·肝脏肿瘤·

DOI：10.12449/JCH250215

五倍子酸对肝癌HepG2细胞索拉非尼化疗增敏作用

刘百坤，王志茹，赵文静

吉林省肝胆病医院中心实验室，长春 130062

通信作者：赵文静，xingyuewj@163.com（ORCID：0000-0002-0841-9632）

摘要：目的 观察五倍子酸（GA）联合索拉非尼（Sora）对HepG2细胞的化疗增敏作用，并探讨其作用机制。**方法** 将肝癌HepG2细胞分为对照组、GA组、Sora组和GA+Sora组。CCK8法检测细胞活力，CompuSyn软件分析联合用药指数（CI值）；平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力；流式细胞术检测细胞凋亡；细胞划痕和Transwell小室侵袭实验检测细胞迁移和侵袭能力；Western Blot法检测基质金属蛋白酶（MMP）2、MMP-9和凋亡相关蛋白表达。肝癌HepG2细胞接种于裸鼠背部右下方，植瘤6 d后分为4组：对照组（Control）、GA组、Sora组和GA+Sora组，每周测量1次肿瘤大小和质量，药物干预21 d，处死裸鼠，取肿瘤称重。计量资料多组间比较采用单因素方差分析，进一步两两比较采用LSD-*t*检验。**结果** GA和Sora作用HepG2细胞48 h的IC_{50}值分别为（123.47±5.16）μmol/L和（9.87±0.98）μmol/L，Sora与70 μmol/L GA（IC_{30}）联用后，IC_{50}降至（2.06±0.35）μmol/L，不同浓度Sora与70 μmol/L GA联合用药CI值均<1；各组细胞克隆形成数分别为234.0±20.4、147.0±12.1、129.3±13.3、73.0±7.6，GA+Sora组细胞克隆数明显低于对照组、GA组和Sora组（*P*值均<0.05）；处理48 h后，各组细胞凋亡率分别为（1.98±0.29）%、（15.17±1.56）%、（18.65±1.48）%和（34.60±5.36）%，GA+Sora组细胞凋亡率明显高于对照组、GA组和Sora组（*P*值均<0.05）；处理24 h后，各组细胞迁移率分别为（55.59±5.08）%、（29.34±4.36）%、（21.80±5.16）%和（6.47±2.75）%，GA+Sora组细胞迁移率明显低于对照组、GA组和Sora组（*P*值均<0.05）；处理48 h后，各组穿膜细胞数分别为223.7±13.0、168.3±10.9、155.3±29.1和62.7±19.7，GA+Sora组穿膜细胞数低于对照组、GA组和Sora组（*P*值均<0.05）；与对照组比较，GA组、Sora组和GA+Sora组细胞中MMP-2、MMP-9、B淋巴细胞瘤2（Bcl-2）蛋白表达水平均明显降低（*P*值均<0.05），Bcl-2关联X蛋白（Bax）、裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3（Cleaved caspase-3）蛋白表达水平均明显升高（*P*值均<0.05）。GA组、Sora组和GA+Sora肿瘤体积和瘤重均比对照组减小（*P*值均<0.05）；与Sora组比较，GA+Sora组裸鼠肿瘤的体积和质量均明显减少（*P*值均<0.05）。**结论** GA对Sora化疗有增敏作用，其机制可能与GA和Sora联用后促进HepG2细胞凋亡及抑制细胞迁移、侵袭有关。

关键词：癌，肝细胞；索拉非尼；五倍子酸

基金项目：吉林省卫生与健康技术创新项目（2020J082）

Effect of gallic acid in increasing the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma HepG2 cells to sorafenib

LIU Baikun, WANG Zhiru, ZHAO Wenjing

Central Laboratory of Hepatobiliary Hospital of Jilin, Changchun 130062, China

Corresponding author: ZHAO Wenjing, xingyuewj@163.com (ORCID: 0000-0002-0841-9632)

Abstract: Objective To investigate the chemosensitization effect of gallic acid (GA) combined with sorafenib (Sora) on hepatocellular carcinoma HepG2 cells and related mechanisms. **Methods** HepG2 cells were randomly divided into control group, GA group, Sora group, and GA+Sora group. CCK8 assay was used to measure cell viability; CompuSyn software was used to analyze combination index (CI); colony formation assay was used to evaluate the colony formation ability of cells; flow cytometry was used to measure cell apoptosis; wound healing assay and Transwell chamber assay were used to observe the migration and invasion abilities of cells; Western Blot was used to measure the expression matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), matrix

metalloproteinase 9（MMP-9），and apoptosis-related proteins. HepG2 cells were subcutaneously inoculated into the lower right back of mice，and 6 days later，the mice were divided into control group，GA group，Sora group，and GA+Sora group. Tumor size and body weight were measured once a week，and drug intervention was performed for 21 days. Then the nude mice were sacrificed，and tumor weight was measured. A one-way analysis of variance was used for comparison between multiple groups，and the least significant difference *t*-test was used for further comparison between two groups. **Results** The mean IC_{50} values of GA and Sora for the treatment of HepG2 cells for 48 hours were 123.47±5.16 μmol/L and 9.87±0.98 μmol/L，respectively，and when Sora was combined with 70 μmol/L GA（IC_{30}），IC_{50} decreased to 2.06±0.35 μmol/L；the CI value was<1 for Sora at different concentrations combined with 70 μmol/L GA. The number of cell colonies was 234.0±20.4，147.0±12.1，129.3±13.3，and 73.0±7.6，respectively，in the four groups，and the GA+Sora group had a significantly lower number of cell colonies than the control group，the GA group，and the Sora group（all P<0.05）. After 48 hours of treatment，the cell apoptosis rate was 1.98%±0.29%，15.17%±1.56%，18.65%±1.48%，and 34.60%±5.36%，respectively，in the four groups，and the GA+Sora group had a significantly higher cell apoptosis rate than the control group，the GA group，and the Sora group（all P<0.05）. After 24 hours of treatment，the cell migration rate was 55.59%±5.08%，29.34%±4.36%，21.80%±5.16%，and 6.47%±2.75%，respectively，in the four groups，and the GA+Sora group had a significantly lower cell migration rate than the control group，the GA group，and the Sora group（all P<0.05）. After 48 hours of treatment，the number of transmembrane cells was 223.7±13.0，168.3±10.9，155.3±29.1，and 62.7±19.7，respectively，in the four groups，and the GA+Sora group had a significantly lower number of transmembrane cells than the control group，the GA group，and the Sora group（all P<0.05）. Compared with the control group，the GA group，the Sora group，and the GA+Sora group had significant reductions in the protein expression levels of MMP-2，MMP-9，and Bcl-2（all P<0.05）and significant increases in the protein expression levels of Bax and cleaved caspase-3（all P<0.05）. Compared with the control group，the GA，Sora，and GA+Sora groups had significant reductions in tumor volume and weight（all P<0.05），and compared with the Sora group，the GA+Sora group had significant reductions in tumor volume and weight in nude mice（both P<0.05）. **Conclusion** GA can increase the sensitivity of HepG2 cells to Sora chemotherapy，possibly by promoting cell apoptosis and inhibiting cell migration and invasion after combination with Sora.

Key words：Carcinoma，Hepatocellular；Sorafenib；Gallic Acid

Research funding：Health Science and Health Technology Innovation Project of Jilin Province（2020J082）

原发性肝癌是源于肝细胞或肝内胆管细胞的恶性肿瘤，75%～85%以上的原发性肝癌的病理类型为肝细胞癌（以下简称肝癌）[1-2]。2023年我国肝癌新发病例38.9万，位列恶性肿瘤第四位，年死亡病例33.6万，位居恶性肿瘤第二位[3]。根治性手术切除是肝癌治疗的主要手段，由于肝癌发病隐匿，70%的患者在确诊时已是中晚期，丧失根治性手术切除机会[4]。对于肿瘤体积较大、肝内多发、已发生血管、淋巴结或远处转移的晚期肝癌患者，分子靶向药物治疗是标准治疗策略[5]。索拉非尼（Sorafenib，Sora）是治疗晚期肝癌的一线分子靶向药物[6]，研究表明Sora可有效延长肝癌患者的总体生存时间，改善生存质量[7]，但耐药的发生限制了Sora的临床疗效。从药用植物中寻找具有抗肿瘤活性的化合物，将其与抗肿瘤药物联合应用，是抗肿瘤治疗研究的热点[8]。五倍子酸（gallic acid，GA）是一种存在于山茱萸、五倍子、牡丹皮、掌叶大黄等植物中的天然多酚酸，许多研究表明GA对多种癌细胞具有抗癌活性，包括直肠癌[9]、肺癌[10]、乳腺癌[11]、子宫内膜癌[12]等。本课题组前期研究显示，GA能显著抑制肝癌细胞生长、迁移和侵袭，促进肝癌细胞凋亡和周期阻滞[13]。本研究拟通过体外实验观察GA与Sora联合应用对人肝癌HepG2细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭的影响，体内构建裸鼠肝癌模型，探究GA和Sora联合使用是否具有协同增效作用，为提高Sora治疗肝癌的效果提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞、主要试剂和仪器 人肝癌HepG2细胞株购自江苏凯基生物技术股份有限公司，Sora、GA购于美国MCE公司，高糖DMEM培养基、胎牛血清购自美国Gibco公司，兔抗人B淋巴细胞瘤2原癌基因（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）抗体、兔抗人Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X，Bax）抗体、兔抗人裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3（Cleaved caspase-3）抗体、小鼠抗人基质金属蛋白酶2（matrix metalloproteinase-2，MMP-2）抗体、兔抗人MMP-9抗体购自美国Abcam公司，辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗购自北京

中山金桥生物技术有限公司，CCK8试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司，Transwell细胞培养板、基质胶购自美国Corning公司。CO_2细胞培养箱购自美国Thermo公司，倒置显微镜购自日本Olympus公司，流式细胞仪购自美国Beckman Coulter公司，酶标仪和SDS-PAGE蛋白电泳仪购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌HepG2细胞置于含10%胎牛血清、1%青链霉素的高糖DMEM培养基中，放于恒温培养箱（5% CO_2，37 ℃）中常规传代培养，维持细胞处于对数生长期。

1.2.2 CCK8法检测细胞活力 5×10^3个/孔HepG2细胞接种于96孔板，培养24 h更换100 μL含有不同药物的培养基。GA组以0、25、50、100、150、200、300 μmol/L的浓度梯度干预，Sora组以0、1、2、5、10、20、40 μmol/L的浓度梯度干预，联合应用组以70 μmol/L GA（IC_{30}）[14]+Sora（1、2、5、10、20、40 μmol/L）联合使用，设置等量不含药物和细胞的培养基作为空白对照组，每组设5个复孔，药物干预48 h后酶标仪450 nm处检测吸光度值（OD），计算细胞增殖抑制率。CompuSyn软件计算联合指数（combination index，CI）。

1.2.3 克隆形成实验检测细胞增殖能力 1×10^3个/孔HepG2细胞接种于6孔板，分为4组：对照组（Control）、GA组（70 μmol/L GA）、Sora组（2 μmol/L Sora）、GA+Sora组（70 μmol/L GA+2 μmol/L Sora）。置于CO_2培养箱培养14 d，4%多聚甲醛溶液固定，PBS缓冲液洗涤3次，结晶紫染色，镜下计数>10个细胞的集落数。实验重复3次。

1.2.4 Annexin V-FITC/PI双染流式细胞术检测细胞凋亡 细胞分组方法同1.2.3节。2×10^5个/孔HepG2细胞接种于6孔板，不同药物干预48 h后收集细胞，严格按照试剂盒染色说明书对细胞染色，流式细胞仪检测并计算细胞凋亡率。细胞凋亡率=（早期凋亡细胞数+晚期凋亡细胞数）/细胞总数×100%。实验重复3次。

1.2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 细胞分组方法同1.2.3节。1×10^6个/孔HepG2细胞接种于6孔板，培养24 h后200 μL无菌枪头垂直6孔板底部划痕并加药处理，加药0 h和24 h后倒置显微镜下观察、拍照。Image J软件对划痕距离进行分析，计算细胞迁移率。细胞迁移率=（0 h划痕间距—24 h划痕间距）/0 h划痕间距×100%。实验重复3次。

1.2.6 Transwell实验检测细胞侵袭能力 细胞分组方法同1.2.3节。取不同药物干预48 h的HepG2细胞接种于上室，下室加入含20%胎牛血清的完全培养基600 μL，24 h取出小室，4%多聚甲醛固定15 min，结晶紫染色液染色5 min，棉签擦去上室细胞，待小室干燥后镜下观察，计数穿膜细胞数。

1.2.7 Western Blot法检测HepG2细胞凋亡相关蛋白、MMP-2和MMP-9蛋白表达水平 细胞分组方法同1.2.3节。药物干预48 h后收集细胞，根据细胞沉淀数量分别加入一定体积的RIPA裂解液（含1% PMSF），冰上裂解30 min，4 ℃、12 000 r/min离心15 min，收集上清液，BCA蛋白定量检测试剂盒法检测蛋白浓度。取30 μg蛋白进行SDS-PAGE电泳并转至PVDF膜，5% BSA封闭4 h，按照抗体说明书配置一抗4 ℃孵育过夜。TBST缓冲液洗膜3次加入1∶1 000稀释二抗，室温孵育2 h，洗膜3次化学发光试剂显影并拍照。Image J软件分析条带灰度值，以目的蛋白条带灰度值与β-actin条带灰度值比值表示目的蛋白的相对表达水平。实验重复3次。

1.2.8 裸鼠异种移植瘤模型 SPF级雄性裸鼠30只（6周龄，体质量18～22 g）购自长春市亿斯实验动物技术有限责任公司，实验动物生产许可证编号：SCXK（吉）2020-0002，实验动物使用许可证编号：SYXK（吉）2021-0020。收集HepG2细胞，磷酸缓冲盐溶液制备成细胞悬液，皮下注射0.2 mL（含5×10^6 HepG2细胞）细胞悬液到裸鼠背部右下方。植瘤6 d后按照肿瘤大小顺序蛇形均衡分为4组：对照组（Control）、GA组、Sora组和GA+Sora组，每组7只。GA和Sora的体内给药剂量和方式参考文献[15]和[16]，按照GA组（80 mg/kg GA）、Sora组（20 mg/kg Sora）、GA+Sora组（80 mg/kg GA+20 mg/kg Sora）的浓度给药。按照上述药物浓度隔天给药1次（灌胃体积按照0.1 mL/10 g标准计算），对照组给予生理盐水。监测裸鼠活动及一般状态，每周测量1次肿瘤大小和质量，根据公式肿瘤体积=长径×短径^2/2，估算肿瘤体积。药物干预21 d，处死裸鼠，取肿瘤称重。

1.3 统计学方法 Graphpad Prism 7.0软件计算药物30%细胞生长抑制浓度（30% inhibition concentration，IC_{30}）和半数抑制浓度（50% inhibition concentration，IC_{50}）。采用SPSS 20.0软件进行数据分析，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，进一步两两比较采用LSD-t检验。$P<0.05$为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GA与Sora联用对HepG2细胞增殖抑制作用 不同浓度GA、Sora，以及两药联合对HepG2细胞增殖均有抑制作用，且具有浓度依赖性。GA和Sora作用HepG2细胞48 h的IC_{50}值分别为（123.47±5.16）μmol/L和（9.87±0.98）μmol/L，Sora与70 μmol/L GA（IC_{30}）联用后，IC_{50}降至（2.06±0.35）μmol/L。利用CompuSyn软件计算CI值，

表1 GA与Sora联合作用对HepG2细胞增殖抑制作用

Table 1 Combination effect of GA with Sora on the proliferation of HepG2 cells

组别	药物浓度(μmol/L)	抑制率(%)	CI
对照组	0	0	–
GA组	25	9.46±2.74	–
	50	20.80±4.64	–
	100	42.77±5.19	–
	150	58.32±5.04	–
	200	67.88±5.01	–
	300	75.46±4.76	–
Sora组	1	7.33±3.37	–
	2	13.47±3.92	–
	5	29.50±4.73	–
	10	54.40±6.32	–
	20	66.24±5.39	–
	40	82.57±2.97	–
GA+Sora组	70+1	36.55±5.56[1)]	0.816
	70+2	49.14±2.83[1)]	0.549
	70+5	64.82±4.60[1)]	0.647
	70+10	71.05±4.70[1)]	0.713
	70+20	77.55±2.36[1)]	0.856
	70+40	85.63±5.37[1)]	0.760

注：与同浓度Sora组比较，1）t=−50.051～−3.131，P<0.05。“–”表示没有结果。

不同浓度Sora与70 μmol/L GA联合用药CI值均<1，说明GA与Sora联合使用具有协同作用（表1）。根据药物联用选择原则[17]（CI>1拮抗，CI=1叠加，0.6<CI<1协同，CI<0.6强协同）确定70 μmol/L GA与2 μmol/L Sora为后续实验联合用药组药物浓度，作用时间48 h。

2.2 GA与Sora联用对HepG2细胞增殖能力的影响 加药处理后各组细胞培养14 d，GA+Sora组细胞克隆数（73.0±7.6）明显低于对照组（234.0±20.4）、GA组（147.0±12.1）和Sora组（129.3±13.3）（P值均<0.05）（图1）。

2.3 GA与Sora联用对HepG2细胞凋亡的影响 Annexin V-FITC/PI双染实验结果（图2）显示，对照组、GA组、Sora组和GA+Sora组细胞凋亡率分别为（1.98±0.29）%、（15.17±1.56）%、（18.65±1.48）%和（34.60±5.36）%。与对照组比较，GA组、Sora组、GA+Sora组细胞凋亡率均明显升高（P值均<0.05）；与GA组、Sora组比较，GA+Sora组细胞凋亡率显著升高（P值均<0.05）。

2.4 GA和Sora联用对HepG2细胞迁移能力的影响 加药处理24 h后，对照组、GA组、Sora组和GA+Sora组细胞迁移率分别为（55.59±5.08）%、（29.34±4.36）%、（21.80±5.16）%和（6.47±2.75）%。与对照组比较，GA组、Sora组和GA+Sora组细胞迁移率均降低（P值均<0.05）；GA组与Sora组细胞迁移率比较，差异无统计学意义（P>0.05）；与GA组、Sora组比较，GA+Sora组细胞迁移率降低（P值均<0.05）（图3）。

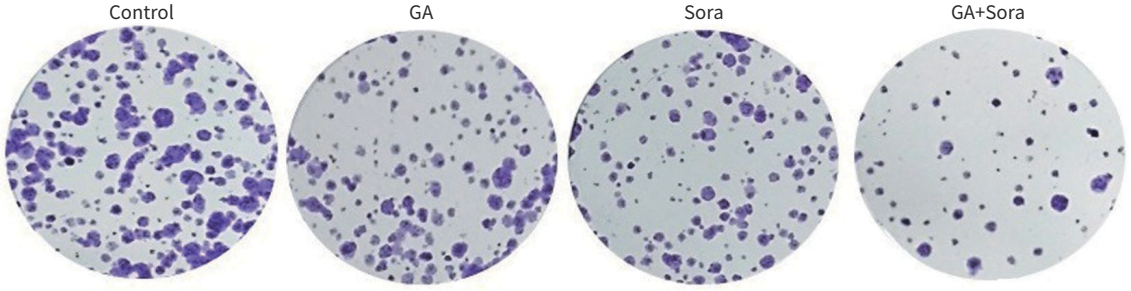


图1 结晶紫染色观察各组细胞克隆形成能力

Figure 1 Colony formation capacity of cells in various groups detected with crystal violet

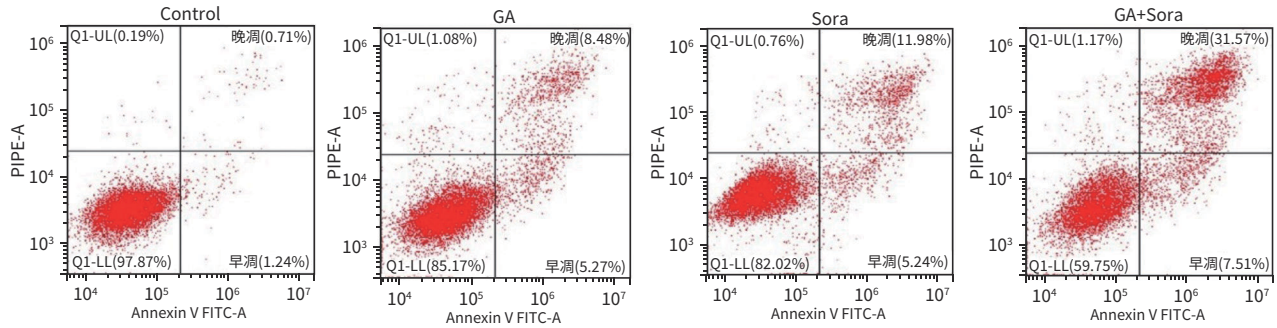


图2 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

Figure 2 Apoptotic rates of cells in various groups detected by flow cytometry

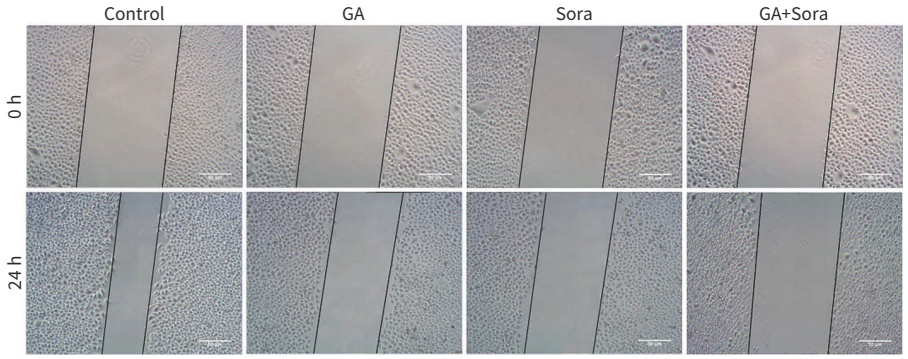


图3　细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力（×40）

Figure 3　Migration abilities of cells in various groups detected by scratch assay（×40）

2.5　GA与Sora联用对HepG2细胞侵袭能力的影响　Transwell实验24 h后，对照组、GA组、Sora组和GA+Sora组HepG2细胞穿膜细胞数分别为223.7±13.0、168.3±10.9、155.3±29.1和62.7±19.7，与对照组比较，GA组、Sora组和GA+Sora组穿膜细胞数均降低（*P*值均<0.05）；与GA组、Sora组比较，GA+Sora组穿膜细胞数明显降低（*P*值均<0.05）（图4）。

2.6　GA与Sora联用对HepG2细胞MMP-2、MMP-9和凋亡相关蛋白表达的影响　与对照组比较，GA组、Sora组和GA+Sora组细胞中MMP-2和MMP-9表达水平均降低（*P*值均<0.05），凋亡相关蛋白Bax和Cleaved caspase-3蛋白表达均增加（*P*值均<0.05），Bcl-2蛋白表达降低（*P*值均<0.05）；与GA组和Sora组比较，GA+Sora组细胞中MMP-2和MMP-9表达水平均明显降低（*P*值均<0.05），凋亡相关蛋白Bax和Cleaved caspase-3蛋白表达均增加（*P*值均<0.05），Bcl-2蛋白表达降低（*P*值均<0.05）（图5，表2）。

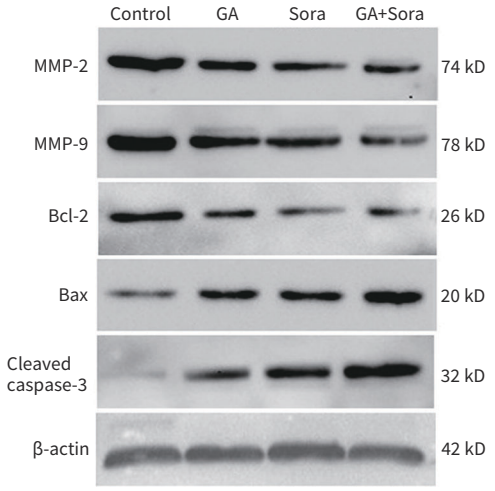


图5　HepG2细胞MMP-2、MMP-9、Bcl-2、Bax和Cleaved caspase-3蛋白表达

Figure 5　The expression of MMP-2、MMP-9、Bcl-2、Bax and Cleaved caspase-3 of HepG2 cells

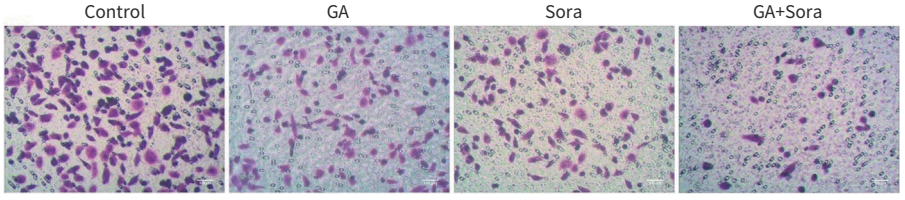


图4　Transwell实验检测各组细胞侵袭能力（×100）

Figure 4　Invasion abilities of cells in various groups detected by Transwell assay（×100）

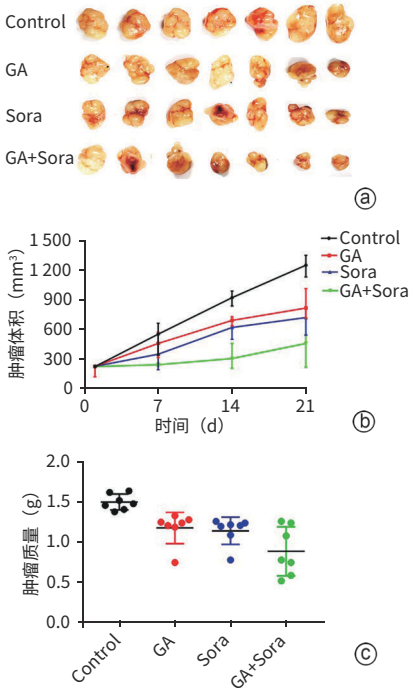
表2　HepG2细胞MMP-2、MMP-9、Bcl-2、Bax和Cleaved caspase-3蛋白表达水平

Table 2　Expression levels of MMP-2、MMP-9、Bcl-2、Bax and Cleaved caspase-3 proteins of HepG2 cells

组别	MMP-2	MMP-9	Bcl-2	Bax	Cleaved caspase-3
对照组	1.07±0.17	1.20±0.17	0.82±0.11	0.41±0.04	0.18±0.04
GA组	0.65±0.08[1)]	0.76±0.05[1)]	0.36±0.06[1)]	0.61±0.05[1)]	0.46±0.07[1)]
Sora组	0.60±0.05[1)]	0.69±0.04[1)]	0.37±0.05[1)]	0.60±0.05[1)]	0.61±0.09[1)]
GA+Sora组	0.34±0.06[1)2)3)]	0.52±0.04[1)2)3)]	0.28±0.03[1)2)3)]	0.73±0.05[1)2)3)]	0.92±0.13[1)2)3)]
*F*值	25.944	127.208	39.235	25.722	35.535
*P*值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与对照组比较，1）*P*<0.05；与GA组比较，2）*P*<0.05；与Sora组比较，3）*P*<0.05。

2.7　GA与Sora联用对裸鼠肿瘤生长的影响　4组裸鼠在喂养过程中，精神、饮食及排便均比较正常，体质量在喂养过程中增加，其中GA组和GA+Sora组体质量增加较多，其次为Sora组，Sora组与对照组比较，差异无统计学意义（P>0.05）。与对照组比较，GA组、Sora组及GA+Sora组均显著抑制裸鼠肿瘤的生长和肿瘤大小（P值均<0.05）；与Sora组比较，GA+Sora组裸鼠肿瘤的体积和质量明显减少（P值均<0.05）（图6）。



注：a，各组裸鼠肿瘤组织；b，各组裸鼠肿瘤体积变化；c，各组裸鼠肿瘤质量变化。

图6　GA与Sora联合对裸鼠肿瘤生长的影响

Figure 6　Effect of GA combined with Sora on tumor growth in nude mice

3　讨论

肝癌是我国常见的恶性实体肿瘤[18]。Sora是治疗晚期肝癌的一线靶向药物，具有抑制肿瘤细胞增殖及阻断肿瘤血管生成的双重抗肿瘤作用[19]。多项国际性临床试验结果表明Sora可延长晚期肝癌患者生存期、提高生存质量，但耐药性和毒副作用限制了其临床应用。据报道，许多从中草药提取的小分子与化疗药物联合使用时表现出了增强的临床疗效[20-21]。GA具有抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗菌、抗糖尿病等多种药理活性。张仲卫等[22]研究结果表明，GA联合顺铂在体内外均具有协同抗食管癌的作用。杨勤龙[23]使用含有GA成分的中药大黄蛰虫丸治疗食管癌患者，患者病情逐渐好转。本研究前期结果显示，GA对肝癌细胞的生长、迁移和侵袭均具有显著的抑制作用，并通过线粒体途径促进肝癌细胞凋亡[13]。这些结果提示，GA可与其他化疗药物联合应用于肿瘤治疗。本实验首先观察GA联合Sora抑制HepG2细胞增殖的协同抑制作用，结果显示，GA与Sora对肝癌HepG2细胞增殖均具有抑制作用，两药联合对HepG2细胞抑制作用更明显。Sora作用HepG2细胞48 h的IC_{50}值为（9.87±0.98）μmol/L，与70 μmol/L GA（IC_{30}）联合用药后，IC_{50}降至（2.06±0.35）μmol/L，且不同浓度Sora与70 μmol/L GA联合用药CI值均<1。为进一步证实GA与Sora联合体内协同抗肝癌作用，本研究在裸鼠肝癌移植瘤模型中测定了GA单药组（80 mg/kg）、Sora单药（20 mg/kg）组及GA（80 mg/kg）和Sora（20 mg/kg）联用组的肿瘤生长情况，结果显示，与对照组、GA或Sora单药组相比，联用组则肿瘤体积明显减少，GA与Sora联合应用抗肿瘤效果最佳。体外、体内实验结果均提示GA联合Sora有协同抗肝癌作用，可降低Sora剂量，减少不良反应，这对于临床用药有重要的指导意义。

Sora是一种多靶点抗肿瘤药，其药理机制之一是通过抑制Raf/Mek/Erk信号转导通路抑制肿瘤生长，促进细胞凋亡。本研究从细胞凋亡角度观察GA化疗增敏作用及可能机制，结果显示，GA与Sora联用可显著增加HepG2细胞凋亡比例。Bcl-2蛋白家族是线粒体途径凋亡的主要调控因子，家族中的Bcl-2是一个主要的抑凋亡蛋白，通过阻止线粒体细胞色素C的释放发挥抗凋亡作用，Bax是主要的促凋亡蛋白，通过增加线粒体膜通透性，释放细胞色素C而引起凋亡发生[24]。Bax蛋白的高表达、Bcl-2蛋白的低表达作用于线粒体，导致线粒体膜通透性转运孔开放，细胞色素C、Smac等凋亡相关因子释放入胞浆，进而激活Caspase-3，引起细胞凋亡[25]。本研究发现GA对Sora化疗增敏的作用机制与升高促凋亡蛋白Bax表达、降低抑凋亡蛋白Bcl-2表达，增加凋亡蛋白Caspase-3的活化有关。

肿瘤细胞转移是癌症死亡的主要原因，肝癌的高死亡率与肝癌细胞的高转移和高侵袭力密切相关[26]。本研究划痕抑制和Transwell侵袭实验结果显示，GA和Sora单药对HepG2细胞迁移和侵袭能力的抑制作用较弱，联用后可显著降低HepG2细胞凋亡迁移和侵袭能力。细胞外基质降解和穿透基底膜是肿瘤发生侵袭和转移的关键步骤，MMP能够降解基底膜和细胞外基质中的Ⅳ型胶原、层粘连蛋白和弹性蛋白等成分，从而促进癌细胞对邻近和远端组织的迁移和侵袭[26]。研究显示MMP-2和MMP-9与肿瘤的侵袭、转移和预后密切相关[27]。Western Blot分析结果显示联合用药组MMP-2和MMP-9

表达水平显著降低，GA与Sora联用可通过降低MMP-2和MMP-9蛋白的表达，抑制肝癌细胞的迁移和侵袭。

综上所述，本研究发现GA与Sora在体内、体外抗肝癌作用上均发挥协同作用，这种协同作用可能与促进肝癌细胞凋亡、抑制迁移和侵袭有关。这些结果提示将GA与Sora联合使用可能是一个有前景的肝癌临床治疗策略。课题组后续将从细胞迁移、侵袭信号通路及动物实验等角度进一步深入探索GA对Sora化疗增敏的作用机制，以期为临床提高肝癌治疗效果提供实验依据。

伦理学声明：本研究方案于2024年1月6日经由吉林大学基础医学院实验动物伦理委员会审批，批号：2024年研审第17号。符合实验室动物管理与使用准则。

利益冲突声明：本文不存在任何利益冲突。

作者贡献声明：刘百坤负责课题设计，资料分析，撰写论文；王志茹参与收集数据，修改论文；赵文静负责拟定写作思路，指导撰写文章并最后定稿。

参考文献：

[1] ZHOU J, SUN HC, WANG Z, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of primary liver cancer (2022 edition)[J]. Liver Cancer, 2023, 12(5): 405-444. DOI: 10.1159/000530495.

[2] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.

[3] YANG XL, XUE JH, CHEN TY, et al. Effect of atractylone on the viability and apoptosis of hepatoma HepG2 cells and related mechanism[J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(11): 2589-2594. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.11.020.
杨雪丽, 薛建华, 陈天阳, 等. 苍术酮对肝癌HepG2细胞活性、凋亡的影响及其相关机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(11): 2589-2594. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2021.11.020.

[4] LI Z, LIU JK. The mechanism of p53 signaling pathway regulating ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J]. J Clin Hepatol, 2023, 39(4): 956-960. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.04.032.
李震, 刘江凯. p53信号通路调控铁死亡在肝细胞癌中的作用机制[J]. 临床肝胆病杂志, 2023, 39(4): 956-960. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2023.04.032.

[5] General Office of National Health Commission. Standard for diagnosis and treatment of primary liver cancer (2022 edition)[J]. J Clin Hepatol, 2022, 38(2): 288-303. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.02.009.
国家卫生健康委办公厅. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2022, 38(2): 288-303. DOI: 10.3969/j.issn.1001-5256.2022.02.009.

[6] BENSON AB, D'ANGELICA MI, ABBOTT DE, et al. Guidelines insights: Hepatobiliary cancers, version 2.2019[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2019, 17(4): 302-310. DOI: 10.6004/jnccn.2019.0019.

[7] XIAN LF, ZHAO P, CHEN X, et al. Heterogeneity, inherent and acquired drug resistance in patient-derived organoid models of primary liver cancer[J]. Cell Oncol (Dordr), 2022, 45(5): 1019-1036. DOI: 10.1007/s13402-022-00707-3.

[8] AI XY, HOU XF, FENG NP. Combination of shikonin and gefitinib reverses drug resistance in human non-small cell lung cancer and its mechanism[J]. China J Chin Mater Med, 2024, 49(1): 175-184. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20230810.401.
艾鑫仪, 侯雪峰, 冯年平. 紫草素与吉非替尼联用逆转人非小细胞肺癌耐药及其机制研究[J]. 中国中药杂志, 2024, 49(1): 175-184. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20230810.401.

[9] HONG ZC, TANG PL, LIU B, et al. Erratum for ferroptosis-ralated genes for overall survival prediction in patients with colorectal cancer can be inhibited by gallic acid[J]. Int J Biol Sci, 2022, 18(4): 1398-1399. DOI: 10.7150/ijbs.69081.

[10] KO EB, JANG YG, KIM CW, et al. Gallic acid hindered lung cancer progression by inducing cell cycle arrest and apoptosis in A549 lung cancer cells via PI3K/Akt pathway[J]. Biomol Ther (Seoul), 2022, 30(2): 151-161. DOI: 10.4062/biomolther.2021.074.

[11] ABOREHAB NM, ELNAGAR MR, WALY NE. Gallic acid potentiates the apoptotic effect of paclitaxel and carboplatin via overexpression of Bax and P53 on the MCF-7 human breast cancer cell line[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2021, 35(2): e22638. DOI: 10.1002/jbt.22638.

[12] BULBUL MV, KARABULUT S, KALENDER M, et al. Effects of gallic acid on endometrial cancer cells in two and three dimensional cell culture models[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2021, 22(6): 1745-1751. DOI: 10.31557/APJCP.2021.22.6.1745.

[13] SUN GJ, ZHANG SQ, XIE YR, et al. Gallic acid as a selective anticancer agent that induces apoptosis in SMMC-7721 human hepatocellular carcinoma cells[J]. Oncol Lett, 2016, 11(1): 150-158. DOI: 10.3892/ol.2015.3845.

[14] XU WB, XIE SD, CHEN X, et al. Effects of quercetin on the efficacy of various chemotherapeutic drugs in cervical cancer cells[J]. Drug Des Devel Ther, 2021, 15: 577-588. DOI: 10.2147/DDDT.S291865.

[15] SHI CJ, ZHENG YB, PAN FF, et al. Gallic acid suppressed tumorigenesis by an lncRNA MALAT1-Wnt/β-catenin axis in hepatocellular carcinoma[J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 708967. DOI: 10.3389/fphar.2021.708967.

[16] LI ZJ, DAI HQ, HUANG XW, et al. Artesunate synergizes with sorafenib to induce ferroptosis in hepatocellular carcinoma[J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(2): 301-310. DOI: 10.1038/s41401-020-0478-3.

[17] CHOU TC. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies[J]. Pharmacol Rev, 2006, 58(3): 621-681. DOI: 10.1124/pr.58.3.10.

[18] CHEN H, NING L, CAI L, et al. Synergistic antitumor effect of evodiamine combined with sorafenib on hepatocellular carcinoma HepG2 cells[J]. J Hubei Univ Sci Technol Med Sci, 2023, 37(6): 461-464, 480. DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2023.06.0461.
陈慧, 宁琳, 蔡丽, 等. 索拉非尼联合吴茱萸碱对肝癌HepG2细胞的协同抗肿瘤作用[J]. 湖北科技学院学报(医学版), 2023, 37(6): 461-464, 480. DOI: 10.16751/j.cnki.2095-4646.2023.06.0461.

[19] CHEN C, XU HL, WANG P, et al. Inhibition effect of sorafenib combined with the Saponin fraction from *Gleditsia sinensis* on HepG2 cells[J]. J Clin Exp Med, 2019, 18(2): 143-146. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2019.02.009.
陈成, 许汉林, 王平, 等. 猪牙皂皂苷与索拉非尼联用对肝癌HepG2细胞的抑制作用及其机制[J]. 临床和实验医学杂志, 2019, 18(2): 143-146. DOI: 10.3969/j.issn.1671-4695.2019.02.009.

[20] TANG MX, YANG MJ, HE KY, et al. Glycyrrhetinic acid remodels the tumor microenvironment and synergizes with doxorubicin for breast cancer treatment in a murine model[J]. Nanotechnology, 2021, 32(18): 185702. DOI: 10.1088/1361-6528/abe076.

[21] WANG XQ, LI QF, CHEN L, et al. Inhibitory effect of curcumin on sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma and its regulatory mechanism[J/OL]. Chin J Hepat Surg (Electronic Edition), 2024, 13(5): 729-735. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3232.2024.05.023.
王向前, 李清峰, 陈磊, 等. 姜黄素抑制肝细胞癌索拉非尼耐药作用及其调控机制[J/OL]. 中华肝脏外科手术学电子杂志, 2024, 13(5): 729-735. DOI: 10.3877/cma.j.issn.2095-3232.2024.05.023.

[22] ZHANG ZW, LI ZG, LI CX. Combination of gallic acid and cisplatin inhibits esophageal cancer by downregulating COX-2[J]. Chin J Surg Integr Tradit West Med, 2024, 30(4): 562-567. DOI: 10.3969/j.issn.1007-6948.2024.04.025.
张仲卫, 李志刚, 李彩霞. 没食子酸联合顺铂通过下调环氧化酶-2抑制食管癌的实验研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2024, 30(4): 562-567. DOI: 10.3969/j.issn.1007-6948.2024.04.025.

[23] YANG QL. Treating advanced malignancies mainly with Dahuang

Zhechong pill[J]. Clin J Chin Med, 2013, 5(19): 16-17. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7860.2013.19.008.
杨勤龙. 大黄蛰虫丸为主治疗晚期恶性肿瘤[J]. 中医临床研究, 2013, 5(19): 16-17. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7860.2013.19.008.
[24] YUAN CL, CHEN GP, JING CB, et al. Eriocitrin, a dietary flavonoid suppressed cell proliferation, induced apoptosis through modulation of JAK2/STAT3 and JNK/p38 MAPKs signaling pathway in MCF-7 cells[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2022, 36(1): e22943. DOI: 10.1002/jbt.22943.
[25] WANG ZY, ZHANG H, ZHOU JH, et al. Eriocitrin from lemon suppresses the proliferation of human hepatocellular carcinoma cells through inducing apoptosis and arresting cell cycle[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2016, 78(6): 1143-1150. DOI: 10.1007/s00280-016-3171-y.
[26] HAN QQ, YE MR, JIN QL. Demethylzeylasteral inhibits proliferation, migration and invasion and promotes apoptosis of non-small cell lung cancer cells by inhibiting the AKT/CREB signaling pathway[J]. J South Med Univ, 2024, 44(2): 280-288. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2024.02.10.
韩齐齐, 叶梦然, 金齐力. 去甲泽拉木醛通过抑制AKT/CREB信号通路抑制非小细胞肺癌细胞的增殖、迁移和侵袭[J]. 南方医科大学学报, 2024, 44(2): 280-288. DOI: 10.12122/j.issn.1673-4254.2024.02.10.
[27] XU GS, JIANG HB, PAN Q, et al. Inhibitory effects of betulinic acid on migration and invasion of gastric cancer MGC-803 cells and their mechanisms[J]. J Jilin Univ Med Ed, 2022, 48(1): 122-128. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20220115.
许广松, 蒋海兵, 盘箐, 等. 桦木酸对胃癌MGC-803细胞迁移和侵袭的抑制作用及其机制[J]. 吉林大学学报(医学版), 2022, 48(1): 122-128. DOI: 10.13481/j.1671-587X.20220115.

收稿日期：2024-07-09；**录用日期：**2024-09-18
本文编辑：王亚南

引证本文：LIU BK, WANG ZR, ZHAO WJ. Effect of gallic acid in increasing the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma HepG2 cells to sorafenib[J]. J Clin Hepatol, 2025, 41(2): 292-299.
刘百坤, 王志茹, 赵文静. 五倍子酸对肝癌HepG2细胞索拉非尼化疗增敏作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2025, 41(2): 292-299.

·国外期刊精品文章简介·

Hepatology | 多中心、回顾性研究比较TACE与TACE联合TKI和ICI作为不可切除肝细胞癌的转化治疗方案(GUIDANCE001)

多数肝细胞癌(HCC)确诊时已进展至中晚期或剩余肝体积不足，仅少数患者可获得Ⅰ期根治性肝切除术机会。针对不可切除HCC，欧美及亚洲指南推荐经动脉化疗栓塞术(TACE)作为中晚期标准治疗，部分亚洲指南甚至将其扩展至晚期患者。临床实践表明，酪氨酸激酶抑制剂(TKI)与TACE联用具有安全性，而免疫检查点抑制剂(ICI)的引入则开启了联合治疗新模式。最新证据提示，TACE联合TKI和ICI的三联方案可能较单纯TACE进一步延长生存，但这一策略的适用人群尚未明确。过度联合治疗可能增加不良反应风险，损害患者生活质量，因此亟需甄别真正受益于三联疗法的患者亚群。

2025年1月，来自广西医科大学附属肿瘤医院钟鉴宏、马良及桂林医科大学附属医院喻亚群共同通讯的研究回顾性分析了2019年1月—2023年6月中国广西壮族自治区20家医疗中心收治的不可切除HCC患者数据，旨在比较单纯TACE与三联方案的总生存期(OS)、无进展生存期(PFS)的差异，评估两个方案在促进后续肝切除方面的效能差异，并探索可能从三联疗法中获益的特定患者群体。通过真实世界数据分析，该研究试图揭示临床实践中转化治疗反应的异质性，为个体化治疗决策提供循证依据。该研究同时关注了术后病理完全缓解(pCR)率、肿瘤分化程度及微血管侵犯等病理指标，以全面评估转化治疗的生物学效应。研究结果有望为优化不可切除HCC分层治疗策略、平衡疗效与安全性等提供关键证据。

该研究发现，相较于仅接受TACE的患者，接受三联疗法的患者有显著更优的OS和PFS。然而，亚组分析提示，这一积极效果仅在中期及晚期HCC患者中得到了确认，而早期HCC患者并未出现显著改善。值得注意的是，三联疗法组的患者在接受转化治疗后，其接受肝切除术的比例显著高于TACE单药治疗组(36.4% vs 23.5%)。尤为突出的是，在那些成功接受了肝切除术的患者中，三联疗法组展现出了更高的pCR率(32.1% vs 11.1%)。然而，三联疗法组的严重不良事件发生率显著高于TACE单药治疗组(35.6% vs 27.0%)。

总之，三联疗法在提高OS、PFS、肝切除率和pCR率方面表现出显著优势，但也伴随着更高的严重不良事件发生率。这些结果主要适用于中晚期HCC患者。

摘译自 YANG DL, YE L, ZENG FJ, et al. Multicenter, retrospective GUIDANCE001 study comparing transarterial chemoembolization with or without tyrosine kinase and immune checkpoint inhibitors as conversion therapy to treat unresectable hepatocellular carcinoma: Survival benefit in intermediate or advanced, but not early, stages[J]. Hepatology, 2025. DOI: 10.1097/HEP.0000000000001229.[Epub ahead of print]

（广西医科大学附属肿瘤医院肝胆外科 杨大龙 报道）