



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.11.015
http://dx.doi.org/10.7659/j.issn.1005-6947.2021.11.015
Chinese Journal of General Surgery, 2021, 30(11):1382-1386.

· 简要论著 ·

白桦脂醛对裸鼠移植瘤生长的抑制作用及机制研究

黄攀豪¹, 汤紫照¹, 聂方钦¹, 符阳霞¹, 晏欣¹, 李岱², 郭韧¹

(1. 中南大学湘雅三医院 药学部, 湖南 长沙 410013; 2. 中南大学湘雅医院 I 期临床试验中心, 湖南 长沙 410008)

摘要

背景与目的: 白桦脂醛是一种天然的 ROR γ t 激动剂, 研究发现 ROR γ t 激动剂是潜在的肿瘤免疫治疗药物, 提示白桦脂醛可能具有抗肿瘤的作用。本文通过体内实验探讨白桦脂醛对 A549 细胞裸鼠成瘤的影响及可能机制。

方法: 将 A549 细胞按 2×10^6 个/100 μ L 通过腋下皮下注射植入裸鼠, 成瘤后将裸鼠随机分为对照组和低、中、高 3 个剂量的白桦脂醛处理组, 每组 7 只, 分别给与溶剂 DMSO、50 mg/kg 白桦脂醛、100 mg/kg 白桦脂醛、200 mg/kg 白桦脂醛腹腔注射, 1 次/d。随后每周进行 2 次瘤体测量; 处理 3 周后, 取移植瘤行 HE 染色观察瘤体组织形态, TUNEL 染色检测细胞凋亡水平, Western blot 检测细胞内增殖信号通路 Akt、ERK、STAT3 蛋白及自噬相关蛋白 LC3 和 P62 的表达。

结果: 与对照组比较, 各剂量白桦脂醛处理组肿瘤的生长被明显抑制 (均 $P < 0.05$); 瘤体组织均出现大小不等的坏死区, TUNEL 染色阳性细胞数明显增加 (均 $P < 0.05$); 瘤体组织 p-Akt、p-ERK、p-STAT3、p62 的表达水平明显下调, LC3 III/I 表达水平明显上调 (均 $P < 0.05$)。以上作用均呈一定的剂量依赖趋势。

结论: 白桦脂醛能够降低 A549 细胞的成瘤能力, 抑制裸鼠皮下移植瘤的生长, 机制可能是其与对肿瘤细胞内多条促增殖信号通路的抑制以及促进细胞自噬作用有关。

关键词

异种移植模型抗肿瘤试验; 白桦脂醛; 孤儿核受体; 小鼠, 裸

中图分类号: R965.1

中国传统医药及其在临床疾病中的应用为提高全世界人民的健康水平做出了巨大贡献。近几十年来, 青蒿素在治疗疟疾、三氧化二砷在治疗白血病等方面取得的重大成就, 证实了中国传统中医药的发展前景^[1-2]。在前期的筛查研究中, 笔者提取了部分中药单体有效成分, 并通过高通量筛选技术筛选出了一些具有明显抗癌活性的中药提取物, 其中筛选出的提取物白桦脂醛对 A549 细胞活性展现出了较大的抑制作用。笔者通过网络药理学方法筛选白桦脂醛作用于肺癌的靶点时, 发现 EGFR 是其潜在靶点, 而 EGFR 可调控 Raf/

MEK/ERK 和 PI3K/Akt/mTOR 等通路, 起到调节肿瘤细胞增值、分化和侵袭转移的作用; IL-6/JAK/STAT3 也是 EGFR 下游的重要信号传导途径, 在调节肿瘤细胞增殖过程中起重要作用。因此, 笔者猜想白桦脂醛的抑瘤作用可能和 Akt、ERK、STAT3 通路有关。由于自噬在肿瘤进展中起着重要的作用, 故白桦脂醛也有可能通过调节 A549 细胞的自噬水平发挥抑瘤作用。因此, 本研究拟通过运用裸鼠皮下成瘤实验进一步在整体动物上观察白桦脂醛的抑瘤作用, 并通过分子生物学实验手段确定白桦脂醛抑瘤作用可能的机制。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82073850); 湖南省自然科学基金资助项目 (2019JJ80032)。

收稿日期: 2021-04-08; **修订日期:** 2021-10-17。

作者简介: 黄攀豪, 中南大学湘雅三医院主管药师, 主要从事肿瘤药理学和治疗药物监测方面的研究。

通信作者: 郭韧, Email: pharmguor@csu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

白桦脂醛购美国 MCE 公司, 分子式为 $C_{30}H_{48}O_2$, 分子量 440.70, 纯度 = 98.56%; TUNEL 试

剂盒 (KGA704) 购自凯基生物 (KeyGEN BioTECH); 苏木素伊红 (HE) 染色试剂盒购自 Wellbio 公司; 抗 Akt、磷酸化 AKT (P-Akt)、抗 ERK、抗 STAT3、抗 LC3、抗 p62、抗 actin 抗体购自美国 Proteintech 公司; 磷酸化 ERK (P-ERK) 和磷酸化 STAT3 (P-STAT3) 抗体购自英国 Abcam 公司; DMEM (含 4 500 mg/L D-葡萄糖) 培养基和胎牛血清购自美国 Sigma 公司。

1.2 实验细胞和动物

人非小细胞肺癌细胞 A549 购自上海中乔新舟公司, 培养于 DMEM 高糖培养基含 10% 胎牛血清, 置 37 °C 恒温含 5%CO₂ 培养箱中培养。4 周龄 SPF 级雄性裸鼠, 12~15 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 动物许可证号: SYXK (湘) 2020-0019。

1.3 实验方法

1.3.1 成瘤模型的建立和分组给药 白桦脂醛溶于 DMSO 配置成 20 mg/mL 储备液。适应性喂养 1 周后, 按 2×10^6 个/100 μ L 人非小细胞肺癌细胞 A549 通过腋下皮下注射植入裸鼠, 待瘤体生长到合适大小, 随机分成 4 组, 每组 7 只裸鼠, 分别为对照组 (DMSO), 白桦脂醛低剂量组 (50 mg/kg), 中剂量组 (100 mg/kg), 白桦脂醛高剂量组 (200 mg/kg), 腹腔注射给药干预持续 1 周, 1 次/d。

1.3.2 肿瘤生长曲线和抑瘤率测定 成瘤后每周进行 2 次瘤体测量, 肿瘤大小用游标卡尺测定长轴 (A) 和短轴 (B) 计算, 计算公式为 $V (\text{cm}^3) = A \times B^2/2$ 。种瘤 21 d 后, 采用颈椎脱臼处死裸鼠。

1.3.3 HE 染色 烤片, 二甲苯脱蜡; 梯度浓度的乙醇中复水; 用苏木素染细胞核, 蒸馏水冲洗后用 PBS 返蓝; 伊红染细胞核, 蒸馏水冲洗, 再用梯度酒精脱水, 取出后置于二甲苯; 中性树胶封片, 用光学显微镜观察阳性细胞。

1.3.4 TUNEL 染色 烘片, 二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水合; 高碘酸封闭后依次加 Proteinase K 工作液、内源性亲和素封闭 A 液和内源性生物素封闭 B 液孵育, 再加 TdT 酶反应液和 Streptavidin-HRP 标记液和 DAB 工作液反应, 漂洗后加苏木素染液染色; 1% 盐酸甲醇中分化; 梯度无水乙醇脱水, 晾干后加中性树胶和盖玻片, 用光学显微镜观察拍照 TUNEL 阳性细胞。

1.3.5 Western blot 检测蛋白表达水平 取各组肿瘤组织加 RIPA 裂解, 提取组织总蛋白; 取蛋白上

清, 蛋白定量; 10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭, 依次加一抗和二抗孵育; ECL 化学发光液与膜孵育, 用塑封膜将膜包裹杂交膜, 在暗盒内与 X 胶片曝光, 显影冲洗; 扫描底片, 用 Quantity one 软件统计灰度值计算相对表达量。

1.4 统计学处理

实验数据采用 SPSS 24.0 软件 (IBM, USA) 进行统计分析, 多组间比较采用方差分析, 进一步多组内两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 裸鼠成瘤实验结果

裸鼠成瘤实验显示, 各组小鼠接种 A549 细胞 3 周后, 接种部位均出现明显肿瘤。于第 3 周实验结束时, 各组裸鼠移植瘤情况见图 1; 不同剂量的白桦脂醛均可一定程度地减慢移植瘤的生长, 并呈一定的剂量依赖性, 3 周后, 中、高剂量白桦脂醛处理组移植瘤体积与对照组的差异有统计学意义 [$(0.33 \pm 2.57) \text{ cm}^3 \text{ vs. } (0.53 \pm 0.10) \text{ cm}^3$; $(0.24 \pm 5.42) \text{ cm}^3 \text{ vs. } (0.53 \pm 0.10) \text{ cm}^3$, 均 $P < 0.01$], 而低剂量白桦脂醛处理组移植瘤体积与对照组间差异无统计学意义 [$(0.43 \pm 1.70) \text{ cm}^3 \text{ vs. } (0.53 \pm 0.10) \text{ cm}^3$, $P > 0.05$] (图 2)。



图 1 各组裸鼠移植瘤生长情况

2.2 移植瘤组织病理情况比较

各组裸鼠移植瘤呈圆形、椭圆形或分叶状包块, 包膜完整, 与周围组织分界清楚。HE 染色后显微镜下可观察到不同白桦脂醛剂量组小鼠瘤体组织呈现出不同程度的退行性病变, 部分区域出

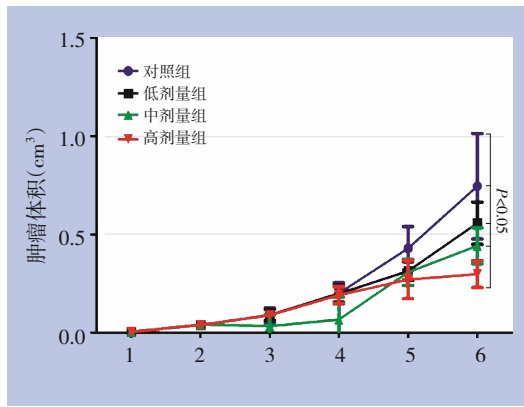


图2 各组移植瘤体积变化曲线

现明显细胞坏死区，在高剂量白桦脂醛处理组较为明显。对照组肿瘤细胞生长旺盛，大小不一，有一定异型性，细胞核较大，瘤体组织未见明显坏死（图3）。

2.3 各组瘤体组织细胞增凋亡平比较

使用TUNEL染色检测了肿瘤组织中细胞的凋亡比例，结果显示，不同剂量的白桦脂醛处理成瘤小鼠后，使瘤体组织中TUNEL染色阳性细胞数明显增加，并且呈剂量依赖性，差异有统计学意义（ $P < 0.01$ ）（图4）。

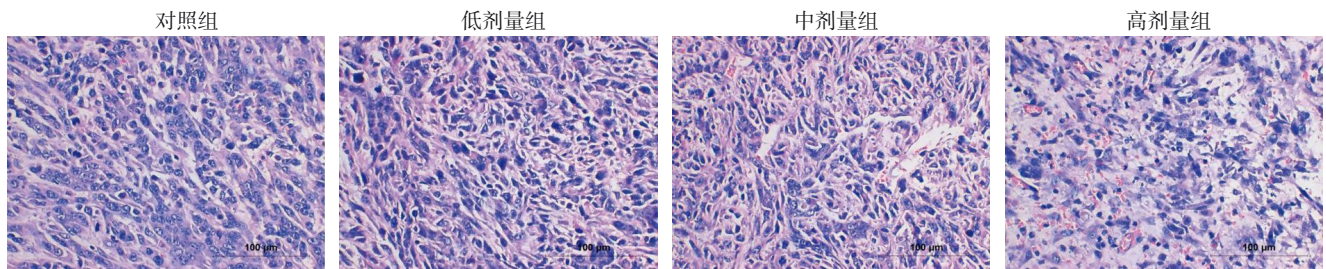


图3 各组瘤体组织 HE 染色情况（×100）

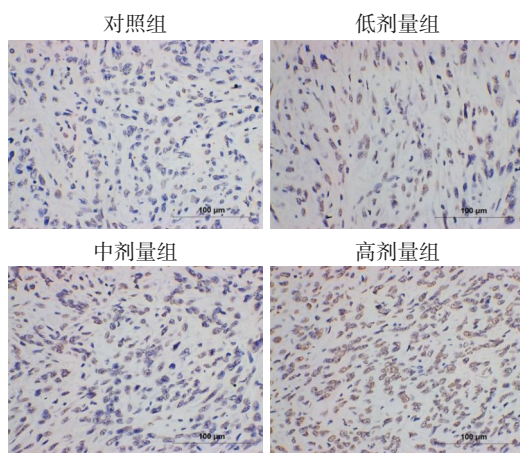
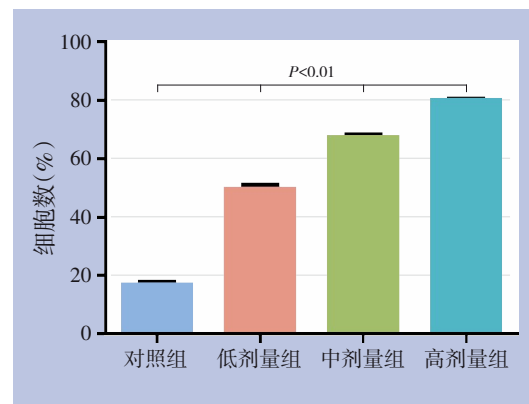


图4 各组瘤体组织 TUNEL 染色结果（×100）



2.4 白桦脂醛对肿瘤组织细胞内增殖信号通路的影响

通过 Western blot 法检测白桦脂醛给药后对瘤体组织细胞中 Akt、ERK、STAT 信号通路的变化，结果发现白桦脂醛可呈剂量依赖性地抑制 Akt、ERK、STAT 信号通路的活化，表现为 p-Akt、p-ERK、p-STAT3 表达的明显下调，差异均有统计学

意义（均 $P < 0.05$ ）（图5）。

2.5 白桦脂醛对肿瘤组织自噬水平的影响

本研究还观察了白桦脂醛对瘤体组织的自噬水平的影响，结果显示，白桦脂醛可呈剂量依赖性地提升瘤体组织的自噬水平，表现为 p62 表达的降低及 LC3 III/I 水平的升高，差异均有统计学意义（均 $P < 0.05$ ）（图6）。

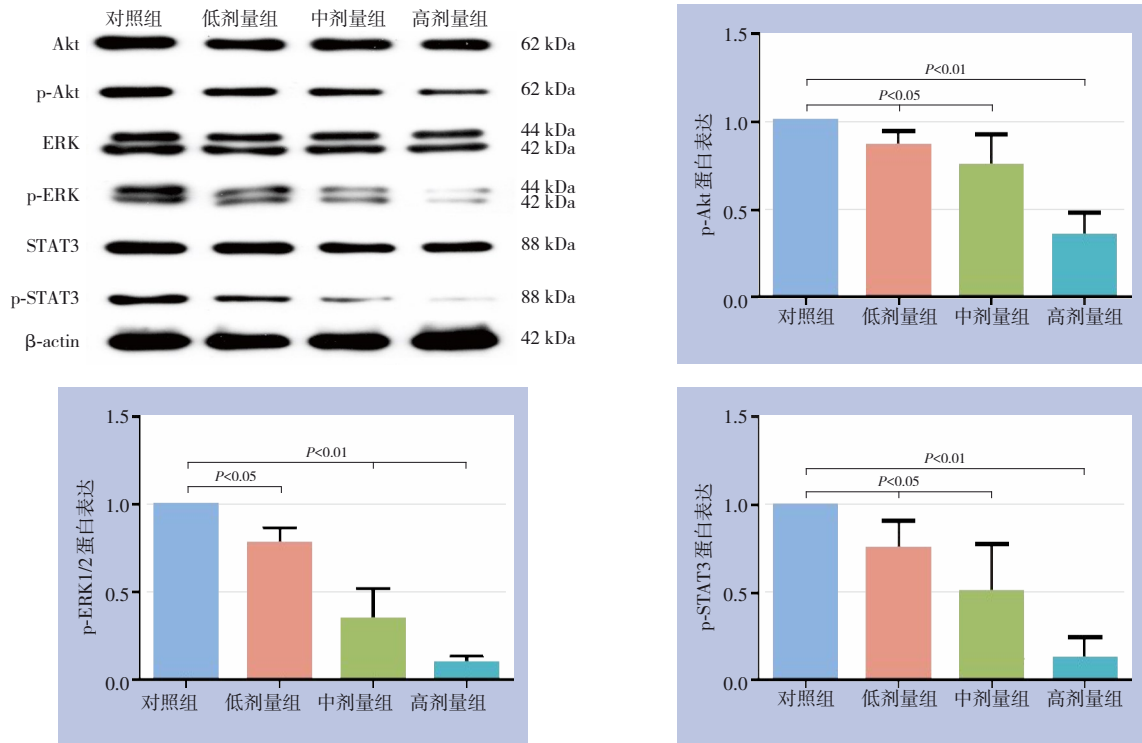


图 5 白桦脂醛对细胞内增殖信号通路相关蛋白水平的影响

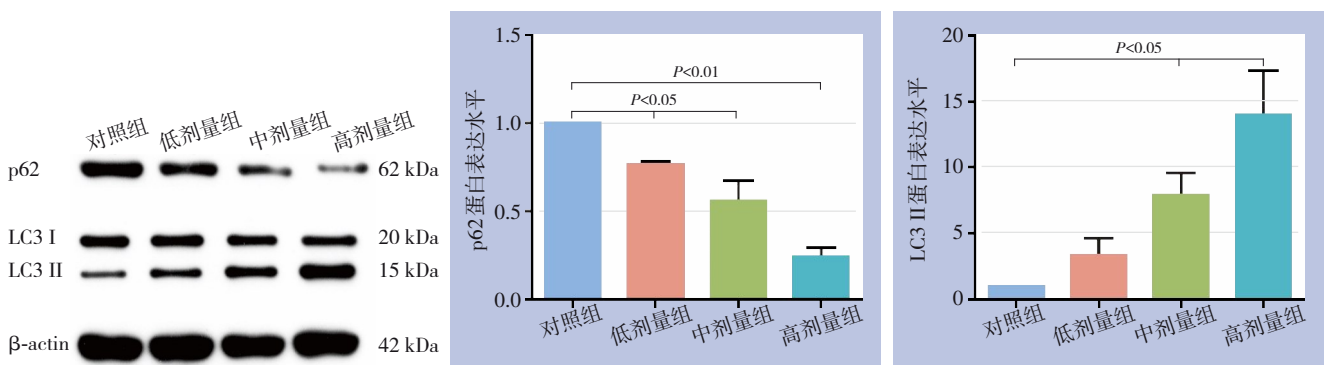


图 6 白桦脂醛对自噬相关蛋白水平的影响

3 讨论

以往对白桦脂醛作用的研究较少。Chung 等^[3]研究表明, 白桦脂醛作为一种 FtsZ 蛋白抑制剂, 能快速抑制金黄色葡萄球菌的生长, 发挥杀菌作用, 并与其他抗菌药物具有协同作用。此外, 有研究^[4-5]表明白桦脂醛作为桦木属植物提取物具有一定的血糖调节能力。Yang 等^[6]也发现白桦脂醛是一种天然的 ROR γ t 激动剂, 可通过直接与蛋白质结合改变 ROR γ t 的热稳定性。ROR γ t 的激动剂和抑制剂分别是潜在的肿瘤免疫治疗药物和自身免疫性疾病药物, 提示白桦脂醛可能具有一定的免疫调节作用^[7-8]。由于肿瘤细胞较正常细胞表现出特异的代谢活性 (偏向于以糖酵解和脂代谢方式

供能) 和免疫活性, 因此白桦脂醛可能通过对代谢和免疫的调节发挥抗肿瘤作用。然而, 关于白桦脂醛抗肿瘤作用的实验数据却未见报道。本研究在前期高通量筛选数据的基础上, 通过裸鼠皮下成瘤实验在整体动物上进一步验证了白桦脂醛的抑瘤作用, 并通过分子生物学技术确定了其主要参与的分子信号通路。

A549 细胞是一种常用的非小细胞肺癌细胞株, 常用于抗肿瘤药物的药筛和药敏实验, 本研究中将其接种于裸鼠皮下 1 周后, 成瘤率达到了 100%, 所有接种个体均形成了大小不等的种植瘤。本实验中设置了低、中、高剂量的白桦脂醛给药组, 结果显示白桦脂醛可明显降低成瘤小鼠最终的瘤体体积, 提示了白桦脂醛在整体动物水平能抑制肿瘤细胞的生长。确定了白桦脂醛抑制肿瘤细胞

生长的作用后,进一步对不同处理组的瘤体组织进行了病理学检查。瘤体组织HE染色结果显示不同剂量给药的裸鼠移植瘤镜下呈现不同程度片状坏死区,坏死区肿瘤细胞结构模糊,细胞核裂解消失,坏死灶周边有少量残存的肿瘤细胞。这一结果提示,白桦脂醛对瘤体组织A549细胞的活性有明显的抑制作用。

为了进一步确定白桦脂醛对瘤体组织细胞生长活性的影响,研究中还使用TUNEL染色检查了瘤体组织处于凋亡状态的细胞数量,与白桦脂醛的抑瘤作用一致,白桦脂醛处理后瘤体组织中凋亡细胞数明显增加,表明白桦脂醛通过对A549细胞内信号通路的调节,打破了细胞原有的凋亡状态的平衡,使细胞趋向于凋亡。肿瘤细胞与正常细胞相比,其胞内促存活信号通路明显活化,主要包括Akt、ERK、STAT等信号通路的活化^[9-11]。本研究中运用Western blot的方法检测了白桦脂醛给药后对瘤体组织细胞中Akt、ERK、STAT信号通路的影响,结果发现白桦脂醛可呈剂量依赖性地抑制Akt、ERK、STAT信号通路的活化,表明白桦脂醛可通过对多条分子信号通路的影响发挥抑瘤作用。既往的研究证实了异常的自噬水平参与了肿瘤疾病的发生发展,但关于自噬在肿瘤疾病中是起到抑制还是促进的作用,有很多相互矛盾的报道^[12-13]。本研究中另一重要发现是白桦脂醛的抑瘤作用可能与自噬有关,白桦脂醛可明显上调瘤体组织细胞中的自噬水平。由于自噬水平的高低对细胞的代谢和能量供应均有密切关系,因此白桦脂醛的抑瘤作用也可能与其对自噬的调节有一定关系,未来需要更进一步的机制实验以证明这一关系。

总之,本研究通过裸鼠皮下肿瘤实验初步证实了一种具有显著药理学活性的植物提取物白桦脂醛,能够显著抑制裸鼠皮下移植瘤的生长,降低A549细胞的成瘤能力,其机制可能与对肿瘤细胞内多条促增殖信号通路的抑制有关。白桦脂醛抑瘤作用的发掘可能为今后临床治疗肺癌及其他恶性肿瘤提供一定的思路。

参考文献

- [1] Talman AM, Clain J, Duval R, et al. Artemisinin Bioactivity and Resistance in Malaria Parasites[J]. Trends Parasitol, 2019, 35(12): 953-963. doi: 10.1016/j.pt.2019.09.005.
- [2] Hoonjan M, Jadhav V, Bhatt P. Arsenic trioxide: insights into its evolution to an anticancer agent[J]. J Biol Inorg Chem, 2018, 23(3): 313-329. doi: 10.1007/s00775-018-1537-9.
- [3] Chung PY. Novel targets of pentacyclic triterpenoids in Staphylococcus aureus: A systematic review[J]. Phytomedicine, 2020, 73:152933. doi: 10.1016/j.phymed.2019.152933.
- [4] Atta-Ur-Rahman, Zareen S, Choudhary MI, et al. alpha-Glucosidase inhibitory activity of triterpenoids from Cichorium intybus[J]. J Nat Prod, 2008, 71(5): 910-913. doi: 10.1021/np800001v.
- [5] Jafari Khataylou Y, Ahmadi Afshar S, Mirzakhani N. Betulinic acid reduces the complications of autoimmune diabetes on the body and kidney through effecting on inflammatory cytokines in C57BL/6 mice[J]. Vet Res Forum, 2021, 12(2): 203-210. doi: 10.30466/vrf.2019.101178.2409.
- [6] Yang F, Zhang R, Ni D, et al. Discovery of betulinaldehyde as a natural RORgammat agonist[J]. Fitoterapia, 2019, 137:104200. doi: 10.1016/j.fitote.2019.104200.
- [7] Fillon M. Immune checkpoint inhibitors may be safe for patients with preexisting autoimmune disease[J]. CA Cancer J Clin, 2020, 70(1):3-4. doi: 10.3322/caac.21587.
- [8] Werner TA, Nolten I, Dizdar L, et al. IAPs cause resistance to TRAIL-dependent apoptosis in follicular thyroid cancer[J]. Endocr Relat Cancer, 2018, 25(3):295-308. doi: 10.1530/ERC-17-0479.
- [9] Singh P, Kumar V, Gupta SK, et al. Combating TKI resistance in CML by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway in combination with TKIs: a review[J]. Med Oncol, 2021, 38(1):10. doi: 10.1007/s12032-021-01462-5
- [10] Morelli AP, Tortelli TC Jr, Mancini MCS, et al. STAT3 contributes to cisplatin resistance, modulating EMT markers, and the mTOR signaling in lung adenocarcinoma[J]. Neoplasia, 2021, 23(10): 1048-1058. doi: 10.1016/j.neo.2021.08.003.
- [11] Cristofolletti C, Bresin A, Picozza M, et al. Blood and skin-derived Sezary cells: differences in proliferation-index, activation of PI3K/AKT/mTORC1 pathway and its prognostic relevance[J]. Leukemia, 2019, 33(4):1231-1242. doi: 10.1038/s41375-018-0305-8.
- [12] Li X, He S, Ma B. Autophagy and autophagy-related proteins in cancer[J]. Mol Cancer, 2020, 19(1):12. doi: 10.1186/s12943-020-1138-4.
- [13] Antunes F, Erustes AG, Costa AJ, et al. Autophagy and intermittent fasting: the connection for cancer therapy?[J]. Clinics (Sao Paulo), 2018, 73(suppl 1):e814s. doi:10.6061/clinics/2018/e814s.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式:黄攀豪,汤紫照,聂方钦,等.白桦脂醛对裸鼠移植瘤生长的抑制作用及机制研究[J].中国普通外科杂志,2021,30(11):1382-1386. doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2021.11.015
Cite this article as:Huang PH, Tang ZZ, Nie FQ, et al. Inhibitory effect of betulinaldehyde on tumor xenograft growth in nude mice and the mechanism[J]. Chin J Gen Surg, 2021, 30(11): 1382-1386. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2021.11.015