

金属硫蛋白在铜绿治疗小鼠实验性肝癌中的作用

黄国健¹ 周 舒¹ 杜皓萍¹ 张 波² Bharat J³

内容摘要 目的:研究金属硫蛋白(metallothionein, MT)在铜绿治疗实验性小鼠肝癌(H₂₂)过程中所起的作用。方法:采用原子吸收法、银饱和法、组织化学法同步观察了肝脏及肿瘤组织中铜元素与 MT 的含量及分布规律。结果:(1)治疗组肝组织内铜及 MT 含量均明显高于模型组;(2)治疗组肿瘤组织中铜含量明显高于模型组,而 MT 含量显著低于模型组;(3)组织化学检测可见治疗组肝细胞胞浆和核内铜元素及 MT 同时存在。肿瘤组织内铜大量存在,而 MT 很少或呈阴性。结论:(1)肝组织内大量的 MT 可与铜耦合,有利于保护肝脏免受铜的损害;(2)肿瘤组织内 MT 减少有利于发挥铜对肿瘤细胞的杀伤作用。

关键词 铜绿 金属硫蛋白 银饱和法 组织化学

Study on Role of Metallothionein in Anticancer Effect of Copper Green on Treatment of Experimental Hepatocarcinoma in Mice HUANG Guojian, ZHOU Shu, DU Haoping, et al *China-Japan Friendship Medical Institute, Beijing (100029)*

Objective: To study the role of metallothionein (MT) in the anticancer effect of copper green on experimental hepatoma (H₂₂) in mice. **Methods:** Atomic absorbency spectrometry (AAS), silver saturation method and histochemistry method were used to study the content and distribution of copper and MT in liver and tumor tissues. **Results:** (1) Both copper and MT contents in liver tissue of the copper treated group were significantly higher than that of the control group ($P < 0.001$ in both). (2) Copper content in tumor tissue of the treated group was higher whereas MT content was markedly lower than that of the control group ($P < 0.001$). (3) Histochemical examination showed that in the copper treated group, both copper and MT existed simultaneously in plasma and nuclei of liver cells, while in the tumor tissue, rich in copper but few or negative in MT existed. **Conclusions:** (1) In liver tissue, large amount of MT is coupled with copper which is helpful to protect liver from the damage of copper. (2) The decrease of MT in tissue of tumor could be beneficial for copper to exert full effect in killing tumor cell.

Key words copper green, metallothionein, silver saturation method, histochemical method

国内外已有许多关于铜具有抗肿瘤作用的研究报道。因为进入机体的铜约有 50% 储存在肝脏,肝功能是否受损是人们十分关注的问题。在我们近十年来的临床观察及实验研究中,在铜绿有效抗癌情况下,机体的肝肾功能未见明显变化,显示了中药“驱邪不伤正”的两个方面。近年来有关金属硫蛋白(metallothionein, MT)在降低重金属毒性方面具有的独特作用这一事实,提示我们必须考虑 MT 在铜“祛邪而不伤正”中的可能作用。我们对此进行了研究,现报告如下。

材料和方法

1 材料

1.1 动物 NIH 雄性小鼠,体重(20.3 ± 1.5)g,由中国中医研究院动物中心提供。

1.2 瘤株 小鼠肝癌(H₂₂)细胞购自中国医学科学院药物研究所,本研究室传代保存。

1.3 主要试剂 醋酸铜(代铜绿,化学纯,天津化工厂产品);E9-MT 单克隆抗体(一抗,英国威尔士大学医学院 Bharat J 博士馈赠);Rohdanmine(瑞典 Luka 公司产品);生物素化羊抗兔 IgG(二抗)及 ABC 复合物(北京中山公司产品);Ag、Cu、Zn 元素测试标准液(中国标准测试中心提供);牛血红蛋白(北京华美生物工程公司提供)。

1. 中日友好医院临床医学研究所(北京 100029);2. 北京医科大学分子病理研究室;3. Department of Pathophysiology, University of Wales of College of Medicine, UK

2 方法

2.1 实体瘤模型 H_{22} 细胞 $5 \times 10^5/\text{ml}$, 每只 0.2ml 接种于小鼠右腋后皮下造成实体瘤模型。随机分为治疗组和模型组, 每组 10 只。

2.2 给药方法 从荷瘤次日起, 治疗组小鼠每日按 150mg/kg 的醋酸铜溶液 0.4ml 灌胃, 模型组小鼠灌服等量自来水, 均连续给药 10 天。

2.3 组织处理 实验第 11 天引颈处死小鼠, 剥取瘤组织称重备用, 同时取出肝脏备用。按下式计算抑瘤率:

$$\text{抑瘤率}(\%) = \frac{\text{模型组瘤重} - \text{治疗组瘤重}}{\text{模型组瘤重}} \times 100\%$$

2.4 原子吸收分光光度计 (HITACHI-180-80 型) 测定肝脏及肿瘤组织中的铜 采用火焰法⁽¹⁾, 取实验小鼠肝脏和肿瘤组织各 0.5g, 三蒸水反复清洗, 吸水纸吸干, 电子天平称重, 用硝酸、高氯酸、三蒸水按 3:3:3:1(v/v/v/g 组织) 配制, 加热消化至无色, 10ml 容量瓶三蒸水定容。

2.5 组织铜化学染色 采用 Rohdanmine 法⁽²⁾, 每毫升无水乙醇加入 Rohdanmine 100mg 配制原液, 取原液 6ml 加三蒸水至 100ml 成染色液。切片按常规脱蜡、水化, 置染色液中 37℃ 温育 6~18h, 蒸馏水洗 5 次, 苏木素快速复染, 快速脱水 (80%、95%、100% 乙醇各 1min), 二甲苯亮化 (3 次, 各 1min), 中性树胶固定封片, 油镜下观察细胞浆和核中鲜红色铜颗粒。

2.6 金属硫蛋白测定 银饱和法测定按文献⁽³⁾方法, 取小鼠肝脏、瘤组织, 三蒸水反复冲洗, 吸尽水分, 称重 0.2~0.5g, 加 0.25mol/L 蔗糖溶液 1ml, 匀浆, 倒出匀浆液, 加醇仿液 (100ml 无水乙醇加 8ml 氯仿) 1ml, 洗净匀浆器, 与原匀浆液充分混和, 4℃ 离心 30min (1000r/min)。取上清 50μl 置 1.5ml 离心管中, 加 D 缓冲液 (0.5mol/L 甘氨酸-氢氧化钠, pH8.5) 750μl, 硝酸银缓冲液 (D 缓冲液 100ml 加硝酸银 3.2mg) 500μl, 20℃ 混匀 5min, 加 2% 牛血红蛋白 100μl, 20℃ 混匀 5min, 100℃ 加热 3~4min, 立即置冰水中 5~10min, 离心 10min (1000r/min), 取上清 1ml, 设立空白对照。原子吸收分光光度计 (火焰法) 测定银含量。根据 1 个 MT 分子结合 17 个银原子, 计算 MT 浓度。

2.7 MT 免疫组织化学染色 按文献⁽⁴⁾方法。石蜡切片, 常规脱蜡、脱水, 0.3% H_2O_2 加甲醇封闭内源性过氧化物酶, 0.1% 胰蛋白酶 37℃ 消化 20min, 小牛血清 1:100 稀释封闭, 37℃ 温育 20min, 加 1:5000 稀释的一抗, 37℃ 温育 1h, 加 1:100 稀释的生物素化

二抗, 37℃ 温育 40min, 加 1:100 稀释的 AB 复合液, 37℃ 温育 40min, 加 DAB- H_2O_2 染色 5~10min, 自来水冲洗, 苏木素复染返蓝, 分化, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封闭。

结 果

1 醋酸铜对实验性 H_2O_2 的抑制作用 瘤重模型组为 $(1.27 \pm 0.31)\text{g}$, 治疗组为 $(0.61 \pm 0.24)\text{g}$; 治疗组的抑瘤率为 51.97%。

2 两组小鼠肝脏、肿瘤组织中铜 (Cu) 与 MT 含量 见表 1。治疗组肝组织中的 Cu 和 MT 含量均明显高于模型组 ($P < 0.01$); 肿瘤组织中的 MT 含量明显低于模型组 ($P < 0.05$), Cu 含量高于模型组 ($P < 0.01$)。在肝组织, Cu 与 MT 的变化比值 [Cu:MT = (治疗组 Cu - 模型组 Cu) / (治疗组 MT - 模型组 MT)] 为 1:2.78; 而在肿瘤组织中 Cu 与 MT 的变化比值为 1:-408。

表 1 两组小鼠肝脏、肿瘤组织中 Cu 与 MT 含量比较 ($\mu\text{g/g}$ 组织, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	Cu	MT
肝脏 模型	10	4.00 ± 0.17	316.3 ± 44.8
治疗	10	$58.90 \pm 8.18^{**}$	$469.0 \pm 68.7^{**}$
肿瘤 模型	10	1.90 ± 0.25	316.4 ± 46.2
治疗	10	$2.30 \pm 0.31^*$	$152.2 \pm 22.4^{**}$

注: 与模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 两组小鼠铜与 MT 在肝脏和肿瘤组织细胞中分布特点 治疗组肝组织细胞有大量铜的红色颗粒, 分布于细胞浆和细胞核中, 肝细胞胞膜与核膜形态结构均完好无损; 肿瘤组织内铜颗粒也同样存在于癌细胞胞浆和核中; 在坏死的肿瘤组织内铜的颗粒更加集中; 模型组小鼠肝组织和肿瘤组织内均未检测出铜的颗粒。

E9-MT 单克隆抗体 DAB 染色显示, MT 棕色信号相当广泛地分布于铜治疗小鼠肝组织细胞中, 在汇管区和中央静脉区周围更加明显 (图略)。MT 在细胞浆和细胞核中, 与铜颗粒分布规律相一致。在治疗组小鼠肿瘤组织中, MT 染色为弱阳性或阴性, 模型组小鼠肝组织和肿瘤组织内 MT 也同样。此结果与用银饱和法测定的结果相一致。

讨 论

应用铜化合物治疗肿瘤, 铜的毒性 (特别是对肝脏可能产生的损伤) 是人们普遍关心的问题。在中医药学中关于铜的毒性问题曾有不少记载。《神农本草经》⁽⁵⁾ 中记述含铜药物: 如绿青, 寒酸, 无毒; 扁青, 小

寒,无毒;白青,甘酸,咸平,无毒;胆矾酸,平寒,有毒。至于铜绿⁽⁶⁾,《嘉佑本草》认为属平,微毒;《本草经疏》认为属酸苦涩,微毒;《中药大辞典》认为属酸涩,平,有毒等。近十年来,在我们应用铜治疗肿瘤的临床及实验研究中,从肝、肾功能及血象等均未见明显不良反应。有研究指出当机体摄取铜后,在肝组织内诱导合成 MT,并与铜离子耦合成铜 MT,是防止铜毒性的的重要途径⁽⁷⁾。MT 是一种小分子蛋白质,具有耦合金属离子,调节金属离子在体内的平衡、代谢及转运功能;有较强的清除自由基作用,尤其对羟自由基的清除作用是 SOD 的 675 倍⁽⁸⁾。

本实验结果显示,当荷瘤小鼠用铜治疗时,肝组织和肿瘤组织均可见铜的聚集,二者的细胞浆和细胞核内均出现大量的铜颗粒。与此同时,肝组织内合成了大量的 MT,明显高于荷瘤模型组,铜颗粒与 MT 的分布相一致,可为铜诱导合成 MT 的佐证。肝组织中铜与 MT 的变化比值为 1:2.78,意味着每一个进入肝组织细胞中的 Cu^{2+} 可以诱导合成 2.78 个 MT。在铜离子进出通道的肝汇管区和中央静脉周围 MT 含量比其他部位更多,可提示 MT 的合成与铜的浓度密切相关。因此,虽然治疗组肝脏中含有大量的铜,但由于 MT 的合成,有效地防止了铜对肝脏可能产生的毒性作用。

治疗组小鼠肿瘤组织的铜含量明显高于模型组,而 MT 却明显低于模型组,铜与 MT 的变化比值为 1:-408,这一非常显著的负相关变化有可能是由于大量的铜离子进入肿瘤组织影响了 MT 的存在状态,使 MT 含量明显降低。治疗组肿瘤组织中,尤其在坏死的肿瘤组织中含有大量的铜颗粒,进一步证实了肿瘤组织中非 MT 铜含量的增多。后者有可能通过 Fenton 氏反应产生较高水平的羟自由基发挥抗肿瘤的作用。

关于肿瘤细胞 MT 的产生可能与肿瘤细胞快速分裂及相关癌基因的表达有关。Angel 研究发现在快速分裂的细胞或在胚胎细胞的特殊阶段 MT 基因的表达非常活跃;同时发现肿瘤促进剂或致癌剂也可以诱导 MT 基因的转录^(9,10)。Schroeder 认为与肿瘤生长相关的细胞因子如 IL-6 等能够促进 MT 的合成⁽¹¹⁾;而且 Schmidt 发现 ras 癌基因与 MT 的合成也有相关性⁽¹²⁾。但关于铜离子进入肿瘤细胞与 MT 水平降低的相关机制尚不清楚,有待进一步研究。

本研究结果表明,在用铜绿治疗肿瘤的过程中,金属硫蛋白在肝脏、肿瘤组织中表达的差异性发挥了“驱邪不伤正”,即抑瘤保肝的双重作用。与此同时,通过对金属硫蛋白的认识也可为研究其他金石类药物的生物效应提供新的思路。

参 考 文 献

1. 孙汉文. 原子吸收光谱分析技术. 北京:中国科学技术出版社,1992:286—294.
2. Lindquist RR. Studies of the pathogenesis of hepatolenticular degeneration II cytochemical methods for the localization of copper. Arch Path 1969;87:370—379.
3. Fuller CE, Elmes ME, Jasani B. Age-related change in metallothionein, copper, copper-related protein, and lipofuscin in human liver: A histochemical and immunohistochemical study. J of Pathology 1990;161:167—172.
4. Bienengraber M, Fordekunz S, Klein D, et al. Determination of Cu containing metallothionein: comparison of Ag saturation assay, thiomolybdate assay and enzyme-linked immunosorbent assay. Analytical Biochemistry 1995;228:69—73.
5. 曹元宁辑注. 本草经. 上海:上海科学技术出版社,1987:26—29.
6. 江苏新医学院. 中药大辞典(缩印本). 上海:上海科学技术出版社,1992:2162.
7. Bremner I. In "Biological Roles of Copper". Excerpta Medica. Amsterdam, 1980:23—48.
8. Hoh D, Magor L, Webb M. The interaction of cadmium induced rat renal metallothionein with bivalent mercury in vitro. Chem Biol Interact 1980;32:125—135.
9. Angel P, Rahmsdorf HJ, Poting A, et al. C-fos mRNA levels in primary human fibroblasts after arrest in various stages of the cell cycle. In cancer Cells/3, growth factors and transformation, edit by Feramisco J Ozanne B, Sties C. Cold Springs Harbor Laboratory NY, 1985:315—319.
10. Angel P, Poting A, Rahmsdorf HJ, et al. Induction of metallothionein and other mRNA species by carcinogens and tumor promoters in primary human skin fibroblasts. Mol. Cell Biol 1986;6:1760—1766.
11. Schroeder JJ, Cousins RJ. Interleukin 6 regulates MT gene expression and zinc metabolism in hepatocytes monolayer cultures. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:3137—3141.
12. Schmidt CJ, Hamer DH. Cell specificity and an effect of ras on human MT gene expression. Proc Natl Acad. Sci USA 1986;83:3337—3350.

(收稿:1999-01-18 修回:2000-01-20)