

本文引用: 曾 千, 吴 涛, 罗 燕, 罗 吉. 肝喜片通过干扰线粒体动力学诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的机制研究 [J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(9): 1636–1643.

肝喜片通过干扰线粒体动力学诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的机制研究

曾 千^{1,2}, 吴 涛^{1,2}, 罗 燕^{2,3}, 罗 吉^{2,3*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省中西医结合医院 (湖南省中医药研究院附属医院), 湖南 长沙 410006;

3. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013

〔摘要〕 **目的** 探究肝喜片通过调控线粒体融合蛋白 2(MFN2)、动力相关蛋白 1(DRP1)介导的线粒体动态平衡诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡的分子机制。**方法** 以 HepG2 细胞为模型, 设置空白对照组和肝喜片低、中、高(10%、15%、20%含药血清)剂量组。采用实时无标记细胞分析动态监测细胞增殖; 流式细胞术检测线粒体膜电位、活性氧 (ROS) 水平及细胞凋亡率; Western blot 检测 MFN2、DRP1、聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1(PARP1)、裂解型 PARP1(cleaved PARP1)、Bcl-2 相关 X 蛋白(BAX)、细胞色素 c(Cyt c) 蛋白表达水平。**结果** 与空白对照组比较, 肝喜片中、高剂量组细胞指数(CI)值降低($P<0.01$); 与肝喜片中剂量组比较, 肝喜片高剂量组 CI 值降低($P<0.05$)。与空白对照组比较, 肝喜片各剂量组线粒体膜电位降低($P<0.05$, $P<0.01$), 细胞内 ROS 水平升高($P<0.05$, $P<0.01$); 与肝喜片低剂量组比较, 肝喜片中、高剂量组线粒体膜电位降低($P<0.05$), 肝喜片高剂量组细胞内 ROS 水平升高($P<0.01$)。与空白对照组比较, 肝喜片各剂量组 MFN2 蛋白表达水平降低($P<0.05$)、DRP1 蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$); 与肝喜片中剂量组比较, 肝喜片高剂量组 MFN2 蛋白表达水平降低, DRP1 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与空白对照组及肝喜片低剂量组比较, 肝喜片中、高剂量组凋亡率升高($P<0.01$); 与肝喜片中剂量组比较, 肝喜片高剂量组凋亡率升高($P<0.05$)。与空白对照组比较, 肝喜片各剂量组 cleaved PARP1/PARP1 比值及 BAX 蛋白表达水平均升高($P<0.05$, $P<0.01$), 肝喜片中、高剂量组 Cyt c 蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)。与肝喜片低剂量组比较, 肝喜片中剂量组 cleaved PARP1/PARP1 比值及 Cyt c 蛋白表达水平升高($P<0.05$), 肝喜片高剂量组 cleaved PARP1/PARP1 比值及 BAX、Cyt c 蛋白表达水平升高($P<0.05$, $P<0.01$)。**结论** 肝喜片通过抑制 MFN2 表达、激活 DRP1 介导的线粒体分裂, 破坏线粒体动态平衡, 诱导线粒体碎片化、氧化应激及膜电位降低, 进而促进 Cyt c 释放、BAX 升高和 PARP1 裂解, 最终激活线粒体依赖性凋亡通路。

〔关键词〕 肝癌; 线粒体动力学; HepG2; 线粒体融合蛋白 2; 动力相关蛋白 1; 凋亡

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.09.007

Mechanism of Ganxi Tablet inducing apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells by interfering with mitochondrial dynamics

ZENG Qian^{1,2}, WU Tao^{1,2}, LUO Yan^{2,3}, LUO Ji^{2,3*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine (The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine), Changsha, Hunan 410006, China; 3. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410013, China

〔Abstract〕 Objective To investigate the molecular mechanism by which Ganxi Tablet induces apoptosis in hepatocellular

〔收稿日期〕 2025-07-04

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金面上项目(2025JJ50499); 湖南省自然科学基金医卫行业联合基金(2025JJ180792); 湖南省中医药科研计划重点项目(A2024018); 湖南中医药大学研究生创新课题(2023CX0116)。

〔通信作者〕 * 罗 吉, 男, 博士, 研究员, 硕士研究生导师, E-mail: luoji927@163.com。

carcinoma HepG2 cells through regulating the mitochondrial dynamics mediated by mitofusin 2 (MFN2) and dynamin-related protein 1 (DRP1). **Methods** HepG2 cells were used as the model, with a blank control group and low-, medium-, and high-dose (10%, 15%, and 20% drug-containing serum, respectively) Ganxi Tablet groups established. Real-time label-free cell analysis was employed to dynamically monitor cell proliferation. Flow cytometry was used to measure mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species (ROS) levels, and the apoptosis rate. Western blot analysis was performed to assess the protein expression levels of MFN2, DRP1, poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), cleaved PARP1, Bcl-2-associated X protein (BAX), and cytochrome c (Cyt c). **Results** Compared with the blank control group, the cell index (CI) values of the medium- and high-dose Ganxi Tablet groups decreased ($P<0.01$); compared with the medium-dose Ganxi Tablet group, the CI value of the high-dose Ganxi Tablet group decreased ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the proportion of cells with reduced mitochondrial membrane potential and intracellular ROS levels increased in all Ganxi Tablet groups ($P<0.05$, $P<0.01$); compared with the low-dose Ganxi Tablet group, the proportion of cells with reduced mitochondrial membrane potential increased in the medium- and high-dose Ganxi Tablet groups ($P<0.05$), and intracellular ROS levels increased in the high-dose Ganxi Tablet group ($P<0.01$). Compared with the blank control group, MFN2 protein expression level decreased in all Ganxi Tablet groups ($P<0.05$), while DRP1 protein expression level increased ($P<0.05$, $P<0.01$); compared with the medium-dose Ganxi Tablet group, MFN2 protein expression level decreased while DRP1 protein expression level increased in the high-dose Ganxi Tablet group ($P<0.05$). Compared with the blank control and low-dose Ganxi Tablet groups, the apoptosis rate increased in the medium- and high-dose Ganxi Tablet groups ($P<0.01$); compared with the medium-dose Ganxi Tablet group, the apoptosis rate increased in the high-dose Ganxi Tablet group ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the cleaved PARP1/PARP1 ratio and BAX protein expression level increased in all Ganxi Tablet groups ($P<0.05$, $P<0.01$), while Cyt c protein expression level increased in the medium- and high-dose Ganxi Tablet groups ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the low-dose Ganxi Tablet group, the cleaved PARP1/PARP1 ratio and Cyt c protein expression level increased in the medium-dose Ganxi Tablet group ($P<0.05$), and the cleaved PARP1/PARP1 ratio as well as BAX and Cyt c protein expression levels increased in the high-dose Ganxi Tablet group ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Ganxi Tablet suppresses MFN2 expression and activates DRP1-mediated mitochondrial fission, thereby disrupting mitochondrial dynamics. This disruption induces mitochondrial fragmentation, oxidative stress, and membrane potential collapse, subsequently promoting Cyt c release, BAX upregulation, and PARP1 cleavage, ultimately activating the mitochondrial-dependent apoptotic pathway.

[**Keywords**] liver cancer; mitochondrial dynamics; HepG2; mitofusin 2; dynamin-related protein 1; apoptosis

肝癌在全球恶性肿瘤致死率排序中位居第三^[1],其高度异质性与获得性耐药特性严重制约了现有治疗策略的临床疗效^[2]。尽管以索拉非尼为代表的分子靶向治疗及程序性细胞死亡蛋白 1/程序性死亡配体 1 单抗等免疫检查点抑制剂取得一定进展^[3-5],但患者 5 年生存率仍不足 15%^[6]。这一治疗结局揭示现行肝癌治疗方案的局限性,亟须探索新的治疗靶点与干预策略。

线粒体动力学作为细胞中至关重要的生理过程,在肿瘤研究领域备受关注。线粒体动力学通过融合与分裂的动态平衡维持细胞稳态,决定线粒体网络的形态与功能。线粒体融合过程可修复受损线粒体,提升氧化磷酸化效率;分裂机制清除异常线粒体片段,保障线粒体群体功能稳态^[7]。此动态平衡是细胞代谢适应的关键,其失衡将干扰能量稳态、物质

运输及质量控制,进而损害细胞生理功能与增殖^[8-9]。在线粒体的调控机制中,线粒体融合蛋白(mitofusin, MFN)通过介导外膜融合维持线粒体网络完整性,抑制细胞色素 C(cytochrome c, Cyt c)释放与胱天蛋白酶(cysteine aspartic acid specific protease, Caspase)激活,实现对细胞程序性死亡的调控;而动力相关蛋白 1(dynamin-related protein 1, DRP1)则通过水解鸟苷三磷酸水解驱动线粒体膜收缩与分裂,其过度激活将诱导线粒体碎片化,促进 Cyt c 向胞质泄漏,并协同 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2-associated X protein, BAX)寡聚化以及聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1[poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP1]裂解,最终激活线粒体依赖性凋亡程序^[10-11]。

相较于单靶点药物,中医药以多组分、多靶点协同干预的特性为肝癌治疗提供了新思路。肝喜片源

自国医大师潘敏求 50 余年临床经验的凝练与总结^[12]。该方由党参、鳖甲、重楼、黄芪、白术、柴胡等 22 味中药组成,具有疏肝健脾、解毒抗癌的功效。肝喜片的抗肿瘤效应已在多维度研究中得到验证,其作用机制涵盖多层面生物学效应,包括:改善肝功能以增强临床协同疗效、调节氨基酸代谢通路等^[13-14],但关于其多靶点协同作用的具体机制尚未完全阐明。近年来,中药活性成分通过调节线粒体动力学发挥药理作用的研究取得重要进展^[15]。作为细胞能量代谢与凋亡调控的核心枢纽,线粒体的动态平衡对细胞稳态至关重要。已有研究证实,肝喜片组方中重楼的活性成分重楼皂苷Ⅶ可通过调节线粒体动力学诱导人卵巢癌细胞凋亡^[16]。基于上述研究基础,本研究提出如下假说:肝喜片可能通过调控 MFN2 与 DRP1,打破线粒体动态平衡并激活凋亡通路。本研究旨在揭示肝喜片通过调控线粒体动力学诱导肝癌细胞凋亡的分子机制,进一步完善其抗肿瘤作用的理论体系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞及实验动物 人肝癌细胞株 HepG2 由中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库提供(目录编号:TCHu 72)。细胞在添加 10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素双抗的 DMEM 高糖培养基中培养,培养条件为 37 ℃、5%CO₂ 恒温培养箱。每 2 天使用含 EDTA 的 0.25%胰蛋白酶溶液消化传代。

20 只体质量为 200~250 g 的雄性 SD 大鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司[许可证号:SCXK(京)2019-0008]。大鼠饲养于湖南省中医药研究院医学实验动物中心 SPF 级屏障环境,环境条件控制在温度(22±1) ℃,相对湿度 55%±5%,12 h/12 h 明暗周期(光照时段:07:00-19:00),自由摄食灭菌饲料及过滤饮用水。所有动物实验均按照湖南省中医药研究院实验动物伦理委员会批准的规程执行(审批号:DWZX-SB-2024015)。

1.1.2 药品及主要试剂 肝喜片由湖南省中西医结合医院(湖南省中医药研究院附属医院)中成药房提供(批准文号:湘药制字 Z20080761,批号:20230305,

规格:100 片/瓶);DMEM 培养基、青霉素-链霉素双抗溶液、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)、BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号:8123447、192814、2492939、5000205);胎牛血清(长沙赛尔博克斯生物科技有限公司,批号:2023032501);PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号:RIKB43639);RIPA 裂解液(强)(安徽白鲨生物科技有限公司,批号:2712232307217);MFN1、MFN2、DRP1 一抗(武汉爱博泰克生物科技有限公司,批号:A9880、A12771、A2586);PARP1cleavedPARP1(美国 Abcam 公司,批号:ab191217、ab32064);Cyt c、BAX、GAPDH(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:10993-1-AP、60267-1-Ig、60004-1-Ig);二抗山羊抗兔 IgG-HRP、山羊抗鼠 IgG-HRP(杭州戴格生物有限公司,批号:db10002、db10003);JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号:C2006);Annexin V-FITC/PE 凋亡试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号:E-CK-A211);2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, H2DCF-DA)(美国 APEX BIO 公司,批号:C3890)。

1.1.3 主要仪器 CO₂ 细胞培养箱(日本 Sanyo 公司,型号:MCO-175);倒置生物显微镜(日本 Olympus 公司,型号:CKX53);实时细胞分析仪(美国 ACE-Abio 公司,型号:xCELLigence);低温高速离心机(德国 Eppendorf 公司,型号:Centrifuge 5810R);流式细胞分析仪(美国 Beckman Coulter 公司,型号:DxFLEX);垂直凝胶电泳仪、半干转印系统转印槽(美国 Bio-Rad 公司,型号:PowerPac HC、Trans Blot SD);化学发光成像仪(英国 Gene 公司,型号:G:BOX Chemi XRQ)。

1.2 方法

1.2.1 含药血清制备 20 只 SD 大鼠经 3 d 适应性饲养后,以随机数字表法均分为对照组和实验组($n=10$)。根据体表面积换算公式^[17],将成人(70 kg,日摄入 100 mL 药物)剂量折算为小鼠等效剂量 1.03 g/kg。实验组按 10 mL/kg 灌胃给药,对照组给予等体积生理盐水,连续 7 d。末次给药 1 h 后,用 1%戊巴比妥钠溶液(45 mg/kg)腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉取血。血液置于 15 mL 离心管,在 4 ℃、3 000×g 条件下离心 15 min,取上层血清经 0.22 μm

微孔滤膜除菌处理,最后将血清保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.2.2 实验分组 参照前期研究成果,鉴于不同剂量的空白血清对细胞生长无明显影响^[18-19],故设置4个实验分组。空白对照组:培养基中添加15%空白血清;肝喜片低、中、高剂量组:培养基中添加10%、15%、20%肝喜片含药血清。各组均以无血清DMEM培养基作为基础培养体系。

1.2.3 实时无标记细胞分析 取对数生长期HepG2细胞,以5 000细胞/孔接种于实时细胞分析仪专用E-Plate电子微孔板。细胞贴壁后,加入血清干预,每组设3个生物学重复孔,在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育24 h。取3个平行孔细胞指数(cell index, CI)值均值作为各时间点数据,将加药点作为0 h点,使用GraphPad Prism 9.0绘制细胞生长动力学曲线,分析各组的细胞增殖动态。

1.2.4 细胞活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测 取对数生长期HepG2细胞,以 3×10^5 细胞/孔接种于6孔板。待细胞贴壁后,加入血清, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育24 h。干预结束后,酶解细胞移至15 mL离心管, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $400\times g$ 离心5 min弃上清,PBS洗涤2次(同条件离心)。用无水二甲基亚砜配制5 mmol/L H2DCFDA储备液,稀释为10 $\mu\text{mol/L}$ 工作液。向细胞沉淀加1 mL工作液, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 避光孵育30 min后移至2 mL离心管, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $400\times g$ 离心5 min弃上清。PBS洗涤2次,500 μL PBS重悬细胞。采用流式细胞术通过FL1通道采集H2DCFDA探针氧化生成的二氯荧光素(2',7'-dichlorofluorescein, DCF)绿色荧光信号,以未染色细胞作为阴性对照设门,定义ROS阳性细胞阈值(DCF强荧光群体)并计算ROS阳性细胞比例。

1.2.5 线粒体膜电位检测 取HepG2贴壁细胞,加入血清培养24 h。胰酶消化细胞,悬液移至15 mL离心管, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $400\times g$ 离心5 min弃上清,PBS重悬并重复离心。按JC-1试剂盒操作,加1 mL工作液重悬细胞, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育20 min,PBS洗涤2次后,使用流式细胞仪检测线粒体膜电位,其中FL1通道检测绿色荧光(单体),FL2通道检测红色荧光(聚合物)。通过比较红/绿平均荧光强度(mean flu-

orescence intensity, MFI)评估膜电位状态。

1.2.6 流式细胞术检测 取HepG2细胞,加入血清干预24 h。收集细胞时,弃培养液,胰酶消化后用完全培养基终止, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $300\times g$ 离心5 min。预冷PBS重悬,同条件重复离心清洗2次。按Annexin V-FITC/PE凋亡检测试剂盒操作,缓冲液重悬细胞,依次加入Annexin V-FITC工作液和PE标记液,室温避光孵育15 min,流式细胞仪检测,分析细胞凋亡率。

1.2.7 Western blot检测 使用含蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液,于冰上裂解HepG2细胞提取总蛋白, $13\text{ }000\times g$ 离心15 min后,用BCA试剂盒测定蛋白浓度。取30 μg 变性总蛋白,经12% SDS-PAGE凝胶电泳分离,半干转至0.22 μm PVDF膜上。以含5%脱脂奶粉的TBST封闭2 h,分别用DRP1(稀释比例为1:2 000)、MFN1(稀释比例为1:1 000)、MFN2(稀释比例为1:1 000)、PARP1(稀释比例为1:10 000)、cleaved PARP1(稀释比例为1:10 000)、Cyt c(稀释比例为1:5 000)、BAX(稀释比例为1:20 000)、GAPDH(稀释比例为1:250 000)抗体工作液 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。TBST洗膜3次(每次15 min),对应种属加入山羊抗兔/抗鼠HRP标记二抗(稀释比例为1:5 000)室温孵育1 h,充分洗涤后用ECL化学发光显色并获取条带图像。用ImageJ分析灰度值,以GAPDH为内参标准化,实验设3次独立生物学重复。

1.2.8 统计学分析 使用GraphPad Prism 9.0进行统计学分析。计量数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,通过Shapiro-Wilk检验验证数据正态性。正态分布数据采用单因素方差分析(one-way ANOVA)评估组间差异;非正态分布数据则使用Kruskal-Wallis非参数检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝喜片含药血清对HepG2细胞增殖的影响

在0~24 h的干预期内,各组CI值均呈动态变化(见图1)。实验进行24 h时,与空白对照组、肝喜片低剂量组比较,肝喜片中、高剂量组CI值均降低($P<0.01$)。与肝喜片中剂量组比较,肝喜片高剂量组CI值降低($P<0.05$)。详见表1。

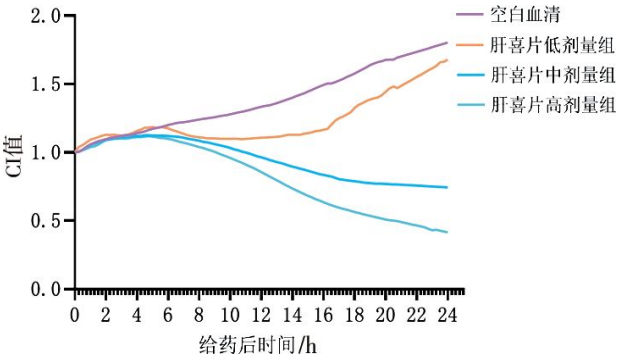


图 1 各组 HepG2 细胞增殖动力学实时监测结果

Fig.1 Real-time monitoring results of proliferation kinetics of HepG2 cells in each group

表 1 各组 HepG2 细胞 24 h CI 值比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 1 Comparison of 24 h CI values of HepG2 cells among different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	CI 值
空白对照组	1.842±0.038
肝喜片低剂量组	1.736±0.057
肝喜片中剂量组	0.757±0.047***
肝喜片高剂量组	0.372±0.044***▲

注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$;与肝喜片低剂量组比较, *** $P<0.01$;与肝喜片中剂量组比较, ▲ $P<0.05$ 。

2.2 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞线粒体功能的影响

与空白对照组比较,肝喜片低、中、高剂量组线粒体膜电位降低($P<0.05, P<0.01$),细胞内 ROS 水平升高($P<0.05, P<0.01$)。与肝喜片低剂量组比较,肝喜片中、高剂量组线粒体膜电位降低($P<0.05$);肝喜片高剂量组细胞内 ROS 水平升高($P<0.01$)。详见表 2—3。

表 2 各组 HepG2 细胞线粒体膜电位比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 2 Comparison of mitochondrial membrane potential in HepG2 cells among different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	(FL2/FL1)MFI
空白对照组	14.572±0.069
肝喜片低剂量组	13.807±0.048*
肝喜片中剂量组	13.325±0.065***
肝喜片高剂量组	12.882±0.105***

注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与肝喜片低剂量组比较, *** $P<0.05$ 。

2.3 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞 MFN1、MFN2、DRP1 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,肝喜片低、中、高剂量组

表 3 各组 HepG2 细胞 ROS 含量比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 3 Comparison of ROS content in HepG2 cells among different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	ROS 阳性细胞/%
空白对照组	27.750±1.060
肝喜片低剂量组	40.940±0.210**
肝喜片中剂量组	43.885±1.235*
肝喜片高剂量组	48.940±0.419***

注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与肝喜片低剂量组比较, *** $P<0.01$ 。

MFN2 蛋白表达水平降低($P<0.05$),DRP1 蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$)。与肝喜片低剂量组比较,肝喜片高剂量组 MFN2 蛋白表达水平降低($P<0.05$),DRP1 蛋白表达水平升高($P<0.05$)。详见图 2、表 4。

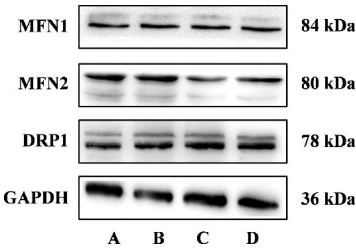


图 2 各组 HepG2 细胞 MFN1、MFN2、DRP1 蛋白电泳图

Fig.2 Protein electrophoresis diagrams of MFN1, MFN2, and DRP1 in HepG2 cells among different groups

注:A.空白对照组;B.肝喜片低剂量组;C.肝喜片中剂量组;D.肝喜片高剂量组。

表 4 各组 HepG2 细胞 MFN1、MFN2、DRP1 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 4 Comparison of protein expression levels of MFN1, MFN2, and DRP1 in HepG2 cells among different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	MFN1	MFN2	DRP1
空白对照组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
肝喜片低剂量组	1.056±0.146	0.826±0.034*	1.151±0.010**
肝喜片中剂量组	0.968±0.035	0.814±0.015*	1.335±0.056*
肝喜片高剂量组	0.921±0.114	0.705±0.025**	1.729±0.094**

注:与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与肝喜片低剂量组比较, *** $P<0.05$ 。

2.4 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞凋亡的影响

与空白对照组、肝喜片低剂量组比较,肝喜片中、高剂量组细胞凋亡率升高($P<0.01$)。与肝喜片中剂量组比较,肝喜片高剂量组细胞凋亡率升高($P<0.05$)。详见表 5。

表 5 各组 HepG2 细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 5 Comparison of apoptosis rates in HepG2 cells among different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	凋亡细胞率/%
空白对照组	20.705±0.555
肝喜片低剂量组	22.100±0.200
肝喜片中剂量组	34.390±1.190** ^{##}
肝喜片高剂量组	48.110±2.040** ^{##} ▲

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与肝喜片低剂量组比较,^{##} $P<0.01$,与肝喜片中剂量组比较,▲ $P<0.05$ 。

与空白对照组比较,肝喜片中剂量组 PARP1 蛋白表达水平降低($P<0.05$);肝喜片高剂量组 PARP1 蛋白表达水平降低($P<0.01$);肝喜片低、中、高剂量组 cleaved PARP1/PARP1 比值及 cleaved PARP1、BAX 蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$);肝喜片中、高剂量组 Cyt c 蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$)。与肝喜片低剂量组比较,肝喜片中剂量组 cleaved PARP1/PARP1 比值及 Cyt c 蛋白表达水平升高($P<0.05$);肝喜片高剂量组 PARP1 蛋白表达水平降低($P<0.05$),cleaved PARP1/PARP1 比值及 cleaved PARP1、BAX、Cyt c 蛋白表达水平升高($P<0.05, P<0.01$)。与肝喜片中剂量组比较,肝喜片高剂量组 PARP1 蛋白表达水平降低($P<0.05$),cleaved PARP1 蛋白表达水平升高($P<0.01$)。详见图 3、表 6。

3 讨论

肝癌作为全球发病率持续居高^[20]、临床治疗极具挑战性的恶性肿瘤,其高侵袭性、易转移性及耐药性等生物学特性严重威胁人类生命健康与生存质量。线粒体作为细胞能量代谢及信号调控的核心枢纽,通过动态的融合与分裂过程维持功能稳态;融合

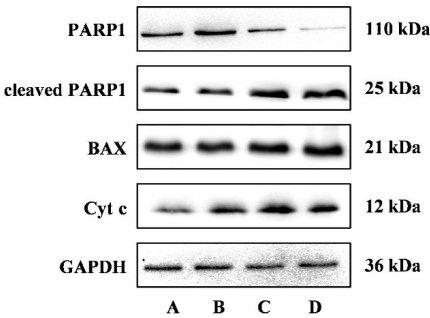


图 3 各组 HepG2 细胞 PARP1、cleaved PARP1、BAX、Cyt c 蛋白电泳图

Fig.3 Protein electrophoresis diagrams of PARP1, cleaved PARP1, BAX, and Cyt c of HepG2 cells in each group

注:A.空白对照组;B.肝喜片低剂量组;C.肝喜片中剂量组;D.肝喜片高剂量组。

过程促进线粒体 DNA 及代谢产物的交换,有效提升氧化磷酸化效率;分裂过程则及时隔离受损片段,并借助线粒体自噬实现质量控制^[21]。线粒体融合与分裂的协同运作,维持线粒体网络的动态平衡,在氧化应激应答、凋亡信号激活等关键生理过程中发挥核心调控作用^[22]。本研究基于体外细胞模型,通过解析中药复方肝喜片诱导人肝癌细胞线粒体依赖性凋亡的分子机制,系统阐释其含药血清的抗肿瘤效应。

借助实时无标记细胞分析技术,证实肝喜片对 HepG2 细胞生长呈现明显的抑制作用。深入探究发现,肝喜片含药血清处理可引发 HepG2 细胞线粒体功能的系统性损伤;线粒体膜电位的降低与 ROS 的大量累积,是线粒体结构完整性受损及功能稳态失衡的直接表征^[23],这些现象与线粒体动力学失衡存在密切关联。Western blot 实验结果显示,肝喜片干预使 MFN2 的表达水平显著降低,而 DRP1 的表达则明显升高,二者的表达失衡直接加剧了线粒体网络

表 6 各组 HepG2 细胞 PARP1、cleaved PARP1、BAX、Cyt c 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

Table 6 Comparison of protein expression levels of PARP1, cleaved PARP1, BAX, and Cyt c in HepG2 cells among different groups ($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	PARP1	cleaved PARP1	cleaved PARP1/PARP1	BAX	Cyt c
空白对照组	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
肝喜片低剂量组	1.068±0.105	2.028±0.062**	1.911±0.131*	1.516±0.341*	1.564±0.175
肝喜片中剂量组	0.763±0.039*	2.489±0.092**	3.266±0.047** ^{##}	2.750±0.264*	2.514±0.075** ^{##}
肝喜片高剂量组	0.372±0.055** ^{##} ▲	3.927±0.109** ^{##} ▲▲	10.828±1.889* ^{##}	3.930±0.397* ^{##}	3.583±0.319* ^{##}

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与肝喜片低剂量组比较,^{##} $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与肝喜片中剂量组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$ 。

的碎片化程度。从分子调控机制分析, MFN1/2 作为介导线粒体外膜融合的关键蛋白, 与驱动线粒体分裂的 DRP1 共同构成线粒体动力学调控体系^[24]。在肝喜片的作用下, MFN2 表达受到抑制导致线粒体融合修复能力大幅衰减, 致使受损线粒体难以恢复正常功能; 同时 DRP1 异常活化促使其快速募集至线粒体表面, 形成分裂复合物, 加速线粒体碎片化进程。二者失衡打破线粒体动态平衡, 最终导致线粒体结构崩解、功能丧失, 进而引发膜电位降低与胞内 ROS 水平升高。

流式细胞术检测结果进一步证实, 肝喜片含药血清可诱导 HepG2 细胞凋亡率升高, 且伴随线粒体凋亡通路的特异性激活; 定位于线粒体外膜的促凋亡蛋白 BAX 表达升高并发生寡聚化, 介导线粒体外膜透化; Cyt c 从线粒体膜间隙释放至胞质后, 与凋亡蛋白酶激活因子形成凋亡体, 触发 Caspase 级联反应, 最终通过活化 PARP1, 推动肿瘤细胞进入死亡程序^[25]。其中, PARP1 的活化是 DNA 损伤无法修复的分子标志, 与 BAX 寡聚化形成功能协同, BAX 介导的膜通透性增加可促使 ROS 与 Cyt c 的释放, 而 ROS 的大量释放又可进一步强化 BAX 的促凋亡活性, 放大凋亡信号^[26], 这一机制为肝喜片诱导 HepG2 细胞凋亡提供了合理的分子解释。

相比传统单靶点小分子抑制剂, 中药复方肝喜片基于其多组分协同作用机制, 展现出多维治疗优势。其处方中党参、重楼、柴胡等活性成分(如党参多糖、重楼皂苷、柴胡皂苷)的抗肿瘤机制已被广泛验证^[27-29]; 党参多糖通过抑制 PI3K/Akt 通路阻滞 HepG2 细胞增殖^[30]; 多种重楼皂苷能通过升高 BAX 及 PARP1 活性, 经线粒体途径诱导肿瘤细胞凋亡^[31]; 柴胡皂苷对肝癌细胞的增殖抑制及促凋亡活性也早有研究报道^[32]。本研究进一步揭示, 肝喜片通过靶向调控线粒体动力学关键分子, 即抑制 MFN2 表达、促进 DRP1 活化, 引发线粒体碎片化与功能损伤, 进而特异性激活线粒体依赖的 Caspase 凋亡通路, 最终实现对 HepG2 肝癌细胞的增殖抑制与凋亡诱导。尽管本研究初步阐明了肝喜片通过干扰线粒体动力学诱导 HepG2 细胞凋亡的机制, 但仍存在一定局限: 实验仅基于体外 HepG2 细胞模型, 未能反映

肿瘤微环境及体内代谢过程对药效的影响。后续需通过人源肿瘤异种移植模型或转基因肝癌动物模型, 在体内水平验证肝喜片对线粒体动力学的调控作用及抗肿瘤效应。

综上所述, 本研究借助实时无标记细胞分析等实验技术, 阐明肝喜片含药血清通过抑制 MFN2 表达、促进 DRP1 表达, 干扰肝癌细胞 HepG2 的线粒体动力学, 进而诱导细胞经线粒体途径发生凋亡的分子机制, 为该药物的临床应用提供了实验依据。

参考文献

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2021, 71(3): 209-249.
- [2] CHAN Y T, ZHANG C, WU J, et al. Biomarkers for diagnosis and therapeutic options in hepatocellular carcinoma[J]. Molecular Cancer, 2024, 23(1): 189.
- [3] LLOVET J M, PINYOL R, YARCHOAN M, et al. Adjuvant and neoadjuvant immunotherapies in hepatocellular carcinoma[J]. Clinical Oncology, 2024, 21(4): 294-311.
- [4] YAU T, PARK J W, FINN R S, et al. Nivolumab versus sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 459): A randomised, multicentre, open-label, phase 3 trial[J]. Oncology, 2022, 23(1): 77-90.
- [5] YANG C, ZHANG H, ZHANG L, et al. Evolving therapeutic landscape of advanced hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology & Hepatology, 2023, 20(4): 203-222.
- [6] 郑永昌, 毛一雷. 早诊早治, 提高我国肝癌 5 年生存率[J]. 肝胆胰外科杂志, 2022, 34(6): 321-324.
- [7] MEYER J N, LEUTHNER T C, LUZ A L. Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity[J]. Toxicology, 2017, 391: 42-53.
- [8] MISHRA P, CHAN D C. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease[J]. Molecular Cell Biology, 2014, 15(10): 634-646.
- [9] ROSSMANN M P, DUBOIS S M, AGARWAL S, et al. Mitochondrial function in development and disease[J]. Disease Models & Mechanisms, 2021, 14(6): 048912.
- [10] KLEELE T, REY T, WINTER J, et al. Distinct fission signatures predict mitochondrial degradation or biogenesis[J]. Nature, 2021, 593(7859): 435-439.
- [11] KHATUN J, GELLES J D, CHIPUK J E. Dynamic death deci-

- sions: How mitochondrial dynamics shape cellular commitment to apoptosis and ferroptosis[J]. *Developmental Cell*, 2024, 59(19): 2549–2565.
- [12] 邓天好, 曾普华, 刘 珍, 等. 基于“瘀、毒、虚”理论探析潘敏求论治肝癌的学术思想[J]. *中医肿瘤学杂志*, 2021, 3(6): 62–66.
- [13] 陈观清, 潘 博, 李映辰, 等. 肝喜片治疗晚期原发性肝癌的临床疗效分析: 一项回顾性队列研究[J]. *湖南中医杂志*, 2024, 40(11): 5–8.
- [14] 陈玲珑, 赵 荻, 彭艳梅. 基于血清非靶向代谢组学研究肝喜片抗肿瘤的作用机制[J]. *湖南中医杂志*, 2023, 39(9): 147–153.
- [15] 楚 魏, 马洪月, 朴钟源, 等. 线粒体动力学对肿瘤、神经、心血管系统疾病的影响及中药干预[J]. *中医学报*, 2023, 38(11): 2274–2281.
- [16] 赵刘碧琦. 重楼皂苷Ⅶ通过调节线粒体动力学诱导人卵巢癌细胞凋亡[D]. 长春: 吉林大学, 2020.
- [17] 谭婉俊, 吴官保, 彭兴宁, 等. 补肾活血汤含药血清调控髓核细胞外泌体中 miR-222-3p 抑制髓核细胞凋亡的研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2025, 45(3): 425–431.
- [18] 罗 燕, 曾普华, 奚剑敏, 等. 肝喜合剂含药血清对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中成药*, 2023, 45(4): 1285–1288.
- [19] 罗 燕, 唐 蔚, 陈玲珑, 等. 肝喜片通过 miR200a/ZEB 信号通路抑制肝癌细胞 HepG2 上皮间质转化的机制研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(11): 2007–2013.
- [20] 曹毛毛, 杨 帆, 李倩茹, 等. 中日韩肝癌流行病学分布对比分析[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2024, 31(4): 205–209.
- [21] CAO K, RILEY J S, HEILIG R, et al. Mitochondrial dynamics regulate genome stability via control of caspase-dependent DNA damage[J]. *Developmental Cell*, 2022, 57(10): 1211–1225.
- [22] GIACOMELLO M, PYAKUREL A, GLYTSOU C, et al. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics[J]. *Molecular Cell Biology*, 2020, 21(4): 204–224.
- [23] VODICKA P, VODENKOVA S, DANESOVA N, et al. Mitochondrial DNA damage, repair, and replacement in cancer[J]. *Trends Cancer*, 2025, 1(1): 62–73.
- [24] TILOKANI L, NAGASHIMA S, PAUPE V, et al. Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms[J]. *Essays in Biochemistry*, 2018, 62(3): 341–360.
- [25] LIU B H, XU C Z, LIU Y, et al. Mitochondrial quality control in human health and disease[J]. *Military Medical Research*, 2024, 11(1): 32.
- [26] PISTRITTO G, TRISCIUOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies[J]. *Aging*, 2016, 8(4): 603–619.
- [27] 聂 岑, 谭 君, 陈 乾, 等. 重楼皂苷化学成分及抗肿瘤作用研究进展[J]. *肿瘤药学*, 2022, 12(3): 337–343.
- [28] 王馨晨, 艾 楠, 刘星宇, 等. 柴胡皂苷保肝作用的研究进展[J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(6): 1564–1568.
- [29] 胡 超, 曹 雯, 许立拔, 等. 清热解毒类中药单体的体外内抗肝癌作用研究[J]. *广西医学*, 2016, 38(1): 85–88.
- [30] 刘云鹤, 蔡金保, 王红丽. 党参多糖抑制 PI3K/AKT 通路对人肝癌 HepG2 细胞生长和运动能力的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(9): 1108–1113.
- [31] 赫名扬, 王成志, 张 山, 等. 中药单体皂苷类调控线粒体凋亡抗肿瘤作用机制的研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(5): 119–123, 286.
- [32] 冯建有. 中药柴胡及其注射液抗肝癌作用机制初探[D]. 太原: 山西大学, 2019.

(本文编辑 周 旦)