护肝布祖热方联合奥沙利铂对肝细胞癌荷瘤裸鼠的减毒增效作用及机制Δ

孟小艺[1*]，杨建华[1,2]，文丽梅[2]，阿依孜巴·图尔洪[1]，胡君萍[1#]（1.新疆医科大学药学院，乌鲁木齐 830017；2.新疆医科大学第一附属医院药学部，乌鲁木齐 830054）

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1001-0408（2024）03-0283-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.03.04

摘 要 目的 研究护肝布祖热方联合奥沙利铂对肝细胞癌荷瘤裸鼠的减毒增效作用及机制。**方法** 从40只裸鼠中选取8只作为空白组（生理盐水），其余32只裸鼠皮下接种人肝癌Huh7细胞构建荷瘤裸鼠模型。将造模成功的32只裸鼠随机分为模型组（生理盐水，灌胃）、奥沙利铂组（10 mg/kg，腹腔注射）、护肝布祖热方组（0.69 g/kg，灌胃）和联合用药组（腹腔注射10 mg/kg奥沙利铂+灌胃0.69 g/kg护肝布祖热方浸膏），每组8只。每天灌胃给药/生理盐水1次，连续32 d；每7天腹腔注射给药1次，共5次。实验期间，观察各组裸鼠一般情况，每4 d测量1次肿瘤体积；给药第30天，检测裸鼠热刺激缩足潜伏期；给药结束后，检测各组裸鼠的抑瘤率、脾脏系数、血常规指标以及血清中天冬氨酸转氨酶（AST）和肌酐水平，观察裸鼠肿瘤组织病理形态变化，检测肿瘤组织中微管相关蛋白1轻链3（LC3）、选择性自噬接头蛋白p62、B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）和胱天蛋白酶3（Caspase-3）的表达。**结果** 与模型组比较，奥沙利铂组裸鼠肿瘤体积、瘤重以及全血中白细胞、红细胞数量和脾脏系数均显著减小/降低（$P<0.01$），热刺激缩足潜伏期和血清中AST、肌酐水平均显著延长/升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。与奥沙利铂组比较，联合用药组裸鼠肿瘤体积、瘤重均显著减小/降低（$P<0.01$），全血中白细胞、红细胞、血小板数量和脾脏系数均显著增加/升高（$P<0.05$或$P<0.01$），热刺激缩足潜伏期和血清中AST、肌酐水平均显著缩短/降低（$P<0.01$）；肿瘤组织中LC3、Bax和Caspase-3蛋白的表达水平均显著升高（$P<0.01$），p62、Bcl-2蛋白的表达水平均显著降低（$P<0.01$）。**结论** 护肝布祖热方通过诱导凋亡和自噬增强奥沙利铂对裸鼠的抑瘤作用，并可缓解奥沙利铂引起的外周神经毒性、血液毒性、肝肾毒性和免疫器官毒性。

关键词 护肝布祖热方；奥沙利铂；肝癌；减毒增效；凋亡；自噬

Attenuation and synergism of Hugan buzure recipe combined with oxaliplatin on hepatocellular carcinoma tumor bearing nude mice and its mechanism

MENG Xiaoyi[1], YANG Jianhua[1,2], WEN Limei[2], Ayiziba·Tuerhong[1], HU Junping[1] (1. College of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830017, China; 2. Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

ABSTRACT OBJECTIVE To investigate the attenuation and synergism of Hugan buzure recipe (HBR) combined with oxaliplatin on hepatocellular carcinoma tumor bearing nude mice and its mechanism. **METHODS** Eight nude mice were selected from 40 nude mice as the blank group (normal saline), and the remaining nude mice were inoculated with hepatoma cells Huh7 to establish the tumor-bearing model. The 32 modeled nude mice were randomly allocated to four groups: model group (normal saline, ig), HBR group (0.69 g/kg, ig), oxaliplatin group (10 mg/kg, ip), and combination group (intraperitoneal injection of 0.69 g/kg HBR+intragastric administration of 10 mg/kg oxaliplatin), with 8 mice in each group. Administer drug/normal saline once a day for 32 consecutive days; administer subcutaneous injection once every 7 days for a total of 5 times. During the experiment, the general condition of nude mice in each group was observed, and the tumor volume was measured every 4 days. On the 30th day of administration, the thermal stimulation paw withdrawal latency of nude mice in each group were detected. The tumor inhibition rate, spleen coefficient, the number of red blood cells, white blood cells and platelets in the whole blood of nude mice in each group, and the content of aspartate aminotransferase (AST) and creatinine in serum were detected after the end of administration. HE staining was used to observe the pathological changes in tumor tissues in nude mice in each group. The expression of microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), selective autophagy adaptor protein p62, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 associated X protein (Bax), and Caspase-3 protein in tumor tissues. **RESULT** Compared with the model group, the tumor volume, tumor weight, white blood cells, red blood cells in the whole blood and spleen coefficients of nude mice in the oxaliplatin group were significantly decreased

Δ **基金项目** 国家自然科学基金项目（No.81560688，No.81860745）；新疆天然药物活性组分与释药技术重点实验室项目（No.XJDX1713）；中央引导地方科技发展专项（No.ZYYD2023B11）

＊ **第一作者** 硕士。研究方向：中药复方肝保护作用及机制。E-mail：2393860921@qq.com

通信作者 教授，博士生导师，博士。研究方向：中药、天然药物。E-mail：hjp-yft@163.com

($P<0.01$); the thermal stimulation paw withdrawal latency, AST and creatinine in serum were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the oxaliplatin group, the tumor volume and tumor weight of nude mice in the combination group were significantly decreased ($P<0.01$); the white blood cells, red blood cells and platelets in the whole blood and spleen coefficients of nude mice were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$); the thermal stimulation paw withdrawal latency, AST and creatinine in serum were significantly decreased ($P<0.01$); the expression levels of LC3, Bax and Caspase-3 proteins in tumor tissues of nude mice were significantly increased ($P<0.01$), and the expression levels of p62 and Bcl-2 proteins were significantly decreased ($P<0.01$). **CONCLUSIONS** HBR enhances the tumor inhibition rate of oxaliplatin by inducing apoptosis and autophagy, and can alleviate the peripheral neurotoxicity, hematological toxicity, hepatorenal toxicity, and immune organ toxicity caused by oxaliplatin in nude mice.

KEYWORDS Hugan buzure recipe; oxaliplatin; hepatic cancer; attenuation and synergism; apoptosis; autophagy

肝细胞癌是目前与癌症相关死亡的第三大原因[1]。目前，肝癌的治疗方法主要包括肝切除、肝移植等外科疗法和放疗及化疗等，但由于这些疗法的毒副作用和耐药性，导致肝癌的预后不好[2]。目前，以奥沙利铂为主的FOLFOX4方案被广泛用于肝癌的治疗，且治疗效果良好[3]。研究表明，奥沙利铂可以通过下调肝癌细胞中B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）表达和上调Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）表达来诱导肝癌细胞凋亡[4]。另有研究表明，奥沙利铂也可以诱导自噬体增加，进而增强HepG2肝癌细胞的自噬功能[5]。但随着奥沙利铂临床用量的增加，其不良反应引起了人们的广泛关注，主要有神经系统、消化系统不良反应和血液毒性及肝肾毒性等[6]。

中药复方多年来一直被用于肝细胞癌的治疗，可有效改善患者的临床症状。比如，槐耳清膏可以激活人肝癌细胞SK-HEP-1自噬，从而发挥抑制癌细胞增殖的作用[7]；小柴胡汤可以上调凋亡相关蛋白Bax的表达、下调Bcl-2的表达，从而促进人肝癌细胞Huh7的凋亡[8]。中药复方联合化疗药物用于肿瘤的治疗，不仅可以增强化疗药物的疗效，还可以延缓耐药性的产生，减轻其毒副反应。如贞芪扶正颗粒具有增强奥沙利铂抑制肝癌移植瘤生长的作用[9]，槐耳颗粒可通过调控氧化还原平衡缓解奥沙利铂所引起的肝脏损伤[10]。

护肝布祖热方是新疆地区的保肝经典方，由芹菜根（Apii Radix）、芹菜子（Apii Semen）、菊苣根（Cichorii Radix）、菊苣子（Cichorii Semen）、菟丝子（Cuscutae Semen）、茴香根皮（Foeniculi Cortex）、小茴香（Foeniculi Fructus）7种药味组成，具有补益肝胃、散气止痛、利胆和利水等功效，在临床上主要用于治疗急、慢性乙型肝炎和急、慢性胆囊炎，并可联合化疗药物用于治疗肝癌等。本课题组前期研究证实了护肝布祖热方在体外可通过调控磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路诱导肝癌细胞凋亡和自噬，进而抑制肝癌细胞增殖[11]。在此基础上，本研究拟从抗凋亡和自噬角度探讨护肝布祖热方联合奥沙利铂对荷瘤裸鼠的减毒增效作用，以期为拓展护肝布祖热方的临床应用提供理论基础。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用的主要仪器有：AE240型分析天平[梅特勒-托利多国际贸易（上海）有限公司]、H1750R型高速台式冷冻离心机（湖南湘仪动力测试仪器有限公司）、MultiskanGO型酶标仪（美国Thermo Fisher Scientific公司）、PL-200型热刺痛仪（成都泰盟科技有限公司）、BC5000vet型全自动血液分析仪（深圳迈瑞医疗器械有限公司）、Eclipse Ni-U型显微镜（日本Nikon公司）。

1.2 主要药品与试剂

菊苣子（批号JJZ-YP-200527）、菊苣根（批号JJZ-YP-191209）、茴香根皮（批号HXGP-YP-210115）药材均购自新疆安萨尔维吾尔药业有限公司；芹菜根（批号G30131002）、芹菜子（批号Z30142203）药材均购自新疆维吾尔自治区维吾尔医医院；小茴香（批号191023）、菟丝子（批号150701）药材均购自新疆和济中药饮片有限公司。以上药材由新疆医科大学药学院胡君萍教授鉴定均为真品，药材标本保存于新疆医科大学生药学教研室。

奥沙利铂对照品（批号100584-202005，纯度≥99%）购自中国食品药品检定研究院；兔抗微管相关蛋白1轻链3（microtubule-associated protein 1 light chain 3，LC3）抗体（批号14600-1-AP）、鼠抗选择性自噬接头蛋白p62抗体（批号66184-1-lg）、鼠抗胱天蛋白酶3（Caspase-3）抗体（批号66470-2-lg）、鼠抗Bax抗体（批号60267-1-lg）、鼠抗β-肌动蛋白（β-actin）抗体（批号66009-1-lg）、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠IgG二抗（批号20000275）和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗（批号20000758）均购自武汉三鹰生物技术有限公司；兔抗Bcl-2抗体（批号32124）购自英国Abcam公司；天冬氨酸转氨酶（aspartate transaminase，AST）测试盒（批号C010-2-1）和肌酐测试盒（批号C011-2-1）均购自南京建成生物工程研究所。

1.3 细胞株及动物

人肝癌Huh7细胞株（批号CL-0120）购自武汉普诺赛生命科技有限公司。本研究所用动物为SPF级雄性BALB/c裸鼠，共40只，体重（22±2）g，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，动物生产许可证号为SCXK（京）2021-0006。本研究所涉及的动物实验均符合新疆医科大学动物伦理委员会的相关要求，伦理批准号为IACUC-20180222-62。

2 方法

2.1 药物制备

根据护肝布祖热原方组成，称取菊苣子40 g、芹菜根40 g、茴香根皮40 g、菊苣根20 g、芹菜子20 g、小茴香20 g、菟丝子10 g，混合粉碎，加水煎煮3次，煎煮时间分别2、1.5、1 h，合并3次煎液，过滤，浓缩干燥滤液得干浸膏，得率为18.82%。称取适量护肝布祖热方浸膏或奥沙利铂，用无菌超纯水稀释至给药浓度。

2.2 建模、分组与给药

将人肝癌Huh7细胞复苏后接种至含10%胎牛血清的DMEM培养基中，置于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养至细胞密度为80%～90%时，用0.25%胰蛋白酶消化，每2～3 d传代1次。按照随机数字表法选取8只裸鼠作为空白组，其余32只裸鼠复制荷瘤模型。用磷酸盐缓冲液调整细胞密度为5×10^7个/mL，取0.1 mL接种于裸鼠右侧腋下，待裸鼠右侧腋下出现黄豆粒大小的肿瘤即视为造模成功[12]。本研究造模成功率为100%。

将造模成功的32只裸鼠按完全随机数字表法分为模型组、护肝布祖热方组、奥沙利铂组和联合用药组，每组8只。空白组和模型组裸鼠每天灌胃生理盐水0.1 mL；奥沙利铂组裸鼠每周腹腔注射奥沙利铂（10 mg/kg）[13]1次，即于实验第0、7、14、21、28天各注射1次，每只裸鼠注射0.2 mL；护肝布祖热方组裸鼠灌胃0.69 g/kg护肝布祖热方浸膏溶液（根据成人临床用量换算而得）；联合用药组裸鼠每周按上述剂量腹腔注射奥沙利铂1次，同时每天灌胃护肝布祖热方浸膏溶液。护肝布祖热方共给药32 d，每天给药1次。

在给药第1天，空白组、模型组和奥沙利铂组裸鼠由于操作原因各死亡1只，给药第4天模型组和护肝布祖热方组裸鼠由于操作原因各死亡1只，给药第8天联合用药组裸鼠由于操作原因死亡1只。由于裸鼠损耗，最终每组取6只裸鼠用于后续实验。

2.3 一般状况及肿瘤体积观察

实验期间观察裸鼠精神状态、活动量、饮食、排泄等一般情况，分别在给药第0、4、8、12、16、20、24、28、32天观察并记录裸鼠体重及肿瘤体积变化，其中肿瘤体积（V）=1/2肿瘤最长直径（a）×肿瘤最短直径（b）^{2}。

2.4 热刺激缩足潜伏期检测

给药第30天，将裸鼠放入热刺痛仪，待裸鼠稳定后将热刺痛仪红外加热中心置于裸鼠后脚掌中心，打开电源，仪器开始加热并计时，等裸鼠因疼痛抬足后，仪器暂停加热并停止计时，此时记录的时间为裸鼠的热刺激缩足反应潜伏期。

2.5 样本取材及处理

末次给药24 h后，眼球取血0.7～1 mL，取出全血0.1 mL用于血常规指标检测；剩余全血以3 000 r/min离心10 min，收集上层血清，于－80 ℃下保存，用于肝、肾功能指标检测。采用颈椎脱臼法处死裸鼠，剥离出肿瘤、脾脏组织，用生理盐水清洗干净，并用吸水纸吸去组织多余水分，称重，然后分别固定在4%多聚甲醛中，用于组织病理形态学观察。

2.6 血常规指标检测

取“2.5”项下全血，使用血细胞分析仪测定全血中红细胞、白细胞和血小板数量。

2.7 抑瘤率及脾脏系数检测

称定“2.5”项下肿瘤、脾脏组织质量，并计算抑瘤率和脾脏系数。抑瘤率＝（模型组平均瘤重－实验组平均瘤重）/模型组平均瘤重×100%；脾脏系数＝脾脏质量（mg）/裸鼠体重（g）。

2.8 血清中肝、肾功能指标检测

取“2.5”项下冻存的血清样品，按照对应的试剂盒说明书，采用酶标仪检测血清中AST和肌酐水平。

2.9 肿瘤组织病理形态学观察

采用苏木素-伊红（HE）染色法进行观察。将“2.5”项下肿瘤组织放入4%甲醛中固定、脱水、包埋、切片（切片厚度5 μm）后，行常规HE染色，然后在显微镜下观察组织病理学变化。

2.10 肿瘤组织中自噬和凋亡相关蛋白的表达水平检测

采用免疫组化法进行检测。取“2.9”项下裸鼠肿瘤组织切片浸泡于不同浓度的二甲苯中脱蜡，使用不同浓度的乙醇浸泡进行水化，柠檬酸微波修复，滴加内源性过氧化物阻断剂后室温孵育，然后加入血清进行封闭。封闭结束后，分别滴加Bax（稀释比例为1∶500）、Bcl-2（稀释比例为1∶500）、Caspase-3（稀释比例为1∶150）、LC3（稀释比例为1∶300）、p62（稀释比例为1∶500）抗体，4 ℃孵育过夜；滴加二抗，使用DAB显色、苏木素染核、分化、脱水、透明、封片后，在显微镜下观察肿瘤组织抗原表达情况。每张切片在显微镜下选取3个视野进行观察，以棕黄色为阳性表达。采用Image J软件计算蛋白的平均光密度值，平均光密度值越大说明蛋白表达水平越高。

2.11 统计学方法

使用SPSS 25.0软件对实验数据进行统计分析，使用GraphPad Prism 8软件作图。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准α＝0.05。

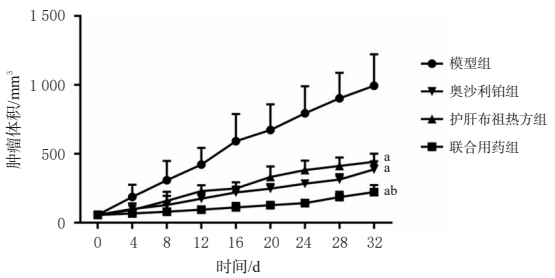
3 结果

3.1 一般状况观察结果

空白组和护肝布祖热方组裸鼠在给药期间活动正常，皮肤呈健康粉色，四肢温度正常，饮食正常；奥沙利铂组裸鼠在给药第20天后出现四肢冰冷、皮肤颜色发白、软便、精神萎靡、少食、少活动等情况；联合用药组裸鼠上述症状明显改善，其四肢温度正常，皮肤呈健康粉色，精神和活动尚可。

3.2 肿瘤体积测定结果

给药32 d后，与模型组比较，各给药组裸鼠肿瘤体积均显著减小（$P<0.01$）；与奥沙利铂组比较，联合用药组裸鼠肿瘤体积显著减小（$P<0.01$）。结果见图1。



a：与模型组比较，$P<0.01$；b：与奥沙利铂组比较，$P<0.01$。

图1 给药不同时间后各组裸鼠的肿瘤体积测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

3.3 热刺激缩足潜伏期测定结果

与空白组[（2.31±0.32）s]比较，模型组裸鼠热刺激缩足潜伏期[（3.03±0.08）s]有所延长，但差异无统计学意义（$P>0.05$）；与模型组比较，护肝布祖热方组、奥沙利铂组裸鼠热刺激缩足潜伏期[分别为（3.13±0.27）、（6.74±1.11）s]均不同程度延长，其中奥沙利铂组差异具有统计学意义（$P<0.01$）；与奥沙利铂组比较，联合用药组裸鼠热刺激缩足潜伏期[（3.83±0.20）s]显著缩短（$P<0.01$）。

3.4 抑瘤率测定结果

与模型组比较，各给药组裸鼠的瘤重均显著降低（$P<0.01$）；与奥沙利铂组比较，联合用药组裸鼠瘤重显著降低（$P<0.05$），其抑瘤率超过了80.00%。结果见表1。

表1 各组裸鼠的抑瘤率测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	瘤重/g	抑瘤率/%
模型组	0.46±0.05	-
奥沙利铂组	0.14±0.04[a]	68.19
护肝布祖热方组	0.21±0.05[a]	54.61
联合用药组	0.08±0.03[ab]	81.68

a：与模型组比较，$P<0.01$；b：与奥沙利铂组比较，$P<0.05$。

3.5 脾脏系数测定结果

与空白组[（3.95±0.82）mg/g]比较，模型组裸鼠的脾脏系数[（5.50±0.73）mg/g]显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，奥沙利铂组裸鼠的脾脏系数[（1.77±0.28）mg/g]显著降低（$P<0.01$），护肝布祖热方组裸鼠的脾脏系数[（5.93±1.14）mg/g]差异无统计学意义（$P>0.05$）；与奥沙利铂组比较，联合用药组裸鼠脾脏系数[（6.77±1.15）mg/g]显著升高（$P<0.01$）。

3.6 血常规指标测定结果

与空白组比较，模型组裸鼠全血中白细胞和血小板数量均显著增加（$P<0.05$或$P<0.01$）；与模型组比较，奥沙利铂组裸鼠全血中白细胞和红细胞数量均显著减少（$P<0.01$），而护肝布祖热方组裸鼠上述血常规指标差异均无统计学意义（$P>0.05$）；与奥沙利铂组比较，联合用药组裸鼠全血中白细胞、红细胞、血小板数量均显著增加（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见表2。

表2 各组裸鼠的血常规测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	白细胞/(10^9 L^{-1})	红细胞/(10^{12} L^{-1})	血小板/(10^9 L^{-1})
空白组	1.78±0.32	10.81±0.83	479.67±144.79
模型组	3.20±0.67[a]	9.83±0.85	856.50±260.82[b]
奥沙利铂组	1.18±0.39[c]	7.67±1.07[c]	609.00±271.44
护肝布祖热方组	4.58±1.28	10.04±0.26	1 056.00±91.12
联合用药组	7.01±3.30[d]	8.89±1.25[d]	1 370.83±262.00[e]

a：与空白组比较，$P<0.05$；b：与空白组比较，$P<0.01$；c：与模型组比较，$P<0.01$；d：与奥沙利铂组比较，$P<0.05$；e：与奥沙利铂组比较，$P<0.01$。

3.7 血清中肝、肾功能指标测定结果

与空白组比较，模型组裸鼠血清中AST和肌酐水平均有所升高，但差异无统计学意义（$P>0.05$）；与模型组比较，奥沙利铂组裸鼠血清中AST和肌酐水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），而护肝布祖热方组裸鼠血清中上述指标差异无统计学意义（$P>0.05$）；与奥沙利铂组比较，联合用药组裸鼠血清中AST和肌酐水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见表3。

表3 各组裸鼠血清中肝、肾功能指标测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	AST/(U/g prot)	肌酐/(μmol/L)
空白组	23.09±4.93	29.50±12.33
模型组	26.27±3.00	32.69±8.94
奥沙利铂组	31.49±4.63[a]	46.22±7.11[b]
护肝布祖热方组	21.66±2.77	24.60±4.94
联合用药组	22.72±5.28[c]	27.20±4.94[c]

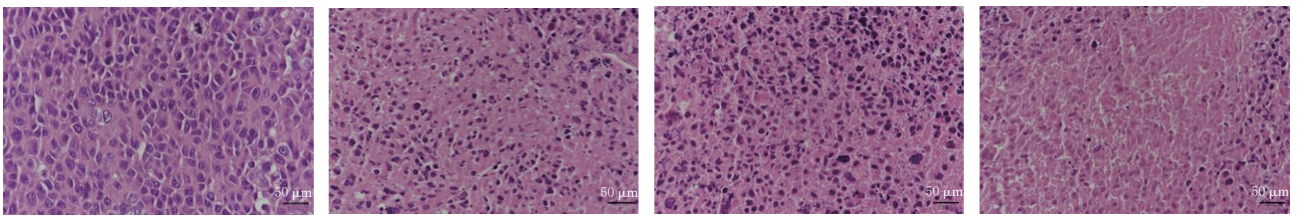
a：与模型组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.01$；c：与奥沙利铂组比较，$P<0.01$。

3.8 肿瘤组织病理形态学观察结果

模型组裸鼠肿瘤细胞排列紧密，细胞密度高，细胞核形状规则；护肝布祖热方组裸鼠肿瘤细胞数量减少，部分肿瘤细胞变性、破裂；奥沙利铂组裸鼠肿瘤细胞核质不清晰，部分肿瘤细胞破裂；联合用药组裸鼠大部分肿瘤细胞破裂坏死，出现大片染红。结果见图2。

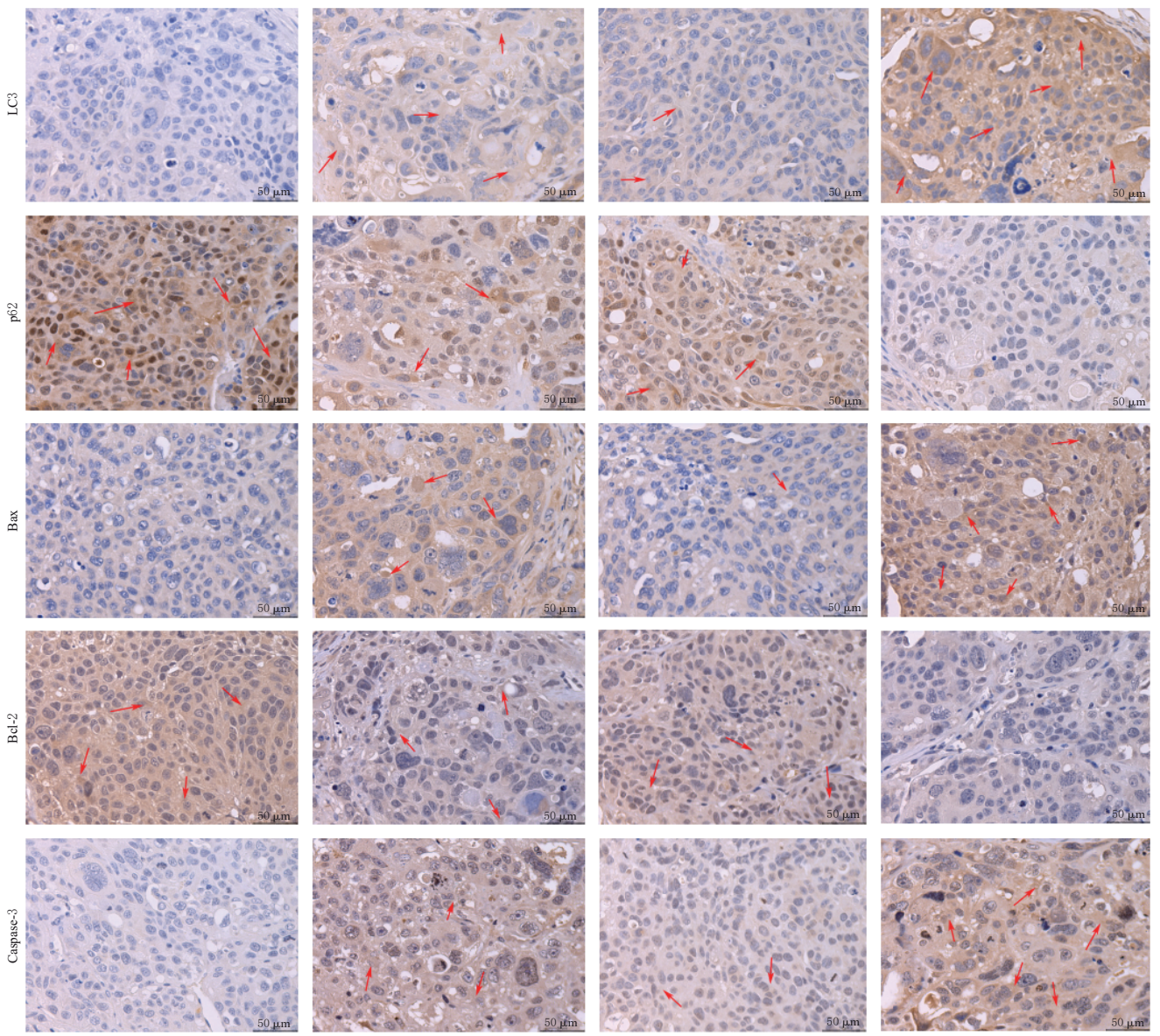
3.9 肿瘤组织中自噬和凋亡相关蛋白表达水平测定结果

与模型组比较，护肝布祖热方组、奥沙利铂组裸鼠肿瘤组织中LC3、Bax、Caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），p62、Bcl-2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$）；与奥沙利铂组比较，联合用药组裸鼠肿瘤组织中LC3、Bax、Caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.01$），p62、Bcl-2蛋白表达水平均显著降低（$P<0.01$）。结果见图3、表4。



A.模型组　B.奥沙利铂组　C.护肝布祖热方组　D.联合用药组

图2　各组裸鼠肿瘤组织的病理形态学观察结果（HE染色）



A.模型组　B.奥沙利铂组　C.护肝布祖热方组　D.联合用药组

注：图中箭头所指为阳性细胞染色。

图3　各组裸鼠自噬和凋亡蛋白表达检测的免疫组化图

表4　各组裸鼠肿瘤组织中自噬和凋亡相关蛋白的表达水平测定结果（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

组别	LC3	p62	Bax	Bcl-2	Caspase-3
模型组	0.08±0.01	0.23±0.01	0.10±0.00	0.19±0.01	0.08±0.01
奥沙利铂组	0.15±0.00[a]	0.13±0.01[a]	0.14±0.01[a]	0.12±0.01[a]	0.18±0.01[a]
护肝布祖热方组	0.10±0.01[a]	0.19±0.00[a]	0.11±0.01[b]	0.14±0.01[a]	0.10±0.01[a]
联合用药组	0.18±0.01[c]	0.08±0.01[c]	0.19±0.01[c]	0.10±0.01[c]	0.20±0.01[c]

a：与模型组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与奥沙利铂组比较，$P<0.01$。

4　讨论

肝癌恶性程度高、预后差，其发病率和死亡率在全球范围内一直呈上升趋势。目前，以奥沙利铂为主的FOLFOX4方案是治疗肝癌的主要手段之一。但奥沙利铂在用药过程中不可避免地出现了一系列毒性反应，如外周神经毒性、血液毒性[14]、免疫毒性[15]和肝、肾毒性[16]。中药复方的整体协同作用与化学药局部治疗理论互补，

联合使用可以达到优势互补、标本兼治的效果，在增强化学药疗效的同时还可以降低其毒副作用。因此，本研究以荷瘤裸鼠为模型，分析护肝布祖热方联合奥沙利铂的增效减毒作用。本研究结果显示，奥沙利铂和护肝布祖热方联用可以增强奥沙利铂抑制肿瘤生长的疗效，提高抑瘤率。

在使用奥沙利铂过程中80%～90%的患者会出现不同程度的外周神经毒性症状，主要体现在末端肢体感觉异常[17]。在本研究中，奥沙利铂组裸鼠在给药后，其四肢冰冷无血色、热刺激缩足潜伏期显著延长，而联合用药组裸鼠上述症状得到缓解，这说明护肝布祖热方可以改善奥沙利铂引起的外周神经毒性。此外，奥沙利铂还具有一定的血液毒性和免疫毒性。本研究结果显示，奥沙利铂会造成模型裸鼠全血中白细胞、红细胞、血小板数量减少，并可使脾脏系数降低；而与护肝布祖热方联合处理后，可以增加模型裸鼠全血中白细胞、红细胞、血小板的数量，并可升高其脾脏系数。这说明护肝布祖热方可以改善模型裸鼠造血功能及免疫功能，拮抗奥沙利铂所造成的血液毒性和对免疫功能的影响。本研究通过检测裸鼠血清中AST和肌酐水平变化，发现护肝布祖热方联合奥沙利铂处理后可以显著降低模型裸鼠血清中AST和肌酐水平，表明护肝布祖热方可以减轻奥沙利铂所引起的肝、肾毒性。

细胞凋亡和细胞自噬均是细胞程序性死亡的表现形式，大多数药物都可以通过调节癌细胞的凋亡达到治疗癌症的目的。细胞凋亡途径分为死亡受体介导的外源性凋亡途径和线粒体介导的内源性凋亡途径，这2条途径均通过激活下游凋亡蛋白酶Caspase诱发凋亡[18]。抗凋亡家族成员Bcl-2蛋白和促凋亡家族成员Bax蛋白是调节凋亡的关键因素，Bcl-2和Bax相互作用，使线粒体膜通透性改变，最终激活下游的Caspase-3，引发细胞凋亡[19]。自噬是一种依赖溶酶体的分解代谢途径，在维持细胞内环境质量方面至关重要[20]。LC3是一种被广泛认可的自噬标记物，当自噬发生时，LC3-Ⅰ会转化为LC3-Ⅱ；p62是一种自噬标记蛋白，能够与LC3结合，在自噬-溶酶体系统的作用下，使自身进行降解[21]。本研究结果显示，与奥沙利铂组比较，联合用药组模型裸鼠肿瘤组织中Bax、Caspase-3和LC3蛋白表达上调，Bcl-2和p62蛋白表达下调。以上结果表明，联合用药后可以促进细胞凋亡和自噬。

综上所述，护肝布祖热方可增强奥沙利铂对荷瘤裸鼠的抑瘤作用，缓解奥沙利铂产生的外周神经毒性、血液毒性、免疫器官毒性和肝肾毒性等；进一步探讨其作用机制发现，护肝布祖热方可能是通过诱导细胞凋亡和自噬从而起到减毒增效作用。

参考文献

[1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2021, 71(3): 209-249.

[2] PAN X W, HUANG J S, LIU S R, et al. Evaluation of the liver targeting and anti-liver cancer activity of artesunate-loaded and glycyrrhetinic acid-coated nanoparticles[J]. Exp Ther Med, 2023, 26(5): 516.

[3] ZHANG C Y, XU C, GAO X Y, et al. Platinum-based drugs for cancer therapy and anti-tumor strategies[J]. Theranostics, 2022, 12(5): 2115-2132.

[4] 张燕，左国庆，汤为学. 奥沙利铂对人肝癌细胞株HepG2体外增殖的影响[J]. 中华肝脏病杂志，2004，12(6)：374-375.
ZHANG Y, ZUO G Q, TANG W X. Study on apoptosis of human hepatoma cell line HepG2 induced by oxaliplatin [J]. Chin J Hepatol, 2004, 12(6): 374-375.

[5] 李媛媛，马泰，仲飞，等. 奥沙利铂诱导的人肝癌细胞株HepG2自噬潮增加及其对细胞生存率的影响[J]. 肿瘤，2013，33(2)：132-137.
LI Y Y, MA T, ZHONG F, et al. The enhancement of autophagic flux induced by oxaliplatin in hepatocarcinoma cell line HepG2 and its influence on cell proliferation[J]. Tumor, 2013, 33(2): 132-137.

[6] 朱晨，刘东，张程亮，等. 姜黄素及其类似物辅助奥沙利铂治疗的研究进展[J]. 中国医院药学杂志，2020，40(21)：2284-2288.
ZHU C, LIU D, ZHANG C L, et al. Study progress of curcumin and its analogues in oxaliplatin therapy[J]. Chin J Hosp Pharm, 2020, 40(21): 2284-2288.

[7] 杨爱琳，夏天吉，赵亚楠，等. 槐耳清膏通过激活自噬抑制人肝癌细胞SK-HEP-1增殖[J]. 中国中药杂志，2018，43(3)：591-595.
YANG A L, XIA T J, ZHAO Y N, et al. Huaier aqueous extract inhibits proliferation of human hepatoma SK-HEP-1 cells through up-regulation of autophagy[J]. China J Chin Mater Med, 2018, 43(3): 591-595.

[8] ZHAO J Y, LIU L Y, ZHANG Y C, et al. The herbal mixture Xiao-Chai-hu Tang (xcht) induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma huh7 cells *in vitro* and *in vivo*[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med, 2017, 14(3): 231-241.

[9] 周熙祥，伍志伟，张录梅，等. 贞芪扶正颗粒辅助奥沙利铂治疗H_{22}移植瘤小鼠的疗效及其对Bax、Bcl-2表达的影响[J]. 中成药，2021，43(7)：1746-1752.
ZHOU X X, WU Z W, ZHANG L M, et al. Effect of Zhenqi fuzheng granules with oxaliplatin in the treatment

for H_{22}-bearing mice and the influences on Bax and Bcl-2 in tumor tissue[J]. Chin Tradit Pat Med, 2021, 43(7): 1746-1752.

[10] 朱晨,张程亮,杨金玉,等.槐耳颗粒缓解奥沙利铂诱导肝脏损伤的作用及机制研究[J].中国医院药学杂志,2021,41(17):1723-1729.
ZHU C, ZHANG C L, YANG J Y, et al. Study on the effect and mechanism of Huaier granules in relieving oxaliplatin-induced liver injury[J]. Chin J Hosp Pharm, 2021,41(17):1723-1729.

[11] MENG X Y, LI M, QIAO M, et al.Hugan buzure induces autophagy and apoptosis in hepatocellular carcinoma by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2022,2022:1618491.

[12] 薛淑一,李明春,苗青,等.白头翁皂苷B4对肝癌细胞Huh-7及其荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用及机制研究[J].中国药房,2019,30(5):601-607.
XUE S Y, LI M C, MIAO Q, et al. Inhibitory effects and mechanism of anemoside B4 on hepatocellular carcinoma Huh-7 cells and tumor-bearing nude mice[J].China Pharm, 2019,30(5):601-607.

[13] WANG Z, ZHOU J, FAN J, et al. Oxaliplatin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2009, 18(11):1595-1604.

[14] 邱泗安,姜秀清.黄芪桂枝五物汤对奥沙利铂所致神经及血液毒性的治疗效果观察[J].山东医药,2014,54(6):88-89.
QIU S A, JIANG X Q. Observation on therapeutic effect of Huangqi guizhi wuwu decoction on nerve and blood toxicity caused by oxaliplatin[J]. Shandong Med J, 2014, 54(6):88-89.

[15] 顾莅冰,陈正鑫,蒋泽砚,等.参麦注射液协同奥沙利铂抗结肠肿瘤作用[J].天津中医药大学学报,2018,37(6):449-454.
GU L B, CHEN Z X, JIANG Z Y, et al. Effect of Shenmai injection combined with oxaliplatin on colon cancer[J]. J Tianjin Univ Tradit Chin Med, 2018, 37(6):449-454.

[16] ILERITURK M, ILERITURK D, KANDEMIR O, et al. Naringin attenuates oxaliplatin-induced nephrotoxicity and hepatotoxicity: a molecular, biochemical, and histopathological approach in a rat model[J]. J Biochem Mol Toxicol, 2023:e23604.

[17] 吴艾平,吴林龙,张红颖,等.加味黄芪桂枝五物汤抑制线粒体凋亡预防奥沙利铂周围神经毒性机制[J].西部医学,2023,35(2):182-187.
WU A P, WU L L, ZHANG H Y, et al. Prevention of modified Huangqi Guizhi Wuwu decoction on inhibiting mitochondrial apoptosis mechanism of oxaliplatin peripheral neurotoxicity[J]. Med J West China, 2023, 35(2): 182-187.

[18] GHOBRIAL I M, WITZIG T E, ADJEI A A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(3):178-194.

[19] 塔玛莎·库尔曼江,王小静,李欣奕,等.异硫氰酸苄酯通过激活p53和AMPK-FOXO1a信号通路诱导宫颈癌细胞周期阻滞和凋亡[J].中国药理学通报,2024,(1):114-125.
Tamasha·Kuermanjiang, WANG X J, LI X Y, et al. Benzyl isothiocyanate induces cell cycle arrest and apoptosis in cervical cancer through activation of p53 and AMPK-FOXO1a signaling pathways[J]. Chin Pharmacol Bull, 2024,(1):114-125.

[20] ZHONG P P, YANG H, LIN S, et al. A traditional Chinese medicine herb mixture Qingjie fuzheng granules inhibits hepatocellular carcinoma cells growth by inducing apoptosis[J]. J Evid Based Integr Med, 2018, 23:2515690X1878-9632.

[21] JIANG T, HARDER B, ROJO DE LA VEGA M, et al.p62 links autophagy and Nrf2 signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 88(Pt B):199-204.

（收稿日期:2023-09-01　修回日期:2024-01-16）
（编辑:林　静）