



# 间歇性禁食在裸鼠体内对肝癌进展的影响

冯 翠<sup>a</sup>, 赵瑞波<sup>b</sup>, 贾晓渊<sup>a</sup>, 孔祥东<sup>b</sup>, 陈 侃<sup>a</sup>

(浙江理工大学, a. 生命科学与医药学院; b. 材料与纺织学院, 杭州 310018)

**摘 要:** 为探究间歇性禁食对肝癌进展的影响, 以皮下注射肝癌细胞 Huh7 的 BALB/c 裸鼠为研究对象, 构建肿瘤模型, 比较间歇性禁食对肝癌形成及生长、肝脏生理功能及血脂血糖的影响。结果显示: 皮下注射 Huh7 细胞引起的肝癌病变, 与对照组相比较, 间歇性禁食组小鼠的成瘤率低, 且在相同时间段内, 间歇性禁食组小鼠形成的肿瘤体积较小; 血清学检测结果表明, 间歇性禁食组小鼠的肝损伤程度较低。间歇性禁食对肝癌形成具有一定程度的抑制作用, 有望成为抑制或减缓肿瘤恶化的有效方法。

**关键词:** 间歇性禁食; 肝癌; 肿瘤形成; Huh7 细胞

中图分类号: R734

文献标志码: A

文章编号: 1673-3851(2019)11-0812-06

## Effect of intermittent fasting on hepatocarcinoma progress in nude mice

FENG Cui<sup>a</sup>, ZHAO Ruibo<sup>b</sup>, JIA Xiaoyuan<sup>a</sup>, KONG Xiangdong<sup>b</sup>, CHEN Kan<sup>a</sup>

(a. College of Life Sciences and Medicine, b. College of Materials and Textiles,  
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** To explore the effect of intermittent fasting on the progress of hepatocarcinoma, BALB/c nude mice were injected subcutaneously with Huh7 cells to establish the tumor model. Subsequently, the effects of intermittent fasting on hepatocarcinoma formation and growth, physiological function of liver, blood fat and blood glucose were analyzed. The results showed pathological changes of hepatocarcinoma caused by subcutaneous injection of Huh7. Compared with the control group, tumor formation rate of intermittent fasting mice was low, and in the same time period, tumor size of intermittent fasting mice was small. In addition, the data from serological experiments showed the liver function of intermittent fasting mice had less injury. This study suggested that intermittent fasting could inhibit the formation of hepatocarcinoma, which is expected to be an effective way to inhibit or relieve tumor deterioration.

**Key words:** intermittent fasting; hepatocarcinoma; tumor formation; Huh7 cells

## 0 引 言

肝癌为全世界第五大常见癌症,也是第三常见的癌症死亡原因<sup>[1]</sup>。原发性肝癌(Primary liver cancer, PLC)包括肝细胞肝癌(Hepatocellular carcinoma, HCC)、胆管细胞肝癌(Cholangiocarcinoma, CC)及二

者混合型,其中,肝细胞癌是最常见的肝脏恶性肿瘤,占原发性肝癌的 95%<sup>[2]</sup>。中国每年死于肝癌的患者约 11 万人,占全世界肝癌死亡人数的 45%。目前的常用治疗方法为手术、放疗、化疗和免疫治疗<sup>[3]</sup>,其中化疗是针对恶性肿瘤的主要手段,但化疗伴随的细胞毒性会损伤正常细胞,在治疗 HCC 对机体有副

收稿日期:2019-04-02 网络出版日期:2019-09-02

基金项目:浙江省自然科学基金项目(LQ19E020010,LY18H160066,18042291-Y)

作者简介:冯 翠(1991-),女,河南驻马店人,硕士研究生,主要从事生物医学工程方面的研究。

通信作者:陈 侃, E-mail:chenkan@zstu.edu.cn

作用<sup>[4]</sup>。

禁食直接影响机体代谢,一定时间的禁食能引发与慢性疾病相关的代谢生物标志物浓度发生明显的变化,如胰岛素、葡萄糖等,因而禁食有望改善与这些疾病相关的标志物水平<sup>[5]</sup>。近年来禁食作为非药物策略来改善健康和延长寿命,禁食与化疗相结合能够提高对恶性肿瘤的治疗效果<sup>[6]</sup>,在胶质瘤<sup>[7]</sup>、胰腺癌<sup>[8]</sup>、前列腺癌<sup>[9]</sup>和乳腺癌<sup>[10]</sup>等治疗中已得到证实。禁食分为热量限制(Caloric restriction, CR),饮食限制(Dietary restriction, DR)和间歇性禁食(Intermittent fasting, IF)<sup>[11]</sup>。在临床前研究中,常用的方法为间歇性禁食。Antunes等<sup>[12]</sup>研究表明,间歇性禁食可以调节自噬,提高抗癌治疗的疗效,同时保护正常细胞。相对于正常细胞,癌细胞具有更多的胰岛素跨膜受体位点,以辅助癌细胞摄取大量的葡萄糖,因而葡萄糖成为肿瘤代谢调节治疗的重要靶点<sup>[13]</sup>。癌细胞对于机体能量的敏感程度要大于正常细胞,在禁食期间体内缺乏葡萄糖时,正常细胞可以灵活地使用脂肪和蛋白质<sup>[14]</sup>,通过糖异生而产生乙酰乙酸酯、 $\beta$ -羟基丁酸酯和丙酮等,递送至外周组织以产生能量,癌细胞却因不能摄取除葡萄糖以外的能量而死亡<sup>[15]</sup>。Rocha等<sup>[16]</sup>发现,间歇性禁食可抑制二乙基亚硝胺诱导的大鼠肝癌; Oriana等<sup>[17]</sup>研究表明,禁食与肿瘤化疗药物索拉非尼联用,可显著抑制肝癌细胞生长和葡萄糖摄取。间歇性禁食有可能在机体不缺乏正常营养供给的前提下,合理调控机体代谢,并有效预防和抑制癌症形成。间歇性禁食主要包含两种方式,一种是隔天禁食,即每周禁食1~4 d,另一种方式是限时禁食,即每天进行一定时间的禁食<sup>[18-19]</sup>。

本文对小鼠实施8 h/d的间歇性禁食,以观察间歇性禁食对小鼠体内肝癌进展、肝脏及血清相关指标的影响,为进一步探索温和有效的肝癌辅助治疗提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与材料

基质胶(美国BD公司)、福尔马林(杭州米克化工仪器有限公司)、DMEM高糖培养基(美国Gibco)、0.25%胰蛋白酶(上海碧云天)、HE染色试剂盒(Biosharp)、BALB/c裸鼠(上海斯莱克实验动物有限责任公司)、PBS(吉诺生物医药技术有限公司)和Huh7细胞系(本实验室保存)。

### 1.2 主要仪器

二氧化碳细胞培养箱(美国Thermo Scientific Corporation公司)、离心机(美国Thermo Scientific Corporation公司)、超净工作台(上海博讯医疗生物仪器股份有限公司)、5 mL注射器(ZEISS-ULTRA55,日本Hitachi公司)、血球计数板(德国Marienfeld)、荧光倒置显微镜(IX71-22FL/PH)、载玻片(上海泰坦科技股份有限公司)、电子天平(福州华志科学仪器有限公司)、游标卡尺(Meinate公司)和石蜡切片机(上海威奥科技有限公司)。

### 1.3 实验动物与分组

4~6周健康雄性的BALB/c裸鼠,体重为 $20 \pm 3$  g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司,动物为SPF级别;将实验动物随机分成实验组(间歇性禁食组)和对照组两组。

### 1.4 细胞实验

取处于对数生长期的肝癌细胞Huh7,胰蛋白酶消化后离心计数。新鲜的DMEM高糖培养液培养与基质胶matrigel体积1:1重悬细胞,置于冰上保存细胞。平均每只小鼠注射 $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液,即 $10^7$ 个细胞/ $200 \mu\text{L}$ 细胞悬液。

### 1.5 成瘤实验

BALB/c裸鼠分为间歇性禁食组和自由进食组,每组8只小鼠。前肢腋窝下部用75%酒精擦拭消毒后,皮下注射Huh7细胞。注射完成后,次日开始间歇性禁食。采用的方法为每天早上9点至下午5点期间8 h对实验组小鼠停止供应食物和水,其余时段正常供给饮食,对照组小鼠自由饮食。隔日定时观察小鼠的皮下成瘤情况,直至有肿瘤出现即肉眼可见后,以游标卡尺测量小鼠肿瘤大小,同时每天记录每只小鼠的体重。肿瘤体积计算公式参考文献<sup>[20]</sup>。

### 1.6 解剖实验

肿瘤形成28 d后,于心脏部位取血。先将动物仰卧固定,轻按小鼠心脏部位,提高小鼠心脏的泵血速度,增加所获得血液的量;将流出的血液收集到EP管中,每只小鼠约 $500 \sim 600 \mu\text{L}$ 血液;采用脱颈椎法处死小鼠,迅速剥取肿瘤和肝脏,用滤纸吸干表面粘附血液,称重、记录,计算肝指数(肝指数=肝重/体重),分别将肝脏和肿瘤置于福尔马林溶液中备用。

### 1.7 血清分离

取出血液后常温放置 $10 \sim 15$  min,转移至 $4^\circ\text{C}$ 静置 $10 \sim 15$  h, $4000 \text{ r/min}$ , $4^\circ\text{C}$ 离心 $10 \text{ min}$ ,用小枪头吸取上清;多次离心,至离心后无分层现象,合

并收集上清,冰浴 1~2 min 后,  $-20^{\circ}\text{C}$  冻存。本文中评估肝功能及血清学所检测的指标为 ALT(谷丙转氨酶)、谷草转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、葡萄糖(GLU)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和乳酸脱氢酶(LDH)。

### 1.8 石蜡切片制备及和染色

分别取出浸泡在福尔马林溶液中的肝脏和肿瘤组织,经脱水、透明、包埋之后进行石蜡切片。将固定好的肝脏组织块在流水下冲洗 24 h,去除福尔马林固定液,按照顺序放入 30% (2 h)、50% (2 h)、70% (2 h)、80% (1 h)、90% (1 h)、95% (1 h) 和 100% (1 h) 浓度梯度的酒精溶液中脱水;经脱水后的组织用二甲苯透明,待组织透明或之后取出用于包埋和切片。将透明好的组织置于  $65^{\circ}\text{C}$  已溶化的蜡池中,包埋好组织块,于冷冻台上凝固成块。凝固之后,在切片机上进行切片,调整好距离及切片的厚度,本文中切片厚度选择  $5\ \mu\text{m}$ ,将准备好的石蜡切片粘贴在载玻片上,保持玻片平整无褶皱。

取出石蜡切片,将切片放入二甲苯溶液中脱蜡 10 min,脱蜡完成后以无水乙醇洗去二甲苯。分别在 90%、80%、70% 和 50% 酒精中浸泡 3 min,蒸馏水洗涤 5 min,苏木素中浸染 20 min,自来水冲洗 30 min 至组织呈现蓝色。伊红溶液浸染 3 min,依次放入 95%、100% 酒精溶液中脱水,每个浓度脱水时间为 3 min,放入二甲苯中浸泡至透明。滴入树胶后,以盖玻片封片,置于显微镜下观察染色结果。

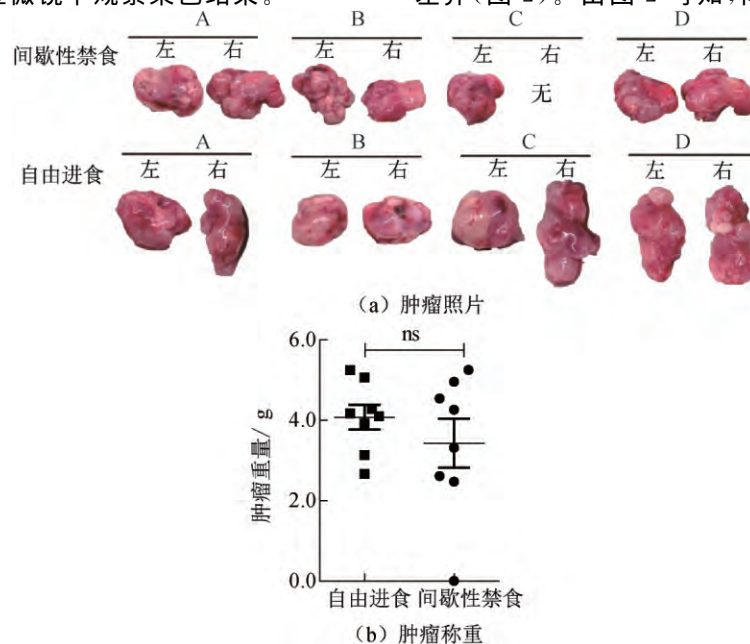


图2 不同进食条件下的剥离肿瘤照片及肿瘤称重结果

### 1.9 数据分析

对所得数据进行统计学处理并进行  $t$ -检验。ns ( $p > 0.05$ ) 表示无统计学差异, \* ( $p < 0.05$ ) 表示有统计学差异, \*\* ( $p < 0.01$ ) 表示有显著性差异, \*\*\* ( $p < 0.001$ ) 表示有显著性差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 肿瘤进展记录

随着时间进展,两组小鼠皮下肿瘤的体积均逐渐增大,禁食组小鼠的肿瘤体积均值明显小于对照组小鼠的肿瘤体积,且成瘤 13~17 d 之间,两组小鼠肿瘤体积差异显著(图 1)。

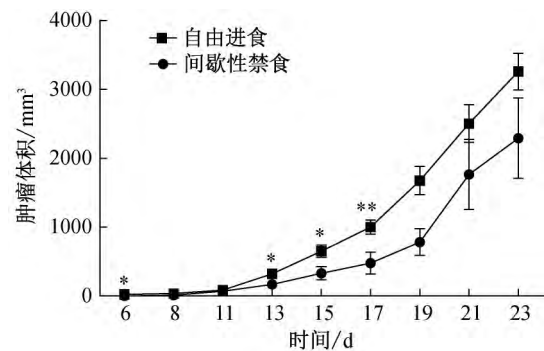


图1 肿瘤体积随时间变化关系

17 d 间歇性禁食组小鼠肿瘤体积仍然小于自由进食组,但是两者之间的差异无统计学意义。处死小鼠后摘取肿瘤,并称重,每组小鼠命名为 A、B、C 和 D,分别表示小鼠 A、小鼠 B、小鼠 C 和小鼠 D,自由进食组和间歇性禁食组小鼠肿瘤重量无显著性差异(图 2)。由图 2 可知,间歇性禁食组小鼠的肿

瘤形成率为 87.5%, 而自由饮食组小鼠的肿瘤形成率为 100%; 注射的 Huh7 细胞株在第 6 d 左右于裸鼠体内成瘤, 在第 12~14 d 肿瘤生长增殖相对较快, 因而在 13~17 d, 实验组与对照组肿瘤体积呈现出显著差异。随着时间增加, 肿瘤体积逐渐增大至 1000 mm<sup>3</sup> 左右, 此时肿瘤的血供相对不足, 而且裸鼠对肿瘤的承受能力也已达到极限<sup>[9]</sup>, 肿瘤生长速度开始减慢, 因而两组小鼠的移植瘤体积差异慢慢变小。当肿瘤体积达到 2000 mm<sup>3</sup> 左右时, 小鼠已经处于恶液质状态, 健康状况不良, 进食不佳<sup>[21]</sup>, 饮食对肿瘤生长的影响显著降低, 实验组与对照组小鼠移植瘤的体积无明显差异, 与最终肿瘤重量无显著差异结果一致。

## 2.2 肝脏 HE 染色

为了探明间断性禁食对肝脏的影响, 本文分别对两组小鼠 A、小鼠 B、小鼠 C 和小鼠 D 的肝脏行组织学分析, 结果如图 3 所示。图 3 表明: 禁食组小鼠的肝脏体积较对照组小鼠略有增大; 两组小鼠的肝脏组织均边缘较锐, 各个肝叶界限清楚, 质地柔软, 颜色均呈褐红色。

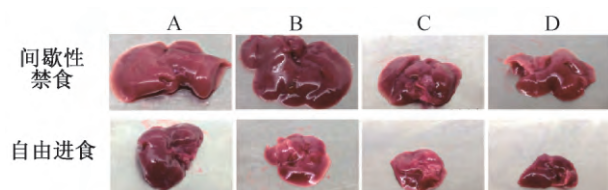
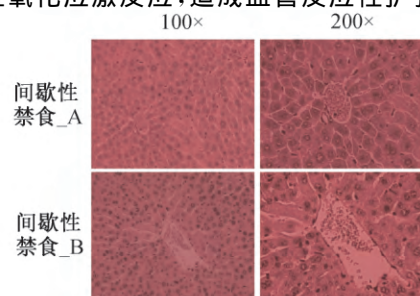
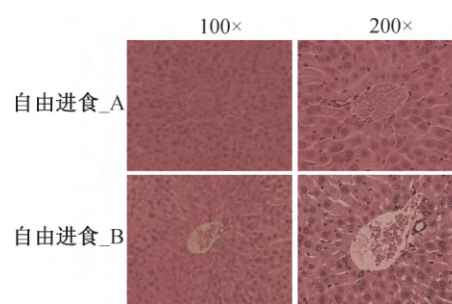


图3 小鼠肝脏解剖图

A、B 两小鼠肝脏 HE 染色情形在显微镜下观察结果结果如图 4 所示。由图 4 可知, 低倍镜下 (100×) 见两组小鼠的肝脏组织结构均较正常, 肝细胞均为条索状排列, 围绕中央静脉呈放射状分布; 高倍镜下 (200×) 见肝细胞分界清晰, 细胞大而圆, 胞浆丰富, 胞核呈圆形, 居中。以上结果表明, 病理学鉴定为间断性禁食组小鼠的肝脏组织较自由饮食组小鼠的肝脏无显著差别; 两组小鼠的部分中央静脉处有充血现象, 其原因可能是实验注射肝癌细胞, 引发了肝脏氧化应激反应, 造成血管反应性扩张所致。



(a) 间歇性禁食组 A、B 小鼠肝脏



(b) 自由进食组 A、B 小鼠肝脏

图4 不同进食组小鼠肝脏 HE 染色结果

## 2.3 肝指数分析

不同种类不同龄期的动物, 其肝指数有一定的规律, 若外物使肝脏受损, 肝指数将发生明显变化<sup>[22]</sup>。分别称量肝脏和小鼠体重, 并计算各组小鼠的肝指数, 结果如图 5 所示。由图 5 可知, 实验组与对照组小鼠的肝指数没有显著差异, 其原因可能是裸鼠进食量较小, 间歇性禁食并没有对体重产生显著影响; 实验后期, 裸鼠健康受到影响, 两组小鼠进食情况均不佳, 导致最终体重无显著差异。

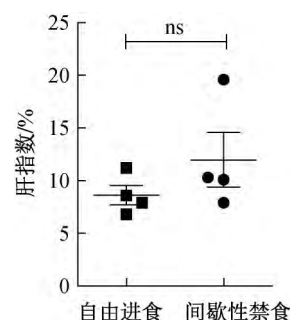


图5 肝指数表征

## 2.4 血清检查结果分析

### 2.4.1 肝功能

间歇性禁食组和对照组小鼠血清中的蛋白含量分析结果如图 6, 由图 6 可知, 注射肝癌细胞后, 禁食组和对照组小鼠血清的谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 含量都明显增大, 表明皮下注射肝癌细胞对小鼠肝脏造成了一定的损伤; ALT 和 AST 穿过细胞膜进入血浆, 在血清中含量升高; 乳酸脱氢酶 LDH 显著提高, 作为厌氧条件下丙酮酸转化为乳酸的关键酶, 其含量上调, 表明已形成恶性肿瘤。禁食组小鼠血清中的总蛋白 (TP) 与白蛋白 (ALB) 含量基本正常, 而对照组小鼠血清中的总蛋白 (TP) 与白蛋白 (ALB) 含量降低约 15%, 这说明间歇性禁食对肝脏有一定保护作用, 在实验组小鼠中, 虽然注射肝癌细胞对肝脏造成了损伤, 但由于禁食的保护作用, 总蛋白和白蛋白含量并无明显变化, 而对照组小鼠由于缺乏保护, 对照组的肝脏损伤程度相对严重。

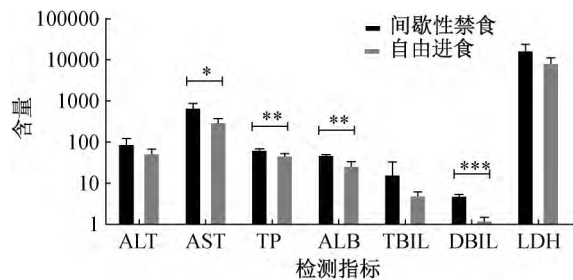


图6 间歇性禁食组和对照组小鼠的肝功能分析

注:ALT、AST和LDH含量单位为IU/L;TP和ALB含量单位为g/L;TBIL和DBIL含量单位为 $\mu\text{mol/L}$ 。

#### 2.4.2 血糖血脂分析

由于进食量较少,间歇性禁食组血清中葡萄糖(GLU)及甘油三酯(TG)含量低于自由进食组,但是两组GLU与TG的含量均处于正常水平,且两组之间无显著性差异(图7)。自由进食组高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量偏低,低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)都处于较低水平(图7)。高密度脂蛋白胆固醇水平降低会增加动脉粥样硬化和中风的风险<sup>[23]</sup>,相对自由进食组,间歇性禁食组表现出正常的脂质代谢,表明间歇性禁食有助于维持正常的脂质代谢,有望防止肿瘤形成过程中一系列心血管疾病的发生,与已被证明的间歇性禁食可以减轻心血管疾病和中风的危险相一致<sup>[24]</sup>。

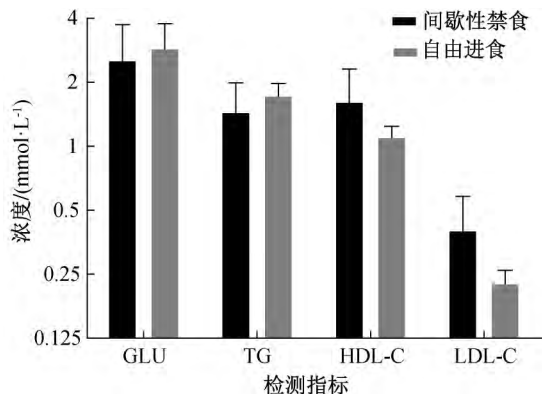


图7 间歇性禁食组和对照组小鼠的血糖血脂分析

### 3 结论

本文通过在裸鼠皮下注射肝癌细胞Huh7,分析间歇性禁食对肿瘤形成、肝脏及血清学影响,主要结果如下:

a) 间歇性禁食的小鼠,成瘤率降低12.5%,表明间歇性禁食降低肿瘤发生率;与禁食组小鼠相比,在肿瘤形成初期,间歇性禁食组肿瘤在同一时间内明显小于对照组,表明间歇性禁食对肿瘤形成的干预作用主要发生在肿瘤形成的初期。

b) 注射的Huh7细胞构建肿瘤模型成功诱发

了肝癌变,间歇性禁食组肝损伤小于对照组,且脂质代谢相对正常。间歇性禁食对保护肝脏及维持脂质代谢发挥重要作用。

间歇性禁食可以实现降低肿瘤发生,抑制肿瘤形成的作用,并在肿瘤形成期间降低肝损伤程度,维持正常脂质代谢。本文结果为抑制肝癌提出新思路,间歇性禁食有望成为预防和控制肝癌的一种便捷有效的方法。

#### 参考文献:

- [1] El-Serag H B, Rudolph K L. Hepatocellular carcinoma: Epidemiology and molecular carcinogenesis [J]. Gastroenterology, 2011, 142(7): 2557-2576.
- [2] Johnson P J, Qin S K, Park J W, et al. Brivanib versus sorafenib as first-line therapy in patients with unresectable, advanced hepatocellular carcinoma: Results from the randomized phase III BRISK-FL study [J]. Journal of Clinical Oncology, 2013, 31(28): 3517-3524.
- [3] Su T S, Lu H Z, Cheng T, et al. Long-term survival analysis in combined transarterial embolization and stereotactic body radiation therapy versus stereotactic body radiation monotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma >5cm [J]. BMC Cancer, 2016, 16(1): 1-9.
- [4] Lee C, Longo V D. Fasting vs dietary restriction in cellular protection and cancer treatment: From model organisms to patients [J]. Oncogene, 2011, 30(30): 3305-3316.
- [5] Patterson R E, Sears D D. Metabolic effects of intermittent fasting [J]. Annual Review of Nutrition, 2016, 37(1): 371-393.
- [6] Brandhorst S, Longo V D. Fasting and caloric restriction in cancer prevention and treatment [J]. Recent Results Cancer Res, 2016, 207: 241-266.
- [7] Fernando S, Sebastian B, Min W, et al. Fasting enhances the response of glioma to chemo- and radiotherapy [J]. Plos One, 2012, 7(9): 1-9.
- [8] Pazienza V, Vinciguerra M, D'Aronzo M, et al. Fasting cycles potentiates the efficacy of gemcitabine treatment in in vitro and in vivo pancreatic cancer models [J]. Oncotarget, 2015, 6(21): 18545-18557.
- [9] Thomas J A, Poulton S H, Phillips T E, et al. Effect of intermittent fasting on prostate cancer tumor growth in a mouse model [J]. Journal of Urology, 2010, 181(4): 350-355.
- [10] Lankelma J, Kooi B, Krab K, et al. A reason for



- intermittent fasting to suppress the awakening of dormant breast tumors[J]. *Biosystems*, 2015,127:1-6.
- [11] Johnstone A. Fasting for weight loss: An effective strategy or latest dieting trend? [J]. *International Journal of Obesity*, 2015,39(5):727-733.
- [12] Antunes F, Erustes A G, Costa A J, et al. Autophagy and intermittent fasting: The connection for cancer therapy? [J]. *Clinics*, 2018,73(suppl 1):e814s.
- [13] Ahmed A, Saeed F, Arshad M U, et al. Impact of intermittent fasting on human health: An extended review of metabolic cascades[J]. *International Journal of Food Properties*, 2019,21(1):2700-2713.
- [14] Renehan A G, Tyson M, Egger M, et al. Body—mass index and incidence of cancer: A systematic review and meta-analysis of prospective observational studies[J]. *Lancet*. 2008,371(9612):569-578.
- [15] Mengmeng L, Xingya Z, Hao W, et al. Roles of caloric restriction, ketogenic diet and intermittent fasting during initiation, progression and metastasis of cancer in animal models: A systematic review and meta-analysis[J]. *Plos One*, 2014,9(12):1-17.
- [16] Rocha N S, Barbisan L F, Oliveira M L, et al. Effects of fasting and intermittent fasting on rat hepatocarcinogenesis induced by diethylnitrosamine[J]. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*, 2002, 22(2):129-138.
- [17] Lo R O, Panebianco C, Porto S, et al. Fasting inhibits hepatic stellate cells activation and potentiates anti—cancer activity of Sorafenib in hepatocellular cancer cells[J]. *Journal of Cellular Physiology*. 2018,233 (2): 1202-1212.
- [18] Gabel K, Hoddy K K, Haggerty N, et al. Effects of 8—hour time restricted feeding on body weight and metabolic disease risk factors in obese adults: A pilot study[J]. *Nutrition & Healthy Aging*, 2018,4(4): 345-353.
- [19] Mattson M P, Longo V D, Harvie M. Impact of intermittent fasting on health and disease processes[J]. *Ageing Research Reviews*, 2016,39:46-58.
- [20] Von Kalle C, Fidler I, Deimling A V, et al. Growth and metastasis of tumor cells isolated from a human renal cell carcinoma implanted into different organs of nude mice[J]. *Cancer Research*, 1986, 46(8):4109-4115.
- [21] 孙保国,邓六香,陈泽雄,等.加味健脾解毒方抗小鼠腹水肝癌恶液质模型的机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2015,33(12):2830-2835.
- [22] Collett D, Friend P J, Watson C J E. Factors associated with short— and long-term liver graft survival in the united ingdom: Development of a UK donor liver index[J]. *Transplantation*, 2017,101(4): 786-792.
- [23] 陈银华,徐晓峰,吴磊磊.胆固醇酯转运蛋白抑制剂升高高密度脂蛋白胆固醇的研究进展[J]. *医学综述*, 2018,24(17):34-38.
- [24] Yuan L, Kaveh H, Majid E, et al. Metabolic mediators of the effects of body—mass index, overweight, and obesity on coronary heart disease and stroke: a pooled analysis of 97 prospective cohorts with 1.8 million participants[J]. *Lancet*, 2014,383(9921): 970-983.

(责任编辑:唐志荣)