

蝎毒多肽提取物联合雷帕霉素增强 H₂₂ 肝癌细胞自噬作用的机制研究

赵嵌嵌^{1,2} 张维东² 武利存² 张璐璐^{1,2} 王兆朋² 张月英² 王朝霞² 贾青²

摘要 目的 观察蝎毒多肽提取物 (polypeptide extract from scorpion venom, PESV) 联合雷帕霉素 (Rapamycin) 对 H₂₂ 肝癌肿瘤细胞自噬的增强作用并探讨其作用机制。**方法** 40 只昆明小鼠, 采用皮下接种 H₂₂ 肝癌肿瘤细胞悬液法建立荷瘤模型, 随机分为荷瘤对照组、PESV 高剂量组、PESV 低剂量组及联合组 (PESV 高剂量加雷帕霉素), 每组 10 只。PESV 高、低剂量组分别予 20 mg/kg、10 mg/kg 的 PESV 灌胃, 联合组予雷帕霉素 (2 mg/kg) 及 PESV (20 mg/kg) 灌胃, 连续给药干预 14 天, 隔日测量肿瘤体积, 记录肿瘤生长曲线, 计算抑瘤率。HE 染色观察各组肿瘤组织病理变化。免疫组织化学法检测各组肿瘤组织哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammal target of rapamycin, mTOR)、UNC51 样激酶 1 (UNC-51-like kinase-1, ULK1)、微管相关蛋白 1 轻链 3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3A) 及 B 淋巴细胞瘤蛋白 12-相互作用蛋白 1 (Beclin1) 蛋白表达水平。**结果** 与荷瘤对照组比较, PESV 高、低剂量组及联合组肿瘤生长受到明显抑制 ($P < 0.05$); 与 PESV 高、低剂量组比较, 联合组瘤重及体积明显减小 ($P < 0.05$), PESV 高、低剂量组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。免疫组织化学法显示, 与荷瘤对照组比较, PESV 高、低剂量组及联合组 mTOR 表达水平降低 ($P < 0.05$), ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 PESV 高剂量组比较, 联合组 ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** 蝎毒多肽提取物联合化疗可能是通过抑制 mTOR 的活性, 增强自噬相关蛋白 ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 的表达, 促进细胞自噬从而抑制肿瘤的发展。

关键词 自噬; 蝎毒多肽提取物; 雷帕霉素; H₂₂ 肝癌细胞移植瘤

Mechanism of Polypeptide Extract from Scorpion Venom Combined Rapamycin in Enhancing Autophagy of H₂₂ Hepatoma Cells: an Experimental Study ZHAO Qian-qian^{1,2}, ZHANG Wei-dong², WU Li-cun², ZHANG Lu-lu^{1,2}, WANG Zhao-peng², ZHANG Yue-ying², WANG Zhao-xia², and JIA Qing² 1 School of Medicine and Life Sciences, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan University, Jinan (250062); 2 Department of Pathology, Institute of Basic Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan (250062)

ABSTRACT Objective To observe enhanced effects of polypeptide extract from scorpion venom (PESV) combined Rapamycin on autophagy of H₂₂ hepatoma cells in mice and to explore its possible mechanism. **Methods** The H₂₂ hepatocarcinoma cell suspension was subcutaneously inoculated into 40 Kunming mice. Then tumor-bearing mice were randomly divided into four groups, i.e., the control group, the high dose PESV group, the low dose PESV group, and the combination group (high dose PESV + Rapamycin), 10 in each group. Mice in high and dose PESV groups were administered with 20 mg/kg and 10 mg/kg PESV respectively by gastrogavage. Mice in the combination group were administered with 2 mg/kg rapamycin and 20 mg/kg PESV by gastrogavage. The intervention lasted for 14 successive days. The tumor volume was measured once every other day, the tumor growth curve was drawn, and then the tumor inhibitory rate calculated. Pathological changes of the tumor tissue were observed by HE staining. Protein expression levels of mammal target of rapamycin (mTOR), UNC-51-like kinase-1 (ULK1), microtubule-associated

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81073102, 30873408); 山东省自然科学基金资助项目 (No. ZR2010HQ003)

作者单位: 1. 济南大学山东省医学科学院医学与生命科学学院 (济南 250062); 2. 山东省医学科学院基础医学研究所病理室 (济南 250062)

通讯作者: 张维东, Tel: 0531-82919939, E-mail: zhangweidongkui@163.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.07.0866

protein1 light chain3 (MAP1LC3A), and Beclin1 were detected by immunohistochemical assay. Results The growth of H₂₂ hepatoma transplantation tumor was inhibited in high and low dose PESV groups and the combination group ($P < 0.05$). And there was statistical difference in tumor weight and tumor volume between the combination group and high and low dose PESV groups ($P < 0.05$). There was no statistical difference in tumor weight or tumor volume between the high dose PESV group and the low dose PESV group ($P > 0.05$). Immunohistochemical assay showed that the protein expression of mTOR was higher, but protein expressions of ULK1, MAP1LC3A, Beclin1 were lower in the control group than in the rest 3 groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the high dose PESV group, protein expressions of ULK1, MAP1LC3A, and Beclin1 were obviously lower ($P < 0.05$). Conclusion PESV combined Rapamycin might inhibit the development of H₂₂ hepatoma transplantation tumor in mice possibly through inhibiting the activity of mTOR, enhancing expressions of ULK1, MAP1LC3A, and Beclin1.

KEYWORDS autophagy; polypeptide extract from scorpion venom; rapamycin; H₂₂ hepatoma transplantation tumor

自噬 (autophagy) 与肿瘤的关系是目前自噬研究领域中的热点。自噬与细胞的关系是双重的。对于不同的细胞,自噬的作用可能不同;相同细胞在不同的外部因素作用下,自噬作用也可能不同^[1]。自噬能抑制肿瘤,但同时也会提高肿瘤细胞的耐受性,使肿瘤细胞可以在不利于其生长的环境中更好地生存^[2],因此,在肿瘤的发生、发展中的不同阶段,自噬的作用也不同。蝎毒多肽提取物 (polypeptide extract from scorpion venom, PESV) 是从东亚钳蝎蝎毒中提取的多肽混合物,前期研究已证实 PESV 对 Lewis 肺癌、肝癌、前列腺癌、卵巢癌及 S180 肉瘤等肿瘤生长有明显抑制作用,能显著抑制肿瘤化疗期间再增殖,在提高机体免疫力、抗肿瘤生长及改善症状等方面也有较好疗效^[3-7]。本实验通过观察 PESV 对小鼠肝癌移植瘤自噬相关蛋白表达水平的影响,进一步探讨 PESV 抗肿瘤的机制,为其临床抗肿瘤应用提供理论依据。

材料与方法

1 细胞与动物 40 只清洁级昆明小鼠,雄性,体重 18~22 g,购自山东大学实验动物中心,合格证号:SCXK(鲁)20090001。H₂₂ 肝癌瘤种由山东省医学科学院药物所赠,以腹腔传代形式在小鼠腹腔内传代,瘤种每 7 天传代 1 次。

2 试剂与仪器 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammal target of rapamycin, mTOR) 购自 Cell Signaling Technology (批号:2983);UNC51 样激酶 1 (UNC-51-like kinase-1, ULK1)、微管相关蛋白 (microtubule-associated protein 1 light chain 3, MAP1LC3A)、Beclin 1 购自北京博奥森生物技术有限公司 (批号分别为 bs-3062R、bs-4309R 及 bs-1353R);DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术

有限公司)。雷帕霉素购自北京华迈科技公司 (批号:BJ130218010)。蝎毒冻干粉购自山东邹平县蝎蚁生物科技有限公司。PESV 为一种含有 50~60 个氨基酸的多肽混合物,纯度为 89.1%,分子量 6 000~7 000 kD, pH 值稳定,由本室提取制备^[7]。用 PBS (pH 7.4) 按 1 g/40 mL 的比例溶解冻干粉得到蝎毒液;5 000 r/min,离心 30 min,然后过滤将微细泥沙颗粒清除;再取上清液 12 000 r/min,离心 30 min,清除大分子黏蛋白;取上清液进行过滤,并收集滤液;将收集后的滤液置于 -80 ℃ 超低温冰箱冷冻 24 h,然后置于冻干机中真空干燥 72 h,并进行收集;依次进行葡聚糖凝胶 G-50 和阳离子交换树脂层析,将层析液于 -80 ℃ 置于超低温冷冻 24 h,并在冻干机中真空干燥 72 h,然后收集 PESV 冻干粉。DM4000B 光学显微镜、LeicaQwin V3 图像分析软件 (德国 Leica 公司)。

3 造模及分组 参照文献^[7],建立 H₂₂ 肝癌皮下种植瘤模型。无菌抽取 H₂₂ 肝癌荷瘤小鼠腹腔肿瘤细胞,用生理盐水稀释,调整 H₂₂ 肝癌细胞浓度至 1×10^7 /mL,于每只小鼠的右腋下注射 0.2 mL 肿瘤细胞悬液 (第 0 天)。接种后第 6 天测量肿瘤体积均达 60~80 mm³,造模成功率 100%。第 7 天采用随机数字表法将小鼠分为荷瘤对照组、PESV 高剂量组、PESV 低剂量组及联合组,每组 10 只。PESV 高剂量组予 PESV (20 mg/kg) 灌胃;PESV 低剂量组予 PESV (10 mg/kg) 灌胃;联合组予雷帕霉素 (2 mg/kg) 及 PESV (20 mg/kg) 灌胃,以上给药均每天 1 次。荷瘤对照组每日予生理盐水灌胃,灌胃体积均为 0.1 mL/10 g,连续用药 14 天。

4 观察指标及检测方法

4.1 肿瘤体积增长曲线绘制及抑瘤率计算 从用药当天开始,隔日用游标卡尺测量肿瘤长径 (A) 及垂

直短径(B), 计算肿瘤体积, 计算公式: $V = A \times B^2 / 2$, 绘制肿瘤体积增长曲线。末次用药 24 h 后, 取完整肿瘤组织, 称重, 计算抑瘤率。计算公式: 抑瘤率 (%) = (对照组平均瘤重 - 实验组平均瘤重) / 对照组平均瘤重 $\times 100\%$ 。

4.2 H₂₂肝癌组织形态学观察 肿瘤组织置于中性甲醛中固定 24 h, 石蜡包埋切片, 脱蜡至水, HE 染色 5 min, 盐酸乙醇分化, 反蓝, 然后伊红染色 5 min, 脱水, 透明, 中性树胶封片。

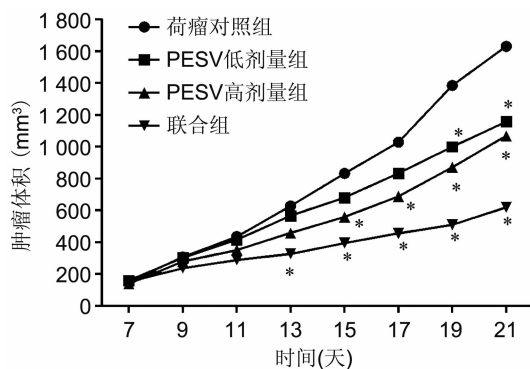
4.3 肿瘤组织 mTOR、ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 蛋白表达检测 采用免疫组化法。取肿瘤组织, 以中性福尔马林固定 24 h 后, 石蜡包埋切片, 采用免疫组化 SP 法检测。3% H₂O₂ 消除内源性过氧化物酶活性, 热修复后, 分别加入一抗, 工作浓度均为 1:200, 4 ℃ 过夜, DAB 显色, 于显微镜下观察结果。mTOR、ULK1 表达于肿瘤细胞胞质, 出现棕黄色颗粒为阳性; MAP1LC3A 及 Beclin1 表达于肿瘤细胞胞浆, 以胞浆出现棕黄色颗粒为阳性。采用显微镜图像采集系统采集图像, 应用双盲法检测 mTOR、ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 的染色强度, 每张切片选取 5 个视野 ($\times 200$), 用 LeicaQwinV3 图像分析软件进行灰度值半定量分析, 数值范围: 0~255, 取其平均值即为其灰度值。灰度值越小, 染色越深, 表明蛋白表达量越高。

5 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组资料比较采用单因素方差分析, 组间比较采用 Bonferroni 法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠一般生长情况 实验中由于小鼠自身状况或肿瘤消耗导致荷瘤对照组接种第 17、19 天各有 1 只小鼠死亡, PESV 低剂量组第 13、17 天各有 1 只小鼠死亡, PESV 高剂量组第 15 天有 1 只小鼠死亡, 联合组第 21 天有 1 只小鼠死亡。

2 各组小鼠移植瘤生长情况比较 (图 1, 表 1) 随着药物干预时间的延长, 各组肿瘤体积增长速度差异增大。与荷瘤对照组比较, 第 13、15、19 天, 联合组、PESV 高剂量组及 PESV 低剂量组肿瘤体积明显增大 ($P < 0.05$)。与荷瘤对照组比较, 3 个药物干预组瘤重不同程度地降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。其中联合组对肿瘤的抑制作用最强, 其次为 PESV 高剂量组, PESV 低剂量组抑瘤作用较弱。联合组与 PESV 高剂量组瘤重比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: 与荷瘤对照组同期比较, * $P < 0.05$

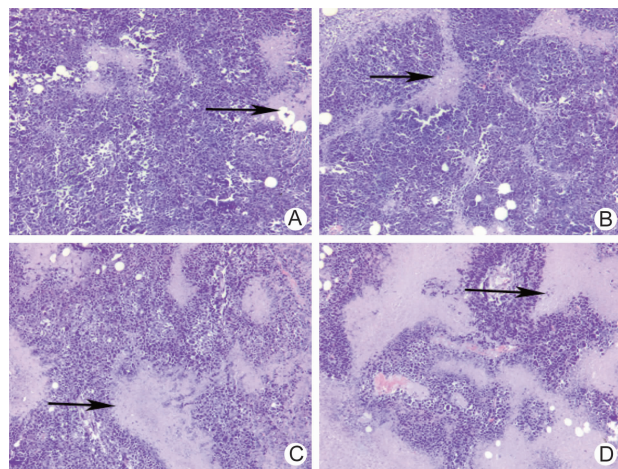
图 1 各组小鼠肿瘤体积增长曲线

表 1 各组小鼠 H₂₂肝癌移植瘤瘤重及抑瘤率比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	瘤重(g)	抑瘤率(%)
荷瘤对照	8	0.94 ± 0.16	—
PESV 低剂量	8	0.77 ± 0.08 *	18.1
PESV 高剂量	9	0.64 ± 0.10 **	31.9
联合	9	0.41 ± 0.05 **△	56.4

注: 与荷瘤对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 PESV 高剂量组比较, △ $P < 0.05$

3 各组小鼠肿瘤组织病理改变 (图 2) 镜下观察可见, 联合组肿瘤组织可见多个大面积片状缺血坏死区, 较多肿瘤细胞呈细胞核固缩、核碎裂及溶解等凋亡的形态学改变。PESV 高、低剂量组肿瘤组织可见数个片状坏死区, 可见核固缩、核碎裂等凋亡形态学改变。荷瘤对照组肿瘤组织坏死区域较少, 且面积较小, 肿瘤细胞生长旺盛, 坏死及凋亡的肿瘤细胞也较少。



注: A 为荷瘤对照组; B 为 PESV 低剂量组; C 为 PESV 高剂量组; D 为联合组; 黑色箭头表示坏死区

图 2 各组小鼠 H₂₂肝癌移植瘤组织形态学表现 (HE, $\times 200$)

4 各组小鼠肿瘤组织 mTOR、ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 蛋白表达水平比较(表 2,图 3) 免疫组织化学法检测显示 mTOR、ULK1、MAP1LC3A、Beclin1 均主要表达于肿瘤细胞胞浆。与荷瘤对照组比较, PESV 高、低剂量组和联合组 mTOR 蛋白表达降低 ($P<0.05$),ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 蛋白表达增加($P<0.05$, $P<0.01$)。与 PESV 高剂量组比较,联合组 ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 蛋白表达水平明显降低($P<0.05$)。

讨 论

雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR) 是一种磷酸蛋白激酶,在哺乳动物体内只有一种异构体,即 mTOR,是一种保守的丝-苏氨酸蛋白激酶,直接或间接地参与细胞增殖、生长和代谢有关环节的调控,处于复杂的细胞内信号转导途径的中心^[8]。该通路整合了营养分子、能量状态以及生长因子等多种信号来源,参与基因转录、蛋白质翻译、核糖体合成等生物过程,在细胞生长、凋亡、细胞代谢、自噬及血管生成

表 2 各组小鼠肿瘤组织 mTOR、ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 蛋白表达灰度值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	mTOR	ULK1	MAP1LC3A	Beclin1
荷瘤对照	8	129.0±12.2	190.6±9.9	183.4±8.4	181.8±8.4
PESV 低剂量	8	148.8±11.0 *	172.2±5.0 *	165.6±3.2 *	166.4±7.2 *
PESV 高剂量	9	167.6±7.8 *	160.6±3.6 *	151.4±11.5 *	146.8±5.5 *
联合	9	184.4±7.5 *	121.6±9.1 **△	122.6±12.5 **△	122.4±10.2 **△

注:与荷瘤对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;与 PESV 高剂量组比较, △ $P<0.05$

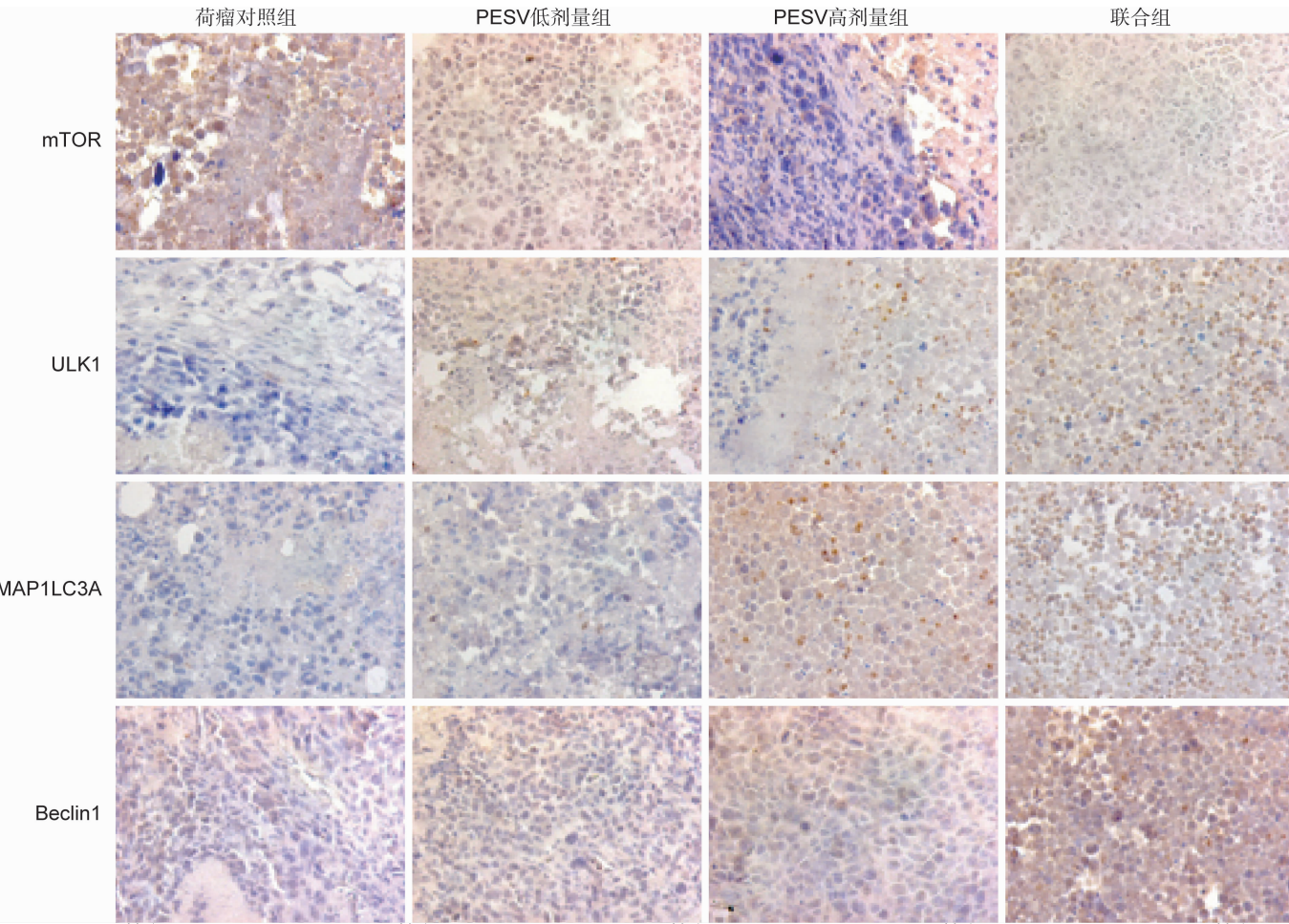


图 3 各组小鼠 H₂₂ 肝癌移植瘤组织 mTOR、ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 蛋白表达 (免疫组化, ×400)

中发挥着重要的作用。

MAP1LC3A 是哺乳动物细胞中酵母自噬相关蛋白分子 ATG8 基因的同源物,定位于前自噬泡和自噬泡膜表面,参与自噬体的形成,也作为自噬体的特异性标记蛋白^[9]。ULK1 是自噬相关蛋白分子 Atg1 在哺乳动物中的同源蛋白,当 ULK1 缺失时,MAP1LC3A 不能形成。正常情况下,mTOR 通过抑制自噬起始分子 ULK1 的活性,实现对自噬的调控。在哺乳动物中,当 TOR 的同源物 mTOR 处于活化状态时,mTOR 可通过磷酸化抑制自噬起始分子 ULK1 的功能,进而抑制 MAP1LC3A 的形成。在哺乳动物自噬泡形成过程中,MAP1LC3A 协同了由 Atg3、Atg5、Atg7、Atg10 及 Atg12 参与组成的两条泛素样蛋白的加工修饰过程,并起着至关重要的作用^[9,10]。Beclin1 是酵母自噬基因 Atg6/Vps30 的同源基因,也称为 BECN1。Beclin1 对自噬的调节,是作为自噬的正性调节分子和抑癌基因,通过与上下游的调节蛋白相互作用,组成多条信号调节通路,在自噬和肿瘤的发生、发展中起着重要作用^[11],目前作为自噬标记蛋白被广泛应用。

在肿瘤恶性病变中,癌细胞是正常机体中的异质细胞,在癌症发生早期,抑制自噬导致癌前细胞的持续生长,此时自噬发挥的是肿瘤抑制作用。前期试验已证明 PESV 在抑制肿瘤血管生成以及肿瘤细胞的增殖发挥抗肿瘤作用^[3-7]。本实验设立 PESV 高、低剂量组和联合组,观察肝癌移植瘤的体积增长速度以及自噬相关蛋白的表达。实验结果表明,采用 PESV 进行干预,mTOR 表达降低,ULK1、MAP1LC3A 及 Beclin1 表达均增多,因此 PESV 可能是作为一种自噬诱导剂发挥抑癌作用。

雷帕霉素作为一种免疫抑制剂已被广泛应用于器官移植领域,作为一种 mTOR 抑制剂,体内外均实验证实雷帕霉素能有效阻断 mTOR 信号通路,抑制肿瘤细胞生长促进凋亡,使肿瘤生长显著减慢^[12]。本实验结果提示,自噬对 H₂₂ 肝癌移植瘤具有抑制作用,而 PESV 以及联合应用雷帕霉素可能通过促进自噬来抑制肿瘤发展,而且联合用药更为有效。但对于 PESV 抗癌的具体成分及其对肿瘤细胞的作用及其机制还需要进一步研究证实。

参 考 文 献

- [1] Jean M, Levy M, Thorburn A. Targeting autophagy during cancer therapy to improve clinical outcomes [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 131(1): 130-141.
- [2] Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, et al. Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia [J]. *Br J Cancer*, 2010, 103(8): 1209-1214.
- [3] 孙晓佳,张月英,贾青,等. 蝎毒多肽提取物联合化疗抑制 Lewis 肺癌血管生成实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2011, 36(12): 1644-1649.
- [4] 王兆朋,张维东,武利存,等. 蝎毒多肽提取物抑制肝癌 H₂₂ 细胞化疗期间再增殖实验研究 [J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(1): 108-113.
- [5] 张维东,崔亚洲,武利存,等. 蝎毒多肽提取物的抗血管生成作用 [J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(3): 343-346.
- [6] 王兆朋,张维东,张捷,等. 蝎毒多肽提取物对非激素依赖性前列腺癌细胞增殖抑制作用的实验研究 [J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(8): 938-942.
- [7] 郑安红,张维东,王兆朋,等. 蝎毒多肽提取物联合 5-氟尿嘧啶对 H₂₂ 肝癌血管生成拟态形成的作用及机制研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(4): 492-496.
- [8] Kathryn G, Foster, Hugo A, et al. Regulation of mTOR Complex 1 (mTORC1) by Raptor Ser⁸⁶³ and multisite phosphorylation [J]. *Biol Chem*, 2010, 285(1): 80-94.
- [9] Klionsky DJ, Abeliovich H, Agostinis P, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes [J]. *Autophagy*, 2008, 4(2): 151-175.
- [10] Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, et al. Network organization of the human autophagy system [J]. *Nature*, 2010, 466(7302): 68-76.
- [11] White E. Role of the metabolic stress responses of apoptosis and autophagy in tumor suppression [J]. *Ernst Schering Found Symp Proc*, 2007, (4): 23-34.
- [12] Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2011, 12(1): 21-35.

(收稿:2014-09-01 修回:2015-02-13)