

DOI:10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.003

· 基础研究 ·

人参皂苷 Rb1 通过 KEAP1/PGAM5/AIFM1 通路促进肝细胞癌 HepG2 细胞发生氧死亡

朱敬轩, 宋园, 杨莹, 王杰, 高浩, 贾连群(辽宁中医药大学 中西医结合学院, 辽宁 沈阳 110847)

[摘要] **目的:**探讨人参皂苷 Rb1 (Gn-Rb1) 对肝细胞癌(HCC) HepG2 细胞氧死亡的影响及其可能的分子机制。**方法:**采用生物信息学方法分析氧死亡的关键基因 PGAM5 表达对 HCC 患者生存期的影响。选取辽宁省肿瘤医院收治的 8 例 HCC 患者的 HCC 组织与癌旁组织, 通过 WB 法及 qPCR 检测氧死亡相关基因蛋白与 mRNA 的表达情况。将 HepG2 细胞随机分为对照组与 Gn-Rb1 组(予以 200 $\mu\text{mol/L}$ Gn-Rb1 干预), 采用细胞克隆形成实验、划痕愈合实验分别检测 Gn-Rb1 对 HepG2 细胞的集落形成能力、迁移能力的影响, ELISA 检测对细胞 ROS 生成水平的影响, 微板法检测对细胞 LDH 释放水平的影响; WB 法、qPCR 法检测 Gn-Rb1 对 HepG2 氧死亡关键基因蛋白质与 mRNA 水平表达的影响。**结果:**生物信息学分析发现, PGAM5 高表达肝癌患者总生存时间较低表达患者更长($P<0.05$)。在临床 HCC 组织与癌旁组织样本中发现, 相较于癌旁组织, 在蛋白质与 mRNA 水平上, 肿瘤组织 KEAP1 与 PGAM5 表达显著降低, NRF2 表达显著升高(均 $P<0.01$), p-AIFM1 蛋白水平显著升高($P<0.05$)。对 HepG2 细胞予以 200 $\mu\text{mol/L}$ Gn-Rb1 干预后, 相较于对照组, Gn-Rb1 组 HepG2 细胞的迁移能力与集落形成能力显著降低(均 $P<0.01$), 而 LDH 水平显著升高($P<0.05$); 相比于对照组, 在 mRNA 和蛋白质水平上, Gn-Rb1 组细胞中 KEAP1、PGAM5 表达均显著升高而 NRF2 表达均显著降低(均 $P<0.05$), p-AIFM1 蛋白表达显著降低($P<0.01$)。**结论:**HCC 组织中氧死亡被抑制, 而 Gn-Rb1 能够通过调控 KEAP1/PGAM5/AIFM1 通路促进 HepG2 细胞氧死亡的发生, 抑制细胞增殖和迁移能力。

[关键词] 人参皂苷 Rb1; 肝细胞癌; HepG2 细胞; 氧死亡; 增殖; 迁移

[中图分类号] R735.7; R730.52 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385x(2024)05-0445-07

Ginsenoside Rb1 promotes oxeiptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells through KEAP1/PGAM5/AIFM1 pathway

ZHU Jingxuan, SONG Nan, YANG Ying, WANG Jie, GAO Hao, JIA Lianqun (School of Integrative Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of ginsenoside Rb1 (Gn-Rb1) on oxeiptosis in hepatocellular carcinoma (HCC) HepG2 cells and its possible molecular mechanism. **Methods:** Bioinformatic was used to analyse the effect of the expression of PGAM5, a key gene of oxeiptosis, on the survival time of HCC patients. HCC tissues and paracancerous tissues of 8 HCC patients admitted into Liaoning Provincial Tumor Hospital were selected, and the expressions of oxeiptosis-related gene proteins and mRNAs were detected by WB assay and qPCR. HepG2 cells were randomly divided into the control group and the Gn-Rb1 group (intervened with 200 $\mu\text{mol/L}$ Gn-Rb1). The effects of Gn-Rb1 on the colony formation ability and the migration ability of HepG2 cells were detected by the cell clone formation assay and the cell scratch assay, respectively. ELISA was used to detect the effect on the level of ROS. Microplate was used to detect the effect on the level of LDH; the effects of Gn-Rb1 on the expressions of key gene proteins and mRNAs were detected by WB assay and qPCR. **Results:** Bioinformatic analysis revealed that, compared with low-expression patients, patients with PGAM5 high-expression hepatocellular carcinoma had longer overall survival time ($P<0.05$). In clinical hepatocellular carcinoma and paracancerous tissue samples, it was found that compared with paracancerous tissues, at protein and mRNA levels, the expressions of KEAP1 and PGAM5 in tumor tissues were significantly lower; the expression of NRF2 was significantly higher (all $P<0.01$); and the expression of p-AIFM1 was significantly higher ($P<0.05$). After HepG2 cells were intervened with 200 $\mu\text{mol/L}$ Gn-Rb1, compared with those in the control group, the migratory and colony-forming abilities of HepG2 cells in the Gn-Rb1 group reduced significantly (all $P<0.01$), and the level of LDH increased significantly ($P<0.05$). Compared with the control group, at mRNA and protein levels, the expressions of KEAP1 and PGAM5 in the Gn-Rb1 group were significantly higher (all $P<0.05$); the expression of NRF2 was

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 82074145); 国家中医药管理局高水平中医药重点学科建设项目(No. zyyzdxk-2023034)

[作者简介] 朱敬轩(1998—), 博士生, 主要从事中西医结合防治心血管与肿瘤疾病的研究。E-mail: 321692607@qq.com

[通信作者] 贾连群, E-mail: jllq-8@163.com

significantly lower (all $P < 0.05$); and the expression of p-AIFM1 protein was significantly lower ($P < 0.01$). **Conclusion:** Oxceptosis is inhibited in hepatocellular carcinoma tissues, and Gn-Rb1 promotes oxceptosis in HCC HepG2 cells by regulating the KEAP1/PGAM5/AIFM1 pathway, thus suppressing the proliferation and migration abilities of HepG2 cells.

[Key words] ginsenoside Rb1 (Gn-Rb1); hepatocellular carcinoma (HCC); HepG2 cell; oxceptosis; proliferation; migration

[Chin J Cancer Biother, 2024, 31(5): 445-451. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2024.05.003]

据统计,在中国肝癌年新发病例达38.9万,年病死病例达33.6万,疾病负担沉重^[1]。肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)为主要组织病理学类型,约占肝癌的80%^[1]。手术切除仅适用于极少数肝癌患者^[2];晚期患者常以口服化疗药物索拉非尼为主,然而常在6个月内发生耐药^[3]。中医药以其多靶点、多途径、低毒副作用的优势有效提高了HCC患者的生存质量并延长了患者生存周期^[4]。人参享有“百草之王”一誉,具有补脾生津、化痰祛痰之功效。人参单体成分在抗HCC治疗中作用显著^[5]。在人参皂苷治疗肝癌的网络药理学研究^[6-7]中发现,人参皂苷对原发性肝癌具有潜在治疗作用,其中人参皂苷Rb1(ginsenoside Rb1, Gn-Rb1)是人参二醇系皂苷的代表成分之一,而其对HCC的作用机制研究较为少见。氧死亡是活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导的不依赖于caspase级联反应的新型细胞死亡方式,可理解为由氧化应激介导的细胞死亡,受KEAP1/PGAM5/AIFM1与KEAP1/NRF2信号通路的调控^[8]。过度活化的Kelch样ECH关联蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)以NRF2非依赖方式,通过磷酸甘油酸变位酶5(phosphoglycerate mutase 5, PGAM5)介导线粒体凋亡诱导因子1(apoptosis-inducing factor mitochondria associated 1, AIFM1)第116位丝氨酸残基去磷酸化,自发性介导氧死亡的发生^[9]。有研究^[10]表明,激活乳腺癌细胞氧死亡可抑制乳腺癌细胞的生长与侵袭,初步验证了氧死亡可能参与肿瘤发生发展。另有研究^[11]发现,参与氧死亡的KEAP1/NRF2抗氧化途径的激活会促进肝癌细胞增殖,而Gn-Rb1是否通过干预氧死亡途径发挥抗HCC作用尚少见报道。本研究探讨Gn-Rb1干预氧死亡途径抗HCC的分子机制,以期临床HCC治疗提供新方向。

1 材料与方法

1.1 临床样本

选择辽宁省肿瘤医院肝胆科及普外科诊治的HCC患者8例作为研究对象,经外科手术摘除患者HCC组织与癌旁组织8对(癌旁组织距肿瘤边缘>1 cm),保存于液氮中。患者纳入标准:无合并胆管细胞癌;经病理确诊为HCC;首次发病就诊;临床资料完整;初次诊断为HCC。排除标准:无明确肿瘤病

灶;转移性肝癌;严重心、肾功能异常患者;临床与病理资料缺乏者。8例患者年龄46~69岁,平均(55.63±7.48)岁,中位年龄54岁;临床分期均为III期。本研究通过辽宁省肿瘤医院伦理委员会批准,受试者均签署知情同意书。

1.2 细胞培养

HepG2细胞购自中国科学院上海生命科学院细胞库。HepG2细胞在37℃、5%CO₂条件下培养于含1%青霉素链霉素双抗、15%胎牛血清的高糖DMEM培养基中。待细胞生长至汇合度达85%以上时,加入0.25%胰酶1 mL消化1 min后终止消化,110×g离心3 min,弃上清液后重悬细胞,1:2进行传代。

1.3 主要试剂与仪器

Gn-Rb1单体(货号B21050)购自上海源叶生物科技有限公司,使用时称取2.218 6 mg Gn-Rb1单体粉末溶于20 μL DMSO,加入10 mL培养液配制含200 μmol/L Gn-Rb1的含药培养基;HiFiScript gDNA Removal RTMasterMix、MagicSYBR Mixture、10×TBST、Multicolor Protein Marker(货号CW2020M、CW3008M、CW0043、CW2841)均购自康为世纪生物科技有限公司,Future PAGETM蛋白预制胶、MOPS-SDS Running Buffer、20×Fast Transfer Buffer(货号ET12010Gel、F00001Gel、F00002Gel)均购自ACE公司,5×SDS-PAGE蛋白上样缓冲液、脱脂奶粉(货号P0015、P0216)均购自碧云天公司,一抗稀释液(货号A1810)购自北京索莱宝科技有限公司,GAPDH引物(货号B661104)购自生工生物公司,KEAP1、NRF2、AIFM1、GAPDH抗体(货号10503-2-AP、16396-1-AP、17984-1-AP、10494-1-AP)均购自proteintech公司,PGAM5抗体(货号A16022)购自ABclonal公司,p-AIFM1抗体(货号AP5501)购自ECM Biosciences公司,FDbio-Dura ECL kit、BCA Protein Assay Kit(货号FD8020、FD2001)均购自弗德生物公司,二抗(anti-rabbit IgG HRP-linked antibody,货号7074S)购自cell signaling technology公司,LDH试剂盒(货号A020-2-2)购自南京建成生物工程研究所,ROS ELISA试剂盒(货号YJ112563)购自上海酶联生物公司,引物由博迈德公司合成。

反转录仪器购自BioRad公司,高速离心机、PCR扩增仪器购自Thermo公司,酶标仪购自TECAN公司,化学发光成像系统购自上海天能科技有限公司,

超微量核酸蛋白检测仪 NanoDrop 购自 BioTeke 公司。

1.4 数据库分析

利用 GEPIA 数据库 (<http://gepia2.cancer-pku.cn/#survival>) 分析 PGAM5 的表达对肝癌患者生存周期的影响。进入 Survival Plots 版块, 输入 PGAM5 与肝癌, 点击 Plot 输出结果。

1.5 CCK-8 法检测 Gn-Rb1 处理对 HepG2 细胞增殖的影响

HepG2 细胞分为对照组与 Gn-Rb1 组 (200、400、600、800 μmol/L), 另设空白组。取 96 孔板, 除空白孔外, 每孔接种 HepG2 细胞 5×10^3 个/100 μL。细胞贴壁后给药处理, 继续培养 12、24、48 h 后弃上清液, 每孔加入 100 μL 含有 10% CCK-8 的完全培养基, 培养 30 min, 酶标仪 450 nm 处检测光密度 (*D*) 值。细胞存活率 = $(D_{\text{Gn-Rb1 组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

1.6 划痕愈合实验检测 Gn-Rb1 处理对 HepG2 细胞迁移的影响

HepG2 细胞接种于六孔板, 随机分为对照组与 Gn-Rb1 组。待细胞生长至汇合度大于 90% 时对单层细胞进行划痕处理, PBS 清洗 2 次, 对照组加入完全培养基, Gn-Rb1 组加入含 200 μmol/L Gn-Rb1 的完全培养基, 每隔 12 h 置显微镜下观察、拍照, Image J 软件分析划痕间面积, 依据公式: 划痕愈合率 = $(\text{Gn-Rb1 组初始划痕面积} - \text{Gn-Rb1 组各时间点划痕面积}) / (\text{对照组初始划痕面积} - \text{对照组各时间点划痕面积}) \times 100\%$, 计算划痕愈合率。

1.7 集落形成实验检测 Gn-Rb1 处理对 HepG2 细胞集落形成的影响

将 HepG2 细胞接种于六孔板, 随机分为对照组与 Gn-Rb1 组, 培养 3 d 后 Gn-Rb1 组予以 200 μmol/L Gn-Rb1 干预, 对照组加入等体积培养基。续培 7 d, 显微镜下见每个集落内含有 50 个以上细胞时, 行结晶紫染色, 计数细胞集落。

1.8 ELISA 检测 Gn-Rb1 处理对 HepG2 细胞 ROS 生成的影响

HepG2 细胞培养至贴壁, 待生长至汇合度达 70%~80%, 予以 200 μmol/L Gn-Rb1 处理 24 h, 取细胞上清液, 330 ×g 离心 10 min 以去除颗粒和聚合物, 向 96 孔板内分别加入标准品及稀释的样本后, 再加入 HRP 标记的检测抗体 100 μL, 37 °C 处理 60 min 后洗板, 再向孔内加入底物 A、B, 37 °C 处理 15 min, 最后加入 50 μL 终止液, 于 450 nm 波长处测定 *D* 值。

1.9 比色法测定 LDH 水平检测 Gn-Rb1 处理对 HepG2 细胞的损伤

细胞分组及上清液处理同 1.8。设置空白孔、标

准孔、测定孔及对照孔。空白孔、标准孔、对照孔分别加入双蒸水 25 μL、5 μL、5 μL, 标准孔加入 0.2 μmol/L 丙酮酸标准液 20 μL, 测定孔与对照孔加入细胞上清液 20 μL。各孔内加入基质缓冲液 25 μL。测定孔加入 5 μL 辅酶 I, 混匀, 37 °C 处理 15 min。各孔内加入 2,4-二硝基苯肼 25 μL, 混匀, 37 °C 处理 15 min。各孔内加入 0.4 mol/L NaOH 溶液 250 μL, 混匀, 室温放置 5 min, 在 450 nm 波长处测定 *D* 值。

1.10 qPCR 法检测 HCC 组织及 Gn-Rb1 处理后 HepG2 细胞中氧死亡相关基因 mRNA 的表达

细胞分组处理同 1.8。TRIzol 法提取细胞与组织中的 RNA, 使用 HiFiScript gDNA Removal RTMasterMix 试剂盒进行反转录, 使用 MagicSYBR Mixture 试剂盒进行 qPCR 扩增, 严格按照说明书操作。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 qPCR 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')
KEAP1	F: CGCCCTGGACTGTTACAACC
	R: CGCTCTGGCTCATACCTCTC
PGAM5	F: GCTACATCGTGTGCAGAGCA
	R: TCTTGTCGGGAGGCATGAAC
NRF2	F: CAACTACTCCCAGGTTGCC
	R: GACTGGGCTCTCGATGTGAC
AIFM1	F: AAGTCAGACGAGAGGGGGTT
	R: ACCTTCCTGCCGTCTTTCAG
GAPDH	F: CACCATCTTCCAGGAGCGAG
	R: TGATGACCCCTTTGGCTCCC

1.11 WB 法检测 HCC 组织及 Gn-Rb1 处理后 HepG2 细胞中氧死亡相关蛋白的表达

细胞分组处理同 1.8。提取各组细胞蛋白与组织蛋白, 加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液煮沸变性, 每孔上样 50 μg 组织蛋白或 30 μg 细胞蛋白, 80 V 电泳至浓缩胶底部, 120 V 电泳至分离胶底部。提前 5 min 用甲醇激活 PVDF 膜, 安装三明治夹, 100 V 冰浴转膜 1 h。5% 脱脂奶粉配制的封闭液封闭 1 h 后, 1×TBST 洗 3 次, 每次 10 min。加入一抗 KEAP1 (1:5 000)、PGAM5 (1:500)、AIFM1 (1:5 000)、NRF2 (1:5 000)、pAIM1 (1:1 000)、GAPDH (1:5 000) 抗体工作液, 4 °C 摇床上反应过夜后, 1×TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 加入二抗工作液 (1:2 000), 室温摇床上反应 1 h 后, 1×TBST 洗 3 次, 每次 10 min, 滴加 ECL 显影液, 曝光后, ImageJ 软件分析条带灰度值。

1.12 统计学处理

以上实验均进行 3 次独立重复实验。数据统计

分析利用 GraphPad Prism 8.0 软件处理,符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 PGAM5 表达与肝癌患者生存时间的关系

对 GEPIA 数据库的肝癌数据集中 PGAM5 表达与患者总生存率的关联进行 Kaplan-Meier 生存分析,结果(图1)发现,PGAM5 高表达的肝癌患者生存周期显著长于 PGAM5 低表达的肝癌患者($P < 0.05$),即 PGAM5 高表达对肝癌患者总生存时间有正面影响。

2.2 临床 HCC 组织样本中氧死亡相关基因 mRNA 与蛋白表达情况

通过 qPCR(图2)、WB(图3)法分别检测氧死亡关键基因(KEAP1、PGAM5、AIFM1、NRF2)mRNA 和蛋白水平的表达,结果显示,相较于癌旁组织,肿瘤组织 KEAP1 与 PGAM5 的 mRNA 和蛋白表达均显著

降低,NRF2 mRNA 和蛋白表达显著升高($P < 0.01$)、p-AIFM1 表达显著升高($P < 0.01$),提示 HCC 组织氧死亡可能被抑制。

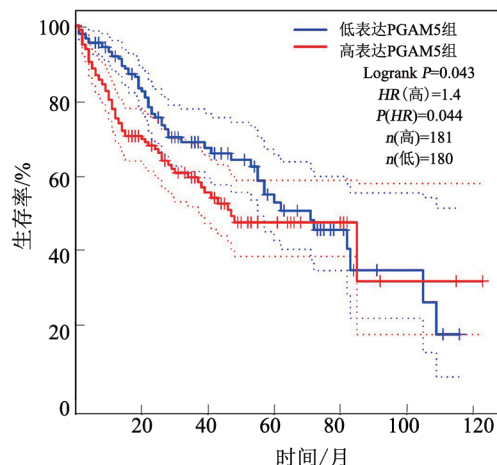
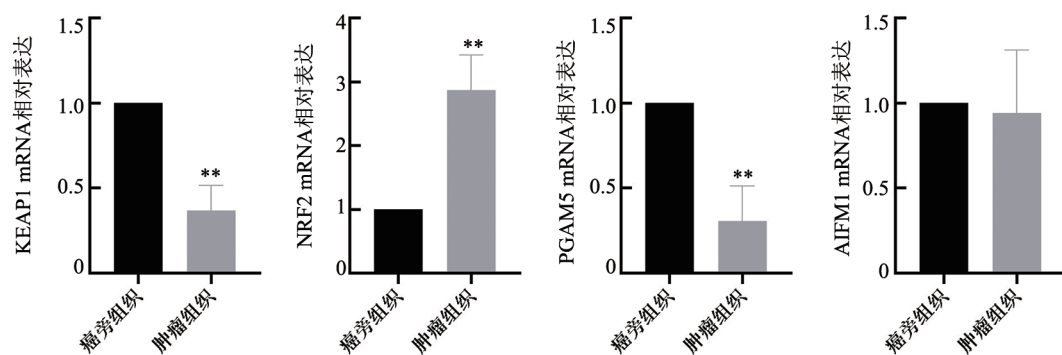


图1 不同PGAM5表达水平肝癌患者的生存分析



与癌旁组织相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图2 HCC组织与癌旁组织中氧死亡相关基因的mRNA表达水平

2.3 Gn-Rb1 对 HepG2 细胞具有增殖抑制作用

CCK-8 法检测结果(图4)显示,与对照组比较,各浓度 Gn-Rb1 干预后 HepG2 细胞增殖能力均受到显著抑制(均 $P < 0.05$)。选择 Gn-Rb1 处理 24 h 时接近 IC_{50} 值的 200 $\mu\text{mol/L}$ Gn-Rb1 进行后续实验。

2.4 Gn-Rb1 抑制 HepG2 细胞的集落形成能力

集落形成实验检测结果(图5)显示,与对照组相比,Gn-Rb1 组集落数显著减少[(25.00 \pm 3.00) vs (52.00 \pm 4.00)个, $P < 0.01$]。

2.5 Gn-Rb1 抑制 HepG2 细胞的迁移能力

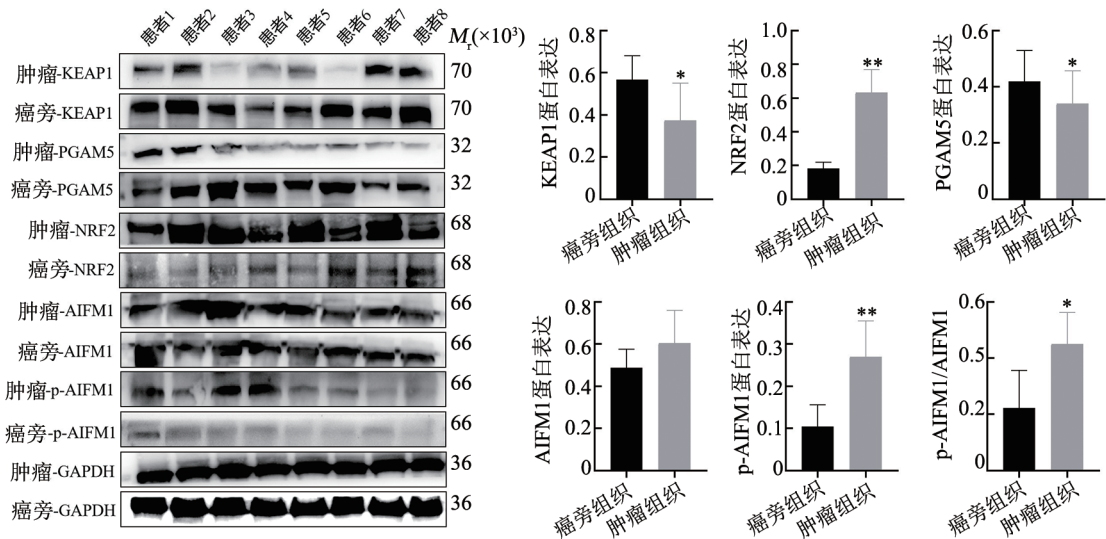
划痕愈合实验结果(图6)显示,12 h 时,Gn-Rb1 组划痕愈合率显著低于对照组[(7.85 \pm 1.03)% vs (20.97 \pm 1.68)%, $P < 0.01$];24 h 时,Gn-Rb1 组划痕愈合率亦显著低于对照组[(14.53 \pm 1.63)% vs (29.87 \pm 1.12)%, $P < 0.01$]。提示 Gn-Rb1 能够抑制 HepG2 细胞的迁移能力。

2.6 Gn-Rb1 对 HepG2 细胞氧化应激及细胞损伤的影响

LDH 测定和 ELISA 检测结果显示,Gn-Rb1 组 HepG2 细胞培养上清液中 LDH 含量显著高于对照组[(101.70 \pm 2.73) vs (79.48 \pm 7.13)U/L, $P < 0.05$],说明细胞损伤程度升高;ROS 含量较对照组有升高趋势[(2.64 \pm 0.18) vs (2.30 \pm 0.02)U/L, $P > 0.05$]。

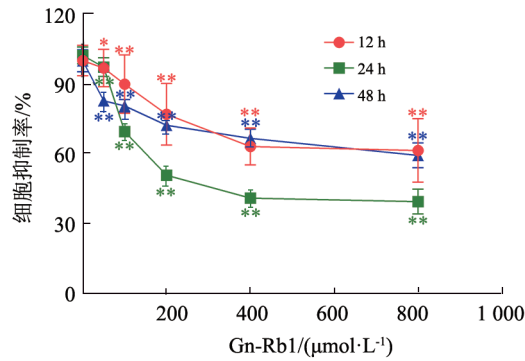
2.7 Gn-Rb1 对 HepG2 细胞氧死亡相关基因 mRNA 及蛋白表达的影响

qPCR 检测结果(图7)显示,在 mRNA 水平上,相比于对照组,Gn-Rb1 组 HepG2 细胞中 KEAP1、PGAM5 基因表达显著升高,NRF2 基因表达显著降低(均 $P < 0.05$);WB 法检测结果(图8)显示,在蛋白水平上,Gn-Rb1 组 HepG2 细胞中 KEAP1、PGAM5 表达显著升高,p-AIFM1、NRF2 表达显著降低(均 $P < 0.01$)。



与癌旁组织相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图3 HCC组织与癌旁组织中氧死亡相关蛋白的表达



与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图4 Gn-Rb1处理抑制HepG2细胞的增殖

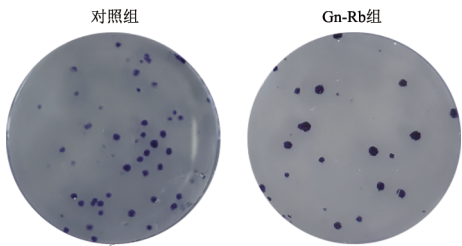


图5 Gn-Rb1对HepG2细胞的集落形成能力的影响(结晶紫染色)

3 讨论

本研究证实,200 $\mu\text{mol/L}$ Gn-Rb1可以有效抑制HepG2细胞的增殖与迁移,并且能显著影响HepG2细胞的集落形成能力,上述实验结果与Gn-Rb1作用于其他类型肿瘤细胞的研究结果基本一致^[12-13]。氧死亡是2018年新发现的一种新型细胞死亡方式,是由ROS介导的非caspase依赖的细胞死亡方式^[8]。正常生理状态下,KEAP1与NRF2在胞质中结合,为防

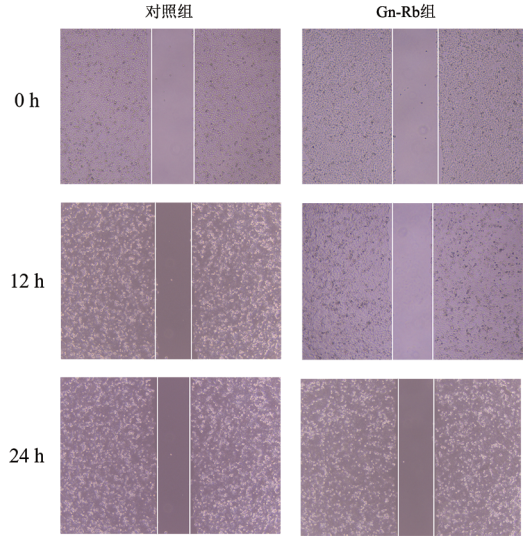
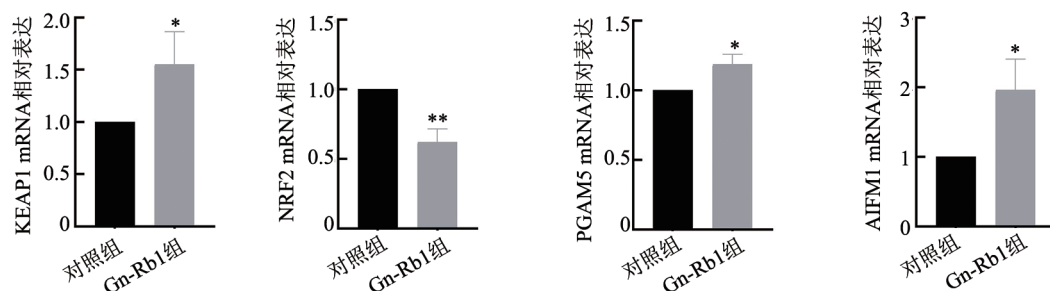


图6 Gn-Rb1对HepG2细胞迁移的影响(倒置显微镜,×200)

止NRF2转运进入细胞核内,KEAP1作为一种泛素连接酶将NRF2泛素化,以此维持氧化与抗氧化之间的平衡^[14];随ROS浓度轻度升高,KEAP1作为ROS的感受器,会与NRF2分离并结合氧死亡的中央枢纽蛋白PGAM5;当细胞内ROS浓度超过KEAP1/NRF2的调节能力时,KEAP1作为氧死亡的开关与PGAM5分离,进而PGAM5被转运进入线粒体内并使AIFM1去磷酸化、发生突变,AIFM1穿梭至细胞核内自发性地开启氧死亡进程^[15]。本研究检测了临床HCC组织样本中氧死亡调控通路KEAP1/PGAM5/AIFM1以及KEAP1/NRF2蛋白与mRNA的表达,结果表明,相较于癌旁组织,HCC组织中KEAP1与PGAM5表达显著降低,NRF2与p-AIFM1表达显著升高,提示在HCC组织中氧死亡可能被抑制。肿瘤组织ROS水平升高,本研究证实肿瘤组织中氧死亡却被抑制,原因

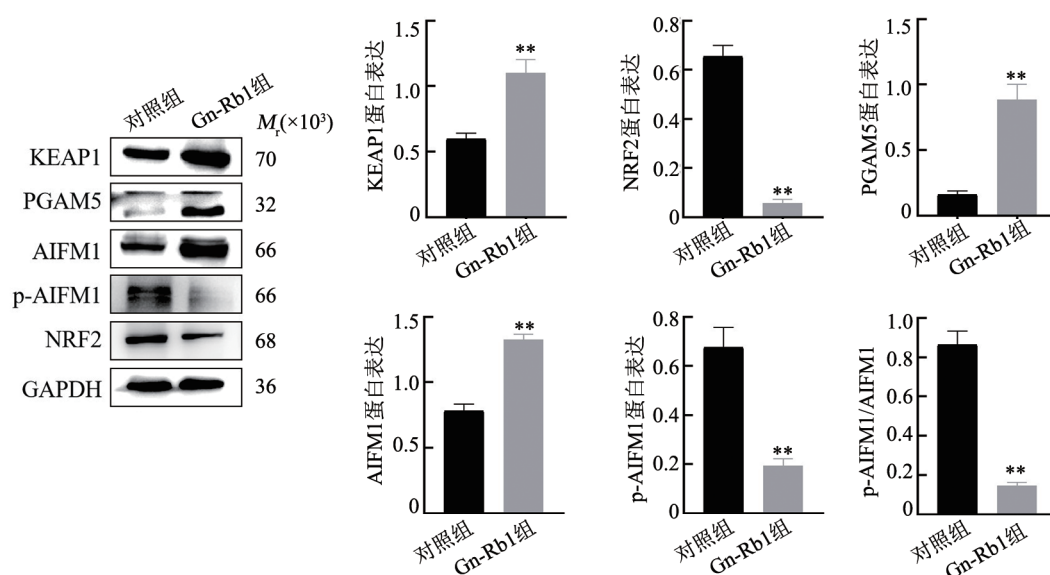
可能为肿瘤组织长期处于氧化应激状态,这种ROS水平的升高有利于HCC细胞的存活与生长^[16-19],有利于KEAP1/NRF2信号通路在HCC中过度激活^[20-22],开

启抗氧化进程,使得HCC细胞在高浓度ROS的状态下生存并且抑制氧死亡的发生。



与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图7 Gn-Rb1对HepG2细胞中氧死亡相关mRNA表达的影响



与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

图8 Gn-Rb1对HepG2细胞中氧死亡相关蛋白表达的影响

中医中并无“肝细胞癌”之病症名,依据其临床表现,将其归为“肝积”的病症范畴。《圣济总录》曾对HCC做出具体描述:“积气在腹中,久不差,牢固推之不移,……按之其状如杯盘牢结,久不已,令人身瘦而腹大,至死不消”^[23]。中医学认为,脾乃后天之本,气血生化之源^[24-25]。脾失健运时,肝气郁结、气机不畅、津血不归正化所生,遂血滞而瘀,津凝成痰,而痰瘀具有重浊腻滞之性,相互驳杂,胶结难解,蕴结于肝,渐成症积。人参具有补脾生津、化痰祛痰之功效^[26],其有效成分Gn-Rb1具有抑制肿瘤细胞增殖^[27-28]与转移^[29]的作用。有研究^[27-28]证明,Gn-Rb1通过调控自噬、线粒体凋亡等细胞死亡进程干预肿瘤细胞的增殖与转移,主要涉及PINK1/Parkin通路与caspase通路,而现少见Gn-Rb1调控新型细胞死亡方式——氧死亡的相关报道。本研究探讨了Gn-Rb1对HepG2

细胞的作用,发现Gn-Rb1干预HepG2细胞后显著抑制了细胞迁移能力与集落形成能力,升高ROS与LDH水平、加剧肿瘤细胞损伤,并且可使KEAP1、PGAM5表达显著升高,p-AIFM1、NRF2表达显著降低,提示Gn-Rb1抑制HepG2细胞的增殖、迁移与集落形成能力,这可能与KEAP1/PGAM5/AIFM1通路介导的氧死亡有关。

综上所述,本研究以新型程序性死亡(氧死亡)为切入点,发现HCC组织中氧死亡被抑制,而细胞水平实验证实Gn-Rb1可抑制HCC细胞HepG2的增殖、迁移与集落形成能力,其原因可能与KEAP1/PGAM5/AIFM1通路介导的氧死亡有关。

[参考文献]

[1] 赵海潮, 高强. 2022年度肝癌研究及诊疗新进展[J]. 中国癌症杂志,

- 2023, 33(4): 315-326. DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2023.04.002.
- [2] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, *et al.* Challenges in liver cancer and possible treatment approaches[J/OL]. *Biochim Biophys Acta BBA Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 188314 [2023-11-26]. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.188314>. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.188314.
- [3] FORNER A, REIG M, BRUIX J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314. DOI: 10.1016/s0140-6736(18)30010-2.
- [4] 李香香, 王振, 杨星, 等. 综述中药抑制肝细胞癌血管生成的作用机制研究进展[J/OL]. *临床肝胆病杂志*, 2024: 1-12[2024-04-06]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1108.r.20240103.1931.002.html>.
- [5] 莫秀丽, 陈石生, 李涛, 等. 人参皂苷协同增效的研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2023, 38(12): 3174-3180. DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.12.045.
- [6] 罗飞凤. 基于网络药理学研究人参皂苷治疗中晚期原发性肝癌的作用机制[D]. 南宁: 广西中医药大学, 2020.
- [7] 汪蕾, 陈红霞. 人参皂苷Rb1拮抗肝癌细胞抑制NK细胞免疫功能的研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(28): 3099-3101. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2012.28.010.
- [8] HOLZE C, MICHAUDEL C, MACKOWIAK C, *et al.* Oxeiptosis, a ROS-induced caspase-independent apoptosis-like cell-death pathway[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(2): 130-140. DOI: 10.1038/s41590-017-0013-y.
- [9] 肖庆澳, 夏旋. 氧死亡: 一种新型调节性细胞死亡[J]. *生命的化学*, 2021, 41(2): 223-230. DOI: 10.13488/j.smhx.20200513.
- [10] ZHANG J, GAO R F, LI J, *et al.* Alloimperatorin activates apoptosis, ferroptosis, and oxeiptosis to inhibit the growth and invasion of breast cancer cells *in vitro*[J]. *Biochem Cell Biol*, 2022, 100(3): 213-222. DOI: 10.1139/bcb-2021-0399.
- [11] ALANNAN M, FATROUNI H, TRÉZÉGUET V, *et al.* Targeting PCSK9 in liver cancer cells triggers metabolic exhaustion and cell death by ferroptosis[J/OL]. *Cells*, 2022, 12(1): 62[2024-04-06]. <https://doi.org/10.3390/cells12010062>. DOI: 10.3390/cells12010062.
- [12] 王红宁, 左国伟, 陈地龙, 等. 人参皂苷Rb1、Rg1、Re对白血病细胞株KG1α增殖的影响[J]. *生物技术*, 2010, 20(2): 56-58. DOI: 10.16519/j.cnki.1004-311x.2010.02.031.
- [13] 吴博. 人参皂苷Rb1脂质体的制备及其体外抗肿瘤活性研究[D]. 镇江: 江苏大学, 2022.
- [14] BAIRD L, YAMAMOTO M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway[J/OL]. *Mol Cell Biol*, 2020, 40(13): e00099-20[2024-04-06]. <https://doi.org/10.1128/mcb.00099-20>. DOI: 10.1128/mcb.00099-20.
- [15] SCATURRO P, PICHLMAIR A. Oxeiptosis: a discreet way to respond to radicals[J]. *Curr Opin Immunol*, 2019, 56: 37-43. DOI: 10.1016/j.coi.2018.10.006.
- [16] MARTÍNEZ-REYES I, CHANDEL N S. Cancer metabolism: looking forward[J]. *Nat Rev Cancer*, 2021, 21(10): 669-680. DOI: 10.1038/s41568-021-00378-6.
- [17] SAHOO B M, BANIK B K, BORAH P, *et al.* Reactive oxygen species (ROS): key components in cancer therapies[J]. *Anti Cancer Agents Med Chem*, 2022, 22(2): 215-222. DOI: 10.2174/1871520621666210608095512.
- [18] LUO C, SUN J, LIU D, *et al.* Self-assembled redox dual-responsive prodrug-nanosystem formed by single thioether-bridged paclitaxel-fatty acid conjugate for cancer chemotherapy[J]. *Nano Lett*, 2016, 16(9): 5401-5408. DOI: 10.1021/acs.nanolett.6b01632.
- [19] 常景芝, 陈剑, 芦琨, 等. MicroRNA-141靶向Keap1调控Nrf2/ARE信号通路对乳腺癌T47D细胞活力的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2018, 34(7): 1245-1249. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2018.07.015.
- [20] LIU Y F, TAO S S, LIAO L J, *et al.* TRIM25 promotes the cell survival and growth of hepatocellular carcinoma through targeting Keap1-Nrf2 pathway[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 348[2024-04-06]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31953436/>. DOI: 10.1038/s41467-019-14190-2.
- [21] CHEN J, JIANG S, SHAO H J, *et al.* CRISPR-Cas9-based genome-wide screening identified novel targets for treating sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma: a cross-talk between FGF21 and the NRF2 pathway[J]. *Sci China Life Sci*, 2022, 65(10): 1998-2016. DOI: 10.1007/s11427-021-2067-7.
- [22] TAKAHASHI N, CHO P, SELFORS L, *et al.* 3D culture models with CRISPR screens reveal hyperactive NRF2 as a prerequisite for spheroid formation *via* regulation of proliferation and ferroptosis[J]. *Mol Cell*, 2020, 80(5): 828-844. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.10.010.
- [23] (宋)赵佑救编;王振国,杨金萍主校. 圣济总录校注(上)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2016.01.
- [24] 汤一新, 安凌. 中医脾阴学说研究[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 1992.
- [25] 刘嘉湘, 田建辉. 传承中医药学术精华, 促进肿瘤学创新发展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2023, 30(11): 944-949. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2020.07.097.
- [26] 王正芳, 王艳. 人参[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 2005.
- [27] 林少泽, 王聪仁. 人参皂苷Rb1介导线粒体自噬途径对肝癌细胞凋亡的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(12): 1713-1717. DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2023.12.009.
- [28] 王红宁. 人参皂苷Rb1、Rg1、Re对K562细胞、KG1α细胞增殖影响及信号转导分子机制研究[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2010.
- [29] 范露露. 人参皂苷对华法林抗凝及抗肿瘤转移作用的研究[D]. 福州: 福州大学, 2018.
- [收稿日期] 2023-11-27 [修回日期] 2024-04-08
[本文编辑] 黄静怡