论著

文章编号:1000-5404(2012)08-0726-03

华蟾素对SD大鼠膀胱肿瘤的抑制作用

李建昌,柳建军,凌生涛 (524000 广东 湛江,广东医学院附属医院泌尿外科)

[摘要] **目的** 研究华蟾素对SD大鼠膀胱肿瘤的治疗作用。**方法** 50只SD大鼠按随机分为对照组和实验组,实验组40只大鼠膀胱灌注N-甲基-N-亚硝基脲(N-methyl-N-nitrosourea, MUN),每3周1次,共4次;于第14周将实验组大鼠随机分为生理盐水组(膀胱灌注生理盐水)、丝裂霉素组(5 mg/kg)、低浓度华蟾素组(5 mg/kg)及高浓度华蟾素组(20 mg/kg),每周灌注1次,连续灌注5次,计算抑瘤率,TUNEL法检测肿瘤细胞的凋亡情况。**结果** MNU膀胱灌注成功建立膀胱肿瘤动物模型,以膀胱肿瘤质量计算高浓度华蟾素组的抑瘤率为76.7%,高浓度华蟾素组抑瘤率较丝裂霉素组及低浓度华蟾素组高;TUNEL法检测高浓度华蟾素组AI值为(24.21±1.24)%,较其他各组AI值明显增高,提示高浓度华蟾素组凋亡指数高于丝裂霉素及低浓度华蟾素组。**结论** 华蟾素对膀胱肿瘤有抑制生长、促进凋亡的作用,且高浓度时抑瘤作用及促凋亡作用较强。

[关键词] MNU;动物模型;膀胱肿瘤;SD大鼠;华蟾素
[中图法分类号] R282.74;R285.5;R737.14 [文献标志码] A

Therapeutic effect of cinobufagin on bladder tumor in SD rats: an *in vivo* experiment

Li Jianchang, Liu Jianjun, Ling Shengtao (Department of Urinary Surgery, Affiliated Hospital of Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong Province, 524000, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the therapeutic effect of cinobufagin on bladder cancer. **Methods** Fifty SD rats were randomly divided into experimental group ($n=40$) and control group ($n=10$). N-methyl-N-nitrosourea (N-MNU) was infused into bladder of rats in experimental group (2.5 mg every 3 weeks, for 4 times), and after that, the rats of later group were divided into saline group, mitomycin group (5 mg/kg), low dose cinobufagin group (5 mg/kg) and high dose cinobufagin group (20 mg/kg), into which saline, mitomycin, low and and high dose cinobufagin were infused, once a week, for 5 times. Tumor-inhibiting rate of cinobufacin was calculated and apoptosis of tumor cells was detected by TUNEL assay. **Results** The animal bladder tumor model was successfully established by infusing N-MNU into bladder. The tumor-inhibiting rate was 76.7% and the apoptosis index (AI) was (24.21±1.24)% in high dose cinobufotalin group, which were significantly higher than those in low dose cinobufotalin group and mitomycin group ($P<0.05$). **Conclusion** Cinobufagin can inhibit the growth of bladder tumor in SD rats, and promote apoptosis of bladder tumor cells. The higher the cinobufotalin level is, the stronger the apoptosis-promoting effect of cinobufotalin is.

[**Key words**] N-methyl-N-nitrosourea;animal model;bladder tumor;SD rats;cinobufagin

Supported by the Foundation for Young Scholars of Guangdong Medical College(2009-0854). Corresponding author: Liu Jianjun,Tel: 86-759-2387418,E-mail: zj-ljj@163.com

近年来国内外研究发现华蟾素注射液及其活性成分能有效抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞分化,促进肿瘤细胞凋亡,提高机体免疫力等[1-5]。目前华蟾素注射液对膀胱癌的治疗一般用肌注或静脉滴注的方式,华蟾素对膀胱癌腔内局部灌注治疗的体内实验国内外仍少见报道。本研究经尿道膀胱灌注华蟾素,探讨华蟾素对SD大鼠膀胱肿瘤的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

7~8周龄SPF级健康雌性SD大鼠50只,体质量180~220 g,由广东医学院实验动物中心提供[合格证编号:2008A036SCXK(粤2004-2008)]。50只大鼠随机分为实验组

[基金项目] 广东医学院青年基金(2009-0854)
[通信作者] 柳建军,电话:(0759)2387418,E-mail:zj-ljj@163.com

40 只和对照组 10 只。

1.2 主要试剂及膀胱灌注

5 mg/ml N-甲基-N-亚硝基脲(N-methyl-N-nitrosourea, MNU,美国 Sigma)溶液需现配,配置后于 50 min 内用完。TUNEL 法细胞凋亡检测试剂盒购自北京中杉金桥,华蟾素注射液购自安徽金蟾生化股份有限公司。膀胱灌注方法参照文献[6],3% 的戊巴比妥钠按 30 mg/kg 腹腔注射麻醉,无菌硬膜外导管经尿道外口插入膀胱,对照组膀胱灌注 0.5 ml 生理盐水,实验组膀胱灌注0.5 ml MNU 溶液。膀胱灌注每3 周1 次,共4 次。

1.3 治疗实验

于膀胱灌注后第 14 周将 40 只灌注 MNU 的荷瘤大鼠随机分成生理盐水组(膀胱灌注生理盐水 0.5 ml)、丝裂霉素组(膀胱灌注丝裂霉素 5 mg/kg)、低浓度华蟾素组(华蟾素 5 mg/kg)及高浓度华蟾素组(华蟾素 20 mg/kg),每组 10 只。每周灌注 1 次,连续膀胱灌注 5 次,于最后 1 次膀胱灌注后第 3 天处死大鼠,分离膀胱,剔除膀胱外脂肪组织,于膀胱前壁剖开观察记录膀胱内情况,称量各膀胱质量。膀胱组织甲醛固定。检测药物作用后肿瘤大小、形态,计算抑瘤率,并用 TUNEL 法检测肿瘤细胞的凋亡情况,观察抑瘤率、凋亡指数的变化,分析华蟾素对膀胱肿瘤的作用。

1.4 抑瘤率的测定

先称取对照组大鼠膀胱质量,测得对照组大鼠的平均膀胱质量作为大鼠的平均膀胱质量。各治疗组膀胱肿瘤质量记为用其相应大鼠的膀胱质量减去大鼠的平均膀胱质量。

抑瘤率 = [(生理盐水组平均肿瘤质量 - 治疗组平均肿瘤质量)/治疗组平均肿瘤质量] ×100%

1.5 TUNEL 法原位凋亡检测

参照 TUNEL 法细胞凋亡检测试剂盒说明书,石蜡标本切片、脱蜡、孵育等,DAB 显色,镜下观察控制显色时间,自来水充分冲洗终止反应,1% 盐酸酒精分色 1 ~ 2 s,自来水冲洗,镜下观察细胞核复染情况,干燥、透明、树胶封片。TUNEL 原位凋亡结果判定:细胞核固缩、染色质凝集成块或边集、呈棕褐色染色者为凋亡细胞。每个视野计数 100 个细胞,计数 3 个视野,凋亡细胞数占细胞总数的百分率即为凋亡指数(AI)。

1.6 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 16.0 统计软件进行单因素方差分析及 t 检验。

2 结果

2.1 一般情况观察

造模期间:大鼠于麻醉后 2 ~ 2.5 h 排尿。大鼠膀胱灌注插管部分有轻度尿道损伤,尿道口水肿、渗血,2 ~ 3 d 尿道口红肿消退。实验后期大部分大鼠出现精神稍差、食欲减退等现象,部分大鼠出现不同程度血尿。膀胱灌注治疗期间:各组大鼠毛色、食量、营养状况及体质量等一般情况较前稍差,部分大鼠有血尿,无尿瘘,未见明显膀胱刺激征,实验后期 1 只丝裂霉素组大鼠死亡。

2.2 肉眼观察

第 18 周实验结束时切开膀胱时见:各组大鼠膀胱内肿瘤多发,呈菜花状或结节状,部分大鼠有膀胱结石形成,结石大小不等,单发至多发,椭圆形。

2.3 华蟾素对膀胱肿瘤的抑瘤率

丝裂霉素组及华蟾素组膀胱肿瘤平均质量均明显小于生理盐水组($P < 0.05$,表 1)。

表 1 华蟾素对大鼠膀胱肿瘤抑瘤率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	膀胱绝对质量(mg)	膀胱肿瘤质量(mg)	抑瘤率
对照组	10	263.5 ± 11.9	–	–
生理盐水组	10	327.1 ± 10.8	64.5 ± 16.5	–
丝裂霉素组	9	309.5 ± 9.3	46.1 ± 19.2[a]	28.5%
低浓度华蟾素组	10	313.8 ± 11.1	50.3 ± 16.0[a]	22.0%
高浓度华蟾素组	10	278.2 ± 9.4	14.9 ± 16.3[a]	76.7%

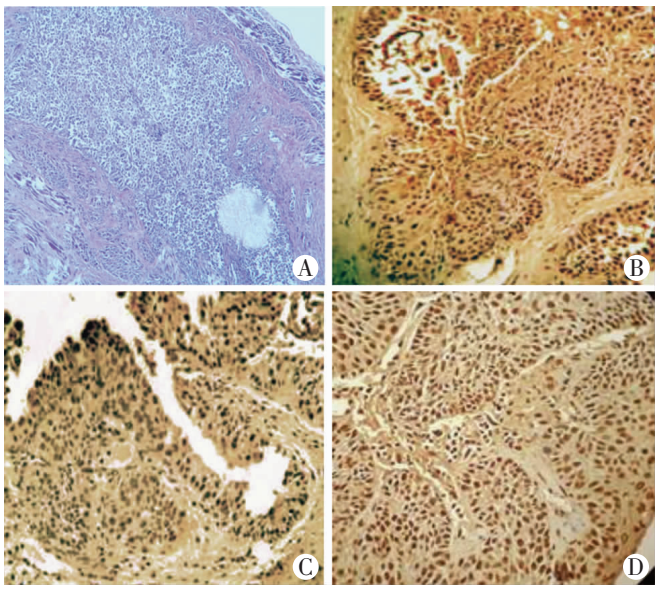
a: $P < 0.05$,与生理盐水组比较

2.4 光镜检查

第 18 周实验结束时:对照组大鼠膀胱黏膜光滑,未见肿瘤。实验组 40 只大鼠均可见膀胱肿瘤,表现为移行上皮结构特征消失,癌细胞多型性明显,核分裂象可见;部分合并鳞状上皮化生(图 1A)。

2.5 各实验组 TUNEL 法检测膀胱肿瘤细胞的凋亡情况

光镜下见各实验组肿瘤细胞核出现不同程度的黄褐色染色(图 1B、C、D),表现为核染色质的浓缩、边聚、碎裂等。与生理盐水组比较,其他各组 AI 值均明显增高,差异有统计学意义($P < 0.05$),高浓度华蟾素组同丝裂霉素组及低浓度华蟾素组比较,其凋亡作用更明显,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 2)。



A:诱导的膀胱肿瘤(HE ×100);B:丝裂霉素组膀胱癌 TUNEL 染色(×400);C:低浓度华蟾素组膀胱癌 TUNEL 染色(×400);D:高浓度华蟾素组膀胱癌 TUNEL 染色(×400)

图 1 膀胱肿瘤组织 HE 与 TUNEL 染色观察

表2 各组大鼠膀胱肿瘤组织的AI值

组别	n	AI值(%)
生理盐水组	10	5.69±1.83
丝裂霉素组	9	17.69±4.56[a]
低浓度华蟾素组	10	13.19±4.28[a]
高浓度华蟾素组	10	24.21±1.24[ab]

a: $P<0.05$,与生理盐水组比较;b: $P<0.05$,与低浓度华蟾素组比较

3 讨论

华蟾素注射液是中华大蟾蜍皮经加工制成的水溶性制剂,具有清热解毒、利水消肿、化瘀溃坚等作用,其主要活性成分为蟾毒内酯类成分,包括蟾毒灵(bufalin)、脂蟾蜍配基(resibufogenin)、华蟾素毒基(又称华蟾毒精 cinobufagin)等[1]。华蟾素不但能直接作用于DNA,具有细胞毒作用;华蟾素还通过免疫调节间接作用于癌细胞[2-3]。华蟾素还能诱导膀胱癌、胃癌、肺癌等多种癌细胞的凋亡[4-5];抑制肿瘤血管形成;影响细胞周期,主要是 G_2/M 周期;影响酶的活性,逆转多药耐药等作用[7]。华蟾素注射液目前主要单独或者与抗癌西药联合用于肝癌、胃癌、乳腺癌等的治疗[8]。

在膀胱癌方面,国内吕静等[9]发现华蟾素对膀胱肿瘤T24细胞有诱导凋亡和直接杀死的双重作用,具体表现为高浓度(25 mg/ml)作用于细胞时,对细胞表现为直接杀死作用,而在较低浓度范围内(0.001~2.5 mg/ml)表现为对细胞诱导凋亡的作用,且具有一定的时效和量效关系。苏劲等[10]研究发现华蟾素作用于膀胱癌T24细胞的裸鼠移植瘤模型,发现其具有良好的抗瘤作用。目前华蟾素注射液对膀胱癌的治疗一般用肌注或静脉滴注的方式,华蟾素对膀胱肿瘤腔内局部灌注治疗的体内实验国内外仍少见报道。膀胱腔是与外界相通的腔,膀胱腔内局部灌注治疗,药物可以直达患处,可以减少用药量,减轻药物对患者的全身毒副作用,减轻患者的经济负担。本实验通过MNU诱导原位膀胱癌动物模型,并模拟临床膀胱灌注治疗膀胱癌,对华蟾素治疗膀胱癌进行了新探索,目前国内外少见该类研究的报道,具有较大的独特性。MNU膀胱灌注建立的动物模型的方法成熟,其优点是肿瘤发生于膀胱,具有器官特异性;肿瘤发生于膀胱原位,便于研究治疗药物的疗效和不良反应;肿瘤的恶性程度和组织学特点与人类膀胱肿瘤相似,基本符合McCormick等[11]提出的理想肿瘤模型应具备的条件。本实验通过膀胱灌注MNU建立原位膀胱癌动物模型,模拟临床常用的膀胱灌注防治膀胱癌的方法,通过抑瘤率及凋亡指数观察,证明膀胱灌注华蟾素有抑制生长、促进凋亡的作用,与目前常用的抑制膀胱肿瘤的丝裂霉素相比,高浓度华蟾素作用效果较好,提示膀胱灌注高浓度华蟾素可能成为治疗膀胱肿瘤的有效方法之一。

目前临床观察华蟾素注射液临床治疗总体疗效较好,华蟾素可使大多数中晚期肿瘤患者临床症状得到改善,生活质量提高,对心、肝、肾功能无影响。当然华蟾素副作用亦值得注意。罗茂玉[12]检索1999-2006年国内医药学期刊报道应用华蟾素注射液所致不良反应案例并进行统计、分析,发现华蟾素注射液可致免疫、血液、循环等系统不良反应,以变态反应临床较多见。本实验膀胱灌注治疗期间各组大鼠毛色、食量、营养状况及体质量等一般情况较前稍差,部分大鼠有血尿,可能与大鼠肿瘤出血等原因有关,膀胱灌注未见明显膀胱刺激征,未见严重过敏等副作用。对华蟾素能否在临床进行膀胱灌注治疗膀胱癌及其安全性仍需要进一步研究。

参考文献:

[1] 李泉旺, 孙韬, 胡凯文. 华蟾素抗肿瘤机制的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2010, 25(12): 2075-2078.

[2] 陈娜, 陈兴平. 华蟾素对小鼠脾淋巴细胞分泌白细胞介素-2水平的影响[J]. 医药导报, 2007, 26(1): 14-16.

[3] 危晓莉, 汪晓莺, 汤伟, 等. 华蟾素对正常人外周血来源树突状细胞的影响[J]. 南通大学学报: 医学版, 2007, 27(2): 98-100.

[4] Masuda Y, Kawazoe N, Nakajo S, *et al*. Bufalin induces apoptosis and influences the expression of apoptosis-related genes in human leukemia cells[J]. Leuk Res, 1995, 19(8): 549-556.

[5] 盛秀胜, 徐玲娟. 华蟾素诱导人红白血病细胞K562凋亡及对Caspase-3表达的影响[J]. 实用肿瘤杂志, 2007, 22(1): 32-36.

[6] 柳建军, 李建昌. 赫赛汀对大鼠膀胱肿瘤靶向治疗的体内研究[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(6): 558-562.

[7] 王玲, 刘世坤, 周于禄, 等. 华蟾素对人乳腺癌细胞阿霉素多药耐药性的逆转作用[J]. 中国药理学通报, 2007, 23(5): 677-680.

[8] 王志超, 冯正平, 王宏. 华蟾素治疗中晚期肝癌的近期疗效观察[J]. 现代医院, 2008, 8(6): 56-57.

[9] 吕静, 王健, 任承德. 华蟾素诱导人膀胱癌细胞株T24凋亡研究[J]. 中国现代医药杂志, 2010, 12(1): 1-5.

[10] 苏劲. 华蟾素对原位膀胱癌大鼠的影响[J]. 第四军医大学学报, 2009, 30(12): 1099-1102.

[11] McCormick D L, Ronan S S, Becci PJ, *et al*. Influence of total dose and dose schedule on induction of urinary bladder cancer in mouse by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitrosamine[J]. Carcinogenesis, 1981, 2(3): 251-254.

[12] 罗茂玉. 华蟾素注射液不良反应及防治措施[J]. 海峡药学, 2007, 19(11): 109-110.

(**收稿**:2011-10-13;**修回**:2011-11-23)

(编辑 龙 亮)