

# 从 PI3K/Akt/p53 通路探讨藤茶总黄酮抗肝癌的作用机制

甘彩玉, 郑作文\*, 梁冰洁, 唐云丽, 张文涛  
(广西中医药大学, 南宁 530001)

**[摘要]** **目的:**研究藤茶总黄酮(TF)对肝癌裸鼠移植瘤的抑制作用,预测其作用机制可能与调控细胞凋亡肌醇磷脂-3-激酶/蛋白激酶 B/p53(PI3K/Akt/p53)通路的相关因子有关。**方法:**建立 BEL-7404 肝癌裸鼠移植瘤模型,实验分为模型组、5-氟尿嘧啶(5-FU, 1.0 g·L<sup>-1</sup>)组及 TF 高、中、低质量浓度(30, 15, 7.5 g·L<sup>-1</sup>)组,给药干预 2 周后处死裸鼠,剥离出瘤组织,根据瘤重和瘤体积计算抑瘤率(IR)及相对肿瘤增殖率(T/C);采用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测 PI3K/Akt/p53 中相关基因胞内 PI3K, Akt1, p53, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(Caspase-3), B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2), Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax) mRNA 表达;采用免疫组化检测相关蛋白 PI3K, Akt1, p53, Caspase-3, Bcl-2, Bax 蛋白的表达。**结果:**TF 高、中、低质量浓度组 IR 分别为 53.26%, 35.94%, 26.74%, T/C 分别为 59.74%, 69.66%, 84.82%;逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)表明,与模型组比较,TF 30 g·L<sup>-1</sup>能明显下调 PI3K, Akt1, Bcl-2 mRNA 表达,显著上调抑癌基因 p53, Caspase-3, Bax mRNA 表达;免疫组化表明,与模型组比较,TF 30, 15 g·L<sup>-1</sup>均明显下调 PI3K, Akt1, Bcl-2 蛋白的表达,显著上调 p53, Caspase-3, Bax 蛋白的表达。**结论:**TF 有明显的体内抗肝癌活性,其机制可能与上调 p53, Caspase-3 的表达,激活细胞凋亡 PI3K/Akt/p53 通路,从而抑制 Bcl-2, 提高 Bax 的表达,促进肝癌细胞凋亡有关。

**[关键词]** 藤茶总黄酮; 抗肝癌; 肌醇磷脂-3-激酶/丝氨酸激酶(PI3K/Akt/p53)信号通路; 作用机制

**[中图分类号]** R22; R242; R2-031; R285.5; R273 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)12-0090-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20190422

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20181101.1208.004.html>

**[网络出版时间]** 2018-11-05 14:53

## Mechanism of Total Flavonoids of *Ampelopsis Grossedentata* in Inhibiting Liver Cancer by PI3K/Akt/p53 Pathway

GAN Cai-yu, ZHENG Zuo-wen\*, LIANG Bing-jie, TANG Yun-li, ZHANG Wen-tao  
(Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study inhibitory effect of total flavonoids from *Ampelopsis grossedentata* (TF) on transplanted tumors of human hepatocellular carcinoma in nude mice, and predict that its mechanism may be related to relevant factors regulating phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) /protein kinases B (Akt) /p53 pathway in apoptosis. **Method:** The nude mice transplanted BEL-7404 hepatoma model was established and divided into model group, 5-fluorouracil (5-FU) group (1.0 g·L<sup>-1</sup>) and TF (30, 15, 7.5 g·L<sup>-1</sup>) groups. Nude mice were put to death after two weeks of administration. The tumor tissues were excised, and tumor inhibition rate (IR) and relative tumor proliferation rate (T/C) were calculated. Reverse transcription PCR (RT-PCR) was used to detect PI3K, Akt1, p53 gene (p53), Caspase-3, B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax) mRNA expressions, immunohistochemical method was used to detect expressions of relevant proteins PI3K, Akt1, p53, Caspase-3, Bcl-2, Bax. **Result:** The establishment of xenograft tumor in mice showed that TF was administered orally once per day for two consecutive weeks. IRs were 53.26%, 35.94%, and 26.74%,

**[收稿日期]** 20180621(006)

**[基金项目]** 广西重点实验室建设项目(17-259-20)

**[第一作者]** 甘彩玉, 硕士, 从事中药抗肝病作用及机制研究, E-mail: fandygan@foxmail.com

**[通信作者]** \* 郑作文, 教授, 硕士生导师, 从事中药抗肝病作用及机制研究, E-mail: zzw\_nn@163.com

respectively. T/Cs were 59.74%, 69.66%, and 84.82%, respectively. RT-PCR experiments showed that compared with model group, when TF concentration was  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , mRNA expressions of PI3K, Akt1, and Bcl-2 were significantly down-regulated, and mRNA expressions of tumor suppressor genes p53, Caspase-3, and Bax were significantly up-regulated. Immunohistochemical method results showed that compared with model group, at TF concentrations of 30,  $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , all PI3K, Akt1, Bcl-2 protein expressions were significantly down-regulated, while p53, Caspase-3, Bax protein expressions were significantly increased. **Conclusion:** TF has an obvious anti-liver cancer activity *in vivo*. Its mechanism may be correlated with up-regulation of expressions of p53, Caspase-3, and activation of apoptosis PI3K/Akt/p53 pathway, thereby inhibiting Bcl-2, increasing expression of Bax, and promoting hepatocellular apoptosis.

[ **Key words** ] total flavonoids from *ampelopsis grossedentata*; anti-liver cancer; phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) /protein kinases B (Akt) /p53 signaling pathway; mechanism of action

肝癌是危害人类健康最常见且发病率最高的五大癌症之一,随着对其病因、病理改变、临床症状等了解的深入,由其发病的分子机制着手发掘更有效的临床治疗手段,愈发引起人们的关注。目前,越来越多的学者开始研究细胞信号通路和肿瘤发生发展之间的关系,其中以诱导肿瘤细胞凋亡的肌醇磷脂-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K/Akt) 通路最为热门<sup>[1-5]</sup>。该通路通过影响下游多种效应分子[如 p53, 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 (Caspase) 家族基因及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 基因等]的活化状态,对肿瘤细胞的增殖及凋亡,瘤体新生血管的形成、转移及治疗方面起着重要作用。目前已有大量研究表明中药活性成分黄酮类化合物如双氢杨梅素、槲皮素、异荜草素、毛蕊异黄酮和金雀异黄素等均具有抑制肝癌细胞增殖及诱导其凋亡作用,机制多与 PI3K 及其下游分子 Akt 所组成的信号通路有关<sup>[6-10]</sup>。其中异荜草素<sup>[11]</sup>可诱导凋亡和自噬来抑制 HepG2 人肝癌细胞增殖,是通过 PI3K/Akt 信号通路上游的刺激因子活性氧 (ROS) 调节其中的细胞因子 PI3K, 磷酸化 Akt (p-Akt), p53, Caspase-3, Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax), Bcl-2 等发挥作用,在介导肝癌的发生发展过程中起着重要作用,该通路的激活可以促进癌细胞生长,而阻断 PI3K/Akt 传导通路可能为肝癌的治疗提供新思路。已有研究表明藤茶总黄酮(TF)具有抑菌抗炎,抗氧化,抗肿瘤及增强机体免疫力等药理作用<sup>[12-16]</sup>。本课题组前期研究发现,TF 体外有明确的抗肝癌作用,能明显抑制人肝癌 BEL-7404 细胞的增殖,其半抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 为  $29.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 体内含药血清抑制 HepG2 细胞的增殖,诱导其产生早期凋亡<sup>[17-19]</sup>,但其中抗肝癌机制尚未明确。因此,本研究从 PI3K/Akt 传导通路及效应分子深入探讨体内 TF 抗肝癌作用可能性机制。

## 1 材料

**1.1 肿瘤细胞株** 人肝癌 BEL-7404 细胞购自江苏凯基生物技术股份有限公司(传至 10 代)。

**1.2 动物** BALB/C 裸鼠购自广西医科大学实验动物中心,合格证号 SCXK(桂)2014-0002,在无特定病原体(SPF 级)条件下饲养,本实验经广西医科大学伦理委员会批准,编号 201711011。

**1.3 药品与试剂** 5-氟尿嘧啶(5-FU,上海旭东海普药业有限公司,批号 FA161110); EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒, THERMOscript 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit,  $2 \times \text{Taq PCR Master Mix}$ , DNA Marker I (北京艾德莱生物科技有限公司,批号分别为 RN2802, PC4402, PC0903, DM0602); 溴化乙锭(北京索莱宝生物科技有限公司,批号 EPO501); PI3K, Akt1, p53, Caspase-3, Bcl-2, Bax 抗体(Abcam 公司,批号分别为 Ab182651, Ab81283, Ab1431, Ab13847, Ab59348, Ab32503); 即用型快捷免疫组化试剂盒,加强型 DAB Plus kit(福州迈新生物技术开发有限公司,批号分别为 KIT-5004, DAB-2031)。

**1.4 仪器** AIRTECH SW-CJ-1FD 型超净台(中国苏净安泰公司); Infinite M200pro 型酶标仪(瑞士 Tecan 公司); Tgradient 型梯度 PCR 仪, GAS7300B 凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司); DYY-12 型电泳仪(北京六一仪器厂); DM2500 型显微镜(德国 Leica 公司)。

## 2 方法

**2.1 TF 的制备** TF 为黄色结晶,由本校中药化学教研室提供,质量分数为 87.1%。提取工艺<sup>[20]</sup>,药材水提,提取液过滤,滤液趁热过大孔树脂柱,水洗近无色后用一定用乙醇洗脱,洗脱液减压浓缩回收,重结晶,即析出黄色结晶,抽滤,干燥,得样品 TF,得率 43.61%。TF 用超纯水配置成  $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  母液,使

用时用超纯水稀释至所需质量浓度。

**2.2 BEL-7404 肝癌裸鼠移植瘤模型建立<sup>[21]</sup>** 在 SPF 级动物房饲养,将 42 只雌雄裸鼠分开,前 3 d 适应期饲养。取对数生长期人肝癌 BEL-7404 细胞消化后,调整密度为  $1 \times 10^7$  个/mL。0.5 mL/只接种于 4 只裸鼠左前肢腋下皮下,约 1 周成瘤,肿瘤呈结节状浸润生长,此时取下瘤块,制备单细胞悬液,调整密度为  $1 \times 10^7$  个/mL。接种 42 只裸鼠左前肢腋下皮下,0.2 mL/只,注射局部出现明显皮丘。7 d 后,裸鼠出现直径  $> 5$  mm 的皮下结节,成瘤率为 98%。在接种后第 7 天测体积称体质量,按肿瘤体积和裸鼠体质量随机分组,雌雄均设置为模型组,5-FU 组 ( $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ),TF 高、中、低质量浓度组 (30, 15,  $7.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (质量浓度确定由前期体外细胞实验,采用噻唑蓝比色法探讨 TF 对人肝癌 BEL-7404 细胞增殖的影响,  $\text{IC}_{50}$  为  $29.15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 给药剂量按照  $\text{IC}_{50}$  的 20, 10, 5 倍确定)。其中模型组 10 只,其余组均 8 只。模型组灌胃给生理盐水  $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ , 5-FU 组腹腔注射  $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ , TF 组灌胃给予相应浓度的药液  $0.02 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$ , 1 次/1 d, 连续给药 2 周。

**2.3 BEL-7404 肝癌裸鼠移植瘤抑瘤率 (IR) 和增殖率检测** 每隔 2 d 称量各组裸鼠的体质量,并用游标千分卡尺测量肿瘤的 2 个相互垂直的直径 (包括皮肤的厚度在内), 计算体积<sup>[22]</sup>  $V = ab^2$ 。停药末次称重后,乙醚吸入麻醉法处死裸鼠,立即剥离取出瘤块,剔除其他组织后称量瘤重,计算  $\text{IR} = (1 - \text{给药组瘤重} / \text{模型组瘤重}) \times 100\%$ , 相对肿瘤体积 ( $\text{RTV} = \text{末次瘤体体积} / \text{给药前体积}$ ); 相对肿瘤增殖率 = 给药组  $\text{RTV} / \text{空白组 RTV} \times 100\%$ 。

**2.4 逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 检测相关 mRNA 表达** 按 EASYspin Plus 组织/细胞 RNA 快速提取试剂盒说明书提取总 RNA; 于酶标仪检查相应的 260 nm 处吸光度  $A$ , 调整各个样品总 RNA 浓度进行 RT 反应; 采用 25  $\mu\text{L}$  总反应体系, PCR 反应条件: 预变性  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  10 min; 变性  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  5 s; 退火; 延伸  $70 \text{ }^\circ\text{C}$  5 min, 循环 38 次; 采用 2% 琼脂糖凝胶电泳; 使用凝胶成像系统显影, 用 Image J 进行灰度值扫描, 以 PI3K, Akt1, p53, Caspase-3, Bcl-2, Bax mRNA 与内参  $\beta$ -actin mRNA 比值作为目的 mRNA 的相对表达量。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计合成, 见表 1。

**2.5 免疫组化法检测相关蛋白表达** 石蜡切片进行脱蜡和水化处理, 去除内源性的过氧化氢酶, 抗原

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称	序列 (5'-3')	退火温度 / $^\circ\text{C}$	长度 /bp
PI3K	上游 TCTTATTCCAGACGCATTTCAC	59	341
	下游 TGTTCTCTTTAGCACCCCTTCG		
Akt1	上游 AGCCTGGGTCAAAGAAGTCAAAG	57	460
	下游 CACAGTCTGGATGGCGGTTG		
p53	上游 CACAGCGTGGTGTACCTTA	58	488
	下游 AAGCCTTGAAGGCTCTAGG		
Caspase-3	上游 GAGCTTGAACGGTACGCTA	56	234
	下游 CCGTACCAGAGCGAGATGAC		
Bcl-2	上游 CATTGGGAAGTTCAAATCAGC	58	308
	下游 GTGCTTTGCATTCTTGGACGAG		
Bax	上游 AGACAGGGGCCTTTTGTCTA	57	400
	下游 TCTTGGATCCAGACAAGCAG		
$\beta$ -actin	上游 TGACGTGGACATCCGCAAAG	59	205
	下游 CTGGAAGGTGGACAGCGAGG		

修复, 加相应的一抗 (Akt1, p53, 1 : 100; PI3K, Caspase-3, Bcl-2 1 : 2 000, Bax 1 : 4 000), 室温下孵育 60 min (或  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜), 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗 3 次, 加二抗, 室温孵育 5 ~ 10 min, 去除 PBS 液, 加 DAB 液, 显微镜下观察 3 ~ 5 min; 自来水冲洗, 苏木素复染, PBS 或自来水冲洗返蓝。切片经梯度乙醇脱水干燥, 二甲苯透明, 中性树脂封固。用 DM2500 型显微镜观察, 组织中出现黄褐色为阳性蛋白表达, 每张免疫组化切片随机选取 5 个视野拍照, 用 Image-Pro Plus 6.0 进行扫描, 以积分吸光度  $IA$  和阳性染色面积百分比表示蛋白的相对表达量。

**2.6 统计学处理** 采用 SPSS 21.0 进行统计分析。各组定量检测数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 TF 对裸鼠 7404 细胞皮下移植瘤的抑制作用

实验过程中无裸鼠死亡。给药后, 除 5-FU 组裸鼠活动减少, 便秘外, 其余各组裸鼠的精神、行为、饮食、大小便与给药前无明显变化。各组体质量下降与模型组比较无差异。与模型组比较, 各药物组瘤重均明显降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 其中 TF 高质量浓度组 IR 为 53.26%, 表明高质量浓度组有较强的抗肿瘤作用。与模型组比较, 5-FU 组和 TF 高、中质量浓度组 RTV 显著降低 ( $P < 0.01$ ), 且 TF 高质量浓度组相对肿瘤增殖率 (T/C) 为 59.74%, 表明 TF 高质量浓度组有较强的抗肿瘤作用。见表 2。

表 2 TF 对裸鼠体质量、瘤重、瘤体体积的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

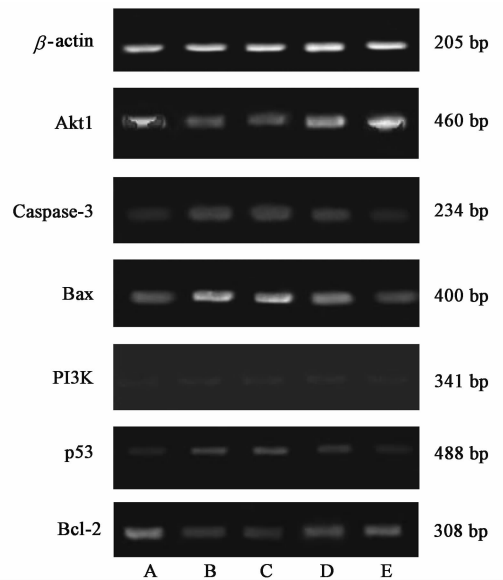
Table 2 Effect of TF on naked weight, volume change of tumor body ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	n	体质量/g		瘤重/g	体积/mm <sup>3</sup>		RTV
			实验前	实验后		实验前	实验后	
模型	-	10	19.48 ± 2.84	17.99 ± 2.88	1.73 ± 0.44	537.5 ± 100.8	3 878.8 ± 788.4	5.68 ± 0.90
5-FU	1	8	19.57 ± 2.21	12.63 ± 2.26	0.53 ± 0.15 <sup>2)</sup>	571.5 ± 79.3	1 483.8 ± 281.8	2.59 ± 0.32 <sup>2)</sup>
TF	30	8	19.07 ± 2.28	16.70 ± 2.57	0.81 ± 0.20 <sup>2,4)</sup>	558.6 ± 75.0	1 897.7 ± 369.2	3.39 ± 0.52 <sup>2,4)</sup>
	15	8	19.68 ± 2.19	17.31 ± 1.18	1.11 ± 0.24 <sup>2,4)</sup>	571.1 ± 63.8	2 273.9 ± 451.2	3.96 ± 0.44 <sup>2,4)</sup>
	7.5	8	19.96 ± 1.72	18.50 ± 1.26	1.26 ± 0.35 <sup>1,4)</sup>	569.3 ± 63.0	2 740.9 ± 540.4	4.82 ± 0.82 <sup>4)</sup>

注:与模型组比较<sup>1)</sup>P < 0.05,<sup>2)</sup>P < 0.01;与 5-FU 组比较<sup>3)</sup>P < 0.02,<sup>4)</sup>P < 0.01(表 3 ~ 5 同)。

**3.2 TF 对 BEL-7404 细胞凋亡通路 PI3K/Akt/p53 中相关 mRNA 表达水平的影响** 5-FU 组,TF 高质量浓度组 PI3K, Akt1, Bcl-2 mRNA 转录水平明显低于模型组 ( $P < 0.05$ ), p53, Caspase-3, Bax mRNA 转录水平明显高于模型组 ( $P < 0.05$ ); TF 中质量浓度组 Bcl-2 mRNA 转录水平明显低于模型组 ( $P < 0.05$ ), p53, Bax mRNA 转录水平明显高于模型组 ( $P < 0.05$ ); TF 低质量浓度组 PI3K, Akt1, p53, Caspase-3, Bcl-2, Bax mRNA 转录水平与模型组比较无统计学差异。见图 1, 表 3。

**3.3 TF 对 BEL-7404 细胞凋亡通路 PI3K/Akt/p53 中相关蛋白表达水平的影响** PI3K, Bcl-2 蛋白表达在细胞浆中, Akt1 蛋白表达于细胞核中, 模型组 PI3K, Akt1, Bcl-2 蛋白表达高, 与模型组比较, 5-FU 组 PI3K, Akt1, Bcl-2 蛋白表达显著减少 ( $P < 0.01$ ); TF 高、中质量浓度组 PI3K, Akt1, Bcl-2 蛋白表达明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。p53 蛋白表达于细胞核, Caspase-3, Bax 蛋白表达于细胞浆; 模型组 p53, Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达较低, 与模型组比较, 5-FU 组 p53, Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达显著



A. 模型组; B. 5-FU 组; C ~ E. TF 高、中、低质量浓度组(图 2 ~ 7 同)  
图 1 BEL-7404 细胞凋亡通路 PI3K/Akt/p53 中 PI3K, Akt1, Bcl-2, p53, Caspase-3 及 Bax mRNA 表达电泳  
Fig. 1 Electrophoresis of TF on transcription of PI3K, Akt1, Bcl-2, p53, Caspase-3, and Bax mRNA expressions in PI3K/Akt/p53 pathway in BEL-7404 cell apoptosis

表 3 TF 对 BEL-7404 细胞凋亡通路 PI3K, Akt1, Bcl-2, p53, Caspase-3, Bax mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 Effect of TF on transcription of PI3K, Akt1, Bcl-2, p53, Caspase-3, and Bax mRNA expressions in PI3K/Akt/p53 pathway of BEL-7404 cell apoptosis ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	PI3K /β-actin	Akt1 /β-actin	Bcl-2 /β-actin	p53 /β-actin	Caspase-3 /β-actin	Bax /β-actin
模型	-	40.77 ± 19.59	32.00 ± 13.53	49.86 ± 18.61	20.06 ± 10.16	12.26 ± 9.17	27.41 ± 12.47
5-FU	1.0	20.76 ± 9.41 <sup>1)</sup>	17.80 ± 6.40 <sup>1)</sup>	27.20 ± 8.74 <sup>1)</sup>	51.30 ± 23.69 <sup>1)</sup>	30.60 ± 16.63 <sup>1)</sup>	76.06 ± 39.17 <sup>1)</sup>
TF	30	20.77 ± 9.57 <sup>1)</sup>	17.40 ± 6.78 <sup>1)</sup>	23.54 ± 6.00 <sup>2)</sup>	47.20 ± 23.33 <sup>1)</sup>	26.66 ± 12.58 <sup>1)</sup>	67.77 ± 39.36 <sup>1)</sup>
	15	33.04 ± 18.26	22.91 ± 8.74	30.79 ± 8.70 <sup>1)</sup>	39.94 ± 17.42 <sup>1)</sup>	23.18 ± 13.11	52.41 ± 24.32 <sup>1)</sup>
	7.5	44.21 ± 18.78 <sup>3)</sup>	32.27 ± 10.46 <sup>3)</sup>	47.60 ± 13.68 <sup>3)</sup>	22.58 ± 9.40 <sup>3)</sup>	11.68 ± 7.12 <sup>3)</sup>	29.59 ± 12.40 <sup>3)</sup>

升高 ( $P < 0.01$ ); TF 高、中质量浓度组 p53, Caspase-3, Bax, Bcl-2 蛋白表达明显升高 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见图 2 ~ 7, 表 4, 5。

#### 4 讨论

藤茶系葡萄科植物显齿蛇葡萄 *Ampelopsis grossedentata* 的嫩茎叶, 又名甜茶藤, 为广西瑶族

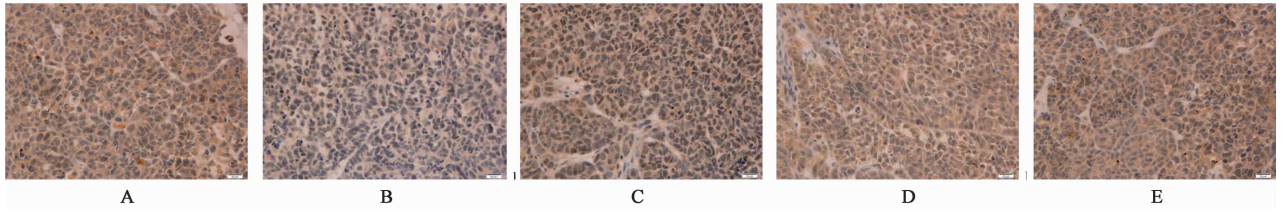


图 2 TF 对裸鼠瘤组织 PI3K 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 2 Comparison of expression of PI3K protein in mouse tumor tissue (IHC, ×400)

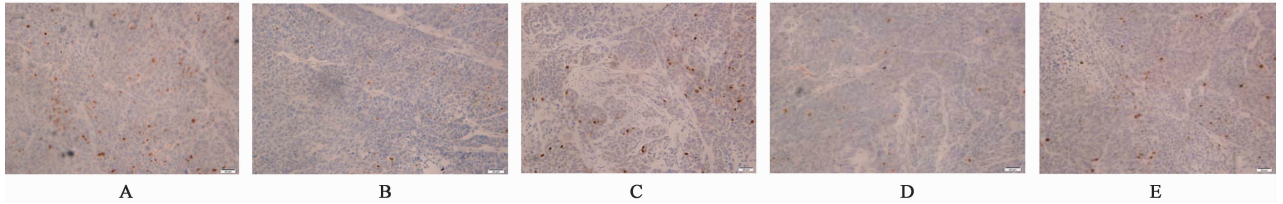


图 3 TF 对裸鼠瘤组织 Akt1 蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 3 Comparison of expression of Akt1 protein in mouse tumor tissue (IHC, ×200)

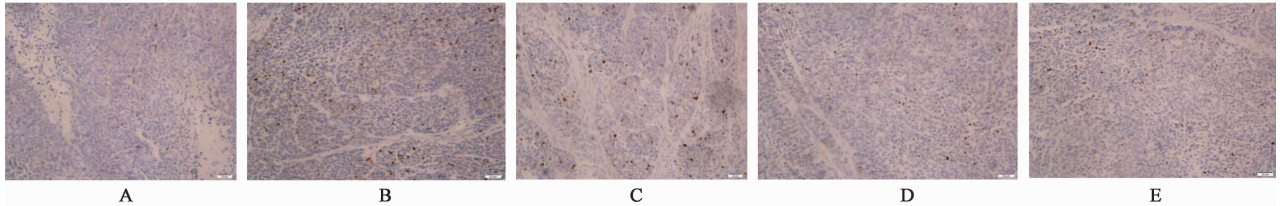


图 4 TF 对裸鼠瘤组织 p53 蛋白表达的影响(免疫组化, ×200)

Fig. 4 Comparison of expression of p53 protein in mouse tumor tissue (IHC, ×200)

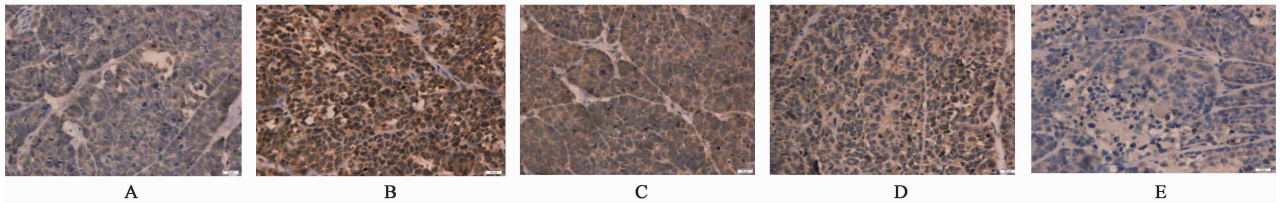


图 5 TF 对裸鼠瘤组织 Caspase-3 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 5 Comparison of expression of Caspase-3 protein in mouse tumor tissue (IHC, ×400)

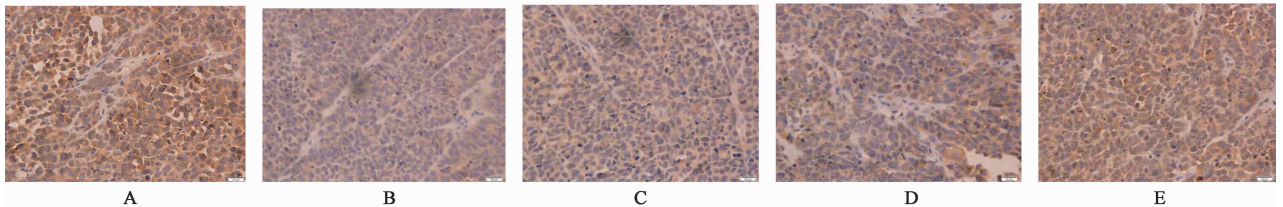


图 6 TF 对裸鼠瘤组织 Bcl-2 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 6 Comparison of expression of Bcl-2 protein in mouse tumor tissue (IHC, ×400)

民间药用的草药之一。经化学成分分析<sup>[23]</sup>,发现藤茶是一种富含黄酮类化合物的一种特殊植物,有效部位黄酮类化合物总量达 43.61% 左右。最新研究表明,TF 具有抑菌抗炎,抗氧化,影响血液流变学,抗肿瘤,增强机体免疫力等药理作用。目前也有大量研究表明中药活性成分黄酮类化合物如双氢杨梅

素、大黄素、芹菜素和姜黄素等均具有抑制肝癌细胞增殖及诱导其凋亡作用,是通过抑制 PI3K/Akt 信号通路中的转导分子如(PKC),三磷酸肌醇(IP3),酪氨酸激酶等实现的。

细胞凋亡由基因控制的细胞自主的有序的死亡,是主动过程,是为更好地适应生存环境而主动

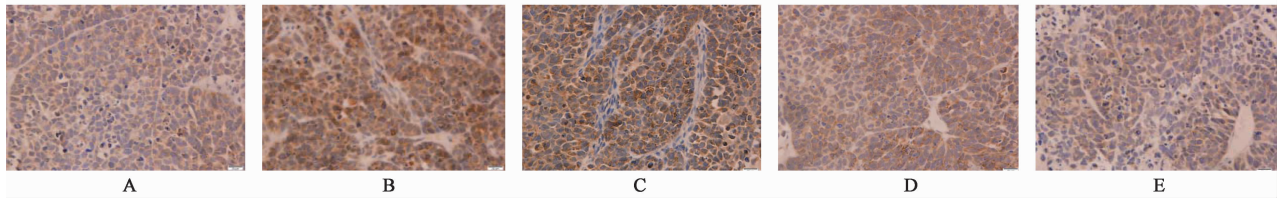


图 7 TF 对裸鼠瘤组织 Bax 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

Fig. 7 Comparison of expression of Bax protein in mouse tumor tissue(IHC, ×400)

表 4 TF 对 BEL-7404 细胞凋亡通路 PI3K, Akt1, Bcl-2, p53, Caspase-3 及 Bax 蛋白积分吸光度的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 4 Effect of TF on average optical density of PI3K, Akt, Bcl-2, p53, Caspase-3, and Bax proteins in apoptosis pathway PI3K/Akt/p53 of BEL-7404 cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	PI3K	Akt1	Bcl-2	p53	Caspase-3	Bax
模型	-	0.214 ± 0.010	0.292 ± 0.052	0.168 ± 0.015	0.312 ± 0.019	0.271 ± 0.010	0.139 ± 0.021
5-FU	1.0	0.182 ± 0.015 <sup>2)</sup>	0.196 ± 0.007 <sup>2)</sup>	0.107 ± 0.018 <sup>2)</sup>	0.372 ± 0.021 <sup>2)</sup>	0.313 ± 0.005 <sup>2)</sup>	0.154 ± 0.018 <sup>2)</sup>
TF	30	0.192 ± 0.015 <sup>1)</sup>	0.203 ± 0.008 <sup>2)</sup>	0.132 ± 0.014 <sup>2,3)</sup>	0.370 ± 0.011 <sup>2)</sup>	0.281 ± 0.003 <sup>1,4)</sup>	0.160 ± 0.019 <sup>2)</sup>
	15	0.200 ± 0.007 <sup>1,4)</sup>	0.208 ± 0.010 <sup>2,3)</sup>	0.144 ± 0.003 <sup>2,4)</sup>	0.353 ± 0.005 <sup>2)</sup>	0.283 ± 0.002 <sup>1,4)</sup>	0.158 ± 0.005 <sup>2)</sup>
	7.5	0.207 ± 0.008 <sup>4)</sup>	0.220 ± 0.019 <sup>2,3)</sup>	0.151 ± 0.005 <sup>1,4)</sup>	0.293 ± 0.057 <sup>4)</sup>	0.278 ± 0.002 <sup>4)</sup>	0.141 ± 0.019 <sup>2)</sup>

表 5 TF 对 BEL-7404 细胞凋亡通路 PI3K, Akt1, Bcl-2, p53, Caspase-3 及 Bax 蛋白染色面积百分比的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of TF on percentage of PI3K, Akt1, Bcl-2, p53, Caspase-3, Bax proteins in PI3K/Akt/p53 apoptosis pathway in BEL-7404 cells( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	PI3K	Akt1	Bcl-2	p53	Caspase-3	Bax
模型	-	32.6 ± 8.7	0.900 ± 0.3	16.7 ± 2.8	0.100 ± 0.4	15.0 ± 7.5	28.9 ± 5.5
5-FU	1.0	14.1 ± 8.8 <sup>2)</sup>	0.300 ± 0.1 <sup>2)</sup>	7.60 ± 3.2 <sup>2)</sup>	0.600 ± 0.1 <sup>2)</sup>	33.5 ± 9.6 <sup>2)</sup>	70.2 ± 12.1 <sup>2)</sup>
TF	30	16.7 ± 9.2 <sup>1)</sup>	0.400 ± 0.2 <sup>2)</sup>	8.40 ± 2.0 <sup>2)</sup>	0.600 ± 0.5 <sup>1)</sup>	32.2 ± 12.7 <sup>1)</sup>	67.6 ± 16.4 <sup>2)</sup>
	15	24.5 ± 1.7 <sup>1,3)</sup>	0.600 ± 0.1 <sup>1,4)</sup>	11.3 ± 1.9 <sup>2,3)</sup>	0.400 ± 0.1 <sup>2,4)</sup>	22.3 ± 1.1 <sup>1,4)</sup>	37.2 ± 7.4 <sup>1,4)</sup>
	7.5	35.3 ± 7.1 <sup>4)</sup>	0.800 ± 0.5 <sup>3)</sup>	13.8 ± 1.9 <sup>4)</sup>	0.200 ± 0.1 <sup>3)</sup>	10.6 ± 9.1 <sup>4)</sup>	25.5 ± 8.7 <sup>4)</sup>

争取的一种死亡过程。它涉及一系列基因的激活、表达以及调控等的作用,如 Bcl-2 家族, Caspase 家族, 癌基因 C-myc, 抑癌基因 p53 等。PI3K/Akt 是与增殖凋亡密切相关的信号通路<sup>[24-29]</sup>, Akt 是核心, 其上游除了 PI3K 还有其他, 但最重要的是 PI3K, 其下游非常多, p53, Caspase, Bcl-2, Bax 等, 其中 p53 是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因。其通过转录激活其他前凋亡基因来实现细胞凋亡的诱导, 如 Caspase-3, Bax, 死亡因子(Fas)等。p53 亦可通过抑制抗凋亡蛋白和诱导因子(PI3K, Akt1 等)的释放参与线粒体介导的细胞凋亡途径。p53 可下调 Bcl-2, 上调 Bax, 使 Bcl-2/Bax 下降, 降低线粒体的跨膜电位, 使线粒体内的一些促凋亡蛋白释放到细胞浆, 引起细胞凋亡。Caspase-3 是凋亡过程中最重要的效应因子, 其凋亡标志着凋亡进入不可逆的阶段。Bcl-2 是目前发现的最重要的抑制肿瘤细胞凋亡的基因, 其过度表达并不加速细胞增殖和分化, 而是

通过延长细胞生存来阻止凋亡的发生。Bcl-2 不但能抑制细胞凋亡, 促进细胞存活, 而且能拮抗抑癌基因所介导的细胞凋亡。当肿瘤细胞的 Bcl-2 表达增强时, 癌细胞对各种化疗药物, γ 射线等所诱导的细胞凋亡产生抵抗作用。Bax 是第 1 个被确定的 Bcl-2 的同源基因, 两者具有 45% 的同源性。Bax 的功能与穿孔素极为相似, 在高浓度时本身可启动细胞死亡, 低浓度时可使细胞器释放出某些分子, 引起 Caspases 的活化, 并拮抗 Bcl-2 的保护效应, 而使细胞趋于凋亡, 因此有人认为在凋亡刺激物作用后, 细胞的生存能力依赖于细胞内部 Bcl-2/Bax。因此, 调控肿瘤细胞内部 Bcl-2/Bax 降低, 能有效地促进该细胞凋亡。

综上所述, 本研究证实了 TF 具有抑制人肝癌 BEL-7404 细胞的增殖, 其具有明显的体内抗肝癌作用, 作用机制可能与与上调 p53, Caspase-3 的表达, 激活细胞凋亡 PI3K/Akt/p53 信号传导通路, 从而

抑制 Bcl-2, 提高 Bax 的表达, 促进肝癌细胞凋亡有关。

[参考文献]

[1] 陈明,王举涛,吴珍妮,等. 半枝莲总黄酮通过 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导肿瘤细胞自噬的体内实验研究[J]. 中国中药杂志,2017,42(7):1358-1364.

[2] 王容容,谭小宁,李勇敏,等. 健脾消癌方对大肠癌肝转移裸鼠模型肝组织 PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(6):177-181.

[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] ZHANG Q Z, YU D. Protection against cerebral infarction by Withaferin A involves inhibition of neuronal apoptosis, activation of PI3K/Akt signaling pathway, and reduced intimal hyperplasia via inhibition of VSMC migration and matrix metalloproteinases[J]. Adv Med Sci,2017,62(1):186-192.

[5] Maliheh A. Epigallocatechin-3-gallate promotes apoptosis in human breast cancer T47D cells through down-regulation of PI3K/Akt and telomerase [J]. Pharmacol Rep,2017,69(5):924-928.

[6] 孙阳,于水澜,吴勃岩,等. 槲皮素自微乳的抗肿瘤作用及其机制分析[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(14):97-101.

[7] 史桂兰,黄琳,卿海燕,等. 槲皮素对人肝癌 SMMC-7721 细胞生长抑制及诱导凋亡作用[J]. 中国实验诊断学,2015,19(1):17-19.

[8] 张冬青,汪德清,李卉,等. 黄芪总黄酮对 K562 细胞凋亡及细胞周期的影响[J]. 中国药理学通报,2010,26(1):136-137.

[9] 盛连兵,孙凯,刘海萍,等. 金雀异黄素调控 Egr1/PTEN 信号通路诱导卵巢癌 SKOV3 细胞凋亡的实验研究[J]. 中国妇产科临床杂志,2017,18(4):341-344.

[10] 王晓东. 汉黄芩素对人肝癌 SMMC-7721 的抑制作用及其作用机制研究[J]. 中国继续医学教育,2016,8(34):180-182.

[11] 于海瑶,李石化,孙丽艳,等. 异荛草素对胃癌细胞自噬作用的研究[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(12):36-38.

[12] 陈帅,郁建平. 藤茶总黄酮抗炎及抑菌作用的实验研究[J]. 贵阳中医学院学报,2013,35(1):1-3.

[13] 冯涵,李娜,王华林,等. 藤茶中黄酮类成分的功效研究进展[J]. 公共卫生与预防医学,2018,29(1):

82-86.

[14] 欧贤红,郑作文. 藤茶总黄酮对免疫性肝损伤小鼠的保护作用[J]. 哈尔滨医药,2011,31(1):1-3.

[15] 曾宪彪,韦桂宁,何飞,等. 藤茶总黄酮对动脉粥样硬化大鼠血脂及血液流变学的影响[J]. 重庆医学,2014,43(5):518-520.

[16] 周春权,林静瑜,姚欣,等. 藤茶总黄酮体外抗肿瘤实验研究[J]. 中国医药科学,2012,2(9):50-51.

[17] 李刚,郑作文,唐云丽. 藤茶总黄酮体外抗人肝癌细胞作用研究[J]. 中国药房,2008(9):652-654.

[18] 郑作文. 藤茶总黄酮在 2215 细胞培养中对乙型肝炎病毒 HBsAg、HBeAg 和 HBV-DNA 的抑制作用[J]. 山东中医杂志,2003,22(9):561-563.

[19] 高倩倩,杨秀芬,欧敏. 藤茶总黄酮和二氢杨梅素含药血清对肝癌 HepG2 细胞增殖及凋亡的影响[J]. 中国中药杂志,2011,36(4):500-503.

[20] 金慧鸣,谭兴和,蔡文,等. 响应面法优化藤茶总黄酮的提取工艺[J]. 食品安全质量检测学报,2015,6(5):1575-1582.

[21] 晏容,刘云,朱欣婷,等. 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤凋亡的影响[J]. 天然产物研究与开发,2015,27(2):236-240.

[22] 冯巍巍,黎梨,黄赞松,等. 苦参素通过调控 MRP1 表达提高多柔比星对人肝癌耐药裸鼠移植瘤的抑制作用[J]. 右江民族医学院学报,2018,40(1):8-12.

[23] 曾云想,郁建平. 藤茶总黄酮提取方法的优选[J]. 山地农业生物学报,2013,32(2):153-158.

[24] 钟宇,郑学宝,蔡康荣,等. 异丁酰紫草素通过 PI3K/Akt/m-TOR 通路靶向抑制结肠癌细胞增殖的研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(11):2358-2364.

[25] 魏蔚,刘玉华. 姜黄素通过活化 PI3K/Akt 信号通路逆转肝癌耐药细胞株 Bel7402/ADR 的耐药性[J]. 中国老年学杂志,2018,38(12):3015-3019.

[26] 胡泽成. 青龙衣多糖对结肠癌 HCT-116 细胞增殖、凋亡及 PI3K/Akt 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(18):136-139.

[27] 辛红,徐巍. 甘草查尔酮 A 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路诱导肾癌细胞自噬的研究[J]. 中国中药杂志,2018,43(17):3545-3552.

[28] 陈滨,郭洁文,何素,等. 叶下珠复方 II 号对肝癌细胞增殖和胰岛素样生长因子-1 受体信号通路转录的作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2018,24(14):108-114.

[29] CHEN Y Y, CAO Y Z, LI F Q, et al. Studies on anti-hepatoma activity of *Annona squamosa* L. pericarp extract[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2017, 27(9):1907-1910.

[责任编辑 张丰丰]