



# DEN诱导大鼠肝癌形成中miR-199a的表达机制及健脾解毒法的干预作用

张斌, 李琦, 殷佩浩, 赵成根, 李先茜, 高虹, 孙珏, 范忠泽

张斌, 李琦, 殷佩浩, 赵成根, 李先茜, 高虹, 孙珏, 范忠泽, 上海中医药大学附属普陀医院中医肿瘤科 上海市 200062  
张斌, 副主任医师, 主要从事肝病的基础和临床研究。

中国博士后基金资助项目, No. 20080440639

肝肾疾病病证教育部重点实验室(上海中医药大学)开放课题  
基金资助项目, No. GS090203

作者贡献分布: 此课题由张斌、李琦及范忠泽共同设计; 研究过程由张斌、赵成根及李先茜操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由高虹与孙珏提供; 数据分析由张斌完成; 本论文写作由张斌与殷佩浩完成。

通讯作者: 范忠泽, 主任医师, 博士生导师, 200062, 上海市兰溪路164号, 上海中医药大学附属普陀医院中医肿瘤科。  
fanzhongze@citiz.com

电话: 021-62572723-4310

收稿日期: 2009-11-15 修回日期: 2009-12-10

接受日期: 2009-12-14 在线出版日期: 2010-01-18

## Involvement of miR-199a downregulation in the preventive effects of Jianpi Jiedu Recipe against experimental hepatocarcinoma in rats

Bin Zhang, Qi Li, Pei-Hao Yin, Cheng-Gen Zhao, Xian-Qian Li, Hong Gao, Jue Sun, Zhong-Ze Fan

Bin Zhang, Qi Li, Pei-Hao Yin, Cheng-Gen Zhao, Xian-Qian Li, Hong Gao, Jue Sun, Zhong-Ze Fan, Department of TCM Oncology, Putuo District Center Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200062, China

Supported by: the China Postdoctoral Science Foundation, No. 20080440639; and the Open Project Program Foundation of Key Laboratory of Liver and Kidney Diseases (Shanghai University of Traditional Chinese Medicine), Ministry of Education, No. GS090203

Correspondence to: Zhong-Ze Fan, Department of TCM Oncology, Putuo District Center Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 164 Lanxi Road, Shanghai 200062, China. fanzhongze@citiz.com

Received: 2009-11-15 Revised: 2009-12-10

Accepted: 2009-12-14 Published online: 2010-01-18

## Abstract

**AIM:** To investigate the preventive effects of Jianpi Jiedu Recipe against diethylnitrosamine-induced hepatocarcinoma in rats and explore the involvement of miR-199a downregulation in this process.

**METHODS:** Male Wistar rats were randomly

divided into three groups: normal control group ( $n = 25$ ), model group ( $n = 40$ ) and prevention group ( $n = 40$ ). The normal control group was given normal saline [10 mL/(kg·d), ig] for 12 weeks, the model group was given diethylnitrosamine dissolved in drinking water (80 ppm) at a dose of 8 mg/(kg·d) for the same duration, and the prevention group was given both diethylnitrosamine at the same dose and Jianpi Jiedu Recipe [17.5 g/(kg·d), ig] for the same duration. Five rats in each group were executed at weeks 4, 8, 12 and 16, respectively, and the remaining rats were killed at week 20. Meanwhile, the mortality, incidence of ascites, and liver and spleen index were measured. Hematoxylin-eosin staining (HE) was used to examine hepatic pathological changes. The expression of miR-199a mRNA was detected by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

**RESULTS:** At week 20, the mortality rate and the incidence rate of ascites were 0% and 0% in the normal control group, 42.5% and 87.5% in the model group, and 17.5% and 44.4% in the prevention group, respectively. The mortality rate and the incidence of ascites were significantly lower in the prevention group than in the model group (both  $P < 0.05$ ). At week 16, the incidence of HCC was 100% in both the model group and prevention group and 0% in the normal control group, the incidence of grade III liver cancer was 100% (5/5) in the model group, and the incidences of grade I, II and III liver cancer were 40% (2/5), 40% (2/5) and 20% (1/5) in the prevention group, respectively. Compared with the model group, the liver and spleen index in the prevention group were significantly reduced at all time points (all  $P < 0.01$ ). Real-time RT-PCR results showed that the expression of miR-199a was significantly upregulated in the model group. However, miR-199a expression was significantly downregulated in the prevention group at all time points except at week 16 (all  $P < 0.01$ ).

**CONCLUSION:** Jianpi Jiedu Recipe has good preventive effects against hepatocarcinoma in

## ■背景资料

原发性肝癌是发病率较高的恶性肿瘤, 缺乏理想的早期诊断和治疗手段, 许多患者一旦发现往往就是晚期, 给进一步治疗带来很大的难度, 造成许多患者从确诊到死亡的时间很短, 因而加强肝癌的预防就显得尤为重要, 其中中医药预防肿瘤的作用受到越来越多人的重视。

## ■同行评议者

丁惠国, 主任医师, 首都医科大学附属北京佑安医院肝病消化科

**■研发前沿**

miRNAs的表达失调与肿瘤发病密切相关,具有癌基因或抑癌基因的特点,是肿瘤诊断和治疗的重要靶点。近年来,miR-199a与恶性肿瘤的发病关系引起许多学者的高度重视,同时健脾解毒方预防肝癌作用是否与调控miR-199a有关,这些都是目前亟待解决的课题。

rats perhaps partly by downregulating miR-199a expression.

**Key Words:** Jianpi Jiedu Recipe; Primary liver cancer; Diethylnitrosamine; Rat; Prevention; miRNA

Zhang B, Li Q, Yin PH, Zhao CG, Li XQ, Gao H, Sun J, Fan ZZ. Involvement of miR-199a downregulation in the preventive effects of Jianpi Jiedu Recipe against experimental hepatocarcinoma in rats. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2010; 18(2): 125-131

**摘要**

**目的:** 探讨中药复方健脾解毒方对二乙基亚硝胺(DEN)诱导的大鼠肝癌的预防作用及其调控miR-199a的表达机制。

**方法:** ♀ Wistar大鼠,随机分为正常组( $n = 25$ )、模型组( $n = 40$ )及中药预防组( $n = 40$ )。除正常组外,其他组在1-12 wk饮用含DEN 80 mg/L的饮水[mg/(kg·d)]以诱癌,中药组同时给予含生药1.75 g/mL的健脾解毒方灌胃(10 mL/kg),正常组给予10 mL/kg生理盐水灌胃,每日1次,共12 wk。于4、8、12、16 wk时相点,各组随机取5只大鼠处死取肝,20 wk将剩余大鼠全部处死取肝,观察肝脏外观,计算死亡率和腹水生成率,比较肝脾指数,肝组织进行HE染色,应用Real-time PCR检测肝组织miR-199a的表达。

**结果:** 在20 wk实验结束时,正常大鼠无死亡,而模型大鼠死亡率为42.5%(17/40),预防组死亡率为17.5%(7/40),16-20 wk时模型组腹水发生率为87.5%(7/8),预防组为44.4%(8/18),与模型组有差异性( $P < 0.05$ )。正常组没有肿瘤形成,模型组和预防组在16 wk后成瘤率均为100%。16 wk模型组肝癌Ⅲ级发生率为100%(5/5),而预防组I、II、III级肝癌发生率分别为40%(2/5)、40%(2/5)及20%(1/5),两组比较有差异( $P < 0.05$ )。与模型组比较,中药预防组有显著降低肝脾指数的作用(均 $P < 0.01$ )。PCR结果显示,模型组肝组织miR-199a较正常组明显上调,中药预防组除16 wk外均有显著下调miR-199a表达的作用(均 $P < 0.01$ )。

**结论:** 健脾解毒方有预防DEN诱导大鼠肝癌发生的作用,其机制可能部分与下调miR-199a的表达有关。

**关键词:** 健脾解毒方; 原发性肝癌; 二乙基亚硝胺; 大鼠; 预防; 微RNA

张斌, 李琦, 殷佩浩, 赵成根, 李先茜, 高虹, 孙珏, 范忠泽。DEN诱导大鼠肝癌形成中miR-199a的表达机制及健脾解毒法的干

预作用。世界华人消化杂志 2010; 18(2): 125-131  
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/125.asp>

**0 引言**

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国发病率较高的恶性肿瘤,许多患者早期发病往往缺乏临床症状,一旦发现常是晚期,给进一步治疗带来很大难度,造成许多患者从确诊到死亡的时间很短<sup>[1-5]</sup>,因而加强肝癌的预防就显得尤为重要,其中中医药预防肿瘤的作用受到越来越多人的重视。健脾解毒方为我院范忠泽教授的经验方,既往研究发现该方具有提高机体免疫、改善脏器功能及抗消化系肿瘤等多种疗效<sup>[6-8]</sup>,但对其机制还不清楚。Micro RNAs(miRNAs)是小片段非编码RNA,参与调节基因表达,发现其表达失调与肿瘤发病密切相关,具有癌基因或抑癌基因的特点,是肿瘤诊断和治疗的重要靶点,其中miR-199a与恶性肿瘤的发病关系近年来引起许多学者的高度重视<sup>[9-11]</sup>。为此,我们采用二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)诱发大鼠肝癌模型,动态观察诱癌过程中肝组织miR-199a的表达规律,同时研究健脾解毒方对肝癌发病的预防作用及机制。

**1 材料和方法**

**1.1 材料** 0.95 g/mL二乙基亚硝胺,纯度99.9%,美国Sigma公司产品。TRIzol RNA提取试剂, RT-PCR试剂, Promega公司; 健脾解毒方由生黄芪、白术、猪苓、八月札、石见穿、野葡萄藤、薏苡仁等组成,经水煎、浓缩及醇沉制成,制成含生药1.75 g/mL浓度的中药制剂,高压灭菌,4℃存放备用,由上海中医药大学附属普陀医院制剂室制成。♀ Wistar大鼠105只,清洁级,体质量100 g±10 g,动物合格证号: SCXP(沪)2008-0016,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,所有大鼠分笼饲养于上海中医药大学附属普陀医院实验动物房。

**1.2 方法**

**1.2.1 造模及分组:** 所有大鼠分笼饲养,每笼5-6只,适应性饲养1 wk后,全部大鼠分为正常组( $n = 25$ )、模型组( $n = 40$ )及中药预防组( $n = 40$ )。模型组和预防组饮用含DEN 80 mg/L的饮水,维持DEN摄入量8 mg/(kg·d)以诱癌,并以普通灭菌水补足不足水量,连续12 wk后改为自由饮水;中药组在饮用DEN水的同时每日给予含生药1.75



图1 各组16 wk时超声检查. A: 正常组; B: 模型组; C: 预防组.

g/mL的中药汤剂灌胃(10 mL/kg), 每天1次, 正常组给予生理盐水10 mL/kg灌胃, 每天1次, 连续12 wk. 于4、8、12、16 wk, 各组随机取5只大鼠处死取肝, 20 wk时剩余大鼠全部处死取肝, 大体观察暴露肝脏, 记录肝脏的形态、颜色、质地, 记录一般情况及表面癌结节数, 记录腹水形成情况及计算肝脾指数.

1.2.2 大鼠肝脏超声波观察: 大鼠吸入含有2%异氟烷的氧气麻醉, 腹部用脱毛霜去毛. 凝胶外涂于小鼠脱毛的皮肤, 通过腹壁获取肝脏和邻近结构的冠状面和矢状面图像. 超声成像应用Vero 770<sup>TM</sup> Imagine System型超声仪, 15L8W宽频线阵探头, 频率为8.0-13.0 MHz.

1.2.3 肝组织病理学观察: 取肝脏标本, 40 g/L多聚甲醛缓冲液固定24 h, 常规石蜡包埋, 切片, HE染色, 光学显微镜下观察, 并对肿瘤采用Edmondson分级法进行分级.

1.2.4 Real-time PCR检测肝组织miR-199a的表达水平: 提取各组组织总RNA, 进行PCR检测miR-199a的表达, 每个样品测3次. 检测步骤: 样本各取1 μg总RNA作为逆转录模板, RT引物为5'-CCCAAGGCTGTACATATCGGTC-3', 同时设计扩增用miR-199a上游引物: 5'-ACC TCCCTGATTGGCTACGA-3', 下游引物: 5'-AGCCCTCTTGATGCTGTCC-3'; 以U6为内参对照, 上游引物: 5'-TAAAATCTATATACACGAC GGCTTCG-3'; 下游引物: 5'-TACTGTGCGTTA AGCACTTCGC-3', 把加好样品的96孔板放在荧光定量PCR仪中进行反应, 反应条件如下: 95 °C 15 min后连续45个循环, 每个循环内95 °C 15 s、55 °C 30 s、72 °C 34 s, 总反应体积20 μL, 反应结束后分析PCR反应曲线, 得到Ct值. Real-time分析采用 $2^{-\Delta Ct}$ 法进行, 该方法是目的基因与内参基因的Ct值比较, 即 $\Delta Ct = Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{内参基因}}$ , 再将实验组与对照组比较, 即 $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{实验组}} - \Delta Ct_{\text{对照组}}$ , 相对表达量 =  $2^{\Delta\Delta Ct}$ 进行计算.

**统计学处理** 所有数据采用SPSS11.0软件统

计分析, 计量资料以mean±SD表示, 采用单因素方差分析, 计数资料的统计采用卡方检验, 肿瘤分级发生率比较采用两样本秩和检验, 两组间均数比较采用t检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

2.1 大鼠一般情况及成瘤率 正常组大鼠生长状态良好, 体质量增加显著, 皮毛光滑, 二便如常; 模型组活动少, 精神萎靡, 胡须下垂, 喜睡少动, 体质量增加减少, 皮毛欠光滑, 尿色黄, 有腹泻; 中药预防组一般状态明显好于模型组. 在20 wk实验结束时, 正常大鼠无死亡, 而模型大鼠死亡率为42.5%(17/40), 预防组死亡率为17.5%(7/40), 经解剖发现, 正常大鼠无腹水, 模型组和预防组在16-20 wk时部分出现腹水, 去除病死部分, 经16、20 wk解剖后统计, 模型组腹水发生率为87.5%(7/8), 预防组为44.4%(8/18), 预防组与模型组的死亡率和腹水发生率比较均有差异性(均 $P < 0.05$ ). 正常组没有发现肿瘤形成, 模型组和预防组大鼠早期肝脏表面变粗糙, 质地较柔软, 边缘锐薄, 切面呈斑剥状, 诱癌至12 wk肝脏表面和实质内出现大小不等的结节, 直径<1 cm, 质地变硬, 16 wk后结节变硬, 个别直径>2.5 cm, 有结节型、巨块型和弥漫型, 模型组和预防组在16 wk后成瘤率为100%. 图1显示模型组和预防组在16 wk时采用超声波均可探及肿瘤形成, 表现为圆形或类圆形略高、等或低回声结节, 无包膜, 边界清楚, 有较明显的声晕, 内部回声欠均匀, 当肿瘤内部出现坏死时可呈低或无回声.

## 2.2 病理形态学观察

2.2.1 肉眼观察: 正常组的大鼠肝脏表面光滑, 色淡红, 边缘锐利, 质地软(图2A). 模型组和预防组大鼠随着诱癌过程的进行, 经历肝炎、肝硬化阶段而形成肝癌, 实验至16 wk后, 模型组大鼠肝脏表面粗糙, 可见多个大小不一的灰白色癌结节, 最大者1 cm×1.5 cm×0.5 cm, 切面呈结节状, 可见出血和坏死, 癌周肝脏常伴结节或肝硬化

## ■相关报道

Jiang等对肝硬化患者的肝组织miRNA情况开展了研究, 发现肝硬化发病与miRNA的表达异常有关, 而且是发生肝癌的重要参考指标, 他们还对人肝癌标本进行了研究, 发现miR-199a、miR-21和miR-301在肝癌中表达明显, 与预后有关.

**■创新盘点**

本实验采用DEN诱导大鼠肝癌模型, 对造模过程中肝组织miR-199a的表达情况进行动态研究, 有助于阐明肝癌的发病机制及中药预防肝癌的效果。



图 2 各组16 wk时肝脏肉眼观察. A: 正常组; B: 模型组; C: 预防组.

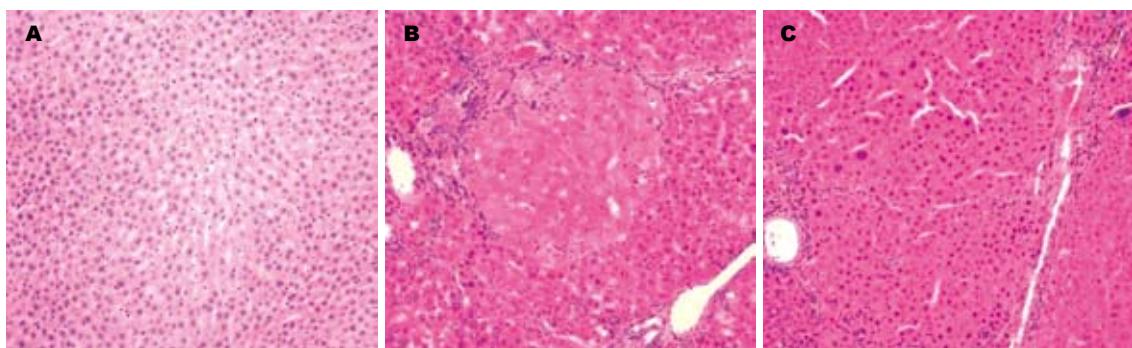


图 3 各组大鼠16 wk时肝组织病理改变(HE × 100). A: 正常组; B: 模型组; C: 预防组.

表 1 各组大鼠肝指数比较 (g/kg, mean ± SD)

分组	4 wk	8 wk	12 wk	16 wk	20 wk
正常组	26.45 ± 1.27 <sup>b</sup>	27.02 ± 1.06 <sup>b</sup>	25.71 ± 2.94 <sup>b</sup>	26.21 ± 3.05 <sup>b</sup>	24.15 ± 2.16 <sup>b</sup>
模型组	30.58 ± 1.36	42.25 ± 1.22	51.82 ± 1.83	80.82 ± 3.35	122.84 ± 5.83
预防组	25.04 ± 1.83 <sup>b</sup>	30.87 ± 2.46 <sup>b</sup>	39.68 ± 4.00 <sup>b</sup>	66.40 ± 11.03 <sup>b</sup>	96.17 ± 6.62 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs 模型组; 4~16 wk每组5只; 20 wk的正常组、模型组、预防组分别为5、3、13只.

改变; 预防组的肝脏表面癌结节较模型组有显著改善(图2B, C).

**2.2.2 病理组织学:** 图3显示各组在16 wk时肝组织HE染色情况, 其中正常组: 肝小叶结构正常, 无界面性炎症及纤维化; 肝条索排列规整, 以中央静脉为中心呈放射状排列, 肝细胞无变性、坏死. 模型组: 肝细胞异型性增生明显, 大部分增生肝细胞出现核异质变, 细胞核仁普遍增大, 细胞成倍增大, 染色质粗糙, 出现癌变细胞, 同时呈典型的柱状及腺管样癌巢结构, 且周围组织肝细胞异型性明显, 伴癌细胞浸润, 并可见不同程度的脂肪变性, 部分区域有出血、坏死及静脉癌栓, 周围的肝组织内尚可见微小癌卫星灶. 癌周组织细胞水肿、嗜酸性变、脂肪变性, 并有肝细胞增生灶、增生结节及非典型增生结节, 呈典型的肝硬化表现. 预防组: 虽然大

鼠肝脏可见癌结节, 但与模型组比较, 肝细胞变性坏死减轻. 肿瘤分级结果研究表明, 16 wk时模型组III级发生率为100%(5/5), 而预防组I、II、III级发生率分别为40%(2/5)、40%(2/5)及20%(1/5), 两组比较有显著差异(P<0.05).

**2.3 肝脾指数** 与模型组比较, 中药预防组4~20 wk的肝脾指数均显著下降(表1, 2, 图4, 5).

**2.4 肝组织miR-199a的表达** 与正常组比较, 模型组和预防组的miR-199a均有显著上调. 同时, 与模型组比较, 预防组除16 wk外均出现miR-199a的表达下调, 两组之间差异显著(P<0.01, 图6, 7, 表3).

### 3 讨论

DEN是具有中毒性和致癌性双重效应的化学毒剂, 可通过产生亲电子产物脱嘌呤作用连接到

**■应用要点**  
本研究证实健脾解毒方有预防DEN诱导大鼠肝癌发生的作用,其机制可能部分与下调miR-199a的表达有关,为中药预防肿瘤的作用提供理论依据。

表 2 各组大鼠脾指数比较 (g/kg, mean ± SD)

分组	4 wk	8 wk	12 wk	16 wk	20 wk
正常组	2.55 ± 0.14 <sup>b</sup>	2.42 ± 0.25 <sup>b</sup>	2.52 ± 0.15 <sup>b</sup>	2.52 ± 0.11 <sup>b</sup>	2.37 ± 0.21 <sup>b</sup>
模型组	4.47 ± 0.30	4.67 ± 0.32	4.36 ± 0.55	4.46 ± 0.20	5.25 ± 0.46
预防组	3.39 ± 0.30 <sup>b</sup>	3.62 ± 0.36 <sup>b</sup>	3.31 ± 0.05 <sup>b</sup>	3.72 ± 0.46 <sup>a</sup>	4.23 ± 0.53 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>P<0.05, <sup>b</sup>P<0.01 vs 模型组; 4~16 wk每组5只; 20 wk的正常组、模型组、预防组分别为5、3、13只。

表 3 各组大鼠肝组织miR-199a的表达 (mean ± SD)

分组	4 wk	8 wk	12 wk	16 wk	20 wk
正常组	1.01 ± 0.06 <sup>b</sup>	1.13 ± 0.05 <sup>b</sup>	0.96 ± 0.09 <sup>b</sup>	1.19 ± 0.04 <sup>b</sup>	1.11 ± 0.03 <sup>b</sup>
模型组	2.55 ± 0.06	4.27 ± 0.10	4.91 ± 0.09	4.16 ± 0.32	5.13 ± 0.16
中药组	1.37 ± 0.07 <sup>b</sup>	1.76 ± 0.04 <sup>b</sup>	4.22 ± 0.25 <sup>b</sup>	4.87 ± 0.09 <sup>b</sup>	3.81 ± 0.12 <sup>b</sup>

<sup>b</sup>P<0.01 vs 模型组; 4~16 wk每组5只; 20 wk的正常组、模型组、预防组分别为5、3、5只。

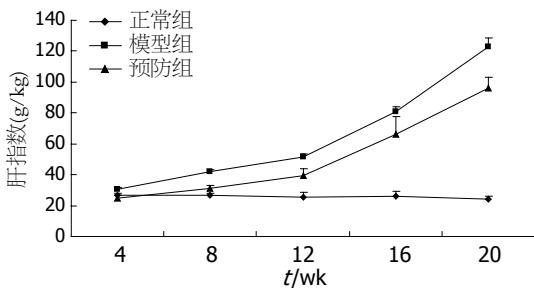


图 4 各组肝指数动态比较。

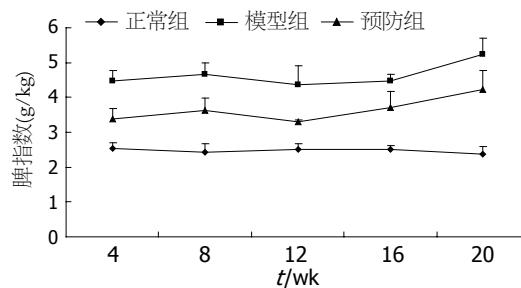


图 5 各组脾指数动态比较。

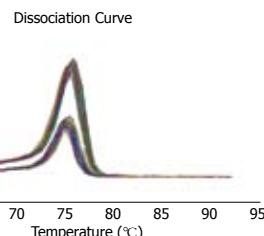
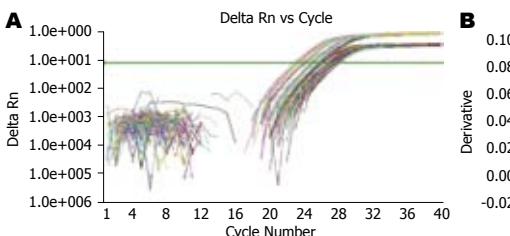
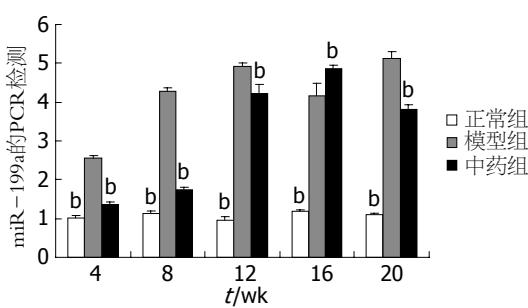


图 6 miR-199a扩增和熔解曲线。A: 扩增曲线; B: 熔解曲线。

图 7 各组肝组织miR-199a的表达。<sup>b</sup>P<0.01 vs 模型组。

DNA双链上,使DNA双链随机内收而导致DNA编码错误引发机体损伤,已经广泛用于原发性肝癌的诱癌模型,该模型经过中毒损伤-增生硬

化-癌变3个阶段,病理类型和人类肝癌发生过程相似<sup>[12,13]</sup>。本研究发现,正常组没有发现肿瘤形成,模型组和预防组大鼠早期肝脏表面变粗糙,质地较柔软,边缘锐薄,切面呈斑剥状,诱癌至12 wk肝脏表面和实质内出现大小不等的结节,质地变硬,16 wk后结节变硬,个别直径>2.5 cm,有结节型、巨块型和弥漫型,模型组和预防组在16 wk后成瘤率为100%,是比较理想的肝癌动物研究模型。

中医中药防治肿瘤在我国有悠久的历史,具有独特的机制与效应,在肝癌的预防中同样具有重要的地位,其中中药复方是根据中医理、法、方、药的理论组方并经过实践确定下来的。

**■同行评价**

本研究采用中医中药防治肝癌并取得一定进展,具有一定理论和临床应用价值。

有效方剂,是中医预防肿瘤的主要手段之一。健脾解毒方是根据中医学整体观念和辨证论治的原则,将清热解毒、祛瘀散结、健脾理气等有机结合起来,选用植物性中药组方,由生黄芪、白术、猪苓、八月札、石见穿、野葡萄藤、薏苡仁等组成,具有健脾理气、化湿解毒的作用,由著名中医肿瘤专家范忠泽教授组方,他认为肝癌的发生、发展与六淫外侵、七情失调、饮食所伤及素体不足等多种因素有关,出现痰、瘀、毒等病理产物,并可涉及肝、肾等多个脏腑功能失调,但脾胃的病变,始终是一个关键的因素,肝癌的形成大多由于脾气不足,运化不能,湿浊内蕴或肾气亏损,气化失司,湿浊内聚。湿浊蕴结体内,日久郁而化热,湿热蕴结下注,浸淫肠道导致肠道气血运行不畅,湿热瘀滞凝结而成肿块。本研究对健脾解毒方预防肝癌的效果进行研究,结果发现,预防组的死亡率为17.5%,16 wk后腹水发生率为44.4%,而模型组死亡率为42.5%,腹水发生率为87.5%,两组有显著差异(均 $P<0.05$ ),同时,预防组还有显著降低肝脾指数的作用。通过对肝组织病理的进一步研究,发现模型组16 wk时肝癌III级发生率为100%(5/5),而预防组I、II、III级肝癌发生率分别为40%(2/5)、40%(2/5)及20%(1/5),两组比较有显著差异( $P<0.05$ )。上述研究表明,健脾解毒方对DEN诱导大鼠肝癌动物模型具有降低死亡率、减少腹水形成及降低肝脾指数的作用,对肝癌发生和发展有较好的预防作用。

miRNA是长度约为20 nt的非编码RNA,本身不编码蛋白。miRNA过去被认为是机体的多余基因,但目前认为在细胞凋亡、增殖、分化、血管生成及肿瘤形成等方面均具有重要的调节作用,参与人体大约30%的基因调节,与肿瘤、心血管疾病、肝病、免疫紊乱及代谢紊乱等多种发病有关<sup>[14-18]</sup>。miRNA与HCC的关系引起国内外很多学者的重视,如Ji等<sup>[19]</sup>研究认为,miRNA是肝癌诊断和治疗研究的重要靶点。Wong等<sup>[20]</sup>采用基因芯片对HCC组织miRNA表达谱进行研究,发现肝癌组织中miR-222、miR-221和miR-31上调,miR-223、miR-126和miR-122a下调。Varnholt等<sup>[21]</sup>对52例肝癌前和HCC患者进行研究,发现miR-122、miR-100和miR-10a在肝癌中表达上调,miR-145表达下降。Jiang等<sup>[22]</sup>对肝硬化患者的肝组织miRNA情况也开展了研究,发现肝硬化发病与miRNA的表达异常有关,而且是发生肝癌的重要参考指

标,他们还对人肝癌标本进行了研究,发现miR-199a、miR-21和miR-301在肝癌中表达明显,与预后有关。近年来,miR-199a与肿瘤的关系引起了许多学者的高度重视,如Yu等<sup>[23]</sup>对大鼠口腔癌模型组织中miRNA表达情况进行研究,发现miR-199a在肿瘤组织中表达下调,认为miR-199与口腔癌发病密切有关,可以作为病情判断的重要参考指标。Garzon等<sup>[11]</sup>对急性髓细胞样白血病血液样本进行研究,发现miR-191和miR-199a的高表达与不良预后相关。但综合国内外研究情况,有关DEN诱导大鼠肝癌模型miR-199a表达规律方面的报道还较少,为此,本研究采用DEN诱导大鼠肝癌模型,对模型形成过程中肝组织miR-199a的表达情况进行了初步研究,结果显示,与正常组比较,模型组肝组织miR-199a的表达有显著上调,而与模型组比较,预防组除16 wk外,均有显著下调miR-199a表达的作用,两组之间差异显著(均 $P<0.01$ ),上述结果表明,miR-199a的表达上调与肝癌发生密切相关,具有癌基因的特点,同时健脾解毒方有较好预防DEN诱导大鼠肝癌发生的作用,其机制可能部分与下调miR-199a的表达有关,对其机制仍需做进一步深入研究。

#### 4 参考文献

- Vivekanandan P, Singh OV. High-dimensional biology to comprehend hepatocellular carcinoma. *Expert Rev Proteomics* 2008; 5: 45-60
- Roessler S, Budhu A, Wang XW. Future of molecular profiling of human hepatocellular carcinoma. *Future Oncol* 2007; 3: 429-439
- Zender L, Kubicka S. Molecular pathogenesis and targeted therapy of hepatocellular carcinoma. *Onkologie* 2008; 31: 550-555
- Pang RW, Poon RT. From molecular biology to targeted therapies for hepatocellular carcinoma: the future is now. *Oncology* 2007; 72 Suppl 1: 30-44
- Lai JP, Sandhu DS, Moser CD, Cazanave SC, Oseini AM, Shire AM, Shridhar V, Sanderson SO, Roberts LR. Additive effect of apicidin and doxorubicin in sulfatase 1 expressing hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. *J Hepatol* 2009; 50: 1112-1121
- 许建华,李朝衡,朱美华,孙珏,范忠泽。肠胃清口服液体内抗肿瘤的实验研究. 中药药理与临床 2004; 20: 42-43
- 许建华,范忠泽,孙珏,朱美华,李琦,韩建宏,石晓兰。肠胃清药物血清对人口腔表皮癌细胞株KB-A-1多药耐药的逆转作用. 肿瘤 2005; 25: 562-565
- 许建华,范忠泽,孙珏,朱美华,费瑞银,韩建宏,石晓兰,李朝衡,张勇。肠胃清治疗晚期胃肠癌及对外周血MDR1 mRNA的影响. 上海中医药杂志 2007; 41: 40-42
- Ladeiro Y, Zucman-Rossi J. [miRNAs in cancer: the case of liver tumors] *Med Sci (Paris)* 2009; 25: 467-472
- Varnholt H. The role of microRNAs in primary

- liver cancer. *Ann Hepatol* 2008; 7: 104-113
- 11 Garzon R, Volinia S, Liu CG, Fernandez-Cymering C, Palumbo T, Pichiorri F, Fabbri M, Coombes K, Alder H, Nakamura T, Flomenberg N, Marcucci G, Calin GA, Kornblau SM, Kantarjian H, Bloomfield CD, Andreeff M, Croce CM. MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* 2008; 111: 3183-3189
- 12 许文, 王阁, 杨志祥, 陈川, 张志敏, 李琼, 雒喜忠, 胡庆, 王东, 李增鹏. APE1在DEN诱导大鼠肝细胞癌形成过程中作用的研究. 肿瘤预防与治疗 2008; 21: 127-129
- 13 刘家国, 赵洪进, 刘艳娟, 王小龙. 富硒麦芽对二乙基亚硝胺致SD大鼠肝癌细胞因子和血管生成的影响. 中国兽医学报 2007; 27: 573-578
- 14 Zhang C. MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology. *Physiol Genomics* 2008; 33: 139-147
- 15 Ladeiro Y, Couchy G, Balabaud C, Bioulac-Sage P, Pelletier L, Rebouissou S, Zucman-Rossi J. MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations. *Hepatology* 2008; 47: 1955-1963
- 16 Bala S, Marcos M, Szabo G. Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 5633-5640
- 17 Song G, Wang L. A conserved gene structure and expression regulation of miR-433 and miR-127 in mammals. *PLoS One* 2009; 4: e7829
- 18 Bray I, Bryan K, Prenter S, Buckley PG, Foley NH, Murphy DM, Alcock L, Mestdagh P, Vandesompele J, Speleman F, London WB, McGrady PW, Higgins DG, O'Meara A, O'Sullivan M, Stallings RL. Widespread dysregulation of MiRNAs by MYCN amplification and chromosomal imbalances in neuroblastoma: association of miRNA expression with survival. *PLoS One* 2009; 4: e7850
- 19 Ji J, Wang XW. New kids on the block: diagnostic and prognostic microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Ther* 2009; 8: 1686-1693
- 20 Wong QW, Lung RW, Law PT, Lai PB, Chan KY, To KF, Wong N. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology* 2008; 135: 257-269
- 21 Varnholt H, Drebber U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, Odenthal M. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2008; 47: 1223-1232
- 22 Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, Roberts LR, Schmittgen TD. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 419-427
- 23 Yu T, Wang XY, Gong RG, Li A, Yang S, Cao YT, Wen YM, Wang CM, Yi XZ. The expression profile of microRNAs in a model of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced oral carcinogenesis in Syrian hamster. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 64

编辑 李军亮 电编 何基才

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

## 《中国期刊引证报告(扩刊版)》发布《世界华人消化杂志》 2008年影响因子0.729

**本刊讯** 《中国期刊引证报告(扩刊版)》是依托中国科学技术信息研究所国家工程技术数字图书馆“知识服务”系统, 在“万方数据·数字化期刊群”基础上, 结合中国科技论文与引文数据库(CSTPCD), 以我国正式出版的各学科6108种中英文期刊为统计源期刊。对全部期刊的引文数据, 严格按题名、作者、刊名、年、卷、期、页等进行分项切分后, 进行规范化处理和有效链接, 经统计分析, 编制而成。2008年《世界华人消化杂志》总被引频次3683次, 影响因子0.729, 即年指标0.142, 引用期刊数732, 学科扩散指标0.533, 被引半衰期4.303, H指数8。(编辑部主任: 李军亮 2010-01-08)