

· 药理 ·

# 葛花解醒方对肝癌细胞原位移植瘤小鼠端粒酶蛋白表达水平的影响

王镜辉<sup>1</sup>, 唐东昕<sup>1</sup>, 黄慧<sup>1</sup>, 罗莉<sup>1</sup>, 龙奉玺<sup>2</sup>, 李军<sup>2</sup>, 王定雪<sup>1</sup>, 杨柱<sup>2\*</sup>

(1. 贵阳中医学院第一附属医院, 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院, 贵阳 550025)

**[摘要]** 目的:探讨葛花解醒方对肝癌小鼠端粒酶蛋白的影响。方法:Balb/C 小鼠 32 只,除正常组 8 只外,其余制备供瘤体,建立 H22 小鼠肝癌细胞原位移植瘤模型,并随机分成 3 组,每组 8 只,分别为模型组、葛花解醒方低、高剂量组(20, 40 g·kg<sup>-1</sup>)。给药组以中药水煎剂 ig,正常组代以生理盐水,观察小鼠一般情况;体重、肝脏指数的变化;HE 染色观察肝脏病理损伤的情况;ELISA 检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT),天门冬氨酸氨基转移酶(AST),谷氨酰转移酶(GGT)的变化;Western blot 检测肝脏端粒酶蛋白含量的变化。结果:与正常组比较,模型组体重明显降低,肝脏指数,ALT,AST,GGT 水平及端粒酶蛋白水平明显升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,葛花解醒方高、低剂量组小鼠体重明显升高,ALT,AST,GGT 及端粒酶蛋白水平明显降低( $P < 0.05$ )。病理结果显示,模型组小鼠肝组织和细胞异型性明显,给药后小鼠肝脏病理损伤有所减轻。结论:葛花解醒方能减轻肝脏损伤,保护肝功能,通过抑制端粒酶蛋白表达,抑制其异常激活引起的细胞无限增殖,对小鼠肝癌原位移植瘤有一定的防治作用。

**[关键词]** 葛花解醒方; 肝癌; 原位移植瘤; 肝功能; 端粒酶蛋白

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)24-0073-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2015240073

**Effect of Gehua Jiecheng Fang on Protein Expression Level of Telomerase in Orthotopic Allograft HCC Mice** WANG Jing-hui<sup>1</sup>, TANG Dong-xin<sup>1</sup>, HUANG Hui<sup>1</sup>, LUO Li<sup>1</sup>, LONG Feng-xi<sup>2</sup>, LI Jun<sup>2</sup>, WANG Ding-xue<sup>1</sup>, YANG Zhu<sup>2\*</sup> (1. First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550002, China; 2. Guiyang College of TCM, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the influence of Gehua Jiecheng Fang (GJF) on the hepatic protein expression level of telomerase in mice. **Method:** The totally 32 Balb/C mice were randomly divided into the normal group (normal saline), the model group (normal saline), the low-and high-dose GJF groups (20, 40 g·kg<sup>-1</sup>) of 8 mice each. The orthotopic allograft hepatic cellular cancer (HCC) model of H22 ascites tumor cells was established. The general observation including the general growth in mice, weight, liver index was conducted the pathological changes of the left hepatic lobe was observes by using HE staining. The changes of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), glutamyltransferase (GGT) were detected by using ELISA. The protein expression level of telomerase in hepatic tissues was detected by using Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the weight decreased, liver index and the levels of ALT, AST, GGT and protein expression of telomerase increased in the model group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the weight increased, liver index and the levels of ALT, AST, GGT and protein expression of telomerase decreased in the low-and high-dose GJF groups ( $P < 0.05$ ). Hepatic tissue and cellular heteromorphism were obvious in the model mice and the damages were reduced in the GJF groups. **Conclusion:** GJF has certain effect on HCC model by reducing the liver damage, protecting the liver function, regulating the protein expression level of telomerase in mice and

**[收稿日期]** 20150430(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81160417,81460697);贵州省研究生工作站计划项目(黔教研合 JYSZ 字[2014]018);贵州省科学技术厅-贵阳中医学院科学技术联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7336 号)

**[第一作者]** 王镜辉, 硕士, 住院医师, 从事中医药防治肿瘤的基础及临床研究, Tel:13765081078, E-mail:547917662@qq.com

**[通讯作者]** \* 杨柱, 博士, 教授, 从事肿瘤的病因病机基础及临床研究, Tel:0851-85652079, E-mail:yangzhu20150426@163.com

restraining the cellular immortalization.

**[Key words]** Gehua Jiecheng Fang; hepatocarcinoma; orthotopic allograft; liver function; telomerase

肝细胞癌(HCC)在世界范围内是发病率第五,死亡率第三的癌症,其发病率处于逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>。现代医学认为肝癌初期首先发生癌前病变,肝癌前病变是介于肝的慢性病变与肝癌之间的一种病理状态,其中高级别异型增生结节(HGDN)最具诊断价值,其分子机制比较复杂,但这一过程被认为是可逆的<sup>[2-3]</sup>。越来越多的证据表明,累积的基因变化可能最终导致肝癌,因此早发现、早诊断、早治疗肝癌具有重要临床意义,一些新的手段在不久的将来或许能够用于肝癌的临床诊断<sup>[4]</sup>。缩短的端粒在增加罹患肝癌风险的同时也限制了癌症的进程,尽管其发病机制还不够明确,但端粒的稳定被认为是肝癌演变的先决条件,端粒酶则是影响细胞永生及癌变的重要因子,其异常激活为第一步致癌打击,已成为肝癌发生发展的一个主要危险因素<sup>[5-7]</sup>。该研究旨在运用蛋白印迹法观察健脾方药葛花解醒方对小鼠肝癌细胞原位移植瘤模型端粒酶蛋白表达水平的影响,初步探讨端粒酶在肝癌进程中的作用。

## 1 材料

**1.1 动物** 雄性 Balb/C 小鼠,由重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司提供,动物合格证号 SCXK(渝)2009-0007。鼠龄 6~8 周,体重(19±2)g,清洁级条件饲养。

**1.2 细胞** 小鼠肝癌 H22 细胞株,购于中国医学科学院肿瘤医院研究所。

**1.3 药物与试剂** 葛花解醒方(李东垣《脾胃论》:青皮 0.9 g,木香 1.5 g,橘皮、人参、猪苓、茯苓各 4.5 g,炒神曲、泽泻、生姜、白术各 6 g,豆蔻仁、葛花、砂仁各 15 g)。由贵阳中医学院第一附属医院药剂科按原方比例制备葛花解醒方水煎剂(生药质量分数分别为 2,4 g·mL<sup>-1</sup>);ELISA 试剂盒:丙氨酸氨基转移酶(ALT,批号 201411),天门冬氨酸氨基转移酶(AST,批号 201411),谷氨酰转移酶(GGT,批号 201411)均由齐一生物科技有限公司购自美国 TSZ 公司;兔抗小鼠 Telomerase(AB-2)单克隆抗体(美国 Millipore 公司,批号 SJ01519)。

**1.4 仪器** SW-CJ-2FD 型超净工作台(苏州净化设备有限公司),USA3131 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国热电公司),Nikon-TS100 型倒置相差显微镜(美国 Napeo 公司),RM2235 型莱卡病理切片机(德国 Leica 公

司),KH-BM 型石蜡自动包埋机(浙江科迪有限公司),Elx808IU 型酶标仪(美国 BIO-RAD 公司),GZX-9140MBE 型电热恒温干燥箱(上海博迅公司),FA2204N 型电子天平(上海菁海仪器有限公司),MLTRA GE MK2 型超纯水系统(英国 ELGA 公司),T10 型高速电动匀浆机(德国 IKA 公司),SHY-2A 型恒温水浴摇床(上海谷宁仪器有限公司),TGL-16G 型低温冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂),1658029 型电转移装置和垂直电泳系统(美国 BIO-RAD 公司)。

## 2 方法

**2.1 Balb/C 小鼠肝癌原位移植瘤(供瘤体)**<sup>[8]</sup> 本实验所用细胞经成功培养及细胞传代。取小鼠,用 75% 乙醇消毒小鼠下腹部。用 1 mL 注射器对小鼠腹腔注射 0.4 mL 细胞悬液。每天观察小鼠腹水情况,待腹部隆起后,抽取黄色细胞悬液。

**2.2 Balb/C 小鼠肝癌原位移植瘤模型**<sup>[9]</sup> 大量研究表明选取小鼠肝左叶,尤其是左肝外叶,在建立肝脏原位移植瘤模型时具有易于操作,成瘤率高等优点<sup>[10-14]</sup>。小鼠用 4% 水合氯醛 0.1 mL/只麻醉,在左腹腔做一长约 1 cm 横断面小切口。用手轻轻按压胸骨将肝左叶挤出切口。用 25 μL 微量注射器吸取 20 μL 细胞悬液。慢慢注射入通过切口暴露的左肝叶切口中。注射后用纱布按压止血,缝合切口,注意保暖及防止感染。

**2.3 分组及处理** 造模后 1 d,将小鼠分别称量、标记,并随机分成 4 组,每组 8 只,分别为正常组、模型组、葛花解方低剂量组和葛花解醒方高剂量组。每次灌胃 0.01 mL·g<sup>-1</sup>,每天 ig 1 次,共 14 d。给药量经预实验及参照文献[15]确定。停药 1 d 后称体重、麻醉后处死小鼠,摘除眼球取血,完整切取肝左叶并称重。将肝左叶用 4% 多聚甲醛固定,乙醇逐级脱水后石蜡包埋,其余部分迅速以液氮冻存,用于后续行分子生物学指标检测。

**2.4 观察指标** 小鼠实验前后的一般生长情况;体重、肝脏指数。

**2.5 病理组织形态学观察** 以 4% 多聚甲醛固定肝左叶,石蜡包埋,4 μm 连续切片,HE 染色后镜下观察左肝外叶病理变化。

**2.6 小鼠肝功能的测定** 小鼠血液静置 1 h 后放入离心机中,3 000 r·min<sup>-1</sup>,15 min 离心,离心后取

上清,将血清置于 2 mL 冻存管中,于 -80 °C 超低温冰箱中冻存,用于血清学测定,ALT,AST,GGT 水平按 ELISA 试剂盒说明书进行检测。

**2.7 肝组织蛋白的提取** 将肝组织按照 10% 裂解液匀浆,在电子天平上称取 50 mg 肝脏组织加入 500 μL 含 1% PMSF 的细胞裂解液→剪碎、充分匀浆后混匀→冰上静置 20 min→低温离心机 4 °C, 14 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min→取上清装入新的 EP 管,加入蛋白上样缓冲液→沸水 100 °C 煮 5 min 变性→分装保存待用。

**2.8 蛋白含量的测定及浓度调整** 以 BCA 蛋白定量试剂盒说明书进行操作,绘制标准曲线图并测定组织蛋白浓度。以细胞裂解液调整蛋白浓度,样品终质量浓度为 4.0 g·L<sup>-1</sup>,加入 5 × 蛋白样品缓冲液,95 °C 煮沸 5 min 进行上样。通过蛋白含量曲线分析测算样本蛋白含量。

**2.9 肝组织端粒酶蛋白表达水平的测定** 采用 Western blot 法检测端粒酶蛋白的表达水平。相对积分吸光度  $IA = \text{Telomerase } IA / \beta\text{-actin } IA$ 。通过凝胶电泳、转膜、免疫反应、化学发光显影,最后采用 Image-Pro Plus 软件进行 IA 分析。

表 1 葛花解醒方对治疗前后小鼠体重的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effect of Gehua Jiecheng Fang on weight between pre and post treatment in mice ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	造模前体重/g	造模结束后体重/g	肝脏指数/mg·g <sup>-1</sup>
正常	-	7	21.80 ± 0.92	27.33 ± 2.83	4.49 ± 0.53
模型	-	6	22.42 ± 0.59	22.65 ± 1.82 <sup>1)</sup>	7.67 ± 0.54 <sup>1)</sup>
葛花解醒方	20	7	21.90 ± 0.83	24.61 ± 2.04	6.25 ± 0.68 <sup>2)</sup>
	40	8	21.59 ± 0.75	24.41 ± 1.83	5.92 ± 0.71 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> P < 0.05;与模型组比较<sup>2)</sup> P < 0.05(表 2~3 同)。

**3.3 对小鼠肝左叶组织病理学的影响** 模型组小鼠左肝外叶肿瘤形成,表现为组织结构紊乱、肝小叶消失、汇管区消失、细胞密度增加、细胞增生、细胞核变大、核深染、形态不规则等特征性改变。表现出炎症反应、癌变、凋亡等过程的特征性改变。葛花解醒方

表 2 葛花解醒方对小鼠肝功能的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effect of Gehua Jiecheng Fang on liver function in mice ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	ALT/μg·L <sup>-1</sup>	AST/μg·L <sup>-1</sup>	GGT/μg·L <sup>-1</sup>
正常	-	7	8.72 ± 0.07	7.50 ± 0.33	11.69 ± 0.93
模型	-	6	17.38 ± 0.78 <sup>1)</sup>	17.01 ± 0.82 <sup>1)</sup>	25.10 ± 1.43 <sup>1)</sup>
葛花解醒方	20	7	11.56 ± 0.55 <sup>2)</sup>	11.18 ± 0.54 <sup>2)</sup>	17.13 ± 0.81 <sup>2)</sup>
	40	8	10.87 ± 0.87 <sup>2)</sup>	9.62 ± 0.70 <sup>2)</sup>	15.20 ± 0.62 <sup>2)</sup>

**3.5 对端粒酶蛋白表达水平的影响** 与正常组比较,模型组端粒酶蛋白表达水平明显升高(P < 0.05);与模型组比较,葛花解醒方高、低剂量组均能

**2.10 统计学分析** 采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析并行两两比较,以 P < 0.05 作为具有显著性差异的标准。

### 3 结果

**3.1 动物模型的建立及原位移植瘤的生长情况** 术中小鼠无死亡,原位移植瘤模型成功 24 例,成功率为 100%。灌胃过程中死亡 4 只。实验 2 周后处死并解剖小鼠,模型组小鼠肝左叶均可见肿瘤生长,其中 2 组有 2 只小鼠可见明显腹腔转移,其余各组均可见不同程度腹水,但未发现明显侵犯、种植或转移。各模型小鼠均出现不同程度被毛蓬松散乱,精神差,活动少,消瘦等状况。其中以模型组最为显著,各给药组一般状况明显优于模型组。小鼠上述症状随给药时间延长得到明显改善。

**3.2 对小鼠的体重、肝脏指数的影响** 与正常组比较,模型组小鼠体重明显降低,肝脏指数明显升高(P < 0.05);与模型组比较,肝脏指数明显降低(P < 0.05),体重变化不明显。葛花解醒方低、高剂量组间,造模结束后体重及肝脏指数无明显差异。见表 1。

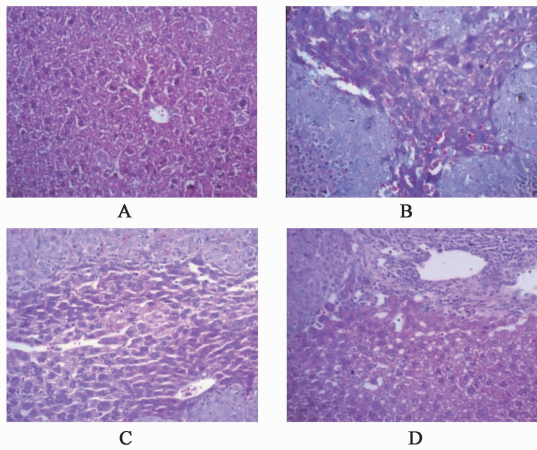
高、低剂量组均能明显改善以上病理特征。如图 1。

**3.4 对小鼠肝功能的影响** 与正常组比较,模型组血清中 ALT,AST,GGT 水平均有显著升高(P < 0.05);与模型组比较,治疗组血清中 ALT,AST,GGT 水平均有显著降低(P < 0.05)。见表 2。

明显降低端粒酶蛋白表达水平(P < 0.05)。见表 3。

### 4 讨论

肿瘤的防治已成为一个世界性难题,手术与放



A. 正常组; B. 模型组; C. 葛花解醒方 20 g·kg<sup>-1</sup> 组; D. 葛花解醒方 40 g·kg<sup>-1</sup> 组(图 2 同)

图 1 葛花解醒方对小鼠肝组织病理变化的影响(HE, ×200)

Fig. 1 Effect of Gehua Jiecheng Fang on pathological change in mice liver tissues(HE, ×200)

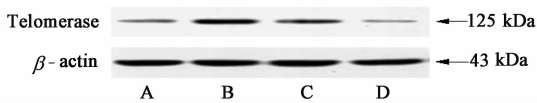


图 2 各组小鼠肝脏组织端粒酶蛋白的表达水平

Fig. 2 Expression level of Telomerase protein in each group of mice liver tissues

表 3 葛花解醒方对小鼠肝脏组织端粒酶蛋白表达水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Gehua Jiecheng Fang on expression level of telomerase protein in mice liver tissues ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Telomerase
正常	-	0.29 ± 0.02
模型	-	0.87 ± 0.15 <sup>1)</sup>
葛花解醒方	20	0.46 ± 0.07 <sup>2)</sup>
	40	0.35 ± 0.12 <sup>2)</sup>

化疗仍为主要手段,但其常表现出一定局限性与毒副作用,患者因不能耐受最终被迫停止治疗。大量研究表明<sup>[16-18]</sup>:传统中医药可抑制肝癌细胞增殖,诱导细胞凋亡,并有效抑制端粒酶活性,其具有减毒增效,改善症状,提高生存质量等特点,已逐渐成为研究的热点。对于肝癌的防治,预防和阻断肝癌前病变的继续发展是一个不错的突破口,主张辨证论治的基础上,应注意顾护脾胃,宜采用健脾法。这与中医学“治未病”思想不谋而合。《金匱要略》中先安未受邪之脏,充分体现了治未病思想在肝癌既病防治中的应用。古今医家均非常重视固护脾胃之气,脾胃为后天之本,留一分胃气则留一分生机。本

研究采用健脾法从根本上、早期防治肝癌,是切实可行的。肝癌以脾虚为本,水饮、湿热、瘀血停滞蕴结为标,脾虚日久,元气耗散。可表现出腹大硬满,腹壁青筋暴露、腹水、消瘦、精神萎靡等症状。作为健脾方药的代,葛花解醒方散渗结合,分消酒湿、温中健脾,攻补兼施疗肝疾。本方发汗与利水并行,消食理气与补气健脾同用,具有理气化湿、补益正气、散渗结合、消补兼施的功效,先安脾后治肝,肝脾同调,健脾以护肝,从现代药理研究上看,其主要成分及提取物还具有以下作用<sup>[19-23]</sup>:增强机体免疫功能;对肿瘤细胞的直接抑制和杀灭作用;抗氧化,清除自由基作用;抑制肿瘤细胞增殖,诱导凋亡;影响肿瘤基因的表达;抑制肿瘤细胞的浸润和转移,已展现出极大的抗癌潜力。

肝癌发生后,小鼠的正气及气血津液大量消耗,癌毒积聚成块可影响气血津液运行,导致气滞血瘀,痰凝湿阻。癌毒与气滞血瘀诸邪均为内生之邪,既是病理产物,又是致病因素,互为因果,形成恶性循环。最终出现恶液质及多脏功能衰竭。而正气具有抗癌作用,正气耗散时,癌毒会进一步扩散与转移。经葛花解醒方治疗后,一般状态好转,精神好转,体重明显增加,肝脏指数相应降低,高剂量组变化最明显。提示葛花解醒方改善了肝癌小鼠的常见症状(如腹水、癌痛、消瘦、精神萎靡等),瘤体局部进一步缩小,肝癌细胞停止扩散,小鼠体重及肝功能有所恢复,生存质量提高,一般状况改善,换言之,机体免疫保护功能大于肿瘤浸润、扩散能力,肝癌细胞暂时处于“静止”、“休眠”的状态,最终达到带瘤生存的目的,小鼠趋向于临床治愈的健康状态。虽然肝癌小鼠所表现出的腹大硬满,腹壁青筋暴露、腹水、消瘦、精神萎靡等症状,表面看去与脾虚气滞并不吻合,但湿阻化热、水液、瘀血内停等一系列病理变化都可以由脾虚气滞发展而来,故脾虚是其本,湿热、瘀血、水液滞留是其标。造模过程中小鼠未发生死亡,表明造模方法可行,实验结果对疗效评价可信度高。与模型组比较,葛花解醒方治疗组小鼠肿瘤明显缩小,肝细胞的形态和结构逐渐恢复,病理损伤程度减轻,疾病向愈,以高剂量葛花解醒方治疗效果更为显著。

另外,ALT广泛存在于全身,但尤以肝脏中含量最多<sup>[24]</sup>,AST主要分布于线粒体中,GGT主要储存在肝脏中。当肝细胞受损,细胞膜的通透性增加,甚或肝细胞坏死,细胞内的酶就会释放入血,使血液中酶的水平升高,通过测定此三者血清或血浆中的

水平,即可反映肝功能的变化<sup>[25-27]</sup>。本实验中经葛花解醒方治疗后,小鼠血清 ALT,AST,GGT 水平明显降低,笔者前期实验发现,葛花解醒方能减轻肝细胞的变性、坏死,减少细胞凋亡,对改善肝损伤,保护肝功能疗效确切<sup>[28-29]</sup>,而通过本实验,葛花解醒方抵抗并修复肝损伤的作用同样适用于肝癌变阶段。

一般情况下,端粒长度随年龄增加而逐步变短,细胞中端粒酶表达受到严格调控。大多数细胞在成癌之前已发生衰老,而大部分癌细胞都发生无限增殖,80%~90%的肿瘤组织中端粒酶表达显著升高,与肝癌的恶性程度关系密切<sup>[30]</sup>,因此衰老和癌变都可以作为细胞的终结。端粒酶被 hTERT 诱导后能以自身 RNA 为模板,添加端粒 DNA 重复片段到端粒末端,使其保持端粒长度而维持细胞持续分裂能力,受不良刺激损伤后,端粒酶异常激活从而获得无限增殖能力,并加速肿瘤的进展。近年来的研究显示<sup>[31]</sup>:癌的一个经典特征是恶性细胞的无限增殖,而细胞的突变逃逸主要表现在两方面,即:端粒稳定性和端粒酶表达的再活化。端粒,端粒酶,衰老及癌变的研究已开启了肿瘤防治的新领域。端粒末端的转移抑制基因 NME2 与端粒酶联合作用可降低端粒酶活性,持续的 NME2 表达可缩短癌细胞的端粒长度,其作为新型的端粒结合蛋白能够改变端粒酶的功能及端粒长度<sup>[32]</sup>。对于肝癌引起的多药耐药,端粒酶的过表达通过促进 mtDNA 损伤和细胞凋亡,可提高肝癌细胞的化疗敏感性<sup>[33]</sup>,端粒酶作为一个新的诊断肿瘤的标志物和预后因素,早已被广泛接受。但其作为一个调节细胞增殖的双刃剑,如何既避免对正常组织细胞的毒害又充分发挥其抗肿瘤作用,是一个亟需解决的难题<sup>[34]</sup>。另外,氧化应激可导致端粒结构与功能的改变,与此同时,端粒酶又可反过来保护细胞免受氧化应激,二者有一定协同作用。在正常细胞内,维持端粒酶正常表达,补充缩短的端粒长度,表现出的抗氧化作用与延缓细胞的衰老相关;肿瘤细胞中则完全相反,抗氧化作用可抑制端粒酶的过表达,促进端粒缩短,阻止癌细胞的永生生化改变,恢复正常的分裂能力,此作用可能与细胞氧化还原微环境有关<sup>[35]</sup>。

从本实验结果来看:葛花解醒方具有一定的保肝作用,可减少癌变、坏死的组织和细胞,对恢复肝脏的正常形态和结构也有一定作用。端粒酶在正常细胞中低表达,在肝癌组织中高表达,经葛花解醒方干预后,随剂量的增加而表达逐渐降低。在不同组别中出现的表达差异提示:该方可能是通过调节端

粒酶蛋白表达水平,阻止其永生生化改变起到防治肝癌的作用。高剂量组低于正常组,考虑与肿瘤细胞大量坏死有关。端粒酶蛋白通过调节端粒长度,可抑制细胞的激变和永生生化,起到抗癌作用,因而正常的端粒酶蛋白表达是重要的抗肿瘤体现。但是,端粒酶如何影响端粒长度,是否是唯一的决定条件还未被公认,这其中,端粒酶的核心成分-端粒酶 RNA 和端粒酶逆转录酶已被证实在端粒酶发挥作用时尤为重要<sup>[36]</sup>。

综上所述,肝炎、肝硬化、肝癌前病变到肝癌是一个不断变化的过程,肝脏的损害是一个逐渐积累的过程,因而从动态发展的角度研究端粒和端粒酶的变化更有助于探究其在肝癌防治中的作用机制,笔者利用此效应,将有利于靶向药物的进一步研发,为肝癌的防治提供更有价值的方向。

#### [参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90.
- [2] Di Tommaso L, Sangiovanni A, Borzio M, et al. Advanced precancerous lesions in the liver[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol,2013,27,269-284.
- [3] Gong L, Wei L X, Ren P, et al. Dysplastic nodules with glypican-3 positive immunostaining: a risk for early hepatocarcinoma[J]. PLoS One,2014,9(1):1-9.
- [4] Jens U Marquardt, Jesper B Andersen. Liver cancer oncogenomics: opportunities and dilemmas for clinical applications[J]. Hepat Oncol,2015,2(1):79-93.
- [5] Carulli L, Anzivino C. Telomere and telomerase in chronic liver disease and hepatocarcinoma[J]. World J Gastroenterol,2014,20(20):6287-6292.
- [6] Heim D, Cornils K, Schulze K, et al. Retroviral insertional mutagenesis in telomerase-immortalized hepatocytes identifies RIPK4 as novel tumor suppressor in human hepatocarcinogenesis[J]. Oncogene, 2015, 34,385-393.
- [7] Philippi C, Loretz B, Schaefer U F, et al. Telomerase as an emerging target to fight cancer-opportunities and challenges for nanomedicine[J]. Controlled Release, 2010,146(2):228-240.
- [8] Li Y, Wu S S, Xiong S S, et al. TERT promoter mutation during development of hepatoblastoma to hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2015, 62, 492-501.
- [9] 王进,王鹏,王友良,等. 川楝素对 H22 肝癌荷瘤小鼠的抑瘤作用[J]. 肿瘤,2010,30(12):1009-1014.
- [10] Chen T A, Wang J L, Hung S W. Recombinant VPI, an Akt inhibitor, suppresses progression of hepatocarcinoma

- carcinoma by inducing apoptosis and modulation of CCL2 production[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8):1-13.
- [11] Kornek M, Lukacs-Kornek V, Limmer A, et al. 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP)-formulated, immune-stimulatory vascular endothelial growth factor a small interfering RNA (siRNA) increases antitumoral efficacy in murine orthotopic hepatocellular carcinoma with liver fibrosis [J]. *Mol Med*, 2014(7/8):365-373.
- [12] Ng K T, Guo D Y, Cheng Q, et al. A garlic derivative, S-allylcysteine (SAC), suppresses proliferation and metastasis of hepatocellular carcinoma [J]. *PLoS One*, 2012, 7(2):e31655.
- [13] Bousserouel S, Bour G, Kauntz H, et al. Silibinin inhibits tumor growth in a murine orthotopic hepatocarcinoma model and activates the TRAIL apoptotic signaling pathway [J]. *Anticancer Res*, 2012, 32(7):2455-2462.
- [14] Han K Q, Huang, Gu W, et al. Anti-tumor activities and apoptosis-regulated mechanisms of bufalin on the orthotopic transplantation tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(24):3374-3379.
- [15] Tang T C, Man S, Lee C R, et al. Impact of metronomic UFT/cyclophosphamide chemotherapy and antiangiogenic drug assessed in a new preclinical model of locally advanced orthotopic hepatocellular carcinoma [J]. *Neoplasia*, 2010, 12(3):264-274.
- [16] 杨柱,田维毅,王文佳,等.葛根散等3首解酒方对乙醇致小鼠急性肝损伤的保护作用[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2010, 12(4):7-9.
- [17] 张延英,朱建坤,吴建军,等.贞芪酪蛋白肽药物血清诱导 Bel-7402 细胞分化的体外实验研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2008, 14(9):47-50.
- [18] 苏涛,孙宏晨,马旭东,等.人参皂苷 Rg3 抑制腺样囊性癌细胞 SACC-83 增殖作用研究[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2011, 17(23):195-198.
- [19] 朱晓莹,李韬,李盛毅,等.肿节风复方含药血清对肝癌 HepG2 细胞增殖、端粒酶及凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(2):109-112.
- [20] Lee M K, Cho S Y, Jang J Y, et al. Effect of Puerariae Flos and Puerariae Radix extracts on antioxidant enzymes in ethanol-treated rats [J]. *Am J Chin Med*, 2001, 29(2):343-354.
- [21] Konstanilnv S R, Zhu W Y, Williams B A, et al. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA [J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 43(2):225-235.
- [22] 高船舟,曲淑贤,吕广艳,等.20(R)-人参皂甙 Rg3 对 K562/ADM 细胞凋亡诱导的研究[J]. *大连医科大学学报*, 2001, 23(3):171-173.
- [23] 刘媛媛,陈友香,侯安继.羧甲基茯苓多糖对小鼠 T 淋巴细胞分泌细胞因子的影响[J]. *中药药理与临床*, 2006, 22(3/4):71-73.
- [24] 李志洲.猪苓多糖的提取及其锌配合物抗氧化性研究[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(2):45-50.
- [25] 夏小芳,周光耀.保肝汤对大鼠酒精性肝损伤治疗的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2010(5):1095-1097.
- [26] 张鹏,刘蓉,张霞,等.秦艽对小鼠酒精性肝损伤的保护作用 [J]. *中国医院药学杂志*, 2014 (21):1822-1825.
- [27] Tsuboya T, S Kuriyama, M Nagai, et al. Gamma-glutamyl transferase and cancer incidence; the Ohsaki cohort study [J]. *J Epidemiol*, 2012, 22(2):144-150.
- [28] 俞琦,王平,王文佳.葛根散等3首解酒方对急性酒精性肝损伤小鼠肝细胞凋亡的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2011, 26(9):2046-2048.
- [29] 俞琦,田维毅,杨柱.葛根散等3首解酒方对急性酒精中毒小鼠细胞因子水平的影响[J]. *时珍国医国药*, 2011, 22(5):1171-1173.
- [30] Shay J W, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer [J]. *Eur J Cancer*, 1997, 33(5):787-791.
- [31] Mocellin S, Pooley K A, Nitti D. Telomerase and the search for the end of cancer [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(2):125-133.
- [32] Kar A, Saha D, Purohit G, et al. Metastases suppressor NME2 associates with telomere ends and telomerase and reduces telomerase activity within cells [J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(6):2554-2565.
- [33] Yan J, Zhou Y, Chen D X, et al. Impact of mitochondrial telomerase over-expression on drug resistance of hepatocellular carcinoma [J]. *Am J Transl Res*, 2015, 7(1):88-99.
- [34] Shay J W, Wright W E. Telomerase: a target for cancer therapeutics [J]. *Cancer Cell*, 2002, 2(4):257-265.
- [35] 何梦瑶,隋宜伦,谢飞舟,等.端粒-端粒酶系统与氧化还原微环境 [J]. *生物物理学报*, 2012, 28(5):411-421.
- [36] Zaug A J, Crary S M, Fioravanti M J. Many disease-associated variants of hTERT retain high telomerase enzymatic activity [J]. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41(19):8969-8978.

[责任编辑 周冰冰]