

JS-K 对 HBV 阳性肝癌鸡胚移植瘤生长影响的实验研究

廖晏茵^{1,2}, 刘正芸¹, 文娟^{1,2}, 陈国丽^{1,2}, 于万^{1,2}, 王欢^{1,2}

(遵义医科大学, 1. 贵州省普通高等学校传染病与生物安全特色重点实验室; 2. 基础医学院, 贵州 遵义 563000)

【摘要】目的: 在乙型肝炎病毒 (HBV) 阳性肝癌鸡胚移植模型中, 探讨一氧化氮供体 JS-K 对肿瘤细胞生长的影响。**方法:** 将 HBV 阳性肝癌细胞 HepG2. 2. 15 接种于 9 日龄受精鸡胚中, 按照处理方式不同分为 5 组: 阴性对照组, JS-K 低、中、高剂量组 (1、5、10 $\mu\text{g}/\text{个}$), 索拉非尼 (Sora) 组 (400 $\mu\text{g}/\text{个}$), 每组各 3 只。2 d 后按分组给药, 给药采用直接滴加于移植瘤上的方式, 1 次/d, 连续 8 d。实验结束后取出鸡胚移植瘤, 观察各组移植瘤大小, 拍照并称重, 采用 HE 染色法观察各组 JS-K 对肿瘤细胞的影响; 采用免疫印迹法检测肿瘤组织中迁移相关蛋白 Vimentin 及 N-Cadherin 的表达情况。**结果:** 与对照组相比, 不同剂量 JS-K 作用后, 鸡胚移植瘤体积均明显减小, 其中 JS-K 高剂量组肿瘤体积最小 ($P < 0.05$); HE 染色可见 JS-K 作用后瘤细胞数量明显减少; JS-K 低剂量组鸡胚移植瘤波形蛋白 Vimentin 表达水平高于其他组, N-cadherin 表达水平低于其他组 ($P < 0.05$)。**结论:** JS-K 对 HBV 阳性肝癌鸡胚移植瘤具有抑瘤作用, 该效应可能与抑制鸡胚移植瘤细胞迁移有关。

【关键词】 乙型肝炎病毒; 肝癌; JS-K; 鸡胚; 肿瘤迁移

【中图分类号】 R373.2 **【文献标志码】** A

Experimental study on the impact of JS-K on the growth of HBV-positive HCC in transplanted chicken embryo tumors

LIAO Yan-lin^{1,2}, LIU Zheng-yun¹, WEN Juan^{1,2}, CHEN Guo-li^{1,2}, YU Wan^{1,2}, WANG Huan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Infectious Disease & Biosafety, Provincial Department of Education; 2. School of Basic Medicine, Zunyi Medical University, Zunyi 563000, Guizhou, China)

【Abstract】Objective: To explore the impact of the nitric oxide donor JS-K on tumor cell growth within a hepatitis B virus (HBV)-positive liver cancer model using chicken embryo transplantation. **Methods:** HepG2. 2. 15 cells, an HBV-positive liver cancer cell line, were inoculated into fertilized chicken embryos at 9 days of age. 2 days post-inoculation, treatments were initiated, dividing the experiment into five groups: control group, JS-K 1 μg group, JS-K 5 μg group, JS-K 10 μg group, and sorafenib group (400 $\mu\text{g}/\text{piece}$) according to different processing methods, 3 subjects in each group. Treatments were administered directly onto the tumors daily for 8 consecutive days, once a day. Post-treatment, tumors were excised for analysis. The size of each tumor was measured, photographed, and weighed, and the tumor inhibition rate was calculated. The effect of JS-K on tumor cells was evaluated using hematoxylin and eosin (HE) staining, and the expression of the cell migration-related protein Vimentin and N-Cadherin in tumor tissue were analyzed by Western blotting. **Results:** Compared with the control group, tumor volumes in the chicken embryos were reduced following treatment with varying doses of JS-K, with the 10 μg group showing the smallest tumor size. HE staining indicated a significant reduction in tumor cell counts post JS-K treatment, the expression level of Vimentin in the 1 μg JS-K group of chicken embryo transplant tumors was higher than that of the other groups, while the expression of N-cadherin was lower than that of the other groups. **Conclusion:** JS-K demonstrates a tumor-suppressive effect in HBV-positive liver cancer in a chicken embryo transplant model, which may be related to inhibiting the migration of tumor cells.

【Key words】 Hepatitis B virus; Hepatocellular carcinoma; JS-K; Chicken embryo; Migration

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B virus, HBV) 感染是严重的全球公共卫生问题, 治疗不及时可能发展为肝细胞性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)^[1-2]。

我国 84% 的肝癌由 HBV 感染所致^[3]。HBV 阳性肝癌目前在临床上主要采用手术切除为主, 辅以药物的综合治疗措施, 但现有化疗药物药效有限且部分

患者对化疗药物不敏感^[4],治愈率仍然很低^[5],因此,寻找新的抗 HBV 阳性肝癌的药物具有重要现实意义。JS-K 是一种分子量为 384 的化合物,能有效抑制多种癌细胞生长^[6-7],口服给药对正常小鼠无明显毒性作用^[8]。本课题组前期在体外实验中发现:JS-K 能抑制 HBV 阳性的肝癌细胞 HepG2.2.15 的生长且该效应与诱导 DNA 损伤和凋亡有关^[9]。但 JS-K 在体内实验中对 HBV 阳性肝癌是否具有抑瘤效应尚不明确,基于此,本研究采用 HBV 阳性肝癌细胞 HepG2.2.15 建立鸡胚尿囊膜移植瘤模型,以观察 JS-K 在体内实验中的抗肿瘤作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

受精鸡胚购自济南赛斯家禽科技有限公司。HBV 阳性肝癌细胞 HepG2.2.15 来自于贵州省普通高等学校传染病与生物安全特色重点实验室。DMEM 高糖培养基及特级胎牛血清购于北京利维宁公司,JS-K 购于 Santa Cruz 公司;N-cadherin 抗体和 β -actin 抗体分别购自 CST 及北京博奥森公司。

1.2 方 法

1.2.1 HepG2.2.15 细胞的培养 使用含有 10% 胎牛血清,100 U/mL 青链霉素和 400 μ g/mL G418 的 DMEM 高糖培养基在 37 $^{\circ}$ C,5% CO_2 孵箱中培养。

1.2.2 HBV 阳性肝癌鸡胚移植瘤模型的建立及鉴定 按照常规方式进行鸡胚孵育^[10-11],每组各 3 只,9 d 后于照蛋灯下用记号笔勾勒出气室位置,将消毒好的鸡胚置于生物安全柜中在鸡胚气室端开口,大小约 1 cm \times 1 cm,使用无菌镊剥去周围蛋壳和壳膜,用注射针头在气室膜中央挑一小口,滴数滴无菌生理盐水,使白色气室膜变为透明色,用小镊子撕开上层的气室膜,充分暴露下层透明的鸡胚尿囊膜。开窗后,将处于对数生长期的 HepG2.2.15 细胞按照 3×10^6 个/30 μ L 的浓度接种于鸡胚尿囊膜上相对无血管区,接种完成后用提前准备好的无菌封口膜封闭窗口,将鸡胚转移至培养箱中继续孵育。鸡胚建模后分别于第 3、7、11 天揭开透明胶带,完整剥离移植瘤,10% 中性福尔马林固定,石蜡包埋,切片,HE 染色后显微镜下观察肿瘤生长情况。见图 1。

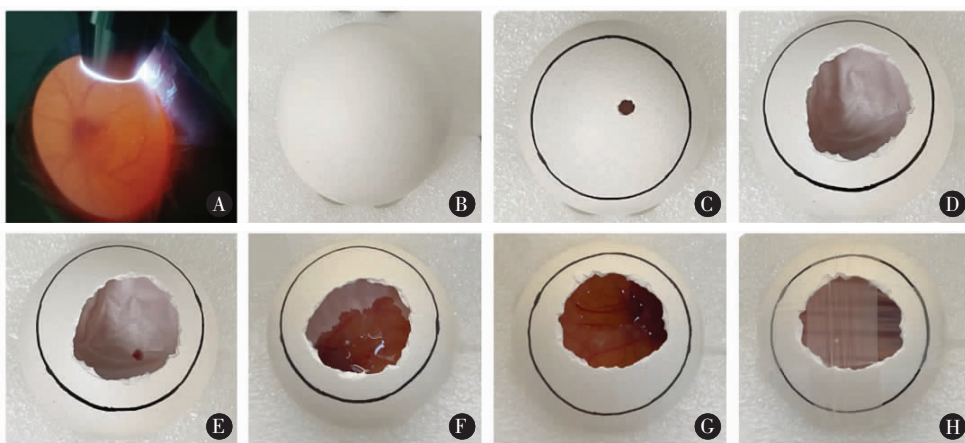


图 1 鸡胚移植瘤模型建立过程

A-D. 暴露鸡胚壳膜;E-G. 暴露鸡胚尿囊膜;H. 接种细胞后用无菌封口膜重新封闭窗口。

1.2.3 JS-K 对鸡胚移植瘤体积与质量的影响 按上述方法建立 HBV 阳性肝癌的鸡胚移植瘤模型,按照处理方式不同分为 5 组:阴性对照组;JS-K 低、中、高剂量组(1、5、10 μ g/个);索拉非尼(Sora)组(400 μ g/个),于接种细胞后 2 d 开始给药,给药采用药物直接滴加在移植瘤上的方式,1 次/d,连续 8 d。给药结束后,完整剥离瘤体,拍照,称重。

1.2.4 JS-K 对鸡胚移植瘤组织细胞生长的影响 采用 HE 染色法观察肿瘤细胞形态,取各组部分瘤体浸泡于 10% 中性福尔马林固定后,经梯度酒精逐级脱水,二甲苯透明两次,30 min/次,石蜡包埋后切片,厚度约 4 μ m。而后行常规 HE 染色,最后中性

树脂封片,镜下观察并拍照。

1.2.5 JS-K 对瘤组织中迁移相关蛋白波形蛋白(Vimentin)及 N 钙粘蛋白(N-cadherin)表达的影响

取各组瘤体组织,采用 RIPA 裂解液提取组织总蛋白,定量后行常规 Western blot 检测 Vimentin 及 N-cadherin 蛋白的表达情况。采用 Image J 软件获取灰度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 29.0 软件对数据进行统计学分析。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,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HBV 阳性肝癌鸡胚移植瘤模型的鉴定

于第 3、7、11 d 移植瘤模型 HE 染色,可见肿瘤细胞较大,核大深染,随着生长天数的增加,细胞数量明显增多。见图 2。

2.2 JS-K 对鸡胚移植瘤体积与质量的影响

与阴性对照组相比,各浓度 JS-K 组的瘤体均减小。与阴性对照组相比,各浓度 JS-K 组的瘤体质量均降低 ($P < 0.05$),Sora 组抑制肿瘤生长效果不明显 ($P > 0.05$)。见图 3。

2.3 JS-K 对鸡胚移植瘤组织细胞生长的影响

与阴性对照组相比,各浓度 JS-K 组鸡胚移植瘤细胞数量减少,形态较模糊,排列较疏松,细胞核体积减小,核质比例减小。见图 4。

2.4 JS-K 对瘤组织中迁移相关蛋白表达的影响

JS-K 低剂量组鸡胚移植瘤波形蛋白 Vimentin 表达量最高 ($P < 0.05$),JS-K 中、高剂量组 Vimentin 表达降低。JS-K 低剂量组钙粘附蛋白 N-cadherin 表达最低 ($P < 0.05$),JS-K 中、高剂量组 N-cadherin 表达水平升高。见图 5。

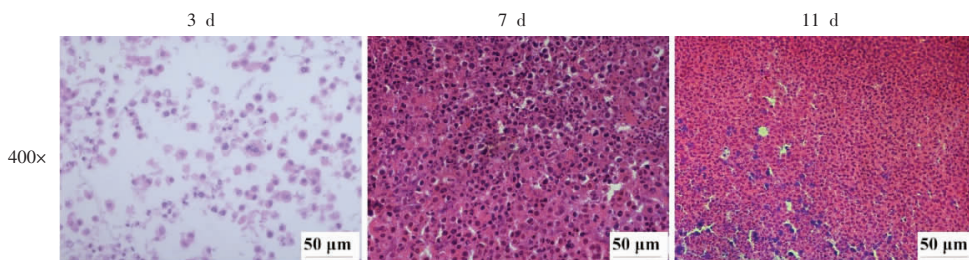


图 2 鸡胚移植瘤瘤体组织 HE 染色 (400×)

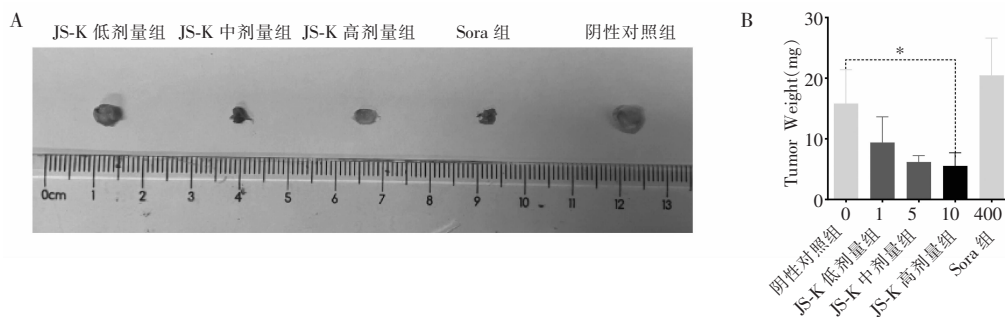


图 3 JS-K 对 HBV 阳性肝癌鸡胚移植瘤大小的影响

A. 各组移植瘤大体观;B. 各组移植瘤质量比较。* $P < 0.05$,与阴性对照组比较。

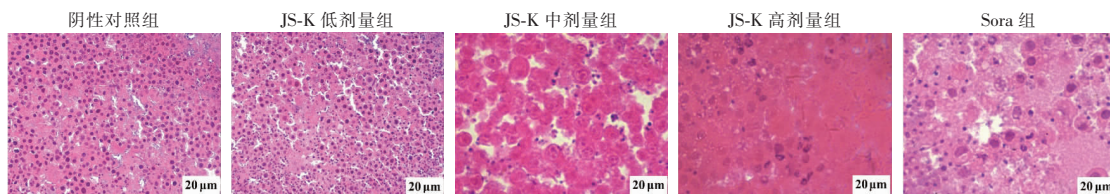


图 4 JS-K 作用后移植瘤 HE 染色图像 (200×)

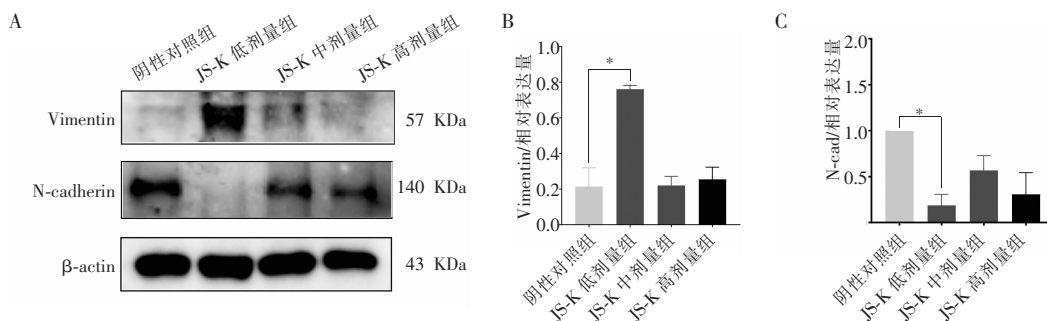


图 5 JS-K 对鸡胚移植瘤组织中 Vimentin 及 N-cadherin 蛋白表达的影响

A. Western blot 检测 Vimentin 及 N-cadherin 蛋白表达条带图;B-C. Vimentin 及 N-cadherin 蛋白相对表达量柱状图。* $P < 0.05$,与阴性对照组比较。

3 讨论

鸡胚尿囊膜肿瘤模型由于其制备简单、经济,已被众多学者用于多种肿瘤研究,其是一种较为理想的抗肿瘤药物筛选模型,能初步用于药物疗效的临床前评价^[12]。本研究中,HepG2. 2. 15 细胞能在鸡胚尿囊膜中正常生长,随着种植天数的延长,瘤体内细胞数量明显增加,证明 HBV 阳性肝癌鸡胚移植瘤能够成功建立。通过瘤体表面滴加 JS-K 药物发现,与模型组相比,JS-K 各剂量组的瘤体体积都有减小,肿瘤组织 HE 染色结果显示瘤细胞数量减少,排列较疏松,也表示 JS-K 抑制了瘤细胞的生长。

肿瘤的转移是其恶性表型的重要特征之一,临床上也有较多的肝癌患者由于肿瘤的转移而影响了最终的预后。上皮-间充质转化是将上皮来源的恶性细胞转化为具有间充质表型且具有迁移和侵袭能力细胞的重要生物学过程,在肿瘤转移中具有重要作用,其特点是上皮样特征的丧失和间充质样特征的获得^[13-16]。N-cadherin 是检测间充质细胞的标记物。N-cadherin 表达水平越高,细胞迁移能力也越高^[17]。本研究结果显示 JS-K 作用后,与阴性对照组比较,瘤组织中 N-cadherin 蛋白表达水平降低;Vimentin 蛋白表达水平升高,提示 JS-K 抑制 HBV 阳性肝癌鸡胚移植瘤的生长与抑制细胞迁移有关。

HCC 是一种典型的高血管实体肿瘤,其异常的血管网络和血管生成有助于其生长、进展、侵袭和转移^[18]。鸡胚尿囊膜模型中具有丰富的血管网络,它不仅可用于建立肿瘤生长的模型,还可用于评估血管生成^[19-20]。因此,下一步可在此模型上深入探究 JS-K 抑制 HBV 阳性肝癌细胞的迁移与血管生成之间的相关性,为探究 JS-K 体内抗 HBV 阳性肝癌机制积累更多的证据。

综上,JS-K 对 HBV 阳性肝癌鸡胚移植瘤具有抑瘤作用,该效应可能与抑制鸡胚移植瘤细胞迁移有关。

参考文献

[1] 王焘,王文涛. 肝细胞癌免疫治疗的现状及发展[J]. 四川大学学报(医学版),2023,54(3):692-698.

[2] Llovet JM, Castet F, Heikenwalder M, et al. Immunotherapies for hepatocellular carcinoma[J]. Nature Reviews Clinical Oncology, 2022,19(3):151-172.

[3] 黄罡,谢青,贺佳,等. 乙型肝炎病毒相关肝细胞癌抗病毒治疗中国专家共识(2023年版)[J]. 肝脏,2023,28(1):1-10.

[4] 王健,张炼. 肝癌的聚焦超声消融治疗[J]. 川北医学院学报,2023,38(11):1451-1454,1474.

[5] 王迪迪,黄玉荣,王建君,等. MiR-148b-3p 通过调节脂代谢基因对肝癌细胞恶性生物学行为的影响[J]. 贵州医科大学学报,2023,48(10):1129-1136,1144.

[6] 刘正芸,勾英,刘杰,等. JS-K 的抗肿瘤作用研究进展[J]. 现代肿瘤医学,2017,25(14):2326-2330.

[7] Liu B, Huang X, Li Y, et al. JS-K, a nitric oxide donor, induces autophagy as a complementary mechanism inhibiting ovarian cancer[J]. BMC Cancer, 2019,19(1):645.

[8] 刘正芸,杨智文,徐尚福,等. 一氧化氮前体药 JS-K 安全性的初步观察[J]. 遵义医学院学报,2016,39(5):464-469.

[9] Liu Z, Li G, Gou Y, et al. JS-K, a nitric oxide prodrug, induces DNA damage and apoptosis in HBV-positive hepatocellular carcinoma HepG2. 2. 15 cell[J]. Biomedicine & Pharmacotherapie, 2017,92:989-997.

[10] 马继伟,张勇,张逸铭,等. 改良鸡胚尿囊膜肿瘤实验动物模型及其生物学行为观察[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(8):30-33.

[11] 梁雨琴,贾云锋. 具有时滞的肿瘤免疫模型的稳定性与 Hopf 分支[J]. 中山大学学报(自然科学版),2020,59(2):28-33.

[12] 吕金玉,周娇娇,左玲怡,等. 鸡胚种植肿瘤模型构建及其抗肿瘤药物药效评价[J]. 江苏海洋大学学报(自然科学版),2023,32(3):49-55.

[13] 刘军,冉灿,曾定胜,等. 透明质酸合成酶 2 通过调控 TGF- β /SMAD4 信号通路对肾细胞癌发生发展的影响[J]. 遵义医科大学学报,2023,46(4):396-402.

[14] Mendonsa AM, Na TY, Gumbiner BM. E-cadherin in contact inhibition and cancer[J]. Oncogene,2018,37(35):4769-4780.

[15] Li Y, Zhang T, Qin S, et al. Effects of UPF1 expression on EMT process by targeting E-cadherin, N-cadherin, Vimentin and Twist in a hepatocellular carcinoma cell line[J]. Molecular Medicine Reports, 2019,19(3):2137-2143.

[16] 冯传平,刘艳,李福元,等. 狭基线纹香茶菜水溶性总黄酮对人肝癌裸鼠移植瘤抑制作用及机制研究[J]. 中药药理与临床,2020,36(3):136-144.

[17] Tiwari A, Ashary N, Singh N, et al. Modulation of E-Cadherin and N-Cadherin by ovarian steroids and embryonic stimuli[J]. Tissue & Cell, 2021,73:101670.

[18] Yao C, Wu S, Kong J, et al. Angiogenesis in hepatocellular carcinoma: mechanisms and anti-angiogenic therapies[J]. Cancer Biology & Medicine, 2023,20(1):25-43.

[19] Chu PY, Koh AP, Antony J, et al. Applications of the chick chorio-allantoic membrane as an alternative model for cancer studies[J]. Cells, Tissues, Organs, 2022,211(2):222-237.

[20] Pollicino T, Caminiti G. HBV-integration studies in the clinic: role in the natural history of infection[J]. Viruses, 2021,13(3):368.

(收稿日期:2024-03-21)

修回日期:2024-05-16)