

大蒜素对荷子宫内膜癌裸小鼠移植瘤生长的影响及其机制研究

贾 丽

摘 要 **目的** 研究大蒜素(allitridi)对荷子宫内膜癌裸小鼠移植瘤生长的影响及其机制。**方法** 取对数生长期子宫内膜癌 Ishikawa 细胞,皮下注射接种的方法制备荷子宫内膜癌裸小鼠模型,成瘤后取 60 只裸小鼠模型随机分为模型组、大蒜素高(40mg/kg)、中(20mg/kg)、低(10mg/kg)剂量组和顺铂 2mg/kg 组,每组 12 只;各治疗组均隔天腹腔注射给药 1 次,共给药治疗 5 次。治疗完成后剥取肿瘤组织并称重、计算抑瘤率;HE 染色法观察肿瘤组织形态学变化;TUNEL 染色法观察肿瘤组织细胞凋亡状况并计算凋亡指数(apoptosis index, AI),免疫组织化学法(immunohistochemistry, IHC)观察肿瘤组织 bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达并进行半定量分析,计算 Bax/bcl-2 比值。**结果** 大蒜素各组和顺铂组裸小鼠移植瘤肿瘤组织细胞呈皱缩、片状坏死等病理性改变,凋亡细胞数量明显增多,以大蒜素高剂量组最为显著。与模型组比较,大蒜素高、中剂量组和顺铂组瘤体重量显著减轻($P < 0.05$, $P < 0.01$),抑瘤率显著升高($P < 0.01$),肿瘤组织 bcl-2 蛋白表达显著下调($P < 0.05$, $P < 0.01$),Bax 和 caspase-3 蛋白表达显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$),Bax/bcl-2 表达比值显著升高($P < 0.01$)。与顺铂组比较,大蒜素高剂量组 Bax/bcl-2 表达比值显著升高($P < 0.05$)。**结论** 大蒜素对荷子宫内膜癌裸小鼠移植瘤生长具有抑制作用,其机制可能与大蒜素能够下调 bcl-2 表达、上调 Bax 和 caspase-3 表达、提高 Bax/bcl-2 表达比值进而促进肿瘤细胞凋亡有关。

关键词 大蒜素 子宫内膜癌 裸小鼠 移植瘤 影响

中图分类号 R285.5

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.01.033

Effects and Mechanism of Allitridi on Xenografts Growth in Endometrial Cancer of Nude Mice. Jia Li. Handan Central Hospital, Hebei 056001, China

Abstract **Objective** To investigate the effects and mechanism of allitridi on xenografts growth in endometrial cancer of nude mice. **Methods** Nude mice models bearing human endometrial cancer were made by injecting inoculation human endometrial cancer Ishikawa cell line were divided randomly into five groups: model group, allitridi high-dose (40mg/kg), middle-dose (20mg/kg), low-dose (10mg/kg) groups and cisplatin 2mg/kg group ($n = 12$). The drugs were given by intraperitoneal injection for 5 times, once every two days. The histopathological changes of tumor tissue was observed by HE staining, and the tumor cells apoptosis was detected by TUNEL. The expression of bcl-2, Bax, caspase-3 protein were detected by IHC and were semi-quantitative analysed. **Results** Compared with model group, the necrosis presentation, tumor cell shrinkage and other pathological morphological changes appeared, the number of apoptotic cells in tumor tissue was significantly increased, especially the rats in allitridi high-dose group. The tumor weight of allitridi high-dose and middle-dose groups were significantly decreased and the inhibition rate were significantly increased. The expression of bcl-2 protein was significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the expression of Bax and caspase-3 were significantly increased ($P < 0.01$), and the ratio of Bax/bcl-2 were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with cisplatin group, the ratio of Bax/bcl-2 in allitridi high-dose group was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Allitridi had inhibitive effects on xenografts growth in endometrial cancer of nude mice, which perhaps related to its effects of down-regulating the expression of bcl-2 protein, up-regulating the expression of Bax and caspase-3 protein, increasing the ratio of Bax/bcl-2, promoting endometrial cancer cell apoptosis.

Key words Allitridi; Endometrial cancer; Nude mice; Xenografts; Effects

大蒜素(Allitridi)是一种二烯丙基三硫化物,由百合科植物大蒜的球茎中分离并可人工合成^[1]。现代药理学研究发现,大蒜素对卵巢癌、宫颈癌、胃癌、

肺癌等均具有一定的抑制作用^[2-6]。但大蒜素是否对子宫内膜癌具有抑制作用尚未见文献报道。本实验通过制备荷人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞裸小鼠模型并给予大蒜素实施干预治疗,以顺铂为阳性对照药,研究大蒜素对荷人子宫内膜癌裸小鼠移植瘤生长

作者单位:056001 邯郸市中心医院妇二科

通讯作者:贾丽,电子信箱:hdsyshx@163.com

的影响,并探讨其可能的作用机制。

材料与方法

1. 药物与试剂:大蒜素注射液购自上海禾丰制药有限公司,规格 5ml:60mg;注射用顺铂购自山东齐鲁制药有限公司,规格:10 毫克/支;DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司;MTT 购自美国 Sigma 公司;bcl-2、Bax、caspase-3 单克隆抗体,SP 免疫组织化学试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;HE、TUNEL 试剂盒购自南京建成生物研究所。

2. 动物与细胞:雌性 Balb/c 裸小鼠,4~6 周龄,18~22g,由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供,实验动物许可证号:SCXK(沪)2012-0005。人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞株由上海拜力生物科技有限公司提供。

3. 方法:(1)动物模型的制备与分组:参照王睿聪等^[7]报道的方法制备荷人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞裸小鼠模型:Ishikawa 细胞株经复苏后接种于 DMEM 高糖培养基进行培养,取对数生长期细胞调整浓度为 5×10^7 个/ml,采用背部皮下注射接种(0.3ml)的方法制备荷人子宫内膜癌 Ishikawa 细胞裸小鼠模型。成瘤后,取 60 只模型裸小鼠按照随机数字表法随机分为模型组、大蒜素高剂量(40mg/kg)、中剂量(20mg/kg)、低剂量(10mg/kg)组和顺铂 2mg/kg 组,每组 12 只;各治疗组每两天腹腔注射给药 1 次,共 5 次,模型组同步给予等体积生理盐水。(2)测定瘤重并计算抑瘤率:采用颈椎脱臼的方法处死动物后剖取肿瘤组织并称重,计算抑瘤率:抑瘤率 = (模型组瘤重 - 实验组瘤重)/模型组瘤重 $\times$ 100%。(3)观察肿瘤组织形态结构改变:取肿瘤组织并依次行 4% 多聚甲醛溶液固定、石蜡包埋和切片处理后,行常规 HE 染色,然后通过倒置光学显微镜观察肿瘤组织形态结构变化并照相保存。(4)观察细胞凋亡状况并计算 AI:取已制备的肿瘤组织石蜡切片,经脱蜡水化处理后,按照 TUNEL 试剂盒操作步骤说明依次进行处理后,通过倒置光学显微镜观察,细胞核黄染为凋亡细胞。计算 AI:每张染色切片均

随机选取 6 个视野,计数每个视野中细胞总数和凋亡细胞数,各组分别取平均值, $AI = (\text{凋亡细胞数} / \text{总细胞数}) \times 100\%$ 。(5)检测肿瘤组织中 bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达:取肿瘤组织石蜡切片,按照 SP 试剂盒操作方法步骤,通过 IHC 法检测肿瘤组织中 bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达^[8];半定量分析:每张染色切片随机选取 6 个视野,通过 BI-2000 医学图像分析软件测定每个视野平均吸光度(A)值,以 A 值代表 bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达密度;以 Bax、bcl-2 蛋白表达 A 值计算 Bax/bcl-2 比值。

4. 统计学方法:运用 SPSS 13.0 进行统计分析,计量资料采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;计数资料采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 各组裸小鼠移植瘤瘤重和抑瘤率:与模型组比较,大蒜素高、中剂量组和顺铂组瘤重、抑瘤率均显著升高($P < 0.05$),而大蒜素高剂量与顺铂组比较差异无统计学意义($P > 0.05$,表 1)。

表 1 各组裸小鼠移植瘤瘤重和抑瘤率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(n)	瘤重(g)	抑瘤率(%)
模型组	12	1.81 $\pm$ 0.24	0.00 $\pm$ 0.00
大蒜素高剂量组	12	0.79 $\pm$ 0.21 **	56.35 $\pm$ 8.03 **
大蒜素中剂量组	12	1.13 $\pm$ 0.25 *	37.57 $\pm$ 6.50 **
大蒜素低剂量组	12	1.46 $\pm$ 0.30	19.34 $\pm$ 4.38 **
顺铂组	12	0.92 $\pm$ 0.16 **	49.17 $\pm$ 7.12 **

与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

2. 各组裸小鼠移植瘤肿瘤组织形态结构改变:观察病理切片发现:模型组裸小鼠移植瘤组织形态结构未见异常,细胞呈椭圆形,胞质饱满,胞核增大、胞核呈现两个或多个;大蒜素组和顺铂组移植瘤组织细胞呈现皱缩、核染色质边集、片状坏死等病理性改变,其中以大蒜素高剂量组最为显著,见图 1。

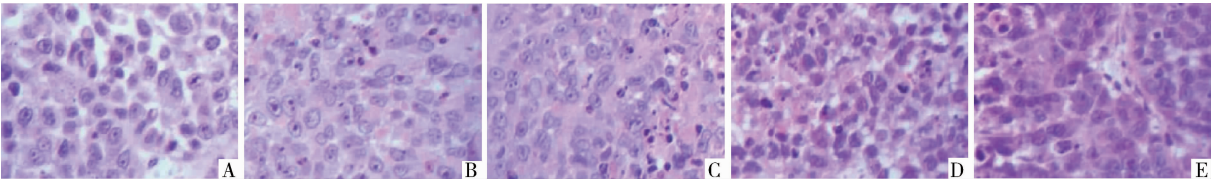


图 1 各组裸小鼠移植瘤肿瘤组织形态结构改变(HE, $\times 400$)

A. 模型组;B. 大蒜素高剂量组;C. 大蒜素中剂量组;D. 大蒜素低剂量组;E. 顺铂组

3. 各组裸小鼠移植瘤细胞凋亡状况:与模型组比较,大蒜素各组 and 顺铂组肿瘤组织凋亡细胞数显著增多,其中以大蒜素高剂量组最为显著(图2);计算并比较 AI 发现:模型组移植瘤细胞 AI 为 $2.4\% \pm 0.8\%$ 、大蒜素高、中、低剂量组 AI 分别为 $36.3\% \pm$

4.9% 、 $25.8\% \pm 3.5\%$ 、 $18.7\% \pm 2.9\%$,顺铂组 AI 为 $26.2\% \pm 2.7\%$;大蒜素高、中剂量组和顺铂组 AI 较模型组显著升高($P < 0.05$),且大蒜素高剂量组 AI 较顺铂组显著升高($P < 0.05$)。



图2 各组裸小鼠移植瘤细胞凋亡状况(TUNEL, $\times 400$)

A. 模型组;B. 大蒜素高剂量组;C. 大蒜素中剂量组;D. 大蒜素低剂量组;E. 顺铂组

4. 各组裸小鼠移植瘤肿瘤组织 bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达:与模型组比较,大蒜素各组 and 顺铂组肿瘤组织 bcl-2 蛋白表达明显下调而 Bax、caspase-3 蛋白表达明显上调,均以大蒜素高剂量组最为显著(图3~图5)。半定量分析发现,与模型组比较,大蒜素高、中剂量组和顺铂组肿瘤组织 bcl-2

蛋白表达 A 值显著降低而 caspase-3 蛋白表达 A 值显著升高($P < 0.05$),大蒜素各组 and 顺铂组肿瘤组织 Bax 蛋白表达 A 值显著升高($P < 0.01$);大蒜素高剂量组 bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达 A 值与顺铂组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$),结果见表2。

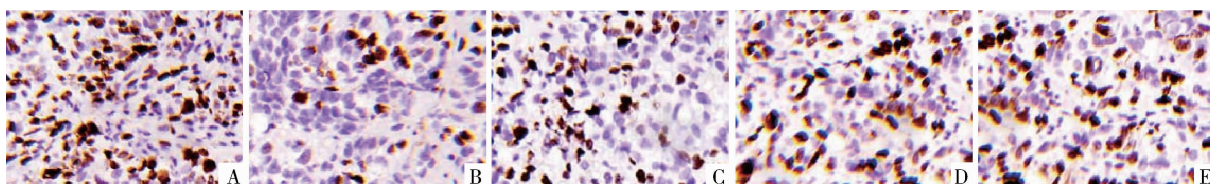


图3 各组裸小鼠移植瘤肿瘤组织 bcl-2 蛋白表达(IHC, $\times 400$)

A. 模型组;B. 大蒜素高剂量组;C. 大蒜素中剂量组;D. 大蒜素低剂量组;E. 顺铂组

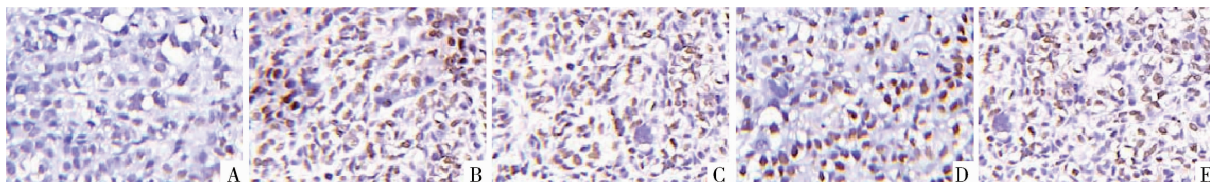


图4 各组裸小鼠移植瘤肿瘤组织 Bax 蛋白表达(IHC, $\times 400$)

A. 模型组;B. 大蒜素高剂量组;C. 大蒜素中剂量组;D. 大蒜素低剂量组;E. 顺铂组

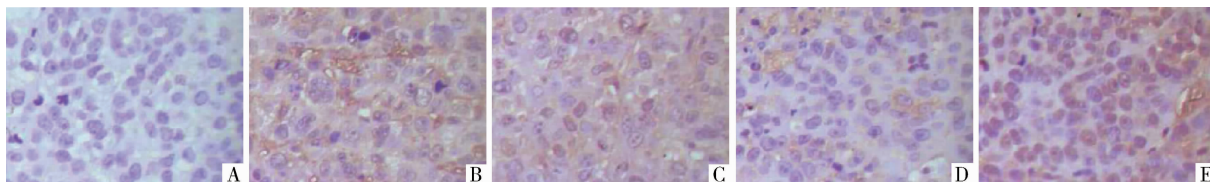


图5 各组裸小鼠移植瘤肿瘤组织 caspase-3 蛋白表达(IHC, $\times 400$)

A. 模型组;B. 大蒜素高剂量组;C. 大蒜素中剂量组;D. 大蒜素低剂量组;E. 顺铂组

5. 各组裸小鼠肿瘤组织中 Bax/bcl-2 比值:根据 A 值进行计算并比较 Bax/bcl-2 比值发现,与模型组比较,大蒜素高、中剂量组和顺铂组 Bax/bcl-2

比值显著升高($P < 0.05$),且大蒜素高剂量组 Bax/bcl-2 比值较顺铂组显著升高($P < 0.05$,表2)。

表 2 各组裸小鼠肿瘤组织 bcl-2、Bax、caspase-3 蛋白表达 A 值及 Bax/bcl-2 比值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数 (n)	bcl-2 (A)	Bax (A)	Bax/bcl-2	caspase-3 (A)
模型组	12	0.48 ± 0.11	0.27 ± 0.06	0.58 ± 0.16	0.12 ± 0.04
大蒜素高剂量组	12	0.30 ± 0.07 **	0.85 ± 0.17 **	2.83 ± 0.57 ***	0.22 ± 0.08 **
大蒜素中剂量组	12	0.37 ± 0.09 *	0.63 ± 0.15 **	1.70 ± 0.41 **	0.16 ± 0.03 *
大蒜素低剂量组	12	0.42 ± 0.13	0.50 ± 0.11 **	1.19 ± 0.33 *	0.11 ± 0.05
顺铂组	12	0.38 ± 0.08 *	0.68 ± 0.12 **	1.79 ± 0.52 **	0.17 ± 0.04 *

与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与顺铂组比较, # $P < 0.05$

讨 论

子宫内膜癌是女性生殖系统发生率最高的恶性肿瘤,临床上对于子宫内膜癌的治疗主要采取手术切除结合术后放、化疗杀灭肿瘤细胞的治疗方案,能够相对延长患者生命,但其复发率及致死率仍居高不下,严重威胁着女性的生命健康^[9]。因此,研发新型有效的抗肿瘤药物仍是临床上亟待解决的难题。

大蒜素是一种具有多种药理学作用的由二烯丙基三硫化物,吴金兰等^[2]研究发现大蒜素能够破坏细胞结构而直接杀伤卵巢癌 HO8910 细胞。张敏等^[4]研究报道大蒜素具有抑制宫颈癌 Hela 和 Caski 细胞的增殖作用,并未具有时间和剂量依赖性。司立钢等^[6]发现大蒜素能够将胃癌 SGC-7901 细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期而起到抑制其增殖的作用。本实验研究发现,大蒜素能够抑制荷人子宫内膜癌裸小鼠移植瘤生长、显著提高抑瘤率。观察病理切片发现,大蒜素能够提高荷人子宫内膜癌裸小鼠移植瘤肿瘤组织细胞凋亡、诱导肿瘤组织坏死,提示大蒜素对荷人子宫内膜癌裸小鼠移植瘤生长具有抑制作用。

caspases 家族基因和 Bcl-2 家族基因在细胞凋亡过程中均发挥着重要的调控作用^[10,11]。caspases 家族基因成员 caspase-3 参与细胞凋亡启动以及整个凋亡过程的调节^[12]。Farhadi 等^[13]和张彦清等^[14]研究发现 bcl-2 家族基因成员 bcl-2 和 Bax 在细胞凋亡过程中发挥着重要的调控作用,bcl-2 抑制细胞凋亡而 Bax 促进细胞凋亡,二者作用相互抑制。因此 bcl-2 和 Bax 对细胞凋亡的调控可能更依赖于 Bax/bcl-2 比值,Bax/bcl-2 比值越高则促凋亡作用越强^[12,15]。本实验研究发现,大蒜素能够显著下调荷人子宫内膜癌裸小鼠肿瘤组织 bcl-2 表达并上调 Bax 表达、提高 Bax/bcl-2 比值,上调 caspase-3 表达,这可能是大蒜素抑制荷人子宫内膜癌裸小鼠移植瘤生长的重要分子机制之一。

总之,大蒜素具有抑制荷人子宫内膜癌裸小鼠移植瘤生长的作用,作用机制可能与大蒜素能够有效调

节凋亡相关基因和蛋白表达有关。

参考文献

1 周美云,李毅群,陈填烽,等. 大蒜素与大蒜新素的抗氧化活性[J]. 暨南大学学报:自然科学版,2012,33(3):283-285

2 吴金兰,万慧芳,涂硕,等. 大蒜素对人卵巢癌 SKOV3/DDP 细胞增殖与凋亡的影响及机制[J]. 南昌大学学报:理科版,2014,38(2):171-176

3 张飞凤,谭布珍. 大蒜素诱导卵巢癌耐顺铂细胞株 SKOV-3/DDP 凋亡机制的初步探讨[J]. 时珍国医国药,2014,25(8):2029-2030

4 张敏,奚杰,孙大伟,等. 大蒜素对宫颈癌细胞生长的影响及作用机制[J]. 中国实用妇科和产科杂志,2011,27(1):39-41

5 余玉清,陈昱倩,颜延凤,等. 不同浓度苦参碱、大蒜素对人胃癌细胞株 MKN-45 杀伤作用的实验研究[J]. 江苏中医药,2014,46(11):82-83

6 司利钢,刘玺诚,李文梅,等. 大蒜素对肺癌 A549 细胞株 B 防御素表达的影响[J]. 首都医科大学学报,2006,27(6):792-794

7 王睿聪,杨清,毕芳芳,等. 坎地沙坦对子宫内膜癌血管生成的影响[J]. 现代肿瘤医学,2013,21(11):2416-2419

8 张华龙,张友良,魏庆民. 白芍总苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞凋亡的影响[J]. 中药药理与临床,2015,31(4):79-83

9 余思云,黄彩梅,胡国华. 紫草素通过 PI3K/Akt 信号通路诱导子宫内膜癌 Ishikawa 细胞凋亡[J]. 世界中西医结合杂志,2014,9(12):1303-1306

10 Kurita M, Hanada S, Ichimaru Y, et al. Indirubin 3'-epoxide induces caspase-independent cell death in human neuroblastoma[J]. Biol Pharm Bull, 2016,39(6):993-999

11 Fernandes RO, De Castro AL, Bonetto JH, et al. Sulforaphane effects on postinfarction cardiac remodeling in rats: modulation of redox-sensitive prosurvival and proapoptotic proteins[J]. J Nutr Biochem, 2016,27,34:106-117

12 Aboutaleb N, Shamsaei N, Rajabi H, et al. Protection of hippocampal CA1 neurons against ischemia/reperfusion injury by exercise preconditioning via modulation of Bax/bcl-2 ratio and prevention of caspase-3 activation[J]. Basic Clin Neurosci, 2016,7(1):21-29

13 Farhadi F, Jahanpour S, Hazem K, et al. Garlic (allium sativum) fresh juice induces apoptosis in human oral squamous cell carcinoma: the involvement of caspase-3, Bax and bcl-2[J]. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects, 2015,9(4):267-273

14 张彦清,刘保江,田首元. 丙泊酚对大鼠离体缺血/再灌注心肌细胞凋亡和 bcl-2/Bax 蛋白表达的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2011,9(1):55-57

15 Ryu B, Ahn BN, Kang KH, et al. Dioxinohydroeckol protects human keratinocyte cells from UVB-induced apoptosis modulated by related genes Bax/bcl-2 and caspase pathway[J]. J Photochem Photobiol B, 2015,153:352-357 (收稿日期:2016-03-10)

(修回日期:2016-06-17)