

网络出版时间:2024-02-01 15:48:33 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20240201.1111.001

◇基础医学研究◇

秋水仙碱经由 Hippo 信号通路对小鼠肝癌的影响及其机制研究

徐燕燕,朱乐乐,李苗苗,杨 雁

摘要 目的 探明秋水仙碱经由 Hippo 信号通路对小鼠肝癌的影响及其机制研究。方法 6 周龄的雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为 3 组:对照组、模型组、秋水仙碱组,建立二乙基亚硝胺(DEN)/四氯化碳(CCl_4)/乙醇($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)诱导小鼠肝癌模型及秋水仙碱(0.1 mg/kg)干预。第 1 至 2 周,模型组和秋水仙碱组腹腔注射 1.0% DEN,每周 1 次;第 3 周至第 7 周,灌胃 4% 溶于橄榄油溶液(5 ml/kg)每周 2 次;第 8 周至第 18 周,灌胃 20% CCl_4 溶于橄榄油溶液(6 ml/kg)每周 2 次。秋水仙碱组连续灌胃给药 20 周。对照组给予相应的溶媒。进行肝指数、谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)血清生化指标的检测,蛋白印迹(Western blot)和免疫荧光检测各组小鼠肝组织中 MST1、pYAP、YAP、pTAZ、TAZ 蛋白的表达水平。结果 对照组小鼠肝脏表面光滑,质地柔软,模型组肝脏粗糙,质地较硬,有颗粒状结节,秋水仙碱组以上病变得明显改善。HE 染色显示,对照组小鼠肝小叶结构正常,模型组肝小叶结构紊乱,可见少量脂滴,组织广泛坏死,炎性细胞浸润,存在脂肪空泡,而秋水仙碱干预后小鼠肝脏病变程度减轻。免疫荧光和 Western blot 结果显示,模型组小鼠较对照组小鼠肝组织中 pYAP、pTAZ 的蛋白表达水平降低,MST1、YAP、TAZ 的蛋白表达水平增加;秋水仙碱干预后,上调 MST1、pYAP、pTAZ 蛋白表达水平,下调 YAP、TAZ 的蛋白表达水平。结论 秋水仙碱对小鼠肝癌的治疗作用可能与其激活的 Hippo 信号通路有关。

关键词 秋水仙碱;Hippo 信号通路;肝癌;二乙基亚硝胺;四氯化碳;乙醇

中图分类号 R 965.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0185-08
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.001

肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是我国常见的恶性肿瘤之一,具有高发病率且难以治疗的特点,是世界上第三大癌症相关死亡原因^[1]。近年来,肝癌患者大多采用肿瘤切除、射频消融术等外科

手术治疗,但由于这些治疗手段费用昂贵,风险高,化疗毒性大,肝癌患者的预期寿命显著缩短^[2]。因此,迫切需要针对肝癌采取更多预防性、低费用的治疗策略。

秋水仙碱(Colchicine)是被称为“草地藏红花”植物中提取的有机生物碱^[3]。现有研究^[4]表明,秋水仙碱对原发性肝癌有一定的抑制作用,但秋水仙碱对肝癌治疗的作用机制尚不明确。据报道^[5],Hippo 信号通路的下游效应因子 YAP 和 TAZ 不仅与肝脏炎症和肝纤维化有关,而且还是肝癌肿瘤微环境中不可或缺的信号枢纽。然而秋水仙碱能否通过调控 Hippo 信号通路影响肝癌的发生发展目前未见报道。因此,该实验旨在探讨秋水仙碱对小鼠肝癌的治疗作用,并进一步研究其介导 Hippo 信号通路的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 30 只 6 周龄的健康雄性 C57BL/6J 小鼠,体质量 $20\sim 22\text{ g}$,购自河南思科巴斯生物科技有限公司[证书编号:SYXK(安徽)2020-001]。小鼠饲养在具有独立通风的 IVC 笼盒中(SPF 屏障系统),并喂以高压消毒饲料和水。环境恒定温度 $24\text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度 50% ,噪声小于 60 分贝,12 h 交替光/暗循环。小鼠在上述条件下饲养 1 周,以适应实验前的实验室条件。本课题中所涉及的实验小鼠的日常饲养及各类实验皆严格遵守国家和机构关于在科学实验中人道利用动物的公约和指南(伦理批准代码:LLSC,20180015)。

1.1.2 主要药品与试剂 秋水仙碱(纯度 $\geq 98.0\%$,编号:PS0197-0025)购自成都 Push 生物技术公司;兔抗 MST1 (#3682)、pYAP (Ser127) (#13008S)、YAP (#14074)、pTAZ (#59971)、TAZ (#72804)抗体购自美国 Affinity Biosciences 公司;四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl_4)(编号:C805332;纯度 $\geq 98.0\%$,相对分子质量:153.82)购自江苏欣诺科催化剂股份有限公司;二乙基亚硝胺(dieth-

2023-07-11 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:82074073)

作者单位:安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

作者简介:徐燕燕,女,硕士研究生;

杨 雁,女,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: yangyan@ahmu.edu.cn

yl nitrosamine, DEN) (编号:73861;纯度 $\geq 99.0\%$,分子量:102.14) 购自焦作沃恩生物科技有限公司。乙醇(ethanol, C_2H_5OH) (编号:100092008;纯度 $\geq 99.7\%$,相对分子质量:46.07) 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

1.1.3 主要仪器 高速冷冻离心机购自张家港市腾鹰机械制造有限公司;病理组织包埋机购自德国 Leica 公司;冷冻研磨仪购自上海净信公司;PCR 仪购自广州市华粤行仪器有限公司;YJ-1450 型医用净化工作台购自苏州菲泰克环境技术有限公司;水平电泳仪购自德诺杰亿生物科技有限公司(北京);荧光显微镜购自基恩士有限公司(上海)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组及处理 选 30 只体重相近的健康雄性小鼠,随机均分为 3 组:对照组、模型组、秋水仙碱组,建立 DEN/ CCl_4 / C_2H_5OH 诱导小鼠肝癌模型及秋水仙碱干预。模型组和秋水仙碱组按照以下方式进行造模:① 1~2 周,腹腔注射 1.0% DEN,每周 1 次;② 3~7 周,灌胃 20% 溶于橄榄油的 CCl_4 溶液(5 ml/kg),每周 2 次;③ 8~18 周,灌胃 20% 溶于橄榄油的 CCl_4 溶液(6 ml/kg),每周 2 次;④ 第 3 周开始,将含有 10% 的乙醇溶液作为饮用水,置于鼠笼,任小鼠自行饮用;⑤ 第 19 周开始,停止所有化学试剂,常规饮食饮水至第 20 周末。同时,秋水仙碱组按体重 0.1 mg/kg 每天给小鼠灌胃秋水仙碱。对照组给予相应的溶媒,常规饮食饮水。20 周末,用异氟烷对小鼠进行麻醉后,摘除眼球取得血清,置于沾有 1% 肝素钠溶液 EP 管中,用试剂盒检测转氨酶水平。颈椎脱臼处死小鼠,取小鼠肝脏,注意其完整性,用 PBS 溶液清洗黏附的血液,在明亮的环境下观察小鼠肝脏的大体形态并拍摄照片。用滤纸擦干肝脏表面,取部分小鼠肝小叶在 4% 多聚甲醛中固定,进行石蜡切片。其余部分冻存于 $-80^\circ C$,用于后期肝组织指标测定、免疫荧光和 Western blot 实验。

1.2.2 小鼠肝脏指数的测定 实验开始前对小鼠进行称重并记录,解剖取出小鼠肝脏称重并记录,根据公式计算,肝指数 = 肝重/体质量 $\times 100\%$ 。

1.2.3 小鼠血清中谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)检测

1.2.3.1 血清的分离处理 将采集的小鼠血液于冰上静置 2 h,提前将高速冷冻离心机预冷至 $4^\circ C$,将装有小鼠血液的 EP 管对齐放置于 $4^\circ C$ 冷冻离心

机中 3 500 r/min 离心 15 min,吸取上清液于新的 EP 管内, $4^\circ C$ 保存备用。

1.2.3.2 血清生物标志物测定 按照试剂盒说明书指示,检测小鼠血清中 AST 和 ALT 水平,并通过酶标仪获得血清中各指标的吸光度(absorbance, A) 值,计算各样本中 AST 和 ALT 的具体值。

1.2.4 苏木精-伊红(HE)染色法 取出多聚甲醛中固定的肝组织,进行组织标本固定并包埋在石蜡中,用切片机切成 3~5 μm 的切片。组织切片依次在不同浓度的二甲苯和无水乙醇中浸泡相应的时间进行脱蜡和水化,苏木精中染色,流水中洗涤以显出蓝色,然后伊红染色后置于盖玻片下封片。光学显微镜下对肿瘤和肝组织进行组织病理学检查。

1.2.5 免疫荧光 在封闭前用柠檬酸盐修复液对组织切片进行抗原修复。切片用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,然后与罗丹明缀合的山羊抗兔 IgG 在 $37^\circ C$ 下孵育 50 min。用 PBS 洗涤后,滴加适量 DAPI 溶液于室温孵育 10 min。切片用 PBS 冲洗并用抗荧光淬灭剂封片,荧光显微镜下观察和拍照,通过 ImageJ 软件对阳性信号进行量化。

1.2.6 Western blot 从肝组织中提取总蛋白,用 BCA 试剂盒定量样品中的蛋白浓度,将样品变性并通过 10% 或 15% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离并转移到聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上。用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,一抗在 $4^\circ C$ 下孵育过夜,用 Tris-HCl 缓冲盐溶液(TBST)洗脱 3 次,然后与辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG 在室温下孵育 1 h。用 TBST 洗脱后,用增加型化学发光试剂覆盖 PVDF 膜,并使用 Gel Pro 分析软件检测不同的目标蛋白,对蛋白质条带强度进行半定量分析。

1.3 统计学处理 GraphPad Prism 8.0 软件用于处理定量数据。采用单向方差分析(ANOVA)或 t 检验来检验统计显著性。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 秋水仙碱对 DEN/ CCl_4 / C_2H_5OH 诱导的肝癌期小鼠肝组织病理学改变的影响 肝活检和组织病理学检查结果显示,对照组小鼠肝脏边缘清晰,颜色红润,有光泽,表面无斑点、结节,而模型组小鼠肝脏表面粗糙,无光泽,边缘有皱纹,切面有明显的米黄色颗粒状增生结节,质地较硬,相比于模型组,秋水仙碱组小鼠肝脏表面略为光滑且边缘无褶皱,颗粒

状结节斑块数量也减少,见图 1 A。HE 染色结果显示,对照组小鼠肝小叶结构完整,肝细胞排列整齐,大小均匀,无明显坏死或核碎裂区,模型组肝脏损害,有可见斑点、碎片坏死,肝小叶广泛堆积,可见明显的胶原纤维,肝细胞排列紊乱,肝窦体积变大,肝细胞大小也发生改变。与模型组比较,秋水仙碱组炎症细胞浸润减轻,胶原束数量明显减少,肝细胞排列趋于规则,见图 1 B。如表 1 所示,模型组小鼠肿瘤发生率为 100%,肿瘤结节直径均大于 1 mm,但秋水仙碱处理后小鼠肿瘤发生率降低($P < 0.01$),说明秋水仙碱降低肝癌结节的发生率和多样性。上述结果提示,秋水仙碱组小鼠肝组织病变程度减轻,表明秋水仙碱具有一定抗肝癌作用。

2.2 秋水仙碱对 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 诱导的肝癌期小鼠体质量与肝脏指数的影响 与对照组相比,模型组小鼠的肝重、体质量都有所减少($P < 0.05$, P

< 0.01),体质量尤甚;与模型组相比,秋水仙碱组小鼠的肝重、体质量均增加($F = 7.637$, $P < 0.05$; $F = 190.3$, $P < 0.01$),见图 2 A、B。小鼠肝脏指数结果显示,模型组的肝脏指数高于对照组($F = 105$, $P < 0.01$),秋水仙碱组与模型组相比差异无统计学意义,见表 2、图 2 C。提示 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 造模对小鼠的肝脏造成一定的损伤,秋水仙碱对小鼠肝脏有保护作用。

2.3 秋水仙碱改善 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 诱导的肝癌期小鼠肝功能 在肝功能检查中,ALT 和 AST 是反映肝细胞受损的指标。与对照组相比,模型组小鼠的 ALT 和 AST 水平显著升高(均 $P < 0.01$);与模型组相比,秋水仙碱组小鼠给药后 ALT 和 AST 水平有所降低($F_{ALT} = 136.1$, $F_{AST} = 143.7$, 均 $P < 0.01$),见表 2、图 3。提示 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 导致小鼠肝脏发生病变,肝功能受损,秋水仙碱能够降低小鼠肝

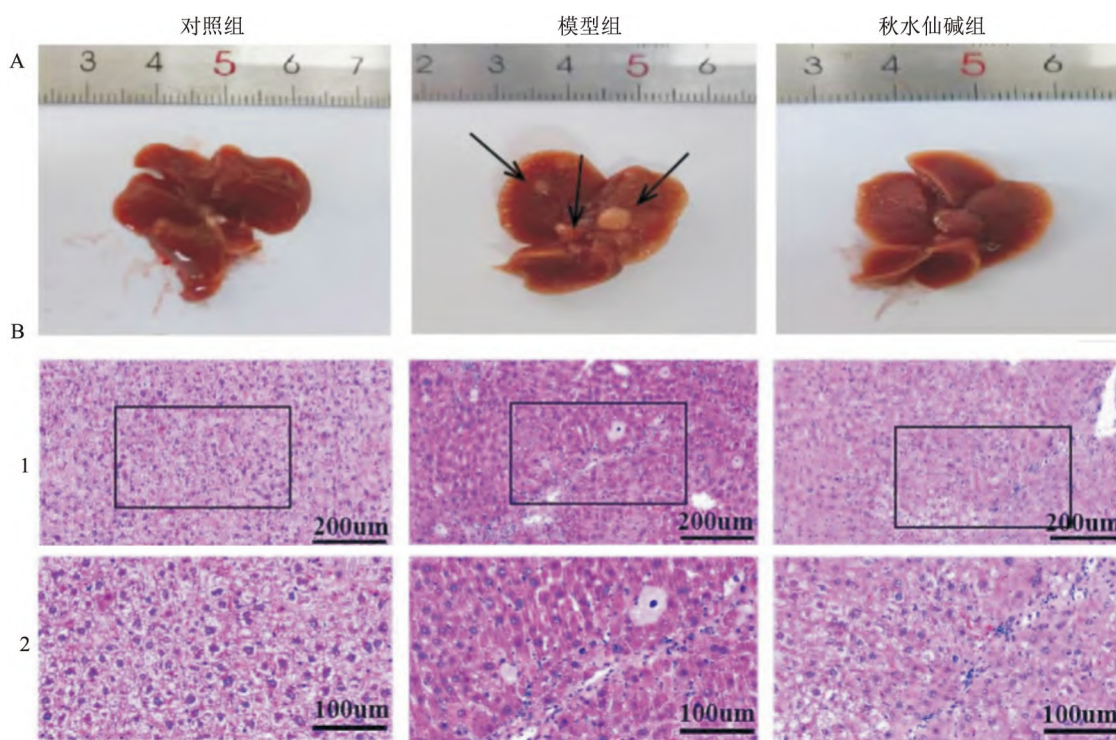


图 1 秋水仙碱对肝癌小鼠肝组织病理学的影响

A:3 组小鼠的代表性肝脏照片(黑色箭头表示肝癌结节);B:HE 染色观察小鼠肝脏组织病理学特征;1: $\times 200$;2: $\times 400$

表 1 秋水仙碱对诱导的小鼠肝组织肿瘤的影响($n = 8$)

分组	剂量 [mg/(kg·d)]	肿瘤发生率 [n(%)]	肿瘤最大直径			多样性
			$R \leq 1$ mm	$1 \text{ mm} < R \leq 5$ mm	$5 \text{ mm} < R$	
对照	—	0/8(0)	0	0	0	0
模型	—	8/8(100.0)	0	5	3	$4.75 \pm 3.64^{**}$
秋水仙碱	0.1	5/8(62.5)	4	1	0	$1.44 \pm 1.72^{##}$

与对照组比较: ** $P < 0.01$;与模型组比较: ## $P < 0.01$

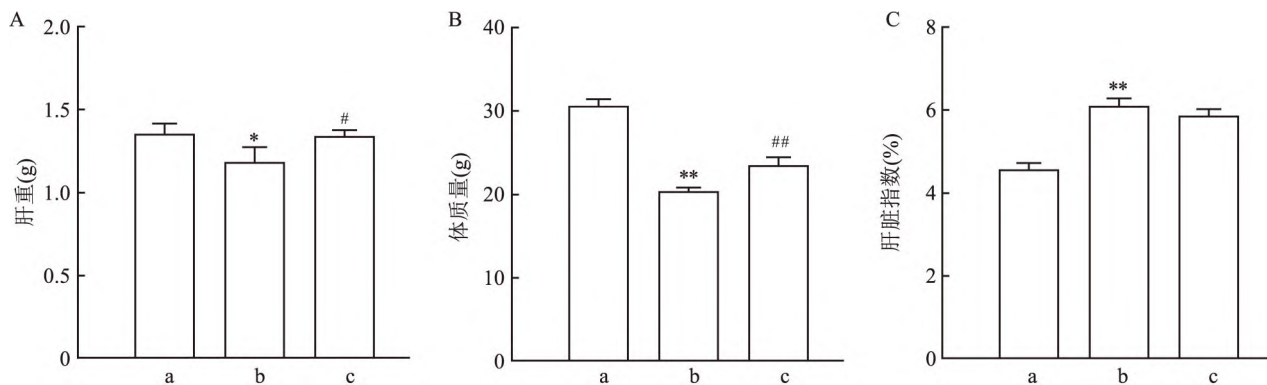


图2 秋水仙碱对肝癌小鼠肝指数的影响

A: 肝脏重量结果; B: 体质量结果; C: 肝脏指数结果; a: 对照组; b: 模型组; c: 秋水仙碱组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

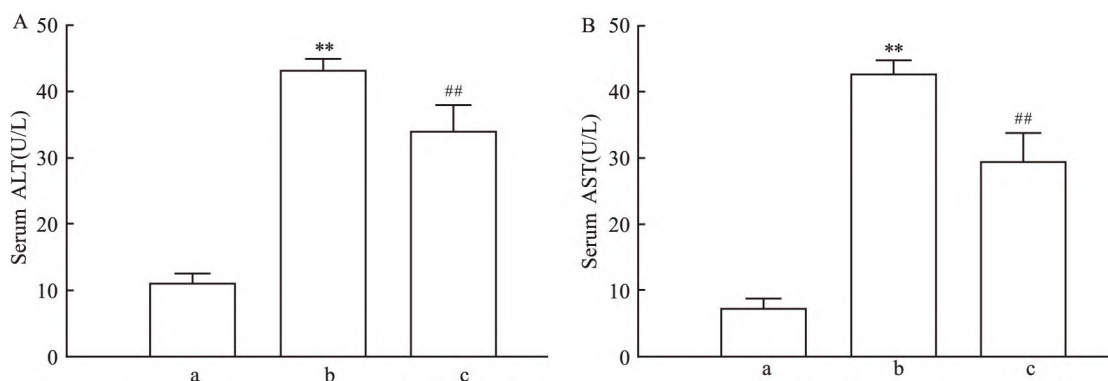


图3 秋水仙碱对肝癌小鼠 ALT(A) 与 AST(B) 的影响

a: 对照组; b: 模型组; c: 秋水仙碱组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

表2 秋水仙碱对小鼠肝脏指数及血清 ALT 和 AST 的影响 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

分组	肝指数 (%)	ALT (U/L)	AST (U/L)
对照	4.58 ± 0.13	7.50 ± 1.17	11.24 ± 1.18
模型	6.12 ± 0.14**	42.94 ± 1.74**	43.41 ± 1.43**
秋水仙碱	5.87 ± 0.15	29.63 ± 2.37##	34.15 ± 3.71##

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

脏的病变程度,改善小鼠肝功能。

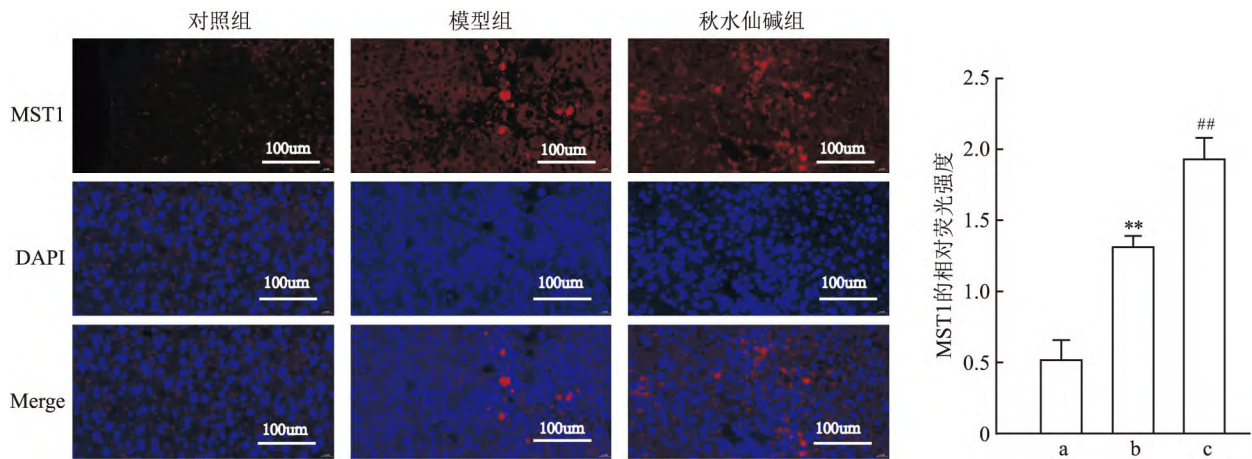
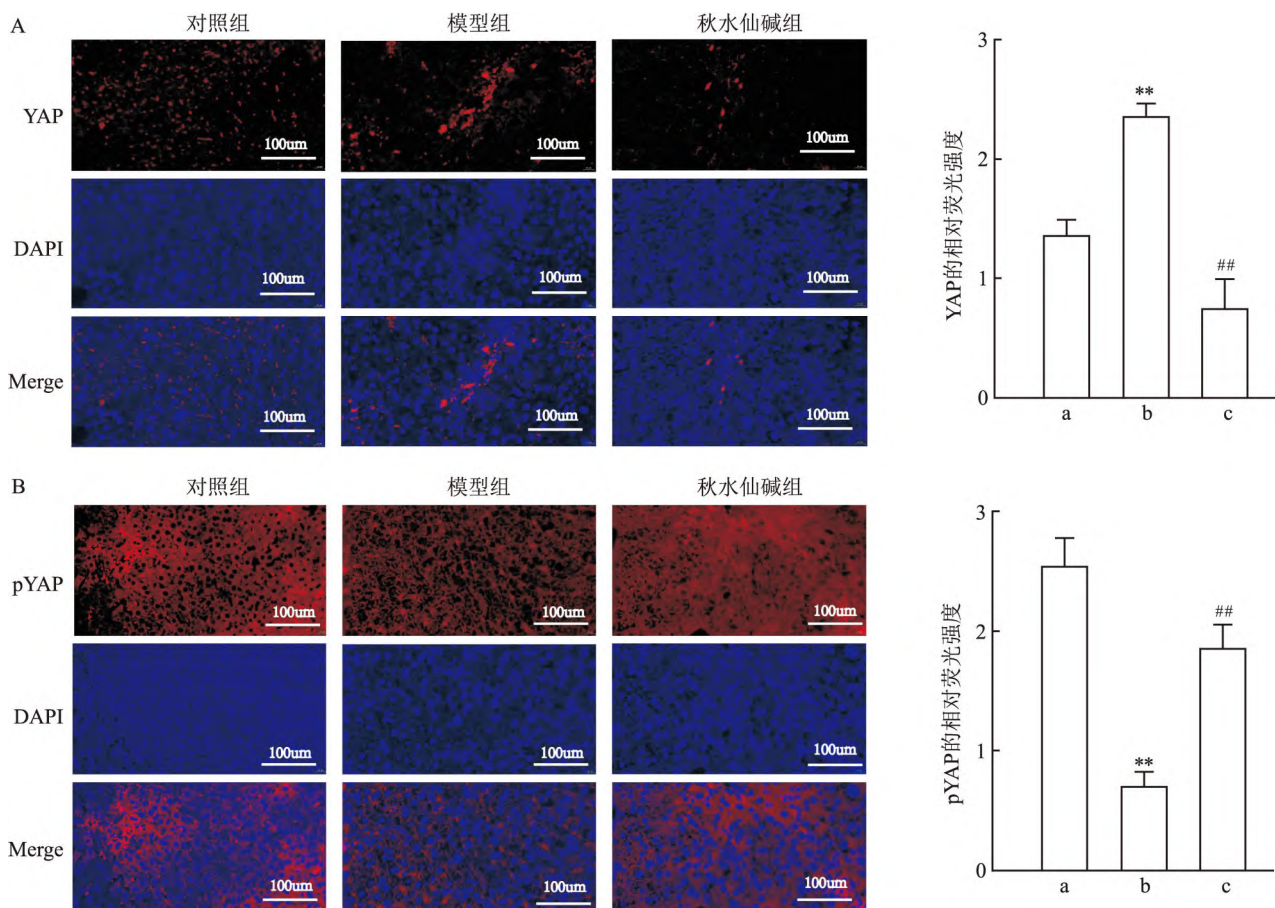
2.4 秋水仙碱对 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 诱导的肝癌期小鼠肝组织中 Hippo 通路相关蛋白 MST1 表达的影响 免疫荧光结果分析显示,对照组小鼠肝组织中 MST1 蛋白表达较少,与对照组相比,模型组小鼠肝组织中 MST1 蛋白表达增多 ($P < 0.01$),与模型组相比,秋水仙碱治疗组小鼠肝组织中 MST1 蛋白表达进一步增强 ($F = 140.7$, $P < 0.01$)。提示秋水仙碱能够促进小鼠肝组织中 MST1 蛋白的表达,见图 4。

2.5 秋水仙碱对 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 诱导的肝癌期小鼠肝组织中 YAP、pYAP 蛋白表达的影响 免

疫荧光结果分析显示,与对照组相比,模型组小鼠肝组织中 YAP 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$),pYAP 蛋白表达明显减少 ($P < 0.01$);与模型组相比,秋水仙碱组小鼠肝组织中 YAP 蛋白表达减少,pYAP 蛋白表达增加 ($F_{YAP} = 81.44$, $F_{pYAP} = 85.34$, 均 $P < 0.01$)。提示秋水仙碱能够促进小鼠肝组织中 pYAP 蛋白的表达,降低小鼠肝组织中 YAP 蛋白的表达,见图 5。

2.6 秋水仙碱对 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 诱导的肝癌期小鼠肝组织中 TAZ、pTAZ 蛋白表达的影响 免疫荧光结果分析显示,与对照组相比,模型组小鼠肝组织中 TAZ 蛋白表达明显增加 ($P < 0.01$),pTAZ 蛋白表达明显减少 ($P < 0.01$);与模型组相比,秋水仙碱治疗组小鼠肝组织中 TAZ 蛋白表达减少,pTAZ 蛋白表达增加 ($F_{TAZ} = 99.10$, $F_{pTAZ} = 68.14$, 均 $P < 0.01$)。提示秋水仙碱能够促进小鼠肝组织中 pTAZ 蛋白的表达,降低小鼠肝组织中 TAZ 蛋白的表达,见图 6。

2.7 秋水仙碱对 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 诱导的肝癌

图4 秋水仙碱对肝癌小鼠肝组织中 MST1 蛋白表达的影响 免疫荧光染色 $\times 40$ a: 对照组; b: 模型组; c: 秋水仙碱组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$ 图5 秋水仙碱对肝癌小鼠肝组织中 YAP(A)、pYAP(B) 蛋白表达的影响 免疫荧光染色 $\times 40$ a: 对照组; b: 模型组; c: 秋水仙碱组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

期小鼠肝组织中 Hippo 通路相关蛋白表达的影响

Western blot 结果检测显示,与对照组相比,模型组肝组织中 MST1、YAP、TAZ 的蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), pYAP、pTAZ 蛋白表达水平降低(均 $P < 0.01$);与模型组比较,秋水仙碱组肝组织中 MST1、pYAP、pTAZ 蛋白表达水平升高

($F_{\text{MST1}} = 93.44$, $P < 0.01$; $F_{\text{pYAP}} = 35.83$, $P < 0.05$; $F_{\text{pTAZ}} = 41.03$, $P < 0.05$), YAP、TAZ 的蛋白表达水平降低 ($F_{\text{YAP}} = 21.30$, $P < 0.01$; $F_{\text{TAZ}} = 14.15$, $P < 0.05$)。提示秋水仙碱在治疗肝癌的过程中,升高 MST1、pYAP、pTAZ 蛋白表达水平,降低 YAP、TAZ 的蛋白表达,见图 7。

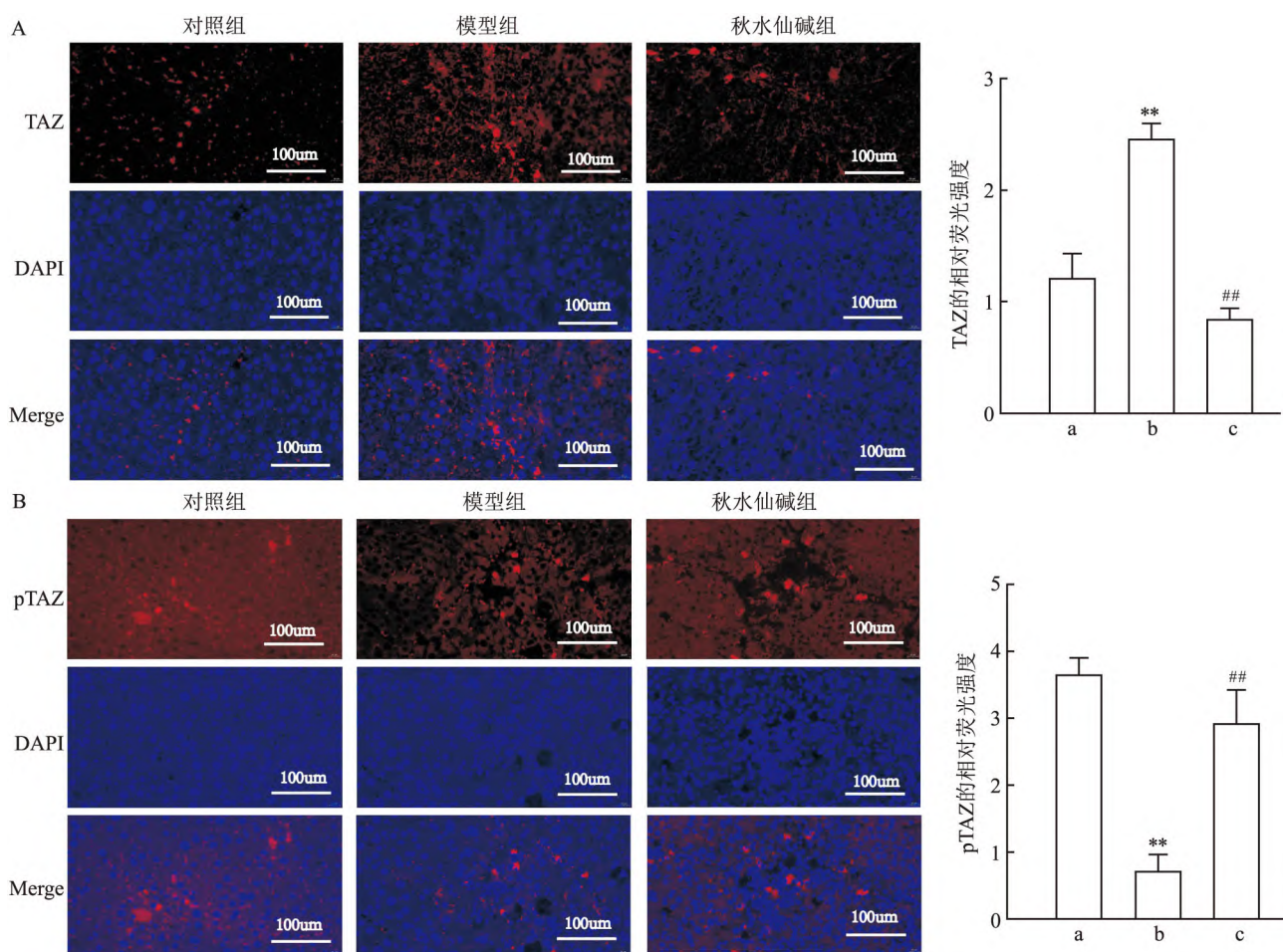


图6 秋水仙碱对肝癌小鼠肝组织中 TAZ (A)、pTAZ (B) 蛋白表达的影响 免疫荧光染色 $\times 40$

a: 对照组; b: 模型组; c: 秋水仙碱组; 与对照组比较: * $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.01$

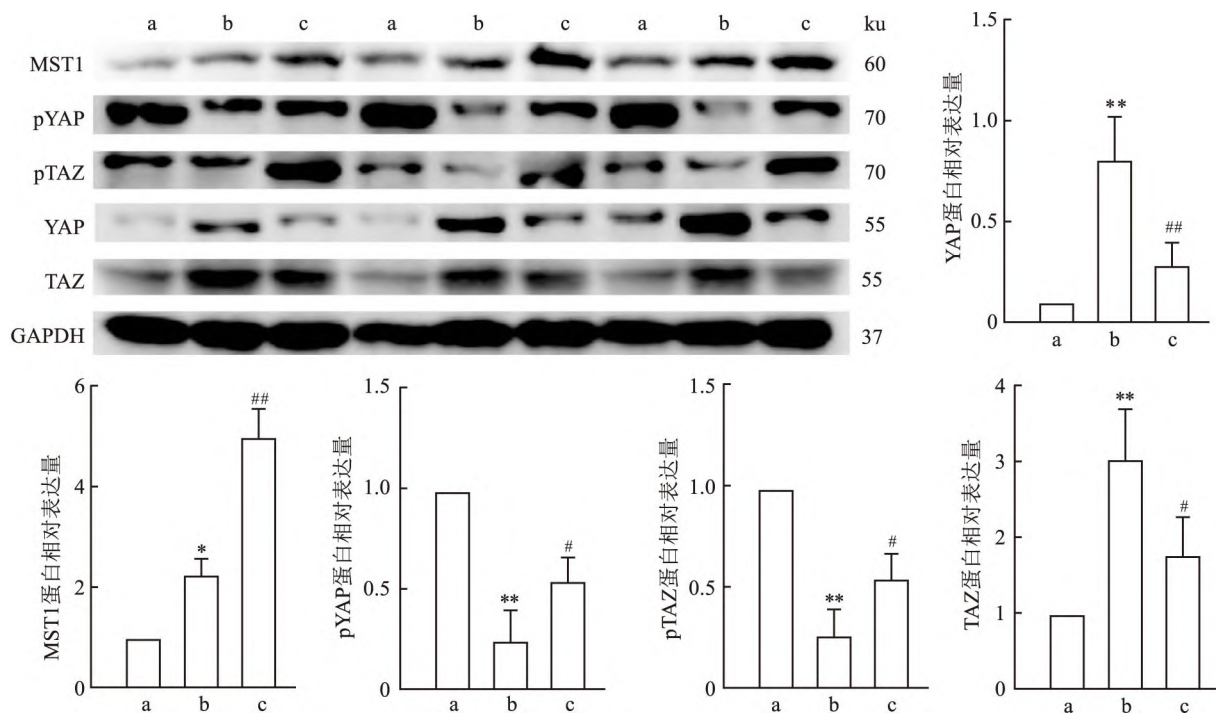


图7 秋水仙碱对肝癌小鼠肝组织中 Hippo 通路相关蛋白表达的影响

a: 对照组; b: 模型组; c: 秋水仙碱组; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

在肝癌的实验研究中,化学药物诱发肝癌动物模型较常用,多以 DEN 化学药物作为诱导剂,DEN 对肝脏有特定毒性,使肝细胞大面积坏死,最终诱导肝癌的发生^[6]。除了 DEN 外,CCl₄ 也常作为肝癌诱导剂,CCl₄ 是一种众所周知的肝毒素,会导致化学性肝损伤,包括炎症和纤维化。它在活性化合物或其代谢物的毒性中起着特殊的作用,一旦被激活,CCl₄ 就会影响细胞稳态和后续类型的毒性。这种毒性通过改变血浆、线粒体和溶酶体膜的通透性直接损害肝细胞^[7]。乙醇可以促进 CCl₄ 的吸收,加剧中毒症状。本实验采用的是 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 联合诱导法建立稳定的小鼠肝癌模型,该法建立的小鼠肝癌模型具有癌变率高、与人类肝癌的发生发展过程类似、无肝转移的优点^[8]。随着造模的进行,小鼠出现活动减少、食欲不振、萎靡的表现,20 周末,小鼠肝脏重量和体质量均降低,肝脏大体可见颜色明显暗淡且表面粗糙,出现米白色肿瘤病灶,HE 可见大量炎性细胞浸润,以及大小不一的异型细胞核,病理上已具备肝癌的基本特征。以上实验结果表明,DEN/CCl₄/C₂H₅OH 能够成功诱导小鼠肝癌模型。

其他生物碱,如紫杉醇和长春新碱,它们的结构复杂、合成难度大、生物利用度差且有毒副作用,尤其在临床上存在多重耐药性问题,相比之下,秋水仙碱是一种中性亲脂性生物碱,且结合位点空腔体积较小,其相应抑制剂的结构较为简单^[9],它通过阻断微管蛋白的聚合,从而影响微管的功能,集中在白细胞,尤其是粒细胞中并干扰其功能,减轻炎症反应,被用于治疗 and 预防自身炎症性疾病的发作^[10]。同时,它也具有抗肿瘤作用,对乳腺癌疗效显著,对肺癌、胃癌、宫颈癌可能也有一定疗效,它的抗癌作用的主要机制是诱导细胞毒作用,而不是通过抑制血管生成。研究^[4]报道,秋水仙碱浓度为 0.01 mg/ml 时对肝癌有抑制作用。因此,本次实验使用 0.01 mg/ml 的秋水仙碱来治疗 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 诱导的小鼠肝癌期,与模型组相比,秋水仙碱治疗后炎性细胞浸润得到明显改善,小鼠肿瘤的发生率和多样性降低,小鼠的体质量、肝脏重量有所增加,肝细胞坏死、细胞异型性均轻于模型组。表明秋水仙碱对 DEN/CCl₄/C₂H₅OH 诱导小鼠肝癌有治疗作用。

本实验研究表明,秋水仙碱发挥抗肝癌作用可能与 Hippo 信号通路有关。Hippo 信号通路启动

后,MST1 被磷酸化作用而激活 LATS1/2,LATS1/2 激活后可磷酸化并抑制 YAP/TAZ 的活性^[11]。其过程是磷酸化的 YAP/TAZ 与支架蛋白 14-3-3 结合,在细胞质积聚,随后被 β -TrCP E3 泛素连接酶介导的泛素化和蛋白酶体降解,最终导致 YAP 和 TAZ 促生长和抗凋亡的功能丧失^[12]。本实验结果表明,对照组小鼠 MST1、YAP、TAZ 的蛋白表达均较少,pYAP 和 pTAZ 的蛋白表达较多。相比于对照组,模型组小鼠 MST1、YAP、TAZ 的蛋白表达明显增多,pYAP 和 pTAZ 的蛋白表达明显减少;秋水仙碱干预后,MST1、pYAP 和 pTAZ 的蛋白表达显著增加,YAP、TAZ 的蛋白表达明显抑制。因此,秋水仙碱可能上调 MST1 激酶活性,增强 YAP 和 TAZ 磷酸化的分子机制,减少 YAP 和 TAZ 进入核转录,从而发挥抗肝癌作用。

综上所述,DEN/CCl₄/C₂H₅OH 诱导的小鼠肝癌中,秋水仙碱可能通过增强 Hippo 信号通路的上游抑癌因子 MST1 的表达而抑制下游基因 YAP/TAZ 的表达,从而发挥其抗肝癌的治疗作用。

参考文献

- [1] 林燕妮,吴淑蒙,任鑫鑫,等. NDR1 对肝癌患者预后和肝癌细胞增殖、迁移的影响[J]. 安徽医科大学学报, 2023, 58(4): 637-42.
- [2] Zhang C, Li L, Hou S, et al. Astragaloside IV inhibits hepatocellular carcinoma by continually suppressing the development of fibrosis and regulating pSmad3C/3L and Nrf2/HO-1 pathways[J]. J Ethnopharmacol, 2021, 279: 114350.
- [3] Finkelstein Y, Aks S E, Hutson J R, et al. Colchicine poisoning: the dark side of an ancient drug[J]. Clin Toxicol (Phila), 2010, 48(5): 407-14.
- [4] Lin Z Y, Wu C C, Chuang Y H, et al. Anti-cancer mechanisms of clinically acceptable colchicine concentrations on hepatocellular carcinoma[J]. Life Sci, 2013, 93(8): 323-8.
- [5] Driskill J H, Pan D. The hippo pathway in liver homeostasis and pathophysiology[J]. Annu Rev Pathol, 2021, 16: 299-322.
- [6] Frank D, Savir S, Gruenbaum B F, et al. Inducing acute liver injury in rats via carbon tetrachloride (CCl₄) exposure through an orogastric tube[J]. J Vis Exp, 2020(158):10.3791/60695.
- [7] Uehara T, Pogribny I P, Rusyn I. The DEN and CCl₄-induced mouse model of fibrosis and inflammation-associated hepatocellular carcinoma[J]. Curr Protoc Pharmacol, 2014, 66:14.30.1-14.30.10.
- [8] 韦淇元, 诸葛芳, 栗莲玉, 等. 相思藤总黄酮基于 FAK/PI3K/Akt 信号通路抗 CCl₄ 大鼠肝纤维化作用机制的研究[J]. 广西医科大学学报, 2020, 37(10):1816-23.
- [9] 刘 翎. 二芳基亚甲基环烷烃类微管蛋白抑制剂的设计、合成及抗肿瘤活性研究[D]. 北京: 北京协和医学院, 2012.

- [10] 潘显阳,陶金辉,李向培. 痛风性关节炎发病的炎性机制研究进展[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(7):1167-71.
- [11] Dey A, Varelas X, Guan K L. Targeting the Hippo pathway in cancer, fibrosis, wound healing and regenerative medicine[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2020, 19(7): 480-94.
- [12] 王明珠,周 阳,何凯桐,等. Hippo 通路在肿瘤发生发展中作用机制的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2022, 30(16): 3061-4.

Effects of colchicine *via* Hippo signaling pathway on mouse liver cancer and its mechanism research

Xu Yanyan, Zhu Lele, Li Miaomiao, Yang Yan

(Dept of Pharmacology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract **Objective** To investigate the effect and mechanism of colchicine on mouse liver cancer *via* Hippo signaling pathway. **Methods** The 6-week-old male C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups: diethylnitrosamine (DEN)/ carbon tetrachloride (CCl₄)/ ethanol (C₂H₅OH) induced mouse liver cancer model and colchicine (0.1 mg/kg) intervention were established in control group, model group and colchicine group. From week 1st to week 2nd, the model group and the colchicine group were intraperitoneally injected with 1.0% DEN once a week. From week 3rd to week 7th, 20% CCl₄ dissolved in olive oil solution (5 ml/kg) was intragastric administration twice a week. From week 8th to week 18th, 20% CCl₄ dissolved in olive oil solution (6 ml/kg) was intragastric twice a week. The colchicine group was given continuous intragastric administration for 20 weeks. The control group was given the corresponding solvent. Liver index, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) serum biochemical indexes were detected. Western blot and immunofluorescence were used to detect the expression levels of MST1, pYAP, YAP, pTAZ and TAZ proteins in liver tissues of mice in each group. **Results** The liver surface of mice in the control group was smooth and soft, while the liver of mice in the model group was rough and hard with granular nodules. The above lesions were significantly improved in the colchicine group. HE staining showed that the liver lobular structure of mice in the control group was normal, while the liver lobular structure of mice in the model group was disordered, with a small amount of fat droplets, extensive tissue necrosis, inflammatory cell infiltration, and fat vacuoles. The degree of liver lesions of mice after colchicine intervention was significantly reduced. The results of immunofluorescence and Western blot showed that compared with the control group, the protein expression levels of pYAP and pTAZ in liver tissue of model group mice were significantly decreased, while the protein expression levels of MST1, YAP and TAZ increased. After colchicine intervention, the protein expression levels of MST1, pYAP and pTAZ were significantly up-regulated, while the protein expression levels of YAP and TAZ were down-regulated. **Conclusion** The therapeutic effect of colchicine on mouse liver cancer may be related to its activated Hippo signaling pathway.

Key words colchicine; hippo signaling pathway; liver cancer; diethylnitrosamine; carbon tetrachloride; ethanol