

基于 ANXA1/VEGF 通路研究片仔癀对肝癌腹水小鼠的保护作用

林 雅¹, 赖文芳¹, 李聪翀¹, 刘毓东¹, 林国清^{2*}

(1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122; 2. 福建中医药大学附属人民医院, 福建 福州 350004)

摘要: 目的 观察片仔癀对 H22 肝癌腹水小鼠的影响, 探讨其作用机制。方法 通过腹腔注射 H22 肝癌细胞法制备肝癌腹水小鼠, 按体重随机分为正常组、模型组、片仔癀组(0.2 g/kg)、环磷酰胺组(0.07 g/kg), 造模 24 h 后予相应药液灌胃给药, 每日 1 次, 连续给药 7 d。实验结束后(7 d 后)检测 4 组小鼠体质量、腹围、腹水量, 酶速率法检测血清 ALT、AST 含量; 苏木素-伊红(HE)染色观察小鼠肝组织形态学改变; Western blot 法检测膜联蛋白 A-1(ANXA1)、血管内皮生长因子(VEGF)、血管内皮生长因子受体(VEGFR)及核因子 κ B(NF- κ B) p50 蛋白表达。结果 与正常组比较, 模型组小鼠出现明显腹水, 肝脏病理提示肝细胞变性坏死, 血清 ALT、AST 含量升高, 肝组织 ANXA1 蛋白表达下降, VEGF、VEGFR、NF- κ B p50 表达增强($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与模型组比较, 片仔癀组腹水量明显减少, 肝脏病理显示片仔癀组肝小叶结构较为清晰, 脂肪空泡减少, 肝细胞的液化、退变现象明显减少, 血清 ALT、AST 含量明显下降, 肝细胞 ANXA1 蛋白表达上升, VEGF、VEGFR 及 NF- κ B p50 蛋白表达下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。结论 片仔癀可通过调控 ANXA1/VEGF 通路对 H22 肝癌腹水小鼠起到保护作用。

关键词: 片仔癀; H22 肝癌细胞; 腹水; 膜联蛋白 A1; 血管内皮生长因子; NF- κ B; 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-338X(2020)01-0037-04

DOI: 10.13260/j.cnki.jfjtc.011965

肝癌是临床常见恶性肿瘤之一, 近年来发病率及病死率逐步升高, 全球发病的地区中以亚洲和南非为本病的高发区, 尤其是在我国, 每年新发肝癌病例占全球 50% 以上, 其病死率位居第 3 位, 在某些农村高发地区甚至为第 1 位^[1-2]。福建名方片仔癀自明代起作为清热解毒、消瘀散结的复方被广泛应用至今, 研究发现其对肝细胞性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者在保肝退黄、控制肿瘤发展、提高生活质量、缓解疼痛等方面有确切疗效, 同时可改善由化疗药物引起的肝功能异常^[3-6]。本课题以膜联蛋白 A-1(annexin-A1, ANXA1)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管内皮细胞生长因子受体(vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR)、核因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)作为切入点, 通过观察片仔癀对 H22 肝癌腹水小鼠的影响, 探讨片仔癀抑制保护肝功能的作用机制, 为其临床应用提供深入的理论基础。

1 实验材料

1.1 实验动物与细胞 SPF 级 ICR 小鼠, 雄性, 体质量 20~24 g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 实验动物许可证号: SCXK(沪)2014-0002, 饲养于福建中医药大学实验动物中心 SPF 条件的层流柜下。人肝癌细胞 H22 购自中国科学院上海生命

科学研究院。

1.2 药物与试剂 片仔癀(漳州片仔癀药业股份有限公司生产, 批号: 0908035); 环磷酰胺(美国 Sigma 公司, 批号: WXBC4024V); ALT、AST 试剂盒(贝尔曼库尔特实验系统有限公司, 货号: Z409226、Z507224); ANXA1 抗体(英国 Abcam 公司, 货号: ab97485); VEGF 抗体、VEGFR 抗体、NF- κ B p50 抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司, 货号: #2463、#9698、#3035); 超敏 ECL 化学发光试剂盒(碧云天生物技术有限公司, 货号: P0018)。

1.3 实验仪器 Infinite M200 Pro 多功能酶标仪(美国 TECAN 公司); Mini PROTEAN Tetra 小型垂直电泳槽、Mini Trans-Blot 小型转印槽、ChemiDoc XRS⁺凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 实验方法

2.1 模型制备 依据文献及本课题组前期造模方法^[7-8], 将 H22 肝癌细胞制备为 1×10^7 个/mL 的活细胞悬液, 按 0.2 mL/只腹腔注射在瘤源鼠腹腔内。接种 7 d 后将瘤源鼠脱颈处死, 抽取出癌性腹水, 制成 1×10^7 个/mL 的活细胞悬液, 按 0.2 mL/只腹腔注射, 建立肝癌腹水模型。

2.2 分组与给药 将 40 只雄性 ICR 小鼠, 适应性饲养 1 周后, 随机分为正常组($n=10$)和造模组($n=30$), 造模组建立肝癌腹水模型后再随机分为模型组、片仔癀组和环磷酰胺组。片仔癀组按 0.2 g/(kg·d)予片仔癀药液灌胃, 环磷酰胺组按 0.07 g/(kg·d)予环磷酰胺灌胃, 正常组和模型组均予等容积蒸馏水灌胃。造模 24 h 后第 1 次给药, 每日灌胃给药 1 次, 连续给药 7 d。

收稿日期: 2019-10-21

基金项目: 福建省自然科学基金面上项目(2016J01775); 福建省教育厅科技类一般项目(JAT160243)

作者简介: 林雅(1977—), 女, 医学博士, 教授, 主要从事中医药抗炎抑瘤作用机制研究。

通信作者: 林国清(1976—), 男, 医学硕士, 副主任医师。

E-mail: 151485578@qq.com

2.3 检测指标

2.3.1 药效学指标检测 实验过程中每日测量体质量(g), 给药 7 d 后脱颈椎处死小鼠, 测量体质量(g)及腹围(cm)后, 抽取腹水测量腹水量(mL)。

2.3.2 血清 ALT、AST 含量检测 小鼠末次给药后 24 h, 摘眼眶取血, 3 000 r/min 离心 15 min, 分离血清, 使用酶速率法按检测试剂盒操作方法和步骤检测血清 ALT、AST 含量。

2.3.3 肝组织病理学检测 小鼠脱颈椎处死, 迅速剖腹摘取同样部位的部分肝脏, 将一部分肝脏置于 4% 的多聚甲醛溶液中固定 24 h 后, 按常规脱水包埋、切片后进行苏木素-伊红染色(HE 染色)。

2.3.4 Western blot 法检测 提取细胞总蛋白, 配胶电泳。转膜成功后 TBS 洗 1 遍, 将 PVDF 膜浸泡在封闭液中, 置于摇床上室温封闭 2 h。TBS 洗涤 10 min, 加入 ANXA1 一抗(1:800)、VEGF 一抗(1:800)、VEGFR 一抗(1:800)、NF- κ B p50 一抗(1:600)、PCNA(1:3 000)、 β -actin(1:3 000), 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。TBS 洗涤后加入二抗, 摇床室温孵育 2 h。TBS 洗涤(10 min $\times$ 3), 显影。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行统计学处理。计量资料符合正态分布以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析, 若方差齐用 LSD 方法, 方差不齐采用 Games-Howell 方法; 不符合正态分布的数据采用非参数检验。

3 结果

3.1 小鼠一般情况 接种 H22 肝癌细胞悬液造模后, 模型小鼠体质量从第 4 天开始明显高于正常小鼠, 模型组、环磷酰胺组各死亡 1 只, 片仔癀组死亡 2 只, 总成模率约 85%。

3.2 4 组小鼠体质量、腹水、腹围指标比较 见表 1。

表 1 4 组小鼠体质量、腹水、腹围指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量/g	腹水/mL	腹围/cm
正常组	10	32.28 $\pm$ 0.77	—	7.80 $\pm$ 0.37
模型组	9	38.57 $\pm$ 3.02 ¹⁾	8.37 $\pm$ 0.76	9.44 $\pm$ 0.49 ¹⁾
片仔癀组	8	36.60 $\pm$ 3.33 ²⁾	7.59 $\pm$ 0.62 ²⁾	8.71 $\pm$ 0.84 ²⁾
环磷酰胺组	9	34.04 $\pm$ 1.86 ²⁾	7.04 $\pm$ 1.20 ²⁾	8.49 $\pm$ 0.92 ²⁾

注: 与正常组比较, 1) $P < 0.01$; 与模型组比较, 2) $P < 0.05$ 。

3.3 4 组小鼠血清 ALT、AST 含量比较 见表 2。

表 2 4 组小鼠血清 ALT、AST 含量比较($\bar{x} \pm s$) IU/L

组别	n	ALT	AST
正常组	10	33.08 $\pm$ 3.93	124.22 $\pm$ 9.45
模型组	9	62.18 $\pm$ 13.41 ¹⁾	521.32 $\pm$ 102.64 ¹⁾
片仔癀组	8	42.30 $\pm$ 8.69 ²⁾	337.56 $\pm$ 68.23 ²⁾
环磷酰胺组	9	52.67 $\pm$ 7.48	475.92 $\pm$ 43.20

注: 与正常组比较, 1) $P < 0.01$; 与模型组比较, 2) $P < 0.05$ 。

3.4 4 组小鼠肝组织 HE 染色结果 正常小鼠肝脏被膜无炎性细胞浸润, 肝索以中央静脉为中心呈放

射状, 肝小叶结构完整, 肝细胞未见明显脂肪变性、坏死; 模型组小鼠肝脏肝索排列紊乱, 肝小叶结构不清晰, 肝细胞出现大小不等的脂肪空泡, 脂肪性变明显, 部分肝细胞胞浆出现液化、退变甚至被吸收消失; 片仔癀组肝索排列紊乱程度较模型组有所改善, 肝小叶结构较为清晰, 脂肪空泡减少, 肝细胞的液化、退变现象明显比模型组减少; 环磷酰胺组与模型组肝脏组织病理形态学并无出现任何加重或者减轻的趋势。见图 1。

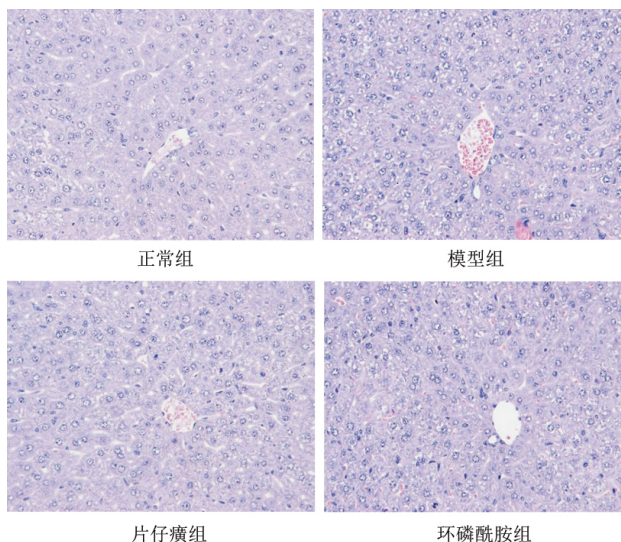
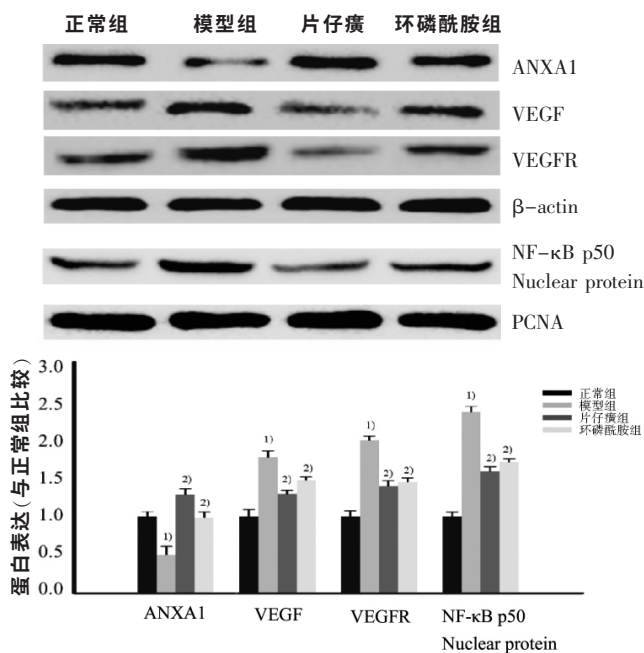


图 1 4 组小鼠肝组织 HE 染色图($\times 200$)

3.5 4 组小鼠肝组织 ANXA1、VEGF、VEGFR 及 NF- κ B p50 蛋白表达比较 见图 2。

4 讨论

肝癌信号转导通路是近年来研究热点, 主要集中在肝癌细胞凋亡增殖、肿瘤血管增生等各个层次。ANXA1 是膜联蛋白超家族中第一个被发现的成员, 近年研究表明 ANXA1 参与炎症过程, 可以抑制炎症介质的合成及释放, 抑制磷脂酶 A2 的表达, 从而抑制中性粒细胞合成释放炎症介质^[9-11], 而 ANXA1 的抗炎作用可能与 NF- κ B、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(Akt)及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)有关, ANXA1 可以有效中断小鼠 NF- κ B 信号通路。从而抑制 NF- κ B 活性, 降低促炎介质的产生^[9,12]。VEGF 既存在于癌旁组织中, 也存在于血清中, 不仅可以通自身分泌效应直接刺激肝癌细胞增殖, 还能分泌至血清中, 间接促进肿瘤血管增生^[13]。研究表明, VEGF 在肿瘤的发生发展过程中起到促进新生血管生成的作用, 同时为肿瘤细胞提供必需的氧气和营养物质^[14]。实验结果表明, 片仔癀可以通过促进肝脏细胞 ANXA1 蛋白的表达, 下调其下游蛋白 VEGF 及其受体 VEGFR 的表达, 抑制血管内皮细胞生长因子分泌作用; 同时, 其能够抑制核蛋白 NF- κ B p50 核转录水平, 通过抑制肿瘤炎症的作用, 发挥其抗



注:与正常组比较,1) $P < 0.01$;与模型组比较,2) $P < 0.01$ 。
图2 4组小鼠肝组织 ANXA1、VEGF、VEGFR 及 NF-κB p50 蛋白表达比较

肝癌的治疗效果。

本研究从肝功能切入,观察片仔癀对肝癌腹水小鼠的肝脏保护作用,从实验结果可以观察到片仔癀可减少 H22 肝癌小鼠的腹水量,降低血清 ALT、AST 含量,保护肝癌腹水小鼠的肝功能。经肝脏病理染色显示,片仔癀组小鼠肝脏中肝索排列紊乱程度较模型组有所改善,肝小叶结构较为清晰,脂肪空泡减少,肝细胞的液化、退变现象明显比模型组减少,说明片仔癀具有非常明显的改善肝细胞、保护肝功能的作用^[6]。

综上所述,片仔癀具有良好的保护并改善肝细胞的作用,并且可以通过调控 ANXA1/VEGF 通路,进而抑制肿瘤炎症作用,产生肝保护作用,具有潜在的抗癌作用,可为肝癌的药物治疗开辟新途径。

参考文献

[1] 中华预防医学会肿瘤预防与控制专业委员会感染相关肿瘤防

控学组,中华预防医学会慢病预防与控制分会,中华预防医学会健康传播分会. 中国肝癌一级预防专家共识(2018)[J]. 临床肝胆病杂志,2018,34(10):2090-2097.

- [2] CHEN W,ZHENG R,BAADE P D,et al. Cancer statistics in China,2015 [J]. CA Cancer J Clin,2016,66(2):115-132.
- [3] 赵水连,潘杰. 片仔癀胶囊配合介入化疗治疗原发性肝癌患者临床观察[J]. 医药世界,2006,8(9):49-51.
- [4] 孟丽萍,顾雪峰. 片仔癀联合 TACE 治疗毒热瘀结型原发性肝癌免疫指标变化的临床观察[J]. 九江医学,2008,23(1):31,37.
- [5] 邱赞,韩升霞,刘丽雅,等. 片仔癀治疗溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 福建中医药,2018,49(6):34-36.
- [6] 黄进明,赵锦燕,万芸,等. 复方片仔癀肝宝对急性肝损伤的保护作用研究[J]. 世界中西医结合杂志,2015,10(9):1216-1218.
- [7] ZHANG Y,GUO X,XIONG L,et al. MicroRNA-101 suppresses SOX9-dependent tumorigenicity and promotes favorable prognosis of human hepatocellular carcinoma [J]. FEBS Lett,2012,586(24):4362-4370.
- [8] ZHANG Y,LI Z,YANG M,et al. Identification of GRB2 and GAB1 coexpression as an unfavorable prognostic factor for hepatocellular carcinoma by a combination of expression profile and network analysis [J]. PLoS One,2013,8(12):e85170.
- [9] QIN C,YANG Y H,MAY L,et al. Cardioprotective potential of annexin-A1 mimetics in myocardial infarction [J]. Pharmacol Ther,2015,148:47-65.
- [10] GALVAO I,VAGO J P,BARROSO L C,et al. Annexin A1 promotes timely resolution of inflammation in murine gout [J]. Eur J Immunol,2017,47(3):585-596.
- [11] LIAO W I,WU S Y,WU G C,et al. Ac2-26,an Annexin A1 peptide,attenuates ischemia-reperfusion-induced acute lung injury [J]. Int J Mol Sci,2017,18(8):1771.
- [12] PURVIS G,CHIAZZA F,CHEN J,et al. Annexin A1 attenuates microvascular complications through restoration of Akt signalling in a murine model of type 1 diabetes [J]. Diabetologia,2018,61(2):482-495.
- [13] 李静,陈力,王丹,等. 芦荟多糖与大黄素配伍对人舌鳞状癌细胞活力及 VEGF 表达的影响[J]. 中医药通报,2019,18(1):59-62.
- [14] BOWER N I,VOGRIN A J,LE GUEN L,et al. Vegfd modulates both angiogenesis and lymphangiogenesis during zebrafish embryonic development [J]. Development,2017,144(3):507-518.

The Liver-protecting Function and Mechanism of Pien Tze Huang on H22 Hepatocellular Carcinoma Ascites Mice Based on ANXA1/VEGF Signaling Pathway

LIN Ya¹, LAI Wenfang¹, Li Congchong¹, Liu Yudong¹, LIN Guoqing^{2*}

¹ College of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

² The Affiliated People's Hospital of Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350004, China

ABSTRACT Objective: To explore the effect of Pien Tze Huang (PZH) on H22 hepatocellular carcinoma (HCC) ascites mice and its mechanism. **Methods:** Ascites hepatoma mice model were prepared by intraperitoneal injection of H22 HCC, and randomly divided into the normal group, the model group, the PZH group (0.2 g/kg) and the cyclophosphamide group (0.07 g/kg) according to their body weight. The H22 HCC ascites mice were intragastrically administered the respective drugs one time per day, and for consecutive 7 days. At the end of the experiment (7 d later), the body weight, abdominal circumference, ascites volume, ALT and AST level of serum were measured. Observe the pathological section of liver by using HE staining. Western blotting was used to detect the expressions of annexin-A1 (ANXA1), vascular endothelial growth factor (VEGF), vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and nuclear factor kappa-B (NF- κ B) p50. **Results:** Compared with the normal group, the ascites volume and the serum AST and ALT levels were increased slightly in the model group, the expression of ANXA1 protein decreased, the expression of VEGF, VEGFR, NF- κ B p50 protein increased, and the hepatic cells turned partially fatty along with liquidation, regression, or disappearance of cytoplasm. Compared with the model group, PZH could reduce the ascites volume and the serum AST and ALT levels significantly, and the pathological section of liver showed that PZH could improve hepatocytes to a certain extent. The expression of ANXA1 by PZH treatment examined was significantly increased, and VEGF, VEGFR, NF- κ B p50 were significantly suppressed. **Conclusion:** In H22 HCC ascites mice, it suggested that protecting the liver function and regulating ANXA1/VEGF signaling pathway might be the mechanisms by which PZH treats hepatocellular carcinoma.

KEY WORDS Pien Tze Huang; H22 hepatocellular carcinoma; ascites; ANXA1; VEGF; NF- κ B; mice

(上接第 36 页)

Scutellaria Barbata D. Don Induce Apoptosis of Colorectal Cancer Stem Cells

WEI Lihui^{1,2}, ZHANG Jingjing^{1,2}, WANG Shu³, FANG Yi^{1,2}, CHEN Youqin^{1,2}, PENG Jun^{1,2}, LIN Jiumao^{1,2*}

¹ Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

² Fujian Key Laboratory of Integrative Medicine on Geriatrics, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

³ College of pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China

ABSTRACT Objective: To study whether *Scutellaria Barbata* D. Don induce the apoptosis of colorectal cancer stem cells and explore its regulatory molecular mechanism. **Methods:** Colorectal cancer stem cells were obtained from SW480 cell line by flow cytometry and treated with *Scutellaria Barbata* D. Don (0 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 0.75 mg/mL) for 24 h. The effect of *Scutellaria Barbata* D. Don on colorectal cancer stem cells proliferation was detected by inverted microscope and cell counter with 4% trypan blue staining. DAPI and Annexin V-APC/PI assay were used to observe the effect of *Scutellaria Barbata* D. Don on the apoptosis of colorectal cancer stem cells. Q-PCR and Western Blot were used to detect the expression of Bcl-2 and Bax in colorectal cancer stem cells. **Results:** These results showed that *Scutellaria Barbata* D. Don could significantly inhibit the proliferation ($P < 0.05$) and induce the apoptosis of colorectal cancer stem cells, while decrease the ratio of Bcl-2/Bax ($P < 0.05$). **Conclusion:** *Scutellaria Barbata* D. Don could induce the apoptosis of colorectal cancer stem cells by a possible way of decreasing the ratio of Bcl-2/Bax.

KEY WORDS *Scutellaria Barbata* D. Don; colorectal cancer stem cell; apoptosis; proliferation; Bcl-2; Bax