

世界华人消化杂志®

**WORLD CHINESE
JOURNAL OF DIGESTOLOGY**

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

2020 年 6 月 28 日 第 28 卷 第 12 期 (Volume 28 Number 12)



12/2020

ISSN 1009-3079



9 771009 307056

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物. 本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊域出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录.



述评

- 453 非编码RNA在食管癌中的意义

周苏娜

- 460 超声影像组学在肝脏病变的诊断应用进展

梁梓南, 杨薇

基础研究

- 467 白花丹醌对大鼠肝细胞肝癌自噬活性的影响并机制初探

陈懿, 李雪, 陈金霞, 林文雅, 张友才

- 475 真核起始因子3e亚基与原发肝癌的发生与发展正相关

张珊, 陈忠伟, 孟诗敏, 丁庆林, 钟自彪, 魏艳红, 叶启发, 胡康洪

文献综述

- 486 调节性B淋巴细胞在消化系统自身免疫性疾病中的作用

霍佳慧, 王小云, 龚镭, 顾馨

- 493 肿瘤微环境对肝细胞癌血管生成的影响

章小珊, 张彩灵, 黄赞松

研究快报

- 501 健康行为能力在初产妇心理弹性和母乳喂养自我效能中的中介作用

楼燕芳

- 506 心理弹性在老年脑卒中合并功能性便秘患者家庭功能与出院准备度的中介作用

蒋元华, 付佳, 方玉华

消 息

- 466 《世界华人消化杂志》参考文献要求
474 《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标
485 《世界华人消化杂志》2011年开始不再收取审稿费
492 《世界华人消化杂志》消化护理学领域征稿启事

封面故事

李健丁, 主任医师, 国家二级教授, 博士生导师, 山西医科大学第一医院“首席专家”, 山西现代医学研究所所长; 历任山西医科大学第一医院放射科主任, 副院长, 山西医科大学医学影像学系主任; 曾任中华医学会放射学分会10、11届委员, 12、13届常务委员; 山西省医学会放射学分会9、10届主任委员, 中国医师协会全国委员; 获中华医学会科技进步奖1项, 山西省科技进步一等奖2项, 二等奖5项; 主编著作8部, 参编教材9部, 主持各类基金20余项, 发表论文100余篇。

本期责任人

编务 王栋梅; 送审编辑 张晗; 组版编辑 刘继红; 英文编辑 王天奇;
形式规范审核编辑部主任 吴云晓健; 最终清样审核总编辑 马连生

世界华人消化杂志

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

吴阶平 题写封面刊名

陈可冀 题写版权刊名

(半月刊)

创 刊 1993-01-15

改 刊 1998-01-25

出 版 2020-06-28

原刊名 新消化病学杂志

期刊名称

世界华人消化杂志

国际标准连续出版物号

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

主编

党双锁, 教授, 710004, 陕西省西安市, 西安交通大学医学院第二附属医院感染科

江学良, 教授, 250031, 山东省济南市, 中国人民解放军济南军区总医院消化科

刘占举, 教授, 200072, 上海市, 同济大学附属第十人民医院消化内科

吕宾, 教授, 310006, 浙江省杭州市, 浙江中医药大学附属医院(浙江省中医院)消化科

马大烈, 教授, 200433, 上海市, 中国人民解放军第二军医大学附属长海医院病理科

王俊平, 教授, 030001, 山西省太原市, 山西省人民医院消化科

王小众, 教授, 350001, 福建省福州市, 福建医科大学附属协和医院消化内科

姚登福, 教授, 226001, 江苏省南通市, 南通大学附属医院临床医学研究中心

张宗明, 教授, 100073, 北京市, 首都医科大学北京电力医院普外科

编辑委员会

编辑委员会成员在线名单, 详见:

<https://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

编辑部

马亚娟, 主任

《世界华人消化杂志》编辑部

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,

CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: wcjd@wjgnet.com

<http://www.wjgnet.com>

出版

百世登出版集团有限公司

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton,

CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

制作

北京百世登生物医学科技有限公司
100025, 北京市朝阳区东四环中路
62号, 远洋国际中心D座903室
电话: +86-10-85381892

《世界华人消化杂志》是一本高质量的同行评议, 开放获取和在线出版的学术刊物。本刊被国际检索系统《化学文摘(Chemical Abstracts, CA)》、《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica, EM)》、《文摘杂志(Abstract Journal, AJ)》、Scopus、中国知网《中国期刊全文数据库(CNKI)》、《中文科技期刊数据库(CSTJ)》和《超星期刊出版平台(Superstar Journals Database)》数据库收录。

《世界华人消化杂志》正式开通了在线办公系统(<https://www.baishideng.com>), 所有办公流程一律可以在线进行, 包括投稿、审稿、编辑、审读, 以及作者、读者和编者之间的信息反馈交流。

特别声明

本刊刊出的所有文章不代表本刊编辑部和本刊编委会的观点, 除非特别声明。本刊如有印装质量问题, 请向本刊编辑部调换。

定价

每期136.00元 全年24期3264.00元

© 2020 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Contents

Volume 28 Number 12 June 28, 2020

EDITORIAL

- 453 Role of non-coding RNAs in esophageal carcinoma
Zhou SN
- 460 Advances in diagnostic application of ultrasomics in liver lesions
Liang ZN, Yang W

BASIC RESEARCH

- 467 Effect of plumbagin on autophagy activity in rat hepatocellular carcinoma and underlying mechanism
Chen Y, Li X, Chen JX, Lin WY, Zhang YC
- 475 Eukaryotic initiation factor 3e subunit is positively associated with tumorigenesis and development of hepatocellular carcinoma
Zhang S, Chen ZW, Meng SM, Ding QL, Zhong ZB, Wei YH, Ye QF, Hu KH

REVIEW

- 486 Role of regulatory B cells in autoimmune diseases of the digestive system
Huo JH, Wang XY, Gong L, Gu X
- 493 Influence of tumor microenvironment on angiogenesis in hepatocellular carcinoma
Qin XS, Zhang CL, Huang ZS

RAPID COMMUNICATION

- 501 Mediating role of healthy behavioral ability in maternal mental resilience and breastfeeding self-efficacy in primiparae
Lou YF
- 506 Mediating effect of mental resilience on family function and discharge readiness in elderly stroke patients with functional constipation
Jiang YH, Fu J, Fang YH

Contents

World Chinese Journal of Digestology
Volume 28 Number 12 June 28, 2020

COVER

Editorial Board Member of *World Chinese Journal of Digestology*, Jian-Ding Li, Professor, Chief Physician, Doctoral Supervisor, Department of Radiology, First Hospital of Shanxi Medical University, No. 85, Jiefang South Road, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Indexed/Abstracted by

Chemical Abstracts, EMBASE/Excerpta Medica, Abstract Journals, Scopus, CNKI, CSTJ and Superstar Journals Database.

RESPONSIBLE EDITORS FOR THIS ISSUE

Assistant Editor: *Dong-Mei Wang*

Review Editor: *Han Zhang*

Production Editor: *Ji-Hong Liu*

English Language Editor: *Tian-Qi Wang*

Proof Editor: *Yun-Xiaojuan Wu*

Layout Reviewer: *Lian-Sheng Ma*

Shijie Huaren Xiaohua Zazhi

Founded on January 15, 1993

Renamed on January 25, 1998

Publication date June 28, 2020

NAME OF JOURNAL

World Chinese Journal of Digestology

ISSN

ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online)

EDITOR-IN-CHIEF

Shuang-Suo Dang, Professor, Department of Infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital of Medical School of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, Shaanxi Province, China

Xue-Liang Jiang, Professor, Department of Gastroenterology, General Hospital of Jinan Military Command of Chinese PLA, Jinan 250031, Shandong Province, China

Zhan-Ju Liu, Professor, Department of Gastroenterology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China

Bin Lv, Professor, Department of Gastroenterology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, Zhejiang Province, China

Da-Lie Ma, Professor, Department of Pathology, Changhai Hospital, the Second Military Medical University of Chinese PLA, Shanghai 200433, China

Jun-Ping Wang, Professor, Department of Gastroenterology, People's Hospital of Shanxi,

Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Xiao-Zhong Wang, Professor, Department of Gastroenterology, Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350001, Fujian Province, China

Deng-Fu Yao, Professor, Clinical Research Center, Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, Jiangsu Province, China

Zong-Ming Zhang, Professor, Department of General Surgery, Beijing Electric Power Hospital, Capital Medical University, Beijing 100073, China

EDITORIAL BOARD MEMBERS

All editorial board members resources online at <https://www.wjgnet.com/1009-3079/editorialboard.htm>

EDITORIAL OFFICE

Ya-Juan Ma, Director

World Chinese Journal of Digestology

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: wjcd@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

PUBLISHER

Baishideng Publishing Group Inc

7901 Stoneridge Drive, Suite 501, Pleasanton, CA 94588, USA

Telephone: +1-925-3991568

E-mail: bpgoffice@wjgnet.com

<https://www.wjgnet.com>

PRODUCTION CENTER

Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Limited Room 903, Building D, Ocean International Center, No. 62 Dongsihuan Zhonglu, Chaoyang District, Beijing 100025, China
Telephone: +86-10-85381892

PRINT SUBSCRIPTION

RMB 136 Yuan for each issue

RMB 3264 Yuan for one year

COPYRIGHT

© 2020 Baishideng Publishing Group Inc. Articles published by this open access journal are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-commercial License, which permits use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non commercial and is otherwise in compliance with the license.

SPECIAL STATEMENT

All articles published in journals owned by the Baishideng Publishing Group (BPG) represent the views and opinions of their authors, but not the views, opinions or policies of the BPG, except where otherwise explicitly indicated.

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

Full instructions are available online at <https://www.wjgnet.com/1009-3079/Nav/36>. If you do not have web access, please contact the editorial office.

白花丹醌对大鼠肝细胞肝癌自噬活性的影响并机制初探

陈懿, 李雪, 陈金霞, 林文雅, 张友才

陈懿, 李雪, 陈金霞, 林文雅, 张友才, 温州医科大学附属第一医院感染内科 浙江省温州市 325000

陈懿, 在读硕士, 主要从事肝脏疾病方面研究.

基金项目: 温州市科技计划项目, No. Y20150016.

作者贡献分布: 此课题由陈懿、李雪、陈金霞、林文雅及张友才设计; 研究过程由陈懿、李雪及林文雅操作完成; 实验研究所用器械及实验步骤由张友才、陈金霞指导; 数据分析由李雪与林文雅完成; 本论文写作由陈懿完成.

通讯作者: 张友才, 博士, 主任医师, 325000, 浙江省温州市瓯海区, 温州医科大学附属第一医院感染内科. zhangyc0815@163.com

收稿日期: 2020-04-28

修回日期: 2020-05-22

接受日期: 2020-05-28

在线出版日期: 2020-06-28

Effect of plumbagin on autophagy activity in rat hepatocellular carcinoma and underlying mechanism

Yi Chen, Xue Li, Jin-Xia Chen, Wen-Ya Lin, You-Cai Zhang

Yi Chen, Xue Li, Jin-Xia Chen, Wen-Ya Lin, You-Cai Zhang, Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325005, Zhejiang Province, China

Supported by: Wenzhou Science and Technology Project, No. Y20150016

Corresponding author: You-Cai Zhang, PhD, Chief Physician, Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Ouhai District, Wenzhou 325000, Zhejiang Province, China. zhangyc0815@163.com

Received: 2020-04-28

Revised: 2020-05-22

Accepted: 2020-05-28

Published online: 2020-06-28

Abstract

BACKGROUND

Autophagy is a multi-step lysosomal degradation pathway supporting nutritional cycle and metabolic adaptation, which is considered to be a process of regulating cancer progression. In this study, rats with hepatocellular carcinoma (HCC) were treated with plumbagin to explore its effect on the autophagy activity in HCC, in order to provide a new idea for the treatment of this malignancy.

AIM

To investigate the effect of plumbagin on autophagy activity in aflatoxin B1 (AFB1)-induced rat hepatocellular carcinoma and to explore the possible mechanism involved.

METHODS

AFB1 was used to develop a rat hepatocellular carcinoma model. The rats were then treated with plumbagin. The ultrastructure of liver tissues and autophagic cells was observed by electron microscopy. The expression of AKT1 mRNA and protein was measured by RT-PCR and immunohistochemical staining, respectively. Western blot was used to detect the expression of LC3B I and LC3B II protein in liver tissue.

RESULTS

Autophagy was common in liver tissues of the AFB1-induced cancer model group and plumbagin treated group. Compared with the control group, the expression levels of AKT1 mRNA and protein in the liver tissues of the AFB1-induced cancer model group were significantly increased ($t = 17.013$ and 9.986 , respectively, $P < 0.001$). The expression of AKT1 mRNA in liver tissue of rats treated with 2 mg/kg and 3 mg/kg plumbagin was significantly lower than that of

the AFB1-induced cancer model group ($t = -2.378$, $P = 0.030$; $t = -17.980$, $P < 0.001$). Compared with the AFB1-induced cancer model group, the LC3B-II/I ratio in the liver tissue of rats treated with 2 mg/kg and 3 mg/kg plumbagin was significantly increased ($t = 2.420$, $P = 0.028$; $t = 35.136$, $P < 0.001$). The LC3B-II/I ratio in rat liver tissue was significantly different between the 2 mg/kg and 3 mg/kg plumbagin treatment groups ($t = 21.316$, $P < 0.001$). There was a significant correlation between the expression of AKT1 mRNA and the LC3B-II/I ratio in the liver tissue of rats treated with 3 mg/kg plumbagin ($r = -0.611$, $P = 0.035$).

CONCLUSION

Plumbagin may enhance the autophagy activity of rat HCC cells by inhibiting the expression of AKT1.

© The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Hepatocellular carcinoma; Plumbago zeylanica; Quinones; AKT1; Autophagy

Citation: Chen Y, Li X, Chen JX, Lin WY, Zhang YC. Effect of plumbagin on autophagy activity in rat hepatocellular carcinoma and underlying mechanism. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2020; 28(12): 467-474

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i12/467.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i12.467>

摘要

背景

自噬是一个支持营养循环和代谢适应的多步骤溶酶体降解途径,被认为是一个调节癌症进展的过程。本研究使用白花丹醌处理大鼠肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)细胞,探究其对HCC自噬活性影响,为HCC治疗提供新的思路。

目的

探讨白花丹醌对黄曲霉毒素B1 (aflatoxin B1, AFB1)诱导型大鼠HCC细胞自噬活性的影响,分析其发生的可能机制。

方法

AFB1制作大鼠HCC模型并用白花丹醌干预,透射电镜观察肝组织和自噬细胞的超微结构。RT-PCR和免疫组织化学染色技术测AKT1 mRNA和蛋白的表达。Western Blot测肝组织中LC3B I、LC3B II蛋白表达。

结果

AFB1诱导模型组和白花丹醌处理组大鼠肝组织中多见细胞自噬现象。与对照组相比,AFB1诱导模型组大鼠肝组织中AKT1 mRNA和蛋白表达水平明显增加(t 值分别为17.013、9.986,均 $P < 0.001$); 2 mg/kg、

3 mg/kg白花丹醌处理组大鼠肝组织中AKT1 mRNA表达明显低于AFB1诱导模型组(前者 $t = -2.378$ 、 $P = 0.030$; 后者 $t = -17.980$, $P < 0.001$)。与AFB1诱导模型组相比,2 mg/kg白花丹醌、3 mg/kg白花丹醌处理组大鼠肝组织中LC3B-II/I比值均明显升高(前者 $t = 2.420$, $P = 0.028$; 后者 $t = 35.136$, $P < 0.001$)。大鼠肝组织中LC3B-II/I比值在2 mg/kg白花丹醌和3 mg/kg白花丹醌处理组间的差异有统计学意义($t = 21.316$, $P < 0.001$)。3 mg/kg白花丹醌处理组大鼠肝组织中AKT1 mRNA表达与LC3B-II/I比值间存在明显相关性($r = -0.611$, $P = 0.035$)。

结论

白花丹醌可能通过抑制AKT1表达,增强大鼠HCC细胞自噬活性。

© The Author(s) 2020. Published by Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

关键词: 肝细胞癌; 白花丹; 醌类; AKT1; 自噬

核心提要: 白花丹醌具抗菌、抗氧化、抗肝损伤、逆转肝纤维化以及抗肿瘤作用,我们的研究显示白花丹醌能有效抑制AFB1诱导性大鼠肝细胞癌组织AKT1表达,进而推测白花丹醌可能通过抑制AFB1诱导性大鼠肝细胞癌组织AKT1表达,诱导肝细胞癌细胞自噬活性。

文献来源: 陈懿, 李雪, 陈金霞, 林文雅, 张友才. 白花丹醌对大鼠肝细胞肝癌自噬活性的影响并机制初探. *世界华人消化杂志* 2020; 28(12): 467-474

URL: <https://www.wjgnet.com/1009-3079/full/v28/i12/467.htm>

DOI: <https://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v28.i12.467>

0 引言

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)恶性程度高,发展迅速,且易于复发。手术难以切除或失去根治机会,对化疗药物不敏感,经导管动脉化疗栓塞术等可能会加重肿瘤组织缺血、缺氧,改变肿瘤细胞内基因转录活性,启动应激反应,诱导肿瘤细胞逃逸凋亡,是严重危害人类生命健康的重大疾病之一。

PI3K/AKT/mTOR信号通路在细胞适应生理条件和环境压力过程中,发挥极其重要的负向调节作用,是自噬启动阶段的关键分子之一,同时参与肿瘤细胞迁移、黏附、细胞基质的降解^[1,2]。白花丹醌是天然的植物化学物质,具有抗菌、抗氧化、抗肝损伤以及逆转肝纤维化的作用^[3-5]。有报道称白花丹醌可能通过PI3K/AKT信号传导途径,影响肿瘤细胞自噬活性,具有抗肿瘤作用^[6,7]。但其对肝细胞癌的发生和进展的影响目前仍未见报道。本研究拟借助黄曲霉毒素B1 (aflatoxin B1, AFB1)诱导型大鼠HCC模型,研究中药白花丹醌对大鼠早期HCC

细胞自噬活性的影响,并探讨其抗肝细胞癌机制是否与PI3K/AKT信号通路相关。

1 材料和方法

1.1 材料 4周龄清洁级近交系雄性Wistar大鼠,体重60-80 g,由中国科学院上海实验动物中心提供。AFB1为美国Sigma公司产品(批号A6636),白花丹醌购自美国Sigma公司,二甲亚砜(DMSO)和2-乙酰氨基苄(2-AAF)购于广州伟伯化工有限公司(编号226388、304-28-9),2-AFF饲料为将基本饲料粉碎后,按150 g/1000 g比例充分混合而成。总RNA提取(TaKaRa RNAiso Plus)、cDNA合成及RT-PCR扩增试剂盒(TaKaRa RNA PCR Kit 3.0)均为大连宝生物工程有限公司产品。Akt抗体购自上海雷浩信息科技有限公司;磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)一抗购自武汉博士德生物工程有限公司;二抗、二氨基联苯胺(DAB)购自北京中衫金桥生物技术有限公司。兔抗LC3B抗体(北京华夏远洋科技有限公司,产品编号:AL221)、二喹啉甲酸(BCA)购自上海润成生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立: 55只雄性Wistar大鼠按清洁级动物要求养在温州医科大学实验动物中心,温度控制在 $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度45%-70%。基本饲料安静饲养1 wk后分成对照组,AFB1诱癌模型组、2 mg/kg白花丹醌处理组和3 mg/kg白花丹醌处理组;对照组10只,其他每组15只。对照组给予0.9%氯化钠溶液 2 mL/Kg腹腔注射,其他组大鼠腹腔注射AFB1 (400 $\mu\text{g/kg}$, AFB1用15 mL DMSO溶剂混匀),每周6次,持续2 wk; 2-AFF饲料喂养2 wk后,重复上述制作过程(13 wk后用基本饲料喂养),于37周时停药^[8]。白花丹醌处理组大鼠在应用AFB1基础上,于第6周起腹腔注射白花丹醌,每周2次。于实验第37周断颈处死所有大鼠。模型制作过程中任大鼠自由饮水、进食。

1.2.2 透射电镜组织超微病理观察: 将所取新鲜肝组织切成1 mm³大小,用2.5%戊二醛固定,PBS漂洗后,1%锇酸固定,制成2 μm 超薄切片,用醋酸双氧铀、枸橼酸铅双重染色,HITACHI日本H-7500型透射电镜观察。

1.2.3 AKT1 mRNA表达(RT-PCR): 用RNAiso Plus试剂提取总RNA,紫外分光光度计测吸光度(A)值,以A260/A280 = 1.8-2.0为RNA质量判断标准。按试剂盒说明书要求合成cDNA。AKT1上游引物: 5'-CCACAGGTCGCTACTATGCC-3',下游引物: 5'-GTCCAGGGCGGACACAATCT-3'; GAPDH上游引物5'-TTCAACGGCACAGTCAAGG-3',下游引物5'-CACCAGTGGATGCAGGGAT-3';产物长度分别为275

bp、477 bp。反应条件: 94°C 预变性5 min后, 95°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 45 s,循环30次后, 72°C 延伸5 min。取PCR反应产物5 μL ,用2%琼脂糖凝胶电泳分离后,在凝胶成像系统(Biosens Sc 810)分析结果。

1.2.4 AKT1免疫组织化学染色: 按过氧化物酶标记链霉亲和素法试剂盒说明书操作。 60°C 烤片1 h,二甲苯、乙醇脱蜡至水,3%过氧化氢溶液 37°C 温育阻断内源性过氧化物酶,0.01%枸橼酸缓冲液高压修复,自然冷却后滴加AKT1一抗(1:50稀释), 4°C 温育过夜;滴加二抗及链霉亲和素-过氧化物酶,DAB显色,苏木精复染,脱水、封片。用PBS代替一抗作阴性对照。

1.2.5 Western Blot检测肝组织中LC3B I、LC3B II蛋白: 自噬形成时,胞浆型LC3(即LC3-I)会酶解掉一小段多肽,转变为(自噬体)膜型(即LC3-II),因此,LC3-II/I比值的大小可估计自噬水平的高低。取 -80°C 保存的肝组织,各组大鼠肝组织均取0.1 g,冰浴,加500 μL 组织裂解液和5 μL 磷酸酶抑制剂,冰浴匀浆, 4°C ,以13800g离心10 min,收集上清液置 -80°C 冰箱保存。使用前用BCA蛋白浓度检测法检测蛋白水平,蛋白稀释至50 ng/ μL 后取15 μL 上样,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜至氟化树脂膜,5%脱脂奶粉封闭,一抗封闭 4°C 过夜,二抗(羊抗兔) 37°C 温育1 h,增强化学发光法检测蛋白表达,Gel-Pro 3.1软件测定各条带的灰度值,经内参照GAPDH校正后得到蛋白相对表达量。

统计学处理 应用SPSS 17.0软件进行统计学处理,计量数据用mean \pm SD表示,各组样本均数比较采用单因素方差分析,Levene法检验方差齐性,方差齐时采用LSD-t检验,方差不齐时采用Dunnett T3检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝组织超微病理改变 实验大鼠中,对照组大鼠无死亡,AFB1诱癌模型组7只大鼠死亡,死亡率为46.67% (7/15),2 mg/kg白花丹醌处理组5只大鼠死亡,死亡率为33.33% (5/15),3 mg/kg白花丹醌处理组3只大鼠死亡,死亡率为20.00% (3/15)。对照组大鼠肝组织质地柔软,表面光滑,边缘整齐,肝小叶结构正常,肝细胞索排列规则有序,未见炎症反应、变性和坏死。模型组和处理组大鼠,肝表面可见微小颗粒,或大小不一结节,或肿块,肝细胞核异型性明显,病理检查证实有肝癌发生。

电镜下肝细胞肿胀明显,核体积增大,核膜固缩,异染色质在核膜下聚集,核仁深染(图1A)。细胞浆内线粒体数目增多、肿胀,嵴变短、减少,基质密度增加,呈粗颗粒状。粗面内质网增生,呈囊性扩张或成泡状。部分肝细胞内可见线管状滑面内质网增生。糖原颗粒可见。瘤

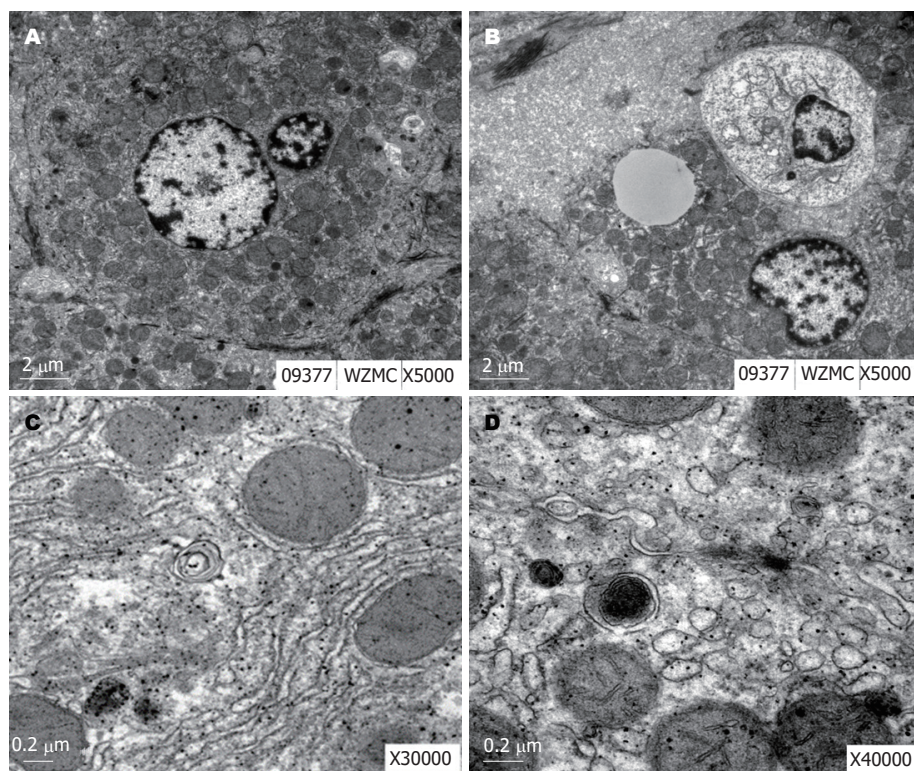


图1 大鼠肝组织超微病理: A: 肿瘤组织; B: 肿瘤组织; C: 自噬细胞; D: 自噬细胞。

细胞大小不一致, 胞核深染、大小不均。核膜曲折内陷或外凸, 异染色质丰富, 呈粗颗粒状弥漫分布或凝集成块堆集在核膜下。可见巨核、双核, 甚至多核, 胞核形态不规则, 可见怪异核, 核仁体积增大, 数目增多, 形态不规则, 靠边(图1B)。

3 mg/kg白花丹醌处理组大鼠肝癌组织中多见细胞自噬现象(8例), AFB1诱癌模型2例, 2 mg/kg白花丹醌处理组4例。电镜下细胞内大块致密物沉积, 核固缩、浓集, 细胞器少见(图1B), 新月状或杯状, 双层或多层膜, 有包绕胞浆成分的趋势(图1C)。双层或多层膜的液泡状结构, 内含胞浆成分, 如线粒体(图1D)。

2.2 肝组织中AKT1表达 AKT1 mRNA表达(RT-PCR)结果(图2), AFB1诱癌模型组与对照组比较, 大鼠肝组织中AKT1 mRNA和蛋白表达水平均明显增加, 差异有统计学意义(t 值分别为17.013、9.986, 均 $P<0.001$); 2 mg/kg白花丹醌处理组与AFB1诱癌模型组, 大鼠肝组织中AKT1 mRNA表达明显下降, 差异有统计学意义($t = -2.378, P = 0.030$), 蛋白表达水平稍有减少, 但差异无统计学意义($t = -1.811, P = 0.089$); 3 mg/kg白花丹醌处理组与AFB1诱癌模型组, 大鼠肝组织中AKT1 mRNA和蛋白表达明显下降, 差异有统计学意义(t 值分别为-17.980、-4.247, 均 $P<0.001$)(见表1)。免疫组织化学结果显示(图3), AKT1阳性为细胞核染成棕黄色, 阴性为细胞核淡蓝色。对照组大鼠肝组织AKT1蛋白在汇管周围少量表达, 肝细胞内

几乎无表达; AFB1诱癌模型组大鼠肝组织AKT1蛋白在汇管区和部分肝细胞核表达, 表达量较对照组明显增加, 经白花丹醌处理后, 肝组织AKT1蛋白表达量稍有减少, 而3 mg/kg白花丹醌处理组表达显著减少。

2.3 肝组织中LC3B-I、LC3B-II蛋白表达 Western印迹检测肝组织中LC3B I、LC3B II蛋白结果(图4), 与对照组比较, AFB1诱癌模型组大鼠肝组织中LC3B-II/I比值稍有上升, 差异无显著性($t = 2.053, P = 0.057$)。与AFB1诱癌模型组比较, 2 mg/kg白花丹醌和3 mg/kg白花丹醌处理组大鼠肝组织中LC3B-II/I比值均明显升高, 差异有统计学意义($t = 2.420, P = 0.028$; $t = 35.136, P<0.001$), 大鼠肝组织中LC3B-II/I比值在2 mg/kg白花丹醌和3 mg/kg白花丹醌处理组之间的差异有统计学意义($t = 21.316, P<0.001$)(表2)。

2.4 肝组织中AKT1 mRNA表达与LC3B-II/I比值的相关性 在3 mg/kg白花丹醌处理组大鼠肝细胞癌组织中, 其AKT1 mRNA表达与LC3B-II/I比值间存显著负相关($r = -0.611, P = 0.035$), 见图5。

3 讨论

PI3K/AKT/mTOR信号通路在细胞适应生理条件和环境压力过程中, 发挥极其重要的负向调节作用, 是自噬启动阶段的关键分子, 参与肿瘤细胞迁移、黏附、细胞基质的降解^[9]。活化的AKT可直接磷酸化mTOR的Ser2448

表 1 AFB1诱导肝细胞癌模型大鼠肝组织中AKT1 mRNA、蛋白表达(mean ± SD)

组别	鼠数(只)	AKT1 mRNA	AKT1蛋白
对照组	10	0.9771 ± 0.0289	1.143 ± 0.084
AFB1诱癌模型组	8	1.3336 ± 0.0582 ^a	1.357 ± 0.097 ^d
2 mg/kg白花丹醌处理组	10	1.2763 ± 0.0441 ^b	1.277 ± 0.089 ^e
3 mg/kg白花丹醌处理组	12	1.0173 ± 0.0166 ^c	1.212 ± 0.056 ^f

与对照组比较, ^a $t = 17.013$, $P < 0.001$; 与AFB1诱癌模型组比较, ^b $t = -2.378$, $P = 0.030$; 与AFB1诱癌模型组比较, ^c $t = -17.980$, $P < 0.001$; 与对照组比较, ^d $t = 9.986$, $P < 0.001$; 与AFB1诱癌模型组比较, ^e $t = -1.811$, $P = 0.089$; 与AFB1诱癌模型组比较, ^f $t = -4.247$, $P < 0.001$.

表 2 AFB1诱导肝细胞癌模型大鼠肝组织中LC3-II/I比值的变化(mean ± SD)

组别	鼠数(只)	LC3-II/I比值
对照组	10	0.9293 ± 0.3179
AFB1诱癌模型组	8	1.1978 ± 0.2095 ^a
2 mg/kg白花丹醌处理组	10	1.4982 ± 0.2961 ^b
3 mg/kg白花丹醌处理组	12	3.3202 ± 0.0272 ^{cd}

与对照组比较, ^a $t = 2.053$, $P = 0.057$; 与AFB1诱癌模型组比较, ^b $t = 2.420$, $P = 0.028$; 与AFB1诱癌模型组比较, ^c $t = 35.136$, $P < 0.001$; 与2 mg/kg白花丹醌处理组比较, ^d $t = 21.316$, $P < 0.001$.

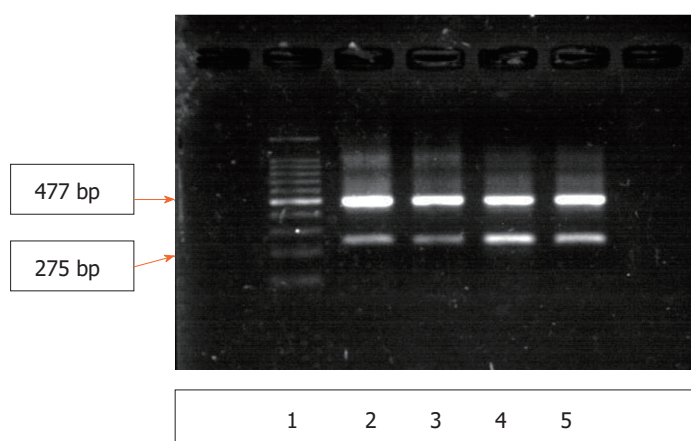


图 2 RT-PCR法测AKT mRNA表达. 1: 分子量marker; 2: 2 mg/kg白花丹醌处理组; 3: 对照组; 4: AFB1诱癌模型组; 5: 2 mg/kg白花丹醌处理组.

位点, 激活下游分子mTOR, 后者引起自噬蛋白Atg13过磷酸化, 使Atg13与Atg1相互作用的亲和力降低, 调控与细胞自噬发生相关的多种效应分子的磷酸化, 调控自噬蛋白的转录和转位过程. mTOR激酶活性受抑制时, Atg13部分脱磷酸化, 诱导自噬的发生^[10]. 自噬是细胞质蛋白和细胞器降解的主要途径, 与肿瘤抑制相关, 特别是在肝脏^[11].

白花丹醌, 为一种具有潜在的抗癌活性的萘醌化合物. 有研究报道, 白花丹醌的提纯物可能通过ERK和PI3K抑制剂, 快速诱导自噬活性, 显著抑制裸鼠MDA-MB-231乳腺癌细胞的生长, 具有强有力的广谱抗肿瘤

活性^[6]. Ma等^[12]报道, 白花丹醌通过活化细胞自噬途径和线粒体介导的凋亡途径, 显著抑制AGS胃癌细胞增殖、抑制细胞浸润和迁移. Lin等^[13]报道, 白花丹醌以剂量和时间依赖方式, 抑制人肝癌SMC-7721细胞株的细胞增殖, SMC-7721 细胞内有自噬体形成和LC3 蛋白表达, 有效抑制裸鼠移植瘤的生长, 诱导细胞凋亡、自噬. 我们的实验电镜结果显示, 白花丹醌处理组大鼠肝癌组织中多见细胞自噬现象. 与AFB1诱癌模型组比较, 2 mg/kg白花丹醌和3 mg/kg白花丹醌处理组大鼠肝组织中LC3B-II/I比值均明显升高, 以3 mg/kg白花丹醌处理组更显著. 结合电镜结果, 我们发现, 白花丹醌可显

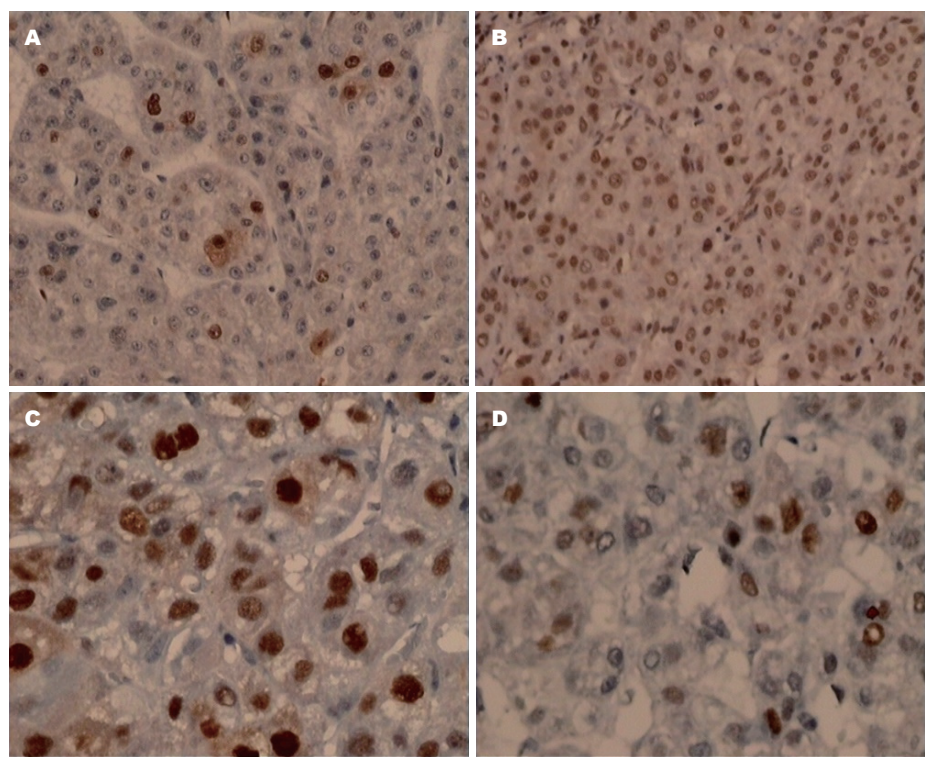


图 3 各组实验大鼠肝组织AKT 1免疫组织化学染色(DAB显色). A: 对照组; B: AFB1诱癌模型组; C: 2 mg/kg白花丹醌处理组; D: 3 mg/kg白花丹醌处理组(A、B放大100倍, C、D放大200倍). DAB: 二氨基联苯胺.

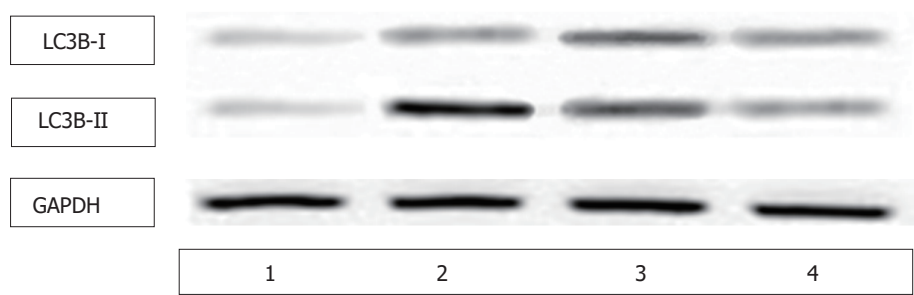


图 4 Western blot法测肝组织中LC3B I、LC3B II 蛋白表达. 1: 对照组; 2: 3 mg/kg白花丹醌处理组; 3: 2 mg/kg白花丹醌处理组; 4: AFB1诱癌模型组.

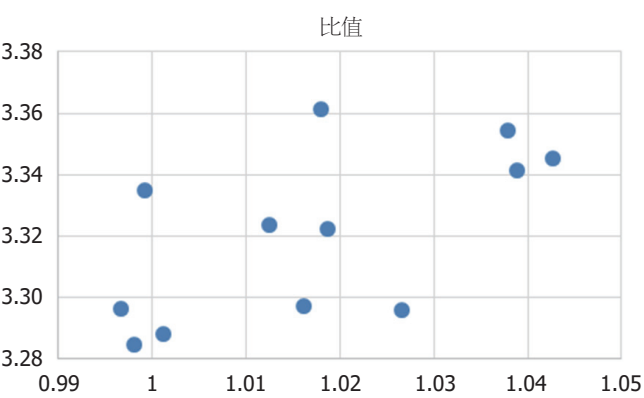


图 5 3 mg/kg白花丹醌处理组肝细胞癌组织中AKT1 mRNA表达与LC3B- II / I 比值间相关性分析.

著增加AFB1诱导型大鼠肝癌细胞自噬活性.

白花丹醌具有抗肿瘤作用, 但其抗癌机制尚未阐

明. Xue等^[14]报道, 白花丹醌可能通过抑制AKT/mTOR 信号通路, 增加细胞内活性氧物质的含量, 提高顺铂对

CAL27细胞、顺铂耐受的CAL27/CDDP细胞的细胞毒性、凋亡和自噬作用, 抑制舌鳞状细胞癌发生和进展。我们的实验结果显示, AFB1诱导模型组大鼠肝组织中AKT1 mRNA和蛋白表达水平均明显增加, 应用3 mg/kg白花丹醌预处理后, 大鼠肝组织中AKT1 mRNA和蛋白表达明显下降。这些证据表明, 白花丹醌能有效抑制AFB1诱导性大鼠肝细胞癌组织中AKT1表达, 这证实了白花丹醌可能通过抑制AKT/mTOR信号通路, 发挥抗肝脏肿瘤作用。

有部分研究报道了自噬与肿瘤进展的关系, 但HCC肿瘤组织中AKT表达与自噬活性之间相关性的研究, 目前少有报道。我们的研究结果显示, AFB1诱导型大鼠肝细胞癌组织中, AKT1 mRNA表达与LC3B-II/I比值存在显著负相关($P = 0.035$)。我们推测HCC组织中自噬活性的增加, 可能抑制AKT的表达。

综上所述, 我们发现AFB1诱导HCC模型大鼠肝组织中, AKT1表达明显升高, 应用白花丹醌可显著抑制AKT1表达, 使肝肿瘤组织中自噬活性增加, 且AKT1表达与自噬活性之间存在显著负相关。因此, 我们推测白花丹醌可能通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路, 抑制AFB1诱导型大鼠肝细胞癌组织中AKT1的表达, 增加肝癌细胞自噬活性, 从而发挥抗肝脏肿瘤的作用。然而, 白花丹醌药理活性广泛, 对组织氧环境、细胞内氧压力的改变, 也有可能改变细胞自噬活性, 除PI3K/AKT/mTOR信号通路外, 且存在多种影响细胞自噬活性的信号传导途径。因此, 白花丹醌抗肿瘤的机制有待进一步研究。

文章亮点

实验背景

自噬在调节肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的进展中起重要作用。白花丹醌具有抗肿瘤作用, 但抗癌机制未明确。本研究采用白花丹醌干预黄曲霉毒素B1(aflatoxin B1, AFB1)诱导型大鼠HCC细胞, 探究其对HCC自噬活性影响及潜在机制。

实验动机

白花丹醌是天然的植物化学物质, 探究其对HCC自噬活性的影响及潜在机制, 对药物的临床应用具有积极意义。

实验目标

探究白花丹醌对大鼠HCC自噬活性影响, 并初步探究其潜在机制。

实验方法

制作大鼠HCC模型并用白花丹醌干预, 透射电镜观察肝

组织和自噬细胞的超微结构。RT-PCR和免疫组织化学染色技术测AKT1 mRNA和蛋白的表达。Western Blot测肝组织中LC3B I、LC3B II蛋白表达。比较各组间AKT1 mRNA和蛋白表达差异, 及LC3B-II/I比值差异。

实验结果

白花丹醌可显著增加AFB1诱导型大鼠HCC细胞自噬活性。AFB1诱导模型组大鼠肝组织中AKT1 mRNA和蛋白表达水平均明显增加, 应用3 mg/kg白花丹醌预处理后, 大鼠肝组织中AKT1 mRNA和蛋白表达明显下降。

实验结论

白花丹醌可能通过抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路, 抑制AFB1诱导型大鼠HCC组织中AKT1的表达, 增加HCC细胞自噬活性, 从而发挥抗HCC的作用。

展望前景

白花丹醌可以增加HCC自噬活性, 抑制早期HCC进展, 为药物的临床应用提供一定的理论基础。

4 参考文献

- Liu H, Gong X, Yang K. Overexpression of the clock gene Per2 suppresses oral squamous cell carcinoma progression by activating autophagy via the PI3K/AKT/mTOR pathway. *J Cancer* 2020; 11: 3655-3666 [PMID: 32284762 DOI: 10.7150/jca.42771]
- Helmy MW, Ghoneim AI, Katary MA, Elmahdy RK. The synergistic anti-proliferative effect of the combination of diosmin and BEZ-235 (dactolisib) on the HCT-116 colorectal cancer cell line occurs through inhibition of the PI3K/Akt/mTOR/NF- κ B axis. *Mol Biol Rep* 2020; 47: 2217-2230 [PMID: 32088816 DOI: 10.1007/s11033-020-05327-4]
- Zaki AM, El-Tanbouly DM, Abdelsalam RM, Zaki HF. Plumbagin ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury in rats: Role of high mobility group box 1 in inflammation, oxidative stress and apoptosis. *Biomed Pharmacother* 2018; 106: 785-793 [PMID: 29990872 DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.004]
- Giménez-García C, Urios A, Agustí A, Mangas-Losada A, García-García R, Escudero-García D, Kosenko E, Ordoño JF, Tosca J, Giner-Durán R, Serra MA, Felipe V, Montoliu C. Cirrhotic patients with minimal hepatic encephalopathy have increased capacity to eliminate superoxide and peroxynitrite in lymphocytes, associated with cognitive impairment. *Free Radic Res* 2018; 52: 118-133 [PMID: 29262736 DOI: 10.1080/10715762.2017.1420183]
- 陈小维, 张伟伟, 陈金霞, 张友才, 陈永平, 李骥. 白花丹醌对肝纤维化大鼠磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号转导通路的影响. *中华传染病杂志* 2013; 31: 519-523 [DOI: 10.1353/shb.2013.0048]
- Tripathi SK, Rengasamy KRR, Biswal BK. Plumbagin engenders apoptosis in lung cancer cells via caspase-9 activation and targeting mitochondrial-mediated ROS induction. *Arch Pharm Res* 2020; 43: 242-256 [PMID: 32034669 DOI: 10.1007/s12272-020-01221-6]
- Ghosh SK, Ganta A, Spanjaard RA. Discovery and cellular stress pathway analysis of 1,4-naphthoquinone derivatives with novel, highly potent broad-spectrum anticancer activity.

- J Biomed Sci* 2018; 25: 12 [PMID: 29422060 DOI: 10.1186/s12929-018-0408-6]
- 8 李果, 朱柱, 戴小明, 余子建. 肝癌动物模型建立的研究进展. *医学综述* 2018; 24: 285-289
- 9 Zhang M, Liu S, Chua MS, Li H, Luo D, Wang S, Zhang S, Sun C, Han B. Correction: SOCS5 inhibition induces autophagy to impair metastasis in hepatocellular carcinoma cells via the PI3K/Akt/mTOR pathway. *Cell Death Dis* 2019; 10: 799 [PMID: 31641102 DOI: 10.1038/s41419-019-2009-z]
- 10 Li F, Vierstra RD. Arabidopsis ATG11, a scaffold that links the ATG1-ATG13 kinase complex to general autophagy and selective mitophagy. *Autophagy* 2014; 10: 1466-1467 [PMID: 24991832 DOI: 10.4161/auto.29320]
- 11 Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K, Mizushima N. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev* 2011; 25: 795-800 [PMID: 21498569 DOI: 10.1101/gad.2016211]
- 12 Ma X, Yin X, Liu H, Chen Q, Feng Y, Ma X, Liu W. Antiproliferative activity of plumbagin (5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone) in human gastric carcinoma cells is facilitated via activation of autophagic pathway, mitochondrial-mediated programmed cell death and inhibition of cell migration and invasion. *J BUON* 2019; 24: 2000-2005 [PMID: 31786867]
- 13 Lin Y, Chen Y, Wang S, Ma J, Peng Y, Yuan X, Lv B, Chen W, Wei Y. Plumbagin induces autophagy and apoptosis of SMMC-7721 cells in vitro and in vivo. *J Cell Biochem* 2019; 120: 9820-9830 [PMID: 30536473 DOI: 10.1002/jcb.28262]
- 14 Xue D, Pan ST, Zhou X, Ye F, Zhou Q, Shi F, He F, Yu H, Qiu J. Plumbagin Enhances the Anticancer Efficacy of Cisplatin by Increasing Intracellular ROS in Human Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 5649174 [PMID: 32308804 DOI: 10.1155/2020/5649174]

科学编辑: 张晗 制作编辑: 刘继红



ISSN 1009-3079 (print) ISSN 2219-2859 (online) DOI: 10.11569 © 2020 Baishideng Publishing Group Inc.
All rights reserved.

• 消息 •

《世界华人消化杂志》性质、刊登内容及目标

本刊讯 《世界华人消化杂志》[国际标准刊号ISSN 1009-3079 (print), ISSN 2219-2859 (online), DOI: 10.11569, *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi/World Chinese Journal of Digestology*], 是一本由来自国内31个省、市、自治区、和香港特别行政区和719位胃肠病学和肝病学专家支持的开放存取的同行评议的半月刊杂志, 旨在推广国内各地的胃肠病学和肝病学领域临床实践和基础研究相结合的最具有临床意义的原创性及各类评论性的文章, 使其成为一种公众资源, 同时科学家、医生、患者和学生可以通过这样一个不受限制的平台来免费获取全文, 了解其领域的所有的关键的进展, 更重要的是这些进展会为本领域的医务工作者和研究者服务, 为他们的患者及基础研究提供进一步的帮助。

除了公开存取之外, 《世界华人消化杂志》的另一大特色是对普通读者的充分照顾, 即每篇论文都会附带有一组供非专业人士阅读的通俗易懂的介绍大纲, 包括实验背景、实验动机、实验目标、实验方法、实验结果、实验结论、展望前景。

《世界华人消化杂志》报道的内容包括食管、胃、肠、肝、胰肿瘤, 食管疾病、胃肠及十二指肠疾病、肝胆疾病、肝脏疾病、胰腺疾病、感染、内镜检查法、流行病学、遗传学、免疫学、微生物学, 以及胃肠道运动对神经的影响、传送、生长因素和受体、营养肥胖、成像及高科技技术。

《世界华人消化杂志》的目标是出版高质量的胃肠病学和肝病学领域的专家评论及临床实践和基础研究相结合具有实践意义的文章, 为内科学、外科学、感染病学、中医药学、肿瘤学、中西医结合学、影像学、内镜学、介入治疗学、病理学、基础研究等医生和研究人员提供转换平台, 更新知识, 为患者康复服务。



Published by **Baishideng Publishing Group Inc**
7041 Koll Center Parkway, Suite 160, Pleasanton,
CA 94566, USA
Telephone: +1-925-3991568
E-mail: bpgoffice@wjgnet.com
https://www.wjgnet.com



ISSN 1009-3079

