

蝎毒多肽促进 5-氟尿嘧啶抑制 H₂₂ 肝癌血管生成的作用机制研究

隋文文^{1,2}, 张维东^{1*}, 武利存¹, 王兆朋¹, 张月英¹, 王朝霞¹, 贾青¹

1. 山东省医学科学院基础医学研究所 病理室, 山东省罕见病重点实验室, 山东 济南 250062

2. 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)抑制肿瘤血管生成的机制。**方法** 建立 H₂₂ 肝癌皮下荷瘤模型, 随机分为模型组、蝎毒多肽(20 mg/kg)组、5-Fu(20 mg/kg)组、联合组(5-Fu+蝎毒多肽), 每组 20 只。绘制肿瘤体积增长曲线并计算抑瘤率; 免疫组织化学法检测各组肿瘤组织微血管密度(MVD)、PTEN、PI3K、P-Akt、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)的变化; Western blotting 检测各组肿瘤组织中 PTEN、PI3K、P-Akt、HIF-1 α 蛋白的表达。**结果** 联合组、5-Fu 组、蝎毒多肽组 H₂₂ 肝癌移植瘤的生长较模型组均受到明显抑制($P<0.05$), 联合组和 5-Fu 组瘤质量和肿瘤体积差异亦显著($P<0.05$)。与荷瘤对照组相比, 联合组明显下调 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 表达($P<0.01$), 上调 PTEN 表达($P<0.01$), 降低 MVD($P<0.01$)。**结论** 蝎毒多肽可促进 5-Fu 抑制小鼠 H₂₂ 肝癌移植瘤血管生成, 其机制可能与抑制肿瘤微环境中 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 的表达, 上调 PTEN 的表达有关。

关键词: 蝎毒多肽; H₂₂ 肝癌; 缺氧诱导因子-1 α ; 血管生成; 微血管密度

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)03-0392-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.03.017

Inhibitory mechanism of polypeptide from scorpion venom combined with 5-fluorouracil on angiogenesis of H₂₂ hepatoma

SUI Wen-wen^{1,2}, ZHANG Wei-dong¹, WU Li-cun¹, WANG Zhao-peng¹, ZHANG Yue-ying¹, WANG Zhao-xia¹, JIA Qing¹

1. Department of Pathology, Key Laboratory for Rare & Uncommon Diseases of Shandong Province, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

2. School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China

Abstract: **Objective** To explore the inhibitory effects of polypeptide from scorpion venom (PSV) combined with 5-fluorouracil (5-Fu) on angiogenesis of H₂₂ hepatoma in mice and its mechanism. **Methods** The H₂₂ hepatoma tumor model was established by sc implanting H₂₂ hepatoma cells into mice. The tumor-bearing mice were randomly divided into four groups: control, PSV (20 mg/kg), 5-Fu (20 mg/kg), and combination groups, 10 mice in each group. The effect of PSV on tumor growth was observed by recording tumor growth curve and calculating the inhibitory rate; Immunohistochemistry was applied to detecting microvessel density (MVD), the levels of PTEN, PI3K, P-Akt, and hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) in tumor tissue of mice in each group; Western blotting was applied to detecting the expression of PTEN, PI3K, P-Akt, and HIF-1 α in tumor tissue of mice in each group. **Results** The growth of H₂₂ hepatoma transplantation tumor was inhibited more obviously in the combination group, the 5-Fu group and PSV group than that in the H₂₂ hepatoma tumor model group ($P<0.05$). There was statistical difference in the tumor weight and the tumor volume between the combination and the 5-Fu groups ($P<0.05$). Compared with the control group, the protein expression of PI3K, P-Akt, and HIF-1 α significantly decreased while the protein expression of PTEN significantly increased in the combination group ($P<0.01$). The MVD was obviously lower in the combination group than that in the control and 5-Fu groups ($P<0.01$). **Conclusion** PSV combined with 5-Fu could inhibit the angiogenesis of H₂₂ hepatoma transplantation tumor in mice. Its mechanisms might be associated with inhibiting the expression of PI3K, P-Akt, and HIF-1 α and increasing PTEN in the microenvironment of tumors.

Key words: polypeptide from scorpion venom; H₂₂ hepatoma; hypoxia-inducible factor-1 α ; angiogenesis; microvessel density

收稿日期: 2013-08-14

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)

作者简介: 隋文文(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤病理学。Tel: (0531)82919939 E-mail: suiwenwenabc@163.com

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

5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-Fu)是一种传统的抗肿瘤药,其通过影响DNA的合成等机制杀伤肿瘤细胞,对消化道肿瘤有良好疗效。化学疗法在杀伤肿瘤细胞的同时亦损伤正常细胞,导致机体免疫功能下降,引起肿瘤细胞的加速再增殖,最终导致化疗失败。中医药在抗肿瘤生长及转移,增强化疗疗效、降低化疗毒性、提高机体免疫功能、改善症状、提高生活质量方面有其自身优势^[1]。蝎毒多肽是从东亚钳蝎 *Buthu martensii* Karsch 蝎毒中提取的多肽混合物,前期研究已证实蝎毒多肽可抑制多种肿瘤生长,能明显提高化疗疗效^[2-4]。本实验通过探讨蝎毒多肽联合 5-Fu 给药对小鼠 H₂₂ 肝癌移植瘤血管生成及肿瘤组织中 PI3K/Akt 信号通路的影响,旨在探讨蝎毒多肽抑制肿瘤血管生成的可能机制,为其临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

蝎毒多肽按文献方法^[2]制备,蛋白质量分数≥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。5-Fu,天津金耀氨基酸有限公司,批号 1210181;PI3K、P-Akt、Akt 一抗及 β -actin 单克隆抗体,美国 Cell Signaling 公司;PTEN、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 一抗及山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗,北京博奥森生物技术有限公司;DAB 二氨基联苯胺显色试剂盒,北京中杉金桥生物技术有限公司;Western blotting 相关试剂,江苏碧云天生物技术研究所以。

1.2 动物与细胞

昆明种小鼠 80 只,6~8 周龄,雄性,体质量 18~20 g,山东大学实验动物中心,合格证号 SCXK(鲁)20090001;H₂₂ 肝癌小鼠腹水瘤种,山东省医学科学院药物所惠赠,腹水瘤种每 7 天传 1 次,第 2 代用于实验。

1.3 仪器

Beckman Coulter 超低温离心机,德国 Leica 倒置显微镜,德国 Leica DM4000B 光学显微镜,德国 Leica QwinV3 图像分析软件,Image J 图像分析软件。

2 方法

2.1 模型制备、分组及给药

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 $1 \times 10^7/\text{mL}$,于每只小鼠右腋部皮下接种 0.2 mL。取小鼠 80 只,随机分为 4 组:模型组、蝎毒多肽组、5-Fu 组、联合

组(蝎毒多肽+5-Fu)。接种当天为第 0 天,蝎毒多肽组每天 ig 给药 20 mg/kg^[5],5-Fu 组和联合组于第 7、10、13、16、19 天 ip 5-Fu 20 mg/kg,0.2 mL/只,其余时间联合组每天 ig 蝎毒多肽 20 mg/kg,给药体积为 0.2 mL/只;模型组每天 ig 等体积生理盐水,每天观察小鼠饮食及肿瘤生长情况,实验共进行 21 d。

2.2 肿瘤体积及质量测定

从用药当天开始,隔日用游标卡尺测量肿瘤长径(a)和垂直横径(b),计算肿瘤体积($V=a \times b^2/2$),绘制肿瘤体积增长曲线。末次给药 24 h 后,颈椎脱臼处死小鼠,完整剥离肿瘤组织,称质量并计算抑瘤率(抑瘤率=1-给药组平均瘤质量/模型组平均瘤质量)。肿瘤组织部分固定于 10%中性甲醛用于免疫组化,部分保存于-80℃冰箱待 Western blotting 检测。

2.3 免疫组化 SP 法检测肿瘤组织中 PTEN、PI3K、P-Akt、HIF-1 α 蛋白表达

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)、PTEN(1:200)、PI3K(1:400)、P-Akt(1:50)、HIF-1 α (1:200),4℃过夜,二抗孵育 1 h,DAB 显色,显微镜下观察结果。

CD34 主要表达于肿瘤血管内皮细胞的细胞质,阳性结果以胞浆呈现棕黄色染色。微血管计数参考 Weidner 等的方法^[6],即首先在低倍镜($\times 40$ 和 $\times 100$)下选取癌组织视野中微血管最密集的 3 个区域,然后在高倍镜($\times 400$)下进行计数(微血管密度,MVD),取平均值进行统计分析。

PTEN、PI3K、P-Akt 表达于细胞质或细胞膜,HIF-1 α 表达于细胞核和细胞质中,均以呈现棕黄色或棕褐色为阳性结果。用显微镜图像采集系统采集图像,每张切片随机选取 5 个视野($\times 400$),用 LeicaQwinV3 图像分析软件进行灰度值的半定量分析,检测 PTEN、PI3K、P-Akt、HIF-1 α 染色程度,数值范围为 0~255,取平均值即为其灰度值,蛋白表达量与灰度值呈负相关。

2.4 Western blotting 法检测 PTEN、PI3K、P-Akt、Akt 和 HIF-1 α 蛋白表达

每组取肿瘤组织 100 mg 加裂解液提取组织总蛋白,按 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行蛋白定量。总蛋白 100℃加热变性 10 min。配制 10%分离胶及 5%浓缩胶,每个加样孔上样量为 60 μg ,电泳后转移至 PVDC 膜,经 5%脱脂奶粉进行抗原封闭后加

入相应的一抗4℃过夜,PTEN和HIF-1 α 按1:500稀释,PI3K按1:1000稀释,P-Akt按1:2000稀释,Akt按1:1000稀释。TBS洗膜后加入二抗,室温孵育1.5h,DAB显影,Image J软件分析PTEN、PI3K、P-Akt、Akt、HIF-1 α 条带。

2.5 统计学方法

采用SPSS 17.0统计软件处理,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据的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,联合组小鼠移植瘤体积增长速度明显减慢,瘤质量显著减轻($P < 0.01$)。蝎毒多肽组与5-Fu组小鼠瘤质量亦明显减轻,肿瘤体积缩小($P < 0.05$);与5-Fu组比较,联合组瘤质量降低,肿瘤体积缩小($P < 0.05$)。结果见表1和图1。

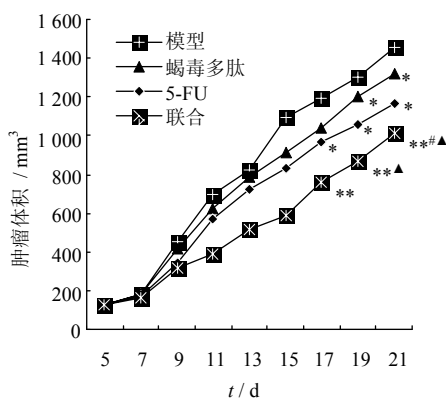
表1 蝎毒多肽与5-Fu联合给药对H₂₂肝癌荷瘤小鼠瘤质量的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

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

组别	瘤质量 / g	抑瘤率 / %
模型	0.70 $\pm$ 0.18	—
蝎毒多肽	0.58 $\pm$ 0.12*	17.1
5-Fu	0.47 $\pm$ 0.24*	32.9
联合	0.40 $\pm$ 0.05** Δ	42.9

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

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$ vs 5-Fu group



与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与蝎毒多肽组比较: # $P < 0.05$; 与5-Fu组比较: $\Delta P < 0.05$, 下同

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ vs PSV group;

$\Delta P < 0.05$ vs 5-Fu group, same as below

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 curve of H₂₂-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

3.2 对肿瘤组织 MVD 的影响

CD34 标记血管内皮细胞,以胞浆呈现棕黄色染色为阳性结果,微血管散在分布。模型组、蝎毒多肽组、5-Fu 组 MVD 计数分别为 3.80 ± 0.84 、 2.20 ± 0.84 、 1.80 ± 0.84 。与模型组相比,蝎毒多肽组与 5-Fu 组对肿瘤 MVD 有一定抑制作用($P < 0.05$)。联合组 MVD 计数为 0.80 ± 0.84 ,明显低于模型组($P < 0.01$)。结果见图2。

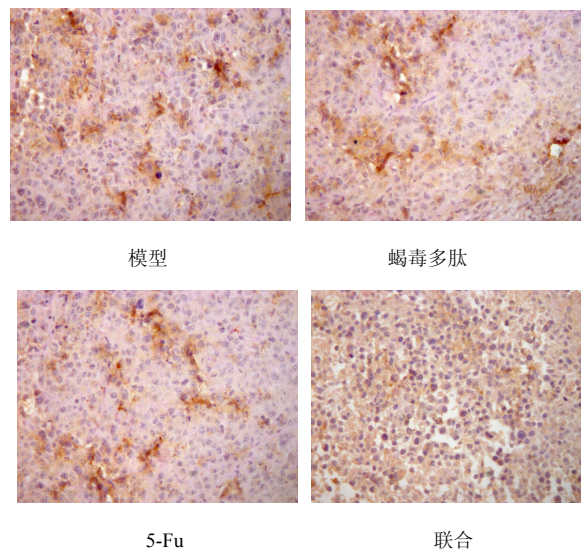


图2 各组小鼠H₂₂肝癌组织中MVD的显微镜观察
Fig. 2 Microscopic obserbation on MVD in tissue of H₂₂-bearing mice in each group

3.3 对肿瘤组织 PTEN、PI3K、P-Akt 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响

免疫组化染色结果表明,联合组PI3K、P-Akt、HIF-1 α 蛋白表达量均明显低于模型组($P < 0.01$),PTEN蛋白表达明显高于模型组($P < 0.01$)。与模型组相比,蝎毒多肽组与5-Fu组PI3K、P-Akt、HIF-1 α 蛋白表达也降低($P < 0.05$),PTEN蛋白表达升高($P < 0.05$);与蝎毒多肽组和5-Fu组比较,联合组PI3K、P-Akt、HIF-1 α 蛋白表达降低($P < 0.05$),PTEN蛋白表达升高($P < 0.05$)。结果见图3和4。

3.4 对肿瘤组织 PTEN、PI3K、P-Akt、Akt 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响

Western blotting法检测结果显示,与模型组比较,蝎毒多肽组与5-Fu组PI3K、P-Akt、HIF-1 α 表达条带均减弱($P < 0.05$),PTEN条带表达增强($P < 0.05$)。联合组PI3K、P-Akt、HIF-1 α 表达条带均明显减弱($P < 0.01$),PTEN条带表达明显增强

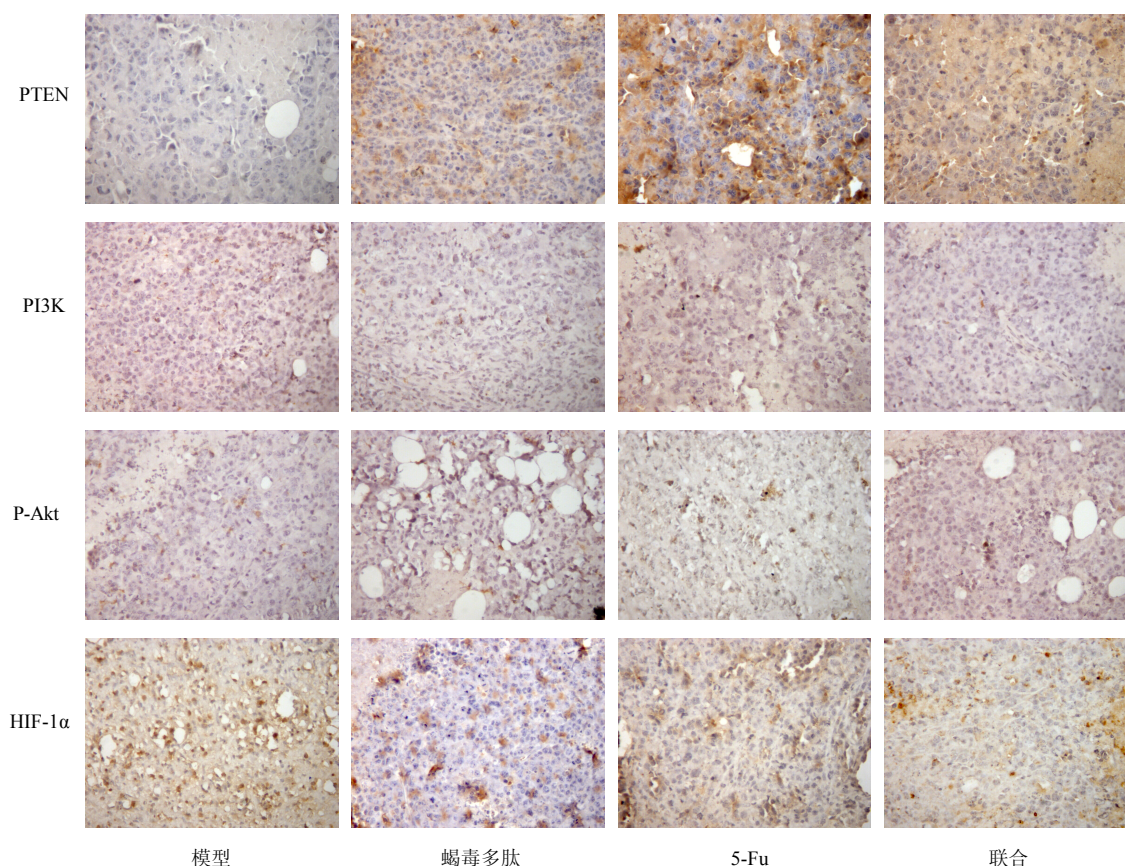


图 3 蝎毒多肽与 5-Fu 联合给药对 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠组织 PTEN、PI3K、P-Akt 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响
Fig. 3 Effect of PSV + 5-Fu on expression of PTEN, PI3K, P-Akt, and HIF-1 α in tissue of H₂₂-bearing mice

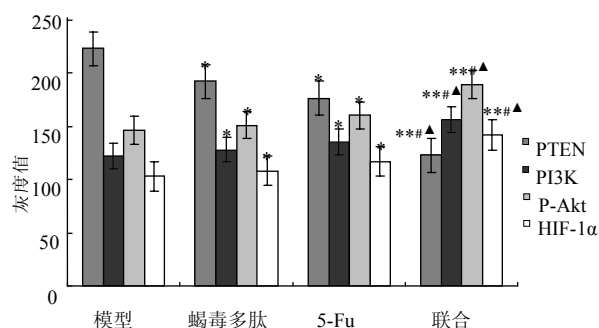


图 4 各组小鼠 H₂₂ 肝癌组织中 PTEN、PI3K、P-Akt 和 HIF-1 α 表达的灰度值分析

Fig. 4 Grey value analysis on expression of PTEN, PI3K, P-Akt, and HIF-1 α in tissue of H₂₂-bearing mice

($P < 0.01$); 与蝎毒多肽组和 5-Fu 组比较, 联合组 PI3K、P-Akt、HIF-1 α 表达条带均减弱 ($P < 0.05$), PTEN 条带表达增强 ($P < 0.05$)。结果见图 5。

4 讨论

PI3K/Akt 信号通路是细胞内重要信号转导通路之一, Akt 是信号转导途径中的重要蛋白激酶, 它是 PI3K 下游作用的靶蛋白, 是 PI3K/Akt 信号

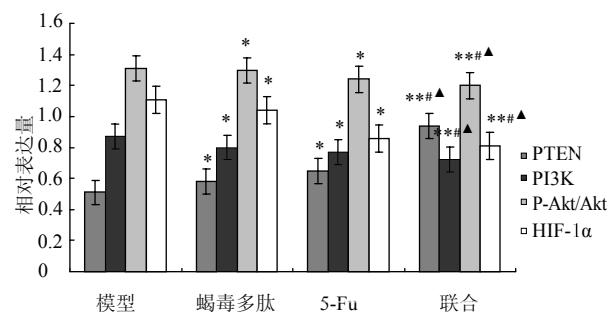
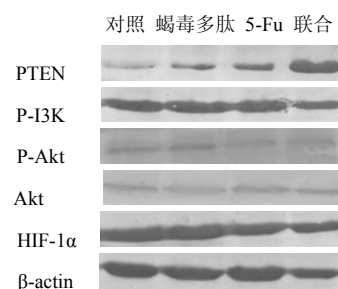


图 5 蝎毒多肽与 5-Fu 联合给药对 H₂₂ 肝癌组织 PTEN、PI3K、P-Akt 和 HIF-1 α 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of PSV + 5-Fu on expression of PTEN, PI3K, P-Akt, and HIF-1 α in hepatocarcinoma tissue of H₂₂-bearing mice

转导通路的核心,其可被 PI3K 激活成为具有磷酸激酶活性的 P-Akt,其持续活化与肿瘤的发生发展密切相关^[7]。由于 PI3K/Akt 信号途径的激活与血管生成密切相关,抑制内皮细胞中 Akt 的活化能够抑制生长因子诱导的血管生成^[8]。PI3K/Akt 信号通路还与 HIF-1 α 之间的关系密切^[9]。Chen 等^[10]应用 PI3K 抑制剂 ly294001 抑制肾上皮细胞中 PI3K 的活性后, HIF-1 α 的表达明显受到抑制。在人类常见的恶性肿瘤及癌前病变中均有 HIF-1 α 蛋白的高表达。HIF-1 α 与肿瘤血管生成密切相关,其可通过多种途径上调 VEGF 等多种血管生成因子的表达,进而促进肿瘤血管生成。

PTEN 是一种新的抑癌基因,可以通过抑制细胞周期、抑制肿瘤细胞侵袭和转移、抑制肿瘤血管形成等途径发挥其抑癌作用^[11]。PTEN 可以去磷酸化磷脂酰 3, 4, 5-三磷酸肌醇,拮抗 PI3K 的活性,降低细胞内磷脂酰 3, 4, 5-三磷酸肌醇的浓度,从而抑制 Akt 的激活^[12]。前期研究发现 PTEN 可阻断内皮细胞 VEGF mRNA 的表达^[13]。进一步研究还发现, PTEN 可抑制 PI3K/Akt 信号通路,抑制细胞生长,下调前列腺癌细胞核组织中 HIF-1 α 的表达^[14]。

5-Fu 是治疗消化道肿瘤的常用药,主要通过抑制脱氧胸苷酸合成酶,阻止脱氧尿苷酸甲基化转变为脱氧胸苷酸,从而影响 DNA 合成,以此达到治疗肿瘤的目的。然而,其在临床治疗中存在一定的耐药性。本室前期研究已证实^[3,15-16],蝎毒多肽不仅可明显抑制人脐静脉内皮细胞增殖及鸡胚尿囊膜新生血管的形成,还可通过影响肿瘤血管微环境而抑制肿瘤血管生成。本实验研究发现,联合组可明显减慢小鼠 H₂₂ 肝癌移植瘤的生长速度,降低荷瘤小鼠的瘤质量,且联合组小鼠肿瘤组织 MVD 显著低于模型组、5-Fu 组和蝎毒多肽组。提示蝎毒多肽联合 5-Fu 抑制小鼠 H₂₂ 肝癌血管生成是其抑制肿瘤组织快速生长的机制之一。

为研究蝎毒多肽联合 5-Fu 抑制小鼠 H₂₂ 肝癌血管生成的作用机制,本实验利用免疫组织化学 SP 法和 Western blotting 法,分析各组小鼠 H₂₂ 肝癌组织中 PTEN、PI3K、P-Akt 和 HIF-1 α 的蛋白表达水平。实验结果显示联合组肿瘤组织 PI3K、P-Akt 和 HIF-1 α 的蛋白表达水平均明显降低, PTEN 表达升高,提示蝎毒多肽与 5-Fu 联合用药可能是通过共同抑制 PI3K、P-Akt 和 HIF-1 α 的表达,上调 PTEN

的表达来抑制肿瘤组织血管生成,从而降低小鼠 H₂₂ 肝癌的生长速度。这可能是蝎毒多肽抑制肿瘤血管生成的机制,这为蝎毒多肽防治肿瘤提供了新的实验依据,并为蝎毒多肽抗肿瘤作用应用于临床提供理论依据。

参考文献

- [1] 宁云娜,张维东,武利存,等.蝎毒多肽提取物促进环磷酸腺苷抑制 Lewis 肺癌的作用机制研究[J].中国中西医结合杂志,2012,32(4):537-542.
- [2] 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试验研究[J].中国药理学通报,2005,21(6):708-711.
- [3] 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.
- [4] 张妍,张维东,张月英,等.蝎毒多肽提取物对人卵巢癌 SKOV3 细胞增殖及血管内皮生长因子、凝血酶敏感蛋白表达的影响[J].中草药,2012,43(3):515-519.
- [5] 郑安红,张维东,王兆朋,等.蝎毒多肽增强 5-氟尿嘧啶对 H22 肝癌抑制作用的机制研究[J].中草药,2013,44(11):1465-1469.
- [6] Weider N, Carroll P R, Flax J, et al. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma [J]. *Am J Pathol*, 1993, 143(2): 401-409.
- [7] Kumar C C, Madison V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors [J]. *Oncogene*, 2005, 24(50): 7493-7501.
- [8] Mehta R R, Yamada T, Taylor B N, et al. A cell penetrating peptide derived from azurin inhibits angiogenesis and tumor growth by inhibiting phosphorylation of VEGFR-2, FAK and Akt [J]. *Angiogenesis*, 2011, 14(3): 355-369.
- [9] Patten D A, Lafleur V N, Robitaille G A, et al. Hypoxia-inducible factor-1 activation in nonhypoxic conditions: the essential role of mitochondrial-derived reactive oxygen species [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(18): 3247-3257.
- [10] Chen T H, Wang J F, Chan P, et al. Angiotensin II stimulates hypoxia-inducible factor 1 α accumulation in glomerular mesangial cells [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1042: 286-293.
- [11] 王晓慧,王兆朋,张月英,等.蝎毒多肽提取物对 A549 细胞增殖抑制作用机制研究[J].中国中药杂志,2012,37(11):1620-1623.
- [12] Carracedo A, Pandolfi P P. The PTEN-PI3K pathway: of

- feedbacks and cross-talks [J]. *Oncogene*, 2008, 27(41): 5527-5541.
- [13] Li Y M, Zhou B P, Deng J, *et al.* A hypoxia-independent hypoxia-inducible factor-1 activation pathway induced by phosphatidylinositol-3 kinase/Akt in HER2 overexpressing cells [J]. *Cancer Res*, 2005, 65(8): 3257-3263.
- [14] Fang J, Ding M, Yang L, *et al.* PI3K/PTEN/AKT signaling regulates prostate tumor angiogenesis [J]. *Cell Signal*, 2007, 19(12): 2487-2497.
- [15] 孙晓佳, 张月英, 贾青, 等. 蝎毒多肽提取物联合化疗抑制 Lewis 肺癌血管生成实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(12): 1644-1649.
- [16] 张维东, 崔亚洲, 武利存, 等. 蝎毒多肽提取物的抗血管生成作用 [J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(3): 343-346.