

增免抑瘤方及有效组分对卵巢癌干细胞裸鼠移植瘤 Notch/Jagged1 信号通路的影响

张婕¹, 梁程程², 杨爱仲², 齐聪^{3*}

(1. 上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032; 2. 上海中医药大学研究生院, 上海 200120;
3. 上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200120)

[摘要] 目的:观察增免抑瘤方(ZMYL)及其有效组分(PAWU)对卵巢癌干细胞裸鼠移植瘤的生长抑制作用及对肿瘤组织 Notch 信号受体(Notch)/Notch 信号配体 1(Jagged1)信号通路的影响。方法:无血清悬浮培养卵巢癌干细胞,建立卵巢癌干细胞裸鼠移植瘤模型,分为模型组、增免抑瘤方组(ZMYL, 36 g·kg⁻¹),有效组分组(PAWU, 5.8 g·kg⁻¹),顺铂组(DDP, 2.5 mg·kg⁻¹),有效组分联合顺铂组(PAWU, 5.8 g·kg⁻¹+DDP, 2.5 mg·kg⁻¹)。成功造模后,灌胃给药 21 d。观察增免抑瘤方及有效组分对裸鼠瘤重的影响;苏木素-伊红(HE)染色观察肿瘤细胞的形态变化;免疫组化、实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测肿瘤组织中 Notch 信号受体 1(Notch1), Notch 信号配体 1(Jagged1), 发状分裂相关增强子 1(Hes1)蛋白和 mRNA 的表达水平。结果:各给药组对裸鼠皮下移植瘤的生长均具有抑制作用, ZMYL 组, PAWU 组, DDP 组, PAWU+DDP 组抑瘤率分别为 35.91%, 32.94%, 57.65%, 69.05%, 与模型组比较, ZMYL 组, PAWU 组, DDP 组, PAWU+DDP 组瘤重明显降低($P<0.05$), 与 PAWU 组比较, PAWU+DDP 组瘤重明显降低($P<0.05$);免疫组化结果表明,与模型组比较, ZMYL 组, PAWU 组, DDP 组, PAWU+DDP 组 Notch1, Jagged1 蛋白阳性表达明显减少($P<0.05$), ZMYL 组, DDP 组, PAWU+DDP 组 Hes1 蛋白阳性表达明显减少($P<0.05$);与 PAWU+DDP 组比较, ZMYL 组, PAWU 组, DDP 组 Notch1, Jagged1, Hes1 蛋白阳性表达明显上调($P<0.05$);Real-time PCR 结果表明,与模型组比较, ZMYL 组, PAWU 组, DDP 组, PAWU+DDP 组 Notch1 mRNA 表达率明显减少($P<0.05$), ZMYL 组, PAWU 组, PAWU+DDP 组的 Jagged1, Hes1 mRNA 表达率明显减少($P<0.05$), 与 DDP 组比较, PAWU+DDP 组 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达率明显减少($P<0.05$)。结论:增免抑瘤方及有效组分可以抑制卵巢癌干细胞裸鼠移植瘤的生长,有效组分与顺铂联合应用有明显的协同增效作用,其机制可能与抑制 Notch/Jagged1 信号通路的激活相关。

[关键词] 增免抑瘤方;有效组分;裸鼠;卵巢癌干细胞;Notch 信号受体(Notch)/Notch 信号配体 1(Jagged1)

[中图分类号] R22;R242;R285.5;R737.31 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)15-0046-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201522

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200522.1443.004.html>

[网络出版日期] 2020-5-22 17:22

Effect of Zengmian Yiliu Formula and Its Effective Components on Notch/Jagged1 Signaling Pathway of Ovarian Cancer Stem Cell Transplanted Tumor in Nude Mice

ZHANG Jie¹, LIANG Cheng-cheng², YANG Ai-zhong², QI Cong^{3*}

(1. Longhua Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shanghai 200032, China; 2. Graduate School, Shanghai University of TCM, Shanghai 200120, China;
3. Shuguang Hospital, Shanghai University of TCM, Shanghai 200120, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Zengmian Yiliu (ZMYL) formula and its effective components (PAWU) on the growth inhibition of ovarian cancer stem cell transplanted tumor in nude mice and

[收稿日期] 20191223(025)

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金项目(81603645);上海市卫生和计划生育委员会科研课题青年项目(20164Y0243)

[第一作者] 张婕,博士,助理研究员,从事中医药防治妇科肿瘤的临床及实验研究, E-mail: jinglezh@126.com

[通信作者] *齐聪,博士,主任医师,教授,从事妇科肿瘤的中西医结合治疗研究, E-mail: qicongxzq@aliyun.com

the Notch signal receptor (Notch) / Notch signal ligand 1 (Jagged1) signal pathway in tumor tissue. **Method:** Ovarian cancer stem cells were cultured in serum-free suspension to establish the transplanted tumor model of ovarian cancer stem cells in nude mice, and then divided into model group, ZMYL group ($36 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), PAWU group ($5.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), cisplatin (DDP) group ($2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and PAWU ($5.8 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$) + DDP group ($2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). After successful modeling, the drugs were given by gavage for 21 days. To observe the effect of Zengmian Yiliu decoction and its effective components on tumor weight in nude mice, the morphological changes of tumor cells were observed under light microscope, immunohistochemistry and real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were used to detect the expressions of Notch 1, Jagged1, Hairy and enhancer of split 1 (Hes1) protein and mRNA in tumor tissues. **Result:** The tumor inhibition rates of ZMYL, PAWU, DDP and combination groups were 35.91%, 32.94%, 57.65% and 69.05%, respectively. Compared with the model group, the tumor weight of ZMYL group, PAWU group, DDP group and combination groups decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with PAWU group, the tumor weight of combination groups decreased significantly ($P < 0.05$). Immunohistochemistry showed that compared with the model group, the positive expressions of Notch1, Jagged1 in ZMYL group, PAWU group, DDP group and combination groups were down-regulated ($P < 0.05$), and the positive expressions of Hes1 in ZMYL group, DDP group and combination groups were down-regulated ($P < 0.05$). Compared with combination groups, the positive expressions of Notch1, Jagged1 and Hes1 in ZMYL group, PAWU group, DDP group were up-regulated ($P < 0.05$). Real time PCR showed that compared with the model group, the expressions of Notch1 mRNA in ZMYL group, PAWU group, DDP group and combination groups decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with model group, the expressions of Jagged1 and Hes1 mRNA in ZMYL group, PAWU group and combination groups decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with DDP group, the expressions of Notch1, Jagged1 and Hes1 mRNA in combination groups decreased significantly ($P < 0.05$). **Conclusion:** The growth of ovarian cancer stem cells transplanted in nude mice can be inhibited by Zengmian Yiliu formula and its effective components. The effective components have a significant synergistic effect in the combination with cisplatin. Its mechanism is correlated to the inhibition of Notch/Jagged1 signaling pathway activation.

[Key words] Zengmian Yiliu formula; effective components; nude mice; ovarian cancer stem cells; Notch/Jagged1

卵巢癌的死亡率高居妇科癌症之首,严重威胁女性的健康和生命。卵巢癌发病隐匿、进展迅速,患者的5年生存率仅为30%,复发率高达70%~80%^[1]。肿瘤干细胞CSCs理论认为,卵巢癌干细胞参与卵巢癌的发生发展,是卵巢癌转移、复发和逃逸化疗机制的根源^[2]。Notch信号受体(Notch)/Notch信号配体1(Jagged1)信号通路是一种高度保守的细胞信号转导系统,通过介导细胞间的关联来调节细胞生理和病理过程。目前研究发现,Notch/Jagged1信号通路的异常激活与卵巢癌密切相关^[3],其在卵巢癌的发生、发展以及细胞的增殖、凋亡、侵袭转移、血管形成以及肿瘤干细胞状态维持等方面起着重要作用。Notch1信号有促进卵巢肿瘤生长的作用,Jagged1作为Notch受体的主要配体,在卵巢癌中的表达也增多,并与预后相关^[4]。发状分裂相关增强子1(Hes1)是Notch信号通路下游的靶基

因,在多种肿瘤的发生中起到癌基因的作用。研究表明,在初期Notch信号通路主要是作为上皮性卵巢癌的早期诊断标志物之一^[5];在卵巢癌发病过程中,Notch1受体和Jagged1配体结合可激活Notch1信号通路,在 γ 分泌酶的作用下,Notch1受体可被酶切成具有活性的胞内区,进而与细胞核内的基因靶点相互作用促进卵巢上皮细胞癌变^[6]。

最大程度的肿瘤细胞减灭术和紫杉醇联合铂类是目前作为上皮性卵巢癌的一线化疗方案,是卵巢癌治疗的“金标准”,但针对复发性卵巢癌的治疗方案有限,且不能治愈。中医药在卵巢癌的治疗中发挥重要作用,中医药辅助化疗具有延长患者5年生存率,减少卵巢癌的化疗耐药与转移^[7]。增免抑瘤方(ZMYL)是已故上海市名中医、妇科肿瘤名家庞泮池教授的经验方(专利号201110058966.7),由保真汤加减化裁而来,以益气养阴、清热解毒辅助

治疗卵巢癌,临床疗效明显^[8]。本课题组前期通过超高效液相色谱与质谱联用法(UPLC-MS)对增免抑瘤方中的有效活性组分(PAWU)芍药苷,黄芪甲苷,汉黄芩素,熊果酸进行了测定,结果准确、重复性好,可用于增免抑瘤方剂的质量控制^[9]。课题组既往研究已证实熊果酸可以在体外抑制卵巢癌干细胞增殖,阻滞卵巢癌干细胞周期于G₀~G₁期,诱导卵巢癌干细胞凋亡;同时能降低肿瘤干细胞的迁移及侵袭能力^[10]。本研究拟通过建立裸鼠卵巢癌干细胞移植瘤模型,观察增免抑瘤方及4种有效组分对卵巢癌荷瘤裸鼠体内抑瘤作用,检测瘤体组织中Notch/Jagged1信号通路Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA,蛋白的相对表达,探究增免抑瘤方抗卵巢癌的作用靶点及机制,为开发低毒高效的抗肿瘤药物提供实验依据。

1 材料

1.1 动物及细胞株 6周龄SPF级雌性BALB/c裸鼠25只,体质量18~20 g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。合格证号SCXK(沪)2017-0005,饲养于上海中医药大学实验动物中心(SPF级)。本次实验动物获得上海中医药大学实验动物福利伦理委员会同意,伦理编号PZSHUTCM190322013。人卵巢癌SKOV3细胞,由中科院上海生命科学院细胞库购买。

1.2 药物与试剂 增免抑瘤方购自上海中医药大学附属龙华医院中药房;熊果酸、黄芪甲苷、芍药苷、汉黄芩素(上海源叶生物公司,批号分别为B21403, B20564, B21148, B20489, 纯度均≥98%);羧甲基纤维素钠[生工生物工程(上海)股份有限公司,批号A501427-0250]。增免抑瘤方由黄芪15 g,党参12 g,枸杞子9 g,半枝莲12 g,八月札12 g,白芍9 g,天冬9 g,鹿角霜9 g等组成,生药由上海中医药大学附属龙华医院中药房提供,药材质量经本单位药剂科谢瑞芳副主任药师鉴定均为正品。制成水煎剂后,旋转蒸发器浓缩为2.4 g·mL⁻¹生药量,4℃保存备用。有效组分的配制:熊果酸,黄芪甲苷、芍药苷、汉黄芩素,给药剂量按前期实验确定裸鼠用量,分别是熊果酸60 g·L⁻¹,黄芪甲苷147.4 g·L⁻¹,芍药苷97.7 g·L⁻¹,汉黄芩素80.6 g·L⁻¹,共385.7 g·L⁻¹,以0.5%羧甲基纤维素钠配置成混悬液,4℃保存备用。注射用顺铂(齐鲁制药有限公司,批号8J025A89);McCoy's 5A Medium,胎牛血清(美国Gibco公司,批号分别为16600082, 10100147);兔Notch1, Jagged1, Hes1抗体(美国CST公司,批号分

别为3608S, 70109S, 11988S);二抗,苏木素-伊红(HE)试剂盒(碧云天生物公司,批号分别为A0208, C0105);4%多聚甲醛(上海钰森生物公司,批号USB015);免疫组化试剂盒(南京建成生物公司,批号I001-1-1);trizol(美国Invitrogen公司,批号15596026);逆转录,实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)试剂盒(日本TaKaRa公司,批号分别为RR037A, RR420A)。PCR引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
18S	上游 CGTTGATTAAGTCCTGCCCTT	137
	下游 TCAAGTTCGACCGTCTTCTCAG	
Notch1	上游 GAGGCGTGGCAGACTATGC	140
	下游 CTTGTACTCCGTCAGCGTGA	
Jagged1	上游 GTCCATGCAGAACGTGAACG	136
	下游 GCGGGACTGATACTCCTTGA	
Hes1	上游 CCTGTCATCCCCGTCTACAC	98
	下游 CACATGGAGTCCGCCGTAA	

1.3 仪器 YZB/USA1802-2009型CO₂恒温培养箱(美国Thermo公司);5424R型高速低温台式离心机(德国Eppendorf公司);Synergy H1MF型酶标仪(美国Bio-Tek公司);Ti-E型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);Tissuelyser型多样品组织研磨仪(上海净信公司);ProFlex PCR型基因扩增仪,ABI7500型实时荧光定量PCR仪(美国Life Technology公司)。

2 方法

2.1 卵巢癌干细胞的悬浮培养与鉴定 参考文献[10-11]描述的方法和步骤,维持卵巢癌SKOV3细胞生长和进行悬浮干细胞球的培养并鉴定。

2.2 构建卵巢癌裸鼠移植瘤模型 SKOV3悬浮干细胞球胰酶消化,4℃,1 500 r·min⁻¹离心4 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤2次,配制成密度5×10⁶个/mL的细胞悬液,低温运至动物房,遵循动物实验无菌操作的要求,于每只裸鼠的右侧腋窝皮下接种细胞悬液0.2 mL;待表皮局部出现明显皮丘后,将针头旋转方向出针。

2.3 分组和干预 造模后裸鼠于SPF级环境下饲养,待干细胞皮下移植瘤直径达5 mm时,成功建立卵巢癌干细胞皮下移植瘤模型^[12]。将成瘤裸鼠随机分为模型组,增免抑瘤方组(ZMLY),有效组分组(PAWU),顺铂组(DDP),有效组分联合顺铂组

(PAWU+DDP), 每组5只。分组当日开始给药, 给药剂量按人和鼠体表面积折算等效剂量法计算^[13]。模型组给予生理盐水溶液灌胃(*ig*), 0.3 mL/次, 1次/d; ZMYL组给予增免抑瘤方浓缩液, 36 g·kg⁻¹, *ig*, 1次/d; PAWU组给予有效组分配制液, 5.8 g·kg⁻¹, *ig*, 1次/d; DDP组给予顺铂腹腔注射(*ip*), 2.5 mg·kg⁻¹, 隔日给药1次; 联合组同时给予PAWU和DDP, PAWU灌胃5.8 g·kg⁻¹, 1次/d和DDP腹腔注射2.5 mg·kg⁻¹, 隔日1次。给药时间为3周。

2.4 计算抑瘤率 实验期间观察各组裸鼠进食量, 精神状态, 活动情况、营养状况等一般情况。给药结束后, 麻醉后颈椎脱臼处死裸鼠, 称取瘤体, 称取瘤质量, 计算抑瘤率; 抑瘤率=(模型组平均瘤质量-治疗组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量×100%。

2.5 HE染色观察肿瘤组织形态 剥取的瘤体置于4%多聚甲醛溶液中固定, 自动脱水机中进行脱水、透明和浸蜡, 后进行石蜡包埋, 制成4 μm厚度切片, 进行HE染色、封片, 染色切片在200倍显微镜下观察肿瘤组织, 每组切片随机选取5个视野拍照保存。

2.6 免疫组化检测 Notch1, Jagged1, Hes1 蛋白的表达 石蜡切片脱蜡至水, 3% H₂O₂ 室温孵育, 以清除内源性过氧化物酶的活性; 抗原微波热修复, 5%~10% 正常山羊血清封闭非特异性位点; 倾去血清, 滴加 Notch1 (稀释倍数 1:400), Jagged1, Hes1 一抗工作液 (稀释倍数 1:200), 4 °C 过夜; 加生物素标记的二抗工作液, DAB 染色, 苏木素复染, 乙醇梯度脱水, 中性树胶封片, 光镜观察。以 PBS 代替一抗作阴性对照, 光镜下观察免疫组化切片阳性表达情况。Notch1, Jagged1, Hes1 蛋白阳性表达于细胞的不同部位, 染色的切片在显微镜下有棕黄色颗粒沉着, 随机选取 10 个视野进行拍照, 运用 Image J 图像分析软件对图片进行定量分析。

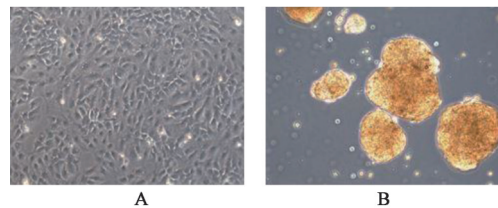
2.7 Real-time PCR 检测裸鼠瘤体组织 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达水平 将各组裸鼠瘤体组织分别置于 DEPC 水预处理过的离心管中, 同时加入 trizol 1 mL 和钢珠, 离心管对称放置于电动组织研磨机内, 频率为 60 Hz, 45 s, 重复 5 次进行低温研磨。待组织充分研磨裂解后置于冰盒内, 提取瘤体组织总 RNA。将抽提的 RNA 采用紫外分光光度计测定浓度, 反转录成 cDNA。反转录后以 cDNA 为模板, 按各基因引物设计 PCR 反应, 根据 TB Green™ Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书操作。PCR 反

应条件: 95 °C 热启动 1 min, 95 °C 变性 5 s, 58 °C 复性 15 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环。以 2^{-ΔΔC_t} 法分析各基因的表达水平, 实验重复 3 次。

2.8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本采用单因素方差分析 One-Way ANOVA 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 卵巢癌干细胞的富集培养和鉴定 人卵巢癌 SKOV3 细胞贴壁培养 2 d, 在无血清 ES 培养基中悬浮培养 42~72 h, 细胞可聚集形成较疏松不规则的片状或椭圆形。悬浮培养 7 d, 细胞富集成三维球样肿瘤干细胞, 细胞数增加, 球体紧密, 见图 1。同时鉴定 SKOV3 悬浮干细胞球干细胞标志基因表达明显升高。



A.SKOV3 细胞贴壁培养; B.SKOV3 细胞悬浮培养 1 周

图 1 卵巢癌 SKOV3 贴壁细胞富集培养成卵巢癌干细胞球 (倒置显微镜, ×100)

Fig. 1 Enrichment culture of ovarian cancer stem cells (invert microscope, ×100)

3.2 对各组裸鼠一般情况的影响 卵巢癌干细胞致瘤接种约 3 d, 裸鼠右侧皮下可见米粒样大小瘤体结节, 质软, 稍增大后质地变硬, 后期瘤体逐渐突出体表, 多为椭圆形, 部分瘤体呈不规则形状, 裸鼠成瘤率为 100%。瘤体表面皮肤颜色不变, 部分瘤体表面皮肤较薄, 但无坏死及破溃。实验过程中, 给药第 3 天 ZMYL 组死亡 1 只荷瘤裸鼠, 解剖示因灌胃不当导致吸入性肺炎而死亡, 其余各组裸鼠均存活。随着肿瘤体积增大, 后期裸鼠逐渐消瘦, 饮食、活动较前减少, 出现精神萎靡, 以 DDP 组变化最为明显。

3.3 对各组裸鼠移植瘤重及抑瘤率的影响 各组给药后, 裸鼠皮下移植瘤的生长均有抑制作用, ZMYL 组, PAWU 组, DDP 组, PAWU+DDP 组抑瘤率分别为 35.91%, 32.94%, 57.65%, 69.05%。与模型组比较, ZMYL 组, PAWU 组, DDP 组, PAWU+DDP 组瘤重明显降低 ($P < 0.05$)。与 PAWU 组比较, PAWU+DDP 组瘤质量明显降低 ($P < 0.05$)。PAWU

组和 ZMYL 组比较差异无统计学意义。增免抑瘤方及有效组分具有抑瘤作用,当有效组分与顺铂联用时,可以明显提高顺铂对卵巢癌干细胞荷瘤裸鼠肿瘤的抑制作用。见表 2。

3.4 对各组裸鼠瘤体组织病理学形态的影响 模型组见癌细胞生长旺盛,核大深染,核浆比失调,核染色质呈粗颗粒性状,核分裂相较多;ZMYL 组,PAWU 组,DDP 组可见病理性核分裂减少,染色质浓缩,胞浆内有空泡,部分细胞凋亡改变呈散在分布;PAWU+DDP 组细胞凋亡细胞进一步增多,细胞核固缩,或成不规则块状,包膜完整,胞浆内较多空

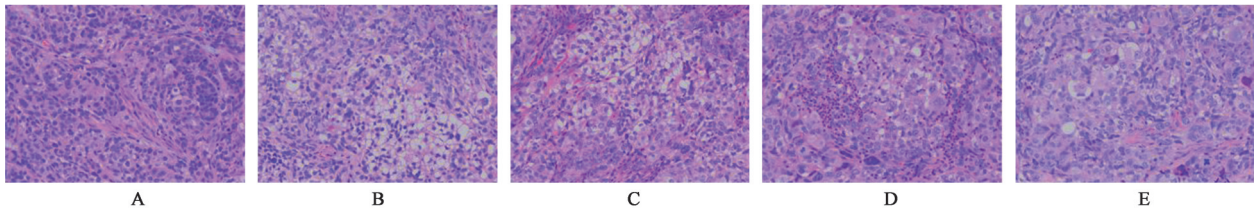
表 2 增免抑瘤方及有效组分对裸鼠瘤重及抑瘤率的影响

Table 2 Effect of Zengmian Yiliu formula and its effective components on tumor weight and tumor inhibition rate in nude mice

组别	剂量/g·kg ⁻¹	瘤重($\bar{x}\pm s, n=5$)/g	抑瘤率/%
模型组	-	0.44±0.15	-
ZMYL	36	0.28±0.06 ¹⁾	35.91
PAWU	5.8	0.29±0.14 ¹⁾	32.94
DDP	0.002 5	0.19±0.11 ¹⁾	57.65
PAWU+DDP	5.8+0.002 5	0.14±0.03 ^{1,2)}	69.05

注:与模型组比较¹⁾ $P<0.05$;与 PAWU 组比较²⁾ $P<0.05$ 。

泡生成。见图 2。



A. 模型组;B.ZMYL 组;C.PAWU 组;D.DDP 组;E.PAWU 联合 DDP 组(图 3 同)

图 2 增免抑瘤方及有效组分对裸鼠瘤体组织形态学的影响(HE,×200)

Fig. 2 Effect of Zengmian Yiliu formula and its effective components on histomorphology of tumor in nude mice(HE,×200)

3.5 对各组裸鼠瘤体组织 Notch1, Jagged1, Hes1 蛋白表达的影响 与模型组比较,ZMYL 组,PAWU 组,DDP 组,PAWU+DDP 组 Notch1, Jagged1 蛋白阳性表达明显减少($P<0.05$);ZMYL 组,DDP 组,PAWU+DDP 组 Hes1 蛋白阳性表达明显减少($P<$

0.05);ZMYL 组,PAWU 组,DDP 组 Notch1, Jagged1, Hes1 蛋白阳性表达组间差异无统计学意义。与 PAWU+DDP 组比较,ZMYL 组,PAWU 组,DDP 组 Notch1, Jagged1, Hes1 蛋白阳性表达明显上调($P<0.05$)。见图 3,表 3。

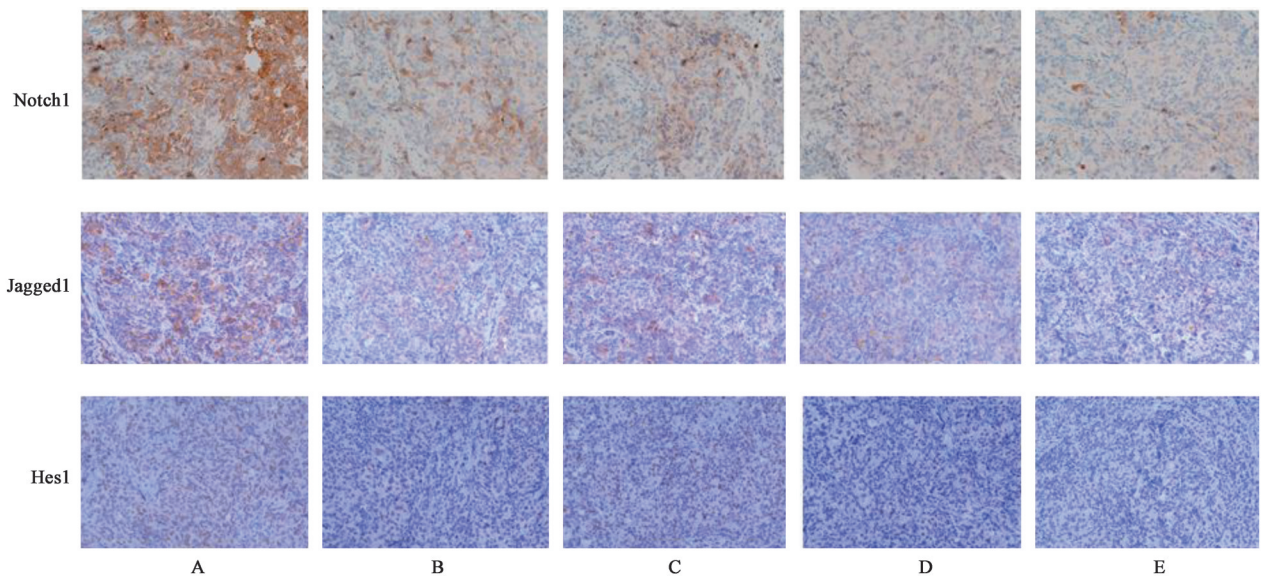


图 3 增免抑瘤方及有效组分对裸鼠瘤体组织 Notch1, Jagged1, Hes1 蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 3 Effect of Zengmian Yiliu formula and its effective components on expressions of Notch 1, Jagged1 and Hes1 in tumor tissues of nude mice(IHC,×400)

表3 增免抑瘤方及有效组分对裸鼠瘤体组织 Notch1, Jagged1, Hes1 蛋白积分吸光度的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 3 Effect of Zengmian Yiliu formula and its effective components on integral absorbance of Notch 1, Jagged1 and Hes1 protein in tumor tissue of nude mice($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Notch1	Jagged1	Hes1
模型	-	0.395±0.049	0.337±0.014	0.330±0.035
ZMYL	36	0.268±0.028 ¹⁾	0.258±0.037 ¹⁾	0.273±0.025 ¹⁾
PAWU	5.8	0.282±0.016 ¹⁾	0.266±0.020 ¹⁾	0.292±0.028
DDP	0.002 5	0.278±0.024 ¹⁾	0.237±0.029 ¹⁾	0.271±0.032 ¹⁾
PAWU+DDP	5.8+0.002 5	0.186±0.014 ^{1,2,3,4)}	0.178±0.021 ^{1,2,3,4)}	0.165±0.026 ^{1,2,3,4)}

注:与模型组比较¹⁾P<0.05;与ZMYL组比较²⁾P<0.05;与PAWU组比较³⁾P<0.05;与DDP组比较⁴⁾P<0.05。

3.6 对各组裸鼠瘤体组织 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达的影响 与模型组比较, ZMYL 组, PAWU 组, DDP 组, PAWU+DDP 组的 Notch1 mRNA 表达率明显减少(P<0.05);与模型组比较, ZMYL 组, PAWU 组, PAWU+DDP 组的 Jagged1, Hes1 mRNA 表达率明显减少(P<0.05);与 DDP 组比较, PAWU+DDP 组 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达率明显减少(P<0.05)。见表4。

表4 增免抑瘤方及有效组分对裸鼠瘤体组织 Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of Zengmian Yiliu formula and its effective components on expressions of Notch1, Jagged1 and Hes1 mRNA in tumor tissues of nude mice($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Notch1	Jagged1	Hes1
模型	-	1.02±0.25	1.01±0.14	1.05±0.25
ZMYL	36	0.49±0.19 ¹⁾	0.44±0.07 ^{1,2)}	0.79±0.26 ³⁾
PAWU	5.8	0.59±0.17 ¹⁾	0.59±0.13 ¹⁾	0.56±0.06 ¹⁾
DDP	0.002 5	0.65±0.16 ¹⁾	0.80±0.10	0.83±0.07
PAWU+DDP	5.8+0.002 5	0.31±0.06 ^{1,2)}	0.52±0.15 ^{1,2)}	0.39±0.17 ^{1,2)}

注:与模型组比较¹⁾P<0.05;与DDP组比较²⁾P<0.05;与PAWU+DDP组比较³⁾P<0.05。

4 讨论

卵巢癌属于祖国医学“癥瘕”范畴,从中医的整体观来看,是全身属虚,局部属实的病证。卵巢癌术后化疗后患者多表现为虚多实少,治疗宜通过益气养阴、健脾理气等中药扶正,同时以活血化瘀、清热解毒、祛痰软坚等中药祛邪^[14]。肿瘤干细胞是一类具有自我更新、高致瘤性,分化潜能、高度耐药等特征的恶性肿瘤细胞群。将CSC理论应用于卵巢癌的研究中,对于卵巢癌的早期诊断、预后测定及靶向治疗具有很重要的临床指导意义,卵巢癌干细胞的发现为卵巢癌治疗提供了新思路,清除体内的肿瘤干细胞可能是治疗卵巢癌的方法之一。

保真汤出自《劳证十药神书》,具有补虚除热之功效,意在扶正益气养阴,其对恶性肿瘤放疗化疗亦有增效作用^[15]。增免抑瘤方主要由黄芪、白芍、党参片、生地黄、天冬、八月札、半枝莲、枸杞子等组成,在保真汤基础上加味清热解毒之品,以扶正为主,祛邪为辅,治则符合卵巢癌患者化疗后以阴虚和气阴两虚为多见的临床特征^[16]。方中黄芪性味甘温,补中益气,温运脾阳,《名医别录》谓之“补丈夫虚损,五劳羸瘦”,白芍平肝养阴生血,《神农本草经》谓之“主邪气腹痛,除血痹,破坚积”;半枝莲清热解毒、消肿止痛,八月札舒肝和胃、软坚散结兼止痛,现代药理学证实其具有抗癌作用^[17-18]。全方益气养阴扶正,兼以清热解毒祛邪,体现了庞泮池教授攻补兼施治疗卵巢癌的学术思想。

Notch 信号通路在维持肿瘤干细胞的干细胞特性方面发挥重要作用, O'CONNOR 等^[19]和 SHAH 等^[20]认为,肿瘤干细胞可导致复发卵巢癌细胞和耐药卵巢癌细胞 Notch 的表达明显上升。完整的 Notch 信号通路包括跨膜蛋白受体、跨膜蛋白、转录因子及下游靶基因,其中人类细胞共有4种 Notch 受体(Notch1-4)及5种配体(Delta-like-1, Delta-like-3, Delta-like-4, Jagged-1 和 Jagged-2)^[21]。Jagged-1 是 Notch 的配体中表达水平最高的配体^[22],同时表达于肿瘤上皮细胞和内膜细胞,通过血管生成作用参与肿瘤进展及肿瘤细胞增殖与耐药,起到对微环境的双重调控^[23]。Notch/Jagged1 信号通路对于多种肿瘤的分化和增殖具有关键的调控作用,下调其过度活化可以有效抑制卵巢癌、乳腺癌、肺癌等多种肿瘤细胞的增殖和分化^[24-26]。Hes 基因作为 Notch 信号通路下游靶基因,将 Notch 信号下传, Delta-like-1 可激活 Notch-1 信号通路导致 Hes-1 被激活^[27]。有研究发现,活化的 Notch1 及其下游基因 HES1 在卵巢腺癌中的表达明显高于在卵巢腺瘤及正常卵巢组织中的表达, Notch1 信号蛋白在卵巢癌

中的表达与卵巢癌的恶性程度呈正比例关系,可能与早期癌变的启动有关^[28-29]。Notch信号通路为研究中医药抗肿瘤的作用机制提供了新思路,吴世婷等^[30]实验研究发现黄芪解毒汤能下调Notch1, Jagged1基因及细胞周期蛋白₁(cyclin D₁)的表达,可以通过抑制Notch信号转导通路的活性来干预乳腺癌细胞的增殖和凋亡。刘云霞等^[31]发现益气补肾方具有明显的抗胃癌细胞增殖转移作用,其机制可能是调控胃癌干细胞和抑制Notch信号通路的活化,与5-氟尿嘧啶(5-Fu)协同后,进一步下调瘤体组织中Notch1, Jagged1蛋白表达。然而,目前针对卵巢癌的中药作用于Notch信号通路影响的机制研究较少。

本课题组前期实验对增免抑瘤方的主要成分和有效单体化合物进行了提取和筛选实验^[9],方中扶正益气药活性成分芍药苷(白芍)、黄芪甲苷(黄芪)含量最高,两种单体均有具有促进肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤增殖转移的作用;清热解毒药活性成分的实验研究已证实汉黄芩素(半枝莲)能抑制卵巢癌SKOV3细胞增殖,且随药物浓度的提高而抑制作用增强^[32],熊果酸(八月札)可以抑制卵巢癌干细胞增殖,诱导卵巢癌干细胞凋亡^[10]。为此,本实验在前期研究基础上探讨了增免抑瘤方及有效组分的整合作用。本研究证实,将较少的CSCs接种于免疫缺陷的裸鼠即能致瘤,且成瘤率高、成瘤时间短,灌胃给药后结果显示有效组分组、增免抑瘤方组、顺铂组、联合组均可抑制卵巢癌干细胞裸鼠移植瘤生长。Notch1蛋白表达定位于细胞膜与细胞质, Hes1阳性结果为细胞膜和细胞质出现浅黄色、棕黄色或褐色颗粒,而Jagged1阳性结果为胞膜和/或胞质均匀染成棕黄色^[24,33]。免疫组化结果显示有效组分组、增免抑瘤方组、顺铂组、联合组Notch1, Jagged1蛋白阳性表达下调,增免抑瘤方组、顺铂组、联合组Hes1蛋白表达也下调,且联合组Notch1, Jagged1, Hes1蛋白表达量最低。与模型组比较,有效组分组、增免抑瘤方组、顺铂组、联合组的瘤体组织Notch1 mRNA表达明显减少,有效组分组、增免抑瘤方组、联合组Jagged1, Hes1 mRNA表达明显减少,联合组Notch1, Jagged1, Hes1 mRNA减少最为明显。此外,增免抑瘤方在抑制瘤体生长和抑制Notch/Jagged1通路mRNA和蛋白表达方面效果略优于有效组分整合作用,但本实验结果差异无统计学意义。

综上,增免抑瘤方及有效组分具有抑制卵巢癌

干细胞裸鼠移植瘤生长的作用,有效组分与顺铂联合应用有明显的协同增效作用,其机制可能与抑制Notch/Jagged1信号通路的激活相关。本研究从增免抑瘤方及其有效组分调控卵巢癌干细胞移植瘤及Notch信号通路探讨抗卵巢癌的多靶点分子机制,为开发低毒高效的抗肿瘤药物提供实验依据,值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] OZOLS R F. Treatment goals in ovarian cancer[J]. Int J Gynecol Cancer, 2005, 15(1):3-11.
- [2] KENDA S N, VIRANT K I. Presence and role of stem cells in ovarian cancer[J]. World J Stem Cells, 2019, 11(7):383-397.
- [3] GROENEWEG J W, FOSTER R, GROWDON W B, et al. Notch signaling in serous ovarian cancer[J]. J Ovarian Res, 2014, 4(7):95-106.
- [4] FENG Z, WEN H, LIAO Q. Expression of Notch1, Jagged1 and NICD in epithelial ovarian carcinomas and a preliminary study on the activity of gamma-secretase in epithelial ovarian carcinoma cell lines[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2014, 49(10):780-786.
- [5] LU K H, PATTERSON A P, WANG L, et al. Selection of potential markers for epithelial ovarian cancer with gene expression arrays and recursive descent partition analysis[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(10):3291-3300.
- [6] 冯兆亿,温宏武,廖秦平. 卵巢上皮性癌组织中Notch1, Jagged1和NICD蛋白表达的意义及癌细胞中 γ -分泌酶活性的初步探讨[J]. 中华妇产科杂志, 2014, 49(10):780-786.
- [7] 占义平,叶丽红. 卵巢癌中医药研究近况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2013, 15(2):218-220.
- [8] 齐聪,张勤华,卢秦. 160例卵巢癌中西医治疗临床疗效评价及生存分析[J]. 上海中医药杂志, 2006, 40(12):38-39.
- [9] 龚灿,钱麟,杨红,等. UPLC-MS法同时测定增免抑瘤颗粒中5种成分[J]. 中成药, 2014, 36(2):301-305.
- [10] 张婕,齐聪. 熊果酸联合顺铂对卵巢癌干细胞的增殖、凋亡、侵袭和迁移的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(10):1655-1661.
- [11] LUO X, DONG Z, CHEN Y, et al. Enrichment of ovarian cancer stem-like cells is associated with epithelial to mesenchymal transition through an miRNA-activated Akt pathway[J]. Cell Prolif, 2013, 46(4):436-446.

- [12] 王文静,吴韶飞,郭飘婷,等. 熊果酸对卵巢癌干细胞荷瘤裸鼠耐药的逆转作用[J]. 上海中医药杂志, 2016,50(50):70-76.
- [13] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2000:145.
- [14] 王瑞杰,齐聪. 齐聪教授治疗卵巢癌经验[J]. 四川中医,2010,28(2):1-2.
- [15] 李京,黎杏群,李家邦,等. 扶正保真汤对恶性肿瘤放、化疗增效作用的临床与实验研究[J]. 中国中西医结合杂志,1998,18(9):523-526.
- [16] 齐聪,刘爱武. 益气养阴煎化疗对卵巢癌T细胞亚群的影响[J]. 辽宁中医杂志,1998,25(3):128-129.
- [17] 满其倩,左琳,吕青涛. 半枝莲抗肿瘤作用及机制研究进展[J]. 辽宁中医杂志,2015,42(1):2251-2253.
- [18] 白雪,关宝生,孙艳男,等. 八月札水提物对H22肝癌荷瘤鼠免疫功能的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(7):1946-1948.
- [19] O'CONNOR M L, XIANG D, SHIGDAR S, et al. Cancer stem cells: a contentious hypothesis now moving forward [J]. *Cancer Lett*, 2014, 344 (2) : 180-187.
- [20] SHAH M M, ZERLIN M, LI B Y, et al. The role of Notch and gammasecretase inhibition in an ovarian cancer model [J]. *Anticancer Res*, 2013, 33 (3) : 801-808.
- [21] MAEK J, ANDERSSON E R. The developmental biology of genetic Notch disorders[J]. *Development*, 2017,144(10):1743-1763.
- [22] CHOI J H, PARK J T, DAVIDSON B, et al. Jagged-1 and Notch3 juxtacrine loop regulates ovarian tumor growth and adhesion [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(14) : 5716-5723.
- [23] STEQ A D, KATRE A A, GOODMAN B, et al. Targeting the notch ligand JAGGED1 in both tumor cells and stroma in ovarian cancer [J]. *Clin Cancer Res*,2011,17(17):5674-5685.
- [24] FENG Z, XU W, ZHANG C, et al. Inhibition of gamma-secretase in Notch1 signaling pathway as a novel treatment for ovarian cancer [J]. *Oncotarget*, 2017,8(5):8215-8225.
- [25] STRATI M, KOTOULA V, KOSTOPOULOS I, et al. Prognostic subcellular Notch2, Notch3 and Jagged1 localization patterns in early triplenegative breast cancer[J]. *Anticancer Res*,2017,37(5):2323-2334.
- [26] 杨秦梅,崔青荣,李彬,等. 姜黄素调控 Notch 信号通路对肺癌干细胞增殖及凋亡的影响[J]. 现代肿瘤医学,2018,26(20):3199-3204.
- [27] JARRIAULT S, LE B O, HIRSINGER E, et al. Delta-1 activation of notch-1 signaling results in HES-1 transactivation[J]. *Mol Cell Biol*,1998,18(12):7423-7431.
- [28] HOPFER O, ZWAHLEN D, FEY M F, et al. The Notch pathway in ovarian carcinomas and adenomas [J]. *Br J Cancer*,2005,93(6):709-718.
- [29] WANG M Y, WANG J, WANG L, et al. Notch1 expression correlates with tumor differentiation status in ovarian carcinoma[J]. *Medical Oncol*,2010,27(4) : 1329-1335.
- [30] 吴世婷,刘丽芳,丁玲,等. 黄芪解毒汤对乳腺癌细胞凋亡及 Notch1 基因表达的影响[J]. 上海中医药大学学报,2017,31(6):49-53.
- [31] 刘云霞,徐叶峰,蒋沈君,等. 益气补肾方调控胃癌干细胞 niche 及 Notch 信号通路抗转移分子机制研究 [J]. 浙江中医药大学学报,2016,40(7):514-522.
- [32] 郭丽华,齐聪,杨红,等. 半枝莲黄酮类单体对人卵巢癌 skov3 细胞增殖的影响[J]. 上海中医药杂志, 2013,47(1):61-65.
- [33] SYED S I, ABDELILAH A. Sequential combination of cisplatin with eugenol targets ovarian cancer stem cells through the Notch-Hes1 signalling pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*,2019,38(1):382-395.

[责任编辑 张丰丰]