

王春玲,文晓东. 八月札乙醇提取物对人肝癌细胞抑制增殖、促进凋亡及转录组学分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2024, 34(8): 60-71.

Wang CL, Wen XD. Transcriptome analysis of ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on cell proliferation inhibitory functions and apoptosis promotion in human liver cells [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(8): 60-71.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.08.007

八月札乙醇提取物对人肝癌细胞抑制增殖、促进凋亡及转录组学分析

王春玲^{1,2}, 文晓东^{3*}

(1.广西中医药大学广西高校中药神经-代谢及免疫药理重点实验室, 南宁 530200; 2.广西中医药大学药学院, 南宁 530200; 3.广西中医药大学附属瑞康医院脑病一区, 南宁 530011)

【摘要】 目的 探讨八月札乙醇提取物(ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz, EEATK)对人肝癌细胞增殖、凋亡的影响及可能作用机制。方法 体外培养人肝癌细胞(Hep3B 和 Huh-7), 设置空白对照组、索拉菲尼(Sorafenib, 5 μ mol/L)组及 EEATK 组(0.10、0.15、0.20、0.3 mg/mL), 分别给予对应药物干预, 采用 CCK-8 法检测不同分组的药物干预对肝癌细胞活力的影响, 筛选最佳作用浓度用于后续实验; 采用 EdU 染色法、克隆形成实验、Annexin V-FITC/PI 双染法观察 EEATK(0.15 mg/mL)对人肝癌细胞(Hep3B 和 Huh-7)增殖和凋亡的影响; 转录组测序分析 EEATK 调控 Hep3B 细胞增殖、凋亡的差异表达基因; 使用基因本体论(gene ontology, GO)和京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)分析差异表达基因的功能及富集通路; 并联合比较毒物基因组学(Comparative Toxicogenomics Database, CTD)数据库分析与肝癌增殖、凋亡相关基因, 应用 qRT-PCR 验证关键基因表达情况。结果 与空白对照组相比, 随着 EEATK 浓度增加, 能够显著抑制 Hep3B 和 Huh-7 细胞的活力($P<0.01$); 0.15 mg/mL 的 EEATK 作用肝癌细胞后, EdU 阳性细胞率、细胞克隆形成率均显著降低(均 $P<0.01$), 同时细胞凋亡率显著增加($P<0.01$); Hep3B 细胞转录组测序结果分析显示, 与空白对照组相比, EEATK 引起 1577 个基因表达发生显著改变($P<0.01$), 其中表达上调差异基因 942 个, 表达下调差异基因 635 个。GO 功能富集分析发现差异表达基因主要显著富集于胆固醇合成、炎症、细胞外基质中。KEGG 通路分析提示 EEATK 可能主要通过转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号通路及核因子- κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)信号通路发挥抑癌作用。CTD 分析及 qRT-PCR 检测显示 EEATK 可引起 BIRC5、细胞周期蛋白依赖性激酶 1(cyclin-dependent kinases 1, CDK1)等细胞凋亡相关基因的表达显著下调($P<0.01$), 周期蛋白抑制因子 1A(cyclin dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A)、脯氨酸羟化酶 3(egl-9 family hypoxia inducible factor 3, EGLN3)的表达显著上调($P<0.01$); 同时, 可引起 FAM83D(family with sequence similarity 83D, FAM83D)、MKI-67 等细胞增殖相关基因显著下调($P<0.01$), MYC、叉头框蛋白 1(forkhead box C1, FOXC1)等表达显著上调($P<0.01$)。结论 EEATK 可抑制细胞增殖并诱导凋亡, 通过调节 TGF- β 及 NF- κ B 信号通路中相关基因的表达而发挥抗肝癌作用。

【关键词】 八月札; 肝癌; 增殖; 凋亡; 转录组学

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2024) 08-0060-12

Transcriptome analysis of ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz on cell proliferation inhibitory functions and apoptosis promotion in human liver cells

【基金项目】 广西壮族自治区中医药管理局课题(GXZYA20220096); 广西中医药大学校级科研项目(2023MS016)。

【作者简介】 王春玲(1974—), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 抗肿瘤药物研究。E-mail: 409116325@qq.com

【通信作者】 文晓东(1973—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 抗肿瘤药物研究。E-mail: 1021643438@qq.com

WANG Chunling^{1,2}, WEN Xiaodong^{3*}

(1. Key Laboratory of TCM Neuro-Metabolism and Immunopharmacology of Guangxi Education Department, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China. 2. College of Pharmacy, Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200. 3. Brain Disease Area 1, Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011)

[Abstract] Objective To investigate the effects of ethanol extract of *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz (EEATK) on the proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma Hep3B and Huh-7 cells and to explore its underlying mechanism. **Methods** Human Hep3B cells and Huh-7 cells were cultured *in vitro* and separated into control group, Sorafenib group (5 μmol/L), and EEATK groups (0.10 mg/mL, 0.15 mg/mL, 0.20 mg/mL, 0.3 mg/mL) and given the corresponding drug interventions. A CCK-8 assay was used to measure the impact of the different interventions on the proliferation of Hep3B cells and Huh-7 cells to screen the optimal action-inducing concentrations for subsequent experiments. EdU staining assay and colony formation assay were used to explore the effect of EEATK on proliferation, and Annexin V-FITC/PI double-staining assay was applied for apoptotic rate analysis. Transcriptome sequencing (RNA-seq) technology was used to analyze differentially expressed genes (DEGs) related to cell proliferation and apoptosis in the control group and EEATK (0.15 mg/mL) groups of Hep3B cells. DEGs were analyzed for function with Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment. The Comparative Toxicogenomics Database(CTD) was used to validate the expression of key proteins related to cell proliferation and apoptosis, and the findings were verified by qRT-PCR. **Results** Compared with the control group, different concentration of EEATK significantly inhibited the activity of Hep3B and Huh-7 cells ($P < 0.01$). Hep3B cells were treated with 0.15 mg/mL EEATK, the EdU-positive cell rate and clone formation rate significantly decreased (all $P < 0.01$). At the same time, the apoptotic rate of the EEATK group significantly increased ($P < 0.01$). Transcriptome sequencing of Hep3B cells showed that EEATK induced significant changes in the expression of 1577 genes ($P < 0.01$), of which 942 were up-regulated and 635 were down-regulated compared with the control group. GO functional enrichment analysis revealed that the DEGs were mainly enriched for cholesterol synthesis, inflammation, and extracellular matrix. KEGG pathway analysis showed that EEATK plays an anti-tumor role, mainly through the TFG-β and NF-κB signaling pathways. CTD and qRT-PCR analysis showed that EEATK significantly down-regulated the expression of apoptosis-related genes such as BIRC5 and CDK1 ($P < 0.01$) and significantly upregulated the expression of CDKN1A and EGLN3 ($P < 0.01$). At the same time, EEATK caused the significant downregulation of cell-proliferation-related genes such as FAM83D and MKI-67 ($P < 0.01$), and significantly upregulated the expression of MYC and FOXC1 ($P < 0.01$). **Conclusions** EEATK can inhibit cell proliferation and induce apoptosis in a manner that may be related to the regulation of TGF-β and NF-κB signal pathway-related gene expression.

[Keywords] *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz; hepatic carcinoma; proliferation; apoptosis; transcriptomics
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝细胞癌(hepatic carcinoma,HCC)是最常见的恶性肿瘤之一,发病率和死亡率在不断上升。我国肝癌患者的5年平均生存率仅为12.1%^[1]。目前,化学药物治疗是临床上治疗肝癌的常用手段,但长期服用会产生耐药性导致治疗低效,寻找高效低毒的药物对于肝癌的治疗具有重要意义。凋亡受阻和无限增殖是肿瘤细胞的主要特点,抑制细胞增殖和促进凋亡可作为治疗HCC一种有效的方法。广西民间应用八月札作为抗肝癌药物已有较长的历史,效果显著。本课题组前期研究从细胞及动物水平联合发现EEATK具有明显的抗肝癌活性^[2],但其抗肝癌的作用机制尚不清楚。本研究通

过体外实验结合转录组学初步阐明其抗肝癌的作用机制,为八月札的深入研究和临床应用提供实验依据,对进一步推动八月札的科学开发利用具有重要的临床应用价值。

1 材料和方法

1.1 细胞株

人肝癌细胞株Huh-7和Hep3B均购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司。

1.2 主要试剂与仪器

八月札,购于广西仙茱中药有限公司,由广西中医药大学中药鉴定教研室马雯芳教授鉴定为三

叶木通 *Akebia trifoliata*(Thunb.) Koidz. 的干燥近成熟的果实。DMEM、MEM 培养液和 CCK-8 检测试剂盒均购自 Biosharp 生物科技公司;CLARK 胎牛血清购自上海慧颖生物科技有限公司;BeyoClick™ EdU-488、RIPA 细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;总 RNA 提取试剂盒均购自康为世纪生物技术有限公司;Scientific RevertAid RT 试剂盒、磷脂酰丝氨酸蛋白抗体-荧光素/碘化丙啶(Annexin V-FITC/PI) 凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;qRT-PCR 引物见表 1,由武汉灵思生物技术有限公司设计及合成。cDM2500 型倒置显微镜(德国 Leica 公司);Forma TM 31 型 CO₂ 细胞培养箱(美国 Thermo 公司);Pico17 型低速离心机(美国 Thermo 公司);HBS-1096A 全功能酶标仪(南京德铁实验设备有限公司);SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);MF52 型荧光显微镜(广州市明美科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 EEATK 冻干粉的制备

取八月札粗粉 500 g,按料液比(m/v, 1 : 8)用石油醚 4000 mL 回流脱脂 2 次,每次 1.5 h,挥尽药材中的石油醚后,取 8 倍药材量的 95%乙醇回流提取 2 h,第二次加入 6 倍的 75%乙醇回流提取 1.5 h,第三次加入 6 倍量的 50%乙醇再回流提取 1 h,过滤合并药液,减压回收乙醇,并浓缩成浸膏,经冷冻干燥后获得冻干粉。

1.3.2 细胞培养

采用含 10%胎牛血清、100 U/mL 青霉素与 100 μg/mL 链霉素的 DMEM 培养液培养 Huh-7 细胞, Hep3B 细胞以相同条件培养于 MEM 培养液中,传 2 ~3 代。两株细胞均在在 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养,细胞单层铺满培养瓶 70%~85%后,加入 0.25%胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞

用于实验。

1.3.3 CCK-8 检测细胞活力

对数生长期的 Huh-7 和 Hep3B 细胞以 2×10⁴/孔接种于 96 孔板。将细胞分为空白对照组、索拉菲尼组(Sorafenib, 5 μmol/L)和 EEATK 组(0.10、0.15、0.20、0.30 mg/mL),每组平行设置 6 个复孔。作用细胞 24 h 后吸弃培养基,沿孔的侧壁每孔缓慢加入 10 μL CCK-8 工作液,继续培养 4 h 后取出培养板,在 450 nm 波长下用多功能酶标仪测定各孔吸光度值(OD 值),按下式计算细胞抑制率= (1-给药孔平均 OD 值/对照孔平均 OD 值)×100%。

1.3.4 EdU 检测细胞增殖能力

对数生长期的 Huh-7 和 Hep3B 细胞,分别以 1×10⁶/孔接种于 6 孔板,将细胞分为空白对照组和终浓度为 0.15 mg/mL 的 EEATK 组,每组设 3 个复孔。空白对照组接种细胞常规培养不加入药物, EEATK 组加入终浓度为 0.15 mg/mL 的培养液;以上两组细胞于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度条件下培养 24 h 后按照 BeyoClick™ EdU-488 细胞增殖检测试剂盒说明书操作后使用倒置荧光显微镜拍摄图像。

1.3.5 克隆形成实验检测细胞克隆形成

对数生长期的 Huh-7 和 Hep3B 细胞按 1×10⁶/孔分别接种于 6 孔板中,分组及加药浓度同“1.3.4”项下,作用 24 h 后对各孔细胞进行消化,并用相同体积培养液重悬细胞,同时对正常组细胞进行计数;正常组接种 3000 个细胞至 24 孔板中,药物组按正常细胞组等体积接种 24 孔板。6 孔板置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 10 d,中间隔 2 d 换液 1 次,待细胞长成克隆(约 20~30 个细胞)后,4%多聚甲醛固定 15 min,0.1%结晶紫溶液染色 20 min,流水冲洗晾干后拍照,计算克隆形成率。

1.3.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率

Hep3B 细胞分组同“1.3.4”项下,作用 24 h 后

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 primer sequence for qRT-PCR

基因 Gene	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	片段长度/bp Length field
BIRC5	5'-AGGACCACCGCATCTCTACAT-3'	5'-AAGTCTGGCTCGTTCTCACTG-3'	118
CDK1	5'-AAACTACAGGTCAAGTGGTAGCC-3'	5'-TCCTGCATAAGCACATCCTGA-3'	148
CDKN1A	5'-TGTCGGTCAGAACCCATGC-3'	5'-AAAGTCGAAGTTCATCGCTC-3'	139
EGLN3	5'-CTGGGCAAATACTACGTCAAGG-3'	5'-GACCATCACCGTTGGGGTTT-3'	106
FAM83D	5'-GGGAAGGTTACAGAAAAGTTCA-3'	5'-GACTGGGCATACAGGATTCCG-3'	167
MKI-67	5'-GCCTGCTCGACCCCTACAGA-3'	5'-GCTTGCTCAACTGCGGTTCG-3'	127
MYC	5'-GGCTCTGGCAAAAGGTCA-3'	5'-CTGCGTAGTTGTGCTGATGT-3'	119
FOXC1	5'-TGTTCGAGTCACAGAGGATCG-3'	5'-ACAGTCGTAGACGAAAGCTCC-3'	112
GAPDH	5'-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3'	5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'	101

吸弃培养液,用 0.25%胰酶收集各组细胞,用预冷的 PBS 洗 2 次,将细胞重悬浮于 250 μ L 结合缓冲液中,调整待测细胞的浓度为 1×10^6 /mL(结合缓冲液用去离子水稀释 4 倍)。取 100 μ L 的细胞悬液于 5 mL 的流式管中,加入 5 μ L Annexin-VFITC 和 10 μ L 的 PI,轻轻混匀,避光,室温反应 20 min,在反应管中补加 400 μ L PBS,立即应用流式细胞仪检测,计算细胞凋亡率。

1.3.7 转录组数据分析 EEATK 干预 Hep3B 细胞后基因差异表达的影响

Hep3B 细胞分组同“1.3.4”项下处理,24 h 后收集细胞,每份细胞加入 1 mL TRIzol 试剂处理细胞,提取总 RNA 后制成细胞重悬液后,进行转录组测序,转录组测序由武汉灵思生物技术有限公司协助完成。利用 DESeq2 软件进行基因差异表达的分析,差异表达基因(筛选标准:|logFC|>1 及 $P<0.05$);采用 cluster Profiler 软件对所筛选出来的差异基因,进行 GO 分析。转录组数据联合数据库(Comparative Toxicogenomics Database,CTD)分析差异表达基因中与增殖、凋亡相关的关键基因,并利用在线软件(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>)绘制韦恩图。

1.3.8 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测

Hep3B 细胞分组同“1.3.4”项下,每组均设 3 个复孔,处理 24 h 后收集细胞,每份细胞加入 1 mL TRIzol 试剂处理细胞,提取总 RNA 后制成细胞重悬液后,应用 Scientific RevertAid RT 试剂盒合成 cDNA 后,qRT-PCR 检测 BIRC5、CDK1、CDKN1A、EGLN3、

FAM83D、MKI-67、MYC、FOXC1 的表达。数据以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示, ΔCT = 目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值, $\Delta\Delta CT$ = 实验组(Ct(目的基因)-Ct(内参基因))-对照组(Ct(目的基因)-Ct(内参基因))。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,应用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析。 $P<0.05$ 说明差异具有统计学意义。

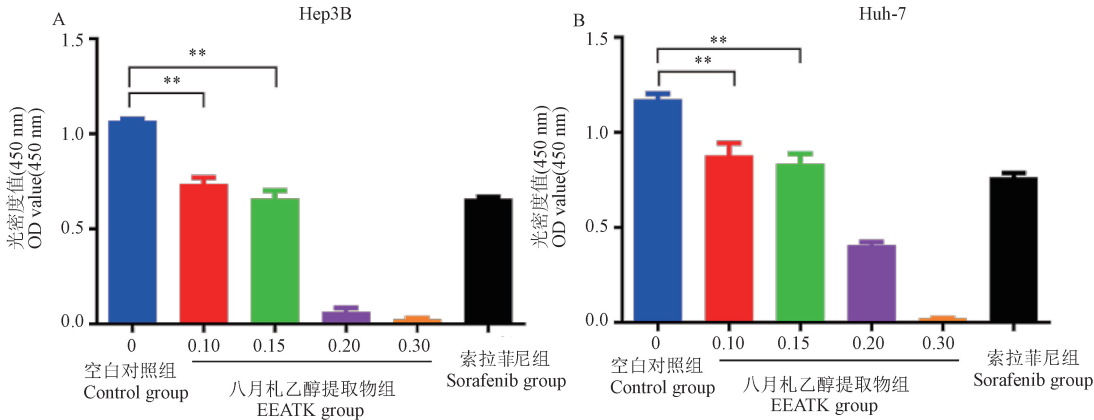
2 结果

2.1 EEATK 抑制 Hep3B 及 Huh-7 细胞的活力

以索拉菲尼(5 μ mol/L)为对照,使用不同终浓度(0.1、0.15、0.2 和 0.3 mg/mL)的 EEATK 分别作用 Hep3B 及 Huh-7 细胞 24 h 后,利用 CCK-8 试剂检测细胞活力的变化。结果显示,与空白对照组比较,随着浓度的增加,EEATK 各组细胞的 OD 值显著降低(均 $P<0.01$),见图 1。当 EEATK 终浓度为 0.15 mg/mL 时,Hep3B 及 Huh-7 细胞活力抑制率分别为 38.29%、21.40%,当终浓度为 0.20 mg/mL 时,对 Hep3B 及 Huh-7 细胞的抑制率均显著升高,分别为 94.10%和 65.43%,故本研究选用 0.15 mg/mL 为终浓度进行后续实验。

2.2 EEATK 抑制 Hep3B 及 Huh-7 细胞的增殖

EdU 检测结果分析发现,EEATK 干预后可显著抑制肝癌细胞(Hep3B、Huh-7)中 EdU 阳性细胞数($P<0.01$);克隆形成实验分析发现,EEATK 干预后可显著抑制肝癌细胞的克隆形成数($P<0.01$),如图 2 所示。



注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$ 。

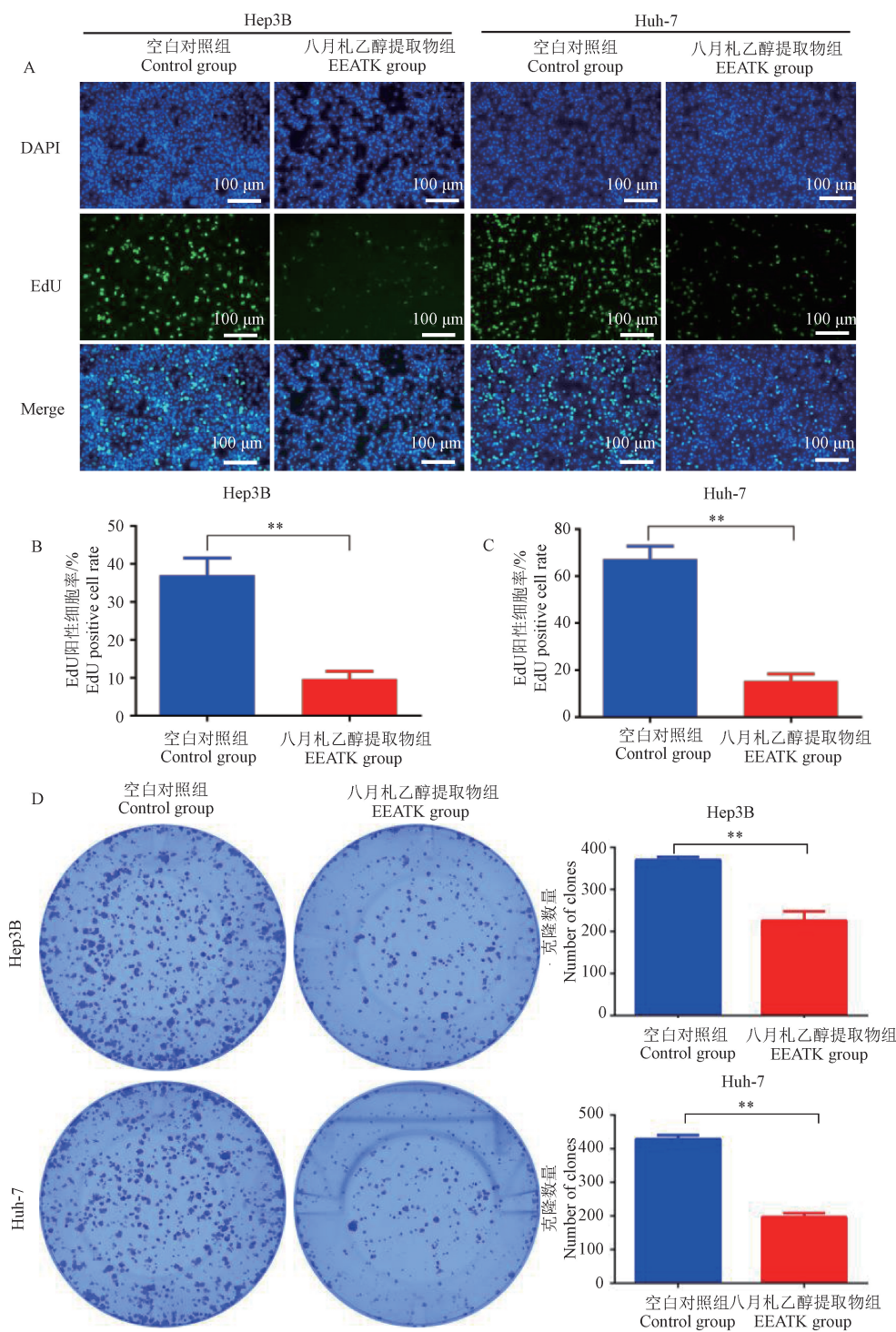
图1 EEATK 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞活力的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Note. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 1 Effects of EEATK on the viability of Hep3B and Huh-7 cells respectively

2.3 EEATK 促进 Hep3B 及 Huh-7 细胞的凋亡
凋亡检测结果表明, EEATK 组对 Hep3B 及

Huh-7 细胞的凋亡率较空白对照组均显著升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 表明 EEATK 可能通



注: A: EEATK 干预后 EdU 检测细胞增殖能力变化; B、C: Hep3B、Huh-7 细胞 EdU 阳性细胞数统计; D: EEATK 干预后克隆形成实验检测细胞克隆形成变化。与空白对照组比较, $** P<0.01$ 。

图 2 EEATK 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞增殖能力影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Note. A, EdU was used to detect the changes in Hep3B and Huh-7 cells of proliferation ability after EEATK intervention. B/C, Statistics on the number of EdU positive cells in Hep3B and Huh-7 cells. D, Clone formation assay was used to detect the changes in Hep3B and Huh-7 cells after EEATK intervention. Compared with the control group, $** P<0.01$.

Figure 2 Effect of EEATK on proliferation of Hep3B and Huh-7 cells

过促进细胞凋亡而抑制生长增殖,见图 3。

2.4 EEATK 对肝癌 Hep3B 细胞的差异表达基因的影响

2.4.1 差异表达基因的筛选

利用 DESeq2 包进行差异表达基因比较分析,筛选条件为 $|\log_2FC| \geq 1$ 且 $P \leq 0.05$ 。 $\log_2FC$ 即差异表达倍数再取以 2 为底的对数, $\log_2FC \geq 1$ 即为上调的差异基因, $\log_2FC \leq -1$ 为下调的差异表达基因。

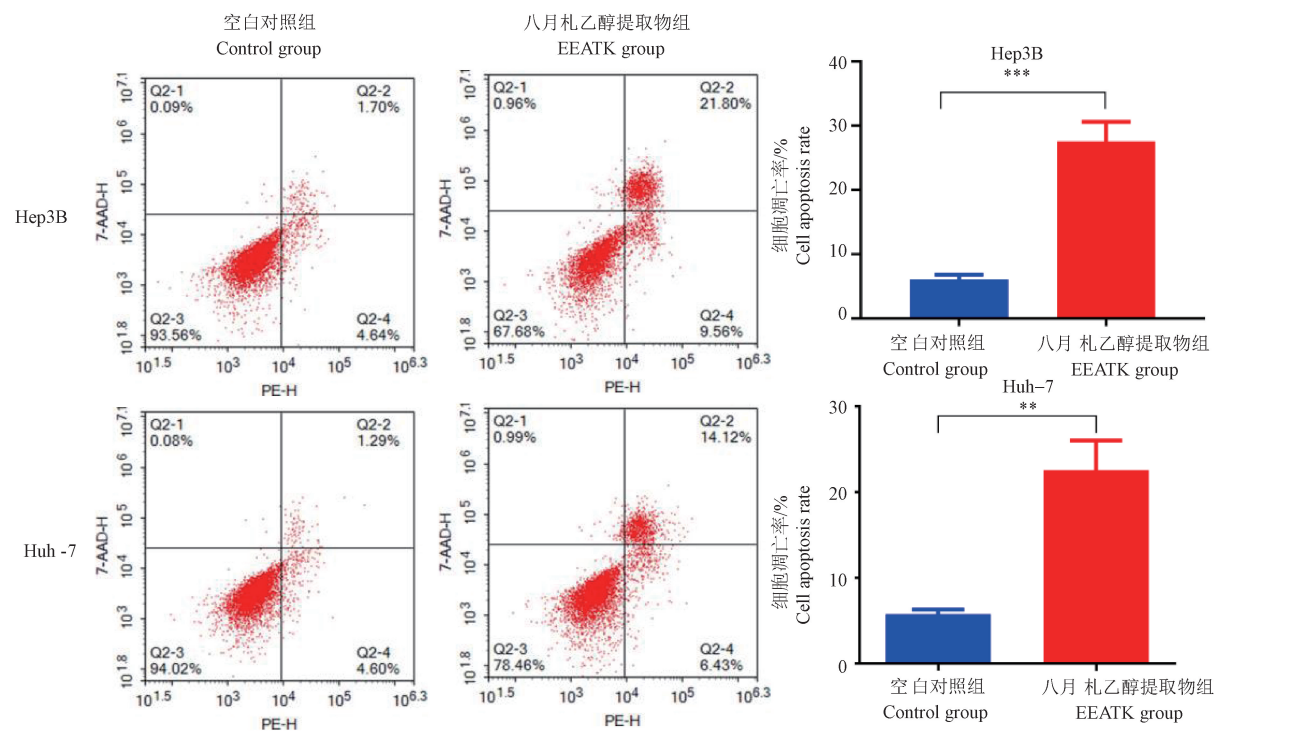
采用热图形式展示 EEATK 抑制肝癌 Hep3B 的差异基因的聚类分析,热图中表达模式相近的基因会被聚集在一起,每个方格中的颜色反映的是表达数据的行进行均一化处理后得到的数值聚类结果,呈现了上调基因与下调基因在组内与组间的分布情况。分析发现 EEATK 组与空白对照组的组间差异显著,具有统计学意义($P < 0.01$),与空白对照组比较,EEATK 组调控显著差异表达基因共 1577 个,其中红色表示相对上调差异基因 942 个,蓝色表示相对下调差异基因 635 个,见图 4。选取 $\log_2FC \geq 4$ 及 $\log_2FC \leq -4$ 的差异表达基因,部分结果见表 2。

2.4.2 差异表达基因 GO 功能富集分析

GO 术语由以下 3 个部分组成:生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF)。对经 EEATK 干预 Hep3B 细胞后的差异表达基因进行 GO 功能富集分析,总共获得了 3232 个 GO 富集条目,BP、CC 和 MF 富集条目数分别是 2284、378 和 570 个。主要富集的生物过程包括胆固醇生物合成过程及其调节、炎症反应、细胞外间质组织、类固醇代谢;主要富集的细胞成分为质膜筏、内质网内腔、胶原的细胞外基质、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM)。主要富集的分子功能包括信号受体结合及活性、生长因子活性、UDP-糖基转移酶活性和乙醇脱氢酶活性等,见图 5A 及表 3。

2.4.3 差异表达基因 KEGG 富集分析

KEGG 结果显示,EEATK 抑制肝癌 Hep3B 的差异表达基因的富集通路共 332 条,基因主要富集于细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 受体相互作用、TGF- β 信号通路、NF- κ B 信号通路、细胞色素代

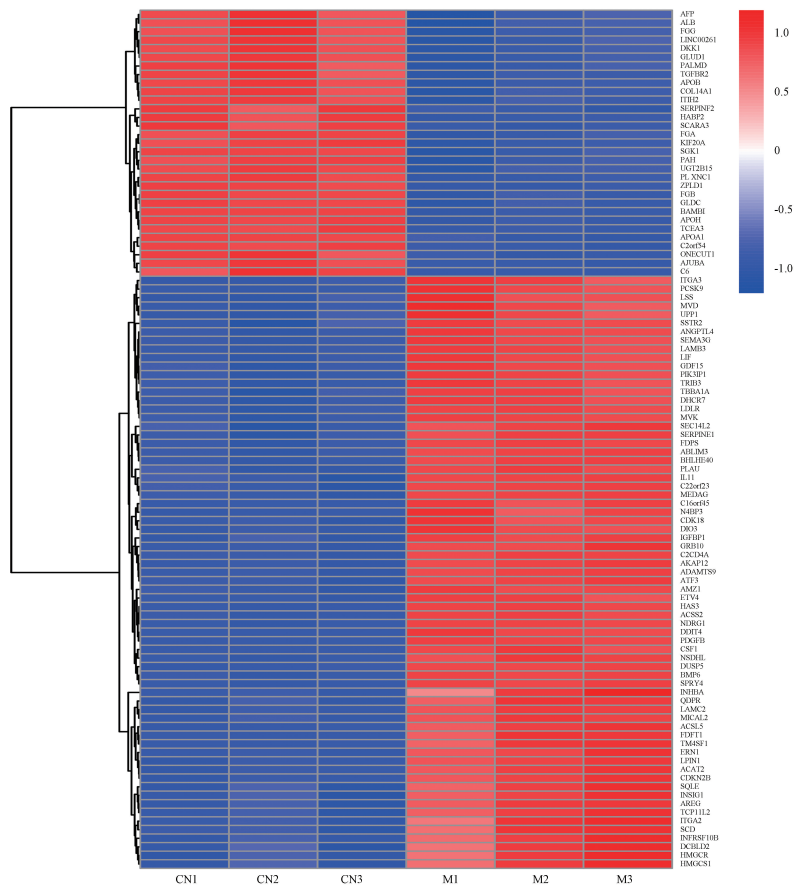


注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

图 3 Annexin V-FITC/PI 双染法检测 EEATK 对 Hep3B 及 Huh-7 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Note. Compared with the control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Annexin V-FITC/PI dual staining method was used to detect the effect of EEATK on the apoptosis rates of Hep3B and Huh-7 cells



注: CN1~CN3:空白对照组; M1~M3:八月札乙醇提取物组,红色为相对上调差异表达基因,蓝色为相对下调差异表达基因。

图 4 EEATK 干预肝癌细胞 Hep3B 的差异表达基因聚类分析

Note. CN1~CN3, Control group. M1~M3, EEATK group. Red represents relatively upregulated differentially expressed genes, while blue represents relatively downregulated differentially expressed genes.

Figure 4 Cluster analysis of differentially expressed genes in Hep3B liver cancer cells treated with EEATK

表 2 差异表达基因
Table 2 Differentially expressed genes

Gene ID	log2FoldChange	P value	padj
OLAH	7.26	2.78E-08	3.75E-07
TLR4	6.67	1.31E-06	1.34E-05
LINC01629	6.50	4.01E-06	3.69E-05
ABCC8	6.42	6.04E-06	5.40E-05
TNS4	6.24	1.26E-05	0.00010532
BLOC1S5-TXNDC5	6.22	5.68E-05	0.0004108
LOC100130744	6.19	9.83E-06	8.38E-05
DMBT1	6.13	3.40E-05	0.00025738
C11orf96	6.13	2.63E-05	0.00020496
ADH1A	-5.03	2.79E-09	4.30E-08
SLC13A2	-5.03	4.54E-13	1.08E-11
ABCD2	-5.05	0.01129	0.043513
F13B	-5.05	2.64E-05	0.00020564
ADH1C	-5.07	2.86E-05	0.00022114
LOC102723675	-5.08	0.0020963	0.010319
FOLH1B	-5.27	0.00023351	0.0014691
KLHL3	-5.35	0.00081067	0.0044587
TLR10	-5.47	0.0005805	0.0033142
PGLYRP2	-5.58	0.00038032	0.0022732

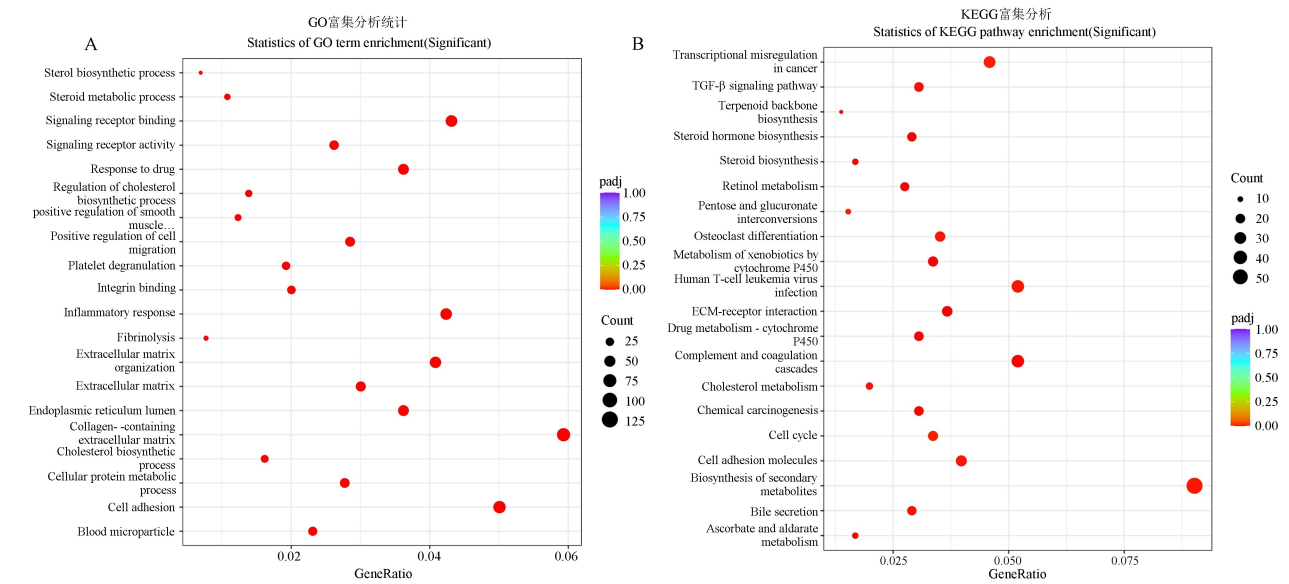
注:上调、下调均取前 10 位;差异倍数>4, P<0.05。
Note. Top 10 for both upregulation and downregulation, multiple of differences>4, P<0.05.

谢外源物代谢通路、类固醇激素生物合成等通路,表明这些通路中的差异表达基因可能影响细胞的增殖和诱导细胞凋亡,见图 5B 及表 4。

2. 4. 4 EEATK 抑制肝癌 Hep3B 细胞与细胞增殖、凋亡差异基因的筛选及验证

本研究的细胞实验已经证实 EEATK 抑制肝癌

细胞增殖可能是诱导凋亡实现的,差异表达基因显著富集在 TGF-β、NF-κB 信号通路,这两条信号通路与肝癌细胞增殖、凋亡密切相关,本研究通过转录组学联合 TCD 数据库分析,筛选出 EEATK 抑制肝癌 Hep3B 细胞与增殖等相关的差异表达基因(图 6),结果以 padj<0. 05 为显著富集,并利用韦恩在线



注:A:差异表达基因的 GO 功能分析;B:差异表达基因的 KEGG 富集分析。

图 5 差异表达基因的 GO 功能分析及 KEGG 富集分析

Note. A, GO functional analysis of differentially expressed genes. B, KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes.

Figure 5 GO functional analysis and KEGG enrichment analysis of differentially expressed genes

表 3 差异表达基因 GO 富集注释表

Table 3 GO enrichment annotation table for differentially expressed genes

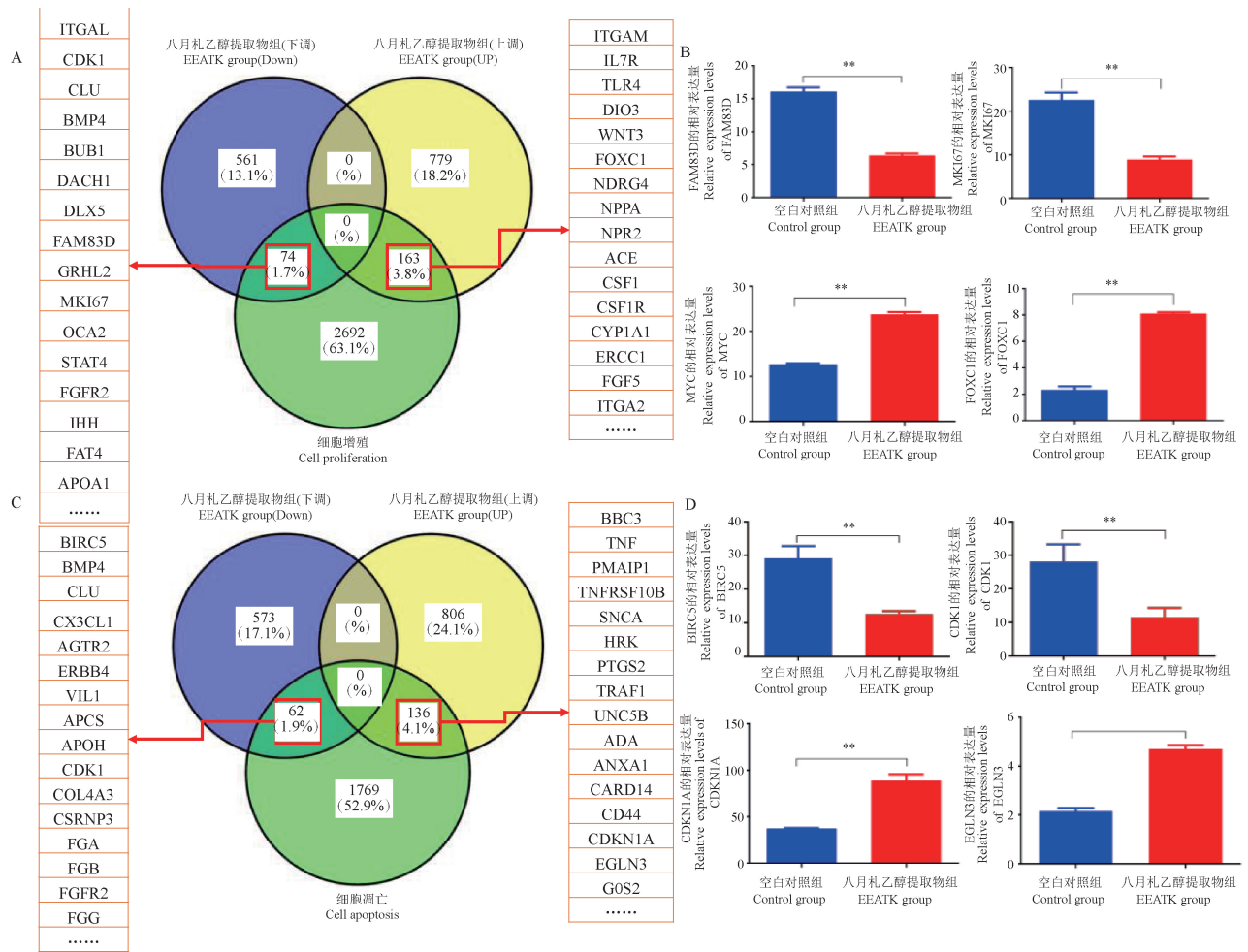
ID	描述 Description	GO_Class	P value	padj
GO:0006695	胆固醇生物合成过程 Cholesterol biosynthetic process	BP	4. 04E-17	1. 09E-13
GO:0030198	细胞外间质组织 Extracellular matrix organization	BP	0. 001183	0. 022086
GO:0045540	胆固醇生物合成过程的调节 Regulation of cholesterol biosynthetic process	BP	6. 17E-16	8. 34E-13
GO:0008202	类固醇代谢 Steroid metabolic process	BP	1. 01E-08	3. 60E-06
GO:0006954	炎症反应 Inflammatory response	BP	1. 54E-07	5. 95E-05
GO:0042493	对药物的反应 Response to drug	BP	1. 60E-09	8. 56E-07
GO:0007155	细胞粘附 Cell adhesion	BP	4. 10E-07	0. 000111
GO:0042730	纤维蛋白溶解 Fibrinolysis	BP	9. 09E-06	0. 000541
GO:0008202	类固醇代谢 Steroid metabolic process	BP	1. 01E-08	3. 60E-06
GO:0045121	质膜筏 Membrane raft	CC	0. 0001056	0. 004393
GO:0005788	内质网腔 Endoplasmic reticulum lumen	CC	9. 76E-09	3. 47E-06
GO:0062023	含胶原蛋白的细胞外间质 Collagen-containing extracellular matrix	CC	2. 15E-11	2. 31E-08

续表3

ID	描述 Description	GO_Class	P value	padj
GO:0031012	细胞外间质 Extracellular matrix	CC	1.92E-06	0.000399
GO:0016323	基底外侧质膜 Basolateral plasma membrane	CC	0.0012822	0.043974
GO:0031093	血小板 α 颗粒腔 Platelet alpha granule lumen	CC	9.37E-06	0.000543
GO:0031410	细胞质小泡 Cytoplasmic vesicle	CC	1.43E-05	0.001464
GO:0072562	血液微粒 Blood microparticle	CC	6.93E-09	3.17E-06
GO:0016324	顶端质膜 Apical plasma membrane	CC	0.000173	0.005804
GO:0005102	信号传导受体结合 Signaling receptor binding	MF	7.89E-05	0.003194999
GO:0038023	信号传导受体活性 Signaling receptor activity	MF	6.71E-05	0.006257259
GO:0005178	整合素结合 Integrin binding	MF	8.69E-05	0.007835062
GO:0008083	生长因子活性 Growth factor activity	MF	1.80E-07	6.10E-05
GO:0008194	UDP-糖基转移酶活性 UDP-glycosyltransferase activity	MF	5.90E-09	2.53E-06
GO:0008201	肝素结合 Heparin binding	MF	2.13E-08	5.08E-06
GO:0030247	多糖结合剂 Polysaccharide binding	MF	0.00027	0.00751
GO:0005201	细胞外间质结构成分 Extracellular matrix structural constituent	MF	0.000272	0.007513
GO:0008106	醇脱氢酶(NADP +) 活性 Alcohol dehydrogenase (NADP+) activity	MF	5.00E-06	0.0003458

表 4 差异表达基因主要通路分析表
Table 4 Analysis of main pathways of differentially expressed genes

ID	描述 Description	P value	padj
map04512	细胞外基质-受体相互作用 ECM-receptor interaction	2.51E-06	0.000387199
map04350	TGF-β 信号通路 TGF-beta signaling pathway	2.68E-05	0.001649486
map04064	NF-κB 信号通路 NF-kappa B signaling pathway	2.32E-05	0.001649486
map00980	细胞色素代谢外源物代谢通路 Metabolism of xenobiotics by cytochrome	1.20E-09	5.41E-08
map00982	药物代谢-细胞色素 P450 Drug metabolism-cytochrome P450	4.17E-11	3.76E-09
map05204	化学致癌作用 Chemical carcinogenesis	9.42E-06	0.000347588
map00900	萜类骨架生物合成 Terpenoid backbone biosynthesis	0.004558131	0.047509755
map00140	类固醇激素生物合成 Steroid hormone biosynthesis	2.21E-11	2.99E-09
map04975	脂肪消化吸收 Fat digestion and absorption	0.000759099	0.011428659
map00072	酮体的合成与降解 Synthesis and degradation of ketone bodies	0.000675403	0.01019245



注:A:细胞增殖相关基因筛选;B;qRT-PCR 检测验证细胞增殖相关基因验证;C:细胞凋亡相关基因筛选;D;qRT-PCR 检测验证细胞凋亡相关基因验证。与空白对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 6 EEATK 对 Hep3B 细胞增殖、凋亡相关基因表达的影响

Note. A, Screening the cell proliferation related gene. B, qRT-PCR was used to verify the expression of genes related to cell proliferation. C, Screening the apoptosis related genes. D, qRT-PCR was used to verify apoptosis related genes. Compared with the control group, ** $P<0.01$.

Figure 6 Effect of EEATK on the expression of proliferation and apoptosis related genes in Hep3B cells

软件绘制韦恩图,结果表明,EEATK 显著调控细胞增殖的差异表达基因共 236 个(上调 162 个,下调 74 个),qRT-PCR 检测结果发现 FAM83D、MKI-67 的表达显著降低($P<0.01$),MYC、FOXC1 的表达显著升高($P<0.01$);凋亡相关差异基因共计 198 个(上调 136 个,下调 62 个),其中 BIRC5、CDK1 的表达显著降低($P<0.01$),CDKN1A、EGLN3 的表达显著升高($P<0.01$)。

3 讨论

肿瘤是一种具有侵袭性的细胞增殖过程,能获得持续增殖信号,实现增殖永生,由于一系列的基因突变,造成细胞增殖与凋亡失衡,从而使得癌

细胞快速增殖。因此研究调控肝癌细胞增殖与凋亡的关键通路,将有望发现干预肝癌的潜在靶点,可有效推动临床肝癌的治疗。

本研究应用 0.1~0.3 mg/mL 范围内的 EEATK 作用于人肝癌 Hep3B 和 Huh-7 两种细胞,CCK-8 实验结果表明,两种细胞的增殖抑制率随 EEATK 浓度升高而增加,同时筛选出了 EEATK 对 Hep3B 和 Huh-7 细胞的最佳药物浓度用于后续实验。EdU 染色结果显示 EEATK 显著降低人肝癌 Hep3B 和 Huh-7 细胞中 EdU 阳性细胞数量。克隆形成结果显示,在 EEATK 明显减少细胞的克隆数,进一步证实了 EEATK 能抑制肝癌细胞的增殖。流式细胞仪检测发现 EEATK 显著增加细胞凋亡率。以上结果提

示,EEATK 具有抑制 Hep3B 和 Huh-7 细胞增殖和促进其凋亡的作用。

GO 分析显示差异表达基因主要富集于胆固醇生物合成及调节、ECM 和炎症等方面。作为快速增殖的细胞,癌细胞较正常细胞需要更高水平的胆固醇来维持细胞膜的生物合成和其他功能需求,胆固醇生物合成增加是许多癌症的一个特征,如在来源于乳腺癌患者的肿瘤干细胞中以观察到胆固醇生物合成的升高^[3],高水平胆固醇促进肿瘤细胞的生长、存活、增殖、迁移、侵袭和转移^[4-5]。而阻断胆固醇的合成和摄取对肿瘤的形成和生长有抑制作用。ECM 作为细胞外微环境的主要部分,是由多种细胞外大分子共同构建成的统一整体,萦绕在肿瘤细胞周围,为其提供基本的液体浸润和空间支持^[6-7]。ECM 可以通过整合素或其他细胞表面受体与细胞直接发生作用,调节关键的细胞过程,例如分化,细胞的增殖和代谢,进而影响整个组织的结构与功能^[8]。癌症中僵硬和非弹性 ECM 的沉积导致化学治疗分子的扩散受阻,并阻碍免疫细胞的浸润,这是恶性进展的关键特征,增加的 ECM 刚度降低抗肿瘤能力^[9]。炎症与肿瘤发生发展关系密切,急性炎症反应不及时消退,可能会转化为慢性炎症,导致免疫抑制微环境中存在大量免疫抑制细胞和细胞因子,这些变化促进基因激活、DNA 和蛋白质损伤、ROS 释放并影响包括 NF- κ B 等多种信号通路^[10]。炎症参与肿瘤发生的多个步骤,包括细胞转化、促进、存活、增殖、侵袭、血管生成和转移等^[11]。

KEGG 富集分析表明 EEATK 的抗癌作用是通过多种途径介导的,如 ECM 受体相互作用通路、TGF- β 信号通路、NF- κ B 通路和代谢信号通路。其中,含有最多富集基因的 TGF- β 、NF- κ B 信号通路可能是 EEATK 发挥肝癌作用的关键信号通路。TGF- β 通路中的信号失调在 HCC 微环境中的炎症发挥着核心作用。过度表达的 TGF- β 会导致大量代谢紊乱和功能障碍,并促进上皮间质转化(EMT)和 ECM 过度沉积^[12-13],从而导致免疫功能障碍、纤维化和癌症^[12,14]。

TGF- β 、NF- κ B 在肝癌中均被异常激活,参与肝癌细胞增殖、侵袭及迁移整个过程。中药、中药活性成分可通过 TGF- β 、NF- κ B 通路影响肝癌细胞增殖,如裂果薯皂苷单体 I 能抑制 SMMC-7721 细胞增殖,侵袭和转移,其机制可能与抑制 TGF- β /Smad 信号通路发生有关^[15]。苦参注射液通过抑制 TGF- β /

Smad7 信号通路进而缓解肝纤维化及肝癌的进展^[16]。双花汤可通过抑制 NF- κ B 信号通路,促进 ROS 介导的 NLRP3 炎症小体表达,最终抑制肝癌细胞增殖、侵袭及迁移^[17]。以上结果说明 TGF- β 、NF- κ B 信号均是复方中药、中药活性成分是治疗肝癌的重要信号通路。

FAM83D 基因调节有丝分裂过程,在肝癌组织中高表达,促进细胞增殖和迁移,抑制细胞凋亡^[18]。MKI-67 是一种增殖细胞相关的核抗原,其在 HCC 中表达量升高,敲低 MKI-67 可以抑制 HCC 的增殖^[19]。MYC 是与细胞增殖密切相关的基因,可影响细胞生长和增殖功能的复制、转录和翻译,以及细胞代谢和凋亡^[20]。FOXC1 是 FOX 蛋白家族的一员,FOXC1 可激活核 NF- κ B 信号,从而调节细胞的增殖^[21],本研究表明 EEATK 可显著降低 Hep3B 细胞中 FAM83D、MKI-67 的表达,显著升高 MYC、FOXC1 的表达,提示 EEATK 可能通过影响上述关键基因的表达抑制细胞增殖。

BIRC5,也称 Survivin,是凋亡蛋白抑制剂家族(inhibitors of apoptosis protein, IAPs)中抑制凋亡作用最强的蛋白,在恶性肿瘤组织中高表达,是调节细胞周期、凋亡关键因子^[22]在肿瘤发生和转移过程中直接调节癌细胞的凋亡和有丝分裂^[23]。CDK1 是细胞周期检查点的重要调控基因,其失调可导致可促进肿瘤侵袭性发展、细胞增殖^[24]。CDKN1A 可阻止 G₁/S 过渡进而减慢细胞周期^[25],从而抑制细胞增殖。EGLN3 在多种恶性肿瘤中表达降低,上调胃癌细胞中 EGLN3 的表达显著抑制细胞增殖和转移^[26]。结果表明,EEATK 可以显著降低 BIRC5、CDK1 的表达,显著升高 CDKN1A、EGLN3 的表达,说明 EEATK 可能通过调控上述靶点促进 Hep3B 细胞凋亡。

综上所述,EEATK 抑制肝癌细胞增殖并诱导凋亡,其作用机制可能与调控 TGF- β 、NF- κ B 信号通路及多个靶点有关,还需要对发现的关键信号通路及其靶基因进行全面、深层次的探究。

参考文献:

- [1] ZENG H, CHEN W, ZHENG R, et al. Changing cancer survival in China during 2003-15: a pooled analysis of 17 population-based cancer registries [J]. *Lancet Glob Health*, 2018, 6(5): e555-e567.
- [2] 王春玲, 郑作文. 八月札抗肝癌活性部位的筛选 [J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(7): 784-789.

WANG C L, ZHENG Z W. Screening of anti-hepatocarcinoma active fractions from akebiae fructus [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(7): 784–789.

[3] HUANG B, SONG B L, XU C. Cholesterol metabolism in cancer: mechanisms and therapeutic opportunities [J]. Nat Metab, 2020, 2(2): 132–141.

[4] ABDALKAREEM JASIM S, KZAR H H, HAIDER HAMAD M, et al. The emerging role of 27-hydroxycholesterol in cancer development and progression: an update [J]. Int Immunopharmacol, 2022, 110: 109074.

[5] WANG R, LIU Z, FAN Z, et al. Lipid metabolism reprogramming of CD8⁺ T cell and therapeutic implications in cancer [J]. Cancer Lett, 2023, 567: 216267.

[6] BANYSPALUCHOWSKI M, LOIBL S, WITZEL I, et al. Clinical relevance of collagen protein degradation markers C3M and C4M in the serum of breast cancer patients treated with neoadjuvant therapy in the GeparQuinto trial [J]. Cancers, 2019, 11(8): 1186.

[7] KESH K, GUPTA V K, DURDEN B, et al. Therapy resistance, cancer stem cells and ECM in cancer: the matrix reloaded [J]. Cancers, 2020, 12(10): 3067.

[8] YANG X, CHEN L, MAO Y, et al. Progressive and prognostic performance of an extracellular matrix-receptor interaction signature in gastric cancer [J]. Dis Markers, 2020, 2020: 8816070.

[9] Mittelheisser V, Gensbittel V, Bonati L, et al. Evidence and therapeutic implications of biomechanically regulated immunosurveillance in cancer and other diseases [J]. Nat Nanotechnol. 2024, 19(3): 281–297.

[10] Zhao H, Wu L, Yan G, et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 263.

[11] MANTOVANI A. Cancer: inflammation by remote control [J]. Nature, 2005, 435(7043): 752–753.

[12] SU J, MORGANI S M, DAVID C J, et al. TGF- β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1 [J]. Nature, 2020, 577(7791): 566–571.

[13] CHAKRAVARTHY A, KHAN L, BENSLE N P, et al. TGF- β -associated extracellular matrix genes link cancer-associated fibroblasts to immune evasion and immunotherapy failure [J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 4692.

[14] LIU S, REN J, TEN DIJKE P. Targeting TGF β signal transduction for cancer therapy [J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 8.

[15] 吕美娴, 廖智红, 周欢, 等. 裂果薯皂苷单体 I 通过 TGF- β 调控上皮间质转化对人肝癌细胞 SMMC-7721 侵袭和转移的影响 [J]. 中国药理学通报, 2020, 36(3): 408–413.

LYU M X, LIAO Z H, ZHOU H, et al. Effect of saponin monomer I of *Schizocapsa plantaginea* Hance on invasion and migration of hepatocellular carcinoma cell SMMC-7721 by regulating epithelial-mesenchymal transition through TGF- β 1 [J]. Chin Pharmacol Bull, 2020, 36(3): 408–413.

[16] YANG Y, SUN M, LI W, et al. Rebalancing TGF- β /Smad7 signaling via Compound Kushen injection in hepatic stellate cells protects against liver fibrosis and hepatocarcinogenesis [J]. Clin Transl Med, 2021, 11(7): e410.

[17] DAI B, FAN M, HUANG X, et al. Shuanghua decoction exerts anticancer activity by activating NLRP3 inflammasome via ROS and inhibiting NF- κ B signaling in hepatocellular carcinoma cells [J]. Phytomedicine, 2022, 103: 154249.

[18] NIE J, LU L, DU C, et al. FAM83D promotes the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells by inhibiting the FBXW7/MCL1 pathway [J]. Transl Cancer Res, 2022, 11(10): 3790–3802.

[19] HOU Y Y, CAO W W, LI L, et al. MicroRNA-519d targets MKi67 and suppresses cell growth in the hepatocellular carcinoma cell line QGY-7703 [J]. Cancer Lett, 2011, 307(2): 182–190.

[20] GONSALVES W I, BRONIOWSKA K, JESSEN E, et al. Metabolomic and lipidomic profiling of bone marrow plasma differentiates patients with monoclonal gammopathy of undetermined significance from multiple myeloma [J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 10250.

[21] WANG J, RAY P S, SIM M S, et al. FOXC1 regulates the functions of human basal-like breast cancer cells by activating NF- κ B signaling [J]. Oncogene, 2012, 31(45): 4798–4802.

[22] Siragusa G, Tomasello L, Giordano C, et al. Survivin (BIRC5): Implications in cancer therapy [J]. Life Sci, 2024, 350: 122788.

[23] FANG X L, CAO X P, XIAO J, et al. Overview of role of survivin in cancer: expression, regulation, functions, and its potential as a therapeutic target [J]. J Drug Target, 2024, 32(3): 223–240.

[24] IZADI S, NIKKHOO A, HOJJAT-FARSANGI M, et al. CDK1 in breast cancer: implications for theranostic potential [J]. Anticancer Agents Med Chem, 2020, 20(7): 758–767.

[25] SINGH S K, BANERJEE S, ACOSTA E P, et al. Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway [J]. Oncotarget, 2017, 8(10): 17216–17228.

[26] CAI F, YANG X, MA G, et al. EGLN3 attenuates gastric cancer cell malignant characteristics by inhibiting JMJD8/NF- κ B signalling activation independent of hydroxylase activity [J]. Br J Cancer, 2024, 130(4): 597–612.

[收稿日期] 2024-04-02