本文引用:邓 哲,欧阳昭广,胡玉星,冯 婷,陈铮甲,宁迪敏,张博宇,雷宜晨,刘 华,田雪飞.薯蓣丸调控HIF-1α与p53表达改善线粒体损伤治疗肝细胞癌的实验研究[J].湖南中医药大学学报,2021,41(7):1010-1016.

薯蓣丸调控HIF-1α与p53表达改善线粒体损伤治疗肝细胞癌的实验研究

邓 哲[1,2],欧阳昭广[3],胡玉星[4],冯 婷[1],陈铮甲[4],宁迪敏[1],张博宇[5],雷宜晨[1],刘 华[4],田雪飞[1,2]*

(1.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南 长沙 410208;3.广州医科大学附属口腔医院口腔预防科,广东 广州 510182;2.湖南中医药大学方证转化湖南省重点实验室,湖南 长沙 410208;4.湖南中医药大学第一附属医院,湖南 长沙 410208;5.湖南中医药大学针灸推拿学院,湖南 长沙 410208)

〔摘要〕**目的** 观察薯蓣丸对肿瘤微环境中HIF-1α与p53的表达以及线粒体损伤的影响,及其对肝细胞癌的治疗作用。**方法** 制备人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型,雄性BALB/c裸鼠(*n*=24, 5周龄),随机分为4组,每组6只:模型组(0.9%生理盐水0.2 mL/d)、薯蓣丸组(薯蓣丸0.4 g/d),薯蓣丸+顺铂组(薯蓣丸0.4 g/d+每周腹腔注射顺铂5 mg/kg)、顺铂组(每周腹腔注射顺铂5 mg/kg)。每只裸鼠灌胃剂量为0.2 mL/d,每2天测量1次肿瘤体积与小鼠体质量,连续干预14 d后脱颈处死,剥离皮下移植瘤;电镜下观察肿瘤组织线粒体结构和数量;Western blot与RT-qPCR法分别检测人肝癌裸鼠皮下移植瘤中HIF-1α、p53的蛋白及mRNA表达。**结果** 与模型组相比,薯蓣丸组可抑制人肝癌裸鼠皮下移植瘤的生长,抑制HIF-1α的mRNA与蛋白表达(P<0.05),上调抑癌基因p53的mRNA与蛋白表达(P<0.05),同时改善线粒体结构损伤;与薯蓣丸组或顺铂组相比,薯蓣丸联合顺铂组对HIF-1α、p53基因表达及改善线粒体结构作用更显著(P<0.05)。**结论** 薯蓣丸可通过促使HIF-1α的失活与p53的活化,改善线粒体结构损伤,从而抑制人肝癌裸鼠皮下移植瘤的生长,与顺铂联用后具有协同增效作用。

〔关键词〕肝癌;肿瘤微环境;薯蓣丸;线粒体损伤;HIF-α;p53

〔中图分类号〕R285.5 〔文献标志码〕A 〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2021.07.007

Shuyu Pills Improves Mitochondrial Damage by Regulating the Expression of HIF-1α and p53 to Prevent Hepatocellular Carcinoma

*DENG Zhe[1,2], OUYANG Zhaoguang[3], HU Yuxing[4], FENG Ting[1], CHEN Zhengjia[4], NING Dimin[1], ZHANG Boyu[5], LEI Yichen[1], LIU Hua[4], TIAN Xuefei[1,2]**

(1. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Key Laboratory of Translational Research in Formulas and Zheng of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Department of Preventive Dentistry, Stomatological Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China; 4. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 5. Department of Acupuncture and Massage, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China)

〔收稿日期〕2021-03-28

〔基金项目〕区域创新联合国家自然科学基金重点项目(U20A20408);国家自然科学基金项目(82074450);湖南省自然科学基金项目(2020JJ4066);中西医结合一流学科开放基金项目(2020ZXIJH35,2018ZXJH28);湖南中医药大学"一方"研究生创新课题(YF201903);湖南省科技创新人才计划大学生创新创业资助项目(肿瘤外治古膏方系列产品研发与推广运用);2018年度湖南省大学生创新创业训练计划项目(大黄抗蜈蚣所致肝损伤的"给邪出路"作用及机制研究)。

〔作者简介〕邓 哲,女,在读博士研究生,研究方向:中西医结合防治肿瘤。

〔通信作者〕* 田雪飞,男,教授,博士研究生导师,E-mail:003640@hnucm.edu.cn。

〔**Abstract**〕 **Objective** To evaluate the effect of Shuyu Pills on the expression of HIF-1α and p53 in tumor microenvironment and mitochondrial damage, and therapeutic effect on treating hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The subcutaneously transplanted tumor model of human hepatocellular carcinoma in nude mice was prepared. Male BALB/c nude mice (n=24, 5 weeks old) were randomly divided into 4 groups with 6 mice in each group: model group (administered normal saline, 0.2 mL/d), SYP group (0.4 g/d Shuyu Pills), SYP+DDP group (0.4 g/d Shuyu Pills + weekly intraperitoneal dose of 5 mg/kg cisplatin), DDP group (weekly intraperitoneal dose of 5 mg/kg cisplatin). Each mouse was taken 0.2 mL drug via gavage every day. The tumor volume and body weight of mouse were measured every 2 days. After continuous intervention for 14 days, all the mice were sacrificed by neck removal and subcutaneous graft tumor was removed; the structure and quantity of mitochondria in tumor tissues were observed by electron microscopy; the protein and mRNA expression levels of HIF-1α and p53 of tumor were detected by Western blot and RT-qPCR. **Results** Compared with model group, SYP group inhibited the growth of subcutaneous transplanted tumor of HCC in nude mice, inhibited the mRNA and protein expression of HIF-1α (P<0.05), upregulated the mRNA and protein expression of tumor suppressor gene p53 (P<0.05), and improved the mitochondrial structure damage; compared with SYP group or DDP group, SYP+DDP group improved the expression of HIF-1α and p53 genes and mitochondrial structure significantly (P<0.05). **Conclusion** Shuyu Pills could inhibit the growth of subcutaneously transplanted human HCC in nude mice, which might inactivate HIF-1α and activate p53, to improve mitochondrial structural damage, combined with cisplatin, Shuyu Pills has synergistic effect.

〔**Keywords**〕 hepatocellular carcinoma; tumor microenvironment; Shuyu Pills; mitochondrial damage; HIF-1α; p53

肝细胞癌(hepatocarcinoma, HCC)是临床常见的恶性肿瘤之一,其发病率、死亡率分别位居全球恶性肿瘤第 6 位与第 4 位[1]。缺氧是实体瘤中的常见现象,可诱导肿瘤能量代谢重编程[2]。代谢异常是肿瘤的重要特征,正常细胞在氧气充足的情况下利用线粒体的氧化磷酸化产生 ATP,为细胞的生命活动提供能量,而在氧气不足的情况下则转变为利用糖酵解的方式。在多数肿瘤中,无论处于有氧还是缺氧环境, 都要保证一定程度的糖酵解反应作为产能方式,这被称为有氧糖酵解过程,即 Warburg 效应,也是肿瘤细胞独有的代谢特征之一[3]。肿瘤细胞糖酵解过程不仅为肿瘤细胞提供维持生长的能量,其合成的乳酸、核苷酸等一系列产物还为肿瘤细胞增殖、转移过程提供了必需的内源性生物原料[4]。也有研究[5]认为是因为肿瘤细胞中线粒体含量减少了 20%~50%的原因导致 OXPHOS 的降低,这一理论进一步扩展支持了 Warburg 的假说。线粒体的代谢受一系列基因的调控,肿瘤发生的早期处于缺氧微环境,使得 HIF-1、p53、NF-κB 等基因的表达变化,导致线粒体的氧化磷酸化受到抑制,细胞主要以糖酵解的形式获得能量[6-7]。肝脏作为一个高度再生的器官,肝细胞中包含大量的线粒体以供能,线粒体代谢重编程在肝癌发生发展中起重要作用,肝脏线粒体代谢异常是公认的致癌因素之一[8]。因此,抑制肿瘤缺氧相关基因的表达,改善线粒体的损伤,有助于抑制肿瘤细胞的有氧糖酵解,恢复线粒体的氧化磷酸化功能,抑制肿瘤的进展。

低氧诱导因子-1(hypoxia inducible factor-1, HIF-1α)是 HCC 细胞适应低氧微环境的重要调节因子,影响 HCC 细胞的生长繁殖、侵袭转移、血管新生、耐药、凋亡等过程[9-10]。研究[2]发现,HIF-1α 的表达可降低线粒体的合成,从而导致细胞氧耗的减少。另外,抑癌基因 p53 的突变、表达下调或缺失,也可作用于线粒体代谢,使线粒体呼吸转变为糖酵解模式[11]。因此,抑制 HIF-1α 的表达与 p53 的失活,有望改善肝癌细胞线粒体代谢重编程,抑制糖酵解的发生。研究[12]发现,脾虚模型大鼠中多器官的线粒体含量明显减少,形状异常,结构紊乱,基质改变。通过改善脾虚进而改善线粒体在脏器中的合成与代谢,有望从改善代谢方式的角度控制肿瘤的进展。而线粒体生物合成、能量代谢功能的正常发挥与中医“脾为后天之本”的功能密切相关[12-13],薯蓣丸出自东汉张仲景《金匮要略·血痹虚劳病》:“虚劳诸不足,风气百疾,薯蓣丸主之”,功用健脾益气和营,因脾气亏虚导致的虚劳百疾皆可用之。现代研究[14-15]表明,薯蓣丸具有改善能量代谢与免疫功能、辅助治疗肿瘤等多个方面的作用。为了探究薯蓣丸是否通过保护线粒体发挥调控 HCC 细胞能量代谢的作用,我们将薯蓣丸与顺铂联合运用,通过研究薯蓣丸对代谢相关基因 HIF-1α 与 p53 的调控,以及线粒体损伤的影响,观察其对 HCC 的辅助治疗作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

胰蛋白酶(北京索莱宝科技有限公司,货号:

T1320)；高糖 DMEM 培养基(美国 Hyclone 公司，货号：AE29005267)；胎牛血清(美国 Gibco 公司，货号：2176404)；水合氯醛(货号：20180622)、无水乙醇(货号：GB/T678-2002)(上海国药集团化学试剂有限公司)；青霉素(货号：408G021)、链霉素(货号：70100900)(北京索莱宝科技有限公司)；环氧丙烷(上海迈瑞尔化学技术有限公司，货号：M25514)；锇酸(货号：18456)、DDSA(货号：18022)、NMA(货号：18032)、DMP30(货号：18042)(美国 TED PELLA INC 公司)；戊二醛(北京雷根生物技术有限公司，货号：DF0156)；HIF-1α 小鼠抗人单克隆抗体(货号：ab1)、p53 小鼠抗人单克隆抗体(英国 Abcam 公司，货号：ab26)；β-actin 小鼠抗人单克隆抗体(美国proteintech 公司，货号：66009-1-Ig)；HRP 标记山羊抗小鼠 IgG 抗体(美国 proteintech 公司，货号：SA00001-1)；RIPA 裂解液(中国上海碧云天有限公司，货号：P0013B)；SuperECL Plus 超敏发光液(美国 Advansta 公司，货号：K-12045-D50)；显影液(货号：BW-61)、定影液(货号：BW-62)(中国上海佳信公司)；TEMED(中国上海阿拉丁公司，货号：T105497)；SDS(货号：MB2479)、EDTA(中国大连美伦生物技术有限公司，货号：MB2514)；琼脂糖(西班牙 BIOWEST 公司，货号：111860)；mRNA 逆转录试剂盒(货号：CW2569)、miRNA 逆转录试剂盒(货号：CW2141)、上样缓冲液(货号：CW0610)、UltraSYBR Mixture(货号：CW2601)、DM2000 Plus DNA Marker(货号：CW0632)(中国北京康为世纪公司)；Tris(货号：V900483)、DEPC(美国 Sigma 公司，货号：D5758)；Trizol(美国 Thermo 公司，货号：15596026)；核酸染料(中国北京普利莱，货号：PB11141)。

1.2 药物

薯蓣丸使用中药配方颗粒，药物组成及生产批号：山药(0090443)24 g，当归(0103203) 6 g，桂枝(0116553) 6 g，建曲(0091033) 6 g，生地黄(0113523) 12 g，人参(0115203) 6 g，炙甘草(0112233) 12 g，川芎(0125883) 6 g，白芍(0121933) 6 g，白术(0111433) 6 g，麦冬(0121693) 6 g，苦杏仁(0112663) 6 g，柴胡(0110723) 6 g，桔梗(0101183) 3 g，茯苓(0110753) 6 g，阿胶(0112143) 6 g，干姜(0115493) 3 g，防风(0101983) 6 g，白蔹(0086073) 6 g，大枣(0111143) 24 g，所有药物购自广东一方制药有限责任公司。将药物用温水溶解后，振荡制备成混悬液。根据薯蓣丸的药理学剂量规定，成人薯蓣丸日剂量为156 g/d，小鼠体质量约为 20 g，根据人鼠体表面积换算，小鼠给药剂量为 0.4 g/d。顺铂注射液(DDP)(齐鲁制药有限公司，货号 9E0214B02)：5 mg/kg，每周 1 次，腹腔注射。

1.3 细胞与动物分组

采用 HCC 细胞株 SMMC-7721，购自中南大学湘雅医学院细胞中心。BALB/c 无胸腺裸鼠(雄性，5 周龄)，购自上海斯莱克实验动物有限公司(生产许可证号：SCXK(沪)2017-0005)，所有动物饲养在无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级环境中，可自由地获取食物和水，并进行 12 h/12h 的明/暗循环。将 1×10^7 个 SMMC-7721 细胞接种于每只裸鼠右上肢后侧，建立人 HCC 裸鼠皮下移植瘤模型。实验从可触及裸鼠皮下移植瘤开始(肿瘤体积约为 100 mm^3)，造模成功后，随机分为 4 组，每组 6 只，分别为：模型组(0.9%生理盐水 0.2 mL/d)、薯蓣丸组(薯蓣丸 0.4 g/d)、薯蓣丸+顺铂组(薯蓣丸0.4 g/d+每周腹腔注射顺铂 5 mg/kg)、顺铂组(每周腹腔注射顺铂 5 mg/kg)。每只裸鼠灌胃剂量为 0.2 mL/d。

1.4 观察指标

1.4.1 肿瘤体积测定 每2 天测量 1 次肿瘤体积，肿瘤体积计算公式为：(最大肿瘤长度×宽度 ^{2})/2[16]。连续干预 14 d 后，根据《实验动物：福利伦理审查指南》[17]对小鼠进行颈椎脱位安乐死，剥离皮下移植瘤并进行检测。所有实验动物均得到悉心照料，本实验通过中南大学实验动物福利伦理审查委员会批准。

1.4.2 透射电子显微镜成像 为了检测线粒体的超微结构变化，在用薯蓣丸或顺铂处理 14 d 后，收集人 HCC 裸鼠皮下移植瘤组织用于样品制备。实验步骤：(1)固定：取 1 cm^3 组织块若干块，在 4 ℃下用 2.5%戊二醛在黑暗中进行12 h 的初次固定，然后将组织在 1%锇酸中固定1 h。(2)脱水：在分级乙醇系列(30%、50%、70%、80%、95%和 100%)和环氧丙烷中进行脱水。(3)浸透：在环氧丙烷和环氧树脂中浸泡 2 h，然后纯环氧树脂中浸泡 3 h。(4)包埋：用纯环氧树脂包埋后入 40 ℃烤箱烘烤 12 h 和 60 ℃烤箱烘烤48 h。(5)切片：使用徕卡 Ultracut UCT 切片机以 80 nm 切片厚度用金刚石刀具切割超薄切片，将切片置于 300 目铜网上。(6)染色：电子染色(铅、铀染色)。(7)拍照：日立 7700 型透射电镜观察，用数码相机记录图像。

1.4.3 Western blot 检测蛋白表达水平 采用 Western blot 方法检测人 HCC 裸鼠皮下移植瘤中 HIF-1α 与 p53 的蛋白表达。实验步骤：(1)蛋白提

取：剪取 25 mg 组织，用冰预冷 PBS 洗涤组织，加入 300 μL RIPA 裂解液以裂解 10 min；离心后将上清液转移入离心管。(2)制胶：在 10%分离胶中加入 TEMED 后立即摇匀灌胶，异丙醇封胶。胶凝后倒去胶上层异丙醇并用滤纸将其吸干。在 4.8%浓缩胶中加入 TEMED 后摇匀灌胶。将梳子插入玻璃板中，剩余空间灌满浓缩胶，等待胶凝固。(3)样品准备：在 200 μL 蛋白上清中加入 50 μL 5×loading buffer 混匀，沸水煮 5 min，冰盒速冷备用。(4)电泳：据蛋白定量结果，第一孔点入 marker 2 μL，其他每孔上样 50 μg 已变性蛋白。开始电泳，电泳恒定电压 75 V，时间为 130 min。待溴酚蓝电泳至胶底部，终止电泳。(5)转膜：分别切胶 PD-1(50-55 kDa)、PD-L1(33 kDa)、CD4(55 kDa)、CD8(35 kDa)、HIF-1α(120 kDa)、p53(53 kDa)、β-actin(42 kDa)。(6)封闭：用 1×PBST 配制 5%脱脂奶粉，将膜浸入后室温静置 60 min，在 4 ℃下过夜后室温静置 30 min。(7)一抗孵育：加入一抗 Mouse anti-HIF-1α antibody(ab1)，1∶200；Mouse anti-HIF-1α antibody (ab26)，1∶500；Mouse anti-β-actin antibody(66009-1-Ig)，1∶5 000，室温放置90 min。孵育结束后用1×PBST 洗 3 次，每次15 min。(8)二抗孵育：加入二抗(HRP goatanti-mouse IgG, SA00001-1，1∶5 000；HRP goat anti-rabbit IgG, SA00001-2，1∶6 000)，室温孵育90 min 后，1×PBST 洗3 次，每次 10 min。(9)ECL显色曝光：使用 ECL 化学发光液与膜孵育 1 min，用滤纸吸尽液体，用塑封膜将膜包裹杂交膜，在暗盒内与 X 胶片曝光后显影冲洗。

1.4.4　RT-qPCR 检测蛋白表达水平　采用 RT-qPCR 法检测人 HCC 裸鼠皮下移植瘤中 HIF-1α 与 p53 的 mRNA 表达。按照说明书使用 TRIzol 试剂从 SMMC7721 细胞中提取总RNA。然后以总 mRNA 为模板，用 cDNA 逆转录酶进行逆转录。定量 PCR 扩增程序：95 ℃ 3 min，95 ℃ 30 s，60 ℃ 20 s，40 个循环，熔解曲线分析：60~95 ℃。引物设计：在 NCBI 上搜索目的基因的序列，运用Primer 5 软件设计引物，由上海生工合成引物。使用的引物如下：β-actin：F-ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC 和 R-TACTCCTGCTTGCTGATCCAC，基因产物223 bp；P53：F-CCCCTGTCATCTTTTGTCCCT 和R-AGCTG-GCAGAATAGCTTATTGAG，基因产物137 bp；HIF-1α：F-TCCAGCAGACCCAGTTACAGA 和R-GCCACT-GTATGCTGATGCCTT，F-GCACCCCAAGGCAAAAA TCG，基因产物 182 bp。

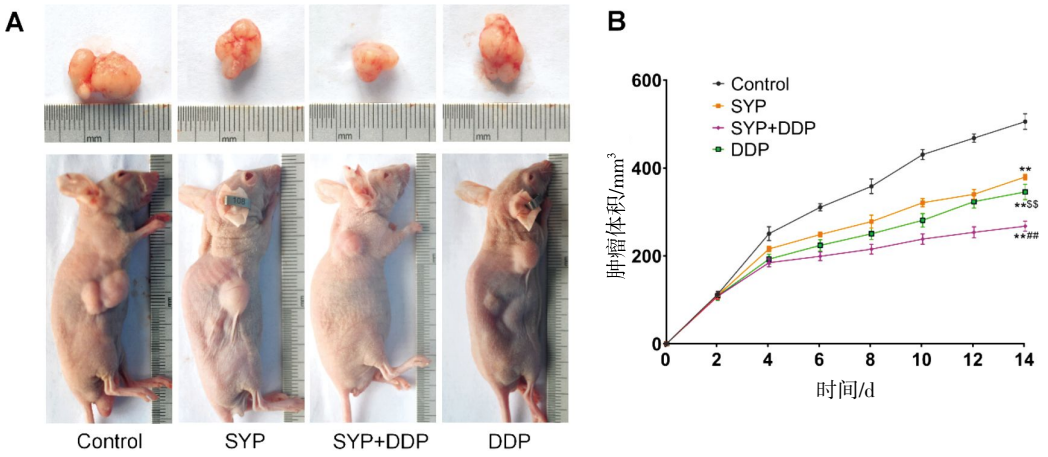
1.5　统计学分析

使用统计学软件 SPSS 25.0 分析数据，所有实验样本均重复 3 次，计量资料以“$\bar{x}\pm s$”表示。用 t 检验进行两组间数据比较，多组比较采用单因素方差分析，多组间数据比较采用 *LSD* 方法检验判定统计学差异，以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　薯蓣丸对人 HCC 裸鼠皮下移植瘤生长的影响

体外肿瘤生长图显示，与模型组相比，薯蓣丸组、薯蓣丸联合顺铂组的瘤体皆有缩小。与模型组相比，薯蓣丸组、薯蓣丸联合顺铂组、顺铂组肿瘤体积缩小，差异具有统计学意义($P<0.05$)；与薯蓣丸组或顺铂组相比，薯蓣丸联合顺铂组对肿瘤体积的抑制作用增强，差异具有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。



注：Control：模型组，SYP：薯蓣丸组，SYP+DDP：薯蓣丸联合顺铂组，DDP：顺铂组。与模型组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与薯蓣丸组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$；与薯蓣丸联合化疗组比较，$$P<0.05$，$$$P<0.01$

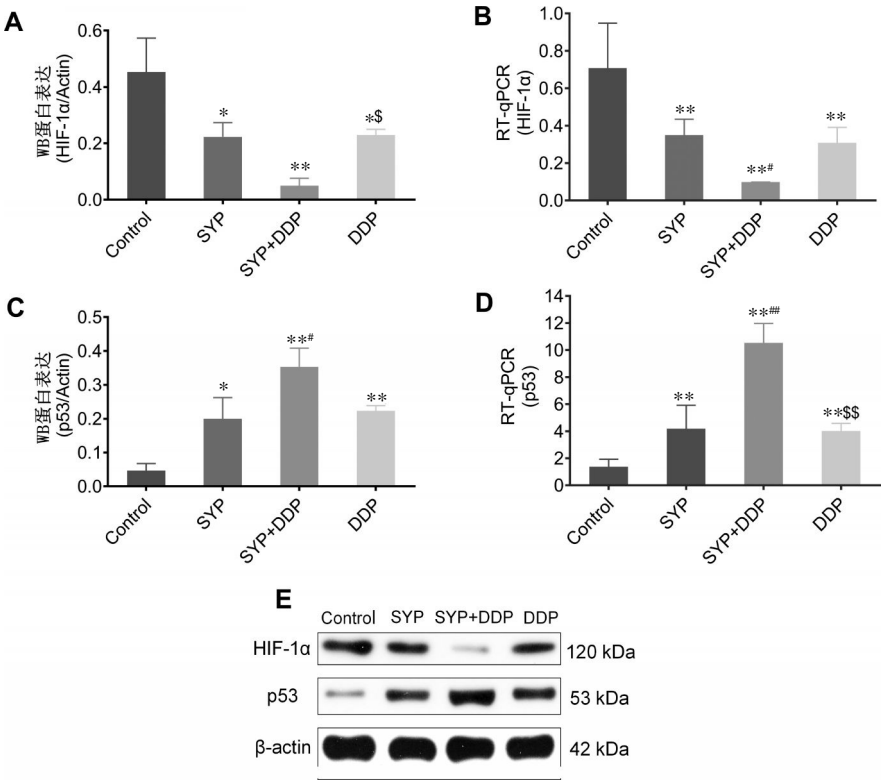
图 1　各组人 HCC 裸鼠皮下移植瘤与体积增长曲线图

2.2 薯蓣丸对 HIF-1α、p53 基因蛋白及 mRNA 表达的影响

HIF-1α 基因的蛋白表达结果显示，与模型组相比，薯蓣丸组、顺铂组中癌基因 HIF-1α 的蛋白表达下降，差异具有统计学意义（P<0.05），且薯蓣丸联合顺铂组差异更加显著（P<0.01）。HIF-1α 基因的 mRNA 荧光定量表达结果显示，与模型组相比，薯蓣丸组、薯蓣丸联合顺铂组、顺铂组中的 HIF-1α 的 mRNA 表达下降，差异具有统计学意义（P<0.01）；与薯蓣丸组相比，薯蓣丸联合顺铂组差异具有统计学意义（P<0.05）。p53 基因的蛋白表达结果显示，与模型组相比，薯蓣丸组中p53 的蛋白表达上调，差异具有统计学意义（P<0.05），且薯蓣丸联合顺铂组、顺铂组差异更加显著（P<0.01）；与薯蓣丸组和顺铂组相比，薯蓣丸联合顺铂组差异具有统计学意义（P<0.05）。p53 基因的 mRNA 荧光定量表达结果显示，与模型组相比，薯蓣丸组、薯蓣丸联合顺铂组、顺铂组中 p53 的 mRNA 荧光定量表达上调，差异具有统计学意义（P<0.01）；与薯蓣丸组和顺铂组相比，薯蓣丸联合顺铂组差异具有统计学意义（P<0.01）。见图 2。

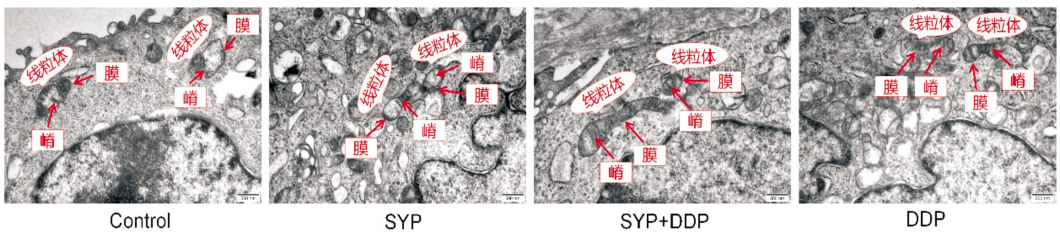
2.3 线粒体结构观察

电镜下人 HCC 裸鼠皮下移植瘤中线粒体结构显示，模型组线粒体数量较少，线粒体变性，嵴状结构排列紊乱且大多已断裂，可见线粒体固缩，膜结构完整；薯蓣丸组线粒体数量多，线粒体嵴状结构部分损伤，但可见排列结构，部分线粒体固缩，膜结构完整；薯蓣丸联合顺铂组线粒体数量较多，线粒体嵴状结构排列整齐，结构清晰，线粒体未固缩，膜结构完整；顺铂组线粒体数量多，线粒体嵴状结构部分损伤，但可见排列结构，部分线粒体固缩，膜结构部分损伤。见图 3。



注：Control：模型组，SYP：薯蓣丸组，SYP+DDP：薯蓣丸联合顺铂组，DDP：顺铂组。与模型组比较，*P<0.05，**P<0.01；与薯蓣丸组比较，#P<0.05，##P<0.01；与薯蓣丸联合化疗组比较，$$P$<0.05，$$$P$<0.01

图 2 各组人 HCC 裸鼠皮下移植瘤 HIF-1α、p53 蛋白与 mRNA 的表达



注：Control：模型组，SYP：薯蓣丸组，SYP+DDP：薯蓣丸联合顺铂组，DDP：顺铂组

图 3 各组对人 HCC 裸鼠皮下移植瘤线粒体结构的影响（×30 000）

3 讨论

中医认为肝癌的病机为本虚标实，本虚因长期癌毒内耗，加之手术、放化疗等损伤性治疗，易导致机体气血虚衰，脏腑功能衰退，全身代谢功能紊乱，免疫功能低下。治疗上，中医以“攻补兼施、扶正祛邪”为主要原则[18]。薯蓣丸治疗“虚劳诸不足，风气百疾”，根据脾为后天之本的思想，针对肝癌本虚标实的特点，可以将健脾扶正法作为肝癌辅助治疗的切入点[19]。现代研究[20-21]也表明，薯蓣丸及方内组分具有抗氧化、改善机体能量代谢、增强免疫、辅助抗肿瘤等多方面的作用。

缺氧是实体瘤的重要生物学特征，肿瘤微环境缺氧可诱导线粒体代谢从氧化磷酸化转变成糖酵解模式，这是肿瘤细胞线粒体代谢重编程的重要表现形式[22]。研究[8]显示，线粒体的损伤与含量减少是导致氧化磷酸化转向糖酵解模式的原因，而肝脏线粒体代谢异常是重要的致癌因素。肿瘤微环境的低氧可诱导线粒体酶的表达发生改变，导致线粒体代谢异常，其机制可能与 HIF-1α 或 p53 基因的作用有关[23]。研究[24]显示，缺氧可通过过表达或稳定 HIF-1 来促进 HCC 进展和侵袭。HIF-1α 的表达可降低线粒体的合成，从而导致细胞氧耗的减少[5]。研究[25-26]发现 HIF-1α 在 HCC 组织中高表达，通过不断激活与 HCC 生长相关的多种靶基因，参与 HCC 的微血管新生、能量代谢、增殖、侵袭转移、凋亡等过程，可促进 HCC 的发生发展，而抑制 HIF-1α 表达有利于控制 HCC 细胞侵袭和转移能力。另外，抑癌基因 p53 可活化 PFK-2 的亚型-TP53 诱导糖酵解和凋亡调节因子(TIGAR)，TIGAR 降低了果糖-2,6-磷酸的表达水平，从而起到抑制糖酵解的作用[5]。但在肿瘤细胞中，p53 基因常出现突变、表达下调或缺失，p53 的失活可使代谢从氧化磷酸化转变到糖酵解模式[27-28]。因此，癌基因 HIF-1α 的活化与抑癌基因p53 的失活，可诱导肿瘤微环境的缺氧，导致能量代谢从氧化磷酸化向糖酵解的转变，从而促进 HCC 的发生发展，其机制可能与线粒体的合成受损相关，靶向调控 HIF-1α 与 p53 有助于改善线粒体损伤，控制肿瘤的进展。

本实验研究结果表明，薯蓣丸具有抑制人 HCC 裸鼠皮下移植瘤生长的作用，而薯蓣丸与顺铂联合运用以后，其抑瘤作用更为显著。为了进一步明确其作用机制，本研究检测了人 HCC 裸鼠皮下移植瘤中 HIF-1α 与抑癌基因 p53 的表达，同时，在电镜下观察了各组皮下移植瘤中线粒体的结构。结果表明，薯蓣丸具有抑制缺氧诱导因子 HIF-1α 与活化抑癌基因 p53 表达的作用，同时改善了线粒体的结构破坏，薯蓣丸与顺铂两者联用具有协同作用。因此，猜测薯蓣丸可能通过促使 HIF-1α 失活与抑癌基因 p53 活化的作用，进一步保护线粒体结构，改善肿瘤微环境的能量代谢，从而发挥抗 HCC 的作用。此外，研究结果发现薯蓣丸与顺铂联用以后具有协同增效作用，有报道显示，缺氧微环境促进肿瘤对放化疗抵抗和耐药[17]。另一方面，研究[29]显示线粒体参与顺铂的耐药性，改善线粒体功能可增强顺铂对肿瘤化疗的敏感性。并且，调控 HIF-1α 与 p53 的表达，有助于控制肿瘤细胞的顺铂耐药[30]。因此，薯蓣丸可能通过调控 HIF-1α 与 p53 改善了肿瘤微环境的缺氧，并且通过改善线粒体的功能，增强了 HCC 细胞对顺铂的敏感性，从而发挥了协同增效的作用，这为我们今后进一步对 HCC 的化疗增敏作用研究提供启发。

参考文献

[1] DASGUPTA P, HENSHAW C, YOULDEN D R, et al. Global trends in incidence rates of primary adult liver cancers: A systematic review and meta-analysis[J]. Frontiers in Oncology, 2020, 10: 171.

[2] VAUPEL P, SCHMIDBERGER H, MAYER A. The Warburg effect: Essential part of metabolic reprogramming and central contributor to cancer progression[J]. International Journal of Radiation Biology, 2019, 95(7): 912-919.

[3] KOPPENOL W H, BOUNDS P L, DANG C V. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism[J]. Nature Reviews Cancer, 2011, 11(5): 325-337.

[4] LIBERTI M V, LOCASALE J W. The Warburg effect: How does it benefit cancer cells? [J]. Trends in Biochemical Sciences, 2016, 41(3): 211-218.

[5] 宋　奎,许晓军.肿瘤细胞的糖酵解能量代谢机制[J].中国肿瘤临床,2012,39(16):1239-1242.

[6] MORENO-SÁNCHEZ R, RODRíGUEZ-ENRíQUEZ S, SAAVEDRA E, et al. The bioenergetics of cancer: Is glycolysis the main ATP supplier in all tumor cells? [J]. BioFactors, 2009, 35(2): 209-225.

[7] BALAMURUGAN K. HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer[J]. International Journal of Cancer, 2016,

138(5): 1058-1066.

[8] JIN T Q, WANG C, TIAN Y, et al. Mitochondrial metabolic reprogramming: An important player in liver cancer progression[J]. Cancer Letters, 2020, 470: 197-203.

[9] YAO D F, JIANG H, YAO M, et al. Quantitative analysis of hepatic hypoxia-inducible factor-1alpha and its abnormal gene expression during the formation of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International: HBPD INT, 2009, 8(4): 407-413.

[10] 孙建英,陈禧钰,王 理,等.缺氧诱导因子-1α 介导和调控肝癌相关血管生成因子的表达[J].中华肝脏病杂志,2020,28(11):942-948.

[11] PUZIO-KUTER A M. The role of p53 in metabolic regulation[J]. Genes & Cancer, 2011, 2(4): 385-391.

[12] 刘友章,王昌俊,周俊亮,等.长期脾虚模型大鼠细胞线粒体的研究[J].中医药学刊,2006,24(3):391-394.

[13] 胡 齐,宋雅芳,孙 莹.中医"脾主肌肉"与线粒体生物合成中能量代谢的相关性探讨[J].时珍国医国药,2014,25(4):1018-1020.

[14] 欧阳钦,吴春明.薯蓣丸不同组分提取物对人肝癌 HepG2 细胞增殖和凋亡的影响[J].浙江中医杂志,2015,50(3):176-178.

[15] 劳春梅,湛 健,朱 政,等.薯蓣丸加减方联合放化疗治疗鼻咽癌效果及对 VEGF、免疫功能的影响[J].现代中西医结合杂志,2019,28(12):1292-1295.

[16] 杨 宝,王 婧,陈 超,等.HIF-1α 对人结直肠癌细胞裸小鼠成瘤性的影响[J].中国癌症杂志,2021,31(5):377-382.

[17] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局.GB/T 35892-2018,实验动物福利伦理审查指南[S].北京:中国国家标准化管理委员会,2018:2.

[18] 张 强,邵明义,王琳琳,等.中医药治疗原发性肝癌研究述评[J].河南中医,2021,41(3):454-457.

[19] 邵 峰,曾普华,曾光等.基于临床数据分析原发性肝癌的证治规律[J].湖南中医药大学学报,2019,39(1):40-44.

[20] 熊 炜,郭喜利,罗诗雨,等.近十年国内薯蓣丸的实验室研究进展[J].湖北中医杂志,2016,38(11):81-82.

[21] 张 琪,陆 鹏,胡幼平.薯蓣丸的应用研究概况[J].湖南中医杂志,2016,32(6):208-209.

[22] JING X M, YANG F M, SHAO C C, et al. Role of hypoxia in cancer therapy by regulating the tumor microenvironment[J]. Molecular Cancer, 2019, 18(1): 157.

[23] CHOWDHURY A R, LONG A, FUCHS S Y, et al. Mitochondrial stress-induced p53 attenuates HIF-1α activity by physical association and enhanced ubiquitination[J]. Oncogene, 2017, 36(3): 397-409.

[24] YUEN V W, WONG C C. Hypoxia-inducible factors and innate immunity in liver cancer[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2020, 130(10): 5052-5062.

[25] SONG Z, LIU T F, CHEN J, et al. HIF-1α-induced RIT1 promotes liver cancer growth and metastasis and its deficiency increases sensitivity to sorafenib[J]. Cancer Letters, 2019, 460: 96-107.

[26] ZHENG S S, CHEN X H, YIN X, et al. Prognostic significance of HIF-1α expression in hepatocellular carcinoma: a meta-analysis[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e65753.

[27] SABLINA A A, BUDANOV A V, ILYINSKAYA G V, et al. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor[J]. Nature Medicine, 2005, 11(12): 1306-1313.

[28] BUDANOV A V. The role of tumor suppressor p53 in the antioxidant defense and metabolism[J]. Sub-cellular Biochemistry, 2014, 85:337-358.

[29] COCETTA V, RAGAZZI E, MONTOPOLI M. Mitochondrial involvement in cisplatin resistance[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(14): E3384.

[30] ZHANG X F, QI Z H, YIN H J, et al. Interaction between p53 and Ras signaling controls cisplatin resistance via HDAC4-and HIF-1α-mediated regulation of apoptosis and autophagy[J]. Theranostics, 2019, 9(4): 1096-1114.

(本文编辑 苏 维)