

· 论 著 ·

柴胡皂苷 b2 通过调控沉默信息调节因子 6 介导的糖代谢通路减轻二乙基亚硝胺诱导的小鼠原发性肝癌

有曼¹, 张虹¹, 何广宏¹, 孟璐¹, 李瑞芳², 王红伟²

〔1. 河南省洛阳正骨医院(河南省骨科医院)药学部, 河南 洛阳 471000; 2. 河南科技大学基础医学院药理学系, 河南 洛阳 471000〕

摘要: 目的 探讨柴胡皂苷 b2(SSb2)对二乙基亚硝胺(DEN)诱导的原发性肝癌小鼠的肝癌抑制作用及对沉默信息调节因子 6(SIRT6)介导的糖代谢通路的影响。方法 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组、肝癌模型组(DEN 50 mg·kg⁻¹)、模型+SSb2 1.5, 3.0 和 6.0 mg·kg⁻¹组及模型+多柔比星(DOX)1 mg·kg⁻¹组。除正常对照组外,其余组小鼠 ip 给予 DEN 50 mg·kg⁻¹,每周 2 次;第 5 周开始 DEN 给药减为每周 1 次,同时按分组给予 SSb2 和 DOX,正常对照组在建模期间给予等体积生理盐水,给药持续 19 周。第 19 周末,收集小鼠血清和肝。计算肝指数,采用 HE 染色观察肝组织病理变化,试剂盒检测血清中谷草转氨酶(GOT)、谷丙转氨酶(GPT)、乳酸脱氢酶(LDH)和甲胎蛋白(AFP)水平;Western 印迹法检测肝组织中 SIRT6、低氧诱导因子 1 α (HIF-1 α)、葡萄糖转运蛋白 1(GLUT1)、丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 1(PDK1)和乳酸脱氢酶 A(LDHA)蛋白表达水平。结果 与正常对照组相比,模型组小鼠肝指数明显升高($P<0.01$);与模型组相比,模型+SSb2 各剂量组和模型+DOX 组小鼠肝指数显著降低($P<0.01$)。HE 染色结果显示,模型组肝细胞异形性明显,癌巢组织多发,模型+SSb2 6.0 mg·kg⁻¹组和模型+DOX 组细胞坏死增多,异形核及癌巢减少。血清指标结果显示,与正常对照组相比,模型组血清中 GOT, GPT, LDH 和 AFP 水平均显著升高($P<0.01$);与模型组相比,模型+SSb2 3.0 和 6.0 mg·kg⁻¹组及模型+DOX 组小鼠血清中 GOT, GPT, LDH 和 AFP 水平均显著降低($P<0.01$),模型+SSb2 1.5 mg·kg⁻¹组 GOT, LDH 和 AFP 水平显著降低($P<0.01$)。Western 印迹结果显示,与正常对照组相比,模型组肝组织中 SIRT6 蛋白的表达显著降低($P<0.01$),HIF-1 α , GLUT1, PDK1 和 LDHA 蛋白表达水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,模型+SSb2 各剂量组和模型+DOX 组肝组织 SIRT6 蛋白的表达显著升高($P<0.01$),而模型+SSb2 3.0 和 6.0 mg·kg⁻¹组及模型+DOX 组肝组织 HIF-1 α , GLUT1, PDK1 和 LDHA 蛋白表达水平均显著降低($P<0.01$),模型+SSb2 1.5 mg·kg⁻¹组 HIF-1 α , GLUT1 和 LDHA 蛋白表达水平显著降低($P<0.01$)。结论 SSb2 对 DEN 诱导的原发性肝癌小鼠的肝癌发展有抑制作用,其作用与其调控 SIRT6 介导的糖代谢通路有关。

关键词: 柴胡皂苷 b2; 原发性肝癌; 沉默信息调节因子 6; 糖代谢

中图分类号: R285.5, R979.1

文献标志码: A

文章编号: 1000-3002-(2022)10-0739-07

DOI: 10.3867/j.issn.1000-3002.2022.10.003

肝癌是全球第六大常见恶性肿瘤,是肿瘤相关死亡的第四大原因^[1]。据统计,超过 50% 的肝癌病例和死亡都发生在中国,其严重威胁着国人的生命健康^[2]。原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)按病理亚型主要分为肝细胞癌(hepatic cellular cancer, HCC)、肝内胆管癌(intrahepatic cholan-

giocarcinoma, ICC)和 HCC-ICC 混合型,这 3 种病理亚型的发病机制、生物学行为、组织学形态、治疗方法和预后等差异较大。HCC 占 PLC 的 85%~90%^[3]。临床常用治疗肝癌的药物主要有多柔比星(doxorubicin, DOX)、五氟尿嘧啶和顺铂等。但有些化疗药物肿瘤细胞选择性差,易导致肿瘤中药物浓度不足、全身细胞毒性和肿瘤细胞耐药性等问题。近年来研发的新型抗肝癌药物奥沙利铂(oxalipatin)和索拉非尼(sorafenib)逐渐展现出各种优势,然而随着药物浓度的累积,其耐药性也开始逐渐增强,治疗有效性逐渐降低^[4]。著名的索拉

基金项目: 河南省科技攻关重点项目(202102310486)

作者简介: 有曼, 硕士, 主管药师, 主要从事肿瘤药理学研究, E-mail: youman_0906@163.com

通讯作者: 张虹, E-mail: Lyzgz2008@163.com; 李瑞芳, E-mail: ylliruifang@163.com

非尼肝细胞癌评估随机方案(SHARP)试验表明,与安慰剂组相比,索拉非尼可使患者总生存期延长 2.8 个月^[5],然而在 6 个月内就开始出现耐药,疗效比较有限^[6]。近年来越来越多的研究表明,从天然产物中提取的植物药物在治疗包括癌症在内的许多慢性疾病方面表现出了广阔的潜力。因此,寻找治疗肝癌的高效、安全、多靶点的新型抗肝癌药物显得尤为重要。

柴胡最早记载在中医专著《神农本草经》中^[7],是我国传统的中药,已有两千多年的历史。其性味苦、微寒,归肝、胆经,常被用作解表、肝气郁滞等。近些年柴胡已被用作肝脏保护药,主要用于治疗各种肝病,如慢性肝炎、病毒性肝炎,甚至肝硬化引起的肝细胞癌^[8]。柴胡皂苷(saikosaponins, SS)是柴胡中的主要生物活性成分,研究发现,它在体内外均具有抗炎、抗肿瘤、抗病毒和护肝活性^[9]。根据结构差异,柴胡皂苷可分为柴胡皂苷 a (SSa)、SSb1 ~ SSb4 和 SSc ~ SSi^[10]。有研究表明,低 pH 条件下,包括胃酸或中药醋炙,会导致柴胡皂苷成分的转化,主要由 SSa 向 SSb1、SSd 向 SSb2 转化。醋炙柴胡治疗肝病更有效、更安全,其中大部分 SSd 转化为 SSb2^[11]。目前研究显示,SSb2 具有强大的抗病毒作用,但还缺乏更为深入、广泛的实验研究,有必要深入了解其药理作用,研究柴胡发挥护肝以及抗肿瘤功效的有效成分。本研究采用二乙基亚硝胺(diethyl nitrosamine, DEN)制备原发性肝癌模型,探讨 SSb2 在护肝方面的药理作用,为开发新型药物提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 药品、试剂和主要仪器

SSb2(纯度>99%, 19032104),成都曼思特生物科技有限公司;DOX(1804E2),深圳万乐有限公司;DEN(180711),阿拉丁试剂有限公司;谷草转氨酶(glutamic oxaloacetic transaminase, GOT)、谷丙转氨酶(glutamate pyruvic transaminase, GPT)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和甲胎蛋白(alpha fetoprotein, AFP)测试盒,南京建成生物工程研究所;兔抗小鼠沉默信息调节因子 6(silent information regulator 6, SIRT6)和兔抗小鼠丙酮酸脱氢酶激酶同工酶 1(pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1, PDK1)多克隆抗体(一抗),武汉三鹰生物技术有限公司;兔抗小鼠葡萄糖转运蛋白 1(glucose transporter 1, GLUT1)单克隆抗体,

美国 Affinity Bioscience 公司;兔抗小鼠低氧诱导因子 1 α (hypoxia inducible factor 1 α , HIF-1 α)多克隆抗体、兔抗小鼠乳酸脱氢酶 A(lactate dehydrogenase A, LDHA)多克隆抗体、兔抗小鼠 β 肌动蛋白单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG 抗体(二抗),武汉博士德生物工程有限公司;RIPA 裂解液和 BCA 蛋白浓度测定试剂盒,北京碧云天有限公司;ECL 底物液,北京普利莱基因技术有限公司。

GZX-DH-40145 型倒置显微镜和 Leica RM2128 切片机,德国 Leica 公司;酶标仪,美国 Thermo Fisher Scientific 公司;垂直电泳槽、Trans-blot 电转膜系统,北京六一公司;高速离心机,湖南湘仪实验室仪器开发有限公司。

1.2 动物、造模、分组和给药处理

60 只健康雄性 BALB/c 小鼠,体重 15~25 g,华中科技大学同济医学院实验动物中心,许可证号:SCXK(苏)2017-0001。小鼠适应性喂养 7 d 后随机分为 6 组:正常对照、模型(DEN 50 mg·kg⁻¹, ip 给药)、模型+SSb2 1.5, 3.0 和 6.0 mg·kg⁻¹(每日 1 次, ip 给药)和模型+DOX 1 mg·kg⁻¹(隔日 1 次, ip 给药),每组 10 只。除正常对照组外,其余组小鼠 ip 给予 DEN 50 mg·kg⁻¹,每周 2 次;第 5 周开始 DEN 给药减为每周 1 次,同时按分组给予 SSb2 和 DOX,正常对照组在建模期间给予等体积生理盐水,给药持续 19 周。

1.3 样本制备和计算肝指数

第 19 周末次给药后 24 h 眼眶取血,4℃,925×g 离心 10 min,取上清液分装,用于后续血清学指标检测。处死小鼠,取肝,称重,计算肝指数,肝指数=肝重(g)/体重(g)×100。

1.4 苏木精-伊红(HE)染色观察肝组织病理改变

将肝组织在 4% 多聚甲醛溶液中固定 12 h 后石蜡包埋,制成 4 μ m 切片,常规 HE 染色,在倒置显微镜下观察肝组织的病理变化。

1.5 试剂盒检测血液学指标

取 1.3 制备的血清,按照试剂盒说明检测小鼠血清中 GOT, GTP, LDH 和 AFP 的含量。

1.6 Western 印迹法检测肝组织中 SIRT6 和糖代谢通路相关蛋白的表达

取小鼠肝组织 100 mg,置冰上间歇匀浆,裂解,将裂解液转移到 1.5 mL 离心管内,14 800×g 离心 20 min。抽取上清,按 BCA 法测定蛋白含量。经 SDS-聚丙烯酰胺电泳后转膜(200 mA, 120 min),5% 脱脂奶粉室温摇床封闭 2 h,分别加入配好的一抗[SIRT6、HIF1 α 、GLUT1、PDK1、LDHA 和 β 肌动

蛋白(1:1000)]溶液,4℃孵育过夜。TBST充分洗涤,用TBST稀释的HRP标记二抗(1:50 000)浸泡PVDF膜,37℃摇床孵育2 h。采用ECL化学发光法显色,X光胶片压片后显影液发光显色,晾干胶片。采用Gel-Pro analyzer 4.0分析软件对条带进行分析,目的蛋白的相对表达水平以目的蛋白与内参蛋白积分吸光度值的比值来表示。

1.7 统计学分析

实验结果数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用SPSS17.0分析软件对数据进行统计分析,采用单因素方差分析,组间两两比较采用Tukey检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SSb2对DEN诱导原发性肝癌模型小鼠肝指数的影响

表1结果显示,DEN诱导小鼠19周后,与正常对照组相比,模型组肝指数明显升高($P<0.01$);与模型组相比,模型+SSb2各剂量组与模型+DOX组小鼠肝指数均显著降低($P<0.01$)。

Tab.1 Effect of saikosaponin b2 (SSb2) on liver index in the primary liver cancer model mice induced by diethyl nitrosamine (DEN)

Group	Body weigh/g	Liver weigh/g	Liver index
Normal control	46.0±5.2	1.92±0.25	4.18±0.23
Model	34.8±3.3	1.81±0.37	5.15±0.61**
Model+SSb2 1.5	26.9±3.4	1.08±0.19	4.01±0.49##
3.0	29.6±4.6	1.16±0.28	3.87±0.38##
6.0	32.1±2.9	1.22±0.24	3.78±0.46##
Model+DOX	31.9±3.6	1.24±0.22	3.88±0.57##

Except for the normal control group, other groups were ip given DEN 50 mg·kg⁻¹, twice a week. From the 5th week, DEN administration was reduced to once a week, and SSb2 and doxorubicin (DOX, 1 mg·kg⁻¹) were given according to groups. The normal control group was given the same volume of saline during modeling for 19 weeks. Liver index=liver weight (g)/body weight (g)×100. $\bar{x}\pm s$, $n=10$. ** $P<0.01$, compared with normal control group; ## $P<0.01$, compared with model group.

2.2 SSb2对DEN诱导原发性肝癌模型小鼠肝组织病理变化的影响

如图1所示,正常组小鼠肝组织结构正常,肝索排列整齐,模型组肝细胞异形性明显,可见多发癌巢组织,肿瘤细胞排列成假腺样、腺管样结构(白色箭头所示),提示模型建立成功。而模型+SSb2和模型+DOX组癌巢数量减少。模型+SSb2 1.5 mg·kg⁻¹组癌巢周围肝组织出现弥漫性水样变性(蓝色箭头

所示),肝细胞点状坏死;模型+SSb2 3.0 mg·kg⁻¹组肿瘤细胞胞浆出现嗜酸样改变(绿色箭头所示),灶状淋巴细胞浸润;而模型+SSb2 6 mg·kg⁻¹组和模型+DOX组肿瘤细胞间可见大量淋巴细胞(红色箭头所示)和中性粒细胞浸润(黄色箭头所示),细胞出现片状坏死。提示SSb2对DEN诱导的肝癌有一定的抑制作用。

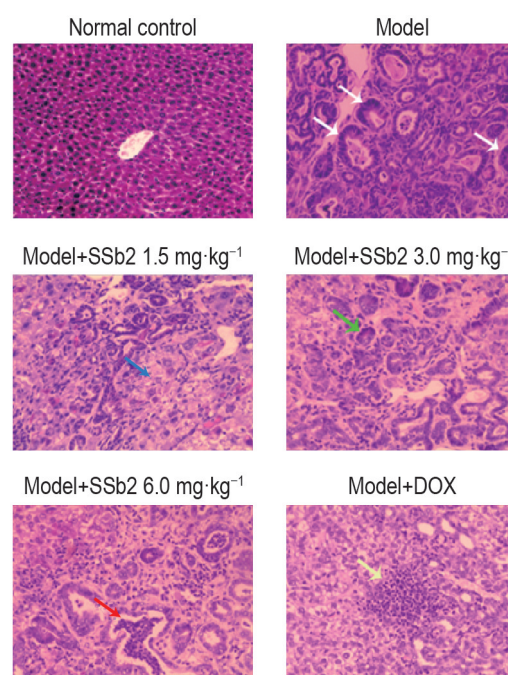


Fig.1 Effect of SSb2 on liver histopathology of primary liver cancer model mice induced by DEN (HE, 200×). See Tab.1 for the mouse treatment. White arrows indicate tumor cells arranged in pseudoglandular or glandular tubular structures; the blue arrow shows the diffuse watery degeneration of hepatic cells; the green arrow indicates the eosinophilic change in cytoplasm of tumor cell; the red arrow indicates a large number of lymphocytes next to the tumor cells; the yellow arrow indicates a large number of neutrophils in the liver tissue.

2.3 SSb2对DEN诱导原发性肝癌模型小鼠血清GOT, GPT, LDH和AFP水平的影响

表2结果显示,与正常对照组相比较,模型组小鼠血清GOT, GPT, LDH和AFP水平显著升高($P<0.01$);与模型组相比,模型+SSb2 3.0和6.0 mg·kg⁻¹组和模型+DOX组小鼠血清中GOT, GPT, LDH和AFP水平均显著降低($P<0.01$),模型+SSb2 1.5 mg·kg⁻¹组GOT, LDH和AFP水平均显著降低($P<0.01$),提示SSb2对小鼠肝功能损伤具有抑制作用。

2.4 SSb2对DEN诱导的原发性肝癌模型小鼠肝组织中糖代谢通路相关蛋白表达的影响

Western印迹结果(图2)显示,与正常对照组相比,模型组小鼠肝组织中SIRT6蛋白表达水平显

Tab.2 Effect of SSb2 on levels of serum glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamate pyruvic transaminase (GPT), lactate dehydrogenase (LDH) and alpha fetoprotein (AFP) in primary liver cancer model mice induced by DEN

Group	GOT/U·L ⁻¹	GPT/U·L ⁻¹	LDH/U·L ⁻¹	AFP/μg·L ⁻¹
Normal control	12.7±3.0	7.9±1.0	3245±274	0.4±0.1
Model	34.0±3.1**	37.2±3.2**	6726±488**	3.2±0.3**
Model+SSb2 1.5	24.9±3.5##	34.5±2.9	5820±451##	2.0±0.3##
3.0	21.2±2.9##	27.4±2.7##	5715±284##	1.7±0.2##
6.0	20.3±2.1##	24.5±3.7##	5217±340##	1.3±0.1##
Model+DOX	19.2±2.8##	19.0±2.8##	4874±357##	0.9±0.2##

Tab.1 for the mouse treatment. $\bar{x} \pm s$, $n=10$. ** $P<0.01$, compared with normal control group; ## $P<0.01$, compared with model group.

著降低 ($P<0.01$), HIF-1 α , PDK1, GLUT1 和 LDHA 蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 模型+SSb2 各剂量组和模型+DOX 组 SIRT6 蛋白表达水平明显升高 ($P<0.01$), 模型+SSb2 3.0 和 6.0 mg·kg⁻¹ 组及模型+DOX 组 HIF-1 α , PDK1,

GLUT1 和 LDHA 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), 模型+SSb2 1.5 mg·kg⁻¹ 组 HIF-1 α , PDK1 和 LDHA 蛋白表达水平明显降低 ($P<0.01$), 提示 SSb2 可能是通过上调 SIRT6 蛋白表达, 从而抑制下游 HIF-1 α 以及糖代谢通路因子 GLUT1, PDK1 和 LDHA 蛋白

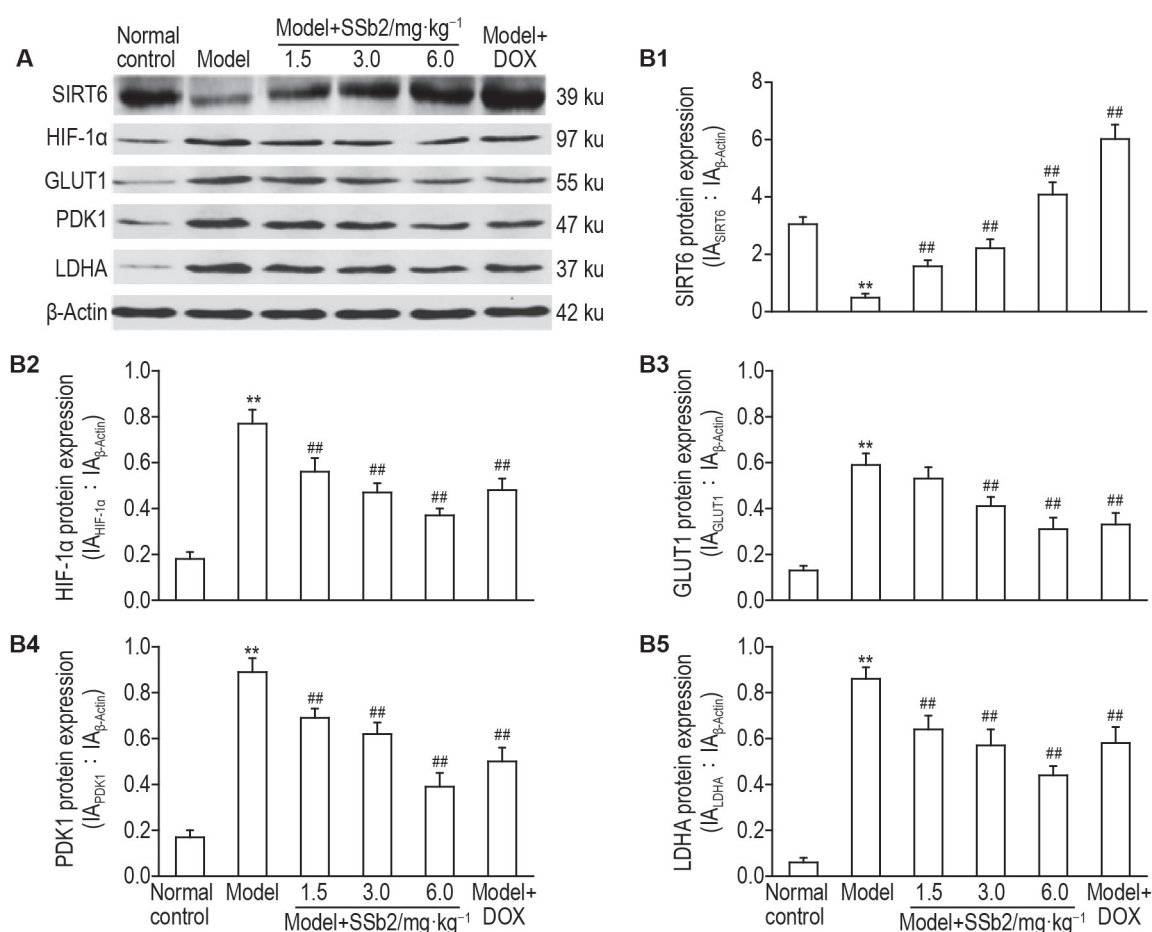


Fig.2 Effect of SSb2 on expressions of proteins related to glucose metabolism pathway in liver tissue of primary liver cancer model mice induced by DEN by Western blotting. See Tab.1 for the mouse treatment. B1–B5 were the semi-quantitative results of A, respectively. SIRT6: silent information regulator 6; HIF-1 α : hypoxia inducible factor 1 α ; GLUT1: glucose transporter 1; PDK1: pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1; LDHA: lactate dehydrogenase A. $\bar{x} \pm s$, $n=3$. ** $P<0.01$, compared with normal control group; ## $P<0.01$, compared with model group.

表达,进一步抑制肝癌发生发展。

3 讨论

本研究发现,SSb2给药后原发性肝癌小鼠肝指数降低,肿瘤细胞坏死增加,肿瘤生长被抑制。此外,SSb2给药组小鼠血清中GOT,GPT,LDH和AFP水平均降低,表明SSb2对DEN诱导的原发性肝癌模型小鼠肿瘤的发展具有一定的抑制作用。

目前,关于SSb2在治疗肝病方面药理作用研究较少。Lin等^[12]发现,SSb2可在早期有效抑制丙型肝炎病毒进入体内,包括中和病毒颗粒、防止病毒附着和抑制病毒进入/融合。Shin等^[13]发现,SSb2可能是炎症相关疾病潜在治疗药物,它可通过干扰NF- κ B抑制蛋白激酶 β 和NF- κ B抑制蛋白活化,有效抑制脂多糖诱导的促炎介质释放,从而阻止NF- κ B活化。而本研究小组前期研究发现,SSb2可以通过下调NF- κ B蛋白的表达以及上调SIRT6蛋白的表达,从而对脂多糖/氨基半乳糖诱导的小鼠急性肝损伤起到保护作用^[14]。有研究表明,SIRT6在糖代谢过程中通过调控糖酵解影响线粒体呼吸^[4]。Liu等^[15]研究发现,SIRT6还可作为抑癌因子,与HCC的发生发展密切相关。Marquardt等^[16]研究发现,人肝癌组织中SIRT6 mRNA和蛋白水平较正常癌旁组织明显降低,过表达SIRT6能抑制肝癌细胞体外增殖和裸鼠肿瘤形成。Zhong等^[17]发现,SIRT6作为组蛋白H3赖氨酸9的脱乙酰酶,可控制多种糖酵解基因表达,尤其是可以共抑制HIF-1 α 。在SIRT6基因沉默的胚胎干细胞中,HIF-1 α 合成和稳定性增强,细胞葡萄糖摄取和糖酵解增强,有氧呼吸被抑制。这些表征与低氧条件下各种表征非常相似。此外,SIRT6敲除小鼠给予HIF-1 α 抑制剂后,小鼠血糖降低,提示SIRT6可能是通过HIF-1 α 发挥糖酵解调节作用。研究还发现,SIRT6与HIF-1 α 靶基因启动子结合,对组蛋白H3赖氨酸9产生去乙酰基作用,直接抑制多种葡萄糖代谢蛋白,如PDK1,LDH,PFK1和GLUT1等表达^[18]。

本研究发现,DEN诱导的原发性肝癌小鼠肝组织中SIRT6蛋白表达水平显著降低,而HIF-1 α ,GLUT1,PDK1和LDHA表达显著升高,说明原发性肝癌小鼠肝组织SIRT6蛋白表达下调,其对HIF-1 α 抑制作用减弱,HIF-1 α 表达增强,下游糖酵解蛋白GLUT1,PDK1和LDHA的表达也随之增强。而SSb2以及阳性对照药DOX作用后,小鼠肝组织的SIRT6表达升高,而HIF-1 α 表达降低,糖酵解蛋白

GLUT1,PDK1和LDHA表达也降低,说明SSb2可能是通过上调SIRT6蛋白表达,从而抑制HIF1 α 调控的糖酵解通路,最终实现对肝癌细胞增殖抑制。但本研究尚未观察SSb2是否直接通过SIRT6发挥调控作用,需深入研究。

综上所述,SSb2可抑制DEN诱导的原发性肝癌小鼠肝癌的发展,其机制可能与抑制SIRT6介导的糖代谢通路相关蛋白的表达有关。

参考文献:

- [1] Barsouk A, Thandra KC, Saginala K, *et al*. Chemical risk factors of primary liver cancer: an update[J]. *Hepat Med*, 2020, 12: 179-188.
- [2] Qi YJ, Liu GX. Berberine-10-hydroxy camptothecin-loaded lipid microsphere for the synergistic treatment of liver cancer by inhibiting topoisomerase and HIF-1 α [J]. *Drug Deliv*, 2021, 28(1): 171-182.
- [3] Zhou J, Sun H, Wang Z, *et al*. Guidelines for the diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (2019 Edition) [J]. *Liver Cancer*, 2020, 9(6): 682-720.
- [4] Kudo M. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: latest advances[J/OL]. *Cancers*(Basel), 2018, 10(11): 412 (2018-10-30) [2022-04-06]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6266463/>. DOI: 10.3390/cancers10110412.
- [5] Mendez-Blanco C, Fondevila F, Garcia-Palomo A, *et al*. Sorafenib resistance in hepatocarcinoma: role of hypoxia-inducible factors[J]. *Exp Mol Med*, 2018, 50(10):1-9.
- [6] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, *et al*. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 378-390.
- [7] Li ZY, Jiang YM, Liu YM, *et al*. Saikosaponin D acts against corticosterone-induced apoptosis via regulation of mitochondrial GR translocation and a GR-dependent pathway[J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, 53: 80-89.
- [8] Yuan B, Yang R, Ma Y, *et al*. A systematic review of the active saikosaponins and extracts isolated from *Radix Bupleuri* and their applications[J]. *Pharm Biol*, 2017, 55: 620-635.
- [9] Ashour ML, Wink M. *Genus Bupleurum*: a review of its phytochemistry, pharmacology and modes of action[J]. *J Pharmacy Pharmacol*, 2011, 63(3): 305-321.
- [10] Maccioni P, Lorrain I, Fara F, *et al*. Differential effects of saikosaponins a, b2, b4, c and d on alcohol and chocolate self-administration in rats[J]. *Alcohol*,

- 2020, 55(4): 367-373.
- [11] Li X, Li X, Huang N, *et al.* A comprehensive review and perspectives on pharmacology and toxicology of saikosaponins[J]. *Phytomedicine*, 2018, 50: 73-87.
- [12] Lin LT, Chung CY, Hsu WC, *et al.* Saikosaponin b2 is a naturally occurring terpenoid that efficiently inhibits hepatitis C virus entry[J]. *J Hepatol*, 2015, 62(3): 541-548.
- [13] Shin JS, Im HT, Lee KT. Saikosaponin B2 suppresses inflammatory responses through IKK / I κ B α /NF - κ B signaling inactivation in LPS-induced RAW 264.7 macrophages[J]. *Inflammation*, 2019, 42(1): 342-353.
- [14] 有曼, 李瑞芳, 高子涵, 等. 柴胡皂苷 b2 对 LPS/GaIN 诱导的小鼠急性肝损伤炎症和能量代谢的影响[J]. 中国中药杂志 (*China Journal of Chinese Materia Medica*), 2019, 44(14): 2966-2971.
- [15] Liu G, Chen H, Liu H, *et al.* Emerging roles of SIRT6 in human diseases and its modulators[J]. *Med Res Rev*, 2020, 41(2): 1089-1137.
- [16] Marquardt JU, Fischer K, Baus K, *et al.* Sirtuin-6-dependent genetic and epigenetic alterations are associated with poor clinical outcome in hepatocellular carcinoma patients[J]. *Hepatology*, 2013, 58(3): 1054-1064.
- [17] Zhong L, D'Urso A, Toiber D, *et al.* The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha[J]. *Cell*, 2010, 140(2): 280-293.
- [18] Shun CT, Lin SK, Hong CY, *et al.* Sirtuin 6 modulates hypoxia-induced autophagy in nasal polyp fibroblasts via inhibition of glycolysis[J]. *Am J Rhinol Allergy*, 2016, 30: 179-185.

Inhibitory effect of saikosaponin b2 on diethyl nitrosamine-induced primary liver cancer of mice by regulating SIRT6-mediated glucose metabolism pathway

YOU Man¹, ZHANG Hong¹, HE Guang-hong¹, MENG Lu¹, LI Rui-fang², WANG Hong-wei²

[1. *Pharmaceutical Department, Luoyang Orthopedic-Traumatological Hospital of Henan Province (Henan Provincial Orthopedic Hospital), Luoyang 471000, China*; 2. *Department of Pharmacy, Basic Medical College, Henan University of Science and Technology, Luoyang 471000, China*]

Abstract: OBJECTIVE To study the inhibitory effect of saikosaponin b2 (SSb2) on primary liver cancer induced by diethyl nitrosamine (DEN) in mice and the effect on the glucose metabolism pathway mediated by silent information regulator 6 (SIRT6). **METHODS** BALB/c mice were randomly divided into the normal control group, model group (DEN, 50 mg · kg⁻¹), model+SSb2 1.5, 3.0, 6.0 mg · kg⁻¹ groups and model+doxorubicin (DOX) 1 mg · kg⁻¹ group. Except the normal control group, these groups were given DEN 50 mg · kg⁻¹, twice a week. From the 5th week, DEN administration was reduced to once a week, and SSb2 and DOX were given according to groups. The normal control group was given the same volume of saline during modeling, and the administration lasted for 19 weeks. At the end of the 19th week, serum was collected from the mice which were killed before their livers were stripped away and weighed to calculate the liver index. HE staining was performed to observe the morphological changes of liver tissue. In addition, the levels of glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamate pyruvic transaminase (GPT), lactate dehydrogenase (LDH) and alpha fetoprotein (AFP) in serum were detected. The expressions of SIRT6, hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α), glucose transporter 1 (GLUT1), pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1 (PDK1) and lactate dehydrogenase A (LDHA) in tumor tissue of DEN-induced mice were investigated by Western blotting. **RESULTS** Compared with the normal control group, the liver index of the model group was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the liver indexes were significantly decreased in model+SSb2 groups and model+DOX group ($P < 0.01$). The results of HE staining showed that there were many heteromorphic hepatocytes and a large number of cancer nests in the liver tissue of the model group. Compared with the model

group, the necrotic cells in the model+SSb2 6.0 mg·kg⁻¹ group and model+DOX group were increased, while the number of heteromorphic nucleuses and cancer nests was significantly reduced. According to the serological results, the serum levels of GOT, GPT, LDH and AFP in the model group were significantly higher than those of the normal control group ($P<0.01$). Compared with the model group, the serum levels of GOT, GPT, LDH and AFP in the model+SSb2 3.0 mg·kg⁻¹, model+SSb2 6.0 mg·kg⁻¹ and model+DOX groups were significantly decreased ($P<0.01$), so were the levels of GOT, LDH and AFP in the model+SSb2 1.5 mg·kg⁻¹ group ($P<0.01$). Western blotting results showed that compared with the normal control group, the protein expression of SIRT6 in the model group was decreased, while the expressions of HIF-1 α , GLUT1, PDK1 and LDHA were markedly increased ($P<0.01$). Compared with the model group, the expressions of SIRT6 in each dose group of model+SSb2 and model+DOX group were significantly increased ($P<0.01$), while the expressions of HIF-1 α , GLUT1, PDK1 and LDHA in model+SSb2 3.0 mg·kg⁻¹, model+SSb2 6.0 mg·kg⁻¹ and model+DOX groups were significantly decreased ($P<0.01$), and the expressions of HIF-1 α , GLUT1 and LDHA in model+SSb2 1.5 mg·kg⁻¹ group were remarkably decreased ($P<0.01$). **CONCLUSION** SSb2 has a significant inhibitory effect on DEN-induced primary liver cancer in mice, which may be related to the regulation of glucose metabolism pathway mediated by SIRT6.

Key words: saikosaponin b2; primary liver cancer; silent information regulator 6; glucose metabolism

Foundation item: Key Scientific and Technological Projects of Henan Province (202102310486)

Corresponding author: ZHANG Hong, E-mail: Lyzgz2008@163.com; LI Rui-fang, Email: yllirufang@163.com

(收稿日期: 2022-04-06 接受日期: 2022-10-08)

(本文编辑: 乔虹)

《中国药理学与毒理学杂志》对图表的要求

1. 论文中的病理照片、电泳图及化学结构式图等要求以“插入”→“图片”方式插入 word 文档,不要使用复制粘贴。病理照片必须加标尺,并以箭头指示典型病变位置。除照片外,其他图尽量不用彩色。

2. 统计的数据图表(包括线图和柱图等)一般通过“插入”→“图表”方式插入 word 文档,双击该图即可直接进入此图的作图软件,看到作图数据。

3. 双栏图大小:宽与高的比为 3:2,宽 ≤ 7.5 cm;通栏图大小为:宽 ≤ 15 cm;横、纵坐标字体为 Arial,字号为 8 或 9 磅。

4. 论著中的图表(包括图表题和图表注)全部使用英文,要求图表自明。图表注内容包括分组设计、药物浓度、给药顺序、作用时间、指标测试时间、各种缩写的解释说明、对观察内容必要的描述和统计方法等。

5. 线图图例依次使用 \circ \bullet \triangle \blacktriangle \square \blacksquare 等,柱图按组别顺序依次用空心、左斜线、右斜线和网格线填充。图例字体用 Arial,字号为 6 磅。

6. 论著中的数据统计图表,应该首先进行一级比较,如模型组与正常对照组比较,结果用“*”表示;各给药组与模型组比较,为二级比较,用“#”表示;待测药各组组间比较或者与阳性对照组比较,为三级比较,用“ Δ ”表示。统计学分析结果分 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 两个水平给出即可。

7. 综述中的图表全部使用中文。