

本文引文格式:徐伟鑫,王春芳,罗艳红.松花粉对于肝癌细胞株 SMMC-7721 的生物学作用及与 α -烯醇酶及其下游 PI3K/AKT 信号通路蛋白的关联作用[J].右江民族医学院学报,2023,45(1):15-21.

【论著与临床报道】

松花粉对于肝癌细胞株 SMMC-7721 的生物学作用及与 α -烯醇酶及其下游 PI3K/AKT 信号通路蛋白的关联作用

徐伟鑫,王春芳,罗艳红

(右江民族医学院医学检验学院,广西 百色 533000)

摘要:目的 探讨松花粉作用于肝癌细胞株 SMMC-7721 的增殖和侵袭作用的影响,以及与之相关的磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶(PI3K/AKT)信号通路蛋白的表达变化。**方法** 首先对松花粉水提液中总多糖、总黄酮和锌离子 3 种主要抗癌成分的浓度进行检测。再用未加松花粉处理的 SMMC-7721 细胞作为对照组,分别用一系列浓度的松花粉处理 12 h,24 h 于 SMMC-7721 细胞,用 CCK8 法检测细胞增殖及其最优半抑制浓度(IC50),并且以 SMMC-7721 细胞的 IC50 作为松花粉处理组的浓度进行后续 Transwell 法检测细胞侵袭、Western Blot 法检测 α -烯醇酶(ENO1)及下游 PI3K/AKT 信号通路蛋白的表达变化。**结果** CCK8 法检测 SMMC-7721 细胞在松花粉处理 24 h 后的 IC50 为 16.78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,与 12 h 的 23.87 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 相比有更好的效果;故后续实验采用松花粉处理 24 h 后的 IC50 作为作用浓度。在 Transwell 实验,加松花粉药液组细胞侵袭数低于未加松花粉药液组,差异有统计学意义($P < 0.01$)。在 Western Blot 实验中,ENO1 蛋白和下游信号通路蛋白分子 PI3K、AKT、C-MYC 的表达量大部分呈现出加松花粉药液组低于未加松花粉药液组($P < 0.05$)。**结论** 松花粉有抑制 SMMC-7721 肝癌细胞增殖和侵袭作用,并且其作用机制与抑制 ENO1、PI3K、AKT 和 C-MYC 的表达量有关。

关键词: α 烯醇酶;松花粉;肝肿瘤

中图分类号:R735.7

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2023)01-0015-07

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2023.01.003

Biological effect of pine pollen on hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 and its association with α -Enolase and the proteins of its downstream PI3K/AKT signaling pathway

Xu Weixin, Wang Chunfang, Luo Yanhong

(School of Laboratory Medicine, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of pine pollen on the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721, and expression changes of the proteins of phosphatidylinositol 3-kinase/protein serine threonine kinase (PI3K/AKT) signaling pathway related to such effect. **Methods** Firstly, this study detected the concentrations of total polysaccharide, total flavonoids and zinc ions in the water extract of pine pollen. SMMC-7721 cells without pine pollen were taken as the control group. SMMC-7721 cells were treated with a series of concentrations of pine pollen for 12 h and 24 h, respectively. The CCK8 method was adopted to detect the proliferation and optimal semi inhibitory concentration (IC50) of cells. In addition,

基金项目:国家自然科学基金项目(81960303);右江民族医学院校级科研课题项目(右医科字[2021]38号)

第一作者简介:徐伟鑫(1982-),男,在读硕士研究生,研究方向:中草药抗肝癌,E-mail:xuweixin76@126.com

通讯作者简介:罗艳红(1965-),女,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向:中草药抗肝癌,E-mail:lyhmail2005@126.com

IC50 of SMMC-7721 cells was used as the concentration of the group treated with pine pollen. The cell invasion was detected with Transwell method. Western Blot was employed to detect the expression changes of α -Enolase (ENO1) and the proteins in downstream PI3K/AKT signaling pathway. **Results** According to CCK8 detection, the IC50 of SMMC-7721 cells treated with pine pollen for 24 h was $16.78 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, which was better than that treated with $23.87 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ for 12 h. Therefore, the IC50 of pine pollen treated for 24 h was used as the acting concentration in subsequent experiments. In Transwell experiment, the number of invaded cells in the groups with pine pollen liquid was lower than that in the group without pine pollen liquid, and the difference was statistically significant ($P < 0.01$). In the Western Blot experiment, it turned out that most groups with pollen liquid had lower expressions of ENO1 and protein molecules (PI3K, AKT and C-MYC) in downstream signaling pathway than the group without pollen liquid ($P < 0.05$). **Conclusion** Pine pollen can inhibit the proliferation and invasion of hepatoma cell line SMMC-7721, and its mechanism is related to the inhibition of ENO1, PI3K, AKT and C-MYC expressions.

Key words: α -Enolase; pine pollen; hepatic carcinoma

肝细胞癌占原发性肝癌的 90%，在全世界范围内具有广泛的分布，其发生率和死亡率在所有癌症中为全球第六常见的肿瘤，在所有癌症死因中排第三位^[1]。就现有技术而言，对肝癌的早期诊断准确性低、风险大，因而十分困难^[2]。而对于所发现的晚期肝癌患者治疗难度大，即使是放化疗联合治疗一般也只能延长 1 年的存活期^[3]。因此，通过探讨肝癌发生发展过程中的分子机制，从而找到关键的分子靶点和针对该靶点作用的药物，对于肝癌的治疗有着重要意义。 α -烯醇酶(α -enolase, ENO1)在肝癌的发生发展和迁移过程中呈现高表达，并且通过促进糖酵解途径促进了肝癌的进程^[4-5]。而松花粉作为一种中药复合剂具有保肝、抑制肿瘤细胞增殖等作用^[6]，特别是可以逆转肝损伤和抑制肝癌细胞增殖^[7-8]。另有报道^[9-11]，松花粉也是我国传统食药兼用的花粉品种，含有包括松花粉多糖、黄酮类、Zn 等在内的多种营养成分。然而松花粉主要成分的含量，以及松花粉对于肝癌细胞作用的分子机制研究较少。本研究旨在检测松花粉所含的多糖、黄酮类、Zn 这些主要抗癌成分具体含量，并探讨松花粉对于肝癌细胞株 SMMC-7721 的生物学作用及与 ENO1 及其下游激活磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白质丝氨酸苏氨酸激酶 (phosphatidylinositide 3-kinases/protein-serine-threonine kinase, PI3K/AKT) 信号通路蛋白的关联作用。

1 材料与方 法

1.1 材料 人肝癌细胞株 SMMC-7721 购自武汉细胞库；RPMI-1640 培养基和细胞冻存液购自北京兰杰柯科技有限公司；胰蛋白酶和青链霉素混合液(货号 P1400-100)购自北京索莱宝生物科学技术有限公司；胎牛血清(货号 11011-8611)购自浙江杭州天杭生物科技股份有限公司；CCK8 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司；松花粉(批号 2021071516)购自烟台

新时代健康产业有限公司；内参抗体小鼠抗人 β -Actin 单克隆抗(货号 BM0627)、小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体(货号 BM1623)、二抗 HRP-羊抗兔(货号 BA1054)、HRP-羊抗小鼠(货号 BA1050)、一抗兔抗人 ENO1 多克隆抗体(货号 A01250-1)购自武汉博士德生物工程有限公司；Transwell 小室(货号 14341)、Transwell 染色试剂盒(货号 BL710B)购自北京兰杰柯科技有限公司，总黄酮测试试剂盒(货号 ML711020)购自上海酶联生物科技有限公司，锌离子检测试剂盒(货号 H308)购自美康生物科技股份有限公司。

1.2 设备仪器 DYY-7C 电泳仪购自北京六一仪器有限公司；VE-180 电泳槽、VE-60 微型垂直槽多板灌胶器、VE-186 转移电泳槽、Tanon5200 全自动化学发光成像分析系统购自上海天能科技有限公司；SK-O180-E 摇床购自大龙仪器公司；SH01D 高速离心机购自广州市知信仪器有限公司；DT5-2 低速离心机购自北京时代北利离心机有限公司；SCIENTZ-24 组织匀浆仪、SCIENTZ-1500F 超声破碎仪购自宁波新芝仪器公司；SpectraMax 190 全波长酶标仪购自美国 MD 公司；Cobas C702 型全自动生化分析仪购自德国罗氏公司。

1.3 实验方法

1.3.1 松花粉主要成分的测定

1.3.1.1 松花粉总多糖的测定 ①总多糖的提取：将松花粉水提液原液冷却后 $10\ 000\ \text{g}$ 离心 $10\ \text{min}$ ，分别吸取 $0.2\ \text{mL}$ 上清，慢慢加入 $0.8\ \text{mL}$ 无水乙醇于两个 $2\ \text{mL}$ EP 管中，混匀后 $4\ ^\circ\text{C}$ 静置过夜， $10\ 000\ \text{g}$ 离心 $10\ \text{min}$ ，弃上清，沉淀中各加入 $1\ \text{mL}$ 蒸馏水，充分混匀溶解沉淀。多糖提取后相当于松花粉浓度($20\ \text{mg}/\text{mL}$)，将其稀释 3 倍。②测定标准品和松花粉供试品吸光度并计算：分光光度计，调节波长至 $490\ \text{nm}$ ；将标准品浓度稀释 3 倍且以 2 倍倍比稀释即得： 0.3333

mg/mL、0.1667 mg/mL、0.0833 mg/mL、0.0417 mg/mL、0.0208 mg/mL 的标准品浓度梯度;另取 5 管玻璃试管各加入 1 mL 相应浓度的标准品,并且每管加入 0.5 mL 试剂 1 和 2.5 mL 浓硫酸,混匀后 90 °C 水浴 20 min,流水冷却。取 3.75 mL 加入比色皿,移液枪分别吸取 3 个样品各 1 mL 上清(稀释液)和作为空白的蒸馏水 1 mL 于各试管中按照标准品同样处理,于 490 nm 下测定吸光值。根据吸光度(x)和浓度(y,mg/mL)得到回归方程,得出其平均吸光度值,代入回归方程得到的浓度乘以稀释倍数即为含松花粉(20 mg/mL)供试品的总多糖浓度,总多糖浓度除以供试品松花粉浓度(20 mg/mL),得出松花粉多糖含量百分比。

1.3.1.2 松花粉总黄酮的测定 ①总黄酮的提取:将样本烘干至恒重,粉碎,过 40 目筛之后,称取约 0.1 g,加入 1 mL 提取液,用超声提取法进行提取,超声功率 300 W,破碎 5 s,间歇 8 s,于 60 °C 提取 30 min。以 12 000 r/min 转速,室温 25 °C 下,离心 10 min,取上清,用提取液定容至 1 mL,待测。②测定标准品和松花粉供试品吸光度并计算:将 10 mg/mL 单宁酸标准溶液进行二倍稀释至 1.2500 mg/mL、0.6250 mg/mL、0.3125 mg/mL、0.1562 mg/mL、0.0781 mg/mL、0.0391 mg/mL、0.0195 mg/mL 备用;酶标仪预热 30 min 以上,调节波长至 470 nm,蒸馏水调零;在对照管和待测管加入待测样本液 60 μ L,标准管加标准溶液 60 μ L,空白管加蒸馏水 60 μ L,然后在这 4 管中每管加入试剂 1 15 μ L,混匀,静置 5 min,再在待测管、标准管、空白管各加入试剂 2 15 μ L,混匀,静置 5 min,在所有 4 管中加入试剂 3 每管 120 μ L 后,在对照管加 60%乙醇 105 μ L,其它 3 管则各加 90 μ L,混匀,于 37 °C 水浴 45 min,10 000 g,10 min 离心取上清,取 200 μ L 于微量玻璃比色皿/96 孔板中测定 470 nm 吸光度。根据吸光度(x)和浓度(y,mg/mL)得回归方程代入回归方程得到的浓度乘以稀释倍数即为含松花粉(100 mg/mL)供试品的总黄酮浓度,总黄酮浓度除以供试品松花粉浓度(100 mg/mL),得出松花粉多糖含量百分比。

1.3.1.3 松花粉锌离子的测定 检测原理:样本中的锌离子在室温下与试剂中的 5-Br-PAPS 形成有色复合物,颜色的深度在 400 μ g/dL 的范围内与锌离子浓度成正比。检测步骤:15 μ L 松花粉水提液样本与 240 μ L 试剂 1 混匀,37 °C 孵育 5 min,读 \times C 校准品。

1.3.2 肝癌细胞株培养及实验分组 人源 SMMC-7721 肝癌细胞株置于含 100 mL/L 胎牛血清及 1%青霉素和链霉素的 RBMI 1640 培养液中,于 37 °C 含 5% CO₂ 饱和湿度环境条件下连续培养,每 48 h 传

代。细胞分为两组:对照组,即未加松花粉药液的 SMMC-7721 肝癌细胞;实验组,加松花粉药液的 SMMC-7721 肝癌细胞。

1.3.3 CCK8 法测细胞增殖 各实验组在 96 孔板中加入 100 μ L 的浓度为 5×10^4 个细胞的细胞悬液;将培养板在培养箱孵育一段适当的时间(例如:12 h、24 h);向每孔加入 10 μ L CCK8 溶液(注意不要在孔中生成气泡,它们会影响 OD 值的读数);将培养板在培养箱内孵育 1 h;用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。细胞活力计算:细胞活力(%)=[A(实验组)-A(空白)]/[A(对照组)-A(空白)] \times 100;A(实验组):加松花粉药液的 SMMC-7721 肝癌细胞、CCK8 溶液的吸光度;A(空白):具有培养基和 CCK8 溶液而没有细胞的孔的吸光度;A(对照组):具有未加松花粉药液的 SMMC-7721 肝癌细胞、CCK8 溶液的吸光度;细胞活力:细胞增殖活力或细胞毒性活力。抑制率=1-细胞活力。其中,实验组在 SMMC-7721 肝癌细胞中使用 1.25 μ g/ μ L、2.50 μ g/ μ L、5.00 μ g/ μ L、7.50 μ g/ μ L、12.50 μ g/ μ L、13.75 μ g/ μ L、15.00 μ g/ μ L、16.25 μ g/ μ L、17.70 μ g/ μ L 浓度的松花粉,孵育 12 h、24 h,绘制曲线图;之后用具有最优半抑制浓度(IC₅₀)的松花粉药液做后续实验,选择 IC₅₀ 低值者。

1.3.4 Transwell 法测细胞侵袭 将加松花粉药液的 SMMC-7721 肝癌细胞组和未加松花粉药液的 SMMC-7721 肝癌细胞组各组相应细胞用无血清 RPMI-1640 培养基稀释成浓度为 5×10^4 个/毫升的细胞悬液,按每组孔上室加入相应的细胞悬液 250 μ L,下室加入 800 μ L 含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基放入培养箱 2 h 贴壁,后在实验组孔加入 126 μ L 浓度为 50 μ g/ μ L 的松花粉药液到小室里,使得最终小室里总液体的药物浓度为最优 IC₅₀;并将对照组的小室里加入相同体积的无血清 RPMI-1640 培养基,放入培养箱培养 24 h;再取出小室弃去培养液,用 Transwell 试剂盒染色,再用倒置显微镜计数 PET 膜下面侵袭的细胞数,计数中间和四周 5 个视野。

1.3.5 Western Blot 法测细胞增殖相关蛋白的表达 将加松花粉药液的 SMMC-7721 肝癌细胞组和未加松花粉药液的 SMMC-7721 肝癌细胞组培养 24 h 的细胞分别收集并加入细胞裂解液提总蛋白,然后按照聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)蛋白定量检测试剂盒说明书分别测总蛋白浓度。再将蛋白于 100 °C 煮沸 5 min 进行蛋白变性,将变性蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳,然后将蛋白电转移到硝酸纤维(NC)膜上,用 TBST 洗膜 3 次取出后加入封闭液封闭 2 h,倒去封闭液并加入 1:1 000 稀释的一抗 ENO1、PI3K、AKT 和 C-MYC 抗体于摇床 4 °C 过

夜。用 TBST 洗膜 3 次后加入 1 : 5 000 稀释的二抗 HRP 羊抗兔、HRP 羊抗小鼠抗体于室温孵育 2 h。用 TBST 洗膜 3 次后用显影剂显影,在用凝胶成像仪成像并以 GDPH 为内参分析各蛋白的表达。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $(\bar{x} \pm s)$ 表示,两组间比较用配对 t 检验。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 松花粉主要成分的测定

2.1.1 松花粉总多糖的测定 将 0.3333 mg/mL、0.1667 mg/mL、0.0833 mg/mL、0.0417 mg/mL、0.0208 mg/mL 浓度梯度的标准品于 490 nm 下测定吸光值 A。根据吸光度(x)和浓度(y,mg/mL)做出标准曲线。测得供试品稀释 3 倍后 3 次测量吸光度值平均值 $A=(2.463+2.714+2.723)/3=2.633$,供试品多糖浓度为:0.784 mg/mL,由于供试品松花粉浓度为 20 mg/mL,松花粉多糖含量为:39.20 mg/g,松花粉多糖含量百分比为 3.92%。见表 1、图 1。

2.1.2 松花粉总黄酮的测定 将 1.2500 mg/mL、0.6250 mg/mL、0.3125 mg/mL、0.1562 mg/mL、0.0781 mg/mL、0.0391 mg/mL、0.0195 mg/mL 浓

表 1 不同标准品多糖浓度与吸光度值

实验编号	1	2	3	4	5
吸光度/A	0.408	0.509	1.279	2.106	3.000
浓度/(mg · mL ⁻¹)	0.0208	0.0417	0.0833	0.1667	0.3333

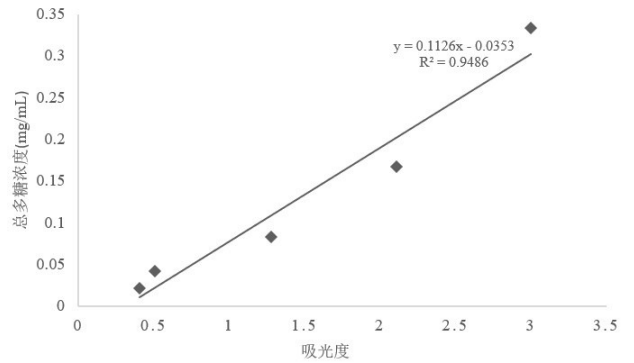


图 1 松花粉供试品总多糖浓度与吸光度标准曲线图

度梯度的标准品于 470 nm 处测吸光度值 A,根据吸光度(x)和浓度(y,mg/mL)做出标准曲线。测得供试品稀释 10 倍后 3 次测量吸光度值平均值 $A=(0.26+0.258+0.254)/3=0.257$,供试品总黄酮浓度为:2.514 mg/mL,由于供试品松花粉浓度为 100 mg/mL,松花粉总黄酮含量为 25.10 mg/g,松花粉总黄酮含量百分比为 2.51%。见表 2、图 2。

表 2 不同标准品总黄酮浓度与吸光度值

实验编号	1	2	3	4	5	6	7
吸光度/A	1.221	0.600	0.301	0.166	0.094	0.069	0.039
浓度/(mg · mL ⁻¹)	1.2500	0.6250	0.3125	0.1562	0.0781	0.0391	0.0195

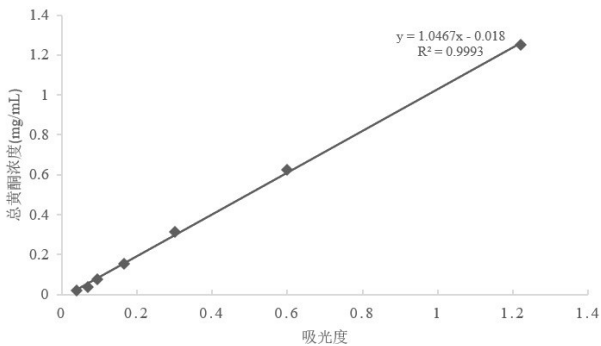


图 2 松花粉供试品总黄酮浓度与吸光度标准曲线图

2.1.3 松花粉锌离子的测定 Zn 浓度($\mu\text{mol/L}$) = $(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) / (\Delta A_{\text{校准品}} - \Delta A_{\text{空白}}) \times C_{\text{校准品}} = 23.52 \mu\text{mol/L}$ 。

2.2 CCK8 法用不同松花粉药液浓度和作用时间对于 SMMC-7721 细胞抑制率的影响结果 在 SMMC-7721 细胞孔中按 1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、2.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、5.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、7.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、10.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、12.50 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、13.75

$\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、15.00 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、16.25 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、17.70 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 浓度梯度加入松花粉药液孵育 12 h、24 h,作直线回归方程,得 IC_{50} 为 23.87 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 、16.78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$;选取松花粉药液作用 24 h 的 IC_{50} 即 16.78 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 作为后续实验的药物浓度。见图 3。

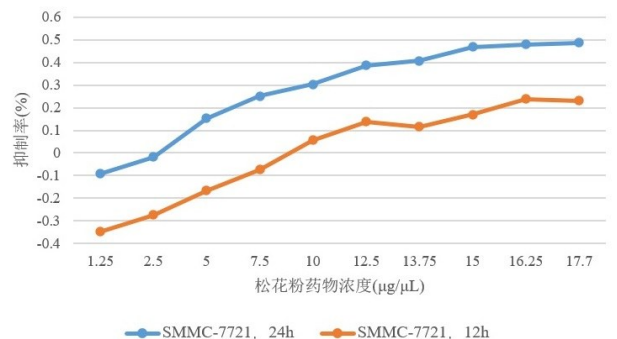
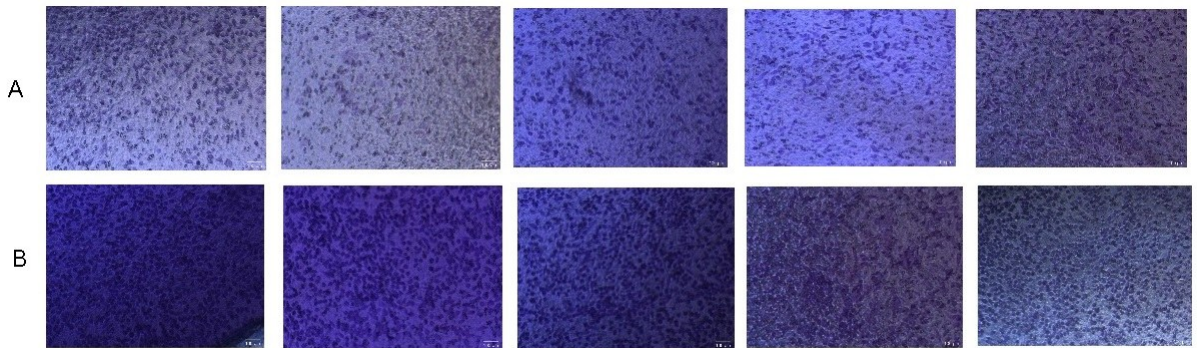


图 3 SMMC7721 细胞在不同药物浓度作用 12 h、24 h 下的抑制率

2.3 Transwell 法测细胞侵袭的结果 Transwell 法中各组间细胞侵袭数的比较用双侧配对 t 检验; SMMC-7721 肝癌细胞加松花粉药液组细胞侵袭数低

于 SMMC-7721 肝癌细胞未加松花粉药液组, 差异有统计学意义 ($P=0.002$)。见图 4、表 3。



注:A. 实验组即 SMMC-7721 肝癌细胞加松花粉药液组;B. 对照组即 SMMC-7721 肝癌细胞未加松花粉药液组。

图 4 实验组和对照组细胞侵袭照片

表 3 松花粉对 SMMC-7721 肝癌细胞侵袭数的影响

组别	药物浓度/ ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	细胞侵 袭数/个
对照组 ^a	0	568.400 ± 70.260
SMMC-7721 肝癌细胞加药组	16.78	210.000 ± 95.450^b

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②a 为 SMMC-7721 肝癌细胞未加松花粉药液组,与对照组比较,b: $P < 0.01$ 。

2.4 Western Blot 法测细胞增殖相关蛋白的表达的

结果 Western Blot 法检测两组相应蛋白的灰度值与其内参的比值并进行比较可见;SMMC-7721 肝癌细胞加松花粉药液组相比于 SMMC-7721 肝癌细胞不加松花粉药液组的 ENO1、AKT、C-MYC 蛋白分子的相对表达量降低,差异均有统计学意义;而 PI3K 蛋白分子的相对表达量虽然也降低,但差异无统计学意义。见表 4、图 5。

表 4 两组细胞中 ENO1、PI3K、AKT 和 C-MYC 蛋白表达比较

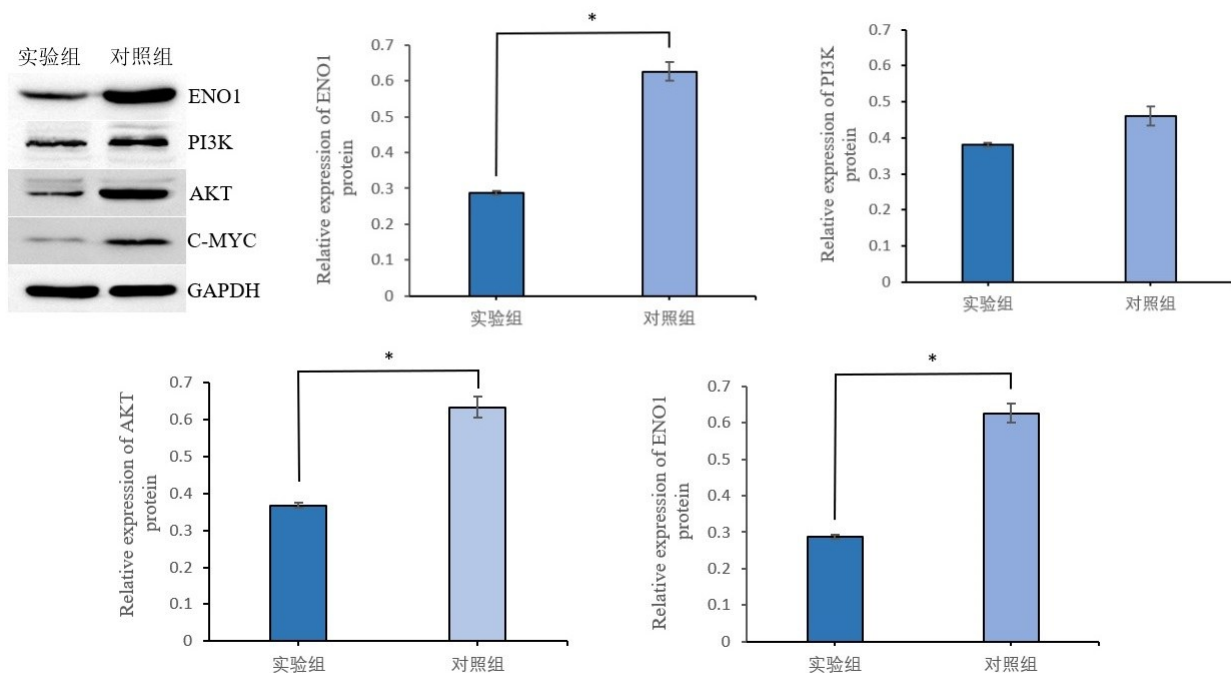
分组	ENO1 蛋白	PI3K 蛋白	AKT 蛋白	C-MYC 蛋白
实验组 ^a	0.288 ± 0.006^c	0.380 ± 0.006	0.368 ± 0.007^c	0.395 ± 0.004^c
对照组 ^b	0.626 ± 0.025	0.461 ± 0.027	0.634 ± 0.030	0.560 ± 0.014
t	24.184	5.383	16.666	23.567
P	0.001	0.011	0.001	0.002

注:①表内计量资料数据以($\bar{x} \pm s$)表示;②a 为 SMMC-7721 肝癌细胞加松花粉药液组,b 为 SMMC-7721 肝癌细胞未加松花粉药液组,c: $P < 0.05$ 。

3 讨论

ENO1 在糖酵解过程中催化 2-磷酸甘油酸(2-phosphate glyceric acid, 2PG)生成磷酸烯醇式丙酮酸(phosphoenolpyruvic acid, PEP)^[12]。而且 ENO1 与 1 型跨膜糖蛋白 B7-H3 (type 1 transmembrane glycoprotein B7-H3, B7-H3) 相互作用,通过上调 C-MYC 和乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase, LDHA) 并且 PI3K/AKT 信号通路来促进糖酵解^[13-14]。这有利于肿瘤的能量代谢。ENO1 的 C 末端赖氨酸可以与纤溶酶原结合激活其成为有活性的纤溶酶^[15],从而利于肿瘤的侵袭。而 ENO1 促进肝癌的进展和迁移是通过 PI3K/AKT 信号通路的激活实现的^[16-17]。并且有报道 SMMC-7721 细胞的增殖是通过 PI3K/AKT 信号

通路激活 C-MYC 的上调来实现的^[18]。C-MYC 上调葡萄糖转运蛋白 1 (glucose transporter 1, GLUT1)、己糖激酶 2 (hexokinase 2, HK2)、ENO1 的表达。ENO1 激活 PI3K/AKT 可以上调 GLUT1 和 HK2 来增强糖酵解^[14,16]。如此形成了 ENO1 通过 PI3K/AKT 通路的正反馈的表达进而从分子机制上形成了肝癌细胞的快速增殖。这也反映出 ENO1 通过 PI3K/AKT 这条信号通路的激活对于肝癌细胞的生长起到了关键作用。另外有报道松花粉多糖可以抑制肝癌细胞的增殖和迁移^[19],黄酮类化合物可以抑制肝癌细胞的增殖^[20]。临床上患者摄入锌使血浆锌浓度升高可以抑制肝细胞癌的进展^[21],然而这些都是拘泥于单一化合物或元素对于肝癌的抑制作用的研究。而本研究是在



注: * $P < 0.05$ 。

图 5 ENO1、PI3K、AKT、C-MYC 在不同分组中的蛋白表达

松花粉含有这三种成分下共同对于肝癌细胞的抑制。本次测量松花粉的总多糖含量为 39.20 mg/g,而具有抗癌作用的灵芝其多糖含量为 30.5 mg/g^[22];本次测量松花粉总黄酮含量为 25.10 mg/g,而有抗癌作用的金银花等 11 种中草药的总黄酮含量在 0.174 mg/g~1.995 mg/g 之间^[23];此次测得松花粉水提液锌离子浓度为 23.52 $\mu\text{mol/L}$,而最近有报道处于离子状态的金属锌修饰的仲钨酸-B 化合物 ZnW12 对于肝癌细胞 HepG2 的有效半抑制浓度为 0.46 $\mu\text{mol/L}$ ^[24]。由此看出松花粉这 3 种主要成分都高于有抗癌作用的其他中草药和化合物中的含量。并且在前期研究中发现松花粉可以有效抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖^[25],本研究论证了另一株肝癌细胞系 SMMC-7721 细胞在松花粉作用下增殖和侵袭受抑制的影响,在于验证松花粉对于不同肝癌细胞系抑制的广泛性,并进一步探明松花粉抑制肝癌细胞增殖和侵袭的过程中与 ENO1 及下游 PI3K/AKT 信号通路的内在分子机制:首先,用 CCK8 法鉴别出 SMMC-7721 细胞在 12 h、24 h 下的 IC₅₀;选出低值 IC₅₀ 做后续实验。而在 Transwell 法中,SMMC-7721 细胞加松花粉药液组细胞侵袭数低于 SMMC-7721 未加松花粉药液组,这说明松花粉可以抑制 SMMC-7721 肝癌细胞的侵袭。在 Western Blot 实验中加松花粉的实验组相比于未加松花粉的对照组,ENO1、AKT 和 C-MYC 这些蛋白的表达都被抑制,仅 PI3K 蛋白的表达未被明显抑制。说明松花粉对于 SMMC-7721 细胞增殖和侵袭的抑制与 ENO1 及其下

游的 PI3K/AKT 通路被抑制有一定的关联性。

综上所述,在主要成分富含多糖、黄酮、锌的松花粉作用于肝癌细胞 SMMC-7721 可以有效抑制其增殖和侵袭,其内在机制表现出与 ENO1 及 PI3K/AKT 这条信号通路有关,进一步的实验对 ENO1 敲低和过表达 SMMC-7721 稳转株进行。

参考文献:

- [1] CHAKRABORTY E, SARKAR D. Emerging therapies for hepatocellular carcinoma (HCC) [J]. *Cancers (Basel)*, 2022, 14(11):2798-2820.
- [2] HE Q F, YANG J, JIN Y H. Immune infiltration and clinical significance analyses of the coagulation-related genes in hepatocellular carcinoma [J]. *Brief Bioinform*, 2022, 23(4):bbac291.
- [3] CHU S S, KUO Y H, LIU W S, et al. Effect of radiotherapy on survival in advanced hepatocellular carcinoma patients treated with sorafenib: a nationwide cancer-registry-based study [J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1):1614.
- [4] CAI C B, YANG L, ZHOU K N. Establishment and validation of a hypoxia-related signature predicting prognosis in hepatocellular carcinoma [J]. *BMC Gastroenterol*, 2021, 21(1):463.
- [5] LI J, HU Z Q, YU S Y, et al. CircRPN2 inhibits aerobic glycolysis and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2022, 82(6):1055-1069.
- [6] LIANG S B, LIANG N, BU F L, et al. The potential effects and use of Chinese herbal medicine pine pollen

- (*Pinus pollen*): a bibliometric analysis of pharmacological and clinical studies[J]. World J Tradit Chin Med, 2020,6(2):163-170.
- [7] ASADIAN S, MOALLEM S A, MOSHIRI M, et al. Evacuation the effect of single-and multi-dose administration of ethanolic extract of pinus eldarica pollen against acetaminophen-induced rat liver injury[J]. Int J Basic Sci Med, 2020,5(4):160-165.
- [8] 李北林, 邓益斌, 罗艳红. 松花粉对人肝癌 SK-Hep-1 细胞的凋亡和自噬作用研究[J]. 中国医药导报, 2020,17(13):13-17.
- [9] SHANG H Q, NIU X Y, CUI W P, et al. Anti-tumor activity of polysaccharides extracted from *Pinus massoniana* pollen in colorectal cancer- *in vitro* and *in vivo* studies [J]. Food Funct, 2022,13(11):6350-6361.
- [10] 付玉嫔, 陈少瑜, 李思广, 等. 云南松花粉中总黄酮和总酚含量的株间差异研究[J]. 西部林业科学, 2022,51(4):62-67.
- [11] 赵霖, W. WINDISCH, M, KIRCHGESSNER. 天然和破壁松花粉中锌生物利用度的研究[J]. 营养学报, 2000,22(3):205-208.
- [12] MOLDOGAZIEVA N T, MOKHOSOEVI I M, TERENTIEV A A. Metabolic heterogeneity of cancer cells: an interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK[J]. Cancers (Basel), 2020,12(4):862.
- [13] ZUO J H, WANG B W, LONG M, et al. The type 1 transmembrane glycoprotein B7-H3 interacts with the glycolytic enzyme ENO 1 to promote malignancy and glycolysis in HeLa cells[J]. FEBS Lett, 2018,592(14):2476-2488.
- [14] GUO C M, GAO C, LV X X, et al. CRKL promotes hepatocarcinoma through enhancing glucose metabolism of cancer cells via activating PI3K/Akt[J]. J Cell Mol Med, 2021,25(5):2714-2724.
- [15] CHEN M L, YUAN T T, CHUANG C F, et al. A novel enolase-1 antibody targets multiple interacting players in the tumor microenvironment of advanced prostate cancer [J]. Mol Cancer Ther, 2022,21(8):1337-1347.
- [16] 崔宏, 高琴琴, 庄昊, 等. 抑制 α -烯醇化酶的表达联合紫杉醇对肝癌细胞增殖侵袭和凋亡的影响[J]. 中华肿瘤杂志, 2021,43(12):1241-1247.
- [17] LI L P, WANG F X, ZHANG J J, et al. Typical phthalic acid esters induce apoptosis by regulating the PI3K/Akt/Bcl-2 signaling pathway in rat insulinoma cells[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2021,208:111461.
- [18] JI Y Y, WANG Z D, LI Z F, et al. Silencing IGF-II impairs C-myc and N-ras expressions of SMMC-7721 cells via suppressing FAK/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Cytokine, 2017,90:44-53.
- [19] CHU H L, MAO H, FENG W, et al. Effects of sulfated polysaccharide from Masson pine (*Pinus massoniana*) pollen on the proliferation and cell cycle of HepG2 cells [J]. Int J Biol Macromol, 2013,55:104-108.
- [20] SIDDIQUI S, UPADHYAY S, AHMAD I, et al. Cytotoxicity of *Moringa oleifera* fruits on human liver cancer and molecular docking analysis of bioactive constituents against caspase-3 enzyme[J]. J Food Biochem, 2021,45(5):e13720.
- [21] HOSUI A, TANIMOTO T, OKAHARA T, et al. Oral zinc supplementation decreases the risk of HCC development in patients with HCV eradicated by DAA[J]. Hepatol Commun, 2021,5(12):2001-2008.
- [22] 滕李铭, 田雪梅, 吴芳, 等. 13 种野生灵芝菌丝体中胞内三萜与多糖含量的比较[J]. 菌物学报, 2021,40(7):1811-1819.
- [23] 王琪, 田迪英, 杨荣华. 11 种中草药对亚硝酸合成阻断能力与总黄酮含量相关性研究[J]. 中国中药杂志, 2010,35(15):1983-1986.
- [24] 曲小妹, 石丹, 赵娜, 等. 双活性中心抗肿瘤仲钨酸-B 化合物的合成及体外药理活性研究[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2022,54(1):89-93.
- [25] 罗艳红, 于沛涛, 陈源红. 松花粉对肝癌细胞株 HepG2 增殖和凋亡的影响[J]. 广东医学, 2013,34(9):1349-1351.

收稿日期:2022-10-26;修回日期:2022-11-20