

抗纤抑癌方调控 HGF/c-Met mRNA 干预肝癌前病变的实验研究

杨先照 江 锋 叶永安

(北京中医药大学东直门医院,北京,100700)

摘要 目的:观察抗纤抑癌方对肝癌前病变大鼠 HGF/c-Met mRNA 的影响,探讨抗纤抑癌方防治肝癌前病变的作用机制。方法:75 只 SD 雄性大鼠随机分为正常组、模型组、抗纤抑癌组、鳖甲软肝组和秋水仙碱组。以二乙基亚硝胺诱发大鼠肝癌前病变模型,用抗纤抑癌方进行干预,并以复方鳖甲软肝片、秋水仙碱片作为对照,采用免疫组化检测肝组织 α -SMA 的表达情况,实时荧光定量 PCR 检测各组大鼠肝脏的 HGF 和 c-Met mRNA 的表达量。结果:免疫组化显示,与模型组及秋水仙碱组比较,抗纤抑癌组能明显减少 α -SMA 表达量,差异有统计学意义($P < 0.01$, $P < 0.05$)。实时荧光定量 PCR 结果显示,HGF mRNA 的相对表达量抗纤抑癌组与模型组比较有统计学意义($P < 0.05$),与秋水仙碱组比较亦有统计学意义($P < 0.05$),抗纤抑癌方能显著提高肝癌前病变大鼠 HGF mRNA 的表达水平。c-Met mRNA 在 DEN 造模的各組中均低表达,各組间差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论:抗纤抑癌方能够提高肝癌前病变大鼠 HGF mRNA 的表达水平,这可能是其防治肝癌前病变的作用机制之一。

关键词 抗纤抑癌方;肝癌前病变;肝细胞生长因子;c-Met

The Regulation Effect of Kangxian Yi-ai Formula on HGF and c-Met mRNA in Rats with Liver Precancerous Lesions

Yang Xianzhao, Jiang Feng, Ye Yong'an

(Dongzhimen Hospital Affiliated to Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Kangxian Yi-ai formula on HGF and c-Met mRNA in rats with liver precancerous lesions, and thus to investigate its prevention and treatment mechanism. **Methods:** Seventy-five SD rats were randomly divided into normal group, model group, Kangxian Yi-ai (KXYA) group, Biejia Ruangan (BJRG) group and colchicine group. Established the animal models of diethylnitrosamine (DEN)-induced liver precancerous lesions and used KXYA formula to intervene. BJRG tablets and colchicine tablets were taken as control drug. To detect the expression levels of α -SMA in liver by using immunohistochemistry and to detect the expression levels of HGF and c-Met mRNA by using real-time quantitative PCR. **Results:** The results of immunohistochemistry showed that compared with the model group and the colchicine group, KXYA group could significantly reduce the expression of α -SMA, which is of statistical significance ($P < 0.01$, $P < 0.05$). The results of real-time quantitative PCR showed that compared to the relative expression of HGF mRNA, KXYA group were significantly different with model group and colchicine group ($P < 0.05$). Kangxian Yi-ai formula can significantly increase the expression level of HGF mRNA in rat liver precancerous lesions. The expression of c-Met mRNA were low in each group of DEN-induce liver precancerous lesions, and there is no statistical significance ($P > 0.05$). **Conclusion:** Kangxian Yi-ai formula can increase the expression of HGF mRNA levels of hepatic lesions in rats, which may be the one of its prevention and treatment mechanism.

Key Words Kangxian Yi-ai formula; Liver precancerous lesions; Hepatic growth factor; c-Met

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2015.09.006

肝细胞肝癌(Hepatocellular Carcinoma, HCC)是全球最常见的恶性肿瘤之一,约占原发性肝癌的90%,在肿瘤相关死因中位列第三^[1]。在我国每年死于肝癌的患者约11万,其病死率已上升为农村和城市恶性肿瘤病死率的第一位和第二位^[2]。肝癌的有效治疗是临床上所面临的艰巨而又紧迫的难题。由于肝癌患者临床症状出现晚、进展迅速、手术切除

率低、复发率高、生存期短等问题,虽然近年来诊疗手段日益丰富,但其发病率和死亡率并无明显下降趋势,预后仍然十分凶险。肝癌相关的基础研究近年来有着较大的投入,但亦未取得重大突破。这些都迫切要求肝癌的临床治疗及相关基础研究需战略前移,加强预防肝癌发生的能力,这使得肝癌前病变的研究具有非常重要的现实意义。而在预防肝癌的

发生方面,目前尚未有一个公认的疗效确切的药物,无论西医还是中医都处在同一条起跑线上,具有完全相同的机会和优势^[3]。中医药防治肝癌有着悠久的历史,具有多层次、多靶点及协同作用的特点^[4],但因其具体作用机制未明,目前仍难以被大多数学者所接受,已成为中医药国际化发展的瓶颈。因而应用现代生物医学技术揭示、阐明中医药干预肝癌前病变的作用机制研究十分必要。

本研究的抗纤抑癌方是我院叶永安教授在临床上治疗肝癌前病变的经验方,从以往的临床及基础研究中已证实其具有抗纤维化、延缓肝癌前病变进展及抑制肝癌细胞增殖等作用^[5-6]。本实验用抗纤抑癌方对二乙基亚硝胺(Diethylnitrosamine, DEN)诱发的肝癌前病变大鼠进行干预,观察抗纤抑癌方对大鼠肝癌前病变的肝细胞生长因子(Hepatocyte Growth Factor, HGF)及其受体(c-Met) mRNA的影响,探讨抗纤抑癌方防治肝癌前病变的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 清洁级SD雄性大鼠75只,每只体重110~120g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SCXK(京)2006-0009。给予北京科澳协力饲料有限公司生产的清洁级大、小鼠维持饲料喂养,生产许可证号:SCXK(京)2009-0012,生产批号:10101621。实验动物饲养于北京中医药大学屏障环境动物实验室。

1.1.2 药品与试剂 抗纤抑癌方主要由柴胡、黄芪、山药等药物组成,由深圳市三九现代中药有限公司提供相应药物的免煎颗粒。复方鳖甲软肝片,内蒙古福瑞中蒙药科技股份有限公司生产,批准文号:国药准字Z19991011。秋水仙碱片,昆明制药集团股份有限公司生产,批准文号:国药准字H53021389。DEN购自sigma公司,货号:N0756, Lot #049k1613v; α -SMA免疫组化检测试剂盒及Mayor苏木素均为武汉博士德生物工程有限公司产品;M-MuLV反转录酶和RNase Inhibitor购自Fermentas(MBI)公司;2 \times PCR TaqMix购自北京美莱博医学科技有限公司;琼脂糖购自西班牙Biowest公司;DEPC购自美国Amresco公司。

1.1.3 主要仪器 LEICA-RM 2135组织切片仪:德国莱卡公司;Olympus L340099光学显微镜:日本奥林巴斯公司;LEICA Q500IW图像分析仪:德国莱卡公司;Takara TP600型梯度PCR仪:日本Takara公司;H1650-W台式微量高速离心机:长沙湘仪离心机

仪器有限公司;电泳槽、电泳仪及凝胶紫外分析仪:北京君意东方电泳设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组、造模及给药方法 将75只SD大鼠随机分为5组,分别为正常组12只,模型组18只,抗纤抑癌组15只,鳖甲软肝组15只,秋水仙碱组15只。所有大鼠在同一个条件下饲养,实验期间各组大鼠自由饮水、摄食。适应性喂养1周后,按我们前期研究方法予造模给药^[6]:除正常组以外的各组均以DEN(70 mg/kg)按1 mL/100 g的剂量灌胃,正常组大鼠按1 mL/100 g的剂量给予生理盐水灌胃,每周1次,连续14周。造模开始后,正常组及模型组大鼠给予生理盐水灌胃,其余各组大鼠分别给予相应药物灌胃,给药剂量相当于临床用量的7倍剂量,按1 mL/100 g的体积灌胃,1次/d,连续给药14周。

1.2.2 取材 最后一次给药后禁食12h,10%水合氯醛麻醉,迅速摘取大鼠右前叶部分肝组织。一部分肝组织置于4%多聚甲醛溶液中准备石蜡切片行苏木素-伊红染色和免疫组化,另一部分肝组织快速置于液氮中备实时荧光定量PCR检测用。

1.2.3 免疫组化 按照SABC试剂盒使用说明书检测大鼠肝脏 α -SMA的表达水平,利用LEICA Q500IW图像分析仪进行图像采集和处理。随机选取5个视野(400倍),测阳性着色面积百分比=阳性着色面积/肝组织面积 \times 100%。所有结果均用均值加减标准差表示。

1.2.4 实时荧光定量PCR Trizal法提取总RNA,琼脂糖凝胶电泳检测提取RNA的完整性。RNA反转录为cDNA,以cDNA为模板行实时荧光定量PCR反应,检测HGF和c-Met的mRNA与 β -actin(管家基因)的扩增效率的一致性,优化反应条件。将优化后的PCR反应体系置于SLAN荧光定量PCR仪中行PCR扩增:95 $^{\circ}$ C 5 min预变性,95 $^{\circ}$ C 15 s \rightarrow 58 $^{\circ}$ C 20 s \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 20 s(荧光检测),共30个循环,终反应于72 $^{\circ}$ C延伸5 min。HGF引物:上游:5'-TTGGTG-GACGATGACACGTG-3';下游:5'-GTGTCTC-CCAAGATGTCCATG-3',产物长度为251 bp。c-Met引物:上游:5'-GCTCGGCTCTATCGTTTTTCG-3';下游:5'-AAAACCTAGCACACTCGCAG-3',产物长度为289 bp。 β -actin引物:上游:5'-GAAGTGTGACGTTGACATCCG-3';下游:5'-GCCTAGAAGCATTTCGGGTG-3',产物长度为282bp,以上引物均由北京擎科生物工程技术有限公司合成。采用比较循环阈值法

(2-ΔΔCt) 分析样本中 HGF 和 c-Met 的 mRNA 相对含量。

1.2.5 统计学方法 使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个均数间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况 实验过程中正常组大鼠一般状况良好, 模型组大鼠予 DEN 灌胃第 3 周以后开始出现毛色枯皱, 不爱活动, 易激惹, 进食和饮水减少, 尿黄, 体重增加缓慢; 各治疗组大鼠也有类似表现, 但程度较模型组轻。第 12 周起造模各组开始出现死亡, 至实验结束, 模型组死亡 6 只, 抗纤抑癌组死亡 2 只 (其中 1 只是因第 2 周时给药不慎致死), 鳖甲软肝组死亡 4 只, 秋水仙碱组死亡 4 只。

2.2 肝组织病理 HE 染色显示正常组大鼠肝细胞束排列整齐, 呈单行放射状排列在中央静脉周围, 未见变性、坏死及纤维增生改变, 肝窦无狭窄。模型组大鼠肝索排列紊乱, 在门脉区有大量的结缔组织增生, 胶原纤维增生明显, 广泛假小叶形成, 可见大量肝细胞异型增生灶及异型增生结节, 肝细胞大小不等, 核仁明显, 细胞核具有多形性, 核浆比增高。与模型组相比, 抗纤抑癌组在肝细胞变性坏死、结缔组织增生程度及肝细胞异型增生灶和异型增生结节数目上均明显减轻; 而鳖甲软肝组、秋水仙碱组大鼠的情况介于两者之间。

表 1 α-SMA 阳性灶面积比 (%)

组别	例数	α-SMA (%)
正常组	8	-
模型组	8	26.11 ± 5.94
抗纤抑癌组	8	17.03 ± 6.16 ^{**}
鳖甲软肝组	8	19.03 ± 2.23 [*]
秋水仙碱组	8	22.37 ± 2.74 ^Δ

注: 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$; 与抗纤抑癌组比较, ^Δ $P < 0.05$ 。

2.3 免疫组化结果 在正常组大鼠的肝组织中, α-SMA 以阴性表达为主, 在中央静脉、汇管区血管平滑肌及胆管壁肌上皮细胞中可见极少量阳性表达。除了正常组以外的各组均可见 α-SMA 阳性表达, 主要表达在肝细胞胞浆、假小叶纤维带、汇管区较大的纤维瘢痕、血管壁、内皮细胞、胆管上皮等部位。由表 1 可看出, 与模型组比较, 抗纤抑癌组的 α-SMA 表达量明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 鳖甲软肝组亦明显下降 ($P < 0.05$), 秋水仙碱组亦较模型组有降低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 抗纤抑癌组较鳖甲软肝组、秋水仙碱组表达量低, 与秋

秋水仙碱组比较有统计学意义 ($P < 0.05$), 但与鳖甲软肝组比较无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 实时荧光定量 PCR 检测结果 由表 2 可看出, HGF mRNA 的相对表达量在模型组、鳖甲软肝组及秋水仙碱组中较低, 在正常对照组和抗纤抑癌组中相对较高。与模型组比较, 抗纤抑癌方组 HGF mRNA 的相对表达量明显偏高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 抗纤抑癌方组与秋水仙碱组比较亦有统计学意义 ($P < 0.05$), 与鳖甲软肝组比较没有统计学意义 ($P > 0.05$); 模型组、鳖甲软肝组和秋水仙碱组之间的差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。抗纤抑癌方能够显著地提高大鼠肝癌前病变的 HGF mRNA 的表达。c-Met mRNA 的相对表达量在正常组与其他各组之间有统计学意义 ($P < 0.01$); DEN 造模的各组间没有统计学意义 ($P > 0.05$)。c-Met mRNA 在 DEN 造模的各组中均为低表达。

表 2 HGF 和 c-Met mRNA 的相对表达量 ($\bar{x} \pm s$)

分组	例数	HGF mRNA	c-Met mRNA
正常组	5	1.25 ± 0.55	3.12 ± 0.60
模型组	5	1.02 ± 0.26	1.32 ± 0.83
抗纤抑癌组	5	1.82 ± 0.97 ^{*Δ}	1.35 ± 0.84
鳖甲软肝组	5	1.09 ± 0.54	1.34 ± 0.79
秋水仙碱组	5	1.02 ± 0.24	0.92 ± 0.79

注: 与模型组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与秋水仙碱组比较, ^Δ $P < 0.05$ 。

3 讨论

HGF 是一种具有多种生物学功能的细胞因子, 主要由间质细胞产生, 其生物学活性是由其受体 c-Met 蛋白所介导。HGF 激活 c-Met 受体后, 通过与细胞内的一些靶蛋白直接作用, 可引起包括 Ras/MAPK 和 PI32K/PKB 等信号通路的级联激活, 从而起到调节多种细胞的增殖、分化、形态发生和侵袭运动等作用^[7]。HGF 在慢性肝病的不同阶段所起到的作用不同, 一般认为在慢性肝病的早中期 HGF 具有抗纤维化、治疗肝硬化的作用。有研究表明 HGF 通过阻滞 TGF-β 和 PDGF 介导的信号通路起到抗纤维化的作用^[8]; Matsuda 等^[9]的研究发现多次注射 HGF 干预二甲基亚硝胺诱导的肝硬化大鼠, 能降低肝脏的 ECM 水平、增加肝细胞的再生, 能改善肝硬化情况。Kim^[10] 和 Ueki^[11] 的相关研究也证实了 HGF 对肝硬化的治疗效果。

抗纤抑癌方是我院叶永安教授临床上用于防治肝癌前病变的经验方, 具有疏肝健脾、活血化痰功效, 临床应用疗效显著。本实验研究结果表明, 从大鼠一般情况来看, 抗纤抑癌方能够改善肝癌前病变

大鼠的一般情况,提高肝癌前病变大鼠的体重,降低肝癌前病变大鼠的病死率。从大鼠组织病理来看,抗纤抑癌方能够减轻肝癌前病变大鼠肝脏的纤维化程度、减少异型增生结节的数目和体积及减轻肝细胞的异形程度;从肝癌前病变的免疫组化指标来看,本实验通过给予抗纤抑癌方灌胃给药,非常显著地降低大鼠肝脏 α -SMA 的表达量,表明抗纤抑癌方能够抑制 DEN 诱导的肝癌前病变大鼠 HSC 的活化。RQ-PCR 的结果表明,抗纤抑癌方能够提高肝癌前病变大鼠 HGF mRNA 的表达量。

由上我们可以得出,抗纤抑癌方能够抗纤维化、延缓肝癌前病变的发生,其作用机制可能是通过调控 HGF/c-Met 系统,抑制肝星状细胞活化,起到抗纤维化作用来改善肝脏的微环境,进而延缓肝癌前病变的进展,具体作用环节仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Kudo M. Molecular targeted therapy for hepatocellular carcinoma: bench to bedside[J]. *Digestive Diseases*, 2011, 29(3): 273-277.
- [2] Chen J G, Zhang S W. Liver cancer epidemic in China: past, present and future[C]. *Seminars in cancer biology*. Academic Press, 2011, 21(1): 59-69.
- [3] 吴孟超. 中医药在肝癌防治中的作用、地位和存在的问题[J]. *中西医结合学报*, 2003, 1(3): 163-164.

- [4] Hu Y, Wang S, Wu X, et al. Chinese herbal medicine-derived compounds for cancer therapy: A focus on hepatocellular carcinoma[J]. *Journal of ethnopharmacology*, 2013, 149(3): 601-612.
- [5] 王晓静. 抗纤抑癌方对 DEN 加乙醇诱导的大鼠肝纤维化合并肝癌前病变预防作用的实验研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2002.
- [6] 江锋. 调肝健脾活血化痰法对肝癌前病变的干预作用及其机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2008.
- [7] van der Voort R, Taher TE, Derksen PW, et al. The hepatocyte growth factor/Met pathway in development, tumorigenesis, and B-cell differentiation[J]. *Adv Cancer Res*, 2000, 79: 39-90.
- [8] Oka K, Fukuta K, Mizuno S. Hepatocyte growth factor (HGF) for a cell-signal-based therapy during acute and chronic liver diseases[J]. *Current Signal Transduction Therapy*, 2011, 6(2): 200-209.
- [9] Matsuda Y, Matsumoto K, Tsuchida T, et al. Hepatocyte growth factor prevents liver cirrhosis caused by dimethylnitrosamine in rats[J]. *J Biochem*, 1995, 118: 643-649.
- [10] Kim W H, Matsumoto K, Bessho K, et al. Growth inhibition and apoptosis in liver myofibroblasts promoted by hepatocyte growth factor leads to resolution from liver cirrhosis[J]. *The American journal of pathology*, 2005, 166(4): 1017-1028.
- [11] Ueki T, Kaneda Y, Tsutsui H, et al. Hepatocyte growth factor gene therapy of liver cirrhosis in rats[J]. *Nature medicine*, 1999, 5(2): 226-230.

(2015-08-20 收稿 责任编辑: 洪志强)

(上接第 1315 页)

病学资料。

关于 MHE 的治疗研究,国内中、西医研究均少见大样本量的长疗程、随机、安慰剂对照研究,疗效评估方法可比性欠佳。指南对 MHE 治疗及研究方面的建议对国内中、西医 MHE 治疗研究参考意义较大,如以 >6 个月的长疗程研究反映治疗方法对患者认知功能的持续疗效及患者对治疗方法的依从性;将能反映 MHE 对个人及社会经济负担的经济疗效比值纳入到疗效评估中;以随机对照队列研究考察中西医治疗方法对患者 OHE 发作的预防作用等。尽管目前指南不推荐常规对 MHE 患者进行治疗,但考虑到 MHE 对个人及社会的潜在危害性,以及伴随慢性肝病进展, MHE 病情逐步发展的必然性,采用中医药辨证论治、早期干预 MHE 具有重要的现实意义。若在指南相关建议的指导下充分证实中医药的疗效作用并得到国内和国际认可,或可推动中医药常规应用于 MHE 的治疗。

参考文献

- [1] Hendrik Vilstrup, Piero Amodio, Jasmohan Bajaj, et al. Hepatic En-

cephalopathy in Chronic Liver Disease; 2014 Practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases and the European Association for the Study of the Liver[J]. *Hepatology*, 2014, 60(2): 715-735.

- [2] 张影,刘威,张福奎. 2014 年美国肝病学会和欧洲肝病学会对慢性肝病时肝性脑病实践指南的建议要点[J]. *临床肝胆病杂志*, 2014, 30(8): 719-721.
- [3] Sharma P, Sharma BC, Agrawal A, et al. Primary prophylaxis of overt hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: an open labeled randomized controlled trial of lactulose versus no lactulose[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2012, 27: 1329-1335.
- [4] Sidhu SS, Goyal O, Mishra BP, et al. Rifaximin improves psychometric performance and health-related quality of life in patients with minimal hepatic encephalopathy (the RIME Trial) [J]. *Am J Gastroenterol*, 2011, 106: 307-316.
- [5] Bajaj JS, Cordoba J, Mullen KD, et al. Review article: the design of clinical trials in hepatic encephalopathy—an International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2011, 33: 739-747.
- [6] 中华医学会消化病学分会, 中华医学会肝病学会. 中国肝性脑病诊治共识意见(2013 年, 重庆) [J]. *中华肝脏病杂志*, 2013, 21(9): 641-643.

(2015-08-20 收稿 责任编辑: 洪志强)