胞是一群具有自我更新和复制能力的特殊细胞,它们能够无限制地自我复制和分化,进而推动恶性肿瘤的发生、发展、转移及耐药性的形成。已有研究显示,WM130 通过减少肿瘤干细胞的生物标记物表达和下调其他与干性相关的基因,实现对糖原合成激酶 3 β (glycogen synthase kinase 3 β , GSK3 β) 磷酸化的抑制和 β -catenin 的降解,以此阻碍肝癌及阿霉素耐药性肝癌细胞的增殖和自我更新^[24]。本研究结果表明,橙皮苷组索拉非尼对 HepG2 细胞的 IC₅₀ 值均高于对照组。EdU 染色结果显示,相较于对照组,橙皮苷高剂量组 EdU 阳性染色数目显著减少;与索拉非尼组相比,橙皮苷+索拉非尼组 EdU 阳性染色数目减少。流式细胞术结果表明,与对照组相比,橙皮苷高剂量组细胞凋亡率显著上升;经索拉非尼处理后,细胞凋亡率也明显升高,而橙皮苷联合索拉非尼组细胞凋亡率进一步上升。Western blotting 结果显示,与对照组相比,橙皮苷高剂量组 Bax 蛋白表达明显增加,Bcl-2 蛋白表达显著降低;橙皮苷+索拉非尼组 Bax 蛋白表达明显增加,Bcl-2 蛋白表达显著降低。以上结果表明,橙皮苷可增强肝癌细胞对索拉非尼的敏感性,进而促进肝癌细胞的凋亡。

β -catenin 蛋白在细胞间的黏附作用和基因转录调控中扮演着双重角色,同时也是 Wnt 信号传导途径中的关键中介。当这一信号途径被激活, β -catenin 的磷酸化受到抑制,避免了其被蛋白酶体降解的命运,导致该蛋白在细胞质中累积,并迁移至细胞核内激活特定基因的表达,进而促进细胞增殖并抑制细胞凋亡过程。Yin 等^[25]发现在肝脏再生过程中, β -catenin 向细胞核内的转移增加,伴随着 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活,这一过程促进了肝脏的再生速度。激活后的 β -catenin 能够促进下游因子 c-MYC 的表达,同时,Wnt/ β -catenin 信号通路在

酪蛋白引起的糖酵解和谷氨酰胺代谢增强,以及对索拉非尼产生耐药性中扮演重要角色^[26]。另有研究表明,FZD10 通过激活 β -catenin 和 YAP1,增强了肝脏中肿瘤干细胞的自我更新能力、肿瘤形成能力和转移潜能^[27]。本研究发现,橙皮苷可能通过抑制 β -catenin 的核移位来发挥抗肿瘤作用。此外,橙皮苷可能通过影响 β -catenin 的核移位来抑制肿瘤干细胞特性。与 OE- β -catenin 组相比,OE- β -catenin+橙皮苷组对索拉非尼的敏感性增加,EdU 阳性细胞数量减少,说明橙皮苷可通过靶向 β -catenin 增强肝癌细胞对索拉非尼的敏感性,抑制了细胞增殖。流式细胞术结果表明,与 OE- β -catenin 组相比,OE- β -catenin+橙皮苷组细胞凋亡率显著增加,进一步支持了橙皮苷通过靶向 β -catenin 促进细胞凋亡的作用。体内实验通过构建肝癌移植瘤小鼠模型,发现橙皮苷可显著抑制肿瘤生长,且与单用索拉非尼相比,橙皮苷与索拉非尼联合治疗进一步减少了肿瘤体积。免疫组化结果显示,橙皮苷+索拉非尼组 Ki67、CD44、CD133、 β -catenin 表达降低,Caspase-3 表达增加,表明橙皮苷抑制了肿瘤生长、干细胞特性和凋亡。以上结果表明,橙皮苷可通过靶向 β -catenin,抑制肝癌细胞的干性特征,增强索拉非尼的敏感性,从而抑制肿瘤生长。

综上,橙皮苷通过作用于 β -catenin,不仅能够有效抑制肝癌细胞的干性特征,还能显著提高肝癌细胞对索拉非尼药物的敏感度。本研究为肝癌治疗开辟了新的路径,提出了潜在的治疗策略,对于改善肝癌患者的治疗效果和预后具有深远的意义,展现了重要的临床应用潜力。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chidambaranathan-Reghupaty S, Fisher P B, Sarkar D. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification [J]. *Adv Cancer Res*, 2021, 149: 1-61.
- [2] Han B F, Zheng R S, Zeng H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022 [J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53.
- [3] Desai A, Sandhu S, Lai J P, et al. Hepatocellular carcinoma in non-cirrhotic liver: A comprehensive review [J]. *World J Hepatol*, 2019, 11(1): 1-18.
- [4] Michelotti A, de Scordilli M, Palmero L, et al. NAFLD-related hepatocarcinoma: The malignant side of metabolic syndrome [J]. *Cells*, 2021, 10(8): 2034.

- [5] Tang W W, Chen Z Y, Zhang W L, *et al.* The mechanisms of sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma: Theoretical basis and therapeutic aspects [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 87.
- [6] 徐健, 杜沅沁, 黄晶晶, 等. 鳖甲煎丸含药血清通过 miR-140 调控肝癌干细胞增殖能力及干性的机制研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2024, 26(7): 26-31.
- [7] 雷雨, 刘伟, 包黎. 橙皮苷对慢性应激抑郁模型大鼠海马组织 Akt/mTOR 信号通路调节机制的研究 [J]. 中国免疫学杂志, 2024, 40(12): 2548-2553.
- [8] 于权麟, 王思爽, 孙子涵, 等. 橙皮苷对脂肪酸致牛乳腺上皮细胞脂质代谢紊乱及其凋亡作用的研究 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2024(19): 8-16.
- [9] Yao Y, Lin M Y, Liu Z J, *et al.* Hesperidin inhibits lung cancer *in vitro* and *in vivo* through PinX1 [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 918665.
- [10] Madureira M B, Concato V M, Cruz E M S, *et al.* Naringenin and hesperidin as promising alternatives for prevention and co-adjuvant therapy for breast cancer [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(3): 586.
- [11] Jeong S A, Yang C, Song J, *et al.* Hesperidin suppresses the proliferation of prostate cancer cells by inducing oxidative stress and disrupting Ca²⁺ homeostasis [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1633.
- [12] 杨萍, 黄清杰, 李喜香, 等. 橙皮苷药理作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(21): 7222-7231.
- [13] Poomipark N, Chaisin T, Kaulpiboon J. Anti-proliferative, anti-migration, and anti-invasion activity of novel hesperidin glycosides in non-small cell lung cancer A549 cells [J]. *Res Pharm Sci*, 2023, 18(5): 478-488.
- [14] Aggarwal V, Tuli H S, Thakral F, *et al.* Molecular mechanisms of action of hesperidin in cancer: Recent trends and advancements [J]. *Exp Biol Med*, 2020, 245(5): 486-497.
- [15] Deng J, Liu L, Li L, *et al.* Hesperidin delays cell cycle progression into the G₀/G₁ phase via suspension of MAPK signaling pathway in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2022, 36(4): e22981.
- [16] Ferreira de Oliveira J M P, Santos C, Fernandes E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models [J]. *Phytomedicine*, 2020, 73: 152887.
- [17] Fontana F, Raimondi M, Marzagalli M, *et al.* The emerging role of paraptosis in tumor cell biology: Perspectives for cancer prevention and therapy with natural compounds [J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(2): 188338.
- [18] Magura J, Moodley R, Mackraj I. The effect of hesperidin and luteolin isolated from *Eriocephalus africanus* on apoptosis, cell cycle and miRNA expression in MCF-7 [J]. *J Biomol Struct Dyn*, 2022, 40(4): 1791-1800.
- [19] Dokumacioglu E, Iskender H, Musmul A. Effect of hesperidin treatment on α -Klotho/FGF-23 pathway in rats with experimentally-induced diabetes [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 109: 1206-1210.
- [20] Zhang M, Zhu S Y, Yang W J, *et al.* The biological fate and bioefficacy of *Citrus* flavonoids: Bioavailability, biotransformation, and delivery systems [J]. *Food Funct*, 2021, 12(8): 3307-3323.
- [21] 张凤亭, 胡坦, 潘思轶. 橙皮苷生物学活性及其改性技术的研究进展 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(10): 442-449.
- [22] 程翠林, 王荣春, 杨雨茗, 等. 橙皮苷半合成香叶木苷及其抑癌作用 [J]. 精细化工, 2020, 37(11): 2308-2312.
- [23] Fazary A E, Alfaifi M Y, Elbehairi S E I, *et al.* Bioactivity studies of hesperidin and XAV939 [J]. *ACS Omega*, 2021, 6(30): 20042-20052.
- [24] Liu Y C, Yeh C T, Lin K H. Cancer stem cell functions in hepatocellular carcinoma and comprehensive therapeutic strategies [J]. *Cells*, 2020, 9(6): 1331.
- [25] Yin Y Z, Kong D F, He K, *et al.* Aurora kinase A regulates liver regeneration through macrophages polarization and Wnt/ β -catenin signalling [J]. *Liver Int*, 2022, 42(2): 468-478.
- [26] Xu C R, Xu Z, Zhang Y, *et al.* β -Catenin signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *J Clin Invest*, 2022, 132(4): e154515.
- [27] Wang J H, Yu H M, Dong W, *et al.* N₆-Methyladenosine-mediated up-regulation of FZD10 regulates liver cancer stem cells' properties and lenvatinib resistance through WNT/ β -catenin and hippo signaling pathways [J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(6): 990-1005.

[责任编辑 李亚楠]