

加味四君子对宫颈癌大鼠模型癌组织中 Caspase-3、Caspase-7、Survivin 表达的干预作用

王 剑¹ 张 轶² 刘月芬¹ 毛宝宏¹ 王文第¹ 刘 青¹

(1 甘肃省妇幼保健院妇幼保健科研中心,兰州,730050; 2 兰州生物制品研究所有限责任公司,兰州,730046)

摘要 目的:观察加味四君子汤对宫颈癌模型癌组织 Caspase-3、Caspase-7、Survivin 表达的影响,以探明加味四君子汤治疗宫颈癌的机制。方法:将 30 只 Wistar 雌性大鼠随机分为空白组、模型组及干预组,其中空白组 10 只,模型组及干预组各 9 只。其中空白组大鼠不接受造模及干预,模型组大鼠仅接受模型制备,干预组大鼠接受模型制备及加味四君子汤灌胃,连续治疗 8 周,疗程结束后比较各组宫颈癌病灶大小,同时用免疫组化法检测各组宫颈癌组织 Caspase-3、Caspase-7、Survivin 的水平表达变化。结果:1)空白组未出现宫颈癌病灶,模型组病灶体积($1\,573.48 \pm 11.24$) mm³,干预组病灶体积(683.23 ± 4.81) mm³,各组宫颈癌病灶大小差异有统计学意义($P < 0.05$),干预组明显较模型组小。2)2 组接受造模术大鼠 Caspase-3、Caspase-7 浓度均有不同程度下调,Survivin 表达升高,其中干预组大鼠经过为期 8 周的干预后 Caspase-3、Caspase-7 浓度上调,Survivin 浓度下降,干预组改善明显优于模型组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。3)经过相关分析显示,癌灶体积与 Caspase-3、Caspase-7 呈负相关关系,与 Survivin 有正相关关系。结论:加味四君子可明显缩小宫颈癌病灶体积,其作用机制可能与调节 Caspase-3、Caspase-7、Survivin 表达有关。

关键词 宫颈癌;大鼠;四君子汤;加味;Caspase-3;Caspase-7;Survivin

Intervention Effects of the Modified Sijunzi Decoction on the Expression of Caspase-3, Caspase-7, Survivin in the Cervical Cancer Tissue

Wang Jian¹, Zhang Yi², Liu Yuefen¹, Mao Baohong¹, Wang Wendi¹, Liu Qing¹

(1 Maternal and Child Care Research Center of Gansu Maternal and Child Care Hospital, Lanzhou 730050, China;

2 Lanzhou Biological Products Research Institute Limited Liability Company, Lanzhou 730046, China)

Abstract Objective: To observe the impact of Modified Sijunzi Decoction on the expression of Caspase-3, Caspase-7, Survivin in the cervical cancer model tissue, and to explore the mechanism of modified Sijunzi Decoction in the treatment of cervical cancer. **Methods:** A total of 30 Wistar female rats were randomly divided into blank group, model group and intervention group, 10 in each group. The blank group rats was not modeled and intervened, and the model group only accepted model preparation, the intervention group accepted model preparation and modified Sijunzi Decoction lavage, which continued for 8 weeks. A comparison was made of the cervical cancer lesion size of these groups after treatment, at the same time the immunohistochemical method was used to detect the expression level changes of Caspase-3, Caspase-7 and Survivin in each cervical cancer tissue. **Results:** 1) The blank group did not have cervical lesion, the cervical lesion volume of the model group were ($1\,573.48 \pm 11.24$) mm³, the cervical lesion volume of the intervention group were (683.23 ± 4.81) mm³. The difference in cervical lesion size had statistical significance ($P < 0.05$), and the intervention group was significantly smaller compared with the model group. 2) The concentration of Caspase-3 and Caspase-7 in 2 groups was lower in different extent, and the expression of Survivin increased. After 8 weeks of intervention, the concentration of Caspase 3 and Caspase-7 in the intervention group increased and the concentration of Survivin decreased. The improvement of the intervention group was obviously better than that of the model group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). 3) The correlation analysis showed that cancer volume were negatively related to Caspase-3 and Caspase-7, but with positive correlation to Survivin. **Conclusion:** Modified Sijunzi Decoction can obviously reduce cervical lesion volume, and its mechanism may be related to regulation of the expression of Caspase-3, Caspase-7 and Survivin.

Key Words Cervical cancer; Rats; Modified Sijunzi Decoction; Caspase-3; Caspase-7; Survivin

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.12.040

宫颈癌是妇科常见的恶性肿瘤之一,仅有少数患者早期出现阴道分泌物异常、阴道接触性出血等

症状,大部分患者并未出现任何临床症状,直至晚期因癌组织浸润其他组织器官出现继发性症状时疾病

基金项目:甘肃省国际交流合作项目(1504WKCA060)——MiRNA 表达谱分析与宫颈病变病程相关性研究

作者简介:王剑(1983.10—),女,博士,主管检验师,研究方向:细胞与分子生物学,E-mail:158410908@qq.com

通信作者:刘青(1962.11—),女,硕士,主任医师,研究方向:妇产科学,E-mail:dewy1021@sina.com

才被发现,具有极强的隐匿性^[1]。因此探寻特异性指标做到尽早发现疾病是目前临床研究的重点。中医药的抗癌效果逐渐得到认可,四君子汤有益气健脾之功,首载自《太平惠民和剂局方》,临床不乏四君子汤加减有效抗肿瘤的报道^[2-4],但其作用机制目前尚无统一论,一定程度限制了其临床的推广应用。基于此,我们亦宫颈癌模型大鼠为研究对象,进行加味四君子汤干预,临床应用提供数据参考,具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Wistar 雌性大鼠 30 只均购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司(合格证:S20089382),平均值中(155 ± 15)g,鼠龄均为 6 周。饲养于兰州生物制品研究所 SPF 动物房中心,饲养环境设置:温度 $22 \sim 24$ °C,平均温度(22 ± 1.28)°C,湿度 53%~55%,平均湿度(54 ± 0.27)%。所有 Wistar 进行为期 3 d 的适应性喂养,随后将 30 只大鼠随机分为空白组 10 只,造模组 20 只,其中造模组大鼠接受宫颈癌模型制备,造模后随机分为模型组和干预组。3 组大鼠在鼠龄、体重方面比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具有可比性。

1.1.2 药物 加味四君子汤详方如下:人参 12 g、白术 9 g、茯苓 9 g、半枝莲 9 g、金银花 9 g、香附 6 g、黄柏 6 g、凤尾草 6 g、甘草 3 g,所有中药均购自四川拓荒牛中药材种植有限公司,水煎备用。

1.1.3 试剂与仪器 人宫颈癌 Hela 细胞株(购自中国医学科学院基础研究所),10% 水合氯醛(购自青岛宇龙海藻有限公司,国药准字 H37022673),4% 多聚甲醛(购自武汉百浩天生物科技有限公司),-actin、Caspase-3、Caspase-7、Survivin 一抗抗体(均购自美国 CST 公司),BCA 蛋白定量试剂盒(购自碧云天生物有限公司),DAB 试剂盒(购自 Solarbio 公司),RPMI-1640 培养液(购自江莱生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 将人宫颈癌 Hela 细胞株置于 RPMI-1640 培养液进行培育,将培养瓶置于 37 °C 体积分数为 5% 的 CO₂ 饱和湿度环境中,当细胞生长至对数期时加入适量的 0.25% 的胰酶进行消化,充分消化后用小牛血清培养基终止消化,将细胞液置于 4 °C 离心机中 1 500 r/min 离心 10 min,充分洗涤后将细胞计数调整为 107 个/mL。将大鼠置于无菌手术操作台,在大鼠腋窝皮下组织注射 0.5 mL 人宫颈癌 Hela 细胞悬液,常规饲养 7 d 后大鼠出现

明显的肿瘤结节提示造模成功,反之则提示造模失败^[5]。本研究对 20 只大鼠进行模型制备,其中 2 只大鼠未出现肿瘤结节,提示造模失败,将 18 只造模成功大鼠随机分为模型组及干预组,每组 9 只。

1.2.2 干预方法 干预组大鼠每天接受加味四君子汤灌胃,以 150 mg/kg·d 剂量进行干预,所有大鼠均只有饮食且术后饲养环境相同。1 剂/d,空白组及模型组大鼠仅每天接受模拟抓取,并用等体积的生理盐水灌胃。各组大鼠均连续干预 8 周。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 宫颈癌病灶大小 对模型组及干预组大鼠的宫颈癌病灶大小进行测量,记录长、宽、高的数据,并计算出体积。

1.2.3.2 Western blotting 法检测 Caspase-3、Caspase-7 浓度变化 干预结束后各取模型组及干预组各 3 只大鼠的肿瘤组织 50 mg,空白组 3 只大鼠腋窝皮下组织 50 mg。分别加入蛋白裂解液将组织的充分裂解匀浆,用 BCA 试剂盒对各样本的蛋白浓度进行测定,随后将样本在水浴中进行蛋白变性,取出适量样本进行 SDS-PAGE 电泳跑胶,随后进行转膜、内参及 Caspase-3、Caspase-7 抗体孵育,随后将目标 PVDF 膜充分洗涤后进行二抗孵育,加入 ECL 显影液后进行图片显影,读取 OD 值,并用 Image(BIO-RAD 公司)的图像处理软件进行数据处理。

1.2.3.3 免疫组化法检测 Survivin 水平变化 干预结束后随机抓取各组 3 只大鼠腹腔注入 10% 水合氯醛充分麻醉后腹主动脉灌注 4% 多聚甲醛进行组织固定,模型组及干预组取出肿瘤组织,空白组取腋窝皮下组织,进行组织脱水、包埋、切片、固定,随后将切好的组织片进行脱蜡,在进行抗原修复、加入内源性过氧化物酶阻断剂,随后用 PBS 冲洗,避光环境下加入 DBA 溶液进行显色,调整显色时间后用自来水将 DAB 冲洗干净,封片,显微镜下读片,每张载玻片片随机选择 5 个视野进行观察并计算。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计数资料比较采用 χ^2 检验,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 宫颈癌病灶大小的变化 空白组未出现宫颈癌病灶,模型组病灶体积($1\,573.48 \pm 11.24$) mm³,干预组病灶体积(683.23 ± 4.81) mm³,各组宫颈癌病灶大小差异有统计学意义($P < 0.05$),干预组明显较模型组小。见表 1。

表 1 各组宫颈癌病灶大小($\bar{x} \pm s$)

组别	长(mm)	宽(mm)	高(mm)	体积(mm ³)
空白组(<i>n</i> = 10)	0	0	0	0
模型组(<i>n</i> = 9)	32.18 ± 1.39	10.98 ± 1.89	4.27 ± 0.28	1 573.48 ± 11.24
干预组(<i>n</i> = 9)	11.92 ± 0.28	3.19 ± 0.89	0.38 ± 0.03	683.23 ± 4.81
<i>Z</i>	1.857	5.34	4.98	8.283
<i>P</i>	0.018	0.024	0.016	0.002

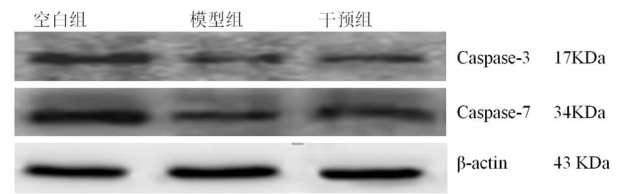


图 1 各组 Caspase-3、Caspase-7 Western blot 电泳结果

表 2 Caspase-3、Caspase-7/内参(IOD 比值)的情况
($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Caspase-3/内参 IOD 比值	Caspase-7/内参 IOD 比值
空白组	4.723 ± 1.021	3.634 ± 0.035
模型组	1.162 ± 0.137	0.479 ± 0.223
干预组	2.571 ± 1.126	1.984 ± 0.121
<i>Z</i>	8.287	4.323
<i>P</i>	0.003	0.002

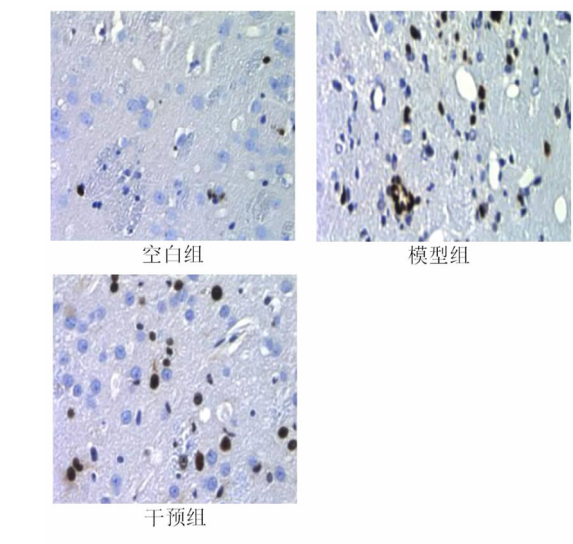


图 2 各组 Survivin 浓度的变化

表 3 Survivin 光密度情况($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	Survivin 光密度
空白组	34.382 ± 1.281
模型组	502.132 ± 0.932
干预组	212.531 ± 1.281
<i>Z</i>	7.243
<i>P</i>	0.025

2.2 各组大鼠 Caspase-3、Caspase-7、Survivin 浓度变化 2 组接受造模术大鼠 Caspase-3、Caspase-7 浓度均有不同程度下调, Survivin 表达升高, 其中干预

组大鼠经过为期 8 周的干预后 Caspase-3、Caspase-7 浓度上调, Survivin 浓度下降, 干预组改善明显优于模型组, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 1、图 2 及表 2、表 3。

3 讨论

宫颈癌是目前临床常见的妇科恶性肿瘤, 手术在早期介入有较理想的临床疗效, 但该病发生发展隐匿, 多数患者发现疾病时依然处于中晚期, 丧失了手术最佳时间窗, 由此新辅助化疗成为中晚期宫颈癌的主要治疗手段^[6], 然而通过长期的临床观察我们发现, 虽然化疗药物可直接作用于瘤体抑制其生长, 但与此同时带来的不良反应亦给患者造成了严重的影响, 阻碍了治疗依从性。中医药以其疗效显著, 安全性高等诸多优势被逐渐运用于抗癌临床治疗中, 中医认为宫颈癌属于“崩漏”“带下”“癥瘕”等范畴, 《黄帝内经》云: “正气存内、邪不可干”“盖冲任失调, 督脉失司, 带脉不固, 因而带下”。宋代医学家陈自明在其代表作《妇人大全良方》写道: “产后血气伤于脏腑, 脏腑虚弱为风冷所乘, 搏于脏腑, 与气血相结, 故成积聚癥块也”。由此不难看出气血亏虚是宫颈癌发生发展的主要病因, 妇人机体正气亏虚, 脏腑功能失调, 外邪趁虚而入, 或因寒湿, 或因痰瘀, 侵袭胞宫, 脉络阻滞, 郁久化热, 热瘀毒郁结于宫颈而成此病, 故健脾益气, 清热解毒, 化瘀散结是治疗本病的关键^[7]。本研究在四君子汤基础上加用清热解毒散瘀之品, 方中人参益气健脾养胃, 气血生这正气充盈; 白术健脾燥湿, 加强人参的益气之功; 茯苓甘淡渗湿, 白术、茯苓合用促使健脾祛湿之功倍增; 方中半枝莲、金银花以清热解毒, 香附首载于陶弘景的《名医别录》, 有理气之功, 是气病之总司, 女科之主帅。黄柏有清热解毒的功效, 如膀胱、大肠经, 可清除下焦湿热, 《神农本草经》描述到: “主五脏肠胃中结热, 女子漏下赤白, 阴伤性疾”。凤尾草味淡微苦, 主入大肠经及心经, 《分类草药性》曰: “凤尾草, 可主一切热毒之疾, 可消肿清火也”, 是专治妇人疾病之良品。甘草可调和诸药药性, 又可健脾胃以固中气之虚羸, 调和阴阳以平衡

营卫之势。整方共奏益气健脾,扶正固本,清热解毒散瘀之功。

在对加味四君子汤作用机制的进一步研究中我们发现其可影响 Caspase-3、Caspase-7、Survivin 的浓度变化,可上调宫颈癌模型大鼠 Caspase-3、Caspase-7 的浓度,抑制 Survivin 的表达。宫颈癌病情的进展与肿瘤细胞的过度增殖及凋亡减弱有关^[6-10],诱导肿瘤细胞的凋亡是抗癌的主要方向,肿瘤细胞的凋亡减弱,导致机体原本细胞增殖/凋亡平衡受破坏,导致大量的肿瘤细胞无法正常凋亡而出现异常增殖,病情日久则肿瘤病灶日趋增大,并逐渐向其他组织或器官浸润扩散,因此抑制肿瘤细胞的过度增殖,促进其凋亡是抗癌的靶向^[11-14]。Caspase 家族是介导肿瘤生长周期的重要因子,其中 Caspase-3、Caspase-7 是其关键成员,其浓度升高可促进肿瘤细胞的凋亡。Survivin^[15-17]是目前公认的抑制细胞凋亡的因子,Survivin 可通过激活因子酶原的活性而产生抑癌效应,有研究发现健康肌体 Survivin 几乎无表达,而宫颈癌肿瘤组织中的 Survivin 呈现高表达状态^[18],因此有研究人员^[19-20]认为 Survivin 可作为诊断及评估恶性肿瘤治疗疗效的独立因子。在本研究中我们认为加用加味四君子汤的大鼠 Caspase-3、Caspase-7 表达上调,Survivin 水平减弱,由此我们认为加味四君子汤可通过诱导促凋亡抑制的表达,从而实现抑制肿瘤细胞的凋亡,重新维护增殖与凋亡间的平衡,抑制肿块的生长,缩小肿瘤组织体积。

由此,我们认为加味四君子汤有明显的抗癌功效,可显著缩小宫颈癌病灶体积,其作用机制可能是通过调节 Caspase-3、Caspase-7、Survivin 表达而实现促进肿瘤细胞凋亡有关,临床建议推广运用。

参考文献

- [1] 刘倩,王玮. 浅谈宫颈癌临床治疗新进展[J]. 实用医学杂志, 2018,34(1):5-7.
- [2] 郑玲英,赵银鹰. 四君子汤抗肿瘤药理研究[J]. 实用中西医结合临床,2010,10(6):93-94.
- [3] 林乐铭. 加味四君子汤治疗大肠癌化疗后不良反应的临床研究[D]. 广州:广州中医药大学,2014.
- [4] 禹雯琦,孙珏,周诣,杜锦芳,石晓兰. 四君子汤及加味方治疗恶性肿瘤的临床及基础研究进展[J]. 上海中医药大学学报,2017,31(5):95-101.
- [5] 高岩然,史铁梅,邸晶,等. 宫颈癌移植瘤大鼠动物模型的建立

- [J]. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(28):5494-5498.
- [6] 崔英,胥爱辉,蔡文娥,等. HPV 致宫颈癌的分子机制研究[J]. 现代肿瘤学,2008,16(1):143-145.
- [7] 简小兰,蒋益兰,曾普华. 蒋益兰教授论治宫颈癌学术经验拾菁[J]. 湖南中医药大学学报,2015,35(7):27-29.
- [8] 冯骁,田聆,黄倩. Caspase-3 基因表达调控研究进展[J]. 生命科学,2014,26(9):936-942.
- [9] 杨斌,陈赛英,史佃云,等. 宫颈癌术前介入化疗前后组织中 Survivin、Caspase-3 和 Caspase-7 的表达变化及意义[J]. 临床肿瘤学杂志,2009,14(1):39-42.
- [10] 夏丽,薛秀珍. NF- κ Bp65, c-IAP2, Caspase-3 在宫颈癌中的表达及意义[J]. 现代妇产科进展,2011,20(5):353-357.
- [11] 赵亚丽,王聪. 苦参消癥汤对宫颈癌大鼠模型癌组织中 Caspase-3、Caspase-7、Survivin 表达的干预作用[J]. 陕西中医,2018,39(5):550-552,560.
- [12] 鲁艳明,孟丽荣,银铎,等. 沉默 survivin 基因表达对人宫颈癌 hela 细胞恶性行为的影响[J]. 解剖科学进展,2011,17(3):259-263.
- [13] 高艳,曹建平,全桂凤,等. 苦参碱对大鼠宫颈癌组织中 Survivin、Caspase-3 和 Caspase-7 表达的影响[J]. 现代生物医学进展,2015,15(23):4471-4473.
- [14] Pereira C, Lopes-Rodrigues V, Coutinho I, et al. Potential small-molecule activators of caspase-7 identified using yeast-based caspase-3 and-7 screening assays[J]. Eur J Pharm Sci,2014,54:8-16.
- [15] Tran LT, Tran LT, Bui TC, et al. Risk factors for high-risk and multi-type Human Papillomavirus infections among women in HoChi Minh City, Vietnam: a cross-sectional study [J]. BMC WomensHealth, 2015,15(1):172.
- [16] Mwaka AD, Okello ES, Wabinga H, et al. Symptomatic presentation with cervical cancer in Uganda: a qualitative study assessing the pathways to diagnosis in a low-income country[J]. BMC Womens Health,2015,15:15.
- [17] Shiju C, Arish D, Bhuvanesh N, et al. Synthesis, characterization, and biological evaluation of Schiff base-platinum(II) complexes[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc,2015,145:213-222.
- [18] Dang YP, Yuan XY, Tian R, et al. Curcumin improves the paclitaxel-induced apoptosis of HPV-positive human cervical cancer cells via the NF- κ B-p53-caspase-3 pathway[J]. Exp Ther Med,2015,9(4):1470-1476.
- [19] Naumovic T, Miljus D, Djoric M, et al. Mortality from cervical cancer in Serbia in the period 1991-2011[J]. J BUON,2015,20(1):231-234.
- [20] Chen CH, Chung CY, Wang LH, et al. Risk of cancer among HIV-infected patients from a population-based nested case-control study: implications for cancer prevention[J]. BMC Cancer,2015,15:133.

(2018-07-30 收稿 责任编辑:王明)