

中药及雷氏大疣蛛毒干预小鼠皮下移植肝肿瘤细胞后 RhoA/ROCK 信号通路蛋白表达的变化

陈继新¹, 刘天云², 罗赤苗³, 张国华³, 陈嘉勤⁴, 郑核³, 贺小平³

(1. 南华大学, 湖南 衡阳 421001; 2. 邵阳市第一人民医院外科;

3. 邵阳市中心医院; 4. 湖南师范大学体育学院)

摘要: **目的** 探讨 RhoA/Rock 信号通路相关细胞因子在昆明小鼠 H₂₂ 皮下移植肝肿瘤中的差异表达和机制。

方法 以昆明小鼠颈部皮下移植 H₂₂ 肝肿瘤细胞建立肿瘤模型, 采用雷氏大疣蛛毒及抗癌中药作为干预手段, 将小鼠随机均分为模型对照(M)组, 雷氏大疣蛛毒素(R)组和抗癌中药(A)组, 每组 10 只。测量肿瘤体积并绘制肿瘤生长曲线。6 周后禁食过夜, 进行肿瘤组织取材。做病理切片, 观察肿瘤细胞形态结构; 检测肿瘤组织中 RhoA/ROCK 信号通路及相关细胞因子蛋白水平的差异表达。 **结果** 通过观察肿瘤的生长速度发现, 在三组中, 雷氏大疣蛛毒素组生长速度最慢。肿瘤细胞形态结构显示模型对照组小鼠肿瘤细胞排列紧密、规整。雷氏大疣蛛毒素小鼠: 细胞排列稀疏、片状空泡样变性、坏死。抗癌中药组: 肿瘤细胞排列松散、出现坏死区。抗癌中药组小鼠肿瘤组织 p21 阳性表达均高于模型非干预组, 而 RhoA/ROCK 阳性表达较模型组低 ($P < 0.01$)。 **结论** 本研究发现雷氏大疣蛛毒及中药通过有效改变 RhoA/ROCK 信号通路及相关细胞因子的表达水平, 从而抑制或减慢肝肿瘤增殖与侵袭速度。

关键词: RhoA/ROCK 信号通路; H₂₂ 肝肿瘤细胞; 雷氏大疣蛛毒素; 小鼠; 抗癌中药

中图分类号: R735.7

文献标识码: A

肝癌是由遗传和表观遗传改变而发生的恶性肿瘤^[1]。目前, 临床上一般采取手术、放疗、化疗、生物治疗、中药治疗以及综合治疗等疗法。手术切除和肝移植仍是肝癌治疗最佳方法, 但由于肝脏肿瘤恶性程度高, 进展快, 故临床上就诊患者约半数以上患者已为中晚期, 且接受手术治疗患者术后易转移、复发。对于可手术的肝癌患者, 术后复发、转移是影响治疗效果及预后的主要因素, 对于不能手术的中晚期肝癌患者尚缺乏有效的治疗方法。因此, 深入了解肝癌的发生发展机制, 寻找新的治疗手段对肝癌患者临床治疗有极为重要的意义。

雷氏大疣蛛毒素已被研究证实是由神经毒性肽、蛋白质和低分子量物质所构成的复杂混合物, 具有多种活性^[2-3]。有研究发现, 雷氏大疣蛛毒可以抑制人肝癌 BEL-7402、HepG2 细胞、宫颈癌 Hela 细胞的生长及增殖^[4-6]。其对多种癌细胞株增殖抑制作用的机制

仍未明确。中医药在抗击肝癌的过程中发挥了重要的作用, 从中药中寻找有效的抗癌药物是当前的研究热点之一。本实验用的抗癌中药由白花蛇舌草和半边莲等中草药组成, 具有清热解毒、活血化瘀、提高机体免疫力等功效; 对治疗肿瘤则正虚邪实, 扶正固本与驱邪^[7], 其机制有待于进一步的研究。

RhoA (Ras homolog gene family, member A) 是小分子 Rho 家族的一员, 它在参与维持细胞形态、细胞的粘附作用及细胞周期调控中起重要作用。研究表明, RhoA 在许多肿瘤中异常表达, 且促进了肿瘤细胞的恶性化程度。Rho 激酶 (Rho associated kinase, ROCK) 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 约有 1300 个氨基酸残基。ROCK 是 RhoA 重要的效应蛋白之一, 通过对肌球蛋白轻链的磷酸化而参与细胞聚集、黏附和纤维收缩, 转染 ROCK 的癌细胞可不依赖于血清而产生侵袭特性。本研究采用雷氏大疣蛛毒和抗癌中药干预的手段, 通过 HE 染色观察肿瘤组织细胞形态观察、免疫组织化学方法法检测小鼠皮下移植的 H₂₂ 肝肿瘤组织中 RhoA 和 ROCK 等蛋白的表达, 探讨其在 H₂₂ 肝肿瘤组织中的表达和理论意义, 为肝癌患者预后判断及临床治疗提供新的实验依据。

收稿日期: 2014-02-27

基金项目: 湖南省卫生厅科研计划课题 (B2010-123, B2012-153)。

作者简介: 陈继新, 硕士研究生, 研究方向: 普腹外科, E-mail: 13789167188@163.com。通讯作者刘天云, 主任医师, 教授, 研究方向: 普腹外科, E-mail: shuchuncjx@163.com。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

成年健康雄性昆明(KM)小鼠,体重 18~22 g,由湖南斯莱克景达实验动物中心(许可证号:湘 scxk2003-003)提供,适应性喂养一周。将 30 只 KM 小鼠随机均分为 3 组:模型组,雷氏大疣蛛毒素组和中药组,每组 10 只。各组小鼠分笼饲养,室温 23~25℃,相对湿度 40~60%;自由进食、饮水,采用国家标准啮齿类动物饲料(湖南斯莱克景达实验动物中心提供)饲养。

1.2 方法

1.2.1 动物模型构建 模型组,雷氏大疣蛛毒素组和中药组小鼠均参照皮下注射法^[8]构建皮下移植瘤模型。具体操作:将浓度为 1×10^6 个/mL 小鼠 H₂₂ 肝癌肿瘤培养细胞悬液,接种于 8 只 KM 小鼠后颈部皮下,接种体积为 0.5 mL/只。待瘤体长至 $1 \sim 1.5 \text{ cm}^3$ 时(15 天左右),处死小鼠,选择生长良好的瘤组织,无菌条件下制成瘤细胞悬液(约每毫升含瘤细胞 2×10^6 个),每只小鼠后颈部皮下接种 0.2 mL。

1.2.2 给药方案 雷氏大疣蜘蛛毒素由湖南师范大学生命科学学院蛋白质化学与分子生物学实验室提供。临用前取无菌生理盐水按 1:10 的比例稀释,制成雷氏大疣蜘蛛毒素输注液。建模成功后第三天开始尾静脉雷氏大疣蛛毒素,雷氏大疣蛛毒素组尾静脉注射 0.3 mL,连续给药 20 天。中药方剂组成:三棱 6 g、莪术 6 g、赤芍 6 g、鳖甲 5 g、当归 6 g、川芎 6 g、猪苓 6 g、玄胡 7 g、丹参 7 g、紫草根 6 g、白花蛇舌草 12 g、半枝莲 12 g、蒲公英 12 g、大黄 3 g。药液制备:用 400 mL 水浸泡,加热煮沸,文火煎煮 1 h,趁热过滤;同法再煮 2 次,合并 3 次滤液,经恒温水浴浓缩至 100 mL,4℃ 保存备用。按人与小鼠体表面积折算等效剂量经口灌胃。中药灌胃剂量 0.4 mL/次,共 6 周。中药组和雷氏大疣蜘蛛毒素组小鼠于术后 3 天开始每天(下午 6 时)干预。

1.2.3 试剂 RhoA/ROCK、P21、Bad、bcl-2 一抗由武汉博士德生物工程有限公司提供,即用型二抗二抗即用型 SABC 小鼠/兔 IgG、抗体稀释液、DAB、DAB Kit、Poly-L-Lysine、快捷免疫组化、Tween20 由福州迈新生物有限公司提供。0.9% 氯化钠注射液、甲醇、无水乙醇、多聚甲醛等常用分析纯试剂均购于上海化学试剂公司;10% 水合氯醛购自邵阳市中心医院。

1.2.4 样品采集与处理 6 周后各组小鼠禁食过夜,用 10% 的水合氯醛麻醉,颈椎脱臼处死。取出肿瘤组织并称重,取部分新鲜肿瘤组织保存于液氮中,进行总 RNA 提取;另一部分置于 10% 多聚甲醛溶液(0.1 M, pH=7.4)中固定 12 小时以上,石蜡包埋、组织切片,HE 染色观察及免疫组化染色分析。

1.2.5 小鼠肿瘤体积测量 H₂₂ 肝癌肿瘤细胞悬液接种后,每天观察小鼠肿瘤生长情况,自可见皮下酱黑色肿块突起(平均第 3 天)起,每 4 天测量 1 次肿瘤体积。用游标卡尺测量瘤体的最长径(L)和最短径(W),按公式($V = 0.5236 \times L \times W$)计算各瘤体体积,绘制肿瘤生长曲线。

1.2.6 病理学观察 取厚 3 μm 石蜡切片,脱蜡、脱水,苏木素和伊红 HE 染色,脱水,透明、中性树胶封片,光学显微镜下观察肿瘤组织形态学。

1.2.7 免疫组织化学染色 采用 SABC 法免疫组织化学染色检测肿瘤组织 RhoA/ROCK 信号通路及相关细胞因子蛋白水平的差异表达:多聚赖氨酸涂片,厚 3 μm 石蜡切片,高压锅沸腾柠檬酸热抗原修复,一抗(1:500),室温孵育 1 h, PBS 冲洗干净,二抗(即用型 SABC 小鼠/兔 IgG),室温孵育 30 min, PBS 冲洗干净, DAB 显色 5~10 min, 苏木素复染 1~3 min, Olympus(日本)显微拍照。PBS 代替一抗作阴性对照。用 Leica Qwin V3 图像分析系统(Leica 公司,德国)分析免疫组化阳性产物面积,每张切片在 200 倍镜下选取不相重叠的 3 个代表性视野,计算每个样本的阳性面积百分比(阳性反应面积/测量面积)。

1.2.8 质量控制 动物采用固定的饲养人员,实验取材、指标检测人员固定,以消除人员异动引起的误差。小鼠灌胃动作要轻柔,从口角进入,防止损伤食道。尾静脉注射前要用酒精擦拭尾巴,扩充血管;选择进针部位,遵循先远后近原则,以抽回血方式作为针进入血管的标志。

1.3 统计学分析

应用 SPSS19.0 软件包进行统计学分析,用 Excel 软件作图。数据以平均数 ± 标准差表示,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用双侧 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异具有显著统计学意义。

2 结 果

2.1 动物一般行为学观察

模型构建过程中,各组未发生意外死亡情况。

模型构建成功后,小鼠食欲较正常,精神状态尚可。随肿瘤生长,小鼠食欲下降、精神状态逐渐变差。雷氏大疣蛛毒素组和中药组小鼠上述症状均轻于模型非干预组。

2.2 小鼠肿瘤生长状况

如表1显示,小鼠测量数目为每组10只,肿瘤测量次数为10次,每4天测量一次。由表可见:模型对照组肿瘤体积生长速度最快,雷氏大疣蛛毒素干预组最慢,中药干预组居间。自第2次测量开始雷氏大疣蛛毒组与模型组体积出现差异($P < 0.05$),第3、第4次测量显示中药组、雷氏大疣蛛毒组与模型对照组相比有非常显著性差异($P < 0.01$),且雷氏大疣蛛毒组与中药组相比出现差异($P < 0.05$)及($P < 0.01$)。第5次测量结果显示:与模型对照组相比中药组、雷氏大疣蛛毒组均有显著性差异($P < 0.05$),雷氏大疣蛛毒组与中药组相比存在显著性差异($P < 0.05$)。第6、7、8、9、10次测量结果均显示中药组、雷氏大疣蛛毒组与模型对照组相比存在非常显著性差异($P < 0.01$),且雷氏大疣蛛毒组与中药组相比存在非常显著性差异($P < 0.01$)。

表1 三组小鼠肿瘤体积10次测量结果

次数	模型对照组	中药组	雷氏大疣蛛毒组
1	0.04 ± 0.01	0.03 ± 0.01	0.03 ± 0.01 ^a
2	0.05 ± 0.16	0.05 ± 0.12	0.03 ± 0.14 ^b
3	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.03 ^b	0.04 ± 0.01 ^{bc}
4	0.20 ± 0.01	0.14 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.02 ^{bd}
5	0.40 ± 0.04	0.24 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.02 ^{ac}
6	0.81 ± 0.05	0.45 ± 0.03 ^b	0.23 ± 0.01 ^{bc}
7	1.40 ± 0.07	0.80 ± 0.08 ^b	0.36 ± 0.06 ^{bd}
8	2.72 ± 0.15	1.42 ± 0.05 ^b	0.77 ± 0.04 ^{bd}
9	5.24 ± 0.21	2.79 ± 0.12 ^b	1.79 ± 0.07 ^{bd}
10	10.65 ± 0.23	5.23 ± 0.26 ^b	3.09 ± 0.16 ^{bd}

与模型组相比, a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$; 与中药组相比, c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$

2.3 三组小鼠肿瘤组织 HE 染色形态学观察

HE 染色结果(图1)显示:模型非干预组小鼠肿瘤细胞排列紧密、规整,核质比较大,核染色深且异型性明显。雷氏大疣蛛毒素组小鼠:细胞排列稀疏、欠规则,可见异型细胞。肿瘤细胞核固缩,片状空泡样变性、坏死。坏死区面积大于低剂量组。中药组:肿瘤细胞排列松散、无序,出现坏死区,胞核较小、破坏不明显,可见少量空泡样变性。

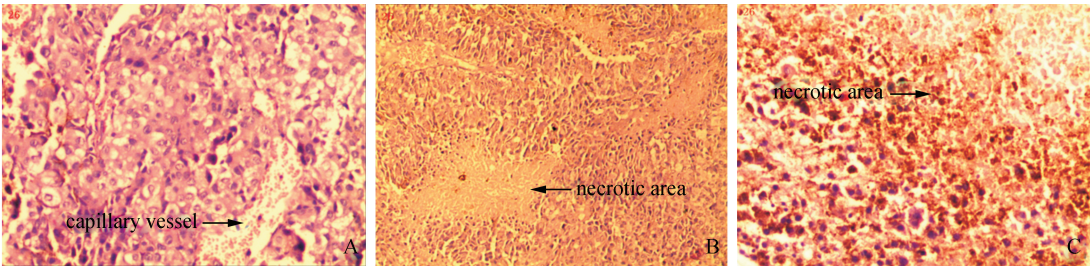


图1 三组小鼠肿瘤组织病理切片 HE 染色图(×200) A:模型组;B:雷氏大疣蛛毒素组;C:中药组

2.4 三组小鼠肿瘤组织 RhoA、ROCK、p21 免疫组化检测

从图2可以看出:RhoA、ROCK 表达定位于细胞浆,偶见细胞膜。p21 表达定位于细胞核。RhoA、ROCK 表达的强弱(棕黄色阳性颗粒的散布程度)依次为模型组、抗癌中药、雷氏大疣蛛毒素干预组。p21 表达的强弱(棕黄色阳性颗粒的散布程度)依次为雷氏大疣蛛毒素干预组、抗癌中药组、模型组。

表2显示,与模型非干预组相比较,雷氏大疣蛛毒素组 p21 表达最高, ($P < 0.01$)。模型组 RhoA、ROCK 表达均最高,抗癌中药组、雷氏大疣蛛毒素组表达与模型组相比较显著降低($P < 0.01$)。且抗癌

中药组与雷氏大疣蛛毒素组比较差异有显著性差异($P < 0.01$)。

3 讨 论

肿瘤细胞转移,首先要黏附于宿主细胞表面,再通过血液循环系统转移到远处。这个过程涉及多种基因产物之间的相互协调作用,其中重要的是调节细胞形态、移动、粘附的细胞骨架肌动蛋白^[9]。RhoA 是小分子 G 蛋白 Rho 家族的一员,被认为与细胞形态、运动、细胞骨架的组装和迁移有关^[10-12]。在肝癌组织中,RhoA 表达量增高,并且其过量表达

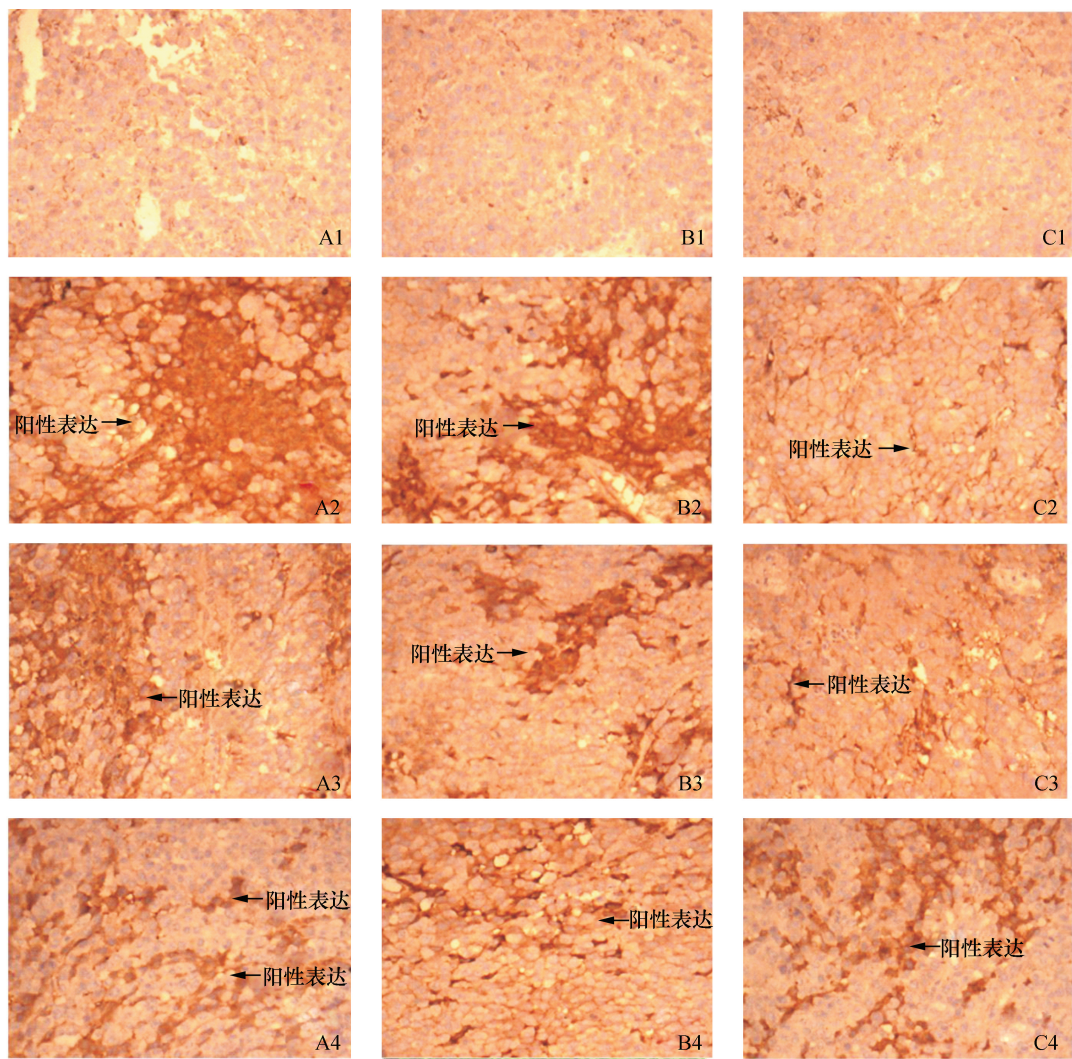


图 2 三组小鼠肿瘤组织中 RhoA、ROCK、p21 免疫组织化学染色结果 (×200) 图 A1、B1、C1 为阴性对照,A2、A3、A4;B2、B3、B4; C2、C3、C4 分别表示模型组、抗癌中药组、雷氏大疣蛛毒素组 RhoA、ROCK 和 p21 阳性表达

表 2 三组小鼠免疫组织化学染色阳性表达比较(%)

分组	n	RhoA 阳性表达	ROCK 阳性表达	p21 阳性表达
模型对照组	10	79.6 ± 5.30	59.80 ± 0.89	7.63 ± 2.26
抗癌中药组	10	45.67 ± 0.69 ^b	30.60 ± 3.89 ^a	23.23 ± 5.20 ^b
雷氏大疣蛛毒素组	10	25.19 ± 2.31 ^{bc}	19.83 ± 3.20 ^{bd}	36.67 ± 5.26 ^{bd}

与模型组相比,a:P<0.05,b:P<0.01;与中药组相比,c:P<0.05,d:P<0.01

与肝癌的分化程度、结节数目、有无静脉浸润以及有无肝外转移灶有关^[13-14]。ROCK 属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,约有 1300 个氨基酸残基。RhoA 蛋白激活后,与 ROCK 的 RBD 结合将 ROCK 激活,同时发生定向转位与肌球蛋白轻链(MLC)靠近。ROCK 的激活本身可以将 MLC 磷酸化而发生肌丝收缩作用,同时 MLCP 是活化 ROCK 的底物,在接受 RhoA/ROCK 的活化信号后磷酸化,从而失活,阻止了磷酸

化的 MLC 脱磷酸失活,使得胞浆内磷酸化 MLC 水平提高,肌球-肌动蛋白交联增加,促进 MLC 磷酸化而促进肌丝收缩在癌细胞的迁移中起主要作用^[15]。此外,有研究显示 RhoA/ROCK 蛋白调节细胞周期主要涉及在 G1/S 转化过程^[9]。

本实验中,抗癌中药组和雷氏大疣蛛毒素组的 RhoA、ROCK 蛋白水平表达比模型非干预组明显减少,提示中药和雷氏大疣蛛毒素下调了 RhoA、

ROCK 的含量,从而影响了 RhoA/ROCK 信号通路开放,从而减缓了肿瘤的增殖和转移。

细胞周期进展涉及多种细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)的连续激活。p21 蛋白是目前已知的具有最广泛激酶抑制活性的细胞周期抑制蛋白。p21 可与几乎每一个 Cyclin-CDK 复合物结合,广泛的抑制各种 Cyclin-CDK 复合物,使细胞停滞在 G1 期而抑制细胞增殖,还能结合并抑制细胞质中的 ROCK 活性。p21 不同区域对应于不同的靶位,其 N 端结合并抑制 Cyclin-CDK,而 C 段则结合 PCNA,从而覆盖 PCNA 的某些功能区,使 PCNA 不能与 DNA 聚合酶 D 形成复合物,或使 DNA 全酶复合物不能在 DNA 单链上滑动,影响 DNA 复制。已有研究证明,p21 的过表达可使细胞周期阻滞于 G1 期、G2 期或 S 期^[16]。p21 与肿瘤的分化、浸润深度、增生和转移有关,具有判断预后的价值^[17]。

抗癌中药与雷氏大疣蛛毒素干预后,p21 蛋白表达量较高,尤以雷氏大疣蛛毒素组表达最高。其作用机制可能是抗癌中药和雷氏大疣蛛毒素提高了 p21 蛋白的含量,从而抑制了 H₂₂ 肿瘤的增殖。有研究显示^[18] 雷氏大疣蛛毒素能抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖的可能机制之一是使 p21 基因和蛋白表达增加,G2/M 细胞周期被阻滞,从而诱导细胞凋亡。本实验结果表明,抗癌中药、雷氏大疣蛛毒能有效的抑制小鼠 H₂₂ 肝癌组织的增殖,其中雷氏大疣蛛毒素的抑制作用更为显著。雷氏大疣蛛毒素中的活性物质可能通过间接维持细胞内 p21 的含量,从而增强了对肿瘤增殖的抑制作用。

综上所述,抗癌中药及雷氏大疣蛛毒素,对小鼠皮下移植的 H₂₂ 肝肿瘤生长和增殖有明显的抑制作用,尤以后者效果更为显著。其机制可能是雷氏大疣蛛毒素可能通过调节 RhoA/ROCK 信号通路中 RhoA、ROCK 和 p21 等相关细胞因子的表达,从而抑制了肿瘤的增殖。

参考文献:

- [1] Tsai WL, Chung RT. Viral hepatocarcinogenesis[J]. *Oncogene*, 2010, 29(16): 2309-2324.
- [2] 费瑞, 杨洋, 张丽娇, 等. 蜘蛛毒素的研究概况及应用[J]. *吉林大学学报: 医学版*, 2004, 30(6): 994-996.
- [3] 张鹏飞, 陈平, 肖顺勇, 等. 大疣蛛毒素-VI 的分离纯化

及部分生物学活性鉴定[J]. *生命科学研究*, 2003, 2(6): 129-133.

- [4] 高莉, 封巍, 单保恩, 等. 雷氏大疣蛛蛛毒对人肝癌 BEL-7402 细胞增殖的抑制作用及其机制的研究[J]. *癌症*, 2005, 24(7): 812-816.
- [5] Zeng XZ, Xiao QB, Liang SP. Purification and characterization of ravenoxin-I and ravenoxin-III, two neurotoxic peptides from the venom of the spider *Macrothele raveni* [J]. *Toxicon*, 2003, 41(6): 651-656.
- [6] 胡增祥, 杜昱蕾, 刘全喜, 等. 雷氏大疣蛛蛛毒素对人肺癌细胞 A549 增殖的影响[J]. *中国肺癌杂志*, 2010, 13(10): 933-936.
- [7] 张丽梅. 中药抗癌作用机制研究概况[J]. *中国医药指南*, 2009, 7(6): 73-74.
- [8] 李彬彬, 王莹, 赵金茹, 等. 小柴胡汤联合环磷酰胺对腹水瘤细胞株肝癌小鼠肿瘤间质血管生成影响随机平行对照研究[J]. *实用中医内科杂志*, 2012(5): 34-36.
- [9] 于月成, 辛晓燕, 吴维光, 等. Rho 和 ROCK 蛋白在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义[J]. *现代肿瘤医学*, 2006, 14(4): 461-464.
- [10] 王德胜, 何勇, 孙伟, 等. RNAi 对肝癌细胞 RhoA 基因表达和侵袭转移影响的研究[J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2011, 18(14): 1061-1064.
- [11] 顾颖, 韩素萍. RhoA 与肿瘤的研究进展[J]. *国医杂志*, 2007, 7(18): 4210-4212.
- [13] 张晓梅, 王波, 陈孝平, 等. RhoA 在肝癌组织中的表达及其临床意义[J]. *临床内科杂志*, 2006, 10(10): 674-676.
- [14] 王德盛, 窦科峰, 项红军, 等. RhoA 基因在肝细胞肝癌中的表达及其意义[J]. *中华现代外科学杂志*, 2005, 2(22): 1450-1453.
- [15] 徐艳群, 康俊生. Rho/ROCK 蛋白与恶性肿瘤发病机制及靶点治疗的研究近况[J]. *实用医药杂志*, 2009, 26(4): 68-70.
- [16] Radhakrishnan SK, Feliciano CS, Najmabadi F, et al. Constitutive expression of E2F-1 leads to p21-dependent cell cycle arrest in S phase of the cell cycle [J]. *Oncogene*, 2004, 23(23): 4173-4176.
- [17] 李作生, 李保庆. p21 和 p27 基因多态性与肿瘤的相关性[J]. *国际遗传学杂志*, 2006, 29(4): 317-320.
- [18] 高莉, 沈金宝, 孙捷, 等. 雷氏大疣蛛毒液对人肝癌 HepG2 细胞 p21 基因表达的影响[J]. *生理学报*, 2007, 59(1): 58-62.

(此文编辑:秦旭平)