

臭牡丹含药血清通过 PI3K/Akt 信号通路对肝癌细胞的影响

胡琦¹, 朱定耀¹, 谭小宁², 朱克俭^{2*}

(1. 湖南中医药大学, 长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院附属医院, 长沙 410006)

[摘要] 目的:从磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号通路角度探讨臭牡丹含药血清对肝癌 MHCC97-H 细胞的影响及可能的机制。方法:臭牡丹 15% 含药血清作用于 MHCC97-H 细胞,细胞增殖/毒性法(CCK-8)观察臭牡丹含药血清对细胞增殖的影响,以筛选最佳作用时间和浓度;Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)双染法检测细胞凋亡;蛋白免疫印迹法(Western blot)检测臭牡丹含药血清作用于细胞 72 h 后对 PI3K/Akt 信号通路中关键蛋白中第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(PTEN),磷酸化 Akt(p-Akt)和磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)蛋白表达的影响;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测臭牡丹含药血清作用于细胞 72 h 后对核转录因子- κ B(NF- κ B)和肿瘤坏死因子- α (TNF- α) mRNA 表达的影响。结果:CCK-8 结果显示,与空白组比较,臭牡丹含药血清对肿瘤细胞的增殖抑制作用呈剂量和时间依赖性。其中高剂量组抑制作用最为明显,在 24,48,72 h 的最大抑制率分别达到 28%,32%,43%;流式细胞术结果显示,与空白组比较,随着臭牡丹含药血清浓度的增加,细胞的生长均受不同程度抑制,细胞的凋亡比例亦相应增加,72 h 干预组抑制作用显著($P < 0.01$),臭牡丹含药血清各组时间段最大凋亡率达 19.48%,19.72% ($P < 0.05$);Western blot 结果显示,与空白组比较,臭牡丹含药血清干预下各组 PTEN 表达量均升高($P < 0.05$),PI3K,p-Akt 蛋白表达均减少($P < 0.05$);Real-time PCR 结果显示,与空白组比较,臭牡丹含药血清可以下调 NF- κ B mRNA 表达,上调 TNF- α mRNA 的表达($P < 0.05$)。结论:臭牡丹含药血清可以有效抑制 MHCC97-H 肝癌细胞增殖并促进其凋亡,可能与 PI3K/Akt 信号通路并影响其关键因子有关。

[关键词] 臭牡丹;肝癌细胞 MHCC97-H;磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt);含药血清

[中图分类号] R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)22-0028-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20191222

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190301.1502.020.html>

[网络出版时间] 2019-03-04 15:12

Effect of Drug-containing Serum of *Clerodendrum bungei* on Liver Cancer Cells Through PI3K/Akt Signaling Pathway

HU Qi¹, ZHU Ding-yao¹, TAN Xiao-ning², ZHU Ke-jian^{2*}

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China;

2. Hunan Academy of Chinese Medicine Affiliated Hospital, Changsha 410006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of *Clerodendrum bungei*-containing serum on liver cancer MHCC97-H cells and its possible mechanism from the perspective of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) / protein kinase (Akt) signaling pathway. **Method:** The medicinal serum of 15% *C. bungei* was used to treat MHCC97-H cells. The effect of serum containing *C. bungei* on cell proliferation was observed by cell counting kit-8 (CCK-8) method, in order to select the best time and concentration. The apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI double staining method. Western blot was used to detect the phosphatase and tensin homologous gene deleted from chromosome 10 in key proteins (PTEN), phosphoprotein kinase B (p-Akt) and phosphatidylinositol

[收稿日期] 20181109(008)

[基金项目] 国家中医药管理重大项目(国中医药人教函[2012]228号);湖南中医药大学校级科研项目(2017XJJJ21)

[第一作者] 胡琦,博士,讲师,从事恶性肿瘤的中医药防治研究,E-mail:151708440@qq.com

[通信作者] *朱克俭,博士生导师,研究员,从事内科疑难杂症的辨证方法学研究,E-mail:zkjo0731@263.net

3-kinase (PI3K) -related protein expression of PI3K/Akt signaling pathway. Real-time PCR was used to detect *C. bungei*-containing serum on cells for 72 h after activation of nuclear factor-activated B cell kappa light chain (NF- κ B) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) mRNA expression. **Result:** The results of CCK-8 showed an inhibitory effect of the *C. bungei*-containing serum on the proliferation of tumor cells in a dose and time-dependent manner. Among them, the high-dose group had the most obvious inhibitory effect, and the maximum inhibition rates at 24, 48, 72 h were 28%, 32%, and 43%, respectively. The results of flow cytometry showed that with the increase of drug-containing serum concentration, the cell growth was observed. The inhibition rate of cells was increased to different degrees, and the inhibition effect was significantly increased in the 72 h intervention group ($P < 0.01$). The maximum apoptosis rate of the *C. bungei*-containing serum group was 19.48% and 19.72%, compared with the blank group. The difference was significant ($P < 0.05$). The results of Western blot showed that the expression of PTEN in different groups increased with different concentrations of *C. bungei*-containing serum ($P < 0.05$), and the expressions of PI3K and p-Akt decreased ($P < 0.05$). Real-time PCR results showed that the *C. bungei*-containing serum could down-regulate the expression of NF- κ B and up-regulate the expression of TNF- α mRNA ($P < 0.05$). **Conclusion:** The medicinal serum of *C. bungei* can effectively inhibit the proliferation of MHCC97-H hepatoma cells and promote its apoptosis, which may be related to the PI3K/Akt signaling pathway and its key factors.

[**Key words**] *Clerodendron bungei*; liver cancer cell MHCC97-H; phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) /protein kinase (Akt) signaling pathway; drug-containing serum

恶性肿瘤已成为威胁人类生命健康的主要杀手,国内外对恶性肿瘤防治的研究投入了大量的人力、物力和财力,虽取得一些成绩,但至今未取得根本性的突破。原发性肝癌(肝癌)是发生于肝脏的恶性肿瘤,被称为“癌中之王”,具有发现晚、发展快、治疗难、预后差、易转移等特点,位居恶性肿瘤第 2 位^[1],严重威胁人类健康,目前常用的手术或者其他治疗方法疗效欠佳^[2-3]。近些年中医药在抗肝癌研究方面成绩颇丰,许多单味中药都能一定程度抑制原发性肝癌的发生发展^[4]。中药臭牡丹是我国常见的中草药,是我国著名中医药学家欧阳锜研究员结合多年的临床经验和科研实践发掘出的民间治疗恶性肿瘤单方^[5-6],分布区域广泛,药物资源丰富,来自臭牡丹的根、叶部分,性质平和,味辛、苦,用以活血散瘀、祛风解毒、消肿止痛,而肝癌的临床治疗方法以“化瘀解毒、消瘤散结”为主,是符合肝癌中医用药原则的中草药,且臭牡丹具有一定的补益之力,这与中医治疗肿瘤所认为的“祛邪不伤正”原则不谋而合。现代药理学研究发现臭牡丹化学成分包括有机酸类化合物、醇类化合物、过氧化物、甾醇类化合物、萜类化合物、挥发性成分等,具有镇静催眠、局麻、镇痛、抗炎、抑菌、抗肿瘤等药理作用^[7]。相关研究已经发现臭牡丹对肺癌细胞的增殖或者迁移有抑制作用,毒副作用小^[8-10],且临床用于治疗非小细胞肺癌有一定的成效,是一种具有良好应用前

景的抗癌中药,但是尚无对其抗肝癌的相关研究报道。本课题组通过前期体外实验研究发现,臭牡丹可以抗肝癌的发生发展^[11-12],但具体机制较少涉及,也罕见文献报道。

近年来的研究表明,磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt)信号通路是细胞内非常重要的信号转导途径,其持续激活与细胞的增殖、分化、凋亡以及癌变等过程密切相关,会导致细胞异常增殖和恶性转化^[13-14]。其在肝癌等多种肿瘤中表现为高度激活状态,是多种抗癌药物的作用靶点之一^[15]。故本研究拟从 PI3K/Akt 信号通路为切入点,观察臭牡丹含药血清对肝癌 MHCC97-H 细胞的影响,并探讨其抗肝癌的可能机制,为证实其为高效、低毒的临床抗肝癌药物提供实验依据和奠定理论基础。

1 材料

1.1 动物 实验动物选取 20 只 SPF 级雄性健康 SD 大鼠,购于湖南斯莱克景达实验动物公司,合格证号 SYXK(湘)2013-0005,体质量 250 ~ 280 g,符合湖南中医药大学实验动物伦理委员会指导原则与要求(批号 2016060A)。

1.2 细胞 上海中乔新舟生物科技有限公司购进人肝癌细胞株 MHCC97-H,由湖南中医药大学心脑血管防治实验室负责传代、培养,库号 ZQ0020。

1.3 药物 臭牡丹饮片由湖南省中医药研究院

附属医院中药房提供,由湖南省中医药研究院中药研究所刘浩药师按照《湖南省中药材标准》,鉴定其为为马鞭草科大青属植物臭牡丹 *Clerodendrum bungei* 的干燥地上部分。

1.4 试剂与仪器 胎牛血清,DMEM 培养基(美国 Gibco 公司,批号分别为 10099141,11965-092);胰酶消化液,RIPA 裂解液(碧云天公司,批号分别为 C0201,P0013B);trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 15596026);第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(PTEN),磷酸化 Akt(p-Akt),PI3K, β -肌动蛋白(β -actin)抗体(美国 Proteintech 公司,批号分别为 22034-1-AP,66444-1-Ig,66225-1-Ig,60008-1-Ig);逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 CW2569M);细胞增殖毒性法(CCK-8)(日本同仁化学研究所,批号 CK04-500T);Annexin V-FITC/碘化丙啶(PI)(美国 Sigma 公司,批号 P4170)。

164-5050 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);DYCZ-24EN 型电泳槽,DYCZ-40A 型转膜仪(中国北京六一仪器厂);PIKO REAL 96 型荧光定量 PCR 仪(美国 Thermo 公司);DSZ2000X 型倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器厂);MB-530 型多功能酶标分析仪(汇松科技发展有限公司);CytoFLEX 型流式细胞仪(美国 Beckman 公司)。

2 方法

2.1 臭牡丹提取物的制备 参考文献[16]方法选取臭牡丹适量,加水回流提取 2 次,第 1 次加 12 倍量,浸泡 1 h,回流提取 1 h,滤过,第 2 次加 7 倍水,回流提取 1 h,滤过,合并滤液,浓缩至每 1 mL 相当于 2 g 生药,加 95% 乙醇至含醇量为 60%,沉淀 24 h,抽滤,滤液回收乙醇至无醇味,浓缩至每 1 mL 浸膏相当于生药 5 g(每 1 g 浸膏相当于臭牡丹生药 4.14 g),灌装,灭菌,蒸干后得纯化干浸膏。

2.2 含药血清的制备 20 只雄性 SD 大鼠随机分成臭牡丹提取物高、中、低剂量组和模型组,每组 5 只。臭牡丹提取物根据 60 kg 成人体质量 $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 臭牡丹生药用量计算,高、中、低剂量分别为 2.18,1.09,0.55 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$,模型组给予生理盐水。小鼠每日灌胃 2 次,至第 3 天末次给药 1 h 之后,常规乙醚麻醉,腹主动脉取血后分离血清。同组大鼠血清混合均匀,过滤,储存备用。

2.3 细胞抑制率的检测 于 96 孔培养板中接种对数生长期细胞(5×10^3 个/mL),加入各组 15% 含药血清进行培养,分别于培养后 24,48,72 h 后换为完

全培养基 100 μL ,每孔加入 CCK-8 10 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 继续孵育 4 h,Bio-Tek 酶标仪分析 450 nm 处吸光度 A,取均值并绘制生长曲线。

2.4 细胞凋亡率的检测 取各组含药血清分别培养肝癌 MHCC97-H 细胞 48,72 h,待 PBS 洗后过 300 目筛,重悬细胞于 binding buffer 中,加入 Annexin V-FITC/PI 5 μL 混匀,在避光条件下室温反应 5 ~ 15 min,1 h 内进行流式细胞仪检测。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定 PTEN,PI3K,p-Akt 蛋白表达水平 待药物干预细胞 72 h,严格遵照 BCA 蛋白定量试剂盒说明进行操作,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 1 次后加入 RIPA 蛋白裂解液 250 μL 提取细胞总蛋白,采用苯二甲甲基氯化铵(BCA)蛋白浓度测定法进行蛋白定量,通过聚丙烯酰胺电泳按相对分子质量大小分离,再转移到杂交膜上,加入封闭液 5 mL,封闭 1.5 h,加入一抗(1:1 000),放入摇床,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,将蛋白条带用 TBST 洗涤 3 次后用稀释后的二抗(1:5 000)与膜共同孵育 90 min。再用 TBST 洗 3 次后,采用化学发光试剂曝光显影,扫描底片,蛋白相对表达量以灰度值比值表示。

2.6 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测 NF- κ B,TNF- α mRNA 的表达 待药物干预细胞 72 h,收集细胞,通过 trizol 法从中提取总 RNA。取总 RNA 1 μg 反转录合成 cDNA。SYBR 法检测基因表达,PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 40 个循环。数据采用相对定量法,相应公式计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 。引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
β -actin	上游 ACCCTGAAGTACCCCATCGAG	224
	下游 AGCACAGCCTGGATAGCAAC	
TNF- α	上游 AGCTCCAGTGGCTGAACCG	190
	下游 TGGTAGGAGACGGCGATGC	
NF- κ B	上游 GGGACTCCTACCCATTTGATG	128
	下游 AATCCCTAGACTGCTACCATCC	

2.7 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据符合正态分布及方差齐性时,两组间比较采用独立样本 *T* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多重比较采用

LSD 法;数据不符合正态分布或方差不齐时,则采用非参数检验中多个独立样本 Kruskal-Wallis H 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 臭牡丹含药血清对肝癌细胞 MHCC97-H 生长抑制的影响 臭牡丹含药血清分别作用肝癌 MHCC97-H 细胞 24, 48, 72 h, 与空白血清组比较,臭

牡丹含药血清中、高剂量组细胞生长受到明显抑制 ($P < 0.05, P < 0.01$), 72 h 臭牡丹含药血清各组细胞生长均受到显著抑制 ($P < 0.01$)。表明臭牡丹含药血清对肿瘤细胞的增殖抑制作用呈剂量和时间依赖性。其中高剂量组抑制作用最为明显,在 24, 48, 72 h 的最大抑制率分别达到 28%, 32%, 43%。见表 2。

表 2 臭牡丹含药血清对 MHCC97-H 细胞增殖的影响

Table 2 Effect of medicinal serum containing *Clerodendron bungei* on proliferation of MHCC97-H cells

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	A ($\bar{x} \pm s, n = 3$)			抑制率/%		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
空白血清	-	2.643 ± 0.025	2.509 ± 0.006	2.468 ± 0.028	-	-	-
臭牡丹	0.55	2.581 ± 0.021	2.292 ± 0.019	1.931 ± 0.104	2	9	22 ²⁾
	1.09	2.227 ± 0.022	1.952 ± 0.034	1.827 ± 0.022	16 ¹⁾	22 ²⁾	26 ²⁾
	2.18	1.898 ± 0.014	1.801 ± 0.017	1.398 ± 0.041	28 ²⁾	32 ²⁾	43 ²⁾

注:与空白血清组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 3 ~ 5 同)。

3.2 臭牡丹含药血清对肝癌细胞 MHCC97-H 凋亡的影响 与空白血清组比较,臭牡丹含药血清中、高剂量组干预 48, 72 h MHCC97-H 肝癌细胞的凋亡率明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01$), 且呈时间和剂量依赖性。说明臭牡丹含药血清是通过诱导细胞凋亡从而抑制肝癌细胞增殖。见表 3。

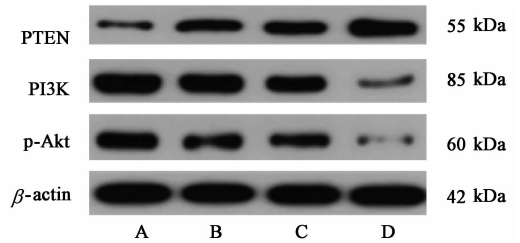
表 3 臭牡丹含药血清对 MHCC97-H 细胞凋亡率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of medicinal serum containing *C. bungei* on apoptosis of MHCC97-H cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$) %

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	48 h	72 h
空白血清	-	8.35 ± 1.07	8.31 ± 1.01
臭牡丹	0.55	8.96 ± 1.12	9.94 ± 1.34
	1.09	12.90 ± 1.59 ¹⁾	15.50 ± 1.66 ¹⁾
	2.18	19.48 ± 1.72 ²⁾	19.72 ± 1.81 ²⁾

3.3 臭牡丹含药血清对 PI3K/Akt 通路中相关蛋白的影响 与空白血清组比较,臭牡丹含药血清低、中、高剂量处理 MHCC97-H 细胞 72 h, PTEN 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$), 臭牡丹含药血清中、高剂量组 PI3K, p-Akt 蛋白表达显著减少 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。见图 1, 表 4。

3.4 臭牡丹含药血清对 PI3K/Akt 通路中相关凋亡基因的影响 与空白血清组比较,臭牡丹含药血清作用 72 h, 各剂量组 NF- κ B mRNA 表达显著减少 ($P < 0.01$), TNF- α mRNA 表达明显增加 ($P < 0.05$,



A. 空白血清组; B. 臭牡丹含药血清低剂量组; C. 臭牡丹含药血清中剂量组; D. 臭牡丹含药血清高剂量组

图 1 PI3K/Akt 通路中 PTEN, PI3K, p-Akt 蛋白表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of PTEN, PI3K, p-Akt protein expressions in PI3K/Akt pathway

表 4 臭牡丹含药血清对 PI3K/Akt 通路中相关蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of drug-containing serum of *C. bungei* on related proteins in PI3K/Akt pathway ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	p-Akt/ β -actin	PI3K/ β -actin	PTEN/ β -actin
空白血清	-	0.372 ± 0.043	0.681 ± 0.029	0.161 ± 0.136
臭牡丹	0.55	0.331 ± 0.024	0.654 ± 0.025	0.381 ± 0.074 ²⁾
	1.09	0.254 ± 0.011 ²⁾	0.482 ± 0.013 ²⁾	0.462 ± 0.029 ²⁾
	2.18	0.094 ± 0.008 ²⁾	0.151 ± 0.011 ²⁾	0.693 ± 0.029 ²⁾

$P < 0.01$), 且呈剂量依赖性。见表 5。

4 讨论

肝癌以其起病隐匿, 发现较晚, 进展迅速等特点居我国十大恶性肿瘤之列, 严重威胁人类的生命健

表 5 臭牡丹含药血清对 PI3K/Akt 通路中相关凋亡 mRNA 的影响
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of medicinal serum containing *C. bungei* on related apoptosis genes in PI3K/Akt pathway($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	NF-κB	TNF-α
空白血清	-	1.651 ± 0.144	1.021 ± 0.068
臭牡丹	0.55	0.503 ± 0.046 ²⁾	1.581 ± 0.132 ¹⁾
	1.09	0.321 ± 0.012 ²⁾	4.435 ± 0.451 ²⁾
	2.18	0.221 ± 0.080 ²⁾	4.638 ± 0.455 ²⁾

康。研究统计表明,肝癌的自然生存期仅有 2~6 个月^[17]。目前常用的手术或者其他西医治疗方式虽起到一定作用,但治疗同时带来的副作用也大大降低患者的生活质量。近年来大量研究表明中医药在防治恶性肿瘤方面不仅有明显抑制肿瘤细胞生长作用,且可以通过多种途径增强患者自身抵抗力,降低化疗副作用,起到改善患者生存质量,延长生存期等作用,一定程度上减少了肿瘤患者的痛苦。导师朱克俭教授为著名中医学家欧阳鎬及湖湘欧阳氏杂病流派传承人,从事中西医结合肿瘤学临床科研工作多年,在临床中常用中药臭牡丹治疗肝癌,疗效可观。

臭牡丹,取自臭牡丹的根、叶部分,有活血散瘀、祛风解毒、消肿止痛之功效,与“化痰解毒、消瘤散结、兼顾脾胃气血”的肝癌中医治法相符合,且臭牡丹具有一定的补益之力,这又与中医治疗肿瘤所认为的“祛邪不伤正”原则不谋而合。现代药理研究表明臭牡丹有镇静催眠、局部麻醉、抗肿瘤、免疫等多种作用^[7]。本课题组前期研究发现,臭牡丹在临床上可以有效抗肺癌、肠癌、肝癌等多种恶性肿瘤的发生发展,且在体内外实验中也表现出良好的治疗效果^[8-12],但其抗肝癌的具体机制较少涉及,也罕见文献报道。故本文对其抗肝癌机制进行进一步研究,探讨其可能的分子机制。

肝癌的发生机制十分复杂,涉及多条信号通路,与细胞增殖调节失控、细胞凋亡机制失活等多个环节密不可分^[18]。其中有着“抗凋亡途径”之称的 PI3K/Akt 信号通路是调控细胞增殖和凋亡的重要通路,见图 2。因此,可以通过观察 PI3K/Akt 信号通路中相关蛋白的表达来探讨臭牡丹抗肝癌的相关分子机制。PI3K/Akt 信号通路活性主要受 PTEN 抑癌基因的调控,PTEN 是一种肿瘤抑制基因和 PI3K 信号通路的拮抗剂,其不仅在原发性肝癌细胞中呈低表达状态,且能够负性调节 PI3K/Akt 信号通

路,PTEN 的磷酸化可导致 PIP3 去磷酸化生成磷脂酰肌醇(PIP2),即抑制 PI3K 信号和功能。当 PTEN 表达下降时,PI3K/Akt 信号通路受到的抑制作用减小,从而激活该通路^[19-22]。与此同时,磷酸化后的 Akt 可通过其下游分子 IKKα 诱导 NF-κB 的表达,从而导致细胞的恶性增殖和转化^[23-24]。并且,大量研究证实,在恶性肿瘤中 PI3K/Akt 信号通路中的某些重要分子如 PI3K, p-Akt 等均呈现异常持续活化状态^[25-26]。

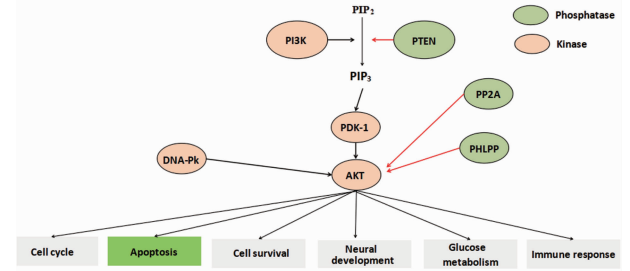


图 2 PI3K/Akt 信号通路示意
Fig. 2 Schematic diagram of PI3K/Akt signal path

课题组前期研究已初步证实,臭牡丹提取物在体外实验中有较好的抑制肝癌细胞增殖的效果^[9],本研究发现臭牡丹含药血清可以有效抑制 MHCC97-H 肝癌细胞增殖,促进其凋亡,说明臭牡丹可以阻滞肝癌的发生发展。Western blot 和 PCR 发现臭牡丹含药血清能明显增加 PTEN 在肝癌 MHCC97-H 细胞中的表达,降低 PI3K 及 p-Akt 蛋白的水平,避免 Akt 活化失控,阻断 NF-κB 进入核内的路径,说明其对 MHCC97-H 细胞的生长、增殖和促凋亡作用可能是通过 PI3K/Akt 信号通路实现的。另外,PCR 结果表明,臭牡丹含药血清给药后 TNF-α 基因的表达量上升,说明臭牡丹的抗肝癌作用可能与激活机体的自身免疫反应也有一定关系^[27]。

本实验研究显示臭牡丹含药血清可以通过 PI3K/Akt 信号通路诱导肝癌细胞凋亡,为臭牡丹作为抗癌药物的进一步研发提供了基本的实验和理论依据。值得注意的是,肝癌的发生机制复杂,影响因素较多,因此,对臭牡丹抗肝癌机制进行更为深入和清晰地探讨将是下一阶段的研究方向。

[参考文献]

[1] SU T S, LU H Z, CHENG T, et al. Long-term survival analysis in combined transarterial embolization and stereotactic body radiation therapy versus stereotactic body radiation monotherapy for unresectable

- Hepatocellular Carcinoma > 5 cm [J]. *Bmc Cancer*, 2016, 16(1): 834-835.
- [2] Barrett M, Nathan H, Vankayala H, et al. Recurrence of hepatocellular carcinoma at surgical incision site: case series and review of literature[J]. *Ann R Coll Surg Engl*, 2017, 99(6):77-119.
- [3] 刘珍,邓天好,程华初,等.原发性肝癌临床治疗新进展[J]. *湖南中医杂志*, 2018, 34(7):207-210.
- [4] 何立丽,吕文良,孙桂芝.中药提取物抗原原发性肝癌的研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(4): 1175-1178.
- [5] 欧阳剑虹,朱克俭. 欧阳琦[J]. *湖南中医杂志*, 1997(6):2-3.
- [6] 朱克俭,张亚利,欧阳剑虹,等.保肺饮预防肺癌的临床流行病学研究[J]. *中国中医药科技*, 1997(6): 332-333.
- [7] 陈思勤,朱克俭,程晓燕,等.臭牡丹化学成分及其药理作用研究进展[J]. *湖南中医杂志*, 2012, 28(2): 141-142.
- [8] 余娜,朱克俭,马思静,等.臭牡丹总黄酮对 A549 细胞增殖迁移侵袭力及 Wnt 通路相关蛋白的影响[J]. *世界中医药*, 2018, 13(4):978-983,987.
- [9] 余娜,朱克俭,马思静,等.臭牡丹总黄酮通过调控 Wnt/ β -catenin 通路影响 A549 细胞上皮间质转化研究[J]. *中草药*, 2018, 49(3):663-670.
- [10] 陈思勤,朱克俭,李勇敏,等.臭牡丹总黄酮抑制小鼠 Lewis 肺癌实体瘤及其与 p53、bcl-2、bax 表达相关性研究[J]. *世界中医药*, 2016, 11(6):946-949.
- [11] 胡琦,朱克俭,谭小宁,等.臭牡丹总黄酮对人肝癌 HepG2 细胞增殖作用的实验研究[J]. *湖南中医杂志*, 2015, 31(2):166-168.
- [12] 胡琦,谭小宁,余娜,等.臭牡丹总黄酮介导 Wnt/ β -catenin 信号转导诱导人肝癌细胞 HepG2 的凋亡[J]. *世界中医药*, 2016, 11(2):954-957.
- [13] Spangle J M, Roberts T M, ZHAO J J. The emerging role of PI3K/Akt-mediated epigenetic regulation in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1868(1): 123-131.
- [14] GAI J Q, SHENG X, QIN J M, et al. The effect and mechanism of bufalin on regulating hepatocellular carcinoma cell invasion and metastasis via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(1): 338-348.
- [15] 张蕊,彭芳.中药影响肝癌细胞信号转导通路的研究进展[J]. *医学综述*, 2017, 23(5):931-934.
- [16] 周红林,刘建新,周俐,等.臭牡丹提取物抗炎镇痛抗过敏作用的实验研究[J]. *中国新药杂志*, 2006(23): 2027-2029.
- [17] 诸佳瑜,陈闯,欧杰,等.中医辨证治疗原发性肝癌的研究进展[J]. *当代医药论丛*, 2017, 15(10):32-34.
- [18] 马星,夏伟.中药抗肝癌细胞增殖和诱导细胞凋亡的信号通路研究进展[J]. *上海中医药杂志*, 2018, 52(8):98-101.
- [19] CHO D C. Targeting the PI3K Akt mTOR pathway in malignancy: rationale and clinical outlook [J]. *Bio Drugs*, 2014, 28(4):373-381.
- [20] Babichev Y, Kabaroff L, Datti A, et al. PI3K/Akt/MtoR inhibition in combination with doxorubicin is an effective therapy for leiomyosarcoma[J]. *J Transl Med*, 2016, 14(1):67-71.
- [21] WAN X W, JIANG M, CAI H F, et al. The alteration of PTEN tumor suppressor expression and its association with the histopathological features of human primary hepatocellular carcinoma. [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2003, 129(2):100-106.
- [22] 黎金华,吴万垠,杨小兵.扶正抗癌方通过 PTEN/PI3K/Bad 通路调控肺癌 A549 细胞增殖与凋亡[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(21):98-103.
- [23] Riquelme I, Tapia O, Leal P, et al. miR-101-2, miR-125b-2 and miR-451a act as potential tumor suppressors in gastric cancer through regulation of the PI3K/Akt/mTOR pathway[J]. *Cell Oncol: Dordr*, 2016, 39(1): 23-33.
- [24] 李平,胡建燃,铁军.柴胡总皂苷通过 Akt/NF- κ B 信号通路抑制胃癌细胞 MGC80-3 的增殖和迁移[J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(10): 1727-1735.
- [25] Spangle J M, Roberts T M, ZHAO J J. The emerging role of PI3K/Akt-mediated epigenetic regulation in cancer[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1868(1): 123-31.
- [26] 邹乐兰,刘红宁,吕红,等.左归丸抗乳腺癌转移及其作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(23): 85-90.
- [27] 陶静怡,李敏,胡利江,等.玉屏风颗粒联合西药对反复上呼吸道感染肺气虚证患者免疫功能及血清 IL-6、TNF- α 水平的影响[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2018, 28(4):263-266,270.

[责任编辑 张丰丰]