

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2018.02.016

僵蚕含药血清对肝癌细胞侵袭能力的影响

严溢泉^{1,2}, 赵星成^{2*}, 杜永平¹, 谢娟¹

(1. 第四军医大学第一附属医院, 陕西省西安市长乐西路 169 号, 710032; 2. 第四军医大学航空航天医学系)

摘要 目的 探讨僵蚕抗肝癌转移的可能作用机制。方法 10 只 SD 大鼠给予 630 mg/100 g 僵蚕水煎剂溶液灌胃, 10 只大鼠给予等体积生理盐水灌胃, 连续灌胃 3 天后 1h 心脏采血, 制备大鼠含药血清。将肝癌 Hepa1-6 细胞分为对照组和实验组, 分别给予对照血清和僵蚕含药血清培养。用 5-乙炔基-2-脱氧尿苷 (EdU) 染色法检测各组 Hepa1-6 细胞染色阳性率判定增殖情况; 用 Transwell 小室法检测各组细胞侵袭能力; 设立空白组, 采用 RT-PCR 法检测 Hepa1-6 细胞上皮细胞间充质转化标志物 E-cadherin、N-cadherin mRNA 水平。结果 实验组肝癌细胞 Hepa1-6 EdU 染色阳性率低于对照组, 肝癌细胞侵袭数目亦低于对照组 ($P < 0.01$)。与空白组比较, 对照组 E-cadherin mRNA 下调, N-cadherin mRNA 上调 ($P < 0.05$); 与对照组比较, 实验组 E-cadherin mRNA 表达增加, N-cadherin mRNA 表达减少 ($P < 0.05$)。结论 僵蚕含药血清能抑制肝癌细胞 Hepa1-6 体外的增殖、侵袭, 可能通过减弱上皮细胞间充质转化发挥抑制肝癌转移的作用。

关键词 肝癌; 僵蚕; 细胞侵袭能力; 肿瘤转移; 上皮细胞间充质转化

肝癌异质性强、死亡率高, 其在我国病死率仅次于肺癌、胃癌^[1]。目前外科手术仍是肝癌的首选治疗方式, 但术后生存率并未明显提高, 制约临床疗效的主因是术后高复发率、转移率^[2-4]。研究表明, 上皮细胞间充质转化 (emergency medical technician, EMT) 是肿瘤转移过程的始动环节^[5-8], 因此抑制肝癌细胞 EMT 在肝癌防治中具有重要价值。有学者从中医理论角度提出“内风”善行数变是引起肝癌转移的关键病机, 并有相关风药抗肿瘤作用的报道^[7-8]。僵蚕具有熄风祛风功效, 长期以来广泛应用于肝癌等恶性肿瘤的辅助治疗。本实验以鼠源性肝癌细胞 Hepa1-6 为研究对象, 观察单味中药僵蚕含药血清在体外对 Hepa1-6 增殖、侵袭的影响, 为中药僵蚕的临床抗肝癌转移应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

清洁级雄性 SD 大鼠 40 只, 7 周龄, 体重 (200 ± 30) g, 购自第四军医大学动物实验中心,

实验动物许可证号: SCXK (军) 2012-0007。鼠源性肝癌 Hepa1-6 细胞株由第四军医大学生化教研室提供。

1.2 实验药物

中药饮片僵蚕 (亳州市豪门中药饮片有限公司生产, 产地: 湖北, 批号: 161001), 取 50 g 常规煎煮, 浓缩制成 1 g/ml 水煎剂溶液, 高温灭菌后 4 °C 冰箱保存备用。

1.3 试剂及仪器

胎牛血清 (美国 ZETA LIFE 公司, 批号: Z7181FBS-500); DMEM 培养液 (美国 Hyclone 公司, 批号: AB217804); 含有青霉素、链霉素的双抗溶液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号: 20150925); 渗透剂 (美国 MP Biomedicals 公司, 批号: MR29539); Hoechst 核染液 (广州市锐博生物科技有限公司, 批号: P1018); 基质胶 (美国 BD Biosciences 公司, 批号: 356234); 纤维粘连蛋白 (美国 BD Biosciences 公司, 批号: 354008); 5-乙炔基-2-脱氧尿苷 (EdU, 广州市锐博生物科技有限公司, 批号: P1111); 鼠源性转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$, 上海近岸科技有限公司, 批号: 0330437); RT 试剂盒 (批号: AK3802)、Taq DNA 聚合酶 (批号: AK7705)、dNTPs (批号: 8904)

基金项目: 国家自然科学基金 (81403292); 陕西省自然科学基金基础研究计划 (2015JQ8290, 2016JQ8002)

* 通讯作者: xingcheng_zhao@163.com, (029) 84774802

(日本 TaKaRa 公司)。Transwell 小室 (膜孔径 $8\ \mu\text{m}$, 美国 BD Biosciences 公司, 批号: 353097); 倒置生物显微镜 (Olympus 公司, 型号: IX2-ILL100); 全自动酶标仪 (北京普朗新技术有限公司, 型号: DNM-9602G)。

1.4 含药血清的制备

采用随机数字表法将 40 只 SD 大鼠分为对照组和高、中、低剂量组, 每组 10 只。高剂量组给药剂量为临床成人 (体重 $60\ \text{kg}$) 等效剂量的 10 倍, 中剂量组为临床成人等效剂量的 5 倍, 低剂量组为临床成人等效剂量的 2 倍。根据人和动物体表面积折算的等效剂量比率表^[8] 换算得出高剂量组给予 $630\ \text{mg}/100\ \text{g}$ 僵蚕水煎剂溶液, 中剂量组给予 $315\ \text{mg}/100\ \text{g}$, 低剂量组给予 $126\ \text{mg}/100\ \text{g}$, 对照组给予等体积生理盐水, 连续灌胃 3 天。于第 3 天灌胃后 1 h 心脏采血, $3000\ \text{r}/\text{min}$ 离心 15 min, 吸取上清液, 即所需大鼠血清。含药血清在培养液中的浓度为 10%。在预实验中发现, 高剂量组含药血清对 Hepa1-6 细胞增殖和迁移的抑制作用明显, 因此, 本研究所有实验均采用高剂量组含药血清。

1.5 细胞培养

将冻存于液氮中的小鼠肝癌细胞株 Hepa1-6 于 37°C 水浴锅复苏, 离心洗涤后转入细胞培养皿, 在含有 10% 胎牛血清和青霉素、链霉素各 $100\ \text{U}/\text{ml}$ 的 DMEM 培养基中, 37°C 、5% CO_2 培养箱内常规培养。细胞贴壁生长, 采用对数生长期的细胞进行实验。

1.6 EdU 染色检测细胞增殖状态

每孔以 1×10^4 个细胞接种于 24 孔板, 分对照组 (对照血清进行培养) 和实验组 (采用高剂量僵蚕含药血清培养), 每组设 3 个复孔, 各组加入不同含药血清培养 48 h 后, 完全细胞培养液按 1000 : 1 稀释 EdU 溶液, 每孔 $200\ \mu\text{l}$ EdU ($50\ \mu\text{M}$) 培养液孵育 2 h。弃培养液, PBS 清洗后加 4% 多聚甲醛固定, 每孔加 $200\ \mu\text{l}$ EdU 染色反应液避光、室温 30 min 后, 弃反应液加入 $200\ \mu\text{l}$ TritonX100 (0.5%) 渗透剂通透 10 min, 每孔加入 $200\ \mu\text{l}$ Hoechst 核染液避光、室温孵育 30 min, 每孔加 PBS 清洗, 荧光显微镜观察, 细胞核中红色信号为增殖细胞。200 倍光镜下观察 10 个视野, 计算阳性细胞数占总细胞数的染色阳性率。

1.7 体外侵袭实验

将基质胶用无血清 DME 按 1 : 8 稀释, 每个 Transwell 小室加入 $60\ \mu\text{l}$ 稀释过的基质胶, 37°C 孵

育 1 h, 在 Transwell 小室下表面涂 $5\ \mu\text{g}$ 纤维粘连蛋白。细胞分组及药物给予同上, 37°C 、5% CO_2 孵箱中培养 Hepa1-6 肝癌细胞 48 h, 消化各组细胞, 用不含血清的 DMEM 培养液重悬, 使其浓度为 6×10^5 个/ml。在每个小室基质胶上层加入 $150\ \mu\text{l}$ 细胞悬液, 下室加入 $600\ \mu\text{l}$ 含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 37°C 、5% CO_2 孵箱中静置培养 24 h。取出 Transwell 小室, 棉签擦掉小室正面细胞, 洗涤后 4% 多聚甲醛固定 15 min。结晶紫染色 30 min, PBS 清洗 3 遍后光学显微镜下观察 Transwell 小室背面细胞。100 倍光镜下选择上、下、左、右、中 5 个不同视野, 计算穿过膜的细胞数。

1.8 E-cadherin、N-cadherin mRNA 水平检测

采用 RT-PCR 法, 对照组和实验组细胞分别加入 TGF- $\beta 1$ ($10\ \text{ng}/\text{ml}$) 诱导 72 h, 各组药物给予方式同上, 增加不进行 TGF- $\beta 1$ 诱导的空白组, 仅给予对照血清干预。72 h 后对各组细胞提取总 RNA, 反转录为 cDNA 后, 以 β -actin 为内参, 检测样本 Ct 值, 用 CFX Manager 软件 (Bio-Rad 公司) 对细胞上皮间质转化标志物 E-cadherin、N-cadherin 的 mRNA 表达水平差异进行分析。引物由北京奥科鼎盛生物科技有限公司合成, β -actin: 上游 GT-GACGTTGACATCCGTAAAGA, 下游 GCCGGACT-CATCGTACTCC; E-cadherin: 上游 CAGTTCCGAG-GTCTACACCTT, 下游 TGAATCGGGAGTCTTC-CGAAAA; N-cadherin: 上游 AGGCTTCTGGT-GAAATTGCAT, 下游 GTCCACCTTGAAATCTGCT-GG。

1.9 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 t 检验, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 僵蚕含药血清对肝癌细胞 Hepa1-6 增殖的影响

对照组细胞 EdU 染色阳性率为 (36.40 ± 2.52)%, 实验组为 (25.92 ± 1.06)%, 实验组低于对照组 ($P < 0.01$), 表明僵蚕含药血清具有明显的抑制肝癌细胞 Hepa1-6 增殖的作用。

2.2 僵蚕含药血清对肝癌细胞 Hepa1-6 侵袭的影响

对照组穿膜细胞个数为 (399.00 ± 39.85), 实验组为 (225.10 ± 30.14), 实验组肝癌细胞 Hepa1-6 侵袭数目低于对照组 ($P < 0.01$), 表明僵

蚕含药血清具有明显抑制肝癌细胞 Hepa1-6 侵袭的作用。

2.3 僵蚕含药血清对肝癌细胞 Hepa1-6 E-cadherin、N-cadherin mRNA 水平的影响

表 1 示,与空白组比较,对照组 E-cadherin mRNA 下调, N-cadherin mRNA 上调,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较,实验组 E-cadherin mRNA 表达增加, N-cadherin mRNA 表达减少 ($P < 0.05$)。

表 1 各组细胞 E-cadherin、N-cadherin mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	E-cadherin mRNA	N-cadherin mRNA
空白组	4	1.813 $\pm$ 0.327	0.404 $\pm$ 0.029
对照组	4	0.915 $\pm$ 0.052*	1.894 $\pm$ 0.441*
实验组	4	2.038 $\pm$ 0.453 $^{\Delta}$	0.828 $\pm$ 0.132 $^{\Delta}$

注:与空白组比较, * $P < 0.05$; 与对照组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

肝癌治疗后的复发转移严重制约其疗效和预后。多数医家认为,正气虚,外邪侵,肝气郁,血行瘀,痰、瘀、热毒结,发为肝癌^[10-14]。有研究提出,内风是肝癌转移的动力,使有形之痰、瘀、毒邪得以流窜全身,形成转移灶,并进一步提出,熄风药应为肿瘤辨证施治过程中的重要组成部分^[15]。传统虫类药物全蝎、蜈蚣、僵蚕等是临床常用熄风药,已应用于临床抗癌治疗。作为临床常用药物之一,近年来对僵蚕抗肿瘤有效成分的研究多从其对肿瘤细胞的毒性作用以及促癌细胞凋亡的机制方面进行^[16-17]。

本研究采用传统的僵蚕水煎剂入药方式制备大鼠含药血清,结果显示单味僵蚕含药血清表现出显著的抑制肝癌细胞 Hepa1-6 增殖的作用,同时明显减弱其侵袭能力。肿瘤转移是一个复杂的多步骤级联过程,其首要阶段就是肿瘤细胞获得运动和侵袭能力,EMT 是肿瘤转移的始发环节,使肿瘤细胞表型发生转变从而侵袭能力增强^[18]。EMT 的发生以上皮细胞标记物 E-cadherin 下调及间充质细胞标记物 N-cadherin 上调为标志^[19]。本研究发现,僵蚕含药血清干预后 E-cadherin 表达量上调, N-cadherin 表达量下调,表明僵蚕含药血清对细胞 EMT 状态起到了一定程度的抑制作用,说明僵蚕可能通过减弱肝癌 EMT 过程发挥抗肿瘤进一步转移的作用。

综上所述,僵蚕含药血清表现出抑制肝癌 Hepa1-6 细胞增殖、侵袭能力的作用,并在一定程

度上减弱了 EMT 现象,为单味中药僵蚕的临床抗肝癌应用以及熄风药的抗肝癌研究提供了理论依据。但本实验仅进行了部分体外实验,缺乏在体研究,下一步将建立动物实验模型,以进一步确认僵蚕的抗肿瘤转移作用相关机制。

参考文献

- [1] 吕桂帅,陈磊,王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景[J]. 生命科学,2015,27(3):237-248.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [3] 吴孟超,汤钊猷,孙燕,等. 原发性肝癌诊疗规范(2011年版)[J]. 中华肝脏病杂志,2012,20(6):419-426.
- [4] CHUN JM, KWON HJ, SOHN J, et al. Prognostic factors after early recurrence in patients who underwent curative resection for hepatocellular carcinoma[J]. J Surg Oncol, 2011,103(2):148-151.
- [5] CHAFFER CL, WEINBERG RA. A perspective on cancer cell metastasis[J]. Science, 2011, 331(6024):1559-1564.
- [6] WU L, FENG H, HU J, et al. Valproic acid (VPA) promotes the epithelial mesenchymal transition of hepatocarcinoma cells via transcriptional and post-transcriptional up regulation of Snail[J]. Biomed Pharmacother, 2016, 84:1029-1035. doi: 10.1016/j.biopha.2016.10.023.
- [7] 贾文霞,赵红兵,陈桂杰,等. 肝癌的中医用药方法[J]. 中国中医基础医学杂志,2017,23(1):121-123.
- [8] 李要远,萧百圆,贺用和. 风药抗肿瘤的研究进展[J]. 中国中药杂志,2011,36(23):3375-3379.
- [9] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,2006:1063-1064.
- [10] 江南雪,熊墨年,唐晓玲. 原发性肝癌的中医治疗进展[J]. 实用中西医结合临床,2016,16(10):84-86.
- [11] 李志辉,付娟,刘忠源. 肝癌的中医药治疗[J]. 中华临床医学杂志,2007,12(8):55.
- [12] 周蓓,梁艳菊. 周岱翰教授病证结合辨治原发性肝癌经验简介[J]. 新中医,2011,43(8):185-186.
- [13] 何若苹,徐光星,顾锡冬. 何任教授中医药辨治肝癌经验探讨[J]. 中西医结合肝病杂志,2012,22(3):174-175.
- [14] 潘志恒,赵志新. 慢性肝病中西医结合治疗学[M]. 北京:人民卫生出版社,2009:335.
- [15] 贺用和,韩静. 论“风”与肿瘤转移[J]. 中国中医基础医学杂志,2006,12(2):124-126.
- [16] 程杏安,蒋旭红,刘展眉,等. 僵蚕七种化学成分抗肿瘤活性的初步研究[J]. 仲恺农业工程学院学报,2015,28(4):35-39.

- [7] WU WP, CAO J, WU JY, et al. Anticancer activity of Bombyx batryticatus ethanol extract against the human tumor cell line HeLa [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(1): 79-88.
- [8] LI J, YANG B, ZHOU Q, et al. Autophagy promotes hepatocellular carcinoma cell invasion through activation

of epithelial-mesenchymal transition [J]. Carcinogenesis, 2013, 34(6): 1343-1351.

- [9] DE WEVER O, PAUWELS P, DE CRAENE B, et al. Molecular and pathological signatures of epithelial-mesenchymal transitions at the cancer invasion front [J]. Histochem Cell Biol, 2008, 130(3): 481-494.

Influence of Serum Containing Stiff Silkworm [*Bombyx Batryticatus*] on Invasion Ability of Hepatocarcinoma

YAN Yiquan^{1,2}, ZHAO Xingcheng², DU Yongping¹, XIE Juan¹

(1. First Affiliated Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an, 710032; 2. Department of Aerospace Medicine, the Fourth Military Medical University)

ABSTRACT **Objective** To explore the potential mechanism of the resistance of Jiangcan (stiff silkworm) to liver cancer metastasis. **Methods** Ten Sprague Dawley rats were given 630 mg/100 g solution of stiff silkworm decoction orally, while another ten rats given equal volume of normal saline by gavage. They were treated for 3 days. One hour after the administration on the 3rd day, blood from heart was drawn to prepare the rat serum containing medicine. Hepa1-6 cells were divided into a control group and an experimental group, and were respectively cultured by the control serum and serum containing stiff silkworm. 5-ethynyl-2-deoxyuridine (EdU) staining was used to detect the positive staining rate of Hepa1-6 cells in each group to determine the proliferation; Transwell chamber assay was used to detect cell invasion ability; a blank group was established, and mRNA expressions of E-cadherin and N-cadherin in Hepa1-6 cells were detected by RT-PCR. **Results** The positive rate of Hepa1-6 EdU staining in experimental group was lower than that in the control group, and the hepatocarcinoma invasion number was also lower than that in the control group ($P < 0.01$). Compared with the blank group, E-cadherin mRNA was down-regulated and N-cadherin mRNA were up-regulated in the control group ($P < 0.05$); compared with the control group, the expression of E-cadherin mRNA increased, and the expression of N-cadherin mRNA decreased in the experimental group ($P < 0.05$). **Conclusion** Stiff silkworm-containing serum can inhibit the proliferation and invasion of Hepa1-6 in vitro, which may inhibit the metastasis of hepatocellular carcinoma by attenuating the epithelial mesenchymal transition.

Keywords liver cancer; stiff silkworm; invasive ability; metastasis; epithelial mesenchymal transition

(收稿日期: 2017-05-31; 修回日期: 2017-07-10)

编辑: 邓 媛

欢迎订阅 《世界中西医结合杂志》

《世界中西医结合杂志》[ISSN 1673-6613, CN 11-5511/R] 由中国科学技术协会主管, 中华中医药学会主办的学术期刊, 国内外公开发刊。由中国科学院院士吴孟超任名誉主编, 首届国医大师、中国中医科学院资深研究员路志正教授任主编。本刊为中国科技核心期刊, 连续两届获得中国科协精品科技期刊示范项目资助, 2012 年获得国家中医药管理局优秀期刊二等奖, 中华中医药学会中医药标志性文化(徽标)一等奖, 2013 年获中国知网“中国国际影响力优秀学术期刊”奖中国科协精品科技期刊, 2015 年获中国科协精品科技期刊项目, 影响因子逐年提升。本刊辟有国医传承、博士论坛、文献研究、实验研究、药物研究、临床研究、思路与方法、海外中医药动态、综述等栏目。及时报道中医及中西医结合在临床、科研等方面的新理论、新技术、新思路、新成果, 探讨中西医结合的思路和方法, 介绍相关学术领域的国内外新进展, 开展学术讨论。

本刊为月刊, 大 16 开本, 每月 28 日出版。每期定价 14 元, 168 元/年。订阅方式: 全国各地邮局订阅, 邮发代号: 80-538。

地址: 北京市朝阳区北土城西路 11 号北京城建开发大厦东座 303 室, 邮政编码: 100029

联系电话: (010) 82275991