

本文引用: 罗 燕, 唐 蔚, 陈玲珑, 曾 千, 张 轩, 罗 吉. 肝喜片通过 miR200a/ZEB 信号通路抑制肝癌细胞 HepG2 上皮间质转化的机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(11): 2007-2013.

肝喜片通过 miR200a/ZEB 信号通路抑制肝癌细胞 HepG2 上皮间质转化的机制研究

罗 燕¹, 唐 蔚¹, 陈玲珑², 曾 千³, 张 轩³, 罗 吉^{1*}

1. 湖南省中西医结合医院(湖南省中医药研究院附属医院), 湖南 长沙 410006; 2. 湖南省中医药研究院, 湖南 长沙 410013; 3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

〔摘要〕 目的 研究肝喜片通过微小分子 RNA200a/E 盒结合锌指蛋白 (microRNA200a/zinc finger E-box binding homeobox, miR200a/ZEB) 信号通路抑制肝癌细胞 HepG2 上皮间质转化的机制。方法 培养肝癌细胞 HepG2, 制备肝喜片含药血清, 采用不同浓度 (10%、15%、20%) 的肝喜片含药血清作用于 HepG2 细胞, 同时设置空白对照组。运用 CCK-8 实验检测 HepG2 细胞的增殖, 划痕实验、Transwell 实验分别检测 HepG2 细胞的横向迁移和纵向迁移, Western blot 检测 ZEB1、ZEB2、E 钙黏蛋白 (E-cadherin)、波形蛋白 (Vimentin) 的表达, RT-PCR 检测 miR200a、ZEB1、ZEB2、E-cadherin、Vimentin mRNA 的表达。结果 与空白对照组比较, 肝喜片各剂量组的细胞存活率显著降低, 且具有明显的时间和浓度依赖性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 肝喜片各剂量组的横向迁移率及纵向迁移细胞数显著减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与空白对照组比较, 肝喜片中、高剂量组 miR200a 表达升高, 肝喜片各剂量组 E-cadherin 蛋白及中、高剂量组 E-cadherin mRNA 表达升高, 肝喜片各剂量组 Vimentin 蛋白及中、高剂量组 Vimentin mRNA 表达下降, 肝喜片各剂量组 ZEB1、ZEB2 蛋白及 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与肝喜片低剂量组比较, 肝喜片中、高剂量组 miR200a、E-cadherin 蛋白及 mRNA 表达升高, Vimentin、ZEB1、ZEB2 蛋白及 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与肝喜片中剂量组比较, 肝喜片高剂量组 miR200a、E-cadherin 蛋白及 mRNA 表达升高, Vimentin、ZEB1、ZEB2 蛋白及 mRNA 表达下降 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 肝喜片可显著抑制肝癌细胞 HepG2 的增殖和转移, 其机制与调控 miR200a/ZEB 信号通路、促进 E-cadherin 的表达、抑制 Vimentin 的表达、逆转上皮间质转化相关。

〔关键词〕 肝癌; 肝喜片; 微小分子 RNA200a; 上皮间质转化; E 盒结合锌指蛋白; E 钙黏蛋白; 波形蛋白

〔中图分类号〕 R273; R735

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.11.010

Mechanism of Ganxi Pill in inhibiting epithelial-mesenchymal transition of HepG2 cells through miR200a/ZEB signaling pathway

LUO Yan¹, TANG Wei¹, CHEN Linglong², ZENG Qian³, ZHANG Xuan³, LUO Ji^{1*}

1. Hunan Provincial Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Changsha, Hunan 410006, China;

2. Hunan Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410013, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

〔Abstract〕 Objective To investigate the mechanism by which Ganxi Pill inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) in

〔收稿日期〕 2024-06-17

〔基金项目〕 国家中医药管理局重大疑难疾病原发性肝癌中西医临床协作试点项目 (国中医药办医政发〔2018〕3 号); 国医大师潘敏求传承工作室 (国中医药办人教函〔2022〕245 号); 湖南省中医药管理局重点项目 (A2024018)。

〔通信作者〕 * 罗 吉, 男, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师, E-mail: luoji927@163.com。

HepG2 cells through the microRNA200a/zinc finger E-Box binding homeobox 1 (miR200a/ZEB) signaling pathway. **Methods** HepG2 cells were cultured and treated with Ganxi Pill-mediated serum at different concentrations (10%, 15%, and 20%), with a blank control group set up in parallel. The CCK-8 assay was used to assess the proliferation of HepG2 cells, while scratch assay and Transwell assay were conducted to evaluate the horizontal and vertical migration of the cells, respectively. Western blot was employed to check the expressions of ZEB1, ZEB2, E-cadherin, and vimentin. Additionally, RT-PCR was utilized to measure the mRNA expression levels of miR200a, ZEB1, ZEB2, E-cadherin, and vimentin. **Results** Compared with the blank control group, the cell survival rate in all Ganxi Pill groups was significantly reduced, exhibiting clear time- and concentration-dependence ($P<0.05$, $P<0.01$). The horizontal migration rate and the number of vertically migrating cells significantly decreased in all Ganxi Pill groups ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the blank control group, the expression of miR200a increased in the medium- and high-dose Ganxi Pill groups; E-cadherin protein level was elevated in all Ganxi Pill groups, with its mRNA expression increased in the medium- and high-dose groups. Meanwhile, the protein expression of vimentin was reduced across all Ganxi Pill groups, with its mRNA expression decreased in the medium- and high-dose groups. The protein and mRNA expressions of ZEB1 and ZEB2 were reduced in all Ganxi Pill groups ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the low-dose group, the medium- and high-dose Ganxi Pill groups exhibited increased protein and mRNA expressions of miR200a and E-cadherin, along with reduced protein and mRNA expressions of vimentin, ZEB1, and ZEB2 ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the medium-dose group, the high-dose Ganxi Pill group showed further increases in the protein and mRNA expressions of miR-200a and E-cadherin, while the protein and mRNA expressions of vimentin, ZEB1, and ZEB2 decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** Ganxi Pill can significantly inhibit the proliferation and migration of HepG2 cells, and its mechanism might be related to the regulation of the miR200a/ZEB signaling pathway, promotion of the E-cadherin expression, inhibition of the vimentin expression, and reversal of EMT.

[**Keywords**] liver cancer; Ganxi Pill; microRNA200a; epithelial-mesenchymal transition; zinc finger E-box binding homeobox; E-cadherin; vimentin

原发性肝癌是临床常见的具有高致死率的恶性肿瘤。据国家癌症中心最新数据显示,我国每年新增肝癌患者 36.77 万,占恶性肿瘤发病率第四位,死亡人数 31.65 万,占恶性肿瘤死亡率第二位^[1]。上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)是上皮细胞获得间充质干细胞表型的过程,其在胚胎形态发生、组织纤维化、伤口愈合和肿瘤转移中起着作用;扭转家族 bHLH 转录因子(Twist)、E 盒结合锌指蛋白 1(zinc finger E-box binding homeobox 1, ZEB1)、E 盒结合锌指蛋白 2(zinc finger E-box binding homeobox 2, ZEB2)、蜗牛家族转录抑制因子(snail)等转录因子可通过调控细胞中 E 钙黏蛋白(E-cadherin)、N 钙黏蛋白(N-cadherin)等的表达,在肿瘤的增殖、侵袭和转移中发挥关键作用^[2-4]。miR200 家族由 miR141、miR200a、miR200b、miR200c 和 miR429 组成,在恶性肿瘤中起到抑癌作用。研究表明,miR200 家族成员的下调不仅与 E-cadherin 的损失显著相关,而且可通过靶向作用于 ZEB1、ZEB2 调控 EMT 过程,抑制多种恶性肿瘤的侵袭转移^[5-6]。肝喜片是由湖南省中西医结合医院(湖南省中医药研究院附属医院)肿瘤科创始人、国医大师潘敏求牵头研发的医院制剂,在医院已使用 30 余年,使用量常年居医院

制剂第一。前期本团队已利用超高效液相-质谱联用技术证实,肝喜片在大鼠血清中的代谢调节机制与戊糖和葡萄糖醛酸的相互转化、色氨酸代谢和类固醇激素生物合成等代谢途径调控有关,且其水剂(肝喜合剂)体外可有效抑制肝癌细胞 HepG2 增殖,通过调节凋亡相关蛋白 B 淋巴细胞瘤-2 相关蛋白 X(Bcl-2-associated X protein, Bax)、p53 上调凋亡调节因子(p53 upregulated modulator of apoptosis, Puma)、半胱氨酸蛋白酶-9(Caspase-9)的表达促进凋亡^[7-8]。本研究在前期研究基础上,从 miR200a/ZEB 信号通路调控 EMT 过程进一步探讨肝喜片的作用机制,以期为其临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 细胞株及实验动物

人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库(目录编号为:TCHu 72);SD 雄性大鼠 10 只,体质量 250~300 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,许可证号:SCXK(京)2019-0008。本研究中涉及动物的实验均经湖南中医药大学实验动物伦理委员会批准(审批号:21-2310-30)。

1.2 药物

肝喜片购自湖南省中西医结合医院(湖南省中医药研究院附属医院)中成药房,批准文号:湘药制字 Z20080761,生产批号:20230305。

1.3 主要试剂

DMEM 培养基、青霉素-链霉素混合液、0.25% EDTA-胰蛋白酶混合液(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:PM150210、PB180120、PB180226);10%胎牛血清(澳大利亚 Cell-box 公司,批号:AUS-01S-02);布拉德福德蛋白检测试剂盒(美国 BioRad 公司,批号:5000205);cDNA 逆转录试剂盒、RT-PCR 试剂盒(日本 Takara 公司,批号:RR047Q、RR430A) PVDF 膜(美国 Millipore 公司,批号:R8AA8000F);RIPA 哺乳动物细胞裂解液、ZEB1、ZEB2、E-cadherin、Vimentin[美国 Thermo Fisher 公司,批号:89900、21544-1-AP(稀释比:1:10 000)、14026-1-AP(稀释比:1:5 000)、20874-1-AP(稀释比:1:5 000)、10366-1-AP(稀释比:1:1 000)];GAPDH 蛋白抗体[美国 Abcam 公司,批号:ab8245(稀释比:1:5 000)];二抗山羊抗兔抗体、二抗山羊抗鼠抗体[杭州戴格生物有限公司,批号:db10002(稀释比:1:4 000)、db10003(稀释比:1:4 000)]。

1.4 仪器设备

MOP175 型二氧化碳细胞培养箱(日本 Sanyo 公司);EIX808U 型全自动酶标仪(美国 BioTek 公司);Mini-PROTEAN Tetra Cell 型垂直凝胶电泳仪、Trans-Blot SD 蛋白质转膜仪(美国伯乐公司);GBOX 型凝胶成像系统(美国 Syngene 公司);480II FAST 型荧光定量 PCR 仪器(瑞士 Roche 公司);GX53 倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

用含 10%胎牛血清和青霉素-链霉素的 DMEM (葡萄糖浓度:4.5 g/L)培养基,于 37℃、5%CO₂饱和湿度的细胞培养箱中培养肝癌细胞 HepG2,当细胞生长至培养皿的 75%左右,进行消化传代,取对数生长期的细胞进行后续实验。

2.2 含药血清制备

SD 雄性大鼠 10 只,随机数字表法分成对照组和实验组,每组 10 只。大鼠灌胃剂量按照人与大鼠体表面积计算比值换算公式计算,实验组按相当于 70 kg 成年人 100 mL/d 的药物量,即 1.03 g/kg 药物量对大鼠进行灌胃;对照组按大鼠体质量灌胃等

容积的生理盐水。每天灌胃 1 次,连续 7 d,于最后 1 次灌胃 1 h 后水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉取血,3 000 g 离心 15 min 后取血清,混匀,用 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,于-80℃保存备用。

2.3 CCK-8 实验检测细胞的增殖

选取对数生长期的肝癌细胞 HepG2 接种于 96 孔板中,培养过夜。依次加入不同浓度(10%、15%、20%)的肝喜片含药血清,设置 6 个平行孔,同时设置空白对照组。继续培养细胞 24、48、72 h,每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL,放入培养箱内孵育 1 h,酶标仪检测 450 nm 波长处的测定吸光度,计算各组细胞存活率。细胞存活率=(加药细胞 OD/对照细胞 OD)×100%^[9]。实验重复 3 次。

2.4 划痕实验检测细胞的横向迁移

取对数生长期的肝癌细胞 HepG2 用 0.25% EDTA-胰蛋白酶混合液常规消化后,配制成细胞悬液,接种于 6 孔培养板中,每组设 3 个复孔;培养至形成单层细胞,更换无血清培养液饥饿处理 4 h,培养板底部正中间划“—”字划痕,PBS 清洗 3 次去除划掉的细胞,加入不同浓度(10%、15%、20%)的肝喜片含药血清,并于 0、12、24 h 拍照观察,Image J 软件分析结果。迁移率=(0 h 划痕距离-目的时间划痕距离)/0 h 划痕距离×100%^[10]。

2.5 Transwell 检测细胞的纵向迁移

取对数生长期的肝癌细胞 HepG2,加入不同浓度(10%、15%、20%)的肝喜片含药血清,用 DMEM 培养基将细胞密度调整为 1×10⁶/mL,100 μL/孔接种于 Transwell 小室上室,小室下室加入含 15%FBS 的 DMEM 1 mL 作为诱导剂,继续培养 36 h,取上室,移除培养液后,4%多聚甲醛固定 20 min,0.1%结晶紫染色 20 min,脱色清洗后显微镜下观察、拍照、计数。

2.6 Western blot 检测 EMT 相关的蛋白表达

采用 RIPA 蛋白裂解液提取总蛋白,BIO-RAD QUICK START BRADFORD 试剂盒测定蛋白浓度。按蛋白 40 μg/孔进行 10%或者 12%SDS-PAGE 分离,湿转法将蛋白转移到 0.22 μm PVDF 膜上,5%脱脂牛奶室温封闭 2 h,分别加入适量稀释后抗体 ZEB1(1:2 000)、ZEB2(1:2 000)、E-cadherin(1:1 000)、Vimentin(1:1 000)、GAPDH(1:5 000),4℃摇床孵育过夜,TBST 洗膜 15 min×3 次,加入山羊抗兔二抗(1:5 000)或者山羊抗鼠二抗(1:5 000),室温摇床孵育 1.5 h,TBST 洗涤 15 min×3 次,加入适量 ECL plus 溶液,暗室内曝光显影拍照,Image J 软件分析各条带灰度值。实验重复 3 次。

2.7 RT-PCR 检测 miR200、EMT 相关的 mRNA 表达

采用 Trizol 法提取总 RNA,按 cDNA 逆转录试剂盒说明书制备 cDNA。按照 RT-PCR 试剂盒说明书扩增 miR200a、U6、ZEB1、ZEB2、E-cadherin、Vimentin、GAPDH(引物序列见表 1),扩增条件:94 ℃ 2 min,94 ℃ 40 s,58 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,72 ℃ 5 min。 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 miR200a、ZEB1、ZEB2、E-cadherin、Vimentin 的相对表达量。实验重复 3 次。

表 1 RT-PCR 引物序列
Table 1 Primer sequences of RT-PCR

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
miR200a	正向 GCCCGCTAGCTTATCAGACTGATG	75
	反向 GTGCAGGGTCCGAGGT	
U6	正向 GCGCGTCGTGAAGCGTTC	75
	反向 GTGCAGGGTCCGAGGT	
E-cadherin	正向 AGAACGCATTGCCACATACACTC	85
	反向 CATTCTGATCGGTTACCGTGATC	
Vimentin	正向 TCCAAGTTTGCTGACCTCTC	102
	反向 TCAACGGCAAAGTTCTCTTC	
ZEB1	正向 GATGATGAATGCGAGTCAGATGC	86
	反向 ACAGCAGTGTCTTGTGTTGT	
ZEB2	正向 CAAGAGCGCAAACAAGCC	128
	反向 GGTTGGCAATACCGTCATCC	
GAPDH	正向 ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG	101
	反向 GCCATCACGCCACAGTTTC	

2.8 统计学分析

采用 GraphPad prism 9.0 软件对数据进行统计分析。计量数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,所有数据符合正态分布的采用单因素方差分析,不符合正态分布的则采用 *Kruskal-Wallis* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义, $P<0.01$ 为差异有显著统计学意义。

3 结果

3.1 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞增殖的影响

与空白对照组比较,肝喜片各剂量组的 24、48、

72 h 细胞存活率均降低($P<0.05$, $P<0.01$);与肝喜片低剂量组比较,肝喜片中、高剂量组 24、48、72 h 细胞存活率均降低($P<0.01$);与肝喜片中剂量组比较,肝喜片高剂量组 24、48、72 h 细胞存活率均降低($P<0.01$)。与 24 h 比较,肝喜片各剂量组 48、72 h 细胞存活率均降低($P<0.05$, $P<0.01$);与 48 h 比较,肝喜片各剂量组 72 h 细胞存活率均降低($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表 2。

3.2 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞横向迁移的影响

与空白对照组比较,肝喜片各剂量组 12、24 h HepG2 细胞横向迁移率均明显下降($P<0.01$);与肝喜片低剂量组比较,肝喜片中、高剂量组 12、24 h HepG2 细胞横向迁移率均明显下降($P<0.01$);与肝喜片中剂量组比较,肝喜片高剂量组 12、24 h HepG2 细胞横向迁移率均明显下降($P<0.01$)。与 0 h 比较,肝喜片低、中剂量组 12、24 h HepG2 细胞横向迁移率均明显上升($P<0.01$);与 12 h 比较,肝喜片低、中剂量组 24 h HepG2 细胞横向迁移率均明显上升($P<0.01$)。详见图 1、表 3。

3.3 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞纵向迁移的影响

与空白对照组比较,肝喜片中、高剂量组纵向迁移细胞数减少($P<0.05$);与肝喜片低剂量组比较,肝喜片中、高剂量组纵向迁移细胞数减少($P<0.05$);与肝喜片中剂量组比较,肝喜片高剂量组纵向迁移细胞数减少($P<0.05$)。详见图 2、表 4。

3.4 肝喜片含药血清对 E-cadherin、Vimentin、ZEB1、ZEB2 蛋白表达的影响

与空白对照组比较,肝喜片各剂量组 E-cadherin 蛋白表达明显升高,Vimentin、ZEB1、ZEB2 蛋白表达明显下降($P<0.01$);与肝喜片低剂量组比较,肝喜片中、高剂量组 E-cadherin 蛋白表达明显升高,Vimentin、ZEB1、ZEB2 蛋白表达明显下降($P<0.01$);与肝喜片中剂量组比较,肝喜片高剂量组 E-cadherin 蛋白表

表 2 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞增殖的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)
Table 2 Effects of Ganxi Pill-mediated serum on the proliferation of HepG2 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量	24 h	48 h	72 h
空白对照组	15%空白血清	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
肝喜片低剂量组	10%含药血清	0.899±0.010*	0.752±0.035*◆	0.485±0.021**◆◆■
肝喜片中剂量组	15%含药血清	0.508±0.079**▲▲	0.398±0.051**▲▲◆◆	0.254±0.017**▲▲◆◆■
肝喜片高剂量组	20%含药血清	0.238±0.023**▲▲◇◇	0.125±0.016**▲▲◇◇◆◆	0.108±0.009**▲▲◇◇◆◆■

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与肝喜片低剂量组比较,▲ $P<0.01$;与肝喜片中剂量组比较,◇ $P<0.01$;与 24 h 比较,◆ $P<0.05$,◆◆ $P<0.01$;与 48 h 比较,■ $P<0.05$,■■ $P<0.01$ 。

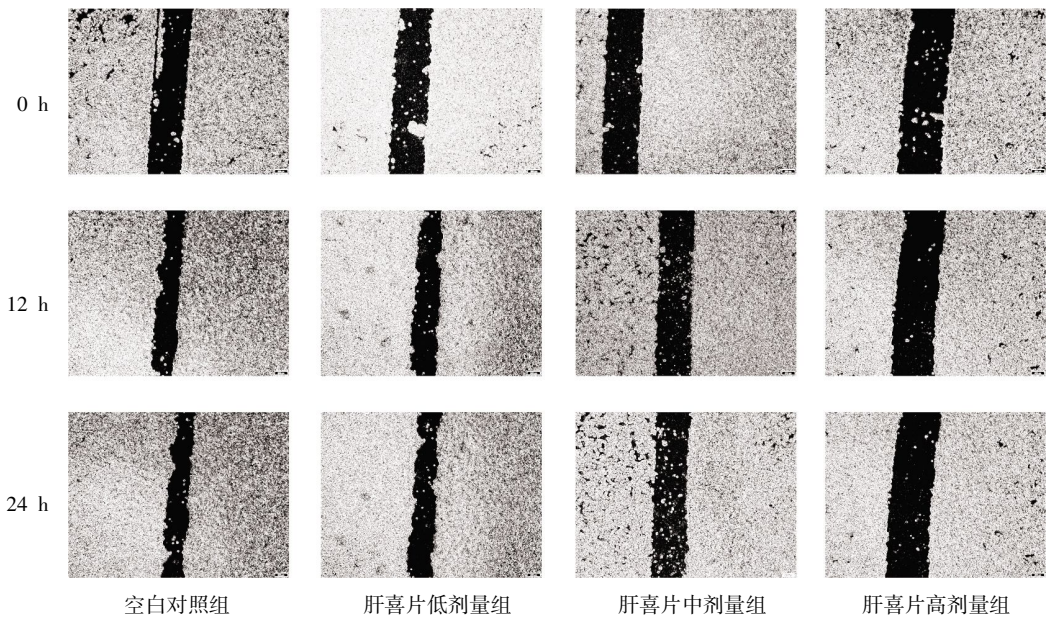


图 1 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞横向迁移的影响($\times 40$)

Fig.1 Effects of Ganxi Pill-mediated serum on the migration of HepG2 cells ($\times 40$)

表 3 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞横向迁移率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Effects of Ganxi Pill-mediated serum on the horizontal migration rate of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	0 h	12 h	24 h
空白对照组	15%空白血清	0.000 $\pm$ 0.000	46.655 $\pm$ 0.884	56.230 $\pm$ 0.933
肝喜片低剂量组	10%含药血清	0.000 $\pm$ 0.000	27.815 $\pm$ 1.663**◆◆	35.610 $\pm$ 1.329**◆◆■
肝喜片中剂量组	15%含药血清	0.000 $\pm$ 0.000	5.660 $\pm$ 0.778**▲▲◆◆	19.155 $\pm$ 0.290**▲▲◆◆■
肝喜片高剂量组	20%含药血清	0.000 $\pm$ 0.000	0.235 $\pm$ 0.163**▲▲◇◇	1.230 $\pm$ 0.226**▲▲◇◇

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与肝喜片低剂量组比较,▲▲ $P<0.01$;与肝喜片中剂量组比较,◇◇ $P<0.01$;与 0 h 比较,◆◆ $P<0.01$;与 12 h 比较,■ $P<0.01$ 。

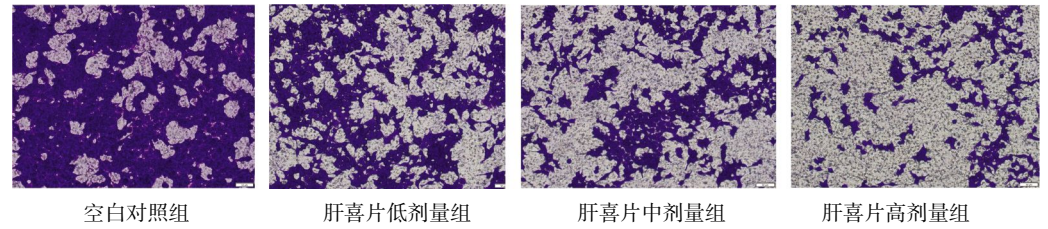


图 2 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞纵向迁移的影响($\times 200$)

Fig.2 Effects of Ganxi Pill-mediated serum on the vertical migration of HepG2 cells ($\times 200$)

表 4 肝喜片含药血清对 HepG2 细胞纵向迁移细胞数的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of Ganxi Pill-mediated serum on the number of vertical migration of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量	迁移细胞数
空白对照组	15%空白血清	3 256 $\pm$ 408
肝喜片低剂量组	10%含药血清	2 689 $\pm$ 241
肝喜片中剂量组	15%含药血清	1 340 $\pm$ 148*▲
肝喜片高剂量组	20%含药血清	769 $\pm$ 157*▲◇

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与肝喜片低剂量组比较,▲ $P<0.05$;与肝喜片中剂量组比较,◇ $P<0.05$ 。

达升高,Vimentin、ZEB1、ZEB2 蛋白表达下降($P<0.05$, $P<0.01$)。详见图 3、表 5。

3.5 肝喜片含药血清对 miR200a、ZEB1、ZEB2、E-cadherin、Vimentin mRNA 表达的影响

与空白对照组比较,肝喜片中、高剂量组miR200a、E-cadherin mRNA 表达升高,Vimentin mRNA 表达降低($P<0.05$, $P<0.01$),肝喜片低、中、高剂量组ZEB1、ZEB2 mRNA 表达均明显降低($P<0.01$);与肝喜片低剂量组比较,肝喜片中、高剂量组miR200a、E-cadherin mRNA 表达升高,Vimentin、ZEB1、ZEB2 mRNA 表达

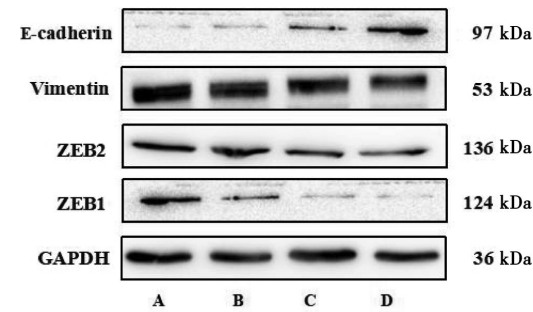


图 3 各组 E-cadherin、Vimentin、ZEB1、ZEB2 蛋白电泳图

Fig.3 Electrophoresis images of E-cadherin, Vimentin, ZEB1, and ZEB2 proteins in each group

注:A.空白对照组;B.肝喜片低剂量组;C.肝喜片中剂量组;D.肝喜片高剂量组。

降低($P<0.05$, $P<0.01$);与肝喜片中剂量组比较,肝喜片高剂量组 miR200a、E-cadherin mRNA 表达明显升高,Vimentin、ZEB1、ZEB2 mRNA 表达明显降低($P<0.01$)。详见表 6。

4 讨论

原发性肝癌是一类临床常见恶性肿瘤,有研究通过对涵盖 185 个国家的 Globocan 数据库进行分析,预计到 2040 年,每年将有 140 万人确诊为肝癌,较 2020 年增加 55.0%,每年将有 130 万人死于肝癌,较 2020 年增加 56.4%^[11]。肝癌的发病主要与乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、非酒精性脂肪肝、过量饮酒、代谢综合征、2 型糖尿病、肥胖、吸烟、摄入黄曲霉素污染的食物等相关,约 56%的肝

癌与 HBV 相关,20%与 HCV 相关^[12-14]。但是肝癌发病隐匿,约 50%的肝癌患者被确诊时已到晚期,需采用综合治疗手段^[15]。中医药作为我国的特色治疗方法,在晚期肝癌的综合治疗方案里被广泛应用,已成为参与晚期肝癌全程治疗的重要手段之一^[16-17]。国医大师潘敏求治疗原发性肝癌从“瘀、毒、虚”着手,认为其发生多因脾虚失运,肝失所养,气机不畅,导致水谷精微蕴结成血瘀,长期气滞血瘀,化火成毒,癌毒积聚,出现“瘀毒互结”等邪实症状。肝喜片是凝练总结了国医大师潘敏求数十载临床经验形成的医院制剂,该制剂主要由党参、黄芪、薏苡仁、白术、茯苓、郁金、苏木、煅牡蛎、陈皮、茵陈、木通、大黄、香附、桃仁、沉香、半枝莲、柴胡、败酱草、砂仁、鳖甲、土鳖虫、重楼等组成,具有疏肝健脾、化瘀软坚、清热解毒的作用,临床主要用于肝郁脾虚、瘀毒互结型肝癌患者,临床疗效良好^[18-19]。

EMT 是实体瘤发生侵袭转移的重要原因,肿瘤细胞在肿瘤微环境中诸多细胞因子的调控与刺激下,经由胞内信号转导途径通过 ZEB(ZEB1 和 ZEB2)、Snail(Snail1 和 Snail2)和基本螺旋-环-螺旋(Twist1 和 Twist2)家族 3 个不同的蛋白家族调控相关基因的转录,其过程主要涉及细胞间黏附因子消失、上皮极性丧失、细胞骨架动态重组、基底膜降解等步骤,具体表现为上皮细胞标记物 E-cadherin 表达下调,间充质标记物 N-cadherin、Vimentin 表达增

表 5 肝喜片含药血清对 E-cadherin、Vimentin、ZEB1、ZEB2 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 5 Effects of Ganxi Pill-mediated serum on the protein expressions of E-cadherin, Vimentin, ZEB1, and ZEB2 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量	E-cadherin	Vimentin	ZEB1	ZEB2
空白对照组	15%空白血清	1.011±0.012	1.009±0.001	1.012±0.008	1.002±0.004
肝喜片低剂量组	10%含药血清	1.549±0.127**	0.868±0.016**	0.440±0.026**	0.871±0.002**
肝喜片中剂量组	15%含药血清	3.751±0.334***▲	0.814±0.015***▲	0.157±0.013***▲	0.755±0.042***▲
肝喜片高剂量组	20%含药血清	8.405±0.414***▲◇	0.705±0.025***▲◇	0.095±0.006***▲◇	0.699±0.004***▲◇

注:与空白对照组比较,** $P<0.01$;与肝喜片低剂量组比较,▲ $P<0.01$;与肝喜片中剂量组比较,◇ $P<0.01$ 。

表 6 肝喜片含药血清对 miR200a、E-cadherin、Vimentin、ZEB1、ZEB2 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 6 Effects of Ganxi Pill-mediated serum on the mRNA expressions of miR200a, E-cadherin, Vimentin, ZEB1, and ZEB2 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量	miR200a	E-cadherin	Vimentin	ZEB1	ZEB2
空白对照组	15%空白血清	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
肝喜片低剂量组	10%含药血清	1.321±0.055	1.635±0.078	0.855±0.049	0.490±0.099**	0.750±0.042**
肝喜片中剂量组	15%含药血清	1.589±0.141***▲	2.550±0.283*▲	0.750±0.042***▲	0.315±0.049***▲	0.520±0.042***▲
肝喜片高剂量组	20%含药血清	2.117±0.211***▲◇	3.545±0.488***▲◇	0.385±0.049***▲◇	0.135±0.021***▲◇	0.335±0.021***▲◇

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与肝喜片低剂量组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$;与肝喜片中剂量组比较,◇ $P<0.01$ 。

加^[20-21]。研究表明,ZEB1表达升高可通过上皮间质转化促进肝细胞癌的侵袭和转移,降低肝细胞癌患者的生存率^[22]。miRNA是一种长度为18~22个核苷酸的小的内源性非编码RNA,广泛参与细胞增殖、分化、死亡、凋亡和代谢等生物学过程,与肿瘤的发展密切相关。miRNA在EMT相关的肿瘤转移中发挥至关重要的作用^[3,23]。miR200家族根据种子序列被分为两个簇,miR-200b、miR-200a和miR-429属于簇I,位于1号染色体上,并具有共同的种子序列(AAUACUG),而miR-200c和miR-141属于簇II,位于11号染色体上,它们的种子序列(AACACUG)与簇I的种子序列仅相差一个核苷酸。miR200家族作为常见的抑癌miRNA,是调控EMT的关键因素之一,miR200家族成员可通过靶向降解ZEB1和ZEB2的mRNA,抑制其蛋白表达,缓解EMT恶性表征,抑制包括肝癌、肺癌、乳腺癌等在内的多种恶性肿瘤的转移^[24-25]。

本论文在前期研究基础上,通过实验体外证实,肝喜片含药血清可体外降低HepG2细胞存活率,抑制HepG2细胞的迁移,同时可上调miR200a、E-cadherin的表达,抑制ZEB1、ZEB2、Vimentin的表达,且呈现显著的浓度依赖性。综上,肝喜片可抑制肝癌的转移,其机制可能与调控miR200a/ZEB信号通路、上调E-cadherin的表达、降低Vimentin的表达、逆转EMT及抑制肝癌的增殖迁移相关。

参考文献

- [1] HAN B F, ZHENG R S, ZENG H M, et al. Cancer incidence and mortality in China, 2022[J]. Journal of the National Cancer Center, 2024, 4(1): 47-53.
- [2] BABAEI G, AZIZ S G G, JAGHI N Z Z. EMT, cancer stem cells and autophagy: The three main axes of metastasis[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2021, 133: 110909.
- [3] PAN G T, LIU Y H, SHANG L R, et al. EMT-associated microRNAs and their roles in cancer stemness and drug resistance[J]. Cancer Communications, 2021, 41(3): 199-217.
- [4] PASTUSHENKO I, BLANPAIN C. EMT transition states during tumor progression and metastasis[J]. Trends in Cell Biology, 2019, 29(3): 212-226.
- [5] GEORGAKOPOULOS-SOARES I, CHARTOUMPEKIS D V, KYRIAZOPOULOU V, et al. EMT factors and metabolic pathways in cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2020, 10: 499.
- [6] UHAN S, HAUPTMAN N. Metastatic EMT phenotype is governed by microRNA-200-mediated competing endogenous RNA networks[J]. Cells, 2021, 11(1): 73.
- [7] 陈玲珑, 赵 荻, 彭艳梅. 基于血清非靶向代谢组学研究肝喜片抗肿瘤的作用机制[J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(9): 147-153.
- [8] 罗 燕, 曾普华, 奚剑敏, 等. 肝喜合剂含药血清对人肝癌HepG2细胞增殖和凋亡的影响[J]. 中成药, 2023, 45(4): 1285-1288.
- [9] 何石燕, 英菲雨, 夏 星, 等. 基于Wnt/ β -catenin通路探究对叶百部碱抗卵巢癌的作用机制[J]. 中草药, 2024, 55(17): 5887-5897.
- [10] 韩宇晨, 陈微微, 白 玉, 等. 亚硒酸钠对肺癌细胞迁移和血管生成的影响及其机制探究[J]. 这个病理生理杂志, 2024, 40(9): 1598-1605.
- [11] RUMGAY H, ARNOLD M, FERLAY J, et al. Global burden of primary liver cancer in 2020 and predictions to 2040[J]. Journal of Hepatology, 2022, 77(6): 1598-1606.
- [12] MAUCORT-BOULCH D, DE MARTEL C, FRANCESCHI S, et al. Fraction and incidence of liver cancer attributable to hepatitis B and C viruses worldwide[J]. International Journal of Cancer, 2018, 142(12): 2471-2477.
- [13] VOGEL A, MEYER T, SAPISOCHIN G, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. Lancet, 2022, 400(10360): 1345-1362.
- [14] ZAJKOWSKA M, MROCZKO B. Chemokines in primary liver cancer[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(16): 8846.
- [15] YANG C, ZHANG H L, ZHANG L M, et al. Evolving therapeutic landscape of advanced hepatocellular carcinoma[J]. Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology, 2023, 20(4): 203-222.
- [16] 王 珏, 张春蕾, 汤凯悦, 等. 中医药调控上皮-间质转化抑制肝癌转移的研究进展[J]. 临床肝胆杂志, 2022, 38(11): 2636-2642.
- [17] 朱耀东, 刘 磊, 巴 赫, 等. 中医药参与中晚期原发性肝癌患者综合治疗的临床疗效和安全性分析[J]. 中西医结合肝病杂志, 2023, 33(1): 26-28.
- [18] 邓天好, 曾普华, 刘 珍, 等. 基于“瘀、毒、虚”理论探析潘敏求论治肝癌的学术思想[J]. 中医肿瘤学杂志, 2021, 3(6): 62-66.
- [19] 任迪莎, 唐 蔚, 潘 博, 等. 基于数据挖掘的国医大师潘敏求治疗原发性肝癌的用药规律研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(7): 1152-1156.
- [20] AKHMETKALIYEV A, ALIBRAHIM N, SHAFIEE D, et al. EMT/MET plasticity in cancer and Go-or-Grow decisions in quiescence: The two sides of the same coin?[J]. Molecular Cancer, 2023, 22(1): 90.
- [21] DONG B, LI S Y, ZHU S L, et al. MiRNA-mediated EMT and CSCs in cancer chemoresistance[J]. Experimental Hematology & Oncology, 2021, 10(1): 12.
- [22] SENGEZ B, CARR B I, ALOTAIBI H. EMT and inflammation: Crossroads in HCC[J]. Journal of Gastrointestinal Cancer, 2023, 54(1): 204-212.
- [23] HUANG G L, SUN J, LU Y, et al. MiR-200 family and cancer: From a meta-analysis view[J]. Molecular Aspects of Medicine, 2019, 70: 57-71.
- [24] CAVALLARI I, CICCARESE F, SHAROVA E, et al. The miR-200 family of microRNAs: Fine tuners of epithelial-mesenchymal transition and circulating cancer biomarkers[J]. Cancers, 2021, 13(23): 5874.
- [25] KLICKA K, GRZYWA T M, MIELNICZUK A, et al. The role of miR-200 family in the regulation of hallmarks of cancer[J]. Frontiers in Oncology, 2022, 12: 965231.