

表没食子儿茶素没食子酸酯提高肝癌细胞对仑伐替尼敏感性的机制[△]

宋传芳*,艾江,温超,张杰,崔江河[#](牡丹江医科大学附属红旗医院消化内科,黑龙江牡丹江 157011)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2025)18-2256-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2025.18.07



摘要 目的 基于磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)信号通路探讨表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)提高肝癌细胞对仑伐替尼敏感性的潜在机制。**方法** 以HepG2、Huh-7、SMMC-7721、SNU-368、SNU-739 5种人肝癌细胞为对象,探讨仑伐替尼、EGCG+仑伐替尼对细胞存活率、克隆形成数、增殖率、侵袭数和通路相关mRNA及蛋白表达的影响;引入PI3K激动剂[胰岛素样生长因子1(IGF-1)],考察激活PI3K/Akt信号通路对EGCG增敏作用的影响。**结果** 与对照组比较,仑伐替尼组($10 \mu\text{mol/L}$)、不同质量浓度EGCG+仑伐替尼组($1, 5, 10 \mu\text{g/mL}$ EGCG+ $10 \mu\text{mol/L}$ 仑伐替尼)5种肝癌细胞的存活率和克隆形成数均呈浓度依赖性降低($P < 0.05$);仑伐替尼组($10 \mu\text{mol/L}$)、EGCG+仑伐替尼组($10 \mu\text{g/mL}$ EGCG+ $10 \mu\text{mol/L}$ 仑伐替尼)5种肝癌细胞的增殖率和侵袭数,HepG2细胞或5种细胞中PI3K、Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、P70S6K、4EBP mRNA的表达以及PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平和mTOR、B细胞淋巴瘤2(Bcl-2)蛋白的表达均显著降低或下调,而第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(PTEN)mRNA及蛋白、胱天蛋白酶3(caspase-3)、剪切的胱天蛋白酶3(cleaved caspase-3)的表达均显著上调($P < 0.05$);且EGCG+仑伐替尼组上述指标的变化较仑伐替尼组更为显著($P < 0.05$)。与仑伐替尼组、EGCG+仑伐替尼组比较,EGCG+仑伐替尼+IGF-1组($10 \mu\text{g/mL}$ EGCG+ $10 \mu\text{mol/L}$ 仑伐替尼+ 50 ng/mL IGF-1)HepG2细胞的克隆形成数、增殖率及侵袭数均显著升高($P < 0.05$)。

结论 EGCG可增加肝癌细胞对仑伐替尼的敏感性,其作用机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路激活有关。

关键词 表没食子儿茶素没食子酸酯;肝癌;仑伐替尼;增敏作用;PI3K/Akt信号通路

The mechanism of epigallocatechin gallate enhancing the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to lenvatinib

SONG Chuanfang, AI Jiang, WEN Chao, ZHANG Jie, CUI Jianghe(Department of Gastroenterology, Hongqi Hospital Affiliated to Mudanjiang Medical University, Heilongjiang Mudanjiang 157011, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the potential mechanism of epigallocatechin gallate (EGCG) enhancing the sensitivity of hepatocellular carcinoma (HCC) cells to lenvatinib based on the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/protein kinase B (Akt) signaling pathway. **METHODS** Five human HCC cell lines (HepG2, Huh-7, SMMC-7721, SNU-368 and SNU-739) were used to evaluate the effects of lenvatinib alone and in combination with EGCG on survival rates, clone number, proliferation rate, invasion number and the expressions of mRNAs and proteins related to the PI3K/Akt signaling pathway. The PI3K activator insulin-like growth factor-1 (IGF-1) was introduced to investigate the effect of activating the PI3K/Akt signaling pathway on the sensitization effect of EGCG. **RESULTS** Compared with the control group, lenvatinib ($10 \mu\text{mol/L}$) and different concentrations of EGCG+lenvatinib ($1, 5$ and $10 \mu\text{g/mL}$ EGCG+ $10 \mu\text{mol/L}$ lenvatinib) significantly reduced the survival rates and clone numbers of all five HCC cell lines in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Lenvatinib ($10 \mu\text{mol/L}$) and EGCG+lenvatinib ($10 \mu\text{g/mL}$ EGCG+ $10 \mu\text{mol/L}$ lenvatinib) also markedly inhibited the proliferation rate and invasion numbers of these cells, and decreased the mRNA expressions of PI3K, Akt, mammalian target of rapamycin (mTOR), P70S6K and 4EBP, and the phosphorylation levels of PI3K and Akt, as well as the protein expressions of mTOR and B cell lymphoma-2 (Bcl-2) in HepG2 cells or all five HCC cells; conversely, the mRNA and protein expressions of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (PTEN), and the protein expressions of caspase-3 and cleaved caspase-3 were significantly upregulated, with more pronounced effects observed in the EGCG+lenvatinib group than in the lenvatinib group ($P < 0.05$). Compared with the lenvatinib group and the EGCG+lenvatinib group, the clone number, proliferation rate and invasion number of HepG2 cells in the EGCG+lenvatinib+IGF-1 group ($10 \mu\text{g/mL}$ EGCG+ $10 \mu\text{mol/L}$ lenvatinib+ 50 ng/mL IGF-1) were significantly increased ($P < 0.05$). **CONCLUSIONS** EGCG can enhance the sensitivity of HCC cells to lenvatinib, and its underlying mechanism may be related to the inhibition of the activation of PI3K/Akt signaling pathway activation.

*基金项目 黑龙江省自然科学基金项目(No.2023JJ0008)

*第一作者 主治医师,硕士。研究方向:消化系统肿瘤。E-mail: songchuanfang1988@163.com

#通信作者 副主任医师。研究方向:消化系统肿瘤。E-mail: 18215039@qq.com

KEYWORDS epigallocatechin gallate; hepatocellular carcinoma; lenvatinib; sensitization effect; PI3K/Akt signaling pathway

肝癌是常见且致命的恶性肿瘤之一,我国肝癌新发病例和死亡病例分别占全球病例总数的48%、42%^[1-2]。据统计,39.0%~53.6%的肝癌患者在初诊时已处于晚期,其治疗以全身治疗为主^[3-4]。仑伐替尼是肝癌治疗的一线靶向药物,可通过抑制肿瘤血管生成来显著延缓肝癌进展,改善患者预后^[5-6]。然而临床实践显示,肝癌细胞易对仑伐替尼耐药^[7],耐药的发生与细胞中显著活化的磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, 又称“Akt”)信号通路密切相关。因此,靶向该通路有望增强肝癌细胞对药物的敏感性,提高仑伐替尼的抗肝癌效果^[8]。

表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate, EGCG)是源自绿茶的类黄酮化合物,可抑制多种肿瘤细胞的增殖和血管生成,并可诱导其凋亡^[9-10]。此外,EGCG可通过调控胞外信号调节激酶、促分裂原活化的蛋白激酶等多条信号通路来调节第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10, PTEN)的表达、抑制Akt的磷酸化、下调哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)的表达,最终抑制肿瘤细胞的生长、促进其凋亡^[11-14]。PI3K/Akt信号通路在肝癌进展及肝癌细胞耐药发生过程中具有关键作用,且EGCG对该通路的调控作用已得到初步证实^[15-16]。已有研究表明,EGCG能够逆转肝癌细胞对索拉非尼的耐药性,并可调控肝癌细胞耐药基因的表达^[17-18]。然而,EGCG能否增强肝癌细胞对仑伐替尼的敏感性尚未可知。基于此,本研究拟从PI3K/Akt信号通路出发,在细胞层面探讨EGCG能否增强肝癌细胞对仑伐替尼的敏感性,并分析其潜在机制,以期为肝癌患者的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Tecan Sunrise型全自动酶标仪(瑞士Tecan公司),FACSVersa型流式细胞仪(美国BD公司),N-SIM/N-STORM型超分辨率显微镜(日本Nikon公司),Thermo Scientific™ BB150型细胞培养箱、QuantStudio 6 Flex型实时荧光定量聚合酶链式反应(real-time quantitative PCR, RT-qPCR)仪、XCell SureLock Mini-Cell型电泳槽(美国Thermo Fisher Scientific公司),ChampChemi610 plus型化学发光荧光凝胶成像系统(北京森西赛智科技有限公司)等。

1.2 主要药品和试剂

EGCG原料药(批号HY-13653,纯度99.75%)、仑伐替尼原料药(批号HY-10981,纯度99.85%)、PI3K激动剂胰岛素样生长因子1(insulin-like growth factor-1, IGF-1)的原料药(批号HY-P7018,纯度≥98%)、兔抗mTOR抗体(批号YA281)均购自美国MCE公司;RNeasy Plus

Mini试剂盒(批号DP430)购自天根生化科技(北京)有限公司;PrimeScript™逆转录试剂盒、SYBR Premix Ex-Taq试剂盒(批号分别为RR064A、RR420A)均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;CCK-8试剂盒(批号C0038)购自上海碧云天生物技术有限公司;EdU细胞增殖检测试剂盒(批号KGA9602)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;结晶紫染色液(批号C432890)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;兔抗PI3K、Akt、磷酸化PI3K(phosphorylated PI3K, p-PI3K)、β-肌动蛋白(β-actin)抗体(批号分别为4292、9272、4228、4967)均购自美国CST公司;兔抗磷酸化Akt(phosphorylated Akt, p-Akt)、剪切的胱天蛋白酶3(cleaved caspase-3)抗体(批号分别为66444-1-IG、25128-1-AP)均购自美国Proteintech公司;兔抗B细胞淋巴瘤2(B cell lymphoma-2, Bcl-2)、PTEN、caspase-3抗体和山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗H&L(辣根过氧化物酶)、山羊抗兔IgG二抗H&L(Alexa Fluor® 488)、驴抗兔IgG二抗H&L(Alexa Fluor® 647)(批号分别为ab182858、ab226801、ab32351、ab6721、ab150077、ab150075)均购自艾博抗(上海)贸易有限公司;DMEM培养基(批号SH30243.01)购自美国Hyclone公司;胎牛血清(批号10099-141)购自美国Gibco公司;PCR相关引物由北京擎科生物科技股份有限公司提供。

1.3 细胞

人肝癌细胞系HepG2、Huh-7细胞(批号分别为SCSP-510、SCSP-526)均购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库;人肝癌细胞系SMMC-7721、SNU-368细胞(批号分别为C6865、C6873)均购自上海碧云天生物技术有限公司;人肝癌细胞SNU-739细胞(批号00739)购自生物风国际试剂进口出口物流中心。所有细胞均于-80 °C下冷冻备用。

2 方法

2.1 肝癌细胞培养与处理

将HepG2、Huh-7、SMMC-7721、SNU-368、SNU-739细胞接种至含10%胎牛血清的DMEM培养基中,于37 °C、5%CO₂条件下培养、传代。后续指标检测实验中,细胞培养均采用不含血清的DMEM培养基。

2.2 EGCG联合仑伐替尼对肝癌细胞存活率的影响

采用CCK-8实验检测。取对数生长期的5种细胞,按1×10³个/孔接种至96孔板中,培养24 h后分为对照组、仑伐替尼组(10 μmol/L)和不同质量浓度EGCG+仑伐替尼组(1、5、10 μg/mL EGCG+10 μmol/L仑伐替尼),同时设置不含细胞、药物的空白组。每组设置3个复孔(各药物组浓度参考相关文献^[19]设置)。培养48 h后,弃去培养基,加入10%CCK-8试剂,避光孵育1 h后,使用酶标仪检测各孔的光密度(OD)值,并计算细胞存活率:细胞存活率=(实验组OD值-空白组OD值)/(对照组

OD值—空白组OD值)×100%。

2.3 EGCG联合仑伐替尼对细胞克隆形成能力的影响

采用克隆形成实验检测。取对数生长期的5种细胞,按 1×10^3 个/孔接种至6孔板中,分为对照组、仑伐替尼组(10 μmol/L)和不同质量浓度EGCG+仑伐替尼组(1、5、10 μg/mL EGCG+10 μmol/L仑伐替尼),每组设置3个复孔。培养至细胞贴壁24 h后,更换培养基;继续培养2周后,弃去上清液,细胞以结晶紫染色30 min,再用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,待干燥后,使用显微镜观察各组细胞的克隆形成情况,采用Image J软件统计克隆形成数(将大于50个细胞的集落记为1个克隆)。

2.4 EGCG联合仑伐替尼对细胞增殖率的影响

采用流式细胞术检测。取对数生长期的5种细胞,按 1×10^5 个/孔接种至6孔板中,分为对照组、仑伐替尼组(10 μmol/L)、EGCG+仑伐替尼组(10 μg/mL EGCG+10 μmol/L仑伐替尼),每组设置3个复孔(EGCG质量浓度参考“2.2”“2.3”项下实验结果设置)。培养48 h后,收集各组细胞,每孔加入50 μmol/L的EdU染液适量,染色2 h;收集细胞并重悬,加入阿波罗染液适量,染色10 min;弃去染液,加入4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染液,避光染核5~10 min;收集细胞并重悬,使用流式细胞仪于激发波长488 nm下检测各组EdU阳性细胞(呈橙色荧光)占比,以评估细胞增殖率。

2.5 EGCG联合仑伐替尼对细胞侵袭能力的影响

采用Transwell实验检测。取对数生长期的5种细胞,按 5×10^4 个/孔接种至预先用基质胶处理的Transwell小室上室;将含10%胎牛血清的DMEM培养基600 μL加至下室。上室细胞按“2.4”项下方法分组、处理。培养48 h后,收集穿膜细胞,以4%多聚甲醛溶液固定30 min,再用0.1%结晶紫于室温下染色20 min,在显微镜下随机选取4个视野观察,使用Image J软件统计细胞侵袭数(侵袭细胞呈紫色)。

2.6 细胞中PI3K/Akt信号通路相关mRNA及蛋白表达检测

2.6.1 通路相关mRNA表达检测

采用RT-qPCR法检测。取对数生长期的HepG2细胞,按 1×10^5 个/孔接种至6孔板中,按“2.4”项下方法分组、处理。培养48 h后,收集各组细胞,提取RNA,经浓度、纯度测定后,将其逆转录为cDNA。以此cDNA为模板,进行PCR扩增。PCR反应体系按相应试剂盒说明书配制。PCR反应条件为:95 °C预变性30 s;95 °C变性5 s,60 °C退火/延伸30 s,共39个循环。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因的相对表达水平。引物序列及产物大小见表1。

2.6.2 通路相关蛋白表达检测

采用Western blot法检测。收集“2.6.1”项下各组细胞,经裂解后,以12 000 r/min离心10 min,收集上清液,

表1 引物序列及产物大小

目的基因	引物	引物序列(5'→3')	产物大小/bp
PI3K	正向	TATTGGACTTGGACAAGACT	190
	反向	TCGAACGTACTGGCTGGATAG	
Akt	正向	AGCGACGTGGCTATTGTGAAG	96
	反向	GCCATCATCTGAGGAGGAAGT	
mTOR	正向	ATGCTTGGAAACGGACCTG	173
	反向	TCTTGACTCATCTCGGAGTT	
P70S6K	正向	CGGGACGGTTTACCCAG	195
	反向	TTTCTCACAAATGTTCCATGCCA	
4EBP	正向	CTATGACCGGAAATCCTGATGG	161
	反向	CCCGCTTATCTCTGGGCTA	
PTEN	正向	TGGATTGACTTAGACTTGACCT	231
	反向	GGTGGGTTATGGTCTTCAAAAGG	
GAPDH	正向	GTCTCCCTGACTTCAACAGCG	131
	反向	ACCACCCCTGTTGCTGTAGCCAA	

经浓度测定后进行变性处理;取变性蛋白适量,进行凝胶电泳分离并转膜,以封闭液封闭1 h;加入PI3K、Akt、p-PI3K、p-Akt、mTOR、Bcl-2、cleaved caspase-3、β-actin一抗(稀释比例分别为1:1 000、1:1 000、1:1 000、1:2 000、1:1 000、1:2 000、1:2 000、1:1 000),于4 °C下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例为1:2 000),于室温下孵育2 h;洗膜后,显色、成像。使用Image J软件,以β-actin为内参,计算各目的蛋白的表达水平,并以p-PI3K与PI3K、p-Akt与Akt的灰度值比值表示PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平。

2.6.3 PTEN、caspase-3蛋白定位检测

采用免疫荧光技术检测。取对数生长期的5种细胞,按 1×10^5 个/孔接种至6孔板中,按“2.4”项下方法分组、处理。培养至细胞贴壁24 h后,更换培养基;继续培养48 h后,收集各组细胞并制成涂片,经预冷的甲醇固定后再用预冷的PBS清洗10 min;于室温下封闭30 min后,加入PTEN、caspase-3一抗(稀释比例均为1:1 000),于4 °C下孵育过夜;清洗后,加入相应二抗(稀释比例均为1:2 000),于室温下孵育1 h;清洗后,加入DAPI染液适量,于室温下避光孵育5 min;加入封片剂适量,使用显微镜观察目的蛋白的分布情况,并使用Image J软件分析其相对荧光强度(PTEN呈绿色荧光,caspase-3呈红色荧光),以评估PTEN、caspase-3蛋白的表达情况。

2.7 激活PI3K/Akt信号通路对EGCG增敏作用的影响检测

本研究通过加入PI3K激动剂进一步探讨EGCG增强肝癌细胞对仑伐替尼敏感性是否与PI3K/Akt信号通路有关,具体操作如下:取对数生长期的HepG2细胞,按 1×10^5 个/孔接种至6孔板中,分为对照组、仑伐替尼组(10 μmol/L)、EGCG+仑伐替尼组(10 μg/mL EGCG+10 μmol/L仑伐替尼)和EGCG+仑伐替尼+IGF-1(10 μg/mL EGCG+10 μmol/L仑伐替尼+50 ng/mL IGF-1^[1,19]),每组设置3个复孔。培养48 h后,按“2.3”~“2.5”项下方法检测各组的克隆形成数、细胞增殖率、细胞侵袭数。

2.8 统计学方法

采用GraphPad Prism 5.0软件对数据进行统计分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用Tukey's事后检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果

3.1 EGCG联合仑伐替尼对肝癌细胞存活率和克隆形成能力的影响

与对照组比较,仑伐替尼组和不同质量浓度EGCG+仑伐替尼组5种细胞的存活率和克隆形成数均显著降低($P<0.05$);与仑伐替尼组比较,不同质量浓度EGCG+仑伐替尼组5种细胞的存活率和克隆形成数均进一步显著降低,且呈EGCG浓度依赖性($P<0.05$)。结果见表2(限于篇幅,细胞克隆形成能力的显微图可扫描本文首二维码查看“增强出版”板块中的附图1)。

3.2 EGCG联合仑伐替尼对肝癌细胞增殖和侵袭能力影响

与对照组比较,仑伐替尼组和EGCG+仑伐替尼组5种细胞的增殖率和侵袭数均显著降低($P<0.05$);与仑伐替尼组比较,EGCG+仑伐替尼组5种细胞的增殖率和侵袭数均进一步显著降低($P<0.05$)。结果见表3(限于篇幅,细胞增殖能力的流式细胞图可扫描本文首二维码查看“增强出版”板块中的附图2)。

3.3 EGCG联合仑伐替尼对PI3K/Akt信号通路相关基因及蛋白表达的影响

与对照组比较,仑伐替尼组和EGCG+仑伐替尼组HepG2细胞中PI3K、Akt、mTOR、P70S6K、4EBP mRNA和mTOR、Bcl-2蛋白的表达水平,以及PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平均显著降低,PTEN mRNA和cleaved cas-

pase-3蛋白的表达水平均显著升高($P<0.05$);与仑伐替尼组比较,EGCG+仑伐替尼组HepG2细胞中PI3K、Akt、mTOR、P70S6K、4EBP mRNA和mTOR、Bcl-2蛋白的表达水平,以及PI3K、Akt蛋白的磷酸化水平均进一步显著降低,PTEN mRNA和cleaved caspase-3蛋白的表达水平均进一步显著升高($P<0.05$)。结果见图1、表4。

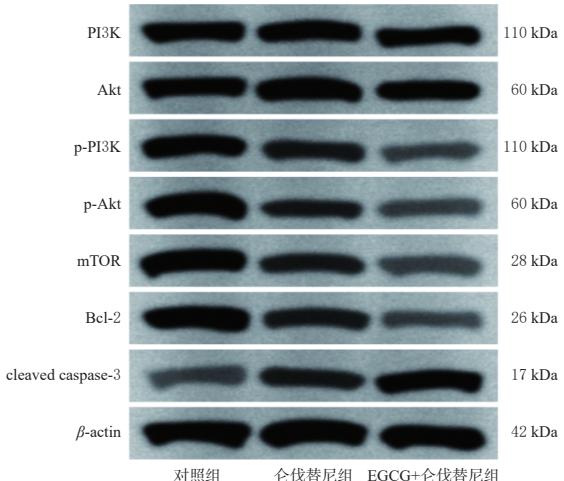


图1 EGCG联合仑伐替尼对HepG2细胞中PI3K/Akt信号通路相关蛋白表达影响的电泳图

与对照组比较,仑伐替尼组和EGCG+仑伐替尼组5种细胞中PTEN、caspase-3蛋白的表达均显著上调($P<0.05$);与仑伐替尼组比较,EGCG+仑伐替尼组5种细胞中上述蛋白的表达均进一步显著上调($P<0.05$)。结果见表5(限于篇幅,以HepG2细胞为例,PTEN、caspase-3蛋白表达的免疫荧光图可扫描本文首二维码查看“增强出版”板块中的附图3)。

表2 EGCG联合仑伐替尼对5种肝癌细胞存活率和克隆形成能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HepG2细胞		SMCC-7721细胞		Huh-7细胞		SNU-368细胞		SNU-739细胞	
	存活率/%	克隆形成数/个								
对照组	97.81±2.31	94.87±1.73	98.78±2.24	96.19±1.65	92.02±2.08	97.81±2.31	94.87±2.24	98.78±2.24	96.19±1.65	92.02±2.08
仑伐替尼组	73.73±1.84 ^a	81.67±2.33	76.12±2.26	91.41±2.04 ^a	88.99±2.14 ^a	73.73±1.84 ^a	81.67±2.33 ^a	76.12±2.26	91.41±2.04 ^a	88.99±2.14 ^a
1 μg/mL EGCG+仑伐替尼组	58.58±2.64 ^a	74.08±2.17 ^a	67.81±2.43 ^a	85.05±1.91 ^a	72.81±1.92 ^a	58.58±2.64 ^a	74.08±2.17 ^a	67.81±2.43 ^a	85.05±1.91 ^a	72.81±1.92 ^a
5 μg/mL EGCG+仑伐替尼组	46.45±2.12 ^{a,b}	60.53±2.58 ^{a,b}	56.31±2.13 ^{a,b}	76.41±2.51 ^{a,b}	56.45±2.34 ^{a,b}	46.45±2.12 ^{a,b}	60.53±2.58 ^{a,b}	56.31±2.13 ^{a,b}	76.41±2.51 ^{a,b}	56.45±2.34 ^{a,b}
10 μg/mL EGCG+仑伐替尼组	33.42±2.29 ^{a,d}	44.52±1.94 ^{a,d}	42.64±2.42 ^{a,d}	56.01±2.23 ^{a,d}	40.44±2.47 ^{a,d}	33.42±2.29 ^{a,d}	44.52±1.94 ^{a,d}	42.64±2.42 ^{a,d}	56.01±2.23 ^{a,d}	40.44±2.47 ^{a,d}

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与仑伐替尼组比较, $P<0.05$;c:与1 μg/mL EGCG+仑伐替尼组比较, $P<0.05$;d:与5 μg/mL EGCG+仑伐替尼组比较, $P<0.05$ 。

表3 EGCG联合仑伐替尼对5种肝癌细胞增殖和侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HepG2细胞		SMCC-7721细胞		Huh-7细胞		SNU-368细胞		SNU-739细胞	
	增殖率/%	侵袭数/个								
对照组	70.82±2.01	247.83±7.69	66.07±1.98	242.72±6.55	69.93±2.00	247.26±6.84	69.33±2.12	244.99±7.18	67.85±1.95	258.03±6.89
仑伐替尼组	38.82±1.78 ^a	191.12±6.24 ^a	39.41±2.01 ^a	205.29±7.08 ^a	38.52±1.76 ^a	193.38±5.99 ^a	41.19±2.14 ^a	192.82±6.03 ^a	39.71±1.82 ^a	203.59±6.72 ^a
EGCG+仑伐替尼组	26.67±1.49 ^a	96.41±5.87 ^a	28.15±1.62 ^a	129.87±6.17 ^a	30.22±1.93 ^a	120.79±5.91 ^a	27.85±1.76 ^a	117.39±5.67 ^a	28.15±1.85 ^a	120.79±6.01 ^a

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与仑伐替尼组比较, $P<0.05$ 。

表4 EGCG联合仑伐替尼对HepG2细胞中PI3K/Akt信号通路相关基因及蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PI3K mRNA	Akt mRNA	mTOR mRNA	P70S6K mRNA	4EBP mRNA	PTEN mRNA	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	mTOR/β-actin	Bcl-2/β-actin	cleaved caspase-3/β-actin
对照组	1.06±0.05	1.19±0.05	1.25±0.04	1.29±0.04	1.09±0.05	0.82±0.05	0.99±0.05	0.97±0.05	1.62±0.03	1.45±0.04	0.41±0.04
仑伐替尼组	0.98±0.05 ^a	0.95±0.04 ^a	0.95±0.06 ^a	0.93±0.05 ^a	0.96±0.06 ^a	0.95±0.03 ^a	0.82±0.06 ^a	0.71±0.04 ^a	0.76±0.05 ^a	0.67±0.05 ^a	0.72±0.05 ^a
EGCG+仑伐替尼组	0.91±0.05 ^a	0.85±0.05 ^a	0.81±0.06 ^a	0.79±0.05 ^a	0.85±0.03 ^a	1.12±0.03 ^a	0.58±0.06 ^a	0.63±0.05 ^a	0.38±0.03 ^a	0.55±0.06 ^a	1.14±0.04 ^a

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与仑伐替尼组比较, $P<0.05$ 。

表5 EGCG联合仑伐替尼对5种肝癌细胞中PTEN、caspase-3蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HepG2细胞		SMMC-7721细胞		HuH-7细胞		SNU-368细胞		SNU-739细胞	
	PTEN	caspase-3								
对照组	100.08±2.56	100.25±4.39	101.84±3.96	87.34±2.08	104.35±2.55	100.25±3.49	108.34±2.46	93.31±4.24	110.84±2.18	91.32±3.57
仑伐替尼组	145.54±4.46 ^a	190.57±3.07 ^a	143.58±2.18 ^a	183.62±3.11 ^a	156.48±4.98 ^a	188.59±3.54 ^a	145.61±2.77 ^a	194.54±2.85 ^a	162.21±2.52 ^a	174.69±2.56 ^a
EGCG+仑伐替尼组	242.42±3.71 ^{ab}	292.81±4.37 ^{ab}	240.25±4.65 ^{ab}	291.81±3.24 ^{ab}	250.94±4.39 ^{ab}	290.82±2.76 ^{ab}	249.71±4.56 ^{ab}	282.88±2.52 ^{ab}	242.55±2.34 ^{ab}	300.74±2.46 ^{ab}

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与仑伐替尼组比较, $P<0.05$ 。

3.4 激活PI3K/Akt信号通路对EGCG增敏作用的影响

EGCG+仑伐替尼+IGF-1组 HepG2 细胞的克隆形成数、增殖率及侵袭数均显著高于EGCG+仑伐替尼组和仑伐替尼组($P<0.05$),但上述指标与对照组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结果见表6(限于篇幅,细胞克隆形成、增殖、侵袭情况的相关图示可扫描本文首二维码查看“增强出版”板块中的附图4)。

表6 激活PI3K/Akt信号通路对EGCG增敏作用的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	克隆形成数/个	增殖率/%	侵袭数/个
对照组	150.11±2.06	70.12±1.73	245.65±2.42
仑伐替尼组	123.55±2.93 ^a	38.23±1.73 ^a	180.24±2.56
EGCG+仑伐替尼组	51.12±2.61 ^a	33.45±1.59 ^a	89.15±1.53 ^a
EGCG+仑伐替尼+IGF-1组	160.23±2.42 ^b	65.23±2.83 ^b	255.14±2.95 ^b

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与仑伐替尼组比较, $P<0.05$;c:与EGCG+仑伐替尼组比较, $P<0.05$ 。

4 讨论

据统计,2023年我国肝癌新发病例超过40万,同时约有30万患者死于肝癌^[20]。仑伐替尼是针对肝癌的一线靶向治疗药物,主要通过抑制致癌性受体酪氨酸激酶信号通路来发挥作用^[1]。尽管仑伐替尼可显著延长肝癌患者的中位总生存时间,但约有60%的患者在1年内发生耐药,从而导致该药的临床应用受限^[21]。因此,如何增强肝癌细胞对仑伐替尼的敏感性是肝癌治疗领域的重要研究方向之一。

已有研究表明,肝癌细胞对仑伐替尼耐药的发生与PI3K/Akt信号通路密切相关。研究指出,仑伐替尼可通过靶向抑制多种受体来抑制PI3K/Akt信号通路,从而发挥抗肿瘤作用,这些受体包括血管内皮生长因子受体1~3(vascular endothelial growth factor receptor 1-3, VEGFR1-3)、成纤维细胞生长因子受体1~4(fibroblast growth factor receptor 1-4, FGFR1-4)、血小板衍生生长因子受体 α 和重排转录因子受体等^[22]。此前已有研究证实,EGCG能通过上调PTEN的表达来抑制PI3K/Akt信号通路的磷酸化,继而抑制mTOR,从而抑制肿瘤细胞生长并促进凋亡^[23]。基于此,本研究选择了5种人肝癌细胞(经预实验证实,上述细胞均可表达VEGFR2、FGFR1,具有仑伐替尼主要作用靶点),初步探讨EGCG能否通过抑制PI3K/Akt信号通路来增强肝癌细胞对仑伐替尼的敏感性。

PI3K/Akt信号通路在多种恶性肿瘤的发生、发展及

肿瘤细胞耐药的发生过程中具有重要作用,是调控细胞增殖、分化、生存及凋亡的关键通路之一^[8]。PI3K的激活可催化磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate,PIP2)转化为PIP3,进而募集Akt至细胞膜并诱导其磷酸化,从而通过调控下游靶点来调节mTOR、P70S6K、4EBP的活性,并间接维持抗凋亡蛋白Bcl-2的功能^[22]。其中,mTOR作为重要的细胞代谢调节因子,可促进肿瘤细胞生长并诱导代谢重编程;P70S6K和4EBP为mTOR下游靶点,主要参与相关mRNA翻译及细胞周期进程的调控;Bcl-2是典型的抗凋亡蛋白,可抑制线粒体通路介导的细胞凋亡^[22]。此外,PTEN为通路上游负调控因子,可去磷酸化PIP3、拮抗PI3K活性,是重要的肿瘤抑制因子之一;caspase-3则是细胞凋亡的关键执行酶,其活化形式cleaved caspase-3可直接介导细胞结构蛋白降解,引发典型凋亡过程,上调cleaved caspase-3的表达是抗肿瘤药物诱导肿瘤细胞凋亡的主要机制之一^[23]。

本研究在验证EGCG增敏作用的基础上,从转录水平、蛋白表达及空间定位等角度检测了PI3K/Akt信号通路相关基因及蛋白的表达。结果显示,仑伐替尼、EGCG+仑伐替尼均可显著抑制肝癌细胞的存活和增殖,减弱其克隆形成和侵袭的能力,且联合EGCG可增加肝癌细胞对仑伐替尼的敏感性。RT-qPCR和Western blot实验结果显示,仑伐替尼组 HepG2 细胞中 PI3K、Akt、mTOR、P70S6K、4EBP mRNA 和 mTOR、Bcl-2 蛋白的表达,以及 PI3K、Akt 蛋白的磷酸化水平均较对照组显著下调,PTEN mRNA 和 cleaved caspase-3 蛋白的表达较对照组显著上调;且 EGCG+仑伐替尼组上述指标的变化较仑伐替尼组更为明显。免疫荧光实验结果显示,仑伐替尼组5种肝癌细胞中PTEN、caspase-3蛋白的表达均较对照组显著上调,且EGCG+仑伐替尼组5种细胞中上述蛋白的表达均较仑伐替尼组进一步上调。这提示仑伐替尼的抗肿瘤作用可能与抑制PI3K/Akt信号通路激活有关,而EGCG可在转录及蛋白水平上协同抑制该信号通路。通过分析EGCG的结构发现,其B环羟基可通过氢键与Akt激酶位点结合,D环的没食子酰基也可阻断PI3K与底物结合,从而直接抑制该信号通路关键酶的激活^[24]。为进一步验证EGCG增敏作用是否与PI3K/Akt信号通路有关,本研究引入了PI3K激动剂IGF-1,结果显示,EGCG+仑伐替尼+IGF-1组 HepG2 细胞中 PI3K/Akt 信号通路被阻断后,细胞存活率、增殖率和克隆形

成、侵袭能力均显著回升,且接近对照组水平。这提示PI3K/Akt信号通路可能是EGCG增强仑伐替尼抗肝癌活性的关键调控靶点。

综上所述,EGCG可增加肝癌细胞对仑伐替尼的敏感性,其作用机制可能与抑制PI3K/Akt信号通路激活有关。本研究为增强仑伐替尼治疗敏感性提供了实验参考,对挖掘新的治疗策略、提高肝癌患者的治疗效果具有重要意义。

参考文献

- [1] 赵海潮,高强. 2022年度肝癌研究及诊疗新进展[J]. 中国癌症杂志,2023,33(4):315-326.
- [2] 张劲丰,安宏亮,苏荣,等. 乙型肝炎病毒耐药性研究进展[J]. 分子诊断与治疗杂志,2019,11(5):434-440.
- [3] 熊洪莉,陈君辉,王雪. 心理护理对介入治疗围手术期肝癌患者焦虑抑郁水平影响的临床对照研究[J]. 四川精神卫生,2015,28(3):227-229.
- [4] NAING C, NI H, AUNG H H, et al. Gene therapy for people with hepatocellular carcinoma[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2024,6(6):CD013731.
- [5] 杨欣荣,孙惠川,谢青,等. 仑伐替尼肝癌全病程应用中国专家指导意见[J]. 中华消化外科杂志,2023,22(2):167-180.
- [6] WANG L, LIN L, ZHOU W. Efficacy and safety of transarterial chemoembolization combined with lenvatinib and PD-1 inhibitor in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. Pharmacol Ther, 2024, 257:108634.
- [7] CHAN L L, CHAN S L. The evolving role of lenvatinib at the new era of first-line hepatocellular carcinoma treatment[J]. Clin Mol Hepatol, 2023,29(4):909-923.
- [8] LU Y G, SHEN H M, HUANG W J, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in hepatocellular carcinoma with lenvatinib resistance[J]. Cell Death Discov, 2021,7(1):359.
- [9] TALIB W H, AWAJAN D, ALQUDAH A, et al. Targeting cancer hallmarks with epigallocatechin gallate (EGCG) : mechanistic basis and therapeutic targets[J]. Molecules, 2024,29(6):1373.
- [10] ALMATROODI S A, ALMATROODI A, KHAN A A, et al. Potential therapeutic targets of epigallocatechin gallate (EGCG), the most abundant catechin in green tea, and its role in the therapy of various types of cancer[J]. Molecules, 2020,25(14):3146.
- [11] DU B X, LIN P, LIN J. EGCG and ECG induce apoptosis and decrease autophagy via the AMPK/mTOR and PI3K/Akt/mTOR pathway in human melanoma cells[J]. Chin J Nat Med, 2022,20(4):290-300.
- [12] LUO K W, LUNG W Y, CHUN-XIE, et al. EGCG inhibited bladder cancer T24 and 5637 cell proliferation and migration via PI3K/Akt pathway[J]. Oncotarget, 2018, 9(15):12261-12272.
- [13] MEHMOOD S, MAQSOOD M, MAHTAB N, et al. Epigallocatechin gallate: phytochemistry, bioavailability, utilization challenges, and strategies[J]. J Food Biochem, 2022,46(8):e14189.
- [14] GU J J, QIAO K S, SUN P, et al. Study of EGCG induced apoptosis in lung cancer cells by inhibiting PI3K/Akt signaling pathway[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2018, 22(14):4557-4563.
- [15] WEI Y C, YANG L, TANG C W, et al. Lenvatinib inhibits cholangiocarcinoma progression by targeting the FGF19/PI3K/Akt signaling pathway[J]. Apoptosis, 2025, 30(1/2):185-196.
- [16] LIU S M, SUN Z W, CHU P, et al. EGCG protects against homocysteine-induced human umbilical vein endothelial cells apoptosis by modulating mitochondrial-dependent apoptotic signaling and PI3K/Akt/ENOS signaling pathways[J]. Apoptosis, 2017, 22(5):672-680.
- [17] DING F, YANG S. Epigallocatechin-3-gallate inhibits proliferation and triggers apoptosis in colon cancer via the hedgehog/phosphoinositide 3-kinase pathways[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2021,99(9):910-920.
- [18] 李明龙. EGCG逆转索拉菲(非)尼耐药肝癌细胞的相关机制研究[D]. 延边大学,2016.
- [19] ZHAI J, HAO H, XU Z, et al. The effect of modulation Piezo2 by IGF-1 on tactile hypersensitivity in BTBR model mice[J]. Life Sci, 2025, 364:123449.
- [20] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政司. 原发性肝癌诊疗指南:2024年版[J]. 中华肝脏病杂志,2024,32(7):581-630.
- [21] YANO S, KAWAOKA T, JOHIRA Y, et al. Advanced hepatocellular carcinoma with response to lenvatinib after atezolizumab plus bevacizumab[J]. Medicine(Baltimore), 2021,100(42):e27576.
- [22] BUTTELL A, QIU W. The action and resistance mechanisms of lenvatinib in liver cancer[J]. Mol Carcinog, 2023,62(12):1918-1934.
- [23] GUAN Y T, WU Q L, LI M M, et al. Epigallocatechin-3-gallate induced HepG2 cells apoptosis through ROS mediated Akt/JNK and p53 signaling pathway[J]. Curr Cancer Drug Targets, 2023,23(6):447-460.
- [24] MORADZADEH M, HOSSEINI A, ERFANIAN S, et al. Epigallocatechin-3-gallate promotes apoptosis in human breast cancer T47D cells through down-regulation of PI3K/Akt and telomerase[J]. Pharmacol Rep, 2017, 69(5):924-928.

(收稿日期:2025-03-26 修回日期:2025-07-29)

(编辑:张元媛)