

# 柯里拉京对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响

张志杨<sup>1</sup>, 朱磊<sup>1</sup>, 贾平<sup>1</sup>, 朱海杭<sup>1,2\*</sup>

(1. 扬州大学临床医学院, 江苏扬州 225001; 2. 江苏省苏北人民医院, 江苏扬州 225001)

**[摘要]** **目的:**研究柯里拉京对转移性人肝癌细胞 SMMC7721, MHCC97H 增殖、迁移和侵袭的影响,并探讨其作用机制。**方法:**分别通过四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 比色法,划痕实验,transwell 实验检测不同浓度的柯里拉京对肝癌细胞 SMMC7721, MHCC97H 的增殖、迁移和侵袭的作用;通过细胞免疫荧光法观察不同浓度柯里拉京对肝癌细胞 SMMC7721, MHCC97H 肌动蛋白纤维的分布、丝状和片状伪足形成等的影响;通过蛋白免疫印迹法 (Western blot) 研究柯里拉京抑制肝癌细胞增殖、迁移、侵袭的作用机制。**结果:**MTT 实验显示,柯里拉京抑制人肝癌细胞 SMMC7721, MHCC97H 增殖的半数抑制浓度 ( $IC_{50}$ ) 分别为  $388.67, 314.42 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。划痕实验显示,  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柯里拉京对 SMMC7721 细胞迁移的抑制作用最强, 迁移率为 12.16%;  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柯里拉京对 MHCC97H 细胞迁移的抑制作用最强, 迁移率为 9.84%。Transwell 实验显示,  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柯里拉京对 SMMC7721 细胞和 MHCC97H 细胞侵袭的抑制作用最强, 侵袭的细胞数分别为  $(40.44 \pm 3.01), (36.69 \pm 3.36)$  个。细胞免疫荧光显示,柯里拉京可使 SMMC7721, MHCC97H 中 F-肌动蛋白 (F-actin) 骨架发生重塑,浓度增高,细胞边缘的丝状伪足和片状伪足形成逐渐减少,张力纤维数目逐渐增多,这种影响在 SMMC7721 为  $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时最显著, MHCC97H 为  $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  最明显。Western blot 显示,柯里拉京能明显下调肝癌细胞 SMMC7721 和 MHCC97H 上皮-间充质转化 (EMT) 的钙黏附蛋白-N (N-Cad) 和波形蛋白 (Vimentin) 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 下调有丝分裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 通路的磷酸化-细胞外信号调节激酶 (p-ERK) 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 上调磷酸化-p38 (p-p38) 蛋白表达 ( $P < 0.05$ )。**结论:**柯里拉京能抑制 2 种人肝癌细胞 SMMC7721, MHCC97H 的增殖、迁移及侵袭,其作用机制可能是通过抑制 EMT 通路中的 N-Cad, Vimentin, MAPK 信号通路 p-ERK 蛋白表达和上调 p-p38 蛋白表达,从而调控细胞骨架重塑来实现的。

**[关键词]** 柯里拉京; 肝癌细胞 SMMC7721; 肝癌细胞 MHCC97H; 增殖; 迁移; 侵袭

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)21-0153-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20171210153

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170809.1125.032.html>

**[网络出版时间]** 2017-08-09 11:25

## Effect of Corilagin on Proliferation, Migration and Invasion of Human Liver Cancer Cells

ZHANG Zhi-yang<sup>1</sup>, ZHU Lei<sup>1</sup>, JIA Ping<sup>1</sup>, ZHU Hai-hang<sup>1,2\*</sup>

(1. Clinical Medical School of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China; 2. Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou 225001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of corilagin on the proliferation, migration and invasion of human liver cancer cells and its relevant mechanism. **Method:** Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, transwell chamber and wound healing assay were used to evaluate the effect of corilagin on cell viability, cell cycle progression and migration of human liver cancer cells. Immunofluorescence staining and Western blot assays were performed to explore the effect on F-actin distribution, formation of lamellipodia and filopodia, and expressions of relevant signal molecules. **Result:** The MTT assay demonstrated that the proliferation of SMMC7721 and MHCC97H cell were inhibited by different concentrations of corilagin. Half maximal inhibitory

**[收稿日期]** 20161227(010)

**[基金项目]** 扬州市科技局自然科学基金-青年科技人才项目 (YZ2014022)

**[第一作者]** 张志杨, 硕士, 从事消化内科研究, Tel:0514-87373295, E-mail:1016301347@qq.com

**[通讯作者]** \* 朱海杭, 主任医师, 教授, 从事消化内科研究, Tel:025-68551558, E-mail:zhuhaihang@medmail.com.cn

concentrations ( $IC_{50}$ ) at 48 h were 388.67, 314.42  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. Wound-healing assay showed that 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  corilagin exhibited the greatest inhibition on SMMC7721 cell, and 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  corilagin exhibited the greatest inhibition on MHCC97H cell. Transwell assay demonstrated that compared with negative control group, the number of penetrating cells in experimental group was decreased significantly. Immunofluorescence staining showed that corilagin can cause F-actin skeleton remodeling in SMMC7721 and MHCC97H cells. With higher concentrations, cell edge filopodia and lamellipodia formation gradually decreased, while fiber tension number increases gradually. This effect was significant in SMMC7721 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and obvious in MHCC97H 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ . Western blot showed that corilagin can significantly down-regulate protein expressions of N-Cad and Vimentin in EMT ( $P < 0.05$ ), and down-regulate MAPK pathway's p-ERK expression and increase p-p38 lightning protein expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Corilagin inhibited the proliferation, invasion and migration in human liver cancer cells *in vitro*. The mechanism may be correlated with the inhibition of N-Cad and Vimentin protein expressions and p-ERK expression, and up-regulation of p-p38 lightning protein expression.

[**Key words**] corilagin; SMMC7721 cell; MHCC97H cell; proliferation; invasion; migration

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,其死亡率在我国恶性肿瘤中排名第 2 位,已严重威胁着人类的健康<sup>[1]</sup>。肝癌转移侵袭是攻克肝癌的一个重大障碍,近几年肝癌细胞转移侵袭机制的基础研究取得较大的进展,但是临床上用于抗肝癌细胞转移侵袭的药物仍非常有限。柯里拉京作为植物药老鹳草、叶下珠、蜜柑草的主要活性成分,具有显著的抗肿瘤作用,广泛应用于老鹳草油、叶下珠复方、剔毒护肝方、抗肿瘤白莲 1 号方等多种抗肝癌中药方剂<sup>[2-6]</sup>。文献报道柯里拉京主要通过抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和迁移等作用来发挥抗肿瘤药效,已成为近年来热点研究的天然抗肿瘤活性化合物<sup>[7-8]</sup>。目前国内外对柯里拉京的抗肿瘤作用研究相对较少,尤其是柯里拉京抗肿瘤的药效作用机制研究尚未见报道,故观察柯里拉京对肝癌细胞增殖、转移、侵袭影响及作用机制探讨具有极其重要的意义。本实验以不同转移潜能的人肝癌细胞 SMMC7721, MHCC97H 为研究对象,研究不同浓度柯里拉京对 2 种肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响,并探讨其作用机制,为抗肿瘤转移的潜在药物柯里拉京的研究提供实验基础和理论依据。

## 1 材料

**1.1 药品** 老鹳草购于安徽亳州佰源堂药业销售有限公司,经扬州大学李洋博士鉴定为牻牛儿苗科植物老鹳草 *Geranium wilfordii* 的干燥地上部分,为 2015 年版《中国药典》一部收录的正品,凭证标签 (NO. 20110913) 存放于正大天晴药业股份有限公司化学部。称取老鹳草饮片 5 kg, 95% 乙醇浸渍 3 d 后取滤液,利用旋蒸抽干溶剂后,加入水 2 000 mL, 分别用 3 倍量三氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取 3

次,并进行浓缩,得乙酸乙酯部位浸膏 200.6 g。利用柱色谱法,采用三氯甲烷-甲醇梯度洗脱,对乙酸乙酯部位进行分离,得到活性化合物柯里拉京<sup>[9]</sup>。

**1.2 细胞** 肝癌细胞株 SMMC7721, MHCC97H 购于江苏凯基生物技术股份有限公司。

**1.3 仪器** CA-1480-2 型超净工作台(上海净化设备有限公司), MDF-C8V(N) 型 -80℃ 超低温冰箱(日本 Sanyo 公司), Thero311 型二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司), ELX808 型多功能酶标仪(美国 Bio-Tek 公司), 3599 型 transwell 小室(美国 Corning 公司), LDZX-50K 型倒置显微镜(日本 Nikon 公司), CKX53 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 1658001 型垂直电泳槽, Trans-Blot plus 型电转印槽(美国 Bio-Rad 公司)。

**1.4 试剂和试剂盒** 胎牛血清(上海洛神生物工程有限公司,批号 LS5002); DMEM 培养基, 噻唑蓝 (MTT), RPMI 1640 培养基(美国 Gibco 公司,批号分别为 KGM41500N-250, M2128-100MG, KGM31800S-500); matrigel 胶(美国 BD Biosciences 公司,批号 356234); 蛋白免疫印迹 (Western blot) chemiluminescence luminal kit(北京普利莱基因技术有限公司,批号 DW101-02); 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 美国 Sigma 公司,批号 D9542); 胰蛋白酶, SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒, 免疫荧光固定液(上海碧云天生物公司,批号分别为 40101ES25, P0012A, P0186); 超敏 ECL 化学发光试剂盒, BCA 蛋白定量试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号均为 GMS30026.4); 鼠抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH), 兔抗人钙黏附蛋白 E (E-Cad), 钙黏附蛋白-N (N-Cad),  $\beta$ -链蛋白 ( $\beta$ -catenin), 波形蛋白

(Vimentin), p38, p-p38, c-Jun 氨基末端激酶(JNK), 磷酸化-JNK(p-JNK), 细胞外信号调节激酶(ERK), 磷酸化-ERK(p-ERK)单克隆抗体(美国 CST 公司, 批号分别为 30203ES10, SR0609, SR0727, SR0625, SR0746, 9790T, 9215S, 9258S, 4668S, 12950S, 3371L)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** SMMC7721 细胞株用含 10% 灭活新生小牛血清及  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素和  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  链霉素的 RPMI 1640 培养基培养, 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5.0%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱中培养。MHCC97H 肝癌细胞株用 DMEM 培养液(加入 10% 胎牛血清,  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  青霉素和  $100 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$  链霉素), 在  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5.0%  $\text{CO}_2$  培养箱中常规培养, 细胞贴壁生长, 胰蛋白酶消化传代, 3~4 d 传代 1 次, 采用对数生长期的细胞进行实验。

**2.2 MTT 检测细胞增殖** 分别取 SMMC7721, MHCC97H 细胞接种于 96 孔板( $1 \times 10^4$  个/孔), 细胞贴壁生长良好后弃上清, 加入无血清培养液, 血清饥饿 24 h 后弃上清, 分别向 96 孔中加入不同浓度的柯里拉京, 按终浓度为 0, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  分组, 同时设溶剂组(仅含 DMEM 培养基)溶液 100  $\mu\text{L}$ , 每组设 5 个复孔, 同时设置调零孔, 继续培养 24 h 后, 每孔加入  $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 溶液 20  $\mu\text{L}$  作用 4 h, 加入二甲基亚砜(DMSO)150  $\mu\text{L}$ , 摇床振荡 10 min 使结晶物充分溶解。用酶标仪在 490 nm 波长处测定每孔吸光度  $A$ , 计算细胞生长抑制率。抑制率 =  $(A_{\text{空白}} - A_{\text{给药}}) / A_{\text{空白}} \times 100\%$ 。

**2.3 划痕实验检测细胞迁移** 分别取对数生长期 SMMC7721 和 MHCC97H 细胞进行培养, 待其长至 80%~90% 开始处理, 划出“伤痕”线(确保每组划痕宽度一致), 后用 PBS 轻柔漂洗细胞 2 次, 用以去除被刮起的漂浮细胞; 分别向对应孔中加入含相应浓度的药物(其中 SMMC7721 细胞为 0, 50, 100, 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , MHCC97H 细胞为 0, 30, 60, 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 于 0, 24, 48 h 时, 在倒置相差显微镜下拍照, 用 Photoshop 软件测量肝癌细胞的迁移距离, 伤口愈合率 = 细胞迁移表面积/划痕表面积  $\times 100\%$ 。

**2.4 transwell 检测细胞侵袭** 在无菌条件下, 将铺好基质胶的 transwell 板在室温下预热 10 min 后, 在上室中加入预热的无血清培养基 50  $\mu\text{L}$ , 进行水化,  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  下孵育 30 min。取对数生长期的 SMMC7721 和 MHCC97H 细胞进行培养, 过夜, 细胞贴壁后, 分

别给细胞 SMMC7721 加入浓度为 0, 50, 100, 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  柯里拉京溶液, MHCC97H 中加入浓度为 0, 30, 60, 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的柯里拉京溶液, 继续在培养箱中孵育 24 h。取出 transwell 小室, 小心吸弃上室中的培养基, 用棉签轻轻地拭去小室里未迁移的细胞, 风干。染色 20 min, 用清水将小室清洗几次, 晾干。在 100 倍显微镜下放置一块载玻片, 将 transwell 小室倒置放在上面, 随机选择 5 个视野观察细胞, 计数。

**2.5 免疫荧光检测细胞骨架重塑** 取处于对数生长期的 SMMC7721 和 MHCC97H 细胞常规培养、消化处理, 制备单个细胞悬浮液, 计数后调整细胞密度并将细胞接种于含无菌盖玻片的 6 孔细胞培养板中, 分别加入含不同浓度柯里拉京(SMMC7721 细胞为 0, 50, 100, 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , MHCC97H 细胞为 0, 30, 60, 120  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 10% 胎牛血清 DMEM 培养基中; 置于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  饱和湿度的培养箱中培养 24 h; 待细胞生长至 70%~80% 时, 取出含盖玻片的 6 孔板, 用 PBS 充分漂洗 2 次, 每次 5 min; 用含 4% 多聚甲醛固定液固定约 30 min, PBST 充分漂洗; 加入含 0.2% 的 triton X-100 溶液透化 10 min, 再用 PBST 充分漂洗; 用含 3% 牛血清白蛋白(BSA)在常温下封闭 1~2 h 后, 用 PBST 漂洗; 用已稀释的罗丹明标记的鬼笔环肽溶液室温避光孵育 1 h, PBST 充分漂洗; 再用  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  DAPI 溶液避光染色 10 min, PBST 充分漂洗 3 次, 每次 5 min; 随后加入抗荧光淬灭剂封片并避光保存; 置于正置荧光显微镜下观察并在相应波长下进行随机拍照。每个实验组随机拍 10 个视野, 实验重复 3 次。

**2.6 Western blot 检测蛋白相对表达** 细胞加药及培养同 2.5 项, 培养 48 h 后, 根据蛋白提取试剂盒操作说明书, 离心收集细胞, 提取细胞总蛋白, 并进行蛋白定量。12% SDS-PAGE 电泳, 电转至硝酸纤维素(NC)膜上, 封闭液封闭, 加入一抗(目的蛋白抗体 1:1 000, GAPDH 1:1 万)  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  孵育过夜, TBST 漂洗后加入相应二抗室温孵育 2 h, TBST 洗涤; 化学发光法显色, 胶片用凝胶成像系统扫描灰度值分析。即目标蛋白/内参表示蛋白相对表达。

**2.7 统计学方法** 运用 SPSS 16.0 软件进行分析, 实验数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 实验组比较用方差分析, 并采用  $t$  检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 柯里拉京对人肝癌细胞增殖作用的影响** 不同浓度柯里拉京对 SMMC7721 和 MHCC97H 细胞的抑

制作用不同。柯里拉京 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时 SMMC7721 细胞存活率明显下降 ( $P < 0.05$ ), 柯里拉京 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时 MHCC97H 细胞存活率明显下降 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

表 1 柯里拉京对 2 种人肝癌细胞存活率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 1 Effect of corilagin on survival rate of SMCC7721 cells and MHCC97H cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ ) %

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SMMC7721	MHCC97H
蛋白	-	100 $\pm$ 0.00	100 $\pm$ 0.00
柯里拉京	50	97 $\pm$ 1.31	99 $\pm$ 0.87
	100	90 $\pm$ 2.74	80 $\pm$ 3.16
	200	86 $\pm$ 1.96 <sup>1)</sup>	58 $\pm$ 2.04
	300	51 $\pm$ 3.02 <sup>1)</sup>	55 $\pm$ 1.79 <sup>1)</sup>
	400	47 $\pm$ 1.77 <sup>1)</sup>	49 $\pm$ 2.32 <sup>1)</sup>
	500	38 $\pm$ 0.99 <sup>1)</sup>	42 $\pm$ 3.03 <sup>1)</sup>
	600	34 $\pm$ 2.18 <sup>1)</sup>	30 $\pm$ 2.71 <sup>1)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (表 2~8 同)。

表 2 柯里拉京对 2 种人肝癌细胞增殖的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of corilagin on proliferation of SMCC7721 cells and MHCC97H cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	SMMC7721			MHCC97H		
	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/%	IC <sub>50</sub> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	存活率/%	IC <sub>50</sub> / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
空白	-	100	-	-	100	-
柯里拉京	50	98.43 $\pm$ 2.15	388.67 $\pm$ 2.31	30	99.49 $\pm$ 1.44	314.42 $\pm$ 1.98
	100	95.20 $\pm$ 3.26		60	98.38 $\pm$ 1.27	
	200	82.19 $\pm$ 2.07		120	90.69 $\pm$ 2.29	
	400	42.12 $\pm$ 3.46 <sup>1)</sup>		240	50.89 $\pm$ 3.10 <sup>1)</sup>	
	600	33.38 $\pm$ 1.17 <sup>1)</sup>		480	38.27 $\pm$ 1.08 <sup>1)</sup>	

表 3 柯里拉京对 2 种人肝癌细胞迁移的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of corilagin on migration of SMCC7721 cells and MHCC97H cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	SMMC7721		MHCC97H	
	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	迁移率/%	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	迁移率/%
空白	-	40.75	-	46.47
柯里拉京	50	28.34	30	18.73 <sup>1)</sup>
	100	21.41 <sup>1)</sup>	60	15.69 <sup>1)</sup>
	200	12.16 <sup>1)</sup>	120	9.84 <sup>1)</sup>

3.3 柯里拉京对人肝癌细胞侵袭作用的影响 柯里拉京可抑制 SMMC7721, MHCC97H 细胞侵袭, 呈浓度依赖性, 浓度越大, 抑制作用越强。与空白组比较, 柯里拉京 50, 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组可明显抑制

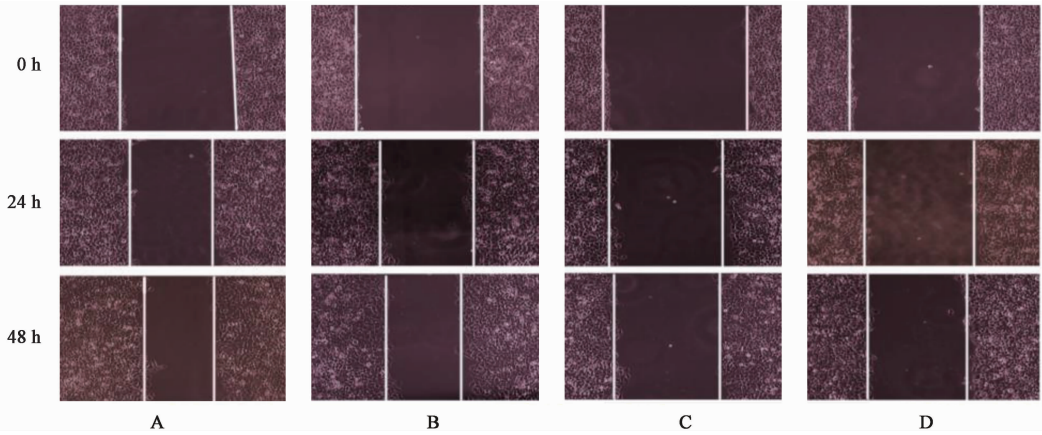
不同浓度柯里拉京对人肝癌细胞 SMMC7721 和 MHCC97H 增殖抑制作用不同。在 24 h 时, 与空白组比较, 柯里拉京 400, 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组能明显抑制 SMMC7721 细胞增殖 ( $P < 0.05$ ), 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  抑制作用最强; 柯里拉京 240, 480  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组能明显抑制 MHCC97H 细胞增殖 ( $P < 0.05$ ), 480  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  抑制作用最强。柯里拉京抑制 SMMC7721, MHCC97H 细胞增殖的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>) 分别为 388.67, 314.42  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 见表 2。

3.2 柯里拉京对人肝癌细胞迁移作用的影响 不同浓度柯里拉京组可抑制 SMMC7721, MHCC97H 细胞的迁移, 呈浓度依赖性, 浓度越大, 抑制作用越强。与空白组比较, 柯里拉京 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组可明显抑制 SMMC7721 细胞迁移 ( $P < 0.05$ ), 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柯里拉京抑制作用最强; 柯里拉京 30, 60, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组可明显抑制 MHCC97H 细胞迁移 ( $P < 0.05$ ), 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柯里拉京抑制作用最强。见表 3, 图 1, 2。

SMMC7721 细胞侵袭 ( $P < 0.05$ ), 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柯里拉京抑制作用最强; 柯里拉京 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组可明显抑制 MHCC97H 细胞侵袭 ( $P < 0.05$ ), 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柯里拉京抑制作用最强。见表 4。

3.4 柯里拉京对人肝癌细胞肌动蛋白细胞骨架重塑的影响 与空白组比较, 随着柯里拉京浓度的增加, SMMC7721 和 MHCC97H 细胞边缘的丝状伪足和片状伪足形成逐渐减少, 细胞中张力纤维数目增加, 且具有一定的浓度依赖性, 其中 SMMC7721 细胞在为柯里拉京 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时最明显, MHCC97H 细胞在为柯里拉京 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时最明显。见图 3, 4。

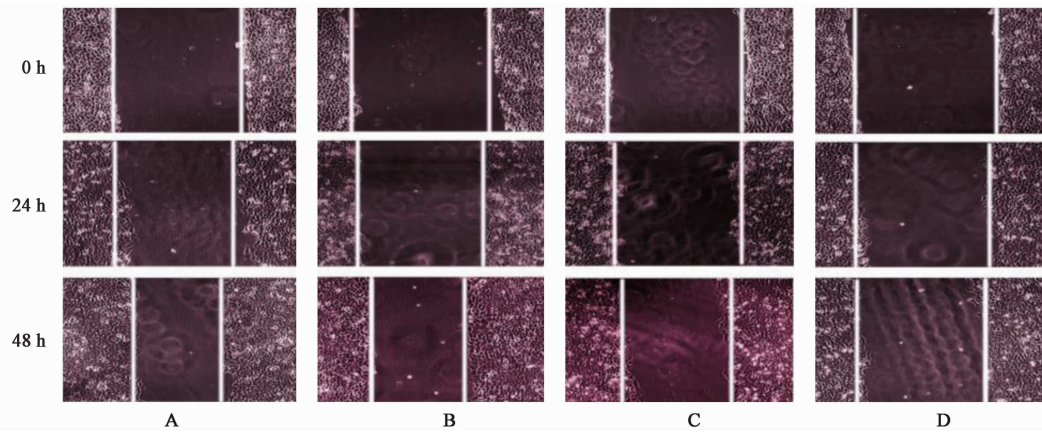
3.5 柯里拉京对人肝癌细胞蛋白表达的影响 与空白组比较, 柯里拉京 50, 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  能明显下调 SMMC7721 细胞 N-Cad 和 Vimentin 蛋白表达



A. 空白组; B ~ D. 柯里拉京 50, 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 (图 3, 5, 6 同)

图 1 柯里拉京对 SMMC7721 细胞迁移的影响 (倒置显微镜,  $\times 200$ )

Fig. 1 Effect of corilagin on SMMC7721 cells migration (inverted microscope,  $\times 200$ )



A. 空白组; B ~ D. 柯里拉京 30, 60, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  组 (图 4, 7, 8 同)

图 2 柯里拉京对 MHCC97H 细胞迁移的影响 (倒置显微镜,  $\times 200$ )

Fig. 2 Effect of corilagin on MHCC97H cells migration (inverted microscope,  $\times 200$ )

表 4 柯里拉京对 2 种人肝癌细胞侵袭细胞数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of corilagin on invasion cells of SMCC7721 and MHCC97H cells ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度 $/\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	SMMC7721	MHCC97H
空白	-	100.32 $\pm$ 2.14	105.61 $\pm$ 4.87
柯里拉京	50	58.35 $\pm$ 2.43 <sup>1)</sup>	95.46 $\pm$ 4.68
	100	51.76 $\pm$ 2.69 <sup>1)</sup>	75.87 $\pm$ 2.14 <sup>1)</sup>
	200	40.44 $\pm$ 3.01 <sup>1)</sup>	36.69 $\pm$ 3.36 <sup>1)</sup>

( $P < 0.05$ ), 对 E-Cad 和  $\beta$ -Cat 表达没有明显作用。见图 5, 表 5。柯里拉京能明显下调 SMMC7721 细胞 p-ERK 蛋白表达, 上调 p-p38 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 对 p-Akt 和 p-JNK 的表达没有明显作用。见表 6, 图 6。

与空白组比较, 柯里拉京 60, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  能明显下调 MHCC97H 细胞 N-Cad 和 Vimentin 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 对 E-Cad 和  $\beta$ -Cat 表达没有明显作用。见表 7, 图 7。与空白组比较, 柯里拉京 60, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  能明显下调 MHCC97H 细胞 p-ERK 蛋白表达, 上调 p-p38 蛋白表达 ( $P < 0.05$ ), 对 p-Akt 和 p-JNK 的表达没有明显作用。见表 8, 图 8。

#### 4 讨论

近年来肝癌发病率逐年增高, 在中国, 肝癌已经成为发病率最高的癌症之一, 严重威胁着人类的健康。其中, 肝癌细胞的无限增殖和扩散转移是导致肝癌患者高发死亡率的重要原因。肿瘤细胞的增殖和迁移是一个多步骤、多环节的生物学过程, 与肿瘤细胞免疫癌基因的激活表达异常、细胞运动能力、骨架异常、基质降解、肿瘤血管形成等密切相关。

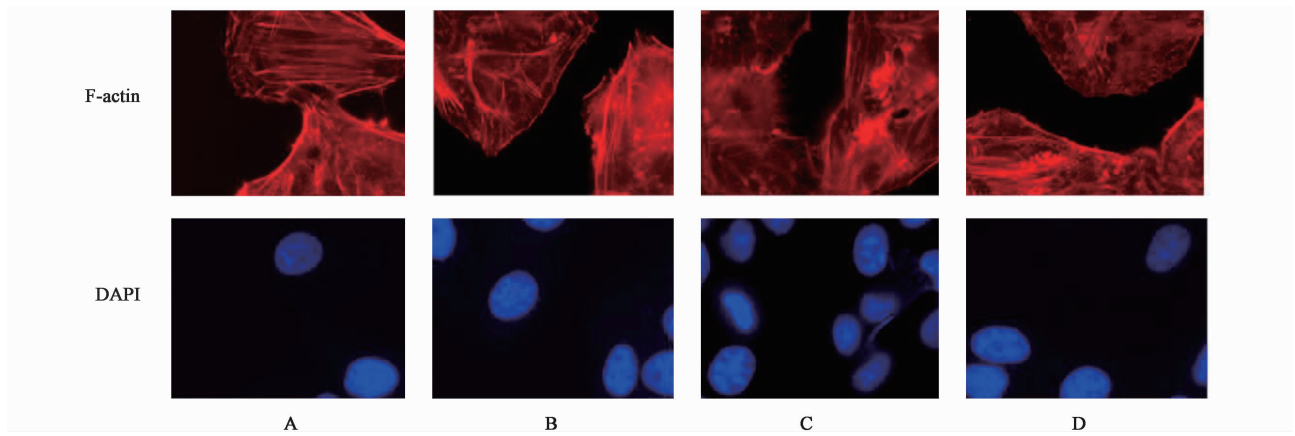


图 3 柯里拉京对 SMMC7721 细胞骨架的影响(鬼笔环肽, ×400)

Fig. 3 Effect of coriagin on cytoskeleton of SMCC7721 cells(phalloidin, ×400)

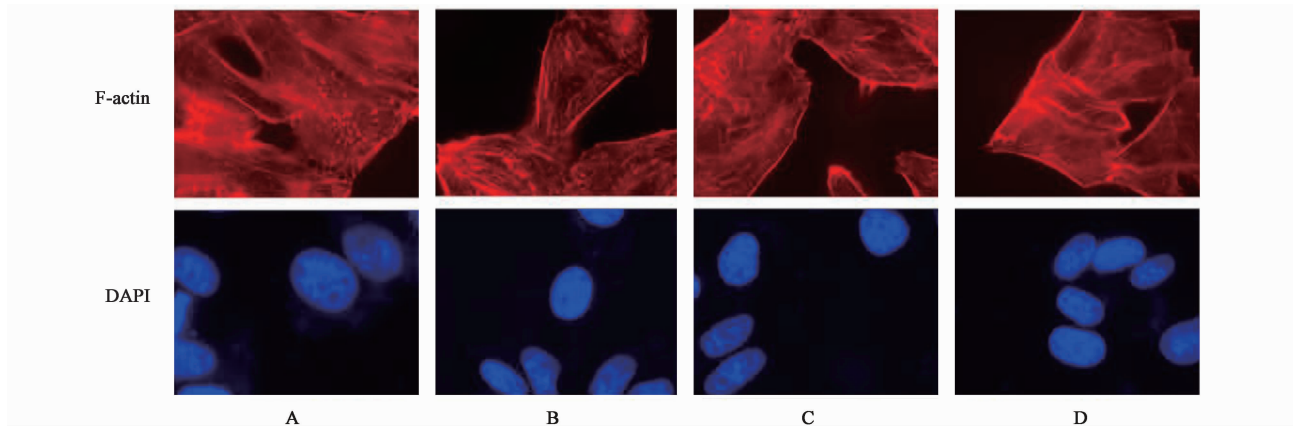


图 4 柯里拉京对 MHCC97H 细胞骨架的影响(鬼笔环肽, ×400)

Fig. 4 Effect of coriagin on cytoskeleton of MHCC97H cells(phalloidin, ×400)

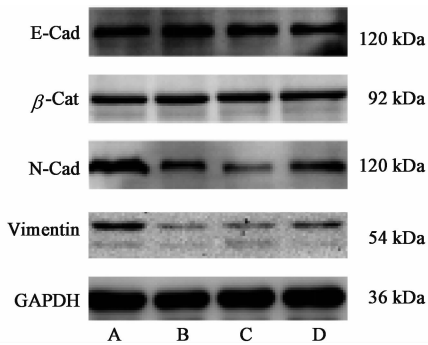


图 5 SMMC7721 细胞 EMT 相关蛋白表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of EMT in SMMC7721 cells treated with corilagin

表 5 柯里拉京对 SMMC7721 EMT 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of protein expression of EMT in SMMC7721 cells treated with corilagin( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	E-Cad/GAPDH	$\beta$ -Cat/GAPDH	N-Cad/GAPDH	Vimentin/GAPDH
空白	-	1.00	1.00	1.00	1.00
柯里拉京	50	1.23 ± 0.56	1.18 ± 1.03	0.57 ± 0.49 <sup>1)</sup>	0.48 ± 1.10 <sup>1)</sup>
	100	1.18 ± 0.43	1.13 ± 0.87	0.38 ± 0.98 <sup>1)</sup>	0.47 ± 1.24 <sup>1)</sup>
	200	0.92 ± 0.14	0.98 ± 0.12	0.46 ± 0.09 <sup>1)</sup>	0.49 ± 0.18 <sup>1)</sup>

其中,EMT 被认为是肿瘤细胞获取迁移和侵袭能力的重要步骤,通常发生 EMT 后,肿瘤细胞会丧失本身的上皮样特性而具有某些间质细胞的特性,从而促使细胞的迁移和侵袭<sup>[10]</sup>。有文献报道,柯里拉京作用于胆管细胞癌、肺癌、喉癌等细胞后可抑制细胞的增殖、侵袭和迁移<sup>[7-8]</sup>,而尚未见报道对肝癌细胞抑制作用研究,故本文选取 2 种代表性人肝癌细胞 SMMC7721, MHCC97H 为研究对象,对柯里拉京对肝癌细胞增殖、侵袭、迁移等抑制作用进行研究。

结果显示柯里拉京对不同转移潜能的肝癌

表 6 柯里拉京对 SMMC7721 MAPK 通路蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 6 Effect of protein expression of MAPK in SMMC7721 cells treated with corilagin ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	p-ERK/ERK	p-p38/p38	p-Akt/Akt	p-JNK/JNK
空白	-	1.00	1.00	1.00	1.00
柯里拉京	50	0.54 ± 0.87 <sup>1)</sup>	2.56 ± 0.54 <sup>1)</sup>	1.07 ± 0.76	1.02 ± 1.14
	100	0.55 ± 0.99 <sup>1)</sup>	4.57 ± 0.67 <sup>1)</sup>	0.93 ± 0.74	0.98 ± 0.75
	200	0.52 ± 0.65 <sup>1)</sup>	4.56 ± 0.79 <sup>1)</sup>	1.16 ± 0.92	1.12 ± 0.99

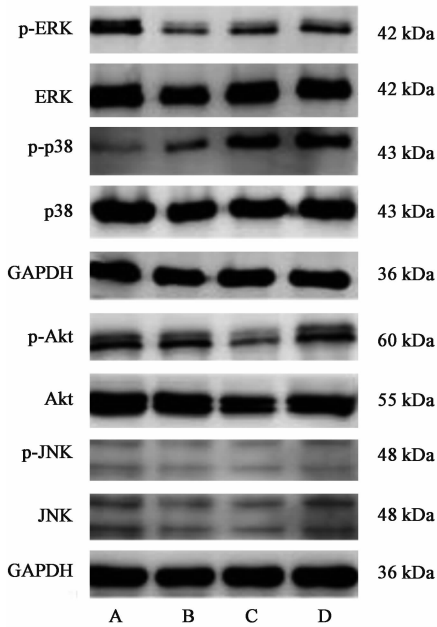


图 6 SMMC7721 细胞 MAPK 相关蛋白表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of MAPK in SMMC7721 cells treated with corilagin

表 7 柯里拉京对 MHCC97H EMT 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Effect of protein expression of EMT in MHCC97H cells treated with corilagin ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	E-Cad/GAPDH	$\beta$ -Cat/GAPDH	N-Cad/GAPDH	Vimentin/GAPDH
空白	-	1.00	1.00	1.00	1.00
柯里拉京	30	1.05 ± 0.67	0.97 ± 1.14	0.79 ± 0.59	0.77 ± 0.31
	60	0.88 ± 1.00	1.08 ± 0.54	0.58 ± 0.21 <sup>1)</sup>	0.42 ± 0.44 <sup>1)</sup>
	120	1.01 ± 0.90	0.90 ± 0.74	0.35 ± 0.30 <sup>1)</sup>	0.38 ± 0.10 <sup>1)</sup>

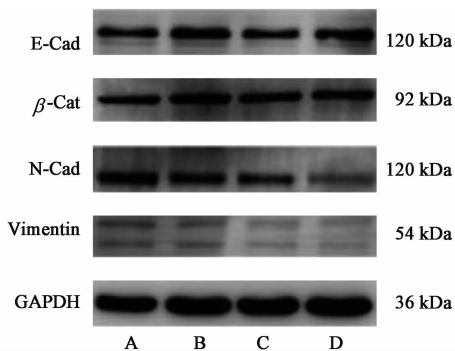


图 7 MHCC97H 细胞 EMT 相关蛋白表达电泳

Fig. 7 Electrophoresis of EMT in MHCC97H cells treated with corilagin

SMMC7721 和 MHCC97H 细胞均有抑制作用,并且呈现出一定的浓度依赖性,两种肝癌细胞对药物的敏感性并不一致;其中 SMMC7721 在柯里拉京 300  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  活性下降最为明显, MHCC97H 细胞在柯里拉京 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  活性下降最为明显。为进一步研究 2 种细胞对药物的敏感差异性,本实验分别对 SMMC7721 和 MHCC97H 细胞检测活力,结果显示 SMMC7721 细胞在柯里拉京 400  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时细胞活力下降最明显,而 MHCC97H 细胞则在柯里拉京 240  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时下降最明显。综合比较 2 次细胞活力检测结果,本实验处理 SMMC7721 细胞选取 50, 100, 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柯里拉京, MHCC97H 选取 30, 60, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  柯里拉京进行后续实验。

结果表明,柯里拉京对 SMMC7721 和 MHCC97H 细胞迁移、侵袭的均有抑制作用,并且与时间及浓度均呈依赖性。2 种肝癌细胞中细胞骨架均有改变,而且随柯里拉京浓度的升高,2 种细胞边

缘的丝状伪足和片状伪足形成越来越少,细胞中张力纤维数目也明显增加,提示柯里拉京抑制 SMMC7721 和 MHCC97H 细胞的迁移和侵袭能力,可能是通过促进肝癌细胞骨架蛋白重塑,增加张力纤维数目,抑制丝状伪足及片状伪足形成而实现的。

柯里拉京能明显下调 2 种肝癌细胞中 N-Cad 和 Vimentin 的表达,而对 E-Cad,  $\beta$ -catenin 蛋白的表达均没有显著改变,提示柯里拉京可能通过下调 N-Cad, Vimentin 等 EMT 的间质标记蛋白的表达、调控细胞骨架蛋白重构进而抑制肝癌细胞转移及侵袭。

表 8 柯里拉京对 MHCC97H MAPK 通路蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 8 Effect of protein expression of MAPK in MHCC97H cells treated with corilagin ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	p-ERK/ERK	p-p38/p38	p-Akt/Akt	p-JNK/JNK
空白	-	1.00	1.00	1.00	1.00
柯里拉京	30	0.71 $\pm$ 0.34 <sup>1)</sup>	0.95 $\pm$ 0.64	0.98 $\pm$ 0.75	1.12 $\pm$ 0.74
	60	0.69 $\pm$ 0.22 <sup>1)</sup>	1.51 $\pm$ 1.24 <sup>1)</sup>	1.08 $\pm$ 0.65	1.03 $\pm$ 0.70
	120	0.58 $\pm$ 0.45 <sup>1)</sup>	1.49 $\pm$ 1.38 <sup>1)</sup>	1.06 $\pm$ 0.72	0.98 $\pm$ 0.71

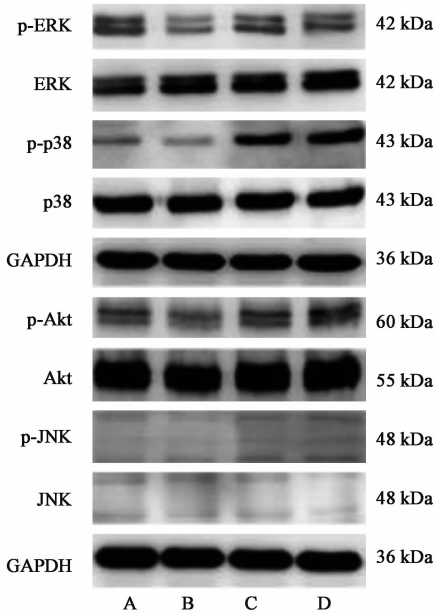


图 8 MHCC97H 细胞 MAPK 相关蛋白表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of MAPK in MHCC97H cells treated with corilagin

结果显示,不同浓度的柯里拉京均可以下调细胞 ERK 磷酸化水平,并有浓度依赖性,药物浓度最高时,ERK 的磷酸化水平下调也最明显,柯里拉京还可以上调 p38 磷酸化,而对 JNK 的磷酸化水平则无明显影响。结果提示,柯里拉京对肝癌细胞中 MAPK 通路中的 ERK 和 p38 磷酸化蛋白均有影响。有研究表明,下调磷酸化的 ERK 可以抑制细胞增殖、促进凋亡、抑制细胞侵袭并影响细胞分化<sup>[11]</sup>。p38 蛋白上调则可能通过促进细胞的凋亡而产生作用。本实验结果提示 MAPK 信号通路与肝癌细胞的 EMT 过程呈正相关,MAPK 信号通路可能调控或部分参与调控 EMT 过程,影响细胞骨架重塑,进而抑制肝癌细胞的迁移和侵袭过程。

综上所述,柯里拉京抑制肝癌细胞迁移和侵袭,其机制可能是通过活化 MAPK 信号通路,抑制细胞 EMT 进程,诱导细胞发生骨架重塑来影响细胞的

运动能力,但柯里拉京对肝癌细胞具体的作用机制以及 MAPK 信号通路对 EMT 的调控作用还有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Siegel R, MA J, ZOU Z, et al. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 9-29.

[2] 王洪成,尹海波,谷靖逸,等. HPLC 同时测定不同产地野老鹳草中 5 种活性成分含量[J]. 辽宁中医杂志, 2015, 42(4): 834-836.

[3] 陈蕙芳. 治疗多种癌症的老鹳草油和紫杉醇等植物活性成分组方[J]. 现代药物与临床, 2009, 24(6): 378.

[4] 魏春山. 叶下珠及其复方对 HBx 介导肝癌 VEGFR3 表达的影响[D]. 广州: 广州中医药大学, 2012.

[5] 蒋小玲,邓欣,聂广,等. 剔毒护肝方及其拆方对人肝癌细胞增殖及端粒酶活性的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2004, 14(2): 91-92.

[6] 庞声航. 抗肿瘤白莲 I 号方[J]. 广西中医药, 2008, 31(4): 34.

[7] 陈玉武,任丽娟. 蜜柑草抗癌有效成份研究[J]. 中草药, 1997, 28(4): 198-202.

[8] 张树峰,明艳林,林毅,等. 叶下珠属植物活性成分柯里拉京研究进展[J]. 亚热带植物科学, 2010, 39(4): 79-83.

[9] ZHANG X Q, GU H M, LI Y, et al. Anti-helicobacter pylori compounds from the ethanol extracts of *Geranium wilfordii* [J]. J Ethnopharmacol, 2013, 147(1): 204-207.

[10] HA G H, Park J S, Breuer E K. TACC3 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) through the activation of PI3K/Akt and ERK signaling pathways [J]. Cancer Lett, 2013, 332(1): 63-73.

[11] Park E J, Chung H J. ERK and GSK-3/ $\beta$ -catenin signaling by pinosyl *vin* inhibits the growth of human colorectal cancer cells [J]. Food Chem Toxicol, 2013, doi:10.1016/j.fct.2013.01.007.

[责任编辑 张丰丰]