

• 药理与临床 •

南蛇藤提取物靶向 mTOR 抑制人肝癌 HepG2 细胞侵袭与转移能力的研究

钱亚云, 李文原, 赵雪煜, 杨 婷, 严 妍, 房传赐, 侯晶晶, 刘延庆

扬州大学医学院, 江苏 扬州 225001

摘要: 目的 探索南蛇藤提取物(COE)靶向哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)抑制人肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭与转移的分子机制。方法 用 siRNA 技术, 构建敲除 mTOR 基因的 HepG2 细胞模型, MTT 法检测 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞增殖能力的影响。划痕实验及 Transwell 实验检测药物对细胞侵袭转移能力的影响。Western blotting 法分析用药后基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、MMP-9 蛋白的表达水平变化。结果 成功构建敲除 mTOR 表达的 HepG2/mTOR⁻细胞。COE 明显抑制 HepG2/mTOR⁻细胞的增殖($P < 0.05$), 并呈浓度依赖性。划痕实验结果显示 COE 降低了细胞迁移能力。Transwell 实验结果表明, COE (80 mg/L) 明显减少了穿膜细胞数目($P < 0.05$)。Western blotting 结果显示, COE (80 mg/L) 明显降低 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平($P < 0.05$)。结论 COE 明显抑制 HepG2/mTOR⁻细胞的增殖与侵袭转移, mTOR 通路可能是其抑制肝癌的潜在作用靶点之一。

关键词: 南蛇藤; 原发性肝细胞癌; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 侵袭; 转移

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)20-4831-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.20.019

Celastrus orbiculatus extracts inhibit invasion and metastasis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by targeting mTOR

QIAN Ya-yun, LI Wen-yuan, ZHAO Xue-yu, YANG Ting, YAN Yan, FANG Chuan-ci, HOU Jing-jing, LIU Yan-qing
Medical College, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China

Abstract: Objective To investigate the molecular mechanisms of *Celastrus orbiculatus* extracts (COE) of the invasion and metastasis inhibition in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells by targeting mTOR. **Methods** The HepG2/mTOR⁻ cells with mTOR knockout expression were constructed by using siRNA technology. The effect of COE on the proliferation of the HepG2/mTOR⁻ cells was also studied. The HepG2/mTOR⁻ cells were treated with COE in different concentrations (20, 40, 80, 160, and 320 mg/L) for 24 h. The cell reproductive capability of HepG2/mTOR⁻ cells was detected by MTT. The effect of COE on the metastatic ability of HepG2/mTOR⁻ cells *in vitro* was investigated by scratch assay and Transwell migration assay. The expression levels of molecular mechanisms related proteins MMP-2 and MMP-9 were assessed by Western blotting. **Results** The HepG2/mTOR⁻ cells with mTOR knockout expression were successfully constructed. COE significantly inhibited the proliferation of HepG2/mTOR⁻ cells in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$). COE decreased the invasion and migration of HepG2/mTOR⁻ cells. The results of Transwell experiment indicated that COE (80 mg/L) significantly reduced the number of transmembrane cells ($P < 0.05$). And the expression levels of MMP2 and MMP9 protein were significantly reduced in the HepG2/mTOR⁻ cells after the treatment of COE. **Conclusion** COE can significantly inhibit the proliferation, invasion, and migration in the HepG2/mTOR⁻ cells. Our data reveal that COE is a potential chemotherapeutic drug in human hepatocellular carcinoma treatments via targeting mTOR signal pathway.

Key words: *Celastrus orbiculatus* Thunb.; hepatocellular carcinoma; mammalian target of rapamycin; invasion; migration

原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是危害人类健康的第5大恶性肿瘤,肿瘤相关死亡率位于第3位^[1],临床治疗常以手术为主。但

由于肝癌的早期临床症状不明显,诊治率低,且肿瘤细胞侵袭力强,复发转移率高,常致使患者的预后较差。通过监测肿瘤相关 miRNA、靶蛋白^[2-3]及基

收稿日期: 2018-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81403232, 81573656); 江苏省自然科学基金项目(BK20171290, BK2012686); 教育部博士点基金新教师类项目(20133250120003)

作者简介: 钱亚云, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要研究方向为中西医结合抗肿瘤研究。

基因组转移相关基因^[4], 可寻找治疗肝癌的新突破点。

传统中药南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb., 为卫矛科 (Celastraceae) 南蛇藤属 *Celastrus* L. 植物, 是中国重要的药用植物。前期实验研究发现, 南蛇藤提取物 (*Celastrus orbiculatus* extracts, COE) 能显著抑制肿瘤细胞的侵袭和转移^[5-6]。患者体内的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 为细胞生长和增殖的重要调节因子^[7], 属于磷脂酰肌醇激酶相关激酶蛋白家族成员。mTOR 的表达水平与肝癌的进展^[8]和预后密切相关。为了深入研究 COE 靶向 mTOR 抑制肝癌早期转移的具体分子机制, 课题组分别构建了过表达 mTOR^[9]和敲除 mTOR 表达的人肝癌 HepG2 细胞株。本研究主要讨论利用 RNAi 技术, 构建敲除 mTOR 表达的 HepG2 细胞, 并初步研究 COE 对该 HepG2/mTOR⁻细胞侵袭转移能力的影响, 为研发治疗肝癌术后预防复发和转移的新药奠定基础, COE 有望成为新型的抗肿瘤转移中药。

1 材料

1.1 药物

南蛇藤购自广州致信药业有限公司 (批号 070510), 经中国药科大学中药资源研究室秦民坚教授鉴定为卫矛科南蛇藤属植物南蛇藤 *Celastrus orbiculatus* Thunb.。顺铂注射液 (DDP) 购自江苏豪森药业股份有限公司 (批号 160101)。

1.2 细胞株和试剂

HepG2 细胞 (带有绿色荧光蛋白的载体 GV248)、*E. coli* DH5 α 感受态细胞和 293T 细胞, 均为本实验室保存。限制性内切酶 Age I 和 EcoR I、T4 DNA Ligation Kit、Oligo 引物、Taq polymerase 等购自 TaKaRa 宝生物工程 (大连) 有限公司; DMEM 高糖培养基 (Gibco 公司); 胎牛血清 (Hyclone 公司); 胰蛋白酶、MTT 粉剂、Matrigel、Transwell 小室 (BD 公司); 基质金属蛋白酶-2 (MMP-2)、MMP-9 单克隆抗体 (Millipore 公司); β -actin 抗体 (Cell Signaling 公司); HRP 标记的羊抗兔 IgG (Bioworld 公司)。

1.3 仪器

恒温培养箱 (美国 Thermo 公司); 蛋白电泳槽、全自动酶标板分析仪、SDS-PAGE 凝胶成像分析仪 (美国 Bio-Rad 公司); 倒置荧光显微镜 (日本 Olympus 公司); RT-PCR 仪 (瑞士 Roch 公司)。

2 方法

2.1 COE 的制备

南蛇藤化合物的提取、纯化和鉴定由中国药科大学王强教授课题组完成^[10]。具体步骤如下: 将南蛇藤藤茎切段, 粉碎成粉, 95%乙醇加热回流提取 3 次, 回收溶剂至干, 加水分散后, 用石油醚和醋酸乙酯分别萃取 3 次, 回收溶剂后减压浓缩并进行真空冻干, 得到醋酸乙酯部位, 即 COE, 其中, 总萜类化合物质量分数为 68.3%^[11]。

2.2 siRNA 靶点序列设计

根据 GeneBank 中 mTOR (NM_004958) 的 mRNA 序列设计 3 条 siRNA 靶点序列。mTOR-RNAi (32866-1): 5'-GGAGTCTACTCGCTTCTAT-3'; mTOR-RNAi (32867-11): 5'-AGGCCTATGGTTCGA-GATTT-3'; mTOR-RNAi (32868-1): 5'-TGTGCTA-CAC TACAAACAT-3'。

2.3 Oligo 法制备双链 DNA

根据 siRNA 靶点序列合成单链 Oligo 引物, mTOR-RNAi (32866-1) -a: 5'-CCGGGAGGAGT-CTACTCGCTTCTATCTCGAGATAGAAGCGAGTA-GACTCCTCTTTT-3'; mTOR-RNAi (32866-1) -b: 5'-AATTCAAAAAGAGGAGTCTACTCGCTTCTA-TCTCGAGATAGAAGCGAGTAGACTCCTC-3'; mTOR-RNAi (32867-110) -a: 5'-CCGGTCAGGCC-TATGGTCGAGATTCTCGAGAAATCTCGACCAT-AGGCCTGATTTT-3'; mTOR-RNAi (32867-11) -b: 5'-AATTCAAAAATCAGGCCTATGGTCGAGATT-CTCGAGAAATCTCGACCATAGGCCTGA-3'; mTOR-RNAi (32868-1) -a: 5'-CCGGGCTGTGCTA-CACTACAAACATCTCGAGATGTTTGTAGTGTAG-CACAGCTTTT-3'; mTOR-RNAi (32868-1) -b: 5'-AATTCAAAAAGCTGTGCTACACTACAAACAT-CTCGAGATGTTTGTAGTGTAGCACAGC-3'。90 °C 水浴 15 min, 冷却至室温, 退火形成双链 DNA。

2.4 RNAi 慢病毒载体的构建

载体 GV248 和引物退火形成的双链 DNA, 分别用限制性内切酶 Age I 和 EcoR I 进行酶切, 16 °C 连接过夜, 转化感受态细胞, 涂板, 摇菌, 使用 GV112 通用引物进行 PCR 鉴定并测序。PCR 反应体系设为 20 μ L, 94 °C、30 s, 94 °C、30 s, 60 °C、30 s, 72 °C、30 s, 30 个循环, 72 °C、6 min。

2.5 RNAi 慢病毒包装与滴度检测

制备编码慢病毒颗粒的重组病毒质粒及其 2 种

辅助包装原件载体质粒, 3种质粒载体分别进行高纯度无内毒素抽提, 按Invitrogen公司Lipofectamine 2000使用说明进行共转染293T细胞, 转染后8 h更换为完全培养基, 培养48 h后, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液, 对其浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液, 在293T细胞中测定并标定病毒滴度。

2.6 Western blotting 检测蛋白的表达水平

对数期HepG2/mTOR⁻细胞, 加入80 mg/L COE, 以临床肝癌化疗药物DDP (2 mg/L) 作为阳性对照, 同时, 设HepG2/mTOR⁻细胞(不加药)和野生HepG2细胞组(不加药)作为阴性药物对照组。加药24 h后, 提取总蛋白并测定浓度。SDS-PAGE电泳, 转膜, 封闭, 抗体孵育。一抗浓度为1:1 000, 二抗浓度为1:2 000。ECL发光, 采集并分析图像。

2.7 实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 检测 mTOR 基因的表达水平

取对数期HepG2/mTOR⁻细胞 1×10^6 个, 接种于6孔板, 提取总RNA, 逆转录合成cDNA, SYBR GREEN法进行qRT-PCR反应。mTOR前向引物: 5'-AGAACTGCACGTCAGCACCA-3'; 逆向引物: 5'-CCATTCCAG CCAGTCATCTTTG。内参 β -actin前向引物: 5'-CTCCATCCTGGCCTCGCTGT-3'; 逆向引物: 5'-GCTGTC ACCTTCACCGTTCC-3'。反应体系为20 μ L, 预变性95 $^{\circ}$ C、30 s, 1个循环, 95 $^{\circ}$ C、5 s, 60 $^{\circ}$ C、31 s, 40个循环。

2.8 MTT 实验

将HepG2/mTOR⁻细胞浓度调整为约 3×10^4 个/孔接种于96孔板, 加入无血清培养基配制的COE (20、40、80、160、320 mg/L), 孵育24、48、72 h, 加入0.5% MTT溶液继续培养4 h, 弃上清。加入DMSO 150 μ L, 置摇床上低速振荡10 min, 使结晶物充分溶解, 多功能酶标仪于490 nm处测量各孔吸光度(A)值。实验设5个复孔, 重复3次。

2.9 划痕实验

对数期细胞接种于24孔板, 30 000个/孔。待细胞贴壁后, 沿中线刮出2 mm刮痕, PBS冲洗3次, 倒置显微镜下观察刮痕内无细胞, 分别设80 mg/L COE组、DDP (2 mg/L) 阳性对照组、HepG2/mTOR⁻细胞和野生HepG2细胞阴性药物对照组。每组设3个复孔。继续培养24 h后, 于倒置相差显微镜下, 拍照记录各孔划痕的距离。

2.10 细胞侵袭实验

Transwell小室膜底部用Matrigel稀释胶包被、

水化。对数期细胞, 用无血清DMEM制成单细胞悬液, 5×10^5 个/mL。设HepG2/mTOR⁻细胞和野生HepG2细胞阴性对照组、80 mg/L COE组、DDP (2 mg/L) 阳性对照组。在Transwell上室加入单细胞悬液200 μ L, 下室加入含10% FBS的DMEM培养液500 μ L。各组设5个复孔, 继续培养24 h, 取出Transwell小室用PBS轻轻洗2遍, 用棉签擦去上室膜表面的细胞。甲醇固定30 min, 0.1%结晶紫室温下染色20 min, PBS清洗3遍, 高倍镜下, 计算穿膜细胞数量。

2.11 细胞迁移实验

除Transwell小室膜底部不用Matrigel稀释胶包被以外, 其余步骤均同细胞侵袭实验。

2.12 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件, 组间比较采用单因素方差分析, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

3.1 重组RNAi慢病毒载体的构建及鉴定

PCR产物测序结果与GeneBank中mTOR (NM_004958)的序列完全同源。重组病毒感染HepG2细胞后, 荧光显微镜下观察细胞的荧光强度。如图1所示, 感染慢病毒的细胞株荧光信号明显增强, 表明已成功构建带有荧光标签的敲除mTOR表达的HepG2细胞模型。

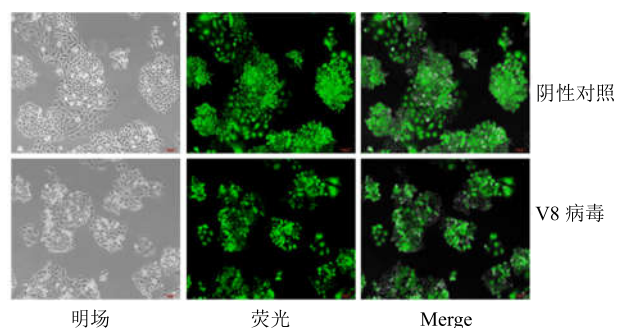


图1 荧光显微镜观察经病毒感染的HepG2细胞

Fig. 1 Observation of HepG2 cells with LV-mTOR-RNAi by fluorescence microscopy

3.2 Western blotting 检测 mTOR 蛋白表达水平

收集3种病毒[V8: mTOR-RNAi (32868)病毒; V7: mTOR-RNAi (32867)病毒; V6: mTOR-RNAi (32866)病毒], 分别感染HepG2细胞, 提取总蛋白, Western blotting检测mTOR蛋白的表达水平。结果见图2, 与感染空载体病毒的阴性对照相比, 感染mTOR-RNAi (32868)病毒(V8)的HepG2细胞中mTOR蛋白的表达明显降低, 感染其余2种病毒的细胞中mTOR蛋白的表达水平无明显变化。

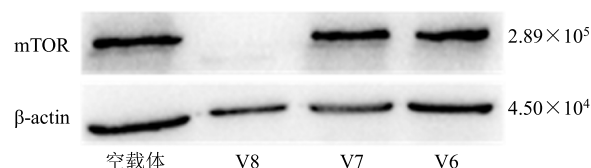


图 2 Western blotting 法检测经病毒感染的 HepG2 细胞内 mTOR 蛋白表达水平

Fig. 2 Protein expression of mTOR in HepG2 cells infected with virus detected by Western blotting

因此,后续实验选取 mTOR-RNAi(32868)病毒(V8)感染的 HepG2 细胞。

3.3 RT-PCR 检测 mTOR mRNA 的表达

病毒感染 HepG2 细胞后,抽提总 RNA,RT-PCR 检测细胞中 mTOR mRNA 的水平。结果见图 3,感染病毒后, HepG2 细胞中 mTOR 的 mRNA 表达水平明显降低。

3.4 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞增殖的影响

MTT 法分析不同质量浓度的 COE (20、40、80、160、320 mg/L) 对 HepG2/mTOR⁻细胞增殖能力的影响,结果见表 1。在药物作用 24 h 条件下 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞作用的半数抑制浓度 (IC₅₀)

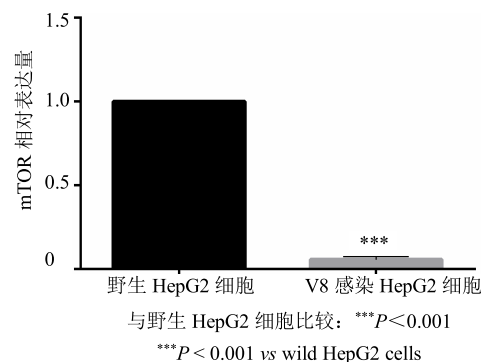


图 3 RT-PCR 检测经 RNAi 病毒感染后 HepG2 细胞的 mTOR mRNA 水平

Fig. 3 Detection of mRNA expression of mTOR in HepG2 cells infected with RNAi by RT-PCR

为 123.73 mg/L。与未加药对照组相比, COE 明显抑制 HepG2/mTOR⁻细胞的增殖 ($P < 0.05$),并具有时间及浓度依赖性。

3.5 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞迁移能力的影响

细胞划痕实验显示 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞迁移能力的影响。结果见图 4,与对照组相比,经 80 mg/L COE 处理后,细胞往划痕中心迁移的速率变慢,说明 COE 具有明显抑制 HepG2/mTOR⁻细胞迁移的能力。

表 1 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞增殖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effect of COE on proliferation of HepG2/mTOR⁻ cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	细胞增殖率/%		
		24 h	48 h	72 h
对照	—	98.35 ± 1.58	97.41 ± 2.25	95.66 ± 1.20
COE	20	87.59 ± 1.42*	81.87 ± 2.72*	77.22 ± 2.38*
	40	80.45 ± 3.54*	72.92 ± 3.42**	67.63 ± 1.68**
	80	69.32 ± 2.72**	64.69 ± 1.51**	59.35 ± 3.81**
	160	56.02 ± 5.23***	51.56 ± 2.44***	46.40 ± 1.35***
	320	31.83 ± 1.41***	28.38 ± 2.09***	17.84 ± 2.81***

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs control group

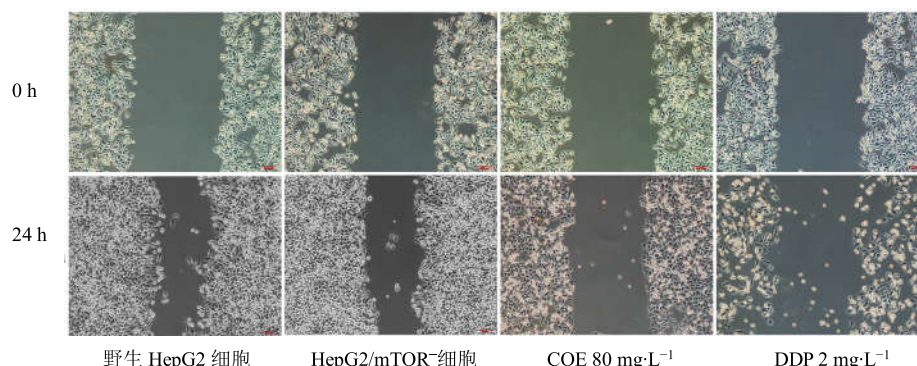


图 4 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞迁移能力的影响 (×200)

Fig. 4 Effect of COE on metastasis of HepG2/mTOR⁻ cells (×200)

3.6 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞侵袭与迁移能力的影响

以 Transwell 实验观察 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞侵袭与转移能力的影响, 结果见图 5, 并计算各组穿膜细胞数目, 结果见表 2。在白色的 Transwell

小室膜上, 穿膜细胞被结晶紫染为蓝色。与野生型 HepG2 细胞相比, 敲除 mTOR 表达的 HepG2/mTOR⁻细胞穿膜数量减少。与对照组比较, COE 干预后进一步降低了 HepG2/mTOR⁻细胞的穿膜数量, 即侵袭和迁移能力下降。

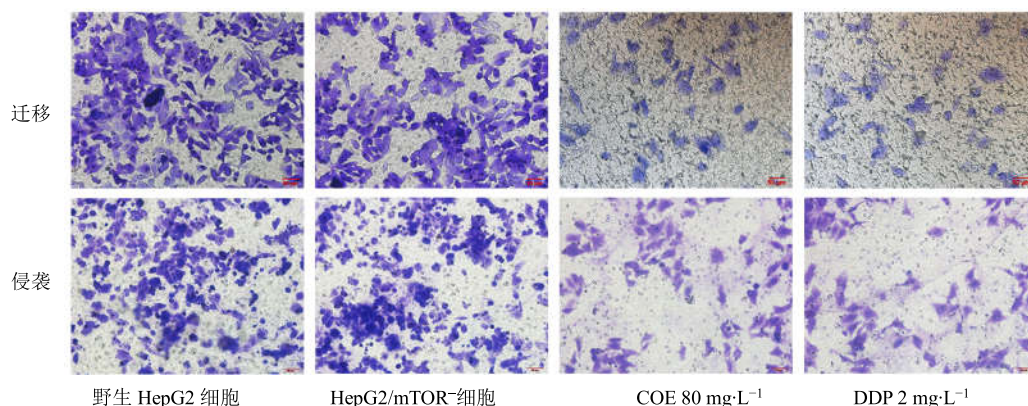


图 5 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞侵袭与迁移的影响

Fig. 5 Effect of COE on invasion and metastasis of HepG2/mTOR⁻ cells

表 2 各组 Transwell 小室穿膜细胞数目 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Numbers of transmembrane cells in transwell of each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$\rho/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	侵袭数目	迁移数目
野生 HepG2	—	205.4 ± 24.6	224.8 ± 22.9
HepG2/mTOR ⁻	—	189.2 ± 20.8	205.0 ± 16.3
COE	80	73.8 ± 15.3***	61.8 ± 14.7***
DDP	2	69.6 ± 12.1***	56.6 ± 12.9***

与 HepG2/mTOR⁻组比较: *** $P < 0.001$

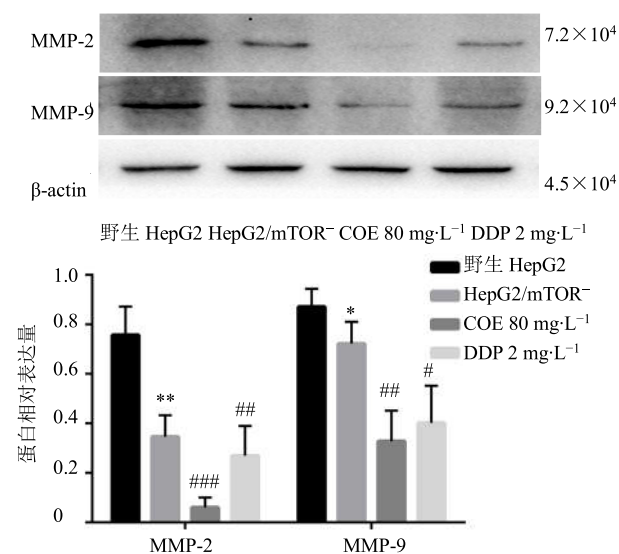
*** $P < 0.001$ vs HepG2/mTOR⁻ group

3.7 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞中 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响

为了探索 COE 抑制 HepG2/mTOR⁻细胞侵袭和转移能力的分子机制, 用 Western blotting 法观察细胞内相关蛋白的表达水平。结果见图 6, 与野生型 HepG2 细胞相比, 敲除 mTOR 表达的 HepG2/mTOR⁻细胞内 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达水平明显降低。COE 干预后, 进一步降低了 MMP-2、MMP-9 蛋白的表达量。表明 COE 可能靶向 mTOR, 通过降低 MMPs 抑制人肝癌细胞的侵袭转移。

4 讨论

肝癌是一种高度促血管生成, 侵袭和转移力强的恶性肿瘤^[12]。随着技术和临床实践的进步, 外科手术切除后的肝癌患者生存率得到了很大提高。然而, 大约 70% 的病例在切除后 5 年内发现肿瘤复发。并且其中大多数病例都出现在前 2 年^[13]。对于



与野生 HepG2 组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 HepG2/mTOR⁻组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs wild HepG2 cells; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$

图 6 COE 对 HepG2/mTOR⁻细胞 MMP-2、MMP-9 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effect of COE on protein expression of MMP-2 and MMP-9 in HepG2/mTOR⁻ cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

不适合手术切除的病人, 肝动脉栓塞化疗技术和索拉非尼是首选。然而, 一些临床试验已经证实了抗癌的边际效应, 同时肝癌患者的生存率没有得到明显改善^[13]。因此, 寻找抑制肝癌侵袭转移的靶点有

助于改善肝癌的治疗。

卫矛科中药南蛇藤，最初用于抗炎消肿，已有上千年的历史。南蛇藤茎醋酸乙酯提取物有明显的抗肿瘤作用^[5-6]，可抑制多种肿瘤细胞的增殖与侵袭^[14-15]，降低肿瘤血管生成^[16]及淋巴管转移^[17-18]。前期研究发现，COE 抑制肝癌早期转移中的上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程，与调节 mTOR 信号通路^[19]密切相关。原发肝癌细胞通过 EMT 过程，可发生短暂的结构改变，细胞表型和生物学特性也随之改变，侵袭性增强，更易于穿越基底膜进入临近宿主组织。EMT 是一个多步骤的复杂过程，受许多分子 (如 TIPE2^[20]、HOXA13^[21]、HMGA2-FOXL2^[22]等) 和信号通路 (如 JAK2/STAT3^[23]、IL-6/STAT3^[24]、PTEN/Akt^[25]) 的网络样调控，迄今为止其具体作用机制还不是特别清楚。mTOR 作为中心调控点，可调节细胞内多条与增殖分化、侵袭转移相关的信号途径^[26]。建立 HepG2 细胞的 mTOR 基因敲除模型，利于探究 COE 干预后，细胞内转录因子和靶蛋白的表达及各信号网络中蛋白激酶的磷酸化水平变化，阐明 COE 通过靶向 mTOR 调控肿瘤细胞侵袭转移的分子机制。

肿瘤转移是恶性肿瘤最为重要的生物学特征之一，其中恶性肿瘤细胞发生侵袭与转移的重要原因之一就是肿瘤微环境中的胞外基质 (ECM) 纤维的生成，使肿瘤细胞向周围组织浸润或远端转移^[27]。而 MMPs 作为肿瘤细胞降解外基质的主要酶原家族，通过降解破坏 ECM 促进肿瘤细胞突破基底膜和细胞外基质构成的组织屏障，从而实现向周围血管、淋巴道和组织的侵袭^[28]。MMPs 家族中以 MMP-2 和 MMP-9 与肝癌的侵袭、转移关系最为密切^[29]。MMPs 受多个信号通路和细胞因子的调控，其中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路有着关键的调节作用，活化该信号通路能上调 MMP2 蛋白的表达水平，促进肿瘤细胞的侵袭和转移^[30]。因此，通过联合抑制 MMPs 与 mTOR 的表达水平可能成为抑制肿瘤细胞侵袭与转移的作用靶点之一。本实验结果显示，COE 明显抑制 HepG2/mTOR⁻细胞的增殖能力，显著下调 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平，从而降低 HepG2/mTOR⁻细胞侵袭和转移能力。本研究阐述了 COE 抑制肝癌侵袭与转移能力的新作用机制，找到了 COE 抑制肿瘤侵袭与转移的新的作用途径。但是，COE 是如何下调 MMP-2 和 MMP-9

蛋白表达的，以及是否有其他信号通路的参与还未能探究。同时，目前的研究仅限于体外实验，还需要建立合适的体内实验模型，在体内监测 COE 对肿瘤的侵袭和转移的影响，为新型抗肿瘤药物的开发提供更充足的理论依据。

参考文献

- [1] Attwa M H, El-Etreby S A. Guide for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(12): 1632-1651.
- [2] Smith S C, Theodorescu D. Learning therapeutic lessons from metastasis suppressor proteins [J]. *Nat Rev Cancer*, 2009, 9(4): 253-264.
- [3] Alečković M, Kang Y. Regulation of cancer metastasis by cell-free miRNAs [J]. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Rev Cancer*, 2015, 1855(1): 24-42.
- [4] Yan J, Huang Q. Genomics screens for metastasis genes [J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2012, 31(3/4): 419-428.
- [5] Zhu Y D, Liu Y Q, Qian Y Y, et al. Research on the efficacy of *Celastrus orbiculatus* in suppressing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition by inhibiting HSP27 and TNF- α -induced NF- κ B/Snail signaling pathway in human gastric adenocarcinoma [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2014, 14(5): 433-445.
- [6] Jue C, Min Z, Zhi S Z, et al. COE inhibits vasculogenic mimicry in hepatocellular carcinoma via suppressing Notch1 signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 208: 165-173.
- [7] Lien E C, Lyssiotis C A, Cantley L C. Metabolic reprogramming by the PI3K-Akt-mTOR pathway in cancer [J]. *Recent Results Cancer Res*, 2016, 207: 39.
- [8] Kang G H, Lee B S, Lee E S, et al. Prognostic significance of p53, mTOR, c-Met, IGF-1R, and HSP70 overexpression after the resection of hepatocellular carcinoma [J]. *Gut Liver*, 2014, 8(1): 79-87.
- [9] 钱亚云, 陆松花, 赵雪煜, 等. 南蛇藤提取物对过表达 mTOR 的人肝癌 HepG2 细胞株的影响 [J]. *世界科学技术—中医药现代化*, 2016, 18(12): 2132-2136.
- [10] 咎珂, 陈筱清, 王强, 等. 南蛇藤茎的化学成分研究 [J]. *中草药*, 2007, 38(10): 1455-1457.
- [11] Li J J, Yang J, Lu F, et al. Chemical constituents from the stems of *Celastrus orbiculatus* [J]. *Chin J Nat Med*, 2012, 10(4): 279-283.
- [12] Aboualfa G K, Venook A P. The antiangiogenic ceiling in hepatocellular carcinoma: Does it exist and has it been reached [J]. *Lancet Oncol*, 2013, 14(7): 283-288.
- [13] Forner A, Llovet J M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Cold Spring Harbor Perspect Medicine*, 2012, 5(2):

- 469-470.
- [14] 杨庆伟, 刘 丽, 刘为为, 等. 南蛇藤总萜提取物对肝癌 7721 细胞侵袭转移能力的影响 [J]. 中草药, 2009, 40(3): 434-437.
- [15] 钱亚云, 曹 玲, 刘延庆, 等. 南蛇藤提取物增强抑癌基因 maspin 抑制人胃癌细胞株 MGC803 侵袭的能力 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(11): 2470-2474.
- [16] Qian Y Y, Zhang H, Hou Y, *et al.* *Celastrus orbiculatus* extract inhibits tumor angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor signaling pathway and shows potent antitumor activity in hepatocarcinomas *in vitro* and *in vivo* [J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 10: 752-760.
- [17] Zhang H, Qian Y Y, Liu Y Q, *et al.* *Celastrus orbiculatus* extract induces mitochondrial-mediated apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(4): 621-626.
- [18] 王海波, 顾 昊, 赵雪煜, 等. 南蛇藤提取物通过调控基质金属蛋白酶组及其抑制因子抑制人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭转移的研究 [J]. 中草药, 2016, 47(8): 1345-1350.
- [19] 钱亚云, 金 凤, 曹 玲, 等. 南蛇藤提取物对人肝癌细胞 HepG2 上皮间质转化的影响 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2014, 16(12): 2647-2651.
- [20] Yin H, Huang X, Tao M, *et al.* Adenovirus-mediated TIPE2 overexpression inhibits gastric cancer metastasis via reversal of epithelial-mesenchymal transition [J]. *Cancer Gene Ther*, 2017, 24(4): 180-188.
- [21] He Y X, Song X H, Zhao Z Y, *et al.* HOXA13 upregulation in gastric cancer is associated with enhanced cancer cell invasion and epithelial-to-mesenchymal transition [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(2): 258-265.
- [22] Dong J, Wang R, Ren G, *et al.* HMGA2-FOXL2 axis regulates metastases and epithelial-to-mesenchymal transition of chemo-resistant gastric cancer [J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(13): 3461-3473.
- [23] Wu X, Tao P, Zhou Q, *et al.* IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(13): 20741-20750.
- [24] Chen G, Tang N, Wang C, *et al.* TNF- α -inducing protein of *Helicobacter pylori* induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) in gastric cancer cells through activation of IL-6/STAT3 signaling pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 484(2): 311-317.
- [25] Xu J, Liu D, Niu H, *et al.* Resveratrol reverses Dxorubicin resistance by inhibiting epithelial-mesenchymal transition (EMT) through modulating PTEN/Akt signaling pathway in gastric cancer [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 19-33.
- [26] Kim E K, Yun S J, Ha J M, *et al.* Selective activation of Akt1 by mammalian target of rapamycin complex 2 regulates cancer cell migration, invasion, and metastasis [J]. *Oncogene*, 2011, 30(26): 2954-2963.
- [27] 沈培亮, 刘兆国, 王 旭, 等. 肿瘤 ECM 纤维生成与肿瘤转移研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(11): 1485-1488.
- [28] Merchant N, Nagaraju G P, Rajitha B, *et al.* Matrix metalloproteinases: Their functional role in lung cancer [J]. *Carcinogenesis*, 2017, 38(8): 766-780.
- [29] 盛 凤, 沈依萌, 万乔浩, 等. 蛋白激酶 B1 去类泛素化修饰抑制肝癌的增殖和转移 [J]. 中华肿瘤杂志, 2017, 39(11): 814-820.
- [30] Lin J J, Su J H, Tsai C C, *et al.* 11-epi-sinulariolide acetate reduces cell migration and invasion of human hepatocellular carcinoma by reducing the activation of ERK1/2, p38MAPK and FAK/PI3K/AKT/mTOR signaling pathways [J]. *Marine Drugs*, 2014, 12(9): 4783-4798.