

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.06.003

溪黄草对肝癌 HepG2 细胞基因表达谱的影响*

罗莹¹,廖长秀^{2,3△},贺珊¹,赖术^{2,3},黎为能^{2,3}

(1. 右江民族医学院机能实验教学中心,广西百色 533000;2. 右江民族医学院药理学教研室,广西百色 533000;3. 右江流域特色民族药研究重点实验室,广西百色 533000)

[摘要] **目的** 采用表达谱芯片研究溪黄草水提取物对人肝癌细胞 HepG2 相关基因的影响,探讨溪黄草水提取物对肝癌作用的可能机制。**方法** 体外培养人肝癌细胞 HepG2,加入溪黄草水提取物(9.54 mg/mL)作用 24 h 后,表达谱芯片检测溪黄草作用后 HepG2 基因的改变,并用 RT-PCR 和 Western blot 验证芯片的结果。**结果** 相差显微镜下观察,发现与阴性对照组相比,溪黄草水提取物作用后 HepG2 细胞数量明显减少。表达谱芯片结果显示,溪黄草水提取物(9.54 mg/mL)作用 24 h 后 264 个基因比阴性对照组上升 2 倍以上,194 个基因比阴性对照组下降 2 倍以上。基因本体(GO)和 KEGG 分析表明溪黄草可上调 HepG2 细胞 DUSPs,IGFBPs 家族多个基因,下调 MCMs 家族多个基因。RT-PCR 检测发现与阴性对照组相比,溪黄草处理组 DUSP1 和 IGFBP1 升高,FXR 和 ALDH8A1 下降($P < 0.01$),与表达谱芯片结果一致。Western blot 结果发现溪黄草处理组 DUSP1 蛋白表达也显著高于阴性对照组($P < 0.01$)。**结论** 表达谱芯片研究表明溪黄草可通过调控多种基因而抑制肝癌细胞增殖。

[关键词] 溪黄草;癌,肝细胞;HepG2;基因表达谱**[中图分类号]** R969.4**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2018)06-0728-05

Effect of rabdosia serra (maxim.) hara on gene expression profile of hepatocellular carcinoma HepG2 cells*

LUO Ying¹,LIAO Zhangxiu^{2,3△},HE Shan¹,LAI Shu^{2,3},LI Weineng^{2,3}

(1. Functional Experimental Teaching Center, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China;

2. Department of Pharmacology, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China;

3. Key Laboratory of Characteristic Ethnic Medicine Research in Youjiang River Valley, Baise, Guangxi 533000, China)

[Abstract] **Objective** To adopt the expression profile chip to investigate the effect of Rabdosia serra (Maxim.) hara water extract on related gene of human hepatocellular carcinoma(HCC) HepG2 cells for researching the possible mechanism of its water extract on HCC. **Methods** The human HCC HepG2 cells were cultured in vitro. After adding Rabdosia serra (Maxim.) hara water extract (9.54 mg/mL) for 24 h action, the expression profile chip was adopted to detect the HepG2 gene change after Rabdosia serra (Maxim.) hara action and then the chip results were verified by using RT-PCR and Western blot. **Results** The phase contrast microscope observation found that compared with the negative control group, the number of HepG2 cells was significantly reduced after Rabdosia serra (Maxim.) hara water extract action. The expression profile results showed that after Rabdosia serra (Maxim.) hara water extract action for 24 h, 264 genes were risen to over twice folds compared with the negative control group and 194 genes were decreased by over twice folds compared with the negative control group. The gene ontology(GO) and KEGG analysis indicated that Rabdosia serra (Maxim.) hara could up-regulate multiple genes in DUSPs and IGFBPs family and down-regulate multiple genes in MCMs family. The RT-PCR detection found that compared with the negative control group, DUSP1 and IGFBP1 in the Rabdosia serra (Maxim.) hara treatment group were increased, while FXR and ALDH8A1 were decreased ($P < 0.01$), which were consistent with the results of expression profile chip. The Western blot results found that the protein expression level of DUSP1 in the Rabdosia serra (Maxim.) hara treatment group was also significantly higher than that in the negative control group ($P < 0.01$). **Conclusion** The expression profile chip shows that Rabdosia serra (Maxim.) hara can inhibit the proliferation of HCC cells by regulating multiple genes.

[Key words] rabdosia serra hara; carcinoma, hepatocellular; HepG2 cells; gene expression profile

原发性肝癌是世界上最常见的恶性肿瘤之一,每年新发病例超过 50 万人,且其发病率仍不断增长。中药在控制肝癌病情发展、改善症状体征及提高生存质量等方面具有独特的优势。中药溪黄草为民间常用草药,主要用于治疗急性黄疸型肝炎、急性胆囊炎、湿热痢疾、肠炎、跌打瘀肿和养生保健等。现代药理学研究溪黄草具有护肝利胆和抗肿瘤作用,作为多种抗肝癌复方组分用于肝癌的治疗,也有报道溪黄草单方对肝

癌细胞增殖有抑制作用,但其具体机制尚不清楚^[1-2]。本文利用表达谱芯片技术,从系统药理学角度研究溪黄草水提取物对人肝癌细胞 HepG2 相关基因的影响,以探讨溪黄草抗肝癌的可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料 人肝癌 HepG2 购于中国科学院上海细胞生物研究所,胎牛血清、DMEM 高糖培养基购自美国 Gibco 公司,溪

* 基金项目:广西壮族自治区自然科学基金资助项目(2014GXNSFAA118252);广西高校科学技术研究项目(KY2015ZD093)。作者简介:罗莹(1979—),实验师,硕士,主要从事中药药理的研究。△ 通信作者,E-mail:liao Zhangxiu@163.com。

表 1 DUSP1、IGFBP1、FXR 和 ALDH8A1 引物

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	引物大小(bp)
GAPDH	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	TGGTGAAGACGCCAGTGGGA	138
DUSP1	GCTCAGCCTTCCCCTGAGTA	GATACGCACTGCCAGGTACA	131
IGFBP1	CACAGGAGACATCAGGAGAAGAAA	ACACTGTCTGCTGTGATAAAATCCA	83
FXR	CCTGGATTTCTTCTGGACAT	TGTATTGCGAGTATGGTTCC	251
ALDH8A1	GAACTTCAGGTTCTTCGCTTCC	GCACAACATCCACGCAGTCA	238

黄草购自广西中医药大学附属医院,由右江民族医学院覃道光副教授鉴定为溪黄草全株,Trizol 为美国 Invitrogen 公司产品,总 RNA 提取试剂盒为美国 Zymo Research 公司产品、FastQuant RT Kit(With gDNase)、SuperReal 荧光定量预混试剂增强版(SYBR Green)购自天根生化科技(北京)有限公司,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,DUSP1 兔单克隆抗体购于英国 Abcam 公司,GAPDH 鼠单克隆抗体、辣根(HRP)标记羊抗兔 IgG 抗体、辣根(HRP)标记羊抗鼠 IgG 抗体为中杉金桥公司产品,其他 Western blot 电泳和转膜及封闭试剂购于碧云天生物技术公司。

1.2 方法

1.2.1 溪黄草水提取物的制备 取溪黄草全株适量,加 10 倍量的水,煎煮 2 次,每次 1 h,合并滤液,浓缩,经冷冻干燥机制成溪黄草水提取物冻干粉,-20 °C 密闭保存。临用前用 PBS 溶解,高压蒸汽灭菌,0.25 μm 无菌滤器过滤后用完全培养基稀释 20 倍(经 MTT 实验证实含该浓度的 PBS 对细胞生长无明显影响),配制成分浓度为 9.54 mg/mL 的溪黄草水提取物。

1.2.2 细胞培养及处理 HepG2 细胞含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,置于 37 °C、含 5% CO₂ 的培养箱中培养,细胞密度为 80%~90% 时可进行传代,2~3 d 传代 1 次。取对数生长期细胞,胰酶消化成单细胞悬液,调整至合适的细胞密度,分别接种至 25 cm² 培养瓶和 6 孔板,实验分为 2 组:溪黄草水提取物组和阴性对照组(加含等量 PBS 的完全培养基)。细胞接种 24 h 后实验组分别加入溪黄草水提取物终浓度是 9.54 mg/mL 的完全培养基,对照组加等量培养基,作用 24 h 后,25 cm² 培养瓶加入 1 mL Trizol,送至上海卓立生物科技有限公司进行表达谱芯片检测。6 孔板细胞用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。

1.2.3 表达谱芯片研究 由上海卓立生物科技有限公司经 RNA 提取、质量鉴定合格后,与 HOA 7.1 版本的芯片进行杂交,Cy5 标记 aRNA,杂交程序为 OneArray Plus,Agilent 0.1 XDR 程序扫描,分析 28 266 个基因的变化。

1.2.4 RT-PCR 验证表达芯片的结果 6 孔板细胞(每组重复 3 个复孔)提取细胞总 RNA,用紫外分光光度法检测总 RNA 纯度和浓度,取 1 μg RNA 按试剂盒说明进行反转录,取合成的 cDNA 进行实时荧光定量 PCR,引物由 Primer Premier 5.0 软件设计,引物序列、产物大小见表 1。反应体系按试剂盒说明,GAPDH、DUSP1 和 IGFBP1 反应条件为:预变性 95 °C

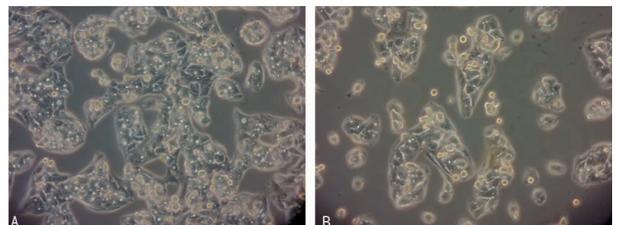
15 min;变性 95 °C 10 s,退火/延伸 60 °C 20 s,共 40 个循环(Roche Lightcycler96 荧光定量 PCR 仪扩增);ALDH8A1 和 FXR 反应条件为:预变性 95 °C 15 min;变性 95 °C 10 s,退火 60 °C 20 s,延伸 72 °C 20 s,共 40 个循环(Bio-rad IQ5 荧光定量 PCR 仪扩增),结果分析采用 2^{-ΔΔCt} 法分析。

1.2.5 Western blot 验证表达芯片的结果 6 孔板细胞(每组重复 3 个复孔)提取细胞总蛋白,用 BCA 法检测总蛋白浓度,取 15 μg 蛋白与 6 × 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)上样缓冲液按 5 : 1 比例混匀煮沸变性 5 min,SDS-PAGE 电泳,湿法转膜,5% BSA 封闭 2 h,一抗 4 °C 孵育过夜,洗膜,二抗室温孵育 2 h,洗膜,化学发光法显色,胶片曝光适当时间,经显影、定影后,扫描后用 Image J 软件读取各组条带灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 相差显微镜观察溪黄草水提取物对 HepG2 细胞的影响 相差显微镜下观察,溪黄草水提取物 9.54 mg/mL 处理 24 h 后,细胞形态皱缩,细胞数量明显减少,见图 1。



A: 阴性对照组;B: 溪黄草水提取物组(9.54 mg/mL)

图 1 相差显微镜观察溪黄草水提取物对 HepG2 细胞的影响(×400)

2.2 表达谱芯片观察溪黄草水提取物对 HepG2 基因的影响 溪黄草水提取物(9.54 mg/mL)作用 24 h 后 264 个基因上升 2 倍以上,194 个基因下降 2 倍以上。其中增加和下降至对照组 5 倍以上的基因见表 2。

2.3 表达谱芯片分析溪黄草水提取物对 HepG2 功能的影响 基因本体(GO)分析发现溪黄草主要影响 24 个 HepG2 分子功能,167 个生物进程通路和 9 个细胞组成。溪黄草处理后主要的 GO 分析变化的通路见表 3。KEGG 分析溪黄草主要影响 7 个 HepG2 信号通路,见表 4。

表 2 溪黄草水提取物(9.54 mg/mL)处理肝癌 HepG2 细胞 24 h 后变化达 5 倍以上的基因

基因库 ID	基因	倍数(溪/阴)	基因库 ID	基因	倍数(溪/阴)
NM_000499	CYP1A1	15.80	NM_001005339	RGS10	5.32
NM_002422	MMP3	15.08	NM_014331	SLC7A11	5.22

续表 2 溪黄草水提取物(9.54 mg/mL)处理肝癌 HepG2 细胞 24 h 后变化达 5 倍以上的基因

基因库 ID	基因	倍数(溪/阴)	基因库 ID	基因	倍数(溪/阴)
NM_145051	RNF183	14.83	NM_001077710	FAM110C	5.22
NM_004925	AQP3	11.02	NM_001216	CA9	5.21
NM_000598	IGFBP3	8.84	NM_001964	EGR1	5.12
NM_000463	UGT1A1	7.59	NM_170771	ALDH8A1	0.09
NM_024943	TMEM156	7.03	NM_002167	ID3	0.09
NM_001955	EDN1	6.43	NM_181353	ID1	0.11
NM_000596	IGFBP1	6.40	NM_001257119	CASP1	0.15
NM_007021	C10orf10	6.37	NM_207381	TNFAIP8L3	0.17
NM_003991	EDNRB	6.11	NM_020995	HPR HP	0.18
NM_004419	DUSP5	5.92	NM_007231	SLC6A14	0.18
NM_017705	PAQR5	5.89	NM_001242889	DDC	0.19
NM_078487	CDKN2B	5.87	NM_181712	KANK4	0.20
NM_006408	AGR2	5.74	NM_002166	ID2	0.20
NM_001124	ADM	5.69	NM_005949	MT1F	0.20
NM_006350	FST	5.47			

表 3 溪黄草水提取物影响 HepG2 的表达谱芯片 GO 分析结果

GO ID	筛选目标	差异基因
0005520	胰岛素样生长因子结合	IGFBP1,IGFBP3,IGFBP4,IGFBP6,IGFBP7,CYR61
0043566	结构特异性 DNA 结合	KLF6,EGR1,ERCC1,FEN1,FOS,MSH6, HMGB2,MCM4,MCM7,MSH2,BCL6,FXR
0033549	MAPK 磷酸酶活性	DUSP1,DUSP5,DUSP6,DUSP9,DUSP13
0016538	细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶调节活性	CDKN1A,CDKN2B,CDKN2C,CCND1
0008283	细胞增殖	FST,CYP1A1,ERCC1,FRAT2,UHRF1,ID4,IGFBP4,CYR61,ITGA2,CRIP3,MCM7,MKI67,NASP,PDZK1,PIM1,CSGALNACT1,KIF15,SKP2,FSCN1,Src,TGFBI,TGFBR3, TXNRD1,E2F8,OSMR,GINS1
0006260	DNA 复制	DUT,FEN1,HMGB2,MCM2,MCM3,MCM4,MCM5,MCM7,NASP,ORC1,GINS2,POLE2,MCM10,POLD4,DSCC1,GINS1
0007049	细胞周期	CDKN1A,CDKN2B,CDKN2C,CETN2,PLK3,DUSP1,E2F2,FBXO5,RGCC,UHRF1,MSH6,H2AFX,ID4,CXCL8,KIF11,KIF22,STMN1,MCM2,MCM3,MCM7,MDM2,MKI67,MSH2,NASP,DUSP13,PIM1,PSMB9,KIF15,CCND1,SKP2,DSCC1,E2F8,CDCA3,CCNE1,AU-RKB,TP53INP1

表 4 KEGG 分析溪黄草改变 HepG2 的信号通路

信号通路	差异基因
细胞周期	CDKN1A,CDKN2B,CDKN2C,E2F2,MCM2,MCM3,MCM4,MCM5,MCM7,MDM2,ORC1,CCND1,SKP2,CCNE1
DNA 复制	FEN1,MCM2,MCM3,MCM4,MCM5,MCM7,POLE2,POLD4
癌症通路	CDKN1A,CDKN2B,CEBPA,E2F2,FGFR2,FN1,FOS,MSH6,CXCL8,ITGA2,MDM2,MSH2,EGLN1,CCND1,SKP2,SLC2A1,SOS1,CCNE1
p53 信号通路	CDKN1A,IGFBP3,MDM2,SERPINE1,PMAIP1,CCND1,CCNE1
膀胱癌	CDKN1A,E2F2,CXCL8,MDM2,CCND1
小细胞肺癌	CDKN2B,E2F2,FN1,ITGA2,CCND1,SKP2,CCNE1
前列腺癌	CDKN1A,E2F2,FGFR2,MDM2,CCND1,SOS1,CCNE1

2.4 RT-PCR 验证部分芯片结果 将溪黄草水提取物处理的 HepG2 提取总 RNA,实时定量 PCR 检测 DUSP1、IGFBP1、ALDH8A1 和 FXR(NR1H4)表达发现,与阴性对照组相比,溪黄草水提取物处理后明显增加 DUSP1 和 IGFBP1 的 mRNA

表达,降低 ALDH8A1 和 FXR 的 mRNA 表达,差异有统计学意义($P < 0.01$),与芯片结果基本一致。

2.5 Western blot 验证部分芯片结果 将溪黄草水提取物处理的 HepG2 提取总蛋白,Western blot 检测 DUSP1 蛋白表达

发现,与阴性对照组相比(蛋白条带灰度值 DUSP1/GAPDH 为 1.15±0.19),溪黄草水提取物处理后(蛋白条带灰度值 DUSP1/GAPDH 为 2.87±0.35)可明显增加 DUSP1 蛋白表达,差异有统计学意义($P<0.01$),见图 2,与芯片结果一致(溪黄草水提取物处理后 DUSP1 mRNA 表达增加为阴性对照组的 2.18 倍)。

表 5 溪黄草水提取物对 HepG2 中 DUSP1、IGFBP1、FXR 和 ALDH8A1 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	DUSP1	IGFBP1	ALDH8A1	FXR
阴性对照组	1.00±0.06	1.00±0.11	1.00±0.08	1.00±0.11
溪黄草水提取物组	1.38±0.07*	2.19±0.28*	0.19±0.10*	0.16±0.02*
芯片结果(倍)	2.18	6.40	0.09	0.21

*: $P<0.01$,与阴性对照组比较;芯片结果中倍数数值是指溪黄草水提取物组/阴性对照组

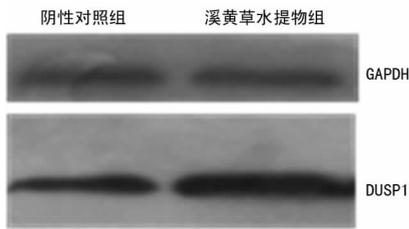


图 2 Western blot 检测溪黄草水提取物对 HepG2 细胞 DUSP1 蛋白表达的影响

3 讨论

中药治疗疾病具有多组分、多靶点的特点。本研究采用表达谱芯片技术研究了治疗肝病的经典中药溪黄草对肝癌 HepG2 细胞的影响,发现溪黄草水提取物可改变肝癌 HepG2 细胞 458 个基因的表达,并影响多个分子功能、生物进程、细胞组分和相关的信号通路。

本研究发现溪黄草水提取物处理后促进细胞增殖的细胞周期蛋白 D(cyclin D1, CCND1)、细胞周期蛋白 E(cyclin E1, CCNE1)、S 期激酶相关蛋白 2(S-phase kinase-associated protein 2, SKP2)^[3]及起始识别复合物 1(origin recognition complex subunit 1, ORC1)^[4]均明显降低,而抑制细胞增殖的细胞周期依赖性激酶抑制因子 CDKN1A(cyclin-dependent kinase inhibitor 1A, p21)及 CDKN2B(cyclin-dependent kinase inhibitor 2B, p15)则明显升高,表明溪黄草可通过多种调控细胞周期的基因和蛋白抑制细胞增殖。

微小染色体维持蛋白(minichromosome maintenance proteins, MCM)是真核细胞 DNA 复制准许因子中的一个重要成员,可启动和参与 DNA 复制,对细胞 DNA 复制和周期具有调控作用^[5]。其家族主要有 MCM2~MCM7,已有研究表明 MCM2、MCM3、MCM6、MCM7 等在肝癌组织或肝癌细胞中异常表达, RNA 干扰降低 MCM7 的表达可使肝癌细胞增殖减少、凋亡增多,细胞周期 S 期缩短,裸鼠移植瘤生长减慢^[6-9]。本研究发现溪黄草水提取物处理的肝癌 HepG2 细胞 MCM2、MCM3、MCM4、MCM5、MCM7 均表达明显降低,分别降至阴性对照组的 0.35、0.32、0.41、0.39 和 0.40 倍,提示溪黄草可能通过抑制 MCM 家族表达,进一步抑制肝癌细胞增殖及使其更多处于静止期,并促进其凋亡。

本研究结果发现溪黄草水提取物处理 HepG2 细胞胰岛素

样生长因子结合蛋白超家族(insulin-like growth factor binding protein superfamily, IGFBPs)中 IGFBP1、IGFBP3、IGFBP4、IGFBP6、IGFBP7、CYR61 均明显增加,分别增加至对照组的 6.40、8.84、2.06、2.80、2.02 和 3.09 倍,其中 IGFBP1 mRNA 表达已通过 RT-PCR 验证与芯片结果一致。已知胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)与胰岛素结构相似,是具有促进物质代谢、降低血糖、促进细胞分裂等多种功能的细胞增殖调控因子。IGFBPs 可与其结合,结合后 IGF 作用减弱^[10]。有研究报道 IGFBP1 和 IGFBP3 在肝癌组织或肝癌患者血清均低于正常水平,其与肝癌的预后呈正相关^[11-12]。也有研究报道 IGFBP3 可通过非 IGF 途径抑制肿瘤细胞增殖,促进其凋亡^[13],提示 IGFBPs 可能参与肝癌的发生、发展及预后。本研究结果表明溪黄草能提高部分 IGFBPs 表达,通过 IGF 和非 IGF 途径抑制肝癌细胞增殖,促进其凋亡。

已知 MAPK(mitogen-activated protein kinase)是细胞内一类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可将细胞内的信号转导到细胞外,参与细胞的生长和分化、调节细胞周期和凋亡及血管的生成等^[14]。目前已有研究表明 MAPK 相关信号转导通路(ERK1/2、p38、JNK 和 ERK5)通过调节肝癌细胞的增殖、凋亡、侵袭及转移^[15-16],在肝癌的发生过程中起着重要的调控作用,成为肝癌防治的重要作用靶点。而双特异性磷酸酶(dual-specificity protein phosphatases, DUSPs)则可使 MAPK 去磷酸化,而抑制其活性,进一步调控肝癌的发生、发展^[17]。目前已有研究证实, DUSP1 在抑制肝癌发生、发展中起着重要作用,它的表达与 ERK 的表达呈负相关,与肝癌细胞增殖指数、细胞的凋亡和存活率,以及微血管密度紧密相关^[18]。可通过调控 p-38/MAPK 磷酸化增强 p-53 的磷酸化水平,诱导其下游靶基因 p21 和 p27 的表达,调控细胞周期和细胞凋亡^[19]。研究表明 DUSP5 同家族中的其他成员一样,通过调控 MAPK 信号通路,调控多种肿瘤细胞的增殖、凋亡、侵袭转移等过程,与肿瘤的发展及预后密切相关^[20-21]。但是对肝癌细胞的影响方面尚未见有相关研究。本研究发现溪黄草水提取物处理的肝癌 HepG2 细胞 DUSP1(2.18 倍, RT-PCR 及 Western blot 结果均已证实)、DUSP5(5.92 倍)、DUSP6(2.89 倍)和 DUSP13(4.86 倍)表达均明显升高,而 DUSP9(0.44 倍)表达下降,提示溪黄草水提取物可通过升高部分 DUSPs 活性,抑制 MAPK 的细胞增殖作用,从而达到抗肝癌或其他肿瘤的作用。

本研究通过芯片和 RT-PCR 技术均发现溪黄草处理后肝癌细胞 ALDH8A1(aldehyde dehydrogenase 8 family, member A1)显著降低, ALDH8A1 主要参与 9-顺式视黄醛转化为 9-顺式视黄酸的过程^[22],目前关于其与肝癌的关系研究较少,溪黄草显著下降 ALDH8A1 mRNA 表达(已通过 RT-PCR 验证与芯片结果一致)的作用究竟对肝癌治疗的是利还是弊有待进一步研究。法尼酯 X 受体(farnesoid X receptor, FXR)调节胆汁酸代谢、胆固醇代谢、脂代谢,有研究报道 FXR 在肝癌组织表达高于癌旁组织,去除 FXR 则可自发生成肝脏肿瘤,激活 FXR 则可抑制肝癌细胞增殖^[23-25]。本研究显示,溪黄草水提取物可显著降低肝癌细胞 FXR 的表达,是否会抑制其抗肝癌作用还有待于进一步研究。

有研究表明溪黄草含有多种活性抗肿瘤成分如二萜类化合物、三萜类化合物、多酚类化合物及活性多糖^[26],溪黄草水提取物的抗肝癌作用可能是这多种抗肿瘤活性成分的协同作

用,具体这些活性成分在溪黄草抗肝癌中的比重还需进一步通过谱-效关系确定。

综上所述,表达谱芯片表明溪黄草水提取物主要可上调 IGF1Rs、DUSPs 及 CDKNs 等抑癌基因的表达,下调与肿瘤细胞增殖和 DNA 复制相关的 MCMs 等基因的表达,进而抑制肝癌细胞增殖和 DNA 复制,从而发挥其抗肝癌作用。但也可能上调促肝癌发生、发展基因(如 MMP3、CYP1A1 等)的表达,下调抑制肝癌发生、发展基因(如 FXR 等)的表达,需要辨证或整体看待溪黄草对肝癌的作用,以及进一步研究这些基因整体对肝癌的调控作用。

参考文献

- [1] 陈源红,曾怡,罗艳红. 溪黄草对肝癌细胞 HepG2 增殖及凋亡的影响[J]. 山东大学学报(医学版),2013,51(11):42-45.
- [2] 唐静雯,裴俊文,田同德,等. 疏肝解毒活血汤联合西药治疗中晚期原发性肝癌 31 例[J]. 中医研究,2014,27(7):26-28.
- [3] 周幸. S 期激酶相关蛋白 2 与人类恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 医学研究生学报,2011,24(5):554-557.
- [4] 江明宏,舒茂琴. 起始识别复合物在细胞周期中作用的研究进展[J]. 医学研究生学报,2007,20(1):80-82.
- [5] 高峻,杨宏新. 微小染色体维持蛋白在肿瘤研究中的进展[J]. 包头医学院学报,2014,30(1):137-139.
- [6] 王晓林,熊枝繁,冯茂辉,等. 微型染色体维持蛋白 2 在肝细胞癌中的表达及其意义[J]. 中华肝脏病杂志,2010,18(7):548-549.
- [7] TANIAI E, YAFUNE A, KIMURA M, et al. Fluctuations in cell proliferation, apoptosis, and cell cycle regulation at the early stage of tumor promotion in rat two-stage carcinogenesis models[J]. J Toxicol Sci, 2012, 37(6): 1113-1126.
- [8] ZHENG T, CHEN M, HAN S, et al. Plasma minichromosome maintenance complex component 6 is a novel biomarker for hepatocellular carcinoma patients[J]. Hepatol Res, 2014, 44(13): 1347-1356.
- [9] 孙雯. RNA 干扰技术沉默 MCM7 基因对人肝癌 SMMC-7721 细胞生物学行为和裸鼠抑制瘤的影响[D]. 南宁:广西医科大学,2013.
- [10] MA Y, HAN C C, LI Y, et al. Insulin-like growth factor-binding protein-3 inhibits IGF-1-induced proliferation of human hepatocellular carcinoma cells by controlling bFGF and PDGF autocrine/paracrine loops[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2016, 478(2): 964-969.
- [11] 戴斌. IGF1R 在肝癌组织中的表达、功能和作用机制研究[D]. 西安:第四军医大学,2015.
- [12] 姚一帆,毛卫林,董敏雅,等. 血清类胰岛素样生长因子结合蛋白-3 在肝癌早期复发中的预测价值[J]. 临床检验杂志,2016,34(8):630-634.
- [13] GUCEV Z S, OH Y, KELLEY K M, et al. Evidence for insulin-like growth factor (IGF)-independent transcriptional regulation of IGF binding protein-3 by growth hormone in SKHEP-1 human hepatocarcinoma cells[J]. Endocrinology, 1997, 138(4): 1464-1470.
- [14] KLEIN A M, ZAGANJOR E, COBB M H. Chromatin-tethered MAPKs[J]. Curr Opin Cell Biol, 2013, 25(2): 272-277.
- [15] NAKAGAWA H, HIRATA Y, TAKEDA K, et al. Apoptosis signal-regulating kinase 1 inhibits hepatocarcinogenesis by controlling the tumor-suppressing function of stress-activated mitogen-activated protein kinase [J]. Hepatology, 2011, 54(1): 185-195.
- [16] LIU W, NING R, CHEN R N, et al. Aspaflilioside B induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis by up-regulating H-Ras and N-Ras via ERK and p38 MAPK signaling pathways in human hepatoma HepG2 cells[J]. Mol Carcinog, 2016, 55(5): 440-457.
- [17] CAMPS M, NICHOLS A, ARKINSTALL S. Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function[J]. FASEB J, 2000, 14(1): 6-16.
- [18] CALVISI D F, PINNA F, MELONI F, et al. Dual-specificity phosphatase 1 ubiquitination in extracellular signal-regulated kinase-mediated control of growth in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4192-4200.
- [19] HAO P P, LI H, LEE M J, et al. Disruption of a regulatory loop between DUSP1 and p53 contributes to hepatocellular carcinoma development and progression[J]. J Hepatol, 2015, 62(6): 1278-1286.
- [20] SHIN S H, PARK S Y, KANG G H. Down-regulation of dual-specificity phosphatase 5 in gastric cancer by promoter CpG island hypermethylation and its potential role in carcinogenesis[J]. Am J Pathol, 2013, 182(4): 1275-1285.
- [21] STAEGE M S, MLLER K, KEWITZ S, et al. Expression of dual-specificity phosphatase 5 pseudogene 1 (DUSP5P1) in tumor cells[J]. PLoS One, 2014, 9(2): e89577.
- [22] 刘佳莹,李淑珍,李晓玲,等. 醛脱氢酶 8A1 融合蛋白的表达及其多克隆抗体的制备与鉴定[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2008,24(12):1197-1198,1201.
- [23] LI G, KONG B, ZHU Y, et al. Small heterodimer partner overexpression partially protects against liver tumor development in farnesoid X receptor knockout mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2013, 272(2): 299-305.
- [24] 孟祥宽,刘念,冯虎,等. FXR 在肝细胞癌组织和癌旁正常组织中的差异表达[J]. 中国实验诊断学,2015,19(7): 1169-1171.
- [25] 位全芳,路菊,陶忠芬,等. FXR 激动剂 GW4064 对裸鼠肝癌细胞移植瘤增殖及血管生成的影响[J]. 现代生物医学进展,2015,15(4):607-609.
- [26] 林恋竹. 溪黄草有效成分分离纯化、结构鉴定及活性评价[D]. 广州:华南理工大学,2013.