

文章编号:1005-6947(2008)07-0663-05

· 基础研究 ·

Quercetin 治疗裸鼠移植人肝癌的作用及机制

黄熙¹, 张继红^{2,3}

(1. 北京大学深圳医院 肝胆外科, 广东 深圳 518036; 2. 广东药学院临床医学院, 广东广州 510224;
3. 广东药学院附属第一医院 肝胆外科, 广东 广州, 510080)

摘要:目的 探讨 quercetin 治疗裸鼠移植人肝癌中的作用及三磷酸肌醇(IP3)和 Bax 基因表达变化。方法 采用 quercetin 治疗实验性肝癌, 观察肝癌增长情况; 用同位素试剂盒检测肝癌组织 IP3 含量; RT-PCR 分析癌组织 bax mRNA 的表达; Western blotting 分析肝癌组织 bax 蛋白的表达。结果 治疗组肝癌体积和重量均显著低于对照组[体积(15.8 ± 10.1) mm³ vs. (52.3 ± 26.5) mm³; 重量(44.8 ± 10.4) mg vs. (91.3 ± 31.4) mg; 均 $P < 0.01$], IP3 含量显著低于对照组[(15.9 ± 2.8) pmol/mg vs. (35.3 ± 6.6) pmol/mg; 均 $P < 0.01$], bax mRNA 表达与对照组无显著性差异[RI(灰度与面积之积的相对强度)(0.64 ± 0.12) vs. (0.56 ± 0.15), $P > 0.05$], 但 bax 蛋白表达显著高于对照组[RI(3.16 ± 0.95) vs. (1.37 ± 0.48)]。结论 结论 Quercetin 能减少 IP3 生成, 上调肝癌组织 bax 蛋白的表达, 抑制裸鼠移植人肝癌的增长。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(7): 663-667]

关键词: 癌, 肝细胞; 染料木黄酮; 基因, bax

中图分类号: R 735.7

文献标识码: A

Effect and mechanism of Quercetin treatment of transplanted hepatic cancer in nude mice

HUANG Xi¹, ZHANG Jihong^{2,3}

(1. Division of Hepato-biliary Surgery, Shenzhen Hospital of Beijing University, Shenzhen, Guangdong 518036, China; 2. Division of Hepato-biliary Surgery, Clinical College of Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China; 3. the First Affiliated Hospital, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: Objective To study the role of 1, 4, 5-trisphosphate inositol (IP3) and bax gene expression in inhibiting transplanted hepatocellular carcinoma of nude mice by quercetin. **Methods** After animals with hepatocellular carcinoma were treated with quercetin 1 mg/kg/d (ip) for 3 weeks, the volume and weight of tumor was measured, and IP3, Bax mRNA, and Bax protein were assayed by IP3-[3H] Birtrak assay, RT-PCR, and Western blotting, respectively; and compared with control group. **Results** The tumor volume and weight of animals treated with quercetin were lower than those of control [(15.8 ± 10.1) mm³ vs. (52.3 ± 26.5) mm³; (44.8 ± 10.4) mg vs. (91.3 ± 31.4) mg], IP3 content was lower than that of control [(15.9 ± 2.8) pmol/mg protein vs. (35.3 ± 6.6) pmol/mg protein], Bax mRNA expression was not significantly different between the 2 groups [RI which was the gray degree multiply area of bax / the gray degree multiply area of β -actin (0.64 ± 0.12) vs. (0.56 ± 0.15)], Bax mRNA expression was higher in group treated with quercetin than that of control [(3.16 ± 0.95) vs. (1.37 ± 0.48)]. **Conclusions**

基金项目:广东省深圳市科技计划项目资助课题(200602054);广东省医学科学基金立项课题(A2004537)。

收稿日期:2007-12-21; **修订日期:**2008-03-17。

作者简介:黄熙,男,北京大学深圳医院副主任医师,主要从事肝胆胰脾外科疾病的基础及临床方面的研究。

通讯作者:张继红 E-mail:zhjihong@126.com

Quercetin can inhibit growth of transplanted hepatocellular carcinoma of nude mice by reducing IP3 production and bax protein expression. [Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(7): 663 - 667]

Key words: Carcinoma, Hepatocellular; Quercetin; Genes, bax

CLC number: R 735.7

Document code: A

细胞信号转导在应答环境刺激和调节基因表达、生理反应的同时,维持着细胞正常代谢,并最终决定细胞增殖、生长、分化、衰老和死亡等生命基本现象。即信号转导最终决定基因表达与细胞增殖和凋亡^[1]。细胞增殖、分化、凋亡三者之间的平衡失调与肝癌的发生发展密切相关^[2-3]。失控性生长和增殖及细胞凋亡受阻是恶性肿瘤细胞的重要特征^[4]。因此,通过改变细胞信号转导状态以调节基因表达,抑制细胞增殖或/和诱导细胞凋亡的方法将可能最终达到治疗肝癌的目的。本研究拟通过探讨磷酸肌醇信号通路抑制剂 quercetin 能否调节肝癌 HepG2 细胞 bax 基因表达及抑制肝细胞癌增长,为应用磷酸肌醇信号通路抑制剂治疗肝细胞癌提供理论和实验依据。

1 材料和方法

1.1 主要材料

肝癌 HepG2 细胞株(中山大学动物实验中心细胞库),RPMI -1640 培养基(Invitrogen 公司),新生牛血清(Hyclone 公司),quercetin(美国 Sigma 公司,分析纯),IP3-[3H] Birtrak Assay 试剂盒(Amersham 公司),RNA later(Ambion 公司),Trizol Reagent(MRC 公司),SuperScript II 逆转录酶(Gibco BRL 公司),Taq 酶(Takara 公司),RNA 酶抑制剂和 Oligo d(T)(18 上海生物工程技术服务有限公司),胰酶(Sigma 公司);dNTP(上海生物工程技术服务有限公司),SDS(Roche 公司),Spanish 低熔点琼脂糖(Biowest 公司),Tris、EDTA(Sigma 公司),Bax 鼠抗人单克隆抗体(Santa Cruz 公司), β -actin 鼠抗人单克隆抗体(Neomarker 公司),带化学发光物的抗小鼠 IgG(二抗)试剂盒(武汉博士德公司),PVDF 膜(Roche 公司)。其他试剂均为分析纯。流式细胞仪(美国 Beckman-Coulter 公司,机器型号 ELITE,激光波长 488nm,功率 15 mW)。PCR 引物合成:上海生物工程技术服务有限公司。

1.2 方法

1.2.1 裸鼠肝原位移植人肝癌模型制作 将 HepG2 细胞加入含 10% 小牛血清、青霉素 100 U/mL、链霉素 100 μ g/mL 的 RPMI 1 640 培养基中,单层培养和孵化于 5% CO₂ 和 95% 的湿润空气、37 °C 的培

养箱中,每 3 天更换培养液 1 次。待细胞覆盖培养瓶壁 80% ~ 90% 后,按前述方法进行传代培养。当细胞传代至足够制造模型数量时,取出用于建立裸鼠移植人肝癌模型。

模型制作步骤:将肝癌 HepG2 细胞株制成 5×10^7 /mL 细胞悬液,分别取 0.2 mL 含 1×10^7 个细胞的悬液接种于 4 只裸鼠皮下。当皮下肿瘤长至 1 cm³ 后用于模型制作的瘤源。模型制作时,处死皮下荷瘤动物,无菌状态下完整取出肿瘤,剔除周围结缔组织,将边缘生长旺盛的肿瘤组织切割成直径 2 mm 的瘤块置于无菌生理盐水中备用。选取 4 ~ 6 周龄的裸鼠 27 只,雌雄不拘,10% 水合氯醛(430 mg/kg)腹腔注射麻醉后腹中线切口开腹,用 7 号针头戳开肝实质,将瘤组织块移植到裸鼠肝实质内,关腹。所有裸鼠在标准超净环境下饲养 2 周时进行实验性治疗。

1.2.2 溶液配制 Quercetin 500 mg 加 DMSO 2 mL 溶解后,RPMI 1 640 培养基加至 500 mL 即配制成 1 mg/mL 的 Quercetin 溶液。注射时每 1 g 动物体重取 0.05 mL 即相当于 50 mg/kg 的剂量,DMSO 浓度为 0.04%。2 mL DMSO 加 RPMI 1 640 培养基至 500 mL 即配制成 DMSO 浓度为 0.04% 的对照溶剂,供对照组使用,动物取 0.05 mL/g 即相当于治疗组的溶剂量和 DMSO 量。

1.2.3 动物分组及处理 肝癌动物模型制成饲养 2 周后,将荷瘤模型动物随机分为 2 组(每组 9 只):(1) 对照组腹腔注入含 0.04% DMSO 的 RPMI 1640 培养基 0.05 mL/g,(2) Quercetin 治疗组腹腔注入 quercetin 50 mg/(kg · d),饲养 3 周后进行各项实验。

1.3 观测项目

1.3.1 肿瘤大小测定和标本采集 迅速处死动物,腹中线切口开腹,游离肝脏,观察肿瘤生长、浸润情况,切除肿瘤,去除周围结缔组织后电子微量天平称重,游标卡尺测量肿瘤最长径(a)和最短径(b),根据公式 $V(\text{mm}^3) = \pi ab^2/6$ 计算肿瘤的体积,分割肿瘤组织,分别取材用于病理检查、细胞 IP3 检测、RT-PCR 和 western-blotting 分析。用于病理检查者用 10% 福尔马林固定,用于 RNA 检测者应用 RNA later 保存,其余标本贮存于

-70 ℃ 冰箱备检。

1.3.2 IP3-[3H] Birtrak Assay 检测 IP3 含量

动物肝癌组织准备:肝癌组织取材全程保持在低温下进行。将肝癌组织块置于匀浆试管中,按 10% (w/v) 加入 10% 高氯酸在冰浴中冷却后匀浆,4 ℃ 下 2 000 g 离心 15 min 以沉淀蛋白质;取上清液用 10N KOH 中和至 pH7.5 ± 0.1,4 ℃ 下 2 000 g 离心 15 min,去除 KClO₄ 沉淀,上清液用于 IP3 测定。

检测 IP3-[3H] Birtrak 按试剂盒操作说明操作。细胞计数后采用高氯酸沉淀法提取 IP3 样品,在反应体系中加入 100 μL 缓冲液、100 μL 标准品或样品、100 μL [3H]-IP3 稀释液、100 μL 结合蛋白,旋转混合,冰上孵育 15 min,4 ℃ 下 2 000 g 离心 10 min,弃去上清液,使沉淀完全干燥,加入 1 mL 去离子水,充分旋转混匀,15~30 ℃ 下孵育 10 min 后再旋转混匀;移入液闪瓶,加入 10 mL 液闪液,加盖混匀,于 β-液闪计数器上进行液闪计数 4 min。按操作说明绘制标准曲线,对照标准曲线求出各样品 IP3 含量。

蛋白浓度检测方法:应用 BCA 蛋白质定量检测试剂盒测定(按说明书指示步骤操作)。基本原理:碱性条件下,蛋白将 Cu²⁺ 还原成 Cu⁺,Cu⁺ 与 BCA 试剂形成紫色络合物,测定其在 562 nm 处的吸收值,并与标准曲线对比,即可计算待测蛋白的浓度。

最后根据蛋白质浓度求出每 mg 蛋白质组织中 IP3 含量 (pmol/mg protein of tissue)。

1.3.3 RT-PCR 检测 bax mRNA 的表达

采用 Trizol Reagent 提取法进行 RNA 提取,离心、沉淀 RNA,RNA 样品用 1% 琼脂凝胶电泳检测 RNA 完整性。RNA 定量后取总 RNA 2 μg 进行逆转录反应,之后 50 μL 反应体系进行体外 PCR 扩增。Bax 上游引物为 5'-CCACCAGCTCTGAACAGTTCATGA-3',下游引物为 5'-TCAGCCATCTTCTTC-CAGATGGT-3'。扩增产物长度 507 bp。DNA 热循环仪(美国 PE 公司)扩增。扩增条件:94 ℃ 变性 5 min,94 ℃ 60 s,55 ℃ 45 s,72 ℃ 60 s;28 个循环。最后 72 ℃ 延伸 10 min。β-actin 上游引物为 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3';下游引物为 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC-3'。扩增产物长度 548 bp。扩增条件:94 ℃ 变性 5 min,94 ℃ 60 s,58 ℃ 60 s,72 ℃ 60 s;35 个循环。最后 72 ℃ 延伸 10 min。反应产物在凝胶中以 100 V 电泳后于凝胶成像仪中观察拍照,在图象分析仪上

经 Gene Tools 软件进行半定量分析,将测出各条带灰度与面积之积除以 β-actin 的灰度与面积之积,获得一相对强度(RI),通过各浓度组和各时相组的 RI 值比较可得出基因表达的量变规律。

1.3.4 Western blotting 方法测定 bax 蛋白表达

取各组细胞,SDS 匀浆、离心,上清液煮沸 5 min 后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。将凝胶完整取下,于转移缓冲液中转膜。取出 PVDF 膜,封闭,加入一抗 bax 鼠抗人单克隆抗体;以 β-actin 单克隆抗体为内参,4 ℃ 轻摇过夜。洗去 PVDF 膜上未结合的抗体,加入二抗(抗小鼠 IgG)室温下共同孵育 2 h 后采用化学发光试剂显色,电子计算机图像分析仪成像并进行半定量分析。

1.4 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,组间差异采用两个独立样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 动物肝细胞癌模型的建立

各动物经 HepG2 细胞团移植入各裸鼠肝脏后,均见肿瘤生长(图 1),经常规病理切片证实符合肝细胞癌(HCC)(图 2)。对照组动物在观察过程中精神较差,但观察期内无明显体重减轻现象。开腹后观察:对照组肝脏移植肿瘤生长良好,瘤体较大,但观察期内未发现腹水、肿瘤转移等现象;治疗组肿瘤生长体积和重量明显小于对照组($P < 0.01$),观察期内亦未发现腹水、肿瘤转移等现象(表 1)。

2.2 移植瘤大小及重量

Quercetin 治疗组动物移植瘤体积和重量均显著低于对照组($P < 0.01$)(表 1)。根据抑瘤率 = [(对照组瘤重 - 治疗组瘤重)/对照组瘤重] × 100% 的公式,计算得出治疗组抑瘤率为 50.9%。

2.3 IP3 含量

治疗组动物移植肝癌细胞内 IP3 含量显著低于对照组($P < 0.01$)(表 1)。

2.4 bax mRNA 表达

治疗组移植肝癌组织 bax mRNA 表达较对照组略有增加,但无显著性差异($P > 0.05$)(表 1)(图 3)。

2.5 bax 蛋白表达

治疗组移植肝癌组织 bax 蛋白表达较对照组明显增加($P < 0.05$)(表 1)(图 4)。

表1 各组动物移植瘤体积、重量和瘤组织 IP3 含量

组别	n	瘤体积(mm ³)	瘤重量(mg)	瘤组织中 IP3 量 (pmol/mg protein)	Bax mRNA	Bax 蛋白
对照组	9	52.3 ± 26.5	91.3 ± 31.4	35.3 ± 6.6	0.56 ± 0.15	1.37 ± 0.48
治疗组	9	15.8 ± 10.1	44.8 ± 10.4	15.9 ± 2.8	0.64 ± 0.12	3.16 ± 0.95
P 值		<0.01	<0.01	<0.01	>0.05	<0.01



图1 移植人肝癌5周裸鼠肿瘤外观

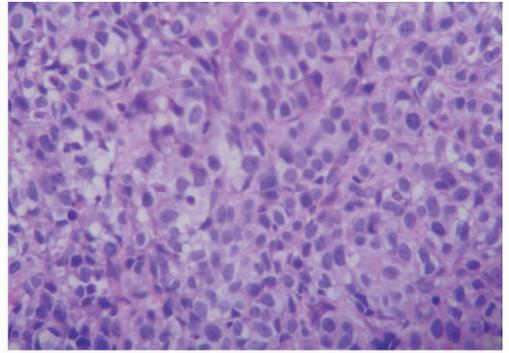


图2 荷瘤病理改变符合肝细胞癌(×400)

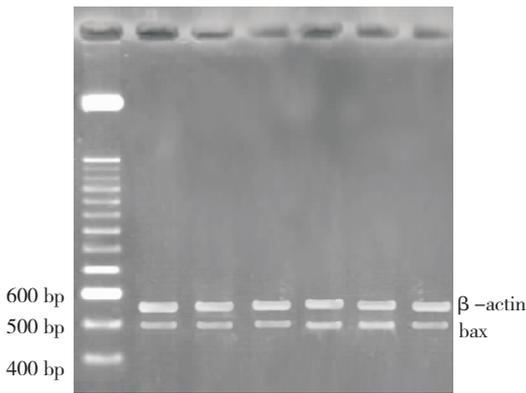


图3 裸鼠肝癌组织 bax mRNA 表达情况

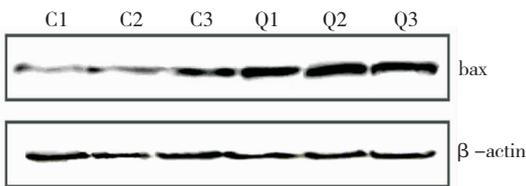


图4 裸鼠肝癌组织 bax 蛋白表达情况

3 讨论

催化磷酸肌醇通路信号转导,通路的生化反应关键酶磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)激酶、磷脂酰肌醇一磷酸(phosphatidylinositol-4-phos-

phate, PIP) 激酶活性增强和第二信使分子三磷酸肌醇(Inositol 1,4,5-trisphosphate, IP3)和二酰基甘油(diacyl glycerol, DG)的产生增加,在肝细胞癌的生长、增殖和演进中起重要作用^[5-6]。bax 基因表达产物上调有促进肿瘤细胞凋亡的作用,反之则抑制凋亡^[7]。但抑制磷酸肌醇通路信号转导能否影响肝癌细胞 bax 基因表达、进而诱导凋亡,目前罕见报道。Quercetin 能同时抑制 PI 激酶和 PIP 激酶活性^[8-10],是磷酸肌醇信号通路抑制剂之一。本实验结果显示,在裸鼠肝内移植人肝癌模型制成饲养2周后,应用磷酸肌醇信号通路抑制剂 quercetin 能降低裸鼠移植人肝癌细胞内 IP3 含量,从 mRNA 和蛋白质水平上调 bax 基因表达,显著抑制裸鼠肝内移植人肝癌增长,抑瘤率在50%以上。说明抑制磷酸肌醇信号通路转导能力,可以在一定程度上调节与肝癌细胞凋亡有关的 bax 基因表达,有效地抑制动物肝原位移植人 HCC 的增长。这一作用可能与调节 bax 基因表达密切相关。由于 mRNA 与蛋白质的变化并不一定绝对一致, mRNA 的微小变化可能引起其编码蛋白质的显著变化。而蛋白质才是生命活动的直接执行者。故本实验治疗组虽 bax mRNA 表达仅略有增加,而 bax 蛋白表达却显著增加。

Bcl-2 基因家族是细胞凋亡相关基因, bcl-2

和 bax 分别是最有代表性的抑制凋亡和促进凋亡基因, bax 还是 bcl-2 活性的主要调控因子。细胞受到死亡信号刺激后, bcl-2 家族中的促凋亡蛋白在蛋白酶作用下发生构像变化, 从细胞浆移位到细胞器膜上, 尤其是线粒体外膜上, 并与细胞器膜上和膜内的抗凋亡蛋白相互作用, 使抗凋亡蛋白丧失对凋亡的抑制作用, 引起细胞器功能丧失和各种促凋亡因子的释放, 最终导致细胞凋亡^[11]。bcl-2 和 bax 表达水平的高低与凋亡调控直接相关^[7]。bcl-2 在决定细胞生存与死亡上起重要作用, bax 单独作用可加速细胞凋亡的发生, 但当与 bcl-2 形成二聚体时, bax-bcl-2 则在凋亡过程中起制动作用, 保护细胞使之不发生凋亡。bcl/bax 值对决定细胞是否进入凋亡状态有重要意义。当细胞内 bcl-2 较多时, bcl-2 和 bax 的同源二聚体增多, 凋亡趋势减弱; 当细胞内 bax 较多时, 则 bax 本身形成的同源二聚体占主导, 则易于发生凋亡^[7]。本研究结果显示, quercetin 能上调裸鼠移植人肝癌细胞 bax mRNA 和蛋白表达, 抑制肝癌的增长; 提示抑制磷酸肌醇通路信号转导, bax 基因表达上调、诱导细胞凋亡可能与抑制肝癌增长有关。

信号转导最终决定基因表达与细胞增殖和凋亡^[1]。细胞增殖、分化、凋亡三者之间的平衡失调与肝癌的发生发展密切相关^[2-3]。肝癌组织细胞增殖速度永远超过凋亡速度, 在肝癌发生发展中起重要作用^[12-13]。因此, 通过改变细胞信号转导状态以调节基因表达, 抑制细胞增殖和/或诱导细胞凋亡的方法将达到治疗肝癌的目的。研究表明, quercetin 可降低肝癌细胞 PI 激酶和 PIP 激酶活性, 导致 IP₃ 的产生下降, 使细胞生长滞留于 G₁/S 期, 表现为增殖能力下降、停止甚至引起细胞死亡^[10]; 笔者的体外实验表明, quercetin 能抑制肝癌细胞磷酸肌醇通路信号转导, 上调 bax 基因表达, 促进细胞凋亡。说明 quercetin 既可抑制细胞增殖, 又可诱导细胞凋亡, 理论上可达到治疗肝癌的目的。本研究结果证实抑制细胞磷酸肌醇通路信号转导, 可上调 bax 基因表达, 抑制裸鼠移植人肝癌增长, 为今后在临床上开展应用磷

酸肌醇信号通路抑制剂治疗 HCC 的研究奠定了一定的实验基础。

参考文献:

- [1] 孙大业, 郭艳林, 马力耕. 细胞信号转导[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 2000. 1-9.
- [2] Duan XX, Ou JS, Li Y, *et al.* Dynamic expression of apoptosis-related genes during development of laboratory hepatocellular carcinoma and its relation to apoptosis[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(30): 4740-4744.
- [3] Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptotic and anti-angiogenic strategies in liver and gastrointestinal malignancies[J]. *J Surg Oncol*, 2005, 90(4): 249-259.
- [4] Baskin-Bey ES, Gores GJ. Caspase-8, death-receptor signaling, and hepatocarcinogenesis: the Fas and the furious[J]. *Gastroenterology*, 2005, 129(5): 1790-1792.
- [5] Singhal RL, Look KY, Yeh YA, *et al.* Coordinated increase in activities of the signal transduction enzymes PI kinase and PIP kinase in human cancer cells[J]. *Life Sciences*, 1994, 55(19): 1487-1492.
- [6] Shen F, Xue X, Weber G. Tamoxifen and Genistein Synergistically Down-Regulate Signal transduction and Proliferation in Estrogen Receptor-Negative human Breast Carcinoma MDA-MB-435 Cells[J]. *Anticancer Research*, 1999, 19(3A): 1657-1662.
- [7] Yang E, Zha J, Jockel J, *et al.* Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death[J]. *Cell*, 1995, 80(2): 285-291.
- [8] Weber G, Shen F, Prajda N, *et al.* increased signal transduction activity and down-regulation in human cancer cells[J]. *Anticancer Research*, 1996, 16(6A): 3271-3282.
- [9] Csokay B, Prajda N, Weber G, *et al.* Molecular mechanism in the antiproliferative action of quercetin[J]. *Life Sciences*, 1997, 60(24): 2157-2163.
- [10] Weber G, Shen F, Prajda N, *et al.* Regulation of the signal transduction program by drugs. *Advan*[J]. *Enzyme Regul*, 1997, 37: 35-55.
- [11] 连君, 曹雪涛, 于益芝. Bcl-2, bax 与肿瘤细胞凋亡[J]. *中国生物治疗杂志*, 2003, 10(3): 232-234.
- [12] Schulte-Hermann R, Bursch W, Low-Baselli A, *et al.* Apoptosis in the liver and its role in hepatocarcinogenesis[J]. *Cell Biol Toxicol*, 1997, 13(4-5): 339-348.
- [13] Grasl-Kraupp B, Ruttikay-Nedecky B, Mullauer L, *et al.* Inherent increase of apoptosis in liver tumors: implications for carcinogenesis and tumor regression[J]. *Hepatology*, 1997, 25(4): 906-912.