

苦参碱对胶质瘤大鼠模型中 Fas 表达的调节作用的实验研究

戚基萍 刘微 张淑君 咎丽坤 孙玉兰 宋月佳

【摘要】 目的 探讨苦参碱应用前后 C6 脑胶质瘤大鼠模型中 Fas 因子的表达变化及意义。**方法** 采用脑立体定向技术, 将体外培养的 C6 胶质瘤细胞注入大鼠尾状核区制备胶质瘤大鼠模型, 并根据是否用药及用药量的多少分为空白对照组、冰片组、苦参碱低剂量组、苦参碱高剂量组、苦参碱低剂量 + 冰片组、苦参碱高剂量 + 冰片组。通过大鼠生存状态、标本的大体所见、MRI、HE 染色观察苦参碱对胶质瘤大鼠模型生存质量及胶质瘤体积的影响, 用免疫组织化学方法检测苦参碱对胶质瘤大鼠模型肿瘤细胞中 Fas 表达的影响。**结果** 大鼠生存状态、标本的大体所见、MRI 及 HE 染色显示苦参碱可显著提高胶质瘤大鼠模型的生存质量, 抑制胶质瘤细胞增殖。免疫组化结果显示, 苦参碱低剂量 + 冰片组(98.16±11.82)、苦参碱高剂量 + 冰片组(112.80±12.12)Fas 表达高于空白对照组(39.09±7.79)、冰片组(46.87±7.43)、苦参碱低剂量组(42.41±7.83)、苦参碱高剂量组(44.20±7.47), 苦参碱高剂量 + 冰片组 Fas 表达高于苦参碱低剂量 + 冰片组, 差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 苦参碱能增加胶质瘤细胞中 Fas 的表达, 抑制胶质瘤细胞增殖。

【关键词】 苦参碱; 神经胶质瘤; Fas; 细胞凋亡

【中图分类号】 R730.264 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-8925(2009)04-0355-04

Effect of matrine on Fas expression in C6 glioma in rats QI Ji-ping*, LIU Wei*, ZHANG Shu-jun, ZAN Li-kun*, SUN Yu-lan*, SONG Yue-jia. *Department of Pathology, First Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China

【Abstract】 Objective To investigate the effect of matrine on Fas expression in C6 glioma in a tumor-bearing rat model. **Methods** Cultured cerebral glioma C6 cells were injected stereotactically into the left caudate nucleus of the rats. The rats were randomized into untreated group, borneol-treated group, low-dose matrine group, high-dose matrine group, low-dose matrine + borneol group, and high-dose matrine + borneol group. The effect of matrine on the quality of life of the rats and the glioma volume was evaluated according to the survival state of the rats and by gross observation, magnetic resonance imaging (MRI) and HE staining of the brain tissue. Immunohistochemistry was performed to detect Fas expression in the glioma cells. **Results** The survival state of the rats, gross observation of the brain specimen, and results of MRI and HE staining all showed that matrine significantly improved the quality of life of the glioma-bearing rats and inhibited the glioma cell proliferation. Fas expression was significantly higher in low-dose matrine + borneol group (98.16±11.82) and high-dose matrine + borneol group (112.80±12.12) than in untreated group (39.09±7.79), borneol group (46.87±7.43), low-dose matrine group (42.41±7.83), and high-dose matrine group (44.20±7.47)($P < 0.05$). Fas expression was obviously upregulated in the high-dose matrine + borneol group as compared with the low-dose matrine + borneol group ($P < 0.05$). **Conclusion** Matrine can significantly upregulate Fas expression in glioma and inhibit glioma cell proliferation in the glioma-bearing rat model.

【Key words】 Matrine; Glioma; Fas; Apoptosis

神经胶质瘤是人体中枢神经系统最常见的原

发性肿瘤, 死亡率高, 治疗效果差, 手术治疗联合化疗、放疗后患者的平均生存期仍不到一年, 因此寻找能有效治疗胶质瘤的药物有着重要意义。研究表明苦参碱具有较广的抗癌谱, 对多种肿瘤细胞株及移植瘤均有较高的抑制率。C6 脑胶质瘤大鼠模型是常

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-8925.2009.04.008

基金项目: 国家自然科学基金(30470661)

作者单位: 150001 哈尔滨, 哈尔滨医科大学第一临床学院病理科(戚基萍、刘微、咎丽坤、孙玉兰); 150001 哈尔滨, 黑龙江省医院病理科(张淑君); 150001 哈尔滨, 哈尔滨医科大学(宋月佳)

用的筛选抗肿瘤药物的动物模型,是一种较为理想的模型系统^[1],成瘤率高且生长快,具有与自发生长的脑胶质瘤一样的生长和浸润特征,并有血管增生,这与人脑胶质瘤侵袭性生长较为接近。据此,本实验通过建立 C6 脑胶质瘤大鼠模型来探讨苦参碱对胶质瘤大鼠模型的作用,并探讨苦参碱应用前后 C6 脑胶质瘤大鼠模型中 Fas 因子的表达变化及意义。

材料与方法

一、实验材料

1. 细胞系及动物:大鼠胶质母细胞瘤 C6 细胞系从哈尔滨医科大学神经生物实验室购置。健康成年 Wistar 雄性大鼠 60 只,体质量(200±20) g,由哈尔滨医科大学附属第一医院实验动物中心提供。

2. 主要试剂及溶液配置:(1)主要试剂:一抗 Fas (武汉博士德生物工程有限公司,编号为 BA0484), DAB 显色试剂盒及 SP 免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司,编号为 ZLI-9032 和 SP-9001)。(2)苦参碱溶液:苦参碱粉剂购自陕西慧科植物开发公司(编号为 MA20070302,纯度 98%)。将苦参碱溶于生理盐水中,制成 20 mg/mL 溶液,然后滤过除菌,4℃保存备用。(3)冰片溶液:冰片购自同仁堂药店。将 10 g 过筛的冰片溶于 100 mL 的 1%羧甲基纤维素钠助溶液中,制成 0.1 g/mL 的冰片溶液,4℃保存备用。

3. 主要仪器设备:25 μL 微量注射器(上海激光医学仪器厂),立体定位仪(日本 NARISHIGE 公司),MRI 仪(日本 TOSHIBA 公司 1.5 T)。

二、实验方法

1. 脑胶质瘤大鼠模型建立:(1)细胞培养:C6 胶质瘤细胞在 DMEM 培养基中,37℃、5%CO₂ 培养箱中传代培养,培养细胞约 90%融合后,用胰酶消化细胞,用计数板计数细胞达 1×10¹¹ 个/L 后给动物接种。(2)模型制作:术前 12 h 大鼠禁食水,用 10%水合氯醛(330 mg/kg)腹腔麻醉后,固定于立体定向仪上,暴露颅骨,用牙科钻钻一直径 1.0 mm 的小孔,将连接于定向仪上的微量注射器的针尖调节至触及硬脑膜,进针 6 mm,后退 1 mm,使针尖距硬脑膜为 5 mm。将细胞悬液 10 μL 缓慢注入脑内。骨蜡封闭骨孔,缝合皮肤,切口消毒,常规饲养。(3)阳性大鼠模型的确定:模型制作后 10 d 的实验大鼠禁食水 12 h,用 10%水合氯醛(330 mg/kg)腹腔麻醉后,经阴茎静脉注射钆喷酸葡胺 0.2 mL/只,然后进行 MRI 检测。MRI 检测示大鼠右侧尾状核区出现不规则或椭圆形团块状肿瘤(图 1),证明模型建立成功。将经

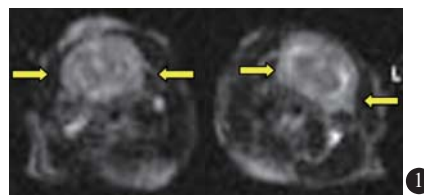


图 1 胶质瘤大鼠模型 MRI 检测

Fig.1 MRI of the glioma-bearing rat model

MRI 检测后模型未建立成功的大鼠弃掉,重新造模,直到成功。

2. 实验动物分组及术后观察:将 MRI 检测后成模的大鼠按随机数字表法分为 6 组,每组各 10 只,其中空白对照组在标准饲养环境下(常温、常湿、自由进食饮水)饲养;冰片组每日给予冰片溶液 1 mL/只灌胃;苦参碱低剂量组每日给予苦参碱溶液 0.5 mL/只腹腔注射;苦参碱高剂量组每日给予苦参碱溶液 1 mL/只腹腔注射;苦参碱低剂量+冰片组每日给予冰片溶液 1 mL/只灌胃后立即给予苦参碱溶液 0.5 mL/只腹腔注射;苦参碱高剂量+冰片组每日给予冰片溶液 1 mL/只灌胃后立即给予苦参碱溶液 1 mL/只腹腔注射。后五组其余饲养条件同空白对照组。6 组于饲养 7 d 后观察大鼠的生存状态(包括精神状态、皮毛色泽、食欲、体重、活动及死亡率等),再进行 MRI 检测,然后处死取大鼠脑组织,观察肿瘤大体标本(包括肿瘤的色泽、质地、包膜、边界、生长方式、体积及继发性改变等)。

3. 脑组织取材:以固定组织内灌注方式取材,用 100~120 mL 温生理盐水经左心尖沿主动脉方向插入细管,冲洗血管内血液,至流出的液体澄清后,再灌注 4%的多聚甲醛 100~120 mL,后断头取脑,置于 4%的多聚甲醛中固定 12 h,然后沿矢状面切开,继续固定 12 h 后,进行脱水、石蜡包埋、切片等。

4. HE 染色:对切片进行 HE 染色,在光学显微镜下观察分析。

5. 免疫组化染色检测 Fas 蛋白的表达:免疫组化 SP 法进行 Fas 染色(工作浓度 1:50),实验过程按照试剂说明书进行。每批染色均设立阳性和阴性对照,以大鼠肝组织做 Fas 阳性对照,以 PBS 代替一抗做阴性对照。DAB 显色,苏木素复染,脱水、透明、封固,显微镜下观察。Fas 阳性细胞以胶质瘤细胞浆和膜出现棕黄色颗粒为标准。每张切片随机选 5 个无重叠高倍视野(400 倍),使用 HMIAS-2000 高清晰度彩色医学图文分析系统进行定量分析,计算目的蛋白表达阴性和阳性的平均吸光度值,血管内皮细胞、肿瘤胶质增生的星形细胞和坏死组织除外。

三、统计学处理

采用统计软件 SPSS11.5 进行处理, 计量资料用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 均数比较用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 SNK 方法, $P\leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

一、大鼠的生存状态

接种 C6 胶质瘤细胞后 10 d 的阳性模型大鼠表现为精神萎靡、毛色失去光泽、运动量下降、攻击性下降、食欲不振、体重下降。在不同处理 7 d 后, 空白对照组、冰片组、苦参碱低剂量组、苦参碱高剂量组大鼠面容不洁、体重明显下降、颅内高压症状明显加重, 有的大鼠出现了眼周淤血, 甚至出现偏瘫、癫痫的症状, 其中空白对照组死亡 1 只, 冰片组死亡 2 只, 而苦参碱低剂量 + 冰片组与苦参碱高剂量 + 冰片组大鼠无颅内高压明显加重的表现。

二、大体标本

接种 C6 胶质瘤细胞后的阳性大鼠模型尾状核区均见团块状肿瘤形成, 肿瘤呈不规则形或椭圆形, 无包膜; 新鲜标本肿瘤组织较周围正常组织颜色深, 边界较清楚; 肿瘤切面实性、色白、呈鱼肉状。在不同处理 7 d 后, 空白对照组、冰片组、苦参碱低剂量组、苦参碱高剂量组大鼠肿瘤体积明显增加, 向周围脑组织浸润性生长, 脑组织中中线结构明显移位, 占位效应明显, 瘤组织内出血坏死明显, 而苦参碱低剂量 + 冰片组与苦参碱高剂量 + 冰片组大鼠肿瘤体积的增加明显受到抑制, 部分大鼠肿瘤内可见钙化灶。

三、肿瘤体积

接种 C6 胶质瘤细胞后 10 d 的阳性大鼠模型肿瘤体积平均为 (14.12 ± 1.05) mm³。在不同处理 7 d 后, 空白对照组 $[(79.24\pm 2.59)$ mm³]、冰片组 $[(81.17\pm 3.06)$ mm³]、苦参碱低剂量组 $[(80.80\pm 2.59)$ mm³]、苦参碱高剂量组 $[(79.98\pm 3.68)$ mm³] 大鼠肿瘤体积明显增加, 而苦参碱低剂量 + 冰片组 $[(53.38\pm 1.69)$ mm³] 与苦参碱高剂量 + 冰片组 $[(39.74\pm 2.93)$ mm³] 大鼠肿瘤体积的增加明显受到抑制。6 组大鼠肿瘤体积比

较差异有统计学意义 ($F=396.230, P=0.000$), 其中与空白对照组比较, 冰片组、苦参碱低剂量组、苦参碱高剂量组差异无统计学意义 ($P>0.05$), 苦参碱低剂量 + 冰片组、苦参碱高剂量 + 冰片组差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与苦参碱低剂量 + 冰片组比较, 苦参碱高剂量 + 冰片组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

四、HE 染色结果

阳性大鼠模型胶质瘤为星形细胞瘤 III 级、IV 级, 表现为瘤细胞丰富、密集, 异型性明显, 偶见瘤巨细胞, 核分裂象多见, 血管增生较丰富, 坏死灶可见。

五、免疫组化染色结果

Fas 蛋白表达水平在空白对照组、冰片组、苦参碱低剂量组、苦参碱高剂量组、苦参碱低剂量 + 冰片组及苦参碱高剂量 + 冰片组中分别为 39.09 ± 7.79 、 46.87 ± 7.43 、 42.41 ± 7.83 、 44.20 ± 7.47 、 98.16 ± 11.82 、 112.80 ± 12.12 。6 组大鼠 Fas 蛋白表达水平比较差异有统计学意义 ($F=117.600, P=0.000$), 其中与空白对照组比较, 冰片组、苦参碱低剂量组、苦参碱高剂量组差异无统计学意义 ($P>0.05$), 苦参碱低剂量 + 冰片组、苦参碱高剂量 + 冰片组差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与苦参碱低剂量 + 冰片组比较, 苦参碱高剂量 + 冰片组差异有统计学意义 ($P<0.05$)。可见, 空白对照组、冰片组、苦参碱低剂量组、苦参碱高剂量组大鼠胶质瘤细胞中 Fas 表达呈弱阳性, 苦参碱低剂量 + 冰片组大鼠胶质瘤细胞中 Fas 表达呈中等阳性, 苦参碱高剂量 + 冰片组大鼠胶质瘤细胞中 Fas 表达呈强阳性 (图 2~4)。

讨 论

苦参碱是传统中药苦参的主要生物碱之一, 其化学分子式为 C₁₅H₂₄N₂O, 相对分子质量为 266 000^[2]。大量研究表明, 苦参碱具有广泛的药理学作用而没有明显的毒副作用^[3-5]。有研究认为苦参碱具有诱导肿瘤细胞凋亡的作用^[6,7]。在本课题组之前的实验中已对苦参碱抑制胶质瘤细胞增殖、诱导其程序性细胞死亡的作用给予了充分的肯定^[8]。而关于苦参碱诱

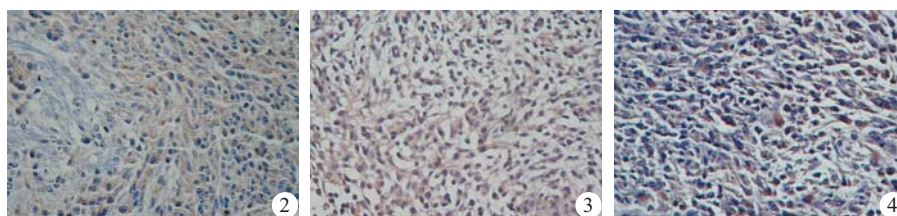


图 2 空白对照组大鼠脑胶质瘤中 Fas 表达呈弱阳性(SP, $\times 400$) 图 3 苦参碱低剂量 + 冰片组大鼠脑胶质瘤中 Fas 表达呈中等阳性(SP, $\times 400$) 图 4 苦参碱高剂量 + 冰片组大鼠脑胶质瘤中 Fas 表达呈强阳性(SP, $\times 400$)

Fig.2 Weak Fas expression in the glioma cells in the untreated group (SP, $\times 400$) **Fig.3** Moderate Fas expression in the glioma cells in low-dose matrine + borneol group (SP, $\times 400$) **Fig.4** Intense Fas expression in the glioma cells in high-dose matrine + borneol group (SP, $\times 400$)

导肿瘤细胞凋亡的机制,目前的研究表明可能与一些凋亡相关基因的表达增强或抑制有关。

神经系统肿瘤的发生和消退与细胞凋亡有着密切的关系。目前研究表明,介导细胞凋亡的途径主要有死亡受体途径、线粒体途径和内质网途径。其中以 Fas 死亡受体途径了解的较为清晰,它是由死亡配体与死亡受体结合后,激活半胱天冬氨酸蛋白酶(Caspase)而导致细胞凋亡,其主要过程包括死亡受体分子的活化、凋亡酶复合体的形成,即 Fas-FasL-FADD-Caspase-8 酶原串联构成的复合物及效应 Caspase 的活化。Fas 是死亡受体途径的重要细胞因子,Fas(Apo-1、CD95)受体属于肿瘤坏死因子受体(TNF)超家族成员,是细胞表面死亡受体。在正常脑组织中 Fas 表达仅限于内皮细胞,但在大多数恶性肿瘤包括脑胶质瘤中却表达,且随胶质瘤级别增高,Fas 表达也增加,呈显著相关。

本实验研究结果表明,与空白对照组、冰片组比较,Fas 在苦参碱低剂量 + 冰片组中表达差异有统计学意义($P < 0.05$),说明苦参碱能显著上调体内胶质瘤细胞的 Fas 蛋白表达,并可能通过提高死亡受体途径中 Fas 的表达来引起胶质瘤细胞凋亡;同时发现 Fas 表达在苦参碱低剂量 + 冰片组和苦参碱高剂量 + 冰片组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),说明高剂量的苦参碱能更有效提高 Fas 的表达,这为以后研究苦参碱治疗胶质瘤的体内用药剂量提供了依据。有研究证明 Fas/FasL 系统诱导细胞凋亡易感性的首要条件是细胞表面 Fas 抗原达到临界水平,苦参碱诱导细胞凋亡可能与增加了细胞表面的 Fas 的表达量有关系。本实验证实了苦参碱能有效提高 Fas 表达,可能通过增加细胞表面的 Fas 的表达量而引起细胞凋亡,也可能与苦参碱作用于 FasL、Caspase 或 Fas 下游信号分子 FADD、Daxx、RIP 等有关,此需进一步深入研究。

肿瘤的体外实验过渡到体内研究是一个质的飞跃,任何的肿瘤诊治手段只有通过临床前体内研究论证后才有可能进入临床应用阶段。因此,本实验建立了大鼠 C6 脑胶质瘤模型来研究苦参碱对大鼠胶质瘤模型的治疗作用。在体内研究中,药物透过血脑屏障是胶质瘤化疗的一个难题。但近年研究证实,中药冰片有增加血脑屏障通透性,促进药物进入脑组织的作用。肖玉强等^[9]给大鼠灌服 10%冰片石蜡油液(15 mL/kg),1 h 后由股动脉注射亚砷酸注射液(0.9 mg/kg),20 min 断头取出脑组织,测得脑组织中砷量明显高于对照组。陈瑞玲等^[10]实验结果显示,冰片组动物按 0.7 g/kg 灌胃给予冰片乙醇溶液,结

果脑脊液中丙戊酸钠浓度及脑脊液与血浆浓度比(C/P)与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$),而血药浓度与对照组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),提示冰片可提高血脑屏障对丙戊酸钠的通透性,增加丙戊酸钠在脑脊液中的分布,但对丙戊酸钠的血清药代动力学无明显影响。本实验在苦参碱低剂量 + 冰片组及苦参碱高剂量 + 冰片组进行腹腔注射苦参碱前先给予冰片灌胃,以保证苦参碱可以通过血脑屏障,实验结果表明 Fas 在空白对照组、冰片组、苦参碱低剂量组、苦参碱高剂量组间差异无统计学意义($P > 0.05$),说明单独应用冰片及单独应用苦参碱对 Fas 表达的影响与空白对照组间无明显差别,因此冰片在本实验中仅起到了促进苦参碱透过血脑屏障的作用,而对 Fas 表达无任何影响,Fas 表达的变化只与应用苦参碱有关。

本实验结果证实苦参碱能显著提高胶质瘤细胞中 Fas 的表达,这可能是苦参碱引起胶质瘤细胞凋亡的途径之一。苦参碱引起胶质瘤凋亡的全部机制有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 吴国祥,余绍祖,李承晏,等. 鼠脑胶质瘤模型的建立[J]. 卒中与神经疾病, 2000, 7(4): 218-220.
- [2] Li Y, Wang B, Zhou C, et al. Matrine induces apoptosis in angiotensin II- stimulated hyperplasia of cardiac fibroblasts: effects on Bcl-2/Bax expression and caspase-3 activation [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2007, 101(1): 1-8.
- [3] Liu J, Zhu M, Shi R, et al. Radix Sophorae flavescens for chronic hepatitis B: a systematic review of randomized trials[J]. Am J Chin Med, 2003, 31(4): 337-354.
- [4] Long Y, Lin XT, Zeng KL, et al. Efficacy of intramuscular matrine in the treatment of chronic hepatitis B [J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2004, 3(1): 69-72.
- [5] Zhu XH, Qiu YD, Shi MK. Effect of matrine on cold ischemia and reperfusion injury of sinusoidal endothelial cells in rat orthotopic liver transplantation[J]. Acta Pharmacol Sin, 2003, 24(2): 169-174.
- [6] Liu XS, Jiang J, Jiao XY, et al. Matrine-induced apoptosis in leukemia U937 cells: involvement of caspases activation and MAPK- independent pathways [J]. Planta Med, 2006, 72 (6): 501-506.
- [7] Luo C, Zhu Y, Jiang T, et al. Matrine induced gastric cancer MKN45 cells apoptosis via increasing pro-apoptotic molecules of Bcl-2 family[J]. Toxicology, 2007, 229(3): 245-252.
- [8] 张淑君,戚基萍,成秉林,等. 苦参碱诱导 C6 胶质瘤细胞程序性死亡的实验研究[J]. 现代生物医学进展, 2008, 8(4): 637-641.
- [9] 肖玉强,张良玉,唐海涛,等. 冰片促进神剂透过血脑屏障实验研究[J]. 中华神经外科疾病研究杂志, 2007, 6(3): 244-246.
- [10] 陈瑞玲,赵志刚,张星虎,等. 冰片对丙戊酸钠透过血脑屏障的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(2): 151-153.

(收稿日期:2008-11-19)

(本文编辑:刘凯)