

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.24.003

文章编号: 1005-8982(2017)24-0011-06

二氢杨梅素对裸鼠腹腔移植人胃癌细胞中 Caveolin-1 表达的影响*

王佑权¹, 张帆¹, 周寿红²

(1. 南华大学附属第二医院 肿瘤外科, 湖南 衡阳 421001; 2. 南华大学医学院生理学教研室, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 目的 观察二氢杨梅素 (DMY) 对裸鼠腹腔移植人胃癌细胞生长的抑制作用及对腹腔瘤组织中 Caveolin-1 表达的影响。**方法** 复制人胃癌腹腔移植的裸鼠模型。将复模成功的 24 只裸鼠随机分为 4 组, 即移植瘤模型组, DMY 低、中及高剂量处理组。分别观察荷瘤裸鼠的腹腔移植瘤的生长和成瘤情况, 测量肿瘤的重量、长短径并计算肿瘤的体积。采用免疫组织化学法和 Western blot 检测人胃癌腹腔移植瘤腹腔瘤体中 Caveolin-1 和 Ki67 的表达。**结果** 与移植瘤模型组比较, 100 和 200 mg/(kg·d) DMY 中、高剂量组腹腔移植瘤成瘤个数, 腹腔瘤体的重量及腹腔瘤体的体积均降低, 呈现剂量依赖性 ($P < 0.05$), 裸鼠的食欲、活动情况和精神状态等一般情况改善。与移植瘤模型组比较, 100 和 200 mg/(kg·d) DMY 中、高剂量组腹腔移植瘤体表达 Caveolin-1 的阳性细胞百分率和 Caveolin-1 的蛋白表达水平均增加, 呈现剂量依赖性 ($P < 0.05$); 而 Ki67 的阳性细胞百分率和 Caveolin-1 的蛋白表达水平均降低, 也呈现剂量依赖性 ($P < 0.05$)。**结论** 二氢杨梅素以剂量依赖的方式抑制人胃癌腹腔移植瘤的生长, 其作用机制可能与上调 Caveolin-1 的表达有关。

关键词: 二氢杨梅素; 胃癌; 裸鼠; 腹腔移植瘤; 小凹蛋白-1

中图分类号: R735.2

文献标识码: A

Effect of Dihydromyricetin on caveolin-1 in nude mouse models of human gastric cancer*

You-quan Wang¹, Fan Zhang¹, Shou-hong Zhou²

(1. Department of Oncological Surgery, the Second Hospital of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China; 2. Department of Physiology, Medical College of University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China)

Abstract: Objective To investigate inhibitory effect of Dihydromyricetin (DMY) on the growth of gastric cancer and expression of caveolin-1 in nude mouse models of human gastric cancer. **Methods** Nude mouse models of peritoneal transplanted human gastric cancer was established. Twenty-four successfully transplanted nude mice were randomly divided into 4 groups: tumor group, tumor with low dose group [50 mg/(kg·d)], moderate dose group [100 mg/(kg·d)] and high dose group [200 mg/(kg·d)] of DMY. The growth rate and tumor size were monitored. The expression levels of caveolin-1 and Ki67 in tumors were tested by Immunohistochemistry and Western blot. **Results** The number, weight, and volume of tumors were significantly decreased in both tumor with moderate and high dose groups dose dependently when compared with the tumor group ($P < 0.05$). The appetite, activity and mental state of animals in the tumor with moderate and high dose groups were significantly improved in comparison with the tumor group. Immunohistochemistry and Western blot data indicated that the percentage of Caveolin-1 positive cells and expression level of protein

收稿日期: 2017-07-11

* 基金项目: 湖南省教育厅科研项目 (No: 11c1108)

[通信作者] 周寿红, E-mail: zhoushouhong@126.com

Caveolin-1 were significantly increased in the tumor with moderate and high dose groups when compared with the tumor group dose dependently ($P < 0.05$). Similarly, the percentage of Ki67 positive cells and expression level were significantly increased in the moderate and high dose groups when compared with the tumor group dose dependently ($P < 0.05$). **Conclusions** DMY inhibits the growth of peritoneal transplanted human gastric cancer in dose dependent manner and the mechanism may be related to upregulation of Caveolin-1.

Keywords: Dihydropyricetin; gastric cancer; nude mice; peritoneal transplantable tumor; Caveolin-1

在我国每年约有 36 万人死于胃癌,占女性恶性肿瘤死因的第 2 位,男性的第 3 位^[1]。胃癌的复发和转移是导致患者死亡的主要原因,进行过胃癌根治性术的患者,其 5 年生存率也只有 30%左右^[2]。因此,抑制胃癌浸润和转移是提高胃癌患者的生存率及生活质量的主要任务。然而目前,尽管在防治肿瘤转移的方面开展大量的研究,但效果仍然不理想。近年来,中医药肿瘤防治领域中作用和优势越来越受到人们的关注。藤茶是一种广泛分布于我国长江流域以南地区的药食两用植物,长期用作茶类植物和中草药。二氢杨梅素(dihydropyricetin, DMY)是一种二氢黄酮醇类化合物,主要从藤茶茎叶中提取。DMY 具有镇痛、抗炎、抗氧化、止咳及调节免疫功能等作用^[3-4]。近年来的研究发现,DMY 具有抗肿瘤的作用,研究显示 DMY 以剂量依赖的方式诱导肺癌细胞 A549 细胞的凋亡,下调 Bcl-2 的表达而上调 Bax 的表达^[5]。研究发现,DMY[100 mg/(kg·d)]灌胃处理减少小鼠乳腺癌肺转移瘤的瘤重和转移灶的数量^[6]。Caveolae-1 是 Caveolae 的标志性蛋白,Caveolin-1 通过磷酸化与去磷酸化的方式与基质金属蛋白酶、Paxilli 和 E-钙粘蛋白等信号分子产生相互作用,参与肿瘤细胞的黏附、增殖、凋亡及迁移等过程的调控^[7-8]。研究显示,抑制 Caveolin-1 的表达可促进胃癌细胞的生长和增生^[9]。因此,本研究拟观察 DMY 对裸鼠腹腔移植人胃癌细胞生长的抑制作用,并从 Caveolin-1 的角度探讨其可能的机制,为胃癌的防治提供新的靶点和策略。

1 材料与方法

1.1 试剂和仪器

人胃低分化黏液腺癌细胞株 MGC-803 细胞(由上海吉玛制药技术有限公司提供),DMY(购自成都曼斯特生物科技有限公司),DMEM 细胞培养液和胎牛血清(购自 Hyclone 公司),免疫组织化学(免疫组织化学)染色试剂盒(购自北京博奥森生物技术有限公司),BCA 蛋白定量试剂(购自 Invitrogen 公

司),一抗兔抗人 Caveolin-1 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的二抗(购自美国 Santa Cruz 公司)。

1.2 实验动物

选取 35 只 4 周龄雄性裸鼠,体重 16~18 g/只,均由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物许可证号为 SCXK(京)2015~0001,饲养于本校动物实验中心无特殊病原体(SPF)级实验室(许可证号:SYXK(湘)2010~0006)。

1.3 细胞培养与人胃癌裸鼠腹腔种植模型的复制

采用含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基培养人胃低分化黏液腺癌细胞株 MGC-803 细胞,在 37℃、5%二氧化碳 CO₂ 的细胞培养箱中培养。取对数生长期的细胞,胰酶消化后,制成单细胞悬液,调整密度为 5×10^7 个/ml,按 0.2 ml/只(约为 1×10^7 个细胞)将细胞悬液注射到裸鼠的腹腔内,正常对照裸鼠组腹腔注射等量的生理盐水。操作完成后裸鼠均正常喂养。

1.4 实验分组及给药

将复模成功的裸鼠随机分为 4 组,即移植瘤模型组,DMY 低、中及高剂量处理组,每组 6 只。接种后第 18 天开始药物处理,DMY 低、中和高剂量分别按 50、100 和 200 mg/(kg·d)灌胃给药。对照组裸鼠,给予相同体积的生理盐水灌胃处理。DMY 组每天给药 1 次,连续 30 d。观察并记录裸鼠的情况(外观、精神、饮食、活动情况和全身改变情况)以及裸鼠腹腔移植瘤生长情况。末次给药后 7 d 处死裸鼠。开腹解剖,取出腹腔瘤体,称量其重量,腹腔瘤体的长短径,计算腹腔瘤体的体积。计算抑瘤率=(移植瘤模型组的瘤重 - 处理组的瘤重)/移植瘤模型组的瘤重 × 100%。

1.5 HE 染色和免疫组织化学检测

腹腔瘤体甲醇固定后进行石蜡切片和 HE 染色,光镜下观察形态学的变化。石蜡切片在脱蜡后,通过煮沸修复抗原,脱脂奶粉封闭,一抗(1:200)孵育,在 4℃条件下过夜。清洗后二抗孵育,在 37℃ 30 min, DAB 显色,镜下控制反应,及时终止反应。苏

木素复染,烘干,透明,封片,显微镜下观察拍照记录结果。Image-Pro Plus 图像分析系统测定光密度,进行半定量分析。

1.6 Western blot 检测

取适量的腹腔瘤体放入碾钵中,加入蛋白裂解液,按试剂盒说明提取组织总蛋白。测定样本的蛋白浓度,2×SDS 凝胶加样缓冲液溶解蛋白样本,煮沸。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,将蛋白转移至 PVDF 膜。PVDF 膜用 10%脱脂牛奶封闭非特异性抗原,在室温下孵育 2 h。加入兔抗人 Caveolin-1(1:400)、Ki67 和 β -actin(1:1000)的一抗,4℃下孵育过夜。清洗后,加入辣根过氧化物酶标记的二抗,4℃下继续孵育 4 h。洗膜后用 ECL 法显色并曝光成像于 X 线,经显影、定影后,以 β -actin 作为内参照,应用凝胶图像分析软件对胶片扫描,分析目的蛋白的表达水平。

1.7 统计学方法

数据处理采用 SPSS 18.0 统计软件,计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较采用方差分析,两两比较用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠的一般情况观察

在接种后 15 d,移植瘤模型组的裸鼠腹部可扪及

瘤结节,随着时间的增长,扪及的瘤结节不断增大,30 d 时就可用注射器从腹腔中抽出少量血性腹水,裸鼠的腹部隆起越来越明显,裸鼠的食欲明显减退、活动明显减少、出现精神萎靡和体重减轻等情况。将裸鼠解剖后观察到裸鼠腹腔内有明显血性腹水,肝周、肠系膜、网膜、横膈、腹膜、腹壁和盆腔等地方可见灰白色 0.1~3.0 cm 大小不等的肿瘤结节,质地较硬,结节与周围组织有粘连,部分出现坏死,表明肿瘤移植成功,腹腔移植成功率为 100%。与移植瘤模型组比较,DMY 中及高剂量处理组腹部可扪及瘤结节较小,30 d 时不能从腹腔中抽出血性腹水,裸鼠腹部隆起较小,裸鼠食欲和活动情况正常,精神状态良好。而 DMY 低剂量处理组与移植瘤模型组以上症状无差异。见图 1、2。

2.2 DMY 对人胃癌腹腔移植瘤生长的抑制作用

各组腹腔移植瘤成瘤个数、瘤体的重量和体积差异有统计学意义($F=53.763, 34.192$ 和 $48.114, P=0.001, 0.011$ 和 0.001)。与移植瘤模型组比较,100 和 200 mg/(kg·d)DMY 中、高剂量组腹腔移植瘤成瘤个数($t=3.751$ 和 4.762 , 均 $P=0.001$),瘤体的重量及体积均降低(均 $P<0.05$),呈现剂量依赖性。50 mg/(kg·d)DMY 低剂量组与移植瘤模型组成瘤个数($t=0.773, P=0.542$),瘤体的重量($t=1.152, P=0.363$)及最大瘤体的体积($t=1.041, P=0.413$)均差异无统计学意义。



图 1 各组裸鼠腹部外观

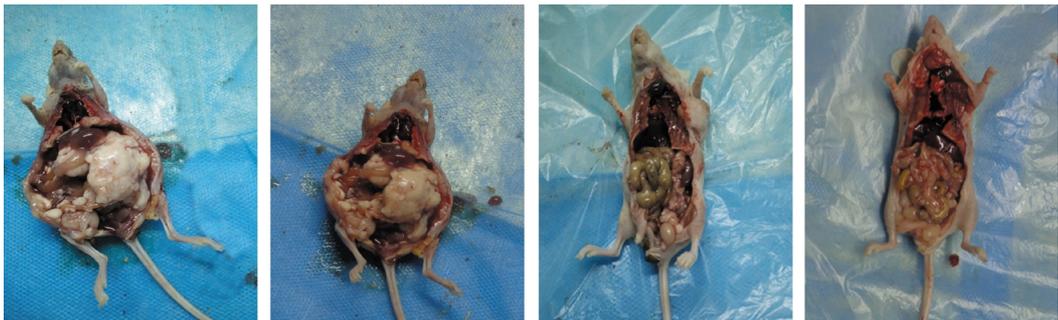


图 2 各组裸鼠腹部解剖情况

50、100 和 200 mg/ (kg·d)DMY 的抑瘤率分别为 5.76%、38.43%和 41.29%，提示高、中剂量的 DMY 对人胃癌腹腔移植瘤有抑制作用。见图 3。

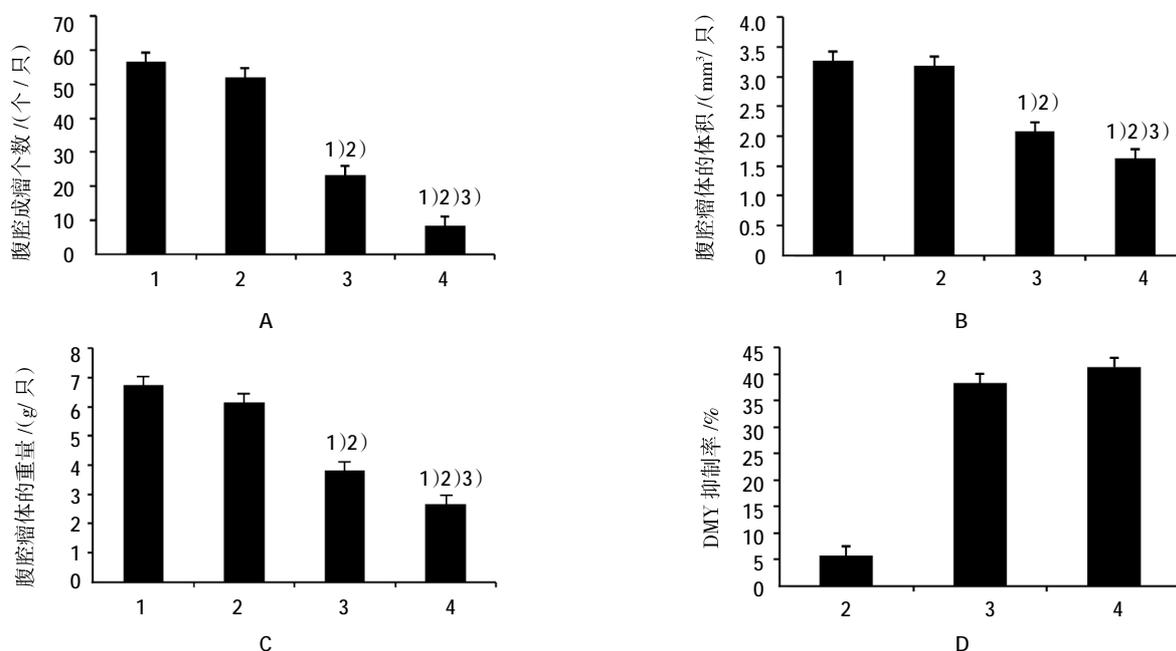
2.3 DMY 对人胃癌腹腔移植瘤瘤体中 Ki67 表达的影响

采用免疫组织化学和 Western blot 检测人胃癌腹腔移植瘤瘤体中 Ki67 的表达,各组表达 Ki67 的阳性细胞百分率的差异有统计学意义($F=24.632, P=0.001$)。见图 4A、B。与移植瘤模型组比较,100 和 200 mg/(kg·d)DMY 中、高剂量组腹腔移植瘤体表达 Ki67 的阳性细胞百分率降低,呈现剂量依赖性(均

$P<0.05$)。与移植瘤模型组比较,100 和 200 mg/(kg·d) DMY 中、高剂量组腹腔移植瘤体中 Ki67 的表达水平降低,呈现剂量依赖性(均 $P<0.05$)。见图 4C、D。

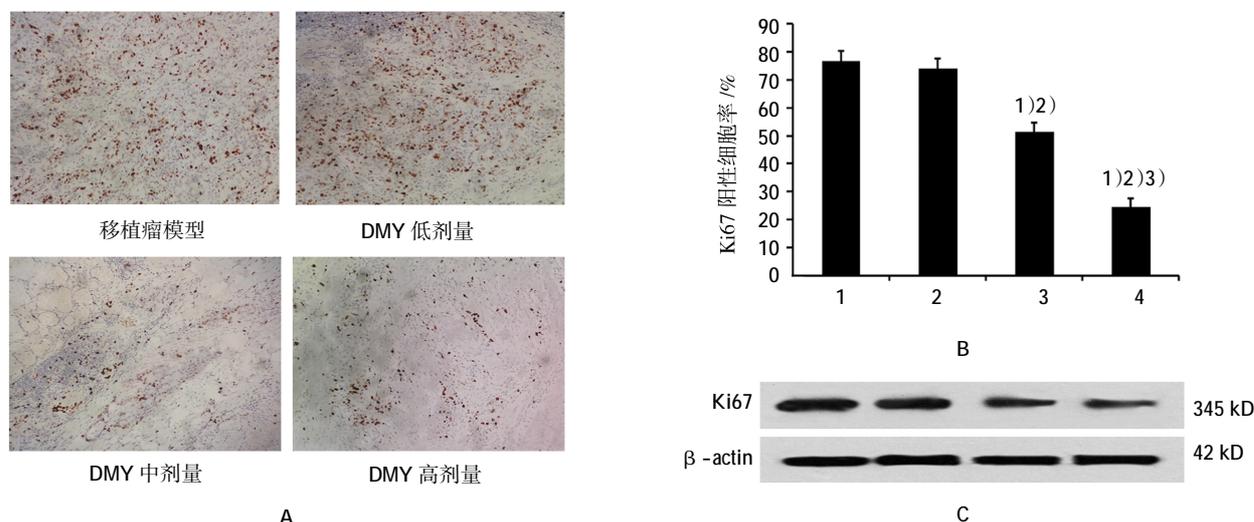
2.4 DMY 对人胃癌腹腔移植瘤瘤体中 Caveolin-1 表达的影响

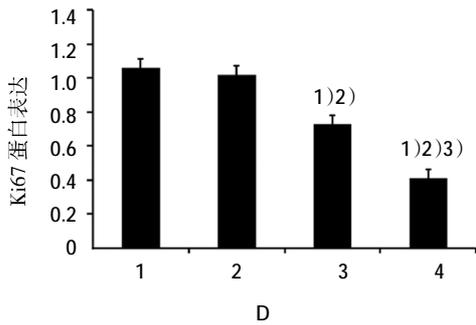
采用免疫组织化学和 Western blot 检测人胃癌腹腔移植瘤瘤体中 Caveolin-1 的表达,各组表达 Caveolin-1 的阳性细胞百分率的差异有统计学意义($F=32.541, P<0.05$)。见图 5A、B。与移植瘤模型组比较,100 和 200 mg/(kg·d)DMY 中、高剂量组腹腔移植瘤表达 Caveolin-1 的阳性细胞百分率增加(均 $P<0.05$),



1: 移植瘤模型;2: DMY 低剂量;3: DMY 中剂量;4: DMY 高剂量。1)与移植瘤模型组比较, $P<0.05$;2)与 DMY 低剂量组比较, $P<0.05$;3)与 DMY 中剂量组比较, $P<0.05$

图 3 DMY 对人胃癌腹腔移植瘤腹腔成瘤个数、瘤重和瘤体积的影响及肿瘤抑制率

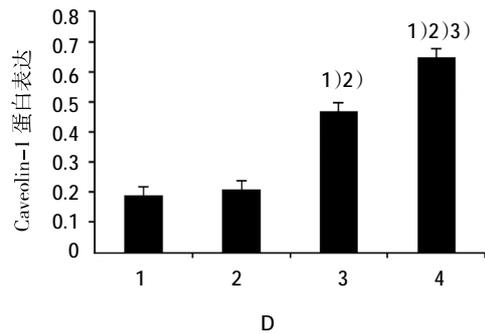
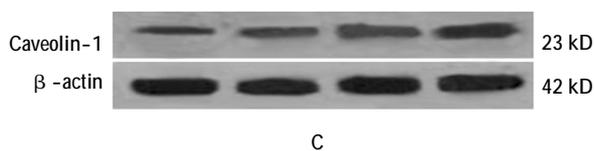
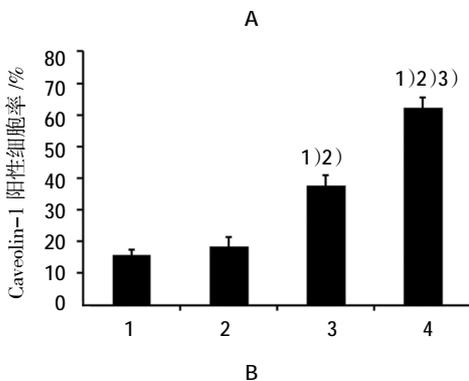
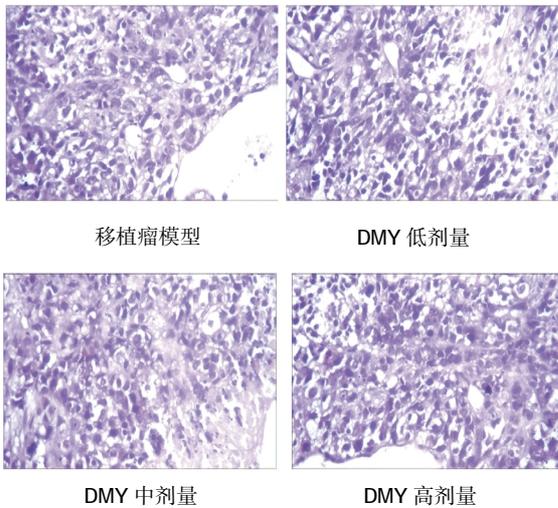




1: 移植瘤模型;2:DMY 低剂量;3:DMY 中剂量;4:DMY 高剂量。
A、B:免疫组织化学;C、D:Western blot。1)与移植瘤模型组比较, $P < 0.05$;2)与 DMY 低剂量组比较, $P < 0.05$;3)与 DMY 中剂量组比较, $P < 0.05$

图 4 人胃癌腹腔移植瘤体中 Ki67 的表达 (×400)

呈现剂量依赖性。与移植瘤模型组比较,100 和 200 mg/ (kg·d) DMY 中、高剂量组腹腔移植瘤中 Caveolin-1 的表达水平增加(均 $P < 0.05$),呈现剂量依赖性。见图 5C、D。



1: 移植瘤模型;2:DMY 低剂量;3:DMY 中剂量;4:DMY 高剂量。
A、B:免疫组织化学;C、D:Western blot。1)与移植瘤模型组比较, $P < 0.05$;2)与 DMY 低剂量组比较, $P < 0.05$;3)与 DMY 中剂量组比较, $P < 0.05$

图 5 人胃癌腹腔移植瘤体中 Caveolin-1 的表达 (×400)

3 讨论

随着社会和生活压力的增加以及饮食结构和环境的变化,胃癌的发病率一直居高不下,而发病的年龄呈现出年轻化的态势^[10-11]。手术切除肿块依然是目前胃癌的主要治疗手段,但手术后有 50% 的患者在 5 年内出现复发或远处转移^[12]。胃癌患者术后复发和转移的主要原因是术前已经存在于腹腔的微小转移灶和手术过程中产生的游离的癌细胞。因此提高胃癌患者的生存率和生存质量的关键是有效预防和及时治疗肿瘤的腹腔转移。

DMY 是一种在藤茶中的含量较高的黄酮类化合物,也大量地存在于葡萄、杨梅和蔬菜中。DMY 具有广泛的药理作用,近年来发现 DMY 具有抗肿瘤的功效。研究显示,DMY 能升高肺癌细胞系 AGZY-83-a 细胞中 Caspase-3 的活性和钙离子浓度,抑制细胞增殖,诱导细胞凋亡^[13]。DMY 也抑制肝癌细胞系 HepG2 细胞的生长,诱导其细胞凋亡^[14]。DMY 还能抑制小鼠 B16 黑色素瘤细胞的增殖、高转移型乳腺癌 MDA-MB-231 细胞和胃癌细胞 SGC-7901 细胞的增殖^[15-16]。DMY 也能抑制在体肿瘤的生长,DMY 能减少小鼠乳腺癌肺转移肿瘤的重量和肺转移灶的数量^[6]。DMY 能抑制人肺癌 GLC 82 裸鼠移植瘤和人肝癌 Bel27402 裸鼠移植瘤的生长^[17]。本实验结果显示,中、高剂量 DMY 能改善裸鼠的食欲、活动情况和精神状态等一般情况,能降低裸鼠的腹腔移植瘤成瘤个数,腹腔瘤体的重量及腹腔瘤体的体积。本结果表明,DMY 有抗胃癌腹腔转移作用,并可抑制胃癌腹腔转移瘤的生长。Ki67 是一种核抗原,与细胞增殖特

异性相关。静止期的细胞不表达 Ki67,而增殖期细胞的细胞核中表达,常用来评估细胞的增殖水平。本研究结果也显示中、高剂量 DMY 降低裸鼠腹腔移植瘤体中表达 Ki67 的阳性细胞百分率和 Ki67 的蛋白表达水平,提示 DMY 可能是通过抑制胃癌细胞增殖,而发挥其抗胃癌效应的,但是其详细机制不清楚。

Caveolin-1 是 1 个抑癌基因,通过磷酸化和去磷酸化的方式与很多信号分子发生相互作用,参与肿瘤细胞的黏附、增殖、凋亡和迁移等生物学行为的控制。研究显示,在肉瘤、乳腺癌、结肠癌、肺癌和卵巢癌等多种恶性肿瘤中 Caveolin-1 的表达均降低^[18]。非贴壁依赖性生长(anchorage-independent cell growth, AICG)是恶性转化的细胞及具有较强转移能力的肿瘤细胞的生长特征。具有 AICG 特征的细胞可表现为细胞伸展出片层伪足,生长过程中未接触性抑制,AICG 与肿瘤侵袭和转移密切相关。研究发现,Caveolin-1 高表达于人乳腺癌细胞中可以抑制其 AICG 的特性^[9]。研究显示,在乳腺癌细胞中存在 132 位密码子突变,而将突变型 Caveolin-1 基因导入 NIH 3T3 细胞中,发现可使 NIH 3T3 细胞获得 AICG 的特性,细胞的侵袭能力也增强^[20]。在本研究中结果显示,与移植瘤模型组比较,中、高剂量 DMY 组裸鼠腹腔移植瘤体中表达 Caveolin-1 的阳性细胞百分率和 Caveolin-1 的蛋白表达水平均增加,呈现剂量依赖性。

总之,本研究结果表明,二氢杨梅素以剂量依赖的方式抑制人胃癌腹腔移植瘤的生长,其作用机制可能与上调 Caveolin-1 的表达有关。

参 考 文 献:

- [1] WANG T, CAI H, SASAZUKI S, et al. Fruit and vegetable consumption, helicobacter pylori antibodies, and gastric cancer risk: A pooled analysis of prospective studies in China, Japan, and Korea[J]. *Int J Cancer*, 2017, 140(3): 591-599.
- [2] ZHANG J, YAN Y, CUI X, et al. CCL2 expression correlates with Snail expression and affects the prognosis of patients with gastric cancer[J]. *Pathol Res Pract*, 2017, 213(3): 217-221.
- [3] CHEN Y, LV L, PI H, et al. Dihydromyricetin protects against liver ischemia/reperfusion induced apoptosis via activation of FOXO3a-mediated autophagy[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(47): 76508-76522.
- [4] 卢忠英,方可,陈仕学. 藤茶中二氢杨梅素的药理作用研究进展[J]. *广州化工*, 2015, 43(7): 16-17.
- [5] 孙大永,左彦珍,梁鸿鹄,等. 二氢杨梅素对肺癌 A549 细胞凋亡的作用[J]. *解剖学报*, 2015, 46(3): 359-362.
- [6] 周防震,张新芳. 二氢杨梅素对 4T1 小鼠乳腺癌肺转移的抑制作用[J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2014, 8(9): 1674-1678.
- [7] POPA I L, MILAC A L, SIMA L E, et al. Cross-talk between dopachrome tautomerase and caveolin-1 is melanoma cell phenotype-specific and potentially involved in tumor progression[J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(24): 12481-12500.
- [8] 张帆. 人胃癌裸鼠腹腔移植模型的建立及 Caveolin-1、HIF-1 α 蛋白和 mRNA 的表达[D]. 衡阳: 南华大学, 2016.
- [9] 刘振华,任双义,陈鑫. Caveolin-1 RNA 干扰真核表达载体的构建及其对人类胃癌细胞生物学行为的影响[J]. *肿瘤研究与临床*, 2010, 22(2): 98-104.
- [10] ZHANG H P, YANG S, CHEN W H, et al. The diagnostic value of confocal laser endomicroscopy for gastric cancer and precancerous lesions among Asian population: a system review and meta-analysis[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2017, 52(4): 382-388.
- [11] 何好臣,秦建领,郭勇. 复方藤藜根制剂对人胃癌裸鼠腹腔移植瘤的作用机制研究[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2011, 13(11): 88-90.
- [12] ISHIGAMI H, YAMAGUCHI H, YAMASHITA H, et al. Surgery after intraperitoneal and systemic chemotherapy for gastric cancer with peritoneal metastasis or positive peritoneal cytology findings[J]. *Gastric Cancer*, 2017, 20(1): 128-134.
- [13] 尹梅梅,潘振伟,蔡本志,等. 二氢杨梅素诱导人肺癌细胞系 AGZY-83-a 凋亡的实验研究[J]. *中国药理学通报*, 2008, 24(5): 626-630.
- [14] 卞杰,顾明,侯胜燕,等. 杨梅素抗肝肿瘤细胞 HepG2 作用及其机制的研究[J]. *中国医药导报*, 2012, 9(36): 7-9.
- [15] ZHOU F Z, ZHANG X Y, ZHAN Y J, et al. Dihydromyricetin inhibits cell invasion and down-regulates MMP-2/-9 protein expression levels in human breast cancer cells[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2012, 39(4): 352-358.
- [16] 吴明彩,蒋明,毕富勇. 二氢杨梅素联合丝裂霉素对胃癌细胞的生长抑制作用[J]. *中国病理生理杂志*, 2011, 27(7): 1424-1427.
- [17] 罗高琴,曾飒,刘德育. 蛇葡萄素的血管生成抑制作用[J]. *中药材*, 2006, 29(2): 146-150.
- [18] LI Z, WANG N, HUANG C, et al. Downregulation of caveolin-1 increases the sensitivity of drug-resistant colorectal cancer HCT116 cells to 5-fluorouracil [J]. *Oncol Lett*, 2017, 13(1): 483-487.
- [19] PRAMCHU-EM C, MEKSAWAN K, CHANVORACHOTE P. Zinc sensitizes lung cancer cells to anoikis through down-regulation of Akt and caveolin-1 [J]. *Nutr Cancer*, 2016, 68(2): 312-319.
- [20] ROSS N L, SULLIVAN M O. Overexpression of caveolin-1 in inflammatory breast cancer cells enables IBC-specific gene delivery and prodrug conversion using histone-targeted polyplexes[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2016, 113(12): 2686-2697.

(王荣兵 编辑)