

## Anti-proliferative Effect and Mechanism of Total Flavonoids Extracted from *Juglans mandshurica* Maxim. on HepG2 Cells Based on Microfluidic Chip

Wenxiao MEN<sup>1</sup> #, Yibo ZHENG<sup>1</sup> #, Tian Jiao LI<sup>1,2,3</sup>, Yongrui BAO<sup>1,2,3</sup>,  
Shuai WANG<sup>1,2,3</sup>, Tingguo KANG<sup>1,\*</sup> & Xiansheng MENG<sup>1,2,3</sup> \*

<sup>1</sup> School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China

<sup>2</sup> Component Medicine Engineering Research Center of Liaoning Province, Dalian 116600, China

<sup>3</sup> Liaoning Province Modern Chinese Medicine Research Engineering Laboratory, Dalian 116600, China

**SUMMARY.** *Juglans mandshurica* Maxim, a traditional Manchu herbal medicine in China, has been used to treat or prevent various diseases. Total flavonoids, the primary chemical constituent of *J. mandshurica* (HH), possesses several bioactivities including anti-tumour. This study aimed at investigating the anti-liver cancer effect of HH *in vitro* through microfluidic chip, and expounding the molecular mechanism based on AKT relevant pathway. A multifunctional integrated microfluidic chip device, which can simulate the real microenvironment in the human body, was engineered to estimate the anti-liver cancer effect and mechanism of HH. The HepG2 cells cultivated in chip were treated with different concentrations of HH, and then proliferation inhibition was analyzed. Flow cytometry was used to assess cell apoptosis and cell cycle. Q-PCR and ELISA were performed to detect the expressions of genes and proteins on AKT-mTOR signaling pathway. The results demonstrated that HH inhibited the growth of HepG2 cells in dose-dependent and time-dependent manner, induced apoptosis and blocked cells cycle (G0/G1 phase) of HepG2 cells in a dose-dependent way. Gene and protein analysis revealed that the expression of PTEN mRNA and CASP-9, BAD proteins were significantly up-regulated while VEGF, AKT, mTOR mRNAs and VEGF, HIF-1 $\alpha$  proteins were down-regulated by HH treatment. These findings based on microfluidic chip provided the first experimental evidence confirming the efficacy of HH in anti-liver cancer via AKT-mTOR signaling pathway and paving the way for the broader use of HH in clinic.

**RESUMEN.** *Juglans mandshurica* Maxim., una tradicional medicina herbal manchú en China, se ha utilizado para tratar o prevenir diversas enfermedades. Los flavonoides totales, el constituyente químico primario de *J. mandshurica* (HH), poseen varias bioactividades que incluyen la antitumoral. Este estudio tuvo como objetivo investigar el efecto sobre el cáncer de hígado de HH *in vitro* a través de un chip microfluídico, y exponer el mecanismo molecular basado en la vía relevante de AKT. Se diseñó un dispositivo de chip microfluídico integrado multifuncional, que puede simular el microambiente real en el cuerpo humano, para estimar el efecto y el mecanismo del cáncer anti-hígado del HH. Las células HepG2 cultivadas en chip se trataron con diferentes concentraciones de HH, y luego se analizó la inhibición de la proliferación. La citometría de flujo se utilizó para evaluar la apoptosis celular y el ciclo celular. Q-PCR y ELISA se realizaron para detectar las expresiones de genes y proteínas en la vía de señalización AKT-mTOR. Los resultados demostraron que HH inhibió el crecimiento de células HepG2 de manera dependiente de la dosis y del tiempo, indujo apoptosis y bloqueó el ciclo celular (fase G0/G1) de células HepG2 en forma dosis dependiente. El análisis de genes y proteínas reveló que la expresión de ARNm de PTEN y CASP-9, proteínas BAD estaban significativamente reguladas al alza mientras que las proteínas VEGF, AKT, mTOR y VEGF, HIF-1 $\alpha$  estaban reguladas negativamente por el tratamiento con HH. Estos hallazgos basados en chips microfluídicos proporcionaron la primera evidencia experimental que confirma la eficacia de HH en el cáncer de hígado a través de la vía de señalización AKT-mTOR y allana el camino para un uso más amplio de HH en la clínica.

**KEY WORDS:** AKT-mTOR signaling pathway, anti-liver cancer, *Juglans mandshurica* Maxim., mechanism, microfluidic chip, total flavonoids.

# These authors contributed equally to this work.

\* Authors to whom correspondence should be addressed. E-mails: kangtingguo@163.com (T. Kang); mxsvvv@163.com (X. Meng).