

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2021.19.012

鳖甲煎丸对二乙基亚硝胺诱导的肝癌前病变模型大鼠肝组织 IL-6/STAT3 信号通路的影响



陈炜聪¹, 文彬², 孙海涛¹, 孙嘉玲¹, 杨雪梅¹,
黄少慧¹, 安海燕¹, 庞杰¹, 贺松其¹✉

1. 南方医科大学中医药学院, 广东省广州市广州大道北 1838 号, 510515; 2. 中国人民解放军南部战区空军医院

[摘要] 目的 探讨鳖甲煎丸治疗肝癌前病变的可能作用机制。方法 30 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、鳖甲煎丸组, 每组 10 只。除正常组外其余两组注射二乙基亚硝胺 (DEN) 连续 16 周建立肝癌前病变模型。造模第 8 周, 鳖甲煎丸组给予鳖甲煎丸药液 1.1 g/kg 灌胃, 正常组和模型组予以 10 ml/kg 生理盐水灌胃, 均每日 1 次, 连续灌胃至第 18 周。给药结束后测量大鼠体重、肝脏重量、肝脏表面结节数量及最大结节直径, 观察肝脏病理改变及肝组织甲胎蛋白 (AFP)、人胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶 (GST- π) 表达情况, 检测肝功能指标包括丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、总胆红素 (TBiL)、白蛋白 (ALB)、谷氨酰转氨酶 (GGT)、碱性磷酸酶 (ALP), 血清白细胞介素 6 (IL-6)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、趋化因子 2 (CCL-2) 表达, 肝组织 IL-6、TNF- α 、CCL-2 mRNA 表达及 IL-6、TNF- α 、磷酸化转录激活因子 3 (p-STAT3) 蛋白表达。结果 与正常组比较, 模型组大鼠体重明显降低, 肝脏重量及肝脏体重比均明显增加, 肝脏表面结节数量及结节最大直径明显增加, HE 染色见肿瘤病灶内出现大片肝细胞坏死, 肿瘤细胞异型性明显, 不典型增生结节内 GST- π 呈强阳性, 瘤组织中 AFP 染色明显, 肝功能指标除 ALB 外均明显升高, 血清 IL-6、CCL-2 水平, 肝组织 IL-6、CCL-2 mRNA 表达及 IL-6、TNF- α 、p-STAT3 蛋白相对表达量均明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸组肝脏重量、肝脏体重比均明显下降, 肝脏表面结节数量及结节最大直径明显降低, 癌细胞多呈高分化, 肿瘤坏死区少见, GST- π 、AFP 染色较浅, 阳性区域较少, 血清 AST、TBiL、GGT 水平明显降低, 血清 IL-6、CCL-2 水平, 肝组织 IL-6、CCL-2 mRNA 表达及 IL-6、p-STAT3 蛋白相对表达量均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 鳖甲煎丸可能通过降低炎症因子表达, 抑制 IL-6/STAT3 通路的激活, 从而抑制肝癌前病变的发生发展。

[关键词] 原发性肝癌; 癌前病变; 鳖甲煎丸; 白细胞介素 6; 转录激活因子 3

肝癌是全球最常见的癌症之一, 在 2020 年全球癌症发病率中排第 6 位, 癌症相关死亡例数排第 3 位^[1], 在我国癌症相关死亡例数中排第 2 位^[2]。在原发性肝癌中, 原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 占 85%~90%^[1]。由于 HCC 起病隐匿, 早期临床症状多不明显, 故早期发现及诊断的难度较大, 确诊时多属晚期, 失去了手术切除的时机, 其五年生存率约为 18%^[3]。持续性肝脏炎症

微环境, 尤其是慢性肝炎, 刺激库弗细胞分泌大量的白细胞介素 6 (IL-6), 可导致异常增生结节 (癌前病变), 最终进展成 HCC^[4]。肝脏炎症微环境中的 IL-6 与受体结合后, 引起转录激活因子 3 (STAT3) 的磷酸化激活, 并进入细胞核, 使癌症驱动基因异常表达, 造成“炎-癌”转化, 故靶向 IL-6、STAT3 成为 HCC 的潜在治疗靶点^[5-6]。肝癌前病变是介于肝纤维化、肝硬化与 HCC 之间的过渡病变阶段, 其定义为“肝组织有异型增生但又未达到恶性肿瘤标准, 具有高度恶性潜能的, 直径 1 mm 以上的不典型增生结节”^[7-8]。中医药以其独

基金项目: 国家自然科学基金 (81774037); 广东省自然科学基金 (2021A1515012591)

✉ 通讯作者: hesongqijz@126.com, (020)61648165

特的辨证论治理论和“治未病”的防治特色，在控制癌前病变方面已凸现优势^[9]。鳖甲煎丸出自《金匮要略》，临床上多用于治疗慢性肝病，具有良好疗效^[10-11]。本研究利用二乙基亚硝胺（DEN）诱导制备肝癌前病变模型大鼠，观察鳖甲煎丸对大鼠肝癌形成过程中肝脏炎症因子表达及 IL-6/STAT3 通路的影响，以探讨鳖甲煎丸调控肝癌前病变的可能作用机制。本实验通过南方医科大学实验动物伦理委员会批准（批准号：L2019055）。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 30 只，体质量 220~250 g，6~8 周龄，购自南方医科大学实验动物中心，实验动物生产许可证号：SCXK（粤）2016-0041，使用许可证号：SYXK（粤）2016-0167。饲养于南方医科大学动物实验中心 SPF 级环境中，所有大鼠以标准饲料喂养，自由饮水。

1.2 药物

鳖甲煎丸，组成：鳖甲胶、阿胶、蜂房（炒）、鼠妇虫、土鳖虫（炒）、蜣螂、硝石（精制）、柴胡、黄芩、半夏（制）、党参、干姜、厚朴（姜制）、桂枝、白芍（炒）、射干、桃仁、牡丹皮、大黄、凌霄花、葶苈子、石韦、瞿麦。武汉中联药业集团股份有限公司，批号：130390，研磨成粉，用生理盐水溶解成浓度为 0.11 g/ml 的药液。

1.3 主要试剂及仪器

DEN（美国 Sigma 公司，批号 N0756-25ML）；水合氯醛（上海麦克林科技有限公司，批号 C11437571）；RNA 提取试剂 TransZol（北京全式金技术有限公司，批号 N10110）；PrimeScript™ RT reagent 试剂盒（批号 RR047A）、TB Green™ Premix Ex Taq™ II（批号 RR820A/B），日本 Takara 公司；丙氨酸氨基转移酶（ALT，批号 20190532）试剂盒、门冬氨酸氨基转移酶（AST，批号 20190122）试剂盒，上海科华生物工程股份有限公司；总胆红素（TbIL，批号 190415）试剂盒、白蛋白（ALB，批号 190422）试剂盒、谷氨酰转肽酶（GGT，批号 190529）试剂盒、碱性磷酸酶（ALP，批号 190510）试剂盒，广州华鑫科技有限公司；IL-6（批号 Z13019260）、肿瘤坏死因子 α （TNF- α ，批号 B06010668）、趋化因子 2（CCL-2，批号 Z14019261）Elisa 试剂盒，武汉华美生物工程有限公司；RIPA 裂解液（碧云天生物技术有限公司，批号 P0013）；BCA 蛋白测定试剂盒（美国 Thermo

公司，批号 TE266619）；甲胎蛋白（AFP）一抗（美国 Elabscience 公司，批号 E-AB-40308）；人胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶（GST- π ）一抗（美国 Abcam 公司，批号 ab138491）；IL-6 一抗（批号 DF6087）、TNF- α 一抗（批号 AF7014），美国 Affinity 公司；磷酸化转录激活因子 3（p-STAT3）一抗（美国 Santa 公司，批号 sc-8509）；STAT3 一抗（美国 CST 公司，批号 4904）；S-P 超敏免疫组化试剂盒（福州迈新生物技术开发公司，批号 1902259720）；DAB 显色试剂盒（福州迈新生物技术开发公司，批号 1907020031）；甘油醛-3-磷酸脱氢酶（GAPDH）一抗（批号 GB11002）、苏木素-伊红（HE）染色试剂（批号 ZH191207），武汉塞维尔生物科技有限公司；ECL 曝光液（美国 Millipore 公司，批号 1925901）。

JA3003N 型电子天平（上海科佑仪器有限公司）；Multiskan 型酶标仪（美国 Thermo 公司）；7020 型全自动生化分析仪（日本日立公司）；Light-Cycler® 96 型实时荧光定量 PCR 仪（瑞士 Roche 公司）；E100 型显微镜（日本尼康公司）；5427R 型离心机（德国 Eppendorf 公司）。

1.4 分组、造模及给药

将 30 只雄性 Wistar 大鼠按随机数字表法分为正常组、模型组、鳖甲煎丸组，每组 10 只。除正常组外其余两组大鼠参考文献 [12] 方法，采用 DEN 50 mg/kg 腹腔注射，每周 1 次，连续 16 周诱导制备大鼠肝癌前病变模型。正常组腹腔注射生理盐水 2.5 ml/kg。造模第 8 周、第 12 周正常组和模型组大鼠均按随机数字表法各处死 2 只，经肝脏组织病理染色提示 DEN 诱导模型大鼠分别处于肝纤维化、肝硬化阶段，与文献 [13] 造模过程中病理变化大致相同。在造模第 8 周，鳖甲煎丸组灌胃予以 1.1 g/kg 鳖甲煎丸药液，给药量按照人与大鼠体表面积进行换算^[14]，每日 1 次；模型组及正常组予以 10 ml/kg 生理盐水灌胃，每日 1 次。各组均连续灌胃至第 18 周。（注：鳖甲煎丸组在造模第 8 周前因 DEN 造成肺部损伤而死亡 2 只（病理显示肺部组织坏死），为了与正常组、模型组的鼠数一致，在造模第 8 周时在剩下的 8 只大鼠中按随机数字表选取 6 只进行灌胃。）

1.5 观察指标及方法

最后一次灌胃 24 h 后，腹腔注射 10% 水合氯醛（3 ml/kg）麻醉大鼠，腹主动脉采血后立即用生理盐水进行心脏灌注，取肝组织样本。血液常温静置 4 h，

3000 r/min, 4℃离心 20 min, 离心半径为 9.49 cm, 分离血清。血清及肝组织于-80℃保存备用。

1.5.1 体重、肝脏重量 麻醉前利用电子天平测量大鼠体重; 麻醉后分离整个肝脏称重, 计算肝脏体重比, 肝脏体重比=(肝脏重量/体重)×100%。

1.5.2 肝脏表面结节数量及直径 肉眼观察, 由两名研究者计量结节直径≥5 mm的结节数, 并测量每只大鼠最大结节的直径, 取两组数据的均值。

1.5.3 肝组织病理学 采用HE染色观察。取大鼠肝左叶组织、结节及肝癌组织, 4%多聚甲醛固定, 乙醇脱水后石蜡包埋、4 μm连续切片制成石蜡切片, 按照常规HE染色步骤进行染色, 中性树脂封片后, 在显微镜下观察。

1.5.4 肝组织 AFP、GST-π蛋白染色情况 用免疫组织化学法检测。肝组织石蜡切片脱蜡、水化, PBS冲洗, 使用枸橼酸钠进行抗原修复, PBS冲洗。根据试剂盒说明书进行操作, 加非特异性染色剂阻断内源性过氧化物酶, 加入一抗 AFP (1:200) 及 GST-π (1:150), 4℃过夜。次日, 加生物素标记 IgG 聚合物, 加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶, DAB显色, 复染, 中性树脂胶封片, 在显微镜下观察 AFP、GST-π蛋白染色情况。

1.5.5 肝功能指标 使用7020型全自动生化分析仪测定肝功能指标, 包括血清 ALT、AST、TBil、ALB、GGT、ALP, 按试剂盒说明书操作。

1.5.6 血清 IL-6、TNF-α、CCL-2 水平 采用 Elisa 试剂盒检测血清 IL-6、TNF-α、CCL-2 水平, 严格按照试剂盒说明书检测。

1.5.7 肝组织 IL-6、TNF-α、CCL-2 mRNA 表达

采用 RT-PCR 法检测。提取肝组织内总 RNA, 逆转录成 cDNA, 以其为模板, 采用 SYBR Green 进行两步法实时荧光定量 PCR 扩增反应, 反应体系为: 1 μl 的 cDNA 产物, 正、反向引物各 0.4 μl, 5 μl 2xSYBR Green 染料, 3.2 μl 无 RNA 酶水, 总体积为 10 μl。引物序列: IL-6, 上游 ACTTCCAGC-CAGTTGCCTTCTTG, 下游 TGGTCTGTTGTGGGTG-GTATCCTC, 110 bp; CCL-2, 上游 CACCTGCTGC-TACTCATTCCTGG, 下游 CTTCTTTGGGACACCT-GCTGCTG, 92 bp; TNF-α, 上游 ATGGGCTCCCTCT-CATCAGTTCC, 下游 GCTCCTCCGCTTGCTGTTT, 114 bp; 内参 GAPDH, 上游 GACATGCCGCCTG-GAGAAAC, 下游 AGCCCAGGATGCCCTTTAGT, 92 bp。引物均由上海生工生物有限公司合成。反应参数: 预热 95℃ 30 s; 95℃ 10 s; 60℃ 30 s,

40 个循环; 溶解曲线温度 97℃ 1 s。GAPDH 作为内参, 每组使用 6 个生物样本, 每个样品重复 3 次, 样本目的基因的计算方法为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

1.5.8 肝组织 IL-6、TNF-α、p-STAT3 蛋白表达

采用 Western Blot 法检测。各组用随机数字表法选取 3 只进行检测。采用 RIPA 裂解液 (加入 10% 蛋白酶抑制剂及 10% 磷酸酶抑制) 提取肝组织蛋白, BCA 法测各组蛋白浓度。用裂解液将各组蛋白稀释至等浓度, 与 5×上样缓冲液 4:1 混合, 98℃变性 5 min。取蛋白 40 μg, 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 将蛋白转移至 PVDF 膜上, 5% BSA 封闭 2 h, 一抗 (1:1000) 4℃过夜。TBST 洗涤 3 次, 加入 TBST 稀释的二抗 (1:3000) 后, 常温下孵育 1.5 h。TBST 洗涤 3 次, ECL 曝光液在暗室发光、显影、定影并获取图像, 采用 Image J 8.0 软件测量 IL-6、TNF-α、p-STAT3、STAT3、GAPDH 蛋白条带灰度值, 并计算 IL-6、TNF-α、p-STAT3 蛋白相对表达量。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析。本研究数据均符合正态分布, 均采用均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 方差齐性的两两比较采用 LSD 法, 方差不齐的两两比较用 Dunnett T^* 法。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、肝脏重量及肝脏体重比比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠体重明显降低 ($P<0.01$), 肝脏重量及肝脏体重比均明显增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸组肝脏重量、肝脏体重比均明显降低 ($P<0.01$), 体重比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 1 各组大鼠体重、肝脏重量及肝脏体重比比较 ($\bar{x}\pm s$)

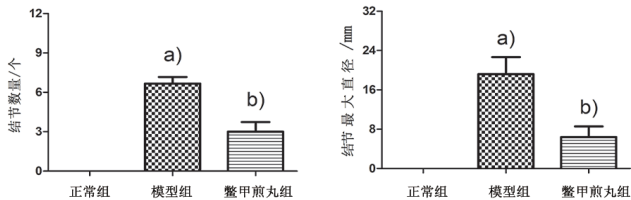
组别	鼠数	体重/g	肝脏重量/g	肝脏体重比
正常组	6	433.95±66.38	11.54±2.92	2.63±0.34
模型组	6	264.00±17.51 ^{a)}	29.77±7.00 ^{a)}	11.20±2.26 ^{a)}
鳖甲煎丸组	6	279.07±16.98	18.98±4.03 ^{b)}	6.81±1.48 ^{b)}

注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

2.2 各组大鼠肝脏表面结节数量及最大结节直径比较

正常组大鼠肝脏表面无肉眼可见结节; 模型组大鼠肝脏表面均有≥5 mm 的结节, 色泽略灰白, 部分结节富含血供, 与周围组织有粘连; 鳖甲煎丸组除其中 1 只大鼠肝脏表面未见≥5 mm 的结节外, 其余大鼠肝表面均有≥5 mm 的结节。图 1 示, 与正常组比较, 模型组大鼠肝脏表面结节数量及结节

最大直径明显增加 ($P<0.01$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸组大鼠肝脏表面结节数量及结节最大直径均降低 ($P<0.01$)。



注: a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。

图1 各组大鼠肝脏表面结节数量及结节最大直径比较

2.3 各组大鼠肝组织病理学结果

图2示 (请扫描本文二维码获取彩图), 正常组大鼠肝组织可见正常肝小叶, 肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝细胞大小一致, 未见变性、坏死。与正常组比较, 模型组和鳖甲煎丸组肝脏均可见局灶异型增生结节, 与周围肝分界清晰, 同时肝脏可见肝癌结节, 癌细胞增生紊乱, 核深染, 核分裂象明显。模型组病灶内出现大片肝细胞坏死, 部分肿瘤细胞脂肪变, 可见瘤巨细胞, 肿瘤

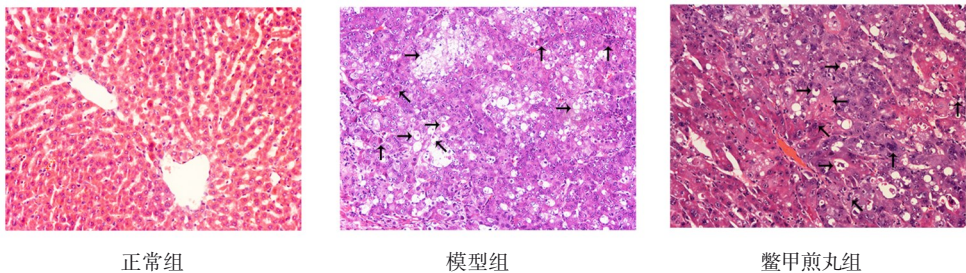
细胞异型性明显。与模型组比较, 鳖甲煎丸组肿瘤细胞多呈高分化, 异型不明显, 肿瘤体积相对较小, 坏死区少见。

2.4 各组大鼠肝组织 GST- π 、AFP 蛋白染色情况

图3示 (请扫描本文二维码获取彩图), 正常组未见明显阳性着色。与正常组比较, 模型组不典型增生结节内可见阳性着色, 表现为增生的肝细胞胞质棕黄色颗粒, 部分细胞颜色深, 提示 GST- π 呈强阳性表达; 增生结节周围由纤维组织包围隔开, 而肿瘤组织中可见棕黄色病灶, 呈片状着色, 提示 AFP 表达升高, 主要分布在细胞质。鳖甲煎丸组可见 GST- π 、AFP 蛋白阳性着色, 但与模型组比较, 鳖甲煎丸组棕色染色较浅, 阳性区域较少。

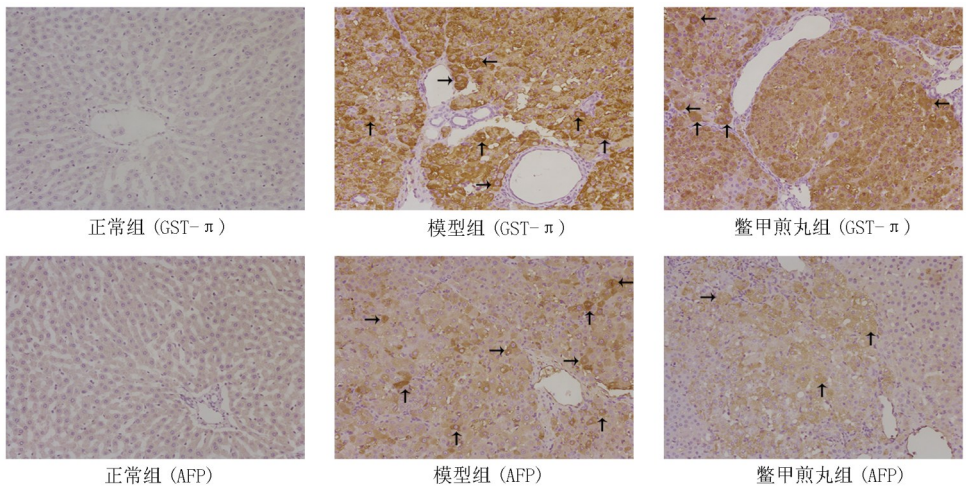
2.5 各组大鼠肝功能指标比较

表2示, 与正常组比较, 模型组血清 ALT、AST、TBiL、GGT、ALP 水平均明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸组血清 AST、TBiL、GGT 水平明显降低 ($P<0.01$), ALT、ALP 水平两组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠血清 ALB 水平比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。



注: 图中箭头所指为典型的核皱缩的坏死细胞, 核异型、核深染色的细胞, 以及脂肪变的肿瘤细胞。

图2 各组大鼠肝组织病理学结果 (HE 染色, $\times 200$)



注: 图中箭头所指分别为 GST- π 、AFP。
GST- π , 人胎盘型谷胱甘肽 S-转移酶; AFP, 甲胎蛋白。

图3 各组大鼠肝组织 GST- π 、AFP 蛋白染色结果 (免疫组化染色, $\times 200$)

表2 各组大鼠血清 ALT、AST、TbIL、ALB、GGT、ALP 水平比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TbIL/mg·dl ⁻¹	ALB/g·L ⁻¹	GGT/U·L ⁻¹	ALP/U·L ⁻¹
正常组	6	30.48±9.99	85.65±27.73	0.22±0.13	29.52±1.90	0.33±0.23	97.07±34.36
模型组	6	273.85±20.51 ^{a)}	630.37±164.11 ^{a)}	47.53±23.73 ^{a)}	29.87±3.96	279.07±16.98 ^{a)}	271.73±60.28 ^{a)}
鳖甲煎丸组	6	239.43±38.34	366.10±56.85 ^{b)}	7.50±2.36 ^{b)}	30.55±1.20	127.97±32.88 ^{b)}	213.68±33.67

注: ALT, 丙氨酸氨基转移酶; AST, 门冬氨酸氨基转移酶; TbIL, 总胆红素; ALB, 白蛋白; GGT, 谷氨酰转肽酶; ALP, 碱性磷酸酶。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。2.6 各组大鼠血清 IL-6、TNF- α 、CCL-2 水平比较

各组大鼠血清 TNF- α 含量均低于试剂盒检测范围, 故结果未展示。表3示, 与正常组比较, 模型组大鼠血清 IL-6、CCL-2 水平明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸组大鼠血清 IL-6、CCL-2 水平明显降低 ($P<0.05$)。

表3 各组大鼠血清 IL-6、CCL-2 水平比较 ($\text{pg} \cdot \text{ml}^{-1}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-6	CCL-2
正常组	6	24.08±6.77	108.50±31.84
模型组	6	51.73±11.10 ^{a)}	423.33±179.04 ^{a)}
鳖甲煎丸组	6	36.66±9.17 ^{b)}	254.20±52.57 ^{b)}

注: IL-6, 白细胞介素6; CCL-2, 趋化因子2。

a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$ 。2.7 各组大鼠肝组织 IL-6、TNF- α 、CCL-2 mRNA 表达比较

表4示, 与正常组比较, 模型组肝组织 IL-6、CCL-2 mRNA 表达均明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸组肝组织 IL-6、CCL-2 mRNA 表达明显降低 ($P<0.01$)。各组肝组织 TNF- α mRNA 表达比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表4 各组大鼠肝组织 IL-6、TNF- α 、CCL-2 mRNA表达比较 ($2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-6	TNF- α	CCL-2
正常组	6	1.26±0.62	1.16±0.59	1.10±0.34
模型组	6	24.80±8.05 ^{a)}	2.18±1.13	20.24±7.68 ^{a)}
鳖甲煎丸组	6	3.14±2.16 ^{b)}	1.32±0.84	2.31±1.35 ^{b)}

注: IL-6, 白细胞介素6; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; CCL-2, 趋化因子2。a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.01$ 。2.8 各组大鼠肝组织 IL-6、TNF- α 、p-STAT3 蛋白表达比较

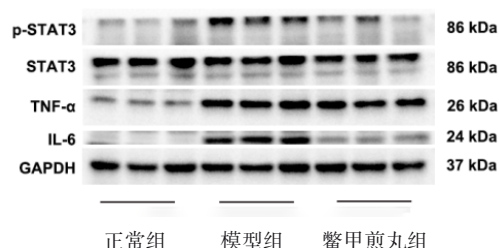
表5示, 与正常组比较, 模型组肝组织 IL-6、TNF- α 、p-STAT3 蛋白相对表达量明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, 鳖甲煎丸组 IL-6、p-STAT3 蛋白相对表达量明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), 两组 TNF- α 蛋白相对表达量比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。各组大鼠肝组织 IL-6、TNF- α 、p-STAT3 蛋白电泳图见图4。

表5 各组大鼠肝组织 IL-6、TNF- α 、p-STAT3 蛋白

表达比较

($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	IL-6/GAPDH	TNF- α /GAPDH	p-STAT3/STAT3
正常组	3	0.29±0.07	0.65±0.04	0.50±0.09
模型组	3	0.91±0.04 ^{a)}	0.98±0.03 ^{a)}	0.96±0.05 ^{a)}
鳖甲煎丸组	3	0.61±0.04 ^{c)}	0.96±0.06	0.69±0.21 ^{b)}

注: IL-6, 白细胞介素6; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; p-STAT3, 磷酸化转录激活因子3; STAT3, 转录激活因子3。a) 与正常组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$;c) 与模型组比较, $P<0.01$ 。注: IL-6, 白细胞介素6; TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; p-STAT3, 磷酸化转录激活因子3; STAT3, 转录激活因子3。图4 各组大鼠肝组织 IL-6、TNF- α 、p-STAT3 蛋白电泳图

3 讨论

中医学对肝癌前病变多参照“癥积”“胁痛”等病症辨证治疗。肝癌前病变阶段患者患病已久, 肝脏受损, 脏腑失和, 气机阻滞, 瘀血内停, 毒浊内生, 痰瘀凝结, 而成癥瘕, 因此, 肝癌前病变基本病机可概括为正虚血瘀毒结。鳖甲煎丸全方攻补兼施, 寒温并用, 具有益气扶正、行气活血、祛湿化痰、解毒散结、软坚消癥之效。研究^[15]发现, 鳖甲煎丸可通过调节 Wnt 信号通路中相关信号分子, 抑制核转录因子 κB (NF- κB) 的磷酸化, 阻断 Wnt 与 NF- κB 信号通路相互串话激活, 最终干预星状细胞增殖活化, 从而发挥抗肝纤维化的作用。此外, 鳖甲煎丸能有效调控 β -连环蛋白 (β -catenin)、糖原合成酶激酶3 β (GSK-3 β)、转化生长因子 β 1 (TGF- β 1) 的表达水平而达到抗 HCC 转移侵袭的目的^[16-17]。本研究利用 DEN 诱导肝癌前病变模型大

鼠,进一步探讨鳖甲煎丸抗肝癌前病变的可能作用机制。

DEN 常作为大鼠肝癌的诱导剂,诱发 HCC 所占的比例大、成功率高^[18]。在第 8 周,模型大鼠处于肝纤维化阶段,在第 12 至 16 周,出现不典型增生结节并逐渐向肝癌恶性转变^[13]。在前期研究中,使用鳖甲煎丸在第 12 周时干预 DEN 肝癌模型大鼠,可以抑制肿瘤上皮间质转化^[17]。为进一步探讨鳖甲煎丸调控 HCC 发生发展的机理,本研究在造模第 8 周给予鳖甲煎丸干预处理。在肝癌前病变阶段的结节中, GST- π 呈高表达^[19]且肝脏表面 ≥ 5 mm 的结节可发展为肝癌^[20]。本研究结果显示,鳖甲煎丸能明显降低 ≥ 5 mm 结节的数量,同时可降低结节中 GST- π 的表达,降低结节最大直径及肝脏重量、肝脏体重比,从而抑制肿瘤的发生及进展。

慢性炎症促进异常肝细胞增生,并进一步恶性转化,形成肿瘤起始细胞 (HCC progenitor cells, HcPCs),同时慢性炎症微环境又促进 HcPCs 的增殖^[21]。CCL-2 是调节单核细胞和 (或) 巨噬细胞迁移和浸润的关键趋化因子之一,在刺激炎症浸润及肿瘤发展中起重要作用^[22]。CCL-2 通过多种免疫细胞的募集和激活促进 HCC 进展并可对索拉非尼耐药^[23]。有研究^[24]通过基因敲除 CCL-2 受体 (C-C chemokine receptor 2, CCR2) 或使用 CCR2 拮抗剂可以显著减少小鼠皮下成瘤模型及 HCC 原位模型癌细胞的增殖和远处转移。本研究结果显示,鳖甲煎丸能够在 mRNA 转录水平及蛋白水平上降低 CCL-2 表达,提示鳖甲煎丸可减少由 CCL-2 介导的单核细胞和 (或) 巨噬细胞在肝组织的浸润。TNF- α 在炎症微环境也具有一定的促癌作用^[25]。本研究结果显示,各组大鼠的血清 TNF- α 含量均低于试剂盒检测范围,但与正常组比较,模型组大鼠肝组织 TNF- α 蛋白水平平均明显升高,而鳖甲煎丸组与模型组 TNF- α 蛋白表达无明显差异,因此,鳖甲煎丸不能降低 TNF- α 表达。库弗细胞被受损肝细胞释放的刺激因子激活并分泌 IL-6,促进肝细胞异常增生,并向 HcPCs 进行转化^[26]。此外, HcPCs 自分泌 IL-6 可持续刺激癌细胞增殖^[26]。本研究结果显示,鳖甲煎丸组大鼠肝组织的 IL-6 在转录水平及蛋白表达方面均较模型组明显降低,且肝脏表面结节数量明显降低,提示鳖甲煎丸可能通过降低肝脏炎症因子 IL-6 的表达,抑制肝细胞的增殖,从而减少不典型增生结节的形成。IL-6/STAT3 信号通路被

认为在癌症发展中发挥作用^[10]。IL-6 与受体结合后,受体上的 gp130 亚基形成二聚体,使得与 gp130 相连的 Jak 酶发生磷酸化, Jak 酶进一步磷酸化 STAT3 蛋白并形成二聚体或异二聚体,易位至细胞核,将胞外信号传递到细胞核并诱导靶基因转录^[27],在人类 HCC 中肿瘤相关巨噬细胞分泌 IL-6 即是通过 STAT3 通路促进肿瘤干细胞增殖^[28]。本研究结果显示,鳖甲煎丸不仅能降低 IL-6 的表达,还能降低肝组织 p-STAT3 的表达,从而抑制肝组织 IL-6/STAT3 通路的异常激活,这可能是鳖甲煎丸抗肝癌前病变的作用机制之一。

综上所述,鳖甲煎丸可能通过降低 DEN 诱导肝癌前病变模型大鼠在癌变过程中炎症因子 IL-6、CCL-2 表达,减少炎症细胞浸润,改善肝脏炎症微环境,抑制由 IL-6/STAT3 通路激活诱导的肝细胞或肝祖细胞的恶性增殖,从而调控肝癌的发生发展。本研究用 DEN 诱导大鼠的模型,重点研究鳖甲煎丸对大鼠癌前病变的作用,但肝癌发生发展的作用机制复杂,部分模型大鼠出现了肝癌,故今后的研究可考虑缩短造模时间。此外,本研究未利用免疫组化或荧光观察肝组织 M1 型、M2 巨噬细胞浸润情况,未能明确鳖甲煎丸是否通过降低 M1 型 (促炎型) 巨噬细胞的浸润进而降低炎症因子的表达,这一方面仍需进一步的深入研究。

参考文献

- [1]SUNG H, FERLAY J, SIEGEL RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries [J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.
- [2]曹梦迪,王红,石菊芳,等. 中国人群肝癌疾病负担:多数据源证据更新整合分析 [J]. 中华流行病学杂志, 2020, 41(11): 1848-1858.
- [3]HENLEY SJ, WARD EM, SCOTT S, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics [J]. Cancer, 2020, 126(10): 2225-2249.
- [4]SCHMIDT AD, ROSE JS. IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy [J]. J Hepatol, 2016, 64(6): 1403-1415.
- [5]JOHNSON DE, O'KEEFE RA, GRANDIS JR. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(4): 234-248.
- [6]THILAKASIRI PS, DMELLO RS, NERO TL, et al.

- Repurposing of drugs as STAT3 inhibitors for cancer therapy [J]. *Semin Cancer Biol*, 2021, 68: 31–46. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.09.022.
- [7] BORZIO M, FARGION S, BORZIO F, et al. Impact of large regenerative, low grade and high grade dysplastic nodules in hepatocellular carcinoma development [J]. *J Hepatol*, 2003, 39(2): 208–214.
- [8] VILLANUEVA A. Hepatocellular carcinoma [J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1450–1462.
- [9] 王俊壹, 程海波. 基于“治未病”思想探讨癌毒病机理论在肿瘤防治中的应用 [J]. *中医杂志*, 2018, 59(12): 1014–1016.
- [10] 姚飞龙, 贺松其, 吕志平, 等. 鳖甲煎丸联合阿德福韦酯治疗乙型肝炎后肝硬化 50 例疗效观察 [J]. *新中医*, 2011, 43(4): 31–32.
- [11] 陈瑞玉, 贺松其, 程旸, 等. 鳖甲煎丸治疗慢性乙型肝炎肝硬化纤维化疗效观察 [J]. *新中医*, 2011, 43(3): 34–35.
- [12] 徐玉音, 陈莉. 肝癌动物模型建立的方法 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2011, 27(4): 405–409.
- [13] FUCHS BC, HOSHIDA Y, FUJII T, et al. Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2014, 59(4): 1577–1590.
- [14] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2004, 9(9): 1069–1072.
- [15] 孙海涛, 文彬, 陈冠新, 等. 鳖甲煎丸对肝纤维化模型大鼠肝组织中 Wnt/ β -catenin 信号通路相关蛋白及其靶基因表达的影响 [J]. *中医杂志*, 2018, 59(10): 876–881.
- [16] 孙海涛, 贺松其, 文彬, 等. 鳖甲煎丸对肝癌细胞中 Wnt 信号分子 β -catenin、GSK-3 β 及靶基因 CD44v6、VEGF 的影响 [J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(10): 1454–1458.
- [17] 陈炜聪, 文彬, 孙海涛, 等. 鳖甲煎丸通过 TGF- β /Smad 信号通路抑制 DEN 诱导肝癌大鼠上皮间质转化的机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(20): 9–15.
- [18] OGAWA K. Molecular pathology of early stage chemically induced hepatocarcinogenesis [J]. *Pathol Int*, 2009, 59(9): 605–622.
- [19] CHATTERJEE A, GUPTA S. The multifaceted role of glutathione S-transferases in cancer [J]. *Cancer Lett*, 2018, 433: 33–42. doi: 10.1016/j.canlet.2018.06.028.
- [20] DEPERALTA DK, WEI L, GHOSHAL S, et al. Metformin prevents hepatocellular carcinoma development by suppressing hepatic progenitor cell activation in a rat model of cirrhosis [J]. *Cancer*, 2016, 122(8): 1216–1227.
- [21] LI XY, YANG X, ZHAO QD, et al. Lipopolysaccharide promotes tumorigenicity of hepatic progenitor cells by promoting proliferation and blocking normal differentiation [J]. *Cancer Lett*, 2017, 386: 35–46. doi: 10.1016/j.canlet.2016.10.044.
- [22] 卢小妹, 付杰军. 靶向 CCL-2-CCR2 轴的肿瘤治疗研究进展 [J]. *肿瘤防治研究*, 2019, 46(5): 470–475.
- [23] ZHOU SL, ZHOU ZJ, HU ZQ, et al. Tumor-associated neutrophils recruit macrophages and t-regulatory cells to promote progression of hepatocellular carcinoma and resistance to sorafenib [J]. *Gastroenterology*, 2016, 150(7): 1646–1658.
- [24] LI X, YAO W, YUAN Y, et al. Targeting of tumour-infiltrating macrophages via CCL-2/CCR2 signalling as a therapeutic strategy against hepatocellular carcinoma [J]. *Gut*, 2017, 66(1): 157–167.
- [25] LI X, CHEN C, XIANG D, et al. Chronic inflammation-elicited liver progenitor cell conversion to liver cancer stem cell with clinical significance [J]. *Hepatology*, 2017, 66(6): 1934–1951.
- [26] HE G, DHAR D, NAKAGAWA H, et al. Identification of liver cancer progenitors whose malignant progression depends on autocrine IL-6 signaling [J]. *Cell*, 2013, 155(2): 384–396.
- [27] SCHAPER F, ROSE JS. Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2015, 26(5): 475–487.
- [28] WAN S, ZHAO E, KRYCZEK I, et al. Tumor-associated macrophages produce interleukin 6 and signal via STAT3 to promote expansion of human hepatocellular carcinoma stem cells [J]. *Gastroenterology*, 2014, 147(6): 1393–1404.

Effect of *Biejiajian Pills* (鳖甲煎丸) on IL-6/STAT3 Signal Pathway in Liver Tissue of Diethylnitrosamine Rat Models of Liver Precancerous Lesion Model Rats

CHEN Weicon¹, WEN Bin², SUN Haitao¹, SUN Jialing¹, YANG Xuemei¹, HUANG Shaohui¹, AN Haiyan¹, PANG Jie¹, HE Songqi¹

1. School of Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, 510515; 2. PLA Southern Theater Command Air Force Hospital

ABSTRACT **Objective** To explore the possible mechanism of *Biejiajian Pills* (鳖甲煎丸) in the treatment of precancerous lesions of liver. **Methods** Thirty male Wistar rats were randomly divided into normal group, model group, and *Biejiajian Pills* group, with 10 rats in each group. Except for the normal group, the rats in the other two groups were injected with diethylnitrosamine (DEN) for 16 consecutive weeks to establish liver precancerous lesion models. On the 8th week of modelling, the liquid of *Biejiajian Pills* (1.1 g/kg) was given by gavage to the *Biejiajian Pills* group, while normal saline (10 ml/kg) was administered by gavage in the normal group and the model group; the interventions were all given once daily until Week 18. After the administration, the body weight of the rats, the weight of the liver, the number of nodules on the liver surface and the largest nodule diameter were measured; the pathological changes of the liver and the expression of alpha-fetoprotein (AFP) and human placental glutathione S-transferase (GST- π) in the liver tissue were assessed; the levels of liver function indicators including alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), total bilirubin (TBiL), albumin (ALB), glutamyl transferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), serum interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor α (TNF- α) and chemokine 2 (CCL2), the mRNA expression of IL-6, TNF- α and CCL2, as well as the protein expression of IL-6, TNF- α and phosphorylated transcription activator 3 (p-STAT3) in the liver tissue were detected. **Results** Compared to those in the normal group, the body weight of the rats in the model group was significantly reduced; the liver weight and the ratio of liver vs body weight were significantly increased; the number of nodules on the liver surface and the largest nodule diameter were significantly increased; HE staining showed large areas of hepatocyte necrosis in the tumor lesions and obvious atypia of cancer cells; GST- π in dysplastic nodules was strongly positive; obvious AFP staining was shown in tumor tissues; all liver function indicators except for ALB were significantly increased; the serum IL-6 and CCL2 levels, the mRNA expression of IL-6 and CCL2, and the protein expression of IL-6, TNF- α , and p-STAT3 in the liver tissue were significantly increased ($P < 0.01$). Compared to those in the model group, the liver weight and the ratio of liver vs body weight in the *Biejiajian Pills* group were significantly decreased; the number of nodules on the liver surface and the largest nodule diameter were significantly reduced; cancer cells were mostly highly differentiated; tumor necrosis was rare; GST- π and AFP staining were lighter, with fewer positive areas; serum AST, TBiL, and GGT levels were significantly reduced; the serum levels of IL-6 and CCL2, the expression of IL-6 and CCL2 mRNA in liver tissue and the relative expression of IL-6 and p-STAT3 protein were significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** *Biejiajian Pills* may inhibit the activation of IL-6/STAT3 pathway by reducing the expression of inflammatory factors, thereby inhibiting the occurrence and development of liver precancerous lesions.

Keywords hepatocellular carcinoma; precancerous lesions; *Biejiajian Pills* (鳖甲煎丸); interleukin 6; transcription activator 3

(收稿日期: 2021-03-24; 修回日期: 2021-07-25)

[编辑: 王利芬]