

# 草苋蓉环烯醚萜苷对肝癌细胞凋亡及 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

崔香丹<sup>1</sup>, 郑峰<sup>1</sup>, 朱洁波<sup>1</sup>, 全吉淑<sup>2</sup>, 尹学哲<sup>\*1</sup>

(1. 延边大学附属医院, 吉林 延吉 133000; 2. 延边大学医学院, 吉林 延吉 133000)

**摘要:** 观察二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌组织的病理变化,探讨草苋蓉环烯醚萜苷(IGBR)对细胞凋亡和 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响。将 Wistar 大鼠分为对照组、模型组、5-FU 组及 IGBR 组。除对照组, 各组大鼠第 1 天给予 200 mg/kg DEN 腹腔注射 1 次, 而后给予饮用体积分数 0.05% 的 DEN 水溶液; 5-FU 组大鼠腹腔注射 25 mg/kg 5-FU 每周 3 次; IGBR 组大鼠灌胃 500 mg/kg IGBR 每日 1 次。实验第 12、20、28 周末, 分批处死动物, 观察肝脏病理变化及细胞凋亡, 免疫组化法检测 Bax、Bcl-2 蛋白的表达。结果表明, 与对照组比较, 模型组细胞凋亡显著增加, 胞质呈棕黄色, 凋亡的肝细胞皱缩、核固缩及核仁消失; 与模型组比较, 5-FU 组与 IGBR 组凋亡显著增多, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 但两组间无显著差异 ( $P > 0.05$ ); Bax 和 Bcl-2 阳性细胞主要分布于不典型增生灶和癌灶中, 表达于胞浆; 与模型组比较, 5-FU 组和 IGBR 组 Bax 表达明显增强, 而 Bcl-2 表达明显减弱, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 两组间无显著差异 ( $P > 0.05$ ); 模型组、5-FU 组与 IGBR 组中 Bax 表达和 Bcl-2 表达均呈负相关 ( $P < 0.05$ )。IGBR 可诱导细胞凋亡, 抑制肝癌细胞增值, 其机制可能与 Bax 蛋白增多和 Bcl-2 蛋白减少有关。

**关键词:** 肝癌; 草苋蓉环烯醚萜苷; 细胞凋亡; Bax; Bcl-2

中图分类号: R 285.5 文章编号: 1673-1689(2019)12-0137-05 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.12.020

## Effect of Iridoid Glycosides from *Boschniakia rossica* on Apoptosis and Expression of Bax and Bcl-2 in Liver Cancer Cells

CUI Xiangdan<sup>1</sup>, ZHENG Feng<sup>1</sup>, ZHU Jiebo<sup>1</sup>, QUAN Jishu<sup>2</sup>, YIN Xuezhe<sup>\*1</sup>

(1. Yanbian University Hospital (Yanbian Hospital), Jilin 133000, China; 2. Yanbian University Medical College, Jilin 133000, China)

**Abstract:** Observation of diethyl nitrosamine (DEN) induced rat liver cancer tissue pathological changes, discusses boschniakia rossica iridoid glycoside (IGBR) on apoptosis the influence of Bax, Bcl-2 protein expression. Wistar male rats were randomly divided into control group, model group, 5-FU group and IGBR group. were injected intraperitoneally once a day for 200 mg / kg DEN intra peritoneally on the 1st day, Rats in the control group were given equal volume of saline; then given

收稿日期: 2017-05-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(81360651)。

\* 通信作者: 尹学哲(1962—), 男, 教授, 博士, 博士研究生导师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: yinxz@ybu.edu.cn

引用本文: 崔香丹, 郑峰, 朱洁波, 等. 草苋蓉环烯醚萜苷对肝癌细胞凋亡及 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 137-141.

free access to 0.05% DEN solution for up to 28 weeks. The IGBR group was gavaged 500 mg/kg IGBR once daily, and 5-FU group was injected with 25 mg/kg 5-FU 3 times a week. The animals were sacrificed in batches after 12, 20 or 28 weeks of DEN exposure, and the pathological changes and apoptosis of liver were observed. The expression of Bax and Bcl-2 were detected with the immunohistochemical method. The results showed that, compared with the control group, the cell apoptosis increased significantly, and the cytoplasm was brownish yellow. Apoptotic hepatocyte showed cytoplasmic and nuclear shrinkage, disappearance of nucleolus. The apoptosis of the 5-FU and IGBR groups were higher than those of model group ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). The Bax and Bcl-2 positive cells were mainly distributed in the atypical hyperplasia and neoplastic foci. In the 5-FU and IGBR groups, the expression of Bax was up-regulated and Bcl-2 was down-regulated as compared with the model group ( $P < 0.05$ ), there was no significant difference between the two groups ( $P > 0.05$ ). The expression of Bax and Bcl-2 in the model group, 5-FU group and IGBR group were negatively correlated. IGBR can induce apoptosis, inhibit the proliferation of liver cancer cells. Its mechanism is likely related to the up-regulation of Bax and down-regulation of Bcl-2.

**Keywords:** liver cancer, Iridoid glycosides from *Boschniakia rossica*, apoptosis, Bax, Bcl-2

如今,原发性肝癌(HCC)的新发呈迅猛的增加趋势<sup>[1]</sup>,WHO 揭晓的《全球癌症报告》表明,肝癌的新发和死亡人数中国居世界第一<sup>[2]</sup>。恶性肿瘤的发生与细胞凋亡、增殖紧密相关<sup>[3]</sup>。细胞凋亡是由基因调控引起的细胞环境和死亡信号变化引起的程序性细胞死亡过程。肿瘤细胞与实体肿瘤中都存在细胞凋亡,且凋亡程度的好坏直接与肿瘤的发展程度相关。

草苈蓉为中国传统的民族药,为我国二类保护植物,是大兴安岭高山地区、长白山特有植物<sup>[4]</sup>。草苈蓉环烯醚萜苷(Iridoid glycosides from *Boschniakia rossica*, IGBR)是草苈蓉重要活性成分,具有抑制肿瘤、诱导凋亡、抗氧化、保肝等作用<sup>[5-6]</sup>。目前对 IGBR 抗癌机制方面的研究受到广泛的关注。探讨二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌中 IGBR 对细胞凋亡及细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2 的作用,进一步阐明其抗癌机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Wistar 大鼠购自延边大学实验动物中心, Bax、Bcl-2 多克隆抗体、TUNEL 和免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥, IGBR 为延边大学基础医学院全吉淑教授惠赠。

### 1.2 肝癌大鼠模型的制备

Wistar 雄性大鼠 148 只,分为对照组、模型组、5-FU 组及 IGBR 组。对照组大鼠第 1 天给予腹腔注射 1 次 0.1 mL/hg 生理盐水;余 3 组大鼠第 1 天腹腔注射 1 次 200 mg/kg DEN, 然后给予饮用体积分数 0.05% 的 DEN 水溶液。5-FU 组大鼠腹腔注射 25 mg/kg 5-FU 每周 3 次;IGBR 组大鼠灌胃 500 mg/kg IGBR 每日 1 次。实验第 12、20 周末处死 6 只动物,第 28 周末处死 24 只动物,取心脏血,肝脏福尔马林固定。

### 1.3 检测方法

HE 染色观测肝脏病理变化, TUNEL 法检测肝细胞的凋亡,免疫组化法检测 Bax 和 Bcl-2 的表达。每张切片中阳性细胞率 < 5% 为阴性(-); 5%~25% 为弱阳性(+); 25%~50% 为中等强度阳性(++); > 50% 为强阳性(+++)。

### 1.4 统计学处理

利用 SPSS19.0 统计软件, 计量资料以  $\bar{X} \pm s$  表示, 计数资料以  $\chi^2$  检验和 Spearman 等级相关检验表示,  $P < 0.05$  差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 肝脏组织病理学改变

**2.1.1 HE 染色** 对照组肝小叶结构正常, 肝索排列正常。模型组病理变化可分为 3 个阶段。1) 肝炎

阶段(12周):可见炎性反应、坏死和淋巴细胞浸润、胶原沉积及凋亡小体。2)肝硬化阶段(20周):可见结节性肝细胞再生,不同大小的肝结节,肝小叶正常结构破坏、肝索排列紊乱。3)肝癌阶段(28周):可见肝细胞核深染,肝细胞变性、增生,部分可见癌细胞增生。5-FU组及IGBR组病理变化较模型组明显改善,但两组间无明显差异。

**2.1.2 肝细胞凋亡染色** 对照组大鼠肝细胞凋亡稀少,着色浅。与对照组比较,模型组细胞凋亡显著增加,胞质呈棕黄色,凋亡的肝细胞固缩、核浓缩、核仁消失,差异有统计学意义( $X^2=11.510, P<0.01$ )。与模型组比较,5-FU组与IGBR组凋亡明显增多,差异有统计学意义(5-FU组  $X^2=11.147, P<0.05$ , IGBR组  $X^2=7.813; P<0.05$ ),但两组间无显著差异( $X^2=2.424,$

$P>0.05$ ), (见表1和图1)。

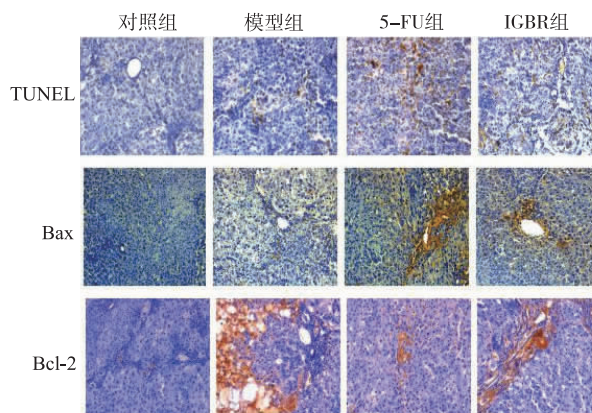


图1 肝组织 TUNEL 及 Bax、Bcl-2 免疫组化观察结果( $\times 100$ )  
Fig. 1 Observation of TUNE and Immunohistochemical observation of Bax , Bcl-2of liver sections ( $\times 100$ )

表1 肝细胞凋亡检测及 Bax、Bcl-2 在各组大鼠肝组织中的表达情况

Table 1 Apoptosis of liver cells and the expression of Bax and Bcl-2 in liver tissue of rats in each group

组别	鼠数	TUNEL				表达率/%	Bax				表达率/%	Bcl-2				表达率/%
		-	+	++	+++		-	+	++	+++		-	+	++	+++	
对照组	24	22	2	0	0	8.3	22	1	1	0	8.3	23	1	0	0	4.2
模型组	24	11	10	2	1	50.0*	9	10	3	2	62.5*	16	6	2	0	33.3*
5-FU组	24	2	11	9	2	91.7#	1	13	8	2	95.8#	23	0	1	0	4.2#
IGBR组	24	4	12	8	0	83.3#	2	12	9	1	91.7#	22	1	0	1	8.3#

注:\* 与对照组比较,  $P<0.05$ , # 与肝癌组比较,  $P<0.05$

## 2.2 Bax 和 Bcl-2 免疫组化染色结果

Bax 和 Bcl-2 阳性细胞主要分布于不典型增生灶和癌灶中,表达于胞浆(见表1,图1)。与对照组比较,模型组 Bax 和 Bcl-2 表达明显增强(Bax  $X^2=15.607, P<0.05$ , Bcl-2  $X^2=6.276; P<0.05$ );与模型组比较,5-FU组和IGBR组 Bax 表达明显增强,而 Bcl-2 表达明显减弱(5-FU组 Bax  $X^2=9.202, P<0.05$ , IGBR组 Bax  $X^2=7.895; P<0.05$ , 5-FU组 Bcl-2  $X^2=7.719, P<0.05$ , IGBR组 Bcl-2  $X^2=6.907; P<0.05$ ),两组间无显著差异(Bax  $X^2=0.956, P>0.05$ , Bcl-2  $X^2=2.827; P>0.05$ )。

## 2.3 各组大鼠肝组织 Bax 与 Bcl-2 之间的相关性

Bax 表达与 Bcl-2 表达,对照组无相关性( $r=-0.090, P>0.05$ ),模型组呈负相关( $r=-0.302, P<0.05$ ),5-FU组呈负相关( $r=-0.844, P<0.05$ ),IGBR组呈负相关( $r=-0.766, P<0.05$ )。

## 3 讨论

DEN 诱发的大鼠肝癌多为肝细胞肝癌,造模简单易成功。研究表明, DEN 诱癌整个过程与人类肝细胞癌进程相似<sup>[6]</sup>。DEN 在致癌过程中损伤肝细胞正常结构,使肝细胞代偿性增生。随着给药时间的延长, DEN 在体内的毒性堆积,可启动癌变机制,肝组织病变程度也逐渐加重,引起大鼠的中毒反应,并导致肝癌的形成。本实验用 DEN 诱发大鼠肝癌过程中发现,造模第28周时 HE 染色结果显示肝细胞核大、深染、变性、异型增生,可见癌变细胞,成功地诱发了肝癌模型。与模型组相比,IGBR组和5-FU组病理变化均减轻,表明IGBR阻止了DEN的致癌进程,保护了肝组织。

肝癌的发生机制非常复杂,与细胞的增殖和凋亡发生异常相关。细胞凋亡是细胞的程序性死亡,

能调控机体发育和内环境稳定<sup>[6-7]</sup>。研发及评估抗肿瘤药物的重要指标与肿瘤细胞的增殖、凋亡密切相关<sup>[8-9]</sup>。有大量的研究表明,抗凋亡因子在肿瘤细胞株和实体肿瘤中表达增加,使正常的凋亡程序受到抑制,而增殖能力不断增强<sup>[10]</sup>。

细胞凋亡的发生受多种基因的调控,其中 Bax 和 Bcl-2 备受关注,且其比值决定细胞接受凋亡信号后存活与否,在调控凋亡中起关键作用<sup>[11-13]</sup>。正常情况下,Bax 和 Bcl-2 的相互调节处于相对稳定的状态。当诱发癌变时,Bax/Bcl-2 表达失衡可加重癌变的进展。大量研究表明,中草药对细胞的凋亡有不同程度的诱导效果,辅助或协同细胞毒药物对癌细胞起杀伤作用,其作用机制与凋亡相关蛋白的表达失衡相关<sup>[14]</sup>。

Bax 为凋亡促进蛋白,Bcl-2 为凋亡抑制蛋白,

细胞中 Bax 升高则形成 Bax 同源二聚体,加速凋亡;反之形成 Bax/Bcl-2 异源二聚体,而抑制凋亡<sup>[15-16]</sup>。研究报道,肝癌和许多肿瘤细胞凋亡的增加,与 Bax/Bcl-2 表达失衡有关<sup>[17-20]</sup>。抑制凋亡蛋白与促凋亡蛋白的比例高低,反映出细胞凋亡的能力大小<sup>[21]</sup>。

## 4 结语

本实验中除对照组,细胞凋亡均明显增多。5-FU 与 IGBR 干预后,上调肝癌组织中 Bax 基因表达,而下调 Bcl-2 基因表达,并且 Bax/Bcl-2 比例也随之升高,表明 IGBR 可使癌变的细胞发生凋亡,进而抑制肝癌的进展。IGBR 可诱发细胞凋亡,抑制肝癌细胞增值,其机制可能与 Bax 蛋白增多和 Bcl-2 蛋白减少有关。

## 参考文献:

- [1] SMITH W A, LI C, NOTTAGE K A, et al. Lifestyle and metabolic syndrome in adult survivors of childhood cancer: a report from the St. Jude Lifetime Cohort study[J]. **Cancer**, 2014, 120(7): 2742-2750.
- [2] CHEN Wanqing, ZHANG Siwei, ZENG Hongmei, et al. Report of cancer incidence and mortality in China, 2010[J]. **China Cancer**, 2014, 23(1): 1-10. (in Chinese)
- [3] FABREOAT I, RONCERO C, FEMANDEZ M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer[J]. **Liver International**, 2007, 27(2): 155-162.
- [4] 中华本草编委会. 中华本草. 第 20 卷[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 507.
- [5] YIN Xuezhe, XU Huixian, ZHAO Wenxi, et al. Effect of aqueous fraction of boschniakia rossica on hepatic oxidative stress and hepatocyte apoptosis of mice with acute liver injury induced by lipopoly saccharide and D-Galactosamine[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2013, 32(5): 469-473. (in Chinese)
- [6] XIAO Z, SHAN J, LI C, et al. Mechanisms of cyclosporine-induced renal cell apoptosis: a systematic review[J]. **Am J Nephrol**, 2013, 37(1): 30-40.
- [7] TOMEK M, AKIYAMA T, DASS C R, et al. Role of Bcl-2 in tumour cell survival and implications for pharmacotherapy[J]. **J Pharm Pharmacol**, 2012, 64(12): 1695-1702.
- [8] LI Q, LU X H, WANG C D, et al. Antiproliferative and apoptosis-inducing activity of schisandrin B against human glioma cells[J]. **Cancer Cell Int**, 2015, 15(1): 12.
- [9] LIAO K, LI J, WANG Z. Dihydroartemisinin inhibits cell proliferation via AKT/GSK3 $\beta$ /cyclin D1 pathway and induces apoptosis in A549 lung cancer cells[J]. **Int J Clin Exp Pathol**, 2014, 7(12): 8684-8691.
- [10] YOUNESS E R, ELNEMR M, ORABY F S, et al. Evaluation of apoptotic marker Bcl2, CD4+, human Hepatocyte growth factor and metalloproteinase-9 as tumor markers for patients with hepatocellular carcinoma[J]. **Indian J Clin Biochem**, 2014, 29(3): 351-356.
- [11] CORY S, ADAMS J M. KILLING cancer cells by flipping the Bcl-2/Bax switch[J]. **Cancer Cell**, 2005, 8(1): 5-6.
- [12] BARAZ L, HAUPT Y, ELKIN M, et al. Tumor suppressor p53 regulates *Heparanase* gene expression[J]. **Oncogene**, 2006, 25(28): 393-3947.
- [13] STEFANAKI C, AATONIOU C, STEFANAKI K, et al. Bcl-2 and Bax in congenital naevi[J]. **Br J Dermatol**, 2006, 154(6): 1175-1179.



- [14] CHEN Chuang. Research progress on mechanism of Chinese medicine in prevention and treatment of primary liver cancer[J]. **Clinical Application of Traditional Chinese and Western Medicine**, 2014, 14(10): 90-92. (in Chinese)
- [15] XIANG J, XIANG Y, LIN S, et al. Anticancer effects of deproteinized asparagus polysaccharide on hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo[J]. **Tumour Biol**, 2014, 35(4): 3517-3524.
- [16] GONZALEZ-SANCHEZ E, MARIN J J, PEREZ M J. The expression of genes involved in hepatocellular carcinoma chemoresistance is affected by mitochondrial genome depletion[J]. **Mol Pharm**, 2014, 11(6): 1856-1868.
- [17] GENTILINI A, LOTTINI B, BROGI M, et al. Evaluation of intracellular signalling pathways in response to insulin-like growth factor I in apoptotic-resistant activated human hepatic stellate cells[J]. **Fibrogenesis Tissue Repair**, 2009, 2(1): 1.
- [18] DELGADO J S, MUSTAFI R, YEE J, et al. Sorafenib triggers antiproliferative and pro-apoptotic signals in human esophageal adenocarcinoma cells[J]. **Dig Dis Sci**, 2008, 53(12): 3055-3064.
- [19] KUROSR T, OHKI M, WU N, et al. Sorafenib induces apoptosis specifically in cells expressing BCR/ABL by inhibiting its kinase activity to activate the intrinsic mitochondrial pathway[J]. **Cancer Res**, 2009, 69(9): 3927-3936.
- [20] NOVO E, MARRA F, ZAMARA E, et al. Overexpression of Bcl-2 by activated human hepatic stellate cells; resistance to apoptosis as a mechanism of progressive hepatic fibrogenesis in humans[J]. **Gut**, 2006, 55(8): 1174-1182.
- [21] JIMENEZ G S, KHAN S H, STOMMELI J M, et al. P53 regulation by post-translational modification and nuclear retention in response to diverse stresses[J]. **Oncogene**, 1999, 18(53): 7656-7665.

## 科技信息

### 欧盟评估一种三酰基甘油脂肪酶的安全性

据欧盟食品安全局(EFSA)消息,2019年10月22日,欧盟食品安全局就来自转基因里氏木霉菌株 RF10625 的三酰基甘油脂肪酶(Triacylglycerol Lipase)的安全性评价发布意见。

据了解,这种三酰基甘油脂肪酶旨在用于烘焙过程和谷物加工过程中。经过评估,评估小组认为在预期使用条件下这种食品酶不会引起安全问题。

[信息来源]食品伙伴网. 欧盟评估一种三酰基甘油脂肪酶的安全性 [EB/OL]. (2019-10-24). <http://news.foodmate.net/2019/10/538014.html>