

· 实验研究 ·

海兔素对小鼠 H₂₂ 移植瘤侵袭及免疫调节影响*

王青¹, 梁惠¹, 刘颖², 戈娜¹, 马爱国¹

摘要:目的 观察海兔素对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤生长侵袭的影响及免疫调节作用。方法 昆明小鼠 40 只, 随机分为模型组、海兔素低、中、高剂量组 ($n=10$)。各组小鼠左前腋下皮下接种 H₂₂ 肝癌细胞, 建立小鼠 H₂₂ 移植性肿瘤模型, 次日除模型组外, 海兔素低、中、高剂量组分别以 25、50、100 mg/kg 海兔素灌胃, 于 15 d 后处死, 剥离肿瘤, 称重, 计算抑瘤率; 采用免疫组化法测定肿瘤组织中基质金属蛋白酶-9 (MMP-9)、血管内皮生长因子 (VEGF) 及增殖细胞核抗原 (PCNA) 表达, 酶联免疫吸附试验测定血清中白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 水平。结果 低、中、高剂量海兔素组小鼠抑瘤率分别为 28.31%、33.84%、42.96%, 呈量效依赖性; 经 50、100 mg/kg 海兔素处理后, 小鼠肿瘤组织中 MMP-9 表达阳性率分别为 (54.29 ± 6.41)%、(29.31 ± 3.15)%, 明显低于模型组 (74.80 ± 8.06)%; VEGF 和 PCNA 阳性表达逐渐下降, 呈剂量效应关系 ($P < 0.05$); 中、高剂量海兔素组小鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 水平 [分别为 (0.34 ± 0.050)、(0.37 ± 0.04) 和 (1.26 ± 0.21)、(1.49 ± 0.17) $\mu\text{g/L}$], 均明显高于模型组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 海兔素可抑制 H₂₂ 小鼠肿瘤增长, 其机制可能与海兔素抑制肿瘤组织细胞外基质降解以及新生血管形成, 同时提高机体免疫能力有关。

关键词: 海兔素; H₂₂ 肿瘤; 基质金属蛋白酶-9 (MMP-9); 血管内皮生长因子 (VEGF); 增殖细胞核抗原 (PCNA); 白细胞介素-6 (IL-6); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。

中图分类号: R 181.2*4 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2014)10-1265-03 DOI: 10.11847/zgggws2014-30-10-09

Effect of aplysin on invasion and immunomodulatory of hepatocarcinoma 22 in mice

WANG Qing*, LIANG Hui, LIU Ying, et al (*Institution of Nutrition, Medical College of Qingdao University, Qingdao, Shandong Province 266021, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of aplysin on tumor invasion and immunomodulation in mice with hepatocarcinoma-22 (H₂₂) implantation. **Methods** Forty Kunming mice were randomly divided into four groups: model group and aplysin treatment groups (25, 50, 100 mg/kg⁻¹/d⁻¹) and H₂₂ cells were inoculated subcutaneously into left anteromedial of the mice of all the groups. Except for the model group, all the mice in the other 3 groups were treated with aplysin of different dosage by gavage on the second day and sacrificed after 15 days. We weighed the tumor tissue and calculated the tumor inhibition rate. The expressions of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9), vascular endothelial growth factor (VEGF), and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in tumor tissue were determined simultaneously with immunohistochemistry. And the levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in serum were measured with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results** Aplysin decreased the tumor weight significantly in a dose-dependent manner, with the tumor inhibition rates of 28.31%, 33.84%, and 42.96%, respectively. For the mice with aplysin treatment at the concentrations of 50 and 100 mg/kg⁻¹/d⁻¹, the expressions of MMP-9 were 54.29 ± 6.41% and 29.31 ± 3.15%, and were significantly different from that of model group (74.80 ± 8.06%). The expressions of VEGF and PCNA were obviously inhibited in a dose-effect manner ($P < 0.05$). In moderate and high-dose aplysin treatment groups, the level of IL-6 in serum were 0.34 ± 0.050 and 0.37 ± 0.04 and the TNF- α were 1.26 ± 0.21 and 1.49 ± 0.17, which were significantly higher than those of model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Aplysin could inhibit tumor growth by suppressing extracellular matrix degradation and angiogenesis and improving the immune capacity in mice.

Key words: aplysin; H₂₂ tumor; MMP-9; VEGF; PCNA; IL-6; TNF- α

肝细胞癌是中国最常见的恶性肿瘤之一, 具有发病隐匿, 转移率高, 预后较差等特点。目前, 化疗作为治疗肝癌的常用方法之一, 在杀伤肿瘤细胞的同时, 也会对机体正常细胞造成严重损害。因此寻找一种高效, 低毒的抗癌药物成为近年来人们关注

的焦点。海兔素是从三列凹顶藻提取物中分离纯化得到的一种溴代倍半萜脂溶性化合物, 在海兔和红藻凹顶藻属中广泛存在^[1]。研究发现, 海兔素具有抗氧化作用^[2], 对乳腺癌^[3]、胃癌^[4]和 S180 肉瘤^[5]均具有抑制作用。本研究以海兔素为干预物, 观察

* 基金项目: 山东省科技发展计划 (2012YD15011); 国家“十二五”科技支撑计划 (2012BAD33B01)

作者单位: 1. 青岛大学医学院医学营养研究所, 山东 青岛 266021; 2. 青岛大学医学院细胞与分子生物学实验室

作者简介: 王青 (1988 -), 女, 山东烟台人, 硕士在读, 研究方向: 营养与食品卫生学。

通讯作者: 梁惠, E-mail: qdlianghui@126.com

数字出版日期: 2014-4-8 14:07

数字出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140408.1407.038.html>

其对 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤的抑制作用,并探讨其可能的作用机制,为海兔素应用于临床肿瘤治疗提供理论依据。结果报告如下。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器 海兔素从三列凹顶藻中提取纯化(青岛大学医学院医学营养学重点实验室),并经红外线、核磁共振碳谱,核磁共振氢谱法鉴定为溴代倍半萜海兔素(aplysin),分子式为 C₁₅H₁₉OBr,分子量为 295。使用时以大豆色拉油为溶剂。兔抗小鼠增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)、基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinases-9, MMP-9)抗体、免疫组化试剂盒(北京中山生物技术有限公司);小鼠白介素-6(interleukin 6, IL-6)试剂盒(北京博奥森生物技术有限公司);小鼠肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α, TNF-α)试剂盒(美国 R&D 公司)。LEICARM 2135 切片 机(德国 Leica Biosystems);ZMN-7803 型自动组织包埋机(常州华利电子公司);Olympus-BX50 显微镜(日本 Olympus 公司);Simple PCI 图像分析系统(v5.2, 美国 Compix 公司);BioTek ELxS08 型酶标仪(西安明克斯检测设备有限公司)。

1.2 实验动物及瘤株 清洁级昆明小鼠 40 只, 18~23 g, 雄性, 由青岛市实验动物中心提供, 许可证号: SCXK(鲁)2009-007。H₂₂ 小鼠肝癌细胞株(中国医学科学院药物研究所), 山东医学科学院药物研究所药室低温冻存保种, 复苏后传 5~7 代的细胞悬液进行实验。

1.3 分组与处理 40 只昆明小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为 4 组, 分别为模型组、海兔素低、中、高剂量组, 每组 10 只, 各组小鼠于左前肢腋窝皮下接种浓度为 2 × 10⁶ 个/mL H₂₂ 瘤细胞悬液 0.2 mL, 24 h 后, 模型组给予大豆色拉油灌胃, 海兔素低、中、高剂量组小鼠分别给予海兔素 25、50、100 mg/kg, 灌胃容量为 0.5 mL; 连续 2 周, 观察小鼠生长状况。末次给药 24 h 后, 小鼠称重, 摘眼球取血, 处死。无菌条件下解剖小鼠, 取肝脏并剥离肿瘤, 准确称重, 计算抑瘤率。抑瘤率(%) = (模型组平均瘤质量 - 海兔素组平均瘤质量) / 模型组平均瘤质量 × 100%。

1.4 指标与方法

1.4.1 MMP-9、VEGF、PCNA 表达检测 采用免疫组化法, 将小鼠新鲜肿瘤组织常规石蜡切片, 按照免疫组化试剂盒说明进行操作, 二氨基联苯胺显色, 中性树胶封固, 镜检, 采用 Simple PCI 图像分析系统,

每组切片随机选取 5 张, 高倍镜下(200 ×) 随机在每张切片中选取 10 个视野, 测定吸光度值(A), 其中 MMP-9、VEGF 阳性信号均以胞浆内出现棕黄色颗粒为判定标准, PCNA 则以胞核内出现棕黄色颗粒为判定标准, A 值越大, 表明 MMP-9、VEGF、PCNA 阳性表达越强。

1.4.2 小鼠血清中 IL-6、TNF-α 水平检测 采用酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)法, 将血液样品 37 °C 孵育, 促凝血, 1500 r/min 离心 2~3 次, 每次 20 min, 至血清析出, 取上清放置 -20 °C 备用。临用前平衡至室温, 按照试剂盒操作说明测定细胞因子 IL-6、TNF-α 浓度。

1.5 统计分析 计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 Q 检验, 检验水准为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结 果

2.1 小鼠一般状态及成瘤情况 实验期间, 模型组小鼠死亡 1 只, 为肿瘤生长所致; 海兔素低剂量组 1 只、中剂量组 1 只、高剂量组 2 只小鼠死亡, 皆为灌胃机械损伤所致。海兔素组小鼠精神状态良好, 皮毛较光洁, 活动基本正常; 肿瘤生长潜伏期为 3 d, 生长缓慢。模型组小鼠精神萎靡且消瘦, 毛色晦暗, 活动迟缓, 出现张口呼吸, 肿瘤生长潜伏期为 2 d, 生长较快; 各组小鼠成瘤率 100%, 接种后第 16 天全部处死。

2.2 海兔素对 H₂₂ 瘤的抑制作用(表 1) 与模型组比较, 海兔素低、中、高剂量组小鼠 H₂₂ 肿瘤增长均较缓慢, 平均瘤质量降低, 差异具有统计学意义(P < 0.05), 呈剂量效应关系; 随着海兔素剂量增加, H₂₂ 肿瘤抑瘤率逐渐升高。

表 1 海兔素对 H₂₂ 小鼠肿瘤抑制作用($\bar{x} \pm s$)

组别(mg/kg)	n	瘤质量(g)	抑瘤率(%)
模型组	9	2.73 ± 0.82	—
海兔素 25	9	1.96 ± 0.54 ^a	28.31
50	9	1.81 ± 0.60 ^{ab}	33.84
100	8	1.56 ± 0.38 ^{abc}	42.96

注: 与模型组比较, a P < 0.05; 与 25 mg/kg 海兔素组比较, b P < 0.05; 与 50 mg/kg 海兔素组比较, c P < 0.05。

2.3 海兔素对小鼠 H₂₂ 肿瘤组织中 MMP-9、VEGF 和 PCNA 表达影响(表 2) 与模型组比较, 海兔素中、高剂量组小鼠 H₂₂ 肿瘤组织中 MMP-9、VEGF、PCNA 表达显著降低, 差异具有统计学意义(P < 0.05), 呈剂量效应关系。

2.4 海兔素对 H₂₂ 小鼠血清中 IL-6、TNF-α 水平影

响(表 3) 与模型组比较,海兔素 50、100 mg/kg 组小鼠血清中细胞因子 IL-6、TNF- α 水平明显升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 海兔素对 H₂₂ 小鼠肿瘤组织中 MMP9、VEGF 和 PCNA 表达影响($A, \bar{x} \pm s$)

组别(mg/kg)	n	MMP-9	VEGF	PCNA
模型组	9	74.80 \pm 8.06	0.23 \pm 0.04	0.22 \pm 0.02
海兔素 25	9	71.75 \pm 7.88	0.22 \pm 0.02	0.20 \pm 0.03
50	9	54.29 \pm 6.41 ^{ab}	0.13 \pm 0.02 ^{ab}	0.18 \pm 0.02 ^a
100	8	29.31 \pm 3.15 ^a	0.12 \pm 0.02 ^{ab}	0.10 \pm 0.03 ^{abc}

注:与模型组比较, a $P < 0.05$; 与 25 mg/kg 海兔素组比较, b $P < 0.05$; 与 50 mg/kg 海兔素组比较, c $P < 0.05$ 。

表 3 海兔素对 H₂₂ 小鼠血清中 IL-6、TNF- α 水平影响($\mu\text{g/L}, \bar{x} \pm s$)

组别(mg/kg)	n	IL-6	TNF- α
模型组	9	0.24 \pm 0.05	0.89 \pm 0.10
海兔素 25	9	0.27 \pm 0.04	1.01 \pm 0.12
50	9	0.34 \pm 0.05 ^{ab}	1.26 \pm 0.21 ^a
100	8	0.37 \pm 0.04 ^{ab}	1.49 \pm 0.17 ^{ab}

注:与模型组比较, a $P < 0.05$; 与 25 mg/kg 海兔素组比较, b $P < 0.05$ 。

3 讨论

MMP-9 是金属基质蛋白酶的一个亚型,具有调节细胞间黏附、降解细胞外基质(ECM)等作用。研究发现, MMP-9 在肝癌组织中的高表达,与肝癌的侵袭和转移密切相关^[6-8]。另外, MMP-9 也可通过促进 VEGF 释放,间接促进肿瘤血管形成。VEGF 是目前公认的诱导和促进血管生成的关键因子,而肝癌是典型的富血管肿瘤,因此血管的生成对肿瘤的生长和转移具有重要意义。郭荣平等^[9]指出, PCNA 和 VEGF 在肝肿瘤的发生过程中具有协同作用。PCNA 是一种细胞周期调节蛋白,直接参与 DNA 合成,其表达的高低与细胞增殖活性呈正相关。本研究结果显示,海兔素可剂量依赖性抑制 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织中 MMP-9、VEGF 和 PCNA 的表达。提示海兔素可能通过阻断细胞外基质降解、新生血管形成以及肿瘤细胞的增殖等过程,从而抑制肝癌的增殖、侵袭和转移。研究发现,海洋菇类化合物不仅能抑制肿瘤细胞增殖^[10-12],而且能够改善机体的免疫功能^[13-14]。IL-6 是一种免疫调节因子,具有调节机体免疫应答作用。张琪等^[15]研究发现, IL-6 在肿瘤细胞变性坏死区域的表达明显增强,提示与肿瘤细胞凋亡有关。TNF- α 是一种多效细胞因子,可直接或间接杀伤肿瘤细胞^[16]。Salako

等^[17]发现,抑制 TNF- α 的表达可增强细胞毒活性。本研究结果显示,各剂量海兔素组荷瘤小鼠血清中 IL-6 和 TNF- α 的水平明显升高。提示海兔素可能通过促进 IL-6 和 TNF- α 分泌,增强机体免疫功能,从而发挥抗肿瘤作用。

参考文献

- [1] 贺娟,梁惠,李元,等. 海兔素对 D-半乳糖诱导衰老小鼠抗氧化作用[J]. 中国公共卫生, 2009, 25(9): 1122-1123
- [2] Ge N, Liang H, Liu Y, et al. Protective effect of aplysin on hepatic injury in ethanol-treated rats [J]. Food Chem Toxicol, 2013, doi:10.1016/j.fct.2013.08.071.
- [3] 马文龙,梁惠,刘颖. 海兔素对人乳腺癌 SK-BR-3 细胞的抑制作用及机制研究[J]. 天然产物研究与开发, 2012, 24(9): 1201-1205
- [4] 刘颖,梁惠,苏爱,等. 海兔素对人胃癌细胞 SGC-7901 增殖和凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(3): 333-337.
- [5] 刘颖,梁惠,徐宏伟,等. 海兔素对 S180 荷瘤小鼠的抑瘤活性及其免疫作用的实验观察[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(11): 1403-1405.
- [6] Chen R, Cui J, Xu C, et al. The significance of MMP-9 over MMP-2 in HCC invasiveness and recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection [J]. Ann Surg Oncol, 2012, doi:10.1245/s10434-011-1836-1837.
- [7] Sze KM, Wong KL, Chu GK, et al. Loss of phosphatase and tensin homolog enhances cell invasion and migration through AKT/Sp-1 transcription factor/matrix metalloproteinase 2 activation in hepatocellular carcinoma and has clinicopathologic significance [J]. Hepatology, 2011, 53(5): 1558-1569.
- [8] Nart D, Yaman B, Yilmaz F, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in predicting prognosis of hepatocellular carcinoma after liver transplantation [J]. Liver Transpl, 2010, 16(5): 621-630.
- [9] 郭荣平,俞武生,韦玮,等. PCNA 在接受过术前经导管肝动脉栓塞化疗的肝癌组织中的表达及其预后意义 [J]. 癌症, 2008, 27(2): 201-205.
- [10] Satomi Y. Fucoxanthin induces GADD45A expression and G1 arrest with SAPK/JNK activation in LNCap human prostate cancer cells [J]. Anticancer Res, 2012, 32: 807-813.
- [11] Cheung FWK, Li C, Che CT, et al. Geoditin A induces oxidative stress and apoptosis on human colon HT29 cells [J]. Mar Drugs, 2010, 8: 80-90.
- [12] Hong JY, Boo HJ, Kang JI, et al. (1S, 2S, 3E, 7E, 11E)-3, 7, 11, 15-Cembratetraen-17, 2-olide, a cembrenolide diterpene from soft coral *Lobophytum sp.*, inhibits growth and induces apoptosis in human colon cancer cells through reactive oxygen species generation [J]. Biol Pharm Bull, 2012, 35: 1054-1063.
- [13] 梁惠,贺娟,张士瑾,等. 凹顶藻菇类化合物抑瘤活性及其对免疫作用的研究 [J]. 中国海洋药物, 2005(1): 6-9.
- [14] 刘克为,梁惠,高华. 海藻菇类化合物对 H₂₂ 小鼠 IL-6 和 TNF- α 水平的影响 [J]. 中国海洋药物, 2009(4): 9-12.
- [15] 张琪,杨鸣琦,王根群,等. 新城疫病毒和康莱特注射液联合抗肿瘤试验中瘤组织的病理变化及 IL-6 表达的研究 [J]. 中国兽医杂志, 2010, 46(10): 33-34.
- [16] 李卫,刘佳,自家媛,等. α 肿瘤坏死因子的研究进展 [J]. 动物医学进展, 2010, 31(12): 108.
- [17] Salako MA, Kulbe H, Ingemarsdotter CK, et al. Inhibition of the inflammatory cytokine TNF- α increases adenovirus activity in ovarian cancer via modulation of cIAP1/2 expression [J]. Molecular Therapy, 2010, 19(3): 490-499.

收稿日期: 2013-12-26

(解学魁编校)