

图4 ILT3重组腺病毒转染HEK293细胞(×100)

入。EGFP为绿色荧光蛋白,可为判断重组质粒转染效率提供依据,3FLAG标签则有利于目的蛋白表达后的检测。

本实验通过PCR扩增目的基因,以BamH I/Age I双酶切法将目的基因连接至穿梭质粒GV314,使用AdMax腺病毒包装系统进行病毒包装,成功构建Ad-ILT3重组腺病毒,扩增、纯化后的病毒具有较高的效价与转染效率,为进一步研究ILT3的基因功能以及其在心血管疾病中的作用提供了良好的工作基础。

参考文献

- 1 Kuroiwa A, Yamashita Y, Inui M, *et al.* Association of tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2, inositol 5-phosphatase SHIP with gp49B1, and chromosomal assignment of the gene[J]. J Biol Chem, 1998, 273(2):1070-1074
- 2 Daeron M, Jaeger S, Du Pasquier L, *et al.* Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs: a quest in the past and future[J]. Immunol Rev, 2008, 224:11-43
- 3 Donath MY. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start[J]. Nat Rev Drug Discov, 2014, 13(6):465-476
- 4 Schror K, Huber K. Platelets, inflammation and anti-inflammatory drugs in ACS and CAD[J]. Thromb Haemost, 2015, 114(3):446-448

- 5 Gullestad L, Ueland T, Vinge LE, *et al.* Inflammatory cytokines in heart failure: mediators and markers[J]. Cardiology, 2012, 122(1):23-35
- 6 Cella M, Dohring C, Samaridis J, *et al.* A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing[J]. J Exp Med, 1997, 185(10):1743-1751
- 7 Katz HR. Inhibition of pathologic inflammation by leukocyte Ig-like receptor B4 and related inhibitory receptors[J]. Immunol Rev, 2007, 217:222-230
- 8 Breslow RG, Rao JJ, Xing W, *et al.* Inhibition of Th2 adaptive immune responses and pulmonary inflammation by leukocyte Ig-like receptor B4 on dendritic cells[J]. J Immunol, 2010, 184(2):1003-1013
- 9 Chang CC, Liu Z, Vlad G, *et al.* Ig-like transcript 3 regulates expression of proinflammatory cytokines and migration of activated T cells[J]. J Immunol, 2009, 182(9):5208-5216
- 10 Lu HK, Rentero C, Raftery MJ, *et al.* Leukocyte Ig-like receptor B4 (LILRB4) is a potent inhibitor of FcγRI-mediated monocyte activation via dephosphorylation of multiple kinases[J]. J Biol Chem, 2009, 284(50):34839-34848
- 11 Gleissner CA, Zastrow A, Klingenberg R, *et al.* IL-10 inhibits endothelium-dependent T cell costimulation by up-regulation of ILT3/4 in human vascular endothelial cells[J]. Eur J Immunol, 2007, 37(1):177-192
- 12 Cortesini R, Suci N, Foca N. ILT3⁺ ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells in transplantation[J]. Transplantation, 2006, 82(1 Suppl):S30-32
- 13 Jensen MA, Yanowitch RN, Reder AT, *et al.* Immunoglobulin-like transcript 3, an inhibitor of T cell activation, is reduced on blood monocytes during multiple sclerosis relapses and is induced by interferon beta-1b[J]. Mult Scler, 2010, 16(1):30-38

(收稿日期:2016-01-23)

(修回日期:2016-01-27)

冬凌草甲素对神经母细胞瘤抗肿瘤的作用研究

张李迪 高丰厚 姜 斌

摘要 目的 在体内体外水平探讨冬凌草甲素(oridonin)对神经母细胞瘤的抗肿瘤作用。方法 CCK-8法检测冬凌草甲素对细胞增殖的影响;AO/EB双荧光染色后荧光显微镜观察细胞凋亡情况;免疫印迹检测细胞内活化的caspase-3和剪切的PARP表达水平;构建SHSY-5Y神经母细胞裸鼠异种移植瘤模型,Ki-67免疫组化染色分析冬凌草甲素对肿瘤组织增殖的影响。结果 冬凌草甲素作用SHSY-5Y和SK-N-MC细胞24h后,可以剂量依赖性抑制细胞增殖。不同浓度冬凌草甲素处理24h后AO/EB双荧光染色显示,随着药物浓度增加细胞凋亡明显增多。免疫印迹结果证实冬凌草甲素可以浓度依赖性增加活化的caspase-3和剪切的PARP蛋白的表达。冬凌草甲素处理组裸鼠移植瘤体积增量显著小于对照组,Ki-67免疫组化显示冬凌草甲素处理组裸鼠移植瘤体积增量显著小于对照组,Ki-67免疫组化显示冬凌草甲素处理组裸鼠移植瘤体积增量显著小于对照组。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81302006)

作者单位:201999 上海交通大学医学院附属第三人民医院肿瘤科

通讯作者:姜斌,主任医师、教授、博士生导师,电子信箱:jiangbinwcr@sjtu.edu.cn

凌草甲素处理组肿瘤组织增殖细胞比率较对照组显著降低。**结论** 冬凌草甲素可以抑制 SHSY-5Y 和 SK-N-MC 细胞增殖并诱导其凋亡,并在动物水平抑制裸鼠移植瘤的生长。

关键词 冬凌草甲素 神经母细胞瘤 SHSY-5Y 细胞 SK-N-MC 细胞 异种移植瘤

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.009

Antitumor Efficacy of Oridonin on Neuroblastoma. Zhang Lidi, Gao Fenghou, Jiang Bin. Department of Oncology, NO. 3 People's Hospital Affiliated to Medical College of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201999, China

Abstract Objective To investigate the antitumor efficacy of oridonin on neuroblastoma in vitro and in vivo. **Methods** The CCK-8 assay was used to measure the inhibitory effect of oridonin on proliferation of SHSY-5Y and SK-N-MC cells. Apoptosis was determined by fluorescence microscope after AO/EB staining. The expression of cleaved caspase-3 and cleaved PARP was determined by immunoblot analysis. BALB/c nude mouse xenograft models with neuroblastoma were built by SHSY-5Y cell line and the proliferation of tumor tissues were assessed by Ki-67 immunohistochemistry. **Results** Treatment with oridonin for 24h resulted in a marked decrease in cell viability of SHSY-5Y and SK-N-MC cells in a dose-dependent manner. After treatment with an increasing concentration of oridonin for 24h, the percentage of apoptotic cells observed by AO/EB staining increased. Treatment with oridonin increased the expression of cleaved caspase-3 and PARP. The tumor volume increment and the proliferation of tumor tissues measured by Ki-67 immunostaining in models with oridonin were significantly less than vehicle control. **Conclusion** Oridonin can exert its antitumor effect by inhibiting proliferation and inducing apoptosis of SHSY-5Y and SK-N-MC cells in vitro and in vivo.

Key words Oridonin; Neuroblastoma; SHSY-5Y; SK-N-MC; Xenograft

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是起源于神经嵴的胚胎性肿瘤,由未分化的交感神经细胞组成,其发生率在15岁以下儿童中约为1/10万,是临床上1岁内儿童中最常见的恶性肿瘤^[1-3]。由于诊断方法和治疗手段的更新改进,神经母细胞瘤患者的整体生存率有较大提高,但高危患儿的生存率与生活质量仍无显著改善^[4-6]。

冬凌草甲素(oridonin, ORI)是从传统中草药冬凌草中提取出来的二萜类化合物,能够有效抑制多种肿瘤细胞的增殖并诱导细胞凋亡^[7-10]。然而,冬凌草甲素对神经母细胞瘤的治疗效果鲜有报道,本研究以神经母细胞瘤 SHSY-5Y 和 SK-N-MC 细胞株为实验材料,在体外观察冬凌草甲素对神经母细胞增殖和凋亡的影响,并构建 SHSY-5Y 神经母细胞瘤裸鼠异种移植模型,在体内水平研究冬凌草甲素对神经母细胞瘤的疗效,为神经母细胞瘤寻找新的治疗药物提供前期实验基础。

材料与方法

1. 试剂:冬凌草甲素购自购自江苏宝泽堂生物医药有限公司,采用二甲亚砜(dimethylsulfoxide, DM-SO)溶解,配置成10mmol/L的储存液,-20℃保存,应用时采用培养基稀释至所需终浓度。RPMI1640培养基、胎牛血清、青链霉素购自美国Gibco公司。CCK-8试剂盒购自日本Dojindo Molecular Technologies公司;AO、EB购自美国Sigma公司;磷酸酶和蛋白酶抑制剂购自德国Roche公司;BCA蛋白定量试

剂盒购自碧云天;一抗、辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔IgG(二抗)均购自美国Cell Signaling Technology公司;WB化学发光试剂购自美国Millipore公司。

2. 细胞培养:神经母细胞瘤细胞系 SHSY-5Y、SK-N-MC 购自中国科学院上海生命科学研究院,于37℃、5% CO₂条件下用含有10%胎牛血清和1%青链霉素的RPMI 1640培养基培养,取对数生长期细胞进行实验。

3. CCK-8法检测细胞活力:胰酶消化 SHSY-5Y、SK-N-MC 细胞后接种于96孔板中[5×10³个细胞/(200微升/孔)],24h后加入不同剂量的冬凌草甲素继续培养,终止培养前2h加20μl的CCK-8于各个孔中,酶标仪(美国Bio-Rad公司)450nm波长下测定各孔的吸光度值,并计算各组细胞的生存率。细胞生存率(%)=(实验组吸光度值-空白组吸光度值)/(对照组吸光度值-空白组吸光度值)×100%。

4. AO/EB荧光染色检测细胞凋亡:胰酶消化 SHSY-5Y、SK-N-MC 细胞后接种于24孔板中,加入冬凌草甲素培养24h后,PBS洗2次,加入200μl 1:1混合的AO(100μg/ml)、EB(100μg/ml)染液,孵育3min后荧光显微镜(日本Nikon Eclipse Ti,公司)下拍照。

5. 免疫印迹:预冷PBS洗细胞2次后加入含有磷酸酶和蛋白酶抑制剂的SDS细胞裂解液提取细胞总蛋白,4℃ 12000r/min离心收上清,BCA法测蛋白

浓度后,加入上样缓冲液,加热变性后取 40g 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移到 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温孵育 30min,加入一抗 4℃ 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次,加入辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1h, TBST 洗膜 3 次,加入显影液,采集图像。

6. 裸鼠移植瘤模型建立:选择 5~6 周无胸腺雌性裸鼠 15 只进行试验,收集 5×10^6 个 SHSY-5Y 细胞于 100 μ l PBS 中备置细胞悬液接种 BALB/c 裸小鼠,所有动物实验均遵守动物保护法规。5~7 天后裸鼠皮下长出体积约 100mm³ 肿瘤时,选择 12 只肿瘤无出血坏死的裸鼠随机分为两组:对照组、冬凌草甲素组($n=6$)。对照组 1% DMSO 100ml/d 腹腔给药,冬凌草甲素 10mg/(kg·d) 腹腔给药。每周测量移植瘤长径(a)和短径(b),并按 $V=(a \times b^2)/2$ 计算肿瘤体积。4 周后终止观察,颈椎脱臼法处死裸鼠,去除皮下移植瘤,称取体积质量。

7. 免疫组化:取部分肿瘤组织,10% 中性甲醛溶液固定,常规制作石蜡切片。切片常规脱蜡至水,

0.01mol/L 枸橼酸钠 750W 微波抗原修复 10min, PBS 洗 3 次,3% 过氧化氢甲醇室温作用 10min。PBS 洗 3 次,0.05% BSA 室温封闭 1h,滴加 Ki-67 单克隆抗体 4℃ 孵育过夜, PBS 洗 3 次,加羊抗兔 IgG-HRP 室温孵育 1h。PBS 洗 3 次, DAB 显色。

8. 统计方法:应用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 冬凌草甲素对神经母细胞瘤 SHSY-5Y、SK-N-MC 细胞生长的抑制情况:以不同浓度冬凌草甲素(2.5、5、10、20 μ mol/L)处理 SHSY-5Y 和 SK-N-MC 细胞 24h, CCK-8 法检测冬凌草甲素对神经母细胞瘤的增殖影响。如图 1 所示,冬凌草甲素对神经母细胞瘤具有显著的增殖抑制作用,并且呈现明显的剂量依赖性。

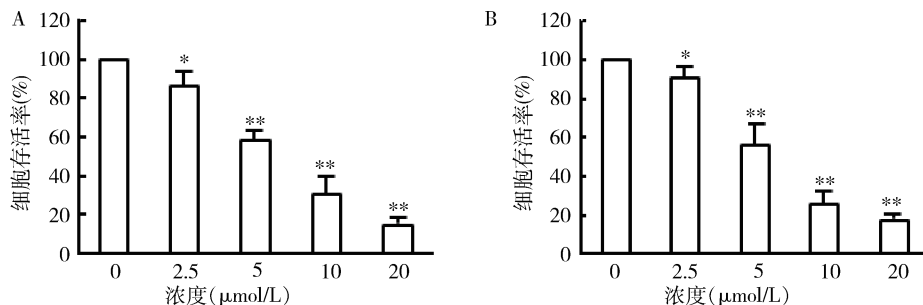


图 1 不同浓度 ORI 对 SH-SY-5Y 和 SK-N-MC 细胞增殖的影响

A. 不同浓度(2.5、5、10、20 μ mol/L)的 ORI 处理 SH-SY-5Y 细胞 24h, 细胞存活率由 CCK-8 测量; B. 不同浓度(2.5、5、10、20 μ mol/L)的 ORI 处理 SK-N-MC 细胞 24h, 细胞存活率由 CCK-8 测量; 与 0 μ mol/L 相比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2. 冬凌草甲素对神经母细胞瘤 SHSY-5Y、SK-N-MC 细胞凋亡的诱导作用:以不同浓度冬凌草甲素(5、10、20 μ mol/L)处理 SHSY-5Y 和 SK-N-MC 细胞 24h, AO/EB 双荧光染色检测冬凌草甲素对神经母细胞瘤凋亡的影响。随着冬凌草甲素浓度的增加, SHSY-5Y、SK-N-MC 细胞凋亡逐渐增多, 当冬凌草甲素作用浓度达到 20 μ mol/L 时, SHSY-5Y、SK-N-MC 细胞几乎全部发生凋亡(图 2)。进一步采用免疫印迹检测冬凌草甲素作用 24h 后神经母细胞瘤细胞内凋亡相关活化的 caspase-3 和剪切的 PARP 蛋白表达水平。结果发现, 随着冬凌草甲素作用浓度的增加, 细胞内 caspase-3 裂解激活片段和 PARP 蛋白酶解逐渐增多, 冬凌草甲素浓度达到 20 μ mol/L 时即可有效促进神经母细胞瘤细胞凋亡(图 3)。

3. 冬凌草甲素对 SHSY-5Y 神经母细胞瘤裸鼠移植瘤生长的抑制作用:为观察冬凌草甲素对神经母细胞瘤的体内抗肿瘤效应, 笔者建立 SHSY-5Y 裸鼠移植瘤模型, 肿瘤细胞接种 3 天后, 按冬凌草甲素(10mg/kg) 每天腹腔给药, 共 28 天。与对照组 BALB/c 裸小鼠相比较, 冬凌草甲素给药组裸鼠的移植瘤体积增量明显减小(图 4A)。Ki-67 免疫组化染色显示, 冬凌草甲素治疗组与对照组相比较, Ki-67 阳性细胞数目显著减少(图 4B)。

讨 论

神经母细胞瘤目前的治疗方式主要是 CiE(顺铂+足叶乙甙)和 CDV(环磷酰胺+柔红霉素+长春新碱)交替化疗方案, 然而完全缓解(CR)和非常好的部分缓解(VGPR)仍低于 50%^[11,12]。鉴于传统化疗方

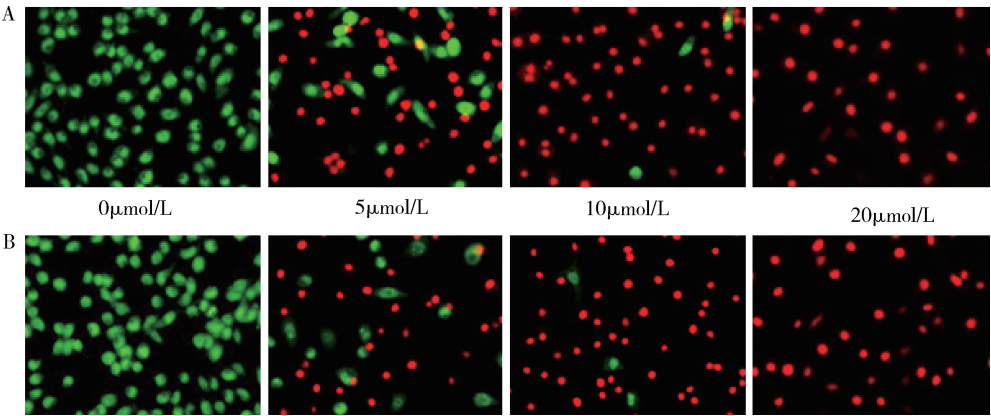


图2 不同浓度ORI对SH-SY-5Y和SK-N-MC细胞凋亡的影响
A. 不同浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)的ORI处理SH-SY-5Y细胞24h, AO/EB 荧光染色检测细胞凋亡情况;
B. 不同浓度(5、10、20 $\mu\text{mol/L}$)的ORI处理SK-N-MC细胞24h, AO/EB 荧光染色检测细胞凋亡情况

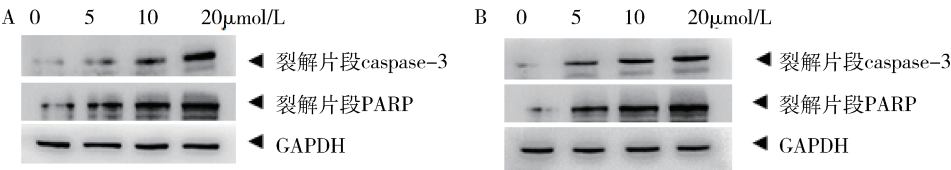


图3 不同浓度ORI对SH-SY-5Y和SK-N-MC细胞cleaved caspase-3和cleaved PARP蛋白表达的影响
A. Western blot 法检测SH-SY-5Y细胞cleaved caspase-3和cleaved PARP蛋白表达的变化;
B. Western blot 法检测SK-N-MC细胞cleaved caspase-3和cleaved PARP蛋白表达的变化

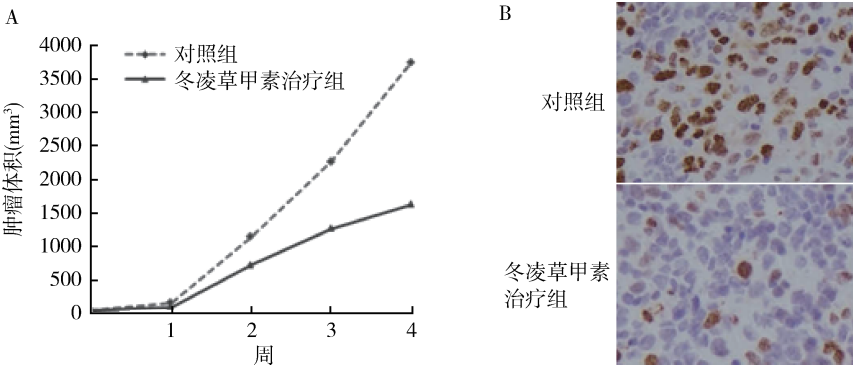


图4 冬凌草甲素对SHSY-5Y神经母细胞瘤裸鼠移植瘤生长的抑制作用
A. 对照组和冬凌草甲素治疗组裸鼠移植瘤的体积变化;B. 对照组和冬凌草甲素治疗组裸鼠移植瘤组织的Ki-67免疫组化染色($\times 200$)

案对治疗的效果及患者的耐受程度已经接近最大限度,因此寻找更为有效的神经母细胞瘤治疗药物是当前值得研究的一项内容。

天然化合物的抗肿瘤作用近年来在肿瘤治疗研究领域颇受关注。冬凌草甲素是从传统中草药冬凌草中提取出来的贝壳杉烯二萜类天然有机化合物,具有广泛的抗肿瘤作用,但具体的分子机制尚不完全清楚^[7-10]。本实验以人神经母细胞瘤 SHSY-5Y、SK-N-MC 细胞株为材料,采用多种方法在细胞和

动物水平对冬凌草甲素的抗肿瘤作用进行研究。CCK-8 结果显示,冬凌草甲素对神经母细胞瘤的增殖抑制效应随着给药剂量的增加逐渐增强,呈现明显的剂量依赖性。AO/EB 双荧光染色可见冬凌草甲素处理组细胞中出现染色质着橘红色并呈固缩或碎片状的凋亡细胞,且细胞凋亡率与药物浓度呈正相关。免疫印迹分析 caspase-3 裂解激活和 PARP 蛋白酶解情况,结果显示 5 $\mu\text{mol/L}$ 的冬凌草甲素处理组细胞即开始出现 caspase-3 裂解激活,随着冬凌草甲素

浓度的增加, caspase-3 剪切活化和底物 PARP 酶解越来越明显, 呈现明显的药物浓度依赖性。上述结果说明, 冬凌草甲素可以诱导神经母细胞瘤细胞凋亡的发生, 其对神经母细胞瘤的增殖抑制作用可能与诱导肿瘤细胞凋亡有关, 并呈现明显的剂量依赖性。此外, 本研究还应用神经母细胞瘤 BALB/c 裸小鼠异种移植瘤模型在体内水平对冬凌草甲素的抗肿瘤效应进行了探索。Ki-67 免疫组化染色显示, 与对照组相比冬凌草甲素处理组肿瘤组织中 Ki-67 阳性的增殖细胞比率显著降低, 提示冬凌草甲素在体内水平仍可以有效抑制神经母细胞瘤的生长。

综上所述, 本研究初步确定了冬凌草甲素作为一种具有抗肿瘤活性的中药制剂, 能够有效抑制 SHSY-5Y、SK-N-MC 神经母细胞增殖, 促进肿瘤细胞凋亡, 并在动物水平上显著抑制神经母细胞裸鼠移植瘤的生长, 这为冬凌草甲素在神经母细胞瘤的临床治疗应用奠定了理论基础。

参考文献

- 1 Louis CU, Shohet JM. Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy [J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66:49-63
- 2 Murphy JM, La Quaglia MP. Advances in the surgical treatment of neuroblastoma: a review [J]. *Eur J Pediatr Surg*, 2014, 24(6): 450-456
- 3 吉毅, 肖现民. 神经母细胞瘤的研究与治疗现状 [J]. *中华小儿外科杂志*, 2011, 32(9):703-706

- 4 Schleiermacher G, Janoueix-Lerosey I, Delattre O. Recent insights into the biology of neuroblastoma [J]. *Int J Cancer*, 2014, 135(10):2249-2261
- 5 Mackall CL, Merchant MS, Fry TJ. Immune-based therapies for childhood cancer [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2014, 11(12):693-703
- 6 Morgenstern DA, Baruchel S, Irwin MS. Current and future strategies for relapsed neuroblastoma: challenges on the road to precision therapy [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2013, 35(5):337-347
- 7 Dong Y, Zhang T, Li J, et al. Oridonin inhibits tumor growth and metastasis through anti-angiogenesis by blocking the Notch signaling [J]. *PLoS One*, 2014, 9(12):e113830
- 8 Wang YY, Lv YF, Lu L, Cai L. Oridonin inhibits mTOR signaling and the growth of lung cancer tumors [J]. *Anticancer Drugs*, 2014, 25(10):1192-1200
- 9 Bao R, Shu Y, Wu X, et al. Oridonin induces apoptosis and cell cycle arrest of gallbladder cancer cells via the mitochondrial pathway [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14:217
- 10 Bu HQ, Liu DL, Wei WT, et al. Oridonin induces apoptosis in SW1990 pancreatic cancer cells via p53- and caspase-dependent induction of p38 MAPK [J]. *Oncol Rep*, 2014, 31(2):975-982
- 11 Park JR, Eggert A, Caron H. Neuroblastoma: biology, prognosis, and treatment [J]. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2010, 24(1):65-86
- 12 Pinto NR, Applebaum MA, Volchenbom SL, et al. Advances in risk classification and treatment strategies for neuroblastoma [J]. *J Clin Oncol*, 2015, 33(27):3008-3017

(收稿日期:2015-12-18)

(修回日期:2015-12-19)

不育症患者指长波动不对称性特点的分析

沈 丹 于皓臣 霍正浩 赵君利 刘永杰 陆 宏

摘 要 目的 分析宁夏汉族男性不育症患者指长波动不对称性(FA)的特点。**方法** 遵循体质测量法, 计算 384 例宁夏汉族男性(不育组 192 例, 对照组 192 例)各指指长 FA(2FA、3FA、4FA、5FA)及复合 FA(CFA)的均值, 比较各均值的差异性。**结果** (1)不育组和对照组各指长 FA 均值分布趋势均为 5FA < 3FA < 4FA < 2FA。(2)不育组各指长 FA 均值均高于对照组, 2FA 及 4FA 差异显著($P < 0.05$), 且不育组 2FA 与体重指数(BMI)正相关($P < 0.05$);不育组 2FA 分布在 $|L-R| \geq 0.04$ 中的人数显著高于对照组($P < 0.05$)。**结论** 2FA 可能为男性不育的早期筛查提供重要的参考信息。

关键词 不育症 波动不对称性 指长

中图分类号 R394.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2016.08.010

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31460272, 31360257, 81060051)

作者单位:750004 银川, 宁夏医科大学教育部生育力保持省部共建重点实验室、宁夏回族自治区生殖与遗传重点实验室、医学遗传与细胞生物学系(沈丹、于皓臣、霍正浩、陆宏);750004 银川, 宁夏医科大学总医院生殖中心(赵君利);750001 宁夏银川市妇幼保健院(刘永杰)(注:沈丹与于皓臣为共同第一作者)

通讯作者:陆宏, 教授, 电子信箱: chuan773@126.com