

熊胆粉对肝癌移植瘤裸鼠 STAT3 通路的影响

赵锦燕 刘丽雅 沈阿灵 林 薇 曹治云 庄群川 洪振丰

摘要 目的 观察熊胆粉对肝癌皮下移植瘤裸鼠信号转导与转录激活因子 3 (STAT3) 通路及其下游靶基因的影响, 探讨熊胆粉治疗肝癌的作用机制。**方法** 采用人肝癌细胞株 HepG₂ 构建裸鼠皮下移植瘤模型, 待皮下移植瘤形成后, 将裸鼠随机分为熊胆粉组和对照组, 每天分别给予熊胆粉和生理盐水, 连续给药 3 周, 每周测量体重和瘤体积 2 次, 给药结束, 剥取瘤体称量瘤重及计算抑瘤率; 采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记测定法 (TUNEL) 检测瘤组织的细胞凋亡情况; 逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 检测 Bcl2-associated X 蛋白 (Bax)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、周期蛋白依赖性蛋白激酶 4 (CDK4)、细胞周期蛋白 D1 (cyclinD1) mRNA 表达; 免疫组化测定磷酸化的信号转导与转录活化因子 3 (p-STAT3)、增殖细胞核抗原 (PCNA)、Bax、Bcl-2、CDK4、cyclinD1 蛋白表达。**结果** 熊胆粉显著抑制肿瘤的体积和瘤重, 与对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。TUNEL 法结果显示熊胆粉显著促进肝癌细胞凋亡。RT-PCR 结果显示熊胆粉促进 Bax 表达而抑制 Bcl-2、CDK4、cyclinD1 mRNA 表达。免疫组化结果显示熊胆粉促进 Bax 表达而抑制 p-STAT3、PCNA、Bcl-2、CDK4、cyclinD1 蛋白表达。**结论** 熊胆粉可以通过调控 STAT3 通路抑制肝癌细胞增殖, 促进肝癌细胞凋亡。

关键词 熊胆粉; 肝癌; 信号转导与转录激活因子 3

Effect of Bear Bile Powder on STAT3 Pathway in Hepatocellular Carcinoma Xenograft ZHAO Jin-yan, LIU Li-ya, SHEN A-ling, LIN Wei, CAO Zhi-yun, ZHUANG Qun-chuan, and HONG Zhen-feng
Academy of Integrative Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou (350122), China

ABSTRACT Objective To observe the effect of bear bile powder (BBP) on the STAT3 pathway and its downstream target genes of nude mice hepatocellular carcinoma (HCC) xenograft, and to explore its mechanism for treating HCC. **Methods** The subcutaneous xenograft model was established using HepG₂ cells. When the subcutaneous transplanted tumor was formed, naked mice were randomly divided into two groups, the BBP group and the control group. Mice in the BBP group were administered with BBP by gastrogavage, once daily for 3 consecutive weeks, while mice in the control group were administered with normal saline by gastrogavage, once daily for 3 consecutive weeks. The body weight and the tumor volume were measured once per week. By the end of medication, the tumor weight was weighed and the tumor inhibition ratio calculated. The apoptosis of the tumor tissue was detected by TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL). The expression of Bcl2-associated X protein (Bax), B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2), cyclin-dependent protein kinase (CDK4), cyclinD1 were detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein expression levels of signal transducers and transcription activators 3 (p-STAT3), proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Bax, Bcl-2, CDK4, and cyclinD1 were determined by immunohistochemistry. **Results** BBP could inhibit the tumor volume and tumor weight, showing statistical difference when compared with the control group ($P < 0.01$). Results of TUNEL showed that BBP could significantly induce the apoptosis of hepatoma carcinoma cells. Results of RT-PCR showed that BBP could up-regulate the expression of Bax and down-reg-

基金项目:福建省科技厅重大专项基金资助项目(No. 2010YZ0001-1)

作者单位:福建中医药大学中西医结合研究院(福州 350122)

通讯作者:洪振丰, Tel: 13509399805, E-mail: zfhong1953@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2014.08.0976

ulate mRNA expression of Bcl-2, CDK4, and cyclinD1. Immunohistochemical results showed that BBP could up-regulate the expression of Bax and inhibit the protein expression of p-STAT3, PCNA, Bcl-2, CDK4, and cyclinD1. Conclusion BBP could induce the apoptosis of hepatoma carcinoma cells and inhibit their proliferation by regulating STAT3 pathway.

KEYWORDS bear bile powder; hepatocarcinoma; signal transducers and transcription of activators 3

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种常见的恶性肿瘤,发病率位居癌症中的第6位,病死率为第3位^[1]。在我国,肝癌的发病率比欧美高5~10倍,是全球肝癌发病率最高的国家^[2]。虽然肝癌的发病和乙肝病毒感染密切相关,但至今对其发病机制仍不清楚。信号转导和转录激活因子家族(STATs)是一类将由细胞因子受体和生长因子受体传递的细胞外信号传至细胞核的转录因子^[3],在多种肿瘤组织中皆发现有其成员的过度表达,其中以STAT3最为活跃。激活STAT3对肿瘤细胞的形成、生长、增殖、凋亡抑制等过程均起着重要的调控作用^[4]。熊胆粉为熊科动物黑熊胆经手术引流胆汁而得的干燥品,临床作为熊胆药物使用,属卫生部批准的新药。现代药理学研究发现,熊胆具有抗菌、解热、抗炎、镇静、抗惊厥、解痉利胆、保肝、溶解胆结石、降血糖、抗肿瘤等多种活性^[5,6]。但是关于熊胆粉治疗肝癌的机制研究鲜有报道。为研究熊胆粉治疗肝癌的作用及其机制,本研究采用HepG₂移植瘤裸鼠为研究对象,观察熊胆粉对移植瘤裸鼠STAT3通路的影响,并进一步探讨其对肝癌细胞增殖和凋亡的作用,为临床上应用熊胆粉治疗肝癌提供新的思路 and 理论依据。

材料与方法

1 动物 雄性BALB/c裸鼠,4周龄,20只,SPF级,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[许可证号:SCXK(沪)2007-0005],SPF级实验室层流架饲养。

2 细胞株 人肝癌细胞株HepG₂,购于中国科学院上海生物研究所细胞库。

3 药物 熊胆粉(0.25 g,批号:Z10980024,福建省归真堂药业股份有限公司提供),熊胆粉用生理盐水配成15 mg/mL液体备用。

4 试剂及仪器

4.1 试剂 胎牛血清(FBS)与DMEM培养液购自美国GIBCO公司;RT-PCR试剂盒购自美国Invitrogen公司;TUNEL试剂盒购自Roche公司;B细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-associated X蛋白(Bax)、增殖细胞核抗原(PCNA)、周期蛋白依赖性

蛋白激酶4(CDK4)、细胞周期蛋白D1(cyclinD1)及磷酸化的信号转导子与转录活化子3(p-STAT3);抗体购自美国Sant Cruze公司。

4.2 仪器 PCR仪(9600,美国PE公司);凝胶成像系统(Gel DOC 2000,美国Bio-RAD公司)。

5 方法

5.1 熊胆粉成分测定 采用HPLC法分析。色谱条件参照2010年版药典的熊胆胶囊。以甲醇-磷酸二氢钠溶液(0.03 mol/L, 68:32)为流动相;检测波长为210 nm;柱温为40℃。以牛黄熊去氧胆酸钠为对照品。

5.2 人肝癌细胞株HepG₂细胞培养 人肝癌细胞株HepG₂用含10% FBS、100 U/mL青霉素和100 μg/mL链霉素DMEM培养液,在37℃,5%饱和湿度的CO₂培养箱中培养。

5.3 建立HepG₂裸鼠移植瘤模型 参照Singh RP等^[7]的方法建立HepG₂裸鼠移植瘤模型。制备单细胞悬液,调整细胞浓度至4×10⁶个/mL,与基质胶1:1混合后接种于裸鼠右侧腋窝皮下,每只0.2 mL,待皮下移植瘤长至直径3 mm时即为成功建立肝癌移植瘤裸鼠模型。

5.4 分组和给药方法 待成瘤直径约6 mm时,将荷瘤小鼠随机分为对照组和熊胆粉组,每组10只。对照组小鼠灌胃生理盐水,0.2 mL/只,熊胆粉组小鼠按照150 mg/kg(配成15 mg/mL,0.2 mL/只)灌胃给药,每天1次,连续21天。

5.5 观察项目及检测方法

5.5.1 裸鼠体重及瘤体积 给药期间,每2天测量裸鼠体重和瘤体积(瘤体积=π/6×瘤长×瘤宽²)。

5.5.2 抑瘤率 脱颈处死裸鼠,完整剥取瘤体,将新鲜瘤组织放于电子天平称重,并计算抑瘤率。抑瘤率(%)=(对照组瘤重-熊胆粉组瘤重)/对照组瘤重×100%。

5.5.3 肿瘤组织细胞凋亡检测 采用TUNEL法检测肿瘤组织细胞的凋亡。按TUNEL反应检测试剂盒说明书操作。镜下观察并计数5个以上高倍视野,每个视野200个细胞,计数1 000个细胞,阳性

细胞数以百分数表示,即为肿瘤细胞凋亡指数(AI)。

5.5.4 Bax、Bcl-2、CDK4、cyclinD1 mRNA 表达 采用 RT-PCR 检测 Bax、Bcl-2、CDK4、cyclinD1 mRNA 表达。用 Trizol 提取瘤组织中总 RNA,以管家基因 GAPDH 为对照,引物序列应用 Primer 5.0 软件进行设计,扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,结果用 Bio-Rad 凝胶成像分析系统进行电泳条带分析,引物序列见表 1。

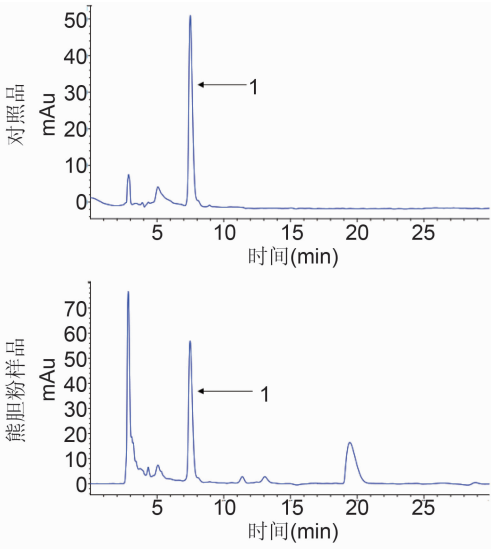
表 1 引物序列和扩增片段长度		
引物名称	引物序列	扩增片段长度(bp)
Bax	上游 5'-CC AAG AAG CTG AGC GAG TGT-3'	271
	下游 5'-TC ACG GAG GAA GTC CAG TGT-3'	
Bcl-2	上游 5'-GG TGG TGG AGG AAC TCT TCA-3'	268
	下游 5'-GA GCA GCG TCT TCA GAG ACA-3'	
CDK4	上游 5'-CAT GTA GAC CAG GAC CTA AGC-3'	206
	下游 5'-AAC TGG CGC ATC AGA TCC TAG-3'	
cyclinD1	上游 5'-TGG ATG CTG GAG GTC TGC GAG GAA-3'	573
	下游 5'-GGC TTC GAT CTG CTC CTG GCA GGC-3'	
GAPDH	上游 5'-CG ACC ACT TTG TCA AGC TCA-3'	240
	下游 5'-AG GGG TCT ACA TGG CAA CTG-3'	

5.5.5 p-STAT3、PCNA、Bax、Bcl-2、CDK4、cyclinD1 蛋白表达 采用免疫组化检测 p-STAT3、PCNA、Bax、Bcl-2、CDK4、cyclinD1 蛋白表达。瘤组织标本经 10% 福尔马林固定,石蜡包埋。作4 μm 厚连续切片 3 张,采用 SP 法染色,按照免疫组织化学常规步骤操作(抗体稀释比均为 1:100)。

5.6 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计软件分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组比较采用 *t* 检验;*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 熊胆粉中牛黄熊去氧胆酸的含量(图 1) 对熊胆粉样品和牛黄熊去氧胆酸(对照品)进行 HPLC 分析,结果显示熊胆粉样品色谱中,在对照品色谱相应的



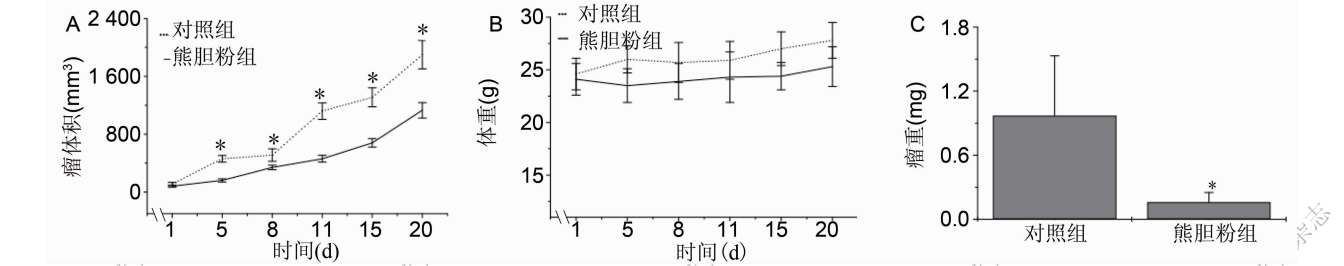
注:图中 1 为牛黄熊去氧胆酸钠
图 1 牛黄熊去氧胆酸和熊胆粉的 HPLC 色谱图

位置上出现相同的峰。

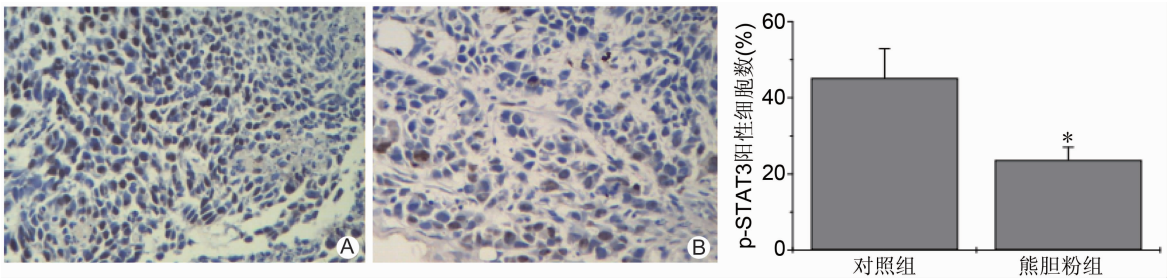
2 熊胆粉对移植瘤裸鼠瘤体积、体重及瘤重的影响(图 2) 从肿瘤的体积生长变化曲线来看(图 2A),熊胆粉组肿瘤生长明显慢于对照组,到实验结束,两组瘤体积分别是(1 130 ± 98) mm³ 和(1 900 ± 167) mm³,与对照组比较,熊胆粉组瘤体积降低了 40.53% (*P* < 0.01);同样熊胆粉组瘤重(0.56 ± 0.09) mg,与对照组[(0.97 ± 0.16) mg]比较,降低了 42.27% (*P* < 0.01)(图 2C);与对照组比较,熊胆粉组裸鼠体重差异无统计学意义(*P* > 0.05)(图 2B)。

3 熊胆粉对移植瘤裸鼠 p-STAT3 表达的影响(图 3) 与对照组比较,熊胆粉组 p-STAT 的阳性率更低,差异有统计学意义(*P* < 0.01)。

4 熊胆粉对移植瘤裸鼠细胞凋亡及增殖的影响(图 4) 结果显示熊胆粉组棕色的凋亡细胞明显多于对照组,凋亡率分别是(84.67 ± 20.65)% 和(22.23 ± 6.13)%,两组比较,差异亦有统计学意义(*P* < 0.01);免疫组化结果显示,熊胆粉显著抑制了 PCNA 的

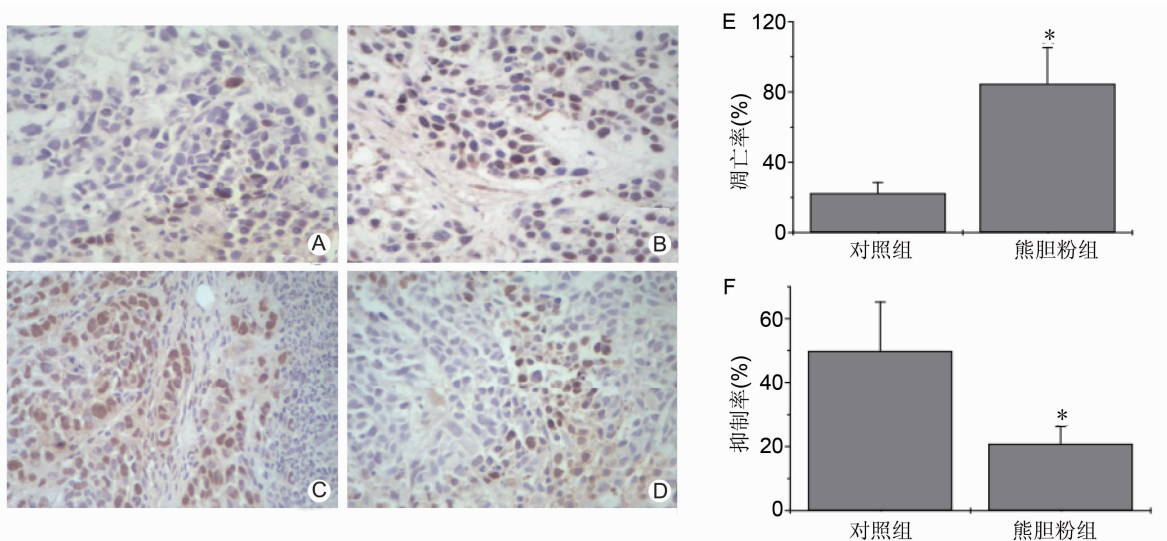


注:A 为裸鼠肿瘤体积;B 为体重;C 为瘤重;与对照组比较,**P* < 0.01
图 2 熊胆粉对移植瘤裸鼠瘤体积、体重及瘤重的影响



注:A 为对照组;B 为熊胆粉组;与对照组比较,* $P < 0.01$

图3 熊胆粉对移植瘤裸鼠 p-STAT3 表达的影响 (SP 染色, $\times 40$)



注:A 为对照组 TUNEL;B 为熊胆粉组 TUNEL;C 为对照组 PCNA;D 为熊胆粉组 PCNA;E 为 TUNEL 的定量分析图;F 为 PCNA 的定量分析图;与对照组比较,* $P < 0.01$

图4 熊胆粉对移植瘤裸鼠细胞凋亡及增殖的影响
(凋亡:TUNEL 染色, $\times 40$;增殖:SP 染色, $\times 40$)

表达[(49.83 ± 15.37)%],与对照组[(20.83 ± 5.42)%]比较,差异亦有统计学意义($P < 0.01$)。

5 熊胆粉对移植瘤裸鼠 Bax、Bcl-2、CDK4、cyclinD1 mRNA 表达的影响(图 5-7) RT-PCR 结果显示,熊胆粉组可以上调 Bax mRNA 表达,下调 Bcl-2、CDK4、cyclinD1 mRNA 表达。免疫组化检测结果和 RT-PCR 的结果一致,熊胆粉组显著促进 Bax 蛋白表达,阳性率是(51.67 ± 12.37)%,与对照组[(77.33 ± 17.68)%]比较,差异有统计学意义($P < 0.01$);同时,熊胆粉组显著抑制了 Bcl-2、CDK4、cyclinD1 蛋白表达,阳性率分别是(45.60 ± 2.67)%、(37.67 ± 5.39)%、(46.17 ± 6.56)%,与对照组[分别为(26.5 ± 3.45)%、(18.67 ± 2.63)%、(27.83 ± 3.95)%]比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

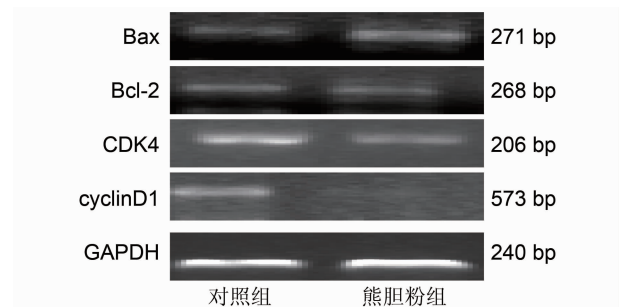
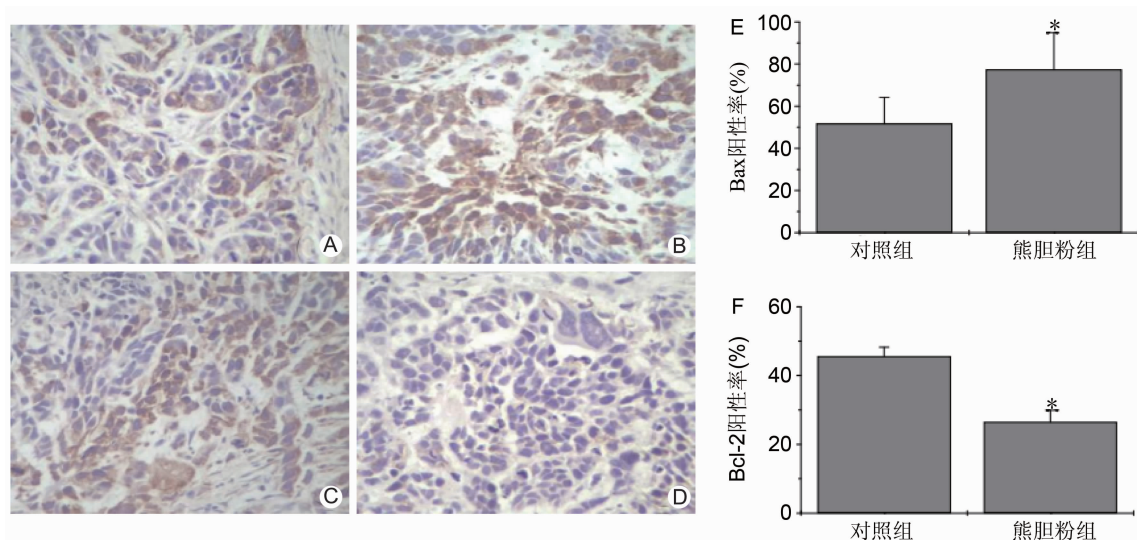


图5 熊胆粉对移植瘤裸鼠 Bax、Bcl-2、CDK4、cyclinD1 mRNA 表达的影响

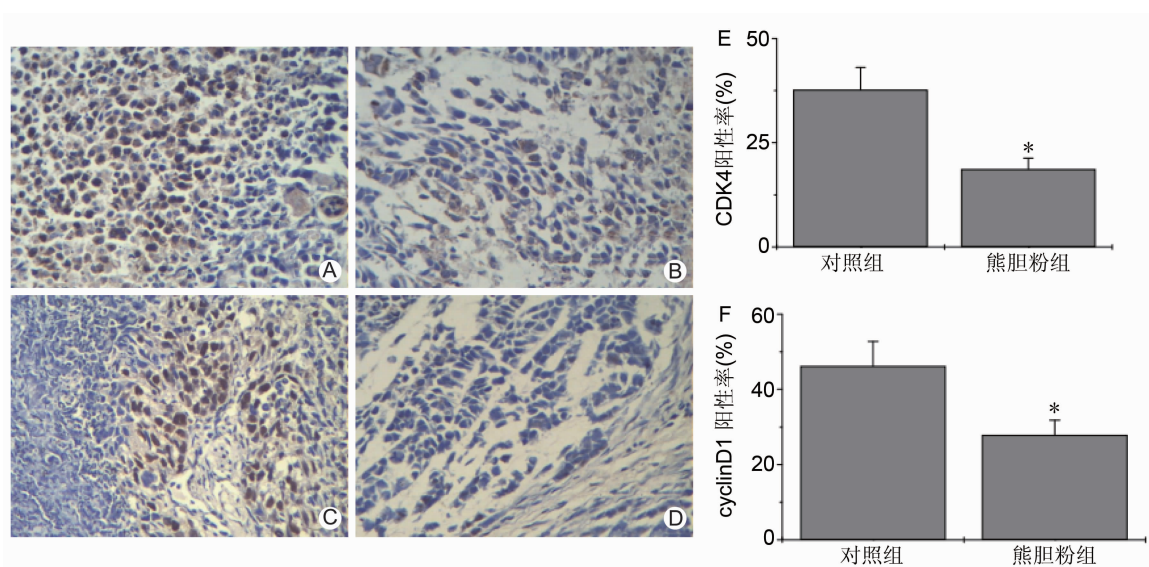
讨 论

目前我国肝癌发病人数约占全球的半数以上,已经成为严重威胁我国人民健康和生命的一大杀手^[2]。早期肝癌患者治疗以手术切除和肝移植辅以化学治疗



注:A 为对照组 Bax;B 为熊胆粉组 Bax;C 为对照组 Bcl-2;D 为熊胆粉组 Bcl-2;E 为 Bax 的定量分析图;F 为 Bcl-2 的定量分析图;与对照组比较, * $P < 0.01$

图6 熊胆粉对移植瘤裸鼠 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响 (SP 染色, $\times 40$)



注:A 为对照组 CDK4;B 为熊胆粉组 CDK4;C 为对照组 cyclinD1;D 为熊胆粉组 cyclinD1;E 为 CDK4 的定量分析图;F 为 cyclinD1 的定量分析图;与对照组比较, * $P < 0.01$

图7 熊胆粉对移植瘤裸鼠 CDK4、cyclinD1 蛋白表达的影响 (SP 染色, $\times 40$)

(化疗)为主,一般可取得满意疗效;但对于术后复发及失去手术机会或发生转移的肝癌患者^[8],化疗则是主要的治疗手段。尽管 5-Fu、顺铂、依立替康等化疗药物的不断发展和联合应用在一定程度上提高了患者对化疗的反应率,然而由于多药耐药的产生,肝癌的化疗疗效并不理想,其平均生存期仅 7.5 周^[9]。因此,寻求一种高效、低毒的抗癌药物是目前肝癌治疗中亟待解决的问题。

熊胆始记于《新修本草》,现代药理学表明熊胆粉有抑制肿瘤细胞生长、延长生存期、提高免疫功能的作

用^[10],但是其抗肿瘤的作用机制尚未明确。

STAT3 信号通路的异常与肿瘤的关系已经得到人们广泛关注^[11],其在多种肿瘤组织与细胞系中异常表达或活性增强,表明了 STAT3 信号通路 with 肿瘤的发生、发展密切相关。本实验发现熊胆粉可以抑制肝癌移植瘤的生长,并且没有显著的细胞毒性;同时,实验结果表明熊胆粉抑制了肿瘤组织 p-STAT3 的活化。

p-STAT3 的持续激活导致细胞增殖和凋亡失控进而引发肿瘤发生^[12-15]。STAT3 下游的信号,如

Bcl-2 家族成员、cyclinD1 等参与了抗细胞凋亡,调控细胞周期,促进细胞增殖和存活^[16-18]。cyclinD1 是细胞周期的正调节因子,与 CDK4 结合后,促使细胞从 G1 期顺利进入 S 期,使细胞发生分裂与增殖,因此 cyclinD1 蛋白的过度表达会使增殖周期不断进行,导致肿瘤的发生^[19,20]。Bcl-2 家族蛋白是目前已知的细胞凋亡中最重要的调控因子,分为两大类:一类为促进细胞凋亡蛋白,主要有 Bax、Bad、Bid 等,一类为抗细胞凋亡蛋白,如 Bcl-2、Bcl-XL 等,细胞内这两种蛋白的含量和功能状态之间的平衡是调控细胞凋亡的重要机制^[21,22]。本实验研究发现熊胆粉促进 Bax 表达,抑制 Bcl-2、CDK4、cyclinD1 的表达,结果与熊胆粉下调 p-STAT3 一致。

综上,熊胆粉抑制 p-STAT3 的活化进而促进 Bax 表达,抑制 Bcl-2、CDK4、cyclinD1 的表达可能是治疗肝癌的机制之一。

参 考 文 献

- [1] Levin B, Amos C. Therapy of unresectable hepatocellular carcinoma[J]. N Engl J Med, 1995, 332(19): 1294-1296.
- [2] 陆再英, 钟南山. 内科学[M]. 第7版. 北京:人民卫生出版社, 2008: 457-462.
- [3] Bowman T, Garcia R, Turkson J, et al. STATs in oncogenesis[J]. Oncogene, 2000, 19(21): 2474-2488.
- [4] Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, et al. STAT3 as an oncogene[J]. Cell, 1999, 98(3): 295-303.
- [5] 徐愚聪, 王野. 熊胆粉的研究进展[J]. 华西药理学杂志, 2000, 15(3): 200-202.
- [6] 丁涛, 温富春, 周继胡, 等. 精制熊胆粉活血化瘀作用研究[J]. 中国天然药物, 2005, 3(3): 184-186.
- [7] Singh RP, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, et al. Dietary feeding of silibinin inhibits advance human prostate carcinoma growth in athymic nude mice, and increases plasma insulin-like growth factor-binding protein-3 levels[J]. Cancer Res, 2002, 62(11): 3063-3069.
- [8] Lou WY. Primary liver tumors[J]. Semin Surg Oncol, 2000, 19(2): 135-144.
- [9] 杨世忠, 刘钊. 固本活血解毒法治疗原发性肝癌的实验研究[J]. 长春中医学院学报, 2005, 21(1): 39-40.
- [10] 孙铁民, 梁伟, 张启明, 等. 熊胆抑瘤作用研究[J]. 辽宁中医杂志, 2003, 30(1): 67.
- [11] Bromberg J. STAT proteins and oncogenesis[J]. J Clin Invest, 2002, 109(9): 1139.
- [12] Bromberg J, Wang TC. Inflammation and cancer: IL-6 and STAT3 complete the link[J]. Cancer Cell, 2009, 15(2): 79-80.
- [13] Darnell JE. Transcription factors as targets for cancer therapy[J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(10): 740-749.
- [14] Alvarez JV, Greulich H, Sellers WR, et al. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor[J]. Cancer Res, 2006, 66(6): 3162-3168.
- [15] Kusaba T, Nakayama T, Yamazumi K, et al. Activation of STAT3 is a marker of poor prognosis in human colorectal cancer[J]. Oncol Rep, 2006, 15(6): 1445-1451.
- [16] Darnell JE. STATs and gene regulation[J]. Science, 1997, 277(5332): 1630-1635.
- [17] Zushi S, Shinomura Y, Kiyohara T, et al. STAT3 mediates the survival signal in oncogenic Ras-transfected intestinal epithelial cells[J]. Int J Cancer, 1998, 78(3): 326-330.
- [18] Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, et al. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 over-expression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Cancer Res, 2002, 62(12): 3351-3355.
- [19] Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis[J]. Science, 1996, 274(5293): 1664-1672.
- [20] Taulés M, Rius E, Talaya D, et al. Calmodulin is essential for cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) activity and nuclear accumulation of cyclin D1-CDK4 during G₁[J]. J Biol Chem, 1998, 273(50): 33279-3386.
- [21] Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy[J]. Oncogene, 2007, 26(9): 1324-1337.
- [22] Youle RJ, Strasser A. The Bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008, 9(1): 47-59.

(收稿:2013-03-27 修回:2014-03-28)