

穿心莲内酯通过抑制 PI3K/AKT 通路对人肝癌 HEPG2 细胞凋亡的影响

范 羿, 周 宇, 高 伟, 范康川

(雅安市第二人民医院, 四川 雅安 625000)

摘 要: [目的] 探讨穿心莲内酯通过抑制磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(AKT)通路对人肝癌细胞凋亡的影响。[方法] 将人肝癌细胞株 HEPG2 分为对照组、低浓度穿心莲内酯组、中浓度穿心莲内酯组、高浓度穿心莲内酯组, 低、中、高浓度穿心莲内酯组分别加入培养基稀释的终浓度为 10、30、50 $\mu\text{mol/L}$ 的穿心莲内酯, 对照组加入等剂量的培养基。采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测各组 HEPG2 细胞增殖率, 流式细胞术检测各组 HEPG2 细胞凋亡率, Western blot 法检测各组 HEPG2 细胞 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平。[结果] 低浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞增殖率及 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平较对照组明显下降 ($Q=2.942$ 、 9.836 、 6.348 , $P<0.05$); 中浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞增殖率及 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平较低浓度穿心莲内酯组明显下降 ($Q=2.942$ 、 13.832 、 10.691 , $P<0.05$); 高浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞增殖率及 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平较中浓度穿心莲内酯组明显下降 ($Q=13.411$ 、 19.058 、 16.371 , $P<0.05$)。低浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞凋亡率较对照组明显升高 ($Q=83.662$, $P<0.05$); 中浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞凋亡率较低浓度穿心莲内酯组明显升高 ($Q=147.267$, $P<0.05$); 高浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞凋亡率较中浓度穿心莲内酯组明显升高 ($Q=241.925$, $P<0.05$)。[结论] 穿心莲内酯可能通过抑制 PI3K/AKT 通路抑制人肝癌细胞增殖, 促进人肝癌细胞凋亡, 可为临床治疗肝癌提供新方向。

关键词: 穿心莲内酯; HEPG2 细胞; PI3K/AKT 通路; 细胞凋亡; 细胞增殖

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2020)06-0496-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2020.06.B006

Effect of Andrographolide on Apoptosis of Human Hepatoma HepG2 Cells by Inhibiting PI3K/AKT Pathway

FAN Yi, ZHOU Yu, GAO Wei, FAN Kang-chuan

(Second People's Hospital of Ya'an, Ya'an 625000, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effect of andrographolide on apoptosis of human hepatoma HepG2 cells and its relation with phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (AKT) pathway. [Methods] Human hepatoma HepG2 cells were divided into control group, low andrographolide concentration group (10 $\mu\text{mol/L}$), medium andrographolide concentration group (30 $\mu\text{mol/L}$) and high andrographolide concentration group (50 $\mu\text{mol/L}$). The proliferation rate of HEPG2 cells was detected by MTT, the apoptosis rate of HEPG2 cells was detected by flow cytometry, and the expression levels of PI3K and p-AKT protein in HEPG2 cells were detected by Western blot. [Results] The proliferation rate and the expression of PI3K and p-AKT protein in the control group were higher than those in low, medium and high andrographolide groups ($Q=2.942$, 9.836 , 6.348 , $P<0.05$; $Q=2.942$, 13.832 , 10.691 , $P<0.05$ and $Q=13.411$, 19.058 , 16.371 , $P<0.05$). The apoptosis rate of HEPG2 cells in control group was lower than that in low, medium and high andrographolide groups ($Q=83.662$, $P<0.05$, $Q=147.267$, $P<0.05$ and $Q=241.925$, $P<0.05$). [Conclusion] Andrographolide may inhibit the proliferation and promote the apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by inhibiting PI3K/AKT pathway, and also promote the apoptosis of HepG2 cells, which may provide a new direction for clinical treatment of hepatocellular carcinoma.

Subject words: andrographolide; HEPG2 cells; PI3K/AKT pathway; apoptosis; cell proliferation

肝癌是人类常见的恶性肿瘤之一, 具有高发病

通信作者: 范康川, 主任医师, 本科; 雅安市第二人民医院外二科, 四川省雅安市雨城区南三路 58 号 (625000), E-mail: 2142114643@qq.com
收稿日期: 2019-08-14; **修回日期:** 2019-11-07

率和高病死率的特点^[1]。据统计我国肝癌年死亡率约 20.37/10 万, 居我国肿瘤致死性疾病的第 2 位^[2]。肝癌早期临床征象极不典型, 病情进展迅速, 发现时

多已处于终末期,失去手术治疗机会^[3],因此寻找有效抗癌药物对改善肝癌患者生存质量有重要意义。穿心莲内酯是药用植物穿心莲的主要有效成分之一,具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B,AKT)信号通路是细胞内重要信号通路之一,在乳腺癌、胰腺癌、肺癌等恶性肿瘤发生发展中有重要调控作用^[4]。研究发现^[5]穿心莲内酯具有抗肝癌作用,但其作用机制是否与PI3K/AKT信号通路有关尚不清楚。本研究就穿心莲内酯对人肝癌细胞增殖、凋亡的影响及其通路机制进行了探讨,以期穿心莲内酯应用于肝癌治疗提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人肝癌细胞株 HEPG2,购自美国 ATCC 公司。

1.2 HEPG2 细胞培养及分组处理

将 HEPG2 细胞置于含 10%胎牛血清(杭州四季清生物制品公司)的 RPMI 1640 培养基(美国 GIBCO 公司),培养于 37℃、5% CO₂ 恒温箱(南京威美特科学仪器有限公司,型号:SPT/YS-60L)中,当细胞融合达 75%~85%,用 0.05%胰蛋白酶(上海素尔生物科技有限公司)消化传代,取对数生长期细胞用于后续实验。实验分组:对照组、低浓度穿心莲内酯组、中浓度穿心莲内酯组、高浓度穿心莲内酯组,将各组细胞按每孔 1×10⁵ 个接种于 6 孔板中,细胞完全贴壁后,1000r/min 离心 10min,弃上清,低、中、高浓度穿心莲内酯组分别加入培养基稀释的终浓度为 10、30、50μmol/L 的穿心莲内酯(美国 Sigma 公司),对照组加入等剂量的培养基,于 37℃、5% CO₂ 恒温箱培养 48h 后用于以下检测项目。

1.3 HEPG2 细胞增殖率检测

采用四甲基偶氮唑盐(MTT)法检测,操作如下:取各组 HEPG2 细胞加入 20 μl 5g/L MTT 溶液(上海碧云天生物技术有限公司),37℃恒温箱孵育 4h,弃去上清液,每孔加入 200μl 二甲基亚砷溶液(上海恒斐生物科技有限公司),轻微振荡 10min,待孔内结晶完全彻底溶解后,采用酶标仪(济南康环医疗器械有限公司,型号:ELx800NB)于 570nm 波长下测定光密度(optical density,OD)值,记录结果,计算各

组 HEPG2 细胞增殖率。细胞增殖率=(处理组 OD 值/对照组 OD 值)×100%。

1.4 HEPG2 细胞凋亡率检测

采用流式细胞术检测,操作如下:取各组 HEPG2 细胞,以 500μl 结合缓冲液重悬。向流式管中依次加入 100μl 细胞悬液、5μl 碘化丙啶(PI)(上海伊卡生物技术有限公司)、5μl 异硫氰酸荧光素(Annexin V-FITC)(上海金穗生物科技有限公司),轻微混匀,25℃避光反应 15min,1h 内采用流式细胞仪(美国 BD 公司,型号:FACSCalibur)检测各组 HEPG2 细胞凋亡率。

1.5 HEPG2 细胞 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平检测

采用 Western blot 法检测,操作如下:取各组 HEPG2 细胞,PBS 漂洗,加细胞裂解液(武汉谷歌生物公司),15 000r/min 离心 10min,收集上清液,采用 BCA 试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)测定蛋白浓度,10% SDS-PAGE 电泳,转膜,5%脱脂奶粉(上海联硕生物科技有限公司)封闭 1 h,加入 1:400 稀释的兔抗人 PI3K 单克隆抗体(上海宸功生物技术有限公司)、1:300 稀释的兔抗人 p-AKT 单克隆抗体(上海恪敏生物科技有限公司)、1:200 稀释的兔抗人 β-actin 单克隆抗体(上海瑞齐生物科技有限公司),4℃孵育过夜,PBS 漂洗,加山羊抗兔 IgG 二抗(杭州启泰生物技术有限公司),37℃孵育 1 h,ECL 发光试剂盒(苏州宇恒生物科技有限公司)对 PVDF 膜进行曝光显影,应用 Image Lab 5.2.1 软件分析目的蛋白与内参蛋白的灰度值,最终结果以目的蛋白与内参蛋白(β-actin)灰度值之比表示。

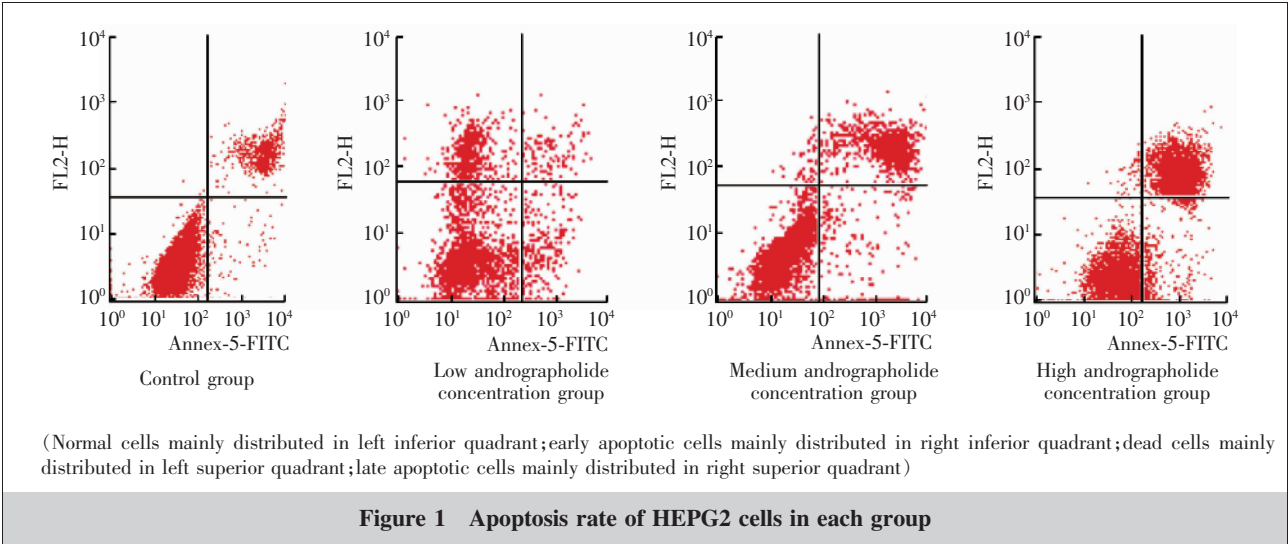
1.6 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件对数据进行统计分析,多组比较采用单因素方差分析,两组比较采用 *snk-q* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组 HEPG2 细胞增殖率

低浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞增殖率较对照组明显下降,差异有统计学意义(*Q*=2.942,*P*<0.05);中浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞增殖率较低浓度穿心莲内酯组明显下降,差异有统计学意义(*Q*=7.951,*P*<0.05);高浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细



胞增殖率较中浓度穿心莲内酯组明显下降,差异有统计学意义 ($Q=13.411$, $P<0.05$)(Table 1)。

2.2 各组 HEPG2 细胞 凋亡率

低浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞凋亡率较对照组明显升高,差异有统计学意义 ($Q=83.662$, $P<0.05$);中浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞凋亡率较低浓度穿心莲内酯组明显升高, 差异有统计学意义 ($Q=147.267$, $P<0.05$);高浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞凋亡率较中浓度穿心莲内酯组明显升高,差异有统计学意义 ($Q=241.925$, $P<0.05$) (Table 1、Figure 1)。

2.3 各组 HEPG2 细胞中 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平

低浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平较对照组明显下降,差异有统计学意义 ($Q=9.836$ 、 6.348 , $P<0.05$); 中浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平较低浓度穿心莲内酯组明显下降,差异有统计学意义 ($Q=13.832$ 、 10.691 , $P<0.05$); 高浓度穿心莲内酯组 HEPG2 细胞 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平较中浓度穿心莲内酯组明显下降,差异有统计学意义 ($Q=19.058$ 、 16.371 , $P<0.05$) (Table 2、Figure 2)。

Table 1 Comparison of proliferation rate and apoptosis rate of HEPG2 cells in each group

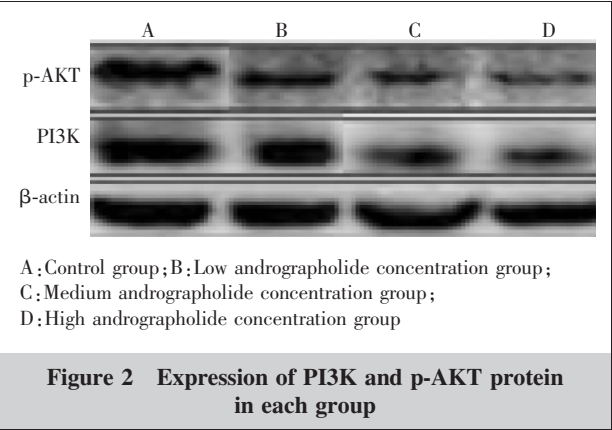
Groups	n	Proliferation rate(%)	Apoptosis rate(%)
Control group	6	100.00±10.98	2.22±0.15
Low andrographolide concentration group	6	89.77±8.32 ^①	13.86±0.28 ^①
Medium andrographolide concentration group	6	72.35±7.64 ^{①②}	22.71±0.39 ^{①②}
High andrographolide concentration group	6	53.36±6.49 ^{①②③}	35.88±0.46 ^{①②③}
F	—	34.690	10438.990
P	—	<0.001	<0.001

Note:Compared with control group, ^① $P<0.05$;Compared with low andrographolide concentration group, ^② $P<0.05$; Compared with medium andrographolide concentration group, ^③ $P<0.05$

Table 2 Comparison of expression of PI3K and p-AKT protein in each group

Groups	n	PI3K(%)	p-AKT(%)
Control group	6	0.83±0.11	0.68±0.10
Low andrographolide concentration group	6	0.51±0.09 ^①	0.49±0.09 ^①
Medium andrographolide concentration group	6	0.38±0.06 ^{①②}	0.36±0.05 ^{①②}
High andrographolide concentration group	6	0.21±0.04 ^{①②③}	0.19±0.03 ^{①②③}
F	—	64.970	61.830
P	—	<0.001	<0.001

Note:Compared with control group, ^① $P<0.05$;Compared with low andrographolide concentration group, ^② $P<0.05$;Compared with medium andrographolide concentration group, ^③ $P<0.05$



3 讨论

目前临床肝癌治疗方法主要有肝切除手术治疗、放射性治疗、化学药物治疗、介入治疗、肝移植治疗等。其中,针对临床分期较早且未出现远处转移的肝癌患者,手术切除和肝移植为最有效的治疗方法,但由于肝癌早期症状无特异性,确诊时多已处于晚期,故临床上仅 15%肝癌患者适宜肝切除及肝移植条治疗;介入治疗操作有一定难度,即使操作顺利进行,由于高压注射等原因,可造成误栓、分流及微转移;放射性治疗对正常肝细胞损伤较大,且适用于早期肝癌患者;化学药物治疗常因肿瘤耐药性而疗效不佳^[6]。因此寻找安全有效的肝癌治疗方法有重要的临床意义。

近年来中药有效成分应用于各种恶性肿瘤治疗而备受关注。穿心莲又名春莲秋柳,是一种爵床科穿心莲属植物,广泛分布于我国南方等地,味苦性寒,归心脏、肺脏、大肠、膀胱经,具清热解毒、消炎止痛、凉血消肿之功^[7]。穿心莲内酯为穿心莲的主要有效成分,除具有镇静、抗病原微生物、免疫功能调节、利胆保肝等作用外,还具有较强的抗肿瘤作用^[8]。研究发现^[9]穿心莲内酯对乳腺癌细胞 DNA 合成有抑制作用。另有研究发现^[10]穿心莲内酯可抑制 W256 移植性肿瘤生长,且其抑制作用随剂量增加而增强。本研究与上述研究^[10]相符,各穿心莲内酯组 HEPG2 细胞增殖率较对照组明显下降,且各穿心莲内酯组 HEPG2 细胞增殖率随穿心莲内酯浓度的上升而下降,提示穿心莲内酯可抑制人肝癌细胞 HEPG2 增殖且呈浓度依赖性。本研究结果还显示各穿心莲内酯组 HEPG2 细胞凋亡率较对照组明显升高,且各穿心莲内酯组 HEPG2 细胞凋亡率随穿心莲内酯浓度的上升而升高,提示穿心莲内酯可促进人肝癌细胞 HEPG2 凋亡且呈浓度依赖性。细胞凋亡是由基因控制的细胞自主的有序死亡,涉及一系列基因的激活、表达。PI3K/AKT 信号通路是细胞内重要信号通路之一,也是恶性肿瘤增殖及转移的重要分子机制之一^[11]。PI3K 是一种胞内磷脂酰肌醇激酶,具有丝氨酸/苏氨酸 (serine/threonine, Ser/Thr) 激酶的活性,与 v-src、v-ras 等癌基因产物相关。AKT 是 PI3K 的下游效应基因,能特异性作用于底物中 Ser/Thr 残基并使之磷酸化。当 PI3K 接受来自酪氨酸激酶

(tyrosine kinase, TK) 和 G 蛋白耦联受体 (G-protein coupled receptor, GPCR) 的信号后,其 p110 亚基与 p85 亚基结合,将磷脂酰肌醇 2 二磷酸转化为磷脂酰肌醇 3 磷酸,磷脂酰肌醇 3 磷酸与 AKT 的 N 端 PH 结构域结合,使 AKT 蛋白上的 Thr、Ser 磷酸化而使其激活^[12]。有研究提到^[13]PI3K/AKT 信号通路是参与细胞增殖、凋亡的信号转导通路,与恶性肿瘤发生、发展密切相关。本研究结果显示各穿心莲内酯组 HEPG2 细胞 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平较对照组明显下降,且各穿心莲内酯组 HEPG2 细胞 PI3K、p-AKT 蛋白表达水平随穿心莲内酯浓度的上升而下降,提示穿心莲内酯可能通过抑制 PI3K/AKT 通路抑制人肝癌细胞增殖,促进人肝癌细胞凋亡。有研究发现^[14]线粒体在细胞凋亡过程中扮演重要角色,因此我们推测穿心莲内酯可能通过抑制 PI3K/AKT 通路而促进线粒体膜通透性转运孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 开放,引起线粒体内膜通透性增加,使细胞色素 C (Cytochrome C, CYC) 等促凋亡因子外流,导致凋亡信号通路广泛激活,从而导致人肝癌细胞 HEPG2 增殖减少和凋亡增多^[15]。

综上所述,穿心莲内酯可能通过抑制 PI3K/AKT 通路抑制人肝癌细胞增殖,促进人肝癌细胞凋亡,这可为临床治疗肝癌提供新的方向。但穿心莲内酯抗肝癌作用是否还可通过其他机制,尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] Wen TC. Interpretation of diagnosis and treatment standard of primary liver cancer (2017 Edition) [J]. Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery, 2018, 2 (3): 128-132. [文天夫. 原发性肝癌诊疗规范 (2017 年版) 解读 [J]. 中国普外基础与临床杂志, 2018, 2(3): 128-132.]
- [2] Zhang S, Wang F, Meng QL, et al. Epidemiology of hepatitis B virus infection among primary liver cancer patients [J]. Chinese Journal of Vaccines and Immunization, 2018, 5(2): 112-117. [张爽, 王锋, 孟庆玲, 等. 原发性肝癌患者流行病学与乙型肝炎病毒感染调查 [J]. 中国疫苗和免疫, 2018, 5(2): 112-117.]
- [3] Huang QR, Zhang L. New progress in the treatment of primary liver cancer [J]. The Journal of Practical Medicine, 2016, 32(14): 2275-2278. [黄乾荣, 张玲. 原发性肝癌治疗研究新进展 [J]. 实用医学杂志, 2016, 32(14): 2275-2278.]
- [4] Mayer IA, Arteaga CL. The PI3K/AKT Pathway as a target

- for cancer treatment[J]. *Annu Rev Med*, 2016, 67: 11–28.
- [5] Liu HY, Wang XQ, Yuan LN, et al. Effects of andrographolide on proliferation of MHCC97H cells and its mechanism [J]. *Journal of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 36(3): 99–106. [刘红英, 王协奇, 袁丽娜, 等. 穿心莲内酯对人肝癌细胞 MHCC97H 增殖的影响及其机制研究 [J]. *广州中医药大学学报*, 2019, 36(3): 99–106.]
- [6] Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Standard for diagnosis and treatment of primary liver cancer (2017) [J]. *Chinese Journal of Digestive Surgery*, 2017, 16 (7): 705–720. [中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范 (2017 年版)[J]. *中华消化外科杂志*, 2017, 16(7): 705–720.]
- [7] Lin L, Li R, Cai M, et al. Andrographolide ameliorates liver fibrosis in mice: involvement of TLR4/NF- κ B and TGF- β 1/Smad2 signaling pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 7808656.
- [8] Guo L, Kang L, Liu X, et al. A novel nanosuspension of andrographolide: Preparation, characterization and passive liver target evaluation in rats [J]. *Eur J Pharm Sci*, 2017, 104: 13–22.
- [9] Liu HY, He QL, Zhou DL, et al. Effects of andrographolide on proliferation and cell cycle of human breast cancer cell line MCF-7[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2016, 37(23): 3511–3514. [刘红英, 何青莲, 周大磊, 等. 穿心莲内酯对人乳腺癌细胞 MCF-7 细胞增殖及细胞周期的影响[J]. *广东医学*, 2016, 37(23): 3511–3514.]
- [10] Lu JF, Tang YH, Wang YL, et al. Inhibitory effect of andrographolide on proliferation of different malignant hematopoietic tumor cell lines in vitro [J]. *Central South Pharmacy*, 2017, 15(3): 305–307. [陆静峰, 唐宇宏, 王育丽, 等. 穿心莲内酯对不同恶性血液肿瘤细胞株增殖抑制的影响[J]. *中南药学*, 2017, 15(3): 305–307.]
- [11] Voshol PJ, Dey JH, Oakeley E, et al. Targeting fibroblast growth factor receptors blocks PI3K/AKT signaling, induces apoptosis, and impairs mammary tumor outgrowth and metastasis[J]. *Cancer Res*, 2016, 70(10): 4151–4162.
- [12] Seraina F, Olivier D. PI3K and AKT: unfaithful partners in cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(9): 21138–21152.
- [13] Michael DA. The multi-faceted roles of the PI3K-AKT pathway in melanoma[J]. *J Transl Med*, 2015, 13(10): 249–253.
- [14] Li Y, Zhao LL, Li Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate induces human liver cancer HepG2 cell apoptosis and growth inhibition by suppressing phosphatidylinositol 3 kinase/protein kinase B signaling[J]. [李懿, 赵莉莉, 李易, 等. 表没食子儿茶素没食子酸酯通过 PI3K/AKT 信号通路抑制人肝癌细胞株 HepG2 增殖和促进凋亡 [J]. *世界华人消化杂志*, 2015, 23(20): 3188–3194.]
- [15] Zhang W, He H, Song HJ, et al. Neuroprotective effects of salidroside in the MPTP mouse model of parkinson's disease: involvement of the PI3K/Akt/GSK3 α , β pathway[J]. *Parkinson's Disease*, 2016, 17(5): 1–9.