

· 经典名方 ·

理冲汤加减联合5-氟尿嘧啶对人肝癌细胞 HepG2 上皮间质转化的影响

王惠¹, 徐陆周², 吴坚², 孙庆敏², 陈敏², 刘沈林^{2*}

(1. 扬中市中医院, 江苏扬中 212200; 2. 南京中医药大学附属医院, 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨理冲汤加减联合5-氟尿嘧啶(5-FU)对人肝癌细胞 HepG2 上皮间质转化(EMT)的影响。方法:采用噻唑蓝(MTT)比色法检测理冲汤加减及5-FU单独和联合使用对 HepG2 细胞生长影响;应用中效原理进行统计分析,确定联合用药时的药物效应-合用指数的关系,判定药物间的相互作用,确定后续实验给药浓度及时间;划痕实验检测理冲汤加减联合5-FU对 HepG2 细胞迁移能力的影响;细胞侵袭实验(transwell小室)检测理冲汤加减联合5-FU对 HepG2 细胞侵袭能力的影响;采用实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测理冲汤加减联合5-FU作用 HepG2 细胞24 h后对 EMT 相关基因上皮型钙黏蛋白(E-cadherin),神经型钙黏蛋白(N-cadherin),锌指转录因子(Snail, Twist) mRNA 表达;采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测理冲汤加减联合5-FU作用 HepG2 细胞24 h后 EMT 相关蛋白 E-cadherin, N-cadherin, Snail, 波形蛋白(Vimentin)的表达。结果:MTT比色法结果显示,随着药物浓度增加,理冲汤加减,5-FU 单药或联合用药对 HepG2 细胞生长的抑制效应也增加;应用中效原理进行统计分析显示,两药在低剂量合用24 h后对 HepG2 细胞可以产生较好的协同效应,故选用理冲汤加减,5-FU 作用 HepG2 细胞24 h的25%抑制浓度(IC₂₅)即800 mg·L⁻¹理冲汤加减,3.125 mg·L⁻¹5-FU;设空白组,5-FU组,理冲汤加减+5-FU组,理冲汤加减组进行后续实验;划痕和侵袭实验显示,理冲汤加减,5-FU 单独及联合均能抑制 HepG2 细胞迁移侵袭能力($P < 0.05, P < 0.01$),与5-FU组比较,理冲汤加减+5-FU组抑制能力更强($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较,5-FU组,5-FU+理冲汤加减组 E-cadherin mRNA 表达上调,N-cadherin, Snail, Twist mRNA 表达下调($P < 0.05, P < 0.01$);与5-FU组比较,5-FU+理冲汤加减组 E-cadherin mRNA 表达上调,N-cadherin, Snail, Twist mRNA 表达下调($P < 0.05, P < 0.01$)。与空白组比较,5-FU组,5-FU+理冲汤加减组 E-cadherin 的表达上调,N-cadherin, Snail, Vimentin 蛋白表达下调($P < 0.05, P < 0.01$);与5-FU组比较,5-FU+理冲汤加减组 E-cadherin 的表达上调,N-cadherin, Snail, Vimentin 蛋白表达下调($P < 0.05, P < 0.01$)。结论:理冲汤加减方与5-FU在低剂量合用24 h后对 HepG2 细胞可以产生较好的协同效应,并且能明显抑制肝癌细胞的迁移和侵袭能力,上调肝癌细胞内 EMT 相关标志物 E-cadherin 的表达,下调 N-cadherin, Snail, Vimentin, Twist 的表达,据此推测,抑制肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭能力及 EMT 相关 mRNA 的表达,从而增强化疗药物的疗效,可能是理冲汤加减方联合5-FU协同作用的机制之一。

[关键词] 理冲汤加减; 5-氟尿嘧啶; HepG2 细胞; 协同效应; 上皮间质转化

[中图分类号] R22; R242; R2-031; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)07-0014-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190621

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181203.1317.010.html>

[网络出版时间] 2018-12-05 14:17

Effect of Modified Lichongtang Combined with 5-Fluorouracil on Epithelial Mesenchymal Transition of Human Hepatoma Cell Line HepG2

WANG Hui¹, XU Lu-zhou², WU Jian², SUN Qing-min², CHEN Min², LIU Shen-lin^{2*}

(1. Yangzhong Hospital of Traditional Chinese Medicine, Yangzhong 212200, China;
2. Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[收稿日期] 20180911(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473605, 81704031);江苏省卫计委青年医学人才项目(QNRC2016641);江苏省中医院高峰学术人才项目(Y2018RC33);江苏省中医院院级课题项目(Y14074)

[第一作者] 王惠,在读硕士,从事中医内科学脾胃病研究, E-mail: wanghui.2007.0k@163.com

[通信作者] *刘沈林,硕士,主任中医师,教授,从事消化道肿瘤的中医治疗研究, E-mail: lsl86618555@sina.com

[Abstract] Objective: To investigate the effect of modified Lichongtang combined with 5-fluorouracil (5-FU) on epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human hepatoma HepG2 cells. **Method:** The growth of HepG2 cells was detected by methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, and the effect of Chinese medicine and 5-FU alone or combined use on the growth of HepG2 cells was analyzed by the principle of efficacy. The growth curves of HepG2 cells were plotted to determine the relationship between drug effect and combination index as well as the interaction between drugs. Scratch test was used to detect the effect of modified Lichongtang combined with 5-FU on the migration of HepG2 cells. Cell invasion assay (transwell chamber) was used to detect the effect of modified Lichongtang combined with 5-FU on the invasion ability of HepG2 cells. Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the effect of modified Lichongtang combined with 5-FU on EMT-related genes E-cadherin, N-cadherin and Zinc finger transcription factors (snail, twist) mRNA expression after 24 hours of treatment on HepG2 cells. The expression levels of E-cadherin, N-cadherin, Snail and Vimentin in HepG2 cells were detected by Western blot after treatment by modified Lichongtang combined with 5-FU for 24 hours. **Result:** MTT assay showed that with the increase of drug concentration, the inhibitory effect of modified Lichongtang, 5-FU alone or combined use on HepG2 cell growth was also increased. Statistical analysis showed that the combined use of these two drugs at a low dosage could produce better synergistic effect on HepG2 cells after 24 hours of treatment. Therefore, modified Lichongtang and 5-FU were selected to treat HepG2 cells for 24 hours. 25% inhibitory concentration (IC_{25}) was $800 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ modified Lichongtang, $3.125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-FU. Blank group, 5-FU group, Lichongtang + 5-FU group, and modified Lichongtang group were set for follow-up experiments. Scratch and invasion experiments showed that modified Lichongtang, 5-FU alone and combined use can inhibit HepG2 cell migration and invasion ability ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with 5-FU group, the inhibitory effect was more obvious in modified Lichongtang + 5-FU group. As compared with the blank group, the mRNA expression of E-cadherin were up-regulated, while the mRNA expression levels of N-cadherin, Snail and Twist were and down-regulated in the 5-FU group and the 5-FU + modified Lichongtang group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with 5-FU group, the mRNA expression of E-cadherin was up-regulated while the mRNA expression levels N-cadherin, Snail and Twist were down-regulated in the 5-FU + modified Lichongtang group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Western blot showed that as compared with the blank group, E-cadherin protein expression was up-regulated while N-cadherin, Snail and Vimentin protein expression levels were down-regulated in 5-FU group and 5-FU + modified Lichongtang group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). As compared with the 5-FU group, E-cadherin protein expression was up-regulated while N-cadherin, Snail, and Vimentin protein expression levels were down-regulated in 5-FU + modified Lichongtang group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** Modified Lichongtang combined with 5-FU can produce a better synergistic effect on HepG2 cells at a low dosage for 24 hours, and can significantly inhibit the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells, up-regulate the expression of E-cadherin, down-regulate the expression of N-cadherin, Snail, Vimentin and Twist in hepatocellular carcinoma cells. Inhibition of tumor cell proliferation, migration, invasion and EMT-related gene expression may be associated with enhancing the efficacy of chemotherapy drugs, and may act as one of the mechanisms for synergistic effect of modified Lichongtang combined with 5-FU.

[Key words] modified Lichongtang; 5-fluorouracil; HepG2 cells; synergistic effect; epithelial mesenchymal transition

原发性肝癌是全球发病率和死亡率最高的恶性肿瘤之一^[1],随着医疗水平的发展,肝癌的诊断和治疗有了很大的改善,包括外科手术、肝移植、化学疗法、免疫疗法、放射疗法等,但是肝癌的预后仍然很差,这一方面归咎于肝癌的高发病率及高转移率;另一方面,归咎于肝癌细胞对常用的抗肿瘤药物和

放化疗等治疗措施的耐药性,以及化疗药物的副作用的存在,使得肝癌患者难以取得满意的治疗效果。因此,现在临床上对肿瘤的治疗多采用联合疗法,联合疗法能够有效抑制肿瘤的生长,增加疗效,降低毒副作用,抑制肿瘤的侵袭转移,这对肝癌的治疗具有很好的借鉴意义。研究表明中医药在提高晚期化疗

后肝癌患者的生活质量、免疫力及生存期上都发挥了一定的积极作用^[2]。因此,探求中药与化疗药物联合使用来增强化疗药物的抗肿瘤功效并减少其毒副作用,已成为当今肿瘤内科研究的热点之一。此外,研究发现,上皮间质转化(EMT)在肿瘤转移的初期便可使肿瘤细胞获得侵袭、迁移能力^[3]。因此,减少肿瘤复发转移可以从抑制肿瘤 EMT 的发生着手。

理冲汤加减出自张锡钝所著《医学衷中参西录》之理冲汤^[4],刘沈林教授临床治疗晚期肝癌常用此方,该方由黄芪、党参片、三棱、莪术组成。黄芪,甘,微温,具有补气升阳,固表止汗,利水消肿,托毒排脓等作用,现代药理研究表明黄芪有促进机体代谢、抗疲劳、促进血清和肝脏蛋白质更新的作用^[5]。党参片甘、平,具有健脾益肺、养血生津的作用。三棱苦辛,平,功能破血行气、消积止痛。莪术辛、苦、温,能行气破血、消肿止痛。4 药合用共奏益气化痰之效。此前藏文华等^[6-7]通过研究发现黄芪-莪术能干预肝癌凋亡,且促进凋亡作用与剂量呈正相关性,且能下调 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2),微小 mRNA(miR)-221,miR-151,上调 miR-122a 的表达,与顺氯氨铂(DDP)合用表现为协同作用。

本课题组前期通研究表明理冲汤加减方与 5-氟尿嘧啶(5-FU)单独和联合使用均对肝癌小鼠移植瘤的生长有抑制作用,且两药合用能增强化疗效果,且一定程度上抑制了 5-FU 的毒性,其机制可能与抑制肝癌 EMT 有关^[8]。但目前尚未有对于理冲汤加减方联合化疗药物作用于肝癌细胞 EMT 方面的研究报道。因此,本实验以人肝癌细胞 HepG2 为实验细胞,利用中效原理判定理冲汤加减方和 5-FU 二者之间是否存在协同作用,并通过研究理冲汤加减方联合 5-FU 对 HepG2 细胞的迁移侵袭能力及 EMT 相关标志物的影响,以期为肝癌的临床治疗提供新的思路和治疗选择。

1 材料

1.1 细胞株 实验细胞株为人肝癌细胞株 HepG2,由江苏省中医院中心实验室馈赠,传至第 3 代。

1.2 药物和试剂 5-FU(天津金耀氨基酸有限公司,批号 1803091)。黄芪、党参片、三棱、莪术经南京中医药大学严辉副教授鉴定,黄芪为豆科植物膜荚黄芪 *Astragalus membranaceus* 的干燥根;党参为桔梗科植物党参 *Codonopsis pilosula* 的干燥根;三棱为黑三棱科植物黑三棱 *Sparganium stoloniferum* 的干燥块茎;莪术为姜科植物广西莪术 *Curcuma*

kwangsiensis 的干燥根茎,均符合 2015 年版《中国药典》的标准。胰酶细胞消化液,结晶紫染色液(南京碧云天公司,批号分别为 C0205, C0121);DMEM 培养液,胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号分别为 1517544, 10270);trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 66006);SYBR 试剂盒, RNA 逆转录试剂盒(日本 TaKaRa 公司,批号分别为 1407466, AK4002);噻唑蓝(MTT)粉剂,鼠抗人 β -肌动蛋白(β -actin)单克隆抗体(美国 Sigma 公司,批号分别为 M2128, BTX82559);PCR 引物由美国 Invitrogen 公司设计合成;兔抗人上皮型钙黏蛋白(E-cadherin),神经型钙黏蛋白(N-cadherin),波形蛋白(Vimentin),锌指转录因子(Snail)抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 3195, 13116, 5741, 3879);二抗(北京中杉生物技术公司,批号 zdr5102)。

1.3 仪器 Fresco21 型冷冻高速离心机(美国 Thermo Fisher scientific 公司);DS-11 型紫外光度仪(美国 DeNoVIX 公司);CKX41 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司);2720 型 PCR 扩增仪,7500Fast 型荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);MP-4 型电泳仪及转印槽(美国 Bio-Rad 公司);odyssey-SA 型双色红外激光成像系统(上海仪涛生物仪器有限公司);ELX800 型全自动酶标仪(美国 Bio-Tek 公司)。

2 方法

2.1 理冲汤加减提取 党参片 15 g,黄芪 30 g,三棱 15 g,莪术 15 g(中药由江苏省中医院提供)共 75 g,用双蒸水 750 mL 浸泡 30 min,煎煮 2 次,每次 30 min,纱布粗过滤去渣,将所得滤液以 $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min 以初步去掉大的颗粒杂质。取上清液浓缩至 100 mL,加等体积的无水乙醇后置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱过夜沉淀。取出各药物与乙醇的混合液,再以 $5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 30 min,取上清液旋转蒸发回收乙醇浓缩药液,浓缩至 50 mL 左右时取出室内挥发 24 h 后冰冻干燥,当药物成粉末状时取出,称取质量,临用时用磷酸盐缓冲液(PBS)溶解,配置成生药质量浓度为 $1\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $0.22\ \mu\text{m}$ 微孔滤器过滤除菌。实验时,用含血清的 DMEM 培养液将原液稀释供实验用。

2.2 HepG2 细胞的培养 生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养基中,并置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 5% CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养。每 2~3 d 采用 0.25% 胰蛋白酶对处于对数生长期的细胞进行消化传代,取第 3~8 代细胞进行实验。

2.3 MTT 比色法测定药物效应 先进行预实验,

得出理冲汤加减方, 5-FU 单药对 HepG2 细胞在各种抑制(10% ~ 90%)下的浓度, 以 2 种药在抑制率约为 50% 的浓度为中间浓度, 两药的中间浓度为固定比值, 上调或下调实验的给药浓度。取处于对数生长期的 HepG2 细胞, 以每孔 6 000 个细胞数种于 96 孔板, 细胞贴壁后, 参照文献[9]设空白组, 5-FU 组(3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100 mg·L⁻¹), 理冲汤加减 + 5-FU 组(50 + 3.125, 100 + 6.25, 200 + 12.5, 400 + 25, 800 + 50, 1600 + 100 mg·L⁻¹), 理冲汤加减组(50, 100, 200, 400, 800, 1 600 mg·L⁻¹), 每组 3 个复孔。分别培养 24, 48 h, 倾倒培养液, PBS 洗 2 遍, 每孔再加入 DMEM 培养液 100 μL + MTT 溶液 20 μL, 继续培养 4 h, 倒掉上清, 每孔加入二甲基亚砷(DMSO)150 μL, 置摇床上避光震荡 10 min, 在酶标仪 490 nm 波长测量各孔吸光度 A, 实验重复 3 次, 取其平均值。根据实验结果计算药物作用效应即抑制率 = (1 - A_{实验组} / A_{空白组}) × 100%, 并根据改良寇氏法计算半数致死浓度(IC₅₀)^[10]。

2.4 利用中效原理^[11]评价药物联合应用效应 根据不同浓度单药及联合用药效应, 应用中效原理(Chou-Talalay 联合指数法)评价两药之间是否存在协同关系。合用指数(CI) = D₁/D_{x1} + D₂/D_{x2} + αD₁D₂/D_{x1}D_{x2}, 其中 D_{x1}, D_{x2} 为 2 药单独使用时产生 X 效应时两药各自的浓度, D₁ 和 D₂ 为两药合用时产生 X 效应时的 2 药各自所需浓度。理冲汤加减与 5-FU 作用机制不同, 故 α = 0。当 CI < 1, 表明两药合用效应为协同; CI = 1, 表明两药合用效应为相加; CI > 1 表明两药合用效应为拮抗。

2.5 细胞划痕实验检测细胞迁移能力 将处于对数生长期的 HepG2 细胞制成单细胞悬液, 计数, 接种于 6 孔板, 使细胞数约为 1 × 10⁶ 个/孔; 放置在 37 °C 5% CO₂ 细胞培养箱中; 待细胞贴壁后, 细胞汇合度约为 80% 时, 换为无血清的 DMEM 培养, 每孔用枪头划出 3 道竖线, 在光学显微镜下观察, 拍摄各孔细胞 0 h 时, 细胞划痕的初始状态; 设空白组, 5-FU 组, 理冲汤加减 + 5-FU 组, 理冲汤加减组, 根据 MTT 的结果给予相应浓度, 放入培养箱中培养至 24 h 后取出, 在光学显微镜下拍摄各组细胞划痕的状态。计算细胞 24 h 迁移率。迁移率 = (划痕面积_{0 h} - 划痕面积_{24 h}) / 划痕面积_{0 h}。

2.6 transwell 实验检测细胞侵袭能力^[12] 将 matrigel 胶放入冰箱中隔夜使其解冻, 在 transwell 小室表面铺 100 μL 用 DMEM 稀释的 matrigel, 放在培养箱中孵育 2 h, 使形成一层基质屏障膜; 将处于对

数生长期的 HepG2 细胞制成单细胞悬液, 计数, 接种于 transwell 小室, 每孔细胞数约为 2 × 10⁴ 个, 细胞用无血清的培养基进行培养; 将 transwell 小室放于 24 孔板中, 在 transwell 下室中加入含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 设空白组, 5-FU 组, 理冲汤加减 + 5-FU 组, 理冲汤加减组, 根据 MTT 的结果给予相应浓度; 放入细胞培养箱, 培养 24 h; 取出 transwell 小室, PBS 轻轻漂洗 2 遍, 用结晶紫染色; PBS 冲洗, transwell 上室中未迁移的细胞用棉签轻轻擦去; 在倒置显微镜下观察, 对膜底细胞进行拍照、计数、统计学分析。

2.7 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肝癌细胞 EMT 相关 mRNA 表达水平 取出对数生长期的肝癌细胞 HepG2, 消化重悬后按照分组分别接种于培养皿中, 放入温箱中培育, 待细胞生长至 80% ~ 85%, 设空白组, 5-FU 组, 理冲汤加减 + 5-FU 组, 理冲汤加减组, 培育 24 h。按照试剂说明书的步骤, 提取各组肝癌细胞中总 RNA, 用紫外线分光光度仪检测 RNA 样品浓度及纯度, 样品在 260, 280 nm 处的 A 比值, 以在 1.8 ~ 2.0 为合格, 以 RNA 为模版逆转录合成 cDNA, 用 PCR 仪进行反应, 扩增条件: 预变性 95 °C 30 s 循环 1 次; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 循环 40 次; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s, 循环 1 次。采用 2^{-ΔΔC_t} 对 PCR 结果进行数据分析, 计算 ΔC_t = C_t目的基因 - C_t内参基因; ΔΔC_t = ΔC_t给药组 - ΔC_t对照组; 差别倍数 = 2^{-ΔΔC_t}, 其中正常组的数值均为 1。检测肝癌细胞中 EMT 相关 mRNA 表达情况。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
ACTB	上游 CATGTACGTTGCTATCCAGGC	134
	下游 CTCCTTAATGTCACGCACGAT	
E-cadherin	上游 CTCGGCCTGAAGTGACTGTAAC	95
	下游 CAGCAACCTGTTTCTGCAATTC	
N-cadherin	上游 GTGCCATTAGCCAAGGAATTCAGC	92
	下游 GCGTTCTCTGTTCCACTCATAGGAGG	
Snail	上游 TAGGCCCTGGCTCGCTACAAG	133
	下游 GCCCTCCCTCCACAGAAATG	
Twist	上游 CTTACGGAGGAGCTGCAGACC	146
	下游 CGCCCTGTTTCTTGAATTC	

2.8 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测肝癌细胞 EMT 相关蛋白的表达 将处于对数生长期的

HepG2 细胞用肝癌细胞胰酶消化接种于 10 cm 的培养皿中放置恒温培育箱中培养,等待细胞贴壁约为皿底面积的 80% ~ 90%,设空白组,5-FU 组,理冲汤加减 + 5-FU 组,理冲汤加减组,放入培养箱中培养 24 h;弃去培养基,用 PBS 洗涤 2 次;加入细胞裂解液,用细胞刮轻轻刮下贴壁细胞,吸至离心管中,4 °C,12 000 r·min⁻¹离心 20 min;取上清液,装到离心管中。用 BCA 法测定组织蛋白浓度,每个样品取 20 μg 上样量进行反应。经聚丙烯酰胺凝胶分离后转到 PVDF 膜上,用 5% BSA 封闭 1 h,取出封闭好的膜,置于一抗(1:1 000)孵育,4 °C 冰箱过夜。次日用 TBST 漂洗 3 次后放入二抗(1:1 万)中室温避光孵育 1 h,经 TBST 漂洗 4 次,采用双色红外激光成像系统进行发光和条带分析。用 Image J 图像分析软件进行结果分析,测得条带的灰度值,计算各组的条带和内参的比值,比较各组间差异。

2.9 统计学方法 数据结果采用 SPSS 22.0 统计软件对数据进行处理分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足正态分布和方差齐性的多组之间均数比较采用单因素方差分析,进一步两两比较用 LSD 法;方差不齐者采用 Dunnett's T3 检验。 $P < 0.05$ 表示差异

有统计学意义。

3 结果

3.1 理冲汤加减方和 5-FU 单独使用对 HepG2 细胞增殖的影响及联合效应分析 理冲汤加减作用于 HepG2 细胞 24, 48 h 的 IC₅₀ 分别为 (1 990.55 ± 139.34), (1 504.50 ± 47.92) mg·L⁻¹, 5-FU 作用于 HepG2 细胞 24, 48 h 的 IC₅₀ 分别为 (36.68 ± 6.18), (9.16 ± 0.20) mg·L⁻¹。随着药物浓度和时间的增加,单药或联合用药对 HepG2 细胞生长的抑制效应也增加。根据 MTT 比色法实验所得单药或联合用药作用于 HepG2 细胞株 24, 48 h 后的效应,运用中效原理法计算出 CI, 作用于 HepG2 细胞 24 h 时,当 $Fa \leq 0.2$ 或 $Fa \geq 0.7$ 时, $CI > 1$, 两药合用效应为拮抗, 当 $0.2 < Fa < 0.7$ 时, $CI < 1$, 两药合用效应为协同。作用于 HepG2 细胞 48 h 时, 当 $Fa \leq 0.7$, $CI > 1$, 两药合用效应为拮抗, 当 $Fa \geq 0.7$ 时, $CI < 1$, 两药合用效应为协同。联合效应分析结果提示作用于 HepG2 细胞 24 h 时,理冲汤加减与 5-FU 在低细胞毒剂量存在协同作用,因此进一步实验研究分析均采用作用于 HepG2 细胞 24 h 时低细胞毒剂量 IC₂₅ 左右浓度,即理冲汤加减 800 mg·L⁻¹, 5-FU 3.125 mg·L⁻¹。见表 2。

表 2 理冲汤加减,5-FU 单用及合用的效应($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of modified Lichongtang and 5-FU alone and combined use($\bar{x} \pm s, n = 3$)

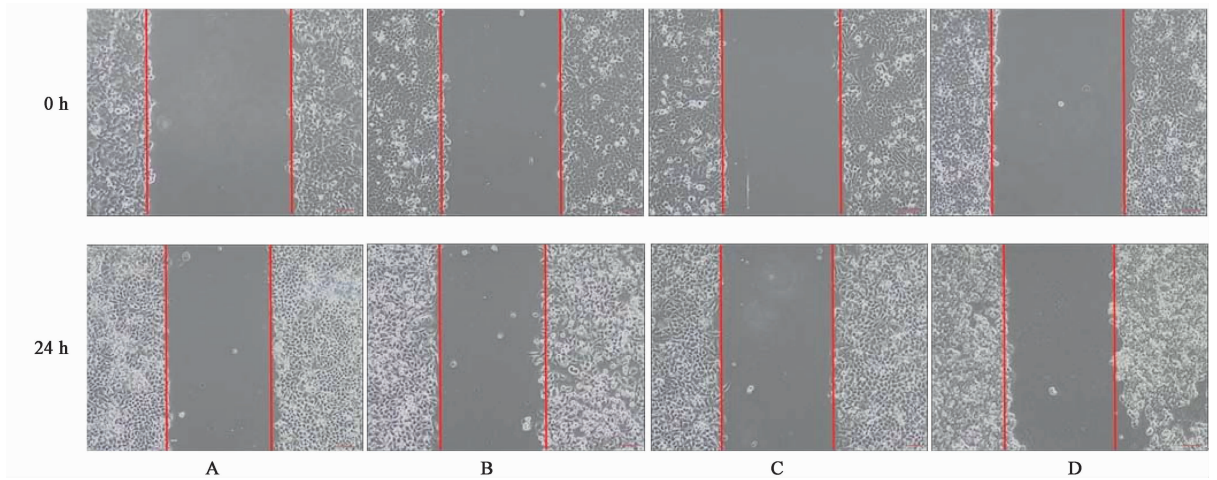
组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	抑制率/%		合用指数	
		24 h	48 h	24 h	48 h
5-FU	3.125	22.54 ± 0.73	32.81 ± 0.85	-	-
	6.25	32.13 ± 1.73	49.06 ± 0.52	-	-
	12.5	34.59 ± 2.84	54.66 ± 0.30	-	-
	25	48.59 ± 3.13	65.03 ± 0.80	-	-
	50	56.17 ± 1.68	69.44 ± 0.31	-	-
	100	58.60 ± 2.78	74.06 ± 0.80	-	-
理冲汤加减	50	0.45 ± 0.33	0.98 ± 0.11	-	-
	100	1.00 ± 0.30	6.84 ± 1.29	-	-
	200	6.53 ± 2.61	11.87 ± 1.30	-	-
	400	14.51 ± 1.56	21.57 ± 1.76	-	-
	800	22.89 ± 0.28	32.75 ± 1.00	-	-
理冲汤加减 + 5-FU	1 600	32.09 ± 3.01	42.45 ± 0.84	-	-
	3.125 ± 50	23.21 ± 1.25	23.58 ± 2.45	0.55 ± 0.22	4.06 ± 0.22
	6.25 ± 100	32.09 ± 2.79	32.18 ± 0.52	0.56 ± 0.32	2.79 ± 0.09
	12.5 ± 200	36.37 ± 4.45	47.91 ± 1.13	0.83 ± 0.24	1.61 ± 0.45
	25 ± 400	59.26 ± 7.51	63.43 ± 0.70	0.47 ± 0.20	1.27 ± 0.05
	50 ± 800	61.43 ± 2.18	72.71 ± 1.68	0.49 ± 0.11	1.01 ± 0.06
100 ± 1 600	62.55 ± 4.03	81.17 ± 1.01	0.77 ± 0.34	0.81 ± 0.06	

3.2 理冲汤加减方联合 5-FU 对 HepG2 细胞迁移、

侵袭能力的影响 与空白组比较,5-FU 组,5-FU + 理

冲汤加减组、理冲汤加减组 HepG2 细胞的迁移率、侵袭能力均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 5-FU 组比较,

5-FU + 理冲汤加减组 HepG2 细胞的迁移率、侵袭能力均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 1, 2, 表 3。



A. 空白组; B. 5-FU 组; C. 理冲汤加减 + 5-FU 组; D. 理冲汤加减组 (图 2, 3 同)

图 1 理冲汤加减方联合 5-FU 对 HepG2 细胞划痕的影响 (倒置显微镜, $\times 100$)

Fig. 1 Effect of modified Lichongtang + 5-FU on scratch of HepG2 cells (inverted microscope, $\times 100$)

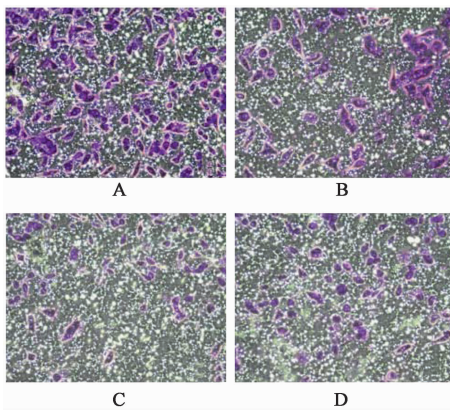


图 2 理冲汤加减方联合 5-FU 对 HepG2 细胞侵袭能力的影响 (结晶紫, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of modified Lichongtang + 5-FU on migration of HepG2 cells (crystal violet, $\times 200$)

表 3 理冲汤加减方联合 5-FU 对 HepG2 细胞迁移、侵袭能力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of modified Lichongtang + 5-FU on migration and invasion of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 / $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	迁移率 / %	视野细胞数 / 个
空白	-	34.88 ± 2.95	97.0 ± 2.12
5-FU	3.125	$11.42 \pm 2.82^{2)}$	$66.0 \pm 1.24^{1)}$
理冲汤加减 + 5-FU	$800 + 3.125$	$3.75 \pm 1.54^{2,3)}$	$34.0 \pm 1.27^{1,3)}$
理冲汤加减	800	$19.99 \pm 5.90^{2)}$	$70.0 \pm 1.94^{1)}$

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与 5-FU 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.3 理冲汤加减方联合 5-FU 对 HepG2 细胞 EMT 相关 mRNA 表达的影响 与空白组比较, 5-FU 组, 5-FU + 理冲汤加减组 E-cadherin mRNA 表达均上调 ($P < 0.05, P < 0.01$); N-cadherin, Snail, Twist mRNA 表达均下调 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 5-FU 组比较, 5-FU + 理冲汤加减组 E-cadherin mRNA 表达上调 ($P < 0.05$); N-cadherin, Snail, Twist mRNA 表达均下调 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

3.4 理冲汤加减方联合 5-FU 对 HepG2 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 与空白组比较, 5-FU 组, 5-FU + 理冲汤加减组, 理冲汤加减组 E-cadherin 蛋白表达均上调 ($P < 0.05, P < 0.01$); N-cadherin, Snail, Vimentin 蛋白表达均下调 ($P < 0.05, P < 0.01$); 与 5-FU 组比较, 5-FU + 理冲汤加减组 E-cadherin 蛋白表达上调 ($P < 0.05, P < 0.01$); N-cadherin, Snail, Vimentin 蛋白表达均下调 ($P < 0.05$)。见图 3, 表 5。

4 讨论

刘沈林教授认为晚期肝癌患者正气亏虚, 癌毒入里, 且化疗药物的不当使用导致患者正气愈亏, 癌毒愈盛, 故确定益气化痰为晚期肝癌的治疗大法。多数化疗药物的治疗窗狭窄, 药物剂量与副作用呈正相关。中药的不良反应较小, 但疗效局限。因此, 有效的联合方案能减少化疗药物剂量, 降低其毒性, 增加抗肿瘤疗效。本实验为明确理冲汤加减与 5-FU 是否具有协同增效作用, 利用中效原理研究理冲汤加减方与 5-FU 的体外相互作用, 根据单药、联合

表 4 理冲汤加减方联合 5-FU 对 HepG2 细胞 EMT 相关 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of modified Lichongtang + 5-FU on expression of EMT-related genes in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	E-cadherin	N-cadherin	Snail	Twist
空白	-	1	1	1	1
5-FU	3.125	$1.59 \pm 0.18^{1)}$	$0.69 \pm 0.20^{1)}$	$0.35 \pm 0.03^{2)}$	$0.11 \pm 0.01^{2)}$
5-FU + 理冲汤加减	800 + 3.125	$2.49 \pm 0.27^{2,3)}$	$0.41 \pm 0.06^{2,4)}$	$0.16 \pm 0.01^{2,4)}$	$0.06 \pm 0.01^{2,3)}$
理冲汤加减	800	1.35 ± 0.21	0.82 ± 0.08	$0.58 \pm 0.15^{3)}$	$0.63 \pm 0.08^{2)}$

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与 5-FU 组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ (表 5 同)。

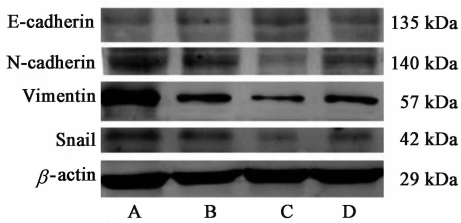


图 3 理冲汤加减方联合 5-FU 对 HepG2 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of modified Lichongtang + 5-FU on expression of EMT-related proteins in HepG2 cells

表 5 理冲汤加减方联合 5-FU 对 HepG2 细胞 EMT 相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of modified Lichongtang + 5-FU on expression of EMT-related proteins in HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	E-cadherin/ β -actin	N-cadherin/ β -actin	Snail/ β -actin	Vimentin/ β -actin
空白	-	0.22 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.80 ± 0.07	1.10 ± 0.08
5-FU	3.125	$0.45 \pm 0.07^{1)}$	$0.45 \pm 0.01^{2)}$	$0.46 \pm 0.03^{2)}$	$0.66 \pm 0.04^{2)}$
5-FU + 理冲汤加减	800 + 3.125	$0.78 \pm 0.10^{2,3)}$	$0.28 \pm 0.01^{2,4)}$	$0.27 \pm 0.01^{2,4)}$	$0.42 \pm 0.07^{2,3)}$
理冲汤加减	800	$0.44 \pm 0.05^{2)}$	0.54 ± 0.09	0.60 ± 0.09	$0.71 \pm 0.05^{2)}$

细胞转化为更具迁移和侵袭能力的间质细胞的生物过程。EMT 是使肿瘤细胞获得浸润能力的重要机制,发生 EMT 改变后肿瘤细胞间黏附能力下降,浸润能力增强,突破基底膜,进入血液循环,然后循环肿瘤细胞在种植部位形成转移瘤^[16]。EMT 的特征之一就是 E-cadherin, N-cadherin 的表达转换^[17]。“钙黏素转换”并非指 N-cadherin 取代 E-cadherin, EMT 的发生仅上调了 Ncadherin 的表达。E-cadherin 降低或缺失是 EMT 最显著的特征,同时也是多种肿瘤不良预后及转移的临床预后指标^[18]。Vimentin 在上皮细胞中的表达是细胞发生 EMT 的主要特征之一,其阳性表达也提示肿瘤细胞发生了 EMT^[19]。研究发现 Vimentin 可能是联系“炎症转化”的重要分子,可通过与肝癌致病因子直接相互作用、调控 EMT 过程和抑制 NLRP3/Caspase-1 炎症信号而在肝癌发生发展过程中发挥重要作用^[20]。Snail 作为一种锌指蛋白,其 DNA 结合因子识别 E-cadherin 启动子区的 E 盒,下调 E-cadherin 的

用药作用于 HepG2 细胞及 24, 48 h 后 MTT 比色法结果,得出理冲汤加减方联合 5-FU 作用于 HepG2 细胞 24 h 后具有低剂量协同作用。

肝癌的侵袭、转移是导致肝癌患者死亡的主要原因之一。肿瘤的侵袭转移是一个复杂的、多步骤、多因素、序贯的过程。2002 年,Theiry^[13]提出恶性肿瘤细胞发生转移前,通过 EMT 获得侵袭和转移能力,自此 EMT 成为解释肿瘤转移的重要理论。肿瘤细胞的 EMT^[14-15]是指上皮细胞来源的恶性肿瘤

表达^[21]。大量的体内和体外实验证实, Twist 可增强肿瘤转移过程中的内渗而对肿瘤细胞的生存、外渗没有作用。因此 Twist 在促进 EMT 发生中具有重要作用并可能成为抗癌药物的新靶点^[22]。故为从细胞学角度分析理冲汤加减方与 5-FU 产生协同作用可能的机制,本实验采用作用于 HepG2 细胞 24 h 时低细胞毒剂量 IC_{25} 左右药物浓度,观察理冲汤加减方与 5-FU 单独及联合作用于 HepG2 细胞的细胞划痕实验和侵袭实验,结果显示理冲汤加减方和 5-FU 联合作用于 HepG2 细胞后较单药可显著抑制细胞迁移和侵袭。进一步通过 PCR, Western blot 观察采用 IC_{25} 左右药物浓度,理冲汤加减方与 5-FU 单独及联合作用于 HepG2 细胞后对 EMT 相关标志物 E-cadherin, N-cadherin, vimentin, Twist, Snail 表达的影响。PCR 结果显示 5-FU 组, 5FU + 理冲汤加减组均能上调 E-cadherin, 且 5-FU + 理冲汤加减组上调程度高于 5-FU + 理冲汤加减组; 5-FU 组, 5FU + 理冲汤加减组均能下调 N-cadherin, Snail, Twist, 且

5-FU + 理冲汤加减组下调程度高于 5-FU 组。Western blot 结果显示 5-FU 组, 5-FU + 理冲汤加减组、理冲汤加减组均能上调 E-cadherin, 且其上调程度由高至低依次为 5-FU + 理冲汤加减组, 5-FU 组, 理冲汤加减组; 5-FU 组, 5-FU + 理冲汤加减组均能下调 N-cadherin, Snail, Vimentin, 且 5-FU + 理冲汤加减组下调程度高于 5-FU 组, 这与与文献报道多种实体恶性肿瘤中表达趋势的结论一致^[23]。

综上所述, 随着药物质量浓度增加, 理冲汤加减方及 5-FU 单药或联合用药对 HepG2 细胞生长的抑制效应也增加; 两药在低剂量合用 24 h 后对 HepG2 细胞可以产生较好的协同效应, 并且能明显抑制肝癌细胞的迁移和侵袭能力, 上调肝癌细胞内 EMT 相关标志物 E-cadherin 的表达, 下调 N-cadherin, Snail, Vimentin, Twist 的表达。据此推测, 抑制肿瘤细胞增殖、迁移、侵袭能力及 EMT 相关基因的表达, 从而增强化疗药物的疗效, 可能是理冲汤加减方联合 5-FU 协同作用的机制之一。

[参考文献]

[1] 马文杰, 蒋春鹤. 中医药治疗原发性肝癌的研究进展[J]. 世界最新医学信息文摘, 2015, 15(A4): 45-46.

[2] 邱宇航, 孙珏. 中医药治疗对提高肿瘤患者生存质量的意义[J]. 内蒙古中医药, 2017, 36(16): 99-100, 124.

[3] De Craene B, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression[J]. Nat Rev Cancer, 2013, 13(2): 97-110.

[4] 张锡纯. 医学衷中参西录[M]. 太原: 山西科学技术出版社, 2009: 168.

[5] 张蔷, 高文远, 满淑丽. 黄芪中有有效成分药理活性的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2012, 37(21): 3203-3207.

[6] 臧文华, 唐德才, 尹刚, 等. 黄芪-莜术配伍及联合顺铂对人肝癌裸鼠原位移植瘤生长的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5): 131-136.

[7] 臧文华, 黄显章, 唐德才, 等. 黄芪-莜术联合顺铂诱导肝癌细胞凋亡及其对 miR-122a, miR-221, miR-151 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(17): 87-91.

[8] 王惠, 吴坚, 徐陆周, 等. 理冲汤加减联合 5-氟尿嘧啶对 H22 荷瘤小鼠移植瘤上皮间质转化的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 145-152.

[9] 殷淑媛, 王瑞平, 邹玺, 等. 常春藤皂苷元与 5-氟尿嘧啶或奥沙利铂联用对人结肠癌 HT-29 细胞增殖的影响[J]. 中医杂志, 2015, 56(7): 602-606.

[10] 黎七雄, 汪晖, 肖清秋, 等. 半数致死量(LD₅₀) Bliss 法的评价及计算[J]. 数理医药学杂志, 1995, 8(4): 318-320.

[11] CHOU T C, Talalay P. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors[J]. Adv Enzyme Regul, 1984, 22(84): 27-55.

[12] Albin A, Iwamoto Y, Kleinman H K, et al. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasiver potential of tumour cells[J]. Cancer Res, 1987, 47(12): 3239-3245.

[13] Thiery J P. Epithelial-mesenchymal transitions in tumor progression[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(6): 442-454.

[14] Hay E D. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it[J]. Dev Dyn, 2005, 233(3): 706-720.

[15] Boyer B, Vallés A M, Edme N. Induction and regulation of epithelial-mesenchymal transitions[J]. Biochemical Pharmacology, 2000, 60(8): 1091-1099.

[16] Chaffer C L, Weinberg R A. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011, 331(6024): 1559-1564.

[17] Wheelock M J, Shintani Y, Maeda M, et al. Cadherin switching[J]. J Cell Sci, 2008, 121(6): 727-735.

[18] Wells A, Yates C, Shepard C R. E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas[J]. Clin Exp Metastasis, 2008, 25(6): 621-628.

[19] Kokkinos M I, Wafai R, Wong M K, et al. Vimentin and epithelial-mesenchymal transition in human breast cancer observations *in vitro* and *in vivo*[J]. Cells Tissues Organs, 2007, 185(13): 191-203.

[20] 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.

[21] Battle E, Sancho E, Franci C, et al. The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells[J]. Nat Cell Biol, 2000, 2(2): 84-89.

[22] KANG Y, Massagué J. Epithelial-mesenchymal transitions: Twist in development and metastasis[J]. Cell, 2004, 118(3): 277-279.

[23] Fischer K R, Durrans A, Lee S, et al. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance[J]. Nature, 2015, 527(7579): 472-476.

[责任编辑 张丰丰]