

高良姜素通过巨噬细胞极化及抑制锌指蛋白 Zbed3 诱导大鼠肝癌细胞凋亡的研究^{*}

胡春兰¹ 周龙² 田玲² 邓利艳³

(1. 重庆大学附属三峡医院全科医学科, 重庆 500101; 2. 重庆大学附属三峡医院医学检验科, 重庆 500101; 3. 重庆万州区人民医院重症医学科, 重庆 404100)

【摘要】 目的 探讨高良姜素诱导巨噬细胞极化对肝癌大鼠瘤体体积及锌指蛋白 Zbed3 的影响。方法 健康 6~8 周龄 SD 雄性大鼠 74 只, 体质量 250~300 g, 常规饲养, 自由饮食饮水。随机分为对照组(健康大鼠常规饲养, $n=14$)、模型组(模型大鼠常规饲养, $n=13$)、高良姜素低剂量组(模型+25 mg/kg/d 高良姜素, $n=13$)、高良姜素中剂量组(模型+50 mg/kg/d 高良姜素, $n=13$)及高良姜素高剂量组(模型+100 mg/kg/d 高良姜素, $n=13$)。HE 染色检测肝组织病理形态, TUNEL 检测肝癌细胞凋亡, 游标卡尺测定肿瘤体积, 免疫组化检测 CD11c、CD206 表达, Western Blot 检测 Zbed3、GSK3 β 、Axin、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 水平。结果 对照组大鼠肝小叶结构清晰, 肝细胞排列有序, 形态正常; 模型组大鼠瘤组织呈膨胀性生长, 癌细胞大小不一, 肝细胞索挤压, 排列不齐, 并可见纤维索样结构; 高良姜素低、中、高剂量组大鼠均出现肿瘤细胞间隙增宽, 肿瘤细胞出现不同程度的肿胀变性, 呈现泡沫状改变, 肿瘤细胞巢可见大量炎细胞浸润, 各组均可见不同程度的肿瘤细胞坏死灶。与对照组相比, 模型组大鼠 CD11c、GSK3 β 、Axin 降低, CD206、Zbed3、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 升高($P<0.05$)。与模型组相比, 高良姜素低剂量组肝癌细胞凋亡率、CD11c、GSK3 β 、Axin 升高, 瘤体体积、CD206、Zbed3、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 降低($P<0.05$)。与高良姜素低剂量组相比, 高良姜素中剂量组大鼠肝癌细胞凋亡率、CD11c、GSK3 β 、Axin 升高, 瘤体体积、CD206、Zbed3、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 降低($P<0.05$)。与高良姜素中剂量组相比, 高良姜素高剂量组大鼠肝癌细胞凋亡率、CD11c、GSK3 β 、Axin 升高, 瘤体体积、CD206、Zbed3、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 降低($P<0.05$)。结论 高良姜素通过调控 Wnt/ β -catenin 通路, 促进巨噬细胞向 M1 型转化并抑制其向 M2 型转化, 降低了 Zbed3 水平从而促进癌细胞凋亡并减小瘤体体积。

【关键词】 高良姜素; 巨噬细胞极化; 肝癌; 大鼠; 瘤体体积; 锌指蛋白 Zbed3

【中图分类号】 R735.7 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2022.07.007

Effect of galangin on apoptosis of rat hepatocellular carcinoma cells induced by macrophage polarization and inhibition of zinc finger protein Zbed3

HU Chunlan¹, ZHOU Long², TIAN Ling², DENG Liyan³

(1. Department of General Practice, Three Gorges Hospital, Chongqing University, Chongqing 500101, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Three Gorges Hospital, Chongqing University, Chongqing 500101, China; 3. Department of Critical Care, Chongqing Wanzhou People's Hospital, Chongqing 404100, China)

【Abstract】 **Objective** This paper investigated the effect of galangin-induced macrophage polarization on tumor volume and zinc finger protein Zbed3 in rats with liver cancer. **Methods** Seventy-four healthy male SD rats aged 6 to 8 weeks with body weight of 250 to 300 g were fed conventionally with free diet and water. The parameters were randomly divided into control group(normal feeding of healthy rats, $n=14$), model group(model rats were reared routinely, $n=13$), low dose of galangin(model+25 mg/kg/d galangin, $n=13$), medium dose group of galangin(model+50 mg/kg/d galangin, $n=13$), high-dose group of galangin(model+100 mg/kg/d galangin, $n=13$). HE staining was used to detect the pathological morphology of liver tissue. Apoptosis of hepatoma cells was detected by TUNEL. Tumor volume was measured with vernier calipers. The expression of CD11c and CD206 was detected by immunohistochemistry. The levels

基金项目:重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0801)

引用本文:胡春兰,周龙,田玲,等.高良姜素通过巨噬细胞极化及抑制锌指蛋白 Zbed3 诱导大鼠肝癌细胞凋亡的研究[J].西部医学,2022,34(7):973-978,984. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2022.07.007

of Zbed3, GSK3 β , Axin, β -catenin, C-myc and cyclin-D1 were detected by Western Blot. **Results** Rats in control group had clear hepatic lobule structure and normal liver cells. The tumor tissue of the model group showed dilatant growth, cancer cells were of different sizes, and the cords of liver cells were extruded and disarranged, with fibrin-like structure. In low, medium and high dose galangin groups, tumor cell space was widened, tumor cells showed swelling and foamy changes to varying degrees, tumor cell nests were infiltrated by a large number of inflammatory cells, and tumor cell necrosis foci of varying degrees were observed in all groups. Compared with control group, CD11c, GSK3 β and Axin in model group were decreased, and CD206, Zbed3, β -catenin, C-YMC and cyclin-D1 were increased ($P < 0.05$). Compared with model group, apoptosis rate, CD11c, GSK3 β and Axin were increased, and tumor volume, CD206, Zbed3, β -catenin, C-YMC and cyclin-D1 were decreased in GF group ($P < 0.05$). Compared with low dose group, apoptosis rate, CD11c, GSK3 β and Axin were increased, and tumor volume, CD206, Zbed3, β -catenin, C-YMC and Presume cyclin-D1 were decreased in medium dose group ($P < 0.05$). Compared with medium dose group, apoptosis rate, CD11c, GSK3 β and Axin were increased in high dose group, and tumor volume, CD206, Zbed3, β -catenin, C-YMC and cyclin-D1 were decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** By regulating the Wnt/ β -catenin pathway, galangin promoted the transformation of macrophages into M1-type and inhibited the transformation of macrophages into M2-type, and reduced the level of Zbed3, thus promoting the apoptosis of cancer cells and reducing the tumor volume.

【Key words】 Galangin; Macrophage polarization; Liver cancer rats; Tumor volume; Zinc finger protein Zbed3

诱发肝癌产生的因素较多,目前尚未完全掌握,但生活中一些因素会增加肝癌的发病率,如肝炎病毒、进食含有黄曲霉毒素的食物、酗酒等^[1]。肝癌早期无特异性特征,随着病情的发展,患者会产生食欲不振、腹痛腹胀、消瘦等。常见的并发症为恶心、意识不清、便秘、晕厥、胆固醇水平升高等^[2]。寻找安全有效、靶点明确、低毒的天然抗肿瘤药物是科学界研究的焦点,从中药中筛选有效的活性物质治疗肝癌是中药发展的中药渠道。高良姜素是天然的黄酮醇类化合物,可从植物高良姜植株的地上部分及根茎和蜂胶中提取得到。研究发现^[3],高良姜素具有镇痛、止呕、抗氧化以及抗肿瘤作用,高良姜素可抑制皮肤癌、骨瘤等癌细胞的增殖、转移并诱导肺癌细胞凋亡。肿瘤微环境与肿瘤的产生与发展联系密切,巨噬细胞在肿瘤微环境中较为重要。肿瘤为逃避巨噬细胞的杀伤作用,迫使其极化状态发生改变,以促进肿瘤发生发展。巨噬细胞极化有两种类型:M1型(杀伤肿瘤)与M2型(促进肿瘤)。可看出,巨噬细胞极化对肿瘤治疗至关重要。涉及巨噬细胞极化的机制也有很多,包括信号转导通路等。Wnt 信号通路的异常与癌细胞生物学行为密切相关,该通路主要由 Axin、GSK3 β 、 β -catenin 等组成,目前已有多项研究表明该通路中的相关因子(Axin、 β -catenin 等)在肝癌的转移、凋亡中具有重要作用^[4]。但影响该通路中因子活性的因素较为复杂,目前尚未完全明确。近年来,相关报道表明^[5],Zbed3(锌指蛋白 3)可与 wnt 号通路中的 Axin 结合,通过抑制 Axin-GSK3 β 复合体功能,阻滞 β -catenin 降解,激活 Wnt/ β -catenin 通路,促进细胞增殖。目前,关于 Zbed3 对人类肿瘤的相关文献较少,

因此本研究探讨高良姜素诱导巨噬细胞极化对肝癌大鼠瘤体体积及锌指蛋白 Zbed3 的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及瘤株 健康 SD 雄性大鼠 74 只,鼠龄 6~8 周,体质量 250~300 g,常规饲养,自由饮食饮水,购自杭州固拓生物公司。合格证号:SCXK(浙)2019-0024。Walker-256 瘤株购自无锡欣润生物公司。本研究经重庆大学附属三峡医院伦理委员会审批(批号:Y2018-009-12)。

1.2 药品及配制 高良姜素购自上海苑试生物公司,在使用时将高良姜素溶解于含 5%吐温 80 的生理盐水中,并稀释成实验所需浓度。

1.3 实验试剂 Zbed3 一抗(上海谷研公司);GSK3 β 、Axin 一抗(武汉菲恩公司); β -catenin、c-myc、cyclin-D1 一抗(贵州平生公司);辣根过氧化物酶二抗(湖北猫尔沃公司);TUNEL 工作液(苏州宇恒公司);戊巴比妥钠(湖北鸿运隆公司)。

1.4 模型建立及分组 取 4 只大鼠,将 Walker-256 瘤株常规复苏、培养扩增、腹水传代,将含肿瘤细胞的腹腔液注射到皮下种植幼鼠的腋下或腹股沟皮下,每个注射点用 0.3~0.5 mL 共注射 15 处。7 d 后处死全部皮下种植鼠,手术切除皮下种植瘤块,挑选出鱼肉状组织,并切成 2 mm³ 大小若干块。置于生理盐水中备用,在 2~3 h 内移植完。取 56 只 SD 大鼠,麻醉后仰位固定,手术区用 75%乙醇消毒。在腹正中皮肤切开 5~10 mm 用显微组织镊子将肝包膜捅一小口,将肿瘤块沿隧道嵌入。移植完毕后检查无渗血逐层缝合腹壁^[6]。移植成功 1 W 后,将未处理的 14 只健康大鼠作为对照组,常规饲养;56 只模型大鼠意外死亡

1 只,建模失败 3 只,剩余 52 只大鼠随机分为模型组(模型大鼠常规饲养)、高良姜素低剂量组(模型+25 mg/kg/d 高良姜素灌胃)、高良姜素中剂量组(模型+50 mg/kg/d 高良姜素灌胃)及高良姜素高剂量组(模型+100 mg/kg/d 高良姜素灌胃),每组 13 只,各组开始治疗时间为移植 1 周后;治疗时间为 28 d,即移植后 35 d。

1.5 检测指标

1.5.1 HE 染色观察各组大鼠病理形态 取各组大鼠戊巴比妥钠麻醉后处死,取出肝脏组织,10%甲醛固定,石蜡包埋,常规制作切片,并进行 HE 染色,最后以中性树胶封片,在偏光显微镜下观察大鼠肝脏组织中的病理改变。

1.5.2 TUNEL 检测肝癌细胞凋亡 取各组大鼠肝癌组织石蜡切片脱蜡,加入 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 不含核酸内切酶的蛋白酶 K,常温孵育 15~30 min, PBS 洗涤后加入 TUNEL 检测液,常温无光孵育 1 h, PBS 清洗,加 50 μL convert-POD,常温无光孵育 0.5 h。PBS 清洗, DAB 液显色,冲洗,苏木素复染,脱水透明,封片。荧光显微镜下观察,并计数其中发荧光的阳性细胞。凋亡率:凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$ 。

1.5.3 各组大鼠瘤体体积检测 治疗结束后,取各组大鼠麻醉后处死,剖腹、暴露肝脏,在手术显微镜下用游标卡尺测定肿瘤最大长径(a)和最短径(b)。

1.5.4 免疫组化检测肿瘤巨噬细胞中 CD11c(M1 型巨噬细胞标志蛋白)、CD206(M2 型巨噬细胞标志蛋白)表达 采用免疫组化 SP 法检测肿瘤相关巨噬细胞标志物(CD11c、CD206)的表达。制作 2 μm 厚度的肝癌石蜡组织连续切片,二甲苯脱蜡并在梯度乙醇中进行水化,之后将组织切片置于 EDTA 抗原修复溶液中进行高压抗原修复,将切片在 3% 过氧化氢中孵育 20 min 阻断内源过氧化物酶活性。孵育一抗,即添加兔抗人多克隆抗体 CD206、CD11c(1:100)。然后 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,用 PBS 溶液冲洗后加入通用型二抗在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 30 min。PBS 洗片后,进行 DAB 显色。终止显色后,苏木精复染、梯度乙醇脱水、透明、封片及镜下观察。免疫组化结果的判定由两名临床经验

丰富的病理科医师双盲下完成。随机选择切片组织上 5 个不重复视野进行免疫组化评分,评分包括染色强度和阳性细胞百分比,染色强度定义如下:棕褐色:3 分、棕黄色:2 分、淡黄色:1 分、着色弱或不着色:0 分,阳性细胞百分比即染色细胞占视野内全部细胞的百分比评分。定义如下: $\leq 5\%$ 为 0 分;6%~25% 为 1 分;26%~50% 为 2 分;51%~75% 为 3 分; >75% 为 4 分。切片最终评分=着色细胞强度评分 \times 阳性细胞百分比评分。最终评分 0 分记为阴性;1~3 分记为弱阳性;4~6 分记为中等强度阳性;400 倍镜下选取 5 处代表性区域,评估其阳性细胞百分比,取平均值,最后大于平均值即定义为高表达,小于平均值定义为低表达。

1.5.5 Western Blot 检测 Zbed3 与 Wnt 通路中 GSK3 β 、Axin、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 水平 取各组大鼠肝组织,蛋白裂解液裂解,匀浆机匀浆,离心后收集上清。测定蛋白浓度。将组织裂解产物进行电泳,硝酸纤维素膜转印,5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 Zbed3、GSK3 β 、Axin、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 一抗(1:500),后加入辣根过氧化物酶二抗(1:1200),杂交冲洗。后将膜浸入 ECL 工作液,随后进行检测,获取图象。蛋白含量通过增强化学发光试剂盒检测并取其与 B-actin 的比值作为蛋白的相对表达量。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析,各组大鼠的肝癌细胞凋亡、瘤体体积、zbed3 等水平比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,计算采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE 染色结果 对照组大鼠肝小叶结构清晰,肝细胞排列有序,形态正常;模型组大鼠瘤组织呈膨胀性生长,癌细胞大小不一,肝细胞索挤压,排列不齐,并可见纤维素样结构;高良姜素低、中、高剂量组大鼠均出现肿瘤细胞间隙增宽,肿瘤细胞出现不同程度的肿胀变性,呈现泡沫状改变,肿瘤细胞巢可见大量炎细胞浸润,各组均可见不同程度的肿瘤细胞坏死灶。见图 1。

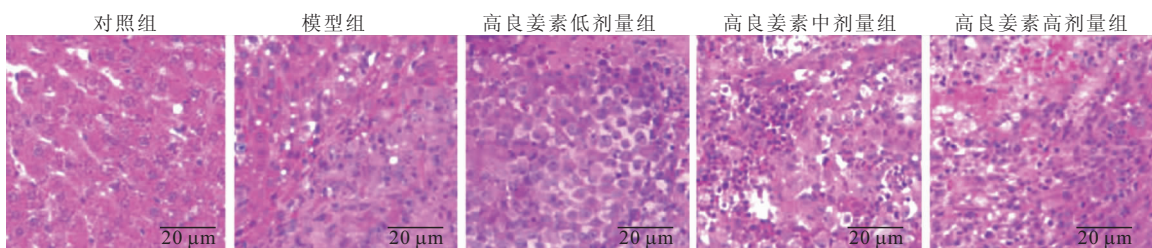


图 1 HE 染色结果(400 \times)

Figure 1 HE staining results

2.2 肝癌细胞凋亡检测结果 对照组大鼠无肝癌细胞;模型组细胞凋亡率(21.32±2.14)%低于高良姜素低剂量组(29.45±3.28)%,差异有统计学意义($t=5.085, P<0.05$);高良姜素低剂量组细胞凋亡率低于

高良姜素中剂量组(36.41±3.17)%,差异有统计学意义($t=3.737, P<0.05$);高良姜素中剂量组细胞凋亡率低于高良姜素高剂量组(47.25±5.31)%,差异有统计学意义($t=4.294, P<0.05$)。见图 2。

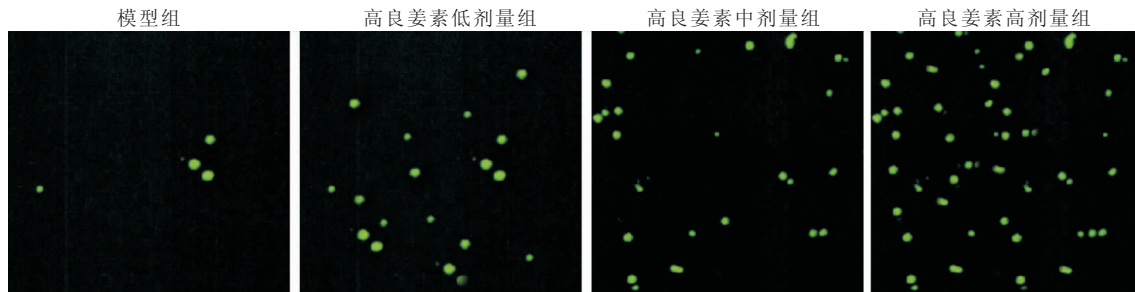


图 2 各组大鼠肝癌细胞凋亡结果(400×)

Figure 2 Apoptosis results of liver cancer cells in each group

2.3 各组大鼠瘤体体积检测结果 对照组大鼠无瘤体,模型组瘤体体积(124.35±13.47)mm³高于高良姜素低剂量组(95.26±8.47)mm³,差异有统计学意义($t=6.841, P<0.001$);高良姜素低剂量组瘤体体积高于高良姜素中剂量组(67.28±5.32)mm³,差异有统计学意义($t=10.470, P<0.001$);高良姜素中剂量组瘤体体积高于高良姜素高剂量组(54.71±5.14)mm³,差异有统计学意义($t=8.838, P<0.001$)。见图 3。

表 1 各组大鼠 CD11c、CD206 水平对比($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Comparison of CD11c and CD206 levels in each group

组别	n	CD11c(%)	CD206(%)
对照组	14	42.38±4.59	6.72±0.81
模型组	13	11.27±1.22 ^①	31.56±4.28 ^①
高良姜素低剂量组	13	18.42±1.65 ^{①②}	24.69±2.73 ^{①②}
高良姜素中剂量组	13	26.37±2.74 ^{①②③}	15.87±1.45 ^{①②③}
高良姜素高剂量组	13	35.61±3.17 ^{①②③④}	10.36±1.24 ^{①②③④}
F		258.200	243.700
P		<0.001	<0.001

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与高良姜素低剂量组比较,③ $P<0.05$;与高良姜素中剂量组比较,④ $P<0.05$

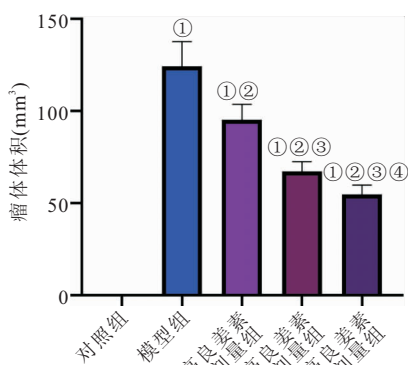


图 3 各组大鼠瘤体体积对比

Figure 3 Comparison of tumor volume in each group

注:与对照组比较,① $P<0.05$;与模型组比较,② $P<0.05$;与高良姜素低剂量组比较,③ $P<0.05$;与高良姜素中剂量组比较,④ $P<0.05$

2.5 Zbed3 与 Wnt 通路中 GSK3 β 、Axin、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 水平检测结果 与对照组相比,模型组大鼠肝组织中 GSK3 β 、Axin 水平降低,Zbed3、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 水平升高(均 $P<0.05$)。与模型组相比,高良姜素低剂量组 GSK3 β 、Axin 水平升高,Zbed3、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 水平降低(均 $P<0.05$)。与高良姜素低剂量组相比,高良姜素中剂量组 GSK3 β 、Axin 水平升高,Zbed3、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 水平降低(均 $P<0.05$)。与高良姜素中剂量组相比,高良姜素高剂量组 GSK3 β 、Axin 水平升高,Zbed3、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 水平降低(均 $P<0.05$)。见表 2、图 5。

2.4 CD11c、CD206 检测结果 与对照组相比,模型组大鼠肝癌组织中 CD11c 阳性率降低、CD206 升高(均 $P<0.05$)。与模型组相比,高良姜素低剂量组 CD11c 升高、CD206 降低(均 $P<0.05$)。与高良姜素低剂量组相比,高良姜素中剂量组 CD11c 升高、CD206 降低(均 $P<0.05$)。与高良姜素中剂量组相比,高良姜素高剂量组 CD11c 升高、CD206 降低(均 $P<0.05$)。见表 1、图 4。

3 讨论

肝癌是我国最常见的肿瘤之一,根据国家癌症中心发布的数据,2018 年预估新发病例近 50 万人,死亡人数 43 万,发病后死亡比例较高^[7]。本研究运用高良姜素治疗肝癌大鼠,探讨对巨噬细胞极化以及瘤体体积、锌指蛋白 Zbed3 的影响。

近年来,炎症在肿瘤中扮演越来越重要的角色,肿瘤免疫微环境在肿瘤发生发展中的作用成为近些

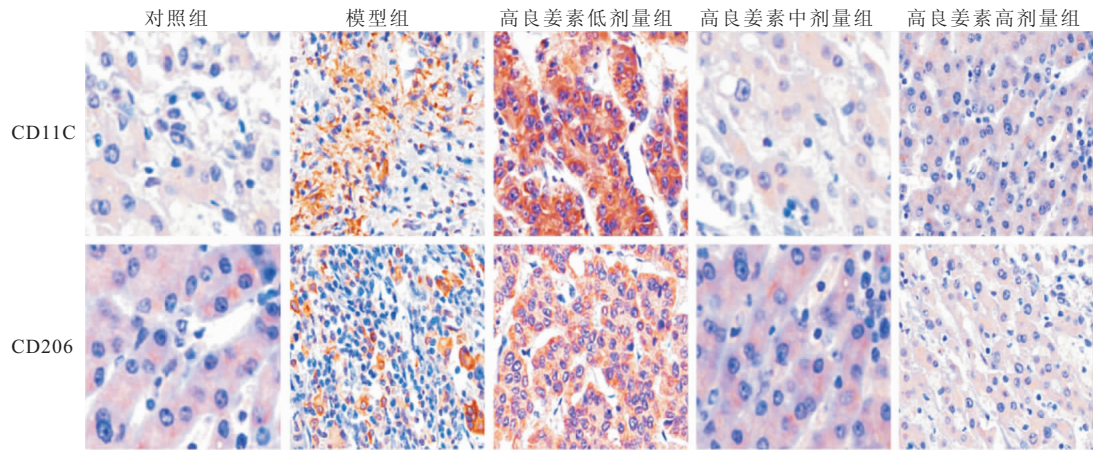


图 4 CD11c、CD206 水平对比

Figure 4 Comparison of CD11c and CD206 levels

注:对照组、高良姜素低剂量组、高良姜素中剂量组、高良姜素高剂量组, 400×, 25 μm; 模型组, 200×, 50 μm

表 2 各组下列指标水平对比($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the levels of the following indicators in each group

组别	n	Zbed3	GSK3β	Axin	β-catenin	c-myc	cyclin-D1
对照组	14	1.05±0.08	2.72±0.05	2.04±0.05	1.12±0.07	1.08±0.04	1.01±0.02
模型组	13	2.82±0.37 ^①	0.45±0.06 ^①	0.38±0.04 ^①	3.16±0.42 ^①	3.05±0.31 ^①	2.94±0.27 ^①
高良姜素低剂量组	13	2.37±0.22 ^{①②}	1.38±0.12 ^{①②}	0.82±0.07 ^{①②}	2.64±0.19 ^{①②}	2.57±0.24 ^{①②}	2.43±0.09 ^{①②}
高良姜素中剂量组	13	1.86±0.13 ^{①②③}	2.04±0.27 ^{①②③}	1.43±0.11 ^{①②③}	1.87±0.08 ^{①②③}	1.94±0.15 ^{①②③}	1.84±0.07 ^{①②③}
高良姜素高剂量组	13	1.14±0.19 ^{①②③④}	2.54±0.13 ^{①②③④}	1.91±0.08 ^{①②③④}	1.26±0.13 ^{①②③④}	1.22±0.08 ^{①②③④}	1.24±0.05 ^{①②③④}
F		168.500	546.900	1280.000	224.900	273.800	511.100
P		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与对照组比较,①P<0.05;与模型组比较,②P<0.05;与高良姜素低剂量组比较,③P<0.05;与高良姜素中剂量组比较,④P<0.05

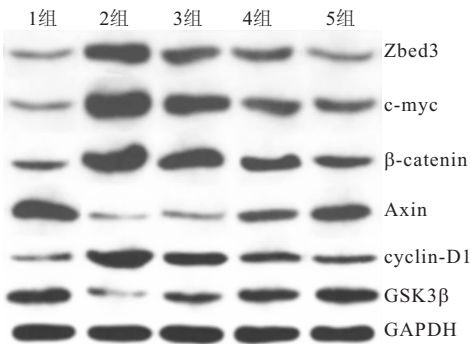


图 5 各组蛋白水平比较

Figure 5 Comparison of protein levels in each group

注:1组.对照组;2组.模型组;3组.高良姜素低剂量组;4组.高良姜素中剂量组;5组.高良姜素高剂量组

年来肿瘤研究的热点。巨噬细胞在肿瘤细胞中至关重要,包含两个表型,M1型巨噬细胞可抑制癌细胞增殖并促进其凋亡、提高机体免疫能力,M2型可以分泌细胞因子转化生长因子-β,白介素 1β 等降低机体的免疫功能促进肿瘤的生长,直接或间接地促进血管生成和肿瘤转移^[8-9]。研究发现在胶质瘤^[10]、胰腺癌^[11]等恶性肿瘤中,M2型巨噬细胞提示患者预后不良。高良姜素具有镇痛、抗氧化,抗肿瘤等作用,且已有研究

证实其在肝癌^[12]、肺癌^[13]、胃癌^[14]、乳腺癌^[15]等肿瘤中均可促进细胞凋亡。本文研究发现,在肝癌中,M1型巨噬细胞标志蛋白 CD11c 表达低于健康大鼠,M2型巨噬细胞标志蛋白 CD206 表达高于健康大鼠,且呈现出明显的剂量依赖性。且本文 TUNEL 检测结果提示,在经过高良姜素干预后,癌细胞凋亡增加。TUNEL 的原理是利用细胞的凋亡使在细胞内外各种诱导凋亡因素的作用下,经一系列胞内信号转导系统激活内源性核酸内切酶,该酶切开 DNA 而形成 180-200bp 或其整倍数的寡核苷酸片段,暴露出的 3'羟基在末端转移酶(TDT)的作用下与生物素标记的核苷酸结合,最终借助抗生物素抗体结合的过氧化物酶,使凋亡细胞被特异性地标记和显示出来。谢昌利等^[16]在对肝癌的实验中提出,M1型巨噬细胞可促进癌细胞的凋亡,在经过干扰 IRF1 后,促进了 M1型巨噬细胞向 M2型转化,促进了癌细胞的增殖。在石旭等^[17]对肝癌的实验中提出,高表达的 hnRNP L 可促进 M2型巨噬细胞标志蛋白 CD206 的表达,从而促进肝癌发展。汪俊剑等^[18]在对肺癌细胞的研究中提出,高良姜素可通过阻滞细胞周期进程,降低线粒体膜电位,打破细胞内钙离子稳态来诱导肺癌细胞凋亡。本

研究与上述研究结果相似,因此本文推测,高良姜素可能是通过提高 CD11c 表达,促进巨噬细胞向 M1 型转化,通过抑制 CD206 表达,阻滞巨噬细胞向 M2 型转化,从而促进癌细胞凋亡,抑制增殖。且本文中 HE 染色结果也表明在经过高良姜素干预后肿瘤细胞出现病死灶。

相关研究表明^[19], Zbed3 在肺癌中高表达,并与肿瘤淋巴结转移相关,影响患者的预后,提示其可能是维持肺癌恶性表型的分子,可能成为临床治疗靶点。Wnt 信号通路的异常与肿瘤产生、发展密切相关。目前,已有研究证实^[20], Zbed3 可通过抑制小鼠胚胎成纤维细胞中的 Axin-GSK3 β 复合体功能,阻滞 β -catenin 降解,使得 Wnt 通路激活后促进细胞增殖。另有研究发现^[21],抑制 Zbed3 水平后,肺癌细胞的增殖、侵袭能力下降,提示其参与肿瘤的预后。在肺癌中,降低 Zbed3 水平后 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 表达降低,提示可能是癌细胞增殖能力下降的原因。相关研究提出^[22], Zbed3 可能为调节 Wnt 通路中关键分子 β -catenin 及下游靶基因的重要分子,从而影响癌细胞的增殖及侵袭,促进肺癌的恶性表型及患者预后。近年来,多项研究表明,高良姜素通过调控 Wnt/ β -catenin 通路可调控癌细胞的生物学行为^[23]。在李永峰等^[24]对乳腺癌细胞的研究中提出,高良姜素通过调控 Wnt/ β -catenin 通路,促进乳腺癌细胞凋亡。经本文研究发现,与肝癌大鼠相比,在经过高良姜素干预后,GSK3 β 、Axin 水平升高,Zbed3、 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 水平降低,且呈现出剂量依赖性。范垂锋^[25]在对肺癌的研究中提出,抑制 Zbed3 表达后,通过促进 Axin-GSK313 复合体的功能后,降低了 β -catenin、c-myc、cyclin-D1 水平,从而抑制了肺癌细胞的增殖并促进了凋亡。刘明江等^[26]在研究中提出,通过提高 GSK3 β 水平后可激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,促进巨噬细胞向 M1 型分化,从而抑制肝癌细胞的增殖并促进凋亡。本文研究结果与上述研究结果相似,因此本文认为,高良姜素可能是通过调控 Wnt/ β -catenin 通路,从而促使了巨噬细胞向 M1 型转化,促进癌细胞凋亡,降低了 Zbed3 的表达。且本文瘤体体积检测结果也表明在经过高良姜素的治疗后,体积减小。

4 结论

高良姜素通过调控 Wnt/ β -catenin 通路,促进巨噬细胞向 M1 型转化并抑制其向 M2 型转化,降低了 Zbed3 水平从而促进癌细胞凋亡并减小瘤体体积。

【参考文献】

- [1] SINGH G, HOSSAIN M M, BHAT A Q, *et al.* Identification of a cross-talk between EGFR and Wnt/ β -catenin signaling pathways in HepG2 liver cancer cells[J]. *Cell Signal*, 2021, 79: 109885.
- [2] 郭瑛,李君,李宗芳,等. 人肝癌细胞系中 miR-20a-5p 的表达及对肝癌细胞 Bel-7402 增殖及凋亡的影响[J]. *西部医学*, 2019, 31(1):7-12.
- [3] BAI H W, YANG C, WANG P, *et al.* Inhibition of cyclooxygenase by blocking the reducing cosubstrate at the peroxidase site: Discovery of galangin as a novel cyclooxygenase inhibitor[J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 899(12): 174036.
- [4] SATELLI A, HU J, XIA X, *et al.* Potential Function of Exogenous Vimentin on the Activation of Wnt Signaling Pathway in Cancer Cells[J]. *J Cancer*, 2016, 7(13): 1824-1832.
- [5] HINDY G, MOLLET I G, RUKH G, *et al.* Several type 2 diabetes-associated variants in genes annotated to WNT signaling interact with dietary fiber in relation to incidence of type 2 diabetes[J]. *Genes Nutr*, 2016, 11:6.
- [6] 陈越,蒋霆辉,刘艳,等. 姜黄素对肝癌大鼠碘油栓塞后信号传导与转录激活因子 3 及其磷酸化形式表达的影响[J]. *介入放射学杂志*, 2016, 25(10):911-915.
- [7] 樊嘉,史颖弘,田孟鑫. 肝癌肝移植术后肿瘤复发的防治策略[J]. *中华消化外科杂志*, 2019, 18(1):20-23.
- [8] 魏芳,宗世焯,周静,等. 肿瘤相关巨噬细胞通过诱导肝癌细胞自噬降低索拉菲尼的促凋亡作用[J]. *南方医科大学学报*, 2019, 39(3):264-270.
- [9] 严瑞明,王薇. 肿瘤相关巨噬细胞研究进展[J]. *西部医学*, 2018, 30(9):1387-1389,1396.
- [10] ZHANG H, LUO Y B, WU W, *et al.* The molecular feature of macrophages in tumor immune microenvironment of glioma patients[J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2021, 19:4603-4618.
- [11] BULLE A, DEKERVEL J, DESCHUTTERE L, *et al.* Gemcitabine Recruits M2-Type Tumor-Associated Macrophages into the Stroma of Pancreatic Cancer[J]. *Transl Oncol*, 2020, 13(3): 100743.
- [12] 李程,张惠文,容鹏飞. 高良姜素对肝癌细胞抑制作用的机制[J]. *临床肝胆病杂志*, 2020, 36(8):1862-1865.
- [13] 杨琼,柴海勇,郭丽,等. 高良姜素对非小细胞肺癌 A549 细胞 SIRT1/mTOR 通路及放射敏感性的影响[J]. *中国药师*, 2021, 24(8):414-418,427.
- [14] 贺文煜,张海明,袁昌劲. 高良姜素通过 PI3K/Akt 及 p38-MAPK 信号通路增强胃癌 SGC-7901 细胞对阿帕替尼的敏感性[J]. *天津医药*, 2019, 47(10):1020-1025.
- [15] 罗焱,尤朋涛,杨敏,等. 高良姜素诱导人乳腺癌细胞 MCF-7 凋亡的研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2017, 28(2):151-154.
- [16] 谢昌利,刘翠颖,林艳,等. IRF1 对 M1 巨噬细胞极化及其抗肿瘤效应的影响[J]. *基础医学与临床*, 2017, 37(2):189-196.
- [17] 石旭,葛勇胜,莢卫东,等. hnRNP L 在肝癌中的表达及与巨噬细胞极化相关性研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2019, 54(10): 1601-1606.
- [18] 汪俊剑,黄少祥. 高良姜素抑制肺癌细胞 A549 增殖和侵袭的作用和机制[J]. *天津医药*, 2017, 45(11):1179-1182.

- the rabbit VX2 model of liver cancer: a pictorial primer and "how to" guide[J]. *Diagn Interv Radiol*, 2014, 20(4): 335-340.
- [5] KHABBAZ R C, HUANG Y H, SMITH A A, *et al.* Development and Angiographic Use of the Rabbit VX2 Model for Liver Cancer[J]. *J Vis Exp*, 2019,(143). doi: 10.3791/58600.
- [6] 唐恩奇,李滨,蒋欢欢,等. 构造肝癌动物模型的研究进展[J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2016, 25(8): 857-859.
- [7] ZHANG H E, HENDERSON J M, GORRELL M D, *et al.* Animal models for hepatocellular carcinoma[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(5): 993-1002.
- [8] TONG H, DUAN L G, ZHOU H Y, *et al.* Modification of the method to establish a hepatic VX2 carcinoma model in rabbits[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4): 5333-5338.
- [9] 邱世香,赵茂林,胡文,等. 臭氧治疗肿瘤的研究进展[J]. *西部医学*, 2019, 31(12): 1966-1968, 1981.
- [10] LI J L, YE W T, LIU Z Y, *et al.* Comparison of microvascular perfusion evaluation among IVIM-DWI, CT perfusion imaging and histological microvessel density in rabbit liver VX2 tumors[J]. *Magn Reson Imaging*, 2018, 46: 64-69.
- [11] 张贵祥,孙诚,魏梦绮,等. 介绍兔 VX2 转移瘤动物模型[J]. *实用放射学杂志*, 1998, 14(2): 59.
- [12] 孙一欣,程文,王宽全,等. 兔 VX2 肝癌模型制作的三种方法及其超声评价[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(12): 2812-2815.
- [13] 吴海东,张春堂,王建华,等. 两种不同方式建立兔小肝癌模型比较研究[J]. *医学影像学杂志*, 2019, 29(7): 1217-1220.
- [14] 李铁汉,梁红敏,何利平,等. 三种不同方法建立兔肝 VX2 肿瘤模型的实验研究[J]. *昆明医学院学报*, 2010, 31(2): 3-7.
- [15] DOEMEL L A, SANTANA J G, SAVIC L J, *et al.* Comparison of metabolic and immunologic responses to transarterial chemoembolization with different chemoembolic regimens in a rabbit VX2 liver tumor model[J]. *Eur Radiol*, 2022, 32(4): 2437-2447.
- [16] BERZ A M, SANTANA J G, ISEKE S, *et al.* Impact of Chemo-Embolic Regimen on Immune Cell Recruitment and Immune Checkpoint Marker Expression following Transcatheter Arterial Chemoembolization in a VX2 Rabbit Liver Tumor Model[J]. *J Vasc Interv Radiol*, 2022, 26: S1051-0443(22)00155-5.
- [17] VAN BREUGEL J M M, GESCHWIND J F, MIRPOUR S, *et al.* Theranostic application of lipiodol for transarterial chemoembolization in a VX2 rabbit liver tumor model[J]. *Theranostics*, 2019, 9(13): 3674-3686.
- [18] MURAI K, HAMAMOTO S, OKUMA T, *et al.* Survival Benefit of Radiofrequency Ablation with Intratumoral Cisplatin Administration in a Rabbit VX2 Lung Tumor Model[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2021, 44(3): 475-481.
- [19] YI H M, CAO B H, AI X, *et al.* Establishment of Rabbit Liver VX2 Tumor Model Using Percutaneous Puncture Inoculation of Tumor Fragment Guided and Evaluated by Ultrasonography[J]. *Curr Med Sci*, 2019, 39(5): 820-824.
- [20] 曾功君,高云华,刘政,等. 三种兔肾 VX2 肿瘤模型制作方法的比较[J]. *西部医学*, 2004, 16(4): 296-298.
- [21] 贾洪顺,全显跃. 改进兔肝动脉插管术: 肝血管影像研究[J]. *放射学实践*, 2002, 17(4): 324-326.
- [22] 马明平,胡道予,周义成,等. 兔肝癌模型制作及介入治疗的实验研究[J]. *放射学实践*, 2000, 15(6): 384-386.
- [23] MOROZ P, JONES S K, GRAY B N. Tumor response to arterial embolization hyperthermia and direct injection hyperthermia in a rabbit liver tumor model[J]. *J Surg Onco*, 2002, 80(3): 149-156.

(收稿日期: 2021-04-01; 修回日期 2022-04-17; 编辑: 刘灵敏)

(上接第 978 页)

- [19] FU A, YU Z, ZHANG E, *et al.* Long noncoding RNA ZBED3-AS1 restrains breast cancer progression by targeting the microRNA-513a-5p/KLF6 axis[J]. *Thoracic Cancer*, 2021, 12(20): 2719-2731.
- [20] RUAN X, LIU G, ZHOU J, *et al.* Zbed3 Is Indispensable for Wnt Signaling Regulation of Cortical Layers Formation in Developing Brain[J]. *Cereb Cortex*, 2021, 31(9): 4078-4091.
- [21] LIU H, SHI X, FAN X, *et al.* The function of BED finger domain of Zbed3 in regulating lung cancer cell proliferation; LIU *et al* [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2019, 120(8): 12340-12347.
- [22] SHI X, ZHAO Y, FAN C. Zbed3 promotes proliferation and invasion of lung cancer partly through regulating the function of Axin-Gsk3 β complex[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(2): 1014-1021.
- [23] 陈亚辉. 高良姜提取物抑制氧化应激引起的成骨细胞损伤和凋亡的作用研究[D]. 广东: 广东医学院, 2015.
- [24] 李永峰,钱祥,石磊,等. 高良姜素对乳腺癌细胞 MCF-7 增殖及迁移的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2020, 36(20): 109-111, 116.
- [25] 范垂锋. Zbed3 及 Btd7 分别通过 β -catenin 和 E-cadherin 影响非小细胞肺癌的生物学行为[D]. 沈阳: 中国医科大学, 2013.
- [26] 刘明江,叶雨辰,秦鸿雁. 巨噬细胞与 Wnt 通路在肿瘤发生发展中的作用[J]. *生命的化学*, 2017, 37(5): 719-725.

(收稿日期: 2021-07-21; 修回日期: 2022-04-27; 编辑: 刘灵敏)