

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.003

· 基础研究 ·

刺芒柄花素通过 COX-2/cyclin D1 轴调控肝癌的发生和发展

焦文鹏^a, 焦文静^b, 张金艳^b (河北医科大学第四医院 a. 放疗一科; b. 检验科, 河北 石家庄 050000)

[摘要] **目的:** 分析环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)的表达与肝癌患者临床病理特征及预后的关系,探讨刺芒柄花素(formononetin, FOR)在肝癌发生和发展中的作用及其机制。**方法:** 收集2021年1~5月河北医科大学第四医院20例手术治疗肝癌患者的癌和相应的癌旁组织、60例手术治疗肝癌患者的临床资料,以及人肝癌细胞系HepG2和Bel-7402。用qPCR法和免疫组织化学染色法检测肝癌组织中COX-2的表达,分析其表达与患者临床病理特征和预后的关系。构建小鼠二乙基亚硝胺诱导肝癌模型,验证FOR对肝癌发病的影响。用0.003、0.006 μmol/ml的FOR分别处理肝癌细胞HepG2和Bel-7402 48 h后,用CCK-8法和流式细胞术检测FOR对肝癌细胞增殖和周期的影响,qPCR和WB法检测细胞中COX-2、CDK4、CDK6和cyclin D1表达的变化。**结果:** 肝癌组织中COX-2 mRNA表达水平显著高于癌旁组织($P<0.01$),COX-2蛋白表达阳性率为68.3%(41/60);COX-2表达阳性与患者TNM分期晚、肿瘤大、生存期短有关(均 $P<0.05$)。诱导小鼠肝癌模型中,FOR处理组小鼠肝癌的发生率显著降低、肝癌组织中COX-2表达显著降低(均 $P<0.05$)。FOR处理可显著抑制HepG2和Bel-7402细胞的增殖能力,增加G0/G1期细胞比例、降低S和G2期细胞比例(均 $P<0.05$),抑制细胞中COX-2和cyclin D1的表达(均 $P<0.01$)。**结论:** COX-2表达阳性肝癌患者临床分期较晚且预后较差,FOR可通过抑制COX-2和cyclin D1表达来降低肝癌的发生和发展。

[关键词] 肝癌;HepG2细胞;Bel-7402细胞;刺芒柄花素;环氧合酶2;细胞周期蛋白D1;增殖;细胞周期

[中图分类号] R735.7; R730.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)09-0877-08

Formononetin affects the pathogenesis of liver cancer by inhibiting the COX-2/cyclin D1 axis

JIAO Wenpeng^a, JIAO Wenjing^b, ZHANG Jinyan^b (a. The First Department of Radiotherapy; b. Clinical Laboratory, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, 050000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To analyze the relationship between the expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and clinicopathological features and prognosis of patients with liver cancer, and to explore the role and mechanism of formononetin (FOR) in the pathogenesis of liver cancer. **Methods:** The clinical data of 60 patients with liver cancer and 20 pairs of surgically resected cancer tissues and corresponding para-cancerous tissues from liver cancer patients that treated in the Fourth Hospital of Hebei Medical University during January 2021 and May 2021 were collected for this study; in addition, human liver cancer cell lines HepG2 and Bel-7402 were also collected. The expression of COX-2 in liver cancer tissues was detected by qPCR and immunohistochemical staining, and the relationship between COX-2 expression and clinicopathological characteristics and prognosis of patients was analyzed. Diethylnitrosamine-induced mouse model of liver cancer was established to verify the effect of FOR on the incidence of liver cancer. After being treated with 0.003 and 0.006 μmol/ml FOR 48 h, the effects of FOR on proliferation and cell cycle of HepG2 and Bel-7402 cells were detected by CCK-8 and Flow cytometry. The changes in the expression of COX-2, CDK4, CDK6 and cyclin D1 were detected by qPCR and WB. **Results:** The mRNA expression of COX-2 in liver cancer tissues was significantly higher than that in para-cancerous tissues ($P<0.01$). The positive expression rate of COX-2 in liver cancer tissues was 68.3% (41/60), and the positive expression of COX-2 was correlated with advanced TNM stage, large tumor and short survival (all $P<0.05$). In the xenograft mouse model of induced liver cancer, the incidence of liver cancer in mice treated with FOR was significantly reduced, and the expression of COX-2 in liver tissues was significantly decreased (all $P<0.05$). FOR significantly inhibited the proliferation, increased the proportion of cells at G0/G1 phase, decreased the proportion of cells at S and G2 phase (all $P<0.05$), and inhibited the expression of COX-2 and cyclin D1 in HepG2 and Bel-7402 cells (all $P<0.01$). **Conclusion:** Liver cancer patients with positive COX-2 expression have an

[基金项目] 河北省卫生厅科研基金资助项目(No. 20200110)。Project supported by the Research Foundation from Bureau of Health of Hebei Province (No. 20200110)

[作者简介] 焦文鹏(1987—),男,硕士,主治医师,主要从事恶性肿瘤治疗的研究,E-mail: jiaowenpeng163@163.com

[通信作者] 张金艳(ZHANG Jinyan, corresponding author),硕士,主任技师,硕士生导师,主要从事临床微生物学和免疫学研究,E-mail: jinyanzhang66@163.com

advanced clinical stage and a poor prognosis. FOR can prevent the occurrence and development of liver cancer by inhibiting the expression of COX-2 and cyclin D1.

[Key words] liver cancer; HepG2 cell; Bel-7402 cell; formononetin (FOR); COX-2; cyclin D1; proliferation; cell cycle

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(9): 877-884. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.09.003]

肝癌是常见的消化道恶性肿瘤,其发病率占全球恶性肿瘤发病率的第6位,其病死率居全球第4位^[1]。肝癌主要包括肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)、肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)和HCC-ICC混合型3种病理类型,其中HCC最多见(占85%~90%)^[2]。肝癌目前的主要治疗手段包括手术切除、肝移植和化疗等,但肝癌的预后仍然很差,患者5年OS率仅为34%~50%^[3-5]。因此只有做到对肝癌的早期预防、降低肝癌的发病率才是解决肝癌问题的最优方法。炎症与肝癌的发生密切相关^[6]。环氧合酶2(cyclooxygenase-2, COX-2)是一种常见的炎症蛋白和肿瘤因子,可以干扰肿瘤的血管生成和转移^[7-8]。目前关于COX-2和肝癌的研究多集中于基础研究^[9-11],而COX-2与肝癌患者临床病理特征及预后的关系尚有争论。研究结果^[12]认为,刺芒柄花素(formononetin, FOR)可以抑制COX-2的表达。FOR是一种从黄芪中分离出来的异黄酮成分,具有抗炎、抗氧化应激和抗癌作用^[13-14]。本研究首先验证COX-2在肝癌组织中的表达情况,并分析其表达水平与肝癌患者临床病理特征和预后的关系,进一步通过小鼠诱导肝癌实验和细胞实验探索FOR能否通过抑制COX-2表达抑制肝癌的发生,从而为今后FOR应用于肝癌的预防提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 研究对象

收集2020年1月至2020年5月河北医科大学第四医院收治的20例手术切除肝癌患者的癌及对应的癌旁组织标本,以及2017年1月至2017年12月60例接受手术治疗的肝癌初治患者临床资料。病例纳入标准:经病理证实的HCC患者;术前未接受其他治疗;无其他肿瘤病史;预期寿命 ≥ 3 个月。病例排除标准:术前接受过其他抗肿瘤治疗;除HCC外患有其他恶性肿瘤病史;预期寿命不足3个月。术前对患者均告知研究过程并签署知情同意书,研究方案获得所在医院医学伦理委员会的批准。

全组患者末次随访时间为2020年12月31日,全组60例患者无失访病例,随访率100%。中位随访时间为22个月。

1.2 细胞系、主要试剂及实验动物

人肝癌细胞系HepG2和Bel-7402购自南京凯基

生物制品有限公司。

COX-2多克隆抗体购自北京中山生物工程有限公司,10%胎牛血清(FBS)、RPMI 1640培养基均购自美国Gibco公司,二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)购自Sigma公司,CCK-8细胞增殖与毒性检测试剂盒购自日本同仁化学研究所,miRcute增强型miRNA荧光定量PCR(qPCR)检测试剂盒购自TianGen(目录号FP411),anti-COX-2抗体购自Abcam公司,anti-CDK4抗体购自CST公司,anti-CDK6抗体购自Cell Signaling Technology公司,anti-cyclin D1抗体、IRDye 800CW羊抗兔IgG二抗均购自Abcam公司。

6周龄、体质量为18~20 g的C57BL/6小鼠(实验动物合格证号:SCXK(京)2016-0006)购自北京维通利华实验动物技术有限公司。

1.3 细胞培养及FOR处理

HepG2和Bel-7402细胞在含10%FBS的RPMI 1640培养基中置于37℃、5%CO₂下常规培养,细胞贴壁后加入浓度为0.003和0.006 μmol/ml的FOR处理,48 h后进行后续实验。

1.4 免疫组化染色法检测肝癌组织中COX-2蛋白的阳性表达率

严格按照试剂盒说明书进行操作。常规制备石蜡肝癌组织切片,脱蜡并与二甲苯水合,封闭并灭活内源性过氧化物酶,进行抗原修复,将柠檬酸盐缓冲液用作抗原修复溶液,并向切片中添加10%柠檬酸盐溶液。加入正常山羊血清,使用PBS洗去血清,加入0.04%二氨基联苯胺和0.03%过氧化氢进行显色,并在显微镜下控制染色深度。用蒸馏水冲洗切片以终止染色,苏木精复染30 s。双蒸水冲洗后,切片脱水、晾干后,显微镜下观察。染色强度评分:0分,无染色细胞;1分,弱阳性,浅棕色染色;2分,具有浅棕色背景的深棕色细胞,或无背景染色的棕色细胞;3分,深褐色细胞,无背景染色。显微镜($\times 400$)下随机选择5个视野以确定细胞数(每个视野200个细胞,总共1 000个细胞),计算阳性细胞的比例。阳性细胞比例评分:0分:无阳性细胞;1分,阳性细胞 $\leq 25\%$;2分,阳性细胞 $> 25\%$ 和 $< 50\%$;3分, $\geq 50\%$ 阳性细胞。两个评分相乘,最终分数 ≥ 1 表示阳性表达。

1.5 DEN诱导小鼠肝癌模型的构建及观察

利用DEN诱导法构建小鼠肝癌模型。将C57BL/6小鼠随机分为空白组(36只)、对照组(36只)和实验组(36只),每周2次(周一、周四上午9时)

按照 20 mg/kg 腹腔注射 DEN(对照组注射 PBS),连续给药 18 周。诱导 18 周后,成功建立肝癌模型。在继续注射 DEN 的条件下,或与 DEN 同时开始实验组小鼠每天用 0.2 g/kg 的 FOR 灌胃 1 次,对照组采用纯净水灌胃。每周对所有小鼠称体质量。分别在给药 6 周和 14 周时,通过麻醉处死各组 6 只小鼠;分别在给药第 10 周和 18 周时,处死各组 12 只小鼠,观察肝癌的发生情况,并收集其肝组织,按照文献[15]方法进行免疫组化染色,观察 COX-2 阳性表达情况。

1.6 qPCR 法检测肝癌组织和细胞中 COX-2、CDK4、CDK6 和 cyclin D1 mRNA 表达水平

用 TRIzol 试剂抽提组织和细胞中总 RNA,并逆转录为 cDNA,按照 qPCR 试剂盒说明书的方法进行 qPCR 反应。PCR 引物序列见表 1。qPCR 反应条件:50 °C 2 min、95 °C 2 min、95 °C 15 s、60 °C 15 s,共 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式计算目的基因 mRNA 的相对表达水平。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Gene	Sequence
COX-2	F: 5'-CGGTGAAACTCTGGCTAGACAG-3'
	R: 5'-GCAAACCGTAGATGCTCAGGGA-3'
CDK4	F: 5'-TGTGGAGCGTTGGCTGTATC-3'
	R: 5'-TGTGGAGCGTTGGCTGTATC-3'
CDK6	F: 5'-TGG AGA CCT TCG AGC ACC-3'
	R: 5'-CAC TCC AGG CTC TGG AAC-3'
Cyclin D1	F: 5'-GCTGCGAAGTGAAACCATC-3'
	R: 5'-CCTCCTTCTGCACACATTTGAA-3'
GAPDH	F: 5'-GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG-3'
	R: 5'-ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA-3'

F: Forward primer; R: Reverse primer

1.7 CCK-8 法检测 FOR 对 HepG2 和 Bel-7402 细胞增殖的影响

将 HepG2 和 Bel-7402 细胞接种于 96 孔板(2×10³ 个/孔)中,并在孔中加入 100 μl 10% 含血清的 DMEM,持续培养 6 d。将 CCK-8 试剂添加到各孔中,并将细胞在 37 °C 下孵育 2 h 后,酶标仪检测在波长 450 nm 处各孔的光密度(D)值,绘制细胞增殖曲线图。

1.8 流式细胞术检测 FOR 对 HepG2 和 Bel-7402 细胞周期分布的影响

将 HepG2 和 Bel-7402 细胞以 1×10⁷/L 的密度接种在 6 孔板中。培养 24 h 后,使用流式细胞仪检测细

胞周期。将 HepG2 和 Bel-7402 细胞用 FBS 洗涤 2 次,然后在 70 °C 乙醇溶液中于 4 °C 固定 24 h。将固定的细胞用 PBS 洗涤 1 次,并重悬为单细胞悬液。将细胞悬液与 500 μl PI(50 μg/ml)孵育 30 min 后上机检测细胞周期分布情况。

1.9 WB 法检测 FOR 对 HepG2 和 Bel-7402 细胞中 COX-2、CDK4、CDK6 和 cyclin D1 表达的影响

用 RIPA 裂解液提取各组细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。将制备的蛋白样品进行 10%SDS-PAGE,将分离蛋白转移到 PVDF 膜上,用脱脂奶粉封闭后,加入 COX-2(1:1 000)、CDK4(1:1 000)、CDK6(1:1 000)和 cyclin D1(1:1 000)一抗处理过夜;TBST 洗涤 3 次后,加入 800CW 羊抗兔 IgG 二抗体(1:5 000)处理 45 min,加入 ECL 发光液并显影,用 Odyssey V3.0 软件分析蛋白条带的灰度值并计算目的蛋白的相对表达量。

1.10 统计学处理

qPCR、CCK-8、流式细胞术、WB 法等实验均重复 3 次。采用 SPSS 20.0 统计学软件进行统计分析,用 Excel 和 GraphPad Prism 8 构图软件构图。符合正态分布的计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验;组间率的比较使用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法;肝癌组织中 COX-2 的表达水平与预后的关系分析采用 Kaplan-Meier 生存分析法。以 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 COX-2 mRNA 在肝癌组织中高表达

qPCR 法检测结果(图 1)显示,20 例肝癌组织中 COX-2 mRNA 表达水平显著高于癌旁组织($P<0.01$)。

2.2 COX-2 蛋白表达及其与肝癌患者临床病理特征之间的关系

免疫组化染色结果(图 2,表 1)显示,60 例患者中,肝癌组织中 COX-2 蛋白表达阳性共 41 例,阳性率为 68.3%。进一步采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率法分析显示,COX-2 表达阳性肝癌患者较阴性表达患者的 TNM 分期晚、肿瘤大相关联(均 $P<0.01$),而与患者的性别、年龄、是否肝硬化无关联(均 $P>0.05$)。

2.3 COX-2 蛋白表达与肝癌患者 OS 之间的关系

用 Kaplan-Meier 生存分析法分析结果(图 3)显示,60 例肝癌患者的中位 OS 为 20 个月,1、2、3 年 OS 率分别为 71.7%、40.8% 和 31.9%。COX-2 蛋白阴性表达患者中位 OS 为 43 个月,1、2、3 年 OS 率分别为 89.5%、68.4%、61.6%;COX-2 阳性表达患者中位 OS 为 19 个月,1、2、3 年 OS 率分别为 63.4%、28.0%、17.5%。两组之间差异比较具有显著的统计学意义

($\chi^2=8.435, P<0.05$)。

2.4 FOR 下调小鼠 COX-2 表达并降低肝癌发生率

DEN 诱导法构建小鼠肝癌模型结果显示, 第6周时实验组、对照组、空白组均未发现肝癌(0/6)。在第10周时, 对照组小鼠中3/12发生肝癌, 实验组和空白组小鼠中未发现肝癌(0/12; 0/12); 在第14周时, 对照组小鼠中3/6发生肝癌, 实验组小鼠中1/6发生肝癌, 空白组小鼠中未发现肝癌(0/12)。DEN 处理后第18周时, FOR 处理小鼠的肝癌发生率显著低于对照组小鼠(4/12 vs 11/12, $\chi^2=8.711, P<0.01$), 而空白组小鼠中未发现肝癌(0/12)。

免疫组化染色结果显示, 对照组小鼠的癌前肝组织(10周)和肝癌组织(18周)中COX-2均高表达, FOR 处理小鼠肝组织中COX-2阳性表达率均显著低于对照组(2/12 vs 8/12, $\chi^2=6.171, P<0.05$; 7/12

vs 12/12, $\chi^2=6.316, P<0.05$), 而空白组小鼠正常肝组织中COX-2未见阳性表达(0/12, 0/12)。

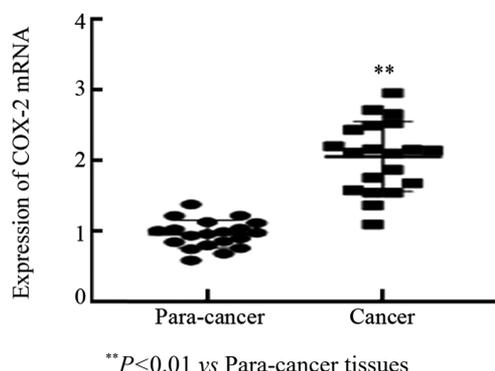


图1 肝癌组织和癌旁组织中COX-2表达水平的比较
Fig.1 Comparison of COX-2 expression levels in liver cancer tissues and para-cancer tissues

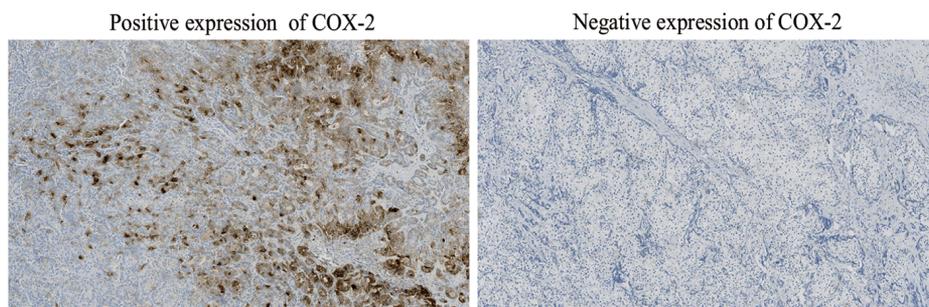


图2 肝癌组织中COX-2免疫组化染色(×100)
Fig.2 Immunohistochemical staining of COX-2 in liver cancer tissues (×100)

表1 COX-2 表达水平与肝癌临床病理特征之间的关系

Tab.1 Correlation between COX-2 expression level and clinicopathological characteristics of hepatocellular carcinoma

Clinicopathological feature	N	COX-2 expression (n)		χ^2	P
		Negative	Positive		
Gender					
Male	37	12	25	0.026	1.000
Female	23	7	16		
Ages (t/a)					
<60	38	12	26	0.001	1.000
≥60	22	7	15		
TNM stage					
I + II	22	13	9	12.073	0.001
III	38	6	32		
Cirrhosis					
No	12	5	7	0.693	0.493
Yes	48	14	34		
Tumor size (d/cm)					
<5	24	14	10	13.145	0.001
≥5	36	5	31		

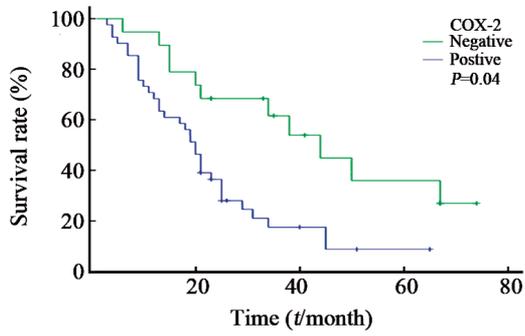
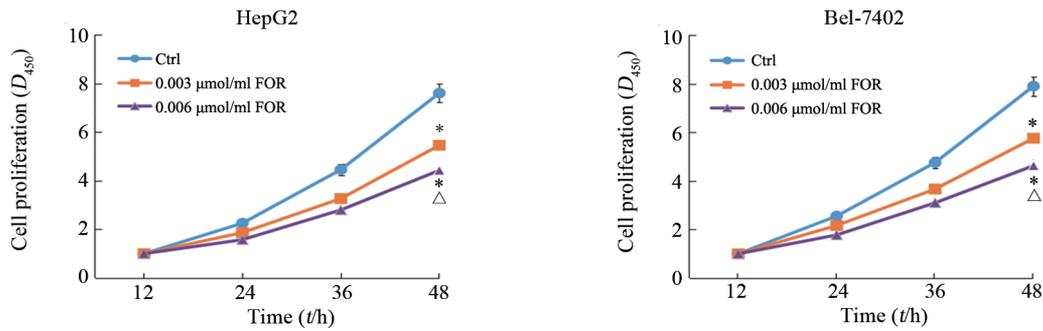


图3 COX-2表达与肝癌患者OS的关系

Fig.3 The relationship between expression of COX-2 and OS in patients with liver cancer

2.5 FOR 显著降低肝癌细胞的增殖能力

分别用浓度为 0.003 和 0.006 $\mu\text{mol/ml}$ 的 FOR 处理肝癌细胞 12、24、36、48 h 后, CCK-8 法检测结果 (图 4) 显示, 与对照组比较, FOR 可以抑制 HepG2 和 Bel-7402 细胞的增殖能力, 其抑制作用随浓度增加而增强 (均 $P < 0.05$)。0.003 $\mu\text{mol/ml}$ 的 FOR 使 HepG2 和 Bel-7402 细胞的增殖能力分别降低了 28.2% 和 27.2%, 0.006 $\mu\text{mol/ml}$ 的 FOR 则使 HepG2 和 Bel-7402 细胞的增殖能力分别降低了 41.8% 和 41.5%。结果表明, FOR 处理可显著降低肝癌细胞的增殖能力, 以 0.006 $\mu\text{mol/ml}$ 的 FOR 作用更强, 所以后续实验选用 0.006 $\mu\text{mol/ml}$ 的 FOR 处理细胞。



* $P < 0.05$ vs Ctrl group; $\Delta P < 0.05$ vs 0.003 $\mu\text{mol/ml}$ FOR group

图4 不同浓度 FOR 对 HepG2 和 Bel-7402 细胞增殖能力的影响

Fig.4 The effect of different concentrations of FOR on the proliferation of HepG2 and Bel-7402 cells

2.6 FOR 阻滞肝癌细胞于 G0/G1 期

用 FOR (0.006 $\mu\text{mol/ml}$) 处理肝癌细胞 48 h, 流式细胞术检测结果 (图 5) 显示, 与对照组比较, 实验组 HepG2 和 Bel-7402 细胞 G0/G1 期比例均显著

增多 (均 $P < 0.05$), 而 S 期和 G2 期细胞则显著减少 (均 $P < 0.01$)。结果表明, FOR 可以将肝癌细胞阻滞在 G0/G1 期, 其通过阻止细胞进入细胞周期来抑制肿瘤细胞的增殖能力。

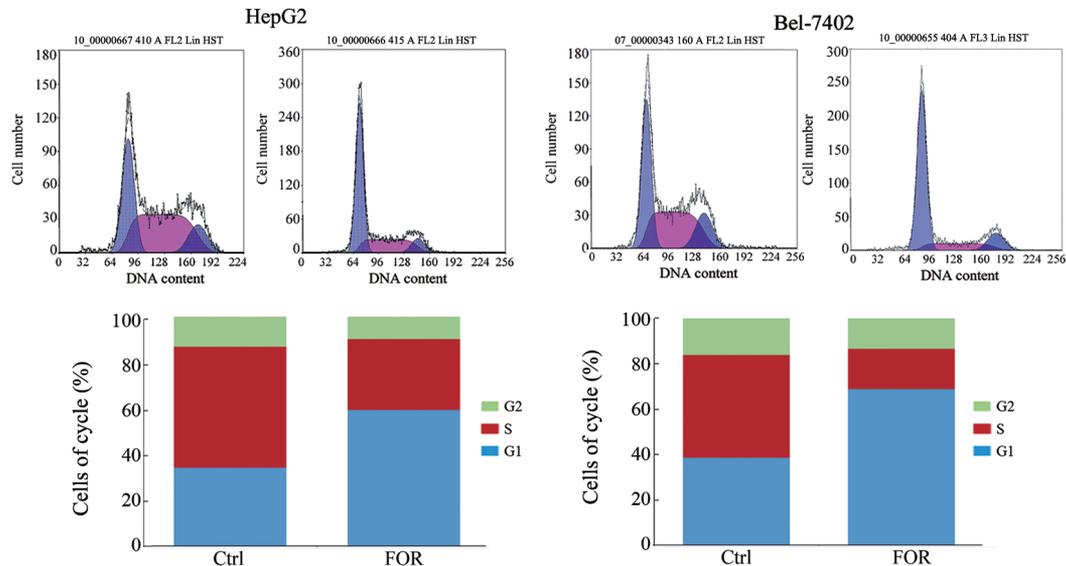


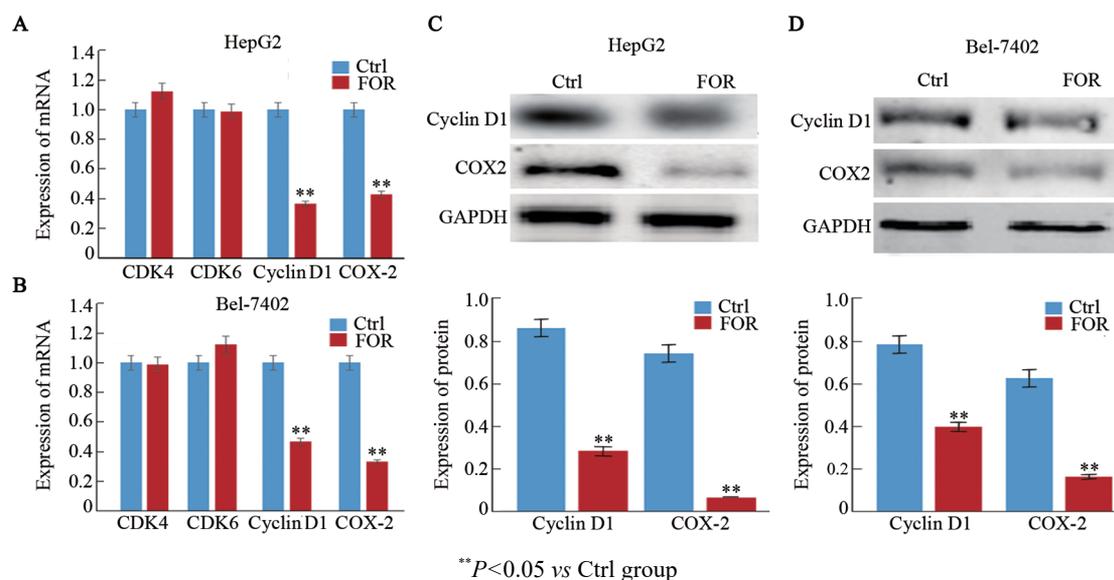
图5 FOR (0.006 $\mu\text{mol/ml}$) 对 HepG2 和 Bel-7402 细胞周期的影响

Fig.5 Effect of FOR (0.006 $\mu\text{mol/ml}$) on cell cycle of HepG2 and Bel-7402 cells

2.7 FOR 通过 COX-2/cyclin D1 轴抑制肝癌细胞进入细胞周期

FOR (0.006 $\mu\text{mol/ml}$) 处理 48 h 时, qPCR 检测结果(图 6A)显示, 与对照组比较, 实验组 HepG2 和 Bel-7402 细胞中 cyclin D1 和 COX-2 mRNA 表达水平均显著降低(均 $P < 0.01$), 而 CDK4 和 CDK6 表达水平

差异比较均无统计学意义(均 $P > 0.05$)。WB 实验进一步印证了 qPCR 的结果(图 7B), 即实验组两种细胞中 cyclin D1 和 COX-2 蛋白的表达水平显著低于对照组(均 $P < 0.01$)。该检测结果表明, FOR 可通过 COX-2/cyclin D1 通路抑制肝癌细胞进入细胞周期。



A and B: qPCR was used to detect mRNA expression in cells; C and D: WB assay was used to detect related protein expression in cells

图 6 FOR (0.006 $\mu\text{mol/ml}$) 对 HepG2 和 Bel-7402 细胞中 cyclin D1、COX-2、CDK4 和 CDK6 表达的影响

Fig.6 Effect of FOR (0.006 $\mu\text{mol/ml}$) on the expression of cyclin D1, COX-2, CDK4 and CDK6 in HepG2 and Bel-7402 cells

3 讨论

慢性炎症与恶性肿瘤的发生密切相关, COX-2 是癌症发生的关键蛋白之一^[16-17]。本研究入组 20 例接受手术治疗的肝癌初治患者, 通过分析肝癌组织与癌旁组织中 COX-2 mRNA 的表达水平差异, 结果发现肝癌组织中 COX-2 mRNA 表达水平显著高于癌旁组织。入组的 60 例肝癌手术患者的病理标本免疫组化染色结果显示, COX-2 蛋白表达阳性率为 68.3%; 分析其表达水平与患者临床病理特征与预后的关系, 结果发现 COX-2 阳性表达的患者较阴性表达患者分期晚、肿瘤大, 且预后差。赵玮等^[18]研究发现, COX-2 在肝癌中的阳性表达率为 56.94%, 其表达水平与肝癌分化程度相关, 阳性表达的患者分化程度较低。在 COX-2 表达与肝癌关系的研究方面, 目前主流观点认为 COX-2 高表达可促进肝癌细胞的增殖和进展^[9-11]。本研究从宏观层面进一步验证了 COX-2 对肝癌的促进作用。

据报道^[19-21], FOR 可以通过抑制 COX-2 表达起到抗炎、抗病毒作用。为了验证 COX-2 在肝癌发生中的作用及其 FOR 是否具有预防肝癌发生的作用, 本实验进行了 DEN 诱导小鼠肝癌的实验, 并检测了肝

癌发生期间不同时间小鼠肝组织中 COX-2 的表达水平。在实验组中, 将 FOR 给予小鼠以测试其对预防肝癌的作用。在 DEN 处理后第 10 周(癌前肝组织)和 18 周(肝癌组织)的结果显示, COX-2 在癌前肝组织和肝癌组织中的表达均上调; 与对照组比较, FOR 处理组小鼠的肝癌发生率和组织中 COX-2 阳性表达水平均明显降低。因此, 笔者认为 FOR 可以通过降低 COX-2 表达来抑制肝癌的发生。然而, FOR 通过 COX-2 影响肝癌发病的机制仍不清楚。

为了探索 FOR 在肝癌发生中的作用机制, 本研究进一步进行了体外细胞实验。首先, 验证了 FOR 对肝癌细胞具有抑制作用。分别用浓度 0.003 和 0.006 $\mu\text{mol/ml}$ 的 FOR 处理肝癌 HepG2 和 Bel-7402 细胞 12、24、36 和 48 h, CCK-8 法检测结果表明, FOR 以剂量依赖的方式抑制肝癌细胞的增殖能力。用 0.006 $\mu\text{mol/ml}$ FOR 处理 HepG2 和 Bel-7402 细胞 48 h, 流式细胞术检测结果表明, 与对照组相比, 用 FOR 处理组肝癌细胞 G0/G1 期细胞数量明显增加, 而 S 期的细胞数量明显减少。细胞无限期进入细胞周期, 导致细胞增殖增强, 在恶性肿瘤的发生中起重要作用^[22]。研究^[23-25]表明, 将肝癌细胞阻滞在 G0/G1 期可以显著抑制癌细胞的增殖。本实验结果表明, FOR

可以通过阻止细胞进入细胞周期来抑制癌细胞的增殖能力。

那么, FOR 如何阻滞肝癌细胞的细胞周期以及此种作用是否与 COX-2 表达有关? 本实验用浓度为 0.006 $\mu\text{mol/ml}$ 的 FOR 处理肝癌细胞 48 h 后, qPCR 和 WB 实验结果表明 FOR 处理组 HepG2 和 Bel-7402 细胞中 COX-2 和 cyclin D1 mRNA 和蛋白的表达水平均显著低于对照组。Cyclin D1 是一种重要的细胞周期调节蛋白, 在肿瘤发病机制和肿瘤细胞的持续增殖中发挥着重要的作用^[26]。Cyclin D1 及其同源 CDK 的不受控制的转录、积累和泛素化可导致细胞增殖不受控制。因此, cyclin D1 被认为是多种肿瘤的致癌驱动因子, 例如肺癌、乳腺癌和黑色素瘤等^[27-29]。动物和细胞实验结果均表明, FOR 可以显著抑制肝癌细胞中 COX-2 和 cyclin D1 的表达, 将细胞阻滞在 G0/G1 期, 从而抑制肝癌的发生。

总之, 本研究结果表明 COX-2 在肝癌的发病机制中起着重要作用, FOR 可以通过抑制 COX-2 和 cyclin D1 的表达来预防肝癌的发生和发展, 此研究结果为肝癌的预防提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] LU X, YANG C, HU Y C, et al. Upregulation of miR-1254 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation, migration, and invasion via inactivation of the Hippo-YAP signaling pathway by decreasing PAX5[J/OL]. *J Cancer*, 2021, 12(3): 771-789[2021-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7778534/>. DOI: 10.7150/jca.49680.
- [2] 樊嘉, 高强. 肝癌分子分型指导精准诊断与治疗的研究前沿[J]. *中华消化外科杂志*, 2020, 19(1): 28-31. DOI:10.3760/cma.j.issn.1673-9752.2020.01.003.
- [3] 巫梦娜, 孙建英, 姚敏, 等. 肝癌外泌体源性 miRNA 表达及其临床价值[J]. *中华肝脏病杂志*, 2020, 28(1): 83-86. DOI:10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2020.01.020.
- [4] FITZMORRIS P, SHOREIBAH M, ANAND B S, et al. Management of hepatocellular carcinoma[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2015, 141(5): 861-876. DOI:10.1007/s00432-014-1806-0.
- [5] LANG H, SOTIROPOULOS G C, BROKALAKI E I, et al. Survival and recurrence rates after resection for hepatocellular carcinoma in noncirrhotic livers[J]. *J Am Coll Surg*, 2007, 205(1): 27-36. DOI: 10.1016/j.jamcollsurg.2007.03.002.
- [6] 王素媛, 侯晋. 肝脏炎症转化调控机制的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2020, 27(1): 1-8. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2020.01.001.
- [7] CHEKI M, YAHYAPOUR R, FARHOOD B, et al. COX-2 in radiotherapy: a potential target for radioprotection and radiosensitization[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2018, 11(3): 173-183. DOI:10.2174/1874467211666180219102520.
- [8] HAN Z Q, LIAO H, SHI F, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 sensitizes lung cancer cells to radiation-induced apoptosis[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5959-5965. DOI:10.3892/ol.2017.6940.
- [9] LI T, ZHONG J T, DONG X F, et al. Meloxicam suppresses hepatocellular carcinoma cell proliferation and migration by targeting COX-2/PGE2-regulated activation of the β -catenin signaling pathway[J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(6): 3614-3622. DOI: 10.3892/or.2016.4764.
- [10] WANG Q, LU D H, FAN L L, et al. COX-2 induces apoptosis-resistance in hepatocellular carcinoma cells via the HIF-1 α /PKM2 pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(1): 475-488. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3936.
- [11] ZHEN Y L, WU Q M, DING Y Q, et al. Exogenous hydrogen sulfide promotes hepatocellular carcinoma cell growth by activating the STAT3-COX-2 signaling pathway[J/OL]. *Oncol Lett*, 2018, 15(5): 6562-6570[2021-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5920354/>. DOI:10.3892/ol.2018.8154.
- [12] WANG H Q, ZHANG D J, GE M, et al. Formononetin inhibits enterovirus 71 replication by regulating COX-2/PGE2 expression [J/OL]. *Virology*, 2015, 12: 35[2021-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4351682/>. DOI: 10.1186/s12985-015-0264-x.
- [13] YI L, CUI J, WANG W Q, et al. Formononetin attenuates airway inflammation and oxidative stress in murine allergic asthma[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 533841. DOI:10.3389/fphar.2020.533841.
- [14] WANG W S, ZHAO C S. Formononetin exhibits anticancer activity in gastric carcinoma cell and regulating miR-542-5p[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2021, 37(3): 215-225. DOI:10.1002/kjm2.12322.
- [15] FUENTES-HERNÁNDEZ S, ALARCÓN-SÁNCHEZ B R, GUERRERO-ESCALERA D, et al. Chronic administration of diethylnitrosamine to induce hepatocarcinogenesis and to evaluate its synergistic effect with other hepatotoxins in mice[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2019, 378: 114611. DOI:10.1016/j.taap.2019.114611.
- [16] FREJBORG E, SALO T, SALEM A. Role of cyclooxygenase-2 in head and neck tumorigenesis[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(23): E9246[2021-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7731111/>. DOI:10.3390/ijms21239246.
- [17] MA X, WANG R H, YU S T, et al. Anti-inflammatory activity of oligomeric proanthocyanidins via inhibition of NF- κ B and MAPK in LPS-stimulated MAC-T cells[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2020, 30(10): 1458-1466. DOI:10.4014/jmb.2006.06030.
- [18] 赵玮, 范璐璐, 于汉卿, 等. 葡萄糖调节蛋白和环氧合酶-2 在肝癌组织中的表达及其相关性研究[J]. *安徽医药*, 2017, 21(2): 259-262. DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.02.017.
- [19] HUANG G C, LEE C J, WANG K T, et al. Immunomodulatory effects of *Hedysarum polybotrys* extract in mice macrophages, splenocytes and leucopenia[J/OL]. *Molecules*, 2013, 18(12): 14862-14875[2021-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6270618/>. DOI:10.3390/molecules181214862.
- [20] KIM M S, PARK J S, CHUNG Y C, et al. Anti-inflammatory effects of formononetin 7-O-phosphate, a novel biorenovation product, on LPS-stimulated RAW 264.7 macrophage cells[J/OL]. *Molecules*, 2019, 24(21): E3910[2021-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6864718/>. DOI:10.3390/molecules24213910.
- [21] ALADAILEH S H, HUSSEIN O E, ABUKHALIL M H, et al. Formononetin upregulates Nrf2/HO-1 signaling and prevents oxidative stress, inflammation, and kidney injury in methotrexate-induced rats[J/OL]. *Antioxidants (Basel)*, 2019, 8(10): E430[2021-

- 03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6827027/>. DOI:10.3390/antiox8100430.
- [22] CANAVESE M, SANTO L, RAJE N. Cyclin dependent kinases in cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(7): 451-457. DOI: 10.4161/cbt.19589.
- [23] FAN J, LOU B, CHEN W, et al. Down-regulation of HDAC5 inhibits growth of humolan hepatocellular carcinoma by induction of apoptosis and cell cycle arrest[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(11): 11523-11532. DOI:10.1007/s13277-014-2358-2.
- [24] HE X X, ZHANG Y N, YAN J W, et al. CP-31398 inhibits the growth of p53-mutated liver cancer cells in vitro and in vivo[J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(1): 807-815. DOI: 10.1007/s13277-015-3857-5.
- [25] KOSAKA M, KANG M R, YANG G, et al. Targeted p21WAF1/CIP1 activation by RNA inhibits hepatocellular carcinoma cells [J/OL]. *Nucleic Acid Ther*, 2012, 22(5): 335-343[2021-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3464408/>. DOI: 10.1089/nat.2012.0354.
- [26] MONTALTO F I, DE AMICIS F. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma[J]. *Cells*, 2020, 9(12): 2648. DOI:10.3390/cells9122648.
- [27] TCHAKARSKA G, SOLA B. The double dealing of cyclin D1 [J/OL]. *Cell Cycle*, 2020, 19(2): 163-178[2021-03-22]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6961668/>. DOI:10.1080/15384101.2019.1706903.
- [28] JOHN R R, MALATHI N, RAVINDRAN C, et al. Mini review: multifaceted role played by cyclin D1 in tumor behavior[J]. *Indian J Dent Res*, 2017, 28(2): 187-192. DOI:10.4103/ijdr.IJDR_697_16.
- [29] KNUDSEN K E, DIEHL J A, HAIMAN C A, et al. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk[J]. *Oncogene*, 2006, 25(11): 1620-1628. DOI:10.1038/sj.onc.1209371.

[收稿日期] 2021-04-23

[修回日期] 2021-08-30

[本文编辑] 党瑞山