

白藜芦醇对肝癌细胞干性的抑制作用

卢钊锋¹, 雷飞飞², 高媛², 李刚² (1. 湖北医药学院, 湖北 十堰 442000; 2. 十堰市人民医院 全科医学科, 湖北 十堰 442000)

摘要: **目的** 探讨白藜芦醇对肝癌细胞干性的抑制作用。**方法** 采用细胞毒性实验检测不同浓度(0、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇处理HepG2及Huh7细胞48 h后的细胞活力。采用平板克隆实验及细胞划痕实验检测不同浓度(0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇对HepG2及Huh7细胞增殖及迁移的影响。采用Western blot实验检测白藜芦醇对肝癌相关肿瘤干细胞标志物CD44及CD133表达的影响。**结果** 不同浓度(0、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇处理48 h后, HepG2细胞活力分别为100%、(93.43 \pm 1.56)%、(78.46 \pm 2.63)%、(68.39 \pm 2.42)%、(61.69 \pm 3.65)%和(11.71 \pm 1.22)%, Huh7细胞活力分别为100%、(83.67 \pm 4.51)%、(73.39 \pm 3.14)%、(65.15 \pm 4.78)%、(55.33 \pm 3.21)%、(31.38 \pm 2.49)%; HepG2及Huh7细胞的IC₅₀分别为145.7 $\mu\text{mol/L}$ 和159.1 $\mu\text{mol/L}$ 。划痕实验表明, 随白藜芦醇浓度升高, HepG2细胞及Huh7细胞迁移率逐渐下降。平板克隆实验表明, 不同药物浓度(0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇处理后, HepG2克隆数分别为(264.64 \pm 7.57)个、(129.00 \pm 11.53)个、(33.67 \pm 6.03)个、0个, Huh7细胞克隆数分别为(173.67 \pm 6.03)个、(115.00 \pm 16.7)个、(24.00 \pm 5.29)个、0个, 差异均有统计学意义(F 值分别为744.2、227.4, P 均 $<$ 0.001)。Western blot实验表明, 不同浓度(0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇均可抑制HepG2及Huh7中CD44及CD133蛋白的表达, 且随药物浓度增高, 其抑制效果更明显。**结论** 白藜芦醇可抑制肝癌细胞的增殖及迁移能力, 还可抑制肝癌细胞相关干性标志物CD44及CD133的表达。**关键词:** 白藜芦醇; 肝细胞癌; 肿瘤干细胞; 干性

Inhibitory effect of resveratrol on hepatocellular carcinoma cell stemness

Lu Yifeng¹, Lei Feifei², Gao Yuan², Li Gang² (1. Hubei University of Medicine, Hubei Shiyuan 442000, China; 2. Department of General Practice, Shiyuan Renmin Hospital, Hubei Shiyuan 442000, China)

Abstract: Objective To investigate the inhibitory effect of resveratrol on hepatocellular carcinoma cell stemness. **Methods** The proliferation capacity of HepG2 and Huh7 cells were measured by cytotoxicity assay after resveratrol treating at different concentrations (0, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{mol/L}$) for 48 hours. The effects of resveratrol on the proliferation and migration of HepG2 and Huh7 cells were evaluated via colony formation assay and cell scratch assay at concentrations of 0, 20, 40, and 60 $\mu\text{mol/L}$. Western blot was performed to detect the expression levels of liver cancer-related cancer stem cell markers CD44 and CD133 upon resveratrol treatment. **Results** After treatment with resveratrol at different concentrations (0, 20, 40, 80, 160, 320 $\mu\text{mol/L}$) for 48 hours, the viability of HepG2 cells was 100%, (93.43 \pm 1.56)%, (78.46 \pm 2.63)%, (68.39 \pm 2.42)%, (61.69 \pm 3.65)% and (11.71 \pm 1.22)%, respectively, and the viability of Huh7 cells was 100%, (83.67 \pm 4.51)%, (73.39 \pm 3.14)%, (65.15 \pm 4.78)%, (55.33 \pm 3.21)% and (31.38 \pm 2.49)%, respectively. IC₅₀ values for HepG2 and Huh7 cells were 145.7 $\mu\text{mol/L}$ and 159.1 $\mu\text{mol/L}$, respectively. Scratch assay

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2025.03.006

基金项目: 湖北省教育厅科学研究计划指导性项目(B2023110)

通信作者: 李刚 Email: 439653434@qq.com

showed that the migration rate of HepG2 and Huh7 cells gradually decreased with resveratrol concentration increasing. Colony formation assay demonstrated that after treatment with resveratrol at concentrations of 0, 20, 40, and 60 $\mu\text{mol/L}$, the number of HepG2 colonies was 264.64 ± 7.57 , 129.00 ± 11.53 , 33.67 ± 6.03 and 0, respectively, while the number of Huh7 cell colonies was 173.67 ± 6.03 , 115.00 ± 16.7 , 24.00 ± 5.29 and 0, respectively. The differences were statistically significant ($F = 744.2, 227.4$; both $P < 0.001$). Western blot analysis indicated that resveratrol at different concentrations (0, 20, 40, 60 $\mu\text{mol/L}$) inhibited the expression of CD44 and CD133 proteins in both HepG2 and Huh7 cells, with a more pronounced inhibitory effect as the drug concentration increased. **Conclusion** Resveratrol can inhibit the proliferation and migration abilities of liver cancer cells, and can also suppress the expression of liver cancer-related stemness markers CD44 and CD133.

Keywords: Resveratrol; Hepatocellular carcinoma; Cancer stem cells; Stemness

肝癌发病率在全球癌症中居第6位^[1], 复发率高, 预后差^[2]。白藜芦醇作为一种天然多酚类物质, 具有多种药理活性^[3], 包括抗肿瘤、抗炎^[4]、保护心脑血管^[5]、保护神经系统^[6]、保护肝肾功能^[7]、抗衰老^[8]等。在抗肿瘤方面, 白藜芦醇对胃肠道肿瘤^[9]、胰腺癌^[10]、乳腺癌^[11]、肾癌^[12]、肺癌^[13]、骨癌^[14]及淋巴瘤^[15]等均有抑制作用。近年来研究发现肿瘤发生发展与肿瘤干细胞密切相关^[16]。研究表明, 白藜芦醇可抑制肝癌增殖与迁移^[17], 但其是否可通过影响肿瘤干细胞来影响肝癌的发生发展尚不明确, 因此本研究拟探讨白藜芦醇是否可抑制肝癌细胞干性, 以期为后续临床治疗肝癌提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及细胞培养 本实验所用细胞为人肝癌细胞系HepG2和Huh7细胞, 购自中国医学科学院基础研究所。HepG2和Huh7使用含89%的高糖培养基、5%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、1%青霉素-链霉素混合液(penicillin-streptomycin solution, PS)的完全培养基在含5% CO₂的恒温培养箱(37 °C)中培养。

1.2 主要实验仪器及材料 生化培养箱购自恒跃公司HPX系列; CO₂培养箱购自Thermi Fisher公司, 型号HERA cell vios 160i; 电泳仪购自君意公司, 型号JY600C; CD44、CD133抗体购自美国Cell Signaling Technology公司, 白藜芦醇购自上海源叶生物科技有限公司, 高糖培养基购自美国HyClone公司, FBS购自美国Gibco公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞毒性实验 调整细胞悬液浓度为(5~10) × 10³个/ml, 96孔板中每孔加入100 μl 细胞悬液, 周围一圈用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)填充, 设置1组空白组(只加培养

基); 次日, 加入浓度(0、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇处理细胞, 48 h后吸弃原培养液后每孔加入90 μl 无血清培养基及10 μl 噻唑兰(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)溶液(避光), 放入培养箱继续培养4 h后, 小心吸弃上清, 避光下每孔加入150 μl 二甲亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)溶液, 摇床上低速振荡10~15 min溶解结晶, 采用酶标仪检测490 nm处的吸光度, 记录每孔数值, 计算细胞活力及半数抑制浓度(median inhibition concentration, IC₅₀)。

1.3.2 细胞划痕实验 6孔板底面使用马克笔画“十”字作为标记线, 每孔铺约5 × 10⁵个肝癌细胞, 次日细胞长满后使用200 μl 黄色枪头沿标记线做划痕, PBS清洗2~3次后每孔加入1 ml无血清培养基及不同浓度(0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇处理细胞, 培养0、24、48、72 h时分别于倒置显微镜拍照, 使用ImageJ测量划痕面积及长度, 计算出划痕宽度, 统计细胞迁移率。

1.3.3 平板克隆实验 取对数生长期细胞, 经胰酶消化后离心, 弃上清, 加培养基重悬细胞, 计数, 调整细胞浓度为(5~6) × 10³个/ml, 6孔板中每孔加100 μl 细胞悬液及1 ml完全培养基进行培养, 次日换液后每孔加入不同浓度(0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇进行培养, 隔天换液并重新加入药物处理, 培养约2周, 当出现肉眼可见的白色集落时终止培养, PBS清洗2遍, 洗去漂浮细胞后每孔加入1 ml的4%多聚甲醛固定15 min, 再使用结晶紫染色15 min, 清水洗去染色液后室温自然晾干, 拍照, 使用ImageJ计数。

1.3.4 免疫印迹实验 提取细胞蛋白进行凝胶电泳、转膜, 5%牛奶室温下封闭2 h, 一抗4 °C冰箱中孵育12~14 h, 二抗孵育1.5 h, 化学发光试剂A液及B液按照1:1配制显影。使用ImageJ软件进行目的条

带灰度值分析。

1.4 统计学处理 采用GraphPad Prism 9软件进行统计学分析,每个实验均重复3次以上,细胞活力、细胞迁移率、细胞克隆数等均为正态分布的计量资料,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用LSD-*t*检验,细胞活力、细胞迁移率、细胞克隆数等与白藜芦醇浓度的关系采用线性回归分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 白藜芦醇可抑制肝癌细胞的增殖能力 细胞毒性实验表明,不同浓度(0、20、40、80、160、320 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇处理48 h后,HepG2细胞活力分别为100%、(93.43 \pm 1.56)%、(78.46 \pm 2.63)%、(68.39 \pm 2.42)%、(61.69 \pm 3.65)%和(11.71 \pm 1.22)%,Huh7细胞活力分别为100%、(83.67 \pm 4.51)%、(73.39 \pm 3.14)%、(65.15 \pm 4.78)%、(55.33 \pm 3.21)%和(31.38 \pm 2.49)%;HepG2及Huh7细胞的 IC_{50} 分别为145.7 $\mu\text{mol/L}$ 、159.1 $\mu\text{mol/L}$ (图1)。

2.2 白藜芦醇可抑制肝癌细胞的迁移能力 根据白藜芦醇 IC_{50} 值并查阅相关文献,最终选取对细胞毒性较小的药物浓度(20、40、60 $\mu\text{mol/L}$)进行后续实验。细胞划痕实验表明白藜芦醇可抑制细胞迁移能力,且随白藜芦醇浓度升高,其迁移率逐渐下降,见图2、表1。

2.3 白藜芦醇抑制肝癌细胞集落形成能力 平板克隆实验表明,不同浓度(0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇处理后,HepG2克隆数分别为(264.64 \pm 7.57)个、(129.00 \pm 11.53)个、(33.67 \pm 6.03)个、0个,Huh7细胞克隆数分别为(173.67 \pm 6.03)个、(115.00 \pm 16.7)个、(24.00 \pm 5.29)个、0个,差异均有统计学意义(F 值分别为744.2、227.4, P 均 < 0.001),提示其可抑制HepG2及Huh7细胞集落形成能力,且呈浓度依赖关系(R^2 分别为0.9344、0.9428, P 均 < 0.001),见图3。

2.4 白藜芦醇下调CD44及CD133蛋白的表达 免疫印迹实验表明,不同浓度(0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$)白藜芦醇均可抑制HepG2及Huh7中CD44及CD133蛋白表达,且随药物浓度增加,其抑制效果更明显,见图4。

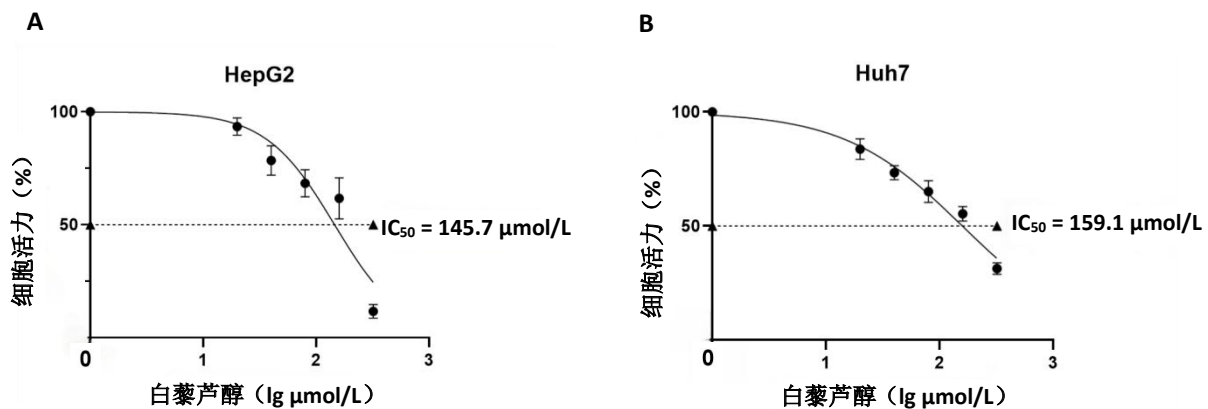


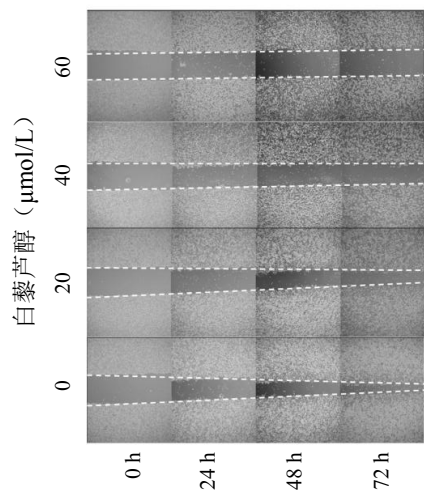
图1 白藜芦醇处理48 h后对HepG2(A)及Huh7(B)细胞活力的影响

注:经白藜芦醇处理48 h后,HepG2及Huh7细胞增殖均被抑制,3次数据拟合结果显示HepG2及Huh7细胞 IC_{50} 分别为145.7 $\mu\text{mol/L}$ 和159.1 $\mu\text{mol/L}$ 。

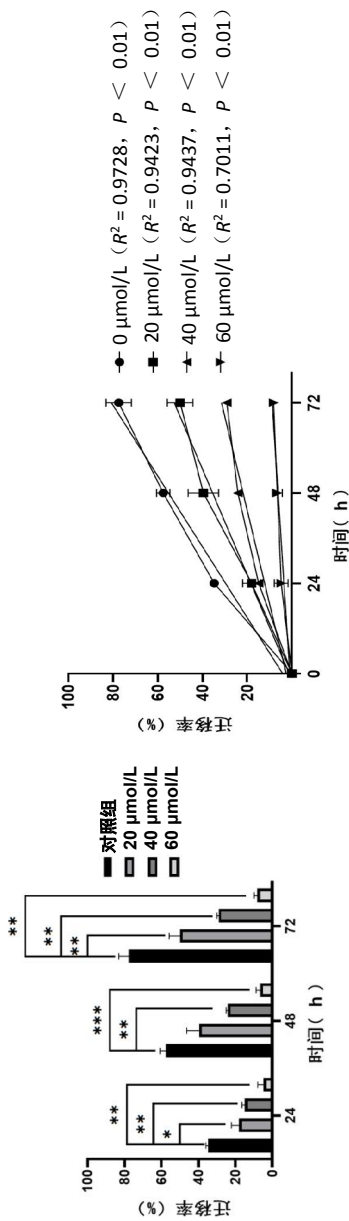
表1 不同浓度白藜芦醇处理后HepG2和Huh7细胞迁移率($\bar{x} \pm s$,%)

项目	白藜芦醇				F 值	P 值
	0 $\mu\text{mol/L}$	20 $\mu\text{mol/L}$	40 $\mu\text{mol/L}$	60 $\mu\text{mol/L}$		
HepG2						
24 h	34.70 \pm 1.27	18.08 \pm 4.06	14.85 \pm 1.73	4.78 \pm 3.12	48.96	0.016
48 h	57.62 \pm 3.04	39.60 \pm 6.86	24.17 \pm 0.81	6.50 \pm 2.33	74.89	0.010
72 h	77.53 \pm 5.66	50.02 \pm 5.81	29.09 \pm 1.03	8.23 \pm 1.72	167.6	0.002
Huh7						
24 h	21.57 \pm 5.77	19.60 \pm 7.87	8.60 \pm 2.55	3.10 \pm 0.56	19.72	0.040
48 h	53.24 \pm 2.90	26.30 \pm 8.17	16.89 \pm 4.94	4.69 \pm 0.53	54.10	0.013
72 h	77.99 \pm 6.78	31.58 \pm 8.72	22.49 \pm 7.32	6.11 \pm 0.29	67.29	0.014

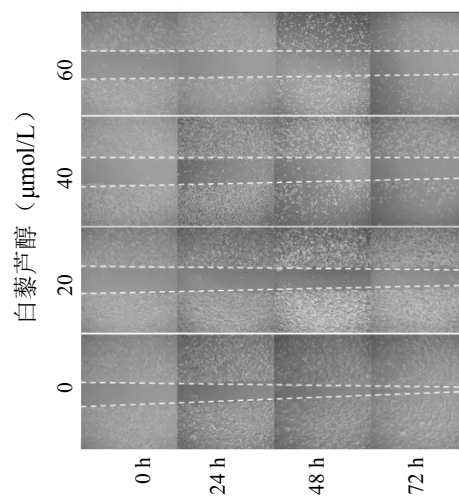
A



HepG2



B



Huh7

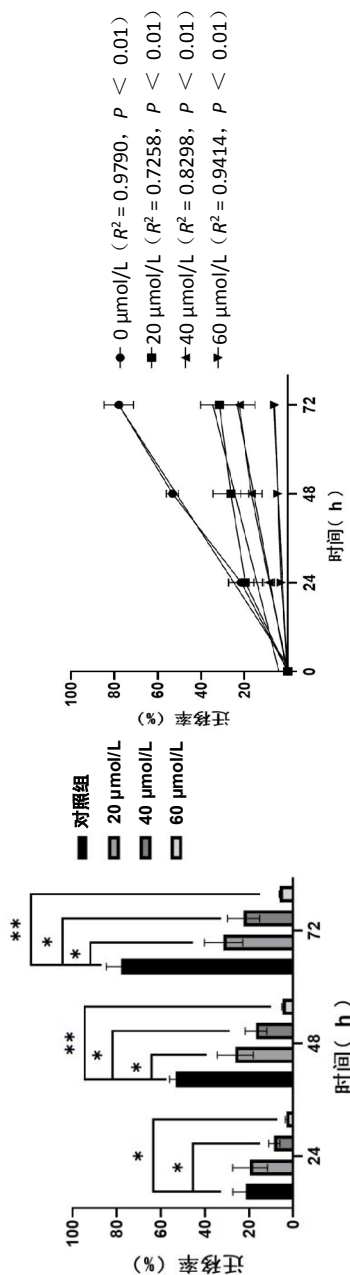


图2 白藜芦醇抑制 HepG2(A) 及 Huh7(B) 细胞的迁移能力

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

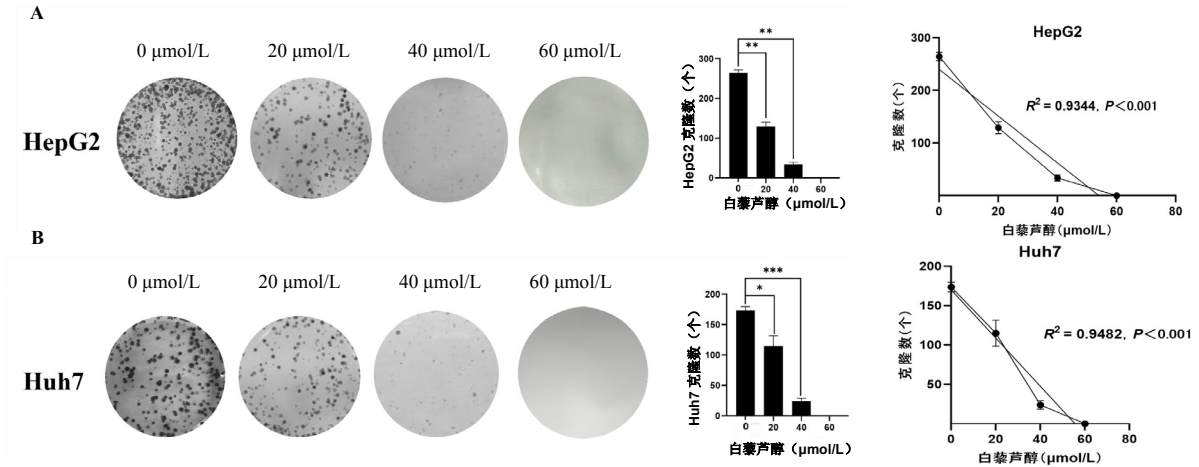


图3 不同浓度白藜芦醇抑制 HepG2 (A) 及 Huh7 (B) 细胞集落形成能力
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

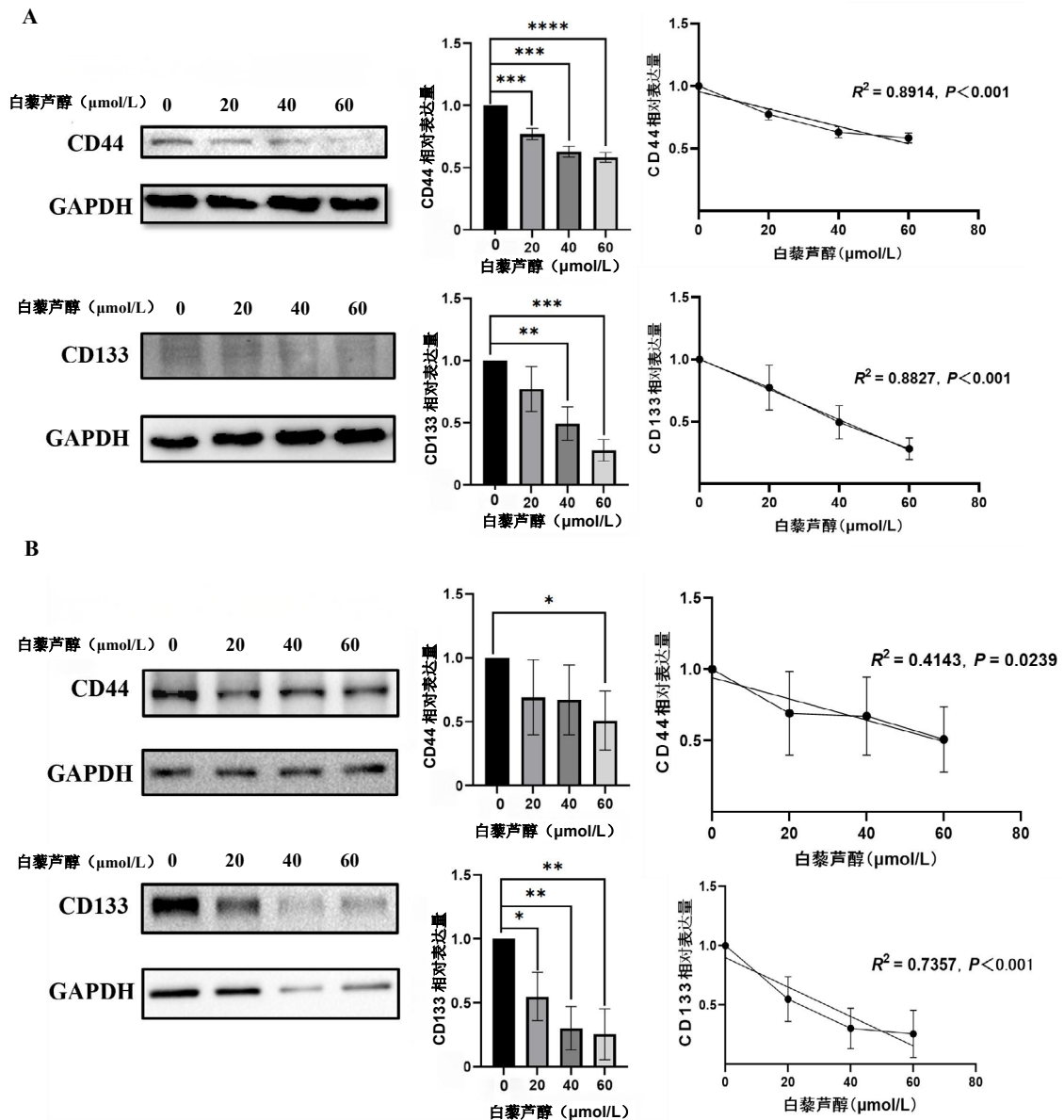


图4 不同浓度白藜芦醇抑制 HepG2 (A) 及 Huh7 (B) 细胞 CD44、CD133 的表达
注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

肝细胞癌是最常见的肝癌类型^[18], 严重危害人体健康, 现有治疗方案效果欠佳^[19]。寻找新的治疗药物至关重要。肿瘤干细胞(cancer stem cell, CSC)相较于已分化完成的肿瘤细胞具有更强的进化及适应能力, 是恶性肿瘤易复发及转移的重要原因^[20]。因靶向CSC可消除肿瘤起始细胞, 能从根源上减少肿瘤复发与转移, 是目前的研究热点。CSC筛选较困难, 大多依靠CSC表面特殊标志物, 目前已发现的常见肝癌干细胞(liver cancer stem cell, LCSC)表面标志物主要有CD44^[21]、CD133^[22]、CD24等^[23]。本研究表明, 白藜芦醇可在体外抑制肝癌细胞的细胞活力、迁移能力及细胞集落形成能力。Western blot表明白藜芦醇可抑制HepG2及Huh7细胞CD44、CD133蛋白表达, 即可抑制肝癌细胞干性。近年来, 对白藜芦醇抗肿瘤(包括消化系统、神经系统、生殖系统等多系统肿瘤)作用的研究局限于体外实验, 且其在生物体内利用度较低, 是否可作为靶向LCSC药物来发挥抗肝癌作用仍需相关临床试验证实^[24]。近年来虽有纳米药物^[25]、脂质体、固体分散体等方法来改善其生物利用度^[26], 但技术仍不成熟且成本较高, 且白藜芦醇抑制LCSC的具体通路仍未明确, 仍需继续完善相关研究为白藜芦醇靶向LCSC治疗提供更确切的依据。

利益冲突 所有作者声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] KHAN A, DHIR M. An update on the global trends in the burden of primary liver cancers[J]. *J Surg Oncol*,2023,128(6):972-979.
- [2] 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.
- [3] WU S X, XIONG R G, HUANG S Y, et al. Effects and mechanisms of resveratrol for prevention and management of cancers: an updated review[J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*,2023,63(33):12422-12440.
- [4] YANG C, LUO P, CHEN S, et al. Resveratrol sustains intestinal barrier integrity, improves antioxidant capacity, and alleviates inflammation in the jejunum of ducks exposed to acute heat stress[J]. *Poult Sci*,2021,100(11):101459.
- [5] JING Y, HU T, LIN C, et al. Resveratrol downregulates PCSK9 expression and attenuates steatosis through estrogen receptor α -mediated pathway in L02 cells[J]. *Eur J Pharmacol*,2019,855:216-226.
- [6] HAN Y, CHU X, CUI L, et al. Neuronal mitochondria-targeted therapy for Alzheimer's disease by systemic delivery of resveratrol using dual-modified novel biomimetic nanosystems[J]. *Drug Deliv*,2020,27(1):502-518.
- [7] YILMAZ N, YILMAZ A F, ILHAN Y S. Resveratrol ameliorates hepatic injury and modulates hepatic biomarkers of regeneration,

- apoptosis and survival in a rat model of blunt hepatic trauma[J]. *Bratisl Lek Listy*,2020,121(7):512-515.
- [8] UDDIN M J, FARJANA M, MONI A, et al. Prospective pharmacological potential of resveratrol in delaying kidney aging[J]. *Int J Mol Sci*,2021,22(15):8258.
- [9] SU N, LI L, ZHOU E, et al. Resveratrol downregulates miR-155-5p to block the malignant behavior of gastric cancer cells[J]. *Biomed Res Int*,2022,2022:6968641.
- [10] QIAN W, XIAO Q, WANG L, et al. Resveratrol slows the tumorigenesis of pancreatic cancer by inhibiting NF κ B activation[J]. *Biomed Pharmacother*,2020,127:110116.
- [11] ALKHARASHI N A. Efficacy of resveratrol against breast cancer and hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Saudi Med J*,2023,44(3):246-252.
- [12] DAI L, CHEN L, WANG W, et al. Resveratrol inhibits ACHN cells via regulation of histone acetylation[J]. *Pharm Biol*,2020,58(1):231-238.
- [13] LI W, LI C, MA L, et al. Resveratrol inhibits viability and induces apoptosis in the small-cell lung cancer H446 cell line via the PI3K/Akt/c-Myc pathway[J]. *Oncol Rep*,2020,44(5):1821-1830.
- [14] HAO M, TANG Q, WANG B, et al. Resveratrol suppresses bone cancer pain in rats by attenuating inflammatory responses through the AMPK/Dmp1 signaling[J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*,2020,52(3):231-240.
- [15] YANG Y, PAIK J H, CHO D, et al. Resveratrol induces the suppression of tumor-derived CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. *Int Immunopharmacol*,2008,8(4):542-547.
- [16] WANG Z, LI R, YANG G, et al. Cancer stem cell biomarkers and related signalling pathways[J]. *J Drug Target*,2024,32(1):33-44.
- [17] ZHANG Q, HUANG H, ZHENG F, et al. Resveratrol exerts antitumor effects by downregulating CD8⁺ CD122⁺ Tregs in murine hepatocellular carcinoma[J]. *OncoImmunology*,2020,9(1):1829346.
- [18] SINGAL A G, KANWAL F, LLOVET J M. Global trends in hepatocellular carcinoma epidemiology: implications for screening, prevention and therapy[J]. *Nat Rev Clin Oncol*,2023,20(12):864-884.
- [19] 袁振刚, 叶胜龙. 肝细胞癌系统治疗策略: 现状和前景[J]. *中华肝脏病杂志*,2024,32(6):565-571.
- [20] LIU Y C, YE H C T, LIN K H. Cancer stem cell functions in hepatocellular carcinoma and comprehensive therapeutic strategies[J]. *Cells*,2020,9(6):1331.
- [21] WANG H C, HAUNG L Y, WANG C J, et al. Tumor-associated macrophages promote resistance of hepatocellular carcinoma cells against sorafenib by activating CXCR2 signaling[J]. *J Biomed Sci*,2022,29(1):99.
- [22] ZHOU L, YU K H, WONG T L, et al. Lineage tracing and single-cell analysis reveal proliferative Prom1⁺ tumour-propagating cells and their dynamic cellular transition during liver cancer progression[J]. *Gut*,2022,71(8):1656-1668.
- [23] XIA P, LIU D H. Cancer stem cell markers for liver cancer and pancreatic cancer[J]. *Stem Cell Res*,2022,60:102701.
- [24] REN B, KWAH M X Y, LIU C, et al. Resveratrol for cancer therapy: challenges and future perspectives[J]. *Cancer Lett*,2021,515:63-72.
- [25] SONG Y, ZHANG J, ZHU L, et al. Recent advances in nanodelivery systems of resveratrol and their biomedical and food applications: a review[J]. *Food Funct*,2024,15(17): 8629-8643.
- [26] BEN DASSI R, IBIDHI S, JEMAI H, et al. Resveratrol: challenges and prospects in extraction and hybridization with nanoparticles, polymers, and bio-ceramics[J]. *Phytother Res*,2024,38(11):5309-5322.

收稿日期: 2024-10-12

卢钊锋, 雷飞飞, 高媛, 等. 白藜芦醇对肝癌细胞干性的抑制作用[J/CD]. *中国肝脏病杂志(电子版)*, 2025,17(3): 40-45.