

虎蝎化积膏对裸鼠 HepG2 细胞移植性肝癌的抑制作用

蔡媛¹, 杜青^{1*}, 曾普华², 沈冰冰¹, 彭艳梅^{1*}

(1. 湖南省中医药研究院中药研究所, 湖南长沙 410006; 2. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南长沙 410006)

摘要: 目的 探讨虎蝎化积膏对裸鼠 HepG2 细胞移植性肝癌的抑制作用。方法 建立 BALB/c 裸鼠 HepG2 细胞移植性肿瘤模型, 造模成功后随机分为模型组、虎蝎化积膏组 (20 mL/kg)、阳性组 (顺铂, 4 mg/kg), 各组给予相应药物干预, 14 d 后记录各组裸鼠体质量及生存状况, ELISA 法检测血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平, HE 染色观察肿瘤组织细胞形态的变化, 免疫组化法和 Western blot 法检测肿瘤组织 Bcl-2、caspase-3、Cyt-C、p53 蛋白表达。结果 与模型组比较, 阳性组与虎蝎化积膏组裸鼠肿瘤生长受到抑制, 肿瘤组织 Bcl-2 蛋白表达降低, Cyt-C、p53、caspase-3 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 虎蝎化积膏组裸鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 虎蝎化积膏能抑制裸鼠 HepG2 细胞移植性肿瘤生长, 其机制可能与降低血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平, 升高 Cyt-C、p53、caspase-3 蛋白表达, 降低 Bcl-2 蛋白表达, 进而诱导肝癌细胞凋亡有关。

关键词: 虎蝎化积膏; 肝癌; HepG2 细胞; 凋亡

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)12-4019-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.047

肝癌是我国常见的高发病率、高致死率恶性肿瘤之一, 因其在临床诊疗中具有发病隐匿、晚期病势迅猛、预后差等特点, 致使临床患者生存质量低下^[1]。中医药从整体布局, 调节阴阳平衡, 又辨证论治有的放矢, 特别是中药复方通过精准配伍而成, 具有多活性组分、多环节、多靶点的抗肿瘤特点, 显示出其独特的治疗优势^[2-3]。研究发现, 肝癌的发生发展与癌基因、抑癌基因及细胞的增殖与凋亡速度平衡失调有关, 诱导肝癌细胞凋亡可能成为临幊上治疗肝癌的有效途径之一^[4]。虎蝎化积膏是抗肿瘤中药创制湖南省级工程研究中心自制的中药复方制剂, 是多年来根据肝癌等常见消化道肿瘤“虚、瘀、毒”的基本病机, 经病证结合、精准配伍而成的临床效验方, 该方辅助临床化疗以及单独给药均对肝癌具有显著的疗效。课题组前期采用虎蝎化积膏联合顺铂对 H22 细胞进行干预, 探讨其对体外肝癌细胞增殖、凋亡形态及凋亡相关蛋白的影响^[5], 但其在体内的药效及相关作用机制尚未明确。本实验旨在研究虎蝎化积膏对 HepG2 细胞移植性肿瘤的药效, 并从调控凋亡为切入点探讨其分子机制, 以期为虎蝎化积膏的临床治疗提供理论及实验依据。

1 材料

1.1 动物与细胞株 雌性 BALB/c 裸鼠 18 只, 4 周龄, SPF 级, 体质量 18~22 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有

限公司, 饲养于湖南安生美动物研究院, 12 h/12 h 明暗交替, 自由摄食饮水, 实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。本实验经湖南安生美动物研究院实验动物福利伦理委员会审核通过 (编号 ASM2019043)。HepG2 细胞购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药物 虎蝎化积膏由党参 20 g、黄芪 30 g、白术 15 g、女贞子 20 g、仙鹤草 30 g、茯苓 15 g、枸杞 10 g、蚤休 15 g、半枝莲 30 g、莪术 15 g、鳖甲 30 g、八月札 15 g、石见穿 30 g、土贝母 15 g、虎杖 15 g、菝葜 30 g、蛇舌草 30 g、全蝎 6 g、壁虎 10 g、土鳖虫 5 g 组成, 药材均购自湖南省中医药研究院附属医院, 由湖南省中医药研究院中药研究所刘浩副研究员鉴定为正品。注射用顺铂, 规格 10 mg/瓶, 批号 8H259A, 购自美国百特国际有限公司。

1.3 试剂 DMEM 高糖培养基 (批号 8119221)、胎牛血清 (批号 42F0266K)、胰蛋白酶 (批号 2042303), 购自美国 Gibco 公司; 兔抗小鼠 B 细胞淋巴瘤 2 (Bcl-2) 抗体 (批号 26593-1-AP)、细胞色素 C (Cyt-C) 抗体 (批号 10993-1-AP)、肿瘤阻抑蛋白 (p53) 抗体 (批号 21891-1-AP)、天冬氨酸蛋白水解酶-3 (caspase-3) 抗体 (批号 19677-1-AP), 购自武汉三鹰生物技术有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH, 批号 YM3029), 购自美国 ImmunoWay 公司; 磷酸酯酶抑制剂 (批号 P021A)、蛋白

收稿日期: 2021-06-27

基金项目: 国家自然科学青年基金项目 (81503197); 湖南省自然科学青年基金项目 (2018JJ3310, 2019JJ50345); 湖南省中医药管理局项目 (201810)

作者简介: 蔡媛 (1988—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事中医学研究。E-mail: tcmyuanyuan@163.com

*通信作者: 杜青 (1991—), 女, 硕士, 助理研究员, 从事中药药理与创新药物研究。E-mail: temqingqing@163.com

彭艳梅 (1973—), 女, 博士, 研究员, 从事中药新药及大健康产品研发。E-mail: 271853145@qq.com

印迹膜再生液(批号P014WB-1)、蛋白酶抑制剂混合物(批号P021A)、羊抗鼠二抗(批号SA001)、羊抗兔二抗(批号SA009),购自湖南艾佳生物科技股份有限公司;DAB显色试剂盒(批号K196721D)、白细胞介素-1β(IL-1β)ELISA试剂盒(批号202006006)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)ELISA试剂盒(批号202006006)、白细胞介素-6(IL-6)ELISA试剂盒(批号202006006),购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.4 仪器 生物组织切片机、HERAcell12401型二氧化碳细胞培养箱(美国Thermo公司);BX53型生物显微镜、IX-71型倒置显微镜(日本Olympus公司);TS-2型水平脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司);envision2105型酶标仪(美国PerkinElmer公司);全自动化学发光系统(美国Bio-Rad公司);EXPERT 16K-R型台式高速冷冻离心机(长沙市鑫奥仪器仪表有限公司)。

2 方法

2.1 虎蝎化积膏制备 按照组方配比称取各药材,第1次加10倍量水煎煮1.5 h,第2次加8倍量水煎煮1 h,合并2次煎液并浓缩,制备成生药量1.34 g/mL的中药提取液(含黄芪甲苷2.35 mg/mL、毛蕊异黄酮苷1.16 mg/mL、槲皮苷0.88 mg/mL、木犀草素0.67 mg/mL、二氢山柰酚0.57 mg/mL、女贞子苷0.79 mg/mL、琥珀酸0.92 mg/mL),该处方的临床剂量为每天412 g,按照体表面积换算成裸鼠等效剂量为53.56 g/kg。

2.2 细胞培养 HepG2细胞株常规培养于DMEM高糖培养基中(含10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素),于37℃、5%CO₂培养箱中培养。取对数生长期细胞进行实验。

2.3 裸鼠HepG2细胞移植性肿瘤模型建立及分组给药 取“2.2”项下细胞,0.25%胰蛋白酶消化后用无血清培养液离心洗涤2次,调整细胞密度为5×10⁷/mL,无菌条件下用注射器抽取0.2 mL接种于经75%乙醇消毒的裸鼠右侧腋窝皮下,约10 d后瘤块长至约5 mm×5 mm×5 mm,即造模成功。将造模成功的裸鼠随机分为模型组、阳性组、虎蝎化积膏组,每组6只。阳性组裸鼠腹腔注射顺铂4 mg/kg,每3 d给药1次;虎蝎化积膏组裸鼠灌胃给予20 mL/kg虎蝎化积膏药液,给药剂量为临床等效剂量2.68 g/mL,由于等效剂量稠度过高,实际配制剂量为1.34 g/mL,按每天给药2次;模型组裸鼠每天灌胃给予等体积纯净水,连续给药14 d。

2.4 肿瘤体积和质量检测 每天观察各组裸鼠一般状况,并称定体质量。每2 d测量肿瘤长、短径,计算肿瘤体积。末次给药后,各组裸鼠眼眶取血,颈椎脱臼处死,剥离肿瘤,称定瘤质量,计算肿瘤抑制率。取部分肿瘤于10%中性甲醛溶液中固定,剩余部分液氮冻存,用于后续检测。

2.5 ELISA法检测血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平 各组裸鼠眼眶取血,3 500 r/min离心10 min,取上清液,严格按照相关试剂盒说明书操作,于450 nm波长处检测光密度值

(OD),计算裸鼠血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平。

2.6 HE染色观察肿瘤组织形态 取10%中性甲醛溶液固定的肿瘤组织,石蜡包埋,切片(4 μm)并进行HE染色,光学显微镜下观察并拍照。

2.7 免疫组化法检测裸鼠肿瘤组织Bcl-2、caspase-3、Cyt-C、p53蛋白表达 取“2.6”项下组织切片,用磷酸盐缓冲液轻轻洗涤,于Bcl-2(1:500)、caspase-3(1:300)、Cyt-C(1:500)、p53(1:500)兔抗小鼠多克隆抗体溶液中4℃孵育过夜,次日将切片与二抗孵育,用苏木精复染。随机选择5个视野,在显微镜(×200)下观察并拍照,计算平均光密度(OD)值。

2.8 Western blot法检测肿瘤组织Bcl-2、caspase-3、Cyt-C、p53蛋白表达 取各组裸鼠肿瘤组织,加入裂解液和磷酸酶抑制剂,充分研磨提取组织总蛋白。BCA法进行蛋白定量,根据目的蛋白分子量,配制10%分离胶和5%浓缩胶,100 V恒压转膜,5%脱脂牛奶-TBST封闭1 h,加入一抗多克隆兔抗小鼠抗体Bcl-2(1:1 000)、caspase-3(1:1 000)、Cyt-C(1:1 000)、p53(1:1 000)4℃孵育过夜,次日洗膜后加入二抗,室温孵育1 h,ECL显色,定影,将胶片进行扫描,用IPP 6.0图像分析软件对图像进行灰度分析,以GAPDH为内参,计算目的蛋白相对表达。

2.9 统计学分析 通过SPSS 20.0进行处理,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用LSD检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 虎蝎化积膏对HepG2细胞移植性肝癌裸鼠肿瘤抑制的影响 如图1所示,随着时间延长,裸鼠体质量均下降,下降幅度从大到小依次为阳性组、模型组、虎蝎化积膏组。与模型组比较,阳性组和虎蝎化积膏组裸鼠肿瘤体积与质量均减小($P < 0.05$, $P < 0.01$),阳性组抑瘤率为53.70%,虎蝎化积膏组抑瘤率为41.07%,见表1~2。

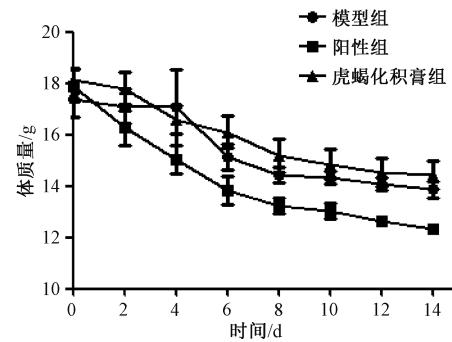


图1 各组裸鼠体质量变化($\bar{x} \pm s$, n=6)

3.2 虎蝎化积膏对HepG2细胞移植性肝癌裸鼠血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平的影响 与模型组比较,虎蝎化积膏组裸鼠血清TNF-α、IL-1β、IL-6水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),阳性组裸鼠血清IL-1β水平降低($P < 0.05$),见表3。

表1 虎蝎化积膏对裸鼠肿瘤体积的影响($\bar{x} \pm s$, n=6)

喂养天数/d	模型组/mm ³	阳性组/mm ³	虎蝎化积膏组/mm ³
0	201.0±22.4	231.8±24.6	216.7±49.1
2	219.2±32.5	259.2±17.6	261.4±64.9
4	256.4±6.0	275.0±28.1	320.6±100.6
6	295.6±41.3	284.1±23.3	344.8±86.8
8	343.9±48.4	289.6±21.2	349.0±72.5
10	377.0±63.3	291.3±13.5	355.7±72.4
12	418.4±87.7	300.2±3.2	360.4±63.0
14	433.6±83.0	311.7±10.5 ^{**}	346.2±62.3 ^{**}

注: 与模型组比较, ^{**}P<0.01。

表2 各组裸鼠体瘤肿瘤质量与抑瘤率比较($\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
模型组	0.806±0.029	—
阳性组	0.373±0.191 [*]	53.70
虎蝎化积膏组	0.475±0.153 [*]	41.07

注: 与模型组比较, ^{*}P<0.05。

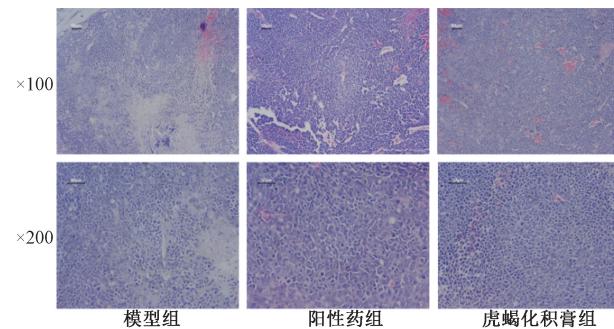
表3 各组裸鼠血清 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平比较(ng/L, $\bar{x} \pm s$, n=6)

组别	TNF-α	IL-1β	IL-6
模型组	783.8±43.0	96.0±5.0	127.1±20.8
阳性组	683.2±115.4	78.6±8.2 [*]	103.3±9.4
虎蝎化积膏组	569.9±31.1 ^{**}	55.5±6.5 ^{**}	88.8±8.0 [*]

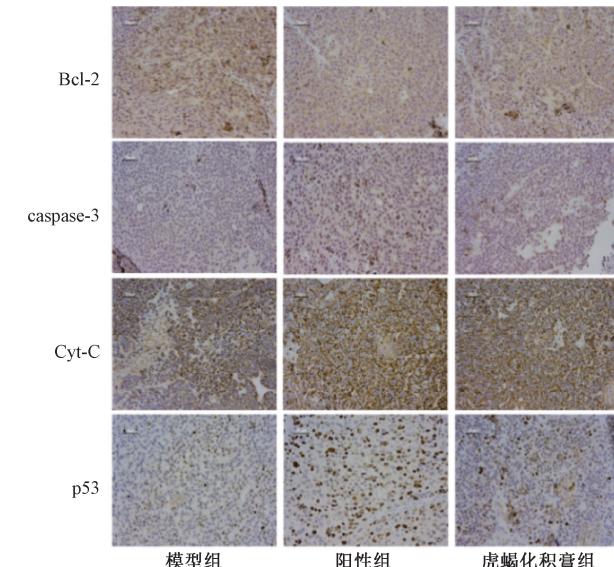
注: 与模型组比较, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01。

3.3 虎蝎化积膏对 HepG2 细胞移植性肝癌裸鼠肿瘤组织病理学变化的影响 各组裸鼠肿瘤组织均存在异质性及明显的肿瘤结节结构, 细胞排列不规则, 且其中细胞的核质比增加, 细胞核大小不一, 表现出肿瘤细胞的特征, 还可以看到明显的肿瘤坏死区, 见图 2。

3.4 虎蝎化积膏对 HepG2 细胞移植性肝癌裸鼠肿瘤组织 Bcl-2、caspase-3、Cyt-C、p53 蛋白表达的影响 与模型组比较, 阳性组与虎蝎化积膏组裸鼠肿瘤组织 Bcl-2 蛋白

**图2** 各组裸鼠肿瘤组织HE染色

表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), caspase-3、p53、Cyt-C 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), 见图 3~4、表 4~5。

**图3** 各组裸鼠肿瘤组织 Bcl-2、caspase-3、Cyt-C、p53 蛋白免疫组化染色(×200)**表4** 各组裸鼠肿瘤组织 Bcl-2、caspase-3、Cyt-C、p53 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	Bcl-2	caspase-3	Cyt-C	p53
模型组	48 790±6 021	3 970±414	3 580±575	4 593±157
阳性组	5 392±958 ^{**}	6 450±481 ^{**}	6 759±167 ^{**}	6 738±260 ^{**}
虎蝎化积膏组	4 122±1 040 [*]	6 278±221 ^{**}	5 582±112 [*]	6 311±580 ^{**}

注: 与模型组比较, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01。

表5 各组裸鼠肿瘤组织中 Bcl-2、caspase-3、Cyt-C、p53 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	Bcl-2	caspase-3	Cyt-C	p53
模型组	0.50±0.17	0.09±0.10	0.21±0.07	0.16±0.12
阳性组	0.17±0.05 [*]	0.81±0.09 ^{**}	0.70±0.05 ^{**}	0.75±0.10 ^{**}
虎蝎化积膏组	0.36±0.12	0.75±0.18 ^{**}	0.44±0.15 [*]	0.56±0.05 ^{**}

注: 与模型组比较, ^{*}P<0.05, ^{**}P<0.01。

4 讨论

肝癌是目前危害人类生命的严重疾病之一, 其发病率位居恶性肿瘤发病率的第4位, 占比8.2%^[6]。目前, 对于恶性肝癌, 放化疗是最常用的治疗手段, 该方法见效快, 对肿瘤细胞杀伤力强, 在临床治疗中占有较大优势, 然而患者在医治过程中生存质量低下。传统中医理论认为,

肿瘤的形成是由于外感邪气、情志郁结等因素导致机体阴阳失衡, 从而使脏腑失和、正气亏虚、气机阻滞、瘀血内停或兼痰湿凝聚而成“积聚”^[7]。肝癌归属于中医学中“鼓胀”“癥瘕”等范畴^[8]。因此, 中医抗肿瘤治疗法则一直秉持扶正祛邪, 使用具有清热解毒、软坚散结、活血化瘀、化痰祛湿等功效的中药^[9-10]。本实验采用的虎蝎化积

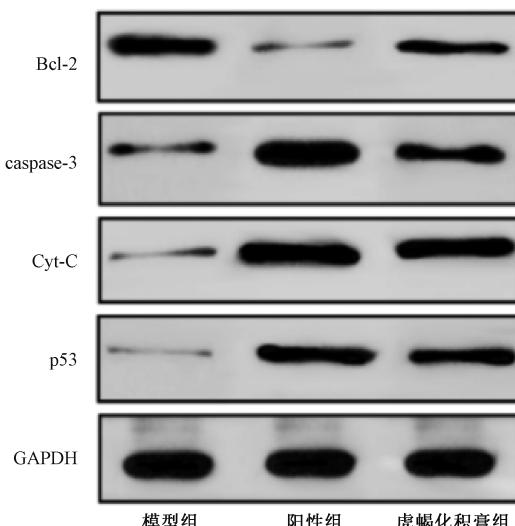


图4 各组裸鼠肿瘤组织中 Bcl-2、caspase-3、Cyt-C、p53 蛋白条带图

膏以“扶正祛邪、清热解毒”为组方原则，全方药物配伍得当，扶正抗癌，标本兼治，共奏“益气健脾、补益肝肾、行气化瘀、清热解毒、攻毒散结”之功效，该方虽在临床已广泛开展应用，但其具体的抗癌作用机制有待进一步探索。

肝癌发生、发展与癌基因和抑癌基因及细胞增殖与凋亡的速度平衡失调有关^[11-12]。细胞凋亡途径的紊乱将会导致细胞发育异常，从而加速肿瘤的发生和恶化^[13]。细胞凋亡的过程受多种促凋亡和抗凋亡蛋白调节^[14]。Bcl-2 是迄今为止功能最明确的细胞凋亡拮抗基因，其能够阻止细胞色素 C (Cyt-C) 从线粒体释放到细胞质，从而抑制细胞凋亡^[15-16]。在人类肿瘤发生中，约 50% 以上与 p53 突变相关，p53 是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的基因^[17-18]。Bcl-2、p53、Cyt-C 处于凋亡途径的上游阶段，其最终激活共同的凋亡效应物-胱冬酶。在正常的细胞中，胱冬酶处于非活化的酶原状态，凋亡程序一旦开始，胱冬酶被活化，随后发生凋亡蛋白酶的层叠级联反应，引发不可逆的凋亡^[19-20]。故本实验选取 Bcl-2、Cyt-C、p53 这 3 个凋亡相关上游基因和 caspase-3 最终效应蛋白作为虎蝎化积膏抗凋亡的药效评价靶点。研究显示，虎蝎化积膏能够抑制 Bcl-2 蛋白表达，升高 Cyt-C、p53、caspase-3 蛋白表达，具有良好的抗凋亡作用。细胞凋亡过程涉及到免疫系统对衰老、损伤细胞的清除过程，TNF-α、IL-2、IL-6 等与细胞膜受体识别，激活各种酶类，使 DNA 暴露给胞质中的内切酶而被裂解^[21-24]。本实验发现，虎蝎化积膏能够降低 TNF-α、IL-1β、IL-6 水平，使裸鼠体质量维持在比较稳定的水平，且整体生活状况较模型组和阳性组好。

综上所述，虎蝎化积膏具有抗肿瘤作用，其机制可能与调节机体免疫和诱导肿瘤细胞凋亡有关。

参考文献:

- [1] Wang W Y, Wei C. Advances in the early diagnosis of 4022

hepatocellular carcinoma [J]. *Genes Dis*, 2020, 7 (3): 308-319.

- [2] 艾望, 夏玉坤, 王秀萍, 等. 原发性肝癌中医药治疗研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2018, 20 (3): 133-136.
- [3] Ma L, Wang B, Long Y X, et al. Effect of traditional Chinese medicine combined with western therapy on primary hepatic carcinoma: a systematic review with meta-analysis [J]. *Front Med*, 2017, 11 (2): 191-202.
- [4] Naz H, Tarique M, Ahamad S, et al. Hesperidin-CAMKIV interaction and its impact on cell proliferation and apoptosis in the human hepatic carcinoma and neuroblastoma cells [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120 (9): 15119-15130.
- [5] 杜青, 蔡媛, 沈冰冰, 等. 虎蝎化积膏联合顺铂诱导肝癌 H22 细胞凋亡作用及其机制 [J]. 北京中医药大学学报, 2019, 42 (5): 409-415.
- [6] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68 (6): 394-424.
- [7] 李维忠, 任明名, 魏小曼, 等. 癌毒病机理论辨治肝癌探析 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2020, 2 (1): 20-23.
- [8] 华雯, 高鸿彬. 基于络病理论探讨三棱-莪术药对治疗肝癌的作用机制 [J]. 世界中医药, 2022, 17 (5): 687-691.
- [9] 林丽珠, 肖志伟, 黄学武, 等. 原发性肝癌中西医结合诊疗实践回眸 [J]. 中医肿瘤学杂志, 2020, 2 (1): 5-9.
- [10] Xia L, Bu Y, Jia Q Q. Traditional Chinese medicine as supportive care for the management of liver cancer: past, present, and future [J]. *Genes Dis*, 2019, 7 (3): 370-379.
- [11] Zhang Z Y, Hong D, Nam S H, et al. SIRT1 regulates oncogenesis via a mutant p53-dependent pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2015, 62 (1): 121-130.
- [12] Younis N S, Ghanim A M H, Saber S. Mebendazole augments sensitivity to sorafenib by targeting MAPK and BCL-2 signalling in N-nitrosodiethylamine-induced murine hepatocellular carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2019, 9 (1): 19095.
- [13] Pistrutto G, Trisciuoglio D, Ceci C, et al. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies [J]. *Aging (Albany NY)*, 2016, 8 (4): 603-619.
- [14] Ouyang L, Shi Z, Zhao S, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis [J]. *Cell Prolif*, 2012, 45 (6): 487-498.
- [15] Edlich F. BCL-2 proteins and apoptosis: recent insights and unknowns [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 500 (1): 26-34.
- [16] Knight T, Luedtke D, Edwards H, et al. A delicate balance—the BCL-2 family and its role in apoptosis, oncogenesis, and cancer therapeutics [J]. *Biochem Pharmacol*, 2019, 162:

- 250-261.
- [17] Kwak S, Lee S H, Han E J, et al. Serine/threonine kinase 31 promotes PDCD5-mediated apoptosis in p53-dependent human colon cancer cells [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (3): 2649-2658.
- [18] Sheikh M S, Fornace A J. Role of p53 family members in apoptosis[J]. *J Cell Physiol*, 2000, 182(2): 171-181.
- [19] Fan T J, Han L H, Cong R S, et al. Caspase family proteases and apoptosis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2005, 37(11): 719-727.
- [20] Marks N, Berg M J, Guidotti A, et al. Activation of caspase-3 and apoptosis in cerebellar granule cells [J]. *J Neurosci Res*, 1998, 52(3): 334-341.
- [21] Wolenski F S, Fisher C D, Sano T, et al. The NAE inhibitor pevonedistat (MLN4924) synergizes with TNF- α to activate apoptosis[J]. *Cell Death Discov*, 2015, 1: 15034.
- [22] Shu Z H, Shi X Z, Nie D Q, et al. Low-molecular-weight fucoidan inhibits the viability and invasiveness and triggers apoptosis in IL-1 β -treated human rheumatoid arthritis fibroblast synoviocytes[J]. *Inflammation*, 2015, 38(5): 1777-1786.
- [23] Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, et al. Correction: Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice[J]. *J Immunol*, 2015, 194 (7): 4652-4660.
- [24] Tan S W, Xu M Y, Ke B L, et al. IL-6-driven FasL promotes NF- κ Bp65/PUMA-mediated apoptosis in portal hypertensive gastropathy[J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(10): 748.

姜黄素通过调控 miR-141-3p 表达对肾癌 Caki-1 细胞增殖和凋亡的作用

张黎¹, 李青¹, 姜姗¹, 千银弟¹, 李慧娟¹, 陈新元^{1,3}, 刘森^{2*}

(1. 湖北省第三人民医院病理科, 湖北 武汉 430000; 2. 湖北省第三人民医院检验科, 湖北 武汉 430000;
3. 湖北省第三人民医院阳逻院区病理科, 湖北 武汉 430000)

摘要: 目的 研究姜黄素通过调控 miR-141-3p 表达对肾癌 Caki-1 细胞增殖和凋亡的影响。方法 将人肾癌 Caki-1 细胞分为对照组、miR-141-3p mimics 组 (转染 miR-141-3p mimics)、mimics-NC 组 (转染 mimics 阴性对照序列)、20 μ mol/L 姜黄素组 (20 μ mol/L 姜黄素处理)、20 μ mol/L 姜黄素+miR-141-3p mimics 组 (转染 miR-141-3p mimics, 并用 20 μ mol/L 姜黄素处理)。RT-qPCR 法检测各组胃癌细胞 miR-141-3p mRNA 表达, CCK-8 试剂盒检测细胞增殖率, 流式细胞仪检测细胞凋亡率, Western blot 法检测细胞上皮细胞-间质细胞转化 (EMT) 标志蛋白 E 钙粘蛋白 (E-cadherin)、N 型钙粘蛋白 (N-cadherin) 和间质标志物波形蛋白 (Vimentin) 表达。结果 与对照组比较, miR-141-3p mimics 组和 20 μ mol/L 姜黄素组细胞增殖率降低 ($P<0.01$), 细胞凋亡率、miR-141-3p mRNA 表达、E-cadherin 蛋白表达升高 ($P<0.01$), N-cadherin、Vimentin 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与 20 μ mol/L 姜黄素组比较, 20 μ mol/L 姜黄素+miR-141-3p mimics 组细胞增殖率降低 ($P<0.01$), 细胞凋亡率、miR-141-3p mRNA 表达、E-cadherin 蛋白表达升高 ($P<0.01$), N-cadherin、Vimentin 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。结论 姜黄素可上调 miR-141-3p mRNA 表达, 并与高表达 miR-141-3p 协同作用抑制肾癌细胞增殖, 促进细胞凋亡, 其机制可能与 EMT 标志蛋白表达相关。

关键词: 姜黄素; 肾癌 Caki-1 细胞; miR-141-3p; 细胞增殖; 细胞凋亡; 上皮细胞-间质细胞转化 (EMT)

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)12-4023-07

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.12.048

肾细胞癌是全球常见泌尿系癌症之一, 其发病率和死亡率呈上升趋势^[1-2], 目前主要治疗手段为外科切除手术, 但肾癌细胞的复发及转移仍是彻底治愈的阻力^[3]。研究表明, 不同内源编码小分子 RNA (miRNA) 在多数泌尿系癌症中表达不同^[4], 其中 miR-141 为 miR-200 家族成员之一, 在肿瘤方向研究广泛, 作为一种生物标志物与不同靶点结合, 参与多个信号通路, 影响癌细胞增殖、凋亡、迁移及

侵袭等^[5-7]。姜黄素是从姜科植物姜黄等的根茎中提取的一种天然多酚类化合物, 具有抗炎、抗氧化和抗肿瘤活性等作用^[8-9], 可调控基因表达或分子间相互作用, 影响生理及病理条件下的一系列反应^[10], 包括细胞增殖、凋亡, 相关癌症炎症反应和信号通路、癌症血管生成和转移等^[11]。李刚等^[12]研究发现, 姜黄素可调控或协助多种 miRNA 抑制肿瘤细胞增殖, 促进凋亡等。姜黄素与抑制肾癌的发展密

收稿日期: 2021-12-01

基金项目: 武汉市医学科研项目 (WX19D33)

作者简介: 张黎 (1970—), 女, 副主任医师, 研究方向为病理肿瘤。Tel: (027) 83743190, E-mail: Z83743190@163.com

*通信作者: 刘森 (1986—), 男, 硕士, 副主任技师, 研究方向为肿瘤与炎症。Tel: (027) 89179982, E-mail: 279825428@qq.com