

WBCT 治疗是否在脑转移瘤的远期疗效上具有明显的改善作用。

参考文献

- Hsu F, Carolan H, Nichol A, *et al.* Whole brain radiotherapy with hippocampal avoidance and simultaneous integrated boost for 1 - 3 brain metastases: a feasibility study using volumetric modulated arc therapy [J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2010, 76(5): 1480 - 1485
- Boehling NS, Grosshans DR, Bluett JB, *et al.* Dosimetric comparison of three - dimensional conformal proton radiotherapy, intensity - modulated proton therapy, and intensity - modulated radiotherapy for treatment of pediatric craniopharyngiomas [J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2012, 82(2): 643 - 652
- 郑连喜, 杨科, 邓超, 等. 三维适形放疗联合替莫唑胺及希美钠治疗脑转移瘤的疗效评价 [J]. 重庆医学, 2014, 12: 1500 - 1502
- 铁山. 脑胶质瘤三维适形放疗与调强适形放疗剂量学对比研究 [J]. 现代肿瘤医学, 2013, 21(12): 2700 - 2702
- Ge X, Lin Q, Ren X, *et al.* Phase II clinical trial of whole - brain irradiation plus three - dimensional conformal boost with concurrent topotecan for brain metastases from lung cancer [J]. Radiation Oncology, 2013, 8(1): 238
- 肖颖, 房芳, 陈红, 等. 后程三维适形放疗联合紫杉醇化疗治疗老年人乳腺癌伴脑转移瘤的临床观察 [J]. 中华老年医学杂志, 2011, 30(4): 295 - 298
- Su SF, Hu YX, Ouyang WW, *et al.* Overall survival and toxicities regarding thoracic three - dimensional radiotherapy with concurrent chemotherapy for stage IV non - small cell lung cancer: results of a prospective single - center study [J]. BMC cancer, 2013, 13(1): 474
- 陈万泉, 郑灵. 三维适形放射治疗配合全脑放射治疗肺癌脑转移 48 例 [J]. 肿瘤研究与临床, 2010, 22(12): 850 - 851
- Yahara K, Ohguri T, Imada H, *et al.* Cancer of the pelvis: definitive three - dimensional conformal radiotherapy for patients with isolated recurrence in the para - aortic lymph nodes [J]. Journal of Radiation Research, 2012, 53(5): 735 - 741
- 刘莲花, 杨晓峰, 贺方学, 等. 肺癌脑转移瘤放疗方案比较临床疗效及预后分析 [J]. 中华肿瘤防治杂志, 2014, 21(2): 143 - 146
- Verheeecke M, Halaska MJ, Lok CA, *et al.* Primary brain tumours, meningiomas and brain metastases in pregnancy: Report on 27 cases and review of literature [J]. European Journal of Cancer, 2014, 50(8): 1462 - 1471
- 郭秋峰, 赵俊谦, 李瑞峰, 等. 非小细胞肺癌脑转移的三维适形放疗疗效分析 [J]. 中国美容医学, 2012, 21(21): 118
- Lin Q, Liu YE, Ren XC, *et al.* Dose escalation of accelerated hypofractionated three - dimensional conformal radiotherapy (at 3 Gy/fraction) with concurrent vinorelbine and carboplatin chemotherapy in unresectable stage III non - small - cell lung cancer: a phase I trial [J]. Radiation Oncology, 2013, 8(1): 201
- Xi Z, Weijian Z, Jinsheng H, *et al.* A Comparative Dosimetric Study Between 3D - CRT and IMRT for Brain Metastasis Tumors [J]. Journal of Basic and Clinical Oncology, 2011, 5: 15

(收稿日期: 2014 - 06 - 19)

(修回日期: 2014 - 07 - 07)

新型基因重组藻胆蛋白对小鼠 S180 实体瘤 COX - 2 表达的影响

张晓平 侯 林 李慧芬 田景振

摘 要 **目的** 探讨新型基因重组藻胆蛋白对小鼠 S180 实体瘤环氧酶 - 2 (COX - 2) 表达的影响。**方法** 将小鼠腋下接种 S180 细胞荷瘤造模后, 随机分为阴性组、环磷酸胺组、新型基因重组藻胆蛋白组 [50mg/(kg · d)]、藻胆蛋白低、高浓度组 [25mg/(kg · d), 100mg/(kg · d)], 共 5 组, 阴性组给予等量生理盐水, 灌胃给药 11 天后处死, 剥离肿瘤, 采用免疫组化方法检测肿瘤组织中 COX - 2 的表达。**结果** 新型基因重组藻胆蛋白组、藻胆蛋白低、高浓度组突变型 COX - 2 平均阳性表达率分别为 28.64%、42.38%、31.68%, 均低于阴性组 66.12% ($P < 0.05$)。**结论** 新型基因重组藻胆蛋白可明显抑制 COX - 2 表达, 可能对 COX - 2 表达有下调作用。

关键词 新型基因重组藻胆蛋白 COX - 2 表达

中图分类号 R9

文献标识码 A

DOI 10.3969/j.issn.1673-548X.2015.01.030

作者单位: 250355 济南, 山东中医药大学药学院

通讯作者: 田景振, 电子信箱: tianjingzhen@163.com

Effect of New Recombinant Phycobiliprotein on Expression of COX - 2 of Mice Treated with S180 Solid Tumor. Zhang Xiaoping, Hou Lin, Li Huifen, et al. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Shandong 250355, China

Abstract Objective To explore the effect of new recombinant phycobiliprotein on expression of cyclooxygenase - 2 (COX - 2) of mice treated with S180 solid tumor. **Methods** The tumor - bearing mice which were inoculated with S180 solid tumor were randomly divided into five groups; model group, cyclophosphamide group, new recombinant phycobiliprotein group[50mg/(kg · d)], low, high dose of phycocyanin group[25,100mg/(kg · d)], the same amount of saline was given to model group. After the intragastric administration for 11 days, the solid tumor was removed from each group, and the expression of COX - 2 was detected by immunohistochemical SABC method. **Results** The average positive expression rates of COX - 2 among new recombinant phycobiliprotein group, low, high dose of phycocyanin group were respectively 28.64%, 42.38%, 31.68%, more lower compared with model group 66.12% ($P < 0.05$). **Conclusion** New recombinant phycobiliprotein may decrease expression of COX - 2 significantly by down regulation effect.

Key words New recombinant phycobiliprotein; COX - 2; Expression

藻胆蛋白是来自藻类的一种捕光色素蛋白,其主要来自真核藻类——红藻、隐藻和原核藻类——蓝藻,某些甲藻也含有藻胆蛋白。藻胆蛋白因其广泛的作用越来越受到重视,在抗肿瘤、抗氧化、消炎以及消除体内自由基等方面具有很高的活性,藻胆蛋白抗肿瘤功效已经有了大量的报道^[1,2]。环氧化物酶 - 2 (COX - 2) 在炎症和肿瘤细胞中表达较高,COX - 2 抑制剂可抑制肿瘤细胞的生长和肿瘤血管的生成,从而诱导细胞凋亡。研究表明,藻胆蛋白能降低肿瘤细胞前列腺素 (PEG₂) 的水平,使 COX - 2 的含量降低从而引起细胞凋亡,通过选择性抑制 COX - 2 活性达到促进肿瘤细胞凋亡的作用^[3]。

本研究着眼于细胞水平,利用免疫组化的手段,探讨与肿瘤密切相关的环氧化物酶 - 2 (COX - 2) 蛋白表达的关系,继而研究了藻胆蛋白抑制肿瘤生长的方式与途径,探索新型基因重组藻胆蛋白抗肿瘤作用可能的作用机制,为新的抗肿瘤海洋药物的研发提供理论依据。

材料与方法

1. 材料:(1)动物及瘤株:清洁级昆明小鼠 50 只,体重 18 ~ 23g,雄性,由山东鲁抗医药股份有限公司质检中心实验动物室提供,动物合格证编号:SCXK(鲁)20080002;小鼠 S180 实体瘤细胞(上海市细胞研究所生产),采用常规方法小鼠体内腹腔传代。(2)药物和试剂:新型基因重组藻胆蛋白(实验室自制);藻胆蛋白从螺旋藻中提取(食品级螺旋藻粉由江苏赐百年公司生产,纯度 1.0(A620 / A280));注射用环磷酰胺(CY,每瓶 0.2g,江苏恒瑞医药股份有限公司生产);苏木色精(上海蓝季科技发展有限公司生产);30% 过氧化氢(分析纯,国药集团化学试剂有限公司生产);兔抗小鼠 COX - 2 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司生产);SABC 试剂盒包括生物素化山羊抗兔 IgG 5% 即用型 BSA SABC 工作液(武汉博士德生物工程有限公司生产);DAB 显色试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司生产)。(3)仪器:KD - 202 轮转式切片机(浙江省金华市科技仪器设备有限公司生产);生物

图像分析系统(江苏捷达科技公司生产);OLYMPUS - BX50 显微镜(日本 OLYMPUS 公司生产);ZMN - 7803 型自动组织包埋机(常州华利电子有限公司生产);Simple PCI 图像分析系统(V5.2, Compix Inc,美国生产)。

2. 方法:(1)肿瘤动物模型的建立:将冻存的 S180 肉瘤细胞复苏活化,并传代 4 代。无菌抽取 S180 肉瘤小鼠腹腔积液,高压灭菌,稀释,以 0.2 毫升/只在小鼠腋下注射,24h 后随机分成 5 组:阴性组给予生理盐水 0.5ml 灌胃,新型基因重组藻胆蛋白按 50mg/(kg · d)、实验室制备藻胆蛋白纯度 1.0 (A620/A280)按 25、100mg/(kg · d)、进口高纯度藻胆蛋白纯度 2.0 (A620/A280)25、100mg/(kg · d)灌胃给药,环磷酰胺组 30mg/(kg · d)腹腔注射,1 次/天,连续给药 11 天。末次给药 24h 后,处死剥瘤^[4]。(2)免疫组化过程:肿瘤组织固定,病理常规脱水,石蜡包埋,切片,滴加 COX - 2 多克隆抗体。载玻片经脱蜡、复水后,3% H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶活性,柠檬酸盐微波 15min 抗原修复,PBS 清洗,滴加 BSA,37℃ 孵育 20min,甩净液体,滴加 1:150 的抗体,4℃ 孵育过夜,加二抗工作液 40 ~ 50μl,37℃ 孵育 20min,滴加 SABC 工作液,37℃ 孵育 20min,加 DAB 显色剂。显色后苏木精中复染,树脂封片。(3)COX - 2 表达的检测:一般肿瘤细胞细胞质内出现棕黄色颗粒,认为是 COX - 2 阳性染色。选择 5 个高倍视野,每个视野分别计数约 500 个细胞,取阳性显色平均数并评分,若着色较深定为 2 分,着淡色定为 1 分,基本上不着色定为 0 分,着色的细胞占计数的细胞百分率:≥51% 为 3 分,26% ~ 50% 为 2 分,6% ~ 25% 为 1 分,≤5% 为 0 分,将每张切片染色细胞的百分率得分染色程度相乘的乘积为其最终得分^[5]。COX - 2 核周胞质薄膜上着色为阳性为判定标准。(4)光镜检查:免疫组化后切片镜检,观察各肿瘤细胞生长情况。

3. 统计学方法:采用 Simple PCI 图像分析系统对免疫组化结果进行分析,采用 SPSS 17.0 进行数据处理,多组数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 F 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

各用药组小鼠 S180 实体瘤组织中 COX - 2 表达与阴性组相比明显减少 ($P < 0.05$)。新型基因重组

藻胆蛋白组与天然藻蓝蛋白组相比明显减少 ($P < 0.05$), 与环磷酸胺组相比差异不明显 ($P > 0.05$), 结果见表 1。

COX-2 免疫组化主要在核周、胞质、胞膜上着色。在显微镜下观察可发现, 阴性组细胞核在苏木精复染后有一定程度的不规则现象, 阳性组细胞核不规则程度较轻, 新型基因重组藻胆蛋白组、天然藻蓝蛋白组也有一定程度不规则性。结果见图 1。

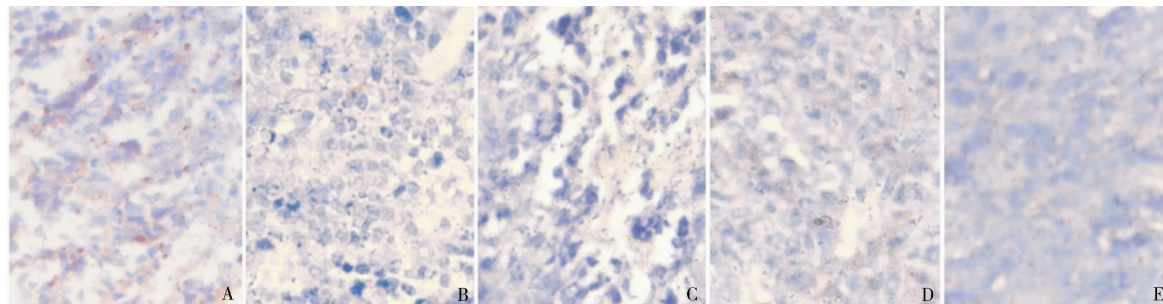


图 1 各组免疫组化 COX-2 检查结果 ($\times 400$)

A. 阴性组; B. 阳性组; C. 新型基因重组藻胆蛋白组; D. 天然藻胆蛋白(2.0)组; E. 天然藻胆蛋白(1.0)组

讨 论

天然藻胆蛋白生物活性广泛, 但以天然藻胆蛋白为对象进行药物开发存在着许多问题, 比如成本高、杂质多、周期长。随着重组 DNA 技术的发展, 胞内基因工程产物的数量不断增多, 新型基因重组藻胆蛋白也可通过基因工程表达出来^[6,7]。

环氧化酶(COX)又称前列腺素内过氧化物合成酶, 是一种膜结合蛋白, 在花生四烯酸合成前列腺素过程中第 1 个限速酶, 是一种双功酶其结构型酶为 COX-1, 诱导型酶为 COX-2。COX-1 参与细胞正常生理功能, 在多数细胞中恒定表达, 而 COX-2 在正常状态下几乎不表达, 但在细胞因子、生长因子、丝裂素、癌基因等的诱导下表达。COX-2 的表达属诱导型, 参与多种病理过程, 其表达定位于核膜和内质网, 在正常组织中不表达, 而在恶性肿瘤中表达较高^[8]。

COX-2 在核周、胞质、胞膜上着色, 阴性组着色最深, 平均阳性表达率达 66.12%。新型基因重组藻胆蛋白组, 环磷酸胺组, 天然藻蓝蛋白 2.0 组, 天然藻蓝蛋白 1.0 组与阴性组比较均有不同程度下调作用。新型重组藻胆蛋白作用的细胞出现典型的细胞核浓缩, 且一定浓度的藻蓝蛋白也会使细胞表现出 DNA 浓缩的现象, 应用藻胆蛋白治疗的细胞在有关聚合酶断裂的研究中也有所表现, 呈现出一定的裂解模式, 藻胆蛋白降低肿瘤细胞前列腺素(PEG_2)的水平, 使 COX-2 的含量降低而引起细胞凋亡, 且对脂多糖

表 1 5 组大鼠 COX-2 表达测定结果($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 [mg/(kg·d)]	n	COX-2 平均阳性 表达率(%)
阴性组	-	10	66.12 ± 17.20
环磷酸胺组	30	10	26.60 ± 7.60 *
新型基因重组藻胆蛋白组	50	10	28.64 ± 4.80 **
天然藻胆蛋白(2.0)组	100	10	31.68 ± 5.60 *
天然藻胆蛋白(1.0)组	25	10	42.38 ± 18.40 *

与阴性组比较, * $P < 0.05$; 与环磷酸胺组比较, ** $P < 0.05$

(LPS)诱导的吞噬细胞株增殖抑制作用与藻胆蛋白的剂量有关, 呈现剂量依赖性。

新型基因重组藻胆蛋白对 COX-2 的表达具有一定下调作用, COX-2 与炎症过程密切相关, COX-2 表达减少降低了其对免疫系统的抑制作用, 从而间接起到抑制肿瘤作用, 另外, 减少了细胞的突变及肿瘤细胞的侵袭力, 从而抑制肿瘤生长。

参考文献

- Manconia M, Pendas J, Ledon N, et al. Fadda phycocyanin liposomes for topical anti-inflammatory activity; in-vitro in-vivo studies [J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2009, 61: 423-430
- 王庭健, 林凡, 赵方庆, 等. 藻胆蛋白及其在医学中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2006, 42(2): 303-307
- 徐清燕, 梁惠, 秦松. 重组别藻蓝蛋白对小鼠 H₂₂ 肿瘤生长及 COX-2、VEGF 和 PCNA 表达的影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2010, 46(1): 22-25
- 吴蕾, 庞广昌, 陈庆森. 螺旋藻藻蓝蛋白的规模化提取和色谱纯化技术研究进展[J]. 食品科学, 2008, 29(4): 461-463
- 陈智彬, 宋永胜. Survivin、Caspase-3、突变型 p53 对膀胱移行细胞癌预后的意义[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(3): 348-350
- 石荣莲, 汪立平, 刘玉佩. 重组褐藻胶裂解酶基因工程菌超声波破碎条件研究[J]. 湖南农业科学, 2010, 21: 98-101, 104
- 徐清燕, 梁惠, 秦松. 重组别藻蓝蛋白对小鼠 H22 肿瘤生长及 COX-2 VEGF 和 PCNA 表达的影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2010, 46(1): 22-25
- Nardone G, Raco A, Vaira D, et al. Expression of COX-2, PGE-synthase, MDR-1(P-gp), and Bcl-X1: a molecular pathway of Hpylori-related gastric carcinogenesis[J]. J Pathol, 2004, 202: 305-312

(收稿日期: 2013-07-24)

(修回日期: 2013-09-03)