

·技术研究·

## $\beta$ -谷甾醇靶向 CDC25B 抑制肝癌细胞增殖

王 凯<sup>1</sup>, 李 卫<sup>1</sup>, 李志芳<sup>1</sup>, 纪会琼<sup>2</sup>, 郭志伟<sup>3</sup>, 曹俊秋<sup>4</sup>

(1. 达州中医药职业学院公共基础部, 四川 达州 635000; 2. 达州市疾病预防控制中心附属医院, 四川 达州 635000; 3. 南充市中心医院影像科, 四川 南充 637000; 4. 四川大学华西医院肝胆外科, 四川 成都 610000)

**摘 要:**【目的】探讨 $\beta$ -谷甾醇对肝癌细胞增殖的影响及其可能作用机制。【方法】通过SwissTarget和TargetNet数据平台预测 $\beta$ -谷甾醇的靶点、GEO2R分析GSE101728肝癌数据集中表达上调基因并分析两者共同基因,通过下载TCGA\_LIHC数据矩阵分析得到细胞分裂周期25B(CDC25B)与肝癌临床分期和患者生存预后存在关系。CCK-8、细胞集落形成实验、流式细胞法检测 $\beta$ -谷甾醇作用下肝癌细胞HepG2和Hep3B细胞活力、细胞增殖、细胞周期分布和细胞凋亡情况;构建HepG2皮下移植瘤裸鼠模型分为Control组和 $\beta$ -谷甾醇组, $\beta$ -谷甾醇组腹腔注射 $\beta$ -谷甾醇(50 mg/kg·d),测量移植瘤体积和质量,免疫组化检测Ki67表达水平;Western blot检测 $\beta$ -谷甾醇不同作用浓度和不同作用时间HepG2和Hep3B细胞系中CDC25B蛋白水平,构建稳定过表达CDC25B的HepG2和Hep3B细胞系并给予 $\beta$ -谷甾醇处理,同上方法检测HepG2和Hep3B细胞系细胞活力、细胞增殖、细胞周期分布和细胞凋亡情况。【结果】CDC25B表达水平,肝癌组织高于其癌旁组织( $P<0.05$ ),TNM分期(T2-4)高于TNM分期(T1)( $P<0.05$ ),肝癌临床分期II-IV高于临床分期I( $P<0.05$ ),肝癌G3-4分化高于G1-2分化( $P<0.05$ ),复发患者高于未复发者( $P<0.05$ ),预后不良者高于预后良好者( $P<0.05$ );CDC25B高表达组患者的总生存率低于CDC25B低表达组( $P<0.05$ )。Hep3B和HepG2的细胞活力随着 $\beta$ -谷甾醇作用剂量增加、作用时间延长而降低,Hep3B( $\beta$ -谷甾醇15  $\mu$ mol/L)和HepG2( $\beta$ -谷甾醇18  $\mu$ mol/L)的相对克隆数目、S期细胞百分比均显著低于Control组( $P<0.05$ ),而G0/G1期细胞百分比、细胞凋亡率均显著高于Control组( $P<0.05$ )。 $\beta$ -谷甾醇组移植瘤的体积、质量和Ki67相对表达水平均显著低于Control组( $P<0.05$ )。Hep3B和HepG2细胞中的CDC25B蛋白表达均随着 $\beta$ -谷甾醇浓度增加、作用时间延长而减低,Hep3B和HepG2细胞的 $\beta$ -谷甾醇+CDC25B组的细胞生长、相对克隆数目、S期细胞百分比均显著高于 $\beta$ -谷甾醇组( $P<0.05$ ),而G0/G1期细胞百分比、细胞凋亡率均显著低于 $\beta$ -谷甾醇组( $P<0.05$ )。【结论】 $\beta$ -谷甾醇可促进肝癌细胞凋亡和抑制细胞增殖,其抑制细胞增殖可能与抑制CDC25B蛋白表达有关。

**关键词:**肝癌; $\beta$ -谷甾醇;细胞分裂周期25B;细胞增殖

中图分类号:R735.7

文献标志码:A

文章编号:1672-3554(2022)04-0675-10

DOI:10.13471/j.cnki.j.sun.yat-sen.univ(med.sci).20220509.001

## Mechanisms of $\beta$ -sitosterol on Inhibiting the Proliferation of Hepatocellular Carcinoma Cells by Targeting CDC25B

WANG Kai<sup>1</sup>, LI Wei<sup>1</sup>, LI Zhi-fang<sup>1</sup>, JI Hui-qiong<sup>2</sup>, GUO Zhi-wei<sup>3</sup>, CAO Jun-qiu<sup>4</sup>

(1. Department of General Foundation Requisite Teaching, Dazhou Vocational College of Traditional Chinese Medicine, Dazhou 635000, China; 2. Affiliated Hospital of Dazhou Center for Disease Control and Prevention, Dazhou 635000, China; 3. Department of Medical Imaging, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, China; 4. Department of Hepatobiliary Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610000, China)

Correspondence to: WANG Kai; E-mail:WK18113396386@163.com

收稿日期:2021-10-09

基金项目:四川省医学(青年创新)科研课题(Q20043)

作者简介:王凯,通信作者,本科,研究方向:中西医结合临床基础研究,E-mail:WK18113396386@163.com

**Abstract:** [Objective] To explore the effects and possible actions mechanisms of  $\beta$ -sitosterol on the proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. [Methods] The target of  $\beta$ -sitosterol was predicted by SwissTarget and TargetNet data platforms. The up-regulated gene in GSE101728 HCC data set was analyzed by GEO2R, and the common gene between the target and the up-regulated gene was analyzed. According to the analysis of TCGA\_LIHC data matrix, the relationship between cell division cyclin 25B (CDC25B) and clinical staging, prognosis of HCC was obtained. The activities, proliferation, cycles distribution and apoptosis of HCC cells (HepG2, Hep3B) treated with  $\beta$ -sitosterol were detected by CCK-8, colony-forming assay and flow cytometry. The models of nude mice with subcutaneous xenografted tumors in HepG2 were constructed and divided into control group and  $\beta$ -sitosterol group. The  $\beta$ -sitosterol group was intraperitoneally injected with  $\beta$ -sitosterol (50 mg/kg·d). The volume and mass of tumors were measured. The expression level of Ki67 was detected by immunohistochemistry. The levels of CDC25B protein in HepG2 and Hep3B cell lines treated with different concentrations of  $\beta$ -sitosterol for different action time were detected by Western blot. HepG2 and Hep3B cell lines with stable overexpression of CDC25B were constructed, and then which were treated with  $\beta$ -sitosterol. The activities, proliferation, cycles distribution and apoptosis of HepG2 and Hep3B cell lines were detected by the above-mentioned methods. [Results] The expression level of CDC25B in HCC tissues was higher than that in para-carcinoma tissues ( $P<0.05$ ). The expression level of CDC25B in patients with TNM staging at stage T2-4, clinical staging at stage II-IV, G3-4 differentiation, recurrence and poor prognosis was higher than that with TNM staging at stage T1, clinical staging at stage I, G1-2 differentiation, non-recurrence and good prognosis, respectively ( $P<0.05$ ). The overall survival rate in high-expression CDC25B group was lower than that in low-expression group ( $P<0.05$ ). The activities of Hep3B and HepG2 cells were decreased with the increase of  $\beta$ -sitosterol dose and the prolongation of action time. The relative number of clone cells and the percentages of cells during S phase in Hep3B (15  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -sitosterol) and HepG2 (18  $\mu\text{mol/L}$   $\beta$ -sitosterol) were significantly lower than those in control group ( $P<0.05$ ), while percentage of cells during G0/G1 phase and apoptosis rate were significantly higher than those in control group ( $P<0.05$ ). The volume and mass of xenografted tumors, and relative expression level of Ki67 in  $\beta$ -sitosterol group were significantly lower than those in the control group ( $P<0.05$ ). The expression of CDC25B protein in Hep3B and HepG2 cells was decreased with the increase of  $\beta$ -sitosterol concentration and the prolongation of action time. The cells growth, relative number of clone cells, and percentages of cells during S phase in Hep3B and HepG2 cells were all significantly higher than those in  $\beta$ -sitosterol group ( $P<0.05$ ), while percentage of cells during G0/G1 phase and apoptosis rate were significantly lower than those in  $\beta$ -sitosterol group ( $P<0.05$ ). [Conclusion] The  $\beta$ -sitosterol can promote apoptosis of HCC cells and inhibited their proliferation. The inhibition of cells proliferation may be related to inhibition of CDC25B protein.

**Key words:** hepatocellular carcinoma;  $\beta$ -sitosterol; cell division cyclin 25B; cell proliferation

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2022, 43(4):675-684]

肝癌是发生在肝脏的恶性实体瘤,肝癌发病早期无典型症状,晚期可表现为发热、乏力和肝脏区域疼痛等症状,肝癌早期治愈几率较高,晚期治疗方案复杂且患者预后差异较大<sup>[1]</sup>。肝癌发病率位居恶性肿瘤第4位,致死率位居第2位,男性发病率高于女性,肝癌发病具体作用机制和诱发因素尚未阐明,普遍认为肝癌发病与饮酒、食用霉变食物、病毒性肝炎、寄生虫和遗传等因素有关<sup>[2]</sup>,肝癌基因组学研究<sup>[3]</sup>显示肝癌发病或进展和转移与多种基因突变、表观遗传修饰有关,肝细胞癌变后会重新激活端粒酶,导致癌变细胞增殖失控。细胞分裂周期25B(cell division cyclin 25B, CDC25B)是调控细

胞周期的蛋白酪氨酸磷酸酶家族成员CDC25的异构体之一,在细胞周期的特定阶段发挥作用<sup>[4]</sup>,有研究<sup>[5-6]</sup>显示CDC25B可参与乳腺癌、黑色素瘤等疾病的调节过程。多种植物中的天然成分表现明显的抗肿瘤活性,其中包括紫杉醇、姜黄素、长春花素等, $\beta$ -谷甾醇是广泛分布于植物中的甾醇类物质,我国杜仲、玄参和天冬等传统中草药的药用成分中也含有大量的植物甾醇类物质。已有研究表明<sup>[7]</sup>红豆杉中的 $\beta$ -谷甾醇和 $\beta$ -谷甾醇-葡萄糖苷对肝癌细胞表现毒性作用,但其具体作用机制尚不明确,故本研究通过肝癌数据库平台联合分子生物学技术探讨黄 $\beta$ -谷甾醇对肝癌细胞增殖的影响及其

作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 细胞和主要试剂

HepG2细胞系和Hep3B细胞系(中科院上海细胞库),6周龄BALB/C Nude裸小鼠【成都达硕实验动物有限公司SCXK(川)2020-030】,动物实验遵守3R原则并通过达州中医药职业学院实验动物伦理委员会批准(审批号20210309A);β-谷甾醇(货号CFN99916,纯度>95%,武汉中标科技有限公司),CCK-8试剂盒(货号CK04,深圳市纽邦生物技术有限公司),细胞凋亡和细胞周期试剂盒(货号A025、F10797,艾美捷科技有限公司),CDC25B抗体(货号FNab01522,武汉菲恩生物科技有限公司),Ki67抗体(货号AD80028,上海研卉生物科技有限公司),PVDF膜(货号ISEQ00010,美国Milestone公司),蛋白提取试剂盒(货号SD-001,美国Invitrogen公司),Lipofectamine™2000(货号11668019,美国Invitrogen公司)。

### 1.2 主要仪器

流式细胞仪(Aurora 3L-5L,美国Cytex Biosciences公司),显微镜(X-Cite® 120PC Q,武汉提沃克科技有限公司),酶标仪(SpectraMax iD3,美国Molecular Devices公司),冷冻离心机(Selectspin™ 17R,美国Select BioProducts公司),细胞培养箱(Galaxy 48 R,德国Eppendorf公司)。

### 1.3 生物信息学分析

通过SwissTarget和TargetNet数据平台预测β-谷甾醇的靶点基因37个,GEO2R分析GSE101728肝癌数据集中表达上调基因并与37个靶点的交集基因5个,然后通过下载TCGA\_LIHC数据矩阵分析得到5个基因中只有CDC25B与肝癌TNM分期(T1、T2-4)、临床分期(I期、II-IV期)、癌症组织分化(G1-2分化、G3-4分化)、复发情况(复发、未复发)和患者生存预后(预后良好、预后不良)存在关系。

### 1.4 细胞培养和β-谷甾醇处理

将HepG2细胞系和Hep3B细胞系置于DMEM培养基(含10%胎牛血清)中培养的96孔板培养(每孔 $3 \times 10^5$ 个),培养条件为37℃、5% CO<sub>2</sub>加湿培养箱,孵育12 h后,HepG2细胞系给予β-谷甾醇(0.5、10、15、20 μmol/L)处理48 h,Hep3B细胞系给

予β-谷甾醇(0.6、12、18、24 μmol/L)处理48 h,加入10 μL CCK-8溶液,继续孵育2 h,在波长450 nm处检测光密度(OD),计算细胞活力相对活力=(实验组OD/空白组OD)×100%。根据两种细胞系的细胞相对活力情况,Hep3B细胞系以15 μmol/L作为β-谷甾醇处理浓度,HepG2细胞系以18 μmol/L作为β-谷甾醇处理浓度,分别作用于0、1、2、3、4、5 d时使用CCK-8法检测在450 nm处OD,并设置不用β-谷甾醇处理的细胞作为Control组,并绘制生长曲线。

### 1.5 细胞集落形成实验检测细胞增殖情况

将HepG2细胞和Hep3B细胞接种至6孔板(每孔1000个),孵育12 h后,Hep3B细胞加入β-谷甾醇至终浓度为18 μmol/L,HepG2细胞加入β-谷甾醇至终浓度为15 μmol/L,继续培养2周,使用多聚甲醛固定15 min、1%结晶紫染色30 min,冲洗,统计细胞集落形成数目,计算相对集落形成率=(实验组集落形成数目/对照组集落形成数目)×100%

### 1.6 流式细胞法检测细胞周期分布和细胞凋亡情况

收集Hep3B细胞系(15 μmol/L β-谷甾醇处理48 h)和HepG2细胞系(18 μmol/L β-谷甾醇处理48 h),2000 g离心5 min收集细胞沉淀。一部分细胞沉淀中经磷酸缓冲液洗涤2次,75%乙醇-20℃固定24 h,0.4 μL PI避光孵育0.5 h,上样流式细胞仪检测处于不同细胞周期的细胞分布情况。一部分细胞沉淀中加入300 μL 1×Binding Buffer使细胞重悬,然后加入5 μL Annexin V/FITC、10 μL PI避光孵育15 min上样流式细胞仪检测细胞凋亡率。

### 1.7 裸鼠移植瘤模型实验

取18只BALB/C Nude裸小鼠均分为Control组和β-谷甾醇组,分别于皮下注射HepG2细胞( $8 \times 10^6$ 个细胞),同时β-谷甾醇组裸鼠腹腔注射β-谷甾醇50 mg/kg·d,Control组裸鼠注射等体积DMSO,每2 d测量1次肿瘤的体积( $1/2 \times$ 肿瘤长轴 $\times$ 肿瘤短轴<sup>2</sup>),连续14 d,处死裸鼠称量移植瘤质量和测量移植瘤体积,使用免疫组化检测移植瘤中Ki67蛋白表达水平。

### 1.8 免疫组化

参考文献报道的方法<sup>[8]</sup>进行免疫组化检测蛋白表达,将移植瘤固定于40 g/L多聚甲醛溶液中进行常规石蜡包埋、切片,枸橼酸抗原修复液微波修复10 min,磷酸缓冲液冲洗2次,加入3%过氧化物酶阻断液封闭30 min,加入Ki67抗体(1:500)

37 ℃反应 45 min,加入生物素标记的二抗继续孵育 30 min,磷酸盐缓冲液冲洗×2次,DAB显色 5 min,蒸馏水冲洗,苏木素染色 20 s,乙醇浓度梯度脱水、二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜(×200)下观察 Ki67 表达水平,呈棕褐色颗粒即为 Ki67 表达阳性。

### 1.9 Western blot 检测蛋白表达

提取细胞总蛋白,调整蛋白浓度一致,经 SDS-PAGE 凝胶电泳、电转膜至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉密封 2 h,加入兔抗人 CDC25B、 $\beta$ -actin 一抗(1:500) 4 ℃孵育过夜,TBST漂洗,加入 HRP 标记的二抗(1:500)孵育 1 h,TBST漂洗,显色、定影,使用凝胶成像仪自带系统分析蛋白条带相对灰度值。

### 1.10 细胞转染

参照 Lipofectamine™2000 说明书进行细胞转染,细胞转染前 24 h 将细胞提前接种于 24 孔板,当细胞生长至融合 30%~50%时,将培养基更换为无血清的培养基,加入 CDC25B 过表达质粒和空质粒,同时每孔细胞中加入 200  $\mu$ L 转染液继续孵育 6 h,然后将无血清培养基更换为含有血清的培养基,继续培养 48 h 后,用 G418 筛选出稳定过表达 CDC25B 的 HepG2 和 Hep3B 细胞系。使用 Western blot 验证细胞中 CDC25B 蛋白表达水平。 $\beta$ -谷甾醇处理稳定过表达 CDC25B 的 HepG2 和 Hep3B 细胞(作用浓度同 1.5;记为  $\beta$ -谷甾醇+CDC25B 组),空载对照组且进行  $\beta$ -谷甾醇处理的细胞记为  $\beta$ -谷甾醇组,不做处理的细胞记为 Control 组,使用 CCK-8、细胞集落形成实验、流式细胞法检测细胞活力、细胞增殖、细胞周期分布和细胞凋亡情况。

### 1.11 统计学处理

实验数据运用 SPSS 22.0 软件、Graph pad 5.0 软件,数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;二组计量资料的均数比较,如果每一组资料都呈正态分布并且方差齐性,组间比较采用  $t$  检验,反之用校正  $t$  检验或秩和检验;多组间计量资料的均数比较,如果每一组资料都呈正态分布并且方差齐性,组间比较采用方差分析,方差分析差异有统计学意义时采用 Bonferroni 法进行两两比较;二组生存分析使用 Log-rank  $t$  检验。 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 CDC25B 与 $\beta$ -谷甾醇和肝癌临床关系分析

SwissTarget 和 TargetNet 预测  $\beta$ -谷甾醇的靶

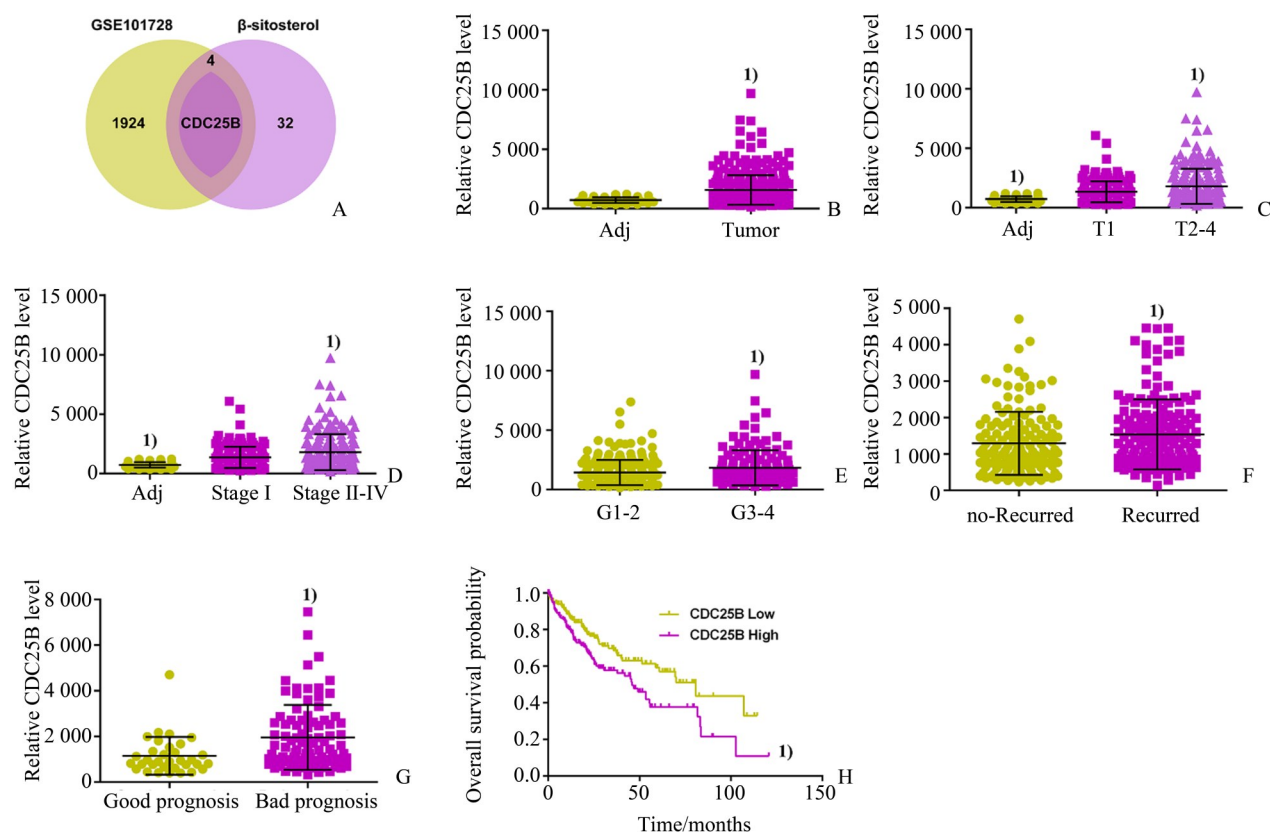
点,共有 37 个靶点。37 个靶点与 GEO2R 分析 GSE101728 肝癌数据集所得上调基因的交集基因有 5 个,其中包括 CDC25B 基因(图 1A)。TCGA\_LIHC 表达数据和临床信息比对发现只有 CDC25B 的表达水平与肝癌患者总生存期相关,因此选择 CDC25B 进一步研究。TCGA\_LIHC 表达数据和临床对应信息分析显示 CDC25B 在肝癌组织表达水平显著高于其癌旁组织( $t=90.414, P<0.001$ ;图 1B),肝癌不同 TNM 分期(T2-4)的 CDC25B 表达水平显著高于 TNM 分期(T1)( $F=3635.158, P<0.001$ ;图 1C),肝癌临床分期(II-IV)的 CDC25B 表达水平显著高于临床分期(I)( $F=3136.663, P<0.001; P<0.001$ ;图 1D),肝癌 G3-4 患者的 CDC25B 表达水平显著高于 G1-2 患者( $t=38.728, P<0.001$ ;图 1E),肝癌复发患者的 CDC25B 表达水平显著高于未复发肝癌患者( $t=29.710, P<0.001$ ;图 1F),预后不良肝癌患者的 CDC25B 表达水平显著高于预后良好肝癌患者( $t=27.006, P<0.001$ ;图 1G),以 CDC25B 表达水平的中位数将患者分为 CDC25B 低表达组和 CDC25B 高表达组,CDC25B 高表达组肝癌患者的总生存率显著低于 CDC25B 低表达组(Log-rank  $t=7.509, P=0.006$ ;图 1H)。

### 2.2 $\beta$ -谷甾醇对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

Hep3B 和 HepG2 的细胞活力随着  $\beta$ -谷甾醇剂量增加而逐渐降低( $F=108.400, P<0.001$ ,图 2A; $F=95.180, P<0.001$ ,图 2B),Hep3B( $\beta$ -谷甾醇 15  $\mu$ mol/L)和 HepG2( $\beta$ -谷甾醇 18  $\mu$ mol/L)的细胞生存率约为 50%,因此选择此浓度做后续实验(图 2A~D);Hep3B( $\beta$ -谷甾醇 15  $\mu$ mol/L)和 HepG2( $\beta$ -谷甾醇 18  $\mu$ mol/L)的相对克隆数目显著低于 Control 组( $t=16.515, P<0.001; t=22.517, P<0.001$ ),S 期细胞百分比均显著低于 Control 组( $t=4.906, P=0.008; t=4.359, P=0.0125$ ), $G_0/G_1$  期细胞百分比高于 Control 组( $t=4.109, P=0.015; t=3.618, P=0.022$ ),细胞凋亡率均高于 Control 组( $t=23.674, P<0.001; t=20.577, P<0.001$ ;图 2E~H)。

### 2.3 $\beta$ -谷甾醇对体内移植瘤生长的影响

$\beta$ -谷甾醇组移植瘤的体积显著低于 Control 组( $F=214.114, P<0.001$ ,图 3A; $t=2.240, P=0.040$ ,图 3B),移植瘤质量低于 Control 组( $t=2.475, P=0.025$ ;图 3C),Ki67 相对表达水平均显著低于 Control 组( $t=26.163, P<0.001$ ;图 3D)。



A: Intersection results of  $\beta$ -sitosterol target and up-regulated gene in GSE101728 HCC dataset (from TCGA); B: Expression level of CDC25B in HCC tissues ( $n=374$ ) and para-carcinoma tissues ( $n=50$ ) in HCC database,  $^{1)} P<0.05$  compared with Adj; C: Expression level of CDC25B in HCC tissues during different TNM stages and para-carcinoma tissues, para-carcinoma tissues ( $n=50$ ), T1 ( $n=182$ ), T2-4 ( $n=188$ ),  $^{1)} P<0.05$  compared with T1; D: Expression level of CDC25B in HCC tissues during different clinical stages and para-carcinoma tissues, para-carcinoma tissues ( $n=50$ ), stages I ( $n=172$ ), stages II-IV ( $n=177$ ),  $^{1)} P<0.05$  compared with Stage I; E: Expression level of CDC25B in HCC tissues with different differentiation degree, G1-2 ( $n=233$ ), G1-2 ( $n=135$ ),  $^{1)} P<0.05$  compared with G1-2; F: Expression level of CDC25B in HCC tissues of patients with or without recurrence, no-Recurred ( $n=143$ ), Recurred ( $n=172$ ),  $^{1)} P<0.05$  compared with no-Recurred; G: Expression level of CDC25B in patients with different prognosis, Good prognosis ( $n=33$ ), Bad prognosis ( $n=91$ ),  $^{1)} P<0.05$  compared with Good prognosis; H: Survival curves of patients with different expression level of CDC25B, CDC25B Low ( $n=186$ ), CDC25B High ( $n=186$ ),  $^{1)} P<0.05$  compared with CDC25B Low.

图1 CDC25B与 $\beta$ -谷甾醇和肝癌临床关系

Fig. 1 Clinical relationship among CDC25B,  $\beta$ -sitosterol and HCC

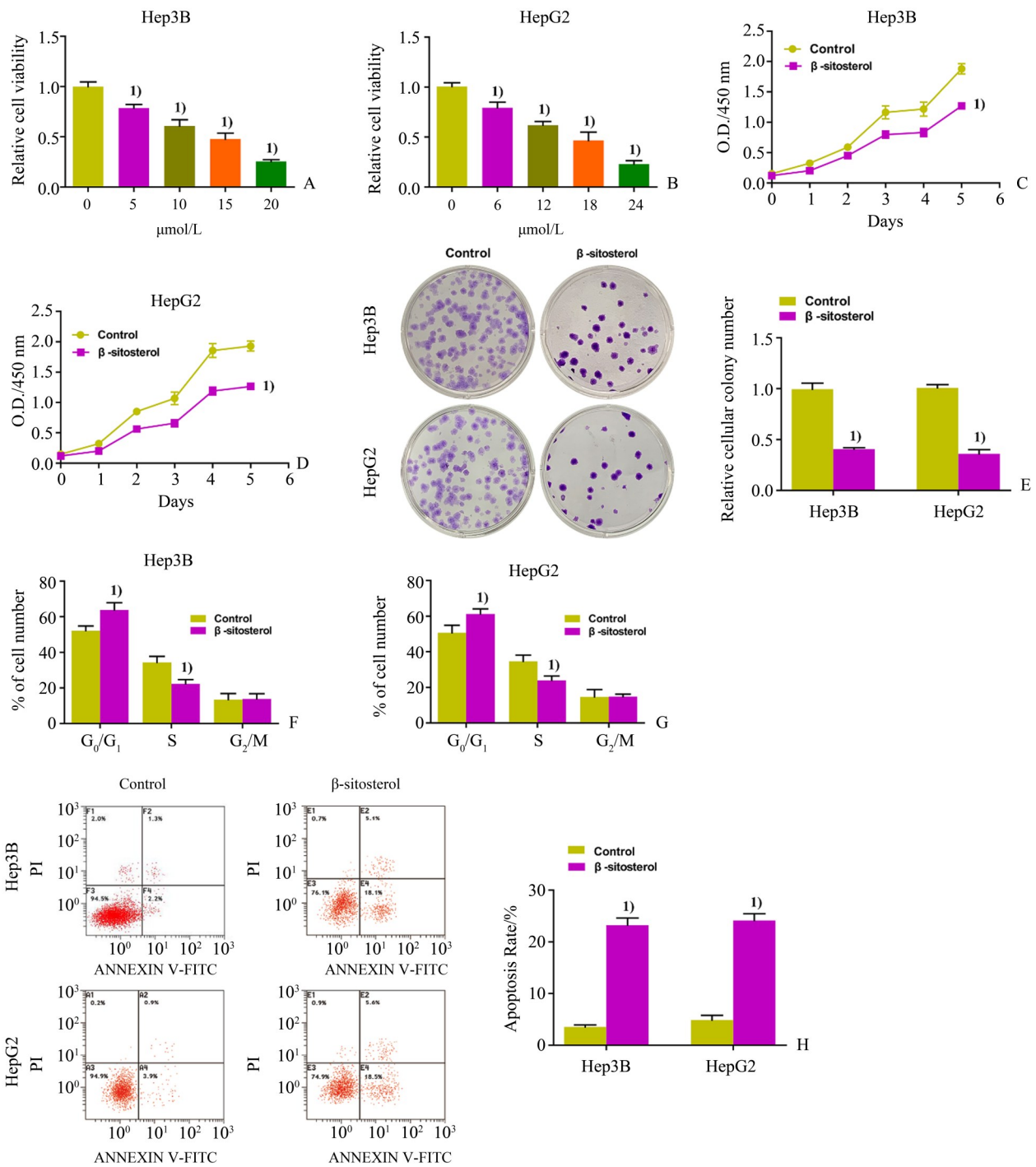
#### 2.4 $\beta$ -谷甾醇对肝癌细胞 CDC25B 蛋白表达的影响

Hep3B 和 HepG2 细胞中的 CDC25B 蛋白水平随着  $\beta$ -谷甾醇浓度增加而逐渐降低, Hep3B( $\beta$ -谷甾醇 15  $\mu\text{mol/L}$ )和 HepG2( $\beta$ -谷甾醇 18  $\mu\text{mol/L}$ )中的 CDC25B 蛋白水平均随着  $\beta$ -谷甾醇作用时间延长而逐渐降低(图 4)。

#### 2.5 $\beta$ -谷甾醇通过 CDC25B 抑制肝癌细胞增殖

$\beta$ -谷甾醇作用下 Hep3B 和 HepG2 细胞 CDC25B 蛋白表达降低 ( $t=25.351$ ,  $P<0.001$ ;  $t=31.859$ ,  $P<0.001$ ;图 5A), 给予 CDC25 稳定过表达细胞系可以恢复细胞中 CDC25 蛋白表达 ( $F=149.686$ ,  $P<0.001$ ;  $F=$

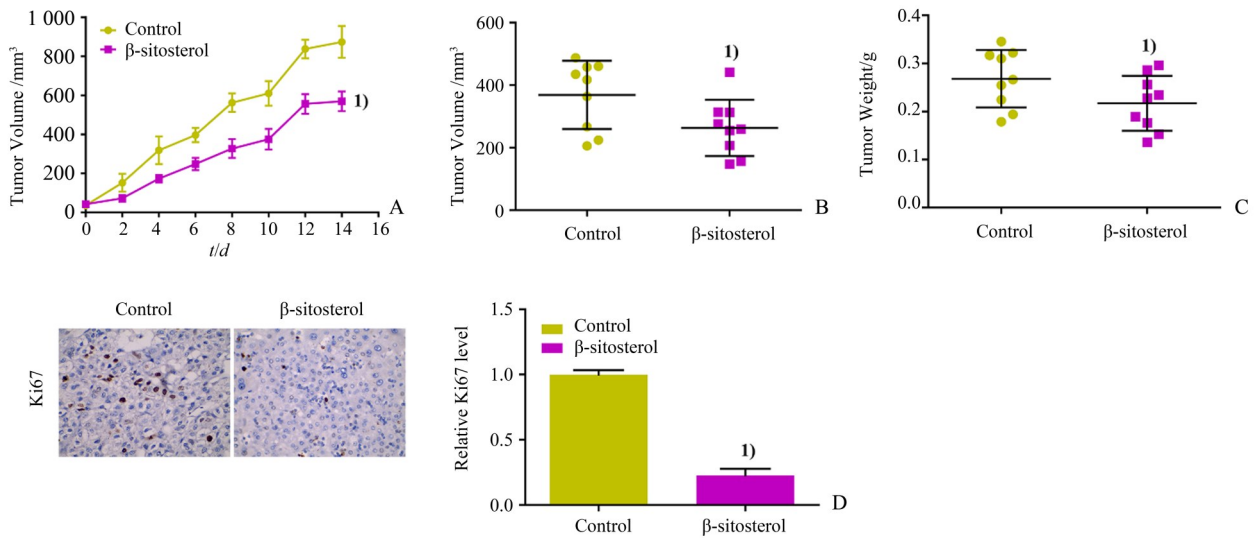
182.844,  $P<0.001$ ;图 5B)。Hep3B 细胞的  $\beta$ -谷甾醇+ CDC25B 组的细胞生长、相对克隆数目、S 期细胞百分比均显著高于  $\beta$ -谷甾醇组 ( $F=176.247$ ,  $P<0.001$ ;  $F=168.153$ ,  $P<0.001$ ;  $F=25.052$ ,  $P=0.001$ ), 而  $G_0/G_1$  期细胞百分比、细胞凋亡率均显著低于  $\beta$ -谷甾醇组 ( $F=15.490$ ,  $P=0.004$ ;  $F=222.843$ ,  $P<0.001$ ) (图 5C、E、F、H)。HepG2 细胞的  $\beta$ -谷甾醇+ CDC25B 组的细胞生长、相对克隆数目、S 期细胞百分比均显著高于  $\beta$ -谷甾醇组 ( $F=186.723$ ,  $P<0.001$ ;  $F=253.500$ ,  $P<0.001$ ;  $F=18.138$ ,  $P=0.003$ ), 而  $G_0/G_1$  期细胞百分比、细胞凋亡率均显著低于  $\beta$ -谷甾醇组 ( $F=17.138$ ,  $P=0.003$ ;  $F=413.382$ ,  $P<0.001$ ;图 5D、E、G、H)。



A: Relative activity of Hep3B cells, <sup>1)</sup> $P < 0.05$  compared with  $\beta$ -sitosterol ( $0 \mu\text{mol/L}$ ),  $n=3$ ; B: Relative activity of HepG2 cells, <sup>1)</sup> $P < 0.05$  compared with  $\beta$ -sitosterol ( $0 \mu\text{mol/L}$ ),  $n=3$ ; C: Growth curves of Hep3B cells ( $\beta$ -sitosterol  $15 \mu\text{mol/L}$ ),  $n=6$ ; D: Growth curves of HepG2 cells ( $\beta$ -sitosterol  $18 \mu\text{mol/L}$ ),  $n=5$ ; E: Colony-forming assay,  $n=3$ ; F: Cycles distribution of Hep3B cell ( $\beta$ -sitosterol  $15 \mu\text{mol/L}$ ),  $n=3$ ; G: Cycles distribution of HepG2 cells ( $\beta$ -sitosterol  $18 \mu\text{mol/L}$ ),  $n=3$ ; H: Apoptosis of Hep3B and HepG2 cells detected by flow cytometry,  $n=3$ . E, H:  $\beta$ -sitosterol  $15 \mu\text{mol/L}$  in Hep3B cells and  $18 \mu\text{mol/L}$   $\beta$ -sitosterol in HepG2 cells,  $n=3$ . C-H: <sup>1)</sup> $P < 0.05$  compared with the control group,  $n=3$ .

图2  $\beta$ -谷甾醇对肝癌细胞增殖和凋亡的影响

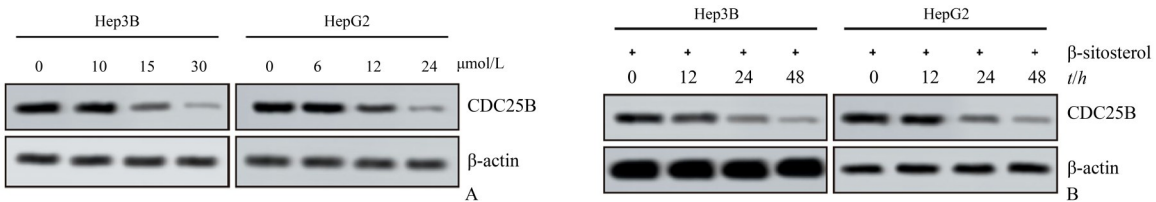
Fig. 2 Effects of  $\beta$ -sitosterol on the proliferation and apoptosis of HCC cells



A: Growth trend of xenografted tumor volume,  $n=9$ ; B: Volume of xenografted tumors,  $n=9$ ; C: Mass of xenografted tumors,  $n=9$ ; D: Expression level of Ki67 (immunohistochemistry,  $\times 200$ ),  $n=9$ ; vs Control group, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$  compared with the control group.

图3 β-谷甾醇对体内移植瘤生长的影响

Fig. 3 Effects of β-sitosterol on the growth of xenografted tumors in vivo



A: Expression of CDC25B protein in Hep3B and HepG2 cells under different concentrations of β-sitosterol,  $n=3$ ; B: Expression of CDC25B protein in Hep3B and HepG2 cells under different action time of β-sitosterol,  $n=3$ .

图4 β-谷甾醇对肝癌细胞 CDC25B 蛋白表达的影响

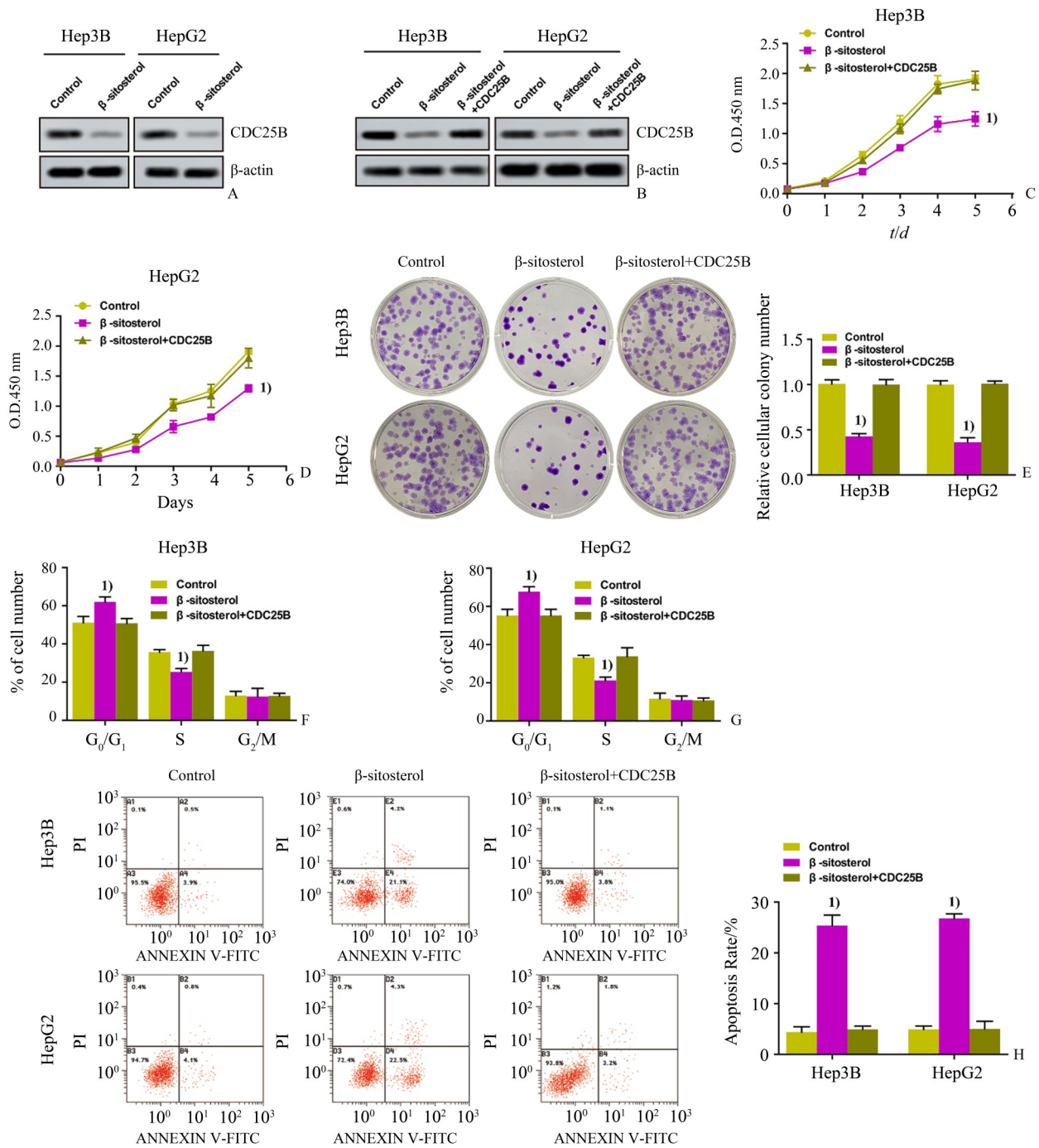
Fig. 4 Effects of β-sitosterol on the expression of CDC25B protein in HCC cells

### 3 讨论

肝癌的临床治疗方案确定主要依赖于患者的肝功能、肿瘤侵犯程度和转移情况,目前普遍认为手术切除治疗或肝移植治疗是可能根治肝癌的重要方式,但术后复发和手术切除率低仍旧是肝癌的治疗难点<sup>[9]</sup>。非手术治疗在控制肝癌病情、辅助术前和术后治疗具有重要意义,其中包括消融治疗、化疗、放射治疗和分子靶向治疗等<sup>[10]</sup>。β-谷甾醇是植物中广泛存在的多酚羟酸类化合物,同时也是构成真核生物细胞膜的主要成分之一,目前已经鉴定植物甾醇约 200 种,β-谷甾醇在植物油、种子和果蔬中含量较高,具有抗氧化<sup>[11]</sup>、抗衰老<sup>[12]</sup>、降低胆固醇<sup>[13]</sup>和神经保护作用<sup>[14]</sup>。国外有研究<sup>[15]</sup>表明β-谷甾醇介导的银纳米粒子在人结肠癌 HT-29 细胞中呈现出细胞毒性作用,可促进结肠癌细胞发生凋

亡。本研究通过分析β-谷甾醇不同作用浓度和不同作用时间的 Hep3B、HepG2 细胞活性和细胞增殖趋势发现β-谷甾醇可以显著抑制肝癌 Hep3B 和 HepG2 细胞增殖,此结果在裸鼠移植瘤实验中也得到证实。

肿瘤增殖抑制受到多方面因素影响,其中包括细胞增殖和细胞凋亡<sup>[16-17]</sup>,本研究结果显示β-谷甾醇作用下的 Hep3B、HepG2 细胞相对克隆数目和 S 期细胞百分比显著降低,而细胞凋亡率和 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞百分比显著升高,同时体内移植瘤中的 Ki67 表达水平显著降低,说明β-谷甾醇对肝癌细胞抑制作用可能是通过抑制癌细胞增殖和促进癌细胞凋亡实现。细胞增殖速率与细胞周期正常运转具有密切关系,一个完整的细胞周期包括有丝分裂和分裂间期,分裂间期包括 G<sub>1</sub> 期、S 期和 G<sub>2</sub> 期,任何一个时期出现问题均会影响细胞周期的正常运



A-B: Expression of CDC25B protein in Hep3B and HepG2 cells, n=3; C-D: Growth curves of Hep3B and HepG2 cells, n=9; E: Colony-forming assay, n=3; F: Cycles distribution of Hep3B cells, n=3; G: Cycles distribution of HepG2 cells, n=3; H: Apoptosis of Hep3B and HepG2 cells by flow cytometry, n=3. β-sitosterol 15 μmol/L in Hep3B cells and β-sitosterol 18 μmol/L in HepG2 cells. <sup>1)</sup> P<0.05 compared with β-sitosterol+CDC25B group.

图5 β-谷甾醇通过 CDC25B 抑制肝癌细胞增殖

Fig. 5 β-Sitosterol inhibited the proliferation of HCC cells by CDC25B

转<sup>[18]</sup>。G1期主要是RNA和蛋白质的合成,S期是DNA的复制<sup>[19]</sup>,Ki67是与核糖体RNA转录有关的核蛋白,与细胞的有丝分裂具有密切关系,Ki67常用于临床肿瘤恶性程度的判断,其表达水平越高表

示细胞增殖越活跃<sup>[20]</sup>。本研究结果说明β-谷甾醇可阻碍使肝癌细胞周期运行,对细胞增殖有抑制作用,关于β-谷甾醇对肝癌细胞凋亡的促进作用可能与通过核因子相关因子2、氧化应激激活人肝癌

细胞线粒体凋亡有关<sup>[21]</sup>。

本研究通过数据库分析显示 CDC25B 是 β-谷甾醇靶点之一,还发现 CDC25B 在肝癌组织、高临床分期、复发和不良预后患者中呈高表达,并且还会影响患者的生存时间。CDC25B 为半衰期磷酸化蛋白,与细胞分裂有关的纺锤体前期的形成关系密切,是细胞早期有丝分裂的启动因子,目前普遍认为 CDC25B 过量表达会促进肿瘤增殖和细胞恶性转化<sup>[22-23]</sup>。本研究结果显示 β-谷甾醇可降低 Hep3B、HepG2 细胞中 CDC25B 表达水平,推测 β-谷甾醇对肝癌增殖的抑制作用可能是通过降低 CDC25B 表达实现,本研究通过构建 CDC25B 稳定过表达细胞系并给予 β-谷甾醇处理,发现 CDC25B

表达水平升高可以逆转 β-谷甾醇对肝癌细胞增殖抑制作用和促进细胞凋亡作用,说明 β-谷甾醇对肝癌细胞的抑癌作用可能与抑制 CDC25B 表达有关。

综上所述,β-谷甾醇对肝癌细胞的凋亡有促进作用,从体外细胞实验和体内移植瘤实验证实 β-谷甾醇可抑制肝癌细胞的增殖,其作用机制可能是通过抑制 CDC25B 蛋白表达使细胞周期运转发生阻碍,从而抑制肝癌细胞增殖,但 β-谷甾醇下调 CDC25B 表达的具体机制尚需进一步探讨。本研究主要发现 β-谷甾醇抑制肝癌细胞增殖的可能作用机制,而关于其对肝癌细胞凋亡的作用机制尚不清楚。

#### 参考文献

- [1] Villanueva A. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15):1450-1462.
- [2] Kulik L, El-Serag HB. Epidemiology and management of hepatocellular carcinoma [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(2):477-491.
- [3] Dhanasekaran R, Nault JC, Roberts LR, et al. Genomic medicine and implications for hepatocellular carcinoma prevention and therapy [J]. *Gastroenterology*, 2019, 156(2):492-509.
- [4] Liu Y, Deng X, Wu D, et al. PKCδ promotes fertilization of mouse embryos in early development via the Cdc25B signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(5):3281-3290.
- [5] Cairns J, Ly RC, Niu N, et al. CDC25B partners with PP2A to induce AMPK activation and tumor suppression in triple negative breast cancer [J]. *NAR Cancer*, 2020, 2(4):zcaa039-16.
- [6] Al-Matouq J, Holmes TR, Hansen LA. CDC25B and CDC25C overexpression in nonmelanoma skin cancer suppresses cell death [J]. *Mol Carcinog*, 2019, 58(9):1691-1700.
- [7] Vo TK, Ta QTH, Chu QT, et al. Anti-hepatocellular-cancer activity exerted by β-Sitosterol and β-Sitosterol-Glucoside from *Indigofera zollingeriana* Miq [J]. *Molecules*, 2020, 25(13):3021-2034.
- [8] 牛丹丹,刘振,李方方. miR-146 a-5 p 通过调控 Notch2 表达对心肌缺血再灌注模型大鼠心肌损伤的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, (5):530-537,554.
- [9] Niu DD, Liu Z, Li FF. Effects of miR-146a-5p on myocardial injury in rats induced by myocardial ischemia reperfusion by regulating expression of Notch2 [J]. *Chin J Immunol*, 2020, (5):530-537,554.
- [10] Varol Fİ. Pediatric hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastrointest Cancer*, 2020, 51(4):1169-1175.
- [11] Chang Y, Jeong SW, Young Jang J, et al. Recent updates of transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21):8165-8185.
- [12] Zhou BX, Li J, Liang XL, et al. β-sitosterol ameliorates influenza A virus-induced proinflammatory response and acute lung injury in mice by disrupting the cross-talk between RIG-I and IFN/STAT signaling [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(9):1178-1196.
- [13] Haiyuan YU, Shen X, Liu D, et al. The protective effects of β-sitosterol and vermicularin from *Thamnia vermicularis* (Sw.) Ach. against skin aging in vitro [J]. *An Acad Bras Cienc*, 2019, 91(4):e20181088-11.
- [14] Feng S, Dai Z, Liu AB, et al. Intake of stigmasterol and β-sitosterol alters lipid metabolism and alleviates NAFLD in mice fed a high-fat western-style diet [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863(10):1274-1284.
- [15] Soto-Rojas LO, Martínez-Dávila IA, Luna-Herrera C, et al. Unilateral intranigral administration of β-sitosterol β-D-glucoside triggers pathological α-synu-

- clein spreading and bilateral nigrostriatal dopaminergic neurodegeneration in the rat [J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8(1):56-81.
- [15] Shathviha PC, Ezhilarasan D, Rajeshkumar S, et al.  $\beta$ -sitosterol mediated silver nanoparticles induce cytotoxicity in human colon cancer HT-29 cells [J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2021, 13(1):42-46.
- [16] Hume S, Dianov GL, Ramadan K. A unified model for the G1/S cell cycle transition [J]. *Nucleic Acids Res*, 2020, 48(22):12483-12501.
- [17] 李慧,汪根树,郑俊,等. Zwint 高表达对肝癌细胞增殖和肝癌肝移植预后的影响[J]. *器官移植*, 2018, 9(2):122-129.
- Li H, Wang GS, Zheng J, et al. Effect of high expression of Zwint on the proliferation of hepatoma cells and the prognosis of liver transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. *Organ Transplant*, 2018, 9(2):122-129.
- [18] 牛义善,曾强. 炎症生物标志物对肝癌肝移植预后的预测作用[J]. *器官移植*, 2022, 13(1):49-54.
- Niu YS, Zeng Q. Predictive effect of inflammatory biomarkers on prognosis of liver transplantation for hepatocellular carcinoma [J]. *Organ Transplant*, 2022, 13(1):49-54.
- [19] Rubin SM, Sage J, Skotheim JM. Integrating old and new paradigms of G1/S control [J]. *Mol Cell*, 2020, 80(2):183-192.
- [20] Zaiem F, Jerbi R, Albanyan O, et al. High Ki67 proliferation index but not cell-of-origin subtypes is associated with shorter overall survival in diffuse large B-cell lymphoma [J]. *Avicenna J Med*, 2020, 10(4):241-248.
- [21] Raj RK, D E, S R.  $\beta$ -Sitosterol-assisted silver nanoparticles activates Nrf2 and triggers mitochondrial apoptosis via oxidative stress in human hepatocellular cancer cell line [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2020, 108(9):1899-1908.
- [22] Aliotta F, Nasso R, Rullo R, et al. Inhibition mechanism of naphthylphenylamine derivatives acting on the CDC25B dual phosphatase and analysis of the molecular processes involved in the high cytotoxicity exerted by one selected derivative in melanoma cells [J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2020, 35(1):1866-1878.
- [23] Jia J, Li H, Chu J, et al. LncRNA FAM83A-AS1 promotes ESCC progression by regulating miR-214/CDC25B axis [J]. *J Cancer*, 2021, 12(4):1200-1211.

(编辑 祁方昉)