

咖啡酸锗抗肝癌作用及其机制的实验研究^{*}

★ 黄越燕^{1**} 隋燕霞² 肖纯³ 黄桂林³ 刘春花³ 周志愉³ 杨波¹ (1 浙江大学药学院 杭州 310031; 2 西安交通大学医学院一附院 西安 710061; 3 江西中医学院 南昌 330006)

摘要:目的:探讨咖啡酸锗对 H22 肝癌小鼠的体内抗肿瘤作用及其诱导细胞凋亡的机制。方法:采用 H22 肝癌小鼠模型观察咖啡酸锗的体内抗肿瘤作用,透射电镜观察肿瘤细胞超微结构改变,免疫组化方法检测肿瘤组织中 bax、bcl-2 蛋白表达。结果:咖啡酸锗对小鼠 H22 移植瘤的生长具有明显抑制作用,高、中浓度组抑瘤率分别为 57.0%、40.4% ($P < 0.01$),电镜下可见典型的细胞凋亡形态特征。咖啡酸锗处理后肿瘤组织中 bax 蛋白表达明显增强,bcl-2 表达降低($P < 0.05$)。结论:咖啡酸锗对 H22 肝癌小鼠具有明显的体内抗肿瘤作用,同时能够促进肿瘤组织中 bax 蛋白表达,抑制 bcl-2 蛋白表达,从而诱导肿瘤细胞凋亡。

关键词:咖啡酸锗;肝癌;H22 荷瘤小鼠;细胞凋亡;抗肿瘤

中图分类号:R 965 **文献标识码:**A

Empirical Study on the Effect and Mechanism of Caffeic Acid Germanium to Hepatocarcinoma

HUANG Yue-yan¹, SUI Yan-xia², XIAO Chun³, HUANG Gui-lin³, LIU Chun-hua³, ZHOU Zhi-yu³, YANG Bo¹

1. Pharmacy Faculty of Zhejiang University, Hangzhou 310031;

2. The First Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061

3. Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330006

Abstract: Objective: To approach the effect of caffeic acid germanium to H22 hepatoma mouse and the mechanism of inducing cell apoptosis. Methods: Observe the effect of caffeic acid germanium to H22 hepatoma mouse in vivo, observe the ultramicro-structural change of tumor cell with transmission electron microscope, detect to the expression of bax, bcl-2 protein in tumor tissue with immunohistochemistry method. Results: There has the manifest depressant effect of caffeic acid germanium to the growth of mouse H22 hepatoma, the rate of restraining tumor of high and middle density group is 57.0%, 40.4% ($P < 0.01$). It is thus evident that morphologic characteristics of typical apoptosis in electron microscope. The expression of bax protein is increased and the expression of bcl-2 is decreased in the tumor tissue has been deal with caffeic acid germanium ($P < 0.05$). Conclusion: There is evident effect of caffeic acid germanium to H22 hepatoma mouse in vivo, at the same time, it can prompt the expression of bax protein in tumor tissue and restrain the expression of bcl-2 protein, inducing the apoptosis of tumor cell.

Key words: Caffeic acid germanium; Hepatoma; H22 tumor mouse; Apoptosis; Anti-tumor

自从 1971 年日本学者浅井一彦发现有有机锗具有广谱抗癌活性以来,有机锗化合物就成为人们寻找有效而低毒的抗癌药物的重要领域之一。研究资料表明有机锗化合物的抗肿瘤活性与提高免疫功能有关^[1],而对其诱导细胞凋亡方面尚未见相关报道。咖啡酸锗是本课题组合成的新化合物(专利号:03118635.1),前期工作中已经发现其具有抗肿瘤作用。为进一步探讨该药抗肿瘤作用机制,本实验通过体内抑瘤实验测定抑瘤率、免疫组化方法检测肿瘤组织中 bcl-2、bax

蛋白的表达,来研究咖啡酸锗对小鼠 H22 肝癌细胞的抑瘤作用及其诱导细胞凋亡的可能作用机制。现将结果报告如下:

1 材料

1.1 实验动物及细胞株 清洁级昆明种小鼠,6~8 周龄,体重(20 ± 2)g,雌性,由江西中医学院动物实验中心提供,合格证号:JZDW No:2006-072。小鼠肝癌细胞株(H22),由浙江省医学科学院提供,本室常规传代保种。

1.2 主要药品与试剂 咖啡酸锗(Caffeic-acid Ge)由江西中

* 国家自然科学基金资助项目(No.30460148)

** 黄越燕,女,讲师,硕士研究生,现工作单位嘉兴学院医学院,研究方向为肿瘤药理学,Email:hyylinda@163.com;杨波(1971-),女,教授,博士生导师,研究方向为抗肿瘤新药的机理研究和开发,Email:xryang@yahoo.com。

医学院化学实验中心合成。注射用环磷酰胺 05121421, 江苏恒瑞医药; 兔抗鼠 bcl-2、bax 多克隆抗体, Santa Cruz; SP 免疫组化试剂盒, PBS, 北京中衫金桥。

1.3 仪器 光学显微镜及摄像系统, 日本 OLYMPUS; 电热恒温干燥箱, 江西电热设备厂; S2K-202 型净化工作台, 苏州净化设备厂; 全套生物组织自动脱水机、石蜡包埋机、摊烤片机, 湖北孝感市亚光医用电子技术有限公司; 电子天平, METTLER TOLEDO。

2 方法

2.1 体内抗肿瘤实验

2.1.1 H22 荷瘤小鼠模型的建立 取传代接种后 9~10 天之瘤源小鼠, 于无菌条件下从腹腔抽出瘤液, 用灭菌生理盐水(1:4)稀释, 调整瘤细胞数至 $1.37 \times 10^7/\text{mL}$, 每只小鼠右腋皮下接种 0.2 mL。随后将小鼠随机分为 5 组: 生理盐水阴性对照组、环磷酰胺阳性对照组、咖啡酸锗药物组(低、中、高剂量组), 每组 10 只。

2.1.2 H22 荷瘤小鼠抑瘤率的测定 于接种次日给药, 低、中、高剂量药物组分别给予 0.5, 1, 2 mg/kg 浓度的咖啡酸锗, 阳性对照组给予环磷酰胺 25 mg/kg, 阴性对照组给予生理盐水, 给药量均为 0.2 mL/只, 每日给药 1 次, 连续 10 天。常规饲养, 饮水食物不限, 每日观察小鼠的自主活动、大便和毛色及瘤体大小等情况。停药次日断椎处死, 称体重, 解剖剥离皮下瘤体, 观察瘤体形态及出血坏死情况, 称瘤重, 按下式计算抑瘤率。同时剖取胸腺和脾脏, 称其重量, 按下式计算免疫器官指数。

抑瘤率(%) = (对照组平均瘤重 - 给药组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 $\times 100\%$

脾脏(胸腺)指数 = 脾脏(胸腺)重量(mg) / 体重(g)。

2.1.3 透射电镜观察 处死动物后立即取出 0.5~1 mm³

大小的肿瘤组织 2~3 块, 迅速用预冷的 2.5% 戊二醛溶液固定 4 小时, 再用 1% 锇酸固定 2 小时, 乙醇、丙酮梯度脱水, 环氧树脂渗透包埋, 0.5 μm 超薄切片, 醋酸双氧铀-柠檬酸铅双重染色, 透射电镜观察和拍照, 对肿瘤细胞凋亡作定性分析。

2.2 免疫组化染色及结果判断

小鼠肝癌组织以石蜡包埋制成 4 μm 切片, 脱蜡水化, bcl-2、bax 抗体工作浓度均为 1:100, 免疫组化操作严格按照试剂盒说明书进行。PBS 代替一抗作为阴性对照; 已知强阳性石蜡切片作阳性对照。

结果判断^[2]: 以在细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 选择 5 个 400 倍视野, 计数至少 100 个细胞中阳性细胞数, <5% 为阴性(-), 6%~25% 为阳性(+), 26%~50% 为中度阳性(++), >50% 为高度阳性(+++)。

2.3 统计学处理

所有数据均采用 SPSS10.0 统计软件进行处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组及组间比较采用方差分析及 q 检验。等级资料用秩检验。

3 结果

3.1 体内抗肿瘤实验结果

抑瘤实验结果如表 1 所示, 与生理盐水组比较, 咖啡酸锗组对小鼠 H22 肿瘤产生显著性抑制, 呈良好的量效关系, 且对荷瘤小鼠的体重、胸腺指数、脾脏指数无明显影响。环磷酰胺组对 H22 荷瘤小鼠肿瘤的抑瘤率虽高达 71.78%, 但对小鼠体质影响较大, 实验结束时体重明显下降, 外观亦可见到消瘦、毛松、精神萎靡、活动减少等表现; 胸腺指数及脾脏指数与生理盐水组相比亦有显著性差异($P < 0.01$)。上述实验结果提示, 咖啡酸锗能显著抑制小鼠 H22 肿瘤的生长, 并且对小鼠体质及免疫器官无明显毒性影响。

表 1 咖啡酸锗对 H22 荷瘤小鼠的抑瘤作用

组别	动物数 <i>n</i>	体重/g		胸腺指数	脾脏指数	瘤重/g	抑瘤率(%)
		给药前	给药后				
生理盐水组	10	21.3 $\pm$ 1.9	23.7 $\pm$ 3.1	2.40 $\pm$ 0.86	9.82 $\pm$ 2.18	1.47 $\pm$ 0.31	-
环磷酰胺组 (25 mg $\cdot$ kg ⁻¹)	9	21.3 $\pm$ 2.0	18.6 $\pm$ 2.2**	1.63 $\pm$ 0.38*	5.81 $\pm$ 2.49**	0.42 $\pm$ 0.11**	71.8
咖啡酸锗低剂量组 (0.5 mg $\cdot$ kg ⁻¹)	10	21.2 $\pm$ 2.1	21.8 $\pm$ 2.5	2.17 $\pm$ 0.69	9.13 $\pm$ 1.46	0.92 $\pm$ 0.24**	37.4
咖啡酸锗中剂量组 (1mg $\cdot$ kg ⁻¹)	10	21.8 $\pm$ 2.2	23.1 $\pm$ 2.8	2.35 $\pm$ 0.28	9.98 $\pm$ 1.67	0.88 $\pm$ 0.32**	40.4
咖啡酸锗高剂量组 (2mg $\cdot$ kg ⁻¹)	10	21.9 $\pm$ 2.3	22.7 $\pm$ 2.8	2.20 $\pm$ 0.43	8.88 $\pm$ 1.65	0.63 $\pm$ 0.14**	57.0

注: 与生理盐水对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3.2 肿瘤形态学观察 透射电镜观察肿瘤细胞超微结构形态见图 1:

生理盐水组, 细胞核膜完整, 常染色质丰富, 核仁明显, 有的有多个核仁, 细胞质内有较多的细胞器, 线粒体基质较深, 内质网丰富, 可见丰富的游离的核糖体。未见典型凋亡细胞。

环磷酰胺组, 细胞核体积变小, 核染色质浓集成块, 边集于核膜处成新月状, 细胞器结构不清, 部分胞质中可见到大小不等的空泡, 部分细胞器溶解消失。

咖啡酸锗组, 细胞体积不同程度缩小, 核染色质浓集成块

状, 边集于核膜处, 或散在核内。有的形成明显凋亡小体, 线粒体受损严重, 嵴变低或消失, 部分呈囊状扩张, 内质网可见扩张, 部分瘤细胞胞质内可见电子致密颗粒。

3.3 小鼠肿瘤组织 bax 和 bcl-2 蛋白的表达 免疫组化实验结果如表 2 所示, 各咖啡酸锗组 bax 蛋白表达均高于生理盐水对照组, 高剂量组与生理盐水组比较具有显著性差异($P < 0.05$); 而咖啡酸锗组 bcl-2 蛋白表达均低于生理盐水对照组, 其中中剂量组和高剂量组具有统计学意义($P < 0.05$)。提示, 咖啡酸锗可下调 bcl-2 的表达, 上调 bax 的表达, 促进 bax/

bcl-2 比值增大,从而促进肿瘤细胞凋亡,见图 2。

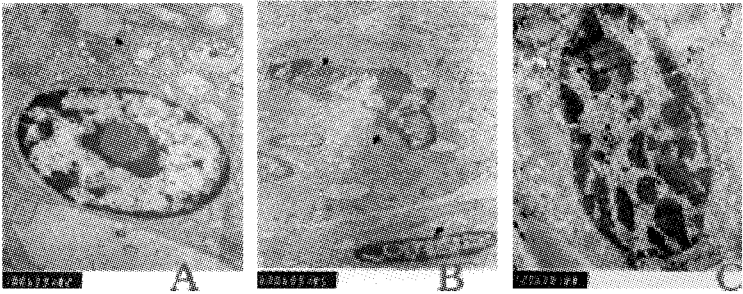


图 1 H22 肿瘤细胞凋亡的透射电镜观察

A:生理盐水组($\times 10\ 000$);B:环磷酰胺组($\times 8\ 000$);C:咖啡酸锗组($\times 12\ 000$)

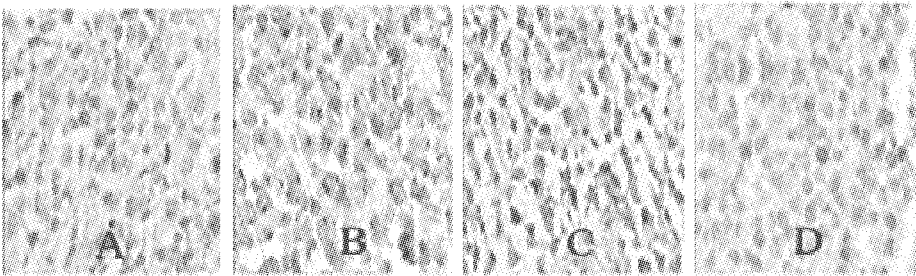


图 2 免疫组化方法检测 bax、bcl-2 基因在 H22 肿瘤细胞的蛋白表达($\times 400$)

理盐水组 bax 低表达;B:咖啡酸锗组 bax 高表达;C: 生理盐水组 bcl-2 高表达;D:咖啡酸锗组 bcl-2 低表达

表 2 咖啡酸锗对 H22 肝癌小鼠肿瘤组织
bax 及 bcl-2 蛋白表达水平的影响

分组	n	bax 表达程度					bcl-2 表达程度					bax/ bcl-2
		-	+	++	+++	++++	-	+	++	+++	++++	
生理盐水组	10	7	2	1	0	30.0	2	2	4	2	80.0	0.4
环磷酰胺组 ($25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	9	4	2	3	0	55.6	4	3	2	0	55.6	1.0
咖啡酸锗低剂 量组($0.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	10	4	3	2	1	60.0	5	3	2	1	50.0	1.2
咖啡酸锗中剂 量组($1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	10	4	1	4	1	60.0	7	1	2	0	30.0*	2.0
咖啡酸锗高剂 量组($2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	10	2	2	4	2	80.0*	7	2	1	0	30.0*	2.7

注:生理盐水对照组比较 * $P<0.05$ 。

4 讨论

肝癌细胞的凋亡是一个多基因参与调控的复杂过程^[3,4]。研究表明肿瘤发生与细胞增殖及凋亡失常有密切关系,许多抗癌药物都可通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥抑瘤效应,故凋亡是评估药物疗效的一项重要指标^[5,6]。

咖啡酸锗是一新型的有机锗类化合物,前期研究中我们发现其具有抗肿瘤活性。本实验中发现其对小鼠 H22 移植瘤的生长有明显抑制作用,高、中剂量组抑瘤率分别为 57.0%、40.4% ($P<0.01$),且小鼠反应及活动均较敏捷。而对照组小鼠瘤体生长较快,反应迟钝,毛色暗淡;环磷酰胺组虽然抑瘤率较高,但其毒性反应也较重,实验小鼠表现出精神萎靡,厌食、消瘦、免疫器官萎缩等症状。

经透射电镜观察到咖啡酸锗组出现胞体缩小,染色质浓缩、核固缩、碎裂,凋亡小体等的典型凋亡形态变化,而环磷酰胺组则主要表现为细胞坏死,凋亡少见。bcl-2 基因家族在细胞凋亡中起着关键作用,其中以 bcl-2/bax 的作用尤为重

要。bcl-2 是目前公认的抗凋亡基因,其编码蛋白的高表达,可抑制许多因素引起的细胞凋亡,引发肿瘤和延长细胞生长周期。而 bax 可与 bcl-2 形成二聚体,抑制 bcl-2 的作用,促进细胞凋亡,研究发现 bcl-2/bax 的比值是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素^[7,8]。研究结果发现咖啡酸锗组肿瘤组织中 bax 蛋白表达水平较高,bcl-2 蛋白的表达较低,bax/bcl-2 比值呈剂量依赖性递增($P<0.05$)。

综上所述,咖啡酸锗对肝癌 H22 具有较强的抗肿瘤作用,其作用机制可能是通过改变细胞内 bax、bcl-2 蛋白表达水平,从而诱导细胞凋亡实现的,因此咖啡酸锗是具有广泛开发前景的抗癌新化合物之一。

参考文献

[1]李凯,朱消非,叶勇,等.有机锗化合物抗肿瘤作用的研究进展[J].精细石油化工,2003,2:54~57
[2]许良中,杨文涛.免疫组织化学反应结果的判断标准[J].中国癌症杂志,1996,6(4):229~231
[3]陆东东.原发性肝癌分子生物学研究进展[J].中国癌症杂志,2000,10(2):182~183
[4]宁厚法.肝癌细胞凋亡调控基因的研究进展[J].国外医学临床放射学分册,2003,26(4):235~238
[5]江培洲,癌基因与抑癌基因的表达研究进展[J].国外医学肿瘤学分册,2001,28(2):89~91
[6]Payne CM. Role of apoptosis in biology and pathology: resistance to apoptosis in colon carcinogenesis[J]. Ultra Stru Path,1995,19:221~248
[7]Kerr JF, Wyllie AH, Gurrie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. [J] Br J Cancer,1972,26(4):239~257
[8]Hou Q, Cymbalyuk E, Hsu SC, et al. Apoptosis modulatory activities of transiently expressed Bcl-2: roles in cytochrome C release and Bax regulation[J]. Apoptosis,2003,8(6):617~629

(收稿日期:2007-03-13)