

齐墩果酸对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织中 细胞凋亡相关蛋白表达的影响

董静¹, 吴勃岩^{2*}, 刘艳秋², 徐放², 车艳新², 王晓军²

(1. 齐齐哈尔医学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006;

2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040)

[摘要] **目的:**通过研究齐墩果酸在 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织中细胞凋亡相关蛋白的表达的影响,探讨其在肿瘤发生、发展过程中的可能作用及意义。**方法:**建立 H22 荷瘤小鼠实体瘤模型进行体内试验,将 50 只已接种 H22 细胞株的小鼠随机分为模型组,环磷酰胺 40 mg·kg⁻¹组,齐墩果酸低、中、高剂量组(1.25, 2.50, 5.00 mg·kg⁻¹),连续灌胃给药 10 d;处死小鼠,检测肝/体比及脾脏指数;采用免疫组化法检测瘤体内凋亡抑制基因生存素(survivin)及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)的蛋白表达水平;利用原位末端标记法检测凋亡指数。**结果:**齐墩果酸可改善 H22 荷瘤小鼠的肝/体比和脾指数,齐墩果酸低、中、高剂量组对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织中 survivin 蛋白表达水平比模型组均显著降低($P < 0.01$);齐墩果酸高、中剂量组对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达水平与模型组比较显著降低($P < 0.01, P < 0.05$);细胞经齐墩果酸处理后, survivin, Bcl-2 表达下调,齐墩果酸各组细胞凋亡指数与模型组比较均显著升高,差异显著($P < 0.01$)。**结论:**齐墩果酸可通过抑制 H22 荷瘤小鼠肿瘤细胞中 survivin 及 Bcl-2 蛋白的表达,提高凋亡率,诱导肿瘤细胞凋亡,还可改善荷瘤小鼠机体免疫力。 survivin, Bcl-2 异常表达与肿瘤的发生密切相关,通过共同调节凋亡而发挥抗肿瘤作用。

[关键词] 齐墩果酸; 细胞凋亡; 生存素; B 细胞淋巴瘤/白血病-2 蛋白; 凋亡指数

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)14-0129-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015140129

Impact of Oleanolic Acid on Apoptosis-related Protein Expression in Mice Bearing H22 Tumor Tissue

DONG Jing¹, WU Bo-yan^{2*}, LIU Yan-qiu², XU Fang², CHE Yan-xin², WANG Xiao-jun² (1. Qiqihar Medical College, Qiqihar 161006, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)

[Abstract] **Objective:** To study effect of oleanolic acid on apoptosis related proteins expression in H22 mice tumor. **Method:** Mice H22 tumor-burdened tumor model was used *in vivo* 50 mice inoculated H22 cell lines were randomly divided into model group, cyclophosphamide group, oleanolic acid low, medium and high dose groups (1.25, 2.50, 5.00 mg·kg⁻¹). The detection of liver, body weight ratio and spleen index was performed. Immunohistochemical method was used to detect the expression of survivin and B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) protein, in situ end labeling method was used to detect apoptosis index, and analyzes its relevance. **Result:** Oleanolic acid could improve H22 tumor-burdened mice liver and body ratio and spleen index, the survivin protein expression was significantly lower than that in the model group ($P < 0.01$); oleanolic acid high dose group decreased significantly Bcl-2 protein expression compared with model group ($P < 0.01$); apoptosis index was significantly increased compared with model group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Oleanolic acid can inhibit H22 mice tumor-burdened tumor cells, increase the rate of apoptosis, thus promotes apoptosis. Survivin and Bcl-2 abnormal expression is closely related to the occurrence of tumor, play a role of anti-tumor by regulating apoptosis together.

[Key words] oleanolic acid; cell apoptosis; survivin; Bcl-2; apoptosis index

[收稿日期] 20150103(004)

[基金项目] 黑龙江省教育厅科研项目(12531610);黑龙江省自然科学基金(D200844)

[第一作者] 董静, 硕士, 助教, 从事抗肿瘤药物研究, Tel:18249281806, E-mail: dongjing0419@126.com

[通讯作者] * 吴勃岩, 教授, 硕士生导师, 从事中药抗肿瘤研究, Tel:18204604277, E-mail: wuboyan.1958@163.com

细胞凋亡是多种基因严格精确调控的为了维持机体内环境稳定的细胞自主有序的死亡过程。通过细胞凋亡,机体在生长、发育和受到外来刺激时可消除多余的、受损的、衰老的、有潜在危险性的细胞,是机体内细胞死亡的重要途径,是维持机体正常生理活动重要的调节机制。大量的实验研究表明,线粒体在细胞凋亡的机制中起着至关重要的作用,是细胞凋亡的调控中心^[1]。本实验通过研究齐墩果酸(oleanolic acid, OA)对肝 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织中凋亡抑制基因生存素(survivin)及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)蛋白的表达及对凋亡指数的影响。在调控细胞凋亡的众多基因中, survivin 和 Bcl-2 蛋白都是线粒体细胞凋亡途径中信号转导的关键的凋亡因子^[2], 本文探讨齐墩果酸对细胞凋亡相关蛋白的作用影响,为齐墩果酸抗肿瘤作用机制研究提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级昆明种小鼠, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 50 只, 雌雄各半, 由黑龙江中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(黑)2008-0004。

1.2 瘤株与试剂 小鼠肝 H22 腹水瘤株(哈尔滨医科大学附属肿瘤医院), 环磷酰胺(CY, 上海如吉生物科技发展有限公司, 批号 131011), 齐墩果酸(Sigma 公司, 批号 42515), survivin 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 批号 BA1420), Bcl-2 单抗及 PV 二步法检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 SC783), 原位末端标记试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司, 批号 MK1023)。

1.3 仪器 HM355s 型石蜡切片机(美国, Thermo 公司), BH2-RFCA 型图像采集系统显微镜(日本, Olympus 公司)。

2 方法

2.1 实体瘤模型的建立 在无菌环境下, 取生长良好的 H22 细胞株与注射用生理盐水 1:3 比例制成细胞悬液, 在每只小鼠右侧腋窝皮下接种 0.2 mL, 制备模型。

2.2 对肿瘤组织中 survivin 和 Bcl-2 蛋白含量表达及凋亡指数的影响 取已造模的昆明种小鼠随机分为 5 组, 每组 10 只, 分为模型组, 环磷酰胺组, 齐墩果酸低、中、高剂量组。接种 H22 肿瘤细胞 6 h 后进行首次给药, 模型组以生理盐水按 0.2 mL 每只 *ig* 给药, 1 次/d。CY 组按 40 mg·kg⁻¹ *ip* 给药, 隔天给药。OA 组(1.25, 2.50, 5.00 mg·kg⁻¹) *ig* 给药, 1 次/d。连续给药 10 d, 停止给药, 处死小鼠, 称其体

重, 解剖剥离瘤组织, 肝脏及脾脏, 称重。采用福尔马林将肿瘤组织固定。

2.2.1 计算肝/体比及脾指数 按下式进行计算, 进行统计学处理。

$$\text{肝/体比} = \text{肝脏质量 mg/体重 g}$$

$$\text{脾指数} = \text{脾质量 mg/体重 g}$$

2.2.2 对基因 survivin 和 Bcl-2 的蛋白表达水平的影响 采用 PV 二步免疫组化法进行常规石蜡制片^[3], 对细胞凋亡调控基因 survivin 和 Bcl-2 的表达水平进行检测。免疫组化染色后, 观察瘤体内 survivin 的表达水平, 并利用分析软件对各组中 survivin 积分吸光度(IA, 阳性细胞)进行分析测定。Bcl-2 蛋白表达阳性细胞以细胞核出现棕黄(褐)色细微颗粒为标志, 阴性细胞以有蓝染细胞核(苏木素复染)的细胞为标志。采用 Image-proplus 6.0 软件对每组瘤组织中的表达产物进行分析。survivin 蛋白阳性细胞的积分吸光度和 Bcl-2 蛋白阳性细胞的平均吸光度 A, 测定阳性区域图像的吸光度作为检测蛋白表达的量化指标。

2.2.3 对凋亡指数的影响 肿瘤组织经石蜡包埋、切片及 HE 染色后, 采用原位末端标记试剂盒进行实验, 对凋亡指数(apoptosis index, AI)进行测定, 每张肿瘤组织切片选 5 个高倍镜视野(阳性凋亡细胞数最多的), 每个视野选取 100 个细胞, 精确计数其中的阳性细胞, 经试剂盒染色后, 显微镜观察细胞核出是否现棕黄(褐)色细微颗粒, 有颗粒存在者即为阳性细胞(阳性反应定位于细胞核)。测定分析各组细胞凋亡指数(AI)。按下式计算:

$$\text{AI} = \text{阳性细胞数/总细胞数} \times 100\%$$

2.3 数据处理 所有实验统计数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, 数据统计分析以 SPSS 17.0 软件进行处理。P<0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 对荷瘤小鼠肝/体比及脾脏指数的影响 H22 荷瘤小鼠在注射 CY 后, 小鼠肝/体比明显上升(P<0.01), 齐墩果酸给药后小鼠肝/体比略有上升(P<0.05); CY 给药后小鼠脾脏指数降低, 与模型组比较差异显著(P<0.01), OA 给药后, H22 荷瘤小鼠脾脏指数升高(P<0.05), 见表 1。

3.2 对 H22 荷瘤小鼠瘤体内 survivin 和 Bcl-2 表达水平的影响 齐墩果酸高、中、低剂量组的 survivin 积分吸光度比模型组均明显降低(P<0.01)。与模型组比较, 齐墩果酸高、中剂量组 Bcl-2 蛋白的平均吸光度显著降低(P<0.01, P<0.05)。见表 2。

表 1 药物对 H22 荷瘤小鼠肝/体比及脾指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 1 Impact of oleanolic acid on body weight ratio and spleen index of mice bearing H22 liver ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药量 /mg·kg ⁻¹	肝/体比 /mg·g ⁻¹	脾脏指数 /mg·g ⁻¹
模型	-	64.09 ± 1.95	7.64 ± 1.42
环磷酰胺	40	67.44 ± 2.26 ²⁾	4.93 ± 1.15 ²⁾
齐墩果酸	5.00	66.12 ± 2.13 ¹⁾	8.90 ± 0.75 ¹⁾
	2.50	65.99 ± 1.91 ¹⁾	8.64 ± 1.17
	1.25	64.62 ± 2.48	7.87 ± 1.01

注:与模型组比较¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01(表 2 同)。

表 2 齐墩果酸对 H22 荷瘤小鼠 survivin, Bcl-2 蛋白表达及凋亡指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 Effects of oleanolic acid on survivin, Bcl-2 protein expression and apoptosis index of mice bearing H22 liver ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	给药量 /mg·kg ⁻¹	survivin/IA	Bcl-2/A	AI/%
模型	-	2 741 ± 381	0.247 ± 0.013	4.30 ± 1.25
环磷酰胺	40	1 566 ± 295 ²⁾	0.180 ± 0.011 ²⁾	15.9 ± 1.79 ²⁾
齐墩果酸	5.00	1 845 ± 299 ²⁾	0.211 ± 0.016 ²⁾	14.8 ± 1.62 ²⁾
	2.50	2 119 ± 378 ²⁾	0.228 ± 0.013 ¹⁾	13.3 ± 0.95 ²⁾
	1.25	1 747 ± 234 ²⁾	0.239 ± 0.020	10.2 ± 1.23 ²⁾

3.3 对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织中凋亡指数的影响
与模型组比较,齐墩果酸高、中、低剂量组凋亡指数均显著升高(P < 0.01),见表 2。

4 讨论

本实验研究发现齐墩果酸可抑制 Bcl-2, survivin 蛋白的表达,促使凋亡指数上升。齐墩果酸可抑制 Bcl-2 蛋白的表达,促进 Cyt-C 释放,导致细胞凋亡。线粒体膜外蛋白 Bcl-2 的调控与表达在线粒体介导细胞凋亡的信号转导途径中起着重要的作用,其过度的表达可抑制细胞发生凋亡,延长细胞活力,促进肿瘤的产生。Bcl-2 主要作用位点在线粒体上,能阻止线粒体膜整合蛋白 Cyt-C 的释放,对凋亡的发生起开关作用。Bcl-2 表达发生异常会促使基因突变的细胞逃避凋亡,导致基因异常的细胞不断累积,是肿瘤形成的重要前提条件^[4]。

齐墩果酸对 H22 荷瘤小鼠肿瘤组织中 survivin 和 Bcl-2 的表达的相互作用关系可能是: survivin 阳性细胞中 Bcl-2 蛋白的表达明显降低,提示 survivin 与 Bcl-2 关系密切,表达具有相关性^[5]。二者表达虽然呈正相关却有着不同的抗凋亡作用, Bcl-2 主要作用于 Caspase 的上游,而 survivin 主要作用于

Caspase 级联反应的下游,两条途径协同作用有着强大的抗凋亡功能^[6]。细胞形态学上发生改变是细胞凋亡最可靠的指标,作为一种成熟的细胞凋亡检测技术,原位末端标记法能迅速直观、特异的、原位地在细胞培养物及组织切片中显示出凋亡的细胞,为检测凋亡细胞提供依据^[7]。齐墩果酸作为一种天然提取药物,可以改善 H22 荷瘤小鼠的肝/体比和脾指数,这可能与其改善机体免疫力有关。实验证实,齐墩果酸可抑制 H22 荷瘤小鼠瘤体内突变型 survivin 和 Bcl-2 蛋白的表达,使凋亡率明显上升,结合前期工作基础^[8-9],充分证实了齐墩果酸通过线粒体通路对肿瘤细胞具有诱导凋亡的作用,且具有改善机体免疫力作用,而其是否具有通过其他途径诱导肿瘤细胞发生凋亡仍需进一步实验进行探索。

[参考文献]

[1] 陈永杰,史仁杰. 藤梨根提取物对 HT-29 荷瘤裸鼠的抑制及诱导凋亡作用的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(17): 1547-1552.

[2] 王书杰,韦艾凌,张永琴. 癌痛消方调控大鼠移植性肝癌细胞 Survivin 及 Bcl-2 的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(12): 1652-1657.

[3] 马怡晖,林汉良,朱有凯. 非霍奇金淋巴瘤中 survivin、bcl-2、bax、p53 表达及其与细胞增殖和凋亡的关系[J]. 临床与实验病理学杂志, 2006, 22(4): 449-453.

[4] 杨峥莉,赵扬,刘荣霞,等. 宫颈病变中凋亡调控因子 Bcl-2、Survivin 及 Fas 的表达与意义[J]. 医学理论与实践, 2011, 24(12): 1395-1397.

[5] Kim H S, Shiraki K, Park S H. Expression of survivin in CIN and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix [J]. Anticancer Res, 2002, 22(2A): 805-808.

[6] 张亚莉,魏虎来,孙利军. 三氧化二砷诱导 K562/ADM 细胞凋亡过程中对 bcl-2, survivin, ROS 表达的影响[J]. 中国肿瘤, 2008, 17(6): 495-498.

[7] 董静,李明珠,毕克滨,等. 原位末端标记法检测齐墩果酸诱导细胞凋亡的实验研究[J]. 中医药信息, 2013, 30(3): 134-135.

[8] 郭艳莹,吴勃岩,董静,等. 齐墩果酸与环磷酰胺联合应用对 H-22 荷瘤小鼠 P53 突变及 TNF- α 的影响[J]. 中医药学报, 2014, 42(3): 32-33.

[9] 吴勃岩,王雪,董静,等. 齐墩果酸对 S180 荷瘤小鼠细胞色素 C 和 Caspase-3 表达的影像[J]. 中医药信息, 2014, 31(4): 14-15.

[责任编辑 聂淑琴]