

- Alternative Medicine, 2014; 671013. doi: 10.1155/2014/671013.
- [6] 韩莉, 龚享文, 杨钦河, 等. 基于 NF- κ B 通路探讨疏肝健脾含药血清对 LPS 刺激下大鼠肝细胞、Kupffer 细胞炎症损伤保护作用机制研究[J]. 中成药, 2015, 37(5): 1114-1119.
- [7] Gong XW, Han L, Yang QH, et al. Effects of Soothing Liver and Invigorating Spleen Recipe on Lipid Metabolism Disorders in Kupffer Cells of NAFLD Rats by LXR α /SREBP-1c Signal Pathway [J]. Chinese Herbal Medicines, 2014, 6(4): 297-304.
- [8] Lidofsky SD. Nonalcoholic fatty liver disease: diagnosis and relation to metabolic syndrome and approach to treatment [J]. Curr Diab Rep, 2008, 8(1): 25-30.
- [9] Kantartzis K, Schick F, Haring HU, et al. Environmental and genetic determinants of fatty liver in humans [J]. Dig Dis, 2010, 28(1): 169-178.
- [10] 张玉佩, 杨钦河, 孔怡琳, 等. 从痰瘀角度探讨脂肪肝“二次打击”学说[J]. 新中医, 2010; 42(10): 11-12.
- [11] 魏继童, 姚小华. 参苓白术散加减治疗非酒精性脂肪肝 60 例疗效观察[J]. 九江学院学报(自然科学版), 2011, 26(4): 59-60.
- [12] 王峰. 加味参苓白术散对非酒精性脂肪肝疗效分析[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(12): 1489-1504.
- [13] Yang QH, Xu YJ, Feng GF, et al. p38 Mapk signal pathway involved in anti-inflammatory effect of chaihui-shugan-san and shen-ling-bai-zhu-san on hepatocyte in non-alcoholic steatohepatitis rats[J]. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, 2014, 11(1): 213-221.
- [14] Urano A, Furusawa Y, Yagishita Y, et al. The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus[J]. Mol Cell Biol, 2013, 33(15): 2996-3010.
- [15] 邵洛林, 郭建强, 许伟华. Nrf2 在肝细胞中作用的研究进展[J]. 国际消化病杂志, 2009, 29(6): 381-383.
- [16] 蔡月琴, 张利棕, 王德军, 等. Nrf2 及其相关因子在非酒精性脂肪肝形成过程中的作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2014, 30(5): 465-470.
- [17] Zhu J, Wang H, Ji X, et al. Differential Nrf2 expression between glioma stem cells and non-stem-like cells in glioblastoma[J]. Oncol Lett, 2014, 7(3): 693-698.
- [18] Klaassen CD, Reisman SA. Nrf2 the Rescue: Effects of the Antioxidative/ Electrophilic Response on the Liver [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 244(1): 57-65.
- [19] Chowdhry S, Nazmy MH, Meakin PJ, et al. Loss of Nrf2 markedly exacerbates nonalcoholic steatohepatitis [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2010, 48(2): 357-371.

(编辑: 宋威, 邹元平)

养肝化瘀颗粒抗肝癌作用及其机制研究

沈阳¹, 朱方方¹, 张光际¹, 杨凡¹, 彭海燕², 时乐³, 徐立³ (1. 南京中医药大学药学院, 江苏南京 210023; 2. 南京中医药大学第一临床医学院, 江苏南京 210023; 3. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏南京 210023)

摘要: **目的** 探讨养肝化瘀颗粒抗肝癌作用及其机制。 **方法** 建立小鼠 H22 肝癌皮下移植瘤模型, 随机分为空白对照组、模型组、5-氟尿嘧啶(5-FU, 10 mg·kg⁻¹, ip) 组和养肝化瘀颗粒高、中、低(6, 3, 1.5 g·kg⁻¹, ig) 剂量组, 连续给药 10 d。观察各组小鼠的肿瘤生长情况及血清甲胎蛋白(AFP)、肿瘤特异性生长因子(TSGF)水平; HE 染色观察瘤组织的病理改变; Western Blot 法检测 β -连环蛋白(β -catenin)、活化型半胱天冬酶-3 (Cleaved-Caspase3) 蛋白表达, 并进一步通过氯化锂(LiCl)激动 Wnt/ β -catenin 信号通路, 研究其抑癌作用机制。 **结果** 养肝化瘀颗粒高、中、低剂量和阳性药 5-FU 作用后, 抑瘤率分别为 41.29, 50.03, 48.15, 52.83%; 与模型组比较, 各给药组血清肿瘤标志物 AFP 均有所下降($P < 0.01$, $P < 0.05$), TSGF 也有所下降, 其中养肝化瘀颗粒中剂量组与 5-FU 组最为明显($P < 0.01$); 瘤组织出现不同程度的坏死, 与模型组比较, 养肝化瘀颗粒中剂量组最为明显。养肝化瘀颗粒可以下调 HepG2 细胞、瘤组织中 β -catenin 蛋白表达水平, 上调 Cleaved-Caspase3 蛋白表达水平。进一步通过 LiCl 激动 Wnt/ β -catenin 信号通路, 与空白对照组比较, LiCl 组 β -catenin 蛋白表达显著上调($P < 0.05$), Cleaved-Caspase3 蛋白表达则下调($P < 0.05$); 与 LiCl 组比较, LiCl + 养肝化瘀颗粒含药血清(10, 20 % 浓度) 组 β -catenin 蛋白表达显著下调($P < 0.01$), Cleaved-Caspase3 蛋白表达则显著上调($P < 0.01$)。 **结论** 养肝化瘀颗粒显著抑制小鼠 H22 皮下移植瘤的生长, 可能是通过抑制 β -catenin 蛋白表

收稿日期: 2016-01-26

作者简介: 沈阳, 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤疾病药理和毒理学研究。Email: yang20131472@163.com。通信作者: 徐立, 男, 教授, 研究方向: 肿瘤、代谢性疾病药理和毒理学研究。Email: xuliglp@126.com。

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目(SBE201270403)。

达, 下调 Wnt/ β -catenin 信号通路, 进而诱导肝癌细胞凋亡发挥抗肿瘤作用。

关键词: 养肝化瘀颗粒; 肝癌; H22 肝癌移植瘤; HepG2; Wnt/ β -catenin 信号通路; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)03-0332-07

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2016.03.005

Inhibitory Effect and Mechanism of *Yanggan Huayu* Granules on Hepatocellular Carcinoma

SHEN Yang¹, ZHU Fangfang¹, ZHANG Guangji¹, YANG Fan¹, PENG Haiyan^{1,2}, SHI Le^{1,3}, XU Li^{1,3} (1. Pharmacy College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023 Jiangsu, China; 2. The First Clinical Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023 Jiangsu, China; 3. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Medicine, Nanjing 210023 Jiangsu, China)

Abstract: Objective To investigate the antitumor effect and the possible mechanism of the *Yanggan Huayu* granules (YGHY) on hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** H22 tumor mice xenograft model was established. The mice were randomly divided into six groups, blank control group, model group, 5-fluorouracil (5-FU, 10 mg·kg⁻¹, ip) group, and YGHY groups of high, medium and low dose (6, 3, 1.5 g·kg⁻¹, ig). The medication lasted for 10 continuous days. After the last administration, the tumor growth of mice in each group was observed, and serum alpha-fetoprotein (AFP) and tumor specific growth factor (TSGF) were also examined. Tumor tissue pathological changes were observed after HE staining, and Western blot was used to detect the protein expression of β -catenin and semi-activated caspase-3 (Cleaved-Caspase3) in hepatocellular carcinoma cells and tumor tissues. The suppressor mechanism was further studied by observing Wnt/ β -catenin signaling pathway activated by lithium chloride (LiCl).

Results High, medium and low dosage of YGHY and 5-FU effectively inhibited the growth of H22 hepatocellular carcinoma cells with the inhibition rate of 41.29 %, 52.09 %, 48.15 %, 52.83 %, respectively. Compared with the model group, YGHY and 5-FU effectively reduces the AFP ($P < 0.01$, $P < 0.05$) and TSGF in tumor-bearing mice, and the effect of medium-dose YGHY and 5-FU were strongest ($P < 0.01$). Varying degrees of necrosis were shown in tumor tissue of the medication groups, and the necrosis was obvious in medium-dose YGHY group compared with the model group. Compared with the blank control group, the protein expression of β -catenin in LiCl group was up-regulated and that of Cleaved-Caspase3 was down-regulated ($P < 0.05$). The results of observation of Wnt signaling pathway activated by LiCl showed that serum containing YGHY+ LiCl (10 %, 20 %) down-regulated β -catenin protein expression obviously and up-regulated Cleaved-Caspase3 protein expression ($P < 0.01$ compared with LiCl group). **Conclusion** YGHY can significantly inhibit tumor growth in the H22 xenograft mice, and the possible mechanism is through inhibiting β -catenin protein expression and then down-regulating the Wnt/ β -catenin signaling pathway, thereby inducing the apoptosis of hepatocellular carcinoma cells.

Keywords: *Yanggan Huayu* granules; hepatocellular carcinoma; H22 tumor xenograft; HepG2; Wnt/ β -catenin signaling pathway; apoptosis

养肝化瘀颗粒为名老中医邹良材的临床经验方, 由楮实子、莪术、泽兰 3 味药组成, 通过几代医家的反复临床实践验证, 该方对于慢性肝病阴虚血瘀证疗效确定, 近年用于肝癌患者的辅助性治疗, 能减轻临床症状, 缓解并发症, 延长生存期。前期临床观察发现该方对于防治慢性感染相关性肝癌、肝癌晚期腹水症有显著疗效^[1], 但其作用机制尚不清楚。已有报道表明, 方中楮实子、莪术等具有增强免疫、肿瘤细胞毒、诱导细胞凋亡的作用^[2-4], 提示养肝化瘀颗粒可

通过多途径、多靶点发挥作用。肝癌的发病机制中, 信号传导通路对肝癌产生、发展起着举足轻重的作用, 本研究拟在整体药效实验的基础上, 以饱受关注的 Wnt/ β -catenin 转导途径^[5]为切入点, 探讨其可能的抑癌作用机制, 以探讨临床使用其治疗原发性肝癌的合理性, 亦为肝癌治疗提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 动物 健康 ICR 小鼠 (SPF 级) 36 只, 雄性, 体质

量 18~22 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 实验动物生产许可证号: SCXK(京)2012-0001。成年 SD 大鼠(SPF 级)18 只, 雄性, 体重(300±20)g, 由扬州大学比较医学中心提供, 实验动物生产许可证号: SYXK(苏)2010-0001。动物均饲养于南京中医药大学实验动物中心, 每天人工光照 12 h, 室温(23±2)℃, 相对湿度 50 %~60 %。

1.2 药物 养肝化瘀颗粒(1 g 颗粒相当于 8 g 生药量), 由江苏省中医院提供, 给药剂量根据人与动物体表面积与剂量换算法计算; 5-氟尿嘧啶(5-FU), 上海旭东海普药业公司, 批号: 080319; 氯化锂(LiCl), SIGMA-ALDRICH 公司, 批号: WXBC0260V。

1.3 细胞株 H22 肝癌细胞株, 由江苏省中医院赠予; HepG2 人肝癌细胞株, 购自上海中科院细胞库。

1.4 试剂与仪器 GAPDH 单抗, Proteintech 公司, 批号: 10494-1; β -catenin 单抗, Proteintech 公司, 批号: 17565-1; Cleaved-Caspase3 单抗, Proteintech 公司, 批号: 19677-1; 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG, Proteintech 公司, 批号: SA400001-2; DMEM 培养基, Gibco 公司, 批号: 8114316; 胎牛血清, Gibco 公司, 批号: 1495527; ECL 发光试剂盒, Millipore 公司, 批号: 1512402; BCA 蛋白定量试剂盒, 江苏碧云天生物技术有限公司, 批号: 08E02A46; 甲胎蛋白(AFP)、肿瘤特异性生长因子(TSGF)ELISA 试剂盒, 上海源叶生物科技有限公司, 批号分别为: 14102702, 14112401。精密分析天平, Sartorius 公司; FA1104N 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司; 游标卡尺, 上海量具刃具有限公司; HH-4 数显恒温水浴锅, 江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司; Allegra X-15R 冷冻离心机, Beckman Coulter 公司; Infinite M1000 全波长多功能酶标仪, TECAN 公司; 凝胶成像系统, 美国 BIO-Rad 公司。

1.5 体内抑瘤实验 取已接种 H22 的腹水型肝癌小鼠, 于其腹腔内抽取乳白色含肿瘤细胞的腹液, 用无菌生理盐水稀释制备细胞悬液, 调节细胞密度为 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$, 于每只动物(空白对照组除外)右前肢腋窝皮下注射 0.2 mL, 造模。将实验小鼠随机分为 6 组, 包括空白对照组、模型组、5-FU 组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, ip)、养肝化瘀颗粒高、中、低剂量组(6, 3, $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, ig)。给药体积均为 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 空白对照组、模型组给予等体积生理盐水, 以上给药均为 1 次/d, 持续 10 d。给药期间, 隔天记录小鼠体质量, 观察小鼠生理状态; 瘤体出现后测量长短径, 分别记做 a、b

值, 按公式 $V=ab^2/2$ 计算瘤体积, 绘制皮下移植瘤生长曲线。末次给药 1h 后, 取血离心得血清, 检测血清肿瘤标志物甲胎蛋白(AFP)、肿瘤特异性生长因子(TSGF)水平。处死动物, 剥取瘤块、肝脏, 分别称重, 计算肝脏指数(肝脏质量/体质量)、抑瘤率[(模型组平均瘤重 - 给药组平均瘤重)/模型组平均瘤重 $\times 100\%$]。取部分瘤组织以 4 %多聚甲醛固定后, HE 染色观察病理改变; 另取部分瘤组织, -80℃保存, 用于 Western Blot 实验。

1.6 抑癌作用机制研究

1.6.1 养肝化瘀颗粒含药血清的制备^[6] 将 SD 大鼠随机分为空白对照组、5-FU 组和养肝化瘀颗粒组, 每组 6 只。5-FU 组按照 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量 ip 给药; 养肝化瘀颗粒组以 $24 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ($1.2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1} \times 20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$)剂量 ig 给药^[7], 以保证一定的血药浓度。以上给药均为 1 次/d, 持续 5 d。末次给药 1 h 后腹主动脉取血, 离心取血清于 56℃灭活 30 min, $0.22 \mu\text{m}$ 针式微孔滤膜过滤, -20℃保存待用, 临用前用培养基梯度稀释至所需浓度(5, 10, 20 %), 调整 pH 值为 7.2。

1.6.2 细胞培养 HepG2 细胞培养于 DMEM 完全培养基(含 10 %的胎牛血清, 1 %双抗)后移入 37℃、5 % CO_2 培养箱中, 细胞呈贴壁状态, 每 2~3 d 以 0.25 %的胰蛋白酶消化后, 传代, 细胞贴壁 3~4 代, 取指数生长期细胞进行实验。

1.6.3 细胞分组与 LiCl 干预 HepG2 细胞以 $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 于 6 孔板培养 24h 后, 细胞贴壁, 分为空白对照组、5-FU 含药血清组、养肝化瘀颗粒含药血清低、中、高浓度组(终浓度: 5, 10, 20 %), 加入相应的含药血清作用培养 24 h, 分别收取各组细胞, 4℃离心, BCA 法定量后分装, -80℃冰箱保存待测。

LiCl 干预实验: 待人肝癌细胞 HepG2 生长稳定, 状态良好后开始分组并干预处理, 分为空白对照组、LiCl 组(终浓度 $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、LiCl + 养肝化瘀颗粒低、中、高浓度组(终浓度: 5, 10, 20 %)。LiCl 干预培养 24 h 后, 再用养肝化瘀颗粒含药血清处理, 方法同前。Western Blot 法检测 β -catenin 和 Cleaved-Caspase3 蛋白表达。

1.6.4 Western Blot 实验 BCA 法定量后取等量 HepG2 细胞蛋白、瘤组织蛋白样品待测; 制胶; 加样品和 mark 液后通电: 40mA, 80 min; 转移蛋白质到 PVDF 膜, 电泳仪开关调至 100 V, 1.5 h; 封闭 1 h; 加入一抗 β -catenin、Cleaved-Caspase3 于 4℃过

夜, 然后加入二抗 IgG 孵育 1 h; 最后使用 ECL 发光试剂盒, 目标蛋白于暗室中显影。采用凝胶成像系统采集蛋白电泳条带, 分析其灰度值, 以目标蛋白的灰度值与内参 GAPDH 的比值代表目标蛋白的半定量值(将空白对照组目标蛋白的灰度值与内参的比值转化为 1)。

1.7 统计学处理方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析, 实验数据采用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 q 检验, 以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 养肝化瘀颗粒对小鼠体质量、肝脏的影响 给药前后, 与空白对照组比较, 各组小鼠体质量均未见明显差异。与空白对照组比较, 5-FU 组小鼠肝脏质量、肝脏指数均显著增高($P < 0.01$, $P < 0.05$), 不同剂量养肝化瘀颗粒组小鼠肝脏质量、肝脏指数未见明显差异。提示与化学药物相比, 中药复方养肝化瘀颗粒副作用相对较小。见表 1。

表 1 养肝化瘀颗粒对小鼠肝脏质量、肝脏指数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of different doses of YGHY on liver weight and hepatic index of mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	肝脏质量 /g	肝脏指数 /g·100g ⁻¹
空白对照组	-	1.39 $\pm$ 0.08	4.6
模型组	-	1.42 $\pm$ 0.26	4.9
5-FU 组	0.01	1.70 $\pm$ 0.14 ^{##}	5.8 [#]
养肝化瘀颗粒高剂量组	6	1.52 $\pm$ 0.15	5.4
养肝化瘀颗粒中剂量组	3	1.48 $\pm$ 0.21	5.2
养肝化瘀颗粒低剂量组	1.5	1.57 $\pm$ 0.24	5.4

注: 与空白对照组比较, ^{##} $P < 0.01$, [#] $P < 0.05$ 。

2.2 养肝化瘀颗粒对小鼠肝癌移植瘤生长的影响 给药 4 d, 模型组及各给药组小鼠皮下均出现可测移植瘤, 在后续实验过程中, 5-FU 组、养肝化瘀颗粒高、中、低剂量组皮下移植瘤生长均受到抑制, 瘤体积均明显小于模型组, 尤其以养肝化瘀颗粒中剂量组显著($P < 0.01$, $P < 0.05$), 见表 2。各给药组的抑瘤率均大于 40 %, 其中 5-FU 组最大为 52.83 %, 养肝化瘀颗粒中剂量组次之, 为 50.03%, 各给药组(除养肝化瘀颗粒高剂量组外)瘤重均明显小于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$), 见表 3。

2.3 养肝化瘀颗粒对小鼠血清肿瘤标志物的影响 与空白对照组比较, 模型组肿瘤标志物 TSGF、AFP 水平均显著上升($P < 0.01$), 且大于正常参考值, 提示

表 2 养肝化瘀颗粒对小鼠瘤体积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of different doses of YGHY on xenograft tumor volume of mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	瘤体积 /mm ³			
		4 d	6 d	8 d	10 d
模型组	-	19.02 $\pm$ 7.68	66.14 $\pm$ 37.08	492.16 $\pm$ 209.74	1094.43 $\pm$ 376.34
5-FU 组	0.01	2.15 $\pm$ 1.50 ^{**}	9.04 $\pm$ 2.88 [*]	246.29 $\pm$ 125.92 ^{**}	402.70 $\pm$ 163.03 ^{**}
养肝化瘀颗粒高剂量组	6	13.15 $\pm$ 3.86	26.98 $\pm$ 12.25 [*]	304.25 $\pm$ 143.98	552.28 $\pm$ 255.91 [*]
养肝化瘀颗粒中剂量组	3	5.17 $\pm$ 3.43 ^{**}	21.32 $\pm$ 11.24 [*]	259.94 $\pm$ 173.60 [*]	499.21 $\pm$ 196.07 ^{**}
养肝化瘀颗粒低剂量组	1.5	5.62 $\pm$ 2.77 ^{**}	23.17 $\pm$ 13.53 ^{**}	291.65 $\pm$ 143.18	518.11 $\pm$ 250.98 [*]

注: 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ 。

表 3 养肝化瘀颗粒对小鼠瘤重的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of different doses of YGHY on xenograft tumor weight of mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	瘤重 /g	抑瘤率 /%
模型组	-	2.1 $\pm$ 0.80	-
5-FU 组	0.01	0.99 $\pm$ 0.36 ^{**}	52.83
养肝化瘀颗粒高剂量组	6	1.24 $\pm$ 0.46	41.29
养肝化瘀颗粒中剂量组	3	1.06 $\pm$ 0.44 [*]	50.03
养肝化瘀颗粒低剂量组	1.5	1.10 $\pm$ 0.50 [*]	48.15

注: 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ 。

造模成功。与模型组比较, 各给药组 AFP 均有所下降($P < 0.01$, $P < 0.05$), TSGF 也有所下降, 其中养肝化瘀颗粒中剂量组与 5-FU 组最为明显($P < 0.01$)。见表 4。

表 4 养肝化瘀颗粒对小鼠血清肿瘤标志物的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 4 Effect of different doses of YGHY on biochemical indicators in serum of mice

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TSGF/ng·L ⁻¹	AFP/ μ g·L ⁻¹
空白对照组	-	101.27 $\pm$ 10.62	15.63 $\pm$ 0.59
模型组	-	172.70 $\pm$ 21.33 ^{##}	32.61 $\pm$ 1.79 ^{##}
5-FU 组	0.01	132.22 $\pm$ 20.48 ^{**}	20.04 $\pm$ 1.75 ^{**}
养肝化瘀颗粒高剂量组	6	148.10 $\pm$ 30.79	27.87 $\pm$ 4.38 [*]
养肝化瘀颗粒中剂量组	3	135.35 $\pm$ 14.05 ^{**}	27.61 $\pm$ 2.63 ^{**}
养肝化瘀颗粒低剂量组	1.5	147.12 $\pm$ 20.71	26.76 $\pm$ 4.72 [*]

注: 与空白对照组比较, ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$, ^{*} $P < 0.05$ 。

2.4 养肝化瘀颗粒对小鼠瘤组织病理组织学改变的影响

模型组瘤组织可见肿瘤细胞和组织结构有明显的异型性, 具备恶性肿瘤的形态学特征, 肿瘤组织轻度坏死。5-FU 组肿瘤坏死程度较模型组明显, 可见极少量瘤细胞“凋亡”。养肝化瘀颗粒高剂量组肿瘤坏死程度较模型组明显, 可见轻度“凋亡”样坏死。养肝化瘀颗粒中剂量组肿瘤坏死程度较模型组最为明显, 可见肿瘤中度、大范围坏死, 肿瘤间质血管轻度

充血。养肝化瘀颗粒低剂量组可见轻、中度坏死。表明以养肝化瘀颗粒中剂量组肿瘤抑制最为明显, 抑瘤

效果最佳。见图 1。

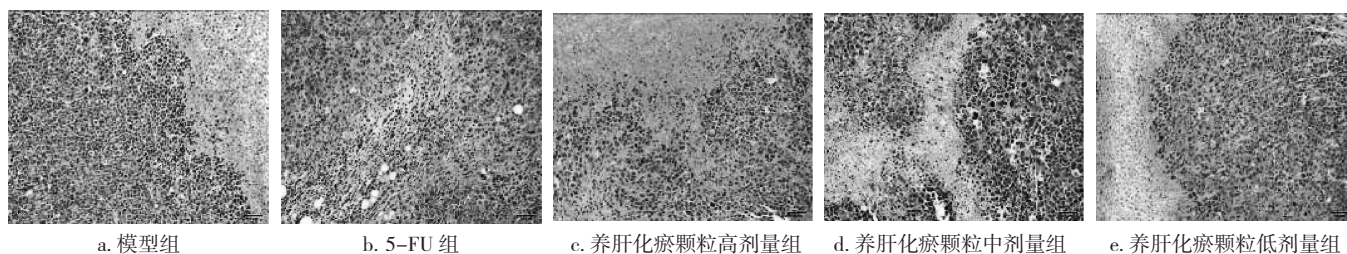


图 1 养肝化瘀颗粒对小鼠瘤组织病理学改变的影响(HE, $\times 200$)

Figure 1 Effect of different doses of YGHY on xenograft tumor histopathological changes in mice

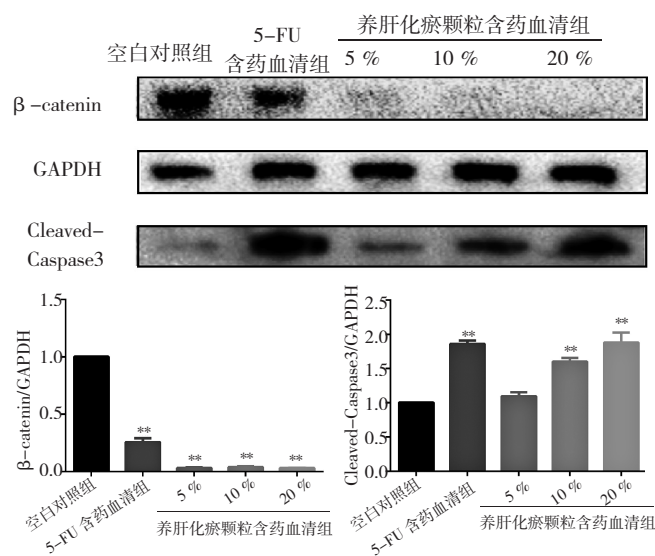
2.5 养肝化瘀颗粒对 HepG2 细胞、瘤组织中 β -catenin、Cleaved-Caspase3 蛋白表达的影响

HepG2 细胞中, 与空白对照组比较, 5-FU 含药血清组、不同浓度养肝化瘀颗粒含药血清组的 β -catenin 蛋白表达均显著下调($P < 0.01$); 除养肝化瘀颗粒含药血清 5 % 浓度组外, 其余各组 Cleaved-Caspase3 蛋白表达上调($P < 0.01$), 见图 2。瘤组织中, 与模型组比较, 养肝化瘀颗粒组($3\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) β -catenin 蛋白表达亦显著下调($P < 0.01$), Cleaved-Caspase3 蛋白表达则显著上调($P < 0.01$), 见图 3。LiCl 激动 Wnt/ β -catenin 信号通路, 与空白对照组比较, LiCl 组 β -catenin 蛋白表达显著上调($P < 0.05$), Cleaved-Caspase3 蛋白表达则下调($P < 0.05$); 与 LiCl 组比较, LiCl + 养肝化瘀颗粒含药血清(10, 20 % 浓度)组 β -catenin 蛋白表

达显著下调($P < 0.01$), Cleaved-Caspase3 蛋白表达则显著上调($P < 0.01$)。见图 4。

3 讨论

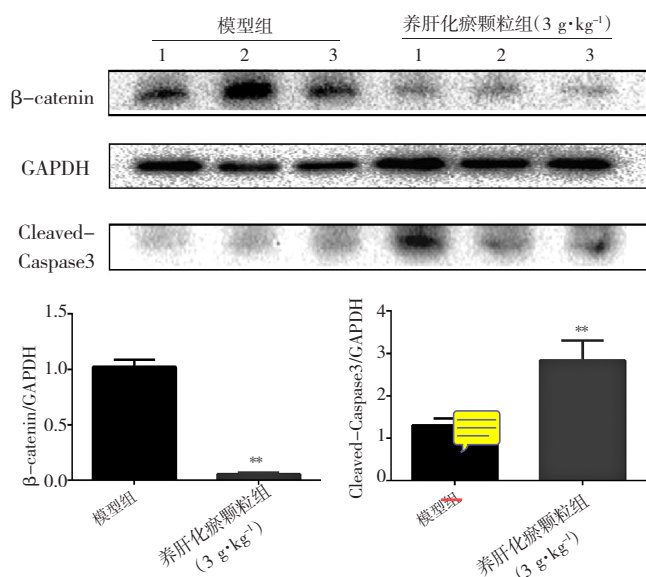
本实验采用技术成熟、应用广泛的 H22 皮下移植瘤模型^[8], 探讨养肝化瘀颗粒抑制肿瘤的作用。实验结果表明, 养肝化瘀颗粒能有效抑制 H22 肝癌小鼠皮下移植瘤的生长, 在实验过程中, 5-FU 组与养肝化瘀颗粒中、低剂量组平均瘤体积均小于模型组($P < 0.05$), 各给药组的抑瘤率均大于 40%, 其中 5-FU 组最大为 52.83 %。但值得注意的是, 传统的化疗药物毒副作用较大, 常引起实验动物免疫、体液等系统的损伤及肝脏质量、肝脏系数等生理指标的异常, 本实验阳性药 5-FU 也表明了这一点, 而养肝化



注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 2 不同浓度养肝化瘀颗粒含药血清对 HepG2 细胞 β -catenin、Cleaved-Caspase3 蛋白表达的影响

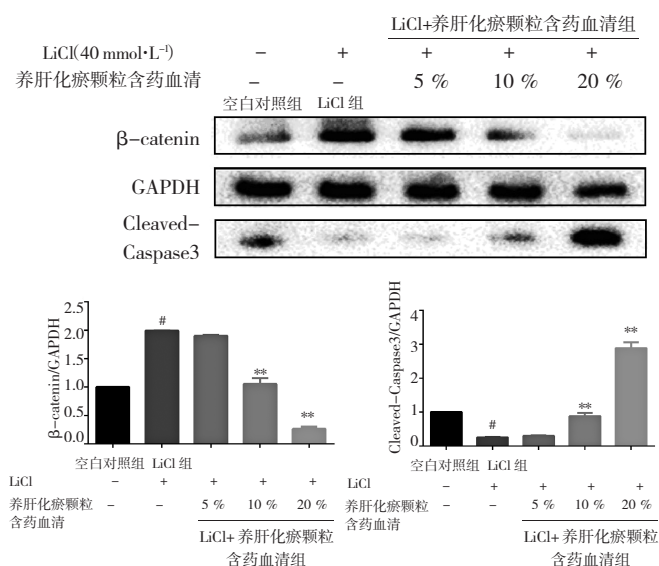
Figure 2 Effect of different concentrations of YGHY-Cs on the protein expression of β -catenin and Cleaved-Caspase3 in HepG2 cells



注: 与模型组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 养肝化瘀颗粒 ($3\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) 对瘤组织 β -catenin、Cleaved-Caspase3 蛋白表达的影响

Figure 3 Effect of YGHY ($3\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) on the protein expression of β -catenin and Cleaved-Caspase3 in xenograft tumor



注：与空白对照组比较，[#] $P < 0.05$ ；与 LiCl 组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图 4 LiCl 干预+不同浓度养肝化瘀颗粒含药血清对 HepG2 细胞 β -catenin、Cleaved-Caspase3 蛋白表达的影响

Figure 4 After LiCl intervention, the effect of different concentrations of YGHY-Cs on the protein expression of β -catenin and Cleaved-Caspase 3 in HepG2 cells

瘀颗粒各剂量组对移植瘤小鼠的体质量、肝脏质量、肝脏系数等生理指标均无明显影响，提示与化学药物相比，中药复方副作用较轻。经养肝化瘀颗粒作用后，血清肿瘤标志物 TSGF、AFP 水平与模型组比较均有所下降，其中养肝化瘀颗粒中剂量组最为明显 ($P < 0.01$)。瘤组织病理组织学检查可见，养肝化瘀颗粒各剂量组瘤组织均出现了不同程度的坏死，其中以养肝化瘀颗粒中剂量组肿瘤坏死程度最为明显，且抑瘤率仅次于 5-FU 组，因此选择养肝化瘀颗粒中剂量 ($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 进行后续抑癌作用机制研究。

近年来有研究报道在肝癌、肺癌等多种肿瘤的发生、发展进程中 β -catenin 蛋白水平均上调呈高表达状态^[9-11]，Wnt/ β -catenin 信号通路可调控肿瘤细胞凋亡^[12]， β -catenin 是 Wnt 信号传导途径中关键调控因子，Wnt 信号传递取决于胞浆游离的 β -catenin 水平，当 β -catenin 水平升高时，通路开启，进而调控特定基因的表达，反之，通路关闭^[13-14]。本研究以 Wnt/ β -catenin 信号通路为切入点，观察养肝化瘀颗粒作用后，经典 Wnt 通路核心分子以及凋亡相关蛋白的表达情况，探讨其可能的抑癌作用机制。实验结果显示，养肝化瘀颗粒作用后，肝癌细胞中 β -catenin 表达显著下调，活化型 Cleaved-Caspase3 表达显著上调，此外，我们亦随机检测了养肝化瘀颗粒中剂量组 ($3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 不同瘤组织中 β -catenin 及

Cleaved-Caspase3 的表达，实验结果与肝癌细胞水平一致，均可见 β -catenin 表达下调，Cleaved-Caspase3 表达上调，提示养肝化瘀颗粒有效抑制了 Wnt/ β -catenin 信号通路的传导，促进了肝癌细胞的凋亡。但 β -catenin 表达水平下调所致的阻断是由于养肝化瘀颗粒直接抑制所致，还是肿瘤恶性程度降低而产生的间接作用，以及 Wnt 信号通路的传导与肝癌细胞凋亡之间的关系，均待进一步研究。

LiCl 作为 Wnt/ β -catenin 信号通路激动剂，通过抑制 GSK3 β 的活性，间接激活 β -catenin^[15]。本研究采用 LiCl 激动 Wnt 通路，与空白对照组比较，LiCl 组 β -catenin 蛋白表达显著上调，Cleaved-Caspase3 蛋白表达则下调；与 LiCl 组相比，LiCl+养肝化瘀颗粒含药血清 (10, 20 % 浓度) 组 β -catenin 蛋白表达显著下调，Cleaved-Caspase3 蛋白表达则显著上调，因此推测养肝化瘀颗粒可能通过下调 β -catenin 蛋白表达，阻断了 Wnt 信号通路传导，进而诱导了肝癌细胞凋亡。

综上所述，养肝化瘀颗粒可能通过下调 β -catenin 蛋白表达，抑制 Wnt/ β -catenin 信号通路，进而启动主要依赖于 Caspase 途径的凋亡程序，导致 Caspase3 的活化，从而诱导肝癌细胞凋亡，发挥其抗肿瘤作用，这为肝癌的临床治疗提供了可靠的理论依据，但细胞凋亡的调控机制复杂，养肝化瘀颗粒干预 Wnt/ β -catenin 信号通路后对肿瘤细胞凋亡具体机制的研究，尚待进一步探讨。

参考文献：

- [1] 彭海燕，汪悦. 尤松鑫治疗乙型肝炎肝硬化经验[J]. 中医杂志，2003，44(10)：732-733.
- [2] 庞素秋，王国权，黄宝康，等. 楮实子总生物碱抗肿瘤作用初步研究[J]. 中国药业，2012，21(22)：35-36.
- [3] 吴万垠，罗云坚，程剑华，等. 莪术油肝动脉灌注治疗大鼠移植性肝癌[J]. 世界华人消化杂志，1998，6(10)：859-861.
- [4] 王奕智，张宁. 姜黄素抗肿瘤作用的研究进展[J]. 宝鸡文理学院学报(自然科学版)，2015，35(1)：41-47.
- [5] 田孜博. 羽扇豆醇对人肝癌细胞 Wnt 通路影响的研究[D]. 石家庄：河北医科大学，2014.
- [6] Iwama H, Amagaya S, Ogihara Y. Effect of shosaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method [J]. Journal of Ethnopharmacology, 1987, 21(1)：45-53.
- [7] 陈宁，宋冬雪，凌娜，等. 中药血清药理学方法的研究进展[J]. 北京联合大学学报(自然科学版)，2014，28(1)：40-43.
- [8] 吴圣曦，吴国欣，何珊，等. 白芥子挥发油对小鼠肝癌 H22 移植性肿瘤的抑制作用及其机制研究[J]. 中草药，2013，44(21)：3024-

- 3029.
- [9] Frauke D, Sabine P, Soichiro Y, et al. Alpha-catenin is a molecular switch that binds E-cadherin-beta-catenin and regulates actin-filament assembly [J]. Cell, 2005, 123(5): 903-915.
- [10] Sun L, Tian Z, Wang J. A direct cross-talk between interferon- γ and sonic hedgehog signaling that leads to the proliferation of neuronal precursor cells [J]. Brain Behavior & Immunity, 2009, 24 (2): 220-228.
- [11] Vivekanand P, Rebay I. Intersection of signal transduction pathways and development [J]. Annual Review of Genetics, 2006, (40): 139-157.
- [12] Zimmerman ZF, Kulikaskas RM, Bomszyk K, et al. Activation of Wnt/ β -catenin signaling increases apoptosis in melanoma cells treated with trail [J]. Plos One, 2013, 8(7): e69593.
- [13] Huelsken J, Birchmeier W. New aspects of Wnt signaling pathways in higher vertebrates [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 2001, 11(5): 547-553.
- [14] Moon RT, Bruce B, Michael B, et al. The promise and perils of Wnt signaling through beta-catenin [J]. Science, 2002, 296 (5573): 1644-1646.
- [15] 张笑斐, 张暄, 潘杰. 氯化锂对脂肪组织 Wnt 信号及 PPAR γ 表达的影响[J]. 济南大学学报(自然科学版), 2013, 27(1): 87-91.
- (编辑: 邹元平)

丹酚酸 B 对慢性血清病肾炎大鼠肾脏保护作用的研究

林 劲, 刘碧好, 欧阳辉, 梁春玲, 周 园, 钟燕春, 周玖瑶(广州中医药大学药理学教研室, 广东 广州 510006)

摘要: 目的 探讨丹酚酸 B 对慢性血清病肾炎大鼠模型的影响及肾脏保护作用。方法 通过改良后的免疫学方法制备慢性血清病肾炎大鼠模型, 造模成功后给予丹酚酸 B(100, 50 mg·kg⁻¹)连续灌胃 5 周, 探讨丹酚酸 B 对慢性血清病肾炎大鼠肾脏指数、24h 尿蛋白、血清肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)、白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、白细胞介素 1 α (IL-1 α)、白细胞介素 10(IL-10)含量的影响。结果 与模型组比较, 丹酚酸 B 高、低剂量组可以降低慢性血清病肾炎大鼠肾脏指数($P < 0.01$); 降低 24 h 尿蛋白排泄量($P < 0.05$); 降低 Scr、BUN 的含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 降低血清中 TC、TG($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$) 的含量, 升高血清中 ALB、TP 的含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 降低血清中 MDA 的含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 升高血清中 SOD 的含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 降低血清中 IL-1 α 、IL-10 的含量($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 丹酚酸 B 可以改善慢性血清病肾炎大鼠肾脏功能, 调节血脂异常状态, 其机制可能与抗脂质过氧化及调节细胞因子平衡有关。

关键词: 丹酚酸 B; 慢性血清病肾炎; 抗脂质过氧化; 细胞因子

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2016)03-0338-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2016.03.006

Protective Effect of Salvianolic Acid B on Chronic Serum Sickness Nephritis in Rats

LIN Jin, LIU Bihao, OU Yanghui, LIANG Chunling, ZHOU Yuan, ZHONG Yanchun, ZHOU Jiuyao(Pharmacology Department of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006 Guangdong, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of salvianolic acid B (SAB) on chronic serum sickness nephritis in rats. **Methods** The chronic serum sickness nephritis model was established by improved immunology method. SAB groups were given intragastric infusion of SAB 100, 50 mg·kg⁻¹ for 5 continuous weeks. The effect of SAB on kidney weight, 24 h urine protein, serum creatinine(Scr), blood urea nitrogen(BUN), albumin (ALB), total protein(TP), total cholesterol(TC), triglyceride(TG), malondialdehyde(MDA), superoxide dismutase (SOD), interleukin-1 α (IL-1 α), interleukin-10 (IL-10) of model rat were measured after treatment for 5 weeks.

收稿日期: 2015-11-18

作者简介: 林劲, 男, 硕士研究生, 研究方向: 中药药效及其作用机理研究与中药新产品研发。Email: linzolo@163.com。通信作者: 周玖瑶, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中药复方作用机理与物质基础。Email: zhoujiuyao@tom.com。

基金项目: 广东省高等学校高层次人才项目(A1-AFD004132A13); 广东省科技计划项目(2014A020210024)。