

葛根素通过阻断PI3K/AKT/mTOR通路磷酸化促进肝细胞癌细胞parthanatos死亡

王颖怡¹ 蒋婧雯² 王良玉^{1*}¹重庆医科大学附属璧山医院/重庆市璧山区人民医院, 药学部, 重庆 402760;²暨南大学生命科学技术学院, 广州 510000)

摘要 该文旨在探究葛根素对肝细胞癌(HCC)细胞parthanatos的影响。培养人HCC细胞系Hep3B、HepG2、Huh7、SK-HEP-1,并将其分为空白组(0 μmol/L)、低浓度葛根素组(10 μmol/L)、中浓度葛根素组(50 μmol/L)和高浓度葛根素组(100 μmol/L)。CCK-8和EdU实验检测葛根素对细胞增殖的影响。采用Western blot检测以下指标:葛根素低、中、高剂量对PARP-1、AIF、PTEN、PAR及PI3K/AKT/mTOR通路相关蛋白表达的影响;加入PARP-1抑制剂(Olaparib)、敲除PTEN、加入AKT激动剂(PTP1B-IN-24)、加入PI3K激动剂(740Y-P)后,葛根素对PTEN、PARP-1、AIF及PI3K/AKT/mTOR通路相关蛋白表达的影响。构建裸鼠荷瘤模型,观察葛根素饲喂对肿瘤体积和质量的影响,采用TUNEL染色检测细胞凋亡情况,免疫荧光染色检测AKT表达情况,Western blot检测PARP-1和AIF蛋白表达水平。结果显示,与Control组相比,葛根素低/中/高剂量依赖性抑制HCC细胞增殖活性($P<0.05$),显著降低PI3K/AKT/mTOR通路磷酸化水平($P<0.05$),升高PAR、PARP-1和AIF蛋白表达水平($P<0.05$),促进AIF蛋白核位移。与Olaparib组/PTEN-KD组/PTP1B-IN-24组相比,加入葛根素后细胞增殖能力无显著变化($P>0.05$);在低/中/高剂量葛根素中,与Control组相比,740Y-P组PAR、PARP-1、AIF表达水平显著降低($P<0.05$),PI3K/AKT/mTOR通路相关蛋白表达水平均显著升高($P<0.05$)。在体内实验中,葛根素饲喂显著抑制了HCC肿瘤体积和质量增长($P<0.001$),提高了PARP-1和AIF蛋白表达水平($P<0.01$),促进了AKT表达。葛根通过素阻断HCC细胞PI3K/AKT/mTOR通路磷酸化促进细胞parthanatos死亡。

关键词 葛根素; 肝细胞癌; PI3K; parthanatos

Puerarin Promotes Parthanatos in Hepatocellular Carcinoma Cells by Blocking the Phosphorylation of the PI3K/AKT/mTOR Pathway

WANG Yingyi¹, JIANG Jingwen², WANG Liangyu^{1*}¹Department of Pharmacy, Bishan Hospital of Chongqing Medical University/Bishan Hospital of Chongqing, Chongqing 402760, China; ²College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510000, China)

Abstract This study aims to investigate the effect of puerarin on parthanatos in HCC (hepatocellular carcinoma) cells. Human HCC cell lines Hep3B, HepG2, Huh7, and SK-HEP-1 were cultured and divided into a blank group (0 μmol/L), low-concentration puerarin group (10 μmol/L), medium-concentration puerarin group (50 μmol/L), and high-concentration puerarin group (100 μmol/L). CCK-8 and EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine)

收稿日期: 2025-09-11 接受日期: 2026-02-27

重庆市基础与前沿研究计划(批准号: Y2022019215)资助的课题

*通信作者。Tel: 13500382617, E-mail: 2905521007@qq.com

Received: September 11, 2025 Accepted: February 27, 2026

This work was supported by the Chongqing Basic and Frontier Research Program Project (Grant No. Y2022019215)

*Corresponding author. Tel: +86-13500382617, E-mail: 2905521007@qq.com

assays were used to detect the effect of puerarin on cell proliferation. Western blot was employed to detect the effects of low/medium/high doses of puerarin on the expression of PARP-1 [poly (ADP-ribose) polymerase 1]/AIF (apoptosis-inducing factor) knockdown/PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) knockdown, PAR [poly (ADP-ribose)], as well as proteins in the PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT (protein kinase B)/mTOR (mammalian target of rapamycin) pathway. The following indicators were detected using Western blot: the effects of low, medium, and high doses of puerarin on the expression of PARP-1, AIF, PTEN, PAR, and proteins in the PI3K/AKT/mTOR pathway; and the effects of puerarin on the expression of PTEN, PARP-1, AIF, and proteins in the PI3K/AKT/mTOR pathway after the addition of a PARP-1 inhibitor (Olaparib), *PTEN* knockdown, addition of an AKT agonist (PTP1B-IN-24), or addition of a PI3K agonist (740Y-P). A nude mouse xenograft model was established to observe the effects of puerarin feeding on tumor volume and mass. TUNEL staining was used to detect apoptosis; immunofluorescence staining was used to detect AKT expression, and Western blot was used to detect the expression levels of PARP-1 and AIF proteins. The results showed that, compared with the Control group, puerarin at low/medium/high doses dose-dependently inhibited the proliferative activity of HCC cells ($P<0.05$), significantly reduced the phosphorylation levels of the PI3K/AKT/mTOR pathway ($P<0.05$), increased the protein expression levels of PAR, PARP-1, and AIF ($P<0.05$), and promoted the nuclear translocation of AIF protein. Compared with the Olaparib group/*PTEN*-KD group/PTP1B-IN-24 group, there was no significant change in cell proliferation ability after the addition of puerarin ($P>0.05$). Among the low/medium/high doses of puerarin, compared with the Control group, the expression of PAR, PARP-1, and AIF in the 740Y-P group was significantly decreased ($P<0.05$), while the expression of PI3K/AKT/mTOR pathway related proteins was significantly increased ($P<0.05$). *In vivo* experiments showed that puerarin feeding significantly inhibited the growth of HCC tumor volume and weight ($P<0.001$), increased the expression levels of PARP-1 and AIF proteins ($P<0.01$), and promoted AKT expression. Puerarin promotes parthanatos in HCC cells by blocking the phosphorylation of the PI3K/AKT/mTOR pathway.

Keywords puerarin; hepatocellular carcinoma; PI3K; parthanatos

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是肝癌的主要病理类型, 由于早期症状不明显, 且缺乏特异性生物标志物, 确诊时多为晚期。HCC 治疗的主要手段, 包括肝切除、肝移植、靶向化疗和全身治疗。但对于晚期 HCC 患者, 手术切除通常不可行, 全身治疗是晚期 HCC 的唯一手段^[1]。在过去的几十年里, 尽管通过手术、靶向治疗、免疫治疗、化疗等综合治疗方案, HCC 的治疗得到了显著改善, 五年总生存率为 50%~70%^[2], 但晚期 HCC 患者, 五年生存率通常低于 20%。因此, 需要考虑更多新的治疗模式。

葛根素 (puerarin, GGS) 是一种异黄酮衍生物, 是从传统中药葛根中提取的主要生物活性成分。研究证实葛根素具有抗纤维化、抗氧化、抗炎和免疫调节特性, 已在临床上广泛用于改善神经元损伤、代谢和治疗心血管疾病^[3]。最近, 葛根素在抗肿瘤治疗方面的作用受到广泛关注。研究发现, 葛根素通过雷帕霉素机制性靶蛋白 (mammalian target of ra-

pamycin, mTOR) 信号转导抑制口腔鳞状细胞癌中的糖酵解并增加顺铂化疗敏感性^[4]。然而, 葛根素是否对 HCC 具有抑制作用, 特别是其是否能够调控一种与肿瘤发生发展密切相关的、新型的细胞死亡方式——parthanatos, 目前尚不清楚。Parthanatos 是最近新发现的一种细胞程序性死亡方式, parthanatos 是一种由 DNA 损伤触发、聚 (ADP-核糖) 聚合酶 1 [(poly (ADP-ribose) polymerase 1, PARP-1) 过度活化所致的细胞死亡, 其最终执行依赖于凋亡诱导因子 (apoptosis-inducing factor, AIF) 的核转位^[5]。近期研究揭示, 混合谱系激酶结构域样蛋白在缺乏受体相互作用蛋白激酶 3 的 HCC 细胞中通过维持内质网-线粒体镁离子动态平衡抑制 parthanatos^[6], 而靶向 parthanatos 可显著抑制移植瘤生长^[6]。此外, 文献指出 HCC 细胞中 PARP-1 表达上调, 易产生耐药^[7]。综上, 葛根素是否通过调控 parthanatos 影响 HCC 进展也尚未见报道。鉴于

parthanatos在克服肿瘤耐药中的独特优势,探索葛根素对该通路的调控作用具有重要临床价值。因此,本研究使用不同浓度葛根素干预HCC细胞,初步探讨了葛根素对HCC细胞parthanatos和PI3K/AKT/mTOR信号通路的影响,为开发基于parthanatos的HCC靶向治疗提供新依据。

1 材料和方法

1.1 细胞系、药物和动物

人HCC细胞系Hep3B、HepG2购自合肥万物生物科技有限公司;24只4周龄BALB/C雄性裸鼠购自重庆医科大学;葛根素中药单体购自北京索莱宝科技有限公司(纯度 $\geq 98\%$)。此研究已通过重庆医科大学附属璧山医院(重庆市璧山区人民医院)伦理委员会审批(批号:202400126)。

1.2 主要试剂

RPMI-1640培养基(货号:11875-093)和胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 货号:10099-141C)均购自ThermoFisher Scientific公司;曲拉通-100(Triton X-100, 货号:T8200)购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH, 货号:2118)、p-PI3K(货号:4228)、磷酸化蛋白激酶B(phospho-protein kinase B, p-AKT, Ser473, 货号:4060)、p-mTOR(Ser2448, 货号:5536)均购自Cell Signaling Technology公司;兔抗PAR(货号:ab14459)、PARP-1(货号:ab227244)、AIF(货号:ab245052)、PI3K(货号:ab191606)、AKT(货号:ab179463)、mTOR(货号:ab2732)均购自Abcam公司;羊抗兔二抗(HRP标记, 货号:SA00001-2)购自Proteintech公司;MTT试剂盒(货号:C0009)、CCK-8(cell counting kit-8)试剂盒(货号:C0037)、EdU试剂盒(BeyoClick™ EdU-488, 货号:C1031)均购自上海碧云天生物科技有限公司;荧光标记二抗(Cy3/Cy5标记羊抗兔, 货号:GB21303/GB21304)、DAPI试剂(货号:G1012-100ML)均购自武汉塞维尔生物科技有限公司;奥拉帕尼(Olaparib, 货号:HY-10162)、PTP1B-IN-24(货号:HY-100866)、740Y-P(PI3K激活剂, 货号:HY-P0175)均购自MedChemExpress公司。

1.3 细胞培养和分组

一般情况下,细胞使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基培养,置于37 °C、5% CO₂的恒温孵育箱内。将Hep3B细胞分组为空白组(Control)、

低浓度葛根素组(low-concentration puerarin, L-GGS)、中浓度葛根素组(medium-concentration puerarin, M-GGS)和高浓度葛根素组(high-concentration puerarin, H-GGS)。

1.4 基因敲除

利用CRISPR/Cas9系统特异性敲除目标基因(AIF、PTEN),通过设计sgRNA引导Cas9核酸酶切割DNA双链,导致基因功能丧失。sgRNA序列AIF: 5'-GAC GTG CTG GAG CTG CTC CA-3'; PTEN: 5'-CAG CTC CAG CAC GTC CAG CA-3'。将sgRNA克隆至CRISPR/Cas9载体[如pX459或pSpCas9(BB)-2A-Puro],通过测序验证sgRNA是否被正确插入。将构建好的质粒转染至Hep3B中,使用Lipofectamine 3000进行孵育,转染42 h后,加入嘌呤霉素(1~2 μg/mL)进行筛选;将存活细胞稀释至 1×10^3 /mL,并将其接种至96孔板,培养2~3周形成单克隆,扩增单克隆细胞系;提取基因组DNA,PCR扩增靶区域并测序,确认基因编辑效果。

1.5 MTT实验

将细胞以 5×10^3 /mL的密度接种至96孔板,每孔100 μL培养基;于37 °C、5% CO₂培养箱中预培养24 h;按实验设计加入不同浓度(0、10、50、100 μmol/L)葛根素,每组设3个复孔;继续培养24~72 h(根据实验需求);每孔加入10 μL MTT溶液(5 mg/mL,溶于PBS),终浓度为0.5 mg/mL;37 °C孵育4 h,避免光照;小心吸弃培养基,每孔加入100 μL DMSO,低速振荡10 h溶解结晶;使用酶标仪在570 nm波长下测定吸光度(D)值,参考波长630 nm;计算细胞活力(C), $C = [(D_{\text{实验组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}})] \times 100\%$ 。

1.6 CCK-8实验

将细胞接种于96孔板内,每孔5 000个细胞。在培养的第12、24、36、48 h分别向各孔内加入10 μL的CCK-8溶液,然后继续37 °C避光孵育2 h。之后,在酶标仪上检测各孔吸光度(D)值。

1.7 EdU增殖实验

将细胞接种于6孔板中,48 h后在37 °C下用50 μmol/L的EdU试剂处理2 h,然后用4%多聚甲醛室温固定30 min。接下来,细胞用0.5% Triton X-100室温孵育15 min进行通透处理,然后根据制造商的说明与EdU反应混合物反应30 min。细胞核使用DAPI试剂室温染色15 min,然后在荧光显微镜下观察。

1.8 Western blot

收集细胞或组织样本,并用含磷酸酶抑制剂、蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液进行充分裂解,获得的裂解物在4 °C、15 000 r/min条件下离心15 min。取离心后的上清,通过BCA试剂盒测定蛋白样品浓度。然后,将蛋白样品加入至SDS-PAGE凝胶孔内进行电泳分离,之后将其转移到PVDF膜上。然后,用5%脱脂牛奶室温进行封闭,并将膜与稀释好的一抗溶液在4 °C下孵育过夜。之后,膜与稀释好的二抗溶液在室温下孵育2 h。再使用ECL化学发光液使膜上的蛋白条带显影。一抗稀释比为1:1 000,二抗稀释比为1:5 000。

1.9 细胞免疫荧光实验

将 1×10^5 /mL细胞接种在24孔培养板中,培养24 h。然后用4%多聚甲醛室温固定细胞30 min,用0.5% Triton X-100透化细胞10 min。随后,细胞在4 °C下与一抗(1:400)孵育过夜,然后在室温下与荧光标记二抗(抗兔IgG, 1:400)避光孵育2 h。细胞核用DAPI试剂室温染色5 min。染色结果通过荧光显微镜观察。

1.10 裸鼠荷瘤模型

24只BALB/C裸鼠在动物房适应性饲喂一周。然后,将Hep3B细胞按 1×10^6 /只接种于裸鼠背部皮下。接种第5天观察到皮下肿瘤形成,表明建模成功。随后,将裸鼠随机分组为对照组、葛根素饲喂组,每组各12只。从第6天开始,每天给予对照组常规饮食饲喂,给予葛根素饲喂组常规饮食+每天10 mg/kg葛根素饲喂。每隔5天测量一次皮下肿瘤体积,公式为 $V=L \times W^2/2$, V =体积, L =长度, W =宽度。接种第21天处死动物,完整取下皮下肿瘤。

1.11 统计分析

使用SPSS 24.0软件进行统计分析,使用Graph-Pad Prism 8.0软件绘制统计图。两组比较采用 t 检验,多组比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 葛根素以浓度依赖性方式抑制HCC细胞增殖活性

MTT实验结果显示Hep3B和HepG2细胞中葛根素的 IC_{50} 约为50 μ mol/L,因此后续实验中我们将50 μ mol/L定为实验中浓度,10 μ mol/L为低浓度,100 μ mol/L为高浓度(图1A, $P < 0.05$)。CCK-8实验结果显示,与Control相比,低浓度葛根素组、中浓度葛根素组和高浓度葛根

素组细胞增殖活性均显著降低,并且表现出浓度依赖性(图1B, $P < 0.05$)。此外,EdU实验结果也显示,与空白组相比,低浓度葛根素组、中浓度葛根素组和高浓度葛根素组在Hep3B细胞中的增殖活性均显著降低($P < 0.001$),且表现出浓度依赖性(图1C)。

2.2 葛根素诱导HCC细胞parthanatos水平升高

Western blot结果显示,与Control细胞相比,L-GGS、M-GGS和H-GGS的Hep3B细胞PAR、PARP-1和AIF蛋白表达水平均显著升高(图2A, $P < 0.05$)。免疫荧光显示,与Control组相比,H-GGS组AIF蛋白在细胞核中积聚增多(图2B)。

当使用2.5 μ mol/L PARP-1抑制剂Olaparib处理细胞后,细胞增殖并不受GGS影响(图2C),具体表现为,与Control组相比,GGS组细胞活力显著下降($P < 0.001$),而当同时加入Olaparib后,与Olaparib组相比,GGS/Olaparib组细胞活力无显著变化($P > 0.05$)。

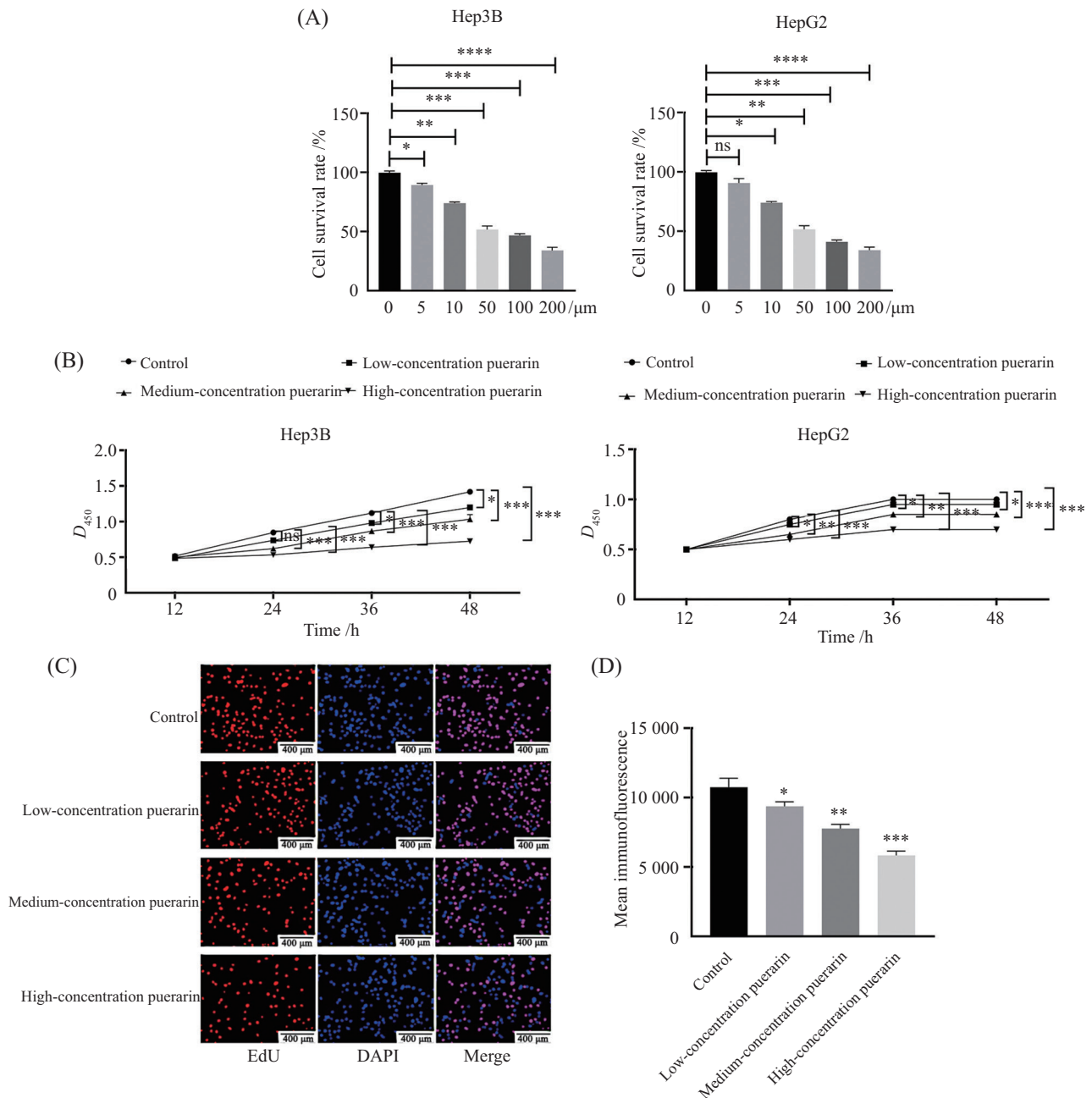
当敲除AIF后细胞增殖也不受中浓度葛根素影响(图2D),具体表现为,与Control组相比,GGS组细胞活力显著下降;与AIF-KO组相比,AIF-KO/GGS组细胞活力无显著变化。

2.3 葛根素阻断HCC细胞PI3K/AKT/mTOR通路磷酸化

为了进一步探究葛根素诱导HCC细胞parthanatos的分子机制,提取各组细胞蛋白进行Western blot。结果显示,与Control的Hep3B细胞相比,L-GGS、M-GGS和H-GGS细胞p-PI3K、p-AKT和p-mTOR表达水平均显著降低,而PI3K、AKT和mTOR蛋白总体水平并无明显变化(图3A, $P < 0.05$)。

当敲除细胞PTEN后,与Control组相比,GGS细胞活力显著下降($P < 0.001$),与PTEN-KO组相比,PTEN-KO/GGS组细胞活力无显著变化(图3B和图3C);同时与Control组相比,GGS组蛋白水平PTEN无变化,parthanatos相关蛋白PARP-1和AIF蛋白水平显著上升;与PTEN-KO组相比,PTEN-KO/GGS组的PTEN蛋白水平无变化,parthanatos相关蛋白PARP-1和AIF蛋白水平无显著变化($P < 0.001$,图3D)。

使用10 μ mol/L AKT磷酸化激动剂PTP1B-IN-24后,PARP-1及AIF表达水平均下调,提示AKT及其下游通路通过上调parthanatos相关蛋白表达引起parthanatos发生($P < 0.001$,图3E)。



A: 葛根素对肝癌细胞的 IC_{50} 值测定; B: 葛根素对肝癌细胞存活率 D 值的影响; C: 葛根素随时间变化对肝癌细胞活力的影响; D: EdU检测结果, 红色标记为EdU阳性增殖细胞, 蓝色为DAPI染色的细胞核。^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$, 与空白组相比。

A: determination of IC_{50} values of puerarin in HCC cells; B: effects of puerarin on the D values of HCC cell viability; C: effects of puerarin affects on HCC cell with time changing; D: effects of puerarin on EdU incorporation in HCC cells. Red indicates EdU-positive proliferating cells, blue indicates DAPI-stained nuclei. ^{ns} $P>0.05$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ compared with Control group.

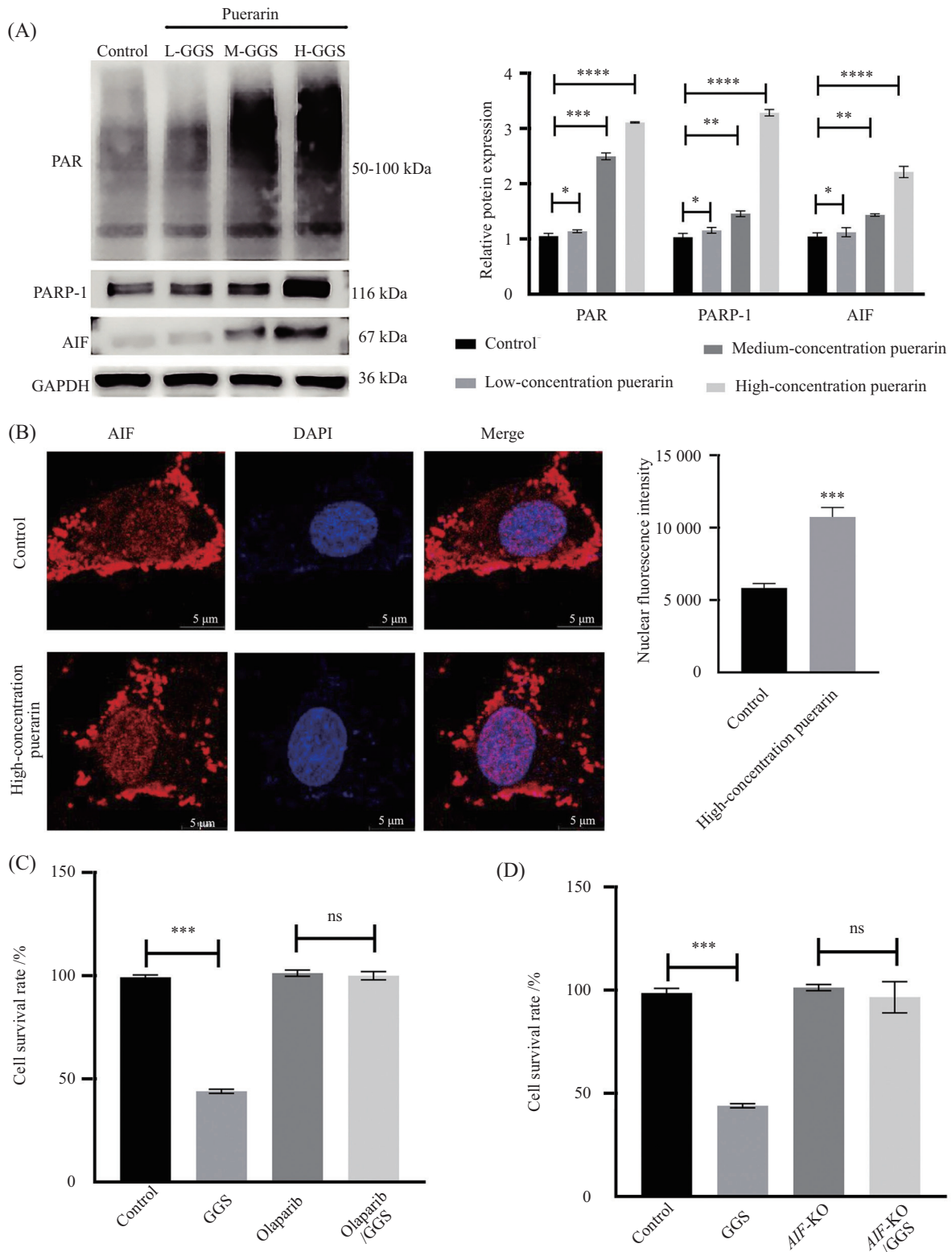
图1 葛根素以浓度依赖性方式抑制肝细胞癌的细胞增殖

Fig.1 Puerarin inhibiting HCC cell proliferation in a concentration-dependent manner

2.4 葛根素通过阻断PI3K/AKT/mTOR通路磷酸化诱导HCC细胞parthanatos

为进一步验证葛根素对HCC细胞parthanatos的诱导作用是否与其抑制PI3K/AKT/mTOR通路磷酸化有关, 向各浓度葛根素组细胞培养体系内

加入等量PI3K激活剂740Y-P。Western blot结果显示, 加入10 $\mu\text{mol/L}$ 740Y-P后, 各浓度葛根素组细胞内p-PI3K、p-AKT和p-mTOR表达水平均有所升高($P<0.05$), PAR、PARP-1和AIF蛋白表达水平均有所降低(图4, $P<0.05$)。这表明, 740Y-P

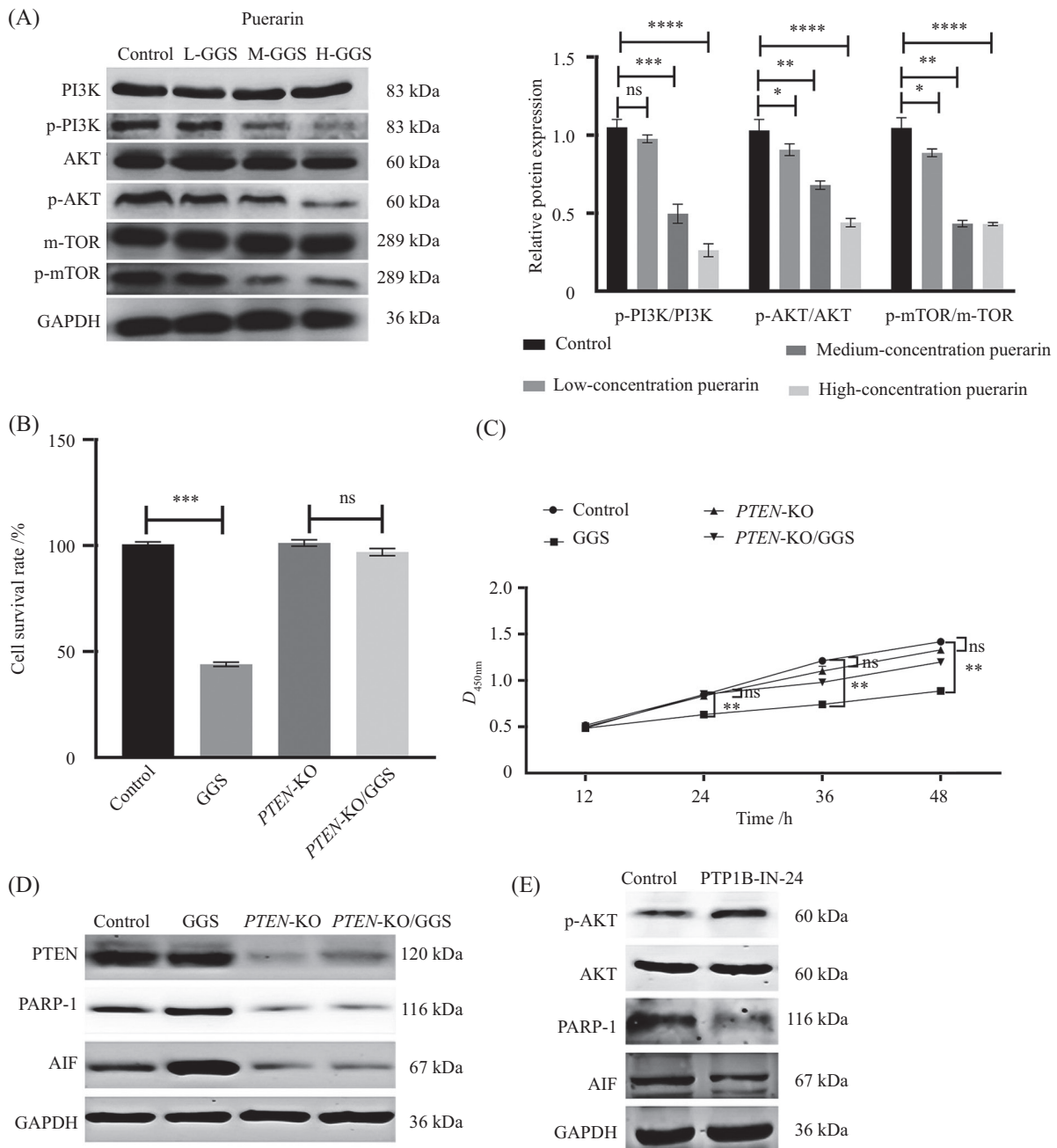


A: 葛根素对PAR、PARP-1和AIF蛋白表达的影响; B: 葛根素处理后肝癌细胞中AIF表达的免疫荧光图像, 红色显示AIF蛋白, 蓝色显示细胞核; C: Olaparib处理后葛根素对细胞存活率的影响; D: *AIF*基因敲除后葛根素对细胞存活率的影响。^{ns}*P*>0.05, ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01, ^{***}*P*<0.001, ^{****}*P*<0.0001。

A: effects of puerarin on the protein expression of PAR, PARP-1, and AIF; B: immunofluorescence images of AIF expression in hepatocellular carcinoma cells after puerarin treatment. Red indicates AIF protein, and blue indicates nuclei; C: effect of puerarin on cell viability after Olaparib treatment; D: effect of puerarin on cell viability after *AIF* knockdown. ^{ns}*P*>0.05, ^{*}*P*<0.05, ^{**}*P*<0.01, ^{***}*P*<0.001, ^{****}*P*<0.0001。

图2 葛根素诱导肝癌细胞发生parthanatos

Fig.2 Puerarin induces elevated levels of parthanatos in HCC cells



A: 葛根素对PI3K/AKT/mTOR通路相关蛋白磷酸化水平影响的代表性印迹图; B: *PTEN*敲除后葛根素对细胞存活率的影响; C: *PTEN*敲除对细胞存活率 D 值的影响; D: *PTEN*敲除对parthanatos相关蛋白表达的影响; E: *PTEN*敲除后使用AKT激动剂对parthanatos相关蛋白表达的影响; ^{ns} $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

A: representative immunoblots showing the effect of puerarin on the phosphorylation levels of proteins in the PI3K/AKT/mTOR pathway; B: effect of puerarin on cell viability after *PTEN* knockdown; C: effect of *PTEN* knockdown on cell viability (D values); D: effect of *PTEN* knockdown on the expression of parthanatos-related proteins; E: effect of AKT agonist treatment on the expression of parthanatos-related proteins following *PTEN* knockdown. ^{ns} $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

图3 葛根素阻断肝癌细胞中PI3K/AKT/mTOR通路的磷酸化

Fig.3 Puerarin blocks the phosphorylation of the PI3K/AKT/mTOR pathway in HCC cells

部分逆转了葛根素对PI3K/AKT/mTOR通路磷酸化的抑制作用,从而有效缓解了HCC细胞内parthanatos效应。

2.5 体内实验验证

为了进一步验证体外实验的结论,构建裸鼠HCC荷瘤模型。如图5A~图5C所示,Control组裸鼠

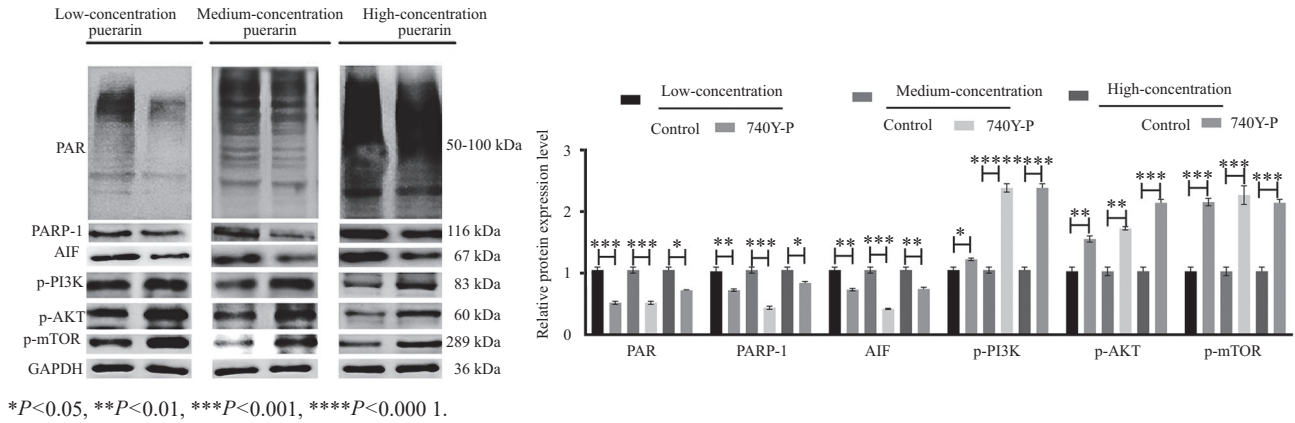


图4 葛根素通过阻断PI3K/AKT/mTOR通路的磷酸化诱导肝癌细胞发生parthanatos

Fig.4 Puerarin induces parthanatos in HCC cells by blocking the phosphorylation of the PI3K/AKT/mTOR pathway

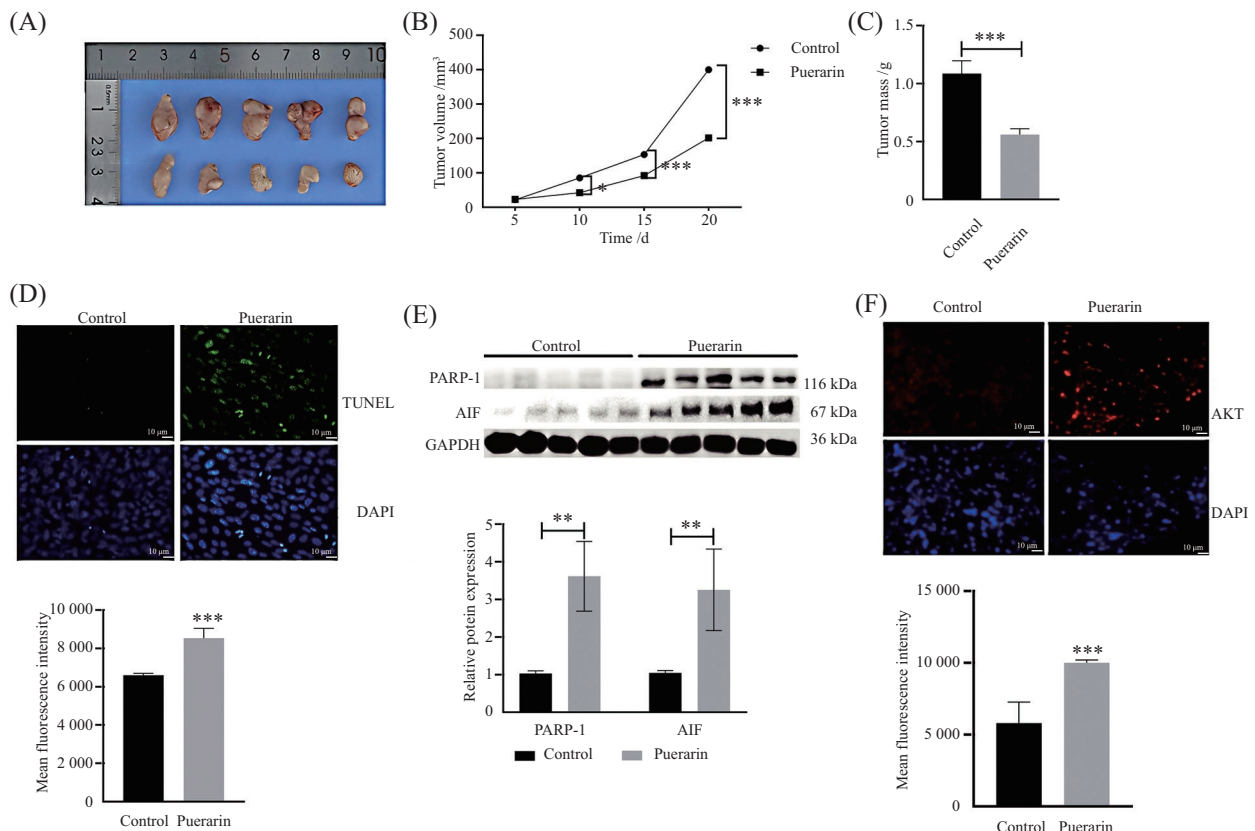


图5 葛根素对HCC荷瘤裸鼠肿瘤细胞增殖、凋亡及相关蛋白的影响

Fig.5 Effects of puerarin on tumor cell proliferation, apoptosis, and related proteins in HCC-bearing nude mice

形成的皮下肿瘤体积和质量均显著大于葛根素组 ($P < 0.001$)。TUNEL结果显示, Puerarin组裸鼠肿瘤组织中凋亡水平显著升高(图5D)。Western blot结果显示, Puerarin组裸鼠肿瘤组织内PARP-1和AIF蛋白

表达水平均显著高于Control组(图5E, $P < 0.01$), 免疫荧光结果中AKT荧光强度更高(图5F), 这进一步验证了在体外实验中葛根素可促进肿瘤细胞凋亡, 抑制肿瘤细胞增殖的结论。

3 讨论

有研究结果表明葛根素在多种肿瘤模型中表现出抗肿瘤活性^[8], 但其在肝细胞癌中的作用机制尚未被完全阐明。本研究首次系统揭示了葛根素通过抑制PI3K/AKT/mTOR通路磷酸化, 诱导HCC细胞发生parthanatos的新型分子机制。

与先前研究相比, 本研究的发现既有一致性, 也有重要突破。HU等^[9]报道葛根素可通过抑制NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡来抑制肝癌进展, 而本研究则发现parthanosis是葛根素诱导HCC细胞死亡的另一个关键机制。在乳腺癌研究中, 葛根素被证明可通过调节miR-133a-3p/DUSP1轴抑制细胞增殖^[10], 或逆转上皮-间质转化过程^[11], 这些发现与本研究观察到的葛根素抑制HCC细胞增殖和迁移的结果相呼应, 但在机制上存在显著差异。

关于parthanatos在肿瘤治疗中的作用, 现有研究存在争议。一方面, 研究表明抑制parthanatos可能促进HCC免疫逃逸^[12], 而增强parthanatos则有利于某些血液肿瘤的治疗^[13]。本研究结果支持后者, 发现葛根素通过诱导parthanatos显著抑制HCC生长, 这与结直肠癌中抑制AKT诱导的PARP-1依赖性parthanatos可抑制肿瘤生长的报道^[24]机制相似, 但作用方向相反。在治疗策略方面, 传统的PARP抑制剂如奥拉帕利虽在BRCA突变相关肿瘤中显示疗效^[14], 但其在HCC应用中面临肝毒性等挑战。本研究发现的葛根素诱导parthanatos的机制, 为避免PARP抑制剂相关毒性提供了新思路。与尼拉帕尼通过抑制AKT/mTOR通路诱导自噬不同^[15], 葛根素通过同一通路诱导parthanatos, 这为HCC治疗提供了更具选择性的死亡机制。然而, 本研究存在一些局限性, 首先, 本研究主要使用Hep3B细胞进行机制探讨, 未来需要扩大细胞系类型以验证结果的普适性。其次, 尽管本研究通过激动剂和基因敲除实验提示PI3K/AKT/mTOR通路在葛根素诱导的parthanatos中扮演重要角色, 但现有的证据链尚不足以断言该信号通路起“直接”或“决定性”的作用。葛根素可能通过影响上游信号或并行通路间接调控PI3K/AKT/mTOR的活性, 进而影响parthanatos。因此, 我们在机制解释上应保持谨慎, 未来需要通过例如关键激酶(如PI3K、AKT)的敲低/敲除并结合回复实验等更具说服力的遗传学手段, 来更严格地验证该通路的必要性, 以构建更坚实的因果链条。此外, 与HU等^[9]的研究相比, 本研究尚未深入探讨葛根素在

肿瘤微环境中的作用, 这也是未来需要加强的方向。尽管存在上述局限性, 但是本研究的发现为理解葛根素的抗肿瘤作用提供了新的视角。本研究发现葛根素可调控parthanatos这一相对新颖的细胞死亡方式, 并初步将其与经典的PI3K/AKT/mTOR通路联系起来, 这为天然化合物抗肿瘤机制研究开辟了新的方向。这一发现不仅首次建立了葛根素与parthanatos之间的联系, 更揭示了天然化合物通过调控关键信号通路诱导程序性死亡的新机制, 为克服现有PARP抑制剂耐药性与肝毒性问题提供了新思路。尽管本研究存在一定局限性, 但其结果为葛根素的抗肿瘤机制研究奠定了基础, 并为未来开发基于parthanatos的新型治疗方案提供了重要参考。同时葛根素有望成为一种具有临床应用前景的HCC治疗药物, 为改善患者预后和提高生存率提供了新的希望。

未来研究应从以下几个方面进行深入探索。①扩大细胞系和动物模型: 使用多种HCC细胞系和动物模型, 验证葛根素对parthanatos的普遍性。②机制研究: 进一步阐明葛根素通过PI3K/AKT/mTOR通路调控parthanatos的具体分子机制, 尤其是PARP-1和AIF的作用。③联合治疗: 探索葛根素与现有靶向药物或免疫疗法的联合应用, 评估其协同抗肿瘤效果。④临床转化: 开展临床试验, 评估葛根素在HCC患者中的安全性和有效性, 为其临床应用提供依据。

参考文献 (References)

- [1] TAN D J H, NG C H, LIN S Y, et al. Clinical characteristics, surveillance, treatment allocation, and outcomes of non-alcoholic fatty liver disease-related hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet Oncol*, 2022, 23(4): 521-30.
- [2] BROWN Z J, TSILIMIGRAS D I, RUFF S M, et al. Management of hepatocellular carcinoma: a review [J]. *JAMA Surg*, 2023, 158(4): 410-20.
- [3] HU R, PENG Z T, LIU H. Puerarin ameliorates ferroptosis in neuronal injury through the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Nutr Cancer*, 2024, 3: 1-9.
- [4] CAI Y, GAO Q, MENG J H, et al. Puerarin suppresses glycolysis and increases cisplatin chemosensitivity in oral squamous cell carcinoma via FBXW7/mTOR signaling [J]. *Nutr Cancer*, 2023, 75(3): 1028-37.
- [5] ZHOU Y, LIU L, TAO S, et al. Parthanatos and its associated components: promising therapeutic targets for cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105299.
- [6] JIANG X, DENG W, TAO S, et al. A RIPK3-independent role of MLKL in suppressing parthanatos promotes immune evasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Discov*, 2023, 9(1): 7.
- [7] ZHOU Y, LIU L, TAO S, et al. Parthanatos and its associated

- components: promising therapeutic targets for cancer [J]. *Pharmacol Res*, 2021, 163: 105299.
- [8] 杨雨, 李彤. 茯苓对宫颈癌细胞增殖、侵袭、及凋亡的影响 [J]. *解剖科学进展*(YANG Y, LI T. Effects of *Poria cocos* on the proliferation, invasion, and apoptosis of cervical cancer cells [J]. *Progress of Anatomical Sciences*), 2024, 30(2): 121-3.
- [9] HU Y, HU C, LEI H, et al. Puerarin inhibits the progression of hepatic carcinoma by suppressing NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis [J]. *Asian J Surg*, 2024, 47(9): 4102-3.
- [10] LI Z F, XU W W, REN X Y, et al. Puerarin promotes DUSP1 expression by regulating miR-133a-3p in breast cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2019, 19(1): 205-12.
- [11] CHEN X, ZHOU Z, ZHANG Z, et al. Puerarin inhibits EMT induced by oxaliplatin via targeting carbonic anhydrase XII [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 969422.
- [12] JIANG X, DENG W, TAO S, et al. A RIPK3-independent role of MLKL in suppressing parthanatos promotes immune evasion in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Discov*, 2023, 9(1): 7.
- [13] MARU B, MESSIKOMMER A, HUANG L, et al. PARP-1 improves leukemia outcomes by inducing parthanatos during chemotherapy [J]. *Cell Rep Med*, 2023, 4(9): 101191.
- [14] GUILLOT C, HALL J, HERCEG Z, et al. Update on hepatocellular carcinoma breakthroughs: poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors as a promising therapeutic strategy [J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2014, 38(2): 137-42.
- [15] ZAI W, CHEN W, HAN Y, et al. Targeting PARP and autophagy evoked synergistic lethality in hepatocellular carcinoma [J]. *Carcinogenesis*, 2020, 41(3): 345-57.