

狼毒提取液对小鼠恶性黑色素瘤 B16 细胞体内转移能力的影响

王园园¹, 王义善^{1,2*}, 杨桂青¹, 杨柯^{1,2}

(1. 滨州医学院中西医结合学院, 山东 烟台 264003;

2. 解放军第 107 医院国家中西医结合肿瘤治疗重点专科, 山东 烟台 264002)

[摘要] **目的:**探讨狼毒提取液对小鼠恶性黑色素瘤 B16 细胞转移能力的影响。**方法:**分别以荷 B16 小鼠模型和小鼠恶性黑色素瘤 B16 细胞实验转移为模型, C57BL/6 小鼠随机分为空白对照组、狼毒 15.0, 20.0 g·kg⁻¹ 组及环磷酰胺组, 检测 ip 狼毒提取液 (EFE) 对小鼠 B16 细胞移植瘤生长和肺转移的影响。免疫组化法分析狼毒提取液对荷 B16 小鼠移植瘤中抑癌转移因子人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源基因 (PTEN) 及促转移因子蛋白激酶 B (p-Akt) 表达水平的影响。**结果:**狼毒提取液明显抑制 B16 细胞的生长, 并能显著抑制其肺转移。ip 狼毒提取液 15.0, 20.0 g·kg⁻¹ 给药 14 d, 对 B16 生长的抑制率分别为 52.9%, 63.6% (环磷酰胺的抑制率为 59.5%); 对 B16 细胞肺转移的抑制率分别为 37.4%, 63.5% (环磷酰胺的抑制率为 56.8%)。免疫组织化学法检测结果显示, 狼毒提取液组胞质中 p-Akt 褐黄色颗粒较空白对照组少见, 而 PTEN 胞浆着黄色则较空白对照组多见。**结论:**狼毒提取液的抗癌转移效果可能部分与其下调促转移因子 p-Akt, 上调抑癌转移因子 PTEN 的表达有关。

[关键词] 狼毒提取液; 恶性黑色素瘤; B16 细胞; 肿瘤转移

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)01-0195-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121029.1621.002.html>

[网络出版时间] 2012-10-29 16:21

Effect of *Euphorbia fischeriana* Extract on Metastatic Ability of Melanoma B16 Cells *in vivo*

WANG Yuan-yuan¹, WANG Yi-shan^{1,2*}, YANG Gui-qing¹, YANG Ke^{1,2}

(1. School of Interation of Traditional and Western Medicine, Binzhou Medical University, Yantai 264003, China;

2. Center for Tumor Treatment of People's Liberation Army 107th Hospital, Yantai 264002, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effect of *Euphorbia fischeriana* extract (EFE) on metastatic ability of melanoma B16 cells *in vivo*. **Method:** The B16 mouse transplanted tumor model and B16 spontaneous motility melanoma metastatic model were established, and C57BL/6 mice were randomly divided into control group, group EFE 15.0, 20.0 g·kg⁻¹ and cyclophosphamide (CTX) group to detect the inhibition effect of EFE for growth of transplanted tumors and metastatic incidence on lung. The expression of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN) and protein kinase B (p-Akt) of transplanted tumors were observed by immunohistochemical method. **Result:** EFE could inhibit the growth of B16 cells and the lung metastasis significantly *in vivo*. The growth inhibition rate of EFE when injected intraperitoneally to mice at concentration of 15.0, 20.0 g·kg⁻¹ were 52.9% and 63.6% respectively (cyclophosphamide was 59.5%); inhibition rate of lung metastasis were 37.4% and 63.5% (inhibition rate of cyclophosphamide was 56.8%). Immunohistochemical

[收稿日期] 20120519(002)

[基金项目] 全军科技攻关计划基金项目(06G034)

[第一作者] 王园园, Tel: 15053532453, E-mail: wangyuan0922@126.com

[通讯作者] * 王义善, 教授, Tel: 0535-2933947, E-mail: wangyishan288@163.com

results indicated that compared with control group, expression of p-Akt in EFE group was less apparent while PTEN expression was more visible than control group. **Conclusion:** EFE could inhibit the metastasis of B16 cells *in vivo*, probably through down-regulating of p-Akt and up-regulating of PTEN expression, and further study are warranted.

[**Key words**] *Euphorbia fischeriana* extract; melanoma; B16 cells; metastasis

肿瘤侵袭和转移是恶性肿瘤的基本生物学特征。恶性黑色素瘤预后不良性主要与其较高的远处转移发生率及侵袭、转移能力较强有关^[1]。在复杂的肿瘤侵袭和转移过程中,涉及多种癌转移相关基因,包括癌基因、抑癌基因、肿瘤转移基因和肿瘤转移抑制基因等。

此前我们已经报告狼毒大戟水提液对多种肿瘤细胞株较强的增殖抑制及凋亡诱导作用,此外,狼毒提取液还可通过调控肿瘤转移相关因子的表达而抑制肿瘤细胞的转移^[2]。前期体外实验证实,狼毒提取液可通过下调小鼠恶性黑色素瘤 B16 细胞 p-Akt (蛋白激酶 B) 表达抑制 PI3K/Akt (磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B) 信号转导通路的活化,进而下调 MMP-2 (基质金属蛋白酶-2)、P70S6K1 (70kDa 核糖体蛋白 S6 激酶) 的表达,降低细胞运动能力,抑制黑色素瘤转移,有望开发狼毒提取液用于恶性黑色素瘤临床治疗中,但仍需在体内对肿瘤转移行为的深入研究。本文报告了 EFE 对小鼠恶性黑色素瘤 B16 细胞体内转移行为的研究结果。

1 材料

1.1 药物与试剂 狼毒 *Euphorbia fischeriana* Stedu 购自鲁南制药有限公司,由烟台市中药研究所鉴定为狼毒大戟的干燥根茎。狼毒提取液由解放军第 107 医院肿瘤实验中心配置,取得济南军区制剂允许(济联制字 2000BM08046,质量浓度相当于生药 2 g·mL⁻¹)。DMEM 培养基、胰蛋白酶及已灭活的胎牛血清均购自美国 Hyclone 公司;PTEN 及 Akt 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔试剂盒均购自 Sigma 公司。

1.2 细胞与动物 小鼠 B16-F10 细胞用含 10% 胎牛血清、100 U·mL⁻¹青霉素和 100 mg·L⁻¹链霉素的 DMEM 培养基,于温度为 37 ℃、5% CO₂ 的饱和湿度恒温培养箱中常规培养,取对数生长期的细胞用于实验。C57BL/6 小鼠,7~8 周龄,体重(21±2)g,雌雄各半,购自北京协和医科大学实验动物中心,实验动物许可证号 SCXK(京)2005-2006。

1.3 仪器 BCN-1360B 型医用超净工作台(东联哈尔仪器制造公司),3111 型二氧化碳培养箱(Thermo 公司),5810R 型台式高速冷冻离心机

(Eppendorf 公司),CKX31 型倒置显微镜(Olympus 公司),TE200-U 型倒置荧光显微镜(Nikon 公司)。

2 方法

2.1 B16 荷瘤小鼠模型肿瘤生长抑制率的检测 每只小鼠背部皮下接种 0.2 mL(4×10⁶ 个细胞) B16 细胞悬液。瘤细胞接种后第 7 天,挑选已成瘤小鼠,随机分组,每组 8 只,雌雄各半。狼毒提取液组每天 ip 狼毒提取液(相当于生药 15.0,20.0 g·kg⁻¹)溶液,共注射 14 d,对照组同时 ip 等量生理盐水,阳性对照组接种当天及第 7 天腹腔注射 0.2 mL 环磷酰胺(50 mg·kg⁻¹)。末次用药后次日颈椎脱位法处死小鼠,剥离原发肿瘤称重并用 10% 中性甲醛固定后用于免疫组化实验。

肿瘤生长抑制率 = (对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 × 100%

2.2 B16 细胞实验转移模型肿瘤转移抑制率的检测 每只小鼠尾静脉接种 0.2 mL(4×10⁶ 个细胞) B16 细胞悬液,肿瘤接种当天开始,狼毒提取液组每天 ip 狼毒提取液溶液(相当于生药 15.0,20.0 g·kg⁻¹)14 d,对照组 ip 等量生理盐水;阳性对照组接种当天、第 7 天 ip 0.2 mL 环磷酰胺(50 mg·kg⁻¹)。末次用药翌日股动脉放血法处死小鼠,剥离肺组织并计数肺表面转移结节总数和大转移结节数(>3 mm),计算肿瘤转移抑制率。

肿瘤转移抑制率 = (对照组平均转移结节数 - 给药组平均转移结节数) / 对照组平均转移结节数 × 100%

2.3 免疫组织化学法检测肿瘤组织 PTEN 及 p-Akt 的表达 免疫组织化学法(SP 法)检测荷 B16 小鼠移植瘤中肿瘤转移基因 PTEN 及 p-Akt 的表达。PTEN 的阳性信号位于胞质,p-Akt 的阳性信号主要位于胞质,胞核中也可见少量表达,均以细胞中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。

2.4 统计学分析 完全随机化设计实验所得结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,资料均数采用 *t* 检验分析。所有数据均用 SPSS 13.0 统计学软件进行统计处理,实验重复 3 次以上,*P* < 0.05 为有统计学意义。

3 结果

3.1 狼毒提取液抑制小鼠 B16 移植瘤的生长 狼

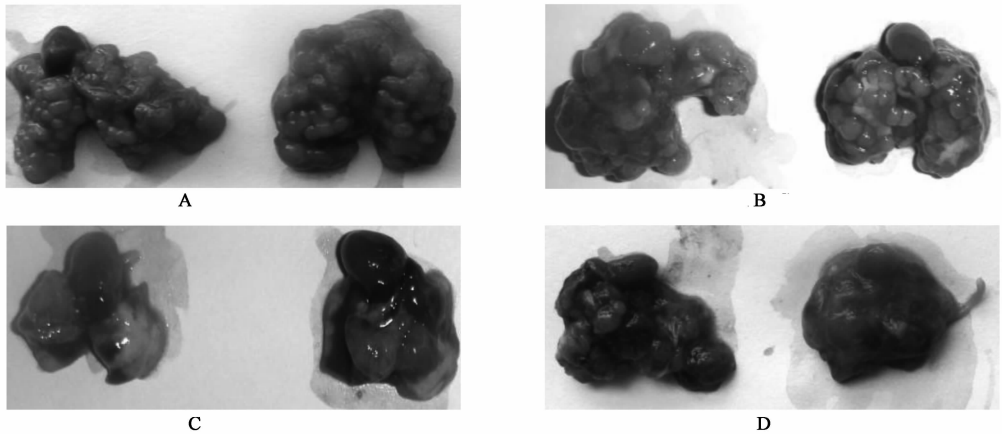
毒提取液组的原发肿瘤明显较对照组体积小,基底窄,易剥离。每天腹腔注射 EFE (15.0, 20.0 g·kg⁻¹) 共 14 d,对 B16 的生长抑制率分别为 52.9% 和 63.6%,环磷酰胺的抑制率为 59.5% (表 1)。

表 1 腹腔注射狼毒提取液 14 d 对荷 B16 小鼠肿瘤的生长抑制情况

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	动物数 (始/末)	平均瘤重 /g	平均抑瘤率 /%
空白对照	-	8/8	1.21 ± 0.36	-
狼毒提取液	15.0	8/8	0.57 ± 0.20 ¹⁾	52.9
	20.0	8/8	0.44 ± 0.21 ²⁾	63.6
环磷酰胺 ³⁾	0.05	8/8	0.49 ± 0.13 ²⁾	59.5

注:与模型组比较¹⁾ P < 0.05, ²⁾ P < 0.01; ³⁾ 于接种当天及第 7 天 ip 给药 (表 2 同)。

3.2 狼毒提取液抑制小鼠 B16 细胞的肺转移 解



A. 空白对照组; B. 狼毒提取液 15.0 g·kg⁻¹组; C. 狼毒提取液 20.0 g·kg⁻¹组; D. 环磷酰胺 50 mg·kg⁻¹组

图 1 狼毒提取液对实验性 B16 细胞肺转移的影响

表 2 狼毒提取液 ip 14 d 对小鼠肿瘤肺转移的抑制情况 (x̄ ± s)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	转移率 /只	转移结节数 /个	转移抑制率 /%
空白对照	-	8/8	42.9 ± 7.2	-
狼毒提到液	15.0	7/8	26.9 ± 9.1 ¹⁾	37.4
	20.0	6/8	15.7 ± 5.3 ²⁾	63.5
环磷酰胺 ³⁾	0.05	7/8	18.5 ± 7.6 ²⁾	56.8

4 讨论

恶性黑色素瘤,来源于神经嵴的黑色素细胞,是致死性最大的皮肤肿瘤^[3]。恶性黑色素瘤预后不良主要与其较高的远处转移发生率及侵袭、转移能力较强有关,临床发现时多已转移,放化疗效果差。现有临床药物治疗中,虽然顺铂和氮烯咪胺对黑色素瘤有效,但其有效率不足 20%^[4]。

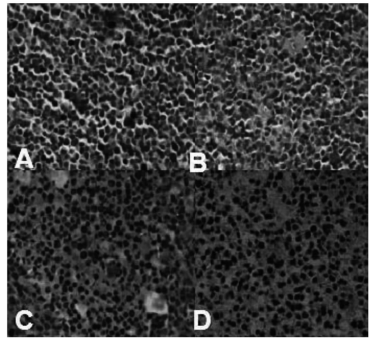
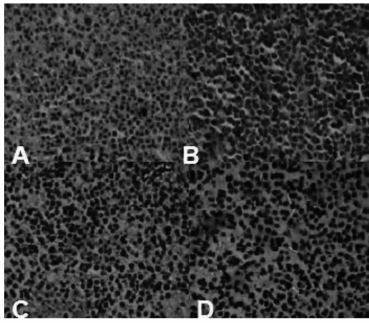
狼毒是一种有极大开发潜能的天然抗癌药物,在我国被用于治疗肿瘤已有较久历史^[5-7]。研究证

剖尾静脉注入 B16 细胞的小鼠并取出肺脏,肉眼即可见对照组小鼠肺表面有较多黑色点状的转移结节,而狼毒提取液 20.0 g·kg⁻¹组的转移结节则很稀少 (图 1)。计数结果表明,15.0, 20.0 g·kg⁻¹狼毒提取液对 B16 细胞肺转移的抑制率分别为 37.4% 和 63.5%,环磷酰胺为 56.8% (表 2)。腹腔注射狼毒提取液显著抑制 B16 细胞肺转移,且其抑制肿瘤转移作用优于环磷酰胺。

3.3 免疫组织化学法检测肿瘤组织 PTEN 及 p-Akt 的表达 免疫组织化学结果显示,p-Akt 对照组 B16 细胞质中出现大量褐黄色颗粒,而在狼毒提取液组细胞中类似颗粒则少见;PTEN 免疫组化结果显示狼毒提取液组 B16 细胞胞浆着黄色 (对照组细胞浆少见着色)。见图 2。

实^[8],狼毒大戟对肿瘤细胞的抑制活性很强,抗癌谱广、副作用小。杨宝印研究发现,狼毒大戟提取液对肝癌、肉瘤的抑瘤率高于农吉利、长春新碱和去甲斑蝥素。而毒性方面,刘萍等^[9]证实,即使剂量增至 360 g·kg⁻¹,其毒性仍远低于治疗剂量下的环磷酰胺。本研究所用狼毒提取液为解放军第 107 医院国家中西医结合肿瘤治疗重点专科研制的狼毒提取液,所含化学成分主要有岩大戟内酯 A、B,黄酮类,狼毒大戟甲、乙素等。以该中心研制的狼毒大戟提取液为研究对象,前期基础研究结果证实^[10-13],狼毒提取液对体外多种肿瘤细胞株具有较强的抑制增殖及诱导凋亡的作用,对机体免疫功能也有明显的促进作用。

最近研究表明,在 30% ~ 50% 的黑色素瘤细胞系和 5% ~ 20% 的黑色素瘤细胞中有 PTEN 基因的改变^[14]。PTEN 的低表达导致其不能有效抑制



A. 空白对照组; B. 狼毒提取液 15.0 g·kg⁻¹组;
C. 狼毒提取液 20.0 g·kg⁻¹组; D. 环磷酰胺 50 mg·kg⁻¹组

图 2 狼毒提取液对小鼠 B16 移植瘤 p-Akt 及 PTEN 的表达影响(免疫组织化学法)

PI3K/Akt 通路的异常活化,从而导致肿瘤转移。激活的 PI3K/Akt 通路可能通过以下途径促进肿瘤细胞的转移:①异常活化 p70^{S6K1} 的表达,促进肌动蛋白的细丝重构,促进细胞运动^[15];②促进下游分子 mTOR 的激活,进而上调基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) mRNA 和蛋白质表达^[16],降解细胞外基质,促进肿瘤细胞的转移;③促进上皮细胞-间充质细胞转换 (EMT),进而下调 E-钙黏蛋白及 β-连环蛋白和上调间充质细胞波形蛋白,降低细胞间黏附力,使肿瘤细胞运动能力增强,赋予肿瘤细胞很强的侵袭、转移能力。

本研究以狼毒提取液为研究对象,以荷 B16 小鼠模型和小鼠恶性黑色素瘤 B16 细胞实验转移为模型,检测了狼毒提取液对小鼠 B16 细胞移植瘤生长和肺转移的影响。实验结果证实,狼毒提取液可能通过下调促转移因子 p-Akt,上调抑癌转移因子 PTEN 的表达而抑制小鼠 B16 细胞移植瘤的生长及实验性转移,值得深入研究。

[参考文献]

[1] Hodi F S, O' Day S J, McDermott D F, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic

melanoma [J]. N Engl J Med, 2010,363(8):711.

[2] 王义善,郑秋生,姜鹏,等.狼毒水提液抗肿瘤的试验研究[J].中华医学进展杂志,2006,4(6):1.

[3] Garbe C, Peris K, Hauschild A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma European consensus based interdisciplinary guideline [J]. Eur J Cancer, 2010,46(2):270.

[4] 金谷,李涛.恶性黑色素瘤药物治疗研究进展[J]. J Oncol, 2010,16(12):976.

[5] 胡虹.中医内病外治之我见[J].中国实验方剂学杂志,2011,17(4):255.

[6] 于大猛,瞿融,范欣生,等.中药“十八反”基层医院应用现状调查[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):267.

[7] 董宇,赵兰英,吴萍,等.生理药代动力学模型的特征及其国内外研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2012,18(1):247.

[8] 简丽,张前程,马惠言.狼毒的有效成分及药理活性研究进展[J].西北药学杂志,2003,18(4):185.

[9] 刘萍,杜鹃,于丽华,等.狼毒大戟水提物对小鼠致突变作用的实验研究[J].山东医科大学学报,2000,38(1):29.

[10] 王义善,姜鹏,马建军,等.中药合剂灌注 RF 透热联合 SFR 治疗肿瘤的临床研究[J].世界肿瘤杂志,2005,4(4):39.

[11] 王义善,郑秋生,贾喜凤,等.狼毒抑制降低癌细胞恶性表型小鼠体内转移及彗星电泳实验研究[J].中医杂志,2006,47(6):148.

[12] 王义善.中药灌注 RF 加温 IMCRT 内外治法于临床肿瘤应用研究[J].中华药学与临床,2007,3(3):1.

[13] 王义善, PDT/IMCRT 同步中药治疗中晚期肿瘤的临床研究[J].医药研究杂志,2008,37(10):28.

[14] Brick A, Ahrenkiel V, Zenthen J, et al. Mutation and allelic loss of the PTEN/MMAC1 gene in primary and metastatic melanoma biopsies [J]. J Invest Dermatol, 2000,114(2):227.

[15] Qian Y, Corum L, Meng Q, et al. PI3K induced actin filament remodeling through Akt and p70S6K1: implication of essential role in cell migration [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004,286(9):153.

[16] Garbe C, Peris K, Hauschild A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma European consensus based interdisciplinary guideline [J]. Eur J Cancer, 2010,46(2):270.

[责任编辑 聂淑琴]