

综 述

中医药防治肝癌的分子机理研究概况

韩克起* 凌昌全*

主题词 肝肿瘤/预防和控制 分子生物学

分子生物学技术的发展推动了中医药防治肝癌的分子机理研究,近年来中医药在肝癌预防和治疗领域的研究发展较快,其抗肿瘤的机理研究已经涉及到DNA的合成,癌基因和抑癌基因的表达,基因突变,细胞凋亡,多耐药的逆转,信号传导,粘附分子及血管形成相关因子等方面,现综述如下。

1 中医药预防肝癌的分子生物学基础

陈永培等^[1]用鼠伤寒沙门氏回复突变(Ames)实验平板掺入法对常用75种抗肿瘤中药进行抗突变研究,结果发现,椿皮、石菖蒲、甘草、土鳖虫、王不留行、大黄、蚤休、艾叶、半夏、蜈蚣、虎杖、苦参12种中药抗突变作用较强,冬虫夏草等7种中药有一定的抗突变作用。甘草有抗移码型和抗置换型基因突变作用,椿皮、土鳖虫、王不留行、大黄、蚤休、蜈蚣有抗移码型基因突变作用,石菖蒲、艾叶、半夏和虎杖有抗置换型基因突变作用。李俊丽等^[2,3]也在DEN诱发大鼠肝癌前病变实验中证实甘草甜素、绞股蓝总甙及当归等中药能显著阻断大鼠癌前病变,其中甘草甜素的抑癌作用有量效关系,其最低有效量216.2mg/kg,最佳效应剂量为432.4mg/kg。

钱妍等^[4]用DEN诱发大鼠肝癌模型,用免疫组化法和计算机图象分析技术观察了肝复健冲剂对诱癌过程中肝细胞阳性表达的PCNA、H-ras蛋白、CDK4、CyclinD1、P27蛋白的影响,结果发现,肝复健冲剂可明显降低DEN诱发大鼠肝癌过程中不同阶段PCNA、H-ras蛋白、CDK4的阳性表达,降低DEN诱癌后期CyclinD1的阳性表达和Brd-U后期的标记指数,而对P27蛋白表达无明显影响。季光等^[5]研究了扶正化癌方(丹参、桃仁、冬虫夏草等)预防大鼠肝癌形成的机制,用DEN诱发大鼠肝癌,观察扶正化癌方对肝脏病理和肝组织TGF- β 1R的表达的影响,结果表明,扶正化癌方对DEN诱发大鼠肝癌有预防作用,表现为保护肝细胞,抗肝纤维化,提高癌组织周围的表达低下的TGF- β 1R水平。王奕等^[6]也证实人参鳖甲煎丸能抑制大鼠肝癌癌前病变模型肝组织TGF- β 1R的表达,从而抑制肝细胞的异型增殖。

吴万垠等^[7]采用HBV转基因小鼠研究健脾理气方对肝脏AFB1-DNA加成物及与AFB1代谢有关的两种酶活性水平的影响,发现HBV转基因小鼠较正常小鼠对AFB1终致癌物积聚,高峰相加成物水平显著升高,24h相仍维持较高水平,健脾理气方则能显著降低该加成物水平,在24h相使其降至正常水平,并能提高小鼠肝脏P450、谷胱甘肽含量及激活GST活性。

2 中医药治疗肝癌的分子生物学基础

2.1 抑制肿瘤细胞DNA的合成:吴万垠等^[8]用莪术油进行小

鼠肝癌HepA抑制实验,用病理图像分析技术分析莪术油对小鼠细胞DNA含量的影响,结果表明,莪术油能显著降低小鼠肝癌细胞DNA光密度值、核面积及DNA指数,同时能提高肝癌细胞中二倍体细胞的比例,降低超五倍体细胞比例,提示其抗癌活性与抑制肿瘤细胞DNA合成有关。王修杰等^[9]用溴脱氧尿嘧啶(BrdU)体内标记、抗增殖细胞核抗原(PCNA)免疫组化染色研究丹参酮抗小鼠肝癌的作用机理,结果小鼠肝癌瘤重减轻,BrdU标记细胞数减少,PCNA表达下降,认为丹参酮抗肝癌机理可能与抑制肿瘤细胞DNA、RNA合成、PCNA表达及DNA多聚酶的活性有关。薛妍等^[10]研究姜黄素对人肝癌细胞SMMC-7721生长的影响,应用MTT法、流式细胞术及透射电镜来观察姜黄素对SMMC-7721生长的作用及细胞周期和形态学改变,结果表明,姜黄素能明显抑制人肝癌细胞SMMC-7721的生长,半数生长抑制剂量(IC50)为5.4mg/L,流式细胞术证实,姜黄素能将肿瘤细胞聚集在S期,发现肿瘤细胞超微结构发生改变。赵建斌等^[12]研究动物毒素华蟾毒精抗癌机制为既能抑制癌细胞DNA生物合成,又能诱导细胞凋亡。

2.2 对癌基因和抑癌基因表达的影响:郭伟剑等^[11]采取免疫组化法观察健脾理气中药(党参、白术、八月札、白花蛇舌草等)兔血清对SMMC7721肝癌细胞P53、P21^{WAF1/CIP1}mRNA及蛋白的表达有下调作用。周振华等^[13]证实健脾理气方能诱导小鼠HAC肝癌细胞凋亡和上调肿瘤细胞Bax基因蛋白表达作用。郭振球等^[14]采用裸鼠移植性人肝癌细胞探讨抗癌方(柴胡、黄芪、莪术等)抗肿瘤机理,结果发现,中药组中癌细胞的形态改变以凋亡为主,而环磷酰胺(CTX)以坏死为主,光镜常见P21^{WAF1/CIP1}蛋白表达,分析其抗癌机理与诱导HepG2凋亡,提高P21^{WAF1/CIP1}蛋白表达有关。周建锋等^[15]研究不同扶正药物血清诱导SMMC-7721人肝癌细胞P53、N-ras基因的调控作用,结果表明,养阴、益气养阴、温阳养阴及补肾养阴组细胞P53蛋白表达增强,N-ras蛋白表达下降,其中又以益气养阴组作用最为明显,益气养阴组P53转录增强,N-ras转录减弱。刘琳等^[16]用MTT法、AO/EB荧光染色法、透射与扫描电镜、流式细胞仪、TUNEL法及免疫组化法观察了三氧化二砷对体外培养的人肝癌细胞株QGY-7701、QGY-7703和人正常肝细胞株L-02的生长能力、细胞凋亡、细胞周期及相关基因表达的影响,结果发现三氧化二砷能显著抑制人肝癌细胞株QGY-7701、QGY-7703的生长,使细胞周期滞于S期,bcl-2基因表达明显下降,bax和fax基因表达显著增强,而对人正常肝细胞株L-02无明显作用。司维可等^[17]研究发现,1.5~3.0g/L的苦参碱可诱导HepG2细胞凋亡,并且使凋亡相关基因wp53、Bax、Fas表达上调,而抗凋亡基因bcl-2、c-myc表达下调。

2.3 逆转肿瘤细胞的多耐药基因:王宝成等^[18]采用BEL-7402、BEL-7402/DOX及BEL-7402/ELE细胞株,通过流式细胞仪技术检测榄香烯乳剂对Pgp蛋白表达的影响,细胞荧光染

* 第二军医大学长海医院中医科,上海市杨浦区长海路174号

(200133)

收稿日期:2003-03-31;修回日期:2003-04-27

色率以 BEL-7402/DOX 组最高,其作用机理可能在于:乳剂包裹的药物可降低与 Pgp 结合的亲和性,乳剂本身也可直接间接抑制 Pgp 泵的功能,乳剂可修饰磷脂膜结构并进一步诱导 Pgp 功能及分子排列的改变,乳剂包裹药物可穿过细胞膜,直接将药物分布到细胞质内。但姜晓峰等^[20]在研究大黄的核苷转运抑制活性和对肿瘤细胞对药耐药性的逆转作用时发现,大黄素仅能增加抗癌药物如 5-FU、MMC、MTX 对人肝癌 BEL-7402 细胞的细胞毒作用,未能逆转 BEL-7402 对 ADM 的耐药性,认为大黄素作为抗肿瘤生化调节剂逆转肿瘤细胞多药耐药作用与抑制核苷转运、降低 Pgp 的功能和表达相关。

2.4 对肿瘤细胞信号传导通路的影响:管冬元等^[21]以二乙基亚硝胺水溶液诱发大鼠肝癌形成,采用 RT-PCR 方法分别观察了清热解毒、活血化瘀、健脾理气等不同治法对癌基因 ras/MAPK 信号传导通路上相关基因转录的调节作用,结果表明,不同治法能够针对性的调节癌基因 ras/MAPK 信号传导通路一些信号分子的转录水平,其中清热解毒法对 raf-1 基因、活血化瘀法对 Grb-2 和 raf-1 基因、健脾理气法对 sos 基因的转录水平有下调作用,各治法均能上调 GAP 基因的转录水平。提示不同治法能够不同程度地调节肝癌发生发展过程中一些促使细胞过度增殖的信号分子的转录,且不同治法有各自的选择性。王代树等^[22]用 Northern blot、Western blot 等方法检测了中药白龙或 HMBA 作用下 P16 的表达调节,结果表明,在白龙或 HMBA 作用下癌细胞 G1 期 P16 的表达增加,这一作用与 CAMP-PKA 和 DAC-PKC 两套信号通路共调节作用密切相关。当以 PKA 抑制剂阻断 PKA 通路时,P16 下降,相反当 PKC 通路被阻断时 P16 表达水平升高。阐明了 P16 上游调控与 CAMP/PKC 信号通路密切相关。

2.5 对肿瘤细胞粘附分子表达的影响:孙婧憬等^[23]观察了丹参对 SMMC-7721 肝癌细胞株侵袭粘附能力和对裸鼠人肝癌切除术后转移复发的影响,结果表明,丹参处理后 SMMC-7721 细胞粘附分子-1 表达明显低于对照组,丹参可抑制 SMMC-7721 细胞的侵袭能力,促进已粘附细胞的脱落,并对早期和晚期裸鼠人肝癌切除术后肝内和远处转移复发有防治作用。

2.6 对肿瘤血管生成因子的影响:高艳景等^[24]研究了大蒜素对人肝癌细胞 VEGFmRNA 表达的影响,应用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法,以 HPRT 为内标。表明大蒜素有明显抑制人肝癌细胞中 VEGFmRNA 表达的作用,较对照组表达水平降低了 66.36%($P < 0.05$)。大蒜素是人肝癌细胞表达 VEGF 基因的调节剂,能抑制人肝癌细胞 VEGF 基因的表达。

2.7 对肿瘤细胞端粒酶活性影响:孟志强等^[25]采用端粒重复序列扩增(TRAP)结合非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染法观察健脾理气中药(党参、白术、八月札、白花蛇舌草等)兔血清对体外培养的人肝癌细胞株 SMMC-7721 端粒酶活性的影响,结果发现中药血清第 4 天开始对肿瘤细胞端粒酶活性有抑制作用,认为抑制端粒酶活性可能是健脾理气中药的部分抗肿瘤机理。

3 展望

中药的多环节、多靶点效应在肝癌的防治方面已显示了良好的苗头,中药逆转多药耐药基因、诱导肿瘤分化、阻断某些信号传导以及抑制肿瘤血管形成等方面已取得了阶段性成果。随着分子生物学理论和技术应用的日益扩大,中医药防治肝癌的分子机制将会逐步被阐明。

参考文献

- 1 陈永培. 临床常用抗肿瘤中草药的抗突变初步研究. 中国中药杂志, 1992,17(7):426-428.
- 2 李俊丽,严瑞琪,王辉云,等. 甘草甜素预防二乙基亚硝胺致大鼠肝癌作用的剂量-效应关系. 中山医科大学学报,1994,15(2):108-121.
- 3 王辉云,严瑞琪,李俊丽,等. 计量分析甘草甜素和纹股蓝总甙等对大鼠癌前病变的影响. 中山医科大学学报,1994,15(1):37-40.
- 4 钱妍,凌昌全,赵江安,等. 肝复健冲剂对大鼠实验性肝癌细胞周期相关因子表达的影响. 第四军医大学学报,2001,22(17):1587-1589.
- 5 钱妍,金岩,李媛,等. 981208 冲剂抑制二乙基亚硝胺诱导的大鼠肝癌细胞增殖活性. 第二军医大学学报,2001,22(6):558-560.
- 6 季光,曹承楼,刘平,等. 扶正化痰方预防大鼠肝癌形成机制的研究. 中国中西医结合消化杂志,2001,9(1):20-22.
- 7 王奕,季光,王育群,等. 二甲基亚硝胺致大鼠癌前病变 TGF- β 1 R 的表达及中药的调节. 浙江中西医结合杂志,2001,11(1):23-24.
- 8 吴万垠,励雁峰,宋明志. 健脾益气方对 HBV 转基因小鼠肝脏 AFB1-DNA 加合物水平的影响. 中医杂志,1997,38(8):497-498.
- 9 吴万垠,罗云坚,程建华,等. 莜术油对小鼠细胞 DNA 作用的图像分析. 中西医结合肝病杂志,1999,9(1):18-20.
- 10 王修杰,袁淑兰,王俊朝,等. 丹参酮抗小鼠肝癌作用和机理初步研究. 中华肿瘤杂志,1996,18(6):412-414.
- 11 薛妍,夏天,赵建斌,等. 姜黄素对人肝癌细胞 SMMC-7721 的抑制作用. 第四军医大学学报,2000,21(5):S84-86.
- 12 赵建斌,崔勤,张雪,等. 华蟾毒精抗癌作用的体外研究. 第四军医大学学报,2001,22(16):1504-1507.
- 13 郭伟剑,于尔辛,郑颂国,等. 健脾理气药诱导人肝癌细胞 SMMC7721 凋亡的研究. 世界华人消化杂志,2000,8(1):52-55.
- 14 周振华,宋明志,于尔辛,等. 健脾理气方对小鼠 HAC 肝癌细胞凋亡和 Bax 基因蛋白表达影响的实验研究. 中国中西医结合脾胃杂志,2000,8(2):78-81.
- 15 郭振球,朱梅菊. 抗癌方对裸鼠移植性人肝癌细胞形态学及提高 P21^{WAF1}/CIP1 蛋白表达的影响. 生命科学研究,2000,4(2):161-166.
- 16 周建锋,王怡平,刘平,等. 不同扶正药物对 SMMC-7721 人肝癌细胞 P53、N-ras 基因的调控作用. 中西医结合肝病杂志,2000,10(增):121-122.
- 17 刘琳,秦叔逵,陈惠英,等. 三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究. 中华肝脏病杂志,2000,8(6):367-368.
- 18 司维可,陈安,李鹏,等. 苦参碱诱导人肝癌细胞系 HepG2 凋亡的研究. 第三军医大学学报,2001,23(7):816-818.
- 19 王宝成,郭军,狄剑时,等. 槐香烯乳剂与肿瘤多药耐药性的基础研究. 中国肿瘤临床,1996,23(2):143-146.
- 20 姜晓峰,甄永苏. 大黄素逆转肿瘤细胞多药耐药性的作用. 药理学学报,1999,34(3):164-167.
- 21 管冬元,鲁恒心,方肇勤. 不同治法对 ras/MAPK 信号传导通路相关基因转录调节的实验研究. 中国中医基础医学杂志,2002,8(10):36-38.
- 22 王代树,施学东,梁云燕,等. 中药白龙与 HMBA 对人癌周期细胞 CKI-P16 的调控. 中国中西医结合杂志,2001,21(10):763-765.
- 23 孙婧憬,周信达,刘银坤. 丹参对肝癌转移复发防治作用的研究. 中国中西医结合杂志,1999,19(5):292-293.
- 24 高艳景,袁孟彪,辛华,等. 大蒜素抑制人肝癌细胞中 VEGFmRNA 表达的研究. 中国药理学通报,2001,17(5):531-53.
- 25 孟志强,郭伟剑,于尔辛,等. 健脾理气方药物血清对肝癌细胞端粒酶活性及凋亡的影响. 世界华人消化杂志,2000,8(8):879-881.