

蝎毒多肽提取物促进自噬抑制 S₁₈₀ 肉瘤作用机制的研究

张璐璐^{1,2}, 张维东^{1*}, 武力存¹, 张月英¹, 王兆朋¹, 王朝霞¹, 贾青¹, 赵嵌嵌^{1,2}

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 探讨蝎毒多肽提取物 (polypeptide extract from scorpion venom, PESV) 抑制 S₁₈₀ 肉瘤的机制。方法 小鼠 30 只, 建立 S₁₈₀ 肉瘤皮下荷瘤模型, 随机分为对照组、PESV 组和雷帕霉素 (rapamycin, RAPA) 组, 每组 10 只, 给药组 ig 给药, 连续给药 14 d。绘制肿瘤体积生长曲线并且计算抑瘤率; HE 染色观察各组肿瘤组织病理变化; 免疫组织化学法检测肿瘤组织中 Beclin1、MAP1LC3A、CD133 的蛋白表达差异; Western blotting 检测各组肿瘤组织中 Beclin1、MAP1LC3A、CD133 的蛋白表达。结果 PESV 组和 RAPA 组移植瘤的生长受到明显抑制, PESV 组与 RAPA 组的抑瘤率分别为 17.9% 和 25.0% ($P < 0.05$)。与对照组相比, PESV 组和 RAPA 组 Beclin1、MAP1LC3A 蛋白表达明显上调 ($P < 0.05$)。且 CD133 的蛋白表达明显下调 ($P < 0.01$)。结论 PESV 可抑制 S₁₈₀ 肉瘤细胞生长, 其机制可能与促进自噬相关因子 Beclin1、MAP1LC3A 的表达及抑制肿瘤干细胞标志物 CD133 的表达有关。

关键词: 蝎毒多肽提取物; S₁₈₀ 肉瘤; 自噬; 肿瘤干细胞; 雷帕霉素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)08-1190-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.08.017

Inhibitory mechanism of polypeptide extract from scorpion venom on sarcoma S₁₈₀ by promoting autophagy

ZHANG Lu-lu^{1,2}, ZHANG Wei-dong¹, WU Li-cun¹, ZHANG Yue-ying¹, WANG Zhao-peng¹, WANG Zhao-xia¹, JIA Qing¹, ZHAO Qian-qian^{1,2}

1. Key Laboratory for Rare & Uncommon Diseases of Shandong Province, Department of Pathology, 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 mechanism of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) on sarcoma S₁₈₀. **Methods** Thirty mice were implanted with S₁₈₀ cells and randomly divided into three groups: control group, PESV group, and rapamycin (RAPA) group with 10 mice in each group. Then the tumor volume growth curve was drawn and the tumor inhibitory rate (IR) was calculated. The morphological changes of the tumor tissue were observed by HE staining. The protein expression levels of Beclin1, MAP1LC3A, and CD133 were detected using immunohistochemical assay. Western blotting was applied to detecting the expression of Beclin1, MAP1LC3A, and CD133 in tumor tissue of mice in each group. **Results** The growth of sarcoma S₁₈₀ transplanted tumor was inhibited more obviously in the PESV group and RAPA group than that in the control group. The IR in the PESV and RAPA groups were 17.9% and 25.0%, respectively ($P < 0.05$). Compared with the control group, the protein expression of Beclin1 and MAP1LC3A increased while the protein expression of CD133 decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** PESV can inhibit the growth of sarcoma S₁₈₀, the mechanisms might be associated with promoting the expression of autophagic relative factors, Beclin1 and MAP1LC3A as well as inhibiting the expression of CD133.

Key words: polypeptide extract from scorpion venom; sarcoma S₁₈₀; autophagy; tumor stem cells; rapamycin

蝎毒多肽提取物 (polypeptide extract from scorpion venom, PESV) 是从东亚钳蝎蝎毒中提取

分离的具有多种生物活性的抗肿瘤有效成分。前期研究证实 PESV 可抑制多种肿瘤细胞生长, 有显著

收稿日期: 2014-08-05

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); 国家青年科学基金项目 (81303077); 国家自然科学基金青年基金项目 (81403150)

作者简介: 张璐璐 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤病理学。Tel: (0531)82919939 E-mail: 864118887@qq.com

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

的抗肿瘤增殖和抗肿瘤血管生成作用^[1-2]。

雷帕霉素 (rapamycin, RAPA) 是一种新型大环内酯类免疫抑制剂, 是哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 的特异性抑制剂, 具有促进自噬的作用。研究发现 RAPA 在抗肿瘤方面有重要作用^[3]。肿瘤干细胞是肿瘤细胞中少数但可以无限增殖的细胞, 是近年来抗肿瘤研究的热点。本实验以小鼠 S₁₈₀ 肉瘤为研究对象, 体内观察 PESV 对肿瘤生长的影响, 并通过检测 PESV 对肿瘤组织 Beclin1、MAP1LC3A 和 CD133 蛋白表达的影响, 探讨 PESV 对自噬和肿瘤干细胞作用的可能机制, 为临床肿瘤治疗提供实验依据。

1 材料

1.1 动物和细胞

6~8 周龄清洁级昆明种小鼠 30 只, 雄性, 体重 20~24 g, 购自山东大学实验动物中心, 合格证号 SCXK (鲁) 20090001。小鼠适应性饲养 3 d。S₁₈₀ 小鼠腹水瘤种, 由山东省医学科学院微生物实验室提供。腹水瘤种每 7 天传 1 次, 第 2 代用于实验。

1.2 药物

蝎毒冻干粉购自邹平县蝎蚁生物科技有限公司。PESV 自制, 取蝎毒冻干粉溶解 (0.025 g/mL, pH 7.4), 离心半径 6.95 cm, 5 000 r/min 低温离心 30 min, 0.45 μm 和 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 将超滤物冻干。取超滤蝎毒冻干粉 400 mg 加磷酸缓冲液, 经葡萄糖凝胶和阳离子交换色谱后, 紫外分光光度计 (吸收波长 280 nm) 检测, 收集蛋白峰, 获得多肽提取物。PESV 为含有 50~60 个氨基酸的多肽混合物, 相对分子质量 6 000~7 000, 耐热, pH 稳定。PESV 在 HPLC 色谱图上显示有 4 个主峰, 主峰占总面积的 45.1%。用前以生理盐水稀释至合适浓度。RAPA 购自北京华迈科技有限公司 (批号 BJ130218010F)。

1.3 试剂与仪器

Beclin1、MAP1LC3A、CD133 一抗及山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗 (bs-0295G-HRP) 购自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购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Leica DM4000B 光学显微镜购自德国徕卡仪器有限公司; 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、实验分组和干预方法

用生理盐水稀释无菌抽取的 S₁₈₀ 肿瘤细胞, 调

整细胞密度至 1×10^7 个/mL。每只小鼠右腋下注射 0.2 mL 肿瘤细胞悬液 (第 0 天), 接种后第 6 天, 测量肿瘤体积均达 50~80 mm³ 时, 将成瘤小鼠随机分为对照组、PESV (20 mg/kg)^[4]组和 RAPA (4 mg/kg)^[5]组, 每组 10 只。各组每天 ig 给药 1 次, 对照组 ig 等体积生理盐水, 连续给药 14 d。

2.2 肿瘤生长情况观察

从给药当天 (第 7 天) 开始, 隔日用游标卡尺测量肿瘤长径 (A) 和垂直短径 (B), 计算肿瘤体积 ($V=A \times B^2/2$), 描绘肿瘤体积增长曲线。末次给药 24 h 后, 处死小鼠, 完整剥离肿瘤组织, 称质量, 计算抑瘤率。

抑瘤率 = (对照组平均瘤质量 - 给药组平均瘤质量) / 对照组平均瘤质量

2.3 肿瘤组织形态学观察

肿瘤组织置于中性甲醛中固定 24 h, 石蜡包埋切片 (4 μm), 脱蜡至水, HE 染色 5 min, 盐酸酒精分化, 反蓝, HE 染色 5 min, 脱水, 透明, 中性树胶封片。

2.4 免疫组化法检测肿瘤组织中 Beclin1、MAP1LC3A 和 CD133 蛋白表达

采用免疫组化 SP 法染色, 3% H₂O₂ 氧化消除内源性过氧化物酶活性, pH 6.0 柠檬酸修复液热修复 15 min, 分别加入一抗 Beclin1 (1:100)、MAP1LC3A (1:100) 和 CD133 (1:200), 4 °C 过夜, 滴加辣根酶标记的二抗, 37 °C 孵育 60 min, DAB 显色, 自来水充分冲洗, 苏木素复染, 封片。显微镜下观察结果。Beclin1、MAP1LC3A 阳性结果是在细胞膜和细胞浆中出现棕黄色颗粒, CD133 阳性结果定位于细胞膜表面, 胞膜出现明显的棕黄色颗粒。显微镜图像采集系统采集图像, 每张切片选 5 个视野 (×400), LeicaQwinV3 图像分析软件进行灰度值半定量分析, 分别检测 Beclin1、MAP1LC3A 和 CD133 的染色程度。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, 即灰度值越高, 蛋白表达越低。

2.5 Western blotting 法检测肿瘤组织中 Beclin1、MAP1LC3A 与 CD133 的蛋白表达

各组取肿瘤组织 100 mg, 加裂解液 (含 PMSF) 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 °C 加热变性 10 min, 配制 10% 分离胶及 5% 积层胶, 按照每个加样孔上样量为 60 μg, 电泳之后转膜 (PVDC 膜), 经 5% 脱脂奶粉

进行抗原封闭。加一抗 4 ℃ 过夜。Beclin1 按 1 : 200 稀释, MAP1LC3A 按 1 : 300 稀释, CD133 按 1 : 300 稀释。TBST 洗膜后加入二抗, 室温孵育 1.5 h, 显影, Image J 软件分析 Beclin-1、MAP1LC3A 和 CD133 条带。

2.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件处理, 所有计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间数据比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行检验。

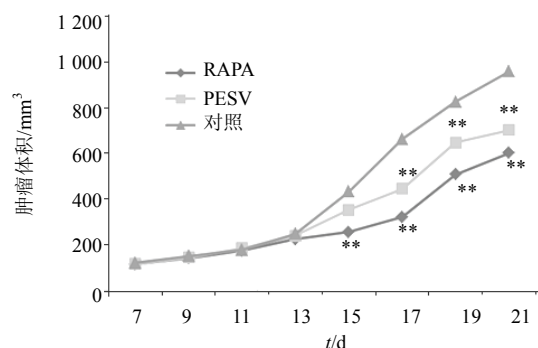
3 结果

3.1 对肿瘤生长的影响

各组小鼠一般状态比较: 对照组小鼠状态较差, 个别小鼠体质量明显减轻。与对照组比较, PESV 组和 RAPA 组小鼠一般状态有所改善。随着实验时间延长, 各组小鼠移植瘤体积逐渐增加; 与对照组比较, PESV 组和 RAPA 组小鼠肿瘤体积分别从第 17 天和第 15 天起开始减小, 差异显著 ($P < 0.01$)。与对照组比较, PESV 组和 RAPA 组肿瘤体积增长速度慢 ($P < 0.05$ 、 0.01)。实验结束时, PESV 组与 RAPA 组小鼠瘤质量也明显减轻 ($P < 0.01$)。结果见图 1 和表 1。

3.2 各组肿瘤组织形态学比较

HE 染色后光镜下观察可见, 对照组坏死区较少且面积较小, 少见核固缩等形态学变化; RAPA 组和 PESV 组可见多个大面积片状坏死区, 大部分肿瘤细胞呈现核固缩、核碎裂等多种凋亡形态学改变。PESV 组和 RAPA 组亦可见肿瘤细胞胞质无定形、核碎裂的表现, 可能是肿瘤细胞自噬的结果。癌巢周围有单核细胞浸润。见图 2。



与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

图 1 各组 S_{180} 荷瘤小鼠肿瘤体积增长曲线

Fig. 1 Tumor growth curves of S_{180} -bearing mice in each group

表 1 各组 S_{180} 荷瘤小鼠体质量、瘤质量及抑瘤率比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Comparison on body weight, tumor weight and IR of S_{180} -bearing mice, in each group ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/g		瘤质量/g	抑瘤率/ %
		实验前	实验后		
对照	—	24.00 ± 1.31	26.70 ± 2.09	0.56 ± 0.39	—
PESV	20	23.80 ± 1.08	26.60 ± 1.94	0.46 ± 0.24**	17.9
RAPA	4	23.90 ± 0.97	27.60 ± 2.38	0.42 ± 0.34**	25.0

与对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group

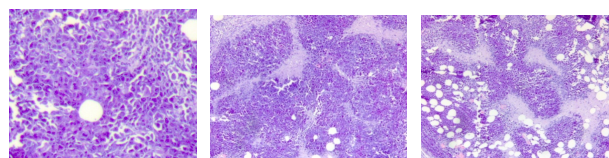


图 2 各组 S_{180} 荷瘤小鼠肿瘤组织形态学比较

Fig. 2 Histomorphological comparison on sarcoma S_{180} -bearing mice in each group

3.3 肿瘤组织 Beclin-1、MAP1LC3A、CD133 蛋白表达免疫组化结果

与对照组比较, PESV 组与 RAPA 组小鼠肿瘤组织中 Beclin-1、MAP1LC3A 蛋白表达量均增加 ($P < 0.05$ 、 0.01), CD133 蛋白表达量均降低 ($P < 0.01$), 见图 3 和 4。

3.4 肿瘤组织 Beclin-1、MAP1LC3A、CD133 蛋白表达 Western blotting 结果

Western blotting 法检测结果显示, 与对照组比较, PESV 组与 RAPA 组小鼠肿瘤组织中 Beclin-1、MAP1LC3A 表达条带均增强 ($P < 0.05$ 、 0.01), CD133 条带表达减弱 ($P < 0.05$ 、 0.01)。见图 5。

4 讨论

细胞自噬是以细胞质空泡化为特征的溶酶体依赖性降解途径, 对维持细胞内环境稳定有重要意义。其贯穿于细胞生长发育和病理生理过程。目前自噬成为肿瘤发展和治疗的研究热点^[6-7]。许多肿瘤细胞中存在自噬活性的改变, 肿瘤的发生发展与自噬有着一定的联系, 已成为探讨肿瘤发生和抑制肿瘤生长研究的新靶点^[8]。Cho 等^[9]发现环氧合酶-2 (COX-2) 能强烈诱导自噬, 抑制肿瘤细胞的生长。并且 COX-2 介导的自噬能通过上调肿瘤抑制基因或者衰老因子, 增强细胞衰老。

雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 信号通路是自噬的

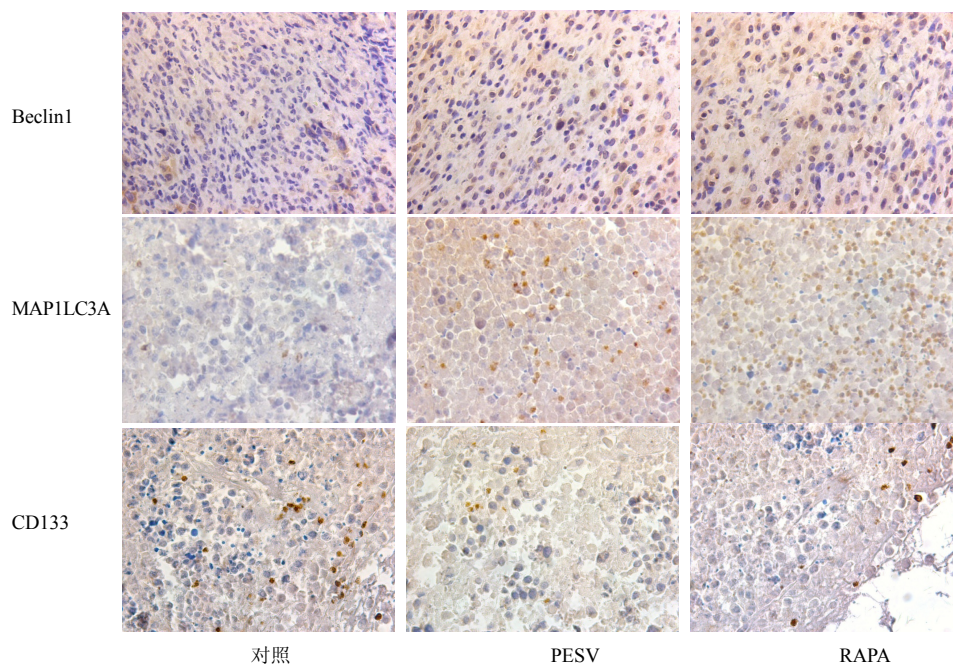


图 3 各组 S_{180} 荷瘤小鼠肿瘤组织中 Beclin-1、MAP1LC3A、CD133 蛋白表达 (免疫组化)

Fig. 3 Expression of Beclin1, MAP1LC3A, and CD133 in tissue of sarcoma S_{180} -bearing mice in each group (immunohistochemistry)

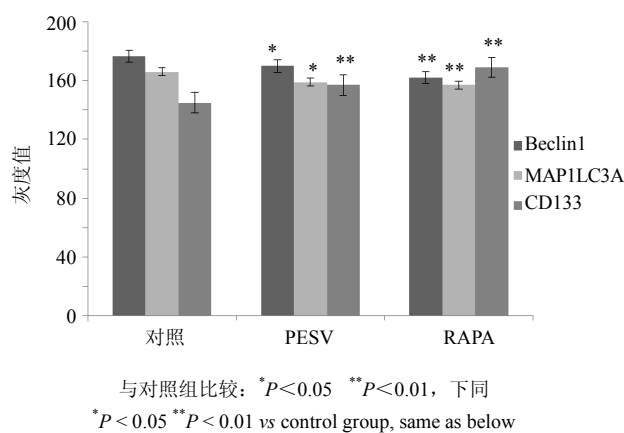


图 4 各组小鼠 S_{180} 肉瘤组织中 Beclin1、MAP1LC3A 和 CD133 表达的灰度值分析

Fig. 4 Grey value analysis on expression of Beclin1, MAP1LC3A, and CD133 in tissue of S_{180} -bearing mice in each group

信号通路之一, RAPA 能抑制 mTOR, 激活自噬。Zhuang 等^[10]通过体内外研究发现, RAPA 能激活肿瘤细胞中的自噬, 并且能降低肿瘤细胞的自我更新能力。Beclin1 是目前唯一被证实的哺乳动物自噬基因, 是自噬的直接执行者。有研究表明, Beclin1 在肿瘤中的表达促使肿瘤细胞自噬性死亡^[11-12], 其可以通过提高细胞自噬来抑制肿瘤的生长。MAP1LC3A 是哺乳动物细胞酵母 ATG8 基因的同源物, 参与自噬体的形成。Beclin1 和 MAP1LC3A 的表达强度都与自噬活性密切相关。本实验室前期

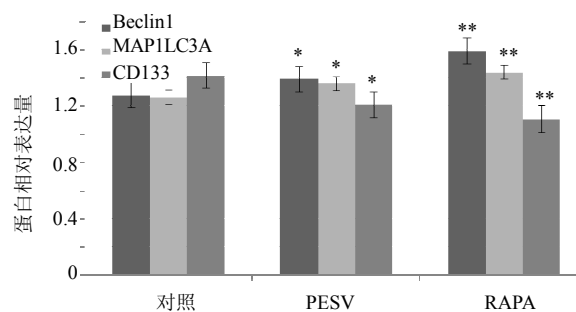
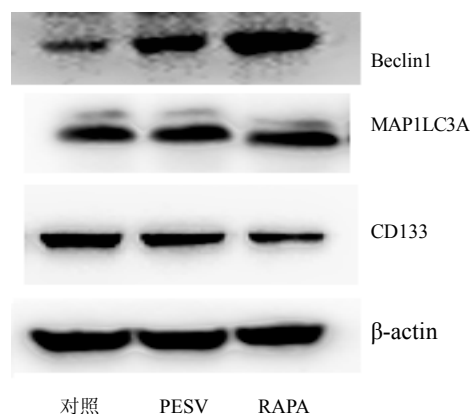


图 5 PESV 对 S_{180} 荷瘤小鼠肿瘤组织 Beclin-1、MAP1LC3A 和 CD133 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of PSVE and RAPA on protein expression of Beclin-1, MAP1LC3A, and CD133 in tissues of S_{180} -bearing mice

研究表明, PESV 具有良好的体内和体外抗肿瘤血管生成活性, 对多种肿瘤细胞具有杀伤作用, 能抑制肿瘤的生长^[13-14]。本研究结果显示, PESV 作用于 S₁₈₀ 荷瘤小鼠后, 肿瘤组织中 Beclin1、MAP1LC3A 的蛋白表达增高。

肿瘤干细胞(tumor stem cells, TSCs)是肿瘤组织中具有自我更新分化能力等干细胞性质的肿瘤细胞亚群, 是形成不同分化程度的肿瘤细胞和肿瘤不断增殖的根源^[15]。这类细胞具有形成并维持肿瘤生长和异质性的能力。目前乳腺癌、胶质瘤、肠癌等多种实体瘤中已被分离出 TSCs, 许多研究表明 TSCs 在肿瘤的发生、发展和转移中起了非常重要的作用^[16]。TSCs 是肿瘤的起源, 检测 TSCs 表面标志物可以提高肿瘤的早期诊断效率。前期研究表明, TSCs 与多种肿瘤患者临床预后相关^[17-18]。CD133 作为 TSCs 标志物, 被广泛运用到 TSCs 的研究中。Kryczek 等^[19]在裸鼠体内实验中发现, CD133⁺细胞比 CD133⁻细胞具有更强的致瘤性。临床上肿瘤复发是患者和医生最头疼的问题。TSCs 是肿瘤增殖的源泉, 常规放化疗难以将其消除, 导致肿瘤经常复发。如果有药物可以干预 TSCs, 从而抑制肿瘤的生长, 那么攻破肿瘤指日可待。本实验中通过检测荷瘤小鼠肿瘤组织中 CD133 的表达, 得出 PESV 组与 RAPA 组 CD133 表达明显降低。可见 PESV 或者 RAPA 的干预对 TSCs 存在影响, 它们可能通过抑制 TSCs 从而抑制了肿瘤的生长。

综上所述, PESV 能够通过增加 Beclin1、MAP1LC3A 的蛋白表达, 促进自噬的发生, 从而对 S₁₈₀ 肉瘤细胞产生自噬性抑制作用。PESV 降低肿瘤组织中 CD133 的表达, 提示 PESV 对 S₁₈₀ 肉瘤 TSCs 有抑制作用。这可能是 PESV 抑制肿瘤生长的机制之一, 可作为 PESV 应用于临床的理论依据。但 PESV 对 S₁₈₀ 肉瘤 TSCs 的抑制作用与自噬的关系, 还有待进一步的研究证实。

参考文献

- [1] 侯毅, 龙俊任, 张平, 等. 蝎毒多肽提取物对人膀胱癌 T24 细胞增殖抑制作用的研究 [J]. 天津医药, 2013, 41(3): 204-207.
- [2] 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.
- [3] Jiang B H, Liu L Z. Role of mTOR in anticancer drug resistance: perspectives for improved drug treatment [J]. *Drug Resist Update*, 2008, 11(3): 63-76.
- [4] 隋文文, 张维东, 武力存, 等. 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 [J]. 中草药, 2014, 45(3): 392-397.
- [5] 仵正, 吕毅, 刘原兴, 等. 雷帕霉素对小鼠 H22 肝癌细胞生长增殖的影响 [J]. 西安交通大学学报: 医学版, 2009, 30(6): 672-676.
- [6] Dhruv K, Sharmila S, Rakesh K S. Rottlerin-induced autophagy leads to the apoptosis in breast cancer stem cells: molecular mechanisms [J]. *Mol Cancer*, 2013, 12(1): 171.
- [7] Liu R, Li J, Zhang T, et al. Itraconazole suppresses the growth of glioblastoma through induction of autophagy: Involvement of abnormal cholesterol trafficking [J]. *Autophagy*, 2014, 10(7): 1241-1255.
- [8] Dikic I, Johansen T, Kirkin V. Selective autophagy in cancer development and therapy [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(9): 3431-3434.
- [9] Cho Y Y, Kim D J, Lee H S, et al. Autophagy and cellular senescence mediated by Sox2 suppress malignancy of cancer cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(2): e57172.
- [10] Zhuang W Z, Long L M, Ji W J, et al. Rapamycin induce differentiation of glioma stem/progenitor cells by activating autophagy [J]. *Chin J Cancer*, 2011, 30(10): 712-720.
- [11] Ahn C H, Jeong E G, Lee J W, et al. Expression of Beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers [J]. *APMIS*, 2007, 115(12): 1344-1349.
- [12] Hanahan D, Weinberg R A. Hallmarks of cancer: the next generation [J]. *Cell*, 2001, 144(5): 646-674.
- [13] 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.
- [14] 张维东, 张月英, 王朝霞, 等. 蝎毒多肽提取物对肿瘤生长和细胞免疫功能的影响 [J]. 山东大学学报: 医学版, 2007, 45(3): 286-289.
- [15] 张璐璐, 张月英, 张维东. 自噬与肿瘤干细胞的研究进展 [J]. 国际肿瘤学杂志, 2014, 41(4): 248-251.
- [16] Tifino V, Desiderio V, Paino F, et al. Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization [J]. *FASEB J*, 2013, 27(1): 13-24.
- [17] Vaiopoulos A G, Kostakis I D, Koutsilieris M, et al. Colorectal cancer stem cells [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(3): 363-371.
- [18] Cuiley M D, Garrent L A, Schorge J O, et al. Evidence for cancer stem cells contributing to the pathogenesis of ovarian cancer [J]. *Front Biosci*, 2011, 16: 368-392.
- [19] Kryczek I, Liu S, Roh M, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase and CD133 defines ovarian cancer stem cells [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130(1): 29-39.