

临床与基础  
桥接研究Clinical and Basic  
Bridging Research莪术醇通过降低 Siglec - 15 的表达抑制  
肝细胞癌增殖迁移的研究

## Research of curcumol inhibiting the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma by downregulating Siglec - 15 expression

连海文<sup>1</sup>, 关璐璐<sup>2</sup>, 李诚煜<sup>3</sup>,  
郭彩茹<sup>2</sup>, 亓 民<sup>2,4</sup>(1. 河南医药大学 研究生院, 河南 新乡 453003;  
2. 洛阳市中心医院 洛阳市肝癌个体化治疗重点  
实验室, 河南 洛阳 471000; 3. 郑州大学, 河南  
郑州 450000; 4. 洛阳市中心医院 老年医学科,  
河南 洛阳 471000)LIAN Hai - wen<sup>1</sup>, GUAN Lu - lu<sup>2</sup>,  
LI Cheng - yu<sup>3</sup>, GUO Cai - ru<sup>2</sup>,  
QI Min<sup>2,4</sup>(1. Graduate School of Henan Medical  
University, Xinxiang 453003, Henan  
Province, China; 2. Luoyang Key  
Laboratory of Individualized Treatment of  
Liver Cancer, Luoyang Central Hospital,  
Luoyang 471000, Henan Province, China;  
3. Zhengzhou University, Zhengzhou  
450000, Henan Province, China;  
4. Department of Geriatrics, Luoyang  
Central Hospital, Luoyang 471000, Henan  
Province, China)基金项目: 河南省医学科技攻关计划基金资助  
项目(LHGJ20250771); 河南省科技  
攻关基金资助项目(252102310123)作者简介: 连海文(2002 - ), 女, 硕士研究生, 主  
要从事消化系统疾病方面的研究通信作者: 亓民, 主任医师, 硕士生导师  
MP: 15037922015

E - mail: Qimin19720629@163.com

**摘要:**目的 研究莪术醇(curcumol)通过唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素 15 (Siglec - 15) 对于抑制肝细胞癌(HCC)生长的效果和机制。方法 随机将 Bel - 7402 和 HepG2 细胞分别分为对照组(正常培养)、低剂量实验组(50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  莪术醇干预 48 h)和高剂量实验组(100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  莪术醇干预 48 h)。用噻唑蓝(MTT)比色法、Transwell 小室实验法、划痕愈合实验法及流式细胞术,分别评估细胞的增殖、侵袭及迁移能力,通过实时荧光定量聚合酶链反应(RT - qPCR)法和蛋白质免疫印迹法对 Siglec - 15、磷脂酰肌醇 3 - 激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)信号通路相关分子的信使 RNA(mRNA)与蛋白相对表达水平进行检测。结果 Bel - 7402 细胞对照组、低、高剂量实验组与 HepG2 细胞的对照组、低、高剂量实验组中的细胞存活率分别为(100.00  $\pm$  0)%、(72.09  $\pm$  1.07)%、(55.65  $\pm$  2.99)%与(100.00  $\pm$  0)%、(57.38  $\pm$  6.97)%、(44.63  $\pm$  6.04)%、Bel - 7402 细胞与 HepG2 细胞的各组凋亡率分别为(1.87  $\pm$  0.05)%、(2.77  $\pm$  0.08)%、(4.19  $\pm$  0.11)%与(3.52  $\pm$  0.17)%、(5.46  $\pm$  0.11)%、(6.63  $\pm$  0.16)%、Bel - 7402 细胞与 HepG2 细胞的各组划痕愈合率分别为(39.06  $\pm$  0.81)%、(19.20  $\pm$  0.59)%、(8.34  $\pm$  0.89)%与(52.25  $\pm$  1.43)%、(21.10  $\pm$  1.95)%、(15.31  $\pm$  0.80)%、Bel - 7402 细胞与 HepG2 细胞的纵向迁移率分别为(100.00  $\pm$  0)%、(72.40  $\pm$  4.34)%、(62.47  $\pm$  3.08)%与(100.00  $\pm$  0)%、(60.51  $\pm$  2.62)%、(40.47  $\pm$  2.76)%、在 Bel - 7402 细胞的对照组及低、高剂量实验组与 HepG2 细胞的对照组及低、高剂量实验组中, Siglec - 15 mRNA 的相对表达水平测定分别为 1.00  $\pm$  0.18、0.89  $\pm$  0.01、0.69  $\pm$  0.07 与 1.00  $\pm$  0.09、0.90  $\pm$  0.04、0.88  $\pm$  0.03, PI3K mRNA 相对表达水平分别为 1.00  $\pm$  0.16、0.80  $\pm$  0.12、0.75  $\pm$  0.11 与 1.00  $\pm$  0.16、0.93  $\pm$  0.08、0.93  $\pm$  0.04, AKT mRNA 相对表达水平分别为 1.00  $\pm$  0.15、0.73  $\pm$  0.17、0.52  $\pm$  0.11 与 1.00  $\pm$  0.21、0.69  $\pm$  0.06、0.27  $\pm$  0.05, Siglec - 15 蛋白相对表达水平分别为 1.05  $\pm$  0.07、0.91  $\pm$  0.09、0.84  $\pm$  0.07 与 0.99  $\pm$  0.05、0.80  $\pm$  0.02、0.64  $\pm$  0.04, PI3K 蛋白相对表达水平分别为 0.96  $\pm$  0.09、0.49  $\pm$  0.10、0.17  $\pm$  0.10 与 1.01  $\pm$  0.03、0.73  $\pm$  0.03、0.49  $\pm$  0.03, AKT 蛋白相对表达水平分别为 0.98  $\pm$  0.04、0.88  $\pm$  0.08、0.63  $\pm$  0.04 与 1.06  $\pm$  0.04、0.92  $\pm$  0.02、0.67  $\pm$  0.03。2 种细胞系中,与对照组相比,各实验组的上述指标,在统计学上差异均具有统计学意义(均  $P < 0.001$ )。结论 莪术醇可通过下调 Siglec - 15 表达,抑制肝癌细胞 Bel7402、HepG2 的增殖与迁移,发挥抗肝癌作用。

**关键词:** 莪术醇; 肝癌; 唾液酸结合免疫球蛋白样凝集素 15; 磷脂酰肌醇 3 - 激酶/蛋白激酶 B 信号通路; 增殖; 迁移

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2026.08.015

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2026)08-1144-07

**Abstract: Objective** To investigate the inhibitory effect of curcumol on

the growth of hepatocellular carcinoma (HCC) cells through sialic acid – binding immunoglobulin – like lectin 15 (Siglec – 15) and its underlying mechanism. **Methods** Bel – 7402 and HepG2 cells were randomly divided into control group (normal culture), low – dose experimental group (treated with  $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  curcumol for 48 hours), and a high – dose experimental group (treated with  $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  curcumol for 48 hours). The proliferative, invasive, and migratory capacities of cells were evaluated through a combination of functional assays, including the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method for cell viability, Transwell and wound healing assays for migration and invasion, and flow cytometry for additional cellular characteristics. The expression levels of Siglec – 15, along with key molecules involved in the phosphatidylinositol 3 – kinase (PI3K) and protein kinase B (AKT) signaling cascade, were examined at both the messenger RNA (mRNA) and protein levels. For this purpose, real – time quantitative polymerase chain reaction (RT – qPCR) was employed to assess transcript abundance, while Western blotting was used to determine protein expression.

**Results** The cell viability rates in the control, low – dose, and high – dose experimental groups of Bel – 7402 cells and HepG2 cells were  $(100.00 \pm 0)\%$ ,  $(72.09 \pm 1.07)\%$ ,  $(55.65 \pm 2.99)\%$  and  $(100.00 \pm 0)\%$ ,  $(57.38 \pm 6.97)\%$ ,  $(44.63 \pm 6.04)\%$ , respectively; the apoptosis rates in the corresponding groups of Bel – 7402 cells and HepG2 cells were  $(1.87 \pm 0.05)\%$ ,  $(2.77 \pm 0.08)\%$ ,  $(4.19 \pm 0.11)\%$  and  $(3.52 \pm 0.17)\%$ ,  $(5.46 \pm 0.11)\%$ ,  $(6.63 \pm 0.16)\%$ , respectively; the wound healing rates (horizontal migration rates) in the corresponding groups of Bel – 7402 cells and HepG2 cells were  $(39.06 \pm 0.81)\%$ ,  $(19.20 \pm 0.59)\%$ ,  $(8.34 \pm 0.89)\%$  and  $(52.25 \pm 1.43)\%$ ,  $(21.10 \pm 1.95)\%$ ,  $(15.31 \pm 0.80)\%$ , respectively; the vertical migration rates in the corresponding groups of Bel – 7402 cells and HepG2 cells were  $(100.00 \pm 0)\%$ ,  $(72.40 \pm 4.34)\%$ ,  $(62.47 \pm 3.08)\%$  and  $(100.00 \pm 0)\%$ ,  $(60.51 \pm 2.62)\%$ ,  $(40.47 \pm 2.76)\%$ , respectively. In the control group, low – dose experimental group, and high – dose experimental group of Bel – 7402 cells and HepG2 cells, the relative mRNA expression levels of Siglec – 15 were  $1.00 \pm 0.18$ ,  $0.89 \pm 0.01$ ,  $0.69 \pm 0.07$  and  $1.00 \pm 0.09$ ,  $0.90 \pm 0.04$ ,  $0.88 \pm 0.03$ , respectively; the relative mRNA expression levels of PI3K were  $1.00 \pm 0.16$ ,  $0.80 \pm 0.12$ ,  $0.75 \pm 0.11$  and  $1.00 \pm 0.16$ ,  $0.93 \pm 0.08$ ,  $0.93 \pm 0.04$ , respectively; the relative mRNA expression levels of AKT were  $1.00 \pm 0.15$ ,  $0.73 \pm 0.17$ ,  $0.52 \pm 0.11$  and  $1.00 \pm 0.21$ ,  $0.69 \pm 0.06$ ,  $0.27 \pm 0.05$ , respectively; the relative protein expression levels of Siglec – 15 were  $1.05 \pm 0.07$ ,  $0.91 \pm 0.09$ ,  $0.84 \pm 0.07$  and  $0.99 \pm 0.05$ ,  $0.80 \pm 0.02$ ,  $0.64 \pm 0.04$ , respectively; the relative protein expression levels of PI3K were  $0.96 \pm 0.09$ ,  $0.49 \pm 0.10$ ,  $0.17 \pm 0.10$  and  $1.01 \pm 0.03$ ,  $0.73 \pm 0.03$ ,  $0.49 \pm 0.03$ , respectively. The relative protein expression levels of AKT were  $0.98 \pm 0.04$ ,  $0.88 \pm 0.08$ ,  $0.63 \pm 0.04$  and  $1.06 \pm 0.04$ ,  $0.92 \pm 0.02$ ,  $0.67 \pm 0.03$ , respectively. In both cell lines, compared with the control group, the differences in the above indicators between each experimental group and the control group were all statistically significant (all  $P < 0.001$ ).

**Conclusion** Curcumol exerts anti – hepatocellular carcinoma effects by downregulating Siglec – 15 expression and inhibiting the proliferation and migration of Bel – 7402 and HepG2 hepatoma cells.

**Key words:** curcumol; hepatocellular carcinoma; sialic acid – binding immunoglobulin – like lectin 15; phosphatidylinositol 3 – kinase/protein kinase B pathway; proliferation; migration

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 作为一种在临床实践中频繁被诊断出的恶性实体肿瘤,其发病与死亡负担在全球各类癌症中均处于较高水平<sup>[1]</sup>。早期 HCC 可通过手术切除获得根治性治疗,但相当比例的患者病程已进展至中期乃至晚期阶段,从而丧失了接受根治性外科治疗的可能<sup>[2-3]</sup>。免疫检查点抑制剂类药物中,最具代表性的当属程序性死亡配体 1 (programmed death ligand 1, PD – L1),为晚期肝癌的治疗开辟了新方向<sup>[4]</sup>。2019 年,有研究首次报道了唾

液酸结合免疫球蛋白样凝集素 15 (sialic acid – binding Ig – like lectin 15, Siglec – 15) 在肿瘤免疫调控中的功能,该蛋白广泛表达于癌细胞及肿瘤浸润免疫细胞,其结构域与含 PD – L1 在内的 B7 家族高度同源,提示二者功能可能相似<sup>[5-6]</sup>。中医药抗肿瘤具有安全性高、疗效稳定等优势。莪术醇为传统中药莪术的主要活性单体,具备显著抗肿瘤及免疫调节活性<sup>[7]</sup>。前期研究证实,莪术醇可下调 PD – L1 表达发挥抗肝癌效应<sup>[8]</sup>。基于此,本研究推测莪术醇可能通过调控

Siglec-15抑制HCC进展,旨在探讨莪术醇经Siglec-15通路对HCC细胞增殖与迁移的影响,从而为中药靶向免疫治疗肝细胞癌提供实验依据。

## 材料与方法

### 1 材料

**细胞** 人肝癌细胞株Bel-7402、HepG2细胞均购自湖南丰晖生物科技有限公司。

**药品与试剂** 莪术醇,规格:每毫升10mM,纯度:99.50%,批号:105061,美国MedChemExpress公司生产;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH),规格:每瓶100  $\mu\text{L}$ ,纯度 $\geq 95\%$ ,批号:K530KA8479,上海生工生物工程股份有限公司生产;Siglec-15抗体,德国Sigma-Aldrich公司生产;GAPDH、磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)、蛋白激酶B(protein kinase B, AKT)抗体以及辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG(H+L),均由浙江杭州华安生物技术有限公司生产;细胞凋亡检测试剂盒,美国ZETA Life公司生产;二喹啉甲酸法(bicinchoninic acid assay, BCA)蛋白浓度测定试剂盒和噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)检测试剂盒,均由北京索莱宝科技有限公司生产;总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)提取试剂盒,美国Promega公司生产;互补脱氧核糖核酸(complementary DNA, cDNA)逆转录试剂盒,日本Takara Bio Inc. 生产;实时荧光定量聚合酶链反应(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)SYBR<sup>®</sup> Green,美国MedChemExpress公司生产;BeyoGel Plus聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)预制胶,上海碧云天生物技术有限公司生产;Transwell小室,美国Corning公司生产。

**仪器** Mini-PROTEANTetra Systems电泳仪和Mini Trans-Blot蛋白转印仪,均为美国Bio-Rad公司产品;Tanon 5200 multi凝胶成像仪,上海天能公司产品;VICTOR X3酶标仪,美国Spectra Max公司产品;DMI4000B荧光显微镜,美国Leica公司产品。

### 2 实验方法

#### 2.1 细胞培养、分组与处理方法<sup>[9]</sup>

Bel-7402及HepG2细胞均置于完全杜尔贝科改良伊格尔培养基(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM)中培养,该培养基的配制方法为:基础DMEM中添加体积分数为10%的胎牛血清

(fetal bovine serum, FBS)以及1%的青霉素混合液。细胞培养环境维持在37℃恒温、含5% CO<sub>2</sub>的湿润条件下。当培养皿中细胞融合度达到约80%时,即进行消化传代操作。将处于对数生长期的Bel-7402、HepG2细胞均分别分为对照组(细胞正常培养),低剂量实验组(50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术醇处理细胞48 h)、高剂量实验组(100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术醇处理细胞48 h)。

#### 2.2 MTT法检测细胞活力<sup>[10]</sup>

收集生长状态良好、正处于对数增殖阶段的Bel-7402与HepG2细胞,将其按每孔大约100  $\mu\text{L}$ 的细胞悬液量接种至96孔培养板内,培养24 h后,更换为含0、50或100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 莪术醇的培养液,继续分别培养24 h和48 h。培养结束后,每孔加入MTT溶液10  $\mu\text{L}$ ,继续培养4 h后弃上清,每孔加入二甲亚砜110  $\mu\text{L}$ 混匀,待反应完成后,使用酶标仪检测各样本孔在490 nm波长下的光密度(optical density, OD)数值,并计算细胞的相对存活率。

#### 2.3 检测细胞凋亡<sup>[11]</sup>

取生长至对数增殖阶段的Bel-7402与HepG2细胞,分别接种到六孔细胞培养板内,每孔加入细胞悬液体积约2 mL,调整各组细胞密度至每毫升 $1 \times 10^5$ 个。培养24 h后,分别采用含0、50或100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度莪术醇的培养基,将细胞继续孵育48 h。培养结束后,对各组细胞进行收集,随后在1 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 的转速下离心5 min。弃去上清后,用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)清洗细胞沉淀,最后加入结合缓冲液100  $\mu\text{L}$ 使细胞重新悬浮,后向悬液中加入195  $\mu\text{L}$ 膜联蛋白V(Annexin-V),于摇床上避光孵育15 min;再加入10  $\mu\text{L}$ 碘化丙啶(propidium iodide, PI)染液,混匀后4℃避光孵育5 min。用流式细胞仪检测细胞凋亡情况,并计算凋亡率。凋亡率=早期凋亡率+晚期凋亡率。

#### 2.4 划痕实验检测细胞横向迁移能力<sup>[9]</sup>

取处于对数生长期的Bel-7402及HepG2细胞,以每孔约 $5 \times 10^5$ 个细胞的密度接种于6孔板中。次日,使用200  $\mu\text{L}$ 移液器吸头垂直于细胞表面划痕。用PBS洗涤细胞3次后,依据实验设计加入相应药物处理。将培养板转移至培养箱内,在设定条件下进行后续培养,并分别于划痕后0 h和48 h在倒置显微镜下观察并拍摄固定位置处的细胞迁移情况。

#### 2.5 Transwell实验检测细胞纵向迁移能力<sup>[9]</sup>

在Transwell小室中,分别向上室加入含1% FBS

的培养基,计数为  $1 \times 10^5$  的 Bel-7402、HepG2 细胞,下室加入 200  $\mu\text{L}$  10% FBS 的培养基,培养 24 h 后,上室更换为含 0、50 或 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  莪术醇的培养液,继续培养 48 h 后,小心取出 Transwell 小室,吸除孔板内残留的培养基,并使用 PBS 漂洗两次。随后,将小室浸入质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液中,室温固定 30 min,再用结晶紫染液染色 20 min。染色结束后,使用洁净棉签轻柔拭去小室聚碳酸酯膜上表面尚未迁移的细胞,继而以 PBS 清洗三次,于室温条件下自然干燥。最后,在光学显微镜下观察小室底膜并采集图像。

## 2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应 (real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR) 法检测 RNA 相对表达水平<sup>[12]</sup>

提取 Bel-7402 及 HepG2 细胞的总 RNA,逆转录合成 cDNA。用 RT-qPCR 检测目的基因的相对表达水平。反应体系如下:将 cDNA 按 1:4 稀释后取 5  $\mu\text{L}$ ,加入 2  $\times$  SYBR Green 荧光染料预混液 10  $\mu\text{L}$ 、无 RNase 水 5  $\mu\text{L}$ ,以及正、反向引物各 0.4  $\mu\text{L}$ 。实时荧光定量 PCR 的扩增反应按以下参数运行:在 95  $^{\circ}\text{C}$  下进行预变性处理,持续 5 min,后进入 40 次的热循环阶段,其中每次循环包含 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s,以及 60  $^{\circ}\text{C}$  条件下同时完成退火和延伸过程,该步骤持续 40 s。引物由杭州有康生物科技有限公司设计合成,序列如下,Siglec-15 上游引物:5'-TCACCAGTGTCTAGCT-TGCTTGTTTC-3',下游引物:5'-AGAAGGAGGAG-GAGGAGGAGGAG-3';PI3K 上游引物:5'-GATGC-CCTTCTGAACTGGCT-3',下游引物:5'-GCTACA-CAGTAGCCAGCACA-3';AKT 上游引物:5'-TAC-GAGATGATGTGCGGTCG-3',下游引物:5'-GGAAGCGGATCTCCTCCATG-3'。

## 2.7 蛋白质印迹法检测蛋白相对表达水平<sup>[12]</sup>

提取 Bel-7402、HepG2 细胞的蛋白,采用 BCA 蛋白定量试剂盒,参照标准曲线对样品进行浓度标定,基于每个孔上 10  $\mu\text{g}$  的蛋白含量,配置包含 4  $\times$  蛋白上样缓冲液的蛋白质系统,沸水浴 10 min,使用预制胶,上样量:样品每孔 10  $\mu\text{L}$ 、蛋白分子量标记每孔 5  $\mu\text{L}$ ,电压设置为 80 V 电泳 100 min,然后转至聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride membrane, PVDF) 膜上,转膜完成后,将 PVDF 膜浸泡于含有脱脂奶粉的含吐温 20 的 Tris 缓冲盐溶液 (tris-buffered saline with tween 20, TBST) 封闭液中,封闭结束后,一抗 GAPDH (1:1 000)、Siglec-15 (1:1 000)、PI3K (1:1 000)、AKT (1:1 000) 孵育过夜。次日,弃去一抗

工作液,用 TBST 缓冲液漂洗膜三次,随后加入辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗,1 h 后再次用 TBST 充分洗涤膜。最后,利用增强型化学发光 (enhanced chemiluminescence, ECL) 底物进行显色反应,在暗室条件下使用化学发光成像系统捕获信号。

## 3 统计学处理

用 Graphpad Prism 8.0 软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组内比较用配对样本  $t$  检验,组间比较用独立  $t$  检验;计数资料用率 (%) 表示,比较用  $\chi^2$  检验。

## 结 果

### 1 莪术醇对 HepG2、Bel-7402 细胞活力的影响

莪术醇处理 24 h、48 h 后,Bel-7402 及 HepG2 细胞低、高浓度实验组的细胞活力值均显著低于其相应对照组 (均  $P < 0.001$ ),见表 1。莪术醇处理 48 h 后,Bel-7402 细胞在 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度下的存活率为  $(55.65 \pm 2.99)\%$ ,HepG2 细胞在 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度下的存活率为  $(57.38 \pm 6.97)\%$ ,均接近 50% 抑制率。因此,后续实验选取莪术醇 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (低剂量) 和 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (高剂量) 处理 48 h 作为检测条件。

表 1 各组细胞存活率的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of cellular viability among different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

| Group              | n | cell viability (%)   |                      |
|--------------------|---|----------------------|----------------------|
|                    |   | 24 h                 | 48 h                 |
| Control (B)        | 8 | 100.00 $\pm$ 0       | 100.00 $\pm$ 0       |
| Experimental-L (B) | 8 | 75.52 $\pm$ 3.15 *** | 72.09 $\pm$ 1.07 *** |
| Experimental-H (B) | 8 | 62.82 $\pm$ 2.35 *** | 55.65 $\pm$ 2.99 *** |
| Control (H)        | 8 | 100.00 $\pm$ 0       | 100.00 $\pm$ 0       |
| Experimental-L (H) | 8 | 71.23 $\pm$ 3.75 ### | 57.38 $\pm$ 6.97 ### |
| Experimental-H (H) | 8 | 65.53 $\pm$ 2.73 ### | 44.63 $\pm$ 6.04 ### |

B: Bel-7402 cells; H: HepG2 cells; Control (B) group: Bel-7402 cells without any treatment; Experimental-L (B) group: Bel-7402 cells treated with a low concentration (50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) of curcumin; Experimental-H (B) group: Bel-7402 cells treated with a high concentration (100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) of curcumin; Control (H) group: HepG2 cells without any treatment; Experimental-L (H) group: HepG2 cells treated with a low concentration (50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) of curcumin; Experimental-H (H) group: HepG2 cells treated with a high concentration (100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) of curcumin; Compared with the control (B) \*\*\*  $P < 0.001$ ; Compared with the control (H) group, ###  $P < 0.001$ .

## 2 莪术醇对 HepG2、Bel-7402 细胞凋亡的影响

采用流式细胞术检测药物处理后肝癌细胞的凋亡情况,结果发现,Bel-7402 细胞低、高剂量实验组和对照组的细胞凋亡率分别为 $(2.77 \pm 0.08)\%$ 、 $(4.19 \pm 0.11)\%$ 和 $(1.87 \pm 0.05)\%$ ,HepG2 细胞低、高剂量实验组和对照组的细胞凋亡率分别为 $(5.46 \pm 0.11)\%$ 、 $(6.63 \pm 0.16)\%$ 和 $(3.52 \pm 0.17)\%$ ,2 组细胞实验组的细胞凋亡率与对照组比较,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.001$ ),见图 1a。

## 3 莪术醇抑制 Bel-7402、HepG2 细胞迁移

用细胞划痕实验和 Transwell 实验评估莪术醇处理后细胞的迁移能力。结果显示,相较于对照组,莪术醇干预后 Bel-7402 及 HepG2 细胞的横向与纵向迁移能力均显著下降(均 $P < 0.001$ );且随浓度升高,细胞迁移能力明显减弱,见图 1b 和表 2。

## 4 莪术醇对 Bel-7402、HepG2 细胞 siglec-15 及相关蛋白和 mRNA 表达的影响

通过 RT-qPCR 和 Western blotting 检测莪术醇处理对肝癌细胞系中 Siglec-15 表达的影响。结果显

示,与对照组相比,2 种细胞系低、高浓度莪术醇实验组中 Siglec-15 的 mRNA 及蛋白相对表达水平均显著降低(均 $P < 0.001$ ),同时,2 种细胞系中 PI3K 与 AKT 的 mRNA 及蛋白相对表达水平在莪术醇处理后亦呈现显著下降趋势(均 $P < 0.001$ ),见图 2 与表 3。

表 2 各组细胞迁移能力的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of horizontal and vertical migration ability among different groups( $\bar{x} \pm s$ )

| Group             | <i>n</i> | Horizontal migratory capacity(%) | Vertical migration ability(%) |
|-------------------|----------|----------------------------------|-------------------------------|
| Control(B)        | 8        | 39.06 ± 0.81                     | 100.00 ± 0                    |
| Experimental-L(B) | 8        | 19.20 ± 0.59***                  | 72.40 ± 4.34***               |
| Experimental-H(B) | 8        | 8.34 ± 0.89***                   | 62.47 ± 3.08***               |
| Control(H)        | 8        | 52.25 ± 1.43                     | 100.00 ± 0                    |
| Experimental-L(H) | 8        | 21.10 ± 1.95###                  | 60.51 ± 2.62###               |
| Experimental-H(H) | 8        | 15.31 ± 0.80###                  | 40.47 ± 2.76###               |

Compared with the control(B) group,\*\*\* $P < 0.001$ ; Compared with the control(H) group,### $P < 0.001$ .

表 3 各组 Bel-7402、HepG2 细胞中免疫球蛋白样凝集素 15(siglec-15)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)、蛋白激酶 B(AKT)分子信使核糖核酸(mRNA)及蛋白相对表达水平的比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Comparison of relative mRNA and protein expression levels of sialic acid-binding Ig-like lectin15(siglec15), phosphatidylinositol 3-kinase(PI3K) and protein kinase(AKT) messenger ribonucleic acid in Bel-7402 and HepG2 cells among different groups( $\bar{x} \pm s$ )

| Group             | <i>n</i> | mRNA             |                |                | Protein          |                |                |
|-------------------|----------|------------------|----------------|----------------|------------------|----------------|----------------|
|                   |          | <i>siglec-15</i> | <i>PI3K</i>    | <i>AKT</i>     | <i>siglec-15</i> | <i>PI3K</i>    | <i>AKT</i>     |
| Control(B)        | 8        | 1.00 ± 0.18      | 1.00 ± 0.16    | 1.00 ± 0.15    | 1.05 ± 0.07      | 0.96 ± 0.09    | 0.98 ± 0.04    |
| Experimental-L(B) | 8        | 0.89 ± 0.01***   | 0.80 ± 0.12*** | 0.73 ± 0.17*** | 0.91 ± 0.09***   | 0.49 ± 0.10*** | 0.88 ± 0.08*** |
| Experimental-H(B) | 8        | 0.69 ± 0.07***   | 0.75 ± 0.11*** | 0.52 ± 0.11*** | 0.84 ± 0.07***   | 0.17 ± 0.10*** | 0.63 ± 0.04*** |
| Control(H)        | 8        | 1.00 ± 0.09      | 1.00 ± 0.16    | 1.00 ± 0.21    | 0.99 ± 0.05      | 1.01 ± 0.03    | 1.06 ± 0.04    |
| Experimental-L(H) | 8        | 0.90 ± 0.04###   | 0.93 ± 0.08### | 0.69 ± 0.06### | 0.80 ± 0.02###   | 0.73 ± 0.03### | 0.92 ± 0.02### |
| Experimental-H(H) | 8        | 0.88 ± 0.03###   | 0.93 ± 0.04### | 0.27 ± 0.05### | 0.64 ± 0.04###   | 0.49 ± 0.03### | 0.67 ± 0.03### |

Compared with the control(B) group,\*\*\* $P < 0.001$ ; Compared with the control(H) group,### $P < 0.001$ .

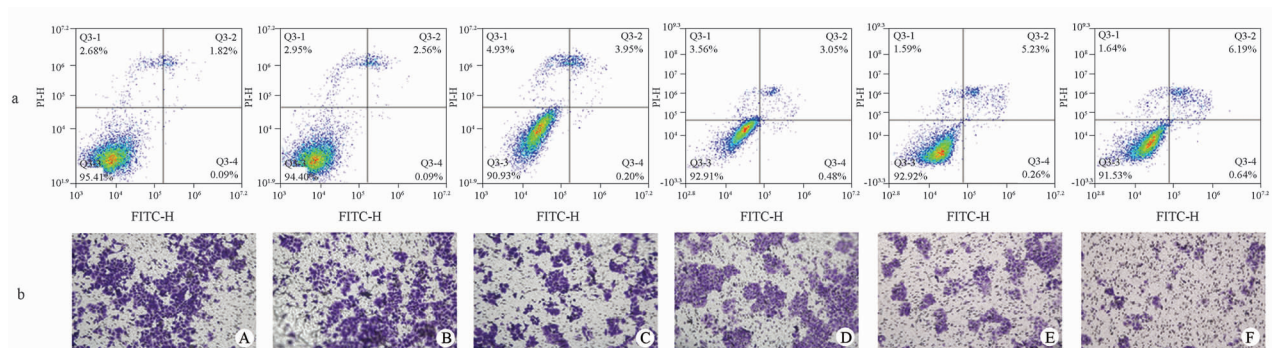


图 1 莪术醇对肝癌 Bel-7402、HepG2 细胞凋亡(a)和迁移能力(b)的影响

Figure 1 Effects of curcuminol on apoptosis (a) and migration (b) of Bel-7402 and HepG2 cells

A:Control(B); B:Experimental-L(B); C: Experimental-H(B); D: Control(H); E: Experimental-L(H); F: Experimental-H(H).

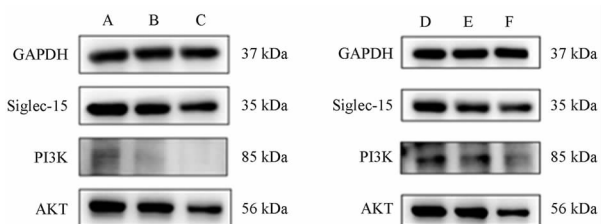


图2 莪术醇对肝癌 Bel-7402、HepG2 细胞中 siglec-15 及相关通路蛋白表达的影响

**Figure 2** Effect of curcumin on the expression of siglec-15 and related pathway proteins in hepatocellular carcinoma Bel-7402 and HepG2 cells

GAPDH; Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; A: Control (B); B: Experimental - L (B); C: Experimental - H (B); D: Control (H); E: Experimental - L (H); F: Experimental - H (H).

## 讨 论

HCC 是我国及全球高发的恶性肿瘤,其高复发率和晚期低根治率长期困扰临床<sup>[1]</sup>。目前其治疗面临的主要挑战之一为中晚期患者对现有免疫检查点抑制剂[如程序性死亡受体 1/程序性死亡配体 1 (programmed cell death protein 1/programmed cell death ligand1, PD-1/PD-L1)]的应答率有限,且易产生耐药<sup>[13-14]</sup>。因此,寻找新的免疫调节靶点及具有多靶点调控能力的天然药物具有重要意义。Siglec-15 是近年来发现的免疫检查点分子,其胞外段结构与 B7 家族(含 PD-L1)高度同源,但功能独立于 PD-1/PD-L1 轴,已成为肿瘤免疫治疗的新热点<sup>[5-6,15]</sup>。中药活性单体莪术醇(分子式:  $C_{15}H_{24}O_2$ , 相对分子质量: 236.35)除已报道的下调 PD-L1 抑制肝癌<sup>[8]</sup>外,其在非小细胞肺癌、乳腺癌、胃癌等肿瘤中亦显示出调控能力<sup>[16-19]</sup>,网络药理学也预测其抗肝癌具有多靶点特征<sup>[20]</sup>,然而其是否影响 Siglec-15 尚未见报道。本研究首次发现,莪术醇( $50, 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )处理 48 h 可显著抑制 Bel-7402 和 HepG2 细胞增殖、诱导凋亡、削弱迁移能力;机制上,莪术醇处理后 Siglec-15 的 mRNA 及蛋白水平呈剂量依赖性降低,同时 PI3K/AKT 通路关键分子的表达也受到明显抑制。上述结果表明,莪术醇对 HCC 细胞的抑制作用与其下调 Siglec-15 和抑制 PI3K/AKT 通路密切相关,但两者之间是否构成直接的上游或下游的调控联系,尚需进一步实验验证。

在肝细胞癌的组织样本中, Siglec-15 会呈现高表达,这一分子特征通常与患者较差的临床结局相

关,它发挥作用的一个方面是与肿瘤相关的巨噬细胞产生相互作用,共同形成了免疫抑制的微环境<sup>[5-6]</sup>。本研究发现,天然小分子莪术醇能降低 HCC 细胞中 Siglec-15 的表达水平,这一结果提示莪术醇可能成为一种新型的 Siglec-15 抑制剂。该发现也与既往关于莪术醇可以下调 PD-L1 的报道<sup>[8]</sup>一致,对那些对 PD-1/PD-L1 抑制剂不敏感或者已出现耐药的患者,或许能够提供新的治疗思路。PI3K/AKT 是调控肿瘤增殖和凋亡的一条重要信号通路,在 HCC 中该通路的异常激活已被证实<sup>[21]</sup>。实验结果显示,经过莪术醇的处理之后,PI3K 和 AKT 的表达量均明显下降,这与吴皓等人在 HepG2 细胞里观察到的结果相吻合<sup>[21]</sup>。需要指出的是,在莪术醇的作用下, Siglec-15 的下调与 PI3K/AKT 受到的抑制表现出高度一致性,但两者是平行关系或上下游关系,目前尚无法确定,具体的分子机制仍有待研究。

本研究观察到在莪术醇作用下, HCC 细胞中 Siglec-15 表达下降及 PI3K/AKT 通路受抑。莪术醇作为一种天然倍半萜类化合物,结构明确、毒性低、具有多靶点调控能力<sup>[22]</sup>。后续研究中,建议一方面采用 Siglec-15 过表达或成簇规律间隔短回文重复序列相关蛋白 9 敲除技术,结合 PI3K/AKT 激动剂或抑制剂,另一方面,在细胞与动物水平上明确 Siglec-15 与 PI3K/AKT 通路之间的调控关系,并探索莪术醇与 PD-1/PD-L1 抑制剂的联合应用效果,为中医药在肝癌免疫治疗中的运用提供更充分的实验依据。

本研究提示:莪术醇可能通过下调 Siglec-15 表达抑制肝癌细胞增殖与迁移,该作用或许与 PI3K/AKT 信号通路的调控有关。

## 参考文献:

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, *et al.* Global cancer statistics 2020; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71 (3): 209—249.
- [2] COURI T, PILLAI A. Goals and targets for personalized therapy for HCC [J]. *Hepatol Int*, 2019, 13(2): 125—137.
- [3] 王骏成,陈敏山. 2024 年度肝癌治疗研究现状与问题 [J]. *肿瘤综合治疗电子杂志*, 2025, 11(2): 67—76.
- [4] SADEGHI S, BEJJANI A, FINN R S. Systemic therapy for primary liver tumors: Cholangiocarcinoma and hepatocellular carcinoma [J]. *Surg Oncol Clin N Am*, 2019, 28(4): 695—715.
- [5] WANG J, SUN J, LIU L N, *et al.* Siglec-15 as an immune suppressor and potential target for normalization cancer immunotherapy [J]. *Nat Med*, 2019, 25(4): 656—666.
- [6] HU J, YU A, OTHMANE B, *et al.* Siglec15 shapes a non-

- inflamed tumor microenvironment and predicts the molecular subtype in bladder cancer [J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3089—3108.
- [7] 王致达,李戈,王佛有. 莪术化学成分及抗肿瘤药理作用的研究进展[J]. 实用中医内科杂志,2025,39(1): 126—129.
- [8] 左红香. 莪术醇对肝癌细胞中 PD-L1 表达的影响及机制研究[D]. 吉林 延吉:延边大学,2020.
- [9] 方崇锴,刘思琳,郑昊,等. 莪术醇通过 PTEN/PI3K/AKT 通路调控肝癌细胞自噬和上皮间质转化的机制[J]. 中华中医药杂志,2023,38(5): 2450—2455.
- [10] 郭洪麟,李静,张琦,等. 基于 PD-1 介导 NF- $\kappa$ B 通路探讨莪术-三棱抗肝癌的机制[J]. 现代肿瘤医学,2024,32(7): 1179—1185.
- [11] WU Z, KANG J, TAN W, *et al.* In silico and *in vitro* studies on the mechanisms of Chinese medicine formula (Yiqi Jianpi Jiedu Formula) in the treatment of hepatocellular carcinoma [J/OL]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 8669993. 2022-10-29 [2026-01-27]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36345477/>.
- [12] 杨情宇,闫梓乔,李潇,等. 黄芪总皂苷与莪术醇抑制肿瘤血管生成及其对 EGFR/PI3K/AKT 和 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路的影响[J]. 世界中西医结合杂志,2022,17(06): 1115—1120.
- [13] YI M, ZHENG X, NIU M, *et al.* Combination strategies with PD-1/PD-L1 blockade: current advances and future directions [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 28.
- [14] PANG K, SHI Z D, WEI L Y, *et al.* Research progress of therapeutic effects and drug resistance of immunotherapy based on PD-1/PD-L1 blockade [J/OL]. *Drug Resist Updat*, 2023, 66: 100907. 2022-11-30 [2025-12-28]. <https://doi.org/10.1016/j.drup.2022.100907>.
- [15] CAO G, XIAO Z, YIN Z. Normalization cancer immunotherapy: blocking Siglec-15! [J/OL]. *Signal Transduct Target Ther*, 2019, 4: 10. 2019-04-19 [2025-12-28]. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0045-x>.
- [16] 齐涓,余贻汉,胡林凌,等. 莪术醇通过 JAK2/STAT3 信号通路抑制非小细胞肺癌增殖和转移机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2026,32(10): 34—45.
- [17] 铁松艳,童天昊,李鑫,等. 莪术醇促进 XL413 诱导的衰老 Hep3B 细胞凋亡 [J]. 中国药理学通报, 2025, 41(8): 1470—1478.
- [18] 亓新峰,冯绪强,王建凤. 莪术醇通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路介导的自噬抑制乳腺癌细胞的增殖活性 [J]. 山西大同大学学报(自然科学版),2023,39(4): 72—77.
- [19] 周桂香,邓帅,班江文,等. 莪术醇对胃癌 AGS 细胞增殖、凋亡的影响及机制研究 [J]. 环球中医药, 2023, 16(7): 1301—1308.
- [20] 冯协和,李曼,李志浩,等. 基于网络药理学和分子对接探讨莪术醇治疗肝癌的作用机制 [J]. 宁夏医科大学学报,2025, 47(3): 302—311.
- [21] 吴皓,李政,彭信幸. 莪术醇通过调控 PI3K/AKT 通路促进人肝癌 HepG2 细胞凋亡 [J]. 中南药学,2019,17(1): 11—14.
- [22] 孟令隆,白丰玺,赵雨,等. 莪术醇通过 SREBP-1/FASN/EGFR 轴延缓非小细胞肺癌进程 [J]. 南京中医药大学学报,2025, 41(6): 794—803.
- (本文编辑:王珊 收稿日期 2026-01-27)

## · 科学文摘 ·

### 靶向先天免疫抑制疗法对比抗生素治疗复发性急性膀胱炎的临床研究

引自: AMBITE I, *et al.* Targeted innate immune inhibition therapy compared with antibiotics for recurrent acute cystitis: A randomized, open-label phase 2 trial [J]. *Nat Microbiol*, 2026, 11(3): 638—647.

膀胱炎是一种膀胱细菌感染,约半数女性一生中至少会发生一次。呋喃妥因等抗生素常用于治疗膀胱炎,但抗生素耐药性问题日益突出,尤其在复发性感染中。本研究旨在分析 IL-1 受体拮抗剂阿那白滞素(anakinra)与呋喃妥因相比,在复发性膀胱炎中的短期和长期安全性及疗效。这是一项开放标签、随机、单中心、II 期研究,共 30 例有复发性膀胱炎病史且正处于急性发作期的成年女性患者入组,并按 2:1 的比例随机分配至阿那白滞素组( $n=20$ )或呋喃妥因组( $n=10$ ),接受为期 5 d 的治疗。研究达到了主要和次要疗效终点,这些终点定义为典型症状的减轻,评估指标包括第 5 天的急性膀胱炎症状评分、纵向症状评分、复发率、生活质量、基因表达分析以及第 15 天、第 30 天和 6 个月随访时的微生物学检测结果。治疗 5 d 后,阿那白滞素组( $P<0.001$ )和呋喃妥因组( $P<0.001$ )的症状评分均较治疗前下降,并在第 15 天、第 30 天及 6 个月时仍保持较低水平。与入组前 6 个月的病史相比,2 个治疗组在 6 个月时的复发频率均显著降低(阿那白滞素组  $P<0.001$ ,呋喃妥因组  $P=0.004$ ),生活质量提高,且未观察到不良反应。阿那白滞素治疗组患者的免疫基因表达受到快速抑制,而呋喃妥因组则未见此现象。对于复发性急性膀胱炎患者,靶向先天免疫抑制治疗的效果不劣于呋喃妥因。