论著

文章编号:1000-5404(2008)14-1330-04

PARP抑制剂对小鼠结肠腺癌CT26细胞肝转移的影响

秦 艳,王娅兰,李圆圆 (重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨5-AIQ抑制小鼠结肠癌CT26细胞聚腺苷二磷酸核糖聚合酶[poly(ADP-ribose)polymerase,PARP]后对其肝转移的影响。**方法** 以小鼠脾脏接种小鼠结肠癌CT26细胞肝转移为模型,采用CT26细胞体外药物处理后脾脏接种和脾脏接种后直接腹腔给药两种方式,将36只BALB/c小鼠按随机区组设计分成6组,其中4组做实验组,2组做对照组,每组6只。观察脾脏原发肿瘤和肝脏转移肿瘤的变化。Western blot检测PARP在各组脾脏原发瘤组织中的蛋白表达量。**结果** 经过药物5-AIQ处理后,CT26细胞脾脏接种的小鼠和CT26细胞直接脾脏接种后腹腔给药处理的小鼠,脾脏肿瘤体积缩小和肝脏转移结节数目及分级减少,与对照组比较差别显著($P<0.05$),但是不同剂量之间未见明显差异($P>0.05$)。各5-AIQ处理组小鼠脾脏组织PARP表达明显低于未给药处理小鼠脾脏原发瘤组织($P<0.05$)。**结论** 5-AIQ能抑制CT26细胞PARP表达,对结肠癌CT26细胞脾脏原发瘤的生长及肝转移具有一定的抑制作用。

关键词: 聚腺苷二磷酸核糖聚合酶(PARP);5-AIQ;肝转移;结肠癌

中图法分类号: R73-36;R73-37;R735.35 **文献标识码:** A

Effect of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor on liver metastasis of colorectal carcinoma CT26 cell line in mice

QIN Yan, WANG Ya-lan, LI Yuan-yuan (Department of Pathology, Faculty of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) expression inhibited by 5-AIQ on the liver metastasis in colorectal carcinoma CT26 cell lines. Methods Liver metastasis model of colorectal carcinoma was established by intrasplenic inoculation of colorectal carcinoma CT26 cell in BALB/c mice. Treated by 5-AIQ (100 or 500 μmol/L), CT26 cells were inoculated to the spleen of the mice, or the rats were first inoculated of CT26 cells, then treated by 5-AIQ (3 or 10 mg/kg) ip. The changes spleen primary carcinoma and liver metastasis carcinoma were observed. The PARP expression in spleen primary carcinoma was detected by Western blotting. Results Significant difference was found in the splenic carcinoma size, the number of liver metastatic nodules, the grading of liver metastatic nodules in the 5-AIQ treated group and control group($P<0.05$), but no statistical significance was observed in the mice treated with different drug dosages ($P>0.05$). The PARP expression of spleen primary carcinoma in 5-AIQ treated groups was lower significantly than that in control group ($P<0.05$). Conclusion 5-AIQ can inhibit PARP expression in the CT26 cell lines and the growth of primary splenic carcinoma and liver metastasis after CT26 cell inoculation *in viro*.

Key words: poly(ADP-ribose)polymerase; 5-aminoisoquinolinone; liver metastasis; colorectal carcinoma

结肠癌是目前临床上常见的恶性肿瘤,其死亡率高并易发生肝转移,聚腺苷二磷酸核糖聚合酶[poly(ADP-ribose)polymerase,PARP]是一种普遍存在于真核细胞的内的单体蛋白,现已发现其与多种疾病[1-4]有关。在与肿瘤的关系研究中,多集中在PARP与肿瘤细胞增殖与凋亡关系方面[5]。而我们先前的研究则表明,大肠癌组织PARP表达与淋巴结转移具有相关性[6]。Rajesh等[7]则报道,PARP抑制剂在体外能抑制血管内皮生长因子诱导的人脐静脉内皮细胞的增殖、分化和出芽形成,提示PARP在肿瘤转移中可能发挥作用。

5-AIQ是一种易溶于水且作用强的PARP抑制剂[8]。对于5-AIQ的研究,目前仅限于炎症中。我们

基金项目:重庆市自然科学基金(2006BB52881);重庆医科大学创新基金(CX200527)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB52881) and the Innovation Foundation of Chongqing Medical University (CX200527)

作者简介:秦 艳,女,湖南省桂阳县人,硕士研究生,主要从事肿瘤病理方面的研究 E-mail:qinyan8595@sina.com
通信作者:王娅兰,E-mail:wangyalan074@126.com

收稿日期:2007-06-22;修回日期:2008-10-15

在先前的实验，结果显示其可抑制肿瘤细胞 PARP 活性。同时，尚可抑制 HT-29 细胞与人脐静脉内皮细胞的黏附。但 PARP 与肿瘤细胞转移的确切关系，以及抑制 PARP 是否可以抑制肿瘤转移尚不清楚。

本研究应用小鼠体内脾包膜下接种小鼠结肠癌 CT26 细胞肝转移模型，以 PARP 抑制剂 5-AIQ 为处理因素，观察 PARP 抑制后对癌细胞转移的影响。

1　材料与方法

1.1　实验材料

1.1.1　实验动物　　雌性 BALB/c 小鼠 36 只，6～8 周龄，体质量 17～23 g，购于重庆医科大学实验动物中心。

1.1.2　肿瘤细胞株　　小鼠结肠腺癌细胞 CT26，系四川大学魏于全教授惠赠。

1.1.3　实验试剂　　5-Aminoisoquinolinone．HCl，英国 Bath 大学 Threadgill 教授惠赠。抗 PARP、β-actin 抗体、ECL 试剂盒均购自 Santa Cruz 公司，HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体购自北京中杉生物技术公司，核蛋白裂解液购自 Pierce 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞培养　　将小鼠结肠腺癌 CT26 细胞常规培养。收集对数生长期细胞，计数制成 1×10^6 ml^{-1} 细胞悬液备用。

1.2.2　小鼠结肠癌 CT26 细胞肝转移动物模型的建立　参照许勤等[9]的方法稍加修改。取 BALB/c 小鼠，1% 戊巴比妥钠 80 mg/kg 腹腔注射麻醉，取左肋缘下切口开腹，在脾包膜下缓慢注射 1×10^6 ml^{-1} CT26 细胞的单细胞悬液 0.05 ml，止血后全层缝合关腹，密切观察小鼠复苏情况。14 d 后处死小鼠，打开腹腔，观察肿瘤生长及分布情况，并取脾脏和肝脏组织，10% 甲醛液固定，石蜡包埋切片，常规 HE 染色，光镜下观察组织结构。

1.2.3　5-AIQ 对小鼠结肠癌 CT26 细胞肝转移的影响

1.2.3.1　体外细胞处理　　取对数生长期小鼠结肠癌 CT26 细胞分别于接种前按 100 μmol/L 和 500 μmol/L 加入 5-AIQ 培养 1 h（处理组），加入无 5-AIQ 的等体积生理盐水为对照组（未处理组）。1 h 后，收集不同处理组及对照组细胞并台盼蓝染色，测定细胞存活率 95%，分别用于 BALB/c 小鼠脾包膜下接种，接种方法同模型建立。每组小鼠 6 只。14 d 后处死，观察脾脏肿瘤体积大小、数目、有无出血等。同时观察肝脏肿瘤转移结节数目、大小、有无融合等。取脾脏肿瘤组织，液氮保存备用。

1.2.3.2　腹腔给药　　取对数生长期 CT26 细胞在 18 只 BALB/c 小鼠进行脾包膜下接种，方法同模型建立。接种后，将小鼠按随机区组设计分为 3 组。其中两组为处理组，即于接种后当日开始，各组腹腔分别每天注射 5-AIQ 3 mg/kg 和 10 mg/kg，连续 7 d。另一组以腹腔注射等体积双蒸水（5-AIQ 溶剂）作为对照组。14 d 后处死小鼠，观察脾脏肿瘤体积大小、数目、有无出血等。同时观察肝脏肿瘤转移结节数目、大小、有无融合等。取脾脏肿瘤组织，液氮保存备用。

测量肿瘤长短径，计算肿瘤体积大小，肿瘤体积（V）$=ab^2/2$，a 为肿瘤最大径，b 为肿瘤最小径，如有多个肿瘤则计算体积总和。

对肝脏转移性肿瘤，参照盛学仕等[10]的方法对肝脏表面转移结节数目进行分级，无肉眼转移结节为 0 级，转移结节 1～5 个为Ⅰ级，6～50 个为Ⅱ级，多于 50 个或肿块融合难以计数为Ⅲ级。

1.2.4　Western blot 检测脾脏原发灶肿瘤组织 PARP 表达　将保存于液氮中各组脾脏肿瘤组织，裂解、匀浆。按 NE-PERTM Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents 说明提取核蛋白，并用 BCA 法测定蛋白浓度。8% 聚丙烯酰胺凝胶垂直电泳，将蛋白质转移至 PVDF 膜上，5% 脱脂奶粉封闭，加入 PARP 一抗、4 ℃ 过夜，加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG，室温孵育 1 h，采用 ECL 试剂盒进行化学发光显影。凝胶成像仪照相，目的条带用图像分析软件（Quantity One）进行光密度积分值分析。以 β-actin 为内对照，PARP 与 β-actin 光密度积分值的比值作为蛋白表达含量。

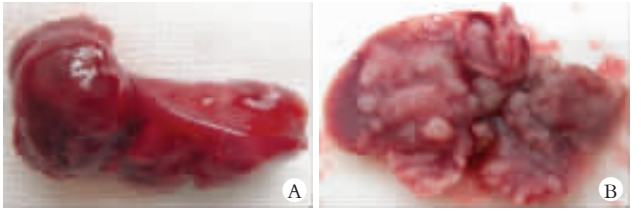
1.3　统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SAS 8.0 统计软件进行近似 t 检验和 Krukal-Wallis 秩和检验。

2　结果

2.1　小鼠结肠癌 CT26 细胞肝转移模型及 HE 染色组织学观察结果

肉眼观察，脾脏均有 1～3 个肿瘤形成，体积约 0.75～2.56 cm^3，质量一般在 1 081～2 860 mg，有时可见瘤内有出血。肝脏每 1 例均发生明显肿瘤转移，肿瘤结节数目至少在 30 个以上，体积小者 0.000 5 cm^3 左右，大者可达 0.008 cm^3 左右。灰白色，大部分融合，肝脏表面见少量正常组织，有的淤血明显（图 1）。光镜下观察，脾脏见明显的低分化腺癌组织，肿瘤细胞异型性明显，形成癌巢，肝脏内亦见转移性低分化腺癌，结构与脾脏内肿瘤形态结构相似（图 2）。其他器官未见肿瘤转移结节形成。

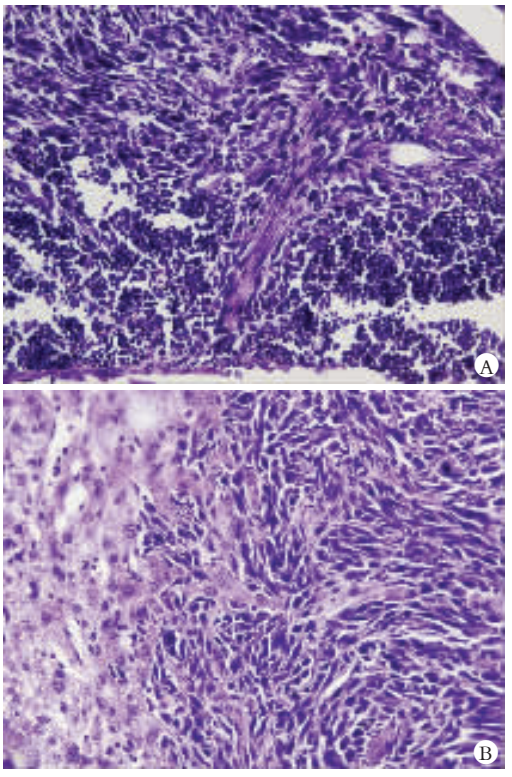


A：脾脏内见肿瘤结节；B：肝脏见多个肿瘤结节

图 1　小鼠结肠癌肝转移模型脾脏和肝脏肉眼变化

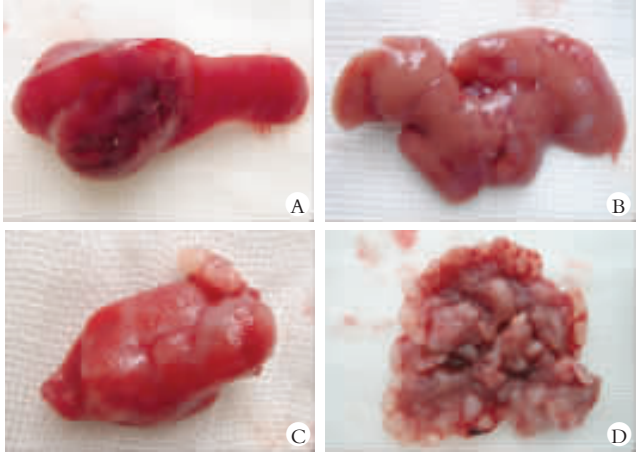
2.2　5-AIQ 对小鼠结肠癌 CT26 细胞肝脏转移的影响

2.2.1　体外细胞处理　　不同剂量 5-AIQ 处理 CT26 细胞，脾脏均见肿瘤结节，多为 1～3 个，平均质量为 118～1 482 mg。对照组脾脏均亦见肿瘤结节，为 1～3 个，平均质量为 1 240～3 417 mg。与对照组相比，5-AIQ 处理组脾脏肿瘤体积减少，经统计学近似 t 检验方法分析，差别具有显著性（$P<0.05$）。但不同剂量组之间差别无显著性（$P>0.05$）。不同剂量 5-AIQ 处理组，肝脏转移结节数及分级均较对照组减少，经统计学 Krukal-Wallis 秩和检验方法分析，差别具有显著性（$P<0.05$）。但不同剂量组之间差别无统计学意义（$P>0.05$）（图 3，表 1）。



A：脾脏见低分化腺癌；B：肝脏见低分化腺癌，形态与脾脏内腺癌相似

图2 小鼠结肠癌肝转移模型脾脏和肝脏组织学变化 （HE×400）



A：处理组脾脏见肿瘤结节较小；B：处理组肝脏见转移结节较少；C：未处理组脾脏见肿瘤结节较大；D：未处理组肝脏见转移结节较多

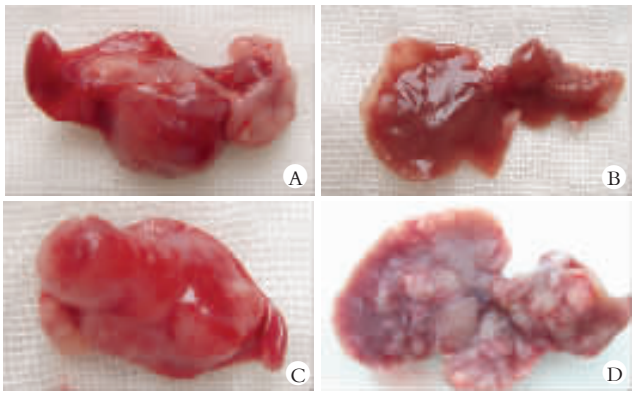
图3 体外细胞药物处理组和未处理组小鼠脾脏和肝脏肉眼变化

表1 体外细胞处理组和对照组脾脏肿瘤体积大小、肝脏表面转移结节数及等级（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	脾脏肿瘤体积（cm^3）	肝脏表面转移结节数（个）	肝脏转移等级			
			0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
对照组	1.83±0.89	47.00±10.20	0	0	2	4
5-AIQ（100 μmol/L）	0.58±0.48[a]	2.41±1.40[a]	4[a]	2[a]	0[a]	0[a]
5-AIQ（500 μmol/L）	0.68±0.33[a]	1.41 ±1.00[a]	3[a]	3[a]	0[a]	0[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.2.2 腹腔给药 不同剂量5-AIQ腹腔注射组，脾脏均见肿瘤结节，多为1～3个，平均质量为780～1 626 mg。对照组脾脏亦均见肿瘤结节，多为1～3个，平均质量为1 076～2 896 mg。与对照组相比，脾脏肿瘤体积缩小，经统计学近似t检验方法分析，差别具有显著性（$P<0.05$）。但不同剂量组之间差别无显著性（$P>0.05$）。不同剂量5-AIQ注射组，肝脏转移结节数及分级均较对照组减少，经统计学Krukal-Wallis秩和检验方法分析，差别具有显著性（$P<0.05$）。但不同剂量组之间差别无统计学意义（$P>0.05$）（图4，表2）。



A：处理组脾脏见肿瘤结节较小；B：处理组肝脏见转移结节较少；C：未处理组脾脏见肿瘤结节较大；D：未处理组肝脏见转移结节较多

图4 腹腔给药处理组和未处理组小鼠脾脏和肝脏肉眼变化

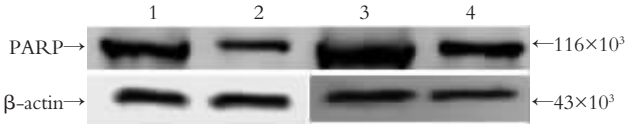
表2 腹腔给药组和对照组脾脏肿瘤体积大小、肝脏表面转移结节数及转移等级比较（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	脾脏肿瘤体积（cm^3）	肝脏表面转移结节数（个）	肝脏转移等级			
			0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
对照组	1.64±0.72	47.18±9.81	0	0	2	4
5-AIQ（3 mg/kg）	0.92±0.23[a]	4.20±2.95[a]	1	2	3	0[a]
5-AIQ（10 mg/kg）	0.88±0.43[a]	5.40±3.31[a]	1	4	1	0[a]

a：$P<0.05$，与对照组比较

2.3 不同方法处理组脾脏肿瘤组织PARP蛋白表达

经Western blot分析，不同方式5-AIQ处理组小鼠脾脏肿瘤组织PARP蛋白表达明显弱于未给药处理组小鼠脾脏肿瘤组织（图5，表3）。



1：体外细胞未处理组；2：体外细胞处理组100 μmol/L；3：腹腔未给药组；4：腹腔给药组3 mg/kg

图5 5-AIQ处理前后小鼠脾脏PARP的表达

表3 5-AIQ给药和未给药小鼠脾脏肿瘤PARP的表达（$n=6$，$\bar{x}\pm s$）

组别	灰度比值
5-AIQ体外细胞未处理组	1.443 6±0.123 9
5-AIQ体外细胞处理组（100 μmol/L）	1.000 8±0.037 1[a]
5-AIQ腹腔未给药组	1.558 6±0.144 3
5-AIQ腹腔给药处理组（3 mg/kg）	1.001 9±0.085 2[b]

a：$P<0.05$，与体外细胞未处理组比较；b：$P<0.05$，与腹腔未给药组比较

3　讨论

PARP 广泛存在于真核细胞核内，是具有锌指结构的单体蛋白，它在细胞中以非活性形式大量存在，DNA 链的缺口或游离的 DNA 末端是该酶唯一的激活因素，而 NAD^+ 则是其唯一的底物。PARP 识别并结合 DNA 链缺口或游离 DNA 末端后被激活，活化后催化 NAD^+ 上的腺苷二磷酸核糖基团转移到蛋白质上，形成与蛋白质共价结合的直链或支链的 PAR，藉此反应，该酶可对核内众多的蛋白质和酶类进行翻译后修饰，从而调节细胞内一系列的分子事件。由于 PARP 是细胞内具有多种重要功能的蛋白酶，因此它与多种疾病的发生、发展有关。在肿瘤中，文献[5,7,11]报道，在结肠癌、皮肤基底细胞癌、骨髓瘤、宫颈癌、恶性淋巴瘤、急性淋巴细胞性白血病等 PARP 表达较对照组织增加，我们也观察到大肠癌 PARP 表达较对照黏膜增加，并与肿瘤转移具有相关性。在炎症中，文献[1－4]报道，缺血心肌组织、局部缺血脑组织、急性炎症肺组织、哮喘、实验性损伤的脊髓组织等 ICAM-1，P-selectin 的表达升高，从而促进中性粒细胞与血管内皮细胞的黏附，而 PARP 抑制剂则可抑制这一过程。而我们观察到，PARP 抑制剂 5-AIQ 对结肠癌 HT-29 细胞 PARP 有抑制作用，并能抑制结肠癌 HT-29 细胞与血管内皮细胞的黏附。但抑制肿瘤细胞 PARP 表达是否可抑制肿瘤细胞转移尚不清楚。

本研究则选用 PARP 抑制剂 5-AIQ 为处理因素，观察小鼠结肠癌 CT26 细胞 PARP 抑制后转移能力的变化。结果表明，经过 5-AIQ 处理的 CT26 细胞接种的小鼠和直接腹腔给药处理的小鼠，脾脏肿瘤原发灶的 PARP 表达比对照组低，原发肿瘤体积大小和肝脏转移结节数目及分级均较对照组明显减少，差异有显著性。提示 5-AIQ 可抑制肿瘤 PARP 表达，并可抑制肿瘤 CT26 细胞肝转移。

另有研究表明，在肿瘤转移过程中，NF-κB 的活化与肿瘤转移相关的 NF-κB 依赖性基因表达密切相关，NF-κB 的活化，可以上调肿瘤生长转移相关的 NF-κB 依赖性基因如 VEGF，M-CSF，TNF，黏附分子，整合素，MMP-2，MMP-9[12－17]等的表达，从而使肿瘤生长抑制与基质黏附，降解肿瘤细胞外基质，迁移及癌栓形成能力降低。

本研究中，PARP 抑制可降低 CT26 细胞脾脏原发癌生长和肝脏转移，我们推测其可能与 5-AIQ 抑制了肿瘤细胞 PARP，而 PARP 减少了 NF-κB 的活化，从而降低与肿瘤生长转移相关的 NF-κB 依赖性基因的表达有关。PARP 在肿瘤转移中可能具有重要作用，其分子机制有待进一步研究。

参考文献：

[1] Zingarelli B, Hake P W, O'Connor M, *et al*. Differential regulation of activator protein-1 and heat shock factor-1 in myocardial ischemia and reperfusion injury: role of poly(ADP-ribose) polymerase-1[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2004, 286(4): H1408－H1415.

[2] Park E M, Cho S, Frys K, *et al*. Interaction between inducible nitric oxide synthase and poly(ADP-ribose) polymerase in focal ischemic brain injury[J]. Stroke, 2004, 35(12): 2896－2901.

[3] Genovese T, Mazzon E, Muia C, *et al*. Inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways and secondary damage in experimental spinal cord trauma[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 312(2): 449－457.

[4] Suzuki Y, Masini E, Mazzocca C, *et al*. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase prevents allergen-induced asthma-like reaction in sensitized Guinea pigs[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 311(3): 1241－1248.

[5] Shiobara M, Miyazaki M, Ito H, *et al*. Enhanced polyadenosine diphosphate-ribosylation in cirrhotic liver and carcinoma tissues in patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2001, 16(3): 338－344.

[6] 郝美香，王娅兰，李圆圆. 大肠癌 PARP 表达与 P-selectin 和 ICAM-1 表达的相关性[J]. 基础医学与临床，2006，26(8)：882－887.

[7] Rajesh M, Mukhopadhyay P, Godlewski G, *et al*. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition decreases angiogenesis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 350(4): 1056－1062.

[8] Cuzzocrea S, McDonald M C, Mazzon E, *et al*. Effects of 5-aminoisoquinolinone, a water-soluble, potent inhibitor of the activity of poly(ADP-ribose) polymerase, in a rodent model of lung injury[J]. Biochem Pharmacol, 2002, 63(2): 293－304.

[9] 许　勤，吴文溪，马利民，等. 小鼠结肠腺癌肝转移模型的建立[J]. 实用癌症杂志，2000，15(5)：456－457.

[10] 盛学仕，张瑞芳，庞慧芳，等. 扶正抑癌方对人结肠癌细胞裸鼠肝转移的影响[J]. 上海中医药大学学报，2005，19(4)：39－41.

[11] Delaney C A, Wang L Z, Kyle S, *et al*. Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(7): 2860－2867.

[12] Russell J P, Engiles J B, Rothstein J L. Proinflammatory mediators and genetic background in oncogene mediated tumor progression[J]. J Immunol, 2004, 172(7): 4059－4067.

[13] Shukla S, Gupta S. Suppression of constitutive and tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor (NF)-kappaB activation and induction of apoptosis by apigenin in human prostate carcinoma PC-3 cells: correlation with down-regulation of NF-kappaB-responsive genes[J]. Clinical Cancer Research, 2004, 10(5): 3169－3178.

[14] Nubel T, Dippold W, Kaina B, *et al*. Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid[J]. Carcinogenesis, 2004, 25(8): 1335－1344.

[15] Wang J H, Manning B J, Wu Q D, *et al*. Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF-kappa B and enhances tumor cell adhesion and invasion through a beta 1 integrin-dependent mechanism[J]. J Immunol, 2003, 170(2): 795－804.

[16] Park J M, Kim A, Oh J H, *et al*. Methylseleninic acid inhibits PMA-stimulated pro-MMP-2 activation mediated by MT1-MMP expression and further tumor invasion through suppression of NF-kappaB activation[J]. Carcinogenesis, 2007, 28(4): 837－847.

[17] 黎　明，蔡　莉，王娅兰，等. PARP 抑制剂 5-AIQ 对 CT26 细胞侵袭及转移的影响[J]. 第三军医大学学报，2008，30(3)：237－240.

（编辑　邓强庭）