

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.27.002

文章编号: 1005-8982(2017)27-0007-05

草苈蓉环烯醚萜苷对二乙基亚硝胺 诱发肝癌大鼠细胞凋亡的影响*

崔香丹¹, 郑峰¹, 朱洁波¹, 全吉淑², 尹学哲¹

(1. 延边大学附属医院, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学基础医学院, 吉林 延吉 133000)

摘要:目的 观察二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌的病理变化,探讨草苈蓉环烯醚萜苷(IGBR)对细胞凋亡的作用及对 p53、Bcl-2 蛋白表达的影响。**方法** 132 只 Wistar 雄性大鼠随机分为对照组、模型对照组、阳性对照组及 IGBR 组。除对照组,各组大鼠给予 DEN 0.2 g/kg 腹腔注射 1 次,而后 0.05% 的 DEN 水溶液用于自由饮水;阳性对照组腹腔注射 5-氟尿嘧啶(5-FU)0.025 g/kg 每周 3 次;IGBR 组每日 IGBR 0.5 g/kg 灌胃 1 次。实验第 12、20 及 28 周末,分批处死动物,观察肝脏病理变化及细胞凋亡,免疫组织化学法和 Western blot 检测 p53、Bcl-2 的表达。**结果** 与对照组比较,模型对照组肝细胞核大且深染,肝细胞变性、异型增生,有些增生灶可见癌变细胞。凋亡的肝细胞皱缩、核固缩及核仁消失。IGBR 组与阳性对照组凋亡指数高于模型对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),但两组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。免疫组织化学结果,p53 和 Bcl-2 阳性细胞主要分布于不典型增生灶和癌灶的胞浆中。与模型对照组比较,IGBR 组和阳性对照组 p53 表达强度增强,而 Bcl-2 表达强度减弱,差异有统计学意义($P < 0.05$),IGBR 组和阳性对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

结论 大鼠肝癌发生与细胞凋亡相关,IGBR 通过调控 p53、Bcl-2 来抑制 DEN 诱发大鼠肝癌。

关键词: 肝癌;草苈蓉环烯醚萜苷;凋亡;p53;Bcl-2

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

Effect of Iridoid Glucosides from *Boschniakia Rossica* on rat models of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinomat*

Xiang-dan Cui¹, Feng Zheng¹, Jie-bo Zhu¹, Ji-shu Quan², Xue-zhe Yin¹

(1. Yanbian University Hospital, Yanji, Jilin 133000, China; 2. Yanbian University Medical School, Yanji, Jilin 133000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of Iridoid Glucosides from *Boschniakia Rossica* (IGBR) on apoptosis and the expression of p53 and Bcl-2 proteins. **Methods** A total of 132 Wistar male rats were randomly divided into control group, model group, positive control group and IGBR group. DEN was administered once by intraperitoneal injection (0.2 g/kg), then through drinking water (0.05%) for the rest of experimental duration in each group except for the control group. Animals from the positive control group was injected with 5-FU 3 times per week (0.025 g/kg). Rats in the IGBR group were treated intragastrically with IGBR daily (0.5 g/kg). Animals were sacrificed on 12, 20 or 28 weeks post insults. Pathological alterations and apoptosis of liver cells were observed and expression of p53 as well as Bcl-2 were determined by Immunohistochemistry and Western blot. **Results** Compared with the control group, the enlarged and deeply stained nuclei, hepatocellular degeneration, dysplasia and cancer cell were observed in the liver tissue of the model group. Apoptotic hepatocyte showed cytoplasmic and nuclear shrinkage without nucleolus. Immunohistochemistry results showed that p53 and Bcl-2 positive signals were mainly distributed in the

收稿日期: 2017-05-23

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81360651)

[通信作者] 尹学哲, E-mail: yinxz@ybu.edu.cn; Tel: 0433-2660004, 15526770004

cytoplasm of atypical hyperplasia and carcinoma. Expression of p53 increased while Bcl-2 decreased in the IGBR group as well as the positive control group significantly compared with the model group ($P < 0.05$). No obvious differences were observed between the IGBR group and the positive control group ($P > 0.05$).
Conclusions Hepatocarcinoma is closely associated with apoptosis, and IGBR inhibits DEN-induced hepatocarcinoma through mediating p53 and Bcl-2 pathway.

Keywords: hepatocarcinoma; Iridoid Glucosides from *Boschniakia Rossica* (IGBR); apoptosis; p53; Bcl-2

如今,原发性肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生呈迅猛的增加趋势^[1],世界卫生组织揭晓的《全球癌症报告》表明,肝癌的新发和死亡人数中国居世界第一^[2]。恶性肿瘤的发生与细胞凋亡和增殖紧密相关^[3]。细胞凋亡是由基因调控引起的细胞环境和死亡信号变化引起的程序性细胞死亡过程。肿瘤细胞与实体肿瘤中都存在细胞凋亡,且凋亡程度的好坏直接与肿瘤的发展程度相关。

草苈蓉为中国传统的民族药,民族药名为不老草,为我国 2 类保护植物,是大兴安岭高山地区、长白山特有植物,可全草入药。传统医药典籍记载其有补肾壮阳、润肠通便、滋补强身、延缓衰老之功效^[4]。草苈蓉环烯醚萜苷(iridoid glucosides from *Boschniakia rossica*, IGBR)是草苈蓉提取物,具有抗癌、清除自由基及诱导凋亡等作用^[5]。目前对 IGBR 抗癌机制方面的研究受到广泛的关注。通过观察二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)引发大鼠肝癌中 IGBR 对细胞凋亡的作用,阐明其抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Wistar 大鼠和 IGBR(延边大学提供),DEN(购自 Sigma 公司),p53、Bcl-2 蛋白多克隆抗体、TUNEL 和免疫组化试剂盒(购自北京中杉金桥), β -actin (Cell Signaling Technology 公司提供), γ -谷氨酰转氨酶(γ -glutamyl-transferase, γ -GT)试剂盒(购自凯基生物科技有限公司)。

1.2 模型的复制与分组

Wistar 雄性大鼠 132 只,分为 4 组,对照组大鼠给予生理盐水 0.1 ml/100 g 体重腹腔注射 1 次;模型对照组、阳性对照组、IGBR 组大鼠第 1 天给予 DEN 0.2 g/kg 腹腔注射 1 次,然后 0.05% 的 DEN 水溶液用于自由饮水;阳性对照组大鼠腹腔注射 5-氟尿嘧啶(5-FU)0.025 g/kg 每周 3 次;IGBR 组大鼠每日灌胃 IGBR 0.5 g/kg。实验第 12、20 周末各组处死 6 只,28 周末各组处死 20 只,取心脏血,肝脏甲醛固定,石蜡包埋。

1.3 检测方法

按 γ -GT 试剂盒的操作步骤测定血清中 γ -GT, HE 染色观察肝脏病理变化, TUNEL 法检测肝细胞的凋亡,凋亡指数(apoptotic index, AI) = $\frac{\text{凋亡阳性细胞数}}{\text{细胞总数}} \times 100\%$ 免疫组织化学法和 Western blot 法检测 p53 和 Bcl-2 蛋白的表达。

1.4 统计学方法

数据处理采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析和 χ^2 检验,计数资料以率(%)表示, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IGBR 对 DEN 诱发肝癌大鼠血清 γ -GT 含量的影响

大鼠诱癌过程中 28 周末,4 组间 γ -GT 比较,差异有统计学意义($F=1111.237, P=0.000$);与对照组比较,模型对照组 γ -GT 增高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型对照组比较,阳性对照组与 IGBR 组 γ -GT 下降,两组差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 肝脏组织 HE 染色

肝小叶和肝索排列正常,可见中央静脉,细胞核清晰。模型对照组肝脏病理改变主要表现为肝脏炎症反应、肝硬化和肝癌。根据不同的病理变化将模型对照组病理变化分为 3 个阶段:①肝炎阶段(12 周):可见炎症反应、坏死和淋巴细胞浸润、胶原沉积及凋亡小体;②肝硬化阶段(20 周):可见结节性肝细胞再生,不同大小的肝结节,肝小叶正常结构破坏、肝

表 1 各组大鼠 γ -GT、AI 值的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	γ -GT/(U/L)	AI/%
对照组	38 \pm 3	1.5 \pm 0.6
模型对照组	97 \pm 13 ¹⁾	12.3 \pm 0.4 ¹⁾
阳性对照组	91 \pm 5 ²⁾	22.3 \pm 0.2 ²⁾
IGBR 组	97 \pm 5 ²⁾	22.2 \pm 0.1 ²⁾

注:1)与对照组比较, $P < 0.05$;2)与模型对照组比较, $P < 0.05$

索排列紊乱;③肝癌阶段(28周):可见肝细胞核深染,肝细胞变性、增生,部分可见癌细胞增生。IGBR组及阳性对照组肝小叶破坏及肝索排列紊乱程度、细胞变性及异性增生度较模型对照组各阶段均减轻,IGBR组和阳性对照组差异无统计学意义。

2.3 肝细胞凋亡染色

对照组大鼠肝细胞凋亡稀少,着色浅;模型对照组细胞凋亡率增加,胞质呈棕黄色,凋亡的肝细胞故缩、核浓缩、核仁消失。4组的AI比较,差异有统计学意义($F=42\ 542.984, P=0.000$);IGBR组与阳性对照组AI差异无统计学意义($P>0.05$),但高于模型对照组,且差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表 2 各组大鼠肝癌阶段肝组织中 p53 表达率的比较 (n=20)

组别	p53 表达				表达率 /%
	-	+	++	+++	
模型对照组	13	5	2	0	35
阳性对照组	4	7	6	3	80 [†]
IGBR 组	5	6	7	2	75 [†]

注:†与模型对照组比较, $P<0.05$

2.4 p53 和 Bcl-2 免疫组织化学染色结果

p53 和 Bcl-2 阳性细胞主要分布于癌灶的胞浆中(见表 2、3 和图 1、2)。3 组 p53 表达率的比较,差异有统计学意义($\chi^2=11.971, P=0.046$);3 组 Bcl-2 表达率比较,差异有统计学意义($\chi^2=34.159, P=0.000$)。较模型对照组比较,IGBR 和阳性对照组 p53 表达增强,而 Bcl-2 表达减弱,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.5 p53 和 Bcl-2 表达水平比较

4 组 p53 的比较,差异有统计学意义($F=2201.596, P=0.000$),但两组间差异无统计学意义($P>0.05$)。4 组 Bcl-2 的比较,差异有统计学意义($F=2\ 838.713,$

表 3 各组大鼠肝癌阶段肝组织中 Bcl-2 表达率的比较 (n=20)

组别	Bcl-2 表达				表达率 /%
	-	+	++	+++	
模型对照组	2	16	2	0	90
阳性对照组	16	1	2	1	20 [†]
IGBR 组	14	2	3	1	30 [†]

注:†与模型对照组比较, $P<0.05$

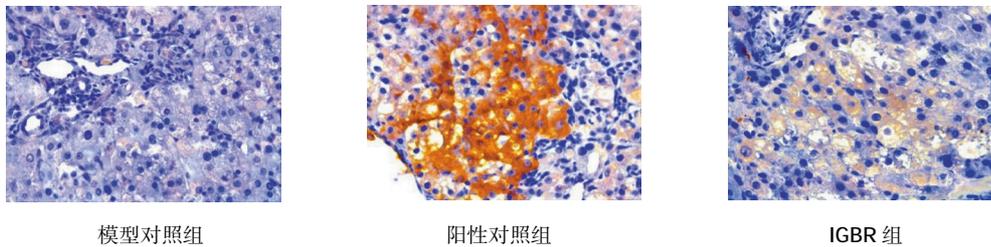


图 1 肝组织 p53 免疫组织化学观察结果 (×100)

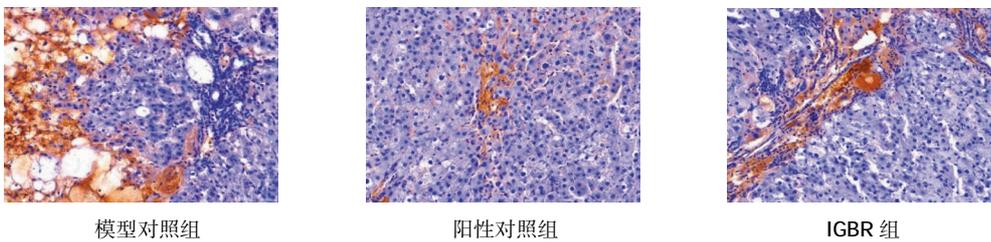
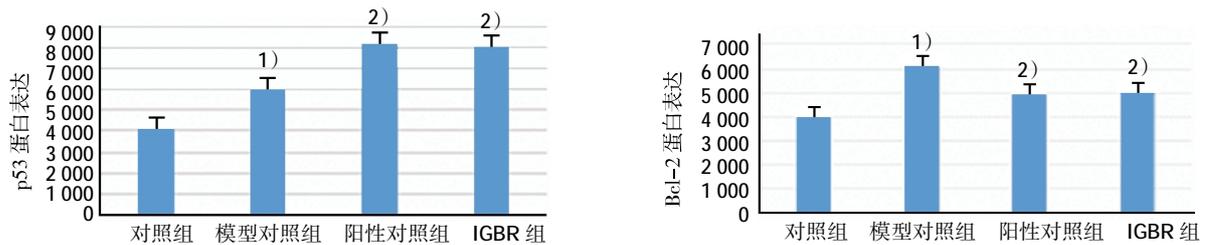


图 2 肝组织 Bcl-2 免疫组织化学观察结果 (×100)



1)与对照组比较, $P<0.05$; 2)与模型对照组比较, $P<0.05$

图 3 肝组织 p53、Bcl-2 Western blot 观察结果

$P=0.000$)。与对照组比较,模型对照组 p53 和 Bcl-2 表达水平升高($P<0.05$);与模型对照组比较,IGBR 组和阳性对照组 p53 表达水平升高,而 Bcl-2 表达水平降低($P<0.05$),两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$),见图 3。

3 讨论

肝癌的发生机制非常复杂,有大量的研究表明,抗凋亡因子在肿瘤细胞株和实体肿瘤中表达增加。DEN 诱发的大鼠肝癌多为肝细胞肝癌,造模简单易成功。张志敏等^[7]观察到,DEN 诱癌过程与人类肝细胞癌进程相似。本实验造模过程中 28 周(肝癌阶段)时血清 γ -GT 增高,且 HE 染色肝细胞核大、深染、变性、异型增生,部分可见癌变细胞,说明 DEN 诱发大鼠肝癌模型制作成功。

细胞凋亡是细胞程序性死亡,调控机体发育和内环境稳定^[6-7]。p53 与 Bcl-2 调节细胞凋亡与增殖,且在凋亡进程中相互影响^[8]。

p53 是抑癌基因,半数以上的人类癌症有 p53 的缺失和突变。突变型 p53 促进细胞生长、抑制细胞凋亡,导致基因异常表达,使细胞癌变^[9-11]。各种应激使 p53 被不同的信号通路激活,引发下游的基因转录,导致细胞凋亡^[12]。研究表明,p53 基因失活与肝癌的形成与预后相关^[13]。在慢性肝损伤中,肝细胞发生依赖 p53 的衰老程序,肝硬化的风险大大增加;另外,缺失 p53 表达的上皮细胞更易转化为肝癌^[14]。

Bcl-2 是原癌基因,通过调控凋亡信号而抑制细胞凋亡,还与细胞异常增殖有关,与肝癌的发生紧密相关^[15]。Bcl-2 高表达转录因子,促进其过多释放及无限制地转录,使量变诱发质变而导致肿瘤发生^[16]。另外,Bcl-2 与癌基因 *C-myc*^[17]和抗癌基因 p53^[18]互相作用,间接控制细胞程序性死亡。

本研究结果显示,DEN 诱发的大鼠肝组织中 p53 和 Bcl-2 均表达增强,免疫组织化学和 Western blot 检测结果示 IGBR 与 5-FU 干预后,p53 表达增强,而 Bcl-2 表达下降。IGBR 和 5-FU 是通过介导抑癌基因和癌基因的表达而实现诱导大鼠肝癌细胞凋亡。已有研究证明 5-FU 为传统抗癌药,本研究结果 IGBR 与 5-FU 作用无差异,进一步证实 IGBR 的抗癌作用。

本研究中,通过 IGBR 对大鼠肝癌的影响,进一步阐明 IGBR 抗肝癌机制,对中医在诱导肿瘤细胞凋亡的机制进行深入研究,并为中医抗肿瘤提供科学

依据。

参 考 文 献:

- [1] SMITH W A, LI C, NOTTAGE K A, et al. Lifestyle and metabolic syndrome in adult survivors of childhood cancer: a report from the St. Jude Lifetime Cohort Study[J]. *Cancer*, 2014, 120(17): 2742-2750.
- [2] 陈万青,张思维,曾红梅,等. 中国 2010 年恶性肿瘤发病与死亡[J]. *中国肿瘤*, 2014, 23(1): 1.
- [3] FAQABREQAT I, RONCERO C, FERNANDEZ M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer[J]. *Liver Int*, 2007, 27(2): 155-162.
- [4] 中华本草编委会. 中华本草[M]. 第 20 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 507.
- [5] 尹学哲,许惠仙,金爱花,等. 草苈蓉环烯醚萜苷对肺癌细胞增殖和凋亡影响[J]. *中国公共卫生*, 2010, 26(7): 805-806.
- [6] TOMEK M, AKIYAMA T, DASS C R, et al. Role of Bcl-2 in tumour cell survival and implications for pharmacotherapy[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2012, 64(12): 1695-1702.
- [7] XIAO Z, SHAN J, LI C, et al. Mechanisms of cyclosporine-induced renal cell apoptosis: a systematic review[J]. *Am J Nephrol*, 2013, 37(1): 34-40.
- [8] 林庆新. 黄连素诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡及其机制研究[J]. *中药材*, 2015, 38(7): 1499-1501.
- [9] 张勤,刘红. P53 在三阴性乳腺癌中的表达及临床意义[J]. *中国肿瘤临床*, 2011, 38(4): 214-217.
- [10] FERNANDEZ-CUESTA L, ANAGANTI S, HAINAUT P, et al. Estrogen levels act as a rheostat on p53 levels and modulate p53-dependent responses in breast cancer cell lines[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 125(1): 35-42.
- [11] WALERYCH D, NAPOLI M, COLLAVIN L, et al. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(11): 2007-2017.
- [12] MARCEL V, CATEZ F, DIAZ J J. p53, a translational regulator: contribution to its tumor-suppressor activity[J]. *Oncogene*, 2015, 34(44): 5513-5523.
- [13] ZHANG Q, LIU J, LIU B, et al. Dihydromyricetin promotes hepatocellular carcinoma regression via a p53 activation-dependent mechanism[J]. *Sci Rep*, 2014, 4(4): 4628.
- [14] LUJAMBI O, AKKARI L, SIMON J, et al. Non-cell-autonomous tumor suppression by p53[J]. *Cell*, 2013, 153(2): 449-460.
- [15] RODRIGUEZA W V, WOOLLISCROFT M J, EBRAHIM A S, et al. Development and anti-tumor activity of a BCL-2 targeted single-stranded DNA oligonucleotide[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2014, 74(1): 151-166.
- [16] MULLER P A, VOUSDEN K H, NORMAN J C. p53 and its mutants in tumor cell migration and invasion[J]. *J Cell Biol*, 2011, 192(2): 209-218.
- [17] DEMR D, YAMAN B, ANACAK Y, et al. Prognostic signifi-

cance of bcl-2, c-myc, survivin and tumor grade in synovial sarcoma[J]. Turkish Journal of Pathology, 2014, 30(1): 55-65.

[18] NAKAZAWA K, DASHZEVEG N, YOSHIDA K. Tumor sup-

pressor p53 induces miR-1915 processing to inhibit Bcl-2 in the apoptotic response to DNA damage[J]. FEBS J, 2014, 281(13): 2937-2944.

(王荣兵 编辑)

《中国现代医学杂志》投稿须知

《中国现代医学杂志》创刊于 1991 年, 期刊号 ISSN1005-8982/CN43-1225/R, 旬刊, 系中国科技论文统计源期刊、北京大学图书馆中文核心期刊、中国核心学术期刊(RCCSE)(A-)及湖南省十佳期刊, 被中国知网、万方数据库、超星域出版、美国《化学文摘》(CA)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)等国内外多个检索系统收录, 公开发行。本刊是中华人民共和国教育部主管的国家级综合性医学学术期刊, 以服务于广大医药卫生科技人员, 促进国内外医学学术交流和医学事业发展为宗旨。由中南大学、中南大学湘雅医院主办, 湖南省湘雅医学期刊社有限公司出版。

本刊刊登的论文内容涉及基础医学、临床医学、预防医学及医学相关学科的新理论、新技术、新成果以及医学信息、动态等。文稿须具有科学性、创新性、实用性。文字要求准确、通顺、精练。本刊设基础研究·论著、临床研究·论著、综述、新进展研究·论著、临床报道、学术报告、病例报告等栏目。学术报告类论文字数控制在 3000 字以内; 病例报告类论文字数控制在 800 字以内。稿件格式为题名、作者姓名、作者单位、邮编、摘要(具体要求见投稿细则)、关键词、正文、参考文献。

本刊对国家级的科研成果或阶段性成果及部级以上课题项目的进展报道实行速审快发。一般稿件 2 个月内有评审结果, 录用后等待发表。请作者自行登录本刊网站(www.zgxdyx.com)查询稿件处理结果, 恕不另行通知。稿件发表后, 赠当期杂志 2 本。

投 稿 细 则

1. 文稿力求文字精练、准确、通顺; 文题简明、醒目, 能反映出文章的主题; 勿用不规范字。请作者仔细校对全文, 并认真复核数据。摘要应与正文内药物剂量、病例数、百分比等数据一致。如有错误, 将降低审稿人和编辑对该文真实性的信任度, 导致退稿。	6. 所有栏目需附关键词 3~5 个, 其中临床报道、学术报告和病例报告只需中文关键词, 其余栏目需中英文关键词齐全。
2. 文题中不使用英文缩略语。摘要中一般也不使用英文缩略语, 如因为该词出现多次而需要使用时, 应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文缩略语(此处不需写出英文全称)。正文中首次使用英文缩略语时, 也应于首次出现处先写出中文全称, 然后括号内注明英文全称及英文缩略语。此规则对已公知、公用的缩略语除外。	7. 照片、图片(黑白原始照片必须清晰, 大小 5 cm × 7 cm), 须在文章内标明其位置, 并附标题, 显微镜下照片应标明放大倍数, 图背面标明作者姓名、文章编号、图序及照片方向(上、下)。
3. 单位介绍信原件, 注明稿件非一稿多投。采用网上投稿方式时, 请将该介绍信照片插入提交的论文 Word 文稿第一页。	8. 所有栏目参考文献须引用 10 条以上, 以近 5 年文献为主。引用期刊的格式为: 作者·文题·刊名, 年, 卷(期): 起止页码.; 引用书籍的格式为: 著者·书名·版次·出版地: 出版社, 年份: 起止页码.; 每条参考文献应列出作者姓名, 如超过 3 名者, 则在 3 名作者后写等。中文格式: 解勤之, 陈方平, 蹇在伏, 等. 红细胞收缩: 血小板无力症的可能代偿机制[J]. 中国医学工程, 1998, 8(11): 3-5. 英文格式: SZEMAN B, NAGY G. Changes in cognitive function in patient with diabetes mellitus[J]. Orv Hetil, 2012, 153(9): 323-329.
4. 所有栏目投稿的中英文论文题目、作者姓名及作者单位需齐全(每位作者只标注一个主要单位, 其余的可以作者简介方式在首页左下角注明, 标注通信作者的必须留下通信作者本人的电话或电子邮箱, 以便核实)。	9. 综述第一作者须有副高以上职称证明(参考文献 35 条以上)。
5. 栏目对中英文摘要的要求: 基础研究·论著、临床研究·论著、新进展研究·论著需中英文摘要齐全, 并按目的、方法、结果、结论四要素书写, 200~500 个字。综述需中英文摘要齐全, 不需按四要素书写。临床报道和学术报告只需中文摘要, 病例报告无需中英文摘要。	10. 凡国家、省部级自然科学基金、博士基金、863 计划及国家重点实验室项目的论文, 请注明基金名称及编号并附相关项目批准文件或任务书复印件, 可优先发表。项目主要负责人为通信作者。采用网上投稿方式时, 请将相关证明材料的照片插入提交的论文 Word 文稿最后一页。