

## · 基础研究 ·

三石猫复方对裸鼠肝癌切除术后  
肿瘤复发的影响及机制

孟永斌 刘 栋 邹 勇 杜 娟

**摘要** **目的** 观察三石猫复方对裸鼠肝原位移植瘤切除术后肿瘤复发的影响,并初步探讨其机制。**方法** 建立人肝癌 Huh7 细胞原位移植瘤裸鼠模型,随机分为治疗组和对照组,每组 6 只。手术切除原位瘤 3 d 后,分别使用三石猫复方[18 g/(kg·d)]及生理盐水灌胃 14 d。观察肝脏肿瘤复发率,采用 Western Blot 检测复发瘤中转运蛋白 Sec62 表达;体外建立 Huh7 过表达 Sec62 稳转株,三石猫复方干预后,观察 Huh7 细胞增殖和侵袭迁移情况。**结果** 与对照组比较,治疗组肿瘤术后复发率明显降低[33.3%(2/6)vs. 100%(6/6),  $P < 0.05$ ],复发肿瘤组织中 Sec62 蛋白表达亦降低( $P < 0.05$ )。体外实验显示,三石猫复方处理浓度  $\geq 1.0$  mg/mL 时,细胞增殖抑制明显( $P < 0.01$ )。三石猫复方处理浓度在 0.2、0.5 mg/mL 时,可抑制肝癌细胞 Huh7 侵袭迁移,将 Huh7 细胞中的 Sec62 过表达后,这种抑制作用明显减弱。**结论** 三石猫复方可以抑制人肝癌 Huh7 细胞原位移植瘤手术切除后复发肿瘤的生长,其机制可能与通过降低 Sec62 表达抑制细胞的侵袭迁移有关。

**关键词** 三石猫复方;肝癌术后;肿瘤复发;Sec62 蛋白;侵袭迁移

Influence of Sanshimao Prescription on the Recurrence of Tumor After Liver Cancer Resection in Athymic Mice and its Mechanism MENG Yong-bin, LIU Dong, ZOU Yong, and DU Juan *Department of Traditional Chinese Medicine, Changhai Hospital, Naval Medical University, Shanghai (200433)*

**ABSTRACT** **Objective** To study the effect of Sanshimao Prescription on tumor recurrence after hepatectomy in athymic orthotopic xenograft mice, and to explore the mechanism. **Methods** The high-recurrent orthotopic xenograft mouse model of HCC with luciferase-labeled Huh7 cells was established. The nude mice were divided into the treatment group and control group randomly, 6 mice in each group. Three days after hepatic resection, the mice were treated with Sanshimao Prescription ( $18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and normal saline for 14 days respectively. The tumor recurrence of the mice was observed and the expression of Sec62 was determined using Western Blot. Huh7-Sec62<sup>high</sup> stable transfectant was established using the lentivirus expressing Sec62 *in vitro*, the proliferation, migration and invasion behavior of Huh7 cells were observed after Sanshimao Prescription treatment. **Results** Compared with the control group, mice in treatment group had fewer liver recurrence [33.3% (2/6) vs. 100% (6/6),  $P < 0.05$ ], Sec62 expression in the treatment group were lower ( $P < 0.05$ ). *In vitro*, Sanshimao Prescription of 1.0 mg/mL and above significantly inhibited cell proliferation ( $P < 0.01$ ). Sanshimao Prescription of 0.2, 0.5 mg/mL inhibited the migration and invasion of Huh7 cells, however, overexpression of Sec62 abated the inhibition. **Conclusions** Sanshimao Prescription could restrain tumor recurrence in orthotopic xenograft mice after hepatectomy. The mechanism may be related to inhibiting the migration and invasion of Huh7 cells via decreasing the expression of Sec62.

**KEYWORDS** Sanshimao Prescription; postoperative liver cancer; tumor recurrence; protein Sec62; migration and invasion

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 81473487)

作者单位: 海军军医大学长海医院中医科(上海 200433)

通讯作者: 杜 娟, Tel: 021-31161966, E-mail: dujuan714@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190514.014

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是常见的恶性肿瘤之一,其病死率在我国居第 2 位,发病率居第 4 位<sup>[1,2]</sup>。目前,手术切除仍是 HCC 的主要治疗手段,但术后 5 年生存率只有 39.6%~44.5%,其原因主要是术后肿瘤复发率高达 60%<sup>[3]</sup>。因此,术后肿瘤复发成为制约 HCC 疗效进一步提高的瓶颈。本科室凌昌全教授从事肝癌中医治疗多年,对原发性肝癌的诊治有丰富的经验,认为癌毒是导致肝癌发生发展及影响预后的根本,重视癌毒的理念应贯穿于肝癌治疗的始终<sup>[4]</sup>,根据此理论创立了三石猫复方,全方由猫人参、石见穿、石上柏和石打穿组成,在临床上运用于治疗肝癌术后复发转移取得较好疗效,经过十余年临床运用,证实可以明显改善肿瘤患者的生活质量<sup>[5,6]</sup>,降低术后复发转移率<sup>[7,8]</sup>。本实验主要通过建立模拟人肝癌切除术后高转移复发的裸鼠模型,观察三石猫复方对肝癌切除术后肿瘤复发的影响及探讨其可能的分子机制。

## 材料与方法

1 细胞及动物 荧光素酶报告基因 (luciferase) 稳定转染的人肝癌 Huh7 细胞株 (Luc-Huh7) 由佛罗里达大学凌晨教授赠予。裸鼠 (BALB/C-nu/nu), SPF 级,雄性,4~6 周龄,体重 20~25 g,购于上海史莱克实验动物公司,合格证号: SCXK (京) 2016-0006。

2 药物 三石猫复方 (猫人参 30 g 石见穿 30 g 石上柏 30 g 石打穿 30 g) 由长海医院中药房制备 (饮片购自蔡同德堂中药制药厂),煎煮后,冷冻,真空干燥成冻干粉,4℃ 保存,使用前用双蒸水稀释,按照患者临床服用剂量配置成 1.8 g/mL。

3 试剂及仪器 Sec62 转运蛋白抗体购于 Abcam 公司,Transwell 小室购自美国 Millipore 公司,Matrigel 购自美国 BD 公司;高表达 Sec62 (Sec62<sup>high</sup>) 的 Huh7 稳转株由本科实验室自行构建。CO<sub>2</sub> 培养箱 (HERA cell240, 美国 Thermo 公司),显微镜及照相系统 (PM-10AD, 日本 Olympus),蛋白电泳及转膜系统 (Mini-Protean Tetra Cell, Mini Trans-Blot Module, and PowerPac HC Power Supply, 美国 Bio-Rad 公司)。小动物活体成像系统 (Quick-View-3000, 奥地利 Bio-Real 公司),免疫组化拍照显微镜 (Eclipse Ci, 日本 Nikon 公司),成像系统 (Digital Sight DS-F12, 日本 Nikon 公司)。

4 裸鼠人肝癌原位种植瘤切除术后肿瘤复发模型建立 参照参考文献<sup>[9]</sup>。无菌条件下取 Huh7 细

胞皮下瘤,将肿瘤切成 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小,原位接种于健康裸鼠的肝脏包膜下,14 日后行原位种植瘤切除术,手术切缘距离肿瘤 ≥ 0.5 cm。本实验经复旦大学附属中山医院伦理委员会批准 (审批时间: 2016 年 7 月 18 日)。

5 实验分组及干预方法 根据术中切除肿瘤大小,按照随机区组法,将 12 只裸鼠随机分成三石猫复方组 [治疗组,三石猫复方 18 g/(kg · d) 灌胃,等同于临床成人口服剂量] 和对照组 (0.2 mL 生理盐水灌胃),每组 6 只。在移植肿瘤切除后第 3 天开始给药,持续给药 14 天后,小动物成像拍照,脱颈处死裸鼠,取瘤。

## 6 检测指标及方法

6.1 HE 染色 实验结束后取肝、肾组织,经 4% 多聚甲醛溶液固定,常规取材,脱水,石蜡包埋,制片 (4 μm 厚),HE 染色,光学显微镜观察并拍照。摄片倍数 200 倍。

6.2 Western Blot 检测 取复发的肿瘤组织,Western Blot 检测治疗组和对照组中裸鼠肝癌复发肿瘤 Sec62 蛋白表达水平,配制 10% SDS-PAGE,每孔加入 20 g 蛋白样品。使用湿转法电转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,1:1 000 TBST 稀释一抗,4℃ 过夜;加入辣根过氧化酶物标记二抗 (1:5 000) 稀释,室温孵育 2 h;ECL 发光。具体步骤参照试剂说明书。

6.3 划痕实验 分别将 Sec62<sup>high</sup> Huh7 细胞和对照组接种于 6 孔板,待细胞融合度生长至 90% 时,用 200 μL 消毒枪头从上而下划线,同时采用不同浓度三石猫复方 (0、0.2、0.5 mg/mL) 处理,并在显微镜下观察,测量划痕的初始距离 (0 h);24 h 后,再次测量划痕的距离,并拍照,计算细胞的迁移率、实验重复 3 次<sup>[10]</sup>。

6.4 Transwell 侵袭实验 将 Sec62<sup>high</sup> Huh7 细胞和对照组细胞采用含 EDTA 的 0.25% 胰酶,37℃ 消化 2 min,细胞变圆后,加入含 10% FBS 的培养基终止消化,轻轻吹打,300 r/min 离心 5 min、计数细胞,按照 2 × 10<sup>4</sup>/mL 用无血清培养基稀释细胞,制成细胞悬液,每孔 200 μL,将细胞悬液加入预铺了 Matrigel 胶的 Transwell 小室,加入不同浓度三石猫复方 (0、0.2、0.5 mg/mL),同时在 Transwell 下室加入含 10% FBS 的完全培养基 500 μL,放入 37℃ 孵箱培养 24 h;甲醛固定,结晶紫染色 10 min,然后用棉签轻轻擦拭内膜上的细胞<sup>[10]</sup>。实验重复 3 次。

6.5 MTT 法测定细胞增殖率 在无菌条件下,取对数生长期 Huh7 细胞,采用含 EDTA 的 0.25% 胰

酶消化,调整细胞密度为  $8 \times 10^4/\text{mL}$ ,每孔  $100 \mu\text{L}$  接种于 96 孔板培养 24 h,加入不同浓度三石猫复方(0、0.2、0.5、1、1.5 mg/mL),对照组加入等体积细胞培养液,另设调零组仅加入完全培养基而不加入细胞,每组设 6 个复孔,培养 24 h 后,每孔加入新鲜配制的 5 mg/mL 的 MTT 溶液  $10 \mu\text{L}$ ,继续培养 4 h,弃上清,每孔加入 DMSO  $150 \mu\text{L}$ ,震荡 10 min,酶标仪于 490 nm 波长处测定吸光度(A)。按下式计算三石猫复方对肝癌细胞增殖率的影响(proliferation rate, PR),  $\text{PR}(\%) = (\text{A}_{\text{给药组}} - \text{A}_{\text{调零组}}) / (\text{A}_{\text{对照组}} - \text{A}_{\text{调零组}}) \times 100\%$ 。

**7 统计学方法** 采用 SPSS 20.0 软件进行数据分析,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间比较用 One-Way ANOVA,方差齐性时多组间两两比较用 LSD 法,方差不齐时多组间两两比较用 Dunnett's *T3* 法。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

**1 一般情况** 两组小鼠在造模及治疗后均未出现死亡,所有小鼠在术后(原位移植和手术切除)2 h 苏醒,逐渐恢复正常活动。对照组干预期间活动未受影响,精神状态良好,毛色光滑,进食饮水正常,排便正常。与对照组小鼠比较,治疗组小鼠外观毛发、活动、饮食、排便方面未见不同。

**2 两组裸鼠肝、肾组织病理结果比较(图 1)** 对照组肝、肾 HE 染色结构正常,与对照组比较,治疗组裸鼠肝、肾 HE 染色未见异常。

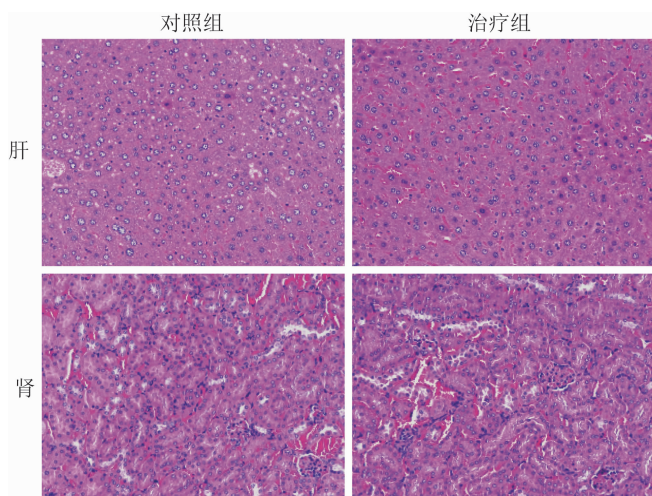
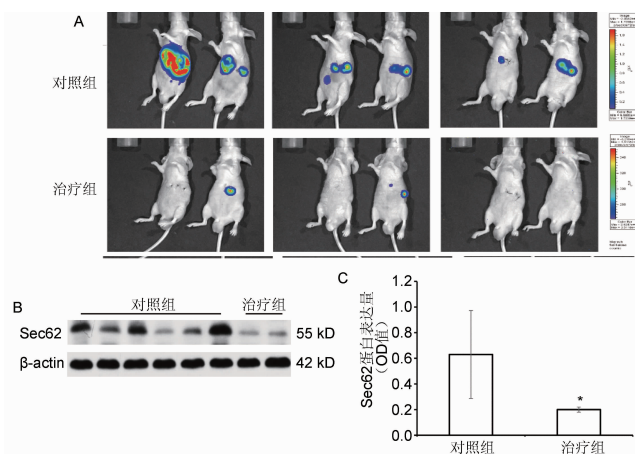


图 1 两组裸鼠肝、肾组织病理结果比较 (HE,  $\times 200$ )

**3 两组裸鼠术后复发情况及复发瘤中 Sec62 表达比较(图 2)** 对照组裸鼠肝脏均有复发病灶

[100% (6/6)],与对照组比较,治疗组肿瘤术后复发率降低[33.3% (2/6)],复发瘤体积减小,复发肿瘤组织中 Sec62 蛋白表达降低( $P < 0.05$ )。

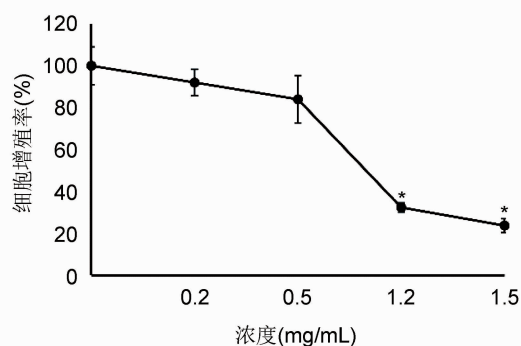


注: A 为小动物成像仪检测原位瘤后复发情况; B 为复发瘤中 Sec62 表达蛋白印迹; C 为两组 Sec62 蛋白表达量比较;对照组全部复发,有 6 个标本,而治疗组仅 2 个复发,有 2 个标本;与对照组比较,\* $P < 0.05$

图 2 两组裸鼠术后复发及复发瘤中 Sec62 表达比较

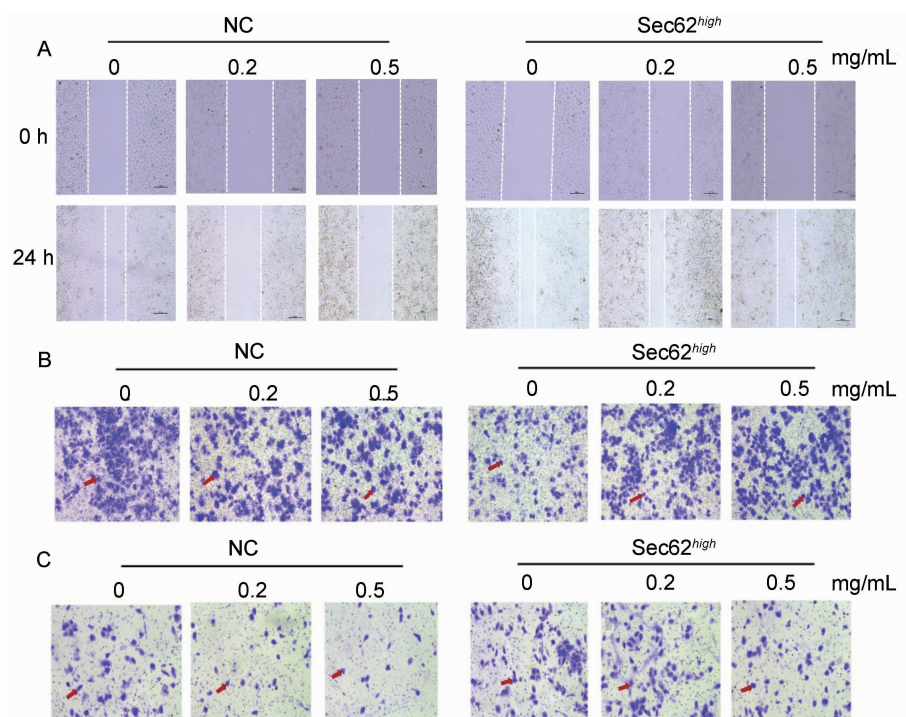
**4 各组细胞体外迁移、侵袭能力比较(图 3)** 划痕实验:与对照组比较,三石猫复方处理浓度在 0.2 和 0.5 mg/mL 时,可抑制肝癌细胞 Huh7 细胞愈合,将 Huh7 细胞中的 Sec62 高表达后,这种抑制作用减弱。Transwell 侵袭实验:与对照组比较,三石猫复方处理浓度在 0.2 和 0.5 mg/mL 时可抑制 Huh7 细胞体外迁移、侵袭,但是对 Sec62<sup>high</sup> Huh7 细胞,则抑制作用减弱。

**5 不同浓度三石猫复方对 Huh7 细胞增殖率的影响(图 4)** 三石猫复方处理浓度  $\geq 1.0 \text{ mg/mL}$  时,细胞增殖抑制明显( $P < 0.01$ )。



注:与 0 mg/mL 比较,\* $P < 0.01$

图 4 不同浓度三石猫复方对 Huh7 细胞增殖率的影响



注: A 为细胞划痕实验;B 为 Transwell 小室迁移;C 为 Transwell 小室侵袭;红色箭头所示为迁移到下室的细胞;NC 为对照组;Sec62<sup>high</sup> 组为高表达 Sec62 组

图 3 不同浓度三石猫复方对肿瘤细胞体外迁移、侵袭的影响 (×100)

## 讨 论

目前,手术仍是治疗肝癌的有效措施之一,可明显提高肝癌患者的生存时间,但是术后肿瘤高复发仍然是临床医生和患者面临的主要问题,因此,术后有必要选择合适的辅助治疗以抑制肿瘤的复发、转移<sup>[11]</sup>。

三石猫复方在海军军医大学长海医院中医科的肝癌防治中应用广泛,经过十几年的临床验证,疗效确切<sup>[5,6]</sup>。全方由猫人参、石见穿、石上柏、石打穿组成,其中猫人参为君药,清热解毒,消肿散结,可用于治疗肝癌、消化道肿瘤等;现代药理学研究发现,猫人参能有效抑制小鼠移植性肿瘤生长<sup>[12]</sup>,机制可能与其有效成分体外诱导肝癌细胞凋亡有关<sup>[13]</sup>。臣药石见穿对肝癌 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠肿瘤的生长也具有明显的抑制作用,其机制可能与抑制血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达有关<sup>[14]</sup>。过去笔者采用三石猫复方预防小肝癌术后复发转移,经过 5 年多中心、前瞻性、随机对照研究,发现其与经导管动脉化疗栓塞术(transarterial chemoembolization, TACE)术组相比,能明显降低小肝癌患者术后复发率<sup>[7,8]</sup>。为进一步证实其疗效,本课题组首先建立类似于人肝癌切除术后复发的动物模型,该模型模拟了肝癌切除过程,复发转移率高,具有人肝癌侵袭转

移的生物学特性,是一种可供实验性干预人肝癌转移复发的较理想模型<sup>[15]</sup>。本实验中模型组所有裸鼠均 100% 复发,三石猫复方治疗剂量是按照临床患者的每日口服剂量换算,治疗组肿瘤术后复发率明显低于对照组,且对照组复发肿瘤组织中的 Sec62 表达明显高于治疗组。表明三石猫复方能够抑制裸鼠肝癌切除术后肿瘤复发。

前期研究发现,Sec62<sup>high</sup> 可能与肝癌术后早期复发、转移密切相关<sup>[16]</sup>,而三石猫复方可以抑制 Sec62 表达。Sec62 基因是四聚体 Sec62/Sec63 复合物的一部分,在酵母中,其功能表现为翻译后蛋白质输出至内质网膜或管腔内的停靠站点<sup>[17,18]</sup>;在哺乳动物中,Sec62 基因通过 N-端胞浆中两个保守的多肽蛋白作用于核糖体,协调蛋白质的翻译和转录,从而影响细胞膜内质网中的蛋白质易位,并可通过间接作用于关键调节因子(unfolded-protein response, UPR)、免疫球蛋白结合蛋白(immunoglobulin binding protein, BIP)、葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein, Grp78)、热休克蛋白 A5 (heat shock protein A5, Hsp A5),进一步影响内质网应激诱导的细胞反应<sup>[19,20]</sup>。研究证实 Sec62 基因在多种肿瘤病理组织中均有高表达,例如前列腺癌、肺癌、甲状腺肿瘤等,选择沉默前列腺癌 PC3 以及胶质母细胞瘤细胞 TX3868、肺癌

细胞 A549、大肠癌细胞 HT1080 中 Sec62 基因的表达, 肿瘤细胞的侵袭及迁移能力被阻止或大大减少, 而对细胞的存活率影响不大<sup>[21]</sup>。根据前期研究结果, 笔者进一步在体外采用 Sec62<sup>high</sup> 肝癌细胞 Huh7 稳转株, 结果发现, 三石猫复方可以抑制 Huh7 细胞迁移、侵袭, 但是对 Sec62<sup>high</sup> 稳转株则抑制作用减弱, 表明三石猫复方可能通过抑制 Sec62 影响肝癌细胞的迁移、侵袭。由于时间有限, 本实验尚未观察三石猫复方对两种以上 Sec62<sup>high</sup> 肝癌细胞的影响及通过何种途径抑制 Sec62 表达, 进一步的机制探讨是课题后续研究需要深入探索的。

总之, 本研究结果表明, 三石猫复方可能通过调节 Sec62 表达, 抑制细胞迁移、侵袭, 从而减少肿瘤术后复发、转移。

**利益冲突:**所有作者声明无利益冲突。

### 参 考 文 献

- [1] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011 [J]. Chin J Cancer Res, 2015, 27(1): 2-12.
- [2] Ling CQ, Fan J, Lin HS, et al. Clinical practice guidelines for the treatment of primary liver cancer with integrative traditional Chinese and Western medicine [J]. J Integr Med, 2018, 16(4): 236-248.
- [3] 汤钊猷. 关于肝癌治疗的策略 [J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(4): 337-339.
- [4] Ling CQ. Cancerous toxin is the key pathogenic factor of malignant tumor [J]. J Integr Med, 2008, 6(2): 111-114.
- [5] Yu Y, Lang Q, Chen Z, et al. The efficacy for unresectable hepatocellular carcinoma may be improved by transcatheter arterial chemoembolization in combination with a traditional Chinese herbal medicine formula: a retrospective study [J]. Cancer, 2009, 115(22): 5132-5138.
- [6] 孙振, 岳小强, 刘龙. 凌昌全运用三石猫治疗恶性肿瘤验案举隅 [J]. 江苏中医药, 2010, 42(10): 55-57.
- [7] Zhai XF, Chen Z, Li B, et al. Traditional herbal medicine in preventing recurrence after resection of small hepatocellular carcinoma: a multicenter randomized controlled trial [J]. J Integr Med, 2013, 11(2): 90-100.
- [8] Zhai XF, Liu XL, Shen F, et al. Traditional herbal medicine prevents postoperative recurrence of small hepatocellular carcinoma: A randomized controlled study [J]. Cancer, 2018, 124(10): 2161-2168.
- [9] Feng YX, Wang T, Deng YZ, et al. Sorafenib sup-

presses postsurgical recurrence and metastasis of hepatocellular carcinoma in an orthotopic mouse model [J]. Hepatology, 2011, 53(2): 483-492.

- [10] Chen B, Tang J, Guo YS, et al. Calpains are required for invasive and metastatic potentials of human HCC cells [J]. Cell Biol Int, 2013, 37(7): 643-652.
- [11] Lin WF, Lu JY, Cheng BB, et al. Progress in research on the effects of traditional Chinese medicine on the tumor microenvironment [J]. J Integr Med, 2017, 15(4): 282-287.
- [12] 张亚妮, 刘岭, 凌昌全. 猫人参有效部位对小鼠移植性肿瘤 H22 的抑制作用及机制探讨 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(11): 918-920.
- [13] 李海燕, 徐燕丰, 辛海量, 等. 科罗索酸对 SMMC-7721 细胞生长抑制作用的初步研究 [J]. 山东医药, 2011, 51(52): 44-46.
- [14] 柳芳, 刘建勋, 李军梅, 等. 石见穿对肝癌 H22 荷瘤小鼠肿瘤生长的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 8(12): 249-251.
- [15] Li X, Yao W, Yuan Y, et al. Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma [J]. Gut, 2017, 66(1): 157-167.
- [16] Weng L, Du J, Zhou Q, et al. Identification of cyclin B1 and Sec62 as biomarkers for recurrence in patients with HBV-related hepatocellular carcinoma after surgical resection [J]. Mol Cancer, 2012, 11: 39.
- [17] Panzner S, Dreier L, Hartmann E, et al. Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p [J]. Cell, 1995, 81(4): 561-570.
- [18] Tyedmers J, Lerner M, Bies C, et al. Homologs of the yeast Sec complex subunits Sec62p and Sec63p are abundant proteins in dog pancreas microsomes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000, 97(13): 7214-7219.
- [19] Dudek J, Greiner M, Muller A, et al. ERj1p has a basic role in protein biogenesis at the endoplasmic reticulum [J]. Nat Struct Mol Biol, 2005, 12(11): 1008-1014.
- [20] Muller L, de Escauriaza MD, Lajoie P, et al. Evolutionary gain of function for the ER membrane protein Sec62 from yeast to humans [J]. Mol Biol Cell, 2010, 21(5): 691-703.
- [21] Greiner M, Kreutzer B, Jung V, et al. Silencing of the SEC62 gene inhibits migratory and invasive potential of various tumor cells [J]. Int J Cancer, 2011, 128(10): 2284-2295.

(收稿: 2018-09-20 在线: 2019-06-04)

责任编辑: 赵芳芳