·重大新药创制专项巡礼·

马兜铃酸 I 致 C3H/HeN 乳鼠肝癌及机制探索

王　婷[1],吴文晓[1,2],林　志[1],王　超[1],杨艳伟[1],苗玉发[1],耿兴超[1],李　波[3]
(1 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心,北京 100176;2 中国医学科学院北京协和医学院,北京 100005;3 中国食品药品检定研究院,北京 100050)

[摘要] **目的:**探索马兜铃酸 I(aristolochic acid I,AAI)对 2 周龄 C3H/HeN 乳鼠的潜在致肝癌作用及其可能的作用机制。**方法:**将 2 周龄的 C3H/HeN 乳鼠雌雄各半随机分为 3 组,溶媒对照组(0.5% CMC-Na),阳性剂对照组(DEN 20 mg·kg^{-1})和 AAI 组(AAI 10 mg·kg^{-1})。单次给药后观察 9 个月,取各脏器进行大体病理学和组织病理学检查,同时检测小鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)等血清生化指标水平和甲胎蛋白(AFP)含量,肝脏中白细胞介素 IL-1β 和 IL-6 含量,Ki67 蛋白和细胞角质蛋白 19(CK19)的表达,NFκB P65,Ras/Raf,Caspase-3 等蛋白表达水平。**结果:**在本实验条件下,单次灌胃给予 AAI 可导致 C3H/HeN 乳鼠发生肝癌,雄性、雌性小鼠肝癌的发生率分别为 78.57% 和 41.67%。与溶媒对照组相比,AAI 组小鼠体内 ALT,AST,AFP,IL-1β 和 IL-6 水平显著升高,肝脏 Ki67 和 CK19 表达呈阳性,NFκB P65,P-AKT,Ras,C-Jun,C-Fos,C-MYC 和 Bcl-2 表达显著升高,IKBα,Bax 和 Caspase-3 表达显著降低。**结论:**本实验条件下,AAI 可以引起 2 周龄 C3H/HeN 乳鼠发生肝脏肿瘤,其机制可能与激活肝细胞内 PI3K/AKT 炎症通路、Ras/AP1/C-MYC 促增殖通路和抑制 Bax/Bcl-2/Caspase-3 线粒体凋亡通路有关。

[关键词] 马兜铃酸 I;肝癌;C3H/HeN 乳鼠
[中图分类号] R965.1;R975.5　[文献标志码] A　[文章编号] 1003－3734(2021)13－1168－08

The hepatocarcinogenic effects of aristolochic acid I and associated mechanisms in C3H/HeN suckling mice

WANG Ting[1], WU Wen-xiao[1,2], LIN Zhi[1], WANG Chao[1], YANG Yan-wei[1], MIAO Yu-fa[1], GENG Xing-chao[1], LI Bo[3]
(1 *National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing* 100176, *China*; 2 *Peking Union Medical College, Beijing* 100005, *China*; 3 *National Institutes for Food and Drug Control, Beijing* 100050, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To explore the potential hepatocarcinogenic effect of aristolochic acid I (AAI) on 2-week-old C3H/HeN suckling mice and its possible mechanism. **Methods**: Two-week-old C3H/HeN suckling mice were randomly divided into 3 groups, i.e., the vehicle control group (0.5% CMC-Na), the liver cancer positive agent model group (DEN 20 mg·kg^{-1}) and the AAI group (AAI 10 mg·kg^{-1}). After 9 months of observation after a single administration, the organs were taken for gross pathological and histopathological examination, and the levels of serum biochemical indicators such as ALT, AST and AFP in mice were detected. At the same time, the contents

[基金项目] 国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2018ZX09101002-002-002)
[作者简介] 王婷,女,硕士研究生,研究方向:药物临床前安全性评价。联系电话:(010)67872233,E-mail:15011437476@163.com。
[通讯作者] 李波,男,研究员,博士生导师,研究方向:药物临床前安全性评价。联系电话:(010)67095790,E-mail:libo@nifdc.org.cn。耿兴超,男,研究员,研究方向:药物临床前安全性评价。联系电话:(010)67872233,E-mail:gengxch@nifdc.org.cn。

of IL-1β and IL-6, the expression of Ki67, CK19, NF-κB P65, Ras, Raf, and caspase-3 in mouse liver were detected. **Results**: In this experiment, AAI caused liver cancer in C3H/HeN suckling mice. The incidence of liver cancer in male and female mice were 78.57% and 41.67%, respectively. Compared with the vehicle control group, the levels of ALT, AST, AFP, IL-1β and IL-6 in the AAI group were significantly increased, and the expression of Ki67 and CK19 in liver were positive. The results of Western blot showed that AAI significantly increased the expression of NF-κB P65, P-AKT, Ras, C-Jun, C-Fos, C-MYC and Bcl-2, and significantly decreased the expression of IKBα, Bax and Caspase-3. **Conclusion**: In this experiment, AAI caused liver cancer in 2-week-old C3H/HeN suckling mice. The mechanism may be related to the activation of PI3K/AKT inflammatory pathway in hepatocytes, Ras/AP1/C-MYC proliferation pathway and the inhibition of Bax/Bcl-2/Caspase-3 Mitochondrial apoptosis pathway.

[**Key words**] aristolochic acid I; liver cancer; C3H/HeN suckling mice

马兜铃酸(aristolochic acids, AAs)是一类硝基菲羧酸类化合物,也被称为马兜铃总酸,广泛存在于马兜铃科植物中,其中含量较高的有关木通、广防己和青木香等,AAs 的主要成分包括马兜铃酸 I(aristolochic acids I, AAI)和马兜铃酸 II(aristolochic acids II, AAII)等[1]。2017 年 10 月,新加坡杜克-新加坡大学医学院和台湾桃园长庚纪念医院联合发表论文[2]报道 AAs 诱发肝癌的发生率与该地域马兜铃属及相关植物使用具有高度一致性,提示 AAs 与肝癌发生之间可能有高度相关性。

我国是中草药使用大国,含有 AAs 的中草药众多,目前使用中的含有 AAs 的药材有 24 种,已上市含有 AAs 的中成药有 47 种。且我国是肝癌高发地区,在我国所有恶性肿瘤中,肝癌发病率居第 4 位,病死率高居第 2 位[3]。如果"肝癌发生与 AAs 暴露相关"观点成立,那么长期接触使用含有 AAs 的中草药,可能是我国除了乙型肝炎病毒感染外另一个肝癌诱发因素。因此,明确 AAs 能否导致肝癌非常重要,这不仅意味着对我国肝癌诱因传统认知的改变,同时也可能促使我国的肝癌防治策略发生调整。

本研究使用 2 周龄 C3H/HeN 乳鼠单次灌胃(*ig*)给予 AAI 开展 9 个月致癌实验,确定 AAI 是否具有潜在致肝癌作用并对其作用机制进行初步探索,以期为后续 AAs 与肝癌相关性研究奠定实验基础,为含 AAs 相关中药制剂的安全监管和风险控制提供实验依据。

材料与方法

1 药物与试剂

AAI(百灵威科技,批号:597712,规格:500 mg,纯度:>95%);二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN,百灵威科技,批号:SY053647,规格:25 mL);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,Sigma 公司,批号:SLBQ8545V);AFP 检测试剂盒(R&D 公司,批号:MAFP00);Luminex 高通量试剂盒(Merck Millipore 公司,批号:RECYTMAG-65K-2);Anti-GAPDH(批号:GB11002)、Anti-C-Fos(批号:GB12069),Anti-C-JUN(批号:GB111604),Anti-Bax(批号:GB11690)等抗体购自武汉赛维尔生物科技有限公司;Anti-Ras(批号:ab52939)、Anti-NFκB P65(批号:ab16502)、Anti-Bcl-2(批号:ab196495)、Anti-Caspase-3(批号:ab13847)、Anti-Caspase-8(批号:ab25901)、山羊抗兔 IgG H&L(HRP,批号:ab205718)及山羊抗小鼠 IgG H&L(HRP,批号:ab6789)等抗体购自 Abcam 公司。

2 仪器

7180 型全自动生化分析仪(日本日立公司);MultiSkan3 型酶标仪(Thermo 公司);Bio-plex 200 系统(美国 Bio-Rad 公司);Luminex® 200 (美国 Luminex 公司);H&E 染色相关设备(日本樱花检验仪器株式会社);电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);电泳槽(Cavoy 公司)。

3 实验动物

从北京维通利华实 验动物技术有限公司购买 6~7 周龄 C3H/HeN 成年鼠 40 只(雌雄各半),使用繁殖生产的 2 周龄乳鼠进行实验。研究方案经动物伦理委员会审核批准。

4 分组及给药

实验共使用 87 只 2 周龄 C3H/HeN 乳鼠(雄性 42 只/雌性 45 只)随机分 3 组(不同窝乳鼠之间混合分组):溶媒对照组(0.5% CMC-Na,雄性 13 只/

雌性 15 只),阳性剂对照组(DEN 20 mg·kg^{-1},雄性 14 只/雌性 15 只)和 AAI 组(AAI 10 mg·kg^{-1},雄性 15 只/雌性 15 只)。在 2 周龄时单次 *ig* 给药,观察 9 个月后对各组动物进行解剖、采血,通过大体剖检、脏器重量、脏器系数、血清生化检查和主要脏器(心、肝、脾、肺、肾、胃、膀胱、肠道、胸腺、乳腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢、胰腺、腹膜、耳道、肿物及病变部位)组织病理学检查对 AAI 潜在致肝癌性进行评价。

5 血清生化检测

用全自动生化分析仪 7180 对小鼠血清进行血清生化检查,检查指标包括血清谷草转氨酶(alanine aminotransferase,AST)、谷丙转氨酶(aspartate aminotransferase,ALT)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)、γ 谷氨酰转肽酶(γ-glutamyl transpeptidase,GGT)、胆固醇(cholesterol,CHO)、三酰甘油(triglyceride,TG)、总胆红素(total bilirubin,TBIL)、尿素氮(urea nitrogen,UREA)和肌酐(creatinine,CRE)等。

6 血清甲胎蛋白(alpha fetoprotein,AFP)含量检测

使用酶联免疫法(ELISA)检测血清中 AFP 含量,按照仪器和试剂盒说明书执行检测操作。

7 组织病理学检查

将各组被检脏器放入 10% 的甲醛进行固定,依次进行脱水、透明、渗透、包埋、修块、切片、HE 染色和封片等操作,最后在光镜下进行组织病理学检查。

8 肝脏中细胞因子白细胞介素(IL)-1β 和 IL-6 检测

使用 Luminex 高通量试剂盒检测小鼠肝脏组织中 IL-1β 和 IL-6 的浓度。

9 免疫组化检测 CK19 和 Ki67 蛋白表达

将“**7 组织病理学检查**”制备好的石蜡切片,依次进行脱蜡复水、抗原修复、灭活过氧化氢酶、羊血清封闭等过程,孵育一抗(CK19 和 Ki67),4 ℃孵育过夜,孵育二抗并进行显色,在光镜下观察。

10 Western Blot 检测 NFκB P65,Ras 和 Caspase-3 相关蛋白表达

取小鼠肝脏组织匀浆上清制备样品。通过电泳、电转等过程将目的蛋白转移到 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭后加入相应一抗 4 ℃孵育过夜,洗膜后加入相应二抗室温孵育 2 h,洗膜后显影。使用 Image J 软件测定条带灰度值,以目的条带和内参比值用于统计分析。

11 统计分析

所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 GraphPad Prism 5 软件进行统计。两组间比较采用 T 检验,Fisher 确切概率法单侧检验统计小鼠肝癌发生率与 AAI 相关性,$P<0.05$ 表明具有统计学意义上的显著性差异。

结 果

1 临床症状观察

给药 3d 后 AAI 组雄性小鼠死亡 1 只,雌性小鼠死亡 3 只;给药 8 个月后该组雄性小鼠陆续死亡 2 只,其余小鼠未见异常。

2 血清生化检测

如表 1 所示,与溶媒对照组相比 DEN 组小鼠血清 ALT,AST,ALP 和 CHO 显著升高,AAI 组小鼠血清 ALT,AST,CHO 和 CRE 显著升高,其余指标未见异常。

表 1 单次 *ig* 给予 C3H/HeN 乳鼠 AAI 9 个月后血清生化结果 $\bar{x} \pm s, n = 12 \sim 14$

性别	组别	AST/U·L^{-1}	ALT/U·L^{-1}	ALP/U·L^{-1}	CRE/μmol·L^{-1}	CHO/mmol·L^{-1}
雄性	0.5% CMC-Na	49.00 ± 6.04	21.17 ± 2.29	56.75 ± 3.68	7.00 ± 0.75	3.66 ± 0.16
	DEN 20 mg·kg^{-1}	107.54 ± 18.29^{b}	109.92 ± 22.68^{b}	124.00 ± 30.78^{a}	7.54 ± 0.67	8.50 ± 1.06^{b}
	AAI 10 mg·kg^{-1}	80.75 ± 23.31^{b}	64.92 ± 18.74^{b}	57.92 ± 16.72	9.75 ± 2.82^{a}	7.48 ± 2.16^{b}
雌性	0.5% CMC-Na	83.27 ± 8.73	33.40 ± 3.36	3.20 ± 0.20	7.80 ± 0.68	2.59 ± 0.08
	DEN 20 mg·kg^{-1}	108.29 ± 39.47^{b}	48.00 ± 15.16^{a}	3.18 ± 0.17	10.00 ± 0.69	2.85 ± 0.07
	AAI 10 mg·kg^{-1}	67.17 ± 8.52^{b}	62.25 ± 4.69^{b}	2.89 ± 0.82	8.14 ± 1.11	6.00 ± 0.15^{b}

与溶媒对照组相比,a:$P<0.05$,b:$P<0.01$

3 血清 AFP 含量

如表 2 所示,与溶媒对照组相比,DEN 组和 AAI 组雄性和雌性小鼠血清 AFP 含量均显著升高。

表 2 单次 *ig* 给予 C3H/HeN 乳鼠 AAI 9 个月后血清 AFP 含量 $\bar{x} \pm s, n = 5$

性别	组别	AFP 浓度/ng·mL^{-1}
雄性	0.5% CMC-Na	2.78 ± 0.38
	DEN 20 mg·kg^{-1}	5.15 ± 0.97[b]
	AAI 10 mg·kg^{-1}	5.34 ± 1.84[b]
雌性	0.5% CMC-Na	2.82 ± 0.47
	DEN 20 mg·kg^{-1}	4.05 ± 1.24[a]
	AAI 10 mg·kg^{-1}	3.84 ± 1.39[a]

与溶媒对照组相比，a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$

4 脏器重量和脏器系数

实验结束对各脏器称重并计算脏器系数。与溶媒对照组相比 AAI 组小鼠肾脏重量均显著降低（$P < 0.05$），但肾脏脏器系数未见显著性差异。AAI 组仅雄性小鼠肝脏重量显著升高（$P < 0.05$）。其余被检脏器重量和脏器系数未见明显变化，具体结果见表 3。

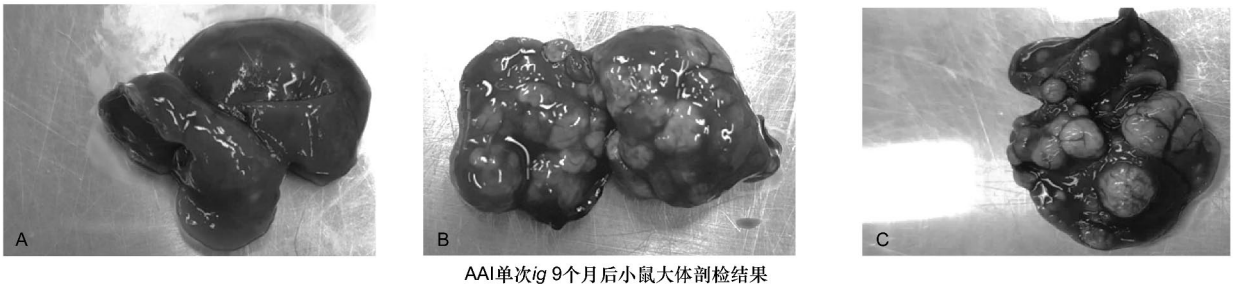
表 3 单次经口 *ig* 给予 C3H/HeN 乳鼠 AAI 9 个月后小鼠脏器重量和脏器系数 $\bar{x} \pm s, n = 12 \sim 14$

性别	脏器	脏器重量/g			脏器系数/%		
		0.5% CMC-Na	DEN 20 mg·kg^{-1}	AAI 10 mg·kg^{-1}	0.5% CMC-Na	DEN 20 mg·kg^{-1}	AAI 10 mg·kg^{-1}
雄性	肝脏	1.26 ± 0.06	2.91 ± 0.33[b]	2.04 ± 0.33[a]	3.59 ± 0.08	8.61 ± 1.02	6.19 ± 1.00
	肾脏	0.61 ± 0.02	0.57 ± 0.03	0.50 ± 0.02[a]	1.74 ± 0.05	1.69 ± 0.10	1.51 ± 0.07
	心脏	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.55 ± 0.08	0.52 ± 0.02	0.49 ± 0.01
	脾脏	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.01[a]	0.09 ± 0.01	0.23 ± 0.01	0.34 ± 0.03	0.26 ± 0.02
	肺	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.59 ± 0.03	0.61 ± 0.03	0.61 ± 0.04
	胃	0.26 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.26 ± 0.01	0.75 ± 0.03	0.89 ± 0.06	0.79 ± 0.02
	膀胱	0.06 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.20 ± 0.08	0.12 ± 0.02	0.14 ± 0.01
	胰腺	0.19 ± 0.07	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.58 ± 0.26	0.39 ± 0.02	0.37 ± 0.02
	睾丸	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.46 ± 0.02	0.46 ± 0.02	0.47 ± 0.02
	附睾	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.13 ± 0.05	0.23 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.39 ± 0.16
雌性	肝脏	1.02 ± 0.08	1.22 ± 0.05	1.17 ± 0.04	3.70 ± 0.26	4.17 ± 0.15	3.84 ± 0.12
	肾脏	0.37 ± 0.01	0.36 ± 0.01	0.30 ± 0.01[b]	1.32 ± 0.04	1.24 ± 0.03	0.99 ± 0.05
	心脏	0.14 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.49 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.41 ± 0.01
	脾脏	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.30 ± 0.02
	肺	0.18 ± 0.01	0.17 ± 0.01	0.19 ± 0.01	0.64 ± 0.02	0.60 ± 0.03	0.62 ± 0.03
	胃	0.28 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.10 ± 0.03	1.03 ± 0.03	1.02 ± 0.04
	膀胱	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.03	0.10 ± 0.01
	胰腺	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01	0.43 ± 0.02	0.41 ± 0.02	0.40 ± 0.04
	卵巢	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.02 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.01
	子宫	0.17 ± 0.01	0.20 ± 0.02	0.16 ± 0.02	0.60 ± 0.05	0.68 ± 0.07	0.54 ± 0.06

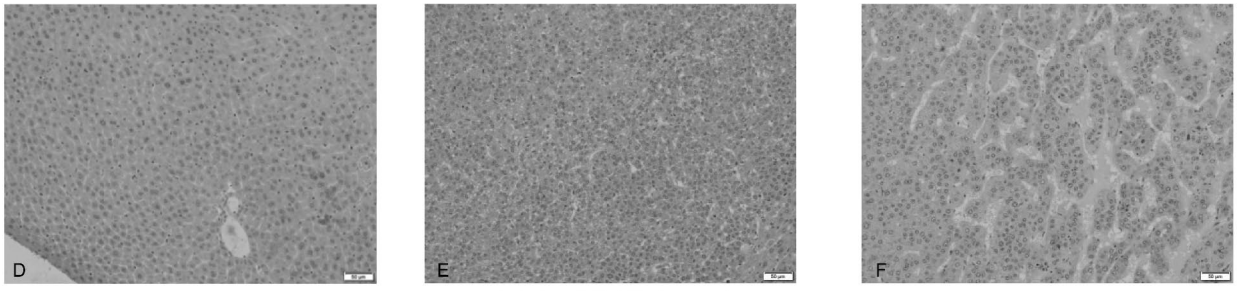
与溶媒对照组相比，a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$

5 肝脏病理学和免疫组化检查

大体解剖、肝脏组织病理和免疫组化检查图片如图 1 和图 2 所示，组织病理学检查结果见表 4。



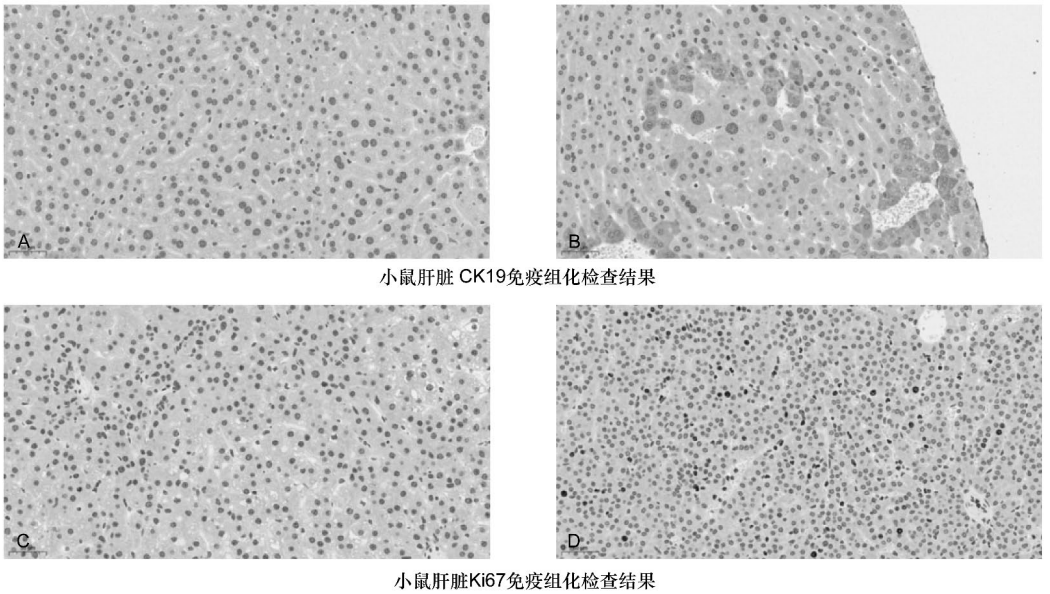
AAI单次*ig* 9个月后小鼠大体剖检结果



组织病理学检查结果（×100）

A:溶媒对照组,未见异常;B:DEN 组,肝脏表面可见多个灰白色结节;C:AAI 组,肝脏表面可见多个灰白色结节;
D:溶媒对照组,未见异常;E:DEN 组,肝细胞癌;F:AAI 组,肝细胞癌

图 1　C3H/HeN 小鼠大体剖检、肝脏组织病理学检查结果



小鼠肝脏 CK19免疫组化检查结果

小鼠肝脏Ki67免疫组化检查结果

A:溶媒对照组,未见异常;B:AAI 组,CK19 蛋白表达显著升高;C:溶媒对照组,未见异常;D:AAI 组,Ki67 蛋白表达升高

图 2　C3H/HeN 小鼠肝脏 CK19 和 Ki67 免疫组化检查结果

表 4　单次 *ig* 给予 C3H/HeN 乳鼠 AAI 9 个月后肝脏组织病理学检查结果

性别	组织病理学改变	0.5% CMC-Na	DEN 20 mg·kg^{-1}	AAI 10 mg·kg^{-1}
雄性	肝细胞腺瘤	—	1/14	2/14
	肝细胞癌	—	10/14	11/14
雌性	肝细胞腺瘤	—	6/15	3/12
	肝细胞癌	—	7/15	5/12

—:未见组织病理学改变;其中“1/14”,1 为发生组织病理学改变的动物数,14 为 9 个月后存活动物数,其他依此类推

大体解剖时,DEN 组共有 24 只小鼠(雄性 14,雌性 10)出现肝脏灰白色结节,AAI 组共有 19 只(雄性 14,雌性 5)出现肝脏灰白色结节,其余被检组织脏器未见肉眼可见异常。

组织病理学检查发现 DEN 组和 AAI 组小鼠肝脏出现肝细胞腺瘤和肝细胞癌,溶媒对照组小鼠肝脏未见异常,其他组织器官未见明显病理学改变。AAI 致雄性 C3H/HeN 乳鼠肝癌发生率为 78.57%(11/14),致雌性乳鼠肝癌发生率为 41.67%(5/12)。使用 Fisher 确切概率法单侧检验发现 AAI 给药组肝癌发生率显著高于溶媒对照组肝癌发生率($P < 0.01$)。初步判断在本实验中 AAI 与乳鼠肝癌发生具有相关性。AAI 可能具有导致乳鼠肝癌的潜力。

免疫组化结果表明 AAI 组小鼠肝脏 CK19 和 Ki67 蛋白表达升高,推测肝细胞处于快速分裂期,肝癌恶性程度较高。

6　肝脏 IL-1β 和 IL-6 含量

如表 5 所示,与溶媒对照组相比 AAI 组雄性小

鼠肝脏中 IL-1β 和 IL-6 含量显著升高，AAI 组雌性小鼠肝脏中 IL-1β 显著升高，IL-6 无显著性升高。

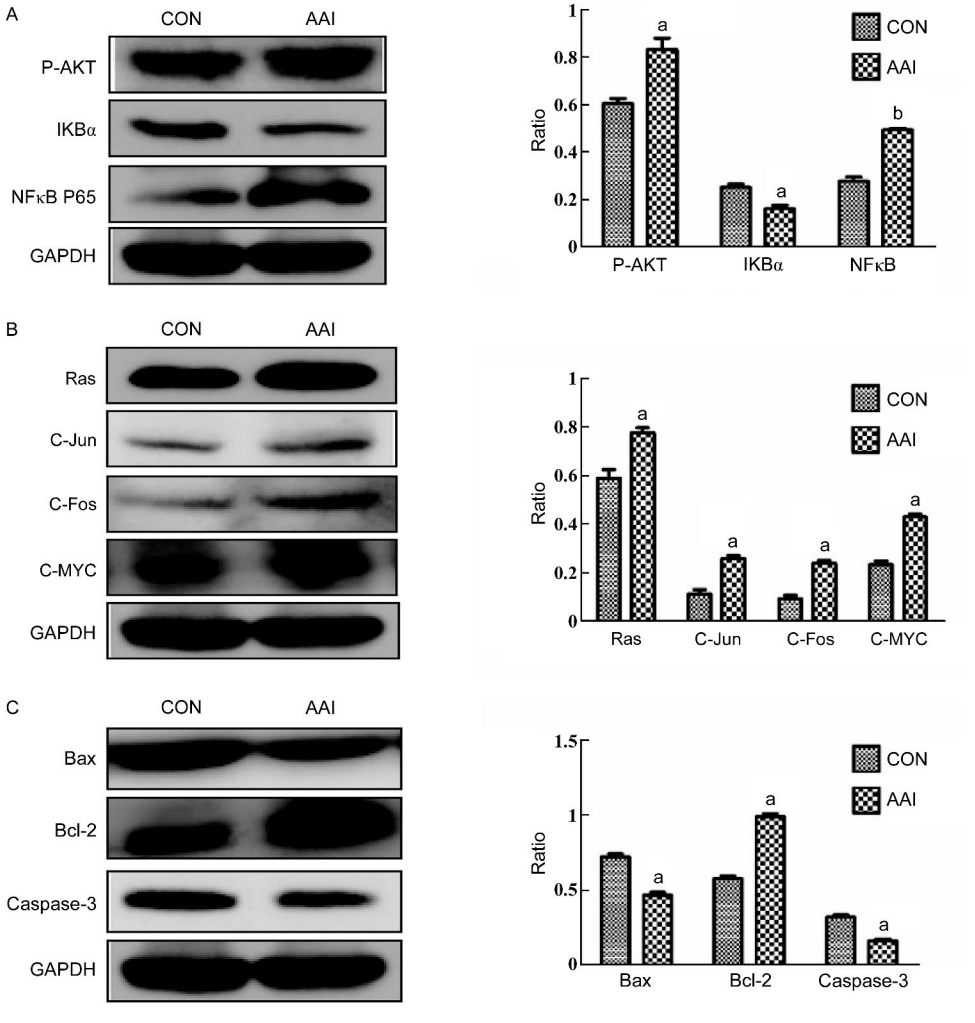
表 5 单次 *ig* 给予 C3H/HeN 乳鼠 AAI 9 个月肝脏中 IL-1β 和 IL-6 含量 $\bar{x} \pm s, n = 12 \sim 15$

性别	组别	IL-1β/pg·mL^{-1}	IL-6/pg·mL^{-1}
雄性	0.5% CMC-Na	18.62 ± 4.85	346.64 ± 39.27
	AAI 10 mg·kg^{-1}	48.59 ± 12.46^{b}	441.75 ± 33.56^{a}
雌性	0.5% CMC-Na	18.56 ± 3.45	372.21 ± 35.67
	AAI 10 mg·kg^{-1}	34.67 ± 2.49^{a}	399.25 ± 42.63

与溶媒对照组相比，a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$

7 肝脏 NFκB P65，Ras 和 Caspase-3 相关蛋白表达

在本实验中 AAI 致雄性小鼠肝癌发生率较雌性小鼠高，所以选用雄性小鼠为研究对象对 AAI 致肝癌机制进行初步探索。Western Blot 结果如图 3 所示。与溶媒对照组相比 AAI 组 P-AKT，NFκB P65 蛋白表达显著升高，IKBα 显著降低；AAI 组 Ras，C-Jun，C-Fos 和 C-MYC 蛋白表达升高；AAI 组 Bcl-2 表达显著上升而 Bax 和 Cleaved Caspase-3 表达显著降低。结果提示 AAI 可能通过激活 PI3K/NFκB 炎症通路，同时激活 Ras/AP1/C-MYC 促增殖通路，抑制细胞凋亡促进肝癌发生，见图 4。



A：肝脏 P-AKT，IKBα 和 NFκB P65 蛋白表达；B：肝脏 Ras，C-Jun，C-Fos 和 C-MYC 蛋白表达；C：肝脏 Bcl-2，Bax 和 Caspase-3 蛋白表达；CON：溶媒对照组；AAI：AAI 10 mg·kg^{-1} 组；与溶媒对照组相比，a：$P < 0.05$，b：$P < 0.01$

图 3 小鼠肝脏 NFκB P65，Ras 和 Caspase-3 相关蛋白表达（$\bar{x} \pm s, n = 5$）

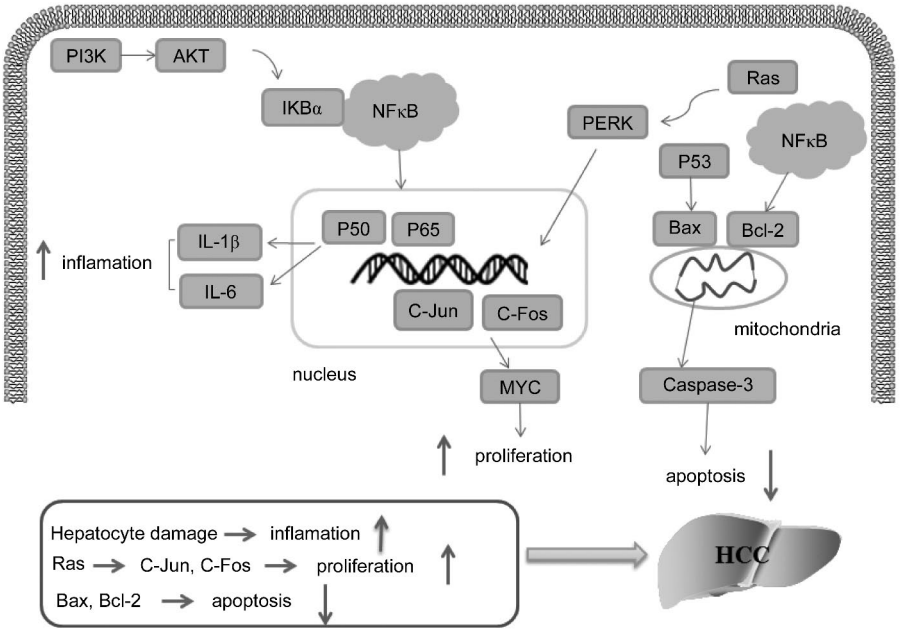


图 4 AAI 致 C3H/HeN 小鼠肝癌作用机制信号通路图

讨　论

AAI 能否导致肝癌目前研究存在较大争议[4-5]。本研究使用 2 周龄 C3H/HeN 乳鼠进行 9 个月毒性实验，发现在 2 周龄时单次 *ig* 给予 10 mg·kg^{-1} AAI 可以导致 C3H/HeN 小鼠发生肝细胞癌和肝细胞腺瘤。AAI 10 mg·kg^{-1} 是本课题组预实验得到的 C3H/HeN 乳鼠耐受暴露的最大剂量，根据临床年人-儿童-小鼠体表面积公式换算，相当于临床拟用剂量的 10 倍。虽然 AAI 的肾毒性在以往的研究中是非常明确的[6]，但本实验单次 *ig* AAI 9 个月后未观察到小鼠肾脏发生肿瘤相关病理学改变。与以往的研究相比，本实验给药剂量偏小且暴露时间短（仅单次给药），这可能是本次实验中 AAI 未造成肾毒性的原因。

为初步探索 AAI 致 2 周龄 C3H/HeN 乳鼠肝癌的机制，从炎症因子、细胞增殖和细胞凋亡等方面初步研究 AAI 对小鼠肝脏的影响。

Ki67 是一种与增殖细胞相关的核抗原，作为标记细胞增殖状态的抗原，其表达阳性说明癌细胞增殖活跃[7]。细胞角蛋白 CK19 在具有胆管细胞癌特征的肝细胞癌中高表达[8]，在本实验中 CK19 高表达说明 AAI 引起的肝癌细胞侵袭和增殖能力较强，恶性程度较高。CK19 也是肝癌干细胞激活的标志之一，其阳性表达说明 AAI 可能激活了肝癌干细胞。

AAI 组小鼠 IL-1β 和 IL-6 显著上升，提示小鼠肝脏内炎症因子可能被大量激活，肝脏处于炎症微环境。NF-κB 是经典炎症通路重要的转录因子之一[9]，可被不同的信号激活，本实验中肝脏白细胞介素 IL-1β 和 IL-6 显著升高，可能使 NF-κB 表达升高，进一步激活 PI3K/Akt 炎症通路，促使 IL-1β 和 IL-6 表达持续升高，陷入恶性循环使肝脏长期处于炎症环境。NF-κB 激活也会导致下游因子 AP1（C-Jun 和 C-Fos）激活，蛋白免疫印迹结果发现 AAI 组小鼠肝脏 Ras，C-Jun，C-Fos 和 C-MYC 癌蛋白表达升高，这提示 AAI 可能激活肝脏中促增殖通路导致肝细胞增殖失控[10-11]。

NF-κB 可调节细胞的凋亡过程，通过转录生成抗凋亡蛋白 Bcl-2 与活化的 Bax 结合以达到抗细胞凋亡的作用，Caspase-3 是线粒体凋亡途径最主要的执行者，通常 Cleaved Caspase-3 高表达代表细胞不可逆的凋亡状态[12]。在本实验中，AAI 组促凋亡蛋白 Bcl-2 和凋亡蛋白 Cleaved Caspase-3 表达显著降低，NF-κB 和抗凋亡蛋白 Bax 显著上升，提示 AAI 在炎症环境中可能导致肝脏线粒体凋亡途径紊乱，使肝细胞无限增殖，与促增殖通路共同导致肝癌发生。

AAI 具有遗传毒性，主要经过肝脏代谢，通过硝基还原和环化反应生成 *N*-羟基马兜铃酸，然后形成活性中间体可以与 DNA 反应形成 DNA 加合物，如 dA-AAI，dG-AAI，dA-AAII 和 dG-AAII 等[13]。生物

体可以通过蛋白网络系统监测受损 DN 并进行修复,哺乳动物的肝脏在出生前后具有不同的功能,出生后,小鼠肝脏逐渐失去造血功能成为机体代谢的主要场所,其功能的改变主要通过大规模改变肝脏基因的表达,如通过转录中调控和转录后调控,一个基因通过可变剪接这一转录后调控可产生多种具有不同功能的 mRNA[14]。幼年鼠身体各器官处于快速生长期,此时肝脏细胞 DNA 复制和细胞分裂速度较快,DNA 修复机制尚未发育完全,此时接触 AAI 可能对肝脏基因组产生的毒性作用较大。

综上所述,AAI 可以导致 2 周龄 C3H/HeN 乳鼠发生肝癌,肝癌发生的过程可能与激活 PI3K/AKT 炎症通路和 Ras/AP1/C-MYC 促增殖通路,抑制线粒体 Bax/Bcl-2/Caspase-3 凋亡通路有关。

[参 考 文 献]

[1] ARLT VM, STIBOROVA M, SCHMEISER HH. Aristolochic acid as a probable human cancer hazard in herbal remedies: a review[J]. *Mutagenesis*, 2002, 17(4): 265 - 277.

[2] NG AWT, POON SL, HUANG MN, *et al*. Aristolochic acids and their derivatives are widely implicated in liver cancers in Taiwan and throughout Asia[J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(412): eaan6446.

[3] 郑荣寿, 孙可欣, 张思维, 等. 2015 年中国恶性肿瘤流行情况分析[J]. 中华肿瘤杂志, 2019, 41(1): 19 - 28.

[4] IVIC M. Etiology of endemic nephropathy[J]. *Lijec Vjesn*, 1969, 91: 1273 - 1281.

[5] 柏兆方,王春宇,王伽伯,等. 马兜铃酸与肝癌相关性的研究及思考[J]. 世界科学技术:中医药现代化, 2019,21 (7): 1275 - 1279.

[6] DEBELLE FD, VANHERWEGHEM JL, NORTIER JL. Aristolochic acid nephropathy: a worldwide problem[J]. *Kidney Int Suppl*, 2008, 74(2): 158 - 169.

[7] JING Y, ZHOU Q, ZHU HD, *et al*. Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2019, 17(1): 974 - 980.

[8] 郝文胜,周俊平,付贵峰. 血清中癌胚抗原和细胞角蛋白片段 19 对局部中晚期肺癌疗效的评价[J]. 重庆医学, 2013, 42(11):1216 - 1217.

[9] WEBER A, BOEGE Y, REISINGER F, *et al*. Chronic liver inflammation and hepatocellular carcinoma: persistence matters [J]. *Swiss Med Wkly*, 2011, 141: w13197.

[10] CICCHINI C, AMICONE L, ALONZI T, *et al*. Molecular mechanisms controlling the phenotype and the EMT/MET dynamics of hepatocyte[J]. *Liver Int*, 2015, 35(2): 302 - 310.

[11] GRANADO-SERRANO AB, MARTÍN MA, HAEGEMAN G, *et al*. Epicatechin induces NF-kappaB, activator protein-1 (AP-1) and nuclear transcription factor erythroid 2p45-related factor-2 (Nrf2) via phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) and extracellular regulated kinase (ERK) signalling in HepG2 cells[J]. *Br J Nutr*, 2010, 103(2): 168 - 179.

[12] OLTVAI ZN, KORSMEYER SJ. Checkpoints of dueling dimers foil death wishes[J]. *Cell*, 1994, 79(2): 189 - 192.

[13] STIBOROVÁ M, ARLT VM, SCHMEISER HH. DNA adducts formed by aristolochic acid are unique biomarkers of exposure and explain the initiation phase of upper urothelial cancer[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(10): e2144.

[14] BHATE A, PARKER DJ, BEBEE TW, *et al*. ESRP2 controls an adult splicing programme in hepatocytes to support postnatal liver maturation[J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 8768.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 - 03 - 25