维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)01-0045-04

大蒜素联合顺铂对大鼠膀胱肿瘤生长抑制和诱导凋亡的实验研究

周生财,唐 伟

(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:评价大蒜素联合顺铂治疗 SD 大鼠膀胱肿瘤的效果,探讨其作用机制。方法:膀胱灌注 N-甲基亚硝基脲(MNU)诱导建立 SD 大鼠膀胱肿瘤模型,于第 14 周对 5 组荷瘤大鼠分别腹腔注射生理盐水,顺铂,不同浓度大蒜素,顺铂+大蒜素。每次注射 0.2ml,隔日 1 次,共 7 次,其间观察实验动物生存状态。全部注射完毕后处死大鼠,称取膀胱总重量,对肿瘤组织进行常规石蜡切片,HE 染色,光镜观察,TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡情况。结果:生理盐水组、不同浓度大蒜素组、顺铂+大蒜素组的大鼠体重均随鼠龄的增长而增加,而顺铂组大鼠在停药后随鼠龄的增长体重明显降低,与其他各组比较,差异显著。顺铂+大蒜素组大鼠膀胱的总重量显著小于其他各组。TUNEL 法原位检测发现各组均出现不同程度的肿瘤细胞凋亡,大蒜素+顺铂组尤为明显。结论:大蒜素联合顺铂可共同诱导细胞凋亡发挥协同效应,抑制膀胱肿瘤的生长,并且能改善大鼠的生存状态。

【关键词】大蒜素;顺铂;膀胱肿瘤;凋亡

【中国图书分类法分类号】R737.14 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-12

Research allicin allied with DDP on growth inhibition and induction apoptosis of rat bladder tumor

ZHOU Sheng-cai, et al

(*Department of Urology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the validity of allicin allied with DDP on bearing tumor SD rats, explore the mechanisms of function. *Methods*: set up bladder cancer models by irrigating MNU into SD rat bladder, examine the incidence of cancer. At the end of 14th weeks, five groups were accepted peritoneal injection with NS, allicin, DDP, DDP + allicin respectively .one time every other day, every rat was injected 0.2ml different drugs every time, 7 times in all, observe experimental animals life quality at the same time. After all rats were killed, bladders were weighed. Tumor tissues were embeded in paraffin, each sample was cut into 3 pieces for HE staining, and observed by light microscope. TUNEL method was applied to examine apoptosis of tumor cells. *Results*: in the DDP group, a marked decrease was shown in the appearance of weight when compared with the other groups. Apoptosis of bladder tumors occurred in all groups, especially in allicin allied with DDP groups. *Conclusion*: Allicin allied with DDP can inhibite bladder tumor growth by inducing apoptosis in common, and improve life quality.

【Key words】 Allicin; DDP; Bladder tumor; Apoptosis

在国内,膀胱肿瘤为泌尿男生殖系统中最常见的肿瘤,目前临床上多采用 TURP,部分以及根治性切除尿流改道在内的多种手术方式治疗,但在术后或晚期患者,化疗则是一种常用而有效的治疗方法。顺铂是治疗膀胱肿瘤常用化疗药物之一,但其毒副作用严重威胁着患者的健康。近年来研究发现,大蒜素能够杀灭多种肿瘤细胞,调节机体免疫功能。因其可选择性地诱导肿瘤细胞、转化细胞、病毒感染细胞发生凋亡[1],而对正常细胞无明显毒性而引起人们的极大兴趣。本研究采用 N-甲基亚硝基脲诱导建立大鼠膀胱肿瘤模型,用大蒜素和顺铂单独和联合进行腹腔注射,评价其疗效,以寻求更安全有效的膀胱肿瘤药物治疗方法。

作者介绍:周生财(1980-),男,硕士,主要研究方向:泌尿系肿瘤的诊治。

通讯作者:唐 伟,男,教授,E-mail:Tangwei2060@yahoo.com。

1 材料与方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1 实验动物

SD 大鼠,6～8 周龄,雌性,体重 200～250g,购于重庆医科大学实验动物中心,饲养于 SPF 动物房。

1.2 药物及试剂

N-甲基亚硝基脲(MNU)购自美国 Sigma 公司;大蒜素购自上海禾丰制药有限公司(国药准字 H31022371);顺铂(DDP)购自山东德州制药厂;TUNEL 试剂盒购自德国 Roche 公司。

1.3 荷瘤大鼠模型的制备与分组

以 pH6.0 的枸橼酸缓冲液为溶剂,配成浓度为 20mg/ml 的 MNU 诱导液,待用。选取雌性 SD 大鼠 55 只,称重。根据大鼠体重,腹腔内注射 3%水合氯醛麻醉,10mg/kg;起效后仰卧固定,新洁尔灭消毒尿道外口。用长约 5cm 的硬膜外导管导尿,排空膀胱;接微量注射器向膀胱内注入 0.1ml MNU 溶液,每 2 周 1 次,共灌注 4 次(分别于 0、2、4、6 周)。于灌注开始后的第 14 周,B 超检查显示所有大鼠膀胱全部荷瘤,并随机处死大鼠 10 只。解剖膀胱,观察肿瘤生长情况,石蜡切片。将 45 只荷瘤大鼠随机分成 5 组,每组 9 只。(1)对照组:给予 0.2ml 生理盐水;(2)顺铂组:给予 5mg/kg 顺铂 0.2ml;(3)低浓度大蒜素组:给予 20mg/kg 大蒜素 0.2ml;(4)高浓度大蒜素组:给予 40mg/kg 大蒜素 0.2ml;(5)大蒜素 + 顺铂组:给予 5mg/kg 顺铂 +20mg/kg 大蒜素共 0.2ml。均腹腔注射给药,隔日 1 次,共 7 次。

1.4 荷瘤大鼠体重及一般情况检测

于开始治疗前 1d 和治疗全部结束暨 14d 后分别测量大鼠体重;同时观察荷瘤大鼠饮食、活动及毛发光洁度等一般情况。

1.5 膀胱总重量的变化

于治疗后第 15d 采用断颈法处死大鼠,解剖膀胱,于膀胱颈离断尿道,紧贴膀胱壁离断双输尿管,取出膀胱,去除膀胱外脂肪。于膀胱前壁剖开观察记录膀胱内情况后,滤纸吸净液体,称膀胱总重量,比较各组膀胱总重量的变化情况。

1.6 末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿苷三磷酸标记法(TUNEL)检测膀胱肿瘤细胞的凋亡情况

按 TUNEL 试剂盒(德国 Roche 公司)说明书操作。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)。

1.7 统计学处理方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,所有实验数据均采用 SPSS11.0 软件进行处理,用 SNK 法进行多个样本均数的方差分析,以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准。

2 结 果

2.1 MNU 诱发膀胱肿瘤情况

MNU 首次灌注后第 14 周随机处死的 10 只大鼠,解剖切开膀胱,发现膀胱壁增厚、苍白、菜花状新生物形成,绝大多数为多发肿瘤,严重者已达到充满膀胱的程度。HE 染色结果:第 14 周瘤基底宽或蒂粗短,细胞异形明显,表现为细胞大小不一,排列紊乱,极向消失,核畸形,核染色质呈粗颗粒状,分布不均匀,常堆积于核膜下,核膜增厚,核仁肥大,核浆比例大,核分裂像明显,部分表现为癌细胞高度未分化,移行上皮结构特征完全消失,呈弥漫分布或排列成实体性癌灶,癌细胞多形性明显,多乳头粗短融合,瘤表面不光滑,坏死或有钙盐沉着,癌细胞伴局灶性粘膜下、肌层浸润(图 1)。各组其他脏器未见异常。据此,选择 MNU 首次灌注后 14 周的动物进行后续实验。

2.2 大蒜素及顺铂的抑瘤作用

2.2.1 荷瘤大鼠体重及一般情况变化(见表 1) 治疗全部结束即 14d 后荷瘤大鼠体重结果显示,生理盐水组、大蒜素组、顺铂 + 大蒜素组的大鼠体重均随鼠龄的增长而增加,治疗前后比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),且治疗前后上述各组大鼠食欲良好、活动正常、皮毛有光泽。而顺铂组大鼠在治疗全部结束即 14d 后测得体重明显低于治疗前,与其他各组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),并表现出

表 1 各组荷瘤大鼠体重、膀胱总重量的变化比较($\bar{x} \pm s$, $n=9$)

组别	膀胱总重量(mg)	体重(g)	
		治疗前	治疗后
生理盐水组	305.0 ± 19.4	285.5 ± 32.7	296.1 ± 21.3*△
顺铂组	267.1 ± 11.5**	276.1 ± 24.2	251.7 ± 26.0*
低浓度大蒜素组	277.6 ± 10.4**	272.8 ± 17.5	281.4 ± 17.3*△
高浓度大蒜素组	259.4 ± 17.9**#	280.9 ± 24.4	286.4 ± 24.5*△
顺铂+大蒜素组	243.9 ± 11.9**	297.8 ± 17.2	307.8 ± 22.5*△

注:与低浓度大蒜素组比较,#$P<0.05$;与生理盐水组比较,**$P<0.01$;与治疗前比较,*$P<0.05$;与顺铂组比较,△$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

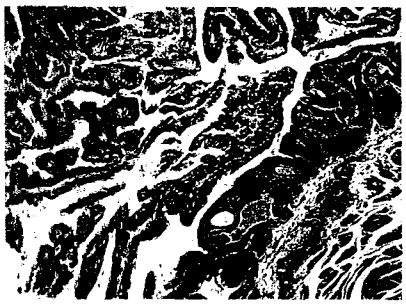


图 1 荷瘤大鼠膀胱癌组织 HE 染色(×100)



图 2 空白组 TUNEL 法凋亡细胞(×400)



图 3 大蒜素+顺铂组 TUNEL 法凋亡细胞(×400)

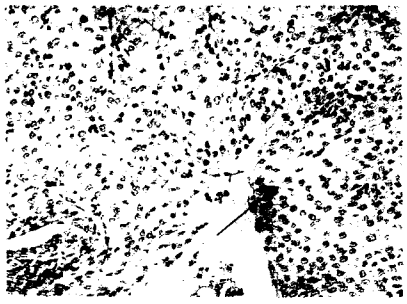


图 4 高浓度大蒜素组 TUNEL 法凋亡细胞(×400)



图 5 低浓度大蒜素组 TUNEL 法凋亡细胞(×400)

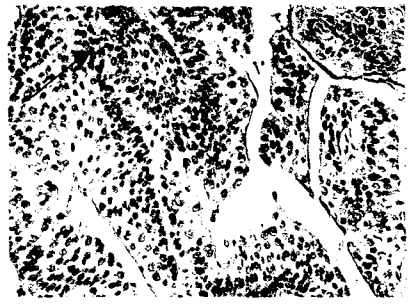


图 6 顺铂组 TUNEL 法凋亡细胞(×400)

明显的食欲减退、活动迟缓、毛色晦暗。

2.2.2 荷瘤大鼠膀胱总重量的变化(见表 1) MNU 膀胱灌注引起的膀胱肿瘤使膀胱重量增加。生理盐水组大鼠膀胱的总重量大于其它各组,顺铂 + 大蒜素组大鼠膀胱的总重量明显低于与其它各组,差异性显著($P<0.01$)。生理盐水组与低浓度大蒜素组比较无显著性差异($P>0.05$);低浓度大蒜素组与高浓度大蒜素组比较差异性显著($P<0.05$);顺铂组与高浓度大蒜素组比较无显著性差异($P>0.05$)。以上表明高浓度大蒜素、顺铂、顺铂 + 大蒜素均可抑制肿瘤的生长,以二者联合应用效果最为显著。

2.3 凋亡细胞检测计数结果

TUNEL 法原位检测发现各组均出现不同程度的肿瘤细胞核呈棕褐色染色(图 2~6)。各组的 AI 值分别为生理盐水组(5.33 ± 1.58)%、顺铂组(9.66 ± 2.00%、低浓度大蒜素组(9.55+1.81)%、高浓度大蒜素组 (19.11 ± 2.20)%、顺铂 + 大蒜素组 (24.11 ± 3.44)%。与生理盐水组比较,其它实验组 AI 均明显高于生理盐水组($P<0.05$),随大蒜素浓度的增加 AI 值增高。而且顺铂 + 大蒜素组同顺铂组、大蒜素组比较,凋亡作用更明显,差异有显著性意义($P<0.05$)。

3 讨 论

目前,膀胱肿瘤动物实验多使用皮下或膀胱种植瘤模型。皮下肿瘤模型易于建立、肿瘤生长一致性好、便于观测而最常使用。但是,该模型忽略了所研究器官的解剖生理特性。本研究应用 MNU 灌注大鼠膀胱所诱导的肿瘤成瘤率高(接近 100%),其形态学特征及病理学特点与人膀胱癌肿瘤十分相似,肿瘤来自膀胱黏膜上皮,组织学为移行细胞癌。本研究结束时对肝、肾、心、肺等实质性器官同时观察,未见肿瘤发生,与刘红耀等[2]的报道一致。证明 MNU 膀胱灌注致癌具有器官特异性,本实验未发现鳞癌或腺癌的膀胱组织学改变。因此,此方法建立的模型是膀胱肿瘤研究的理想模型之一,其特别适合观察膀胱肿瘤的发生, 发展和探索新的治疗方法。

大蒜素是一种良好的抗肿瘤药物,它是从大蒜球茎中分离出的一种化合物,化学名二烯丙基三硫化物,有多种生物活性,传统上,大蒜素被用于抗细菌、病毒和真菌的感染。近年来,体外实验证实大蒜素不仅能够通过直接杀伤肿瘤细胞及通过调节机体免疫功能来干扰肿瘤细胞的生长等途径来抑制肿瘤的发生,而且对机体几乎没有毒副作用。

近几年来,研究发现诱导肿瘤细胞凋亡是大蒜素抗肿瘤作用的重要方式之一。Wong 等[3]从大蒜等植物中提取有机硫化物(OSCs),研究 OSCs 与生长

维普资讯 http://www.cqvip.com

抑制活性的关系时发现:OSCs 能阻滞人类白血病细胞于 G_2/M 期,并于此期发生凋亡。Sigounas 等[4]研究成熟大蒜提取物中的有机硫化物对红白血病细胞系 HEL 和 OCIM-1 的抗增生作用中,发现其能有效地抑制 HEL 和 OCIM-1 细胞增生,并诱导凋亡。Sengupta 等[5]研究了大蒜素能抑制鼠结肠肿瘤增生并诱导凋亡。Gunadharin 等[6]发现大蒜素能诱导人前列腺癌 LNCaP 细胞的凋亡,并且呈剂量依赖关系。本研究采用 TUNEL 法检测膀胱癌细胞凋亡情况,结果发现顺铂组、不同浓度大蒜素组、顺铂 + 大蒜素组与生理盐水组相比,凋亡细胞数均明显多于生理盐水组;随大蒜素浓度的增加凋亡细胞数增多;而且,顺铂 + 大蒜素组同顺铂组、不同浓度大蒜素组相比,凋亡作用更明显。

顺铂是膀胱癌重要的化疗药物之一,目前,研究发现以顺铂为基础的联合新辅助化疗能够明显的延长膀胱癌患者的总体生存时间。但是,顺铂的毒副作用大大限制了它在临床上的应用。本研究观察到,大蒜素组、顺铂 + 大蒜素组荷瘤大鼠给药后不仅能够明显抑制膀胱肿瘤生长,而且荷瘤大鼠表现为食欲良好、活动正常、皮毛有光泽;而顺铂组虽然膀胱肿瘤生长也明显受到抑制,但大鼠却表现出食欲减退、活动迟缓、毛色晦暗,体重明显下降,与其他各组比较差异显著。有学者研究发现,大蒜素有对化疗药物的增敏作用[7]。本研究结果证实,大蒜素联合顺铂治疗膀胱肿瘤,不但增强了抗肿瘤作用,而且一定程度避免了顺铂的毒副作用,此两种药物的组合,有望成为一种新的膀胱肿瘤治疗方法。

参 考 文 献

[1] Gebhardt R. Multiple inhibitory effects of garlic extracts on cholesterol biosynthesis in hepatocytes[J]. Lipids, 1993; 28(7): 613-619.

[2] 刘红耀,李晓东,米振国,等.N- 甲基亚硝基脲的制备及其诱导膀胱肿瘤的作用[J]. 中华实验外科杂志,2000;17(6):548-549.

[3] Wong W W, Macdonald S, Langler RF, et al. Novel synthetic organosulfur compounds induce apoptosis of human leukemic cells[J]. Anticancer Res, 2000; 20(3A): 1 367-1 374.

[4] Sigounas G, Hooker JL, Li W, et al. S-allylmercaptocysteine, a stable thioallyl compound, induces apoptosis in erythroleukemia cell lines[J]. Nutr Cancer, 1997; 28(2): 153-159.

[5] Sengupta A, Ghosh S, Bhattacharjee S, et al. Indian food ingredients and cancer prevention -an experimental evaluation of anticarcinogenic effects of garlic in rat colon [J]. Asian Pac Cancer Prev, 2004; 5(2): 126-132.

[6] Gunadharin DN, Arunkumar A, Krishnamoorthy G, et al. Antiproliferative effect of diallyl disulfide (DADS) on prostate cancer cell line LNCaP[J]. Cell Biochem Funct, 2006; 24(5): 407-412.

[7] 陆婉琴,金杏泉,徐静芳.大蒜素对抗癌药物作用的初步研究[J]. 肿瘤,1992;12(3):113-115.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 44 页)

参 考 文 献

[1] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in ca:cer and lymphoma[J]. Nat Med, 1997; 3(8): 917-921.

[2] Mori A, Wada H, Nishimura Y, et al. Expression of the apoptosis gene survivin in human leukemia[J]. Int J Hematol, 2002; 75(2): 161-165.

[3] Sarela AI, Verbeke CS, Ramsdale J, et al. Expression of survivin, a novel inhibitor of apoptosis and cell cycle regulatory protein, in pancreatic adenocarcinoma[J]. Br J Cancer, 2002; 86(6): 886-892.

[4] 朱红霞,刘 爽,周翠琦,等.抗凋亡基因 survivin 促进细胞转化的作用机制[J]. 中华医学杂志,2002;82(5):338-340.

[5] 刘筱梅,徐西华,于 洁,等.儿童急性白血病 survivin, bcl-2, mdr1 的表达及意义[J]. 重庆医科大学学报,2006;31(2):215-218.

[6] 温贤浩,徐西华.survivin 反义寡核苷酸对 K562细胞诱导分化的研究[J].中华儿科杂志,2005;43(4):279-283.

[7] Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, et al. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer[J]. Cancer Res, 1998; 58(22): 5071.

[8] Moriai R, Asanuma K, Kobayashi D, et al. Quantitative analysis of the anti-apoptotic gene survivin expression in malignant haematopoietic cells[J]. Anticancer Res, 2001; 21(1B): 595-600.

[9] Olie RA, Simoes-Wust P, Baumann B, et al. A novel antisense oligonucleotide targeting survivin expression induces apoptosis and sensitizes lung cancer cells to chemotherapy[J]. Cancer Res, 2000; 60(11): 2 805-2 809.

[10] Li F, Ambrosini G, Chu EY, et al. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin[J]. Nature, 1998; 396(6 771): 580-584.

[11] 邹 冰,涂水平,谭继宏,等. pEGFP-C1- 反义生存素重组质粒的构建和转染[J]. 中华消化杂志,2002;22(12):711-714.

(责任编辑:冉明会)