文章编号:1000-5404(2011)02-0107-04

论著

没食子酸抑制人神经母细胞瘤增殖作用的实验研究

何文飞,何大维,马 超,赵 丹,张永波,卞则栋 (400014 重庆,重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科,儿童发育疾病研究省部共建教育部重点实验室)

【摘要】 目的 研究没食子酸抑制小鼠模型中人神经母细胞瘤增殖的作用以及对化疗药物的协同作用。**方法** 建立人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞株免疫活性 C57BL/6j 小鼠移植瘤模型,随机分配成 4 组,每组 10 只:①PBS 荷瘤对照组,按 PBS 0.5 ml/只,腹腔注射,作为阴性对照;②没食子酸组,按 250 mg/kg,1 次/2 d 给药,连续 2 周;③环磷酰胺组,按 75 mg/kg 给药,每周 2 次,连续 2 周,作为阳性对照;④没食子酸 + 环磷酰胺组,没食子酸在环磷酰胺给药前 24 h 给药,没食子酸与环磷酰胺独立给药,剂量和时间同前。药物均 9∶00 腹腔注射给药,每周监测相对肿瘤体积(RTV),治疗时间共 2 周,次日处死小鼠,称体质量和瘤质量(Wt)、计算抑瘤率(IR),BrdU 标记检测移植瘤细胞增殖。**结果** 没食子酸组、环磷酰胺组、没食子酸 + 环磷酰胺组在 2 周的移植瘤瘤质量分别为(4 559.0 ± 677.7)、(2 117.0 ± 749.6)、(637.7 ± 319.6)mg,平均抑瘤率分别为 36.94%、70.72%、91.18%,与 PBS 组比较差异有显著性($P < 0.01$),没食子酸 + 环磷酰胺组瘤质量与环磷酰胺组比较差异有显著性($P < 0.01$)。各给药组肿瘤增殖指数分别为 0.122 9 ± 0.021 9、0.107 6 ± 0.015 6、0.041 3 ± 0.013 0,与 PBS 组肿瘤增殖指数(0.230 8 ± 0.075 9)比较差异有显著性($P < 0.01$),同时没食子酸 + 环磷酰胺组与没食子酸组或环磷酰胺组比较差异有显著性($P < 0.01$)。**结论** 没食子酸具有抑制人神经母细胞移植瘤增殖、协同环磷酰胺抗肿瘤生长的作用。

【关键词】 没食子酸;人神经母细胞瘤;肿瘤增殖指数;环磷酰胺
【中图法分类号】 R285.5;R730.23;R739.4 **【文献标志码】** A

Gallic acid inhibits growth of human neuroblastoma xenograft in mice

He Wenfei, He Dawei, Ma Chao, Zhao Dan, Zhang Yongbo, Bian Zedong (Department of Urology, Children's Hospital, Key Laboratory of Developmental Diseases in Childhood Cofounded by Chongqing Medical University and Ministly of Educaion, Chongqing Medical University, Chongqing, 400014, China)

【Abstract】 Objective To study inhibitory effects of gallic acid (GA) on human neuroblastoma xenograft model, and its synergistic effect with chemotherapy. Methods A total of 40 3-week-old immunocompetent C57BL/6j mice were transplanted with SK-N-SH cells to established xenograft model, and then randomly divided into 4 groups, 10 of each, PBS control group (0.5 ml PBS, i.p, as a negative control), GA group (250 mg/kg, i.p., every other day, for 2 continuous weeks), cyclophosphamide (CP) group (75 mg/kg, i.p., twice a week, for 2 weeks, as a positive control), and CP plus GA group (GA and CP were independently administered with same dose and time as above). The relative tumor volume (RTV) was monitored weekly with growth curves. The average weight of the imsplanted tumors and the tumor inhibitory rate (IR) were tested at 21st day after transplantation. Tumor cell proliferation was detected by bromouracil deoxyriboside labeling (BrdU). Results The average weight of the transplanted tumors in the GA, CP, and CP plus GA groups were 4 559.0 ± 677.7, 2 117.0 ± 749.6, and 637.7 ± 319.6 mg respectively, and the average IR were 36.94%, 70.72%, and 91.18%, respectively. Significant difference was observed in average tumor weight in these 3 groups compareel with the PBS group ($P < 0.01$), and between the CP plus GA group and the CP group ($P < 0.01$). Tumor proliferation index (LI) were 0.122 9 ± 0.021 9, 0.107 6 ± 0.015 6, and 0.041 3 ± 0.013 0, respectively in the tumor tissues of GA, CP, and CP plus GA groups, significant higher than that of the PBS group (0.230 8 ± 0.075 9, $P < 0.01$). LI of the mice with CP plus GA treatment was significantly smaller than that treated by CP or GA ($P < 0.01$). Conclusion GA can inhibit tumor proliferation, and exert synergistic effect with CP to suppress the growth of human neuroblastoma xenograft.

【基金项目】 国家自然科学基金(30772274);重庆市卫生局医学科研基金(2008-1-35)
【通信作者】 何大维,电话:(023)63633394,E-mail:dw.he@163.com

【Key words】 gallic acid; human neuroblastoma; tumor proliferation index; cyclophosphamide

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772274) and the Foundation of Medical Science of Chongqing. Municipal Health Bureau (2008-1-35). Corresponding author: He Dawei, Tel: 86-23-63633394, E-mail: dw.he@163.com

没食子酸(gallic acid,GA),化学名3,4,5-三羟基苯甲酸,是一种天然的多酚类化合物,广泛存在于中草药和水果类植物中,包括叶下珠、五倍子、余甘子、葡萄、甜茶、报春黄甙叶等提取物。没食子酸在体内外具有抑制部分肿瘤生长的作用,如人前列腺癌[1]和人结肠腺癌[2]。但是,没食子酸对儿童极度恶性的神经母细胞瘤是否有抑制作用,以及对化疗药物是否具有协同作用尚不清楚。本实验应用人神经母细胞瘤C57BL/6j小鼠移植瘤模型,研究没食子酸对人神经母细胞瘤移植瘤相对肿瘤体积、瘤质量、抑瘤率和肿瘤细胞增殖水平的影响,探讨没食子酸抑制人神经母细胞瘤作用,以及对化疗药物的协同作用。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞株

SPF级正常3周龄C57BL/6j系小鼠45只,雌雄性随机,体质量(15.0±1.5)g,动物及饲料购自重庆医科大学实验动物中心。人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞株由重庆医科大学金先庆教授惠赠。

1.2 试剂

DMEM培养基为HyClone公司产品,优级胎牛血清购于天津灏洋生物制品科技有限公司,胰酶购于Invitrogen公司,含97.5%没食子酸(G7384)和含99% BrdU(B5002)试剂购自美国Sigma公司,小鼠抗BrdU单克隆抗体(MS-1058)购自美国Thermo公司,SP-9002山羊抗小鼠免疫组化试剂盒购自北京中杉金桥生物工程有限公司,注射用环磷酰胺(CP,国药准字H14023686)试剂购自山西普德药业有限公司,配制0.01 mol/L无菌磷酸盐缓冲液(PBS)。

1.3 动物模型

取含对数生长期人神经母细胞瘤SK-N-SH细胞,0.25%胰酶消化形成细胞悬液,调整细胞数1×10^7/ml。用1 ml注射针抽取单细胞悬液0.2 ml接种于C57BL/6j小鼠右前肢腋下。接种后7 d潜伏期肉眼可见瘤块,定人每周游标卡尺测量肿瘤的长(L)、宽(W)及高(H),按公式$V=L\times W\times H\times\pi/6$计算肿瘤生长体积。肿瘤体积达到或超过100 mm^3,即建模成功[3],选择瘤体积在100~200 mm^3进行后续实验研究。

1.4 实验分组及给药

根据成瘤情况,将荷瘤鼠随机分配成4组:①PBS荷瘤对照组,0.5 ml/只,腹腔注射,作为阴性对照;②没食子酸组,按250 mg/kg,1次/2 d给药,连续2周;③环磷酰胺组,按75 mg/kg给药,每周2次,连续2周,作为阳性对照;④没食子酸+环磷酰胺组,没食子酸在环磷酰胺给药前24 h给药,没食子酸与环磷酰胺独立给药,剂量、给药方式和时间同前,每组10只C57BL/6j小鼠,药物均9:00腹腔注射给药。

1.5 计算相对肿瘤体积、抑瘤率

根据测量的结果计算出相对肿瘤体积(RTV),计算公式:RTV = Vt/V0。其中V0为分笼给药时测量所得肿瘤体积,Vt为每次测量时的肿瘤体积。停药后次日量瘤体积、颈椎脱臼处死小鼠,剥瘤块称瘤质量(Wt)、体质量,在15 min内收集标本,取肿瘤未坏死区域,4%中性甲醛固定,供增殖实验用,计算肿瘤抑瘤率(IR)。

抑瘤率=[(1-实验组平均瘤质量)/PBS荷瘤对照组平均瘤质量]×100%

1.6 肿瘤组织增殖指数检测

处死C57BL/6j小鼠前2 h腹腔注射BrdU 100 mg/kg,组织经脱水及石蜡包埋后切片,经盐酸处理后,胰蛋白酶修复抗原,山羊血清封闭,加抗BrdU一抗(1∶200),4 ℃过夜;滴加生物素化山羊抗小鼠IgG工作液,辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP),DAB显色。苏木精轻度复染。脱水,透明,封片。BrdU标记移植瘤增殖指数结果判定:BrdU主要表达位于细胞核,故以细胞核出现棕黄色染色为阳性表达,每个标本随机计数1 000个细胞,以BrdU标记细胞所占比例计为肿瘤增殖指数(LI)。

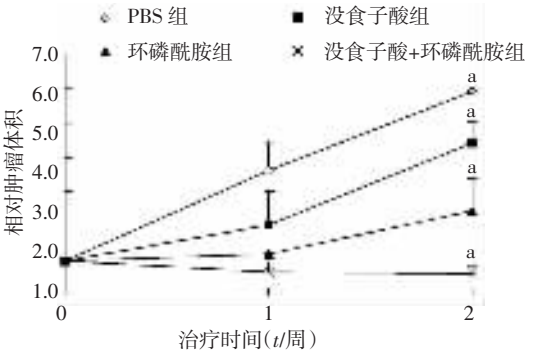
1.7 统计学分析

采用SPSS 16.0统计软件,计量资料值采用单因素方差分析及重复测量的方差分析。

2 结果

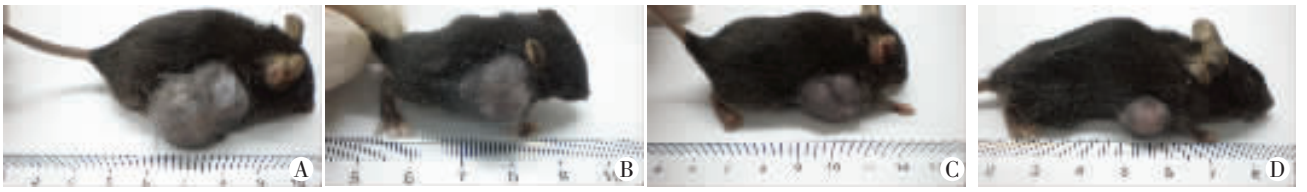
2.1 没食子酸对神经母细胞移植瘤相对肿瘤体积、瘤质量、抑瘤率的影响

没食子酸治疗2周,没食子酸组相对肿瘤体积值较PBS组小,而大于环磷酰胺组,没食子酸组、PBS组、环磷酰胺组相对肿瘤体积值均呈上升趋势,但是,联合没食子酸+环磷酰胺组相对肿瘤体积值最低,呈下降趋势(图1、2)。没食子酸组、环磷酰胺组、没食子酸+环磷酰胺组治疗2周,人神经母细胞瘤移植瘤质量分别为(4 559.0±677.7)、(2 117.0±749.6)、(637.7±319.6) mg,平均抑瘤率分别为36.94%、70.72%、91.18%,各给药组瘤质量与PBS组[(7 230.0±625.8) mg]比较有显著性差异($P<0.01$),没食子酸单独治疗以及联合环磷酰胺化疗治疗神经母细胞瘤移植瘤均有不同程度的抑制作用($P<0.01$),没食子酸与环磷酰胺具有协同抑制肿瘤作用($P<0.01$)。



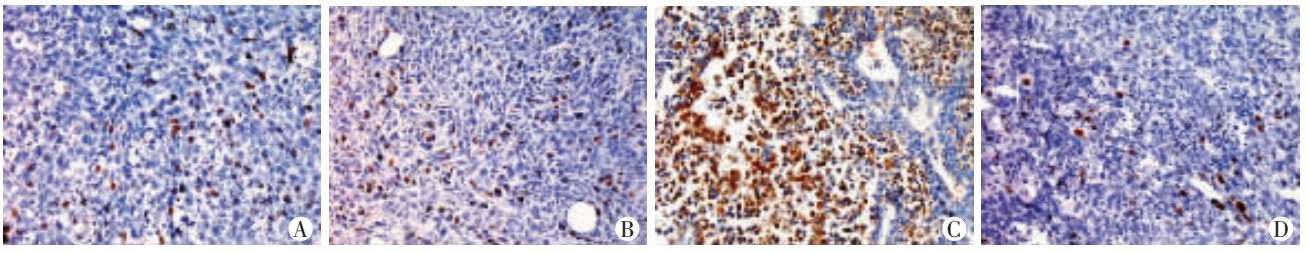
a: $P<0.05$, 两两比较

图1 各组小鼠相对肿瘤体积生长曲线



A:PBS 组;B:没食子酸组;C:环磷酰胺组;D:没食子酸 + 环磷酰胺组

图 2　治疗 2 周各组小鼠实体瘤比较



A:PBS 组;B:没食子酸组;C:环磷酰胺组;D:没食子酸 + 环磷酰胺组

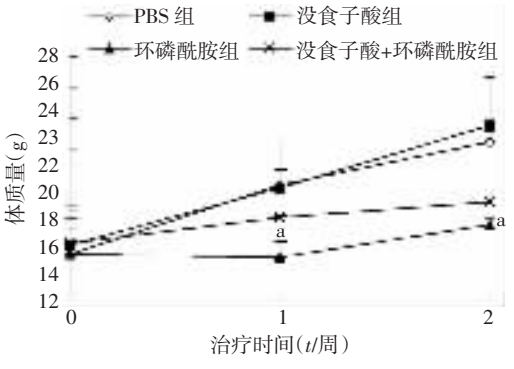
图 3　治疗 2 周各组小鼠肿瘤细胞增殖情况　(S-P ×400)

2.2　没食子酸对神经母细胞瘤细胞增殖的抑制作用

BrdU 检测示具有增殖能力的肿瘤细胞核呈棕黄色颗粒样。没食子酸组阳性细胞数明显少于 PBS 组,与环磷酰胺组比较无明显差异;没食子酸 + 环磷酰胺组仅有少许阳性细胞处于增殖状态,阳性细胞数明显少于没食子酸组、环磷酰胺组(图 3)。没食子酸组、环磷酰胺组、没食子酸 + 环磷酰胺组肿瘤增殖指数分别为 0.122 9 ± 0.021 9、0.107 6 ± 0.015 6、0.041 3 ± 0.013 0。与 PBS 组肿瘤增殖指数(0.230 8 ± 0.075 9)比较移植瘤细胞增殖较少($P < 0.01$),同时没食子酸 + 环磷酰胺组与单独用没食子酸组或环磷酰胺组比较移植瘤细胞增殖较少($P < 0.01$)。

2.3　没食子酸对荷瘤 C57BL/6j 小鼠体质量的影响

经过 7 d 潜伏期,根据判断荷瘤成功标准,有 5 只小鼠接种失败,成瘤率 88.89% (40/45)。PBS 组荷瘤 C57BL/6j 小鼠出现活动减少、呆滞。环磷酰胺组小鼠也活动减少,精神萎靡,治疗 2 周,小鼠体质量明显低于 PBS 组和没食子酸组($P < 0.05$),与没食子酸 + 环磷酰胺组比较无差异($P > 0.05$)(图 4)。没食子酸对荷瘤 C57BL/6j 小鼠未见不良反应,各组均未见动物死亡。



a:$P < 0.05$,与 PBS 组和没食子酸组比较

图 4　各组小鼠体质量增长曲线

3　讨论

由于化学合成的抗肿瘤药物的毒副作用大,患者常因化疗的毒副作用而不能完成治疗,或者大剂量化疗药物治疗,虽然患者生存,但可能导致一些器官远期功能障碍,如心肌功能损害、性腺生殖功能损害而不育或子代畸形[4]。因此,选择毒副作用低或无毒副作用的肿瘤药物治疗策略,是临床不断探索的难题[5]。近年,中药治疗肿瘤已经成为肿瘤治疗领域的重要措施,没食子酸是中药中较为常见的多酚类化合物。体外实验发现,没食子酸抑制人肝癌细胞株 Bele74044、人胃癌细胞株 SGC7901、小鼠肝癌细胞株 H22 和小鼠肉瘤细胞株 S180[6]、人前髓细胞性白血病 HL-60 细胞株等[7]增殖,抑制人胶质细胞瘤细胞活性、增殖、浸润、血管生成[8-9],抗氧化作用[10-11]。但是,对没食子酸抗肿瘤效果仍有争议[12],且是否没食子酸具有抑制人神经母细胞瘤作用,及其疗效如何,尚少见报道。

我们前期已成功建立人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞株 C57BL/6j 免疫活性小鼠移植瘤模型,其生物学行为更近似人神经母细胞瘤。本研究选用儿童最常见恶性的神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞株建立移植瘤模型,以临床常用化疗药物环磷酰胺作为阳性对照,PBS 作为阴性对照,动态监测没食子酸、环磷酰胺及没食子酸联合环磷酰胺治疗后的移植瘤相对肿瘤体积、瘤质量和抑瘤率的变化,发现没食子酸能够抑制肿瘤相对肿瘤体积生长,单用没食子酸抑瘤率达 36.94%,而联合环磷酰胺其高达 91.18%,没食子酸具有减少瘤质量,提高抑瘤率,与阳性对照组化疗效果比较,没

食子酸疗效不如环磷酰胺明显，但是，具有协同提高环磷酰胺治疗效果。同时利用 BrdU 标记检测了没食子酸治疗 2 周的移植瘤细胞的增殖指数，发现没食子酸能有效抑制其增殖，联合环磷酰胺较单用环磷酰胺具有极显著抑制细胞增殖作用，充分支持没食子酸具有抑制肿瘤生长，并具有协同环磷酰胺抗肿瘤作用。此外，监测没食子酸对宿主一般情况和体质量的影响，未发现没食子酸毒副作用，与环磷酰胺联合化疗减缓宿主体质量下降，没食子酸可能具有减轻环磷酰胺毒副作用。故可以在治疗肿瘤过程中，利用没食子酸协同环磷酰胺治疗作用而降低环磷酰胺剂量，从而降低环磷酰胺化疗毒副作用。本研究表明没食子酸可能有效抑制人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞株移植瘤增殖，可能协同环磷酰胺疗效。

没食子酸抑制肿瘤细胞增殖其机制涉及到多方面，可能包括抑制肿瘤生长相关的鸟氨酸脱羧酶、DNA 聚合酶、核苷酸还原酶和环氧合酶等[7]。抗氧化过氧化氢酶和 N-乙酰半胱氨酸清除肿瘤细胞产生的活性氧族以及调控线粒体凋亡，激活 Chk1、Chk2 和抑制 Cdc25C、Cdc2 活性，抑制肿瘤细胞停留在 G_2/M 期[13]，增加瘤组织氧化活性族物质过氧化氢、超氧负离子等[14-16]，以及可能与细胞信号转导途径相关。但其抑制人神经母细胞瘤增殖以及对环磷酰胺协同机制有待更进一步研究。

本实验所采用的 3 周龄人神经母细胞瘤 C57BL/6j 小鼠移植瘤模型，其宿主具有正常的免疫原性，更类似人类神经母细胞瘤的生物学行为，以此模型为基础的研究结果更接近临床[17-18]。本实验证实，没食子酸具有抑制人神经母细胞瘤增殖作用，与低剂量环磷酰胺联合化疗疗效显著，具有协同环磷酰胺抗肿瘤作用。没食子酸可能作为一种天然的抗肿瘤的中草药提取试剂。

参考文献：

[1] Kaur M, Velmurugan B, Rajamanickam S, *et al*. Gallic acid, an active constituent of grape seed extract, exhibits anti-proliferative, pro-apoptotic and anti-tumorigenic effects against prostate carcinoma xenograft growth in nude mice [J]. Pharm Res, 2009, 26(9): 2133-2140.

[2] Lazze M C, Pizzala R, Gutierrez-Pecharroman F J, *et al*. Grape waste extract obtained by supercritical fluid extraction contains bioactive antioxidant molecules and induces antiproliferative effects in human colon adenocarcinoma cells[J]. J Med Food, 2009, 12(3): 561-568.

[3] Valentiner U, Haane C, Nehmann N, *et al*. Effects of bortezomib on human neuroblastoma cells *in vitro* and in a metastatic xenograft model [J]. Anticancer Res, 2009, 29(4): 1219-1225.

[4] 李娜，梅同华. 同剂量环磷酰胺对肺癌裸鼠移植瘤耐药的影响[J]. 第三军医大学学报，2007，29(16)：1584-1586.

[5] 陈鹊汀，刘智勤，朱惠学，等. 当归补血汤联合环磷酰胺抗肿瘤实验研究[J]. 第三军医大学学报，2008，30(16)：1568-1571.

[6] 钟振国，梁红，钟益宁，等. 余甘子叶提取成分没食子酸的体外抗肿瘤实验研究[J]. 时珍国医国药，2009，20(8)：1954-1955.

[7] Madlener S, Illmer C, Horvath Z, *et al*. Gallic acid inhibits ribonucleotide reductase and cyclooxygenases in human HL-60 promyelocytic leukemia cells[J]. Cancer Lett, 2007, 245(1/2): 156-162.

[8] Liu Z, Schwimer J, Liu D, *et al*. Gallic acid is partially responsible for the antiangiogenic activities of Rubus leaf extract[J]. Phytother Res, 2006, 20(9): 806-813.

[9] Lu Y, Jiang F, Jiang H, *et al*. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 641(2/3): 102-107.

[10] Chen H M, Wu Y C, Chia Y C, *et al*. Gallic acid, a major component of Toona sinensis leaf extracts, contains a ROS-mediated anticancer activity in human prostate cancer cells [J]. Cancer Lett, 2009, 286(2): 161-171.

[11] Giftson J S, Jayanthi S, Nalini N. Chemopreventive efficacy of gallic acid, an antioxidant and anticarcinogenic polyphenol, against 1,2-dimethyl hydrazine induced rat colon carcinogenesis[J]. Invest New Drugs, 2010, 28(3): 251-259.

[12] Gorinstein S, Park Y S, Heo B G, *et al*. A comparative study of phenolic compounds and antioxidant and antiproliferative activities in frequently consumed raw vegetables[J]. Eur Food Res Technol, 2009, 228(6): 903-911.

[13] Agarwal C, Tyagi A, Agarwal R. Gallic acid causes inactivating phosphorylation of cdc25A/cdc25C-cdc2 *via* ATM-Chk2 activation, leading to cell cycle arrest, and induces apoptosis in human prostate carcinoma DU145 cells [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(12): 3294-3302.

[14] Fernandes A, Fernandes I, Cruz L, *et al*. Antioxidant and biological properties of bioactive phenolic compounds from Quercus suber L[J]. J Agric Food Chem, 2009, 57(23): 11154-11160.

[15] Kim Y J. Antimelanogenic and antioxidant properties of gallic acid [J]. Biol Pharm Bull, 2007, 30(6): 1052-1055.

[16] Faried A, Kurnia D, Faried L S, *et al*. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, Phaleria macrocarpa (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines[J]. Int J Oncol, 2007, 30(3): 605-613.

[17] Thomas M A, Spencer J F, La-Regina M C, *et al*. Syrian hamster as a permissive immunocompetent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors[J]. Cancer Res, 2006, 66(3): 1270-1276.

[18] Schlereth B, Kleindienst P, Fichtner I, *et al*. Potent inhibition of local and disseminated tumor growth in immunocompetent mouse models by a bispecific antibody construct specific for Murine CD3[J]. Cancer Immunol Immunother, 2006, 55(7): 785-796.

（收稿：2010-08-04 修回：2010-09-17）

（编辑　吴培红）