

贝莱斯芽孢杆菌SN-1胞外多糖对人肝癌HepG2细胞的抑制作用

曹承旭¹, 高育哲¹, 闵钟嫚¹, 杨庆余^{1*}, 乌日娜^{2*}, 廖英杰³

(1. 沈阳师范大学粮食学院, 辽宁沈阳 110034) (2. 沈阳农业大学食品学院, 辽宁沈阳 110866)

(3. 中粮米业(沈阳)有限公司, 辽宁沈阳 110100)

摘要: 为研究贝莱斯芽孢杆菌 SN-1 胞外多糖 (Released Exopolysaccharides-2, rEPS-2) 对人肝癌 HepG2 细胞抑制和凋亡的影响, 该文评估了 rEPS-2 对人 HepG2 细胞的抑制作用, 经 rEPS-2 处理 48 h 的 HepG2 细胞, 用倒置显微镜和荧光显微镜观察 rEPS-2 作用后的细胞形态, 采用 MTT 法考察经 rEPS-2 处理 24 和 48 h 后对人肝癌 HepG2 细胞抑制作用, 并采用流式细胞仪对处理过的 HepG2 细胞进行细胞周期分布的检测。结果表明: rEPS-2 对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用呈时间和剂量依赖关系, 当 rEPS-2 的质量浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其抑制率可达 72.35%。流式细胞仪 Annexin-V/PI 双染法分析表明, G1/S 期发生阻滞并且 G0/G1 期细胞的百分比升高, 并有剂量依赖性, 此外, rEPS-2 对凋亡相关活性酶 Caspase-9 和 Caspase-3 的活力均有所提高, 经 rEPS-2 处理 48 h 后, Caspase-3 和 Caspase-9 的活性分别可达 140% 和 162%。综上所述, 贝莱斯芽孢杆菌 SN-1 胞外多糖对人肝癌 HepG2 细胞有明显的体外活性抑制作用, 可为贝莱斯芽孢杆菌 SN-1 胞外多糖的开发和应用提供参考文献和数据支撑。

关键词: 胞外多糖 (Released Exopolysaccharides, rEPS); 贝莱斯芽孢杆菌 SN-1; 人 HepG2 细胞; 抑制作用

文章编号: 1673-9078(2026)03-9-15

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.3.1874

Antiproliferative Effects of Exopolysaccharide from *Bacillus velezensis* SN-1 on Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

CAO Chengxu¹, GAO Yuzhe¹, MIN Zhongman¹, YANG Qingyu^{1*}, WU Rina^{2*}, LIAO Yingjie³

(1.College of Grain Science and Technology, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China)

(2.College of Food Science, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

(3.COFCO Rice (Shenyang), Shenyang 110100, China)

Abstract: We investigated the impacts of exopolysaccharides isolated from *Bacillus velezensis* SN-1 (referred to as rEPS-2) on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells, including their influence on apoptosis. HepG2 cells were treated with rEPS-2 for 48 hours, and their morphological characteristics were observed using an inverted microscope and fluorescence microscopy. An MTT

引文格式:

曹承旭,高育哲,闵钟嫚,等.贝莱斯芽孢杆菌SN-1胞外多糖对人肝癌HepG2细胞的抑制作用[J].现代食品科技,2026,42(3): 9-15.

CAO Chengxu, GAO Yuzhe, MIN Zhongman, et al. Antiproliferative effects of exopolysaccharide from *Bacillus velezensis* SN-1 on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. Modern Food Science and Technology, 2026, 42(3): 9-15.

收稿日期: 2024-12-17; 修回日期: 2025-03-04; 接受日期: 2025-03-10

基金项目: 辽宁省属本科高校基本科研业务费专项资金项目 (LJ202410166003); 农业农村部杂粮加工重点实验室开放课题 (2023CC008); 沈阳师范大学博士科研启动项目 (BS202321)

作者简介: 曹承旭 (1991-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品生物技术, E-mail: caochengxu@synu.edu.cn

通讯作者: 杨庆余 (1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 粮油深加工, E-mail: yangqy0311@163.com; 共同通讯作者: 乌日娜 (1979-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 益生菌营养健康调控, E-mail: wrn6956@163.com

assay was employed to examine the effects of rEPS-2 treatment for 24 and 48 hours on HepG2 cell survival and proliferation. The impact of treatment on cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. The inhibitory effects of rEPS-2 on HepG2 cells were time and dose dependent. At an rEPS-2 concentration of $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, inhibition of cell proliferation reached 72.35%. Flow cytometry analysis using Annexin V/PI double staining indicated dose dependent induction of G1/S phase arrest, with an increased percentage of cells in G0/G1 phase. rEPS-2 also increased the activity of apoptosis-associated enzymes Caspase-9 and Caspase-3. After 48 hours of treatment with rEPS-2, Caspase-3 and Caspase-9 activities increased to 140% and 162%, respectively. In conclusion, rEPS-2 displays significant *in vitro* antiproliferative efficacy against HepG2 cells. These findings provide a reference and supportive data for rEPS-2 development and application.

Key words: released exopolysaccharides (rEPS); *Bacillus velezensis* SN-1; human hepG2 cells; inhibitory effect

由于细胞增殖和凋亡的失衡, 导致癌症是世界上最致命的疾病之一^[1,2]。细胞凋亡是细胞程序性死亡的主要过程, 对身体组织发育和维持动态平衡具有重要意义^[3,4]。事实证明, 多种癌症的形成都与癌细胞凋亡通道受阻有关, 因此促使癌细胞凋亡已成为治疗癌症的新策略^[5,6]。然而, 由于肝癌晚期癌细胞增殖迅速, 导致其治愈率很低^[7,8]。传统的治疗方法主要包括手术切除、放疗和化疗。虽然化疗药物具有很好疗效, 但不良反应较明显, 还存在远期耐药性等问题, 而针对于某些天然化合物能够抑制癌细胞生长、副作用小的特点, 越来越多的肿瘤患者更青睐于天然化合物。因此, 开发高效、低毒、副作用小的天然化合物用于肿瘤的治疗具有重要意义。

近年来, 由于生物多糖具有高效的抗肿瘤活性和生物安全性, 已成为国内外的研究热点^[9-11]。微生物胞外多糖已被证明具有抗癌作用, 其中一些对人类肝癌细胞具有抑制作用, Wang 等^[12]研究发现植物乳杆菌 70810EPS 对人肝癌 HepG2 细胞具有明显的抑制作用^[13]。HepG2 是一种常用的肝癌细胞, 研究表明, 微生物胞外多糖能对 HepG2 肝癌细胞产生抑制作用, 从而阻断肝癌细胞的生长和扩散^[14,15]。然而, 目前国内外对芽孢杆菌胞外多糖对 HepG2 细胞的抑制作用鲜有报道。

rEPS-2 是提取自一株高产粘贝莱斯芽孢杆菌 SN-1 (*Bacillus velezensis* SN-1) 的微生物胞外多糖。前期研究结果显示 rEPS-2 具有一定的抗氧化、保肝等作用^[16-18]。该研究以 HepG2 为研究对象, 首先利用 MTT 方法对 rEPS2 抑制 HepG2 细胞的效果进行评价, 其次通过倒置显微镜观察 rEPS-2 对 HepG2 细胞形态的影响, 最后使用流式细胞仪分析胞外多糖对 HepG2 细胞的细胞周期和细胞凋亡等指标的影响, 以确定 rEPS-2 是否是通过诱导凋亡来实现对 HepG2 细胞的抑制作用, 为微生物胞外多糖抗肿瘤药物的开发提供参考和数据支撑。

1 材料与方法

1.1 原料

rEPS-2 由前期 *Bacillus velezensis* SN-1 分离纯化获得。人肝癌细胞 HepG2 与人正常细胞 L929 购自碧云天生物技术有限公司。DMSO、胰蛋白酶、链霉素、青霉素双抗、噻唑蓝 (Thiazolyl blue tetrazolium bromide, MTT)、5-氟尿嘧啶 (5-Fluorouracil)、DMEM 培养基和胎牛血清 (Bovine serum albumin) 均购于沈阳鼎国生物技术有限公司; Annexin V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒 Caspase-3 和 Caspase-9 活力测试试剂盒均购于碧云天生物技术有限公司。

1.2 主要仪器设备

H1650R 台式低速离心机, 上海天美科学仪器有限公司; TS100 倒置光学显微镜, 日本 Nikon 公司; LT-CIX250FT 细胞培养箱, 上海立德泰勃科学仪器有限公司; Herocell Vios160i CR 细胞培养恒温箱, 美国 Thermo 公司; iMark 酶标仪, 美国 Bio-Rad 公司; BDFAC-Saria 流式细胞仪, 美国 BD 公司。

1.3 试验方法

1.3.1 HepG2细胞、L929细胞的复苏与传代

细胞复苏: 首先将培养液置于 37°C 水浴锅中, 并将液氮罐中的细胞冻存管迅速取出同样放入 37°C 水浴锅中, 使其迅速溶解。其次将新鲜细胞液吸出至 5 mL 培养液中, 并用移液枪吹打混匀, 于室温下 $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 4 min 去除培养液中多余的 DMSO。将离心沉淀收集并轻微震荡混匀, 重新加入新鲜细胞培养液并用移液枪吹打混匀置于 T25 细胞培养瓶中, 37°C 于 CO_2 (体积分数 5%) 培养箱中培养。4 h 复苏后换液。

细胞传代: 首先将培养液和 PBS 缓冲液置于 37°C 水浴锅中, 弃去旧培养基, 向细胞瓶中加入 4 mL PBS 进行润洗, 倒掉, 此过程重复两遍。其次加入 1 mL

左右质量分数为 0.25% 胰蛋白酶进行润洗, 弃去后重新加入等体积胰蛋白酶消化细胞, 37 °C 于 CO₂ (体积分数 5%) 培养箱中温育 2~3 min。向其中添加 3 mL 新鲜培养液以停止消化, 并于室温下 2 000 r·min⁻¹ 离心 4 min 去除培养液中多余胰蛋白酶, 添加 6 mL 新鲜培养液用移液枪反复吹打, 使细胞悬浮分散于培养液中。最后, 滤去 2 mL 细胞悬液并重新加入新鲜培养液 10 mL 吹打均匀, 从中吸取 7 mL 细胞悬液置于 T25 细胞瓶中, 37 °C 于 CO₂ 培养箱中培养。在使用前, 将细胞传代三遍以上。

1.3.2 rEPS-2对HepG2细胞抑制作用实验

将细胞悬液按 1:5 接种到新的培养瓶中, 采用 MTT 法测定 rEPS-2 对 HepG2 细胞的抑制作用。取生长至对数期的 HepG2 细胞和 L929 正常细胞, 加入胰酶消化成单细胞悬液, 后用血球计数板计数, 置于新鲜培养基稀释 (每毫升 2×10⁵ cell)。96 孔板每孔分别接种 100 μL, 置于 37 °C, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中消化 24 h。吸弃培养液, 分别加入质量浓度为 0.05、0.2、0.5、1 和 5 mg·mL⁻¹ 的 rEPS-2 溶液 100 μL, 以质量浓度为 50 μg·mL⁻¹ 的 5-氟尿嘧啶为阳性对照; 分别于 37 °C, CO₂ (体积分数 5%) 培养箱中培养 24 h、48 h 和 72 h 后添加 10 μL 质量浓度为 5 mg·mL⁻¹ MTT 溶液, 并继续培养 4 h。弃去培养液并每孔加入 100 μL 的 DMSO 溶液, 温育 10 min 后彻底溶解后混匀, 最后用酶标仪检测 OD_{570 nm}。选取作用最强的进行后续试验。细胞抑制率公式如下:

$$R = \left(1 - \frac{T-B}{C-B}\right) \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R——细胞抑制率, %;

T——实验组的吸光度;

B——指空白组的吸光度;

C——指对照组的吸光度。

1.3.3 荧光显微镜观察细胞形态变化

样品按照 AO/EB 染色试剂盒说明书进行操作, 将培养液清除并加入两次 PBS 清洗细胞表面, 再次加入 1 mL PBS 与 20 μL AO/EB 混合液, 室温置于 5 min 后在荧光显微镜下观察。

1.3.4 流式细胞术检测细胞ROS水平

采用 Hoechst 33258 荧光染色法观察细胞凋亡形态学变化, 用种板、给药处理细胞 48 h 完成后, 后用质量分数为 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞。无血清培养液按 1 000:1 稀释 DCFH-DA 探针, 使其摩尔浓度达到 10 μmol·L⁻¹。将收集到的细胞悬浮于稀释过的 DCFH-

DA 中, 将细胞浓度调整为每毫升 2×10⁷ cell, 细胞培养箱内 37 °C 培养 20 min。每隔 3~5 min 混匀颠倒, 使细胞与探针充分接触, 待探针安装完成后, 用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 以除去未进入细胞内的 DCFH-DA。将对照组、0.2 和 1.0 mg·mL⁻¹ rEPS-2 处理过的细胞洗涤完成后加入 PBS 重悬检测。利用流式细胞仪分析 ROS 含量。

1.3.5 细胞凋亡率的测定

细胞凋亡率使用质量浓度为 1.0 mg·mL⁻¹ rEPS-2 处理的 HepG2 细胞。未添加 rEPS-2 的细胞当作对照组。将四个试验组在 37 °C, 体积分数 5.0% CO₂ 恒温箱中培养 24、48 和 72 h。除去培养基, 分散细胞, 并用少量生理盐水重悬。然后将细胞吸入离心管中, 并在 4 °C 下以 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。丢弃上清液, 并将细胞重悬。将 10.0 μL 的细胞悬液添加到 190.0 μL 缓冲液中, 然后添加 10.0 μL Annexin V-FITC。轻轻混合溶液, 避免在室温下光照 15 min。之后, 添加 295 μL 缓冲液并温育 1 h, 同时检查设备。在运行设备之前, 添加 5.0 μL 的 PI。

1.3.6 细胞周期分布的检测

用质量浓度为 0.0、0.2、0.5 和 1.0 mg·mL⁻¹ rEPS-2 处理过的细胞来分析细胞周期。先用胰蛋白酶消化处理的细胞, 再用冷的 PBS 缓冲液洗涤两次, 并以 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。然后将细胞用 φ=80% 的乙醇中固定在 4 °C 下 1 h, 然后用 PI 染色缓冲液染色。使用 400 目尼龙网过筛后将样品在波长 488 nm 下的流式细胞仪检测。

1.3.7 Caspase-3和Caspase-9酶活的测定

向培养 24 h 后的细胞加入不同质量浓度的 rEPS-2 (0、0.5 和 1 mg·mL⁻¹), 温育 48 h 后按 Caspase (CysteinyI Aspartate Specific Proteinase) 试剂盒说明书方法对细胞酶活力进行测定。方法如下: 分别向 PBS 冲洗过的细胞 (每毫升 1×10⁵ cell) 离心管中添加 0.1 mL 裂解液, 置于碎冰上进行裂解, 15 min 后迅速在 12 000 r·min⁻¹ 4 °C 条件下离心 15 min, 收集上清液并存放于 4 °C 预冷离心管中, 用考马斯亮蓝法测定上清液蛋白质含量, 其质量浓度控制在 1~3 mg·mL⁻¹ 即可; 此外, 按说明书向反应试剂中添加 10 μL 蛋白质裂解液, 混匀后置于 37 °C 避光条件下 12 h, 随后使用酶标仪测定其 OD_{405 nm}。Caspase 酶活化程度按以下公式计算:

$$R = \frac{S}{C} \times 100\% \quad (2)$$

式中:

R——Caspase 酶活, %;

S—实验组的 OD 值;

C—对照组的 OD 值。

1.3.8 数据统计分析

每个试验重复 3 次, 结果用“平均值 ± 标准差”表示。数据利用 SPSS 26.0 进行事后 Tukey 检验以进行多次比较, 用 Origin 2018 64bit 软件作图, $P < 0.05$ 被认为具有差异性显著。

2 结果与分析

2.1 rEPS-2 对人肝癌 HepG2 细胞的抑制作用

采用 MTT 法考察 rEPS-2 对 L929 和 HepG2 细胞作用 24、48 h 后对其细胞存活率的影响。由于一些抑制癌细胞的药物也会对正常细胞造成影响。因此, 本试验使用 L929 细胞作为对照来评估 rEPS-2 对癌细胞的特异性抑制作用。由图 1a 可知, rEPS-2 对 L929 细胞没有明显的抑制作用, 说明 rEPS-2 对正常细胞没有细胞毒性。此外, 由图 1b 可知, 随着 rEPS-2 质量浓度的增加和培养时间的延长, HepG2 细胞生长的抑制作用明显增强 ($P < 0.05$)。rEPS-2 实验组在最高的质量浓度 ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和最长的培养时间 (48 h) 下, HepG2 细胞的生长抑制率为 72.35%。藏颖等^[19]报道雨生红球藻多糖在 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 质量浓度下对 HepG2 细胞的抑制率可达 55.18%, 这与 rEPS-2 效果相当。rEPS-2 的抗癌活性受糖链结构、单糖组成、胞外多糖 (EPS) 中硫酸基团或蛋白质等功能基团的含量以及分子量的影响^[20]。Ukawa 等^[21]从莲雾中分离出 11 种 EPS, 其中四种 EPS 表现出较强的抗肿瘤活性, 他们的共同特征是含有 (1→3) 或 (1→3,6) 链连接的 EPS, 其中属 (1→3) 链连接的 EPS 抗肿瘤活性最强, 其次是 (1→3,6) 链连接的 EPS, 这可能是该研究中 rEPS-2 具有更强的抗肿瘤活性的原因之一。

通过对细胞形态的观察可判断细胞的生长状态和细胞的生理状态, 可有效的反映样品对细胞生长的影响^[22](图 2a)。rEPS-2 在低质量浓度下, 观察到 HepG2 细胞具有健康单一的形态, 细胞间紧密的连接, 单个细胞体积大并具有相对完整的形态。经 rEPS-2 处理 48 h 后, HepG2 细胞的数量逐渐减少, 细胞间空隙变大, 一些细胞膨胀或收缩, 细胞碎片数量增加。这表明 HepG2 细胞群落的增殖受到了抑制, 这与 MTT 试验的结果一致。细胞形态的变化表明 rEPS-2 有效的抑制了 HepG2 细胞的增殖。此外, rEPS-2 对 HepG2 细胞的抑制作用呈现质量浓度与时间依赖性。

抗肿瘤药物消杀细胞通常以两种形式, 分别为细

胞凋亡和细胞坏死, 而二者之间的形态和生化学特性各不相同, 存在明显差异。细胞凋亡通常发生细胞核的皱缩并且核膜空泡化, 但是细胞膜不会发生破裂; 细胞坏死情况下细胞核呈现碎片式, 并且核膜和原生质膜破裂。EB 可以通过破碎的细胞膜与 DNA 相结合发出红色的荧光, 而 AO 可以进一步跨过完整的细胞膜与 DNA 相结合发出绿色的荧光。因此 AO/EB 染色试剂盒可以用来判断细胞膜的完整性, 进而判断细胞是处于凋亡阶段还是坏死阶段^[23]。

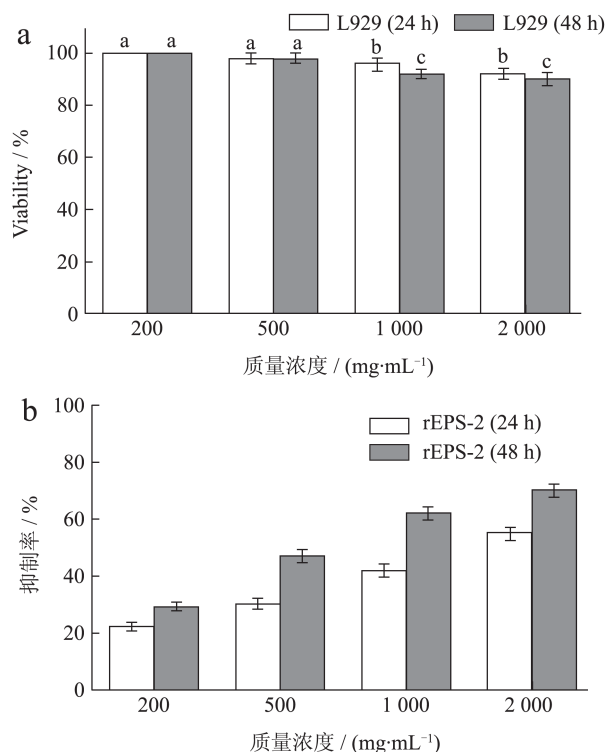


图 1 rEPS-2 作用于 L929 细胞 (a) 和 HepG2 细胞 (b) 24 h 和 48 h 后的抑制效果

Fig.1 Inhibitory effects of rEPS-2 on the L929 cells (a) and HepG2 cells (b) *in vitro* after 24 and 48 h

注: 不同小写字母表示组间差异显著 ($P < 0.05$)。

rEPS-2 作用于 HepG2 细胞的荧光显微镜图如图 2b 所示。对照组中细胞形态饱满且染色质颜色呈现绿色, 代表对照组细胞均为活细胞 (箭头所指绿色)。在经过质量浓度为 $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 rEPS-2 处理 48 h 后, 细胞质颜色逐渐被染成红色并且不规则细胞数增多, 这说明凋亡细胞在此阶段出现 (箭头所指红色)。在经过 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理过后, 细胞核的红色荧光强度明显增强, 这说明凋亡 HepG2 细胞呈现质量浓度依赖式递增, 表明 rEPS-2 具可通过诱导 HepG2 细胞凋亡而抑制其生长, 并且抑制作用随质量浓度的增大而增强, 从而达到抗肝癌的效果。

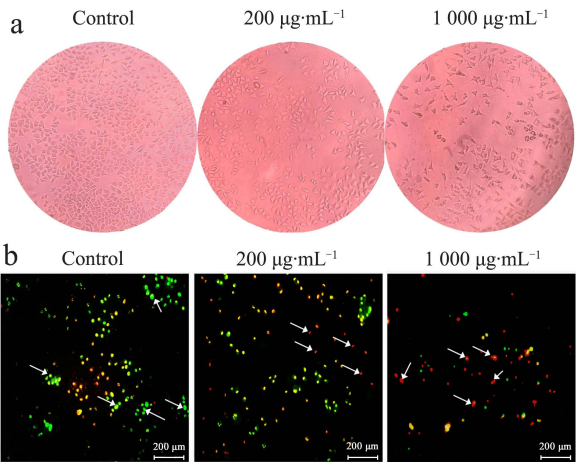


图 2 rEPS-2 作用后 HepG2 细胞的显微镜图

Fig.2 Inverted microscope (a) and fluorescence microscope (b) images of HepG2 cells after rEPS-2 action

注: a 为倒置显微镜; b 为荧光显微镜。

2.2 rEPS-2对HepG2细胞内ROS水平的影响

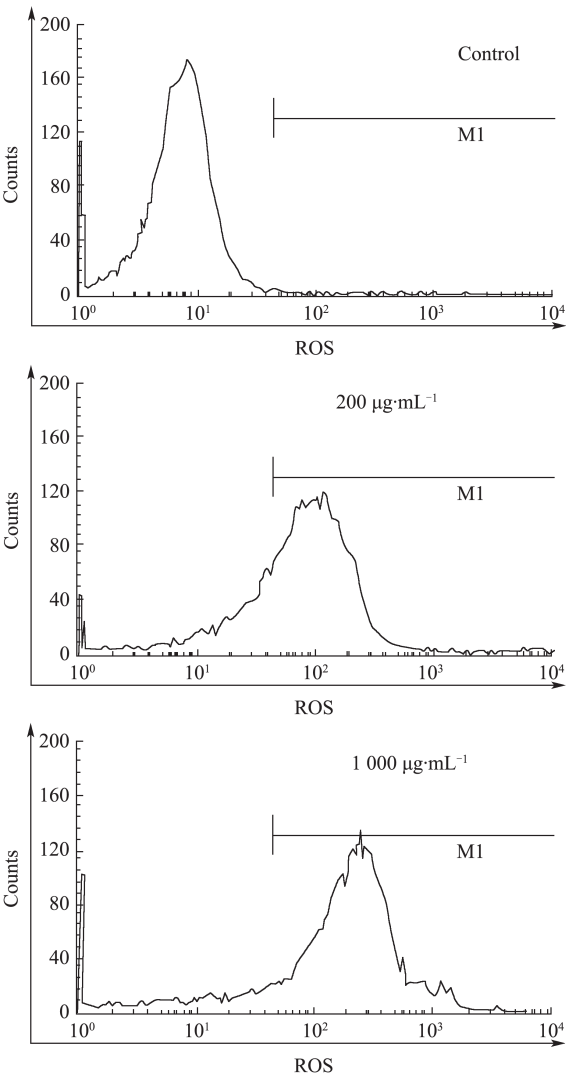


图 3 rEPS-2 诱导 HepG2 细胞内 ROS 的积累

Fig.3 rEPS-2 induces the accumulation of ROS in HepG2 cells

ROS 在细胞生长、分化、凋亡和自噬等各种细胞反应中均有重要作用，其水平可反映机体清除氧自由基的能力、机体内脂质过氧化物程度及机体氧化损伤程度等^[24,25]。ROS 在细胞凋亡启动的过程中起着关键的作用，研究报道，一些肿瘤药物抑制肝癌细胞的生长主要是依靠影响其细胞 ROS 的生成来实现的^[26]。图 3 ROS 水平检测结果也证明，HepG2 细胞中的 ROS 呈现质量浓度依赖式增长，对照组中 ROS 的含量仅为 0.60%，当 rEPS-2 质量浓度增长到 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，HepG2 细胞的 ROS 增长到 75.67%，当 rEPS-2 质量浓度增长到 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时 ROS 可增加到 87.74%，经 rEPS-2 处理后，HepG2 细胞内的 ROS 水平显著升高，表明 rEPS-2 可能通过破坏 HepG2 细胞氧化还原平衡，从而激活 ROS 通路，从而引起细胞凋亡。

2.3 流式细胞仪测定细胞凋亡率结果

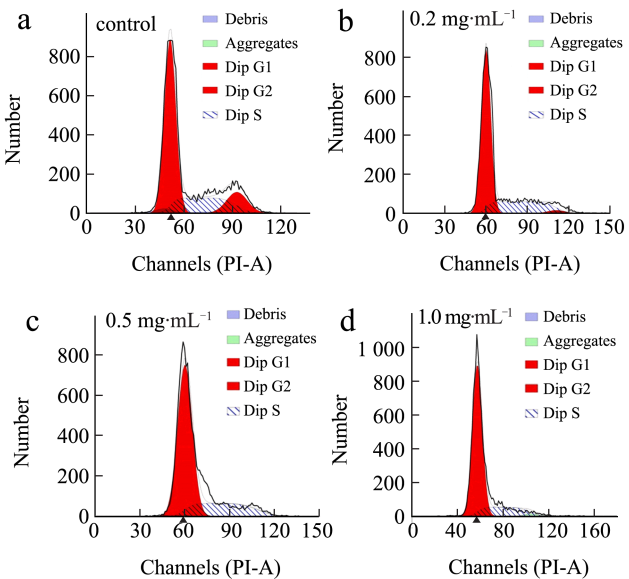


图 4 不同质量浓度的 rEPS-2 对 HepG2 细胞周期的影响

Fig.4 The effect of different concentrations of rEPS-2 on the cell cycle of HepG2

胞外多糖 rEPS-2 对肝癌细胞 HepG2 周期的影响如图 4 和表 1 所示，可通过流式细胞仪检测发现，在 0.0、0.2、0.5 和 1.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 质量浓度下的 rEPS-2，随着 rEPS-2 质量浓度的增加，G1/S 期的出现阻滞并且 G0/G1 期细胞的百分比升高，这表明经 rEPS-2 处理后，HepG2 细胞被阻滞在 G1/S 周期内。因此，细胞不能进行正常的有丝分裂，这进一步可使癌细胞增殖受到抑制^[27]。通过对细胞周期的监测，可以了解肿瘤细胞是否处在增殖减缓或凋亡的进程中。所以对癌细胞周期进行干扰可用于控制肿瘤细胞的生长，目前许多抗癌药物都是通过此方法阻断肿瘤细胞的细胞周期^[28,29]。

胞外多糖 rEPS-2 对肝癌细胞 HepG2 凋亡的影响如图 5 所示, 对照组中未经胞外多糖 rEPS-2 处理的 HepG2 细胞的存活率为 92.70%, 凋亡率为 6.53%。当用 1 mg·mL⁻¹ rEPS-2 处理 24、48 和 72 h 时, HepG2 细胞的凋亡率分别为 23.49%、34.14% 和 45.49%, 而坏死细胞分别为 9.28%、16.60% 和 15.70%。随着时间的延长活细胞的比率显著降低, 分别降至 67.20%、49.3% 和 38.8%。柴洋洋^[30]研究报道槲寄生多糖 48 h 处理的 HepG2 细胞的凋亡率为 12.11%, 可知 rEPS-2 显著促进 HepG2 细胞凋亡的效果。

表 1 HepG2 的细胞分布

Table 1 Cell distribution of HepG2

Concentration/ (mg·mL ⁻¹)	Phase G0-G1/%	Phase S/%	Phase G2-M/%
0.05	61.68 ± 3.56 ^a	13.32 ± 0.72 ^a	25 ± 0.93 ^a
0.2	69.01 ± 2.35 ^a	2.3 ± 0.31 ^a	28.68 ± 0.68 ^a
0.5	74.63 ± 0.27 ^b	0.28 ± 0.03 ^b	25.09 ± 0.32 ^c
1	80.23 ± 3.41 ^c	0 ^c	19.77 ± 0.08 ^b

注: 不同小写字母表示组间差异显著 ($P<0.05$)。

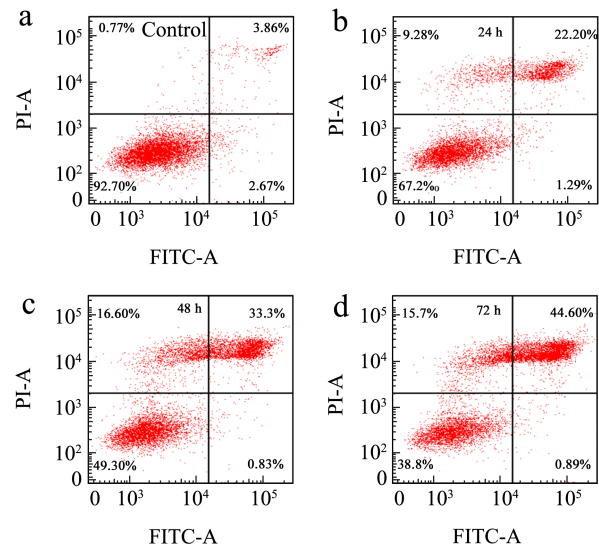


图 5 rEPS-2 诱导 HepG2 细胞凋亡

Fig.5 rEPS-2 induces apoptosis of HepG2 cells

2.4 Caspase-3和Caspase-9活性检测结果

凋亡是导致细胞死亡的调节性生理过程。半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) 家族是直接导致凋亡细胞解体的蛋白酶系统, 在细胞凋亡机制网络中居中心地位^[31]。Caspase 家族成员大多是凋亡的效应子或启动子, 在细胞凋亡中发挥重要的作用^[32]。Caspase-3 为凋亡效应子, 位于级联反应下游, 能被上游的始动子 Caspase-9 激活, 激活后的 Caspase 作用于特异性底物使细胞发生生化

及形态学改变, 导致细胞凋亡。Caspase-9 为凋亡始动子, 位于 Caspase 级联反应上游, 能在其他蛋白参与下发生自我活化并激活下游的 Caspase^[33]。由图 6 已知, rEPS-2 处理 48 h 后, Caspase-3 和 Caspase-9 的活性呈现质量浓度依赖式提高, 分别可达 140% 和 162%。这说明 rEPS-2 是通过调控细胞凋亡酶 Caspase-3 和 Caspase-9 的表达, 导致细胞周期停滞在 G1/S 周期内, 从而抑制癌细胞的增殖。

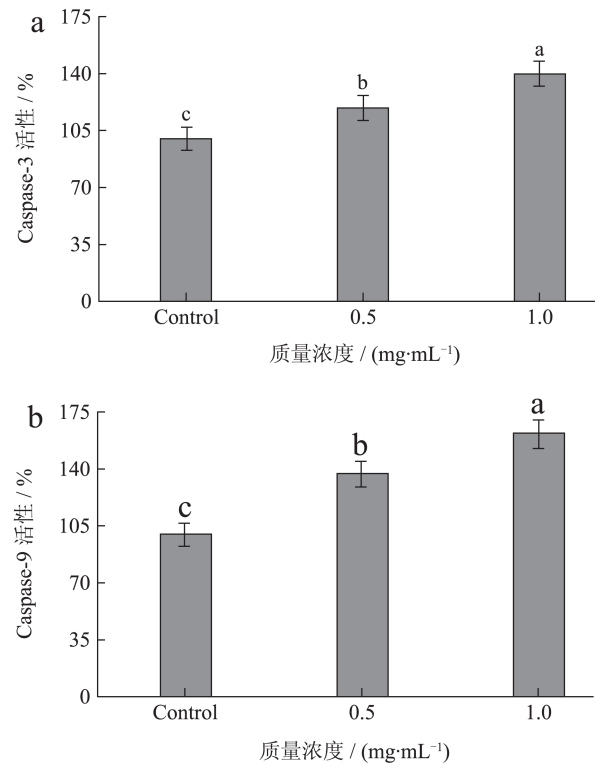


图 6 rEPS-2 对 HepG2 细胞 Caspase-3 和 Caspase-9 活力的影响

Fig.6 Effects of rEPS-2 on Caspase-3 and Caspase-9 activity of HepG2 cells

注: 不同小写字母表示组间差异显著 ($P<0.05$)。

3 结论

通过 MTT 试验证明, 从 *B. velezensis* SN-1 中提取的 rEPS-2 可显著抑制 HepG2 细胞的生长, 其抑制作用呈现时间和剂量的依赖性。倒置显微镜和荧光显微镜分析显示 rEPS-2 诱导 HepG2 细胞产生凋亡现象。通过流式细胞仪对 HepG2 细胞 PI/Annexin V 染色的分析表明, 随着 rEPS-2 质量浓度的增加, G1/S 期发生停滞并且 G0/G1 期细胞的百分比升高。这些结果表明, rEPS-2 具有抑制 HepG2 细胞生长的作用, 不仅可以作为新型抗肿瘤药物的替代来源, 也可以与常规抗肿瘤药物联合使用。

参考文献

- [1] VIEIRA COSTA R, BALBINOT K M, DA SILVEIRA G C A R, et al. Prognostic value of the expression and localization of cell proliferation and apoptosis markers in unicystic ameloblastomas [J]. Scientific Reports, 2024, 14(1): 3856.
- [2] 刘海涛,王昌惠,范理宏.黄精联合黄芩对肺癌细胞增殖及凋亡的影响与机制研究[J].世界中医药,2024,19(21):3289-3259.
- [3] HE C, ZHAO X, LEI Y, et al. The role of Nrf2/HO-1 signal pathway in regulating aluminum-induced apoptosis of PC12 cells [J]. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2023, 79: 127232.
- [4] NEWTON K, STRASSER A, KAYAGAKI N, et al. Cell death [J]. Cell, 2024, 187(2): 235-256.
- [5] GONG G, LIU Q, DENG Y, et al. Arabinogalactan derived from Lycium barbarum fruit inhibits cancer cell growth via cell cycle arrest and apoptosis [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 149: 639-650.
- [6] 黄光强,熊槐,欧阳运琼.基于溶酶体钙离子通道TRPML1探讨罗哌卡因在诱导心肌细胞自噬性凋亡中的作用机制[J].川北医学院学报,2024,39(6):726-731.
- [7] RIAZ RAJOKA M S, MEHWISH H M, FANG H, et al. Characterization and anti-tumor activity of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefir* isolated from Chinese kefir grains [J]. Journal of Functional Foods, 2019, 63: 103588.
- [8] FEI D, WANG F, WANG Y, et al. Circular RNA ACVR2A promotes the progression of hepatocellular carcinoma through mir-511-5p targeting PI3K-Akt signaling pathway [J]. Molecular Cancer, 2024, 23(1): 159.
- [9] GHARIBZAHEDI S M T, MARTI-QUIJAL F J, BARBA F J, et al. Current emerging trends in antitumor activities of polysaccharides extracted by microwave- and ultrasound-assisted methods [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 202: 494-507.
- [10] ZHANG J, LIU L, REN Y, et al. Characterization of exopolysaccharides produced by microalgae with antitumor activity on human colon cancer cells [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 128: 761-767.
- [11] 范慧珍,李涵蓉,张韵琪,等.金针菇多糖结构及生物活性研究进展[J].菌物研究,2025,23(2):107-118.
- [12] WANG K, LI W, RUI X, et al. Structural characterization and bioactivity of released exopolysaccharides from *Lactobacillus plantarum* 70810 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2014, 67: 71-78.
- [13] RAHBAR SAADAT Y, YARI KHOSROUSHAHI A, POURGHASSEM GARGARI B. A comprehensive review of anticancer, immunomodulatory and health beneficial effects of the lactic acid bacteria exopolysaccharides [J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 217: 79-89.
- [14] 杨义,赵守祺,葛菁萍,等.微生物胞外多糖在环境中的应用[J].中国农学通报,2024,40(9):66-74.
- [15] 秦孟春,张玲芳,胡顺安,等.乳酸菌胞外多糖抗肿瘤活性研究进展[J].中国乳品工业,2023,51(9):36-40.
- [16] CAO C, BIAN Y, CANG W, et al. Structural characterization and hepatoprotective activity of exopolysaccharide from *Bacillus velezensis* SN-1 [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2023, 103(2): 738-749.
- [17] CAO C, LIU Y, LI Y, et al. Structural characterization and antioxidant potential of a novel exopolysaccharide produced by *Bacillus velezensis* SN-1 from spontaneously fermented Da-Jiang [J]. Glycoconjugate Journal, 2020, 37(3): 307-317.
- [18] CAO C, LI Y, WANG C, et al. Purification, characterization and antitumor activity of an exopolysaccharide produced by *Bacillus velezensis* SN-1 [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 156: 354-361.
- [19] 藏颖.雨生红球藻多糖抑制肝癌HepG-2细胞增殖活性研究[D].南宁:广西民族大学,2024.
- [20] LI X, ZHOU J, DONG X, et al. *In vitro* and *in vivo* photothermal cancer therapeutic effects of gold nanorods modified with mushroom β -glucan [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2018, 66(16): 4091-4098.
- [21] UKAWA Y, HISAMATSU M, ITO H. Antitumor effects of (1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucan and (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucan purified from newly cultivated mushroom, *Hatakeshimiji* (*Lyophyllum decastes* Sing.) [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 90(1): 98-104.
- [22] 武铭,李梅,周中凯.发酵灵芝主要活性物质变化及对HepG2细胞的抑制作用[J].中国食品学报,2023,23(4):12-21.
- [23] CHENG Y, XIAO X, LI X, et al. Characterization, antioxidant property and cytoprotection of exopolysaccharide-capped elemental selenium particles synthesized by *Bacillus paralicheniformis* SR14 [J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 178: 18-26.
- [24] PAL A, PARIPATI A K, DEOLAL P, et al. Eisosome protein Pil1 regulates mitochondrial morphology, mitophagy, and cell death in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Journal of Biological Chemistry, 2022, 298(11): 102533.
- [25] 岳刘平,孙永康,徐方飏,等.基于Keap1/Nrf2/ARE信号通路探讨中医药干预帕金森病的研究进展[J/OL].中国实验方剂学杂志,1-15[2025-09-22].
- [26] XU H, HE Y, MA J, et al. Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase-1 by dicoumarol enhances the sensitivity of hepatocellular carcinoma cells to oxaliplatin via metabolic reprogramming [J]. International Journal of Oncology, 2020, 57(3): 733-742.
- [27] WANG Y, YANG J, LI X, et al. Optimization of the process of extracting polysaccharides from *Agrocybe aegerita* and *in vitro* antioxidant and anti-aging tests [J]. Molecules, 2024, 29(21): 4992.
- [28] 张靖鹏,彭岩枫,张得钧.枸杞清汁酶解澄清工艺优化及体外抗氧化作用[J].食品研究与开发,2024,45(1):83-91.
- [29] 左佳欣,邢蕊.MYB通过调控细胞周期促进胃癌细胞的增殖[J].胃肠病学和肝病杂志,2024,33(12):1605-1609.
- [30] 柴洋洋.槲寄生多糖分离纯化及对人肝癌细胞HepG2增殖和凋亡的影响[D].哈尔滨:东北林业大学,2016.
- [31] 秦宇,张劲松,闵晓洁,等.microRNA let-7a调控Caspase家族影响白内障发生的机制研究[J].中国医药导报,2015,12(17):4-8.
- [32] PEDRYCZ A, KOZAKIEWICZ M, RAHNAMA M, et al. Hyperbaric treatment stimulates chaperone-mediated macroautophagy and autophagy in the liver cells of healthy female rats [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(19): 10476.
- [33] 田淼,陈雨,陶朋,等.Caspase家族与失神经支配骨骼肌萎缩的研究进展[J].中风与神经疾病杂志,2024,41(1):84-87.