

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.15.011
文章编号: 1005-8982 (2022) 15-0059-08

实验研究·论著

巴豆生物碱对Lewis小鼠肺腺癌细胞生长和凋亡的影响及机制研究*

武晓¹, 谷勤勤², 于淼淼³, 刘凤娟¹, 孙荣丽¹

(青岛大学附属青岛市中心医院 1.呼吸与危重症医学科, 2.病理科, 3.放射科, 山东 青岛 266042)

摘要: 目的 通过研究巴豆生物碱(CA)对Lewis小鼠肺腺癌细胞生长及对凋亡相关蛋白(Survivin、Caspase-3、Bax)、YAP蛋白的调控作用, 探讨CA对肺腺癌细胞生长和凋亡的影响及其具体的作用机制。**方法** 培养Lewis鼠源性肺腺癌细胞(LLC), 复制小鼠皮下成瘤模型, 分为5组, 每组10只, 分别为对照组、低剂量CA组、中剂量CA组、高剂量CA组及顺铂组。皮下成瘤1周后给予药物干预, 第22天对5组小鼠取瘤称重, 计算抑瘤率并通过光学显微镜观察各组病理形态学的变化, 判断CA对瘤体生长的抑制作用; Western blotting检测Survivin、Caspase-3、Bax及YAP蛋白相对表达量; qRT-PCR法检测Survivin、Caspase-3、Bax及YAP mRNA相对表达量。**结果** 中剂量CA组和高剂量CA组小鼠的一般生存状态较对照组、低剂量CA组及顺铂组好。低剂量CA组、中剂量CA组、高剂量CA组及顺铂组肿瘤细胞出现不同程度细胞凋亡现象, 对照组肿瘤细胞多为坏死细胞。低剂量CA组、中剂量CA组、高剂量CA组及顺铂组的抑瘤率分别是13.91%、14.83%、27.84%和68.45%, 4组抑瘤率比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 各组抑瘤率依次升高, 顺铂组肿瘤生长最慢。不同剂量CA组中Survivin mRNA相对表达量低于对照组($P < 0.05$), CA剂量越高, Survivin mRNA相对表达量越低; 而不同剂量CA组中Caspase-3和Bax mRNA相对表达量高于对照组($P < 0.05$), CA剂量越高, Caspase-3和Bax mRNA的相对表达量越高; 各组YAP mRNA的相对表达量比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** CA对Lewis肺腺癌小鼠瘤体生长有抑制作用, 并引起细胞凋亡。CA通过促进Bax和Caspase-3表达及抑制Survivin表达来调控Lewis小鼠肺腺癌细胞凋亡; 其调控机制可能是通过下调Survivin的表达, 从而使得Survivin对Caspase-3的抑制作用减弱, 而Bax上调可进一步激活Caspase-3, 从而诱导Caspase级联效应促进细胞凋亡, 为肺腺癌治疗提供了新思路。

关键词: 肺腺癌; Lewis鼠源性肺腺癌细胞; 小鼠; 巴豆生物碱; 凋亡; 机制
中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

Effect and mechanism of croton alkaloids on growth and apoptosis of lewis mice lung adenocarcinoma cells*

Xiao Wu¹, Qin-qin Gu², Miao-miao Yu³, Feng-juan Liu¹, Rong-li Sun¹

(1. Department of Respiratory and Critical Care Medicine, 2. Pathology, 3. Department of Radiology, Qingdao Central Hospital Affiliated to Qingdao University, Qingdao, Shandong 266042, China)

Abstract: Objective To explore the effects of croton alkaloids (CA) on the growth and pathomorphology of Lewis mice lung adenocarcinoma cells, and to research the regulation of apoptosis-related proteins (Bax, Survivin, Caspase-3) and YAP in Lewis mice lung adenocarcinoma cells. To discuss the effects of CA on growth and apoptosis

收稿日期: 2022-01-08

* 基金项目: 青岛市中医药科研项目(No: 2019-zyy038)

[通信作者] 孙荣丽, E-mail: zzt73229189@126.com; Tel: 17805325532

of lung adenocarcinoma and its specific mechanism. **Methods** Lewis mouse-derived lung adenocarcinoma cells (LLC) were cultured, and subcutaneous tumorigenesis model of 50 mice were divided into control group, low dose group of CA, medium dose group of CA, high dose group of CA, and cisplatin group. After one week, given the drug intervention to the subcutaneous neoplasia. On the 22nd day, the effect of CA on LLC with calculating the tumor volume, tumor weight, tumor inhibition rate, and observing the changes of pathomorphology in each group was analyzed. Western blots and RT-PCR were used to detect the expression of apoptosis related proteins and genes Yap, Bax, Caspase-3, and Survivin to explore the mechanism of CA in promoting the apoptosis of lung adenocarcinoma cells. **Results** (1) The general survival status of mice in medium dose CA Group and high dose CA Group was better than that in control group, low dose group and cisplatin group. (2) HE staining: the tumor cells in low-dose CA Group, medium dose CA Group, high-dose CA Group and cisplatin group showed different degrees of apoptosis, while the tumor cells in the control group were mostly necrotic cells. (3) The tumor inhibition rates of low-dose CA Group, medium dose CA Group, high-dose CA Group and cisplatin group were 13.91%, 14.83%, 27.84%, and 68.45% respectively. The difference was statistically significant by analysis of variance ($P < 0.05$). The tumor inhibition rates of each group increased in turn, and the tumor growth of cisplatin group was the slowest. (4) The expression of Yap, Bax, Caspase-3, and Survivin was detected by RT-PCR and Western blot in each group. It found that the expression of Survivin in different doses of CA Group was lower than that control group ($P < 0.05$). The higher the dose of CA, the lower the expression of Survivin; The higher the CA dose, the higher the expression of Bax and Caspase-3 proteins ($P < 0.05$). YAP did not change significantly in each group and has not statistically significant. (5) Western blotting was used to detect the effect of group A and the groups with different doses of CA on the expression of apoptosis-related proteins. However, Bax and Caspase-3 were both higher than the group A at different doses of CA. The higher the CA dose, the higher the expression of Bax and Caspase-3 proteins. YAP did not change significantly in each group and was not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusions** CA can inhibit the growth of Lewis lung adenocarcinoma mice tumors and cause the apoptosis of cells. CA can induce the apoptosis of Lewis lung adenocarcinoma mice tumor cells by up-regulating the expression of protein and gene protein and gene expression, and the down-regulating the expression of survivin. The regulatory mechanism may be through down-regulation of Survivin expression, so that Survivin's inhibitory effect on Caspase-3 protein is weakened, and Bax up-regulation can further activate Caspase-3 protein, thereby inducing Caspase cascade effect to promote cell apoptosis, which provides new targets for lung adenocarcinoma treatment.

Keywords: lung adenocarcinoma; Lewis mouse-derived lung adenocarcinoma cells; mice; croton alkaloids; apoptosis; mechanism

肺癌已经成为威胁人类健康的重大疾病之一，主要采取多学科综合治疗模式，而中西医结合治疗肺癌是我国的特色^[1]。中药抗肺癌的研究越来越多^[2]，其中巴豆就是一种用于抗癌的中草药^[3-4]，查阅国内外文献，巴豆生物碱(CA)是巴豆提取物的一种，CA对于胃癌、卵巢癌、肠癌等癌症均有抗癌作用^[5-6]，但有关CA抗肺癌作用的报道较少，前期的初步研究发现CA具有较好的体内暴露量，能够抑制肺癌的生长，但具体的作用机制尚不明确，目前国内外尚无关于CA体内对肺癌细胞的作用机制及对肿瘤相关凋亡蛋白表达的影响的相关研究报道。那么CA作用于体内是否可抗肺癌？是否通过诱导肿瘤细胞凋亡抗癌？具体机制是什么？为此本研究在前期体外试验研究的基础上行体内实验(Lewis肺腺癌小鼠)，进一步探讨CA对肺腺癌生

长和凋亡的影响及其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

Lewis小鼠肺腺癌细胞(Lewis mouse-derived lung adenocarcinoma cells, LLC)由上海中国科学院提供；SPF级C57BL/6小鼠，4~6周龄，雄性，体重25~30g，共50只，由重庆恩斯维尔生物科技有限公司提供[实验动物生产许可证号：SCXK(湘)2019-0004]；DMEM培养基、胎牛血清(FBS)、水合氯醛、无水乙醇等购自北京中杉金桥生物技术有限公司；凋亡试剂盒及各引物购自上海生物工程股份有限公司；CA购自山东中医药大学；顺铂购自德州德药制药有限公司；PrimeScript RT试剂盒购自日本TaKaRa公司。

1.2 仪器与设备

离心机购自上海安亭科学仪器厂; 二氧化碳培养箱购自日本三洋公司; 倒置显微镜购自日本 Nikon 有限公司; 电子分析天平购自瑞士 Precisa 公司; 生物组织自动包埋机、生物组织烤片机、DM500 光学显微镜购自德国 Leica 公司。

1.3 方法

1.3.1 药物配制及分组 将 20 mg 顺铂溶于 5 mL 生理盐水, 即 4 mg/mL, 按照 75 mg/m² 给药。CA 原液浓度为 200 μg/ml, 分别按照低剂量 0.6 mg/kg、中剂量 1.2 mg/kg 和高剂量 2.4 mg/kg 对小鼠注射。将小鼠随机分为对照组、低剂量 CA 组、中剂量 CA 组、高剂量 CA 组及顺铂组。对照组不注射任何药物; 低剂量 CA 组、中剂量 CA 组、高剂量 CA 组分别按 0.6 mg/kg、1.2 mg/kg 和 2.4 mg/kg 的剂量注射 CA 注射液; 顺铂组按 75 mg/m² 的剂量经腹腔注射顺铂溶液。

1.3.2 小鼠成瘤及瘤体测量 ①小鼠皮下接种。取对数生长期细胞, 制成浓度为 5 × 10⁷ 个/mL 的细胞悬液, 按照分组进行接种, 每只小鼠于右腋下缓慢接种 200 μL 细胞悬液, 拔针后迅速用针头将细胞聚集, 以防止细胞液外漏。②成瘤观察与测量。皮下接种成功后, 每天观察小鼠的精神状况, 形成肿瘤后, 每 2 天测量 1 次肿瘤的长径和短径, 并计算肿瘤的体积 (肿瘤体积 = 0.52 × 短径 × 长径²)。③生存状态的观察。每天下午 3 点记录小鼠的进食量 (先设定每组固定进食量为 50 g), 期间再观察小鼠的精神、活动状态, 以及小鼠的毛色和光泽度等一般状况。④差异化处理。接种细胞 1 周后即第 8 天开始按照之前的分组腹腔注射给药, ⑤肿瘤抑瘤率测定: 剥取肿瘤后称重, 计算抑瘤率 (抑瘤率 = 1 - 药物组平均瘤重 / 对照组平均瘤重 × 100%)。

1.3.3 肿瘤病理切片的制备及苏木精-伊红染色 先用二甲苯溶解烘烤完毕组织切片上残留的石蜡, 然后按以下顺序进行梯度水化: 无水乙醇、95% 乙醇、90% 乙醇、80% 乙醇, 苏木精染色, 1% 盐酸乙醇分化, 稀氨水返蓝, 伊红染色, 自来水洗去浮色后, 可于光学显微镜下观察染色情况。之后, 按照 80%、90%、95% 乙醇, 无水乙醇 2 次, 二甲苯 2 次的顺序进行脱水, 最后用中性树胶进行封片。

1.3.4 qRT-PCR 法检测 Survivin、Caspase-3、Bax、YAP mRNA 相对表达量 提取细胞总 RNA: 细胞孔板中加 300 μL Trizol, 转入 EP 管中, 加入氯仿 (0.2 mL), 待转为粉色时, 静置 5 min, 13 000 r/min 离心 15 min, 吸取上清液至新 EP 管, 加入 0.5 mL 异丙醇, 静置 10 min, 离心弃上清液, 加入 75% 乙醇 1 mL, 离心干燥 EP 管中沉淀, 溶解沉淀, 溶解总 RNA (55 ~ 60℃ 水浴 5 min), 检测 RNA 浓度和纯度。RNA 质量测定: 用 DEPC 空白调零, 吸取 2 μL 溶解后的总 RNA 加入上样孔, 检测光密度 (OD) 值, 当 OD 值介于 1.8 ~ 2.0 之间 (260/280), RNA 纯度好。使用 PrimeScript RT 试剂盒 (TaKaRa, Shiga, 日本) 将每个样品的 1 mg 总 RNA 逆转录为 cDNA, 根据上海生工基因库设计引物和探针。qRT-PCR 反应条件: 50℃ 预变性 2 min, 95℃ 变性 4 min, 54℃ 再变性 15 s, 72℃ 退火 5 s, 83℃ 延伸 15 s, 最后在 72 ~ 95℃ (0.5℃ 增量) 下熔解, 每个步骤熔解 5 s。每个样本以 GAPDH 为内参基因, 将每个样本的阈值周期 (Ct) 归一化, 每个样本都是重复检测的。按照 2^{-ΔΔCt} 计算目的基因相对表达量, 通过每组 3 个样本的几何平均值得到各基因的最终相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	引物序列	引物长度/bp
Survivin	正向: 5'-CCCTGCCTGGCAGCCCTTTC-3'	243
	反向: 5'-CTGGCTCCCAGCCTTCCA-3'	
Caspase-3	正向: 5'-TTTGAACGAACGGACCTGT-3'	412
	反向: 5'-CACGGGATCTGTTTCTTTGC-3'	
Bax	正向: 5'-GAGGAAGTGGACAGTAACATGGAGCT-3'	83
	反向: 5'-CGGCCCCAGTTGAAGTTGC-3'	
YAP	正向: 5'-TCTGGAGCATCTGCTGTCTG-3'	294
	反向: 5'-CCTGCCTGGTGTCTGAAGTT-3'	
GAPDH	正向: 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	105
	反向: 5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGT-3'	

1.3.5 Western blotting 检测 Survivin、Caspase-3、Bax、YAP 蛋白相对表达量 Loading buffer 提取蛋白, RIPA 裂解液裂解 30 min, 将裂解液转入 EP 管中离心, 置入 -80℃ 冰箱冷冻保存。蛋白浓度测定

及预变性：将蛋白标准品加入标准品稀释液，加 BCA 工作液，混匀，37℃ 孵育 30 min；测定 562 nm 的 OD 值，计算样品蛋白浓度。根据分子量大小选择浓度，配制分离胶混匀后灌胶，异丙醇液封胶，静置 30 min，弃掉异丙醇，滤纸吸干，加浓缩胶，插入梳子，静置 1 h。每组样本各取 10 μg 总蛋白与 15% 聚丙烯酰胺凝胶电泳，电泳结束后应用 80 V 恒压转膜 120 min，封闭 1 h，TBST 洗涤 3 次；将 PVDF 膜剪成条带放入孵育皿中（按目的蛋白和 Marker 分子量大小），上述 4 种抗体及内参 GAPDH 以 1 : 1 000 4℃ 摇床上孵育，次日 TBST 洗涤 3 次，加入羊抗兔二抗孵育 1 h，弃二抗，TBST 洗涤 3 次。压片，调整曝光时间，将 X 射线片放入显影液中，出现条带后放入定影液中，取出 X 射线片，风干，扫描图片保存，采用 Image J 软件分析灰度值。以目的蛋白条带与 GAPDH 条带灰度值比值为目的蛋白相对表达量。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 和 GraphPad Prism 5.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，比较用方差分析，两两比较用 SNK-*q* 检验；*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠肺癌 LLC 细胞生长状态

光学显微镜低倍镜下观察细胞形态，小鼠 LLC 细胞呈上皮样贴壁生长，有些细胞呈圆形、梭形，生长状态良好。见图 1。

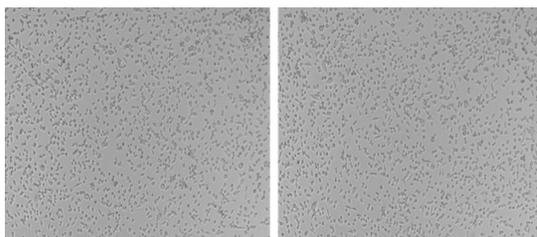


图 1 LLC 细胞生长状态（光学显微镜 × 100）

2.2 CA 对 LLC 细胞诱导的小鼠成瘤及一般状况的影响

至取材之日，低剂量 CA 组、高剂量 CA 组及对照组各有 1 只小鼠死亡；中剂量 CA 组死亡 2 只，顺铂组死亡 3 只。模型复制 1 周后，各组小鼠长出肉

眼可见的肿瘤组织，各组小鼠在模型复制 2 周左右开始出现不同程度的脱毛，食欲不振，毛发干枯，不喜动，有的小鼠出现明显消瘦等情况，尤以顺铂组小鼠最为明显。而高剂量 CA 组和低剂量 CA 组小鼠脱毛、食欲不振及活动敏感度下降等情况比顺铂组好，毛色比顺铂组有光泽。

2.3 CA 对 LLC 细胞诱导的小鼠成瘤体积的影响

对照组、低剂量 CA 组、中剂量 CA 组、高剂量 CA 组及顺铂组的肿瘤体积分别为 $(4.09 \pm 0.24) \text{cm}^3$ 、 $(3.09 \pm 0.58) \text{cm}^3$ 、 $(2.91 \pm 0.64) \text{cm}^3$ 、 $(2.59 \pm 0.89) \text{cm}^3$ 和 $(1.98 \pm 1.04) \text{cm}^3$ ，经方差分析，差异有统计学意义 ($F = 26.652, P = 0.010$)。进一步两两比较，对照组肿瘤体积大于低剂量 CA 组、中剂量 CA 组及高剂量 CA 组 ($P < 0.05$)；顺铂组肿瘤体积小于低剂量 CA 组、中剂量 CA 组及高剂量 CA 组 ($P < 0.05$)；高剂量 CA 组肿瘤体积小于低剂量 CA 组和中剂量 CA 组 ($P < 0.05$)。各组肿瘤体积随剂量增加体积逐渐缩小，对照组肿瘤生长最快，顺铂组肿瘤生长最慢。

2.4 CA 对瘤重及抑瘤率的影响

对照组、低剂量 CA 组、中剂量 CA 组、高剂量 CA 组及顺铂组瘤重比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。低剂量 CA 组、中剂量 CA 组、高剂量 CA 组及顺铂组肿瘤重量逐渐减少，对照组瘤重最大，顺铂组瘤重最小。低剂量 CA 组、中剂量 CA 组、高剂量 CA 组及顺铂组的抑瘤率比较，经方差分析，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，各组抑瘤率依次升高，顺铂组肿瘤生长最慢 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组瘤重、抑瘤率的比较

组别	<i>n</i>	瘤重/(g, $\bar{x} \pm s$)	抑瘤率/%
对照组	9	2.56 ± 0.57	-
低剂量 CA 组	9	2.48 ± 0.58 [†]	13.91 [†]
中剂量 CA 组	8	2.36 ± 0.64 [†]	14.83 [†]
高剂量 CA 组	9	1.89 ± 0.82 [†]	27.84 [†]
顺铂组	7	1.12 ± 0.85	68.45
<i>F</i> 值		29.149	32.413
<i>P</i> 值		0.008	0.004

注：† 与顺铂组比较， $P < 0.05$ 。

2.5 各组小鼠 LLC 细胞病理形态学变化

对照组: 细胞生长活跃, 发现大量肿瘤细胞, 核质粗、深染, 核仁明显, 核分裂象多见, 可见大量细胞坏死, 但细胞凋亡不明显 (见图 2)。低剂量组: 细胞凋亡比例较低, 但有凋亡现象, 大部分细胞为坏死细胞 (见图 3)。中剂量组: 细胞坏死和细胞凋亡现象均可见 (见图 4)。高剂量组: 可见细胞坏死, 凋亡现象多, 间质可见红细胞渗出, 细胞分裂象减少, 可见散在许多凋亡小体 (见图 5)。顺铂组: 可见肿瘤细胞出现明显的凋亡现象, 可见形成的凋亡小体, 细胞质深嗜伊红, 细胞核浓染 (见图 6)。

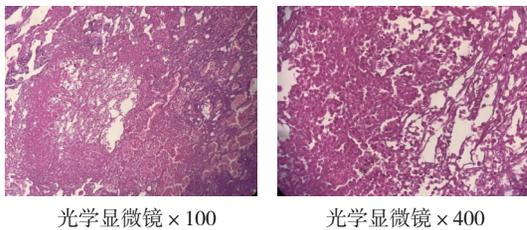


图 2 对照组 LLC 细胞病理学形态

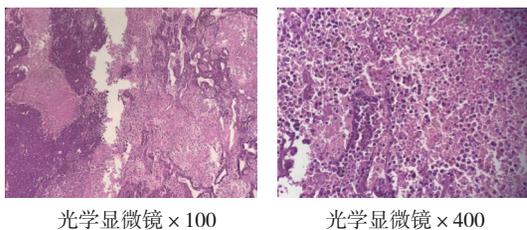


图 3 低剂量组 LLC 细胞病理学形态

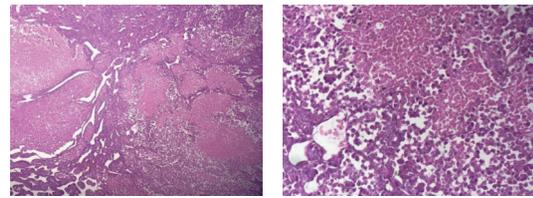


图 4 中剂量组 LLC 细胞病理学形态

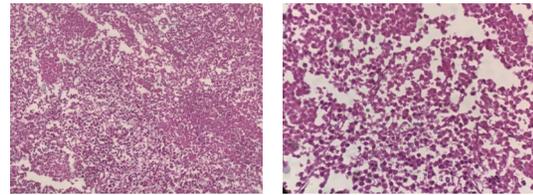


图 5 高剂量组 LLC 细胞病理学

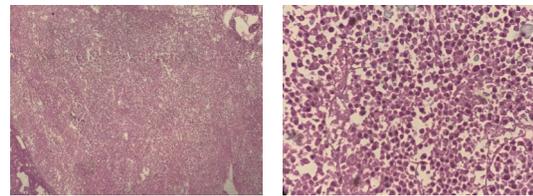


图 6 顺铂组 LLC 细胞病理学形态

2.6 各组 LLC 细胞 Survivin、Caspase-3、Bax 及 YAP mRNA 相对表达量的比较

对照组、低剂量 CA 组、中剂量 CA 组及高剂量 CA 组 LLC 细胞 Survivin、Caspase-3、Bax mRNA

相对表达量比较, 经方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 对照组 Survivin mRNA 相对表达量高于不同剂量 CA 组 ($P < 0.05$), 低剂量 CA 组 Survivin mRNA 相对表达量高于中剂量 CA 组和高剂量 CA 组 ($P < 0.05$)。对照组 Caspase-3、Bax mRNA 相对表达量低于不同剂量 CA 组 ($P < 0.05$), 低剂量 CA 组 Caspase-3、Bax mRNA 相对表达量低于中剂量 CA 组和高剂量 CA 组 ($P < 0.05$)。各组 YAP mRNA 相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 各组 LLC 细胞 Survivin、Caspase-3、Bax 及 YAP mRNA 相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Survivin mRNA	Caspase-3 mRNA	Bax mRNA	YAP mRNA
对照组	3.148 ± 0.211	1.754 ± 0.102	2.241 ± 0.101	1.613 ± 0.247
低剂量 CA 组	2.618 ± 0.065 ^①	2.601 ± 0.278 ^①	3.451 ± 0.191 ^①	1.229 ± 0.037
中剂量 CA 组	1.590 ± 0.025 ^{①②}	3.629 ± 0.086 ^{①②}	5.309 ± 0.156 ^{①②}	1.381 ± 0.207
高剂量 CA 组	1.304 ± 0.098 ^{①②}	3.861 ± 0.088 ^{①②}	6.182 ± 0.050 ^{①②}	1.484 ± 0.195
F 值	28.532	16.413	6.409	3.019
P 值	0.009	0.018	0.014	0.128

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与低剂量 CA 组比较, $P < 0.05$ 。

2.7 各组 LLC 细胞 Survivin、Caspase-3、Bax 及 YAP 蛋白相对表达量的比较

对照组、低剂量 CA 组、中剂量 CA 组及高剂量 CA 组 Survivin、Caspase-3、Bax 蛋白相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。进一步两两比较, 对照组 Survivin 蛋白相对表达量高于低剂量 CA 组、中剂量 CA 组及高剂量 CA 组 ($P < 0.05$), 低

剂量 CA 组 Survivin 蛋白相对表达量高于中剂量 CA 组和高剂量 CA 组 ($P < 0.05$)。对照组 Caspase-3、Bax 相对表达量低剂量 CA 组、中剂量 CA 组及高剂量 CA 组 ($P < 0.05$), 低剂量 CA 组 Caspase-3、Bax 蛋白相对表达量低于中剂量 CA 组和高剂量 CA 组 ($P < 0.05$)。各组 YAP 蛋白相对表达量比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 各组 LLC 细胞中 Survivin、Caspase-3、Bax 及 YAP 蛋白相对表达量的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Survivin 蛋白	Caspase-3 蛋白	Bax 蛋白	YAP 蛋白
对照组	0.892 ± 0.0349	0.251 ± 0.055	0.243 ± 0.045	1.113 ± 0.047
低剂量 CA 组	0.706 ± 0.087 ^①	0.480 ± 0.047 ^①	0.295 ± 0.089 ^①	1.166 ± 0.068
中剂量 CA 组	0.451 ± 0.032 ^{①②}	1.005 ± 0.034 ^{①②}	0.631 ± 0.056 ^{①②}	1.043 ± 0.032
高剂量 CA 组	0.319 ± 0.025 ^{①②}	1.298 ± 0.094 ^{①②}	0.882 ± 0.096 ^{①②}	1.101 ± 0.079
F 值	18.532	22.413	16.409	3.391
P 值	0.016	0.009	0.018	0.110

注: ①与对照组比较, $P < 0.05$; ②与低剂量 CA 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

肺癌目前仍是最常见的肿瘤之一^[7], 其发病率和病死率均占肿瘤死亡患者的前位, 2019 年国家癌症中心关于恶性肿瘤流行情况分析报告指出肺癌的发病率和病死率仍居榜首, 中国每年约有 6 万患者因肺癌死亡^[8]。最近研究表明, 中药能在肿瘤的整个过程中发挥重要的预防和治疗作用。中药在预防和治疗肺癌中有自己的优势^[9-10]。巴豆是一种流传于民间, 用于抗癌的中草药, 民间早已应用巴豆的提取物治疗恶性肿瘤, 但关于巴豆提取物的具体抗癌机制研究较少。近年来, 对巴豆及其提取物抗肿瘤作用机制的最新研究进展主要集中在以下几个方面: ①影响膜系统分子动力学^[11]; ②诱导肿瘤细胞的凋亡: 如 CA 会抑制人卵巢癌细胞 (HO-8910) 的增殖, 使其发生细胞凋亡^[12]; ③可诱导肿瘤分化和抗氧化、抑制肿瘤转移^[13]; ④可改变癌细胞的胞浆结构和破坏癌细胞的微管等^[14]。以上机制相互影响相互作用, 起到抗肿瘤作用。

目前肺腺癌发病率最高^[15], 笔者前期已经进行了 CA 对肺腺癌 A549 细胞凋亡机制的体外实验研究, 本研究通过体内实验进一步探讨 CA 对肺腺癌生长的作用及具体的凋亡机制。本研究首先从复制动物模型开始, 因小鼠的肺脏在分子特点、组

织形态等方面与人类相似, 而且两者的基因有 90% 以上同源性, 所以复制小鼠肺腺癌模型更具有意义。本实验选用 LLC 细胞, 主要是由于 LLC 肿瘤细胞来源于 C57BL/6 小鼠的自发性肺肿瘤。将其接种于 C57B/6 小鼠皮下, 具有同种移植、成瘤率高、且生长较快等优点。本研究分两部分进行。第一部分为 CA 对 Lewis 小鼠肺腺癌细胞生长的研究: 实验结果顺铂组小鼠死亡数目最多, 可能是因为化疗药物副作用太大, 不能耐受所致。顺铂组小鼠肿瘤生长虽然比对照组、低剂量 CA 组、中剂量 CA 组、高剂量 CA 组速度明显减慢, 但出现体重下降, 食欲差的现象, 与临床上顺铂化疗后出现消化道副作用相符, 可见顺铂对患者身体素质要求高, 使用较局限。不同 CA 组可抑制肿瘤生长速度, 虽不如顺铂组明显, 但小鼠生活状态良好。说明 CA 更能提高生活总体质量。通过瘤重、瘤体体积及抑瘤率, 发现 CA 对 Lewis 小鼠肺腺癌细胞的生长具有抑制作用, 且随着 CA 浓度的增加, 抑制作用增强, 说明 CA 可以抑制肿瘤细胞生长, 并与 CA 浓度相关。继续增加 CA 剂量后是否抑瘤效果更好? 副作用更大? 这一点可以通过后续的实验进一步证实。形态学观察发现, 随 CA 浓度的升高, 肿瘤细胞凋亡率不断增加, 但均没有顺铂组凋亡率高, 说明 CA 对肺腺癌细胞生长抑制作用不如顺

铂组, 但副作用较小。结果提示, 在不能完全耐受顺铂治疗的患者中, 可以尝试应用 CA 进行联合治疗, 减少顺铂用量, 以减轻副作用。为进一步明确 CA 通过何种途径促进细胞凋亡, 抑制肿瘤生长, 本研究通过检测凋亡相关蛋白的表达, 探讨其具体凋亡机制。

凋亡有内源性和外源性凋亡途径^[16], 内源性途径在细胞凋亡中起到决定性作用^[17]。Bax 属于 Bax 亚家族之一, 具有促凋亡作用, 在凋亡过程中扮演重要角色^[18]; Survivin 是迄今发现最强的凋亡抑制因子^[19]; Caspase-3 是一种终末剪切酶, 在细胞凋亡过程中发挥重要作用^[20], 且 Survivin 是 Caspase-3 的直接抑制剂^[21]; Hippo-YAP 信号转导通路在细胞中调节各类转录因子, 调控细胞的增殖和凋亡^[22-23]。本研究 Survivin mRNA 在不同剂量 CA 组中的相对表达量低于对照组, CA 剂量越高, Survivin mRNA 的相对表达量越低; 而 Bax mRNA 和 Caspase-3 mRNA 在不同剂量 CA 组中的相对表达量高于对照组, CA 剂量越高, Bax mRNA 和 Caspase-3 mRNA 的相对表达量越高; 笔者猜测 CA 对 Lewis 小鼠肺腺癌细胞生长的机制与 Bax 和 Caspase-3 表达上调及 Survivin 表达下调从而抑制细胞的增殖和凋亡有关; YAP 在各组中变化不明显, Hippo-YAP 信号转导通路不是 CA 引起 Lewis 小鼠细胞凋亡的主要通路, 有可能是本研究的样本量太少, 有待于进一步加大样本量进行研究。

综上, CA 可诱导 Lewis 小鼠肺癌细胞凋亡, 其可能的机制可能是因为 Survivin 是 Caspase-3 的直接抑制剂, Survivin 和 Bcl-2 可能具有调节细胞凋亡的共同途径, CA 抑制了 Survivin 的表达, 从而使得 Survivin 对 Caspase-3 蛋白的抑制作用减弱, 使得 Caspase-3 的剪切增强, 由于 CA 可使 Bax 表达增强, 其与线粒体体外膜结合, 将 Cyt-c 释放到细胞质中, 与其他细胞因子结合形成凋亡小体并募集和激活 Caspase-3 蛋白, 从而诱导 Caspase 级联效应并因此促进细胞凋亡, 起到抗肿瘤生长的作用。参与肺腺癌的凋亡相关因子众多^[24-25], 如 β -抑制蛋白 2 基因, 钙结合蛋白家族成员 *S100A6* 基因等, 本研究仅从体内实验初步探讨 CA 引起肺腺癌细胞凋亡的作用机制, 以及阻止肿瘤复发和转移的机制, 同时涉及多个分子和信号通路。仅用一个方

面说明或评估肺腺癌细胞凋亡的发生机制无说服力, 需要更深一步探讨, 笔者认为可在此基础上运用高通量测序等高水平检测方法, 进一步研究参与凋亡的其他凋亡蛋白和信号通路, 以明确起最主要作用的凋亡蛋白和信号通路, 为肺腺癌治疗提供新的思路。

参 考 文 献 :

- [1] MA Z, FAN Y Q, WU Y M, et al. Traditional Chinese medicine-combination therapies utilizing nanotechnology-based targeted delivery systems: a new strategy for antitumor treatment[J]. *Int J Nanomedicine*, 2019, 14: 2029-2053.
- [2] HE X R, HAN S Y, LI P P. Recent highlights of Chinese medicine for advanced lung cancer[J]. *Chin J Integr Med*, 2017, 23(5): 323-330.
- [3] SONG H K, LEE G S, PARK S H, et al. Crotonis fructus extract inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced expression of matrix metalloproteinase-9 via the activator protein-1 pathway in MCF-7 cells[J]. *J Breast Cancer*, 2017, 20(3): 234-239.
- [4] GAO X H, XU Y S, FAN Y Y, et al. Cascarinoids A-C, a class of diterpenoid alkaloids with unpredicted conformations from croton cascarilloides[J]. *Org Lett*, 2018, 20(1): 228-231.
- [5] 许群, 方铁萍, 赵小迎, 等. 巴豆生物碱上调 TRAIL 配体、caspase-8 的表达诱导 HeLa 细胞凋亡的体外研究[J]. *海峡药学*, 2011, 23(2): 179-184.
- [6] LI C Y, WU X, SUN R L, et al. Croton tiglium extract induces apoptosis via Bax/Bcl-2 pathways in human lung cancer A549 cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2016, 17(11): 4893-4898.
- [7] 李洪波, 吴琼, 薛倩, 等. 复方苦参注射液对晚期肺癌患者近期疗效、带瘤生存及 T 细胞亚群的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2020, 30(14): 70-75.
- [8] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2020[J]. *CA Cancer J Clin*, 2020, 70(1): 7-30.
- [9] LIAO Y H, LI C I, LIN C C, et al. Traditional Chinese medicine as adjunctive therapy improves the long-term survival of lung cancer patients[J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2017, 143(12): 2425-2435.
- [10] 张添威, 陈卫建, 张蓉映, 等. 基于“痰毒”理论探讨化痰解毒法对中晚期非小细胞肺癌患者带瘤生存的临床意义[J]. *中华全科医学*, 2019, 17(12): 2042-2045.
- [11] 徐立生, 曲长芝, 马志铨, 等. 抗癌药物巴豆生物碱、顺铂对红细胞膜的作用[J]. *中华肿瘤杂志*, 1995, 17(2): 115-117.
- [12] MFOTIE NJOYA E, ELOFF J N, MCGAW L J. Croton gratissimus leaf extracts inhibit cancer cell growth by inducing caspase 3/7 activation with additional anti-inflammatory and antioxidant activities[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 305.
- [13] DASGUPTA A. Review of abnormal laboratory test results and

- toxic effects due to use of herbal medicines[J]. *Am J Clin Pathol*, 2003, 120(1): 127-137.
- [14] KIM J Y, YUN J W, KIM Y S, et al. Mutagenicity and tumor-promoting effects of Tiglium seed extract via PKC and MAPK signaling pathways[J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2015, 79(3): 374-383.
- [15] 曹赫, 郑静, 赵菁, 等. c-ROS 癌基因 1 融合阳性肺腺癌 54 例临床特征分析[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2020, 43(2): 120-125.
- [17] KÜHN E C, SLAGMAN A, KÜHN-HEID E C D, et al. Circulating levels of selenium-binding protein 1 (SELENBP1) are associated with risk for major adverse cardiac events and death[J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2019, 52: 247-253.
- [18] CHEN M X, ZHOU B, ZHONG P, et al. Increased intracellular reactive oxygen species mediates the anti-cancer effects of WZ35 via activating mitochondrial apoptosis pathway in prostate cancer cells[J]. *Prostate*, 2017, 77(5): 489-504.
- [19] TIAN Y Z, LIU Y P, TIAN S C, et al. Antitumor activity of ginsenoside Rd in gastric cancer via up-regulation of caspase-3 and caspase-9[J]. *Pharmazie*, 2020, 75(4): 147-150.
- [20] 肖丽娜, 周先荣, 张青华. Caspase-3 蛋白在非小细胞肺癌中的表达及其与肿瘤细胞凋亡的关系[J]. *检验医学与临床*, 2019, 16(14): 2034-2036.
- [21] RAFATMANESH A, BEHJATI M, MOBASSERI N, et al. The survivin molecule as a double-edged sword in cellular physiologic and pathologic conditions and its role as a potential biomarker and therapeutic target in cancer[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(2): 725-744.
- [22] SNIGDHA K, GANGWANI K S, LAPALIKAR G V, et al. Hippo signaling in cancer: lessons from drosophila models[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2019, 7: 85.
- [23] 杨生辉, 莫安薇, 王琳. 科罗索酸通过抑制 Hippo-YAP 信号转导通路促进非小细胞肺癌细胞的凋亡[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 34(7): 1023-1028.
- [24] 胡美琴, 龚军, 唐昊, 等. β -arrestin2 基因转染对人肺腺癌细胞 A549 的凋亡影响[J]. *现代肿瘤医学*, 2017, 25(2): 195-197.
- [25] 南岩东, 姜华, 房延凤, 等. 下调 S100A6 基因对裸鼠肺腺癌移植瘤生长和凋亡的影响[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2017, 10(3): 251-256.

(张西倩 编辑)

本文引用格式: 武晓, 谷勤勤, 于淼淼, 等. 巴豆生物碱对 Lewis 小鼠肺腺癌细胞生长和凋亡的影响及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(15): 59-66.

Cite this article as: WU X, GU Q Q, YU M M, et al. Effect and mechanism of croton alkaloids on growth and apoptosis of lewis mice lung adenocarcinoma cells[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(15): 59-66.