

黄芪-莪术联合顺铂诱导肝癌细胞凋亡及其对 miR-122a, miR-221, miR-151 表达的影响

臧文华¹, 黄显章¹, 唐德才^{2*}, 尹刚²

(1. 南阳理工学院 张仲景国医学院, 河南 南阳 473061;

2. 南京中医药大学基础医学院, 南京 210046)

[摘要] 目的:探讨黄芪-莪术联合顺铂(DDP)抗肝癌的作用机制。方法:构建人肝癌裸鼠原位移植瘤模型。成瘤后,将其随机分为模型组、顺铂组(DDP, 2 mg·kg⁻¹, ip), 黄芪-莪术高、中、低剂量(H, M, L, 12, 6, 3 g·kg⁻¹·d⁻¹, ig)组, 黄芪-莪术高剂量+顺铂组(H+DDP), 黄芪-莪术中剂量+顺铂组(M+DDP), 黄芪-莪术低剂量+顺铂组(L+DDP), 每组 8 只。采用 TdT-mediated dUTP nick end labeling(TUNEL)法观察黄芪-莪术联合顺铂对人肝癌细胞 HepG2 的原位诱导凋亡作用,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测其对凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)的影响,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)观察人肝癌裸鼠肿瘤组织中 microRNA(miR)-122a, miR-221, miR-151 的表达。结果:H, H+DDP, M+DDP, L+DDP 组均有肿瘤细胞凋亡,镜下观察肿瘤细胞核内呈棕黄色,核高度凝聚,部分细胞脱落,与模型组比较有明显的凋亡现象发生($P < 0.05$, $P < 0.01$),以 H+DDP 组诱导凋亡作用最为显著。与模型组比较, H, M, H+DDP, M+DDP, L+DDP 组血清中 Bcl-2 含量均显著降低($P < 0.01$),以 H+DDP 组降低最为显著。与 DDP 组比较, H, M, L, H+DDP, M+DDP, L+DDP 均能显著上调 miR-122a 的表达($P < 0.01$), H+DDP 对 miR-221, miR-151 的表达有显著抑制作用($P < 0.01$)。结论:黄芪-莪术能显著诱导人肝癌细胞 HepG2 凋亡,且诱导凋亡作用与剂量有一定的正相关性,其机制可能与显著下调 Bcl-2 表达,上调 miR-122a, 下调 miR-221, miR-151 的表达有关,与 DDP 合用表现为协同增效作用。

[关键词] 黄芪; 莪术; 肝细胞癌; 细胞凋亡; microRNA; B 淋巴细胞瘤-2

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)17-0087-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016170087

Effects of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma and Combined with Cisplatin on Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells and Expressions of miR-122a, miR-221 and miR-151

ZANG Wen-hua¹, HUANG Xian-zhang¹, TANG De-cai^{2*}, YIN Gang²

(1. Zhang Zhongjing College of Chinese Medicine, Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473061, China;

2. College of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the action mechanism of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma combined with cisplatin (DDP) for hepatic cancer. **Method:** Human hepatocarcinoma cells HepG2 were transplanted into nude mice to establish models, and the modeled mice were randomly divided into 8 groups: model group, cisplatin (DDP) group (2 mg·kg⁻¹, ip), Astragali Radix-Curcumae Rhizoma high dose, middle dose and low dose groups (H, M, L, 12, 6, 3 g·kg⁻¹·d⁻¹, ig), Astragali Radix-Curcumae Rhizoma high dose + cisplatin group (H+DDP), middle dose + cisplatin group (M+DDP), and low dose + cisplatin group (L+DDP), $n = 8$ in each group. The effects of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma combined with cisplatin on apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells HepG2 were observed by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The

[收稿日期] 20151213(003)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81073072, 81373990);国家自然科学基金青年项目(81503270, 81503267);河南省高等学校重点科研项目(15A360011);河南省中医药科学研究专项(2015ZY02004)

[第一作者] 臧文华, 博士, 讲师, 从事临床中药学研究, Tel:0377-62071309, E-mail: zangwenhua2004@163.com

[通讯作者] *唐德才, 博士, 教授, 从事中药药性、配伍机制及应用研究, Tel:025-85811010, E-mail: talknow@163.com

apoptosis related protein B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) was detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). Expressions of microRNA (miR) -122a, miR-221 and miR-151 in transplanted tumor tissues were determined by Real-time PCR. **Result:** As compared with the model group, the apoptosis of tumor cells was obvious, the tumor cell nucleus was brown yellow under the microscope, tumor cell nucleus was highly condensed and some cells were detached from the nucleus in H, H + DDP, M + DDP, and L + DDP groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The apoptosis was most significant in H + DDP group. ELISA results showed that the contents of Bcl-2 in H, M, M + DDP, H + DDP and L + DDP groups were significantly decreased as compared with the model group ($P < 0.01$), and the decrease extent was most significant in H + DDP group. The Real-time PCR results showed that the expressions of miR-122a could be significantly up-regulated in H, M, L, H + DDP, M + DDP, and L + DDP groups ($P < 0.01$) and expressions of miR-221, miR-151 were significantly inhibited in H + DDP group ($P < 0.01$) as compared with DDP group. **Conclusion:** Astragali Radix-Curcumae Rhizoma can significantly induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells HepG2 in positive correlation with dosage. The mechanism may be related to significantly down-regulating the expression of Bcl-2, up-regulating the expression of miR-122a and down-regulating the expression of miR-221 and miR-151. The combination of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma and DDP showed synergistic effect.

[**Key words**] Astragali Radix; Curcumae Rhizoma; Hepatocellular Carcinoma; apoptosis; microRNA; B-cell lymphoma-2

我国每年约有 13 万患者死于肝癌,约占全世界肝癌死亡总数的 43%^[1],与其他大多数恶性实体瘤不同,肝癌在瘤体较小时就易出现血管内侵犯、门静脉癌栓,甚至发生肝内播散,或在原有肝硬化基础上形成新的癌灶等,严重影响肝癌的治疗与预后^[2]。尽管近年来治疗手段不断增加,但并没有从根本上改变肝癌死亡率高的现状。中药成分复杂,作用于肿瘤能够发挥多途径、多靶点、多效应的综合效果,与化疗药物比较,其不良反应小,不易产生耐药性,因此在延缓肿瘤进展,延长患者生存期,使其长期带瘤生存并维持较好的生存质量等方面有明显优势。

补气活血药对黄芪-莪术在改善肝功能、提高患者生活质量、缓解临床症状等方面有较突出的作用^[3-4]。本课题组前期研究表明,黄芪-莪术能抑制人肝癌裸鼠原位移植瘤的生长,与顺铂联合用药能发挥协同增效作用,有助于克服单用化疗药所引起的不良反应大、容易发生耐药等缺点^[5]。本实验采用 DNA 断裂的原位末端标记法 (TUNEL) 观察黄芪-莪术联合顺铂对人肝癌细胞 HepG2 的原位诱导凋亡作用,采用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测其对凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 的影响,并采用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 观察其对肝癌裸鼠肿瘤组织中 microRNAs (miR) -122a, miR-221, miR-151 表达的影响,探讨黄芪-莪术抗肿瘤的可能机制。

1 材料

1.1 药品与试剂 根据课题组前期研究结果^[6],

莪术品种采用温郁金。黄芪-莪术分别购自产地内蒙古、浙江,经南京中医药大学药学院吴德康教授鉴定,分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* var. *mongholicus* 的干燥根以及姜科植物温郁金 *Curcuma wenyujin* 的干燥根茎。注射用顺铂 (齐鲁制药有限公司,批号 H20073652)。细胞培养液 RPMI 1640 (美国 Gibco 公司,批号 1237579); 新生小牛血清 (杭州四季青生物工程材料有限公司,批号 040622); 胰蛋白酶 (美国 Gibco 公司,批号 27250-018); TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒 (南京凯基生物科技有限公司,批号 KGA703); Bcl-2 ELISA 试剂盒 (中国欣博盛生物科技有限公司,批号 ERC109)。引物由南京金斯瑞科技有限公司合成, hsa-U6 snRNA (60 bp): 上游 5'-GCCGGT CGTGAAGCGTTC-3', 下游 5'-GTGCAGGTCAGG AGGT-3'; hsa-miR-122a (61 bp): 上游 5'-CAAGC GTTGAGTGTGACA-3', 下游 5'-CGTCCTACCATT CTCCAGC-3'; hsa-miR-221 (62 bp): 上游 5'-GCC CGAGCTACATTGTCTGC-3', 下游 5'-GTGCAGG GTCCGAGGT-3'。

1.2 细胞株与动物 人肝癌细胞株 HepG2 购于扬州大学中心细胞库。5~6 周龄 BALB/c 雄性裸鼠,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,体重 18~20 g,合格证号 SCXK (沪) 2012-0006。

1.3 仪器 GBB16 型 CO₂ 培养箱 (德国 Heraen 公司), YJ-1450 型超净工作台 (苏州净化设备厂), MK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Thermo Scientific

公司), MultiGene Gradient 型 PCR 循环仪(美国 Labnet 公司), DA7600 型荧光定量 PCR 循环仪(中山达安基因股份有限公司)。

2 方法

2.1 造模 取对数生长期的人肝癌 HepG2 细胞, 调整细胞密度 5×10^7 个/mL, 注射到裸鼠颈部皮下, $100 \mu\text{L}/\text{只}$, 3 周后处死荷瘤裸鼠, 无菌条件下剥离瘤体, 将肿瘤组织分割成 1 mm^3 的组织碎块。另取一批裸鼠用戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 于右肋缘下做长约 1 cm 的横切口, 暴露肝右叶, 将 1 块 HepG2 组织碎块植入肝实质切口内, 缝合固定, 逐层关腹。整个操作过程在超净工作台中完成, 术后不用抗生素。

2.2 药物制备 取黄芪、莪术各 150 g, 加水浸泡 0.5 h, 加 5 倍量水提取 2 次, 每次 1 h, 合并滤液, 浓缩至 250 mL, 回收莪术油, 加入相应药液中, 所得药液即为黄芪-莪术高剂量($0.6 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组, 中剂量组药液质量浓度为高剂量的 1/2, 低剂量组药液质量浓度为高剂量的 1/4。

2.3 分组及给药 肿瘤移植后第 3 天, 将 64 只裸鼠按体重随机分为模型组、顺铂(DDP)组、黄芪-莪术高剂量(H)组、黄芪-莪术中剂量(M)组、黄芪-莪术低剂量(L)组、黄芪-莪术高剂量 + 顺铂(H + DDP)组、黄芪-莪术中剂量 + 顺铂(M + DDP)组、黄芪-莪术低剂量 + 顺铂(L + DDP)组, 每组 8 只, 开始给药治疗。

模型组 *ig* 等体积生理盐水, 顺铂组 *ip* 顺铂 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, H, M, L 组分别 *ig* 药液 $12, 6, 3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, H + DDP, M + DDP, L + DDP 组分别 *ig* 药液 $12, 6, 3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 联合 *ip* 顺铂 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。给药体积均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 每天 1 次, 连续 21 d; 顺铂每 3 d *ip* 1 次, 共 7 次。用药期间每日观察各组裸鼠的精神、饮食、活动、大小便等一般情况, 用药前后称取体重。

2.4 TUNEL 法检测肝癌细胞凋亡指数 给药结束后第 2 天, 颈椎脱臼处死裸鼠, 完整剥离原位种植瘤, 瘤块以最大面对剖, 取其 1/2, 切成 2 ~ 3 mm 薄片, 用 10% 甲醛固定, 石蜡包埋, 切片, 采用 TUNEL 法检测组织样本中肿瘤细胞凋亡指数, 以细胞核有明显棕黄色为凋亡细胞, 凋亡细胞的细胞核中央呈圆形、均一棕黄色, 细胞质也呈点状或片状着色, 细胞形态较完整。根据凋亡细胞的形态学特征(如染色质浓缩、细胞皱缩与周围分离、出现凋亡小体、无明显炎症反应等)进行综合判定。每张切片观察 10

个高倍视野, 随机计数 2 000 个肿瘤细胞中的阳性细胞数, 计数时避开肿瘤坏死区, 计算凋亡指数。

凋亡指数 = 凋亡细胞数 / 总细胞数 $\times 100\%$

2.5 ELISA 法检测 Bcl-2 含量 给药结束后第 2 天, 各组裸鼠采用摘眼球法取血, 静置 30 min 后, $3 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 收集上清液。按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作, 450 nm 波长测量各孔吸光度 *A*。以 *A* 为纵坐标(*Y*), 相应的标准品浓度为横坐标(*X*), 绘制标准曲线, 得回归方程式, 将样品 *A* 代入方程式, 计算得出样品的浓度。

2.6 RNA 提取 取适量肿瘤组织按试剂说明书提取总 RNA, 计算总 RNA 浓度和纯度, 置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

2.7 miRNA 检测 cDNA 的合成反应按照试剂盒说明书进行, 实时荧光定量 PCR 反应按照试剂盒说明书进行, 反应条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 20 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 40 s, 40 个循环。扩增反应在 DA7600 荧光定量 PCR 循环仪上进行, 使用 U6 snRNA 为内参进行相对定量分析, miRNAs 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 数据统计方法对结果进行分析。

$$\Delta\Delta C_t = (C_{t, \text{miRNA}} - C_{t, \text{U6 RNA}})_{\text{待测样品}} - (C_{t, \text{miRNA}} - C_{t, \text{U6 RNA}})_{\text{空白组}}$$

2.8 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件, 数据进行单因素方差分析。计量结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

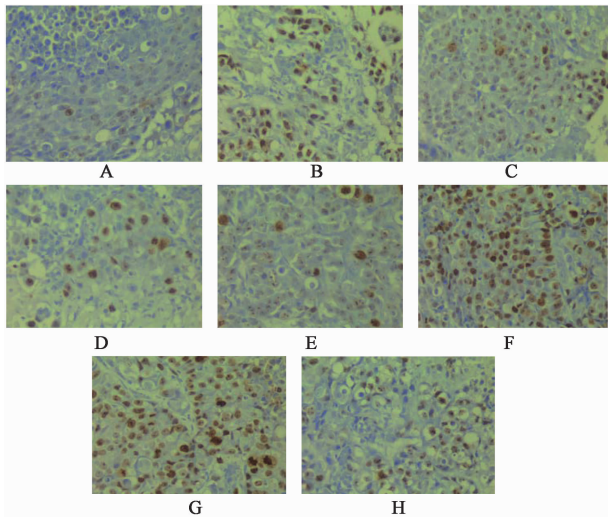
3 结果

3.1 黄芪-莪术对肿瘤细胞凋亡及凋亡指数的影响

模型组细胞大部分形态正常, 少量细胞核内有着色情况, 胞质着色浅。H, H + DDP, M + DDP, L + DDP 组均有肿瘤细胞凋亡, 镜下观察肿瘤细胞核内呈棕黄色, 核高度凝聚, 部分细胞脱落, 与模型组比较有明显的凋亡现象发生。见图 1。统计结果表明, H, H + DDP, M + DDP, L + DDP 组凋亡指数明显高于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 DDP 组比较, H + DDP 组肝癌细胞的凋亡指数明显升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.2 黄芪-莪术联合顺铂对凋亡相关蛋白 Bcl-2 的影响 与模型组比较, H, M, H + DDP, M + DDP, L + DDP 组血清中 Bcl-2 含量均显著降低 ($P < 0.01$)。与 DDP 组比较, H + DDP, M + DDP 组 Bcl-2 含量显著降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

3.3 黄芪-莪术联合顺铂对人肝癌裸鼠肿瘤组织 miR-122a, miR-221, miR-151 表达的影响 与模型组比较, DDP 组对 miR-122a 的表达无明显影响, 但



A. 模型组; B. DDP (2 mg·kg⁻¹) 组; C ~ E. 黄芪-莪术 (12, 6, 3 g·kg⁻¹) 组; F ~ H. 黄芪-莪术 (12, 6, 3 g·kg⁻¹) + DDP (2 mg·kg⁻¹) 组
图 1 黄芪-莪术对各组肿瘤细胞凋亡的影响 (TUNEL, ×400)

Fig. 1 Comparison of tumor cell apoptosis between various groups (TUNEL, ×400)

表 1 黄芪-莪术联合顺铂对人肝癌细胞 HepG2 的原位诱导凋亡作用 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effects of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma combined with cisplatin on apoptosis of Hepatocellular Carcinoma cells ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 凋亡指数/% |
|-------------|-----------------------|-----------------------------|
| 模型 | - | 2.82 ± 1.89 |
| DDP | 0.002 | 5.45 ± 2.63 ¹⁾ |
| 黄芪-莪术 | 12 | 5.51 ± 2.01 ¹⁾ |
| | 6 | 3.96 ± 1.94 |
| | 3 | 3.73 ± 0.96 |
| 黄芪-莪术 + DDP | 12 + 0.002 | 8.15 ± 3.47 ^{2,3)} |
| | 6 + 0.002 | 5.74 ± 2.14 ¹⁾ |
| | 3 + 0.002 | 5.39 ± 1.45 ¹⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 DDP 组比较³⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

表 2 黄芪-莪术联合顺铂对凋亡相关蛋白 Bcl-2 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Effects of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma combined with cisplatin on expression of Bcl-2 level ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | Bcl-2/ng·L ⁻¹ |
|-------------|-----------------------|-----------------------------|
| 模型 | - | 10.25 ± 0.38 |
| DDP | 0.002 | 4.79 ± 0.38 ¹⁾ |
| 黄芪-莪术 | 12 | 2.55 ± 0.13 ¹⁾ |
| | 6 | 5.72 ± 0.20 ¹⁾ |
| | 3 | 8.39 ± 0.44 |
| 黄芪-莪术 + DDP | 12 + 0.002 | 0.86 ± 0.13 ^{1,2)} |
| | 6 + 0.002 | 2.14 ± 0.24 ^{1,2)} |
| | 3 + 0.002 | 5.20 ± 0.41 ¹⁾ |

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与 DDP 组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

能显著下调 miR-221, miR-151 的表达 ($P < 0.01$), H, M 组对裸鼠肿瘤组织 miR-221, miR-151 的表达有明显抑制作用 ($P < 0.05, P < 0.01$), H, M, L, H + DDP, M + DDP, L + DDP 组可显著上调 miR-122a 的表达 ($P < 0.01$), H + DBP, M + DDP, L + DDP 组对 miR-221, miR-151 的表达有显著抑制作用 ($P < 0.01$)。与 DDP 组比较, H, M, L, H + DDP, M + DDP, L + DDP 均能显著上调 miR-122a 的表达 ($P < 0.01$), H + DDP 对 miR-221, miR-151 的表达有显著抑制作用 ($P < 0.01$)。见表 3。

4 讨论

细胞凋亡在肿瘤治疗中具有重要意义,以诱导肿瘤细胞凋亡为主的治疗方法已成为肿瘤治疗的新途径^[7]。有研究表明莪术油等抗肿瘤药物能下调 Bcl-2 表达,诱导肝癌细胞凋亡^[8-9]。本实验结果表明黄芪-莪术高、中剂量组能降低人肝癌裸鼠血清中 Bcl-2 含量,并与剂量呈正相关性,黄芪-莪术可能是作用于分子靶点 Bcl-2 而发挥诱导凋亡作用。黄芪-莪术联合顺铂能显著诱导肿瘤细胞凋亡,下调 Bcl-2 表达,尤其以黄芪-莪术高剂量联合顺铂组作用最为显著,诱导肿瘤细胞凋亡作用明显增加,提示二者合用具有协同增效作用。肿瘤细胞对化疗药物敏感性的差别来源于 Bcl-2 表达水平的高低,下调 Bcl-2 表达可提高化疗药物诱导凋亡的易感性,从而增强化疗药对肿瘤细胞的细胞毒作用,这可能是联合用药后抗肿瘤作用增强的机制。

在肝癌发生发展过程中, microRNA 不仅与细胞增殖、凋亡有关,还与肿瘤血管生成、侵袭转移有关,影响肝癌的整个进展过程。miR-122 是较早被发现且研究较为详细的一种 miRNA,定位于人染色体的 18q21.31,专一表达于成年人肝脏,占肝脏总 miRNA 的 70%^[10],参与肝细胞分化、增殖、凋亡,调控病毒感染、肝细胞表型维持以及肝细胞癌 (HCC) 等多种生物学过程。研究发现, miR-122 在人肝癌组织、细胞中的表达下调,并且其表达水平与患者预后密切相关^[11-12], miR-122 通过对靶基因 ADAM17 (a disintegrin and metalloprotease 17) 的调节可抑制肿瘤血管新生,影响 HCC 的肝内转移,在肝癌模型中 miR-122 也被证实参与肿瘤的发生、血管生成以及肝内转移^[11]。Gramantieri 等^[13]也发现 miR-122a 在 70% 肝细胞肝癌和所有的肝癌细胞系中表达降低。

Ding 等^[14]发现在 HCC 中 miR-151 及其宿主基因 FAK 高表达, miR-151 与 FAK 协同作用,激活 Ras 相关 C3 肉毒素底物 1 (Rac1), 细胞分裂周期蛋白

表 3 黄芪-莪术联合顺铂对人肝癌裸鼠肿瘤组织 miR-122a, miR-221, miR-151 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effects of Astragali Radix-Curcumae Rhizoma combined with cisplatin on expression levels of miR-122a, miR-221 and miR-151

($\bar{x} \pm s, n = 5$)

$2^{-\Delta\Delta Ct}$

| 组别 | 剂量/ $g \cdot kg^{-1}$ | miR-122a | miR-221 | miR-151 |
|-------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 模型 | - | 0.80 ± 0.17 | 0.81 ± 0.12 | 0.86 ± 0.11 |
| DDP | 0.002 | 0.79 ± 0.07 | 0.31 ± 0.01 ²⁾ | 0.31 ± 0.02 ²⁾ |
| 黄芪-莪术 | 12 | 5.18 ± 0.28 ^{2,3)} | 0.36 ± 0.05 ²⁾ | 0.37 ± 0.03 ²⁾ |
| | 6 | 4.66 ± 0.42 ^{2,3)} | 0.60 ± 0.02 ^{1,3)} | 0.57 ± 0.07 ^{2,3)} |
| 黄芪-莪术 + DDP | 3 | 2.51 ± 0.26 ^{2,3)} | 0.82 ± 0.06 ³⁾ | 0.83 ± 0.03 ³⁾ |
| | 12 + 0.002 | 6.12 ± 0.26 ^{2,3)} | 0.21 ± 0.02 ^{2,3)} | 0.19 ± 0.03 ^{2,3)} |
| | 6 + 0.002 | 4.73 ± 0.39 ^{2,3)} | 0.30 ± 0.05 ²⁾ | 0.36 ± 0.03 ²⁾ |
| | 3 + 0.002 | 3.70 ± 0.27 ^{2,3)} | 0.38 ± 0.06 ²⁾ | 0.38 ± 0.03 ²⁾ |

42 (Cdc42) 蛋白活性, 增加肝癌细胞的侵袭、转移能力, miR-151 基因在肝癌中高表达与肝癌的肝内转移呈正相关性。Gramantieri 等^[13] 则筛选出可以区分肝硬化与 HCC 组织的 miRNA, 相对于肝硬化组织而言, miR-221 在 HCC 中表达上调。Huang 等^[15] 发现在非病毒相关的肝癌及癌旁组织中, miR-221 等 18 个 miRNA 仅在癌组织中表达。

以上研究均说明, miR-122, miR-221, miR-151 的异常表达在肝癌的发生发展过程中发挥重要作用, 本研究结果发现, 顺铂对 miR-122a 的表达无明显影响, 但能下调 miR-221, miR-151 的表达, 黄芪-莪术对裸鼠肿瘤组织 miR-221, miR-151 的表达有明显抑制作用, 黄芪-莪术能显著上调 miR-122a 的表达; 黄芪-莪术联合顺铂后, 可显著上调 miR-122a 的表达, 对 miR-221, miR-151 的表达也有明显抑制作用, 尤其以黄芪-莪术高剂量联合顺铂组作用最为显著, 二者联合用药有协同增效作用。

黄芪-莪术联合顺铂后能够明显改变肝癌组织中异常的 miRNA 表达, 上调与肿瘤的发生发展、新生血管生成密切相关的 miR-122a 表达, 下调增加肝癌侵袭、转移能力的 miR-221, miR-151 表达, 这可能是其抗肿瘤作用的机制。

[参考文献]

[1] 吴孟超, 沈锋. 肝癌[M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2010; 310-311.

[2] 芮静安. 现代肝癌诊断治疗学[M]. 北京: 清华大学出版社, 2004; 57-67.

[3] 岳伟, 付伟, 毛小荣, 等. 莪术黄芪超滤膜提取物对人肝癌细胞株 HepG2 凋亡的诱导作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(5): 493-495.

[4] 高三民. 中药治疗肝癌 20 例[J]. 陕西中医, 2000, 21(3): 104-105.

[5] 臧文华, 唐德才, 尹刚, 等. 黄芪-莪术及联合顺铂对人肝癌裸鼠原位移植瘤生长的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5): 131-135.

[6] 唐德才, 臧文华, 冯海红. 莪术不同品种含药血清对人胃癌细胞 BGC823 增殖、凋亡及核质比的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2013, 36(4): 254-257.

[7] Reed J C. Apoptosis-targeted therapies for cancer[J]. Cancer Cell, 2003, 3(1): 17-22.

[8] 张维彬, 谭敏, 肖刚, 等. 莪术油诱导小鼠 HepA 肝癌细胞凋亡及其对 bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 现代中西医结合杂志, 2009, 18(4): 370-371.

[9] Efferth T, Kahl S, Paulus K, et al. Phytochemistry and pharmacogenomics of natural products derived from traditional Chinese medicine and Chinese materia medica with activity against tumor cells[J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(1): 152-161.

[10] Jopling C L, Norman K L, Sarnow P. Positive and negative modulation of viral and cellular mRNAs by liver-specific microRNA miR-122[J]. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 2006, 71(1): 369-376.

[11] Tsai W C, Hsu P W, Lai T C, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2009, 45(9): 1571-1582.

[12] Budhu A, Jia H L, Forgues M, et al. Identification of metastasis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008, 47(3): 897-907.

[13] Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al. Cyclin G₁ is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2007, 67(13): 6092-6099.

[14] Ding J, Huang S L, Wu S Q, et al. Gain of miR-151 on chromosome 8q24.3 facilitates tumour cell migration and spreading through downregulating RhoGDI A [J]. Nat Cell Biol, 2010, 12(4): 390-399.

[15] Huang Y S, Dai Y, Yu X F, et al. Microarray analysis of microRNA expression in hepatocellular carcinoma and nontumorous tissues without viral hepatitis [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2008, 23(1): 87-94.

[责任编辑 张丰丰]