DOI:10.16016/j.1000-5404.201507096

吉祥草中甾体皂苷 RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤的抑制作用

杨小姣,白彩虹,邹 坤,贺海波,尉小琴,覃慧林,张永峰,汪鋆植 (443002 湖北 宜昌,三峡大学天然产物研究与利用湖北省重点实验室,湖北省土家医药研究所)

[**摘要**] **目的** 观察吉祥草中甾体皂苷 RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤的抑制作用。**方法** 采用传统方法分离鉴定 RCE-4。将 0.3 mL Caski(4×10^7/mL)细胞悬液接种于裸鼠右侧后腿背部皮下,建立宫颈癌移植瘤模型,然后按瘤体积大小随机分为模型组、紫杉醇(10 mg/kg)和 RCE-4(25、50、100 mg/kg)组,1 次/d 给药,连续 4 周,末次给药的次日处死裸鼠,称量裸鼠体质量、瘤质量,测量肿瘤体积,计算抑瘤率。光镜下观察移植瘤组织形态学变化,TUNEL 染色测定细胞凋亡率,免疫组化检测肿瘤组织中 COX-2 表达,荧光定量 PCR 测定移植瘤组织中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 表达,计算 Bcl-2/Bax 值,Western blot 检测移植瘤组织中 Survivin 蛋白表达。**结果** RCE-4(25、50、100 mg/kg)可明显降低宫颈癌裸鼠移植瘤的体积和瘤质量($P<0.05$,$P<0.01$),上调 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 表达,下调 Bcl-2 mRNA 表达和 COX-2、Survivin 蛋白表达及 Bcl-2/Bax 值($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤的生长具有显著抑制作用,其机制可能与其上调 Bax、Caspase-9、Caspase-3 的表达和下调 Survivin、Bcl-2、COX-2 的表达有关。

[**关键词**] 甾体皂苷 RCE-4;吉祥草;宫颈癌;Caski 细胞;裸鼠;细胞凋亡
[**中图法分类号**] R282.71; R73-36; R737.33 [**文献标志码**] A

Steroidal saponin RCE-4 from *Reineckia carnea* (*Andr.*) *Kunth* inhibits growth of human cervical cancer xenograft in nude mice

Yang Xiaojiao, Bai Caihong, Zou Kun, He Haibo, Yu Xiaoqin, Qin Huilin, Zhang Yongfeng, Wang Junzhi (Hubei Provincial Key Laboratory of Natural Products Research and Development, Hubei Institute of Tujia Medicine, Three Gorges University, Yichang, Hubei Province, 443002, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the inhibitory effect of steroid sapogenin RCE-4 derived from *Reineckia carnea* (*Andr.*) *Kunth* on the growth of human cervical cancer xenograft in nude mice. **Methods** Steroidal saponin RCE-4I was extracted and identified by conventional methods. Nude mice model of transplanted tumor of human cervical cancer Caski cells were established by subcutaneously injection of 0.3 mL cells (4×10^7) under the right hind leg. Caski cervical cancer model mice were randomly divided into model group, paclitaxel (10 mg/kg) and RCE-4 (25, 50 and 100 mg/kg) groups, once a day for 4 weeks. Then all mice were sacrificed in 24 h after the final medication, and the volume and weight of transplanted tumor masses were measured to calculate the tumor inhibitory rate. Morphological changes of transplanted tumor tissue were observed by light microscopy, apoptotic rate was determined by TUNEL staining, COX-2 expression in the tumor tissues was detected by immunohistochemical assay, the mRNA levels of Bcl-2, Bax, Caspase-3 and Caspase-9 were detected by real-time PCR, and the Bcl-2/Bax ratio was analyzed, and the expression level of survivin protein in the tumor tissue was detected by Western blot

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(21272136);湖北省自然科学基金(2013CFB224);宜昌市科学技术局项目(A13-302a-14);三峡大学培优基金(2014PY071)
[**通信作者**] 贺海波,E-mail: hehaibo252219@163.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151204.1355.033.html(2015-12-04)

analysis. **Results** RCE-4 (25, 50 and 100 mg/kg) significantly inhibited the volume and weight of the transplanted tumor in the nude mice ($P<0.05$, $P<0.01$), up-regulated the mRNA expression levels of Bax, Caspase-3 and Caspase-9, down-regulated the expression of Bcl-2 at mRNA level and COX-2 and survivin at protein level, and reduced the Bcl-2/Bax ratio ($P<0.05$, $P<0.01$). **Conclusion** RCE-4 significantly inhibites the growth of human cervical cancer in nude mice, which may be associated with up-regulating the expression of Bax, Caspase-3 and Caspase-9, and down-regulating the expression of survivin, Bcl-2 and COX-2.

[**Key words**] steroidal saponin RCE-4; *Reineckia carnea* (*Andr.*) *Kunth*; cervical cancer; Caski cells; nude mice; apoptosis

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (21272136), the Natural Science Foundation of Hubei Province (2013CFB224), the Project of Yichang City Bureau of Science and Technology (A13-302a-14) and the Training Foundation for Outstanding Personnel of Three Gorges University (2014PY071). Corresponding author: He Haibo, E-mail: hehaibo252219@163.com

吉祥草为百合科吉祥草属植物 *Reineckia carnea* (*Andr.*) *Kunth* 的干燥的全草,又名观音草、玉带草、小叶万年青等,具有清肺止咳、凉血止血、解毒利咽的功效,民间主要用于肺热咳嗽、咯血、吐血、衄血、便血、咽喉肿痛、目赤翳障痈肿疮疖等[1]。研究表明吉祥草的化学成分主要含有甾体皂苷类、萜类、黄酮类,此外还含有一些微量元素、脂肪酸、生物碱等成分[2]。我们前期研究发现其乙酸乙酯部位和其中甾体皂苷 RCE-4 均具有良好的人宫颈癌 Caski 细胞增殖抑制活性,初步证实线粒体途径可能是其诱导 Caski 细胞凋亡的重要途径之一[3]。本研究拟在此基础上通过裸鼠宫颈癌 Caski 移植瘤模型,观察 RCE-4 对裸鼠 Caski 细胞移植瘤的抑制作用,并探寻其可能的机制,以期为其用于宫颈癌的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人宫颈癌 Caski 细胞株由三峡大学肿瘤微环境与免疫治疗湖北省重点实验室王艳林教授惠赠。雌性 BALB/c-nu 裸鼠 30 只,6~8 周龄,体质量 20~22 g,由北京维通利华实验动物有限公司提供,生产许可证号:SCXK(京)2012-0001。吉祥草药材采自湖北省长阳土家族自治县乐园乡,经三峡大学生物与制药学院杨进副教授鉴定为 Reineckia carnea (Andr.) Kunth。RPMI1640(Gibco 公司),胎牛血清(四季青公司),HEPES、胰蛋白酶(Amresco 公司),TUNEL 试剂盒(Roche 公司),Bcl-2、Bax、Caspase-9、Caspase-3 和 GAPDH(上海生工公司,表 1),COX-2 和 Survivin 一抗(Cell Signaling 公司),β-actin 抗体(博奥森公司),羊抗兔二抗(中杉金桥公司),蛋白抽提试剂盒、ECL 发光试剂盒、蛋白含量测定试剂盒(碧云天公司),其余试剂为市售分析纯。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列	片段长度(bp)
Bcl-2	上游 5′-TGTGGCCTTCTTTGAGTTCG-3′ 下游 5′-TCACTTGTGGCTCAGATAGG-3′	280
Bax	上游 5′-GCGTCCACCAAGAAGCTGAG-3′ 下游 5′-ACCACCCTGGTCTTGGATCC-3′	311
Caspase-3	上游 5′-TTTGTTTGTGTGCTTCTGAGCC-3′ 下游 5′-GATGTTCTGGAGAGCCCCG-3′	400
Caspase-9	上游 5′-CCCACACAGATGCTGTTTACCAT-3′ 下游 5′-GCACAACAAAGCACTTCATCCTC-3′	153
GAPDH	上游 5′-GGGAGCCAAAAGGGTCATCTC-3′ 下游 5′-CCATGCCAGTGAGCTTCCGTTC-3′	353

1.2 RCE-4 的分离

将干燥的吉祥草根茎切成小段,用 95% 乙醇在 65 ℃回流提取 3 次,每次 2 h,将 3 次的提取液合并,回收乙醇,得深棕色浸膏,然后加入适量蒸馏水,混悬至浸膏完全溶解。依次用石油醚、乙酸乙酯、水饱和的正丁醇萃取,回收萃取液,得石油醚部位、乙酸乙酯部位和正丁醇。然后取乙酸乙酯部位浸膏硅胶柱层析,采用氯仿-甲醇=15∶1梯度洗脱,经甲醇重结晶即得。

1.3 模型的制备及给药

取对数生长的 Caski 细胞,PBS 稀释,制成 4×10^7/mL 的细胞悬液。裸鼠局部皮肤消毒后,将细胞悬液 0.3 mL 注射于裸鼠右侧后腿背部皮下。待肿瘤体积达到 100~200 mm^3 后,将造模成功的动物按瘤体积大小分为 5 组:模型组(灌胃给予 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液)、紫杉醇(皮下注射 10 mg/kg)和 RCE-4(灌胃给予 25、50、100 mg/kg)组,1 次/d,连续 4 周。

1.4 观察裸鼠成瘤情况及一般状态

每天观察裸鼠的精神状态、活动力、进食量、饮水量、肿瘤生长情况、大便形态等。每 3 天测量 1 次裸鼠体质量、饮食量、饮水量。分组后第 2 天开始测量各组移植瘤的长度(L)和宽度(W),每 3 天测量 1 次,肿瘤体

积(V)=(L×W²)/2。以观测时间(d)作为横轴,瘤体积的均值(mm³)为纵轴绘制移植瘤生长曲线[4]。

1.5 称量瘤质量和计算抑瘤率

末次给药的次日颈椎脱臼法处理裸鼠,将肿瘤完整剥离,称量各组肿瘤质量,按照公式计算抑瘤率:抑瘤率=[1-(治疗组瘤质量/模型组瘤质量)]×100%。

1.6 肿瘤组织形态学观察

剥取肿瘤组织后,取 2 mm×2 mm 肿瘤组织用4%多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,在光学显微镜下观察肿瘤组织形态学变化。

1.7 TUNEL 检测肿瘤组织细胞凋亡

取肿瘤组织切片经脱蜡后,滴加蛋白酶 K(20 μg/mL),室温放置 20 min,PBS 洗涤 3 次,然后滴加 TUNEL 反应液(酶液:标记液=1:9),37 ℃孵育 1 h,PBS 洗涤 3 次后,滴加 POD 液,37 ℃再次孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次,DAB 显色(90 s),苏木精复染 5 min,中性树脂封片。在低倍镜下选取细胞均匀分布的视野,然后在高倍镜下随机选取 0.04 mm² 的 10 个视野计算肿瘤组织中阳性细胞数[5]。

1.8 免疫组化检测肿瘤组织中 COX-2 表达

取肿瘤组织切片常规脱蜡至水后,将整个架子放入枸橼酸盐缓冲液中,微波炉加热至沸腾后断电,间隔 5~10 min,反复 1~2 次,室温自然冷却后用 PBS 洗 3 遍,每次洗完静置 5 min,擦干。滴加 3% H_2O_2,以液体覆盖整个组织为准,室温 5~10 min,以灭火内源性酶。PBS 洗 3 遍,每次洗完静置 5 min,擦干。滴加 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余的水,不洗。滴加适当稀释的一抗,4 ℃过夜,PBS 洗 3 遍,每次洗完静置 5 min,擦干。滴加二抗,室温放置 30 min。PBS 洗 3 遍,每次洗完静置 5 min,擦干。滴加 SABC,室温放置 30 min,PBS 洗 3 遍,每次洗完静置 5 min,擦干。DAB 显色(1~2 min),苏木精复染 5 min,中性树脂封片,然后在光学显微镜下采用半定量积分综合计量法分析各个实验组移植瘤细胞中 COX-2 的蛋白表达。具体方法依照李龙等[6]报道进行。

1.9 实时定量 PCR 检测肿瘤组织中 Bcl-2、Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 mRNA 表达

按照 RNA 提取试剂盒说明书,提取肿瘤组织 RNA,反转录为 cDNA。在反应管中加入 SYBR® Premix Ex TaqTM Ⅱ(2X)12.5 μL,10 μmol/L PCR 上游引物 r 和 PCR 10 μmol/L 下游引物 r 各 1 μL,cDNA 模板 2 μL,灭菌蒸馏水 8.5 μL,最终反应体系为 25 μL。将样品放入实时定量 PCR 扩增仪中按 95 ℃预变性 30 s、95 ℃变性 5 s、退火 30 s、72 ℃延伸 20 s 条件扩增 30 次。利用 PCR 仪汇出扩增曲线,进行结果分析。

1.10 Western blot 检测肿瘤组织中 Survivin 蛋白表达

按照蛋白质提取试剂盒说明书,提取肿瘤组织蛋白,进行蛋白定量后,加样品缓冲液煮沸 5 min,各取 20 μL 加样;10% 聚丙烯酰胺凝胶,在 120 V、28 mA 条件下电泳 1.5 h;100 mA 条件下 PVDF 膜转膜 3 h;5% 脱脂牛奶封闭,滴加 Survivin 一抗(1∶200),4 ℃过夜;用含 0.1% Tween 20 的 TBS 冲洗 5 min×3 次,再加二抗(1∶1 000)室温下孵育 2 h,用 0.1% TBST 冲洗 15 min×3 次,ECL 发光检测,X 线片显影,扫描图像,测得各条带的灰度值,以 β-actin 为内对照标准化后,比较其表达量的变化。

1.11 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较用单因素方差分析,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RCE-4 的结构鉴定

RCE-4 波谱数据:^{1}H-NMR(400 MHz,C_5D_5N)δ 0.85(3 H,s,H-18),1.34(3 H,s,H-19),1.15(3 H,s,H-21),1.08(3 H,d,J=6.5 Hz,H-27),1.76(3 H,d,J=6.1 Hz,CH_3-Rha),6.63(1 H,s),5.11(1 H,d,J=7.3 Hz);^{13}C-NMR(100 MHz,C_5D_5N)δ:75.9(C-1),27.3(C-2),67.3(C-3),34.2(C-4),31.8(C-5),26.4(C-6),26.4(C-7),35.6(C-8),42.0(C-9),39.4(C-10),21.4(C-11),40.3(C-12),40.7(C-13),56.4(C-14),32.2(C-15),81.3(C-16),62.9(C-17),16.7(C-18),19.4C-19),42.5(C-20),14.9(C-21),109.7(C-22),26.3(C-23),26.2(C-24),27.3(C-25),65.1(C-26),16.3(C-27),98.1(xyl,C-1),76.9(xyl,C-2),79.2(xyl,C-3),71.6(xyl,C-4),67.4(xyl,C-5),101.9(rha,C-1),72.0(rha,C-2),72.2(rha,C-3),74.5(rha,C-4),69.9(rha,C-5),18.8(rha,C-6)。该化合物为无色针状结晶,分子式 $C_{38}H_{62}O_{12}$,鉴定该化合物为(1β,3β,5β,25S)-螺甾烷-1,3-二醇 1-[α-L-鼠李糖-(1→2)-β-D-木吡喃糖苷](图 1,简称 RCE-4)。

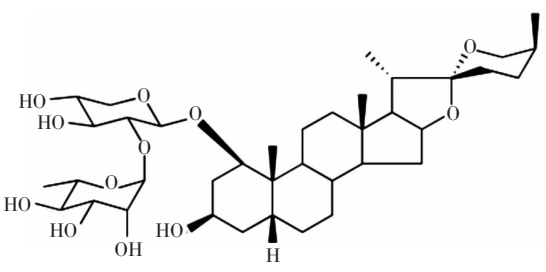


图 1 RCE-4 的化学结构

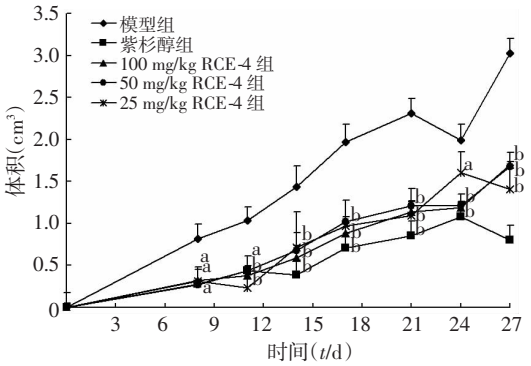
2.2 RCE-4 对宫颈癌移植瘤裸鼠一般状态的影响

Caski 细胞接种裸鼠 8 d 后,裸鼠右侧后腿背部出

现黄豆大小的移植瘤,20 只裸鼠全部成瘤,用药前各组间平均肿瘤体积大小差异无统计学意义($P>0.05$),提示宫颈癌肿瘤模型成功,9 d 起开始给药。实验期间各组裸鼠精神状态良好,每天的进食、饮水及二便均正常。

2.3　RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤生长的影响

治疗期间,测量移植瘤大小,计算瘤体积,绘制移植瘤生长曲线图(图 2)。各实验组裸鼠移植瘤的体积均随着时间延长有不同程度的增大;模型组的增长速度明显快于紫杉醇和 RCE-4 治疗组;各治疗组无论是自身前后比较还是与同时间的模型组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),而且 RCE-4 给药组呈现出较好的量效关系。



a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与同时间点模型组比较

图 2　各组宫颈癌裸鼠移植瘤生长情况

2.4　RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤瘤质量和抑瘤率的影响

模型组裸鼠移植瘤体积和肿瘤质量最大,用紫杉醇(10 mg/kg)和 RCE-4(25、50、100 mg/kg)治疗后,瘤质量均出现了明显的减小,与模型组比较具有统计学差异($P<0.01$,表 2、图 3)。

表 2　各组宫颈癌裸鼠移植瘤瘤质量和抑瘤率比较($n=6$)

组别	瘤体积 (cm^3, $\bar{x}\pm s$)	瘤质量 (g, $\bar{x}\pm s$)	抑瘤率 (%)
模型组	3.25 ± 2.40	3.011 ± 0.171	–
10 mg/kg 紫杉醇组	0.51 ± 0.36	0.585 ± 0.093[a]	80.57
25 mg/kg RCE-4 组	1.72 ± 1.51	1.939 ± 0.253[a]	35.60
50 mg/kg RCE-4 组	1.13 ± 0.80	1.434 ± 0.545[a]	52.37
100 mg/kg RCE-4 组	0.80 ± 0.07	0.934 ± 0.602[a]	68.98

a:$P<0.01$,与模型组比较

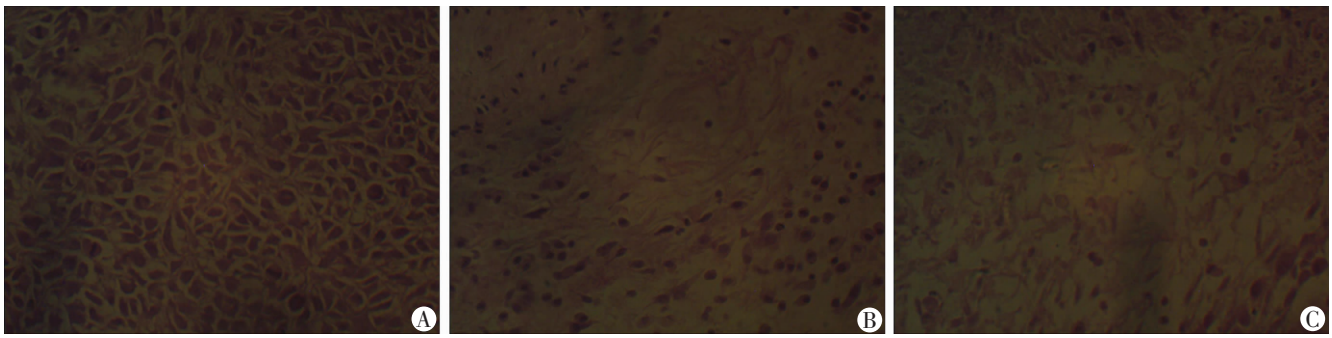
2.5　RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤组织形态学的影响

HE 染色观察显示,模型组裸鼠移植瘤组织中肿瘤细胞生长迅速,染色质增多,核体积明显增大,呈 2 个或多个,核仁轮廓清晰;用紫杉醇(10 mg/kg)和 RCE-4 (25、50、100 mg/kg)治疗后,可见肿瘤细胞皱缩,细胞质浓缩,细胞核染色质向边缘聚集,并伴随有成片的红染坏死区域,而且随 RCE-4 剂量的增加,其作用效果更为明显(图 4)。



A:模型组;B:紫杉醇组;C: 100 mg/kg RCE-4 组

图 3　各组宫颈癌裸鼠移植瘤大小观察



A: 模型组;B: 紫杉醇组;C: 100 mg/kg RCE-4 组

图 4　各组宫颈癌裸鼠移植瘤组织形态学观察　(HE ×400)

2.6 RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤组织细胞凋亡的影响

紫杉醇组和 RCE-4 组(25、50、100 mg/kg)裸鼠移植瘤细胞凋亡率分别为、(70.33 ± 5.69)%、(26.17 ± 7.38)%、(49.77 ± 4.82)%、(61.06 ± 6.36)%,与模型组(15.96 ± 4.57)% 比较差异有统计学意义($P < 0.05$,$P < 0.01$),且随 RCE-4 剂量的增加,其作用效果更为明显。由图 5 可见,凋亡细胞主要表现为细胞核固缩成均一致密物,呈棕黄色。模型组阳性反应区域较少,多呈蓝色;用紫杉醇(10 mg/kg)和 RCE-4 (25、50、100 mg/kg)和治疗后,可见凋亡细胞明显增多,且随着 RCE-4 剂量的增加,其作用效果更为明显。

2.7 RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤组织中 COX-2 蛋白表达的影响

COX-2 蛋白表达为细胞质呈棕黄色颗粒,紫杉醇组(0.33 ± 0.52)和 RCE-4 (25、50、100 mg/kg)组(分别为 1.00 ± 0.89、0.67 ± 0.82、0.50 ± 0.55)COX-2 蛋白表达量明显减少,与模型组(2.50 ± 0.55)比较差异有统计学意义($P < 0.05$、$P < 0.01$,图 6)。

2.8 RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤组织中 Bcl-2、Bax mRNA 表达的影响

由表 3 可知,模型组裸鼠移植瘤组织中 Bcl-2 mRNA 表达水平明显增加,Bax mRNA 表达水平明显降低;用紫杉醇(10 mg/kg)和 RCE-4 (25、50、100 mg/kg)治疗后,Bcl-2 mRNA 表达和 Bcl-2/Bax 值明显降低,Bax mRNA 表达明显升高,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,$P < 0.01$),而且其改善作用随剂量的增加而增强。

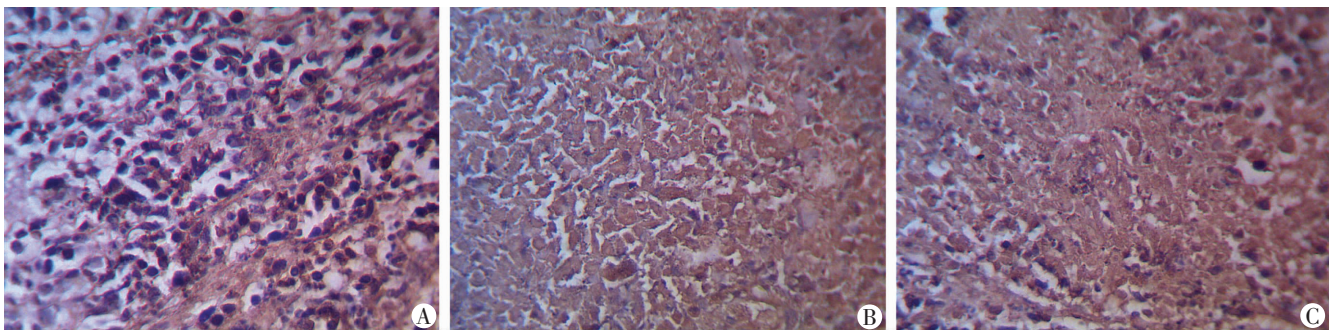
表 3 各组宫颈癌裸鼠移植瘤组织中 Bcl-2、Bax mRNA 表达($n = 4$,$\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/Bax
模型组	0.657 ± 0.036	0.367 ± 0.034	1.794 ± 0.072
10 mg/kg 紫杉醇组	0.327 ± 0.040[b]	0.634 ± 0.045[b]	0.514 ± 0.032[b]
25 mg/kg RCE-4 组	0.502 ± 0.064[a]	0.496 ± 0.053[a]	1.010 ± 0.046[b]
50 mg/kg RCE-4 组	0.427 ± 0.033[b]	0.574 ± 0.065[b]	0.746 ± 0.033[b]
100 mg/kg RCE-4 组	0.379 ± 0.032[b]	0.611 ± 0.073[b]	0.622 ± 0.031[b]

a:$P < 0.05$, b:$P < 0.01$,与模型组比较

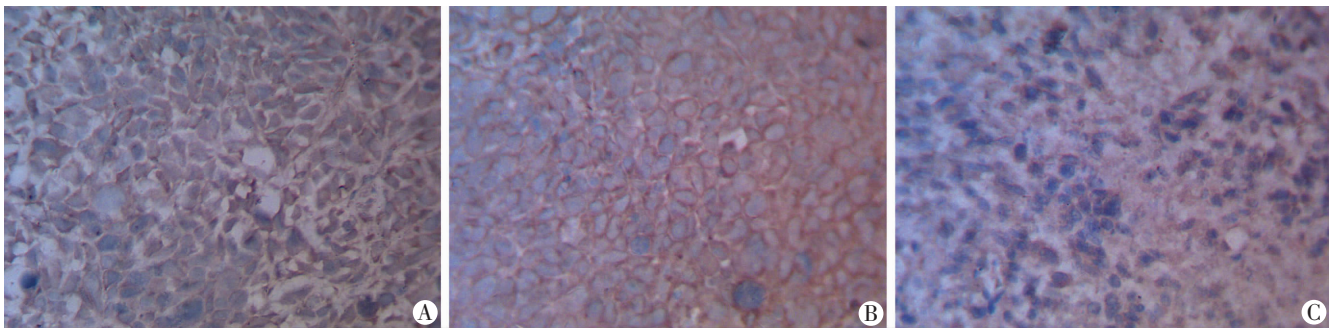
2.9 RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤组织中 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达的影响

由表 4 可见,模型组裸鼠移植瘤组织中 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平明显降低;用紫杉醇(10 mg/kg) 和 RCE-4 (25、50、100 mg/kg)治疗后,上述异常表达得到有效的逆转,与模型组比较差异有统计学意义($P < 0.05$,$P < 0.01$),且随 RCE-4 剂量的增加,其作用效果更为明显。



A:模型组;B:紫杉醇组;C:100 mg/kg RCE-4 组;箭头示凋亡细胞

图 5 各组宫颈癌裸鼠移植瘤组织细胞凋亡观察 (TUNEL × 400)



A:模型组;B:紫杉醇组;C:100 mg/kg RCE-4 组;箭头示 COX-2 蛋白表达

图 6 RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤组织中 COX-2 蛋白表达的影响 (× 400)

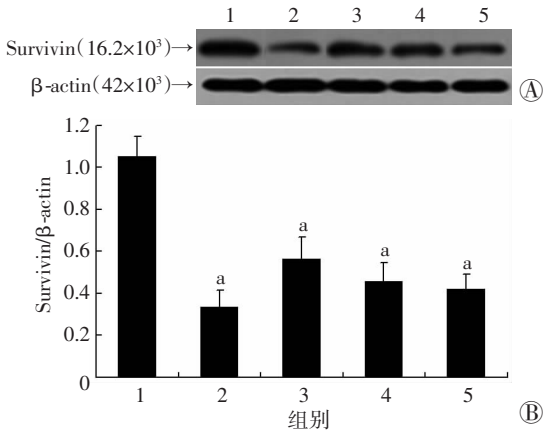
表 4 各组宫颈癌裸鼠移植瘤组织中 Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	Caspase-3/GAPDH	Caspase-9/GAPDH
模型组	0.408 ± 0.060	0.360 ± 0.054
10 mg/kg 紫杉醇组	0.702 ± 0.076[b]	0.622 ± 0.064[b]
25 mg/kg RCE-4 组	0.552 ± 0.103[a]	0.468 ± 0.072[a]
50 mg/kg RCE-4 组	0.618 ± 0.062[b]	0.538 ± 0.094[b]
100 mg/kg RCE-4 组	0.656 ± 0.052[b]	0.561 ± 0.043[b]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与模型组比较

2.10 RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤组织中 Survivin 蛋白表达的影响

由图 7 可见,模型组裸鼠移植瘤组织中 Survivin 蛋白表达水平明显升高;用紫杉醇(10 mg/kg)和 RCE-4 (25、50、100 mg/kg)治疗后,Survivin 蛋白表达水平明显降低,与模型组比较差异有统计学意义($P<0.05$,$P<0.01$),且随 RCE-4 剂量的增加,其作用效果更为明显。



A:移植瘤组织 Survivin 蛋白表达;B:半定量分析;1:模型组,2:紫杉醇组,3:25 mg/kg RCE-4 组,4:50 mg/kg RCE-4 组,5:100 mg/kg RCE-4 组;a:$P<0.01$,与模型组比较

图 7 Western blot 检测各组宫颈癌裸鼠移植瘤组织中 Survivin 蛋白表达

3 讨论

本实验用 Caski 细胞皮下移植建立宫颈癌移植瘤模型,发现模型组肿瘤生长迅速,肿瘤组织中 COX-2、Bcl-2、Survivin 表达水平明显增加,Bax、Caspase-3、Caspase-9 表达水平明显降低;用紫杉醇和 RCE-4 治疗后,可显著抑制移植瘤的生长和逆转移植瘤组织中 COX-2、Survivin、Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9 的异常表达。表明 RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤的生长具有显著抑制作用。

近年靶向 Survivin 成为肿瘤防治的重要措施之一[7-8]。本实验中模型组移植瘤组织中 Survivin 蛋白表达水平明显升高;用紫杉醇和 RCE-4 治疗后,其表达水平明显降低,实验结果与 Chen 等[9]的报道一致。作为细胞凋亡通路的重要靶标之一,Survivin 需要和下游的多种信号通路相结合,组成系列完整的信号网络来实现调控细胞凋亡的进程,比如:死亡受体、线粒体途径,细胞周期蛋白等[8]。

作为细胞凋亡信号通路的重要靶蛋白 Bcl-2 家族,其 Bcl-2、Bcl-x 等抗凋亡蛋白和 Bax、Bad 等促凋亡蛋白组成上游与 Survivin 衔接的信号通络,掌控着细胞的命运;而 Caspase 蛋白激酶家族则在细胞凋亡通路的下游发挥调控作用,它们组成 Survivin-Bcl-2 家族-Caspase 蛋白激酶家族信号调节通路,调控细胞凋亡的进程[10]。当 Survivin 介导的 Bcl-2 家族的抗凋亡蛋白和凋亡蛋白平衡体系被打破后,Bcl-2、Bax 等表达及 Bcl-2/Bax 值将出现异常变化,其结果是线粒体膜通透性改变,使得细胞质中细胞色素 C、凋亡蛋白酶活化因子-1 的表达异常,进而使得 Caspase-9、Caspase-3 等出现异常表达,导致细胞凋亡紊乱[11-12]。本研究发现,宫颈癌裸鼠移植瘤组织中 Bcl-2 表达水平明显增加,Bax、Caspase-3、Caspase-9 表达水平明显降低;用紫杉醇和 RCE-4 治疗后,与模型组比较可显著降低 Bcl-2 mRNA 表达水平,升高 Bax、Caspase-3、Caspase-9 mRNA 表达水平及降低 Bcl-2/Bax 值;本结果与其降低宫颈癌裸鼠移植瘤体积和瘤质量、肿瘤组织形态学分析和 TUNEL 法分析细胞凋亡的结果一致。本研究表明,抑制 Bcl-2 家族和 Caspase 蛋白激酶家族的异常表达可能是 RCE-4 治疗肿瘤的重要作用机制之一。

COX 分为 COX-1、COX-2 两种亚型,其中 COX-1 是属于结构性表达,COX-2 为诱导性表达。在正常情况下,COX-2 鲜见表达,然而当机体受到外源或内源刺激时,常被激活[13]。近年研究发现,COX-2 的高表达,与许多肿瘤肿瘤(如肝癌、胃癌、前列腺癌、宫颈癌、肺癌等)的发生、发展、转移密切相关,它的持续高表达常预示肿瘤的不良预后。因此,针对 COX-2 开展积极干预成为肿瘤防治的又一重要靶标[14]。本实验中免疫组化分析结果显示模型组移植瘤组织 COX-2 的表达水平明显升高,用紫杉醇和 RCE-4 治疗后,其表达水平明显降低,这与我们前期研究[15]证实其具有良好抗炎活性和抗肿瘤作用一致。由此我们初步推断抑制 COX-2 的表达可能是 RCE-4 抑制肿瘤生长的重要作用机制之一。

综上所述,RCE-4 对宫颈癌裸鼠移植瘤的生长具有显著抑制作用,其机制可能与其上调 Bax、Caspase-9、Caspase-3 的表达和下调 Survivin、Bcl-2、COX-2 的表达有关,但是 RCE-4 是否仅通过该通路发挥作用还是有其他通路参与其中,我们正在进一步研究。

参考文献:

[1] 中华本草编委会. 中华本草[M]. 第8册22卷. 上海: 上海科学技术出版社, 1999: 178-180.

[2] 王倩. 吉祥草根茎化学成分及其细胞毒活性研究[D]. 宜昌: 三峡大学, 2012.

[3] Wang G, Huang W, He H, *et al*. Growth inhibition and apoptosis-inducing effect on human cancer cells by RCE-4, a spirostanol saponin derivative from natural medicines[J]. Int J Mol Med, 2013, 31(1): 219-224. DOI: 10.3892/ijmm.2012.1178

[4] 曾建华, 钟玲, 徐波. 地塞米松对宫颈癌细胞裸鼠移植瘤生长的抑制作用[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(13): 1279-1382.

[5] Roomi M W, Kalinovsky T, Cha J, *et al*. Effects of a nutrient mixture on immunohistochemical localization of cancer markers in human cervical cancer HeLa cell tumor xenografts in female nude mice[J]. Exp Ther Med, 2015, 9(2): 294-302. DOI: 10.3892/etm.2014.2127

[6] 李龙, 尚卫华, 赵娟, 等. 阿司匹林对宫颈癌裸鼠移植瘤生长的影响及 Bax 与 VEGF 的表达变化[J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2013, 34(6): 808-812. DOI: 10.7652/jdyxb201306022

[7] Jaiswal P K, Goel A, Mittal R D. Survivin: A molecular biomarker in cancer [J]. Indian J Med Res, 2015, 141 (4): 389-397. DOI: 10.4103/0971-5916.159250

[8] Khan S, Ferguson-Bennit H, Asuncion-Valenzuela M M, *et al*. Localization and upregulation of survivin in cancer health disparities: a clinical perspective[J]. Biologics, 2015, 9: 57-67. DOI: 10.2147/BTT.S83864

[9] Chen Z Y, Liang K, Lin Y, *et al*. Study of the UTMD-based delivery system to induce cervical cancer cell apoptosis and inhibit proliferation with shRNA targeting Survivin [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(1): 1763-1777. DOI: 10.3390/ijms14011763

[10] Spagnuolo C, Russo G L, Orhan I E, *et al*. Genistein and cancer: current status, challenges, and future directions [J]. Adv Nutr, 2015, 6(4): 408-419. DOI: 10.3945/an.114.008052

[11] Wang Z, Zhao Z, Lu J, *et al*. A comparison of the biological effects of 125I seeds continuous low-dose-rate radiation and ^{60}Co high-dose-rate gamma radiation on non-small cell lung cancer cells [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0133728. DOI: 10.1371/journal.pone.0133728

[12] 王爱玲, 王海燕, 覃慧林, 等. 南赤爬醇提物对裸鼠宫颈癌 Caski 移植瘤的抑制作用[J]. 三峡大学学报: 自然科学版, 2015, 37(3): 108-112.

[13] Jones R P, Bird N T, Smith R A, *et al*. Prognostic molecular markers in resected extrahepatic biliary tract cancers; a systematic review and meta-analysis of immunohistochemically detected biomarkers[J]. Biomark Med, 2015, 9(8): 763-775. DOI: 10.2217/BMM.15.48

[14] Misra S, Sharma K. COX-2 signaling and cancer: new players in old arena[J]. Curr Drug Targets, 2014, 15(3): 347-359.

[15] Bai C H, He H B, Cheng F, *et al*. A steroidal saponin RCE-4 inhibits lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses *via* blocking PI3K/Akt-mediated NF-κB activation in RAW264.7 cells[J]. Applied Mechanics and Materials, 2014, (568/570): 1901-1906.

(**收稿**:2015-07-16;**修回**:2015-09-06)

(编辑 张 维)