

本文引用:陈成,刘毅,许汉林. 土田七醇提物抑制肝癌细胞增殖活性部位筛选及其对肝癌细胞侵袭迁移的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(6): 930-933.

土田七醇提物抑制肝癌细胞增殖活性部位筛选及其对肝癌细胞侵袭迁移的影响

陈成,刘毅,许汉林*

(湖北中医药大学,湖北 武汉 430065)

〔摘要〕目的 筛选土田七醇提物抗肝癌活性部位,并研究其对肝癌 SMMC-7721 细胞和 HepG2 细胞侵袭迁移的影响。方法 采用大孔树脂对土田七醇提物进行洗脱,并采用 CCK-8 法检测不同洗脱部位对肝癌细胞增殖的影响;建立荷瘤小鼠模型,通过瘤体质量变化评价不同洗脱部位的体内抗肿瘤作用;采用 Transwell 侵袭实验和细胞划痕实验检测肝癌细胞侵袭迁移能力。结果 土田七醇提物的大孔树脂不同洗脱部位均有抑制肝癌细胞增殖的作用,并可抑制裸鼠肿瘤的生长,其中 70%洗脱部位的效果最好。Transwell 侵袭实验和细胞划痕实验结果显示,70%洗脱部位可抑制肝癌细胞侵袭和迁移过程。结论 土田七醇提物的大孔树脂 70%洗脱部位抗肝癌活性最好,并可抑制肝癌细胞侵袭迁移能力。

〔关键词〕 土田七;肝癌;醇提物;活性部位;侵袭;迁移

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2022.06.010

Screening of active fractions from the alcohol extract of *Stahlianthus involucratus* and its effect on invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells

CHEN Cheng, LIU Yi, XU Hanlin*

(Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan, Hubei 430065, China)

〔Abstract〕 Objective To screen the anti-hepatocellular carcinoma active fractions from the alcohol extract of *Stahlianthus involucratus*, and investigate its effect on invasion and migration of SMMC-7721 and HepG2. **Methods** The alcohol extract of *Stahlianthus involucratus* was eluted by macroporous adsorbents, followed by the CCK-8 to investigate the hepatocellular carcinoma cell proliferation treated by the different fractions. The tumor bearing mouse model was established and used to screen the antitumor effect in vivo with different fractions by the changes of the weight of tumor mass. The invasion and migration abilities of hepatocellular carcinoma cells were detected by Transwell chamber assay and scratch assay. **Results** Different fractions of macroporous adsorbents from alcohol extract of *Stahlianthus involucratus* can inhibit the multiplication of hepatocellular carcinoma cells and inhibit the growth of tumor in nude mice. Among them, the fraction eluted with 70% ethanol has the best effect. Both Transwell chamber assay and scratch assay results showed that the fraction eluted with 70% ethanol can inhibit the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. **Conclusion** The 70% elution fraction of macroporous adsorbents from alcohol extract of *Stahlianthus involucratus* has the best anti-liver cancer activity, which also could inhibit the invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells.

〔Keywords〕 *Stahlianthus involucratus*; hepatocellular carcinoma; alcohol extract; active fraction; invasion; migration

肝癌是我国临床上常见的恶性肿瘤之一,由于其具有极强的侵袭转移能力,导致中晚期肝癌的死亡

率仍然居高不下^[1-5]。研究表明,约 60%以上的患者在接受手术治疗后的 5 年内会出现复发和转

〔收稿日期〕 2021-12-21

〔基金项目〕 湖北中医药大学“青苗计划”项目(2017ZZX002)。

〔第一作者〕 陈成,男,高级实验师,研究方向:药物分析。

〔通信作者〕 *许汉林,男,教授,博士研究生导师, E-mail: 952817047@qq.com。

移^[6-9]。因此,探索抑制肝癌细胞侵袭迁移能力的方法是当前肝癌研究的热点之一,而姜科药用植物在抗肿瘤研究中的进展给人们提供了新的思路和策略。

土田七是姜科土田七属植物土田七[*Stahlianthus involucratus* (King ex Bak.) Craib]的干燥块根和根茎,中医学认为其具有活血止血、消肿散瘀的功效^[10-11]。现代研究表明,土田七对多种类型的肿瘤细胞具有抑制和杀伤作用^[12-14]。但目前土田七对肝癌 SMMC-7721 和 HepG2 细胞侵袭迁移的影响尚未见报道。本实验通过体内外抗肝癌药理试验,筛选出土田七醇提物抗肝癌活性最强的大孔树脂洗脱部位,并观察其对肝癌细胞侵袭迁移的影响,为土田七抗癌作用的研究提供实验基础和研究依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 细胞株与实验动物 肝癌细胞株 SMMC-7721 (上海翼和应用生物技术有限公司,批号:20180412-01)和 HepG2 (上海信裕生物科技有限公司,批号:XY0022)。昆明小鼠(雄性,4~6周;体质量 18~22 g),购自湖北省实验动物研究中心。动物生产许可证号:SCXK(鄂)2015-0018。

1.1.2 药材与试剂 药材购自云南省文山州,经湖北中医药大学的陈科力教授鉴定为土田七[*Stahlianthus involucratus* (King ex Bak.) Craib]。姜黄素标准品(上海源叶生物科技有限公司,纯度 $\geq 98\%$,货号:B20614);DMEM 细胞培养基(美国 HyClone 公司,批号:8118269);胎牛血清(武汉四季青生物制品公司,批号:18040502);胰蛋白酶消化液(美国 Gibco 公司,批号:2323527);PBS (美国 HyClone 公司,批号:AG29574691);Annexin V -FITC/PI 检测试剂盒(上海贝博生物技术公司,批号:BB21061);Matrigel 基质胶(美国 BD 公司,批号:7156009)。

1.1.3 主要仪器 SW-CJ-2G 型超净工作台(苏州净化工作台设备有限公司);INCO108 型二氧化碳培养箱(德国 Memmert 公司);xMark 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);L530R 型低温离心机(湖南湘仪离心机有限公司);D2060R 型流式细胞仪(艾森生物有限公司);CKX53 型倒置相差显微镜(Olympus 公司)。

1.2 方 法

1.2.1 土田七醇提物的制备 称取洗净的土田七 1 kg,粉碎过筛,75%乙醇加热回流提取 3 次,合并提取液,过滤浓缩,冷干成粉备用。

1.2.2 大孔树脂柱各洗脱部位的制备 称取 D101 大孔吸附树脂适量,预处理后,湿法装柱。将土田七醇提物用适量水溶解,上样。依次用水溶液、30%乙醇溶液、70%乙醇溶液、95%乙醇溶液进行洗脱。收集各洗脱液,并减压浓缩至干粉状。各乙醇洗脱部位以 DMSO 复溶后,制成 0.1 g/mL(以提取物计)的原液,0.22 μm 滤膜过滤,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.3 检测土田七各洗脱部位对肝癌细胞增殖的影响 取对数期生长的 SMMC-7721 细胞、HepG2 细胞,调整细胞浓度为 $5\times 10^4/\text{mL}$,每孔 100 μL 加入 96 孔板中,置于培养箱(37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2)中培养 24 h。将细胞随机分组,姜黄素组和 30%、70%、95%乙醇洗脱组分别设置 5 个不同给药浓度(20、40、60、80、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$),同时设置阴性对照组(含细胞,加入等体积培养基)和空白对照组(不含细胞,只含培养基),每组复孔 5 个。加药后继续培养 24 h。药物处理结束后,加入含 10% CCK-8 试剂的细胞培养基,混匀后置于培养箱中继续培养 3 h,在 450 nm 波长下检测各培养孔的吸光度(A)值,并计算肝癌细胞的细胞活力[细胞活力=($A_{\text{给药组}}-A_{\text{空白组}}$)/($A_{\text{对照组}}-A_{\text{空白组}}$) $\times 100\%$]。

1.2.4 肝癌细胞移植瘤小鼠模型的建立及分组给药

取对数期生长的 SMMC-7721 细胞悬液和 HepG2 细胞悬液,分别调整细胞浓度为 $1\times 10^6/\text{mL}$,每只小鼠腹腔注射 0.2 mL。培养 5~7 d 后,无菌条件下抽取小鼠腹水,调整细胞悬液浓度为 $2\times 10^6/\text{mL}$,每只小鼠 0.2 mL 接种至右腿皮下部位。接种完成后,按随机原则将两种肝癌细胞的已成模小鼠各分为 5 组,每组 6 只。分组情况如下:空白对照组、姜黄素组及 30%、70%、95%乙醇洗脱组。空白对照组给予生理盐水灌胃,0.5 mL/d;姜黄素组和各乙醇洗脱组给药剂量均为 100 mg/(kg·d),连续灌胃给药 14 d。给药结束后,完整剥离小鼠的皮下移植瘤,并称取肿瘤质量。

1.2.5 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力 将基质胶用不含血清的培养基稀释,加入 Transwell 小室,于培养箱中静置 1 h 使基质胶凝固。取药物预先处理 24 h 的肝癌细胞,调整细胞浓度为 $2\times 10^5/\text{mL}$,均匀接种至 Transwell 小室中。小室中加入 600 μL 的含血清培养基,培养 24 h 后,取出小室,清洗 2~3 次,用 4%多聚甲醛固定细胞 20 min,将小室浸泡在结晶紫染液中染色 10 min,再次清洗并擦去上室内残留的细胞。晾干后,倒置显微镜下拍照,200 倍下随机选取 5 个视野进行细胞计数。

1.2.6 划痕实验检测细胞迁移能力 取对数生长期的肝癌细胞制成细胞悬液,并接种于6孔板,每孔 5×10^5 个细胞,待细胞覆盖率达90%时,用 $10 \mu\text{L}$ 移液枪枪头垂直于孔板画线。用PBS清洗2~3次,洗掉悬浮的细胞。加入含有药物的培养基,在培养箱中继续培养,于0 h和24 h时,在倒置显微镜下观察并拍照。划痕面积=(0 h空白对照组划痕面积减号24 h给药组划痕面积)/(0 h空白对照组划痕面积) $\times 100\%$ 。

1.2.7 统计学分析 使用GraphPad Prism 7 7 统计软件进行分析,计量资料数据以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,两组间的比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 大孔树脂柱各洗脱部位抑制肝癌细胞增殖

测定各给药组的细胞活力,结果见图1。各洗脱部位中,70%乙醇洗脱组抑制肝癌细胞增殖的效果最佳,且存在显著的量效关系。70%乙醇洗脱组与姜黄素组相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),与30%、95%乙醇洗脱组相比较,存在显著性差异($P < 0.01$)。

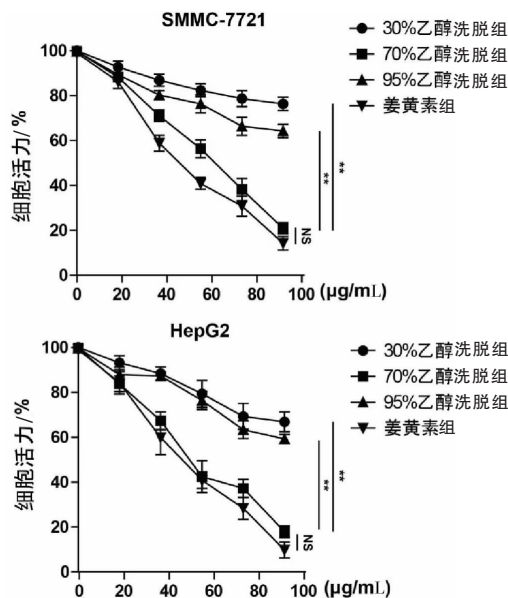


图1 大孔树脂柱各洗脱部位抑制肝癌细胞增殖的作用

注:与70%乙醇洗脱部位比较,** $P < 0.01$ 。

2.2 大孔树脂柱各洗脱部位对小鼠移植瘤生长的影响

比较各给药组的瘤重,结果见图2。在SMMC-7721模型组中,70%乙醇洗脱组与空白对照组比较,平均瘤重有显著性差异($P = 0.0238$);95%乙醇洗脱组与空白对照组比较,平均瘤重有显著性差异($P = 0.0314$)。在HepG2模型组中,70%乙醇洗脱

组与空白对照组比较,平均瘤重有显著性差异($P = 0.0324$);95%乙醇洗脱组与空白对照组比较,平均瘤重有显著性差异($P = 0.0388$)。与空白对照组相比较,30%乙醇洗脱部位对小鼠的瘤重无明显影响。

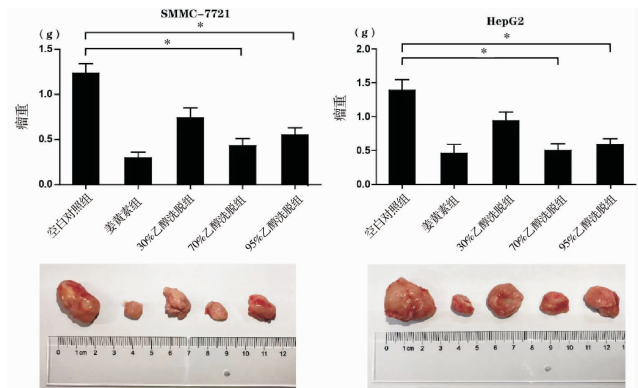


图2 不同给药组的瘤重分布

注:与空白对照组比较,* $P < 0.05$ 。

2.3 土田七抗肝癌活性部位对肝癌细胞侵袭能力的影响

Transwell 侵袭实验发现,用70%乙醇洗脱部位($20 \mu\text{g/ml}$)处理肝癌SMMC-7721和HepG2细胞24 h后,与空白对照组相比,土田七能明显降低肝癌SMMC-7721和HepG2细胞侵袭的能力。详见图3。

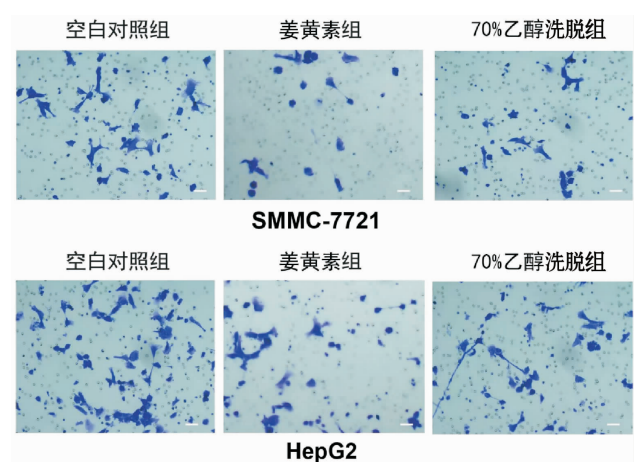


图3 土田七70%乙醇洗脱部位抑制肝癌细胞的侵袭

(比例尺=50 μm)

2.4 土田七抗肝癌活性部位对肝癌细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示,与对照组相比,70%乙醇洗脱组($20 \mu\text{g/ml}$)对肝癌SMMC-7721和HepG2细胞的迁移能力具有明显的抑制作用。在SMMC-7721模型组中,70%乙醇洗脱组与空白对照组比较,划痕面积有显著性差异($P = 0.0385$)。在HepG2模型组中,70%乙醇洗脱组与空白对照组比较,划痕面积有显著性差异($P = 0.0213$);详见图4。

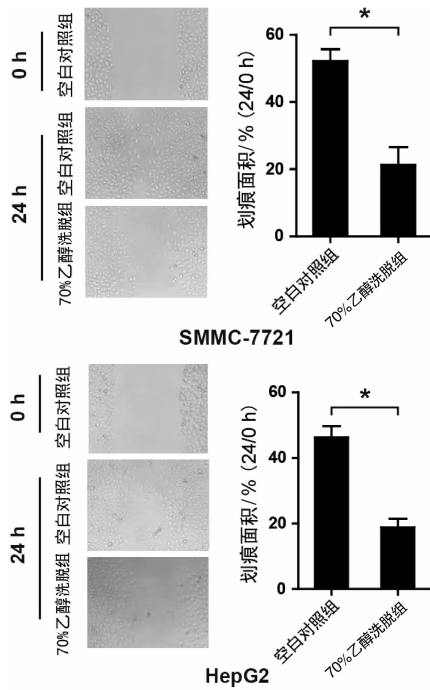


图4 划痕实验检测土田七70%乙醇洗脱部位对肝癌细胞迁移能力的影响

注:与空白对照组相比较,* $P < 0.05$ 。

3 讨论

临床上,手术治疗依然是提高肝癌治疗效果的主要手段,但除少数早期患者外,大部分患者因为肝癌细胞的转移而失去了手术机会。即便接受了手术治疗,在后期也有较大概率发生转移及复发,导致患者的5年存活率尚不及30%^[15-20]。鉴于此,对能够抑制肝癌侵袭迁移的药物进行探索和研究具有重要的现实意义。本研究通过体内外抗肿瘤实验对土田七醇提物的大孔树脂洗脱部位进行了活性筛选,通过实验数据的分析,发现70%乙醇洗脱部位的抗肿瘤活性最佳,其次是95%乙醇洗脱部位,30%乙醇洗脱部位则无明显的抗肿瘤效果。因此,本实验以70%乙醇洗脱部位为基础,进一步探究其是否具有抑制肝癌细胞侵袭迁移的能力。为了排除药物通过诱导细胞凋亡对侵袭迁移的影响,此次采用了对肝癌细胞增殖率影响较小的药物浓度(20 $\mu\text{g/mL}$)进行了后续的Transwell侵袭实验和细胞划痕实验。实验结果表明,70%乙醇洗脱部位对两种人肝癌细胞株SMMC-7721和HepG2的侵袭迁移能力均具有显著的抑制作用。本研究为姜科植物土田七的开发利用和肝癌的临床治疗提供了实验依据和理论基础,随着研究的深入,土田七在肝癌的临床防治上将会有更广泛的作用。

参考文献

[1] 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: global cancer statistics 2018[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2018, 68(6): 394-424.

- [2] 安 澜,曾红梅,郑荣寿,等.2015年中国肝癌流行情况分析[J].中华肿瘤杂志,2019,41(10):721-727.
- [3] EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER ELECTRONIC ADDRESS: EASLOFFICE@EASLOFFICE.EU, EUROPEAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF THE LIVER. EASL clinical practice guidelines: Management of hepatocellular carcinoma[J]. Journal of Hepatology, 2018, 69(1): 182-236.
- [4] 黄 成,孙惠川.中晚期肝癌的根治之路:转化治疗[J].临床外科杂志,2021,29(11):1008-1011.
- [5] LI D, YU T, HU J J, et al. Downregulation of CYP39A1 serves as a novel biomarker in hepatocellular carcinoma with worse clinical outcome[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2021, 2021: 5175581.
- [6] CHEN W Q, ZHENG R S, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: a Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2): 115-132.
- [7] AL-SALAMA Z T, SYED Y Y, SCOTT L J. Lenvatinib: A review in hepatocellular carcinoma[J]. Drugs, 2019, 79(6): 665-674.
- [8] MOSENTA M, BUSATO D, BABOCI L, et al. New insight into therapies targeting angiogenesis in hepatocellular carcinoma [J]. Cancers, 2019, 11(8): E1086.
- [9] 孙 萌,邵 亮,刘 攀,等.姜黄素联合顺铂对 HepG2 肝癌细胞增殖、凋亡、迁移及侵袭的影响[J].中华实验外科杂志,2017,34(5): 774-776.
- [10] 高江云,夏永梅,黄加元,等.中国姜科花卉[M].北京:科学技术出版社,2006:107.
- [11] 国家中医药管理局《中华本草》编委会.中华本草,第8册,24卷[M].上海:上海科技出版社,1999:6231.
- [12] 曾立威,唐春燕,徐 勤.三七姜挥发油成分的GC-MS分析与体外抗肿瘤活性研究[J].华夏医学,2017,30(4):33-38.
- [13] 于 政,郑雪绒,赵亚宁,等.姜三七对子宫肌瘤大鼠子宫组织细胞凋亡及 Bcl-2、Bax 蛋白表达的影响[J].现代生物医学进展, 2017,17(35):6921-6924,6991.
- [14] 骆宇桑.土田七抗肿瘤作用及其机制研究[D].武汉:湖北中医药大学,2020.
- [15] CERVELLO M, EMMA M R, AUGELLO G, et al. New landscapes and horizons in hepatocellular carcinoma therapy[J]. Aging, 2020, 12(3): 3053-3094.
- [16] CHEN Z Q, XIE H, HU M M, et al. Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma[J]. American Journal of Cancer Research, 2020, 10(9): 2993-3036.
- [17] 王润兮,刘培民,高剑锋.中西医治疗原发性肝癌的研究进展[J].中医临床研究,2020,12(33):56-60.
- [18] 何正阳,商斌仪,余为民,等.中药联合 TACE 治疗原发性肝癌疗效的系统评价[J].肝脏,2020,25(12):1262-1268,1281.
- [19] 郭 丽,赵 虹,张俊涛,等.白花丹素通过调控 Wnt 信号通路抑制肝癌 MHCC97-H 细胞增殖、迁移和侵袭[J].中国老年学杂志, 2021,41(24):5635-5639.
- [20] HIRAOKA A, KUMADA T, KUDO M, et al. Hepatic function during repeated TACE procedures and prognosis after introducing sorafenib in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: Multicenter analysis [J]. Digestive Diseases (Basel, Switzerland), 2017, 35(6): 602-610.