【简报】

抗乙型肝炎病毒中药复方 ZYD 对人肝癌 SMMC-7721 细胞生物学行为及机制的探讨

郭 平[1,2]，黄 卉[1]，康 超[1]，钟 云[1]，李 娜[1]，张 冰[2*]
（1. 北京汉典制药有限公司企业技术中心，北京 100020；2. 北京中医药大学，北京 100029）

摘要：目的 阐明抗乙型肝炎病毒中药复方 ZYD 对人肝癌 SMMC-7721 细胞生物学行为产生的影响，并探讨其可能的作用机制。**方法** 采用四甲基偶氮唑盐比色法（MTT）检测细胞的增殖能力，细胞黏附试验检测细胞的黏附能力，划痕试验检测细胞的迁移能力，流式细胞术检测细胞的周期和凋亡，逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）检测基质金属蛋白酶（*MMP*）-*2*、*MMP-9*、金属蛋白酶组织抑制剂 1（*TIMP-1*）、*Snail*、波形蛋白（*Vimentin*）、过氧化物酶 1（*Prx-1*）mRNA 的表达。**结果** ①复方 ZYD 可明显抑制 SMMC-7721 细胞增殖，且抑制作用优于组方中各单味药；②复方 ZYD 可明显抑制 SMMC-7721 细胞黏附能力，且具有剂量依赖关系；③复方 ZYD 可明显抑制 SMMC-7721 细胞迁移能力，且呈明显的量 - 效关系和时 - 效关系；④ ZYD 可促进 SMMC-7721 细胞凋亡，且在 S 期产生细胞周期阻滞；⑤各剂量复方 ZYD 均能显著下调 SMMC-7721 细胞 *MMP-2*、*Snail* mRNA 的表达，高剂量（1 000 μg/ml）复方 ZYD 能明显下调 *MMP-9* mRNA 的表达。**结论** 复方 ZYD 可通过促进细胞凋亡、S 期细胞周期阻滞而产生抑制肝癌 SMMC-7721 细胞增殖的作用，并通过下调 *Snail*、*MMP-2* 和 *MMP-9* mRNA 的表达抑制肝癌细胞的转移。

关键词：中药复方 ZYD；肝癌；SMMC-7721 细胞；增殖；转移
中图分类号：R735.2；R932 **文献标志码：**A **文章编号：**1672-9188（2018）05-0306-07
DOI：10.13683/j.wph.2018.05.005

Studies on the biological behavior and mechanism of human hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721 by the traditional Chinese medicine ZYD of anti-hepatitis B virus

GUO Ping[1,2], HUANG Hui[1], KANG Chao[1], ZHONG Yun[1], LI Na[1], ZHANG Bing[2*]
(*1. Beijing Han Dian Pharmaceutical Co., Ltd. Enterprise Technology Center, Beijing 100020;*
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: ***Objective*** To evaluate the effect of anti-hepatitis B virus traditional Chinese medicine ZYD on the biological behavior of human hepatocellular carcinoma cells SMMC-7721, and to discuss their possible mechanism. ***Methods*** The cell proliferation was detected by MTT; the cell adhesion ability was detected according to cell adhesion experiment; the cell migration ability was determined by scratch test; the cell cycle and apoptosis were tested by flow cytometry, and the reverse-transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR） was applied to detect the expression of *MMP-2*、*MMP-9*, *TIMP-1*, *Snail*, *Vimentin*, and *Prx-1* mRNA. ***Results*** ZYD could significantly inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells, and the inhibitory effect was better than each herb component. ZYD could inhibit the adhesion of SMMC-7721 cells in a dose-dependent manner, and could reduce the migratory ability of SMMC-7721 cells by dose-effect and time-effect manner.

收稿日期：2018-02-03；**修回日期：**2018-03-06
作者简介：郭 平，研究员，研究方向：中药防治代谢性疾病的基础与临床研究，专业特长：新药研发、体内外药效评价及机制研究。
通信作者：张 冰，教授，主任医师，博士研究生导师，研究方向：中药防治代谢性疾病的研究。
基金项目：中小企业创新基金（编号：09C26211100043）。

ZYD could promote apoptosis of SMMC-7721 cells and lead to cell cycle block in S stage. Furthermore, the expressions of *MMP-2* and *Snail* mRNA in SMMC-7721 cells were significantly down-regulated at each dose, while high dose（1 000 μg/ml）of ZYD could significantly reduce the expression of *MMP-9* mRNA. ***Conclusion*** ZYD can inhibit the proliferation of SMMC-7721 hepatoma cells by promoting cellular apoptosis and blocking cell cycle in S stage. Moreover, ZYD can suppress the metastasis of hepatocellular carcinoma cells by decreasing *Snail*, *MMP-2* and *MMP-9* mRNA expression.

Key words: traditional Chinese medicine ZYD; hepatocellular carcinoma; SMMC-7721 cell; proliferation; metastasis

肝癌是临床最常见的恶性肿瘤之一，位于全球癌症死亡率第三位，中国癌症死亡率第二位[1]，具有发病初期无症状、恶性程度高、病情进展快、生存期短和病死率高等特点。传统中医理论认为肝癌多属于“癥瘕、积聚、臌胀、黄疸、胁痛、胆胀、痞满和岩”等范畴，其主要病因为劳倦伤脾致脾不健运，或情志抑郁致肝失疏泄，导致体内产生瘀、毒、痰、湿、热等各种病理状态[2]。

抗乙型肝炎病毒中药复方 ZYD 由叶下珠、丹参、云芝和紫草组方而成，叶下珠、丹参、云芝和紫草均有一定的抗肿瘤作用[3-6]，中药复方 ZYD 临床上用于治疗慢性乙型病毒性肝炎辩证属湿热内蕴兼气虚血瘀者。我国 80% ～ 95% 肝癌患者乙肝表面抗原（HBsAg）呈阳性[7]，乙型肝炎病毒感染已被公认为肝癌的主要病因，若乙肝治疗不当，肝脏持续性损伤可发展为肝硬化，从而为肝癌结节的形成奠定基础[8]。这些都为中药复方 ZYD 用于肝癌治疗提供了理论依据和线索。本研究观察肝癌细胞 SMMC-7721 在药物干预下细胞生物学行为的改变，评价中药复方 ZYD 的体外抗肿瘤作用，并探讨其在肝癌治疗过程中可能的作用机制，同时评价中药复方 ZYD 与各单味药的药效差异，为肝癌的中药复方治疗提供参考。

1　材料与方法

1.1　细胞与药品

人肝癌细胞株 SMMC-7721（由中国科学院上海细胞库提供）。复方 ZYD（生产批号：13040102），ZYD 各提取部位混合物，叶下珠水提液过大孔树脂，叶下珠醇提物，叶下珠水提物，云芝水提物，紫草、丹参醇提物及紫草、丹参水提物均购自北京汉典制药有限公司。

1.2　方法

1.2.1　四甲基偶氮唑盐比色法（MTT）检测 ZYD 复方及组方中各单味药对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

人肝癌细胞株 SMMC-7721 于 10%FBS 的 1640 完全培养基中常规培养，以密度 3×10^3 个 / 孔接种于 96 孔板中。分别加入浓度为 500、1 000 μg/ml 的不同受试物：复方 ZYD（成品组），ZYD 各提取部位混合物（全方组），叶下珠水提液过大孔树脂（药物 1 组），叶下珠醇提物（药物 2 组），叶下珠水提物（药物 3 组），云芝水提物（药物 4 组），紫草、丹参醇提物（药物 5 组），紫草、丹参水提物（药物 6 组）。平行 3 孔，分别培养 24、48 和 72 h 后进行 MTT 检测。抑制率（%）＝（$A_{空白孔}-A_{测量孔}$）/（$A_{空白孔}-A_{调零孔}$）×100%。

1.2.2　细胞黏附试验检测 SMMC-7721 细胞黏附能力

以密度 1×10^6 个 / 孔接种于 6 孔板中，分别加入浓度为 500、750、1 000、1 500 和 2 000 μg/ml 的 ZYD，平行 3 孔，药物作用 48 h 后收集细胞并用 10%FBS 的 1640 完全培养基重悬细胞接种于 24 孔板，培养 4 h。甲醇固定 20 min（或用 95% 酒精固定 10 min），用 0.1% 结晶紫染色 15 ～ 20 min，用清水洗 3 次，风干，拍照。细胞黏附抑制率（%）＝（对照组细胞黏附数－药物组细胞黏附数）/ 对照组细胞黏附数 ×100%。

1.2.3　划痕试验法检测 SMMC-7721 细胞迁移能力

以密度 1×10^6 个 / 孔接种细胞于 6 孔板中，分别加入浓度为 500、1 000、1 500 和 2 000 μg/ml 的

ZYD，平行3孔。培养至细胞长满培养板后，吸弃上清，用20 μl的枪头在6孔板上画“一”字，对照组加入完全培养基。在100倍倒置显微镜下，分别于药物作用0、24和48 h时拍照。愈合率（%）＝（药物作用前痕迹宽度－药物作用后痕迹宽度）/药物作用前痕迹宽度×100%。

1.2.4 流式细胞术检测SMMC-7721细胞凋亡及周期

以密度1×10^{6}个/孔接种细胞于6孔板中，分别加入浓度为1 500、2 000、2 500、3 000、4 000 μg/ml和500、750、1 000 μg/ml复方ZYD于37 ℃培养48 h。采用流式细胞术检测SMMC-7721细胞的凋亡及周期。

1.2.5 逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）检测SMMC-7721细胞侵袭转移相关基因的表达

以密度1×10^{6}个/孔接种细胞于6孔板中，分别加入浓度为500、1 000、2 000 μg/ml ZYD培养48 h。Trizol法提取总RNA，分别扩增*Snail*基因（3'-CCTTCGTCCTTCTCCTCTACTT，5'-GCTTCTTGACATCTGAGTGGGT；94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，56.4 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s，35个循环，72 ℃ 5 min）、波形蛋白（*Vimentin*）基因（3'-CGA CGC CAT CAA CAC CGA GT，5'-CCG TGA GGT CAG GCT TGG AA；94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，56.4 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s，26个循环，72 ℃ 5 min）、过氧化物酶1（*Prx-1*）基因（3'-AGGAAATGCTAAAATTGGGCACC，5'-TCTTTGCTCTTTTGGACATCAGG；94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，59.7 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s，35个循环，72 ℃ 5 min）、基质金属蛋白酶（*MMP*）-2基因（3'-GGATGATGCCTTTGCTCG，5'-CAGTGGACATGGCGGTCT；94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，61 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s，40个循环，72 ℃ 5 min）、*MMP-9*基因（3'-GGCTACGTGACCTATGACATCCT，5'-TCCTCCCTTTCCTCCAGAACA；94 ℃ 2 min，94 ℃ 45 s，60.5 ℃ 45 s，72℃ 45 s，40个循环，72 ℃ 5 min）、金属蛋白酶组织抑制剂1（*TIMP-1*）基因（3'-CCAGAGAGACACCAGAGAACC，5'-GCTGGTATAAGGTGGTCTGGT；94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，60.3 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s，35个循环，72 ℃ 5 min）、*β-actin*基因（3'-TGACGTGGACATCCGCAAAG，5'-CTGGAAGGTGGACAGCGAGG；94 ℃ 2 min，94 ℃ 30 s，58 ℃ 30 s，72 ℃ 60 s，30个循环，72 ℃ 5 min）；PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳。

1.3 统计学方法

应用SPSS17.0软件对数据进行统计处理。计量资料以均数 ± 标均差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组计量资料分析采用One way ANOVA，多重比较采用LSD，线性相关采用线性回归分析，以$P<0.05$表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复方ZYD及组方中各单味药对SMMC-7721细胞增殖的影响

表1显示，随着作用时间的延长和给药剂量的增加，除药物4组，其余组均对SMMC-7721细胞增殖逐渐产生抑制作用，且抑制率方面，成品组＞全方组＞组方中各单味药组，并呈现明显的量-效关系和时-效关系。在500 μg/ml剂量下，48 h、72 h成品组和全方组的抑制率高于细胞对照组（$P<0.01$），72 h药物2、3、5组的抑制率高于细胞对照组（$P<0.05$或$P<0.01$）；在1 000 μg/ml剂量下，24、48、72 h成品组和全方组的抑制率均高于细胞对照组（$P<0.01$），72 h药物1、2、3、5、6组的抑制率高于细胞对照组（$P<0.01$）。

2.2 复方ZYD对SMMC-7721细胞黏附能力的影响

与细胞对照组比较，复方ZYD除500 μg/ml组外，其他各剂量组SMMC-7721细胞数量减少（$P<0.01$），且细胞数量随着复方ZYD浓度增加而递减，见表2。

2.3 复方ZYD对SMMC-7721细胞迁移能力的影响

表3显示，复方ZYD各剂量组的愈合率，随着给药剂量的增加而递减，随着给药时间的增加而增加。在划痕24 h后，细胞对照组愈合率为85.5%，复方ZYD各剂量组的愈合率均低于细胞对照组（$P<0.05$或$P<0.01$）；在划痕48 h后，细胞对照组的

表 1　复方 ZYD 及其单味药对 SMMC-7721 细胞增殖的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Table 1　Effect on the proliferation of SMMC-7721 cells of ZYD and its single herb（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	抑制率/%		
	24 h	48 h	72 h
细胞对照组	0	0	0
成品组（500 μg/ml）	-13.3±10.4**	19.5±4.1**	45.4±1.8**
全方组（500 μg/ml）	-6.8±2.3	6.7±2.1**	24.7±2.3**
药物 1 组（500 μg/ml）	-10.4±5.6*	-0.7±2.6	1.9±0.8
药物 2 组（500 μg/ml）	-11.1±1.3*	-3±2.9	7.1±3.0**
药物 3 组（500 μg/ml）	-24.6±6.7**	-5.3±2.8*	4.6±3.7*
药物 4 组（500 μg/ml）	-29.4±5.5**	-21.1±0.3**	-14.8±2.9*
药物 5 组（500 μg/ml）	-6.5±3.3	-0.8±4.9	7.1±3.0**
药物 6 组（500 μg/ml）	-12.1±3.5*	-12.8±0.6**	-3.3±1.2
成品组（1 000 μg/ml）	17.6±3.9**	54±6.3**	76.9±3.3**
全方组（1 000 μg/ml）	17.8±2.6**	40.1±5.3**	70.2±3.1**
药物 1 组（1 000 μg/ml）	-12.5±4.2**	7.9±4.0	22.5±5.5**
药物 2 组（1 000 μg/ml）	-17.3±1.6**	-1±3.1	19.3±2.6**
药物 3 组（1 000 μg/ml）	-21±3.7**	3.4±6.4	20.2±7.3**
药物 4 组（1 000 μg/ml）	-36.1±3.6**	-22.9±6.3**	-3.4±4.4
药物 5 组（1 000 μg/ml）	-10.6±3.9**	7.1±3.8	16.5±3.9**
药物 6 组（1 000 μg/ml）	-22.1±4.9**	-6.2±2.0	10.9±4.2**

与细胞对照组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$

vs the cell control group, *$P<0.05$, **$P<0.01$

表 2　复方 ZYD 对 SMMC-7721 细胞黏附能力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Table 2　Effect on the cell adhesion ability of SMMC-7721 cells of ZYD（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	细胞数量/个	抑制率/%
细胞对照组	396±28	
复方 ZYD 组		
500 μg/ml	367±27	7.3
750 μg/ml	227±13**	42.7
1 000 μg/ml	93±7**	76.5
1 500 μg/ml	46±5**	88.4
2 000 μg/ml	5±2**	98.7

与细胞对照组相比，**$P<0.01$

vs the cell control group, **$P<0.01$

痕迹完全愈合，复方 ZYD 各剂量组的痕迹愈合率均低于细胞对照组，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

表 3　复方 ZYD 对 SMMC-7721 细胞迁移能力的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Table 3　Effect on the cell migration ability of SMMC-7721 cells of ZYD（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	愈合率/%	
	24 h	48 h
细胞对照组	85.5±2.6	100.0±0.0
复方 ZYD 组		
500 μg/ml	78.9±4.5*	86.6±1.5**
1 000 μg/ml	62.3±2.7**	69.2±1.8**
1 500 μg/ml	52.9±2.6**	65.4±1.3**
2 000 μg/ml	26.8±6.7**	41.7±4.3**

与细胞对照组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$

vs the cell control group, *$P<0.05$, **$P<0.01$

表 4　复方 ZYD 对 SMMC-7721 细胞凋亡的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

Table 4　Effect on the apoptosis of SMMC-7721 cells of ZYD（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	细胞凋亡率/%
细胞对照组	4.2±0.4
复方 ZYD 组	
1 500 μg/ml	45.7±4.3**
2 000 μg/ml	50.2±3.7**
2 300 μg/ml	52.1±5.6**
3 000 μg/ml	56.2±5.0**
4 000 μg/ml	88.6±6.7**

与细胞对照组相比，**$P<0.01$

vs the cell control group, **$P<0.01$

表 5　复方 ZYD 对 SMMC-7721 细胞周期的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

Table 5　Effect on the cell cycle of SMMC-7721 cells of ZYD（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	细胞周期/%		
	G0/G1期	S期	G2/M期
细胞对照组	75.2±5.2	18.3±2.1	6.5±1.6
复方 ZYD组			
500 μg/ml	65.1±4.4	32.7±2.3*	2.2±0.8
750 μg/ml	56.3±4.1	41.2±3.3**	2.5±1.2
1 000 μg/ml	56.2±5.6	42.6±3.9**	1.1±1.8

与细胞对照组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$

vs the cell control group, *$P<0.05$, **$P<0.01$

2.4 复方 ZYD 对 SMMC-7721 细胞凋亡及细胞周期的影响

细胞凋亡试验结果显示，在培养 48 h 时，与细胞对照组相比，复方 ZYD 各剂量组细胞凋亡率增加，差异有统计学意义（$P < 0.01$），且凋亡率随着给药剂量的增加而增加（表 4）。

细胞周期试验结果显示，在培养 48 h 时，与细胞对照组相比，复方 ZYD 各剂量组 S 期细胞数比例增加，差异具有统计学意义差异（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$），G0/G1 期与 G2/M 期细胞数比例差异无统计学意义（$P > 0.05$）（表 5）。

2.5 复方 ZYD 对 SMMC-7721 细胞侵袭转移相关基因表达的影响

与细胞对照组相比，复方 ZYD 各剂量组 SMMC-7721 细胞 *MMP-2*（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）、*Snail*（$P < 0.01$）mRNA 的表达均降低，*MMP-9* mRNA 的表达也有下调，其中 ZYD 2 000 μg/ml 组差异具有统计学意义（$P < 0.01$）。与细胞对照组相比，复方 ZYD 各剂量组 SMMC-7721 细胞 *TIMP-1*、*Vimentin* 和 *Prx-1* mRNA 表达差异无统计学意义（$P > 0.05$）（图 1、表 6）。

3 讨论

肝癌是一种严重危害人类健康的疾病，临床上常用手术、介入、化疗等方法治疗。针对肝癌的靶向药物如索拉菲尼，在延长患者生存期的同时也伴随着较大的毒副反应[9]。另外某些治疗药物如多柔比星、氟尿嘧啶等，无论是单独用药还是联合用药，有效率均不高，且毒副作用大。因此，研发具有低

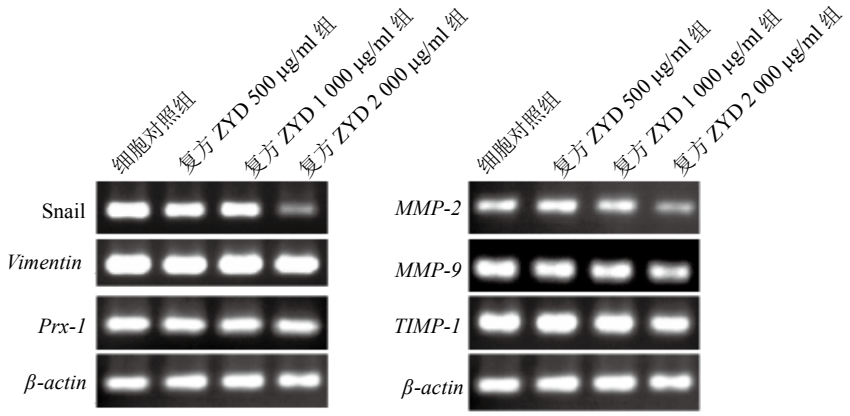


图 1 复方 ZYD 对 SMMC-7721 细胞侵袭转移相关基因影响的电泳图

Figure 1 Electrophorogram on the invasion and metastasis related genes of SMMC-7721 cells of ZYD

表 6 复方 ZYD 对 SMMC-7721 细胞侵袭转移相关基因的影响（$\bar{x}\pm s$，$n = 3$）

Table 6 Effect on the invasion and metastasis related genes of SMMC-7721 cells of ZYD（$\bar{x}\pm s$，$n=3$）

组别	基因相对表达量					
	Snail	*Vimentin*	*Prx-1*	*MMP-2*	*MMP-9*	*TIMP-1*
细胞对照组	1.10±0.05	1.75±0.07	1.22±0.06	1.03±0.09	1.19±0.07	1.39±0.05
复方 ZYD 组						
500 μg/ml	0.91±0.05**	1.68±0.19	1.11±0.11	0.86±0.09*	1.12±0.12	1.33±0.08
1 000 μg/ml	0.90±0.04**	1.71±0.19	1.15±0.06	0.84±0.08*	1.06±0.09	1.35±0.09
2 000 μg/ml	0.76±0.08**	1.64±0.21	1.12±0.04	0.70±0.09**	0.94±0.06**	1.24±0.05

与细胞对照组相比，*$P<0.05$，**$P<0.01$

vs the cell control group, *$P<0.05$, **$P<0.01$

毒性的抗肝癌药物是临床研究的热点和难点。我国传承千年之久的中药在安全性上有着明显的优势，用于治疗肝癌的中成药种类繁多，如肝复乐片等，具有一定的疗效，毒副作用较小，目前多为肝癌的辅助治疗用药。

中药复方 ZYD 具有毒副作用小的优势，还具有抗乙型肝炎病毒的作用，适用于我国肝癌患者高乙型肝炎病毒携带率的情况，这在抗肝癌中成药中较为少见。方中叶下珠性味甘苦、凉，入肝、肺经，平肝清热，利水解毒，为君药；云芝性味甘、平，益气养阴，扶正祛邪，调和阴阳，为臣药；君药解毒以祛邪，臣药补阴以扶正，君臣共奏祛邪扶正之功。丹参性味苦、微寒，入心、肝经，清营凉血，活血通经，此处用之活血化瘀、消肿止痛，是为佐使药；紫草性味苦、咸、寒，入心、肝经，凉血、活血，解毒，此处用之，与叶下珠配伍，既发挥清热凉血解毒之效，又增活血化瘀之功，也是佐使药。

癌症的发生机制十分复杂，其发病是多因素、多步骤、多基因突变的结果，主要表现为细胞的恶性增殖和无序凋亡，可以说细胞的恶性增殖是肿瘤发生的基础，有效抑制肿瘤细胞的增殖，是研究抗肿瘤药物的第一步 [10]。本研究通过 MTT 法观察复方 ZYD 及其组方中各单味药不同提取物对 SMMC-7721 细胞的影响，结果证明，对 SMMC-7721 细胞的增殖抑制作用复方 ZYD ＞提取物混合物＞组方中各单味药，且呈现明显的量 - 效关系和时 - 效关系，说明复方 ZYD 对 SMMC-7721 细胞具有抑制作用，同时也验证了组方的合理性。进一步的细胞凋亡与细胞周期试验结果表明，培养 48 h 时，剂量在 1 500 μg/ml 以上的复方 ZYD 可诱导 SMMC-7721 细胞产生细胞凋亡，剂量在 500 ～ 1 000 μg/ml 的复方 ZYD 可诱导 SMMC-7721 细胞在 S 期产生细胞周期阻滞。提示，复方 ZYD 可能通过诱导 SMMC-7721 细胞产生细胞凋亡，且通过抑制 S 期产生细胞周期阻滞，从而起到抑制 SMMC-7721 细胞增殖的作用。

肿瘤的转移是一个复杂的过程，肿瘤细胞需从原发瘤中脱落，向上皮基底膜及上皮浸润，从而进入循环系统，扩散黏附至其他部位并增殖形成转移瘤 [11]，故肿瘤细胞的增殖、黏附、迁移、侵袭能力决定了肿瘤的转移能力。而上皮细胞 - 间充质转化（EMT）是上皮细胞来源的恶性肿瘤细胞获得迁移和侵袭能力的重要生物学过程。E- 钙黏蛋白属于Ⅰ型钙黏蛋白，通过细胞质中的 α 和 β 蛋白连接到肌动蛋白细胞骨架，并通过形成胞外免疫球蛋白域而形成稳定的细胞间接触，从而阻止细胞活动侵袭及转移扩散 [12]。Snail 是一种锌脂蛋白，可通过 DNA 结合因子识别钙黏蛋白 E 启动子区的 E 盒，抑制钙黏蛋白 E 的表达，诱导 EMT 的发生。Vimentin 是间充质细胞中发现的一种中间丝蛋白，与肿瘤的发生和转移密切相关，Vimentin 调节细胞骨架蛋白、细胞黏附分子等蛋白间的相互作用，参与肿瘤细胞和肿瘤相关内皮细胞、巨噬细胞的黏附、迁移、侵袭和细胞信号转导 [13]。研究表明，间质表型的分子指标 Vimentin 的表达增加可以促进 EMT 的发生。从本研究的黏附、划痕试验结果可以看出，复方 ZYD 可以抑制 SMMC-7721 细胞的黏附和迁移能力，且呈现明显的量 - 效关系和时 - 效关系。而 RT-PCR 结果显示，复方 ZYD 可以下调 SMMC-7721 细胞 *Snail* mRNA 的表达，而对 *Vimentin* mRNA 的表达无显著影响，提示复方 ZYD 抑制肝癌转移的作用机制可能与下调 *Snail* mRNA 的表达有关。

Prx 1 属于 Prx 蛋白家族中的一员，后者是一类新发现的过氧化物酶，具有很强的抗氧化和清除自由基作用，在多种恶性肿瘤中都存在高表达现象，与肿瘤的发生、发展、侵袭、转移及放化疗敏感性相关 [14]。本研究结果显示，复方 ZYD 对 *Prx 1* mRNA 的表达并无显著影响，故其对肝癌转移作用的机制应与 Prx 1 无关。

Ⅳ型胶原是 ECM 和基底膜的主要结构蛋白，而 MMP 包括 MMP-2 和 MMP-9，是降解Ⅳ型胶原三螺旋部位惟一的酶，故 MMP 的过表达对肿瘤的侵袭和转移过程有着十分重要的促进作用 [15]。MMP

的表达和活性受转录水平、酶原激活和抑制剂抑制作用的调节[16]。TIMP-1是一种糖蛋白，分子量为28.5 kDa，可抑制多数MMP，并与MMP-9前体或有活性的MMP-9形成具有高亲和度的非共价复合物，从而阻止MMP-9的激活或直接抑制其活性[17]。大量研究证明，恶性肿瘤中MMP的活性和表达上调，而TIMP-1的活性和表达降低，从而打破MMP-9和TIMP-1之间的平衡增加其侵袭和转移能力。从本研究的RT-PCR结果可以看出，复方ZYD能降低*MMP-2*和*MMP-9* mRNA的表达，而*TIMP-1*没有升高，推测复方ZYD有可能通过其他信号通路调控*MMP-2*和*MMP-9* mRNA的表达。

4 结论

综上所述，中药复方ZYD可能通过细胞凋亡、S期细胞周期阻滞而发挥抑制肝癌SMMC-7721细胞增殖的作用；同时可能通过下调*Snail*、*MMP-2*和*MMP-9* mRNA的表达达到抑制肝癌转移的作用。

参考文献：

[1] 曾倩, 崔芳芳, 宇传华, 等. 中国癌症发病、死亡现状与趋势分析[J]. 现代生物医学进展, 2016, 33(2): 321-323.

[2] 谢晶日, 赵 刚, 梁国英. 原发性肝癌的中医药现代研究进展[J]. 中国医药导报, 2008, 5(7): 17-18.

[3] 戴卫波, 肖文娟. 叶下珠药理作用研究进展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(3): 498-500.

[4] 王爱云, 陶丽, 陆茵, 等. 丹参干预肿瘤和缺血性疾病血管生成研究进展[J]. 中草药, 2015, 46(9): 1399-1404.

[5] 林文华. 云芝多糖的研究概况[J]. 海峡药学, 2014, 26(1): 35-37.

[6] 梁文全, 陈凛, 郗洪庆, 等. 紫草素在消化系统肿瘤中的抗癌机制研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(15): 2976-2980.

[7] 吴跃锐, 陈伟, 唐贝, 等. 原发性肝癌病理类型与乙肝病毒感染模式和血清AFP含量的相关性研究[J]. 广东药科大学学报, 2017, 33(3): 321-323.

[8] 张春晨, 董勤. 原发性肝癌发病相关因素研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(75): 62-65.

[9] 王俊珊, 卢洁, 周莹群, 等. 索拉菲尼及几种靶向药物的肝癌治疗评价[J]. 世界临床药物, 2015, 36(6): 361-365.

[10] 崔国祯. 旋毛虫抗肿瘤作用的实验研究[D]. 吉林大学, 2006.

[11] 魏伟, 吴希美, 李元建, 等. 药理实验方法学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1623.

[12] 王辉. 上皮间质转化促进胰腺癌干细胞增生、侵袭和迁移的研究[D]. 南京医科大学, 2012.

[13] 潘燕, 韩婧, 张晔, 等. Vimentin在肿瘤转移中的作用及药物研究进展[J]. 生理得科学进展, 2010, 41(6): 413-416.

[14] 郭启帅. Peroxiredoxin Ⅰ对乳腺癌细胞放射敏感性的影响及其作用机制的实验研究[D]. 重庆医科大学, 2011.

[15] 刘坤. 黄蘑碱溶性多糖抗肿瘤作用及其体内对MMPs/TIMPs的调节作用的研究[D]. 吉林大学, 2006.

[16] 刘永. MMP-9及TIMP-1在皮肤恶性黑色素瘤中的表达及其临床意义[D]. 青岛大学, 2005.

[17] 李国萍. 不同侵袭迁移能力鼻咽癌细胞蛋白组学及转移相关基因功能研究[D]. 昆明医科大学, 2012.

（责任编辑：赵绪韬）

