

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2024.06.011

实验研究

实脾消积饮含药血清对肝癌 HepG2 细胞
线粒体动力学平衡和铁死亡的影响翦慧颖¹, 李克雄², 曾普华²✉

1. 湖南中医药大学, 湖南省长沙市岳麓区学士路 300 号, 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

[摘要] 目的 从细胞线粒体动力学平衡和铁死亡角度探讨实脾消积饮治疗原发性肝癌的可能作用机制。方法 制备实脾消积饮含药血清, 体外培养肝癌 HepG2 细胞。设置空白组、对照组、顺铂组 (10 $\mu\text{g/ml}$) 及 5%、10%、15% 含药血清组, 每组设 4 个复孔。各组加入相应的药物, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养 24 h 后采用 CCK-8 实验计算细胞存活率, Transwell 小室侵袭实验培养 48 h 后计算穿过基质胶到达上层小室膜的细胞数量, 划痕实验培养 24 h、48 h 计算划痕迁移率, 筛选含药血清浓度进行后续实验。实验设置对照组、10% 含药血清组 (筛选出的浓度)、10% 含药血清+Mdivi-1 组, 培养 24 h 后检测线粒体、活性氧 (ROS) 平均荧光强度及三磷酸腺苷 (ATP) 含量, 检测细胞胞浆和线粒体动力相关蛋白 1 (Drp1)、线粒体磷酸化动力相关蛋白 1 (p-Drp1) 蛋白表达。实验设置对照组、10% 含药血清组、铁死亡激活剂组 (Erastin, 10 $\mu\text{mol/L}$)、10% 含药血清+铁死亡抑制剂组 (ferrostatin-1, 10 $\mu\text{mol/L}$), 各组加入相应药物后培养 24 h, 检测细胞内谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 含量以及亚铁离子水平, 检测细胞中溶质载体家族 7 成员 11 (SLC7A11)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPX4) 蛋白表达。结果 与对照组比较, 各浓度的含药血清组和顺铂组细胞存活率、侵袭个数及 24 h、48 h 划痕迁移率均降低 ($P<0.01$); 随着含药血清浓度的增加, 含药血清组细胞存活率、侵袭个数及 48 h 划痕迁移率逐渐降低 ($P<0.01$), 最终筛选出 10% 实脾消积饮含药血清作为后续实验干预浓度。与对照组相比, 10% 含药血清组线粒体平均荧光强度及 ATP 含量降低, ROS 平均荧光强度升高 ($P<0.05$); 与 10% 含药血清组比较, 10% 含药血清+Mdivi-1 组线粒体平均荧光强度、ATP 含量升高, ROS 平均荧光强度降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与对照组比较, 其余各组细胞中 GSH 含量及 SLC7A11、GPX4 蛋白表达降低, MDA 含量及亚铁离子水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与铁死亡激活剂组比较, 10% 含药血清组和 10% 含药血清+铁死亡抑制剂组 MDA 含量及亚铁离子水平降低, SLC7A11、GPX4 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与 10% 含药血清组比较, 10% 含药血清+铁死亡抑制剂组 GSH 含量亦升高 ($P<0.01$)。结论 实脾消积饮含药血清可能通过引起线粒体动力学失衡及诱导铁死亡, 抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖、侵袭与迁移, 从而发挥抗肝癌作用。

[关键词] 原发性肝癌; 实脾消积饮; HepG2 细胞; 线粒体; 动力学; 铁死亡

原发性肝癌 (以下简称肝癌) 为我国常见恶性肿瘤之一。肝癌起病隐匿、恶性程度高, 进展快, 预后差且死亡率高, 总体 5 年生存率约 3%~6%^[1], 中位生存时间约 23 个月^[2], 晚期肝癌的中位生存

时间仅 6 个月^[3-4], 对患者及社会均造成了严重的疾病负担。因此, 探寻延缓肝癌进展、抗侵袭转移的治疗方法方药是改善肝癌患者预后、延长生存期的关键。实脾消积饮 (原名益气化痰解毒方、固脾消积饮) 为潘敏求教授团队近 50 年治疗肝癌的临床经验方, 具有实脾扶正固本、解毒散结消积的功效。既往临床研究证实该方具有稳定瘤体、调节免疫、改善生活质量、抗复发转移的特点, 可使患

基金项目: 国家自然科学基金 (82074425); 国家中医药管理局青年岐黄学者支持项目; 湖南省科技创新计划; 湖南省自然科学基金 (2023JJ40400); 湖南省中医药科研计划 (D2022010); 湖南省中医药研究院科研课题 (202115)

✉ 通讯作者: zph120@126.com

者呈现“带瘤生存”的状态^[5]；基础实验研究发现，该方能诱导肝癌细胞的程序性死亡，调控线粒体功能和能量代谢，从而抑制肝癌细胞的增殖^[6-9]。

肿瘤细胞的快速增殖需要足够的能量，线粒体作为细胞的主要能量产生细胞器，其动力学的平衡影响着各种生理病理过程^[10]。铁死亡是一种铁依赖性的、伴随过度脂质过氧化的调节性细胞死亡方式。肝脏储藏铁并能调控铁的稳态与水平，因而对诱导铁死亡的治疗敏感^[11]。本研究选用肝癌 HepG2 为实验细胞株，从线粒体动力学平衡及铁死亡相关指标探讨实脾消积饮延缓肝癌进展的可能作用机制，为其临床应用提供科学依据。本动物实验经湖南中医药大学动物伦理委员会批准，批准号：LL2022070501。

1 材料

1.1 动物和细胞

SPF 级 SD 雄鼠 20 只，5~6 周龄，体质量 180~220 g，购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司，实验动物质量合格证号：SCXK（湘）2019-0004。饲养于湖南中医药大学实验动物中心，自由饮水，普通饮食，温度 22~26℃，干燥、通风，光照 12 h 明暗交替，湿度 50%~70%。HepG2 细胞为中南大学湘雅医学院肿瘤研究所馈赠。

1.2 药物

实脾消积饮组成：黄芪、人参、茯苓、女贞子、淫羊藿、石见穿、桃仁、土鳖虫、预知子、郁金、法半夏、半枝莲、龙葵、壁虎、皂角刺，按照 3:3:3:2:2:3:1:1:2:2:1:3:3:1:1 的比例配制。药物购自湖南省中医药研究院附属医院中药房，将各药物按比例配制，5 倍量冷水浸泡 30 min，大火煮沸后，转小火煎 30 min，趁热过滤，药渣再煎煮一次，两道药液混合后过滤、离心、去渣，再将药物浓缩至含生药 2.0 g/ml，4℃ 保存。注射用顺铂（10 mg/支，国药准字：H20023460，齐鲁制药有限公司），用 0.9% 氯化钠注射液配置成浓度为 1 mg/ml 的溶液，细胞实验时以完全培养基稀释成浓度为 10 μg/ml 的工作液。

1.3 主要试剂及仪器

DMEM 培养基（货号：PM15210）、青霉素/链霉素（双抗）溶液（货号：PB180120），武汉普诺赛生命科技有限公司；胎牛血清（Gibco 公司，货号：A316081）；CCK-8 试剂盒（ApexBio 公司，货号：k1018）；铁死亡激活剂 Erastin（货号：HY-

15763）、铁死亡抑制剂 ferrostatin-1（货号：A4371）、动力相关蛋白 1 蛋白抑制剂 Mdivi-1（货号：HY15886），MCE 公司；Transwell 小室（Coster 公司，货号：3422）；Matrigel 基质胶（Corning 公司，货号：356234）；4% 多聚甲醛（Biosharp 公司，货号：BL539A）；谷胱甘肽（GSH）比色法测试盒（武汉伊瑞莱特生物科技股份有限公司，货号：E-BC-K030-M）；丙二醛（MDA）检测试剂盒（货号：S0131S）、线粒体绿色荧光探针（货号：C1048）、细胞线粒体分离试剂盒（货号：C3601），碧云天生物技术有限公司；亚铁离子检测探针-FerroOrange（日本同仁化学研究所，货号：F374）；三磷酸腺苷（ATP）含量检测试剂盒（北京盒子生工科技有限公司，货号：AKOP004M）；活性氧（ROS）荧光法测试盒（Elabscience 公司，货号：E-BC-K138-F）；NP40 裂解液（Solarbio 公司，货号：N8032）；溶质载体家族 7 成员 11（SLC7A11）抗体（货号：AF301472）、谷胱甘肽过氧化物酶 4（GPX4）抗体（货号：AF301385）、动力相关蛋白 1（Drp1）抗体（货号：AF02064）、磷酸化动力相关蛋白 1（p-Drp1）抗体（货号：AF14404），艾方生物科技有限公司；β-actin 抗体（Affinity 公司，货号：AF7018）；过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG（Elabscience 公司，货号：E-AB-1003）；ECL 化学发光底物（Biosharp 公司，货号：BL520A）。

酶标仪（美国 BioTek 公司，EIX808U 型）；倒置荧光显微镜（日本奥林巴斯公司，XDS-600C 型）；微量高速冷冻离心机（Eppendorf 公司，Microfuge 20R 型）；单细胞分析系统（美国贝克曼库尔特有限公司，CytoFLEX 型）；电泳仪（美国伯乐公司，PowerPac 型）。

2 方法

2.1 实脾消积饮含药血清的制备

20 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为药物组、对照组各 10 只。根据《中药药理研究方法学》^[12]中人和大鼠间按体表面积折算的等效剂量比值，得出药物组予实脾消积饮 37.26 g/（kg·d）灌胃，对照组予纯净水 10 ml/（kg·d）灌胃。在灌胃前 12 h 禁食不禁水，每天灌胃 1 次，连续 7 天，最后 1 次灌胃 1 h 后腹主动脉采血，4℃、3000 r/min 离心 15 min（离心半径 6 cm），收集含药血清，合并同组含药血清，灭活后备用。

2.2 实脾消积饮含药血清实验药物浓度的筛选

通过对细胞活力及细胞侵袭、迁移能力的评估,与对照组进行比较,以具有显著抑制效应的含药血清浓度作为后续实验的干预浓度。

2.2.1 CCK-8 法检测细胞活力 取对数生长期的 HepG2 细胞,以每孔 3000 个细胞接种于 96 孔板,设置空白组、对照组、顺铂组 (10 μg/ml) 及 5%、10%、15% 含药血清组,每组设 4 个复孔。待细胞贴壁后,各组加入相应的药物后放回 37℃、5% CO₂ 培养箱。干预 24 h 后加入 CCK-8 试剂,于培养箱中孵育 1 h 后,采用酶标仪测定 450 nm 处的 OD 值,计算细胞存活率。细胞存活率 = $\frac{(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}})}{(OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}})} \times 100\%$ 。

2.2.2 Transwell 小室侵袭实验检测细胞侵袭能力 取对数生长期的 HepG2 细胞,以每组 1×10^4 个细胞种入上层小室,实验分组同上,在上层小室加入不同处理药物,下层小室加入完全培养基,放回培养箱中。干预 48 h 后将上层小室用 4% 多聚甲醛固定 15 min,1% 结晶紫染色 1 h,自来水漂洗干净,晾干后显微镜下对各小室在 3 个随机选取的区域进行拍照,使用 ImageJ 1.8.0 软件计算穿过基质胶到达上层小室膜的细胞数量。

2.2.3 划痕实验检测细胞迁移能力 取对数生长期的 HepG2 细胞,以每孔 2×10^4 个细胞接种于 6 孔板,贴壁生长后用 200 μl 枪头垂直划线,并用 PBS 清洗 3 次,实验分组同上,根据分组加入不同药物干预。按照 0、24、48 h 时间点拍照,显微镜下观察划痕修复情况并拍照。最后使用 Image Pro Plus 6.0 软件进行划痕宽度像素统计,并计算划痕迁移率。划痕迁移率 = $\frac{(\text{划痕后即刻的划痕宽度} - \text{划痕后指定时间点的划痕宽度})}{\text{划痕后即刻的划痕宽度}} \times 100\%$ 。

2.3 线粒体功能检测

根据上述研究结果,筛选出实脾消积饮含药血清最佳干预浓度进行后续实验。设置对照组、筛选浓度的含药血清组、筛选浓度的含药血清 + Mdivi-1 (30 μmol/L) 组,各组加入相应药物后放回培养箱中干预 24 h。

2.3.1 检测细胞内 ATP 含量、ROS 荧光强度及线粒体损伤情况 根据 ATP 检测试剂盒说明书对细胞内 ATP 含量进行检测。根据 ROS 荧光法测试盒说明书,使用单细胞分析系统对细胞内 ROS 水平进行检测。Mito-Tracker 染色观察线粒体损伤情况,在培养板中加入 Mito-Tracker Green 工作液孵

育 30 min,在倒置荧光显微镜下观察及拍照,使用 ImageJ 1.8.0 软件计算平均荧光强度。

2.3.2 Western blot 法检测细胞胞浆和线粒体 Drp1、线粒体 p-Drp1 蛋白表达 NP40 裂解液裂解细胞 15 min,然后在 4℃、14 000 r/min 离心 10 min (离心半径 6 cm),BCA 法测定总蛋白浓度,100℃金属浴使蛋白变性,取 30 μg 蛋白样品上样,电泳,转膜,0.5% 脱脂牛奶封闭 1 h,加入一抗 (β-actin、Drp1、p-Drp1 稀释比均为 1:2000),4℃孵育过夜,收集一抗,TBST 洗膜 3 遍后孵育荧光二抗,37℃孵育 1 h,TBST 洗膜 3 遍后加入 ECL 化学发光底物进行显影,使用 ImageJ 1.8.0 软件分析 Drp1、p-Drp1 蛋白条带灰度值。

2.4 铁死亡水平检测

设置对照组、筛选浓度的含药血清组、铁死亡激活剂组 (Erastin, 10 μmol/L)、筛选浓度的含药血清 + 铁死亡抑制剂组 (ferrostatin-1, 10 μmol/L),各组加入相应药物后放回培养箱中干预 24 h。

2.4.1 检测细胞内 GSH、MDA 含量以及亚铁离子水平 干预结束后收集细胞,根据 GSH、MDA 试剂盒说明书进行 GSH、MDA 含量检测;根据亚铁离子检测探针试剂盒说明书步骤进行亚铁离子水平检测,在荧光显微镜下观察拍照,使用 ImageJ 1.8.0 软件计算平均荧光强度。

2.4.2 Western blot 法检测 SLC7A11、GPX4 蛋白表达 蛋白检测方法同 2.3.2,SLC7A11、GPX4 一抗稀释比均为 1:2000,使用 ImageJ 1.8.0 软件分析蛋白条带灰度值。

2.5 统计学方法

使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。计量资料均满足正态分布采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,方差齐时多组样本比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,方差不齐时采用 Welch 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组 HepG2 细胞存活率、侵袭个数及划痕迁移率比较

表 1 示,与对照组比较,各浓度的含药血清组和顺铂组细胞存活率、侵袭个数及 24 h、48 h 划痕迁移率均降低 ($P < 0.01$);随着含药血清浓度的增加,含药血清组细胞存活率、侵袭个数及 48 h 划痕迁移率逐渐降低 ($P < 0.01$),顺铂组除 24 h 划痕迁移率外其余各指标均低于各浓度含药血清组

表 1 各组 HepG2 细胞存活率、侵袭个数、划痕迁移率比较

Table 1 Comparison of survival rate, invasion number, and scratch migration rate of HepG2 cells in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	细胞存活率/%	侵袭个数/个	划痕迁移率/%	
				24 h	48 h
对照组	4	100.00±0.00	921±39	21.10±0.22	31.11±0.39
5% 含药血清组	4	88.09±1.15 ^{a)}	738±18 ^{a)}	19.46±0.61 ^{a)}	26.76±0.44 ^{a)}
10% 含药血清组	4	72.41±2.54 ^{a) b)}	494±6 ^{a) b)}	16.68±0.24 ^{a) b)}	22.34±0.32 ^{a) b)}
15% 含药血清组	4	49.45±0.97 ^{a) b) c)}	257±9 ^{a) b) c)}	15.80±0.08 ^{a) b)}	20.06±0.33 ^{a) b) c)}
顺铂组	4	35.04±0.92 ^{a) b) c) d)}	96±11 ^{a) b) c) d)}	14.79±0.23 ^{a) b)}	18.06±0.24 ^{a) b) c) d)}

注：a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与 5% 含药血清组比较， $P<0.01$ ；c) 与 10% 含药血清组比较， $P<0.01$ ；d) 与 15% 含药血清组比较， $P<0.01$ 。

($P<0.01$)。24 h 划痕迁移率各组比较，10%、15% 含药血清组和顺铂组显著低于 5% 含药血清组 ($P<0.01$)，10%、15% 含药血清组和顺铂组组间差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组 HepG2 细胞 Transwell 小室侵袭情况见图 1，细胞划痕迁移情况见图 2。根据实验结果，5% 实脾消积饮含药血清即产生对 HepG2 细胞的抑制作用，由于对照组培养液中胎牛血清的浓度为 10%，为避免血清浓度不同带来的影响，后续实验以 10% 实脾消积饮含药血清作为干预浓度。

3.2 各组 HepG2 细胞中线粒体、ROS 荧光强度和 ATP 含量比较

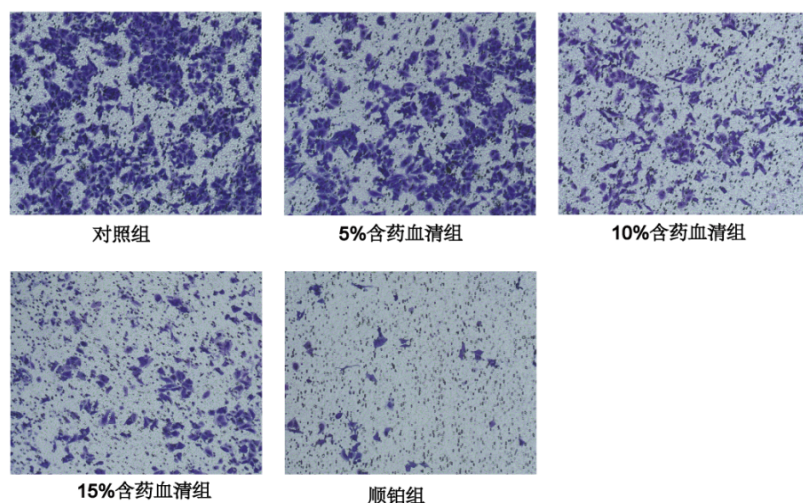
表 2 示，与对照组相比，10% 含药血清组线粒体平均荧光强度及 ATP 含量降低，ROS 平均荧光强度升高 ($P<0.05$)；与 10% 含药血清组比较，10% 含药血清+Mdivi-1 组线粒体平均荧光强度、ATP 含量升高，ROS 平均荧光强度降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组 HepG2 细胞线粒体荧光图见图 3。

3.3 各组 HepG2 细胞中 Drp1、p-Drp1 蛋白表达比较

表 3 示，与对照组比较，10% 含药血清组胞浆 Drp1 蛋白表达降低，线粒体 Drp1 和 p-Drp1 蛋白表达升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与 10% 含药血清组比较，10% 含药血清+Mdivi-1 组胞浆 Drp1 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，而线粒体 Drp1 和 p-Drp1 蛋白表达差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

3.4 各组 HepG2 细胞中 GSH、MDA 含量及亚铁离子水平比较

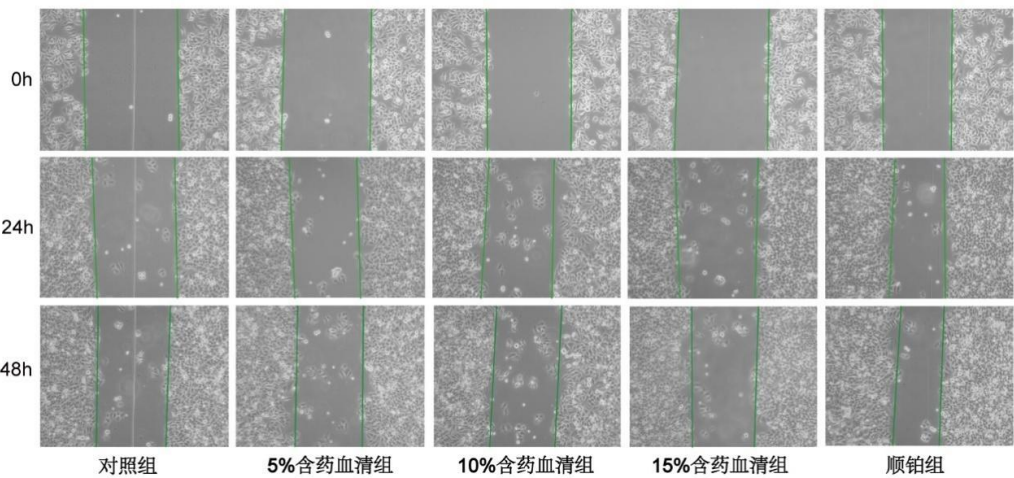
表 4 示，与对照组比较，其余各组细胞中 GSH 含量降低，MDA 含量及亚铁离子水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与铁死亡激活剂组比较，10% 含药血清组和 10% 含药血清+铁死亡抑制剂组 MDA 含量及亚铁离子水平降低，10% 含药血清+铁死亡抑制剂组 GSH 含量升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与 10% 含药血清组比较，10% 含药血清+铁死亡抑制剂组 GSH 含量亦升高 ($P<0.01$)。各组 HepG2 细胞亚铁离子荧光图见图 4。



注：图中深色部分为结晶紫染色的细胞团块。

图 1 各组 HepG2 细胞 Transwell 小室上层细胞侵袭情况 (结晶紫染色，×400)

Figure 1 Invasion diagram of cells in the upper layer of Transwell chamber of HepG2 cells in each group (crystal violet staining, ×400)

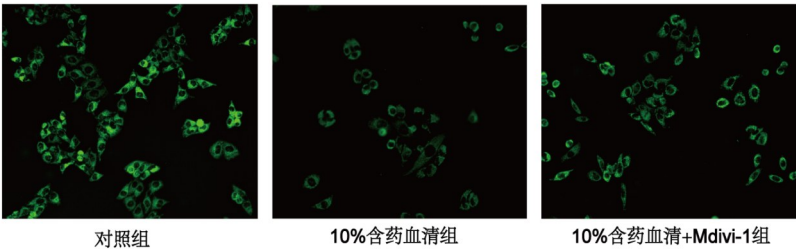


注：图中绿线为划痕后细胞迁移的最前端。
图2 各组 HepG2 细胞不同时间细胞划痕迁移情况 (×200)
Figure 2 Cell scratch migration of HepG2 cells in each group at different timepoints (×200)

表2 各组 HepG2 细胞线粒体、ROS 平均荧光强度及 ATP 含量比较

Table 2 Comparison of average fluorescence intensity of mitochondria and ROS and ATP content in HepG2 cells in each group ($\bar{x}\pm s$)				
组别	样本数	线粒体平均荧光强度/AU	ROS 平均荧光强度/AU	ATP 含量/ $\mu\text{mol}\cdot 10^8\text{ cell}^{-1}$
对照组	3	87.77 $\pm$ 3.20	49954.00 $\pm$ 1356.00	0.15 $\pm$ 0.09
10% 含药血清组	3	50.09 $\pm$ 5.17 ^{a)}	86895.00 $\pm$ 1551.00 ^{a)}	0.07 $\pm$ 0.01 ^{a)}
10% 含药血清+Mdivi-1 组	3	71.07 $\pm$ 2.40 ^{a) b)}	67016.00 $\pm$ 2687.00 ^{a) c)}	0.10 $\pm$ 0.01 ^{a) c)}

注：ROS，活性氧；ATP，三磷酸腺苷。
a) 与对照组比较， $P<0.05$ ；b) 与 10% 含药血清组比较， $P<0.05$ ；c) 与 10% 含药血清组比较， $P<0.01$ 。



注：图中绿色荧光代表染色的线粒体。
图3 各组 HepG2 细胞线粒体荧光图 (×400)
Figure 3 Fluorescence imaging of mitochondria of HepG2 cells in each group (×400)

表3 各组 HepG2 细胞 Drp1、p-Drp1 蛋白表达比较

Table 3 Comparison of Drp1 and p-Drp1 protein expression in HepG2 cells in each group ($/\beta\text{-actin}, \bar{x}\pm s$)				
组别	样本量	胞浆 Drp1	线粒体 Drp1	线粒体 p-Drp1
对照组	3	0.976 $\pm$ 0.07	0.768 $\pm$ 0.03	0.630 $\pm$ 0.08
10% 含药血清组	3	0.212 $\pm$ 0.05 ^{a)}	1.452 $\pm$ 0.18 ^{b)}	1.253 $\pm$ 0.06 ^{b)}
10% 含药血清+Mdivi-1 组	3	0.709 $\pm$ 0.08 ^{c)}	1.274 $\pm$ 0.19	1.049 $\pm$ 0.14

注：Drp1，动力相关蛋白 1；p-Drp1，磷酸化动力相关蛋白 1。
a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与对照组比较， $P<0.05$ ；c) 与 10% 含药血清组比较， $P<0.01$ 。

3.5 各组 HepG2 细胞中 SLC7A11、GPX4 蛋白表达比较
表 5 示，与对照组比较，其余各组 SLC7A11、GPX4 蛋白表达均降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与

铁死亡激活剂组比较，10% 含药血清组和 10% 含药血清+铁死亡抑制剂组 SLC7A11、GPX4 蛋白表达均升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与 10% 含药血清组比较，10% 含药血清+铁死亡抑制剂组 GPX4

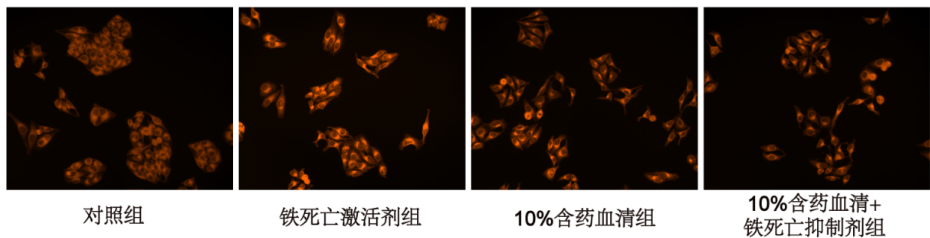
表 4 各组 HepG2 细胞 GSH、MDA 及亚铁离子水平比较

Table 4 Comparison of GSH, MDA and ferrous ion levels in HepG2 cells in each group ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	GSH 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	MDA 含量/ $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$	亚铁离子平均荧光强度
对照组	3	1.000 $\pm$ 0.06	0.933 $\pm$ 0.08	45.43 $\pm$ 1.30
铁死亡激活剂组	3	0.470 $\pm$ 0.03 ^{a)}	1.806 $\pm$ 0.18 ^{a)}	69.36 $\pm$ 2.15 ^{a)}
10% 含药血清组	3	0.580 $\pm$ 0.06 ^{a)}	1.414 $\pm$ 0.13 ^{a) c)}	58.39 $\pm$ 2.23 ^{a) c)}
10% 含药血清+铁死亡抑制剂组	3	0.795 $\pm$ 0.05 ^{a) c) e)}	1.284 $\pm$ 0.02 ^{b) d)}	55.77 $\pm$ 5.04 ^{b) c)}

注：GSH，谷胱甘肽；MDA 丙二醛。

a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与对照组比较， $P<0.05$ ；c) 与铁死亡激活剂组比较， $P<0.01$ ；d) 与铁死亡激活剂组比较， $P<0.05$ ；e) 与 10% 含药血清组比较， $P<0.01$ 。



注：图中橙色代表细胞内亚铁离子。

图 4 各组 HepG2 细胞中亚铁离子荧光图 ($\times 400$)

Figure 4 Fluorescence imaging of ferrous iron ions in HepG2 cells in each group ($\times 400$)

蛋白表达升高 ($P<0.05$)。

表 5 各组 HepG2 细胞 SLC7A11、GPX4 蛋白表达比较

Table 5 Comparison of SLC7A11 and GPX4 protein expression in HepG2 cells in each group ($/\beta\text{-actin}$, $\bar{x}\pm s$)

组别	样本量	SLC7A11	GPX4
对照组	3	1.014 $\pm$ 0.13	1.032 $\pm$ 0.08
铁死亡激活剂组	3	0.470 $\pm$ 0.03 ^{a)}	0.435 $\pm$ 0.09 ^{a)}
10% 含药血清组	3	0.664 $\pm$ 0.03 ^{a) c)}	0.627 $\pm$ 0.04 ^{a) c)}
10% 含药血清+铁死亡抑制剂组	3	0.767 $\pm$ 0.06 ^{b) d)}	0.830 $\pm$ 0.01 ^{b) d) e)}

注：SLC7A11，溶质载体家族 7 成员 11；GPX4，谷胱甘肽过氧化物酶 4。

a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与对照组比较， $P<0.05$ ；c) 与铁死亡激活剂组比较， $P<0.05$ ；d) 与铁死亡激活剂组比较， $P<0.01$ ；e) 与 10% 含药血清组比较， $P<0.05$ 。

4 讨论

根据肝癌相关症状、体征，可将其归属于中医学“脾积”“肝积”“积聚”“膨胀”“黄疸”“癥瘕”等范畴。《圣济总录》中记载：“积气在腹中，久不瘥……饮食不节，致脏腑气虚弱，饮食不消……久不已，令人身疲而腹大，至死不消。”《诸病源候论·积聚病诸候》中描述：“虚劳之人，阴阳损伤，血气凝涩，不能宣通经络，故积聚于内也。”《医林改错·膈下逐瘀汤所治症目》中提到：“积聚一证……气无形不能结块，结块者，必有形之血也。”《医学摘粹·杂证要法·实证类》中指出：“积聚

者，气血凝瘀也。积者所谓血滞而不濡者也。”课题组认为，癌毒、血瘀、脾虚是肝癌的关键病机。当机体脏腑亏虚，正气不足，外邪侵入并潜伏体内，阻滞气血津液的运行，气血津液停滞则聚湿生痰化热，加之七情郁滞，久则转化为癌毒。癌毒形成之后，反过来又会加剧气血津液的停滞，酿为水湿、痰饮、湿热，瘀毒胶结难去，进一步损害脾肾功能，加剧脏腑亏虚，形成恶性循环。实脾消积饮方中黄芪、人参、茯苓、女贞子、淫羊藿益气健脾、补益肝肾，发挥“实脾扶正固本”之功效；石见穿、桃仁、郁金、预知子、法半夏、土鳖虫化瘀散结、疏肝解郁，半枝莲、龙葵清热解毒，壁虎、皂角刺攻毒散结，发挥解毒散结消积之功效。全方共奏攻补兼施、扶正抗癌之功。

恶性肿瘤以其快速增殖、迁移、侵袭的能力而具有进展迅速、广泛转移和高复发的特性。本研究结果显示，随着实脾消积饮含药血清浓度的增加，肝癌 HepG2 细胞的存活率逐渐降低，侵袭通过基质胶的细胞数减少，细胞划痕迁移速度减慢，所有趋势同化疗药物顺铂的效应，说明实脾消积饮通过抑制肝癌 HepG2 细胞的存活率、侵袭及迁移能力来发挥抗肝癌的作用。综合实验结果，认为 10% 实脾消积饮含药血清对 HepG2 细胞具有抑制作用，且为和对照组浓度保持一致，故后续实验以 10% 实脾消积饮含药血清作为干预浓度。

肿瘤细胞为满足其快速地生长、增殖,需要足够多的 ATP 提供能量,而线粒体作为细胞的“能量工厂”,是维持细胞生存和稳态的重要细胞器,在合成 ATP 供能方面有着重要地位,也参与了细胞的分化、代谢、增殖、死亡等过程^[10, 13-14]。Drp1 是动力蛋白超家族成员之一,为线粒体分裂的必需蛋白^[15]。当位于胞质中的 Drp1 被招募到分裂部位,与分布在线粒体外膜的受体蛋白结合,形成包裹在线粒体周围的寡聚复合体,Drp1 的 GTP 酶活性驱动复合体在线粒体管周围收缩^[16],并通过磷酸化来影响线粒体的分裂过程,则线粒体发生分裂^[17-18]。线粒体功能的实现与线粒体结构的变化密不可分,而分裂与融合是实现功能的基础。正常情况下,线粒体的分裂与融合协同进行并处于动态平衡,以维持细胞内线粒体的形态、结构和功能稳定。当 Drp1 过表达,位于胞浆的 Drp1 向线粒体外膜募集,发生 Drp1 的线粒体转位,线粒体分裂异常增加、动力学失衡^[19],线粒体功能随之受损,细胞 ATP 产出降低,细胞的病理性裂变增加,导致大量 ROS 积累^[20-21],损伤细胞并导致死亡。本研究结果显示,与对照组比较,10% 含药血清组肝癌 HepG2 细胞的线粒体动力学失衡明显,线粒体功能受损,表现为线粒体荧光强度降低,细胞中 ATP 含量减少,ROS 积累增多,胞浆 Drp1 的蛋白表达水平降低,线粒体 Drp1 和 p-Drp1 蛋白表达增加,予以 Drp1 的抑制剂 Mdivi-1 进行干预后,仍出现以上结果及趋势,说明实脾消积饮可能通过引起线粒体动力学失衡来抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖、侵袭、迁移,进而发挥抗肝癌的作用。

既往研究表明,ROS 的爆发性积累会大量消耗如超氧化物歧化酶(SOD)、GSH 和 GPX4 等抗氧化物,使得细胞内的氧化还原系统失衡继而出现氧化应激。当细胞的抗氧化能力减弱,氧化和抗氧化调节失衡,细胞对 ROS 清除减少时,也可能引起以过氧化损伤为主的铁死亡^[22-23]。铁死亡是一种主要依赖于铁介导的伴随氧化损伤的调节性细胞死亡方式。GSH 是细胞抗氧化系统的主导力量,GPX4 可将活性磷脂氢氧化物(PL-OHO)还原为非活性磷脂醇(PL-OH),从而阻断自由基链反应,抑制脂质过氧化,抑制铁死亡,因此,GSH-GPX4 轴被认为是控制哺乳动物铁死亡的主要系统^[24-25]。GSH 的合成受胱氨酸/谷氨酸逆向转运蛋白 SLC7A11 的影响,SLC7A11 将细胞外的胱氨酸转运进细胞内,胱氨酸被还原为半胱氨酸,用于生物合成 GSH。

GSH 的耗竭可以直接使 GPX4 失活,并导致随后的铁死亡^[26]。本研究结果显示,与对照组比较,10% 含药血清组肝癌 HepG2 细胞中 GSH 含量降低,MDA 含量及亚铁离子增多,铁死亡调控蛋白 SLC7A11 及 GPX4 蛋白表达水平降低,趋势同铁死亡激活剂 Erastin;以铁死亡抑制剂 ferrostatin-1 进行回复实验后,仍出现以上结果及趋势,说明实脾消积饮可能通过诱导铁死亡来抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖、侵袭、迁移,进而发挥抗肝癌的作用。

综上所述,实脾消积饮可能通过引起线粒体动力学失衡并诱导铁死亡来抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖、侵袭与迁移,进而发挥抗肝癌的作用。但本研究仅开展了体外实验,在后续的研究中我们将完善体内实验,并深入探究线粒体动力学失衡和铁死亡之间的交互作用及分子机制,寻找实脾消积饮抗肝癌的关键效应机制。

参考文献

- [1] 郑金伟,袁权,夏宁邵.慢性乙型肝炎潜在治疗靶点和新药研发进展[J].微生物学报,2019,59(8):1437-1451.
- [2] LLOVET JM, CASTET F, HEIKENWALDER M, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2022,19(3):151-172.
- [3] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021,71(3):209-249.
- [4] CHIDAMBARANATHAN-REGHUPATY S, FISHER PB, SARKAR D. Hepatocellular carcinoma (HCC): epidemiology, etiology and molecular classification [J]. Adv Cancer Res, 2021,149:1-61. doi: 10.1016/bs.acr.2020.10.001.
- [5] 曾普华,郜文辉,潘敏求,等.益气化痰解毒方加减联合鸦胆子油乳经血管介入治疗中晚期原发性肝癌的临床研究[J].辽宁中医杂志,2013,40(1):18-21.
- [6] MACDONALD JA, BOTHUN AM, ANNIS SN, et al. A nanoscale, multi-parametric flow cytometry-based platform to study mitochondrial heterogeneity and mitochondrial DNA dynamics [J]. Commun Biol, 2019,2:258. doi: 10.1038/s42003-019-0513-4.
- [7] 柳卓,田雪飞,谭小宁,等.固脾消积饮对肝星状细胞共培养条件下 HepG2 细胞氨基酸代谢和能量代谢的影响[J].中国中医药信息杂志,2023,30(4):94-99.
- [8] 柳卓,田雪飞,郜文辉,等.固脾消积饮对人肝癌细胞 HepG2 线粒体结构功能的调节作用[J].中国药理学通报,2023,39(4):781-786.
- [9] 翦慧颖,郜文辉,谭小宁,等.基于网络药理学与分子

- 对接技术探讨固脾消积饮对肝癌 HepG2. 2. 15 细胞焦亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(6): 159-166.
- [10] JIN T, WANG C, TIAN Y, et al. Mitochondrial metabolic reprogramming: an important player in liver cancer progression [J]. *Cancer Lett*, 2020, 470: 197-203. doi: 10.1016/j.canlet.2019.11.029.
- [11] COLUCCI S, ALTAMURA S, HENTZE M, et al. Sensing of liver iron content requires cell-cell communication between hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells [J]. *Blood*, 2019, 134(Supplement 1):432-432.
- [12] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996: 1103.
- [13] SHARMA RK, CHAFIK A, BERTOLIN G. Aurora kinase A/AURKA functionally interacts with the mitochondrial ATP synthase to regulate energy metabolism and cell death[J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1):203.
- [14] KABIRI Y, FUHRMANN A, BECKER A, et al. Mitochondrial impairment by MitoBlock-6 inhibits liver cancer cell proliferation[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 725474. doi: 10.3389/fcell.2021.725474.
- [15] 周曼丽, 王健章, 冯宇, 等. 促线粒体融合分裂蛋白在线粒体融合、分裂和细胞凋亡中的调控机制研究进展[J]. 中国医药导报, 2019, 16(25):53-56.
- [16] LENNON FE, SALGIA R. Mitochondrial dynamics: biology and therapy in lung cancer [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2014, 23(5):675-692.
- [17] CRIBBS JT, STRACK S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death[J]. *EMBO Rep*, 2007, 8(10):939-944.
- [18] DICKEY AS, STRACK S. PKA/AKAP1 and PP2A/B β 2 regulate neuronal morphogenesis via Drp1 phosphorylation and mitochondrial bioenergetics [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(44):15716-15726.
- [19] 李芳, 陈正君, 葛俊李, 等. 党参经 PI3K/Akt 干预溃疡性结肠炎黏膜细胞铁死亡-线粒体动力学失衡的机制研究[J]. 中草药, 2023, 54(12):3865-3877.
- [20] ALAN P, VANDEVOORDE KR, JOSHI B, et al. Basal Gp78-dependent mitophagy promotes mitochondrial health and limits mitochondrial ROS [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(11):565.
- [21] COLPMAN P, DASGUPTA A, ARCHER SL. The role of mitochondrial dynamics and mitotic fission in regulating the cell cycle in cancer and pulmonary arterial hypertension: implications for dynamin-related protein 1 and mitofusin2 in hyperproliferative diseases [J]. *Cells*, 2023, 12(14):1897. doi:10.3390/cells12141897.
- [22] ZHENG D, LIU J, PIAO H, et al. ROS-triggered endothelial cell death mechanisms: focus on pyroptosis, parthanatos, and ferroptosis [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1039241. doi: 10.3389/fimmu.2022.1039241.
- [23] YUAN J, KHAN SU, YAN J, et al. Baicalin enhances the efficacy of 5-Fluorouracil in gastric cancer by promoting ROS-mediated ferroptosis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164:114986. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114986.
- [24] MA S, ADZAVON YM, WEN X, et al. Novel insights in the regulatory mechanisms of ferroptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 873029. doi: 10.3389/fcell.2022.873029.
- [25] PAN F, LIN X, HAO L, et al. The critical role of ferroptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10:882571. doi: 10.3389/fcell.2022.882571.
- [26] DIXON SJ, LEMBERG KM, LAMPRECHT MR, et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death [J]. *Cell*, 2012, 149(5):1060-1072.

Effect of *Shipi Xiaoji Beverage* (实脾消积饮) -containing Serum on Mitochondrial Dynamics Imbalance and Ferroptosis of Liver Cancer HepG2 Cells

JIAN Huiying¹, LI Kexiong², ZENG Puhua²

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. Hunan Province Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine/ The Affiliated Hospital of Hunan Academy of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To explore the possible mechanism of *Shipi Xiaoji Beverage* (实脾消积饮) in treating primary liver cancer from the perspective of mitochondrial dynamics imbalance and ferroptosis. **Methods** The *Shipi Xiaoji Beverage*-containing serum was prepared, and liver cancer HepG2 cells were cultured in vitro. The blank group, control group, cisplatin group (10 μ g/ml), and 5%, 10%, and 15% medicated serum groups were set, with 4 duplicate holes in each group. After adding the corresponding medicinals to each group, the cell survival rate was calculated using the CCK-8 test after 24-hour culture at 37 °C with 5% CO₂. Using transwell invasion assay, the number of cells that reached the upper chamber membrane through penetrating the Matrigel was calculated after culturing for 48 hours. The scratch migration rate was calculated after incubation for 24 h and 48 h in the scratch experiment, and

the concentration of the medicated serum was screened for subsequent experiments. The control group, 10% medicated serum group (the screened concentration) and 10% medicated serum+Mdivi-1 group were set up. After culturing for 24 hours, the average fluorescence intensity of mitochondria and reactive oxygen species (ROS), adenosine triphosphate (ATP) content and level were measured, and the protein expression of cytoplasmic and mitochondrial dynein-related protein 1 (Drp1) and mitochondrial phosphorylated dynamin-related protein 1 (p-Drp1) was detected. The control group, 10% medicated serum group, ferroptosis activator group (Erastin, 10 $\mu\text{mol/L}$) and 10% medicated serum+ferroptosis inhibitor group (fer-1, 10 $\mu\text{mol/L}$) were set up, and after adding the corresponding medicinals to each group and culture for 24 hours, the intracellular glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) content and ferrous ion level were detected, as well as the protein expression of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) and glutathione peroxidase 4 (GPX4) in cells. **Results** Compared to those in the control group, the cell survival rate, invasion number, 24 h and 48 h scratch migration rate in all medicated serum groups and cisplatin group significantly decreased ($P<0.01$); as the concentration of medicated serum increased, the cell survival rate, invasion number and 48h scratch migration rate of each medicated serum group gradually decreased ($P<0.01$), and finally, 10% of *Shipi Xiaoji Beverage*-containing serum was selected for subsequent experimental concentration. Compared to the control group, the 10% medicated serum group had decreased average fluorescence intensity of mitochondria and ATP content and increased average fluorescence intensity of ROS ($P<0.05$); compared to the 10% medicated serum group, the 10% medicated serum+Mdivi-1 group had higher average fluorescence intensity of mitochondria and ATP content and lower average fluorescence intensity of ROS ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to those in the control group, GSH content and protein expression of SLC7A11 and GPX4 in other groups significantly decreased, while MDA content and ferrous ion level increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared to the ferroptosis activator group, the 10% medicated serum group and the 10% medicated serum+ferroptosis inhibitor group had decreased MDA content and ferrous ion level, and increased protein expression of SLC7A11 and GPX4 ($P<0.05$ or $P<0.01$); the 10% medicated serum+ferroptosis inhibitor group had higher GSH level than the 10% medicated serum group ($P<0.01$). **Conclusion** *Shipi Xiaoji Beverage* may inhibit the proliferation, infestation, migration of HepG2 cells by causing mitochondrial dynamics imbalance and inducing ferroptosis, thereby playing against liver cancer.

Keywords primary liver cancer; *Shipi Xiaoji Beverage* (实脾消积饮); HepG2 cell; mitochondria; dynamics; ferroptosis

(收稿日期: 2023-09-07; 修回日期: 2023-11-23)

[编辑: 邓 媛]