

DOI:10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-02-011

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

毛花苷 C 抑制肝癌 HepG2 细胞增殖及下调 Akt 表达

王梦玲^{ab}, 刘敏珍^{ab}, 吴丹^c, 韦建伶^d, 郭昌洪^d, 谭宁^c

(桂林医学院 a.药学院, b.研究生院, c.基础医学院, d.临床医学院, 桂林 541199)

摘要 **目的** 探究毛花苷 C 对肝癌 HepG2 细胞增殖的作用及其潜在的分子机制。**方法** 采用毛花苷 C 处理 HepG2 细胞, 利用细胞增殖实验与克隆形成实验评估毛花苷 C 对其增殖能力的影响。使用流式细胞仪分析细胞周期的分布。采用 Western blot 实验检测细胞周期相关蛋白 p21、p27、CDK4 以及 p-Akt 和 Akt 的表达。**结果** 毛花苷 C 呈浓度依赖性抑制 HepG2 细胞增殖, 与对照组相比, 毛花苷 C 干预后, HepG2 细胞克隆形成率明显下降, 细胞阻滞于 G0/G1 期。Western blot 检测结果揭示, 毛花苷 C 干预 HepG2 细胞后, p21 和 p27 蛋白的表达增强, p-Akt 和 Akt 的表达降低。**结论** 毛花苷 C 能抑制 HepG2 细胞增殖, 诱导细胞周期阻滞, 其机制可能与毛花苷 C 抑制 Akt 的表达与磷酸化, 上调细胞周期调节蛋白 p21 和 p27 有关。

关键词: 肝癌; 毛花苷 C; 细胞周期; Akt

中图分类号: R735.7

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)02-0075-06

Lanatoside C inhibits the proliferation of HepG2 cells and down-regulates Akt expression

WANG Mengling^{ab}, LIU Minzhen^{ab}, WU Dan^c, WEI Jianling^d, GUO Changqi^d, TAN Ning^c

(a. College of Pharmacy, b. Graduate School, c. College of Basic Medicine,

d. College of Clinical Medicine, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract **Objective** To observe the effect of Lanatoside C on the proliferation in hepatocellular carcinoma cell HepG2 and to explore its potential molecular mechanism. **Methods** HepG2 cells were treated with various concentrations of Lanatoside C, and the effect of Lanatoside C on the proliferation of HepG2 cells was evaluated by cell proliferation and clonal formation experiments. Flow cytometry was used to analyze the cell cycle. Western blot assay was used to test the protein expression levels of cell cycle related proteins p21, p27, CDK4, p-Akt and Akt. **Results** The proliferation of HepG2 cells was significantly inhibited by Lanatoside C in a dose-dependent manner. Compared with the control group, the clonogenesis rate of HepG2 cells was significantly decreased by Lanatoside C. Flow cytometry results showed that Lanatoside C blocked HepG2 cells in G0/G1 phase. Western blot results showed

基金项目: 国家自然科学基金地区基金项目(82160699); 广西壮族自治区教育厅 2021 年研究生教育创新计划项目(JGY2021138); 大学生创新创业训练国家级项目(202110601005, 202210601017)。

第一作者: 王梦玲, 硕士, 研究方向为抗肿瘤药物。

通信作者: 谭宁, 653651606@qq.com。

that the protein expressions of p21 and p27 in HepG2 cells were significantly up-regulated by Lanatoside C, and the protein expressions of p-Akt and Akt were significantly down-regulated. **Conclusion** Lanatoside C inhibites the proliferation and induces the cell cycle arrest in HepG2 cells, which the mechanism may be related to the inhibition of Akt protein expression and phosphorylation induced by Lanatoside C, as well as the up-regulation of cell cycle regulatory proteins p21 and p27 induced by Lanatoside C.

Keywords: liver cancer; Lanatoside C; cell cycle; Akt

根据美国癌症协会的预测,到 2023 年,美国将新增 190 万癌症病例和 60 万癌症死亡病例^[1]。2016 年,中国癌症新发病例数和死亡病例数分别约为 400 万和 250 万,其中,肝癌患者的死亡率位居中国肿瘤死亡率的前 5 位^[2]。作为一种多因素、多阶段和多基因性疾病,肝癌的发生发展牵涉到多个抑癌基因的失活和癌基因的活化^[3]。常见的抑癌基因有 p53、Rb、p21 和 PTEN 等,常见的癌基因则有 N-ras、C-myc、C-fos、Akt 等。研究^[4]结果显示, Akt 作为潜在的人类致癌基因,在多种肿瘤发生中存在扩增。这种 Akt 基因扩增现象最早在胃癌中被发现,并陆续在人类卵巢癌、胰腺癌和乳腺肿瘤中被发现。作为磷脂酰肌醇 3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)信号转导通路下游的信息分子, Akt 参与抑制细胞凋亡、促进细胞周期进程和细胞增殖等生物过程, Akt 的异常表达与肿瘤的发生、发展以及对放疗产生的耐受密切相关^[4]。

强心苷类药物是从植物或动物中提取的天然甾醇类化合物^[5],除了用于治疗心血管疾病外,目前也被推荐用于肝癌术后的辅助治疗^[6]。毛花苷 C 作为一种美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)批准的速效强心苷类药物,已被证实具有抗肿瘤活性,例如毛花苷 C 可以通过 Wnt/ β -catenin/cMyc 信号通路诱导胃癌细胞凋亡^[7],通过 PCK δ 诱导肝癌细胞凋亡^[8],以及通过诱导线粒体失功能增强结肠癌细胞的放疗敏感性^[9]。毛花苷 C 可导致肝癌细胞 Huh-7 凋亡,并激活凋亡相关基因 Caspase-7^[10]。本研究旨在探究毛花苷 C 对肝癌细胞 HepG2 增殖的影响及其与 Akt 信号通路的关系。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院上海生物科学研究所细胞资源中心。毛花苷 C 购自 Sigma 公

司; DMEM 高糖培养基购自 Sigma-Aldrich 公司;胎牛血清 FBS 购自 Corille 公司; BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo 公司; Cell Counting Kit-8 试剂购自上海同仁化学研究所; 单克隆抗体 p21、p27、Akt、p-Akt (Ser473)、p-Akt (Thr308)、CDK2 及 CDK4 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 抗 β -actin 一抗购自 Proteintech 公司。CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司; 光栅型连续波长酶标仪购自瑞士 TECAN 公司; 冷冻离心机购自美国贝克曼库尔特公司; 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将肝癌 HepG2 细胞接种在含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基(完全培养基)中,放入 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。

1.2.2 IC₅₀ 实验 细胞用完全培养基培养。将 HepG2 细胞接种在 96 孔板中,密度为 8 000 个/孔,做好标记,放入培养箱中培养 24 h 后,然后进行毛花苷 C 干预。实验设对照组(试剂对照)和 8 个毛花苷 C 浓度干预组,对照组加入试剂二甲基亚砜(DMSO),干预组分别加入 39、78、156、312、625、1 250、2 500、5 000 ng/mL 毛花苷 C,设 3 个复孔,培养 24 h 后,移去培养液,加入细胞增殖-毒性检测试剂(CCK-8)溶液,每个孔 10 μ L,置培养箱孵育 2 h 后,用酶标仪检测,检测波长为 450 nm,用 GraphPad Prism 5.0 软件进行数据处理,计算毛花苷 C 的 IC₅₀ 值。

1.2.3 细胞增殖实验 将 HepG2 细胞接种在 96 孔板中,密度为 2 000 个/孔,做好标记,放入培养箱中培养,24 h 后进行毛花苷 C 干预。实验设对照组和 5 个不同浓度的毛花苷 C 干预组,对照组加入 DMSO,干预组分别加入 78、156、312、625、1 250 ng/mL 毛花苷 C,设 3 个复孔,培养细胞 2 h、24 h、48 h、72 h、4 d 和 5 d 后,移去培养液,加入 CCK-8 溶液,每个孔

10 μL ,再培养 2 h 后,采用酶标仪检测,检测波长 560 nm,计算细胞增殖抑制率,细胞增殖抑制率 = (对照组 OD-干预组 OD)/对照组 OD \times 100%。

1.2.4 克隆形成实验 将 HepG2 细胞接种在 6 孔板中,密度为 1 000 个/孔,做好标记,放入培养箱中培养。培养 10 d 后进行毛花苷 C 干预,设对照组和毛花苷 C 干预组,对照组加入 DMSO,干预组加入 312 ng/mL 毛花苷 C,设置 9 个复孔,培养 6 d 后,移去培养液,用 PBS 洗板 2 次,多聚甲醛固定细胞 15 min,结晶紫溶液染色 15 min 后,用清水浸泡冲洗,放在室温下晾干,用扫描仪扫描,保存扫描图像。然后每孔加 2 mL 10% 的冰醋酸溶液,溶解结晶紫,取 100 μL 转入 96 孔板,使用酶标仪检测,检测波长为 560 nm。参考文献中的方法^[1] 计算克隆形成抑制率,克隆形成抑制率 = (对照组 OD-干预组 OD)/对照组 OD \times 100%。

1.2.5 细胞周期检测 5×10^5 个细胞接种于培养皿中,做好标记,放入培养箱中培养 24 h 后,进行毛花苷 C 干预,设对照组和毛花苷 C 干预组,干预组毛花苷 C 的浓度为 312 ng/mL。毛花苷 C 干预培养 24 h 后,采用胰酶消化法收集细胞,用预冷的乙醇溶液进行固定,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。染色前取出细胞,并用 PBS 重悬,加入 RNase A 溶液,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中孵育 30 min。离心、弃去上清液、用 PI 染色液重悬细胞,并在 4 $^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 30 min。最后,使用流式细胞仪和 FlowJo 软件进行检测和分析。

1.2.6 Western blot 实验 裂解细胞提取细胞总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。制备上样蛋白样品,混匀,95 $^{\circ}\text{C}$ 热变性 10 min,置于冰上 10 min,-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。实验时,取出处理好的上样蛋白样品,进行凝胶电泳、转膜、封闭、一抗孵育与洗涤、二抗孵育与洗涤。这些处理步骤完成后,进行发光、X 线胶片曝光、显影及定影。最后,用扫描仪和 Image J 及 GraphPad Prism 5.0 软件对图像进行分析。

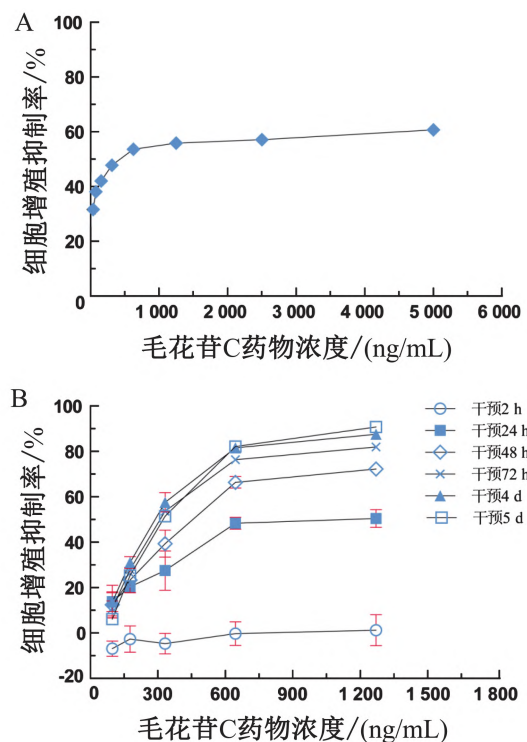
1.3 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件对数据进行统计学分析, $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 毛花苷 C 抑制 HepG2 细胞增殖

毛花苷 C 对 HepG2 细胞的增殖有明显抑制作用,随毛花苷 C 干预浓度的增加和干预时间的延长,抑制 HepG2 细胞增殖越明显,干预 24 h 的 IC_{50} 为 (579.40 ± 0.04) ng/mL,结果如图 1A 所示。CCK-8 实验结果显示,与对照组相比,毛花苷 C 干预组 HepG2 细胞增殖被抑制,抑制效应呈浓度和时间依赖性,加毛花苷 C 作用 24 h 后,HepG2 细胞生长受到明显抑制,结果如图 1B 所示。



注:A. 毛花苷 C 与 HepG2 细胞的剂量效应关系分析;B. 毛花苷 C 浓度与干预时间对 HepG2 细胞的影响。

图 1 毛花苷 C 对 HepG2 细胞增殖的影响

2.2 毛花苷 C 抑制 HepG2 细胞克隆形成

312 ng/mL 的毛花苷 C 干预组 HepG2 细胞克隆形成能力明显受抑制,与对照组比较,克隆形成抑制率为 (54.47 ± 2.30) %,差异有统计学意义($P<0.05$),结果如图 2 所示。

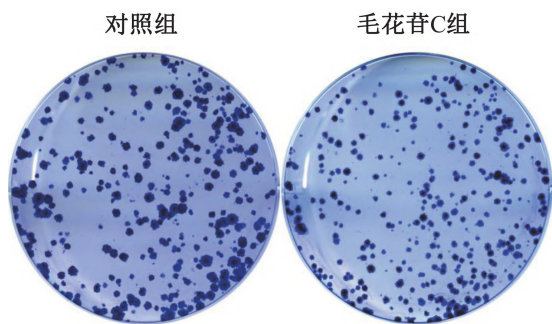


图 2 毛花苷 C 对 HepG2 细胞克隆形成能力的影响

2.3 毛花苷 C 诱导 HepG2 细胞 G0/G1 期阻滞

312 ng/mL 的毛花苷 C 干预组, G1 期的细胞 74.6% 高于对照组 43.7%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果如图 3 所示。

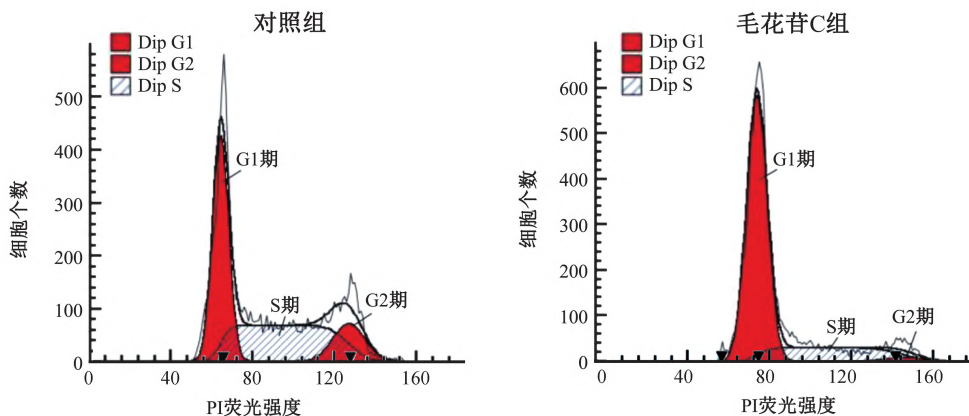
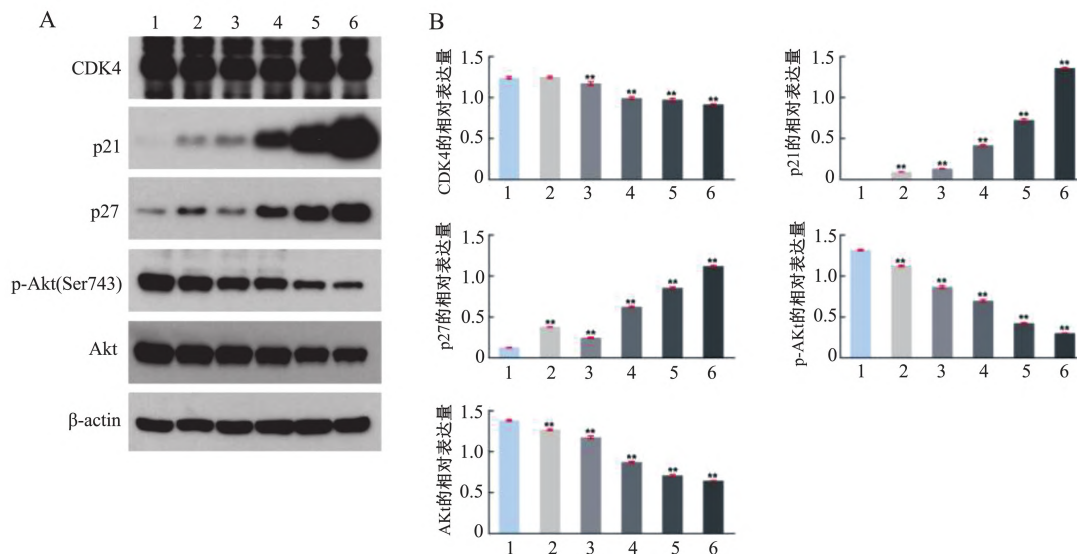


图 3 流式细胞仪检测 HepG2 细胞的周期

2.4 相关蛋白表达

毛花苷 C 上调 HepG2 细胞 p21、p27 蛋白表达, 毛花苷 C 浓度越高, p21、p27 蛋白表达越强。毛花

苷 C 抑制 HepG2 细胞 Akt 及 p-Akt 蛋白的表达, 毛花苷 C 浓度越高, Akt 及 p-Akt 蛋白的表达越低, 如图 4A 和图 4B 所示。



注: A. Western blot 检测蛋白表达; B. 蛋白表达分析 (1. 对照组; 2. 毛花苷 C 78 ng/mL 浓度组; 3. 毛花苷 C 156 ng/mL 浓度组; 4. 毛花苷 C 312 ng/mL 浓度组; 5. 毛花苷 C 625 ng/mL 浓度组; 6. 毛花苷 C 1 250 ng/mL 浓度组)。与对照组比较, $** P < 0.01$ 。

图 4 毛花苷 C 对 p21、p27、Akt 和 p-Akt 蛋白表达的影响分析

3 讨论

肝癌居 2020 年中国消化道肿瘤死亡病例的首位^[12],它是一种严重威胁人类生命健康的恶性肿瘤。强心苷类药物具有治疗肿瘤的潜力,蟾蜍灵^[13]、哇巴因^[14]、地高辛^[15]和毛花苷 C^[16]等强心苷类药物均被证实具有抗肿瘤作用。本课题组前期研究结果证实,毛花苷 C 可导致肝癌细胞 Huh-7 凋亡,并激活凋亡相关基因 Caspase-7^[10]。本研究以人肝癌细胞 HepG2 为对象,探究毛花苷 C 对肝癌细胞增殖的作用。结果显示,毛花苷 C 干预 HepG2 24 h 后,其 IC₅₀ 为 (579.40±0.04) ng/mL。CCK-8 检测结果提示,毛花苷 C 明显抑制 HepG2 细胞增殖,抑制作用呈浓度和时间依赖性。细胞克隆实验结果显示,毛花苷 C 能够显著抑制 HepG2 细胞的克隆形成,克隆形成抑制率为 (54.47±2.30)%。上述结果均表明,毛花苷 C 对肝癌细胞增殖具有抑制作用。

Akt 也称蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员。它在哺乳动物中存在 3 种亚型, Akt1 (也被称为 PKB α)、Akt2 (也被称为 PKB β) 和 Akt3 (也被称为 PKB γ)。Akt1 在多种组织中广泛表达,发挥着重要的生物学功能; Akt2 主要在胰岛素敏感组织(如肝脏、肌肉和脂肪组织)中表达,在胰岛素信号通路调节中发挥重要作用; Akt3 主要在大脑和睾丸中表达,参与神经发育和生殖功能调控。在结构上, Akt 有氨基末端 Pleckstrin 同源性 (the amino-terminal pleckstrin homology, PH) 结构域、与 cAMP 依赖性蛋白激酶 (cAMP-dependent protein kinases) 具有同源性的催化结构域以及羧基末端的调节结构域组成。Akt 3 种亚型的催化结构域具有同源性,但 PH 结构域和调节结构域却不同^[17]。

Akt (Akt1 即通常所说的 Akt) 是 PI3K/Akt 通路的主要成分,该通路具有调节细胞的存活、增殖、转录、蛋白质合成等多种作用。因此,该通路受到任何干扰都会对细胞稳态产生影响^[18]。PI3K 是脂质激酶家族的一种磷脂酰肌醇激酶,具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性,可被生长因子刺激激活,促进磷脂酰肌醇二磷酸 (phosphatidylinositol bisphosphate, PIP₂) 向磷脂酰肌醇三磷酸 (phosphatidylinositol triphosphate,

PIP₃) 转化^[19]。Akt 的 PH 结构域与 PI3K 在质膜上形成的 PIP₃ 结合,使 Akt 在苏氨酸 (Thr) 和丝氨酸 (Ser) 残基处发生磷酸化 (Akt1 在 Thr 308 和 Ser 473 位点, Akt2 在 Thr 309 和 Ser 474 位点, Akt3 在 Thr 305 和 Ser473 位点)^[17]。活化的 Akt 可以分别在细胞周期抑制剂 p21、p27 的 Thr 145 和 Thr 157 位点进行磷酸化,抑制 p21、p27 的活性,从而抑制其对细胞周期造成的阻滞作用^[20]。

Ji 等^[21]发现, MiR-335-5p 通过靶向 Oct4/Akt 途径,抑制 Huh-7 肝癌细胞的增殖。LIU 等^[22]发现,达沙替尼抑制肝癌细胞的增殖,但 Akt/mTOR 的激活减轻达沙替尼的抗癌作用。LIU 等^[23]发现,多酚原花青素 B2 通过直接结合和抑制 Akt 活性阻碍肝癌细胞增殖和肝癌发生。这些研究结果表明,抑制 Akt 的激活是抗肝癌的一种重要途径。因此,通过调控 PI3K-Akt 信号通路,可有效地靶向细胞周期,抑制肿瘤增殖^[19]。本研究使用毛花苷 C 干预 HepG2 细胞,流式细胞仪检测结果显示,毛花苷 C 阻滞 HepG2 细胞于 G₀/G₁ 期,毛花苷 C 干预后, HepG2 细胞 p21 和 p27 蛋白表达上调, p-Akt 和 Akt 蛋白表达下调。

4 结论

毛花苷 C 可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路,上调 p21 和 p27 蛋白表达,诱导细胞周期阻滞,从而抑制 HepG2 细胞增殖,发挥抗肝癌作用。本研究初步证实,毛花苷 C 对肝癌细胞增殖和 Akt 磷酸化有抑制作用,为毛花苷 C 治疗肝癌的机制研究提供新的认识。

参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017 [J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] 郑荣寿, 张思维, 孙可欣, 等. 2016 年中国恶性肿瘤流行情况分析 [J]. 中华肿瘤杂志, 2023, 45(3): 212-220.
- [3] WANG Y, DENG B C. Hepatocellular carcinoma: molecular mechanism, targeted therapy, and biomarkers [J]. Cancer Metastasis Rev, 2023, 42(3): 629-652.
- [4] 苏君梅. Akt 与肿瘤的关系及其作用机制的研究进展 [J]. 杭州师范学院学报 (医学版), 2008, 28(4): 272-274.
- [5] KUMAVATH R, PAUL S, PAVITHRAN H, et al. Emer-

- gence of cardiac glycosides as potential drugs: current and future scope for cancer therapeutics [J]. *Biomolecules*, 2021, 11(9):1275.
- [6] 贺庆,刘坤,王超红,等.《原发性肝癌诊疗指南(2022年版)》解读[J].*西部医学*,2023,35(4):474-479.
- [7] HU Y D, YU K K, WANG G, et al. Lanatoside C inhibits cell proliferation and induces apoptosis through attenuating Wnt/ β -catenin/c-Myc signaling pathway in human gastric cancer cell[J]. *Biochem Pharmacol*,2018,150:280-292.
- [8] CHAO M W, CHEN T H, HUANG H L, et al. Lanatoside C, a cardiac glycoside, acts through protein kinase C δ to cause apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells[J]. *Sci Rep*,2017,7:46134.
- [9] KANG M A, KIM M S, KIM W, et al. Lanatoside C suppressed colorectal cancer cell growth by inducing mitochondrial dysfunction and increased radiation sensitivity by impairing DNA damage repair[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(5):6074-6087.
- [10] 张艳群,徐庆,曾永联,等.毛花苷 C 促进肝癌细胞 Huh-7 凋亡并增强 caspase-7 的活化[J].*中国药理学通报*, 2018,34(12):1745-1750.
- [11] 张笑,余涛,林河春,等.过表达 CSRP1 基因可促进人肺腺癌 H1299 细胞的增殖、迁移和侵袭[J].*肿瘤*,2018,38(4):291-299.
- [12] 周家琛,郑荣寿,王少明,等.2020 年中国和世界部分国家主要消化道肿瘤负担比较[J].*肿瘤综合治疗电子杂志*,2021,7(2):26-32.
- [13] MIAO Q, BI L L, LI X, et al. Anticancer effects of bufalin on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells: roles of apoptosis and autophagy[J]. *Int J Mol Sci*,2013,14(1):1370-1382.
- [14] WANG Y, ZHAN Y C, XU R, et al. Src mediates extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation and autophagic cell death induced by cardiac glycosides in human non-small cell lung cancer cell lines [J]. *Mol Carcinog*, 2014, doi.org/10.1002/mc.22147.
- [15] WANG Y Y, HOU Y Q, HOU L J, et al. Digoxin exerts anticancer activity on human nonsmall cell lung cancer cells by blocking PI3K/Akt pathway [J]. *Biosci Rep*, 2021,41(10):BSR20211056.
- [16] REDDY D, KUMAVATH R, GHOSH P, et al. Lanatoside C induces G2/M cell cycle arrest and suppresses cancer cell growth by attenuating MAPK, Wnt, JAK-STAT, and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways [J]. *Biomolecules*, 2019,9(12):792.
- [17] MROWEH M, ROTH G, DECAENS T, et al. Targeting Akt in hepatocellular carcinoma and its tumor microenvironment[J]. *Int J Mol Sci*,2021,22(4):1794.
- [18] MARTELLI A M, TABELLINI G, BRESSANIN D, et al. The emerging multiple roles of nuclear Akt [J]. *Biochim Biophys Acta*,2012,1823(12):2168-2178.
- [19] WEI J E, GOU Z P, WEN Y, et al. Marine compounds targeting the PI3K/Akt signaling pathway in cancer therapy[J]. *Biomedicine Pharmacother*,2020,129:110484.
- [20] CHEN Y, LIU X D, WANG H H, et al. Akt-regulated phosphorylation of GSK-3 β /cyclin D1, p21 and p27 contributes to cell proliferation through cell cycle progression from G1 to S/G2M phase in low-dose arsenite exposed HaCat cells[J]. *Front Pharmacol*,2019,10:1176.
- [21] JI Y Y, SONG Y, WANG A N. MiR-335-5p inhibits proliferation of Huh-7 liver cancer cells via targeting the Oct4/Akt pathway [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(4):1853-1860.
- [22] LIU C, ZHU X X, JIA Y Q, et al. Dasatinib inhibits proliferation of liver cancer cells, but activation of Akt/mTOR compromises dasatinib as a cancer drug[J]. *Acta Biochim Biophys Sin*,2021,53(7):823-836.
- [23] LIU G J, SHI A M, WANG N N, et al. Polyphenolic Proanthocyanidin-B2 suppresses proliferation of liver cancer cells and hepatocellular carcinogenesis through directly binding and inhibiting AKT activity[J]. *Redox Biol*,2020,37:101701.

[收稿日期:2024-01-19]

[责任编辑:涂剑,向秋 英文编辑:周寿红]