

芦荟大黄素对肝癌 HepG2 细胞生长、迁移及纤维状肌动蛋白的影响

王晓辉^{1,2}, 王伊林³, 靳小石^{1,2*}

(1. 河北大学, 河北保定 071002; 2. 河北大学附属医院, 河北保定 071000;
3. 广西中医药大学第一附属医院, 南宁 530200)

[摘要] 目的:探讨芦荟大黄素对肝癌 HepG2 细胞生长、迁移及纤维状肌动蛋白(F-actin)的影响。方法:通过对人正常肝细胞株 QSG-7701 细胞的药物毒性实验筛选出芦荟大黄素对人正常肝细胞无明显毒性的最大无毒浓度(TC₀);以 TC₀ 为最高浓度并稀释成 3 个不同的芦荟大黄素浓度,作用于体外培养人肝癌 HepG2 细胞为芦荟大黄素组,另设置未加药物 HepG2 细胞为空白组;通过噻唑蓝(MTT)比色法检测两组细胞作用 48 h 后细胞增殖抑制率;采用细胞小室移动实验及划痕实验检测两组细胞迁移能力;高内涵细胞成像系统分析芦荟大黄素对 HepG2 细胞 F-actin 表达的影响;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组细胞磷酸化内皮型一氧化氮合酶(p-eNOS),核转录因子- κ B p65(NF- κ B p65)蛋白表达。结果:芦荟大黄素对人正常肝细胞株 QSG-7701 细胞的 TC₀ 为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,以 TC₀ 为最高浓度,将芦荟大黄素(10, 30, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)作用于 HepG2 细胞;与空白组相比,芦荟大黄素组细胞培养 48 h 后增殖抑制率升高,且呈剂量递进型($P < 0.01$);芦荟大黄素组细胞培养 48 h 后划痕距离增宽,迁移能力降低,且呈剂量递减型($P < 0.01$);F-actin 面积缩小,排列紊乱且不规则,边缘模糊,且呈浓度递减型($P < 0.01$);芦荟大黄素组细胞 NF- κ B p65 表达增多,p-eNOS 表达减少,且呈浓度递减型($P < 0.01$)。结论:芦荟大黄素可能通过增强 NF- κ B p65,降低 p-eNOS 表达,促进 F-actin 解聚,减少微丝形成,从而降低肝癌 HepG2 细胞的增殖和迁移能力,发挥其抑制肿瘤的作用。

[关键词] 芦荟大黄素; 肝癌; 迁移; 纤维状肌动蛋白

[中图分类号] R22;R243;R273;R2-03;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)11-0111-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181119

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180315.0956.022.html>

[网络出版时间] 2018-03-15 11:01

Effect of Aloe-emodin on Growth, Migration and Fibrous Actin of Hepatoma HepG2 Cells

WANG Xiao-hui^{1,2}, WANG Yi-lin³, JIN Xiao-shi^{1,2*}

(1. Hebei University, Baoding 071002, China;

2. Affiliated Hospital of Hebei University, Baoding 071000, China;

3. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of aloe-emodin on the growth, migration and fibrous actin (F-actin) of hepatoma HepG2 cells. **Method:** The maximum toxic concentration (TC₀) of aloe-emodin on human normal hepatocytes was screened out in the drug toxicity experiment for human normal hepatocyte cell line QSG-7701. TC₀ was taken as the highest concentration, diluted to 3 different concentrations of aloe-emodin, and used to treat human hepatoma HepG2 cells *in vitro* for the aloe-emodin group; another untreated HepG2 cells were set up as a blank group; cell proliferation inhibition rate was measured by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium

[收稿日期] 20171130(017)

[基金项目] 广西壮族自治区卫生和计划生育委员会科研课题项目(Z2016668)

[第一作者] 王晓辉,在读硕士,医师,从事普外科肿瘤疾病发病机制与治疗研究,E-mail:hnwangxiaohui@yeah.net

[通信作者] *靳小石,博士,副主任医师,从事普外科肿瘤疾病发病机制与治疗研究,E-mail:doctorjinxiaoshi@126.com

bromide (MTT) assay after 48 hours. Cell migration assay and scratch assay were used to detect the cell migration in both groups. The effect of aloe-emodin on the expression of HepG2 cell F-actin was analyzed by high-content cell imaging system. The expressions of phosphorylated endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS) and nuclear transcription factor- κ B p65 (NF- κ B p65) in HepG2 cells were detected by Western blot. **Result:** TC₀ of aloe-emodin on human normal hepatocyte cell line QSG-7701 was 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. TC₀ was taken as the highest concentration to treat HepG2 cells with aloe-emodin (10, 30, 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$). Compared with blank group, The proliferation inhibition rate of aloe-emodin group increased after 48 hours of culture, indicating the dose escalation thpe ($P < 0.01$), after 48 hours of culture, the scratch distance of aloe-emodin group was broadened, and the migrating ability of aloe-emodin group was decreased, indicating the dose decline type ($P < 0.01$); F-actin area was shorten, disordered, irregular and fuzzy, indicating the dose decline type ($P < 0.01$); the expression of NF- κ B p65 in aloe-emodin group was increased, while the expression of p-eNOS was decreased, indicating the dose decline type ($P < 0.01$). **Conclusion:** Aloe-emodin may reduce the proliferation and migration of HepG2 cells by increasing NF- κ B p65, inhibiting the expression of p-eNOS, promoting the depolymerization of F-actin, and reducing the formation of microfilaments, with an effect in inhibiting tumor.

[**Key words**] aloe-emodin; hepatoma; migration; fibrous actin (F-actin)

肝癌是临床上常见的恶性肿瘤之一,在各类肿瘤中发病率为第 6 位,死亡率高居第 2 位^[1]。我国目前行肝癌切除术后 5 年内复发率为 60% ~ 70%,而每年新发病例约有 39 万之多^[2],因此,积极寻找有效且副作用小的抗肝癌药物,是目前亟待解决的问题。芦荟大黄素是从芦荟、决明和大黄中提取出来的有效成分,已证实对于肝癌、胃癌、乳腺癌等细胞有明确抑制生长作用^[3-5],目前研究认为,其抗肿瘤机制主要是影响肿瘤细胞周期、诱导肿瘤细胞凋亡^[6-7],但其对于抑制恶性肿瘤细胞生长、迁移的深层机制报道较少,有待发掘、研究。

肿瘤转移是肿瘤患者最主要的死亡原因,临床中约 90% 死亡的肿瘤患者均出现肿瘤转移,抑制肿瘤细胞转移是目前公认的肿瘤治疗方向,也是目前肿瘤的研究热点^[8-9]。细胞骨架主要由微管、微丝及中间纤维组成,其中纤维状肌动蛋白 (filament actin, F-actin) 是构成微丝的主要蛋白之一,在细胞中以游离球状存在^[10]。RAO 等^[11] 研究发现, F-actin 的异常表达可降低微丝功能,引起细胞骨架重构,从而使细胞形态及迁移能力出现异常改变。本研究拟用不同浓度芦荟大黄素培养肝癌 HepG2 细胞,观察其对肝癌细胞生长、迁移及对 F-actin 的影响,为芦荟大黄素抑制肝癌细胞迁移提供基础理论依据。

1 材料

1.1 细胞株 人肝癌 HepG2 细胞株、人正常肝细胞 QSG-7701 细胞株,均购自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心。

1.2 试剂 芦荟大黄素(中国食品药品检定研究院,纯度 $\geq 98\%$);DMEM 低糖培养基,胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 D3461, 16000-044); transwell 小室(中国乐博生物公司,批号 R625483); 噻唑蓝 (MTT) 试剂盒(日本 Dojindo 公司,批号 EY683);细胞骨架分析试剂盒(美国赛默飞世尔公司,批号 8423000);磷酸化内皮型一氧化氮合酶 (phosphorylated endothelial nitric oxide synthase, p-eNOS),核转录因子- κ B p65 (nuclear transcription factor- κ B p65, NF- κ B p65) 一抗(中国欣博盛公司,批号分别为 GTX69248, GTX57361);甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 一抗(英国 Abcam 公司,批号 ab5263)。

1.3 仪器 VT1700 型高内涵细胞成像系统(美国赛默飞世尔公司);3X16 型实时细胞分析仪(美国 Roche 公司);M5 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices Spectramax 公司);U4950E 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 Nuair 公司);1703940 型半干转膜仪及电泳仪,1708159 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司);DFC-259 型倒置相差显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 细胞毒性检测 QSG-7701 细胞传至第 5 代,用 0.25% 胰酶消化,收集处于对数生长期的细胞,并调整单细胞悬液的细胞密度为 4×10^4 个/mL,接种于 96 孔培养板,每孔 100 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO₂ 饱和湿度下培养 24 h,加入不同浓度芦荟大黄素 (200, 100, 50, 40, 30, 20, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 培养液,每孔

100 μL , 每个浓度设 3 个复孔, 并设空白组(培养液和 QSG-770 细胞)。芦荟大黄素作用 48 h 后, 每孔加 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MTT 20 μL , 充分反应后, 室温震荡 10 min, 用酶标仪在 492 nm 波长处测定各孔吸光度 A , 并计算细胞存活率和最大无毒浓度(TC_0)。无毒浓度细胞存活率要求 $> 95\%$, 记为 TC_0 。以对人正常肝细胞无明显毒性的 TC_0 为最高浓度, 并稀释成 3 个浓度进行后续实验。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白组}}) / (A_{\text{空白组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

2.2 细胞培养与分组 HepG2 细胞加入到 10% 灭活胎牛血清的 MEM 培养液中(37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 饱和湿度培养), 每 2 ~ 3 d 传代 1 次, 待细胞长至瓶底 80% 左右, 用胰酶消化、传代, 取对数生长期细胞用于实验。取对数生长期的 HepG2 细胞, 用 0.25% 胰酶消化, 制备成 5×10^7 个/L 的细胞悬液, 按每孔 100 μL 接种于 96 孔板, 贴壁后分为空白组和芦荟大黄素组, 芦荟大黄素组以 TC_0 为最高浓度, 添加 3 个不同浓度^[5], 细胞均培养 48 h。

2.3 细胞生长曲线的建立 5×10^5 个/mL/孔接种于 6 孔板中, 加入 20% 小牛血清 5 mL 进行培养, 每 24 h 用 0.25% 胰酶消化 3 孔细胞, 采用台盼蓝染色进行活细胞计数记录 5 d 内 HepG2 细胞数量, 实验重复 3 次并绘制细胞生长曲线。

2.4 细胞增殖率检测 测定采用 MTT 试剂盒检测细胞增殖率, 严格按照说明书操作, 分别检测各组 HepG2 细胞培养 48 h 后 A , 各组各做 3 孔。增殖抑制率 = $(1 - A_{\text{加药}}/A_{\text{空白}}) \times 100\%$, 计算不同浓度芦荟大黄素对肝癌 HepG2 细胞的增殖抑制率^[12]。

2.5 transwell 迁移实验 在各组 HepG2 细胞培养 48 h 后, 将无血清培养液中的 5×10^4 个细胞置于 transwell 的上层小室中, 再取出 1×10^4 个细胞并滴入无血清培养液重悬细胞, 然后移至 transwell 小室中层。孵化 24 h 后, 用无菌棉签擦除小室内细胞。固定染色后, 显微镜下取随机视野拍照计数, 此实验步骤重复 3 次^[13-14]。

2.6 细胞迁移距离测定 收集生长对数期 HepG2 细胞, 调整为 5×10^5 个/mL, 接种于 6 孔板中, 接种 1.5 mL/孔, 于 35 $^{\circ}\text{C}$ 无菌培养箱中。在细胞贴壁存活后, 弃去 6 孔板中多余液体, 划痕, PBS 缓冲液冲洗贴壁细胞, 加入小牛血清后分别加入不同浓度芦荟大黄素药液 100 μL 后继续培养 48 h, 去除漂浮细胞后置于倒置显微镜下测量划痕距离, 计算平均值, 实验重复 3 次。

2.7 高内涵细胞成像系统分析 F-actin 表达 将细胞消化悬浮于培养液中, 接种每孔细胞悬液 100 μL , 培养 24 h 后给药, 分空白组和给药组, 每组设 3 个复孔, 继续培养 48 h 后加入多聚甲醛固定、孵育, 清洗 2 次; 加入 Permeability buffer 孵育再加入 Blocking buffer 孵育加入一抗探针鬼笔环肽和 4', 6-二脒基-2 苯基吲哚溶液; 室温孵育 1 h, 清洗 3 次; 加入全细胞染色溶液, 避光室温孵育, 清洗 3 次后加入漂洗缓冲液 150 μL , 读板并记录数据^[15]。

2.8 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测各组细胞中 p-eNOS 及 NF- κ B p65 的表达 选取培养 48 h 的 HepG2 细胞, 提取蛋白, 进行蛋白浓度测定 (BCA 法), 制备上样液。取各组待测样品 20 μg 加至 SDS-PAGE 电泳中, 转膜后脱脂牛奶封闭 2 h, 加入 anti-p-eNOS (1 : 1 000), anti-NF- κ B p65 (1 : 1 000), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜 3 次, 加入二抗室温孵育 2 h, 洗膜 3 次后用 ECL 化学液显像^[16], 暗室曝光扫描。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值/内参 GAPDH 灰度值。

2.9 统计学处理 采用 SPSS 17.00, GraphPad Prism 6.0 软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 Student's t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 芦荟大黄素对人正常肝 QSG-7701 细胞株细胞毒性的影响 与空白组相比, 芦荟大黄素浓度为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下时, 细胞存活率 $> 95\%$, 推定 TC_0 为 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 即芦荟大黄素 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时对人正常肝细胞无明显毒性, 见表 1。

表 1 芦荟大黄素对人正常肝细胞 QSG-7701 细胞株毒性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Toxic effect of aloe-emodin on human normal hepatocyte QSG-7701 cell line ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	细胞存活率/%
空白	-	0.984 \pm 0.037	100.00
芦荟大黄素	10	0.979 \pm 0.640	98.33
	20	0.977 \pm 0.930	98.05
	30	0.964 \pm 0.082	97.68
	40	0.952 \pm 0.086	97.62
	50	0.942 \pm 0.710	96.37
	100	0.894 \pm 0.083 ¹⁾	92.61
	200	0.813 \pm 0.046 ¹⁾	80.36

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 HepG2 细胞生长曲线 传代 4 h 后细胞可

贴壁,培养 1 d 后进入生长对数期,细胞培养 5 d 后增殖减缓,进入生长抑制期,细胞生长曲线见图 1。

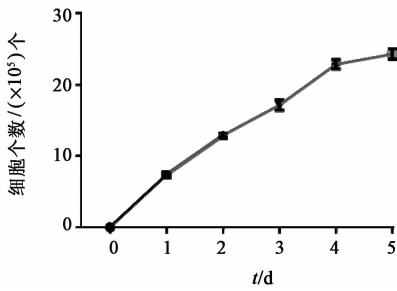


图 1 HepG2 细胞生长曲线($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 HepG2 cell growth curve($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.3 芦荟大黄素对 HepG2 细胞增殖的影响 与空白组相比,芦荟大黄素组 HepG2 细胞培养 48 h 后增殖抑制率升高,且呈浓度递增型($P < 0.01$),见表 2。

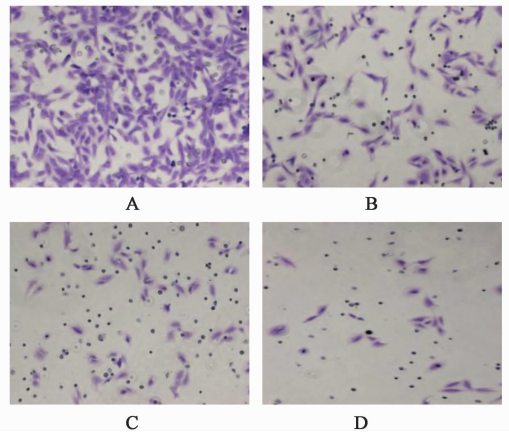
表 2 芦荟大黄素对 HepG2 细胞培养 48 h 细胞增殖抑制率的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of aloe-emodin on proliferation in HepG2 cells of cultured for 48 h($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	A	增殖抑制率/%
空白	-	0.973 \pm 0.06	-
芦荟大黄素	10	0.812 \pm 0.07	10.36 ²⁾
	30	0.639 \pm 0.10	21.71 ²⁾
	50	0.596 \pm 0.06	45.69 ²⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 3~6 同)。

3.4 芦荟大黄素对 HepG2 细胞 transwell 迁移实验的影响 与空白组相比,芦荟大黄素组细胞迁移能力降低($P < 0.01$),且呈浓度递减,见图 2,表 3。



A. 空白组;B~D. 芦荟大黄素(10,30,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组(图 3~5 同)

图 2 芦荟大黄素对肝癌 HepG2 细胞迁移能力的影响(荧光紫, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of aloe-emodin on migration of liver cancer HepG2 cells (fluorescent violet, $\times 400$)

表 3 芦荟大黄素对肝癌 HepG2 细胞迁移能力的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of aloe-emodin on migration of liver cancer HepG2 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	迁移细胞数量/个
空白	-	78.56 \pm 12.31
芦荟大黄素	10	35.69 \pm 6.42 ²⁾
	30	28.73 \pm 5.67 ²⁾
	50	19.04 \pm 3.32 ²⁾

3.5 芦荟大黄素对 HepG2 细胞迁移距离的影响 与空白组相比,芦荟大黄素组细胞培养 24,48 h 后划痕距离增宽($P < 0.01$),且呈浓度递增,见图 3,表 4。

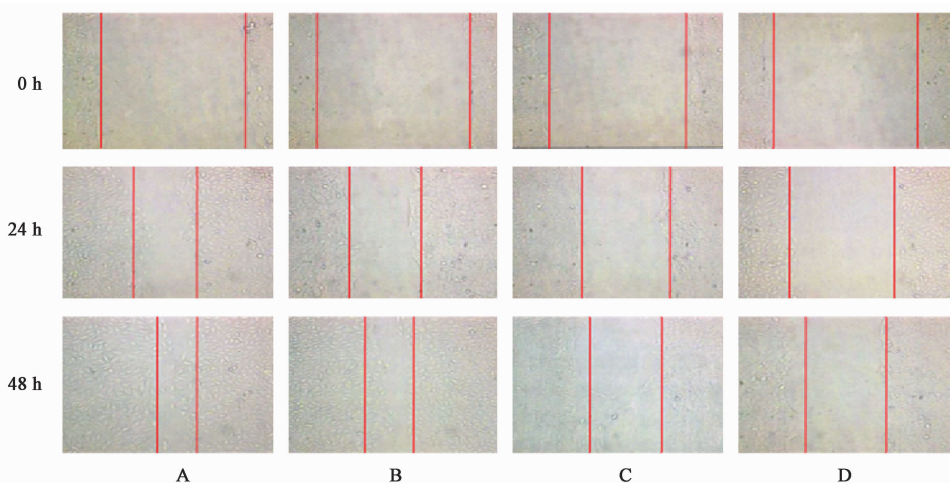


图 3 芦荟大黄素对肝癌 HepG2 细胞划痕愈合的影响(倒置显微镜, $\times 200$)

Fig. 3 Effect of aloe-emodin on healing ability of liver cancer HepG2 cells (inverted microscope, $\times 200$)

表 4 芦荟大黄素对肝癌 HepG2 细胞划痕距离的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of aloe-emodin on scratch distance of liver cancer HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	mm		
		0 h	24 h	48 h
空白	-	7.36 ± 0.48	4.08 ± 0.46	1.73 ± 0.41
芦荟大黄素	10	7.29 ± 0.66	5.03 ± 0.45 ²⁾	2.36 ± 0.13 ²⁾
	30	7.34 ± 0.74	5.28 ± 0.41 ²⁾	3.25 ± 0.29 ²⁾
	50	7.41 ± 0.83	5.83 ± 0.63 ²⁾	4.03 ± 0.21 ²⁾

3.6 芦荟大黄素对 HepG2 细胞 F-actin 的影响 与空白组相比,芦荟大黄素组细胞 F-actin 面积缩小,排列紊乱且不规则边远模糊 ($P < 0.01$),且呈浓度递减。见图 4,表 5。

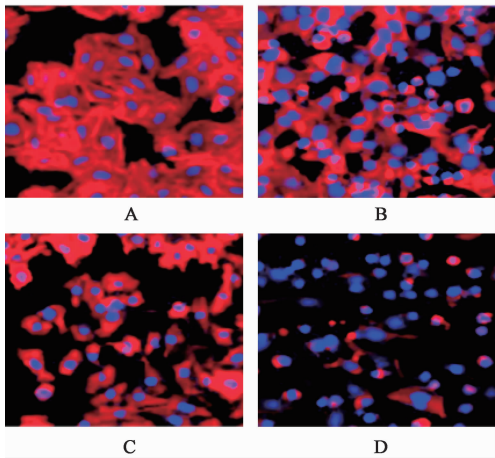


图 4 芦荟大黄素对 HepG2 细胞 F-actin 的影响 (免疫荧光, ×400)
Fig. 4 Effect of aloe-emodin on F-actin of HepG2 cells (Immunofluorescence, ×400)

表 5 芦荟大黄素对 HepG2 细胞 F-actin 荧光面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of aloe-emodin on F-actin area fluorescence of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	F-actin 相对荧光面积
空白	-	5 283.64 ± 429.86
芦荟大黄素	10	4 687.72 ± 357.19 ²⁾
	30	2 928.73 ± 408.76 ²⁾
	50	983.75 ± 82.11 ²⁾

3.7 芦荟大黄素对 HepG2 细胞 p-eNOS, NF- κ B p65 蛋白表达的影响 与空白组细胞相比,芦荟大黄素组 p-eNOS 表达降低, NF- κ B p65 表达升高,且随药物浓度升高,变化趋势愈加明显 ($P < 0.01$),见图 5,表 6。

4 讨论

肿瘤是人类三大主要死亡原因之首,占有疾病死因的 25%,肿瘤转移是肿瘤患者疾病发展进程

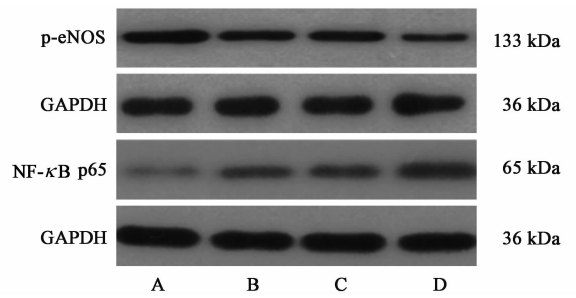


图 5 芦荟大黄素对各组 HepG2 细胞 p-eNOS, NF- κ B p65 表达变化
Fig. 5 Effect of aloe-emodin on changes in expressions of p-eNOS and NF- κ B p65 in HepG2 cells of each group

表 6 芦荟大黄素对各组 HepG2 细胞 p-eNOS, NF- κ B p65 表达变化 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of aloe-emodin on changes in expressions of p-eNOS and p65 in HepG2 cells of each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p-eNOS	NF- κ B p65
		/GAPDH	/GAPDH
空白	-	1.38 ± 0.23	0.18 ± 0.00
芦荟大黄素	10	1.12 ± 0.11 ²⁾	0.37 ± 0.03 ²⁾
	30	0.93 ± 0.07 ²⁾	0.62 ± 0.05 ²⁾
	50	0.47 ± 0.06 ²⁾	0.83 ± 0.14 ²⁾

中的危险阶段^[17],也是肿瘤患者死亡的首要原因,因此,寻找抑制肿瘤细胞转移药物具有非常重要的临床和社会意义。已证实,肿瘤细胞黏附和转移的特性与微丝活性密切相关^[18],这也是 F-actin 在肿瘤细胞迁移中的分子生物学基础。研究表明, F-actin 聚合/解聚状态的改变,调节恶性肿瘤的细胞形态、活动和表型^[19];另外, F-actin 可与 E-cadherin 通过内部连环素相连,影响细胞与细胞之间的黏附连接表达^[20]。因此,降低 F-actin 的表达可能成为抑制恶性肿瘤迁移的新途径。

本研究通过 MTT 比色法、细胞迁移、划痕实验证明,芦荟大黄素对肝癌细胞的生长、迁移有抑制作用,且呈浓度递减。为了进一步明确芦荟大黄素抑制 HepG2 细胞迁移的具体机制,本研究采用高内涵成像分析系统检测各组 HepG2 细胞 F-actin 面积,结果显示,芦荟大黄素能够显著增强 F-actin 的解聚,降低 F-actin 的面积。说明芦荟大黄素可能通过降低 HepG2 细胞中 F-actin 面积,减少应力纤维与运动密切相关的板状伪足形成,从而抑制肝癌 HepG2 细胞的迁移能力。

NF- κ B 是一种重要的转录因子,由 NF- κ B p65, NF- κ B p50, NF- κ B p52, Relb, c-Rel 构成。已有研究证实, eNOS 的活性可影响细胞一氧化氮的产生,从而影响 NF- κ B 信号通路的激活和失活^[21]。另有

研究表明, NF- κ B 的活性变化与 F-actin 的解聚和重组密切相关, 激活的 NF- κ B 信号转导通路可能通过 F-actin 大量解聚致使细胞活动能力降低^[22-23]。本研究发现, 芦荟大黄素可以使肝癌 HepG2 细胞内 NF- κ B p65 表达增加, p-eNOS 表达减少。说明芦荟大黄素可能通过影响 p-eNOS/NF- κ B p65 信号通路, 进而激活 NF- κ B 信号转导通路, 从而增加 F-actin 的解聚、减少微丝的形成, 进而抑制肝癌 HepG2 细胞的增殖和迁移能力。

综上所述, 本研究从细胞学水平证实, 芦荟大黄素可能通过增强 NF- κ B p65, 降低 p-eNOS 表达, 促进 F-actin 解聚, 减少微丝形成, 降低肝癌 HepG2 细胞迁移能力, 减弱增殖能力, 从而发挥其抑制肿瘤的作用。

[参考文献]

[1] 王黎军, 殷鹏, 刘韞宁, 等. 1990 年与 2013 年中国人群肝癌疾病负担研究[J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37(6): 758-762.

[2] 舒宏, 康晓楠, 刘银坤. 肝癌转移、复发预测的蛋白质分子标志物[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(13): 1350-1355.

[3] WU Y Y, ZHANG J H, GAO J H, et al. Aloe-emodin (AE) nanoparticles suppresses proliferation and induces apoptosis in human lung squamous carcinoma via ROS generation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(3): 601-607.

[4] 梁军, 王俊林, 刘志新, 等. 芦荟大黄素诱导胃癌细胞株 MGC-803 细胞凋亡药效学作用研究[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(10): 1915-1919.

[5] 陶毅明, 洪雪, 马义丽, 等. 芦荟大黄素联用顺铂对乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(20): 127-130.

[6] LIN H D, LI K T, DUAN Q Q, et al. The effect of aloe-emodin-induced photodynamic activity on the apoptosis of human gastric cancer cells: a pilot study [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(5): 3431-3436.

[7] 肖丙秀, 郭俊明, 刘东海, 等. 芦荟大黄素抑制胃癌细胞生长与细胞周期阻滞的关系[J]. 中草药, 2008, 39(5): 729-732.

[8] 齐菲菲, 贺福初, 姜颖. 肿瘤转移研究的现状与趋势[J]. 生物化学与生物物理学进展, 2009, 36(10): 1244-1251.

[9] 卢大用, 黄敏, 周晋, 等. 肿瘤转移及抗肿瘤转移药研究进展[J]. 河南医学研究, 2004, 13(3): 273-281.

[10] 刘军楼, 沈洪, 徐力, 等. 冬凌草甲素对胰腺癌细胞骨架蛋白 F-actin 的影响[J]. 中国癌症杂志, 2015, 25

(1): 31-37.

[11] RAO J, LIN N. Micro filament actin remodeling as a potential target for cancer drug development [J]. *Current Cancer Drug Targets*, 2004, 4(1): 345-354.

[12] 雷桅, 李建文, 税晓容. 黄芩苷对肺癌细胞 A549 增殖和迁移的作用研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(8): 1612-1616.

[13] WEI C H, WU G, CAI Q, et al. MicroRNA-330-3p promotes cell invasion and metastasis in non-small cell lung cancer through GRIA3 by activating MAPK/ERK signaling pathway [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, 10(1): 125.

[14] 胡松, 阳诺, 陈铭伍, 等. 抑癌基因 TCF21 对肺癌细胞 A549 增殖、凋亡和迁移的影响 [J]. 中国肺癌杂志, 2014, 17(4): 302-307.

[15] 庄静, 孙长岗, 汪丛丛, 等. 天花粉蛋白对肺癌 A549 细胞凋亡及细胞骨架微管结构改变的研究 [J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(11): 693-696.

[16] 王伊林, 赵雅君, 杨洋, 等. 磷酸肌酸钠对慢病毒介导 Calumenin 蛋白沉默阿霉素损伤心肌细胞内质网应激信号通路的作用 [J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(10): 1119-1122.

[17] 张伟东, 苗树军. 我国恶性肿瘤死亡率流行病学特征分析 [J]. 中国健康教育, 2009, 25(4): 246-248.

[18] 肖英, 程爱兰. 细胞骨架在肿瘤侵袭转移中的研究进展 [J]. 中国肿瘤临床, 2016, 43(22): 1007-1011.

[19] 武浩杰, 高宁, 何慧敏, 等. ANXA2 对肝癌细胞 F-actin 表达及细胞微结构的调节 [J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2014, 42(2): 73-76.

[20] Menke A, Giehl K. Regulation of adherens junctions by Rho GTPases and p120-catenin [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 524(1): 48-55.

[21] Dolunay A, Senol S P, Temiz-Resitoglu M, et al. Inhibition of NLRP3 inflammasome prevents LPS-induced inflammatory hyperalgesia in mice; contribution of NF- κ B, Caspase-1/11, ASC, NOX and NOS isoforms [J]. *Inflammation*, 2017, 40(2): 366-386.

[22] Banan A, ZHANG L, ZHANG L, et al. NF- κ B activation as a key mechanism in ethanol-induced disruption of the F-actin cytoskeleton and monolayer barrier integrity in intestinal epithelium [J]. *Alcohol*, 2007, 41(6): 447-460.

[23] YE X, SUN M. AGR2 ameliorates tumor necrosis factor- α -induced epithelial barrier dysfunction via suppression of NF- κ B p65-mediated MLCK/p-MLC pathway activation [J]. *Int J Mol Med*, 2017, 39(5): 1206-1214.

[责任编辑 张丰丰]