

斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤凋亡的影响

晏容¹, 刘云², 朱欣婷¹, 易小飞¹, 刘流¹, 张云辉³, 李晓飞^{1*}

¹遵义医学院基础医学院; ²遵义医学院医学与生物学研究中心, 遵义 563003; ³贵州柏强制药有限公司, 贵阳 550001

摘要: 建立人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤模型, 实验组每只裸鼠瘤周注射斑蝥素酸镁 6.26×10^{-5} mmol, 对照组给予相同容积的无菌生理盐水瘤周注射。给药 22 d 后, 观察斑蝥素酸镁对皮下移植瘤增殖的影响, 并在此基础上, 利用 HE 染色观察药物对人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织形态学特征的影响。实验发现斑蝥素酸镁组移植瘤细胞体积变小、胞浆固缩、嗜酸性变, 细胞核固缩、碎裂。透射电镜观察人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织超微结构的改变, 镜下见斑蝥素酸镁组移植瘤细胞核膜基本消失、核染色质聚集成团等改变。免疫组化二步法检测人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织中 bcl-2、bax 的表达水平, 结果显示斑蝥素酸镁组瘤组织中 bcl-2 的表达低于生理盐水组, 而 bax 的表达高于生理盐水组 ($P < 0.05$)。本实验提示斑蝥素酸镁能明显抑制人肝癌裸鼠皮下移植瘤的增殖, 并能诱导移植瘤细胞发生凋亡, 其机制可能与上调 bax 和下调 bcl-2 表达有关。

关键词: 斑蝥素酸镁; 裸鼠; 皮下移植瘤; 细胞凋亡

中图分类号: R93

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.02.008

Effect of Magnesium Cantharidate on the Apoptosis of Subcutaneous Transplantation Tumor from Human Hepatoma Cells SMMC-7721 in Nude Mice

YAN Rong¹, LIU Yun², ZHU Xin-ting¹, YI Xiao-fei¹, LIU Liu¹, ZHANG Yun-hui³, LI Xiao-fei^{1*}

¹Basic Medicine School, Zunyi Medical College; ²Medical and Biological Research Center, Zunyi Medical College, Guizhou Zunyi 563003, China; ³Guizhou Baiqiang Pharmaceutical, Guizhou Guiyang 550001, China

Abstract: The model of subcutaneous transplantation tumor from human hepatoma cells SMMC-7721 in nude mice was established. Each nude mice was injected with magnesium cantharidate (6.26×10^{-5} mmol) around the tumor in experimental group, while the same volume of sterile saline was injected as control group. After administration for 22 days, the effect of magnesium cantharidate on the proliferation of subcutaneous transplantation tumor was observed. On the basis of that, the histomorphologic characteristics of subcutaneous transplantation tumor in nude mice was observed by HE staining. HE staining showed that the volume of transplantation tumor cells in magnesium cantharidate group became smaller, cytoplasm pyknosis, acidophilic degeneration, nuclear pyknosis and fragmentation. The ultra-structural changes of subcutaneous transplantation tumor in nude mice was observed by transmission electron microscopy. The results showed that the nuclear membrane of transplantation tumor in magnesium cantharidate group disappeared, chromatin gathered together, etc. The expression level of bcl-2 and bax was detected by Two-step immunohistochemistry. The results showed that the expression of bcl-2 in magnesium cantharidate group was obviously lower, but the expression of bax was higher than that of control group ($P < 0.05$). The study indicated that magnesium cantharidate can inhibit the proliferation of subcutaneous transplantation tumor from human hepatoma cells in nude mice and induce the apoptosis of transplantation tumor cells. The mechanism may be related with the up-regulation of the expression of bax and down-regulation of the expression of bcl-2.

Key words: magnesium cantharidate; nude mice; subcutaneous transplantation tumor; cell apoptosis

收稿日期: 2014-07-14

接受日期: 2014-10-10

基金项目: 国家自然科学基金(81260488); 贵州省科技厅社会发展攻关项目(2012-3082); 贵州省科技厅社会发展攻关项目(2011-3031); 贵州省优秀科技教育人才省长资金(2010-48)

* 通讯作者 Tel: 86-852-8609647; E-mail: lixiaofei35@gmail.com

斑蝥素是一种来源于抗癌昆虫——斑蝥的抗肿瘤活性物质, 对原发性肝癌、腹水型肝癌等具有良好治疗效果^[1], 但由于其水溶性差, 造成在使用上的诸多不便。目前, 国内已有研究者制备出水溶性较

好的斑蝥酸钠,并将其开发为注射液广泛应用于临床治疗(如:贵州柏强制药有限公司开发的《斑蝥酸钠维生素 B6 注射液》)。本课题组在此基础上,以斑蝥素为原料研制出一种水溶性和体外抗癌活性都较好的斑蝥素盐类衍生物——斑蝥素酸镁^[2,3]。为了进一步明确该化合物的体内抗癌活性,课题组构建了人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤模型,并对斑蝥素酸镁的体内抑癌机制进行了初步研究,以期为下一步开发打下基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

1.1.1 药物

斑蝥素酸镁由自制斑蝥素合成而来,已授权国家发明专利^[4]。

1.1.2 肝癌细胞株

人肝癌细胞 SMMC-7721 购自中国科学院细胞库。

1.1.3 实验动物

BALB/C 裸鼠,4 周龄,体重 15 ~ 17 g,雄性,购于重庆腾鑫生物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2009-0004;在遵义医学院实验动物中心 SPF 级条件下饲养,动物实验室合格证号:SYXK(黔)2011-003。

1.1.4 试剂

RPMI-1640 培养基购自美国 GIBCO 公司;南美胎牛血清、胰蛋白酶购自美国 HYCLONE 公司;鼠抗人 AFP 单克隆抗体、SP 免疫组化试剂盒、PV6001 二步法免疫组化检测试剂盒及鼠抗人 bcl-2、bax 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.1.5 仪器

3131 型 CO₂ 培养箱,美国 Thermo 公司;超净工作台,苏州净化设备有限公司;倒置显微镜,日本 Nikon 公司;Nikon YS100 光学显微镜,日本 Nikon 公司;H-7550 型透射电镜,日本 Hitachi 公司;JEM-1400 型透射电镜,日本电子公司;细胞图像分析系统,德国 Leica 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 肝癌细胞的培养

人肝癌细胞 SMMC-7721 采用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 培养箱培养。

1.2.2 人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤模型的建立

取对数生长期的肝癌细胞 SMMC-7721, PBS 洗两次,用 0.25% 胰酶消化,1000 rpm 离心 5 min,收集细胞,镜下计数。生理盐水调整细胞密度为 1×10^7 /mL,每只取 0.2 mL 接种于裸鼠腋窝皮下,接种后每日观察裸鼠成瘤情况。随机挑取已成瘤的裸鼠三只,颈椎脱位法处死裸鼠,取移植瘤标本。置于 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色后用光镜观察移植瘤组织病理学变化。同时按照 SP 试剂盒说明书进行免疫组化染色。阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。AFP 染色的阳性判断:肿瘤细胞胞浆出现黄色或棕黄色物质。最后结合移植瘤组织病理学变化和 AFP 染色结果确定人肝癌裸鼠皮下移植瘤模型是否成功建立。

1.2.3 实验动物分组及处理

实验随机分为两组,分别为生理盐水组($n = 5$)、斑蝥素酸镁组($n = 5$)。待移植瘤体积大小约 150 ~ 250 mm³ 开始用药,以每只裸鼠 6.26×10^5 mmol 剂量的斑蝥素酸镁进行瘤周注射,对照组给予相同容积的无菌生理盐水瘤周注射,注射隔日一次,共计 11 次;22 d 后,观察裸鼠皮下移植瘤生长情况,并取出实体瘤作后续研究。

1.2.4 人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织形态特征的观察

取斑蝥素酸镁组、生理盐水组移植瘤标本,置于 10% 福尔马林中固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察移植瘤的组织形态特征。

1.2.5 透射电镜观察人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织超微结构

移植瘤标本置于 3.5% 戊二醛进行前固定;PBS 冲洗后用 1% 锇酸后固定 2 h;常规梯度丙酮脱水;梯度 Epon812 包埋剂浸透,纯包埋剂包埋并聚合;超薄切片;染色;透射电子显微镜下观察。

1.2.6 免疫组化法检测人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织中 bcl-2、bax 的表达

将瘤体于 10% 福尔马林固定,常规石蜡包埋,切片。按照 PV6001 二步法免疫组化检测试剂盒说明进行操作。阴性对照用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗。将切片置于光镜下观察,细胞质和细胞膜染成棕黄色或棕褐色的即为 bcl-2、bax 阳性细胞。采用 Image-Pro Plus 图像分析软件对 bcl-2、bax 的表达进行定量分析(每张切片随机选取 5 个高倍镜视

野,测量每个视野下阳性细胞的平均光密度值)。

1.2.7 统计学分析

数据用 SPSS 13.0 软件包进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

2 结果与讨论

2.1 人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤模型的建立

裸鼠皮下移植瘤模型是常用的一种肿瘤实验研究模型,具有方法简便、成瘤率高、易于观察、测量等优点^[5],因而在肿瘤研究中得了广泛应用。本试验将人肝癌细胞 SMMC-7721 接种于裸鼠皮下以观察肿瘤生长情况。结果显示:平均 8 ~ 10 d 裸鼠腋窝皮下接种处出现瘤块,成瘤率 100%,随着饲养时间的延长,瘤块逐渐增大(图 1),无自发消退现象。



图 1 裸鼠成瘤

Fig. 1 Tumor formation in nude mice

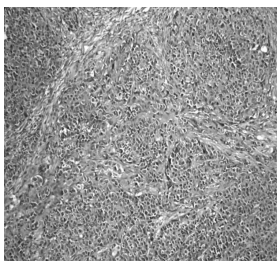


图 2 移植瘤组织 HE 染色($\times 100$)

Fig. 2 HE staining of transplantation tumor tissue ($\times 100$)

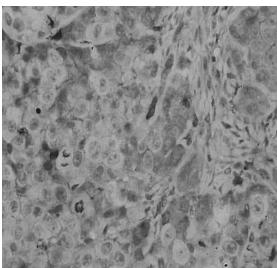


图 3 移植瘤组织 AFP 染色($\times 400$)

Fig. 3 AFP staining of transplantation tumor tissue ($\times 400$)

HE 染色,在光学显微镜下可见,肿瘤细胞呈大小不等实性、巢团状分布,未见明确坏死灶,间质纤维组织增生、玻变(图 2)。AFP 染色呈阳性即肿瘤细胞浆可见棕黄色物质(图 3)。HE 染色、AFP 染色证实为肝细胞性肝癌组织,表明裸鼠皮下移植瘤模型建立成功。

2.2 斑蝥素酸镁对人肝癌裸鼠皮下移植瘤增殖和组织形态的影响

斑蝥素酸镁处理 22 d 后,与生理盐水对照组比较,斑蝥素酸镁处理组皮下移植瘤的体积明显小于对照组(图 4),可见斑蝥素酸镁对皮下移植瘤增殖有较强的抑制作用。在此基础上,可以利用组织形



图 4 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤增殖的影响

Fig. 4 The effects of magnesium cantharidate on the proliferation of subcutaneous transplantation tumor from human hepatoma cells SMMC-7721 in nude mice

注:A 为生理盐水组;B 为斑蝥素酸镁组

Note: A was saline group; B was magnesium cantharidate group

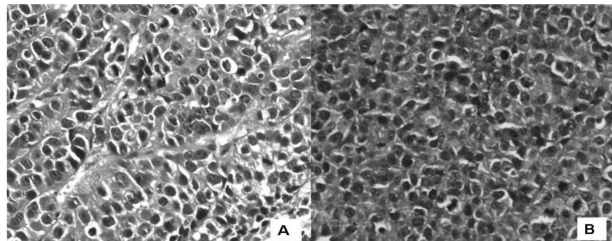


图 5 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤组织形态的影响(HE 染色 $\times 400$)

Fig. 5 The effects of magnesium cantharidate on the histomorphology of subcutaneous transplantation tumor from human hepatoma cells SMMC-7721 in nude mice (HE staining $\times 400$)

注:A 为生理盐水组;B 为斑蝥素酸镁组。

Note: A was saline group; B was magnesium cantharidate group.

态学方法进一步检测其细胞凋亡情况。从图 5A 中可以看出,生理盐水组:裸鼠移植瘤细胞排列呈条索状、厚度约 3~8 层,条索间可见裂隙状血窦,肿瘤细胞呈圆形、多边形,胞浆丰富,红染,细胞核大、深染,可见病理性核分裂。斑蝥素酸镁组:癌细胞胞浆固缩、嗜酸性变。细胞核固缩、碎裂(图 5B)。

2.3 斑蝥素酸镁对人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织超微结构的影响

在 HE 染色法的基础上进一步结合透射电镜进行观察,透射电镜是最经典可靠的判定细胞凋亡的方法,被认为是鉴定细胞凋亡的金标准。镜下见生理盐水组移植瘤细胞表面有细小突起,核质比正常,核膜核仁清晰,粗面内质网、线粒体清晰可见(图 6A)。斑蝥素酸镁组移植瘤细胞核膜基本消失,染色质聚集成团,细胞质均质,细胞器基本消失(图 6B)。形态学检测表明斑蝥素酸镁在裸鼠体内可诱导肝癌细胞凋亡。

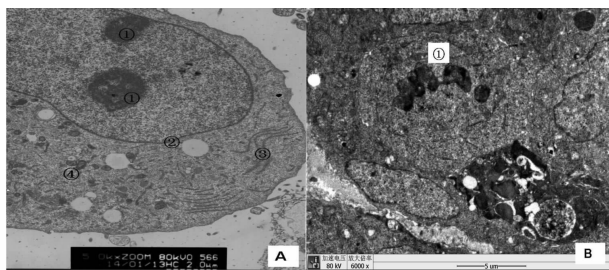


图 6 斑蝥素酸镁对人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤组织超微结构的影响

Fig. 6 The effects of magnesium cantharidate on the ultrastructure of subcutaneous transplantation tumor from human hepatoma cells SMMC-7721 in nude mice

注:A 生理盐水组 ①核仁,②核膜,③粗面内质网,④线粒体;B 斑蝥素酸镁组 ①染色质聚集成团。

Note: A saline group ①nucleolus, ②nuclear membrane, ③rough endoplasmic reticulum, ④ mitochondria; B magnesium cantharidate group ①chromatin gathered together.

2.4 斑蝥素酸镁对人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织中 bcl-2、bax 表达的影响

2.4.1 染色观察

光镜下观察细胞质和细胞膜染成棕黄色或棕褐色的即为 bcl-2、bax 阳性细胞。从图 7A、7B 可见,斑蝥素酸镁组瘤组织中 bcl-2 阳性细胞数量与着色强度低于生理盐水组。从图 7C、图 7D 可见,斑蝥素酸镁组瘤组织中 bax 阳性细胞数量与着色强度高于生理盐水组。

2.4.2 图像分析平均光密度值测定

斑蝥素酸镁组瘤组织中 bcl-2 阳性细胞的平均光密度值(0.172 ± 0.024),显著低于生理盐水组(0.318 ± 0.063)($P < 0.05$)。斑蝥素酸镁组瘤组织中 bax 阳性细胞的平均光密度值(0.483 ± 0.124),显著高于生理盐水组(0.219 ± 0.071)($P < 0.05$)。

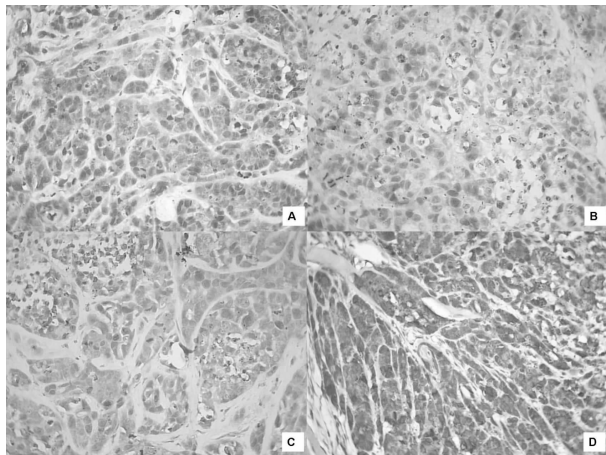


图 7 斑蝥素酸镁作用后人肝癌细胞 SMMC-7721 裸鼠皮下移植瘤组织中 bcl-2、bax 的表达($\times 400$)

Fig. 7 The expressions level of bcl-2, bax of subcutaneous transplantation tumor from human hepatoma cells SMMC-7721 in nude mice treated by magnesium cantharidate ($\times 400$)

注:A:生理盐水组 bcl-2 染色;B:斑蝥素酸镁组 bcl-2 染色;C:生理盐水组 bax 染色;D:斑蝥素酸镁组 bax 染色。

Note: A: bcl-2 staining in the groups with saline; B: bcl-2 staining in the groups with magnesium cantharidate; C: bax staining in the groups with saline; D: bax staining in the groups with magnesium cantharidate.

研究表明,细胞凋亡受细胞内多种基因调控^[6]。其中,bcl-2 和 bax 基因均属于 bcl-2 家族中的重要成员。bcl-2 基因是目前公认的重要的细胞凋亡调控基因,Schindler 等实验发现 bcl-2 基因可以通过抑制细胞凋亡,延长细胞寿命而促进肿瘤的发生^[7]。而 bax 是目前研究最深入的促凋亡基因之一,其编码的 Bax 蛋白能够促进细胞凋亡^[6]。本实验采用免疫组化法检测人肝癌裸鼠皮下移植瘤组织中 bcl-2、bax 的表达水平,结果显示斑蝥素酸镁组瘤组织中 bcl-2 的表达低于生理盐水组,而 bax 的表达高于生理盐水组。

3 结论

本实验通过对瘤体大小、HE 染色组织形态

学、透射电镜、bax 和 bcl-2 凋亡相关蛋白一系列指标的比较研究,初步探讨了斑蝥素酸镁的体内抗癌机制。研究结果显示斑蝥素酸镁能明显抑制人肝癌裸鼠皮下移植瘤的增殖;并能诱导移植瘤细胞发生凋亡,其机制可能与上调 bax 和下调 bcl-2 表达有关。

参考文献

- Huang TK (黄泰康). Commonly used Traditional Chinese Medicine Composition and Pharmacological Manual, the Second Volume. Beijing: Chinese Medical Science and Technology Press, 1994. 1651.
- Liu Y (刘云), Hu SS (胡姗姗), Lou FM (娄方明), et al. Inhibitory effect of magnesium cantharidate on proliferation of lung adenocarcinoma. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2013, 24: 26-28.
- Li XF (李晓飞), Lou FM (娄方明), Yan R (晏容), et al. Inhibitory effect on human hepatoma QGY-7703 cell exposed to three kinds of cantharidate. *Chin J Gerontol* (中国老年学杂志), 2013, 33: 2049-2050.
- Li XF (李晓飞). Magnesium cantharidate and its preparation method; Chinese, ZL201110149288. 5, 2013-04-17.
- Wang W, Kim SH, El-Deiry WS. Small molecule modulators of p53 family signaling and antitumor effects in p53 deficient human colon tumor xenografts. *Proc Nat Acad Sci USA*, 2006 (29): 11003-11008.
- Guo QL (郭青龙). *Oncological Pharmacology*, Version 1. Beijing: Chemical Industry Press, 2008. 67-68.
- Schindler CK, Shinoda S, Simon RP, et al. Subcellular distribution of Bcl-2 family protein and 14-3-3 within the hippocampus during seizure-induced neuronal death in the rat. *Neurosci Lett*, 2004, 356: 163-166.
- Li Y, Wang J, Zhong J. Recovery of ganoderic acids from *Ganoderma lucidum* mycelia by macroporous adsorption resins. *Biotechnol Bioproc Eng*, 2012, 17: 326-336.
- Xu YX (徐玉霞), Wang HB (王华斌). Purification technology of *Malus micromalus* Makino flavonoids by macroporous adsorbent resins. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2012, 24: 1297-1302.
- Shan T, Sun W, Wang X, et al. Purification of ustiloxins A and B from rice false smut balls by macroporous resins. *Molecules*, 2013, 18: 8181-8199.
- Bode HB, Zeeck A. UV mutagenesis and enzyme inhibitors as tools to elucidate the late biosynthesis of the spirobisanthralenes. *Phytochemistry*, 2000, 55: 311-316.
- Bode HB, Wegner B, Zeeck A. Biosynthesis of cladospirone bisepoxide, a member of the spirobisanthralene family. *J Antibiot*, 2000, 53: 153-157.
- Li Y, Wang J, Zhong J. Recovery of ganoderic acids from *Ganoderma lucidum* mycelia by macroporous adsorption resins. *Biotechnol Biorproc Eng*, 2012, 17: 326-336.
- Mou Y, Meng J, Fu X, et al. Antimicrobial and antioxidant activities and effect of 1-hexadecene addition on palmarumycins C₂ and C₃ yields in liquid culture of endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12. *Molecules*, 2013, 18: 15587-15599.
- Mou Y, Luo H, Mao Z, et al. Enhancement of palmarumycins C₁₂ and C₁₃ production in liquid culture of endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12 after treatments with metal ions. *Int J Mol Sci*, 2013, 14: 979-998.
- Phillips T, Chase M, Wagner S, et al. Use of in situ solid-phase adsorption in microbial natural product fermentation development. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, 40: 411-425.
- Xu L, Liu Y, Zhou L, et al. Enhanced beauvericin production with in situ adsorption in mycelial liquid culture of *Fusarium redolens* Dzf2. *Process Biochem*, 2009, 44: 1063-1067.
- Zhao J, Li Y, Shan T, et al. Enhancement of diepoxin ζ production with in situ resin adsorption in mycelial liquid culture of the endophytic fungus *Berkleasium* sp. Dzf12 from *Dioscorea zingiberensis*. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, 27: 2753-2758.

(上接第 209 页)