

重楼皂苷IX通过调节Fas/FasL信号通路诱导肝癌细胞凋亡及对裸鼠移植瘤生长的抑制作用^Δ

姚敏娜^{1*}, 张伟¹, 高凯¹, 李锐莉¹, 殷英¹, 郭超¹, 陆云阳², 汤海峰², 王婧雯^{1#} (1. 空军军医大学西京医院药剂科, 西安 710032; 2. 空军军医大学药理学系中药与天然药物学教研室, 西安 710032)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)18-2238-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.18.04



摘要 **目的** 探讨重楼皂苷IX通过调节凋亡相关因子Fas/Fas配体(FasL)信号通路对肝癌细胞凋亡的诱导作用以及其对裸鼠移植瘤生长的抑制作用。**方法** 在细胞系及干预条件筛选的基础上,以HepG2细胞为对象,考察2、4 μmol/L PP9干预对细胞克隆形成能力、凋亡率以及Fas、FasL、切割的胱天蛋白酶8(cleaved caspase-8)、cleaved caspase-3蛋白表达的影响;引入Fas抑制剂KR-33493,考察PP9抗肝癌活性的潜在机制。以HepG2细胞荷瘤裸鼠模型为对象,以5-氟尿嘧啶(20 mg/kg)为阳性对照,考察10 mg/kg PP9对荷瘤裸鼠瘤体体积、瘤体质量、细胞核增殖相关抗原Ki-67、cleaved caspase-3蛋白表达的影响。**结果** 与对照组比较,2、4 μmol/L PP9可显著降低细胞的克隆数和克隆形成率,显著升高其凋亡率和Fas、FasL、cleaved caspase-8、cleaved caspase-3蛋白的表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而联用KR-33493可显著逆转PP9对Fas/FasL信号通路相关蛋白表达的上调作用($P<0.01$)。与对照组裸鼠比较,PP9组裸鼠的瘤体体积(第27天)、瘤体质量、Ki-67蛋白的表达水平均显著降低,cleaved caspase-3蛋白的表达水平显著升高($P<0.01$)。**结论** PP9可通过激活Fas/FasL信号通路来诱导肝癌HepG2细胞凋亡;同时,PP9还能有效抑制裸鼠移植瘤的生长。

关键词 重楼皂苷IX;肝细胞癌;HepG2细胞;凋亡;Fas/FasL信号通路

Induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by polyphyllin 9 through regulating the Fas/FasL signaling pathway and the inhibitory effect on the growth of transplanted tumor in nude mice

YAO Minna¹, ZHANG Wei¹, GAO Kai¹, LI Ruili¹, YIN Ying¹, GUO Chao¹, LU Yunyang², TANG Haifeng², WANG Jingwen¹ (1. Dept. of Pharmacy, Xijing Hospital of Air Force Medical University, Xi'an 710032, China; 2. Dept. of Chinese Materia Medica and Natural Medicines, School of Pharmacy, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the induction of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells by polyphyllin 9 (PP9) through the regulation of the Fas/Fas ligand (FasL) signaling pathway, and its inhibitory effect on the growth of transplanted tumor in nude mice. **METHODS** Based on the screening of cell lines and intervention conditions, HepG2 cells were selected as the experimental subject to investigate the effects of 2 μmol/L and 4 μmol/L PP9 treatment on cell colony formation activity, apoptosis rate, as well as the protein expressions of Fas, FasL, cleaved caspase-8 and cleaved caspase-3. Additionally, Fas inhibitor KR-33493 was introduced to investigate the underlying mechanism of PP9's anti-hepatocellular carcinoma activity. Using HepG2 cell tumor-bearing nude mice model as the object, and 5-fluorouracil (20 mg/kg) as the positive control, the effects of 10 mg/kg PP9 on tumor volume, tumor mass, and the protein expressions of the nuclear proliferation-associated antigen Ki-67 and cleaved caspase-3 in tumor-bearing nude mice were investigated. **RESULTS** Compared with the control group, 2, 4 μmol/L PP9 significantly decreased the number of clones and the clone formation rate of cells, but significantly increased the apoptosis rate, the protein expressions of Fas, FasL, cleaved caspase-8 and cleaved caspase-3 ($P<0.05$ or $P<0.01$). However, the combination of Fas inhibitor KR-33493 could significantly reverse the effect of PP9 on the up-regulation of proteins related to the Fas/FasL signaling pathway ($P<0.01$). Compared with the control group, the tumor volume (on day 27), mass and protein expression of Ki-67 in nude mice of the PP9 group were significantly decreased, while the protein expression of cleaved caspase-3 was significantly

increased ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** PP9 can induce apoptosis of HepG2 cells by activating the Fas/FasL signaling pathway. Meanwhile, PP9 can also effectively inhibit the growth of transplanted tumors in nude mice.

KEYWORDS polyphyllin 9; hepatocellular carcinoma; HepG2 cells; apoptosis; Fas/FasL signaling pathway

^Δ **基金项目** 国家自然科学基金项目(No.81903862);陕西省卫生健康科研创新能力提升计划平台建设项目(No.2023PT-10);陕西省自然科学基金基础研究计划项目(No.2024JC-YBMS-746)

* **第一作者** 副主任药师,硕士。研究方向:中药抗肿瘤药理。
E-mail: yaona3698@163.com

通信作者 副主任药师,硕士。研究方向:中药药理学、临床药理学。E-mail: wangjingwen8021@163.com

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球第六大常见癌症和第三大癌症相关死亡原因,位列我国癌症相关死亡原因的第2位^[1-2]。目前,手术切除仍是HCC治疗的首选方案,但由于该病起病隐匿,多数患者在确诊时已处于中晚期,丧失手术机会,故以化疗、靶向治疗及免疫治疗为核心的药物治疗策略已成为中晚期HCC患者的主要治疗手段^[3]。然而,临床实践显示,这些药物的不良反应及耐药性等问题严重影响了患者的预后^[4]。因此,开发新型安全、有效的抗HCC药物具有重要意义。

中药及其活性成分因具有高效、低毒等特点,已成为抗癌药物的重要来源^[5]。重楼皂苷IX(polyphyllin 9, PP9; 分子式 $C_{45}H_{72}O_{17}$),是本课题组前期从宽叶重楼 *Paris polyphylla* var. *latifolia* 中分离出的主要活性成分之一^[6]。前期研究发现,PP9能够诱导结直肠癌细胞凋亡并阻滞其细胞周期,显著抑制裸鼠移植瘤的生长,且对主要脏器无明显的毒副作用^[7]。此外,多项研究证实,PP9对宫颈癌^[8]、尤文肉瘤^[9]、胶质瘤^[10]等多种肿瘤细胞均具有明显的抑制作用;同时,该成分亦能抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖^[11],但其能否诱导肝癌细胞凋亡及其具体机制尚不清楚。凋亡相关因子 Fas/Fas 配体(Fas ligand, FasL)信号通路能够介导细胞外源性凋亡,在HCC等多种癌症的发生发展中具有重要作用^[12]。研究指出,结构与PP9相似的甾体皂苷及重楼总皂苷均能通过调控Fas/FasL信号通路来诱导肿瘤细胞凋亡^[13-14],遂本课题组推测PP9诱导肿瘤细胞凋亡的作用可能与上述信号通路有关。基于此,本研究从Fas/FasL信号通路出发,探讨PP9对HCC细胞凋亡的影响及潜在机制;同时,通过构建荷瘤裸鼠模型,初步验证PP9的体内抗HCC作用,以期PP9的进一步开发及应用提供理论和实验依据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Cytomics™ FC500型流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司),3111型CO₂培养箱、Varioskan LUX型酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司),ChemiDoc型化学发光成像系统、iMark680型酶标仪(美国Bio-Rad公司),IX71型倒置显微镜(日本Olympus公司)等。

1.2 主要药品及试剂

PP9(纯度≥98%)由本课题组提取、制备^[6];5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)对照品(阳性对照,批号22009,纯度≥98%)、Fas抑制剂KR-33493的对照品(批号24010,纯度99.94%)均购自美国MCE公司;胎牛血清(批号CE011023)购自新西兰NEWZERUM公司;Annexin V-FITC/PI凋亡试剂盒(批号SB-F6012)、CCK-8试剂盒(批号C6901030)均购自上海翊圣生物科技有限

公司;RPMI-1640培养基(批号6124579)购自美国Gibco公司;兔抗细胞核增殖相关抗原Ki-67多克隆抗体、兔β-肌动蛋白(β-actin)多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔免疫球蛋白G二抗(批号分别为GB111499、GB11001、GB23303)均购自武汉赛维尔生物科技有限公司;兔抗Fas单克隆抗体(批号ab133619)购自英国Abcam公司;兔抗切割的胱天蛋白酶3(cleaved caspase-3)、cleaved caspase-8、FasL单克隆抗体(批号分别为9664、9496、68405)均购自美国CST公司。

1.3 细胞与实验动物

人肝癌HepG2、SMMC-7721、Bel-7404细胞株均由空军军医大学西京医院肿瘤生物学国家重点实验室惠赠。

SPF级BALB/c雄性裸鼠,4周龄,体重(20±2)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号为SCXK(湘)2019-0004。所有动物均饲养于空军军医大学实验动物中心[温度(22±2)℃、相对湿度40%~70%、12 h光照/12 h黑暗循环],自由摄食、饮水。本实验方案通过空军军医大学实验动物中心福利与伦理委员会审查(编号IACUC-20191120)。

2 方法

2.1 细胞实验

2.1.1 细胞培养

将HepG2、SMMC-7721、Bel-7404细胞接种于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(简称“完全培养基”)中,在37℃、5%CO₂培养箱中培养(培养条件下同),待细胞生长至对数生长期后进行后续实验。

2.1.2 细胞及药物干预条件筛选

取对数生长期的HepG2、SMMC-7721、Bel-7404细胞,经胰酶消化后重悬于完全培养基中,调整密度至 5×10^4 个/mL并以每孔100 μL接种于96孔培养板中。培养24 h后,将细胞分为空白组(不加细胞与药物,只加培养基)、对照组(0.1%DMSO+培养基)、不同浓度PP9组(1、2、4、8、16、32 μmol/L,浓度依据前期预实验和相关文献^[7]设置),每组设置5个复孔。分别继续培养24、48、72 h。随后,向每孔加入CCK-8试剂10 μL,于37℃下避光孵育2 h,使用酶标仪于450 nm波长处测定各孔的吸光度(A)值并计算细胞存活率[细胞存活率=(A_{实验组} - A_{空白组})/(A_{对照组} - A_{空白组})×100%],使用GraphPad Prism 9.0软件计算PP9对各细胞系的半数抑制浓度(IC₅₀),再根据上述结果,选择敏感的细胞系、最佳药物浓度和最适干预时间,用于后续研究。

2.1.3 HepG2细胞克隆形成能力检测

取对数生长期的HepG2细胞,以500个/孔接种于6孔板中,培养24 h后,将细胞分为对照组和不同浓度PP9组(2、4 μmol/L),每组设置3个复孔。各组以(含药)培养基培养14 d(每2 d更换培养基1次)后,弃去培养基,

细胞以磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,再以预冷的甲醇固定15 min;移除甲醇,细胞以0.1%结晶紫染液染色10 min;移除染液,细胞以水洗涤2次,静置,干燥后,使用显微镜观察各组细胞的克隆形成情况,记录克隆数(大于50个细胞的集落计为1个克隆)并计算克隆形成率[克隆形成率(%)=克隆数/细胞接种数×100%]。

2.1.4 HepG2细胞凋亡情况检测

取对数生长期的HepG2细胞,以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,培养24 h后,按“2.1.3”项下方法分组,每组设置3个复孔。各组以(含药)培养基培养24 h后,收集细胞,以0.25%胰酶消化,经预冷的PBS洗涤2次,以binding buffer 200 μ L重悬,分别加入Annexin V-FITC试剂、PI试剂各5 μ L,混匀后避光孵育15 min,使用流式细胞仪检测各组细胞的凋亡率。

2.1.5 HepG2细胞中Fas/FasL信号通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。取对数生长期的HepG2细胞,按“2.1.4”项下方法分组、处理。培养24 h后,收集细胞并分离总蛋白,经浓度测定后于95 $^{\circ}$ C下加热5 min进行热变性处理。取变性蛋白样品,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,以半干转法转移至聚偏二氟乙烯膜上,用5%脱脂牛奶于室温下封闭1 h;洗膜后,加入Fas、FasL、cleaved caspase-8、cleaved caspase-3、 β -actin一抗(稀释比例均为1:1 000),于4 $^{\circ}$ C下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:5 000),于室温下孵育60 min;洗膜后,以增强化学发光底物(ECL)显影、成像,并使用Image J软件分析各目的蛋白的条带灰度值,以目的蛋白与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值表示目的蛋白的表达水平。

2.1.6 Fas抑制剂干预对PP9抗肿瘤活性的影响检测

另取对数生长期的HepG2细胞,以 5×10^5 个/孔接种于6孔板中,培养24 h后,将其分为对照组、PP9组(4 μ mol/L)、KR-33493组(10 μ mol/L,浓度参考相关文献^[15]设置)和PP9+KR-33493(4 μ mol/L PP9+10 μ mol/L KR-33493)组,每组设置3个复孔。各组以(含药)培养基培养24 h后,收集细胞,按“2.1.5”项下方法检测各组细胞中Fas、FasL、cleaved caspase-8、cleaved caspase-3蛋白的表达水平。

2.2 动物实验

2.2.1 造模、分组与给药

取对数生长期的HepG2细胞,用PBS配制成单细胞悬液,按 1×10^7 个/只接种于裸鼠右侧腋窝皮下,待肿瘤体积达到50 mm³时即为荷瘤裸鼠模型构建成功。将造模成功的裸鼠随机分为对照组、5-Fu组(阳性对照,20 mg/kg)和PP9组(10 mg/kg),每组6只。各药物组剂量参考预实验结果及相关文献^[7]设置,以生理盐水为溶剂。各组裸鼠均腹腔注射生理盐水或相应药液,每3 d注射1

次,连续27 d。给药期间,每3 d称定裸鼠体重、测量瘤体长/宽度各1次,计算瘤体体积(瘤体体积=肿瘤长度×肿瘤宽度×肿瘤宽度/2)。末次给药后次日,予CO₂吸入处死各组裸鼠,取出其瘤体,称重后计算抑瘤率[抑瘤率(%)=(对照组裸鼠瘤重-药物组裸鼠瘤重)/对照组裸鼠瘤重×100%]。

2.2.2 肿瘤组织中Ki-67、cleaved caspase-3蛋白表达检测

采用免疫组化法检测。取“2.2.1”项下各组裸鼠肿瘤组织,经常规脱水后进行石蜡包埋,制作石蜡切片;取切片,经脱蜡水化、柠檬酸修复、3%过氧化氢阻断内源性过氧化物酶活性10 min后,加入牛血清白蛋白于室温下封闭30 min;加入增殖相关蛋白Ki-67、凋亡效应因子cleaved caspase-3一抗(稀释比例均为1:400),于4 $^{\circ}$ C下孵育过夜;加入相应二抗(稀释比例为1:200),于室温下孵育50 min;用PBS洗涤后,以二氨基联苯胺试剂显色,再以苏木精复染、乙醇脱水、二甲苯透明,用中性树胶封片后,使用显微镜观察各组细胞阳性染色(呈棕褐色)情况,采用Image J软件分析阳性染色区域的平均光密度值,以表示Ki-67、cleaved caspase-3蛋白的表达水平。

2.3 统计学方法

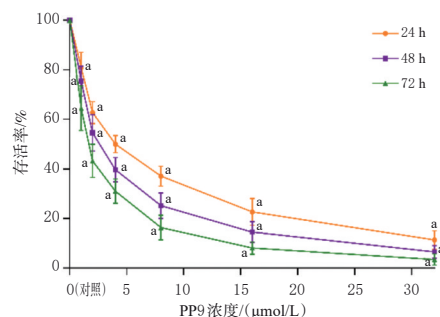
采用GraphPad Prism 9.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-*t*检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 细胞实验结果

3.1.1 细胞及药物干预条件筛选结果

与对照组比较,经1~32 μ mol/L的PP9干预24、48、72 h后,HepG2、SMMC-7721、Bel-7404细胞的存活率均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。干预24 h时,PP9对HepG2、SMMC-7721、Bel-7404细胞的IC₅₀分别为4.08、7.44、9.91 μ mol/L,提示PP9对HepG2细胞的体外抑制效果更好。基于此,后续研究以更为敏感的HepG2细胞作为对象,药物浓度分别为2、4 μ mol/L;此外,考虑到药物作用24 h即有明显的效果,故将干预时间设为24 h。结果见图1(以HepG2细胞为例)。



a: 与对照组比较, $P<0.01$ 。

图1 PP9对HepG2细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

3.1.2 PP9对HepG2细胞克隆形成能力的影响

与对照组比较,PP9 2、4 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的克隆数及克隆形成率均显著降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图2、表1。

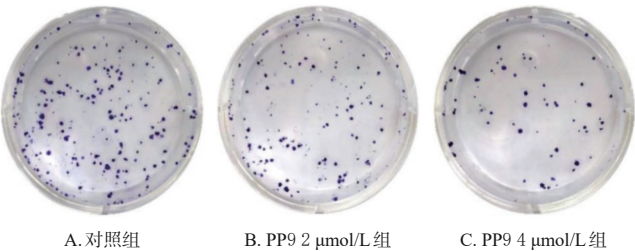


图2 PP9对HepG2细胞克隆形成影响的观察图(圆形视野直径:35 mm)

表1 PP9对HepG2细胞克隆数、克隆形成率和凋亡率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	克隆数/个	克隆形成率/%	凋亡率/%
对照组	146.00±20.22	29.20±4.04	2.96±1.62
PP9 2 $\mu\text{mol/L}$ 组	83.67±24.66 ^a	16.73±4.93 ^a	22.68±5.72 ^a
PP9 4 $\mu\text{mol/L}$ 组	34.01±25.16 ^b	6.80±5.03 ^b	35.54±10.30 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.05$;b: 与对照组比较, $P<0.01$ 。

3.1.3 PP9对HepG2细胞凋亡的影响

与对照组比较,PP9 2、4 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞的凋亡率均显著升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图3、表1。

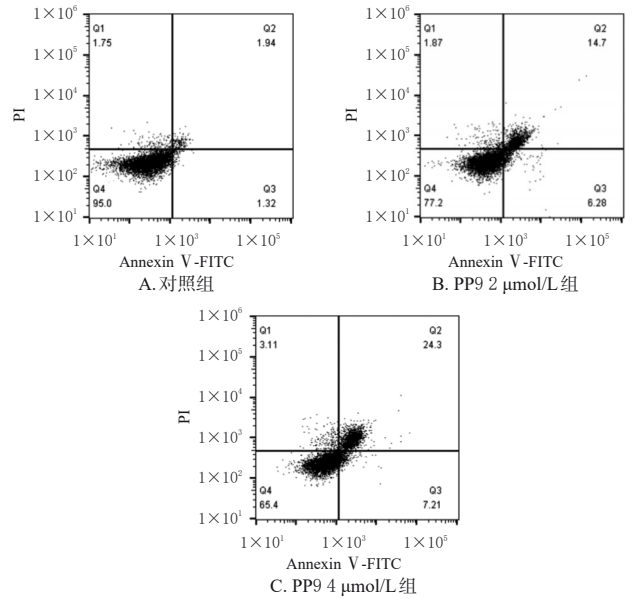


图3 PP9对HepG2细胞凋亡影响的流式细胞图

3.1.4 PP9对HepG2细胞中Fas/FasL信号通路相关蛋白表达的影响

与对照组比较,PP9 2、4 $\mu\text{mol/L}$ 组细胞中Fas、FasL、cleaved caspase-8、cleaved caspase-3蛋白的表达均显著上调($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结果见图4、表2。

3.1.5 Fas抑制剂干预对PP9抗肿瘤活性的影响

与对照组比较,PP9组细胞中Fas、FasL、cleaved caspase-8、cleaved caspase-3蛋白的表达均显著上调

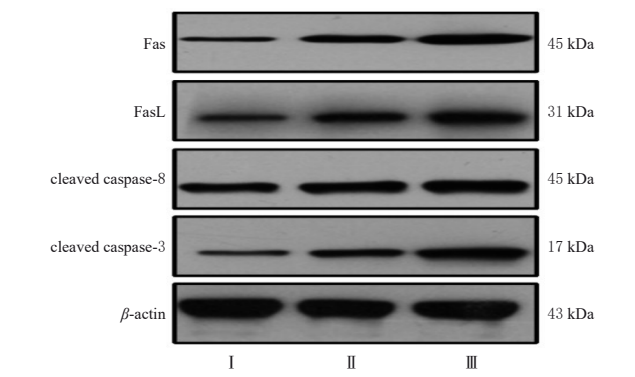


图4 PP9对HepG2细胞中Fas/FasL信号通路相关蛋白表达影响的电泳图

表2 PP9对HepG2细胞中Fas/FasL信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Fas/ β -actin	FasL/ β -actin	cleaved caspase-8/ β -actin	cleaved caspase-3/ β -actin
对照组	0.15±0.04	0.35±0.14	0.42±0.09	0.15±0.04
PP9 2 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.38±0.05 ^a	0.75±0.11 ^a	0.74±0.14 ^a	0.50±0.16 ^a
PP9 4 $\mu\text{mol/L}$ 组	0.56±0.13 ^b	0.89±0.13 ^b	0.87±0.12 ^b	0.79±0.15 ^b

a: 与对照组比较, $P<0.05$;b: 与对照组比较, $P<0.01$ 。

($P<0.01$),KR-33493组上述蛋白表达的差异均无统计学意义($P>0.05$);与PP9组比较,PP9+KR-33493组细胞中上述蛋白的表达均显著下调($P<0.01$)。结果见图5、表3。

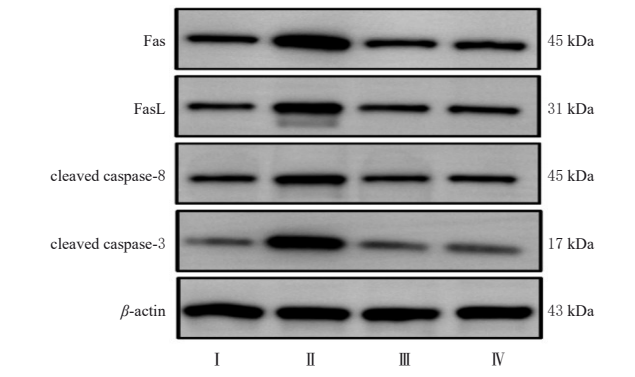


图5 加入Fas抑制剂后PP9对HepG2细胞中Fas/FasL信号通路相关蛋白表达影响的电泳图

表3 加入Fas抑制剂后PP9对HepG2细胞中Fas/FasL信号通路相关蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	Fas/ β -actin	FasL/ β -actin	cleaved caspase-8/ β -actin	cleaved caspase-3/ β -actin
对照组	0.51±0.08	0.46±0.08	0.44±0.07	0.22±0.04
PP9组	1.14±0.07 ^a	1.06±0.06 ^a	0.82±0.09 ^a	1.02±0.07 ^a
KR-33493组	0.52±0.08	0.47±0.07	0.43±0.08	0.26±0.07
PP9+KR-33493组	0.60±0.07 ^b	0.58±0.05 ^b	0.48±0.09 ^b	0.31±0.04 ^b

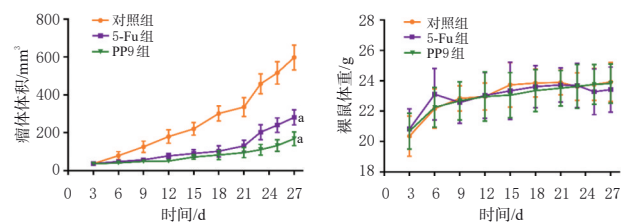
a: 与对照组比较, $P<0.01$;b: 与PP9组比较, $P<0.01$ 。

3.2 动物实验结果

3.2.1 PP9对裸鼠体内移植瘤生长的影响

与对照组比较,5-Fu组、PP9组裸鼠的瘤体体积(第27天)、瘤体质量均显著降低($P<0.01$),其抑瘤率分别

为48.75%、67.97%;而各组裸鼠体重比较的差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见图6、表4。



a: 与对照组比较, $P<0.01$ 。

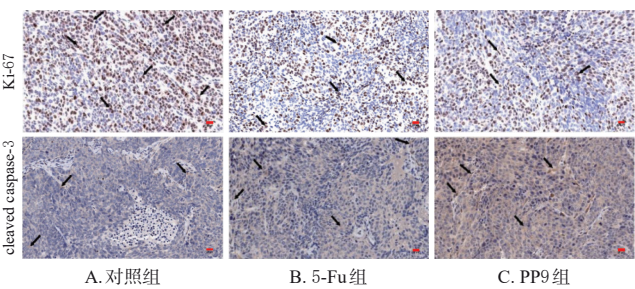
图6 各组裸鼠瘤体体积、体重变化折线图($\bar{x} \pm s, n=6$)

表4 各组裸鼠的瘤体质量及相关蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	瘤体质量/g	Ki-67	cleaved caspase-3
对照组	0.52 ± 0.08	0.35 ± 0.02	0.05 ± 0.01
5-Fu组	0.26 ± 0.03^a	0.27 ± 0.02^b	0.15 ± 0.01^b
PP9组	0.19 ± 0.02^a	0.25 ± 0.01^b	0.19 ± 0.02^b

a: 与对照组比较, $P<0.01$; b: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

3.2.2 PP9对裸鼠肿瘤组织中相关蛋白表达的影响
与对照组比较, 5-Fu组、PP9组裸鼠肿瘤组织中Ki-67蛋白的表达均显著下调($P<0.05$), cleaved caspase-3蛋白的表达均显著上调($P<0.05$)。结果见图7、表4。



黑色箭头: 阳性表达蛋白。

图7 各组裸鼠肿瘤组织中Ki-67、cleaved caspase-3蛋白表达的免疫组化图(标尺: 20 μm)

4 讨论

HCC发病隐匿, 患者确诊时常处于中晚期, 平均5年生存率低于20%^[16]。目前, 临床治疗以5-Fu、索拉非尼、仑伐替尼、贝伐珠单抗和阿替利珠单抗等药物为主, 但由于耐药性以及皮肤毒性、胃肠道反应、全身性不良反应、高血压等副作用的发生, 使得上述药物的临床应用受限^[3]。天然产物因具有低毒性、多靶点和高疗效等特点, 逐渐成为抗肿瘤药物研发的重要方向^[17]。

甾体皂苷是一类重要的天然产物, 对包括肝癌在内的多种肿瘤细胞具有明显的抑制作用^[18-19]。PP9是从宽叶重楼中分离鉴定的一种天然甾体皂苷, 已有研究者通过MTT实验初步证实了其对SMMC-7721细胞增殖的抑制作用^[11]。为进一步评价PP9的抗HCC活性, 本研究首先采用CCK-8实验对3种人肝癌细胞系(HepG2、SMMC-7721、Bel-7404)进行了体外活性筛选。结果显示, PP9可抑制上述细胞的增殖, 且有一定的浓度、时间依赖趋势; 同时, 从中筛选出对PP9最敏感的细胞系

(HepG2细胞)进行后续实验。本克隆形成实验结果显示, PP9可减弱HepG2细胞的集落形成能力, 提示该成分可抑制肝癌细胞的增殖。此外, 本裸鼠移植瘤实验结果表明, PP9可显著抑制裸鼠的肿瘤生长, 但对裸鼠体重无明显影响, 提示该成分具有一定的抑瘤作用, 且毒性较低。Ki-67是细胞核内与增殖相关的核蛋白, 是评价肿瘤细胞增殖活性的重要指标^[20]。本裸鼠移植瘤实验结果还显示, PP9组裸鼠肿瘤组织中Ki-67蛋白的表达较对照组显著下调。以上研究结果均表明, PP9具有抗HCC的作用。

细胞凋亡是细胞程序性死亡的重要生理过程, 诱导肿瘤细胞凋亡是相关药物发挥抗肿瘤作用的关键^[21-22]。本研究结果显示, PP9可显著升高HepG2细胞的凋亡率, 提示该成分的抗HCC作用可能是通过促进肝癌细胞凋亡来实现的。细胞凋亡受多种信号通路调控, 其中Fas/FasL信号通路是重要途径之一。Fas是肿瘤坏死因子家族中的一种重要细胞膜表面受体蛋白, 其配体FasL属于II型跨膜蛋白^[23], 两者结合后可招募Fas相关死亡结构域蛋白, 形成死亡诱导信号复合物, 该复合物的形成可直接导致caspase-8前体的募集和自体剪切, 生成具有活性的cleaved caspase-8; 同时, 作为Fas/FasL信号通路的关键下游效应分子, cleaved caspase-8可进一步剪切caspase-3前体, 使其转化为具有活性的cleaved caspase-3, 最终启动不可逆的细胞凋亡程序^[24]。此外, 已有研究报道, 激活Fas/FasL信号通路可抑制肝癌细胞的恶性生物学行为^[25]。本研究结果显示, 与对照组比较, 不同浓度PP9组细胞中Fas、FasL、cleaved caspase-8、cleaved caspase-3蛋白的表达均显著上调, 且亦在移植瘤裸鼠肿瘤组织中检测到了cleaved caspase-3蛋白表达的上调, 提示PP9的抗HCC活性可能与激活Fas/FasL信号通路有关。为验证上述假设, 本研究引入了Fas抑制剂KR-33493, 结果显示, 抑制剂单用对Fas、FasL、cleaved caspase-8、cleaved caspase-3蛋白的表达无显著影响(排除非特异性干扰), 而PP9与KR-33493联用则可显著逆转PP9对HepG2细胞中Fas、FasL、cleaved caspase-8、cleaved caspase-3蛋白表达的上调作用, 提示PP9可能通过激活Fas/FasL信号通路来诱导肝癌细胞凋亡。

综上所述, 细胞实验证实, PP9可通过激活Fas/FasL信号通路来诱导HepG2细胞凋亡; 动物实验证实, 其能有效抑制裸鼠移植瘤的生长。上述研究提示, PP9有望成为一种潜在的HCC治疗候选药物, 但其是否涉及其他抗肿瘤机制尚有待进一步探索。

参考文献

[1] BRAY F, LAVERSANNE M, SUNG H, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2024, 74(3): 229-263.

- [2] HAN B F, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. J Natl Cancer Cent, 2024, 4(1): 47-53.
- [3] 国家卫生健康委员会医政司. 原发性肝癌诊疗指南: 2024年版[J]. 中华消化外科杂志, 2024, 23(4): 429-478.
- [4] ANWANWAN D, SINGH S K, SINGH S, et al. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches [J]. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2020, 1873(1): 188314.
- [5] NAEEM A, HU P Y, YANG M, et al. Natural products as anticancer agents: current status and future perspectives [J]. Molecules, 2022, 27(23): 8367.
- [6] 华栋, 刘杨, 王夏茵, 等. 宽叶重楼化学成分研究[J]. 中南药学, 2015, 13(1): 43-46.
- [7] YAO M N, LI R L, YANG Z F, et al. PP9, a steroidal saponin, induces G₂/M arrest and apoptosis in human colorectal cancer cells by inhibiting the PI3K/Akt/GSK3 β pathway[J]. Chem Biol Interact, 2020, 331: 109246.
- [8] STEFANOWICZ-HAJDUK J, BARTOSZEWSKI R, BARTOSZEWSKA S, et al. Pennogenyl saponins from *Paris quadrifolia* L. induce extrinsic and intrinsic pathway of apoptosis in human cervical cancer HeLa cells[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135993.
- [9] ZOU X L, HUANG W F. TTB2 induces apoptosis in Ewing sarcoma cells[J]. Exp Ther Med, 2018, 16(2): 1021-1025.
- [10] ZHANG S, LU Y Y, LI H, et al. A steroidal saponin from *Paris vietnamensis* (Takht.) reverses temozolomide resistance in glioblastoma cells via inducing apoptosis through ROS/PI3K/Akt pathway[J]. Biosci Trends, 2020, 14(2): 123-133.
- [11] 仲光勇, 王昌利, 宋延平, 等. 陕重楼甾体皂苷类单体B (BM-61)对SMMC-7721细胞增殖的影响[J]. 河南中医, 2016, 36(4): 718-720.
- [12] ZHAO J H, LIANG K Y, ZHONG H, et al. A cold-water polysaccharide-protein complex from *Grifola frondosa* exhibited antiproliferative activity via mitochondrial apoptotic and Fas/FasL pathways in HepG2 cells[J]. Int J Biol Macromol, 2022, 218: 1021-1032.
- [13] WU X B, LAI C H, HO Y J, et al. Anti-apoptotic effects of diosgenin on ovariectomized hearts[J]. Steroids, 2022, 179: 108980.
- [14] 方海雁, 龚晓燕, 洪星辉, 等. 重楼总皂苷对人胃癌 MKN-45细胞凋亡及 Fas/FasL 信号通路的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(7): 1388-1391.
- [15] WANG S H, YANG Y Q, LIN J H, et al. Astragalins activate autophagy and inhibit apoptosis of astrocytes in AD mice via down-regulating Fas/FasL-VDAC1 pathway[J]. Free Radic Biol Med, 2025, 232: 72-85.
- [16] WANG X C, SU Y J, LAN B, et al. USP22 promotes the proliferation and Sorafenib resistance of hepatocellular carcinoma cells via its deubiquitinase activity[J]. Clin Transl Med, 2025, 15(5): e70324.
- [17] WANG K L, CHEN Q, SHAO Y Y, et al. Anticancer activities of TCM and their active components against tumor metastasis[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 133: 111044.
- [18] YANG R Y, GAO W H, WANG Z B, et al. Polyphyllin I induced ferroptosis to suppress the progression of hepatocellular carcinoma through activation of the mitochondrial dysfunction via Nrf2/HO-1/GPX4 axis[J]. Phytomedicine, 2024, 122: 155135.
- [19] 施亚敏, 周政, 边猛, 等. 重楼皂苷 II 通过调控 ROS 和内质网应激促进骨肉瘤细胞自噬的研究[J]. 中国药理学通报, 2024, 40(12): 2340-2346.
- [20] 闫本纯, 何春艳, 李宏伟, 等. 桃叶珊瑚苷对前列腺癌的抑制作用及机制的体内外研究[J]. 中国药房, 2024, 35(13): 1618-1623.
- [21] EMDAD L, BHOOPATHI P, TALUKDAR S, et al. Recent insights into apoptosis and toxic autophagy: the roles of MDA-7/IL-24, a multidimensional anti-cancer therapeutic[J]. Semin Cancer Biol, 2020, 66: 140-154.
- [22] LI C Y, CHEN H B, CHEN X J, et al. Identification of inflammatory response-related molecular mechanisms based on the ATM/ATR/p53 pathway in tumor cells[J]. Comput Biol Med, 2024, 180: 108776.
- [23] 王虎平, 陈怡琴, 杨娇, 等. 黑逍遥散调控 Fas/FasL/Caspase-8/Caspase-3 信号通路对 AD 大鼠神经元细胞凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(17): 18-26.
- [24] ALI ABD EL-HAFEEZ A, MARZOUK H M M, ABDELHAMID M A A, et al. Anti-cancer effect of *Hyo-scyamus muticus* extract via its activation of Fas/FasL-ASK1-p38 pathway[J]. Biotechnol Bioprocess Eng, 2022, 27(5): 833-845.
- [25] WANG B, NIE C H, XU J, et al. Bigelovin inhibits hepatocellular carcinoma cell growth and metastasis by regulating the MAPT-mediated Fas/FasL pathway[J]. Neoplasma, 2023, 70(2): 208-215.

(收稿日期: 2025-03-25 修回日期: 2025-08-06)

(编辑: 张元媛)