

果王素对非小细胞肺癌细胞化疗效果的影响

肖华¹, 邓湘¹, 张平¹, 贺兼斌^{2*}

(1. 南华大学附属第一医院, 湖南 衡阳 421001;

2. 怀化市第一人民医院, 湖南 怀化 418000)

[摘要] **目的:**观察果王素对肺腺癌小鼠异体移植瘤对化疗药物增敏作用,并初步探讨其作用机制。**方法:**构建肺腺癌小鼠移植瘤模型,将 40 只接种 Lewis 肺癌细胞的 C57BL/6J 小鼠随机分成 5 组,每组 8 只:正常组(生理盐水),果王素组(果王素 180 mg·kg⁻¹),化疗组(顺铂联合吉西他滨),60 mg·kg⁻¹果王素联合化疗组,180 mg·kg⁻¹果王素联合化疗组;肿瘤细胞接种后 4 d 成瘤后给予相应药物干预,接种后 20 d 处死小鼠,剥离皮下肿瘤。应用 Western blot 法和 RT-PCR 检测化疗耐药相关基因切除修复交叉互补基因(ERCC1)和核糖核苷酸还原酶 M1(RRM1)的表达。**结果:**正常组比较,各药物干预组肿瘤的生长明显受到抑制($P < 0.01, P < 0.05$),各组抑瘤率分别为 14.95%, 41.77%, 44.21%, 59.68%。正常组 ERCC1 基因表达最高,各果王素药物干预组表达与正常组比较 ERCC1 表达明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.01$),果王素组与高剂量果王素联合化疗组表达与其他各组比较明显低于其他组($P < 0.01$),ERCC1 mRNA 表达与 ERCC1 蛋白表达呈一致性;正常组 RRM1 基因表达最高,各果王素药物干预组表达与正常组比较 RRM1 表达明显减少,差异均有统计学意义($P < 0.01, P < 0.05$),果王素组与高剂量果王素联合化疗组表达与其他各组比较明显低于其他组。**结论:**果王素可以通过降低 ERCC1 表达及提高 RRM1 的表达增强化疗药物抑制肿瘤生长及转移的能力。

[关键词] 肺肿瘤; 腺癌; 切除修复交叉互补基因; 核糖核苷酸还原酶 M1; 果王素

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)02-0132-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016020132

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20151210.1437.008.html>

[网络出版时间] 2015-12-10 14:37

Effect of *Kiwi essence* on Response of Chemotherapy for Non-small Cell Lung Cancer in Mice

XIAO Hua¹, DENG Xiang¹, ZHANG Ping¹, HE Jian-bin^{2*}

(1. First Affiliated Hospital of University of South China, Hengyang 421001, China;

2. Huaihua First People's Hospital, Huaihua 418000, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the role of *Kiwi essence* in sensibilization of chemotherapeutics for allotransplantation tumors in mice with lung adenocarcinoma, and preliminarily discuss the related mechanism thereof. **Method:** Transplantation tumor models were established in mice with lung adenocarcinoma. 40 C57BL/6J mice bearing Lewis cells were randomized into five groups, $n = 8$ in each group: normal group (normal saline), *K. essence* group (*K. essence* 180 mg·kg⁻¹), chemotherapy group (cisplatin and gemcitabine), 60 mg·kg⁻¹ *K. essence* combined with chemotherapy group, 180 mg·kg⁻¹ *K. essence* combined with chemotherapy group. After inoculated with adenocarcinoma cells for 4 days, corresponding drugs were given for intervention. Mice were

[收稿日期] 20150107(008)

[基金项目] 2012 年度湖南省卫生厅科研计划项目(2012-81)

[第一作者] 肖华, 硕士, 主治医师, 从事呼吸疾病防治及肺癌基础与临床的研究工作, Tel: 13873480848, E-mail: xiaohua770104@163.com

[通讯作者] * 贺兼斌, 硕士, 副主任医师, 从事呼吸疾病防治及肺癌基础与临床的工作, Tel: 13789260691, E-mail: hjb0919@yahoo.com.cn

sacrificed 20 days after tumor inoculation, and the subcutaneous tumors were stripped for histological examination. The expressions of excision repair cross-complementation group1 (ERCC1) and ribonucleotidereductase subunit M1 (RRM1) for chemotherapy-related drug resistance genes were detected by Western blot assay and RT-PCR. **Result:** Compared with the normal group, the tumor growth of various drug intervention groups was inhibited significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the anti-tumor rate was 14.95%, 41.77%, 44.21%, 59.68% respectively in various groups. Expression of ERCC1 gene was highest in normal group, and significantly decreased in various *K. essence* essence groups, with statistically significant difference ($P < 0.01$). Expression of ERCC1 in *K. essence* groups and *K. essence* high dose + chemotherapy group was significantly lower than other groups ($P < 0.01$). ERCC1 mRNA expression and ERCC1 proteins expression were in consistency. Expression of RRM1 gene was highest in normal group, and significantly decreased in various *K. essence* groups, with statistically significant difference ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Expression of RRM1 in *K. essence* groups and *K. essence* high dose + chemotherapy group was significantly lower than other groups. **Conclusion:** *K. essence* could increase the ability of chemotherapeutics to inhibit tumor growth and transfer by reducing ERCC1 expression and increasing RRM1 expression.

[**Key words**] lung neoplasms; adenocarcinoma; excision repair cross-complementation group1; ribonucleotidereductase subunit M1; *Kiwi essence*

肺癌居恶性肿瘤死亡的首位,5 年生存率不到 15%,其中约 80% 为非小细胞肺癌 (non-small cell lung cancer, NSCLC)^[1]。SCLC 的治疗手段主要为药物治疗,但由于其极易发生多药耐药性 (multidrug resistance, MDR),效果不令人满意。众多研究^[4-5]表明果王素 (猕猴桃果仁油脂酸) 的有效成分可抑制肿瘤的生长和转移。核糖核苷酸还原酶 M1 亚基 (ribonucleotidereductase subunit M1, RRM1), RRM1 可通过控制核苷酸还原酶的活性以及酶与底物结合的特异性,在细胞内 DNA 合成通路中起限速作用^[2]。吉西他滨 (GEM) 通过竞争脱氧胞苷和抑制核糖核苷酸还原酶干扰细胞内 DNA 合成,高水平的 RRM1 表达与肿瘤细胞对吉西他滨的耐药密切相关^[3]。切除修复交叉互补基因 1 (excision repair cross-complementation group1, ERCC1) 在 DNA 损伤识别和链间切割的关键作用。且肿瘤细胞高表达 ERCC1 可导致其对顺铂耐药^[15]。本研究通过观察果王素干预下肺腺癌小鼠异体移植瘤中 ERCC1, RRM1 的表达水平的变化,探讨其在 NSCLC 多药耐药过程中所起的作用。

1 材料

1.1 动物 C57BL/6J 小鼠 40 只,雄性,SPF 级,鼠龄 4~5 周,体重(20±2) g,购自中国医学科学院肿瘤医院实验动物中心,合格证号 SCXK(京)2009-0004,由南华大学动物部提供 SPF 级饲养环境。Lewis 肺癌(鼠源)荷瘤种鼠 2 只,购自中国医学科学院基础医学研究所细胞中心。

1.2 药物及试剂 果王素 120 mL,淡黄色油性液体,浓度 60%,由湘西老爹生物有限公司惠赠提供。顺铂规格 10 mg/支冻干型(齐鲁制药(海南)有限公司,批号 040605),吉西他滨(江苏豪森药业股份有限公司,批号 121113),兔抗鼠 ERCC1 单抗(美国 Proteintech 公司,批号 14586),兔抗鼠 RRM1 单抗(美国 Proteintech 公司,批号 10526),RNA 提取所用 Trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 CW580),引物购自上海生工有限公司,RNA 提取试剂盒, *Taq* Mix, 100 bp ladder,二抗均购自北京康为世纪生物公司;RNA 逆转录试剂盒(加拿大 Fermentas 公司)。

1.3 仪器 Mini Protean 3 Cell 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),Gel DocTM XR 型凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物模型的建立 处死荷瘤鼠,无菌条件下剥离瘤块,剪去瘤体表面的血管、结缔组织以及内部坏死组织。按 1 g 肿瘤组织加 4 mL 生理盐水放入表面皿中,剪碎肿瘤,移入匀浆机中研磨成匀浆液,过 360 目(孔径 0.042 mm)钢网,制成肿瘤细胞悬液,倒入离心管中,加入生理盐水,显微镜下调节细胞浓度为 2×10^6 个/mL,于每只小鼠右后腿根部外侧皮下注射 0.2 mL 肿瘤细胞悬液,形成小鼠皮下肿瘤动物模型。

2.2 分组及用药 小鼠皮下接种细胞 4 d 均成瘤,予以接种 4 d 开始进行药物干预,将 40 只小鼠随机分成 5 组,每组 8 只。正常组:生理盐水 0.4 mL/次

于 5, 12, 19 d *ip* 1 次, 蒸馏水 0.3 mL/次每日 *ig* 1 次; 果王素组: 于接种后每天 *ig* 1 次, 剂量为果王素 180 mg·kg⁻¹, 每只鼠每次体积为 0.3 mL; 化疗组: 接种 4 d 后开始腹腔注射药物, 按 GP 方案, 顺铂于接种后第 5, 12, 19 天各 *ip* 1 次, 剂量为 3 mg·kg⁻¹, 体积为 0.2 mL/次, 吉西他滨于接种后第 5, 12, 19 天各 *ip* 1 次, 剂量为 50 mg·kg⁻¹, 体积为 0.2 mL/次; 低剂量果王素联合顺铂组: 化疗方案同化疗组, 于接种后每天 *ig* 1 次, 剂量为果王素 60 mg·kg⁻¹, 体积为 0.3 mL/次; E 高剂量果王素联合顺铂组: 化疗方案同化疗组, 于接种后每天 *ig* 1 次, 剂量为果王素 180 mg·kg⁻¹, 体积为 0.3 mL/次。肿瘤接种 20 d 后处死全部小鼠。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 RT-PCR 检测移植瘤 ERCC1, RRM1 mRNA 的相对量

液氮研磨, 以 Trizol 一步法提取各组移植瘤总 RNA, 按照 Fermentas 公司 RNA 逆转录试剂盒说明书行逆转录, 获取 cDNA, 行 PCR 扩增。目的基因 ERCC1 的引物正义链为 5'-CACAACCTCCATCCAGACTACA-3', 反义链为 5'-CACTTGAACCAGCAGCACAC-3', 产物长度 84 bp。目的基因 RRM1 引物正义链为 5'-TTGATGTGTCCCAATGAGTGT-3', 反义链为 5'-GACCCTGCTTCTCGTAACTTTC-3', 产物长度 88 bp。内参 β -actin 的引物正义链为 5'-CACGGCATTGTAACCAACTG-3', 反义链为 5'-TCTCAGCTGTGGTGAAG-3'。产物长度 400 bp。反应条件均为: 94 °C 2 min 预变性, 94 °C 30 s 变性, 退火 55 °C 温度 30 s 退火, 72 °C 30 s 延伸, 35 个循环, 72 °C 3 min 终止延伸。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后行凝胶成像分析。以目的条带与内参灰度值的比值反映 RRM1 及 ERCC1 的 mRNA 水平。

2.3.2 Western blot 检测 ERCC1, RRM1 蛋白的表达

液氮研磨各组移植瘤组织, 裂解, 提取总蛋白, BCA 法行蛋白浓度测定, 电泳, 转膜, 封闭蛋白膜, 一抗二抗孵育, ECL 法显影, 用 image J 软件分析显影条带, 以 β -actin (43 kDa) 为内参, 测 ERCC1 (38 kDa), RRM1 (90 kDa) 蛋白表达, 相对表达量为 ERCC1/ β -actin, RRM1/ β -actin 显影条带灰度值的比值。

2.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数比较行单因素方差分析, 多重比较采用 LSD-*t* 检验, 率的比较采用 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对肿瘤生长的影响

肿瘤接种后的第 1 ~ 4 天, 接种处成瘤率为 100%, 移植瘤生长基本相同, 各组皮下移植瘤的体积逐渐增大, 呈局部结节状生长。18 ~ 20 d, 正常组移植瘤生长明显快于其他组, 180 mg·kg⁻¹ 果王素联合顺铂组肿瘤生长最慢, 处死后解剖观察见肿瘤质较硬, 表面有血管生长分布, 以正常组明显, 各用药组对移植瘤生长均有抑制作用, 以 180 mg·kg⁻¹ 果王素联合顺铂组用药更为明显, 各组肿瘤的生长情况。见表 1。

表 1 果王素对小鼠移植瘤情况及抑瘤率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 9$)
Table 1 Effects of Kiwi essence on transplantation tumor lung metastatic and inhibition rate of mice ($\bar{x} \pm s, n = 9$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	肿瘤大小 /cm ³	肿瘤质量 /g	抑瘤率 /%
正常	-	6.66 ± 0.49	5.95 ± 0.20	0.00
果王素	180	5.55 ± 0.56 ^{1,4)}	5.06 ± 0.45 ^{1,4)}	14.95
顺铂	3	3.72 ± 0.39 ^{2,4)}	3.53 ± 0.52 ^{2,4)}	41.77
果王素联合	60	3.41 ± 0.48 ^{2,3)}	3.18 ± 0.93 ^{2,3)}	44.21
顺铂	180	2.41 ± 0.58 ²⁾	2.29 ± 0.31 ²⁾	59.68

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与高剂量果王素联合顺铂组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对移植瘤 ERCC1 和 RRM1 mRNA 表达影响

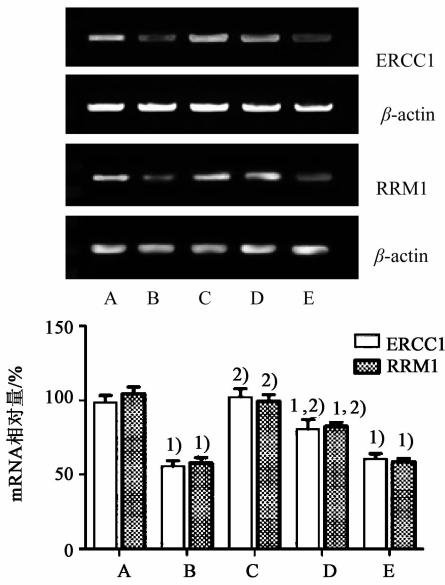
与正常组比较, 180 mg·kg⁻¹ 果王素联合顺铂组、果王素组 ERCC1 mRNA 水平相对表达量明显降低 ($P < 0.01$)。与正常组比较, 180 mg·kg⁻¹ 果王素联合顺铂组、果王素组 RRM1 mRNA 水平相对表达量明显降低 ($P < 0.01$)。见图 1。

3.3 对移植瘤 ERCC1 和 RRM1 蛋白表达的影响

与正常组比较, 180 mg·kg⁻¹ 果王素联合顺铂组、果王素组 ERCC1 蛋白水平相对表达量明显降低 ($P < 0.01$); 与正常组比较, 180 mg·kg⁻¹ 果王素联合顺铂组、果王素组 RRM1 蛋白水平相对表达量明显降低 ($P < 0.01$)。见图 2。

4 讨论

由于吸烟及环境污染的加重, 根据世界卫生组织 (WHO) 2008 年公布的资料显示, 肺癌已成为癌症死亡的首要病因。但因肺癌早期表现无特异性, 早期发现率低, 化疗成为肺癌治疗的主要方式。虽然有许多化疗药物应用于临床, 但治疗效果仍不尽人意, 开发抗肿瘤、化疗增敏药物作用的药物成为研究热点, 果王素主要成分为 α -亚麻酸, 其水溶性好, 生物利用率较高, 具有抗癌和保护正常细胞活性的



A. 正常组; B. 果王素组; C. 顺铂组; D. 60 mg·kg⁻¹ 果王素联合顺铂组; E. 180 mg·kg⁻¹ 果王素联合顺铂组; 注: 与正常组比较¹⁾ P < 0.05; 与联合组比较²⁾ P < 0.05 (图 2 同)

图 1 果王素对小鼠移植瘤 ERCC1 和 RRM1 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Effects of Kiwi essence on expression of transplantation tumor ERCC1 and RRM1 mRNA in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

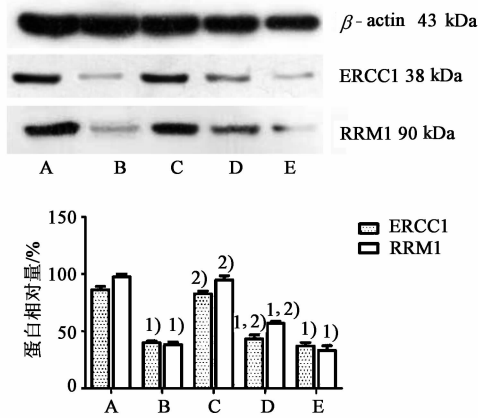


图 2 各组移植瘤组织 ERCC1 和 RRM1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effects of Kiwi essence on expression of transplantation tumor ERCC1 and RRM1 protein in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

作用,同时有研究^[4-5]表明其具有良好的抗氧化、抗肿瘤、保护细胞的作用,但其对肺癌的抑制及降低化疗耐药的作用研究尚未见报道。本研究复制高转移性肺腺癌动物模型,并通过检测移植瘤中的 RRM1 和 ERCC1 mRNA 和蛋白的表达初步探讨其增加化疗敏感性作用。

本研究发现果王素组、化疗组、低剂量果王素联合顺铂组及高剂量果王素联合顺铂组对肿瘤的生长

有明显的抑制作用,抑瘤率分别 14.95%、41.77%、44.21% 和 59.68%,高剂量果王素联合顺铂组抑瘤作用进一步增强。联合组与正常组相比差异有统计学意义,余各组与正常组相比差异均有统计学意义。以上结果表明果王素能抑制肿瘤的生长。

化疗为中晚期非小细胞肺癌的主要治疗方法,常常采用以铂类药物为主的联合化疗,GP 方案是肺癌化疗的经典方案。铂类抗癌药物的细胞毒性作用主要是通过形成铂-DNA 加合物。核苷酸切除修复 (nucleotide excision repair, NER) 是主要修复途径^[6]。ERCC1 是 DNA 修复途径中核苷酸切除修复的重要基因^[7]。ERCC1 与 XPF 形成的二聚体复合物既能对损伤 DNA 5' 端进行识别,也能从 5' 端对 DNA 链进行切割,从而修复损伤的 DNA^[14],肿瘤细胞高表达 ERCC1 可导致其对顺铂耐药^[8]。近年研究表明 ERCC1 表达水平增高明显降低肿瘤患者对铂类药物的敏感性,与铂类药物化疗疗效呈负相关性^[9-10]。本研究中,正常组移植瘤中 ERCC1 基因及蛋白质的表达水平较高,予以果王素干预后,ERCC1 基因及蛋白的表达水平明显降低,各果王素干预组与正常组比较差异有统计学意义。果王素剂量越高,ERCC1 的表达抑制越明显。移植瘤生长亦被抑制。表明果王素能抑制 ERCC1 基因及蛋白的表达,提高铂类化疗药物的敏感性,抑制肿瘤的生长。吉西他滨 (GEM) 通过竞争脱氧胞苷和抑制核糖核苷酸还原酶干扰细胞内 DNA 合成,高水平的 RRM1 表达与肿瘤细胞对吉西他滨的耐药密切相关^[11]。Li-Ping Zhao 等^[12]研究表明,低水平表达 RRM1 mRNA 的吉西他滨联合顺铂组患者对化疗的反应较好。Lee 等^[13]研究显示 RRM1 蛋白阳性表达组患者的疾病控制率 (PR + SD) 低于阴性表达组患者。本研究的各组肿瘤组织中,Western blot 以及 PCR 结果显示:正常组 RRM1 表达高,而有果王素干预的各组表达较正常组明显降低,果王素剂量越高,RRM1 的表达抑制越明显。果王素干预组与正常组相比均有统计学意义。表明果王素增强抗肿瘤药物的作用机制可能与下 ERCC1 和 RRM1 基因及蛋白的表达相关。

综上所述,果王素能抑制肿瘤生长。果王素对肺腺癌的生长有一定的抑制作用,通过降低肺腺癌细胞 ERCC1 和 RRM1 的表达并增强化疗药物对肿瘤的抑制作用,虽然果王素的抗癌作用不及 GP 方案的化疗药物,但作为一种辅助抗癌药物,有明显的化疗增敏作用,如应用于临床,有望提高化疗疗

效,提高患者的生存期及生存质量。

[参考文献]

- [1] Jemal A, Bray F, Center M M, et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Vilmar A C, Santoni-Rugiu E, Sorensen J B. Predictive impact of RRM1 protein expression on vinorelbine efficacy in NSCLC patients randomly assigned in a chemotherapy phase III trial [J]. Ann Oncol, 2013, 4(2):309-314.
- [3] Pasini A, Paganelli G, Tesei A. Specific biomarkers are associated with docetaxel and gemcitabine-resistant NSCLC cell lines [J]. Transl Oncol, 2012, 5(6):461-468.
- [4] 向志钢,李先辉,刘锋,等. 果王素对小鼠酒精性肝病保护作用的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(3):374-376.
- [5] 周卫华,米长忠,吴仕筠,等. 果王素对D-半乳糖致衰老小鼠学习记忆功能的改善作用[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8):1915-1916.
- [6] Cavallo F, Feldman D R, Barchi M. Revisiting DNA damage repair, p53-mediated apoptosis and cisplatin sensitivity in germ cell tumors [J]. Int J Dev Biol, 2013, 57(2/4):273-280.
- [7] Lindsey-Boltz L A, Kemp M G, Reardon J T, et al. Coupling of human DNA excision repair and the DNA damage checkpoint in a defined *in vitro* system [J]. J Biol Chem, 2014, 289(8):5074-5082.
- [8] Ota S, Ishii G, Goto K, et al. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy [J]. Lung Cancer, 2009, 64(1):98-104.
- [9] 黄进,胡华斌,谢阳春,等. TUBB3, TS, ERCC1 mRNA 表达对晚期胃癌化疗疗效和预后的影响[J]. 中南大学学报, 2013, 38(6):582-589.
- [10] 李琳,许崇安,田大力,等. 非小细胞肺癌组织 ERCC1 表达及其与预后的相关性分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(3):186-190.
- [11] Alice Pasini, Giulia Paganelli, Anna Tesei. Specific biomarkers are associated with docetaxel and gemcitabine-resistant NSCLC cell lines [J]. Transl Oncol, 2012, 5(6):461-468.
- [12] Zhao L P, Xue C, Zhang J W, et al. ERCC1 and BRCA1 mRNA expressions are associated with clinical outcome of non-small cell lung cancer treated with platinum-based chemotherapy [J]. Chin J Cancer, 2012, 31(10):476-483.
- [13] Lee J J, Maeng C H, Baek S K, et al. The immunohistochemical overexpression of ribonucleotide reductase regulatory subunit M1 (RRM1) protein is a predictor of shorter survival to gemcitabine-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC) [J]. Lung Cancer, 2010, 70(2):205-210.
- [14] Vilmar A, Sorensen J B. ERCC1 in platinum-based treatment of non-small cell lung cancer with special emphasis on carboplatin; a review of current literature [J]. Lung Cancer, 2009, 64(2):131-139.
- [15] Ota S, Ishii G, Goto K, et al. Immunohistochemical expression of BCRP and ERCC1 in biopsy specimen predicts survival in advanced non small-cell lung cancer treated with cisplatin-based chemotherapy [J]. Lung Cancer, 2009, 64(1):98-104.

[责任编辑 周冰冰]