

## 叶下珠复方Ⅱ号对肝癌HepG2细胞lncRNA CCAT1表达的调控作用

陈力文, 李俏敏, 李小翠, 李常青\*  
(广州中医药大学, 广州 510405)

**[摘要]** 目的:探讨叶下珠复方Ⅱ号通过抑制长链非编码RNA(lncRNA)结肠癌相关转录因子1(CCAT1)的表达,恢复小分子RNA let-7a(microRNA let-7a)的表达,从而发挥抗肝癌的作用机制。方法:应用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测正常肝细胞LO2与肝癌HepG2细胞lncRNA CCAT1的表达,比较2种细胞的表达差异。采用噻唑蓝(MTT)比色法测定肝癌HepG2在不同浓度的叶下珠复方Ⅱ号与5-氟尿嘧啶(5-FU)作用24, 48, 72 h后细胞增殖的情况。体外培养肝癌HepG2细胞,设空白组,叶下珠复方Ⅱ号高、低质量浓度组(1.6, 0.8 g·L<sup>-1</sup>),应用Real-time PCR检测各组lncRNA CCAT1, microRNA let-7a和其靶基因高迁移率蛋白A2(HMGA2), N-RAS基因(N-RAS)mRNA表达改变;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测各组HMGA2和细胞周期蛋白D<sub>1</sub>(Cyclin D<sub>1</sub>)的蛋白表达。结果:与LO2细胞比较,肝癌HepG2细胞lncRNA CCAT1的表达明显上调(P<0.05)。通过MTT比色实验测定出叶下珠复方Ⅱ号和5-FU作用于肝癌HepG2细胞的半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)分别为1.649, 0.044 648 g·L<sup>-1</sup>;与空白组比较,叶下珠复方Ⅱ号高、低质量浓度组(1.6, 0.8 g·L<sup>-1</sup>)均可抑制肝癌HepG2细胞增殖(P<0.05),叶下珠复方Ⅱ号高质量浓度组(1.6 g·L<sup>-1</sup>)最为显著。Real-time PCR结果显示,与空白组比较,叶下珠复方Ⅱ号高、低质量浓度组(1.6, 0.8 g·L<sup>-1</sup>)lncRNA CCAT1的表达明显抑制(P<0.05),高质量浓度组microRNA let-7a表达明显上调(P<0.05),叶下珠复方Ⅱ号高、低质量浓度组HMGA2 mRNA表达均明显下调,高质量浓度组N-RAS mRNA表达明显下调(P<0.05)。Western blot结果表明,与空白组比较,叶下珠复方Ⅱ号高、低质量浓度组(1.6, 0.8 g·L<sup>-1</sup>)的HMGA2, Cyclin D<sub>1</sub>蛋白表达均明显下调(P<0.05)。结论:叶下珠复方Ⅱ号可以通过抑制HepG2细胞lncRNA CCAT1表达,恢复microRNA let-7a表达,并抑制其下游相关靶基因的mRNA和蛋白表达,进而抑制肝癌细胞增殖,发挥抗肝癌作用。

**[关键词]** 肝癌HepG2细胞; 叶下珠复方Ⅱ号; 结肠癌相关转录因子1(CCAT1); 小分子RNA let-7a(microRNA let-7a); 高迁移率蛋白A2(HMGA2)

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)02-0074-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20202123

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200819.1908.001.html>

**[网络出版日期]** 2020-8-20 11:10

## Effect of Compound *Phyllanthus urinaria* Ⅱ in Regulating Expression of lncRNA CCAT1 in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

CHEN Li-wen, LI Qiao-min, LI Xiao-hui, LI Chang-qing\*  
(Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the anti-hepatoma effect of compound *Phyllanthus urinaria* Ⅱ (CPU Ⅱ) by inhibiting the expression of the long non-coding RNA (lncRNA) colon cancer associated transcript-1 (CCAT1) and restoring the expression of microRNA let-7a. **Method:** Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the expression of lncRNA CCAT1 in normal liver cells (LO2 cells) and hepatocellular carcinoma HepG2 cells, and the differences in expression between these two

**[收稿日期]** 20200408(027)

**[基金项目]** 广东省高水平大学建设项目(A1-AFD018171Z11004)

**[第一作者]** 陈力文, 硕士, 从事肝病药物治疗及作用机制研究, E-mail: 1119250161@qq.com

**[通信作者]** \*李常青, 博士, 研究员, 从事肝病与肿瘤研究, E-mail: 1106923438@qq.com

types of cells were compared. The methylthiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to detect the proliferation of HepG2 cells after treatment with different concentrations of CPU II and 5-fluorouracil (5-FU) for 24, 48 and 72 h. Hepatocellular carcinoma HepG2 cells were cultured *in vitro* and set into three groups: cell control group, CPU II low-dose group ( $0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and high-dose group ( $1.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Real-time PCR was used to detect the mRNA expression of lncRNA CCAT1, microRNA let-7a and its target genes high mobility group protein A2 (HMGA2), and N-RAS in each group. Western blot was used to detect the protein expression of HMGA2, and Cyclin D<sub>1</sub> in each group. **Result:** As compared with LO2 cells, expression of lncRNA CCAT1 in HepG2 cells was significantly up-regulated ( $P < 0.05$ ). Results of MTT assay showed that the 50% inhibiting concentration ( $IC_{50}$ ) of CPU II and 5-FU on hepatocellular carcinoma HepG2 cells was 1.649, 0.044 648  $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  respectively. As compared with the control group, CPU II high-and low-dose groups ( $1.6, 0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) significantly inhibited the proliferation of HepG2 cells ( $P < 0.05$ ), and the effect was most remarkable in CPU II high-dose group ( $P < 0.05$ ). The results of Real-time PCR showed that as compared with control group, the expression of lncRNA CCAT1 mRNA was significantly inhibited in CPU II high-and low-dose groups ( $P < 0.05$ ), and the expression of microRNA let-7a mRNA was obviously up-regulated in high-dose group ( $P < 0.05$ ), but the expression of HMGA2 mRNA in CPU II high-and low-dose groups as well as the expression of N-RAS mRNA in CPU II low-dose group were down-regulated ( $P < 0.05$ ). Western blot results showed that as compared with the cell control group, the protein expression of HMGA2 and Cyclin D<sub>1</sub> in CPU II high-and low-dose groups ( $1.6, 0.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was significantly down-regulated ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** CPU II can inhibit the expression of lncRNA CCAT1, recover the expression of microRNA let-7a, and suppress the mRNA and protein expression of related downstream target genes in hepatoma cells line HepG2, thereby inhibiting the proliferation of hepatocellular carcinoma cells and exerting anti-hepatocellular carcinoma effect.

**[Key words]** HepG2 cells; *Phyllanthus urinaria* II; colon cancer associated transcript-1 (CCAT1); microRNA let-7a; high mobility group protein A2 (HMGA2)

肝细胞癌的发生机制复杂,编码蛋白的抑癌基因与癌基因的表达异常,导致肿瘤关键信号通路活化,与肝癌的发生密切相关,但目前的证据还不能充分解释肝癌的发生机制,进一步探究肝癌的发病机制和有效的分子治疗靶标,是目前研究的重要方向。结肠癌相关转录因子1 (CCAT1) 是一种长链非编码 RNA (lncRNA), 在转录和翻译活动中对靶基因在表观遗传学、转录和转录后等多水平上进行调控。CCAT1 作为癌基因在多种肿瘤中的表达上升, 在 Huh7, HepG2 和 Hep3B 等许多肝癌细胞系中的表达上调<sup>[1]</sup>。研究表明, lncRNA CCAT1 的过表达, 导致靶基因小分子 RNA let-7a (microRNA let-7a) 的表达抑制, 从而导致下游高迁移率族蛋白 A2 基因 (HMGA2), 大鼠肉瘤病毒基因 (RAS) 和细胞周期蛋白 D<sub>1</sub> (Cyclin D<sub>1</sub>) 的过表达, 与肝癌的发生、侵袭、转移密切相关<sup>[2-7]</sup>; 抑制 lncRNA CCAT1 的表达可以提高 microRNA let-7 的表达, 并抑制肝癌的发生发展<sup>[2,8]</sup>, 该发现为肝癌的药物治理提供了新的分子靶点。

叶下珠复方 II 号 (CPU II) 是由小柴胡汤合二

至丸加减而成的。方中包括叶下珠、白花蛇舌草、半枝莲、苦参、丹参、桃仁、三棱、莪术、北柴胡、太子参、女贞子、墨旱莲、甘草片 13 味中药, 具有清热解毒、活血化瘀、健脾补肾功效。研究表明 CPU II 可以显著抑制肝癌细胞的增殖, 诱导肝癌细胞的凋亡和自噬<sup>[9-11]</sup>, 抑制肝癌肿瘤生长<sup>[12-13]</sup>, 有较好的抗肝癌作用效果, 作用机制与促进 microRNA let-7a 表达并抑制下游 RAS, c-Myc 和白细胞介素-6/信号传导及转录激活因子通路 (IL-6/STAT3) 相关基因的表达有关<sup>[10,13]</sup>, 但 microRNA let-7a 的表达增加是否通过抑制 lncRNA CCAT1 表达这一作用环节来实现, 目前尚不清楚。本实验以 HepG2 肝癌细胞为研究对象, 通过噻唑蓝 (MTT) 比色法测定 CPU II 对肝癌 HepG2 细胞的增殖影响, 采用实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 研究 CPU II 对肝癌 HepG2 细胞的 lncRNA CCAT1, microRNA let-7a 及其下游基因的表达影响, 探讨其抗肝癌作用的新机制, 为其临床应用提供新的依据。

## 1 材料

**1.1 细胞** 正常LO2肝细胞购于中桥新舟生物公司,批号ZQ0031,传至3代;肝癌HepG2细胞购于美国菌种保藏中心(ATCC),批号BFN6080069,传至3代。

**1.2 药物与试剂** CPU II药材由广州市药材公司提供,经广州中医药大学中药学院李小翠副教授鉴定,符合2015年版《中国药典》要求,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T20150701)。用时称取CPU II颗粒,溶解于超纯水中,混匀后用 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤器过滤除菌,配成 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 母液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,使用时用完全培养基稀释到所需的药物浓度。5-氟尿嘧啶(5-FU,上海旭东海普药业有限公司,批号FA171108);胎牛血清,DMEM高糖培养基,0.25%胰酶,MTT(美国Gibco公司,批号分别为42G6287K, 8119164, 2046777, 38C85359);HiFiScript gDNA Removal cDNA Synthesis Kit(北京康为世纪生物科技有限公司,批号CW2582M);SYBR GREEN qPCR Super Mix, trizol(美国Invitrogen公司,批号分别为C11733046, 10296-028);ImProm- II™ Reverse Transcription System, dNTP, Random Primer, M-MLV, DNase, RNasin Ribonuclease Inhibitor(北京普洛麦格生物技术有限公司,批号分别为A3800, U1515, C1181, M1701, M6101, N2112S);PVDF膜(美国Millipore公司,批号IPVH00010);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)小鼠单克隆抗体(杭州贤至公司,批号AB-M-M001);HMGA2, Cyclin D<sub>1</sub>抗体(北京索莱宝公司,批号分别为K007508P, K006377P);引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

**1.3 仪器** Galaxy170S型二氧化碳培养箱(英国NewBrunswick公司);SW-CJ-2D型超净工作台(苏州净化设备有限公司);XDS-2型倒置显微镜(中国广州光学仪器厂);22331 Hamburg型核酸蛋白测定仪(德国Eppendorf公司);ABI7500型Real-time PCR仪(美国ABI公司);VarioskanLUX型酶标仪(芬兰Thermo Fisher公司);TGL-16M型低温冷冻离心机(湖南湘仪公司);JY600E型电泳仪(北京君意公司);S-150D型细胞超声破碎仪(上海天呈科技公司);X-OMAT型X射线摄影暗匣(美国柯达公司);Mini-Protean型垂直电泳仪及转移系统(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养** LO2细胞、肝癌HepG2细胞 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴复苏,置于15 mL离心管中,加入细胞培养基5 mL吹匀,以 $800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,吸弃上清;加入含10%胎牛血清,1%青-链霉素的完全培养基5 mL吹匀,吸入25 cm的细胞培养瓶,置于5%CO<sub>2</sub>  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 饱和湿度的培养箱中培养,隔天换液1次;待细胞生长至80%~90%时,用磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗净,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,将细胞以 $800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃去上清液,加入完全培养基吹打均匀,视细胞密度按照1:2~1:3传代,细胞传3代以后选择对数生长期细胞进行实验。

**2.2 Real-time PCR检测细胞中lncRNA CCAT1表达** 取对数生长期LO2, HepG2细胞, PBS冲洗2次,用0.25%胰酶消化下来,计数后以 $2\times 10^5$ 个/孔接种于六孔板中。设LO2细胞组和肝癌HepG2细胞组,每组3个复孔。接种细胞后置六孔板于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,含5%CO<sub>2</sub>饱和湿度的培养箱中培养48 h后,吸弃上清,收集细胞。用trizol法提取总RNA, RNase-free D的Dnase I去除基因组DNA,根据转录反应试剂盒说明书,每个样本取RNA 1  $\mu\text{L}$ 进行逆转录反应,合成cDNA;再以cDNA为模板,各样本基因检测按20  $\mu\text{L}$ 体系进行PCR反应。目的片段:lncRNA CCAT1;内参片段U6。反应条件: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应2 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应15 s; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应32 s,40个循环;于 $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ 进行融解曲线分析;各个样品重复实验3次。利用Real-time PCR仪自带软件观察扩增曲线,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示各样本相对表达量。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
CCAT1	上游 TGCCAGGGTGTAATAGGAAC	265
	下游 GGCCAGGATTCAAGTTCAAG	
U6	上游 CTCGCTTCGGCAGCACA	96
	下游 AACGCTTCACGAATTTGCGT	

**2.3 MTT比色法检测细胞增殖抑制** 取对数期肝癌HepG2细胞,以 $1\times 10^4$ 个/孔接种于96孔板中。CPU II半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>)的测定,设置溶剂组,空白组,CPU II各质量浓度组(6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),每组6个复孔。5-FU组IC<sub>50</sub>测定,设置溶剂组,空白组,CPU II各质量浓度组(1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.062 5, 0.031 25, 0.015 63  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),每组6个复

孔。将接种了肝癌 HepG2 细胞的 96 孔板置于 37 °C, 含 5% CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱中培养 24 h, 按上述分组, 溶剂组、空白组加入完全培养基, CPU II 组加入不同浓度的药液继续培养。培养 48 h, 去上清, 采用 MTT 比色法, 用酶标仪检测 490 nm 的波长测定吸光度 A, 计算细胞增殖抑制率。增殖抑制率 =  $(A_{\text{空白组}} - A_{\text{药物组}}) / A_{\text{空白组}} \times 100\%$ , 采用 Logit 法测定 IC<sub>50</sub>。

细胞传代及培养 24 h, 弃上清, 根据测得的 IC<sub>50</sub>, 设立空白组, CPU II 组 (1.6, 0.8 g·L<sup>-1</sup>) 和 5-FU 组 (0.03 g·L<sup>-1</sup>), 每组 3 个复孔。给药组加入对应的浓度的药物, 空白组加入完全培养基, 继续培养 24, 48, 72 h 后进行 MTT 检测。吸弃上清, MTT 孵育 4 h, 于酶标仪上检测波长为 490 nm 时 A。

**2.4 Real-time PCR 检测 lncRNA CCAT1, microRNA let-7a 和其靶基因 HMGA2, N-RAS Mrna mRNA 表达** 取对数期肝癌 HepG2 细胞, 细胞计数, 以 1×10<sup>4</sup> 个/孔接种于 96 孔板。设置空白组, CPU II 高、低质量浓度组 (1.6, 0.8 g·L<sup>-1</sup>), 每组 3 个复孔。将接种了肝癌 HepG2 细胞的 96 孔板置于 37 °C, 含 5%CO<sub>2</sub>, 饱和湿度的培养箱中培养 24 h, 吸弃上清, 按照分组: 空白组加入新完全培养基, CPU II 高、低质量浓度组分别加入 CPU II, 再培养 48 h 后收集细胞。用 Real-time PCR 检测 lncRNA CCAT1, microRNA let-7a 和 HMGA2, N-RAS mRNA 表达, 内参片段 β-肌动蛋白 (β-actin), U6, 操作方法同 2.2 项。引物序列见表 2。

表 2 引物序列

Table 2 Primer sequence

引物	序列(5'-3')	长度/bp
CCAT1	上游 AAGCATTGCGAAAACGCTCA	163
	下游 AGTTCATGTCTCGGCACCTT	
HMGA2	上游 AAGCCACTGGAGAAAAACGG	126
	下游 GATATATAAGATTGCCCGGGTGG	
N-RAS	上游 CTGGGTTCTTCCACAGCACA	99
	下游 TTCACGTTTGGGTTTGGTT	
hsa-let-7a-5p	上游 CGCGTGAGGTAGTAGGTTGT	66
	下游 CAGTGCAGGGTCCGAGGTATT	
β-actin	上游 CTCCATCCTGGCCTCGCTGT	268
	下游 GCTGTACCTTACCCTTCC	
U6	上游 CTCGCTTCGGCAGCACA	94
	下游 AACGCTTACGAATTTGCGT	

**2.5 Western blot 检测 microRNA let-7a 的靶基因 HMGA2, Cyclin D<sub>1</sub> 蛋白表达** 取对数生长期的取

对数生长期 HepG2 细胞, 细胞培养, 分组, 给药同 2.4 项。加药培养 48 h, 吸弃上清, 收集细胞, 提取总蛋白, 用 BCA 蛋白定量检测试剂盒进行样品蛋白定量分析。取蛋白总上样量 100 μL 进行 SDS-PAGE 电泳; 转膜后用 5% 脱脂奶粉常温封闭 2 h; 分别加一抗 HMGA2, Cyclin D<sub>1</sub> (1:1 000) 常温摇床中振荡孵育 2 h, GAPDH (1:1 500) 常温下摇床振荡孵育 1 h; 加入 HPR 标记的二抗 (1:2 500) 常温振荡孵育 1 h; 洗膜, 按照 ECL 荧光底物试剂盒中的步骤操作, 进行发光、显影、定影, 检测条带灰度值。实验重复 3 次。

**2.6 统计学处理** 用 SPSS 23.0 软件处理数据进行统计学分析, 计量资料表示为  $\bar{x} \pm s$ , 多个样本均数采用单因素方差分析进行组间比较, 方差齐时两两比较采用最小显著性差异法 (LSD), 方差不齐时采用 Dunnett's T3, P<0.05 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 正常 LO2 肝细胞与肝癌 HepG2 细胞的 lncRNA CCAT1 表达** 与正常 LO2 肝细胞组比较, 肝癌 HepG2 细胞组中的 lncRNA CCAT1 表达明显升高 (P<0.05)。见表 3。

表 3 两组细胞 lncRNA CCAT1 mRNA 的相对表达 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Comparison of relative mRNA expression values of lncRNA CCAT1 in each group ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	lncRNA CCAT1
LO2 细胞	1.00±0.12
HepG2 细胞	2.80±0.12 <sup>1)</sup>

注: 与 LO2 细胞比较<sup>1)</sup> P<0.05。

**3.2 CPU II 对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响** 与空白组比较, 随着 CPU II (6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39 g·L<sup>-1</sup>) 和 5-FU (0.5, 0.25, 0.125, 0.062 5, 0.031 25, 0.015 625 g·L<sup>-1</sup>) 作用肝癌 HepG2 细胞药物浓度和作用时间增加, 对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制作用逐渐增强, 表明 CPU II 和 5-FU 对肝癌 HepG2 细胞均有明显的抑制作用。CPU II 和 5-FU 作用于肝癌 HepG2 细胞的 IC<sub>50</sub> 分别为 1.649 g·L<sup>-1</sup>, 0.044 648 g·L<sup>-1</sup>。见表 4。在 IC<sub>50</sub> 以下, CPU II (0.8, 1.6 g·L<sup>-1</sup>) 和 5-FU (0.03 g·L<sup>-1</sup>) 作用肝癌 HepG2 细胞 24, 48, 72 h, 与空白组比较, 随着 CPU II 质量浓度和作用时间增加, CPU II 对肝癌 HepG2 细胞增殖抑制作用逐渐增强 (P<0.05)。见表 5。

**3.3 CPU II 对肝癌 HepG2 细胞 lncRNA CCAT1, microRNA let-7a 和其靶基因 HMGA2, N-RAS mRNA 表达的影响** 与空白组比较, CPU II (0.8,

表4 CPU II 和 5-FU 对肝癌 HepG2 细胞生长的抑制作用 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 4 Inhibitory effect of CPU II and 5-FU on growth of hepatocellular carcinoma HepG2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	A	抑制率/%
空白		0.96±0.03	-
CPU II	6.25	0.10±0.00	89.80
	3.13	0.41±0.09	57.17
	1.56	0.61±0.05	35.72
	0.78	0.77±0.03	19.84
	0.39	0.90±0.07	5.61
空白		0.99±0.06	-
5-FU	1	0.39±0.02	60.77
	0.5	0.43±0.03	56.61
	0.25	0.46±0.01	53.18
	0.125	0.48±0.01	51.67
	0.062 5	0.52±0.01	47.52
	0.031 25	0.55±0.02	45.06
	0.0156 25	0.57±0.03	42.40

1.6 g·L<sup>-1</sup>) 组 lncRNA CCAT1, HMGA2 mRNA 表达

表5 CPU II 对肝癌 HepG2 细胞增殖吸光度的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

Table 5 Effect of CPU II on proliferation of hepatocellular carcinoma HepG2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=6$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	24 h	48 h	72 h
空白		0.73±0.02	1.49±0.02	2.00±0.02
5-FU	0.03	0.56±0.02 <sup>1)</sup>	0.83±0.01 <sup>1)</sup>	0.83±0.02 <sup>1)</sup>
CPU II	0.8	0.69±0.01 <sup>1)</sup>	1.17±0.02 <sup>1)</sup>	1.52±0.02 <sup>1)</sup>
	1.6	0.66±0.01 <sup>1,2)</sup>	1.06±0.01 <sup>1,2)</sup>	1.15±0.01 <sup>1,2)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05;与CPU II 0.8 g·L<sup>-1</sup>组比较<sup>2)</sup>P<0.05(表6,7同)。

表6 CPU II 对肝癌 HepG2 细胞 lncRNA CCAT1, microRNA let-7a 和其靶基因 HMGA2, N-RAS mRNA 表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of CPU II on lncRNA CCAT1, microRNA let-7a and its target genes HMGA2, N-RAS mRNA expression in HepG2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	lncRNA CCAT1	microRNA let-7a	HMGA2	N-RAS
空白		1.00±0.12	1.00±0.05	1.00±0.12	1.00±0.06
CPU II	0.8	0.59±0.03 <sup>1)</sup>	1.04±0.02	0.70±0.04 <sup>1)</sup>	0.94±0.06
	1.6	0.33±0.02 <sup>1,2)</sup>	1.75±0.11 <sup>1,2)</sup>	0.53±0.09 <sup>1)</sup>	0.89±0.01 <sup>1)</sup>

表7 CPU II 对 HMGA2, Cyclin D<sub>1</sub> 蛋白表达的影响 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 7 Effect of CPU II on protein expression of HMGA2 and Cyclin D<sub>1</sub> in HepG2 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	Cyclin D <sub>1</sub> /GAPDH	HMGA2/GAPDH
空白		0.87±0.01	0.50±0.02
CPU II	0.8	0.38±0.01 <sup>1)</sup>	0.45±0.01 <sup>1)</sup>
	1.6	0.13±0.02 <sup>1,2)</sup>	0.25±0.02 <sup>1,2)</sup>

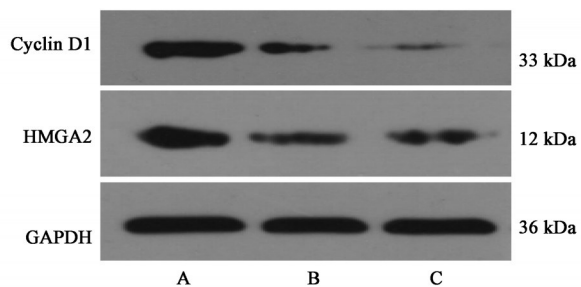
下降 ( $P<0.05$ ); CPU II (1.6 g·L<sup>-1</sup>) 组 microRNA let-7a mRNA 表达增加 ( $P<0.05$ ), N-RAS mRNA 表达下调 ( $P<0.05$ )。与 CPU II (0.8 g·L<sup>-1</sup>) 组比较, CPU II 高质量浓度 (1.6 g·L<sup>-1</sup>) 组的 lncRNA CCAT1 mRNA 表达明显下调, microRNA let-7a 表达明显上调 ( $P<0.05$ )。见表6。

3.4 CPU II 对肝癌 HepG2 细胞 microRNA let-7a 的靶基因 HMGA2, Cyclin D<sub>1</sub> 蛋白表达的影响 与空白组比较, CPU II (0.8, 1.6 g·L<sup>-1</sup>) 组 HMGA2, Cyclin D<sub>1</sub> 蛋白表达均下降 ( $P<0.05$ ); 与 CPU II 低质量浓度 (0.8 g·L<sup>-1</sup>) 组比较, CPU II (1.6 g·L<sup>-1</sup>) 组的 HMGA2, Cyclin D<sub>1</sub> 蛋白表达均下降 ( $P<0.05$ )。见表7, 图1。

#### 4 讨论

microRNA let-7 (包含 let-7a-g 和 let-7i) 作为抑癌基因, 可以直接抑制靶基因 RAS, c-Myc 和 HMGA2 表达<sup>[5-7]</sup>; let-7a 还可抑制靶基因半胱氨酸蛋白酶 (Caspase) Caspase-3, IL-6 表达和下游 STAT3, PI3K/Akt 信号通路的活化<sup>[7,14]</sup>。研究表明, microRNA let-7 是 lncRNA CCAT1 的调控的靶基因,

lncRNA CCAT1 通过“分子海绵”作用与 microRNA let-7 结合, 抑制其表达和功能<sup>[2]</sup>。lncRNA CCAT1 长度为 2 628 nt, 位于染色体 8q24.21 位置, 肝癌患者肿瘤组织和多种肝癌细胞株 Huh7, HepG2, SMMC-7721 等中 CCAT1 的表达升高, 导致 microRNA let-7 的表达抑制, 与肝癌的发生、侵袭、转移密切相关, 抑制 CCAT1 的表达可以提高 let-7 的表达, 抑制肝癌的发生发展<sup>[2,8]</sup>。本实验中, 本课题组通过比较正常



A.空白组;B,C.CPU II (0.8,1.6 g·L<sup>-1</sup>)组

图1 各组HMGA2,Cyclin D<sub>1</sub>蛋白表达凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoresis of protein expression of HMGA2 and Cyclin D<sub>1</sub> in each group

肝细胞与肝癌 HepG2 细胞中 lncRNA CCAT1 的差异表达,进一步证实了 lncRNA CCAT1 的表达升高与肝癌的发生发展密切相关。

CPU II 的组方药物叶下珠、白花蛇舌草、半枝莲、苦参清热解毒,丹参、桃仁、三棱、莪术活血化瘀,太子参、甘草片补气健脾,旱连草、女贞子滋阴补肾,诸药合用,具有清热解毒、活血化瘀、健脾补肾的功效,针对肝癌“毒、瘀、虚”的病机特点进行治疗<sup>[15-16]</sup>,前期的动物及细胞实验均证实该复方具有较好的抗肝癌作用<sup>[10,13]</sup>。

本研究结果表明 CPU II 对肝癌 HepG2 细胞的增殖有显著的抑制作用,并呈明显的量效关系。CPU II 作用于肝癌 HepG2 细胞后 lncRNA CCAT1 的表达明显下调, microRNA let-7a 的表达上调, HMGA2 和 N-RAS mRNA 的表达均明显下调, Western blot 检测 microRNA let-7a 的靶基因 HMGA2 和 Cyclin D<sub>1</sub> 的蛋白表达明显下调,表明 CPU II 可以通过抑制 HepG2 细胞的 lncRNA CCAT1 表达,恢复 microRNA let-7a 的表达,并抑制其下游相关靶基因 HMGA2, N-RAS 和 Cyclin D<sub>1</sub> 的 mRNA 和蛋白表达,进而抑制肝癌细胞增殖,发挥抗肝癌作用。

#### [参考文献]

[1] GUO J, MA Y, PENG X, et al. lncRNA CCAT1 promotes autophagy via regulating ATG7 by sponging miR-181 in hepatocellular carcinoma [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(10):17975-17983.  
[2] DENG L, YANG S B, XU F F, et al. Long noncoding RNA CCAT1 promotes hepatocellular carcinoma progression by functioning as let-7 sponge [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34(1):1-10.  
[3] XIN Y, LI Z, SHEN J, et al. CCAT1: a pivotal

oncogenic long non-coding RNA in human cancers [J]. Cell Prolif, 2016, 49(3):255-260.

[4] SUN H, DING C, ZHANG H, et al. Let-7 miRNAs sensitize breast cancer stem cells to radiation-induced repression through inhibition of the cyclin D<sub>1</sub>/Akt1/Wnt1 signaling pathway [J]. Mol Med Rep, 2016, 14(4):3285-3292.  
[5] JOHNSON S M, GROSSHANS H, SHINGARA J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family [J]. Cell, 2005, 120(5):635-647.  
[6] MAYR C, HEMANN M T, BARTEL D P. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation [J]. Science, 2007, 315(5818):1576-1579.  
[7] SAITO Y, SUZUKI H, MATSUURA M, et al. microRNAs in hepatobiliary and pancreatic cancers [J]. Front Genet, 2011, 2(66):1-5.  
[8] ZHU H, ZHOU X, CHANG H, et al. CCAT1 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion [J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(5):5427-5434.  
[9] 何素, 王小龙, 李小翠, 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.  
[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] 申建柯, 李常青, 梁曼仪, 等. 叶下珠复方 II 号对人肝癌 HepG2 细胞增殖和细胞凋亡作用 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(7):810-812.  
[12] 李常青, 申建柯, 李小翠. 叶下珠复方 II 号对小鼠 H22 肝癌移植瘤生长的抑制作用 [J]. 中国热带医学, 2011, 11(10):1182-1183, 1189.  
[13] 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.  
[14] ILIOPOULOS D, HIRSCH H A, STRUHL K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, Let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation [J]. Cell, 2009, 139(4):693-706.  
[15] 方肇勤, 管冬元, 梁尚华, 等. 不同中医治法对 DEN 诱发大鼠肝癌作用的比较研究 [J]. 中医杂志, 2002, 43(7):542-544.  
[16] 侯炜, 梁婷, 周雍明. 原发性肝癌的中医药临床研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2010, 16(7):534-536.

[责任编辑 张丰丰]