

斑蝥酸钠维生素B₆注射液对人肝癌细胞的作用及其机制

思兰兰^{1,2}, 许文¹, 李乐¹, 纪冬³, 陈雪媛¹, 戴久增¹, 姚增涛¹, 陈威巍^{1*}, 刘妍^{1*}

¹解放军总医院第五医学中心感染病医学部, 北京 100039; ²广州医科大学研究生院, 广东广州 511436; ³解放军总医院第五医学中心肝病医学部, 北京 100039

[中图分类号] R512.62 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.0422.2025.0512

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 思兰兰, 许文, 李乐, 等. 斑蝥酸钠维生素B₆注射液对人肝癌细胞的作用及其机制[J]. 解放军医学杂志, 2025, 50(6): 747-755.

[收稿日期] 2025-03-11 [录用日期] 2025-04-06 [上线日期] 2025-05-12

[摘要] **目的** 分析斑蝥酸钠维生素B₆注射液(SCV)对4种人肝癌细胞(SMMC-7721、Bel-7402、Huh7、HepG2)的作用及其机制。**方法** 设置未用药对照组(0 μmol/L)和0.5、1、2、4、8、16、32 μmol/L SCV组, 处理正常肝细胞系L02, 采用CCK-8法检测SCV对L02细胞的毒性作用。培养人肝癌细胞系SMMC-7721、Bel-7402、Huh7、HepG2, 设置未用药对照组(0 μmol/L)和2、4、8 μmol/L SCV组。采用CCK-8法、平板克隆实验、Transwell实验和细胞划痕实验、流式细胞实验分别检测SCV对4种肝癌细胞的生长增殖能力、细胞克隆形成能力、细胞侵袭和迁移能力、细胞周期和细胞凋亡的影响。采用Western blotting检测凋亡相关的核因子κB亚基p65(p65)、B细胞淋巴瘤2家族蛋白质(Bcl-2)和胱天蛋白酶-3(Caspase-3)的表达情况, 并初步探索其作用机制。**结果** CCK-8法检测结果显示, 与未用药对照组(0 μmol/L)比较, 0.5、1、2、4、8 μmol/L SCV对L02细胞无明显的毒性作用, 选择2、4、8 μmol/L SCV进行后续实验。与未用药对照组(0 μmol/L)比较, 不同浓度(2、4、8 μmol/L)的SCV均可明显抑制4种肝癌细胞的增殖能力($P < 0.001$)。平板克隆实验结果显示, 与未用药对照组(0 μmol/L)比较, 不同浓度(2、4、8 μmol/L)的SCV均可明显降低4种肝癌细胞的克隆形成能力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。此外, Transwell和细胞划痕实验结果显示, 与未用药对照组(0 μmol/L)比较, 不同浓度(2、4、8 μmol/L)的SCV可明显抑制肝癌细胞的侵袭和迁移($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。在上述结果中, SCV的抑制作用均呈浓度依赖性。流式细胞检测结果显示, SCV可将细胞阻滞于G₂/M期($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 并可明显促进细胞凋亡($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$)。Western blotting检测结果显示, SCV可明显下调p65($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)和Bcl-2的表达($P < 0.05$), 上调Caspase-3的表达($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论** SCV可明显抑制多种人肝癌细胞的增殖、克隆形成、侵袭和迁移, 并可阻滞细胞周期进程。SCV可能通过抑制p65、Bcl-2的表达, 从而解除其对凋亡通路的抑制作用, 进而激活Caspase-3促进凋亡的发生。

[关键词] 斑蝥酸钠维生素B₆注射液; 人肝癌细胞系; 细胞增殖; 细胞周期; 细胞凋亡

Effect of sodium cantharidinate and vitamin B₆ injection on human hepatocellular carcinoma cells and its mechanism

Si Lan-Lan^{1,2}, Xu Wen¹, Li Le¹, Ji Dong³, Chen Xue-Yuan¹, Dai Jiu-Zeng¹, Yao Zeng-Tao¹, Chen Wei-Wei^{1*}, Liu Yan^{1*}

¹Senior Department of Infectious Diseases, ³Senior Department of Hepatology, the Fifth Medical Center of Chinese PLA General Hospital, Beijing 100039, China

²Graduate School of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 511436, China

*Corresponding author. Liu Yan, E-mail: liuyan5360@163.com; Chen Wei-Wei, E-mail: cww302@126.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82470632, 81721002)

[Abstract] **Objective** To analyze the effect of sodium cantharidinate and vitamin B₆ injection (SCV) on four human hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines (SMMC-7721, Bel-7402, Huh7, and HepG2) and explore its mechanism. **Methods** Normal hepatic cell line L02 was treated with SCV at concentrations of 0 μmol/L (control), 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, and 32 μmol/L, and the cytotoxicity of SCV on L02 cells was detected using CCK-8 assay. Human HCC cell lines (SMMC-7721, Bel-7402, Huh7, and

[基金项目] 国家自然科学基金(82470632, 81721002)

[作者简介] 思兰兰, 博士研究生, 主要从事传染病和肝病的基础及临床方面的研究

[通信作者] 刘妍, E-mail: liuyan5360@163.com; 陈威巍, E-mail: cww302@126.com

HepG2) were cultured. SCV-untreated control group (0 $\mu\text{mol/L}$) and 2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$ SCV-treated groups were set up. CCK-8 assay, plate cloning formation assay, Transwell assay, wound healing assay, and flow cytometry were used to detect the effects of SCV on the growth and proliferation capacity, colony formation ability, invasion and migration capabilities, cell cycle, and apoptosis of the four hepatocellular carcinoma cell lines, respectively. Western blotting was performed to detect the expression levels of apoptosis-related proteins, including nuclear factor kappa-B subunit p65 (p65), B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), and Caspase-3, and to preliminarily explore the underlying mechanism. **Results** The CCK-8 assay showed that SCV at 0.5, 1, 2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$ had no significant cytotoxic effect on L02 cells compared with untreated control group, so 2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$ SCV were selected for subsequent experiments. Compared with the untreated control group (0 $\mu\text{mol/L}$), SCV at different concentrations (2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the proliferation of the four HCC cell lines ($P<0.001$). The plate cloning formation assay showed that SCV at different concentrations (2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$) significantly reduced the colony formation ability of the four HCC cell lines ($P<0.05$ or $P<0.01$ or $P<0.001$). In addition, Transwell and wound healing assays revealed that SCV at different concentrations (2, 4, and 8 $\mu\text{mol/L}$) significantly inhibited the invasion and migration of HCC cells ($P<0.05$ or $P<0.01$ or $P<0.001$). In the above results, the inhibitory effect of SCV was concentration-dependent. Flow cytometry analysis indicated that SCV arrested cells in the G_2/M phase ($P<0.05$ or $P<0.01$ or $P<0.001$) and significantly promoted cell apoptosis ($P<0.05$ or $P<0.01$ or $P<0.001$). Western blotting showed that SCV significantly down-regulated the expression of p65 ($P<0.05$ or $P<0.01$) and Bcl-2 ($P<0.05$), and up-regulated the expression of Caspase-3 ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusions** SCV can significantly inhibit the proliferation, colony formation, invasion, and migration of multiple human HCC cell lines and arrest the cell cycle. SCV may inhibit the expression of p65 and Bcl-2, thereby lifting their inhibitory effect on the apoptotic pathway and activating Caspase-3 to promote apoptosis.

[Key words] sodium cantharidinate and vitamin B₆ injection; human hepatocellular carcinoma cell lines; cell proliferation; cell cycle; cell apoptosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球范围内最常见的原发性肝恶性肿瘤, 约占所有肝癌病例的90%^[1]。我国2024年公布的癌症数据显示, 肝癌是发病率第4位、死亡率第2位的恶性肿瘤, 严重危害国民的健康^[2]。原发性肝癌诊疗指南(2024版)提出以手术治疗为基础的HCC综合治疗策略虽提升了诊疗水平, 但仍面临诸多挑战, 大多数系统性治疗的效果尚待提升^[3]。近年来, 中药或其提取物在HCC治疗中的应用越来越受到关注, 新版指南也倡导中药结合现代医学技术形成系统方案, 中药不仅在缓解症状和提高患者生活质量方面显示出积极作用, 还在减少化疗和放疗的不良反应方面效果显著^[4]。例如, 石皮消积方能够通过诱导铁死亡来抑制HCC细胞的增殖和迁移^[5]。商陆中的活性成分黄姜味草醇可通过靶向磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)通路, 有效抑制HCC的生长^[6]。大黄廑虫丸也在HCC的辅助治疗中显示出良好的疗效^[7]。

斑蝥酸钠维生素B₆注射液(sodium cantharidinate and vitamin B₆ injection, SCV)是斑蝥酸钠与维生素B₆通过螯合作用形成, 研究显示, SCV联合经典放化疗不仅可增强对HCC的治疗效果, 还可减少放化疗相关的不良反应, 改善患者生活质量和免疫功能^[8]; 但其体外抗HCC机制研究少见报道, 或仅限于1或2个肿瘤表型^[9]。本研究同时在4种肝癌细胞系水平, 分别从增殖、克隆形成、侵袭、迁移、周期、凋亡

等多种肿瘤表型角度, 全面分析SCV对HCC细胞生长的抑制作用, 并初步探讨其机制, 旨在为肝癌的治疗提供实验基础, 也为其临床应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞及主要试剂 人肝癌细胞系SMCC-7721、Bel-7402、Huh7、HepG2和正常人肝细胞系L02均为解放军总医院第五医学中心感染病研究所实验室保存; 胎牛血清及高糖DMEM培养基购自美国Gibco公司; SCV由贵州柏强制药股份有限公司馈赠; CCK-8检测试剂购自上海翊圣生物科技有限公司; Transwell小室购自美国Corning公司; DAPI染料和0.5%结晶紫染液购自上海碧云天生物技术有限公司; 伤口愈合插件购自德国Ibidi公司; 细胞周期检测试剂、Annexin V-PE/7-AAD细胞凋亡检测试剂、蛋白裂解液RIPA(强)购自苏州碧云天生物技术有限公司; 抗核因子 κB 亚基p65(nuclear factor kappa B subunit p65, p65)、B细胞淋巴瘤2家族蛋白质(B cell lymphoma 2 family protein, Bcl-2)、胱天蛋白酶-3(Caspase-3)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体购自美国CST公司; HRP标记山羊抗小鼠IgG(H+L)抗体购自北京全式金生物技术股份有限公司; ECL化学发光显色液购自美国Thermo公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SMCC-7721、Bel-7402、Huh7、HepG2、L02细胞在含10%胎牛血清的DMEM中于

37 ℃、5% CO₂饱和湿度条件下培养，细胞贴壁生长，每2~3 d传代1次。

1.2.2 CCK-8法检测细胞增殖情况

1.2.2.1 SCV对L02细胞的毒性实验及浓度的选择

取对数生长期L02细胞按 1×10^4 个/孔接种于96孔板中。实验分为未用药对照组(0 μmol/L)与不同浓度(0.5、1、2、4、8、16、32 μmol/L) SCV组，每组设置3个平行孔。每组加药处理24、48、72、96 h，培养基和CCK-8试剂按照1:10比例混合均匀，按照100 μl/孔的体积加入CCK-8混合液，继续培养2 h后震荡混匀；用酶标仪在450 nm波长下测定各孔吸光度值(OD)，计算SCV对细胞存活率的影响，以评价SCV对正常肝细胞的毒性作用。细胞存活率(%)= $\frac{OD_{\text{实验组}}}{OD_{\text{对照组}}} \times 100\%$ 。

1.2.2.2 细胞增殖实验 取对数生长期的4种肝癌细胞按 1×10^4 个/孔接种于96孔板中。据参考文献[10]及SCV对L02细胞的毒性作用结果，本研究选择SCV的实验浓度分别为2、4、8 μmol/L。实验分为未用药对照组(0 μmol/L)和2、4、8 μmol/L SCV组，分别处理24、48、72、96 h，培养基和CCK-8试剂按照1:10比例混合均匀，按照100 μl/孔的体积加入CCK-8混合液，继续培养2 h后震荡混匀，用酶标仪在450 nm波长下测定各孔OD值。通过细胞存活率评价SCV对4种肝癌细胞增殖的影响。细胞存活率(%)= $\frac{OD_{\text{实验组}}}{OD_{\text{对照组}}} \times 100\%$ 。

1.2.3 细胞克隆形成实验 取对数生长期的4种肝癌细胞消化离心，用未用药对照组(0 μmol/L)的DMEM培养基和含2、4、8 μmol/L SCV的DMEM培养基重悬细胞，SMCC-7721和Bel-7402细胞以300个/孔、Huh7细胞以400个/孔、HepG2细胞以250个/孔的量分别接种于12孔板中，摇晃均匀，置于细胞培养箱常规培养14 d，当出现肉眼可见的克隆时终止培养，弃培养基，1×PBS洗2次，4%多聚甲醛溶液800 μl固定15 min，弃固定液，加入1 ml 0.5%结晶紫，染色20 min，自来水冲洗，空气干燥，计数细胞形成克隆数，评价SCV对细胞克隆形成情况的影响。

1.2.4 Transwell细胞侵袭实验 准备对数生长期的4种肝癌细胞，细胞铺板前撤血清饥饿24 h，去除血清的影响。设置未用药对照组(0 μmol/L)和2、4、8 μmol/L SCV组，向细胞中加入含2% FBS的不同浓度的SCV或未含药的DMEM培养基重悬细胞，细胞浓度控制在 5×10^5 个/ml，SCV组和未用药对照组(0 μmol/L)细胞浓度保持一致。细胞计数，将预先包被基质胶的Transwell小室放入24孔板，向Transwell上室中加入 5×10^3 个细胞，上室加入的体积为100~200 μl。下室加入600 μl含20% FBS的含药或

未含药的DMEM培养基。37 ℃ CO₂恒温箱中培养，SMCC-7721、Bel-7402、Huh7、HepG2侵袭具体时间分别为18、30、20、20 h，每组设置3个复孔。待上述细胞分别侵袭18、30、20、20 h后取出小室，吸干上室培养液，置于4 ℃的4%多聚甲醛溶液中固定15 min，吸干多聚甲醛并晾干，将Transwell孔倒置，滴加约50 μl的0.5%结晶紫染色并晾干，清水清洗后用棉签擦净上室内部细胞，吸水纸轻轻擦拭上室下表面。打开PS-DSB2软件，将设置调在显微镜和相机同时观测状态。将Transwell孔倒置在载玻片上自然光下拍照，拍摄固定位置5个视野进行后续的定量分析，以评价SCV对细胞侵袭情况的影响。

1.2.5 细胞划痕愈合实验 计数对数生长期的4种肝癌细胞并调整浓度为 3×10^5 个/ml，细胞划痕插件放入12孔板中，每个插件内室中加入70 μl细胞悬液。37 ℃ CO₂恒温箱中培养至细胞贴壁，当所有细胞贴壁后用镊子将插件拔出，加入新鲜的含2、4、8 μmol/L不同浓度的SCV培养基及未用药对照组(0 μmol/L)培养基，观察细胞48 h的迁移情况，并采集0、48 h的划痕图像。ImageJ软件进行划痕图像分析，计算划痕愈合百分比，以评价SCV对细胞划痕愈合能力的影响。划痕愈合百分比(%)= $\frac{(0 \text{ h 划痕面积} - 48 \text{ h 的划痕面积})}{0 \text{ h 划痕面积}} \times 100\%$ 。

1.2.6 细胞周期实验 计数对数生长期的4种肝癌细胞并按 2×10^5 个/孔接种于6孔板中，分别使用0(未用药对照组)、2、4、8 μmol/L不同浓度的SCV处理24 h后，胰酶消化1 min，收集细胞并转移到微量离心管(EP)中，3000 r/min离心3 min。离心后的细胞用100 μl 1×PBS悬浮，将细胞滴入1 ml预冷的70%乙醇(用双蒸水配置)中，-20 ℃固定过夜。3000 r/min离心3 min，1×PBS洗涤2次。留100 μl 1×PBS细胞悬浮液，按照细胞周期检测试剂盒说明书配制碘化丙啶(PI)染色液，每管细胞样品中加入0.5 ml PI染色液，缓慢并充分重悬细胞沉淀，37 ℃避光30 min。用PI染色15 min后进行流式检测。采用MFLT32软件进行细胞DNA含量分析和光散射分析，根据细胞周期各期的分布特征评价SCV对细胞周期的影响。

1.2.7 细胞凋亡实验 计数对数生长期的4种肝癌细胞并按 4×10^5 个/孔接种于6孔板中，加入新鲜的含2、4、8 μmol/L不同浓度的SCV培养基，未用药对照组(0 μmol/L)培养基平行加入实验，60 h后用预冷1×PBS洗涤、消化、离心细胞，同时收集(1~10)× 10^5 个细胞(包括培养上清中的细胞)。按照细胞凋亡试剂盒的操作说明，用双蒸水稀释5×结合缓冲液为1×工作液，取500 μl 1×结合缓冲液重悬细胞。每管加入5 μl Annexin V-APC和10 μl 7-AAD。轻柔涡旋混

匀后, 室温避光孵育 5 min, 流式检测细胞凋亡情况, FlowJo 7.6.1 分析流式检测结果。根据细胞凋亡率评价 SCV 对细胞凋亡的影响。

1.2.8 Western blotting 检测目标蛋白的表达 将 HepG2 细胞按照 4×10^5 个/孔接种于 12 孔板中, 细胞贴壁后, 分别加入 0 (未用药对照组)、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 不同浓度的 SCV, 置于 37°C 、5% CO_2 条件下培养 48 h, 使用蛋白裂解液提取细胞蛋白, 离心后取上清, 加入蛋白上样缓冲液煮沸 10 min。使用 12.5% 的 SDS-PAGE 凝胶进行蛋白电泳、转膜, 封闭, 一抗[P65(1:1000)、Bcl-2(1:1000)、Caspase-3(1:1000)、GAPDH(1:1000)]孵育、洗脱、二抗[辣根过氧化物酶偶联的鼠 IgG(1:1000)]孵育、洗脱, 采用 ECL 显色在 Tanon5200 全自动化学发光仪上进行蛋白成像分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析。上述细胞实验均独立重复 3 次。所有数据经 Shapiro-Wilk 检验符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用两因素方差分析, 进一步两两比较采用 Dunnett' *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 SCV 对正常 L02 细胞毒性的影响 CCK-8 法检测结果显示, 与未用药对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较, 0.5、1、2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 SCV 处理正常 L02 肝细胞 24、48、72、96 h 后, 细胞存活率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 提示 8 $\mu\text{mol/L}$ 为安全浓度, 故将后续实验中的 SCV 浓度分别设定为 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$; 而与未用药对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较, 16 $\mu\text{mol/L}$ SCV 在 48 h 出现明显细胞毒性 ($P < 0.05$), 72 h ($P < 0.01$) 和 96 h ($P < 0.001$) 细胞毒性明显增强; 32 $\mu\text{mol/L}$ SCV 在 24 h 即出现明显细胞毒性作用 ($P < 0.001$) (附图 1, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0422.2025.0512FJ>)。

2.2 SCV 对肝癌细胞增殖的影响 CCK-8 法检测结果显示, 与未用药对照组比较, 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ SCV 处理细胞 24、48、72、96 h 均可明显抑制 4 种肝癌细胞的增殖 ($P < 0.001$), 呈现剂量依赖性抑制作用, 且用药时间越长, 抑制增殖的能力越强 (图 1)。

2.3 SCV 对肝癌细胞克隆形成能力的影响 结晶紫

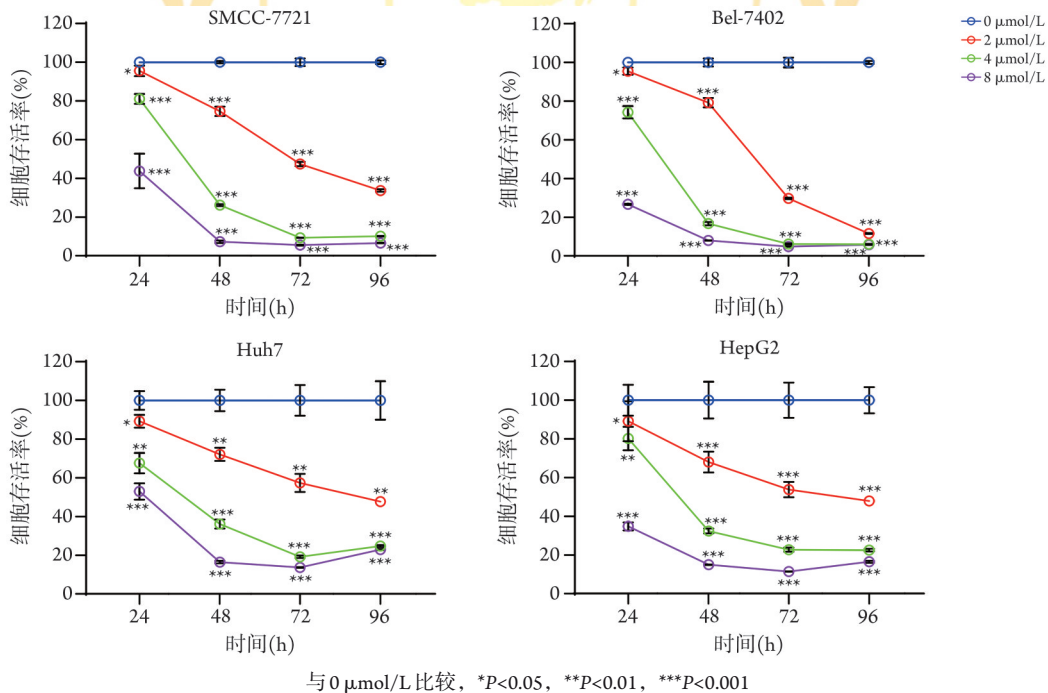
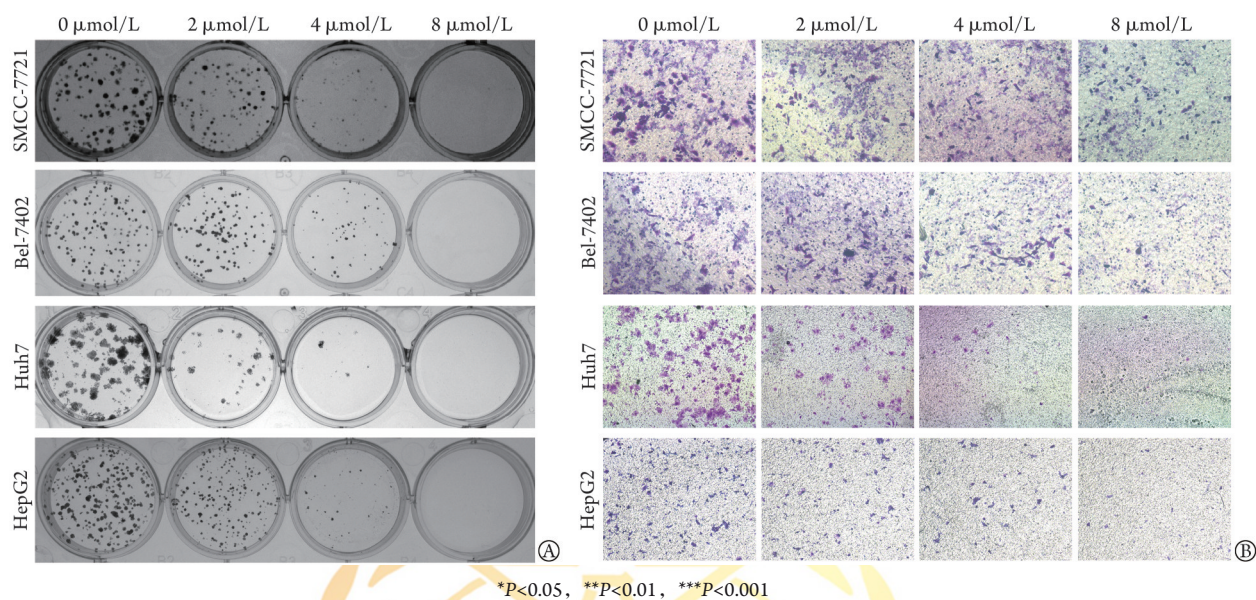


图 1 斑螋酸钠维生素 B₆ 注射液 (SCV) 对 SMCC-7721、Bel-7402、Huh7、HepG2 细胞增殖的影响

Fig. 1 Effects of sodium cantharidate and vitamin B₆ injection (SCV) on the proliferation of SMCC-7721, Bel-7402, Huh7, and HepG2 cells

染色后平板克隆形成实验结果显示, 与未用药对照组比较, 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ SCV 可明显抑制 SMCC-7721 细胞的克隆形成能力 ($P < 0.001$), 且这种抑制作用与 Bel-7402 细胞 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、Huh7 细胞 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$) 和 HepG2 细胞 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$) (图 2A) (附图 2A, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0422.2025.0512FJ>) 一致。

2.4 SCV 对肝癌细胞侵袭能力的影响 Transwell 实验结果显示, 与未用药对照组比较, 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ SCV 处理 SMCC-7721 细胞 18 h 后, 可明显抑制 SMCC-7721 细胞的侵袭能力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 处理 Bel-7402 细胞 30 h 后, 可明显抑制 Bel-7402 细胞的侵袭能力 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.001$); 处理 Huh7 细胞 20 h 后, 可明显抑制 Huh7 细胞的侵袭能



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图2 斑蝥酸钠维生素 B_6 注射液(SCV)对SMCC-7721、Bel-7402、Huh7、HepG2细胞克隆形成能力(A)、细胞迁移能力(B)的影响

Fig.2 Effects of sodium cantharidinate and vitamin B_6 injection (SCV) on cell colony formation (A) and migration (B) of SMCC-7721, Bel-7402, Huh7, and HepG2 cells

力($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 处理 HepG2 细胞 20 h 后, 可抑制 HepG2 细胞的侵袭能力($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(图 2B)(附图 2B, <https://dx.doi.org/10.11855/j.issn.0577-7402.0422.2025.0512FJ>), 上述抑制作用均呈现浓度依赖性。

2.5 SCV 对肝癌细胞迁移能力的影响 细胞划痕愈合实验结果显示, 与未用药对照组比较, 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ SCV 处理后, SMCC-7721、Bel-7402、Huh7 和 HepG2 细胞的愈合能力均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$); 其中, 在 SMCC-7721 细胞中, 与未用药对照组比较, 8 $\mu\text{mol/L}$ SCV 组细胞愈合的抑制效果最明显($P < 0.001$, 图 3A), 且与 Bel-7402($P < 0.01$, 图 3B)、Huh7($P < 0.001$, 图 3C)和 HepG2 细胞($P < 0.01$, 图 3D)一致。

2.6 SCV 对肝癌细胞周期的影响 流式检测细胞周期结果显示, 与未用药对照组比较, 4、8 $\mu\text{mol/L}$ SCV 处理均可明显减少 4 种肝癌细胞 G_0/G_1 期细胞比例($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 增加 S 期和 G_2/M 期细胞比例($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$), 提示细胞周期被阻滞在 S 期或 G_2/M 期(图 4A-D)。

2.7 SCV 对肝癌细胞凋亡的影响 流式细胞检测结果显示, 与未用药对照组比较, 在 SMCC-7721、Bel-7402、HepG2 细胞中, 4、8 $\mu\text{mol/L}$ SCV 组细胞凋亡率均明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$, 图 5A、B、D); 而在 Huh7 细胞中, 与未用药对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)比较, 2、4、8 $\mu\text{mol/L}$ SCV 组细胞凋亡率均明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 或 $P < 0.001$, 图 5C)。

2.8 SCV 对 HepG2 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

Western blotting 检测结果显示, 与未用药对照组比较, 4、8 $\mu\text{mol/L}$ SCV 组的抗凋亡蛋白 p65、Bcl-2 蛋白相对表达水平明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 凋亡蛋白 Caspase-3 表达水平明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(图 6)。

3 讨 论

斑蝥素是中药斑蝥的主要有效成分, 已被证实具有明显的抗肿瘤特性, 但因其不良反应较多限制了其临床应用^[11-15]。鉴于此, 开发的半合成衍生物斑蝥酸钠在保留斑蝥素抗肿瘤活性的同时显著降低了其毒性, 临床上已用于多种恶性肿瘤的治疗^[16-18], 但单独使用仍然存在安全隐患。SCV 通过将斑蝥酸钠和维生素 B_6 配伍, 结合了两者的优势: 不仅充分发挥了斑蝥酸钠通过 DNA 损伤、干扰细胞周期、激活氧化应激以及促进细胞凋亡等多途径的抗肿瘤作用^[19], 更借助维生素 B_6 的代谢调节功能有效减轻了不良反应^[20-21]。SCV 的这种药物组合策略为中药抗肿瘤治疗提供了新的解决方案。与单一成分的中药提取物相比, 如黄芪多糖的免疫调节作用^[22]或其他植物提取物成分的凋亡效应^[23], SCV 都展现出了更全面的治疗优势。SCV 中的维生素 B_6 不仅模拟了植物多酚类的抗氧化和抗炎特性^[24], 更通过精确的组分控制避免了天然提取物常见的质量不稳定问题。这种基于现代药理学的配伍方式, 既保留了传统中药的多靶点作用特色, 又通过科学组方提高了治疗的安全性^[22], 为中药研究提供了重要的参考范例。

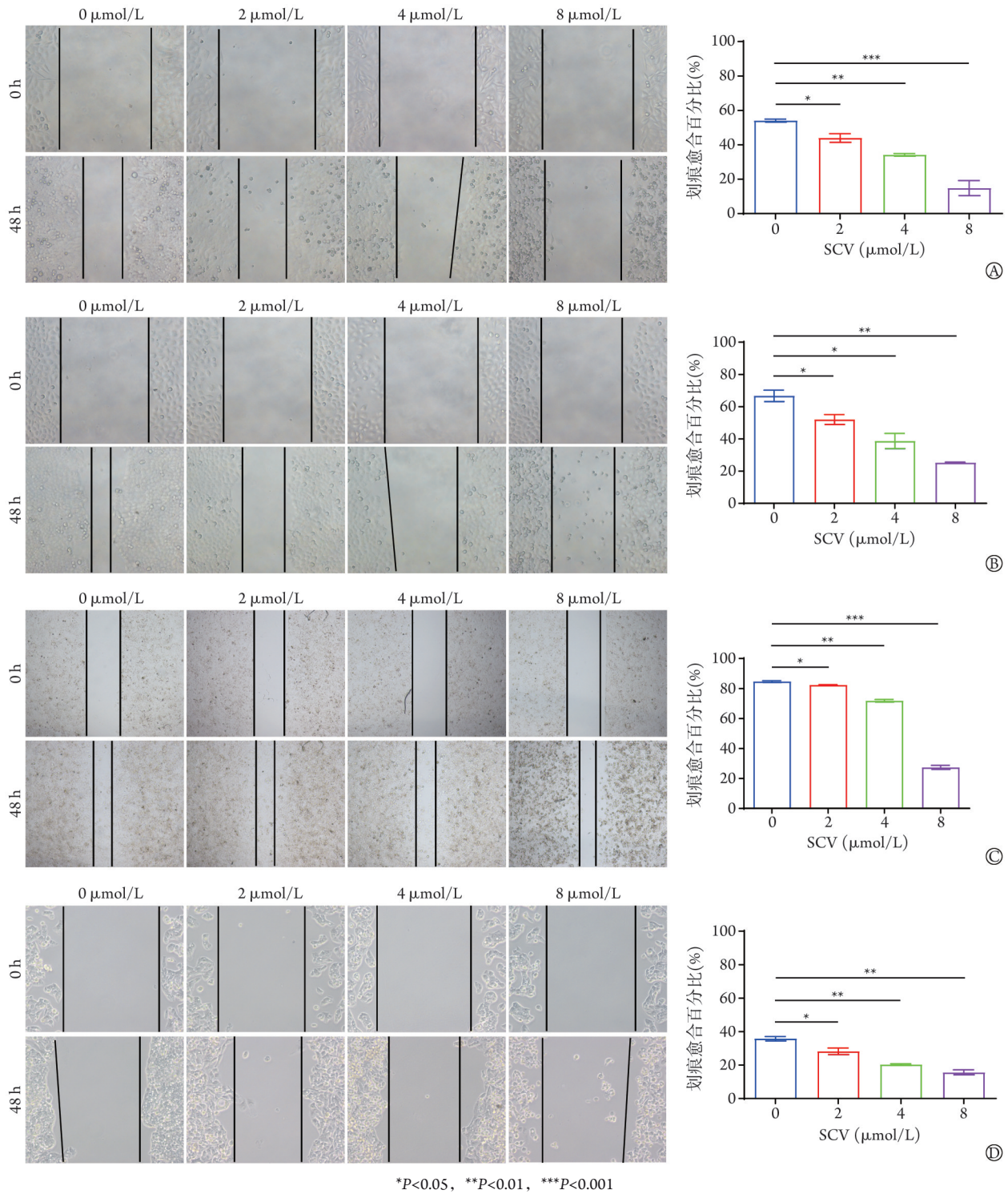


图3 斑蝥酸钠维生素B₆注射液(SCV)对SMCC-7721(A)、Bel-7402(B)、Huh7(C)及HepG2(D)细胞划痕愈合能力的影响
Fig.3 Effects of sodium cantharidate and vitamin B₆ injection (SCV) on the scratch healing ability of SMCC-7721 (A), Bel-7402 (B), Huh7 (C), and HepG2 (D) cells

多项临床研究表明, SCV联合经典放化疗对HCC具有良好的治疗效果^[25-26], 但其体外抗肝癌的确切机制尚未系统阐明, 既往研究仅限于单一细胞系及少量表型分析^[10], 而本研究则通过在4种肝癌细胞系中开展多种肿瘤表型(细胞增殖、迁移、侵袭、周期和凋亡)实验探讨了SCV的抗肝癌作用, 提供了多样

化的研究模型; 同时还对SCV抗HCC的作用机制进行了初步探讨。

本研究发现, SCV可明显抑制4种肝癌细胞(SMCC-7721、Bel-7402、Huh7、HepG2)的增殖、克隆形成、侵袭及迁移, 提示SCV具有广谱抗肝癌活性, 可通过多个关键通路对肿瘤异质性产生广泛影

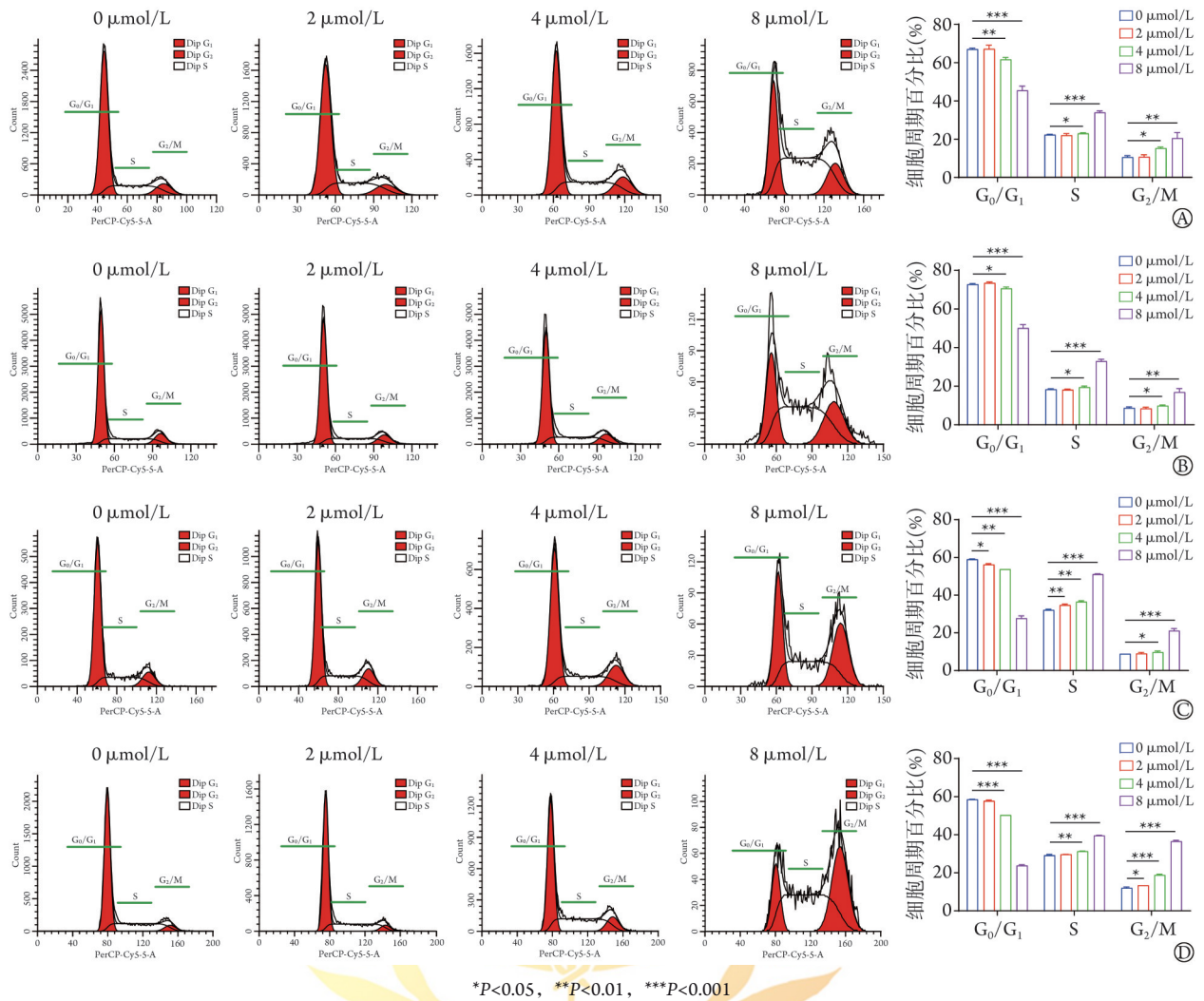


图4 斑蝥酸钠维生素B₆注射液(SCV)对SMCC-7721(A)、Bel-7402(B)、Huh7(C)和HepG2(D)细胞周期的影响
Fig.4 Effects of sodium cantharidate and vitamin B₆ injection (SCV) on the cell cycle of SMCC-7721 (A), Bel-7402 (B), Huh7 (C), and HepG2 (D) cells

响。其中，高浓度(8 μmol/L)SCV处理对Bel-7402细胞增殖的抑制效果最好，对SMCC-7721细胞平板克隆形成和迁移能力的抑制作用最强，对Huh7细胞侵袭能力的抑制作用最强，提示SCV对不同细胞系的作用强度存在差异。如SCV能根据细胞特性“差异化”抑制HCC的关键表型，则可能实现个体化治疗，使患者受益。

细胞周期分析表明，SCV处理可明显改变4种肝癌细胞系的周期分布特征。与未处理组相比，SCV处理后G₀/G₁期细胞比例明显降低，S期和G₂/M期细胞比例增高，提示细胞周期检查点激活可能导致增殖阻滞并诱导凋亡^[27-28]，但潜在作用机制仍有待后续深入探讨。此外，这一现象与胶质母细胞瘤研究中斑蝥酸钠诱导细胞周期重分布的作用机制具有跨肿瘤类型的一致性^[10]。SCV作用的跨肿瘤一致性提示SCV可能通过保守机制(如DNA损伤)跨癌症种类调控细胞周期，但作用靶点可以不一致，这为

后续机制研究提供了一个新的方向。

细胞凋亡实验进一步验证了剂量依赖性凋亡率增高，支持SCV通过细胞周期阻滞诱导凋亡发生的推测^[29]。Western blotting检测结果显示，SCV可上调促凋亡蛋白Caspase-3的表达，下调抗凋亡蛋白Bcl-2及核因子κB(NF-κB)通路关键调控因子p65水平，提示其可能通过多靶点协同调控凋亡通路诱导的程序性细胞死亡。然而，NF-κB是与免疫、炎症及肿瘤等发生和发展密切相关的转录调控因子，对肿瘤细胞具有既促进凋亡又抑制凋亡的双重作用^[30-32]，推测SCV的抗癌作用机制为下调NF-κB蛋白的表达而诱导人肝癌细胞的凋亡，因此，下一步将对该推测进行深入的实验验证及解析。

综上所述，本研究在4种HCC细胞系中证实SCV通过周期阻滞、凋亡通路激活而发挥抗肿瘤作用，体现了多靶点协同抗肿瘤机制的优势。SCV抗肝癌表型的稳定性和可重复性为其临床应用提供了

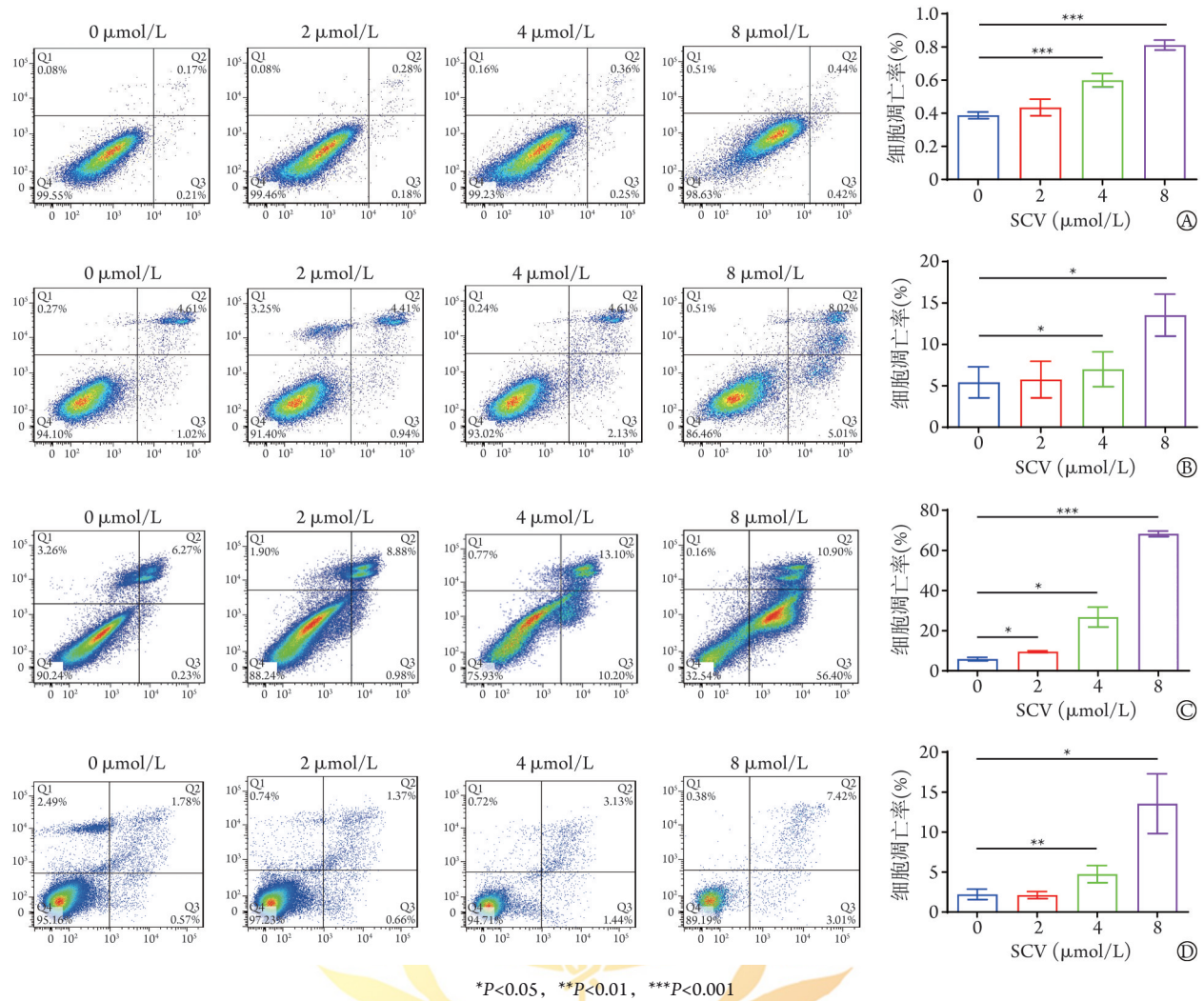
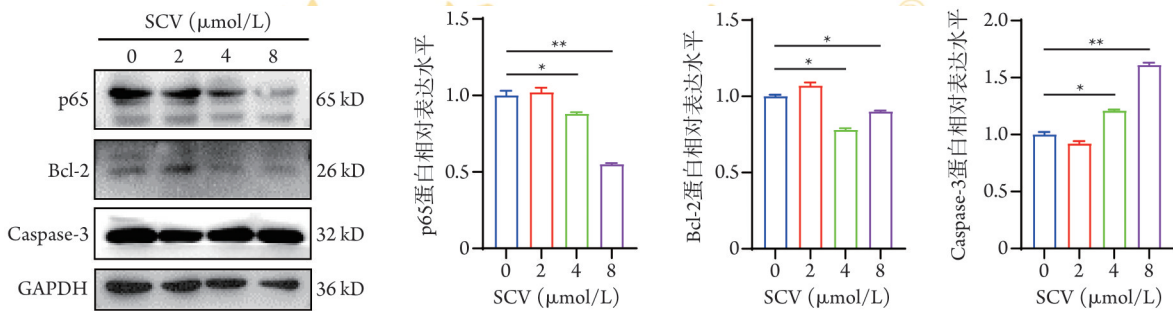


图5 斑螋酸钠维生素B₆注射液(SCV)对SMCC-7721(A), Bel-7402(B), Huh7(C)及HepG2(D)细胞凋亡的影响

Fig.5 Effects of sodium cantharidinate and vitamin B₆ injection (SCV) on the cell apoptotic of SMCC-7721 (A), Bel-7402 (B), Huh7 (C), and HepG2 (D) cells



p65. 核因子κB亚基P65; Bcl-2. B细胞淋巴瘤2家族蛋白质; Caspase-3. 胱天蛋白酶-3; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图6 斑螋酸钠维生素B₆注射液(SCV)对HepG2细胞中p65、Bcl-2、Caspase-3蛋白表达的影响(Western blotting)

Fig.6 Effects of sodium cantharidinate and vitamin B₆ injection (SCV) on p65, Bcl-2, Caspase-3 protein levels in HepG2 cells (Western blotting)

关键的体外实验依据,并为联合用药治疗策略提供了新思路。但本研究仍存在不足:(1)机制研究探索不足:如NF-κB通路的具体调控机制及与其他信号通路的交互作用未充分探讨;(2)缺乏体内实验:未开展动物实验或临床样本研究,尚不能确认SCV的体内抗肿瘤效果及其不良反应的阈值和作用机制。

因此,后期研究将通过RNA-seq和代谢组学技术全面解析SCV的分子机制网络;通过构建肝癌动物模型验证体外细胞实验的结果,并结合临床样本分析疗效异质性;优化SCV与其他化疗药物的联合用药方案,评估其增效减毒的潜力;验证NF-κB通路的双向调控作用,明确其对凋亡的最终影响方向。

【参考文献】

- [1] Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, *et al.* Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16018.
- [2] Han BF, Zheng RS, Zeng HM, *et al.* Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. *J Natl Cancer Cent*, 2024, 4(1): 47-53.
- [3] 汤钰宏, 范松松, 曹俊, 等. 《原发性肝癌诊疗指南(2024年版)》更新要点[J]. *肝胆胰外科杂志*, 2024, 36(10): 583-588.
- [4] Zhang XY, Qiu H, Li CS, *et al.* The positive role of traditional Chinese medicine as an adjunctive therapy for cancer[J]. *Biosci Trends*, 2021, 15(5): 283-298.
- [5] Yang R, Fu X, Wang Z, *et al.* Unlocking the potential of traditional Chinese medicine (TCM): Shipi Xiaoji formula (SPXJF) as a novel ferroptosis inducer in hepatocellular carcinoma[J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 340: 119236.
- [6] Liu JY, Zhou Y, Zhou PC, *et al.* Mechanistic insights into xanthomicrol as the active anti-HCC ingredient of *Phytolacca acinosa* Roxb: a network pharmacology analysis and transcriptomics integrated experimental verification[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 333: 118467.
- [7] Fu CK, Zhang YH, Xi WJ, *et al.* Dahuang Zhechong pill attenuates hepatic sinusoidal capillarization in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma rat model *via* the MK/integrin signaling pathway[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 308: 116191.
- [8] Zhu M, Liu XJ, Zhou CH, *et al.* Effect of sodium cantharidinate/vitamin B₆ injection on survival, liver function, immune function, and quality of life in patients with hepatocellular carcinoma: Protocol for a meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2020, 99(34): e21952.
- [9] 张萌, 李胜超, 乔治斌, 等. 斑蝥酸钠维生素B₆诱导人肝癌HepG2细胞凋亡及周期阻滞[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(23): 216-220.
- [10] 石晓旭, 李昊文, 任文娟, 等. 斑蝥酸钠维生素B₆注射液体外诱导胶质母细胞瘤U87凋亡作用[J]. *中国临床药理学杂志*, 2015, 31(6): 463-466, 469.
- [11] Zhu M, Shi XP, Gong ZY, *et al.* Cantharidin treatment inhibits hepatocellular carcinoma development by regulating the JAK2/STAT3 and PI3K/Akt pathways in an EphB4-dependent manner[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158: 104868.
- [12] Xu YL, Wang M, Ning SC, *et al.* Development of glycyrrhetic acid and folate modified cantharidin loaded solid lipid nanoparticles for targeting hepatocellular carcinoma[J]. *Molecules*, 2022, 27(20): 6786.
- [13] Naz F, Wu Y, Zhang N, *et al.* Anticancer attributes of cantharidin: involved molecular mechanisms and pathways[J]. *Molecules*, 2020, 25(14): 3279.
- [14] Hu SP, Chang JL, Ruan HF, *et al.* Cantharidin inhibits osteosarcoma proliferation and metastasis by directly targeting miR-214-3p/DKK3 axis to inactivate β -catenin nuclear translocation and LEF1 translation[J]. *Int J Biol Sci*, 2021, 17(10): 2504-2522.
- [15] Pan YH, Zheng Q, Ni WT, *et al.* Breaking glucose transporter 1/pyruvate kinase M2 glycolytic loop is required for cantharidin inhibition of metastasis in highly metastatic breast cancer[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 590.
- [16] Liu XX, Zhang L, Thu PM, *et al.* Sodium cantharidinate, a novel anti-pancreatic cancer agent that activates functional p53[J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(8): 1295-1310.
- [17] Chen XX, Zhou MX, Fan WJ, *et al.* Combination of sodium cantharidinate with cisplatin synergistically hampers growth of cervical cancer[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15: 171-183.
- [18] Wu L, Deng C, Zhang H, *et al.* Efficacy and safety of docetaxel and sodium cantharidinate combination *vs.* either agent alone as second-line treatment for advanced/metastatic NSCLC with wild-type or unknown EGFR status: an open-label, randomized controlled, prospective, multi-center phase III trial (Cando-L1) [J]. *Front Oncol*, 2021, 11: 769037.
- [19] Hsia TC, Yu CC, Hsu SC, *et al.* Cantharidin induces apoptosis of H460 human lung cancer cells through mitochondria-dependent pathways[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(1): 245-254.
- [20] 菅若男, 赵秀梅, 吕志如, 等. 斑蝥酸钠联合常规化疗治疗非小细胞肺癌的临床疗效和安全性Meta分析[J]. *中国合理用药探索*, 2024, 21(10): 43-51.
- [21] 徐肖, 周爱军, 王春风, 等. 肺癌患者采用斑蝥酸钠维生素B₆注射液辅助化疗治疗的效果及对不良反应的影响[J]. *慢性病学杂志*, 2024, 25(1): 100-102, 106.
- [22] Li Q, Zhang CH, Xu GH, *et al.* Astragalus polysaccharide ameliorates CD8⁺ T cell dysfunction through STAT3/Gal-3/LAG3 pathway in inflammation-induced colorectal cancer[J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 171: 116172.
- [23] Kuete V, Krusche B, Youns M, *et al.* Cytotoxicity of some Cameroonian spices and selected medicinal plant extracts[J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 134(3): 803-812.
- [24] Diniz do Nascimento L, Moraes AAB, Costa KSD, *et al.* Bioactive natural compounds and antioxidant activity of essential oils from spice plants: new findings and potential applications[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(7): 988.
- [25] Shao HJ, Hong GH, Luo XH. Evaluation of sodium cantharidinate/vitamin B₆ in the treatment of primary liver cancer[J]. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10(Suppl 1): 75-78.
- [26] 赵若琳, 陈美娟, 赵凤鸣, 等. 斑蝥酸钠联合化疗药对肝癌的协同增效及其机制研究[J]. *中药材*, 2014, 37(11): 1938-1946.
- [27] Li XQ, Cheng XJ, Wu J, *et al.* Targeted inhibition of the PI3K/Akt/mTOR pathway by (+)-anthrabenoxocinone induces cell cycle arrest, apoptosis, and autophagy in non-small cell lung cancer[J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 58.
- [28] Zhao W, Zhang L, Zhang Y, *et al.* The CDK inhibitor AT7519 inhibits human glioblastoma cell growth by inducing apoptosis, pyroptosis and cell cycle arrest[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(1): 11.
- [29] 高伟, 郑军. 斑蝥酸钠抑制人肝癌HepG2细胞增殖及其机制的研究[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(11): 1356-1358.
- [30] Yu H, Lin L, Zhang Z, *et al.* Targeting NF- κ B pathway for the therapy of diseases: mechanism and clinical study[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 209.
- [31] Guo Q, Jin Y, Chen X, *et al.* NF- κ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 53.
- [32] Chen L, Lin X, Lei Y, *et al.* Aerobic glycolysis enhances HBx-initiated hepatocellular carcinogenesis *via* NF- κ B p65/HK2 signalling[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2022, 41(1): 329.

(责任编辑: 张小利)