

新鱼腥草素钠通过 USP22 介导 SIRT1 去泛素化调控自噬抑制肝细胞癌进展

张学习¹, 董长虹¹, 訾 臣², 孙象军^{1*}

1. 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

2. 临沂市人民医院, 山东 临沂 276000

摘要: **目的** 探究新鱼腥草素钠 (sodium new houttuifonate, SNH) 通过泛素特异性肽酶 22 (ubiquitin-specific peptidase 22, USP22) 介导的沉默调节蛋白 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 去泛素化调控自噬抑制肝细胞癌进展的作用机制。 **方法** 人肝癌 HepG2 细胞给予 SNH 或索拉非尼处理 24 h 后, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡, Transwell 实验检测细胞侵袭能力。质粒转染诱导 USP22 过表达, 免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 验证 USP22 和 SIRT1 之间的相互作用, Western blotting 检测 USP22、SIRT1 蛋白表达和 SIRT1 泛素化水平。使用 SIRT1 激活剂处理后, 通过 mRFP-GFP-LC3 双荧光标记、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 水平测定、乳酸生成测定以及 USP22、SIRT1、微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) -II/I、p62 的蛋白表达分析评估自噬活性。在体内实验中, 40 只 BALB/c-nu 裸鼠异位移植 HepG2 细胞, 给予 SNH 或索拉非尼干预 12 d, 每 3 天监测肿瘤体积和质量。对肿瘤组织进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色、TUNEL 染色, 采用免疫组化法检测核增殖抗原 Ki67、USP22 和 SIRT1 的蛋白表达。 **结果** SNH 呈剂量相关性地抑制 HepG2 细胞活力和侵袭 ($P < 0.01$ 、 0.001), 诱导细胞凋亡 ($P < 0.001$), 其中高剂量 SNH 的作用与索拉非尼相当。Co-IP 证实了 USP22-SIRT1 蛋白相互作用, 高剂量 SNH 显著降低 USP22-SIRT1 蛋白相互作用 ($P < 0.01$)。高剂量 SNH 显著下调 USP22 和 SIRT1 蛋白表达 ($P < 0.01$ 、 0.001), 增加 SIRT1 的泛素化 ($P < 0.001$), 以上作用被 USP22 过表达逆转 ($P < 0.05$ 、 0.001)。SNH 抑制 HepG2 细胞自噬, 表现为 GFP/mRFP 荧光信号增强 ($P < 0.01$), ATP 水平降低 ($P < 0.001$), 乳酸水平升高 ($P < 0.001$), p62 表达增加以及 USP22、SIRT1、LC3-II/I 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)。SIRT1 激活部分抵消了 SNH 的自噬抑制作用 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。在体内, 高剂量 SNH 显著降低肿瘤体积、质量和恶性程度 ($P < 0.001$), 诱导肿瘤细胞凋亡以及 Ki67、USP22 和 SIRT1 表达降低 ($P < 0.001$)。 **结论** SNH 调控 USP22 表达介导 SIRT1 去泛素化来抑制自噬, 从而抑制肝细胞癌的进展, 为肝细胞癌的治疗提供了潜在策略。

关键词: 新鱼腥草素钠; 肝细胞癌; 自噬; USP22; SIRT1

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253 - 2670(2026)04 - 1366 - 11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.04.015

Sodium new houttuifonate inhibits hepatocellular carcinoma progression through USP22-mediated SIRT1 deubiquitination regulating autophagy

ZHANG Xuexi¹, DONG Changhong¹, ZI Chen², SUN Xiangjun¹

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

2. Linyi People's Hospital, Linyi 276000, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism by which sodium new houttuifonate (SNH) inhibits hepatocellular carcinoma (HCC) progression through autophagy regulation via ubiquitin-specific peptidase 22 (USP22)-mediated silent mating type information regulation 2 homolog 1 (SIRT1) deubiquitination. **Methods** Human liver cancer HepG2 cells were treated with SNH or sorafenib for 24 h, cell viability was detected by CCK-8 assay, cell apoptosis was detected by flow cytometry, and cell invasion ability was detected by Transwell assay. After plasmid transfection induced overexpression of USP22, the USP22-SIRT1 interaction was verified by co-immunoprecipitation (Co-IP). USP22 and SIRT1 protein expressions, as well as SIRT1 ubiquitination were detected by Western

收稿日期: 2025-10-15

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2020QH041)

作者简介: 张学习, 男, 硕士, 主治医师, 研究方向为中西医结合治疗肝胆疾病。E-mail: 18265903921@163.com

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

blotting. After treatment with SIRT1 activator, autophagy activity was evaluated through mRFP-GFP-LC3 dual fluorescence labeling, adenosine triphosphate (ATP) level measurement, lactate production assay, and analysis of USP22, SIRT1, microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-II/I and p62 protein expressions. For *in vivo* experiments, 40 BALB/c-nu nude mice were eutectopically transplanted with HepG2 cells and intervened with SNH or sorafenib for 12 d. Tumor volume and weight were monitored every 3 d. Hematoxylin-eosin (HE) staining and TUNEL staining were performed on tumor tissues, and immunohistochemistry was used to detect the protein expressions of nuclear proliferation antigens Ki67, USP22 and SIRT1. **Results** SNH dose-dependently suppressed HepG2 cell viability and invasion ($P < 0.01, 0.001$), induced cell apoptosis ($P < 0.001$). The effect of high-dose SNH was comparable to sorafenib. Co-IP confirmed USP22-SIRT1 protein interaction, which was significantly reduced by high-dose SNH ($P < 0.01$). High-dose SNH significantly down-regulated USP22 and SIRT1 protein expressions ($P < 0.01, 0.001$), increased SIRT1 ubiquitination ($P < 0.001$). These effects were reversed by USP22 overexpression ($P < 0.05, 0.001$). SNH inhibited autophagy in HepG2 cells, manifested by enhanced GFP/mRFP fluorescence signal ($P < 0.01$), decreased ATP level ($P < 0.001$), increased lactate level ($P < 0.001$), increased p62 expression and decreased expression levels of USP22, SIRT1 and LC3-II/I proteins ($P < 0.05, 0.001$). SIRT1 activation partially counteracted the autophagic inhibition of SNH ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). *In vivo*, high-dose SNH significantly reduced tumor volume, weight and malignancy degree ($P < 0.001$), induced tumor cell apoptosis and decreased Ki67, USP22, and SIRT1 expressions ($P < 0.001$). **Conclusion** SNH inhibits HCC progression by suppressing autophagy through USP22-mediated regulation of SIRT1 deubiquitination, providing a potential therapeutic strategy for HCC.

Key words: sodium new houttuynonate; hepatocellular carcinoma; autophagy; USP22; SIRT1

肝细胞癌是原发性肝恶性肿瘤最常见的形式, 已被列为全球第6大常见恶性肿瘤和第3大癌症相关死亡原因, 每年造成约90万例新发病例和83万例死亡^[1]。尽管近年来在肝癌诊断和治疗方面取得了一定进展, 但由于其高度异质性、复杂发病机制以及化疗耐药性等问题, 晚期肝细胞癌患者的平均5年生存率仍不足20%^[2-3]。目前临床应用的靶向药物如索拉非尼和仑伐替尼虽然能延长患者生存期, 但普遍存在疗效有限、不良反应显著且易产生耐药性等局限性^[4]。因此, 深入探索肝细胞癌发生发展的分子机制, 并开发新型高效低毒的抗肝细胞癌药物具有重要的临床意义和科学价值。传统中药因其多靶点、低毒性和整体调节的特点, 在肿瘤治疗领域展现出独特优势^[5]。鱼腥草 *Houttuynia cordata* Thunb. 作为我国传统药用植物, 具有清热解毒、消痈排脓等功效^[6], 其活性成分新鱼腥草素钠 (sodium new houttuynonate, SNH) 已被证实具有广谱抗菌、抗炎、免疫调节和抗肿瘤等多种药理活性^[7]。前期研究表明, SNH 可通过抑制磷酸肌醇 3-激酶 (phosphoinositide 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路、调节细胞周期和诱导凋亡等途径发挥抗肿瘤作用^[8]。然而, 其在肝细胞癌治疗中的作用机制, 特别是与肿瘤细胞自噬调控的关系仍不清楚。

自噬是细胞内重要的代谢和稳态维持过程, 过度自噬可能促进肿瘤细胞在营养缺乏和化疗压力

下的存活^[9]。泛素特异性肽酶 22 (ubiquitin-specific peptidase 22, USP22) 作为去泛素化酶家族的重要成员, 能够通过去除蛋白质上的泛素化修饰, 稳定靶蛋白的表达, 从而参与多种生物学过程的调控^[10]。已有研究发现, USP22 在多种肿瘤中高表达, 且与肿瘤的恶性表型及不良预后密切相关^[11]。USP22 可以调控沉默调节蛋白 1 (silent mating type information regulation 2 homolog 1, SIRT1) 及其下游通路^[12]。SIRT1 作为去乙酰化酶, 不仅能调节能量代谢和氧化应激反应, 还是自噬过程的关键调控因子^[13]。USP22/SIRT1 轴在多种癌症中已被证实与肿瘤细胞的增殖、凋亡及多药耐药密切相关^[14], 但其在自噬调控中的具体分子机制仍有待阐明。本研究旨在揭示 SNH 靶向 USP22 介导的 SIRT1 去泛素化通路来调控自噬过程, 进而抑制肝细胞癌进展的分子机制。

1 材料

1.1 动物

40 只 SPF 级 6 周龄雄性 BALB/c-nu 裸鼠购自北京维通利华动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006, 实验动物使用许可证号 SYXK (鲁) 2023-0003。所有裸鼠均饲养于 SPF 级动物房, 温度 (22±2) °C, 相对湿度 (50±5) %, 12 h/12 h 光暗循环, 自由进食饮水。动物实验经临沂市人民医院医学伦理委员会批准 (批准号 L20250121)。

1.2 细胞

人肝癌 HepG2 细胞 (货号 SCSP-510) 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。

1.3 药品与试剂

SNH (质量分数 $\geq 98\%$, 批号 B26386) 购自上海源叶生物科技有限公司; 索拉非尼 (批号 43-9006) 购自北京索莱宝科技有限公司; 蛋白酶体抑制剂 MG132 (批号 HY-13259) 购自美国 MedChemExpress 公司; USP22 过表达质粒、阴性对照质粒、自噬双标腺病毒 mRFP-GFP-LC3 质粒 (批号 HB-LP210 0001) 购自上海汉恒生物科技有限公司; SIRT1 激活剂 SRT1720 (批号 SC0267)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 P0398S)、RIPA 裂解液 (批号 P0013B)、蛋白酶抑制剂 (批号 P1005)、一抗二抗去除液 (批号 P0025)、极超敏 ECL 化学发光试剂盒 (批号 P0018FS)、TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒 (批号 C1176M)、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色试剂盒 (批号 C0105S) 购自上海碧云天生物科技有限公司; 磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffered saline, PBS, 批号 10010)、胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS, 批号 A5256501)、DMEM 培养基 (批号 11965092)、青霉素/链霉素溶液 (批号 15140122)、0.25% 胰蛋白酶消化液 (批号 25200056)、Lipofectamine 3000 (批号 L3000001)、Pierce™ 蛋白 A/G 磁珠 (批号 88802) 购自美国 Gibco Life Sciences 公司; CCK-8 细胞活力检测试剂盒 (批号 CK04) 购自日本 DOJINDO 化学科技有限公司; 流感病毒血凝素标签泛素 (hemagglutinin-tagged ubiquitin, HA-Ub) 质粒 (批号 BNCC356352) 购自河南北纳创联生物科技有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 (批号 560931) 购自美国 BD 公司; 三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 含量检测试剂盒 (批号 ZC-S0474)、乳酸含量检测试剂盒 (批号 ZC-S0488) 购自上海茁彩生物科技有限公司; USP22 抗体 (批号 ab195289)、SIRT1 抗体 (批号 ab189494)、微管相关蛋白轻链 3 (microtubule-associated protein light chain 3, LC3) 抗体 (批号 ab62721)、p62 抗体 (批号 ab207305)、核增殖抗原 Ki67 抗体 (批号 ab15580)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体 (批号 ab8245)、HA 抗体 (批号 ab9110)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 ab150077) 购自英国 Abcam 公司;

PrimeScript™ RT-PCR 试剂盒 (批号 RR014A)、PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒 (批号 RR047Q) 购自日本 TakaraBio 生物技术有限公司; 异丙醇 (批号 80109218)、无水乙醇 (批号 10009218)、甲醇 (批号 10014118)、4% 多聚甲醛 (批号 LJ199431L) 购自上海国药集团化学试剂有限公司。

1.4 仪器

DW-86L288 型 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱 (青岛海尔股份有限公司); 51032874 型二氧化碳细胞恒温培养箱、A28140 型 QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo 公司); SW-CJ-2F.D 型超净工作台 (上海新苗医疗器械制造有限公司); Epoch 酶标仪 (美国 BioTek 公司); JY92-2D 型超声波细胞破碎仪 (宁波新芝生物科技股份有限公司); CytoFLEX 型流式细胞仪 (美国 Beckman Coulter 公司); ECLIPSE TI-SR 型倒置荧光显微镜 (日本 Nikon 公司); HC-3018 型台式离心机 (安徽中科中佳科学仪器有限公司); AUY120 型分析天平 (日本 SHIMADZU 公司); 1658033 型 Mini-PROTEAN Tetra 蛋白电泳系统 (美国 Bio-Rad 公司); UC6 型超薄切片机 (德国 Leica 公司); HT7800 型透射电子显微镜 (日本 Hitachi 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与分组处理

HepG2 细胞用含 10% FBS、100 U/mL 青霉素、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的 DMEM 培养基, 于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养。使用 4~7 代的 HepG2 细胞, 当细胞密度达到 70%~80% 时, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下用 0.25% 胰蛋白酶消化液处理 1 min, 细胞悬液用含 10% FBS 的 DMEM 培养基稀释至 2×10^5 个/mL, 接种于 12 孔板, 在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱内培养 24 h。

设置对照组及 SNH 低、高剂量 (50、100 $\mu\text{mol}/\text{L}$)^[8]组和索拉非尼 (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)^[15-16]组, 各给药组加入相应药物处理细胞 24 h, 对照组加入不含药物的培养基。设置对照组、SNH (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 组、USP22 过表达组和 USP22 过表达+SNH (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 组, 转染 USP22 质粒后加入药物处理细胞 24 h, 对照组加入不含药物的培养基。设置对照组、SNH (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 组、SIRT1 激活组和 SIRT1 激活+SNH (100 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 组, 先加入 1 $\mu\text{mol}/\text{L}$ SIRT1 激活剂 SRT1720 预处理细胞 1 h, 再加入药物处理细胞 24 h, 对照组加入不含药物的培养基。

2.2 过表达质粒转染

将细胞以 3×10^5 个/mL (1 mL/孔) 接种于 12 孔板中孵育 24 h, 待细胞密度达到 80% 时, 用 PBS 和无血清 DMEM 分别洗涤, 每孔加入 0.4 mL 无血清 DMEM 培养基。根据试剂盒说明书, 使用 Lipofectamine 3000 转染试剂进行瞬时转染。

2.3 细胞活力检测

HepG2 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板, 加入 SNH (50、100 $\mu\text{mol/L}$) 或索拉非尼 (10 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中继续孵育 2 h。采用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 计算细胞活力。

2.4 细胞凋亡检测

细胞按“2.1”项下方法进行处理后, 胰酶消化, 用预冷的 PBS 洗涤 2 次, 加入 100 μL Annexin V-FITC 结合缓冲液重悬细胞, 随后加入 Annexin V-FITC 和 PI 染液各 5 μL , 室温避光孵育 15 min, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况, 采用 FlowJo 软件进行数据分析。

2.5 细胞侵袭检测

采用 8 μm 孔径 Transwell 小室评估细胞侵袭能力, 上室基底预先涂覆基质胶模拟细胞外基质。细胞按“2.1”项下方法进行处理后, 以无血清培养基调整胰酶消化后的细胞密度至 1×10^5 个/mL, 取 200 μL 细胞悬液加入上室, 下室加入 600 μL 含 10% FBS 的完全培养基作为趋化因子。37 $^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后, 棉签擦去上室未侵袭细胞, 4% 多聚甲醛固定穿透细胞 10 min, 0.1% 结晶紫染色 20 min。于倒置显微镜下随机选取 5 个视野计数穿透细胞, 取平均值评价侵袭能力。

2.6 Western blotting 检测相关蛋白表达

细胞按“2.1”项下方法进行处理后, 收集细胞, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 蛋白样品与 $5 \times$ 上样缓冲液混合, 95 $^\circ\text{C}$ 加热 5 min 使蛋白变性。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 于 5% 脱脂牛奶中室温封闭 1 h, 分别加入 USP22、SIRT1、LC3 和 p62 一抗, 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次后, 加入 HRP 标记的二抗, 室温孵育 1 h, 加入 ECL 化学发光试剂显影, 采用 Image Lab 软件分析条带灰度值。

2.7 免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 实验

细胞按“2.1”项下方法进行处理后, 收集细胞,

加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液提取总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。取 500 μg 总蛋白与 2 μg USP22 抗体于 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 加入 Protein A/G 磁珠继续孵育 4 h。磁珠经裂解缓冲液洗涤后, 加入 $2 \times$ 上样缓冲液煮沸 10 min 以解离复合物。后续通过 Western blotting 检测 SIRT1 蛋白表达水平, 验证 USP22 与 SIRT1 的相互作用。设置 IgG 同型抗体作为阴性对照, 排除非特异性结合干扰。

2.8 泛素化水平检测

细胞按“2.1”项下方法进行处理, 转染 HA-Ub 质粒 24 h 后, 使用蛋白酶体抑制剂 MG132 处理 6 h 以阻断泛素化蛋白降解。细胞裂解后采用 SIRT1 特异性抗体进行免疫沉淀, 所得复合物通过 SDS-PAGE 电泳分离并转膜。使用 HA 抗体进行 Western blotting 检测, 分析 SIRT1 条带对应的泛素化修饰水平。

2.9 细胞自噬检测

将细胞接种于共聚焦专用培养皿, 转染自噬双标腺病毒 mRFP-GFP-LC3 质粒 48 h 使荧光蛋白稳定表达。细胞按“2.1”项下方法进行处理, 于激光共聚焦显微镜下观察, 中性 pH 环境下 LC3 与双荧光标签结合形成黄色斑点代表自噬体, 当自噬体与溶酶体融合形成自噬溶酶体时, 绿色荧光 GFP 淬灭, 仅保留红色荧光 mRFP 信号。GFP/mRFP 值升高反映细胞自噬受阻。

2.10 ATP 水平测定

细胞按“2.1”项下方法进行处理后, 收集细胞, 按照试剂盒说明书测定 ATP 水平。

2.11 乳酸水平测定

细胞按“2.1”项下方法进行处理后, 收集细胞上清液, 按照试剂盒说明书测定乳酸水平。

2.12 动物分组与给药

取 40 只 SPF 级 6 周龄雄性 BALB/c-nu 裸鼠, sc HepG2 细胞 (1.0×10^7 个/只), 待肿瘤体积达到 100 mm^3 时, 随机分为对照组及 SNH 低、高剂量 (37.5、75.0 mg/kg)^[17] 组和索拉非尼 (30 mg/kg)^[18] 组, 每组 10 只。各给药组 ig 相应药物, 对照组 ig 等体积的生理盐水, 1 次/d, 连续给药 12 d。每 3 天用游标卡尺测量 1 次肿瘤大小, 末次给药 24 h 后, 全身麻醉下处死小鼠, 测量肿瘤体积和质量, 一部分肿瘤组织固定于 4% 多聚甲醛中, 另一部分置于液氮中速冻, 在 -80 $^\circ\text{C}$ 冰箱中保存。

$$\text{肿瘤体积} = \text{长} \times \text{宽}^2 \times 0.5$$

2.13 HE 染色观察肿瘤组织病理变化

新鲜肿瘤组织经 4%多聚甲醛固定 24 h 后, 梯度乙醇脱水处理。脱水后的组织经二甲苯透明后浸蜡包埋, 使用切片连续切片, 厚度设置为 5 μm。切片经脱蜡水化后, 依次浸入苏木素染液染色 5 min, 盐酸乙醇分化 30 s, 流水返蓝 1 h, 伊红染液复染 2 min。染色完成后经梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片, 于光学显微镜下观察肿瘤组织的病理变化。

2.14 TUNEL 染色检测肿瘤组织细胞凋亡

肿瘤组织石蜡切片经二甲苯脱蜡后, 梯度乙醇水化, 蛋白酶 K 工作液 37 °C 消化 15 min。PBS 洗涤后加入 TUNEL 反应混合液, 37 °C 避光孵育 1 h。反应终止后滴加转换工作液, 室温孵育 30 min。在凋亡细胞断裂的 DNA 3'-羟基末端催化掺入荧光素-12-脱氧三磷酸尿苷, 通过检测其标记的 DNA 片段来判断细胞凋亡。显色液处理 3 min, 苏木素复染细胞核 1 min, 封片后在荧光显微镜下观察。红色荧光强度升高代表细胞凋亡增加。

2.15 免疫组化检测肿瘤组织 Ki67、USP22 和 SIRT1 表达

肿瘤组织石蜡切片经柠檬酸盐缓冲液修复抗原后, 加入 3%过氧化氢甲醇溶液于室温封闭 15 min。分别加入 Ki67、USP22 和 SIRT1 一抗, 4 °C 孵育过夜。次日, 滴加 HRP 标记的二抗, 37 °C 孵育 30 min。DAB 显色液显色后, 苏木素复染, 中性树脂封片, 于显微镜下观察阳性信号分布。

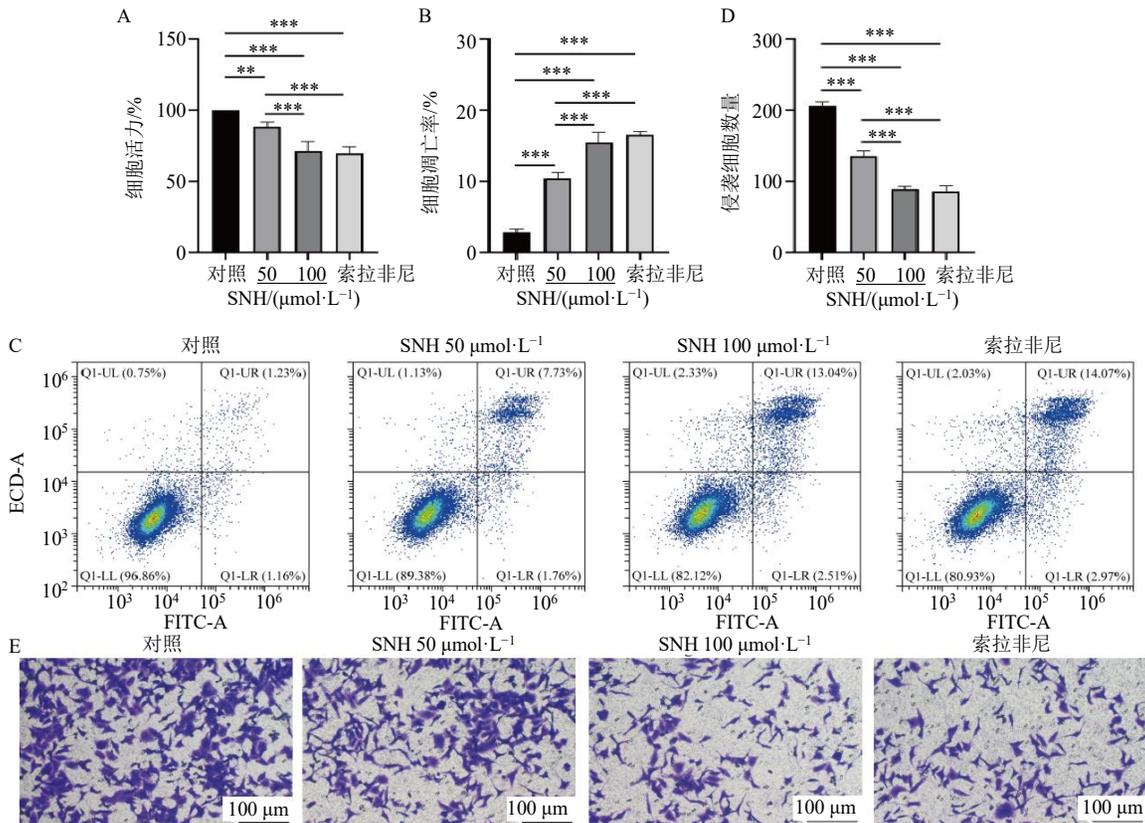
2.16 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析, Image J 软件进行定量分析。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两组间比较采用最小显著性差异法 (least significant difference test, LSD-*t*) 检验。

3 结果

3.1 SNH 对 HepG2 细胞增殖和侵袭的抑制作用

如图 1 所示, 与对照组比较, SNH 显著抑制 HepG2 细胞活力 ($P < 0.01$ 、 0.001), 促进 HepG2 细



A-CCK-8 检测细胞活力; B、C-流式细胞术检测细胞凋亡; D、E-Transwell 检测细胞侵袭 ($\times 100$); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图 2、3 同。

A-cell viability detected by CCK-8; B, C-cell apoptosis detected by flow cytometry; D, E-cell invasion detected by Transwell ($\times 100$); * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, same as Figs. 2, 3.

图 1 SNH 对 HepG2 细胞增殖和侵袭的抑制作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

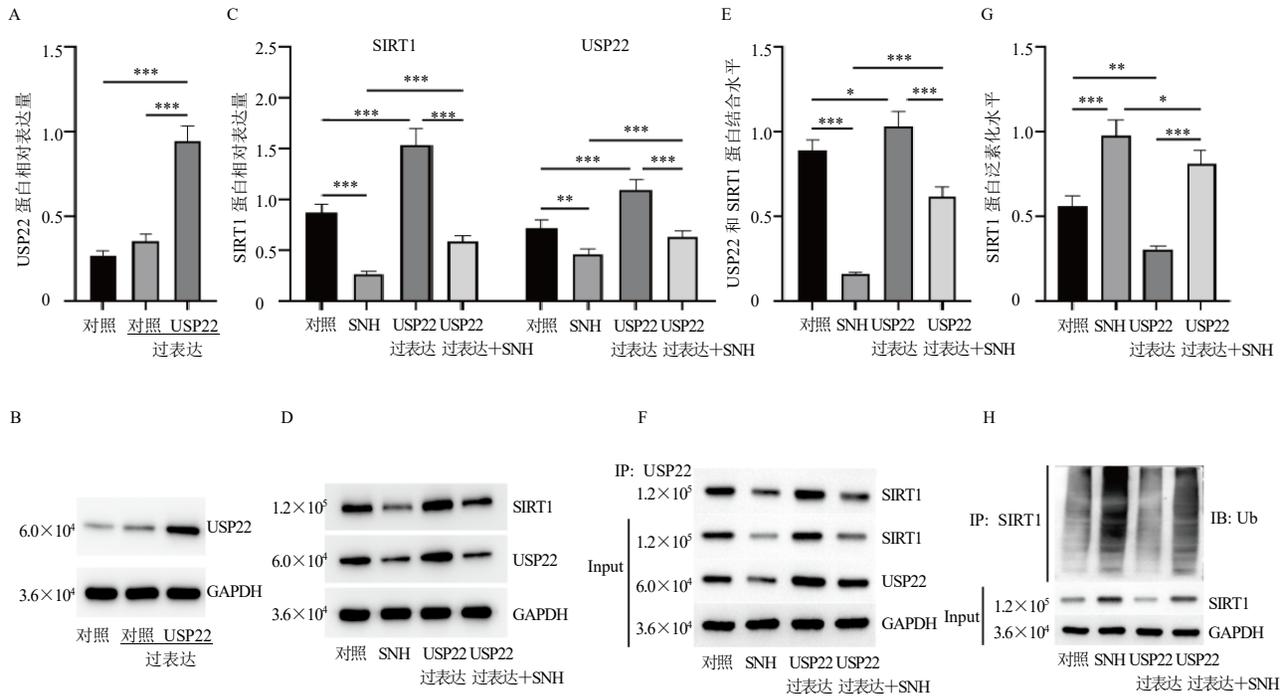
Fig. 1 SNH inhibits proliferation and invasion of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

胞凋亡($P < 0.001$), 并抑制其侵袭能力($P < 0.001$), 呈剂量相关性, 其中 SNH 高剂量组效果与阳性对照组相近。

3.2 SNH 抑制 USP22 介导的 SIRT1 去泛素化

Western blotting 结果 (图 2-A、B) 表明成功过表达 HepG2 细胞中的 USP22。如图 2-C、D 所示, 与对照组比较, SNH 组 USP22 和 SIRT1 蛋白表达

水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。如图 2-E~H 所示, SNH 能够显著降低 HepG2 细胞 USP22 与 SIRT1 的蛋白-蛋白相互作用 ($P < 0.01$), 同时 SIRT1 泛素化水平显著升高 ($P < 0.001$)。而 USP22 过表达后 SNH 的以上作用均被显著逆转 ($P < 0.05$ 、 0.001), 证实 USP22 介导的 SIRT1 去泛素化是 SNH 发挥作用的关键机制。



A、B-Western blotting 验证 USP22 蛋白过表达; C、D-Western blotting 检测 USP22、SIRT1 蛋白表达水平; E、F-Co-IP 检测 USP22 和 SIRT1 结合; G、H-转染 HA-Ub 质粒后, Western blotting 检测 SIRT1 泛素化水平。

A, B-USP22 overexpression validated by Western blotting; C, D-USP22 and SIRT1 protein expression levels detected by Western blotting; E, F-Co-IP analysis of USP22-SIRT1 interaction; G, H-SIRT1 ubiquitination levels following HA-ubiquitin plasmid transfection detected by Western blotting.

图 2 SNH 抑制 USP22 介导的 SIRT1 去泛素化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 SNH inhibits USP22 mediated deubiquitination of SIRT1 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

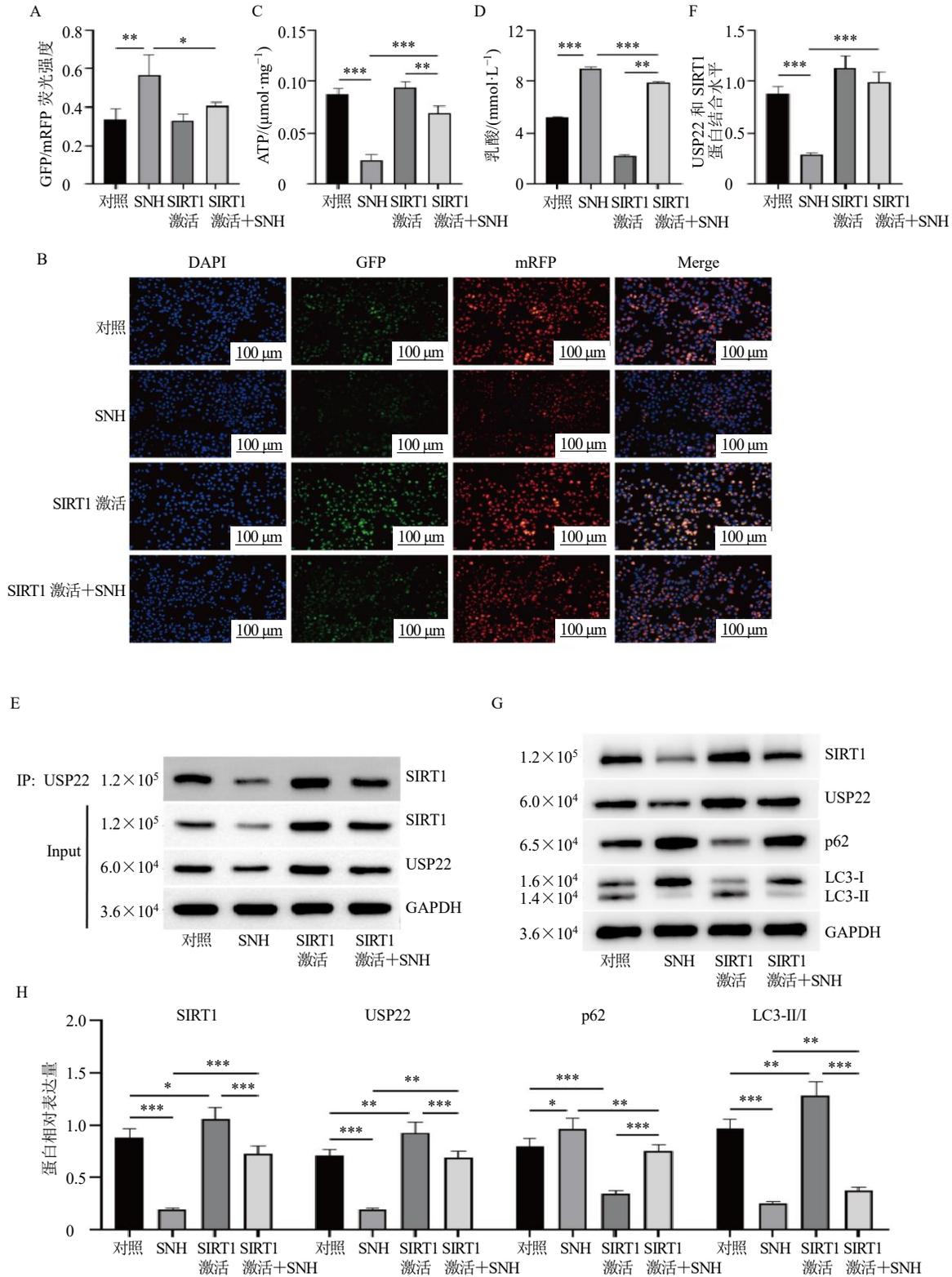
3.3 SNH 通过 USP22-SIRT1 轴调控自噬

采用 mRFP-GFP-LC3 双荧光标记检测细胞自噬流, GFP/mRFP 值升高反映细胞自噬受阻。结果显示, 与对照组比较, SNH 组 GFP/mRFP 值显著升高 ($P < 0.01$, 图 3-A、B), 表明细胞自噬活性显著降低, 伴随 ATP 水平下降及培养上清液中乳酸水平升高 ($P < 0.001$, 图 3-C、D)。Co-IP 检测结果表明, SNH 显著抑制 HepG2 细胞 USP22 与 SIRT1 的蛋白-蛋白相互作用 (图 3-E、F, $P < 0.001$)。Western blotting 检测结果 (图 3-G、H) 显示, 与对照组比较, SNH 处理后 HepG2 细胞 USP22、SIRT1 蛋白表达水平及 LC3-II/I 值显著降低 ($P < 0.001$), p62 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$), 提示自噬受到抑

制。而激活 SIRT1 可部分阻断 SNH 的以上效应 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.4 SNH 在裸鼠异位荷瘤模型中的抗肿瘤效果

如图 4-A~C 所示, 与对照组比较, SNH 各剂量组肿瘤体积和质量显著减小 ($P < 0.01$ 、 0.001), 呈剂量相关性, 且高剂量 SNH 的干预效果和阳性对照组无显著差异。HE 染色结果 (图 4-D) 显示, 与对照组比较, SNH 干预后裸鼠肿瘤恶性程度有一定的减轻。TUNEL 染色结果 (图 4-E、F) 表明 SNH 干预促进肝癌细胞凋亡 ($P < 0.05$ 、 0.001)。免疫组化结果 (图 4-G~J) 显示, 与对照组比较, SNH 处理组 USP22、SIRT1 和 Ki67 表达显著降低 ($P < 0.001$), 与细胞实验结果一致。

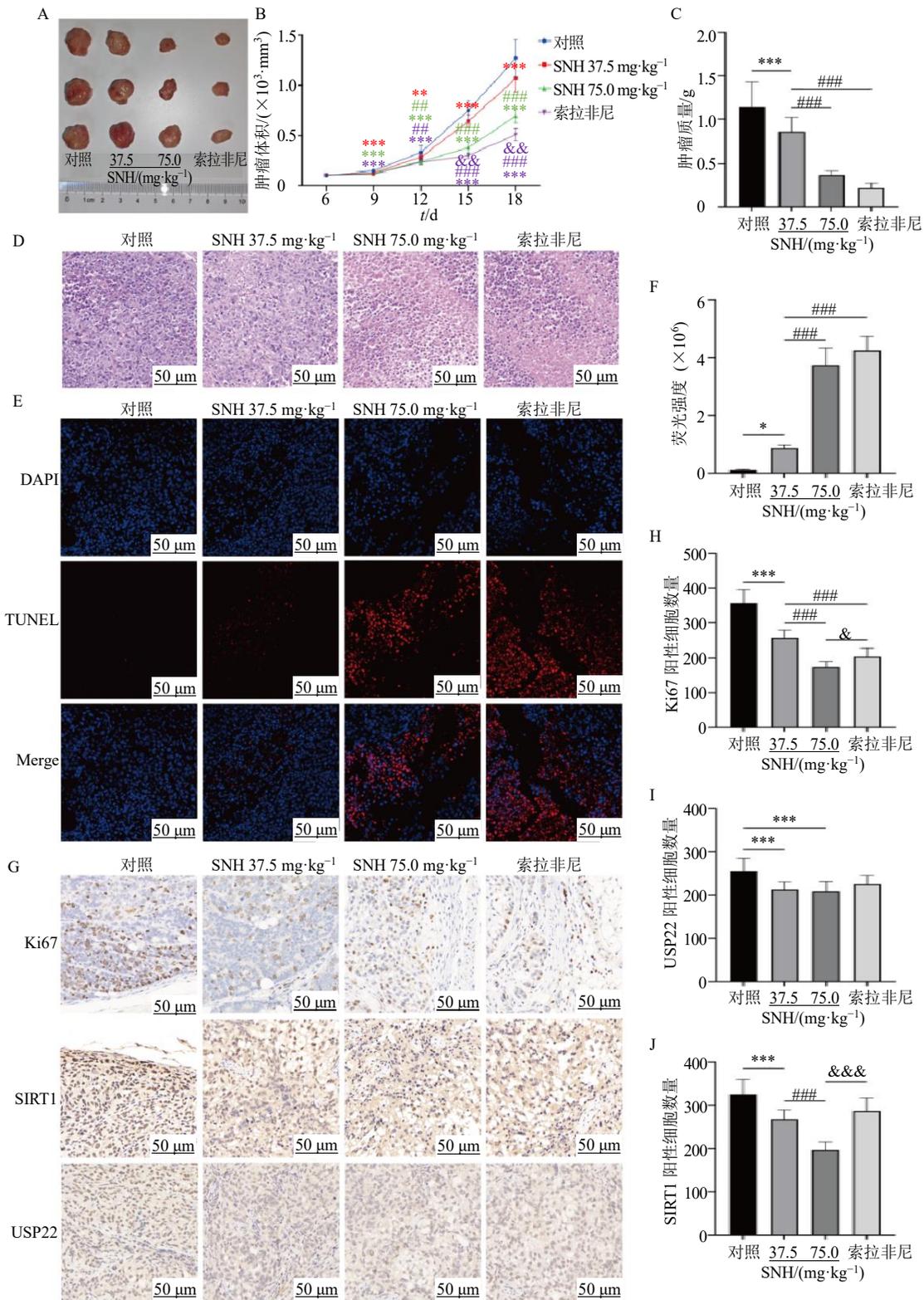


A、B-mRFP-GFP-LC3 双荧光标记检测细胞自噬 (×200); C-细胞 ATP 水平; D-细胞上清液中乳酸水平; E、F-Co-IP 检测 USP22 和 SIRT1 结合; G、H-Western blotting 检测 USP22、SIRT1、p62、LC3-II/I 蛋白表达水平。

A, B-cell autophagy detected mRFP-GFP-LC3 dual fluorescence labeling (× 200); C-cellular ATP level; D-lactate level in cell supernatant; E, F-Co-IP analysis of USP22-SIRT1 interaction; G, H-USP22, SIRT1, p62 and LC3-II/I protein expression levels detected by Western blotting.

图 3 SNH 通过 USP22-SIRT1 轴调控自噬 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 SNH regulates autophagy through USP22-SIRT1 axis ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



A-代表性小鼠肿瘤图；B-肿瘤体积；C-肿瘤质量；D-HE 染色观察肿瘤恶性程度（×200）；E、F-TUNEL 染色观察细胞凋亡（×200）；G~J-免疫组化检测 USP22、SIRT1 和 Ki67 蛋白表达（×200）；与对照组比较：**P*<0.05 ****P*<0.01 *****P*<0.001，与 SNH 低剂量组比较：#*P*<0.01 ###*P*<0.001，与 SNH 高剂量组比较：&*P*<0.05 &&*P*<0.01 &&&*P*<0.001。

A-representative image of mouse tumors; B-tumor volume; C-tumor weight; D-assessment of tumor malignancy by HE staining (× 200); E, F-TUNEL staining of cell apoptosis; G—J-immunohistochemistry detection of USP22, SIRT1 and Ki67 protein expressions (× 200); **P* < 0.05 ****P* < 0.01 *****P* < 0.001 vs control group, #*P* < 0.01 ###*P* < 0.001 vs SNH low-dose group, &*P* < 0.05 &&*P* < 0.01 &&&*P* < 0.001 vs SNH high-dose group.

图 4 SNH 在裸鼠异位荷瘤模型中的抗肿瘤效果 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
 Fig. 4 Anti-tumor effect of SNH in a nude mouse ectopic tumor model ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

4 讨论

肝细胞癌作为全球高发的恶性肿瘤,约占原发性肝癌的75%~85%,并且发病率持续增长,预计未来10年全球肝细胞癌负担将进一步加重^[19]。目前,肝细胞癌的临床治疗面临手术切除后5年复发率高、靶向药物的客观缓解率不足以及免疫治疗应答率低等重大挑战,促使研究者将目光转向传统中药^[20]。相关研究证实,中药复方及其有效成分能够有效延缓肝细胞癌进展^[21]。鱼腥草作为我国传统药用植物,其活性成分SNH不仅具有明确的抗炎和免疫调节作用^[7],近年研究还发现其对乳腺癌^[8]、宫颈癌^[22]等多种恶性肿瘤具有抑制作用,但其在肝细胞癌中的作用机制,尤其是与表观遗传调控和自噬的关系尚未阐明。本研究通过系统探讨SNH对肝细胞增殖、侵袭及自噬调控的影响,揭示了其靶向USP22-SIRT1轴抑制肝细胞癌进展的分子机制。

本研究结果显示,SNH以剂量相关性的方式显著抑制细胞活力并促进凋亡,与叶晓荣等^[23]发现SNH抑制胰腺癌细胞增殖的研究结论一致。在细胞侵袭能力方面,SNH显著抑制了肝癌细胞的Transwell穿透能力。贺丽欣^[24]研究中SNH抑制乳腺癌细胞系MCF-7和CMT-1211迁移和侵袭的发现同样证实了这一点。这些结果共同表明,SNH不仅能够抑制肝癌细胞增殖,还能有效阻断其侵袭转移过程。USP22作为去泛素化酶家族成员,通过稳定靶蛋白参与肿瘤发生发展,在多种肿瘤中高表达且与不良预后相关^[11]。而SIRT1是自噬关键调控因子,USP22/SIRT1轴激活导致的保护性自噬已被证实能促进骨肉瘤细胞的生物学功能^[25]。Huang等^[26]的研究指出,视网膜母细胞瘤中USP22直接与SIRT1相互作用,积极调控SIRT1蛋白表达,促进肿瘤生长,沉默USP22或SIRT1的表达可以抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭。本研究通过Western blotting和CO-IP实验证实,USP22和SIRT1蛋白在肝癌细胞中存在相互作用,和前人的研究一致。本研究还发现,SNH处理能够显著抑制USP22和SIRT1蛋白表达和相互作用,同时升高SIRT1的泛素化水平。Sun等^[27]的研究也显示,USP22脱泛素并稳定SIRT1,靶向USP22能够限制黑色素瘤转移,和本研究SNH处理的结果相符。

本研究结果还表明,SNH处理导致肝癌细胞自噬活性显著降低,伴随ATP含量下降和乳酸积累,这一现象与自噬抑制后线粒体代谢和糖酵解紊乱

的研究结果相吻合^[28-29]。龚裕伟等^[30]的研究也指出,自噬抑制可导致活性氧积累,引发DNA损伤,破坏代谢稳态,阻断肿瘤细胞的存活机制。这可能为本研究中SNH干预诱导细胞凋亡率升高的现象提供合理解释,同时提示其可能通过代谢重编程增强抗肿瘤效果。同时,LC3-II/I值降低和p62表达升高进一步佐证了自噬流受阻。LC3是细胞自噬过程的核心标志物,在自噬进程中发生翻译后修饰,由LC3-I转化为LC3-II,其动态转化过程直接反映自噬活性。p62则是一种关键的泛素结合蛋白,通过调控自噬维持细胞稳态^[31]。研究表明,SIRT1可以调节LC3-II/I值及p62表达,影响肿瘤细胞的自噬与线粒体功能^[32]。SNH已在非小细胞肺癌中被证明具有调控上皮-间质转化进展,促进细胞焦亡的作用^[33]。而本研究中SNH诱导肝癌细胞凋亡升高,同时降低细胞自噬。以上结果提示本研究肝癌细胞中USP22-SIRT1轴驱动的自噬可能属于保护性自噬,SNH通过影响USP22和SIRT1表达,抑制细胞自噬,同时促进如凋亡、焦亡等其他类型的细胞死亡,可能是其抑制肝细胞癌进展的重要机制。SNH的抗肿瘤作用在USP22过表达和SIRT1激活剂处理后被部分逆转,进一步证实了USP22-SIRT1轴在SNH调控自噬,最终抑制肿瘤进展中的关键作用,提示USP22可能是SNH作用的直接靶点。本研究中SNH在裸鼠异位荷瘤模型中的抗肿瘤效果同样验证了其体内活性。经SNH处理后的肿瘤体积和质量显著减小,USP22、SIRT1和细胞增殖标志物Ki67表达降低,细胞凋亡率升高,以上证据均表明SNH在体内具有与体外实验相似的抗肿瘤效应。本研究结果与SNH在动物模型中发挥抗肿瘤作用的其他研究结果一致^[8,24]。

尽管本研究取得重要进展,但仍存在一定的局限性,如未系统探讨SNH对USP22-SIRT1轴以外信号通路的影响,可能遗漏潜在调控机制,未深入探讨SNH抑制自噬是否在肝细胞癌不同时期进展中具有双重调控作用,同时体内实验仅采用皮下移植瘤模型,尚需使用原位荷瘤模型进一步验证。未来的研究可进一步构建原位荷瘤模型,在不同时间点检测,并结合临床样本验证,以完善SNH抗肝癌的理论体系。综上,本研究揭示了SNH通过USP22介导的SIRT1去泛素化调控自噬,最终抑制肝癌细胞增殖、侵袭并促进凋亡的机制,在体内外均表现出显著抗肝细胞癌效果,为肝细胞癌治疗提供了新

的理论依据和药物靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Foglia B, Turato C, Cannito S. Hepatocellular carcinoma: Latest research in pathogenesis, detection and treatment [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(15): 12224.
- [2] Saranya C, Fisher P B, Devanand S. Hepatocellular carcinoma (HCC): Epidemiology, etiology and molecular classification [J]. *Adv Cancer Res*, 2021, 149: 61.
- [3] 王嘉欣, 吴雪, 李志浩, 等. 基于网络药理学和分子对接探究黄精抗肝细胞癌的作用机制 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(9): 2196-2204.
- [4] Ladd A D, Duarte S, Sahin I, et al. Mechanisms of drug resistance in HCC [J]. *Hepatology*, 2024, 79(4): 926-940.
- [5] Zhang W L, Li S B, Li C T, et al. Remodeling tumor microenvironment with natural products to overcome drug resistance [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1051998.
- [6] Rafiq S, Hao H H, Ijaz M, et al. Pharmacological effects of *Houttuynia cordata* Thunb (*H. cordata*): A comprehensive review [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(9): 1079.
- [7] He X M, Hu M X, Song C, et al. Sodium new houttuynonate effectively improves phagocytosis and inhibits the excessive release of inflammatory factors by repressing TLR4/NF- κ B pathway in macrophages [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2023, 24(15): 1964-1971.
- [8] He L X, Feng H L, Yin B Y, et al. Sodium new houttuynonate induces apoptosis of breast cancer cells via ROS/PDK1/AKT/GSK3 β axis [J]. *Cancers*, 2023, 15(5): 1614.
- [9] Niu X G, You Q, Hou K J, et al. Autophagy in cancer development, immune evasion, and drug resistance [J]. *Drug Resist Updat*, 2025, 78: 101170.
- [10] Guo J H, Zhao J, Fu W, et al. Immune evasion and drug resistance mediated by USP22 in cancer: Novel targets and mechanisms [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 918314.
- [11] Wang Y H, Jia Z R, Gao J C, et al. Clinicopathological and prognostic value of USP22 expression in gastric cancer: A systematic review and Meta-analysis and database validation [J]. *Front Surg*, 2022, 9: 920595.
- [12] Zhang S S, Liu X, Wang J H, et al. Targeting ferroptosis with miR-144-3p to attenuate pancreatic β cells dysfunction via regulating USP22/SIRT1 in type 2 diabetes [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2022, 14(1): 89.
- [13] Ding X Q, Zhu C Y, Wang W H, et al. SIRT1 is a regulator of autophagy: Implications for the progression and treatment of myocardial ischemia-reperfusion [J]. *Pharmacol Res*, 2024, 199: 106957.
- [14] 赵征洋, 王丰. USP22 在细胞周期调控中的作用 [J]. *生命的化学*, 2024, 44(10): 1885-1897.
- [15] Li J R, Li Y L, Wang D H, et al. PLAG1 interacts with GPX4 to conquer vulnerability to sorafenib induced ferroptosis through a PVT1/miR-195-5p axis-dependent manner in hepatocellular carcinoma [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2024, 43(1): 143.
- [16] Shi Z H, Li Z M, Jin B, et al. Loss of LncRNA DUXAP8 synergistically enhanced sorafenib induced ferroptosis in hepatocellular carcinoma via SLC7A11 de-palmitoylation [J]. *Clin Transl Med*, 2023, 13(6): e1300.
- [17] Jia F J, Yu Q, Zhao L, et al. Sodium new houttuynonate inhibits cancer-promoting *Fusobacterium nucleatum* (Fn) to reduce colorectal cancer progression [J]. *Cancers*, 2022, 14(24): 6111.
- [18] Li C X, Xiong L T, Yang Y H, et al. Sorafenib enhanced the function of myeloid-derived suppressor cells in hepatocellular carcinoma by facilitating PPAR α -mediated fatty acid oxidation [J]. *Mol Cancer*, 2025, 24(1): 34.
- [19] Hwang S Y, Danpanichkul P, Agopian V, et al. Hepatocellular carcinoma: Updates on epidemiology, surveillance, diagnosis and treatment [J]. *Clin Mol Hepatol*, 2025, 31(Suppl): S228-S254.
- [20] 王曦, 冯苏, 李红, 等. 免疫检查点抑制剂联合 TACE 在肝癌治疗中的研究进展 [J]. *介入放射学杂志*, 2023, 32(1): 90-93.
- [21] 陈鑫球, 赵希琳, 朱小玉, 等. 中医药调控代谢重编程干预肝细胞癌的研究进展 [J]. *中药新药与临床药理*, 2025, 36(3): 469-478.
- [22] 唐方祥. 新鱼腥草素钠对宫颈癌细胞生物学行为的影响 [D]. 南充: 川北医学院, 2022.
- [23] 叶晓荣, 李修靖, 刘铭宇, 等. 新鱼腥草素钠抑制胰腺癌 Panc-1 细胞恶性生物学行为及其作用机制研究 [J]. *安徽医药*, 2024, 28(7): 1302-1306.
- [24] 贺丽欣. 新鱼腥草素钠抑制乳腺癌细胞活性的机制研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- [25] Han X X, Yin M F, Gong C, et al. A1BG-AS1 promotes the biological functions of osteosarcoma cells via regulating the microRNA-148a-3p/USP22 axis and stabilizing the expression of SIRT1 through deubiquitinase function [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2023, 27(10): 1017-1029.

- [26] Huang X M, Wan J F, Liu F, *et al.* P38 mitogen-activated protein kinase protects against retinoblastoma through regulating USP22/SIRT1/SOST axis [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 781247.
- [27] Sun H Y, Meng Y, Yao L, *et al.* Ubiquitin-specific protease 22 controls melanoma metastasis and vulnerability to ferroptosis through targeting SIRT1/PTEN/PI3K signaling [J]. *MedComm*, 2024, 5(8): e684.
- [28] 张璐懿, 龚作炯. 肝脏疾病中的自噬与能量代谢 [J]. *肝脏*, 2022, 27(1): 12-15.
- [29] 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.
- [30] 龚裕伟, 井鑫淼, 苏朴承, 等. 异槲皮素诱导巨噬细胞 M1 型极化抑制肝癌细胞自噬及迁移侵袭的机制研究 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2025, 45(7): 1240-1248.
- [31] 辛辰, 王笑影, 李响, 等. LncRNA SOX2OT 靶向 SIRT1/自噬通路增强胆管癌细胞 5-FU 耐药 [J]. *南方医科大学学报*, 2024, 44(1): 187-193.
- [32] 辛辰, 王笑影, 李响, 等. 沉默 SIRT1 降低胆管癌细胞对 5-氟尿嘧啶的耐药: 基于抑制 FOXO1/Rab7 自噬通路 [J]. *南方医科大学学报*, 2023, 43(3): 454-459.
- [33] Jiang R L, Lu B, Feng F C, *et al.* The sodium new houttuynonate suppresses NSCLC via activating pyroptosis through TCONS-14036/miR-1228-5p/PRKCDBP pathway [J]. *Cell Prolif*, 2023, 56(7): e13402.

[责任编辑 李亚楠]