

基于 Lin28a/let-7a 轴探讨芍药软肝方抑制 HepG2 增值作用的研究

王鑫昱, 马永力, 刘立权, 文雯

浙江中医药大学附属杭州市中医院 浙江杭州

【摘要】目的 研究芍药软肝方对肝癌细胞 HepG2 增值抑制的影响及初步作用机制。**方法** MTT 法检测不同浓度芍药软肝方对 HepG2 细胞增殖的影响; qRT-PCR 和 Western blot 检测芍药软肝方对 Lin28a/let-7a 轴的影响。**结果** 芍药软肝方能够抑制 HepG2 细胞增殖, 并诱导其凋亡; 芍药软肝方能够上调 let-7a 表达, 下调 Lin28a 表达。**结论** 芍药软肝方可能通过调控 Lin28a/let-7a 轴抑制 HepG2 增值, 诱导细胞凋亡, 为肝癌治疗提供新的思路。

【关键词】 芍药软肝方; 肝癌; 细胞凋亡; Lin28a; let-7a

【基金项目】 杭州市医药卫生科技项目(A20200020): 基于 Lin28a/let-7a 轴研究芍药软肝方诱导 HepG2 细胞凋亡的作用及机制

【收稿日期】 2024年8月22日

【出刊日期】 2024年9月25日

【DOI】 10.12208/j.ircm.20240044

Study on the inhibitory effect of Shaoyao Ruangan prescription on HepG2 proliferation based on Lin28a/let-7a axis

Xinyu Wang, Yongli Ma, Liquan Liu, Wen Wen

Hangzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang University of Chinese Medicine, Hangzhou, Zhejiang

【Abstract】Objective To study the effect of Shaoyao Ruangan prescription on hepatocellular carcinoma cell HepG2 proliferation inhibition and its preliminary mechanism. **Methods** MTT assay was used to detect the effect of Paeonia Ruangan Decoction on the proliferation of HepG2 cells. The effect of Shaoyao Ruangan prescription on Lin28a/let-7a axis was determined by qRT-PCR and Western blot. **Results** Shaoyao Ruangan Formula could inhibit proliferation and induce apoptosis of HepG2 cells. Shaoyao Ruangan formula could up-regulate the expression of let-7a and down-regulate the expression of Lin28a. **Conclusion** Shaoyao Ruangan formula may inhibit HepG2 proliferation and induce apoptosis by regulating Lin28a/let-7a axis, providing a new idea for the treatment of liver cancer.

【Keywords】 Shaoyao Ruangan formula; Liver cancer; Cell apoptosis; Lin28a; let-7a

肝癌是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率和死亡率均较高, 严重威胁人类健康^[1]。肝细胞癌(HCC)是肝癌的主要类型, 约占所有肝癌病例的85%~90%^[2]。目前, 肝癌的治疗方法主要包括手术切除、肝移植、放疗、化疗等, 但疗效仍不理想, 且存在毒副作用大、易复发转移等问题^[3]。因此, 寻找新的治疗靶点和开发疗效确切、毒副作用小的治疗药物, 对于提高肝癌患者的生存率具有重要意义。

中医药在肝癌治疗中具有独特的优势, 近年来受到越来越多的关注^[4]。芍药软肝方是源自中医经

典方剂“芍药甘草汤”, 由中医师经过多年临床实践和优化最终形成芍药软肝方, 本方由芍药、重楼、栀子、三叶青等中药组成, 具有疏肝理气、活血化瘀、软坚散结的功效^[5]。

前期研究表明, 芍药软肝方对多种肿瘤细胞具有抑制增殖、诱导凋亡的作用^[6-7], 但其作用机制尚不明确。

Lin28a 是一种 RNA 结合蛋白, 在胚胎发育过程中发挥重要作用, 并在多种肿瘤中异常表达^[8]。let-7a 是一种肿瘤抑制性 miRNA, 能够抑制多种肿瘤细

胞的增殖、侵袭和转移^[9]。研究表明, Lin28a 能够与 let-7a 前体结合, 抑制其成熟, 从而解除 let-7a 对肿瘤细胞的抑制作用^[10]。因此, Lin28a/let-7a 轴可能是肝癌治疗的潜在靶点。

本研究旨在探讨芍药软肝方对肝癌细胞 HepG2 抑制的影响, 并进一步研究其是否通过调控 Lin28a/let-7a 轴发挥作用, 为芍药软肝方治疗肝癌提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株: 人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院上海细胞库。

1.1.2 药物: 芍药软肝方由白芍、甘草等组成, 购自浙江天道医药公司, 并制备成不同浓度的药物溶液。

1.1.3 主要试剂: MTT、DMSO、胰蛋白酶等。

1.1.4 主要仪器: CO2 培养箱、酶标仪、PCR 仪、Western blot 仪等。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养: 将 HepG2 细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37℃、5% CO2 培养箱中培养。

1.2.2 MTT 法检测细胞增殖: 将 HepG2 细胞接种于 96 孔板中, 分别加入不同浓度的芍药软肝方药物溶液, 设空白对照组和阳性对照组。培养一定时间后, 加入 MTT 溶液, 继续培养 4 h, 弃上清, 加入 DMSO 溶解, 酶标仪测定 490 nm 处吸光度值,

计算细胞存活率。

1.2.3 qRT-PCR 检测 Lin28a 和 let-7a mRNA 表达: 提取细胞总 RNA, 逆转录为 cDNA, 以 GAPDH 为内参基因, 进行 qRT-PCR 检测 Lin28a 和 let-7a mRNA 的相对表达量。

1.2.4 Western blot 检测 Lin28a 和 let-7a 蛋白表达: 提取细胞总蛋白, 进行 SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 分别加入 Lin28a、let-7a 和 β -actin 抗体孵育, 洗涤, 加入二抗孵育, 洗涤, ECL 发光, 采集图像, 分析蛋白表达量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 软件进行统计学分析, 数据以均数 \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, * $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芍药软肝方对 HepG2 细胞增殖的影响

MTT 结果显示, 与空白对照组相比, 不同浓度的芍药软肝方均能抑制 HepG2 细胞的增殖, 且呈剂量依赖性 (表 1)。

2.2 芍药软肝方对 Lin28a 和 let-7a 表达的影响

qRT-PCR 结果显示, 与空白对照组相比, 芍药软肝方能下调 Lin28a mRNA 的表达, 上调 let-7a mRNA 的表达 (图 1)。

Western blot 结果显示, 与空白对照组相比, 芍药软肝方均能下调 Lin28a 蛋白的表达, 上调 let-7a 蛋白的表达 (图 2)。

表 1 芍药软肝方对 HepG2 细胞增殖的影响

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	24h (平均 \pm 标准差)	48h (平均 \pm 标准差)	72h (平均 \pm 标准差)
0	0.652 \pm 0.028	1.087 \pm 0.045	1.526 \pm 0.063
25	0.629 \pm 0.025	1.023 \pm 0.049	1.398 \pm 0.068
50	0.584 \pm 0.031	0.902 \pm 0.047*	1.165 \pm 0.059*
100	0.518 \pm 0.036*	0.741 \pm 0.052*	0.884 \pm 0.055*
200	0.439 \pm 0.030**	0.572 \pm 0.039**	0.623 \pm 0.044**
400	0.341 \pm 0.027*	0.398 \pm 0.035*	0.402 \pm 0.037*
800	0.263 \pm 0.023	0.285 \pm 0.02	0.266 \pm 0.025*

注: 不同浓度芍药软肝方处理 HepG2 细胞 24、48 和 72 h 后, MTT 法检测细胞活力。数据以平均值 \pm 标准差表示, $n=3$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. 对照组。

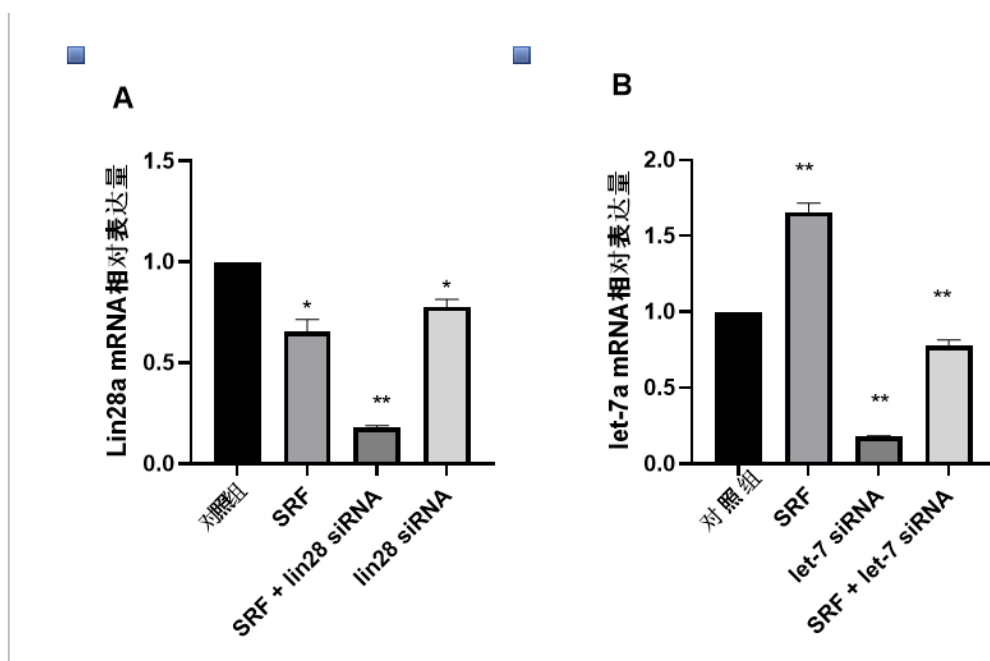


图1 芍药软肝方对 HepG2 细胞中 let-7a mRNA 表达的影响

A: 芍药软肝方处理 HepG2 细胞 48 h 后, qRT-PCR 检测 Lin28a mRNA 的表达。B: 芍药软肝方处理 HepG2 细胞 48 h 后, qRT-PCR 检测 let-7a mRNA 的表达。数据以平均值±标准差表示, n=3。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. 对照组。

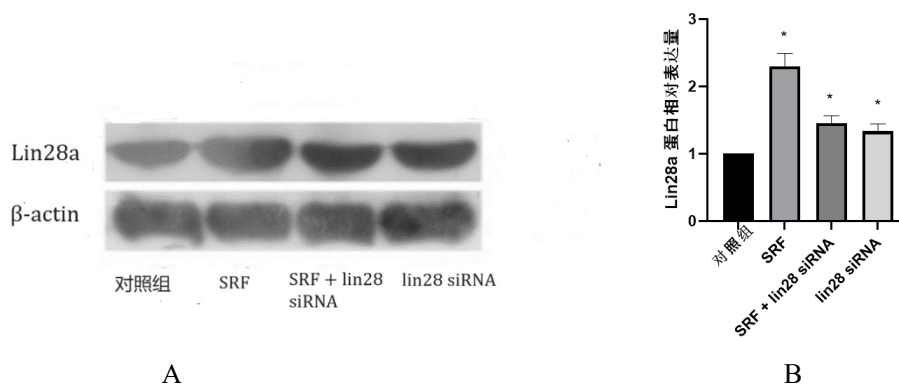


图2 芍药软肝方对 HepG2 细胞中 Lin28a 和 let-7a 蛋白表达的影响

A: 不同浓度芍药软肝方处理 HepG2 细胞 48 h 后, Western blot 检测 Lin28a 蛋白表达。B: Lin28a 蛋白表达量的统计分析结果。数据以平均值±标准差表示, n=3。* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs. 对照组。

3 讨论

本研究结果表明, 芍药软肝方能够抑制 HepG2 细胞增殖, 并诱导其凋亡, 其机制可能与调控 Lin28a/let-7a 轴有关。

Lin28a/let-7a 轴在肿瘤发生发展中发挥重要作用。Lin28a 作为一种癌基因, 在多种肿瘤中高表达, 能够促进肿瘤细胞增殖、侵袭和转移, 抑制细胞凋亡^[11]。let-7a 作为一种抑癌基因, 在多种肿瘤中低表达, 能够抑制肿瘤细胞增殖、侵袭和转移, 促进细胞凋亡^[12]。Lin28a 能够与 let-7a 前体结合, 抑制其成

熟, 从而解除 let-7a 对肿瘤细胞的抑制作用^[13]。

本研究发现, 芍药软肝方能够下调 Lin28a 的表达, 上调 let-7a 的表达, 这与芍药软肝方抑制 HepG2 细胞增殖、诱导其凋亡的结果相一致。因此, 我们推测芍药软肝方可能是通过调控 Lin28a/let-7a 轴发挥抗肿瘤作用的。

4 结论

研究表明, 芍药软肝方能够抑制 HepG2 细胞增殖, 并诱导其凋亡, 其机制可能与调控 Lin28a/let-7a 轴有关。本研究为芍药软肝方治疗肝癌提供了新

的理论依据, 也为寻找新的肝癌治疗靶点提供了新的思路。

参考文献

- [1] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2018, 68(6): 394-424.
- [2] Llovet JM, Zucman-Rossi J, Pikarsky E, et al. Hepatocellular carcinoma[J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2016, 2: 16018.
- [3] Forner A, Reig M, Bruix J. Hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 2018, 391(10127): 1301-1314.
- [4] Wong VK, Tse SK, Lam KC, et al. Chinese medicine for the treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *Integr Cancer Ther*, 2014, 13(1): 1-12.
- [5] 姜建伟, 钟晓明, 章红燕, 等. 芍药软肝方对肺癌化疗患者肝损伤的保护作用[J]. *中国中医药科技*, 2019, 26(04): 598-600.
- [6] 孙燕, 张爱琴, 余新民, 等. 芍药软肝合剂对肝癌 H₂₂ 荷瘤小鼠的抑瘤作用及对 Bax、Survivin 表达的影响[J]. *浙江中医杂志*, 2013, 48(11): 839-841.
- [7] 李骏飞, 郑小蓉, 姜建伟, 等. 基于 Bax/Bcl-2-Caspase-3 通路芍药软肝方抑制裸鼠肝癌生长及机制研究[J]. *中国现代医生*, 2021, 59(07): 38-41+45+193.
- [8] Viswanathan SR, Daley GQ. Lin28: A microRNA regulator with a macro role in development and disease[J]. *Cell*, 2010, 140(4): 445-449.
- [9] Boyerinas B, Park SM, Hau A, et al. The role of let-7 in cell differentiation and tumor suppression[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2010, 17(1): F19-F36.
- [10] Heo I, Joo C, Cho J, et al. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA[J]. *Mol Cell*, 2008, 32(2): 276-284.
- [11] Balzeau J, Menezes MR, Cao S, Hagan JP. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Front Genet*. 2017 Mar 28;8:31. doi: 10.3389/fgene.2017.00031.
- [12] Li G, Wakao S, Kitada M, Dezawa M. Tumor suppressor let-7 acts as a key regulator for pluripotency gene expression in Muse cells. *Cell Mol Life Sci*. 2024 Jan 23;81(1):54. doi: 10.1007/s00018-023-05089-9.
- [13] Deshmukh SK, Srivastava SK, Zubair H, Khan MA, Singh AP, Singh S. Resistin Induces LIN28A-Mediated Let-7a Repression in Breast Cancer Cells Leading to IL-6 and STAT3 Upregulation. *Cancers (Basel)*. 2021 Sep 7;13(18):4498.

版权声明: ©2024 作者与开放获取期刊研究中心(OAJRC)所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS