

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2024.03.007

软枣猕猴桃根内生真菌 *Trichoderma sp.* 总皂苷抗肝癌初步探究*

李翠莹^{1,3} 王丽红¹ 王婷婷^{2,3} 辛馥辰^{2,3} 刘德江^{1,2,3Δ}

(1 佳木斯大学药学院 黑龙江 佳木斯 154007; 2 佳木斯大学生物与农业学院 黑龙江 佳木斯 154007;
3 中-乌农林技术开发与应用国际合作联合实验室 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要 目的: 研究软枣猕猴桃根内生真菌 C15(*Trichoderma sp.*) 发酵提取物中的总皂苷成分对 2 种肝癌细胞 HepG 2 和 Huh-7 细胞的凋亡作用与初步作用机制。**方法:** 采用 CCK-8 细胞计数 (Cell Counting Kit-8, CCK-8) 法检测软枣猕猴桃根总皂苷 (AARTS) 和内生真菌 C15 总皂苷 (C15TS) 对 HepG 2 和 Huh-7 细胞的细胞活力的影响; 采用细胞划痕实验和 Transwell 小室实验对细胞的迁移和侵袭能力进行检测; 采用蛋白质印迹法 (Western Blot, WB) 检测 P53 信号通路中 3 种凋亡相关蛋白 (Bax、Bcl-2、Caspase-3) 的表达水平; 采用 Annexin V-FITC/PI 染色检测 HepG 2 和 Huh-7 细胞的凋亡时期。**结果:** 根据细胞活力测试得出浓度为 50~400 $\mu\text{g/mL}$ 时 AARTS 和 C15TS 对 HepG 2 和 Huh-7 细胞的活力有抑制作用, 且呈现剂量依赖性; 细胞划痕实验表明浓度为 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 时 AARTS 和 C15TS 可以降低 HepG 2 和 Huh-7 细胞的迁移能力; 在 Transwell 小室实验中, 浓度为 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 时 AARTS 和 C15TS 均可抑制对 HepG 2 细胞和 Huh-7 细胞的侵袭能力; 在 WB 实验中, AARTS 和 C15TS 经 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 孵育 24 h 后, HepG 2 和 Huh-7 细胞胞内 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达量增加, Bcl-2 蛋白表达量减少; 在 Annexin V-FITC/PI 染色实验中, 浓度为 200、400 $\mu\text{g/mL}$ 时 AARTS 组和 C15TS 组均具有促进 HepG 2 和 Huh-7 细胞凋亡的能力, 且多为早期凋亡。**结论:** C15TS 与 AARTS 的作用效果相似, 也可抑制 HepG 2 和 Huh-7 细胞的增殖、迁移和侵袭, 促进细胞凋亡, 其机制可能与 P53 信号通路有关。

关键词: 软枣猕猴桃; 内生真菌; 肝癌; 总皂苷

中图分类号: S663.4; R285; R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2024)03-434-08

Study on Total Saponins of Endophytic Fungi in *Actinidia Arguta* Root Against Hepatocellular Carcinoma*

LI Cui-ying^{1,3}, WANG Li-hong¹, WANG Ting-ting^{2,3}, XIN Fu-chen^{2,3}, LIU De-jiang^{1,2,3Δ}

(1 School of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, 154007, China;

2 College of Biology and Agriculture, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang, 154007, China;

3 China-Ukraine Agriculture & Forestry Technology Development And Application International Cooperation Joint Lab, Jiamusi, Heilongjiang, 154007, China)

ABSTRACT Objective: To study the total saponins in the extract of endophytic fungus C15 from *Actinidia arguta* root and their effects on the apoptosis of hepatoma HepG 2 and Huh-7 cells, and to explore the possible mechanism. **Methods:** The effects of total saponins of AARTS (Total Saponins from the roots of *Actinidia arguta*, AARTS) and C15TS (C15 Total Saponins, C15TS) on the cell viabilities of HepG 2 and Huh-7 hepatoma cells were determined by CCK-8 (Cell Counting Kit-8) method; The cell migration and invasion abilities were detected by cell scratch assay and Transwell assay; Western Blot (WB) was used to detect the expression levels of three apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2, Caspase-3) in HepG 2 and Huh-7 hepatoma cells; Annexin V-FITC/PI staining was used to detect the apoptotic period of HepG 2 and Huh-7 cells. **Results:** According to cell viability tests, AARTS and C15TS inhibited the viabilities of HepG 2 and Huh-7 cells in a dose-dependent manner at concentrations ranging from 50 to 400 $\mu\text{g/mL}$. The cell scratch test showed that the concentration of AARTS and C15TS at 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$ could decreased the migration abilities of HepG 2 and Huh-7 cells. In Transwell assay, AARTS and C15TS at concentrations of 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$ inhibited the invasion abilities of HepG 2 and Huh-7 cells. In WB experiment, after incubation with 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$ AARTS and C15TS for 24 h, the expression of Bax and Caspase-3 protein increased in HepG 2 and Huh-7 cells, while the expression of Bcl-2 protein decreased. In the Annexin V-FITC/PI staining experiment, both the AARTS groups and the C15TS groups with concentrations of 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$ had the abilities to promote the apoptosis of HepG 2 and Huh-7 cells, and the apoptosis was mostly early. **Conclusion:** Similar to AARTS, the C15TS can also inhibit the proliferation, migration and invasion of HepG 2 and Huh-7 cells, and promote cell apoptosis, which may be related to P53 signaling pathway.

* 基金项目: 中央支持地方高校改革发展资金优秀青年人才项目 (2020YQ09)

作者简介: 李翠莹 (1996-), 女, 硕士, 研究方向: 植物天然产物研究, E-mail: Licuiying0911@163.com

Δ 通讯作者: 刘德江 (1980-), 男, 硕士, 正高级实验师, 研究方向: 寒地植物资源、生态、栽培及其提取物的研究, E-mail: Liudejiang2004@163.com

(收稿日期: 2023-07-19 接受日期: 2023-08-16)

Key words: Actinidia arguta; Endophytic fungi; Liver cancer; Total saponins

Chinese Library Classification(CLC): S663.4; R285; R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2024)03-434-08

前言

软枣猕猴桃 *Actinidia arguta* (Sieb. et Zucc.) Planch. ex Miq., 属落叶大藤本植物, 主要生长在黑龙江、辽宁、湖南、江西、安徽、浙江等地^[1,2]。软枣猕猴桃最早记载于《开宝本草》^[3], 其根又名藤梨根^[4], 具有滋阴润肺、补气养血、消食健脾等功效^[5]; 根中含有大量功能性成分, 如生物碱、三萜类、醌类、黄酮类、猕猴桃碱及肉苁蓉碱^[6,9], 具有很好的医疗保健作用, 如抗氧化^[10]、抗肿瘤等作用^[11]。

因软枣猕猴桃生长周期较长, 以根入药不利于软枣猕猴桃的资源保护。而内生真菌具有繁殖快速、产量高、成本低、便于组织大规模的工业化生产等优点^[12], 其次其代谢产物可以产生与宿主植物相类似的活性成分^[13], 可以缓解中药资源短缺, 避免对中药资源的破坏, 且植物内生真菌作为一种新兴的药用资源, 已成为植物药领域的研究热点。

基于以上背景, 本文采用 CCK-8 法、Transwell 小室实验、Western Blot (WB) 和 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测等方法研究了软枣猕猴桃根总皂苷 (Total Saponins from the roots of *Actinidia arguta*, AARTS) 和内生真菌 C15 总皂苷 (C15 Total Saponins, C15TS) 对 HepG 2 和 Huh-7 细胞活性、增殖、迁移、凋亡的影响, 进而探究内生真菌代替宿主植物发挥药理活性的可行性, 并为软枣猕猴桃根的资源保护与利用提供实验基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

HepG 2 和 Huh-7 细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司; Mouse Anti-Bax antibody、Rabbit Anti-Bcl-2 antibody、Mouse Anti-Caspase-3 antibody 购自北京博奥森生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡试剂盒购自碧云天; 全自动多功能酶标仪 (Synergy-HT) 购自美国 Bio-TEK 公司; VE-186 垂直电泳仪购自上海天能科技公司; Tanon 5200 全自动化学发光仪购自上海天能科技公司; 光学显微镜 XS-43C 购自上海光学仪器厂。

新鲜软枣猕猴桃根采于佳木斯大学农林实验实习基地, 经刘德江正高级实验师鉴定为猕猴桃科猕猴桃属植物软枣猕猴桃。将洗净后的软枣猕猴桃根采用组织块接种的方法分离内生真菌得到 C15 菌株。最终由武汉博越致和公司对其进行 ITS 分子鉴定, 鉴定结果为 *Trichoderma sp.*。

课题组前期通过对 C15 (*Trichoderma sp.*) 进行发酵培养^[14], 并采用超声提取法对软枣猕猴桃根和内生真菌 C15 进行总皂苷提取^[15], 以及 D101 大孔树脂纯化^[16]。纯化后 AARTS 和 C15TS 含量分别为 63.29% 和 61.37%。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 参照吕洁^[17]、何志龙^[18]等操作对 HepG 2 和 Huh-7 细胞进行细胞重悬 (1000 rpm 离心 5 min), 并将细胞悬液接种瓶置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内培养。

1.2.2 CCK-8 活力检测 将 HepG 2 和 Huh-7 细胞制成细胞

悬液 (浓度为 5×10^4 个 / mL), 其余步骤参考许洋^[19]方法。5-氟尿嘧啶组 (5-FU 组, 药物浓度梯度为 (10、20、30、40、50 μg/mL)、AARTS 组、C15TS 组 (药物浓度梯度均为 25、50、100、200、400 μg/mL)。计算公式如下, 其中 A 为吸光度 (OD 值)。

细胞增殖抑制率 = $[A \text{ 给药组} - A \text{ 空白组} / A \text{ 对照组} - A \text{ 空白组}] \times 100\%$

1.2.3 细胞划痕实验 参考王谦^[20]方法处理细胞悬液后, 参考陈成^[21]操作分别用含不同浓度 5-FU 组、AARTS 组和 C15TS 组的无血清培养基 (DEME) 培养 HepG 2 和 Huh-7 细胞 24 h, 在 0 h、24 h 取样, 拍照记录。运用 Image J 软件测量两种细胞在药物培养 24 h 后细胞划痕面积的大小变化, 计算相应的细胞迁移率, 其中 S 为细胞迁移面积。

计算公式: 细胞迁移率 = $(S0 \text{ h} - S24 \text{ h}) / S0 \text{ h} \times 100\%$

1.2.4 Transwell 小室实验 通过血细胞板计数调整细胞密度至 5×10^4 个 / mL, 取 100 μL 细胞悬液接种于小室上 (各浓度设置 3 个复孔), 分别将不同浓度的 5-FU 组、AARTS 组和 C15TS 组药物加入上室。其余步骤按张安勇^[22]操作进行, 最后在单个小室镜下随机选取 3 个视野进行拍照, 并用 Image J 软件对图片中视野内细胞进行计数。

1.2.5 WB 对 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白含量检测 参考梁家豪^[23]方法处理细胞, 其余操作按照杨宗林^[24]方法进行, 最后用 Image J 软件进行条带分析。各蛋白稀释比例为 Bcl-2、Bax、Caspase-3 (均为 1:500), GAPDH (1:5000), 二抗 (1:1700)。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测 配制不同浓度 C15TS、AARTS 与 5-FU 药物培养基, 沿细胞孔壁每孔加入 2 mL 配制好的培养基, 每组设 3 个复孔, 混匀后于培养箱孵育 24 h。细胞重悬后, 将浓度为 5×10^5 个 / mL 的细胞悬液 200 μL 于 2 mL 共聚焦小皿, 均加入 5 μL Annexin V-FITC 与 PI 室温条件下避光孵育 20 min。再加入 300 μL Binding buffer (1×) 并充分混匀后, 将细胞悬液在荧光显微镜下检测。

1.3 统计学分析

使用 GraphPad Prism 8.0 进行数据处理, 并使用 t 检验、单因素方差分析进行统计学分析。P < 0.05 具有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 细胞活力测试结果

实验结果由图 1 所示。与对照组相比, 5-FU 组能够抑制 HepG 2 和 Huh-7 细胞增殖 (P < 0.05, P < 0.01 或 P < 0.001) 且呈剂量依赖性, 说明 5-FU 具有较强的抑制细胞增殖的作用。与对照组相比, 在浓度为 25 μg/mL 剂量下 AARTS 组与 C15TS 组对 HepG 2 和 Huh-7 细胞均有抑制作用, 但无统计学意义 (P > 0.05); 在 50 μg/mL 剂量下 AARTS 组和 C15TS 组对 HepG 2 和 Huh-7 有抑制作用 (P < 0.05); 在 100 μg/mL、200 μg/mL、400 μg/mL 剂量下 AARTS 组和 C15TS 组对 HepG 2 和 Huh-7 细胞均有显著抑制作用 (P < 0.01)。

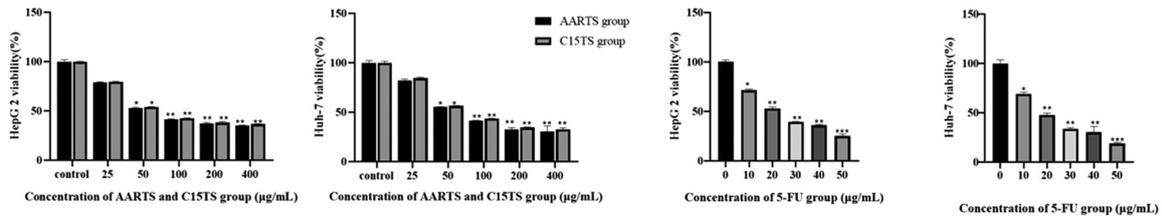


图 1 5-FU、AARTS 和 C15TS 组对 HepG 2 和 Huh-7 细胞的增殖影响

Fig.1 Inhibitory effect of 5-FU, AARTS and C15TS groups on proliferation of HepG 2 and Huh-7 cells

Note: Compared with control group, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

参考 5-FU 组、AARTS 组与 C15TS 组对 HepG 2 细胞和 Huh-7 细胞的 IC_{50} 值, 见表 1。将后续实验的给药量浓度确定为: 5-FU 组为 20 $\mu\text{g/mL}$ 、AARTS-H 组为 200 $\mu\text{g/mL}$ 、AARTS-M 组为 100 $\mu\text{g/mL}$ 、AARTS-L 组为 50 $\mu\text{g/mL}$ 、C15TS-H 组为 200 $\mu\text{g/mL}$ 、C15TS-M 组为 100 $\mu\text{g/mL}$ 、C15TS-L 组为 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

表 1 对 HepG 2 和 Huh-7 细胞抑制的 IC_{50}
Table 1 IC_{50} that inhibits HepG 2 and Huh-7 cells

Cell type	Groups	IC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HepG 2	5-FU group	21.9
	AARTS group	90.98
	C15TS group	97.67
Huh-7	5-FU group	18.64
	AARTS group	87.36
	C15TS group	97.60

2.2 划痕实验结果

通过显微镜($\times 200$)观察 5-FU 组、AARTS 组和 C15TS 组对 HepG 2 和 Huh-7 细胞的迁移影响, 结果如图 2A 和图 2B 所示。对比 0 h 前的划痕区域正常培养的对照组细胞, HepG 2 和 Huh-7 细胞在正常生长 24 h 后发生了较大面积的迁移。经过 24 h 药物培养后的实验结果显示, 5-FU 组显著抑制 HepG 2 细胞迁移($P < 0.01$)。其中 AARTS 和 C15TS 的高剂量组和中剂量组对 HepG 2 和 Huh-7 细胞的迁移具有抑制作用($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 低剂量组无统计学意义($P > 0.05$), 细胞迁移率见图 3。

2.3 Transwell 小室实验

结果如图 4 和图 5 所示。在 HepG 2 和 Huh-7 细胞中, 5-FU 组、AARTS 组和 C15TS 组中侵袭成功的细胞数都明显少于对照组。其中 5-FU 组对抑制 HepG 2 和 Huh-7 细胞的侵袭有显著效果($P < 0.01$)。在 AARTS 组和 C15TS 组的培养下, AARTS、C15TS 的高剂量组和中剂量组对抑制 HepG 2 和 Huh-7 细胞的侵袭具有抑制作用($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 低剂量组无统计学意义($P > 0.05$), 细胞侵袭个数见图 6。

2.4 WB 对 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白含量的检测结果

HepG 2 和 Huh-7 细胞中 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达含量结果如图 7、图 8 所示。在 5-FU 组处理下, HepG 2 和 Huh-7 细胞中 Bax 和 Caspase-3 蛋白表达含量显著升高($P < 0.01$), Bcl-2 蛋白表达含量显著降低($P < 0.01$)。在 AARTS 组和 C15TS 组处理下, HepG 2 和 Huh-7 细胞中凋亡相关蛋白表达水平发生变化, AARTS 和 C15TS 高剂量组和中剂量组 Bax 蛋白和 Caspase-3 蛋白表达水平升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), Bcl-2 蛋白表达水平降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 低剂量组无统计学意义($P > 0.05$)。

2.5 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测结果

HepG 2 和 Huh-7 细胞经过不同浓度的 AARTS 和 C15TS 处理培养 24 h 后, 运用 AnnexinV-FITC/PI 双染法荧光标记细胞, 并检测其细胞凋亡情况, 结果如图 9 和图 10 所示。荧光显微镜下进行随机取样, 观察到显示 FITC 标记的细胞为早期凋亡细胞, 呈绿色荧光; PI 染色后的细胞则为晚期凋亡细胞, 呈红色荧光, 通过 Image J 软件将同一视野下的荧光图 Merge 后得到荧光标记后全凋亡情况。与对照组相比, 5-FU 组可以促进 HepG 2 和 Huh-7 细胞凋亡, AARTS 和 C15TS 促进 HepG 2 和 Huh-7 细胞凋亡, 且多为早期凋亡细胞(绿色荧光)。

3 讨论

先前研究表明 *Trichoderma sp.* 次生代谢产物对人非小细胞肺癌细胞 A549 和人前列腺癌细胞 PC3 有较为明显的抑制作用^[25,26]。且有文献报道皂苷类成分对癌细胞有很好的抑制活性^[27,28]。本文首次研究了 C15(*Trichoderma sp.*)菌株和 AARTS 对 HepG 2 和 Huh-7 细胞的抗肝癌作用。通过一系列的实验表明, C15TS 和 AARTS 可以抑制细胞的增殖、迁移、侵袭及促进细胞的凋亡。

近年来研究表明, 细胞凋亡与肿瘤关系密切^[29,30]。其中 P53 信号通路中两种具有代表性作用的蛋白 Bax 与 Bcl-2 通常发生同源二聚体与异源二聚体作用^[31]。Bax 会发生高表达, 同时与 Bcl-2 形成同源二聚体, 促进释放细胞色素 C 进入细胞质, 最终激活 Caspase 级联作用导致凋亡的发生^[32]。

采用 Transwell 小室和划痕实验的方法检测 C15TS 和 AARTS 对 HepG 2 和 Huh-7 细胞侵袭和迁移的情况。结果表

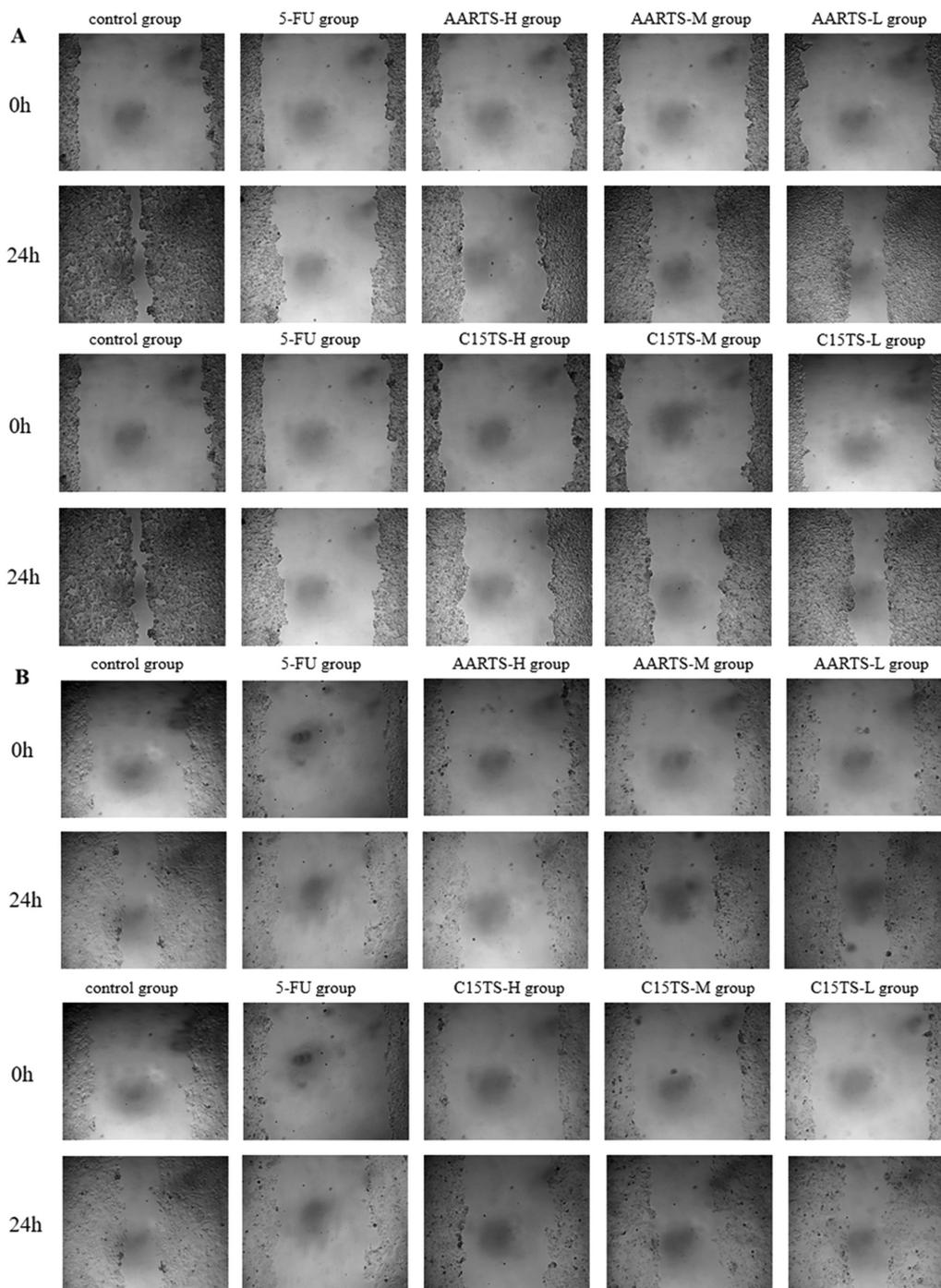


图 2 5-FU、AARTS 和 C15TS 组对 HepG 2 和 Huh-7 细胞 24 h 内迁移率影响 (× 200)

Fig.2 Effect of 5-FU group, AARTS groups, and C15TS groups on Migration rates within 24 h in HepG 2 and Huh-7 cells (× 200)

Note: A.HepG 2 cells; B.Huh-7 cells.

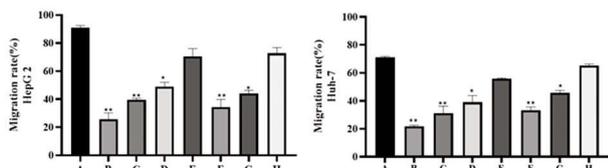


图 3 5-FU、AARTS 和 C15TS 组对 HepG 2 和 Huh-7 细胞 24 h 内迁移率
Fig. 3 5-FU, AARTS, and C15TS groups on Migration rates within 24 h in HepG 2 and Huh-7 cells.

Note: A. control group; B. 5-FU group; C. AARTS-H group;

D. AARTS-M group; E. AARTS-L group; F. C15TS-H group;

G. C15TS-M group; H. C15TS-L group; Compared to control group,

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$.

明,C15TS 和 AARTS 对 2 种肝癌细胞的侵袭和迁移均有抑制作用,这一结果与左天^[33]的研究相似。采用 Annexin V-FITC/PI 荧光双染的方法检测 C15TS 和 AARTS 对 HepG 2 和 Huh-7 细胞凋亡情况。结果表明,C15TS 和 AARTS 对 2 种细胞均有促进凋亡的作用,且多为早期凋亡细胞。同时运用 WB 法检测 P53 信号通路蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 在 HepG 2 和 Huh-7 细胞胞内蛋白表达情况,发现 C15TS 和 AARTS 均能够抑制 Bcl-2 蛋白含量的表达以及提高 Bax 和 Caspase-3 蛋白含量的表达。说明 C15TS 和 AARTS 对 HepG 2 和 Huh-7 细胞有相似的作用效果,且可能是通过 P53 信号通路促进细胞凋亡。

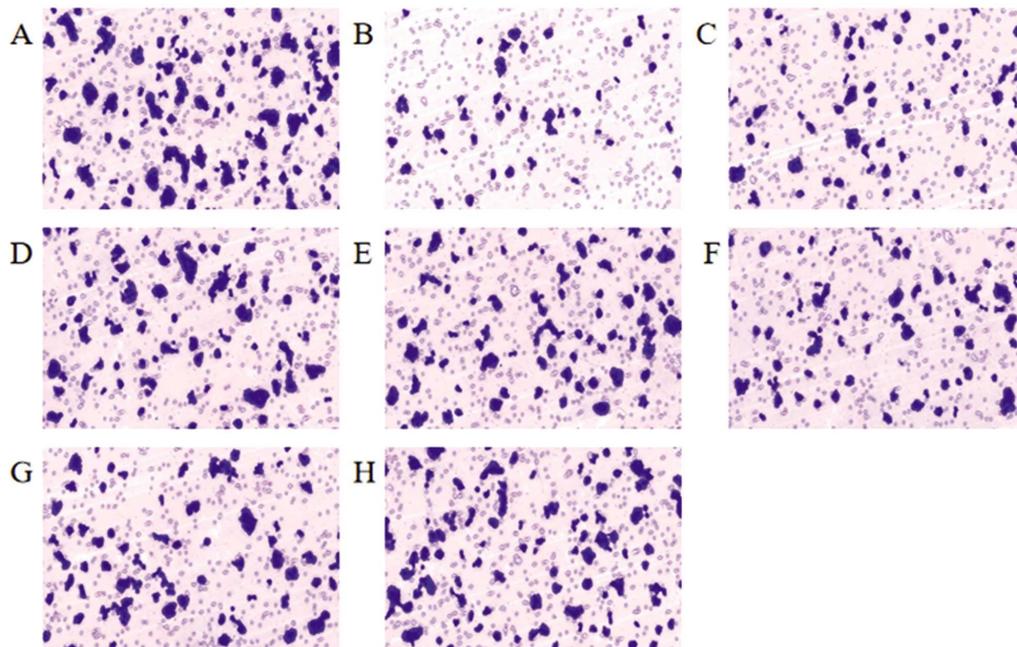


图 4 AARTS 和 C15TS 组 HepG 2 细胞侵袭程度的影响(× 200)

Fig. 4 Effect on the degree of invasion of HepG 2 cells within AARTS groups, C15TS groups (× 200)

Note: A. control group; B. 5-FU group; C. AARTS-H group; D. AARTS-M group; E. AARTS-L group; F. C15TS-H group; G. C15TS-M group; H. C15TS-L group.

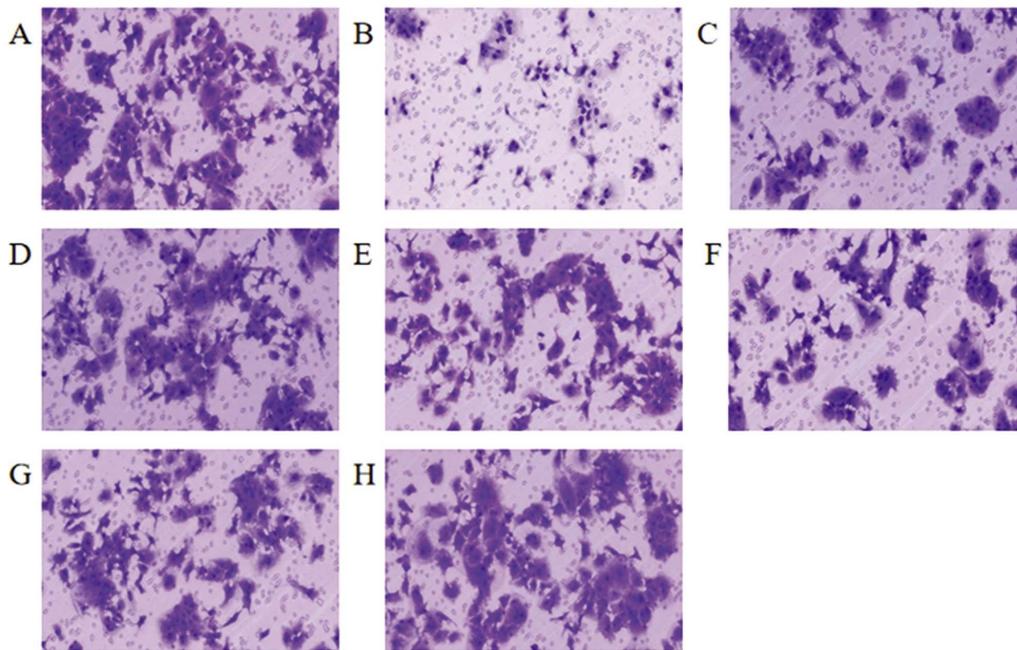


图 5 AARTS 和 C15TS 组对 Huh-7 细胞侵袭程度的影响(× 200)

Fig. 5 Effect on the degree of invasion of Huh-7 cells within AARTS groups, C15TS groups (× 200)

Note: A. control group; B. 5-FU group; C. AARTS-H group; D. AARTS-M group; E. AARTS-L group; F. C15TS-H group; G. C15TS-M group; H. C15TS-L group.

综上所述,C15TS 和 AARTS 有相似的药理活性,两者均可抑制肝癌细胞 HepG 2 和 Huh-7 的细胞增殖、迁移、侵袭及促进细胞凋亡。因此,软枣猕猴桃根内生真菌可能成为一种新型的药用资源,为软枣猕猴桃根的资源保护与利用提供实验基础。

参考文献(References)

[1] 唐艺宁,田密霞,李奕莹,等.软枣猕猴桃的开发利用研究进展[J].保鲜与加工,2023,23(08):76-80.

[2] 李爽,宋庆超,王勇.我国软枣猕猴桃开发利用概况[J].黑龙江科技

信息,2016(09):270-271.

[3] 周贻谋.《开宝本草》新增的保健药(三)[J].长寿,2011,(7):54-55.

[4] 周明轩,李建厂.藤梨根在恶性肿瘤中的研究进展[J].国际医药卫生导报,2022,28(08):1176-1179.

[5] 夏婷婷,王颖.藤梨根从“痰”论治恶性肿瘤的研究进展[J].浙江中医药大学学报,2020,44(07):702-706.

[6] 陈方超,高守红,王志鹏,等.基于UHPLC-Q-TOF-MS/MS技术鉴定藤梨根的化学成分[J].中国药房,2020,31(14):1725-1731.

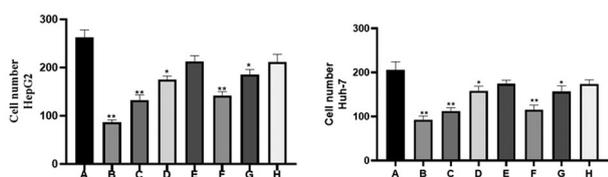


图 6 5-FU、AARTS 和 C15TS 组对 HepG2 和 Huh-7 细胞侵袭个数的影响
Fig. 6 The inference on invasion numbers of HepG 2 and Huh-7 cells by 5-FU, AARTS and C15TS groups.

Note: A. control group; B. 5-FU group; C. AARTS-H group; D. AARTS-M group; E. AARTS-L group; F. C15TS-H group; G. C15TS-M group; H. C15TS-L group; Compared to control group, ** $P<0.01$, * $P<0.05$.

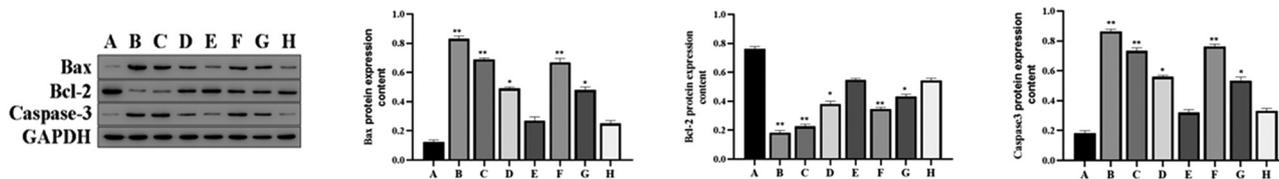


图 7 HepG 2 细胞电泳条带及蛋白表达含量

Fig.7 Electrophoretic bands and protein expression content of HepG 2 cells

Note: A. control group; B. 5-FU group; C. AARTS-H group; D. AARTS-M group; E. AARTS-L group; F. C15TS-H group; G. C15TS-M group; H. C15TS-L group; Compared with control group, ** $P<0.01$, * $P<0.05$.

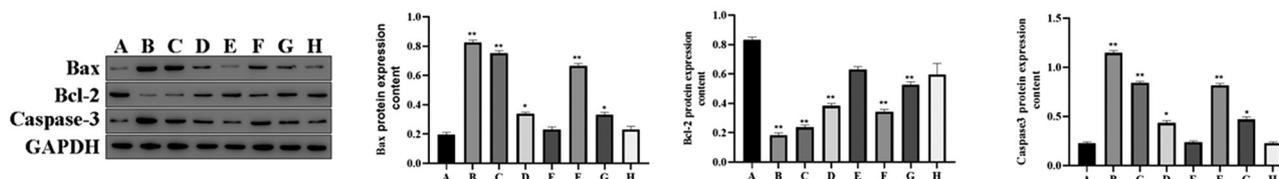


图 8 Huh-7 细胞电泳条带及蛋白表达含量

Fig.8 Electrophoretic bands and protein expression content of Huh-7 cells

Note: A. control group; B. 5-FU group; C. AARTS-H group; D. AARTS-M group; E. AARTS-L group; F. C15TS-H group; G. C15TS-M group; H. C15TS-L group; Compared with control group, ** $P<0.01$, * $P<0.05$.

2020, 42(03): 269-274.

[13] 王晓玥,张丽红,范娜,等. 中药材内生真菌应用研究进展[J]. 山东化工, 2020, 49(22): 62-64+67.
[14] 刘德柱,陈艺扬,张蒙,等. 内生真菌生物转化提高滇重楼皂苷含量及抗肿瘤作用研究[J]. 中草药, 2022, 53(14): 4486-4492.
[15] 孙宏莱,时得友,李丽丽,等. 响应面法优化软枣猕猴桃枝条总三萜提取工艺及其体外抗炎活性分析 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(15): 189-197.
[16] 郭慧玲,罗江南,胡律江,等. D101 大孔树脂纯化山银花总皂苷的工艺研究[J]. 江西中医药大学学报, 2022, 34(05): 76-79.
[17] 吕洁,赵树立,张雪峰. 美洲大蠊提取物抑制肝癌 HepG2 细胞增殖的机制研究[J]. 现代中药研究与实践, 2022, 36(05): 37-42.
[18] 何志龙,林莹,邓有麟,等. α - 番茄碱对人肝癌细胞 Huh-7 增殖、迁移及糖酵解活性的影响[J]. 中成药, 2022, 44(06): 2005-2010.
[19] 许洋,吴成林,郭德华,等. 毛蕊异黄酮对 H_2O_2 诱导的氧化损伤的星形胶质细胞增殖和凋亡的影响[J]. 实用医学杂志, 2022, 38(19): 2419-2423.
[20] 王谦,孙超,牛丽娟. 超声引导下射频消融治疗肝癌的体外研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2021, 43(02): 188-193.
[21] 陈成,刘毅,许汉林. 土田七醇提取物抑制肝癌细胞增殖活性部位筛选及其对肝癌细胞侵袭迁移的影响 [J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(06): 930-933.

[7] 陈方超. 藤梨根化学成分的定性定量检测方法研究 [D]. 上海中医药大学, 2023.
[8] 唐阳. 藤梨根药用成分及作用机制的现代研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2013, 22(03): 330-332.
[9] 刘德江,郭乐乐,田立娟,等. 三种猕猴桃茎中总生物碱提取工艺优化及抑菌活性分析[J/OL]. 食品工业科技, 2023: 1-19.
[10] 滕坤,张海丰,臧皓,等. 藤梨根甲醇提取物的抗氧化活性及物质基础初步研究[J]. 中草药, 2019, 50(18): 4384-4388.
[11] 赵楠,柴军红,何婷婷,等. 软枣猕猴桃植物化学成分及生物活性研究进展[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(02): 211-215.
[12] 乔新荣,叶润. 药用植物内生真菌多糖研究进展 [J]. 化学试剂,

[22] 张安勇. 虫草素对 HepG2 肿瘤细胞增殖的影响及其机制研究[D]. 江西科技师范大学, 2022.
[23] 梁家豪,齐亚鹏,胡俊文,等. 二甲双胍联合塞来昔布对肝癌细胞 HepG2 和 Huh7 增殖及凋亡的影响 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2020, 26(06): 449-454.
[24] 杨宗林. 和枢消积丸调控 NS5ATP13 正反馈 AKT/GSK/MTOR 信号通路对人肝癌细胞系 HepG2 增殖凋亡的影响 [D]. 西南医科大学, 2022.
[25] 蒋晖. 猪苓内生菌的多样性、系统发育和抗肺癌细胞系 A549 活性的研究[D]. 兰州大学, 2018.
[26] 陈旭,雷帮星,文庭池,等. 一株马比木植物内生真菌 Trichoderma sp. 抗癌活性研究[J]. 时珍国医国药, 2017, 28(03): 522-525.
[27] Zhe W, Jingwen X, Yihai W, et al. Total saponins from Tupistra chinensis Baker inhibits growth of human gastric cancer cells in vitro and in vivo[J]. Journal of ethnopharmacology, 2021, 278: 114323.
[28] Meng G, Jie J, Dong Z, et al. Research Advances on Anti-Cancer Natural Products [J]. Frontiers in Oncology, 2022, 12: 866154.
[29] Douglas R G. The Mitochondrial Pathway of Apoptosis: Part I: MOMP and Beyond [J]. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 2022, 14(5): a041038.
[30] 王晶. LXR 激动剂诱导胃癌细胞发生细胞焦亡机制的初步研究 [D]. 江苏大学, 2022.

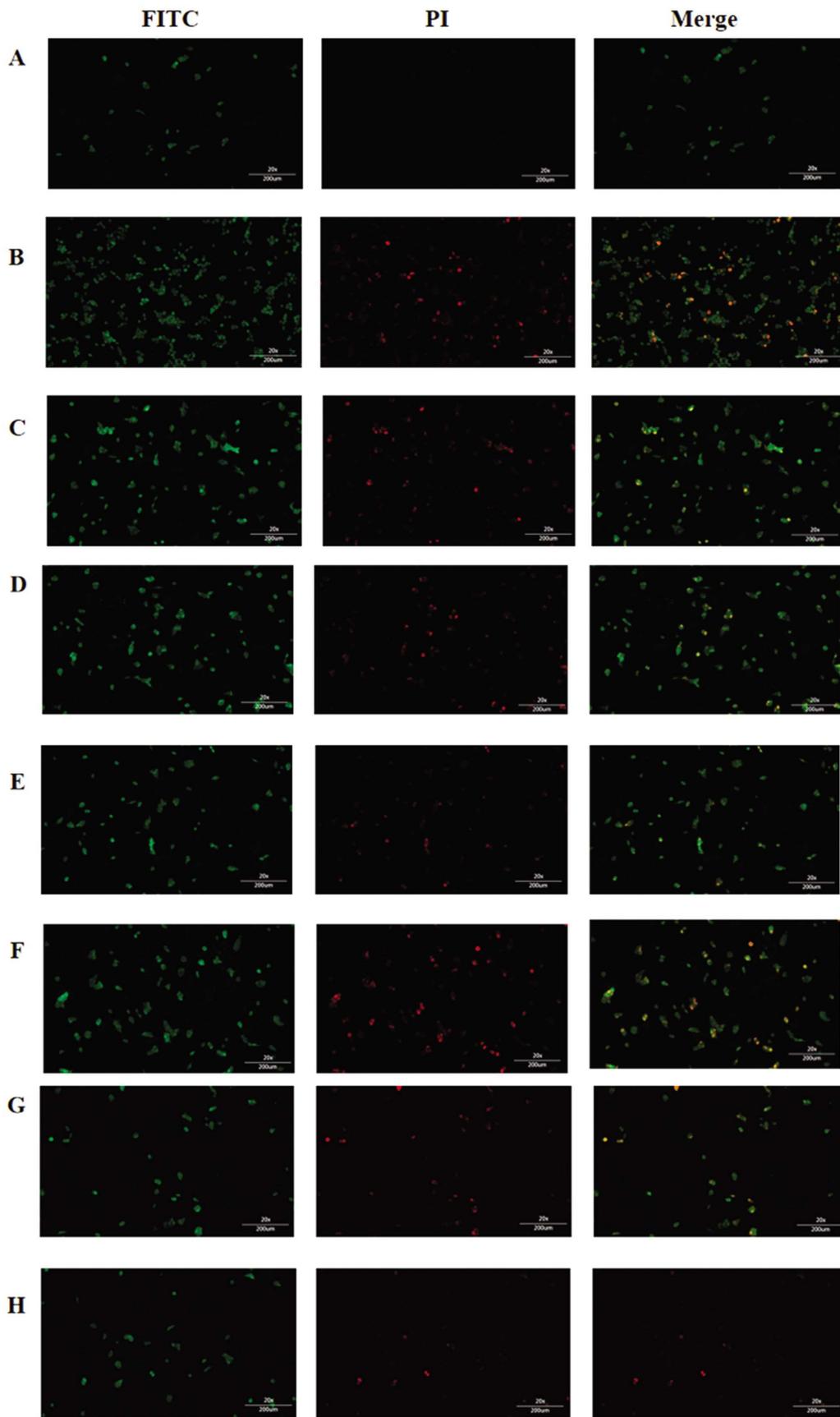


图9 HepG 2 细胞的凋亡结果

Fig. 9 Apoptosis results of HepG 2 cells

Note: A. control group; B. 5-FU group; C. AARTS-H group; D. AARTS-M group; E. AARTS-L group; F. C15TS-H group; G. C15TS-M group; H. C15TS-L group;

Green fluorescence was early apoptotic cells; Red fluorescence indicates late apoptotic cells; Merge represents all apoptotic cells.

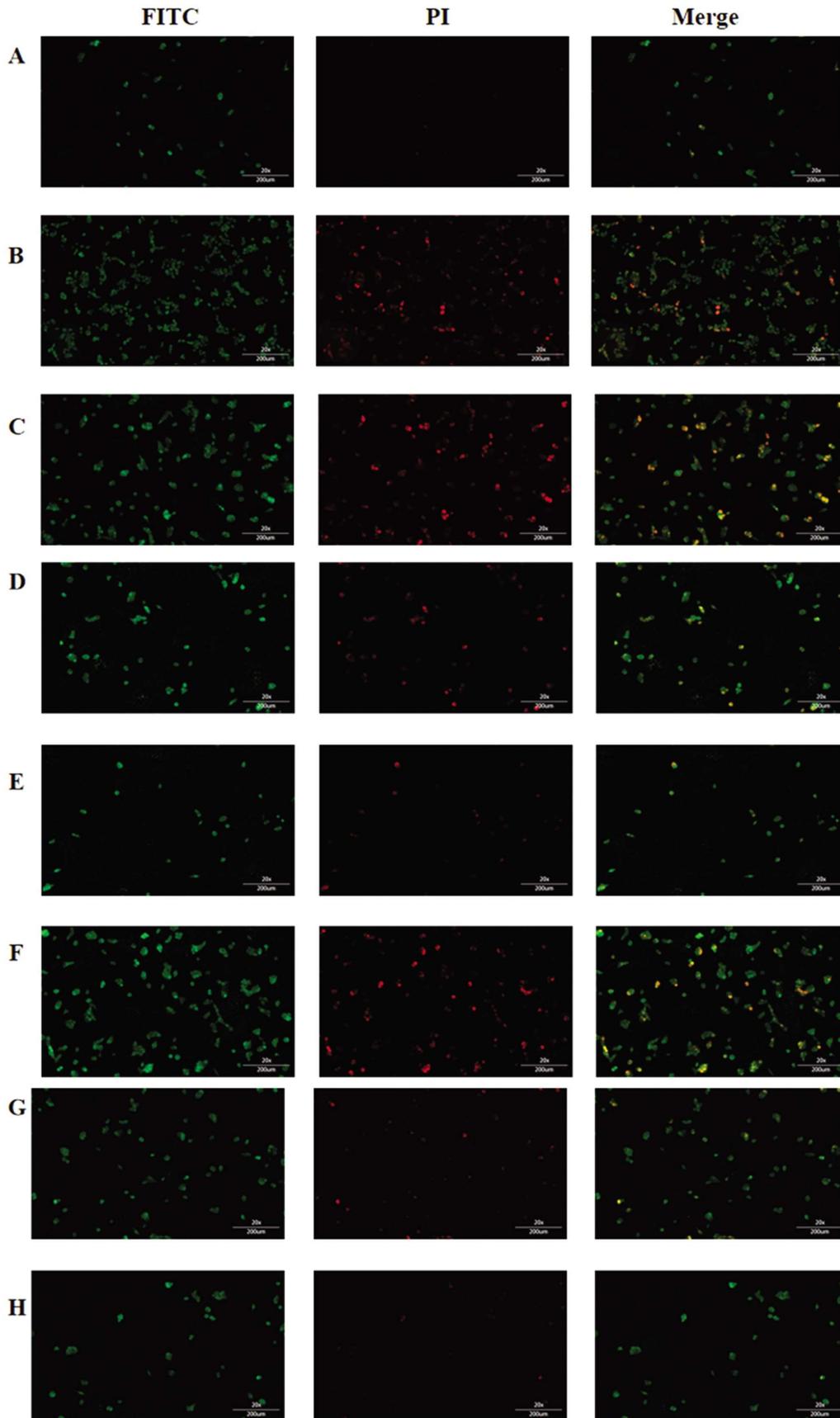


图 10 Huh-7 细胞的凋亡结果

Fig. 10 Apoptosis results of Huh-7 cells

Note: A. control group; B. 5-FU group; C. AARTS-H group; D. AARTS-M group; E. AARTS-L group; F. C15TS-H group; G. C15TS-M group;

H. C15TS-L group;

Green fluorescence was early apoptotic cells; Red fluorescence indicates late apoptotic cells; Merge represents all apoptotic cells.

(下转第 552 页)

- stage of treatment-resistant depression and clinical utility of ketamine/esketamine: A systematic review [J]. *J Affect Disord*, 2022, 318(12): 139-149.
- [18] Medeiros GC, Gould TD, Prueitt WL, et al. Blood-based biomarkers of antidepressant response to ketamine and esketamine: A systematic review and meta-analysis[J]. *Mol Psychiatry*, 2022, 27(9): 3658-3669.
- [19] Siegel AN, Di Vincenzo JD, Brietzke E, et al. Antisuicidal and antidepressant effects of ketamine and esketamine in patients with baseline suicidality: A systematic review [J]. *J Psychiatr Res*, 2021, 137(7): 426-436.
- [20] Meshkat S, Rodrigues NB, Di Vincenzo JD, et al. Pharmacogenomics of ketamine: A systematic review [J]. *J Psychiatr Res*, 2021, 145(7): 27-34.
- [21] Di Vincenzo JD, Siegel A, Lipsitz O, et al. The effectiveness, safety and tolerability of ketamine for depression in adolescents and older adults: A systematic review [J]. *J Psychiatr Res*, 2021, 137 (3): 232-241.
- [22] Wang X, Lin C, Lan L, et al. Perioperative intravenous S-ketamine for acute postoperative pain in adults: A systematic review and meta-analysis[J]. *J Clin Anesth*, 2021, 68(8): 110071.
- [23] 周萍, 朱玉梅, 张维清, 等. 亚麻醉剂量艾司氯胺酮联合舒芬太尼用于老年髋关节置换术患者的临床观察 [J]. *实用药物与临床*, 2022, 25(2): 159-163.
- [24] Monahan K, Weyandt L, Shepard E. Diversity inclusion in clinical trials investigating esketamine for depression: A systematic review[J]. *Exp Clin Psychopharmacol*, 2022, 15(7): 1225-1229.
- [25] Souza-Marques B, Santos-Lima C, Araújo-de-Freitas L, et al. Neurocognitive Effects of Ketamine and Esketamine for Treatment-Resistant Major Depressive Disorder: A Systematic Review[J]. *Harv Rev Psychiatry*, 2021, 29(5): 340-350.
- [26] Gill H, Gill B, Rodrigues NB, et al. The Effects of Ketamine on Cognition in Treatment-Resistant Depression: A Systematic Review and Priority Avenues for Future Research[J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2021, 120(11): 78-85.
- [27] 袁婉秋, 梁磊, 周兵. 艾司氯胺酮联合臂丛麻醉方案在小儿上肢手术中的应用效果[J]. *中国医学创新*, 2022, 19(17): 137-140.
- [28] Weibel S, Rücker G, Eberhart LH, et al. Drugs for preventing postoperative nausea and vomiting in adults after general anaesthesia: a network meta-analysis [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2020, 10 (10): CD012859.
- [29] Bahji A, Vazquez GH, Zarate CA Jr. Erratum to "Comparative efficacy of racemic ketamine and esketamine for depression: a systematic review and meta-analysis" [Journal of Affective Disorders 278C (2021) 542-555] [J]. *J Affect Disord*, 2021, 281(6): 1001.
- [30] Wilkinson ST, Sanacora G. A new generation of antidepressants: an update on the pharmaceutical pipeline for novel and rapid-acting therapeutics in mood disorders based on glutamate/GABA neurotransmitter systems [J]. *Drug Discov Today*, 2019, 24 (2): 606-615.

(上接第 441 页)

- [31] Mayang S, Andreanyta M, Rita C, et al. Chlorogenic Acid Ameliorates Liver Function in Association with Bax Downregulation, P53 Downregulation and Bcl-2 Upregulation in Diabetic Wistar Rat [J]. *BIO Web of Conferences*, 2022, 49.
- [32] Zaki Islam, Masoud Reham E, Hamoud Mohamed M.S, et al. Design, synthesis and cytotoxicity screening of new synthesized pyrimidine-5-carbonitrile derivatives showing marked apoptotic effect[J]. *Journal of Molecular Structure*, 2022, 1259.
- [33] 左天. 竹节参皂苷IV和V诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡的分子机制研究[D]. 武汉轻工大学, 2022.