

# 不同治法方药抑制肝癌 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠瘤细胞增殖的实验研究

蒋时红<sup>\*</sup>, 刘旺根, 谢慧琚, 张文娴  
(河南中医学院, 郑州 450008)

**[摘要]** **目的:** 观察比较活血化瘀方、清热祛湿方和养阴柔肝方 3 种不同治法中药复方对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠瘤细胞增殖的影响。**方法:** 采用皮下接种肝癌 H<sub>22</sub> 细胞的方法建立荷瘤小鼠模型, 分别用上述 3 种中药复方水煎液灌胃处理 11 d, 观察各组荷瘤小鼠的肿瘤生长情况, 用免疫组织化学方法检测肿瘤组织增殖细胞核抗原(PCNA)及 G1 期细胞周期蛋白(CyclinD1)的表达情况。**结果:** 3 种复方作用后, 活血化瘀方对瘤细胞 PCNA 表达的抑制作用最为显著; 用药组小鼠瘤细胞 CyclinD1 阳性表达细胞百分数与单纯造模组比较, 差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ), 3 个给药组之间两两比较差异亦具有统计学意义( $P < 0.01$ )。**结论:** 3 种治法中药复方在抑制瘤细胞增殖方面以活血化瘀方作用最为显著; 3 者均可以明显抑制肝癌细胞 CyclinD1 表达, 推断 3 种方法能够抑制肝癌细胞增殖活性的分子机制, 可能是通过降低肝癌细胞内 CyclinD1 的阳性表达, 阻断 CyclinD1-CDK4/Rb 通

[收稿日期] 2009-03-11

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(0524420036)

[通讯作者] \* 蒋时红, Tel: (0371) 65680028; E-mail: shihong\_jiang@hotmail.com

路,降低细胞周期转换速度实现的。

[关键词] 不同治法;中药复方;H<sub>22</sub>小鼠;PCNA; CyclinD1

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)10-0064-03

在真核细胞的细胞周期调控中, G<sub>1</sub>-S 期之间的调控点(restriction point, 又称 R 点)是细胞内外信号经传递、整合,汇集到细胞核,对细胞增殖进行调控的关键点,由 G<sub>1</sub> 期周期蛋白(CyclinD1)等调控<sup>[1~2]</sup>。细胞能否通过限制点从 G<sub>1</sub> 期进入 S 期很大程度上取决于 G<sub>1</sub> 期内 CyclinD1 的积累<sup>[3]</sup>。本课题组在前期实验研究的过程中,发现活血化瘀、清热祛湿、养阴柔肝 3 种方法均能增强对 H<sub>22</sub> 小鼠移植瘤的抑制作用,其中以清热祛湿方对肿瘤细胞的生长抑制作用最为显著,并且 3 种方法均可诱导肿瘤细胞发生凋亡。在此基础上,我们将经方复元活血汤、茵陈蒿汤、一贯煎进行加减,以肝癌 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠为模型,比较上述 3 种方法对 H<sub>22</sub> 小鼠移植性肝癌组织中细胞增殖的不同影响,探讨 3 种方法对荷瘤小鼠肝癌细胞增殖情况影响及其机制。

## 1 材料

**1.1 中药水煎液的制备** 活血化瘀方由当归 12 g, 桃仁 12 g, 红花 15 g, 山甲 6 g, 蛭虫 15 g, 柴胡 12 g 组成,水煎后,浓缩为含生药 0.935g/mL;清热祛湿方由茵陈 30 g, 栀子 15 g, 大黄 9 g, 厚朴 9 g, 陈皮 9 g, 泽泻 12 g 组成,水煎后,浓缩为含生药 1.09 g/mL;养阴柔肝方由生地 30 g, 沙参 12 g, 麦冬 12 g, 枸杞 12 g, 川楝子 6 g 组成,水煎后,浓缩为含生药 1.87 g/mL。3 方浓度剂量均由预实验最佳量效关系所确定。

**1.2 动物** 清洁级昆明小鼠 40 只,雌雄各半,体重(20±2)g,购于河南省实验动物中心[许可证号:SCXK(豫)2005-0001],并由其提供标准实验动物全价颗粒饲料。

**1.3 瘤细胞株** 肝癌 H<sub>22</sub> 细胞株,由河南省医学科学研究所提供。

**1.4 主要试剂** 增殖细胞核抗原(Proliferation Cell Nuclear Antigen, PCNA)抗小鼠多克隆抗体为北京博奥森公司产品;CyclinD1 抗小鼠单克隆抗体为美国 Santa Cruz 公司产品,规格均为 0.1 mL。

## 2 方法

**2.1 造模方法** 无菌条件下,抽取接种 H<sub>22</sub> 瘤种 8 d 生长良好小鼠腹水为瘤源,用生理盐水整细胞浓度

至 1×10<sup>7</sup> mL,取 0.2 mL 于鼠右侧腋窝皮下接种。

**2.2 动物分组及处理方法** 将 40 只昆明小鼠随机分为 4 组,即模型对照组、活血化瘀组、清热祛湿组、养阴柔肝组,每组 10 只,雌雄各半。模型对照组接种瘤株 12 h 后于每日上午 8 点予以生理盐水灌胃,每只 0.4 mL·d<sup>-1</sup>,每日 1 次,3 组用药组则在同样条件下给予相应中药水煎液灌胃,连续给药 11 d。

**2.3 取材** 停药 24 h 后,称重,断颈处死小鼠,完整剥离瘤体,滤纸吸干后电子天平称取瘤重。再于瘤体中心部位取小块组织,进行常规石蜡切片,-20℃保存待检。

## 2.4 检测指标

**2.4.1 PCNA 表达情况** 严格按照试剂盒说明书应用 SABC 法检测待检切片 PCNA 表达情况。阳性判断标准<sup>[4]</sup>:细胞核染成棕黄色或棕褐色为阳性反应,每个标本随机观察 10 个高倍镜视野(×400),各统计 100 个肿瘤细胞中的阳性细胞数,取其平均值作为 PCNA 的阳性细胞数。坏死区可见大面积均匀深染者,为非特异性染色,不予计数。

**2.4.2 CyclinD1 表达情况** 严格按照试剂盒说明书应用 SABC 法检测待检切片 CyclinD1 表达情况。以肿瘤细胞核出现棕黄色颗粒为阳性表达,少数胞质可同时染色。阳性细胞数<10%为阴性(-),10%~25%为弱阳性(+),26%~50%为中度阳性(++),>50%为强阳性(+++)<sup>[5]</sup>。

**2.5 统计学方法** 采用 SPSS13.0 统计软件进行单因素方差分析,数值变量均以( $\bar{x} \pm s$ )表示,以  $\alpha=0.05$  为检验水准。

## 3 结果

**3.1 对瘤体细胞 PCNA 表达的影响** 各用药组与模型对照组 PCNA 表达量比较,均具非常显著的差异( $P < 0.01$ );3 个给药组之间也均有显著性差异( $P = 0.000 \sim 0.012$ ),以活血化瘀组最低。如表 1 所示。

**3.2 对瘤体细胞 CyclinD1 表达的影响** 与模型对照组比较,3 个组的 CyclinD1 均明显降低( $P < 0.01$ );组间比较均具有统计学意义( $P < 0.01$ ),其中活血化瘀组表达量最低(参见表 1)。

表 1 不同复方对 H<sub>22</sub> 荷瘤小鼠瘤体生长抑制作用( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 (g·kg <sup>-1</sup> )	n	PCNA 表达量 (%)	CyclinD1 阳性 表达(%)
模型对照组	—	9	73.26 ± 3.15	78.43 ± 1.51
活血化癥组	18.7	8	22.19 ± 2.05 <sup>1)</sup>	24.20 ± 0.91 <sup>1)</sup>
清热祛湿组	21.8	10	52.36 ± 3.20 <sup>1,2)</sup>	35.97 ± 1.83 <sup>1,2)</sup>
养阴柔肝组	37.4	9	42.60 ± 5.58 <sup>1,2,3)</sup>	49.10 ± 2.84 <sup>1,2,4)</sup>

注:与模型对照组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与活血化癥组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;  
与清热祛湿组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup>  $P < 0.01$

#### 4 讨论

肿瘤的研究在经历了癌基因、抑癌基因和细胞周期后,越来越多的学者认为,大多数癌基因、抑癌基因的作用最终都会聚集到细胞周期机制上<sup>[6]</sup>。细胞周期中各种调节因子组成复杂的网络调控系统,其中最主要的是细胞周期蛋白(Cyclins)-细胞周期蛋白依赖性激酶(Cyclin-Dependent Kinases, CDKs)-细胞周期蛋白依赖性激酶抑制蛋白(Cyclin-Dependent Kinases Inhibitors, CKIs)系统。CDKs 是此系统的中心,Cyclins 起正调控作用,CKIs 为负调控因子。在 G<sub>1</sub> → S 监测点上,CyclinD1 可与 CDK4 结合,导致 CDK4 活化,活化的 CDK4 可使视网膜母细胞瘤易感基因(Retinoblastoma, Rb)的蛋白产物磷酸化,驱使细胞通过检测点,加速细胞周期进程。由此可见,在细胞周期调控中,CyclinD1-CDK4-Rb 是最重要的细胞周期调节通路之一,在 G<sub>1</sub> → S 期转换中起着关键作用<sup>[7-8]</sup>。Cyclin D1 过度表达可缩短细胞周期 G<sub>1</sub>/S 期转换时间,增加细胞周期转换速度,导致细胞增殖失控而癌变<sup>[9]</sup>。

实验结果显示,活血化癥方、清热祛湿方、养阴柔肝方均可发挥良好的抑制肝癌瘤体生长的作用,其中清热祛湿方对肿瘤细胞生长的抑制作用最为显著( $P < 0.01$ ),抑瘤率高达 50.91%;H<sub>22</sub> 肝癌细胞内 PCNA 平均表达量与单纯造模组相比明显减少,差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),提示 3 种复方均具有良好的抑制肿瘤细胞增殖的作用;3 种方法作用后,H<sub>22</sub> 肝癌细胞内 CyclinD1 平均阳性表达百分数与造模组相比明显减少,符合抑瘤率及 PCNA 检测趋势。推

断 3 种方法能够抑制肝癌细胞增殖活性的分子机制,可能是通过降低肝癌细胞内 CyclinD1 的阳性表达,阻断 CyclinD1-CDK4-Rb 通路,使其停滞于 G<sub>1</sub> 期,细胞无法进入自主分裂程序,从而降低细胞周期转换速度实现的;同时 3 个给药组之间 CyclinD1 阳性表达情况的差异具有统计学意义( $P < 0.01$ ),说明 3 种方法降低肝癌细胞内 CyclinD1 阳性表达的作用相对独立,其中活血化癥方法作用最明显。

#### [参考文献]

[ 1 ] Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S, *et al.* CyclinD1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications [ J ]. *Chir cancer Res*, 1996, 2: 175-180.

[ 2 ] Cattam P, Hohaus S, Bellacosa A, *et al.* Association between CyclinD1 ( CCND ) gene amplification and human papillomavirus Infection in human laryngeal squamous cell carcinoma [ J ]. *Chir cancer Res*, 1998, 4: 2595-2598.

[ 3 ] 曹跃琼, 乔守怡, 赵寿元. 细胞周期抑制蛋白 Kip 及 INK4 研究进展 [ J ]. *国外医学分子生物学分册*, 1998, 20(01): 2-7.

[ 4 ] 陈清勇, 吴玉泉, 何永生, 等. 复方抗瘤冲剂抑制小鼠肉瘤 S180 的生长及对 p53 和增殖细胞核抗原表达的影响 [ J ]. *解放军医学杂志*, 2001, 26(11): 853-855.

[ 5 ] 董俊峰, 吴小鹏. 原发性肝细胞癌 Survivin, CyclinD1 的表达及其临床意义 [ J ]. *中国现代普通外科进展*, 2007, 10(2): 156-159.

[ 6 ] 曾益新. *肿瘤学* [ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1.

[ 7 ] Simile MM, Miglio MR, Muroli MR, *et al.* Down regulation of c-myc and CyclinD1 genes by antisense oligodeoxy nucleotides inhibits the expression of E2F and in vitro growth of HepG2 and Morris 5123 liver cancer cells [ J ]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(3): 333-441.

[ 8 ] 冯作化. *医学分子生物学* [ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 2005.

[ 9 ] Youssef EM, Hasuma T, Morishima Y, *et al.* Overexpression of CyclinD1 in rat esophageal carcinogenesis model [ J ]. *Cancer Res*, 1997, 88(1): 18-27.