

沙棘多糖对肝癌细胞 Hep-G2 生长、凋亡、迁移和侵袭的影响

包晓玮¹, 魏晨业¹, 刘晓禄¹, 江峻峰¹, 孙嘉莉¹, 徐均²

(¹新疆农业大学食品科学与药学院 乌鲁木齐 830052

²新疆沙棘精深加工工程技术研究中心 新疆克孜勒苏柯尔克孜自治州 845350)

摘要 目的:研究纯化沙棘多糖(SBP-3)通过 p38 通路对肝癌细胞 Hep-G2 增殖、凋亡、迁移、侵袭的影响。方法:将不同浓度 SBP-3 作用于 Hep-G2 细胞,采用 CCK-8 法检测细胞增殖情况,流式细胞术检测细胞凋亡、划痕试验,细胞迁移侵袭试验(Transwell)检测细胞迁移及侵袭情况,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 p-p38、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平。结果:经 SBP-3 作用 48 h,125,250,500,1 000 μg/mL 剂量组细胞抑制率均显著升高($P<0.05$);125,250,500 μg/mL 各剂量组均能诱导 Hep-G2 细胞产生凋亡作用($P<0.01$),且细胞凋亡率随 SBP-3 浓度的增加而逐渐升高;SBP-3 能降低 Hep-G2 细胞侵袭和迁移能力($P<0.01$),抑制 p-p38、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达($P<0.01$)。结论:沙棘纯化多糖 SBP-3 能够抑制肝癌细胞 Hep-G2 的增殖、迁移和侵袭,促进凋亡,这些作用可能是通过调节 p38 信号通路抑制 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达来实现。

关键词 沙棘多糖;肝癌细胞;增殖;凋亡;迁移;侵袭;p38 通路

文章编号 1009-7848(2022)09-0047-08 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.09.005

近年来,恶性肿瘤发病率显著增高,据了解,全球范围内约 20%的男性和 17%的女性具有一定的患癌风险^[1]。在亚洲地区,癌症死亡的人数占全球癌症死亡总人数的 50%,其中肝癌是现今较为多见的恶性肿瘤之一,患者自身的生命安全始终得不到有效保障。据 2021 年统计数据,肝癌是全球第六大常见高发癌症,也是癌症相关死亡的第三大原因,仅次于肺癌和结直肠癌^[2],且恶性肿瘤具有早期诊断率低、临床治愈率低的特点,尚无有效的治疗方法。目前主要采用手术及放化疗等手段进行癌症治疗。此外,使用放疗、化疗等治疗手段对人体产生的毒副作用较大,在治疗过程中,药物对肿瘤细胞的识别作用不强,在消除肿瘤细胞的同时,也损害了正常细胞的生长发育,对病患后期的身心健康及生活质量都造成重大的影响。探寻毒副作用小的有效抗肿瘤药物,降低病患的恶性肿瘤死亡率,改善其生存质量,已成为广大医学工作者亟待解决的问题。多糖作为常见的天然活性物质,成为抗肿瘤研究的热点之一。目前已报道香菇多糖^[3]、槐角多糖^[4]、板栗种仁多糖^[5]等具有一

定抗肿瘤作用,而有关沙棘多糖的相关研究并不多见。本文以人肝癌细胞(Hep-G2)为研究对象,探讨沙棘多糖 SBP-3 组分对肿瘤细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Hep-G2 人肝癌细胞,武汉普诺赛生命科技有限公司;CCK-8 试剂盒、DMEM 高糖培养基,美国 Hyclone 公司;Annexin V-FITC 凋亡试剂盒,碧云天生物试剂公司;BCA 试剂盒,上海易色医疗科技有限公司;p-p38 抗体、MMP-2 抗体、MMP-9 抗体,上海户实医药科技有限公司。

1.2 仪器与设备

SW-CJ-IFD 超净工作台,苏州安泰有限公司;SC3614 高速离心机,中佳有限公司;U-CTR30-2 倒置光学显微镜,上海普赫有限公司;HERACELL1150i 细胞恒温培养箱,美国 Thermo Scientific 公司;Multiscan MK3 酶标仪,美国 Thermo Scientific 公司;BG-Power 600i 电泳仪,北京百晶生物技术有限公司。

1.3 方法

1.3.1 沙棘多糖 SBP-3 的制备、分组及细胞培养

根据魏晨业等^[6]的研究方法,采用 DEAE-52 纤维素柱分离纯化,得到酸性多糖 SBP-3。将沙棘多

收稿日期:2021-09-24

基金项目:国家自然科学基金项目(81860766)

作者简介:包晓玮(1969—),女,博士,副教授

E-mail: 408531623@qq.com

糖 SBP-3 组分用不含血清的 DEAE 培养基配成质量浓度为 0.625, 1.25, 2.5, 5 mg/mL 和 10 mg/mL 的多糖组, 以不加多糖的组作为空白对照组。

将冻存 Hep-G2 细胞复苏后, 置于 5% CO₂、37 °C 的恒温培养箱中培养。

1.3.2 CCK-8 法检测 Hep-G2 细胞增殖率 将 Hep-G2 细胞按 2×10⁴ 个/孔的密度接种于 96 孔板, 每孔 90 μL, 设立 3 个复孔。分别加入不同浓度的沙棘多糖溶液 10 μL, 使其终质量浓度分别为 62.5, 125, 250, 500, 1 000 μg/mL, 培养 24 h 和 48 h 后, 每孔加 10 μL CCK-8, 置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培育 4 h。用酶标仪检测 450 nm 处吸光度 OD 值, 计算细胞增殖抑制率。计算公式^[7]:

$$\text{细胞增殖抑制率}(\%) = 1 - \frac{\text{OD}_1}{\text{OD}_2} \times 100\%$$

式中: OD₁——含多糖样品吸光度; OD₂——不含多糖样品吸光度。

1.3.3 流式细胞术检测 Hep-G2 细胞的凋亡率

按 1.3.2 节方法处理 Hep-G2 细胞, 通过 CCK-8 试验选择不同浓度沙棘多糖溶液作为凋亡试验的剂量, 即用 125, 250, 500 μg/mL 作用细胞, 培养 24 h 和 48 h 后, 用 PBS 溶液反复洗涤细胞, 使其混合均匀, 加入胰蛋白酶(不含 EDTA)消化, 观察细胞是否从培养板壁上脱落。将 0.5 mL 细胞悬液转移至无菌离心管中, 加入 1.25 μL Annexin V-FITC 混匀后加入 10 μL PI, 室温避光反应 15 min, 用流式细胞仪检测^[8]。

1.3.4 划痕试验检测 Hep-G2 细胞迁移能力 将 Hep-G2 细胞接种于 6 孔板中, 用显微镜观察细胞生长密度达到 80% 后, 用移液器吸头将细胞垂直划伤, 用 PBS 贴壁缓慢加入润洗, 分别加入不同质量浓度的沙棘多糖溶液(125, 250, 500 μg/mL) 培养 48 h 后, 置于显微镜下观察并拍照^[9]。

1.3.5 Transwell 小室检测 Hep-G2 细胞侵袭能力

将 Hep-G2 细胞接种于 Transwell 板^[10], 上室中加入含 1% 血清的细胞悬液 100 μL, 下室中加入 500 μL 含 15% FBS 的各浓度组培养液, 放入 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱, 培养 48 h 后取出小室, 用 PBS 反复润洗后加入结晶紫染色 5 min, 清洗后用棉签擦去内侧坏死细胞, 随机选取 5 个视野观察并计数穿越小室的侵袭性细胞数目。

$$\text{侵袭率} = \frac{\text{各处理组细胞数}}{\text{对照组细胞数}} \times 100\%$$

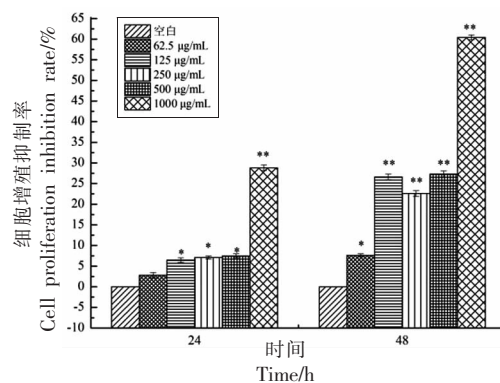
1.3.6 Western blot 检测 p-p38、MMP-2、MMP-9 蛋白表达水平 按 1.3.3 节方法处理 Hep-G2 细胞, 分别加入不同质量浓度的沙棘多糖溶液(125, 250, 500 μg/mL) 培养 48 h, 经胰蛋白酶消化后, 提取蛋白, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒定量。通过 SDS-PAGE 垂直板电泳, 电转至 PVDF 膜上, 放入 5% 脱脂奶粉封闭液中, 封闭 1 h, 一抗孵育, 将 PVDF 膜放入稀释好的 p-p38、MMP-2、MMP-9 抗体中, 4 °C 过夜。第 2 天将 PVDF 膜放入对应的二抗中, 室温培养 2 h, TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, ECL 显色, 用凝胶成像分析仪系统拍照^[11], 计算机扫描并分析处理结果。

1.3.7 数据处理 运用 SPSS 20.0 对试验数据进行单因素方差分析, 结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 图、表采用 origin 8.5 绘制。

2 结果与分析

2.1 SBP-3 对 Hep-G2 细胞增殖的影响

CCK-8 法是一种准确度和灵敏度较高且常用于测定细胞增殖的比色法^[12]。由图 1 可知, 与空白组相比, Hep-G2 细胞经 SBP-3 各剂量组作用 24 h, 对其抑制率逐渐升高($P < 0.05$)。当 SBP-3 质量浓度升至 1 000 μg/mL 时抑制效果最佳, 达 28.83%; 经 SBP-3 各剂量组作用 48 h, 各组细胞抑制率也显著升高($P < 0.01$), 其中 SBP-3 质量浓



注: * 表示与空白组比较差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示与空白组比较差异极显著 ($P < 0.01$); 下同。

图 1 沙棘多糖 SBP-3 组分对 Hep-G2 的抑制作用

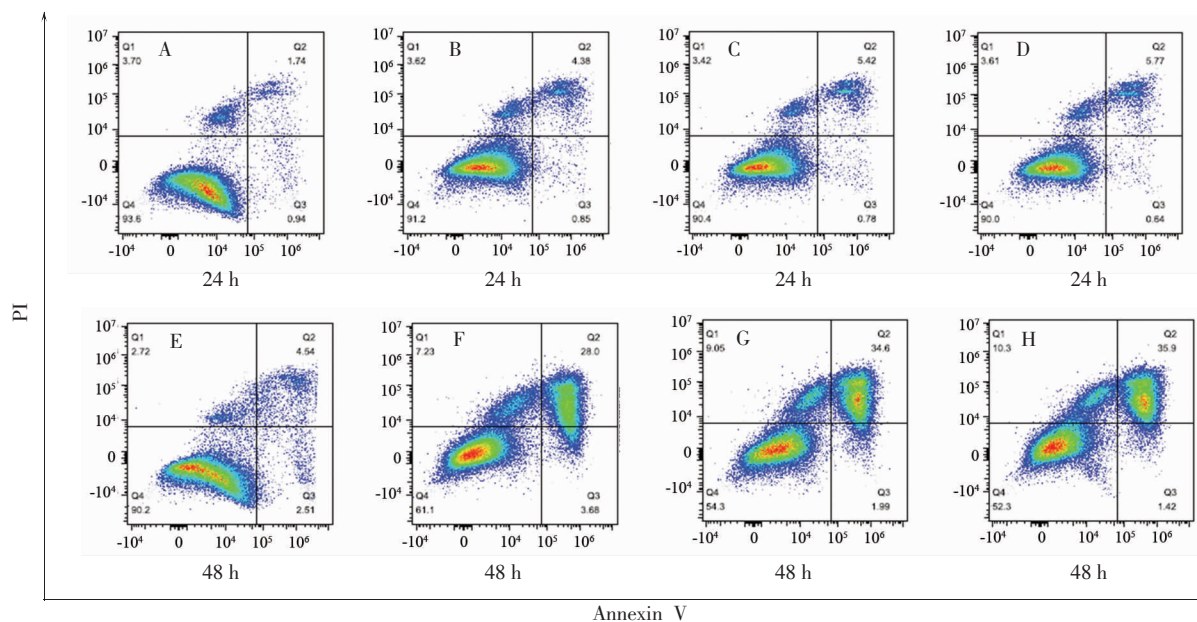
Fig.1 Inhibitory effect of SBP-3 fraction of seabuckthorn polysaccharides on Hep-G2

度为 125, 500 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 000 $\mu\text{g/mL}$ 时的抑制率分别为 26.62%, 27.3% 和 60.43%。以上结果说明沙棘多糖 SBP-3 组分在 62.5~1 000 $\mu\text{g/mL}$ 浓度范围, 能够抑制 Hep-G2 细胞的增殖, 且抑制率随其浓度的增加、作用时间的延长而呈上升趋势。

2.2 SBP-3 对 Hep-G2 细胞凋亡的影响

根据 SBP-3 对 Hep-G2 细胞增殖的作用结果, 选择 125, 250 $\mu\text{g/mL}$ 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 3 个质量浓度梯度, 作用 24 h 和 48 h 为 Hep-G2 细胞的培养条件, 试验结果见图 2。与空白组相比, 各 SBP-3 浓度组均能诱导 Hep-G2 细胞产生凋亡作用, 且细胞凋亡率随 SBP-3 浓度的增加而逐渐升高。125 $\mu\text{g/mL}$ SBP-3 作用 24 h, 细胞凋亡率为

5.23%; 500 $\mu\text{g/mL}$ SBP-3 时细胞凋亡率最高为 6.41%。当作用时间 48 h 时, 细胞凋亡率极显著上升 ($P < 0.01$), 当 SBP-3 多糖质量浓度分别为 125, 250 $\mu\text{g/mL}$ 和 500 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞凋亡率分别为 31.68%, 36.59% 和 37.32%。SBP-3 作用 48 h 的效果明显优于 24 h, 最终选择 SBP-3 作用 48 h 为后续试验条件。图 3 中, Q1 表示坏死细胞; Q2 表示晚期凋亡细胞; Q3 表示早期凋亡细胞; Q4 表示正常细胞, Q2+Q3 表示凋亡细胞^[13]。通过测定 Hep-G2 细胞凋亡信号, 发现 48 h 内沙棘多糖 SBP-3 组分各剂量组凋亡细胞比例显著增加, 说明 SBP-3 能够诱导 Hep-G2 细胞的凋亡。



注: A, E 分别为作用 24h 和 48h 空白对照组; B, F 为 125 $\mu\text{g/mL}$ SBP-3; C, G 为 500 $\mu\text{g/mL}$ SBP-3; D, H 为 1 000 $\mu\text{g/mL}$ SBP-3。

图 2 流式细胞术检测 Hep-G2 细胞凋亡

Fig.2 Detection of Hep-G2 cell apoptosis by flow cytometry

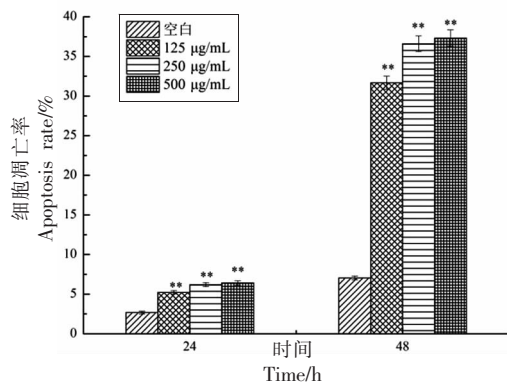


图 3 Hep-G2 细胞凋亡率

Fig.3 Apoptosis of Hep-G2 cells

2.3 SBP-3 对 Hep-G2 细胞迁移的影响

肿瘤细胞在不断发育生长的阶段, 当其分化速度及迁移能力在短时间内呈现异常性变化时, 转化为恶性肿瘤的可能性急剧增加, 将对人的生命安全及治疗产生巨大的危害, 沙棘多糖 SBP-3 对 Hep-G2 细胞转移能力的影响可通过伤口愈合试验进行评估^[14]。单层 Hep-G2 细胞覆盖在 6 孔板上, 在汇合细胞层的中心形成具有尖端的伤口, 中央伤口的恢复率表明 Hep-G2 细胞的迁移能力。当给予不同浓度的沙棘多糖 SBP-3

作用 Hep-G2 细胞 48 h, 试验结果如图 4 所示。与未添加多糖的空白对照组相比, 沙棘多糖 SBP-3 作用的各组 Hep-G2 细胞的迁移能力随其剂量的增加, 得到不同程度地抑制, 划痕闭合范围明显减小。当 SBP-3 质量浓度增到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对

Hep-G2 细胞的抑制效果最佳, 细胞迁移率仅 5.59%, 即 SBP-3 的刺激可以显著减少迁移到聚碳酸酯膜下侧的 Hep-G2 细胞数量 ($P < 0.01$), 这表明沙棘多糖 SBP-3 组分呈剂量依赖性抑制 Hep-G2 细胞的迁移。

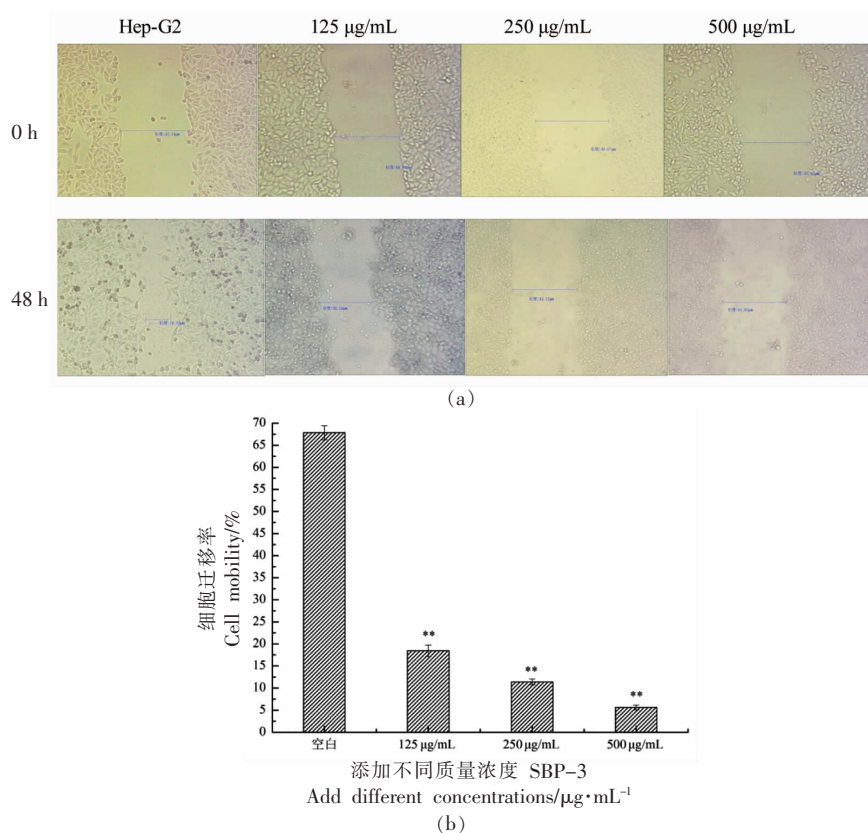


图 4 SBP-3 对 Hep-G2 细胞迁移能力的影响

Fig.4 Effects of different SBP-3 concentrations on Hep-G2 cell migration

2.4 SBP-3 对 Hep-G2 细胞侵袭的影响

Transwell 法检测细胞侵袭的状况, 结果显示: 空白对照组 HepG2 细胞具有较强的迁移能力^[15]。培养 48 h 后, 可观察到大量颜色深浅不一的 HepG2 细胞, 形状为长梭形, 且分布十分密集(图

5a)。随着 SBP-3 药物浓度的增加, 细胞穿越小室基底膜的数量明显减少, HepG2 细胞聚集的密度显著降低, 呈零星分散状态, 由此可判断 SBP-3 使 HepG2 细胞侵袭穿透能力减弱(图 5b、5c、5d)。与空白对照组相比, 经 SBP-3 作用的各剂量组侵袭

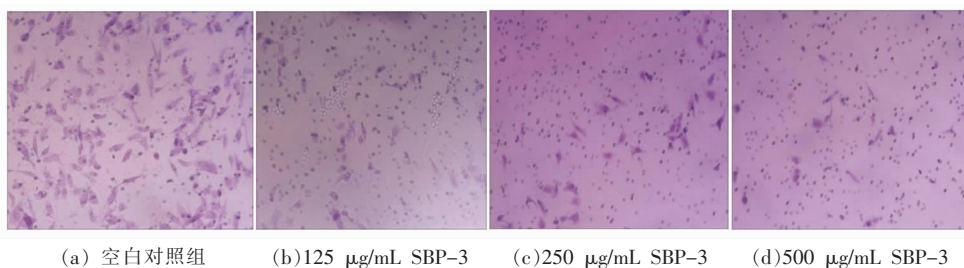


图 5 SBP-3 对 Hep-G2 细胞侵袭能力的影响

Fig.5 Effect of SBP-3 on invasion of Hep-G2 cells

细胞数量在 48 h 内显著减少 ($P < 0.01$, 图 6), 且呈剂量依赖性抑制 Hep-G2 细胞侵袭, 即 SBP-3 浓度越大, 侵袭细胞数越少, 其中 SBP-3 质量浓度 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞侵袭率仅为 16.42%, 抑制 Hep-G2 转移能力最佳。

2.5 SBP-3 对 Hep-G2 细胞 p-p38、MMP-2 及 MMP-9 蛋白表达的影响

通过 Western blot 法测定 SBP-3 对 Hep-G2 细胞 p38MAPK 信号通路中关键蛋白 p-p38、MMP-2 及 MMP-9 的表达^[16], 结果表明, 与空白对照 Hep-G2 组相比, 沙棘多糖 SBP-3 各剂量组 p-p38、MMP-2 及 MMP-9 表达水平随 SBP-3 浓度的增加而逐渐降低 ($P < 0.01$), 当 SBP-3 质量浓度达 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 下调蛋白表达的能力最强, 说明沙棘多糖 SBP-3 能够抑制 p38 通路中 p-p38、MMP-2 及 MMP-9 的表达, 初步推测 SBP-3 呈剂

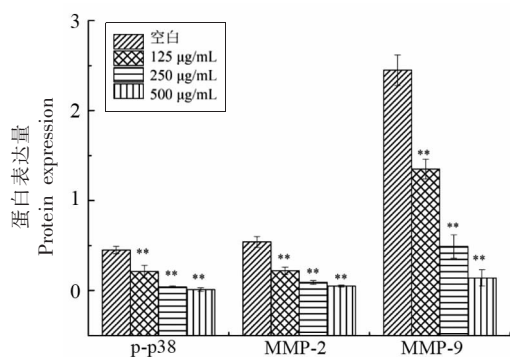


图 7 SBP-3 对 p-p38、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达的影响

Fig.7 Effect of SBP-3 on protein expression of p-p38, MMP-2 and MMP-9

3 讨论

正常条件下, 细胞增殖和凋亡是一个动态平衡过程, 若此过程中出现平衡失调的状态, 则可能导致肿瘤细胞的产生和扩散。肿瘤细胞的发展与多通道信号的传递密不可分^[17]。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联反应是细胞内连接并产生信号的常见通路之一^[18]。p38 是 MAPK 信号通路中重要的子系统, 通常参与细胞整体生长发育过程^[19], 当 p38 蛋白在磷酸化后才能发挥其活性, 即通过磷酸化形成 p-p38 对 Hep-G2 细胞生长、转移及侵袭的调节。肿瘤细胞在生长过程中由于未受到正常细胞的接触

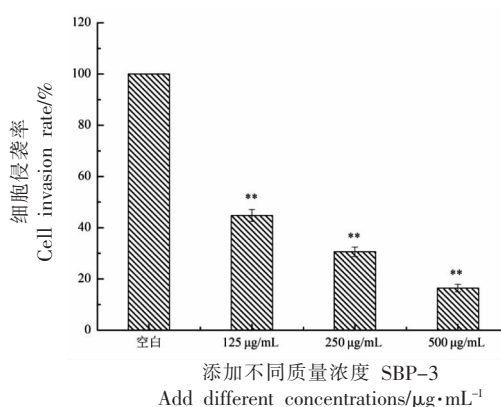
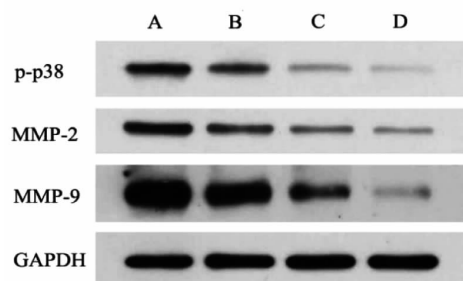


图 6 SBP-3 对 Hep-G2 细胞侵袭作用影响

Fig.6 Effect of SBP-3 on invasion of Hep-G2 cells

量依赖性抑制 p38 信号通路中相关蛋白的表达, 进而降低细胞的侵袭和迁移能力并诱导 Hep-G2 细胞凋亡。



注: A. 空白对照组; B. 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SBP-3; C. 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SBP-3; D. 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SBP-3。

图 8 Western Blot 检测 p-p38、MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平

Fig.8 Expression levels of p-p38, MMP-2 and MMP-9 proteins by Western blot

抑制, 进而不断地侵袭和排挤正常组织并突破底部基膜, 当其增殖到一定体积后, 通过基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP), 如 IV 型胶原酶降解细胞外基质, 促使转移通路形成, 最终形成继发性肿瘤。通过提高基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 表达水平, 促使转移通路形成, 最终形成继发性肿瘤。

p38MAPK 通路通过调节 MMPs 的蛋白表达量, 实现肿瘤细胞在短时间内的迁移和侵袭。首先激活 p38 信号通路中相关磷酸化蛋白, 其次增强下游如 MMP-2 和 MMP-9 等多个结合靶点的表达与活化。唐治蓉等^[20]等发现, 当归多糖对 HeLa

细胞中的 p38 通路产生抑制作用,从而降低 HeLa 细胞的迁移率。Zheng 等^[21]发现红豆杉多糖能够下调 MMP-2 和 MMP-9 的表达,改善黑色素瘤细胞的迁移及侵袭速率,即 MMP-2 和 MMP-9 主要参与肿瘤细胞的侵袭及转移过程,提示抑制基质金属蛋白酶的表达或抑制其活性可以预防肿瘤细胞的转移^[22]。本结果表明 SBP-3 对 Hep-G2 细胞生长、凋亡、转移及侵袭具有一定的调节作用,推测可能通过下调 p38 MAPK 通路的活性,降低 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达,进而对 Hep-G2 细胞迁移及侵袭能力产生抑制作用,具有一定的抗肿瘤作用。多糖对肿瘤微环境的调节,即治疗机制并非直接产生抗肿瘤作用,而是通过间接增强免疫调节,抑制肿瘤生长、凋亡、侵袭和转移来实现的^[23]。多糖的结构在一定程度上能够影响其生物活性,后续可从分子水平研究其作用机制,阐明多糖的构效关系,用分子修饰等方法改善其活性,更高层次探讨其作用价值。

4 结论

本研究表明沙棘多糖 SBP-3 能够抑制肝癌细胞 Hep-G2 的增殖、凋亡、迁移和侵袭,初步推测是通过下调 p38MAPK 信号通路活性,抑制 MMP-2 和 MMP-9 表达,从而产生抗肿瘤作用。

参 考 文 献

- [1] 边亮, 陈华国, 周欣. 植物多糖的抗肿瘤活性研究进展[J]. 食品科学, 2020, 41(7): 275-282.
BIAN L, CHEN H G, ZHOU X. Recent advances in understanding the antitumor activity of polysaccharides from plants [J]. Food Science, 2020, 41(7): 275-282.
- [2] 周泽文, 刘颖春, 向邦德, 等. 原发性肝癌的全球展望: 流行情况、危险因素和人群归因分值[J]. 中国癌症防治杂志, 2021, 13(1): 14-21.
ZHOU Z W, LIU Y C, XIANG B D. Global outlook for primary liver cancer: prevalence, risk factors, and population attributable scores [J]. Chinese Journal of Oncology Prevention and Treatment, 2021, 13(1): 14-21.
- [3] 张琪琳. 香菇多糖的结构鉴定及抗肿瘤作用机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- [4] 王杰. 槐角多糖分离纯化、结构分析及生理活性研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2019.
WANG J. Isolation, purification, structure and physiological activity of polysaccharides from sophorae frutus[D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.
- [5] 何俊平, 李晓菁, 孟迪, 等. 板栗种仁多糖的提取纯化及体外抗肿瘤活性筛选[J]. 食品工业科技, 2020, 41(22): 134-141, 149.
HE J P, LI X J, MENG D, et al. Extraction, purification and in vitro antitumor screening of polysaccharides from chestnut kernel[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 41(22): 134-141, 149.
- [6] 魏晨业, 包晓玮, 王娟, 等. 沙棘多糖分离纯化及抗氧化活性[J]. 食品科学, 2021, 42(4): 227-232.
WEI C Y, BAO X W, WANG J, et al. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from the Fruit of *Hippophae rhamnoides* [J]. Food Science, 2021, 42(4): 227-232.
- [7] 杨焕治, 熊芳琪, 杨岚, 等. 不同组分羧甲基茯苓多糖对 HepG2 细胞增殖的影响[J]. 中国食物与营养, 2019, 25(12): 26-28, 39.
YANG H Z, XIONG F Q, YANG L, et al. Effects of carboxymethyl Poria cocos polysaccharides on proliferation of HepG2 cells[J]. Food and Nutrition in China, 2019, 25(12): 26-28, 39.
- [8] 张爱龙, 赵飞, 金周雨, 等. 金针菇多糖抑制肝癌 HepG2 细胞增殖并诱导细胞凋亡[J]. 吉林农业大学学报, 2019, 41(5): 521-525.
ZHANG A L, ZHAO F, JIN Z Y, et al. Flammulina velutipes polysaccharide inhibits proliferation and induces apoptosis of HepG2 cells[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2019, 41(5): 521-525.
- [9] LI H Q, SU J, JIANG J Y, et al. Characterization of polysaccharide from *Scutellaria barbata* and its antagonistic effect on the migration and invasion of HT-29 colorectal cancer cells induced by TGF- β 1 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 131(15): 886-895.
- [10] CHEN Y, LIU Z J, LIU J, et al. Inhibition of metastasis and invasion of ovarian cancer cells by crude polysaccharides from *rosa roxburghii* tratt in

- vitro[J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2014, 15(23): 1-4.
- [11] ZHANG D, LI Y H, MI M, et al. Modified apple polysaccharides suppress the migration and invasion of colorectal cancer cells induced by lipopolysaccharide[J]. *Nutrition Research*, 2013, 33(10): 839-848.
- [12] GAO P Y, BIAN J, XU S H, et al. Structural features, selenization modification, antioxidant and anti-tumor effects of polysaccharides from alfalfa roots[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 149(2): 207-214.
- [13] LIU XI X, LIU F, ZHAO S, et al. Purification of an acidic polysaccharide from Suaeda salsa plant and its anti-tumor activity by activating mitochondrial pathway in MCF-7 cells[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2019, 215(6): 99-107.
- [14] KRAMER N, WALZL A, UNGER C, et al. *In vitro* cell migration and invasion assays[J]. *Mutation Research*, 2013, 75(2): 10-24.
- [15] YAN K H, LEE L M, YAN S H, et al. Tomatidine inhibits invasion of human lung adenocarcinoma cell A549 by reducing matrix metalloproteinases expression[J]. *Chemico Biology Interaction*, 2013, 203(3): 580-587.
- [16] 张悦, 符乔珊. 苦参碱对宫颈癌 HeLa 细胞黏附和侵袭的抑制作用及其机制[J]. *山西医科大学学报*, 2015, 46(12): 1198-1202.
- ZHANG Y, FU Q S. Effect and mechanism of matrine on adhesion and invasion of cervical cancer HeLa cells[J]. *Journal of Shanxi Medical University*, 2015, 46(12): 1198-1202.
- [17] 姜恩平, 王卓, 陈建光, 等. ERK 信号途径介导五味子多糖对 HeLa 细胞凋亡和侵袭的作用[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(8): 1892-1895.
- JIANG E P, WANG Z, CHEN J G, et al. ERK signaling pathway mediates the effect of Schisandra chinensis polysaccharide on HeLa cell apoptosis and invasion[J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2015, 26(8): 1892-1895.
- [18] 乔静, 张秋芳. p38MAPK 信号传导通路与肿瘤细胞多药耐药的关系[J]. *山西医药杂志*, 2013, 42(9): 1020-1022.
- QIAO J, ZHANG Q F. Relationship between p38MAPK signal transduction pathway and multidrug resistance of tumor cells[J]. *Shanxi Medical Journal*, 2013, 42(9): 1020-1022.
- [19] 常蕊静, 李佩佩, 梁丽峰, 等. p38MAPK 在肺鳞癌组织中的表达及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2013, 21(5): 1025-1029.
- CHANG R J, LI P P, LIANG L F, et al. Expression and clinical significance of p38MAPK in lung squamous cell carcinoma[J]. *Journal of Modern Oncology*, 2013, 21(5): 1025-1029.
- [20] 唐洽蓉, 龙琼先, 刘欣雅, 等. 当归多糖通过调节 p38 通路抑制宫颈癌 HeLa 细胞生长、迁移和侵袭[J]. *中国免疫学杂志*, 2020, 36(3): 332-337.
- TANG Z R, LONG Q X, LIU X Y, et al. Angelica sinensis polysaccharide inhibits growth, migration and invasion of cervical cancer HeLa cells by regulating p38 pathway[J]. *Chinese Journal of Immunology*, 2020, 36(3): 332-337.
- [21] ZHENG Z Q, FU Y Y, LI B H, et al. PSY-1, a *Taxus chinensis* var. *mairei* extract, inhibits cancer cell metastasis by interfering with MMPs[J]. *Natural Product Communications*, 2014, 9(2): 241-245.
- [22] LEE K R, LEE J S, KIM Y R, et al. Polysaccharide from *Inonotus obliquus* inhibits migration and invasion in B16-F10 cells by suppressing MMP-2 and MMP-9 via downregulation of NF- κ B signaling pathway[J]. *Oncology reports*, 2014, 31(5): 2447-2453.
- [23] 谭西, 周欣, 陈华国. 植物多糖构效关系研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(21): 4104-4109.
- TAN X, ZHOU X, CHEN H G. Structure-activity relationship of plant polysaccharides[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2017, 42(21): 4104-4109.

Effects of *Hippophae rhamnoides* Polysaccharides on the Growth, Apoptosis, Migration and Invasion of Hep-G2 Cells

Bao Xiaowei¹, Wei Chenye¹, Liu Xiaolu¹, Jiang Junfeng¹, Sun Jiali¹, Xu Jun²

¹School of Food Science and Pharmacy, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052

²Xinjiang Seabuckthorn Deep Processing Engineering Technology Research Center,

Kizilsu Kirghiz Autonomous Prefecture 845350, Xinjiang)

Abstract Objective: To study effects of *Hippophae rhamnoides* polysaccharides (SBP-3) on proliferation, apoptosis, invasion of Hep-G2 cells through p38 pathway. Methods: The proliferation of Hep-G2 cells was detected by CCK-8 method. The apoptosis of Hep-G2 cells was detected by flow cytometry. The migration and invasion of Hep-G2 cells were detected by scratch test and Transwell method. The effect of seabuckthorn polysaccharide on Hep-G2 cells was investigated by Western blot. Results: After 48 hours of SBP-3 treatment, the inhibition rate of each group (125, 250, 500, 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was significantly increased ($P<0.05$), and the highest inhibition rate was 60.43% at the concentration of 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Apoptosis of Hep-G2 cells could be induced in each dose group (125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($P<0.01$), and the apoptosis rate gradually increased with the increase of SBP-3 concentration. At the same time, SBP-3 can weaken the invasion and migration ability of cells ($P<0.01$), inhibit MMP-2 and MMP-9 protein expression ($P<0.01$) in p38 signaling pathway. Conclusion: SBP-3 can inhibit the proliferation, apoptosis, migration and invasion of Hep-G2 cells. It is speculated that SBP-3 can further inhibit the expression of MMP-2 and MMP-9 by down regulating the activity of p38MAPK signaling pathway.

Keywords seabuckthorn polysaccharide; Hep-G2 cells; growth; apoptosis; migration; invasion; p38 pathway