

重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤肽协同 5-氟尿嘧啶对小鼠 H22 肝癌的抑制作用

赵向阳^{1*}, 石永强¹, 缪林², 陈跃¹⁽¹南京市溧水区人民医院消化科, 江苏 溧水 211200; ²南京医科大学第二附属医院消化医学中心, 江苏 南京 210011)

[摘要] **目的:**探讨重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤肽(recombinant analgesic-antitumor peptide, rAGAP)增强 5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)对肝癌 H22 细胞的抑制作用及机制。**方法:**SPF 级雄性小鼠 120 只, 采用接种 H22 肝癌小鼠腹水方法建立模型, 随机分为 4 组: rAGAP 组(予 rAGAP 0.03 mg/kg)、5-FU 组(予 5-FU 10 mg/kg)、联合组(予 rAGAP 0.03 mg/kg, 5-FU 10 mg/kg)、模型组(予等体积生理盐水), 每 4 d 腹腔注射 1 次, 用药持续 24 d。用药结束后取出肿瘤组织标本, 检测各组瘤体组织重量和抑瘤率, Western blot 方法检测 PI3K、AKT、PTEN 蛋白表达。**结果:**与模型组相比, 其他各组小鼠瘤体组织重量均明显降低 ($P < 0.05$); 联合组抑瘤率明显高于 rAGAP 组和 5-FU 组 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 其他各组 PI3K、p-Akt 表达均明显减弱, PTEN 表达明显增强 ($P < 0.05$); 与 5-FU 组、rAGAP 组相比, 联合组 PI3K、p-Akt 表达均明显减弱, PTEN 表达明显增强 ($P < 0.05$)。**结论:**rAGAP 能增强 5-FU 对肝癌组织的抑制作用, 其机制可能与影响 PI3K/AKT/PTEN 信号通路, 进而抑制肝癌细胞的增殖有关。

[关键词] 重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤肽; 5-氟尿嘧啶; 肝癌 H22**[中图分类号]** R735.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2017)01-0044-04**doi:** 10.7655/NYDXBNS201701019

Inhibition of recombinant analgesic-antitumor peptide combined with 5-fluorouracil on H22 hepatoma in mice

Zhao Xiangyang^{1*}, Shi Yongqiang¹, Miao Lin², Chen Yue¹⁽¹Department of Gastroenterology, LiShui district people's hospital, Nanjing 211200, China; ²Department of Gastroenterology, the Second Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the inhibitory effect and mechanism of recombinant analgesic-antitumor peptide (rAGAP) enhanced 5-fluorouracil (5-FU) on H22 hepatoma. **Methods:** The models of H22 hepatoma in mice were established through ascites inoculating H22 cells suspension into mice in right armpits, and randomly divided into 4 groups. rAGAP group was given 0.03 mg/kg IP rAGAP, 5-FU group 10 mg/kg IP 5-FU, United group 0.03 mg/kg 5-FU and 10 mg/kg IP rAGAP, Model group used equal volume of normal saline intraperitoneal injection for 3 weeks. After that, the tumor tissue were sampled, the tumor weight and tumor inhibition rate were detected. The expressions of PI3K, AKT, and PTEN were detected by Western blot method. **Results:** Compared with Model group, mice tumor weight of other groups was significantly lower ($P < 0.05$); tumor suppressor rate of United Group was obviously higher than that of rAGAP group and 5-FU group ($P < 0.05$). Compared with Model group, PI3K and p-Akt expression of other groups were significantly decreased, but PTEN expression was significantly increased ($P < 0.05$); compared with 5-FU group, rAGAP group, PI3K and p-Akt expression of United group were significantly reduced, but PTEN expression was significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** rAGAP can enhance the inhibitory effect of 5-FU on H22 hepatoma, its mechanism may be related to the activity of PI3K/AKT/PTEN signaling pathway, and then inhibition the proliferation of H22 hepatoma.

[Key words] recombinant analgesic-antitumor peptide; 5-fluorouracil; H22 hepatoma

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(01):0044-0047]

肝癌是全世界最常见的恶性肿瘤之一, 预后

[基金项目] 南京市卫生局自然科学基金课题(YKK13200)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: lszhaoxiangyang@126.com

差。由于多数肝癌患者确诊时已为晚期, 且多合并肝功能异常, 导致许多患者不能手术, 因此化疗仍是目前重要治疗方法^[1]。5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是公认的肝癌基础化疗药物之一, 疗效良好,

但存在耐药性问题^[2]。因此,如何提高 5-FU 化疗敏感性,降低化疗不良反应是临床亟待解决的问题。大量研究证实,蝎毒能抑制多种肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡^[3-5]。重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤肽(recombinant analgesic-antitumor peptide, rAGAP)是由刘岩峰等^[6]从东亚钳蝎蝎毒中分离纯化得到的单纯碱性多肽,并被证实具有抑制鼠源骨肉瘤的作用。研究表明,rAGAP 对肝癌 HepG2 细胞、结肠癌细胞和卵巢癌细胞的生长均有抑制作用^[7]。本研究观察 rAGAP 对肝癌细胞生长及 5-FU 化疗敏感性的影响,以 PI3K/AKT/PTEN 信号通路为切入点来探讨 rAGAP 的作用机制,为肝癌 5-FU 化疗增敏提供新的理论依据和潜在的干预靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

rAGAP(江苏省中医药研究院馈赠);四甲基偶氮唑盐(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)(Sigma 公司,美国);PI3K、AKT 一抗及 β -actin 单克隆抗体(Cell Signaling 公司,美国);PTEN 一抗及山羊抗兔 IgG/辣根过氧化物酶标记二抗(北京博奥森生物技术有限公司);DAB 二氨基联苯胺显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);Western blot 相关试剂(江苏碧云天生物技术研究所)。

1.2 方法

1.2.1 建立动物模型与分组

昆明种小鼠 120 只,雄性,SPF 级,体重 18~22 g,由南京医科大学实验动物中心提供。H22 肝癌小鼠腹水瘤种由南京医科大学第二附属中心实验室提供。抽取 H22 肝癌小鼠腹水,以生理盐水调整细胞密度为 3×10^7 个/mL,于昆明种小鼠右前肢腋部皮下行无菌接种,0.2 mL/只。待瘤体长至约 0.5 cm

时,采用随机数字表法随机分为 rAGAP 组(rAGAP 0.03 mg/kg)、5-FU 组(5-FU 10 mg/kg)、联合组(rAGAP 0.03 mg/kg, 5-FU 10 mg/kg)、模型组(等体积生理盐水),每组各 30 只,采用等体积腹腔注射(0.5 mL/只),每 4 d 给药 1 次,每组用药 6 次,24 d 后颈椎断离法处死小鼠。

1.2.2 计算抑瘤率

取出肿瘤组织标本,完整剥离皮下肿瘤组织,称重并计算抑瘤率。抑瘤率(%)=[(1-治疗组平均瘤重/模型组平均瘤重)] \times 100%。

1.2.3 Western blot 方法检测 PI3K、AKT、PTEN 蛋白表达

取肿瘤组织加入蛋白裂解液提取组织总蛋白。按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒进行。取 30 μ g 蛋白样品,10% SDS-PAGE 电泳,100 V 转移 1 h 至硝酸纤维素薄膜,置于封闭液中 37 $^{\circ}$ C 封闭 1 h;一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。反复洗膜,二抗孵育 1 h,显影后用 Image J 软件测定 PI3K、AKT、PTEN 条带。

1.3 统计学方法

应用 SPSS13.0 统计软件,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析;率的比较采用卡方检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

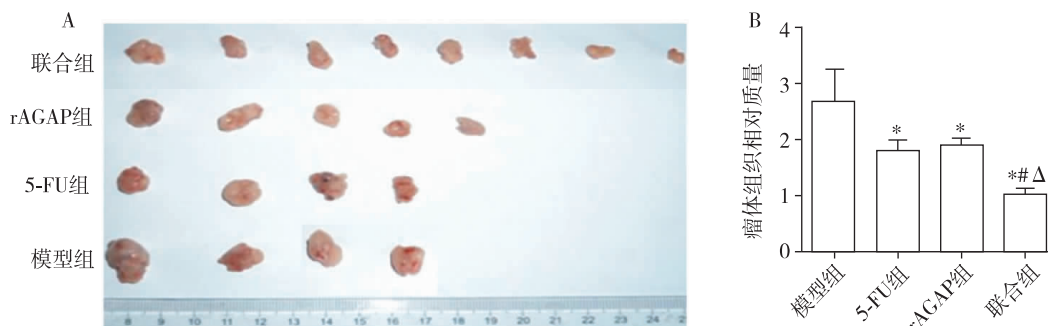
2 结果

2.1 各组小鼠肿瘤质量的比较

与模型组相比,其他各组小鼠肿瘤重量均明显减轻($P < 0.05$);联合组瘤重减小的程度明显高于 rAGAP 组和 5-FU 组($P < 0.05$,图 1)。

2.2 各组药物处理小鼠抑瘤率的比较

与模型组相比,其他各组小鼠抑瘤率均明显增高($P < 0.05$);联合组抑瘤率(43.06%)明显高于 rAGAP 组(18.06%)和 5-FU 组(33.33%),差异有统计



与模型组相比,* $P < 0.05$;与 rAGAP 组相比,# $P < 0.05$;与 5-FU 组相比,Δ $P < 0.05$ 。

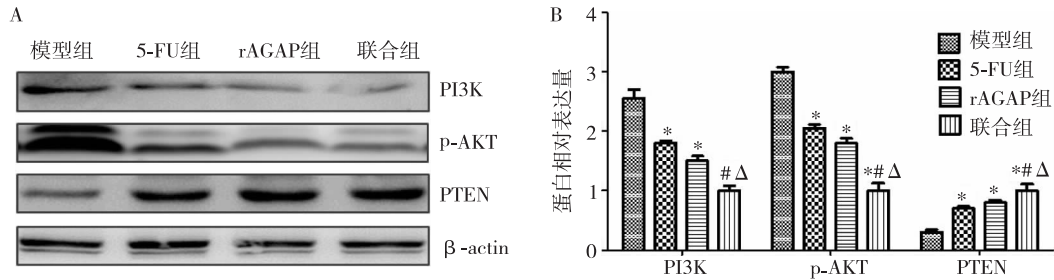
图 1 不同药物组别对肿瘤生长的影响

Figure 1 Effects of different groups on tumor growth

学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 各组小鼠肿瘤组织 PI3K、AKT、PTEN 蛋白表达的比较

与模型组相比,其他各组 PI3K、p-AKT 表达均明显减弱,PTEN 表达明显增强 ($P < 0.05$);与 5-FU 组、rAGAP 组相比,联合组 PI3K、p-AKT 表达均明显减弱,PTEN 表达明显增强 ($P < 0.05$,图 2)。



与模型组相比,* $P < 0.05$;与 rAGAP 组相比,# $P < 0.05$;与 5-FU 组相比,Δ $P < 0.05$ 。

图 2 各组肿瘤组织 PI3K、p-AKT、PTEN 蛋白表达的比较

Figure 2 Expression of PI3K, p-AKT and PTEN in each group of the tumor tissues

凋亡^[9]。

在介导肿瘤细胞凋亡的众多信号转导途径中,以 PI3K/PTEN/AKT/mTOR 途径尤其重要。PI3K/AKT/PTEN 通路是细胞内重要的信号转导通路,通过激活下游 mTOR、NF-κB,进一步促进 Bcl-2、Bcl-x 表达,抑制 P53、灭活 caspase、诱导细胞周期基因转录或其转录调控子的生成等,在促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、诱导肿瘤细胞多药耐药等方面发挥重要作用^[10]。PTEN 作为一种重要的抑癌基因,主要通过其脂质磷酸酶和蛋白磷酸酶的作用分别抑制细胞内 FAK 和 PI3K 两条信号转导通路来实现其抑癌作用。PTEN 在 PI3K/AKT 信号转导途径中起负性调节作用,该信号通路的活化可以阻碍细胞的凋亡进程,促进细胞周期进展,从而促进细胞的生存和增殖^[11]。PTEN 基因的突变或其蛋白的低表达或缺失表达与肝癌的发生密切相关,与肝癌生存率呈正相关^[12]。

近年来动物来源药物越来越受重视,在传统中药中,蝎是重要的药物来源。近年来国内外学者对蝎毒素抗肿瘤机制的探讨逐渐增多:Zargan 等^[13]证实蝎毒素通过细胞毒性和细胞周期阻滞来限制变异细胞 SH-SY5Y 和 MCF-7 的生长;Das Gupta 等^[4]研究得出印度蝎毒液能够抑制白血病细胞 U937 和 K562 增殖,促进凋亡;东亚钳蝎 BmK 通过上调 PTEN,调控 PI3K/AKT 信号通路,促进淋巴瘤细胞凋亡,阻滞细胞周期进程^[14]。上述研究结果显示:蝎毒

3 讨论

研究表明,加速细胞死亡过程是多数化疗药物(如 5-FU)发挥化疗药物毒性的最初作用形式,化疗药物可以抑制引起凋亡的信号转导途径^[8]。5-FU 可调节促凋亡和抑制凋亡的因子,还可调节凋亡通路下游的凋亡抑制蛋白家族(IAPs)来诱导肿瘤的

可抑制多种人类肿瘤细胞生长,诱导肿瘤细胞凋亡。

研究显示,rAGAP 可以抑制人神经胶质瘤细胞 SHG-44 和大鼠神经胶质瘤细胞 C6 的增殖、迁移,并证实其机制可能是通过 PI3K、Bcl-2 及核转录因子 NF-κB 等信号分子调节的^[15]。研究表明,rAGAP 可抑制人胆管癌细胞株 HuCC-T1 的生长与迁徙,诱导细胞凋亡,其分子机制可能与 Bcl-2/Bax 信号通路有关^[16]。本研究结果显示,联合组可明显降低小鼠的瘤重,且联合组小鼠肿瘤组织凋亡率显著低于模型组、rAGAP 组和 5-FU 组,提示 rAGAP 协同 5-FU 抑制小鼠 H22 癌细胞的增殖是其抑制肿瘤组织快速生长的机制之一。本研究结果显示,与 5-FU 组和 rAGAP 组相比较,联合组的 PI3K、p-Akt 表达均明显减弱,PTEN 表达明显增强,提示 rAGAP 协同 5-FU 对肝癌组织的抑制作用,可能通过影响 PI3K/AKT/PTEN 信号通路实现。

综上所述,rAGAP 能增强 5-FU 对肝癌组织的抑制作用,其机制可能影响 PI3K/AKT/PTEN 信号通路,进而增加肝癌细胞的凋亡、抑制其增殖有关。

[参考文献]

- [1] 吴金道,韩国勇,陆森,等.肝动脉栓塞化疗术联合索拉菲尼对比单纯介入术治疗原发性肝癌的临床观察[J].南京医科大学学报(自然科学版),2015,35(12):1739-1742
- [2] Wu J, Hu D, Zhang R. Depletion of Bmi-1 enhances 5-fluorouracil-induced apoptosis and autophagy in hepato-

- cellular carcinoma cells [J]. *Oncol Lett*, 2012, 4(4): 723-726
- [3] Zargan J, Sajad M, Umar S, et al. Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(1): 447-454
- [4] Das Gupta S, Debnath A, Saha A, et al. Indian black scorpion (*Heterometrus bengalensis Koch*) venom induced antiproliferative and apoptogenic activity against human leukemic cell lines U937 and K562 [J]. *Leuk Res*, 2007, 31(6): 817-825
- [5] Gao F, Li H, Chen YD, et al. Upregulation of PTEN involved in scorpion venom-induced apoptosis in a lymphomacell line[J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(4): 633-641
- [6] Liu YF, Ma RL, Wang SL, et al. Expression of an antitumor-analgesic peptide from the venom of Chinese scorpion *Buthus martensii Karsch* in *Escherichia coli*[J]. *Protein Expr Purif*, 2003, 27(2): 253-258
- [7] 金思思, 黄智铭, 申苏建. 镇痛抗肿瘤肽基因真核表达载体构建及其体外抗肝细胞癌作用[J]. *中华内科杂志*, 2010, 49(2): 154-156
- [8] Wilson TR, Johnston PG, Longley DB. Anti-apoptotic mechanisms of drug resistance in cancer[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2009, 9(3): 307-319
- [9] Dineen SP, Roland CL, Greer R, et al. Smac mimetic increases chemotherapy response and improves survival in mice with pancreatic cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(7): 2852-2861
- [10] Khwaja A. PI3K as a target for therapy in haematological malignancies[J]. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2010, 347: 169-188
- [11] Hollander MC, Blumenthal GM, Dennis PA. PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(4): 289-301
- [12] Chung JY, Hong SM, Choi BY, et al. The expression of phospho-AKT, phospho-mTOR, and PTEN in extrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Clin Cancer Res*, 2009, 15(2): 660-667
- [13] Zargan J, Sajad M, Umar S, et al. Scorpion (*Androctonus crassicauda*) venom limits growth of transformed cells (SH-SY5Y and MCF-7) by cytotoxicity and cell cycle arrest[J]. *Exp Mol Pathol*, 2011, 91(1): 447-454
- [14] Gao F, Li H, Chen YD, et al. Upregulation of PTEN involved in scorpion venom-induced apoptosis in a lymphomacell line[J]. *Leuk Lymphoma*, 2009, 50(4): 633-641
- [15] Zhao Y, Cai X, Ye T, et al. Analgesic-antitumor peptide inhibits proliferation and migration of SHG-44 human malignant glioma cells[J]. *J Cell Biochem*, 2011, 112(9): 2424-2434
- [16] 葛贤秀, 曹鹏, 卢梧广, 等. 重组东亚钳蝎镇痛抗肿瘤肽抑制人胆管癌细胞生长作用及其机制研究[J]. *医学研究生学报*, 2013, 26(4): 343-347
- [收稿日期] 2016-08-03

(上接第 43 页)

- CYP2C9 genotypes on the formation of a hepatotoxic metabolite of valproic acid in human liver microsomes [J]. *Pharmacogenomics J*, 2003, 3(6): 335-342
- [13] Nanau RM, Neuman MG. Adverse drug reactions induced by valproic acid [J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(15): 1323-1338
- [14] Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, et al. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics [J]. *Pharmacogenet Genomics*, 2013, 23(4): 236-241
- [15] 白向荣, 姜德春, 王育琴. 基因多态性与丙戊酸钠的药物代谢[J]. *中国药物依赖性杂志*, 2007, 16(4): 241-244
- [收稿日期] 2016-05-24