

# 鲜枸杞子提取物通过 p38 MAPK 信号通路抑制人肝癌细胞 HepG2 诱导小鼠恶病质的作用及机制

刘婷<sup>1</sup>, 丁艳<sup>2</sup>, 杨婷婷<sup>1</sup>, 马晓娜<sup>1</sup>, 金毅然<sup>1</sup>, 马海滨<sup>1</sup>, 梁雪云<sup>1\*</sup>

(1. 宁夏医科大学总医院 宁夏人类干细胞研究所, 银川 750004;

2. 宁夏医科大学 总医院, 银川 750004)

**[摘要]** **目的:**探讨鲜枸杞子提取物(LBL)对人类肝癌细胞系 HepG2 诱导的小鼠恶病质模型的作用及其相关机制研究。**方法:**小鼠分为正常组,恶病质模型组,LBL 低剂量组(LBL 5 mg·kg<sup>-1</sup>),LBL 高剂量组(LBL 25 mg·kg<sup>-1</sup>)。采用人肝癌细胞系 HepG2 成功建立小鼠恶病质模型,待小鼠的体质量明显下降时,连续灌喂生理盐水或不同剂量 LBL 28 d 后,记录各组小鼠的体质量,酶联免疫吸附测定(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)检测血浆肌酸激酶(creatinase,CK),促炎因子白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ ,IL-1 $\beta$ ),白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6),肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ ,TNF- $\alpha$ )的水平,采用免疫组织化学检测小鼠肌肉降解水平及 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase,p38 MAPK)的表达,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测磷酸化 p38 MAPK(phospho-p38 mitogen-activated protein kinase,p-p38 MAPK),炎症信号通路核转录因子- $\kappa$ B(nuclear factor  $\kappa$ B,NF- $\kappa$ B)的表达。**结果:**与恶病质模型组比较,LBL 低、高剂量组小鼠体质量明显下降( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),肌肉降解程度明显抑制( $P < 0.05$ ),CK 水平显著下降( $P < 0.01$ );LBL 低、高剂量组小鼠血浆 IL-1 $\beta$ ,IL-6,TNF- $\alpha$  表达水平明显下调( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。免疫组织化学结果显示,LBL 低、高剂量组 p38 MAPK 蛋白表达降低( $P < 0.05$ ),Western blot 结果进一步证实 p-p38 MAPK,NF- $\kappa$ B 蛋白表达降低( $P < 0.01$ )。与 LBL 低剂量组比较,LBL 高剂量组血浆肌酸激酶,p38 MAPK,p-p38 MAPK,NF- $\kappa$ B 蛋白表达明显降低( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ )。**结论:**鲜枸杞子提取物能够抑制人肝癌细胞系 HepG2 诱导的小鼠恶病质模型的恶病质的进程,其作用机制可能与其下调促炎因子 IL-1 $\beta$ ,IL-6,TNF- $\alpha$ ,从而抑制 p38 MAPK,p-p38 MAPK,NF- $\kappa$ B 的表达相关。

**[关键词]** 恶病质; 肝癌; HepG2; 促炎因子; 枸杞提取物

**[中图分类号]** R22;R242;R2-031;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)09-0089-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.20190924

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190116.1931.013.html>

**[网络出版时间]** 2019-01-18 8:53

## Effect and Mechanisms of Lycii Fructus on Hepatoma HepG2 Cell Line-induced Cachexia in Mice

LIU Ting<sup>1</sup>, DING Yan<sup>2</sup>, YANG Ting-ting<sup>1</sup>, MA Xiao-na<sup>1</sup>, JIN Yi-ran<sup>1</sup>, MA Hai-bin<sup>1</sup>, LIANG Xue-yun<sup>1\*</sup>

(1. Ningxia Human Stem Cell Institute, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

2. General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the inhibitory effect and mechanism of the extracts from fresh Lycii Fructus (LBL) on hepatoma HepG2 cell-induced cachexia in mouse. **Method:** The human hepatoma cell line HepG2 was injected into BALB/C mice to establish the cachexia model. Then the LBL was fed to the models respectively in low dose (5 mg·kg<sup>-1</sup>) or high dose (25 mg·kg<sup>-1</sup>). After 28 days of continuous feeding, the mice's body weight was detected. The expression levels of creatine kinase (CK), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6

**[收稿日期]** 20190109(007)

**[基金项目]** 宁夏自然科学基金项目(NZ16168)

**[第一作者]** 刘婷,硕士,助理研究员,从事肿瘤生物学研究,E-mail:25856262@qq.com

**[通信作者]** \*梁雪云,博士,副研究员,从事细胞生物学研究,E-mail:706977918@qq.com

(IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were evaluated by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The muscle degradation and the expression of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) were detected by immunohistochemistry staining. The expression levels of phospho-p38 mitogen-activated protein kinase (p-p38 MAPK) and nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) were determined by Western blot. **Result:** Compared with cachexia group, the loss of body weight and muscle decomposition were significantly inhibited both in the low dose LBL group and high dose LBL group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). The level of plasma CK decreased significantly both in the low-dose LBL group and the high-dose LBL group ( $P < 0.01$ ). ELISA tests revealed lower expression levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  in both the low-dose LBL group and the high-dose LBL group ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Immunohistochemistry staining showed that the expression of p38 MAPK was inhibited both in the low-dose LBL group and the high-dose LBL group ( $P < 0.05$ ). Western blot indicated that the expressions of p-p38 MAPK and NF- $\kappa$ B were inhibited both in the low-dose LBL group and the high-dose LBL group ( $P < 0.01$ ). We found that the high-dose LBL group shows a higher inhibitory capability than the low-dose LBL group. **Conclusion:** LBL could inhibit the cachexia induced by hepatoma HepG2 cell line in mouse, suggesting LBL could reduce major cytokine and plasma inflammatory factors through p-p38 MAPK pathway.

[**Key words**] cachexia; liver cancer; HepG2; pro-inflammatory cytokines; Lycii Fructus

恶病质是导致癌症患者死亡的最主要的原因之一。根据国际临床流行病学研究显示,大约 40% ~ 80% 的癌症患者晚期出现恶病质,并导致患者的死亡<sup>[1]</sup>。出现恶病质的患者,在临床上主要表现为体质量进行性下降,目前临床上用于癌症治疗的主要手段包括化疗、放疗、以及靶向药物应用等手段,通过抑制或者杀死癌细胞,试图达到延缓患者病情进展,延长患者生存期间的目的。然而,这些手段并不能有效地延缓恶病质的出现。有效地延缓或抑制恶病质的状态,是国际上癌症治疗的重大课题<sup>[2]</sup>。肝癌患者容易发生恶病质,其主要原因是肝癌细胞易于分泌多种炎症因子,且这些炎症因子大量释放入血。同时肝脏是机体代谢的调节中心器官。因而,从肝癌入手,研究对抗恶病质的作用机制具有重要的临床意义。

在《神农本草经》中,记载了枸杞的功效。指出枸杞子的药理特性为“味苦寒,主五内邪气,热中,消渴,周痹。久服坚筋骨,轻身不老。”其适应症与现代医学中的恶病质具有相似的临床特征。此后历代各部药典均记载枸杞子为补“肝阴”与“肾精”的“要药”或“上品”。现代研究证明枸杞具有“保肝”的作用,并具有抑制机体消瘦,疲乏无力,机体消耗性分解代谢亢进(热中)的功效<sup>[3-4]</sup>。但枸杞子是否具有抑制肝癌导致的恶病质,迄今未见报道。本课题通过建立人肝癌恶病质小鼠模型,灌胃鲜枸杞子(LBL)提取物进行干预,探讨其抑制恶病质的作用机制,这项研究将为有效控制恶病质提供新的实验证据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF 级 BALB/C 近交系小鼠,雌雄各半,12 周龄,体质量 18.0 ~ 27.5 g。购于维通利华实验动物中心,合格证号 SCXK(京)2012-0001。动物置于 12 h/12 h 明暗交替环境,自由进食。所有动物实验操作均按国家实验动物管理条例执行。本研究经宁夏医科大学总医院医学科研伦理审查委员会批准,编号 2018-296。

**1.2 药材** 从宁夏禹尧农产品科技有限公司购得当年新鲜枸杞子,经宁夏医科大学中医学院姜红副教授鉴定为茄科植物枸杞 *Lycium barbarum* 的果实。LBL 提取物制作方法参照张义军等<sup>[5]</sup>方法并进行改进,将鲜枸杞子按照传统中药的煎煮方法,加 20 倍水,煎煮 30 min,连续煎煮 2 次,将 2 次的煎煮液混合,用旋转蒸发仪浓缩。将浓缩后的鲜枸杞子提取物制成冻干粉。最终 1 g 冻干粉相当于原药材 31.25 g,避光密闭,4 °C 保存。

**1.3 试剂** 胎牛血清(FBS),胰酶,青链霉素(美国 Gibco 公司,批号分别为 1739463,548977,793256);改良型 RPMI 1640 培养液(美国 HyClone 公司,批号 NXM0761);苏木素-伊红(HE,索莱宝公司,批号 G1120);考马斯蛋白测定试剂盒、血浆肌酸激酶(CK)测试试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20170924,20180110);p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK) antibody(美国 Abcam 公司,批号 ab170099);HRP-gout-anti-rabbit(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 154105A);白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ ),白细胞介素-6(IL-6),肿瘤坏死因子- $\alpha$

(TNF- $\alpha$ )酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(上海依科赛生物制品有限公司,批号分别为171202,171128,180106);Anti-磷酸化 p38 MAPK (p-p38 MAPK) antibody, Anti-核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) p65 antibody(美国 Santa Cruz 公司,批号分别为 sc166182, sc372); $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)兔抗鼠多克隆抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司,批号为 16AV0209)。

**1.4 仪器** Eclipse Ti-E 型倒置显微镜(日本尼康公司);SUNRISE 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司);AU2700 型全自动生化分析仪(美国 Beckman Coulter 公司);CM 3050 型冰冻切片机(德国 Leica 公司);Galaxy 171R 型细胞培养箱,5430R 型台式低温离心机(德国 Eppendorf 公司);Gel DocTM XR<sup>+</sup> 型凝胶成像仪,Mini-Protean Tetra system 蛋白电泳槽,Mini-Trans-Biot-Moduie 型蛋白转膜仪(美国 Bio-Rad 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物模型的制作** 采用郑亚兵等<sup>[6]</sup>方法制备肝癌恶病质小鼠模型,将肝癌细胞系 HepG2 复苏,用细胞培养基中(改良型 RPMI 1640 培养液,10% FBS,100 mg·L<sup>-1</sup>链霉素和 1 × 10<sup>5</sup> U·L<sup>-1</sup>青霉素)调整密度为 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL,接种于 100 mm 培养皿中,置于 37 °C 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。待细胞长满整个培养皿时,加入 0.05% 胰酶消化后,收集细胞,用生理盐水配成 1 × 10<sup>7</sup> 个/mL,注入 BALB/C 近交系小鼠右前肢腋下的皮下区域,然后继续饲养小鼠。饲养 4 周后,选择有肿瘤生长的动物,麻醉消毒后,取出长出的肿瘤组织。4 °C 条件下,将肿瘤剪成 1.0 mm<sup>3</sup> 左右的组织小块。用 0.01% 磷酸盐缓冲溶液(PBS)将组织小块清洗干净后,重新植入到 BALB/C 近交系小鼠右前肢腋下。待小鼠明显消瘦,出现厌食、虚弱、衰竭,体质量下降至与正常组有显著性差异时,即进入恶病质状态,说明模型制备成功。28 d 后,待肿瘤外观长大,并且荷瘤小鼠体质量开始下降时,开始分组给药。

**2.2 分组及给药** 待肝癌恶病质小鼠模型制作成功后,随机分为 4 组,每组 10 只,雌雄各半。给药剂量参照文献<sup>[7-8]</sup>,按照成人 60 kg 给予枸杞生药 10 ~ 50 g,根据实验动物等效剂量换算用药剂量。LBL 低、高剂量组灌胃枸杞提取物(5, 25 mg·kg<sup>-1</sup>),正常组(未接种肿瘤细胞,在相同部位注射等量生理盐水)和模型组每日灌胃等体积蒸馏水,4 组连续灌胃 28 d。

**2.3 各组小鼠体质量的评估** 测定荷瘤状态下小鼠的体质量。荷瘤小鼠的体质量是衡量小鼠恶病质状态的主要指标。既往有关恶病质的实验中,有的测定去除肿瘤后的小鼠体质量,本实验发现在解剖肿瘤的过程中,常常会去除部分正常组织,影响到实验结果的稳定性。因此测定荷瘤小鼠的体质量,能够更准确的反映小鼠恶病质的状态。

**2.4 ELISA 检测小鼠血浆 CK 及促炎因子的水平** 将各组小鼠用戊巴比妥钠麻醉(40 mg·kg<sup>-1</sup>),腹主动脉取血,肝素抗凝,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,将上清血浆移到新的 1.5 mL 的离心管中,置于 -20 °C 存储备测。采用 ELISA 试剂盒,按说明书分别测定 CK 及 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  的水平。

**2.5 小鼠骨骼肌组织学检测** 分离各组小鼠背部肌肉组织,置于 4% 多聚甲醛 PBS 溶液中固定 72 h,然后用 30% 蔗糖磷酸盐缓冲液脱水,最后用 OCT 包埋介质固定,冰冻切片,组织切片 20  $\mu$ m。经 HE 染色,切片室温平衡 10 min,苏木精染色 5 min,蒸馏水洗 5 min,0.1% 盐酸-乙醇分色 5 s,水洗 10 min 返蓝,依次 70%, 80% 乙醇各 5 min,伊红染色 20 s 后,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,观察组织图片。

**2.6 免疫组织化学检测小鼠骨骼肌组织 p38 MAPK 蛋白表达** 将小鼠背部骨骼肌组织切片,室温平衡 10 min,4% 多聚甲醛 PBS 溶液固定 15 min, PBS 洗 3 遍,0.25% TritonX-100 中 10 min, PBS 洗 3 遍,每次 5 min,1% BSA-PBST 溶液中封闭 30 min,移入一抗(1:500)4 °C 孵育过夜, PBS 洗 3 遍,每次 5 min,移入二抗 HRP-gout-anti-rabbit (1:1 000) 孵育 2 h,最后浸入二氨基联苯胺(DAB)中染色 1 min。为了充分量化 p38 MAPK 在肌肉细胞中表达的程度,采用核染色甲基绿进行复染 5 min。PBS 洗 3 遍,封片保存观察。

**2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测骨骼肌 p-p38 MAPK 及 NF- $\kappa$ B 蛋白表达** 分离各组小鼠背部肌肉组织,提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度后,用超纯水调整各组浓度一致。配置 10% SDS-PAGE 胶,每泳道上样蛋白 50  $\mu$ g,电泳后转膜至 PVDF 膜上。加入兔单克隆抗体 p-p38 MAPK (1:1 000), NF- $\kappa$ B p65 (1:500),4 °C 封闭过夜,次日 TBS-T 洗涤后加入 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5 000)室温摇床 1 h。TBS-T 洗涤膜后,加入发光液显色后扫描图像。用 Image J 软件将条带转化为灰度值,以目的条带灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值反映蛋白相对表达量。

**2.8 统计学分析** 用 SPSS 20.0 进行统计分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,不同组间的差异比较采用 One-way ANOVA with *T*-test 进行统计学分析。所有的病理切片及免疫组化图像经 Chi-Square Test 卡方检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对肝癌恶病质小鼠体质量的影响** 与正常组比较,恶病质模型组小鼠体质量显著降低 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,LBL 低、高剂量组均能够明显延缓肝癌恶病质小鼠体质量下降的作用 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 鲜枸杞子提取物对肝癌恶病质小鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effect of extracts of Lycii Fructus in delaying weight loss in cachexia mouse ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

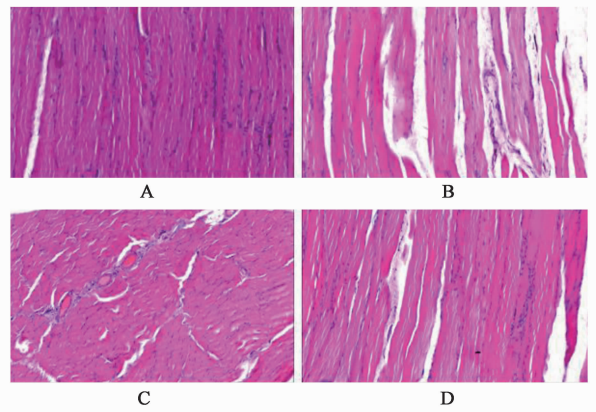
组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	体质量/g
正常	-	24.79 ± 2.26
模型	-	19.36 ± 2.45 <sup>1)</sup>
LBL	5	21.56 ± 2.02 <sup>2)</sup>
	25	22.33 ± 2.04 <sup>3)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ ;与 LBL 低剂量组比较<sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

**3.2 对肝癌恶病质小鼠背部肌肉骨骼肌降解的影响** 正常组小鼠骨骼肌排列整齐,未见肌肉纤维降解,间质无水肿。恶病质模型组小鼠肌肉纤维降解明显,肌肉纤维萎缩,造成间质水肿。LBL 低剂量组肌肉纤维中的原纤维出现降解,但降解的程度明显减弱。肌肉纤维萎缩不明显,间质虽有水肿,但水肿的程度明显被抑制。LBL 高剂量组原纤维出现降解,但降解的程度进一步明显减弱,肌肉纤维萎缩不明显,间质水肿的程度明显被抑制。见图 1。

**3.3 对小鼠骨骼肌分解代谢产物血浆 CK 的水平** 与正常组比较,恶病质模型组血浆肌酸激酶水平显著增高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,LBL 低剂量组血浆肌酸激酶水平显著下降 ( $P < 0.01$ ),LBL 高剂量组血浆肌酸激酶水平进一步下降 ( $P < 0.01$ ),提示肌肉降解程度明显减弱;LBL 高剂量组的抑制水平明显强于 LBL 低剂量组 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

**3.4 对恶病质小鼠血浆中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  分泌水平的抑制作用** 与正常组比较,恶病质模型组的 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  显著增高 ( $P < 0.01$ );与恶病质模型组比较,LBL 低剂量组 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平显著下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ );与恶病质模型组



A. 正常组; B. 模型组; C. LBL 低剂量组; D. LBL 高剂量组(图 2,3 同)

图 1 鲜枸杞子提取物对肝癌恶病质小鼠背部肌肉骨骼肌降解的影响(HE,  $\times 100$ )

Fig.1 Effect of extracts of Lycii Fructus on degradation of skeletal muscle by tissue slicing in cachexia mouse(HE,  $\times 100$ )

表 2 鲜枸杞子提取物对恶病质小鼠血浆中肌酸激酶的水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effect of extracts of Lycii Fructus on levels of CK in cachexia mouse ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	CK/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
正常	-	65.62 ± 23.58
模型	-	139.47 ± 32.86 <sup>1)</sup>
LBL	5	101.29 ± 24.12 <sup>3)</sup>
	25	67.13 ± 17.59 <sup>3,4)</sup>

比较,LBL 高剂量组 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平进一步得到了抑制 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

表 3 鲜枸杞子提取物对恶病质小鼠血浆中 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effect of extracts of Lycii Fructus on levels of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  in cachexia mouse ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )  $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-1 $\beta$	IL-6	TNF- $\alpha$
正常	-	51.13 ± 12.17	564.80 ± 123.82	477.18 ± 152.43
模型	-	105.03 ± 21.84 <sup>1)</sup>	1 040.63 ± 256.23 <sup>1)</sup>	1 010.68 ± 226.88 <sup>1)</sup>
LBL	5	76.98 ± 25.49 <sup>2)</sup>	739.64 ± 163.58 <sup>3)</sup>	827.71 ± 118.02 <sup>3)</sup>
	25	65.44 ± 26.57 <sup>3)</sup>	636.64 ± 247.34 <sup>3)</sup>	709.30 ± 182.69 <sup>3)</sup>

**3.5 对小鼠骨骼肌 p38 MAPK 蛋白表达的影响** 棕黄色为 p38 MAPK 表达阳性区域。正常组 p38 MAPK 表达较低,肌肉纤维排列整齐。模型组 p38 MAPK 显著增多,肌肉纤维萎缩,肌纤维断裂。LBL 低、高剂量组 p38 MAPK 表达较模型组降低,肌肉纤

维排列部分恢复。见图 2。

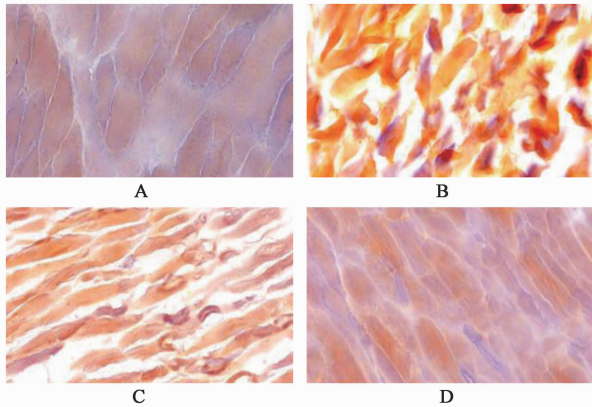


图 2 鲜枸杞子提取物对肝癌恶病质小鼠肌肉组织 p38 MAPK 蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 2 Effect of extracts of Lycii Fructus on expression of p38 MAPK in cachexia mouse (IHC, ×200)

**3.6 对肝癌恶病质小鼠骨骼肌 p-p38 MAPK 及 NF-κB 表达的影响** 与正常组比较,恶病质模型组小鼠骨骼肌蛋白 p38 MAPK, NF-κB 的表达均显著上调 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,LBL 低、高剂量组 p38 MAPK, NF-κB 的表达均显著得到抑制 ( $P < 0.01$ ),与 LBL 低剂量组比较,LBL 高剂量组减弱程度更显著 ( $P < 0.01$ )。见图 3,表 4。

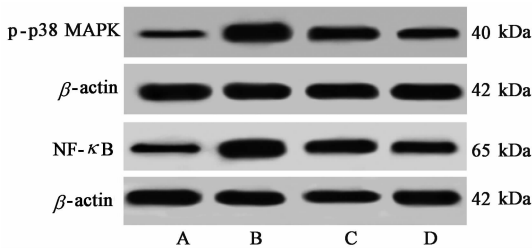


图 3 肝癌恶病质小鼠骨骼肌 p-p38 MAPK, NF-κB 蛋白表达电泳  
Fig. 3 Electrophoresis of p-p38 MAPK and NF-κB detected in cachexia mouse

表 4 鲜枸杞子提取物对恶病质小鼠 p-p38 MAPK, NF-κB 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of extracts of Lycii Fructus on relative expression of p-p38 MAPK and NF-κB in cachexia mouse ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	p-p38 MAPK/β-actin	NF-κB/β-actin
正常	-	0.304 ± 0.009	0.463 ± 0.007
模型	-	0.906 ± 0.015 <sup>1)</sup>	1.057 ± 0.013 <sup>1)</sup>
LBL	5	0.683 ± 0.006 <sup>3)</sup>	0.885 ± 0.019 <sup>3)</sup>
	25	0.445 ± 0.008 <sup>3,4)</sup>	0.650 ± 0.026 <sup>3,4)</sup>

## 4 讨论

癌症所诱发的恶病质是癌症患者致残致死的

主要原因,国际上目前尚无有效手段控制癌症的恶病质。事实上,现代医学通过全营养补充,促进同化代谢等手段均不能扭转或阻止癌症恶病质的状态。肝癌是一种恶病质发生率高恶性程度较高的癌症,控制肝癌恶病质的发生与发展是国际上亟待解决的课题<sup>[9]</sup>。

癌症出现恶病质状态的确切的病理机制迄今仍不清楚。但国际上近来的研究发现,癌细胞与其微环境的细胞,可释放大量的炎症因子。例如,肝癌细胞及其微环境中的淋巴细胞均可释放炎症因子,包括 TNF-α, IL-1, IL-6 等<sup>[10-11]</sup>,这些因子在癌症的早期,可能具有抑制癌细胞的作用。但在癌症的晚期,这些因子反复大量释放入血,作用于机体骨骼肌和脂肪细胞,使得骨骼肌分解、萎缩与无力,同时也导致脂肪组织的分解。患者尤其厌食,处于摄入减少、消耗增多的慢性消耗性病理状态。CK 是肌肉组织分解的主要代谢产物,是恶病质的主要标志物之一。在机体肾功能正常的情况下,轻度的肌肉分解所产生的肌酸激酶会被肾脏排出,血浆肌酸激酶水平并不会明显升高。但是中到重度的肌肉分解,特别是癌症诱发的恶病质,短期内诱发大量的肌肉分解,释放了大量的肌酸激酶,致使血浆肌酸激酶水平显著升高。

已有报道 p38 MAPK 与 NF-κB 信号通路与肿瘤的发生发展密切相关,并且中医药在肿瘤的治疗中表现出低毒副作用、稳定瘤体、防止复发、延长生存期及提高生存率等疗效优势<sup>[12]</sup>。研究发现,肝癌细胞分泌的炎症因子,如 TNF-α<sup>[11]</sup>,作用于肌肉组织的线粒体,促进脂肪氧化代谢,活化的脂肪代谢激活了 p38 MAPK 激酶,活化的 p38 MAPK 进一步磷酸化(p-p38 MAPK)导致分解代谢的酶活化,最终导致肌肉组织分解<sup>[13]</sup>。TNF-α 作为重要的炎症因子,已被证实与 NF-κB 通路是双向调控,一方面 NF-κB 可以增加 TNF-α 的转录,而后者又可反过来负调控 NF-κB, NF-κB 通过调控一系列炎症因子,包括但不限于 TNF-α,从而诱发肿瘤的发生发展<sup>[14]</sup>。在内皮细胞中,已证实 p38 MAPK 及 ERK 参与了 NF-κB 的激活过程,从而发挥一系列的功能<sup>[15]</sup>,但是在肿瘤发生发展中,尚有待证实。因而,抑制多种炎症因子的表达,并抑制其下游 p38 MAPK, p-p38 MAPK, NF-κB 的活化,可能是抑制癌症恶病质的重要途径。

枸杞子是一种传统的中药,具有滋补“肝阴”的作用。现代研究显示,枸杞子可能具有“保肝”,抑制机体消瘦,疲乏无力,调节脂质代谢,保护实验性

肝损伤,并对肿瘤有一定的抑制作用<sup>[16-17]</sup>。但枸杞子是否具有抑制肝癌导致的恶病质,及其具体机制迄今未见报道。

这项课题研究将人类的肝癌细胞 HepG2 接种到 BALB/C 小鼠体内,建立肝癌恶病质小鼠模型,当小鼠的体质量明显下降时,分组灌胃鲜枸杞子提取物(5,25 mg·kg<sup>-1</sup>)。连续灌胃 28 d 后,实验组恶病质小鼠的体质量降低明显减缓,肌肉降解被显著抑制,血浆肌酸激酶水平显著下降。进一步实验发现能够导致癌症恶病质的血浆炎症因子,包括 CK,促炎因子 IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  的表达被抑制,而肿瘤发生发展中的重要通路 p38 MAPK 与 NF- $\kappa$ B 也被证实得到了抑制。证实鲜枸杞子提取物抑制恶病质的作用机制可能与其抑制促炎因子的分泌,从而调控 p38 MAPK, NF- $\kappa$ B 信号通路有关,但是两个信号通路直接的上下游关系还需要进一步实验研究。

这项研究虽然为探索性研究,但为有效控制恶病质提供新的中药材料和实验证据,下一步的研究还需要探讨具体鲜枸杞子提取物的哪些成分在抑制恶病质发生过程中发挥作用及具体机制,以期进一步提高和优化其抗癌症恶病质的临床作用。

#### [参考文献]

[1] Guttridge D C. A TGF- $\beta$  pathway associated with cancer cachexia[J]. Nat Med, 2015, 21(11): 1248-1249.

[2] Lee D E, Brown J L, Rosa-Caldwell M E, et al. Cancer cachexia-induced muscle atrophy: evidence for alterations in microRNAs important for muscle size[J]. Physiol Genomics, 2017, 49(5): 253-260.

[3] GAO Y, WEI Y, WANG Y, et al. *Lycium barbarum*: a traditional chinese herb and a promising anti-aging agent [J]. Aging Dis, 2017, 8(6): 778-791.

[4] HU Q, JIA B L, GAO T S, et al. A study on the anti-cancer effect of ningxia wolfberry [J]. J Tradit Chin Med, 1989, 9(2): 117-124.

[5] 张义军,陈丽. 均匀设计法优选枸杞提取工艺[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(10): 2457-2458.

[6] 郑亚兵,马胜林,周卫民,等. 沙利度胺抗 Lewis 肺癌

小鼠癌性恶病质的实验研究[J]. 北京医学, 2010, 32(7): 559-561.

[7] 龚梦鹃,谢媛媛,邹忠杰. 枸杞对阴虚小鼠的抗疲劳作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(14): 171-174.

[8] 任非非,刘敬霞,俞维,等. 枸杞不同制剂对环磷酰胺致血虚大鼠全血细胞及骨髓造血功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 187-189.

[9] Suzuki H, Asakawa A, Amitani H, et al. Cancer cachexia-pathophysiology and management [J]. J Gastroenterol, 2013, 48(5): 574-594.

[10] Scheede-Bergdahl C, Watt H L, Trutschnigg B, et al. Is IL-6 the best pro-inflammatory biomarker of clinical outcomes of cancer cachexia [J]. Clin Nutr, 2012, 31(1): 85-88.

[11] Fortunati N, Manti R, Birocco N, et al. Pro-inflammatory cytokines and oxidative stress/antioxidant parameters characterize the bio-humoral profile of early cachexia in lung cancer patients [J]. Oncol Rep, 2007, 18(6): 1521-1527.

[12] 洪梓德,莫志贤. 中药抗肿瘤机制中的 11 种信号通路[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(21): 205-218.

[13] Barreto R, Waning D L, GAO H, et al. Chemotherapy-related cachexia is associated with mitochondrial depletion and the activation of ERK1/2 and p38 MAPKs [J]. Oncotarget, 2016, 7(28): 43442-43460.

[14] Blackwell T S, Christman J W. The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 1997, 17(1): 3-9.

[15] Je J H, Lee J Y, Jung K J, et al. NF-kappa B activation mechanism of 4-hydroxyhexenal via NIK/IKK and p38 MAPK pathway [J]. FEBS Lett, 2004, 566(1/3): 183-189.

[16] 章培军,邢雁霞,刘斌钰,等. 枸杞多糖对实验性肝损伤保护作用的研究 [J]. 中国药物与临床, 2011, 11(11): 1286-1287.

[17] 朱彩平,张声华. 枸杞多糖对 H(22)肝癌小鼠的抑癌作用 [J]. 中国公共卫生, 2006, 22(6): 717-718.

[责任编辑 张丰丰]