

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.10.007

◇ 药学研究 ◇

微小RNA-558靶向调控叉头框转录因子C1促进卵巢癌SKOV3细胞的增殖和侵袭力

李静¹, 王金铭², 任琛琛¹, 杨立¹, 刘迦希¹, 白杨¹作者单位:¹郑州大学第三附属医院妇产科, 河南 郑州 450000;²河南省人民医院医学遗传研究所, 河南 郑州 450000

摘要:目的 探讨miR-558通过对叉头框转录因子C1(Forkhead box protein C1, FOXC1)的调控从而对人卵巢癌腺癌细胞(SKOV3)增殖和侵袭能力的影响。方法 选择2014年1月至2017年12月郑州大学第三附属医院妇产科收治的上皮性卵巢癌病人25例、交界性卵巢上皮性肿瘤病人25例和良性卵巢上皮性肿瘤病人25例, 三组病例均行手术治疗, 取其部分经手术切除的卵巢组织标本, 使用实时荧光定量PCR技术来分析微小RNA-558(miR-558)的表达水平。把卵巢癌SKOV3细胞分成三组, 分别为miR-558模拟物组、抑制物组和阴性对照组。通过靶基因预测网站来预测miR-558的靶基因(FOXC1基因), 通过荧光素酶报告基因实验来验证miR-558对FOXC1基因表达的调控作用。通过实时荧光定量-PCR技术和蛋白印迹法来分析转染后各组细胞的miR-558和FOXC1的表达水平。通过细胞增殖实验(Cell Counting Kit-8, CCK-8法)检测三组细胞的增殖率。通过基质胶侵袭实验检测三组细胞的侵袭能力。结果 实时荧光定量-PCR结果显示, 在上皮性卵巢癌、交界性卵巢上皮性肿瘤和良性卵巢上皮性肿瘤病人的卵巢组织中, miR-558的相对表达水平分别为(3.43±0.42)、(2.47±0.35)、(1.37±0.31); 在miR-558模拟物组、抑制物组和阴性对照组中, SKOV3细胞miR-558的表达水平分别为(2.37±0.17)、(0.64±0.17)、(1.14±0.11)。在miR-558模拟物组、抑制物组和阴性对照组中, SKOV3细胞的FOXC1基因转录出的信使RNA(mRNA)表达水平分别为(0.51±0.10)、(2.27±0.12)、(0.99±0.11)。荧光素酶报告基因实验结果显示, SKOV3细胞被含miR-558的质粒以及含FOXC1基因的重组质粒共同转染后, 的荧光素酶活性下降了49.50% ($P < 0.05$)。蛋白印迹结果显示, 上述三组SKOV3细胞中, FOXC1蛋白的表达水平分别为(0.83±0.07)、(2.17±0.15)、(1.47±0.21)。CCK-8检测结果显示, 不同时间miR-558模拟物组SKOV3细胞的增殖率明显高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 不同时间miR-558抑制物组SKOV3细胞的增殖率明显低于阴性对照组 ($P < 0.05$)。基质胶侵袭实验结果显示, 上述三组SKOV3细胞穿透基底膜的细胞数分别为(158.33±9.45)、(67.01±10.58)、(117.67±16.86) ($P < 0.05$)。结论 miR-558能够通过靶向调控FOXC1的表达, 促进SKOV3细胞的增殖能力和侵袭能力, 从而参与卵巢癌的发生发展。
关键词: 卵巢肿瘤; 叉头转录因子类; 微小RNA; 增殖; 实时聚合酶链反应; 荧光免疫测定; 实时荧光定量PCR; 侵袭

MicroRNA-558 promotes the proliferation and invasion of SKOV3 cells by targeting FOXC1

LI Jing¹, WANG Jinming², REN Chenchen¹, YANG Li¹, LIU Jiayi¹, BAI Yang¹

Author Affiliations: ¹Department of Obstetrics and Gynecology, the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan 450000; ²Institute of Medical Genetics, Henan Provincial People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000

Abstract: Objective To clarify the role of miR-558 on the proliferation and invasion of SKOV3 cell and the relationship with FOXC1. **Methods** We recruited 25 patients with epithelial ovarian cancer, 25 patients with borderline epithelial ovarian tumors and 25 patients with benign epithelial ovarian tumors in Department of Obstetrics and Gynecology of the Third Affiliated Hospital of Zhengzhou University from January 2014 to December 2017. The three groups underwent surgical treatment, and some ovarian tissue of patients were taken. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used to measure the expression of miR-558 in ovarian tissues. SKOV3 cells were assigned to miR-558 mimics group, inhibitor group, negative control, respectively. Bioinformatics was used for predicting target genes for miRNA-558-5p (FOXC1) and dual-luciferase reporting system for verifying the target gene. MiR-558 expression was evaluated by qRT-PCR. FOXC1 expression was evaluated by western blot and qRT-PCR. Cell proliferation was determined by CCK-8 assay. Invasive activities were assessed by cell Transwell invasion assay. **Results** The relative expression of miR-558 measured by qRT-PCR in the ovarian tissues of patients with epithelial ovarian cancer, borderline ovarian epithelial tumor and benign ovarian epithelial tumor were (3.43±0.42), (2.47±0.35), (1.37±0.31), respectively. The expression of

miR-558 in SKOV3 cell line in the miR-558 mimics group, inhibitor group and negative control group were (2.37 ± 0.17) , (0.64 ± 0.17) , (1.14 ± 0.11) , respectively. The expression of FOXC1 mRNA in SKOV3 cell line in the miR-558 mimics group, inhibitor group and negative control group were (0.51 ± 0.10) , (2.27 ± 0.12) , (0.99 ± 0.11) , respectively. Luciferase reporter assay results showed that the luciferase activity of SKOV3 cells transfected with miR-558 containing plasmid and FOXC1 containing recombinant plasmid decreased by 49.50% ($P < 0.05$). The expression of FOXC1 protein in SKOV3 cell line in the miR-558 mimics group, inhibitor group and negative control group were (0.83 ± 0.07) , (2.17 ± 0.15) , (1.47 ± 0.21) , respectively. The results of CCK-8 assay showed that the proliferation rate of SKOV3 cells in the miR-558 mimics group at different times was higher than that in the negative control group ($P < 0.05$), and that of the miR-558 inhibitor group at different times was significantly lower when compared with negative control group ($P < 0.05$). The number of SKOV3 cell that passed through the membrane in miR-558 mimics group, inhibitor group and negative control group was (158.33 ± 9.45) , (67.01 ± 10.58) , (117.67 ± 16.86) , respectively ($P < 0.05$). **Conclusions** MiR-558 can promote the proliferation and invasion of SKOV3 cells by targeting FOXC1, which participates in the pathogenesis of ovarian cancer.

Key words: Ovarian neoplasms; Forkhead transcription factors; microRNA (miR); Proliferation; Real-time polymerase chain reaction; Fluoroimmunoassay; Quantitative real-time PCR; Invasion

卵巢癌是常见的妇科恶性肿瘤,在卵巢肿瘤中它的发病率占 50%~70%^[1]。在早期,卵巢癌多无明显表现,具有较高的病死率^[1-2]。目前研究的主要理论认为:细胞的过度增殖和侵袭力的异常参与了肿瘤的发生发展^[2],微小 RNA (microRNA, miRNA) 和卵巢癌的发生发展存在密切关系,通过对下游靶基因的调控表达,miRNA 影响了细胞的增殖和侵袭能力,可能导致卵巢癌的发生发展^[3]。其中,miR-558 是目前被发现参与肿瘤发生发展过程的一种非常重要的新的癌基因,但是 miR-558 在卵巢癌组织中的表达以及 miR-558 在卵巢癌发生发展过程中的作用机制尚不明确,并且 miR-558 和叉头框转录因子 C1 (FOXC1) 之间的调控关系尚未见报道^[4]。本研究主要探讨 miR-558 在卵巢癌组织中的表达情况、miR-558 与 FOXC1 基因之间的调控关系和 miR-558 对人卵巢癌腺癌细胞 SKOV3 细胞增殖、侵袭能力的影响,在卵巢癌的发生机制及治疗思路方面提供一些新的方向。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2014 年 1 月至 2017 年 12 月郑州大学第三附属医院妇产科同期收治的 25 例上皮性卵巢癌、25 例交界性卵巢上皮性肿瘤和 25 例良性卵巢上皮性肿瘤病人,经过知情同意,取其手术切除的部分卵巢组织标本;上皮性卵巢癌组年龄范围为 35~76 岁,临床分期 I~II 期 6 例、III~IV 期 19 例,中高分化 10 例、低分化 15 例;交界性卵巢上皮性肿瘤组年龄范围为 39~65 岁,临床分期 I~II 期 12 例、III~IV 期 13 例,中高分化 13 例、低分化 12 例;良性卵巢上皮性肿瘤组年龄范围为 31~55 岁。本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。病人对研究方案均签署了知情同意书。由第四军医大学

病原微生物学教研室惠赠卵巢腺癌细胞系 SKOV3 细胞。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 从广州锐博科技有限公司购买 miR-558 的模拟物、抑制物及阴性对照。miR-558、小核 RNA6 (U6) 的特异性引物、FOXC1 的引物由上海生工生物工程有限公司合成。 β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体、FOXC1 抗体购买于美国 Abcam 生物技术有限公司。实时荧光定量 PCR 试剂盒购买于北京鼎国公司产品。

1.2.2 验证 miR-558 对 FOXC1 基因的调控作用借助于权威的生物信息学靶基因预测网站 (PicTar、miRanda 和 TargetScan), 将 miR-558 的名称和物种输入, 预测与 miR-558 相关的靶基因 FOXC1; 通过荧光素酶报告基因实验, 验证 miR-558 对 FOXC1 基因的靶向调控作用, 构建荧光素酶报告基因载体质粒 [(含有 FOXC1 基因 3'-非翻译区 (UTR) 中潜在结合位点)], 野生型 FOXC1 基因 3'-UTR (野生型-FOXC1-2'-3'-UTR) 和突变型 FOXC1 基因 3'-UTR (突变型-FOXC1-3'-UTR), 放入 -20℃ 冰箱保存备用。把质粒和 miR-558 共同转染到 SKOV3 细胞系中, 培养 48 h, 用荧光素酶活性检测试剂盒测定并计算海肾荧光素酶与萤火虫荧光素酶的比值, 以此值表示细胞荧光素酶的水平。

1.2.3 细胞培养及转染 在 RPMI1640 培养基中 (含 1% 青霉素及链霉素及 10% 胎牛血清) 加入 SKOV3 细胞, 恒温培养箱的温度为 37℃, 含 5% 二氧化碳, 后续实验选取对数生长期的 SKOV3 细胞; 选取并计数对数生长期的 SKOV3 细胞, 按照 2.0×10^5 个/孔接种到 6 孔培养板中进行培养。转染在细胞生长态势较好的时候进行。将转染实验细胞分

成三组,分别为 miR-558 模拟物组、miR-558 抑制物组及阴性对照组。将 miRNA 转染到 SKOV3 细胞中,miRNA 由羧基荧光素 (Carboxyfluorescein, FAM) 标记。转染之前,充分混合 miRNA 和转染试剂,在室温下放置 5 min,然后放置到培养箱的细胞培养板内,开始转染反应;转染 24 h 以后,在 200 倍光镜及荧光显微镜下分别观察并计数,把表达荧光蛋白的细胞作为阳性细胞,计算其转染效率,转染效率为阳性细胞数与总细胞数的比值。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 技术检测 卵巢组织 SKOV3 细胞中 miR-558 的表达水平以及 SKOV3 细胞中 FOXC1 的 mRNA 的表达水平将细胞的总 RNA 用 Trizol 一步法提取,浓缩,计算总 RNA 的纯度和质量。采用实时荧光定量 PCR 技术进行试验后,行融解曲线分析,每个实验均重复 3 次。对结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 (Ct 值为反应的实时荧光强度明显大于背景值时的循环数)。

1.2.5 蛋白印迹法检测 SKOV3 细胞中 FOXC1 蛋白的表达水平提取总蛋白后测定浓度,依标准进行凝胶电泳,封闭液进行封闭,加入兔抗人 FOXC1 一抗 (1:5 000 稀释),在室温下孵育 2 h,然后洗涤 3 次,加入二抗,室温下再孵育 1 h,洗涤 3 次,把 β -actin 作为内参,分析其灰度值,计算 FOXC1 蛋白的相对表达水平 (FOXC1 蛋白与 β -actin 的灰度值的比值)。该实验重复进行 3 次。

1.2.6 CCK-8 法检测 转染后 SKOV3 细胞的增殖情况将对数生长期的 SKOV3 细胞接种于 96 孔板中,在转染后 24、48、72、96 h,采用 CCK-8 试剂盒来检测细胞处于 450 nm 的吸光度 (A) 值并且记录。计算细胞增殖率 [(实验组 A 值-空白对照组 A 值)/(对照组 A 值-空白对照组 A 值)×100%]。本实验重复进行 3 次。

1.2.7 基质胶侵袭实验检测 转染后 SKOV3 细胞的侵袭力将转染后 24 h 的 SKOV3 细胞进行收集,细胞悬液加入到穿膜小室内,培养 36 h,取出小室,擦拭掉上室细胞,把那些已经侵入并且贴附于下层微孔膜的细胞用多聚甲醛固定 5 min,磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗后在显微镜下观察,随机在每张微孔膜中选 5 个视野进行细胞计数。此实验重复进行 3 次。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 21.0 软件包对实验数据进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 来表示,所有数据均进行正态检验并且符合正态分布,采用单因素方差分析进行多组间的比较,采用独立样本 *t* 检验对两组间进行比较。 $P < 0.05$ 时,差异有统计学意义。

2 结果

2.1 验证 miR-558 对 FOXC1 基因的靶向调节作用

上述 3 个权威的生物信息学靶基因预测数据库预测得出 miR-558 的靶基因是 FOXC1,荧光素酶报告基因实验显示,含有 miR-558 的质粒以及含有 FOXC1 基因的重组质粒共同转染 SKOV3 细胞后,模拟物组荧光素酶相对活性为 (0.56±0.01),阴性对照组荧光素酶相对活性为 (1.12±0.02),与阴性对照组相比较,模拟物组的荧光素酶活性下降了 49.50% ($P < 0.05$)。

2.2 卵巢组织中的 miR-558 的相对表达水平比较

实时荧光定量-PCR 技术结果显示,上皮性卵巢癌、交界性卵巢上皮性肿瘤和良性卵巢上皮性肿瘤病人卵巢组织中 miR-558 的相对表达水平分别为 (3.43±0.42)、(2.47±0.35)、(1.37±0.31),各组之间两两比较,均差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

实时荧光定量-PCR 技术的结果显示,在 miR-558 模拟物组、抑制物组和阴性对照组中,SKOV3 细胞 miR-558 的表达水平分别为 (2.37±0.17)、(0.64±0.17)、(1.14±0.11),miR-558 各组间两两比较,差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$);在 miR-558 模拟物组、抑制物组和阴性对照组中,SKOV3 细胞的 FOXC1 基因转录出的 mRNA 的表达水平分别为 (0.51±0.10)、(2.27±0.12)、(0.99±0.11),FOXC1 的 mRNA 表达水平各组间两两比较,差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

蛋白印迹法结果显示,在 miR-558 模拟物组、抑制物组和阴性对照组 SKOV3 细胞中,FOXC1 蛋白的表达水平分别为 (0.83±0.07)、(2.17±0.15)、(1.47±0.21),FOXC1 蛋白的表达水平各组间两两比较,差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

CCK-8 结果显示,miR-558 模拟物组的细胞增殖率显著高于阴性对照组,抑制物组细胞的细胞增殖率明显低于阴性对照组,模拟物组中增殖率水平高于抑制物组,各组间两两比较,差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$),见图 1。

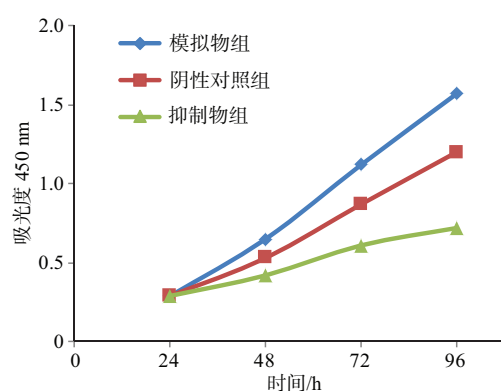


图1 卵巢癌组织CCK-8实验结果

基质胶侵袭实验结果显示,在 miR-558 模拟物组、抑制物组和阴性对照组 SKOV3 细胞中,SKOV3 细胞穿透基底膜的细胞数分别为 (158.33 ± 9.45) 、 (67.01 ± 10.58) 、 (117.67 ± 16.86) ($P < 0.05$)。miR-558 细胞侵袭力水平各组间两两比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

卵巢癌的发病率位居女性生殖系统恶性肿瘤的前 3 位,而它的死亡率却位居妇科恶性肿瘤之首^[1]。据不完全统计,2015 年,我国大约有 5 万多名女性被确诊为卵巢癌,约 3 万例病人死于卵巢癌^[1-2]。肿瘤细胞异常的增殖和侵袭能力是恶性肿瘤的主要生物学特征,细胞的增殖和侵袭能力是影响癌症治疗和预后的重要因素。肿瘤细胞异常的增殖力与侵袭力相互作用,共同促进癌细胞的生长,最终导致癌症的发展转移和化疗耐药^[1,5-7]。因此,明确卵巢癌细胞增殖和侵袭能力过度的具体原因对控制卵巢癌的发生发展具有重大意义。腺癌是卵巢上皮性癌中的主要病理类型,本研究所选用的 SKOV3 细胞系是卵巢腺癌细胞系能够更为真实地反映卵巢癌的生物特性。

miRNA 是小分子单链 RNA,由 21 至 23 个核苷酸组成,位于内源非编码区,通过与靶 mRNA 特异性的碱基配对,将靶 mRNA 降解,或者抑制它的翻译,继而实现对目的基因的调控^[3]。miR-558 是 miRNA 中的一种,位于人类 2 号染色体 p22.3,能够调节环氧合酶 2 和白细胞介素-1 β 的表达,诱导人关节软骨细胞分解代谢^[4]。有研究表明,miR-558 可通过调控细胞的凋亡、增殖以及细胞的迁移、侵袭等生物学行为从而参与肿瘤的进展,如胃癌、成神经细胞瘤^[8,10]。Li Y 等^[9]通过研究发现,在膀胱癌病人体内,环状 RNAHIPK3 (circHIPK3) 是低表达的, circHIPK3 能够抑制 miR-558 的表达水平,降低乙酰肝素酶的表达,从而调控细胞的迁移和侵袭及膀胱癌的血管生成,由此提示我们,miR-558 能够促进膀胱癌的肿瘤发生。华中科技大学同济医学院的 Qu H 教授团队^[10]通过研究发现 miR-558 能够与缺氧诱导因子 2 的 5'-非编码区结合,促进缺氧诱导因子 2 的表达从而促进成神经细胞瘤细胞的生长、迁移、侵袭和血管生成,从而促进肿瘤的发生,研究表明,高表达 miR-558 的病人生存预后较差。同时 Qu H 教授团队^[11]也在成神经细胞瘤的细胞中,通过敲除内源性 miR-558 的表达,证实其能够通过活化乙酰肝素酶促进成神经细胞瘤的肿瘤生成和侵袭。华中科技大学同济医学院的 Zheng L 教授团队^[8]发

现在胃癌的体内实验和体外实验中,miR-558 能够识别乙酰肝素酶启动子中的互补位点,以 AGO 蛋白家族成员 1 (Argonaute 1) 依赖的方式结合 SMAD 家族成员 4 (Smad4) 降低 Smad4 的表达,从而促进胃癌的进展。这些研究与我们的结果相一致,从而更加明确了 miR-558 的致癌作用。

FOXC1 基因长约 1787kb,位于人类 6 号染色体 p25.3,经转录翻译形成 FOXC1 蛋白。最新的研究表明,FOXC1 通过激活趋化因子受体 4 (CXCR4),能够参与癌症的发生发展,并且能够与活化 T-细胞核因子 1 (NFATC1) 构成基因遗传轴参与疾病的发展^[12]。本课题组的前期研究已经通过 QRT-PCR 技术和免疫组化法分析上皮性卵巢癌、交界性卵巢上皮性肿瘤和良性卵巢上皮性肿瘤病人的卵巢组织,明确在上皮性卵巢癌中 FOXC1 的表达水平是降低的,与本次研究中的 miR-558 的表达水平呈负向相关性^[13-14]。同时本研究我们通过分析 miRNA 靶基因预测 (PicTar、miRanda 和 TargetScan) 数据库和荧光素酶报告实验明确了 miR-558 对 FOXC1 的靶向调控作用。本课题组通过前期研究发现在重组 FOXC1 慢病毒表达稳定的 SKOV3 的细胞中,细胞的增殖和侵袭能力受到明显抑制,在本次研究中我们进一步通过细胞实验明确了 FOXC1 对卵巢癌细胞的增殖和侵袭能力的抑制作用是由 miR-558 对 FOXC1 的靶向调控实现的^[15]。

综上所述,miR-558 通过靶向调控 FOXC1 的表达,能够促进卵巢癌细胞的增殖和侵袭能力,这为卵巢癌的发病机制提供了重要的理论依据。但是 miR-558 在卵巢癌病人血清中的具体表达情况以及在卵巢癌裸鼠移植瘤动物模型中的具体作用尚不明确,且与卵巢癌病人生存预后之间的关系尚不清楚,这仍然是本课题组下一步要深入研究的重点。

参考文献

- [1] CHEN WQ, ZHENG RS, BAADE PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [2] 任红英. 人附睾蛋白 4 在卵巢癌患者手术前后的变化及其对复发的监测价值[J]. 安徽医药, 2018, 22(2): 2390-2393.
- [3] 余艳玲. 血清 miRNA-125b 与 miRNA-21 联合检测对前列腺癌的诊断价值[J]. 安徽医药, 2018, 22(12): 120-123.
- [4] PARK SJ, CHEON EJ, KIM HA. MicroRNA-558 regulates the expression of cyclooxygenase-2 and IL-1 β -induced catabolic effects in human articular chondrocytes[J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(7): 981-989.
- [5] 李静, 王金铭, 刘月华, 等. 微小 RNA-106b 靶向调控基质金属蛋白酶 2 对滋养细胞侵袭和增殖的影响[J]. 中华妇产科杂志, 2017, 52(5): 327-332.

- [6] WANG J, LIU Y, WANG X, et al. miR-1266 promotes cell proliferation, migration and invasion in cervical cancer by targeting DAB2IP [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864 (12): 3623-3630.
- [7] 张展, 王金铭, 刘月华, 等. 微小RNA-26 a靶向调控高迁移率族蛋白A1抑制宫颈癌细胞迁移、侵袭的研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2017, 37(10): 778-784.
- [8] ZHENG L, JIAO W, SONG H, et al. miRNA-558 promotes gastric cancer progression through attenuating Smad4-mediated repression of heparanase expression [J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(9): e2382. DOI: 10.1038/cddis.2016.293.
- [9] LI Y, ZHENG F, XIAO X, et al. CircHIPK3 sponges miR-558 to suppress heparanase expression in bladder cancer cells [J]. *EMBO Rep*, 2017, 18(9): 1646-1659.
- [10] Qu H, Zheng L, Song H, et al. microRNA-558 facilitates the expression of hypoxia-inducible factor 2 alpha through binding to 5'-untranslated region in neuroblastoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(26): 40657-40673.
- [11] QU H, ZHENG L, PU J, et al. miRNA-558 promotes tumorigenesis and aggressiveness of neuroblastoma cells through activating the transcription of heparanase [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(9): 2539-2551.
- [12] PAN H, PENG Z, LIN J, et al. Forkhead box C1 boosts triple-negative breast cancer metastasis through activating the transcription of chemokine receptor-4 [J]. *Cancer Sci*, 2018, 109(12): 3794-3804.
- [13] 李倩, 任琛琛, 杨立, 等. 上皮性卵巢癌组织中FOXO1 mRNA表达变化及其启动子区甲基化情况观察[J]. *山东医药*, 2015, 55(38): 21-23.
- [14] 黄玲, 任琛琛, 杨立, 等. 上皮性卵巢癌组织中FOXO1的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2017, 57(13): 13-16.
- [15] 任琛琛, 刘迦希, 杨立, 等. 上调FOXO1的表达对SKOV3细胞增殖及侵袭的影响[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2017, 52(3): 271-274.

(收稿日期: 2019-06-17, 修回日期: 2019-07-23)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2020.10.008

◇ 药学研究 ◇

茵陈五苓散对实验性梗阻性黄疸大鼠肝损伤的保护作用

张伟¹, 赵卫华¹, 徐云兴¹, 王红坡²作者单位:¹郑州煤炭工业(集团)有限责任公司总医院药剂科, 河南 郑州 452370;²新乡医学院第一附属医院磁共振科, 河南 卫辉 453100

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(15A320010)

摘要: **目的** 探究茵陈五苓散对实验性梗阻性黄疸大鼠肝损伤的保护作用。 **方法** 2017年1月至2019年5月, 60只SD大鼠, 选取45只制成实验性梗阻性黄疸大鼠模型, 剩余15只为对照组, 45只模型大鼠按照随机数字表法分为: 模型组、低剂量茵陈五苓散组(10 g·kg⁻¹·d⁻¹)和高剂量茵陈五苓散组(20 g·kg⁻¹·d⁻¹)每组各15只; 实验组使用对应浓度茵陈五苓散灌胃, 对照组和模型组使用等量生理盐水灌胃, 持续15 d。使用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、血清总胆红素(TBIL)和内毒素(ET)水平; 使用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组大鼠肝组织匀浆丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)含量水平; 使用蛋白质印记法检测各组大鼠肝组织凋亡相关蛋白B淋巴细胞瘤-2蛋白(Bcl-2)、Bcl-2相关X蛋白(Bax)、半胱氨酸天门冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase-3)和钙蛋白酶(Calpain)蛋白表达水平。 **结果** 相比对照组, 模型组大鼠体重、肝指数、ALT、AST、TBIL、ET、MDA、Bax蛋白、Caspase-3蛋白、Calpain蛋白水平均显著升高($P < 0.05$), SOD、Bcl-2蛋白水平均显著降低($P < 0.05$); 相比模型组, 低剂量茵陈五苓散组大鼠体重、肝指数、ALT、AST、TBIL、ET、MDA、Bax蛋白、Caspase-3蛋白、Calpain蛋白水平分别为[(0.75±0.23)g、(2.53±0.17)、(130.50±12.05)U/L、(125.55±20.95)U/L、(100.10±10.38)μmol/L、(0.52±0.03)EU/mL、(13.50±3.21)U/mg、(1.00±0.15)、(1.20±0.20)、(0.75±0.15)], 高低剂量茵陈五苓散组分别为[(0.69±0.10)g、(2.11±0.13)、(93.15±10.25)U/L、(83.47±12.27)U/L、(72.30±10.25)μmol/L、(0.40±0.03)EU/mL、(9.26±2.20)U/mg、(0.90±0.11)、(1.00±0.19)、(0.45±0.10)]均显著降低($P < 0.05$), 且高剂量茵陈五苓散组显著低于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.05$); 相比模型组, 低剂量茵陈五苓散组大鼠SOD、Bcl-2蛋白水平分别为[(200.47±27.15)U/mg、(0.69±0.23)], 高剂量茵陈五苓散组大鼠分别为[(270.15±32.06)U/mg、(0.75±0.10)], 均显著升高($P < 0.05$), 且高剂量茵陈五苓散组显著高于低剂量茵陈五苓散组($P < 0.05$)。 **结论** 茵陈五苓散通过降低脂质过氧化物水平、提高SOD活性、抑制钙蛋白酶的表达同时抑制肝细胞的凋亡实现实验性梗阻性黄疸大鼠肝脏的保护作用, 且在一定剂量范围内呈剂量依赖性。

关键词: 黄疸, 阻塞性; 茵陈五苓散; 肝损伤; 钙蛋白酶; 氧化应激; 大鼠, Sprague-Dawley