

DOI:10.12174/j.issn.2096-9600.2025.11.02

# 葛根素对肝癌小鼠肝细胞氧化应激损伤的干预机制研究\*

李琳婵<sup>1</sup>, 鱼麦侠<sup>△1</sup>, 王松海<sup>2</sup>

1 陕西省中医医院, 恶性肿瘤固本培元法重点研究室, 陕西 西安 710003;

2 陕西省中医医院, 陕西 西安 710003

**[摘要]** 目的:探究葛根素对肝癌小鼠肝细胞氧化应激损伤的干预作用,以及对骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein-9, BMP-9)、血管内皮生长因子165(vascular endothelial growth factor-165, VEGF-165)表达的调控机制。方法:将36只小鼠按照随机数字法分为空白组、模型组及实验组,每组12只。小鼠适应性饲养1周后,模型组与实验组通过左侧腋窝皮下注射人肝癌HuH-7细胞悬液建立肝癌模型,空白组不造模。造模成功后,空白组与模型组每日腹腔注射生理盐水,实验组每日腹腔注射葛根素注射液。连续干预4周后,检测各组小鼠血清活性氧(reactive oxygen species, ROS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、血清丙二醛(malondialdehyde, MDA)及谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH)表达水平;苏木精-伊红染色法(hematoxylin-eosin staining, HE)观察各组小鼠肝组织病理学变化情况;通过逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)及蛋白免疫印迹法(western blot, WB)检测各组小鼠肝组织中BMP-9、VEGF-165 mRNA及蛋白表达情况。结果:与空白组比较,模型组小鼠肝组织细胞损伤严重,血清ROS、MDA水平升高, SOD、GSH水平降低(均 $P < 0.05$ );肝组织BMP-9、VEGF-165的mRNA及蛋白表达升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,实验组小鼠肝组织细胞形态明显改善,血清ROS、MDA水平降低, SOD、GSH水平回升( $P < 0.05$ ),肝细胞氧化应激损伤明显缓解;肝组织BMP-9、VEGF-165的mRNA及蛋白表达下调( $P < 0.05$ )。结论:葛根素可改善肝癌小鼠肝细胞氧化应激损伤,这可能是与葛根素调控BMP-9、VEGF-165表达有关。

**[关键词]** 肝癌;葛根素;氧化应激损伤;小鼠;实验

**[中图分类号]** R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2096-9600(2025)11-0008-04

## Study on Intervention Mechanism of Puerarin on Oxidative Stress Injury in Hepatocytes of Liver Cancer Mice

LI Linchan, YU Maixia<sup>△</sup>, WANG Songhai

1 Key Research Laboratory for Fortifying the Root and Nourishing the Essence in Malignant Tumors, Shaanxi Provincial TCM Hospital, Xi'an 710003, China; 2 Shaanxi Provincial TCM Hospital, Xi'an 710003, China

**Abstract** Objective: To explore the intervention effects of puerarin on oxidative stress injury in hepatocytes of liver cancer mice, and its mechanism of regulating the expressions of BMP-9 and VEGF-165. Methods: A total of 36 mice were allocated to blank group, model group and experiment group with 12 in each according to random number method. After one week of adaptive feeding, the mice in the model group and the experiment group were established into liver cancer models by hypodermic injection of human hepatocellular carcinoma HuH-7 cell suspension into left armpit, and the blank group was unhandled. After successfully modeling, the blank group and the model group received peritoneal injection of physiological saline each day, and puerarin injection was given to the experiment group every day. After four consecutive weeks of the intervention, to detect the expressions of ROS, SOD, MDA and GSH in the mice of different groups; HE was used to observe pathological changes of liver tissue in the mice of different groups; RT-PCR and WB were applied to measure the levels of BMP-9, VEGF-165 mRNA and protein in different groups. Results: Compared with the blank group, liver tissue cells were severely damaged in the model group, an increase in ROS and MDA, and a decrease in SOD and GSH were found (all  $P < 0.05$ ); the expressions of BMP-9, VEGF-165 mRNA and protein were elevated in liver tissue ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the changes including significant improvement of liver tissue cell morphology, the decrease in the levels of serum ROS and MDA, and the increase in the levels of SOD and GSH were seen in the experiment group ( $P < 0.05$ ), oxidative stress injury of hepatic cells was relieved obviously; the expressions of BMP-9, VEGF-165 mRNA and protein were reduced in liver tissue ( $P < 0.05$ ). Conclusion: Puerarin could improve oxidative stress injury in liver cancer mice, and it might be related to the regulation of BMP-9 and VEGF-165 expression by puerarin.

**Keywords** liver cancer; puerarin; oxidative stress injury; mice; experiment

葛根素又称葛根黄酮,是从豆科植物野葛 *Pueraria lobata*(Willd.) Ohwi 干燥根中提取的异黄酮类衍生物。研究表明,葛根素能有效抑制炎症反应、改善机体氧化应激损伤、减轻肿瘤细胞引起的组织损害,但其具体作用机制尚未完全明确<sup>[1-2]</sup>。本研究通过分析葛根素对肝癌小鼠肝细胞氧化应激损伤的干预效果,及对骨形态发生蛋白9(bone morphogenetic protein-9, BMP-9)、血管内皮生长因子165(vascular endothelial growth factor-165, VEGF-165)表达的调控作用,探究葛根素保护肝癌肝细胞氧化应激损伤的机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选取36只BALB/c-nu裸鼠,3周龄,雄性,体质量(10±2)g,购自西安交通大学医学部实验动物中心,实验动物生产许可证号:SCXK(陕)2023-002,实验动物使用许可证号:SYXK(陕):2023-004。动物饲养条件:温度(22±2)℃,相对湿度60%,自由饮水和进食。普通饲料购自西安交通大学医学部实验动物中心。本实验严格遵循《关于动物伦理与福利的作者指南共识》及《动物实验体内实验研究报告规范指南》,并经陕西省中医院实验伦理委员会批准(SZFYIEC-2023-0022)。

**1.2 试剂与仪器** 葛根素注射液(百正药业股份有限公司,批号:20100060,规格:2 mL:100 mg);人肝细胞癌细胞系-7(human hepatocellular carcinoma-7, HuH-7)(上海康朗生物科技有限公司,批号:H110);丙二醛(malondialdehyde, MDA)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(批号:P31400R)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)ELISA测定试剂盒(批号:P31718R),谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH)ELISA测定试剂盒(批号:P31642R)均由上海梵态生物科技有限公司生产;VEGF-165抗体(批号:H10093)、BMP-9抗体(批号:M99513)均购自上海博湖生物科技有限公司;聚合酶链式反应试剂盒(polymerase chain reaction, PCR)(批号:P2101)、二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白含量检测试剂盒(批号:PR017)、十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)试剂盒(批号:S964179)均购自上海邦景实业有限公司;KD-2268型病理切片仪(金华市科迪仪器);iMark™型酶联免疫检测仪(美国BIO-RAD公司);BX53型正置光学显微镜(日本Olympus公司);3253型血

糖仪(美国强生公司);GR20.22型低温高速离心机(法国Jouan公司)。

**1.3 实验动物分组及方法** 实验动物适应性饲养1周后,按照随机数字法分为空白组、模型组及实验组,每组12只。空白组小鼠未进行肿瘤造模,全程普通饲料喂养,其余两组小鼠用1 mL无菌注射器吸取100 μL HuH-7细胞在小鼠左侧腋窝处注射,进行肝肿瘤造模,1周后见肿瘤体积增长视为造模成功。造模成功后进行干预,空白组和模型组小鼠予生理盐水[1.3 mL/(kg·d)]腹腔注射,实验组小鼠予葛根素注射液[1.3 mL/(kg·d)]腹腔注射,连续干预4周。干预期间每日观察小鼠精神状态、饮食饮水情况,每周测量体质量及肿瘤体积。

## 1.4 检测指标与方法

**1.4.1 肝组织细胞形态学变化** 干预结束后,小鼠禁食12 h,经颈椎脱臼法处死,迅速取部分肝组织,固定于4%多聚甲醛24 h以上;通过梯度乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后,用组织切片机将其切为厚度4 mm的石蜡切片。石蜡切片烘烤、二甲苯脱蜡、梯度乙醇脱蜡、PBS缓冲液冲洗后,按照试剂盒说明书进行染色,再通过梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片后显微镜下(×200)观察组织病理学形态(如细胞核固缩、细胞质空泡化、炎症细胞浸润等),并拍照记录。

**1.4.2 肝组织 BMP-9 和 VEGF-165 蛋白表达情况** 取部分肝组织并加入RIPA裂解缓冲液,提取分离肝组织中的总蛋白,BCA蛋白测定试剂盒测定小鼠肝组织中蛋白的含量。SDS-PAGE对蛋白质进行等量分离后移至PDVF膜,并置于4℃下添加一抗与β-actin孵育过夜。洗涤后添加二抗,常温下孵育2 h后使用ECL试剂进行显影,分析BMP-9和VEGF-165蛋白相对表达水平。

**1.4.3 肝组织 BMP-9 和 VEGF-165 mRNA 表达情况** 采用逆转录试剂盒反转录获取cDNA后设计引物序列,提取各组小鼠肝组织中总RNA量,RT-PCR法检测各组小鼠肝组织中BMP-9和VEGF-165 mRNA表达情况,采用2<sup>-ΔΔCt</sup>方法分析数据。引物序列见表1。

表1 扩增引物序列

引物	长度(bp)	序列(5'-3')
BMP-9	141	上游:GATATTGACGACCCATGC
		下游:CGGTTAACCTAACGTCC
VEGF-165	176	上游:AGTGTAAGAAAGCCTATCGT
		下游:GGGTGAAAATGTTAGAGGTC
β-actin	233	上游:GTAAGCCCTCACTATCCACTA
		下游:TAGAAGCCTGAGCAATGTTCC

1.4.4 氧化应激指标检测 干预结束后,取各组小鼠静脉血置于离心机中,以离心半径 15 cm, 3000 r/min 离心 15 min,离心后取上清液,ELISA 法检测各组小鼠血清中氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、ROS、MDA、GSH 水平。

1.5 统计学方法 采用 SPSS 24.0 统计软件分析数据,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,单因素方差分析用于多组间比较,两组间比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 肝组织形态学变化情况 空白组小鼠肝细胞排列结构完整,细胞间隙均匀分布无空泡;模型组小鼠肝细胞排列紊乱,结构形态不完整,细胞间出现明显空泡;实验组小鼠肝细胞形态逐步恢复,排列趋向整齐,细胞间隙空泡减少,说明肝组织在逐步恢复正常。见图 1。

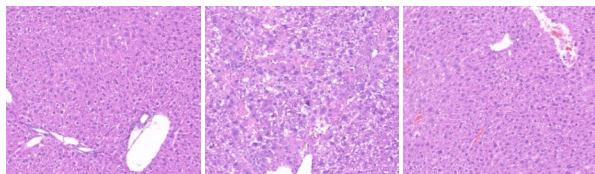


图 1 各组小鼠肝细胞组织形态学比较(HE, × 200)

2.2 肝组织中 BMP-9 和 VEGF-165 蛋白表达情况 与空白组比较,模型组小鼠肝组织中 BMP-9 和 VEGF-165 蛋白相对表达量升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,实验组小鼠肝组织中 BMP-9 和 VEGF-165 蛋白相对表达量降低( $P < 0.05$ )。见图 2、表 2。

2.3 肝组织中 BMP-9 和 VEGF-165 mRNA 表达情况 与空白组比较,模型组小鼠肝组织中 BMP-9 和 VEGF-165 mRNA 表达升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,实验组小鼠肝组织中 BMP-9 和 VEGF mRNA 表

达降低( $P < 0.05$ )。见表 3。

2.4 氧化应激相关指标 与空白组比较,模型组小鼠血清 SOD、GSH 水平降低( $P < 0.05$ ),ROS、MDA 水平升高( $P < 0.05$ );与模型组比较,实验组小鼠血清 SOD、GSH 水平升高( $P < 0.05$ ),ROS、MDA 水平降低( $P < 0.05$ )。见表 4。

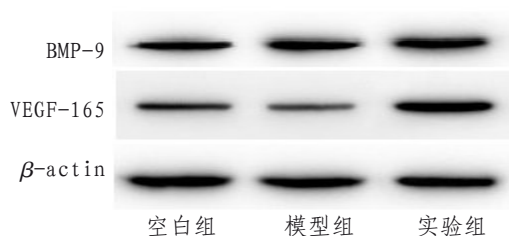


图 2 各组小鼠肝组织中 BMP-9 和 VEGF-165 蛋白表达条带

表 2 各组小鼠肝组织中 BMP-9 和 VEGF-165 蛋白表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数	BMP-9	VEGF-165
空白组	12	0.62 ± 0.049	0.55 ± 0.016
模型组	12	1.131 ± 0.038*	1.01 ± 0.026*
实验组	12	0.97 ± 0.038 <sup>△</sup>	0.745 ± 0.058 <sup>△</sup>
<i>F</i>		115.1	107.3
<i>P</i>		0.000	0.000

注:\*表示与空白组比较, $P < 0.05$ ;△表示与模型组比较, $P < 0.05$

表 3 各组小鼠肝组织中 BMP-9 和 VEGF-165 mRNA 表达量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	BMP-9	VEGF-165
空白组	12	10.53 ± 0.02	8.23 ± 0.04
模型组	12	25.77 ± 0.17*	27.18 ± 0.13*
实验组	12	12.02 ± 0.05 <sup>△</sup>	11.34 ± 0.21 <sup>△</sup>
<i>F</i>		8.174	11.221
<i>P</i>		0.000	0.000

注:\*表示与空白组比较, $P < 0.05$ ;△表示与模型组比较, $P < 0.05$

表 4 各组小鼠氧化应激相关指标含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	SOD/(ng/mL)	ROS/(ng/mL)	MDA/(μmol/L)	GSH/(mg/L)
空白组	12	35.04 ± 0.11	68.72 ± 1.01	30.77 ± 0.85	170.36 ± 1.05
模型组	12	14.08 ± 0.07*	178.74 ± 0.99*	123.56 ± 0.76*	65.78 ± 0.08*
实验组	12	23.16 ± 0.02 <sup>△</sup>	97.69 ± 1.33 <sup>△</sup>	59.18 ± 0.87 <sup>△</sup>	112.05 ± 1.44 <sup>△</sup>
<i>F</i>		11.743	10.952	18.116	15.307
<i>P</i>		0.000	0.000	0.000	0.000

注:\*表示与空白组比较, $P < 0.05$ ;△表示与模型组比较, $P < 0.05$

## 3 讨论

2020 版《中国临床肿瘤学会原发性肝癌诊疗指南》指出,原发性肝癌在我国恶性肿瘤中的发病率居第四位,死亡率居第二位<sup>[3]</sup>。中医药防治肿瘤具有多靶点、多通路特点<sup>[4]</sup>。葛根素对于生物体免疫抑制反应具有特殊作用,而且能够调整机体微循环障碍,降低氧化应激过度导致的肝组织

细胞损伤<sup>[5-6]</sup>。

流行病学调查显示,随着社会发展,人类患恶性肿瘤的风险显著升高<sup>[7-8]</sup>,且晚期肝癌治疗效果不佳<sup>[9]</sup>。氧化应激引发的细胞损伤及抗氧化平衡紊乱导致的组织炎症,是造成肝组织细胞功能失调的核心原因<sup>[10-11]</sup>。抗氧化酶系统是机体抵御氧化损伤的重要屏障,抗氧化治疗能够有效保护肝

组织。机体氧化应激反应时,组织内产生ROS等大量自由基,导致组织脂质过氧化及蛋白质氧化。ROS是体内氧化应激反应的重要产物,生理条件下,适量的ROS可促进细胞免疫和修复<sup>[12]</sup>。肝细胞损伤后,脂质过氧化产物MDA的含量显著升高,其水平是评价肝细胞氧化损伤严重程度的关键生物标志物。MDA含量变化是氧自由基脂质过氧化反应的基本表现<sup>[13]</sup>;SOD可清除过度分泌的氧自由基,保护细胞免受氧化应激损伤<sup>[14]</sup>。GSH能够依靠催化过氧化氢的还原反应保护组织黏膜的结构完整<sup>[15-16]</sup>。本研究结果显示,与空白组比较,模型组小鼠肝组织细胞损伤严重,血清中ROS、MDA、SOD、GSH含量发生明显变化,这表明肝癌小鼠组织中发生明显的氧化应激损伤。

BMP-9是TGF- $\beta$ 家族重要的组成蛋白,主要由肝脏星状细胞产生,对肿瘤细胞的生长有促进作用<sup>[17]</sup>;VEGF-165是一种二硫键连接的同源二聚体,作为血小板衍生的半胱氨酸结合生长因子家族,VEGF-165在诱导新生血管生存及肿瘤转移中发挥重要作用<sup>[18-19]</sup>。本研究结果显示,模型组小鼠肝组织中BMP-9和VEGF-165 mRNA及蛋白表达变化明显,表明BMP-9和VEGF-165在肿瘤模型中发生异常表达。经葛根素干预后,与模型组比较,实验组小鼠氧化应激反应明显降低,肝组织细胞形态好转,且肝组织中BMP-9和VEGF mRNA及蛋白表达明显改善。

今后,本课题组将深入探究葛根素对肝癌的干预机制,从分子及基因角度为葛根素治疗肝癌提供实验证据。

#### 参考文献

- [1] LI X, SUN S, CHEN D, et al. Puerarin attenuates the endothelial-mesenchymal transition induced by oxidative stress in human coronary artery endothelial cells through PI3K/AKT pathway[J]. *Eur J Pharmacol*, 2020, 886: 173472.
- [2] GUAN L, LI C, ZHANG Y, et al. Puerarin ameliorates retinal ganglion cell damage induced by retinal ischemia/reperfusion through inhibiting the activation of TLR4/NLRP3 inflammasome [J]. *Life Sci*, 2020, 25(6): 117-135.
- [3] HUANG P, DU S X. Puerarin enhances the anti-tumor effect of Cisplatin on drug-resistant A549 cancer *in vivo* and *in vitro* through activation of the Wnt signaling pathway[J]. *Cancer Manag Res*, 2020, 12: 6279-6289.
- [4] 李晓玲, 吴玉泓, 梁永林, 等. 中药靶向调控 IL-6/JAK/STAT3 通路的抗消化系统肿瘤研究进展[J]. *西部中医药*, 2024, 37(6): 98-102.
- [5] 曹盼, 张樱山, 魏学明, 等. 葛根素药理作用研究新进展[J]. *中成药*, 2021, 43(8): 2130-2134.
- [6] 曹焕泽, 任玲, 刘恭雪, 等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨葛根素治疗早发性卵巢功能不全的作用机制[J]. *西部中医药*, 2024, 37(10): 64-70.
- [7] CHO N H, SHAW J E, KARURANGA S, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2018, 13(8): 271-281.
- [8] ONITILLO A A, ENGEL J M, GLURICH I, et al. Diabetes and cancer I: risk, survival, and implications for screening [J]. *Cancer Causes Control*, 2012, 23(6): 967-981.
- [9] 刘光德, 张灿明, 王斌哲. 肝脏恶性肿瘤的局部微创介入治疗进展[J]. *西部中医药*, 2023, 36(10): 172-177.
- [10] 侯瑞英, 吴冬梅, 焦伟杰, 等. 毛蕊异黄酮改善2型糖尿病模型大鼠的糖脂代谢紊乱和代谢相关脂肪性肝病症状[J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(11): 1965-1971.
- [11] DOGRA A, GUPTA D, BAG S, et al. Glabridin ameliorates methotrexate-induced liver injury via attenuation of oxidative stress, inflammation, and apoptosis [J]. *Life Sci*, 2021, 278: 119583.
- [12] 王丽惠, 张佳祥, 刘双平, 等. 原儿茶酸对刀豆蛋白A所致的免疫性肝损伤小鼠肝组织MDA、NO、SOD和GSH-PX表达的影响[J]. *实用肝脏病杂志*, 2021, 24(3): 323-326.
- [13] BAI L L, ZHANG L Q, MA J, et al. DIP2A is involved in SOD-mediated antioxidative reactions in murine brain [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 16(8): 6-15.
- [14] WU Y, HUANG D, WANG X, et al. Suppression of NLRP3 inflammasome by Platycodin D via the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway contributes to attenuation of lipopolysaccharide induced acute lung injury in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 9(6): 107-121.
- [15] 夏佩, 何昊, 马瑞, 等. 参芪消痞汤对慢性萎缩性胃炎癌前期病变胃黏膜修复作用和血管生成机制及血清p53、MDA、GSH-Px的相关影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2021, 29(1): 19-23.
- [16] 马翠, 王华. BMP9与肝脏疾病的研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(8): 1045-1048.
- [17] 叶晓娟, 吴喆, 孙燕玲. PELP1在二乙基亚硝胺诱导糖尿病小鼠肝癌形成中的表达及意义[J]. *湖北科技学院学报(医学版)*, 2021, 7(3): 200-203.
- [18] 赵燕颖, 李亚刚, 颜波群, 等. VEGF165b在肝细胞癌中的表达及其作用机制[J]. *世界华人消化杂志*, 2016, 24(3): 355-361.
- [19] ALI E M T, ABDALLAH H I, EL-SAYED S M. Histomorphological, VEGF and TGF- $\beta$  immunoexpression changes in the diabetic rats' ovary and the potential amelioration following treatment with metformin and insulin [J]. *J Mol Histol*, 2020, 51(3): 287-305.

收稿日期: 2025-01-18

\*基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2020SF-348); 陕西省中医药管理局中医药科研课题(2019-LC014)。

作者简介: 李琳婵(1989—), 女, 硕士学位, 主治医师。研究方向: 恶性肿瘤的防治。

△通讯作者: 鱼麦侠(1979—), 女, 硕士学位, 副主任医师。研究方向: 消化系统肿瘤的防治。Email: 2114822237@qq.com。