

- metrium under the influence of sex steroids[J]. Gynecol Oncol, 1985, 21(1): 32-41.
- [9] MATSUO H, KURACHI O, SHIMOMURA Y, et al. Molecular bases for the actions of ovarian sex steroids in the regulation of proliferation and apoptosis of human uterine leiomyoma[J]. Oncology, 1999, 57 Suppl 2: 49-58.
- [10] 王月刚, 金春华, 黄海潇, 等. 虎杖苷对缺血缺氧下平滑肌细胞蛋白激酶C的影响[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(4): 461-464.
- [11] 龚晓燕, 保永亮, 黄金玲. 血管内皮生长因子与肿瘤侵袭转移[J]. 安徽医药, 2013, 17(1): 3-5.
- [12] 李岩, 胡冰. 恶性腹水的抗血管生成治疗进展[J]. 安徽医药, 2013, 17(4): 541-543.
- [13] 孙桂丽, 王大鹏. 蛋白激酶C在细胞及肿瘤细胞凋亡中的作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2009, 13(7): 1360-1363.
- [14] 丁金丽. 蛋白激酶C-theta (PKC θ)在GIST尤其是C-KIT阴性的GIST中表达的病理意义[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2010.
- [15] 刘燕. OTR、PKC β 及CPI-17在子宫腺肌病患者子宫结合带中的表达及意义[D]. 河南: 郑州大学, 2017.
- [16] 张呈艳, 王哲梅, 董建春. 缺氧诱导因子1 α 和VEGF及其受体与妇科恶性肿瘤[J]. 国际妇产科学杂志, 2011, 38(4): 320-323.
- (收稿日期: 2017-06-13, 修回日期: 2019-01-15)

doi: 10.3969/j.issn.1009-6469.2019.05.002

◇ 药学研究 ◇

紫草素对荷肝癌裸小鼠移植瘤生长的抑制作用及机制

武向丽

作者单位: 邯郸市中心医院药学部, 河北 邯郸 056001

摘要:目的 研究紫草素抑制荷肝癌裸小鼠移植瘤生长的作用及其机制。方法 通过皮下注射肝癌细胞制备荷肝癌裸小鼠模型; 设模型组、紫草素低、中、高剂量组和顺铂组, 每组12只, 分别隔天一次给予0.9%氯化钠溶液, 紫草素0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg和顺铂2 mg/kg, 共给药6次。观察动物生存状态和移植瘤组织生长状态, 称量瘤重并计算抑瘤率; HE染色法进行肿瘤组织形态检查, TUNEL法进行细胞凋亡检查, 免疫组织化学法观察肿瘤组织凋亡相关蛋白表达。结果 与模型组比较, 紫草素各组裸小鼠食欲和精神状态都明显好转, 瘤体积小、活动度低、硬度低, 移植瘤组织出现片状坏死病变、移植瘤组织细胞凋亡数量明显增多, 凋亡指数显著升高[(22.93±5.40)、(39.86±8.25)、(60.74±9.61)比(2.64±1.09), $P < 0.05$]; 瘤体质量显著减轻[(1.32±0.21) g、(1.18±0.17) g、(0.83±0.12) g比(1.69±0.14) g, $P < 0.05$]、抑瘤率显著升高[(21.89±3.75)%、(30.18±4.92)%、(50.89±6.43)%比(0.00±0.00)%, $P < 0.01$]; 肿瘤组织中凋亡相关蛋白[半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(caspase-3)、bcl-2相关X蛋白质(Bax、bcl-2)]中的caspase-3表达显著上调[(0.16±0.05)、(0.21±0.04)、(0.27±0.06)比(0.05±0.02), $P < 0.05$]、Bax表达显著上调[(0.54±0.10)、(0.63±0.15)、(0.81±0.21)比(0.29±0.05), $P < 0.01$], 其中紫草素中、高剂量组bcl-2显著下调[(0.37±0.05)、(0.30±0.05)比(0.50±0.07), $P < 0.05$], Bax/bcl-2比值显著升高[(1.17±0.25)、(1.70±0.39)、(2.71±0.68)比(0.59±0.20), $P < 0.05$]。结论 紫草素具有抑制荷肝癌裸小鼠移植瘤生长的作用, 可能与其调节凋亡相关蛋白表达而促进细胞凋亡、诱导肿瘤组织坏死有关。

关键词: 肝肿瘤; 紫草素; 细胞凋亡; 顺铂; 半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3; bcl-2相关X蛋白质; 小鼠, 裸

The effects and mechanism of *Shikonin* on xenografts growth in liver cancer of nude mice

WU Xiangli

Author Affiliation: Department of Pharmacy, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001, China

Abstract: Objective To investigate the effect of *Shikonin* on the growth of transplanted tumor in nude mice bearing liver cancer and its mechanism. Methods The nude mice models bearing liver cancer were made by subcutaneous injection of human liver cell line HepG2, and were treated with *Shikonin* (0.5, 1, 2 mg/kg) and Cisplatin (2 mg/kg), once every two days, for 6 times. The mice's general states and tumor growth conditions were observed, the histopathological changes of tumor tissue was observed by HE staining; the tumor cells apoptosis was detected by TUNEL; the expression of apoptosis-related protein were detected by immunohistochemistry (IHC). Results After treated with *Shikonin*, the diet and mental state of nude mice bearing liver cancer were improved, tumor size, activity and hardness decreased; the tumor tissue showed pathological changes such as necrosis, cell shrinkage, the number of apoptotic cells in tumor tissue increased significantly, and the apoptotic index increased significantly[(22.93±5.40), (39.86±8.25), (60.74±9.61) vs. (2.64±1.09), $P < 0.05$]; the tumor weight of *Shikonin* treated groups decreased significantly[(1.32±

0.21) g, (1.18±0.17) g, (0.83±0.12) g vs. (1.69±0.14) g, $P < 0.05$ or $P < 0.01$]; the inhibition rate increased significantly [(21.89±3.75)%, (30.18±4.92)%, (50.89±6.43)% vs. (0.00±0.00)%, $P < 0.01$]; the expression of Bax [(0.16±0.05), (0.21±0.04), (0.27±0.06) vs. (0.05±0.02), $P < 0.05$] and caspase-3 [(0.54±0.10), (0.63±0.15), (0.81±0.21) vs. (0.29±0.05), $P < 0.01$] increased significantly, the expression of Bcl-2 protein in Shikonin (1, 2 mg/kg) groups decreased significantly [(0.37±0.05), (0.30±0.05) vs. (0.50±0.07), $P < 0.05$], and the ratio of Bax/Bcl-2 were increased significantly [(1.17±0.25), (1.70±0.39), (2.71±0.68) vs. (0.59±0.20), $P < 0.05$]. **Conclusions** Shikonin inhibits the growth of xenografted liver cancer in nude mice, which may be related to the regulation of apoptosis-related protein expression, apoptosis and tumor necrosis.

Key words: Liver neoplasms; Shikonin; Apoptosis; Cisplatin; Caspase 3; Bcl-2-associated X protein; Mice, nude

肝癌是全球及我国发病率和致死率均较高的恶性肿瘤之一,于我国致死率居恶性肿瘤第二位。紫草素是我国传统中药品种紫草的活性成分之一,具有增强免疫力、抑制炎症反应等多方面药理学作用^[1-2],已见文献报道紫草素对乳腺癌、子宫内膜癌、白血病、宫颈癌、喉癌等部位肿瘤生长都具有一定的抑制作用^[3-7],但紫草素是否对肝癌生长具有抑制作用的文献报道尚不多见,本研究将对这一问题进行研究分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物和实验细胞 本研究时间为2016年4—8月,选取4~6周龄Balb/C品系裸小鼠,雄性、体重范围18~22 g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005]提供;所有实验操作均符合一般动物伦理学要求。人肝癌HepG2细胞株由河北医科大学细胞生物研究室惠赠。

1.2 药物与试剂 紫草素(中国药品生物制品检定所,批号110769-201603,纯度≥98%);注射用顺铂[齐鲁制药(海南)有限公司,10 mg/支,批号1602016];HE、TUNEL试剂盒购自南京建成生物研究所(批号分别为20141123、20140918);半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(caspase-3)、bcl-2相关X蛋白质(Bax、bcl-2)抗体(上海碧云天生物技术有限公司,批号201501006、201410013、201405009)。

1.3 荷肝癌裸小鼠模型的制备、分组与给药 参照谢丹等^[8]报道的方法制备荷肝癌裸小鼠模型人肝癌HepG2细胞株经解冻复苏后植入DMEM高糖培养基进行培养,取对数生长期细胞并调整其浓度为 2×10^7 个/mL,于右后腿外侧皮下注射0.5 mL浓度为 2×10^7 个/mL的细胞溶液,以一周后右后腿外侧皮下出现 $> 0.3 \text{ cm}^2$ 移植瘤为模型复制成功。取模型裸小鼠设模型组,紫草素低、中、高剂量组和顺铂组,每组12只,分别隔天一次给予0.9%氯化钠溶液,紫草素0.5 mg/kg、1 mg/kg、2 mg/kg和顺铂2 mg/kg,共给药6次。

1.4 观察动物生存状态和抑制率组织生长状态 观察各组裸小鼠食欲、精神状态等;观察各组裸小

鼠抑制率瘤体大小、活动度、硬度等指标。

1.5 瘤量和抑瘤率 颈椎脱臼处死动物后剥取肿瘤组织并称重,抑瘤率(%)=(模型组瘤重-治疗组瘤重)/模型组瘤重 $\times 100\%$ 。

1.6 肿瘤组织形态检查和细胞凋亡状况观察 称重后瘤体经4%多聚甲醛溶液固定72 h后进行石蜡包埋、切片、展片、水化等处理后,①行HE染色后封片,倒置光学显微镜观察肿瘤组织形态结构;②依照TUNEL试剂盒操作步骤进行处理,倒置光学显微镜观察细胞凋亡状况(细胞核黄染为细胞凋亡指征),凋亡指数(Apoptosis Index, AI)(%)=(凋亡细胞数/细胞总数) $\times 100\%$ 。

1.7 凋亡相关蛋白表达 取1.6步骤水化处理后切片,采用IHC法检测凋亡相关蛋白[半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶3(caspase-3)、bcl-2相关X蛋白质(Bax、bcl-2)]表达;蛋白表达量通过半定量分析计算:每张切片随机选取互不重叠的5个视野,通过图像分析软件计算每个视野光密度值(OD),以OD值代表蛋白表达密度,并进一步计算Bax/bcl-2表达比值。

1.8 统计学方法 运用SPSS 13.0进行数理统计分析,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组裸小鼠生存状态及肿瘤特征观察结果 模型组裸小鼠精神萎靡、食欲不振,移植瘤呈质硬、活动性强、与胸壁不粘连等特征。紫草素低、中、高剂量组和顺铂组裸小鼠食欲和精神状态较模型组均明显改善,瘤体积小、活动度低、硬度低,紫草素干预作用具有一定剂量依赖性。

2.2 各组裸小鼠移植瘤瘤体质量和抑瘤率 与模型组比较发现经紫草素中、高剂量组和顺铂治疗能够显著降低荷肝癌裸小鼠移植瘤质量,差异有统计学意义($P < 0.05$),经紫草素低、中、高剂量组或顺铂治疗能够显著提高抑瘤率,差异有统计学意义($P < 0.01$);紫草素高剂量组和顺铂组比较瘤重、抑瘤率,均差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表1。

表1 紫草素对荷肝癌裸小鼠移植瘤瘤体质量和抑瘤率的影响/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	瘤体质量/g	抑瘤率/%
模型组	12	1.69±0.14	0.00±0.00
紫草素低剂量组	12	1.32±0.21	21.89±3.75 ^b
紫草素中剂量组	12	1.18±0.17 ^a	30.18±4.92 ^b
紫草素高剂量组	12	0.83±0.12 ^b	50.89±6.43 ^b
顺铂组	12	0.76±0.11 ^b	55.03±8.17 ^b
<i>F</i> 值		72.509	194.686
<i>P</i> 值		0.000	0.000

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

2.3 各组裸小鼠肿瘤组织形态结构 结果如图1所示:与模型组比较发现,经紫草素低、中、高剂量组或顺铂干预治疗后,肝癌移植瘤组织呈现片状坏死病变,移植瘤组织细胞数量减少、间隙增大,上述作用呈一定剂量依赖性。

2.4 各组裸小鼠肿瘤组织细胞凋亡状况 结果如图2所示:与模型组比较发现,经紫草素各剂量或顺铂干预治疗后荷肝癌裸小鼠移植瘤组织凋亡细胞数量明显增多,以紫草素高剂量组效果最为显著。凋亡指数(AI)计算结果:与模型组比较,紫草素低、中、高剂量组和顺铂组AI均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);紫草素高剂量组和顺铂组比较,紫草素高剂量组AI显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表2。

表2 紫草素对荷肝癌裸小鼠肿瘤组织细胞AI的影响

组别	鼠数	AI/(%, $\bar{x} \pm s$)
模型组	12	2.64±1.09
紫草素低剂量组	12	22.93±5.40 ^a
紫草素中剂量组	12	39.86±8.25 ^a
紫草素高剂量组	12	60.74±9.61 ^{ab}
顺铂组	12	45.80±7.13 ^a
<i>F</i> 值		123.789
<i>P</i> 值		0.000

注:与模型组比较,^a $P < 0.01$;与顺铂组比较,^b $P < 0.05$ **表3** 各组裸小鼠移植瘤组织中caspase-3、Bax、bcl-2表达OD值及Bax/bcl-2表达比值/ $\bar{x} \pm s$

组别	鼠数	caspase-3(OD)	Bax(OD)	bcl-2(OD)	Bax/bcl-2
模型组	12	0.05±0.02	0.29±0.05	0.50±0.07	0.59±0.20
紫草素低剂量组	12	0.16±0.05 ^a	0.54±0.10 ^b	0.46±0.11	1.17±0.25 ^a
紫草素中剂量组	12	0.21±0.04 ^b	0.63±0.15 ^b	0.37±0.05 ^a	1.70±0.39 ^b
紫草素高剂量组	12	0.27±0.06 ^{bc}	0.81±0.21 ^b	0.30±0.05 ^b	2.71±0.68 ^{bc}
顺铂组	12	0.15±0.04 ^a	0.74±0.14 ^b	0.39±0.07 ^a	1.89±0.43 ^b
<i>F</i> 值		37.423	23.766	11.979	41.591
<i>P</i> 值		0.000	0.000	0.001	0.000

注:与模型组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与顺铂组比较,^c $P < 0.05$

2.5 各组裸小鼠移植瘤caspase-3蛋白表达 较模型组,经紫草素低、中、高剂量组或顺铂组治疗后荷肝癌裸小鼠移植瘤组织中caspase-3蛋白表达显著上调,以紫草素2 mg/kg组效果最为显著;见图3。半定量分析结果:较模型组,紫草素低、中、高剂量组和顺铂组移植瘤组织caspase-3蛋白表达OD值显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。紫草素高剂量组和顺铂组比较caspase-3蛋白表达OD值,紫草素高剂量组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表3。

2.6 各组裸小鼠移植瘤组织Bax、bcl-2蛋白表达及Bax/bcl-2表达比值 与模型组比较,紫草素低、中、高剂量组和顺铂组移植瘤组织Bax蛋白表达不同程度上调、bcl-2表达不同程度下调,差异有统计学意义($P < 0.05$),其中以紫草素高剂量组上述效果最为显著;见图4、图5。半定量分析结果:较模型组,紫草素低、中、高剂量组和顺铂组裸小鼠移植瘤Bax表达OD值明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),紫草素中、高剂量组和顺铂组bcl-2表达OD值显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),紫草素低、中、高剂量组和顺铂组Bax/bcl-2表达比值显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);紫草素高剂量组和顺铂组比较,紫草素高剂量组Bax/bcl-2表达比值显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),Bax、bcl-2蛋白表达OD值差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表3。

3 讨论

肝癌是一种转移能力和侵袭其它器官组织能力都比较强的癌种之一^[9-10],并且因为肝癌发病较为隐匿,多数病人确诊时已错过手术机会^[11],5年复发率达60%,因此延缓肝癌肿瘤生长、延长病人生存期是临床上迫切需要解决的医学难题。

紫草素是一种萘醌类化合物,近年来研究发现紫草素具有抑制多部位肿瘤生长的作用,能够通过促进内源性活性氧合成而抑制人宫颈癌Hela细胞增殖^[5]、通过调节细胞周期时相而抑制喉癌细胞增殖^[6]、促进人乳腺癌MCF-7细胞自噬^[3]、促进抑制白

血病HL-60细胞凋亡并抑制增殖^[7]。本实验结果显示,紫草素能够明显改善荷肝癌裸小鼠食欲和精神状态、减慢移植瘤生长、降低瘤体硬度、降低瘤体活动度,诱导移植瘤组织片状坏死、促进肿瘤细胞凋亡,说明紫草素具有抑制荷肝癌裸小鼠移植瘤生长的作用。

细胞凋亡是细胞的一种自助程序性死亡模式,caspase-3、Bax、bcl-2三种蛋白在细胞凋亡过程中发挥着重要调节作用。其中caspase-3蛋白为凋亡刺激因子,为细胞凋亡的“激活器”,Bax能够改变线粒体膜通透性、促进细胞色素C释放而诱导细胞凋亡^[12],bcl-2能够通过抑制caspase-3活性、保护线粒体膜而抑制细胞凋亡^[13-15]。此外,Bax蛋白和bcl-2蛋白能够形成同源二聚体而相互抑制二者活性,因此Bax/bcl-2蛋白表达比值能够反应二者对细胞凋亡的真实调节作用^[16]。本实验结果显示,紫草素能够上调移植瘤组织caspase-3、Bax蛋白表达并下调bcl-2蛋白表达,提高Bax/bcl-2表达比值。

综上所述,紫草素具有抑制肝癌裸小鼠移植瘤生长的作用,紫草素调节凋亡相关蛋白表达而促进肿瘤细胞凋亡可能是该作用重要的分子机制。

(本文图1~5见插图5-1)

参考文献

- [1] 张永红,于慧敏,聂英坤.紫草素对类风湿关节炎滑膜成纤维细胞COX-2表达的影响[J].哈尔滨医科大学学报,2012,46(3):261-265.
- [2] 代巧妹,李冀,颜培宇.紫草素免疫调节作用研究进展[J].中医药信息,2012,29(6):116-118.
- [3] 陈菊英,刘朝纯,曾智,等.紫草素通过PI3K/Akt通路促进人乳腺

癌MCF-7细胞自噬[J].中国药理学通报,2013,29(2):194-198.

- [4] 杨京哲,张凌霄,邢永静,等.紫草素对子宫内腺癌Ishikawa细胞生长的作用研究[J].现代中西医结合杂志,2013,22(23):2520-2523.
- [5] 于海荣,苗浩,庞冲,等.紫草素对人宫颈癌Hela细胞增殖的影响及其作用机制研究[J].中国生化药物杂志,2015,35(4):16-18.
- [6] 鲁昊,康健.紫草素对人喉癌Hep-2细胞生长的作用研究[J].东南大学学报(医学版),2011,30(2):350-354.
- [7] 陈志炉,戴其舟,王勇,等.紫草素对白血病细胞HL-60增殖及凋亡作用的影响[J].中国中西医结合杂志,2012,32(2):239-243.
- [8] 谢丹,林源,杨阿莉.大黄素抑制人肝癌裸鼠移植瘤生长机制探讨[J].中华肿瘤防治杂志,2015,22(1):28-33.
- [9] 高姗,杨万水,高静,等.原发性肝癌的分子流行病学研究进展[J].中国肿瘤,2012,21(2):136-144.
- [10] 吕桂帅,陈磊,王红阳.我国肝癌研究的现状与前景[J].生命科学,2015,27(3):237-248.
- [11] ANSARI D, ANDERSSON R. Radiofrequency ablation or percutaneous ethanol injection for the treatment of liver tumors[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(10):1003-1008.
- [12] FARHADI F, JAHANPOUR S, HAZEM K, et al. Garlic (Allium sativum) fresh juice induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma: the involvement of caspase-3, bax and bcl-2[J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2015, 9(4):267-273.
- [13] OGURA T, TANAKA Y, TAMAKI H, et al. Docetaxel induces Bcl-2- and pro-apoptosis caspase-independent death of human prostate cancer DU145 cells[J]. Int J Oncol, 2016, 48(6):2330-2338.
- [14] 焦卫云,陈道俊,柯章敏,等.姜黄素增加U937细胞对TRAIL的敏感性的凋亡机制研究[J].安徽医药,2015,19(3):563-565.
- [15] 叶记林,于有江,吴爱莲,等.氧化应激在TRAIL诱导Hela细胞凋亡中的作用[J].安徽医药,2015,19(11):2090-2093.
- [16] SAEEDI BORUJENI MJ, HAMI J, HAGHIR H, et al. Evaluation of bax and bcl-2 proteins expression in the rat hippocampus due to childhood febrile seizure[J]. Iran J Child Neurol, 2016, 10(1):53-60.

(收稿日期:2016-09-17,修回日期:2019-01-12)

◇ 编读往来 ◇

关于关键词标引的要求

关键词是为了文献标引工作从报告、论文中选取出来的用以表示全文主题内容信息款目的单词或术语。关键词包括叙词(主题词)和自由词两部分。主题词是专门为情报检索机构编制索引用的,它是从自然语言的主要词汇中选取后并加以规范化的词或词组;自由词是尚未规范化的词或词组。

GB/T 3179-92规定,现代科技期刊都应在学术论文的摘要后面给出3~8个关键词(或叙词)。关键词的标引应按GB/T 3860-1995《文献叙词标引规则》的原则和方法,参照各种词表和工具书选取;请尽量使用美国国立医学图书馆编辑的最新版《Index Medicus》中的医学主题词表(MeSH)内所列的词,其中文译名可参照中国医学科学院信息研究所编译的《医学主题词注释字顺表》。如果MeSH表中尚无相应的词,可选用直接相关的几个主题词进行组配;可根据树状结构表选用最直接的上位主题词;必要时可以将新学科、新技术中的重要术语以及文章题名的人名、地名作为关键词标出(自由词),并排列于最后;忌用泛指词。

关键词中的缩写应按MeSH表还原为全称;每个英文关键词第一个字母大写,各词汇之间用分号;中、英文关键词要相对应。

(郝希春)