doi:10.11659/jjssx.11E018030

·基础研究·

朱砂莲甲素对口腔鳞癌大鼠模型 P63、TRPM8 的影响

曾宁碧,赵 希,曾 旖,黄文静,叶艳艳 (陆军军医大学第一附属医院口腔科,重庆 400038)

[摘 要] **目的** 探讨朱砂莲甲素对口腔鳞癌大鼠模型 P63、TRPM8 的影响。**方法** 选取 20 只 Wistar 大鼠制作口腔鳞癌模型,成功 16 只,分为模型组和朱砂莲甲素组,每组 8 只;另外选择 10 只 Wistar 大鼠作为正常组。朱砂莲甲素组给予朱砂莲甲素进行治疗,其余 2 组大鼠采用无菌蒸馏水进行腹腔注射。3 组大鼠进行平均体质量、肿瘤体积检查,病理形态学观察,采用 Western blot 检测 P63、TRPM8、HGF、c-Met 表达。**结果** 模型组大鼠平均体质量低于正常组,肿瘤体积大于正常组,差异具有统计学意义($P<0.05$);朱砂莲甲素组大鼠平均体质量高于模型组,肿瘤体积小于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。模型组大鼠 P63、TRPM8、HGF、c-Met 水平高于正常组,差异具有统计学意义($P<0.05$);朱砂莲甲素组大鼠 P63、TRPM8、HGF、c-Met 低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 朱砂莲甲素可有效减小口腔鳞癌大鼠肿瘤体积,通过调节 HGF/c-Met 信号通路改善 P63、TRPM8 水平,对临床治疗口腔鳞癌具有重要意义。

[关键词] 朱砂莲甲素;口腔鳞癌;肿瘤体积;大鼠
[中图分类号] R739.8 [文献标识码] A [收稿日期] 2018-11-11

Effect of emodin on P63 and TRPM8 of oral squamous cell carcinoma in rat model

ZENG Ning-bi, ZHAO Xi, ZENG Yi, HUANG Wen-jing, YE Yan-yan (Department of Stomatology, First Hospital Affiliated to Army Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of emodin on P63 and TRPM8 of oral squamous cell carcinoma in rat model. **Methods** Twenty Wistar rats were selected to make oral squamous cell carcinoma models, 16 of them were successfully divided into model group and emodin group, 8 rats in each group. Another 10 Wistar rats were selected as the normal group. Emodin group was treated with emodin, the other two groups were injected with aseptic distilled water. The average body weight, tumor volume and pathomorphology of rats in 3 groups were examined, and the expressions of P63, TRPM8, HGF and c-Met were detected by Western blot. **Results** The average body weight of the model group was lower than that of normal group, and the tumor volume of the model group was larger than that of normal group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The average body weight of the emodin group was higher than that of model group, and the tumor volume of the emodin group was smaller than that of model group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of P63, TRPM8, HGF and c-Met in model group were higher than those in normal group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). The levels of P63, TRPM8, HGF, c-Met in emodin group were lower than those in model group, the differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Emodin can effectively reduce the tumor volume of oral squamous cell carcinoma in rats, which regulates HGF/c-Met signaling pathway to improve P63 and TRPM8 levels. It is important for clinical treatment of oral squamous cell carcinoma.

Keywords: emodin; oral squamous cell carcinomas; gross tumor volume; rat

口腔癌是一种临床上常见的恶性肿瘤,其患病人群正趋于年轻化,其中口腔鳞状细胞癌占 80%[1]。口腔鳞癌从鳞状上皮覆盖的皮肤开始,一些侵袭到皮肤以及结膜的交界处,严重的会入侵患者的副鼻窦进入颅内,还会通过淋巴结转移入侵全身,严重影响患者的身体健康[2]。有研究发现,从中草药中提炼出来的有效物质具有抗癌作用[3]。朱砂莲甲素(大黄素)是一种蒽醌类的物质,具有抗炎、免疫抑制、降血压等作用,对肿瘤的抑制率在30%以上[3]。P63在细胞的生长和分化过程中起到重要的调控作用,其水平的异常会导致肿瘤发生[4]。TRPM8 属于一种前列腺特异性基因,生理病理学效应较广,并参与炎症反应和能量代谢[5-6]。本文通过研究朱砂莲甲素对口腔鳞癌大鼠模型 P63、TRPM8 的影响,探究其抗癌机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取 30 只雄性、健康、清洁的 Wistar 大鼠,年龄为 8~10 周龄,平均(9.0±0.5)周龄,体质量 200~220 g,平均(210.2±20.4)g,由河北医科大学实验动物中心提供。所有大鼠在无病原菌的干净笼子里喂

[基金项目] 国家自然科学基金(30300396)
[通信作者] 叶艳艳,E-mail:85408115@qq.com

养,所饮用的水和食物均经过高温高压消毒,室温维持在23 ℃。所有大鼠在年龄、体质量上差异均无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。本研究经过我院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 口腔鳞癌大鼠模型建立 选取20只大鼠制作口腔鳞癌模型。所有大鼠制作前需要禁食和禁水8 h,采用10%水合氯醛进行腹腔注射,大鼠采取仰卧位,将头和四肢固定,4NQO采用蒸馏水稀释成0.1%最终浓度为5 g/L的溶液,将其均匀涂抹在大鼠的口腔腭黏膜上,2 d涂抹1次,连续20 d,建模成功16只。另外10只大鼠不做处理,待大鼠清醒后正常饲养。

1.2.2 分组及给药 当大鼠舌背中部出现了灰白色的外生肿物,牙龈、口底以及腭部和唇部发生溃疡和肿物,质地坚硬,与周围组织粘连,进食困难,说明建模成功。建模成功大鼠16只,随机分为模型组和朱砂莲甲素组,各8只;另10只大鼠为正常组。朱砂莲甲素组大鼠给予朱砂莲甲素进行治疗,100 mg的朱砂莲甲素溶于20 mL 0.1%的NaOH溶液中,配置成5 g/L浓度,按照2.5 mg/100 g的剂量进行腹部注射,第1天每6 h 1次,之后每天3次,连续治疗1周。模型组和正常组大鼠与等体积的无菌蒸馏水进行腹腔注射,连续治疗1周。在治疗过程中,所有大鼠均正常饲养,自由饮水,每天保证人工排尿3次。

1.2.3 平均体质量、肿瘤体积检查 所有大鼠在治疗1周过程中,观察大鼠的活动情况以及大鼠毛色,称取大鼠体质量。之后将大鼠断头处死,称取大鼠的肿瘤体积。

1.2.4 病理形态学观察 选取大鼠上腭部分病变黏膜组织,对模型组和朱砂莲甲素组大鼠的样本进行染色处理,使用二甲苯进行常规脱蜡处理2次,每次5 min,然后在梯度酒精下水花处理3 min,自来水冲洗1次;使用苏木素染色5 min,自来水冲洗1次;使用浓度为1%的盐酸酒精分化处理30 s,在0.2%氨水中反蓝处理2 min,自来水冲洗1次;用浓度0.5%伊红染色10 min,自来水冲洗1次;使用乙醇梯度进行脱水处理,最后用中性树胶进行封片。

1.2.5 Western blot检测P63、TRPM8、HGF、c-Met表达水平 将采集到的标本,使用PBS缓冲液清洗3遍以上,分离缓冲液,加入IP细胞裂解液裂解35 min,提取总蛋白,BCA测定蛋白浓度。取每孔20 μg蛋白质,通过10%的SDS-PAGE凝胶进行电泳,加入适量浓缩的SDS-PAGE蛋白缓冲液15 min;100 V,电泳10 min,结束之后,将电转膜浸泡在10%的牛奶中,在37 ℃环境下的摇床上封闭1.5 h;与一抗结合,加入TBST稀释按(1∶1 000)稀释一抗Tubulin(内参照),在4 ℃的环境下孵育过夜保存;第2天用TBST缓冲液清洗,与二抗结合在室温下孵育1 h,再次用TBST缓冲液反复清洗。最后加入显影剂,将其浸在底物溶液中进行显色,严格按照显影定影试剂盒操作说明书进行。

1.3 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)进行描述,2组间比较采用独立样本t检验,$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

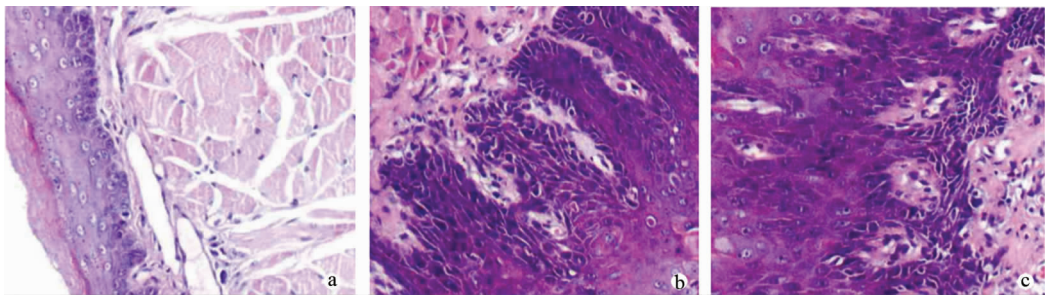
2 结果

2.1 3组大鼠间病理学观察

正常组大鼠黏膜组织正常,未见炎性细胞浸润和细胞增生,有角化现象,上皮角延长不显著。模型组大鼠病变黏膜组织细胞呈弥漫性成片排列,细胞体积大,细胞核体积大,增生严重,有大量炎性细胞浸润。朱砂莲甲素组炎性细胞浸润得到缓解,增生情况降低,细胞体积减小(图1)。

2.2 3组大鼠平均体质量、肿瘤体积比较

模型组大鼠平均体质量(170.47±18.05)g低于正常组(210.70±22.50)g,肿瘤体积(9.86±2.45)mm^3大于正常组,差异具有统计学意义($P<0.05$);朱砂莲甲素组大鼠平均体质量(190.85±12.65)g高于模型组,肿瘤体积(0.95±0.05)mm^3小于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。模型组与朱砂莲甲素组大鼠肿瘤体积比较见图2。



a:正常组;b:模型组 c:朱砂莲甲素组

图1 3组大鼠病理学观察(×400)

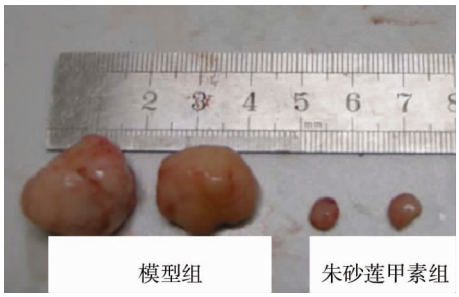
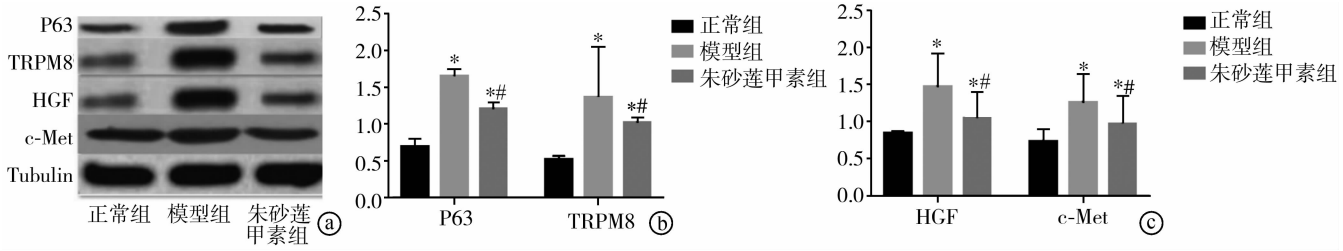


图 2 模型组与朱砂莲甲素组大鼠肿瘤体积比较

2.3 3 组大鼠 P63、TRPM8、HGF、c-Met 表达水平比较

Western blot 结果显示:模型组大鼠 P63、TRPM8、HGF、c-Met 水平均高于正常组,差异具有统计学意义($P<0.05$);朱砂莲甲素组大鼠 P63、TRPM8、HGF、c-Met水平低于模型组,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 3。



a: Western blot 检测结果;b:3 组大鼠 P63、TRPM8 表达水平比较;c:3 组大鼠 HGF、c-Met 表达水平比较 *:与正常组比较,$P<0.05$;#:与模型组比较,$P<0.05$

图 3 3 组大鼠 P63、TRPM8、HGF、c-Met 表达水平比较

3 讨论

口腔鳞癌的主要特点是具有较高的恶性程度,其生长速度较快,严重影响舌肌,最终会限制舌的运动,使患者发生吞咽困难[7-8]。有研究显示,患口腔鳞癌的男性多于女性,吸烟和酗酒的男性患者常发[9]。本研究建立的口腔鳞癌模型是通过 4NQO 诱导建立,主要是因为 4NQO 对周围的组织不容易产生炎症反应而导致坏死。4NQO 还原酶在癌症的发病过程中起到关键性的作用,大鼠舌部黏膜的 4NQO 还原酶具有较高的含量,采用 4NQO 诱导使大鼠病变器官存在靶向性[10]。

本研究主要通过采取朱砂莲甲素治疗口腔鳞癌大鼠,研究其对 P63、TRPM8 水平的影响以及作用机制。结果显示,朱砂莲甲素组大鼠平均体质量增加,肿瘤体积减小,说明朱砂莲甲素有助于改善大鼠身体状况,促进大鼠恢复。朱砂莲甲素通过抑制巨噬细胞有助于减少炎症因子释放,经过泻下作用,有助于肠道的蠕动,细菌在肠道内的停留时间会大大缩短,减少内毒素的生成和吸收[11]。通过抑制内毒素避免炎症因子被激活和释放,有助于细胞保持稳定。本研究中,朱砂莲甲素组大鼠 P63 水平降低,说明朱砂莲甲素有助于抑制 P63 水平。P63 属于一种抑癌基因,在鳞状上皮细胞的生长和分化中起到参与作用。P63 发生突变会导致转录的多种异构体表达出现异常,同时 P63 对细胞的凋亡有诱导作用,异常表达的 P63 会造成肿瘤细胞分化异常和增生[12]。韩江[13]指出,P63 在宫颈癌中显示高表达。P63 在鳞癌中是一种肿瘤标志物,对口腔鳞癌患者来说具有重要意义。本研究结果显示,朱砂莲甲素组大鼠 TRPM8 水平降低,说明朱砂莲甲素可以改善大鼠 TRPM8 水平。TRPM8 能够通过刺激冷敏感通道中的通道膜电位,促进通道保持开放。TRPM8 被激活后,会促进 Ca^{2+} 内流在细胞中产生生物效应,在细胞的增殖、迁移、分化中起到调控作用[14-15]。刘涛等[16]指出 TRPM8 在前列腺癌中显示高表达,Liu 等[17]研究说明 TRPM8 在乳腺癌中也有表达。

本研究结果显示,朱砂莲甲素组大鼠 HGF 和 c-Met表达降低,说明朱砂莲甲素可以降低 HGF 和 c-Met的水平。HGF 和 c-Met 经过特异性结合会促进 HGF/c-Met 信号通路建立形成。HGF 的主要来源在间质细胞,c-Met 的主要来源在上皮细胞,HGF 和c-Met 结合会调控上皮-间质细胞之间相互作用,促进结构形成[18-19]。有研究显示,HGF 和 c-Met 在正常状态下显示低表达,上皮细胞和间质细胞起到严格调控作用[20-21]。在肿瘤细胞中 c-Met 和 HGF 可以通过自分泌和旁分泌完成,导致表达水平升高。HGF 和 c-Met 在多种肿瘤中均显示表达异常,和口腔鳞癌之间也存在紧密的联系。张敏等[22]指出 HGF/c-Met 信号通路参与口腔鳞癌的形成、浸润、转移等有关,在口腔鳞癌的发病中起到关键性作用。朱砂莲甲素主要是对癌细胞的 DNA、RNA 有抑制作用,抑制蛋白质的合成以及癌细胞发生氧化脱氢[23-24]。张凯亮等[25]的研究显示,朱砂莲甲素会抑制口腔鳞癌细胞增殖,促进细胞发生凋亡。本研究结果显示朱砂莲甲素通过激活 HGF/c-

Met 信号通路,下调 P63、TRPM8 水平。

综上所述,朱砂莲甲素可以有效减小口腔鳞癌大鼠肿瘤体积,通过调节 HGF/c-Met 信号通路改善 P63、TRPM8 水平,对临床治疗口腔鳞癌具有重要意义。

[参考文献]

[1] Mikami Y,Fujii S,Nagata K,et al. Gli-mediated keratin 17 expression promotes tumor cell growth through the anti-apoptotic function in oral squamous cell carcinomas[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2017,143(8):1381 - 1393. doi:10.1007/s00432 - 017 - 2398 - 2.

[2] Kao SS,Peters MD,Krishnan SG,et al. Swallowing outcomes following primary surgical resection and primary free flap reconstruction for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas:a systematic review[J]. Laryngoscope,2016,126(7):1572 - 1580. doi:10.1002/lary.25894.

[3] Manimaran A,Buddhan R,Manoharan S. Emodin downregulates cell proliferation markers during dmba induced oral carcinogenesis in golden syrian hamsters[J]. Afr J Tradit Complement Altern Med,2017,14(2):83 - 91. doi:10.21010/ajtcam.v14i2.10.

[4] Monteiro LS,Delgado ML,Ricardo S,et al. Prognostic significance of cd44v6,p63,podoplanin and mmp-9 in oral squamous cell carcinomas[J]. Oral Dis,2016,22(4):303 - 312. doi:10.1111/odi.12442.

[5] 李宏维,周 斌,张海鸿. TRPM8 通过 cAMP-PKA/UCP4 信号调控氧糖剥夺/复糖复氧诱导的神经元凋亡[J]. 南方医科大学学报,2016,36(9):1265 - 1270. doi:10.3969/j.issn.1673 - 4254.2016.09.18.

[6] 董 正,陈 超,董绪德,等. TRPM8 离子通道在胰腺癌中高表达的临床意义[J]. 中华肝胆外科杂志,2017,23(10):680 - 684. doi:10.3760/cma.j.issn.1007 - 8118.2017.10.008.

[7] De Pazo,Kao HK,HY,et al. Prognostic stratification of patients with advanced oral cavity squamous cell carcinoma[J]. Curr Oncol Rep,2017,19(10):65. doi:10.1007/s11912 - 017 - 0624 - 3.

[8] Gelwan E,Malm IJ,Khararjian A,et al. Nonuniform distribution of high-risk human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the oropharynx:rethinking the anatomic boundaries of oral and oropharyngeal carcinoma from an oncologic HPV perspective[J]. Am J Surg Pathol,2017,41(12):1722 - 1728. doi:10.1097/PAS.0000000000000929.

[9] 高 路. 绿茶提取物对口腔鳞癌模型大鼠抗肿瘤组织中 EphA2、EphrinA1 和 E-cadherin 表达的影响[J]. 西部中医药,2018,31(4):25 - 28.

[10] 廖鹏程,张 绪,谭 红,等. 屏障环境下建立 4NQO 饮水诱导 SD 大鼠口腔鳞癌模型[J]. 广东牙病防治,2015,23(2):66 - 70.

[11] 梁洪华. 萝卜硫素对缺氧肺动脉平滑肌细胞增殖和迁移影响的研究[D]. 南宁:广西医科大学,2017.

[12] 陈建霖,杨 喆,周 力,等. p16、p53 及 p63 在口腔鳞癌及癌前病变组织中的表达[J]. 宁夏医学杂志,2016,38(10):875 - 878. doi:10.13621/j.1001 - 5949.2016.10.0875.

[13] 韩 江. E-cadherin 和 P63 蛋白在宫颈癌组织中的表达及与临床病理特征的关系研究[J]. 中国妇幼保健,2016,31(19):4048 - 4050. doi:10.7620/zgfybj.j.issn.1001 - 4411.2016.19.65.

[14] 陈 晨,刘兆国,汪思亮,等. 薄荷醇及其受体 TRPM8 与肿瘤关系研究进展[J]. 中国药理学通报,2015,31(3):312 - 314. doi:10.3969/j.issn.1001 - 1978.2015.03.004.

[15] Bidaux G,Borowiec AS,Dubois C,et al. Targeting of short TRPM8 isoforms induces 4TM-TRPM8-dependent apoptosis in prostate cancer cells[J]. Oncotarget,2016,7(20):29063 - 29080. doi:10.18632/oncotarget.8666.

[16] 刘 涛,陶皇恒,方志海,等. TRPM8 抑制剂 BCTC 对前列腺癌 DU145 细胞的抑癌作用[J]. 武汉大学学报(医学版),2015,36(2):225 - 230. doi:10.14188/j.1671 - 8852.2015.02.01.

[17] Liu J,Chen Y,Shuai S,et al. Trpm8 promotes aggressiveness of breast cancer cells by regulating emt via activating akt/gsk-3β pathway[J]. Tumour Biol,2014,35(9):8969 - 8977. doi:10.1007/s13277 - 014 - 2077 - 8.

[18] 罗朝阳,陈仲伟. HGF/c-Met 信号通路及其与口腔鳞癌关系研究进展[J]. 广东牙病防治,2014,22(9):497 - 501.

[19] 杜洪亮,何等旗,于 涛,等. 肝细胞生长因子对口腔鳞癌裸鼠移植瘤的作用及其机制研究[J]. 实用口腔医学杂志,2018,34(5):586 - 590. doi:10.3969/j.issn.1001 - 3733.2018.05.002.

[20] 吕 洁,张德保,陈 建,等. c-Met 蛋白与 HGF 蛋白在舌鳞癌细胞中的表达及临床意义[J]. 西安交通大学学报(医学版),2015,36(2):245 - 248. doi:10.7652/jdyxb201502020.

[21] Kwon Y,Godwin AK. Regulation of HGF and c-Met interaction in normal ovary and ovarian cancer[J]. Reprod Sci,2017,24(4):494 - 501. doi:10.1177/1933719116648212.

[22] 张 敏,雷志敏,闫国胜,等. HGF/c-Met、VEGF 和 uPA 在口腔鳞癌组织中的表达及意义[J]. 临床口腔医学杂志,2010,26(1):8 - 11. doi:10.3969/j.issn.1003 - 1634.2010.01.003.

[23] Chen X,Zhang S,Chen X,et al. Emodin promotes the osteogenesis of MC3T3-E1 cells via BMP-9/Smad pathway and exerts a preventive effect in ovariectomized rats[J]. Acta Biochim Biophys Sin(Shanghai),2017,49(10):867 - 878. doi:10.1093/abbs/gmx087.

[24] 党中峰,党雅梅,陈 城,等. 大黄素诱导对内质网应激相关蛋白表达及肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响[J]. 兰州大学学报(医学版),2015,41(2):50 - 54. doi:10.13885/j.issn.1000 - 2812.2015.02.010.

[25] 张凯亮,焦康礼,朱玉娟,等. 大黄素抑制人口腔鳞癌细胞 Tca8113 增殖及细胞周期进程的实验研究[J]. 南方医科大学学报,2015,35(5):665 - 670. doi:10.3969/j.issn.1673 - 4254.2015.05.08.

(编辑:刘 艺)