

• 实验研究 •

半枝莲乙醇提取物对高低转移性肝细胞癌 细胞生长和侵袭的影响*

王倩 陈亭亭 王守梅 张树辉

上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院, 上海 200437

摘要:目的: 研究半枝莲乙醇提取物对肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC) 细胞生长、迁移和侵袭的影响及其机制。方法: 实验选用高、低转移性 HCC 细胞系 MHCC-97H 和 MHCC-97L, 采用不同浓度(0.25 g·L⁻¹、0.5 g·L⁻¹、1.0 g·L⁻¹、2.0 g·L⁻¹ 和 3.0 g·L⁻¹) 的半枝莲乙醇提取物进行干预, 筛选出 50% 最大抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 作为后续实验浓度, CCK-8 实验和平板克隆实验测定细胞增殖情况; 流式细胞术检测细胞周期、细胞凋亡及 EpCAM⁺ 和 CD133⁺ 细胞比例; 细胞划痕实验评估细胞迁移率; Transwell 小室迁移和侵袭实验评估细胞迁移抑制率和侵袭抑制率; 细胞成球实验测定肿瘤细胞的干细胞特性; Western Blot 检测 CyclinD1、P27、Bcl-2、Vimentin、Ki-67、Bax、E-cadherin 蛋白表达水平。将 16 只 SPF 级 4 周龄雄性 BALB/c 裸鼠分为半枝莲乙醇提取物组(0.97 g·kg⁻¹) 和对照组, 每组 8 只, 于裸鼠左侧腋窝皮下注射 100 μL(2×10⁶ 个) MHCC-97H 细胞, 待移植瘤直径 >0.5 cm 开始给药治疗, 对照组给予 0.9% 生理盐水灌胃, 隔 5 天评估移植瘤体积变化; 给药 35 d 后 HE 染色检测移植瘤的形态变化及移植瘤肝、肺转移情况; 免疫组织化学染色检测 Ki-67 蛋白表达水平。结果: 2.0 g·L⁻¹ 为半枝莲乙醇提取物的最佳干预浓度。与对照组比较, 半枝莲乙醇提取物可明显抑制 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞增殖, 明显减少 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞克隆数目, G₀/G₁ 期细胞比例显著增加, S 期和 G₂/M 期细胞比例显著减少, 细胞凋亡率显著升高, 细胞划痕愈合进程明显减缓, 细胞迁移和侵袭数目明显减少, 细胞成球体积明显变小, 细胞成球数目、球体形成率及 EpCAM⁺ 与 CD133⁺ 细胞比例明显降低, Cyclin D1、Bcl-2、Ki-67、Vimentin 蛋白表达水平明显降低, P27、Bax、E-cadherin 蛋白表达水平明显升高, 差异均具有统计学意义(P < 0.05)。与对照组比较, 半枝莲乙醇提取物组裸鼠 MHCC-97H 细胞移植瘤体积明显缩小, 瘤质量及 Ki-67 蛋白表达水平明显降低; 肝、肺组织形态学检查显示, 半枝莲乙醇提取物组大鼠的癌转移灶大小和数目明显降低, 差异均具有统计学意义(P < 0.05)。移植瘤组织形态学检查显示, 对照组肿瘤细胞呈弥漫致密排列、有不同程度有丝分裂活性; 半枝莲乙醇提取物组肿瘤组织可见明显的细胞坏死和凋亡。结论: 半枝莲乙醇提取物可通过抑制细胞增殖、阻滞细胞周期进程、促进肝癌细胞凋亡、调控上皮间质转化和干细胞特性相关基因表达抑制肝癌细胞生长和侵袭。

关键词: 半枝莲乙醇提取物; 肝细胞癌; 上皮间质转化; 干细胞特性; 细胞凋亡; 细胞侵袭; 裸鼠

DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2023.03.097

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-8999(2023)03-0584-11

Effects of Banzhilian (Scutellaria Barbata) Extract on Growth and Invasion of High and Low Metastatic Hepatocellular Carcinoma Cells

WANG Qian, CHEN Tingting, WANG Shoumei, ZHANG Shuhui

Integrative Medicine Hospital of Yueyang, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, China 200437

Abstract: Objective: To study the effect of Scutellaria barbata ethanol extract on the growth, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells.

* 基金项目: 国家自然科学基金项目(81172311); 上海中医药大学中西医结合 I 类高原学科项目(30304114325)

• 584 •

lar carcinoma (HCC) cells and its mechanism. Methods: In the experiment high and low metastatic HCC cell lines MHCC-97H and MHCC-97L were selected, and the ethanol extracts of *Scutellaria barbata* with different concentrations ($0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ and $3.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) were used for intervention, and 50% maximum inhibitory concentration (IC₅₀) was selected as the subsequent experimental concentration. The cell proliferation was determined by CCK-8 experiment and plate cloning experiment; Cell cycle, apoptosis and the ratio of EpCAM and CD133 cells were detected by flow cytometry; Cell migration rate was evaluated by cell scratch test; Transwell cell migration and invasion experiments were used to evaluate the inhibition rate of cell migration and invasion; The stem cell characteristics of tumor cells were determined by cell spheroidization test; Western blot was used to detect the expression level of cyclinD1, P27, Bcl-2, Vimentin, Ki-67, Bax, E-cadherin protein. Sixteen SPF grade 4-week-old male BALB/c nude mice were divided into *scutellaria barbata* ethanol extract group ($0.97 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) and control group, with 8 in each group, and 100 were injected subcutaneously into the left armpit of the nude mice (2×10^6) MHCC-97H cells, after the diameter of the transplanted tumor was more than 0.5 cm, the drug treatment was started. The control group was given 0.9% normal saline by gavage, and the volume change of the transplanted tumor was evaluated every 5 days; After 35 days of administration, HE staining was used to detect the morphological changes and liver and lung metastasis of the transplanted tumor; The expression level of Ki-67 protein was detected by immunohistochemical staining. Results: $2.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ is the best intervention concentration of ethanol extract of *Scutellaria barbata*. Compared with the control group, the ethanol extract of *Scutellaria barbata* can significantly inhibit the proliferation of MHCC-97H and MHCC-97L cells, significantly reduce the number of MHCC-97H and MHCC-97L cell clones, significantly increase the proportion of G₀/1 phase cells, significantly reduce the proportion of S phase and G₂/M phase cells, significantly increase the rate of apoptosis, significantly reduce the process of cell scratch healing, the number of cell migration and invasion, significantly reduce the volume of cell spherulation, the number of cell spherulation. The spheroid formation rate and the ratio of EpCAM⁺ to CD133⁺ were significantly decreased, the expression level of cyclinD1, Bcl-2, Ki-67, and Vimentin protein was significantly decreased, and the expression level of P27, Bax, and E-cadherin protein was significantly increased, the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the volume of transplanted MHCC-97H cells in the *scutellaria barbata* ethanol extract group was significantly shortened ($P < 0.05$), and the tumor mass and Ki-67 protein expression level were significantly decreased ($P < 0.05$). Histomorphological examination of liver and lung showed that the size and number of tumor metastasis in the ethanol extract group of *Scutellaria barbata* significantly decreased ($P < 0.05$). Histomorphological examination of the transplanted tumor showed that the tumor cells in the control group were densely distributed and had mitotic activity in different degrees; The tumor tissue in the ethanol extract group of *Scutellaria barbata* showed obvious cell necrosis and apoptosis. Conclusion: The ethanol extract of *Scutellaria barbata* can inhibit the growth and invasion of hepatoma cells by inhibiting cell proliferation, blocking the process of cell cycle, promoting the apoptosis of hepatoma cells, regulating the epithelial-mesenchymal transformation and the expression of genes related to stem cell characteristics.

Key words: ethanol extract of *Banzhilian* (*Scutellaria barbata*); hepatocellular carcinoma; epithelial-mesenchymal transformation; stem cell characteristics; cell apoptosis; cell invasion; nude mouse

原发性肝癌是我国第4位常见恶性肿瘤及第2位致死肿瘤,严重威胁人民的生命安全和健康,其中75%~85%原发性肝癌为肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC),常由慢性乙型或丙型肝炎病毒感染所致^[1]。大多数HCC在中晚期才被确诊,选择合理和规范化的多学科综合治疗可获得最佳疗效^[2]。肝癌以气血亏虚为本,肝失疏泄为基本病机,气血湿热瘀毒互结为标,蕴结于肝,渐成症积, HCC不同病期分别采用疏肝理气、活血化瘀、清热解毒等扶正祛邪、标本兼治的辨证论治法恢复肝主疏泄之功能,使气血流畅,祛湿热瘀毒之邪,对控制症状、提高免疫力、预防复发转移及提高生存质量等优势明显。以

往研究显示,清热解毒药半枝莲在原发性肝癌的治疗中使用频率较高^[3-5]。半枝莲为唇形科黄芩属植物半枝莲的全草,具有清热解毒、散肿消痈等功效。药理学及临床研究表明,半枝莲及其活性成分具有良好的抗肿瘤作用,常用于肺癌、乳腺癌、胃癌、肝癌、结直肠癌等恶性肿瘤的治疗^[6-9]。本研究采用高、低转移性HCC细胞系MHCC-97H和MHCC-97L探究半枝莲乙醇提取物对细胞增殖、迁移和侵袭的抑制作用,并分析其作用机制。

1 材料

1.1 动物及细胞株 SPF级4周龄雄性BALB/c

裸鼠 16 只, 体质量 18 ~ 20 g, 购自上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司, 动物生产许可证号: 20180003007216。所有小鼠均饲养于恒温(25 ± 2) °C, 湿度 50% ~ 60% 的 SPF 环境中, 高压灭菌后的水和饲料随意进食。所有实验方案均按照实验动物治疗和使用委员会的指南进行, 并获得上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院伦理委员会批准, 伦理批准号: YYLAC - 2019 - 036 - 4 - 2。人高、低转移性 HCC 细胞株 MHCC - 97H 和 MHCC - 97L 购自北京北纳创联生物技术研究院。

1.2 试剂 半枝莲(产地: 浙江, 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院药剂科, 货号: 0306901); 5 - 氟尿嘧啶(美国 MCE 公司, 货号: HY - 90006, 规格: 1 g/瓶); DMEM 高糖型培养基(美国 Hyclone 公司, 货号: SH30243. 01); 胎牛血清(美国 GIBCO 公司, 货号: 16000 - 044); 青链霉素混合液、结晶紫、RNase A(北京索莱宝科技有限公司, 货号: P1400 - 100、C8470、R8020 - 25); CCK - 8 试剂盒(美国 Signalway Antibody 公司, 货号: CP002); BCA 蛋白定量试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 货号: PICPI23223); PI 染液(上海七海复泰生物科技有限公司, 货号: C001 - 200); Annexin V - FITC 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司, 货号: C1063); CD133、EpCAM 抗体(美国 Invitrogen 公司, 货号: 11 - 1339 - 42、A15782); CycinD1、P27 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: 2922、3686); Bcl - 2、Bax、Ki - 67 抗体(英国 Abcam 公司, 货号: Ab194583、Ab32503、Ab209897); E - cadherin、GAPDH 抗体(美国 Proteintech 公司, 货号: 20874 - 1 - AP、60004 - 1 - Ig); Vimentin 抗体(英国 Affinity 公司, 货号: AF0292); 二抗(上海誉源有限公司, 货号: 70678)。

1.3 仪器 精密电子天平(德国 Sartorius 公司, 型号: CP225D); 高速离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司, 型号: TDZ4 - WS); CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 型号: Thermo Forma 3111); 酶标分析仪(北京普朗新公司, 型号: DNM - 9602); 显微镜(上海蔡康光学仪器有限公司, 型号: XDS - 500C); Transwell 小室(美国 COSTAR 公司, 型号: 3422); 流式细胞仪(美国 BD 公司, 型号: Accuri C6); 凝胶成像系统(上海天能生命科学有限公司, 型号: 5200); Leica 石蜡切片机、全自动免疫组织化学仪(德国 Leica 公司, 型号: RM2235、Bond

Max)。

2 方法

2.1 药物的制备 参考文献[10]介绍的方法制备半枝莲乙醇提取物, 取半枝莲 1 000 g, 按 1 g : 10 mL 的固液比加入体积分数 70% 乙醇, 加热回流提取 3 次, 过滤后合并滤液, 60 °C 真空干燥 3 d, 最后减压浓缩得到粉末, 将得到的粉末制成浓度为 100 g · L⁻¹ 的半枝莲乙醇提取物储备液, 4 °C 冰箱备用。

2.2 细胞培养 人高、低转移性 HCC 细胞株 MHCC - 97H 和 MHCC - 97L 复苏后置于含 100 U · mL⁻¹ 青链霉素混合液和 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 5% CO₂、37 °C 的培养箱中传代培养。

2.3 CCK - 8 实验 取 MHCC - 97H 和 MHCC - 97L 细胞, 制成 3 × 10⁴ mL⁻¹ 的细胞悬液, 接种于 96 孔培养板中, 每孔 100 μL, 置于 5% CO₂、37 °C 培养箱中培养过夜, 每孔加入 100 μL 不同浓度(0.25 g · L⁻¹、0.5 g · L⁻¹、1.0 g · L⁻¹、2.0 g · L⁻¹ 和 3.0 g · L⁻¹) 的半枝莲乙醇提取物, 对照组加入等体积完全培养液, 每组 3 个复孔, 分别处理 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 后弃培养液, 每孔加入 100 μL 含 10% CCK - 8 溶液的无血清必需培养基, 5% CO₂、37 °C 培养箱中孵育 1 h 后, 采用酶标仪检测 450 nm 波长处的吸光度值(optical density, OD), 计算细胞生长抑制率。以 50% 最大抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 作为半枝莲乙醇提取物组的实验浓度进行后续实验。根据实验设计, 后续实验设对照组、半枝莲乙醇提取物组和 5 - 氟尿嘧啶组(10 mg · L⁻¹)。

细胞生长抑制率 = (1 - 实验组 OD 值/对照组 OD 值) × 100%

2.4 平板克隆实验 取 MHCC - 97H 和 MHCC - 97L 细胞, 制成 3 × 10³ mL⁻¹ 的单细胞悬液, 接种于 37 °C 培养皿中, 每皿 1 mL, 培养 24 h。按照 2.3 项所述进行分组及给药, 每组 3 个复孔, 5% CO₂、37 °C 培养箱中继续培养 2 周, 每隔 3 d 换液 1 次并观察细胞状态, 克隆完成后, PBS 洗涤 2 次, 4% 甲醛固定 15 min, 加 1% 结晶紫染色 30 min, 流水冲洗、干燥, 显微镜下观察并按文献介绍的方法计算细胞克隆形成率^[11]。

2.5 细胞周期和凋亡实验 取 MHCC - 97H 和

MHCC-97L细胞制成 $3 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的单细胞悬液,分别接种在6孔板中,每孔1 mL,培养24 h。按照2.3项所述进行分组及给药,每组3个复孔,继续培养72 h后。细胞周期实验:胰酶消化细胞,离心5 min后,PBS洗涤2次,加入 -20°C 预冷的无水乙醇700 μL ,于 4°C 固定24 h,继续离心5 min,PBS重悬细胞,加入浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的RNase A溶液100 μL ,重悬沉淀细胞,避光下 37°C 温浴30 min,每管加入浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的PI溶液400 μL ,避光下 4°C 孵育10 min,进行流式细胞术检测和分析。细胞凋亡实验:胰酶消化细胞,离心5 min后,PBS洗涤2次,计数 10×10^4 个重悬细胞,离心5 min,弃上清,分别加入195 μL Annexin V和5 μL FITC结合液混匀,避光下 4°C 孵育15 min;再加入PI染色液5 μL 混匀,避光下 4°C 孵育5 min,进行流式细胞术检测和分析。

2.6 细胞划痕、Transwell 迁移和侵袭实验 根据文献^[12]记载的方法进行实验。细胞划痕实验:取对数生长期 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞,胰酶消化后计数 8×10^5 个细胞接种于培养皿中,细胞分组同2.3项所述,培养24 h后弃培养液,用枪头划去皿中细胞,PBS冲洗,按实验分组给药处理后,置于 37°C 培养箱中培养24 h。分别在划痕0 h、24 h取出培养皿,在倒置显微镜下拍照,使用Image J软件测量划痕面积和宽度,计算细胞迁移率。细胞 Transwell 小室迁移和侵袭实验:先将 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞进行血清饥饿培养24 h,在各组 Transwell 小室的上室中加入细胞密度为 $2 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液0.3 mL(侵袭实验另需在小室的上室中加入80 μL 基质胶),分组同2.3项所述,对照组在 transwell 小室的下室中加入0.7 mL含10% FBS的完全培养液;半枝莲乙醇提取物组在 transwell 小室的下室中加入0.7 mL含 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 半枝莲乙醇提取物和10% FBS的完全培养液;5-氟尿嘧啶组在 transwell 小室的下室中加入0.7 mL含 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 5-氟尿嘧啶和10% FBS的完全培养液, 37°C 培养72 h后甲醛固定,结晶紫染色后PBS洗涤,晾干,显微镜下计数迁移细胞数和侵袭细胞数。

细胞迁移率 = (1 - 24 h 划痕宽度 / 0 h 划痕宽度) $\times 100\%$

2.7 细胞成球实验 取 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞,制成 $1 \times 10^4 \text{ mL}^{-1}$ 的细胞悬液,接种于96

孔培养板中,每孔100 μL ,每组3个复孔,按2.3项所述进行分组给药后,用无血清成球培养基培养14 d,期间每隔3 d换液1次,观察细胞成球状态,并计算球体形成率。

球体形成率 = (成球细胞数 / 接种细胞数) $\times 100\%$

2.8 干细胞标记 EpCAM⁺ 和 CD133⁺ 细胞比例检测 取 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞,按2.3项所述进行实验分组给药后计数($5 \sim 10$) $\times 10^4$ 个重悬细胞,加入200 μL PBS、5 μL EpCAM 和5 μL CD133 抗体混匀, 4°C 避光30 min,随即进行流式细胞仪检测并分析结果。

2.9 Western Blot 检测 按2.3项所述进行实验分组给药后,参考文献的方法提取 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞蛋白质^[11],用 BCA 蛋白试剂盒测定蛋白浓度,制备 PAGE 胶、上样和电泳、转膜,用5%脱脂奶粉封闭,加一抗 CyclinD1、P27、Bcl-2、Vimentin、Ki-67(稀释比例为1:1 000)、Bax(稀释比例1:2 000)、E-cadherin(稀释比例1:5 000)、GAPDH(稀释比例1:8 000)和膜 4°C 孵育过夜, TBST 洗膜,加二抗(稀释比例1:10 000)与膜 37°C 孵育1 h,洗膜后加入配制的 ECL 发光液,放入凝胶成像系统检测蛋白表达,再用灰度分析软件进行结果分析。

2.10 裸鼠成瘤实验 将16只 BALB/C 裸鼠分为半枝莲乙醇提取物组和对照组,每组8只。在每只裸鼠左侧腋窝皮下注射100 μL (约 2×10^6 个) MHCC-97H 细胞,SPF 级条件下饲养,按文献介绍的方法^[11],每日观察裸鼠及移植瘤情况,待移植瘤直径 $>0.5 \text{ cm}$ 时开始给药治疗,给药剂量参考文献^[9],半枝莲乙醇提取物组灌胃给予 $0.97 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的半枝莲乙醇提取物溶液,对照组每天灌胃给予2.0 mL的 $9 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 生理盐水,隔5 d记录移植瘤的长径(a)和短径(b),计算移植瘤的体积(体积 = $1/2 \times a \times b^2$)^[9]。灌胃35 d后处死裸鼠,取出肿瘤、肝和肺组织置于10%中性甲醛液固定。

2.11 形态学和免疫组织化学检查 将移植瘤、肝和肺组织进行取材,常规石蜡包埋 $3 \sim 5 \mu\text{m}$ 厚石蜡切片行 HE 染色和 Ki-67 免疫组织化学染色。免疫组化染色在全自动免疫组织化学仪中进行。显微镜下进行形态学观察,免疫组织化学染色结果判读参考文献进行^[13]。

2.12 统计学方法 采用 SPSS 25.0 统计软件对数

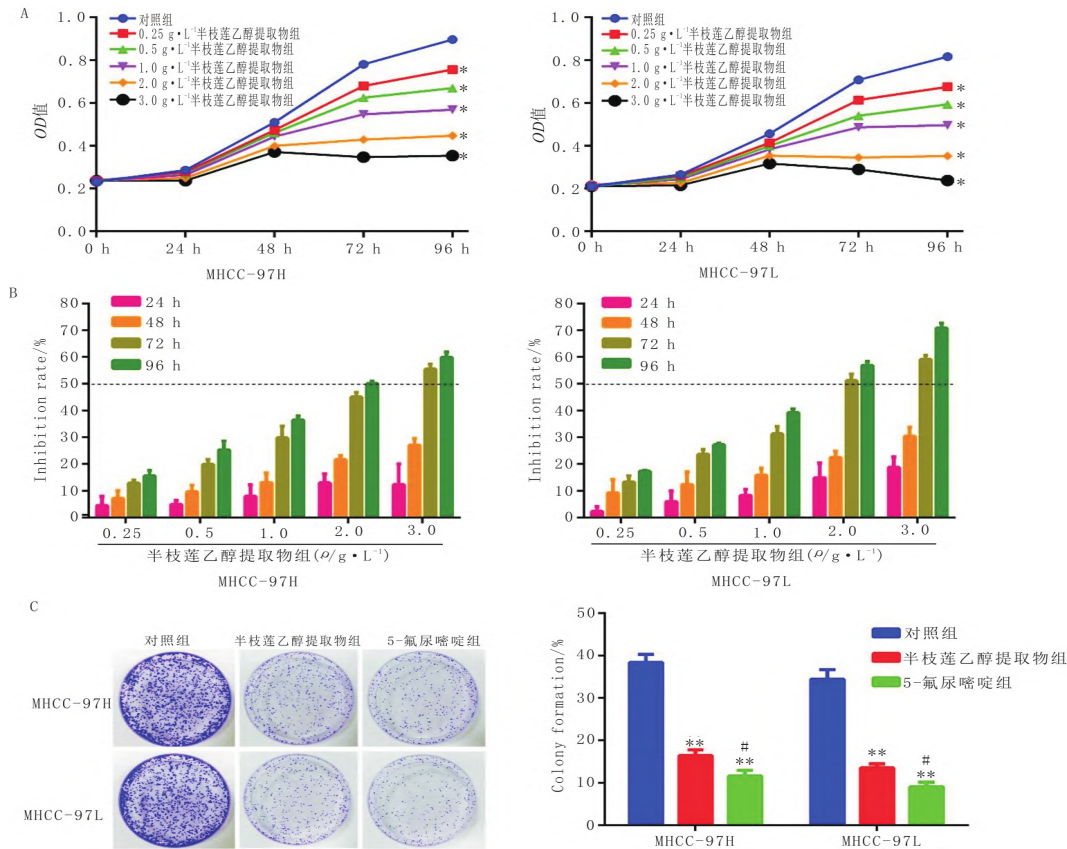
据进行统计分析,数据服从正态分布和方差齐性,计量资料采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同浓度半枝莲乙醇提取物对肝癌细胞增殖和克隆形成的影响

与对照组比较,不同浓度半枝莲乙醇提取物可明显抑制 MHCC-97H 和 MHCC-

97L 细胞的增殖,且呈剂量-时间依赖性 ($P < 0.05$),见图 1A,其中半枝莲乙醇提取物作用 72 h 的抑制作用最明显,通过 SPSS 软件分析显示半枝莲乙醇提取物组干预 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞 72 h 的 IC₅₀ 值分别为 2.490 g · L⁻¹ 及 2.243 g · L⁻¹,见图 1B,后续实验选取 2.0 g · L⁻¹ 为半枝莲乙醇提取物组药物浓度。与对照组比较,半枝莲乙醇提取物可使 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞的克隆数目明显减少 ($P < 0.01$),见图 1C。



注:A:细胞生长曲线;B:细胞抑制率;C:细胞平板克隆形成。与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与半枝莲乙醇提取物组比较 # $P < 0.05$; $n = 3$

图1 不同浓度半枝莲乙醇提取物对 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞生长的影响

3.2 半枝莲乙醇提取物对细胞周期和细胞凋亡的影响

与对照组比较,半枝莲乙醇提取物组 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞中 G₀/G₁ 期细胞比例显著增加 ($P < 0.01$),S 期和 G₂/M 期细胞比例显著减少 ($P < 0.01$),表明半枝莲乙醇提取物将细胞周期停滞于 G₀/G₁ 期。此外,与对照组比较,半枝莲乙醇提取物显著促进 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞凋亡 ($P < 0.01$),见图 2。

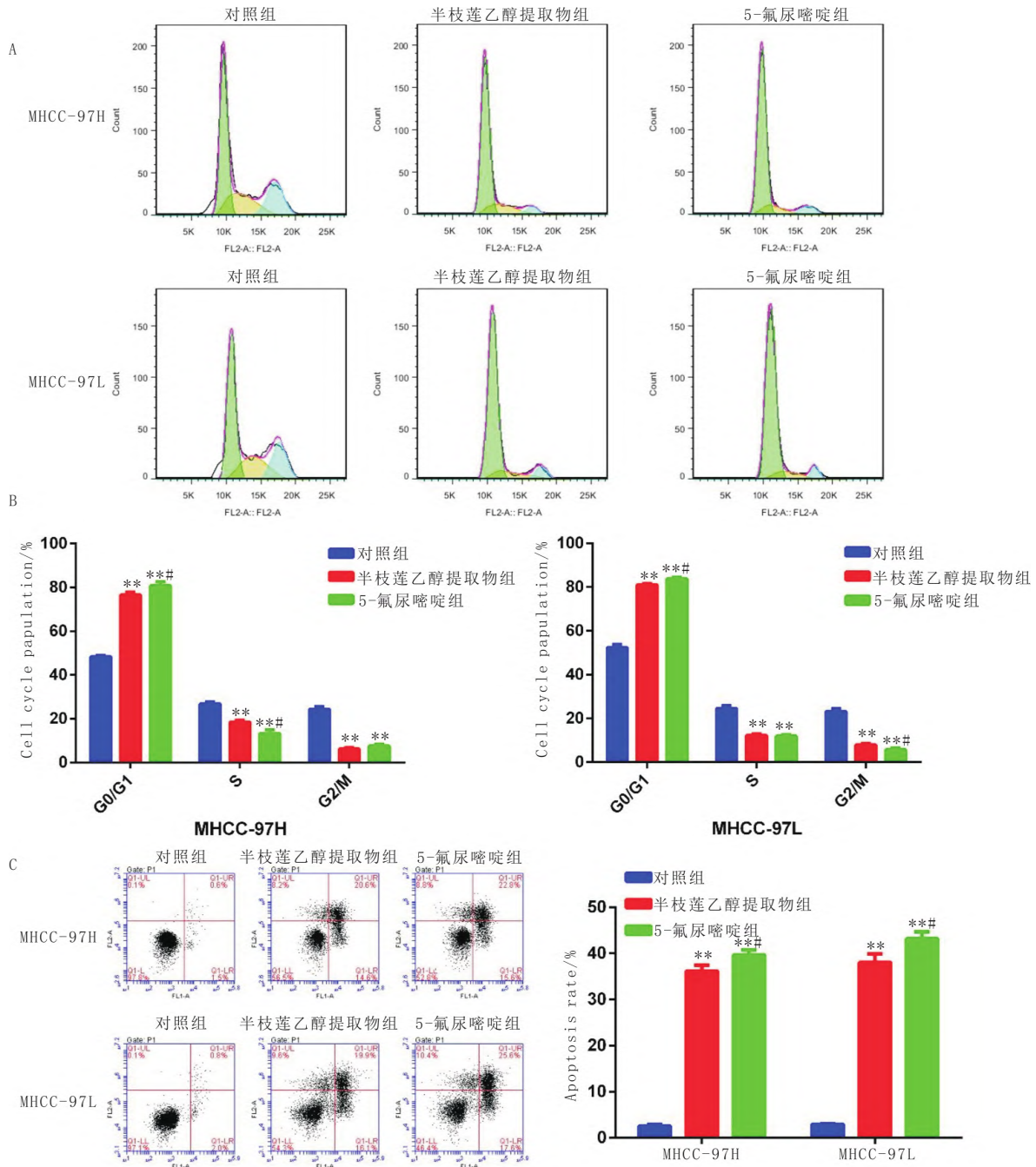
3.3 半枝莲乙醇提取物对细胞划痕愈合、迁移和侵袭的影响

与对照组比较,半枝莲乙醇提取物组 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞的划痕愈合进程

明显缩短 ($P < 0.05$),细胞侵袭的数目明显减少 ($P < 0.05$);MHCC-97L 细胞迁移数目明显减少 ($P < 0.05$)。见图 3。

3.4 半枝莲乙醇提取物对细胞成球和干细胞特性的影响

与对照组比较,半枝莲乙醇提取物组 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞成球体积明显变小,细胞球体形成率明显降低 ($P < 0.01$),见图 4A。流式细胞术分析显示,与对照组比较,半枝莲乙醇提取物组 EpCAM⁺ 与 CD133⁺ 细胞比例显著下降 ($P < 0.01$),见图 4B。



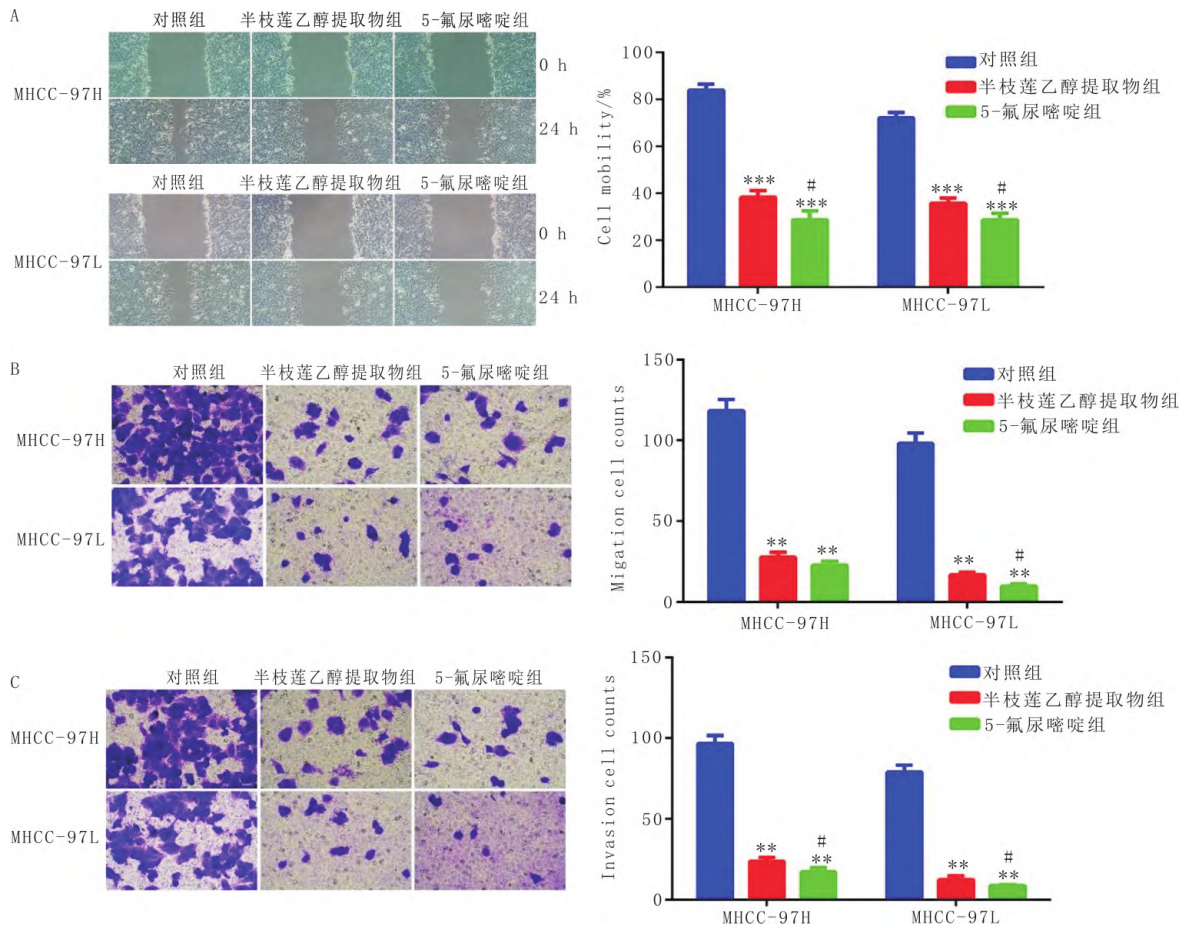
注: A: 细胞周期流式检测图; B: 细胞周期分布比较; C: 左侧为细胞凋亡流式检测图, 右侧为细胞凋亡指数比较; 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与半枝莲乙醇提取物组比较 # $P < 0.05$; $n = 3$

图2 半枝莲乙醇提取物对 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞周期和凋亡的影响

3.5 半枝莲乙醇提取物对细胞周期、凋亡及上皮间质转化相关蛋白表达的影响 与对照组比较, 半枝莲乙醇提取物组 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞周期和凋亡相关蛋白 Cyclin D1、Bcl-2、Ki-67 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), P27、Bax 表达水平明显上调 ($P < 0.05$); 上皮间质转化相关蛋白 E-cadherin 表达水平明显上调 ($P < 0.05$), Vimentin 表达水平明显下调 ($P < 0.05$)。见图 5。

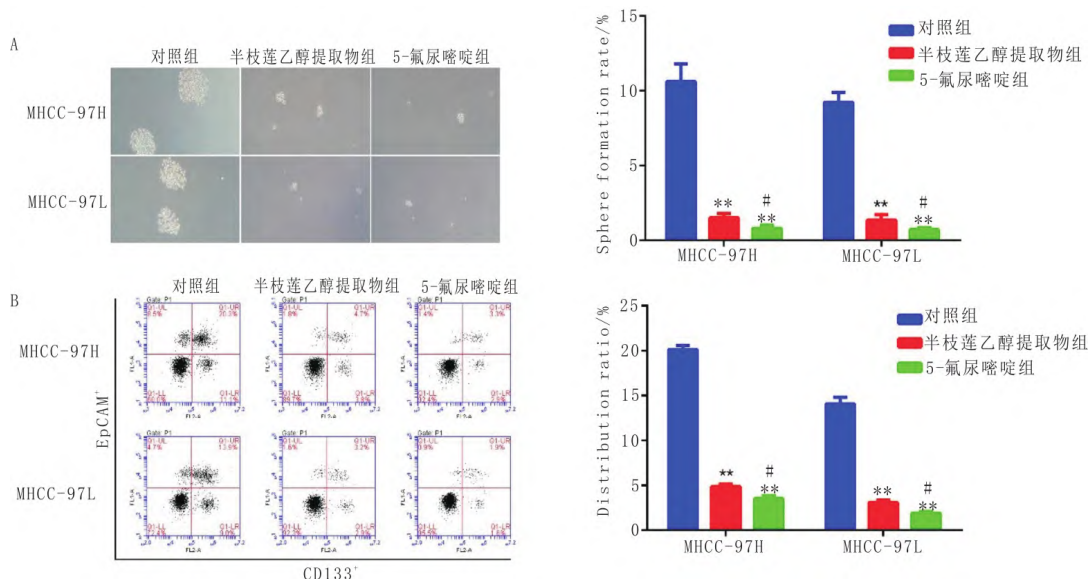
3.6 半枝莲乙醇提取物对裸鼠移植瘤生长及肝、肺转移的影响 与对照组比较, 半枝莲乙醇提取物组 MHCC-97H 细胞移植瘤体积明显缩小 ($P < 0.05$)。见图 6A。移植瘤组织形态学检查显示, 对照组肿瘤细胞呈弥散致密排列、有不同程度有丝分裂活性; 半枝莲乙醇提取物组肿瘤组织可见明显的坏死和凋亡。见图 6B。免疫组织化学分析表明, 与对照组比较, 半枝莲乙醇提取物组 Ki-67 蛋白染色减少, 见

图6C。肝、肺组织形态学检查显示,与对照组比较,半枝莲乙醇提取物组移植瘤肝、肺转移灶的大小和数目明显降低($P < 0.05$)。见表1 图7。



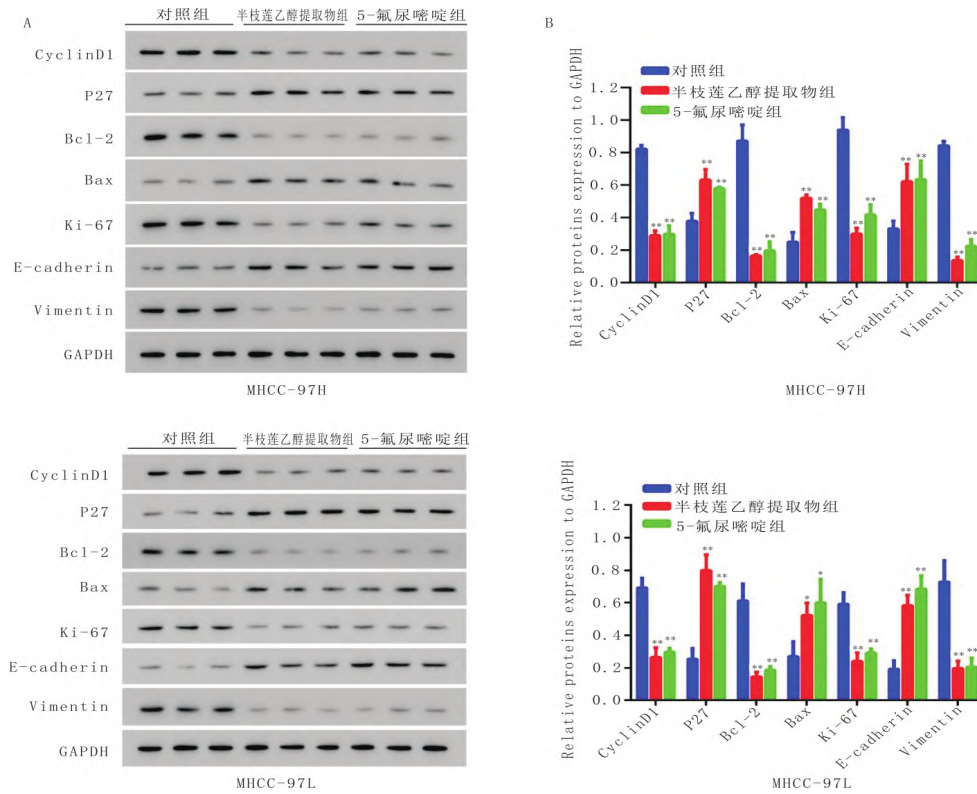
注: A: 细胞划痕试验; B: 细胞迁移实验; C: 细胞侵袭试验。左侧为光镜下观察得到的图片(×200), 右侧为计数资料比较; 与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与半枝莲乙醇提取物组比较 # $P < 0.05$; $n = 3$

图3 半枝莲乙醇提取物对 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞划痕、迁移和侵袭的影响



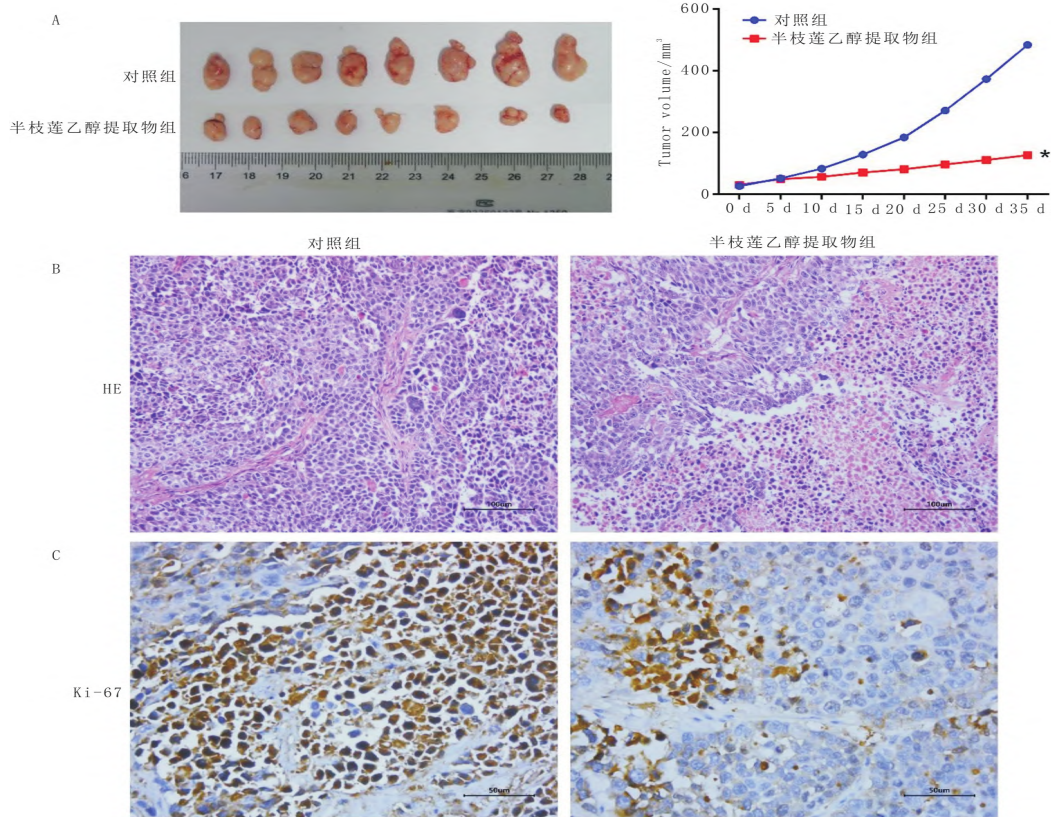
注: A: 细胞成球情况(×200); B: 干性标记 EpCAM⁺ 和 CD133⁺ 流式细胞术分布图; 左侧为代表性图片, 右侧为计数资料比较。与对照组比较, ** $P < 0.01$; 与半枝莲乙醇提取物组比较 # $P < 0.05$; $n = 3$

图4 半枝莲乙醇提取物对 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞成球和干细胞特性的影响



注: A: Western Blot 蛋白条带图片; B: 蛋白表达定量分析。与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 3$

图5 半枝莲乙醇提取物对 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞周期、凋亡及上皮间质转化相关蛋白表达水平的影响



注: A: 移植瘤的大体形态和生长曲线; B: 移植瘤组织形态学(HE染色, $\times 200$); C: 移植瘤 Ki-67 免疫组化染色($\times 400$)。与对照组比较, * $P < 0.05$; $n = 8$

图6 半枝莲乙醇提取物对 MHCC-97H 细胞裸鼠移植瘤生长、肝肺转移的影响

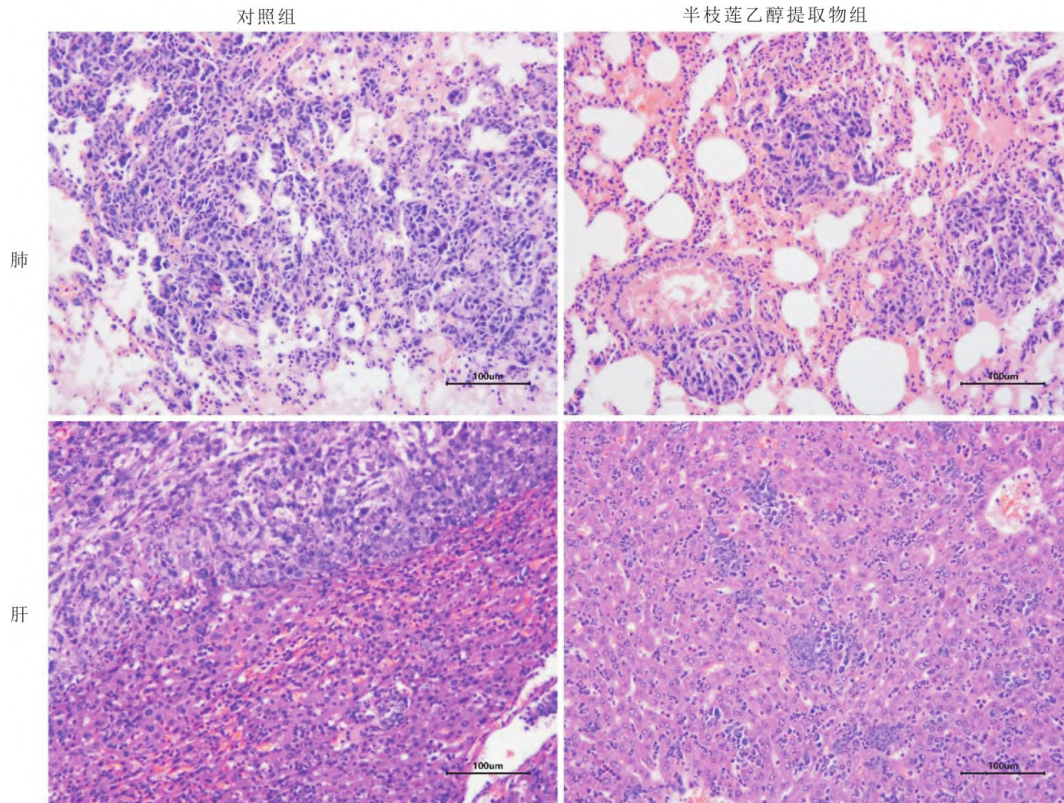


图7 半枝莲乙醇提取物对MHCC-97H细胞裸鼠移植瘤肺和肝转移的影响(HE染色, ×200)

表1 半枝莲乙醇提取物对移植瘤肝、肺转移的影响 (x̄ ± s)

组别	n	肺组织瘤转移灶/个	肝组织瘤转移灶/个
对照组	8	16.53 ± 4.3	11.45 ± 3.2
半枝莲乙醇提取物组	8	9.21 ± 3.9*	7.87 ± 2.6*

注:与对照组比较, * P < 0.05

4 讨论

肝细胞癌恶性程度较高,易发生侵袭和转移,术后较高的复发和转移率是治疗肝癌的重大障碍。中医上无“肝癌”这一病名,肝癌的“积聚”“癥瘕”“臌胀”“胁痛”“黄疸”等临床症状与中医经典著作《内经》中的“积”病相似,因此,众多中医专家采用扶正祛邪、活血化瘀、疏肝理气、解毒抑瘤等法治疗肝癌^[14-15],发挥了中草药独特的功效和协同干预作用,在临床广泛应用于抑制肿瘤进展和转移。半枝莲是中医学领域中常用的抗肿瘤组方药物,已有研究报道半枝莲可抑制多种肿瘤如非小细胞肺癌、结直肠癌、胰腺癌、肝癌和胃癌的增殖和侵袭转移^[16-20]。

细胞增殖与凋亡的稳态失衡是肿瘤的发病机制之一,因此,可通过抑制细胞增殖,阻滞细胞周期的进展,促进细胞凋亡,从而减缓肝癌细胞的发展。研究显示,半枝莲乙醇提取物作用 Hep-G2 细胞 72 h

后,可促使早期凋亡细胞增多,G0/G1期细胞增多,S期细胞减少,阻滞细胞周期进展,抑制肝癌细胞生长^[21]。半枝莲主要活性成分木犀草素通过促进细胞凋亡和阻滞细胞周期G0/G1期(Huh7细胞)或G2/M期(HepG2),调控多个细胞周期和凋亡相关基因包括 *cyclinA*、*cyclinB1*、*cyclinD1*、*cyclinE*、*CDK1*、*CDK2*、*CDK4*、*CDK6*、*p21*、*p27*、*Bax* 和 *Bcl-2* 等的表达^[13],抑制肝癌细胞生长。细胞周期的相关蛋白,特别是 *CyclinD1* 在很多肿瘤细胞中高表达,加速了细胞周期进展,在细胞增殖中起到癌基因的作用^[22-23]。*Bcl-2* 和 *Bax* 是调控凋亡的蛋白,两者形成二聚体而又互相拮抗,当机体受到外界异常刺激后,若 *Bcl-2* 表达高于 *Bax* 时,抑制细胞凋亡;若 *Bax* 表达高于 *Bcl-2* 时,激活 *Caspase-3* 蛋白表达,从而促进细胞凋亡^[24]。半枝莲乙醇提取物作用人肝癌 SMMC-7721 细胞后,使得 *Caspase-3* 蛋白表达显著上升,*Bcl-2* 和 *Survivin* 蛋白表达明显下降,促进细胞凋亡^[25]。本研究结果显示,半枝莲乙醇提取物显著抑制 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞的体外增殖和体内移植瘤生长,其机制与降低 *CyclinD1*、*Bcl-2*、*Ki-67* 蛋白表达水平,提高 *P27* 和 *Bax* 蛋白表达水平,阻滞细胞周期于 G0/G1 期,促进细胞凋亡等有关。

恶性肿瘤细胞的侵袭与转移在肿瘤相关死亡中

起着关键作用。EMT 标志物 E-cadherin 和 Vimentin 是 HCC 进程和侵袭的决定性分子^[12]。研究显示,半枝莲乙醇提取物通过阻断 TGF- β /Smad/AMPK 信号通路,上调 E-cadherin 蛋白表达水平,下调 N-cadherin 和 Vimentin 蛋白表达水平,逆转 TGF- β 诱导的上皮间质转化,抑制肝癌 HepG2 细胞迁移及侵袭^[26]。课题组前期的研究显示,半枝莲提取物可降低 HBV 阳性肝细胞癌 HepG2. 2. 15 和 Hep3B 细胞的划痕愈合率,抑制细胞的迁移和侵袭^[9]。此外,半枝莲乙醇提取物也可抑制 HepG2 肝癌细胞侵袭和迁移,诱发细胞自噬,该作用与半枝莲提取物抑制 Raf/MEK/ERK 信号通路有关^[27]。本研究结果显示,半枝莲乙醇提取物可下调 Vimentin 蛋白表达水平,上调 E-cadherin 蛋白表达水平,降低细胞划痕愈合率,减少迁移和侵袭细胞数目。

肿瘤干细胞具有较强的增殖和自我更新能力,与肿瘤细胞耐药、复发、转移和不良预后密切相关。研究显示,肿瘤干细胞标志物 EpCAM 和 CD133 参与肝癌恶性进程的发展,通过免疫组化检测到这两个指标在肝癌组织中的阳性表达率明显高于癌旁组织^[28]。EpCAM 和 CD133 的高表达可提示肝癌患者预后不良。本研究也显示,半枝莲乙醇提取物可降低干细胞 EpCAM⁺ 与 CD133⁺ 细胞数量及球体形成,与 Liu 等^[29] 的研究报道相同,提示半枝莲乙醇提取物可通过调控干细胞特性相关分子,抑制肝癌 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞的侵袭和转移能力。

综上所述,半枝莲乙醇提取物可通过抑制细胞增殖、阻滞细胞周期进程、促进肝癌细胞凋亡、调控上皮间质转化和干细胞特性相关基因表达抑制肝癌 MHCC-97H 和 MHCC-97L 细胞体内外生长和侵袭,为临床上半枝莲乙醇提取物治疗 HCC 提供理论依据。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2022, 30(4): 367-388.
Medical Administration Bureau of the National Health Commission of the People's Republic of China. Standardization for diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma (2022 edition) [J]. Chin J Hepatol, 2022, 30(4): 367-388.
- [2] 丁晓毅, 王征, 石洁, 等. 中国肝癌多学科综合治疗专家共识[J]. 临床肝胆病杂志, 2021, 37(2): 278-285.
DING X Y, WANG Z, SHI J, et al. Chinese expert consensus on multidisciplinary treatment of liver cancer [J]. J Clin Hepatol, 2021, 37(2): 278-285.
- [3] 黄雪, 张树辉. 原发性肝癌中西医结合治疗进展[J]. 国际中医中药杂志, 2015, 37(3): 278-282.
- [4] HUANG X, ZHANG S H. The research progress of primary liver cancer treated by integrative Chinese and western medicine [J]. Int J Tradit Chin Med, 2015, 37(3): 278-282.
- [5] 赵向丽, 张树辉, 吴士延. 中医药治疗原发性肝癌的用药特点分析[J]. 上海中医药大学学报, 2012, 26(6): 68-72.
ZHAO X L, ZHANG S H, WU S Y. Analysis on laws of herbal Prescriptions in treatment of primary hepatic cancer [J]. Acta Univ Tradit Med Sin Pharmacol Shanghai, 2012, 26(6): 68-72.
- [6] 钱丽丽, 赵向丽, 冯晓军, 等. 原发性肝癌证型分布及用药分析[J]. 河南中医, 2018, 38(8): 1189-1193.
QIAN L L, ZHAO X L, FENG X J, et al. Distribution of TCM syndromes of primary liver cancer and drug-use characteristics of TCM treatment [J]. Henan Tradit Chin Med, 2018, 38(8): 1189-1193.
- [7] 朱晓芹, 郝雅, 刘志强, 等. 半枝莲主要黄酮类成分抗癌协同机制的网络药理学分析[J]. 中药新药与临床药理, 2020, 31(9): 1037-1044.
ZHU X Q, ZHENG Y, LIU Z Q, et al. Research on synergistic mechanism of main anticancer flavonoids of Scutellaria barbata based on network pharmacology [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2020, 31(9): 1037-1044.
- [8] 曾沙, 杨寒, 赵晖, 等. 基于网络药理学探讨中药半枝莲抗结直肠癌的机制研究[J]. 中药药理与临床, 2021, 37(4): 125-132.
ZENG S, YANG H, ZHAO H, et al. Mechanism of Chinese herb Banzhilian(半枝莲) in treatment of colorectal cancer: an exploration based on network pharmacology [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2021, 37(4): 125-132.
- [9] 闵钦威, 左娜娜, 贺冬林. 秦皮乙素调节 AMPK/NOTCH1 通路对 TGF- β 1 诱导的肺癌 A549 细胞上皮间质转化的影响研究[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(3): 85-91.
MIN Q W, ZUO N N, HE D L. Aesculetin inhibits the epithelial-mesenchymal transition of lung cancer A549 cells induced by TGF- β 1 through modulating AMPK/Notch1 pathway [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med, 2022, 38(3): 85-91.
- [10] YANG P W, CHEN T T, ZHAO W X, et al. Scutellaria barbata D. Don and Oldenlandia diffusa (Willd.) Roxb crude extracts inhibit hepatitis-B-virus-associated hepatocellular carcinoma growth through regulating circRNA expression [J]. J Ethnopharmacol, 2021, 275: 114110.
- [11] 魏丽慧, 林久茂, 李琼瑜, 等. 半枝莲对大肠癌细胞及干细胞生长和 β -catenin 活化的影响[J]. 福建中医药, 2015, 46(2): 27-30.
WEI L H, LIN J M, LI Q Y, et al. Effects of Scutellaria barbata on the growth and β -catenin activation of colorectal cancer cells and stem cells [J]. Fujian J Tradit Chin Med, 2015, 46(2): 27-30.
- [12] SONG W H, FENG X J, GONG S J, et al. MicroRNA-622 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(12): 1754-1763.
- [13] FENG X J, PAN Q, WANG S M, et al. MAP4K4 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in hepatocellular carcinoma [J]. Tumour Biol, 2016, 37(8): 11457-11467.
- [14] YANG P W, LU Z Y, PAN Q, et al. MicroRNA-6809-5p mediates luteolin-induced anticancer effects against hepatoma by targeting flotillin 1 [J]. Phytomedicine, 2019, 57: 18-29.

- [14]陈超. 任光荣治疗原发性肝癌用益气养阴之内涵与外延[J]. 世界中西医结合杂志 2015, 10(2): 158-160.
CHEN C. Connotation and denotation of doctor Chen Guangrong's therapy of benefiting qi and nourishing Yin in treating primary hepatocellular carcinoma[J]. World J Integr Tradit West Med 2015, 10(2): 158-160.
- [15]任晓琳, 王润珍, 陈剑峰, 等. 李春辉老中医治疗原发性肝癌经验介绍[J]. 新中医 2020, 52(2): 194-196.
REN X L, WANG R Z, CHEN J F, et al. Experience introduction of Li Chunhui treating primary liver cancer[J]. J New Chin Med, 2020, 52(2): 194-196.
- [16]任守雷, 郭晓晓, 陈翠翠, 等. 半枝莲总黄酮对非小细胞肺癌细胞增殖及迁移的影响[J]. 安徽医药, 2019, 23(10): 1939-1942, 2122.
REN S L, GUO X X, CHEN C C, et al. Effects of total flavonoids of Scutellaria barbata D. Don on proliferation and migration of non-small cell lung cancer cells[J]. Anhui Med Pharm J, 2019, 23(10): 1939-1942, 2122.
- [17]张晶晶, 方翌, 刘丽雅, 等. 半枝莲抑制大肠癌干细胞自我更新及成瘤能力[J]. 福建中医药 2021, 52(1): 41-45.
ZHANG J J, FANG Y, LIU L Y, et al. Scutellaria barbata D. don inhibits the self-renewal and tumorigenic ability of colorectal cancer stem cells[J]. Fujian J Tradit Chin Med 2021, 52(1): 41-45.
- [18]蔡芸芸, 高嵩, 刘鲁明, 等. 半枝莲提取物通过 Hippo/YAP 通路抑制胰腺癌 PANC-1 细胞的增殖、侵袭转移和成瘤能力的研究[J]. 中华中医药杂志 2017, 32(7): 2947-2951.
CAI Y Y, GAO S, LIU L M, et al. Inhibitive effect of Scutellaria barbata D. Don extract on proliferation, invasion, metastasis and tumorigenesis of pancreatic cancer PANC-1 cells via Hippo/YAP signaling pathway[J]. China J Tradit Chin Med Pharm 2017, 32(7): 2947-2951.
- [19]牟卫伟, 许焕丽. 半枝莲乙醇提取物对顺铂抗肝癌的增效作用研究[J]. 中华中医药杂志 2017, 32(1): 306-308.
MOU W W, XU H L. Assistant antitumor effects of ethanol extracts from barbated skullcup herb on cisplatin against hepatocellular carcinoma[J]. China J Tradit Chin Med Pharm 2017, 32(1): 306-308.
- [20]范燕燕, 陈有志, 卢英恺, 等. 白花蛇舌草-半枝莲药对组分对胃癌 SGC-7901 细胞增殖、线粒体自噬及凋亡的影响[J]. 中医学报 2020, 35(1): 130-135.
FAN Y Y, CHEN Y Z, LU Y K, et al. Effects of herba Hedyotis and herba scutellariae barbatae couplet medicines component on the proliferation, autophagy and apoptosis in gastric cancer SGC-7901 cells[J]. Acta Chin Med 2020, 35(1): 130-135.
- [21]林敬明, 刘煜, 罗荣城. 半枝莲提取物抗人肝癌 Hep-G2 细胞增殖及其机制研究[J]. 南方医科大学学报 2006, 26(7): 975-977.
LIN J M, LIU Y, LUO R C. Effect of Scutellaria barbata extract against human hepatocellular Hep-G2 cell proliferation and its mechanism[J]. J South Med Univ 2006, 26(7): 975-977.
- [22]张欢欢, 朱全刚, 潘会君, 等. 海藻玉壶汤对 Hep3B 肝癌裸鼠肝功能及 CyclinD1、Bax 蛋白表达的影响[J]. 中医学报 2019, 34(9): 1906-1911.
ZHANG H H, ZHU Q G, PAN H J, et al. Effects of Haizao Yuhu Decoction on liver function, CyclinD1 and bax protein expression in nude mice with Hep3B xenografted tumor[J]. Acta Chin Med, 2019, 34(9): 1906-1911.
- [23]高珊珊, 伍月红, 曹礼慧. 石上柏颗粒对肝癌模型小鼠瘤组织中 Cyclin D1、CKS 表达的影响[J]. 中医学报 2017, 32(10): 1828-1831.
GAO S S, WU Y H, CAO L H. Effect of Selaginella granule on cyclin D1 and CKS expression in tumor tissue of mice with hepatocellular carcinoma[J]. Acta Chin Med 2017, 32(10): 1828-1831.
- [24]钟大仓, 陈超, 李桐, 等. 胡椒碱诱导人胰腺腺癌 PANC-1 细胞凋亡的 Caspase 3/Bax/Bcl-2 信号通路机制研究[J]. 中国现代应用药学 2020, 37(14): 1687-1691.
ZHONG D C, CHEN C, LI T, et al. Study on the caspase 3/bax/bcl-2 signal pathway mechanism of induction apoptosis effect of piperine in human pancreatic cancer PANC-1 cell[J]. Chin J Mod Appl Pharm 2020, 37(14): 1687-1691.
- [25]韦鹏涯, 浦洪琴, 韦星, 等. 半枝莲提取物诱导人肝癌 SMMC-7721 细胞凋亡及其对凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 时珍国医国药 2007, 18(12): 3020-3022.
WEI P Y, PU H Q, WEI X, et al. Apoptosis-inducing effect of Scutellaria barbata D. Don extract on human liver cancer SMMC-7721 cells and the expression of apoptosis related proteins[J]. Lishizhen Med Mater Med Res 2007, 18(12): 3020-3022.
- [26]黄有星, 张生, 刘开睿. 半枝莲提取物逆转上皮间质转化抑制肝癌细胞迁移侵袭研究[J]. 新中医 2019, 51(8): 17-21.
HUANG Y X, ZHANG S, LIU K R. Study on inhibition of reversal of epithelial-mesenchymal transition by extracts from Scutellaria barbata for cell migration and invasion of hepatoma cells[J]. J New Chin Med 2019, 51(8): 17-21.
- [27]赵继森, 周元龙, 杨季红, 等. 半枝莲提取物抑制 HepG2 肝癌细胞的作用研究[J]. 中华中医药学刊 2022, 40(7): 217-219, 282.
ZHAO J S, ZHOU Y L, YANG J H, et al. Inhibitory effect of Banzhilian(Scutellaria barbata) extract on HepG2 hepatoma cells[J]. Chin Arch Tradit Chin Med 2022, 40(7): 217-219, 282.
- [28]潘群雄, 苏子剑, 王聪仁, 等. 肿瘤干细胞标志 EpCAM 和 CD133 在人原发性肝癌中的表达及其对预后的临床意义[J]. 肿瘤, 2012, 32(8): 628-633.
PAN Q X, SU Z J, WANG C R, et al. Expressions of tumor stem cell markers EpCAM and CD133 in human primary hepatocellular carcinoma and their value in prognostic prediction[J]. Tumor 2012, 32(8): 628-633.
- [29]LIU Y, QI Y, BAI Z H, et al. A novel matrine derivate inhibits differentiated human hepatoma cells and hepatic cancer stem-like cells by suppressing PI3K/AKT signaling pathways[J]. Acta Pharmacol Sin 2017, 38(1): 120-132.

收稿日期: 2022-11-10

作者简介: 王倩(1989-), 女, 上海人, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 中西医结合防治肿瘤。

通信作者: 张树辉(1963-), 男, 医学博士, 主任医师, 研究方向: 中西医结合防治肿瘤。E-mail: shzhang@126.com

编辑: 孙亚萍