

草苈蓉环烯醚萜苷联合5-氟尿嘧啶对人肝癌HepG2、SK-Hep1细胞上皮间质转化的抑制效果研究

董学花¹, 延光海², 朱洁波¹, 刘莉园², 全吉淑², 李良昌², 尹学哲^{1*}

1. 延边大学附属医院, 吉林 延吉 133000

2. 延边大学医学院, 吉林 延吉 133000

摘要:目的 研究草苈蓉环烯醚萜苷(IGBR)联合5-氟尿嘧啶(5-Fu)抑制转化生长因子- β 1(TGF- β 1)诱导人肝癌HepG2、SK-Hep1细胞上皮间质转化(Epithelial-mesenchymal transition, EMT),比较其药物的作用疗效。方法 采用噻唑蓝(MTT)法检测HepG2、SK-Hep1细胞存活率,计算联合指数(Q值),判断联合用药的相互作用;建立HepG2、SK-Hep1细胞EMT模型,检测细胞黏附率,Western blotting检测相关的蛋白表达,免疫荧光法检测钙黏附蛋白-E(E-cadherin)和波形纤维蛋白(Vimentin)的表达。结果 人肝癌细胞在给药48h细胞存活率降低($P < 0.05$),IGBR和5-Fu两者有相加或协同作用;与模型组比较,给药组(IGBR组、5-Fu组、联合组)抑制细胞黏附率($P < 0.05$);与对照组比较,模型组基质金属蛋白酶2、7、9(MMP2、MMP7、MMP9)、锌指转录因子1、2(Snail、Slug)蛋白表达上调($P < 0.05$);与模型组比较,给药组(IGBR组、5-Fu组、联合组)MMP2、MMP7、MMP9、Snail、Slug蛋白表达降低($P < 0.05$);与对照组比较,模型组E-cadherin荧光强度减弱,Vimentin荧光强度增强;与模型组比,给药组(IGBR组、5-Fu组、联合组)E-cadherin荧光强度增强,Vimentin荧光强度减弱。结论 IGBR和5-Fu可以抑制肝癌EMT,联合用药对HepG2细胞作用相加;对SK-Hep1细胞具有协同效果,SK-Hep1细胞用药疗效优于HepG2细胞。

关键词:草苈蓉;环烯醚萜苷;5-氟尿嘧啶;肝癌;HepG2细胞;SK-Hep1细胞;上皮间质转化;转化生长因子- β 1;细胞存活率;细胞黏附率;Western blotting;免疫荧光法;钙黏附蛋白-E;波形纤维蛋白;基质金属蛋白酶;锌指转录因子;协同

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:0253-2670(2020)17-4498-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.17.018

Inhibitory effects of iridoid glycosides from *Boschniakia rossica* combined with 5-fluorouracil on human hepatoma HepG2 and SK-Hep1 cells epithelial-mesenchymal transition

DONG Xue-hua¹, YAN Guang-hai², ZHU Jie-bo¹, LIU Li-yuan², QUAN Ji-shu², LI Liang-chang², YIN Xue-zhe¹

1. Affiliated Hospital of Yanbian University, Yanji 133000, China

2. Yanbian University Medical College, Yanji 133000, China

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of iridoid glycosides from *Boschniakia rossica* (IGBR) combined with 5-Fu on epithelial-mesenchymal transition induced by TGF- β 1 in human hepatoma SK-Hep1 and HepG2 cells, and compare the efficacy of drugs. **Methods** The survival ability of HepG2 and SK-Hep1 cells was detected by MTT and the combination index (Q value) was calculated to judge the interaction of combined drugs. The EMT model of HepG2 and SK-Hep1 cells was established. The cell adhesion rate was detected by MTT. The expression of matrix metalloproteinase (MMP) MMP2, MMP7, MMP9, Snail, and Slug was detected by Western blotting. The localization and expression intensity of E-cadherin and Vimentin was detected by immunofluorescence. **Results** MTT showed that compared with the control group, the 5-FU group, IGBR group and combination group cell survival ability were decreased ($P < 0.05$) at 48 h after administration; IGBR and 5-Fu had an additive or synergistic effect. Compared with the model group, the adhesion rate of 5-FU group, IGBR group and combination group was reduced ($P < 0.05$). Western blotting results showed that compared with the control group, the expression of MMP2, MMP7, MMP9, Snail, Slug were

收稿日期: 2019-08-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81760659)

作者简介: 董学花(1990—),女,山东莒县人,住院医师,硕士,研究方向为分子肿瘤学。E-mail: 1372384070@qq.com

*通信作者 尹学哲(1962—),男,朝鲜族,吉林延吉人,主任医师,博士,研究方向为分子肿瘤学。E-mail: yinxz@ybu.edu.cn

up-regulated ($P < 0.05$) in the model group. Compared with the model group, the expression of MMP2, MMP7, MMP9, Snail and Slug were down-regulated ($P < 0.05$) in 5-FU group, IGBR group and combination group. Compared with the control group, immunofluorescence showed that the E-cadherin fluorescence intensity was decreased in the model group, but the Vimentin fluorescence intensity was increased. Compared with the model group, the E-cadherin fluorescence intensity was increased in 5-FU group, IGBR group and combined group, but the Vimentin fluorescence intensity was decreased. **Conclusion** IGBR and 5-Fu can inhibit human hepatoma EMT. The combined drugs have the combined effect on HepG2 cells and synergistic effect on SK-Hep1 cells. The therapeutic effect on SK-Hep1 cells is better than HepG2 cells.

Key words: *Boschniakia rossica* Fedtsch. et Flerov; iridoid glycosides; 5-FU; hepatocellular carcinoma; HepG2 cells; SK-Hep1 cells; epithelial-mesenchymal transition; TGF- β 1; cell survival rate; cell adhesion rate; Western blotting; immunofluorescence; E-cadherin; Vimentin; matrix metalloproteinase; synergistic effect

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 简称肝癌, 以原发性肝癌多见, 起源于肝脏的上皮或间叶组织, 是全世界高发的恶性肿瘤^[1]。肝癌的复发、转移与上皮-间充质细胞转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 密切相关, EMT 是指上皮细胞失去其分化表型, 获得间质细胞特征的过程^[2-3]。草苈蓉 *Boschniakia rossica* Fedtsch. et Flerov 具有延年益寿、滋补强身、补肾壮阳以及润肠止血等功效, 近年来的研究表明, 草苈蓉具有抗氧化、抗炎、保肝以及抗癌等作用^[4-5]。本课题实验的前期已通过检测 Western blotting 和 RT-PCR 检测波形纤维蛋白 (Vimentin)、钙黏附蛋白-E (E-cadherin)、钙黏附蛋白-N (N-cadherin) 的表达, 证明实验模型成立, 通过划痕实验和 Transwell 实验观察草苈蓉环烯醚萜苷 (IGBR) 对肝癌细胞迁移和侵袭的抑制作用。本实验在前期实验取得满意结果的基础上, 进一步探讨 IGBR 和 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 联合用药抗肝癌 EMT 的相关机制, 比较人肝癌 HepG2、SK-Hep1 细胞的用药疗效, 为联合用药提供实验数据支持。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

IGBR 和人肝癌 HepG2 细胞由延边大学基础医学院生化教研室全吉淑教授惠赠; IGBR 主要由 49.1% 草苈蓉纳拉昔和 30.3% 7-脱氧表马钱子酸构成; 人肝癌 SK-Hep1 细胞由中国科学院上海生命科学院研究院提供; 5-Fu, 批号 F8301-5g, 北京索莱宝科技有限公司; DMEM 细胞培养液, 美国 HyClone 公司; 胎牛血清, 美国 Gibco 公司; 兔抗人 Actin、兔抗人 MMP2、MMP7、MMP9、Snail、Slug、E-cadherin 抗体和鼠抗 Vimentin、免疫荧光标记的山羊抗鼠 IgG、山羊抗兔 IgG, 购于 Cell Signaling Technology 公司; 兔抗, 北京中杉金桥公司; 甲醇、

无水乙醇、甲醛溶液, 科密欧化学试剂公司; IX70-1120 倒置显微镜, Olympus 公司; F.A.M.E.16/20 全自动酶标仪, 美国 Bio Tek 公司; MCO-18AIC CO₂ 培养箱, Thermo 公司; Cytation5 多功能成像仪, 上海土森视觉科技有限公司; AURA SD4 无菌超净台, Bioair 公司; FluorChem FC3 凝胶显像仪, 美国 Protein Simple 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 SK-Hep1、HepG2 细胞培养于含有 10% 胎牛血清、100 μ g/mL 青霉素、100 μ g/mL 链霉素的 DMEM 培养液中, 放置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养, 每 2~3 天传代 1 次, 取对数生长期 (约 7 d) 细胞进行实验。

1.2.2 分组及给药 取 1×10^5 个 SK-Hep1、HepG2 细胞悬液加入 6 孔板中, 贴壁后随机分为 5 组, 对照组、模型组、给药组 (IGBR 组、5-Fu 组、联合组)。对照组只给予 DMEM; 模型组给予含有 TGF- β 1 10 ng/mL 的 DMEM; IGBR 组给予含有 TGF- β 1 10 ng/mL 和 IGBR 500 mg/mL 的 DMEM; 5-Fu 组给予含有 TGF- β 1 10 ng/mL 和 5-Fu 75 μ g/mL 的 DMEM; 联合组给予含有 TGF- β 1 10 ng/mL、IGBR 500 mg/mL 和 5-Fu 75 μ g/mL 的 DMEM。

1.2.3 MTT 法测定细胞活力 取 200 μ L 1×10^4 个 SK-Hep1、HepG2 细胞悬液加入 96 孔板中, 每组设置 5 个复孔, 随机分为 5 组; 24 h 后第 1 组为对照组, 每孔加入 DMEM 200 μ L; 第 2 组为 DMSO 组, 每孔加入含有 DMSO 1 μ L/mL 的 DMEM 200 μ L; 第 3 组为 5-Fu 组, 每孔加入含有 5-Fu 75 μ g/L 的 DMEM 200 μ L; 第 4 组为 IGBR 组, 每孔加入含有 IGBR 500 mg/mL 的 DMEM 200 μ L; 第 5 组为联合组, 每孔加入含有 5-Fu 75 μ g/mL 和 IGBR 500 mg/mL 的 DMEM 培养液 200 μ L; 培养 24、48 h 后每孔加入 20 μ L MTT, 37 $^{\circ}$ C 温箱孵育 4 h; 加入 200

μL DMSO; 振荡 10 min, 于酶标仪中 490 nm 波长处检测吸光度 (A) 值。计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{给药}} / A_{\text{对照}}$$

1.2.4 联合应用结果判定方法^[6] 按以下公式计算 SK-Hep1、HepG2 细胞生长抑制率 (IR) 后计算联合指数 (Q 值) 并判断两药的联合效果。

$$IR = (A_{\text{正常对照}} - A_{\text{实验}}) / A_{\text{正常对照}}$$

$$Q = E(A+B) / [EA + (1-EB)EB]$$

E(A+B) 表示联合用药抑制率, EA 表示 IGBR 抑制率, EB 表示 5-Fu 抑制率

Q=0.85~1.15 联合用药作用相加, Q>1.15 联合用药作用协同, Q<0.85 联合用药作用相互拮抗。

1.2.5 观察细胞形态 按照“1.2.2”项下方法分组和给药, 48 h 后 PBS 清洗, 4% 甲醇固定, 滴加 1 mL 苏木素 5 min 后用双蒸水清洗, 干燥后拍照, 观察其形态变化。

1.2.6 检测细胞黏附率 按照“1.2.2”项下方法分组和给药, 培养 48 h, 胰酶消化、离心取 200 μL 细胞悬液加入已铺设好 Matrigel 基质胶的 96 孔板中, 每组设 5 个复空, PBS 缓冲液冲洗后加入 MTT 50 μL/孔, 37 °C 温箱孵育 4 h, 加入 DMSO 200 μL/孔, 于酶标仪中 570 nm 波长处检测 A 值, 计算细胞黏附率。

$$\text{细胞黏附率} = A_{\text{试验}} / A_{\text{对照}} - 1$$

1.2.7 Western blotting 检测蛋白表达 提取细胞总蛋白, 酶标仪检测蛋白浓度, 配制 5% 的浓缩胶和 10% 的分离胶进行电泳, 常规转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1.5~2.0 h, 常规清洗, 分别加入 1:1 000 稀释的 MMP2、MMP7、MMP9、Snail、Slug 抗体 4 °C 过夜; 加入 1:1 000 稀释的二抗在室温下孵育 2~3 h, 常规洗涤, 滴加 ECL 发光液成像。

1.2.8 免疫荧光法 按照“1.2.2”项下方法分组和给药, 48 h 后洗掉培养液, 每孔加入 2 mL PBS 清洗 5 min, 清洗 3 次, 3.65% 甲醇固定, 0.2% Triton-X100 渗透, 5% BSA 封闭, E-cadherin、Vimentin 抗体 4 °C 过夜, 加入 2 mL PBS 清洗 5 min, 清洗 3 次, 加入免疫荧光二抗 2 h 再加入 2 mL PBS 清洗 5 min, 清洗 3 次, 滴加 20 μL/孔 DAPI 溶液盖上盖玻片, 避免产生气泡, 5 min 后多功能成像仪拍照。

1.3 数据处理

数据处理采用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, 实验均重复 3 次, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 IGBR 对 HepG2、SK-Hep1 细胞活力的影响

图 1 结果显示细胞活力呈现时间相关性, 人肝癌细胞在给药 24 h 后细胞活力变化不明显, 而作用 48 h 后细胞活力降低明显, 与对照组相比, 给药组 (IGBR 组、5-Fu 组、联合组) 差异显著 (P<0.05)。IGBR 和 5-Fu 可以抑制 SK-Hep1 细胞和 HepG2 细胞活力。

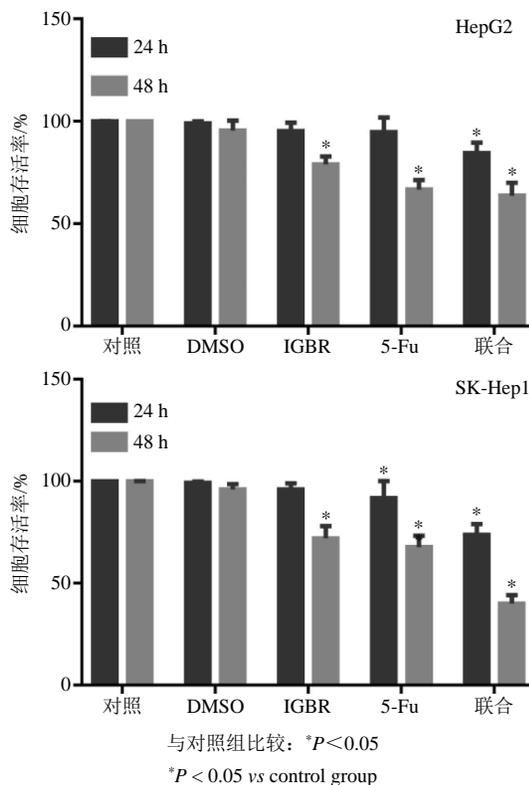


图 1 给药 48 h 后检测 HepG2、SK-Hep1 细胞存活率结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 1 Cell survival rate of HepG2 and SK-Hep1 after administration of 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.2 联合用药的作用疗效

如表 1 所示, 联合用药对 HepG2 细胞作用相加, 对 SK-Hep1 细胞具有协同效果, SK-Hep1 细胞用药疗效优于 HepG2 细胞。

2.3 细胞形态变化

由图 2 可知 TGF-β1 诱导 48 h, HepG2 细胞由圆型逐渐变为梭形、多边形, 并集聚成团, 凝集, 聚集状, 模型组细胞较对照组细胞数量增多, 并发生纤维样改变, 给药组 (IGBR 组、5-Fu 组、联合组) 细胞数量及发生纤维样改变的细胞减少。SK-Hep1 细胞由圆形逐渐变为不规则型, 细胞伸长, 并伸出伪足, 出现纺锤丝样变化。模型组细胞较对

表 1 IGBR 联合 5-Fu 对 HepG2、SK-Hep1 细胞的作用 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 Effects of IGBR combined with 5-Fu on HepG2 and SK-Hep1 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	IGBR/(mg·mL ⁻¹)	5-Fu/(μ g·mL ⁻¹)	IR/%		Q 值	
			HepG2	SK-Hep1	HepG2	SK-Hep1
IGBR	500	—	15.48±3.91	28.00±3.61	—	—
5-Fu	—	50	22.07±4.70	32.33±5.69	—	—
联合	500	50	37.62±6.22	59.67±5.69	1.11	1.16

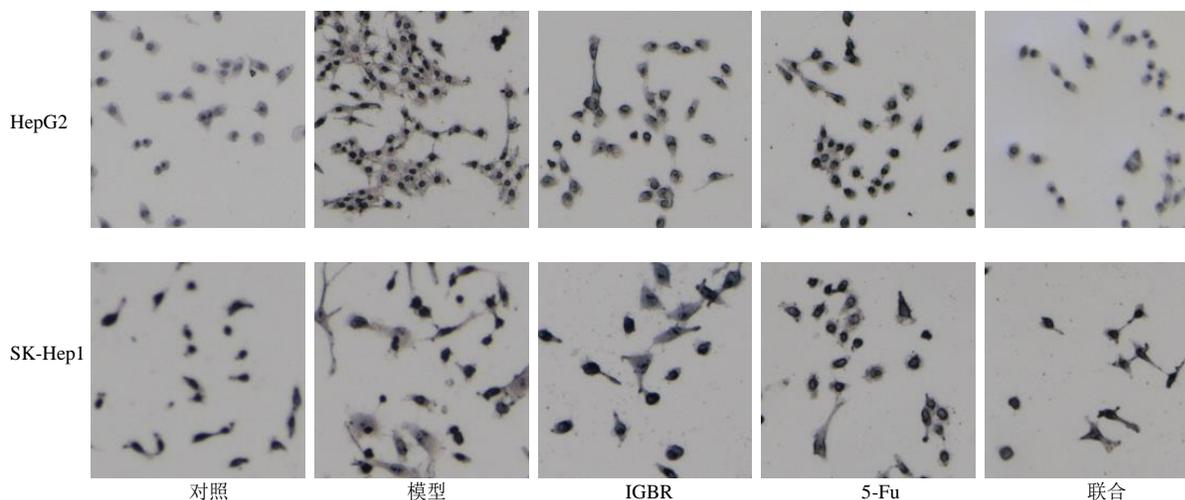


图 2 细胞生长形态变化 ($\times 100$)

Fig. 2 Changes of cell growth morphology ($\times 100$)

照组细胞数量及发生纺锤丝样改变增多, 给药组 (IGBR 组、5-Fu 组、联合组) 细胞数量及发生形状改变的细胞减少。IGBR 和 5-Fu 可以抑制 HepG2、SK-Hep1 细胞 EMT。

2.4 对 HepG2、SK-Hep1 细胞黏附能力的影响

由图 3 可知给药 48 h 后, HepG2 细胞模型组、IGBR 组、5-Fu 组、联合组黏附率分别为 208%、169%、143%、107%; SK-Hep1 细胞模型组、IGBR 组、5-Fu 组、联合组黏附率分别为 200%、144%、87%、73%, SK-Hep1 细胞黏附率较 HepG2 细胞黏附率低。

2.5 对 HepG2 细胞 EMT 相关蛋白的表达

由图 4 可知, TGF- β 1 诱导 HepG2 细胞 48 h 后, MMP2、MMP7、MMP9、Snail、Slug 蛋白表达上调, IGBR、5-Fu 和联合给药处理后 MMP2、MMP7、MMP9、Snail、Slug 蛋白表达降低。与对照组比较, 模型组各蛋白表达上调 ($P < 0.01$), 与模型组比较, 给药组 (IGBR 组、5-Fu 组、联合组) 各蛋白表达降低 ($P < 0.05$)。

2.6 对 SK-Hep1 细胞 EMT 相关蛋白的表达

如图 5 可知, TGF- β 1 诱导 SK-Hep1 细胞 MMP2、MMP7、MMP9、Snail、Slug 蛋白表达上

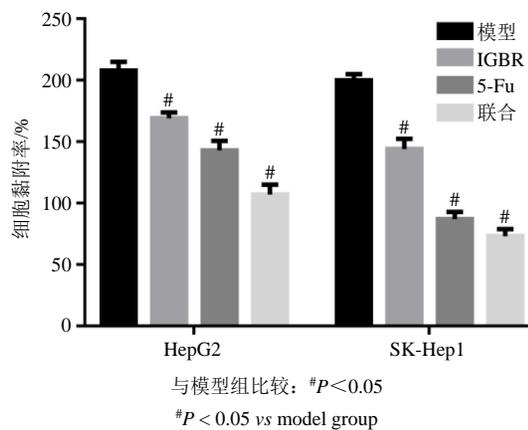


图 3 给药 48 h 后检测 HepG2、SK-Hep1 细胞粘附率结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Cell adhesion rate of HepG2 and SK-Hep1 after administration of 48 h ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

调, IGBR、5-Fu 和联合给药对 SK-Hep1 细胞 MMP2、MMP7、MMP9、Snail、Slug 蛋白表达降低, 差异显著 ($P < 0.05$)。

2.7 联合用药对 HepG2 和 SK-Hep1 细胞 EMT 标志物抑制效果比较

如图 6 所示, 联合用药在 MMPs 家族对 SK-Hep1 细胞的治疗效果优于 HepG2; 在 Snail 家族中标志蛋白 Snail 在 HepG2 细胞降低显著, 而 Slug 在

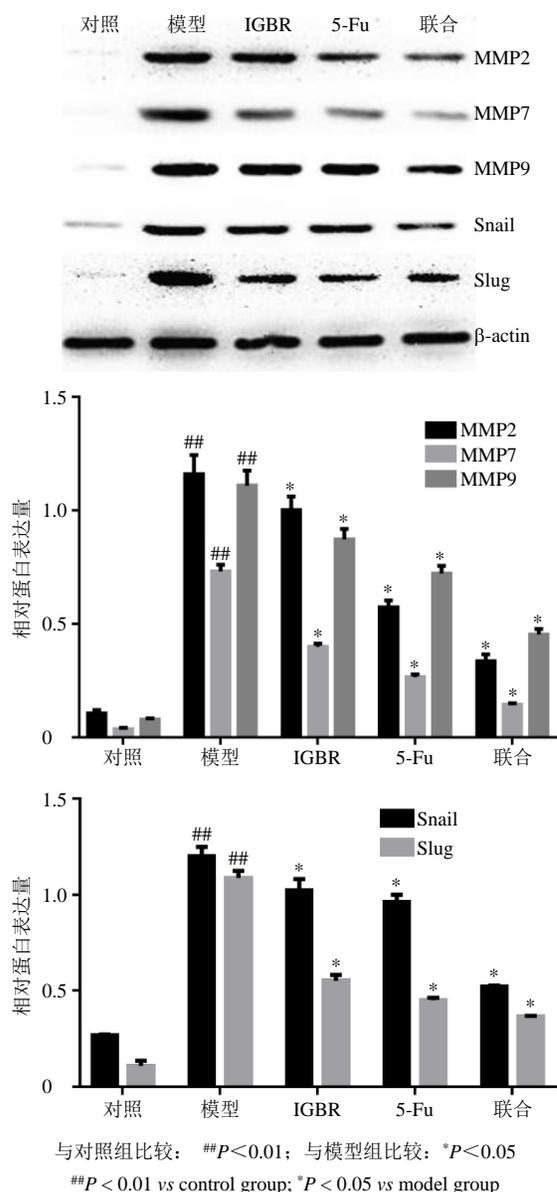


图 4 药物处理后 HepG2 细胞中 MMP2、MMP7、MMP9、Snail 和 Slug 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Expression of MMP2, MMP7, MMP9, Snail and Slug protein in HepG2 cells treated with IGBR and 5-Fu ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

SK-Hep1 细胞降低显著 ($P < 0.05$)。

2.8 Vimentin 在 HepG2 细胞中的定位和表达

如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组荧光信号增强; 与模型组比较, 用药组 (IGBR 组、5-FU 组、联合组) 荧光信号减弱。TGF- β 1 可以诱导 Vimentin 表达增强, Vimentin 是间质细胞标志蛋白^[7]。IGBR 和 5-Fu 可以抑制 TGF- β 1 诱导 Vimentin 的表达, 进而抑制肝癌 HepG2 细胞 EMT 继续进展。

2.9 E-cadherin 在 HepG2 细胞中的定位和表达

如图 8 所示, 与对照组比较, 模型组荧光信号

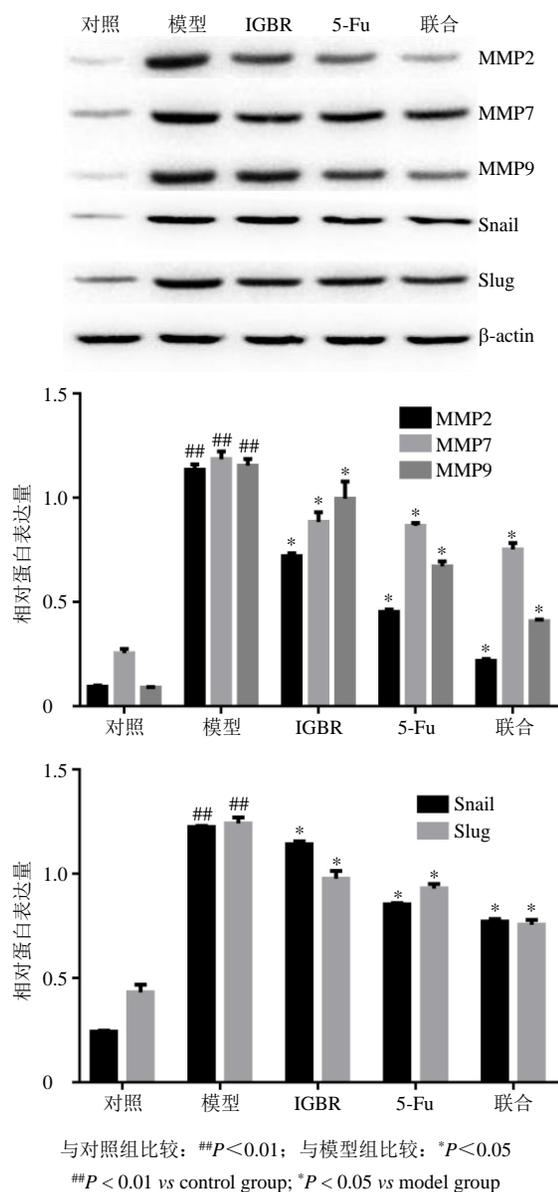


图 5 IGBR 和 5-Fu 处理后 SK-Hep1 细胞中 MMP2、MMP7、MMP9、Snail 和 Slug 蛋白表达量 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Expression of MMP2, MMP7, MMP9, Snail and Slug protein in SK-Hep1 cells treated with IGBR and 5-Fu ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

减弱; 与模型组比较, 用药组 (IGBR 组、5-FU 组、联合组) 荧光信号增强。E-cadherin 是上皮细胞标志蛋白^[8], TGF- β 1 可以使 E-cadherin 的表达减弱, IGBR 和 5-Fu 可以逆转 TGF- β 1 诱导 E-cadherin 的表达。

2.10 Vimentin 在 SK-Hep1 细胞中的定位和表达

如图 9 所示, SK-Hep1 细胞表达趋势与图 7 相同, 更进一步说明 IGBR 和 5-Fu 可以抑制 TGF- β 1 诱导 Vimentin 的表达, 进而抑制肝癌 SK-Hep1 细胞 EMT 继续进展。

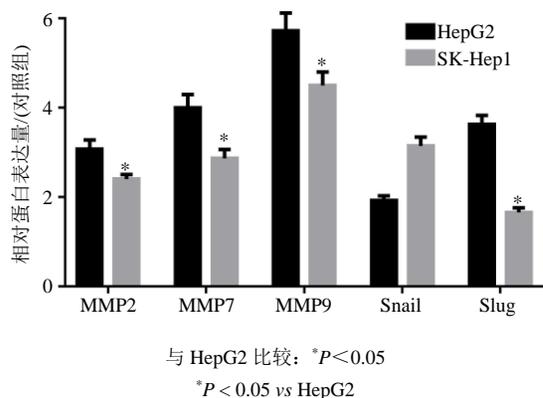


图 6 IGBR 联合 5-Fu 用药后 HepG2、SK-Hep1 细胞中 MMP2、MMP7、MMP9、Snail 和 Slug 蛋白表达效果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 6 Expression of MMP2, MMP7, MMP9, Snail and Slug protein of control in HepG2 and SK-Hep1 cells treated with IGBR combined with 5-Fu ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

2.11 E-cadherin 在 SK-Hep1 细胞中的定位和表达

如图 10 所示, SK-Hep1 细胞表达趋势与图 8 相同, 更进一步说明 IGBR 和 5-Fu 可以逆转 TGF- β 1 诱导 E-cadherin 表达。

3 讨论

TGF- β 1 是体外诱导 EMT 的关键因子, 参与肝癌细胞增殖、分化、迁移或细胞死亡、组织和器官的稳态, 其异常表达与肝癌细胞的发生和预后不良密切相关^[9]。本实验的模型可用于肝癌体外 EMT 的研究, TGF- β 1 不仅是肿瘤细胞 EMT 的诱导剂, 而且是一种重要的促生长剂, TGF- β 1 诱导 SK-Hep1、HepG2 细胞生长和增殖 (图 1)。Chen 等^[10]在研究 TGF- β 1 诱导肝癌 HepG2 细胞 EMT 过程中, 也证实 TGF- β 1 是一种重要的促生长剂。

肿瘤细胞 EMT 是伴随肿瘤早期转移发生的病

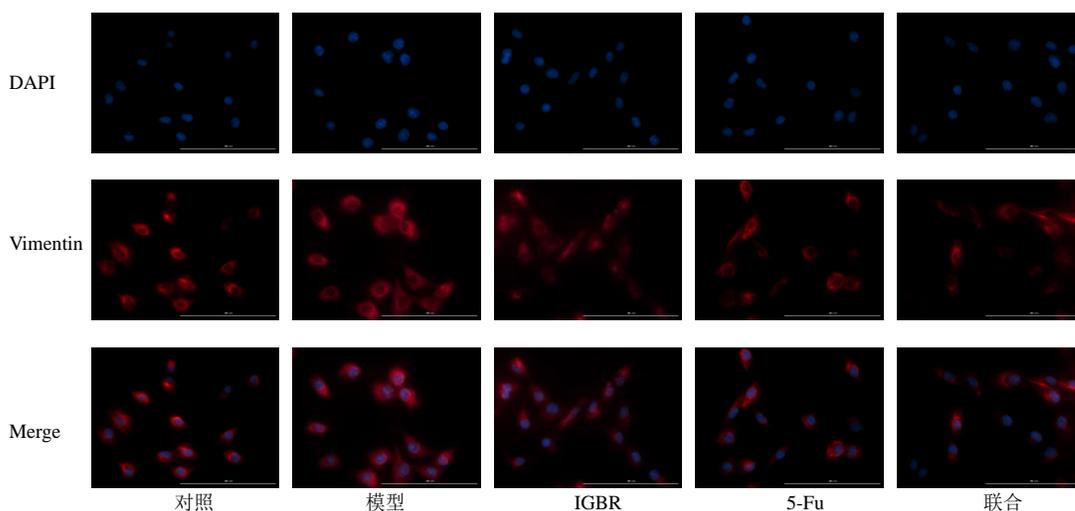


图 7 免疫荧光观察 Vimentin 在 HepG2 细胞中的定位和表达情况 ($\times 400$)

Fig. 7 Localization and expression of Vimentin in HepG2 cells observed by immunofluorescence ($\times 400$)

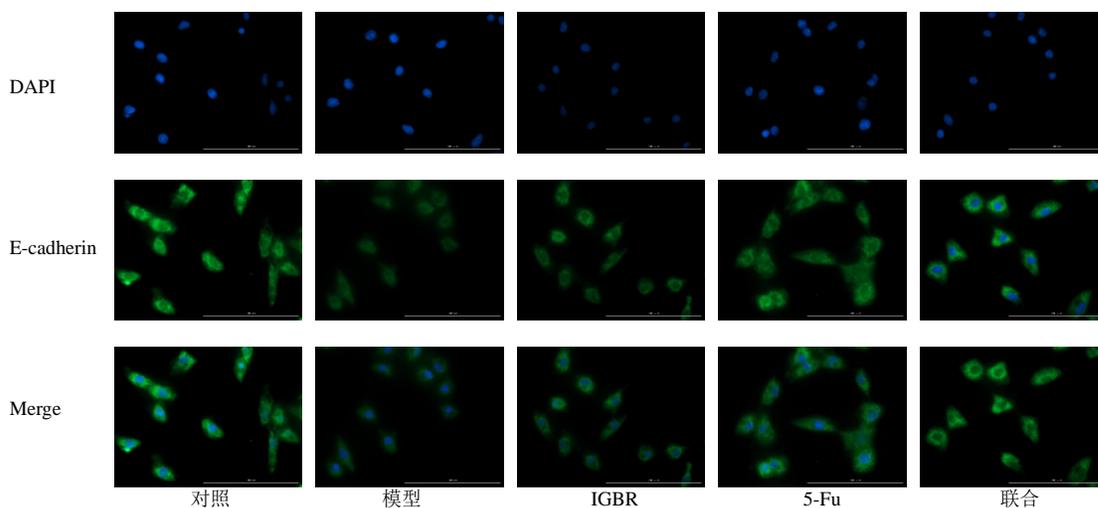


图 8 免疫荧光观察 E-cadherin 在 HepG2 细胞中的定位和表达情况 ($\times 400$)

Fig. 8 Localization and expression of E-cadherin in HepG2 cells observed by immunofluorescence ($\times 400$)

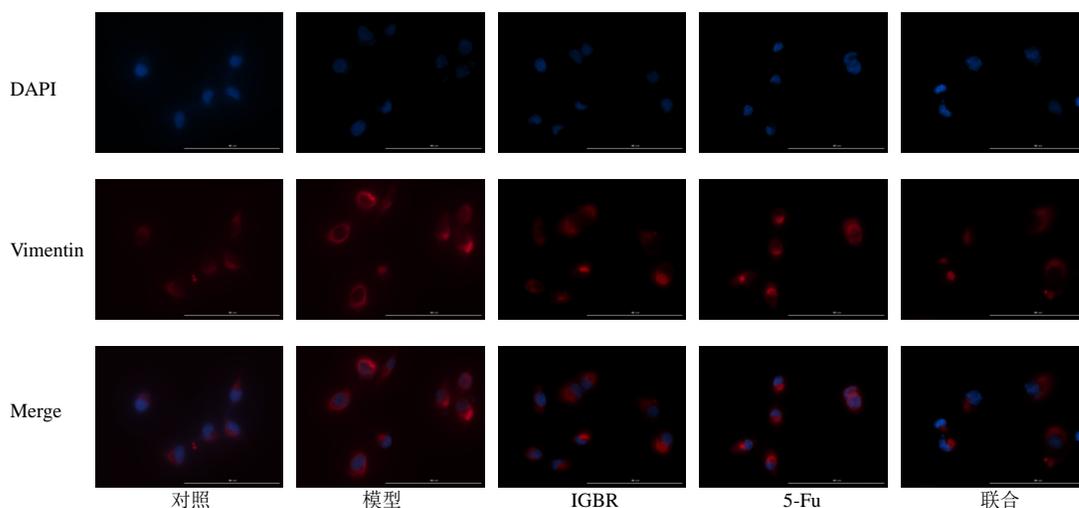


图 9 免疫荧光观察 Vimentin 在 SK-Hep1 细胞中的定位和表达情况 (×400)

Fig. 9 Localization and expression of Vimentin in SK-Hep1 cells observed by immunofluorescence (× 400)

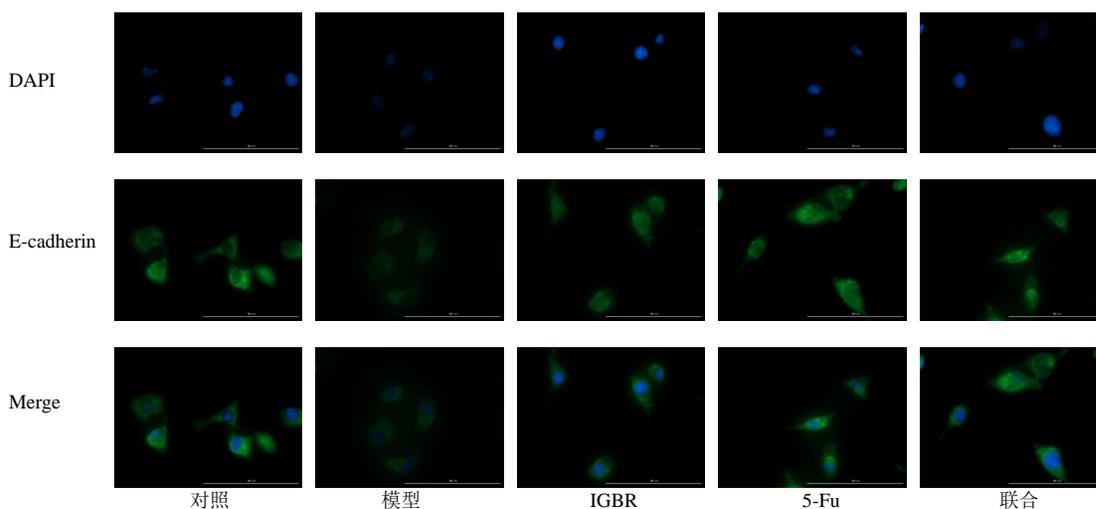


图 10 免疫荧光观察 E-cadherin 在 SK-Hep1 细胞中的定位和表达情况 (×400)

Fig. 10 Localization and expression of E-cadherin in SK-Hep1 cells observed by immunofluorescence (× 400)

理现象, 细胞形态呈现梭形, 纤维样、纺锤样并出现伪足, 其上皮细胞失去细胞极性, 黏附链接并获得浸润和游走迁移能力, 使肿瘤细胞的恶性程度相应增加^[11-12]。本实验中发现 TGF-β1 刺激后肝癌细胞数量增多, 表型出现明显变化, 黏附能力增强。给药后细胞数量减少, 黏附力减低^[13]。

本课题发现 TGF-β1 诱导 2 种肝癌细胞过程中上皮细胞标志蛋白 MMP2、MMP7、MMP9、Snail、Slug 标志蛋白的表达上调, Vimentin 荧光信号增强, 上皮细胞标志蛋白 E-cadherin 荧光信号减弱。有研究证实^[14]Snail 可以单独抑制 E-cadherin 表达, MMP 家族可以诱导 Snail 激活肿瘤细胞发生侵袭, 也有研究证实^[15-16]Snail 表达上调可促进 MMP 家族的表达, 因此 Snail 与 MMP 家族的关系还需要进一步的探究。

HepG2 是一种常见的肝癌细胞株, 具有低转移的潜能, 而 SK-Hep1 转移能力较强, 恶性程度较高。比较 IGBR 和 5-Fu 联合用药对两种细胞的用药疗效, 结果显示 TGF-β1 诱导肝癌细胞发生 EMT, 联合用药 SK-Hep1 较 HepG2 抑制 EMT 效果显著。IGBR 和 5-Fu 联合用药在 HepG2 作用相加, 在 SK-Hep1 两药具有协同效果。

大量研究数据表明, 中草药治疗肝癌有不同程度的抑制肝脏肿瘤细胞 EMT 效果。草苈蓉具有抗炎、提高肝脏枯否细胞的免疫活性、抗脂质过氧化、清除氧自由基的作用^[17]。草苈蓉的主要提取物 IGBR 是其有效的药理成分, 对抗肿瘤有明显抑制作用。

近年来实验研究显示, IGBR ig 后能够对移植鳞癌 VX2 荷瘤兔和小鼠 H22 移植瘤的细胞生长起

到了有效的抑制作用,且 IGBR 可诱导大鼠肝癌细胞发生凋亡^[18-20]。在前期的动物实验中 IGBR 抑制肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡,增强 IGBR 抗癌基因的表达。本次通过细胞实验检测 MMP2、MMP7、MMP9、Snail、Slug 相关标志因子,观察 Vimentin、E-cadherin 在肝癌细胞胞质中的表达,证实 IGBR 和 5-Fu 药物可以逆转 EMT。

IGBR 和 5-Fu 可以抑制肝癌细胞 EMT,IGBR 联合 5-Fu 治疗肝癌 HepG2 细胞 EMT 具有相加效果,治疗肝癌 SK-Hep1 细胞 EMT 具有协同作用。本实验探讨了 IGBR 联合 5-Fu 介导 TGF- β 1 调控 EMT 的相关分子机制,确定 IGBR 联合 5-Fu 靶向调控肝癌 EMT 的确切靶标,为肝癌的中西医结合治疗策略开辟新的途径。

参考文献

- [1] Mazmishvili K, Jayant K, Janikashvili N, *et al.* Study to evaluate the immunomodulatory effects of radiofrequency ablation compared to surgical resection for liver cancer [J]. *J Cancer*, 2018, 9(17): 3187-3195.
- [2] Giannelli G, Koudelkova P, Dituri F, *et al.* Role of epithelial to mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2016, 65(4): 798-808.
- [3] Su Q, Fan M, Wang J, *et al.* Sanguinarine inhibits epithelial-mesenchymal transition via targeting HIF-1 α /TGF- β feed-forward loop in hepatocellular carcinoma [J]. *Cell Death Dis*, 2019, 10(12): 939-954.
- [4] 崔香丹, 郑峰, 朱洁波, 等. 草苈蓉环烯醚萜苷对二基亚硝胺诱发肝癌大鼠细胞凋亡的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(27): 7-11.
- [5] 李彩峰, 王晓琴, 刘勇, 等. 草苈蓉化学成分及药理活性研究进展 [J]. *中草药*, 2014, 45(7): 1016-1023.
- [6] Wang W, Qin S K, Chen B A, *et al.* Experimental study on antitumor effect of arsenic trioxide in combination with cisplatin or doxorubicin on hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2001, 7(5): 702-705.
- [7] Guo D, Song X, Guo T, *et al.* Vimentin acetylation is involved in SIRT5-mediated hepatocellular carcinoma migration [J]. *Am J Cancer Res*, 2018, 8(12): 2453-2466.
- [8] Olmeda D, Jorda M, Peinado H, *et al.* Snail silencing effectively suppresses tumour growth and invasiveness [J]. *Oncogene*, 2007, 26(13): 1862-1874.
- [9] Fabregat I, Moreno-Caceres J, Sanchez A, *et al.* TGF- β signalling and liver disease [J]. *FEBS J*, 2016, 283(12): 2219-2232.
- [10] Chen B N, Zhou S, Zhan Y, *et al.* Dioscin inhibits the invasion and migration of hepatocellular carcinoma HepG2 cells by reversing TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition [J]. *Molecules*, 2019, 24(12): 2222-2242.
- [11] Ru N Y, Wu J, Chen Z N, *et al.* HAb18G/CD147 is involved in TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and hepatocellular carcinoma invasion [J]. *Cell Biol Int*, 2015, 39(1): 44-51.
- [12] Tian X, Cao Z, Ding Q, *et al.* Prognostic value of multiple epithelial mesenchymal transition-associated proteins in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. *Oncol Lett*, 2019, 18(2): 2059-2065.
- [13] Hemmatzadeh M, Mohammadi H, Babaie F, *et al.* Snail-1 silencing by siRNA inhibits migration of TE-8 esophageal cancer cells through downregulation of metastasis-related genes [J]. *Adv Pharm Bull*, 2018, 8(3): 437-445.
- [14] Miyoshi A, Kitajima Y, Sumi K, *et al.* Snail and SIP1 crease cancer invasion by upregulating MMP family in hepatocellular carcinoma cells [J]. *Br J Cancer*, 2004, 90(6): 1265-1273.
- [15] Wei Y, Lv B, Xie J, *et al.* Plumbagin promotes human hepatoma SMMC-7721 cell apoptosis via caspase-3/vimentin signal-mediated EMT [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2343-2355.
- [16] Miyoshi A, Kitajima Y, Kido S, *et al.* Snail accelerates cancer invasion by upregulating MMP expression and is associated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Br J Cancer*, 2005, 92(2): 252-258.
- [17] 郑峰, 崔香丹, 金雪峰, 等. 含有草苈蓉环烯醚萜苷的大鼠血清对人肝癌细胞增殖、凋亡影响及其机制 [J]. *山东医药*, 2018, 57(7): 33-36.
- [18] 尹学哲, 许惠仙, 金爱花, 等. 草苈蓉环烯醚萜苷对移植鳞癌 VX2 荷瘤兔的抑瘤作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(6): 134-136.
- [19] 金爱花, 朴龙, 尹学哲, 等. 草苈蓉环烯醚萜苷对 H22 小鼠肝癌移植瘤的抑瘤作用 [J]. *中草药*, 2012, 43(2): 332-335.
- [20] 崔香丹, 郑峰, 朱洁波, 等. 草苈蓉环烯醚萜苷对肝癌抑制作用 [J]. *中国公共卫生*, 2018, 34(4): 521-524.