

叶下珠复方Ⅱ号对肝癌细胞增殖和胰岛素样生长因子-1受体信号通路转录的作用

陈滨¹, 郭洁文^{2*}, 何素³, 李常青³, 杜欣芸³, 李俏敏³, 李阿荣²

(1. 广州中医药大学, 广州 510130; 2. 广州市中医医院, 广州 510130;

3. 广州中医药大学热带医学研究所, 广州 510405)

[摘要] **目的:**观察叶下珠复方Ⅱ号(CPUⅡ)对肝癌Huh7细胞增殖以及叶下珠复方Ⅱ号对胰岛素样生长因子-1受体(IGF-1R)信号通路转录的影响,探讨叶下珠复方Ⅱ号抗肝癌作用机制。**方法:**采用小分子干扰RNA技术(siRNA)转染肝癌Huh7细胞,构建抑制IGF-1R的肝癌Huh7细胞(anti-IGF-1R Huh7),选择稳定表达的抑制IGF-1R的肝癌Huh7细胞,将肝癌Huh7细胞以及抑制IGF-1R的肝癌Huh7细胞分别分为4组:空白组,叶下珠复方Ⅱ号高、低质量浓度组(3.0,1.5 g·L⁻¹)以及5-氟尿嘧啶(5-FU)组(0.03 g·L⁻¹),采用噻唑蓝(MTT)比色法测定药物对各组细胞增殖的影响,通过实时荧光定量PCR(Real-time PCR)以及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测IGF-1R及其下游相关指标mRNA及蛋白表达。**结果:**与空白组比较,转染(SASI_Hs01_00126196及SASI_Hs01_00126196_AS)序列肝癌Huh7 IGF-1R mRNA及蛋白表达量最低,选择该细胞进行实验。MTT比色实验结果表明,与空白组比较,叶下珠复方Ⅱ号能够抑制Huh7细胞以及抑制IGF-1R的肝癌Huh7细胞增殖,并且siRNA抑制IGF-1R基因表达后,叶下珠复方Ⅱ号还能继续抑制Huh7细胞增殖,且IGF-1R,磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)和丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶3(Akt3)mRNA表达量进一步下降($P < 0.05$)。**结论:**叶下珠复方Ⅱ号能够抑制Huh7细胞增殖,作用机制可能是抑制IGF-1R及其下游mRNA转录有关。

[关键词] 肝细胞癌; 叶下珠复方Ⅱ号; 细胞增殖; 胰岛素样生长因子1受体信号通路转录

[中图分类号] R22;R242;R273;R285.5;R2-031 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)14-0108-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181316

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180412.0905.005.html>

[网络出版时间] 2018-04-13 10:54

Proliferation Effect of Compound Phyllanthus Urinsria II and Insulin-like Growth Factor-1 Receptor Signaling Transcription

CHEN Bin¹, GUO Jie-wen^{2*}, HE Su³, LI Chang-qing³, DU Xin-yun³,
LI Qiao-min³, LI A-rong²

(1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510130, China;

2. Guangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510130, China;

3. Tropical Medicine Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of compound phyllanthus urinsria II (CPU II) on the proliferation of hepatocellular carcinoma Huh7 cells and the transcription of insulin-like growth factor-1 receptor (IGF-1R) signaling pathway, and explore the mechanism of action of CPU II in inhibiting liver cancer. **Method:** Small interfering RNA (siRNA) was transfected into Huh7 cells to construct hepatocellular carcinoma Huh7 cells that inhibited insulin-like growth factor-1 receptor (anti-IGF-1R Huh7). IGF-1R Huh7 cells with stable

[收稿日期] 20180117(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673861)

[第一作者] 陈滨,在读硕士,从事中药药理及抗肿瘤研究,E-mail:13763008763@163.com

[通信作者] *郭洁文,博士生导师,主任药师,从事抗代谢综合征的天然药物开发研究,E-mail:guo774@sina.com

expression, namely Huh7 cells of hepatocellular carcinoma and Huh7 cells of hepatocellular carcinoma that inhibited insulin-like growth factor-1 receptor, were divided into four groups: control group, high and low-dose CPU II groups ($3.0, 1.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) and 5-fluorouracil (5-FU) ($0.03 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). The effect of drugs on the proliferation of each group were determined by methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay. Real-time PCR was used to detect the mRNA expression of IGF-1R and its downstream genes. **Result:** The mRNA expression of Huh7 IGF-1R and the lowest expression level of Huh7 were detected by Real-time PCR and Western blot. The cells were selected for experiment. The results of MTT showed that CPU II could inhibit the proliferation of Huh7 cells and Huh7 cells that inhibit IGF-1R; after siRNA inhibited IGF-1R gene expression, CPU II could continue the proliferation of Huh 7 cells; and the mRNA expressions of IGF-1R, Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and Serine-threonine protein kinase 3 (Akt) further decreased compared with the control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** CPU II can inhibit the proliferation of Huh7 cells. The mechanism may be related to the inhibition of IGF-1R and its downstream mRNA transcription.

[Key words] hepatocellular carcinoma; compound phyllanthus urinsria II (CPU II); proliferation; insulin-like growth factor-1 receptor pathway transcription

原发性肝癌是目前我国常见的恶性肿瘤之一,居我国恶性肿瘤致死率前列,肝癌可分为肝细胞癌、肝内胆管癌以及肝细胞癌-肝内胆管癌混合型 3 种,其中肝细胞癌占原发性肝癌 85% 以上。肝细胞癌发病率高,不易察觉,一般发觉即为晚期,死亡率高,对人民群众造成严重威胁,目前尚未有行之有效的治疗方法,临床上常采用中西医结合治疗^[1]。因而积极探索阻断肿瘤形成发展的有效方法,具有重要意义。胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R)是胰岛素轴重要媒介,对细胞生长,增殖具有重要意义^[2-3]。研究表明,IGF-1R 在肝癌中高表达,IGF-1R 高表达导致下游通路异常活化,从而加速细胞有丝分裂,促进细胞增殖,促进肿瘤形成发展。姚志华^[4]通过姜黄素作用于氯化钨诱导 SMMC-7721 细胞缺氧模型证明姜黄素通过 IGF-1R 信号通路抑制血管内皮生长因子(VEGF)生成,从而抑制肿瘤微血管生成。姬媛媛等^[5]发现鬼白苦素能够抑制 MHCC97-H 细胞增殖及转移。李晨阳等^[6]发现沉默 IGF-1R 后,能显著抑制 Huh7 细胞以及 He3B 细胞增殖,侵袭作用。以上研究都表明,IGF-1R 在肿瘤细胞增殖中具有重要作用。叶下珠复方 II 号由叶下珠、丹参、太子参、旱莲草、甘草组成,具有清热活血健脾补肾作用,研究证明叶下珠复方 II 号具有较好的抗肝纤维化,抗肝癌作用^[7-10],而叶下珠复方 II 号抑制肿瘤细胞增殖作用是否与抑制 IGF-1R 基因表达有关,暂时未见文献报道,本次实验通过沉默 IGF-1R,建立 Anti-IGF-1R Huh7 细胞,通过噻唑蓝(MTT)比色法,实时荧光定量 PCR 法(Real-time PCR)检测叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞以及 anti-

IGF-1R Huh7 细胞增殖的影响以及 IGF-1R 下游通路 mRNA 表达的影响,为叶下珠复方 II 号临床应用提供新的依据。

1 材料

1.1 细胞株 人源肝癌 Huh7 细胞(广州蓝博生物公司,编号 LM12601),人源 Huh7 细胞 IGF-1R 小分子干扰 RNA 技术(siRNA)转染后(Sigma 公司,编号 NM_000875)。

1.2 药物与试剂 叶下珠复方 II 号由叶下珠、丹参、太子参、旱莲草、甘草组成,实验药材由广州市药材公司提供,采用标准水体醇沉工艺制备,浓缩至含生药 $5.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 提取物(广州泽力医药科技有限公司,批号 T20170702),经广州泽力医药科技有限公司鉴定,符合 2015 年版《中国药典》要求(含各药材主要成分含量)。取叶下珠复方 II 号 5 g,加入超纯水 50 mL,超声溶解后经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤除菌,冷却后分装至 1 mL 离心管中,置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用,临用时用培养基稀释至所需质量浓度即可。氟尿嘧啶(5-FU,海普药业有限公司,货号 120313);胎牛血清,1640 培养基(Hyclone 公司,货号分别为 A31608-03, C11995502BT);SYBR Green qPCR SuperMix 试剂盒(Invitrogen 公司,货号 C1744501);辣根过氧化物酶标记的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH,Proteintech 公司,货号 A08025);辣根过氧化物酶标记兔抗山羊免疫球蛋白(Ig)G(武汉博士德生物工程有限公司,货号 BA1063);Puromycin(Clontech 公司,货号 A1113803);MTT(Amresco 公司,货号 38085359);trizol 试剂(美国英杰生命技术有限公司,货号 15596-028);DNase I

试剂(脱氧核糖核苷酸酶 I), 10 mmol·L⁻¹ dNTP, M-MuLV 逆转录酶试剂[普洛麦格(北京)生物有限公司, 货号分别为 10296-028, U1515, M1701]; 辣根过氧化物酶标记兔抗鼠 IGF-1R 单克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号 BA1060); IGF-1R, 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K) 和丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶 3(Akt3) mRNA 和 18 srRNA 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 仪器 Elx 808 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司); CK 40-F200 型倒置显微镜(上海智诚分析仪器有限公司); HERACELL150i 型细胞恒温培养箱(美国 Thermo Scientific 公司); DMI6000B 型倒置荧光显微镜(德国 Leica 公司); PRISM® 7500 Sequence Detection System 型荧光定量 PCR 仪(加拿大 ABI 公司); PROTEAN II 型直电泳仪及转移系统(美国 Bio-Rad 公司); Simon 型 Western blot 分析仪(美国 ProteinSimple 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 Huh7 细胞 37 °C 水浴复苏后, 置于 15 mL 离心管中, 加入 1640 培养基 9 mL, 800 r·min⁻¹ 离心 5 min 后弃去上清液, 用 100 U·L⁻¹ 的青霉素, 含有 10% 胎牛血清的 1640 吹打均匀, 放入 25 cm 培养瓶中, 置于饱和湿度的恒温培养箱中培养, 每隔 6 h 观察细胞生长状态。每隔 24 h 更换 1 次培养基, 待细胞生长至 80% ~ 90% 时, 采用磷酸盐缓冲液(PBS) 冲洗 2 ~ 3 次, 冲洗净后用 0.25% 胰酶消化细胞 1 min, 观察细胞间隙变大, 细胞变圆时终止消化, 将细胞 1 500 r·min⁻¹ 离心 5 min 后弃去上清液, 1640 培养基吹打均匀, 视细胞密度按照 1:2 ~ 1:3 传代。

2.2 细胞转染筛选 SiRNA

2.2.1 SiRNA 筛选转染方案 收集对数生长期的 Huh7 细胞, 以 6 × 10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔板。以 25, 50, 100 mmol·L⁻¹ 分别接种 NC siRNA, IGF-1R_001 siRNA, IGF-1R_002 siRNA, IGF-1R_003 siRNA(引物序列见表 1), 待 Huh7 细胞生长到 6 孔板 50% 时, 可以进行转染实验, 弃去培养基, 用 PBS 洗 2 遍, 每孔加入含有 20% FBS 的 1640 培养基 1 mL, 按照说明书配置 AB 管, 取终浓度为 25, 50, 100 mmol·L⁻¹ 的 A 管溶液分别取 2.5, 5.0, 10.0 μL, 将 A 管与 B 管溶液混匀, 静置 20 min 后分别加入各孔中, 混匀后静置 20 min 逐滴加入培养皿中, 放入培养箱培养 12 h 后, 弃去转染培养基, 用 PBS 洗 2 遍, 每孔加入 1640 完全培养基 10 mL, 放入

培养箱中, 24 h 后采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 检测 siRNA 的干扰效率。

表 1 IGF-1R siRNA 引物序列

Table 1 GF-1R siRNA primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度 /bp
SASI_Hs01_00126194	上游 GGAAUUGCAUGGUAGCCGAdTdT	21
	下游 UCGGCUACCAUGCAAUUCcTdT	
SASI_Hs01_00126196	上游 CUGACUACAGGAUCUCAuTdT	21
	下游 AUGAGAUCCUGUAGUCAGdTdT	
SASI_Hs01_00126195	上游 GCAAUUUCCUCAUUAACAuTdT	21
	下游 AUGUUAAGAGCAAAUUGCdTdT	
NC siRNA	上游 UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	21
	下游 ACGUGACACGUUCGGAGAATT	
18 srRNA	上游 UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	112
	下游 GCGGCGCAATACGAATGCCCC	

2.2.2 转染 Huh7 细胞采用 10% 胎牛血清的 1640 培养基培养, 传代至第 5 次, 待细胞生长至 80% 时, PBS 冲洗 2 次后用 0.25% 胰酶消化, 计数后以 5 × 10⁶ 个/孔接种于 6 孔板中培养, 24 h 后更换无血清培养基培养细胞生长至 90% 时, 以感染复数(MOI) 50 浓度时加入病毒 rLv-IGF-1R, 以 MOI 20 浓度加入病毒, 恒温孵育 2 h, 除去无血清培养基, PBS 冲洗 2 次后换成 1640 培养基继续培养, 适时传代。48 h 后更换为 4 g·L⁻¹ 的 puromycin 的完全培养基培养, 48 h 更换为 0.006 g·L⁻¹ 的 puromycin 完全培养基, 同时以接种 Huh7 细胞作为对照细胞。每 4 h 观察细胞, 对照细胞 Huh7 细胞全部死亡后, 将培养基更换为 1 g·L⁻¹ 的 puromycin 完全培养基继续培养, 待细胞长满 6 孔板后消化传代培养, 采集部分细胞提取 mRNA Real-time PCR 鉴定。其余细胞继续培养, 传代数次后, 即可获得稳定转染细胞株(anti-IGF-1R Huh7 细胞)。

2.2.3 蛋白免疫印迹法(Western blot) 检测细胞 IGF-1R 表达 分别收集 Huh7, Huh7-NC, T1, T2 细胞, 提取总蛋白, 按照 BCA 法测定总蛋白含量, 取总蛋白 35 μg 上样。加入上样缓冲液, 80 V 电泳 60 min, 120 V 恒压电泳, 电泳后进行转膜。转膜后用 5% 牛奶封闭 1 h, 一抗(1:4 000) 4 °C 孵育过夜, 洗膜, 加入二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜。使用 ECL 化学发光检测条带灰度值, 重复 3 次。

2.3 细胞半数抑制浓度(IC₅₀) 及增殖检测 肝癌 Huh7 细胞及 anti-IGF-1R Huh7 细胞长至 90%, 用

1640 培养基调整细胞悬液浓度,以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板,每孔 100 μL 。设置空白组、溶剂组、叶下珠复方 II 号 (5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 1.5, 1.0 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 组,每组设置 5 个复孔。置于饱和湿度的培养箱中培养。24 h 后,弃去旧培养液,PBS 冲洗 2 次,各组加入相应药物 100 μL ,放入培养箱中培养 44 h 后再取出 96 孔板,吸干上清液,每孔加入含有 20% MTT 的培养基 100 μL ,避光培养 4 h 后,每孔加入 DMSO 100 μL ,按照酶标仪设置程序,采用 490 nm 波长下读取溶液吸光度 A ,分别计算药物对细胞的抑制率,并计算药物 IC_{50} ^[11],通过计算得出药物 IC_{50} 后,分别设置空白组、叶下珠复方 II 号高、低剂量组以及 5-FU 组,按照上述方法操作,计算得出药物对细胞抑制率。

2.4 Real-time PCR 检测细胞 IGF-1R, PI3K 和 Akt3 mRNA 表达 Huh7 细胞以及 anti-IGF-1R Huh7 细胞生长至 90% 时, PBS 冲洗 2 次, 0.25% 胰酶消化计数,调整细胞密度以 5×10^5 个/mL 接种于 6 孔板,每孔 2 mL 细胞悬液。设置细胞空白组、叶下珠复方 II 号 (3.0, 1.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 5-FU 组 (0.03 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 4 组,每组设置 3 个复孔,培养 24 h 后,吸弃旧培养液,各组每孔加入相应药品培养基 2 mL,继续培养 48 h,胰酶消化肝癌 Huh7 细胞和 anti-IGF-1R Huh7 细胞并收集,以 trizol 法提取细胞总 RNA, Dnase I (RNase-free) 去除基因组 DNA,每样本取 RNA 1 μL 进行逆转录反应 (合成 cDNA),按照说明书操作步骤进行。以 cDNA 为模板进行 RCR 检测,各样本基因检测按 20 μL 体系,进行 PCR 扩增,反应条件为 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 32 s, 共 40 个循环。利用 ABI 公司自带 PCR 系统软件分析,观察扩增曲线,计算样本 $\Delta\Delta C_t$,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ mRNA 表达,引物序列见表 2。

表 2 引物序列

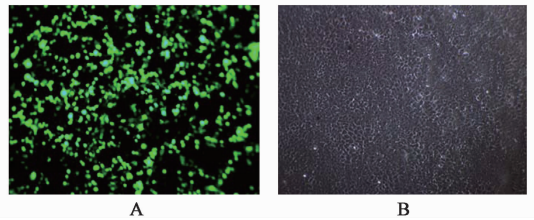
Table 2 primer sequences

引物	引物(5'-3')	长度/bp
IGF-1R	上游 GGCTGGGGCTCTGTTTACC	98
	下游 CTCTCTCGAGTTCGCCTGGT	
PI3K	上游 CCCAGGGAAATTCTGGGCTC	144
	下游 TGTATTCAAGTCAATTGCAGAAGG	
Akt3	上游 TTTTCTCTATTATTTGGGCTGAGTC	71
	下游 GGTTTGGATTCTCTGCTGC	
ACTB	上游 CATGTACGTTGCTATCCAGGC	23
	下游 CTCCTTAATGTCAGGCACGAT	

2.5 统计学处理 用 Microsoft Excel 建立数据库,应用 SPSS 24.0 软件对数据进行统计分析。计量资料以表示,单因素方差分析采用 One-way ANOVA, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 siRNA 构建稳定沉默 IGF-1R 基因的 Huh7 细胞株 与 Huh7 细胞组相比,采用 (SASI_Hs01_00126196 及 SASI_Hs01_00126196_AS) 序列转染的 anti-IGF-1R 的 Huh7 细胞, anti-IGF-1R 的 Huh7 细胞 IGF-1R mRNA 表达量下降 ($P < 0.05$), anti-IGF-1R 的 Huh7 细胞 IGF-1R 蛋白表达量下降 ($P < 0.05$)。转染后,采用荧光标记,绿色荧光蛋白 (GFP) 阳性细胞占 60% 以上,构建了稳定转染 anti-IGF-1R 的 Huh7 细胞见图 1, 2, 表 3, 4。



A. 暗场; B. 明场

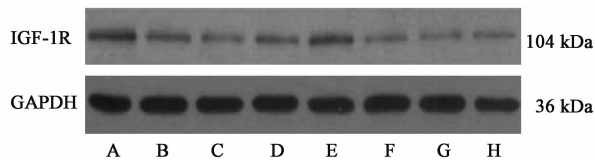
图 1 anti-IGF-1R 的 Huh7 荧光蛋白在暗场与明场中表达情况 ($\times 100$)

Fig. 1 Expression of Huh7 fluorescent protein of anti-IGF-1R in dark field and bright field ($\times 100$)

表 3 叶下珠复方 II 号对细胞 IGF-1R mRNA 相对表达及抑制效率的影响

Table 3 IGF-1R relative mRNA expression values and inhibition efficiency in each group

组别	浓度 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	IGF-1R mRNA ($\bar{x} \pm s, n = 6$)	抑制效率 /%
SASI_Hs01_00126194	25	0.90 \pm 0.15	-9.76
	50	0.42 \pm 0.08	60.75
	100	0.35 \pm 0.10	71.31
SASI_Hs01_00126195	25	0.63 \pm 0.11	23.17
	50	0.55 \pm 0.07	48.60
	100	0.29 \pm 0.03	76.23
SASI_Hs01_00126196	25	0.72 \pm 0.20	12.20
	50	0.48 \pm 0.12	55.14
	100	0.30 \pm 0.08	75.41
NC siRNA	25	0.82 \pm 0.16	-
	50	1.07 \pm 0.29	-
	100	1.22 \pm 0.11	-



A, E. Huh7 细胞; B, F. Huh7-NC (转染 SASI-HS01-00126196) 细胞; C, G. Huh7-T1 (转染 SASI-HS01-00126195) 细胞; D, H. Huh7-T2 (转染 SASI-HS01-00126194) 细胞

图 2 转染对 Huh7 细胞 IGF-1R 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of transfection on IGF-1R protein expression in Huh7 cells

表 4 转染对 Huh7 细胞 IGF-1R 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of transfection on IGF-1R protein expression in Huh7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	IGF-1R/GAPDH
Huh7	0.31 ± 0.02
Huh7-NC	0.15 ± 0.02 ¹⁾
Huh7-T1	0.12 ± 0.00 ¹⁾
Huh7-T2	0.15 ± 0.00 ¹⁾

注:与 Huh7 组比较¹⁾ $P < 0.05$, SiRNA 浓度均为 100 mmol·L⁻¹。

3.2 叶下珠复方 II 号对 Huh7 和 anti-IGF-1R Huh7 细胞增殖的影响 给药后 48 h, 在倒置显微镜下可以明显看出 Huh7 细胞轮廓较空白组模糊, 并且出现了空斑, 折光率降低。给药浓度越高, 细胞轮廓也更加模糊, 形成空斑数目也越多, 折光率也越低 ($P < 0.05$)。且 anti-IGF-1R Huh7 细胞给药组比 Huh7 细胞更容易观察出细胞轮廓模糊, 形成空斑、折光率降低也更加明显 ($P < 0.05$)。表明叶下珠复方 II 号对于两组细胞增殖均具有抑制作用, 随着药物浓度上升, 抑制作用也更显著 ($P < 0.05$), 呈现正相关性。采用 origin 8.0 软件计算得出叶下珠复方 II 号作用于 Huh7 细胞 48 h 的 IC₅₀ 为 2.575 g·L⁻¹, 作用于 anti-IGF-1R Huh7 细胞 48 h 的 IC₅₀ 为 1.686 g·L⁻¹。加药 24, 48 h, 与空白组比较, 叶下珠复方 II

表 7 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞及 anti-IGF-1R Huh7 细胞增殖 A 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 7 Inhibitory effect of CPU II on proliferation of Huh7 cells and anti-IGF-1R Huh7 cells ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	Huh7		anti-IGF-1R Huh7	
		24 h	48 h	24 h	48 h
空白	-	0.34 ± 0.00	0.65 ± 0.08	0.14 ± 0.01 ²⁾	0.22 ± 0.01 ²⁾
叶下珠复方 II 号	3.0	0.12 ± 0.02 ¹⁾	0.16 ± 0.08 ¹⁾	0.08 ± 0.00 ^{1,2)}	0.08 ± 0.01 ^{1,2)}
	1.5	0.27 ± 0.01 ¹⁾	0.35 ± 0.04 ¹⁾	0.12 ± 0.01 ^{1,2)}	0.11 ± 0.00 ^{1,2)}
5-FU	0.03	0.18 ± 0.03 ¹⁾	0.22 ± 0.04 ¹⁾	0.09 ± 0.01 ^{1,2)}	0.12 ± 0.03 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与 Huh7 细胞比较²⁾ $P < 0.05$ (表 8 同)。

3.3 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞和 anti-IGF-1R

号高、低剂量组对 Huh7 细胞和 anti-IGF-1R Huh7 细胞的增殖均有明显的抑制作用 ($P < 0.05$), 呈现较明显的浓度效应关系, 结果见表 5 ~ 7。

表 5 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞增殖的抑制作用

Table 5 Inhibitory effect of CPU II on proliferation of Huh7 cells

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	A ($\bar{x} \pm s, n = 6$)	抑制率/%
叶下珠复方 II 号	5.0	0.10 ± 0.01	98.73
	4.5	0.11 ± 0.05	95.25
	4.0	0.29 ± 0.05	72.84
	3.5	0.30 ± 0.04	70.78
	3.0	0.52 ± 0.06	43.09
	2.5	0.72 ± 0.06	19.34
	2.0	0.76 ± 0.04	13.70
	1.5	0.79 ± 0.02	11.71
	1.0	0.82 ± 0.01	9.86
空白	-	0.88 ± 0.01	-

表 6 叶下珠复方 II 号对 anti-IGF-1R Huh7 细胞增殖的抑制作用

Table 6 Inhibitory effect of CPU II on proliferation of anti-IGF-1R Huh7 cells

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	A ($\bar{x} \pm s, n = 6$)	抑制率/%
叶下珠复方 II 号	5.0	0.05 ± 0.01	98.97
	4.5	0.07 ± 0.04	96.98
	4.0	0.07 ± 0.02	93.23
	3.5	0.08 ± 0.04	86.37
	3.0	0.09 ± 0.03	81.85
	2.5	0.11 ± 0.01	67.02
	2.0	0.14 ± 0.02	55.90
	1.5	0.20 ± 0.02	43.42
	1.0	0.23 ± 0.00	20.76
空白	-	0.28 ± 0.01	-

Huh7 细胞 IGF-1R, PI3K 和 Akt3 mRNA 表达的

影响 与空白组相比,叶下珠复方 II 号以及 5-Fu 作用于 Huh7 细胞以及 anti-IGF-1R Huh7 细胞 48 h 后,两组细胞 IGF-1R, PI3K, Akt3 mRNA 表达降低

($P < 0.05$); 与 Huh7 各组比较, anti-IGF-1R Huh7 细胞各组 IGF-1R, PI3K, Akt3 mRNA 表达量降低 ($P < 0.05$), 见表 8。

表 8 叶下珠复方 II 号各组细胞 IGF-1R, PI3K, Akt3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 8 Effect of CPU II on mRNA expressions of IGF-1R, PI3K and Akt3 in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /g·L ⁻¹	Huh7 细胞			anti-IGF-1R Huh7		
		IGF-1R	PI3K	Akt3	IGF-1R	PI3K	Akt3
空白	-	3.58 ± 0.74	5.23 ± 0.21	18.04 ± 4.49	0.9 ± 0.11 ²⁾	1.02 ± 0.10 ²⁾	0.92 ± 0.14 ¹⁾
叶下珠复方 II 号	1.60	0.71 ± 0.05 ¹⁾	0.76 ± 0.17 ¹⁾	2.65 ± 0.24 ¹⁾	0.08 ± 0.02 ^{1,2)}	0.12 ± 0.01 ^{1,2)}	0.53 ± 0.05 ^{1,2)}
	3.20	0.04 ± 0.02 ¹⁾	0.24 ± 0.01 ¹⁾	1.89 ± 0.11 ¹⁾	0.02 ± 0.01 ^{1,2)}	0.02 ± 0.01 ^{1,2)}	0.21 ± 0.03 ^{1,2)}
5-FU	0.03	0.91 ± 0.05 ¹⁾	0.60 ± 0.02 ¹⁾	2.96 ± 0.39 ¹⁾	0.84 ± 0.04 ^{1,2)}	0.65 ± 0.29 ²⁾	0.84 ± 0.04 ^{1,2)}

4 讨论

最新研究证明 IGF-1R 信号通路的异常活化与肝细胞增殖和肝癌的发生发展紧密相关, IGFs 系统能够调节细胞周期, IGF-1R 表达上调使 IGF 信号传导失衡, 过度激活下游信号通路, 缩短细胞周期, 促进细胞增殖^[2,11-15]。IGF-1R 在多种肿瘤中呈现过度表达, 具有抗细胞凋亡的作用, 通过抑制 IGF-1R 表达能有效抑制肿瘤生长、迁移^[16]。本实验中, 本课题组根据 siRNA 设计原则, 设计并合成了多对靶向 IGF-1R 的 siRNA 序列, 分别转染肝癌 Huh7 细胞, 通过 RNA 表达以及蛋白表达作为筛选指标, 结果筛选出 SASI_Hs01_00126196 的抑制效率最高, 达 76.23%, 将其 siRNA 序列克隆, 构建慢病毒载体, 得到沉默 IGF-1R 基因表达的稳定细胞株, 细胞实验结果采用 siRNA 技术抑制 IGF-1R 表达后建立的 anti-IGF-1R Huh7 细胞模型, 与 Huh7 细胞比较, 细胞增殖明显抑制, 表明沉默 IGF-1R 基因后, anti-IGF-1R Huh7 细胞增殖速度减慢, IGF-1R 与 Huh7 细胞生长增殖有关。

肝癌是由阴阳失调, 七情郁抑, 脏腑受损等原因导致功能失调, 运化失常, 进而产生气滞、痰凝、湿浊、热毒等病理变化, 蕴结脏腑, 久积而成的恶性疾病。虽然对于肝癌病机见解不同, 但中医治疗都以清热活血健脾补肾等为治则, 叶下珠具有清肝明目、收敛利水、解毒消积功效, 常用于治疗肝炎等疾病, 丹参具有活血祛瘀、清热除烦等功效, 太子参补益阴气、生津止渴, 旱莲草具有补肾益阴、凉血, 甘草具有补脾益气, 清热解毒, 润肺止咳, 调和药性^[17-19]。叶下珠复方 II 号以叶下珠为君药, 丹参为臣药, 太子参, 旱莲草为佐, 甘草调和诸药为使, 共收清热活血之效, 以达清热活血健脾补肾之效, 因而在动物以及

细胞实验中具有较好的抗肝癌作用^[7-10]。

本实验在构建沉默 IGF-1R 的 Huh7 细胞基础上, 给予叶下珠复方 II 号, 结果表明, 叶下珠复方 II 号对两组细胞增殖均具有抑制作用, 对于 anti-IGF-1R Huh7 细胞抑制作用更明显, IC₅₀ 也更小。采用 MTT 比色法检测叶下珠复方 II 号对细胞增殖的抑制作用, 发现给药后的 anti-IGF-1R Huh7 细胞不论是 24 h 或者 48 h, 其增殖能力均低于 Huh7 细胞, 表明沉默 IGF-1R 基因后, 药物对仍能抑制 anti-IGF-1R Huh7 细胞增殖, 叶下珠复方 II 号作用于 Huh 细胞后, IGF-1R, PI3K, Akt3 mRNA 的表达均明显下调作用于 anti-IGF-1R Huh7 细胞后, 其 IGF-1R, PI3K, Akt3 mRNA 的表达下调更为明显, 并且沉默 IGF-1R 基因后还能够继续发挥抑制 anti-IGF-1R Huh7 细胞增殖作用, 表明叶下珠复方 II 号通过抑制 IGF-1R 及其抑制下游 PI3K/Akt 信号通路基因 mRNA 转录, 诱导 Huh7 凋亡, 发挥抗肝癌作用。此外, 叶下珠复方 II 号还可能具有其他作用机制, 发挥协同抗肝癌作用。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2017年版)[J]. 中华消化外科杂志, 2017, 16(7): 705-720.

[2] Bähr C, Groner B. The insulin like growth factor-1 receptor (IGF-1R) as a drug target: novel approaches to cancer therapy [J]. Growth Horm IGF Res, 2004, 14(4): 287-295.

[3] 姚宁华, 姚登福. IGF-1 受体介导的信号通路与肝癌靶向治疗[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2011, 20(5): 486-490.

[4] 姚志华. 姜黄素通过 IGF-1R 信号通路抑制缺氧肝癌

- SMMC-7721 细胞 VEGF 表达的实验研究 [D]. 福州: 福建医科大学, 2016.
- [5] 姬媛媛, 王志东, 王宝太, 等. IGF-1R 阻断剂抑制人肝癌细胞 MHCC97-H 增殖转移的研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2016, 24(5): 681-685.
- [6] 李晨阳, 张文彦, 张祎, 等. 慢病毒介导的 IGF-1R 基因沉默对肝细胞癌的增殖和迁移的影响 [J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(11): 1056-1060.
- [7] 何素, 王小龙, 李小翬, 等. 叶下珠复方 II 号对裸鼠肝癌移植瘤生长的抑制作用及机制 [J]. 中药新药与临床药理, 2016, 27(6): 762-768.
- [8] 夏曦, 赵敏, 李常青, 等. 叶下珠复方 II 号对肝星状细胞凋亡和 miR-16/Bcl-2 表达的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(5): 690-696, 775.
- [9] 罗来育, 李常青, 李小翬, 等. 叶下珠复方 II 号对肝星状细胞增殖和 miR-122/KLF6 表达的影响 [J]. 热带医学杂志, 2015, 15(1): 8-12.
- [10] 李常青, 王小龙, 康水胜, 等. 叶下珠复方 II 号对肝癌 Huh7 细胞白细胞介素-6 信号通路及微小 RNA let-7a 网络的调控作用 [J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(6): 683-690, 750.
- [11] Aiello A, Pandini G, Sarfstein R, et al. HMGA1 protein is a positive regulator of the insulin-like growth factor-I receptor gene [J]. Eur J Cancer, 2010, 46 (10): 1919-1926.
- [12] BAI S, Nasser M W, WANG B, et al. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib [J]. J Biol Chem, 2009, 284 (46): 32015-32027.
- [13] Scharf J G, Schmidt-Sandte W, Pahernik S A, et al. Characterization of the insulin-like growth factor axis in a human hepatoma cell line (PLC) [J]. Carcinogenesis, 1998, 19 (12): 2121-2128.
- [14] Hopfner M, Huether ASutter A P, Baradari V, et al. Blockade of IGF-1 receptor tyrosine kinase has antineoplastic effects in hepatocellular carcinoma cells [J]. Biochem Pharmacol, 2006, 71(10): 1435-1448.
- [15] 何素. 叶下珠复方 II 号对肝癌细胞 IGF-1R 信号通路活化的抑制作用研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2017.
- [16] 杜永亮, 赵杰, 贾晓民, 等. RNA 干扰沉默 IGF1R 表达对 A549 细胞凋亡及化疗敏感性的观察 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(11): 835-839.
- [17] 刘晓霓, 李宁. 原发性肝癌中医临床用药荟萃分析 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(9): 1327-1331.
- [18] 罗来育, 陈斯泰, 李常青, 等. 叶下珠复方 II 号对二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌形成的抑制作用及机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(8): 126-132.
- [19] 刘嘉辉, 邓金凤, 何洁茹, 等. 中医药治疗原发性肝癌用药规律文献分析 [J]. 中医杂志, 2014, 55(18): 1592-1595.

[责任编辑 张丰丰]