

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2019.09.016

化浊解毒软坚方对 H22 肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织中 IL-6 和 STAT3 蛋白表达的影响

魏美美¹, 毛启远², 宋梦蝶³, 李晓宁³, 毛宇湘^{3*}

(1. 河北省中医院, 河北省石家庄市中山路 389 号, 050011; 2. 北京中医药大学第二临床医学院; 3. 河北中医学院研究生学院)

摘要 目的 探讨化浊解毒软坚方治疗原发性肝癌的可能作用机制。方法 将 32 只 H22 肝癌荷瘤模型小鼠随机分为模型组、中药组、西药组、联合组, 每组 8 只。在接种 H22 肝癌细胞 24 h 后中药组予化浊解毒软坚方配方颗粒水溶液 0.2 ml (含生药量 752.7 mg) 灌胃, 西药组给予腹腔注射 5-氟尿嘧啶注射液 0.4 ml, 联合组予化浊解毒软坚方配方颗粒水溶液灌胃和腹腔注射 (剂量同上), 模型组予生理盐水 0.2 ml 灌胃。连续 7 天后, 比较各组小鼠瘤重并计算抑瘤率, 分别采用免疫组化及 Western blot 法检测肿瘤组织中白细胞介素 6 (IL-6) 及信号传导蛋白和转录激活物 3 (STAT3) 蛋白表达。结果 中药组、西药组、联合组抑瘤率分别为 48.78%、53.65%、71.81%, 联合组抑瘤作用更明显。与模型组比较, 其余各组瘤重、肿瘤组织中 IL-6、STAT3 蛋白表达均降低, 并且联合组较中药组、西药组降低更明显 ($P < 0.05$)。结论 化浊解毒软坚方可抑制 IL-6/STAT3 信号通路活化, 从而有效调节肿瘤炎症微环境有关, 可能为其治疗原发性肝癌作用机制之一。

关键词 原发性肝癌; 化浊解毒软坚方; 白细胞介素 6; 信号传导蛋白和转录激活物 3

原发性肝癌是我国最常见恶性的肿瘤之一, 其病死率已居我国恶性肿瘤中的第二位^[1]。有研究表明, 肝癌的发生与慢性炎症或非可控性炎症、持续的肝损伤相关^[2]。大约 90% 的肝癌均是由慢性肝脏损害发展而来, 是由于肿瘤周围炎性微环境与肿瘤细胞之间相互作用而引起^[3]。白细胞介素 6 (IL-6) 及信号传导蛋白和转录激活物 3 (STAT3) 信号因子是肿瘤炎症反应微环境中关键的物质, IL-6/STAT3 信号通路在多种恶性肿瘤中存在, 并呈持续活化状态^[4]。化浊解毒软坚方是我们在国医大师李佃贵教授所提出的“浊毒理论”的指导下, 结合多年临床经验总结的经验方。临床研究发现, 该方能够明显缓解中晚期原发性肝癌患者的临床症状, 改善患者的卡氏评分及生存质量, 延长生存期^[5]。本实验观察化浊解毒软坚方对肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织 IL-6、STAT3 表达的影响, 以探讨其治疗肝癌的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞

清洁级昆明小鼠 32 只, 雄性, 5~6 周龄, 体

重 (20 ± 2) g, 购于河北医科大学实验动物中心, 实验动物合格证号: 1703307。肝癌瘤株为小鼠肝癌腹水瘤细胞系 H22, 由河北省实验动物中心惠赠。

1.2 药物

化浊解毒软坚方颗粒剂组成: 薏苡仁 30 g (批号: 17070085)、黄芪 20 g (批号: 17100048)、女贞子 10 g (批号: 17070125)、醋鳖甲 20 g (批号: 17060054)、牡蛎 20 g (批号: 17030081)、半枝莲 15 g (批号: 17060125)、烫水蛭 6 g (批号: 17040032)、蜂房 10 g (批号: 16050128)、白花蛇舌草 30 g (批号: 17040064)、醋莪术 10 g (批号: 17040018)、葶苈子 10 g (批号: 16080026)、灵芝 12 g (批号: 17070146), 以上颗粒剂由四川新绿色药业有限公司生产。5-氟尿嘧啶注射液 (10 ml, 0.25 g, 国药准字 H12020959), 天津金耀氨基酸有限公司产品。

1.3 主要试剂及仪器

IL-6 (批号: 20170822)、STAT3 (批号: 20170716) 多克隆兔抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 4% 多聚甲醛 (货号: P1110), Solarbio 公司; 山羊血清封闭液 (货号: CW0130), 北京康为世纪生物科技有限公司; 苏木素 (货号: KGA223), 凯基生物公司; 细胞裂

基金项目: 河北省科技计划项目 (17277746D); 河北省科学技术研究与发展计划 (06276102D-69)

* 通讯作者: maoyuxiang88@sohu.com, 13930466070

解液 (批号: WB0106), 上海威奥生物公司。

BP310P 型精密电子天平, Sartorius 公司; BIOPHOTOMETER PLUS 型蛋白浓度定量仪, 德国 Eppendorf 公司; DYCZ-24DN 型电泳仪, 北京六一公司; WSE-4040 型半干转膜仪系统, 日本 ATTO 公司; TS-8 型转移脱色摇床, 海门其林贝尔仪器制造有限公司; DM500 型光学显微镜, 德国徕卡公司。

1.4 模型建立

参照文献 [6] 中方法建立肝癌荷瘤小鼠模型: 在无菌条件下, 将复苏的 H22 肿瘤细胞, 接种于小鼠腹腔内进行传代, 生长 5 天后, 可看到小鼠腹部隆起, 产生癌性腹水, 用颈椎脱臼法将其处死。在无菌条件下, 抽取生长良好的小鼠的腹水, 稀释成 1.0×10^7 个/ml 细胞悬液, 抽取 0.2 ml, 接种于小鼠右腋下。

1.5 分组及给药

32 只小鼠采用随机数字表法分为模型组、中药组、西药组、联合组, 每组 8 只。小鼠在接种肝癌细胞 24 h 后中药组予化浊解毒软坚方配方颗粒水溶液 0.2 ml 灌胃 (含生药量 752.7 mg), 每日 1 次; 西药组给予腹腔注射 5-氟尿嘧啶注射液 0.4 ml, 每日 1 次; 联合组予化浊解毒软坚方配方颗粒水溶液 0.2 ml 灌胃, 腹腔注射 5-氟尿嘧啶注射液 0.4 ml, 均每日 1 次; 模型组予生理盐水 0.2 ml 灌胃, 每日 1 次。连续 7 天。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 抑瘤率 7 天后小鼠禁食不禁水 12h 以上, 称重后采用颈椎脱臼法处死小鼠, 常规消毒后剖开腹部, 完整剥离出肿瘤组织, 滤纸吸干血迹, 用精密电子天平称重, 计算抑瘤率。抑瘤率 = (模型组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重) / 模型组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

1.6.2 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 IL-6、STAT3 蛋白表达 钝性剥离肿瘤组织并称重, 以 4% 多聚甲醛固定肿瘤组织。常规切片脱蜡、酒精梯度水化, 流水冲洗 5 min, 0.01 mol/L PBS 冲洗 5 min $\times 3$, 3% 甲醇双氧水 20 min, PBS 洗 5 min $\times 3$, 滴加抗原修复液 I, 室温 10 min, 以 PBS 冲洗 5 min $\times 3$, 滴加山羊血清封闭液, 室温 20 min 后, 甩去多余液体, 滴加 IL-6 (1 : 80)、STAT3 (1 : 80) 稀释的一抗, 4℃ 过夜。第 2 日室温复温后, PBS 漂洗 5 min $\times 3$; 加入二抗, 37℃ 避光 20 min 后, PBS 漂洗 5 min $\times 3$, DAB 显色; 流水冲洗 10 min, 苏木素复染, 贴片, 脱水和透明, 中性树胶封片。于光学显微镜下以 400 倍的镜头分别观察

切片组织, 观察胞质内出现棕黄色颗粒者为 IL-6 的阳性细胞。STAT3 的阳性表达为细胞质内可明显见到棕黄色的细颗粒。在每张切片中随机选取高倍视野 ($\times 400$) 5 个, 通过 IPP 6.0 软件进行分析, 每个视野分别计数 100 个肿瘤细胞的阳性细胞数, 并计算阳性表达率。阳性表达率 = 阳性表达细胞数 / 总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6.3 采用 Western blot 法检测肿瘤组织中 IL-6、STAT3 蛋白表达 利用液氮、研钵粉碎肿瘤组织, 分装于离心管中, 加入细胞裂解液, 充分混匀, 4℃ 冰箱过夜裂解。4℃ 下, 离心半径 8.5 cm, 12000 r/min 离心 10 min, 取上清备用。用蛋白浓度定量仪测定蛋白浓度, 用 PBST 缓冲液洗膜 10 min $\times 3$, 曝光及洗片。将图像目的条带用 IPP 6.0 软件进行灰度值分析, 经 β -actin 校正后, 进行统计分析。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析, 计量数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 方差齐性则采用单因素方差分析进行检验, 组间两两比较采用 SNK- q 检验; 方差不齐采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠瘤重和抑瘤率比较

表 1 示, 中药组、西药组、联合组小鼠平均瘤重均低于模型组 ($P < 0.05$), 联合组小鼠瘤重明显低于西药组和中药组 ($P < 0.05$); 中药组与西药组小鼠瘤重差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。中药组抑瘤率为 48.78%, 西药组为 53.65%, 联合组为 71.81%, 联合组抑瘤率最高。

表 1 各组小鼠瘤重比较 ($g, \bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	瘤重
模型组	8	3.69 ± 0.87
中药组	8	$1.89 \pm 0.48^{* \Delta}$
西药组	8	$1.71 \pm 0.43^{* \Delta}$
联合组	8	$1.04 \pm 0.31^{*}$

注: 与模型组比较, $^{*} P < 0.05$; 与联合组比较, $^{\Delta} P < 0.05$

2.2 各组小鼠肿瘤组织中 IL-6、STAT3 蛋白表达比较

表 2、表 3 示, 与模型组比较, 其余各组小鼠肿瘤组织中 IL-6、STAT3 蛋白阳性表达率和灰度值降低, 并且联合组 IL-6、STAT3 蛋白阳性表达率和灰度值明显低于中药组和西药组 ($P < 0.05$)。中药组与西药组肿瘤组织中 IL-6、STAT3 蛋白阳性表达率和灰度值比较, 差异无统计学意义 ($P >$

0.05)。各组小鼠肿瘤组织中 IL-6、STAT3 蛋白电泳图见图 1。

表 2 各组小鼠肿瘤组织中 IL-6、STAT3 蛋白表达
免疫组化法检测结果比较 (%, $\bar{x} \pm s$)

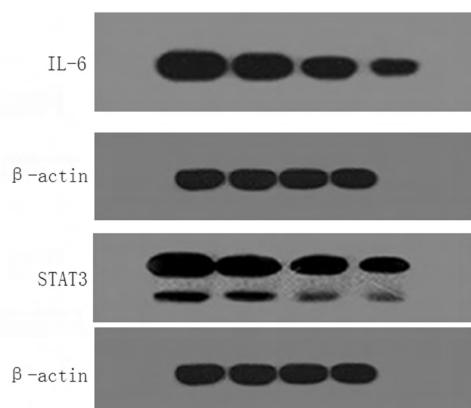
组别	例数	IL-6	STAT3
模型组	8	56.00 $\pm$ 2.87	53.25 $\pm$ 2.96
中药组	8	31.12 $\pm$ 2.41 ^{*△}	30.25 $\pm$ 4.52 ^{*△}
西药组	8	30.50 $\pm$ 4.78 ^{*△}	29.25 $\pm$ 4.65 ^{*△}
联合组	8	16.75 $\pm$ 3.69 [*]	16.50 $\pm$ 2.44 [*]

注: IL-6, 白细胞介素 6; STAT3, 信号传导蛋白和转录激活物 3; 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与联合组比较, $\Delta P < 0.05$

表 3 各组小鼠肿瘤组织中 IL-6、STAT3 蛋白表达
Western blot 法检测结果比较 (灰度值, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-6	STAT3
模型组	8	1.02 $\pm$ 0.05	0.99 $\pm$ 0.05
中药组	8	0.74 $\pm$ 0.03 ^{*△}	0.71 $\pm$ 0.02 ^{*△}
西药组	8	0.68 $\pm$ 0.02 ^{*△}	0.65 $\pm$ 0.03 ^{*△}
联合组	8	0.44 $\pm$ 0.05 [*]	0.39 $\pm$ 0.04 [*]

注: IL-6, 白细胞介素 6; STAT3, 信号传导蛋白和转录激活物 3; 与模型组比较, * $P < 0.05$; 与联合组比较, $\Delta P < 0.05$



模型组 中药组 西药组 联合组

注: IL-6, 白细胞介素 6; STAT3, 信号传导蛋白和转录激活物 3

图 1 各组小鼠肿瘤组织中 IL-6、STAT3 蛋白电泳图

3 讨论

根据原发性肝癌临床表现, 可将其归为中医学“肝积”“积聚”“癥瘕”等范畴。其病因病机在正气内虚的基础上, 感受邪毒、情志不畅、饮食损伤、宿有旧疾等因素导致机体脏腑功能失和, 气血阴阳失衡, 进而导致气滞、血瘀、痰湿、热毒等病理因素的产生, 这些病理因素蕴结于脏腑, 并相互搏结, 日久而发为本病^[1]。我们认为, 原发性肝癌的病因病机复杂, 大多为外感湿热毒邪、情志不调、饮食不节等因素长期存在, 导致机体正气亏虚, 水湿内生, 湿邪阻滞, 郁而成浊, 日久致气

滞、血瘀、痰凝, 久之变生浊毒之邪, 浊毒之邪蕴结于内, 侵及脏腑, 留滞不去, 结于肋下所致。该病是在脏腑气血亏虚的基础上, 湿、热、毒、血相互搏结, 变生浊毒而致本病^[2]。因此, 原发性肝癌的治疗应以化浊解毒为原则, 兼以软坚散结、活血化瘀、扶助正气等法。化浊解毒软坚方中女贞子、黄芪、灵芝益气养阴; 薏苡仁、白花蛇舌草、蜂房、半枝莲化浊解毒健脾; 醋莪术、牡蛎、醋鳖甲软坚散结消积。诸药合用, 在化浊解毒的基础上, 兼加益气养阴、软坚消积之功。本研究发现, 中药组抑瘤率为 48.78%, 联合组为 71.81%, 说明化浊解毒软坚方对 H22 荷瘤小鼠的实体瘤有一定的抑制作用, 且联合 5-氟尿嘧啶效果更好。

近年来, 炎症与肿瘤的关系越来越受到关注。不同程度的慢性炎症在迁延不愈的过程中可促使细胞发生基因突变、DNA 损伤等, 从而诱发肿瘤形成^[3-14]。另一方面, 通过介导复杂的信号通路, 如活化 STAT3、核因子 κ B (NF- κ B) 等细胞信号通路, 促使肿瘤的生长、侵袭及转移^[11-12]。IL-6 是一种具有多种生物学功能的促炎细胞因子, 并参与多种生理过程及疾病发生发展的全过程, 是衔接炎症与肿瘤最为核心的炎症因子^[13-14]。IL-6 通过自身或刺激诱导的方式逐渐产生慢性炎症微环境, 为肿瘤的细胞增殖和分化创造条件^[15]。STAT3 在早期胚胎发育和较多正常组织分化中发挥着重要作用, 调控多种细胞的生理及病理生物学活动, 包括细胞的增殖、恶性突变及凋亡抑制等^[16]。STAT3 通过介导炎症介质的细胞外信号来调控肿瘤细胞、免疫细胞等的生物学行为, 是慢性炎症促进肿瘤发生及发展过程中不可或缺的关键性分子之一^[17]。有研究表明, 在临床上至少有 60% 的肝癌肿瘤组织 STAT3 活性异常增高, 并且肿瘤恶性程度更高^[18]。本研究结果发现, 化浊解毒软坚方能够下调肿瘤组织中 IL-6 水平, 并减弱 STAT3 蛋白在肿瘤组织中的表达, 进而进一步抑制 IL-6/STAT3 信号通路的持续活化, 从而有效调节肿瘤炎症微环境, 抑制肿瘤的生长与转移, 这可能是化浊解毒软坚方治疗原发性肝癌的可能机制之一。

参考文献

- [1] SOERJOMATARAM I, LORTET-TIEULENT J, PARKIN DM, et al. Global burden of cancer in 2008: a systematic analysis of disability-adjusted life-years in 12 world regions [J]. Lancet, 2012, 380(9856): 1840-1850.
- [2] NAKAGAWA H, MAEDA S. Inflammation and stress-related signaling pathways in hepatocarcinogenesis [J].

- World J Gastroenterol, 2012, 18(31) : 4071-4081.
- [9] 王凤梅,李超,贾文玲,等. 炎性微环境与肝癌发生间关系的研究进展 [J]. 肿瘤, 2015, 35(11) : 1282-1286.
 - [10] 张雪,万茜,徐天舒. 麦粒灸对 Lewis 肺癌小鼠炎性微环境中白介素 6 及信号转导蛋白和转录激活因子 3 的影响 [J]. 针刺研究, 2017, 42(3) : 235-239.
 - [11] 沈正先. 复肝春 6 号治疗中晚期原发性肝癌的临床研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015: 23.
 - [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] 张葛,花宝金. 从炎性微环境探究中医肿瘤病机与治则治法 [J]. 中医杂志, 2012, 53(13) : 1101-1104.
 - [14] 张志威. 化浊解毒软坚方对肝癌荷瘤小鼠组织生长与转移影响的实验研究 [D]. 石家庄: 河北医科大学, 2015: 25.
 - [15] DE MARTEL C,FRANCESCHI S. Infections and cancer: established associations and new hypotheses [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2009, 70(3) : 183-194.
 - [16] PARK EJ,LEE JH,YU GY, et al. Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression [J]. Cell, 2010, 140(2) : 197-208.
 - [17] KADHIM HS,AL-JEBOORI TI,TAWFIK MS. Possible role of nuclear factor kappaB detected by in situ hybridization in the pathogenesis of transitional cell carcinoma of the bladder [J]. J Med Liban, 2006, 54(4) : 196-199.
 - [18] YU H,KORTYLEWSKI M,PARDOLL D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment [J]. Nat Rev Immunol, 2007, 7(1) : 41-51.
 - [19] NAUGLER WE,SAKURAI T,KIM S, et al. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production [J]. Science, 2007, 317(5834) : 121-124.
 - [20] NAUGLER WE,KARIN M. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer [J]. Trends Mol Med, 2008, 14(3) : 109-119.
 - [21] BROMBERG J,WANG TC. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link [J]. Cancer Cell, 2009, 15(2) : 79-80.
 - [22] 侯嘉杰,孙倍成. STAT3: 慢性炎症介导肿瘤发生和发展的关键节点 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2014, 41(1) : 69-78.
 - [23] XU WC,LUO CL,FENG WL, et al. Expression and clinical significance of signal transducers and activators of transcription 3 in non small cell lung cancers [J]. Chin J Clin Lab Sci, 2003, 21(4) : 23-24.
 - [24] BARBIERI I,PENSA S,PANNELLINI T, et al. Constitutively active Stat3 enhances neu-mediated migration and metastasis in mammary tumors via upregulation of Cten [J]. Cancer Res, 2010, 70(6) : 2558-2567.

Effects of *Huazhuo Jiedu Ruanjian Recipe* (化浊解毒软坚方) on Expression of IL-6 and STAT3 Protein in Tumor Tissue of H22 Hepatoma Tumor-bearing Mice

WEI Meimei¹, MAO Qiyuan², SONG Mengdie³, LI Xiaoning³, MAO Yuxiang¹

(1. Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050011; 2. Second Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine; 3. Graduate School of Hebei College of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To explore the possible action mechanism of *Huazhuo Jiedu Ruanjian Recipe* (化浊解毒软坚方) in the treatment of primary liver cancer. **Methods** A total of 32 H22 hepatocarcinoma model mice were randomly divided into model group, traditional Chinese medicine (TCM) group, western medicine group and combined group, with 8 rats in each group. After inoculation of H22 hepatoma cells for 24 hours, the TCM group was given 0. 2 ml aqueous solution of *Huazhuo Jiedu Ruanjian Granules* (containing 752. 7 mg of crude drug), and the western medicine group was given intraperitoneal injection of 0. 4 ml 5-fluorouracil injection. The combined group was intragastrically given and intraperitoneally injected aqueous solution of *Huazhuo Jiedu Ruanjian* (the dose was the same as above), and the model group was administered with 0. 2 ml of normal saline. After 7 consecutive days, the tumor weight of each group was compared and the tumor inhibition rate was calculated. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of interleukin-6 (IL-6) and signaling protein and activator of transcription 3 (STAT3). **Results** The tumor inhibition rates of the TCM group, western medicine group and combined group were 48. 78% , 53. 65% and 71. 81% , respectively. The anti-tumor effect of the combined group was more obvious. Compared with the model group, the expression of IL-6 and STAT3 protein in the tumor weight and tumor tissues of the other groups decreased, and the combined group was more significantly lower than the TCM group and western medicine group (*P* < 0. 05). **Conclusion** *Huazhuo Jiedu Ruanjian Recipe* can inhibit the activation of IL-6/STAT3 signaling pathway, which can effectively regulate the microenvironment of tumor inflammation, which may be one of the mechanisms for the treatment of primary liver cancer.

Keywords primary liver cancer; *Huazhuo Jiedu Ruanjian Recipe* (化浊解毒软坚方); interleukin-6; signaling protein and transcriptional activator 3

(收稿日期: 2018 - 08 - 01; 修回日期: 2018 - 12 - 17)

编辑: 邓 媛