

# 葛花解醒方对移植性肝癌小鼠肿瘤组织生长抑制及其 APC 蛋白表达的影响

李军, 唐东昕, 龙奉玺, 罗莉, 王镜辉, 郭斌, 杨柱\*  
(贵阳中医学院, 贵阳 550025)

**[摘要]** **目的:**探讨葛花解醒方对 BALB/c 小鼠 H<sub>22</sub>肝癌细胞生长抑制作用,及其对肿瘤组织腺瘤样息肉蛋白(APC)蛋白表达的影响。**方法:**雄性 BALB/c 小鼠随机分为正常组、模型组和葛花解醒方高、低剂量(40, 20 g·kg<sup>-1</sup>)组,正常组不做处理,其余 3 组制备移植性肝癌小鼠模型,从造模后第 2 日开始给药,正常组及模型组给予生理盐水 ig,葛花解醒方高、低剂量组给予同体积中药水煎剂 ig。ig 剂量均为 0.01 mL·g<sup>-1</sup>,连续灌服 12 d 后处死小鼠,完整剥离肿瘤组织,称重,计算抑瘤率;肿瘤组织制作病理切片;取脾脏和胸腺,计算脾脏和胸腺指数;取血离心后用酶联免疫吸附法检测血清中白细胞介素-1(IL-1)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)含量变化。免疫组化法检测小鼠肿瘤组织中 APC 蛋白的表达,免疫印迹法(Western blot)检测 APC 蛋白表达。**结果:**与模型组比较,葛花解醒方高、低剂量组对小鼠瘤重均有不同程度的抑制作用,抑瘤率分别为 37.05%, 16.51% ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。模型组 APC 蛋白高表达,葛花解醒方高、低剂量组中 APC 表达水平较模型组明显下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。**结论:**葛花解醒方在一定剂量下能抑制肝癌小鼠瘤块的生长,并呈量效关系,还对抑癌基因 APC 有一定的调控作用,这可能是葛花解醒方抑制肝癌细胞的作用机制之一。

**[关键词]** 葛花解醒方; 肝癌; 腺瘤样息肉蛋白; 抑癌基因

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)15-0128-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2016150128

## Inhibitive Effect of Gehua Jiecheng Decoction on Growth and APC Protein Expression of Tumor Tissues of Transplanted Liver Cancer Mice

LI Jun, TANG Dong-xin, LONG Feng-xi, LUO Li, WANG Jing-hui, GUO Bin, YANG Zhu\*  
(Guiyang University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitive effect of Gehua Jiecheng decoction on tumor growth of transplanted H<sub>22</sub> in BALB/c mice and expressions of adenomatous polyposis coli (APC) protein in tumor tissues. **Method:** Thirty-four male BALB/c mice were randomly divided into four groups, namely blank group, model group and Gehua Jiecheng decoction of high and low dose (40, 20 g·kg<sup>-1</sup>) groups. Except for the blank control group, the other groups were included in the preparation of the transplanted liver cancer mouse model. At the 2<sup>nd</sup> day after the modeling, the mice were given drugs, the blank control group and the model group were given NS, ig, and Gehua Jiecheng decoction high and low dose groups were given the same volume of decoction, ig, with the dosage 0.2 mL for each. After 12 days, all mice were sacrificed. Their tumor lumps were collect to weigh and calculate the inhibition rate and make pathological sections. Spleen and thymus were collected to calculate the spleen index and thymus index, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to examine interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor-α (TNF-α) content in peripheral blood after blood was collected and centrifuged. Immunohistochemistry was used to examine the expression of APC, Western blot method was adopted to detect the

**[收稿日期]** 20151014(009)

**[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(黔教研合 JYSZ 字[2014]018);贵阳中医学院-贵州省科技厅联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7336 号)

**[第一作者]** 李军, 硕士, 助教, 从事肿瘤中医病因病机的基础研究, Tel: 18286037278, E-mail: 971339248@qq.com

**[通讯作者]** \* 杨柱, 博士, 教授, 硕士生导师, 从事肿瘤中医病因病机学研究, Tel: 0851-85652079, E-mail: yangzhu20150426@163.com

expression of APC protein expression. **Result:** Compared with the model control group, the inhibition rate of Gehua Jiecheng decoction high and low dose groups were 37.05% and 16.51% ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), the model group showed high expression of APC protein, Gehua Jiecheng decoction high and low dose groups showed significantly lower APC expressions than model group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Under a certain dose range, Gehua Jiecheng decoction can inhibit the growth of liver cancer in mice tumor blocks in a dose-effect manner, and regulate and control cancer suppressor gene APC, which may one of Gehua Jiecheng decoction's mechanisms for inhibiting liver cancer.

[ **Key words** ] Gehua Jiecheng decoction; liver cancer; adenomatous polyposis coli; cancer suppressor gene

原发性肝癌是最常见的消化系统恶性肿瘤之一,发病率及死亡率不断上升,探索有效的中西医结合方法治疗肝癌有重大的临床意义<sup>[1-3]</sup>。根据流行病学提示,饮酒和乙型肝炎病毒(HBV)感染是中国肝癌发生的两大重要诱因<sup>[4]</sup>。早期发现、早期诊断、早期治疗是肝癌防治的关键,而预防和阻断肝癌变的发生尤为重要,这也正是中医学“治未病”思想的体现。细胞凋亡是由于细胞内、外环境发生变化或死亡信号触发以及在基因的调控下所引起的细胞发生主动死亡的一个复杂过程。研究表明,细胞凋亡调控失调是导致肿瘤发生的一个重要原因,目前临床上很多抗肿瘤治疗的方法其机制均在不同程度上与诱导细胞发生凋亡有关<sup>[5]</sup>。中医药治疗肝癌在改善患者的身体状况、生存质量、控制病情进展、以及适当延长患者生存期等方面具有不可比拟的作用。葛解醒方为李东垣治疗酒伤之古方,主治酒积伤脾证。在本课题前期研究中发现,该方具有减少肝细胞破坏及肝细胞凋亡、稳定肝细胞、减轻肝脏损害、降低血乙醇含量、阻止肝细胞的脂肪变性和促进肝内脂质代谢等重要作用<sup>[6-7]</sup>,本研究基于此基础,以葛花解醒方为研究对象,通过建立移植性肝癌小鼠模型,观察该方对小鼠肿瘤组织生长的抑制作用,并通过免疫组化法检测肿瘤组织中腺瘤样息肉蛋白(APC)的蛋白表达,探讨葛花解醒方可能的抗肿瘤作用机制,为其临床有效地治疗肝癌提供理论指导和数据支撑。

## 1 材料

**1.1 动物及瘤株** BALB/c 近交系小鼠,雄性,6~7 周龄,体重(18±2)g,34 只,购自重庆腾鑫比尔实验动物销售有限公司,合格证号 SCXK(渝)2009-0007,饲养于贵阳中医学院中心实验室动物房。小鼠 H22 肝癌细胞株购自中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所。

**1.2 药物** 葛花解醒方(木香 1.5 g,人参 4.5 g,猪苓 4.5 g,茯苓 4.5 g,陈皮 4.5 g,白术 6 g,干姜 6 g,神曲 6 g,泽泻 6 g,豆蔻 15 g,砂仁 15 g,葛花 15 g,青皮

1 g 等),饮片购自北京同仁堂(贵阳店),由贵阳中医学院第一附属医院万明香副教授鉴定为正品,由贵阳中医学院第一附属医院中药制剂室协助制备为分别含生药 2,4 g·mL<sup>-1</sup>的水煎液,备用。

**1.3 试剂与仪器** 小鼠白细胞介素-1(IL-1),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(北京环亚泰克生物医学技术有限公司,批号均为 201210),抗 APC 单克隆抗体(美国 Santa-Cruz 公司,编号 sc-896),GAPDH 一抗(北京环亚泰克生物医学技术有限公司,批号 TA-09),兔超敏第二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号 PV-9001)。TS-100F 型倒置显微镜(美国 NaPco 公司),L600 型离心机(德国 Hettich 公司),YD-335 型 RM2245 组织切片仪(德国 Leica 公司),DYCZ-24DN 型垂直电泳槽及电转移仪,DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 移植性肝癌小鼠模型制备** 小鼠 H22 肝癌细胞株体外培养至对数生长期,接种于腹部,待产生腹水,抽取腹水,离心计数,调整细胞密度至  $1.0 \times 10^7$  个/mL,抽取 0.2 mL 接种于小鼠腋窝。

**2.2 分组及给药** 小鼠适应性喂养 1 周后,随机分成正常组,模型组,葛花解醒方高、低剂量(40,20 g·kg<sup>-1</sup>)组,正常组 7 只,其他组各 9 只。正常组不予造模,与其余各组均从造模后第 2 日开始给药,正常组、模型组 ig 生理盐水,葛花解醒方高、低剂量组 ig 葛花解醒方水煎液,葛花解醒方水煎液含生药 2 g·mL<sup>-1</sup>为前期研究中筛选出的在抗肝纤维化方面的最佳剂量<sup>[8]</sup>,ig 剂量均为 0.01 mL·g<sup>-1</sup>,为摸索在抗肿瘤方面的最佳有效剂量,本研究在前期最佳剂量的基础上×2 作为高剂量,未设中剂量组。

**2.3 肿瘤抑瘤率检测** ig 给药 12 d 后次日称取小鼠体重,采取摘除眼球法取血,取小鼠脾脏和胸腺,计算脾脏和胸腺指数,取材后完整剥离瘤块并称重,

计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (1 - \text{平均瘤重}_{\text{治疗组}} / \text{平均瘤重}_{\text{正常组}}) \times 100\%$$

**2.4 肿瘤组织病理学检测** 肿瘤块用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 常规石蜡包埋、切片、苏木素伊红(HE)染色, 中性树胶封固后镜下观察。

**2.5 采用 ELISA 检测 IL-1, TNF- $\alpha$  含量** 将血液常温下静置 1 h 后离心, 3 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。取血清, 严格按照试剂盒说明书操作测定。

**2.6 免疫组化法测定肿瘤组织中 APC 蛋白表达** 肿瘤组织石蜡切片二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化。抗原修复, 封闭, 滴加 APC 一抗(1:150)4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 二抗反应, DAB 染色, 苏木精复染, 盐酸乙醇分化后梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封片, 显微镜下观察。APC 主要位于细胞膜和细胞质表达, 阳性表达为棕黄色, 检测结果作半定量处理, 无着色计为 0 分, 浅黄色计为 1 分, 棕黄色计为 2 分, 棕褐色计为 3 分。按照阳性细胞数占整个癌细胞总数的比例, 取 5 个高倍视野, 在每个高倍视野下计数 100 个癌细胞中的阳性细胞数, 计算平均值, 当均值  $\leq 25\%$  为 1 分, 26% ~ 50% 为 2 分, 51% ~ 75% 为 3 分,  $> 75\%$  为 4 分。着色计分 + 评分,  $\leq 2$  分为阴性(-), 3 分为弱阳性(+), 4 分为中度阳性(++),  $\geq 5$  分为强阳性(+++).

**2.7 免疫印迹法 (Western blot) 测定肿瘤组织中 APC 蛋白表达** 肿瘤组织匀浆, 裂解, 提取蛋白, 测定蛋白浓度, 蛋白变性, 上样, 转膜, 封闭, 加入 APC 一抗(1:5 000)4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 二抗反应, 化学发光, 采用 Image-Pro Plus 软件进行吸光度分析, 以 APC 蛋白/ $\beta$ -actin 表示蛋白相对表达。

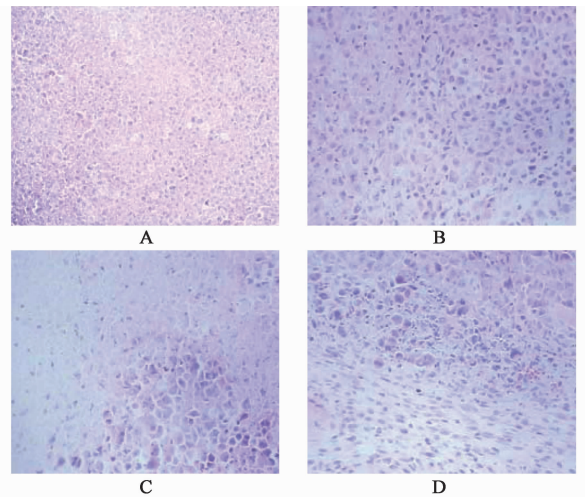
**2.8 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析, 计量结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量数据符合正态分布且方差齐性组间比较, 采用单因素方差分析, 非正态分布采用非参数统计的秩和检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 葛花解醒方对小鼠一般情况的影响** 模型组因操作不当死亡 2 只, 其余各组小鼠均存活。从给

药第 4 天开始, 与正常组比较, 模型组以及葛花解醒方组小鼠逐渐出现饮食减少, 活动稍迟缓, 体重增加, 对刺激反应稍迟钝, 毛发无光泽等表现。

**3.2 葛花解醒方对小鼠瘤块病理学影响** 模型组小鼠肿瘤组织中癌细胞大小不等, 可见癌巨细胞, 核染色质深, 癌细胞呈大小不等的巢状分布, 并浸润肌肉及周围神经组织, 分裂相较多。葛花解醒方高剂量组小鼠肿瘤组织较正常组比较, 癌细胞波及面积以及癌细胞巢明显缩小, 巢内可见大片出血性坏死及退行性改变, 有癌细胞出现脂肪变性及细胞核固缩, 细胞周围有大量以淋巴细胞、浆细胞为主的炎性细胞浸润; 葛花解醒方低剂量组小鼠肿瘤组织中癌细胞面积缩小, 巢内出血坏死区域较高剂量组缩小, 巢内见少量脂肪变性。见图 1。



A. 正常组; B. 模型组; C ~ D. 葛花解醒方(20, 40  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ )组(图 3, 4 同)

图 1 各组小鼠肿瘤组织病理学改变(HE,  $\times 400$ )

Fig. 1 Histopathological changes in tumor tissues in all groups (HE,  $\times 400$ )

**3.3 葛花解醒方对肝癌模型小鼠抑瘤率的影响** 与模型组比较, 葛花解醒方高、低组对小鼠瘤重均有不同程度地下降( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与葛花解醒方低剂量组比较, 葛花解醒方高剂量组瘤重明显下降( $P < 0.05$ )。见表 1, 图 2。

表 1 葛花解醒方对肝癌模型小鼠抑瘤率的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Effects of Gehua Jiecheng decoction on tumor inhibition rate of liver cancer in mice( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	体重/g		瘤重/g	抑瘤率/%
			治疗前	治疗后		
正常	7	-	19.90 $\pm$ 1.19	21.43 $\pm$ 1.82	-	-
模型	7	-	20.21 $\pm$ 1.78	21.98 $\pm$ 3.57	1.94 $\pm$ 0.60	-
葛花解醒方	9	40	19.51 $\pm$ 1.12	20.99 $\pm$ 2.44	1.22 $\pm$ 0.71 <sup>2)</sup>	37.05 <sup>2)</sup>
	9	20	19.31 $\pm$ 1.13	20.24 $\pm$ 1.55	1.62 $\pm$ 0.45 <sup>1)</sup>	16.51 <sup>2)</sup>

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ 。

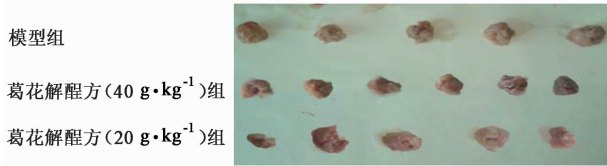


图 2 葛花解醒方对肝癌模型小鼠肿瘤组织形态的影响  
Fig. 2 Effects of Gehua Jiecheng decoction on gross morphology in tumor tissues of liver cancer in mice

表 2 葛花解醒方对肝癌模型小鼠免疫器官的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	胸腺指数	脾脏指数
正常	7	-	$2.35 \pm 0.47$	$3.37 \pm 0.51$
模型	7	-	$1.54 \pm 0.11^{2)}$	$7.51 \pm 1.96^{2)}$
葛花解醒方	9	40	$1.84 \pm 0.51^{1)}$	$8.97 \pm 1.90^{2)}$
	9	20	$1.99 \pm 0.55^{3)}$	$8.12 \pm 1.42^{2,3)}$

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup> $P < 0.01$ 。

**3.5 葛花解醒方对肝癌模型小鼠血清 IL-1 和 TNF- $\alpha$  水平的影响** 与正常组比较,模型组、葛花解醒方高、低剂量组 IL-1, TNF- $\alpha$  水平均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较,葛花解醒方高、低剂

**3.4 葛花解醒方对肝癌模型小鼠免疫器官的影响** 与正常组比较,模型组,葛花解醒方高、低剂量组胸腺指数显著降低,脾脏指数显著升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,葛花解醒方高、低剂量组的胸腺及脾脏指数均升高,其中葛花解醒方高剂量组的胸腺及脾脏指数升高显著 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

量组 IL-1, TNF- $\alpha$  水平均明显降低 ( $P < 0.05$ )。与葛花解醒方低剂量组比较,葛花解醒方高剂量组 IL-1, TNF- $\alpha$  水平降低更明显 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

表 3 葛花解醒方对肝癌模型小鼠血清 IL-1 和 TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	例数	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-1	TNF- $\alpha$
正常	7	-	$9.18 \pm 0.48$	$15.05 \pm 2.28$
模型	7	-	$23.52 \pm 1.88^{1)}$	$45.21 \pm 3.33^{1)}$
葛花解醒方	9	40	$13.16 \pm 1.64^{1,2,3)}$	$22.68 \pm 3.68^{1,2,3)}$
	9	20	$19.56 \pm 1.41^{1,2)}$	$34.53 \pm 2.71^{1,2)}$

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ ;与葛花解醒方低剂量组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ 。

**3.6 葛花解醒方对肝癌模型小鼠肿瘤组织 APC 蛋白表达的影响** 正常组为正常小鼠肝脏组织,无 APC 蛋白表达,模型组 APC 呈现高度表达,葛花解

醒方高、低剂量组中 APC 表达水平较模型组比较下降,与模型组比较,葛花解醒方高、低剂量组 APC 蛋白表达明显升高。见表 4。

表 4 葛花解醒方对肝癌模型小鼠肿瘤组织 APC 表达的影响

组别	例数	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	APC 蛋白/分			
			-	+	++	+++
正常	7	-	0	0	0	0
模型	7	-	0	1	1	5
葛花解醒方	9	40	0	5	4	0
	9	20	0	3	6	0

**3.7 葛花解醒方对肝癌模型小鼠肿瘤组织 APC 蛋白变化的影响** 正常组为正常小鼠肝脏组织,几乎没有 APC 表达;模型组 APC 呈现高表达,癌细胞基本没有改变,颗粒染色深,呈棕褐色,且集中分布;葛

花解醒方高剂量组 APC 表达明显减弱,且出现癌细胞大片坏死、溶解和固缩,退行性改变,颗粒染色浅;葛花解醒方低剂量组 APC 表达率较模型组有所下降,癌细胞出现核固缩及退行性改变,棕黄色颗粒,

并呈散在分布。见图 3。

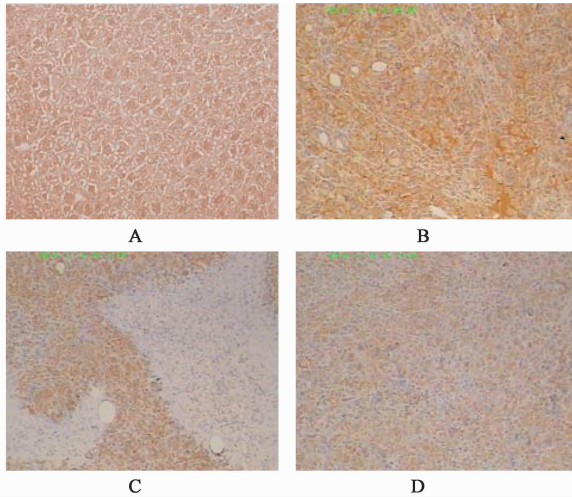
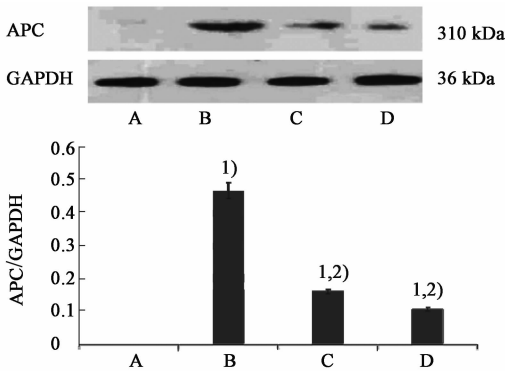


图 3 葛花解醒方对肿瘤组织 APC 蛋白表达的影响(免疫组化,  $\times 200$ )

Fig. 3 Effects of Gehua Jiecheng decoction on protein expression of APC in tumor tissues( immunohistochemistry,  $\times 200$ )

**3.8 葛花解醒方对肝癌模型小鼠肿瘤组织 APC 蛋白水平的影响** 与正常组比较,模型组 APC 蛋白表达增强( $P < 0.05$ ),与模型组比较,葛花解醒方高剂量组和低剂量组 APC 蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ )。见图 4。



与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$

图 4 葛花解醒方对肝癌模型小鼠 APC 蛋白水平表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

Fig. 4 Effects of Gehua Jiecheng decoction on APC express in tumor tissues of liver cancer in mice( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 3$ )

#### 4 讨论

中医学无肝癌病名,根据其临床表现大致可归为“癥瘕”、“积聚”、“臌胀”、“黄疸”等范畴。如《黄帝内经》中记载“肥气”、“在肋下,若覆杯”,“伏梁”、“在心下,上下行,时唾血”,从肝癌发生的部位以及肺转移的特点论述;《难经》说:“在右肋下覆大如杯”,恰如其分的记述了右上腹肿块;《脉经》谓:“诊得肝积,脉弦而细,肋下痛”,指出了肝积的大致

脉象以及主要症状。中医药通过对机体的整体调节,从多个层次、多个环节、多个靶点发挥其抗肿瘤的作用,在抑制、杀伤肿瘤细胞,调节机体免疫功能,改善患者的症状及体征,减轻放化疗反应所致的毒性等多个方面都发挥着不可比拟的作用。

中医学认为“正气存内、邪不可干,邪之所凑、其气必虚”。研究表明,中药复方在肿瘤的防治过程中发挥着重要作用。由于肝癌的发生机制不明,且基础及应用研究相对薄弱,目前肝癌患者的 5 年生存率仍较低下<sup>[9]</sup>,因而不断深入研究肝癌的发病机制、从而寻求更有效的治疗方案迫在眉睫。在肝癌防治方面,因中医药具有副作用小、症状改善明显以及改善生存质量等方面的优势,使得中西医结合治疗肝癌取得长足的发展<sup>[10]</sup>。葛花解醒方中葛花为君,甘寒芳香,长于解酒醒脾,其性轻清发散,能使酒湿从表而解;臣以神曲消食和胃,尤善消酒湿陈腐之积;豆寇、砂仁理气开胃醒脾,除痞满,增食欲;茯苓、猪苓、泽泻渗湿止泻,引酒湿从小便而去。饮酒过多,必伤脾胃,故又以人参、白术补中健脾,干姜温运化湿。全方发汗与利水并行,以分消酒湿;消食理气和补气健脾同用,以邪正兼顾,充分体现了散渗结合、消补兼施的重要法则<sup>[11]</sup>。

结直肠 APC 是一种抑癌基因,是 Herrera 等<sup>[12]</sup> 1986 年在格德纳综合症患者中发现的一个新的基因。目前针对结直肠腺瘤息肉蛋白的功能并不清楚,但大致概括为参与了  $\beta$ -链蛋白( $\beta$ -catenin)诱导的信号转导通路的调节、通过  $\beta$ -catenin 和 E 型钙黏附蛋白(E-cad)介导的细胞黏附的调节、通过与微血管发生相互作用介导细胞迁移的调节,及通过直接抑制细胞周期成分阻滞细胞周期的进展。有研究指出,APC 基因编码的 APC 蛋白通过参与细胞分化、增殖以及迁移等相关调节而能够达到抑制肿瘤的功能<sup>[13]</sup>。研究发现,Wnt 信号通路的过度激活与癌症的发生有密切的关系<sup>[14-16]</sup>,主要通过激活其下游靶基因而导致肝癌的发生与发展。经典 Wnt 信号通路通过  $\beta$ -连环蛋白在核中累积而启动靶基因, $\beta$ -catenin 作为该信号通路的关键部位,与糖原合成激酶 3,结直肠腺瘤息肉蛋白以及轴蛋白形成多聚蛋白复合体。APC 在肝癌的发生中同样起着重要作用,在肝细胞特异性 APC 缺乏的小鼠中, $\beta$ -catenin 处于稳定状态,从而明显提高了肝癌的发生率<sup>[17]</sup>。一旦经典 Wnt 途径的 APC 基因发生变化,将会使靶基因过度表达,进而影响细胞的增殖、分化,促进肿瘤的发生<sup>[18]</sup>。

本次实验结果显示,模型组小鼠肿瘤组织中 APC 均出现高度表达,葛花解醒方高、低剂量组中 APC 表达水平较模型组下降。结果表明,葛花解醒方对肝癌模型小鼠肿瘤组织中 APC 表达水平有下调作用,从而提示葛花解醒方的抗肿瘤作用可能通过抑制癌基因的表达实现,葛花解醒方在一定剂量下可抑制肝癌小鼠瘤块的生长,并呈量效关系,对抑癌基因 APC 有一定的调控作用,这可能是葛花解醒方抑制肝癌的作用机制之一。

[参考文献]

[ 1 ] Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, riskfactors, andscreening [ J ]. Seminliver Dis, 2005, 25 ( 2 ): 143-154.

[ 2 ] 何秀兰,肖俐,刘传波,等.鳖甲煎化裁与局部微创相结合治疗原发性肝癌 38 例临床观察[ J ]. 中国中医基础医学杂志,2013,19(4):470-472.

[ 3 ] 曾志涛,傅纓,熊耀斌,等.发酵虫草菌粉对人肝癌细胞增殖、凋亡及 VEGF, MMP-2 表达的影响[ J ]. 中国实验方剂学杂志,2015,21(9):141-144.

[ 4 ] 唐东昕,郭斌,罗莉,等.建立乙醇、HBV 双因素所致肝癌癌前病变小鼠模型的探讨[ J ]. 中国中医基础医学杂志,2015,21(11):1374-1376.

[ 5 ] 汤睿,朱正纲.凋亡途径与肿瘤治疗[ J ]. 世界华人消化杂志,2005,13(20):2469-2472.

[ 6 ] 杨柱,田维毅,王文佳,等.5 首解酒方对小鼠醉酒模型解酒效应的比较研究[ J ]. 中成药,2010,32(11):1969-1970.

[ 7 ] 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.

[ 8 ] 王镜辉,唐东昕,黄慧,等.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[ J ]. 中国实验方剂学杂志,2015, 21(24):73-78.

[ 9 ] 汤钊猷.关于肝癌治疗的策略[ J ]. 临床肝胆病杂志, 2011,27(4):337-339.

[ 10 ] 方肇勤,梁超,任红艳.肝癌常用治法复方抑制肝癌细胞恶性增殖的机制研究[ J ]. 中国中医基础医学杂志,2013,19(1):34-37.

[ 11 ] 李军,唐东昕,龙奉玺,等.葛花解醒方对移植性肝癌小鼠外周血中免疫炎症因子含量的影响[ J ]. 时珍国医国药,2015,26(12):2845-2847.

[ 12 ] Herrera L, Kakati S, Gibas L, et al. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q [ J ]. Am J Med Genel, 1986, 25(3):473-476.

[ 13 ] Van Noort M, Meeldijk J, Vander Zee R, et al. Wnt signaling controls the phosphorylation status of  $\beta$ -catenin [ J ]. J Biol Chem, 2002, 277(20):17901-17905.

[ 14 ] Polakis P. The many ways of Wnt in cancer [ J ]. Curr Opin Genet Dev, 2007, 17(1):45-51.

[ 15 ] Logan C Y, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease [ J ]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2004, 20(1):781-810.

[ 16 ] Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer [ J ]. Nat Rev Cancer, 2008, 8(5):387-398.

[ 17 ] Colnot S, Decaens T, Niwakawakita M, et al. Liver-targeted disruption of Apc in mice activates beta-catenin signaling and leads to hepatocellular carcinomas [ J ]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(49):17216-21.

[ 18 ] 宋银宏,张琼,张昌菊.经典 Wnt 信号途径与结肠直肠癌发生[ J ]. 生命的化学,2005,25(6):498-501.

[责任编辑 张丰丰]