

柞蚕雄蛾提取液对荷瘤大鼠放疗后肿瘤组织缺氧诱导因子-1 α 表达的影响

张俊平, 张维东*, 张月英, 王朝霞, 贾青, 王兆朋

山东省医学科学院基础医学研究所 山东现代医用药物与技术重点实验室, 山东 济南 250062

摘要: **目的** 探讨柞蚕雄蛾提取液对放疗后荷瘤大鼠肿瘤组织缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 表达的影响。**方法** 制备 W256 荷瘤模型, 常规放疗后, 柞蚕雄蛾提取液 16.53 mg/kg 连续 ig 给药 10 d。采用免疫组化染色检测肿瘤组织中 HIF-1 α 和血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达; 原位杂交法检测肿瘤组织中 HIF-1 α mRNA 表达。**结果** 免疫组化结果显示, 与模型组比较, 放疗组肿瘤组织 HIF-1 α 和 VEGF 蛋白表达有增强趋势 ($P>0.05$); 放疗联合柞蚕雄蛾提取液 (联合组) 和柞蚕雄蛾提取液组肿瘤组织 HIF-1 α 和 VEGF 的表达均显著减弱 ($P<0.05$), 且 HIF-1 α 与 VEGF 呈明显正相关 ($r=0.649$, $P<0.01$)。原位杂交结果显示, 放疗组较模型组 HIF-1 α mRNA 表达无统计学意义 ($P>0.05$); 联合组及柞蚕雄蛾提取液组肿瘤组织 HIF-1 α mRNA 表达均降低 ($P<0.05$)。**结论** 柞蚕雄蛾提取液对放疗后及未实施放疗的肿瘤组织 HIF-1 α 的表达有下调作用。**关键词:** 柞蚕; 雄蛾; 缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α); 血管内皮生长因子 (VEGF); 放疗
中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)03-0521-05

Effect of extract from male zooid of *Antheraea pernyi* on hypoxia-inducible factor-1 α expression in tumor-bearing rats after radiotherapy

ZHANG Jun-ping, ZHANG Wei-dong, ZHANG Yue-ying, WANG Zhao-xia, JIA Qing, WANG Zhao-peng

Key Laboratory for Modern Medicine and Technology of Shandong Province, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of the extract from male zooid of *Antheraea pernyi* on the expression of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in tumor-bearing rats after radiotherapy. **Methods** W256 tumor model was established by continuous ig administration of the extract from the male zooid of *A. pernyi* (16.53 mg/kg) for 10 d after conventional radiotherapy. To observe the expression of HIF-1 α and vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumor tissue by immunohistochemical staining and the HIF-1 α mRNA expression by *in situ* hybridization (ISH). **Results** Compared with the model group, immunohistochemistry results showed the expression of HIF-1 α and VEGF increased with tendency ($P>0.05$) in tumor tissue of the rats in radiotherapy group, and the HIF-1 α and VEGF expression in the combination group and the extract from the male zooid of *A. pernyi* group decreased significantly ($P<0.05$). HIF-1 α and VEGF were correlation positively ($r = 0.649$, $P<0.01$). ISH results revealed the expression of HIF-1 α mRNA was no statistical significance ($P>0.05$) in radiotherapy group compared with the model group. However, the HIF-1 α mRNA expression in tumor tissue was lower in both the combined group and the extract from male zooid of *A. pernyi* group ($P<0.05$). **Conclusion** The extract from male zooid of *A. pernyi* could down-regulate the HIF-1 α expression in tumor tissue after radiotherapy or without radiotherapy.

Key words: *Antheraea pernyi* Guérin-Ménéville; male zooid; hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α); vascular endothelial growth factor (VEGF); radiotherapy

缺氧是大多数实体瘤的特征之一^[1], 缺氧诱导因子-1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 是肿瘤细胞对缺氧反应的主要调节者^[2]。局部肿瘤放疗产生大量的活性氧簇 (reactive oxygen species,

ROS) 和自由基^[3], 具有稳定 HIF-1 α 的作用^[4]。细胞缺氧、ROS 和自由基增多均可调控 HIF-1 α 表达^[5], 并诱导其下游基因, 如血管内皮生长因子 (VEGF)、转化生长因子 (TGF- β) 等表达, 参与肿瘤血管生

收稿日期: 2010-05-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472260); 山东省自然科学基金资助项目 (Y2006C92)

作者简介: 张俊平 (1981—), 女, 山东德州人, 在读硕士, 从事肿瘤病理研究。E-mail: junpingzhang1@163.com

*通讯作者 张维东 Tel: (0531)82919939 E-mail: zhangweidongkui@163.com

成,抑制免疫细胞增殖及功能,促进肿瘤生长^[6]。近年来,以 HIF-1 α 为靶点寻找改善肿瘤组织缺氧微环境的途径,从而提高肿瘤治疗的疗效已成为研究热点。前期研究发现柞蚕雄蛾提取液可逆转荷瘤大鼠放射性免疫抑制^[7],为减轻放疗不良反应提供了新的治疗途径。本实验进一步探讨柞蚕雄蛾提取液对荷瘤大鼠放疗后缺氧微环境的影响,观察肿瘤组织中 HIF-1 α 表达的变化,为柞蚕雄蛾提取液的进一步开发奠定基础。

1 材料与方法

1.1 药品及试剂

柞蚕雄蛾提取液^[8](含游离氨基酸总量为 11.336 mg/mL),由山东省蚕业研究所提供,HIF-1 α 单克隆鼠抗购于 Santa Cruz 公司,VEGF 单克隆兔抗购于 Biotechnology 公司;原位杂交试剂盒均由武汉博士德公司生产,HIF-1 α 探针序列为(1) 5'-TTATGAGCTTGCTCATCAGTTGCCACTTCC-3';(2) 5'-CTCAGTTTGAACCTAAGTGGACACAGTG TGT-3';(3) 5'-GGCCGCTCAATTTATGAATATT ATCATGCT-3'。DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 主要仪器

SW—CJ—IC 标准型双人净化工作台为苏州净化设备厂产品;西门子 PRIMUS 医用电子直线加速器为德国西门子公司产品;德国 Leica DM4000B 光学显微镜和德国 Leica Qwin V3 图像分析软件为德国 Leica 公司产品。

1.3 大鼠 W256 荷瘤模型制备

雄性 Wistar 大鼠 45 只,体质量(180 $\pm$ 20)g,购自山东大学实验动物中心,动物许可证:SCXK(鲁)20030004。W256 腹水瘤种,购自中国医学科学院药物研究所药理室。从荷腹水型 Walker-256 瘤种大鼠腹腔中抽取传代 7~9 d 的腹水,用生理盐水稀释成 4 $\times$ 10⁷/mL 细胞悬液,于大鼠右侧腋部皮下接种,0.2 mL/只,5 d 成瘤。

1.4 分组、照射及干预

荷瘤大鼠随机分为模型组、放疗组、放疗联合柞蚕雄蛾提取液组(联合组)和柞蚕雄蛾提取液组,每组 10 只。放疗组和联合组给予常规肿瘤组织放疗,吸收剂量 1 Gy/min,源皮距 205 cm,5 Gy/d,连续照射 2 d,共 10 Gy,其他部位铅板屏蔽;给药组于照射后 24 h 给予柞蚕雄蛾提取液,剂量为 16.53 mg/kg^[9],模型组和放疗组给予等量生理盐水,

每日 1 次,连续 10 d。于末次给药 24 h 后处死动物,剥离瘤体,固定、包埋、切片,免疫组化染色检测肿瘤组织 HIF-1 α 和 VEGF 的表达,原位杂交法检测 HIF-1 α mRNA 的表达。

1.5 免疫组化染色检测肿瘤组织 HIF-1 α 及 VEGF 的表达

免疫组化采用 SP 法,具体步骤:石蜡切片常规脱蜡至水,0.3% H₂O₂ 室温孵育 10 min 以消除内源性过氧化物酶;水浴高温抗原修复 10 min,PBS 洗涤 3 次,5 min/次;滴加一抗(1:100),4℃过夜,37℃孵育 1 h;PBS 洗涤 3 次,5 min/次;滴加 HRP 标记的二抗(1:100),37℃孵育 50 min;PBS 洗涤 3 次,5 min/次;DAB 显色 5~10 min,显微镜下控制显色程度;苏木素复染,酒精脱水,二甲苯透明,封片,镜下观察。用 PBS 替代一抗作为阴性对照。应用 Leica Qwin V3 图像分析软件在相同灰度阈值设定条件下,放大倍数为 200 倍,随机选取 5 个视野,取平均灰度值,其值越小说明 HIF-1 α 及 VEGF 蛋白表达越多。

1.6 原位杂交法检测肿瘤组织 HIF-1 α mRNA 表达

步骤按照试剂说明书进行,阴性对照用预杂交液代替寡核苷酸探针,其余成分相同。灰度值检测方法同上。

1.7 统计学处理

各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,凡符合正态分布和方差齐性检验的数据,应用单因素方差分析(One-way ANOVA);对不符合正态分布或方差齐性的数据,则应用 Wilcoxon 秩和检验;HIF-1 α 与 VEGF 相关性采用 Spearman 相关分析。数据均采用 SPSS11.0 统计软件处理。

2 结果

2.1 各组肿瘤组织 HIF-1 α 及 VEGF 表达

HIF-1 α 和 VEGF 阳性反应均为棕黄色颗粒,均定位于肿瘤细胞的细胞核或细胞质。HIF-1 α 主要表达于肿瘤坏死区周围或坏死区内,VEGF 主要表达于肿瘤坏死区周围。数据显示,放疗组肿瘤组织 HIF-1 α 和 VEGF 表达较模型组呈一定的增高趋势,但无统计学意义($P>0.05$);给予柞蚕雄蛾提取液后,联合组与放疗组相比,肿瘤组织 HIF-1 α 和 VEGF 表达均降低($P<0.05$),柞蚕雄蛾提取液组与模型组比较,差异显著($P<0.05$),与联合组比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。结果见图 1,其灰度值分析见表 1。

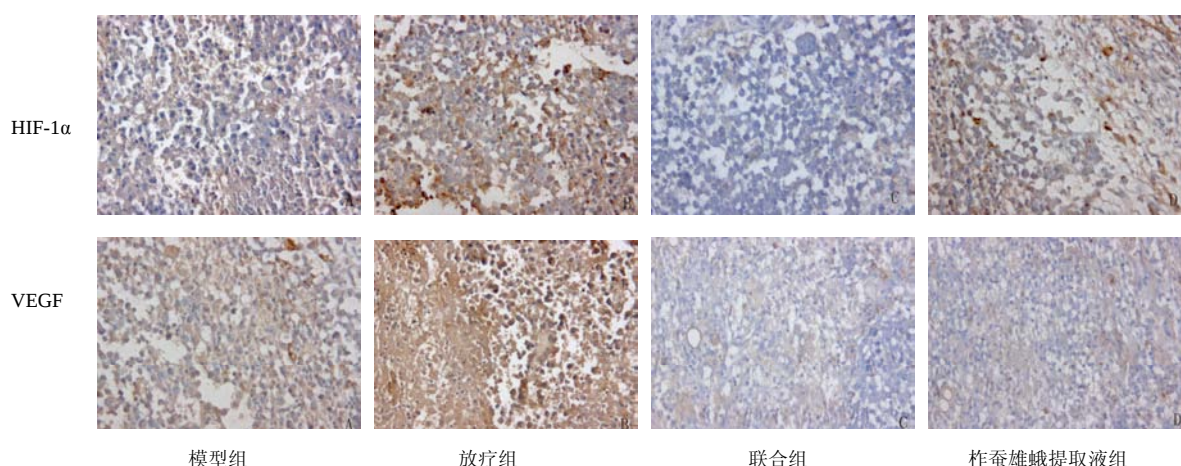


图 1 免疫组化检测各组肿瘤组织中 HIF-1 α 和 VEGF 表达

Fig. 1 Immunohistochemical staining detection of HIF-1 α and VEGF expression in tumor tissue of every group

表 1 荷瘤大鼠放疗后肿瘤组织 HIF-1 α 和 VEGF 表达的灰度值分析 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Gray value analysis on HIF-1 α , VEGF, and HIF-1 α mRNA expression in tumor bearing rats after radiotherapy ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	HIF-1 α	VEGF	HIF-1 α mRNA
模型	—	159.46 $\pm$ 17.58	150.98 $\pm$ 20.18	161.46 $\pm$ 17.20
放疗	—	120.52 $\pm$ 18.40	142.24 $\pm$ 14.21	154.52 $\pm$ 17.72
联合	16.53	180.43 $\pm$ 16.65*	173.53 $\pm$ 15.74*	190.43 $\pm$ 15.55*
柞蚕雄蛾提取液	16.53	164.77 $\pm$ 19.52 Δ	166.86 $\pm$ 17.48 Δ	182.57 $\pm$ 18.46 Δ

与放疗组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs radiotherapy group; $\Delta P < 0.05$ vs model group

2.2 肿瘤组织中 HIF-1 α 与 VEGF 的关系

Spearman 相关分析显示, HIF-1 α 与 VEGF 表达呈正相关 ($r = 0.649, P < 0.01$)。

2.3 各组肿瘤组织 HIF-1 α mRNA 表达

HIF-1 α mRNA 在肿瘤组织中普遍表达, 主要分布于肿瘤坏死区周围或坏死区内, 其阳性反应结果为棕黄色杂交颗粒, 主要定位于肿瘤细胞细胞核或

细胞质。放疗后肿瘤组织较模型组 HIF-1 α mRNA 表达有一定的升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 给予柞蚕雄蛾提取液后, 联合组与放疗组相比, 肿瘤组织 HIF-1 α mRNA 表达明显降低 ($P < 0.05$), 柞蚕雄蛾提取液组与模型组比较, 差异显著 ($P < 0.05$), 与联合组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果见图 2, 其灰度值分析见表 1。

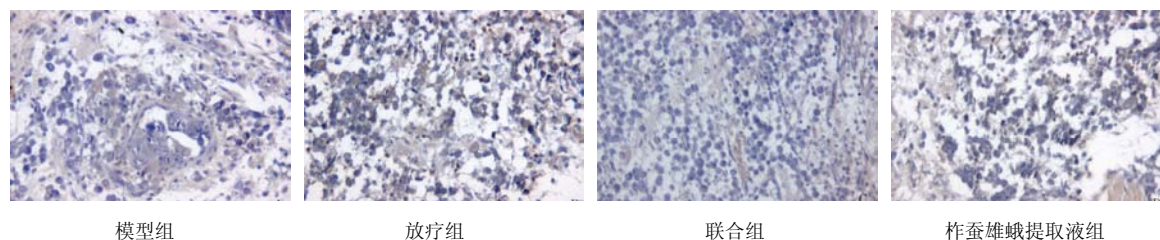


图 2 原位杂交检测各组肿瘤组织中 HIF-1 α mRNA 表达

Fig. 2 *In situ* hybridization detection of HIF-1 α mRNA expression of in tumor tissue of every group

3 讨论

研究证实, 缺氧参与了多种疾病的病理生理过

程, 包括肿瘤、炎症、动脉粥样硬化、贫血及局部缺血等。快速生长的实体瘤随体积的增大, 肿瘤内

部血供不足,致氧供和氧耗不平衡。研究发现肿瘤内部存在一定程度或一定区域的缺氧,缺氧是实体瘤的突出特征,在促进肿瘤组织恶性进展和治疗抵抗过程中起重要作用^[10]。放射治疗是治疗肿瘤的重要措施之一,约70%的恶性肿瘤患者需要接受不同程度的放射治疗^[11],但其在发挥治疗作用的同时,也产生了很多不良反应,如间接产生大量的活性氧簇和自由基等^[12],均具有稳定 HIF- α 的作用,进而调节 HIF- α 基因的转录和翻译^[4]。

HIF-1 是降低低氧张力分子反应的关键调节者,且在肿瘤组织中过表达^[13]。HIF-1 由 α 和 β 两个亚单位组成, α 亚基是决定 HIF-1 活性的调控亚基,组织处于缺氧状态时它发挥转录和基因调控作用。细胞内缺氧和(或)ROS增多时,脯氨酰羟化酶(prolyl hydroxylase domains, PHDs)的作用受到抑制,使 HIF-1 α 的表达增加,转移到细胞核,与 HIF-1 β 结合形成杂合二聚体,与缺氧效应元件结合,激活下游基因转录^[14]。HIF-1 α 的下游基因有40多种,涉及肿瘤细胞能量代谢、血管生成、免疫抑制、肿瘤转移等,其中 VEGF、TGF- β 1 等绝大多数基因对肿瘤的生长起促进作用^[15]。

柞蚕雄蛾提取液是选用初羽化、未交尾的柞蚕雄蛾为原料,采用低温负压抽提的方法,加工浓缩而成。在低温下(0℃以下)为棕黄色,是透明度极高、似油状的液体,并随着温度的升高(0℃以下至常温)色泽逐渐变深,为棕紫色,具有典型的蛾香味,主要含有雄性激素(蜕皮激素,12 ng/mL以上),保幼激素及脑激素、细胞色素C等;18种游离氨基酸总量为11.336 mg/mL,其中,人体必需氨基酸达3.287 mg/mL,占总量的29%,赖氨酸高达0.377 mg/mL;含维生素A 1.52 U/100 g,维生素E、B₁、B₂总量0.992 mg/100 g;8种矿质元素含量丰富;含脂肪量仅为0.09%^[8]。保幼激素是一种抗氧化剂,具有抗氧化和清除自由基的作用。

通过对放疗后W256荷瘤大鼠体内实验,应用免疫组化染色和原位杂交方法观察到:HIF-1 α 和 VEGF 在肿瘤组织中普遍表达,放疗后肿瘤组织中表达均有升高趋势;联合组与放疗组相比,肿瘤组织 HIF-1 α 和 VEGF 表达均降低,表明柞蚕雄蛾提取液对放疗后肿瘤组织 HIF-1 α 和 VEGF 表达有下调作用,柞蚕雄蛾提取液组与模型组比较,差异有统计学意义($P<0.05$),提示柞蚕雄蛾提取液可下调未实施放疗的肿瘤组织 HIF-1 α 的表达。另外,

HIF-1 α 与 VEGF 表达呈较强的正相关,这与文献报道结果基本一致^[16],表明柞蚕雄蛾提取液可间接抑制肿瘤组织中 VEGF 的表达。本研究结果表明,柞蚕雄蛾提取液对放疗后及未放疗肿瘤组织中 HIF-1 α 的表达有抑制作用,从而阻断肿瘤组织的自身保护,在辅助肿瘤治疗中具有一定的应用前景,值得深入研究。

参考文献

- [1] Noman M Z, Buart S, Van Pelt J, *et al.* The cooperative induction of hypoxia-inducible factor-1 alpha and STAT3 during hypoxia induced an impairment of tumor susceptibility to CTL-mediated cell lysis [J]. *J Immunol*, 2009, 182(6): 3510-3521.
- [2] Ruan K, Song G, Ouyang G. Role of hypoxia in the hallmarks of human cancer [J]. *J Cell Biochem*, 2009, 107(6): 1053-1062.
- [3] Gridley D S, Makinde A Y, Luo X, *et al.* Radiation and a metalloporphyrin radioprotectant in a mouse prostate tumor model [J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(5A): 3101-3109.
- [4] Dewhirst M W, Cao Y, Moeller B. Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response [J]. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8(6): 425-437.
- [5] Chandel N S, McClintock D S, Feliciano C E, *et al.* Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O₂ sensing [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(33): 25130-25138.
- [6] Singh V, Singh S M. Progressive tumor growth-associated altered tumor microenvironment: implications in a tumor stage-dependent modulation in survival of a murine T cell lymphoma [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(8): 1015-1024.
- [7] 张维东, 张月英, 王朝霞, 等. 柞蚕雄蛾提取液改善W256 荷瘤大鼠放疗后免疫功能的实验研究 [J]. 山东大学医学院报: 医学版, 2007, 45(11): 1085-1091.
- [8] 邹德庆, 郑淑湘, 阮怀军, 等. 柞蚕雄蛾浓缩液对肝细胞的保护和对抗高血脂症的治疗效果 [J]. 蚕业科学, 2006, 32(4): 530-534.
- [9] 张俊平, 张维东, 张月英, 等. 柞蚕雄蛾提取液抗肿瘤作用及其对大鼠免疫状态的影响的初步研究 [J]. 中国医药导刊, 2009, 11(5): 1017-1019.
- [10] Meyuhas R, Pikarsky E, Tavor E, *et al.* A key role for cyclic AMP-responsive element binding protein in hypoxia-mediated activation of the angiogenesis factor CCN1 (CYR61) in tumor cells [J]. *Mol Cancer Res*, 2008, 6(9): 1397-1409.

- [11] 殷尉伯, 谷锐之. 肿瘤放射治疗学 [M]. 第 3 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2002.
- [12] Makinde A Y, Rizvi L O X. Effect of a metalloporphyrin antioxidant (MnTE-2-PyP) on the response of a mouse prostate cancer model to radiation [J]. *Anticancer Res*, 2009, 29(1): 107-118.
- [13] Bertout J A, Patel S A, Fryer B H, *et al.* Heterozygosity for hypoxia inducible factor 1 α decreases the incidence of thymic lymphomas in a p53 mutant mouse model [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(7): 3213-3220.
- [14] Moller A, House C M, Wong C S, *et al.* Inhibition of Siah ubiquitin ligase function [J]. *Oncogene*, 2009, 28(2): 289-296.
- [15] Melillo G. Inhibiting hypoxia-inducible factor 1 for cancer therapy [J]. *Mol Cancer Res*, 2006, 4(9): 601-605.
- [16] Bussink J, Kaanders J H, van der Kogel A J. Microenvironmental transformations by VEGF- and EGF-receptor inhibition and potential implications for responsiveness to radiotherapy [J]. *Radiother Oncol*, 2007, 82(1): 10-17.

2010 年版《中华人民共和国药典》(一部) 配套权威巨著

《中华人民共和国药典中药材及原植物彩色图鉴》(上、下册) (中英文对照版)

国家药典委员会 中国医学科学院药用植物研究所 组织编撰

中国卫生部部长陈竺院士作序 人民卫生出版社出版发行

《中华人民共和国药典中药材及原植物彩色图鉴》(下文简称《药典图鉴》)系由国家药典委员会与中国医学科学院药用植物研究所组织专家共同编著完成。《药典图鉴》的内容科学、权威、准确, 图文并茂。本书以 2010 年版《中国药典》为蓝本, 收载几乎涵盖 2010 年版《中国药典》全部植物基原的中药 491 种, 并以临近完成全套出版的《Flora of China》和《中国高等植物图鉴》为核心参考资料。以力求准确、全面反映最新研究成果。

《药典图鉴》中各药材的原植物形态特征的描述力求准确把握植物鉴别特征, 并记录该植物在《Flora of China》、《中国植物志》和《中国高等植物图鉴》中所记述拉丁学名的正名, 以帮助读者更方便使用经典分类学专著, 获取更详尽分类学资料。同时, 巨著还全面反映了专家们对历版《中国药典》(包括 1953、1963、1977、1985、1990、1995、2000、2005 年版)记述的拉丁学名所进行系统整理的成果, 以帮助读者了解各药材记录于国家药典的历史与演变以及拉丁学名的应用情况。有关药材初加工及药材性状描述均同 2010 年版《中国药典》(一部)相应品种。为达到记录药材及原植物形象直观、图文并茂的目的, 本书配以经过精选的 2 300 余幅原植物、药材彩色照片, 使其真实、准确地反映原植物生境、形态和药材形状, 突出基原植物的鉴定特点。其中植物图像包括生境、花果枝、鉴别特征部位、新鲜药材部位, 药材图像包括原药材及药材切面。实物与图像资料为笔者进行长期野外考察、植物拍摄、凭证标本采集、药材制作和凭证标本鉴定、药材拍摄获得。凭证标本经过中国医学科学院药用植物研究所初步鉴定, 再送英国皇家植物园 (KEW Garden) 及中国科学院植物研究所分类学家重复鉴定确认, 以确保所有资料的准确。书中绝大部分彩色照片为首次使用。

本书为全文中英文对译, 有利于开展对外学术交流。我国药用植物权威研究机构中国医学科学院药用植物研究所与英国皇家植物园 (KEW Garden) 精诚合作 10 余年, 两国专家学者跋山涉水、不畏艰辛深入药材产地拍摄记录植物及生境图片、采集(挖)并制作原药材, 为该巨著面世奠定了扎实基础。

《药典图鉴》对从事药品检验、中药学或植物学教学与科研, 以及药材、饮片、中成药生产、供应企业和国际贸易等方面的机构与有关人员具有极高的参考价值。同时, 适合关注我国药典以及传统药物的外国专家学者阅读。本书是一部不可多得的工具书, 它必将对推动中医药事业的健康发展, 提升我国中药监管水平, 以及加强对外交流发挥重要的作用, 并产生深远的影响。

该书分上下册, 定价: 868.00 元/套。已于 2010 年 10 月由人民卫生出版社正式出版并面向国内外发行。