

# 肝癌全方及其不同治法拆方抑制 SMMC7721 人肝癌细胞增殖的作用

王晓敏, 潘志强\*, 梁龙龙, 方肇勤  
(上海中医药大学基础医学院, 上海 201203)

**[摘要]** 目的:探讨肝癌全方及不同治法拆方抗肿瘤作用的分子机制。方法:体外培养 SMMC7721 人肝癌细胞,分别给予 2.5~100 g·L<sup>-1</sup>肝癌全方、清热方、活血方、健脾方干预 24 h 后,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测细胞增殖;分别采用 1.25~20 g·L<sup>-1</sup>肝癌全方,5~20 g·L<sup>-1</sup>清热方和活血方及 20~120 g·L<sup>-1</sup>健脾方干预 24 h 后,运用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测相关基因的表达;分别采用 20 g·L<sup>-1</sup>肝癌全方和清热方,10 g·L<sup>-1</sup>活血方及 120 g·L<sup>-1</sup>健脾方干预 SMMC7721 细胞 24 h 后,通过蛋白免疫印迹法检测相关蛋白的表达,通过碘化丙啶(PI)/RNase staining solution 试剂染色检测细胞周期的改变。结果:与空白组比较,肝癌全方及其不同治法拆方能抑制 SMMC7721 细胞的增殖,并呈现量效关系( $P < 0.05$ )。与空白组比较,5~20 g·L<sup>-1</sup>清热方呈现量效抑制细胞周期依赖性激酶阻滞基因 1B(CDKN1B)基因表达( $P < 0.05$ ),20~120 g·L<sup>-1</sup>健脾方也呈现量效抑制 CDKN1B 基因表达( $P < 0.05$ );5~20 g·L<sup>-1</sup>肝癌全方明显抑制糖皮质激素调节蛋白激酶 1(SGK1)基因表达( $P < 0.05$ ),且量效显著;5~20 g·L<sup>-1</sup>清热方量效抑制 SGK1 基因表达( $P < 0.05$ );20~120 g·L<sup>-1</sup>健脾方也抑制 SGK1 基因表达( $P < 0.05$ ),同时肝癌全方及清热、活血治法方可抑制 SGK1 磷酸化蛋白的表达( $P < 0.05$ );1.25,20 g·L<sup>-1</sup>肝癌全方可促进叉头框蛋白 O3(FOXO3)基因表达( $P < 0.05$ );15,20 g·L<sup>-1</sup>清热方明显促进 FOXO3 基因表达( $P < 0.05$ );20 g·L<sup>-1</sup>活血方促进 FOXO3 基因表达( $P < 0.05$ )。与空白组比较,全方组 G<sub>2</sub> 期细胞数增加( $P < 0.05$ ),清热组和健脾组 G<sub>2</sub> 期细胞数增加更明显( $P < 0.05$ );肝癌全方及不同治法拆方能够抑制细胞周期蛋白 E<sub>1</sub>(CyclinE<sub>1</sub>)蛋白的表达,其中以健脾组抑制效果最显著。结论:肝癌全方及其不同治法拆方通过改变细胞增殖和周期,从而发挥抑制肝癌的作用。

**[关键词]** 肝癌; SMMC7721 细胞; 治法; 细胞周期; 细胞增殖

**[中图分类号]** R22;R242;R273;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)13-0117-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181116

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180316.0926.001.html>

**[网络出版时间]** 2018-03-16 13:30

## Inhibitory Effect of Hepatocellular Carcinoma Prescription and Its Different Disassembled Prescriptions on Proliferation of SMMC7721 Hepatoma Cells

WANG Xiao-min, PAN Zhi-qiang\*, LIANG Long-long, FANG Zhao-qin

(Basic Medical School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the molecular mechanism on anti-tumor effect of hepatocellular carcinoma prescription (Quanfang) and its different disassembled prescriptions. **Method:** SMMC7721 human hepatoma cells were cultured *in vitro* and treated with 2.5-100 g·L<sup>-1</sup> Quanfang, Qingrefang, Huoxuefang and Jianpifang for 24 h. Then cells proliferation was measured by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay. After SMMC7721 cells were treated with 1.25-20 g·L<sup>-1</sup> Quanfang, 5-20 g·L<sup>-1</sup> Qingrefang and Huoxuefang and 20-120 g·L<sup>-1</sup> Jianpifang for 24 h, related gene expression levels were detected by Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). After SMMC7721 cells were treated with 20 g·L<sup>-1</sup>

**[收稿日期]** 20170905(014)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上项目(81473562)

**[第一作者]** 王晓敏,在读硕士,从事中医证候实验研究与中医药防治肝癌研究,Tel:021-51322214,E-mail:jsntrd\_wxm@163.com

**[通信作者]** \*潘志强,教授,博士,硕士生导师,从事实验中医教学与中医基础实验研究,Tel:021-51322116,E-mail:pzq527@163.com

Quanfang and Qingrefang, 10 g·L<sup>-1</sup> Huoxuefang and 120 g·L<sup>-1</sup> Jianpifang for 24 h, related protein expression levels were detected by Western blot and cell cycle changes were detected by PI/RNase staining solution reagent staining. **Result:** As compared with blank control group, Quanfang and different disassembled prescriptions inhibited the proliferation of SMMC7721 cells and showed dose-effect relationship ( $P < 0.05$ ). As compared with the blank control group, CDKN1B gene expression was inhibited significantly by 5-20 g·L<sup>-1</sup> Qingrefang and 20-120 g·L<sup>-1</sup> Jianpifang ( $P < 0.05$ ) in a dose-effect manner. SGK1 gene expression was inhibited significantly by 5-20 g·L<sup>-1</sup> Quanfang and Qingrefang ( $P < 0.05$ ); Quanfang and different disassembled prescriptions can inhibited SGK1 phosphorylated protein expression. SGK1 gene expression was inhibited by 5-20 g·L<sup>-1</sup> Qingre disassembled prescriptions and 20-120 g·L<sup>-1</sup> Jianpi disassembled prescriptions ( $P < 0.05$ ). FOXO3 gene expression was promoted significantly respectively by 1.25, 20 g·L<sup>-1</sup> Quanfang, 15, 20 g·L<sup>-1</sup> Qingre disassembled prescriptions and 20 g·L<sup>-1</sup> Huoxue disassembled prescriptions ( $P < 0.05$ ). As compared with blank control group, the number of G<sub>2</sub>/M cells was increased in Quanfang group ( $P < 0.05$ ) and was increased more significantly in Qingre group and Jianpi group ( $P < 0.05$ ). CyclinE<sub>1</sub> protein expression was inhibited by Quanfang and different disassembled prescriptions, and the effect was most significant in Jianpi group. **Conclusion:** Quanfang and different disassembled prescriptions play a role in inhibiting liver cancer by altering cell proliferation and cycle.

[ **Key words** ] liver cancer; SMMC7721 hepatoma cells; therapeutic principle; cell cycles; cell proliferation

原发性肝癌(肝癌)是我国常见的恶性肿瘤,高居癌症死亡率第 2 位<sup>[1-2]</sup>。尽管目前肝癌的治疗仍以现代医学为主,但是中医药一直积极参与探索,尤其在中晚期肝癌及术后肝癌的防治过程中,中医药辨证论治发挥一定的作用,其优势表现在毒副作用小、症状改善明显或可延长带瘤生存期。本课题组方肇勤教授既往开展了肝癌中医证候分布特征及中药运用规律的临床调查研究,发现瘀毒、气滞、脾虚等是肝癌的主要病机特点,中医临床治疗肝癌主要以清热解毒、行气活血、健脾益气治法为主,据此拟定了抑癌扶正肝癌处方(全方)<sup>[3-4]</sup>;随后在一系列体外研究发现该处方及其不同治法拆方具有抑制肝癌细胞增殖作用<sup>[5-6]</sup>,尤其是预知子及预知子籽具有强烈抑制肝癌细胞增殖并诱导其内质网应激的作用<sup>[7-9]</sup>。文献报道藤梨根、田基黄、龙葵、石见穿、半夏、何首乌、女贞子等中药及其提取物均具有抑制肝癌细胞增殖、促进肝癌细胞凋亡、抑制肿瘤血管生成、调控肝癌细胞周期、调节免疫功能等作用<sup>[10]</sup>。本研究在前期基础上,进一步探索肝癌全方及不同治法拆方对肝癌细胞增殖抑制作用的分子机制,重点观察其对肝癌细胞周期及周期调控分子表达的影响,以揭示全方抗肝癌作用的可能分子机制、以及不同治法拆方后的作用差异性,有助于阐明不同治法对肝癌细胞增殖作用的效应。

## 1 材料

**1.1 细胞株** SMMC7721 人肝癌细胞株,源于中国

科学院细胞库,目录号 TCHu 52。

## 1.2 药物与试剂

**1.2.1 药物** 中药饮片购自上海中医药大学附属龙华医院中药房,白花蛇舌草和预知子购自上海华浦中药饮片有限公司;半枝莲、蒲公英和半夏均购自上海万仕诚药业有限公司;丹参、桃仁、柴胡、薏苡仁、赤芍、白芍、茯苓、黄芪、白术和郁金均购自上海康桥中药饮片有限公司;茵陈和六神曲均购自上海余天成中药饮片有限公司。药材由上海中医药大学卢文丽副教授鉴定为正品。肝癌全方(全方组)由半枝莲 30 g,白花蛇舌草 30 g,蒲公英 30 g,茵陈 10 g,丹参 15 g,桃仁 10 g,赤芍 15 g,白芍 15 g,郁金 10 g,柴胡 6 g,预知子 10 g,黄芪 30 g,白术 10 g,薏苡仁 15 g,茯苓 15 g,半夏 10 g,六神曲 10 g 等组成。全方具有清热解毒、行气活血、健脾益气之功效。清热解毒拆方(清热组)由半枝莲、白花蛇舌草、蒲公英、茵陈组成;行气活血拆方(活血组)由丹参、桃仁、赤芍、白芍、郁金、柴胡、预知子组成;健脾益气拆方(健脾组)由黄芪、白术、薏苡仁、茯苓、半夏、六神曲组成。

**1.2.2 试剂** 噻唑蓝(MTT),二甲基亚砷(DMSO)(Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 M2128, D1435);胎牛血清(Corning CellGro 公司,批号 35076116);100 U·L<sup>-1</sup>青链霉素,RPMI 1640 培养液(Gibco 公司,批号分别为 SV30010, C11875500BT);RIPA 裂解液,免疫印迹化学发光试剂 ECL 试剂盒(上海碧

云天生物试剂有限公司,批号分别为 P0013C, P0018);抗体  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin),抗体细胞周期蛋白激酶抑制因子 27(p27Kip1)(Sigma-Aldrich 公司,批号分别为 A5441, SAB4500067);抗体糖皮质激素调节蛋白激酶 1(SGK1),SGK1(phosphoS422),细胞周期蛋白(Cyclin)D<sub>1</sub>,Cyclin E<sub>1</sub>,细胞周期蛋白依赖激酶 4(CDK4)(Abcam 公司,批号分别为 ab43606, ab55281, ab134175, ab33911, ab68266);碘化丙啶(PI)/RNase staining solution(天津三箭生物技术有限公司,批号 AO2001-02P-H);trizol 裂解液(Invitrogen 公司,批号 15596018);PrimeScript® RT reagent Kit,SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa 公司,批号分别为 RR036A, RR820A);上下游引物序列采用 Primer3(v.0.4.0)在线软件设计并委托 Life Technologies 公司合成(表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	编号	引物序列	长度/bp
$\beta$ -actin	NM_001101	上游 5'-CTCTCCAGCCTTCCTCTCT-3'	116
		下游 5'-AGCACTGTGTGGCGTACAG-3'	
CDKN1B	NM_004064	上游 5'-CCGGCTAACTCTGAGGACAC-3'	106
		下游 5'-TTGCAGTCCGCTTCCTTATT-3'	
FOXO3	NM_001455	上游 5'-GCAAGCACAGAGTTGGATGA-3'	186
		下游 5'-CAGTCTCCATGAGGTTTT-3'	
SGK1	NM_005627	上游 5'-GCAGAAGGACAGGACAAAGC-3'	185
		下游 5'-CAGGCTCTCGGTAAACTCG-3'	

**1.3 仪器** Value Digital 型旋转蒸发仪(德国 Heidolph 公司),7500 Fast 型 Real-time PCR System 实时荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司),FACSCalibur 型流式细胞仪(美国 Becton Dickinson 公司),Elx800 型酶标仪(美国 BioTek 公司),Alpha 型化学发光凝胶成像系统(美国 Protein-Simple 公司),Mini-PROTEAN® Tetra Cell #1658001 型小型垂直电泳仪,Mini Trans-blot® Electrophoretic Transfer Cell #1703930 型小型转印槽,PowerPac™ Basic Power Supply #1645050 型转膜用电源供应系统(美国 Bio-Rad 公司)。

**2 方法**

**2.1 中药制备** 采用水煎乙醇提取方法制备中药液,室温采用双蒸水分别浸泡各中药饮片 1 h,再用电煎壶煮沸后文火煎煮 0.5 h,取汁;药渣再以水浸没,煮沸后文火煎煮 0.5 h,取汁;2 次药液合并、过

滤。加无水乙醇 500 mL,混匀后密封,并置于 4 ℃ 冷藏过夜。70% 乙醇沉淀 22 h 后过滤,加无水乙醇醇沉至含醇量 85%,混匀,密封,置于 4 ℃ 冷藏,过夜。4 ℃,3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 15 min,除去沉淀,采用旋转蒸发仪,挥发乙醇、浓缩,采用双蒸水定容,调节 pH 7.2 ~ 7.4,最后浓缩至含生药 1 000 g·L<sup>-1</sup> 母液,-80 ℃ 冰箱保存。干预细胞时,先采用 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤除菌。

**2.2 细胞培养** SMMC7721 人肝癌细胞用含 10% 胎牛血清,100 U·L<sup>-1</sup> 青链霉素的 RPMI 1640 培养液常规培养,置于 5% CO<sub>2</sub> 37 ℃ 湿饱和的条件下培养。细胞生长至 80% ~ 85% 融合时,铺板后培养,取其的对数生长期细胞进行实验。

**2.3 细胞增殖检测** 将 SMMC7721 细胞按照 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL,每孔 100  $\mu$ L,接种于 96 孔培养板中,次日分别给予 2.5 ~ 100 g·L<sup>-1</sup> 肝癌全方、清热方、活血方、健脾方干预,同时设空白组,每组设 4 个复孔,3 次实验。置于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中常规培养,在用药 24 h 后每孔加入 0.5% MTT 溶液 15  $\mu$ L,继续孵育 4 h,弃培养液,每孔加入 DMSO 150  $\mu$ L,低速振荡 10 min,在酶标仪上测定 570 nm 处吸光度 A。

$$\text{细胞增殖抑制率} = (1 - A_{\text{药物组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$$

**2.4 细胞周期检测** 分别采用 20 g·L<sup>-1</sup> 肝癌全方和清热方,10 g·L<sup>-1</sup> 活血方及 120 g·L<sup>-1</sup> 健脾方干预 SMMC7721 细胞 24 h。按照 PI/RNase staining solution 试剂说明书操作,收集细胞,70% 乙醇 4 ℃ 固定 16 h,离心去除乙醇,加入 PI/RNase 染液室温下孵育 30 min,流式细胞仪测定细胞的 DNA 含量,分析细胞周期。

**2.5 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 mRNA 表达** 分别采用 1.25 ~ 20 g·L<sup>-1</sup> 肝癌全方,5 ~ 20 g·L<sup>-1</sup> 清热方和活血方及 20 ~ 120 g·L<sup>-1</sup> 健脾方干预 SMMC7721 细胞 24 h,运用 Real-time PCR 技术检测相关基因表达。按照 trizol 试剂盒说明书抽提 SMMC7721 细胞总 RNA;测定样品 260,280 nm 处 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 在 1.8 ~ 2.0。逆转录反应体系 20  $\mu$ L,所需 RNA 总量为 1  $\mu$ g,根据 RNA 浓度,计算得出所需 RNA 体积,再加 5 × RTMix 4  $\mu$ L,剩余体积用 RNase-free H<sub>2</sub>O 补充,反应条件为 37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,4 ℃ 保存,合成 cDNA 第一条链。然后使用 Real-time PCR 仪进行扩增,反应程序为 95 ℃ 3 min,95 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,40 个循环。基因相对表达量分析方法,采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法分析。

## 2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测蛋白表达

分别采用  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  肝癌全方和清热方,  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  活血方及  $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  健脾方干预 SMMC7721 细胞 24 h, 采用 RIPA 裂解液处理细胞, 收集蛋白质样品并予以定量。通过变性处理, 分别执行聚丙烯凝胶电泳, 转膜, 封闭, 一抗孵育  $\beta$ -actin (1:2 万), SGK1 (1:2 000), SGK1 (phospho S422) 抗体 (1:1 000), p27Kip1 抗体 (1:2 000), Cyclin D<sub>1</sub> 抗体 (1:1 万), Cyclin E<sub>1</sub> 抗体 (1:2 000), CDK4 抗体 (1:1 000), 洗涤, 二抗孵育, 显影, 定影, 以目的蛋白/内参灰度值表示蛋白相对表达量。

## 2.7 统计学方法

采用 GraphPad. Prism5.0 专业软件进行统计分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Newman-Keuls post-hoc 方差分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 肝癌全方及其不同治法拆方对 SMMC7721 人肝癌细胞增殖的抑制作用

与空白组比较,  $> 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  肝癌全方在用药 24 h 后抑制率显著升高 ( $P < 0.01$ ), 清热解毒方呈现与肝癌全方类似的抑制效果,  $> 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  抑制率显著升高 ( $P < 0.01$ ); 行气活血方  $> 15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  抑制率显著升高 ( $P < 0.01$ ); 健脾益气方  $> 80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  抑制率显著升高 ( $P < 0.01$ )。结果提示肝癌全方及其不同治法方对 SMMC7721 细胞增殖的抑制率随药物质量浓度的增加而升高, 均呈现质量浓度依赖关系, 但在相同质量浓度作用下, 健脾益气方对 SMMC7721 细胞增殖的抑制作用最弱。见表 2。

### 3.2 肝癌全方及其不同治法拆方抑制 SMMC7721 人肝癌细胞增殖有关基因表达的作用

与空白组比较,  $1.25 \sim 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  肝癌全方处理 SMMC7721 细胞 24 h 后对 CDKN1B 基因表达无影响;  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  清热拆方呈现量效抑制 CDKN1B 基因表达 ( $P < 0.05$ ); 不同质量浓度活血拆方对 CDKN1B 基因表达无明显影响,  $20 \sim 120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  健脾拆方也呈现量效抑制 CDKN1B 基因表达 ( $P < 0.05$ ), 见表 3。提示清热方和健脾方均可量效抑制 CDKN1B 基因表达。

与空白组比较,  $1.25, 10, 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  肝癌全方可明显促进 FOXO3 基因表达 ( $P < 0.05$ );  $15, 20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  清热方也显著促进 FOXO3 基因表达 ( $P < 0.05$ );  $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  活血方可促进 FOXO3 基因表达 ( $P < 0.05$ ); 健脾方不影响 FOXO3 基因表达。提示肝癌全方及清热方与活血方可促进 FOXO3 基因表达。见表 3。

表 2 肝癌全方及其不同治法拆方对 SMMC7721 细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of hepatocellular carcinoma prescription and its different disassembled prescriptions on proliferation of SMMC7721 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	抑制率/%
空白	-	0.00 $\pm$ 4.59
全方	2.5	24.55 $\pm$ 7.48
	5	22.97 $\pm$ 9.24
	10	29.21 $\pm$ 9.20
	15	42.58 $\pm$ 5.75
	20	60.23 $\pm$ 5.33 <sup>2)</sup>
	30	86.49 $\pm$ 3.47 <sup>2)</sup>
	40	92.30 $\pm$ 1.04 <sup>2)</sup>
	80	-
	100	-
	空白	-
清热	2.5	16.35 $\pm$ 5.50
	5	20.40 $\pm$ 8.60
	10	23.43 $\pm$ 2.07
	15	27.25 $\pm$ 4.88
	20	42.77 $\pm$ 4.08 <sup>2)</sup>
	30	89.07 $\pm$ 2.96 <sup>2)</sup>
	40	90.94 $\pm$ 2.61 <sup>2)</sup>
	80	-
	100	-
	空白	-
活血	2.5	9.71 $\pm$ 2.37
	5	12.47 $\pm$ 5.79
	10	34.44 $\pm$ 4.28
	15	85.76 $\pm$ 2.41 <sup>2)</sup>
	20	86.91 $\pm$ 2.96 <sup>2)</sup>
	30	82.59 $\pm$ 3.37 <sup>2)</sup>
	40	83.05 $\pm$ 5.82 <sup>2)</sup>
	80	-
	100	-
	空白	-
健脾	2.5	13.37 $\pm$ 9.22
	5	24.20 $\pm$ 5.38
	10	27.57 $\pm$ 10.44
	15	-
	20	29.48 $\pm$ 3.92
	30	-
	40	37.67 $\pm$ 2.20
	80	46.10 $\pm$ 3.51 <sup>1)</sup>
100	51.00 $\pm$ 3.13 <sup>1)</sup>	

注:与空白组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ (表 3 ~ 7 同)。

表 3 肝癌全方及其不同治法拆方对 CDKN1B, FOXO3, SGK1 基因表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of hepatocellular carcinoma prescription and its different disassembled prescriptions on CDKN1B, FOXO3, SGK1 mRNA expression ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	CDKN1B	FOXO3	SGK1
空白	-	1.04 ± 0.06	0.94 ± 0.09	0.94 ± 0.09
全方	1.25	0.93 ± 0.16	1.40 ± 0.19 <sup>1)</sup>	0.80 ± 0.10
	5	1.00 ± 0.01	1.14 ± 0.13	0.74 ± 0.01 <sup>1)</sup>
	10	0.97 ± 0.05	1.42 ± 0.01 <sup>1)</sup>	0.66 ± 0.01 <sup>1)</sup>
	20	0.96 ± 0.04	1.54 ± 0.21 <sup>1)</sup>	0.55 ± 0.02 <sup>1)</sup>
空白	-	1.06 ± 0.08	1.10 ± 0.14	1.09 ± 0.12
清热	5	1.26 ± 0.14	1.60 ± 0.12	0.69 ± 0.07 <sup>1)</sup>
	10	1.17 ± 0.04	1.73 ± 0.04	0.64 ± 0.09 <sup>1)</sup>
	15	0.99 ± 0.01	2.42 ± 0.44 <sup>1)</sup>	0.47 ± 0.08 <sup>1)</sup>
	20	0.71 ± 0.05 <sup>1)</sup>	3.91 ± 0.37 <sup>2)</sup>	0.31 ± 0.01 <sup>1)</sup>
空白	-	0.94 ± 0.08	0.91 ± 0.13	0.88 ± 0.18
活血	5	0.94 ± 0.10	0.98 ± 0.09	0.88 ± 0.04
	10	0.85 ± 0.04	0.91 ± 0.01	0.83 ± 0.11
	15	1.03 ± 0.08	1.09 ± 0.15	0.72 ± 0.07
	20	1.02 ± 0.01	1.36 ± 0.16 <sup>1)</sup>	0.71 ± 0.02
空白	-	0.98 ± 0.04	1.05 ± 0.06	0.96 ± 0.06
健脾	20	0.86 ± 0.06	1.20 ± 0.11	0.77 ± 0.04
	40	0.87 ± 0.04	1.18 ± 0.08	0.80 ± 0.08
	80	0.77 ± 0.08	1.43 ± 0.23	0.67 ± 0.06 <sup>1)</sup>
	120	0.62 ± 0.07 <sup>1)</sup>	1.22 ± 0.08	0.50 ± 0.10 <sup>1)</sup>

与空白组比较, 5 ~ 20 g·L<sup>-1</sup> 肝癌全方明显抑制 SGK1 基因表达 ( $P < 0.05$ ), 且量效显著; 5 ~ 20 g·L<sup>-1</sup> 清热方量效抑制 SGK1 基因表达 ( $P < 0.05$ ); 活血方对 SGK1 基因表达影响较小; 20 ~ 120 g·L<sup>-1</sup> 健脾方也抑制 SGK1 基因表达 ( $P < 0.05$ )。提示 SGK1 基因表达受肝癌全方及其不同治法拆方所调控。见表 3。

**3.3 肝癌全方及其不同治法拆方对 SGK1 蛋白表达的影响** 与空白组比较, 肝癌全方及不同治法拆方对 SGK1 蛋白表达无明显的影响, 肝癌全方及清热方、活血方明显抑制 SGK1 磷酸化蛋白的表达 ( $P < 0.05$ ), 见图 1, 表 4。

与空白组比较, 肝癌全方及不同治法拆方对 CyclinD<sub>1</sub> 蛋白的表达无明显影响, 肝癌全方及不同治法拆方能够抑制 CyclinE<sub>1</sub> 蛋白的表达, 但差异无统计学意义, 见图 2, 表 5, 提示肝癌全方及不同治法拆方通过抑制 CyclinE<sub>1</sub> 蛋白的表达, 从而阻滞细胞进入 S 期。

与空白组比较, 肝癌全方及不同治法拆方对

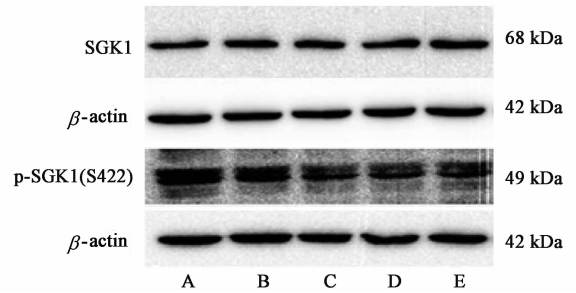


图 1 肝癌全方及其不同治法拆方作用细胞后 SGK1 蛋白及其磷酸化蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of hepatocellular carcinoma prescription and its different disassembled prescriptions

表 4 肝癌全方及其不同治法拆方对 SGK1 蛋白及其磷酸化蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of hepatocellular carcinoma prescription and its different disassembled prescriptions on SGK1 protein and its phosphorylated protein expression ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	SGK1/ $\beta$ -actin	p-SGK1/ $\beta$ -actin
空白	-	0.87 ± 0.05	1.12 ± 0.11
全方	20	1.04 ± 0.08	0.76 ± 0.05 <sup>1)</sup>
清热	10	0.99 ± 0.06	0.79 ± 0.06 <sup>1)</sup>
活血	10	1.11 ± 0.06	0.69 ± 0.05 <sup>1)</sup>
健脾	120	1.10 ± 0.10	0.97 ± 0.09

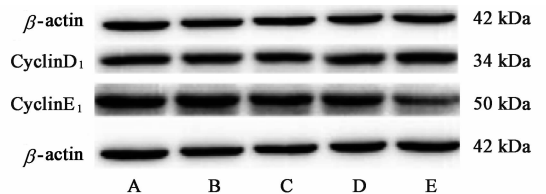


图 2 肝癌全方及其不同治法拆方作用细胞后对 CyclinD<sub>1</sub>, CyclinE<sub>1</sub> 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of hepatocellular carcinoma prescription and its different disassembled prescriptions on CyclinD<sub>1</sub>, CyclinE<sub>1</sub> protein expression

表 5 肝癌全方及其不同治法拆方对 CyclinD<sub>1</sub>, CyclinE<sub>1</sub> 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of hepatocellular carcinoma prescription and its different disassembled prescriptions on CyclinD<sub>1</sub> and CyclinE<sub>1</sub> protein expression ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	CyclinD <sub>1</sub> / $\beta$ -actin	CyclinE <sub>1</sub> / $\beta$ -actin
空白	-	1.10 ± 0.07	1.02 ± 0.12
全方	20	1.13 ± 0.07	0.99 ± 0.08
清热	10	1.11 ± 0.09	0.94 ± 0.11
活血	10	1.26 ± 0.11	1.00 ± 0.09
健脾	120	1.26 ± 0.08	0.65 ± 0.08

P27 与 CDK4 蛋白的表达无明显作用, 见图 3, 表 6,

提示肝癌全方及其拆方对细胞周期相关的蛋白表达影响较弱。

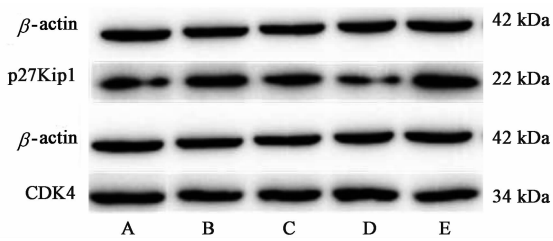


图 3 肝癌全方及其不同治法拆方对 p27Kip1 与 CDK4 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of hepatocellular carcinoma prescription and its different disassembled prescriptions on p27Kip1 and CDK4 protein expression

表 6 肝癌全方及其不同治法拆方对 p27Kip1, CDK4 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of hepatocellular carcinoma prescription and its different disassembled prescriptions on p27Kip1 and CDK4 protein expression ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	p27Kip1/ $\beta$ -actin	CDK4/ $\beta$ -actin
空白	-	1.21 $\pm$ 0.25	1.14 $\pm$ 0.10
全方	20	1.45 $\pm$ 0.27	1.00 $\pm$ 0.07
清热	10	1.32 $\pm$ 0.19	1.03 $\pm$ 0.06
活血	10	1.12 $\pm$ 0.17	1.13 $\pm$ 0.08
健脾	120	1.56 $\pm$ 0.16	0.88 $\pm$ 0.07

**3.4 肝癌全方及其不同治法拆方对 SMMC7721 细胞周期的影响** 与空白组比较,全方组  $G_2$  期细胞数增加 ( $P < 0.05$ ),清热组和健脾组  $G_2$  期细胞数增加更明显 ( $P < 0.05$ ),而活血组  $G_2$  期细胞数量无明显变化,见表 7。提示肝癌全方及清热解毒拆方与健脾益气拆方具有将 SMMC7721 人肝癌细胞阻滞在  $G_2$  期的作用,即肝癌全方可通过  $G_2$  细胞周期阻滞抑制肝癌细胞的生长。

表 7 肝癌全方及不同治法拆方对 SMMC7721 细胞周期分布的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of hepatocellular carcinoma prescription and its different disassembled prescriptions on cell cycle distribution of SMMC7721 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

组别	质量浓度/ $g \cdot L^{-1}$	$G_1$	$G_2$	S
空白	-	55.38 $\pm$ 3.45	8.30 $\pm$ 0.79	36.32 $\pm$ 2.56
全方	20	45.75 $\pm$ 2.58	16.77 $\pm$ 1.24 <sup>1)</sup>	37.48 $\pm$ 2.81
清热	10	37.34 $\pm$ 1.66	22.88 $\pm$ 1.55 <sup>1)</sup>	39.78 $\pm$ 3.22
活血	10	58.04 $\pm$ 3.87	7.02 $\pm$ 0.68	34.94 $\pm$ 2.49
健脾	120	38.37 $\pm$ 2.13	23.57 $\pm$ 1.95 <sup>1)</sup>	38.06 $\pm$ 2.17

#### 4 讨论

临床流行病学调查研究表明,我国肝癌发病原

因主要与肝炎病毒感染、酒精肝、黄曲霉毒素污染、环境污染以及其他代谢类或免疫类疾病等密切相关<sup>[2,11-12]</sup>。目前肝癌的治疗仍以现代医学为主,包括手术疗法(肝切除术或肝移植术)和非手术疗法(导管动脉栓塞化疗术、经皮消融治疗、放射治疗、化学治疗、介入治疗、生物治疗、免疫疗法),然而业界已经关注到肝癌的临床疗效尤其是 5 年或 10 年生存率似乎已达极限,近 20 年来未见突破性进展,这显然已成为疗效的巨大瓶颈。尽管中医药辨证论治防治肝癌具有一定的优势,但是疗效的个体差异性较大,纵观国内肝癌患者的治疗模式,多数采用中西医结合的综合治疗方案,客观上对患者肿瘤控制或症状的改善具有一定的疗效<sup>[13]</sup>。如何从疗效较好的少数案例中寻找线索,积极探索中医药防治肝癌的有效策略是中医临床的重点工作。

中医理论认为正气虚衰,难以抵抗外邪导致毒、瘀、虚等虚实夹杂病理变化,是肿瘤发生发展的重要原因,基于此,本课题组拟定出抑癌扶正肝癌处方(全方),并在体外细胞研究上确定该全方具有抑制肝癌细胞生长的作用,但具体机制仍不太明确。考虑到多数癌症病情发展变化快、难以控制主要与细胞周期紊乱导致细胞增殖迅速及凋亡过少有关<sup>[14]</sup>。因此通过抑制肿瘤细胞增殖,诱发癌细胞凋亡,成为目前癌症研究的主要方向。本研究观察肝癌全方及其不同治法拆方对肝癌细胞增殖及其周期的影响,以揭示中药抗肝癌的可能分子机制。

研究结果表明,肝癌全方在用药 24 h 后可抑制 SMMC7721 人肝癌细胞增殖,相同浓度下,清热解毒拆方与肝癌全方的抑制效果类似,而行气活血拆方抑制作用最强,健脾益气拆方的抑制效果最弱。总体分析,肝癌全方及其不同治法拆方对 SMMC7721 细胞增殖的抑制率随药物浓度的增加而升高,均呈现量效关系,提示肝癌全方具有确定的抑制体外培养的肝癌细胞增殖作用。采用流式细胞术检测药物干预后细胞周期变化,发现肝癌全方、清热解毒方和健脾益气方可影响肝癌细胞  $G_2/M$  期,并使其细胞数增加,提示肝癌全方及清热解毒方与健脾益气方具有将 SMMC7721 人肝癌细胞阻滞在  $G_2/M$  期的作用,从而抑制肝癌细胞的生长。

进一步检测与细胞增殖有关的分子表达,结果表明清热解毒方和健脾益气方呈现量效抑制 CDKN1B 基因表达;而肝癌全方、清热解毒方与健脾益气拆方均可现量效抑制 SGK1 基因表达;但是免疫印迹检测发现肝癌全方及其不同治法拆方不影响

CDKN1B 蛋白(p27Kip1)及 SGK1 总蛋白表达,而肝癌全方及不同治法拆方可抑制 SGK1 磷酸化蛋白的表达。有研究表明,CDKN1B 基因是细胞周期素依赖性激酶抑制蛋白,在多种肿瘤中呈现低表达特征<sup>[15]</sup>;SGK1 与细胞增殖关系密切,且受血清及有关激素的影响,在乳腺癌、肺癌、大肠癌等多种肿瘤中 SGK1 基因也呈现高表达特征。本研究提示 CDKN1B 和 SGK1 基因与蛋白在 SMMC7721 人肝癌细胞中也呈现高表达特性,肝癌全方及其不同治法拆方具有抑制 CDKN1B 和 SGK1 基因转录作用,从而参与抑制肝癌细胞增殖。此外,高浓度的肝癌全方、清热解毒方与行气活血方均可显著促进 FOXO3 基因表达升高。有研究表明,在乳腺癌、白血病等肿瘤疾病中,恢复或促进 FOXO3 的表达能促进肿瘤细胞的凋亡,抑制肿瘤的生长<sup>[16-17]</sup>。

进而检测与细胞周期有关的关键蛋白,仅发现肝癌全方及不同治法拆方能够抑制 CyclinE<sub>1</sub> 蛋白的表达,其中以健脾组抑制效果最明显,而对 CyclinD<sub>1</sub> 与 CDK4 蛋白表达无明显影响,研究表明,细胞周期的调控机制与肿瘤的发生发展有着密切的联系,周期的正常运转需要依靠 CDK 的正调控因子 Cyclin 与负调控因子 CDI 的协同与平衡<sup>[18]</sup>。其中 CyclinD<sub>1</sub> 与 CyclinE<sub>1</sub> 在 G<sub>1</sub> 期转变成 S 期的过程中起到重要的作用。在肿瘤组织中 CyclinD<sub>1</sub> 表达增高,CyclinE<sub>1</sub> 是 S 期的标志物,它的过表达能促进细胞的转化和肿瘤的恶性增殖。本研究提示中药复方对肝癌细胞周期调控的复杂特性、且总体影响较弱,其中以抑制 CyclinE<sub>1</sub> 蛋白的表达为主。

值得注意的是,通过前期文献查阅,本课题组发现文献报道的中药复方质量浓度在 1 g·L<sup>-1</sup>上下,文献报道的是采用中药提取物干燥粉末再溶解的浓度表示;本研究采用中药水煎乙醇提取方法制备中药液并以生药浓度表述,因而本文肝癌全方及不同治法拆方质量浓度达 20 ~ 120 g·L<sup>-1</sup>,这提示本文药物提取工艺不同及得率偏低有关。综上所述,本研究表明肝癌全方及其不同治法拆方均能抑制 SMMC7721 肝癌细胞的增殖,其中肝癌全方及清热解毒拆方通过调节 FOXO3,SGK1 等增殖相关基因和 CyclinE<sub>1</sub> 周期蛋白表达,将肝癌细胞阻滞在 G<sub>2</sub> 期,从而达到抑制肝癌的作用。

#### 【参考文献】

[ 1 ] 汤钊猷. 21 世纪肝癌临床研究面临的挑战[J]. 临床肝胆病杂志,2012,28(4):241-242.

[ 2 ] 吕桂帅,陈磊,王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景[J]. 生命科学,2015,27(3):237-248.

[ 3 ] 方肇勤,李永健,唐辰龙,等. 2060 例原发性肝癌患者证候特点分析[J]. 中医杂志,2004,45(1):53-54,5.

[ 4 ] 陈德溯,方肇勤. 中药治疗原发性肝癌中晚期的药味频率分析[J]. 辽宁中医杂志,2002,29(4):187-189.

[ 5 ] 方肇勤,梁超,任红艳. 肝癌常用治法复方抑制肝癌细胞恶性增殖的机制研究[J]. 中国中医基础医学杂志,2013,19(1):34-37.

[ 6 ] 张兴,丁亚杰,田天宁,等. 不同中药体外不同给药对人肝癌细胞恶性增殖的影响实验[J]. 中华中医药学刊,2014,32(10):2331-2333.

[ 7 ] 任红艳,方肇勤,梁超. 预知子、白花蛇舌草抑制肝癌细胞恶性增殖的研究[J]. 辽宁中医杂志,2013,40(12):2553-2555.

[ 8 ] 任红艳,方肇勤,梁超,等. 预知子籽对多种肝癌细胞恶性增殖的抑制作用研究[J]. 辽宁中医杂志,2015,42(3):459-461,插图 I, II.

[ 9 ] LU W L, REN H Y, LIANG C, et al. *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz seed extract inhibits the proliferation of human hepatocellular carcinoma cell lines via inducing endoplasmic reticulum stress [ J ]. Evid Based Complement Alternat Med,2014,192749(10):1-12.

[ 10 ] 何立丽,吕文良,孙桂芝. 中药提取物抗原发性肝癌的研究进展[J]. 中华中医药杂志,2014,29(4):1175-1178.

[ 11 ] 高姗,杨万水,高静,等. 原发性肝癌的分子流行病学研究进展[J]. 中国肿瘤,2012,21(2):136-144.

[ 12 ] 肖开银,彭民浩. 原发性肝癌流行病学研究进展[J]. 中国普外基础与临床杂志,2000,7(4):272-274.

[ 13 ] 朱羿霖,刘军楼,金妙文. 补骨脂素抗肿瘤实验研究进展[J]. 云南中医中药杂志,2015,36(5):95-97.

[ 14 ] Hoeijmakers J H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer [ J ]. Nature, 2001, 411 ( 6835 ): 366-374.

[ 15 ] Fornari F, Gramantieri L, Ferracin M, et al. MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma [ J ]. Oncogene, 2008, 27(43):5651-5661.

[ 16 ] 郑星星,王建刚. FoxO3a 转录因子在肿瘤治疗中的作用[J]. 肿瘤学杂志,2014,20(5):409-412.

[ 17 ] 王磊,秦玖刚,王川. 麦冬提取物对胰岛素抵抗大鼠肝组织 miRNA-29a 及 FOXO3 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(1):124-129.

[ 18 ] 詹启敏,陈杰. 细胞周期与肿瘤转化医学[J]. 中国肿瘤临床,2014,41(1):1-7.

【责任编辑 张丰丰】