

网络出版时间: 2018-11-5 15:38 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20181105.0926.012.html>

西黄丸对肝癌 HepG2 细胞增殖、侵袭及 STAT3 信号通路的影响

朱正春¹, 姚梦群¹, 严芳莉², 仲飞^{1,2,3}

摘要 目的 考察西黄丸对肝癌细胞的增殖、侵袭及信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 异常激活的抑制效果。方法

选取人肝癌细胞株 HepG2, 给予不同浓度梯度的西黄丸血清, 考察西黄丸对 HepG2 细胞株增殖、侵袭作用的影响及对 STAT3 异常激活的抑制效果。结果 MTT 结果显示, 西黄丸对肝癌细胞的增殖具有显著的抑制作用, 呈时间和剂量依赖性 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 西黄丸低、中及高剂量组肝癌细胞的侵袭作用均显著减弱, MMP-2 mRNA、MMP-9 mRNA 及 p-STAT3 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。结论 西黄丸可显著抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖及侵袭作用, 机制可能与抑制 STAT3 异常激活有关。

关键词 西黄丸; 原发性肝癌; HepG2; STAT3; 基质金属蛋白酶

中图分类号 R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)12-1875-04
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.12.012

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是临床上常见的恶性肿瘤, 发病率和死亡率均逐年上升, 严重威胁人类的生命健康。早期肝癌患者的治疗仍以手术为最佳治疗手段, 但绝大多数患者在确诊时已失去了手术的机会, 多依赖于化学药物的治疗, 然而, 化疗对肝癌患者具有较大的副作用, 因此开发新型的抗肿瘤药物对于临床具有积极的意义^[1-2]。西黄丸由牛黄、麝香、乳香及没药组成, 具有消肿止痛、解毒散瘀、软坚散结之效, 是临床上治疗“肺癰”、“痰核”、“瘰癧”及“乳岩”之名方。据报道, 异常激活的 STAT3 信号通路与多种肿瘤的发生、发展、侵袭、转移等均密切相关^[3-5]。该研究将考察西黄丸对肝癌细胞的增殖、侵袭及 STAT3 异常

激活的抑制效果。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 西黄丸 (北京同仁堂科技发展有限公司制药厂, 批准文号: 国药准字 Z11020073, 规格: 3 g/瓶); 人肝癌细胞株 HepG2 (美国 ATCC 公司); 细胞培养箱 (型号: Forma 370, 美国 Thermo 公司); MTT 试剂盒 (北京索莱宝科技有限公司); DMEM 培养液、胎牛血清及胰蛋白酶 (美国 HyClone 公司); 倒置相差显微镜 (日本尼康公司); 鼠抗人 STAT3 及 p-STAT3 单克隆抗体及 GAPDH 内参 (美国 Sigma 公司); Transwell 小室 (美国 Millipore 公司); PCR 仪 (型号: MyCycler)、蛋白电泳仪及转移仪 (美国 BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组 采用相同的人肝癌细胞株 HepG2 作为研究对象, 依据外源性给予的西黄丸含药血清浓度不同分为西黄丸低剂量组 (4 mg/ml)、西黄丸中剂量组 (8 mg/ml) 及西黄丸高剂量组 (16 mg/ml)。

1.2.2 西黄丸含药血清的制备 首先利用研钵将西黄丸研磨呈细粉, 并以预冷的 DMEM 培养基浸泡于密闭的容器内 48 h (生药量为 100 mg/ml), 超声震荡 2 h 助溶, 然后提取上清液, 过滤膜 (0.22 μm), 然后调整至所需浓度^[6]。

1.2.3 细胞培养 人肝癌细胞株 HepG2 用含有 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养基内培养, 置于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱内培养 2~3 d 传代 1 次, 待细胞处于对数生长期时进行实验。

1.2.4 MTT 检测西黄丸对肝癌细胞的增殖作用 以 1×10^5 个/ml 的密度将 HepG2 细胞株接种于 96 孔培养板中, 对照组加入 100 μl 的 DMEM 培养基, 药物组设置 3 个浓度, 分别是西黄丸低剂量组 (4 mg/ml)、西黄丸中剂量组 (8 mg/ml) 及西黄丸高剂量组 (16 mg/ml), 每个组别设置 3 个复孔, 分别作用 24、48、72 h, 避光加入终浓度为 0.5 mg/ml 的 MTT 溶液 100 μl, 37 °C 培养 4 h, 弃掉上清液, 加入 DMSO 150 μl, 摇床震荡 10 s, 使用酶标仪于 490 nm 处测定各酶标孔的吸光度值, 并计算抑制率, 重复 3

2018-07-26 接收

基金项目: 安徽省卫生和计划生育委员会科研课题 (编号: 2016zy34); 国家级大学生创新创业训练计划项目 (编号: 201510366001)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院肿瘤科, 合肥 230022

² 安徽医科大学临床医学院, 合肥 230601

³ 安徽医科大学附属阜阳医院肿瘤科, 阜阳 236000

作者简介: 朱正春, 男, 硕士研究生;

仲飞, 男, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 18226616729@163.com

次实验。抑制率(%) = $(1 - OD_{\text{实验组}} / OD_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

1.2.5 Transwell 小室检测 将 HepG2 肝癌细胞接种于 Transwell 小室内,加入不同浓度的西黄丸,于下室内加入培养基,孵育 48 h,固定细胞,进行 DAPI 染色。

1.2.6 RT-PCR RT-PCR 法测定基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2) mRNA 和 MMP-9 mRNA 的表达,各组作用细胞 48 h 后,采用 TRIzol 法提取总 RNA,反转录按照 Transcriptor First Stand cDNA Synthesis Kit 试剂盒进行,以 GAPDH 作为内参,扩增后,以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 的表达。RT-PCR 引物序列: MMP-2: 上游引物: 5'-GGCACCATTACACCTACA-3', 下游引物: 5'-CCAAGGTCAATGTCAGGAGAG-3'; MMP-9: 上游引物: 5'-GAACCTTGACAGCGACAAGAAG-3', 下游引物: 5'-CGGCACTGAGGAATGATCTAA-3'; GAPDH: 上游引物: 5'-GGTGTGAACCATGAGAAGTATGA-3', 下游引物: 5'-GAGTCCTTCCACGATACCAAAG-3'。

1.2.7 Western blot 各剂量的西黄丸作用于肝癌细胞 48 h,裂解细胞,提取蛋白,然后加入到 SDS-PAGE 蛋白凝胶上样孔内,120 V 电泳 30 min,之后将蛋白质转移至 PVDF 膜,分别加入一抗 p-STAT3 (1:500)、STAT3 (1:500),4 °C 摇床过夜,加入二抗 (1:5000),室温孵育 1 h,曝光,以目的蛋白的条带与对应内参 GAPDH 条带的灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达水平。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析,定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 西黄丸对肝癌细胞增殖作用的抑制率 与作用 24 h 比较,作用 48 h 及 72 h 的相同浓度西黄丸对肝癌细胞的抑制作用显著增强,呈时间依赖性 ($P < 0.05$)。与西黄丸低剂量组比较,西黄丸中及高剂

量组肝癌细胞的抑制作用显著增强,呈剂量依赖性 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 西黄丸对肝癌细胞增殖作用的抑制率(%, $\bar{x} \pm s$)

时间点	西黄丸 低剂量组	西黄丸 中剂量组	西黄丸 高剂量组	F 值
24 h	9.68 ± 2.49	18.45 ± 4.10*	26.01 ± 3.15*	4.569
48 h	16.27 ± 3.16#	24.01 ± 3.83*#	31.22 ± 4.15*#	5.842
72 h	24.33 ± 5.24#	32.53 ± 4.12*#	49.17 ± 7.18*#	5.203

与西黄丸低剂量组比较: * $P < 0.05$; 与 24 h 作用时间比较: # $P < 0.05$

2.2 不同浓度的西黄丸对肝癌细胞侵袭作用的影响 与对照组比较,西黄丸低、中及高剂量组肝癌细胞的侵袭作用均显著减弱,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

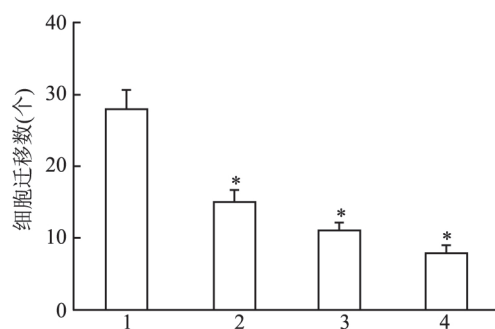


图 1 不同浓度的西黄丸对肝癌细胞侵袭作用的影响

1: 对照组; 2: 西黄丸低剂量组; 3: 西黄丸中剂量组; 4: 西黄丸高剂量组; 与对照组比较: * $P < 0.05$

2.3 不同浓度的西黄丸对肝癌细胞侵袭作用的影响

2.3.1 不同浓度的西黄丸对肝癌细胞 MMP-2 mRNA 和 MMP-9 mRNA 表达的影响 与对照组比较,西黄丸低、中、高剂量组的 MMP-2 mRNA 和 MMP-9 mRNA 的表达均显著降低 ($P < 0.05$); 与西黄丸低剂量组比较,中、高剂量组的 MMP-2 mRNA 和 MMP-9 mRNA 的表达均显著降低 ($P < 0.05$); 与西黄丸中剂量组比较,高剂量组的 MMP-2 mRNA 和 MMP-9 mRNA 的表达均显著降低 ($P < 0.05$)。见表 2。具体扩增曲线见图 2。

表 2 不同浓度的西黄丸对肝癌细胞 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达的影响($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	西黄丸低剂量组	西黄丸中剂量组	西黄丸高剂量组	F 值
MMP-2 mRNA	0.84 ± 0.03	0.56 ± 0.05*	0.42 ± 0.04*#	0.31 ± 0.02*#△	4.618
MMP-9 mRNA	1.38 ± 0.08	1.24 ± 0.06*	0.97 ± 0.05*#	0.78 ± 0.03*#△	3.225

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与西黄丸低剂量组比较: # $P < 0.05$; 与西黄丸中剂量组比较: △ $P < 0.05$

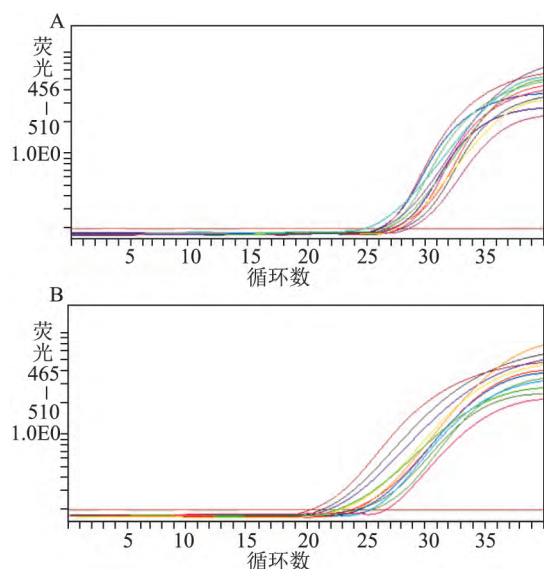


图2 MMP-2 mRNA 和 MMP-9 mRNA 的 RT-PCR 扩增曲线

A: MMP-2 mRNA 的 RT-PCR 扩增曲线; B: MMP-9 mRNA 的 RT-PCR 扩增曲线

2.3.2 不同浓度的西黄丸对肝癌细胞 STAT3 及 p-STAT3 蛋白表达的影响 与对照组比较,西黄丸低、中、高剂量组的 p-STAT3 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$)。与西黄丸低剂量组比较,西黄丸高剂量组的 p-STAT3 蛋白表达显著降低,见表3。3个剂量组的 Western blot 条带见图3。

表3 不同浓度的西黄丸对肝癌细胞 STAT3 及 p-STAT3 蛋白表达的影响 ($n=6$, $\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	西黄丸 低剂量组	西黄丸 中剂量组	西黄丸 高剂量组	F 值
STAT3	0.98 ± 0.21	0.77 ± 0.12	0.79 ± 0.19	0.81 ± 0.28	1.036
p-STAT3	1.21 ± 0.31	$0.87 \pm 0.31^*$	$0.63 \pm 0.38^*$	$0.51 \pm 0.17^*$	2.839

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与西黄丸低剂量组比较: # $P < 0.05$

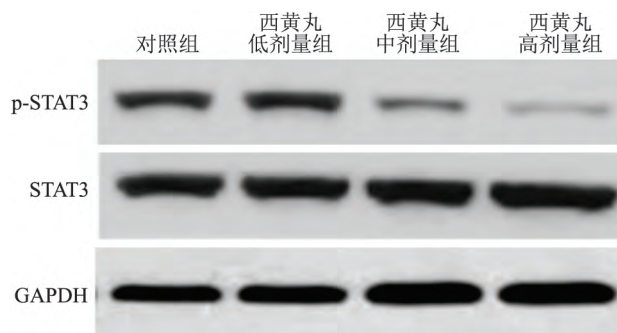


图3 Western blot 法检测西黄丸对
人肝癌细胞株 HepG2 中 p-STAT3 及 STAT 的影响

3 讨论

原发性肝癌是人类常见的恶性肿瘤之一,恶性

程度较高,肝脏移植和外科手术切除是目前临床上的主要治疗手段,肝癌的临床转移率较高,侵袭和转移是肝癌的显著特征,同时也是肝癌患者预后较差的重要原因之一,因此找寻出肝癌细胞侵袭转移的调控和分子机制对于指导临床具有积极的科学意义。西黄丸始载于《外科证治全生集》,为清代名医王洪绪所创,原称为犀黄丸,由牛黄、麝香、乳香及没药组成,方中牛黄性凉、味甘、苦,具有化痰利胆、清热解毒之效;麝香性温、性温、味辛,具有消肿散结之效;乳香没药相须为用,具有消肿止痛、行气活血之效。诸药合用,既可消肿散结、活血祛瘀,又可解毒散结、益气扶正,以达到去邪而不伤正的治疗癌症的目的。现代药理研究^[7-8]表明,西黄丸对乳腺癌、结肠癌、卵巢癌细胞均有一定的抑制作用,同时还可缓解化疗药物产生的副作用。增殖和侵袭是肝癌细胞的基本特点,本研究 MTT 结果显示,西黄丸对肝癌细胞的增殖具有显著的抑制作用,呈时间和剂量依赖性 ($P < 0.05$),同时 Transwell 侵袭实验也得出,与对照组比较,西黄丸低、中及高剂量组肝癌细胞的侵袭作用均显著减弱,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$),提示西黄丸可缓解肝癌细胞的异常增殖及侵袭作用。STAT3 为 STATs 家族的重要成员之一,定位于人体第 12 号染色体上,是细胞内重要的信号传递和基因表达的调控因子,其下游的靶基因主要参与调控细胞的增殖、分化、转移等。正常情况下,未活化的 STAT3 存在于细胞质中,而在肿瘤细胞内,由于某些细胞因子或者生长因子的失调,将会导致 STAT3 异常激活并且长时间的处于高表达状态,促进肿瘤细胞的增殖并抑制其凋亡^[9-10]。基质金属蛋白酶是一种锌离子依赖性的内肽酶,可降解细胞外基质和细胞基底膜的蛋白水解酶,既往研究^[11-13]显示, MMP-2 和 MMP-9 均是 STAT3 调控细胞增殖和侵袭的靶基因,在肿瘤细胞内,基质的异常降解可诱发肿瘤细胞的生长失去控制,进而导致炎症的产生、重塑及浸润转移,故而 MMP 在肿瘤细胞的侵袭转移中发挥重要的作用,肿瘤细胞转移的重要环节即是 STAT3 与 MMP 细胞外基质及基底膜的破坏与降解^[11-13]。本研究 RT-PCR 结果显示,与对照组比较,西黄丸低、中、高剂量组的 MMP-2 mRNA 和 MMP-9 mRNA 的表达均显著降低 ($P < 0.05$),蛋白水平上也证实,与对照组比较,西黄丸低、中、高剂量组的 p-STAT3 蛋白表达均显著降低 ($P < 0.05$),提示西黄丸可通过下调 p-STAT3 蛋白表达来发挥抗肝癌的作用。

综上所述,西黄丸可显著抑制 HepG2 肝癌细胞的增殖及侵袭作用,机制可能与抑制 STAT3 异常激活有关。

参考文献

- [1] Katsanos K, Kitrou P, Spiliopoulos S, et al. Comparative effectiveness of different transarterial embolization therapies alone or in combination with local ablative or adjuvant systemic treatments for unresectable hepatocellular carcinoma: a network meta-analysis of randomized controlled trials [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0184597.
- [2] Su H, Zhu G, Djaja P K I, et al. Preoperative transcatheter arterial chemotherapy may suppress oxidative stress in hepatocellular carcinoma cells and reduce the risk of short-term relapse [J]. *Onco-target*, 2017, 8(33): 54402–15.
- [3] Kim H S, Kim T, Ko H, et al. Identification of galiellalactone-based novel STAT3 selective inhibitors with cytotoxic activities against triple-negative breast cancer cell lines [J]. *Bioorg Med Chem*, 2017, 25(19): 5032–40.
- [4] Fang X, Hong Y, Dai L, et al. CRH promotes human colon cancer cell proliferation via IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway and VEGF-induced tumor angiogenesis [J]. *Mol Carcinog*, 2017, 56(11): 2434–45.
- [5] Fei R, Zhang Y, Wang S, et al. $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in tumor-associated macrophages inhibits colorectal cancer metastasis through the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5): 2619–28.
- [6] 陈珊珊,秦旭华,金沈锐,等. 西黄丸及乳香、没药、乳没药对多种人恶性肿瘤细胞株体外增殖影响的比较研究[J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(3): 102–4.
- [7] 洪日,吴永强,吴越. 西黄丸辅助治疗中晚期乳腺癌的疗效观察[J]. *中国中药杂志*, 2014, 39(6): 1120–3.
- [8] Zheng W, Han S, Jiang S, et al. Multiple effects of Xihuang pill aqueous extract on the Hs578T triple-negative breast cancer cell line [J]. *Biomed Rep*, 2016, 5(5): 559–66.
- [9] 葛倩,杨振强,王邈. 西黄丸逆转大肠癌细胞株多药耐药的体外研究[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(1): 176–80.
- [10] 李望,张超,李方跃,等. 生长抑素对瘦素诱导肝星状细胞的活化增殖、PTP1B 表达及 JAK2-STAT3 通路的影响[J]. *安徽医科大学学报*, 2014, 49(10): 1387–91.
- [11] Wang W J, Mou K, Wu X F, et al. Grb2-associated binder 2 silencing impairs growth and migration of H1975 cells via modulation of PI3K-Akt signaling [J]. *Int J Exp Pathol*, 2015, 8(9): 10575–84.
- [12] Zou M, Zhang X, Xu C. IL6-induced metastasis modulators p-STAT3, MMP-2 and MMP-9 are targets of 3,3'-diindolylmethane in ovarian cancer cells [J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2016, 39(1): 47–57.
- [13] Li C, Yang D, Zhao Y, et al. Inhibitory effects of isorhamnetin on the invasion of human breast carcinoma cells by downregulating the expression and activity of matrix metalloproteinase-2/9 [J]. *Nutr Cancer*, 2015, 67(7): 1191–200.

Effects of Xihuang pill on proliferation and invasion of HepG2 cells and STAT3 signal pathway

Zhu Zhengchun¹, Yao Mengqun¹, Yan Fangli², et al

(¹Dept of Oncology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022;

²School of Clinical Medicine, Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the inhibitory effect of Xihuang pill on proliferation, invasion and abnormal activator of transcription 3 (STAT3) in human hepatocellular carcinoma cells. **Methods** Selected the human carcinoma cell line HepG2, and treated with different concentrations of serum contained Xihuang pill, then studied the effect of Xihuang pill on proliferation, invasion and abnormal activation of STAT3 in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Results** MTT result showed that Xihuang pill had inhibition effect on the proliferation of HepG2, and the inhibition effect showed time-dependent and dose-dependent ($P < 0.05$). Compared with control group, the invasion of low dosage group, middle dosage group and high dosage group weakened significantly, and the protein expression of MMP-2 mRNA, MMP-9 mRNA and p-STAT3 decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Xihuang pill can significantly inhibit the proliferation and invasion of HepG2 cells, its mechanism may be related to inhibition of abnormal activation of STAT3.

Key words Xihuang pill; hepatocellular carcinoma; HepG2; signal transduction and activators of transcription 3; matrix metalloproteinase