

消癌解毒方诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞 miRNA 表达变化

徐力立¹, 陈慧¹, 吴铭杰¹, 陈海彬¹, 李文婷¹, 沈政洁², 上官端丹³, 董凡¹,
李林晚¹, 周红光^{1,4*}

(1. 南京中医药大学江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京 210023;
2. 张家港市第一人民医院, 江苏 张家港 215600; 3. 句容市中医院, 江苏 句容 212400;
4. 江苏省中医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨消癌解毒方对人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖及微小核糖核酸(microRNA, miR)-25-3p, miR-29a-5p, miR-122-3p, miR-124-3p, miR-182-5p 表达谱的影响。方法:将 12 只雄性大耳白兔随机分为 4 组,分别为消癌解毒方高、中、低剂量(15.12, 7.56, 3.78 g·kg⁻¹)组和空白组,各组分别给予消癌解毒方及生理盐水灌胃 4 d。4 d 后于颈动脉中取血清并配制培养基。用消癌解毒方(15.12, 7.56, 3.78 g·kg⁻¹)含药血清及空白血清的培养基处理人肝癌细胞株 SMMC-7721, 噻唑蓝(MTT)比色法检测肿瘤细胞增殖活性,实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(Real-time polymerase chain reaction, Real-time PCR)法验证人肝癌细胞 SMMC-7721 中 miR-25-3p, miR-29a-5p, miR-122-3p, miR-124-3p 和 miR-182-5p 的表达水平。结果:经过 12, 24, 48 h 后,消癌解毒方(15.12, 7.56, 3.78 g·kg⁻¹)含药血清对人肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖均存在抑制作用。随着消癌解毒方含药血清浓度的增加,其对肝癌细胞 SMMC-7721 细胞增殖的抑制率也相应增加。其中高剂量组含药血清的抑制效果最好,其干预 12, 48 h 的吸光度 A 较同期空白组明显降低(P < 0.05)。高剂量组干预 24 h A 比同期空白组显著降低(P < 0.01),该组抑制率为 42.86%。Real-time PCR 证实消癌解毒方(15.12, 7.56, 3.78 g·kg⁻¹)含药血清的培养基能诱导 miR-25-3p, miR-182-5p 表达下调,诱导 miR-29a-5p, miR-122-3p, miR-124-3p 表达上调。且高剂量组的调控作用较空白组更显著(P < 0.01)。结论:消癌解毒方可能通过诱导 miRNA 表达谱的改变而参与抑制人肝癌细胞 SMMC-7721 增殖作用,但其具体机制仍有待进一步研究。

[关键词] 癌毒; 消癌解毒方; 肝癌 SMMC-7721 细胞; 微小核糖核酸; 抑制增殖

[中图分类号] R22; R285.5; R273; R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)07-0089-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20180616

miRNA Expression of SMMC-7721 Cell Induced by Xiaoi Jiedu Formula

XU Li-li¹, CHEN Hui¹, WU Ming-jie¹, CHEN Hai-bin¹, LI Wen-ting¹, SHEN Zheng-jie²,
SHANGGUAN Duan-dan³, DONG Fan¹, LI Lin-wan¹, ZHOU Hong-guang^{1,4*}

(1. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Tumor Prevention and Treatment with
Traditional Chinese Medicine (TCM), Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China;
2. Zhangjiagang First People's Hospital, Zhangjiagang 215600, China;
3. Jurong Hospital of TCM, Jurong 212400, China;
4. Jiangsu Province Hospital of TCM, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Xiaoi Jiedu formula on the proliferation of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells and expression profiles of microRNA (miR) -25-3p, miR-29a-5p, miR-122-3p, miR-124-3p and miR-182-5p. **Method:** Twelve male white rabbits were randomly divided into four groups. They were respectively given high-dose, middle-dose and low-dose Xiaoi Jiedu formula or normal saline for four

[收稿日期] 20170731(004)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81473608);江苏省大学生创新训练计划项目(201610315042Z,201710315060Y)

[第一作者] 徐力立,从事中西医结合临床研究, E-mail:923414871@qq.com

[通信作者] *周红光,博士,副教授,副主任中医师,从事中西医结合抗肿瘤研究, E-mail:zhouhongguang2288@163.com

days. Serum was taken from their carotid blood and then made into culture medium. Cytotoxicity of Xiaoi Jiedu formula against SMMC-7721 cells was measured by 3- (4, 5-dimethyl-2-thiazolyl) -2, 5-diphenyl-2-H-tetrazolium bromide (MTT) assay. Expression profiles of miR-25-3p, miR-29a-5p, miR-122-3p, miR-124-3p and miR-182-5p of SMMC-7721 cells were analyzed by a miRNA array and Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** High-dose, middle-dose and low-dose Xiaoi Jiedu formula could all inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells after 12, 24, 48 h. Xiaoi Jiedu formula gradually increased the proliferation inhibition rate of SMMC-7721 cells in a dose-dependent manner, with the increase of drug concentration. The absorbancy of the high-dose group showed statistical differences after 12 h and 48 h compared with blank control group at the same time points ($P < 0.05$). The absorbancy of the high-dose group showed statistically significant differences after 24 h compared with the blank control group at the same time point ($P < 0.01$). The absorbancy of the high dose group after intervention for 24 h was significantly lower than that of blank control group ($P < 0.01$), the group's inhibition rate was 42.86%. Moreover, Real-time PCR verified the down-regulation of miR-25-3p, miR-182-5p and the up-regulation of miR-29a-5p, miR-122-3p, miR-124-3p induced by Xiaoi Jiedu formula. The regulatory effect of the high-dose group was more significant than that of the blank control group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Xiaoi Jiedu formula may inhibit the proliferation of SMMC-721 by inducing the change in microRNA (miRNA) expression. However, the concrete mechanism remains to be further studied.

[**Key words**] cancerous toxin; Xiaoi Jiedu formula; hepatocarcinoma SMMC-7721 cell; microRNA; proliferation inhibition

肝癌已经成为世界上第 2 大常见的致死癌症。国内 2010 年的统计资料显示,其发生率达 29/10 万,死亡率达 28.1/10 万,肝癌的防治面临着严峻的挑战^[1]。其发病率逐年增高,起病隐匿,早期诊断困难^[2]。近年来,学者们对微小核糖核酸 (microRNA, miRNA) 的研究不断深入,研究指出 miRNA 可作为新的肿瘤标志物和治疗靶点运用于肝癌的防治^[3]。

“癌毒”病机理论是国医大师周仲瑛教授(周老)认识肿瘤病机的核心理论之一。周老认为正虚是肿瘤发生的基础,而癌毒侵犯是肿瘤发生的必要条件。即在机体气血津液亏虚的基础之上,火郁、热毒、痰聚、湿浊等癌毒侵袭人体,并与体内的病理性产物互为因果,兼夹为病^[4]。随着肿瘤的发生发展,癌毒逐渐亢盛,故抗癌解毒应是癌症治疗过程中的重点^[5]。在此基础之上,针对恶性肿瘤的治疗,周老提出“消癌解毒,扶正祛邪”的原则,创制了中医抗肿瘤验方——消癌解毒方。前期研究表明消癌解毒方可抑制 S180, H22 诱发的移植性肿瘤,抑制 Survivin 蛋白的表达,下调趋化因子信号通路中 CCL3, CXC 趋化因子配体 2 (CXCL2) 等基因的表达,降低转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 的水平,抑制血管内皮生长因子 (VEGF) 生成,降低基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 活性,影响 Toll 样受体 (TLRs)/核转录因子 (NF)- κ B 信号转导通路^[6]。李文婷等^[7]

认为消癌解毒方抗肿瘤机制之一可能为其抑制端粒酶活性、调控凋亡相关 mRNA 的表达。基于前期研究,消癌解毒方已被授予专利(专利号 ZL201110313737.5)。

从现代医学的角度,“癌毒”病机理论可通过肿瘤炎症微环境来解释。本课题组前期已从 miRNA 调控基因的角度对消癌解毒方的抗肿瘤机制进行理论分析^[8]。本实验旨在通过研究消癌解毒方对人肝癌 SMMC-7721 细胞株的抑制增殖以及相关 miRNA 的表达变化,以探讨 miRNA 参与调控消癌解毒方抗肝癌作用的可能机制。

1 材料

1.1 细胞 人肝癌 SMMC-7721 细胞株由南京中医药大学基础医学院实验室提供,最初购自上海细胞库,传至第 6 代。

1.2 动物 清洁级健康雄性大耳白兔,体质量 2.0 ~ 2.5 kg,购自江苏省南京市江宁区青龙山动物繁殖场,合格证号 SCXK(苏)2012-0008。所有动物实验研究均符合南京中医药大学实验动物伦理委员会有关动物研究指导原则。

1.3 药物 消癌解毒方由太子参 15 g,麦冬 12 g,白花蛇舌草 20 g,山慈菇 10 g,僵蚕 10 g,蜈蚣 3 条和八月札 12 g,按特定剂量比例组成,中药制剂购自安徽省亳州市中西药有限公司,方中药材由南京中医药大学吴德康教授鉴定为正品,由南京中医药

大学动物实验中心煎制,浓缩成含生药 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的滤液,保存备用。

1.4 试剂 胎牛血清(FBS),RPMI 1640 培养基,胰蛋白酶(Gibco 公司,批号分别为 1698221,8116383,1810640),磷酸缓冲盐溶液(PBS,Hyclone 公司,批号 AAJ207798),二甲基亚砷

(DMSO,汕头市西陇化工有限公司,批号 090116),trizol(Invitrogen 公司,批号 15596-026),cDNA 第一链合成试剂盒(Thermo Fisher 公司,批号 K1622),Real-time PCR Master Mix (SYBR Green,Toyobo 公司,批号 QPR-201)。相关引物序列由南京思普金科技有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列	长度/bp
hsa-miR-25-3p	上游 5'-ACACTCCAGCTGGGCATTGCACCTGTCTCG-3'	54
	下游 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTCAGACCG-3'	
hsa-miR-29a-5p	上游 5'-ACACTCCAGCTGGGACTGATTTCTTTTGGT-3'	54
	下游 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGCTGAACAC-3'	
hsa-miR-122-3p	上游 5'-ACACTCCAGCTGGGAACGCCATTATCACAC-3'	54
	下游 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGTATTTAGT-3'	
hsa-miR-124-3p	上游 5'-ACACTCCAGCTGGGTAAGGCACGCGGTG-3'	52
	下游 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGGGCATTCA-3'	
hsa-miR-182-5p	上游 5'-ACACTCCAGCTGGGTTTGGCAATGGTAGAACT-3'	56
	下游 5'-CTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGAGTGTGAG-3'	

1.5 仪器 Thermo311 型 CO_2 恒温培养箱(日本 Sanyo 公司),SW-CJ-1FD 型超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司),5804R 型高速离心机(美国 Eppendorf 公司),ELX800 型多功能酶标仪(美国 BioTek 公司),ABI Step one plus 型荧光定量 PCR 循环仪(美国 Life Technologies 公司)。

2 方法

2.1 含药血清及空白血清的制备 将大耳白兔随机分为 4 组,即消癌解毒方高、中、低剂量组和空白组,每组 3 只。以临床治疗量为本实验低剂量,即低剂量组的给药浓度为临床治疗用药浓度,低剂量 $3.78 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,中剂量 $7.56 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,高剂量 $15.12 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,并用生理盐水稀释至等体积灌胃给药,空白血清组给予等体积生理盐水灌胃给药,连续 4 d。于末次给药后 2 h 在盐酸利多卡因局麻下切开颈总动脉采血,静置后离心分离血清,合并同组血清。于 $56 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 30 min 以灭活补体,于超净台中用 $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ 滤膜过滤分装血清。置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 常规细胞培养 人 SMMC-7721 肝癌细胞株在含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基中, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 5% CO_2 的孵箱中培养。隔天换培养液,细胞生长铺满单层培养瓶后,用适量 0.25% 胰蛋白酶消化传代,取对数生长期的细胞用于实验。

2.3 MTT 比色法检测消癌解毒方对细胞增殖的抑制作用 将处于对数生长期的细胞消化、计数后,配制成 3×10^4 个/mL 的细胞悬液,接种到 96 孔板中, CO_2 孵育箱中过夜,待细胞贴壁后弃去原培养基,加入含高、中、低消癌解毒方含药血清和空白血清的培养基 100 μL ,每个浓度设 10 个复孔,继续培养各 12,24,48 h 后,每个孔再加入 $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL ,4 h 后弃上清,置培养箱中孵育 4 h。吸除孔内剩余液体,每孔加入 DMSO 200 μL ,于振荡器上震荡 30 min 后,用酶标仪检测 490 nm 处的吸光度 A,计算细胞生长抑制率。抑制率 = $(1 - A_{\text{药物组}} / A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

2.4 实时荧光定量逆转录聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测相关 miRNA 表达 人肝癌 SMMC-7721 用含高、中、低剂量消癌解毒方含药血清的培养基处理 24 h 后,使用 trizol 法提取细胞总 RNA。取 RNA 样品 5 μL ,测定样品在 260 nm 和 280 nm 的 A。取 RNA 2 μg 加入逆转录体系,逆转录总 RNA 后,荧光定量 PCR 仪上进行 PCR 扩增,使用 U6 作为内参。反应体系为 $2 \times \text{Real-time PCR Master Mix (SYBR Green)} 10 \text{ }\mu\text{L}$,模板(cDNA 稀释 10 倍)1 μL ,上下游引物各 2 μL ,0.1% DEPC 水 7 μL 。反应条件为 $95 \text{ }^\circ\text{C}$,5 min;40 个 PCR 循环($95 \text{ }^\circ\text{C}$,10 s; $60 \text{ }^\circ\text{C}$,20 s; $72 \text{ }^\circ\text{C}$,40 s); $95 \text{ }^\circ\text{C}$,10 s; $60 \text{ }^\circ\text{C}$,1 min;

95 °C, 15 s。各样品的目的 miRNA 和内参(U6) 分别进行 Real-time PCR 反应。用 2^{-ΔΔC_t}法进行相对定量分析。

2.5 统计学方法 数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,各结局指标以 $\bar{x} \pm s$ 表示。相同浓度不同时间点间比较采用重复测量数据方差分析,不同浓度间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 消癌解毒方含药血清对 SMMC-7721 细胞体外增殖的抑制 不同浓度消癌解毒方含药血清处理人肝癌 SMMC-7721 细胞 12, 24, 48 h 后,细胞的生长均受到不同程度的抑制。消癌解毒方高剂量含药血清作用于人肝癌 SMMC-7721 细胞 12, 48 h 后的抑制效果明显, *A* 比同期空白组明显降低 ($P < 0.05$)。消癌解毒方高剂量组干预 24 h 的 *A* 显著低于同期空白组 ($P < 0.01$)。消癌解毒方高剂量组含药血清作用 24 h 对人肝癌 SMMC-7721 细胞的生长抑制率最高,为 42.86%。且随着药物浓度的增加,消癌解毒方对人肝癌 SMMC-7721 细胞的生长抑制作用

增强,呈剂量相关性。见表 2。

表 2 消癌解毒方对 SMMC-7721 细胞作用 12, 24, 48 h 后增殖 *A* 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Effect of different concentrations of Xiaoi Jiedu formula on proliferation of SMMC-7721 cell ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	12 h	24 h	48 h
空白	-	0.677 ± 0.042	0.656 ± 0.115	0.697 ± 0.052
消癌解毒方	3.78	0.667 ± 0.078	0.620 ± 0.060	0.683 ± 0.110
	7.56	0.645 ± 0.107	0.598 ± 0.080	0.627 ± 0.085
	15.12	0.554 ± 0.047 ¹⁾	0.375 ± 0.051 ²⁾	0.564 ± 0.105 ¹⁾

注:与相同干预时间下空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 消癌解毒方含药血清对 SMMC-7721 细胞相关 miRNA 表达的影响 将不同浓度消癌解毒方含药血清的培养液作用于人肝癌 SMMC-7721 细胞 24 h 后,与空白组比较,消癌解毒方可以诱导 miR-25-3p, miR-182-5p 表达下调, miR-29a-5p, miR-122-3p 和 miR-124-3p 表达上调 ($P < 0.01$),其中高剂量组的调控作用更显著。见表 3。

表 3 消癌解毒方含药血清对 SMMC-7721 细胞相关 miRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Effect of different concentrations of Xiaoi Jiedu formula on relative miRNA expression ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	miR-25-3p	miR-29a-5p	miR-122-3p	miR-124-3p	miR-182-5p
空白	-	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.03
消癌解毒方	3.78	0.87 ± 0.01 ¹⁾	1.03 ± 0.01 ¹⁾	1.18 ± 0.02 ¹⁾	1.37 ± 0.02 ¹⁾	0.87 ± 0.01 ¹⁾
	7.56	0.76 ± 0.00 ¹⁾	2.17 ± 0.02 ¹⁾	1.73 ± 0.04 ¹⁾	2.61 ± 0.11 ¹⁾	0.71 ± 0.00 ¹⁾
	15.12	0.59 ± 0.01 ¹⁾	3.31 ± 0.00 ¹⁾	2.66 ± 0.01 ¹⁾	4.14 ± 0.04 ¹⁾	0.64 ± 0.00 ¹⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 生物信息学方法预测靶基因 利用生物信息学方法,TargetScan Human 7.1 数据库分析预测差异表达的 miR-25-3p, miR-29a-5p, miR-122-3p, miR-124-3p 和 miR-182-5p 的靶基因,结果表明,hsa-miR-25-3p 的靶基因可能为 BTG2, RPL15, LHFPL2, MAP2K4, PKDCC, NFIB, DSTYK, PDZD2; hsa-miR-29a-5p 的靶基因可能为 RTP3, SLC35E3, ZNF667, COMMD6, TTC14, ODF3, C20orf187, EMB; hsa-miR-122-3p 的靶基因可能为 MTRNR2L11, ASGR2, LRRRC17, TSPAN3, FKBP1B, BCMO1, GALNS, TAF13; hsa-miR-124-3p 的靶基因可能为 RHOG, CTDSP1, SNAI2, LRRRC58, B4GALT1, SLC10A7, VAMP3, MAGT1; hsa-miR-182-5p 的靶基因可能为 RGS17, HAS2, CTTN, MITF, LPP, RASA1,

LHX1, ZFP36L1。

4 讨论

肝癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一^[9]。肿瘤的特征是增殖与凋亡失去平衡,细胞处于无限增殖状态,因此抑制增殖和调控凋亡应成为抗肿瘤的重要研究方向之一^[10]。miRNA 能够诱导 mRNA 的降解,或抑制其翻译而降低靶基因的表达,故能在肿瘤的发生发展过程中发挥着癌基因和抑癌基因的功能^[11]。Sadeghian 等^[12]发现 miR-25 在肝癌患者血清中的表达升高,故可作为生物标志物用于肝癌的早期诊断。Mahati 等^[13]研究了 miR-29a 与肝细胞癌发生及转移的关系,结果显示 miR-29a 可能通过靶向调节 CLDN1 以抑制肝癌细胞的生长和转移。HE 等^[14]通过小鼠体内实验证实 miR-122 抑制肝

细胞癌生长的潜在机制,发现存在 713 个上调基因和 395 个下调基因,但具体机制仍有待进一步明确。CAI 等^[15]认为 miR-124 通过调控转录因子 Sp1 而抑制肿瘤发生转移。WANG 等^[16]的研究结果表明,miR-96 和 miR-182 抑制 ephrinA5 的表达从而发挥致癌作用。此外,陈淑英等^[17]证实 HepG2 细胞中 miR-141 低表达,且上调 miR-141 表达能明显抑制 HepG2 细胞的增殖,促进细胞的凋亡及改变细胞周期的分布。ZHENG 等^[18]发现 miR-124a 在肝癌组织中呈低表达,并通过调节果蝇 Zeste 基因增强子同源物 2 (EZH2) 和 ROCK2 的表达,以参与调控肝癌细胞增殖和转移的过程。另有研究表明 miR-10a 在肝细胞癌中表达下调,miR-10a 能够靶向调控酪氨酸激酶受体 A4 (EphA4) 所介导的上皮与间充质细胞转化^[19]。

周老认为肝癌的发生主要与外感湿毒有关,湿热瘀滞气机,日久酿生癌毒^[20]。有学者通过比较中西医对肿瘤发病机制的研究,认为癌毒与非可控性炎症一样,既可诱导肿瘤的形成,又可促进肿瘤的侵袭与转移,与肿瘤的发生发展互为因果^[21]。在肿瘤的发生发展过程中,炎症细胞释放的炎症因子可活化相关的信号通路,而这些信号通路的激活又能够诱发更多的炎症因子的表达,两者互为因果,共同促进肿瘤的发展^[21]。

消癌解毒方是周老辨治恶性肿瘤的经验方,具有显著的临床疗效。大多数肿瘤细胞中的 miRNA 表达异常,使肿瘤癌基因和抑癌基因之间的平衡被破坏^[22-23]。有研究显示,消癌解毒方中麦冬^[24]、白花蛇舌草^[25]等多种中药抗肿瘤作用与 miRNA 表达变化相关。消癌解毒方以白花蛇舌草、山慈菇为君药,具有清热解毒、消肿散结之效。僵蚕、蜈蚣为臣药,具有通络化痰之效。佐以太子参、麦冬和八月札,起固本培元、益气和胃之效。全方配伍精妙,诸药共奏消癌解毒、益气固本之功效。

本研究通过对 5 种 miRNA 的 Real-time PCR 检测发现,消癌解毒方含药血清抑制人肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的过程中,伴随着 miR-25-3p 和 miR-182-5p 表达下调,以及 miR-29a-5p, miR-122-3p 和 miR-124-3p 表达上调。邱雯莉等^[26]对 H₂₂瘤荷小鼠予不同剂量消癌解毒方灌胃,证实消癌解毒方可诱导 miR-1298-5p, miR-874-3p, miR-721, miR-298-5p, miR-551b-5p, miR-346-5p, miR-105 表达显著上调,miR-24-3p, miR-3963, miR-127-3p, miR-434-5p, miR-1187, miR-468-3p, miR-221-5p, miR-6695-5p 表达

显著下调。这提示消癌解毒方的抗肿瘤机制确与 miRNA 及其调控网络有关。但是,关于消癌解毒方诱导某些特定 miRNA 表达变化的可能机制及与抗肝癌作用对应的靶基因之间的关系,还有待进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] HUANG S J, JIANG F F, WANG Y, et al. Diagnostic performance of tumor markers AFP and PIVKA-II in Chinese hepatocellular carcinoma patients [J]. *Tumor Biol*, 2017, 39(6): 1010428317705763.
- [2] Elemeery M N, Badr A N, Mohamed M A, et al. Validation of a serum microRNA panel as biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma post-hepatitis C infection in Egyptian patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(21): 3864-3875.
- [3] LU M X, KONG X, WANG H G, et al. A novel microRNAs expression signature for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(5): 8775-8784.
- [4] 赵智强. 周仲瑛教授对消化道恶性肿瘤的辨治研究 [J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(1): 1-3.
- [5] 郑志攀, 周仲瑛, 叶放, 等. 国医大师周仲瑛教授辨治癌症正邪关系探析 [J]. *南京中医药大学学报*, 2016, 32(3): 201-203.
- [6] 程海波, 沈卫星, 姚志华, 等. 基于癌毒病机理论的消癌解毒方抗肿瘤研究进展 [J]. *南京中医药大学学报*, 2014, 30(6): 593-595.
- [7] 李文婷, 赵凤鸣, 周红光, 等. 消癌解毒方含药血清对人肝癌 SMMC-7721 细胞端粒酶及凋亡相关基因 mRNA 表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(4): 1211-1214.
- [8] 徐力立, 周红光, 司誉豪, 等. miRNA 抗肝癌机制与癌毒理论的关系研究概况 [J]. *中医杂志*, 2017, 58(8): 704-709.
- [9] ZHOU J J, ZHANG Y J, QI Y H, et al. microRNA-152 inhibits tumor cell growth by directly targeting RTKN in hepatocellular carcinoma [J]. *Oncol Rep*, 2017, 37(2): 1227-1234.
- [10] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646-674.
- [11] Adams B D, Kasinski A L, Slack F J. Aberrant regulation and function of microRNAs in cancer [J]. *Curr Biol*, 2014, 24(16): R762-R776.
- [12] Sadeghian Y, Kamyabi-Moghaddam Z, Nodushan S M, et al. Profiles of tissue microRNAs; miR-148b and miR-25 serve as potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma [J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(12):

- 16379-16380.
- [13] Mahati S, XIAO L, YANG Y, et al. MiR-29a suppresses growth and migration of hepatocellular carcinoma by regulating CDLN1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 486(3):732-737.
- [14] HE B S, HE Y, SHI W X, et al. Bioinformatics analysis of gene expression alterations in microRNA-122 knockout mice with hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(6):3681-3689.
- [15] CAI Q Q, DONG Y W, WANG R, et al. MiR-124 inhibits the migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells by suppressing integrin alpha V expression [J]. *Sci Rep*, 2017, doi:10.1038/srep40733.
- [16] WANG T H, Yeh C T, Ho J Y, et al. OncomiR miR-96 and miR-182 promote cell proliferation and invasion through targeting EphrinA5 in hepatocellular carcinoma [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 55(4):366-375.
- [17] 陈淑英, 张敬军, 林勇. 微小 RNA-141 对肝癌细胞增殖、凋亡及细胞周期的影响 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2017, 23(6):401-405.
- [18] ZHENG F, LIAO Y J, CAI M Y, et al. The putative tumor suppressor microRNA-124 modulates hepatocellular carcinoma cell aggressiveness by repressing ROCK2 and EZH2 [J]. *Gut*, 2012, 61(2):278-289.
- [19] YAN Y, LUO Y C, WAN H Y, et al. MicroRNA-10a is involved in the metastatic process by regulating Eph tyrosine kinase receptor A4-mediated epithelial-mesenchymal transition and adhesion in hepatoma cells [J]. *Hepatology*, 2013, 57(2):667-677.
- [20] 赵智强, 吴勉华, 周瑛, 等. 周仲瑛辨治消化系统恶性肿瘤学术思想探讨 [J]. *中医杂志*, 2013, 54(14):1186-1188.
- [21] 程海波, 沈卫星. 癌毒病机理论与炎癌转变 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2015, 35(2):243-246.
- [22] 周红光, 李黎, 李沐涵, 等. miRNA 是中医药防治恶性肿瘤的新靶标 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(11):4531-4534.
- [23] 石文静, 谭佳妮, 沈卫星, 等. 消癌解毒方含药血清对人结肠癌细胞增殖及糖酵解过程的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(20):120-125.
- [24] 邱雯莉, 姜泽群, 陈海彬, 等. 麦冬皂苷 B 体外调控非小细胞肺癌 A549 细胞 miRNA-34b 表达的研究 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2016, 18(4):620-625.
- [25] 林久茂. 白花蛇舌草逆转大肠癌多药耐药的作用及其机制研究 [D]. 福州: 福建中医药大学, 2016.
- [26] 邱雯莉, 陈海彬, 姜泽群, 等. 消癌解毒方对 H₂(22) 瘤荷小鼠 miRNAs 表达谱的影响 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2016, 36(9):1112-1118.

[责任编辑 张丰丰]