

# 阴阳攻积丸含药血清抑制 HepG2 细胞增殖、侵袭及促进其凋亡的作用

李永伟\*, 谢和平, 陈鸿杰, 李跃, 陈燕, 李义伟, 李玉洁, 向旭  
(中山大学附属第三医院, 广州 510630)

**[摘要]** **目的:**探讨阴阳攻积丸(Yingyang Gongji Wan, YYGJ)对肝癌细胞株 HepG2 的体外作用,为临床应用提供依据。**方法:**制备 YYGJ 大鼠含药血清;四唑化合物(MTS)比色法检测 YYGJ 含药血清组和空白组抑制率;原位末端凋亡法(TUNEL)检测空白组,YYGJ 含药血清和 5-氟尿嘧啶(5-FU)组凋亡;实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 HepG2 细胞上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin),波形蛋白(Vimentin),基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和 Smad4 mRNA 和蛋白表达;细胞迁移分析(transwell)检测 HepG2 细胞侵袭能力。**结果:**YYGJ 含药血清呈浓度时间依赖性抑制 HepG2 细胞增殖,与空白组比较,第 3 天 YYGJ 5%,10%,20% 含药血清抑制率均明显升高( $P < 0.05$ );YYGJ 含药血清组凋亡率显著升高( $P < 0.05$ ),YYGJ 50% 含药血清组凋亡率与 5-FU 组比较差异不显著。与空白组比较,YYGJ 含药血清组 E-cadherin,Smad4 mRNA 和蛋白表达均明显升高,Vimentin,MMP-2 mRNA 和蛋白均明显降低( $P < 0.05$ ),与 5-FU 作用一致;与空白组比较,YYGJ 含药血清组 HepG2 细胞侵袭能力明显降低( $P < 0.05$ ),其中 YYGJ 50% 含药血清组与 5-FU 组细胞侵袭数目无显著差异。**结论:**阴阳攻积丸含药血清可抑制 HepG2 细胞增殖,诱导细胞凋亡,调节肿瘤细胞上皮间质转换(EMT)相关的 E-cadherin,Vimentin,MMP-2,Smad4 mRNA 和蛋白表达,并降低肿瘤侵袭能力,与化疗药物 5-FU 作用特点类似。该方可作为治疗肝癌寒湿证型的代表方,应深入研究其抗癌机制。

**[关键词]** 阴阳攻积丸;原发性肝癌;HepG2 细胞;上皮-间质转换

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5;R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0028-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20182420

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180927.1149.027.html>

**[网络出版时间]** 2018-09-27 17:05

## Effect of Yingyang Gongji Wan Contained Serum on Inhibiting HepG2 Cell Proliferation and Invasion, and Inducing Apoptosis

LI Yong-wei\*, XIE He-ping, CHEN Hong-jie, LI Yue, CHEN Yan, LI Yi-wei, LI Yu-jie, XIANG Xu  
(The Third Affiliated Hospital, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510630, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effect of Yingyang Gongji Wan (YYGJ) on hepatoma cell line HepG2, and provide evidence for clinical application. **Method:** YYGJ-contained rats serum was prepared. Then the inhibitory rate of cells was detected by methye thiazolye telrazlium (MTS) method in both YYGJ group and blank group. Apoptosis of HepG2 was detected by TdT-mediated dUT nick-end labeling (TUNEL) method in blank group, YYGJ group, and 5-fluorouracil (5-FU) group. The mRNA expression and protein expression levels of E-cadherin, Vimentin, metalloproteinase-2 (MMP-2) and Smad4 were detected by Real-time quantitative PCR (Real-time PCR) and Western blot respectively. The invasion ability of HepG2 cells was detected by cell migration assay (transwell). **Result:** YYGJ-contained serum inhibited the proliferation of HepG2 cells in a time and concentration-dependent manner. As compared with blank group, the inhibitory rate was increased in 5%, 10%,

**[收稿日期]** 20180605(008)

**[基金项目]** 广东省科技计划项目(2014A020212073);2018年广东省名中医传承工作室建设项目

**[通信作者]** \*李永伟,博士,副教授,从事中西医结合肝胆系统疾病研究,Tel:020-85253497,E-mail:liyongwei22@163.com

and 20% YYGJ-contained serum groups on the third day ( $P < 0.05$ ), and apoptosis rate was also increased significantly in YYGJ and 5-FU groups ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between 50% YYGJ group and 5-FU group in apoptosis rate. As compared with blank group, the mRNA and protein expression levels of E-cadherin and Smad4 were increased significantly, while Vimentin and MMP-2 mRNA and protein expression levels were decreased significantly in YYGJ and 5-FU groups ( $P < 0.05$ ). HepG2 cell invasive ability was decreased significantly in YYGJ and 5-FU groups as compared to blank group ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between 50% YYGJ group and 5-FU group. **Conclusion:** YYGJ-contained serum can inhibit the proliferation of HepG2 cells, induce apoptosis, regulate epithelial-mesenchymal transition (EMT)-related E-cadherin, Vimentin, MMP-2 and Smad4 genes and proteins, and decrease tumor invasion ability. The effect was similar to that of 5-fluorouracil. As a unique prescription, YYGJ can be used as a representative for the treatment of coldness and dampness syndrome of primary liver cancer and its anti-cancer mechanism should be further studied.

[**Key words**] Yingyang Gongji Wan; primary liver cancer; HepG2 cell; epithelial-mesenchymal transition (EMT)

我国是世界上原发性肝癌,主要为肝细胞肝癌(HCC)的高发区域。虽然已具有较完善的 HCC 综合治疗措施,但预后仍不理想,复发率高<sup>[1]</sup>。上皮间质转化(EMT)在肿瘤的侵袭转移中具有重要的作用。指的是上皮细胞分化为间质细胞,主要的特征为上皮细胞黏附分子,如上皮细胞钙黏蛋白(E-cadherin)表达缺失,获得间质细胞的特性,即成纤维细胞样的外形,波形蛋白(Vimentin)表达。EMT 在 HCC 中客观存在,并且与 HCC 的转移密切相关<sup>[2]</sup>,目前尚无有效的药物干预,因此研究抑制 HCC,干预 EMT 相关分子的药物对治疗 HCC 具有重要意义。中国 2017 版《原发性肝癌诊疗规范》指出中医药治疗是肝癌治疗的重要辅助手段<sup>[3]</sup>。肝癌属于中医学的癥瘕积聚范畴,现代文献研究显示古代医家认为阳气虚衰是癥瘕、积聚的主要病因病机,而其治多用温法<sup>[4]</sup>。《黄帝内经·灵枢·百病始生》云:“积之所生,得寒乃成,厥乃成积。”<sup>[5]</sup>《诸病源候论》云:“积聚者,由寒气在内所生也。”<sup>[6]</sup>现代研究也认为不论地域,癥瘕积聚病因以寒邪为主<sup>[7]</sup>。但目前治疗肝癌的中成药多以活血化瘀、软坚散结为主,含有动物类活血药,或多具清热解毒的功效,如斑蝥素<sup>[8]</sup>,肝复乐胶囊<sup>[9]</sup>;仅联合肝动脉化疗栓塞的中药注射剂就至少 16 种,其中 7 种注射剂显示了协同增效作用<sup>[10]</sup>,但尚缺乏对于有寒证表现的肝癌用药。明朝李中梓创制的阴阳攻积丸主治五积、六聚、七癥、八瘕,痰食等,疗效颇佳<sup>[11]</sup>。其组方严谨,均由植物药组成,谓其不论阴阳皆效。方选吴茱萸、干姜、肉桂、制川乌、酒黄连、生半夏、橘红、茯苓、槟榔、厚朴、枳实、石菖蒲、延胡索、人参、沉香、琥珀、桔梗、巴豆霜、皂角、生姜等。融理气、温散、化

痰、散结、通下为一炉,配伍精湛,为后世所常用<sup>[12]</sup>。本课题组应用该方治疗 HCC 取得了较好的临床效果,但尚缺乏实验研究证明,既往亦未见相关研究,因此本研究探讨阴阳攻积丸的体外抗癌效果,为临床提供依据。肝癌的复发与 EMT 转换密切相关,包括关键分子 Vimentin, E-cadherin 的变化,也与基质金属蛋白酶(MMP)溶解细胞外基质为转移提供条件有关,亦受到抑癌基因 Smad4 的调节,因此本课题将研究 YYGJ 对该 4 个分子的调节,及是否可抑制肝癌细胞株的生长和诱导凋亡,并降低癌细胞的侵袭能力。

## 1 材料

**1.1 细胞和动物** 人肝癌细胞 HepG2(广州铭善上生物科技有限公司赠送),复苏后加入含胎牛血清的 DMEM 培养基,培养条件 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度,传至第 3 代。清洁级健康 SD 成年大鼠,体质量(200 ± 50)g,雌雄各半,购自广东省医学实验动物中心,合格证号 SCXK(粤)2013-0002,由中山大学附属第三医院实验动物伦理委员会审核通过,编号 2017-005。SPF 级鼠料为广东省医学实验动物中心供应,适应性喂养 3 d,按随机数字表随机分为空白血清组和阴阳攻积丸组,各 5 只。

**1.2 试剂** 胎牛血清,DMEM-高糖培养基,青-链霉素,磷酸钾缓冲液(PBS)(美国 Hyclone 公司,批号分别为 SH30022.01B, SH30087.01, SH3001, SH3025 6.01B);5-氟尿嘧啶(5-FU,美国 MCE 公司,批号 51-21-8);cellTiter96AQ 单溶液细胞增殖检测试剂,原位末端凋亡法(TUNEL)试剂盒, RNase-free DNase I,逆转录试剂盒(美国 Promega 公司,货号分别为 G3582, G3250, M6101, A3500);SYBR Green

qPCR Super Mix 定量 PCR 检测试剂盒, trizol (美国 Invitrogen 公司, 货号分别为 C11744100, 15596026); 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (上海康成生物公司, 货号 KC-5G5); Anti-Vimentin antibody, Anti-Smad4 antibody, Anti-MMP-2 antibody (英国 Abcam 公司, 货号分别为 ab8978, ab40759, ab38898); E-cadherin 单克隆抗体 (美国 Cell Signaling 公司, 货号 31915); 过氧化物酶标记兔抗大鼠免疫球蛋白 (Ig) G (武汉博士德生物工程有限公司, 货号 BA1058); matrigel, transwell 小室 (美国 BD 公司, 货号分别为 356234, REF3530)。

**1.3 仪器** Q0313876 型解剖镜 (中国上海光学仪器一厂); IS7 型智能型独立通气笼 IVC 系统 (苏州市苏杭科技器材有限公司); SW-CJ-IFD 型超净工作台 (苏州安泰空气技术有限公司); CKX41, U-CTR30-2 型倒置光学显微镜 (日本 Olympus 公司); DMI6000B 型倒置荧光显微镜 (德国 Leica 公司); HERACELL150i 型细胞恒温培养箱, multiscan MK3 型酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PRISM® 7500 Sequence Detection System 型定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司); EPS100 型电泳仪, Tanon 1220 型凝胶图像分析仪 (中国上海天能科技有限公司); mini protean 4 型小型垂直电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 阴阳攻积丸含药血清制备** 药物组成严格按照明朝李中梓《医宗必读》中阴阳攻积丸的配方, 药材来源于中山大学附属第三医院中药房, 由该院中药房吴小林主任药师鉴定为正品, 方药组成: 吴茱萸、干姜、肉桂、制川乌各 30 g, 酒黄连、生半夏、橘红、茯苓、槟榔、姜厚朴、麸炒枳实、菖蒲、醋延胡索、人参<sup>(去芦)</sup>、沉香、琥珀<sup>(另研)</sup>、桔梗各 2.4 g, 巴豆霜 15 g<sup>(另研)</sup>。以上各药为细末, 皂角 180 g 和生姜 10 g, 分别于冷水中浸泡 30 min, 分别用武火煮沸后改文火煎煮 30 min, 煎煮 2 次的药液置于常温, 混合上述细末泛为丸, 每丸含生药 4 g。

动物给药剂量 = 临床常用量 × 动物等剂量系数<sup>[13]</sup>, 成人用量是每天 4 g · (60 kg)<sup>-1</sup>, 换算成大鼠的等效剂量为 0.083 g。常规法纯水溶解质量浓度为 83 g · L<sup>-1</sup>, 灌药组动物每次灌药 1 ~ 2 mL, 通过开口器、灌胃管给药, 每日 9:00, 21:00 各灌胃 1 次, 持续 7 d, 于末次灌胃 2 h 后, 主动脉采血, 分离血清, 0.22 μm 滤膜过滤后, 无菌分装冷藏备用。

**2.2 四唑化合物 (MTS) 比色法检测细胞增殖** 实

验分组为空白组 (未加任何干预), 阴阳攻积丸含药血清 5%, 10%, 20% 组。收集各组细胞, 消化后调整细胞密度为 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL, 加至 96 孔板, 每孔 100 μL。细胞贴壁后, 收集各个时间点细胞 (0, 24, 48, 72 h) 按照说明书加入 cellTiter96AQ 单溶液细胞增殖检测试剂, 孵育 4 h 后, 酶标仪读板, 在波长 490 nm 检测其吸光度, 抑制率 = (1 - A<sub>实验组</sub> / A<sub>溶剂组</sub>) × 100%。

**2.3 TUNEL 检测细胞凋亡** 实验分组为空白组 (未加任何干预), 10% 阴阳攻积丸含药血清组, 50% 阴阳攻积丸含药血清组, 5-FU 组。细胞爬片, 4% 甲醛溶液 4 °C 固定 25 min。PBS 洗涤, 0.2% Triton X-100 室温孵育 5 min, PBS 洗涤, 按照 TUNEL 检测说明书, 加 Equilibration buffer 100 μL 室温平衡 10 min。加入 TdT 工作液 50 μL, 37 °C 湿盒避光孵育 60 min, 2 × SSC 溶液洗涤 15 min, PBS 溶液室温洗涤, DAPI 染液室温湿盒避光孵育 10 min, 去离子水室温洗涤, 荧光淬灭剂封片, 荧光显微镜镜检 (避光, 4 °C 保存)。

**2.4 实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测相关 mRNA 表达** 实验分组为空白组 (未加任何干预), 空白血清 (大鼠血清) 组, 10% 阴阳攻积丸含药血清组, 5-FU 组。药物干预后 48 h 收集细胞, 采用 trizol 法提取细胞总 RNA, 检测总 RNA 纯度和完整性, 按说明书体系配置反应液, 37 °C 30 min, 65 °C 10 min, 逆转录试剂生成 cDNA, PCR 反应按照试剂盒说明书进行, 反应条件: 50 °C 2 min; 95 °C 2 min; 95 °C 15 s, 60 °C 32 s, 40 个循环; 融解曲线分析: 温度 60 ~ 95 °C。每个样本重复 3 次, 按照 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 表示 mRNA 相对表达量。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 见表 1。

表 1 引物设计

Table 1 Primer design

引物	序列	长度/bp
MMP-2	上游 5'-AGCATGTCCCTACCGAGTCT-3'	180
	下游 5'-CCCTGTCTAGGCTCTGCTA-3'	
Smad4	上游 5'-TGCTGTTGCAAAGGCTGCTT-3'	283
	下游 5'-GCTTCTGGCATAGCTGCATT-3'	
Vimentin	上游 5'-GACCAGCTAACCAACGACAA-3'	120
	下游 5'-GTTTTGGCTTCTCTCTCT-3'	
E-cadherin	上游 5'-GTACTCAAAGCCAGAATCC-3'	180
	下游 5'-CCCTCAACTAACCCCTTTA-3'	
β-actin	上游 5'-TGGATCAGCAAGCAGGAGTA-3'	275
	下游 5'-TCGGCCACATTGTGAACCTT-3'	

**2.5 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测相关蛋白表达** 细胞分组同 2.4 项。药物干预后 48 h 收集细胞,按照说明书抽提总蛋白,BCA 法测量蛋白浓度,蛋白变性,配制分离胶和浓缩胶,80 V 恒压 50 min,120 V 恒压电泳至溴酚蓝刚出胶底部止。蛋白转至 PVDF 膜上。取出杂交膜,TBST 漂洗,5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h,加入一抗 (1:1 000),GAPDH (1:1 万) 4 ℃ 过夜,TBST 洗膜,加入二抗 (1:2 000) 37 ℃ 孵育 1 h,分别用 TBST 和蒸馏水洗膜。化学荧光发光底物加至 PVDF 膜上,反应 5 min,曝光后拍照,Image J 软件获得灰度值进行统计处理。

**2.6 transwell 检测细胞迁移** 细胞分组同 2.3 项。按照说明书,用预冷的无血清培养基以 1:3 稀释 matrigel,取 40 μL 加入预冷的 transwell 小室,37 ℃ 孵育 2 h 使 matrigel 凝固,上室、下室分别加入无血清培养基 100,600 μL,37 ℃ 平衡过夜。细胞加药第 2 天,计数  $1 \times 10^5$  个细胞,用无血清 DMEM 培养基 100 μL 重悬,加入 transwell 小室上室,在下室加入完全培养基 600 μL。在 37 ℃ 5%CO<sub>2</sub> 孵育 48 h 后,取出小室,用棉签擦去上室的细胞,4% 多聚甲醛固定 15 min,PBS 洗涤 1 次,结晶紫染色 10 min,PBS 洗涤 1 次,拍照统计穿过小孔的细胞。

**2.7 统计学处理** 统计软件采用 SPSS 22.0,数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,正态分布计量资料比较采用单因素方差分析,计数资料采用卡方检验,偏态分布、方差不齐采用 Mann-Whitney U 秩和检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 阴阳攻积丸含药血清对 HepG2 细胞增殖抑制的影响** 与空白组比较,第 1,2 天 5% 阴阳攻积丸含药血清组细胞抑制率无明显差异;第 3 天 5% 阴阳攻积丸含药血清组以及第 1~3 天 10%,20% 阴阳攻积丸含药血清组细胞抑制率明显升高 ( $P < 0.05$ ),显示阴阳攻积丸含药血清对 HepG2 细胞的抑制率随着浓度及时间的变化而升高。见表 2。

**3.2 阴阳攻积丸含药血清对 HepG2 细胞凋亡的影响** 10%,50% 阴阳攻积丸含药血清组和 5-FU 组可导致细胞凋亡,与空白组比较,3 组凋亡细胞明显升高 ( $P < 0.05$ ),与 10% 阴阳攻积丸含药血清组分别比较,50% 阴阳攻积丸含药血清组和 5-FU 组凋亡细胞明显升高 ( $P < 0.05$ ),50% 含药血清组与 5-FU 组比较差异不明显。见图 1。

**3.3 阴阳攻积丸含药血清对 E-cadherin, Vimentin,**

表 2 阴阳攻积丸含药血清对 HepG2 抑制率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of Yinyang Gongji Wan (YYGJ) contained serum on inhibition of HepG2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

时间/d	组别	体积浓度/%	抑制率/%		
0	空白	-	0 ± 0.02		
	阴阳攻积丸	5	0.17 ± 0.05		
		10	0.67 ± 0.02		
		20	1.5 ± 0.05		
		1	空白	-	0 ± 0.40
			阴阳攻积丸	5	2.42 ± 1.45
10	9.14 ± 0.47 <sup>1)</sup>				
		20	11.56 ± 1.82 <sup>1)</sup>		
		2	空白	-	0 ± 0.03
			阴阳攻积丸	5	6.84 ± 3.63
10	14.81 ± 1.33 <sup>1)</sup>				
		20	17.09 ± 0.79 <sup>1)</sup>		
		3	空白	-	0 ± 0.04
			阴阳攻积丸	5	10.3 ± 1.44 <sup>1)</sup>
10	20.79 ± 0.85 <sup>1)</sup>				
		20	23.62 ± 2.58 <sup>1)</sup>		

注:与同时间空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ 。

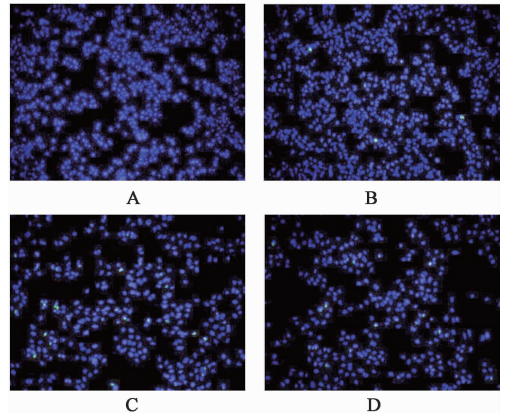


图 1 阴阳攻积丸含药血清对 HepG2 细胞凋亡的影响 (倒置荧光显微镜, ×100)

Fig. 1 Effect of YYGJ-contained serum on apoptosis of HepG2 cells (inverted fluorescence microscope, ×100)

**Smad4, MMP-2 mRNA 和蛋白表达的影响** 与空白组和空白血清组比较,10% 阴阳攻积丸含药血清组和 5-FU 组 E-cadherin, Smad4 mRNA 和蛋白明显升高, Vimentin, MMP-2 mRNA 和蛋白明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3,4,图 2。

**3.4 阴阳攻积丸含药血清对 HepG2 细胞侵袭的影响** 与空白组比较,阴阳攻积丸含药血清组和 5-FU

组细胞侵袭数目减少 ( $P < 0.05$ ); 与 10% 阴阳攻积丸含药血清组比较, 其 50% 含药血清组肝癌细胞侵

袭数目明显减少 ( $P < 0.05$ ), 但 50% 阴阳攻积丸含药血清组与 5-FU 组无明显差异。见图 3。

表 3 阴阳攻积丸含药血清对 Vimentin, E-cadherin, MMP-2, Smad4 mRNA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of YYGJ-contained serum on Vimentin, E-cadherin, MMP-2 and Smad4 mRNA expression ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

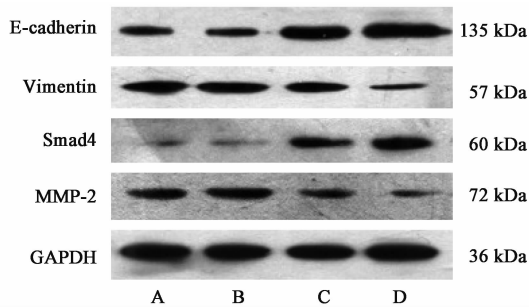
组别	浓度	Vimentin	E-cadherin	MMP-2	Smad4
空白	-	1.00 ± 0.05	1.06 ± 0.44	1.01 ± 0.20	1.01 ± 0.16
空白血清	-	1.00 ± 0.02	1.04 ± 0.50	0.99 ± 0.60	1.00 ± 0.33
阴阳攻积丸	10%	0.69 ± 0.11 <sup>1,2)</sup>	1.81 ± 0.47 <sup>1,2)</sup>	0.50 ± 0.06 <sup>1,2)</sup>	1.84 ± 0.2 <sup>1,2)</sup>
5-FU	50 mg·L <sup>-1</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>	2.80 ± 0.55 <sup>1,2)</sup>	0.49 ± 0.20 <sup>1,2)</sup>	2.87 ± 0.15 <sup>1,2)</sup>

注: 与空白组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与空白血清组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$  (表 4 同)。

表 4 阴阳攻积丸含药血清对 Vimentin, E-cadherin, MMP2, Smad4 蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of YYGJ-contained serum on Vimentin, E-cadherin, MMP-2 and Smad4 protein expression ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度	Vimentin/GAPDH	E-cadherin/GAPDH	MMP-2/GAPDH	Smad4/GAPDH
空白	-	0.94 ± 0.02	0.47 ± 0.02	1.06 ± 0.09	0.05 ± 0.01
空白血清	-	0.91 ± 0.07	0.47 ± 0.03	1.09 ± 0.03	0.06 ± 0.01
阴阳攻积丸	10%	0.48 ± 0.04 <sup>1,2)</sup>	1.13 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.84 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.48 ± 0.08 <sup>1,2)</sup>
5-FU	50 mg·L <sup>-1</sup>	0.23 ± 0.03 <sup>1,2)</sup>	1.41 ± 0.01 <sup>1,2)</sup>	0.46 ± 0.0 <sup>1,2)</sup>	0.84 ± 0.22 <sup>1,2)</sup>



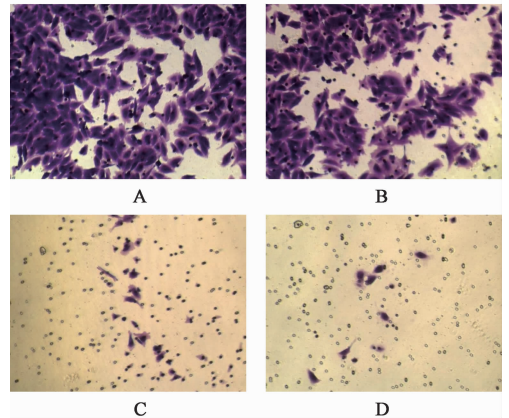
A. 空白组; B. 空白血清组; C. 10% 阴阳攻积丸含药血清组; D. 5-FU 组

图 2 阴阳攻积丸作用于细胞后 E-cadherin, Vimentin, Smad4 和 MMP-2 蛋白表达电泳

Fig. 2 Electrophoresis of YYGJ on E-cadherin, Vimentin, Smad4, and MMP-2 protein expression in HepG2 cells

#### 4 讨论

根据积聚寒痰凝结的病机, 明朝李中梓首创温阳散结之名方阴阳攻积丸, 出自其《医宗必读》<sup>[11]</sup>, 整方以皂角煎液水泛为丸, 生姜汤送服, 皂角最大剂量达 180 g, 其次, 温热药物吴茱萸、干姜、肉桂、制川乌各 30 g, 巴豆霜 15 g, 取其“益火之源, 以消阴翳”之意, 以祛寒化痰; 其三, 生半夏、橘红、茯苓、枳实、厚朴、石菖蒲、桔梗多味药祛痰除湿; 其四, 槟榔、枳实、厚朴、沉香亦兼行气; 延胡索、琥珀活血, 人参益气, 小量酒黄连苦寒防止过于辛热。功用温中理气,



A. 空白组; B, C. 10%, 15% 阴阳功能积丸含药血清组; D. 5-FU 组

图 3 阴阳攻积丸含药血清对 HepG2 细胞侵袭的影响 (transwell, × 200)

Fig. 3 Effect of YYGJ-contained serum on HepG2 cells invasion (transwell, × 200)

化痰导滞, 破癥散积, 主治五积、六聚, 七癥、八瘕, 痰癖、虫血, 痰食。虽整方药性偏热, 但李中梓强调该方无论阴阳寒热, 只要是积聚癥瘕痞满之类皆可应用, 即辨病论治为主, 医案中有用于治疗襄阳郡守脾有大积, 配合调补仅 1 月而愈。

目前对于中药复方的实验研究仍需借助含药血清, 原书中以 2.4 g 渐加至 4.5 g, 也有以 4 g 加至 8 g, 本实验以相当于 4 g 的成人量予大鼠灌胃, 结果显示阴阳攻积丸含药血清可抑制 HepG2 细胞株

增殖,随着作用时间的延长和药物浓度的增加,其抑制率较空白组明显升高。TUNEL 检测显示 10% 阴阳攻积丸含药血清即可引起 HepG2 细胞凋亡,50% 阴阳攻积丸含药血清组凋亡率更明显,与 5-FU 组效果相当。HepG2 细胞 transwell 实验显示阴阳攻积丸含药血清可降低细胞侵袭能力,尤其是 50% 阴阳攻积丸含药血清降低侵袭能力与 5-FU 相比无明显差异,提示阴阳攻积丸抑制肿瘤细胞疗效与其血清浓度有关。为探讨阴阳攻积丸上述作用的机制,本研究检测与肝癌 EMT 转换、侵袭转移相关的分子。结果显示阴阳攻积丸含药血清可升高 E-cadherin, Smad4 mRNA 和蛋白表达,同时降低 Vimentin, MMP-2 水平,与空白组和空白血清组相比差异明显,其作用与 5-FU 一致。提示阴阳攻积丸可能通过调节 EMT 相关的多个分子,抑制肝癌细胞从上皮细胞向间质细胞转换,从而降低其侵袭能力。

肿瘤 EMT 是人体多种肿瘤侵袭转移的普遍表现之一, E-cadherin, Vimentin, Smad4, MMP-2 均与 EMT 相关。主要表现为细胞黏附分子(如 E-cadherin)表达减少,细胞骨架转化为 Vimentin 为主,从而使细胞获得了迁移侵袭能力,这两个分子对 EMT 具有关键的调控作用<sup>[14-15]</sup>。在肝癌组织中 E-cadherin 表达降低, Vimentin 表达增高与肝癌的分化程度(低分化/未分化)和转移具有明显的相关性<sup>[2]</sup>。MMP-2 属于基质金属蛋白酶家族,具有降解细胞外基质的作用,因此为肿瘤细胞的转移侵袭解除了组织学屏障的阻碍,在肝癌细胞株干扰 MMP-2 后,可伴随 E-cadherin 升高和 Vimentin 下降<sup>[16]</sup>。Smad4 处于 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的中心位置,被认为是抑癌基因,可减少细胞侵袭能力,但在肝癌中的机制研究较少<sup>[17]</sup>。目前缺乏对肝癌 EMT 的有效药物是导致肝癌治疗后高复发的原因之一。

无论是古代还是现代,对皂荚植物的抗癌作用研究一直集中在皂角刺<sup>[18]</sup>,而很少认识到荚果皂角的抗癌功能。临床仅有治愈 1 例手术确诊晚期胃癌的病例报道,并随访 3 年<sup>[19]</sup>。《中药大辞典》记载皂角辛、温、微毒,功能主治祛风痰,除湿毒杀虫,含有三萜皂苷、鞣质、蜡醇、廿九烷、豆甾醇、谷甾醇等,多以研末入丸剂,或外用<sup>[20]</sup>。其中三萜皂苷也是藏族药翼首草的主要抗肿瘤化学成分,该药提取物可上调 Hep3B 肝癌细胞株 E-cadherin 蛋白,可能也是阴阳攻积丸含药血清具有上调该蛋白的药理基础之一<sup>[21]</sup>。翼首草提取物还可抑制 Hep3B 细胞磷酸化的 Smad4,而本研究结果显示阴阳攻积丸上调的是

HepG2 细胞 Smad4 总蛋白,且与 5-FU 作用一致,这可能与 Smad4 本身在不同的研究中差别较大<sup>[17]</sup>有关,这种差异值得进一步研究。本研究还提示伴随 EMT 相关蛋白 E-cadherin 上调和 Vimentin 的降低,阴阳攻积丸含药血清可下调 MMP-2;该方中的吴茱萸更具有多种抗癌成分,包括可抑制多药耐药性肿瘤株<sup>[22]</sup>,减少细胞外蛋白激酶(ERK)转导通路 ERK 及磷酸化 ERK 的蛋白表达,抑制血管内皮生长因子(VEGF)表达<sup>[23]</sup>。上述机制不同于单药成分发酵虫草菌粉含药血清的药理作用,后者作用 SMMC-7721 肝癌细胞可抑制 VEGF,但对 MMP-2 无效<sup>[24]</sup>,两者之间的差异值得进一步探讨。另外如半夏<sup>[25]</sup>、巴豆霜<sup>[26]</sup>的抗癌作用也有报道,提示该方作为古代治疗癥瘕积聚的名方,具有现代研究所发现的诸多抗癌成分,其总体疗效值得进一步研究。

综上,本研究首次探讨了经典古方阴阳攻积丸的体外抗肝癌效果,初步显示阴阳攻积丸 10% 的含药血清浓度即可抑制 HepG2 细胞增殖和导致凋亡,并调节肿瘤 EMT 相关的分子,但 10% 含药血清浓度的作用强度尚不及 5-FU。本实验显示 50% 含药血清浓度效果方与 5-FU 效果相当,故其药物用量及所含的有效成分需要进一步探索。该方以攻为主,药性偏热,临床应用亦需根据患者兼证,配合其他方剂调补。

#### [参考文献]

- [1] Raza A, Sood G K. Hepatocellular carcinoma review: current treatment, and evidence-based medicine [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(15): 4115-4127.
- [2] 周顺. EMT 相关蛋白在肝细胞肝癌组织中的表达鉴定及相关 microRNA 表达谱的研究 [D]. 南京: 南京医科大学, 2010.
- [3] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 原发性肝癌诊疗规范(2017 年版) [J]. 临床肝胆病杂志, 2017, 33(8): 1419-1431.
- [4] 何新慧, 朱娇玉, 吴中平. 历代文献癥瘕、积聚证治计算机分析 [J]. 上海中医药杂志, 2004, 38(11): 62-64.
- [5] 荆汝雯. 黄帝内经 [M]. 武汉: 华中科技大学出版社, 2017: 282-286.
- [6] 柳长华. 巢元方·诸病源候论 [M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2016: 194-202.
- [7] 陈玉超, 刘沈林. 浅谈扶阳法在肿瘤治疗中的应用 [J]. 吉林中医药, 2005, 25(3): 13-15.
- [8] 封艳艳, 马齐襄, 隋彤彤, 等. 斑蝥素对肝癌 HepG2 细胞增殖、凋亡的影响及其可能机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(15): 112-117.

- [ 9 ] 潘宇,李顺祥,黄丹,等. 基于网络药理学预测肝复乐治疗肝细胞癌的抗癌活性成分[J]. 中华中医药杂志,2014,29(5):1490-1498.
- [ 10 ] 石芳毓,娄丽丽,谢吻,等. 中药注射剂联合肝动脉插管栓塞化疗术治疗肝癌的网状 Meta 分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(10):180-187.
- [ 11 ] 包来发. 李中梓医学全书[M]. 北京:中国中医药出版社,2015:206-210.
- [ 12 ] 许兴涛. 论《医宗必读》对中医肿瘤学的贡献[J]. 河南中医药学刊,2000,15(2):2-3.
- [ 13 ] 卓少元,谢金玲. 健脾益气方含药血清通过 Caspase-3/Vimentin 促进人肝癌 MHCC-97H 细胞凋亡[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(24):161-166.
- [ 14 ] 李裕明,韩克强,郑璐,等. 上皮间质转化标志物 E-cadherin 和 Vimentin 在原发性肝癌中的表达及其临床意义[J]. 中华肝脏病杂志,2013,21(4):279-284.
- [ 15 ] 谢金玲,卓少元. Vimentin 在原发性肝癌发生发展及凋亡过程中的作用[J]. 中国肿瘤,2017,26(2):130-134.
- [ 16 ] 何平. 探讨基质金属蛋白酶 2 在肝癌细胞株 SMMC-7721 上皮间质转化发生中的作用[J]. 临床医药文献电子杂志,2016,3(14):2682-2684.
- [ 17 ] 黄晓丹,张发明,季国忠. Smad4 在肿瘤侵袭和转移中的作用[J]. 世界华人消化杂志,2009,17(9):849-853.
- [ 18 ] 王蓟花,唐静,李端,等. 皂荚化学成分和生物活性的研究进展[J]. 中国野生植物资源,2008,27(6):1-3.
- [ 19 ] 张传清. 皂角为主治愈晚期胃癌 1 例[J]. 四川中医,1988,1(2):22.
- [ 20 ] 南京中医药大学. 中药大辞典[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1592-1597.
- [ 21 ] 郭晨旭,吴迎春,朱元章,等. 藏族药翼首草正丁醇部位提取物体外抑制人肝癌 Hep3B 细胞增殖和侵袭转移[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(3):100-105.
- [ 22 ] 龚慕辛,王智民,张启伟,等. 吴茱萸有效成分的药理研究进展[J]. 中药新药与临床药理,2009,20(2):183-187.
- [ 23 ] Shyu K G, LIN S, Lee C C, et al. Evodiamine inhibits invitro angiogenesis; implication for antitumor genicity [J]. Life Sci,2006,78(19):2234-2243.
- [ 24 ] 曾志涛,傅纓,熊耀斌,等. 发酵虫草菌粉对人肝癌细胞增殖、凋亡及 VEGF, MMP2 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):141-144.
- [ 25 ] 李玉先,刘晓东,朱照静. 半夏药理作用的研究述要[J]. 辽宁中医学院学报,2004,6(6):459-460.
- [ 26 ] 李佳桓,林海红,杜钢军. 巴豆不同给药方式对荷瘤小鼠的影响[J]. 河南大学学报:医学版,2012,31(1):8-11.

[责任编辑 张丰丰]