

蝎毒多肽提取物联合雷帕霉素抑制 H₂₂ 肝癌肿瘤血管生成的作用机制研究

赵嵌嵌^{1,2}, 张维东^{1*}, 武利存¹, 王兆朋¹, 张月英¹, 张璐璐^{1,2}, 王朝霞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** 探讨蝎毒多肽提取物(PESV)联合雷帕霉素(RAPA)对 H₂₂ 肝癌肿瘤血管生成的抑制作用并探讨可能的作用机制。**方法** 40 只昆明小鼠, 皮下接种 H₂₂ 肝癌肿瘤细胞悬液建立荷瘤模型, 随机分为模型组、PESV 组(20 mg/kg)、RAPA 组(2.5 mg/kg)和 PESV+RAPA 组(联合组), 每组 10 只。连续药物干预 14 d, 隔日测量肿瘤体积, 记录肿瘤生长曲线, 计算抑瘤率。免疫组织化学法检测各组肿瘤组织的哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)和血管内皮生长因子-A(VEGF-A)蛋白表达水平。以 VIII 因子标记肿瘤微血管, 计算微血管密度(MVD)。**结果** 连续药物治疗 14 d 后, PESV 组、RAPA 组、联合组肿瘤生长速度较模型组明显减慢($P<0.05$ 、 0.01), 抑瘤率分别为 17.7%、29.2%、44.8%。与模型组相比, 3 个给药组的 mTOR、HIF-1 α 、VEGF-A 的蛋白表达量降低($P<0.05$ 、 0.01), MVD 不同程度降低($P<0.05$ 、 0.01)。联合组肿瘤体积以及蛋白表达量均低于 RAPA 组($P<0.05$ 、 0.01)。**结论** PESV 联合 RAPA 能够抑制 H₂₂ 肝癌小鼠肿瘤血管的生成, 其作用机制可能与抑制肿瘤微环境中 mTOR、HIF-1 α 、VEGF-A 的蛋白表达有关。

关键词: 蝎毒多肽; 雷帕霉素; 血管生成; H₂₂ 肝癌移植瘤; 血管内皮生长因子

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2015)09-1343-05

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.09.016

Research on inhibition mechanism of polypeptide extract from scorpion venom combined with Rapamycin on angiogenesis of H₂₂ hepatoma

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

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, Shandong Academy of Medical Sciences, University of Jinan, Jinan 250062, China

Abstract: Objective To study the inhibition of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) combined with Rapamycin (RAPA) on angiogenesis of H₂₂ hepatoma and its mechanism. **Methods** The H₂₂ carcinoma cell suspension was subcutaneously inoculated into 40 Kunming mice. Then tumor-bearing mice were randomly divided into four groups, i.e., control group, PESV group (20 mg/kg), RAPA group (2.5 mg/kg), and PESV + RAPA group, 10 mice in each group. The intervention was lasted 14 d. The tumor volume was measured once every other day, the tumor volume growth curve was drawn, and the tumor inhibitory rate was calculated. The protein expression levels of mammal target of RAPA (mTOR), hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) were detected by immunohistochemical assay. Microvessel was signed by factor VIII and then detected by immunohistochemical assay. **Results** The growth speed of H₂₂ hepatoma transplantation tumor was obviously inhibited in the PESV group, RAPA group, and PESV + RAPA group compared with control group after 14 d intervention ($P<0.05$, 0.01), and the tumor inhibitory rates were 17.7%, 29.2%, and 44.8%. Immunohistochemical assay showed that the protein expression of mTOR, HIF-1 α , and VEGF-A in the three drug groups was reduced compared with the control group ($P<0.05$, 0.01), and the MVD was reduced at different levels ($P<0.05$, 0.01). The tumor volume and the protein expression in PESV + RAPA group are lower than those in RAPA group. **Conclusion** PESV + RAPA could promote the inhibition on angiogenesis of H₂₂ hepatoma, the mechanism maybe related to the inhibition on the protein expression of mTOR, HIF-1 α , and VEGF-A. **Key words:** scorpion venom; rapamycin; angiogenesis; H₂₂ hepatoma carcinoma; vascular endothelial growth factor

收稿日期: 2014-08-24

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, 81403150)

作者简介: 赵嵌嵌(1989—), 女, 硕士研究生, 研究方向为肿瘤病理学。Tel: (0531)82919939 E-mail: zhaoqianqianqq@163.com

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

恶性肿瘤的生长、转移及预后与新生血管的生成密切相关^[1]。肿瘤的血管生成主要由肿瘤细胞产生的各种血管形成因子诱导,血管内皮生长因子-A (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A) 是血管生成中较为关键的血管内皮生长因子。由哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)参与信号转导通路可以通过多种途径促进缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α) 的表达,进一步启动 VEGF 基因的转录,促进 VEGF 的表达。VEGF 与其特异性受体结合后能够刺激血管内皮细胞生长、增加血管通透性或者诱导新的血管管腔的形成,为肿瘤生长提供大量营养物质以及为肿瘤细胞的浸润及远处转移提供了条件^[2]。

蝎毒多肽提取物(polypeptide extract from scorpion venom, PESV)是本课题组从东亚钳蝎蝎毒中提取的抗肿瘤有效部位,同时具有多种生物活性。前期研究^[3-5]已证实 PESV 对 Lewis 肺癌、肝癌等肿瘤的生长有明显抑制作用,并可以显著增强肿瘤的化疗效果。本实验通过观察 PESV 组及联合雷帕霉素(RAPA)组小鼠 H₂₂ 肝癌移植瘤血管密度及血管生成相关通路蛋白表达量的变化,进一步探讨 PESV 的抗血管生成机制以及对化疗药物的促进作用,为其临床抗癌应用提供理论依据。

1 材料

1.1 细胞与动物

40 只昆明小鼠,雄性,体质量 18~22 g,购自山东大学实验动物中心,合格证号 SCXK(鲁)20090001。H₂₂ 肝癌瘤种由山东省医学科学院药物所惠赠,以腹腔传代形式在小鼠腹腔内传代,瘤种每 7 天传代 1 次。

1.2 试剂与仪器

mTOR 购自 Cell Signaling, VIII 因子、HIF-1 α 、VEGF-A 一抗及山羊抗兔 IgG/辣根酶标记二抗,购自北京博奥森生物技术有限公司,DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。雷帕霉素(RAPA)购自北京华迈科技公司(批号 BJ130218010),蝎毒冻干粉购自邹平县蝎蚁生物科技有限公司,由本课题组制备成蝎毒多肽提取物(为含有 50~60 个氨基酸的多肽混合物,耐热、pH 值稳定,相对分子质量为 $6 \times 10^3 \sim 7 \times 10^3$)^[3,5]。德国 Leica DM4000B 光学显微镜;德国 Leica 公司 Leica Qwin V3 图像分析软件。

2 方法

2.1 造模、分组及给药

H₂₂ 肝癌皮下种植瘤模型制备: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 $1 \times 10^7/\text{mL}$,于每只小鼠的右腋下注射 0.2 mL 肿瘤细胞悬液(第 0 天)。第 7 天将小鼠随机分为模型组、PESV 组、RAPA 组和 PESV+RAPA 组(联合组),每组 10 只。PESV 组 ig 给予 PESV 20 mg/kg, RAPA 组 ig 给予 RAPA 2.5 mg/kg,联合组 ig 给予 PESV (20 mg/kg^[3]) 和 RAPA (2.5 mg/kg),模型组每天给予等体积生理盐水,各组均每天给药 1 次,连续给药 14 d。

2.2 描绘肿瘤体积增长曲线并计算抑瘤率

从用药当天(第 7 天)开始,隔日用游标卡尺测量肿瘤长径(A)及垂直短径(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,取完整肿瘤组织,称质量,计算抑瘤率。

抑瘤率=(模型组平均瘤质量-实验组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量

2.3 免疫组织化学法检测肿瘤组织中相关蛋白的表达和微血管密度(MVD)

取肿瘤组织,以中性福尔马林固定 24 h 后,石蜡包埋切片,采用免疫组化 SP 法检测。3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶活性,热修复后,分别加入一抗,mTOR 工作浓度为 1:100, HIF-1 α 、VEGF-A、VIII 因子的工作浓度均为 1:500,4 ℃过夜,DAB 显色,于显微镜($\times 400$)下观察结果。mTOR、VEGF-A 主要表达于肿瘤细胞胞浆,以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性,HIF-1 α 表达于细胞核和胞浆中,以出现棕黄色或褐色为阳性。用显微镜图像采集系统采集图像,利用双盲法检测 mTOR、HIF-1 α 、VEGF-A 的染色强度,每张切片选取 5 个视野($\times 400$)用 Leica QwinV3 图像分析软件进行灰度值半定量分析,数值范围 0~255,取其平均值即为灰度值。灰度值越小,染色越深,蛋白表达量越高。

VIII 因子表达于肿瘤血管内皮细胞,以胞浆呈现棕黄色为阳性。检测肿瘤组织 MVD,参考 Weider 等^[6]校对方法,于低倍镜下($\times 100$)找到 3 个 VIII 因子阳性高表达区域,然后分别于高倍镜下($\times 400$)随机各选取 3 个视野计数微血管,其平均值即为 MVD。

2.4 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,多组资料的比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 各组小鼠移植瘤的生长情况

模型组小鼠于实验第 17 天有 1 只小鼠死亡,可能与实验条件、自身原因或肿瘤消耗有关。与模型组相比, PESV 组、RAPA 组、联合组瘤质量降低,差异显著 ($P<0.05$ 、 0.01),见表 1。各给药组与模型组相比,肿瘤体积减小,其中联合组、RAPA 组、PESV 组分别于实验第 13、15、17 天开始与模型组相比,肿瘤体积差异具有统计学意义($P<0.05$ 、 0.01)。见图 1。

3.2 各组小鼠肿瘤组织中 mTOR、HIF-1 α 、VEGF-A 表达的变化

免疫组织化学法检测显示 mTOR、VEGF-A 均主要表达于肿瘤细胞胞浆, HIF-1 α 表达于细胞胞浆和胞核,见图 2。经灰度值半定量分析,3 个给药组 mTOR、HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达平均灰度值高于模型组 ($P<0.05$ 、 0.01),蛋白表达量低于模型组 ($P<0.05$ 、 0.01);联合组 mTOR、HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达平均灰度值均高于 RAPA 组 ($P<0.05$ 、 0.01),蛋白表达量均低于 RAPA 组 ($P<0.05$ 、 0.01)。见表 2。

3.3 各组肿瘤组织中 MVD 的比较

与模型组相比,3 个给药组小鼠肿瘤组织中 MVD 均降低 ($P<0.05$ 、 0.01);联合组 MVD 低于 RAPA 组 ($P<0.05$),见表 3 和图 3。

表 1 PESV 与 RAPA 联合给药对 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠瘤质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of PESV + RAPA on tumor weight of H₂₂-bearing mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	—	9	0.96±0.15	—
PESV	20	10	0.79±0.08*	17.7
RAPA	2.5	10	0.68±0.11**	29.2
联合	20+2.5	10	0.53±0.13**	44.8

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$, 下同

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group, same as below

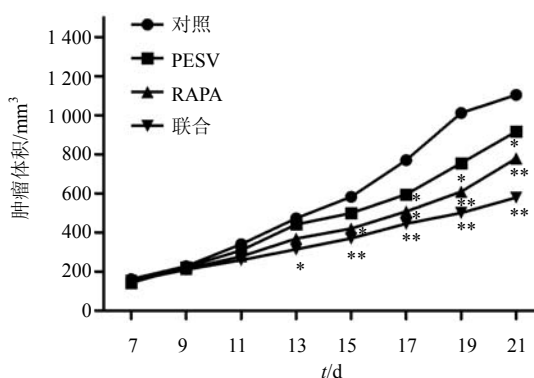


图 1 各组 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠肿瘤体积增长曲线 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 1 Tumor growth curve of H₂₂-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

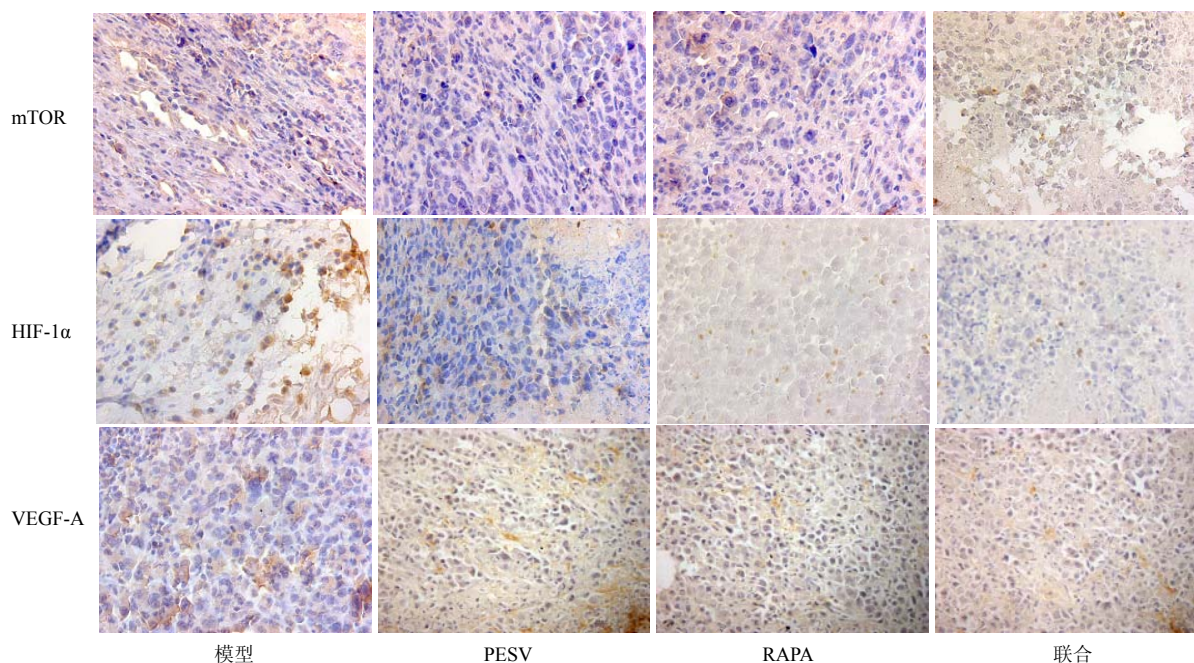


图 2 各组 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠肿瘤组织 mTOR、HIF-1 α 和 VEGF-A 表达

Fig. 2 Expression of mTOR, HIF-1 α , and VEGF-A in tumor tissue of H₂₂-bearing mice in each group

表 2 各组 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织 mTOR、HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达灰度值分析 ($\bar{x} \pm s$)Table 2 Grey value analysis on expression of mTOR, HIF-1 α , and VEGF-A in tumor tissue of H₂₂-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

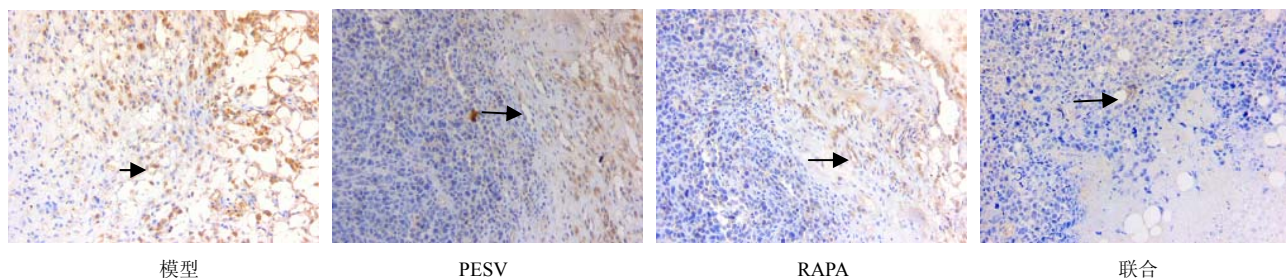
组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	mTOR	HIF-1 α	VEGF-A
模型	—	9	107.2 $\pm$ 11.1	113.4 $\pm$ 14.6	108.2 $\pm$ 9.8
PESV	20	10	136.2 $\pm$ 6.3 [*]	166.0 $\pm$ 13.8 ^{**}	148.2 $\pm$ 10.3 ^{**}
RAPA	2.5	10	148.8 $\pm$ 15.9 ^{**}	143.2 $\pm$ 17.6 [*]	135.0 $\pm$ 7.3 [*]
联合	20+2.5	10	175.6 $\pm$ 19.0 ^{**#}	203.6 $\pm$ 15.4 ^{**##}	182.4 $\pm$ 23.1 ^{**##}

与 RAPA 组比较: ^{*}P<0.05 ^{##}P<0.01, 下同[#]P<0.05 ^{##}P<0.01 vs model group, same as below表 3 各组 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织 MVD 分析 ($\bar{x} \pm s$)Table 3 MVD analysis in tumor tissue of H₂₂-bearing mice in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物/只	MVD
模型	—	9	8.67 $\pm$ 2.06
PESV	20	10	6.11 $\pm$ 1.69 [*]
RAPA	2.5	10	6.22 $\pm$ 2.11 [*]
联合	20+2.5	10	3.78 $\pm$ 1.30 ^{**#}

4 讨论

雷帕霉素载体 (TOR) 是一种磷酸蛋白激酶, 在哺乳动物体内只有一种异构体, 即 mTOR, mTOR 本身是一个调控细胞周期和细胞增殖等细胞活动的丝氨酸苏氨酸激酶。当细胞受到生长因子等刺激后, 磷脂酰肌醇 3-羟基激酶 (PI3K) 活化, 磷酸化其底物 3,4 二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2) 转化成 3,4,5 三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3), 进而通过磷脂酰肌醇依赖性



模型

PESV

RAPA

联合

箭头表示肿瘤微血管

Black arrow shows microvascular of tumor tissue

图 3 各组 H₂₂ 荷瘤小鼠肿瘤组织中微血管形成结果Fig. 3 Consequence of angiogenesis in tumor tissue of H₂₂-bearing mice in each group

激酶 1、2 (PDK1、PDK2) 磷酸化蛋白激酶 B (Akt), 正向调节 mTOR 的功能。PI3K/AKT/mTOR 信号通道是蛋白质合成的主要信号调节通道之一, 参与细胞增殖、分化、迁移等生物活动的调节, 与细胞凋亡也有密切的关系^[7]。

肿瘤的发生和发展依赖于新生血管的不断生成, 因此, 靶向调控血管生成通路对治疗肿瘤尤为重要。HIF-1 α 通常在人类肿瘤中过表达, 其活性受到细胞氧浓度的调节, 与肿瘤细胞的能量代谢、血管生成、肿瘤转移存在密切联系。VEGF 是由刺激血管生成细胞产生的信号蛋白, VEGF 的主要功能是在胚胎发育或损伤后新生血管生成、肌肉运动、血管阻塞时侧支循环建立等情况下创建新的血管。VEGF 的过度表达在一些疾病中发挥作用, 特别是

在实体瘤由于生长过快而引起瘤内血流供应不足情况下, 瘤细胞可通过表达 VEGF 增加肿瘤血管生成而促进肿瘤生长和转移^[8]。国外已有研究报道在口腔鳞状细胞癌中, mTOR 和 VEGF 表达呈正相关^[9]。

PI3K/AKT/mTOR 信号转导通路是调节血管生成的重要通路, 可通过缺氧和 HIF-1、癌基因、激素、生长因子和细胞因子等因素调节 VEGF 的表达。在肿瘤生长过程中, 缺血、缺氧等可促进 VEGF 激活 P13K, 进而激活 P13K/AKT/mTOR 信号转导通路形成正反馈^[10]。

RAPA 是一种 mTOR 抑制剂, Schumacher 等^[11]的实验证实 RAPA 不仅具有免疫抑制作用, 同时对肝癌细胞具有抑制作用, 通过不同的细胞因子受体阻断信号转导^[12]。Hudson 等^[13]研究发现, 在前列

腺细胞癌中,RAPA 通过抑制 HIF-1 α 的表达而使其下游靶基因如 VEGF 表达下降,导致了肿瘤血管生成的抑制。前期实验中,已证明 PESV 能够较好地抑制 P13K/AKT 信号转导途径中 P13K/AKT 信号蛋白的表达^[3]。本实验中给药组 mTOR、HIF1 α 、VEGF-A 表达均低于模型组,提示 PESV 抑制肿瘤血管生成可能是通过抑制 mTOR 的活性降低 HIF-1 α 、VEGF-A 的表达量实现的。由于联合组的蛋白表达量均低于 RAPA 组,因此 PESV 能够促进 RAPA 更为有效地抑制小鼠 H₂₂ 肝癌血管的生成。在该实验中发现 RAPA 组 mTOR 平均灰度值高于 PESV 组,mTOR 蛋白表达量较低,但 HIF-1 α 、VEGF-A 的平均灰度值低于 PESV 组,HIF-1 α 、VEGF-A 蛋白表达量较高。因此与 RAPA 相比,PESV 除了通过 mTOR 抑制血管生成之外,还可能存在其他作用机制,还需要进一步的实验研究进行证实。

参考文献

- [1] Kerbel R S. Tumor angiogenesis [J]. *N Engl J Med*, 2008, 358(19): 2039-2049.
- [2] 张丹丹, 李庆林. PI3K/Akt/mTOR 信号通路与肿瘤 [J]. *安徽医药*, 2012, 16(3): 281-282.
- [3] 隋文文, 张维东, 武利存, 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.
- [4] 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.
- [5] 郑安红, 张维东, 王兆朋, 等. 蝎毒多肽提取物联合 5-氟尿嘧啶对 H₂₂ 肝癌血管生成拟态形成的作用及机制研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(4): 492-496.
- [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] Maiese K. Therapeutic targets for cancer: Current concepts with P13K, Akt, mTOR [J]. *Indian J Med Res*, 2013, 37(2): 243-246.
- [8] Johnson K E, Wilgus T A. Multiple roles for VEGF in non-melanoma skin cancer: angiogenesis and beyond [J]. *Skin Cancer*, 2012, 2012: 483439.
- [9] Naruse T, Kawasaki G, Yanamoto S, *et al.* Immunohistochemical study of VEGF expression in oral squamous cell carcinomas: correlation with the mTOR-HIF-1 α pathway [J]. *Anticancer Res*, 2011, 31(12): 4429-4437.
- [10] Ruan G X, Kazlauskas A. Axl is essential for VEGF-A-dependent activation of PI3K/Akt [J]. *Embo J*, 2012, 31(7): 1692-1703.
- [11] Schumacher G, Oidtmann M, Rueggeberg A, *et al.* Sirolimus inhibits growth of human hepatoma cells alone or combined with tacrolimus, while tacrolimus promotes cell growth [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(10): 1420-1425.
- [12] Proud C G, Denton R M. Molecular mechanisms for the control of translation by insulin [J]. *Biochem J*, 1997, 328(2): 329-341.
- [13] Hudson C C, Liu M, Chiang G G, *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(20): 7004-7014.