

## · 中药抗肿瘤作用研究专题 ·

[编者按] 我国癌症发病率和死亡率逐年攀升,攻克肿瘤一直以来都是人类生存的一大难题。化学药物治疗是目前肿瘤临床治疗的通用方案,但肿瘤细胞常常产生耐药性阻碍药效的发挥,从而使肿瘤治疗变得难上加难。中医药是中华民族的瑰宝,现已成为我国医学体系的重要组成部分,中药单独使用或与常规化疗或放射治疗联合使用已被证明能够提高肿瘤患者生活质量以及延长患者无进展生存期。中药通过对机体的整体调节作用,并且发挥其多成分、多靶点、方组内药味相辅相成等特点来治疗肿瘤,近年来中药抗肿瘤作用研究正受到越来越多的关注。本课题组针对槐耳开展了抗肿瘤作用相关研究,发现槐耳清膏能够通过激活自噬以及下调 Lamin B<sub>1</sub> 表达来发挥抑制雄激素受体阳性的人前列腺癌 VCaP 细胞增殖的作用,本研究能够为槐耳临床应用提供一定的理论基础。还发现槐耳蛋白聚糖 TPG-1 能够明显抑制人肝癌 SK-HEP-1 细胞的增殖能力,而且能够明显促进其凋亡的发生,并且能够抑制 SK-HEP-1 细胞的体外迁移能力,开展的基因芯片检测结果也能够为 TPG-1 抗肝癌作用机制的深入研究提供一定的参考。此外,本课题组针对血竭开展的一项研究发现,血竭石油醚提取物能够抑制人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞的增殖和体外迁移能力,而且能够诱导人胃癌 HGC-27 和 MGC-803 细胞凋亡和自噬的发生,而且 mTOR/STAT3 信号通路下调可能参与了血竭石油醚提取物的抗胃癌作用,该研究也能够为血竭抗肿瘤作用研究提供一定的参考。最后,本课题组就从中药中分离出的单体成分、单个药味或其提取部位以及经典抗癌名方逆转肿瘤细胞耐药性的机制也进行了综述,为进一步开展中药抗肿瘤作用研究奠定了一定的基础。

# 槐耳蛋白聚糖 TPG-1 抑制人肝癌 SK-HEP-1 细胞生长的机制

杨爱琳<sup>1</sup>, 黄惠铭<sup>1</sup>, 刘亚鑫<sup>1</sup>, 欧阳里山<sup>1</sup>, 范海涛<sup>2</sup>, 屠鹏飞<sup>1\*</sup>, 胡仲冬<sup>1\*</sup>

(1. 北京中医药大学 中药学院 中药现代研究中心, 北京 100029;

2. 北京电子科技职业学院 生物工程学院, 北京 100029)

[摘要] 目的:蛋白聚糖 TPG-1 具有良好的抗肝癌活性,本研究进一步探究蛋白聚糖 TPG-1 抗肝癌的分子作用机制。方法:用槐耳蛋白聚糖 TPG-1(0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 g·L<sup>-1</sup>)处理人肝癌 SK-HEP-1 细胞,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测槐耳蛋白聚糖 TPG-1 对 SK-HEP-1 细胞增殖的影响,采用流式细胞术检测 TPG-1 对 SK-HEP-1 细胞凋亡的影响。对经 TPG-1 处理过的人肝癌 SK-HEP-1 细胞进行基因芯片检测分析,探讨 TPG-1 抗肝癌的分子作用机制。结果:与空白组比较,槐耳蛋白聚糖 TPG-1 能够显著抑制人肝癌 SK-HEP-1 细胞的增殖能力( $P < 0.01$ )。TPG-1(1 g·L<sup>-1</sup>)作用于 SK-HEP-1 细胞 48 h, SK-HEP-1 细胞凋亡率显著增加( $P < 0.01$ ),且 TPG-1 给药能够显著促进细胞凋亡重要执行者含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase)-3 和 Caspase-7 的剪切水平( $P < 0.01$ )。与空白组比较,TPG-1(0.1 g·L<sup>-1</sup>)能够抑制 SK-HEP-1 细胞的迁移能力( $P < 0.05$ )。基因芯片检测分析结果显示,TPG-1 处理后,SK-HEP-1 细胞中差异表达基因有 971 个,其中表达上调基因 486 个,表达下调基因 485 个。基因本体(GO)和通路(Pathway)分析结果显示表达差异基因的功能主要涉及白细胞介素-6(IL-6)生物合成、抗原加工与呈递、超氧化物歧化酶活性、丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MAPKKK)级联反应的正调控、自然杀伤(NK)细胞趋化、趋化因子生物合成等。此外,表达差异基因所涉及的信号通路主要包括核苷酸寡聚化结构域(NOD)样受体信号通路,凋亡, Toll 样受体信号通路, 维甲酸诱导基因-1 (RIG-I)样受体信号通路, T 细胞受体信号通路及趋化因子信号通路等。蛋白免疫印迹法结果显示, TPG-1(1 g·L<sup>-1</sup>)能够显著激活 SK-HEP-1 细胞中丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路( $P < 0.01$ )。结论:槐耳蛋白聚糖 TPG-1 能够抑制人肝癌 SK-HEP-1 细胞增殖及迁移能力并促进其发生凋亡, MAPK 信号通路的激活可能与 TPG-1 发挥抑制人肝癌 SK-HEP-1 细胞生长作用有关。

[关键词] 槐耳; 蛋白聚糖 TPG-1; 人肝癌 SK-HEP-1 细胞; 基因芯片; 丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2022)01-0072-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20220126

[收稿日期] 20210915(018)

[基金项目] 北京市科技新星计划项目(Z191100001119083); 中华中医药学会青年人才托举工程项目[CACM-2018-(QNRC2-B05)]

[第一作者] 杨爱琳, 博士, 从事中药活性成分抗肿瘤作用研究, E-mail: yangailin0418@163.com

[通信作者] \* 胡仲冬, 研究员, 从事中药活性成分抗肿瘤作用研究, E-mail: huzhongdong@126.com;

\* 屠鹏飞, 教授, 从事中药活性成分与新药开发研究, E-mail: pengfeitu@163.com

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20211105.1654.004.html>

[网络出版日期] 2021-11-08 9:49

## Mechanism of Proteoglycan TPG-1 from *Trametes robiniophila* Inhibiting Growth of Human Hepatoma SK-HEP-1 Cells

YANG Ai-lin<sup>1</sup>, HUANG Hui-ming<sup>1</sup>, LIU Ya-xin<sup>1</sup>, OUYANG Li-shan<sup>1</sup>, FAN Hai-tao<sup>2</sup>,  
TU Peng-fei<sup>\*</sup>, HU Zhong-dong<sup>1\*</sup>

(1. Modern Research Center for Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;  
2. College of Bioengineering, Beijing Polytechnic, Beijing 100029, China)

**[Abstract]** **Objective:** Proteoglycan TPG-1 isolated from *Trametes robiniophila* (Huaier) has proved to have anti-hepatoma activity, and this paper aims to explore the molecular mechanism. **Method:** Human hepatoma SK-HEP-1 cells were treated with TPG-1 (0, 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1 g·L<sup>-1</sup>). Then cell survival was detected by methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) and apoptosis by flow cytometry. In addition, expression of genes in SK-HEP-1 cells treated with or without TPG-1 was examined by DNA microarray to preliminarily explore the anti-hepatoma molecular mechanism of TPG-1. **Result:** TPG-1 inhibited the proliferation of SK-HEP-1 cells as compared with the blank group ( $P < 0.01$ ). After treatment with 1 g·L<sup>-1</sup> TPG-1 for 48 h, the apoptosis rate of SK-HEP-1 cells increased ( $P < 0.01$ ), and TPG-1 promoted the cleavage of cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase)-3 and Caspase-7, the key mediators of apoptosis ( $P < 0.01$ ). Additionally, TPG-1 (1 g·L<sup>-1</sup>) suppressed the migration of SK-HEP-1 cells ( $P < 0.05$ ). A total of 971 differentially expressed genes (DEGs) were identified in SK-HEP-1 cells after treatment with TPG-1, with 486 up-regulated and 485 down-regulated. These DEGs were mainly involved in the Gene Ontology (GO) terms of interleukin-6 (IL-6) biosynthesis, antigen processing and presentation, superoxide dismutase activity, positive regulation of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) cascade, nature killer (NK) cell chemotaxis, and chemokine biosynthesis, and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways of nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptor signaling pathway, apoptosis, Toll-like receptor signaling pathway, retinoic acid-inducible gene- I (RIG- I)-like receptor signaling pathway, T-cell receptor signaling pathway, and chemokine signaling pathway. Western blot results showed that TPG-1 (1 g·L<sup>-1</sup>) activated mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway in SK-HEP-1 cells ( $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Proteoglycan TPG-1 inhibited the proliferation and migration, and induced apoptosis of human hepatoma SK-HEP-1 cells. Up-regulation of MAPK signaling pathway may be responsible for the growth inhibition of human hepatoma SK-HEP-1 cells by TPG-1.

**[Keywords]** *Trametes robiniophila*; proteoglycan TPG-1; human hepatoma SK-HEP-1 cells; gene chip; mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway

肝细胞性肝癌(HCC)是一种侵袭性较强的恶性肿瘤,在癌症诱导的死亡中排名第3位。到目前为止,手术切除是早期治疗HCC患者的主要方法,但不适宜中、晚期肝癌患者<sup>[1]</sup>。索拉菲尼是临床用于HCC治疗的第一个分子靶向剂,虽然索拉菲尼已被证明能够延长患者的生存期,但其具有许多不良反应,如导致患者疲劳、腹泻、高血压病及手足皮肤

反应<sup>[2-3]</sup>。两千多年来,中医药已成为我国医学体系的重要组成部分,中药单独使用或与常规化疗或放射治疗联合使用已被证明能够显著提高免疫力,提高HCC病人生活质量及延长患者无进展生存期,中药以其多成分、多靶点的治疗特点,已在临床癌症治疗中得到广泛应用<sup>[4-5]</sup>。

槐耳为多孔菌科真菌槐栓菌 *Trametes*

*robiniophila* 的干燥子实体,其作为一种药效明确的中药在中国已应用1 600 多年,槐耳单药、其提取物及上市药物槐耳颗粒因具有良好的抗癌效果已得到学者们的广泛关注,基础研究及临床应用已证实其具有良好的抗肝癌效果<sup>[6-8]</sup>。目前已有研究表明从槐耳中分离得到的多糖类成分具有较好的抗肿瘤活性<sup>[9-10]</sup>。本课题组前期从槐耳中分离得到一种均一蛋白聚糖类成分 TPG-1,并发现 TPG-1 具有良好的抗肝癌活性,机制研究揭示其可能是通过 Toll 样受体 4 (TLR4) 来介导丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 及核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路的活化从而激活免疫来发挥抗肿瘤作用<sup>[11]</sup>。MAPK 是一个激酶家族,包括胞外信号调节激酶 (ERK), c-Jun N 末端激酶 (JNK), p38 MAPK, 其参与细胞生长、分化、免疫调节、血管形成等多种生理过程<sup>[12]</sup>。为了进一步揭示 TPG-1 抗肝癌作用机制,本研究探讨 TPG-1 对人肝癌 SK-HEP-1 细胞生长的作用,并且借助基因芯片检测技术研究 TPG-1 对人肝癌细胞中基因表达的影响,以期对 TPG-1 抗肝癌作用机制的深入阐释提供一定的借鉴和参考。

## 1 材料

**1.1 药物与试剂** 槐耳蛋白聚糖 TPG-1 的分离制备过程参考文献<sup>[11]</sup>,用含各种氨基酸和葡萄糖 (DMEM) 完全培养基配成母液质量浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 过滤除菌,存储于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 。DMEM 基础培养基,青-链霉素,0.25% 胰蛋白酶-EDTA 酶,胎牛血清 (美国 Corning 公司,批号分别为 10-040-CVR, 30-002-CI, 25-053-CI, 35-010-CV); 噻唑蓝 (MTT, 北京百瑞极生物科技有限公司,批号 298-93-1); 细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司,批号 C1062M); TRIzol 试剂 (美国 Invitrogen 公司,批号 15596018); 一抗 p38, 磷酸化 (p)-p38, JNK, p-JNK, ERK, p-ERK, 羊抗鼠 (兔) 二抗 (美国 CST 公司,批号分别为 8690T, 4511T, 9252T, 4668T, 4370T, 7076, 4695T, 7074); 半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶 (Caspase)-3, Caspase-7, 活化的 (cleaved) Caspase-3, cleaved Caspase-7 一抗 (美国 Cell Signaling Technology 公司,批号分别为 14220, 12827, 9664, 8438); 一抗  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin, 美国 Santa Cruz 公司,批号 sc-47778); SuperECL Plus 超敏发光液 (美国 GE Healthcare 公司,批号 RPN2232)。

**1.2 仪器** MCO-18AIC 型细胞培养箱 (日本三洋公司); Enspire 型多功能酶标仪 (美国 Perkin Elmer 公司); 5424R 型低温高速离心机 (美国 Eppendorf 公

司); TS100 型倒置显微镜 (日本 Nikon 公司); DYY-6D 型电泳仪及转膜仪 (北京六一仪器厂); TS-92 型水平摇床 (江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); DMIL LED 型荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司); BD FACSCanto II 型流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** 人肝癌 SK-HEP-1 细胞购于中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。人肝癌 SK-HEP-1 细胞培养于 DMEM 完全培养基中 (含有 10% 胎牛血清, 1% 青-链霉素), 并且  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度条件下进行培养。

**2.2 MTT 比色法检测细胞存活率** 将 SK-HEP-1 细胞进行消化, 调节细胞密度为  $3.5 \times 10^7$  个/L, 吸取  $100 \mu\text{L}$  均匀铺入 96 孔板中。过夜待细胞完全贴壁后, 用 DMEM 完全培养基将 TPG-1 配置成不同浓度的工作液, 每个浓度设置 5 个复孔。给药处理 72 h, 将孔中原液吸除, 加入含有  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 的 DMEM 基础培养基, 于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  避光孵育 3 h, 吸除 MTT 溶液, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO)  $150 \mu\text{L}$ , 溶解完全后在 490 nm 处用酶标仪测定吸光度  $A$ , 并计算细胞存活率。

**2.3 流式细胞术检测细胞凋亡** 将 SK-HEP-1 细胞以  $1 \times 10^8$  个/L 接种于 6 孔板, 过夜贴壁后加入终质量浓度为  $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  TPG-1 药物培养基, 每个浓度设置 3 个复孔, 培养 48 h, 按照细胞凋亡检测试剂盒说明书处理样品, 于流式细胞仪进行凋亡分析, 计算细胞凋亡率。

**2.4 细胞划痕实验检测细胞迁移** 将 SK-HEP-1 细胞以适当密度接种于 12 孔板中, 待板中的细胞长到皿底面积近乎 100% 时将完全培养基替换为基础培养基, 饥饿 12 h 后手持移液器用无菌的  $10 \mu\text{L}$  白枪头垂直于孔板底部进行划痕操作, 轻轻晃动培养板, 吸走基础培养基及其中划掉脱落的细胞, 用基础培养基清洗 2 次, 用  $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  TPG-1 处理 SK-HEP-1 细胞, 并在 0, 12, 24 h 进行定点拍照, 不同时间点针对同一视野拍照, 用图片处理软件测量划痕间的距离, 并计算每个时间点划痕愈合的相对距离 (均与 12 h 空白组相比) 并做统计分析。

**2.5 基因芯片检测分析相关基因** 人肝癌 SK-HEP-1 细胞经 TPG-1 给药处理后, 用 TRIzol 试剂提取细胞总 RNA, 经浓度检测, 毛细管电泳质检合格后送至上海伯豪生物科技有限公司进行检测。后续样品总 RNA 中的 mRNA 被放大并用荧光染料进行标记, 后对标记的 cRNA 进行纯化。纯化后的产

物与芯片进行杂交反应,经清洗及讯号侦测后进入分析流程。使用 Affymetrix Gene Chip Scanner 3000 进行基因芯片扫描,并且使用 Affymetrix GeneChip Command Console 软件,记录样品信息和基因芯片阵列信息。对公司返回的样品检测数据结果进行整理和分析,包括差异基因的基因本体(GO)功能富集及京都基因与基因组百科全书(KEGG)信号通路富集。

**2.6 蛋白免疫印迹法检测相关蛋白表达** 将 SK-HEP-1 细胞以适当密度接种于 6 孔板,隔夜贴壁后,TPG-1(0.1, 1 g·L<sup>-1</sup>) 给药处理 72 h,用磷酸盐缓冲液(PBS)缓慢清洗细胞,之后加入细胞裂解液裂解细胞,收集裂解液于 1.5 mL 离心管,置于加热模块 95 °C 加热 10 min。蛋白样品上样 20 μg/孔,后进行恒压电泳,恒流转膜,用 5% TBST 溶解的脱脂奶粉溶液封闭聚偏氟乙烯(PVDF)膜 2 h,然后一抗(1:1 000)4 °C 孵育过夜, TBST 漂洗 3 次,每次 15 min,后运用相应种属的二抗(1:2 000)4 °C 孵育 4~5 h, TBST 漂洗 3 次,每次 15 min,滴加超敏发光液进行曝光,显影。

**2.7 统计学分析** 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,利用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析,各组之间的比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 槐耳蛋白聚糖 TPG-1 对人肝癌 SK-HEP-1 细胞增殖的影响** 药物处理 72 h,与空白组比较,TPG-1 组细胞存活率显著下降( $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.2 槐耳蛋白聚糖 TPG-1 对人肝癌 SK-HEP-1 细胞凋亡的影响** 与空白组比较,TPG-1(1 g·L<sup>-1</sup>) 组细胞凋亡率显著升高( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.3 槐耳蛋白聚糖 TPG-1 对人肝癌 SK-HEP-1 细胞凋亡相关蛋白的影响** 与空白组比较,TPG-1(0.1, 1 g·L<sup>-1</sup>) 组显著促进细胞凋亡重要执行者 Caspase-3 和 Caspase-7 的剪切水平( $P < 0.01$ )。见图 1,表 3。

**3.4 槐耳蛋白聚糖 TPG-1 对人肝癌 SK-HEP-1 细胞迁移能力的影响** 与空白组比较,TPG-1(0.1 g·L<sup>-1</sup>) 组细胞迁移距离明显降低( $P < 0.05$ )。见图 2,表 4。

表 3 TPG-1 对 SK-HEP-1 细胞凋亡相关蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	Caspase-3/ $\beta$ -actin	cleaved Caspase-3/ $\beta$ -actin	Caspase-7/ $\beta$ -actin	cleaved Caspase-7/ $\beta$ -actin
空白		1.00±0.05	1.00±0.02	1.00±0.03	1.00±0.17
TPG-1	0.1	0.82±0.04	0.88±0.05	1.08±0.10	2.03±0.18 <sup>1)</sup>
	1	0.95±0.01	1.85±0.19 <sup>1)</sup>	1.36±0.13	2.54±0.47 <sup>1)</sup>

表 1 TPG-1 对 SK-HEP-1 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1 Effect of TPG-1 on proliferation of SK-HEP-1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

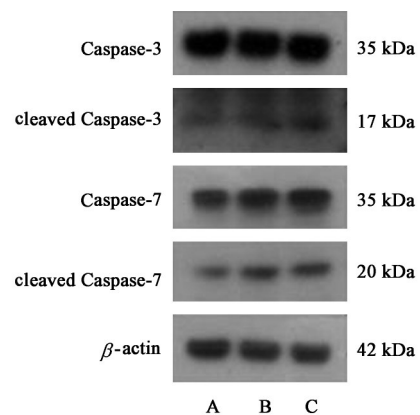
组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	细胞存活率/%
空白		100.00±2.36
TPG-1	0.05	59.47±0.49 <sup>1)</sup>
	0.10	53.18±1.20 <sup>1)</sup>
	0.25	47.04±1.83 <sup>1)</sup>
	0.50	46.74±0.54 <sup>1)</sup>
	1.00	43.79±0.61 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.01$ (表 2,3,7 同)。

表 2 TPG-1 对 SK-HEP-1 细胞凋亡的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of TPG-1 on apoptosis of SK-HEP-1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	细胞凋亡率/%
空白		3.70±0.12
TPG-1	1	11.33±0.48 <sup>1)</sup>

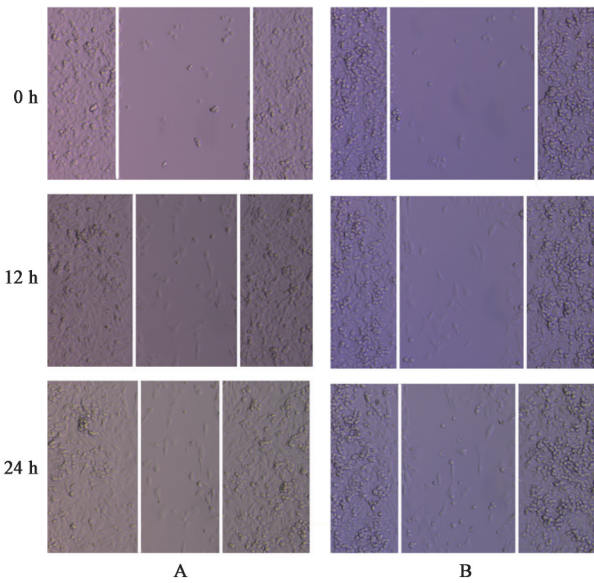


A. 空白组; B, C. TPG-1(0.1, 1 g·L<sup>-1</sup>) 组(图 3 同)

图 1 槐耳蛋白聚糖 TPG-1 对人肝癌 SK-HEP-1 细胞凋亡相关蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of proteoglycan TPG-1 on expression of apoptosis-related proteins of human hepatoma SK-HEP-1 cells

**3.5 对槐耳蛋白聚糖 TPG-1 差异基因 GO 聚类及信号通路分析** TPG-1 组与空白组比较有 971 个基因差异表达,其中上调基因 486 个,下调基因 485 个。GO 功能分析将基因功能分为生物过程、分子功能和细胞组成三类,通过 GO 分析能够发现不同处理



A. 空白组; B. TPG-1(0.1 g·L<sup>-1</sup>)组

图2 槐耳蛋白聚糖 TPG-1 对人肝癌 SK-HEP-1 细胞迁移能力的影响(倒置显微镜, ×100)

Fig. 2 Effect of proteoglycan TPG-1 from Huaier on migration of human hepatoma SK-HEP-1 cells (inverted microscope, ×100)

组间的差异基因与哪些基因功能的改变有关。GO 功能分析结果显示差异基因的功能主要涉及白细胞介素(IL)-6生物合成,抗原加工与呈递,超氧化物歧化酶活性,丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MAPKKK)级联反应的正调控,自然杀伤(NK)细

表6 Pathway功能分析结果

Table 6 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment results of differential genes

通路	基因	基因数目	P
NOD样受体信号通路	CXCL1/CXCL2/BIRC3/IKBKB/IL1B/IL6/CXCL8/NFKBIA/CCL5/TNF/CARD6	11	2.60×10 <sup>-6</sup>
凋亡	APAF1/BIRC3/IKBKB/IL1A/IL1B/NFKBIA/NGF/PPP3R2/TNF/CASP10	10	0.000 626
TLR 信号通路	TIRAP/FOS/IKBKB/IL1B/IL6/CXCL8/IRF7/LBP/NFKBIA/CCL5/TNF	11	0.000 480
RIG-I 样受体信号通路	IKBKB/CXCL8/IRF7/NFKBIA/TNF/CASP10/ISG15	7	0.008 416
T 细胞受体信号通路	CSF2/FOS/IKBKB/NFKBIA/PPP3R2/PAK6/TNF/CD8B	8	0.025 372
趋化因子信号通路	CCL26/CXCL1/CXCL2/CXCL3/IKBKB/CXCL8/NFKBIA/PF4/PARD3/CCL5/CCL25/CXCL14	12	0.021 484

3.6 槐耳蛋白聚糖 TPG-1 能够激活人肝癌 SK-HEP-1 细胞中 MAPK 信号通路 与空白组比较, TPG-1(0.1, 1 g·L<sup>-1</sup>)组 p-p38 蛋白表达显著上调, 差异有统计学意义(P<0.01), TPG-1 (1 g·L<sup>-1</sup>)组 p-JNK, p-ERK 蛋白表达显著上调, 差异有统计学意义(P<0.01)。说明槐耳蛋白聚糖 TPG-1 能够激活 SK-HEP-1 细胞中相关的 MAPK 信号通路。见

表4 TPG-1对SK-HEP-1细胞迁移能力的影响(̄x±s, n=3)

Table 4 Effect of TPG-1 on migration of SK-HEP-1 cells (̄x±s, n=3)

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	12 h 细胞相对迁移距离	24 h 细胞相对迁移距离
空白		1.00±0.09	1.48±0.02
TPG-1	0.1	0.72±0.05	1.06±0.13 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05。

胞趋化,趋化因子生物合成等。信号通路分析结果显示,差异基因涉及的信号通路主要包括核苷酸寡聚化结构域(NOD)样受体信号通路,凋亡, Toll 样受体信号通路, 维甲酸诱导基因- I (RIG- I) 样受体信号通路, T 细胞受体信号通路及趋化因子信号通路等。见表 5, 6。

表5 差异基因的部分 GO 功能注释

Table 5 List of gene ontology (GO) results of differential genes

功能类别	基因	基因数目	P
IL-6 生物合成	TIRAP/REG/IL1B	3	0.000 660
抗原加工与呈递	HLA-DOA/HLA-DOB	2	0.007 089
超氧化物歧化酶活性	NQO1/SOD2	2	0.007 288
MAPKKK 级联反应正调控	KLB/FGFR3	2	0.010 454
NK 细胞趋化	CCL5/CXCL14	2	0.010 454
趋化因子生物合成	HMOX1/IL1B/IL6/TNF	4	0.000 232

表7,图3。

#### 4 讨论

TPG-1 是从中药槐耳中提取分离到的一种均一蛋白聚糖类成分,前期研究显示 TPG-1 具有良好的抗肝癌活性,机制研究揭示其可能是通过激活 TLR4/核转录因子(NF)-κB/MAPK 信号通路从而激活免疫来发挥抗肿瘤作用<sup>[11]</sup>。在本研究中选取了

表7 TPG-1对SK-HEP-1细胞中MAPK信号通路的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of TPG-1 on MAPK signaling pathway in human hepatoma SK-HEP-1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	p-p38/ $\beta$ -actin	p38/ $\beta$ -actin	p-ERK/ $\beta$ -actin	ERK/ $\beta$ -actin	p-JNK/ $\beta$ -actin	JNK/ $\beta$ -actin
空白		1.00±0.04	1.00±0.10	1.00±0.23	1.00±0.32	1.00±0.13	1.00±0.02
TPG-1	0.1	1.13±0.02 <sup>1)</sup>	1.06±0.14	0.97±0.04	0.83±0.29	1.06±0.15	1.17±0.05
	1	2.35±0.06 <sup>1)</sup>	1.23±0.26	1.96±0.06 <sup>1)</sup>	1.19±0.38	2.27±0.04 <sup>1)</sup>	1.62±0.15

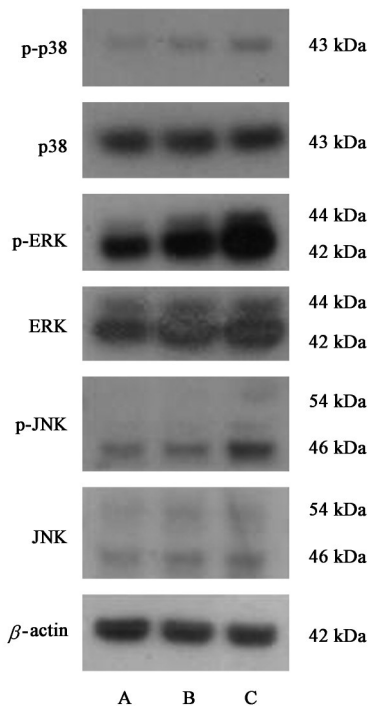


图3 槐耳蛋白聚糖 TPG-1 对人肝癌 SK-HEP-1 细胞中 MAPK 信号通路蛋白电泳

Fig. 3 Electrophoresis of proteoglycan TPG-1 from Huaier on MAPK signaling pathway in human hepatoma SK-HEP-1 cells

人肝癌 SK-HEP-1 细胞进行了体外细胞学研究,结果显示 TPG-1 能够明显抑制 SK-HEP-1 细胞的增殖能力,而且能够明显促进细胞凋亡重要执行者 Caspase-3 和 Caspase-7 的剪切水平,进而诱导细胞凋亡的发生。此外,TPG-1 还能够抑制 SK-HEP-1 细胞的体外迁移能力。

基因芯片技术广泛应用于药物药效机制研究,有助于探寻新的药物靶点,其能够同时对千万数量级数目的基因的表达情况进行分析,并且形成完整的基因表达谱,能够为药物的开发及合理的临床应用提供依据<sup>[13]</sup>。借助基因芯片能够分析药物对生物体规模庞大的基因集合的调控作用,而且通过对成千上万的基因进行变化趋势和变化倍数的统计及对差异显著的基因进行 GO 分类富集分析与基于 KEGG 通路富集分析,能够得到大量有效的数据,从而对揭示药物作用机制具有很好的提示作用<sup>[14-16]</sup>。

在本研究中基因芯片检测分析结果显示,TPG-1 给药处理组与空白组比较,有 971 个基因差异表达,其中表达上调基因 486 个,表达下调基因 485 个。GO 分析结果显示,差异基因的功能主要涉及 IL-6 生物合成,抗原加工与呈递,超氧化物歧化酶活性,MAPKKK 级联反应的正调控,NK 细胞趋化,趋化因子生物合成等。IL-6 对乳腺癌、白血病及淋巴瘤的增殖有明显抑制作用,而且有研究报道 IL-6 在体外能提高 NK 细胞和淋巴因子激活的杀伤 (LAK) 细胞的活力而发挥抗肿瘤作用<sup>[17]</sup>。所有真核细胞中均含有二种超氧化物歧化酶,研究表明其活性降低是许多肿瘤发生系统的特征<sup>[18]</sup>。NK 细胞在机体天然免疫中发挥重要作用,对肿瘤细胞、衰老突变细胞、胞内寄生虫等都有较强的清除能力<sup>[19]</sup>。肿瘤细胞及基质细胞可通过自分泌或旁分泌方式产生趋化因子,趋化因子家族是一类小分子蛋白质,其能够结合受体诱导 NK 细胞脱颗粒、促进 NK 细胞杀伤肿瘤细胞<sup>[20]</sup>。上述发现为深入研究 TPG-1 抗肝癌作用的分子机制提供了重要参考。此外,基于 KEGG 富集分析结果显示,TPG-1 给药可能影响了人肝癌细胞中 NOD 样受体信号通路,TLR 信号通路,RIG- I 样受体信号通路,T 细胞受体信号通路及趋化因子信号通路等信号通路,且相关蛋白检测结果显示,TPG-1 能够激活 SK-HEP-1 细胞中由 TLR 介导的 MAPK 信号通路,这在一定程度上验证了基因芯片提示结果。MAPK 信号通路在调节肿瘤细胞增殖,凋亡,迁移等过程中占据重要地位<sup>[21]</sup>。有研究报道抗肿瘤药物可通过激活 MAPK 信号通路发挥促进肿瘤细胞凋亡的作用<sup>[22]</sup>。因此,MAPK 信号通路的激活可能部分介导了 TPG-1 的抗肝癌作用。

综上所述,TPG-1 能够明显抑制人肝癌 SK-HEP-1 细胞的增殖能力,而且能够明显促进其凋亡的发生,并且能够抑制 SK-HEP-1 细胞的体外迁移能力。此外,开展的基因芯片检测结果也能够为 TPG-1 抗肝癌作用机制的深入研究提供一定的参考。本研究工作能够为槐耳蛋白聚糖 TPG-1 未来

的临床应用奠定一定的理论基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] YANG J D, ROBERTS L R. Hepatocellular carcinoma: a global view[J]. *Nat Rev Gastro Hepat*, 2010, 7(8): 448-458.
- [2] LLOVET J M, RICCI S, MAZZAFERRO V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4): 378-390.
- [3] MARISI G, CUCCHETTI A, ULIVI P, et al. Ten years of sorafenib in hepatocellular carcinoma: are there any predictive and/or prognostic markers? [J]. *World J Gastroenterol*, 2018, 24(36): 4152-4163.
- [4] XIANG Y, GUO Z, ZHU P, et al. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: modern perspectives of ancient but advanced science [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(5): 1958-1975.
- [5] NIE J, ZHAO C, DENG LI, et al. Efficacy of traditional Chinese medicine in treating cancer [J]. *Biomed Rep*, 2016, 4(1): 3-14.
- [6] 杨爱琳, 胡仲冬, 屠鹏飞. 槐耳抗肿瘤作用研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2015, 40(24): 4805-4810.
- [7] 张书琳. 槐耳及其复方制剂槐杞黄颗粒的研究进展[J]. *医学综述*, 2015, 21(1): 114-116.
- [8] CHEN Q, SHU C, LAURENCE A, et al. Effect of Huaier granule on recurrence after curative resection of HCC: a multicentre, randomised clinical trial [J]. *Gut*, 2018, 67(11): 2006-2016.
- [9] ZHENG J, LI C, WU X, et al. Huaier polysaccharides suppresses hepatocarcinoma MHCC97-H cell metastasis via inactivation of EMT and AEG-1 pathway[J]. *Int J Biol Macromol*, 2014, 64: 106-110.
- [10] SUN Y, SUN T, WANG F, et al. A polysaccharide from the fungi of Huaier exhibits anti-tumor potential and immunomodulatory effects [J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 92(1): 577-582.
- [11] YANG A, FAN H, ZHAO Y, et al. An immune-stimulating proteoglycan from the medicinal mushroom Huaier up-regulates NF- $\kappa$ B and MAPK signaling via Toll-like receptor 4 [J]. *J Biol Chem*, 2019, 294(8): 2628-2641.
- [12] DHILLON A S, HAGAN S, RATH O, et al. MAP kinase signalling pathways in cancer [J]. *Oncogene*, 2007, 26(22): 3279-3290.
- [13] BRENTANI R R, CARRARO D M, VERJOVSKIALMEIDA S, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications [J]. *Crit Rev Oncol Hemat*, 2005, 54(2): 95-105.
- [14] 刘天龙, 李玉文, 张一恺, 等. 基因芯片技术在中药药理作用机制研究中的应用[J]. *中国药房*, 2016, 27(28): 4021-4024
- [15] 王珊珊, 廖清船, 许静, 等. 基因芯片技术在中药肿瘤药理研究中的应用[J]. *中国药房*, 2011, 22(31): 2968-2970.
- [16] LI W F, JIANG J G, CHEN J. Chinese medicine and its modernization demands[J]. *Arch Med Res*, 2008, 39(2): 246-251.
- [17] 路秀英, 王占长. IL-1、IL-6与肿瘤的关系[J]. *国外医学*, 1995(3): 159-161.
- [18] 李性天. 超氧化物歧化酶的作用机理及其抗肿瘤和抗心肌梗塞作用[J]. *生化药物杂志*, 1988(2): 16-19.
- [19] 杨春媚, 张婷婷, 钱程, 等. NK细胞抗肿瘤机制及相关免疫疗法的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2019, 35(11): 1492-1496.
- [20] 辛崇美, 徐秀莲, 孙建方. 趋化因子在肿瘤进展中的作用[J]. *国际免疫学杂志*, 2014, 37(3): 183-186.
- [21] BRAICU C, BUSE M, BUSUIOC C, et al. A comprehensive review on MAPK: a promising therapeutic target in cancer [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, doi: 10.3390/cancers11101618.
- [22] WADA T, PENNINGER J M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation[J]. *Oncogene*, 2004, 23(16): 2838-2849.

[责任编辑 张丰丰]