

Hymeglusins诱导LX-2细胞凋亡和G₀/G₁周期阻滞

常雪婷^{1,2} 魏明月² 何建林² 吴科锋¹ 徐广鑫² 汤熙翔^{1,2*}⁽¹⁾广东医科大学海洋医药研究院, 湛江 524023; ⁽²⁾自然资源部第三海洋研究所, 厦门 361005

摘要 该文探讨了hymeglusins对人肝星状细胞系LX-2的作用。采用CCK-8法检测不同浓度的hymeglusins对LX-2细胞活力的影响以及不同死亡抑制剂与hymeglusins联合处理对LX-2细胞活力的影响; 流式细胞术检测不同浓度的hymeglusins、氯喹(chloroquine, CQ)以及hymeglusins+CQ对LX-2细胞凋亡的影响; RNA-seq测序技术获得对照组和hymeglusins组的差异表达基因, 并进行GO富集分析和KEGG通路分析; 流式细胞术检测hymeglusins处理后LX-2细胞周期的变化。结果显示, 与对照组相比, 40 μmol/L hymeglusins显著降低了LX-2细胞的存活率; hymeglusins诱导的LX-2细胞死亡主要通过凋亡途径实现; CQ能够增强hymeglusins诱导的细胞凋亡效应, 而Z-VAD-FMK可部分逆转CQ介导的这一促凋亡作用; KEGG通路分析揭示, 在细胞周期通路中, 差异显著基因呈现下调趋势; hymeglusins处理可导致细胞G₀/G₁期比例显著升高, 同时G₂/M期比例显著降低, 与CQ联用时, 导致G₂/M期阻滞。总之, hymeglusins诱导LX-2细胞凋亡和G₀/G₁周期阻滞, CQ可进一步增强hymeglusins对LX-2细胞的诱导凋亡的作用。

关键词 hymeglusins; 肝星状细胞; 凋亡; 氯喹; 转录组分析; 细胞周期

Hymeglusins Induces Apoptosis and G₀/G₁ Cycle Arrest in LX-2 Cells

CHANG Xueting^{1,2}, WEI Mingyue², HE Jianlin², WU Kefeng¹, XU Guangxin², TANG Xixiang^{1,2*}⁽¹⁾Marine Biomedical Research Institution, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China;⁽²⁾Third Institute of Oceanography, Ministry of Natural Resources, Xiamen 361005, China)

Abstract This study investigated the effects of hymeglusins on the human hepatic stellate cell line LX-2. The CCK-8 assay was used to investigate the impact of different concentrations of hymeglusins on the viability of LX-2 cells, as well as to examine the effects of various death inhibitors and hymeglusins on LX-2 cells viability. Flow cytometry was used to evaluate apoptosis in LX-2 cells treated with different concentrations of hymeglusins, CQ (chloroquine), or hymeglusins plus CQ. RNA-seq analysis identified differentially expressed genes between control and hymeglusins-treated groups, followed by GO enrichment and KEGG pathway analyses. Cell-cycle alterations after hymeglusins treatment were also examined by flow cytometry. The results showed that, compared with the control group, 40 μmol/L hymeglusins markedly reduced LX-2 cells viability. Hymeglusins-induced LX-2 cells death occurred primarily via apoptosis. CQ potentiated hymeglusins-mediated apoptosis, whereas Z-VAD-FMK partially reversed this CQ-enhanced pro-apoptotic effect. KEGG pathway analysis revealed that significantly differentially expressed genes in the cell cycle pathway showed a downregulation trend. Hymeglusins treatment significantly increased the proportion of LX-2 cells in G₀/G₁ phase and decreased the proportion in G₂/M phase; combined treatment with CQ further induced G₂/M arrest. Collectively, hymeglusins induces apoptosis and G₀/G₁ phase arrest

收稿日期: 2025-08-01

接受日期: 2025-10-16

厦门市自然科学基金(批准号: 3502Z202372065)资助的课题

*通信作者。Tel: 13774699879, E-mail: tangxixiang@tio.org.cn

Received: August 1, 2025

Accepted: October 16, 2025

This work was supported by the Xiamen Natural Science Foundation of China (Grant No.3502Z202372065)

*Corresponding author. Tel: +86-13774699879, E-mail: tangxixiang@tio.org.cn

in LX-2 cells, and CQ further enhances this pro-apoptotic effect.

Keywords hymegeglusin; hepatic stellate cells; apoptosis; chloroquine; transcriptome analysis; cell cycle

Hymegeglusin最初由ALDRIDGE等^[1]作为抗生素分离,后被证明是3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A合酶1(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase 1, HMGCS1)的特异性抑制剂,其通过与活性位点Cys-129的特异性结合发挥作用^[2]。HMGCS1是甲戊酸途径的关键酶之一,能够催化乙酰乙酰辅酶A向HMG-CoA的转化,从而在甲羟戊酸代谢中发挥关键作用^[3]。因此,HMGCS1是胆固醇合成通路中的关键调控分子。有研究表明,在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)中,HMGCS1的表达和活性受到COP9信号体亚基6(COP9 signalosome subunit 6, CSN6)的调控。CSN6通过抑制HMGCS1的K48泛素化修饰,减少其蛋白酶体降解,从而稳定HMGCS1蛋白,促进胆固醇合成和胆汁酸生成,进而激活Yes相关蛋白1(Yes-associated protein 1, YAP1)信号通路,推动HCC进展。此外,CSN6-HMGCS1轴通过调控甲羟戊酸代谢影响YAP1的核定位和转录活性,促进肿瘤生长,且该轴在高脂饮食诱导的非酒精性脂肪性肝病相关HCC中发挥重要作用^[4]。

肝纤维化是慢性肝损伤的共同病理过程^[5],其核心特征是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在各种慢性肝损伤的刺激下发生异常沉积^[6]。胆固醇代谢异常与肝纤维化相关,高胆固醇水平可能导致肝细胞损伤和炎症,进而促进肝纤维化^[7]。然而,目前尚未有报道研究HMGCS1的抑制剂是否对肝纤维化产生影响。肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)是肝脏特有的一种非实质细胞,在正常肝组织中通常处于静息状态^[8]。然而,在慢性肝损伤的情况下,常驻HSCs被激活并转化为活化的肌成纤维细胞,这些细胞大量分泌细胞外基质蛋白,形成纤维瘢痕,进而加剧肝脏炎症和纤维化^[9]。因此,HSCs的活化被视为肝纤维化的核心事件,而减少活化HSCs的数量或促进其凋亡,成为阻断肝纤维化进程的关键策略^[10]。

本实验以人肝星状细胞系LX-2为研究对象,采用CCK-8(cell counting kit-8)法、流式细胞术和RNA-seq测序技术,系统探究hymegeglusin对LX-2细胞增殖、凋亡及细胞周期的调控作用,旨在为肝纤维化等肝脏疾病的治疗提供新的理论依据和潜在治疗靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝星状细胞系(HSC-LX-2)由上海纪宁实业有限公司提供。

1.1.2 试剂 DMEM高糖基础培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素溶液(100×)、胰蛋白酶-EDTA消化液、胰蛋白消化液(不含EDTA)购自武汉普诺赛生命科技有限公司;1×PBS缓冲液购自北京兰杰柯科技有限公司;CCK-8试剂购自碧云天生物技术有限公司;细胞凋亡检测试剂盒、细胞周期检测试剂盒购自江苏凯基生物技术股份有限公司。

1.1.3 仪器 恒温生化培养箱购自上海爱朗实验设备有限公司;酶标仪购自美国ThermoFisher Scientific公司;流式细胞仪购自美国BD公司;移液枪购自德国Eppendorf公司;Count Star细胞计数仪购自上海睿钰生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 HSC-LX-2细胞培养 将LX-2细胞系在含10%胎牛血清、1%青霉素-链霉素的DMEM高糖培养基中,置于37℃、5% CO₂条件下培养;细胞贴壁后更换新鲜培养基,待细胞覆盖率达到90%左右时,按以下步骤处理:先吸除旧培养基,使用PBS轻柔漂洗细胞2次以清除血清残留;随后加入0.25%胰酶37℃消化约1 min,加入全培养基终止消化反应。收集细胞悬液,4℃下以1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入2 mL新鲜配制的完全培养基(含10%胎牛血清的培养基)重悬细胞沉淀,使用计数板进行细胞计数。

1.2.2 CCK-8法测定hymegeglusin对LX-2细胞活力的影响 选取处于对数生长期的LX-2细胞,按 1×10^4 /孔的密度接种于96孔板中,实验分为4组:溶剂对照组(含0.4%乙醇)、10 μmol/L hymegeglusin组、20 μmol/L hymegeglusin组和40 μmol/L hymegeglusin组,每组设6个复孔。在标准细胞培养条件(37℃、5% CO₂)下,将96孔板孵育过夜。随后,分别向各组加入相应剂量的hymegeglusin,使其终浓度分别为10 μmol/L、20 μmol/L和40 μmol/L,继续培养24 h和48 h。细胞培养完成后,向各孔中添加10 μL CCK-8试剂,37℃孵育2 h,待颜色变深后,用酶标仪在450 nm波

长检测各孔的吸光度(*D*)值。细胞存活率(%)=[(*D*实验组-*D*空白组)/(*D*对照组-*D*空白组)]×100%

1.2.3 CCK-8法测定不同死亡抑制剂对LX-2细胞活力影响 选取处于对数生长期的LX-2细胞,按 5×10^3 /孔的密度接种于96孔板中。共设置10组(包括溶剂对照组),每组6个复孔,在标准细胞培养条件(37 °C、5% CO₂)下,将96孔板孵育过夜。随后,分别向各组加入对应剂量的抑制剂进行预处理:Z-VAD-FMK(凋亡抑制剂,20 μmol/L)、Nec-1(坏死性凋亡抑制剂,10 μmol/L)、VX-765(细胞焦亡抑制剂,20 μmol/L)、氯喹(chloroquine, CQ, 细胞自噬抑制剂,20 μmol/L),预处理30 min后,加入终浓度为40 μmol/L的hymegluslin。将96孔板放回培养箱继续培养。细胞培养完成后,向各孔中添加10 μL CCK-8试剂,37 °C孵育2 h,待颜色变深后,用酶标仪在450 nm波长检测各孔的吸光度值。

接着,再选取处于对数生长期的LX-2细胞,按 5×10^3 /孔的密度接种于96孔板中。在标准细胞培养条件(37 °C、5% CO₂)下,将96孔板孵育过夜。实验分为5组,每组6个复孔:溶剂对照组、hymegluslin(40 μmol/L)组、hymegluslin(40 μmol/L)+Z-VAD-FMK(20 μmol/L)组、hymegluslin(40 μmol/L)+CQ(20 μmol/L)组、hymegluslin(40 μmol/L)+Z-VAD-FMK(20 μmol/L)+CQ(20 μmol/L)组。将其中的Z-VAD-FMK和CQ预作用30 min后,再加入hymegluslin。将96孔板放回培养箱继续培养。细胞培养完成后,向各孔中添加10 μL CCK-8试剂,37 °C孵育2 h,待颜色变深后,用酶标仪在450 nm波长检测各孔的吸光度值。

1.2.4 流式细胞术检测不同浓度hymegluslin对LX-2细胞凋亡影响 选取处于对数生长期的LX-2细胞,按 4×10^5 /孔的密度接种于6孔板中,使用十字振荡法充分混匀后,在标准细胞培养条件(37 °C、5% CO₂)下,将6孔板孵育过夜。实验分为4组,每组设3个复孔:溶剂对照组、hymegluslin(10 μmol/L)组、hymegluslin(20 μmol/L)组和hymegluslin(40 μmol/L)组。按分组加入相应剂量的药物后,将6孔板放回培养箱继续培养。培养结束后,弃去培养基,用0.25%胰酶(不含EDTA)于37 °C消化细胞1 min后,加入新鲜培养基终止消化,4 °C下以1 000 r/min离心5 min,弃上清,取 1×10^5 个细胞重悬于流式管中。按照Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒说明书进

行染色,将LX-2细胞在室温避光条件下培养10 min,随后采用流式细胞技术进行分析检测。

1.2.5 流式细胞术检测自噬抑制剂CQ对LX-2细胞凋亡影响 选取处于对数生长期的LX-2细胞,按 4×10^5 /孔的密度接种于6孔板中,使用十字振荡法充分混匀后,在标准细胞培养条件(37 °C、5% CO₂)下,将6孔板孵育过夜。实验分为4组,每组设3个复孔:溶剂对照组、hymegluslin(40 μmol/L)组、CQ(20 μmol/L)组和hymegluslin(40 μmol/L)+CQ(20 μmol/L)组。按照实验设计的分组情况,向各组添加对应浓度的药物,其中hymegluslin(40 μmol/L)+CQ(20 μmol/L)组先加入CQ(20 μmol/L)处理30 min,再加入hymegluslin(40 μmol/L)。将6孔板重新置于细胞培养箱(37 °C、5% CO₂)中进行后续培养。培养结束后,弃去培养基,用0.25%胰酶(不含EDTA)于37 °C消化细胞1 min后,加入新鲜培养基终止消化,4 °C下以1 000 r/min离心5 min,弃上清,取 1×10^5 个细胞重悬于流式管中。按照Annexin V-FITC/PI双染细胞凋亡检测试剂盒说明书进行染色,将LX-2细胞在室温避光条件下培养10 min,随后采用流式细胞技术进行分析检测。

1.2.6 Hymegluslin作用于LX-2细胞的转录组分析 本研究采用百迈客生物科技有限公司提供的转录组测序服务对LX-2细胞进行分析。选取对数生长阶段的LX-2细胞,经胰酶(浓度0.25%)于37 °C消化1 min后,加入新鲜培养基终止消化,4 °C下以1 000 r/min离心5 min,弃上清,以 5×10^5 /孔的密度接种至6孔培养板。细胞在含10%胎牛血清的培养基中,置于在37 °C、5% CO₂的饱和湿度培养箱中过夜,以确保细胞在适宜的环境中达到最佳生长状态。3孔作为溶剂对照组,3孔加入hymegluslin(40 μmol/L)处理24 h后收集细胞。利用提取试剂盒分离RNA样本,建立测序文库并在测序平台进行检测。数据分析通过百迈客云平台BMKCloud(www.biocloud.net)提供的生物信息学分析流程完成。

1.2.7 Hymegluslin与自噬抑制剂CQ对LX-2细胞周期的影响 取对数生长期的LX-2细胞,细胞接种密度调整为 4×10^4 /孔,使用6孔板进行培养,并在37 °C、5% CO₂条件下过夜培养。实验分为4组,每组设3个复孔:溶剂对照组、hymegluslin(40 μmol/L)组、CQ(20 μmol/L)组和hymegluslin(40 μmol/L)+CQ(20 μmol/L)组。按分组加入相应剂量的药物,其中

hymeglusin(40 $\mu\text{mol/L}$)+CQ(20 $\mu\text{mol/L}$)组先加入CQ(20 $\mu\text{mol/L}$)处理30 min, 再加入hymeglusin(40 $\mu\text{mol/L}$)。将接种后的6孔板置于细胞培养箱中, 在37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养24 h, 严格遵循细胞周期检测试剂盒的说明书步骤进行处理, 通过流式细胞仪检测细胞周期水平。

1.2.8 统计学方法 采用GraphPad Prism 9.5软件进行统计学分析, 各组数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 多组间均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用Tukey法, 两组间比较差异采用 t 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度hymeglusin对LX-2细胞活力的影响

CCK-8实验数据(图1)显示, LX-2细胞的增殖在hymeglusin作用下受到明显抑制, 且这种抑制作用呈现出剂量和时间依赖性。与对照组相比, 10、20和40 $\mu\text{mol/L}$ 的hymeglusin分别作用于LX-2细胞24 h和48 h后, 细胞存活率显著性降低, 差异有统计学意义($P<0.05$), 后续实验均采用40 $\mu\text{mol/L}$ hymeglusin进行干预。

2.2 不同死亡抑制剂对LX-2细胞活力的影响

采用CCK-8法检测hymeglusin及不同抑制剂对LX-2细胞活力的影响。实验数据(图2)表明, 相较于对照组, hymeglusin显著抑制了LX-2细胞的活力($P<0.0001$)。相较于hymeglusin组, 联用凋亡抑制剂Z-VAD-FMK后, hymeglusin对LX-2细胞活力的抑制作用被显著逆转($P<0.0001$)。这表明, hymeglusin

诱导的LX-2细胞死亡主要通过凋亡途径实现。当自噬抑制剂CQ与hymeglusin联合处理时, 相较于hymeglusin组, 对LX-2细胞活力的抑制作用显著降低($P<0.0001$)。这一结果表明, hymeglusin与CQ联合使用在抑制LX-2细胞活力方面存在协同作用。

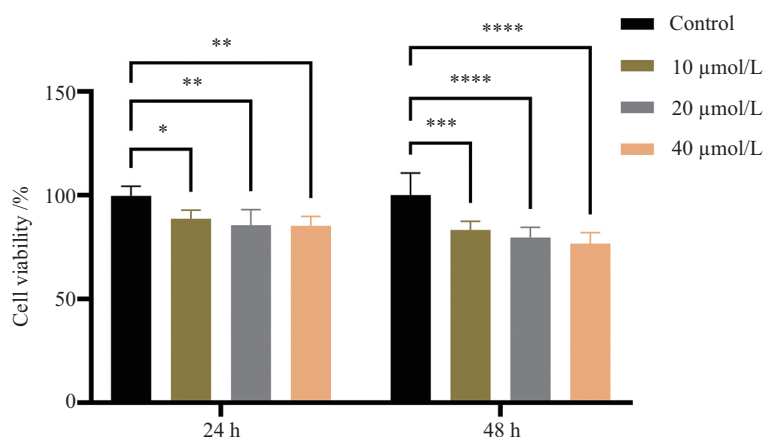
进一步采用CCK-8法检测hymeglusin、凋亡抑制剂Z-VAD-FMK和自噬抑制剂CQ对LX-2细胞活力的影响。实验数据(图3)表明, 相较于hymeglusin组, hymeglusin联合CQ处理显著抑制了LX-2细胞的活力, 且抑制作用较强($P<0.0001$)。相较于hymeglusin+CQ组, 加入凋亡抑制剂Z-VAD-FMK后, hymeglusin+CQ对LX-2细胞活力的抑制作用明显减弱($P<0.0001$)。这一结果表明, Z-VAD-FMK能够在一定程度上挽救由CQ增强的hymeglusin诱导性细胞凋亡, 提示CQ可能通过促进凋亡增强hymeglusin对LX-2细胞活力的抑制作用。

2.3 不同浓度hymeglusin对LX-2细胞凋亡的影响

如图4所示, 通过流式细胞术分析发现, LX-2细胞凋亡率与hymeglusin浓度呈正相关, 相较于对照组, 实验组随着药物浓度增加, 细胞凋亡率呈现上升趋势。经统计学分析, 当hymeglusin浓度为40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞凋亡率与空白组相比显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.001$)。

2.4 自噬抑制剂CQ和hymeglusin对LX-2细胞凋亡的影响

如图5所示, 通过流式细胞术分析, 观察到与对照组相比, CQ与hymeglusin联合处理的LX-2细胞凋亡率显著上升($P<0.0001$), 这一结果揭示了CQ能够



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$; $\bar{x}\pm s$, $n=6$.

图1 CCK-8检测不同浓度hymeglusin对LX-2细胞活力

Fig.1 CCK-8 assay of LX-2 cells viability at different concentrations of hymeglusin

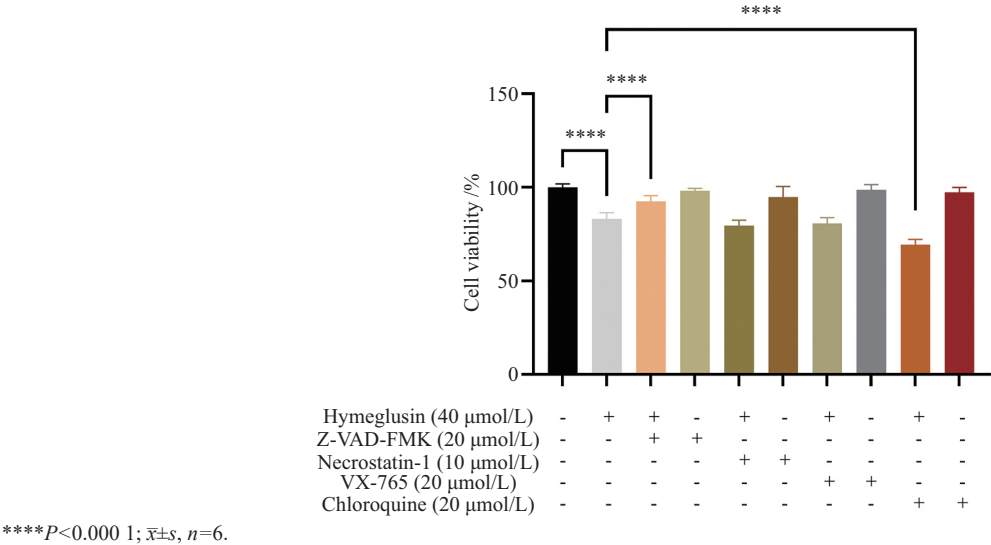


图2 CCK-8检测不同处理因素对LX-2细胞活力的影响
Fig.2 CCK-8 detects the effect of different treatment factors on LX-2 cells activity

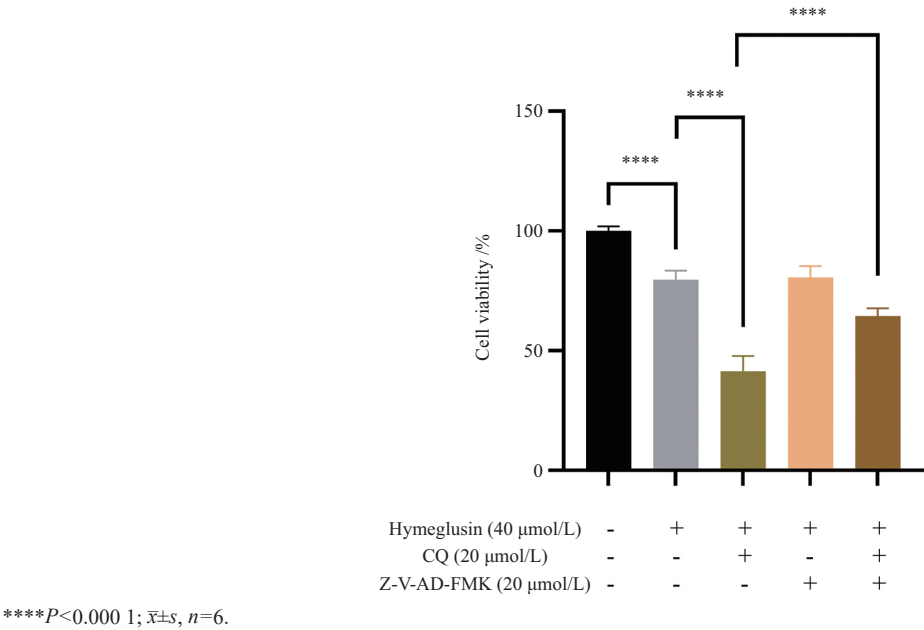


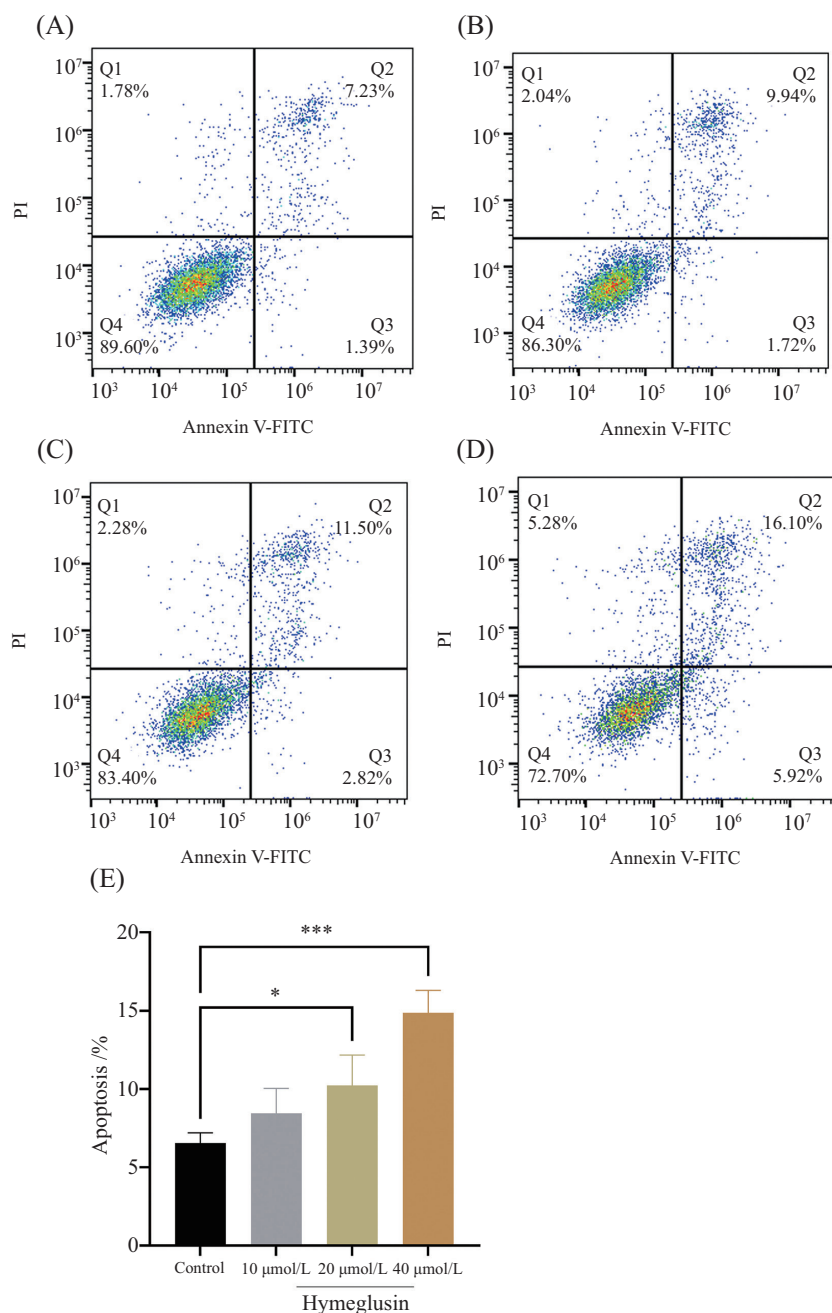
图3 CQ+Z-VAD-FMK对hymeglusin影响的细胞活力检测
Fig.3 Cell viability assay plot of CQ+Z-VAD-FMK effect on hymeglusin

增强hymeglusin诱导LX-2细胞凋亡的效果。

2.5 Hymeglusin作用于LX-2细胞的转录组分析

基于RNA-seq测序技术, 我们共鉴定出431个差异显著基因。基因表达谱分析显示, 鉴定出198个显著上调基因及233个显著下调基因。针对GO功能富集分析中显著性水平最高的20个功能类别进行深入探讨, 结果表明: 在生物学过程(biological process, BP)中, 这些差异基因主要参与细胞分裂、ERK1和ERK2级联的负调控和离子转运的正向调节等功能;

在细胞组分 (cellular component, CC) 方面, 差异基因主要富集于中体、细胞皮层、膜区、宿主细胞核等; 在分子功能 (molecular function, MF) 中, 差异基因主要富集于结合、催化活性、分子功能调节剂等(图6)。根据KEGG通路富集分析结果(图7), 筛选得到341条与差异表达基因相关的通路, 其中IL-17、MAPK、Hippo信号转导途径以及细胞周期等通路呈现显著富集其中; KEGG通路富集气泡图显示, 在细胞周期通路中, 差异显著基因呈现下调趋势, 这可能与调



A: 对照组; B: hymeglusin(10 $\mu\text{mol/L}$)组; C: hymeglusin(20 $\mu\text{mol/L}$)组; D: hymeglusin(40 $\mu\text{mol/L}$)组; E: 不同浓度hymeglsin作用下LX-2细胞的凋亡率。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. $\bar{x} \pm s$, $n=3$ 。

A: control group; B: hymeglusin (10 $\mu\text{mol/L}$) group; C: hymeglusin (20 $\mu\text{mol/L}$) group; D: hymeglusin (40 $\mu\text{mol/L}$) group; E: apoptosis rate of LX-2 cells at different concentrations of hymeglusin. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. $\bar{x} \pm s$, $n=3$.

图4 不同浓度hymeglusin对LX-2细胞凋亡情况

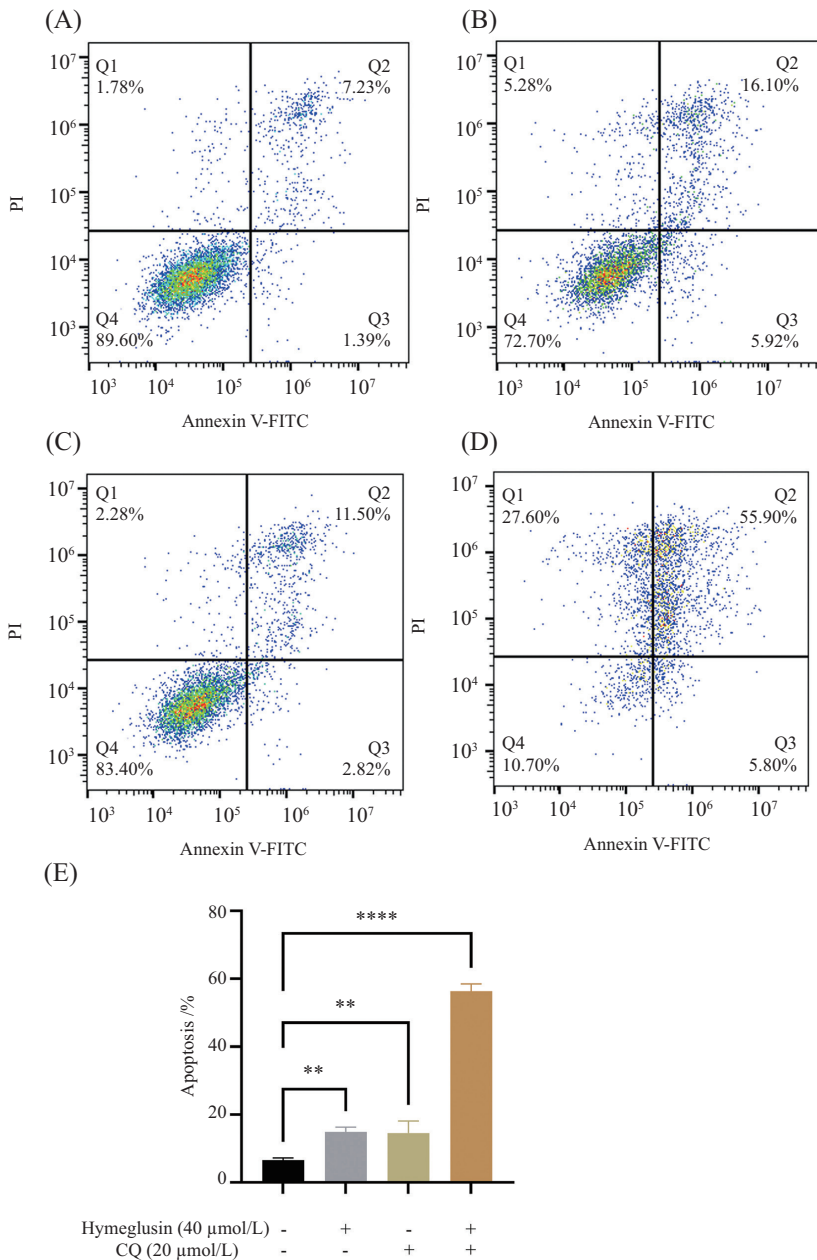
Fig.4 Apoptosis of LX-2 cells treated by different concentrations of hymeglusin

控细胞周期下调的相关基因(如 *CDC20*、*CCNB1*、*BUB1B*、*CCNB2*、*CDC25C*、*PTTG1*、*PLK1*和 *BUB1*)的表达有关。

2.6 Hymeglusin与自噬抑制剂CQ在细胞周期中的作用

基于FlowJo软件分析细胞周期数据,结果如图

8所示。与对照组相比, hymeglusin处理LX-2细胞后, G_0/G_1 期的百分比显著升高 ($P < 0.001$), 表明细胞更多地停留在DNA合成前期; G_2/M 期的百分比显著降低 ($P < 0.05$), 表明细胞生长受到抑制或阻滞。然而, 加入自噬抑制剂CQ后, 这一趋势被逆转: G_0/G_1 期的百分比显著下降 ($P < 0.0001$), 而S期和 G_2/M 期的百



A: 对照组; B: hymeglusin(40 μmol/L)组; C: CQ(20 μmol/L)组; D: hymeglusin(40 μmol/L)+CQ(20 μmol/L)组; E: LX-2细胞对hymeglusin和CQ的凋亡率。 ***P*<0.01, *****P*<0.000 1. $\bar{x} \pm s$, *n*=3。

A: control group; B: hymeglusin (40 μmol/L) group; C: CQ (20 μmol/L) group; D: hymeglusin (40 μmol/L)+CQ (20 μmol/L) group; E: apoptosis rate of LX-2 cells in response to hymeglusin and CQ. ***P*<0.01, *****P*<0.000 1. $\bar{x} \pm s$, *n*=3.

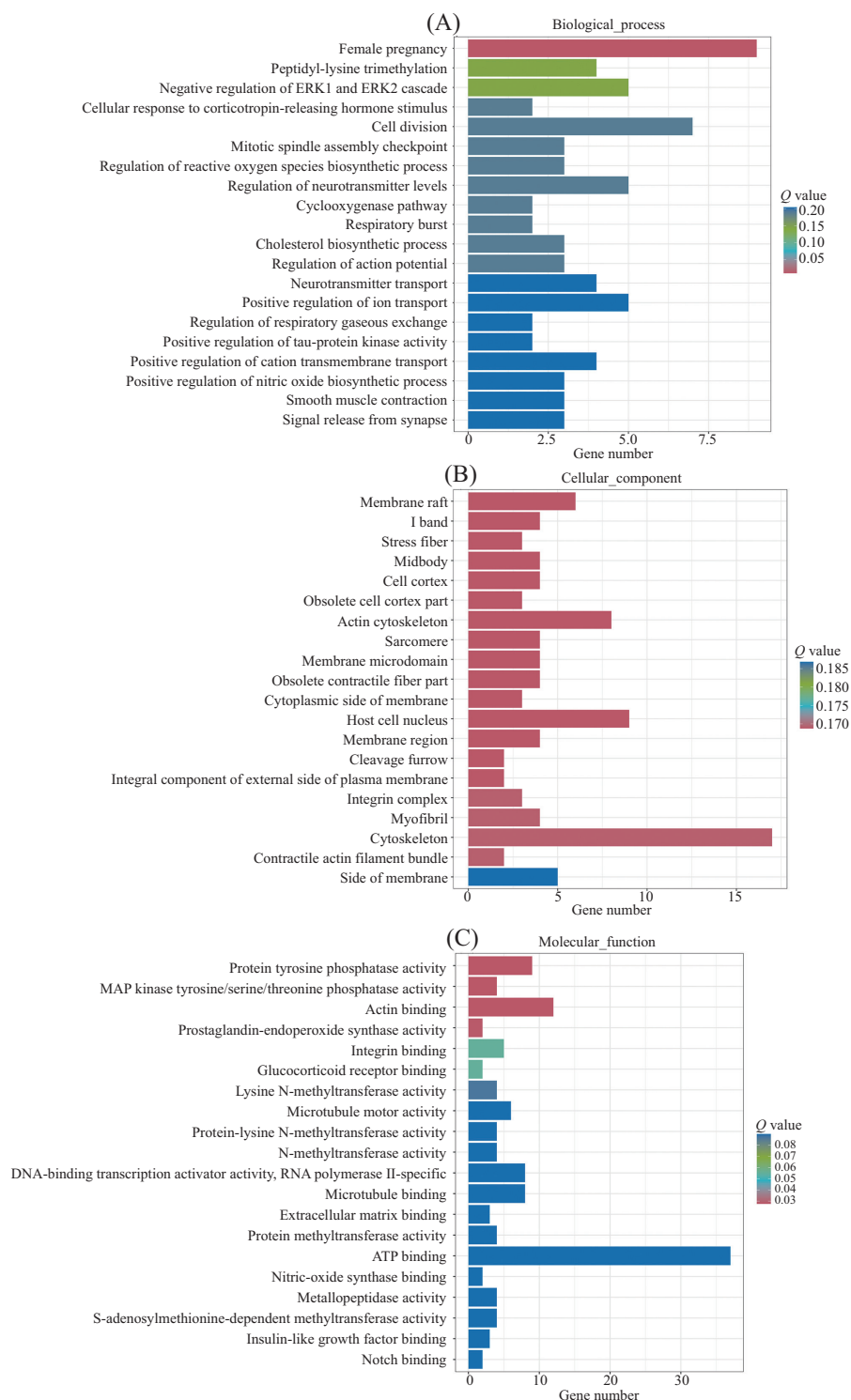
图5 Hymeglusin和CQ对LX-2细胞凋亡情况
Fig.5 Apoptosis of LX-2 cells by hymeglusin and CQ

分比显著升高(*P*<0.01, *P*<0.000 1)。这一结果表明, CQ可能通过调控自噬过程, 促进LX-2细胞从G₀/G₁期向S期和G₂/M期的转变, 并将其阻滞在G₂/M期。

3 讨论

本实验研究了hymeglusin对LX-2细胞增殖和凋亡的作用, 并揭示了自噬抑制剂CQ的协同效应。

CCK-8实验结果显示, hymeglusin抑制LX-2细胞增殖, 并且具有浓度和时间依赖性。细胞死亡的方式包括凋亡^[11]、坏死^[12]、焦亡^[13]等, 自噬通常被认为是细胞的自我保护机制, 过度抑制或激活可能诱发细胞死亡^[14]。将不同死亡抑制剂与hymeglusin共同作用于LX-2细胞, 结果显示, 凋亡抑制剂Z-VAD-FMK能够挽救hymeglusin对LX-2细胞活力的抑制作



A: BP的前20个注释类别; B: CC的前20个注释类别; C: MF的前20个注释类别。

A: the top 20 annotated categories of BP; B: the top 20 annotated categories of CC; C: the top 20 annotated categories of MF.

图6 Hymeglusin显著差异基因GO功能富集分析

Fig.6 GO function enrichment analysis of hymeglusin significantly differentially differentiated genes

用, 这说明 hymeglusin 诱导的 LX-2 细胞死亡主要是通过凋亡途径实现的。自噬与细胞凋亡之间存在复杂而密切的关系。自噬受到强烈抑制, 可能触发

内质网应激进而引起细胞凋亡^[15]。自噬抑制剂 CQ 与 hymeglusin 联合处理, 对 LX-2 细胞活力的抑制作用显著降低。这揭示 hymeglusin 与 CQ 在抑制 LX-2

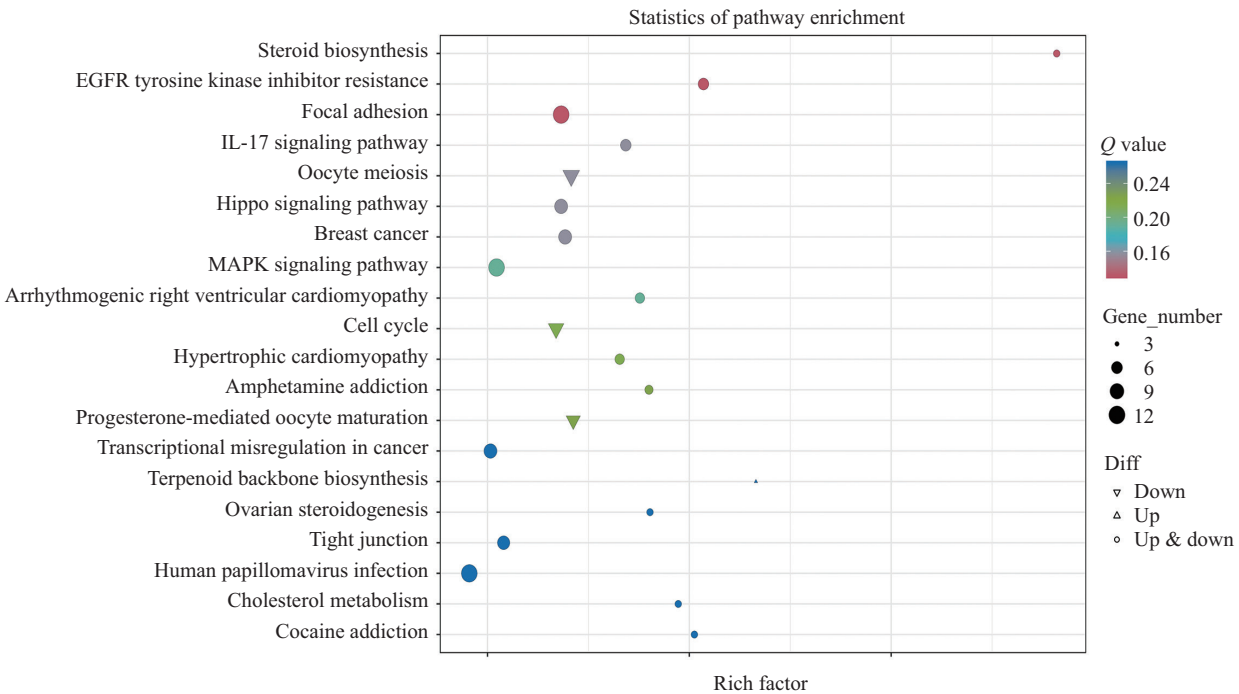


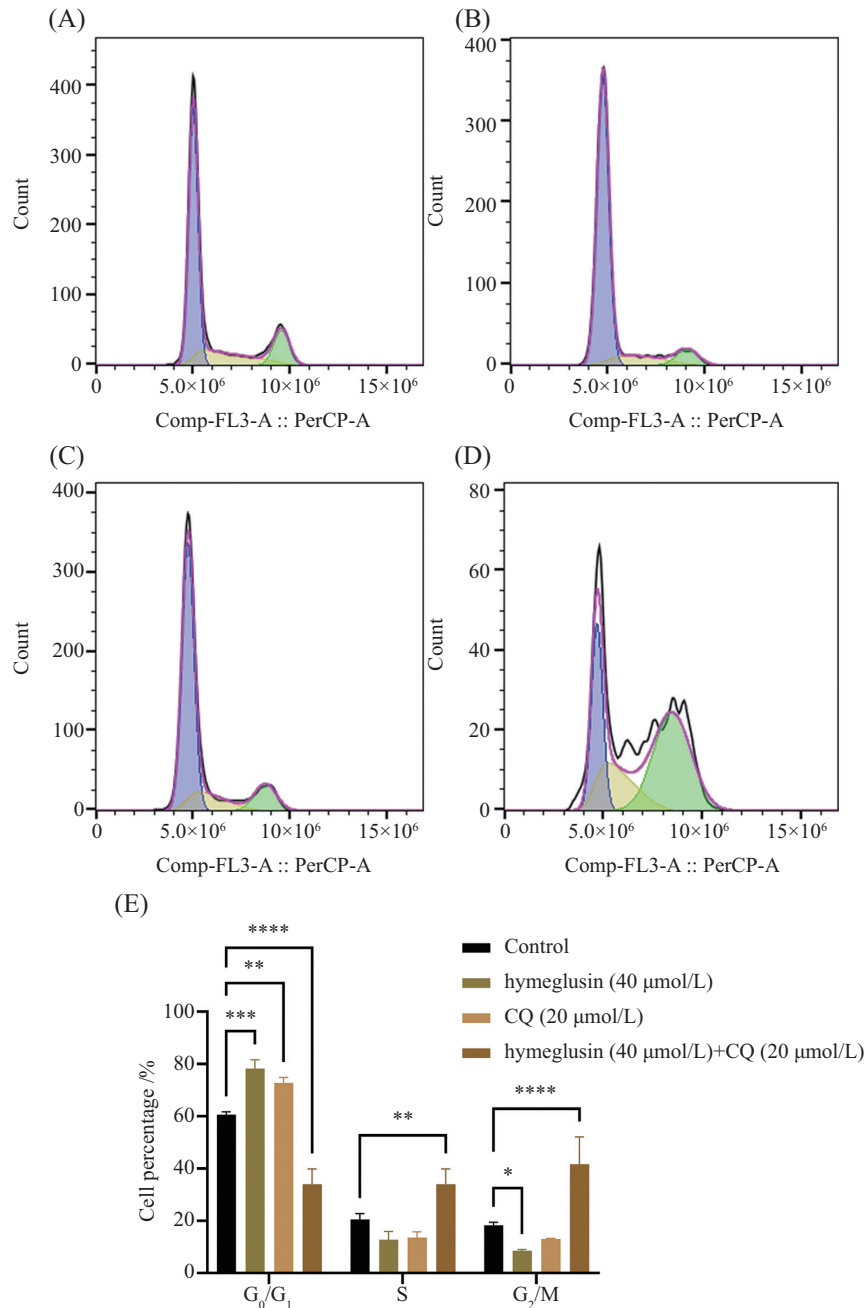
图7 KEGG信号通路富集气泡图
Fig.7 KEGG signaling pathway enrichment bubble map

细胞活力方面存在协同作用。此外,将hymeglusin、Z-VAD-FMK和CQ共同作用于LX-2细胞,检测其对细胞活力的影响。结果显示,与hymeglusin组相比,hymeglusin联合CQ对LX-2细胞活力的抑制作用更强。与hymeglusin+CQ组相比,Z-VAD-FMK的加入则能够减弱hymeglusin联合CQ对LX-2细胞活力的抑制作用,这表明Z-VAD-FMK能够在一定程度上挽救CQ引起的细胞凋亡。流式细胞术结果表明,hymeglusin对LX-2细胞凋亡的诱导作用具有浓度依赖性。另外,CQ联合hymeglusin的细胞凋亡结果进一步证实了CQ能够增强hymeglusin对LX-2细胞的诱导凋亡作用。

RNA-seq是一种用于研究细胞或组织中全mRNA分子的高通量测序方法,其可以提供基因表达谱的分析,使我们从分子层面了解在特定条件下的基因表达模式和功能调控机制^[16]。本研究利用RNA-seq测序技术发现,LX-2细胞经hymeglusin处理后,在转录组水平的基因表达存在明显差异。GO功能富集结果显示,在BP中,差异基因主要富集于细胞分裂、ERK1和ERK2级联的负调控及以离子转运的正向调节等过程;在CC中,基因主要富集于中体、细胞皮层、膜区及宿主细胞核等过程;在MF中,基因显著富集于结合、催化活性及分子功能调节等过程。KEGG通路富集分析结果表明,在细胞

周期通路中,差异显著基因呈现下调趋势,这可能与调控细胞周期下调的相关基因(如*CDC20*、*CCNB1*、*BUB1B*、*CCNB2*、*CDC25C*、*PTTG1*、*PLK1*和*BUB1*)的表达有关。有研究表明,*CDC20*基因表达下调,使M期周期蛋白降解出现障碍,导致细胞不能由中期向后期进行转化^[17]。研究表明*CCNB2*在细胞周期G₂期过渡至M期的阶段中发挥重要作用,且*CCNB2*的过表达被认为可以抑制细胞有丝分裂^[18]。这揭示hymeglusin可能通过调控细胞周期相关基因的表达,从而抑制细胞的增殖和肝纤维化的进展。

细胞凋亡在多个生理过程中具有重要的生理学意义,细胞周期的变化可以影响细胞凋亡的发生和进程^[19]。KEGG通路富集分析结果表明,hymeglusin的处理影响了LX-2细胞周期调控。为了验证这一发现,我们采用了流式细胞术进行检测。检测结果表明,与对照组相比,LX-2细胞经hymeglusin处理后,G₀/G₁期的百分比显著升高,这表明hymeglusin处理后的LX-2细胞更多地停留在DNA合成前期;G₂/M期的百分比显著降低,这表明细胞在有丝分裂期的进展受到抑制,细胞无法正常完成分裂。转录组分析与流式细胞术实验结果一致表明,hymeglusin通过扰乱细胞周期相关基因的表达程序,有效抑制LX-2细胞的G₀/G₁期向S、G₂/M期的转变,



A: 对照组; B: hymeglusins(40 $\mu\text{mol/L}$)组; C: CQ (20 $\mu\text{mol/L}$)组; D: hymeglusins(40 $\mu\text{mol/L}$)+CQ (20 $\mu\text{mol/L}$)组; E: 各组细胞周期比率的统计分析。
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 3$ 。

A: control; B: hymeglusins (40 $\mu\text{mol/L}$) group; C: CQ (20 $\mu\text{mol/L}$) group; D: hymeglusins (40 $\mu\text{mol/L}$)+CQ (20 $\mu\text{mol/L}$) group; E: statistical analysis of cell cycle ratios in each group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 3$ 。

图8 Hymeglusins与CQ在细胞周期中的作用

Fig.8 Role of hymeglusins and CQ in cell cycle

形成 G_0/G_1 阻滞,使之不进入或延迟进入S、 G_2/M 期,干扰有丝分裂期的进展,从而有效抑制LX-2细胞的分裂增殖,并促进细胞凋亡。而经hymeglusins+CQ处理的LX-2细胞, G_0/G_1 期百分比下降,S期和 G_2/M 期百分比升高。这表明自噬抑制剂CQ的加入可能使hymeglusins作用下的LX-2细胞从 G_0/G_1 期向S期和 G_2

期转变。这种转变可能是由于CQ抑制自噬过程,使得细胞内的代谢和信号转导发生变化,从而影响细胞周期的调控。细胞阻滞在 G_2/M 期可能是因为CQ和hymeglusins的联合作用进一步干扰了细胞周期的正常进程,使得细胞无法正常完成有丝分裂。

综上所述,我们的研究揭示了hymeglusins抑制

肝星状细胞LX-2增殖的机制: hymeglusin以剂量和时间依赖方式显著抑制LX-2细胞增殖;通过干扰细胞周期进程,诱导G₀/G₁期阻滞,进而触发细胞凋亡;此外, hymeglusin联合CQ后可诱导G₂/M期阻滞。这为hymeglusin作为一种潜在的抗肝纤维化药物提供了重要的理论依据。后续研究将重点验证其在动物模型中的作用及安全性。

参考文献 (References)

- [1] TOMODA H, OHBAYASHI N, MORIKAWA Y, et al. Binding site for fungal beta-lactone hymeglusin on cytosolic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A synthase [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2004, 1636(1): 22-8.
- [2] ZHOU C, WANG Z, YANG S, et al. Hymeglusin enhances the pro-apoptotic effects of venetoclax in acute myeloid leukemia [J]. *Front Oncol*, 2022, 12: 864430.
- [3] MULLEN P J, YU R, LONGO J, et al. The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(11): 718-31.
- [4] LI K, ZHANG J, LYU H, et al. CSN6-SPOP-HMGCS1 axis promotes hepatocellular carcinoma progression via YAP1 activation [J]. *Adv Sci*, 2024, 11(14): e2306827.
- [5] 邓斯铭, 刘礼剑, 黎丽群, 等. 中药活性成分及复方调控JAK/STAT信号通路改善肝纤维化的研究进展[J]. *中国药房* (DENG S M, LIU L J, LI L Q, et al. Research progress on active ingredients of traditional chinese medicine and compound formulations regulating the JAK/STAT signaling pathway to improve liver fibrosis [J]. *China Pharmacy*), 2024, 15: 1923-27.
- [6] 封文斌, 杨建钦, 李丽媚, 等. 他达拉非新型片剂通过抑制肝星状细胞活化改善小鼠肝纤维化[J]. *中国药理学通报* (FENG W B, YANG J Q, LI L M, et al. Novel tablet of tadalafil ameliorates hepatic fibrosis in mice by inhibiting hepatic stellate cell activation [J]. *Chinese Pharmacological Bulletin*), 2025, 41(2): 290-7.
- [7] 贺尼娅, 王琳. 慢性乙型肝炎患者血清胆固醇与肝纤维化的相关性研究[J]. *肝脏* (HE N Y, WANG L. Correlation study of serum cholesterol and liver fibrosis in patients with chronic hepatitis B [J]. *Chinese Hepatology*), 2020, 25(6): 645-7, 54.
- [8] 王燕, 肖雄, 马丽, 等. 和血柔肝方含药血清通过鞘氨醇激酶-1对肝星状细胞增殖与凋亡的作用[J]. *中西医结合肝病杂志* (WANG Y, XIAO X, MA L, et al. Role of hepatic stellate cell proliferation and apoptosis via sphingosine kinase-1 by hexahexaquon liver-containing serum [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases*), 2024, 34(10): 903-8.
- [9] KISSELEVA T, BRENNER D. Molecular and cellular mechanisms of liver fibrosis and its regression [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2021, 18(3): 151-66.
- [10] 符秋雨, 王飞虾, 张峰, 等. 白术内酯III调控ASCT2介导的线粒体-溶酶体互作诱导肝星状细胞衰老的抗肝纤维化机制研究[J]. *南京中医药大学学报* (FU Q Y, WANG F X, ZHANG F, et al. Atractylenolide III modulates ASCT2-mediated mitochondrial-lysosomal interactions to induce hepatic stellate cell senescence in the study of anti-hepatic fibrosis mechanism [J]. *Journal of Nanjing University of Chinese Medicine*), 2024, 40(4): 341-9.
- [11] PISTRITTO G, TRISCIOGLIO D, CECI C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging*, 2016, 8(4): 603-19.
- [12] NIKOLETOPOULOU V, MARKAKI M, PALIKARAS K, et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(12): 3448-59.
- [13] VASUDEVAN S O, BEHL B, RATHINAM V A. Pyroptosis-induced inflammation and tissue damage [J]. *Semin Immunol*, 2023, 69: 101781.
- [14] 李佩容, 张海丹, 李虹瑶, 等. 铁死亡及自噬在急性胰腺炎中的研究进展[J]. *药学前沿* (LI P R, ZHANG H D, LI H Y, et al. Research progress on ferroptosis and autophagy in acute pancreatitis [J]. *Advances in Pharmaceutical Sciences*), 2024, 28(12): 705-10.
- [15] SHU Y, HE Y, YE G, et al. Curcumin inhibits the activity and induces apoptosis of activated hepatic stellate cell by suppressing autophagy [J]. *J Cell Biochem*, 2023, 124(11): 1764-78.
- [16] 汪思云, 李艺博, 谭春霞, 等. 基于转录组测序技术分析补骨脂素对HepG2细胞的作用机制[J]. *临床输血与检验* (WANG S Y, LI Y B, TAN C X, et al. Analysis of the mechanism of psoralen on HepG2 cells based on transcriptome sequencing technology [J]. *Journal of Clinical Transfusion and Laboratory Medicine*), 2024, 26(1): 35-41.
- [17] 孙慧, 黄越承, 徐勤枝, 等. HIV-1 Tat 蛋白对细胞周期相关基因表达及辐射细胞周期阻滞的影响[J]. *军事医学科学院院刊* (SUN Y, HUANG Y C, XU Q Z, et al. Effects of HIV-1 Tat protein on the expression of cell cycle-related genes and radiation-induced cell cycle arrest [J]. *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences*), 2006, 30(2): 101-5.
- [18] 陈坚, 张建华. CCNB2对肺腺癌的诊断及调控功能研究[J]. *中国肿瘤临床* (CHEN J, ZHANG J H. Diagnostic and regulatory role of CCNB2 in lung adenocarcinoma [J]. *Chinese Journal of Clinical Oncology*), 2024, 51(19): 1003-8.
- [19] 苗久旺, 高荧, 于宜平. 紫草素诱导人乳腺癌MCF-7细胞自噬对细胞增殖及凋亡的影响[J]. *临床医学研究与实践* (MIAO J W, GAO Y, YU Y P. Effects of shikonin-Induced autophagy on proliferation and apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells [J]. *Clinical Research and Practice*), 2023, 8(6): 5-8.