论著

文章编号:1000-5404(2012)19-1940-04

蛋白酶体抑制剂MG132对肿瘤恶病质的改善作用

张刘平[1],陈志雄[1],安昌勇[1],寇 耀[1],唐 华[1],汤为学[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:胃肠外科[1],重庆市神经病学重点实验室[2])

[摘要] **目的** 研究不同剂量蛋白酶体抑制剂MG132对肿瘤恶病质的预防和治疗作用。**方法** 采用小鼠结肠腺癌C26细胞接种BALB/c小鼠诱导的肿瘤恶病质模型。分为对照组(HC),肿瘤恶病质组(CC),MG132预防的低浓度组(PL),中浓度组(PM)和高浓度组(PH),MG132治疗的低浓度组(TL)、中浓度组(TM)和高浓度组(TH)。每天监测小鼠体质量、饮食量和肿瘤体积,预防组和治疗组分别于接种后第5、12天开始每天腹腔注射MG132(0.01、0.1、0.5 mg/kg)。第19天各组处死8只小鼠,称量肿瘤、左侧腓肠肌和附睾脂肪组织质量,检测血清葡萄糖(Glu)、甘油三酯(TG)、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)水平。CC、PM和TM组剩余8只小鼠继续原治疗至其死亡,观察生存时间。**结果** 与CC组相比,MG132预防和治疗组小鼠自发活动量、去瘤体质量、腓肠肌纤维横切面积、腓肠肌和附睾脂肪质量增加,Glu和ALB水平升高,TG水平降低,生存时间延长,均以PM和TM组效果最好,且两组间以上指标差异均有统计学意义($P<0.05$);PH组最显著地抑制了肿瘤生长($P<0.05$)。**结论** MG132的中浓度剂量能较好地改善恶病质,延长生存时间,且预防效果更明显。

[关键词] 蛋白酶体抑制剂;MG132;肿瘤恶病质

[中图法分类号] R589.2; R730.23; R797.1 [文献标志码] A

Effect of protease inhibitor MG132 on cancer cachexia

Zhang Liuping[1], Chen Zhixiong[1], An Changyong[1], Kou Yao[1], Tang Hua[1], Tang Weixue[2] ([1]Department of Gastrointestinal Surgery, [2]Chongqing Key Laboratory of Neurology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To study the role of different MG132 doses in prevention and treatment of cancer cachexia. **Methods** A mouse cancer cachexia model was induced by inoculating mouse colon cancer 26 cells into male BALB/c mice. Eighty-eight male BALB/c mice were divided into healthy control (HC) group ($n=8$), cancer cachexia (CC) group ($n=16$), low concentration MG132 prevention (PL) group ($n=8$), moderate MG132 concentration prevention (PM) group ($n=16$) and high MG132 concentration prevention (PH) group ($n=8$), low MG132 concentration treatment (TL) group ($n=8$), moderate MG132 concentration treatment (TM) group ($n=16$) and high MG132 concentration treatment (TH) group ($n=8$). Their BMI, diet intake and tumor volume were measured daily. Mice in prevention groups and treatment groups were intraperitoneally injected with MG132 (0.01, 0.1 and 0.5 mg/kg) on days 5 and 12 after inoculation of colon cancer 26 cells. Eight mice in each group were killed on day 19 after inoculation of colon cancer 26 cells and their tumor, left gastrocnemius muscle and epididymis adipose tissue were weighed. Serum levels of glucose (Glu), triglyceride (TG), total protein (TP) and albumin (ALB) were measured. The remaining 8 mice in CC group, PM group and TM group received the original treatment till their death and their survival time was recorded. **Results** The spontaneous activity and non-tumor BMI, the weight of cross-cut gastrocnemius muscle fiber, gastrocnemius muscle and epididymis adipose, and the serum Glu and ALB levels were significantly higher and the survival time was longer whereas the serum TG level was significantly lower in MG132 prevention and treatment groups than in CC group ($P<0.05$). The best effect of MG132 on cancer cachexia was observed in PM and TM groups ($P<0.05$). The tumor growth was significantly inhibited in PH group ($P<0.05$). **Conclusion** MG132 at a moderate dose can rather effectively prevent and improve cancer cachexia, and prolong the survival time of cancer cachexia patients.

[**Key words**] protease inhibitors; MG132; cancer cachexia

Corresponding author: Tang Hua, E-mail: tanglihua6969@sina.com

[通信作者] 唐 华,E-mail: tanglihua6969@sina.com

肿瘤恶病质(cancer cachexia,CC)是传统的营养支持不能被完全逆转的进行性骨骼肌组织减少(有或没有脂肪组织减少),并导致进一步功能损害的多因子综合征[1]。有资料表明,约有50%晚期肿瘤患者可发生恶病质,是患者死亡的直接原因。恶病质减弱抗癌治疗效果,增加治疗副作用,降低病人生命质量和缩短生存时间[2-3]。肿瘤患者恶病质的预防和治疗最为重要,但是目前临床还缺乏有效的治疗方法。蛋白酶体是新近受到关注的蛋白水解酶复合体。佴永军等[4]研究表明,蛋白酶体抑制剂Bortezomib能够改善恶病质。MG132是另一种有效、可逆的醛基肽类特异性26S蛋白酶体抑制剂,有研究表明MG132能显著地抑制废用型大鼠骨骼肌的萎缩[5-6],但是目前MG132对肿瘤恶病质的作用尚不清楚。本研究采用小鼠结肠腺癌Colon26移植性BALB/c小鼠肿瘤恶病质模型,观察MG132不同浓度对肿瘤恶病质的调控作用,为肿瘤恶病质预防和治疗提供理论与实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料

健康雄性BALB/c小鼠,清洁级,6~8周龄,体质量20~24 g,购自重庆医科大学实验动物中心[合格证号:SCXK渝20020001];小鼠结肠腺癌Colon26(C26)细胞株由重庆医科大学病理教研室惠赠;MG132(Santa Cruz公司):使用前先用DMSO(25 mg/ml)助溶,再用生理盐水稀释成0.05、0.1、0.5 mg/kg[7]的3种浓度备用。

1.2 动物分组

88只BALB/c小鼠分为8组:健康对照组(HC,8只),肿瘤恶病质组(CC,16只),MG132预防的低浓度组(PL,8只)、中浓度组(PM,16只)和高浓度组(PH,8只),MG132治疗的低浓度组(TL,8只)、中浓度组(TM,16只)和高浓度组(TH,8只)。

1.3 建模及给药

实验开始前所有的动物饲养1周,使其适应新的实验环境。冻存的C26细胞复苏后,取对数生长期的细胞,胰蛋白酶消化,制成单细胞悬液,取0.1 ml(约1×10^6个/只)细胞接种于后7组小鼠腋窝皮下。每天定时监测每组小鼠精神状态、毛发、体质量和摄食量。采用公式$V=ab^2/2$(a、b分别为肿瘤长度和宽度)从可触及皮下肿瘤开始监测肿瘤体积。荷瘤小鼠平均体质量开始下降具有统计学意义,并出现虚弱、活动减少、精神不振等,即进入恶病质期[8]。预防组小鼠从第5天触及肿瘤结节开始每天分别腹腔注射3种浓度的MG132,CC组和治疗组小鼠从第12天进入恶病质期开始每天分别腹腔注射等量生理盐水和3种浓度的MG132,第19天给药结束。

1.4 监测各项指标

治疗期间于相同时间段采用ZH-ZFT型自发活动实验视频分析系统记录每组小鼠初始、第12天和终末1 h内自发性活动总路程。治疗结束后,各组8只小鼠眼球取血,于室温下静置1 h后,4 000 r/min离心10 min,取血清-20 ℃冻存,检测血糖(Glu)、三酰甘油(TG)、总蛋白(TP)和白蛋白(ALB)生化指标。取血后脱颈椎处死小鼠,称量肿瘤、左侧腓肠肌和附睾脂肪组织质量。CC、PM和TM组剩余8只小鼠分别继续给药至其死亡,记录每只小鼠生存时间。

1.5 腓肠肌纤维横切面积检测

将常规方法包埋好的腓肠肌组织石蜡块以10 μm厚度连续横切片,常规苏木精-伊红(HE)染色后,200倍显微光镜下摄像,采用Image Pro Plus 6.0软件测量各组200个腓肠肌纤维横切面积[9]。

1.6 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件分析。计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,多组比较采用单因数方差分析,组间两两比较采用SNK-q检验,生存曲线采用log-rank检验。

2 结果

2.1 一般状况

从接种第5天开始,荷瘤小鼠皮下均可触及肿瘤结节,第8天肿瘤体积增长最快,与CC组相比,经MG132治疗后荷瘤小鼠的肿瘤体积增长缓慢,以PH组肿瘤体积增长最缓慢。与HC组相比,CC、TL、TM和TH组小鼠从接种后第12天开始出现体质量下降($P<0.05$),自发性活动减少($P<0.05$),并出现毛发变暗无光泽,虚弱,精神不振等恶病质症状,而PM组小鼠进入恶病质期的时间延长。第16天各组荷瘤小鼠体质量下降至最低值,之后由于肿瘤生长,7组小鼠体质量又轻微地增加。第19天与HC组相比,PH组小鼠摄食量减少($P<0.05$);与CC组相比,MG132预防和治疗组小鼠自发性活动量都增加($P<0.05$),分别以PM组和TM组最明显,且这两组间差异有统计学意义($P<0.05$),PM组优于TM组。结果见表1。

2.2 终末体质量及终末去瘤体质量

实验开始前各组间小鼠初始体质量无显著性差异($P>0.05$)。第19天,与HC组相比,除PM组小鼠外,终末体质量均减轻($P<0.05$),后7组荷瘤小鼠的终末去瘤体质量均减轻($P<0.05$);与CC组比较,MG132预防和治疗组小鼠去瘤体质量都增加($P<0.05$),分别以PM组和TM组最明显,且这两组之间有统计学差异($P<0.05$),PM组优于TM组。结果见表1。

2.3 腓肠肌和附睾脂肪组织

与HC组相比,各组荷瘤小鼠的腓肠肌纤维横切面积减小($P<0.05$),腓肠肌和附睾脂肪质量减轻($P<0.05$)。与CC组比较,MG132预防和治疗组小鼠腓肠肌纤维横切面积增大,腓肠肌和附睾脂肪质量有所增加,以PM组和TM组最明显,且两组之间差异有统计学意义($P<0.05$),PM组优于TM组。结果见表2和图1、2。

2.4 肿瘤体积和质量

第19天,与CC组比较,MG132预防和治疗组小鼠呈剂量依赖性地抑制了终末肿瘤体积和肿瘤质量的增长,都以PH组和TH组抑制肿瘤生长最明显,且两组之间差异有统计学意义($P<0.05$),同时PM组优于TM组($P<0.05$)。结果见表2。

表1 MG132给药对各组小鼠体质量、1 h自发活动总路程和摄食量的影响($\bar{x} \pm s$)

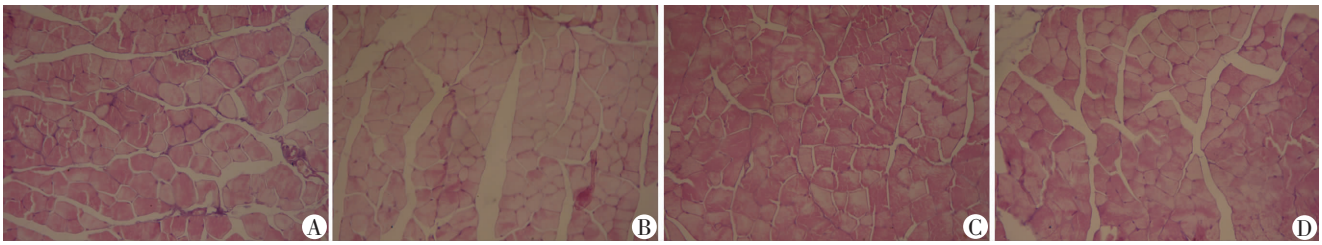
组别	n	初始体质量(g)	第12天体质量(g)	终末体质量(g)	终末去瘤体质量(g)	初始1 h总路程(cm)	第12天1 h总路程(cm)	终末1 h总路程(cm)	食物摄入量[g/(只·d)]
HC组	8	21.79±0.86	23.27±0.77	24.77±0.90	24.77±0.90	44 388.06±3 373.55	46 442.56±4 639.10	47 133.90±4 168.46	5.37±0.60
CC组	16	21.80±0.94	22.22±0.71^{a}	20.84±1.23^{a}	16.04±1.05^{a}	42 858.27±3 472.50	29 482.40±3 776.77^{a}	13 426.78±1 225.35^{a}	5.40±0.58
PL组	8	21.81±0.86	22.55±0.73	21.25±1.59^{a}	17.37±0.97^{ab}	43 520.92±3 592.20	41 161.50±4 023.61^{a}	27 397.35±2 794.65^{ab}	5.27±0.59
PM组	8	21.88±0.80	22.86±0.66	24.07±1.44^{b}	21.21±1.09^{ab}	45 259.55±3 354.16	43 576.76±3 896.62	33 776.13±2 870.19^{ab}	5.26±0.57
PH组	16	21.90±0.79	22.66±0.85	19.48±1.69^{ab}	17.03±1.04^{ab}	45 253.30±3 469.24	38 327.32±2 939.15^{a}	24 603.92±2 333.11^{ab}	4.72±0.59^{a}
TL组	8	21.78±0.86	22.18±0.89^{a}	21.43±1.68^{a}	16.89±1.03^{a}	44 319.41±3 618.67	32 212.49±3 481.77^{a}	20 484.93±2 182.47^{ab}	5.39±0.55
TM组	16	21.87±0.93	22.17±0.78^{a}	21.76±1.28^{a}	18.73±1.01^{abc}	44 321.00±3 493.52	31 282.34±3 016.97^{a}	23 600.53±2 155.24^{abc}	5.16±0.63
TH组	8	21.89±0.77	22.17±0.70^{a}	19.46±1.73^{ab}	16.62±1.34^{a}	43 766.06±4 054.27	30 494.12±3 033.07^{a}	17 969.83±1 677.79^{ab}	5.04±0.48

a:$P<0.05$,与HC组比较;b:$P<0.05$,与CC组比较;c:$P<0.05$,与PM组比较

表2 MG132给药对各组小鼠腓肠肌和附睾脂肪质量、肿瘤生长和血清生化指标的影响($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

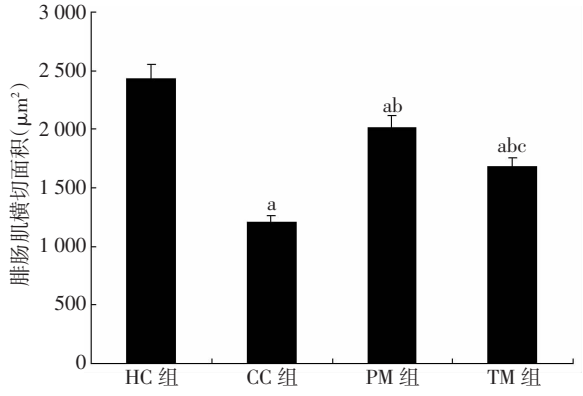
组别	腓肠肌质量(mg)	附睾脂肪质量(mg)	终末肿瘤体积(mm^3)	肿瘤质量(g)	Glu(mmol/L)	TG(mmol/L)	TP(g/L)	ALB(g/L)
HC组	141.27±11.42	122.48±9.60	–	–	5.87±0.48	1.05±0.38	57.26±4.46	20.14±2.45
CC组	74.28±9.23^{a}	47.41±5.08^{a}	5 305.65±116.05	4.80±0.64	3.05±0.45^{a}	5.14±0.49^{a}	51.34±3.67^{a}	12.60±2.18^{a}
PL组	90.53±11.88^{ab}	64.18±7.56^{ab}	4 288.36±117.09^{b}	3.89±0.62^{b}	4.14±0.38^{ab}	2.89±0.34^{ab}	56.22±3.57^{b}	17.05±1.97^{ab}
PM组	112.79±9.74^{ab}	89.09±7.67^{ab}	3 852.72±141.41^{b}	2.75±0.53^{b}	4.48±0.47^{ab}	2.46±0.35^{ab}	56.42±3.98^{b}	17.86±1.54^{ab}
PH组	86.37±10.03^{a}	74.31±7.90^{ab}	3 312.39±114.45^{b}	2.35±0.66^{b}	3.95±0.45^{ab}	3.41±0.39^{ab}	56.04±4.68^{b}	16.76±2.56^{ab}
TL组	84.46±9.73^{ab}	53.54±6.32^{ab}	4 522.15±118.45^{b}	4.54±0.66	4.01±0.40^{ab}	4.12±0.43^{ab}	55.74±6.11^{b}	16.20±2.37^{ab}
TM组	97.78±8.18^{abc}	64.52±5.65^{abc}	4 104.18±116.76^{bc}	3.22±0.52^{bc}	4.17±0.42^{abc}	3.78±0.41^{abc}	55.85±5.04^{b}	16.35±1.55^{abc}
TH组	80.57±9.52^{a}	55.48±6.81^{ab}	2 824.23±90.27^{b}	3.01±0.53^{b}	3.83±0.39^{ab}	4.34±0.47^{ab}	55.50±4.85^{b}	16.08±1.97^{ab}

a:$P<0.05$,与HC组比较;b:$P<0.05$,与CC组比较;c:$P<0.05$,与PM组比较



A:HC组;B:CC组;C:PM组;D:TM组

图1 各组小鼠腓肠肌组织横切面HE染色观察 (×200)



a:$P<0.05$,与HC组比较;b:$P<0.05$,与CC组比较;c:$P<0.05$,与PM组比较

图2 MG132给药对小鼠腓肠肌纤维横切面积的影响

2.5 血清生化指标

与HC组相比,各组荷瘤小鼠的Glu和ALB水平下降($P<0.05$),TG水平升高($P<0.05$);CC组TP水平下降($P<0.05$)。与CC组比较,MG132预防和治疗组Glu和ALB水平均有所升高($P<0.05$),TG水平均有所降低($P<0.05$),以PM组和TM组最明显,且PM组优于TM组($P<0.05$);MG132预防和治疗组TP水平均有所升高($P<0.05$),但PM组和TM组之间无统计学差异($P>0.05$)。结果见表2。

2.6 生存时间

与CC组相比,PM和TM组中位数生存时间延长(分别是27、36、32 d,$P<0.05$),生存率提高($P<0.05$),且PM和TM组间差异有统计学意义($P<0.05$),PM组优于TM组。见图3。

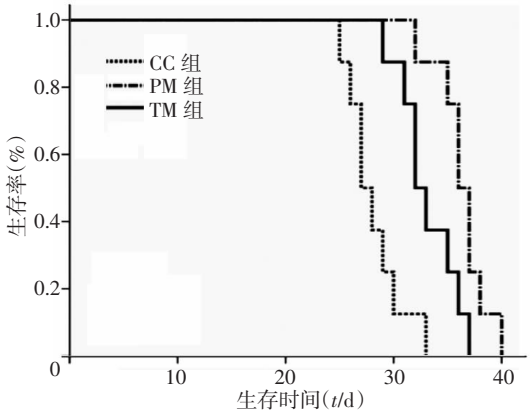


图3 MG132给药对荷瘤小鼠生存时间的影响

3 讨论

肿瘤恶病质是肿瘤晚期的并发症,以短期内进行性体质量减少、骨骼肌及脂肪组织消耗为临床特征,同时伴有机体营养不良和代谢紊乱。晚期恶性肿瘤患者

易于出现贫血、厌食、极度消瘦、乏力等恶病质表现,进而引起机体抵抗力下降、系统感染、多器官功能衰竭等并发症,最终导致患者死亡。本研究采用周伟等[8]报道的小鼠肿瘤恶病质建模方法,与 HC 相比,第 12 天观察到 CC 组小鼠毛发变暗无光泽,虚弱,精神不振,自发性活动量和体质量减少均有统计学意义;第 19 天,CC 组小鼠去瘤体质量、腓肠肌和附睾脂肪组织质量均显著减少,腓肠肌纤维横切面积减小,血清 Glu、TP 和 ALB 水平下降,TG 水平升高,反映了荷瘤小鼠严重的营养不良和代谢紊乱,与临床肿瘤恶病质表现相似,证明建模成功。

肿瘤恶病质以进行性的骨骼肌萎缩和肌肉蛋白降解进而引起体质量下降为最显著的特征,潜在的进行性骨骼肌减少是肿瘤恶病质负面影响的主要原因[10],严重影响肿瘤患者晚期生活质量[11]。研究表明,在骨骼肌蛋白质降解中包含 3 条途径,即泛素-蛋白酶体途径(UPP)、自噬-溶酶体途径和钙依赖蛋白酶途径,其中 UPP 是最重要的一条途径,而蛋白酶体在 UPP 引起的肿瘤恶病质肌肉蛋白的降解中起至关重要的作用[12]。MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO,三肽基乙醛)是一种有效、可逆的醛基肽类特异性 26S 蛋白酶体抑制剂。MG132 能阻止 26S 蛋白酶体对泛素化靶蛋白的降解、抑制 20S 蛋白酶体中糜蛋白酶的活性,从而阻断 UPP,而 MG132 对肿瘤恶病质的发生和发展是否起到重要的抑制作用少见报道。

对于绝大多数肿瘤患者来说,晚期治疗的目的仍是以改善患者的生活质量、延长生存时间为主要目标。本研究结果表明,与 CC 组相比,TL、TM 和 TH 组小鼠不同程度地增加自发性活动量和去瘤体质量,减轻腓肠肌和附睾脂肪萎缩,提高腓肠肌纤维横切面积,升高血清 Glu、TP 和 ALB 水平,降低 TG 水平,延长生存时间,且以 TM 组的治疗效果最好。TL 组和 TH 组可能因为低剂量药物作用弱和高剂量药物毒性作用,上述指标变化均不如 TM 组明显。本实验表明 MG132 能够改善患者生活质量,纠正营养和代谢紊乱,延长生存时间,是肿瘤恶病质的一种可行的治疗方法。

目前对肿瘤恶病质进行早期监控和干预已成国际共识[1]。本研究同时也发现,与 CC 组相比,预防的 PL、PM 和 PH 组小鼠更明显地使自发性活动量和去瘤体质量增加,腓肠肌和附睾脂肪萎缩减轻,腓肠肌纤维横切面积增大,血清 Glu 和 ALB 水平升高, TG 水平降低,进入恶病质期和生存时间均延长,以 PM 组的治疗效果最好,并且 PM 组小鼠上述各项指标与 TM 组相比有统计学差异,表明早期预防效果更好。

有研究表明,MG132 也能够抑制肿瘤细胞增殖,促进肿瘤细胞凋亡,是一种潜在的抗肿瘤药物[13-15]。本研究也显示,MG132 能显著抑制荷瘤小鼠肿瘤体积和质量的增长,表明 MG132 改善肿瘤恶病质同时起到显著的抗肿瘤作用。至于 MG132 抑制骨骼肌和附睾脂肪组织萎缩,改善肿瘤恶病质的具体作用机制尚待进一步探索。

参考文献:

[1] Fearon K, Strasser F, Anker S D, *et al*. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus[J]. Lancet Oncol, 2011, 12(5): 489-495.

[2] Dodson S, Baracos V E, Jatoi A, *et al*. Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies[J]. Annu Rev Med, 2011, 62: 265-279.

[3] von-Haehling S, Anker S D. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers[J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2010, 1(1): 1-5.

[4] 佴永军, 江志伟, 黎介寿. 蛋白酶体抑制剂调控癌性恶病质的实验研究[J]. 肠外与肠内营养, 2010, 17(2): 101-105.

[5] Caron A Z, Haroun S, Leblanc E, *et al*. The proteasome inhibitor MG132 reduces immobilization-induced skeletal muscle atrophy in mice[J]. BMC Musculoskelet Disord, 2011, 12: 185.

[6] Jamart C, Raymackers J M, Li-An G, *et al*. Prevention of muscle disuse atrophy by MG132 proteasome inhibitor[J]. Muscle Nerve, 2011, 43(5): 708-716.

[7] Ma Y, Chen B, Liu D, *et al*. MG132 treatment attenuates cardiac remodeling and dysfunction following aortic banding in rats *via* the NF-κB/TGFβ1 pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(10): 1228-1236.

[8] 周伟, 江志传, 姜军, 等. 一种癌性恶病质动物模型的建立[J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(4): 490-491.

[9] Mittal A, Bhatnagar S, Kumar A, *et al*. The TWEAK-Fn14 system is a critical regulator of denervation-induced skeletal muscle atrophy in mice[J]. J Cell Biol, 2010, 188(6): 833-849.

[10] Prado C M, Lieffers J R, McCargar L J, *et al*. Prevalence and clinical implications of sarcopenic obesity in patients with solid tumours of the respiratory and gastrointestinal tracts: a population-based study[J]. Lancet Oncol, 2008, 9(7): 629-635.

[11] Tisdale M J. Mechanisms of cancer cachexia[J]. Physiol Rev, 2009, 89(2): 381-410.

[12] Melstrom L G, Melstrom K A Jr, Ding X Z, *et al*. Mechanisms of skeletal muscle degradation and its therapy in cancer cachexia[J]. Histol Histopathol, 2007, 22(7): 805-814.

[13] Zanotto-Filho A, Braganhol E, Battastini A M, *et al*. Proteasome inhibitor MG132 induces selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and NFkappaB pathways, mitochondrial dysfunction, and activation of p38-JNK1/2 signaling[J]. Invest New Drugs, 2012, [Epub ahead of print].

[14] Zhang L, Hu J J, Gong F. MG132 inhibition of proteasome blocks apoptosis induced by severe DNA damage[J]. Cell Cycle, 2011, 10(20): 3515-3518.

[15] 岳彩霞, 马骥, 周海俊, 等. 蛋白酶体抑制剂 MG132 对 RhoA 诱导的肿瘤血管生成的抑制作用的研究[J]. 四川大学学报: 医学版, 2011, 42(4): 445-450.

(**收稿**:2012-04-09;**修回**:2012-05-30)

(编辑 汪勤俭)