“肠复方”对裸鼠肠癌原位移植瘤缺氧诱导因子-1α及基质金属蛋白酶-2的影响

梁 慧[1] 李 伟[2] 曾 伟[1] 尚 姣[1] 谢胜军[2] 李晓萍[2]
(1.中南大学湘雅医学院附属肿瘤医院,湖南长沙 410013;2.湖南中医药大学,湖南长沙 410208)

摘 要 目的:探讨肠复方对小鼠肠癌原位移植瘤缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的影响。方法:将裸鼠采用原位瘤块接种法建立人结肠癌原位移植瘤模型,造模成功后的50只裸鼠随机分入模型组、氟尿嘧啶(5-Fu)组和肠复方低、中、高剂量组,每组10只,相应干预4周后采取标本。采用免疫组化法检测各组小鼠瘤体HIF-1α与MMP-2的表达。结果:与模型组比较,肠复方中、高剂量组小鼠肿瘤组织中HIF-1α与MMP-2的表达明显下调,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:缺氧诱导因子-1α及基质金属蛋白酶-2高表达与肠癌发生发展有关,肠复方有降低HIF-1α、MMP-2表达的作用。

关键词 肠复方 大肠癌 缺氧诱导因子-1α 基质金属蛋白酶-2 实验性肿瘤 裸鼠
中图分类号 R735.3 **文献标志码** A **文章编号** 1672-397X(2016)04-0075-03

肿瘤的侵袭与转移受肿瘤微环境相关因素的影响[1]。缺氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1α,HIF-1α)产生于肿瘤乏氧的微环境中,是在缺氧条件下普遍存在于人和哺乳动物细胞内的一种核转录因子,对维持体内氧稳态起重要的调节作用,是肿瘤进展的始动因素。研究表明,HIF-1α在许多肿瘤中高表达,通过参与多种靶基因的转录调控影响肿瘤生物学特性,在肿瘤发生发展中起重要作用[2]。基质金属蛋白酶-2(matrixmetalloproteinase,MMP-2)是降解细胞外基质的最重要的一种蛋白酶,参与了肿瘤的转移过程。前期动物实验显示肠复方具有提高肠癌原位移植瘤裸鼠的生存率、抑制肿瘤细胞增殖、诱导肿瘤细胞凋亡、降低肝转移率的作用。本研究通过观察肠复方对小鼠肠癌原位移植瘤缺氧诱导因子HIF-1α、MMP-2表达的影响,探索肠复方抑瘤机理。

1 实验材料

1.1 实验细胞 人结肠腺癌细胞株HCT-116(编号TCHu99),购自中科院上海细胞库。

1.2 实验动物 BALB/c裸鼠60只,雄性,5~6周龄,平均体重(20±2)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,动物许可证号:SCXK(湘)2011-0003。在师大医学院动物实验中心SPF条件下饲养并自由饮食,动物实验中心许可证号:SYXK(湘)2014-0006。

1.3 实验试剂 胎牛血清购自浙江天杭生物科技有限公司;RPMI 1640、PBS青霉素和链霉素混合、0.25%胰蛋白酶购自Hyclone公司;DMSO购自SIGMA公司。SABC免疫组化试剂盒、鼠抗人HIF-1α单克隆抗体和鼠抗人MMP-2单克隆抗体均购自中杉金桥。

1.4 实验仪器 超净工作台购于北京亚泰隆公司;MD-U53V型超低温冰箱购于日本SANYO公司;5%二氧化碳培养箱产于上海三藤仪器公司;倒置生物显微镜购于北京中显恒业仪器;5702R型台式低速离心机购于德国Eppendorf公司;恒温箱购于北京市六一仪器厂;切片机购于德国;IMS细胞图像分析系统购自基尔顿生物科技(上海)有限公司。

1.5 实验药物 中药肠复方所需药材购自湖南省肿瘤医院中药房,药物组成:黄芪15g、党参10g、白术10g、薏苡仁15g、山药15g、陈皮9g、壁虎10g、地鳖虫3枚、白花蛇舌草20g、半边莲10g、菟丝子10g(包)、女贞子10g、苏木10g、莪术10g。取药后先用清水500mL浸泡药物30min,然后武火煎沸,改文火煎1h,保留药渣,提取药液,再煎加水300mL,煎煮1h,提取药液,取2次药液混合,浓煎至每毫升含肠复方生药2.6g/mL。肠复方低、中、高剂量组中药

基金项目:湖南省科技厅项目(2012TT2034)

给药剂量分别相当于 50kg 人等效剂量的 0.5、1 和 2 倍。采用人和动物间按体表面积折算的等效剂量比值表计算，参照小鼠灌胃容量每日 0.4mL/只，配置肠复方高、中、低剂量组给药浓度分别为 2.6、1.3、0.65g/mL。用标示好的消毒玻璃瓶保存，4℃冰箱冷藏备用。5-氟尿嘧啶注射液(5-FU)购自上海旭东海普药业有限公司，批号：FA141201，规格：250mg/支。

2 实验方法

2.1 大肠癌细胞悬液制备 常规复苏大肠癌 HCT-116 细胞，将细胞培养于含 10%胎牛血清 RPMI 1640 培养液中，置于 37℃、含 5%CO_2 的培养箱内培养并传代。取对数生长期的细胞，用 0.25%胰蛋白酶加 0.02%EDTA 消化液消化收集。使用 PBS 配制成细胞密度为 2×10^6 个/mL 的单细胞悬液。

2.2 瘤源制备 取制备好的大肠癌 HCT-116 细胞悬液 0.1mL，即接种细胞数为 1×10^7/mL，注射到 4 只 BALB/C 小鼠右腋下，10d 后可长出直径约 1cm 左右的实体瘤，作为原位移植瘤的瘤源。

2.3 裸鼠原位移植瘤模型建立 处死皮下瘤源小鼠，皮肤消毒，剥离皮下肿瘤，立即浸入含青霉素、链霉素各 100U/mL 的生理盐水中，剔除周围结缔组织，取肿瘤中心近边缘处肉眼观呈鱼肉状的组织，剪碎成 1mm³ 大小的瘤块备用。将待造模的小鼠分别称重，5%水合氯醛(40mg/kg)腹腔内注射麻醉后，取仰卧位，固定四肢，络合碘消毒腹部术野，左下腹部切口入腹，显露盲结肠，用 4 号针头轻轻刮去盲结肠交界处少许浆膜，有血液渗出，随机选取 1 粒已制备好的瘤块贴于划破处，轻轻往里推压后于其表面滴 1 滴 OB 胶，见瘤块迅速粘牢(约 10s)，观察无活动性出血后将外置肠段回纳入腹，缝合腹壁。待小鼠麻醉清醒后置于清洁级动物房中常规饲养。整个操作过程遵循无菌操作原则。

2.4 分组及干预 按随机数字表法将造模成功的 50 只裸鼠随机分组至模型组、氟尿嘧啶(5-Fu)组和肠复方高、中、低剂量组，每组 10 只。造模后第 14 天开始给药干预：模型组给予生理盐水灌胃，0.4mL/只，1 次/d，每周 5d，并予氟尿嘧啶等量生理盐水腹腔注射，1.5mg/次，每周 2 次；肠复方高、中、低剂量组分别予相应浓度药液灌胃给药，0.4mL/只，1 次/d，每周 5d，并予氟尿嘧啶等量生理盐水腹腔注射，每周 2 次；5-FU 组按人腹腔给药 500~750mg 折算为 1.5mg/次(约 0.16mL)，腹腔注射，每周 2 次，并生理盐水灌胃，剂量与次数同模型组。上述干预均连续 4 周。

2.5 标本处理 干预 4 周后停药 1d，以颈椎脱臼法处死小鼠，剖腹剥离移植瘤组织，采用 10%甲醛溶液固定 48h，酒精梯度脱水，浸蜡，石蜡包埋，切片，厚度约 4μm。

2.6 检测指标及方法

2.6.1 HIF-1α、MMP-2 表达检测 采用免疫组化 SABC 两步法检测 HIF-1α、MMP-2 在肿瘤组织中的表达，方法如下：将各组已包埋好的肿瘤组织切片，常规脱蜡水化，3%H_2O_2 去离子水孵育 10min，以阻断内源性过氧化物酶。磷酸盐缓冲液(PBS)洗 2 次，每次 3min，分别滴加 HIF-1α、MMP-2 鼠抗人单克隆抗体 20μL，4℃过夜，PBS 洗，滴加 SABC 试剂稀释液(1:200)，37℃孵育 20~30min，PBS 冲洗。二氨基联苯胺(DAB)显色，苏木精复染，脱水封片。HIF-1α 阳性细胞为细胞核染色成棕黄色、细胞浆不着色细胞；MMP-2 蛋白阳性细胞为细胞质被染成棕黄色颗粒的细胞。

2.6.2 免疫组化的判定标准 采用半定量积分法，综合考虑阳性细胞百分率和显色强度来判定结果：计算阳性细胞百分率并赋予分值，≤5%为 0 分，6%~25%为 1 分，26%~50%为 2 分，51%~75%为 3 分，>75%为 4 分；观察显色强度并赋予分值，无着色为 0 分，浅黄色为 1 分，黄色为 2 分，棕黄色为 3 分。两者积分相乘判断阳性：阴性≤1 分；阳性≥2 分。

2.7 统计学方法 采用 SPSS17.0 软件对数据进行统计分析处理，半定量积分采用($\bar{x}\pm s$)描述，组间比较采用卡方检验(χ^2)，以 $P<0.05$ 为有统计学差异。

3 实验结果

各组小鼠由于灌胃不当或自然死亡，实验结束时模型组死亡 2 只，肠复方低剂量组死亡 1 只，肠复方高剂量组死亡 1 只，5-FU 组死亡 2 只。死亡小鼠数据予以剔除。

各组小鼠瘤体 HIF-1α、MMP-2 阳性表达见表 1、图 1、图 2。肠复方中、高剂量组及 5-FU 组小鼠瘤体 HIF-1α、MMP-2 阳性表达均明显低于模型组($P<0.01$)；肠复方低剂量组与模型组比较 HIF-1α、MMP-2 阳性率有所降低，但差异均无统计学意义($P>0.05$)；肠复方高剂量组 HIF-1α 阳性率明显低于肠复方中剂量组及 5-FU 组($P<0.05$)。

表 1 各组小鼠瘤体 HIF-1α、MMP-2 阳性表达率比较 %(只)

组别	动物数(只)	HIF-1α 阳性表达	MMP-2 阳性表达
模型组	8	75.0(6/8)	75.0(6/8)
肠复方低剂量组	9	66.7(6/9)	66.7(6/9)
肠复方中剂量组	10	50.0(5/10)**	50.0(5/10)**
肠复方高剂量组	9	33.3(3/9)**#	55.6(5/9)**
5-FU 组	8	50.0(4/8)**	62.5%(5/8)**

注：** 与模型组比较，$P<0.01$；# 与肠复方中剂量组、5-FU 组比较，$P<0.05$。

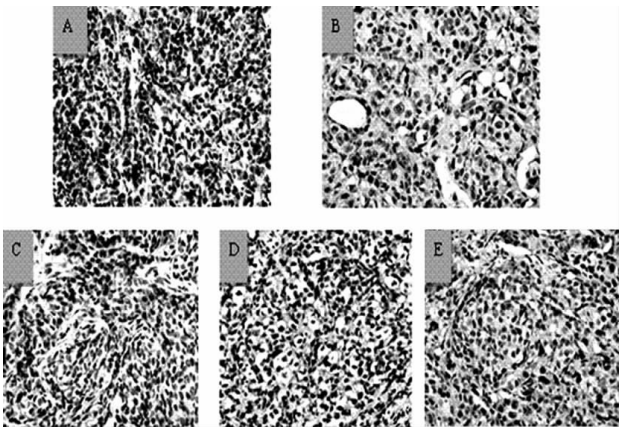

图1 各组肠癌原位移植瘤裸鼠肿瘤组织中 HIF-1α 表达情况(DAB,×400)

(注:A.模型组;B.肠复方低剂量组;C.肠复方中剂量组;D.肠复方高剂量组;E.5-FU 组)

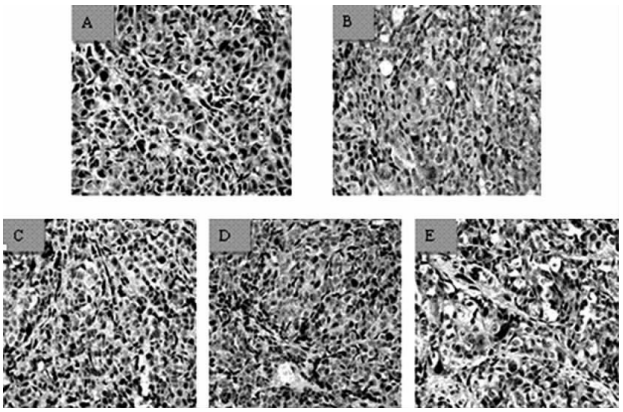

图2 各组肠癌原位移植瘤裸鼠肿瘤组织中 MMP-2 表达情况(DAB,×400)

(注:A.模型组;B.肠复方低剂量组;C.肠复方中剂量组;D.肠复方高剂量组;E.5-FU 组)

4 讨论

大肠癌的发病与肿瘤微环境的改变密切相关,HIF-1 和 MMP-2 是微环境中主要的相关因子[3],HIF-1 是由 120kD HIF-1α 和 91~94kD HIF-1β 两个亚单位组成的异源二聚体,编码的基因分别位于染色体第 14 号的 q21、q24 区和第 1 号的 q21 区。HIF-1α 是缺氧条件下存在于人体内的一种异源二聚体核转录因子,与肿瘤血管生成、肿瘤相关炎症、肿瘤上皮间转化密切相关。有研究已证明 HIF-1α 在大多数实体癌中及某些癌前病变中呈过度表达[2]。MMP-2 即明胶酶 A(gelatinase A)是 MMP 家族中的一个成员,MMP-2 以前酶原的形式由多种细胞如成纤维细胞、巨噬细胞、内皮细胞和恶性肿瘤细胞等分泌,其基因位于人类染色体 16q21,由 13 个外显子和 12 个内含子组成,结构基因总长度为 27kb。因其能降解结缔组织及细胞外基质大分子如胶原、蛋白多糖、层蛋白及纤维连接蛋白等,可能在肿瘤侵袭和转移过程中发挥重要作用。HIF-1 和 MMP-2 在肠癌组织中均有过度表达。

中药在临床抗肿瘤中取得良好疗效,其抗肿瘤靶点众多,能够通过抑制肿瘤细胞增殖、诱导凋亡、抑制侵袭转移和调节免疫等多途径抑制肿瘤的生长,其中调节肿瘤组织微环境是中药抗肿瘤作用机制的研究热点[4]。

肠复方是临床应用于肠癌的有效方剂。方中白花蛇舌草、半枝莲、莪术等经研究可通过下调 HIF-1α 和 MMP-2 的表达调节肠癌微环境[5-7]。前期我们针对肠癌裸鼠原位移植瘤模型干预实验显示肠复方有抑制瘤体生长、延长荷瘤小鼠生存时间、改善小鼠生存状态的作用。本研究结果显示,肠复方能明显抑制肿瘤细胞 HIF-1α 及 MMP-2 的表达,其中肠复方高、中剂量效果更为明显。我们推测肠复方可能通过调节 HIF-1α 和 MMP-2 蛋白表达,从而抑制肿瘤周围新生血管的形成,抑制肿瘤的浸润与远处转移而发挥抑瘤作用。众所周知,中药的抗肿瘤作用是多靶点的,肠复方的抗肿瘤机制是否与改善肠道微环境、外周血循环及改善免疫介导等有关还有待进一步分析研究。

参考文献

[1] CATALANO V,TURDO A,DI FRANCO S,et al.Tumor and its microenvironment:a synergistic interplay[J].Semin Cancer Biol,2013,23(6 Pt B):522.

[2] SEMENZA G L.Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics[J].Oncogene,2010,29(5):625.

[3] 任亚君,熊枝繁,曹仕琼,等.HIF-1α、MMP2 在大肠癌中的表达及相关性研究[J].胃肠病学和肝病学杂志,2015,24(4):425.

[4] 程海波,沈政洁,孙东东,等.抗肿瘤中药对肿瘤微环境的干预作用评述[J].中医杂志,2014,55(15):1343.

[5] 刘岩,张春阳,张大田,等.白花蛇舌草提取物诱导人肾癌 GRC-1 细胞凋亡及抑制血管生成的实验研究[J].山东医药,2011,51(8):97.

[6] 郭振敏,李景强,刘彬,等.复方半枝莲对肝纤维化大鼠血清学及其 MMP-2 影响[J].辽宁中医药大学学报,2015,17(1):47.

[7] 臧文华,唐德才,尹刚,等.黄芪莪术配伍对人肝癌裸鼠原位移植瘤新生血管生成的影响[J].时珍国医国药,2014,25(3):516.

第一作者:梁慧(1969—),女,医学博士,主任医师,从事中西医结合治疗肿瘤的临床与实验研究。lianghui@hnszlyy.com

收稿日期:2015-12-23

编辑:吴 宁