

新藤黄酸对 Hep G2 裸小鼠移植瘤的抗肿瘤作用与 MAPK 信号转导通路的关系

刘卫海^{1,2}, 肖国丽², 赖小平^{1,2}, 赵爱国^{1,3*}

(1. 东莞广州中医药大学中医药数理工程研究院, 广东 东莞 523808;
2. 广州中医药大学新药开发研究中心, 广州 510006; 3. 清远医药集团, 广东 清远 511518)

[摘要] **目的:**研究新藤黄酸(neo-gambogic acid, NGA)对 Hep G2 裸小鼠移植瘤的体内抗肿瘤作用及其机制。**方法:**采用 Hep G2 裸小鼠移植瘤模型,造模 7 d 后将模型动物随机分为 5 组,即荷瘤对照组,阳性对照组(5-FU 10.0 mg·kg⁻¹),NGA 高、中、低剂量组(分别为 8.0, 4.0, 2.0 mg·kg⁻¹),隔天 ip 给药 1 次,给药 7 次后处死动物,分离肿瘤,测量肿瘤体积,称瘤重,计算相对肿瘤体积和抑瘤率,并将肿瘤组织切片,采用免疫组化法,检测实体瘤组织的 Bax, Bcl-2, p-ERK1/2, p-MEK1/2 蛋白的表达情况。**结果:**NGA 高、中、低剂量组的平均瘤重[分别为(0.21 ± 0.07), (0.41 ± 0.17), (1.00 ± 0.28)g]均明显低于荷瘤对照组(1.29 ± 0.24)g, NGA 高剂量组的抑瘤率为 83.75%, 高于阳性对照药 5-FU 的抑瘤率 46.54% ($P < 0.05$); Bax 表达量呈剂量依赖性升高, Bcl-2 表达量呈剂量依赖性降低; NGA 给药组 p-ERK1/2 和 p-MEK1/2 的表达量均明显低于荷瘤对照组 ($P < 0.05$)。**结论:**NGA 对 Hep G2 裸小鼠移植瘤具有确切的体内抗肿瘤作用,其作用机制与上调 Bax/Bcl-2 比值而诱导实体瘤细胞凋亡及下调丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导通路的磷酸化水平密切相关。

[关键词] 新藤黄酸; 抗肿瘤; 裸小鼠; 凋亡; 丝裂原活化蛋白激酶

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)19-0179-04

Anti-tumor Effects of Neo-gambogic Acid on Hep G2 Xenografts in Nude Mice Correlated with MAPK Signal Transduction Pathway

LIU Wei-hai^{1,2}, XIAO Guo-li², LAI Xiao-ping^{1,2}, ZHAO Ai-guo^{1,2,3*}

(1. Dongguan Institution for Mathematics and Theoretics Engineering Research, Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan 523808, China; 2. New Drug R&D Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China; 3. Qingyuan Medicine Group, Qingyuan 511518, China)

[Abstract] **Objective:** To study the anti-tumor effect of neo-gambogic acid (NGA) on Hep G2 xenograft in nude mice *in vivo* and its mechanism. **Method:** Sixty healthy BALB/c-nu mice, transplanted by Hep G2 hepatocarcinoma cells, were divided into 5 groups, including model group, 5-FU (10.0 mg·kg⁻¹) group and three groups of neo-gambogic acid in high dose, middle dose and low dose (8.0, 4.0, 2.0 mg·kg⁻¹). The mice were executed after fourteen days of treatment every other day (*qod*) and tumor tissues were excised. The size of tumor tissues was measured and tumor inhibition rate was calculated. Immunohistochemistry was used to detect the expressions of Bax, Bcl-2, p-ERK1/2 and p-MEK1/2. **Result:** the tumor weight of NGA groups was reduced remarkably compared with control group. The tumor inhibition rate of NGA high-dose (8.0 mg·kg⁻¹) group was 83.75%, which excelled the tumor inhibition rate of the 5-FU (10.0 mg·kg⁻¹) group (46.54%, $P < 0.05$). The expression of Bax was up-regulated by NGA dose dependently while the expression of Bcl-2 was down-

[收稿日期] 20120218(004)

[基金项目] 广东省科技计划重点项目(2008A030101002);广东省高等学校科技创新团队项目(06CXTD004);东莞市科技计划高等院校和科研机构项目(2007108101080)

[第一作者] 刘卫海,博士,抗肿瘤药物开发研究,Tel:18924550315,E-mail:lwhworld@foxmail.com

[通讯作者] *赵爱国,博士,副研究员,从事中药药理研究,Tel:13660132332,E-mail:zaghyp@hotmail.com

regulated. The expressions of p-ERK1/2 and p-MEK1/2 in NGA groups were reduced remarkably compared with control group ($P < 0.05$). **Conclusion:** NGA exerts exact anti-tumor effect on Hep G2 xenograft in nude mice *in vivo*. Its mechanism correlates with that the cells in Hep G2 xenograft are induced apoptosis via up-regulating the Bax/Bcl-2 ratio and that the phosphorylation level of mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction pathway is down-regulated.

[**Key words**] neo-gambogic acid; anti-tumor; nude mice; apoptosis; MAPK

新藤黄酸是从中药藤黄中分离到的具有抗肿瘤活性的桥环类化合物,本课题组前期研究已证实,NGA 在体外对肝细胞癌 Hep G2 细胞株有良好的抗增殖作用。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号转导通路是真核生物信号传递网络中的重要途径之一,在基因表达调控和细胞质功能活动中发挥关键作用,已被确定是多种抗肿瘤药物的有效靶点^[1]。在哺乳动物机体中,已经发现 5 种不同的 MAPK 信号转导通路,其中 Ras/Raf/MEK/ERK 级联通路是第一条被确认的通路^[2],与多种信号转导通路相关,蛋白磷酸化是该级联通路的活化形式。本实验在确定 NGA 具有确切的体内抗肿瘤作用的基础上,运用免疫组织化学的方法,检测实体瘤组织 Bax 蛋白、Bcl-2 蛋白、p-ERK1/2 和 p-MEK1/2 的表达情况,研究 NGA 对细胞凋亡相关蛋白及对 MAPK 信号转导通路的影响,进一步揭示 NGA 的抗肿瘤作用机制。

1 材料

1.1 试药与仪器 新藤黄酸(NGA,由广州中医药大学新药开发研究中心制备,纯度 > 95%,批号 20100304,先用乙醇溶解,再用生理盐水稀释至所需浓度,乙醇的终浓度 < 1%),5-氟尿嘧啶(5-FU,上海旭东海普药业有限公司,批号 100610),免疫组化试剂盒(SA1022 兔 IgG 试剂盒,博士德生物技术有限公司),鼠抗人 Bax 抗体(碧云天公司),兔抗人 Bcl-2 抗体(碧云天公司),兔抗人 p-ERK1/2 抗体(北京博奥森公司),兔抗人 p-MEK1/2 抗体(美国 Signalway Antibody 公司)。SW-CJ-2F 型医用净化工作台(苏州净化设备厂),CO-150 型二氧化碳培养箱(美国 NBS 公司);CKX-41-32 型倒置显微镜(日本 Olympus 公司),CU600 型电热恒温水浴锅(上海一恒科学仪器有限公司),MC-1180 显微镜(广州粤显光学仪器有限责任公司)。

1.2 细胞与动物 人肝细胞癌 Hep G2 细胞株,购自中国科学院细胞库,本实验室传代保存。BALB/c-nu 裸小鼠 60 只(SPF 级,体重 15 ~ 20 g,雌雄不限),由南方医科大学实验动物中心提供,实验动物

质量合格证号 0077582;许可证号 SCXK(粤)2006-0015。裸小鼠饲养于广州中医药大学实验动物中心,SPF 级条件下,12 h 采光,12 h 黑暗,恒温(25 ± 2) °C,恒湿(50% ± 10%),饲料和水经消毒后方可使用。实验均严格按照动物实验室有关条例进行。

2 方法

2.1 肝癌 HepG2 裸小鼠移植瘤模型的建立及检测指标 参考文献[3],取指数生长期 Hep G2 细胞,胰酶消化后,用 PBS 洗涤 2 次并混悬,镜下计数,调整细胞密度为 $6.0 \times 10^9/L$,每只裸小鼠背部皮下注射细胞悬液 0.2 mL,即每鼠种植瘤细胞数约为 $1.0 \times 10^9/L$ 。接种后,所有裸小鼠在 SPF 级、恒温(25 ± 2) °C 和恒湿(50% ± 10%)条件下饲养,隔天观察肿瘤生长情况,用游标卡尺测定移植瘤直径,当肿瘤体积达到 50 ~ 150 mm³ 时,将动物随机分组并给药^[4]。分别设荷瘤对照组(ip 体积分数为 0.01 的乙醇生理盐水 20 mL·kg⁻¹);阳性对照组(ip 5-FU 10 mg·kg⁻¹);NGA 高、中、低剂量组(分别 ip NGA 8.0, 4.0, 2.0 mg·kg⁻¹),每组 12 只。以上均隔天给药 1 次,共给药 7 次。给药前称裸小鼠体重,测量移植瘤的最长径(L)和垂直径长(D),计算肿瘤体积(TV)、相对肿瘤体积(RTV)、相对肿瘤增殖率(T/C),绘制生长曲线。给药结束后,次日处死全部动物,剥离肿瘤组织,生理盐水冲洗,滤纸吸干后称重,计算抑瘤率^[5]。

$$TV = 0.5 L \times D^2$$

$$RTV = \frac{TV_t}{TV_0}$$

$$T/C = RTV_{treated} / RTV_{control} \times 100\%$$

TV_0 为分组给药时测量所得肿瘤体积, TV_t 为每一次测量时的肿瘤体积

$$\text{抑瘤率} = (\text{荷瘤对照组平均瘤质量} - \text{实验组平均瘤质量}) / \text{荷瘤对照组平均瘤质量} \times 100\%$$

2.2 免疫组化检测^[6] 将 Hep G2 裸小鼠移植瘤组织用 10% 的甲醛固定后,用脱水石蜡包埋,4 μm 连续切片;将组织切片浸泡于二甲苯中脱蜡 10 min,梯度乙醇浸泡水化;3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶;行抗原微波热修复;滴加 5% BSA(牛血清白蛋

白)封闭液,室温 15 min,甩去多余液体;滴加一抗 4 ℃ 过夜;滴加生物素化二抗,37 ℃ 20 min;滴加链霉素化亲和素试剂,37 ℃ 20 min;DAB 显色,苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封片,镜检,每张片随机观察 6 个高倍视野(400 ×),拍照,用 Imaga-ProPlus 6.0 软件分析计算每张相片的积分吸光值(IA)。阳性判断:以胞浆和(或)胞膜着咖啡色,且着色明显高于背景或背景不着色而细胞着色者为阳性细胞。

2.3 统计学处理 运用 SPSS 11.5 软件包对数据进行统计处理,多组均数间比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用两独立样本 *t* 检验分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对人肝细胞癌 Hep G2 裸小鼠移植瘤生长的抑制作用 接种后第 4 天可见皮下肿瘤生长,出瘤率 100%,移植瘤多呈圆型,实质性,呈局限性膨胀生长,表面凹凸不平,呈多个结节融合状,肿瘤组织

为淡红色鱼肉状,瘤块较大的表面可见增粗的血管网分布。实验中各组无 1 例死亡。实验结果表明,给药后各给药组肿瘤生长曲线(图 1)、肿瘤体积、平均瘤重均明显低于荷瘤对照组,其中 NGA 高、中剂量组对肝癌 Hep G2 裸小鼠移植瘤有较明显的生长抑制作用,抑瘤率均明显高于 5-FU(10.0 mg·kg⁻¹)组。见表 1~2。

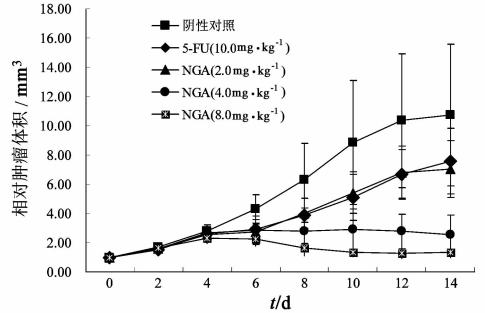


图 1 新藤黄酸对 Hep G2 裸小鼠移植瘤生长曲线的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

表 1 新藤黄酸对 Hep G2 裸小鼠移植瘤肿瘤体积的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	肿瘤体积/mm ³		相对肿瘤体积	相对肿瘤增殖率/%
		给药前	给药后		
荷瘤对照	-	119.75 ± 40.62	1 215.92 ± 288.13	10.72 ± 4.83	100.00
5-FU	10.0	103.92 ± 29.17	750.08 ± 110.76 ¹⁾	7.57 ± 2.24 ¹⁾	70.59
NGA	2.0	111.50 ± 37.58	769.79 ± 97.19 ¹⁾	7.02 ± 1.94 ¹⁾	65.50
	4.0	117.67 ± 53.58	238.92 ± 42.05 ²⁾	2.52 ± 1.37 ²⁾	23.49
	8.0	105.08 ± 37.86	129.67 ± 35.64 ²⁾	1.34 ± 0.36 ²⁾	12.52

注:与荷瘤对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ (表 2~4 同)。

表 2 新藤黄酸对 Hep G2 裸小鼠移植瘤动物体重、瘤的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	体重/g		瘤质量/g	抑瘤率/%
		给药前	给药后		
荷瘤对照	-	22.72 ± 0.78	26.87 ± 1.44	1.29 ± 0.24	-
5-FU	10.0	22.12 ± 1.65	26.92 ± 2.68	0.69 ± 0.17 ²⁾	46.54
NGA	2.0	22.17 ± 0.69	25.85 ± 1.01	1.00 ± 0.28 ¹⁾	22.14 ³⁾
	4.0	22.02 ± 1.33	24.77 ± 1.56	0.41 ± 0.17 ²⁾	68.09 ³⁾
	8.0	22.75 ± 1.36	21.47 ± 1.91	0.21 ± 0.07 ²⁾	83.75 ³⁾

注:与 5-FU 组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 NGA, NGA 中、高剂量组和 NGA(8.0 mg·kg⁻¹)组的 IA 值均明显高于荷瘤对照组,且差异具有统计学意义;NGA 3 个剂量组的 Bcl-2 阳性表达量均明显低于荷瘤对照组,且差异具有统计学意义;3 个 NGA 给药组 Bax/Bcl-2 均高于荷瘤对照组,且呈现剂量依赖性升高趋势。见表 3。

3.3 对 p-ERK1/2 和 p-MEK1/2 蛋白表达的影响 NGA 3 个剂量组的 p-ERK1/2 和 p-MEK1/2 的阳性表达量 IA 均明显低于荷瘤对照组,且差异具有统计

学意义,提示在一定浓度范围内,NGA 可降低肿瘤细胞 ERK1/2 蛋白和 MEK1/2 蛋白的磷酸化水平。见表 4。

表 3 新藤黄酸对 Bax 和 Bcl-2 表达量的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	IA		Bax/Bcl-2
		Bax	Bcl-2	
荷瘤对照	-	9.05 ± 1.85	23.49 ± 4.99	0.39
NGA	2.0	11.67 ± 0.98	14.53 ± 2.01 ¹⁾	0.80 ¹⁾
	4.0	15.20 ± 1.50 ¹⁾	9.69 ± 1.26 ²⁾	1.57 ²⁾
	8.0	24.13 ± 6.13 ²⁾	8.07 ± 2.14 ²⁾	2.99 ²⁾

表 4 新藤黄酸对 p-ERK1/2 和 p-MEK1/2 表达量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$) IA

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	p-ERK1/2	p-MEK1/2
荷瘤对照	-	24.54 ± 5.05	22.64 ± 5.37
NGA	2.0	17.81 ± 2.31 ¹⁾	14.97 ± 2.11 ¹⁾
	4.0	11.55 ± 1.95 ²⁾	9.43 ± 1.37 ²⁾
	8.0	8.44 ± 2.78 ²⁾	8.07 ± 2.21 ²⁾

4 讨论

本实验采用人肝癌 Hep G2 裸小鼠移植瘤模型评价 NGA 的体内抗肝癌作用,评价指标为瘤重抑瘤率与相对肿瘤增殖率,当瘤重抑瘤率 > 30%,连续数次疗效稳定,或相对肿瘤增殖率 T/C ≤ 60%,并经统计学处理差异有显著性时,则评定此药具有体内抗肿瘤作用^[7]。本实验结果表明给药后各给药组的平均瘤重均明显低于生理盐水对照组,其中 NGA 高剂量组(8.0 mg·kg⁻¹)的抑瘤率为 83.75%,T/C 为 12.52%。可认为 NGA 对人肝癌 Hep G2 裸小鼠移植瘤具有较好的治疗作用。

诱导细胞凋亡是药物发挥抗肿瘤作用的重要机制,普遍认为 Bax 和 Bcl-2 两蛋白之间的比例关系是决定细胞凋亡的关键因素之一^[8]。Bcl-2 蛋白具有抗凋亡作用,Bax 是一种与 Bcl-2 相关的蛋白,其功能与 Bcl-2 相反。Bcl-2 家族成员的功能与它们形成同二聚体或异二聚体的能力密切相关,当肿瘤细胞受到凋亡诱导因子的刺激后是否存活取决于 Bax/Bcl-2 的比率,当 Bax 表达增加时,形成 Bax-Bax 同二聚体,加速细胞凋亡;当 Bcl-2 表达增加时,形成 Bax-Bcl-2 异二聚体,抑制细胞凋亡。本实验结果表明,NGA 诱导细胞凋亡时,Bax 表达增加,Bcl-2 减少,同时 Bax/Bcl-2 的比率亦随剂量的升高而逐渐升高,呈现明显的剂量依赖性。结果提示 NGA 诱导细胞凋亡与 Bax 表达增加,Bcl-2 表达减少及 Bax/Bcl-2 的比率升高有关^[9]。

细胞外信号调节激酶(extracellular-signal regulated protein kinase, ERK)包括 ERK1 和 ERK2,是介导细胞周期蛋白 Cyclin D1 表达的限速酶,激活后的 ERK 可促进 Cyclin D1 与 CDK4 和(或)CDK6 结合,继而激活细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK),促进细胞周期的 G₁/S 期转换,引发细胞增殖周期失调而形成肿瘤^[10]。p-ERK1/2 是 ERK 的活化形式,实验结果显示,NGA 在一定剂量范围内,可下调

p-ERK1/2 蛋白水平,说明 NGA 可以通过下调 ERK 信号通路的信号而引起细胞周期阻滞进而抑制细胞的增殖。p-ERK1/2 水平下降的原因有 ERK1/2 表达量的减少和(或)ERK 通路上游激酶水平的降低,后者是主要原因^[11]。本实验结果表明,NGA 同样可降低 ERK 的激酶(p-MEK1/2)的水平,说明 NGA 对 ERK 信号通路的调节点处于 MEK 的上游(如 Raf, Ras 等),其具体的调节点有待进一步的实验证实。

[参考文献]

[1] Maemura K, Shiraishi N, Sakagami K, et al. Proliferative effects of Gamma-aminobutyric acid on the gastric cancer cell line are associated with extracellular signal-regulated kinase1/2 activation [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2009, 24(4): 688.

[2] 孟丽君, 姜藻. Ras/Raf/MEK/ERK 通路靶点药物联合治疗新进展[J]. 肿瘤, 2009, 29(1): 97.

[3] 李军, 李福涛, 开丽, 等. 采用 Hep G2 细胞株建立裸鼠肝癌模型的方法[J]. 四川生理科学杂志, 2002, 24(2): 80.

[4] 程卉, 彭代银, 王效山, 等. 新藤黄酸体内外抗肿瘤作用研究[J]. 中草药, 2008, 39(2): 236.

[5] 龙白, 胡铁辉, 张阳德. DADS 抑制裸鼠肝癌 Hep G2 细胞移植瘤的实验研究[J]. 中南大学学报: 医学版, 2010, 35(7): 711.

[6] 李连琨, 黄云峰, 谢早红, 等. 黄芪注射液对 H22 荷瘤小鼠瘤组织 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(17): 188.

[7] 刘建文. 药理实验方法学-新技术与新方法[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007: 27.

[8] 鄢印根, 林泉峰, 徐焱, 等. 厚朴酚对 MPTP 诱导 PC12 细胞凋亡的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(18): 223.

[9] 刘瑾. 白花蛇舌草和半枝莲配伍微粉对移植性小鼠肝癌肿瘤组织 Bcl-2, Bax 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(21): 227.

[10] 农朝赞, 黄娟娟, 郭凌霄, 等. 苦丁茶熊果酸致鼻咽癌 NCE 细胞增殖能力下降对 ERK 及 Cyclin D1 的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(12): 1678.

[11] 黄坊, 谢明, 景志亮, 等. ERK/MAPK 信号通路活性表达与鼻咽癌细胞增殖凋亡的关系[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2010, 17(15): 1191.

[责任编辑 聂淑琴]