

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2010.06.006

香加皮三萜类化合物抑制食管癌 Eca109 细胞裸鼠成瘤及其机制

王丽芳¹, 刘丽华², 马毓梅³, 孟凡茹¹, 单铁强², 单保恩² (1. 河北医科大学第二医院检验科, 河北石家庄 050000; 2. 河北医科大学第四医院科研中心, 河北石家庄 050011; 3. 河北医科大学第二医院病理科, 河北石家庄 050000)

[摘要] 目的: 研究香加皮三萜类化合物(triterpenes compound extracted from cortex periplocae, TCPP)对荧光素酶(luciferase)标记的人食管鳞癌细胞株 Eca109(Eca109-luc 细胞)在裸鼠体内成瘤的作用及其机制。方法: Eca109-luc 细胞经皮下接种裸鼠, 构建 Eca109-luc 细胞裸鼠移植瘤模型, 观察 TCPP 治疗后移植瘤体积和质量的变化, 应用活体成像系统观察移植瘤生长情况, H-E 染色观察移植瘤组织形态学变化, 流式细胞仪检测移植瘤细胞的凋亡, Western blotting 检测移植瘤组织中 survivin 的表达。结果: TCPP 在体内能明显抑制裸鼠 Eca109-luc 移植瘤的生长, 移植瘤体积和质量明显减少, 抑瘤率为 40.7%。TCPP 治疗组小鼠移植瘤组织出现明显炎性细胞浸润及肿瘤细胞坏死, 移植瘤细胞的凋亡率明显高于大豆油对照组 ($P < 0.05$), 移植瘤组织中 survivin 蛋白表达水平明显下降 ($P < 0.05$)。结论: TCPP 在体内能抑制人食管癌 Eca109 细胞的生长, 其作用机制可能与下调 survivin 的表达诱导肿瘤细胞凋亡有关。

[关键词] 香加皮三萜类化合物; 食管肿瘤; Eca109 细胞; survivin; 凋亡

[中图分类号] R735.1; R730.54

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2010)06-0620-05

Triterpenes compound extracted from cortex periplocae inhibits tumorigenesis of esophageal cancer Eca109 cells in nude mice and related mechanisms

WANG Li-fang¹, LIU Li-hua², MA Yu-mei³, MENG Fan-ru¹, SHAN Tie-qiang², SHAN Bao-en² (1. Department of Clinical Laboratory, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China; 2. Research Center, Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, Hebei, China; 3. Department of Pathology, Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect of triterpenes compound extracted from cortex periplocae (TCPP) on tumorigenesis of luciferase-marked Eca109 cells (Eca109, human esophageal cancer cell line; Eca109-luc) in nude mice and the related mechanisms. **Methods:** Eca109-luc-implanted tumor model was prepared by subcutaneously injecting Eca109-luc cells into nude mice. After treated with TCPP, the volume and weight of transplanted tumors in nude mice were measured, and tumor growth was monitored with *in vivo* imaging system. Morphology of transplanted tumor tissues was observed by H-E staining; apoptosis of transplanted tumor cells was analyzed by flow cytometry; and survivin expression in transplanted tumor tissues was examined by Western blotting analysis. **Results:** The growth of implanted tumor in nude mice was markedly inhibited by TCPP, and the volume and weight of tumors were significantly decreased, with the inhibitory rate being 40.7%. TCPP treatment induced inflammatory cell infiltration and necrosis of tumor cells in implanted tumor tissues, and the apoptosis rate of tumor cells was significantly higher than that in soybean oil control group ($P < 0.05$). Expression level of survivin protein in implanted tumors was significantly lower in TCPP-treated group than that in control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** TCPP can inhibit proliferation of human esophageal cancer Eca109 cells *in vivo*, which might be associated with the down-regulation of survivin and apoptosis of tumor cells.

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30772752); 河北省自然科学基金资助项目(No. C2008000952)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China(No. 30772752), and the Natural Science Foundation of Hebei Province(No. C2008000952)

[作者简介] 王丽芳(1971-), 女, 河北省行唐市人, 副主任检验师, 博士, 主要从事肿瘤免疫方向的研究。E-mail: wanglfzh@163.com

[通信作者] 单保恩(SHAN Bao-en, corresponding author), E-mail: baoenshan@yahoo.com.cn

[网络出版] 2010-12-01; <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20101201.1552.008.html>

[**Key words**] triterpenes compound extracted from cortex periplocae; Eca109 cell; survivin; apoptosis; esophageal cancer

[Chin J Cancer Biother, 2010, 17(6): 620-624]

食管癌尤其是食管鳞状细胞癌(esophageal squamous carcinoma, ESC)作为我国的高发肿瘤,目前还没有较理想的预防、诊断和治疗方法,虽经积极治疗,食管癌患者 5 年生存率仍不超过 30%^[1-2]。肿瘤的发生、发展与细胞增殖与凋亡失衡有关,促凋亡基因活性受抑、抗凋亡基因被激活是抑制肿瘤细胞凋亡和促进肿瘤进展的主要原因。其中抗凋亡基因 survivin 异常表达引起的细胞凋亡抑制在食管癌的发生、发展中起重要作用^[3-4]。

近年来,中药作为抗肿瘤新药已初步显示出其独特的优势。本研究小组前期通过对上百种中药进行筛选发现,香加皮(cortex periplocae)提取物在体外对多种实体肿瘤细胞有显著的增殖抑制作用^[5-6],但其在体内作用尚不清楚。本研究观察了香加皮乙酸乙酯提取物三萜类化合物(triterpenes compound extracted from cortex periplocae, TCCP)对荧光素酶(luciferinase)标记的人食管鳞癌细胞 Eca109(Eca109-luc 细胞)在裸鼠体内成瘤的抑制作用,探讨其对诱导 Eca109-luc 细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响,为寻找治疗食管癌的新方法提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株和试剂

TCCP 为本室从香加皮中提取和纯化,主要由羽扇豆烷乙酸酯(cortex periplocae lupane acetate, CPLA)及其类似物组成,CPLA 含量占 85%,用注射用大豆油溶解并配制成溶液。Eca109-luc 细胞由中国医学科学院生物技术研究所肿瘤室协助转染赠送,用含 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素的 RPMI 1640 培养基,于 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 培养,以 0.25% 胰蛋白酶消化细胞传代,取对数生长期细胞用于实验。

SPF 级 4 ~ 5 周龄免疫缺陷 BALB/c 裸鼠,18 只,雌性,体重 12 ~ 15 g,购自中科院北京实验动物中心(合格证号: Scxk 京-2005-0013)。RPMI 1640 和胰蛋白酶购自 Gibco 公司,胎牛血清购自杭州四季青公司,碘化丙啶购自 Sigma 公司,蛋白抽提试剂盒购自美国 Pierce 公司。兔抗鼠 survivin 多克隆抗体及兔抗鼠 GAPDH 单克隆抗体为 Santa Cruz 产品,HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京中山生物技术公

司。活体成像采用美国 Zongmed 公司活体成像系统(Xenogen IVIS Imaging System)。

1.2 Eca109-luc 细胞荷瘤裸鼠模型的建立

选取 4 ~ 5 周龄裸鼠 18 只,取对数生长期的 Eca109-luc 细胞,以 0.25% 胰酶消化后制成单细胞悬液,用 6 号注射针头吸取 0.2 ml 悬液(含有细胞数 1×10^7 个)接种于裸鼠左侧肋腹部皮下。移植瘤直径达 0.5 cm 左右时,将裸鼠随机分为 3 组。实验组:于小鼠瘤旁注射 TCCP(质量浓度为 1.5 mg/ml, 按 20 mg/kg 给药),隔日 1 次;溶剂对照组:小鼠瘤旁注射等剂量大豆油;生理盐水对照组:小鼠瘤旁注射等剂量生理盐水。每 3 d 测量肿瘤大小,记录长径和短径,按公式(体积 = $1/2$ 长径 \times 短径²)计算肿瘤体积大小,连续观察 4 周,绘制肿瘤生长曲线。治疗的每周用活体成像技术观察肿瘤大小^[7]。4 周后处死动物,剥离肿瘤,称瘤质量,计算肿瘤生长抑制率。肿瘤生长抑制率(%) = (对照组肿瘤质量 - 实验组肿瘤质量) / 对照组肿瘤质量 \times 100% 。

1.3 移植瘤组织病理形态学观察

小鼠移植瘤制备和处理按照方法 1.2 进行。取移植瘤组织,中性甲醛固定,石蜡包埋,常规切片作 H-E 染色,中性树胶封片,光镜下观察组织学形态。

1.4 流式细胞术检测移植瘤组织细胞的凋亡

将经 70% 乙醇固定的肿瘤组织置于 120 目不锈钢网上,下置一平皿,用眼科剪刀将组织剪碎,眼科镊子轻搓组织块,边搓边用生理盐水冲洗。将平皿中的细胞混悬液用 300 目铜网过滤去除细胞团块,收集单细胞悬液。加入碘化丙啶(50 μg/ml, 含 Triton-X 100 1.0%) 1 ml, 于 4 °C 染色 30 min, 用流式细胞仪检测细胞凋亡变化。

1.5 Western blotting 检测移植瘤组织 survivin 蛋白的表达

切取 3 组裸鼠部分肿瘤组织,切成 1 mm³ 大小,分别放入匀浆器内,加入 1 ml 全细胞裂解液,4 °C 裂解后,12 000 \times g 离心 15 min,取上清液,用考马斯亮蓝法测定蛋白含量。进行 SDS-PAGE,然后将凝胶中的蛋白转移至 PVDF 膜,1% 脱脂牛奶封闭 60 min 后,依次加入 1:200 稀释的一抗(兔抗鼠 survivin 抗体或兔抗鼠 GAPDH 单克隆抗体),4 °C 反应过夜。加入用 TBST 1:1 000 稀释的 HRP 标记羊抗兔 IgM,37 °C 孵育 1 h。用 Odyssey 双色红外荧光扫描系统

进行检测及灰度分析,以目标蛋白显色条带与 GAP-DH 条带的灰度比值作为目标蛋白的相对表达量。

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 12.0 软件对所有数据进行统计学处理,各组均数的比较采用单因素方差分析,方差齐时用 SNK-q 检验作两两比较。 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCCP 对 Eca109-luc 细胞裸鼠移植瘤的抑制作用

接种 Eca109-luc 细胞 5 d 后,裸鼠肉眼看不见肿瘤结节,但通过活体成像技术可观察到肿瘤;第 7 天时在接种部位出现肿瘤结节、质地较硬,大小约 0.03 cm^3 。治疗 4 周后,TCCP 组小鼠肿瘤体积明显小于大豆油组(图 1);TCCP 治疗组裸鼠移植瘤生长速度慢于大豆油组($P < 0.05$),而大豆油组和生理盐水组裸鼠肿瘤生长速度无明显差异(图 2)。TCCP 治疗组瘤体质量为 $(0.82 \pm 0.14) \text{ g}$,显著低于大豆油组的 $(1.38 \pm 0.36) \text{ g}$ ($P < 0.05$),TCCP 对肿瘤生长的抑制率为 40.7%;大豆油组与盐水组的 $(1.46 \pm 0.28) \text{ g}$ 相比无显著性差异($P > 0.05$)。

2.2 TCCP 对 Eca109-luc 细胞裸鼠移植瘤组织结构的影响

H-E 染色光镜下观察结果显示,大豆油和生理盐水组小鼠肿瘤组织均可见肿瘤细胞成片分布,核异型性明显,核膜增厚,核染色质粗大,核仁明显,可见双核仁以及核分裂,肿瘤性坏死少见,小片状分

布;TCCP 组荷瘤小鼠肿瘤组织的瘤细胞内出现炎性细胞浸润及大片肿瘤性坏死,表现为肿瘤细胞细胞核碎裂、消失,胞质嗜酸性增强(图 3)。

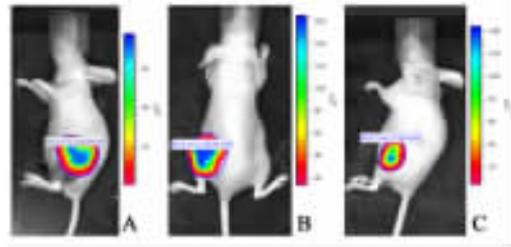


图 1 活体成像技术检测不同组移植瘤的大小

Fig. 1 Tumor size in different groups as detected by *in vivo* imaging technique

A: NS treatment; B: Soybean oil treatment; C: TCCP treatment

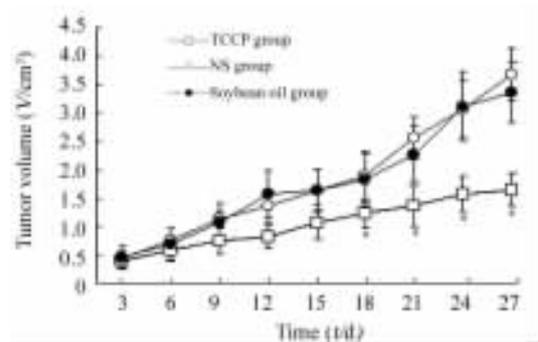


图 2 Eca109-luc 细胞裸鼠移植瘤的生长曲线

Fig. 2 Growth curve of Eca109-luc-implanted tumors in nude mice

* $P > 0.05$ vs NS or soybean oil group

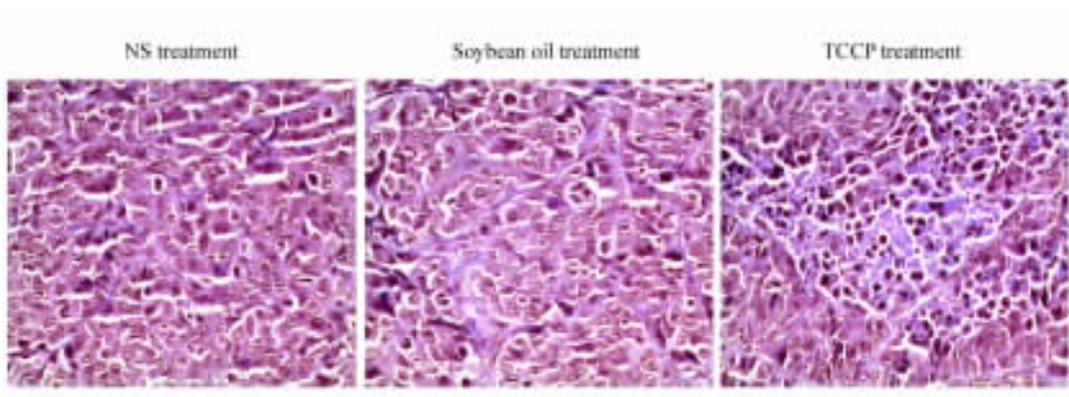


图 3 H-E 染色检测 TCCP 对 Eca109-luc 细胞裸鼠移植瘤细胞形态的影响($\times 400$)

Fig. 3 Influence of TCCP on morphology of Eca109-luc-implanted tumor cells in nude mice as detected by H-E staining($\times 400$)

2.3 TCCP 对 Eca109-luc 细胞裸鼠移植瘤细胞凋亡的影响

流式检测结果显示,与大豆油组相比,TCCP 治疗组裸鼠移植瘤组织细胞的凋亡率明显增高

[(32.5 ± 1.2)% vs (11.6 ± 1.0)% , $P < 0.05$], 而大豆油与生理盐水组的肿瘤细胞凋亡率相比无显著

性差异 [(11.6 ± 1.0)% vs (10.8 ± 3.6)% , $P > 0.05$] (图 4)。

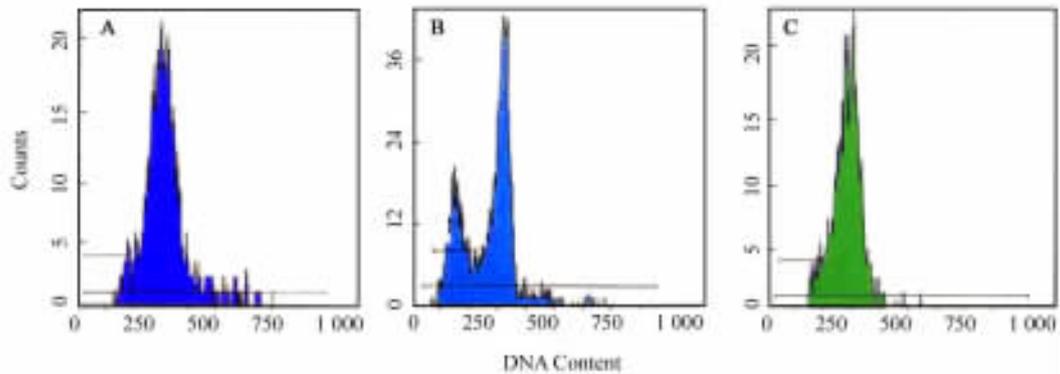


图 4 TCCP 促进 Eca109-luc 细胞裸鼠移植瘤细胞的凋亡

Fig. 4 TCCP increased apoptosis of Eca109-luc-implanted tumor cells in nude mice

A: Soybean oil treatment; B: TCCP treatment; C: NS treatment

2.4 TCCP 治疗对 Eca109-luc 细胞裸鼠移植瘤组织 survivin 蛋白表达的影响

Western blotting 结果显示, TCCP 组裸鼠移植瘤组织 survivin 的表达水平 (0.052 ± 0.003) 明显低于大豆油组 (0.449 ± 0.018) ($P < 0.05$), 而大豆油组和生理盐水组 (0.456 ± 0.016) 相比, survivin 表达水平无显著性差异 ($P > 0.05$, 图 5)。

3 讨论

中药香加皮始载于《神农本草经》, 系萝科植物, 主产于我国的东北和华北地区, 具有抗炎、强心和抗辐射等药理作用, 临床上主要用于治疗风湿性关节炎、冠状动脉硬化性心脏病和肺源性心脏病等^[8]。本研究小组的前期研究^[9-10]发现, 香加皮提取物对体外培养多种肿瘤细胞株有增殖抑制作用, 包括食管癌细胞株, 但其体内作用目前尚不明确。本文研究了 TCCP 对食管癌细胞 Eca109-luc 裸鼠移植瘤的增殖抑制作用。实验结果显示, TCCP 能抑制 Eca109-luc 细胞在裸鼠体内生长。裸鼠皮下接种 Eca109-luc 细胞 5 d 后在触摸不到肿瘤结节时, 通过活体成像技术即可观察到肿瘤。第 7 天时, 在接种部位出现肉眼可见及触摸得到的肿瘤结节, 治疗 4 周后, 活体成像技术显示, TCCP 组小鼠肿瘤体积明显小于大豆油组。与大豆油组比较, TCCP 组 Eca109-luc 移植瘤在体内的生长速度显著减慢, 移植瘤体积、瘤重显著低于大豆油对照组, 其抑瘤率为 40.7%。剥离的瘤组织经 H-E 染色, 结果显示, TCCP 组小鼠肿瘤组织的瘤细胞内出现明显炎细胞浸润及大片肿瘤细胞坏死。

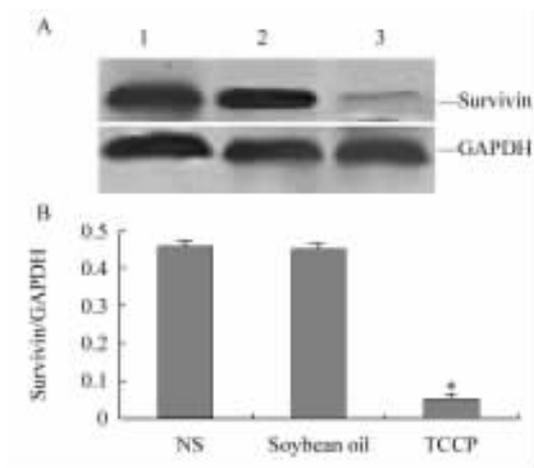


图 5 TCCP 抑制 Eca109-luc 细胞裸鼠移植瘤组织中 survivin 蛋白的表达

Fig. 5 TCCP inhibited survivin protein expression in Eca109-luc-implanted tumor tissues in nude mice

* $P < 0.05$ vs soybean oil group

A: Western blotting bands; B: Semi-quantitative analysis results

肿瘤的发生是一个多步骤的复杂过程, 抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡是抗肿瘤治疗的重要环节^[11]。Survivin 是凋亡蛋白抑制因子 IAPs 家族成员, 在绝大多数成人正常终末分化的细胞中不表达, 而在人体大多数肿瘤组织细胞中表达^[12-13]。

许多研究^[14-16]均证实,食管鳞状细胞癌中 survivin 过表达,且与食管癌细胞的增殖、患者总的生存率、对化疗的反应、以及食管癌细胞的凋亡相关。抑制肿瘤细胞 survivin 的表达可促进肿瘤细胞凋亡,起到治疗肿瘤的作用^[17-19]。Wang 等^[20]用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术下调食管鳞状细胞癌细胞株中 survivin 的表达,抑制了食管癌细胞的生长,提示 survivin 可作为治疗食管癌的有效靶点。为观察 TCCP 是否诱导肿瘤细胞凋亡,本研究应用流式细胞技术观察了 TCCP 对 Eca109-luc 细胞裸鼠移植瘤组织细胞凋亡和 survivin 表达的影响。本研究结果显示, TCCP 治疗组 Eca109-luc 荷瘤裸鼠肿瘤细胞凋亡率显著高于大豆油组, survivin 蛋白表达水平明显下调,表明 TCCP 作用于食管癌裸鼠移植瘤后,可能通过抑制凋亡抑制基因 survivin 的表达,促进肿瘤细胞的凋亡。

综上所述, TCCP 能够抑制 Eca109 细胞在裸鼠体内的生长,该作用可能与下调 survivin 的表达,从而促进肿瘤细胞的凋亡有关,其详细作用机制有待进一步研究。

[参 考 文 献]

- [1] Swisher SG, Hofstetter W, Komaki R, Correa AM, Erasmus J, Lee JH, et al. Improved long-term outcome with chemoradiotherapy strategies in esophageal cancer [J]. *Ann Thorac Surg*, 2010, 90(3): 892-898.
- [2] 魏文强, 杨 娟, 张思维, 陈万青, 乔友林. 2004-2005 年中国食管癌死亡情况及变化趋势 [J]. *中华预防医学杂志*, 2010, 44(5): 398-402.
- [3] Rosato A, Pivetta M, Parenti A, Iaderosa GA, Zoso A, Milan G, et al. Survivin in esophageal cancer: An accurate prognostic marker for squamous cell carcinoma but not adenocarcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(7): 1717-1722.
- [4] Hoffmann AC, Vallböhmer D, Grimminger P, Metzger R, Prenzel KL, Hoelscher AH, et al. Preoperative survivin mRNA detection in peripheral blood is an independent predictor of outcome in esophageal carcinoma [J]. *Pharmacogenomics*, 2010, 11(3): 341-347.
- [5] 单保恩, 李俊新, 张 静, 梁文杰, 李宏芬. 中药香加皮与其易混物体外抑瘤效果研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2005, 17(5): 265-268.
- [6] 张 静, 单保恩, 刘刚叁, 赵学涛, 陈书红. 香加皮提取物抗肿瘤活性的研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2006, 2(12): 108-111.
- [7] Luker KE, Luker GD. Bioluminescence imaging of reporter mice for studies of infection and inflammation [J]. *Antiviral Res*, 2010, 86(1): 93-100.
- [8] 王利萍, 刘建利. 香加皮的化学成分和药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2009, 40(3): 493-496.
- [9] 单保恩, 李俊新, 张 静. 香加皮水提物诱导人胃癌细胞 BGC-823 凋亡及其作用机制 [J]. *中草药*, 2005, 36(8): 1184-1188.
- [10] 赵连梅, 艾 军, 张 倩, 韩丽娜, 刘丽华, 王 玲, 等. 香加皮杠柳苷诱导人食管癌细胞凋亡及其作用机制的研究 [J]. *肿瘤*, 2009, 29(11): 1025-1030.
- [11] Sun W, Yang J. Functional mechanisms for human tumor suppressors [J]. *J Cancer*, 2010, 15(1): 136-140.
- [12] Meng H, Lu C, Mabuchi H, Tanigawa N. Prognostic significance and different properties of survivin splicing variants in gastric cancer [J]. *Cancer Lett*, 2004, 216(2): 147-155.
- [13] Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions [J]. *J Cell Mol Med*, 2005, 9(2): 360-372.
- [14] Grimminger P, Vallböhmer D, Hoffmann A, Schulte C, Bollschweiler E, Schneider PM, et al. Quantitative analysis of survivin RNA expression in blood as a non-invasive predictor of response to neoadjuvant radiochemotherapy in esophageal cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2009, 100(6): 447-451.
- [15] Mamori S, Kahara F, Ohnishi K, Takeda A, Higashida A, Ashida C, et al. Survivin expression in primary malignant melanoma of the esophagus [J]. *Scand J Gastroenterol*, 2009, 44(12): 1497-1498.
- [16] Feng YB, Lin DC, Shi ZZ, Wang XC, Shen XM, Zhang Y, et al. Overexpression of PLK1 is associated with poor survival by inhibiting apoptosis via enhancement of survivin level in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2009, 124(3): 578-588.
- [17] Mesri M, Wall NR, Li J, Kim RW, Altieri DC. Cancer gene therapy using a survivin mutant adenovirus [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(7): 981-990.
- [18] 杨彤涛, 李存孝, 高摇杰, 黄立军, 张摇勇, 周摇勇, 等. 靶向 survivin 的 siRNA 对骨肉瘤细胞 MG63 的抑制作用 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2008, 15(2): 125-128.
- [19] 陈 涛, 贾玉容, 赵铁军, 尹致良. 反义寡核苷酸抑制 survivin 基因表达及肝癌细胞生长的研究 [J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2004, 11(3): 187-190.
- [20] Wang Y, Zhu H, Quan L, Zhou C, Bai J, Zhang G, et al. Down-regulation of survivin by RNAi inhibits the growth of esophageal carcinoma cells [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(9): 974-978.

[收稿日期] 2010-08-25

[修回日期] 2010-09-27

[本文编辑] 王 莹