

· 肝脏肿瘤 ·

DOI: 10.12449/JCH251019

## 鸢尾黄素(TEC)对肝癌细胞活力、迁移和凋亡的影响及其机制

唐文敏<sup>1</sup>, 程明亮<sup>2</sup>, 祝娟娟<sup>2</sup>

1 贵州医科大学临床医学院, 贵阳 550004

2 贵州医科大学附属医院感染科, 贵阳 550004

通信作者: 祝娟娟, 184184239@qq.com (ORCID: 0009-0002-4999-4248)

**摘要:** 目的 观察蓝莓单体鸢尾黄素(TEC)对肝癌细胞系 HepG2、Huh7 细胞的影响,并探讨其作用机制。方法 从蓝莓中提取纯化 TEC;利用生物信息学进行靶基因及信号通路筛选;分别采用 HepG2、Huh7 细胞系,并设置 4 个 TEC 浓度处理组(0、30、60 和 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )进行实验。通过 CCK-8 法检测细胞活力;划痕实验、Transwell 实验评估迁移能力;流式细胞术检测凋亡率;Western Blot 检测 CCNB1、p53、MDM2、Bax、Bcl-2 和 active-Caspase 3 蛋白表达。构建 CCNB1 低表达(共 5 组:NC 组、si-NC 组、si-NC+TEC 组、si-CCNB1 组和 si-CCNB1+TEC 组)和过表达(共 4 组:OE-NC 组、OE-NC+TEC 组、OE-CCNB1 组和 OE-CCNB1+TEC 组)细胞模型验证靶点。计量资料多组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验。癌组织及癌旁组织间基因表达量的比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验。**结果** 在 HepG2、Huh7 细胞中,同一 TEC 浓度下,TEC 干预 24 h 时细胞存活率显著低于 12 h 和 48 h( $P$  值均 $<0.05$ );在干预时间为 24 h 时,TEC 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组的细胞存活率均显著低于其他浓度组( $P$  值均 $<0.05$ )。故采用 TEC 浓度为 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、干预时长为 24 h 进行后续实验。与 TEC 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组相比,30、60、90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组细胞的迁移数量及划痕愈合率均显著降低( $P$  值均 $<0.05$ );与 NC 组及 si-NC 组相比,HepG2 和 Huh7 细胞 si-NC+TEC 组及 si-CCNB1 组的迁移细胞数目、划痕愈合率均出现了明显的下降( $P$  值均 $<0.05$ )。与 NC 组及 si-NC 组相比,HepG2 和 Huh7 细胞 si-NC+TEC 组、si-CCNB1 组的细胞凋亡率均显著上升( $P$  值均 $<0.05$ )。在 HepG2 细胞中,与 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组相比,30、60、90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组均表现出 CCNB1 和 Bcl-2 蛋白表达水平的下调( $P$  值均 $<0.05$ ),60 和 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组 p53、Bax、active-Caspase 3 蛋白表达水平上调( $P$  值均 $<0.001$ ),同时伴随 MDM2 蛋白表达的降低( $P$  值均 $<0.05$ )。在 Huh7 细胞中,与 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组相比,30、60 和 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  组 CCNB1 蛋白表达降低( $P$  值均 $<0.01$ );60 和 90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组 p53 和 Bax 蛋白表达显著上调,MDM2 蛋白下调( $P$  值均 $<0.05$ );90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  浓度组 Bcl-2 蛋白表达下调、active-Caspase 3 蛋白表达上调( $P$  值均 $<0.01$ )。与 si-NC 组相比,HepG2 和 Huh7 细胞中 si-NC+TEC 组及 si-CCNB1 组 CCNB1、MDM2、Bcl-2 蛋白的表达水平均显著下调,p53 和 Bax 蛋白的表达水平均显著上调( $P$  值均 $<0.05$ )。与 OE-NC 组相比,HepG2 和 Huh7 细胞 OE-NC+TEC 组 CCNB1、MDM2 显著下调,p53 蛋白水平上调( $P$  值均 $<0.05$ ),而 OE-CCNB1 组的 CCNB1 和 MDM2 蛋白表达水平均显著上调,p53 蛋白表达水平则显著下调( $P$  值均 $<0.05$ );OE-CCNB1 组与 OE-CCNB1+TEC 组间 CCNB1、MDM2 及 p53 的蛋白表达水平比较差异均无统计学意义( $P$  值均 $>0.05$ )。**结论** TEC 可在体外抑制 HepG2 和 Huh7 细胞增殖、迁移,促进细胞凋亡,其机制可能是通过下调 CCNB1 表达,激活 p53 信号通路。

**关键词:** 花青苷类;肝肿瘤;Hep G2 细胞;细胞周期蛋白 B1**基金项目:** 贵州省科技厅基础研究计划项目(黔科合基础-ZK[2022]一般 452);国家自然科学基金地区基金(82160119, 82360122)

### Effect of tectorigenin on the viability, migration, and apoptosis of hepatoma cells and its mechanism

TANG Wenmin<sup>1</sup>, CHENG Mingliang<sup>2</sup>, ZHU Juanjuan<sup>2</sup>

1. School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China; 2. Department of Infectious Diseases, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China

Corresponding author: ZHU Juanjuan, 184184239@qq.com (ORCID: 0009-0002-4999-4248)

**Abstract: Objective** To investigate the effect of blueberry-derived tectorigenin (TEC) on hepatocellular carcinoma cell lines HepG2 and Huh7 and its mechanism. **Methods** TEC was extracted from blueberries and purified, and a bioinformatics analysis was performed to identify potential target genes and signaling pathways. HepG2 and Huh7 cell lines were used and divided into 0, 30, 60, and 90  $\mu\text{g/mL}$  groups according to the concentration of TEC. CCK-8 assay was used to measure cell viability; wound healing assay and Transwell assay were used to assess the migration ability of cells; flow cytometry was used to measure cell apoptosis rate; Western Blot was used to measure the protein expression levels of CCNB1, p53, MDM2, Bax, Bcl-2, and active-Caspase 3. Cell models with low CCNB1 expression (NC group, si-NC group, si-NC+TEC group, si-CCNB1 group, and si-CCNB1+TEC group) and CCNB1 overexpression (OE-NC group, OE-NC+TEC group, OE-CCNB1 group, and OE-CCNB1+TEC group) were established to validate the targets. A one-way analysis of variance or two factors analysis of variance was used for comparison of continuous data between multiple groups, and the least significant difference *t*-test was used for further comparison between two groups. The Wilcoxon signed rank sum test was used to compare the expression levels of genes between cancer tissue and paracancerous tissue. **Results** In HepG2 and Huh7 cells under the same concentration of TEC, cell viability at 24 hours of TEC intervention was significantly lower than that at 12 and 48 hours (all  $P < 0.05$ ), and at 24 hours of intervention, the TEC 90  $\mu\text{g/mL}$  group had a significantly lower cell viability than the other groups (all  $P < 0.05$ ). Therefore, TEC intervention for 24 hours at a concentration of 90  $\mu\text{g/mL}$  was used for subsequent studies. Compared with the TEC 0  $\mu\text{g/mL}$  group, the 30, 60, and 90  $\mu\text{g/mL}$  groups had significant reductions in the number of migrated cells and wound healing rate (all  $P < 0.05$ ), and compared with the NC group and si-NC group, the si-NC+TEC group and the si-CCNB1 group for HepG2 and Huh7 cells had significant reductions in the number of migrated cells and wound healing rate (all  $P < 0.05$ ). Compared with the NC group and si-NC group, the si-NC+TEC group and the si-CCNB1 group for HepG2 and Huh7 cells had a significant increase in cell apoptosis rate (all  $P < 0.05$ ). For HepG2 cells, compared with the 0  $\mu\text{g/mL}$  group, the 30, 60, and 90  $\mu\text{g/mL}$  groups had significant reductions in the protein expression levels of CCNB1 and Bcl-2 (all  $P < 0.05$ ), and the 60 and 90  $\mu\text{g/mL}$  groups had significant increases in the protein expression levels of p53, Bax, and active-Caspase 3 (all  $P < 0.001$ ) and a significant reduction in the protein expression level of MDM2 (both  $P < 0.05$ ). For Huh7 cells, compared with the 0  $\mu\text{g/mL}$  group, the 30, 60, and 90  $\mu\text{g/mL}$  groups had a significant reduction in the protein expression level of CCNB1 (all  $P < 0.01$ ); the 60 and 90  $\mu\text{g/mL}$  groups had significant increases in the protein expression levels of p53 and Bax and a significant reduction in the protein expression level of MDM2 (all  $P < 0.05$ ); the 90  $\mu\text{g/mL}$  group had a significant reduction in the protein expression level of Bcl-2 and a significant increase in the protein expression level of active-Caspase 3 (both  $P < 0.01$ ). Compared with the si-NC group, the si-NC+TEC group and the si-CCNB1 group for HepG2 and Huh7 cells had significant reductions in the protein expression levels of CCNB1, MDM2, and Bcl-2 and significant increases in the protein expression levels of p53 and Bax (all  $P < 0.05$ ). Compared with the OE-NC group, the OE-NC+TEC group for HepG2 and Huh7 cells had significant reductions in the protein expression levels of CCNB1 and MDM2 and a significant increase in the protein expression level of p53 (all  $P < 0.05$ ), while the OE-CCNB1 group had significant increases in the protein expression levels of CCNB1 and MDM2 and a significant reduction in the protein expression level of p53 (all  $P < 0.05$ ), and there were no significant differences in the protein expression level of CCNB1, MDM2, and p53 between the OE-CCNB1 group and the OE-CCNB1+TEC group (all  $P > 0.05$ ). **Conclusion** TEC can inhibit the proliferation and migration of HepG2 and Huh7 cells and promote their apoptosis in vitro, possibly by downregulating the expression of CCNB1 and activating the p53 signaling pathway.

**Key words:** Anthocyanins; Liver Neoplasms; Hep G2 Cells; Cyclin B1

**Research funding:** The Basic Research Program of Guizhou Provincial Science and Technology Department [Qiankehe Foundation-ZK (2022) General 452]; National Natural Science Foundation of China Regional Funds (82160119, 82360122)

肝细胞癌(HCC)是全球第三大癌症死因,发病率持续攀升。数据显示,2019年全球HCC病例达74万例,较1990年增长70%<sup>[1]</sup>。蓝莓果实中含有多种花青素、多酚和异黄酮等生物活性物质<sup>[2]</sup>。蓝莓汁灌胃大鼠的血清能诱导HepG2细胞凋亡及细胞周期阻滞,具体机制不

明<sup>[3]</sup>。前期课题组发现,蓝莓花青素中鸢尾黄素(tectorigenin, TEC)逆转肝细胞脂肪变性的作用最强。TEC属于天然的异黄酮类化合物,其药理活性广泛<sup>[4]</sup>。Jiang等<sup>[5]</sup>发现,TEC可通过线粒体介导途径降低HepG2细胞活力,诱导其凋亡,但具体机制不明。研究还发现,

TEC可通过诱导细胞周期G0/G1、G2/M期阻滞发挥抗癌作用<sup>[6-8]</sup>。基于此,本研究以人肝癌细胞HepG2、Huh7细胞为研究对象,研究TEC对HepG2、Huh7细胞的影响,并探讨TEC是否能够通过下调细胞周期蛋白B1(cyclin B1,CCNB1)激活p53信号通路促进肝癌细胞的凋亡。

## 1 材料与方法

1.1 细胞株 人肝癌细胞系HepG2、Huh7细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 仪器 高效液相色谱仪(上海安捷伦科技有限公司,型号Agilent 1260 Infinity II);酶标仪(美国赛默飞世尔科技有限公司,型号Multiskan FC);流式细胞仪(美国碧迪医疗器械有限公司,型号CNL17-A0271);WB曝光仪(美国赛默飞世尔科技有限公司,型号iBright CL1500)。

1.3 试剂 TEC标准品(贵州明涵生物科技有限公司,批号B21609);CCK-8试剂盒(上海伟寰生物科技有限公司,批号101839133EF5E);Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(上海爱必信生物科技有限公司,批号abs-50001);CCNB1(批号HO211217)、Bcl-2(批号H661309004)、Bax(批号H681-501027)、active-Caspase 3(活化的半胱氨酸蛋白酶蛋白3)(批号HO211101)、兔二抗(批号H651000028)均购自杭州华安生物技术有限公司;GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号GB15004-100);p53(批号T05141919\*)、MDM2(鼠双微体基因2蛋白)(批号R11211906)均购自沈阳万类生物科技有限公司;针对CCNB1基因(序列号NM\_031966)过表达质粒、小干扰RNA(siRNA)、转染试剂(批号241107)由上海吉玛制药技术有限公司购入。

1.4 TEC制备 取100 g蓝莓,用70%乙醇(含0%甲酸,料液比1:4)超声提取,抽滤后减压浓缩;用水分散后乙酸乙酯萃取,浓缩有机相至恒重;薄层层析纯化。使用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)对提取的TEC进行测定,以TEC标准品和鸮尾苷标准品为对照,评估提取物的纯度。根据实验设计,配置浓度为30、60、90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的TEC溶液。

1.5 生物信息学分析 从NCBI GEO数据库中下载原发性肝癌数据集:GSE101685、GSE6764、GSE121248,以 $P < 0.05$ 和 $|\log_2\text{FC}| > 1$ 的标准筛选差异基因,对差异基因进行KEGG分析。用GEPIA2分析GTEX数据库的77例肝癌组织、128例癌旁正常肝组织的转录组测序数据。

1.6 细胞活力检测 调整细胞密度至 $5 \times 10^4$ 个/孔,实验组根据实验所需予以给药或转染处理,加入含10% CCK-8显

色液的培养基,37  $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。使用酶标仪读取各孔在450 nm波长下的吸光度值(OD值)。

1.7 细胞划痕实验 调整细胞密度至 $2 \times 10^6$ 个/孔,使用100  $\mu\text{L}$ 移液枪头的尖端,在培养孔板中垂直于预先标记在背侧的基准线,平行划出三道划痕。分别加入2 mL含药培养基干预24 h,显微镜下观察0、24 h的细胞划痕愈合状况。

1.8 Transwell实验 将细胞密度调整至 $1.5 \times 10^5$ 个/孔,上室加入含药无血清培养基100  $\mu\text{L}$ ,下室加入500  $\mu\text{L}$ 含15%胎牛血清培养基,孵育24 h;小室取出后用4%多聚甲醛溶液固定细胞30 min;加入结晶紫染色20 min;显微镜下计数膜下层细胞。

1.9 细胞转染与实验分组 将HepG2和Huh7细胞接种于6孔板(70%~80%汇合度),按说明书分别进行CCNB1敲低实验和过表达实验。敲低实验分为5组:(1)NC组:正常组,未转染细胞,常规培养;(2)si-NC组:空载体siRNA转染组;(3)si-NC+TEC组:在si-NC基础上,加入90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TEC处理24 h;(4)si-CCNB1组:转染CCNB1 siRNA;(5)si-CCNB1+TEC组:转染CCNB1 siRNA后,加入90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TEC处理24 h。过表达实验分为4组:(1)OE-NC组:空载体质粒转染组;(2)OE-NC+TEC组:在OE-NC基础上,加入90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TEC处理24 h;(3)OE-CCNB1组:转染CCNB1过表达质粒;(4)OE-CCNB1+TEC组:转染CCNB1过表达质粒后,加入90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TEC处理24 h。转染使用si-CCNB1、CCNB1过表达质粒(NM\_031966)和GP-transfect-Mate转染试剂。

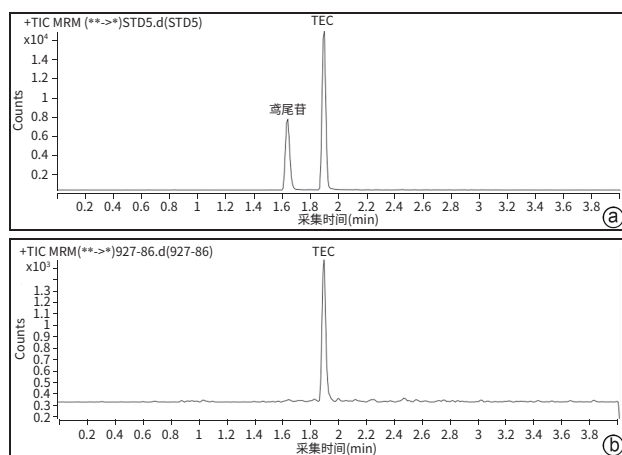
1.10 流式细胞仪检测凋亡 收集不同分组的HepG2、Huh7细胞,加入300  $\mu\text{L}$  1 $\times$ Binding Buffer重悬细胞,随后加入AnnexinV-FITC和PI染液各5  $\mu\text{L}$ 。轻轻混匀后于室温避光孵育15 min。最后在1 h内使用流式细胞仪进行检测。

1.11 Western Blot法检测相关蛋白的表达 收集不同处理组的细胞,加入RIPA裂解液提取总蛋白质,BCA法测定蛋白质浓度,进行SDS-PAGE电泳,湿转到PVDF膜上,用封闭液封闭,一抗孵育过夜,室温孵育二抗2 h,曝光成像,使用Image J分析蛋白灰度值。

1.12 统计学方法 采用SPSS Statistics 27.0和GraphPad Prism 10.0软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析或双因素方差分析,进一步两两比较采用LSD- $t$ 检验。癌组织与癌旁组织基因表达量的比较采用Wilcoxon符号秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 TEC纯度测定 提取纯化得到的TEC经HPLC检测,总杂质峰面积占比<5%,表明TEC纯度大于95%(图1)。



注:a, 鸢尾苷与TEC标准品的HPLC图谱;b, 实验所得提取物的HPLC图谱。

图1 HPLC图谱

Figure 1 HPLC chromatograms

2.2 生物信息学分析 KEGG通路富集分析结果显示,差异表达基因在细胞周期通路上存在显著富集,其中共有6个与细胞周期相关的基因表达显著上调。qRT-PCR发现CCNB1在肝癌细胞HepG2、Huh7中表达最高。CCNB1在肝癌组织中的表达高于癌旁组织,且CCNB1的高表达与患者总生存期及无病生存期缩短显著相关(图2)。

2.3 TEC对肝癌细胞活力的影响 在HepG2、Huh7细胞中,经不同浓度TEC干预12、24、48 h后,同一TEC浓度干预下,24 h时间点的细胞存活率均显著低于12 h和48 h( $P$ 值均<0.05);并且,在干预时间为24 h时,TEC浓度90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的细胞存活率均显著低于其他浓度组( $P$ 值均<0.05)(表1)。故采用TEC浓度为90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、干预时长为24 h进行后续实验。

2.4 TEC对肝癌细胞迁移能力的影响 与对照组(0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )相比,经30、60、90  $\mu\text{g}/\text{mL}$  TEC干预24 h后,HepG2、Huh7细胞的迁移数量及划痕愈合率均显著降低( $P$ 值均<0.05)(图3、4)。

与NC组及si-NC组相比,HepG2和Huh7细胞si-NC+TEC组及si-CCNB1组的迁移细胞数目、划痕愈合率均出现了明显的下降( $P$ 值均<0.05);与si-CCNB1组相比,si-CCNB1+TEC组迁移细胞数目及划痕愈合率并无明显变化( $P$ 值均>0.05)(图5、6)。

表1 HepG2和Huh7细胞经不同浓度TEC干预后各组存活率比较

Table 1 The effect of different concentrations of TEC on the survival rate of HepG2 and Huh7 cells

TEC 浓度 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	细胞存活率		
	12 h	24 h	48 h
HepG2			
0	1.000 <sup>1)</sup>	1.000 <sup>1)</sup>	1.000 <sup>1)</sup>
30	0.829±0.102 <sup>1)2)</sup>	0.647±0.042 <sup>1)</sup>	0.911±0.090 <sup>1)2)</sup>
60	0.749±0.087 <sup>1)2)</sup>	0.588±0.064 <sup>1)</sup>	0.839±0.034 <sup>2)</sup>
90	0.585±0.062 <sup>2)</sup>	0.516±0.055	0.742±0.096 <sup>2)</sup>
Huh7			
0	1.000 <sup>1)</sup>	1.000 <sup>1)</sup>	1.000
30	0.937±0.052 <sup>1)2)</sup>	0.803±0.029 <sup>1)</sup>	0.983±0.034 <sup>2)</sup>
60	0.843±0.038 <sup>2)</sup>	0.752±0.057 <sup>1)</sup>	0.987±0.051 <sup>2)</sup>
90	0.812±0.131 <sup>2)</sup>	0.734±0.063	0.913±0.092 <sup>2)</sup>

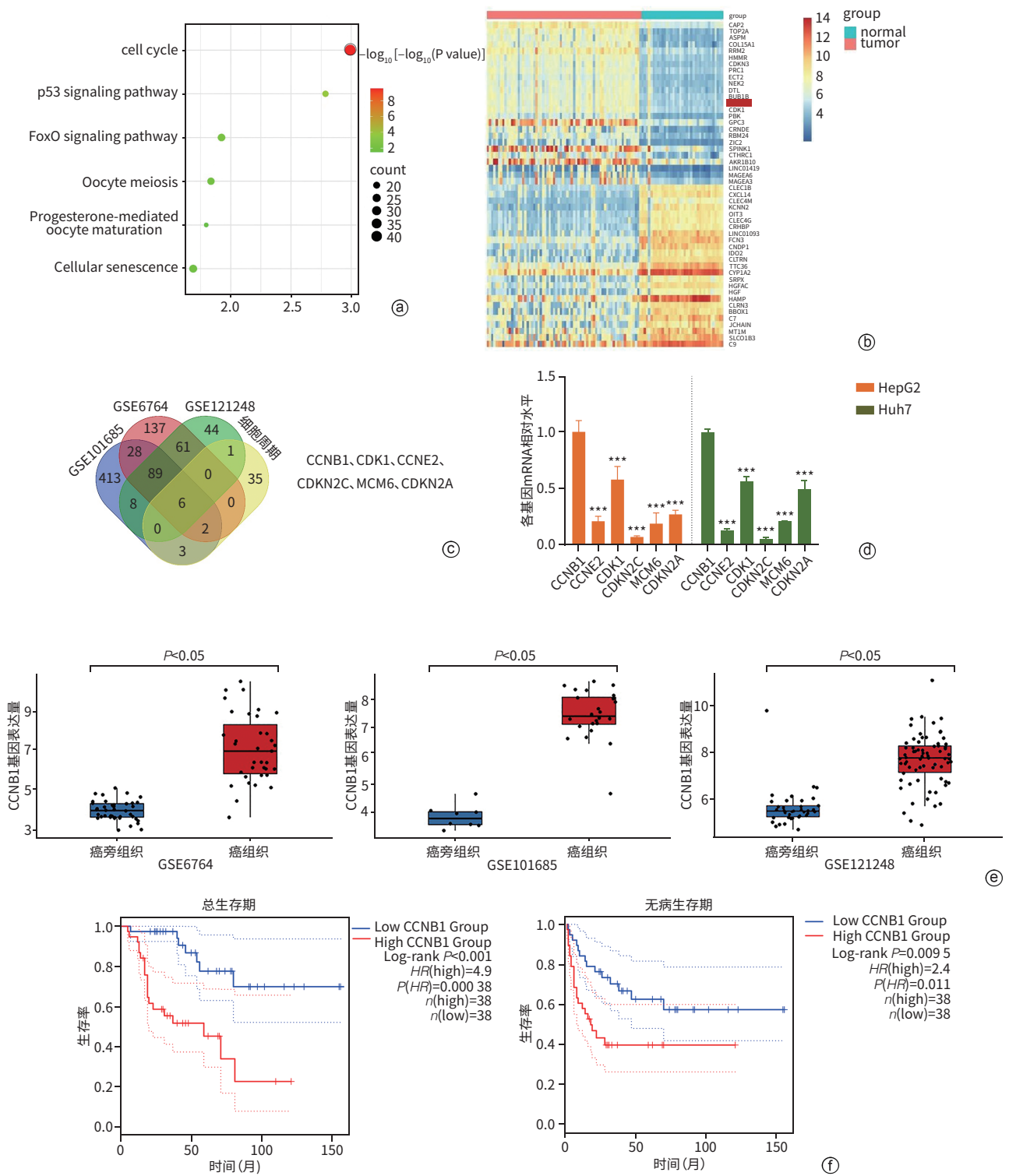
注:与同一时间点内TEC浓度为90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组比较,1)  $P$ <0.05;与同一TEC浓度内干预时长为24 h比较,2)  $P$ <0.05。

2.5 TEC对肝癌细胞凋亡的影响 与NC组及si-NC组相比,HepG2和Huh7细胞si-NC+TEC组、si-CCNB1组的细胞凋亡率均显著上升( $P$ 值均<0.05);si-CCNB1+TEC组与si-CCNB1组相比并没有显著改变( $P$ 值均>0.05)(图7)。

2.6 TEC对肝癌细胞相关蛋白表达的影响 在HepG2细胞中,与0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组相比,30、60、90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组均表现出CCNB1和Bcl-2蛋白表达水平的下调( $P$ 值均<0.05),60和90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组p53、Bax、active-Caspase 3蛋白表达水平上调( $P$ 值均<0.001),同时伴随MDM2蛋白表达的降低( $P$ 值均<0.05)。在Huh7细胞中,与0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组相比,30、60和90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组CCNB1蛋白表达降低( $P$ 值均<0.01);60和90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组p53和Bax蛋白表达显著上调,MDM2蛋白下调( $P$ 值均<0.05);90  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组Bcl-2蛋白表达下调、active-Caspase 3蛋白表达上调( $P$ 值均<0.01)(图8)。

与si-NC组相比,HepG2和Huh7细胞中si-NC+TEC组及si-CCNB1组CCNB1、MDM2、Bcl-2蛋白的表达水平均显著下调,p53和Bax蛋白的表达水平均显著上调( $P$ 值均<0.05)。然而,si-CCNB1组与si-CCNB1+TEC组CCNB1、p53、MDM2、Bcl-2及Bax的蛋白表达水平比较,均未观察到显著差异( $P$ 值均>0.05)(图9)。

与OE-NC组相比,HepG2和Huh7细胞OE-NC+TEC组CCNB1、MDM2显著下调,p53蛋白水平上调( $P$ 值均<0.05),而OE-CCNB1组的CCNB1和MDM2蛋白表达水平均显著上调,p53蛋白表达水平则显著下调( $P$ 值均<0.05);然而,OE-CCNB1组与OE-CCNB1+TEC组CCNB1、MDM2及p53蛋白表达水平均未呈现统计学差异( $P$ 值均>0.05)(图10)。



注: a, GSE101685、GSE6764、GSE121248 数据集中肝癌差异表达基因 KEGG 富集分析; b, 肝癌组织和癌旁组织关键基因表达差异热图; c, 数据集中上调的差异基因与细胞周期相关基因交集; d, HepG2、Huh7 细胞 CCNB1、CDK1、CCNE2、CDKN2C、MCM6、CDKN2A mRNA 相对表达量(与 CCNB1 相比,  $***P < 0.001, n=3$ ); e, CCNB1 在肝癌组织与癌旁组织中的表达差异; f, GTEX 数据库中 CCNB1 表达与肝癌患者的总生存期及无病生存期的关系。

图2 CCNB1在肝癌组织中高表达  
Figure 2 CCNB1 is highly expressed in hepatocellular carcinoma tissues

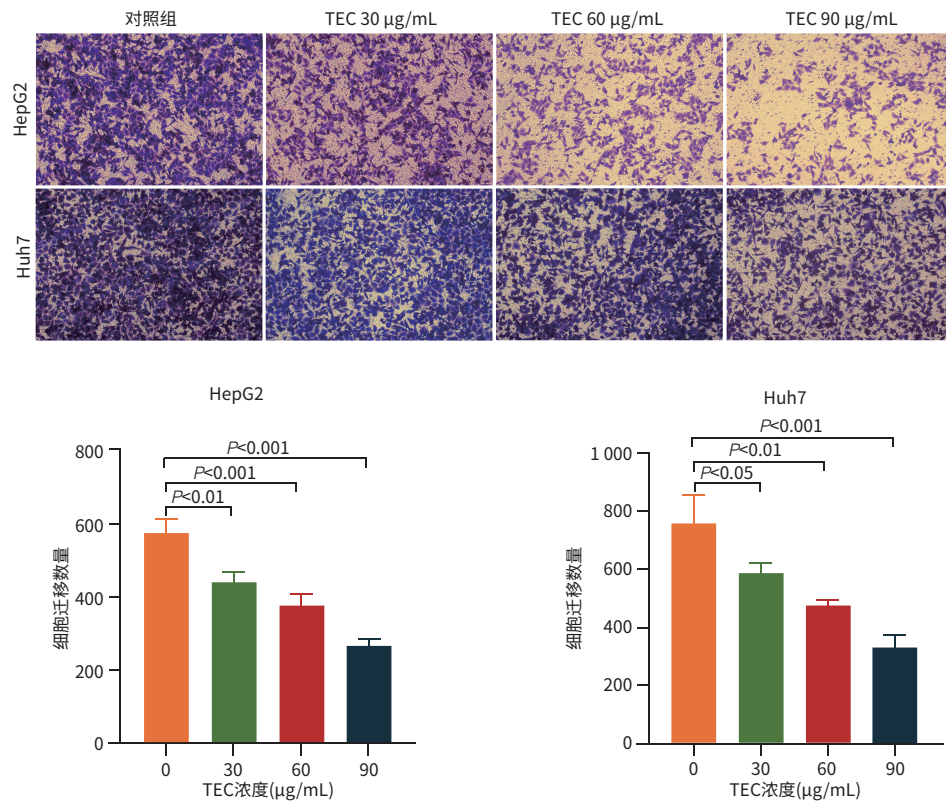


图3 各组细胞Transwell实验结果(结晶紫染色, ×100)  
 Figure 3 The results of Transwell experiment in each group of cells (crystal violet staining, ×100)

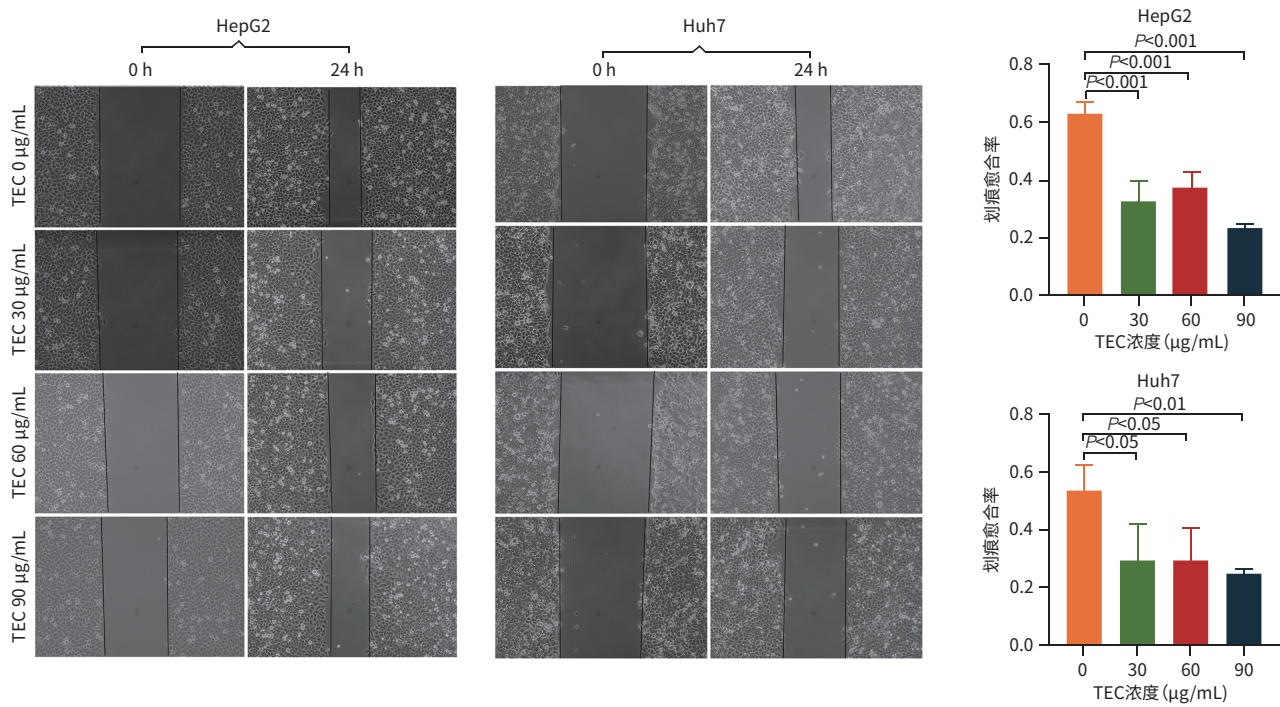


图4 各组细胞划痕实验结果  
 Figure 4 The results of cell scratch test in each group

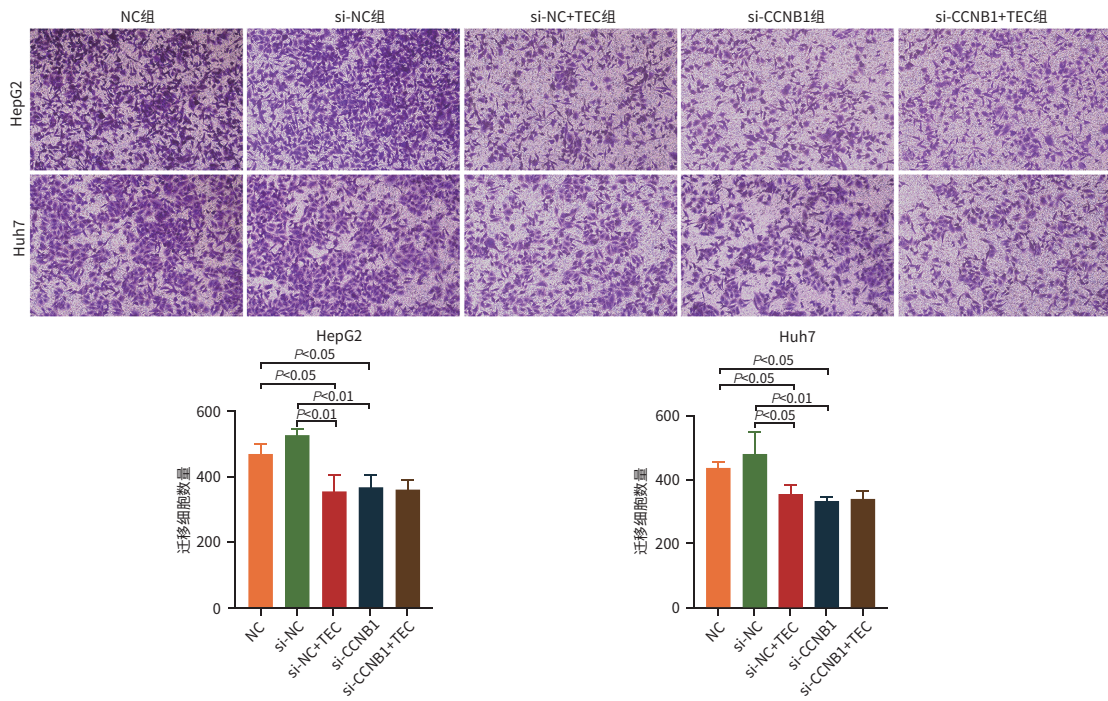


图5 敲低CCNB1后各组细胞Transwell实验结果(结晶紫染色, ×100)

Figure 5 Results of Transwell assay after CCNB1 knockdown in each group of cells (crystal violet staining, ×100)

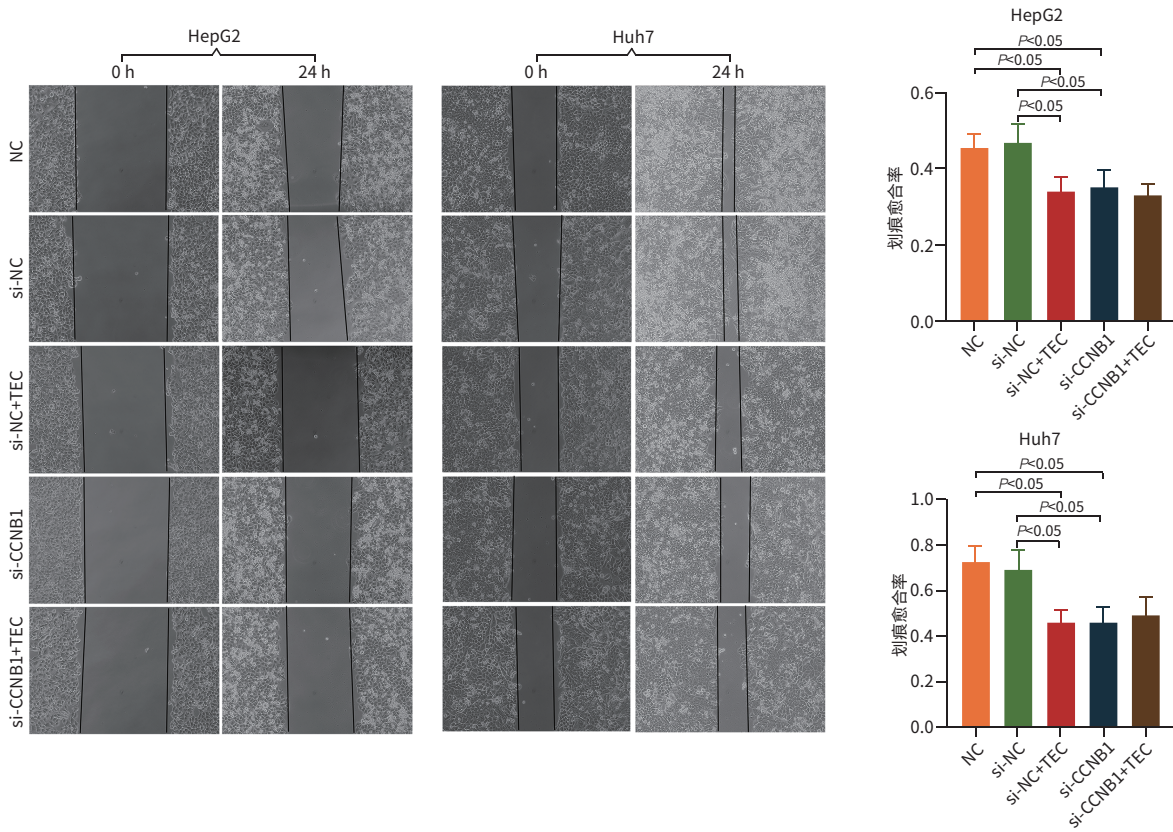


图6 敲低CCNB1后各组细胞划痕实验结果

Figure 6 Scratch images of cells in each group after knockdown of CCNB1

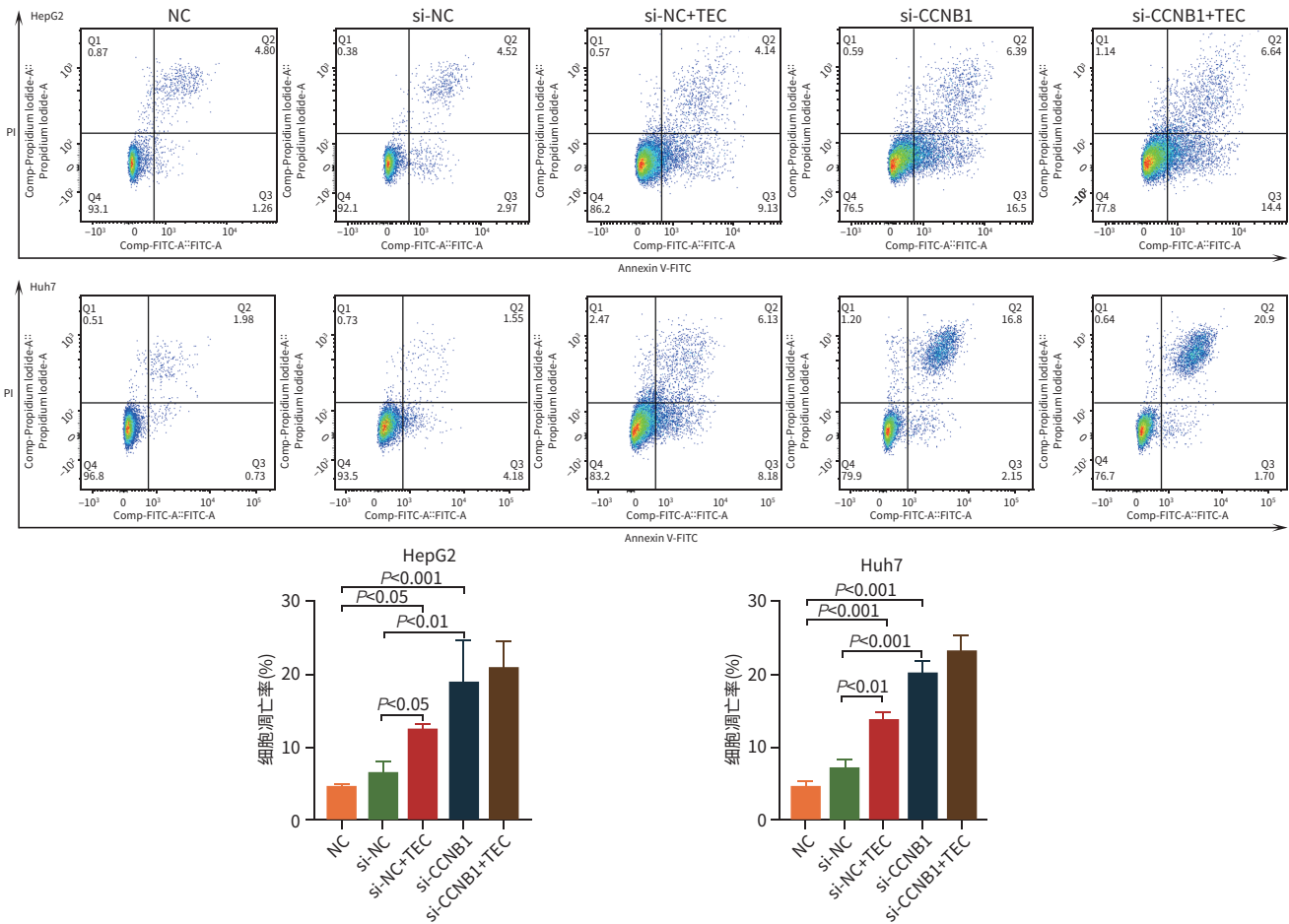


图7 敲低CCNB1后各组细胞的凋亡情况比较

Figure 7 Comparison of apoptosis in different groups of cells after knockdown of CCNB1

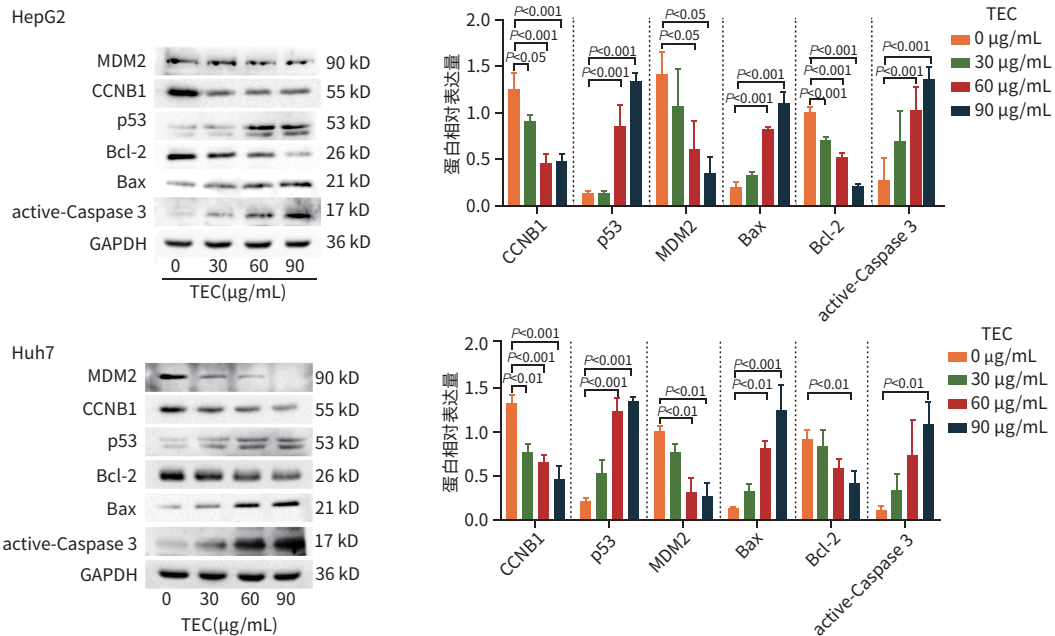


图8 各组细胞蛋白表达水平比较

Figure 8 Comparison of protein expression levels among different groups of cells

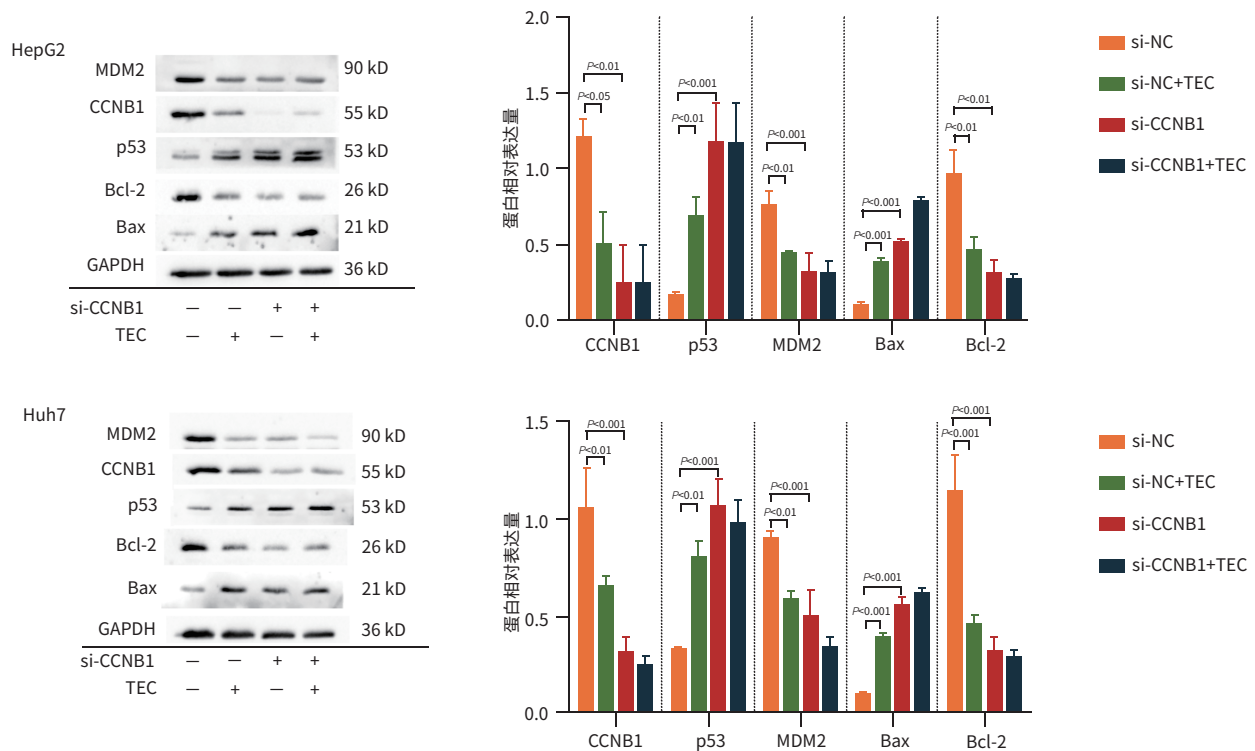


图9 敲低CCNB1后各组细胞蛋白表达水平比较

Figure 9 Comparison of protein expression levels in different groups of cells after knockdown of CCNB1

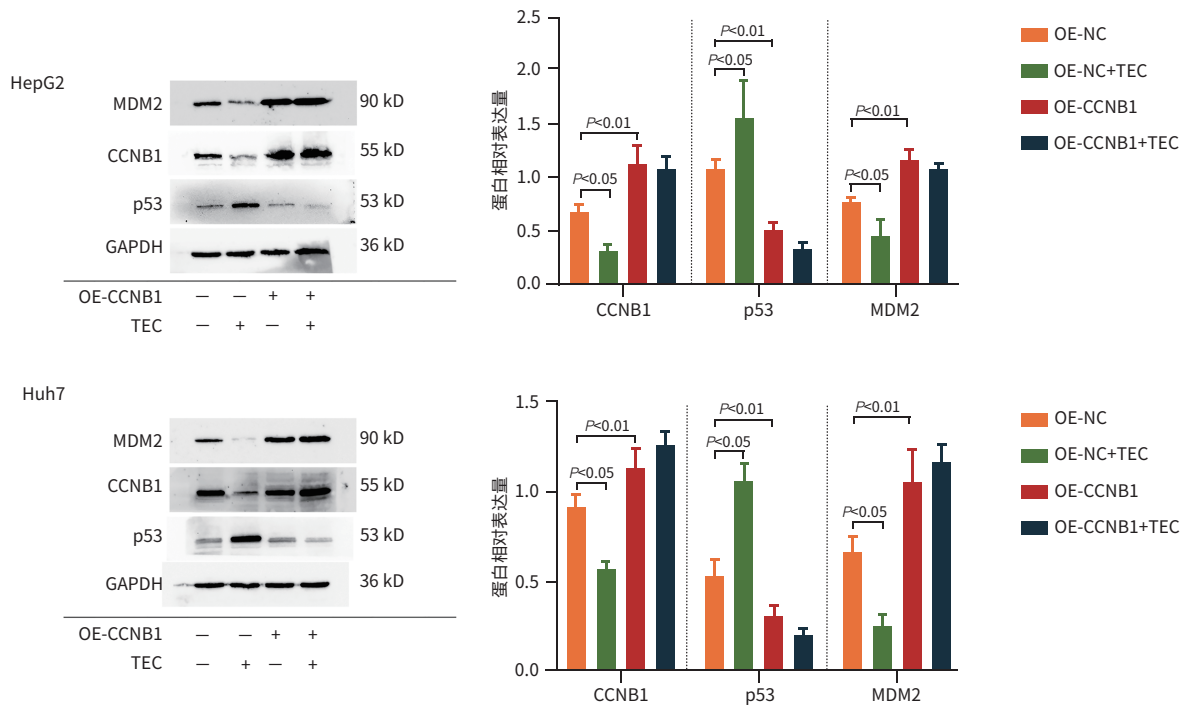


图10 过表达CCNB1后各组细胞蛋白表达水平比较

Figure 10 Comparison of protein expression levels in different groups of cells after overexpression of CCNB1

### 3 讨论

分子靶向和免疫治疗虽用于晚期肝癌,但存在费用高、副作用大、疗效有限等问题。开发安全有效的辅助治疗药物具有重要意义<sup>[9]</sup>,天然产物仍是抗肿瘤药物研发的重要基础<sup>[10]</sup>。TEC是一种天然异黄酮化合物,具有显著抗肿瘤活性,荸荠皮提取物含12.41 mg/g TEC,可抑制人肺泡腺癌细胞系A549细胞生长<sup>[11]</sup>。诱导癌细胞凋亡是癌症治疗的关键。本研究发现TEC可抑制HepG2、Huh7细胞增殖和迁移,流式细胞术提示高剂量TEC可增加HepG2、Huh7细胞凋亡率,表明TEC在体外抑制HepG2、Huh7细胞增殖和迁移能力可能与其能激活细胞的凋亡途径有关。Western Blot结果提示,TEC可上调HepG2和Huh7细胞中Bax与active-Caspase 3蛋白的表达水平,抑制Bcl-2蛋白的表达。Bax作为p53直接下游靶标,可直接被p53激活,透化线粒体并启动凋亡程序<sup>[12]</sup>。而活化的Caspase 3是细胞凋亡过程中的关键执行蛋白,Bcl-2通过调控线粒体外膜通透性,减少细胞色素c释放实现抗凋亡功能,研究从蛋白层面证实TEC能通过促进细胞凋亡来抑制肝癌细胞。

细胞增殖增强和周期加速是恶性肿瘤的关键特征,Fang等<sup>[8]</sup>发现G2/M期人肺癌细胞COR-L23细胞百分比的增加与TEC浓度成正比,提示TEC可通过G2/M期细胞周期停滞发挥抗癌作用。本研究聚焦的CCNB1是调节细胞G2/M期进程的关键周期蛋白,细胞入G2期后CCNB1表达渐升,与CDK1(细胞周期蛋白依赖性激酶1)结合成CCNB1-CDK1复合物,驱使细胞由G2期进M期<sup>[13]</sup>。多种人类癌症如结直肠癌<sup>[14]</sup>、乳腺癌<sup>[15]</sup>和胰腺癌<sup>[16]</sup>中观察到CCNB1过表达,尤其是肝癌中,已观察到肝癌组织中CCNB1的表达显著高于正常组织,并且其高表达与患者生存期缩短相关<sup>[17]</sup>,这一发现与本研究的生物信息学分析结果一致,表明其在肝癌中作为潜在诊断和治疗标志物的价值。p53基因是公认的肿瘤抑制基因<sup>[18]</sup>,MDM2蛋白作为p53蛋白的主要负调节因子,MDM2的N端p53结合域与p53的N端激活域结合,导致p53被标记泛素化降解<sup>[19]</sup>,研究发现肝癌中p53信号通路再激活伴随MDM2阻抑<sup>[20]</sup>。本研究通过Western Blot实验发现TEC能够下调肝癌细胞中CCNB1、MDM2蛋白表达,上调p53蛋白表达,表现出显著的抗肝癌活性。同时,CCNB1与p53密切相关<sup>[21]</sup>。既往研究发现,CCNB1沉默可通过激活p53信号通路抑制胰腺癌细胞增殖并促进细胞凋亡<sup>[22]</sup>,本研究在肝癌细胞中也得出了相似的结果。为进一步阐述TEC抗

肝癌细胞机制,本研究构建了HepG2、Huh7细胞中CCNB1低表达模型,结果显示,敲低CCNB1后,细胞MDM2蛋白表达下降,p53蛋白表达上升,流式细胞检测结果提示细胞凋亡率显著增加,结果表明CCNB1在肝癌细胞的凋亡过程中起着关键作用,其机制可能与激活p53信号通路有关。值得注意的是,当使用高剂量TEC对敲低CCNB1后的肝癌细胞进行干预时,未观察到对肝癌细胞的明显额外抑制作用,表明TEC可能通过抑制CCNB1的表达来抑制肝癌生长。类似地,Xia等<sup>[23]</sup>发现增强CCNB1 mRNA翻译可降低p53蛋白表达。本研究还构建了HepG2、Huh7细胞CCNB1过表达细胞模型,发现细胞MDM2蛋白表达上调,p53蛋白表达下调,且加入TEC后对过表达细胞的CCNB1、MDM2、p53蛋白表达无明显影响。

综上,本研究发现TEC在体外可抑制HepG2、Huh7细胞增殖、迁移,促进细胞凋亡,其机制可能是通过下调CCNB1表达,激活p53信号通路。本研究为阐明TEC的抗肝癌机制提供了重要线索,但仍存在局限(如未检测细胞周期、仅完成体外实验)。后续将重点开展TEC的体内抗肝癌效应研究。

**利益冲突声明:** 本文不存在任何利益冲突。

**作者贡献声明:** 唐文敏负责实施研究,采集数据,分析/解析数据,起草文章,修改文章,统计分析;程明亮负责对文章的知识性内容审阅,研究指导;祝娟娟负责设计实验,对文章的知识性内容审阅,统计分析,获取研究经费。

### 参考文献:

- [1] TOH MR, WONG EYT, WONG SH, et al. Global epidemiology and genetics of hepatocellular carcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2023, 164(5): 766-782. DOI: 10.1053/j.gastro.2023.01.033.
- [2] SILVA S, COSTA EM, VEIGA M, et al. Health promoting properties of blueberries: A review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2020, 60(2): 181-200. DOI: 10.1080/10408398.2018.1518895.
- [3] ZHAN W, LIAO X, YU L, et al. Effects of blueberries on migration, invasion, proliferation, the cell cycle and apoptosis in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(5): 579-584. DOI: 10.3892/br.2016.774.
- [4] RONG J, FU F, HAN CX, et al. Tectorigenin: A review of its sources, pharmacology, toxicity, and pharmacokinetics[J]. *Molecules*, 2023, 28(15): 5904. DOI: 10.3390/molecules28155904.
- [5] JIANG CP, DING H, SHI DH, et al. Pro-apoptotic effects of tectorigenin on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(15): 1753-1764. DOI: 10.3748/wjg.v18.i15.1753.
- [6] YEH LT, HSU LS, CHUNG YH, et al. Tectorigenin inhibits glioblastoma proliferation by G0/G1 cell cycle arrest[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 56(12): 681. DOI: 10.3390/medicina56120681.
- [7] ZENG LW, YUAN SF, SHEN JL, et al. Suppression of human breast cancer cells by tectorigenin through downregulation of matrix metalloproteinases and MAPK signaling in vitro[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 3935-3943. DOI: 10.3892/mmr.2017.8313.

- [8] FANG R, HOUGHTON PJ, HYLANDS PJ. Cytotoxic effects of compounds from *Iris tectorum* on human cancer cell lines[J]. *J Ethnopharmacol*, 2008, 118(2): 257-263. DOI: 10.1016/j.jep.2008.04.006.
- [9] YANG YJ, KE TY, LIU SX, et al. Synergistic sensitization of apatinib mesylate and radiotherapy on hepatocarcinoma cells in vitro[J]. *J Jilin Univ (Med Edit)*, 2024, 50(4): 1009-1015. DOI: 10.13481/j.1671-587X.2024-04015.  
杨永净, 柯天洋, 刘士新, 等. 甲磺酸阿帕替尼联合放疗对肝癌HepG2细胞的体外协同增敏作用[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(4): 1009-1015. DOI: 10.13481/j.1671-587X.202404015.
- [10] NAEEM A, HU PY, YANG M, et al. Natural products as anticancer agents: Current status and future perspectives[J]. *Molecules*, 2022, 27(23): 8367. DOI: 10.3390/molecules27238367.
- [11] ZHAN G, PAN LQ, TU K, et al. Antitumor, antioxidant, and nitrite scavenging effects of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*) peel flavonoids[J]. *J Food Sci*, 2016, 81(10): H2578-H2586. DOI: 10.1111/1750-3841.13434.
- [12] KIM EM, JUNG CH, KIM J, et al. The p53/p21 complex regulates cancer cell invasion and apoptosis by targeting bcl-2 family proteins[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(11): 3092-3100. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2098.
- [13] GAVET O, PINES J. Progressive activation of CyclinB1-Cdk1 coordinates entry to mitosis[J]. *Dev Cell*, 2010, 18(4): 533-543. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.02.013.
- [14] FANG YF, YU H, LIANG X, et al. Chk1-induced CCNB1 overexpression promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2014, 15(9): 1268-1279. DOI: 10.4161/cbt.29691.
- [15] LUNDGREN C, AHLIN C, HOLMBERG L, et al. Cyclin E1 is a strong prognostic marker for death from lymph node negative breast cancer. A population-based case-control study[J]. *Acta Oncol*, 2015, 54(4): 538-544. DOI: 10.3109/0284186X.2014.965274.
- [16] ZHOU L, LI J, ZHAO YP, et al. The prognostic value of Cyclin B1 in pancreatic cancer[J]. *Med Oncol*, 2014, 31(9): 107. DOI: 10.1007/s12032-014-0107-4.
- [17] ZOU YP, RUAN SY, JIN L, et al. CDK1, CCNB1, and CCNB2 are prognostic biomarkers and correlated with immune infiltration in hepatocellular carcinoma[J]. *Med Sci Monit*, 2020, 26: e925289. DOI: 10.12659/MSM.925289.
- [18] WANG HL, GUO M, WEI HD, et al. Targeting p53 pathways: Mechanisms, structures, and advances in therapy[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 92. DOI: 10.1038/s41392-023-01347-1.
- [19] KOO N, SHARMA AK, NARAYAN S. Therapeutics targeting p53-MDM2 interaction to induce cancer cell death[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(9): 5005. DOI: 10.3390/ijms23095005.
- [20] LOU J, ZHAO L, ZHU YJ, et al. Effect of Fuzheng Ruanjian Anticancer Formula on malignant biological behaviors of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by regulating Akt/MDM2/P53 signaling pathway[J]. *J Jilin Univ (Med Edit)*, 2024, 50(6): 1654-1663. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20-240619.  
娄静, 赵雷, 朱岩洁, 等. 扶正软坚抗癌方调控Akt/MDM2/P53信号通路对肝癌HepG2细胞恶性生物学行为的影响[J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2024, 50(6): 1654-1663. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20240619.
- [21] YUAN JP, YAN RL, KRÄMER A, et al. Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in human tumor cells[J]. *Oncogene*, 2004, 23(34): 5843-5852. DOI: 10.1038/sj.onc.1207757.
- [22] ZHANG H, ZHANG X, LI X, et al. Effect of CCNB1 silencing on cell cycle, senescence, and apoptosis through the p53 signaling pathway in pancreatic cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2018, 234(1): 619-631. DOI: 10.1002/jcp.26816.
- [23] XIA P, ZHANG H, XU KQ, et al. MYC-targeted WDR4 promotes proliferation, metastasis, and sorafenib resistance by inducing CCNB1 translation in hepatocellular carcinoma[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 691. DOI: 10.1038/s41419-021-03973-5.

收稿日期: 2025-03-24; 录用日期: 2025-04-14

本文编辑: 林姣

引证本文: TANG WM, CHENG ML, ZHU JJ. Effect of tectorigenin on the viability, migration, and apoptosis of hepatoma cells and its mechanism[J]. *J Clin Hepatol*, 2025, 41(10): 2082-2092.

唐文敏, 程明亮, 祝娟娟. 鸢尾黄素(TEC)对肝癌细胞活力、迁移和凋亡的影响及其机制[J]. *临床肝胆病杂志*, 2025, 41(10): 2082-2092.

读者·作者·编者

## 《临床肝胆病杂志》对作者姓名汉语拼音的书写要求

1. 两/三字姓名,姓全拼大写,名全拼首字母大写。如:王阳,WANG Yang;王少阳,WANG Shaoyang。
2. 复姓姓名,复姓全拼大写,名全拼首字母大写。如:诸葛正我,ZHUGE Zhengwo。
3. 少数民族语姓名,按照民族语用汉语拼音字母音译转写。如:阿卜杜艾尼·啊卜力孜,ABUDUAINI Abulizi。
4. 吕、旅、闰等姓氏,拼音为“LYU”。如:闫艳,LYU Yan。