

贾贵阳,倪元萍,王梦茹,等. 熊胆粉及熊去氧胆酸对肝癌癌前病变的作用 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1424-1432.

JIA G Y, NI Y P, WANG M R, et al. Effect of bear bile powder and ursodeoxycholic acid on preneoplastic lesions of hepatocarcinoma [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1424-1432.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.007

熊胆粉及熊去氧胆酸对肝癌癌前病变的作用

贾贵阳¹, 倪元萍¹, 王梦茹¹, 涉谷淳², 金美兰^{1,3*}

(1. 西南大学动物医学院, 重庆 400715; 2. 东京农工大学农学研究科动物生命科学部
兽医病理学研究室, 东京 183-8509; 3. 西南大学实验动物中心, 重庆 400715)

【摘要】 目的 为了探究熊胆粉(bear bile powder, BBP)及其熊去氧胆酸(chenodeoxycholic acid, UDCA)在肝癌癌前病变的发生发展中的影响,利用短期致癌动物模型探索了 BBP 和 UDCA 的抗氧化作用及它在抗癌前病变中的影响。**方法** SPF 级 SD 大鼠 40 只随机分 4 组:对照(Control)组,模型(DEN)组,熊胆粉(DEN + BBP)组(200 mg/kg),熊去氧胆酸(DEN + UDCA)组(30 mg/kg),每组 10 只。实验开始除 Control 组外所有大鼠腹腔注射 100 mg/kg 二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN),每周一次,共 3 周。从实验开始到结束, DEN + BBP 组每天灌胃 200 mg/kg BBP 水溶剂, DEN + UDCA 组每天灌胃 30 mg/kg UDCA 悬浮溶液。**结果** DEN 组, DEN + BBP 组, DEN + UDCA 组的体重和肝重量, 3 组之间无显著性差异。DEN 组的肝组织中丙二醛(malondialdehyde, MDA)的水平显著增高,谷胱甘肽(glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)的水平显著降低。但 UDCA 处理显著降低了 MDA 的水平,显著增加了 GSH, SOD 的水平。相反, BBP 处理在血清中发挥同样的作用。DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组的谷胱甘肽-S-转氨酶(glutathione S-transferase, GST-P)阳性病变数量及面积和 Ki-67 阳性细胞率显著低于 DEN 组,且在 DEN + UDCA 组中更为明显。同时, DEN + UDCA 组中的 *Caespase-9* 表达量显著高于 DEN 组。**结论** BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变的发生均发挥显著的抑制作用,且对 DEN 诱导的氧化应激也有抗氧化作用,但它们的作用方式不同。同时,这些抗氧化作用是否参与抗癌作用需进一步研究。

【关键词】 熊胆粉;熊去氧胆酸;肝癌癌前病变;氧化应激

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1424-09

Effect of bear bile powder and ursodeoxycholic acid on preneoplastic lesions of hepatocarcinoma

JIA Guiyang¹, NI Yuanping¹, WANG Mengru¹, MAKOTO Shibutani², JIN Meilan^{1,3*}

(1. College of Veterinary Medicine, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Laboratory of Veterinary Pathology, Division of Animal Life Science, Graduate School, Institute of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo 183-8509, Japan; 3. Laboratory Animal Center, Southwest University, Chongqing 400715, China)

Corresponding author: JIN Meilan. E-mail: meilan0622@swu.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the effect of bear bile powder (BBP) and ursodeoxycholic acid (UDCA) on preneoplastic lesions of hepatocarcinoma, using short-term carcinogenesis bioassay models. **Methods** Forty 6-week-old male SD rats were divided randomly into control, diethylnitrosamine (DEN), DEN + BBP (200 mg/kg), and DEN + UDCA (30 mg/kg) groups. All rats, except for the control group, were injected intraperitoneally with 100 mg/kg DEN once a week for 3 weeks. Rats in the DEN + BBP and DEN + UDCA groups also received oral BBP 200 mg/kg or UDCA 30 mg/kg suspended solution, respectively, daily from the beginning to the end of the experiment. **Results** There were no

【作者简介】 贾贵阳,男,在读硕士研究生,研究方向:中药抗癌作用机制。Email: 15206761100@163.com

【通信作者】 金美兰,女,教授,博士,研究方向:中药抗癌作用机制及毒性病理学。Email: meilan0622@swu.edu.cn

significant differences in body or liver weights between the DEN, DEN + BBP, and DEN + UDCA groups. DEN treatment increased the accumulation of malondialdehyde (MDA), decreased superoxide dismutase (SOD), and reduced glutathione (GSH) activities in liver tissue, while UDCA enhanced SOD and GSH activities and decreased MDA accumulation in liver tissue. In contrast, BBP exerted these antioxidant effects in serum. The number and area of glutathione S-transferase placental (GST-P) type-positive lesions and the Ki-67-positive cell ratio were significantly lower in the DEN + BBP and DEN + UDCA groups than in the DEN group, especially in the DEN + UDCA group. UDCA significantly increased *Caspase-9* mRNA expression compared with the model group. **Conclusions** BBP and UDCA have significant inhibitory effects on preneoplastic lesions of hepatocarcinoma induced by DEN, and both have antioxidant effects on DEN-induced oxidative stress. The antioxidant mechanisms of BBP and UDCA differ, however, and further research is needed to determine the roles of the antioxidant effects in their anticancer mechanisms.

[Keywords] bear bile powder; ursodeoxycholic acid; preneoplastic lesions of hepatocarcinoma; oxidative stress

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界上最为易发的恶性肿瘤之一,且肝癌死亡率一直居高不下,临床上一直追求更加有效的治疗方式^[1]。在全球范围内肝细胞癌的发病率和死亡率有所上升,其中以中国和发展中国家较为突出。2020 年中国肝细胞癌新增病例 46 万,且有超过 42 万肝癌相关死亡患者,但 HCC 预后效果仍差强人意,五年生存期仅为 14.1%^[2-3]。早期预防和筛查可以降低恶性肿瘤发生的概率,但是肝细胞癌被初诊时往往已进入中晚期^[4]。因此,早期预防和治疗 HCC,降低死亡率尤为重要。

近年来众多传统中药逐渐走上临床治疗一线,中药辅助治疗肝癌逐渐成为热点,熊胆粉 (bear bile powder, BBP) 是传统名贵中药材,最初记载于《新修本草》,我国自 20 世纪 80 年代后采用无管造瘘引流法获得黑熊胆汁干燥后得到 BBP^[5]。BBP 具有清肝利胆、清热解毒和平肝镇惊止血等功效,近年来关于 BBP 的研究发现其具有保肝护胆、抗惊厥、抗病毒、抗肿瘤发生发展等药理作用^[6-7]。熊去氧胆酸 (ursodeoxycholic acid, UDCA) 和鹅去氧胆酸 (chenodeoxycholic acid, CDCA) 等是 BBP 中的主要活性成分。近年来研究结果表明,BBP 有抑制癌细胞增殖活性、诱导癌细胞凋亡、调节氧化应激因子等作用,从而抑制肿瘤的发生发展。灌胃 200、400、800 mg/kg 的 BBP 可有效抑制肝癌细胞 H22 的生长^[8],促进 *p21* 表达抑制细胞周期 G1/S 期的转变,抑制 *Bcl-2*、*Caspase-3*、*Caspase-8*、*Caspase-9* 表达诱导肝癌细胞凋亡^[9]。同时,BBP 前处理可增加肝细胞中谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的水平,从而降低乙醇诱导的肝细胞脂质过氧化,起到保护肝组织的作用^[10]。前期研究结果提示,BBP 可诱导细胞凋亡,

抑制细胞增殖活性,诱导 DNA 修复相关基因 *JWA* 的表达,抑制肝癌的发生发展^[11-12]。另外,BBP 的主要活性成分 UDCA 可下调 *Bcl-2* 的表达抑制肿瘤细胞生长,可通过改变 *p21*、*p53*、*CDK1*、*Cyclin B1* 等相关因子水平,将细胞分裂阻滞在 G2/M 期^[13]。同时,UDCA 可通过降低细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平、*Bcl-2*、*Bax* 等蛋白表达量,进一步诱导线粒体膜电位下降,膜通透性增加,从而释放细胞色素 c (cytochrome c, cyt c) 到胞浆,激活下游凋亡信号通路,引起 M14 细胞凋亡^[14]。这些研究结果表明,BBP 和 UDCA 均可抑制肝癌的发展,其作用机制中包括抑制细胞增殖活性和诱导细胞凋亡。同时,它们均有抗氧化作用。但 BBP 和 UDCA 是否在早期肝癌发生过程中有抑制作用,且其抗氧化作用是否参与其抗癌作用,尚未清楚。

二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 是遗传毒性致癌物,代谢过程中可产生大量的过氧化产物,引发机体氧化应激引起肝细胞变异进而诱发肿瘤,是建立肝癌模型良好的诱导剂^[15-17]。2000 年 ITO 等^[18]开发了腹腔注射 200 mg/kg DEN 一周后进行 2/3 肝部分切除术的方式成功建立早期肝癌动物模型。诸多研究使用 200 mg/kg DEN 单次腹腔注射后长期饲养或给予促进肿瘤发展的非遗传毒性致癌物诱导肝癌^[19-21]。大鼠肝癌癌前病变生物标记物胎盘型谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione S-transferase placental, GST-P) 阳性病变的检测结果与两年致癌性实验结果具有良好的相关性^[18,22-23]。因此,本研究利用腹腔注射 DEN 的方式诱导建立大鼠早期肝癌癌前病变动物模型,确认 BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导肝癌癌前病变的发生发展过程中的抑制作用及抗氧化作用的基础上,探讨了其抗氧化作用在抗肝癌癌前病变中的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠, 体重约 120 g, 共计 40 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2021-0006】, 饲养在西南大学药学院 SPF 级动物房【SYXK(渝)2020-0006】, 光照条件为循环 12 h 光照/12 h 黑暗, 温度设置为 $(24 \pm 2)^\circ\text{C}$, 相对湿度控制在 $55\% \pm 5\%$, 3 ~ 4 只/笼, 动物自由采食和饮水。本实验通过西南大学实验动物伦理审查委员会审查批准(IACUC-20230913-08)。

1.1.2 主要试剂与仪器

BBP(吉林松宝制药, 中国, 延边); UDCA(Aladdin, 中国, 上海); DEN(Bio Ruler, 美国); 封闭用山羊血清(Southern Biotech, 美国); 马血清(Vector Laboratories, 美国); GST-P 抗体(Medical and Biological Laboratories, 日本); Ki-67 抗体[SP6](Abcam, 中国, 上海); Goat Anti-Rabbit IgG H&L (HRP) Secondary Antibody(Thermo fisher scientific, 美国); Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG H&L (HRP) Secondary Antibody (Vector Laboratories, 美国); vecastain® ABC Reagent (PK-6100, Vector Laboratories, 美国); 增强型 DAB 显色试剂盒(索莱宝, 中国, 北京); TRIzol 试剂(Life technologies, 美国); 逆转录预混液(Thermo fisher scientific, 美国); 乾坤白金 SYBR Green 预混液(Thermo fisher scientific, 美国); 大鼠粉状基础饲料(Ensiveier, 中国, 重庆)。C1000-CFX96 实时荧光定量系统(Bio-Rad Laboratories, 美国); 组织包埋机(浙江科迪 KD-BM III, 中国); 切片机(Leica RM2235, 德国); 生物组织摊烤片机(科迪 KD-TK, 中国); 光学显微镜(Olympus BX53, 日本)。

1.2 方法

1.2.1 实验设计

40 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后随机分为 4 组, 每组 10 只: 对照(Control)组, 模型(DEN)组, 熊胆粉(DEN + BBP)组, 熊去氧胆酸(DEN + UDCA)组。前 3 周除 Control 组以外所有大鼠腹腔注射 100 mg/kg DEN, 每周 1 次。DEN + BBP 组每天灌胃 200 mg/kg 水溶剂, DEN + UDCA 组每天灌胃 30 mg/kg 悬浮溶液, 给药共计 8 周。实验结束后, 称取大鼠体重, 在异氟烷深度吸入麻醉下腹主动脉

采血, 后放血处死。取出肝组织称重后, 取中间叶和左侧外叶固定于福尔马林缓冲液, 剩余的肝组织放置 -80°C 超低温冰箱用于分子生物学分析。

1.2.2 酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

每组随机选取 5 只大鼠腹主动脉采血后离心获得血清, 肝组织匀浆后, 委托上海原鑫生物科技有限公司根据试剂盒说明书检测丙二醛(malondialdehyde, MDA), GSH 和 SOD 水平。标准品孔数值用于绘制回归曲线所有孔加入稀释液后, 加入辣根加入过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记抗体孵育 1 h, 加入底物避光孵育 0.25 h, 终止反应, 在 450 nm 波长处测定各孔的 OD 值。以曲线方程计算浓度。

1.2.3 病理组织学和免疫组织学检查

制石蜡切片, 并苏木素-伊红(HE)染色和 GST-P 和 Ki-67 免疫组织学染色。脱蜡脱水后的切片用 0.3% 过氧化氢甲醇溶液通透处理 30 min, Ki-67 免疫染色在柠檬酸缓冲液中高压锅热介导抗原修复处理 15 min, 之后切片由 5% 山羊血清或马血清封闭 30 min, 并加入多克隆抗体 GST-P(1:1000)或重组抗体 Ki-67(1:200) 4°C 16 h 孵育。之后用反应增强剂 vecastain® ABC Reagent 孵育 30 min, DAB 显色后苏木精复染切片。Olympus Cellsens standard V0202 软件统计直径大于 200 μm 的 GST-P 阳性病灶数量及面积, 使用软件 KatiKati 2.0 计算肝组织的阳性细胞率。

1.2.4 抽提总 RNA 和实时荧光定量 PCR 分析

每组随机选取 5 只大鼠, 抽提总 RNA, 逆转录后使用 SYBR Green 预混液检测表达量。在 Pubmed 网站设计引物序列后委托生工生物公司(中国, 成都)合成, 见表 1。

选择内源性参照基因 *GAPDH* 通过 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算各基因的相对表达量。检测体系为 20 μL , SYBR Green PCR Master Mix 10 μL , cDNA 1 μL , Forward Primer 0.4 μL , Reverse Primer 0.4 μL , DEPC 水 8.2 μL 。反应程序为预变性 95°C 2 min, 变性 95°C 15 s, 退火/延伸温度为 $(95^\circ\text{C}$ 15 s, 60°C 1 min) 循环 40 次, 4°C 维持。

1.3 统计学分析

所有数据表示方式为平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)。用 SPSS 26.0 检查统计学意义和 GraphPad Prism 5.0 软件作图。通过 Dunnett's test 计算 Control 组

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列
Table 1 Sequence of primers used for qPCR

基因类型 Gene classification	登录号 Accession no.	基因说明 Gene description	基因名 Gene symbol	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')
DNA 损伤修复相关基因 DNA damage repair-related genes	NM_023972.4	ADP 核糖基化因子样 GTPase 6 相互作用蛋白 5 ADP-ribosylation factor like GTPase 6 interacting protein 5	ARL6IP5	F:GGAACAACCGTGTAGTGAGC R:GAAGGGGCTCAGAAACCCAA
	NM_001106318.2	p53 诱导的死亡域蛋白 1 p53-induced death domain protein 1	PIDD-1	F:CCGGTGTTACAGGCTTCAGT R:TGTCATCCCAGGTGCTTGTCTC
凋亡相关基因 Apoptosis-related genes	NM_012922.2	胱天蛋白酶 3 Caspase-3	CAS-3	F:GAGCTTGGAACGCGAAGAAAA R:GAGTCCATCGACTTGCTTCCA
	NM_031632.2	胱天蛋白酶 9 Caspase-9	CAS-9	F:CTTGTCGCGGAACCTGCAAG R:CAGAGCCTGCCCCGCTGAATA
	NM_030989.3	肿瘤蛋白 p53 Tumor protein p53	p53	F:CCCCTGAAGACTGGATAACTGT R:TCTCCTGACTCAGAGGGAGC
氧化应激相关基因 Oxidative stress-related genes	NM_030826.4	谷胱甘肽过氧化物酶 1 Glutathione peroxidase 1	GPX-1	F:TCAGTTCCGACATCAGGAGAAT R:TCACCATTACCTCGCACTT
	NM_012962.1	谷胱甘肽合成酶 Glutathione synthetase	GSS	F:CAGCTGGAAGAGTTGGCACA R:GGCATACGTCACCACGTCAG
	NM_017051.2	超氧化物歧化酶 2 Superoxide dismutase 2	SOD2	F:CGGGGGCCATATCAATCACA R:CCAGCAACTCTCCTTTGGGT
内参基因 Housekeeping gene	NM_017008.4	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	F:CCGCATCTTCTTGTGCACTG R:CGATACGGCCAAATCCGTTC

与其他组的显著性差异,使用 Student’s *t*-test 确定 DEN 组与 DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组的显著性差异。以 *P* < 0.05 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 一般状态、体重和肝重

因灌胃失误致 1 只大鼠死亡。DEN 组、DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组的体重和绝对肝重量显著低于 Control 组,但相对肝重量无显著性差异。DEN 组与 DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组之间无显著性差异(表 2)。

2.2 BBP 和 UDCA 对 MDA, GSH 和 SOD 的影响

在肝组织中 BBP 升高了 MDA 的含量,降低了 GSH 水平,UDCA 恢复了 MDA 含量,提升了 DEN 造成的 GSH 水平下降,恢复了 SOD 的水平。在血清中 MDA,GSH 和 SOD 的活性与肝组织呈现相反结果(表 3)。

2.3 病理组织学检查和免疫组织化学检查结果

肝组织病理学检查结果,DEN 组可见轻微的炎性细胞浸润。然而,DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组中该变化明显得到缓解。在肝组织的免疫组织

表 2 SD 大鼠体重和肝重量
Table 2 Body weights and liver weights in SD rats

组别 Groups	Control 组(<i>n</i> = 10) Control group(<i>n</i> = 10)	DEN 组(<i>n</i> = 10) DEN group(<i>n</i> = 10)	DEN + BBP 组(<i>n</i> = 10) DEN + BBP group(<i>n</i> = 10)	DEN + UDCA 组(<i>n</i> = 9) DEN + UDCA group(<i>n</i> = 9)
最终体重/g Final body weights/g	522.00 ± 33.91	447.40 ± 32.90**	426.20 ± 48.90**	444.00 ± 23.64**
肝绝对重量/g Absolute liver weights/g	13.16 ± 1.33	10.74 ± 1.37**	10.32 ± 1.81**	10.62 ± 0.93**
肝相对重量/(g/100g) Relative liver weights/(g/100g)	2.55 ± 0.17	2.36 ± 0.46	2.47 ± 0.39	2.39 ± 0.13

注:与 Control 组相比,***P* < 0.01。(下图/表同)
Note. Compared with control group, ***P* < 0.01. (The same in the following figures and tables)

表 3 ELISA 检测氧化应激的相关指标

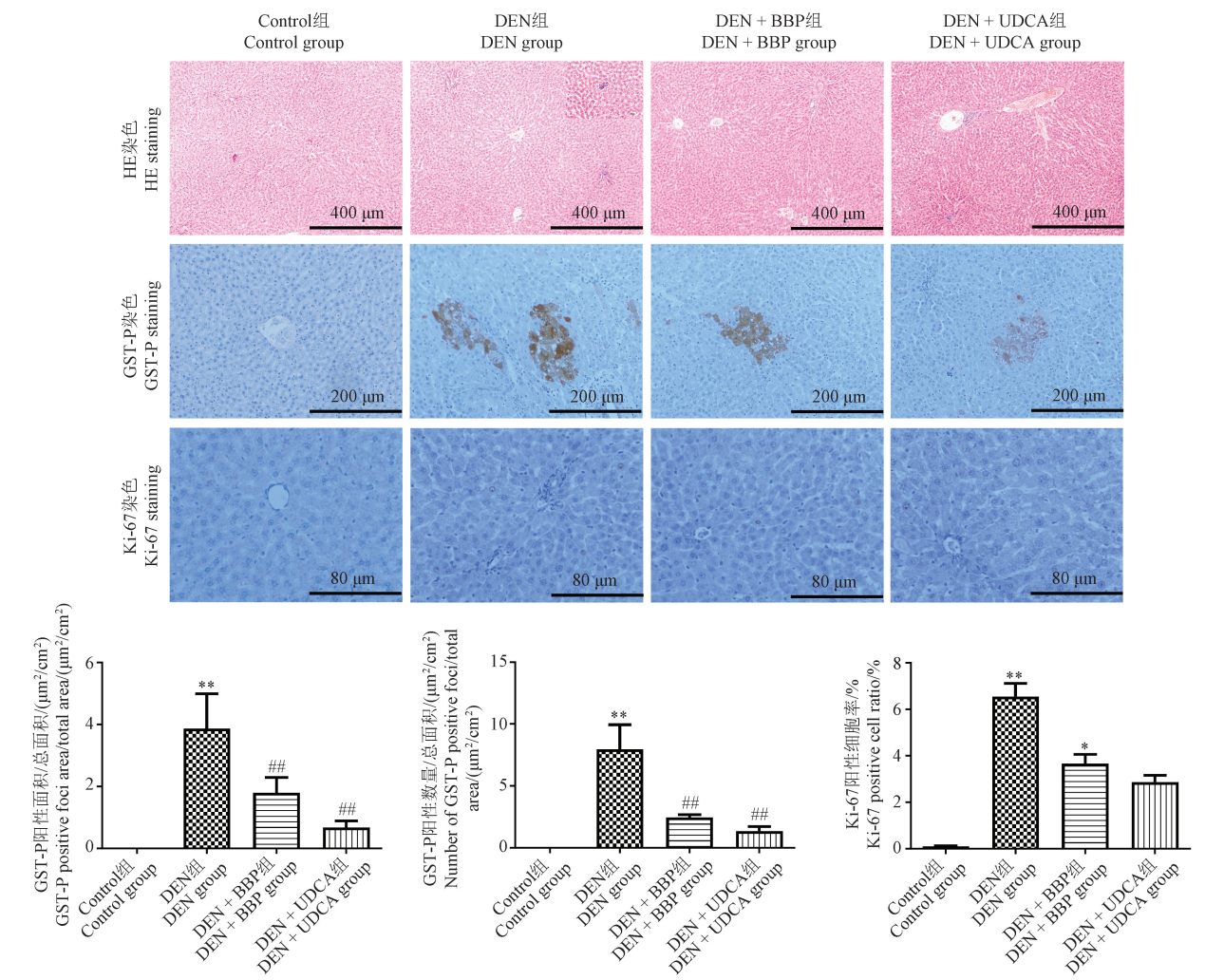
Table 3 Relevant indicators of oxidative stress were detected by ELISA

组织 Tissue	组别 Groups	对照组 Control group	DEN 组 DEN group	DEN + BBP 组 DEN + BBP group	DEN + UDCA 组 DEN + UDCA group
肝组织 Liver	MDA/(nmol/mL)	4. 51 ± 0. 64	5. 78 ± 0. 56 **	7. 06 ± 0. 66 ** ##	4. 93 ± 0. 56 ** ##
	GSH/(nmol/mL)	10. 06 ± 0. 38	7. 87 ± 0. 25 **	6. 70 ± 0. 61 ** ##	9. 18 ± 0. 35 ** ##
	SOD/(μ /mL)	308. 56 ± 119. 03	236. 06 ± 77. 12 **	216. 78 ± 19. 24 **	294. 68 ± 20. 70 ##
血清 Serum	MDA/(nmol/mL)	8. 64 ± 0. 34	6. 12 ± 0. 48 **	4. 69 ± 0. 17 ** ##	7. 22 ± 0. 58 ** ##
	GSH /(nmol/mL)	5. 38 ± 0. 31	7. 81 ± 0. 45 **	9. 26 ± 0. 27 ** ##	6. 69 ± 0. 80 ** ##
	SOD/(μ /mL)	182. 49 ± 10. 36	260. 28 ± 25. 09 **	306. 39 ± 11. 88 ** ##	220. 07 ± 10. 98 ** ##

注:与 DEN 组相比,##*P* < 0. 01。(下图同)
Note. Compared with DEN group, ##*P* < 0. 01. (The same in the following figures)

化学检查结果,GST-P 是大鼠肝癌癌前病变生物标记物,DEN 组阳性病变面积和数量显著高于 Control 组,然而 DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组的显著低

于 DEN 组。同时,DEN 组的细胞增殖活性生物标记物 Ki-67 阳性细胞率显著高于 Control 组,然而 BBP 和 UDCA 处理显著降低了阳性细胞率(图 1)。



注:与 Control 组相比, **P* < 0. 05。(下图同)
图 1 BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的组织病理学和免疫组化 (GST-P 和 Ki-67) 变化的影响

Note. Compared with control group, **P* < 0. 05. (The same in the following figures)

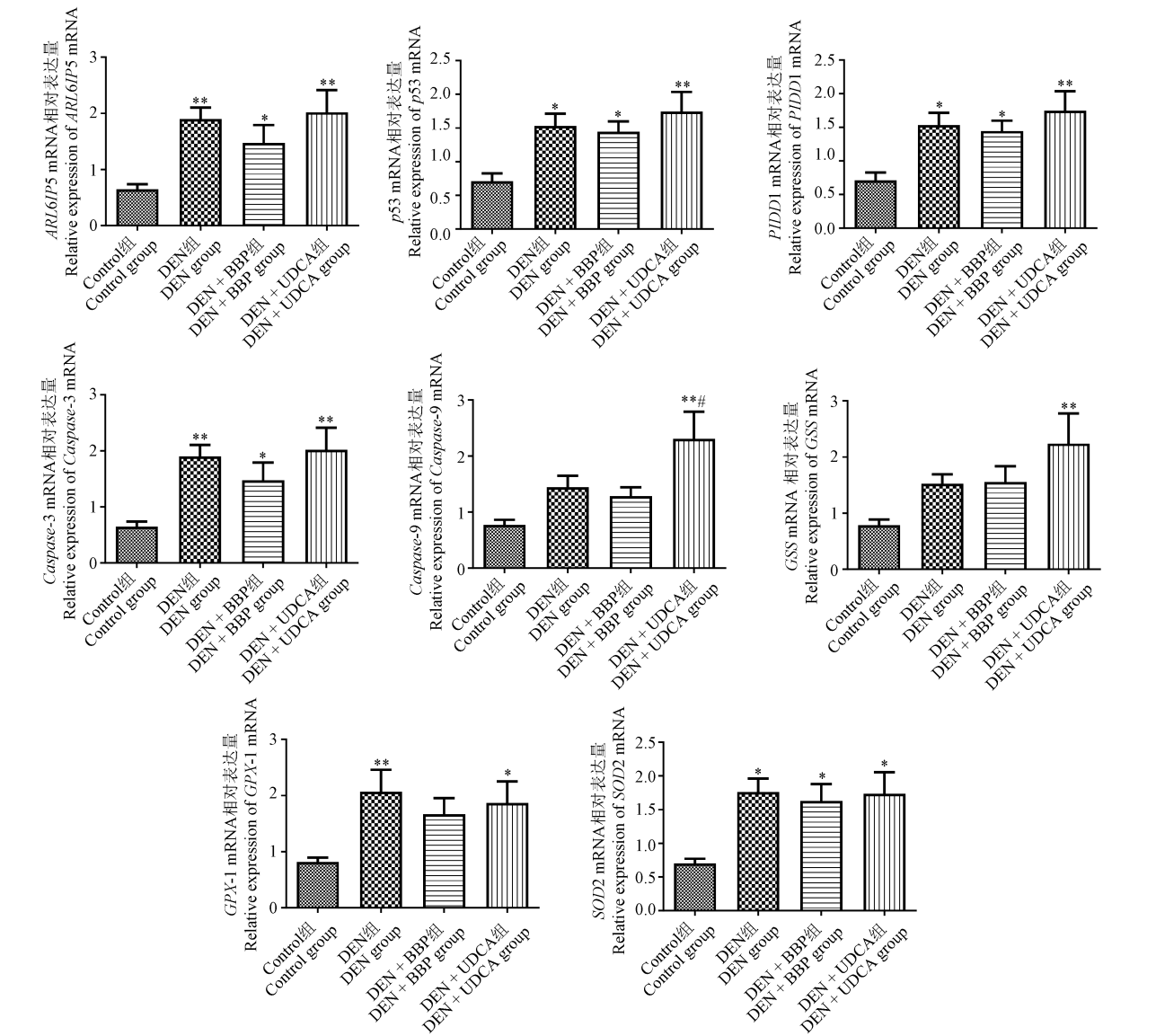
Figure 1 Effects of BBP and UDCA on the histopathological and immunohistochemical (GST-P and Ki-67) changes induced by DEN

同时,这些抑制作用在 DEN + UDCA 组中更显著。

2.4 BBP 和 UDCA 对 DNA 修复、细胞凋亡和氧化损伤相关基因 mRNA 表达水平的影响

利用实时荧光定量 PCR 检测了肝组织中与 DNA 修复、细胞凋亡和氧化损伤相关基因的 mRNA 表达量。结果显示,与 Control 组相比,DEN 组、DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组中的细胞增殖相关的 *PIDD-1*、细胞凋亡相关的 *Caspase-3*、氧化应激相关

的 *GPX-1* 及 *SOD2* 的 mRNA 表达量明显升高,但是 3 组之间无显著性差异。DEN + UDCA 组的 *Caspase-9* 和 *GSS* 表达量显著高于 Control 组,且 *Caspase-9* 的表达量还显著高于 DEN 组。在 DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组中的 *ARL6IP5* (*JWA*) 的表达量与 DEN 组相比有升高趋势,但无显著性差异。另外,细胞凋亡相关基因 *p53* 在各组之间无显著性差异(图 2)。



注:与 DEN 组相比, $^{\#}P < 0.05$ 。

图 2 DNA 修复、细胞凋亡和氧化应激相关 mRNA 表达量

Note. Compared with DEN group, $^{\#}P < 0.05$.

Figure 2 mRNA expression levels in DNA repair, apoptotic proliferation and oxidative stress

3 讨论

肝癌是世界上最致命的恶性肿瘤之一,早期预防和筛查可以降低恶性肿瘤发生的概率^[4]。近年

来众多传统中药逐渐走上临床治疗一线,BBP 作为传统中药,诸多研究证明 BBP 有抗炎、抗氧化和抗肿瘤的功效,其主要活性成分 UDCA 亦有抗氧化和抗肿瘤的作用,但 BBP 和 UDCA 在体内抗氧化作用

机制以及这些作用是否参与抗肿瘤过程仍未可知^[10]。因此,本研究利用遗传毒性致癌物 DEN 建立大鼠肝癌癌前病变动物模型,确认了 BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变发生发展过程中的抗氧化、抗肿瘤作用,并探讨了 BBP 和 UDCA 的抗氧化作用在抗癌过程中的作用。

本研究中, DEN 组、DEN + BBP 组和 DEN + UDCA 组的体重及绝对肝重量显著性降低,而相对肝重量在各组间无显著性差异。同时,病理组织学检查中未发现肝组织的明显的病理变化。GHUFRAN 等^[24] 2021 年利用 SD 大鼠腹腔注射 30 mg/kg DEN 每周 2 次 10 周后,从 12 ~ 16 周每周注射 1 次的方式建立肝癌模型中,从 12 周开始出现大鼠体重下降及相对肝重量的显著变化。这些结果提示,本实验中的诱导方法不足以影响相对肝重量,绝对肝重量的下降与摄入致癌物导致的体重下降有关。然而, BBP 和 UDCA 的处理显著降低了 DEN 诱导的直径大于 200 μm 的 GST-P 阳性病灶的数量和面积以及 Ki-67 阳性细胞率,且 UDCA 的抑制作用更加明显。GST-P 是胎盘型谷胱甘肽转移酶,是大鼠肝癌癌前病变的生物标志物^[25],在短期致肝癌模型中检测 GST-P 阳性病变可在体内检测受试物的致癌潜在性^[18,22]。MIZUKAMI 等^[26] 2010 年还报道直径大于 200 μm 的 GST-P 阳性病变可有效的发展成肝癌。Ki-67 核抗原是一种增殖活性生物标志物,是体现癌细胞增殖和分化能力的有效指标^[27]。由此可见, BBP 和 UDCA 均可有效的抑制 DEN 诱导的肝癌癌前病变的发生。另外,本实验使用 100 mg/kg DEN 腹腔注射 3 次的方法诱导了肝癌癌前病变,该方法虽然能有效诱导 GST-P 阳性肝癌癌前病变的发生,但因给药剂量较低,给药周期较短对肝组织的重量及病理组织上不呈现明显的变化。

诸多研究表明,熊胆及其主要成分抑制肿瘤细胞增殖和发展。2013 年,赵锦燕等^[28] 通过 Hep G2 肝癌细胞异种皮下移植的裸鼠模型,发现 BBP 治疗促进 p21 的表达从而抑制细胞周期素 E (cyclin E) 和细胞周期素依赖性酶抑制剂 2 (cyclin-dependent kinases 2, CDK2) 结合最终抑制细胞周期从 G1 期到 S 期的转变,引发细胞周期停滞。UDCA 预处理裸鼠,显著抑制接种的肿瘤细胞增殖和细胞团块形成^[29]。另外, UDCA 可以通过抑制蛋白酶体 (deleted in liver cancer 1, DLC1) 非泛素化降解,诱

导 DLC1 蛋白表达,从而抑制细胞增殖^[30]。本课题组在前期研究中也发现早期肝癌促进阶段处理 BBP 可显著抑制 GST-P 阳性病变的发展^[31]。在本实验中 BBP 和 UDCA 的处理不仅显著减少了 Ki-67 阳性细胞率,且显著增高了细胞凋亡相关基因 *PIDD1*、*Caspase-3* 及 *Caspase-9* 的 mRNA 表达量。特别是 DEN + UDCA 组的 *Caspase-9* 的表达量显著高于 DEN 组。半胱天冬酶家族在稳态和细胞程序性死亡中起重要作用^[32], *Caspase-9* 是参与线粒体途径的关键,激活 *Caspase-9* 可以启动细胞凋亡的发生,促进下游效应 *Caspase-3* 发挥作用。不同活性片段的编码 p53 诱导死亡的结构域蛋白 1 (p53-induced death domain protein 1, *PIDD1*) 可以修复 DNA 损伤或激活 *Caspase-2* 介导 DNA 损伤导致的细胞凋亡,以响应 DNA 损伤^[33-34]。p53 可通过 *PIDD-BID* 轴介导 *Caspase-3* 和 *Caspase-9* 诱导的凋亡^[34]。另外,前期课题组研究还发现 BBP 的前期处理可显著增加 DNA 修复相关基因 *JWA* (*ARL6IP5*) 的表达量,从而参与抑制肝癌癌前病变的发生。但是,在本实验中没有发现 *ARL6IP5* 表达量的显著变化。这些结果表明, BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变的发生发展的抑制作用主要与促进细胞凋亡及抑制细胞增殖有关。

DEN 是一种遗传毒性肝致癌物, DEN 不仅以烷基化的方式导致 DNA 损伤,而且在代谢过程中产生大量的氧化应激产物,常应用于化学诱导大鼠肝癌,且诱发肝癌过程相似于人原发性肝癌^[35-36]。熊敏琪等^[37] 报道 BBP 可通过增加 GSH 和 SOD 活性,缓解动脉粥样硬化。此外,注射 BBP 可以降低 MDA 水平和增强 SOD 活性,以降低脑损伤组织中的氧化应激^[38]。2024 年, WANG 等^[39] 报道了 UDCA 显著降低 H_2O_2 损伤的肝细胞氧化应激水平。同时,在各种肝病中 UDCA 处理可提高体内外 SOD、过氧化氢酶 (catalase, CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 的活性和促甲状腺素 (thyrotrophin, TSH)、GSH 的水平,减少细胞内 ROS、MDA 的积累和氧化型谷胱甘肽 (oxidized glutathione, GSSG) GSSG/GSH 的速率^[40]。由此可见, BBP 和 UDCA 均具有抗氧化作用,但在 DEN 诱导的氧化应激过程中 BBP 和 UDCA 是否发挥抗氧化作用,且抗氧化作用是否参与抑制肝癌癌前病变作用,尚不清楚。因此,本次实验检测了肝组织和血清中的氧化应激相关酶的水平 and 肝组织中的氧

化应激相关基因水平。实验结果表明, BBP 仅在血清中显著的降低 MDA 水平, 显著增高 SOD 和 GSH 水平发挥抗氧化作用, 在肝组织中反而显著增强氧化应激水平。相反, UDCA 仅在肝组织中显著降低 MDA 水平, 显著增高 SOD 和 GSH 水平, 而在血清中无明显的抗氧化作用。然而, 肝组织中的氧化应激相关基因的表达量, 在 DEN 组和 DEN + BBP 组或 DEN + UDCA 组之间无显著性差异。由此可见, BBP 和 UDCA 均具有抗氧化作用, 但是其作用机制不同, 且 BBP 和 UDCA 的抗氧化作用是否参与抗癌过程及它们的抗氧化作用机制, 有待于进一步研究。

综上所述, 本研究确认了 BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变的作用, 并探讨了它们抗氧化作用对肝癌癌前病变的影响。BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变均有抑制作用, 且 UDCA 的作用似乎优于 BBP。同时, BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的氧化应激均有抗氧化作用, 但它们的作用机制不同。BBP 的抗氧化作用体现在血清中, 而 UDCA 表现在肝组织中。《神农本草经》中说: “上药养命, 中药养性, 下药治病”。BBP 是天然中药, UDCA 是人工合成的主要活性成分, 本实验结果提示中药宏观调节机体的基本功能, 从而达到治病目的的作用机制与靶器官、靶点式调控从而达到治病目的的西药截然不同, 探讨分析中药的治病机制时应关注它的宏观调控机制。BBP 和 UDCA 对 DEN 诱导的肝癌癌前病变的抑制作用主要来自于细胞增殖活性的降低和细胞凋亡的促进, 而其抗氧化作用是否参与抗癌机制需进一步研究。

参 考 文 献(References)

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] HAO X, SUN G, ZHANG Y, et al. Targeting immune cells in the tumor microenvironment of HCC: new opportunities and challenges [J]. Front Cell Dev Biol, 2021, 9: 775462.

[3] HE S, XIA C, LI H, et al. Cancer profiles in China and comparisons with the USA: a comprehensive analysis in the incidence, mortality, survival, staging, and attribution to risk factors [J]. Sci Chin Life Sci, 2024, 67(1): 122-131.

[4] YE Q, LING S, ZHENG S, et al. Liquid biopsy in hepatocellular carcinoma: circulating tumor cells and circulating tumor DNA [J]. Mol Cancer, 2019, 18(1): 114.

[5] 张启明, 袁惠南. 人工引流熊胆研究概况 [J]. 中国药学杂志, 1993, 28(9): 526-529.

ZHANG Q M, YUAN H N. Overview of artificial pancreatic

drainage in bears [J]. Chin Pharm J, 1993, 28(9): 526-529.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 化学工业出版社; 2009.

National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China [M]. Beijing: Chemical Industry Press; 2009.

[7] 王佳婧, 郑勇凤, 秦晶, 等. 熊胆粉的药理作用与新剂型研究进展 [J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(7): 598-602.

WANG J J, ZHENG Y F, QIN J, et al. Advances in pharmacological activities and novel dosage forms of bear bile powder [J]. Chin J Hosp Pharm, 2016, 36(7): 598-602.

[8] 王硕, 睢大贫, 陈志鸿, 等. 熊胆粉对小鼠肝癌 H₂₂ 的抑制作用及量效关系研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2012, 28(2): 202-203.

WANG S, SUI D Y, CHEN Z H, et al. Inhibitory effect of bear bile powder on mouse hepatocellular carcinoma H₂₂ and its dose-effect relationship [J]. J Changchun Univ Tradit Chin Med, 2012, 28(2): 202-203.

[9] 张梅. 熊胆粉对不同时期 SD 大鼠肝癌的作用及机制的初步探讨 [D]. 重庆: 西南大学; 2020.

ZHANG M. Preliminary discussion of its mechanism and effects of bear bile powder on different stages hepatocarcinogenesis in SD rats [D]. Chongqing: Southwest University; 2020.

[10] 刘菁菁, 肖向红, 薛艺, 等. 熊胆粉抗乙醇诱导的小鼠肝细胞氧化损伤研究 [J]. 野生动物, 2013, 34(4): 223-225, 242.

LIU J J, XIAO X H, XUE Y, et al. Protective effect of bear bile powder on alcohol-induced oxidative damage in mouse primary cultured hepatocytes [J]. Chin J Wild, 2013, 34(4): 223-225, 242.

[11] 董锐. 熊胆粉和熊去氧胆酸对 SD 大鼠肝癌的防治作用和机制探讨 [D]. 重庆: 西南大学; 2023.

DONG R. Preventive and therapeutic effects of bear bile powder and ursodeoxycholic acid on liver cancer in SD rats and its mechanism [D]. Chongqing: Southwest University; 2023.

[12] 洪泽宣. 熊胆粉的安全性及预防治疗肝癌的作用和机制研究 [D]. 重庆: 西南大学; 2021.

HONG Z X. Study on the safety of bear bile powder and its role and mechanism in prevention and treatment of liver cancer [D]. Chongqing: Southwest University; 2021.

[13] AZIZ K, LIMZERWALA J F, STURMLECHNER I, et al. Ccne1 overexpression causes chromosome instability in liver cells and liver tumor development in mice [J]. Gastroenterology, 2019, 157(1): 210-226.

[14] 余焕. 熊去氧胆酸对黑色素瘤细胞 M14 的抑制作用及机理研究 [D]. 厦门: 厦门大学; 2019.

YU H. Inhibitory effect and mechanism of ursodeoxycholic acid on melanoma cell M14 [D]. Xiamen: Xiamen University; 2019.

[15] KURMA K, MANCHES O, CHUFFART F, et al. DEN-induced rat model reproduces key features of human hepatocellular carcinoma [J]. Cancers, 2021, 13(19): 4981.

- [16] RODRÍGUEZ M J, SABAJ M, TOLOSA G, et al. Maresin-1 prevents liver fibrosis by targeting Nrf2 and NF- κ B, reducing oxidative stress and inflammation [J]. Cells, 2021, 10 (12): 3406.
- [17] PARK M K, LEE J C, LEE J W, et al. Effects of fermented rice bran on DEN-induced oxidative stress in mice: GSTP1, LINE-1 methylation, and telomere length ratio [J]. J Food Biochem, 2020, 44(7): e13274.
- [18] ITO N, IMAIDA K, ASAMOTO M, et al. Early detection of carcinogenic substances and modifiers in rats [J]. Mutat Res, 2000, 462(2/3): 209–217.
- [19] DAS B K, CHOUKIMATH S M, GADAD P C. Asarone and metformin delays experimentally induced hepatocellular carcinoma in diabetic milieu [J]. Life Sci, 2019, 230: 10–18.
- [20] KUMAR A, NAITHANI M, KUMAR N, et al. Piperlongumine inhibits diethylnitrosamine induced hepatocellular carcinoma in rats [J]. Hum Exp Toxicol, 2022, 41: 9603271211073593.
- [21] MUGURUMA M, KAWAI M, DEWA Y, et al. Threshold dose of piperonyl butoxide that induces reactive oxygen species-mediated hepatocarcinogenesis in rats [J]. Arch Toxicol, 2009, 83(2): 183–193.
- [22] SHIRAI T. A medium-term rat liver bioassay as a rapid *in vivo* test for carcinogenic potential; a historical review of model development and summary of results from 291 tests [J]. Toxicol Pathol, 1997, 25(5): 453–460.
- [23] OGISO T, TATEMATSU M, TAMANO S, et al. Comparative effects of carcinogens on the induction of placental glutathione S-transferase-positive liver nodules in a short-term assay and of hepatocellular carcinomas in a long-term assay [J]. Toxicol Pathol, 1985, 13(4): 257–265.
- [24] GHUFRAN H, AZAM M, MEHMOOD A, et al. Standardization of diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma rat model with time based molecular assessment [J]. Exp Mol Pathol, 2021, 123: 104715.
- [25] LIU Y Z, LU H L, QI X M, et al. Aristolochic acid I promoted clonal expansion but did not induce hepatocellular carcinoma in adult rats [J]. Acta Pharmacol Sin, 2021, 42(12): 2094–2105.
- [26] MIZUKAMI S, ICHIMURA R, KEMMOCHI S, et al. Induction of GST-P-positive proliferative lesions facilitating lipid peroxidation with possible involvement of transferrin receptor up-regulation and ceruloplasmin down-regulation from the early stage of liver tumor promotion in rats [J]. Arch Toxicol, 2010, 84 (4): 319–331.
- [27] WANG L, ZHENG L, WANG S Y, et al. Clonal analysis of gastric carcinoma and precancerous lesions and its relation to Ki-67 protein expression [J]. Neoplasma, 2009, 56(1): 48–55.
- [28] 赵锦燕, 刘丽雅, 万芸, 等. 熊胆粉对肝癌移植瘤裸鼠血管生成和细胞周期的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2013, 8 (7): 672–674, 686.
- ZHAO J Y, LIU L Y, WAN Y, et al. Impacts of Xiongdanfen on angiogenesis and cell cycle in the nude mice with hepatoma xenograft [J]. World J Integr Tradit West Med, 2013, 8(7): 672–674, 686.
- [29] LIU H, XU H W, ZHANG Y Z, et al. Ursodeoxycholic acid induces apoptosis in hepatocellular carcinoma xenografts in mice [J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(36): 10367–10374.
- [30] CHUNG G E, YOON J H, LEE J H, et al. Ursodeoxycholic acid-induced inhibition of DLC1 protein degradation leads to suppression of hepatocellular carcinoma cell growth [J]. Oncol Rep, 2011, 25(6): 1739–1746.
- [31] 董锐, 张梅, 洪泽宣, 等. 熊胆粉对 DEN + PBO 诱发大鼠肝癌早期阶段的影响研究 [J]. 中国实验动物学报, 2023, 31 (9): 1148–1155.
- DONG R, ZHANG M, HONG Z X, et al. Effects of bear bile powder on the early stage of hepatocarcinogenesis induced by DEN + PBO in SD rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2023, 31 (9): 1148–1155.
- [32] MCILWAIN D R, BERGER T, MAK T W. Caspase functions in cell death and disease [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015, 7(4): a026716.
- [33] JANSSENS S, TINEL A. The PIDDosome, DNA-damage-induced apoptosis and beyond [J]. Cell Death Differ, 2012, 19 (1): 13–20.
- [34] SHEIKH T I, VASLI N, PASTORE S, et al. Biallelic mutations in the death domain of PIDD1 impair caspase-2 activation and are associated with intellectual disability [J]. Transl Psychiatry, 2021, 11(1): 1.
- [35] 程延安, 袁利超, 党双锁, 等. 间断小剂量 DEN 诱发大鼠肝癌模型研究 [J]. 肿瘤防治杂志, 2005, 12(11): 806–808.
- CHENG Y A, YUAN L C, DANG S S, et al. Research of rat hepatocarcinogenesis model induced by low doses of DEN interruptedly [J]. J Qilu Oncol, 2005, 12(11): 806–808.
- [36] VALKO M, RHODES C J, MONCOL J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [J]. Chem Biol Interact, 2006, 160(1): 1–40.
- [37] 熊敏琪, 贾成林, 崔金刚, 等. 熊胆粉在麝香通心滴丸抗动脉粥样硬化中的作用机制研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(9): 1083–1089.
- XIONG M Q, JIA C L, CUI J G, et al. Study on the Mechanism of bear bile powder in anti-atherosclerosis of shexiang tongxin pills [J]. Chin J Integr Med, 2015, 35(9): 1083–1089.
- [38] 张庆镐, 徐惠波, 朴惠善. 注射用熊胆粉对大鼠脑血栓的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(9): 1360–1364.
- ZHANG Q G, XU H B, PIAO H S. Effect of Fel Ursi powder for injection on cerebral thrombosis in rats [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2005, 36(9): 1360–1364.
- [39] WANG X, LIANG G, ZHOU Y, et al. Ameliorative effect and mechanism of ursodeoxycholic acid on hydrogen peroxide-induced hepatocyte injury [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 4446.
- [40] LI C, ZHANG S, LI L, et al. Ursodeoxycholic acid protects against arsenic induced hepatotoxicity by the Nrf2 signaling pathway [J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 594496.