

大黄素通过调节 TGF- β 1、Smad4 抑制人胰腺癌的血管生成

徐锦波 陈敏远 徐宏涛

摘要 **目的** 探讨大黄素是否抑制胰腺癌的血管生成及其机制。**方法** 建立胰腺癌 SW1990 细胞裸鼠原位移植瘤动物模型(SOI),分为对照组(N组)、20mg/kg 大黄素组(E₂₀组)、40mg/kg 大黄素组(E₄₀组)和 80mg/kg 大黄素组(E₈₀组)。采用免疫组织化学染色法检测肿瘤组织 CD34 的表达,从而确定其微血管密度(MVD)。通过 RT-PCR 法分析肿瘤新生血管相关的 TGF- β 1、Smad4 因子的表达,Western blot 法分析肿瘤新生血管相关的 TGF β 1、Smad4 的表达。**结果** 免疫组织化学染色显示大黄素组 MVD 比对照组均显著减少,而且 MVD 与大黄素用药浓度呈负相关。大黄素降低 TGF- β 1 的 mRNA 表达水平,并且与剂量呈负相关,E₄₀和 E₈₀相对于对照组水平显著降低($P < 0.05$)。同时,大黄素明显增加 Smad4 基因 mRNA 的表达水平。Smad4 基因在 E₂₀、E₄₀和 E₈₀组相对于对照组均显著提高($P < 0.05$)。Western blot 法与 mRNA 水平的差异相符合,不同剂量的大黄素较对照组上调 Smad4 在胰腺癌组织中的相对蛋白水平($P < 0.05$),而下调了 TGF- β 1 的蛋白表达。**结论** 大黄素对裸鼠体内人胰腺癌 SW1990 细胞原位移植瘤的新生血管抑制作用效果显著。其机制可能是大黄素改变新生血管相关的 TGF- β 1、Smad4 的表达有关。

关键词 大黄素 胰腺癌 新生血管 TGF- β 1 Smad4

中图分类号 R965

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.10.040

Emodin Inhibits the Angiogenesis of Pancreatic Cancer by Regulating the TGF- β 1 and Smad4. Xu Jinbo, Chen Minyuan, Xu Hongtao. The Central Hospital of Lishui, Zhejiang 323000, China

Abstract **Objective** To investigate whether emodin suppresses angiogenesis in pancreatic cancer. **Methods** A nude mouse pancreatic cancer xenograft model was established with SW1990 human pancreatic cancer cells by surgical orthotopic implantation. Different doses of emodin were injected into the abdominal cavities of the tumor-bearing mouse models and controls 3 times weekly for 2 weeks. The expression of CD34 was detected by immunohistochemistry, and microvessel density was calculated. Quantitative RT-PCR and Western blot were performed to determine the mRNA and protein expressions of TGF- β 1 and Smad4. **Results** A negative dose-dependent association was found among emodin treatments about the weight of tumors. Emodin was associated with lower levels of TGF- β 1 mRNA and protein, and higher levels of the mRNAs and proteins Smad4. **Conclusion** Emodin may repress angiogenesis in pancreatic cancer by altering activities of the TGF- β 1 and Smad4.

Key words Emodin; Pancreatic cancer; Angiogenesis; TGF- β 1; Smads

胰腺癌是胰腺的外分泌腺癌,为临床上常见的消化系统恶性肿瘤,在全部恶性肿瘤中列第4位^[1]。由于胰腺位置的特殊性,发病隐匿,因此多数胰腺癌患者在确诊时已达局部晚期或有远处转移,治疗效果不佳,近年来5年生生存率虽有提高,但仍 $< 6\%$ ^[1,2]。吉西他滨作为晚期胰腺癌化疗的标准用药^[3],在临床应用中可使多数胰腺癌患者逐步耐药,而且其化疗毒性不良反应强,价格贵。因此,寻找一种廉价、低毒性及低耐药率的药物成了当务之急。

大黄素(emodin)是一种蒽醌类物质,研究表明,大黄素作为一种重要的中药,能抑制多种恶性肿瘤细胞生长并诱导凋亡,而且毒性低,价格便宜^[4-6]。最近的研究发现,大黄素也能通过抑制肿瘤新生血管的形成,从而抑制肿瘤的生长^[7]。本研究通过建立胰腺癌裸鼠原位移植瘤模型(surgical orthotopic implantation, SOI)观察大黄素在裸鼠体内对胰腺癌肿瘤新生血管相关的 TGF- β 1、Smad4 表达的影响,并初步探讨大黄素抑制胰腺癌新生血管形成的作用机制。

材料与方法

1. 实验动物:5~6周龄 BALB/c nu/nu 雄性裸小鼠,体重 20~22g,购于中科院上海实验动物中心。

作者单位:323000 丽水市中心医院

通讯作者:徐宏涛,主任医师,电子信箱:xujinbo0108@163.com

饲养于温州医科大学动物实验中心 SPF 级屏障系统的洁净层流架内,控制室温在 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $40\% \sim 60\%$ 。

2. 试验试剂:大黄素(emodin)购于美国 Sigma 公司,兔抗人 TGF- β 1 抗体购于美国 Abcam 公司,鼠抗人 Smad4 抗体购于美国 Santa Cruz 公司,SW1990 细胞株购于美国组织细胞库(ATCC)。

3. 人胰腺癌 SW1990 细胞的培养和传代:SW1990 细胞培养于 37°C , $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中,使用含 10% 胎牛血清、 100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素的 RPMI1640,细胞单层贴壁生长至 $70\% \sim 80\%$ 时胰蛋白酶消化传代。

4. 人胰腺癌裸鼠原位移植瘤模型建立:皮下移植瘤制备: 75% 乙醇消毒裸小鼠皮肤,取 $(2 \sim 3) \times 10^6$ 对数生长期的 SW1990 细胞行裸鼠右腿背部皮下注射,建立胰腺癌裸鼠皮下移植瘤。待肿瘤体积生长至约 1cm^3 ,无菌条件下取出皮下移植瘤,去除肿瘤坏死部分,选取健康肿瘤组织剪成 1mm^3 的瘤块待用。裸鼠原位移植瘤建立: 2% 戊巴比妥钠(50mg/kg)腹腔注射麻醉裸鼠, 75% 乙醇消毒裸鼠腹部皮肤,取左上腹直肌旁 1cm 切口,暴露脾脏和胰腺尾部,剪开胰腺被膜,将 1mm^3 瘤块植入胰尾,用 8-0 可吸收缝合线缝合胰尾被膜,移植成功后分两层关闭腹壁,共制备 40 只裸鼠。以上所有移植瘤模型制作过程的所有操作均在超净台内完成。

5. 不同剂量的大黄素对人胰腺癌裸鼠模型的影响:建模 3 周后,将 40 只 BALB/c 雄性裸鼠按体重随机分为 4 组:对照组(N 组), 20mg/kg 大黄素组(E_{20} 组), 40mg/kg 大黄素组(E_{40} 组)和 80mg/kg 大黄素组(E_{80} 组)^[8],每组 10 只。分组当天即开始用药,均采取腹腔注射给药,对照组给予 DMSO 终浓度 $<0.1\%$ 的生理盐水,每周 3 次,共 2 周。末次用药后 1 周处死裸鼠,取瘤体组织称重。新鲜肿瘤组织存于液氮中供 RT-PCR 和 Western blot 法检测使用。

6. 免疫组织化学染色法检测 CD34,计算微血管密度 MVD:免疫组织化学检测 CD34。低倍镜($\times 100$)下寻取血管热点区域,然后高倍镜($\times 400$)下随机选择 5 个视野,计数每个视野中 CD34 阳性细胞数,即为微血管密度(microvessel density, MVD)。

7. 定量 RT-PCR 法分析大黄素对 TGF- β 1、Smad4 mRNA 表达的影响:按照 Trizol 试剂盒使用说明从组织中提取总 RNA。反转录试剂盒由 Fermentas 公司提供,按照 SYBR Premix Ex Taq TM II 试

剂盒说明书进行 RT-PCR 操作。试验所需引物序列见表 1。

表 1 定量 RT-PCR 所用引物列表

定量 RT-PCR	序列(5'→3')
TGF- β 1 上游引物	CAATTCCTGGCGATACCTCAG
下游引物	GCACAACCTCCGGTGACATCAA
Smad4 上游引物	CCACCAAGTAATCGTGACATCG
下游引物	TGGTAGCATTAGACTCAGATGGG
β -actin 上游引物	CATTGCCGACAGGATGCAG
下游引物	CTCGTCATACTCTGCTTGCTG

8. Western blot 法分析蛋白表达:用常规方法提取各组肿瘤细胞的总蛋白,BCA 方法定量蛋白浓度。 12% SDS-PAGE 凝胶电泳,湿转膜法转膜,用含 5% 无脂牛奶 TBST 封闭,滴加抗体 4°C 孵育过夜,HRP 标记的二抗孵育 2h,用 ECL 发光液显色。

9. 统计学方法:应用 Totallab 2.1 软件分析 Western 印迹图像,由 LightCycler Real Time PCR 扩增仪获取实验数据。实验数据采用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,所有数据用 SPSS 17.0 统计学软件 ANOVA 方差分析进行统计分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 大黄素抑制原位移植胰腺癌的生长:不同剂量的大黄素最后一次治疗后 7 天,戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,处死裸鼠并测量肿瘤的重量(表 2)。 E_{40} 和 E_{80} 组的瘤重均显著低于对照组和 E_{20} 组。对照组与 E_{20} 组($P > 0.05$)之间的平均肿瘤重量差异无统计学意义($P < 0.05$)。因此,大黄素治疗的荷瘤小鼠用 40mg/kg 即可有效地抑制肿瘤生长。

表 2 大黄素对裸鼠体内胰腺癌生长的影响

组别	n	瘤重(g)	抑瘤率*(%)
对照组(N 组)	10	0.775 ± 0.167	
20mg/kg 大黄素组(E_{20} 组)	10	0.635 ± 0.110	18.1
40mg/kg 大黄素组(E_{40} 组)	10	$0.456 \pm 0.104^{\#}$	41.2
80mg/kg 大黄素组(E_{80} 组)	10	$0.317 \pm 0.325^{\#}$	59.1

* 抑瘤率(%) = $(1 - \text{治疗组平均肿瘤}/\text{对照组平均瘤重}) \times 100\%$;与对照组比较, $^{\#}P < 0.05$

2. 大黄素显著降低原位移植胰腺癌的血管生成:通过免疫组化 CD34 阳性细胞的数量分析和计算 MVD(图 1,表 3),证实大黄素可显著抑制胰腺癌的

血管生成。相较于对照组, MVD 在 E_{20} 、 E_{40} 和 E_{80} 组均显著减小。此外, 用 20mg/kg 大黄素治疗荷瘤裸鼠可显著降低胰腺癌组织中的血管生成。

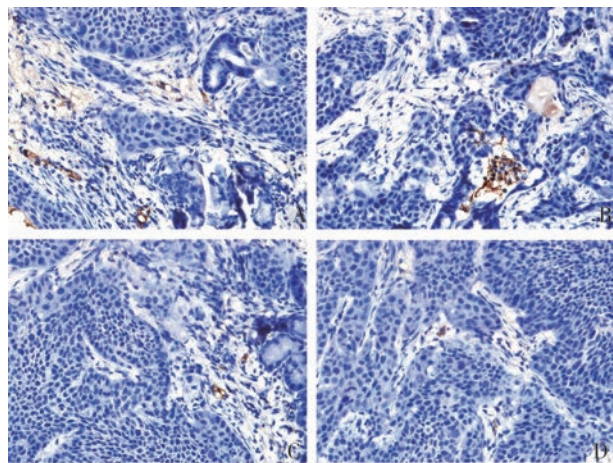


图1 免疫组化法检测在高倍镜下 CD34 阳性 ($\times 400$)

A. 对照组; B. E_{20} 组; C. E_{40} 组; D. E_{80} 组

表3 大黄素对胰腺癌裸鼠原位移植瘤 MVD 的影响

组别	MVD
对照组 (N 组)	17.2 ± 1.3
20mg/kg 大黄素组 (E_{20} 组)	$12.4 \pm 1.6^*$
40mg/kg 大黄素组 (E_{40} 组)	$5.8 \pm 1.8^*$
80mg/kg 大黄素组 (E_{80} 组)	$4.6 \pm 1.5^*$

与对照组比较, $^* P < 0.05$

3. 大黄素降低 TGF- $\beta 1$ mRNA 表达水平, 而增加了 Smad4 mRNA 的表达: 检测与血管生成相关的 TGF- $\beta 1$ 和 Smad4 蛋白基因表达水平, 大黄素降低 TGF- $\beta 1$ 的 mRNA 表达水平, 并且剂量呈负相关。 E_{40} 和 E_{80} 相对于对照组水平显著降低 ($P < 0.05$)。同时, 大黄素明显增加 Smad4 基因 mRNA 的表达水平, 而且 E_{20} 、 E_{40} 、 E_{80} 相对于对照组均显著提高 ($P < 0.05$, 图 2), 呈剂量依赖性表现。

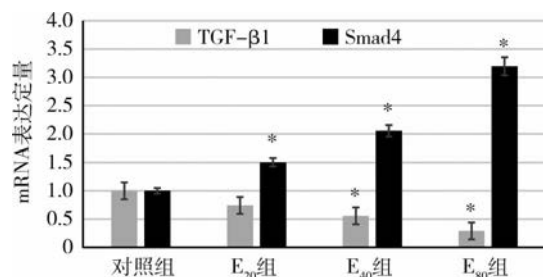


图2 大黄素治疗后, 血管生成相关的 TGF- $\beta 1$ 和 Smad4 在各组荷瘤裸鼠中 mRNA 表达的量化

与对照组比较, $^* P < 0.05$

4. 大黄素降低 TGF- $\beta 1$ 蛋白表达水平, 而增加了 Smad4 的蛋白表达: Western blot 法检测结果显示与 mRNA 水平的差异相符合, 不同剂量的大黄素较对照组均上调 Smad4 在胰腺癌组织中的相对蛋白水平 ($P < 0.05$, 图 3)。同样, 大黄素下调 TGF- $\beta 1$ 在胰腺癌组织蛋白水平, E_{40} 和 E_{80} 组与对照组之间的比较差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 4)。

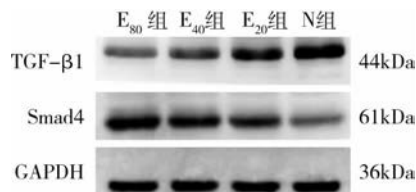


图3 Western blot 法检测对照组、 E_{20} 组、 E_{40} 组和 E_{80} 组各组肿瘤组织中 TGF- $\beta 1$ 和 Smad4 的蛋白表达

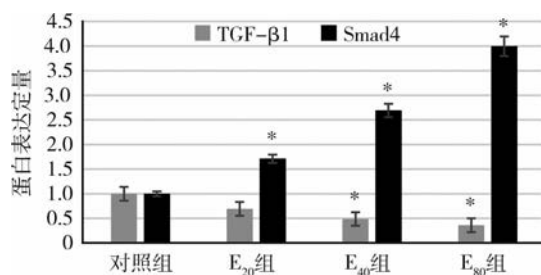


图4 各组肿瘤组织中 TGF- $\beta 1$ 和 Smad4 的蛋白表达的量化

与对照组比较, $^* P < 0.05$

讨 论

肿瘤的发生、发展除了肿瘤本身的因素外, 肿瘤微环境在肿瘤发生中起着至关重要的作用。持续的血管生成是肿瘤的特点和癌细胞转移的关键。肿瘤的增殖依赖其周围原有的血液血管系统。但是, 当肿瘤体积超过 $1 \sim 2 \text{ mm}^3$ 时, 既存的血管供给养分已不足以维持肿瘤进一步生长, 因此生产新的血管或血管生成, 是肿瘤继续生长所必需的。早在 1971 年, Folkman^[9] 曾提出肿瘤的生长依赖于血管生成 (angiogenesis)。

在本研究中笔者发现, 大黄素治疗胰腺癌是以剂量依赖的方式抑制其生长的。既往多项研究表明, 大黄素可通过抑制多种血管内皮细胞增殖及其功能而抑制血管生长的生物学效应^[10, 11]。本研究中, 笔者课题组通过微血管密度 (MVD) 来评价大黄素在治疗胰腺癌裸鼠原位移植肿瘤模型中的抗血管生成特性。结果证实与对照组比较, 大黄素治疗组的微血管密度

显著降低,与之前相关文献报道相符^[7]。这些数据表明,大黄素抑制肿瘤生长的机制可能与抑制肿瘤血管生成有关。

肿瘤血管新生由各种血管促进因子和抑制因子相互调控的动态过程。TGF- β /Smads 信号转导通路在许多肿瘤中发挥着抑制肿瘤信号转导的作用,通路中任一元件异常都可引起 TGF- β /Smads 信号转导紊乱^[12]。其中 TGF- β 1、Smad4 尤为关键。TGF- β 对肿瘤的作用是多方面的。在肿瘤发生的早期阶段,TGF- β 具有抑制细胞增殖,促进细胞分化,诱导细胞凋亡的作用;随着肿瘤进展,TGF- β 可抑制免疫功能,增加血管新生而促进肿瘤的侵袭^[13]。TGF- β 依次与细胞膜表面具有丝氨酸/苏氨酸激酶活性的 TGF- β 受体 II (T β R II) 和 TGF- β 受体 I (T β R I) 结合形成复合物,随后 Smads 亦被磷酸化并诱导其复合物转至细胞核内。磷酸化的 Smad 蛋白转运到细胞核,调节一系列基因的转录。在胰腺癌^[14]、胆囊癌、乳腺癌和直肠癌等多种病例中,均发现了 T β R I、T β R II 基因发生突变,导致肿瘤血管新生而无限增殖。

Smads 蛋白家族是 TGF- β 信号通路的关键组成部分。研究表明,超过一半以上的胰腺癌都有 TGF- β /Smads 信号转导异常,其发生机制主要是 Smad 基因家族突变(主要为 Smad4)以及 TGF- β 超家族及其受体的改变。在胰腺癌患者中,接近 50% 的患者有 Smad4 基因突变,其发生率与 KRAS、P53 和 p16INK4A 蛋白发生突变的概率相当^[15]。然而,Smad4 蛋白基因的失活突变通常是肿瘤发生过程中晚期事件。本研究通过对裸鼠胰腺癌原位移植瘤组织中 TGF- β 1、Smad4 因子进行了 mRNA 和蛋白的检测,结果显示大黄素可下调 TGF- β 1 的表达,并上调 Smad4 表达。其机制可能是大黄素通过抑制 TGF- β 1 的表达,增强 TGF- β 1 依次与 T β R II、T β R I 结合形成复合物的能力,且影响其与下游位点的结合,尤其是 Smad4 的结合而调节 TGF- β /Smads 信号转导通路,从而抑制裸鼠胰腺癌原位移植瘤血管新生。

综上所述,在胰腺癌裸鼠原位移植模型中,大黄素可通过调节 TGF- β 1、Smad4 的表达而抑制胰腺癌的血管生成,其具体机制有待于进一步研究。本的研究结果表明,大黄素作为传统中药,可通过多种途径抑制胰腺癌的发展,为研究肿瘤治疗提供了新的思

路,这表明大黄素在腺癌的治疗方面是一种很有前途的天然药物。

参考文献

- 1 Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013[J]. CA Cancer J Clin, 2013, 63(1): 11-30
- 2 Hidalgo M. Pancreatic cancer[J]. N Engl J Med, 2010, 362(17): 1605-1617
- 3 Tempero MA, Behrman S, Ben-Josef E, et al. Pancreatic adenocarcinoma: Clinical Practice Guidelines in Oncology[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2005, 3(5): 598-626
- 4 Su YT, Chang HL, Shyue SK, et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 70(2): 229-241
- 5 Guo Q, Chen Y, Zhang B, et al. Potentiation of the effect of gemcitabine by emodin in pancreatic cancer is associated with survivin inhibition[J]. Biochem Pharmacol, 2009, 77(11): 1674-1683
- 6 Lin SY, Lai WW, Ho CC, et al. Emodin induces apoptosis of human tongue squamous cancer SCC-4 cells through reactive oxygen species and mitochondria-dependent pathways[J]. Anticancer Res, 2009, 29(1): 327-335
- 7 Lin SZ, Wei WT, Chen H, et al. Antitumor activity of emodin against pancreatic cancer depends on its dual role: promotion of apoptosis and suppression of angiogenesis[J]. PLoS One, 2012, 7(8): e42146
- 8 Liu JX, Zhang JH, Li HH, et al. Emodin induces Panc-1 cell apoptosis via declining the mitochondrial membrane potential[J]. Oncol Rep, 2012, 28(6): 1991-1996
- 9 Folkman J. Fundamental concepts of the angiogenic process[J]. Curr Mol Med, 2003, 3(7): 643-651
- 10 Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications[J]. N Engl J Med, 1971, 285(21): 1182-1186
- 11 Kaneshiro T, Morioka T, Inamine M, et al. Anthraquinone derivative emodin inhibits tumor-associated angiogenesis through inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation[J]. Eur J Pharmacol, 2006, 553(1-3): 46-53
- 12 Kimura Y, Sumiyoshi M, Taniguchi M, et al. Antitumor and antimetastatic actions of anthrone-C-glucoside, cassialoin isolated from Cassia garrettiana heartwood in colon 26-bearing mice[J]. Cancer Sci, 2008, 99(11): 2336-2348
- 13 Itoh S, Ten DP. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction[J]. Curr Opin Cell Biol, 2007, 19(2): 176-184
- 14 Moustakas A, Heldin CH. Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression[J]. Cancer Sci, 2007, 98(10): 1512-1520
- 15 Miyazono K. TGF-beta/SMAD signaling and its involvement in tumor progression[J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23(10): 1125-1130

(收稿日期:2017-02-16)

(修回日期:2017-02-23)