

李锦源, 黄文涛, 韦园园, 等. 氧化苦参碱联合全反式维甲酸干预大鼠肝癌变进程中细胞因子的变化[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 111-117, 134.

Li JY, Huang WT, Wei YY, et al. Effects of oxymatrine combined with all-trans retinoic acid on cytokines during hepatocarcinogenesis in rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 111-117, 134.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.08.018

氧化苦参碱联合全反式维甲酸干预大鼠肝癌变进程中细胞因子的变化

李锦源, 黄文涛, 韦园园, 吴 琼*

(广西医科大学附属肿瘤医院, 南宁 530022)

【摘要】 目的 观察氧化苦参碱(oxymatrine, OMT)联合全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)抑制二乙基亚硝胺(DEN)诱导的大鼠肝癌形成效果,并探讨其作用机制。**方法** 采用DEN诱导建立肝癌大鼠模型,造模18周,将Wistar大鼠随机分为空白组、模型组、干预组,分别在诱癌后6、12、18周处死大鼠,通过HE染色观察大鼠肝组织病理变化,检测大鼠肝功能相关指标,ELISA检测大鼠IL-6含量;采用RT-qPCR法检测大鼠let-7a、NF-κB-p65、IL-6、STAT3 mRNA表达变化;采用Western blot检测大鼠STAT3、p-STAT3的蛋白变化。**结果** HE染色病理学观察显示,干预组大鼠肝癌结节数明显少于模型组,肝细胞病变坏死减轻;与模型组比较,干预组大鼠血清IL-6及肝功能指标ALT、GGT、AST、ALP水平均明显降低($P<0.05$);RT-qPCR检测结果:与模型组比较,干预组大鼠肝组织中let-7a mRNA表达水平明显上升,而NF-κB-p65、IL-6和STAT3 mRNA表达量均明显降低($P<0.05$)。实验第18周,Western blot检测结果干预组STAT3、p-STAT3蛋白表达均明显低于模型组($P<0.05$)。**结论** 氧化苦参碱联合全反式维甲酸能够明显抑制DEN诱发的大鼠肝癌形成,在一定程度上延缓肿瘤生长。

【关键词】 氧化苦参碱;全反式维甲酸;二乙基亚硝胺;肝癌;大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019)08-0111-06

Effects of oxymatrine combined with all-trans retinoic acid on cytokines during hepatocarcinogenesis in rats

LI Jinyuan, HUANG Wentao, WEI Yuanyuan, WU Qiong*

(Cancer Hospital Affiliated to Guangxi Medical University, Nanning 530022, China)

【Abstract】 Objective To observe the inhibitory effect of oxymatrine (OMT) combined with all-trans retinoic acid (ATRA) on diethylnitrosamine (DEN)-induced hepatocellular carcinoma in rats, and to explore its mechanism of action. **Methods** A rat model of hepatocellular carcinoma was established by DEN induction for 18 weeks. Wistar rats were randomly divided into control, model, and intervention groups. Rats were killed at 6, 12, and 18 weeks after cancer induction. Pathological changes of the liver tissues were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining, related indexes of rat liver function were detected, and interleukin (IL)-6 expression was detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The mRNA expressions of let-7a, nuclear factor (NF)-κB-p65, IL-6, and signal transducer and activator of transcription (STAT)3 were detected by quantitative real-time (RT-q) PCR, while the changes of STAT3 and p-STAT3 proteins were

【基金项目】2016年广西高校中青年教师基础能力提升(KY2016LX037);2016年广西医科大学青年科学基金(GXMUYSF201631)。

【作者简介】李锦源(1987—),女,硕士,研究方向:肝癌、乳腺癌,中西医结合。E-mail:14789834339@163.com

【通信作者】吴琼(1987—),女,汉族,黑龙江,硕士研究生,主管药师,研究方向:肝癌的抗肿瘤治疗。E-mail: wuqiong1919@163.com

detected by western blotting. **Results** The pathological examination revealed a significantly decreased number of liver cancer nodules in the intervention group compared with the model group ($P < 0.05$), while levels of serum IL-6, alanine aminotransferase (ALT), glutamyl transpeptidase (GGT), aspartate aminotransferase (AST), and alkaline phosphatase (ALP) were significantly lower ($P < 0.05$). RT-qPCR results showed that the expression of let-7a was significantly increased in the intervention group compared with the model group, while that of NF- κ B-p65, IL-6, and STAT3 was significantly decreased ($P < 0.05$). At the 18th week of the experiment, the expressions of STAT3 and p-STAT3 in the intervention group were significantly lower than in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** OMT combined with ATRA can significantly inhibit DEN-induced hepatocarcinogenesis in rats and delay the growth of tumors to some extent.

【Keywords】 oxymatrine; all-trans retinoic acid; diethylnitrosamine; liver cancer; rats

肝癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,近年来其发病率和死亡率呈逐年上升趋势^[1-2]。在中国,肝癌的发病率仅次于肺癌和胃癌,居恶性肿瘤的第三位^[3-4]。由于肝癌发病率高,治疗难度大,死亡率高,预后差,故对其防治工作尤为重要。

苦参素(oxymatrine, OMT)是中药苦参中提取的一种生物碱活性成分,具有消炎、阻止肝纤维化和肝硬化、抗心律失常、抗肿瘤等作用^[5]。全反式维甲酸(all-trans retinoic acid, ATRA)是一种维 A 酸类衍生物,可调节细胞增殖、分化、凋亡等,还具有很强的抗肿瘤作用。本研究用二乙基亚硝胺(N-nitroso-diethylamin, DEN)为诱变剂建立大鼠肝癌模型^[6],同时用全反式维甲酸联合苦参素对其进行干预,观察在诱癌及干预过程中大鼠的体征及组织病理学的动态变化,为阐明肝癌的发展及有效预防、治疗提供重要参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 6 周龄 SD 大鼠,150 只,体重 120 ± 25 g,购自购自广西医科大学实验动物中心[SCXK(桂)2015-0013],饲养于本院动物房[SYXK(桂)2015-0011]。其中正常组 30 只,诱癌组 60 只,干预组 60 只,饲养温度: $22^{\circ}\text{C} \pm 4^{\circ}\text{C}$,相对湿度: $50\% \pm 5\%$,实验过程符合动物 3R 原则(伦理审批号:2018-2-1-7)。

1.2 主要试剂与仪器

DEN(sigma 公司,批号 049K1613 V);苦参素注射液(山东方明药业集团股份有限公司,批号 180104);全反式维甲酸(Sigma-Aldrich 公司,批号 R2625);SYBR Green PCR Master Mix(日本 Toyobo 公司,批号 QPK-346C);总 RNA 提取试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 15695-020);辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(中杉金桥公司);p-STAT3、STAT3 兔单克隆抗体(Genetex 公司,批号 2467、

3571);HRP 标记的内参 β -actin 抗体(上海康成生物公司);IL-6 ELISA 试剂盒(上海通蔚,批号 20170914);各基因引物由重庆威斯腾生物公司合成。

ELX800 型全自动酶标仪(美国 Biotek 公司);PEPS301 型电泳仪(美国 GE 公司);AU500 型全自动生化分析仪(美国贝克曼公司);XDS-2 型倒置显微镜(南京米厘特)。

1.3 实验方法

1.3.1 大鼠肝癌模型建立与给药方法

模型组:DEN 剂量为每周第一天灌胃(10 mg/kg , 2.5 mg/mL DEN 溶液),其余 6 日饮用 80 ppm 的 DEN 水溶液,至 18 周后正常饲养;干预组(ATRA+OMT):DENA 剂量与模型组相同,将 ATRA(2 mg/kg)和 OMT(200 mg/kg)混匀后,每 2 d 灌胃一次,持续 18 周。正常组不做任何处理,作为空白对照。

1.3.2 取材

自建模之日起,实验第 6、12、18 周各组随机抽取 8 只大鼠,腹腔麻醉后腹主动脉取血,采用自动生化分析仪检测碱性磷酸酶(ALP)、谷草转氨酶(AST)、谷氨酰转氨酶(GGT)、血清谷丙转氨酶(ALT)水平。动物处死后,取肝组织,置于液氮中保存;对所取肝形态、颜色、表面癌结节数进行观察和记录。

1.3.3 病理学观察

将取出的肝组织经 4% 多聚甲醛溶液固定,包埋,连续切片,厚度约 $3 \mu\text{m}$,行 HE 染色,光镜下观察肝组织病理学改变。

1.3.4 血清中 IL-6 含量检测

采用 ELISA 法检测血清中 IL-6 含量,操作严格按照试剂盒说明书进行。

1.3.5 RT-qPCR 检测肝组织 let-7a、NF- κ B-p65、IL-6 和 STAT3 mRNA 表达

分别取各组大鼠肝组织 30 mg ,Trizol 试剂提取总 RNA,根据 Revertaid First Strand CDNA Synthesis Kit 说明书进行反转录反应,合成 cDNA,保存在-

80℃。GAPDH 作为内参,采用重庆威斯腾生物公司合成的 let-7a、NF-κB-p6、IL-6 及 STAT3 的引物序列,参照 SYBR Green 荧光 PCR 试剂盒说明书,配置反应体系,依次进行逆转录及扩增反应。独立实验重复 3 次。最后由计算机自动计算并读出各组 Ct 值,系统软件进行结果分析:采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示目的 mRNA 的含量。

1.3.6 Western blot 检测

大鼠处死后,迅速取肝组织,采用 RIPA 裂解法提取总蛋白,并用 BCA 法测定蛋白浓度并调至一致。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离、转膜,然后脱脂奶粉封闭 2 h,加适量一抗 STAT3、p-STAT3 在 4℃ 孵育过夜,TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔二抗室温孵育 1 h,经 ECL 显色后胶片曝光显影,并用 Image J 软件对条带进行分析,以 $A_{目的蛋白}/A_{GAPDH}$ 的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件对数据进行统计学处理。数据以平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。组间比较采用单因素 AVOVA 分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OMT 联合 ATRA 对大鼠肝表面肝癌结节形成的影响

正常组大鼠肝颜色淡红,质地柔软,光滑,无结节。在 DEN 诱导下,建模大鼠会依次经历肝炎,肝硬化进而形成肝癌。研究人员发现在第 6 周时,各组大鼠肝没有结节出现,到第 12 周时出现少量结节,而第 18 周时出现大量结节。与模型组比较,干预组肝表面结节数明显减少,见图 1。

2.2 HE 染色观察各组大鼠肝病理改变

第 18 周时,正常组肝细胞无变性、坏死,肝小叶结构正常,无炎症及纤维化;模型组发生明显肝细胞异型性增生,多数增生肝细胞核仁普遍增大,出现核异质变以及癌变细胞,且周围组织肝细胞异型性明显,伴癌细胞浸润,同时出现腺管样及柱状癌巢结构,周围的肝组织内可见微小癌卫星灶。癌周组织肝细胞增生灶、脂肪变性、嗜酸性变、细胞水肿,以及增生及非典型增生结节,呈典型的肝硬化表现;干预组肝组织中发现有癌结节,但肝细胞变性坏死较模型组程度轻、肿瘤病灶数减少。见图 2。

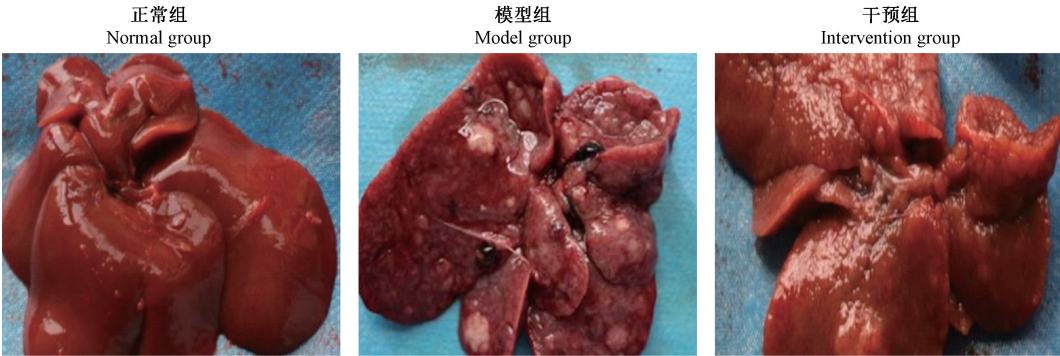
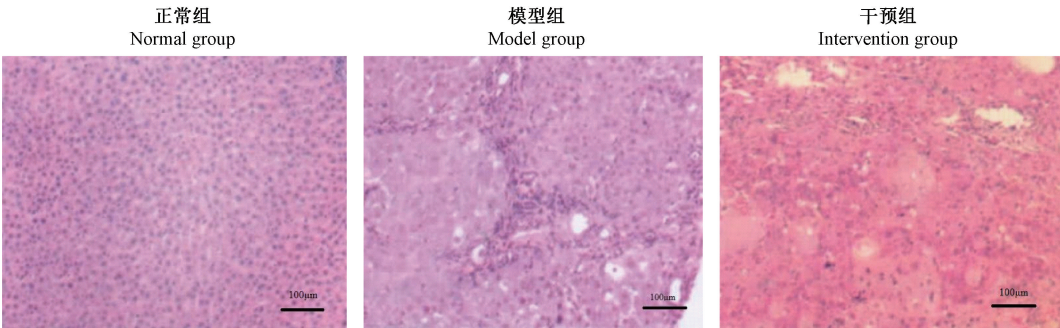


图 1 第 18 周时各组大鼠肝情况观察
Figure 1 Gross appearance of the rat livers at the 18th week



注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$ 。
图 2 各组大鼠肝病理改变($n=8$)

Note. Compared with the normal group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$.

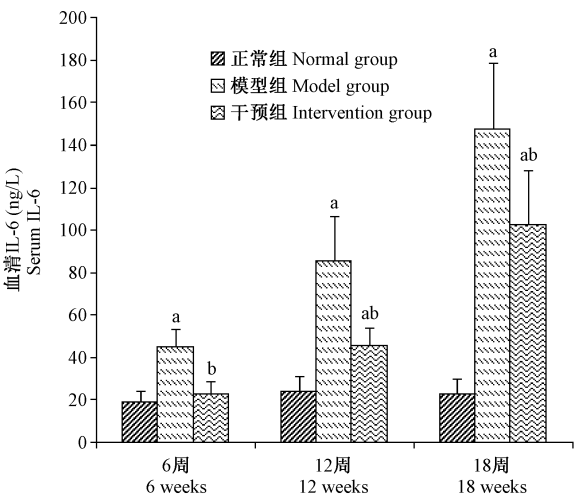
Figure 2 Pathological changes of the rat livers in each group

2.3 ELISA 法检测血清 IL-6 含量

建模后第 6,12,18 周时与正常组比较,模型组大鼠血清 IL-6 水平明显上升($P<0.05$);在第 12、18 周时与正常组比较,干预组大鼠血清 IL-6 水平也明显上升($P<0.05$),而第 6,12,18 周时与模型组比较,干预组血清 IL-6 水平均明显下降($P<0.05$),见图 3。

2.4 ATRA 联合 OMT 对大鼠肝功能的影响

第 6、12、18 周时与正常组比较,模型组、干预组大鼠血清 ALT、AST、GGT、ALP 水平均明显升高($P<0.05$);第 12、18 周时与模型组比较,干预组 AST、GGT 水平均明显下降($P<0.05$),而第 6、12、18 周时与模型组比较,干预组 ALT、ALP 水平均明显下降($P<0.05$),详见图 4。

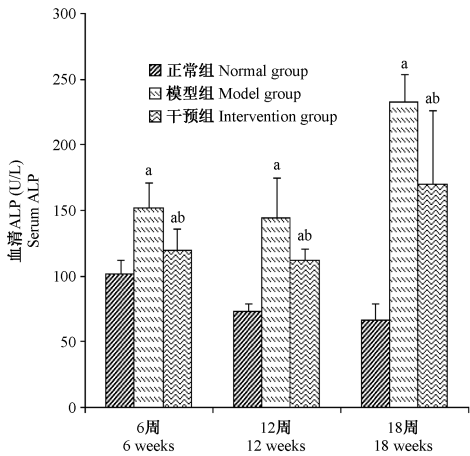
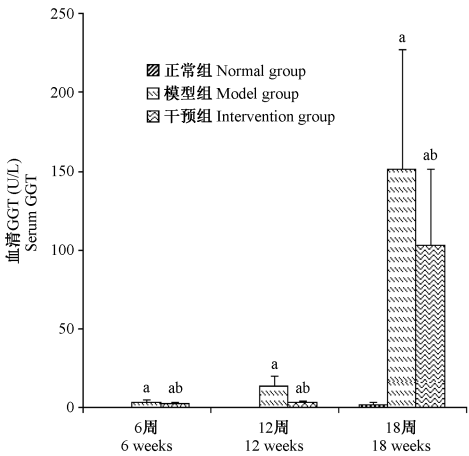
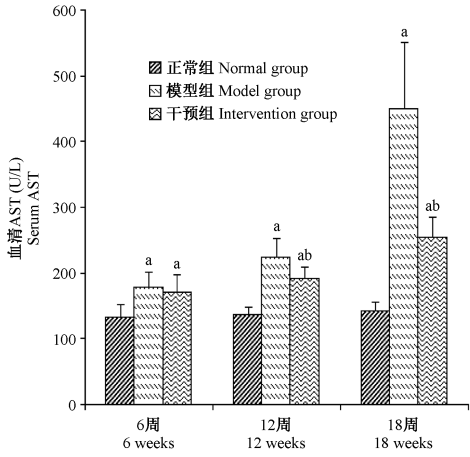
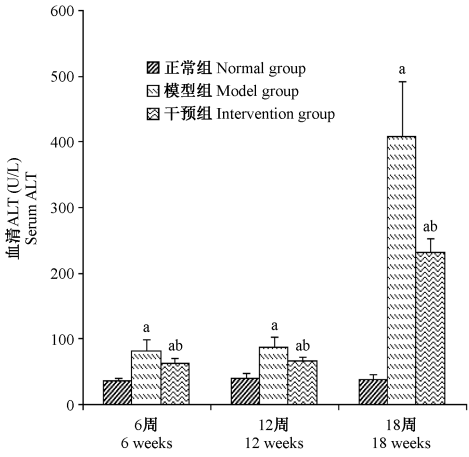


注:与正常组相比, ^a $P<0.05$;与模型组相比, ^b $P<0.05$ 。

图 3 各组大鼠血清 IL-6 水平变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

Note. Compared with the normal group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$.

Figure 3 Changes of serum IL-6 levels in the rats of each group



注:与正常组相比, ^a $P<0.05$;与模型组相比, ^b $P<0.05$ 。

图 4 各组大鼠 ALT、AST、GGT 和 ALP 水平变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

Note. Compared with the normal group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$.

Figure 4 Changes of ALT, AST, GGT and ALP levels in the rats of each group

2.5 ATRA 联合 OMT 对大鼠肝组织 microRNA let-7a、NF-κB-p65、IL-6 和 STAT3 mRNA 表达变化

第 18 周时,模型组大鼠肝组织 microRNA let-7a 表达量低于正常组 ($P<0.05$),而干预组 let-7a 表达量明显上升 ($P<0.05$);同时正常组与模型组或干预组与模型组比较,大鼠肝组织中 NF-κB-p65,IL-6, STAT3 mRNA 表达量差异均有统计学意义 ($P<0.05$),详见图 5。

2.6 ATRA 联合 OMT 对大鼠肝组织 STAT3、p-STAT3 蛋白表达的影响

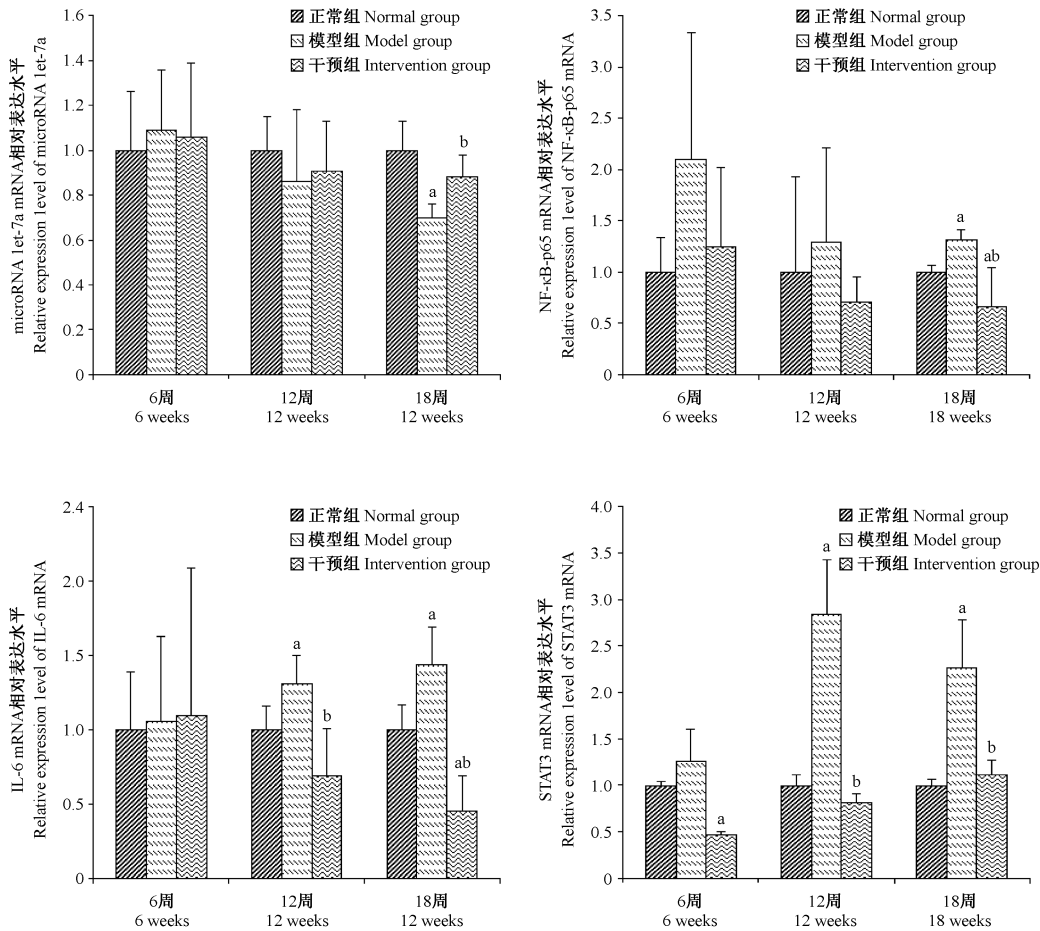
第 18 周时 Western blot 检测结果:与正常组相比,模型组大鼠肝组织中 STAT3、p-STAT3 蛋白表达均明显上升 ($P<0.05$),而与模型组相比,干预组 STAT3、p-STAT3 蛋白表达均明显下降 ($P<0.05$),同时干预组 p-STAT3 蛋白表达较正常组也明显下降 ($P<0.05$),见图 6。

3 讨论

肝癌是临床上最常见的消化道恶性肿瘤之一,每年全球范围内约有 69 万人死于肝癌,其中我国约占 50%^[7]。通常早期肝癌治疗方式为手术,或经肝动脉插管化疗栓塞、热疗、放疗等,由于多数病人就诊时已到中、晚期,此时病人肝功能和体质较差,很难耐受手术治疗,多选择接受化疗,常用的药物包括顺铂、苦参素等^[8-10]。

氧化苦参碱是中药苦参素的主要有效成分,具有抗肿瘤、抗纤维化、免疫调节、抗炎镇痛的作用。大量药理研究证实,氧化苦参碱对胃癌、肝癌、直肠癌等细胞均具有较强的杀伤力^[11];全反式维甲酸在体内由维生素 A 转化而来,是维生素 A 的一种重要活性代谢物,在癌细胞增殖,浸润、转移等各个阶段来发挥其抑癌作用^[12]。

DEN 对肿瘤的发生具有启动和促进的双重作

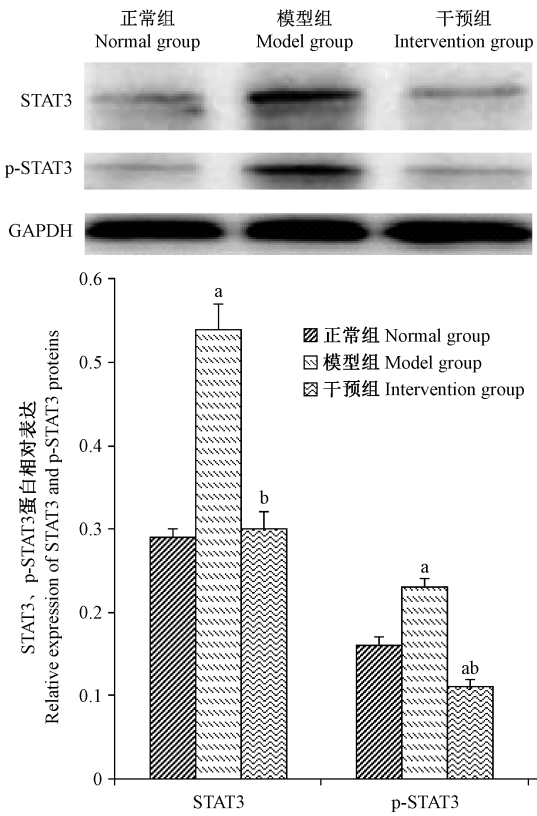


注:与正常组相比, ^a $P<0.05$;与模型组相比, ^b $P<0.05$ 。

图 5 各组大鼠肝组织中 microRNA let-7a、NF-κB-p65、IL-6、STAT3 mRNA 表达变化($\bar{x}\pm s, n=8$)

Note. Compared with the normal group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$.

Figure 5 Expression of microRNA let-7a, NF-κB-p65, IL-6 and STAT3 mRNA in the liver tissues of rats in each group



注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$ 。

图 6 各组大鼠肝组织中 STAT3、p-STAT3 蛋白表达 ($\bar{x}\pm s, n=8$)

Note. Compared with the normal group, ^a $P<0.05$. Compared with the model group, ^b $P<0.05$.

Figure 6 Expression of STAT3 and p-STAT3 proteins in liver tissues of the rats in each group

用,具有重复性好、诱癌率高、操作简便等优点,被广泛运用在肝癌的研究中^[13]。本实验 HE 结果显示,模型组明显肝细胞异型性增生,多数增生肝细胞核仁普遍增大,出现核异质变以及癌变细胞,同时第 18 周时,模型组大鼠肝癌结节数较正常组显著增多,这说明建模成功。

MicroRNA (miRNA) 是一类内源性小分子单链非编码 RNA, MiRNA 参与调节多种癌症的发生与发展,发挥负向调控基因表达的功能^[14-15]。let-7a 是目前研究最广泛的 miRNA 之一,已被证实具有抑制肿瘤细胞增殖、促进分化和凋亡的功能。let-7a 抑制肝癌细胞的生长主要是通过 microRNA 作用 IL-6, Ras 等基因表达来实现^[16-17];目前在肝癌与炎症的关系中 IL-6 备受关注^[18],它参与多种细胞的增殖和分化、血细胞的生成及调节免疫反应。STAT3 属于胞浆蛋白家族,具有信号转导、转录调控的双重功能,同时 STAT3 是 IL-6 重要的调节因子,两者相

互作用,形成互相激活的通路。

本实验主要考察 DEN 诱导肝癌中 IL-6 信号通路的作用,采用 ATRA 联合 OMT 进行干预治疗后检测肝癌发生过程中 IL-6 通过 STAT3 连接 NF- κ B 构成的炎症-癌症信号通路的改变^[19-20],同时观察 IL-6 及其上游正调控基因 NF- κ B^[20]和负调控基因 let-7a^[21]的改变。HE 染色的病理学观察及肝功能检测结果表明:干预组大鼠肝表面结节数,肝功能各指标水平明显降低,这提示 ATRA 联合 OMT 对 DEN 诱发的肝癌具有生长抑制作用,受损肝细胞数量减少;RT-qPCR 实验结果还显示:不同阶段干预组大鼠肝组织中 IL-6、NF- κ B-p65 mRNA 表达水平低于模型组,而干预组 microRNA let-7a 表达量显著高于模型组,这说明 ATRA 联合 OMT 抑制 IL-6 mRNA 表达可能是通过上调 microRNA let-7a mRNA 表达和下调 NF- κ B-p65 mRNA 表达来实现,从而阻断 IL-6 信号通路活化。

Western blot 结果显示,干预组 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达均显著低于模型组,提示 ATRA 联合 OMT 干预治疗能够明显抑制大鼠肝癌,其机制与下调 NF- κ B-p65 的表达和上调 let-7a 表达,从而抑制靶基因 IL-6 的表达,以及阻断 IL-6/STAT3 信号通路活化,进而抑制肝癌的发生和发展,起到防治肝癌的作用。

参考文献:

[1] Fidler MM, Gupta S, Soerjomataram I, et al. Cancer incidence and mortality among young adults aged 20–39 years worldwide in 2012: a population-based study [J]. Lancet Oncol, 2017, 18 (12): 1579–1589.

[2] 张典,姜凤良,胡志芳,等. 原发性肝癌的预防措施[J]. 中国老年学杂志,2018,38(17): 4317–4319.

[3] 黄俊琪,蔡燕. 肝癌转移相关标志物的研究进展[J]. 实用医学杂志,2017,33(12): 2059–2061.

[4] Llovet JM, Bruix J. Novel advancements in the management of hepatocellular carcinoma in 2008 [J]. J Hepatol, 2008, 48(1): 20–37.

[5] Wan XY, Luo M, Li XD, et al. Hepatoprotective and anti-hepatocarcinogenic effects of glycyrrhizin and matrine [J]. Chem Biol Interact, 2009, 181(1): 15–19.

[6] Liu DD, Zhi LJ, Song YY, et al. Primarily screening and analyzing ESTs differentially expressed in rats primary liver cancer [J]. Chin J Cancer Res, 2013, 25(1): 71–78.

[7] 郑荣寿,左婷婷,曾红梅,等. 中国肝癌死亡状况与生存分析[J]. 中华肿瘤杂志,2015,10(9): 697–702.