

从细胞自噬角度探讨紫草多糖抑制H₂₂肝癌实体瘤细胞增殖的作用机制

陈 奇*,陈松海,陈小凯(广东省人民医院/广东省医学科学院药学部,广州 510080)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)34-4811-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.34.18

摘 要 目的:探讨紫草多糖是否通过诱导自噬而抑制H₂₂肝癌实体瘤细胞的增殖。方法:将40只KM小鼠随机分为模型组、环磷酰胺组(阳性药物,30 mg/kg, ip, 每4 d给药1次)和紫草多糖低、高剂量组(100、300 mg/kg, ig, 每天给药1次),每组10只。各组小鼠均腋下接种H₂₂细胞株复制H₂₂肝癌实体瘤模型,造模同时各给药组小鼠给予相应药物,模型组小鼠ig等体积生理盐水。末次给药后,记录并测定小鼠体质量、瘤质量系数和胸腺、脾脏指数;采用实时荧光定量聚合酶链式反应法测定小鼠瘤组织中自噬相关基因Atg5、Beclin1 mRNA表达水平;Western blot法测定瘤组织中自噬微管相关蛋白1轻链3A/B(LC3A/B)蛋白表达水平。结果:紫草多糖可显著降低H₂₂实体瘤小鼠的瘤质量系数,抑瘤率达34.7%;可显著上调瘤组织中自噬相关基因Atg5、Beclin1 mRNA的表达和LC3A/B蛋白的表达,较模型组差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论:紫草多糖通过促进肝癌细胞的自噬,从而抑制H₂₂肝癌实体瘤细胞的增殖,延缓肿瘤生长。
关键词 紫草多糖;自噬;H₂₂肝癌实体瘤;小鼠;增殖

Discussion on Inhibitory Effect Mechanism of *Lithospermum erythrorhizon* Polysaccharide on the Proliferation of H₂₂ Hepatoma Solid Tumor Cells in Mice Based on Autophagy

CHEN Qi, CHEN Songhai, CHEN Xiaokai (Dept. of Pharmacy, Guangdong Provincial People's Hospital/Guangdong Academy of Medical Science, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate whether *Lithospermum erythrorhizon* polysaccharide inhibit the proliferation of H₂₂ hepatoma solid tumor cells in mice through inducing autophagy. METHODS: 40 KM mice were randomly divided into model group, cyclophosphamide group (30 mg/kg, ip, once for every 4 d), *L. erythrorhizon* polysaccharide low-dose and high-dose groups (100, 300 mg/kg, ig, once a day), with 10 mice in each group. H₂₂ hepatoma solid tumor model was induced of mice in each group by incubating H₂₂ cell line. Treatment groups were given relevant medicine during modeling, and model group was given constant volume of normal saline intragastrically. After last medication, body weight, tumor weight coefficient, thymus and spleen index were recorded and determined. The mRNA expression of autophagy related genes, such as Atg5 and Beclin1, were measured by using Real-time PCR. The protein expression of autophagic microtubule-associated protein 3A/B (LC3A/B) was detected by Western blot assay. RESULTS: *L. erythrorhizon* polysaccharide could significantly reduce tumor weight coefficient of H₂₂ solid tumor, with tumor inhibitory rate of 34.7%; it also significantly up-regulated the mRNA expression of autophagy related genes Atg5 and Beclin1 and the protein expression of LC3A/B, with statistical significance compared to model group ($P<0.05$ or $P<0.01$). CONCLUSIONS: *L. erythrorhizon* polysaccharide can inhibit the proliferation of H₂₂ hepatoma solid tumor cells and slow down the growth of tumor through promoting hepatoma cell autophagy.
KEYWORDS *Lithospermum erythrorhizon* polysaccharide; Autophagy; H₂₂ hepatoma solid tumor; Mice; Proliferation

紫草为紫草科植物新疆紫草 *Arnebia euchroma* (Royle) Johnston.或内蒙紫草 *Arnebia guttata* Bunge 的干燥根,春、秋二季采挖,除去泥沙,干燥即得^[1]。研究表明,紫草具有多种生理、药理活性,如抗炎、解热、镇痛、抗病原微生物、抗肿瘤等^[2],具有凉血活血、解毒透疹等功效。紫草多糖是紫草中一种重要的活性成分,也是紫草发挥抗肿瘤作用的主要活性成分,对多种肿瘤(如宫颈癌U14实体瘤、S180腹水瘤等)均具有明显的抑制作用^[3-4]。自噬是一种依赖溶酶体的胞内降解过程,普遍存在于真核细胞中,细胞通过自噬能清除细胞中损伤或衰老的细胞器及生物大分子,是一种维持自身稳态的重要调节机制^[5],影响着细胞的多种生理功能。研究表明,自噬与肿瘤细胞的增殖存在一定关系,促进自噬可以抑制肿瘤细胞的增殖^[6]。目前,尚未见关于紫草多糖对人H₂₂肝癌实体瘤的增殖及自噬水平的影响的研究,故本研究从H₂₂肝癌实体瘤增殖情况、小鼠免疫和自噬水平出发,考察紫草多糖对H₂₂肝癌实体瘤小鼠的免疫、自噬水平和瘤细胞增殖的影响,旨在从自噬角度考察紫

草多糖抑制H₂₂肝癌实体瘤的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

EL204电子分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司];MEGAFUGE2.0R低温高速离心机(德国Hermle公司);7500实时荧光定量聚合酶链式反应(RT-PCR)仪(美国ABI公司);Tanon 5200天能凝胶成像系统(上海天能化学有限公司)。

1.2 药品与试剂

注射用环磷酰胺(山西普德药业有限公司,批号:20140308,规格:每支0.2 g);自噬微管相关蛋白1轻链3A/B(LC3A/B)抗体(美国CST公司);内参GAPDH抗体(上海吉泰依科赛生物科技有限公司);羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)二抗(美国Abbkine公司);PCR试剂盒、RNA提取试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司,批号:K6101、A7505-1];其余试剂均为分析纯。

1.3 药材

紫草(康美药业股份有限公司,批号:140513),经广州中医药大学博物馆张秋镇副教授鉴定为紫草科植物新疆紫草

*副主任药师。研究方向:医院药学。电话:020-81884713-80560。E-mail:1466692092@qq.com

Arnebia euchroma (Royle) Johnst.的干燥根。

1.4 细胞株与动物

小鼠肝癌H₂₂瘤株购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心(资源编号:3111C0001CCC000309)。SPF级KM小鼠40只,♀♂各半,体质量18~22 g,购自广州中医药大学实验动物中心[实验动物生产许可证号:SCXK(粤)2013-0020],自由摄食,在室温为20~25℃、相对湿度为50%~70%、昼夜循环(12 h:12 h)的环境下饲养。

2 方法

2.1 紫草多糖的制备

取干燥紫草200 g,按照文献[7]中方法提取紫草多糖,得紫草粗多糖9.34 g(得率为4.67%)。经苯酚-硫酸法测定多糖含量为20.31%,用生理盐水溶解成以粗多糖计质量浓度分别为100、300 mg/ml的溶液,过滤除菌,分装后于4℃条件下保存,备用。

2.2 分组、造模与给药

将小鼠适应性饲养1周后随机分为4组,分别为模型组、环磷酰胺(阳性药物)组和紫草多糖低、高剂量组,每组10只。各组小鼠均采用腋下接种H₂₂肝癌细胞株复制H₂₂实体瘤小鼠模型^[7]。造模5 d左右,可在接种部位摸到小圆球的实体肿瘤块,提示造模成功。在造模同时给药,紫草多糖低、高剂量组小鼠分别ig紫草多糖100、300 mg/kg(给药剂量依据预实验结果设置),每天1次,连续3周;环磷酰胺组小鼠ip环磷酰胺30 mg/kg(根据临床给药剂量换算而得),每4天给药1次,连续3周,共给药5次;模型组小鼠ig等体积生理盐水,每天1次,连续3周。

2.3 标本收集

小鼠末次给药后禁食12 h,称定体质量,然后颈椎脱臼处死,剪取肿瘤块组织,称定瘤质量并计算瘤质量系数[瘤质量系数=瘤质量(mg)/体质量(g)]和抑瘤率[抑瘤率=(模型组平均瘤质量-给药组平均瘤质量)/模型组平均瘤质量×100%]。剪取瘤组织于-80℃条件下保存,备用。剪取胸腺、脾脏,称定质量并计算脏器指数[脏器指数=脏器质量(mg)/体质量(g)]。

2.4 RT-PCR法测定瘤组织中自噬相关基因mRNA的表达水平

严格按RNA提取试剂盒说明书提取瘤组织总RNA,加入20 μl无RNA酶水溶解沉淀;核酸蛋白分析仪检测A₂₆₀/A₂₈₀值,比值大于1.8而小于2.2为宜。将RNA逆转录后进行扩增,以GAPDH为内参,应用Primer Express 5.0软件在CDS区设计特异性引物,并由上海生工生物工程技术有限公司合成,引物序列:Atg5,上游为5'-GCCTTTCATCCAGAAGCTG-3',下游为5'-TCATCACCTGGCTCCTCTTC-3',产物长度为131 bp;Beclin1,上游为5'-AGCCTCTGAACTGGACACG-3',下游为5'-CCTCTTCCTCTGGGTCTCT-3',产物长度为117 bp。反应体系:cDNA 2.4 μl,SYBR Premix Ex Taq II混合物10 μl,上、下游引物各0.4 μl,校正染料ROX Reference Dye II 0.4 μl,蒸馏水6.8 μl,体系共20 μl;反应条件:95℃、30 s,95℃、15 s,60℃、1 min,共40个循环,进行PCR扩增。以扩增公式2^{-ΔΔC_t}对目的基因mRNA的表达量进行分析计算。

2.5 Western blot法测定瘤组织中LC3A/B蛋白的表达水平

取瘤块加入裂解液,全自动匀浆机制备瘤组织匀浆,离心后得到总蛋白提取物;采用二喹啉甲酸(BCA)试剂盒测定蛋白浓度。根据十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)凝胶配制试剂盒说明书配制10%分离胶和5%浓缩胶。上样:每20 μl蛋白提取液加入5 μl加样缓冲液>Loading buffer,5×),将样品(20 μl)和预染标志蛋白(Marker)5 μl上样至SDS-PAGE

胶加样孔内。恒压80 V、20 min跑浓缩胶,恒压120 V、110 min跑分离胶。电泳后取出凝胶,200 mA恒流转聚偏二氟乙烯(PVDF)膜45 min。电转结束后,用TBST缓冲液摇床洗膜,5%小牛血清蛋白(BSA)封闭1 h。根据一抗的说明书,采用5% BSA封闭液稀释一抗LC3A/B(1:1 000)、内参GAPDH抗体(1:500),4℃孵育过夜;室温孵育羊抗兔IgG二抗90 min, TBST洗膜。利用ECL化学发光液显影,凝胶成像系统进行发光检测,Image Pro Plus 6.0软件分析凝胶图像的光密度值。以目的蛋白条带与内参GAPDH条带光密度值的比值表示目的蛋白的相对表达水平。

2.6 统计学方法

采用SPSS 22.0软件进行统计分析。所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 紫草多糖对H₂₂荷瘤小鼠脏器系数的影响

与模型组比较,环磷酰胺组小鼠的脾脏系数、胸腺系数均显著降低($P < 0.01$),这提示环磷酰胺对小鼠脾脏和胸腺有较强毒性,对免疫系统具有明显的抑制作用;而紫草多糖低、高剂量紫草多糖均可一定程度地增加H₂₂荷瘤小鼠脾脏、胸腺系数,这提示紫草多糖可一定程度改善小鼠免疫系统功能,但差异无统计学意义($P > 0.05$),结果详见表1。

表1 各组小鼠脏器系数测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 1 Viscera indexes of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
组别	剂量,mg/kg	胸腺系数,mg/g	脾脏系数,mg/g
模型组		2.42 ± 1.07	3.24 ± 0.75
环磷酰胺组	30	0.66 ± 0.39**	1.14 ± 0.43**
紫草多糖低剂量组	100	3.01 ± 1.13	3.50 ± 1.05
紫草多糖高剂量组	300	3.20 ± 1.07	3.74 ± 1.28

注:与模型组比较,** $P < 0.01$

Note:vs. model group,** $P < 0.01$

3.2 紫草多糖对H₂₂荷瘤小鼠瘤质量系数和抑瘤率的影响

与模型组比较,各给药组小鼠瘤质量系数显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);低、高剂量紫草多糖对H₂₂肝癌实体瘤有明显的抑制作用,且抑瘤率随着剂量增加而升高,结果详见表2。

表2 各组小鼠瘤质量系数和抑瘤率测定结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab 2 Tumor weight coefficient and tumor inhibitory rate of mice in each group($\bar{x} \pm s, n = 10$)			
组别	剂量,mg/kg	瘤质量系数,mg/g	抑瘤率,%
模型组		38.08 ± 13.01	
环磷酰胺组	30	14.43 ± 5.02**	54.9
紫草多糖低剂量组	100	28.02 ± 8.19*	13.5
紫草多糖高剂量组	300	21.12 ± 9.27**	34.7

注:与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note:vs. model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

3.3 紫草多糖对H₂₂荷瘤小鼠瘤组织中自噬相关基因mRNA表达的影响

与模型组比较,环磷酰胺组和紫草多糖低、高剂量组小鼠瘤组织中Atg5、Beclin1 mRNA表达水平均升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),这提示紫草多糖可一定程度地促进肿瘤细胞的自噬,从而抑制肿瘤增殖,结果详见图1。

3.4 紫草多糖对H₂₂荷瘤小鼠瘤组织中自噬调控蛋白LC3A/B蛋白表达的影响

与模型组比较,环磷酰胺组和紫草多糖低、高剂量组小鼠瘤组织中LC3A/B蛋白表达水平升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),这提示紫草多糖可通过促进肿瘤细胞的自噬活动从而抑制H₂₂肝

癌细胞的异常增殖,结果详见图2、图3。

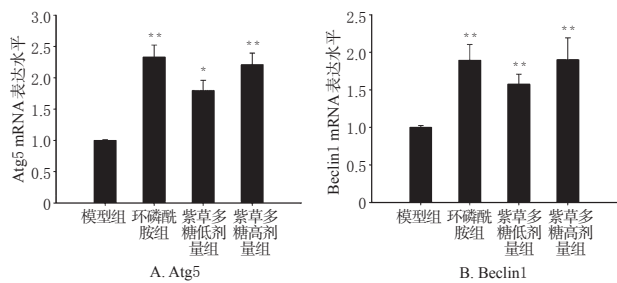


图1 各组小鼠瘤组织Atg5、Beclin1 mRNA表达水平测定结果
注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Fig 1 The mRNA levels of Atg5 and Beclin1 in tumor tissue of mice in each group
Note: vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

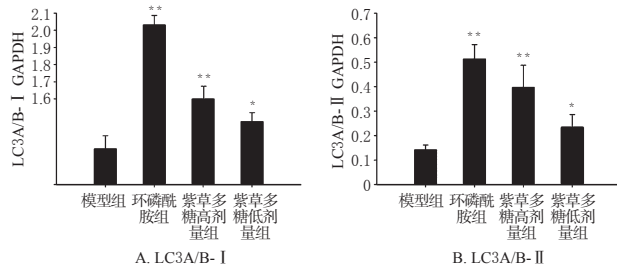


图2 各组小鼠瘤组织中LC3A/B蛋白表达测定结果
注:与模型组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

Fig 2 The protein expression of LC3A/B in tumor tissue of mice in each group
Note: vs. model group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$

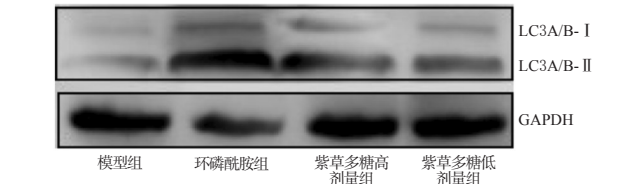


图3 各组小鼠瘤组织中LC3A/B蛋白表达电泳图
Fig 3 Electropherogram of protein expression of LC3A/B in tumor tissue of mice in each group

4 讨论

紫草多糖是紫草水溶性提取物,多糖含量在30%左右,具有增强机体特异性和非特异性免疫的作用^[8]。此外,紫草多糖还对S180荷瘤小鼠具有明显的抑瘤作用,其机制与紫草多糖改善红细胞膜流动性和带3蛋白有关^[9],随后也被证实其可影响荷瘤小鼠红细胞膜磷脂脂肪酸的含量与组分,增强了膜的流动性,从而调整红细胞的免疫功能^[10]。此外,紫草多糖还可以诱导荷瘤小鼠体内肿瘤坏死因子 α (TNF- α)和 γ 干扰素 (IFN- γ)的生成,增加机体免疫功能,抑制瘤体增殖^[3]。本研究表明,紫草多糖对H₂₂肝癌实体瘤的增殖有显著的抑制作用,高剂量紫草多糖作用下抑瘤率达34.7%;紫草多糖还可以明显提高H₂₂荷瘤小鼠胸腺、脾脏系数,这提示紫草多糖可以改善H₂₂荷瘤小鼠的免疫系统功能。

自噬是自噬溶酶体对其包裹的细胞质内含物进行降解的一种分解代谢过程^[11]。自噬过程一般是在营养匮乏的条件下被激活,但是也与一些生理过程有关,如感染、肿瘤等^[12]。自噬与肿瘤的关系是近年来的研究热点。自噬在许多肿瘤发生、发展和治疗中均占有重要地位,其通过溶酶体降解胞质蛋白

和细胞器,调控肿瘤细胞的增殖^[13]。Atg5是形成自噬体必不可少的蛋白,有研究发现,Atg5也参与了细胞凋亡,其可被钙蛋白酶分解,抑制线粒体膜上的B淋巴细胞瘤2基因的活性,进而激活含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶级联反应,引发细胞凋亡^[14]。LC3最初被认定为是微管相关蛋白1A和1B的一个亚基,对于自噬起着至关重要的作用。LC3有LC3A、LC3B和LC3C 3种亚型,在自噬过程中翻译后被修饰,在Atg家族体系蛋白作用下,LC3-I被脂质化为LC3-II,从而将LC3与自噬小泡联系起来,影响着细胞的自噬水平^[15]。本研究结果显示,与模型组比较,紫草多糖可以明显上调自噬相关基因Atg5、Beclin1的表达,显著增加LC3的蛋白水平,与环磷酰胺作用趋势一致,这提示紫草多糖可能通过诱导自噬而抑制H₂₂肝癌实体瘤细胞的异常增殖。

综上,紫草多糖可通过诱导H₂₂肝癌实体瘤细胞的自噬,从而抑制瘤体增殖,但其作用机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:一部[S]. 2015年版. 北京:中国医药科技出版社,2015:340.
- [2] 吴振. 紫草素诱导肿瘤细胞凋亡作用机制的研究[D]. 沈阳:沈阳药科大学,2004.
- [3] 倪洋. 紫草多糖对S180荷瘤小鼠免疫器官及细胞因子TNF- α 和IFN- γ 的影响[J]. 黑龙江医药,2014,27(3):512.
- [4] 陈韩英,陈韩飞,李德芳,等. 新疆软紫草多糖体内抗肿瘤作用研究[J]. 中国现代应用药学,2010,27(12):1 061.
- [5] Doria A, Gatto M, Punzi L. Autophagy in human health and disease[J]. *N Engl J Med*,2013,368(19):1 845.
- [6] Vitale I, Manic G, Dandrea V, *et al*. Role of autophagy in the maintenance and function of cancer stem cells[J]. *Int J Dev Biol*,2015,59(1/2/3):95.
- [7] 程尧,奚胜艳,王彦晖,等. 慈济化癌保生汤对H22肝癌荷瘤化疗模型小鼠外周血细胞与脾脏造血因子的影响[J]. 中华中医药杂志,2016,31(4):1 245.
- [8] 卢贺起. 紫草多糖粗提物的药效作用研究[J]. 中国药理学会通讯,2000,17(4):26.
- [9] 张秀娟,穆坤,杨姗姗,等. 紫草多糖对S180荷瘤小鼠红细胞膜流动性与带3蛋白的影响[J]. 亚太传统医药,2007,3(9):30.
- [10] 张秀娟,秦睿. 紫草多糖对S180小鼠红细胞膜磷脂脂肪酸的影响[J]. 哈尔滨商业大学学报:自然科学版,2009,25(6):652.
- [11] Reggiori F, Klionsky DJ. Autophagy in the eukaryotic cell[J]. *Eukaryot Cell*,2002,1(1):11.
- [12] Levine B, Yuan J. Autophagy in cell death: an innocent convict? [J]. *J Clin Invest*,2005,115(10):2 679.
- [13] Tanida I. Autophagosome formation and molecular mechanism of autophagy[J]. *Antioxid Redox Signal*,2011,14(11):2 201.
- [14] Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, *et al*. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis[J]. *Nat Cell Biol*,2006,8(10):1 124.
- [15] Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, *et al*. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation[J]. *Nature*,2000,408(6 811):488.

(收稿日期:2016-06-06 修回日期:2016-10-11)
(编辑:林 静)