

叶下珠复方Ⅱ号对二乙基亚硝胺诱导大鼠肝癌形成的抑制作用及机制

罗来育¹, 陈斯泰¹, 李常青^{1*}, 李小翠², 黄玉影²

(1. 广州中医药大学热带医学研究所, 广州 510405; 2. 广州中医药大学中药学院, 广州 510405)

[摘要] 目的:观察叶下珠复方Ⅱ号抑制二乙基亚硝胺(DEN)诱导的大鼠肝癌形成效果,并探讨其作用机制。方法:将240只SPF级雄性Wistar大鼠随机分为正常组,模型组,叶下珠复方Ⅱ号高、中、低剂量(23.14, 11.57 g·kg⁻¹)组,喃氟啉组,采用DEN诱导肝癌大鼠模型,造模18周,同时给药进行干预,每6周各组处死大鼠8只,观察大鼠一般情况,肝功能指标变化和肝癌结节形成情况,镜下观察大鼠肝组织病理变化,放免法检测大鼠血清白细胞介素-6(IL-6)含量;采用实时定量PCR(qRT-PCR)法、免疫印迹法(Western blot)分别检测肝组织IL-6信号通路及microRNA let-7a调控网络基因的mRNA和蛋白表达改变。结果:实验第18周末,叶下珠复方Ⅱ号高、低剂量组大鼠肝癌结节数较模型组明显减少($P < 0.05$);叶下珠复方Ⅱ号高、低剂量组大鼠血清IL-6,谷丙转氨酶(ALT),谷草转氨酶(AST)水平与模型组比较均明显降低($P < 0.05$);与模型组比较,叶下珠复方Ⅱ号高剂量组大鼠肝组织microRNA let-7a表达量明显上升,转录因子蛋白家族(NF- κ B-p65),IL-6,信号转导与转录激活因子3(STAT3),Harvery鼠肉瘤病毒Ras基因(Ras)和原癌基因(C-myc)mRNA表达量均明显降低($P < 0.05$)。实验第18周,叶下珠复方Ⅱ号高、低剂量组STAT3和p-STAT3蛋白表达均明显低于模型组($P < 0.05$)。结论:叶下珠复方Ⅱ号对DEN诱导的大鼠肝癌形成具有明显的抑制作用,作用机制与上调microRNA let-7a表达和下调NF- κ B-p65的表达,从而抑制IL-6的表达和IL-6/STAT3信号通路活化有关。

[关键词] 肝细胞癌; 白细胞介素-6; 炎症; 微小RNA

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)08-0126-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016080126

Inhibitory Effect and Mechanism of Compound Phyllanthus Urinsria II (CPU II) on Formation of Liver Cancer in Rats Induced by DEN

LUO Lai-yu¹, CHEN Si-tai¹, LI Chang-qing^{1*}, LI Xiao-hui², HUANG Yu-ying²

(1. Institute of Tropical Medicine, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guangzhou 510405, China; 2. School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the inhibitory effect of Compound phyllanthus Urinsria II (CPU II) on formation of liver cancer in rats induced by diethylnitrosamine (DEN), and explore its anti-cancer mechanism. **Method:** Two hundred and forty SPF grade Wistar male rats were randomly divided into normal group, model group, CPU II high dose group (23.14 g·kg⁻¹), low dose group (11.57 g·kg⁻¹), and tegafur group. Rat models of liver cancer were induced by DEN for eighteen weeks, and medicine intervention was done at the same time according to the experimental design for eighteen weeks. 8 rats were sacrificed in each group after treatment for every 6 weeks, to observe the general condition, hepatic function index and nodule formation of liver cancer of the rats. Pathologic changes of liver tissues were observed under microscope. Radioimmunoassay method was used to

[收稿日期] 20150918(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81373524);广东省科技计划重点项目(2011A030100008)

[第一作者] 罗来育, 硕士, 实习研究员, 从事中药药理及新药开发研究, Tel:020-36585419, E-mail:luolaiyugzy@163.com

[通讯作者] *李常青, 博士, 研究员, 从事肝病治疗的新药开发研究, Tel:020-36585419, E-mail:gzlxh2002@163.com

determine the levels of interleukin (IL) -6 in serum of rats. Gene expression levels of mRNA and protein related to IL-6 signal pathway and microRNA let-7a regulatory network of the liver tissues were detected respectively by real-time fluorescent quantitative PCR and Western blot method. **Result:** At the end of eighteenth week, the number of nodules of liver cancer in rats of CPU II high dose group and low-dose group was significantly reduced as compared with that in the model group ($P < 0.05$); levels of IL-6, ALT and AST in serum of rats in CPU II high dose group and low dose group were significantly decreased ($P < 0.05$); the expression level of microRNA let-7a in liver tissues increased obviously in CPU II high dose group as compared with that in model group, while the mRNA expression levels of NF- κ B-p65, IL-6, STAT3, RAS and c-myc genes were significantly decreased ($P < 0.05$). The protein expression levels of STAT3 and p-STAT3 were also obviously reduced in CPU II high dose group and low dose group as compared with that in model group ($P < 0.05$). **Conclusion:** CPU II can effectively inhibit the formation of liver cancer in rats induced by DEN through inhibiting IL-6 expression and activation of IL-6/STAT3 signaling pathway, and its mechanism may be related with up-regulating microRNA let-7a expression and down-regulating NF- κ B-p65 expression.

[**Key words**] hepatocellular carcinoma; interleukin-6; inflammation; microRNA

肝细胞癌简称肝癌(HCC),是临床上最常见的恶性肿瘤之一,全球发病率逐年增长,发病率居恶性肿瘤的第5位,居肿瘤相关死亡率的第3位。目前的研究表明大部分肝癌是在多年的慢性肝脏炎症导致的肝硬化基础上发生,炎症是癌变的主要病因^[1]。白细胞介素-6(IL-6)是连接肝脏炎症与肝癌分子信号通路的中心环节,在炎症恶性转化,促进肝癌细胞增殖,抑制肿瘤细胞凋亡和促进肿瘤浸润转移过程中起重要作用,其表达受复杂的信号通路网络调控^[2]。二乙基亚硝胺(DEN)诱导的肝癌模型,经过肝细胞损伤,炎症反应-肝硬化-癌变3个阶段,与人肝癌发生的过程相似,其癌变发生的关键病理机制为IL-6的表达增加及信号通路的活化^[3]。IL-6是microRNA let-7a调控的靶基因;IL-6的表达既受核转录因子- κ B(NF- κ B)的正调控,又受microRNA let-7a的负调控^[4],DEN诱导的肝癌模型发生过程中IL-6表达增加,是否与NF- κ B表达增加或let-7a表达减少有关未见文献报道。

叶下珠复方II号由叶下珠、丹参、太子参等药物组成,具有清热活血健脾补肾作用,经研究证实有较好的抗炎保肝作用^[5],可以明显抑制肝癌实体瘤的生长^[6],但其抗炎保肝与抗癌作用的内在联系机制尚不清楚。本实验采用DEN诱导建立大鼠肝癌模型,观察该复方抗抑制肝癌形成的作用效果,并从IL-6信号通路网络失衡调节,探讨其抗肝癌作用的新机制。

1 材料

1.1 实验动物 雄性健康SPF级Wistar大鼠,体重170~230g,120只由中山大学实验动物中心提

供,合格证号SCXK(粤)2011-0029,120只由南方医科大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(粤)2011-0015,饲养于广州中医药大学动物中心,自由摄食与摄水,基础饲料由广州中医药大学动物中心提供。

1.2 药物 叶下珠复方II号,由叶下珠、丹参、太子参、旱莲草、甘草等组成,实验药材由广州市药材公司提供,经鉴定合格(含各药材主要有效成分含量检测),采用标准的水提醇沉工艺制备,浓缩至含生药2.6g·mL⁻¹浓度提取物(广州泽力医药科技有限公司,批号T20131201),-20℃冻存备用。

1.3 试剂 二乙基亚硝胺(美国Sigma公司,批号049k1613v); 喃氟定(齐鲁制药有限公司,批号301001LD);总RNA提取试剂盒(美国Invitrogen公司,批号15596-018);SYBR Green PCR Master Mix(日本TOYOBO公司,批号QPK-201C);信号转录与转录激活因子3(STAT3)兔单克隆抗体(Genetex公司,批号9145);p-STAT3兔单克隆抗体(Cellsignaling公司,批号4050-05);辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗(Goat Anti-Rabbit IgG,美国Southern biotech公司,批号KC-5A08),HRP标记的内参 β -actin抗体(上海康成生物公司,批号KC-5A08)。各基因检测引物和内参引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。let-7a逆转录引物由广州莱德尔生物科技有限公司合成。IL-6放免检测试剂盒(北京华卓力特生物技术研究,批号20140925)。医用X射线胶片(美国柯达公司,批号XBT-1);聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(美国Millipore公司,批号WBKLS0500)。

1.4 仪器 ELX800 型全自动酶标仪(美国 Biotek 公司);PRISM[®] 7500 型 Sequence Detection System (美国 ABI 公司);EPS301 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(中国广州光学仪器厂)。

2 方法

2.1 大鼠肝癌模型制备及给药方法 SPF 级雄性 Wistar 大鼠,体重 170~230 g,总共 240 只。适应性饲养 7 d,按体重随机分为 5 组,每组动物 48 只。分别为正常组,模型组,叶下珠复方 II 号高、低剂量(23.14,11.57 g·kg⁻¹·d⁻¹,经体表面积换算后,相当于临床使用剂量 1,0.5 倍)组,喃氟定(82.7 mg·kg⁻¹·d⁻¹,经体表面积换算后,相当临床使用剂量)组。除正常组以外,其余 4 组实验大鼠均每周第 1 天以 10 mg·kg⁻¹灌胃 DEN 2.5 g·L⁻¹溶液,剩余 6 d 饮用 80 mg·L⁻¹ DEN 水溶液,至实验模型制备结束,共 18 周。

在造模同时,叶下珠复方 II 号高、低剂量组和喃氟定治疗组按将上述药物剂量 *ig* 给药,每天 1 次;正常组、模型组大鼠均给予等体积蒸馏水 *ig*,连续给药至实验结束。大鼠每周称重 1 次,并根据体重变化调整给药的剂量。给药期间所有大鼠给予基础饲料饲养。共 18 周。

整个实验过程记录大鼠一般情况,体重变化及存活数量。于实验第 6,12,18 周各组随机抽取 8 只大鼠,经腹主动脉采血,放免法检测大鼠血清 IL-6 含量,自动生化分析仪检测大鼠血清谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)水平,取肝组织,待检;对全部所取肝脏形态,颜色,质地,表面癌结节数进行观察和记录。

2.2 肝组织病理学观察 10% 甲醛溶液固定肝组织,石蜡包埋切片,常规苏木素伊红(HE)染色,光镜下观察,肿瘤组织采用 Edmondson 分级。

2.3 实时荧光定量 PCR 检测大鼠肝组织 IL-6 信号通路及 microRNA 调控网络基因的 mRNA 表达 第 6,12,18 周末各组随机抽取 8 只大鼠,处死后取肝组织,检测 microRNA let-7a 表达;检测第 18 周大鼠 NF-κB-p65,IL-6 mRNA 表达,再从其中各组取 4 只大鼠,检测肝组织 STAT3, Ras, C-myc 基因的 mRNA 表达。以 Trizol 法提取肝组织总 RNA,分别测定 260,280 nm 处吸光度 *A*, *A*₂₆₀/*A*₂₈₀ 均 > 1.8。每样本取 RNA 1 μL 合成 cDNA,按说明书操作步骤进行。以 cDNA 为模板进行荧光定量 PCR 检测,各样本基因检测按 20 μL 体系,分别扩增 microRNA let-7a 和

snRNA U6 (内参),NF-κB-p65,IL-6,STAT3,Ras,C-myc 基因的 mRNA 和肌动蛋白(β -actin)。扩增条件:95 ℃ 5 min,95 ℃ 15 s,60 ℃ 15 s,72 ℃ 32 s,共 40 个循环。融解曲线分析:温度 60~95 ℃。利用 ABI 公司自带的 PCR 系统软件分析,观察扩增曲线,计算样本 $\Delta\Delta C_t$ 值,以 $\Delta\Delta C_t$ 值的负数为指数计算 $2^{-\Delta\Delta C_t}$,采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 相对定量法计算各组基因的相对表达量。见表 1。

表 1 PCR 引物序列及产物长度

Table 1 PCR primer sequence and extent

| 引物 | 序列 | 产物长度 /bp |
|----------------|-----------------------------|----------|
| let-7a | 5'-ACACTCCAGCTGGGTGAGGTAG | 72 |
| | TAGGTTGT-3' | |
| U6 | 5'-CTCAACTGGTGTCTGCGGA-3' | 94 |
| | 5'-AAGCCTTCACGAATTTGCGT-3' | |
| NF-κB-p65 | 5'-GACGATCTGTTCCCTCAT-3' | 150 |
| | 5'-GCTTCTCTCCCAGGAATAC-3' | |
| IL-6 | 5'-CTGGAGTTCGGTTTCTACCT-3' | 202 |
| | 5'-GCCACTCCTTCTGTGACTCT-3' | |
| STAT3 | 5'-TAGGTGAGGTGGGACAGACT-3' | 150 |
| | 5'-AGGTGGCTTTGAGTCACTGA-3' | |
| Ras | 5'-TAGACACGAAACAGGCTCAG-3' | 71 |
| | 5'-TGTCTTCGCTGAGGTCTCAAT-3' | |
| C-myc | 5'-TGTAGTAATTCCAGCGAGAG-3' | 247 |
| | 5'-CGCAGATTGTAAGTCCAG-3' | |
| β -actin | 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACAT-3' | 150 |
| | 5'-GAACCGCTCATTGCCGATAG-3' | |

2.4 Western blot 检测大鼠肝组织 STAT3,p-STAT3 的蛋白表达 第 18 周末各组随机抽取大鼠 4 只,裂解液裂解大鼠肝组织,提取蛋白;蛋白定量,按照总蛋白浓度一致进行电泳,用湿转方法转至 PVDF 膜上;5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h,分别加入一抗(STAT3 兔单抗,p-STAT3 兔单抗, β -actin 羊抗兔 1:300,1:2 000,1:20 000),4 ℃ 孵育过夜后加入二抗(1:20 000),室温 1 h;洗膜后化学发光,显影,定影。使用图像分析软件对条带灰度进行分析,计算目的蛋白/内参蛋白。

2.5 统计方法 采用 SPSS 10.0 软件对各组数据进行处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 One-ANOVA,方差齐时多组间两两比较采用 LSD,方差不齐时采用 Dunnett-*t*₃ 检验法,*P* < 0.05 为差异有统

计学意义。

3 结果

3.1 叶下珠复方 II 号对大鼠一般情况的影响 正常组的大鼠精神状态良好,反应灵敏,动作自如,皮毛有光泽且体重持续上升,未见动物死亡。模型组大鼠有反应不灵敏,脱毛或毛色枯黄,行动迟缓等表现。实验 18 周末,与模型组比较,叶下珠复方 II 号高、低剂量组及喃氟定组大鼠体重均明显低于正常组 ($P < 0.05$)。

自诱癌第 5 周末,模型组开始有大鼠死亡,整个造模及给药期间,模型组,叶下珠复方 II 号高、低剂

量组及喃氟定组大鼠死亡率差异无显著性意义。

3.2 叶下珠复方 II 号对大鼠肝脏表面肝癌结节形成的影响 正常组的大鼠肝脏表面光滑,色淡红,边缘锐利,质地软。模型组大鼠随着诱癌过程的进行,经历肝炎,肝硬化阶段而形成肝癌。诱癌第 6 周末各组大鼠肝脏未见有结节出现。至第 12 周末各组大鼠肝脏表面出现少量肝癌结节。第 18 周末与正常组比较,模型组大鼠肝脏表面出现大量肝癌结节 ($P < 0.05$);叶下珠复方 II 号高、低剂量组和喃氟定组肝脏表面癌结节数较模型组明显减少 ($P < 0.05$)。见图 1,表 2。



A. 正常组;B. 模型组;C~D. 叶下珠复方 II 号高、低剂量(23.14, 11.57 $g \cdot kg^{-1}$)组;E. 喃氟定组(图 2,3 同)

图 1 第 18 周各组肝脏表面肝癌结节观察

Fig.1 Gross observation of liver in rats of different groups

表 2 各组大鼠肝脏表面肝癌结节数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Comparison of liver cancer nodule numbers in liver surface of rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量 $/g \cdot kg^{-1}$ | 12 周 | 18 周 |
|------------|--------------------------|-----------------|--------------------------------|
| 正常 | - | - | - |
| 模型 | - | 3.00 \pm 2.83 | 15.25 \pm 2.82 ¹⁾ |
| 叶下珠复方 II 号 | 23.14 | 3.00 \pm 0.00 | 5.75 \pm 2.49 ²⁾ |
| | 11.57 | 1.00 \pm 0.00 | 6.75 \pm 1.28 ²⁾ |
| 喃氟定 | 0.082 7 | 2.25 \pm 1.26 | 3.00 \pm 1.31 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 ~ 7 同)。

3.3 叶下珠复方 II 号对大鼠血清 IL-6 水平的影响 实验第 6, 12, 18 周模型组大鼠血清 IL-6 水平明显高于正常组 ($P < 0.05$);叶下珠复方 II 号高、低剂量组和喃氟定组血清 IL-6 水平均明显低于模型组 ($P < 0.05$)。见表 3。

3.4 叶下珠复方 II 号对大鼠肝功能的影响 第 18 周模型组大鼠 ALT, AST 水平较正常组明显升高 ($P < 0.05$),第 18 周末叶下珠复方 II 号高、低剂量组 ALT, AST 水平均明显低于模型组 ($P < 0.05$)。结果表 4,5。

3.5 叶下珠复方 II 号对大鼠肝脏病理改变的影

响 正常组大鼠肝小叶结构正常,细胞中央静脉清晰可见,围绕中央静脉呈放射状分布的肝细胞索排列有序,肝细胞核呈圆形大小一致。第 6, 12, 18 周末模型组大鼠呈现肝细胞炎性损伤,肝硬化结节形成和癌变形成病理改变,具有明显的肝细胞损伤,炎症反应—肝硬化—癌变 3 个阶段病理演变特征。

除模型组外,第 18 周末,各实验组大鼠均出现不同程度的肝癌病变。但模型组大鼠肝细胞异型性增生明显,大部分增生肝细胞出现核异质变,细胞核仁普遍增大,细胞成倍增大,且染色较深,可见有个别核分裂,排列紊乱,部分有空泡状,癌病变 III 级。叶下珠复方 II 号高、低剂量组,喃氟定组大鼠细胞染色较深,可见有个别核分裂,部分有空泡状。叶下珠复方 II 号高剂量组大鼠细胞癌病变 II ~ III 级,叶下珠复方 II 号低剂量组,喃氟定组大鼠细胞癌病变 III 级;叶下珠复方 II 号高剂量组与模型组比较,肝细胞变性坏死较轻,肿瘤病灶数减少。见图 2。

3.6 叶下珠复方 II 号对大鼠肝组织 microRNA let-7a/IL-6 信号通路网络调控基因 mRNA 表达的影响

3.6.1 叶下珠复方 II 号对肝组织 microRNA let-7a 表达的影响 第 18 周末,与正常组比较,模型组大鼠肝组织 microRNA let-7a 表达量明显降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,叶下珠复方 II 号高剂量组大

表 3 叶下珠复方 II 号对各组大鼠 IL-6 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 6 周 | 12 周 | 18 周 |
|------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 正常 | - | 19.72 ± 5.19 | 24.32 ± 6.57 | 22.87 ± 7.12 |
| 模型 | - | 44.99 ± 8.36 ¹⁾ | 85.49 ± 21.02 ¹⁾ | 147.49 ± 31.08 ¹⁾ |
| 叶下珠复方 II 号 | 23.14 | 22.67 ± 5.91 ²⁾ | 45.73 ± 7.98 ²⁾ | 103.45 ± 24.95 ²⁾ |
| | 11.57 | 44.07 ± 10.19 | 49.13 ± 11.25 ²⁾ | 103.76 ± 24.00 ²⁾ |
| 喃氟定 | 0.082 7 | 20.26 ± 4.83 ²⁾ | 45.44 ± 5.83 ²⁾ | 101.82 ± 22.25 ²⁾ |

表 4 叶下珠复方 II 号对各组大鼠谷丙转氨酶 (ALT) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 6 周 | 12 周 | 18 周 |
|------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| 正常 | - | 37.14 ± 3.59 | 40.00 ± 6.57 | 38.71 ± 6.61 |
| 模型 | - | 81.86 ± 16.37 ¹⁾ | 87.57 ± 14.94 ¹⁾ | 409.67 ± 142.89 ¹⁾ |
| 叶下珠复方 II 号 | 23.14 | 63.43 ± 6.08 ²⁾ | 67.33 ± 4.33 | 190.33 ± 29.00 ²⁾ |
| | 11.57 | 69.29 ± 10.53 | 85.60 ± 21.52 | 233.67 ± 17.33 ²⁾ |
| 喃氟定 | 0.082 7 | 64.29 ± 8.61 ²⁾ | 77.17 ± 25.56 | 210.75 ± 78.69 ²⁾ |

表 5 叶下珠复方 II 号对各组大鼠谷草转氨酶 (AST) 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 6 周 | 12 周 | 18 周 |
|------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| 正常 | - | 133.00 ± 18.00 | 136.57 ± 11.18 | 143.75 ± 12.50 |
| 模型 | - | 179.57 ± 22.37 ¹⁾ | 224.17 ± 27.22 ¹⁾ | 456.29 ± 104.33 ¹⁾ |
| 叶下珠复方 II 号 | 23.14 | 172.14 ± 26.16 | 192.71 ± 20.04 ²⁾ | 256.33 ± 29.56 ²⁾ |
| | 11.57 | 177.33 ± 28.11 | 204.33 ± 20.22 | 346.00 ± 79.00 ²⁾ |
| 喃氟定 | 0.082 7 | 175.43 ± 19.51 | 192.75 ± 18.69 ²⁾ | 327.00 ± 18.33 ²⁾ |

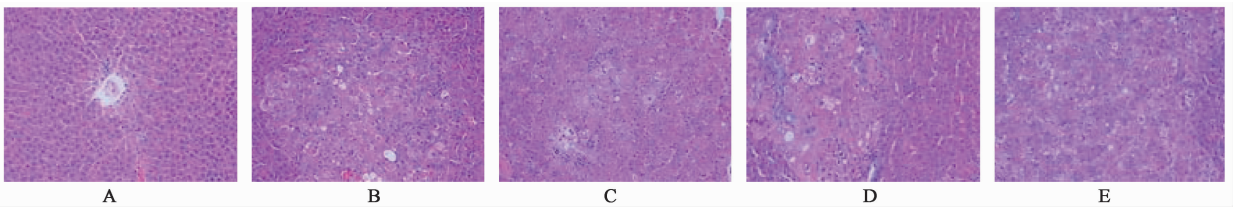


图 2 各组大鼠肝组织病理观察 (HE, ×200)

Fig. 2 Liver pathology of rats in different groups (HE, ×200)

鼠肝组织 microRNA let-7a 表达量明显上升 ($P < 0.05$)。见表 6。

3.6.2 叶下珠复方 II 号对大鼠肝组织 NF- κ B-p65, IL-6, STAT3, Ras, C-myc mRNA 表达的影响 第 18 周末,与正常组比较,模型组大鼠肝组织 NF- κ B-p65, IL-6, STAT3, Ras, C-myc mRNA 表达量均明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比较,叶下珠复方 II 号高剂量组大鼠肝组织 NF- κ B-p65, IL-6, STAT3, Ras, C-myc mRNA 表达量均明显降低 ($P < 0.05$)。见表 7。

3.7 叶下珠复方 II 号对大鼠肝组织 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达的影响 第 18 周末,模型组大鼠肝组织 STAT3, p-STAT3 蛋白表达均明显高于正常组 ($P < 0.05$);叶下珠复方 II 号高、低剂量组大鼠肝组织 STAT3, p-STAT3 蛋白表达均明显低于模型组 ($P < 0.05$)。见图 3,表 8。

4 讨论

IL-6 作为一种旁分泌或自分泌的促炎与生长因子,与许多炎症相关恶性肿瘤的发生过程密切相关^[2,7]。IL-6 异常的分泌,通过激活蛋白酪氨酸激

表 6 各组大鼠 microRNA let-7a 的相对表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 6 Relative expression value of microRNA let-7a in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | 6 周 | 12 周 | 18 周 |
|------------|-----------------------|-------------|-------------|---------------------------|
| 正常 | - | 1.00 ± 0.26 | 1.00 ± 0.15 | 1.00 ± 0.13 |
| 模型 | - | 1.09 ± 0.27 | 0.86 ± 0.32 | 0.70 ± 0.06 ¹⁾ |
| 叶下珠复方 II 号 | 23.14 | 1.06 ± 0.33 | 0.91 ± 0.22 | 0.97 ± 0.27 ²⁾ |
| | 11.57 | 1.16 ± 0.22 | 0.88 ± 0.17 | 0.88 ± 0.10 |
| 喃氟定 | 0.082 7 | 1.33 ± 0.29 | 0.91 ± 0.24 | 0.91 ± 0.07 ²⁾ |

表 7 各组大鼠 NF-κB-p65, IL-6, STAT3, Ras, C-myc mRNA 相对表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Relative mRNA expression value of NF-κB-p65, IL-6, STAT3, Ras, C-myc in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | NF-κB-p65 | IL-6 | STAT3 | Ras | C-myc |
|------------|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 1.00 ± 0.07 | 1.00 ± 0.17 | 1.00 ± 0.17 | 1.00 ± 0.11 | 1.00 ± 0.20 |
| 模型 | - | 1.32 ± 0.09 ¹⁾ | 1.44 ± 0.25 ¹⁾ | 1.44 ± 0.25 ¹⁾ | 1.65 ± 0.17 ¹⁾ | 1.33 ± 0.13 ¹⁾ |
| 叶下珠复方 II 号 | 23.14 | 0.66 ± 0.38 ²⁾ | 0.45 ± 0.24 ²⁾ | 0.45 ± 0.24 ²⁾ | 0.85 ± 0.27 ²⁾ | 0.90 ± 0.16 ²⁾ |
| | 11.57 | 1.13 ± 0.49 | 0.49 ± 0.38 ²⁾ | 0.49 ± 0.38 ²⁾ | 0.89 ± 0.18 ²⁾ | 1.26 ± 0.24 |
| 喃氟定 | 0.082 7 | 0.80 ± 0.25 ²⁾ | 0.44 ± 0.31 ²⁾ | 0.44 ± 0.31 ²⁾ | 1.11 ± 0.31 ²⁾ | 1.08 ± 0.19 |

表 8 各组大鼠 STAT3 和 p-STAT3 蛋白相对表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 8 Relative expression value of STAT3 and p-STAT3 protein in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

| 组别 | 剂量/g·kg ⁻¹ | STAT3 | p-STAT3 |
|------------|-----------------------|-----------------------------|---------------------------|
| 正常 | - | 0.29 ± 0.00 | 0.16 ± 0.00 |
| 模型 | - | 0.97 ± 0.03 ¹⁾ | 0.23 ± 0.01 ¹⁾ |
| 叶下珠复方 II 号 | 23.14 | 0.30 ± 0.00 ^{2,3)} | 0.11 ± 0.00 ²⁾ |
| | 11.57 | 0.30 ± 0.00 ^{2,3)} | 0.15 ± 0.01 ²⁾ |
| 喃氟定 | 0.082 7 | 0.06 ± 0.00 ²⁾ | 0.20 ± 0.01 ²⁾ |

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$;与喃氟定组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

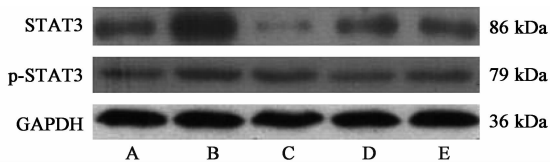


图 3 各组大鼠 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达

Fig. 3 Protein expressions of STAT3 and p-STAT3 in rats of different groups

酶/转录激活子 3 (JKA/STAT3), 基因 Ras/蛋白激酶 (Ras/Erk), 磷脂酰肌醇-3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K/AKT) 信号通路, 促进细胞的恶性转化, 癌细胞增殖失控和凋亡减少, 促进肿瘤血管的生成和肿瘤的侵袭转移, 并通过促进肿瘤局部炎症反应和肿瘤干细

胞自我更新等机制, 参与肿瘤的发生和发展的各个环节, 促进肿瘤的发生和发展^[8-12]。

DEN 诱导的肝脏癌变由肝细胞坏死发起, 明显依赖 IL-6 产生的炎症反应和补偿性增殖, 敲除小鼠体内的 IL-6 基因, 几乎可以完全阻断 DEN 诱导的肝脏癌变的发生, 其肝癌演变机制主要为 DEN 在肝脏内被转换成亲电子形式, 诱导 DNA 损伤和基因突变, 并造成肝细胞坏死, 坏死的肝细胞碎片主要通过 Toll-like 受体 (TLR) 信号激活肝组织内的巨噬细胞 (KCs), 活化肝脏 KCs 内核心转录因子 NF-κB, 促进 IL-6 的转录^[3]。

microRNA let-7 家族作为一种抑癌基因, 在人肝癌组织和多种肝癌细胞株中表达明显下调^[5,13]。已证实 let-7a 调控的靶基因为 IL-6, Ras, HMGA2, let-7a 通过标准的 microRNA 作用方式抑制 IL-6, Ras, HMGA2 基因表达, 进而抑制肝癌细胞和肝癌肿瘤生长^[5,14-15]。

本研究显示 DEN 诱导的大鼠肝癌模型, 在肝细胞损伤, 炎症反应 (实验 6 周), 肝硬化 (实验 12 周), 癌变 (实验 18 周) 3 个阶段, 呈现大鼠血清 IL-6, ALT, AST 水平的逐步升高, 而肝组织 microRNA let-7a 表达量逐步降低, 存在明显的负相关; 在肝癌癌变形成阶段, 大鼠肝组织 NF-κB-p65 表达量明显增高。提示 DEN 诱导的大鼠肝癌形成过程中, IL-6 表达的升高与 microRNA let-7a 表达量降低和 NF-κB-p65 表达量增高密切相关。

本实验研究结果显示,采用叶下珠复方 II 号对于 DEN 诱导的大鼠肝癌模型进行干预,实验第 18 周末,叶下珠复方 II 号高、低剂量组大鼠肝癌结节数较模型组显著减少;叶下珠复方 II 号高、低剂量组大鼠血清 IL-6、ALT、AST 水平明显低于模型组,血清 ALB 水平较模型组明显升高;与模型组比较,叶下珠复方 II 号高剂量组 microRNA let-7a 表达量显著上升,NF- κ B-p65, IL-6, STAT3, Ras 和 C-myc 基因 mRNA 表达量均显著降低;叶下珠复方 II 号高、低剂量组 STAT3 和 p-STAT3 蛋白表达均显著低于模型组,提示叶下珠复方 II 号对 DEN 诱导的大鼠肝癌形成具有明显的抑制作用,作用机制与上调 let-7a 表达和下调 NF- κ B-p65 的表达,从而抑制 IL-6 的表达和 IL-6/STAT3 信号通路活化有关。

[参考文献]

[1] Mantovani A, Allavena P, Sica A, et al. Cancer-related inflammation[J]. *Nature*,2008,454(7203):436-444.
[2] Aggarwal B B, Gehlot P. Inflammation and cancer: how friendly is the relationship for cancer patients? [J]. *Curr Opin Pharmacol*,2009,9(4):351-369.
[3] Naugler W E, Sakurai T, Kim S, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production [J]. *Science*, 2007, 317 (5834):121-124.
[4] Iliopoulos D, Hirsch H A, Struhl K. An epigenetic switch involving NF-kappaB, Lin28, let-7 microRNA, and IL6 links inflammation to cell transformation[J]. *Cell*, 2009,139(4):693-706.
[5] 李小翠,李钢,李常青,等.叶下珠复方 II 号对小鼠实验性肝损伤的保护作用[J]. *广州中医药大学学报*, 2007,24(5):392-395.
[6] 李常青,申建柯,李小翠.叶下珠复方 II 号对小鼠 H22

肝癌移植瘤生长的抑制作用[J]. *中国热带医学*, 2011,11(10):1182-1183.
[7] Mantovani A, Marchesi F, Portal C et al. Linking inflammation reactions to cancer: novel targets for therapeutic strategies [J]. *Adv Exp Med Biol*,2008,6(10):112-127.
[8] Grivennikov S, Karin E, Terzic J, et al. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer [J]. *Cancer Cell*,2009,15(2):103-113.
[9] Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine-40 years in immunology [J]. *Annu Rev Immunol*,2005,23(1):1-21.
[10] Labbozzetta M, Notarbartolo M, Poma P, et al. Significance of autologous interleukin-6 production in the HA22T/VGH cell model of hepatocellular carcinoma [J]. *Ann N Y Acad Sci*,2006,1089(1):268-275.
[11] Soresi M, Giannitrapani L, D'Antona F, et al. Interleukin-6 and its soluble receptor in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*,2006,12(16):2563-2568.
[12] Hodge D R, Hurt E M, Farrar W L. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer[J]. *Eur J Cancer*, 2005,41(16):2502-2512.
[13] Ji J, Zhao L, Budhu A, et al. Let-7g targets collagen type I alpha2 and inhibits cell migration in hepatocellular carcinoma[J]. *J Hepatol*,2010,52(5):690-697.
[14] Johnson S M, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family[J]. *Cell*,2005,120(5):635-647.
[15] Mayr C, Hemann M T, Bartel D P. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation [J]. *Science*, 2007, 315 (5818): 1576-1579.

[责任编辑 张丰丰]