

蝎毒多肽增强 5-氟尿嘧啶对 H₂₂ 肝癌抑制作用的机制研究

郑安红, 张维东*, 王兆朋, 王朝霞, 贾青, 张月英, 武利存

山东省医学科学院基础医学研究所 山东省罕见病重点实验室, 济南大学 山东省医学科学院 医学与生命科学学院, 山东济南 250062

摘要: 目的 探讨蝎毒多肽增强 5-氟尿嘧啶 (5-Fu) 对肝癌 H₂₂ 抑制作用的机制。方法 以接种 H₂₂ 肝癌小鼠腹水方法建立小鼠荷瘤模型, 在接种后第 7 天将荷瘤小鼠随机分为模型组、蝎毒多肽 (20 mg/kg) 组、5-Fu (15 mg/kg) 组、低剂量蝎毒多肽 (5 mg/kg) + 5-Fu 组、高剂量蝎毒多肽 (20 mg/kg) + 5-Fu 组, 每组 10 只, 连续给药 21 d。绘制肿瘤体积增长曲线并计算抑瘤率; CD34 标记肿瘤微血管; 免疫组织化学法检测核因子- κ B (NF- κ B)、基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 和血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白表达。结果 与模型组相比, 联合给药组 H₂₂ 肝癌移植瘤的生长受到明显抑制 ($P < 0.01$), 微血管密度 (MVD) 及 NF- κ B、MMP-9、VEGF 蛋白表达均明显降低 ($P < 0.01$); 与 5-Fu 组相比, 高剂量蝎毒多肽 + 5-Fu 组的 MVD 及 NF- κ B、MMP-9、VEGF 蛋白表达也显著降低 ($P < 0.01$), 而低剂量蝎毒多肽 + 5-Fu 组则无显著改变。结论 蝎毒多肽可增加 5-Fu 对肿瘤组织的抑制作用, 其机制可能与抑制 H₂₂ 肝癌组织 NF- κ B 通路及 MMP-9、VEGF 的表达, 从而抑制新生血管形成有关。

关键词: 蝎毒多肽; 肝癌 H₂₂; 核因子- κ B; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶

中图分类号: R282.710.5; R979.19 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)11-1465-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.11.020

Mechanism of polypeptide from scorpion venom increasing inhibition of 5-fluorouracil on H₂₂ hepatoma

ZHENG An-hong, ZHANG Wei-dong, WANG Zhao-peng, WANG Zhao-xia, JIA Qing, ZHANG Yue-ying, WU Li-cun

Key Laboratory for Rare & Uncommon Diseases of Shandong Province, Institute of Basic Medicine, School of Medical and Life Science, Jinan University, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of polypeptide from scorpion venom (PSV) on increasing the inhibition of 5-fluorouracil (5-Fu) on H₂₂ hepatoma. **Methods** H₂₂ hepatoma model was established through sc inoculating H₂₂ cells suspension into 40 mice in right armpits. Then tumor-bearing mice were divided into five groups randomly on the day 7 after inoculating: model, PSV (20 mg/kg), 5-Fu (15 mg/kg), low-dose PSV (5 mg/kg) + 5-Fu, and high-dose PSV (20 mg/kg) + 5-Fu groups, 10 mice in each group, continuously administered for 21 d. Tumor volumes were measured once every other day, then the curves of tumor growth were drawn and the tumor inhibitory rate was calculated; CD34 was used to mark capillary; Immunohistochemical assay was used to detect the protein expression changes of nuclear factor-kappa B (NF- κ B), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and vascular endothelial growth factor (VEGF). **Results** Compared with the model group, the growth of H₂₂ hepatoma transplantation tumor in the combinational groups was obviously inhibited ($P < 0.01$); The microvessel density (MVD) and the protein expression of NF- κ B, MMP-9, and VEGF in the two PSV groups were all decreased significantly ($P < 0.01$); Compared with 5-Fu group, the MVD and the protein expression of NF- κ B, MMP-9, and VEGF in the high-dose PSV + 5-Fu group were also decreased ($P < 0.01$), while there was no significant difference between the low-dose PSV + 5-Fu group. **Conclusion** PSV may increase the inhibition of 5-Fu on H₂₂

收稿日期: 2012-09-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81073102, 30873408); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2010HQ003); 济南市科学技术发展计划 (201004012)

作者简介: 郑安红 (1987—), 女, 硕士研究生, 研究方向为实验肿瘤病理学。Tel: 18264170193 (0531)82919939 E-mail: ahzheng2008123@126.com

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

hepatoma through blocking NF- κ B pathway and reducing the expression of MMP-9 and VEGF, which is beneficial to the inhibition of angiogenesis.

Key words: polypeptide from scorpion venom; H₂₂ hepatoma; nuclear factor-kappa B; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinases

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一,近年来其发生率呈逐年上升趋势。由于大部分肝癌患者确诊时病情已经相当严重,且往往伴随不同程度的肝功能异常,造成手术治疗困难,因此药物治疗对肝癌患者是重要的治疗手段之一。5-氟尿嘧啶(5-Fu)是一种重要的抗代谢抗肿瘤药物,对消化道肿瘤有良好疗效,但在临床应用中存在耐药性问题。蝎毒多肽是从东亚钳蝎 *Buthus martensii* Karsch 蝎毒中提取的多肽混合物,具有抑制多种肿瘤生长和快速增殖的作用,其与环磷酰胺等化疗药物联合应用能明显提高化疗疗效^[1-3]。本实验通过探讨蝎毒多肽与5-Fu联合给药对H₂₂肝癌荷瘤小鼠血管生成及肿瘤组织中NF- κ B信号通路的影响,为明确其抗肝癌作用机制及其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

蝎毒(取自东亚钳蝎的蝎尾)冻干粉,购自邹平县蝎蚁生物科技有限公司,外观呈白色、雪花粉末状,易溶于水和缓冲液。蝎毒多肽由本实验室提取^[1],蛋白质量分数 $\geq 80\%$,水分2.0%~2.5%,聚丙烯酰胺电泳呈现17条蛋白条带,HPLC法检测可见30多个分离峰。昆明种小鼠腹腔给药的LD₅₀为(4.7 $\pm$ 0.5) mg/kg。核因子- κ B(NF- κ B) p65、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、血管内皮生长因子(VEGF)多克隆抗体购自北京博奥森生物技术有限公司; β -actin多克隆抗体、山羊抗兔IgG/辣根酶标记二抗、DAB二氨基联苯胺显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 动物和细胞

昆明种小鼠,雄性,4~5周龄,体质量18~20 g,购自山东大学实验动物中心,合格证号SCXK(鲁)20090001。H₂₂肝癌腹水瘤种,由山东省医学科学院药物所赠予。

1.3 仪器

LeicaDM4000B光学显微镜、Qwin V3图像分析软件,德国徕卡仪器有限公司。

2 方法

2.1 模型建立、分组与给药

无菌抽取H₂₂肝癌荷瘤小鼠腹腔积液,以生理

盐水稀释,调整肿瘤细胞密度至 1×10^7 /mL,接种于小鼠右腋部皮下,0.2 mL/只。接种后第7天,取50荷瘤小鼠随机分为模型组、蝎毒多肽(20 mg/kg)组、5-Fu(15 mg/kg)组、蝎毒多肽(5 mg/kg)+5-Fu(15 mg/kg)组和蝎毒多肽(20 mg/kg)+5-Fu(15 mg/kg)组,每组10只。5-Fu组、低剂量蝎毒多肽+5-Fu、高剂量蝎毒多肽+5-Fu组于接种H₂₂细胞第8、11、14、17、20、23、26天ip 5-Fu 15 mg/kg 1次,在实验的28 d内的其余时间低剂量蝎毒多肽+5-Fu、高剂量蝎毒多肽+5-Fu组每天分别ig蝎毒多肽5、20 mg/kg 1次,模型组和5-Fu组ig等体积蒸馏水,蝎毒多肽组每天ig蝎毒多肽20 mg/kg 1次,每天观察小鼠肿瘤生长情况。

2.2 检测指标

2.2.1 肿瘤增长 从用药当天开始,用游标卡尺隔日测量肿瘤长径(A)及垂直短径(B),计算肿瘤体积(V)($V=A \times B^2/2$)。末次给药24 h后,取完整肿瘤组织,称质量,计算抑瘤率[抑瘤率=(对照组平均瘤质量-实验组平均瘤质量)/对照组平均瘤质量]。

2.2.2 免疫组化SP法检测肿瘤组织中微血管密度、NF- κ B p65、MMP-9、VEGF蛋白表达 末次给药24 h后,取完整肿瘤组织,于中性甲醛中固定24 h,石蜡包埋切片,脱蜡至水,采用免疫组化SP法检测。3% H₂O₂氧化灭活内源性过氧化物酶的活性,柠檬酸热修复15 min后分别加入一抗CD34(1:200)和NF- κ B p65、MMP-9、VEGF(均为1:100),4℃过夜,二抗孵育1 h, DAB显色,苏木素染核,盐酸酒精分化,反蓝,脱水,透明,中性树胶封片,于显微镜下观察。

CD34主要表达于肿瘤血管内皮细胞胞质,以CD34表达阳性的血管进行肿瘤微血管密度(MVD)统计。先于低倍镜下($\times 100$)找到CD34表达阳性的血管密集区,然后于高倍镜下($\times 200$)随机选取5个视野计数CD34表达阳性的血管,取其平均值即为该例MVD。

NF- κ B p65表达于细胞核和细胞质中,MMP-9和VEGF均表达于细胞质中,均以呈现棕黄色或褐色为阳性结果。用显微镜图像采集系统采集图像,

每张切片选 5 个视野 ($\times 400$), 用 LeicaQwinV3 图像分析软件进行灰度值半定量分析, 检测 NF- κ B p65、MMP-9、VEGF 染色程度, 数值范围为 0~255, 取平均值即为其灰度值, 灰度值越大蛋白表达量越低。

2.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 统计软件处理, 数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对肿瘤生长的影响

与模型组比较, 联合给药组小鼠瘤体积增长速度明显减慢, 瘤质量显著减轻 ($P < 0.01$); 蝎毒多肽组和 5-Fu 组小鼠瘤质量亦明显减轻, 瘤体积缩小 ($P < 0.05$)。高剂量蝎毒多肽+5-Fu 组小鼠瘤质量和瘤体积与 5-Fu 组比较差异明显 ($P < 0.05$), 而低剂量蝎毒多肽+5-Fu 组与 5-Fu 组比较无显著差异。结果见表 1、图 1。

3.2 对肿瘤组织 MVD 的影响

免疫组化染色显示, CD34 主要位于肿瘤血管内皮细胞的胞浆中, 阳性表达的表现棕黄色或褐色。经半定量图像分析可见, 模型组小鼠肿瘤组织 MVD 为每个视野 (11.8 ± 3.553) 个。与模型组比

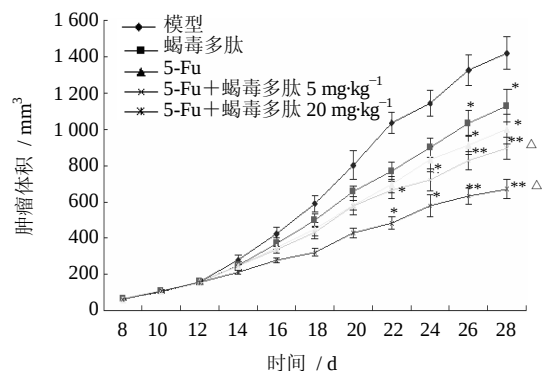
表 1 蝎毒多肽与 5-Fu 联合给药对 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠瘤质量及抑瘤率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of PSV + 5-Fu on tumor weight and inhibitory rate of H₂₂-bearing mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组 别	剂量 / (mg·kg ⁻¹)	瘤质量 / g	抑瘤率 / %
模型	—	0.590 ± 0.136	—
蝎毒多肽	20	0.478 ± 0.091*	18.98
5-Fu	15	0.439 ± 0.113*	25.50
5-Fu+蝎毒多肽	15+5	0.404 ± 0.086**	31.53
	15+20	0.319 ± 0.086*** ^Δ	44.24

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 5-Fu 组比较: ^Δ $P < 0.05$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs 5-Fu group



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与 5-Fu 组比较: ^Δ $P < 0.05$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group; ^Δ $P < 0.05$ vs 5-Fu group

图 1 各组 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠肿瘤体积增长曲线 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 1 Tumor growth curves of H₂₂-bearing mice in each group

较, 高、低蝎毒多肽与 5-Fu 联合用药组 MVD 均明显降低, 分别为每个视野 (6.7 ± 2.312)、(8.9 ± 2.283) 个, 差异显著 ($P < 0.01$)。5-Fu 组 MVD 为每个视野 (9.8 ± 2.440) 个, 蝎毒多肽组为每个视野 (9.3 ± 2.214) 个, 均明显高于高剂量蝎毒多肽+5-Fu 组 ($P < 0.05$), 而与低剂量蝎毒多肽+5-Fu 组无显著差异。结果见图 2。

3.3 对肿瘤组织 NF- κ B p65、MMP-9 和 VEGF 蛋白表达的影响

用 LeicaQwinV3 图像分析软件进行灰度值半定量分析显示, 与模型组比较, 联合给药组大鼠脑组织 NF- κ B p65、MMP-9、VEGF 蛋白表达量均明显减少 ($P < 0.01$); 与 5-Fu 组比较, 高剂量蝎毒多肽+5-Fu 组的 NF- κ B p65、MMP-9、VEGF 蛋白表达量也均明显减少 ($P < 0.05$), 而低剂量蝎毒多肽+5-Fu 组则无显著改变; 高、低剂量蝎毒多肽+5-Fu 组间亦存在显著差异 ($P < 0.05$)。结果见图 3 和 4。

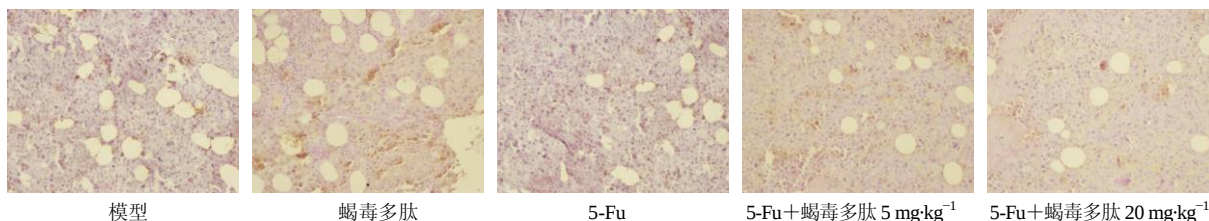


图 2 各组小鼠 H₂₂ 肝癌组织中 MVD 的显微镜观察

Fig. 2 Microscopic observation on MVD in tissue of H₂₂-bearing mice in each group

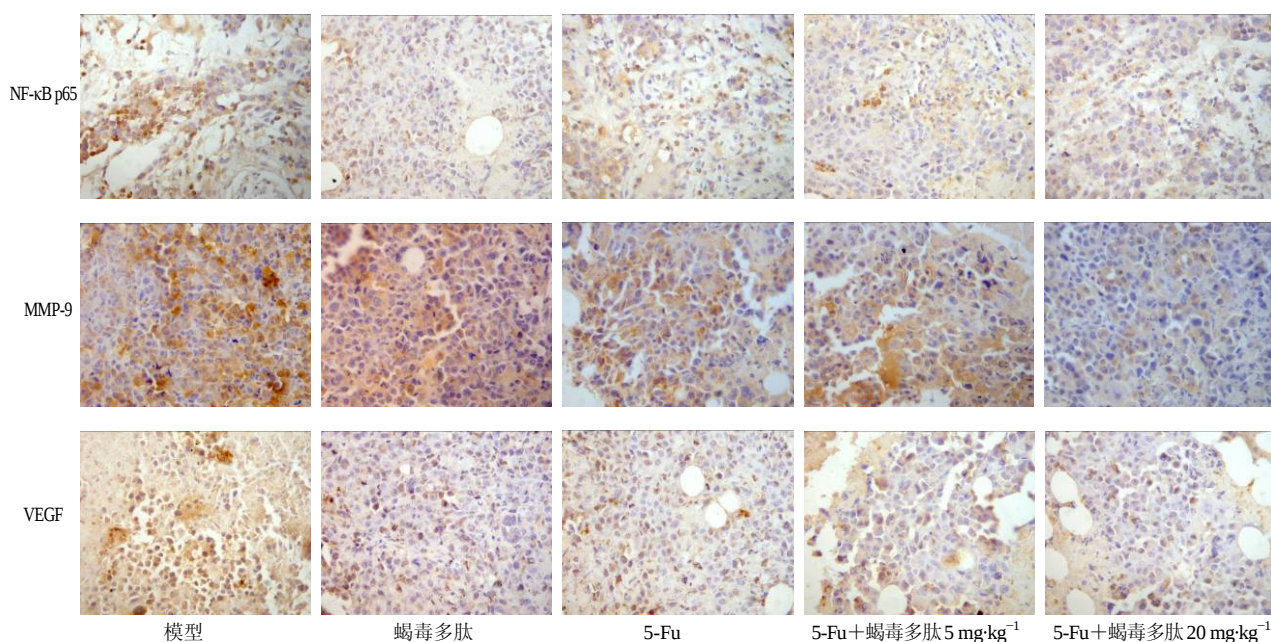


图3 蝎毒多肽与5-Fu联合给药对H₂₂肝癌荷瘤小鼠组织NF-κB p65、MMP-9和VEGF蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of PSV + 5-Fu on expression of NF-κB p65, MMP-9, and VEGF protein in tissue of H₂₂-bearing mice

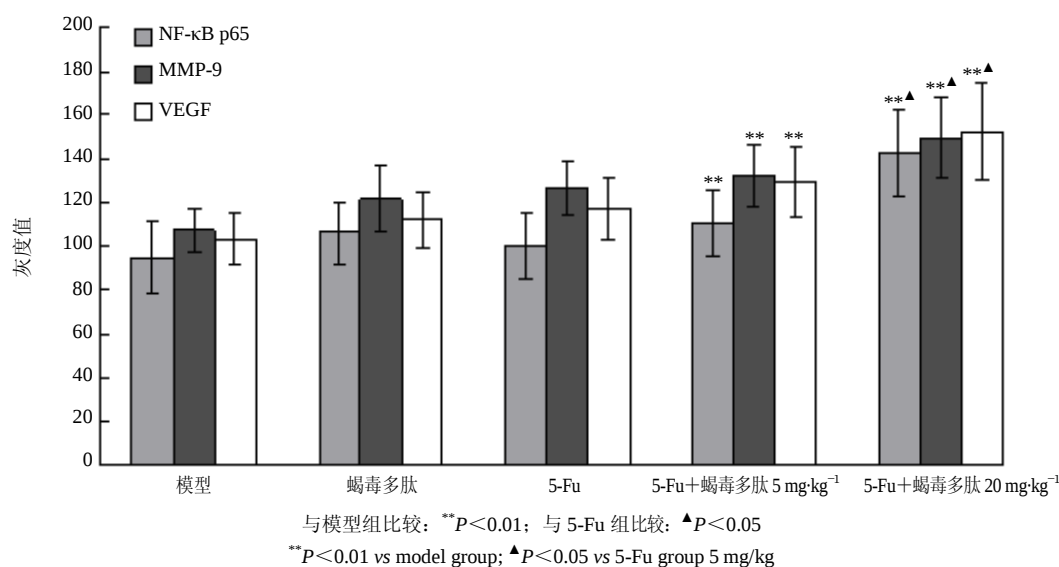


图4 各组小鼠H₂₂肝癌组织中NF-κB p65、MMP-9和VEGF表达的灰度值分析

Fig. 4 Grey value analysis on NF-κB p65, MMP-9, and VEGF in tissue of H₂₂-bearing mice

4 讨论

NF-κB 蛋白家族是重要的核转录因子, NF-κB p65 是 NF-κB 家族的重要成员, 是普遍存在于细胞质中的快反应转录因子, 在细胞核内与 DNA 特定序列结合, 激活多种与炎症、免疫反应、细胞生长或凋亡相关的细胞因子转录^[4-7]。NF-κB 在多种肿瘤细胞或组织中高表达或持续性激活, 其活化在恶性肿瘤的发生和发展中起重要作用。NF-κB 信息传递

与肝癌细胞的异常活化和肿瘤的恶性程度密切相关, 其机制之一为 NF-κB 诱导 VEGF、MMP-2、MMP-9、环氧合酶-2 的表达, 从而促进肿瘤血管生成、浸润及转移。

肿瘤新生血管形成不仅为肿瘤组织提供养分, 而且是恶性肿瘤快速生长、侵袭和转移的重要途径^[8]。VEGF 是最重要的肿瘤血管生长因子之一, 主要通过促进血管内皮细胞增殖而促进肿瘤血管生

成,同时增加血管通透性,其表达水平与肿瘤恶性程度及肿瘤患者的预后密切相关,阻断 VEGF 与其受体的结合成为抗肿瘤血管生成的重要靶点^[9-10]。MMP-9 是基质金属蛋白酶家族的重要成员,其通过降解微血管基底膜和细胞外基质,在肿瘤新生血管形成早期及促进肿瘤侵袭和转移过程中发挥重要作用^[11]。在肿瘤血管生成过程中 NF- κ B 可通过促进 VEGF 和 MMP-9 等血管生长因子的表达而发挥促血管生成作用。Chiang 等^[12]的研究发现,索拉非尼可通过抑制肝细胞癌细胞 NF- κ B 通路而减少 VEGF 和 MMP-9 的表达。

化疗是治疗肝癌的重要手段之一,而 NF- κ B 的激活可造成肿瘤组织对化疗的抵抗而导致治疗失败。NF- κ B 抑制剂能够增强肿瘤细胞对传统化疗的敏感性,提示临床上化疗联合阻断 NF- κ B 信号通路的方法将为治疗肝癌带来新希望。蝎毒多肽是从东亚钳蝎蝎毒中提取的含有 50~60 个氨基酸的多肽混合物,在抑制多种肿瘤生长和肿瘤血管生成中发挥重要作用,但作用机制尚不清楚。本实验结果表明,蝎毒多肽联合 5-Fu 干预小鼠 H₂₂ 移植瘤,可明显抑制肿瘤生长及新生血管形成,高剂量蝎毒多肽联合 5-Fu 组小鼠肿瘤组织 NF- κ B、VEGF、MMP-9 表达水平较模型组、蝎毒多肽组、5-Fu 组均明显降低,与低剂量蝎毒多肽联合 5-Fu 组比较亦有显著差异,提示一定剂量的蝎毒多肽可有效增强 5-Fu 对 H₂₂ 肝癌抑制作用,其机制可能与阻断 NF- κ B 通路、抑制 VEGF 和 MMP-9 的表达,从而减少肿瘤新生血管形成有关。蝎毒多肽抑制 NF- κ B 通路的具体作用靶点将在今后的研究中进一步探索。

参考文献

- [1] 张维东,崔亚洲,姚成芳,等.蝎毒多肽提取物抗肿瘤血管生成作用的实验研究[J].中国药理学通报,2005,21(6):708-711.
- [2] 张维东,崔亚洲,贾青,等.蝎毒多肽提取物对小鼠 S180 肉瘤和 H22 肝癌血管生成抑制作用的实验研究[J].山东中医药大学学报,2005,29(2):152-155.
- [3] 王兆朋,张维东,武利存,等.蝎毒多肽提取物抑制肝癌 H22 细胞化疗期间再增殖实验研究[J].中国中药杂志,2010,35(1):108-113.
- [4] Jin H R, Jin S Z, Cai X F, et al. Cryptopleurine targets NF- κ B pathway, leading to inhibition of gene products associated with cell survival, proliferation, invasion, and angiogenesis[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e40355.
- [5] Li X, Zheng Z, Ma X C, et al. Unfractionated heparin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through blocking p38 MAPK and NF- κ B activation on endothelial cell[J]. *Cytokine*, 2012, 6(8): 1-8.
- [6] Jang E Y, Yang C H, Han M H, et al. Sauchinone suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses through Akt signaling BV2 cells[J]. *Int Immunopharmacol*, 2012, 14(2): 188-194.
- [7] Spirina L V, Yunusova N V, Kondakova I V, et al. Association of growth factors, HIF-1 and NF- κ B expression with proteasomes in endometrial cancer[J]. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(9): 8655-8662.
- [8] Giatromanolaki A, Lyberakidis G, Lyratzopoulos N, et al. Angiogenesis and angiogenic factor expression in thyroid cancer[J]. *J BUON*, 2010, 15(2): 357-361.
- [9] Tsai M S, Chang C C, Kuo M L, et al. Vascular endothelial growth factor-A and changes in a tumor-bearing mouse model with lewis lung cancer[J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(6): 1143-1147.
- [10] Liu Y, Zhou Y, Zhang X S, et al. Expression of VEGF and MMP-9 and MRI imaging changes in cerebral glioma[J]. *Oncol Lett*, 2011, 2(6): 1171-1175.
- [11] Yu F, Jiang Q, Zhou Y, et al. Abnormal expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP9) correlates with clinical course in Chinese patients with endometrial cancer[J]. *Dis Markers*, 2012, 32(5): 321-327.
- [12] Chiang I T, Liu Y C, Wang W H, et al. Sorafenib inhibits TPA-induced MMP-9 and VEGF expression via suppression of ERK/NF- κ B pathway in hepatocellular carcinoma cells[J]. *In Vivo*, 2012, 26(4): 671-681.