

健脾活血祛湿方经 AQP9 和线粒体细胞凋亡途径对 H22 肝癌荷瘤裸鼠的影响

李嘉, 高玲, 陈晓兰, 杨孝芳, 蒲翔, 张雄

贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550025

摘要: **目的** 观察健脾活血祛湿方对 H22 肝癌皮下移植瘤裸鼠的影响, 探讨其是否通过干预水通道蛋白 9 (AQP9) 蛋白靶点调控肝癌细胞线粒体凋亡途径, 从而发挥抗肿瘤的可能机制。 **方法** 采用 H22 肝癌细胞成功建立裸鼠皮下移植瘤模型, 选取成瘤裸鼠 25 只随机分为空白组 (生理盐水灌胃, 0.2 ml/10 g)、阳性对照组 (环磷酰胺腹腔注射, 30 mg/kg) 和健脾活血祛湿方低、中、高剂量组 (灌胃, 25、50、100 mg/kg), 每组 5 只, 1 次/d。计算各组 H22 肝癌移植瘤裸鼠的抑瘤率及脾脏指数, 采用荧光探针 JC-1 和流式细胞术检测线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 的变化; Western blot 检测瘤组织 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、B 淋巴细胞瘤因子相关 X 蛋白 (Bax) 的表达变化; 免疫组织化学检测 AQP9 表达。 **结果** 与空白组相比, 阳性对照组裸鼠的生存状态较差, 瘤体体积减小, 抑瘤率、Bcl-2、Bax 蛋白表达显著增高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 脾指数、线粒体膜电位水平显著降低 ($P < 0.01$); 免疫组织化学结果显示 AQP9 表达增多。与阳性对照组相比, 健脾活血祛湿方高剂量组瘤体体积减小, 瘤重和抑瘤率均无明显变化 ($P > 0.05$), 脾指数升高 ($P < 0.05$), 线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.05$), Bcl-2、Bax 表达和 Bax/Bcl-2 比值显著增高 ($P < 0.05$); 免疫组织化学结果显示 AQP9 广泛表达, 呈现 AQP9 棕褐色深染, 部分细胞出现胞核的形态改变, 细胞空泡显著增多。 **结论** 健脾活血祛湿方在一定剂量下对 H22 肝癌荷瘤裸鼠有明显的抑瘤作用, 并可改善裸鼠免疫功能, 其作用可能与调控 AQP9 干预肝癌细胞线粒体凋亡途径有关。

关键词: 健脾活血祛湿方; H22 肝癌细胞; 凋亡; 水通道蛋白 9; 线粒体途径

中图分类号: R 273 R 735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2020)08-1014-06

Effect of Jianpi Huoxue Qushi Decoction on nude mice bearing H22 hepatoma through AQP9 and mitochondrial apoptosis pathway

LI Jia, GAO Ling, CHEN Xiao-lan, YANG Xiao-fang, PU Xiang, ZHANG Xiong

Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550025, China

Corresponding author: GAO Ling, E-mail: 570948306@qq.com

Abstract: Objective To observe the influence of Jianpi Huoxue Qushi Decoction on nude mice bearing H22 hepatoma, and to investigate the possible mechanism of Jianpi Huoxue Qushi Decoction by interfering with Aquaporin 9 (AQP-9) protein target to regulate mitochondrial apoptosis pathway in hepatoma cells. **Methods** H22 hepatoma cells were used to establish subcutaneous xenograft models, 25 nude mice were selected. All the nude mice bearing H22 were randomly divided into blank group (normal saline gavage, 0.2 ml/10 g), positive control group (cyclophosphamide intraperitoneal injection, 30 mg/kg) and low-, medium- and high-dose groups (Jianpi Huoxue Qushi Decoction intragastric administration, 25, 50, 100 mg/kg, respectively), with 5 rats in each group. nude mice bearing H22 were intervened once a day. The inhibition rate and spleen index of nude mice bearing H22 in each group were calculated. Fluorescent probe JC-1 and flow cytometry were used to detect the expression of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). Western blot was used to detect the expression of B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and B-lymphocyte tumor factor associated X protein (Bax). Immunohistochemistry was used to detect the expression of AQP-9. **Results** Compared with the blank group, the survival status of nude mice in the positive control group was worse, and the tumor volume, the spleen index and $\Delta\Psi_m$ were significantly reduced, the tumor inhibition rate, the expression of Bcl-2 and Bax protein were significantly increased in the

positive control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Immunohistochemical results showed that the expression of AQP9 was increased in the positive control group. Compared with the positive control group, the tumor volume in the high-dose group significantly reduced, without significant change in the tumor weight and tumor inhibition rate ($P > 0.05$), the spleen index increased ($P < 0.05$), the $\Delta\Psi_m$ significantly decreased ($P < 0.05$), the expression of Bcl-2 and Bax and the ratio of Bax/Bcl-2 significantly increased ($P < 0.05$). The results of immunohistochemistry showed that AQP9 was widely expressed and stained dark brown. Some cells showed morphological changes of nucleus and increased cell vacuoles. **Conclusions** Jianpi Huoxue Qushi Decoction has obvious antitumor effect on nude mice bearing H22 hepatoma, and can improve the immune function of nude mice. The effect may be related to the regulation of AQP-9 intervention on mitochondrial apoptosis pathway of hepatoma cells.

Key words: Jianpi Huoxue Qushi Decoction; H22 hepatoma cells; Apoptosis; Aquaporin 9; Mitochondrial pathway

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81560771, 81860887); Qianmiao Medical Project (K[2017]No.010); Special Project of Science and Technology of Traditional Chinese Medicine and Ethnic Medicine in Guizhou Province (QZYY-2018-013); Internal Medicine Research Project of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine(200)

肝癌是常见的恶性肿瘤,复发率和转移率高,治愈率低,其死亡率仅次于胃癌和肺癌,也是导致癌症相关死亡的第二大原因^[1]。据统计,肝切除术后 5 年患者生存率为 30% ~ 40%,且放化疗严重影响患者的生存质量^[2]。健脾活血祛湿方基于“络病学说”成方,以五爪龙、白术为君,田基黄、猪苓、白背叶根三药为臣,土鳖虫、茜根为佐,砂仁为使,在祛瘀通络基础上兼以扶正解毒,治疗肝癌同时可缓解患者放化疗后的副反应。细胞凋亡机制被广泛应用于肿瘤治疗,线粒体途径是经典细胞凋亡途径之一,包括线粒体膜电位的变化和凋亡因子释放等相关细胞信号转导机制^[3]。同时,线粒体的结构和功能变化也会影响对相关蛋白的合成和分泌^[4]。目前,共发现有 13 种水通道蛋白(AQP)(AQP0 ~ 12),主要介导不同细胞水、甘油等小分子物质转运,其中,AQP9 在肝脏中表达活跃,控制膜内外水转运,其结构由四聚体(即四个 AQP)组成,中间的通道管为水分子通过提供结构空间^[5]。课题组前期发现健脾活血祛湿方能升高肝硬化大鼠 AQP8 的表达,改善肝功能,减轻线粒体水肿,促进腺苷三磷酸(ATP)合成,提高细胞色素 C(Cyt-C)的表达,提示 AQP 和线粒体之间存在一定相关性^[6]。基于此,课题组采用健脾活血祛湿方灌胃法对裸鼠 H22 肝癌皮下移植瘤裸鼠模型进行干预,观察 AQP9 和线粒体细胞凋亡途径中线粒体膜电位和相关凋亡因子 Bcl-2、Bax 的表达变化,探讨健脾活血祛湿方对 H22 肝癌细胞线粒体凋亡途径中的相关细胞因子的功能变化及可能的防治机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 裸鼠 25 只,SPF 级,体质量(18 ~

22)g,购自中山大学实验动物中心,动物合格证号为 SCXK(粤)2016-0020。饲养于广州中医药大学实验动物中心实验室,标准 SPF 级饲料喂养,动物实验符合广州中医药大学动物伦理委员会标准。

1.1.2 实验药物 健脾活血祛湿方(主要组成:五爪龙 30 g,白术 30 g,白背叶根 30 g,猪苓 15 g,田基黄 20 g,茜草 15 g,土鳖虫 10 g,砂仁 5 g)购自贵阳中医学院第一附属医院药房,经本院药剂科鉴定为纯正药材(均符合《中国药典》2015 年版要求),取药物适量,先加蒸馏水浸泡 40 min,一煎加药材量的 8 倍水,沸腾后煎 40 min,二煎加药材量的 6 倍水,沸腾后煎 30 min,过滤,两煎所得滤液混合后干燥浓缩至 1 g/ml 的原液 15 ml,80 °C 水浴 30 min 灭活后,1 000 rpm 离心 10 min, -20 °C 保存备用。实验时以含 2% DMEM 培养液倍比稀释。

1.1.3 试剂和仪器 Anti-Bcl-2 antibody, Anti-Bax antibody(英国 Abcam 公司);BCA 试剂盒(中日合资 Solarbio);二抗(羊抗兔)(博奥森公司);ECL 显影液(美国 Bio-Rad 公司);线粒体膜电位检测试剂盒(美国 BD 公司);0.25% 胰酶(不含 EDTA)(以色列 BI 公司);Anti-Aquaporin 9 antibody(以色列 Alomone labs 公司);DAB 显色试剂盒,苏木素染液(中杉金桥公司)。注射用环磷酰胺:200 mg/瓶(德国 Baxter Oncology GmbH 公司)。超净工作台,CO₂ 培养箱,多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);垂直凝胶电泳仪,凝胶成像分析仪,Turbo 电转仪,全自动细胞计数仪(美国 Bio-Rad 公司);正置显微镜(德国 Leica 公司);倒置荧光显微镜(日本 Olympus 公司);流式细胞仪,获取软件,分析软件(美国 BD 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物模型的建造 小鼠肝癌细胞 H22 来源于湘雅医学院肿瘤研究所,培养于 10% FBS 高糖培养基 DMEM,5% CO₂、37 °C 培养箱。取对数生长期 H22 细胞消化制备悬液。取裸鼠,每鼠后肢右侧腋窝皮下接种制备好的瘤细胞悬液 0.2 ml/只(约含瘤细胞 1 × 10⁶/ml),制备实体瘤模型。

1.2.2 动物分组、给药及取材 接种 14 d 后挑选成瘤裸鼠 25 只,将裸鼠随机分为 5 组,各 5 只。空白组采用 0.2 ml/10 g 生理盐水灌胃,1 次/d;阳性对照组采用环磷酰胺腹腔注射,30 mg/kg,1 次/d;健脾活血祛湿方低、中、高剂量组(25、50、100 mg/kg)灌胃给药,0.2 ml/10g,1 次/d。给药时间 3 周。中药剂量使用方法均参照《中药药理实验方法》^[7]规定方法。期间每天记录各组裸鼠的生存状态。观察至末次给药 24 h 后颈椎脱臼处死裸鼠,剖取移植瘤组织。

1.3 观察指标

1.3.1 观察一般情况及瘤体体积 观察各组裸鼠生存行为状态及瘤体的直观大小。

1.3.2 计算抑瘤率 各组分别称取瘤组织。抑瘤率(%) = (对照组平均瘤重 - 治疗组平均瘤重)/对照组平均瘤重 × 100%。

1.3.3 计算脾脏指数 各组分别称取脾脏。脾脏指数(%) = 脾重(mg)/体重(g) × 100%。

1.3.4 流式细胞术检测线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$) 取肿瘤组织块制备单细胞悬液,用流式细胞仪按四氯四乙基苯丙咪唑羰化青碘化物(JC-1)法检测。取适量 JC-1(200 ×),按照每 50 μ l JC-1(200 ×)加入 8 ml 超纯水的比例稀释 JC-1,剧烈震荡充分溶解并混匀 JC-1,然后再加入 2 ml JC-1 染色缓冲液(5 ×),混匀后把试剂盒中提供的 CCCP(10 mM)按照 1:1 000 的比例加入到细胞培养液中,稀释至 10 μ M,处理细胞 20 min,流式细胞仪检测膜电位。JC-1 是一种理想的用于检测线粒体膜电位的荧光探针,当线粒体膜电位较高时,JC-1 聚集在线粒体基质中,形成聚合物,可以产生红色荧光,在流式细胞仪上表现为 FL1 和 FL2 探测器双阳性;当线粒体膜电位较低时,JC-1 不能聚集在线粒体基质中,此时 JC-1 为单体,可以产生绿色荧光,形成流式图汇总所有细胞 FL1 为阳性。不同荧光颜色的转变反映线粒体膜电位的变化,本研究线粒体膜电位丢失率计算:Ratio = 红/绿(蓝)荧光强度的比值,制图时调成了蓝色和玫红色,玫红色代表各组线粒体膜电位的丢失率。

1.3.5 Western blot 检测 Bcl-2 及 Bax 蛋白表达 提取瘤组织总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,取 10 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。结束

后电转到 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,1:500 的一抗浓度 4 °C 孵育过夜,用含 0.1% Tween-20 的 TBST 漂洗 PVDF 膜 3 次,每次 5 min,二抗 1:5 000 孵育室温 40 min,TBST 漂洗 3 次,每次 5 min。使用 ECL 液显影,暗房 X 胶片曝光,GAPDH 内参作为蛋白浓度统一指标。

1.3.6 免疫组织化学检测 AQP9 蛋白表达 取瘤组织常规固定后,行石蜡包埋、连续切片,脱蜡后苏木精复染,进行图像分析。按照试剂盒说明书操作,一抗孵育:PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加 10% 正常山羊血清封闭液,室温 20 min,滴加一抗 50 μ l,4 °C 过夜,在 37 °C 复温 20 min。PBS 洗 3 次,各 5 min;滴加二抗复合液 40 ~ 50 μ l,37 °C 30 min;PBS 洗 3 次各 5 min;DAB 显色 1 ~ 12 min,在显微镜下掌握染色程度;PBS 或自来水冲洗 10 min;苏木精复染 2 min,脱水、透明、封片、镜检。应用 IPP6 图像分析系统,每张切片随机选取 3 ~ 4 个视野(×200),进行阳性细胞的平均光密度值测定。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 24.0 软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对各组数据先进行正态性检验和方差齐性检验,遵循正态分布和方差齐性的采用单因素方差分析,组间两两比较采用 SNK-*q* 法分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 观察肝癌 H22 移植瘤裸鼠一般情况及瘤体体积 成瘤裸鼠生存状态基本良好,随着注射次数增多,部分裸鼠进食进水量减小,活动度降低,精神状态欠佳,以阳性对照组尤为明显,实验期间无裸鼠死亡。瘤体体积直观观察显示,阳性对照组和健脾活血祛湿方高、中剂量组的瘤体体积与空白组比较减小,其中健脾活血祛湿方高剂量组减小更甚。见图 1。

2.2 对裸鼠抑瘤率的影响 阳性对照组的移植瘤瘤重显著低于空白组($P < 0.01$),抑瘤率显著高于空白组($P < 0.01$)。健脾活血祛湿方中、低剂量组的移植瘤瘤重大于阳性对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),抑瘤率低于阳性对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),高剂量组与阳性对照组移植瘤瘤重和抑瘤率比较无统计学差异($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 对裸鼠脾脏指数的影响 阳性对照组的脾脏指数显著低于空白组($P < 0.01$)。健脾活血祛湿方中、低、高剂量组的脾脏指数高于阳性对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

2.4 对线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)的影响 阳性对照组的线粒体膜电位丢失率显著高于空白组($P < 0.01$)。

健脾活血祛湿方高剂量组的线粒体膜电位丢失率显著高于阳性对照组 ($P < 0.01$), 中、低剂量组线粒体膜电位丢失率显著低于阳性对照组 ($P < 0.01$)。见表 2、图 2。

2.5 免疫组化检测 AQP9 表达定位 AQP9 表达主要定位于肝细胞膜和胞质内, 呈棕褐色的阳性染色。空白组的 AQP9 表达较少, 细胞核染色清晰; 阳性对照组 AQP9 表达增多; 健脾活血祛湿方高剂量组 AQP9 广泛表达, 呈现 AQP9 棕褐色深染, 部分细胞出现胞核的形态改变, 细胞空泡显著增多; 中剂量组 AQP9 表达显著减少, 出现明显的胞核形态改变, 高、中剂量组均提示有凋亡趋势; 低剂量组的 AQP9 表达相对高剂量组有显著减少, 健脾活血祛湿方各剂量组的 AQP9 表达呈剂量依赖性提高。见图 3。

2.6 Western blot 检测组织 Bcl-2、Bax 表达 与空白组相比, 阳性对照组的 Bcl-2、Bax 蛋白表达显著增高 ($P < 0.05$); 与阳性对照组相比, 健脾活血祛湿方各剂量组的 Bcl-2 表达显著降低, Bax 显著增高 ($P < 0.05$)。高、中剂量组的 Bax/Bcl-2 比值显著增高。见图 4、表 3。

表 1 各组瘤重及抑瘤率比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

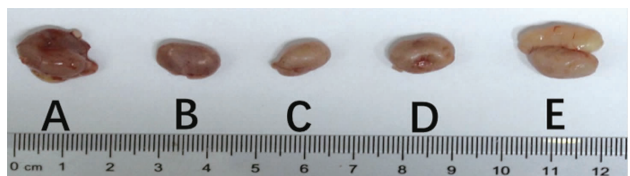
组别	移植瘤重(g)	抑瘤率(%)
空白组	4.15 ± 0.26	0
阳性对照组	2.80 ± 0.37 ^a	32.58 ^a
健脾活血祛湿方高剂量组	2.82 ± 0.52	32.13
健脾活血祛湿方中剂量组	3.85 ± 0.52 ^b	7.08 ^b
健脾活血祛湿方低剂量组	4.18 ± 0.27 ^c	-0.75 ^c

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。

表 2 各组免疫器官指数比较 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

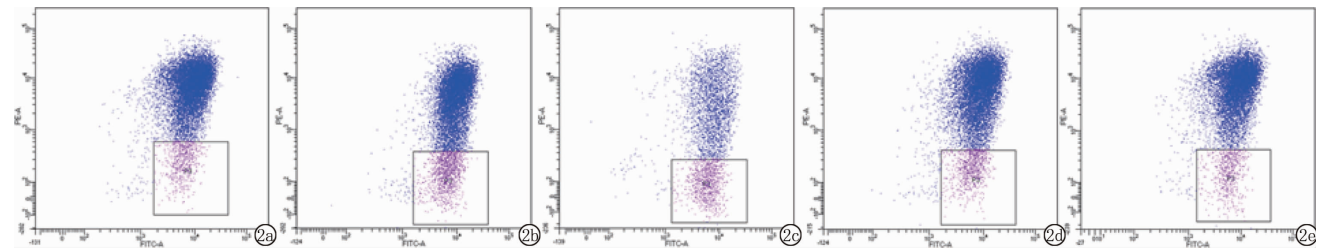
组别	脾脏指数(mg/g)	$\Delta\Psi_m$ 丢失率(%)
空白组	7.90 ± 0.25	5.32 ± 0.43
阳性对照组	5.23 ± 0.20 ^a	11.41 ± 0.26 ^a
健脾活血祛湿方高剂量组	5.96 ± 0.53 ^b	25.10 ± 1.03 ^c
健脾活血祛湿方中剂量组	6.74 ± 0.42 ^c	7.33 ± 0.12 ^c
健脾活血祛湿方低剂量组	7.53 ± 0.38 ^c	5.01 ± 0.18 ^c

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.01$; 与阳性对照组比较, ^b $P < 0.05$, ^c $P < 0.01$ 。



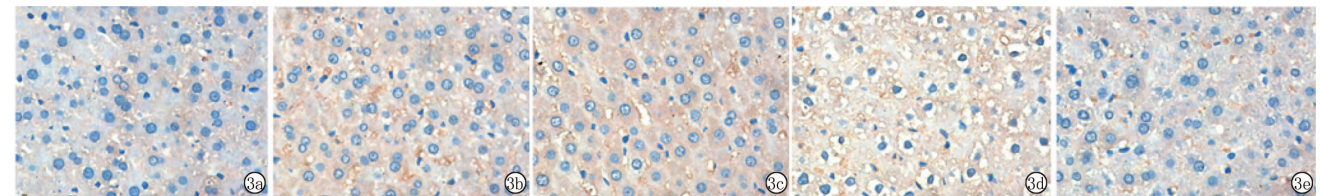
注: A 为空白组; B 为阳性对照组; C 为健脾活血祛湿方高剂量组; D 为健脾活血祛湿方中剂量组; E 为健脾活血祛湿方低剂量组。

图 1 各组裸鼠肿瘤体积对比



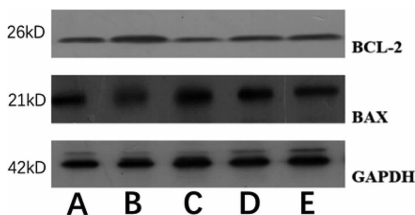
注: 2a: 空白组; 2b: 阳性对照组; 2c: 健脾活血祛湿方高剂量组; 2d: 健脾活血祛湿方中剂量组; 2e: 健脾活血祛湿方低剂量组; 玫红色代表各组线粒体膜电位丢失率。

图 2 线粒体膜电位变化



注: 3a: 空白组; 3b: 阳性对照组; 3c: 健脾活血祛湿方高剂量组; 3d: 健脾活血祛湿方中剂量组; 3e: 健脾活血祛湿方低剂量组。

图 3 H22 肝癌细胞 AQP9 表达病理图 (免疫组化, ×200)



注: A 为空白组; B 为阳性对照组; C 为健脾活血祛湿方高剂量组; D 为健脾活血祛湿方中剂量组; E 为健脾活血祛湿方低剂量组。

图 4 Bcl-2、Bax 表达免疫印迹图

表 3 Western blot 检测 Bcl-2、Bax 和 Bax/Bcl-2 表达水平 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2	Bax	Bax/Bcl-2
空白组	0.41 ± 0.02	0.49 ± 0.06	1.18 ± 2.30
阳性对照组	1.21 ± 0.08 ^a	2.06 ± 0.16 ^a	1.71 ± 1.84
健脾活血祛湿方高剂量组	0.89 ± 0.22 ^b	3.22 ± 0.13 ^b	3.61 ± 0.59 ^b
健脾活血祛湿方中剂量组	1.06 ± 0.15 ^b	2.62 ± 0.08 ^b	2.48 ± 0.51 ^b
健脾活血祛湿方低剂量组	1.07 ± 0.13 ^b	1.17 ± 0.08 ^b	1.10 ± 0.58

注: 与空白组比较, ^a $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, ^b $P < 0.05$ 。

3 讨论

肝癌的病因复杂多样,包括病毒感染、接触化学致癌物、酗酒,或受黄曲霉真菌污染的食品^[8-11],不同的病因均可导致肝癌细胞的黏附、迁移、侵袭、转移,最终形成不受控制的细胞增殖和肿瘤生长。脾是人体最大的免疫器官,可在早期清除新生肿瘤细胞,并在肿瘤进展的后期导致肿瘤免疫耐受。有研究表明,在 H22 原位移植肝癌模型中,一旦肿瘤细胞接种于肝脏,脾脏可迅速启动抗肿瘤和促肿瘤免疫反应,并且脾切除术有助于提高肿瘤宿主的免疫应答^[12]。因此,脾脏大小与免疫应答有密切的关系。环磷酰胺是带有细胞毒性的一线广谱抗癌药物,是目前应用的免疫抑制剂中作用最强而持久的药物,临床应用最多,抗肿瘤作用效果显著,但副作用大。本研究发现,阳性对照组虽然有明显的抑瘤作用,但裸鼠的生存状态不佳,脾指数降低,提示环磷酰胺在治疗肿瘤同时会降低裸鼠免疫力;健脾活血祛湿方高剂量组的脾脏指数升高,抑瘤率和瘤体质量与阳性对照组比较均无统计学差异,提示健脾活血祛湿方在抑制肿瘤增殖方面与环磷酰胺相当。

线粒体凋亡途径是三大经典细胞凋亡途径之一。正常生理情况下,线粒体外膜之间的通透性转换孔处于关闭状态,细胞受到刺激后,线粒体膜电位降低,转换孔开放,膜两侧离子梯度降低,正离子入基质,细胞膜破裂,激活 Bcl-2 家族(促凋亡蛋白 BAX)、Cty-C、AIF、Smac/DIABLO、endoG 等释放入胞^[13-15]。同时,细胞膜发生去极化,细胞内离子浓度降低,膜内外形成渗透梯度,水经 AQP 从细胞内迅速且有选择性的流出,使细胞凋亡性容积减小^[16-19],最终导致细胞水分丢失,核染色碎裂、DNA 大规模片段化、细胞内陷从而凋亡^[13]。本研究发现,与空白组相比,阳性对照组的膜电位丢失率增高,与阳性对照组相比,健脾活血祛湿方高剂量组的膜电位丢失率增高,提示高剂量组膜电位水平下降更明显,诱导肝癌细胞启动线粒体凋亡程序。肝内的 AQP9 表达于正常肝脏,在肝癌细胞中表达下降,使得肝癌细胞对渗透压反应和对凋亡的刺激性下降,从而促进肿瘤细胞增殖^[20]。因此,增加 AQP9 的蛋白表达可以改善肝脏功能。课题组前期研究发现,该方能升高肝硬化大鼠 AQP9 的表达,改善肝功能,减轻线粒体水肿,初步发现 AQP 与线粒体之间具有一定相关性。免疫组化结果显示,健脾活血祛湿方可有效增加 AQP9 的表达,且呈剂量依赖性增高。因此笔者推测,可能是因为健脾活血祛湿方引起 AQP9 的高表达,加速细胞水分流失从而启动

线粒体细胞凋亡途径来诱导肝癌细胞的。

凋亡因子 Bcl-2 和 Bax 同属 Bcl-2 家族,两者相互拮抗,Bcl-2 主要抗凋亡,Bax 促凋亡。在凋亡过程中 Bax 通过从线粒体释放 Cty-C 来激活 Caspase 级联反应,此时,抗凋亡因子 Bcl-2 阻止 Cty-C 释放从而阻止下游激活,且 Bcl-2 也参与将增殖的细胞退至 G0 期,进一步阻止细胞分化增殖^[21]。有研究表明,高 Bax 或者低 Bcl-2 以及较高的 Bax/Bcl-2 比值均有利于细胞凋亡,从而改善恶病质状况^[22-23]。一项针对急性髓系白血病(AML)患者的研究指出,Bax/Bcl-2 比率高表明化疗后易缓解,Bax/Bcl-2 比率低则提示预后较差^[24]。本实验结果显示,与阳性对照组相比,健脾活血祛湿方各剂量组 Bcl-2 均有所下降;中、高剂量组的 Bax 明显上升,提示健脾活血祛湿方通过释放 Bax 促凋亡因子,有效促进肝癌细胞凋亡。

综上所述,健脾活血祛湿方治疗肝癌的有效机制,可能是通过降低线粒体细胞膜电位,激活线粒体细胞凋亡途径,同时通过上调 Bax、下调 Bcl-2,提高 AQP9 的表达来提高肝肿瘤细胞的抑瘤率,从而缩小肿瘤体积。

参考文献

- [1] He L, Tian DA, Li PY, et al. Mouse models of liver cancer: progress and recommendations [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(27): 23306.
- [2] Blum HE. Hepatocellular carcinoma: therapy and prevention [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(47): 7391 - 7400.
- [3] Dai ZJ, Wang XJ, Li ZF, et al. Scutellaria barbata extract induces apoptosis of hepatoma H22 cells via the mitochondrial pathway involving caspase-3 [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(48): 7321.
- [4] 王全凯, 杨全会, 郭静, 等. 人肝癌组织裸鼠移植瘤模型建立及其应用 [J]. *中草药*, 2014, 45(3): 398 - 402.
- [5] 郑博. Aquaporin-9 在前列腺癌 pc-3 细胞株中表达及意义(附病例报告) [D]. 大连: 大连医科大学, 2015.
- [6] 李嘉. 健脾活血祛湿方对肝硬化腹水大鼠肝 AQP8、9 和线粒体的影响 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2014.
- [7] 陈奇. *中药药理研究方法学* [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006.
- [8] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2003, 362: 1907 - 1917.
- [9] Okuda K. Hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2000, 32(S1): 225 - 237.
- [10] Fattovich G, Stroffolini T, Zagni I, et al. Hepatocellular carcinoma in cirrhosis: incidence and risk factors [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127(5 Suppl 1): S35 - S50.
- [11] Lai H, Mo XW, Yang Y, et al. Association between aflatoxin B1 occupational airway exposure and risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 9577 - 9584.

与纳入对象的冠脉基础条件、吻合血管的技术、术后药物的强化管理以及血糖等危险因素有关^[15-16]。

综上所述, OPCABG 较 ONCABG 对机体循环干扰更小, 术后恢复更快, 应用于三支冠脉狭窄性心脏病患者能够明显增加桥血管血流, 降低围术期应激和炎症反应, 可减少近期并发症和远期死亡率, 提高生存率和桥血管通畅率, 减少二次手术风险。但限于样本量较少, 随访时间较短, 单中心经验和非随机对照, 结果仍需进一步验证。

参考文献

[1] Khan AR, Golwala H, Tripathi A, et al. Meta-analysis of percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass grafting in left main coronary artery disease[J]. *Am J Cardiol*, 2017, 119(12): 1949-1956.

[2] Shroyer AL, Hattler B, Grover FL. Five-year outcomes after on-pump and off-pump coronary-artery bypass[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(19): 1898-1899.

[3] 张欣, 高长青. 非体外循环冠状动脉旁路移植术的研究进展[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(11): 180-183.

[4] Athanasopoulos LV, Athanasiou T. Off-pump coronary artery bypass grafting in left main stem Stenosis: outcomes, concerns and controversies[J]. *J Thorac Dis*, 2016, 8(Suppl 10): S787-S794.

[5] Lamy A, Devereaux PJ, Prabhakaran D et al. Five-year outcomes after off-pump or on-pump coronary-artery bypass grafting[J]. *N Engl J Med*, 2017, 376(9): 894-895.

[6] 白瑞凯, 李温斌, 杨昭, 等. 单中心体外和非体外循环下冠状动脉旁路移植术后远期临床效果研究[J]. *心肺血管病杂志*, 2019, 38(1): 44-51.

[7] 魏凯, 王琪峰, 庞云峰. 体外循环与非循环冠状动脉旁路移植术对老年冠心病病人脏器损伤的影响[J]. *临床外科杂志*, 2019, 27(6): 508-511.

[8] Kirmani BH, Holmes MV, Muir AD. Long-term survival and freedom from reintervention after off-pump coronary artery bypass grafting: a propensity-matched study[J]. *Circulation*, 2016, 134(17): 1209.

[9] 冠状动脉旁路移植术围术期抗血小板治疗共识专家组. 冠状动脉旁路移植术围术期抗血小板治疗专家共识[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2016, 32(1): 1-8.

[10] 刘博, 王其逊, 粟家元, 等. 2 型糖尿病对于非体外循环冠状动脉旁路移植术患者术后急性肾损伤等并发症的影响[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2018, 38(8): 1089-1094.

[11] Lehnert P, Møller CH, Damgaard S, et al. Transit-time flow measurement as a predictor of coronary bypass graft failure at one year angiographic follow-up[J]. *J Card Surg*, 2015, 30(1): 47-52.

[12] 杨恒, 张润生, 胡亚兰. 非体外循环冠状动脉旁路移植术患者围术期血管麻痹与血浆精氨酸血管加压素水平的关系分析[J]. *山西职工医学院学报*, 2018, 28(6): 8-10.

[13] 宋媛媛, 徐晓晗, 陆小虎, 等. 个体化全动脉冠状动脉旁路移植术的临床应用[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2019, 39(6): 899-902.

[14] Tanaka A, Ishii H, Oshima H, et al. Progression from Stenosis to occlusion in the proximal native coronary artery after coronary artery bypass grafting[J]. *Heart Vessels*, 2016, 31(7): 1056-1060.

[15] 孙文强, 赵舟, 高卿, 等. 非体外循环冠状动脉旁路移植术中桥血管血流对术后近中期预后的影响[J]. *北京大学学报(医学版)*, 2019, 6(3): 1-8.

[16] 张晓雅, 顾松, 刘岩, 等. OPCABG 紧急中转体外循环的危险因素及预后分析[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2015, 31(9): 564.

收稿日期: 2019-12-04 编辑: 王娜娜

(上接第 1018 页)

[12] Li BH, Zhang S, Huang N, et al. Dynamics of the spleen and its significance in a murine H22 orthotopic hepatoma model[J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2016, 241(8): 863-872.

[13] Mohamad N, Gutiérrez A, Núñez M, et al. Mitochondrial apoptotic pathways[J]. *Biocell*, 2005, 29(2): 149-161.

[14] Delivani P, Martin SJ. Mitochondrial membrane remodeling in apoptosis: an inside story[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(12): 2007.

[15] Tachikawa M, Toki H, Tomi M, et al. Gene expression profiles of ATP-binding cassette transporter A and C subfamilies in mouse retinal vascular endothelial cells[J]. *Microvasc Res*, 2008, 75(1): 68.

[16] Borgnia M, Nielsen S, Engel A, et al. Cellular and molecular biology of the aquaporin water channels[J]. *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 425-458.

[17] Brown D. The ins and outs of aquaporin-2 trafficking[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284(5): F893-F901.

[18] Brown D, Katsura T, Gustafson CE. Cellular mechanisms of aquaporin trafficking[J]. *Am J Physiol*, 1998, 275(3): F328-F331.

[19] King LS, Yasui M, Agre P. Aquaporins in health and disease[J].

Mol Med Today, 2000, 6(2): 60-65.

[20] Calamita G, Ferri D, Gena P, et al. The inner mitochondrial membrane has aquaporin-8 water channels and is highly permeable to water[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(17): 17149-17153.

[21] Kulsoom B, Shamsi TS, Afsar NA, et al. Bax, Bcl-2, and Bax/Bcl-2 as prognostic markers in acute myeloid leukemia; are we ready for Bcl-2-directed therapy? [J]. *Cancer Manag Res*, 2018, 10: 403.

[22] Katkooi VR, Suarez-Cuervo C, Shanmugam C, et al. Bax expression is a candidate prognostic and predictive marker of colorectal cancer[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2010, 1(2): 76-89.

[23] Singh L, Pushker N, Saini N, et al. Expression of pro-apoptotic Bax and anti-apoptotic Bcl-2 proteins in human retinoblastoma[J]. *Clin Experiment Ophthalmol*, 2015, 43(3): 259-267.

[24] Del Poeta G, Venditti A, Del Principe MI, et al. Amount of spontaneous apoptosis detected by Bax/Bcl-2 ratio predicts outcome in acute myeloid leukemia (AML)[J]. *Blood*, 2003, 101(6): 2125-2131.

收稿日期: 2019-12-01 编辑: 王海琴