文章编号:1000-5404(2009)11-1041-04

论著

熊果酸抑制胶质瘤裸鼠移植瘤生长及其机制的初步探讨

刘 琼[1,2],叶秀峰[1,2],张 徽[2] (重庆医科大学:[1]神经科学研究中心,[2]基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

摘 要:目的 观察熊果酸对恶性胶质瘤裸鼠移植瘤细胞外信号调节激酶ERK1及核内因子C-Jun、C-Myc、Cyclin D1表达的影响,探讨熊果酸抗胶质瘤生长的机制。**方法** 皮下注射技术复制恶性胶质瘤细胞株C6裸鼠皮下移植瘤模型,然后将其分为3组:①空白对照组,②熊果酸组(50 mg·kg^{-1}·d^{-1},共20 d),③PD98059组(2 mg·kg^{-1}·d^{-1},共7 d),观察处理后动物生存、移植瘤生长状况及移植瘤组织病理学形态变化;用免疫组化技术检测移植瘤组织ERK1、C-Jun、C-Myc、Cyclin D1蛋白表达变化;用原位杂交技术观察ERK1 mRNA变化。**结果** 熊果酸组和PD98059组移植瘤生长缓慢,其肿瘤体积及质量明显低于对照组($P<0.05$)。熊果酸组和PD98059组ERK1、C-Jun、C-Myc 、Cyclin D1蛋白及ERK1 mRNA表达明显低于对照组($P<0.05$)。**结论** 熊果酸具有抑制恶性胶质瘤裸鼠移植瘤生长的作用,其机制可能与下调ERK1、C-Jun、C-Myc、Cyclin D1表达有关。

关键词: 熊果酸;移植瘤;ERK1;C-Jun;C-Myc;Cyclin D1;ERK1 mRNA
中图法分类号: R284.1; R730.264; R966 **文献标识码:** A

Effects of ursolic acid on proliferation of transplanted glioma in nude mice and its mechanisms

LIU Qiong[1,2], YE Xiu-feng[1,2], ZHANG Hui[2] ([1]Institute of the Neuroscience, [2]Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of ursolic acid on the expression of extracellular signal regulated kinase (ERK1), C-Jun, C-Myc, Cyclin D1 in transplanted tumor of malignant glioblastoma cell line C6 in nude mice and the related mechanisms. **Methods** C6 glioblastoma cells were subcutaneously injected into nude mice to establish the subcutaneous model of glioblastoma in nude mice, and then the mouse models were divided into 3 groups: blank control group, ursolic acid group (50 mg·kg^{-1}·d^{-1}, intra-abdominal injection, 20 d), PD98059 group (2 mg·kg^{-1}·d^{-1}, intra-abdominal injection, 7 d). Survival of nude mice, growth and histopathological changes of the tumors were observed. The expressions of ERK1, C-Jun, C-Myc, and Cyclin D1 in the tumor tissues and the expression of ERK1 mRNA in the tumor tissues were detected by immunohistochemical technique (IHC) and in suit hybridization (ISH), respectively. **Results** Slow growth of the implanted tumor was found in ursolic acid group and PD98059 group. The mean volume and weight of tumors in the two groups were significantly smaller than those in the blank control group ($P<0.05$). The expressions of ERK1, C-Jun, C-Myc, Cyclin D1, and ERK1 mRNA in ursolic acid group and PD98059 group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). **Conclusion** Ursolic acid can significantly inhibit the growth of the implanted glioma in nude mice through down-regulation of the expressions of ERK1, C-Jun, C-Myc, and Cyclin D1 of ERK signal transduction pathway.

Key words: ursolic acid; transplanted tumor; ERK1; C-Jun; C-Myc; Cyclin D1; ERK1 mRNA

神经胶质瘤是颅内最常见的原发性中枢系统肿瘤,呈侵袭性生长,手术切除比较困难,术后易复发,目前临床应用的抗肿瘤药对胶质瘤普遍无疗效或疗效轻微。因此,胶质瘤在治疗上成为一个难题。熊果酸(ursolic acid, UA)又名乌索酸,属五环三萜类化合物,广泛存在于熊果、女贞子等天然植物和中草药中。最近有报道,熊果酸不仅对多种致癌、促癌物质有抵抗作

基金项目:重庆市自然科学基金(2006BB5298);重庆市教委科技研究项目基金(08032)
Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2006BB5298) and the Research Foundation of Chongqing Education Commission (08032)
作者简介:刘 琼,女,四川省广安市人,硕士研究生,主要从事肿瘤病理学方面的研究。E-mail: lambcy@126.com
通信作者:叶秀峰,E-mail:Yxf1960@126.com
收稿日期:2008-08-02;修回日期:2008-10-06

用,而且能抑制肿瘤血管生成[1]和肿瘤细胞增殖[2],但其作用机制尚不清楚。本研究利用恶性胶质瘤细胞株C6裸鼠移植瘤模型,观察UA对移植瘤中ERK1、C-Jun、C-Myc、Cyclin D1蛋白及ERK1 mRNA表达的影响,初步探讨熊果酸抑制胶质瘤细胞增殖的分子机制,旨在为胶质瘤的生物治疗提供新的靶点和思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4~6周龄BALB/c雄性裸小鼠,购自重庆医科大学实验动物中心,共15只,体质量(18±2)g,饲养于无菌净化屏蔽系统,室内定期进行紫外线照射,笼、垫料、饮水、饲料均经高压灭菌锅消毒,室温控制在(25±2)℃,相对湿度40%~60%。

1.2 药物及主要试剂

C6胶质瘤细胞株由重庆医科大学病理生理学教研室提供。熊果酸购自陕西旭煌植物科技发展有限公司,PD98059购自重庆波尔生物技术有限公司,1640培养液、胰酶购自Gibco公司,小牛血清为杭州四季青公司生产,ERK1抗体、C-Jun抗体及Cyclin D1购自Santa Cruz公司,C-Myc抗体购自Chemicon公司,S-P免疫组化试剂盒购自北京中杉,ERK1探针及原位杂交试剂盒购自天津灏阳生物制品科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肿瘤细胞制备和接种 常规复苏的恶性胶质瘤细胞株C6于含20%小牛血清的1640培养液中培养,置于5% CO_2、37 ℃培养箱孵育,选择对数生长期细胞,消化后制成2×10^7/ml的无血清1640培养液单细胞悬液,0.1 ml/只单细胞悬液接种于裸鼠左后腿与腹部邻接部位皮下。

1.3.2 实验动物分组 将接种后的15只裸鼠分为3组,空白对照组4只,熊果酸组6只,PD98059抑制剂组5只。裸鼠成瘤12 d后开始给药,此时各组移植瘤大小无明显差异。各组用药情况如下:①对照组:生理盐水0.2 ml,1次/d,腹腔注射,共20 d;②熊果酸组:熊果酸50 mg·kg^{-1}·d^{-1}溶于0.2 ml生理盐水,腹腔注射,1次/d,连续治疗20 d;③PD98059组:PD98059 2 mg·kg^{-1}·d^{-1},配成20%的二甲亚砜(DMSO)溶液,腹腔注射,连续注射7 d。

1.3.3 肿瘤生长情况的观察和测量 每天观察、记录裸鼠及肿瘤的生长状况,并每隔5天测量肿瘤的长径(a)和短径(b),用以下公式计算肿瘤体积:肿瘤体积(cm^3)=π(ab^2)/6,求出其平均值。最后1次用药24 h后以脱颈方式处死裸鼠,测出瘤体的体积和瘤质量,并根据公式:肿瘤抑制率(%)=(对照组体积-治疗组体积)/对照组体积×100%,计算出肿瘤抑制率[3]。

1.3.4 病理学检查 将剥出的肿瘤组织及其心、肝、肺、肾以4%多聚甲醛固定、石蜡包埋保存备用。心、肝、肺、肾和肿瘤组织HE染色后,光镜下观察各组移植瘤的组织病理学特征。

1.3.5 免疫组化法检测移植瘤ERK1、C-Jun、C-Myc、Cyclin D1蛋白表达 免疫组化染色采用S-P免疫组化技术,移植瘤石蜡标本做成4 μm切片,常规脱蜡至水,组织抗原修复采用微波抗原修复法,抗体工作浓度分别为ERK1(1∶100)、C-Jun(1∶100)、C-Myc(1∶100)、Cyclin D1(1∶50),具体染色步骤按照试剂盒说明书操作。

1.3.6 原位杂交法检测移植瘤ERK1 mRNA 原位杂交前将实验所用器械、玻片、试剂均进行灭活RNA酶处理,实验中各步骤注意避免RNA酶污染。石蜡切片常规脱蜡,打孔后用3% H_2O_2封闭内源性过氧化氢酶,复合消化工作液37 ℃消化30 min,滴加预杂交工作液37 ℃ 1 h,然后滴加ERK1杂交液,加盖专用盖玻片37 ℃ 2~4 h,SSC水洗涤后用TBS洗,滴加抗地高辛生物素标记的抗体37 ℃ 45 min,生物素化过氧化物酶37 ℃ 20 min,DAB显色,自来水冲洗,苏木精复染、脱水、透明,中性树胶封片,光镜下观察。

1.4 结果判断

1.4.1 蛋白表达的判断和测算 ERK1表达于细胞质和(或)细胞核内,C-jun、C-Myc、Cyclin D1均表达于细胞核内,出现棕黄色颗粒为阳性。按Bresalier半定量公式[4]判断染色结果,每例随机选出10个不重复的视野,计数阳性细胞数及所有细胞数,计算阳性细胞百分率。并根据细胞染色强度将其分为4级,阴性:无显色(0分),弱阳性:浅黄色(1分),阳性:棕黄色(2分),强阳性:棕褐色(3分)。根据下列公式计算每张切片的平均染色强度(intensity score,IS):IS=Σ(0×F0+1×F1+2×F2+3×F3),F=10×视野%。

1.4.2 ERK1 mRNA的判断 ERK1 mRNA以细胞质出现棕黄色染色作为阳性细胞,400倍光镜下选取5个典型视野,在200倍光镜下计数100个细胞中的阳性细胞数,计算出500个细胞中染色阳性细胞百分数,根据阳性细胞数量分为:≤5%为阴性,>5%为阳性[5]。

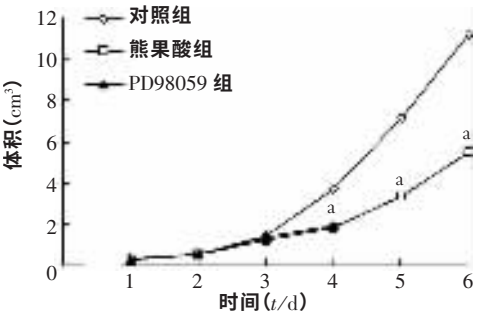
1.5 统计学分析

数据均以$\bar{x}\pm s$表示,采用SPSS 10.0统计软件,2组间均数比较行t检验。

2 结果

2.1 裸鼠皮下移植瘤生长情况

对照组移植瘤生长快,肿瘤体积大;熊果酸组、PD98059组与对照组比较,肿瘤生长缓慢($P<0.05$)。从图1可以看出肿瘤生长受到抑制,抑瘤率>50%。部分瘤体表面皮肤出现破溃现象,以对照组多见。

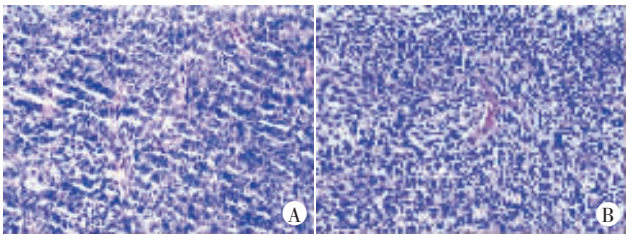


a: $P<0.05$, 与对照组比较

图1 各组裸鼠皮下移植瘤生长曲线

2.2　裸鼠移植瘤组织形态学观察

肿瘤呈椭圆形、肾形或不规则形,有假包膜形成,对照组瘤体较大,瘤体靠近皮肤处出现坏死,切面呈鱼肉状,灰白色,肿瘤内部坏死、出血和/或囊性变多见;熊果酸组和 PD98059 组瘤体小,坏死少见。对照组瘤细胞密集,排列紊乱,呈圆形、梭形或多角形,核大深染,细胞质较少,间质见丰富的微血管。熊果酸组和 PD98059 组细胞以梭形多见,微血管明显少于对照组(图 2),且分裂象相对较少。所有裸鼠心、肝、肺、肾组织正常,未见肿瘤远处转移。



A: 对照组; B: 熊果酸组

图 2　光镜下移植瘤的形态学观察　(HE ×200)

2.3　免疫组化结果

对照组肿瘤细胞中 ERK1、C-Jun、C-Myc 及 Cyclin D1 表达强阳性,阳性细胞密度高,数量多,ERK1 表达位于细胞质和(或)细胞核上,C-Jun、C-Myc 及 Cyclin D1 表达在细胞核中,呈棕黄色。见图 3。熊果酸组和 PD98059 组肿瘤内阳性细胞密度下降,阳性强度减弱,与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。熊果酸组和 PD98059 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

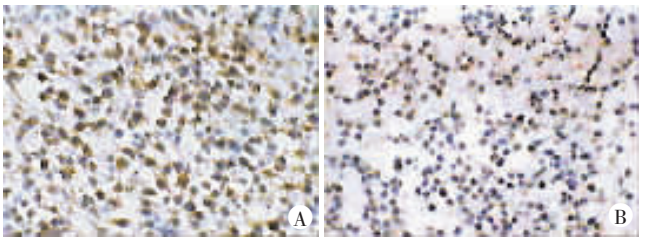
表 1　移植瘤中 ERK1、C-Jun、C-Myc 和 Cyclin D1 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ERK1	C-Jun	C-Myc	Cyclin D1
对照组	4	2.06 ± 0.22	2.04 ± 0.02	2.11 ± 0.01	2.10 ± 0.07
熊果酸组	6	1.04 ± 0.04[a]	1.05 ± 0.04[a]	1.00 ± 0.15[a]	0.97 ± 0.10[a]
PD98059 组	5	1.14 ± 0.13[a]	1.10 ± 0.07[a]	1.12 ± 0.04[a]	1.11 ± 0.02[a]

a: $P < 0.05$,与对照组比较

2.4　原位杂交结果

移植瘤组织 ERK1 mRNA 表达在细胞质中,熊果酸组和 PD98059 组均有少量 ERK1 mRNA 阳性细胞表达,2 组相比差异无统计学意义[分别为(14.4 ± 10.0)和(22.0 ± 10.0),$P > 0.05$]。对照组 ERK1 mRNA(55.0 ± 11.0)阳性细胞表达数较多,与熊果酸组和 PD98059 组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。



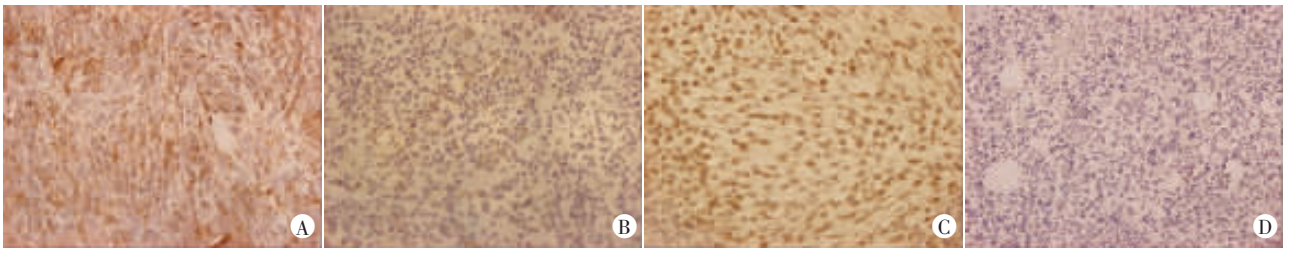
A: 对照组; B: 熊果酸组

图 4　原位杂交法检测移植瘤 ERK1 mRNA 的表达　(×400)

3　讨论

细胞信号转导系统控制着细胞的所有活动,许多癌基因和抑癌基因位于信号转导系统的不同部位,参与细胞重要的生理和病理过程。ERK 信号通路广泛存在于真核生物中,是 MAPK 系统中主要的和经典的信号转导通路,是多种生长因子、细胞因子等共有的信号传递通路。该通路成员包括:KDR、Ras、Raf、MEK、ERK1/2 及核内转录因子(C-Myc、C-Jun 和 Cyclin D1 等),可通过其成员的级联激活和失活,介导细胞外刺激到细胞内反应,调节细胞增殖、分化及细胞周期等[6]。ERK1 是 ERK 通路的重要成员之一,能被各种生长因子等有丝分裂原激活,进入细胞核内,活化核内转录因子(C-Jun、C-Myc、C-fos 等),促进细胞增殖和分化。C-Jun、C-Myc、Cyclin D1 是 ERK 通路的下游靶基因,参与细胞增殖的调控。ERK 通路的过度激活与肿瘤的发生、发展密切相关。研究表明,ERK1 的高水平表达与神经胶质瘤细胞增殖有关[7],而抑制 ERK 信号转导通路可以抑制胶质瘤裸鼠移植瘤的生长[8]。因此,理论上任何针对 ERK 信号转导通路上游激酶的抑制剂均具有治疗胶质瘤的潜在作用。随着对 ERK 信号通路(即 Ras/MAPK 通路)的深入研究,肿瘤细胞中 ERK 信号通路受到了基础研究与药物开发工作者的广泛关注,针对该途径中某些关键酶抑制剂的筛选非常活跃,已经有多种针对该通路的激酶抑制剂的新型抗肿瘤药物进入临床前实验。

研究证实,熊果酸能有效抑制乳腺癌、肺癌、肝癌、淋巴瘤等多种肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞分化[2,9,10]。



A: ERK1 在对照组中的表达; B: ERK1 在熊果酸组中的表达; C: C-Jun 在对照组中的表达; D: C-Jun 在熊果酸组中的表达

图 3　各组移植瘤 ERK1、C-Jun 免疫组化染色结果　(S-P ×400)

Bhaskara 等[11]在研究胶质瘤发病机制的实验中观察到,ERK 信号通路的激活与胶质瘤增殖、分化密切相关。Bonaccorsi 等[12]报道熊果酸具有抗胶质瘤细胞株 U87 增殖的功效,并能诱导其分化。目前对熊果酸的研究主要集中在作用机制方面,国内外有关熊果酸作用于胶质瘤的研究大多是体外细胞学实验,活体动物的体内实验少见报道。Mijatovic 等[8]研究发现芦荟大黄素明显抑制了恶性胶质瘤细胞株 C6 的增殖,并能诱导胶质瘤细胞向星型细胞分化,其机制与芦荟大黄素显著抑制恶性胶质瘤细胞株 C6 的 ERK 通路活性有关。本研究显示,熊果酸通过抑制 ERK 信号途径抑制了胶质瘤裸鼠移植瘤的生长。PD98059 是一种特效的 ERK 抑制剂,能选择性的抑制 ERK 的活性,进而抑制细胞恶性胶质瘤细胞 C6 增殖,并能诱导其分化[8]。本实验中,我们从肿瘤生长速度、肿瘤质量及肿瘤体积方面对 3 组移植瘤进行比较分析,结果显示,熊果酸组和 PD98059 组移植瘤生长速度明显减慢,治疗结束时熊果酸组肿瘤质量及体积明显低于对照组($P < 0.05$),抑瘤率 >50%。移植瘤形态学观察结果也显示熊果酸组瘤体比对照组小,且所有裸鼠心、肝、肺、肾组织正常,表明熊果酸和 PD98059 可以抑制恶性胶质瘤裸鼠移植瘤的生长,并且无明显的毒副作用。为进一步探讨熊果酸抗胶质瘤生长机制,我们检测了 3 组移植瘤组织的 ERK1、C-Jun、C-Myc、Cyclin D1 蛋白表达,结果显示,熊果酸与 PD98059 下调了移植瘤内 ERK1、C-Jun、C-Myc、Cyclin D1 蛋白表达,与对照组比较熊果酸组与 PD98059 组 ERK1、C-Jun、C-Myc 、Cyclin D1 蛋白表达明显减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。熊果酸组与 PD98059 组比较差异无统计学意义($P > 0.05$),提示熊果酸具有类似于 ERK 抑制剂 PD98059 的抑制 ERK 信号通路活性的功能。本实验原位杂交结果显示,熊果酸对移植瘤中 ERK1 mRNA 的表达有影响,熊果酸组 ERK1 mRNA 的表达比对照组明显降低($P < 0.05$),表明熊果酸能够抑制移植瘤 ERK1 的表达,进一步证实了熊果酸具有抑制移植瘤 ERK 信号通路活性的作用。已有研究证明,抑制 ERK 信号通路活性能有效抑制恶性胶质瘤细胞株 C6 的增殖[8]。综上所述,我们可以认为熊果酸通过抑制 ERK 信号通路的活性抑制了恶性胶质瘤裸鼠移植瘤生长。

ERK 信号通路是多种信号的交汇点或共同通路,在细胞的增殖和分化调控中发挥重要作用。本实验结果表明,熊果酸可能通过抑制 ERK 信号通路的活性,抑制恶性胶质瘤细胞株 C6 裸鼠移植瘤生长。因此,我们认为熊果酸能够抑制胶质瘤生长,其作用机制可能与熊果酸抑制 ERK 信号通路活性有关。熊果酸作为一种分布广泛、造价低廉、高效低毒的天然植物药,在肿瘤防治领域有良好的临床前景。

参考文献:

[1] Das B, Yeger H, Tsuchida R, *et al*. A hypoxia-driven vascular endothelial growth factor/Flt1 autocrine loop interacts with hypoxia-inducible factor-1alpha through mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neuroblastoma[J]. Cancer Res, 2005, 65(16): 7267 - 7275.

[2] 王 婷, 宋怀燕, 赵德明. 福安特抗小鼠移植性肿瘤的实验研究Ⅰ[J]. 中国兽医杂志, 2007, 43(7): 28 - 29.

[3] 林 伟, 章 翔, 王占祥, 等. 人 IFN-β 基因脂质体对胶质瘤裸鼠移植模型及其血管生成的抑制作用[J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(2): 128 - 131.

[4] Bresalier R S, Ho S B, Schoeppner H L, *et al*. Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis[J]. Gastroenterology, 1996, 110(5): 1354-1367.

[5] 王 辉, 齐凤英. CyclinD1、P15 在食管鳞状细胞癌中的表达及生物学意义[J]. 现代肿瘤医学, 2006, 14(10): 1238 - 1241.

[6] Bose C, Zhang H, Udupa K B, *et al*. Activation of p-ERK1/2 by nicotine in pancreatic tumor cell line AR42J: effects on proliferation and secretion[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2005, 289(5): G926 - G934.

[7] Vilimanovich U, Bumbasirevic V. TRAIL induces proliferation of human glioma cells by c-FLIPL-mediated activation of ERK1/2[J]. Cell Mol Life Sci, 2008, 65(5): 814 - 826.

[8] Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Radovic J, *et al*. Anti-glioma action of aloe emodin: the role of ERK inhibition[J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(5): 589 - 598.

[9] 樊 华,金 锋,张国君,等. Ras、pERK1/2 在非霍奇金淋巴瘤中的表达及临床意义[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(7):688.

[10] 李 洁,魏莲枝,向银洲. 熊果酸诱导鼻咽癌细胞株 CNE-2Z 凋亡的实验研究[J]. 重庆医科大学学报, 2008, 33(1): 37 - 40.

[11] Bhaskara V K, Sundaram C, Babu P P. pERK, pAkt and pBad: a possible role in cell proliferation and sustained cellular survival during tumorigenesis and tumor progression in ENU induced transplacental glioma rat model[J]. Neurochem Res, 2006, 31(9): 1163 - 1170.

[12] Bonaccorsi I, Altieri F, Sciamanna I, *et al*. Endogenous reverse transcriptase as a mediator of ursolic acid's anti-proliferative and differentiating effects in human cancer cell lines[J]. Cancer Lett, 2008, 263(1): 130 - 139.

(编辑 王小寒)