

# 黄芪甲苷配伍姜黄素对人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤转移的抑瘤作用

杨苏钰, 唐德才\*, 曹子丰, 张硕, 时晓霞, 尹刚\*

(江苏省中医药防治肿瘤协同创新中心, 南京中医药大学基础医学院, 南京 210023)

**[摘要]** **目的:**研究黄芪甲苷配伍姜黄素对人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤出现转移的抑瘤作用,探讨两者配伍对抗肿瘤是否有协同增效作用。**方法:**选取已建立荧光蛋白转染的 HO-8910 卵巢癌动物模型,设 G1 模型组, G2 顺铂组, G3 黄芪甲苷组, G4 姜黄素组, G5 黄芪甲苷 + 姜黄素配伍组, 每组 8 只。称瘤重并计算抑瘤率;免疫组化法检测肿瘤组织基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase 2, MMP2), B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (apoptosis regulator, Bcl-2) 的蛋白表达;实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 法检测 MMP2, Bcl-2 及 miR21, miR15a, miR200a 基因表达。**结果:**荷瘤鼠经治疗后,与模型组比较,瘤重均有所减小,配伍组瘤重明显低于其他组 ( $P < 0.05$ )。免疫组化结果显示,与模型组比较,顺铂组、单体组 MMP2, Bcl-2 蛋白表达均降低,配伍组明显降低 ( $P < 0.05$ ); Real-time PCR 结果显示,与模型组比较,中药组 MMP2, Bcl-2, miR21 基因表达均降低,配伍组明显下调 ( $P < 0.05$ ), miR15a, miR200a 基因表达均增强,配伍组明显上调 ( $P < 0.05$ )。**结论:**黄芪甲苷配伍姜黄素对人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤出现转移后有抑瘤作用,其作用机制可能与抑制 MMP2, Bcl-2, miR21 表达,上调 miR15a, miR200a 表达有关,黄芪甲苷配伍姜黄素确有协同增效作用。

**[关键词]** 黄芪甲苷; 姜黄素; 卵巢癌; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; 基质金属蛋白酶 2

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)06-0155-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017060155

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161228.1151.046.html>

**[网络出版时间]** 2016-12-28 11:51

## Anti-tumor Effect of Astragaloside Combined with Curcumin on Orthotopic Transplantation Tumor Tissue of HO-8910 Ovarian Carcinoma Metastasis

YANG Su-yu, TANG De-cai\*, CAO Zi-feng, ZHANG Shuo, SHI Xiao-xia, YIN Gang\*

(Jiangsu Collaborative Innovation Center of Traditional Chinese Medicine Prevention and Treatment of Tumor, College of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the anti-tumor effect of astragaloside combined with curcumin on human ovarian cancer HO-8910 orthotopic transplantation tumor metastasis and discuss whether the combination of astragaloside and curcumin has the synergies effect against tumor. **Method:** HO-8910 ovarian carcinoma animal models with fluorescent protein transfection were selected, including G1 model group, G2 Cisplatin group, G3 Astragaloside group, G4 curcumin group, G5 Astragaloside + curcumin group,  $n = 8$  in each group. The tumor was weighted and the inhibitory rate was calculated. The protein expression level of matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and apoptosis regulator (Bcl-2) were detected by immunohistochemical method, and the gene expression levels of

**[收稿日期]** 20160929(001)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81073012, 81503267);江苏省自然科学基金项目(15KJB360003)

**[第一作者]** 杨苏钰, 硕士, 从事中药配伍理论研究, Tel: 15298385543, E-mail: 283616615@qq.com

**[通讯作者]** \*唐德才, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中药药性、配伍机制以及临床应用研究, E-mail: talknow@163.com;

\*尹刚, 博士, 助理研究员, 从事中药配伍机制及实验研究, E-mail: yingang\_9@126.com

MMP2, Bcl-2, miR21, miR15a and miR200a were detected by Real-time PCR. **Result:** Tumor weights of the tumor-bearing nude mice after treatment were lower than those in model group; the tumor weight in Astragaloside + curcumin group was significantly lower than that in other groups ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemical results showed that the levels of the protein expressions of MMP2, Bcl-2 in G2, G3 and G4 groups were lower than those in model group, and the levels in G5 group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). Real-time PCR results showed that the gene expression levels of MMP2, Bcl-2 and miR21 in Chinese medicine groups were lower than those in model group, and the levels in G5 group were significantly reduced ( $P < 0.05$ ); the gene expression levels of miR15a, miR200a were higher than those in model group, and the levels in G5 group were significantly increased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The combination of astragaloside and curcumin has the suppression effect on human ovarian cancer HO-8910 orthotopic transplantation tumor metastasis, which may be associated with the down-regulation of MMP2, Bcl-2 and miR21 expressions and the up-regulation of miR15a and miR200a expressions. Therefore, the combination of astragaloside and curcumin has the synergies effect against tumor.

[ **Key words** ] astragaloside; curcumin; ovarian cancer; apoptosis regulator ( Bcl-2 ); matrix metalloproteinase 2 ( MMP2 )

卵巢癌是常见的妇科恶性肿瘤,死亡率位居妇科疾病榜首<sup>[1]</sup>。其发生、发展是多基因改变的过程,是多种癌基因和抑癌基因表达失衡导致肿瘤细胞失控增殖及凋亡抑制的结果<sup>[2]</sup>,卵巢癌早期常无特征性症状和体征,难以发现。目前西医卵巢癌治疗以手术配合放化疗为主,随着中医药配合西医疗肿瘤新模式的日趋完善,对改善症状、提高疗效,甚至延长生命都有着积极的作用,近年来许多学者致力于卵巢癌中医药方向的实验研究,表明半枝莲含药血清<sup>[3]</sup>和熊果酸<sup>[4]</sup>对人卵巢癌 SKOV3 细胞的增殖有抑制作用。王熙月等<sup>[5-6]</sup>研究发现理冲生髓饮能调节人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞凋亡相关基因的表达从而诱导卵巢癌细胞凋亡。邓舒婷等<sup>[7]</sup>研究表明固体脂质纳米姜黄素对人卵巢癌 HO-8910 细胞具有较好的体外抑制效果,与紫杉醇联合化疗有增效减毒作用。郑丽端等<sup>[8]</sup>实验结果显示姜黄素能显著抑制卵巢癌细胞的体外生长,能诱导人卵巢癌细胞 A2780 的细胞凋亡。本课题前期已建立人卵巢癌 HO-8910 荧光转染的原位移植瘤模型<sup>[9]</sup>,并通过研究发现黄芪配伍莪术可显著降低人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤组织中血管内皮生长因子(VEGF),成纤维细胞生长因子-2(FGF-2)表达水平<sup>[10-11]</sup>。针对目前中药治疗卵巢癌单体配伍方向的研究较少,基于补气活血的中医理论基础,本实验对黄芪甲苷配伍姜黄素治疗发生转移的卵巢癌进行疗效观察。采用免疫组化及实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测多种肿瘤因子蛋白和基因的表达。探讨黄芪甲苷配伍姜黄素对发生转移的卵巢癌肿瘤生长的抑制作用,为临床用药和研发

提供实验依据。

## 1 材料

**1.1 药品** 顺铂(南京制药厂有限公司,国药准字 H20030675); 黄芪甲苷(南京泽朗医药科技有限公司,批号 ZL130325YY); 姜黄素(南京泽朗医药科技有限公司,批号 ZL130320G2)。

**1.2 细胞株及动物** 人卵巢癌细胞株 HO-9810, 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库。红色荧光蛋白逆转录病毒转染载体: pLNCX-DsRed-2/PT67-pLPCX-EGFP 由南京源端生物科技公司构建。4~6 周雌性裸鼠 BALB/c, 购自苏州工业园区爱尔麦特科技有限公司,合格证号 SYXK(苏)2009-0001, 本实验由南京中医药大学伦理委员会批准[编号 ACU-38(20141226)], 所有实验符合实验动物伦理学要求。裸鼠饲养用饲料为钴 60 辐射灭菌过的大裸鼠专用颗粒饲料(江苏省协同医药生物工程有限公司)。

**1.3 仪器** ZOOM645S 型体视显微镜(中国江南禹成光学仪器有限公司); Retiga Exi cooled Digital Color 型 CDC(美国 Qimaging 公司); LG-150-A 型荧光激发仪(中国南京超腾科技发展有限公司); Image-Pro Plus6.0 型多功能真彩色细胞图象分析管理系统(美国 Media Cybernetics 公司); BL310, BL21S 型分析天平(德国 Sartorius 公司); CX31-3/2CO<sub>2</sub> 型显微镜(日本 Olympus 公司); Centrifuge 5804R 型高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); UV-2450 型紫外光度仪(日本 Shimadzu 公司); MultiGene Gradient 型 PCR 循环仪(美国 Labnet 公司); DA7600 型荧光定量 PCR 循环仪(中山大学达

安基因股份有限公司)。

**1.4 试剂** 胰蛋白酶,胎牛血清(含 EDTA)(美国 Gibco 公司,批号分别为 25200-056,112020);SP 试剂盒(福州迈新生物科技有限公司,批号 KIT5504);苏木素染色液(福州迈新生物科技有限公司,批号 CTS-1097);基质金属蛋白酶 2(MMP2),B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)一抗(Abcam 公司,批号分别为 AB110186,AB7973);正常羊血清(北京索莱宝公司,批号 SL2-10);Trizol(Invitrogen 公司,批号 15596-026);cDNA 第一链合成试剂盒(Fermentas 公司,批号 K1622);Agarose(Biowest 公司,批号 111860)。

## 2 方法

**2.1 造模** 将筛选出的第 10 代荧光蛋白稳定表达的细胞接种到(皮下注射)裸鼠皮下,密度为  $5 \times 10^6$  个/ $\mu\text{L}$ 。选择肿瘤直径约 10 mm,荧光明显且没有坏死的裸鼠体内肿瘤作为移植瘤块的来源,放置于 RPMI 1640 培养基中,分割成体积约 1~2 mm<sup>3</sup> 的组织块。用  $2 \text{ g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  盐酸氯胺酮腹腔注射麻醉小鼠,暴露左侧卵巢,用显微镊剥离附着在卵巢上的包膜,用 8-0 外科无菌手术缝线(上海浦东金环医疗用品有限公司)将分割的瘤块缝在卵巢黏膜上,用 5'-0 外科无菌手术缝线关闭腹腔。整个手术过程及手术完成后,皆用 Deltaphase 恒温垫维持裸鼠体温。整个手术过程皆在 SPF 实验室洁净工作台上完成。参照美国癌症联合委员会(AJCC)卵巢癌和原发性腹膜癌肿瘤分期系统(TNM)和国际妇产科协会(FIGO)分期系统(2010 年,第 7 版)<sup>[12]</sup>,定义临床卵巢癌分期,确定 HO-8910 卵巢癌原位移植瘤转移的组织病理学表现为出现肿瘤周围浸润性转移(浸润到周围脂肪组织)。通过活体成像系统观察裸鼠肿瘤生长、转移情况,依据本课题组前期

研究<sup>[10-11]</sup>,接种移植瘤的裸鼠在第 42 天普遍出现肿瘤周围浸润性转移。

**2.2 分组和给药** 在卵巢癌原位移植瘤裸鼠生存期内,通过活体成像系统观察裸鼠肿瘤变化情况,测量其肿瘤大小,每周 2 次。测量其长径(L),短径(S),测量 3 次取均值,计算出肿瘤的体积  $V = ab^2/2$ 。在手术后 42 d,各组平均肿瘤体积达到 250 mm<sup>3</sup> 左右时,将其随机分成 G1 模型组,G2 顺铂组,G3 黄芪甲苷组,G4 姜黄素组,G5 黄芪甲苷+姜黄素配伍组,每组 8 只,分组后立即给药。根据课题组前期实验结果<sup>[11]</sup>,给药剂量和方式如下,G1 组灌胃给予生理盐水  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,G2 组腹腔注射顺铂( $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),3 d/次,G3,G4,G5 组分别给予黄芪甲苷( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),姜黄素( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),黄芪甲苷( $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) + 姜黄素( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),按照  $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃给药。每天 1 次。给药共计 15 d。

**2.3 移植瘤质量和抑瘤率检测** 给药结束后,所有裸鼠采用摘眼球取血处死。对各组移植瘤称质量,计算抑瘤率。

$$\text{抑瘤率} = (1 - \text{治疗组平均移植瘤重} / \text{模型组平均移植瘤重}) \times 100\%$$

**2.4 Real-time PCR 检测 MMP2, Bcl-2 及 miR21, miR15a, miR200a 基因表达** 取裸鼠 HO-8910 卵巢癌肿瘤组织用 Trizol 法提取组织中的总 RNA,测定总 RNA 纯度,若符合要求将 RNA 逆转录为 cDNA 后进行 PCR 循环,引物由南京金斯瑞科技有限公司合成,引物序列见表 1。PCR 反应条件:95 ℃ 热启动,95 ℃ 变性 15 s,60 ℃ 复性 20 s,72 ℃ 延伸 40 s,40 个循环,45 ℃ 升高 40 s。每个样本设置 3 个复孔,结果以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

引物	上游	下游	片段大小/bp
MMP-2	5'-AAGGGCATTTCAGGAGCTCTA-3'	5'-AGCGATGCCATCAAATACAA-3'	123
Bcl-2	5'-CTTTACGTGGCCCTGTTTCAA-3'	5'-CTGCATTCAGGAAGACCCT-3'	102
甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)	5'-ATCATCCCTGCCTCTACTGG-3'	5'-GTCAGGTCCACCAGTACAC-3'	122
miR21	5'-GTTAGCTTATCAGACTGA-3'	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'	66
miR15a	5'-CGCCTAGCAGCACATAATGG-3'	5'-GTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'	80
miR200a	5'-GGCCCCTAACACTGTCTGTGTTAA-3'	5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGT-3'	72
Hsa-U6 snRNA	5'-GCCCGTCTGTAAGCGTTC-3'	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'	60

**2.5 免疫组化方法检测 MMP2 和 Bcl-2 蛋白表达** 取卵巢癌肿瘤组织置于中性甲醛中固定并进行

常规石蜡包埋,将石蜡切片脱蜡,乙醇水化,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,抗原修复,PBS 洗涤,用 3%

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇溶液灭活酶, PBS 洗涤, 正常山羊血清封闭, 加一抗 (1:100), 37 °C 湿盒孵育 2 h; PBS 洗涤, 加增强剂 50 μL, 室温湿盒孵育 20 min, PBS 洗涤, 加 HRP 标记二抗 50 μL, 37 °C 孵育 30 min, 以 DAB 法显色, 用蒸馏水终止显色反应; 苏木素染液复染, 脱水, 二甲苯透明后用中性树脂封片; 置于镜下观察和拍摄。采用 IPP6.0 图像分析软件处理数据。

**2.6 统计学处理** 使用 SPSS 21.0 统计软件, 所有数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组比较采用 *t* 检验, 3 组或以上比较用方差分析, 比较不同分组之间均数差异, 若总体差别有统计学差异, 则采用 *LSD* 多重比较方法进行两两比较, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 黄芪甲苷配伍姜黄素对各组移植瘤质量及抑瘤率的影响** 与模型组比较, 顺铂组、单体组和配伍组荷瘤鼠平均瘤重均明显减少 ( $P < 0.05$ ); 与顺铂组比较, 配伍组、单体组瘤重明显减小 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 3 黄芪甲苷配伍姜黄素对裸鼠 MMP2 和 Bcl-2 基因相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of combination of astragaloside and curcumin on gene expressions of MMP2 and Bcl-2 in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	MMP2	Bcl-2
模型	-	1.057 9 ± 0.224 9	1.836 5 ± 0.406 1
顺铂	2	0.393 2 ± 0.076 6 <sup>1)</sup>	0.452 8 ± 0.222 6 <sup>1)</sup>
黄芪甲苷	20	0.088 4 ± 0.012 7 <sup>1,2)</sup>	0.085 1 ± 0.028 5 <sup>1,2)</sup>
姜黄素	100	0.105 4 ± 0.032 5 <sup>1,2)</sup>	0.137 2 ± 0.059 8 <sup>1,2)</sup>
黄芪甲苷 + 姜黄素	20 + 100	0.045 4 ± 0.005 4 <sup>1,2,3)</sup>	0.020 8 ± 0.006 6 <sup>1,2,3)</sup>

与模型组比较, 顺铂组、单体组和配伍组的 miR21 基因表达均明显减弱 ( $P < 0.05$ ), 单体组和配伍组的 miR15a, miR200a 基因表达均明显增强 ( $P < 0.05$ ); 与顺铂组比较, 单体组和配伍组的 miR21 基因表达有所降低 ( $P < 0.05$ ); 与单体组比较, 配伍组 miR15a, miR200a 基因表达明显上调 ( $P < 0.05$ ); 与姜黄素组比较, 配伍组 miR21 基因表

表 4 黄芪甲苷配伍姜黄素对裸鼠 miR21, miR15a, miR200a 基因相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of combination of astragaloside and curcumin on gene expressions of miR21, miR15a and miR200a ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	miR21	miR15a	miR200a
模型	-	0.985 4 ± 0.091 5	0.966 6 ± 0.031 0	0.968 0 ± 0.095 6
顺铂	2	0.537 0 ± 0.106 1 <sup>1)</sup>	1.288 2 ± 0.046 7	1.000 3 ± 0.180 9
黄芪甲苷	20	0.068 8 ± 0.009 6 <sup>1,2)</sup>	8.061 7 ± 1.179 9 <sup>1,2)</sup>	7.482 9 ± 1.011 7 <sup>1,2)</sup>
姜黄	100	0.195 8 ± 0.030 6 <sup>1,2)</sup>	4.968 3 ± 0.998 7 <sup>1,2)</sup>	4.213 3 ± 0.489 8 <sup>1,2)</sup>
黄芪甲苷 + 姜黄素	20 + 100	0.034 6 ± 0.374 3 <sup>1,2,3)</sup>	28.412 9 ± 1.318 8 <sup>1,2,3)</sup>	26.477 9 ± 1.256 9 <sup>1,2,3)</sup>

表 2 黄芪甲苷配伍姜黄素对裸鼠移植瘤质量及抑瘤率的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of combination of astragaloside and curcumin on transplanted tumor quality and inhibitory rate in mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	瘤重/g	抑瘤率/%
模型	-	1.29 ± 0.33	-
顺铂	2	0.84 ± 0.25 <sup>1)</sup>	34.9
黄芪甲苷	20	0.92 ± 0.35 <sup>1)</sup>	28.6
姜黄素	100	0.86 ± 0.12 <sup>1)</sup>	33.3
黄芪甲苷 + 姜黄素	20 + 100	0.50 ± 0.23 <sup>1,2,3)</sup>	61.2

注: 与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ; 与顺铂组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ; 与单体组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$  (表 3 ~ 5 同)。

**3.2 黄芪甲苷配伍姜黄素对各组移植瘤组织中 MMP2, Bcl-2 及 miR21, miR15a, miR200a 基因表达的影响** 与模型组比较, 顺铂组、单体组和配伍组 MMP2, Bcl-2 基因表达均明显减弱 ( $P < 0.05$ )。与顺铂组比较, 单体组和配伍组 MMP2, Bcl-2 基因表达有明显降低 ( $P < 0.05$ ); 与单体组比较, 配伍组 MMP2, Bcl-2 基因表达明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 3。

达明显降低 ( $P < 0.05$ )。见表 4。

**3.3 黄芪甲苷配伍姜黄素对各组移植瘤组织中 MMP2 和 Bcl-2 蛋白表达的影响** MMP2, Bcl-2 蛋白表达定位于细胞质。与模型组比较, 顺铂组、单体组和配伍组 MMP2 蛋白表达均明显减弱 ( $P < 0.05$ ); 与黄芪甲苷组比较, 配伍组 MMP2 蛋白表达明显下调 ( $P < 0.05$ )。见表 5, 图 1, 2。

表 5 黄芪甲苷配伍姜黄素对裸鼠 MMP2 和 Bcl-2 蛋白相对表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

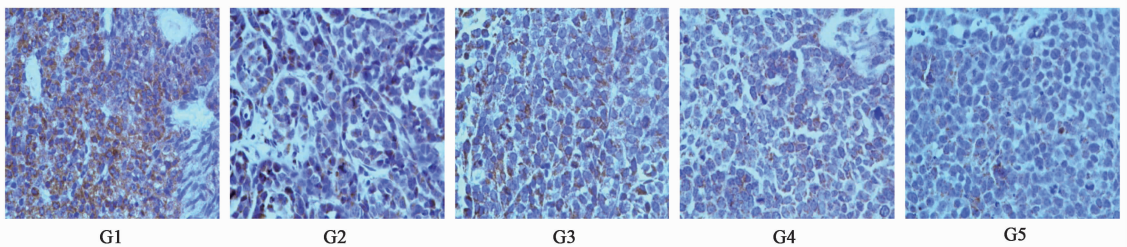
Table 5 Effect of combination of astragaloside and curcumin on protein expressions of MMP2 and Bcl-2 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	MMP2	Bcl-2
模型	-	11.25 ± 1.39	11.63 ± 1.06
顺铂	2	8.13 ± 2.10 <sup>1)</sup>	11.13 ± 1.64
黄芪甲苷	20	8.63 ± 1.92 <sup>1,3)</sup>	10.13 ± 2.23
姜黄素	100	8.25 ± 1.91 <sup>1)</sup>	9.63 ± 2.72
黄芪甲苷 + 姜黄素	20 + 100	7.38 ± 2.67 <sup>1,3)</sup>	9.13 ± 2.03 <sup>1)</sup>

#### 4 讨论

卵巢癌属于生殖系统肿瘤,归于中医学“癥瘕”的范畴,中医认为其发生发展是一个正虚邪实的过程,如《景岳全书·妇人规下·癥瘕类》曰:“瘀血留滞作癥……气虚而血滞,或积劳成弱,气弱而不行……则留滞日积而渐以成癥矣。”故临床常用补气活血法治疗。黄芪属于补气药,功善补气健脾;莪术属于活血化瘀药,用以破血行气,两药配伍在补气活血的同时以防攻伐破血太过,可起到“祛瘀而不伤正,活血而不留瘀”的作用,一举两得。

黄芪甲苷是黄芪主要活性成分黄芪皂苷的成分



G1. 模型组;G2. 顺铂组;G3. 黄芪甲苷组;G4. 姜黄素组;G5. 黄芪甲苷 + 姜黄素配伍组(图 2 同)

图 1 黄芪甲苷配伍姜黄素对裸鼠移植瘤组织中 MMP2 蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 1 Effect of combination of astragaloside and curcumin on protein of MMP2 in transplanted tumor tissues(IHC, ×400)

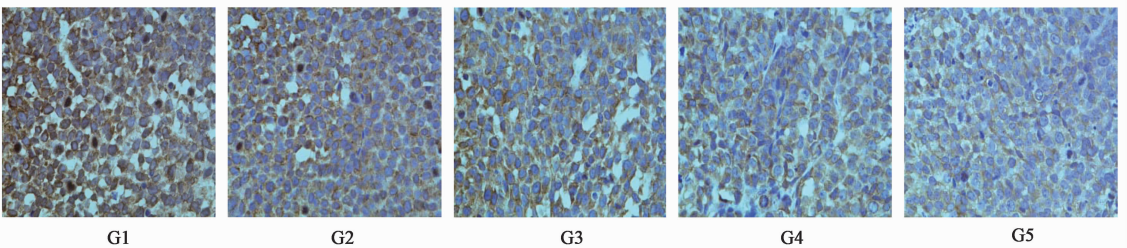


图 2 黄芪甲苷配伍姜黄素对裸鼠移植瘤组织中 Bcl-2 蛋白表达的影响(IHC, ×400)

Fig. 2 Effect of combination of astragaloside and curcumin on protein of Bcl-2 in transplanted tumor tissue(IHC, ×400)

之一,能在体外促进小鼠 T, B 淋巴细胞增殖和抗体生成,从而起到免疫调节的作用,还可通过诱导细胞凋亡等途径发挥抗肿瘤作用<sup>[13]</sup>。相关研究发现黄芪多糖诱导细胞凋亡的机制之一是影响细胞周期使之阻滞于 G<sub>1</sub> 期,激活细胞凋亡系统,诱导细胞凋亡<sup>[14-15]</sup>。姜黄素是从中药姜黄中提取的多酚色素,因其安全且毒副作用小而被广泛应用于抗肿瘤治疗,被肿瘤研究者称为潜在性第三代抗肿瘤药物<sup>[16]</sup>。研究表明姜黄素可以通过下调 Bcl 来促进细胞凋亡,也可通过下调周期蛋白依赖性激酶(CDK)或增殖相关因子活性使细胞周期阻滞进而抑制肿瘤细胞增殖,还可通过抑制血管内皮细胞增殖、抑制 VEGF 和基质金属蛋白酶家族(MMPs)来抑制血管生成,从而发挥抗癌效应<sup>[17]</sup>。

文献数据显示肿瘤的生长和转移与 MMPs, Bcl-2 以及 MicroRNA 的表达密切相关。MMP2 是 MMPs 的重要成员,通过分解蛋白成分降解细胞外基质(ECM),已被证实与肿瘤转移侵袭有密切联系<sup>[18]</sup>。Bcl-2 是一种原癌基因,具有抑制细胞凋亡作用,有研究表明 Bcl-2 高表达时对肿瘤细胞有侵袭与转移作用<sup>[19]</sup>。本实验结果表明黄芪甲苷配伍姜黄素对 MMP2, Bcl-2 表达有抑制作用,提示其作用机制可能是通过抑制 MMP2, Bcl-2 表达以促进肿瘤细胞凋亡。miR21 在多种肿瘤中表达上调,是卵巢癌中上调最为明显的 miRNA 之一。miR15a 是最早发现的具有肿瘤抑制功能的 miRNA 之一,通过调控其靶蛋白 Bcl-2, VEGF-A 等表达,触发肿瘤细胞凋亡、增殖抑制及生长减缓等。miR200a 在多数的肿瘤中表达

下调,通过影响信号传导通路与上皮间质化(EMT)<sup>[20]</sup>过程,调控肿瘤发生侵袭与转移,发挥抑癌基因的作用。有学者认为 miR-200a 可作为判断卵巢癌患者预后标志物,其低表达与晚期卵巢癌术后复发和总生存率低相关<sup>[21]</sup>。本实验结果显示配伍组瘤重明显低于其他各组,配伍组基因表达与单体组比较有统计学意义,可表明单药与两药联合有差异,说明在抑制肿瘤生长上联合用药优于单药用药。免疫组化结果显示黄芪甲苷组与配伍组有统计学意义,姜黄素组与配伍组无统计学意义,但从数值上可看出有减小趋势,考虑可能与卵巢癌转移后细胞增殖加剧有关。

总之,实验结果表明黄芪甲苷配伍姜黄素能明显抑制人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤的生长,两者配伍使用有协同增效作用。其作用机制可能是通过下调肿瘤组织中 MMP2, Bcl-2, miR21 的表达,上调 miR15a, miR200a 表达来抑制肿瘤生长与转移、促进细胞凋亡。本课题仍存在不足,由于肿瘤的生长受多种因素影响,黄芪甲苷配伍姜黄素对卵巢癌的作用机制还不甚明了,有待进一步深入研究。

[参考文献]

[1] Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin, 2005, 55(1):10-30.

[2] 刘俊宝, 冷维春, 张爱臣, 等. FADD 在卵巢癌中的表达及其临床意义[J]. 中国妇幼保健, 2009, 24(14): 1911-1913.

[3] 李冀, 张睿苏, 高彦宇, 等. 半枝莲含药血清对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖的影响[J]. 中医药信息, 2016, 33(3):1-4.

[4] 王丽琴. 熊果酸对人上皮性卵巢癌 SKOV3 细胞增殖和凋亡的影响[J]. 安徽医药, 2016, 20(4):647-650.

[5] 王熙月, 韩凤娟, 于燕, 等. 中药复方药物血清对 BID 和 CTNNB1 基因在人卵巢癌细胞株 SKOV3 中表达的影响[J]. 中国妇幼保健, 2011, 26(12):1854-1857.

[6] 王熙月, 韩凤娟, 汤欣, 等. 中药复方药物血清对 CDKN2A 和 RPS3a 基因在人卵巢癌细胞株 SKOV3 中表达的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(9): 747-750.

[7] 邓舒婷, 徐建业, 李蓉, 等. 紫杉醇联合固体脂质纳米姜黄素对人卵巢癌 HO-8910 细胞的抑制作用研究[J]. 中国药房, 2013, 19(10):1756-1759.

[8] 郑丽端, 童强松, 吴翠环. 姜黄素诱导人卵巢癌细胞株 A2780 凋亡及其分子机制的研究[J]. 癌症, 2002,

21(12):1296-1300.

[9] 郭秀霞, 唐德才, 臧文华, 等. 人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤动物模型建立及分期研究[J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(4):356-358

[10] 尹刚, 唐德才, 戴建国, 等. 黄芪、莪术配伍对人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤组织中 MMP2 和 VEGF 表达的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2014, 30(1): 53-56.

[11] 赵凡, 尹刚, 唐德才, 等. 黄芪莪术配伍对人卵巢癌 HO-8910 原位移植瘤组织中 FGF-2 和 Bcl-2 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(7):1537-1540.

[12] Prat J, Belhadj H, Berek J, et al. Staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum [J]. Int J Gynaecol Obstet, 2014, 124(1):1-5.

[13] 张丽敏, 贺永贵, 伊红丽, 等. 黄芪甲苷药理作用研究进展[J]. 河北联合大学学报, 2014, 16(2):160-162.

[14] 冯涛, 张保国. 黄芪多糖对肝癌 HepG2 细胞的抑制作用及其机制[J]. 实用老年医学, 2010, 24(6):486-488, 495.

[15] 谢少茹, 沈洪, 赵崧, 等. 黄芪多糖对胃癌细胞的生长抑制和促凋亡作用[J]. 河北中医, 2009, 31(9): 1373-1378.

[16] Das S S, Nanda G G, Alone D P. Artemisinin and Curcumin inhibit Drosophila brain tumor, prolong life span, and restore locomotor activity[J]. Iubmb Life, 2014, 66(7):496-506.

[17] 唐华科, 曾星, 胡志全. 姜黄素抗癌机制的研究进展[J]. 现代泌尿生殖肿瘤杂志, 2016, 8(3):180-182.

[18] Malhotra A, PNair D K. Dhawan study to evaluate molecular mechanics behind synergistic chemopreventive effects of curcumin and resveratrol during lung[J]. PLoS One, 2014, 9(4):e93820.

[19] 杨洋博君, 王爽, 李舒, 等. 复方大七气汤联合顺铂对裸鼠卵巢癌皮下移植瘤 Bcl-2/Bax 表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(8):1575-1579.

[20] XIONG M, JIANG L, ZHOU Y, et al. The miR-200 family regulates TGF- $\beta_1$ -induced renal tubular epithelial to mesenchymal transition through Smad pathway by targeting ZEB1 and ZEB2 expression[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 302(3):369-379.

[21] HU X, Macdonald D M, Huettner P C, et al. A miR-200 micro-RNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer [J]. Gynecol Oncol, 2009, 114(3): 457-464.

[责任编辑 张丰丰]