

## · 研究论文 ·

## 虫草素抑制肝癌转移及分子机制研究

李娜<sup>1\*</sup>, 单媛媛<sup>2</sup>, 武德珍<sup>1</sup>, 赵欣<sup>1</sup>

(1. 新乡市中心医院, 河南 新乡 453000; 2. 西安交通大学第一附属医院, 陕西 西安 710061)

**摘要:** 探讨虫草素抑制肝癌细胞 MHCC97H 转移及其分子机制。采用 MTT 法检测细胞增殖; 应用细胞划痕实验检测细胞迁移能力; Transwell 检测细胞侵袭及迁移能力; Western blotting 检测蛋白的表达水平; 应用皮下移植及尾静脉注射法检测肿瘤原位生长及肺转移。实验结果表明虫草素剂量依赖性地抑制 MHCC97H 细胞的生长、迁移及侵袭能力, 这与其降低 AKT、p-AKT、p-GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin、N-cadherin、MMP-7 和 MMP-9 蛋白表达, 上调 E-cadherin 的蛋白表达等有关。动物实验表明虫草素剂量依赖性地抑制 MHCC97H 细胞的原位生长及肺转移, 虫草素高剂量组 (40 mg·kg<sup>-1</sup>)、中剂量组 (20 mg·kg<sup>-1</sup>)、低剂量组 (10 mg·kg<sup>-1</sup>) 及 5-氟尿嘧啶组的原位移植瘤重分别为 0.38±0.04、0.61±0.08、1.13±0.36 和 0.65±0.07 g, 与对照组瘤重 (1.52±0.46 g) 相比, 虫草素高、中剂量组及 5-氟尿嘧啶组具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 但虫草素低剂量组无统计学差异 ( $P > 0.05$ ); 在肺转移模型中, 以上各组的肺转移结节数分别为 48.9±7.2、67.2±9.4、106.4±11.3 和 73.6±8.6, 与对照组肺转移结节数 (123.5±14.5) 相比, 虫草素高、中剂量组及 5-氟尿嘧啶组具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ), 虫草素低剂量组无统计学差异 ( $P > 0.05$ ) 且肺转移结节中相关蛋白表达的变化与细胞实验一致。故虫草素通过调控 AKT 信号通路抑制肝癌细胞 MHCC97H 生长及转移。

**关键词:** 虫草素; 肿瘤转移; 蛋白激酶 B; 肝癌

中图分类号: R966

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 07-1117-05

## Antimetastatic effects of cordycepin and its molecular mechanism in human hepatoma MHCC97H cells *in vitro* and *in vivo*

LI Na<sup>1\*</sup>, SHAN Yuan-yuan<sup>2</sup>, WU De-zhen<sup>1</sup>, ZHAO Xin<sup>1</sup>

(1. Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China;

2. The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

**Abstract:** The objective of this study was to examine the antimetastatic effects of cordycepin and elucidate its molecular mechanism using MHCC97H cells *in vitro* and *in vivo*. Cellular proliferation was detected with MTT assay. The migration and metastatic potential were measured with scratch wound healing as well as transwell migration assays *in vitro*. Protein expression was detected by Western blotting. Antitumor and antimetastatic effects of cordycepin were evaluated by subcutaneous xenograft and lung metastatic model *in vivo*. The results demonstrated that cordycepin significantly inhibited MHCC97H cells proliferation and metastasis which was due to the down-regulation of AKT, p-AKT, p-GSK-3 $\beta$ ,  $\beta$ -catenin, N-cadherin, MMP-7, MMP-9 and up-regulation the expression of E-cadherin. Furthermore, cordycepin inhibited tumor growth and metastasis in a dose-dependent manner *in vivo*. Cordycepin (40 and 20 mg·kg<sup>-1</sup>) and 5-fluorouracil group significantly inhibited the tumor weights to 0.38 ± 0.04, 0.61 ± 0.08 and 0.65 ± 0.07 g, respectively, comparing with the

收稿日期: 2017-01-01; 修回日期: 2017-02-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81302641).

\*通讯作者 Tel: 86-373-2048924, E-mail: linaln861@163.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2017-0005

control group ( $1.52 \pm 0.46$  g) ( $P < 0.01$ ), but not 10 mg·kg<sup>-1</sup> cordycepin group ( $1.13 \pm 0.36$  g) ( $P > 0.05$ ); the lung metastasis nodus numbers showed the same results, which in all group above ( $48.9 \pm 7.2$ ,  $67.2 \pm 9.4$ ,  $73.6 \pm 8.6$ , respectively) were fewer than the control group ( $123.5 \pm 14.5$ ) ( $P < 0.01$ ), except 10 mg·kg<sup>-1</sup> cordycepin ( $106.4 \pm 11.3$ ) ( $P > 0.05$ ). Collectively, cordycepin inhibited MHCC97H cell proliferation and metastasis *in vivo* and *in vitro*.

**Key words:** cordycepin; tumor metastasis; AKT; hepatoma

肝癌是临床最常见的恶性肿瘤之一, 由于我国病毒感染性肝炎等慢性肝病者较多, 且其易发展为肝纤维化甚至肝癌, 使得我国肝癌发病率及死亡率约占全球的一半。目前肝癌治疗的首选方案为外科手术, 但多数患者确诊时已是中晚期, 失去了最佳手术时期, 故化学药物治疗仍是治疗的主要方案。由于肝癌对大部分临床使用的化疗药物不敏感, 故亟需研发新的抗肿瘤药物。中医药是研发新药的巨大宝库, 目前许多临床常用的抗肿瘤药物均来源于此<sup>[1]</sup>。

虫草是昆虫病原菌侵袭昆虫寄主后所形成的一种特殊形式, 多种类型的虫草均具有良好的药用价值。虫草素 (cordycepin) 是从传统中医药冬虫夏草中分离出来的水溶性核苷类成分, 具有广泛的药理作用, 如抗肿瘤、抗病毒、抗菌、抗炎、调节免疫及降糖降脂等<sup>[2, 3]</sup>。虽然以往对虫草素抗肿瘤作用进行了大量研究, 但较少涉及肝癌转移方面, 而肝癌的侵袭和转移是导致患者病情恶化以及死亡的主要原因之一。本文以高转移性肝癌细胞 MHCC97H 为研究对象, 以期探讨虫草素体内外抗肝癌转移作用及可能的分子机制。

## 材料与方 法

**药品与试剂** 胰蛋白酶、RPMI1640、胎牛血清购于 Gibco 公司; MTT、虫草素购于 Sigma 公司; AKT、p-AKT、p-GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin、N-cadherin、MMP-7、MMP-9、E-cadherin 等一抗及相应的二抗均购于 Cell Signaling Technology 公司或碧云天公司。

**细胞培养** 肝癌 MHCC97H 细胞购于上海复旦大学肝癌研究所, 用含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养基培养 (含双抗), 取对数生长期的细胞用于实验。

**MTT 法检测细胞生长** 取对数生长期的细胞, 以每孔 8 000 个肝癌 MHCC97H 细胞接种于 96 孔板中。12 h 后加入虫草素 (终浓度分别为 20、40、80、160 和 320  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中继续培养。48 h 后每孔加入 10  $\mu\text{L}$  MTT 溶液 ( $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 4 h 后每孔加入二甲基亚砷 100  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  振荡 30 min 后用酶标仪在 570 nm 波长处测其吸光度 (OD) 值, 细胞生

长抑制率 =  $(1 - \text{OD}_{\text{实验组}} / \text{OD}_{\text{对照组}}) \times 100\%$ <sup>[4]</sup>。

**细胞划痕实验** 在 24 孔板底用 marker 笔均匀画横线作为标记, 每孔加  $2 \times 10^5$  个细胞, 细胞贴壁后用 20  $\mu\text{L}$  枪头垂直于背后的横线划痕, PBS 洗去脱落的细胞并显微镜下拍照, 记录时间为  $t=0$  h, 此时的划痕宽度记录为  $W_{0\text{h}}$ 。加入虫草素 (终浓度分别为 20、40、80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 用无血清的培养基培养 24 h 后用显微镜拍照, 记录时间为  $t=24$  h, 此时的划痕宽度记录为  $W_{24\text{h}}$ 。细胞的迁移率 =  $(W_{0\text{h}} - W_{24\text{h}}) / W_{0\text{h}} \times 100\%$ <sup>[4]</sup>。

**细胞侵袭实验** 用 matrigel 稀释液均匀地铺在 transwell 上室底部膜的内表面, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养箱孵育 30 min, 以每孔  $1 \times 10^5$  个细胞重悬于 200  $\mu\text{L}$  含 1% 血清培养基中, 并分别于上室加入虫草素 (终浓度分别为 20、40、80  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 下室加含 10% FBS 的培养基 600  $\mu\text{L}$ , 培养 24 h 后用镊子取出小室, 用脱脂棉签轻轻转动去除上室中残留的细胞和细胞碎片, 倒扣并置于通风处风干。用含 0.1% 的结晶紫甲醇溶液染色 20 min 后, PBS 冲洗干净、风干。将聚碳酸酯膜切下并置于载玻片上, 显微镜下记录 5 个视野中穿过聚碳酸酯膜的细胞数目<sup>[4]</sup>。

**细胞迁移实验** 除不铺 matrigel 外, 其余步骤同细胞侵袭实验<sup>[4]</sup>。

**Western blotting 检测蛋白的表达** 收集经虫草素处理的细胞或肺转移肿瘤结节标本, 加入细胞裂解液 (碧云天公司), 在冰上裂解 30 min, 于 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000  $\times g$  离心 15 min, 取上清液。蛋白定量后分别取 50  $\mu\text{g}$  蛋白加入上样缓冲液, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 10 min。12% 聚丙烯酰胺-SDS 凝胶电泳后, 电转移至硝酸纤维素膜上, 5% 脱脂奶粉封闭后依次加入一抗和二抗, 室温孵育 2 h, TBST 缓冲液洗涤 5 次, 每次 10 min, 凝胶成像系统获取图像并进行灰度计算<sup>[1]</sup>。

**荷瘤动物实验** 雄性 BALB/c 裸鼠购于上海斯莱克实验动物有限责任公司 (实验动物合格证号: 201600548837), 日龄 28~35 天, 体重 18~22 g。

**原位肿瘤移植模型** 收获对数生长期的 MHCC97H 细胞, 调整细胞悬液浓度为每毫升  $5 \times 10^6$  个, 以每只 0.1 mL 接种于裸鼠右侧腋窝皮下。移植瘤生长至

50 mm<sup>3</sup> 左右时将裸鼠随机分成对照组 (注射生理盐水)、虫草素低、中、高组 (10、20 和 40 mg·kg<sup>-1</sup>) 和 5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil, 5-Fu) 组作为阳性对照 (20 mg·kg<sup>-1</sup>), 每组 6 只, 腹腔注射每天 1 次, 连续 20 天。停药次日处死裸鼠, 手术剥取瘤块称重, 计算肿瘤生长抑制率 (inhibition rate, IR), IR (%)=(1-给药组平均瘤重/模型组平均瘤重)×100%<sup>[1]</sup>。

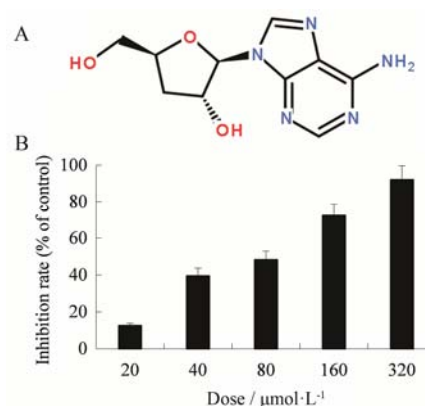
**肺转移模型** 收获对数生长期的 MHCC97H 细胞, 调整细胞悬液浓度为每毫升 5×10<sup>6</sup> 个, 以每只裸鼠 0.2 mL 尾静脉注射。15 天后将裸鼠随机分组并给药, 方法同“原位肿瘤移植模型”。停药次日处死裸鼠, 手术剥取肺组织, Bouin 固定液固定后检测肺结节数, 计算肺转移抑制率 (%)=(1-给药组平均结节数/模型组平均结节数)×100%, 肿瘤标本进一步进行 HE 染色检查病理变化<sup>[5]</sup>。

**统计学分析** 所有数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS12.0 统计包进行单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

## 结果

### 1 虫草素抑制肝癌细胞增殖

MHCC97H 细胞经不同浓度虫草素 (图 1A) 作用

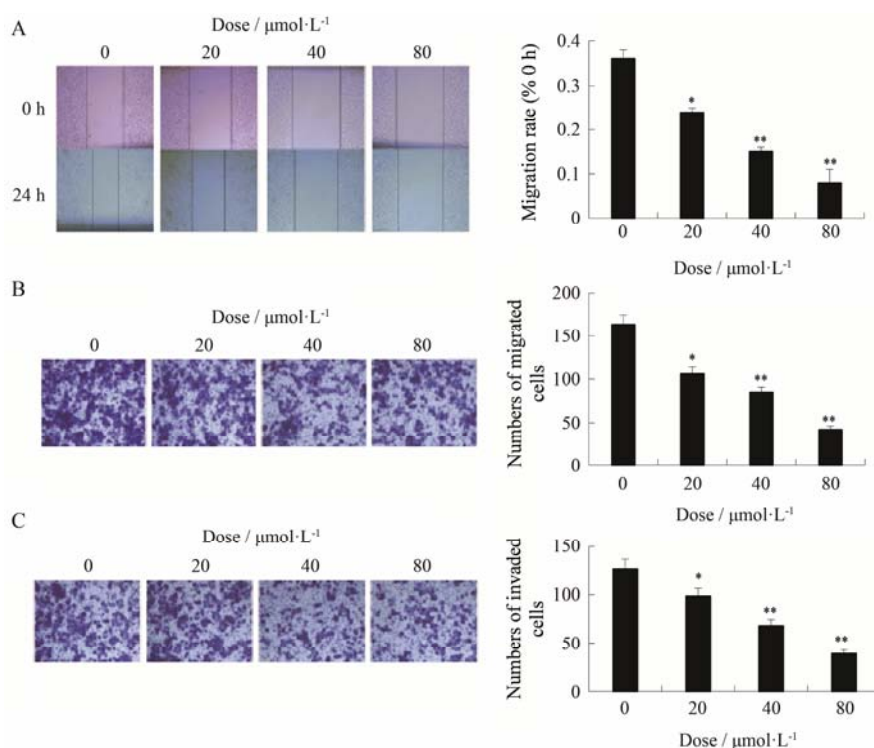


**Figure 1** Cordycepin inhibited MHCC97H cells proliferation *in vitro*. A: The structure of cordycepin; B: The anti-proliferative effect of cordycepin was detected using MTT assay after treatment with 48 h

48 h 后, 细胞增殖均受到不同程度的抑制, 并呈剂量依赖性 (图 1B), 半数抑制率 (IC<sub>50</sub>) 为 92.4±8.3 μmol·L<sup>-1</sup>。

### 2 虫草素抑制肝癌细胞迁移及侵袭

MHCC97H 细胞经不同浓度虫草素作用 24 h 后, 细胞划痕实验 (图 2A) 及 transwell (不铺 matrigel) 实验 (图 2B) 均表明虫草素剂量依赖性地抑制 MHCC97H 细胞的迁移; 此外, transwell (铺 matrigel) 实验进一步表明虫草素剂量依赖性地抑制 MHCC97H



**Figure 2** Cordycepin inhibited MHCC97H cells migration and invasion *in vitro*. A: The antimigrated effect of cordycepin was detected using wound healing experiment after treatment for 24 h; B: The anti-migrated effect of cordycepin was detected after treatment for 24 h using transwell (no matrigel); C: The anti-invasion effect of cordycepin was detected after treatment with 24 h using transwell (matrigel).  $n=3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs control

细胞的侵袭能力 (图 2C)。

### 3 虫草素调控迁移及侵袭相关蛋白的表达

经虫草素处理 48 h 后, 与对照组相比, AKT、p-AKT、p-GSK-3 $\beta$ 、 $\beta$ -catenin、N-cadherin、MMP-7、MMP-9 等蛋白的表达明显降低, 并呈剂量依赖性, 而 E-cadherin 的表达则呈剂量依赖性增加 (图 3)。

### 4 虫草素抑制 MHCC97H 细胞的原位生长及肺转移

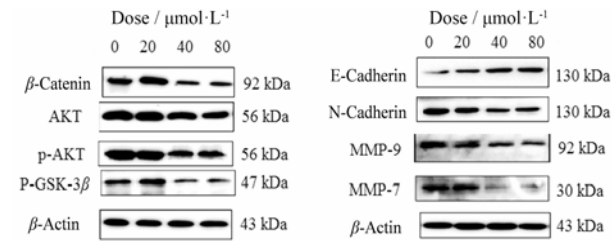
经 20 天治疗后, 对照组、虫草素高、中、低 (40、20 和 10 mg·kg<sup>-1</sup>) 3 个剂量组及 5-氟尿嘧啶组的原位移植瘤重分别为 1.52 $\pm$ 0.46、0.38 $\pm$ 0.04、0.61 $\pm$ 0.08、1.13 $\pm$ 0.36 和 0.65 $\pm$ 0.07 g, 虫草素高、中、低 3 个剂量组及 5-氟尿嘧啶组的抑瘤率分别为 75.2%、59.9%、25.9% 及 57.3% (图 4A), 与对照组相比, 除虫草素低剂量组外均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ ); 在肺转移模

型中, 对照组、虫草素高、中、低 (40、20 和 10 mg·kg<sup>-1</sup>) 3 个剂量组及 5-氟尿嘧啶组的肺转移结节数分别为 123.5 $\pm$ 14.5、48.9 $\pm$ 7.2、67.2 $\pm$ 9.4、106.4 $\pm$ 11.3 和 73.6 $\pm$ 8.6, 虫草素 3 个剂量组及 5-氟尿嘧啶组的肺转移抑制率分别为 60.4%、45.6%、13.8% 及 40.4% (图 4B), 与对照组相比, 除虫草素低剂量组外均具有显著性差异 ( $P < 0.01$ )。此外, 肺转移结节中 p-AKT、N-cadherin、MMP-7 和 MMP-9 等蛋白的表达均明显降低, 并呈剂量依赖性, 而 E-cadherin 的表达则剂量依赖性的增加 (图 4C)。Bouin 固定液固定后可见肺转移结节数随虫草素剂量增加逐渐减少 (图 4D), HE 染色后显微镜下可见肺转移灶数量及面积也随虫草素剂量增加逐渐减少 (图 4E)。

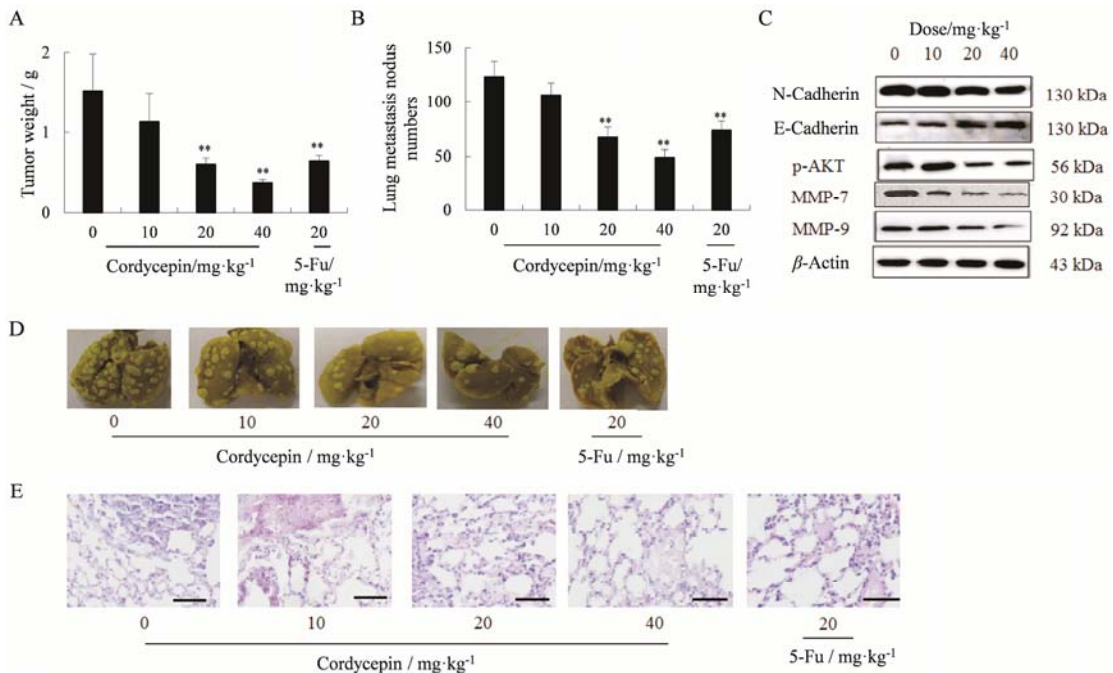
### 讨论

体内外实验均表明虫草素抑制肝癌 MHCC97H 细胞的增殖及原位生长, 这与虫草素抗乳腺癌、肺癌和白血病等一致<sup>[2, 6]</sup>。虫草素可抑制 MHCC97H 细胞及肺转移结节中的 AKT、 $\beta$ -catenin 等蛋白的表达及 AKT、GSK-3 $\beta$  的磷酸化, 以上结果提示虫草素通过抑制 AKT 信号通路从而产生抗肿瘤生长作用。

Cadherin 家族共有 3 个成员 (E-cadherin、N-cadherin 和 p-cadherin), 其作用为介导细胞连接、



**Figure 3** The protein expression of MHCC97H cells was detected by Western blotting after treatment with cordycepin for 48 h



**Figure 4** Cordycepin inhibited tumor growth and lung metastasis *in vivo*. A: Mean tumor weight in subcutaneous model; B: Mean lung metastasis nodus numbers in the hepatoma pulmonary metastasis model; C: The protein expression of lung metastasis nodus after treatment with cordycepin; D: Representative images of lung metastasis nodus; E: Representative images of lung metastasis after HE staining. Bar = 200  $\mu$ m.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$  vs control. 5-Fu: 5-fluorouracil

参与细胞分化、调控细胞迁移等,其中很多种癌组织中细胞表面的 E-cadherin 减少或消失,以致癌细胞易从瘤块脱落,成为侵袭与转移的前提<sup>[7]</sup>。虫草素在体内外均引起 E-cadherin 上调及 N-cadherin 下调,提示虫草素通过调控 cadherin 产生抗 MHCC97H 细胞转移作用。肿瘤侵袭、转移是非常复杂的过程,如肿瘤细胞从原发部位脱离、分泌金属蛋白酶 (MMPs) 降解周围基质,特别是 MMP-7 和 MMP-9,从而使肿瘤细胞进入血液循环或淋巴循环<sup>[8]</sup>。本实验结果表明虫草素降低 MMP-7 和 MMP-9 的表达,提示虫草素抑制 MHCC97H 细胞转移的分子机制也与 MMP-7 和 MMP-9 表达降低有关。细胞划痕实验、transwell 实验、原位移植肿瘤及肺转移分别从细胞实验和动物实验证明了虫草素抑制 MHCC97H 肝癌细胞的侵袭和转移。

综上所述,虫草素通过干扰 AKT 信号通路从而产生抑制 MHCC97H 细胞生长及转移作用,为虫草素进一步开发应用奠定了实验依据和理论基础。

## References

- [1] Liu RR, Zhang X, Xiao B, et al. Mechanism of TTF1-NP induced implanted hepatoma tumor apoptosis in nude mice by endoplasmic reticulum stress pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 403-407.
- [2] Gao J, Lian ZQ, Zhu P, et al. Lipid-lowering effect of cordycepin (3'-deoxyadenosine) from cordycepin militaris on hyperlipidemic hamsters and rats [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2011, 46: 669-676.
- [3] Hueng DY, Hsieh CH, Cheng YC, et al. Cordycepin inhibits migration of human glioblastoma cells by affecting lysosomal degradation and protein phosphatase activation [J]. *J Nutr Biochem*, 2017, 41: 109-116.
- [4] Wang M, Cui HX, Sun C, et al. Effect of lupeol on migration and invasion of human breast cancer MDA-MB-231 cells and its mechanism [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2016, 51: 558-562.
- [5] Nakamura K, Shinozuka K, Yoshikawa N. Anticancer and antimetastatic effects of cordycepin, an active component of *Cordyceps sinensis* [J]. *J Pharmacol Sci*, 2015, 127: 53-56.
- [6] Wang Z, Wu X, Liu J, et al. Advances in research on antitumor activities of cordycepin [J]. *Chin Pharm J (中国药杂志)*, 2015, 50: 1365-1368.
- [7] Maier J, Traenkle B, Rothbauer U. Visualizing epithelial-mesenchymal transition using the chromobody technology [J]. *Cancer Res*, 2016, 76: 5592-5596.
- [8] Jayachandran A, Dhungel B, Steel JC. Epithelial-to-mesenchymal plasticity of cancer stem cells: therapeutic targets in hepatocellular carcinoma [J]. *J Hematol Oncol*, 2016, 9: 74.