

· 药理 ·

叶下珠复方Ⅱ号对肝癌 Huh7 细胞增殖、凋亡与自噬的影响

杜欣芸, 李常青*, 陈滨, 李小翠

(广州中医药大学热带医学研究所, 中药学院, 广州 510405)

[摘要] 目的:观察叶下珠复方Ⅱ号对肝癌 Huh7 细胞增殖、凋亡与自噬的影响,进一步探讨其抗肝癌的作用机制。方法:体外培养肝癌 Huh7 细胞,设空白组,叶下珠复方Ⅱ号高、低质量浓度组($40, 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)和5-氟尿嘧啶(5-FU)($0.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)组,采用噻唑蓝(MTT)比色法检测叶下珠复方Ⅱ号对肝癌 Huh7 细胞增殖的影响,流式细胞仪检测细胞凋亡变化,单丹磺酰尸胺(MDC)染色观察药物作用后细胞自噬体的变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测各组磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K),丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶2(Akt2),B淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)和微管相关蛋白1轻链3(LC3Ⅱ)mRNA表达的改变,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Akt2 和 LC3Ⅱ蛋白表达的变化。结果:叶下珠复方Ⅱ号($40, 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)可显著抑制肝癌 Huh7 细胞,并诱导其凋亡,凋亡率分别为 51.72%, 19.74%, 显著高于空白组($P < 0.01$)。采用 MDC 染色后,叶下珠复方Ⅱ号($40, 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)组可见大量自噬体的形成。与空白组比较,叶下珠复方Ⅱ号高、低剂量组 PI3K, Akt2, Bcl-2 mRNA 表达均显著下降, LC3Ⅱ mRNA 表达均显著增加($P < 0.01$)。与空白组比较,叶下珠复方Ⅱ号($40, 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)组处理后的 Akt2 蛋白表达显著下降, LC3Ⅱ 蛋白表达明显增加($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:叶下珠复方Ⅱ号对肝癌 Huh7 细胞增殖有明显的抑制作用,其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路活化从而诱导细胞凋亡和自噬有关。

[关键词] 叶下珠复方Ⅱ; 增殖; 凋亡; 自噬; Huh7 细胞

[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)02-0048-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20182422

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180929.1352.006.html>

[网络出版时间] 2018-09-30 11:32

Effect of Compound *Phyllanthus urinaria* II (CPU II) on Proliferation, Apoptosis and Autophagy of Hepatocellular Carcinoma Huh7 Cells

DU Xin-yun, LI Chang-qing*, CHEN Bing, LI Xiao-hui

(Institute of Tropical Medicine, School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect and investigate the mechanism of compound *Phyllanthus urinaria* II (CPU II) on proliferation, apoptosis and autophagy of human hepatoma cell line Huh7. **Method:** Huh7 cells were cultured *in vitro* and divided into blank control group, high-dose CPU II group ($40 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), low-dose CPU II group ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), and 5-FU group ($0.04 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$). Methye thiazolye telrazlium (MTT) assay was used to detect the inhibitory effect of CPU II on proliferation of human hepatoma Huh7 cells. The apoptosis rate was observed by Annexin V-FITC/PI flow cytometry; the changes of autophagosomes in each group were observed by monodansylcadaverin (MDC) staining; Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) was used to detect the mRNA expression of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), Serine-threonine protein kinase 2 (Akt2), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) and Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3Ⅱ) and Western blot was used to detect the protein expression of Akt2 and LC3Ⅱ. **Result:** CPU II ($40, 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)

[收稿日期] 20180705(010)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81673861,81373524)

[第一作者] 杜欣芸, 硕士, 从事抗肿瘤中药药理研究, E-mail:gzdx0825@126.com

[通信作者] *李常青, 博士, 研究员, 从事肝病与肿瘤研究, Tel:020-36585419, E-mail:1106923438@qq.com

significantly inhibited the hepatoma cell line Huh7 and induced apoptosis, with an apoptosis rate of 51.72% and 19.74% respectively, significantly higher than that of control group ($P < 0.01$). After MDC staining, it was observed that a large number of fluorescent particles were distributed in the cytoplasm and nucleus of liver cancer cells under the effect of CPU II. As compared with blank control group, the mRNA expression levels of PI3K, Akt2, and Bcl-2 were decreased significantly while the mRNA expression of LC3 II was increased significantly in CPU II high-and low-dose groups ($P < 0.01$); the protein expression of Akt was significantly decreased while protein expression of LC3 II was significantly increased in CPU II high-dose and low-dose groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** CPU II had obvious inhibitory effect on the proliferation of hepatoma cell line Huh7, and the mechanism may be related to inhibiting the activation of PI3K/Akt signaling pathway to induce apoptosis and autophagy.

[Key words] *Phyllanthus urinaria* II; autophagy; proliferation; apoptosis; Huh7 cells

肝细胞肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,全球发病率逐年升高。由于肝癌起病隐匿、侵袭性强、发病时多已属晚期,西医治疗上多以手术治疗为主,但预后差,死亡率高,是严重威胁我国人民健康和生命的重大疾病^[1]。因此,从分子和基因水平研究出对肝癌有效的治疗手段日益重要。磷脂酰肌醇 3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 是广泛存在于细胞中的信号通路,其在调节肿瘤细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进肿瘤细胞血管形成和转移及促进肿瘤细胞的侵袭转移中均发挥重要的作用^[2]。近年研究发现,PI3K/Akt 是细胞自噬典型的信号通路^[3],其可通过抑制细胞自噬从而促进细胞凋亡^[4]。相关研究发现可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导子宫内腺癌 Ishikawa 细胞发生自噬,从而发挥抗肿瘤的作用^[5-6]。

细胞自噬是细胞程序性死亡之一,是细胞通过形成自噬溶酶体以清除细胞内变性的蛋白及衰老的细胞“自噬样”死亡的过程,是机体在应激状态下产生的自我保护机制,与细胞坏死、细胞凋亡共同存在^[7]。近年来研究表明,细胞自噬和凋亡与肝癌的发生发展有着密切的联系。查勇等^[8]研究发现,5-氟尿嘧啶 (5-FU) 联合苦参碱作用于肝癌细胞 SMMC-7721 可下调抗凋亡基因 B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 的表达及上调自噬相关基因自噬相关基因 5 (Atg5), Beclin-1 的表达,从而抑制肝癌细胞 SMMC-7721 的增殖,增加其化学治疗的效果;张多强等^[9]研究发现枸杞多糖可诱导肝癌 HepG2 细胞自噬增强,但该作用抑制了肝癌细胞的凋亡作用,从而促进肝癌细胞的生长。以上研究表明,细胞自噬在肝癌的发生发展中具有一定作用,但是否通过 PI3K/Akt 信号通路尚需进一步研究。

在中医学上,肝癌的病因病机主要为肝失疏泄,

脏腑气血亏虚,瘀毒、湿邪蕴结于肝,渐成症结。治法上多以健脾补肾、养阴柔肝、活血化瘀、化痰软坚、清热解毒、益气清毒为主。本课题组所研究的叶下珠复方 II 号由叶下珠、太子参、三七和苦参等组成,具有清热解毒、健脾补肾、活血化瘀的功效,前期的研究表明,叶下珠复方 II 号在体内可较好地抑制肝癌的发生发展^[10-11]。在体外可以显著抑制肝癌 Huh7 细胞增殖^[12],但该作用是否通过抑制 PI3K/Akt 信号通路从而诱导细胞自噬或细胞凋亡产生的分子机制尚不清楚,本实验通过检测 PI3K/Akt 信号通路及自噬标记物微管相关蛋白 1 轻链 3 II (LC3 II) 等相关 mRNA 及蛋白水平,为叶下珠复方 II 号抗肝癌提供新的靶点。

1 材料

1.1 细胞 人肝癌 Huh7 细胞由广州蓝博生物公司提供;L02 细胞由中桥新舟生物公司提供,传至 3 代。

1.2 药物与试剂 叶下珠复方 II 号的组方药材购于广州中医药大学第一附属医院,所有药材经广州中医药大学中药学院李小翠副教授鉴定,叶下珠为大戟科植物叶下珠 *Phyllanthus urinaria* 的干燥全草,苦参为豆科植物苦参 *Sophora flavescens* 的干燥根,三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* 的干燥根,太子参为石竹科植物太子参 *Pseudostellaria heterophylla* 的干燥根,均为正品,水煎后冷却,经旋转蒸发浓缩至含生药 $2.0 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,经 $0.22 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,分装至离心管中,置于 $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱保存,临用前用 DMEM 培养液配制成所需浓度。胎牛血清,DMEM 高糖培养基,青链霉素 (Gibco 公司,批号分别为 A31806-02, C11875500BT, 15104-122); 0.25% 胰酶消化液 (中国医学科学院医药生物技术研究所,批号 J150211); 5-FU (上海旭东海普药业有

限公司,批号 FA1617003);噻唑蓝(MTT, Amresco 公司,批号 38085959);单丹磺酰尸胺(MDC)试剂盒(Sloarbio 公司,批号 G0170);Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)细胞凋亡检测试剂盒(贝博生物公司,批号 BB150101);SYBR GREEN qPCR Super Mix,总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen 公司,批号分别为 C11733046, 10296-028);LC3 II, PI3K, Akt2, Bcl-2, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表 1);人源 LC3 II 单克隆抗体(CST 公司,批号 3868S);兔抗人多克隆蛋白激酶 2(Akt2)抗体(Omnimabs 公司,批号 OM285019);HRP 标记的 GAPDH 一抗(杭州贤至科技公司,批号 AB-P-R001);细胞自噬染色检测试剂盒(Solarbio 公司,批号 G0170)。

表 1 PCR 引物序列及产物长度

Table 1 PCR primer sequence and product length

引物	引物(5'-3')	长度/bp
LC3-II	上游 CGACTTATTTCGAGAGCAGCA	233
	下游 ACCTCTGAGATTGGTGTGGA	
PI3K	上游 AAAGGCGGCTGAAAGGT	163
	下游 GACGATCTCCAATFCCAAA	
Akt2	上游 TGCGAAGGAAGTCATCATTG	181
	下游 CGGACAGGTGGAAGAACAG	
Bcl-2	上游 TCATGTGTGGAGAGCGTC	117
	下游 AGCCTCCGTTATCCTGGATC	
GAPDH	上游 GGGAAACTGTGCGGTGAT	299
	下游 GAGTGGGTGTCGCTGTGA	

1.3 仪器 Mini-PROTEAN Tetra 型垂直电泳仪及转移系统(美国 Bio-Rad 公司);SW-CJ-2D 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);Galaxy 170S 型二氧化碳培养箱(奥地利艾本德公司);CK40-F200 型倒置显微镜(上海智诚分析仪器有限公司);Elx808 型酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);ABI7500 型荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司);Simon 型蛋白免疫印迹法(Western blot)分析仪(美国 Protein Simple 公司);FACSCalibur II 型流式细胞仪(美国 BD 公司);XDY-2 型倒置荧光显微镜(广州粤显光学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 细胞培养 人肝癌 Huh7 细胞复苏后以含 1% 青-链霉素,10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中置于 37 °C 饱和湿度,5% CO₂ 的培养箱培养,每隔 2 d 换 1 次液,待细胞达到 90% 时,按 1:2 传代,传 3 代后

选择对数生长期的细胞进行实验。

2.2 Huh7 细胞半数抑制浓度(IC₅₀)测定 取传代 Huh7 细胞以密度 5 × 10³ 个/mL,接种于 96 孔板中,100 μL/孔,培养 24 h,分别加入 125,62.5,31.25,15.6,7.8,3.9 g · L⁻¹ 叶下珠复方 II 号,100 μL/孔,每组设 6 个复孔。培养 48 h,弃上清,采用 MTT 比色法检测,在酶标仪中选取 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_{空白组} - A_{药物组}) / A_{空白组} × 100%,采用 Logit 法测定 Huh7 细胞 IC₅₀^[13]。

2.3 Huh7 细胞增殖检测 细胞传代及培养同 2.2 项,培养 24 h,弃上清,设置空白组、叶下珠复方 II 号高、低质量浓度(40, 20 g · L⁻¹)组和 5-FU(0.04 g · L⁻¹)组,每组设 6 个复孔,培养 24,48 h,吸弃上清,加入 MTT 作用 4 h,在酶标仪中检测 490 nm 波长下 A,比较叶下珠复方 II 号对细胞增殖的影响。

2.4 Huh7 细胞凋亡检测 细胞培养、分组与给药同 2.3 项,各组设 3 个复孔,加药 48 h,吸弃上清,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗细胞 2 次,收集细胞,用 Annexin V binding buffer 200 μL 重悬细胞。于细胞悬液中加入 Annexin V-FITC 和 PI 各 10 μL,充分混匀后室温避光反应 15 min,加入 Annexin V binding buffer 300 μL,上流式细胞仪检测其凋亡率。结果判定,左上象限,机械损伤细胞(Annexin V FITC⁻/PI⁺);左下象限,活细胞(Annexin V FITC⁻/PI⁻);右上象限,凋亡晚期或坏死细胞(Annexin V FITC⁺/PI⁺);右下象限,早期凋亡细胞(Annexin V FITC⁺/PI⁻)^[14]。

2.5 Huh7 细胞自噬检测 采用 MDC 法检测。取传代 Huh7 细胞以密度 5 × 10⁴ 个/mL,接种于 6 孔板中,2 mL/孔,培养 24 h,吸弃上清,设置空白组、叶下珠复方 II 号高、低质量浓度(40,20 g · L⁻¹)组和 5-FU(0.04 g · L⁻¹)组,每组设 3 个复孔。加药培养 48 h,吸弃上清,按照 MDC 法说明书进行如下操作,消化收集细胞,用 1 × wash buffer 清洗细胞 1 次,弃上清,收集细胞,调整密度为 1 × 10⁶ 个/mL,取细胞悬液 90 μL,加入 MDC stain 10 μL,充分混匀后培养箱中避光染色 45 min,于荧光显微镜下观察(激发光滤光片波长 355 nm,阻断滤光片波长 512 nm)并拍照。

2.6 实时荧光定量 PCR 检测 PI3K, Akt2, Bcl-2, LC3 II mRNA 表达 细胞培养、分组及给药同 2.5 项,同时设置正常肝细胞(L02)组。加药培养 48 h,吸弃上清,收集细胞,以 trizol 法提取总 RNA,使用

RNase-free 的 DNase I 去基因组。按照逆转录反应试剂盒说明,每个样本取 RNA 1 μL 作为逆转录模板合成 cDNA,再以此为模板,按 20 μL 的反应体系进行 PCR 反应。反应条件:50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 32 s,40 个循环,每个样本设 3 个复孔,重复 3 次。以 GAPDH 为内参,分析扩增曲线,计算样本 $\Delta\Delta C_t$,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 表示 mRNA 相对表达。

2.7 Western blot 检测 LC3 II, Akt2 蛋白表达 细胞培养、分组及给药同 2.6 项,加药培养 48 h,吸弃上清,收集细胞,以 RIPA 裂解法提取各组蛋白,用 BCA 蛋白定量检测试剂盒法进行蛋白定量,按照各组总蛋白上样量均为 25 μg 进行聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳,并采用湿转法转移至 PVDF 膜上,在室温下用 10% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入一抗 LC3 II 单克隆抗体 (1:1 000),兔抗人多克隆 Akt2 抗体 (1:800),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;加入 HRP 标记的二抗 (1:2 500),室温孵育 1 h;彻底洗膜后,采用 ECL 荧光底物进行化学发光、显影、定影。于凝胶成像仪上拍照,并做灰度分析,实验重复 3 次。

2.8 统计学处理 将所得数据导入 SPSS 22.0 统计学软件进行分析,各组实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞 IC₅₀ 的影响 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞的 IC₅₀ 为 33.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,与空白组比较,随着药物质量浓度的升高,叶下珠复方 II 号对肝癌 Huh7 细胞的抑制作用越明显,呈较明显的量效关系,见表 2。

3.2 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞增殖的影响 与空白组比较,叶下珠复方 II 号 (40, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组作用于 Huh7 细胞 24 h 后细胞开始凋亡,镜下可见细胞出现皱缩、老化等现象 ($P < 0.01$); 加药后 48 h,

表 2 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞生长抑制的影响

Table 2 Effect of CPU II on inhibition of Huh7 cell

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$A(\bar{x} \pm s, n=6)$	抑制率/%
叶下珠复方 II 号	250	0.32 \pm 0.03	71.81
	125	0.3 \pm 0.03	72.95
	62.5	0.33 \pm 0.02	70.60
	31.3	0.42 \pm 0.07	62.64
	15.6	0.63 \pm 0.13	43.91
	7.8	0.98 \pm 0.08	12.08
空白	-	1.09 \pm 0.09	2.95
空白	-	1.12 \pm 0.05	0.00

与叶下珠复方 II 号 (20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组比较,叶下珠复方 II 号 (40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组显著抑制 Huh7 细胞的增殖 ($P < 0.01$),呈明显的量效关系,见表 3。

表 3 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of CPU II on proliferation of Huh7 cell ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h	48 h
空白	-	0.91 \pm 0.09	1.23 \pm 0.19
叶下珠复方 II 号	20	0.81 \pm 0.06 ¹⁾	0.69 \pm 0.12 ¹⁾
	40	0.30 \pm 0.03 ^{1,2)}	0.17 \pm 0.03 ^{1,2)}
5-FU	0.04	0.69 \pm 0.06 ^{1,3)}	0.68 \pm 0.07 ^{1,3)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与叶下珠复方 II 号 (20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组比较²⁾ $P < 0.01$;与叶下珠复方 II 号 (40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 4,6 同)。

3.3 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞凋亡的影响 与空白组,5-FU 组比较,叶下珠复方 II 号 (40, 20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组作用于 Huh7 细胞 48 h 后细胞总凋亡率均显著升高 ($P < 0.01$);其中与叶下珠复方 II 号 (20 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组比较,叶下珠复方 II 号 (40 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 组的凋亡率显著升高 ($P < 0.01$),呈明显的量效关系,见表 4。

表 4 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of CPU II on apoptosis of Huh7 cell ($\bar{x} \pm s, n=3$)

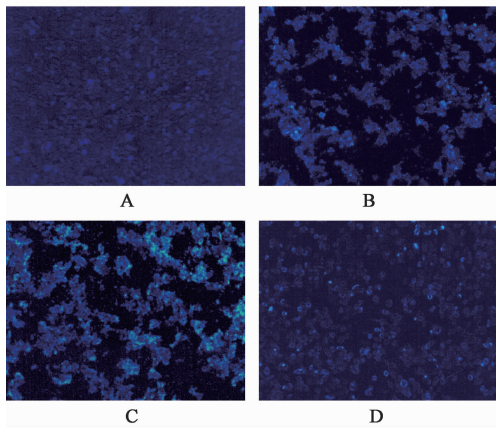
组别	质量浓度/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	早期凋亡率	晚期凋亡率	总凋亡率
叶下珠复方 II 号	20	15.92 \pm 0.98 ¹⁾	3.82 \pm 0.86 ¹⁾	19.74 \pm 1.50 ¹⁾
	40	47.98 \pm 0.99 ¹⁾	3.74 \pm 0.80 ¹⁾	51.72 \pm 1.79 ^{1,2)}
5-FU	0.04	3.68 \pm 0.62 ¹⁾	4.05 \pm 0.40 ¹⁾	7.73 \pm 1.02 ^{1,3)}

注:空白组早期凋亡率、晚期凋亡率、总凋亡率均为 0。

3.4 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞自噬的影响 由于荧光染料 MDC 呈弱碱性,故进入细胞后可与

呈酸性的自噬体特异性结合,从而检测自噬体的变化。与空白组比较,叶下珠复方 II 号高、低剂量作用

后,大量荧光颗粒分布于肝癌细胞胞浆与核周,说明叶下珠复方 II 号可诱导细胞自噬体形成。见图 1。



A. 空白组;B,C. 叶下珠复方 II 号(20,40 g·L⁻¹)组;D. 5-FU 组
图 1 叶下珠复方 II 号对 huh7 细胞自噬体的影响(MDC, ×100)
Fig.1 Effect of CPU II on autophagosome of Huh7 cell (MDC, ×100)

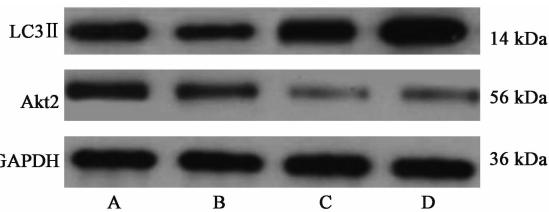
3.5 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞 PI3K, Akt2, Bcl-2, LC3 II mRNA 表达的影响 与正常肝细胞

表 6 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞 LC3 II, PI3K, Akt2, Bcl-2 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of CPU II on LC3 II, PI3K, Akt2, Bcl-2 mRNA expression in Huh7 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	LC3 II	PI3K	Akt2	Bcl-2
空白	-	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.05	1.00 ± 0.08	1.00 ± 0.07
叶下珠复方 II 号	20	1.27 ± 0.11	0.77 ± 0.08 ¹⁾	0.58 ± 0.04 ¹⁾	0.50 ± 0.03 ¹⁾
	40	1.77 ± 0.11 ^{1,2)}	0.45 ± 0.03 ^{1,2)}	0.44 ± 0.03 ¹⁾	0.44 ± 0.04 ¹⁾
5-FU	0.04	3.22 ± 0.13 ^{1,3)}	1.78 ± 0.04 ^{1,3)}	1.57 ± 0.12 ^{1,3)}	1.70 ± 0.25 ^{1,3)}

3.6 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞 LC3 II 和 Akt2 蛋白表达的影响 与空白组比较,叶下珠复方 II 号(20,40 g·L⁻¹)组 Akt2 蛋白表达下降,叶下珠复方 II 号(40 g·L⁻¹)组 LC3 II 蛋白表达显著增加($P < 0.01$)。见图 2,表 7。



A. 空白组;B. 5-FU 组;C, D. 叶下珠复方 II 号(20,40 g·L⁻¹)组
图 2 各组 LC3 II, Akt2 蛋白表达凝胶电泳
Fig.2 Electrophoresis of protein expression of LC3 II and Akt2 in different groups

4 讨论

肝癌是临床常见的恶性肿瘤,早在《黄帝内经》

L02 比较,Huh7 细胞自噬相关基因 LC3 II mRNA 显著下降($P < 0.01$),说明自噬在正常肝细胞中起保护作用,自噬的减少促进肝癌的发生发展,见表 5。与空白组比较,叶下珠复方 II 号(20,40 g·L⁻¹)组 PI3K, Akt2, Bcl-2 mRNA 表达均显著下降,LC3 II mRNA 表达显著增加($P < 0.01$),说明叶下珠复方 II 号可通过调控 PI3K/Akt 信号通路,上调 LC3 II 的表达和抑制 Bcl-2 mRNA 表达,从而促进细胞自噬的发生和诱导细胞凋亡,见表 6。

表 5 L02 细胞与 Huh7 细胞 LC3 II mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of CPU II on expression of LC3 II mRNA in L02 cells and Huh7 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	LC3 II
L02	1 ± 0.06
Huh7 细胞	0.44 ± 0.00 ¹⁾

注:与 L02 细胞组比较¹⁾ $P < 0.01$ 。

表 7 叶下珠复方 II 号对 Huh7 细胞 LC3 II, Akt2 蛋白相对表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 7 Effect of CPU II on relative protein expression of LC3 II, Akt2 in Huh7 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/g·L ⁻¹	LC3 II /GAPDH	Akt2 /GAPDH
空白	0	0.97 ± 0.02	0.56 ± 0.02
叶下珠复方 II 号	20	1.06 ± 0.02 ²⁾	0.22 ± 0.01 ¹⁾
	40	1.22 ± 0.02 ¹⁾	0.26 ± 0.01 ¹⁾
5-FU	0.04	0.99 ± 0.08 ²⁾	0.41 ± 0.03 ^{1,2)}

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$;与叶下珠复方 II 号(40 g·L⁻¹)组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

上有类似记载,历代有痞气、积气、肥气之称,现属“积聚”“黄疸”“癥瘕”之范畴。近年研究表明,中医药对肝癌的治疗越来越广泛^[15],且其在分子和基因研究水平上发挥着重要的作用^[16]。基于肝癌“毒、瘀、虚”发病机制的特点^[17],本研究所用的

叶下珠复方 II 号是以叶下珠、苦参为君药,发挥清热解毒之功;配三七以活血化瘀为臣药;佐以太子参补气健脾、旱莲草滋阴补肾,共奏清热解毒、活血化瘀、健脾补肾之功,从而达到抗肝癌的效果。

近年研究发现,细胞自噬与肿瘤、衰老等疾病密切相关。通常情况,自噬是发生于细胞缺氧、饥饿、生长因子缺乏等应激状态下的一种胞内成分自我降解并被机体重复利用的过程^[18]。不同于细胞坏死与细胞凋亡,细胞自噬是受多种自噬相关基因(ATg)调控的程序性死亡,又称“II 型程序性死亡”^[19]。其中 LC3 I/II (Atg-8)是自噬发生的标志性蛋白。PI3K/Akt 是以 mTOR 为靶点的细胞分裂和合成代谢的调节中心,在调控细胞增殖、凋亡、分化及迁徙等生理功能上发挥着重要的作用,同时也是细胞自噬重要的信号通路^[20]。研究表明,一方面,PI3K 的失活导致其质膜上产生的第二信使 PI3P 减少,与 Akt 信号蛋白结合减少,从而导致 Akt 失活,进而诱导细胞自噬发生。自噬发生的过程中 LC3-I 被 Atg-7 激活,然后通过 Atg-3 用磷脂酰乙醇胺(PE)脂化成 LC3-II^[21]。研究发现,细胞自噬水平可以通过 LC3 II/I 的蛋白表达来判定,其中 I 型 LC3 分布于细胞胞浆中,II 型 LC3 分布于自噬体内外膜上。而在自噬形成的过程中,自噬标志蛋白 LC3 会在自噬泡的膜上聚集,而自噬体形成所依赖的第二个泛素样结合系统(ATg8)是位于自噬囊泡膜上,其可与 MDC 特异性结合,从而聚集于自噬囊泡中,故可通过 MDC 染色法可观察细胞自噬情况^[22]。另一方面,PI3K/Akt 信号通路中由于 PI3K 的激活从而使其与 Akt 信号蛋白 PH 结构域结合的第二信使 PIP3 大量增多,使促进下游靶蛋白 Bcl-2 的磷酸化的 Akt 信号蛋白被激活,从而导致肿瘤的发生。

本研究通过 MTT 比色法检测显示叶下珠复方 II 号作用后可显著抑制肝癌 Huh7 细胞增殖,且通过比较正常肝细胞 L02 与肝癌 Huh7 细胞中 LC3 II mRNA 的表达,自噬在正常的肝细胞中起保护作用,自噬的减少诱导肝癌的发生,PCR,Western blot 检测结果显示叶下珠复方 II 号作用下,肝癌 Huh7 细胞中 Akt2,PI3K mRNA 和 Akt2 蛋白表达下调,LC3 II mRNA 和蛋白表达上调,通过 MDC 染色观察到叶下珠复方 II 号(20,40 g·L⁻¹)作用于肝癌 Huh7 细胞后,大量荧光颗粒分布于细胞胞浆与核周,显示叶下珠复方 II 号可诱导肝癌 Huh7 细胞自噬体形成,故 PI3K/Akt 信号通路的下调,导致自噬标记物

LC3 II 升高,诱导肝癌 Huh7 细胞自噬发生从而抑制肝癌细胞增殖;另 AnnexinV-FITC/PI 流式细胞术检测结果显示叶下珠复方 II 号作用后细胞总凋亡率明显升高,可知下调 PI3K/Akt 信号通路可通过诱导细胞凋亡从而抑制肝癌细胞增殖。因此诱导细胞凋亡与自噬,均可抑制肝癌细胞生长^[23]。故本研究显示叶下珠复方 II 号可通过抑制 PI3K/Akt 信号通路相关 mRNA 表达,诱导细胞凋亡和自噬,从而抑制肝癌细胞增殖,但二者之间是否存在交互作用,需进一步探讨。

[参考文献]

- [1] CHEN W,ZHENG R,Baade P D,et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA: A Cancer J Clin, 2016, 66 (2):115-132.
- [2] 葛信艳,黄玮,李瑞琴,等. PI3K/Akt 信号转导通路与肿瘤发生相互作用的机制研究[J]. 中国现代医药杂志,2017,19(7):98-101.
- [3] LI J,ZHOU J,ZHANG D, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells enhance autophagy via PI3K/Akt signalling to reduce the severity of ischaemia / reperfusion-induced lung injury [J]. J Cell Mol Med, 2015,19(10):2341-2351.
- [4] Singh B N,Kumar D,Shankar S, et al. Rottlerin induces autophagy which leads to apoptotic cell death through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway in human pancreatic cancer stem cells [J]. Biochem Pharmacol, 2012,84(9):1154-1163.
- [5] 余思云,黄彩梅,胡国华. 紫草素通过 PI3K/Akt 信号通路诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡[J]. 世界中西医结合杂志,2014,9(12):1303-1306.
- [6] 林琼燕,生秀杰,刘娟,等. 顺铂通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞自噬 [J]. 肿瘤预防与治疗,2017,30(5):337-342.
- [7] Lum J J, Bauer D E, KONG M, et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis [J]. Cell,2005,120(2):237-248.
- [8] 查勇,寸英丽,黄云超. 苦参碱对肝癌细胞株 SMMC-7721 凋亡和自噬相关基因表达的影响 [J]. 世界华人消化杂志,2010,18(29):3078-3083.
- [9] 张多强,辛国军,丁洋,等. 枸杞多糖对 HepG2 肝癌细胞自噬与细胞凋亡的影响 [J]. 中成药,2017,39 (12):2600-2602.
- [10] 王坤凤,林琛,吴玲芳,等. 不同产地叶下珠药材中总酚含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19 (13):110-112.
- [11] 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.
- [12] 陈滨, 郭洁文, 何素, 等. 叶下珠复方 II 号对肝癌细胞增殖和胰岛素样生长因子-1 受体信号通路转录的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(14): 108-114.
- [13] 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.
- [14] 夏曦, 赵敏, 李常青, 等. 叶下珠复方 II 号对肝星状细胞凋亡和 miR-16/Bcl-2 表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(5):690-696, 775.
- [15] 江南雪, 熊墨年, 唐晓玲. 原发性肝癌的中医治疗进展[J]. 实用中西医结合临床, 2016, 16(10):84-86.
- [16] 汤庆丰, 孙健, 于卉, 等. 基于 PI3K/Akt 信号通路的中药抗肿瘤多药耐药作用研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2016, 30(6):78-82.
- [17] 王新华, 李常青, 郭兴伯, 等. 叶下珠复方联合干扰素治疗慢性乙型肝炎 40 例临床观察[J]. 中西医结合肝病杂志, 1999, 8(1):12-13.
- [18] Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, et al. Metabolic control of autophagy [J]. Cell, 2014, 159(6): 1263-1276.
- [19] Kroemer G, Levine B. Autophagic cell death: the story of a misnomer[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(12): 1004-1010.
- [20] Martelli A M, Evangelisti C, Follo M Y, et al. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase /Akt /mammalian target of rapamycin signaling network in cancer stem cells[J]. Curr Med Chem, 2011, 18(18):2715-2726.
- [21] Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2011, 27:107-132.
- [22] 王树彦, 周易明, 陈宗祐. 自噬与肿瘤的发生和治疗研究进展[J]. 复旦学报:医学版, 2008, 35(6):928-931, 934.
- [23] 李婷婷, 朱迪, 牟童, 等. IL-37 通过抑制哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)的磷酸化而诱导 SMMC-7721 肝癌细胞凋亡和自噬[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2017, 33(4):440-445.

[责任编辑 张丰丰]